

# Charakterisierung der Einflussfaktoren auf SERS-Spektren niedermolekularer Substanzen und medizinisch relevante Anwendungen des LOC-SERS-Systems



---

seit 1558

## Dissertation

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

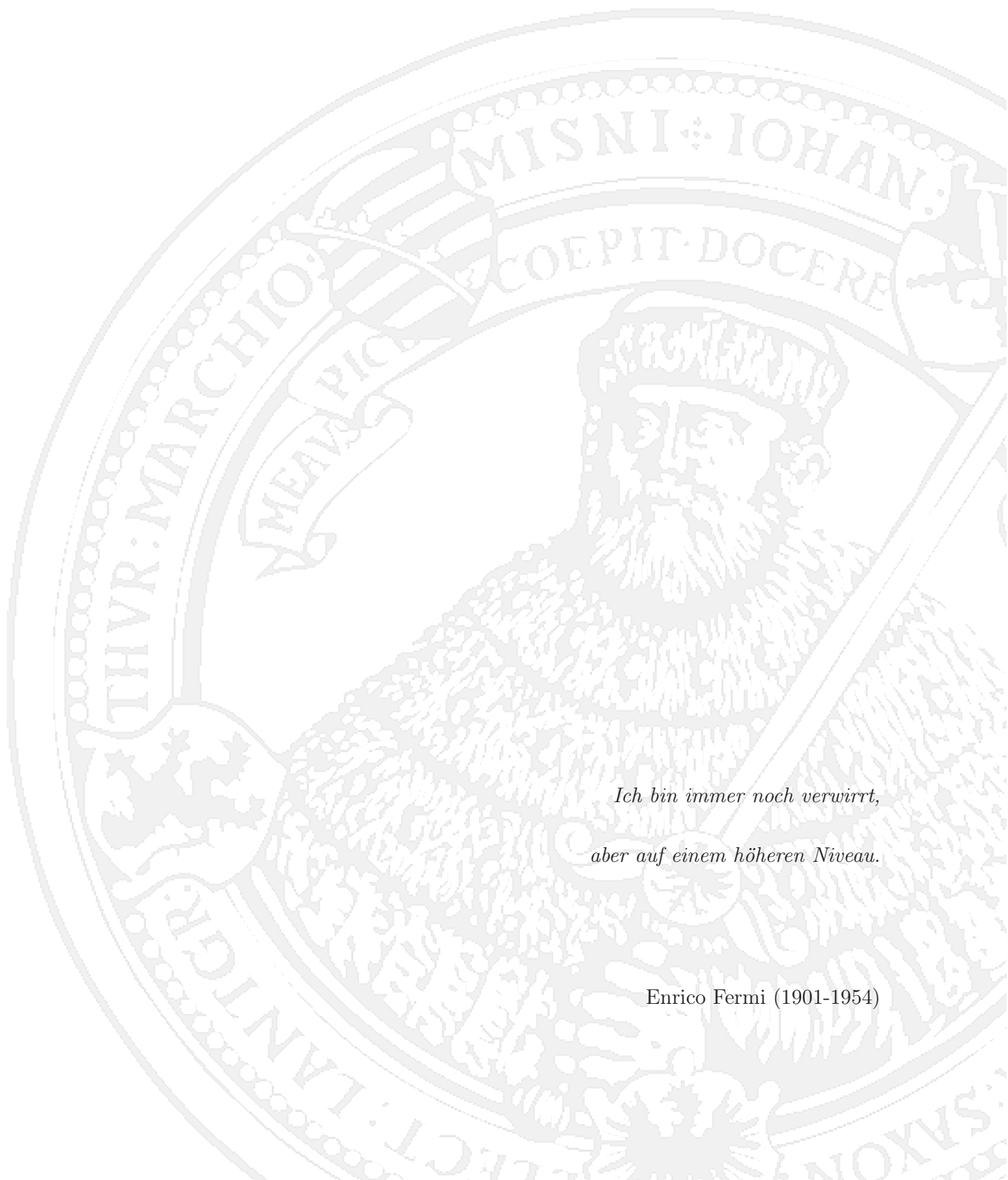
vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität von

**Dipl.-Chem. Anna Mühlig (geb. Hauser)**

geb. am 06. August 1983 in Dresden, Sachsen

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Jürgen Popp - FSU Jena
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Volker Deckert - FSU Jena

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 13.07.2016



*Ich bin immer noch verwirrt,  
aber auf einem höheren Niveau.*

Enrico Fermi (1901-1954)





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>6</b>
2.1. Einführung in die Quantenchemie . . . . .	6
2.2. Elektronische Anregung - UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	7
2.3. Schwingungsanregung . . . . .	9
2.3.1. Der Raman-Effekt . . . . .	10
2.3.2. SERS: Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie . . . . .	12
2.4. Quantenchemische Näherungsverfahren . . . . .	13
2.4.1. Hartree-Fock Methode . . . . .	13
2.4.2. <i>Post</i> -Hartree-Fock Methoden - <i>Møller-Plesset</i> . . . . .	15
2.4.3. Basissätze . . . . .	16
2.5. Quantenchemische Berechnung von Normalmoden . . . . .	17
2.6. Nomenklatur der Normalmoden . . . . .	18
2.7. Oberflächenauswahlregeln der SERS-Spektroskopie . . . . .	20
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1. Chemikalien und Probenvorbereitung . . . . .	22
3.1.1. Herstellung der Silbernanopartikel . . . . .	22
3.1.2. Kultivierung und Probenvorbereitung der Mykobakterien . . . . .	23
3.2. UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie . . . . .	24
3.3. Raman- und SERS-Spektroskopie . . . . .	24
3.4. Mikrofluidischer <i>Lab-on-a-chip</i> (LOC)-SERS-Aufbau . . . . .	25
3.5. Spektren-Vorbehandlung . . . . .	28
3.6. Anpassen einer Lorentzfunktion für Schwingungsbanden . . . . .	29
3.7. Chemometrische Methoden . . . . .	29
3.8. Quantenchemische Rechnungen . . . . .	31
<b>4. Untersuchung von Einflussfaktoren auf SERS-Spektren</b>	<b>33</b>
4.1. Einfluss von Silbernanopartikeln . . . . .	36
4.2. Einfluss der Substitutionsposition . . . . .	45
4.3. Der Einfluss der funktionellen Gruppe . . . . .	56
<b>5. Quantitative Detektion von Methotrexat</b>	<b>62</b>

5.1. SERS-Signal in Abhängigkeit des pH-Wertes . . . . .	63
5.2. Orientierung der MTX-Moleküle relativ zur Oberfläche . . . . .	67
5.3. Quantitative Detektion von MTX in wässriger Umgebung . . . . .	70
5.4. Quantitative Detektion von MTX in Blutplasma . . . . .	72
<b>6. Identifizierung von Mykobakterien</b>	<b>77</b>
6.1. Spektroskopische Charakterisierung der Mykolsäure . . . . .	79
6.2. Identifizierung auf Genotypebene . . . . .	82
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>Eigene Publikationen</b>	<b>105</b>
<b>Danksagung</b>	<b>107</b>
<b>Appendices</b>	<b>111</b>
<b>A. Zertifikat für die Verwendung vom Mykobakterien im S1 Labor</b>	<b>I</b>
<b>B. Darstellung der Atombewegungen der Normalmoden in Pyridinderivaten (spektraler Bereich: 1750 – 500 cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>XXII</b>
<b>C. Optimierte Strukturparameter der Pyridinderivate</b>	<b>XXVIII</b>
<b>D. Protokoll zur Herstellung von SBF</b>	<b>XXXIII</b>
<b>E. LOC-SERS-Spektren der sieben Mykobakterienstämme</b>	<b>XXXIV</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>XXXVIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2-picam	<i>ortho</i> -Picolylamin
2-pymeth	<i>ortho</i> -Pyridinmethanol
3-picam	<i>meta</i> -Picolylamin
3-pymeth	<i>meta</i> -Pyridinmethanol
4-picam	<i>para</i> -Picolylamin
4-pymeth	<i>para</i> -Pyridinmethanol
4-cypy	<i>para</i> -Cyanopyridin
4-pic	<i>para</i> -Picolin
4-formpy	<i>para</i> -Formylpyridin
<i>AEF</i>	Analytischer Verstärkungsfaktor
AgNPs	Silbernanopartikel
c-AgNPs	Citrat-reduzierte Silbernanopartikel
h-AgNPs	Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel
AO	Atomorbital
CG	Kontrahierte Gauss-Funktion
CGTO	Contracted Gaussian Type Orbitals
CT	Charge-Transfer
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DG	Tropfengenerator-Einheit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DU	Dosiereinheit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektromagnetisch
HF	Hartree-Fock
ID	Identifikationsnummer
LD	<i>loading</i>
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
LOAO-MO	Linear Combination of Atomic Orbitals - Molecule Orbitals
LOC	<i>Lab on a chip</i>
MDR	<i>multi drug resistant</i>
MP	Møller-Plesset
MO	Molekülorbital
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex
MTX	Methotrexat
NA	Numerische Apertur
Nd:YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat
NRZ	Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien
NTM	Nicht-tuberkulöse Mykobakterien
ODTS	Octadecyltrichlorosilan
PC	Hauptkomponente
PCA	Hauptkomponentenanalyse
SE	Schrödinger-Gleichung
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie

SNIP *Sensitive Nonlinear Iterative Peak*  
STO Slater Type Orbital  
TB Tuberkulose  
TDM Therapeutische Medikamentenüberwachung  
UV Ultraviolett  
Vis Sichtbar

## Formelverzeichnis

$\hat{H}_{\text{tot}}$	zeitunabhängiger Hamilton-Operator
$\hat{H}_{\text{el}}$	elektronischer Hamilton-Operator
$\hat{H}_{\text{nu}}$	Kern-Hamilton-Operator
$\hat{H}_0^f$	Hamilton-Operator nullter Ordnung
$\hat{H}'$	Störungs-Hamilton-Operator
$\hat{h}(\vec{x}_i)$	Ein-Elektronen Kern-Hamilton-Operator
$ \Psi_{\text{tot}}\rangle$	molekulare Wellenfunktion
$ \psi_{\text{nu}}\rangle$	Kern-Teil der molekularen Wellenfunktion
$ \psi_{\text{el}}\rangle$	elektronischer Teil der molekularen Wellenfunktion
$E_{\text{tot}}$	Energie-Eigenwerte von $\hat{H}_{\text{tot}}$
$E_{\text{el}}$	Energie-Eigenwerte von $\hat{H}_{\text{el}}$
$\Delta E$	Änderung der Energie
$E_v$	Schwingungs-Eigenwert der Schwingungsquantenzahl $v$
$E_{\text{exakt}}$	exakte Energie der Elektronen
$E_{\text{HF}}$	Hartree-Fock-Energie
$E_C$	Korrelationsenergie
$E_{\text{MP0}}$	Møller-Plesset Störungsenergie 0. Ordnung
$E_{\text{MP1}}$	Møller-Plesset Störungsenergie 1. Ordnung
$E_{\text{MP2}}$	Møller-Plesset Störungsenergie 2. Ordnung
$E$	elektrische Feldstärke
$E_0$	EM-Feld des einstrahlenden Lasers
$E_{\text{Loc}}(\omega_L)$	evaneszentes lokal verstärktes EM-Feld
$I$	Intensität
$I_0$	Ausgangsintensität
$I(d)$	verringerte Intensität in Abhängigkeit der Schichtdicke $d$
$I_{\text{RS}}$	Raman-Intensität
$I_{\text{SERS}}$	SERS-Intensität
$v$	Schwingungsquantenzahl
$\nu_0$	Anregungsfrequenz
$l$	Nebenquantenzahl bzw. Drehimpulsquantenzahl
$h$	Planck'sches Wirkungsquantum
$\nu$	Anregungsfrequenz
$\tau$	Transmission
$A$	Absorbanz
$\varepsilon$	spezifischer Absorptionskoeffizient
$c$	Konzentration bzw. Lichtgeschwindigkeit
$d$	Schichtdicke
$R$	Bindungsabstand
$R_e$	Gleichgewichtsabstand
$D_e$	Dissoziationsenergie
$\alpha$	Polarisierbarkeit
$ \alpha ^2$	Erwartungswert der Polarisierbarkeit
$\eta$	Potentialkonstante
$\mu$	Dipolmoment
$\mu_r$	reduzierte Masse

$\varepsilon_0$	Suszeptibilität
$\varepsilon_i$	Suszeptibilität des Metalls
$\omega_0$	Anregungsfrequenz
$\omega_R$	Änderungen der Frequenz bei Stokes-Streuprozess
$N$	Teilchenzahldichte
$\sigma_s$	Streuquerschnitt
$\frac{d\sigma_s}{d\Omega}$	absoluter differentialer Raman-Streuquerschnitt
$\rho_i$	Depolarisationsgrad
$\langle \alpha' \rangle$	Erwartungswert der Polarisierbarkeit
$(\gamma'_i)^2$	Anisotropiewert der Schwingungsmode $i$
$\vartheta$	Winkel relativ zum anregenden Feld
$g$	Faktor der Suszeptibilität
$\Phi$	Test-Wellenfunktion
$\chi_a(\vec{x}_i)$	kanonische Spin-Orbitale
$\epsilon_a$	Orbitalenergien der kanonischen Spin-Orbitale
$\hat{f}(\vec{x}_i)$	Fock-Operator
$\hat{J}_b$	Coulomb-Term
$\hat{K}_b$	Austausch-Operator
$\hat{T}_{nu}$	kinetische Energie der Atomkerne
$\langle \hat{V}_{el,el} \rangle$	Erwartungswert der gemittelten Elektron-Elektron-Wechselwirkung
$\Psi_0$	HF-Determinante
$C_{\mu a}$	Expansionskoeffizient
$\phi_{\mu}(\vec{r}_i)$	Atom-Orbitale
$\phi^{CGTO}$	Contracted Gaussian Type Orbitals (CGTOs)
$F_{ii}$	Diagonalelemente der Hesse-Matrix
<b>X</b>	Datenmatrix
<b>T</b>	Matrix der <i>scores</i>
<b>L<sup>T</sup></b>	transponierte Matrix der <i>loadings</i>
<b>E</b>	Residualmatrix
<b>C</b>	Kovarianzmatrix
<i>RP</i>	Anzahl der richtig positiv zugeordneten Spektren
<i>FN</i>	Anzahl der falsch negativ zugeordneten Spektren
<i>RN</i>	Anzahl der richtig negativ zugeordneten Spektren
<i>FP</i>	Anzahl der falsch positiv zugeordneten Spektren







## 1. Einleitung

Personalisierte Medizin und therapeutische Medikamentenüberwachung [1] werden in der Zukunft grundlegende Bestandteile der medizinischen Behandlung sein. Dabei richtet sich der Fokus zunehmend auf eine individuelle Behandlung der Patienten. Ein in diesem Zusammenhang häufig verwendeter Begriff ist die Theragnostik. Eine Wortkombination aus Therapie und Diagnostik [2]. Die Kombination dieser beiden essentiellen Grundbausteine bildet die Basis einer erfolgreichen medizinischen Behandlung mit maximaler Wirksamkeit der verabreichten Medikamente und minimalem Schaden durch diese. Da jeder Patient eine individuelle Pharmakokinetik<sup>1</sup> aufweist [3], ist eine engmaschige Überwachung der Konzentration verabreichter Medikamente im Körper unerlässlich. Die therapeutische Medikamentenüberwachung (*therapeutic drug monitoring* - TDM) ist eine große Herausforderung der modernen Medizin, da die vorhandenen Methoden für derartige Anwendungen nicht geeignet sind. Hier ist die Wissenschaft gefragt, um neue Methoden bereitzustellen.

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der medizinischen Behandlung gravierender Krankheiten (wie z.B. Tuberkulose) ist der ökonomische Aspekt [4]. Hier kann durch eine rasche Identifizierung des Krankheitserregers eine zielgerichtete Therapie im frühen Stadium der Erkrankung initiiert werden. Jedoch kann es aufgrund der zum Teil zeitaufwendigen Standardverfahren für Bakterienidentifikation (z.B. kulturbasierte Methoden) zu erheblichen Verzögerungen kommen. Auch in dieser Hinsicht besteht ein großer Bedarf an Forschung und Entwicklung, um zuverlässige Alternativen aufzuzeigen.

Einige sehr erfolgversprechende Ansätze basieren auf spektroskopischen Methoden. Dabei stellt die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) eine herausragende Rolle dar. Diese auf Schwingungsanregungen basierende spektroskopische Methode ermöglicht die Detektion niedermolekularer Substanzen mit einer sehr hohen Sensitivität. Die geringe Intensität des Raman-Effekts wird durch den Einsatz plasmonischer (SERS-) Substrate um mehrere Größenordnungen ( $10^4$  bis  $10^{11}$ ) erhöht [5]. Wird das SERS-Substrat mit einer Laserwellenlänge nahe der Plasmonenresonanz angeregt, so wirkt auf die Moleküle in der näheren Umgebung ein induziertes evaneszentes elektromagnetisches (EM-) Feld.

Die SERS-Spektren enthalten molekularspezifische Informationen und ermöglichen somit eine Detektion und Identifizierung molekularer Systeme. Da SERS eine oberflächenabhängige spektroskopische Methode ist, sind die erhaltenen Signale stark mit der Beschaffenheit der Oberfläche und der Orientierung der untersuchten Substanzen zur Oberfläche korreliert.

---

<sup>1</sup> Geschwindigkeit, mit der Substanzen im Körper metabolisiert werden.

Als SERS-Substrate werden sowohl nanostrukturierte Metalloberflächen als auch metallische Nanopartikel eingesetzt [6]. Durch die Verwendung nanostrukturierter Metalloberflächen ist es möglich räumlich und zeitlich konstante Signalintensitäten zu erzielen [7–9]. Jedoch ist die Produktion solcher Substrate technisch sehr aufwendig. Die damit verbundenen hohen Produktionskosten verhindern die Anwendung solcher Substrate in der Analytik medizinisch relevanter Substanzen. Metallische Nanopartikel können durch einfache Reduktion von Metallsalzen kostengünstig hergestellt werden. Es gibt bei der Verwendung dieser Metallnanopartikel jedoch Komplikationen mit der Reproduzierbarkeit der SERS-Spektren. So kann es zu großen Signalfuktuationen kommen [10, 11]. Die Unterschiede in der Intensität der SERS-Spektren werden durch die Beschaffenheit der eingesetzten Nanopartikel hervorgerufen. Es kann durch die Bildung von „hot spots“ zu extremen punktuellen Verstärkungen kommen. Durch die Verwendung eines tropfenbasierten mikrofluidischen *Lab-on-a-chip* (LOC)-SERS-Aufbaus können diese Signalfuktuationen weitestgehend ausgeglichen werden [12]. Die LOC-SERS-Methode ermöglicht eine hohe Durchsatzrate von Einzelproben unter geringen Aufkommen von Probenvolumina. So wird ein statistisch valider Datensatz erzeugt. Weiterhin ist die Implementierung von Modulen zur Probenvorbehandlung mit geringem technischen Aufwand realisierbar.

Das LOC-SERS-System bietet die Möglichkeit, durch unterschiedliches Chipdesign und exakt definierte Umgebungsparameter vielfältige Fragestellungen zu adressieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das System für die quantitativen Analysen von Mitoxantron und Promethazin [13], sowie Nikotin [14] und Thiocyanat [15] geeignet ist. Weiterhin zeigten Untersuchungen von DNA [16, 17], Proteinen [18] und Enzymaktivitäten [19] die variable Einsetzbarkeit der LOC-SERS-Methode. Ebenso wurden mikrofluidische SERS-Studien zur Dynamik zellulärer chemischer Prozesse durchgeführt [20]. Es konnten auch Arsenionen mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden [21]. Eine aktuelle Übersicht der LOC-SERS Anwendungen findet sich in Ref. [22] und Ref. [23].

Die Orientierung der untersuchten Substanz relativ zur Metalloberfläche bestimmt, welche Schwingungssignale intensiver, weniger intensiv oder nicht verstärkt werden. Sie ist von der bevorzugten Analyt-Metall-Wechselwirkung abhängig, welche sich mit den Eigenschaften der Metallnanopartikel und mit der Molekülstruktur ändert. Aus diesem Grund ist es essentiell die damit verbundenen Einflussfaktoren detailliert zu untersuchen um SERS als Analysemethode zu etablieren. Studien zu den Einflussfaktoren auf SERS-Spektren werden häufig mit Pyridin oder Benzol und Derivaten dieser beiden Grundstrukturen durchgeführt. Diese Substanzen eignen sich hervorragend als Analyten für Grundlagenstudien. So wurde bereits der Einfluss unterschiedlicher Silbernanopartikel auf die SERS-Spektren von Pyridin untersucht [24]. Metall-Pyridin-Komplexe wurden sowohl experimentell als auch quantenchemisch [25] untersucht. Verschiedene Aspekte, wie der Einfluss des Elektropotentials auf SERS-Signale [26], die Orientierung zur Metalloberfläche [27], die Beeinflussung der SERS-Spektren durch Ionen [28] und weitere Faktoren, wie der Charge-

Transfer-Effekt [29,30] und die Verwendung verschiedener Metalle als SERS-Substrat [31] wurden untersucht. Studien an Pyridinderivaten, wie z. B. *para*-Cyanopyridin [32], *para*-, *meta*- und *ortho*-Picolin [33], *ortho*-Cyanopyridin und *ortho*-Picolyamin [34] oder Isomeren der Pyridincarboxylsäure [35] wurden durchgeführt, zum Teil unter Berücksichtigung der Substitutionsposition [36,37].

Bei den aufgeführten Studien wurde meist nur ein Einflussfaktor an einem konkreten System untersucht. Es können anhand dieser Arbeiten keine Zusammenhänge der einzelnen Faktoren erkannt werden. Weiterhin werden die experimentellen Ergebnisse nur in wenigen Studien durch quantenchemische Berechnungen validiert. Somit sind die Bandenzuordnungen oft nicht nachvollziehbar.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Schwerpunkt auf die grundlegende Untersuchung von Pyridin und Pyridinderivaten gelegt. Es werden in einer Studie sowohl der Einfluss von Silbernanopartikeln als auch der Einfluss der Substitutionsposition und der Art der funktionellen Gruppe untersucht. Durch die Anwendung quantenchemischer Methoden werden die Raman-Schwingungssignale der verwendeten Analyten berechnet, somit ist eine valide Bandenzuordnung gesichert. Sind die Einflussfaktoren eines Analyt-Metall-Systems bekannt, so können Rückschlüsse auf chemisch ähnliche Systeme gezogen werden.

Durch die grundlegende Untersuchung erschließen sich Anwendungsmöglichkeiten von medizinischer Relevanz, wie beispielsweise TDM mittels LOC-SERS. Des Weiteren können gezielt SERS-Spektren von Markermolekülen zur Identifizierung von Pathogenen genutzt werden.

Zunächst werden in Kapitel 2 die Grundlagen der verwendeten Technik eingeführt. Es wird ein Überblick über die verschiedenen Effekte bei Wechselwirkungen von Licht mit Materie gegeben. Die auf plasmonischer Verstärkung basierende SERS-Spektroskopie wird beschrieben. Weiterhin gibt es eine Einführung in die Grundlagen der verwendeten quantenchemischen Methoden. Anschließend werden in Kapitel 3 die verwendeten Materialien und Methoden erklärt sowie die zum Einsatz kommenden Messapparaturen beschrieben.

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei Kapitel unterteilt. In Kapitel 4 werden Einflussfaktoren auf SERS-Signale untersucht. Hierfür werden Pyridin und einige Derivate von Pyridin als Analyten verwendet, da diese heteroaromatischen Verbindungen Bestandteile vieler biologisch und medizinisch relevanter Substanzen sind. Zunächst wird der Einfluss von Silbernanopartikeln (AgNPs) untersucht. Es werden die drei Isomere des Picolyamins Raman- und SERS-spektroskopisch gemessen. Die erhaltenen Daten werden analysiert und interpretiert. Als SERS-Substrate kommen zwei der meist verwendeten AgNPs zum Einsatz, Citrat-reduzierte AgNPs und Hydroxylamin-reduzierte AgNPs. Die erhaltenen Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf bevorzugte Interaktionspositionen und die Orientierung der Moleküle zur Oberfläche zu. Weiterhin wird der Einfluss der funktionellen Gruppe überprüft. Raman- und SERS-Messungen von den Isomeren des Picolyamins und Pyridin-

methanols werden durchgeführt. Daraus können Schlussfolgerungen zu der Abhängigkeit der erhaltenen SERS-Schwingungssignale von der Substitutionsposition gezogen werden. Abschließend findet in dieser Grundlagenstudie die Raman- und SERS-Untersuchung von fünf *para*-substituierten Pyridinderivaten statt. Betrachtet werden hierbei Pyridin selbst, Cyanopyridin, Formylpyridin, Picolin, Picolylamin und Pyridinmethanol. So wird der Einfluss der funktionellen Gruppe in *para*-Position auf die erhaltenen Schwingungssignale ermittelt. Die in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnisse werden in den beiden folgenden Kapiteln auf medizinisch relevante Fragestellungen angewandt.

In Kapitel 5 wird die quantitative Detektion von Methotrexat (MTX) präsentiert. Das MTX-Molekül ist aus zwei großen Bestandteilen aufgebaut. Ein Bestandteil ist ein Pteridinringsystem (ein heteroaromatisches Ringsystem, ähnlich dem Pyridin), substituiert mit Aminogruppen. Ein weiterer Bestandteil ist ein *para*-substituierter Phenylring (ähnlich den *para*-substituierten Pyridinderivaten). MTX ist ein Antimetabolit, welcher zu den Folsäureantagonisten zählt. Es wird in der Chemotherapie von malignen Tumoren eingesetzt. Auf Grund der hohen Toxizität wird die Verabreichung von MTX in der Regel von therapeutischer Medikamentenüberwachung (TDM) begleitet. Die quantitative Analyse von MTX wird in dieser Arbeit sowohl in basischer Pufferlösung als auch in artifiziellem Blutplasma erfolgreich durchgeführt. Erste Hinweise auf die quantitative Detektion von MTX in realem Blutplasma zeigen das hohe Potential des LOC-SERS-Aufbaus für die Anwendung zur therapeutischen Medikamentenüberwachung.

MTX wird nicht nur in der Chemotherapie verwendet, es kommt auch bei der Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen zum Einsatz. Dabei zählt MTX zu den Medikamenten der zweiten Stufe. Es wird verabreicht, wenn die Medikamente der ersten Stufe (zum Beispiel Cortison) nicht ausreichen oder unerwünschte Nebenwirkungen in der Dauertherapie als Immunsuppressivum auftreten. Einige Erkrankungen, bei denen MTX verabreicht wird, sind z.B. rheumatische Arthritis sowie Morbus Crohn und Sarkoidose. Die beiden zuletzt genannten Erkrankungen zählen zwar zu den Autoimmunerkrankungen, jedoch wird ihr Erscheinen auch mit bakteriellen Erregern assoziiert. Dabei handelt es sich sowohl bei Morbus Crohn [38,39] als auch bei Sarkoidose [40] um Mykobakterien.

Die Gattung *Mycobacterium* umfasst eine große Anzahl von Spezies. Unter ihnen finden sich auch die Erreger der Tuberkulose. Akute Tuberkulose ist eine Erkrankung der Atemwege. Diese wird von verschiedenen Stämmen des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (MTC) verursacht. Darin vereint sind sowohl die humanpathogene Spezies *M. tuberculosis* als auch tierpathogene Spezies wie z.B. *M. bovis*. Neben den MTC-Stämmen existieren auch nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM), welche ebenfalls gravierende Erkrankungen der Lunge und anderer Organe hervorrufen können [41].

In Kapitel 6 wird die erfolgreiche Identifizierung von Mykobakterien auf Genotypebene anhand eines SERS-Datensatzes präsentiert. Die SERS-Spektren der Bakterien-

pension werden von Schwingungssignalen der Mykolsäure dominiert. Da die Mykolsäure stammspezifische strukturelle Unterschiede aufweist [42], eignen sich die erhaltenen SERS-Informationen für eine valide Identifizierung. Die Mykolsäure fungiert hierbei als Markermolekül.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die vielfältigen Möglichkeiten des mikrofluidischen SERS-Systems aufzuzeigen. Das System bietet die Möglichkeit, grundlegende Erkenntnisse zu Wechselwirkungsmechanismen und zu der Beeinflussung von SERS-Schwingungssignalen durch verschiedene Faktoren zu erlangen. Durch die Verwendung des LOC-SERS-Systems wird die Bestimmung exakter Messbedingungen und eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet. Der hohe Probendurchsatz und die geringen benötigten Probenvolumina ermöglichen die Generierung von großen Datensätzen für eine valide statistische Auswertung. Es soll gezeigt werden, dass für eine akkurate Bandenzuordnung die Inklusion quantenchemischer Methoden unerlässlich ist, um die Schwingungssignale richtig zu interpretieren. Mit Hilfe der Erkenntnisse aus Grundlagenstudien ist es möglich valide Analysen durchzuführen. Es wird demonstriert, dass anhand von LOC-SERS-Datensätzen quantitative Analysen in komplexen Medien durchgeführt werden können. Des Weiteren können Pathogene mittels chemometrischer Methoden anhand der SERS-Spektren von Markermolekülen identifiziert werden. Im Fokus der Arbeit steht dabei die Detektion niedermolekularer Substanzen in komplexen Medien, wie Blutplasma und Bakteriensuspension sowie die Identifizierung pathogener Mykobakterien.

## 2. Theoretische Grundlagen

Bei der Wechselwirkung von elektromagnetischer (EM-) Strahlung mit Materie kann es zu verschiedenen Arten von Interaktionen kommen. Die Art der Wechselwirkung hängt dabei von der eingestrahlten Wellenlänge beziehungsweise von der in der Strahlung enthaltenen Energie ab. So ist beispielsweise die Röntgen-Strahlung in der Lage, Elektronen aus einem Molekül herauszulösen, während UV- und sichtbares Licht lediglich energetisch angeregte Zustände verursachen können. Schwingungsanregungen innerhalb eines elektronischen Zustandes werden ebenfalls durch UV- und sichtbares Licht hervorgerufen, allerdings auch durch infrarote Wellenlängen. Rotationsanregungen benötigen eine sehr viel niedrigere Anregungsenergie und treten daher bereits bei Tageslicht und Raumtemperatur auf. Um die Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie genauer zu betrachten, wird zunächst eine kurze Einführung in die Quantenchemie gegeben, anschließend wird in Abschnitt 2.2 auf elektronische Anregungen und im Abschnitt 2.3 auf Schwingungsanregung eingegangen. Dabei liegt der Schwerpunkt bei der Raman-Spektroskopie (Abschnitt 2.3.1) und der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (Abschnitt 2.3.2). Anschließend werden in Abschnitt 2.4 ausgewählte quantenchemische Näherungsverfahren vorgestellt, in Abschnitt 2.5 wird beschrieben, wie die Normalmoden eines molekularen Systems quantenchemisch bestimmt werden. In Abschnitt 2.6 wird die Herzberg Notation am Beispiel von Pyridin eingeführt, sie wird in dieser Arbeit zur Benennung der Normalmoden angewandt. Im letzten Abschnitt 2.7 werden die Oberflächenauswahlregel für die SERS-Spektroskopie erläutert. Hierbei wird ebenfalls Pyridin als Beispielmolekül herangezogen.

### 2.1. Einführung in die Quantenchemie

Für eine umfassende Charakterisierung eines quantenmechanischen Systems ist es notwendig, die Schrödinger-Gleichung (SE) [43] zu lösen. Das Vielkörper-Problem für mehr als zwei Teilchen kann nicht analytisch gelöst werden, daher gilt es, angemessene Näherungen anzuwenden, um ein molekulares System zu beschreiben. Zunächst kann man zur Vereinfachung von einem nicht-relativistischen, zeitunabhängigen System ausgehen; damit erhält man die zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung

$$\hat{H}_{\text{tot}}|\Psi_{\text{tot}}\rangle = E_{\text{tot}}|\Psi_{\text{tot}}\rangle \quad , \quad (2.1)$$

wobei der Operator  $\hat{H}_{\text{tot}}$  den totalen Hamilton-Operator für das quantenmechanische System darstellt, die reellen Zahlen  $E_{\text{tot}}$  sind die Eigenwerte des Operators  $\hat{H}_{\text{tot}}$  und  $\Psi_{\text{tot}}$  die

zugehörigen Eigenfunktionen. Gilt die Born-Oppenheimer-Näherung<sup>1</sup> [44] kann man die Kern- und die Elektronen-Bewegungen, welche in den totalen Eigenfunktionen  $\Psi_{\text{tot}}$  vereint sind, entkoppeln. Somit ist es möglich eine Separation der molekularen Wellenfunktion in einen Kern-Teil  $|\psi_{\text{nu}}\rangle$  und einen elektronischen Teil  $|\psi_{\text{el}}\rangle$  durchzuführen

$$|\Psi_{\text{tot}}\rangle = |\psi_{\text{nu}}\rangle|\psi_{\text{el}}\rangle \quad . \quad (2.2)$$

Daraus resultieren die elektronische Schrödinger-Gleichung sowie die Kern-Schrödinger-Gleichung

$$\hat{H}_{\text{el}}|\psi_{\text{el}}\rangle = E_{\text{el}}|\psi_{\text{el}}\rangle \quad (2.3)$$

$$\hat{H}_{\text{nu}}|\psi_{\text{nu}}\rangle = E_{\text{tot}}|\psi_{\text{nu}}\rangle \quad . \quad (2.4)$$

Hierbei hängt die elektronische Wellenfunktion  $|\psi_{\text{el}}\rangle$  explizit von den Elektronenkoordinaten und parametrisch von den Kernkoordinaten ab. Die Born-Oppenheimer-Näherung ist eine angemessene Näherung für molekulare Systeme im Grundzustand. Das Quadrat der elektronischen Wellenfunktion  $|\psi_{\text{el}}^2\rangle$  stellt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen dar. Die Kern-SE [vgl. Gleichung (2.4)] hängt ausschließlich von den Kernkoordinaten ab. In den Abschnitten 2.2 und 2.3 werden die elektronischen Anregungs- bzw. die Schwingungsanregungs-Prozesse beschrieben. Im Abschnitt 2.4 werden Lösungsansätze für die elektronische SE besprochen, während in Abschnitt 2.5 noch einmal auf die Kern-SE zurück gegriffen wird, um zu beschreiben, wie die Normalmoden eines molekularen Systems quantenchemisch bestimmt werden können.

## 2.2. Elektronische Anregung - UV/Vis-Spektroskopie

Löst man die in Gleichung (2.3) gegebene zeitunabhängige elektronische SE, erhält man die Energie als Eigenwerte  $E_{\text{el}}$  und die zugehörigen elektronischen Wellenfunktionen  $|\psi_{\text{el}}\rangle$ . Vereinfacht dargestellt ist somit jedem Orbital eines Systems ein diskreter Energie-Eigenwert zugeordnet. Der Hund'schen Regel [45] entsprechend werden Orbitale der selben Nebenquantenzahl ( $l = 0, 1, 2$ ) der Reihe nach, zunächst einzeln mit Elektronen derselben Spinquantenzahl, gefüllt. Anschließend werden nach dem Pauli-Prinzip [46] Elektronen mit umgekehrter Spinquantenzahl ergänzt, so dass sich in jedem Orbital zwei Elektronen befinden können. Die Orbitale werden der energetischen Reihenfolge nach besetzt, beginnend mit der niedrigsten Energie. Bei der Betrachtung eines einzelnen Atoms sind diese Orbitale die Atomorbitale. Wird jedoch eine molekulare System mit mehreren Atomen betrachtet,

<sup>1</sup> Aufgrund des sehr viel größeren Gewichts der Kernteilchen bewegen sich diese sehr viel langsamer als die Elektronen. Daher folgen die Elektronen in einem molekularen System der Bewegung der Kernteilchen näherungsweise adiabatisch. Daher kann die Abstoßung zwischen den Kernteilchen als Konstante einer bestimmten Kerngeometrie betrachtet werden.



so bilden die Atomorbitale sogenannte Molekülorbitale (MO) [47]. Formal gehen aus zwei Atomorbitalen auch zwei MOs hervor, davon ist eines ein energetisch günstigeres, bindendes, während das andere ein energetisch ungünstigeres, nicht- bzw. anti-bindendes MO darstellt. Demzufolge werden zunächst die bindenden MOs besetzt. Diese sind zwischen den beteiligten Atomen delokalisiert und haben die höchste Elektronendichte zwischen den Atomkernen. Für nicht-bindende und anti-bindende MOs gilt, dass sie mindestens eine Knotenebene zwischen den Atomkernen aufweisen. Wird nun durch das einstrahlende EM-Feld genügend Energie aufgebracht, um ein oder mehrere Elektronen in ein elektronisch ungünstigeres anti-bindendes MO wechseln zu lassen, so spricht man von elektronischer Anregung. Da jeder Elektronenkonfiguration ein diskretes Energieniveau zugeordnet ist, kann die benötigte Anregungsenergie angegeben werden durch

$$\Delta E = h\nu \quad , \quad (2.5)$$

wobei  $h$  das Plank'sche Wirkungsquantum und  $\nu$  die Anregungsfrequenz ist. Das heißt nur durch die Absorption einer gewissen, diskreten Energiemenge  $h\nu$  kann ein Übergang zwischen verschiedenen Elektronenkonfigurationen induziert werden. Dieses Phänomen kann mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie indirekt gemessen werden. Dabei wird die Intensität des Lichts vor der Probe und nach dem Durchdringen der Probe gemessen. Das Verhältnis  $I/I_0$  wird Transmission  $\tau$  genannt, die Absorbanz kann nun über das Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet werden

$$A = \lg \left( \frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad , \quad (2.6)$$

dabei ist  $\varepsilon$  der spezifische Absorptionskoeffizient (abhängig von der Wellenlänge und der Temperatur),  $c$  die Konzentration der Probe und  $d$  die Schichtdicke. Für  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  Übergänge, also im Falle von Einfachbindungen, ist die benötigte Anregungsenergie verhältnismäßig hoch, meist bei Wellenlängen unter 200 nm. Sind jedoch Doppelbindungen oder freie Elektronenpaare vorhanden, kommt es zu  $\pi \rightarrow \pi^*$  bzw.  $n \rightarrow \pi^*$  Übergängen, welche eine niedrigere Anregungsenergie benötigen. Somit kann der Übergang durch UV- bzw. sichtbares Licht induziert werden. Je mehr konjugierte Doppelbindungen bzw. Mehrfachbindungen das untersuchte System aufweist, um so niedriger wird die zu erbringende Anregungsenergie für einen elektronischen Übergang. Befinden sich unterschiedliche Substanzen in der Probe, so kann die Absorbanz im Fall von Wechselwirkungen zwischen den Substanzen stark von den Absorbanzen der individuellen Substanzen abweichen. Damit ist die UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie eine adäquate Methode, um die Wechselwirkungen der in dieser Arbeit verwendeten Silberkolloid-Analyt-Lösungen abschätzen zu können.



### 2.3. Schwingungsanregung

Wird ein molekulares System mit sichtbarem Licht oder infrarotem Licht bestrahlt, so kann es zu Schwingungsanregungen der molekularen Bindungszustände innerhalb eines elektronischen Zustandes kommen. Die Anregung von Schwingungen erfordert im Vergleich zur elektronischen Anregung weniger Photonenenergie. Das heißt, dass Wellenlängen im Bereich von infrarotem Licht zum Teil bereits ausreichen, um Schwingungsanregungen zu induzieren. Wird das molekulare System vereinfacht als harmonischer Oszillator betrachtet, kann die SE analytisch gelöst werden. Die sich ergebenden Schwingungs-Eigenwerte

$$E_v = h\nu_0 \left( v + \frac{1}{2} \right) \quad , \quad (2.7)$$

bestehend aus dem Abstand zweier Schwingungs-Energieniveaus  $h\nu_0$  und der Schwingungsquantenzahl  $v$ , sind im quadratischen Potential des harmonischen Oszillators äquidistant angeordnet. Der Schwingungsgrundzustand hat somit eine Energie von  $E = \frac{1}{2}h\nu_0$ . Diese Vereinfachung lässt grundlegend keine Bindungsdissoziation<sup>2</sup> zu, weiterhin bleibt der Gleichgewichtsabstand der Elektronen zum Kern unabhängig vom Schwingungsniveau konstant. Daher ist es angemessen dem realen System wieder etwas näherzukommen durch Verwendung eines anharmonischen Potentials, z.B. dem sogenannten Morse-Potential [48]

$$V(R) - D_e = D_e \cdot \left( e^{-2\eta(R-R_e)} - 2e^{-\eta(R-R_e)} \right) \quad . \quad (2.8)$$

Dabei ist  $R$  der Bindungsabstand,  $R_e$  der Gleichgewichtsabstand der Atome und  $\eta$  die Potential-Konstante, diese ist über

$$\eta = \nu_0 \cdot \sqrt{\frac{\mu_r}{2D_e}} \quad , \quad (2.9)$$

sowohl von der Dissoziationsenergie  $D_e$  als auch von der reduzierten Masse  $\mu_r$  des betrachteten Systems abhängig. Die Energie-Eigenwerte werden durch Entwicklung einer Taylorreihe (der SE) um einen Anharmonizitäts-Term erweitert

$$E_v = h\nu_0 \left( v + \frac{1}{2} \right) + \frac{h^2\nu_0^2}{4D_e} \left( v + \frac{1}{2} \right)^2 \quad . \quad (2.10)$$

Damit ergibt sich der Abstand der Energieniveaus wie folgt:

$$\Delta E = h\nu_0 \left\{ 1 - \frac{h\nu_0}{2D_e} (1 - v) \right\} \quad , \quad (2.11)$$

das heißt der Abstand zwischen den Energieniveaus wird nun mit steigender Schwingungsquantenzahl  $v$  geringer, während der Gleichgewichtsabstand zunimmt. Die Übergänge zwi-

<sup>2</sup> Ein Elektron wird so stark angeregt, dass es das betrachtete System verlässt. Das heißt, es kommt zur Auflösung einer Bindung bzw. zur Ionisation.

schen den diskreten Schwingungs-Energieniveaus sind durch die Auswahlregel restringiert. Diese Auswahlregeln haben im Bild des anharmonischen Oszillators keine absolute Gültigkeit mehr, so werden zum Beispiel Übergänge mit  $\Delta v > 1$  möglich, welche im harmonischen Oszillator strikt verboten sind. Diese Schwingungsübergänge nennt man Obertöne. Der auf Schwingungsübergängen basierende Raman-Effekt soll im nächsten Abschnitt 2.3.1 kurz beschrieben werden, bevor im Abschnitt 2.3.2 die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie eingeführt wird.

### 2.3.1. Der Raman-Effekt

Der Raman-Effekt wurde 1928 zum ersten Mal von Raman und Krishnan beobachtet [49]. Dieser Effekt basiert auf inelastischen Lichtstreuungsprozessen. Dabei werden durch Lichteinstrahlung Schwingungsanregungen induziert. Innerhalb eines elektronischen Zustandes werden höhere Schwingungsniveaus besetzt. Darauf folgt eine Relaxation, bei der Licht emittiert wird. Der Großteil dieses emittierten Lichts ist energetisch unverändert gegenüber der Anregungsenergie (elastische Streuung, bezeichnet als Rayleigh-Streuung), während ein kleiner Teil des emittierten Lichts inelastisch gestreutes Licht ist. Das heißt, dass die Energie des gestreuten Lichts leicht verändert ist. Wird die Energie größer<sup>3</sup>, so spricht man von Anti-Stokes-Streuung, wird sie kleiner so handelt es sich um Stokes-Streuung. Ein Schema der beschriebenen Streuprozesse ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Die Intensität (im  $90^\circ$  Winkel zur Anregungsintensität) der Stokes-gestreuten Photonen (auch als Raman-Intensität bezeichnet) ergibt sich somit aus

$$I_{RS} = \frac{1}{32\pi^2 \varepsilon_0 c^3} \cdot (\omega_L - \omega_R)^4 \cdot \alpha^2 \cdot E^2 \quad . \quad (2.12)$$

Dabei ist  $\omega_L$  die Anregungsfrequenz,  $\omega_R$  die Änderungen der Frequenz bei einem Stokes-Streuprozess,  $\varepsilon_0$  die Suszeptibilität des umgebenden Mediums,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit,  $\alpha$  die Polarisierbarkeit und  $E$  die elektrische Feldstärke [50]. Da die Intensität proportional zum Quadrat der elektrischen Feldstärke ist und  $\alpha$  quantenmechanisch als Tensor in einer Taylor-Reihe um die Kern-Gleichgewichtslage ( $q = 0$ ) entwickelt wird, ergibt sich Gleichung (2.12) zu

$$I_{RS} = const \cdot I_0 (\omega_L - \omega_R)^4 \cdot |\alpha|^2 \quad . \quad (2.13)$$

Wobei  $I_0$  die Anregungsintensität und  $|\alpha|^2$  der Erwartungswert der Polarisierbarkeit ist [50].

---

<sup>3</sup> Durch die Boltzmannverteilung befinden sich einige Elektronen bereits in höheren Schwingungsniveaus, die Besetzung der Schwingungszustände ist temperaturabhängig.

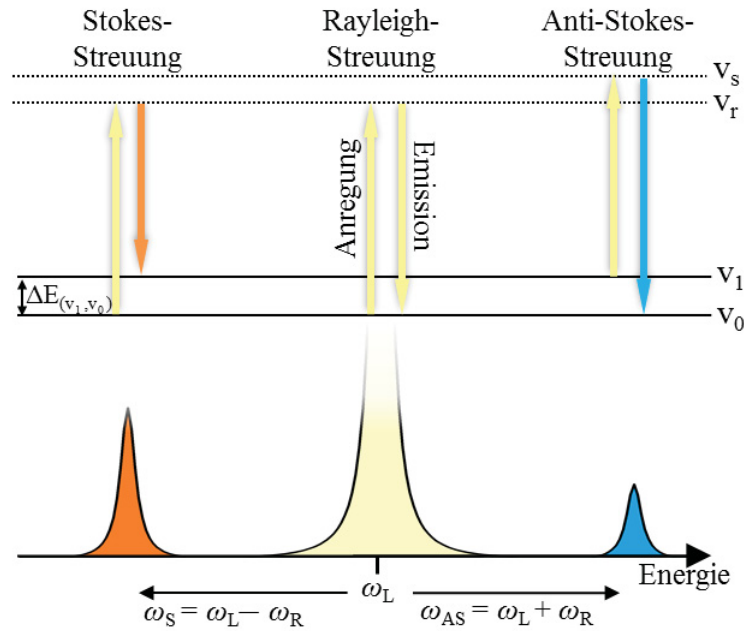


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung des Raman-Effekts. Das Licht der Anregungsfrequenz  $\omega_L$  wird entweder energetisch unverändert (elastisch als Rayleigh-Streuung) gestreut oder es kommt zur inelastischen Streuung, Stokes- ( $\omega_S$ ) bzw. Anti-Stokes-Streuung ( $\omega_{AS}$ ).  $v_0$  und  $v_1$  sind der Schwingungsgrundzustand und der erste angeregte Schwingungszustand.  $v_R$  und  $v_S$  sind virtuelle Zustände im betrachteten elektronischen Zustand.

Die Auswahlregel für Raman-aktive Schwingungsübergänge besagt, dass sich die Polarisierbarkeit des molekularen Systems während der betrachteten Schwingung ändern muss. Das heißt das induzierte Dipolmoment

$$\mu = \left[ \alpha_0 + \left( \frac{\partial \alpha}{\partial q} \right) \Big|_{q=0} \cdot q_0 \cos \omega_R t \right] E_0 \cdot \cos \omega_0 t \quad , \quad (2.14)$$

muss ungleich null sein. Die Zahl der inelastisch gestreuten Photonen hängt in Analogie zum Lambert-Beer'schen Gesetz über

$$I(d) = I_0 e^{-N \cdot \sigma_s \cdot d}$$

vom Streuquerschnitt  $\sigma_s$  ab [51]. Wobei  $I_0$  die einfallende Lichtintensität darstellt,  $I(d)$  die verringerte Intensität in Abhängigkeit der Probentiefe  $d$  und  $N$  die Teilchenzahldichte. Der Streuquerschnitt ist die wirksame Querschnittsfläche der streuenden Teilchen, innerhalb derer ein einfallendes Photon abgelenkt werden kann

$$\sigma_s = \frac{8\pi}{3} \frac{1 + 2\rho_i}{1 + \rho_i} \frac{d\sigma_s}{d\Omega} \quad . \quad (2.15)$$

Dabei ist  $\frac{d\sigma_s}{d\Omega}$  der absolute differentiale Raman-Streuquerschnitt und  $\rho_i$  stellt den Depolari-

sationsgrad dar. Dieser Depolarisationsgrad  $\rho_i$  hängt von der Symmetrie der betrachteten Schwingungsmode  $i$  ab

$$\rho_i = \frac{3(\gamma'_i)^2}{45(\langle\alpha'\rangle)^2 + 4(\gamma'_i)^2} \quad . \quad (2.16)$$

Mit dem Erwartungswert der Polarisierbarkeit  $\langle\alpha'\rangle = \frac{1}{3}(\alpha'_{xx} + \alpha'_{yy} + \alpha'_{zz})$  und dem Anisotropiewert  $(\gamma'_i)^2$  [52]. Der Streuquerschnitt in Gleichung (2.15) ist eine physikalisch kleine Größe, in der Regel handelt es sich um Werte von  $10^{-28} \text{ m}^2$  bis  $10^{-31} \text{ m}^2$ . Daraus geht hervor, dass die Wahrscheinlichkeit der inelastischen Streuung eines Photons sehr gering ist.

Eine Erhöhung des Raman-Signals kann durch die Induktion eines zusätzlichen EM-Feldes erreicht werden. Diese Methode wird in der oberflächenverstärkten Raman-Spektroskopie (*surface enhanced Raman-spectroscopy* - SERS) angewandt. Der SERS-Effekt wird im nächsten Abschnitt in seinen Grundzügen erklärt.

### 2.3.2. SERS: Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie

Befindet sich eine Molekül in nächster Umgebung eines Metallnanopartikels oder einer nanostrukturierten metallischen Oberfläche so werden die Raman-Moden dieses Moleküles verstärkt. In dem nanostrukturierten Metall wird ein Oberflächen-Plasmonen-Polariton angeregt wenn die Anregungsfrequenz in der Nähe der Plasmonenresonanz liegt [53]. Die SERS-Intensität hängt über den EM-Verstärkungsfaktor, bezeichnet als  $G$ , von der EM-Feldstärke ab.  $G$  ist definiert als

$$G = \frac{|E_{\text{Loc}}(\omega_{\text{L}})|^2}{|E_0(\omega_{\text{L}})|^2} \cdot \frac{|E_{\text{Loc}}(\omega_{\text{R}})|^2}{|E_0(\omega_{\text{R}})|^2} \quad (2.17)$$

$$\approx \frac{|E_{\text{Loc}}(\omega_{\text{L}})|^2 \cdot |E_{\text{Loc}}(\omega_{\text{R}})|^2}{|E_0|^4} \quad , \quad (2.18)$$

wobei  $E_{\text{Loc}}$  das evaneszente lokal verstärkte EM-Feld und  $E_0$  das EM-Feld des einstrahlenden Lasers ist [54]. Da für eine effektive SERS-Verstärkung die Laserfrequenz mit der Plasmonenresonanz übereinstimmen muss, ist  $I_{\text{SERS}}$  näherungsweise proportional zu  $|E_{\text{Loc}}/E_0|^4$  [55]. Basierend auf theoretischen Rechnungen konnten unter Berücksichtigung der Form, der Größe, des Materials welches als oberflächenverstärkendes (SERS-) Substrat verwendet wird, und der Suszeptibilität des umgebenden Mediums EM-Verstärkungsfaktoren von bis zu  $10^{11}$  berechnet werden [56,57]. Das lokal verstärkte EM-Feld  $E_{\text{Loc}}$  wird berechnet über

$$E_{\text{Loc}}^2 = E_0^2 \cdot |g|^2(1 + 3\cos^2\vartheta) \quad , \quad (2.19)$$

mit  $\vartheta$ , dem Winkel relativ zum anregenden Feld und  $g$ , dem Faktor der Suszeptibilität

$$g = \frac{\varepsilon_i - \varepsilon_0}{\varepsilon_i + 2\varepsilon_0} . \quad (2.20)$$

Somit werden die größten lokalen Feldstärken für  $\vartheta = 0^\circ$  und  $180^\circ$  erreicht. Weiterhin kann das lokale Feld für eine gegebenen Geometrie des SERS-Substrates erhöht werden wenn der Realteil der Suszeptibilität des Metalls  $\text{Re}(\varepsilon_i) \approx -2\varepsilon_0$  und der Imaginärteil  $\text{Im}(\varepsilon_i) \ll 1$  wird, dies ist die Plasmonenresonanz Bedingung [50]. Die Plasmonenresonanz wird durch  $\varepsilon_i$  charakterisiert, daher werden präferenziert Gold und Silber für SERS-Experimente mit Wellenlängen im NIR- bzw. sichtbarem Bereich eingesetzt.

Die Gesamtverstärkung beim SERS-Effekt resultiert zum größten Teil aus der beschriebenen EM-Verstärkung. Jedoch tritt eine weitere Verstärkung auf, dies ist die chemische Verstärkung. Ihr Anteil an der Gesamtverstärkung wird auf einen Faktor von  $10^1$  bis  $10^3$  geschätzt [6]. Sie setzt sich zusammen aus verschiedenen Beiträgen. Zum einen eine Signalverstärkung durch chemische Wechselwirkungen zwischen dem Molekül und dem Metallnanopartikel im Grundzustand. Weiterhin eine Verstärkung in Folge von Resonanzanregungen von Charge-Transfer-Prozessen (CT) zwischen dem Molekül und dem Metall. Einen Beitrag zur chemischen Verstärkung leistet auch die Resonanz-Raman-Verstärkung basierend auf der Elektronenanregung im Molekül [58]. Dieser Effekt tritt nur auf wenn die anregende Wellenlänge in Resonanz mit der Elektronenanregung des Moleküls ist.

Für die Charakterisierung von Raman- und SERS-Spektren ist eine exakte Bandenzuordnung notwendig. Um diese zu realisieren werden in der vorliegenden Arbeit die Schwingungsmoden der in Kapitel 4 betrachteten Moleküle simuliert. Hierbei kommen quantenchemische Methoden zur Anwendung. Eine kurze Einleitung in die Theorie der verwendeten quantenchemischen Näherungsverfahren wird in den nächsten Abschnitten gegeben.

## 2.4. Quantenchemische Näherungsverfahren

### 2.4.1. Hartree-Fock Methode

Eine analytische Lösung für die elektronische zeitunabhängige Schrödinger-Gleichung ist nur für Systeme mit einem Elektron möglich. Für größere Systeme sind weitere Näherungsmethoden notwendig. Die meisten dieser Methoden entspringen dem Variationsprinzip [59]

$$\frac{\langle \Phi | \hat{H}_{\text{el}} | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle} \geq E_{\text{exakt}} , \quad (2.21)$$

welches auf der Annahme basiert, dass die Energie  $E_{\text{el}}$  der Elektronen einer Test-Wellenfunktion  $\Phi$ , berechnet als Erwartungswert aus dem elektronischen Hamilton-Operator dividiert durch die Norm der Wellenfunktion, immer größer-gleich der exakten Energie der Elektronen ist. Das Ziel der hier beschriebenen quantenchemischen Methoden ist es diese Energie zu minimieren. Durch Optimieren der Parameter wird die optimal passende

Wellenfunktion gesucht. Dem Pauli-Prinzip [46] folgend, muss die Wellenfunktion antisymmetrisch werden für den Fall, dass zwei Elektronenkoordinaten mit einander wechselwirken. Solch eine Wellenfunktion kann als Slater-Determinante dargestellt werden, diese enthält die Spin-Orbitale, welche  $N$ -Einpaketel-Funktionen  $\chi_a(\vec{x}_1)$  enthalten. Durch Anwendung des Variationsprinzips (2.21) auf die Wellenfunktion als Slater-Determinante und den elektronischen Hamilton-Operator erhält man die Hartree-Fock Gleichungen (HF) [60]

$$\hat{f}(\vec{x}_i) |\chi_a(\vec{x}_i)\rangle = \epsilon_a |\chi_a(\vec{x}_i)\rangle \quad , \quad (2.22)$$

diese stellen  $N$ -Ein-Elektronen Schrödinger-Gleichungen für die Zustände der Spin-Orbitale eines Elektrons dar. Die Lösung dieser Gleichungen sind die kanonischen Spin-Orbitale  $\chi_a(\vec{x}_i)$  und ihre zugehörigen Orbitalenergien  $\epsilon_a$ . Der Vektor  $(\vec{x}_i)$  enthält sowohl die Raum-, als auch die Spin-Koordinaten ( $\vec{x}_i = \{\vec{r}, \sigma\}$ ), da der elektronische Hamilton-Operator nicht auf den Spin wirkt kann  $\chi_a$  also in eine räumliche, und eine Spin-Komponente aufgespalten werden

$$\chi_a(\vec{x}_i) = \psi_a(\vec{r}_i) \cdot \begin{cases} \alpha(\sigma_i) \\ \beta(\sigma_i) \end{cases} \quad . \quad (2.23)$$

Der Fock-Operator  $\hat{f}(\vec{x}_i)$ , aus Gleichung (2.22), besteht aus drei wesentlichen Bestandteilen, dem Ein-Elektronen Kern-Hamilton-Operator  $\hat{h}(\vec{x}_i)$ , dem Coulomb-Term  $\hat{J}_b$  und dem Austausch-Operator  $\hat{K}_b$

$$\hat{f}(\vec{x}_i) = \hat{h}(\vec{x}_i) + \sum \left( \hat{J}(\vec{x}_i) - \hat{K}(\vec{x}_i) \right) \quad . \quad (2.24)$$

Da der Fock-Operator durch  $\hat{J}_b$  und  $\hat{K}_b$  von der Lösung der kanonischen Spin-Orbitale abhängig ist, kann Gleichung (2.22) keine lineare Eigenwert-Gleichung sein. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte *pseudo*-Eigenwert-Gleichung, welche iterativ gelöst werden muss [61]. Die Berechnung der Energien durch die Hartree-Fock-Methode berücksichtigt nur eine grobe Mittelung der Elektron-Elektron-Wechselwirkung zwischen gleichgerichteten Elektronen (Pauli-Prinzip). Um eine wirklichkeitsnähere Abschätzung zu erhalten empfiehlt es sich aber, auch die Wechselwirkungen zu Elektronen mit gegensätzlichem Spin zu betrachten. Die Korrelationsenergie  $E_C$  ist die Differenz der exakten nicht-relativistischen Energie  $E_{\text{exakt}}$  und der (nicht-relativistischen) Hartree-Fock-Energie  $E_{\text{HF}}$  (in den Grenzen des verwendeten Basissatzes)

$$E_C = E_{\text{exakt}} - E_{\text{HF}} \quad . \quad (2.25)$$

Aufgrund des Variationsprinzips aus Gleichung (2.21) muss die Korrelationsenergie demzufolge im Allgemeinen negativ sein. Eine Möglichkeit  $E_C$  zu berechnen ist die *Møller-Plesset*-Störungstheorie (MP), welche im nächsten Abschnitt erklärt wird.

### 2.4.2. Post-Hartree-Fock Methoden - Møller-Plesset

Bei der *Møller-Plesset*-Methode wird ein störungstheoretischer Ansatz verfolgt, um die Korrelation der Elektronen zu integrieren [59, 61]. Hierbei wird der Hamilton-Operator aufgeteilt in einen ungestörten Teil, den Hamilton-Operator nullter Ordnung  $\hat{H}_0^f$  und den Störungs-Hamilton-Operator  $\hat{H}'$ . Der Operator  $\hat{H}_0^f$  wird definiert als Summe über die Fock-Operatoren, dabei ist der Erwartungswert der (gemittelten) Elektron-Elektron-Wechselwirkung  $\langle \hat{V}_{el,el} \rangle$  doppelt enthalten, während die Störung sich aus dem exakten Operator  $\hat{V}_{el,el}$  minus dem doppelten Erwartungswert  $\langle \hat{V}_{el,el} \rangle$  zusammen setzt

$$\hat{H}_0^f = \sum_{i=1}^N \hat{f}_i = \sum_{i=1}^N \hat{h}_i + 2\langle \hat{V}_{el,el} \rangle \quad (2.26)$$

$$\hat{H}' = \hat{H} - \hat{H}_0^f = \hat{V}_{el,el} - 2\langle \hat{V}_{el,el} \rangle \quad (2.27)$$

Durch die Wahl des Störungs-Hamilton-Operator (2.27) wird die Bedingung, dass die Störung klein sein sollte im Vergleich zu  $\hat{H}_0^f$  nicht erfüllt. Allerdings führt sie dazu, dass die Lösungen der ungestörten SE bekannt sind. Die Wellenfunktion nullter Ordnung  $|\Psi_0\rangle$  ist die HF-Determinante, während die Energie nullter Ordnung  $E_{MP0}$  lediglich eine Summe der Energien der Molekül-Orbitale (MO) darstellt. Um die HF-Energie zu erhalten muss der Erwartungswert der gemittelten Wechselwirkung  $\hat{V}_{el,el}$  ergänzt werden, dies ist die Energie erster Ordnung  $E_{MP1}$ . Wird auch die Energie zweiter Ordnung  $E_{MP2}$  berücksichtigt, beginnt man bei dieser Wahl von  $\hat{H}_0^f$  direkte Elektron-Elektron-Wechselwirkungen mit zu betrachten. Die Energiekorrektur zweiter Ordnung bezieht Matrixelemente des Störungs-Operators zwischen der HF-Referenz und allen möglichen Anregungsdeterminanten mit ein

$$E_{MP2} = \sum_i c_i \langle \Psi_0 | \hat{H}' | \Psi_i \rangle = \sum_{i \neq 0} \frac{\langle \Psi_0 | \hat{H}' | \Psi_i \rangle \langle \Psi_i | \hat{H}' | \Psi_0 \rangle}{E_0 - E_i} \quad (2.28)$$

Da die Störung ein zwei-Elektronen-Operator ist, werden alle Matrixelemente welche dreifach-, vierfach-, usw. Anregungen enthalten gleich null. Des Weiteren sind auch die Matrixelemente mit Einzelanregungen gleich null (beruhend auf dem Brillouin-Theorem [62]). Daraus folgend, besteht die Energiekorrektur zweiter Ordnung aus der Summe der Doppelanregungsdeterminanten. Die Møller-Plesset-Störung zweiter Ordnung berücksichtigt etwa 80% bis 90% der Wechselwirkungsenergie [63].

Ein nicht auf der HF-Methode basierender Ansatz für die Näherung der SE ist die Dichtefunktionaltheorie (DFT). Diese basiert auf dem Ansatz, dass sich alle physikalischen und chemischen Eigenschaften eines molekularen Systems aus seiner Elektronendichte herleiten lassen. Dies führt dazu, dass die Zahl der Variablen von  $3 \cdot (N + n)$ , wobei  $N$  die Zahl der Kerne und  $n$  die Zahl der Elektronen des betrachteten Systems ist, auf die drei Raumkoordinaten reduziert werden. Da diese Methode in der vorliegenden Arbeit nicht eingesetzt wird, soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden.

### 2.4.3. Basissätze

In den beiden vorherigen Abschnitten wurden die Hartree-Fock-Methode, und die darauf beruhende *Møller-Plesset*-Störungstheorie in ihren Grundzügen erläutert. Dabei wurde gezeigt, dass die kanonischen Spin-Orbitale  $\chi_a(\vec{x}_i)$  in eine Raum-, und eine Spin-Komponente aufgespalten werden können [vgl. Gleichung (2.23)]. Da aber die Raum-Funktionen  $\psi_a$  nicht bekannt sind, werden sie durch eine Linearkombination eines Satzes von  $k$  bekannten Basis-Funktionen substituiert. Zu diesem Zweck werden zunächst die Atom-Orbitale als Basis-Funktionen herangezogen (diese sind keine Lösung des molekularen HF-Problems)

$$\psi_a(\vec{r}_i) = \sum_{\kappa=1}^k C_{\kappa a} \phi_{\kappa}(\vec{r}_i) \quad , \quad (2.29)$$

dabei sind  $C_{\kappa a}$  die Expansionskoeffizienten der Linearkombination. Dieser Ansatz wird als *Linear Combination of Atomic Orbitals - Molecule Orbitals* (LCAO-MO) bezeichnet. Die in Gleichung (2.29) enthaltenen Atom-Orbitale  $\phi_{\kappa}$  werden, mit dem Ziel einer schnellen Evaluierung der zwei-Elektronen Terme  $\hat{J}_b$  und  $\hat{K}_b$  [aus Gleichung (2.24)], durch einen Basissatz von *Contracted Gaussian Type Orbitals* (CGTOs) dargestellt

$$\phi_{\kappa}(\vec{r}_i) = \phi^{\text{CGTO}}(\vec{r}_i) = \sum_{p=1}^L d_{p\kappa} \phi_p^{\text{GTO}}(\alpha, \vec{r}_i) \quad . \quad (2.30)$$

Der in dieser Arbeit verwendete Basissatz 6-311++G\*\* gehört zu der Klasse der *Split-Valence*-Basissätze. Dabei werden die inneren Elektronen der beteiligten Atome zu einem Atomrumpf zusammen gezogen, dieser wird nun durch eine kontrahierte Gauss-Funktion (CG), bestehend aus sechs Gauss-Funktionen, beschrieben. Die äußeren Elektronen, die sogenannten Valenzelektronen, werden durch drei CG-Funktionen dargestellt, diese bestehen aus drei bzw. einer, und einer Gauss-Funktion. Der Infix ++ zeigen an, dass sogenannte diffuse Funktionen in der Rechnung berücksichtigt werden. Es werden sp-Diffusions-Funktionen für jedes Nicht-Wasserstoffatom ergänzt und eine s-Diffusions-Funktion für Wasserstoffatome. Diese Diffusions-Funktionen sind vor allem von Bedeutung, wenn Ionen



betrachtet werden oder Wechselwirkungen über größere Distanzen. Die Suffixe \*\* bedeuten, dass Polarisations-Funktionen in die Berechnung mit einbezogen werden. Folglich werden für Atome der ersten Reihe des Periodensystems (Li-F) d-Funktionen hinzugefügt und für Wasserstoff Atome werden p-Funktionen mit berücksichtigt. Da in dieser Arbeit heteroaromatische Ringsysteme untersucht werden, ist es sinnvoll Polarisations-Funktionen zu ergänzen. Diese ermöglichen die Beschreibung der Anisotropie der Elektronenverteilung in aromatischen Systemen [59]. Bei der Anwendung quantenchemischer Rechnungen wird zunächst eine Startgeometrie festgelegt. Diese wird iterativ variiert, bis ein energetisches Minimum erreicht ist. Um zu testen ob es sich um ein echtes Minimum auf der Potentialenergieebene handelt, wird eine Frequenzrechnung durchgeführt. So werden die Normalmoden erhalten. Die Berechnung der Normalmoden wird im nächsten Abschnitt kurz erklärt.

## 2.5. Quantenchemische Berechnung von Normalmoden

Um die Normalmoden eines Moleküls berechnen zu können, ist es notwendig, die Kern-SE zu lösen. Der Hamilton-Operator  $\hat{H}_{\text{nu}}$  aus Gleichung (2.4) setzt sich zusammen aus dem Operator der kinetischen Energie der Atomkerne  $\hat{T}_{\text{nu}}$  und der elektronischen Energie als Funktion der Kernkoordinaten, damit ergibt sich

$$\left(\hat{T}_{\text{nu}} + E_{\text{el}}\right) |\psi_{\text{nu}}\rangle = E_{\text{tot}} |\psi_{\text{nu}}\rangle \quad . \quad (2.31)$$

Wobei  $E_{\text{tot}}$  die gesamte Energie des betrachteten Systems ist und  $\psi_{\text{nu}}$  die Wellenfunktion bezogen auf die kartesischen Kernkoordinaten. Da für die Berechnungen von  $E_{\text{el}}$  (durch Lösen der elektronischen SE) die Kernkoordinaten als Parameter bekannt sein müssen wird eine Taylor-Reihenentwicklung um den Gleichgewichtsabstand zur Beschreibung der elektronischen Energie verwendet. Die Reihe wird bis zum zweiten Glied entwickelt, die resultierenden zweiten Ableitungen der Energie werden in einer Hesse-Matrix zusammengefasst. Nach der Umrechnung der kartesischen in die massegewichteten Koordinaten wird ein System aus gekoppelten Differentialgleichungen zweiter Ordnung erhalten. Durch Diagonalisieren der Hesse-Matrix werden die Differentialgleichungen entkoppelt. Das resultierende Koordinatensystem sind die Normalkoordinaten, entlang derer die Normalmoden oszillieren.

Aus den Diagonalelementen  $F_{ii}$  der Hesse-Matrix ergibt sich die Lage der Normalmoden über

$$\tilde{\nu} = \frac{\sqrt{F_{ii}}}{2\pi c} \quad . \quad (2.32)$$

So werden die  $3N$ -Freiheitsgrade des molekularen Systems berechnet, wobei  $N$  die Anzahl der enthaltenen Atome ist. Die Freiheitsgrade setzen sich zusammen aus der Translation, der Rotation und der Vibration. Dabei entfallen drei Freiheitsgrade auf die Translation<sup>4</sup>. Für lineare Systeme existieren zwei Rotationsfreiheitsgrade bei nicht linearen Systemen drei. Damit bleiben  $3N - 5$  bzw.  $3N - 6$  Vibrationsfreiheitsgrade. Befindet sich die Molekülstruktur in einem echten energetischen Minimum (auf der Potentialenergieebene) so sind diese Vibrationsfreiheitsgrade ausschließlich nicht komplexen Wellenzahlen zugeordnet. Existieren jedoch Vibrationsfreiheitsgrade mit komplexen Zahlen so befindet sich die betrachtete Struktur an einem Sattelpunkt auf der Potentialenergieebene.

## 2.6. Nomenklatur der Normalmoden

In einfachen molekularen Systemen, z.B.  $\text{H}_2\text{O}$  können die Normalmoden in Streckschwingungen und Deformationsschwingungen unterteilt werden. Die Streckschwingungen können weiterhin in symmetrische und asymmetrische Streckschwingungen aufgeteilt werden. Mit zunehmender Komplexität des betrachteten Systems, z.B. in heteroaromatischen Ringsystemen wird diese Unterteilung schnell unübersichtlich und reicht für eine exakte Bestimmung der Normalmode nicht mehr aus. Da in Kapitel 4 die Normalmoden des Heteroaromaten Pyridin und dessen Derivate ausführlich besprochen werden, wird für die Benennung der Normalmoden in dieser Arbeit die Herzberg-Notation [64] verwendet. Pyridin hat eine  $C_2$ -Symmetrieachse, es gehört also der  $C_{2v}$ -Punktgruppe an. Diese Punktgruppe unterteilt sich in vier Symmetrieklassen. Dabei werden die 27 Normalmoden des Pyridins auf diese vier Symmetrieklassen verteilt, in der Anordnung

$$\Gamma_{C_{2v}} = 10A_1 + 3A_2 + 5B_1 + 9B_2 \quad . \quad (2.33)$$

Die  $y$ - und  $z$ -Achse werden hierbei so gewählt, dass sie in der Molekülebene liegen und  $z$  die  $C_2$ -Symmetrieachse einschließt (siehe Abbildung 4.1 in Kapitel 4). Damit verlaufen die Normalmoden der Symmetrieklassen  $A_1$  und  $B_2$  in der Molekülebene (*in-plane*), während die Normalmoden der Symmetrieklassen  $A_2$  und  $B_1$  aus der Molekülebene heraus, in  $x$ -

<sup>4</sup> Gleichzeitige Auslenkung aller Atome in dieselbe Richtung.

Richtung (*out-of-plane*) ablaufen. Die Normalmoden von Pyridin sind in Abbildung 2.2 zusehen.

Der Herzberg-Notation folgend werden zunächst die Normalmoden der  $A_1$ -Symmetrieklassen beginnend bei der höchsten Wellenzahl der Reihe nach mit  $\nu_i$  ( $i = 1 - 10$ ) durchnummeriert. Daran schließen sich die Normalmoden der  $A_2$ -Symmetrieklasse an mit  $\nu_i$  ( $i = 11, 12, 13$ ), ebenfalls beginnend mit der Mode bei der größten Wellenzahl.

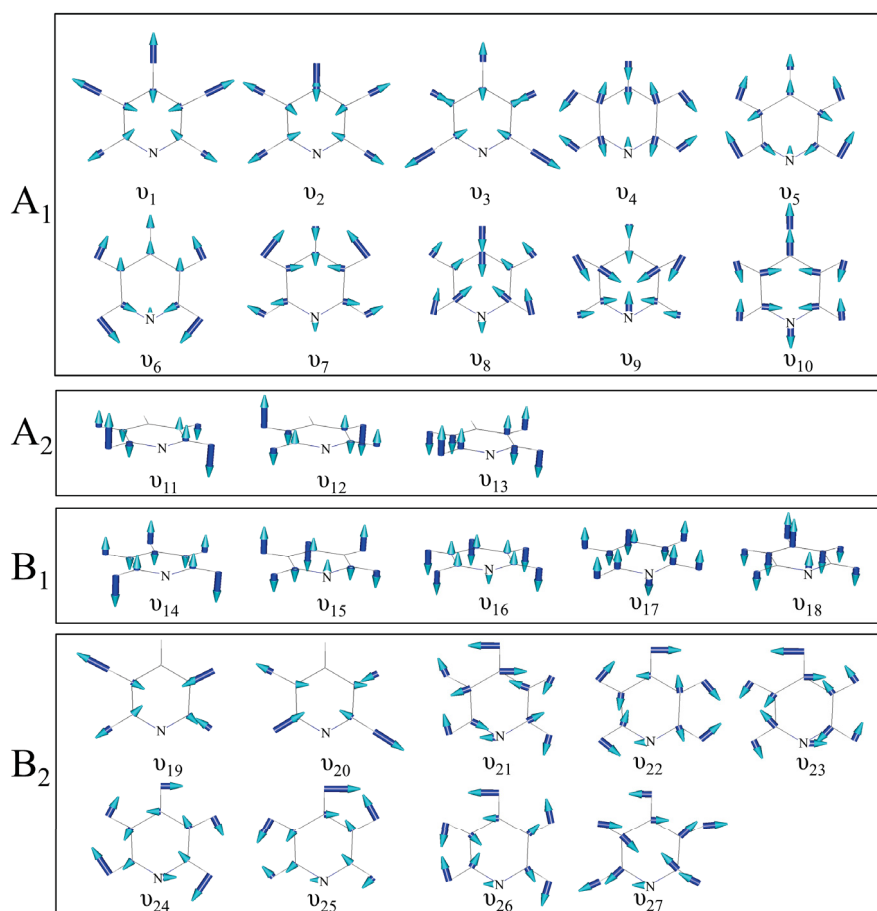


Abbildung 2.2.: Normalmoden von Pyridin mit Bezeichnung nach der Herzberg-Notation.

Es folgen die Normalmoden der  $B_1$ -Symmetrieklasse mit  $\nu_i$  ( $i = 14 - 18$ ), zum Schluss werden die Normalmoden der  $B_2$ -Symmetrieklasse berücksichtigt mit  $\nu_i$  ( $i = 19 - 27$ ), wie zuvor wird dabei jeweils zunächst die Mode mit der größten Wellenzahl betrachtet. Durch diese klare Nummerierung ist die Notation leicht auf die Pyridinderivate übertragbar, auch wenn diese überwiegend nicht der  $C_{2v}$ -Punktgruppe angehören. Bei der Zuordnung der Normalmode der Pyridinderivate werden vorwiegend die Bewegung der Atome des Pyridinrings betrachtet. Bei einer Großzahl der so zugeordneten Normalmoden ist jedoch zu beachten, dass auch Schwingungsbeiträge der funktionellen Gruppe vorhanden

sind. Bei der quantenchemischen Berechnung der Normalmoden werden auch Werte für die Raman-Aktivität jeder Mode erhalten, dabei werden weder die Anregungswellenlänge noch die Intensität der Anregung berücksichtigt. Daher sind die so erhaltenen Werte eher als Richtwert zu betrachten und entsprechen nicht der tatsächlichen Raman-Intensität. Bei der SERS-Spektroskopie ist zusätzlich zu beachten, dass es sich um einen oberflächenabhängigen Prozess handelt. Daher haben sich für die Abschätzung der SERS-Intensität von Normalmoden die Oberflächenauswahlregeln etabliert. Sie werden im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

## 2.7. Oberflächenauswahlregeln der SERS-Spektroskopie

Da SERS ein oberflächenabhängiger Prozess ist, hängt die Verstärkung der Schwingungsmoden direkt mit der Orientierung der Moleküle relativ zur Oberfläche zusammen. Um die Intensität der Verstärkung (Verstärkungsfaktor) zu berechnen gibt es verschiedene Ansätze [65, 66].

Oft wird ein Verstärkungsfaktor für das verwendete SERS-Substrat angegeben, jedoch kann ein Verstärkungsfaktor auch bezugnehmend auf den Analyten bestimmt werden. So gibt es z.B. den analytischen Verstärkungsfaktor (AEF) [65]

$$AEF = \frac{I_{SERS}/c_{SERS}}{I_{RS}/c_{RS}}, \quad (2.34)$$

hierbei sind  $I_{RS}$  und  $I_{SERS}$  die gemessenen Intensitäten im Raman- (RS) bzw. im SERS-Spektrum;  $c_{RS}$  und  $c_{SERS}$  sind die Konzentrationen des Analyten für die Raman- (RS) bzw. SERS-Messung. Der AEF ist für jede im Spektrum enthaltene Schwingungsbande separat zu berechnen, da der Verstärkungsfaktor von der Orientierung der Moleküle relativ zur Metalloberfläche abhängt. Um die zu erwartende Verstärkung der einzelnen Schwingungsbanden abzuschätzen, werden die Oberflächenauswahlregeln [67] verwendet. Sie werden oft zur Vereinfachung reduziert auf die Aussage: Schwingungen senkrecht zur Oberfläche werden intensiv verstärkt, Schwingungen parallel zur Oberfläche werden nicht oder nur wenig verstärkt. Creighton et al. [52] haben in einem vereinfachten Modell die Verstärkungen für die Normalmoden der einzelnen Symmetrieklassen für Pyridin berechnet. Dabei wurden als SERS-Substrat sphärische Partikel mit einem Radius sehr viel kleiner als die Wellenlänge angenommen. Nach einigen mathematischen Umformungen, welche in Ref. [52] bzw. Ref. [68] nachvollzogen werden können, folgt für Pyridin in aufrechter Orientierung zur Oberfläche das Verhältnis  $A_1:A_2:B_1:B_2= 1-16:1:4:4$ . Während für Pyridin in paralleler Orientierung zur Oberfläche das Verhältnis  $A_1:A_2:B_1:B_2= 1-16:4:4:1$  berechnet wird. Die eingangs erwähnte vereinfachte Aussage trifft demzufolge für Pyridin nicht zu. Vielmehr

müssen die Symmetrieklasse, beziehungsweise ihre Raman-Tensorkomponenten getrennt von einander betrachtet werden. In Tabelle 2.1 sind die Raman-Tensorkomponenten angegeben, für das freie Pyridinmolekül sowie für die beiden möglichen Orientierungen, vertikal bzw. parallel zu Metalloberfläche. Wobei die Begriffe vertikal und parallel sich auf die Ausrichtung der  $yz$ -Molekülebene relativ zur Metalloberfläche beziehen.

Berücksichtigt man nur die Schwingungen der  $A_2$ - und  $B_2$ -Symmetrieklassen hält die Aussage: „Schwingungen senkrecht zur Oberfläche werden intensiv verstärkt, Schwingungen parallel zur Oberfläche werden nicht oder nur wenig verstärkt“ stand. Für Moleküle welche über das Stickstoffatom an die Oberfläche gebunden sind liegen die  $x$ - und  $y$ -Achsen parallel zur Oberfläche, das heißt  $\alpha_{12} = \alpha_{xy}$ . Damit werden die  $A_2$ -Schwingungsmoden am wenigsten verstärkt. Während in paralleler Orientierung der Molekülebene zur Oberfläche  $\alpha_{12} = \alpha_{yz}$  gilt und somit die  $B_2$ -Schwingungsmoden am wenigsten verstärkt werden.

Tabelle 2.1.: Die Symmetrieklassen der Schwingungsmoden für Moleküle der  $C_{2v}$ -Punktgruppe mit den zugehörigen Raman-Tensorkomponenten.

Symmetrieklassen ( $C_{2v}$ )	Raman-Tensorkomponenten		
	Molekülachsen	vertikal	parallel
$A_1$	$\alpha_{xx}, \alpha_{yy}, \alpha_{zz}$	$\alpha_{11}, \alpha_{22}, \alpha_{33}$	$\alpha_{11}, \alpha_{22}, \alpha_{33}$
$A_2$	$\alpha_{xy}$	$\alpha_{12}$	$\alpha_{23}$
$B_1$	$\alpha_{xz}$	$\alpha_{13}$	$\alpha_{13}$
$B_2$	$\alpha_{yz}$	$\alpha_{23}$	$\alpha_{12}$

Weiterhin ergibt sich für Normalmoden der  $A_1$ -Symmetrieklasse, dass sie umso stärker verstärkt werden um so größer der  $\alpha_{33}$  Anteil<sup>5</sup> der Atombewegungen ist. Haben Atombewegungen, welche nahe der Oberfläche stattfinden, einen großen  $\alpha_{33}$  Anteil<sup>6</sup> so kommt es zu zusätzlichen Verstärkungen.

In diesem Kapitel wurden die theoretischen Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Methoden erklärt. Im nächsten Kapitel werden die verwendeten Materialien sowie die Messapparaturen beschrieben. Weiterhin werden Probenvorbereitungen und Analyseverfahren zur Auswertung der SERS-Spektren erklärt.

<sup>5</sup>  $\alpha_{33}$  bezeichnet die Raman-Tensorkomponente die senkrecht auf der Oberfläche steht.

<sup>6</sup> Die Bewegung des Atoms erfolgt dann orthogonal zur Oberfläche.

## 3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden alle verwendeten Chemikalien angegeben. Es werden die Herstellungen der Nanopartikel sowie die Probenvorbereitung der verwendeten Bakterien beschrieben. Anschließend werden die verwendeten Messapparaturen sowie der LOC-SERS-Aufbau erklärt. Abschließend wird die Bearbeitung der Spektren dargestellt und die verwendeten chemometrischen Methoden werden kurz eingeführt.

### 3.1. Chemikalien und Probenvorbereitung

Die im Kapitel 4 verwendeten Pyridinderivate wurden kommerziell erworben und wie erhalten ohne weitere Reinigung verwendet. Der Antimetabolit Methotrexat wurde ebenfalls wie erhalten eingesetzt. Das Gleiche gilt auch für die Salze, welche zur Herstellung des artifiziellen Blutplasmas, nach dem Protokoll von Kokubo et al. [69], verwendet wurden. Das reale Blutplasma wurde kommerziell vom Universitätsklinikum Jena<sup>1</sup> erworben. Die zur Herstellung der Silbernanopartikel (AgNPs) verwendeten Substanzen wurden ohne weitere Reinigungsschritte verwendet. Eine Beschreibung der Synthese der AgNPs folgt im nächsten Abschnitt. Für die Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Verdünnungen wurde destilliertes Wasser eingesetzt. Die Konzentration von Pyridin und den Pyridinderivaten bei den SERS-Experimenten in Kapitel 4 ist für alle Substanzen  $c = 1$  mM.

#### 3.1.1. Herstellung der Silbernanopartikel

##### Citrat-reduzierte Silbernanopartikel: c-AgNPs

Die Citrat-reduzierten Silbernanopartikel (c-AgNPs) werden nach dem Protokoll von Lee und Meisel [70] hergestellt. Es werden 500 ml einer 1 mM Silbernitrat-Lösung zum Sieden gebracht, bevor 10 ml einer 1% Natriumcitrat-Lösung tropfenweise zugegeben werden. Anschließend wird die Lösung eine Stunde konstant bei 100 °C gehalten. Die Aktivierung der Citrat-umschlossenen AgNPs erfolgt, wenn nötig, durch Zugabe einer 1 M Kaliumchlorid-Lösung. Die entstandenen c-AgNPs haben in der Regel einen Durchmesser von 50-100 nm.

---

<sup>1</sup> Universitätsklinikum Jena, Institut für Transfusionsmedizin, Erlanger Allee 101, 07747 Jena, Deutschland.

Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM) von c-AgNPs, welche nach demselben Protokoll synthetisiert wurden, findet sich in Ref. [5]. Die so synthetisierten c-AgNPs werden für die Untersuchungen der Einflussfaktoren auf SERS-Spektren in Kapitel 4 eingesetzt sowie für die SERS-Messungen von MTX in basischer Pufferlösung in Kapitel 5.

### Hydroxylamin-reduzierte Silbernanopartikel: h-AgNPs

Für die Herstellung der Hydroxylamin-reduzierten Silbernanopartikel (h-AgNPs) wird nach dem Protokoll von Leopold und Lendl [71] vorgegangen. 10 ml einer 0,1 mM Silbernitrat-Lösung werden unter intensivem Rühren zu 90 ml einer Mischung aus Hydroxylaminhydrochlorid (0,15 mM) und Natriumhydroxid (0,3 mM) gegeben. Das Reaktionsgemisch färbt sich dabei instantan grau-gelb. Die Mischung wird im Anschluss weitere 10 Minuten unter Rühren gehalten. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von h-AgNPs, welche nach demselben Protokoll hergestellt wurden, sind in Ref. [71] zu finden. Die erhaltenen h-AgNPs werden für die SERS-Messungen der Pyridinderivate in Kapitel 4 sowie für die Untersuchungen von MTX in artifiziellem und realem Blutplasma in Kapitel 5 eingesetzt. Weiterhin werden sie auch als SERS-Substrat für die Identifizierung der Mykobakterien in Kapitel 6 verwendet.

#### 3.1.2. Kultivierung und Probenvorbereitung der Mykobakterien

Die Mykobakterien für die SERS-Experimente in Kapitel 6 werden im Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien in Borstel<sup>2</sup> kultiviert. Hierbei erfolgt eine Vor-kultivierung der Mykobakterien in Loewenstein-Jensen-Medium. Im Anschluss wird eine Kultivierung in solidem Middelbrook-Medium durchgeführt. Nach einer Kultivierungszeit von fünf bis acht Wochen werden neun Kultivierungsansätze jedes Stamms für die Herstellung der drei distinkten Proben verwendet (drei Kultivierungsansätze pro Probe). Um ein sicheres Arbeiten im SERS-Laboratorium (S1) zu gewährleisten, werden die Mykobakterien durch thermische Behandlung der Probe bei 99 °C für 15 Minuten inaktiviert. Ein entsprechendes Gutachten ist im Anhang A zu finden. Dabei werden die Mykobakterien abgetötet, aber ihre Zellmembran bleibt intakt. Die so präparierten Proben werden im Anschluss bei einer Transporttemperatur von 4 °C nach Jena versandt. Hier werden die Proben dreifach mit Tris-EDTA-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 1,5 ml Tris-EDTA-Pufferlösung resuspendiert. So wird sichergestellt, dass sich keine Reste des Kultivierungsmediums in der Probe befinden. Nun wird die Probe im *bead-beating*-Modul (entwickelt von Alere Tech-

---

<sup>2</sup> Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel, Parkallee 1-40, 23845 Borstel, Deutschland.

nologies<sup>3</sup>) mechanisch lysiert. Anschließend können die SERS-Messungen der Bakterien-suspension direkt im LOC-SERS-Aufbau durchgeführt oder die Mykobakteriensuspension kann in einem Probengefäß bei -80 °C bis zur SERS-Messung zwischengelagert werden. Weitere Details zu dem *bead-beating*-Modul sind in Abschnitt 3.4 aufgeführt.

### 3.2. UV/Vis-Absorptions-Spektroskopie

Für die Messungen der UV/Vis-Absorptions-Spektren kommen zwei verschiedene Geräte zum Einsatz. Für die Untersuchungen der Pyridinderivate in Kapitel 4 wird das Cary5000-UV-Vis-NIR-Spektralphotometer der Firma Varian<sup>4</sup> verwendet. Die Absorptions-Spektren werden in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 700 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 100 nm pro Sekunde gemessen. Für die Messung der UV/Vis-Absorptions-Spektren in Kapitel 5 wird ein V650-Spektralphotometer der Firma Jasco<sup>5</sup> eingesetzt. Die Absorptions-Spektren werden über einen Wellenlängenbereich von 230 bis 850 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 100 nm pro Sekunde gemessen. Für alle Absorptions-Spektren sind die angegebenen Absorbanzen normiert auf das Absorptionsmaximum der Kolloid-Lösung.

### 3.3. Raman- und SERS-Spektroskopie

Für die Raman- und SERS-Messungen der Pyridinderivate in Kapitel 4 sowie für die SERS-Messungen der Mykobakteriensuspension in Kapitel 6 und die SERS-Messungen von MTX in Blutplasma (artifizial und real) in Kapitel 5 kommt ein konfokales Raman-Mikroskop der Firma WITec<sup>6</sup> zum Einsatz. Die Anregungsquelle ist ein *continuous-wave diode-pumped solid-state* Laser (Fandango) der Firma Cobolt<sup>7</sup> mit einer Laserwellenlänge von 514 nm und einer maximalen Leistung von 100 mW. Die Leistung auf der Probe beträgt etwa 30 mW. Die Raman-Spektren der Pyridinderivate werden in wässriger Lösung oder an der reinen flüssigen Substanz gemessen. Die resultierenden Raman-Spektren werden über 100 Akkumulationen gemittelt mit je einer Sekunde Integrationszeit. Die Messungen werden in Quarzküvetten durchgeführt. Es wird ein Objektiv mit 10-facher Vergrößerung verwendet (Zeiss<sup>8</sup> EC Epiplan, 10×, NA: 0,25). Die LOC-SERS-Messungen werden unter Verwendung eines 20-fachen Vergrößerungsobjektiv durchgeführt (Zeiss EC Epiplan, 20×, NA: 0,4).

Die Raman-Messung des MTX-Pulvers in Kapitel 5 wird ebenfalls an einem konfokalen

<sup>3</sup> Alere Technologies GmbH, Löbstedter Straße 103-105, 07743 Jena, Deutschland.

<sup>4</sup> Agilent Technologies, Hewlett-Packard-Str. 8, 76337 Waldbronn, Deutschland.

<sup>5</sup> Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Robert-Bosch-Straße 11, 64823 Groß-Umstadt, Deutschland.

<sup>6</sup> WITec Wissenschaftliche Instrumente und Technologie GmbH, Lise-Meitner-Str. 6, 89081 Ulm, Deutschland.

<sup>7</sup> Cobolt AB, Vretenvägen 13, 171 54 Solna, Schweden.

<sup>8</sup> Carl Zeiss Microscopy GmbH, Carl-Zeiss-Straße 56, 73447 Oberkochen, Deutschland.



Raman-Mikroskop der Firma WITec realisiert. In diesem Fall kommt ein Dioden-Laser der Firma ThorLabs<sup>9</sup> mit einer Anregungswellenlänge von 785 nm zum Einsatz. Die Laserleistung auf der Probe beträgt etwa 80 mW. Gemessen werden Raman-Spektren mit einer Integrationszeit von fünf Sekunden, ein Mittelwert-Spektrum wird aus zehn Spektren gebildet. Für die Messungen wird ein Objektiv mit 50-facher Vergrößerung verwendet (Zeiss EC Epiplan, 50×, NA: 0,95).

Die LOC-SERS Messungen von MTX in basischer Pufferlösung in Kapitel 5 werden an einem HR 800 LabRam Spektrometer der Firma Horiba Jobin-Yvon<sup>10</sup> durchgeführt. Als Anregungsquelle wird ein frequenz-verdoppelter Nd:YAG Laser verwendet, mit einer Wellenlänge von 532 nm. Die Laserleistung auf der Probe beträgt etwa 10 mW. Für die Fokussierung des Laserstrahls in den mikrofluidischen Kanal wird ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung eingesetzt (Nikon<sup>11</sup>, 20×, NA: 0,4).

Für die Raman-Messung der inaktivierten Mykobakterien wird ein konfokales Raman-Mikroskop (BioParticleExplorer - BPE) der Firma rap.ID<sup>12</sup> angewandt. Dieses Gerät ermöglicht die automatisierte Messung von einzelnen Zellen mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm. Der Laser ist hierbei ein frequenz-verdoppelter Nd:YAG Laser der Firma Laser-export<sup>13</sup>. Die Laserleistung auf der Probe beträgt etwa 7 mW. Für die Fokussierung des Laserstrahls wird ein Objektiv mit 100-facher Vergrößerung (Olympus<sup>14</sup> MPLFLN BD 100×, NA: 0,9) eingesetzt.

Das für die SERS-Messungen verwendete mikrofluidische Chip-System wird im nächsten Abschnitt detailliert beschrieben.

### 3.4. Mikrofluidischer *Lab-on-a-chip* (LOC)-SERS-Aufbau

Der Anwendung der SERS-Methode als qualitatives Analyseverfahren wurde in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit gewidmet. Dies lässt sich anhand der großen Zahl von wissenschaftlichen Veröffentlichungen bemessen [5]. Quantitative SERS-Untersuchungen lassen sich jedoch nur wenige in der Literatur finden [12, 72–74]. Die quantitativen Untersuchungen in den angegebenen Referenzen basieren auf einem mikrofluidischen Versuchsaufbau. Die Verwendung eines solchen *Lab-on-a-chip* (LOC)-SERS-Aufbaus birgt verschiedene Vorteile, die eine quantitative Detektion mit Hilfe von SERS erst möglich machen. Ein bekanntes Problem in der Anwendung der SERS-Spektroskopie in quantitativen Analysen

<sup>9</sup> Thorlabs GmbH, Hans-Boeckler-Str. 6, 85221 Dachau/München, Deutschland

<sup>10</sup> HORIBA Jobin Yvon GmbH, Neuhofstrasse 9, 64625 Bensheim, Deutschland.

<sup>11</sup> Nikon GmbH Geschäftsbereich Mikroskope, Tiefenbroicher Weg 25, 40472 Düsseldorf, Deutschland.

<sup>12</sup> rap.ID Particle Systems GmbH, Köpenicker Str. 325 Haus 11/12, 12555 Berlin, Deutschland.

<sup>13</sup> Laser-compact group Laser-export Co.LTD, Vvedensky St. 3, 117342 Moskau, Russland.

<sup>14</sup> Olympus Deutschland GmbH, Wendenstraße 14- 18, 20097 Hamburg, Deutschland.

stellen die Signalfuktuationen dar [10, 11]. Ein zweites Problem ist die geringe Reproduzierbarkeit der SERS-Spektren [12, 73, 75]. Durch die Verwendung des LOC-SERS-Aufbaus ist es möglich, eine große Menge an SERS-Spektren mit wenig Zeitaufwand zu messen. Dabei ist das erforderliche Probenvolumen sehr gering. Des Weiteren erlaubt die Verwendung des LOC-SERS-Aufbaus eine strikte Definition der Messparameter (wie z.B. Probenvolumen, Fokussierung und Inkubationszeit des Kolloids mit dem Analyten und vorhandenen Zusätzen). Gleichzeitig ist es durch die Verwendung von verschiedenen Fluidmanipulationseinheiten möglich, Reaktionen direkt im Versuchsaufbau durchzuführen. In diesem Abschnitt wird das LOC-SERS-System, welches für die vorliegende Arbeit verwendet wird, kurz beschrieben. Dabei wird auch auf das integrierte Probenvorbereitungs-Modul für die Mykobakterien (in Kapitel 6) eingegangen.

Eine schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Chip-Designs ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Chip besteht aus einem Eingang für das Separationsmedium, einer Tropfengenerator-Einheit (DG), einer Dosiereinheit (DU) und dem Ausgang. Innerhalb der DG stehen drei Zugänge für die gleichzeitige Zugabe verschiedener Substanzen zur Verfügung. Die DU beinhaltet zwei Zugänge. Durch die Mäander-Strukturen im oberen Bereich des Chips wird eine ausreichende Durchmischung der eingetragenen Substanzen sichergestellt [76]. Über den Zugang für das Separationsmedium wird Mineralöl oder Tetradekan injiziert. Am Zugang des DG zum Hauptkanal entstehen gleichmäßige wässrige Tropfen im Separationsmedium. Über die DU ist es möglich nach einem ersten Durchmischen der im Tropfen bereits vorhandenen Substanzen weitere Chemikalien in den Tropfen zuzuführen. Hierbei ist durch den kontinuierlichen Fluss ein gleichmäßiger Eintrag in jeden Tropfen gewährleistet [77]. Im unteren Teil des Chips befindet sich ein langer Kanal, in dem die SERS-Spektren je nach benötigter Reaktionszeit an unterschiedlichen Positionen gemessen werden können.

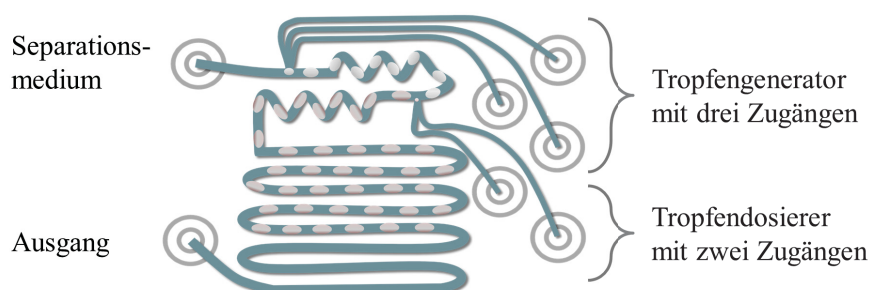


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung des verwendeten Chip-Designs. Der Chip besteht aus einem Eingang für das Separationsmedium, einer Tropfengenerator-Einheit (DG), einer Dosiereinheit (DU) und dem Ausgang.

Die Chips werden vollständig aus Glas hergestellt. In einem Zwei-Schritt-Ätzverfahren werden in zwei Glashälften Halbkanäle generiert. Die beiden Glashälften werden über einen anodischen Bindungsprozess mit Hilfe einer Siliziumschicht verbunden. Der Hauptkanal des Chips hat eine Tiefe von  $260\ \mu\text{m}$  und eine Weite von  $560\ \mu\text{m}$ . Die Kanaloberflächen werden mit Octadecyltrichlorosilan (ODTS) funktionalisiert, um Kontaminationen durch die im Tropfen enthaltenen Substanzen zu verhindern. So können Memory-Effekte [78] weitestgehend umgangen werden.

Standardmäßig wird der Chip mit Mineralöl oder Tetradekan als Separationsmedium betrieben. In der DG werden die wässrigen Analytlösungen und eventuell Pufferlösungen eingetragen, so dass ein Tropfen entsteht [22]. An der DU werden Kolloid und KCl-Lösung (falls verwendet) in den Tropfen injiziert. Der Messpunkt wird je nach optimaler Signalintensität angepasst. Die Flussraten betragen in der Regel  $11\ \frac{\text{nl}}{\text{s}}$  für das Separationsmedium,  $14\ \frac{\text{nl}}{\text{s}}$  Gesamtflussrate für den DG und  $11\ \frac{\text{nl}}{\text{s}}$  Gesamtflussrate für die DU.

Die genannten Flussraten werden erreicht, indem ein computergesteuertes Spritzen-Pumpen-System (neMESYS) der Firma Cetoni<sup>15</sup> eingesetzt wird. Somit ist eine konstante, pulsationsfreie Flussrate gewährleistet. Die verwendeten Substanzen werden in Glasspritzen gefüllt (Füllvolumen:  $100\ \mu\text{l}$  bis  $2,5\ \text{ml}$ ) und anschließend auf das Spritzen-Pumpen-System montiert. Durch die Möglichkeit sowohl positive als auch negative Flussraten zu erzeugen, können die Spritzen auch durch das Spritzen-Pumpen-System computergesteuert befüllt werden. Diese Eigenschaft wird bei den Experimenten mit der Mykobakteriensuspension (siehe Kapitel 6) genutzt.

Für die SERS-Messungen in Blutplasma in Kapitel 5 Abschnitt 5.4 wird die Kolloid-Lösung über den DG eingebracht und das Blutplasma über die DU. So wird eine kürzere Verweildauer des Blutplasmas im Hauptkanal erreicht. Die Flussraten werden hierfür angepasst. Das Kolloid hat eine Flussrate von  $17\ \text{nl/s}$ ; das Blutplasma wird mit einer Flussrate von  $7\ \text{nl/s}$  über die DU injiziert.

Für die Messungen der Mykobakterien in Kapitel 6 wird eine Einheit zur Vorbehandlung der Proben vor dem Chip integriert. Bei dieser Einheit handelt es sich um ein *bead-beating*-Modul der Firma Alere. Das Modul besteht aus einer spezialisierten Kugelmühle für die Zerstörung der Zellwand der Mykobakterien. Eine schematische Darstellung dieses *bead-beating*-Moduls und seiner Integration in das LOC-SERS-System ist in Abbildung 3.2 wiedergegeben.

---

<sup>15</sup> Cetoni GmbH, Gewerbegebiet Korbwiesen, Wiesenring 6, 07554 Korbußen, Deutschland.

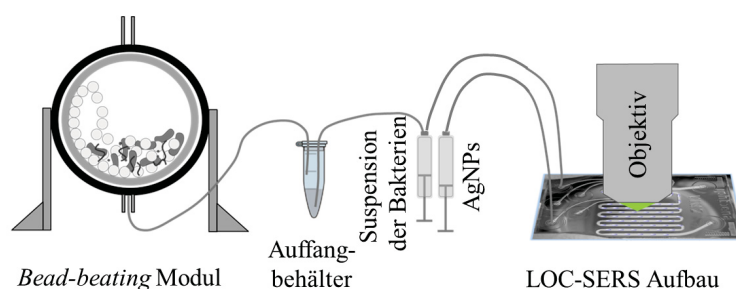


Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung des *bead-beating*-Moduls in Kombination mit dem LOC-SERS-Aufbau. Dieses Modul wird für die Zerstörung der Zellwand der Mykobakterien eingesetzt.

Die vorbereitete Probe (siehe Abschnitt 3.1.2) wird in das *bead-beating*-Modul importiert, mit Hilfe von Glaskugeln (Durchmesser  $106\ \mu\text{m}$ ) werden die Zellwände der Bakterien in einem Mahlprozess zerstört. Das erhaltene Probenvolumen der Bakteriensuspension beträgt  $600\ \mu\text{l}$ . Anschließend können die SERS-Messungen der Suspension direkt im LOC-SERS-Aufbau durchgeführt oder die Mykobakteriensuspension kann in einem Probengefäß bei  $-80\ \text{°C}$  bis zur SERS-Messung zwischengelagert werden. Weitere Details zu dem *bead-beating*-Modul und der Implementierung des Moduls in das LOC-SERS-System sind in Abschnitt 3.1.2 sowie Kapitel 6 aufgeführt.

### 3.5. Spektren-Vorbehandlung

In diesem Abschnitt wird die Vorbehandlung der Raman- und SERS-Datensätze beschrieben. Die Umsetzung der Vorbehandlung erfolgt mit der Programmiersprache „GNU R“, welche als *open source* Statistiksoftware des GNU-Projekts [79] erhältlich ist. In einem ersten Schritt wird für alle erhaltenen Spektren eine Untergrundkorrektur durchgeführt. Hierfür wird der SNIP-Algorithmus [80] verwendet. Im Anschluss kommt eine robuste Variante des *upper-bound*-Spektrum-Algorithmus [81] für die Entfernung kosmischer Spikes zum Einsatz. Im Falle der Raman-Messungen wird eine Wellenzahlkalibration mit dem Raman-Spektrum von Acetaminophenol als Standard realisiert. Für die Raman-Spektren wird weiterhin eine Vektornormierung durchgeführt, bevor die Mittelwertspektren gebildet werden. Der spektrale Bereich wird auf den relevanten Wellenzahlbereich ( $3300\ \text{cm}^{-1}$  bzw.  $1750\ \text{cm}^{-1}$  bis  $500\ \text{cm}^{-1}$ ) reduziert und eine Interpolation der Wellenzahlen wird durchgeführt.

Die Datensätze, welche aus den LOC-SERS-Messungen erhalten werden, beinhalten sowohl reine SERS-Spektren der Analyttropfen als auch Raman-Spektren des Trägermediums und

Mischspektren aus SERS- und Raman-Signalen. Daher erfolgt zunächst eine Reduktion und Interpolation der Wellenzahlen, anschließend werden die SERS- und Raman-Spektren separiert und die Mischspektren aus dem Datensatz entfernt. Darauf folgend wird eine online Wellenzahlkalibration anhand der Raman-Spektren des Trägermediums (Tetradekan bzw. Mineralöl) [75,82] realisiert. Die SERS-Spektren welche in Kapitel 4 und Kapitel 6 im Fokus stehen, werden anhand der jeweiligen Referenzbanden normiert. Da in Kapitel 5 eine quantitative Analyse durchgeführt wird, werden die SERS-Spektren hier nicht normiert.

### 3.6. Anpassen einer Lorentzfunktion für Schwingungsbanden

Um eine akkurate Zuordnung der Raman- und SERS-Banden zu den verursachenden Schwingungsmoden (erhalten aus quantenchemischen Rechnungen) zu erreichen, ist es essentiell, die genaue Lage einer Bande bestimmen zu können. Häufig überlappen aber die Banden der Schwingungssignale und somit ist eine genaue Bestimmung des Maximums der Bande aus dem gemessenen Spektrum direkt nicht möglich. Daher werden den erwarteten Banden Lorentzfunktionen angepasst, um so die exakte Wellenzahl des Bandenmaximums zu ermitteln. Für die Anpassung der Lorentzfunktion wird in dieser Arbeit das Programm Origin9G (OriginLab, Northampton, MA) verwendet. Die Anpassungsfunktion hat die Form

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \cdot \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2} \quad . \quad (3.1)$$

Die Parameter  $A$  (Fläche der Funktion),  $w$  (Halbwertsbreite),  $x_c$  (Maximum der Funktion) und  $y_0$  (Verschiebung der Funktion auf der Ordinate) werden dabei so variiert, dass die angepasste Funktion mit der Schwingungsbande bestmöglich übereinstimmt. Mit Hilfe dieser Methode können überlagerte Schwingungsbanden separiert und die Bandenmaxima genau benannt werden. Dies wird bei der Beschreibung der Schwingungsspektren und der Diskussion in Kapitel 4 angewandt. Bei der quantitativen Analyse in Kapitel 5 werden ebenfalls Lorentzfunktionen für bestimmte Banden angepasst, um die integrierte Fläche der Bande bzw. der angepassten Lorentzfunktion zu erhalten. So kann der Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der Konzentration erfasst werden.

### 3.7. Chemometrische Methoden

Für die Identifizierung der Mykobakterien in Kapitel 6 werden verschiedene chemometrische Methoden angewandt. Der Begriff Chemometrie umfasst die Anwendung statistischer und mathematischer Methoden zur Analyse chemischer Daten. Datensätze, in denen sich

die Spektren unterschiedlicher Analyten untereinander sehr ähneln, können ohne die Anwendung von chemometrischen Methoden meist nicht ausgewertet werden. Die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden Hauptkomponentenanalyse (PCA) und Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) werden im Folgenden erklärt.

### Hauptkomponentenanalyse: PCA

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis* - PCA) wird zur Reduktion der Dimensionen des Datensatzes eingesetzt. Der Datensatz wird in ein bilineares Modell von linear unabhängigen Variablen (*principal components* - PCs) zerlegt [83]. Der Algorithmus der verwendeten PCA sucht zunächst den Vektor, welcher die meisten Unterschiede des Datensatzes am besten beschreibt. Dabei wird jedes Spektrum auf diesen Vektor (*loading vector*) projiziert. Der Hauptkomponentenwert (*score*) ist die Projektion des Probenvektors auf den *loading vector*. Das Produkt des *loading vectors* und des *scores* ist per Definition die erste Hauptkomponente (PC). Sie beschreibt das Maximum an Varianz des Datensatzes. Die zweite Hauptkomponente beschreibt dementsprechend die zweitgrößte Varianz und so weiter. Mathematisch lässt sich dies als Matrixgleichung beschreiben

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{L}^T + \mathbf{E} \quad , \quad (3.2)$$

dabei ist  $\mathbf{X}$  die Datenmatrix mit  $n$  Zeilen (Anzahl der Spektren) und  $p$  Spalten (Anzahl der Punkte jedes Spektrums).  $\mathbf{T}$  ist die Matrix der *scores* mit  $n$  Zeilen und  $d$  Spalten (Anzahl der PCs) und  $\mathbf{L}^T$  ist die transponierte Matrix der *loadings* mit  $d$  Zeilen und  $p$  Spalten. Die Matrix  $\mathbf{E}$  enthält die verbleibenden Variationen, welche nicht durch die PCs erfasst werden. Daher hat  $\mathbf{E}$  dieselben Dimensionen wie  $\mathbf{X}$ . Durch die Reduktion der Dimensionen  $p$  auf die Anzahl  $d$  der PCs lässt sich ein *overfitting* vermeiden [84]. Das heißt, die Möglichkeit, dass nach Artefakten klassifiziert wird, wird reduziert.

### Lineare Diskriminanzanalyse: LDA

Die LDA gehört im Gegensatz zu der PCA zu den überwachten chemometrischen Verfahren. Das heißt, die Klassenzugehörigkeit wird berücksichtigt, indem ein Modell anhand von bekannten Proben erstellt wird. Anschließend kann dieses Modell für eine Identifizierung von unbekanntem Proben genutzt werden. Die LDA [85] berechnet die Trennebene so, dass die Varianz zwischen den zu trennenden Klassen maximal wird, während sie innerhalb der Klassen minimal wird. Wird eine Datenmatrix  $\mathbf{X}$  mit  $n$  Objekten und  $g$  Klassen betrachtet, so werden die Gewichte der linearen Diskriminanzfunktion als Eigenvektoren der Matrixgleichung

$$\mathbf{G}^{-1}\mathbf{H}\mathbf{w} = \varsigma\mathbf{w} \quad , \quad (3.3)$$

mit  $\varsigma$  Eigenwerten dargestellt. Die Matrix  $\mathbf{G}$  ergibt sich aus der Kovarianzmatrix  $\mathbf{C}$  der verschiedenen Klassen  $g$

$$\mathbf{C}_j = \frac{1}{n_j - 1} \sum_{l \in g_j} (x_{li} - \bar{x}_{ji})(x_{lk} - \bar{x}_{jk}) \quad (3.4)$$

$$\mathbf{G} = (n - g) \frac{1}{n - g} \sum_{j=1}^g (n_j - 1) \mathbf{C}_j \quad . \quad (3.5)$$

Dabei ist  $n_j$  die Anzahl der Elemente in der Gruppe  $j$ ;  $l$  ist ein Element der  $j$ ten Gruppe  $g_j$ ;  $x_{li}$  und  $x_{lk}$  sind dementsprechend Objekte der Gruppe  $g_j$ ;  $\bar{x}_{ji}$  und  $\bar{x}_{jk}$  sind Mittelwerte. Die Matrix  $\mathbf{H}$  in Gleichung 3.3 beschreibt die Varianz der Gruppenmittelwerte  $\bar{x}_j$  und den Gesamtmittelwert  $\bar{x}$

$$\mathbf{H} = \sum_{j=1}^g (\bar{x}_j - \bar{x})(\bar{x}_j - \bar{x})^T \quad , \quad (3.6)$$

dabei berechnet sich  $\bar{x}$  über

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n n_j \bar{x}_j \quad . \quad (3.7)$$

Der Eigenvektor  $\mathbf{w}_1$  [vgl. Gleichung (3.3)] auf der Basis des größten Eigenwertes  $\varsigma_1$  liefert die erste lineare Diskriminanzfunktion  $LD_1$ . Mit den Residualwerten der Datenmatrix  $\mathbf{X}$  ist  $\varsigma_2$  der zweitgrößte Eigenwert. Damit kann mit dem neuen Eigenvektor  $\mathbf{w}_2$  die zweite Diskriminanzfunktion  $LD_2$  berechnet werden [86]. Das Verfahren wird fortgesetzt, bis eine Lösung des Klassifizierungsproblems erreicht wird. Durch das Auftragen der Diskriminanzfunktionen gegeneinander kann die Trennung visualisiert werden.

### 3.8. Quantenchemische Rechnungen

Um die Schwingungsmoden von Pyridin und den Pyridinderivaten in Kapitel 4 zu berechnen wird das Programm GAUSSIAN09 [87] verwendet. Die Startstrukturen der Moleküle werden in Molden [88] erstellt. Zunächst wird eine Strukturoptimierung durchgeführt. Hierbei wird die Startstruktur auf ein energetisches Minimum auf der Potentialenergieebene optimiert. Die Rechnungen werden auf dem Level der Møller-Plesset-Störungstheorie zwei-

ter Ordnung (MP2) (vgl. Abschnitt 2.4.2), in Kombination mit dem Basissatz 6-311++G\*\* (vgl. Abschnitt 2.4.3) realisiert.

Im Anschluss wird unter Anwendung einer Frequenzrechnung geprüft, ob die optimierte Struktur in einem echten lokalen Minimum der Potentialenergieebene liegt oder es sich um einen Sattelpunkt handelt. Hierbei wird ebenfalls die MP2 in Kombination mit dem 6-311++G\*\* Basissatz verwendet. Ist gesichert, dass es sich bei der optimierten Struktur um ein echtes lokales Minimum handelt so werden die Raman-aktiven Frequenzen auf MP2/6-311++G\*\*-Level berechnet.

Mit Hilfe der graphischen Benutzeroberfläche Gabedit [89] für theoretische Chemie werden die optimierten Strukturen sowie die Atombewegungen der Normalmoden graphisch dargestellt.

Nachdem in diesem Kapitel die Grundlagen der vorliegenden Arbeit besprochen wurden, folgt nun der Ergebnisteil dieser Arbeit. In Kapitel 4 werden mittels quantenchemischer Methoden die Normalmoden von Pyridin und den untersuchten Pyridinderivaten berechnet. Raman- und SERS-Spektren werden mit c-AgNPs sowie h-AgNPs gemessen und die erhaltenen Daten werden auf die Einflussfaktoren auf die SERS-Spektren geprüft.



## 4. Untersuchung von Einflussfaktoren auf SERS-Spektren

Um SERS als Methode in der analytischen Anwendung zu etablieren, ist es von großer Bedeutung, die Einflussfaktoren auf die spektralen Informationen genau bestimmen zu können. Das heißt, es muss bekannt sein, wie die zu analysierende Substanz mit dem verwendeten SERS-Substrat in Wechselwirkung tritt. Weiterhin gilt es zu klären, welchen Einfluss vorhandene funktionelle Gruppen und ihre Substitutionsposition auf das SERS-Spektrum haben. Nur so ist es möglich, diese Faktoren bewusst zu manipulieren und so potentielle Anwendungen wie Marker- oder Sensor-Moleküle zu erschließen.

In den folgenden Abschnitten werden Einflüsse der verwendeten AgNPs sowie der Substitutionsposition und der Art der funktionellen Gruppe auf SERS-Signale untersucht. Hierfür werden Pyridin und monosubstituierte Derivate von Pyridin als Analyten verwendet. Pyridin ist seit der Entdeckung des SERS-Effekts weitreichend SERS-spektroskopisch untersucht worden. Nachdem Fleischmann et al. [90] 1974 zum ersten Mal den SERS-Effekt bei Raman-Messungen von Pyridin an Silberelektronen beschrieben, folgten viele weiterführende Studien. Dabei wurden Metall-Pyridin-Komplexe sowohl experimentell als auch quantenchemisch untersucht. Verschiedene Aspekte, wie der Einfluss des Elektrospotentials auf SERS-Signale [26], die Orientierung zur Metalloberfläche [27], die Beeinflussung der SERS-Spektren durch Ionen [28] und weitere Faktoren, wie der Charge-Transfer-Effekt [29, 30] und die Verwendung verschiedener Metalle als SERS-Substrat [31] wurden untersucht.

Es besteht ein großes Interesse an substituierten Pyridinderivaten, da diese Bestandteil vieler biologisch und medizinisch relevanter Substanzen sind. Mittels SERS wurden bereits mehrere Studien an substituiertem Pyridin realisiert. Verschiedene Pyridinderivate, wie z.B. *para*-Cyanopyridin [32], *para*-, *meta*- und *ortho*-Picolin [33], *ortho*-Cyanopyridin und *ortho*-Picolylamin [34] oder Isomere der Pyridincarboxylsäure [35] wurden untersucht, zum Teil unter Berücksichtigung der Substitutionsposition [36, 37].

In dem vorliegenden Kapitel sollen die Einflüsse der verwendeten AgNPs sowie der Substitutionsposition und der Art der funktionellen Gruppe auf die erhaltenen SERS-Signale analysiert werden. Pyridin und monosubstituierte Pyridinderivate werden dabei als Modellmoleküle verwendet. Diese Substanzen eignen sich hervorragend als Analyten für Grundlagenstudien [12]. Ihre Schwingungsspektren sind sehr übersichtlich, da es nur wenige Schwingungsüberlagerungen gibt. Weiterhin handelt es sich um verhältnismäßig kleine Moleküle.

Dies ermöglicht eine valide Auswertung der experimentellen Ergebnisse mit Hilfe quantenchemischer Berechnungen.

Um die erhaltenen Raman- und SERS-Spektren auf Unterschiede in Bandenposition und Signalintensitäten untersuchen und die festgestellten Differenzen anschließend sinnvoll interpretieren zu können, ist es unumgänglich, eine exakte Bandenzuordnung durchzuführen. Aus diesem Grund werden unter Verwendung quantenchemischer Methoden Raman-aktive Schwingungsmoden für Pyridin und die verwendeten Pyridinderivate berechnet. Die Bewegungen der Atome jeder Normalmode werden nachvollzogen und den Normalmoden des Pyridinmoleküls zugeordnet (für eine detaillierte Darstellung der Atombewegungen vgl. Anhang B).

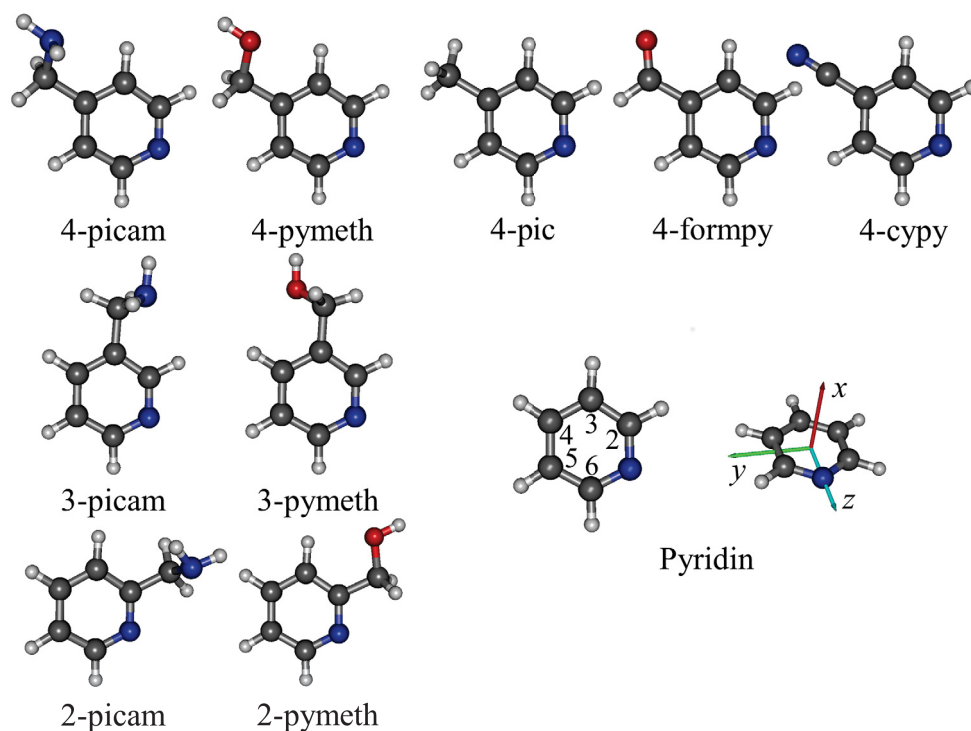


Abbildung 4.1.: Optimierte Molekülstrukturen von *para*-, *meta*- und *ortho*-Picolylamin (4-, 3- und 2-picam), *para*-, *meta*- und *ortho*-Pyridinmethanol (4-, 3- und 2-pymeth), *para*-Picolin (4-pic), *para*-Formylpyridin (4-formpy), *para*-Cyanopyridin (4-cypy) und Pyridin mit eingezeichneten Raumkoordinaten. Optimiert auf ein energetisches Minimum unter Verwendung der MP2 Methode mit dem Basissatz 6-311++G\*\*. Die optimierten Strukturparameter können aus Anhang C entnommen werden.

Zunächst wird in Abschnitt 4.1 der Einfluss verschiedener Silbernanopartikel (AgNPs) untersucht. Hierfür werden Raman- und SERS-Spektren von *para*-, *meta*- und *ortho*-Picolylamin aufgenommen. Als SERS-Substrate werden zwei der zur Zeit meist verwendeten Kolloide angewandt. Konkret werden Citrat-reduzierte (c-AgNPs) und Hydroxylamin-

reduzierte (h-AgNPs) Kolloide hergestellt und für die SERS-Messungen verwendet. Des Weiteren wird der Einfluss der Substitutionsposition untersucht. In diesem Zusammenhang werden Raman- und SERS-Spektren von *para*-, *meta*- und *ortho*-Picolyamin und *para*-, *meta*- und *ortho*-Pyridinmethanol untersucht. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2 präsentiert, analysiert und diskutiert. Der letzte Abschnitt 4.3 des Kapitels beschäftigt sich mit dem Aspekt der verschiedenen funktionellen Gruppen. Hierfür werden verschiedene *para*-substituierte Pyridinderivate untersucht. Diese sind *para*-Picolyamin, *para*-Pyridinmethanol, *para*-Picolin, *para*-Formylpyridin und *para*-Cyanopyridin. Die Molekülstrukturen aller in diesem Kapitel verwendeten Analyten sind in Abbildung 4.1 dargestellt.

Die Nomenklatur, welche in dieser Arbeit für alle Normalmoden (in Anlehnung an die Normalmoden des Pyridinmoleküls) verwendet wird, leitet sich aus der Herzberg-Notation ab (siehe Abschnitt 2.6). Obwohl in der Literatur die Wilson-Notation weiter verbreitet ist, erscheint es nicht sinnvoll, diese für Heteroaromaten der  $C_{2v}$ -Punktgruppe zu verwenden. Dies liegt darin begründet, dass die Wilson-Notation für das aromatische System von Benzol entwickelt wurde. Das Benzolmolekül gehört zur  $D_{6h}$ -Punktgruppe. Daraus ergeben sich völlig andere Symmetrieklassen als bei Pyridin. Infolgedessen kann es zu Komplikationen bei der Zuordnung der richtigen Normalmoden zu den im Spektrum vorhandenen Banden kommen [91].

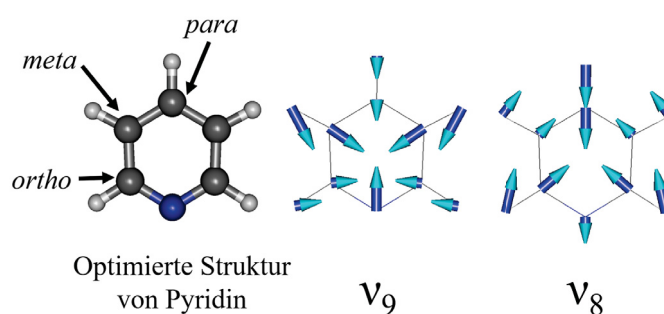


Abbildung 4.2.: Auf der linken Seite ist die optimierte Struktur des Pyridinrings mit den möglichen Substitutionspositionen abgebildet. In der Mitte sind die Atombewegungen der Normalmode  $\nu_9$  dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Atombewegungen der Normalmode  $\nu_8$  zu sehen.

In den nun folgenden Abschnitten werden die erhaltenen Raman- und SERS-Spektren detailliert beschrieben und interpretiert. Dabei werden Banden mit expliziten Wellenzahlen angegeben. Diese Wellenzahlen bezeichnen das jeweilige Maximum der angepassten Lorentzfunktion für die Schwingungsbande (vgl. Abschnitt 3.6). Bei der Beschreibung der

Spektren wird jeweils in Klammern angegeben, welche Schwingungsmode der Bande zu Grunde liegt. Die diskutierten Intensitäten sind relativ zu der Intensität der trigonalen Ringschwingung angegeben. Das heißt als Referenzbande wird für Pyridin sowie die *para*- und *ortho*-substituierten Pyridinderivate die  $\nu_9$ -Schwingungsbande herangezogen, während für *meta*-substituierte Derivate die Intensität der  $\nu_8$ -Schwingungsbande als Referenz verwendet wird. In Abbildung 4.2 sind die beiden verschiedenen trigonalen Ringschwingungen dargestellt. Weiterhin werden die Positionen der *ortho*-, *meta*- und *para*-Substitution am Pyridinring gezeigt.

Da beide Schwingungen ( $\nu_8$  und  $\nu_9$ ) zur  $A_1$ -Symmetrieklasse gehören und im Raman- und SERS-Spektrum von Pyridin sehr dominant sind (vgl. Abschnitt 4.2) sind sie als äquivalente Referenzbanden geeignet. Wenn vom EM-Feld gesprochen wird, so ist das evaneszente EM-Feld ausgehend von den verwendeten AgNPs gemeint.

#### 4.1. Einfluss von Silbernanopartikeln

In diesem Abschnitt wird untersucht, welchen Einfluss verschiedene Silbernanopartikel auf die SERS-Signale haben. Hierfür kommen zwei verschiedene Silberkolloide (*c*-AgNPs und *h*-AgNPs) zur Anwendung. Als Analyten werden *para*-, *meta*- und *ortho*-Picolyamin untersucht. Sie werden im Folgenden mit den Abkürzungen 4-picam für *para*-Picolyamin, 3-picam für *meta*-Picolyamin und 2-picam für *ortho*-Picolyamin bezeichnet.

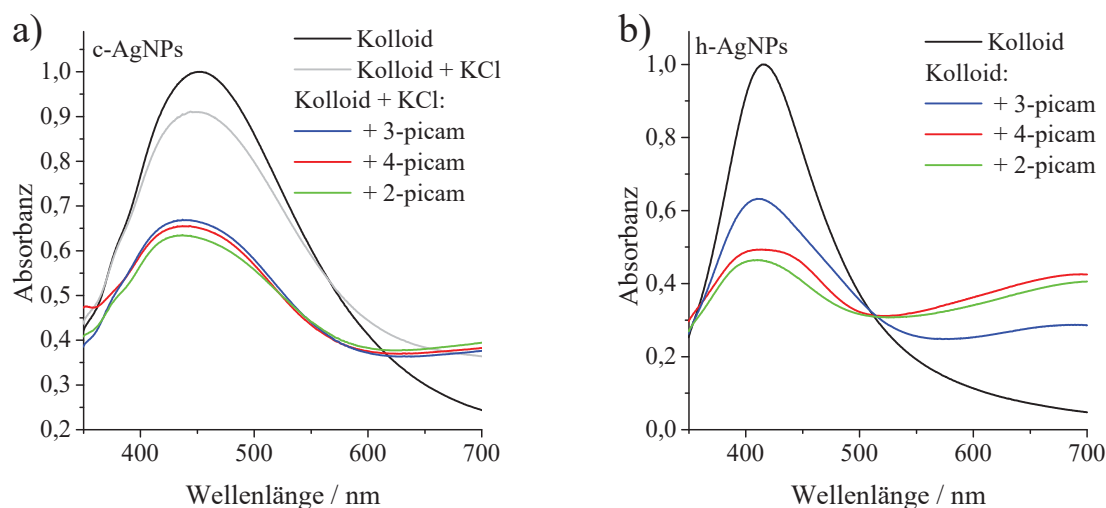


Abbildung 4.3.: UV/Vis-Absorptions-Spektren der Analyt-Kolloid-Mischung von 4-picam (rot), 3-picam (blau) und 2-picam (grün). In a) mit *c*-AgNPs (schwarz) und KCl als Agglomerationsmittel (grau), in b) mit *h*-AgNPs ohne Zusätze (schwarz). Die Intensität wird relativ zum Intensitätsmaximum der jeweiligen Kolloid-Lösung angegeben.

Um eine vorläufige Abschätzung über vorhandene Wechselwirkungen zwischen Analyt und Silbernanopartikel zu erreichen, werden UV/Vis-Absorptions-Spektren der Mischungen der Analyten mit den jeweiligen AgNPs gemessen. Die Absorptions-Spektren sind in Abbildung 4.3 dargestellt, in Abbildung a) werden die Analyten mit c-AgNPs und Kaliumchlorid (als Agglomerationsmittel) gemessen, in Abbildung b) diejenigen mit h-AgNPs ohne Zugabe anderer Substanzen. In beiden Fällen ist die Veränderung der Absorbanz bei Zugabe aller drei Analyten deutlich zu erkennen. Die Intensität des Absorptionsmaximums bei 450 nm (c-AgNPs) und bei 414 nm (h-AgNPs) nimmt signifikant ab. Das heißt, dass die Kolloid-Lösungen Agglomerate bilden. Bei den h-AgNPs wird die Agglomeration durch die Zugabe der Analytlösung induziert. Im Fall der c-AgNPs ist die Zugabe von KCl notwendig um die Agglomeration hervorzurufen. Durch die Bildung der Agglomerate entstehen Bereiche mit extrem starkem EM-Feld nahe der neu gebildeten Metalloberfläche. Demnach ist eine Oberflächenverstärkung der Raman-Signale zu erwarten.

Im Folgenden werden die Raman-Spektren (gemessen in wässriger Lösung) sowie die SERS-Spektren mit den unterschiedlichen AgNPs (c-AgNPs: c-SERS und h-AgNPs: h-SERS) der picam-Isomere sukzessive beschrieben und analysiert. Die Mittelwert-Spektren der Raman- sowie der beiden SERS-Messungen von 4-picam mit unterschiedlichen Kolloiden sind in Abbildung 4.4 a) dargestellt.

Für den betrachteten spektralen Bereich ( $1750\text{ cm}^{-1}$  bis  $660\text{ cm}^{-1}$ ) werden in der Tabelle 4.1 alle Normalmoden des Pyridinmoleküls aufgeführt. Die Schwingungsmoden der Pyridinderivate 4-picam, 3-picam und 2-picam wurden den jeweiligen Normalmoden des Pyridins zugeordnet. Für jede Normalmode werden die berechneten Wellenzahlen, die Wellenzahlen der Raman-Messung und die Wellenzahlen der SERS-Messungen angegeben.

Zwischen den in Abbildung 4.4 gezeigten Spektren sind signifikante Unterschiede sichtbar. Allgemein zeigt sich für beide SERS-Messungen (c-SERS und h-SERS von 4-picam), dass Schwingungen der Symmetrieklassen  $A_1$  und  $B_2$  innerhalb der Molekülebene ( $yz$ -Ebene, *in plane*) deutlich mehr verstärkt werden als die Schwingungen, welche einen Beitrag in  $x$ -Richtung (*out of plane*) besitzen. Dies zeigt sich beispielsweise bei der Bande um  $797\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{16}$ ).

Die Bande bei der Wellenzahl  $1224\text{ cm}^{-1}$  (Raman) bzw. bei  $1268\text{ cm}^{-1}$  (SERS) wird einerseits von der  $\nu_6$ -Normalmode und andererseits von der Streckerschwingung zwischen  $C_4$  und dem Kohlenstoff der  $CH_2$ -Gruppe (*stretching*,  $\nu_{C-CH_2}$ ) verursacht. Die Normalmode  $\nu_8$  ruft in Kombination mit der  $CH_2$ -Wippschwingung (*wagging*,  $\omega_{CH_2}$ ) eine Bande bei  $1210\text{ cm}^{-1}$  hervor. Die beiden zuvor erwähnten Banden sind in ihrer Signalintensität sehr viel stärker im h-SERS-Spektrum als im c-SERS-Spektrum sichtbar. Bei den Wellenzahlen

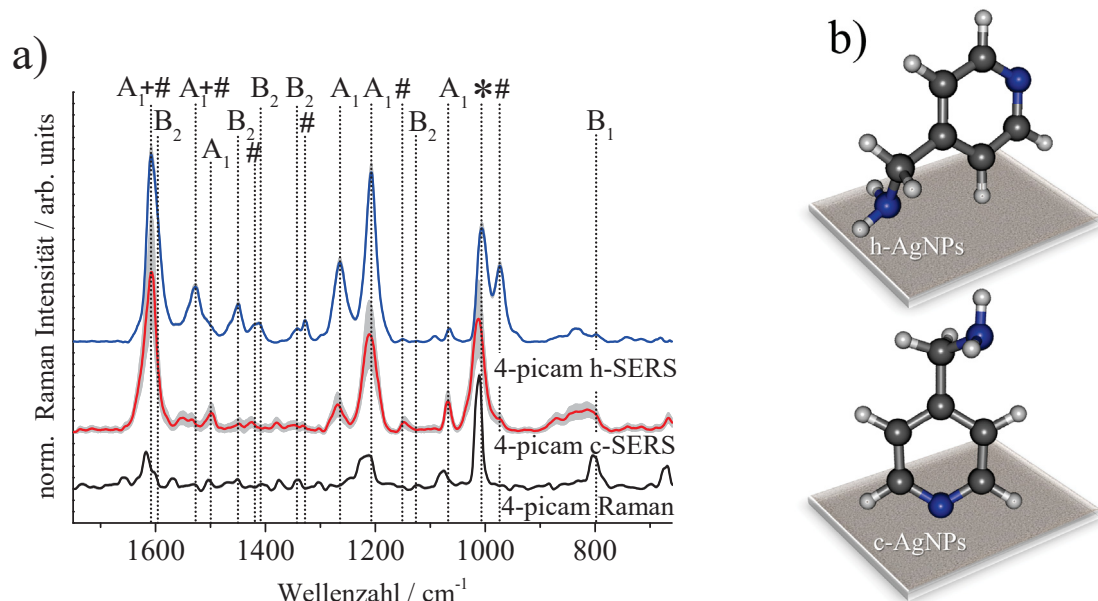


Abbildung 4.4.: In a) sind die Mittelwert-Spektren von 4-picam dargestellt: Raman (aq), gemessen in wässriger Lösung (schwarz), c-SERS (rot) und h-SERS (blau). Die Standardabweichungen sind grau abgebildet. Die Banden der  $A_1$ -,  $B_1$ - und  $B_2$ -Symmetrieklasse sind als solche markiert. Die Banden, welche von Schwingungsmoden der funktionellen Gruppe hervorgerufen werden, sind durch # markiert. Die Referenzschwingungsbande  $\nu_9$  ist durch \* markiert. In b) sind schematische Darstellungen der Orientierung der 4-picam Moleküle relativ zur Metalloberfläche abgebildet. Im oberen Teil für h-AgNPs, im unteren Teil für c-AgNPs.

$1617\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu_4$  und  $\text{NH}_2$ -Scherschwingung (*scissoring*,  $\sigma_{\text{NH}_2}$ )] und  $1502\text{ cm}^{-1}$  (c-SERS) bzw.  $1528\text{ cm}^{-1}$  (h-SERS) ( $\nu_5$  und  $\sigma_{\text{NH}_2}$ ) befinden sich weitere Banden, welche im Spektrum der h-SERS-Messung stärker hervortreten als im c-SERS-Spektrum. Die vier zuletzt genannten Banden bei  $1210\text{ cm}^{-1}$ ,  $1268\text{ cm}^{-1}$ ,  $1528\text{ cm}^{-1}$  und  $1617\text{ cm}^{-1}$  sind Normalmoden der Symmetrieklasse  $A_1$  zugeordnet. Jedoch gilt für alle vier, dass die Schwingungen der funktionellen Methylaminogruppe signifikant zu den Signalen beitragen.

Es fällt auf, dass im h-SERS-Spektrum mehrere Banden erscheinen, welche in dem Raman- und dem c-SERS-Spektrum nicht oder nur mit sehr geringer Signalintensität zu finden sind. Konkret handelt es sich um die Bande bei  $973\text{ cm}^{-1}$  [ $\text{CH}_2$ -Schaukelschwingung (*rocking*,  $\rho_{\text{CH}_2}$ ) sowie  $\text{NH}_2$ -Drehschwingung (*twisting*,  $\tau_{\text{NH}_2}$ )]. Weiterhin erscheinen im h-SERS-Spektrum intensiv verstärkte Banden bei den Wellenzahlen  $1327\text{ cm}^{-1}$  ( $\tau_{\text{CH}_2}$  und  $\tau_{\text{NH}_2}$ ) sowie bei  $1422\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{CH}_2}$  und  $\tau_{\text{NH}_2}$ ). Diese Banden werden den Schwingungen der Methylaminogruppe zugeordnet, welche in *para*-Position des Pyridinrings substituiert ist.

Tabelle 4.1.: Wellenzahlen in  $\text{cm}^{-1}$  der Normalmoden des Pyridinrings von 4-picam, 3-picam und 2-picam. Für jeden Analyten werden von links nach rechts die berechnete Werte (Sim.), die Maxima der Raman-Banden (RS) [Raman-Spektren der Analyten gemessen in wässriger Lösung (aq)], die Maxima der c-SERS-Banden oben und die Maxima der h-SERS-Banden unten angegeben.

Mode	4-picam			3-picam			2-picam		
	Sim.	RS	c-SERS/ h-SERS	Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$			Sim.	RS	c-SERS/ h-SERS
A <sub>1</sub>									
$\nu_4^*$ (8a)**	1651	1657	1630/	1633	1604	1594/ 1593	1615	1578	1564/ 1565
	1641	1617	1615/ 1610						
$\nu_5$ (19a)	1523	1569	1552/ 1541	1505	1488	1495/	1507	1500	1499/ 1501
	1517	1503	1500/ 1528						
$\nu_6$ (9a)	1258	1224	1271/ 1265	1221	1205	1212/ 1229	1306	1304	1312/ 1315
$\nu_7$ (18a)	1087	1075	1068/ 1065	1053	1054	1050/ 1047	1061	1061	1049/ 1049
							1076	1085	1055/ 1057
$\nu_8$ (12)	1235	1210	1210/ 1208	1038	1039	1033/ 1031			
$\nu_9$ (1)	1008	1012	1013/ 1006				1014	1011	1007/ 1008
$\nu_{10}$ (6a)	809	806	813/ 833	810	827	832/ 829	849	825	826/ 826
							812	802	823/ 803
A <sub>2</sub>									
$\nu_{12}$ (10a)	937			939	965	958/ 961	947	946	970/ 972
			/934						
$\nu_{14}$ (5)				915	941	933/ 927			
B <sub>1</sub>									
$\nu_{16}$ (11)	787	797	798/ 797	768	800	798/ 790	765	782	772/ 770
$\nu_{17}$ (16b)	630	668	613/	639	645	345/	699	700	701/
B <sub>2</sub>									
$\nu_{21}$ (8b)	1607	1601	1605/ 1599	1617	1588	1576/ 1574	1632	1605	1590/ 1590
$\nu_{22}$ (19b)	1449	1451	1450/ 1449	1461	1467	1445/	1464	1471	1471/ 1469
$\nu_{23}$ (14)	1391	1375	1379/ 1411	1402	1400	1405/ 1402	1403	1407	1403/ 1404
$\nu_{24}$ (3)	1364	1341	1351/ 1344	1365	1366	1385/ 1366	1337	1343	1360/ 1351
$\nu_{25}$ (15)				1138	1107	1123/ 1126	1174	1170	1153/ 1161
$\nu_{26}$ (18b)	1109	1123		1080	1084	1088/ 1092	1115		1096/ 1107
			1124						
$\nu_{27}$ (6b)	676	676	667/	631	606	621/	630	639	623/

\* Herzberg-Notation

\*\* Wilson-Notation



Zur Veranschaulichung werden in Tabelle 4.2 die Banden aufgeführt, denen Schwingungsmoden der Methylaminogruppe zu Grunde liegen. Bei allen drei in diesem Abschnitt betrachteten Analyten (4-picam, 3-picam und 2-picam), werden für die Schwingungsmoden die berechneten Wellenzahlen, die Wellenzahlen der Raman-Messung und die Wellenzahlen der c-SERS- sowie h-SERS-Messungen angegeben.

Die bisher beschriebenen Veränderungen in den c-SERS- und h-SERS-Spektren von 4-picam im Vergleich zum entsprechenden Raman-Spektrum können durch die Orientierung der 4-picam Moleküle relativ zur Metalloberfläche interpretiert werden. Eine schematische Darstellung der relativen Orientierung von 4-picam zu den beiden Metalloberflächen ist in Abbildung 4.4 b) dargestellt. Unter Berücksichtigung aller erwähnten Änderungen der Signalintensitäten von Raman-, c-SERS- und h-SERS-Daten zeigt sich, dass die 4-picam Moleküle bevorzugt senkrecht zur Metalloberfläche beider AgNPs orientiert sind. Dies ergibt sich aus der Verstärkung der B<sub>2</sub>-Normalmoden und der Unterdrückung der A<sub>2</sub>-Normalmoden (vgl. Oberflächenauswahlregeln in Abschnitt 2.7).

Tabelle 4.2.: Wellenzahlen in  $\text{cm}^{-1}$  der Schwingungen der Methylaminogruppe, welche als funktionelle Gruppe in *para*-, *meta*- oder *ortho*-Position an den Pyridinring gebunden ist (4-picam, 3-picam und 2-picam). Für jeden Analyten werden von links nach rechts die berechneten Werte (Sim.), die Maxima der Raman-Banden (RS) [Raman-Spektren der Analyten gemessen in wässriger Lösung (aq)], die Maxima der c-SERS-Banden oben und die Maxima der h-SERS-Banden unten angegeben.

Mode	4-picam			3-picam			2-picam		
	Sim.	RS	c-SERS/ h-SERS	Sim.	RS	c-SERS/ h-SERS	Sim.	RS	c-SERS/ h-SERS
$\rho_{\text{CH}_2} + \tau_{\text{NH}_2}$	1002		986/ 973	1001			994		995/ 995
$\tau_{\text{CH}_2} + \tau_{\text{NH}_2}$	1178	1170	1146/ 1150	1178	1198	1194/ 1191	1166	1161	1127/ 1150
$\omega_{\text{CH}_2}$	1258*	1224*	1271*/ 1265*	1257	1237	1229/ 1229	1268	1236	1224/ 1228
$\tau_{\text{CH}_2} + \tau_{\text{NH}_2}$	1305	1303	1331/ 1327	1307	1344	1348/ 1343	1337*	1343*	1360*/ 1351*
$\omega_{\text{CH}_2} + \tau_{\text{NH}_2}$	1433	1428	1425/ 1422	1433	1438	1426/ 1423	1431	1449	1440/ 1439
$\sigma_{\text{CH}_2}$	1517*	1503*	1500*/ 1528*	1526		1528/ 1531	1517	1529	1512/
$\sigma_{\text{NH}_2}$	1641*	1617*	1615*/ 1610*	1650	1653	1625/ 1620	1649	1657	1628/ 1627

\* Die Schwingungsbande wird zum Teil auch von Normalmoden des Pyridinrings hervorgerufen.

Erklärung der Symbole:  $\rho$  Schaukelschwingung,  $\tau$  Drehschwingung,  $\omega$  Wippschwingung,  $\sigma$  Scherschwingung.



Weiterhin kann aus dem vermehrten Auftreten von Methylamino-Schwingungsbanden im h-SERS-Spektrum geschlossen werden, dass die 4-picam Moleküle über die funktionelle Gruppe mit der Oberfläche der h-AgNPs wechselwirken. Das heißt die Methylaminogruppe befindet sich in diesem Fall sehr nah an der Oberfläche. Ihre Schwingungssignale werden also durch das intensive EM-Feld stärker verstärkt als bei den c-AgNPs. Die  $yz$ -Molekülebene des heteroaromatischen Ringsystems ist durch die sterische Anordnung der  $\text{NH}_2$ -Gruppe orthogonal zur Metalloberfläche orientiert. Dies ist durch die hohe Signalintensität der *in-plane*-Schwingungsmoden bestätigt.

Im Fall der c-AgNPs findet die Wechselwirkung zwischen 4-picam und Oberfläche offensichtlich über das Stickstoffatom des Pyridinrings statt. Daher läuft die Atombewegung des Stickstoffatoms in Richtung der  $\alpha_{33}$ -Raman-Tensorkomponente ab. Dieses Verhalten wurde bereits mehrfach für Pyridin und dessen Derivate festgestellt [27, 92].

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die Analyt-Metall-Wechselwirkung in der Hauptsache über das Stickstoffatom des Pyridinrings stattfindet, allerdings nur bei Verwendung von c-AgNPs. In dieser Orientierung ist folglich die funktionelle Gruppe, welche in *para*-Position an den Pyridinring gebunden ist, in größtmöglicher Entfernung zur Metalloberfläche. Das evaneszente EM-Feld wirkt weitaus schwächer. Daher werden die Schwingungsmoden der funktionellen Gruppe nicht oder kaum verstärkt. Bei h-AgNPs sind die Moleküle nahezu invers gegenüber der Metalloberfläche orientiert. Das heißt die Schwingungssignale der funktionellen Gruppe treten im h-SERS-Spektrum intensiv hervor. Eine weitere Möglichkeit ist, dass beide Stickstoffatome gleichzeitig in Wechselwirkung mit der Metalloberfläche treten. Diese Orientierung kann ausgeschlossen werden. In diesem Fall würden sich im SERS-Spektrum die *out-of-plane*-Normalmoden (vorrangig die Moden der  $A_2$ -Symmetrieklasse) sehr deutlich hervorheben. Dies folgt aus den Oberflächenauswahlregeln aus Abschnitt 2.7. Ein solches Verhalten wird weder bei den c-SERS- noch bei den h-SERS-Messungen beobachtet.

In einem weiteren Experiment werden die Raman-, c-SERS- und h-SERS-Spektren von 3-picam untersucht. Die erhaltenen Mittelwert-Spektren sind in Abbildung 4.5 a) dargestellt. Im Raman-Spektrum dieses picam-Isomeres hat die Bande bei  $797\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{16}$ , der  $B_1$ -Symmetrieklasse) eine deutlich größere Signalintensität als in den SERS-Spektren. Derselbe Trend lässt sich für die von der funktionellen Gruppe verursachten Banden bei  $1195\text{ cm}^{-1}$  ( $\tau_{\text{CH}_2}$  und  $\tau_{\text{NH}_2}$ ) sowie  $1237\text{ cm}^{-1}$  (Raman) bzw.  $1230\text{ cm}^{-1}$  (c-SERS) ( $\omega_{\text{CH}_2}$ ) beobachten. Bemerkenswert ist die Verschiebung der Bande bei  $1653\text{ cm}^{-1}$  im Raman-Spektrum zu  $1625\text{ cm}^{-1}$  im c-SERS-Spektrum bzw. zu  $1620\text{ cm}^{-1}$  im h-SERS-Spektrum. Eine solche Verschiebung zu niedrigeren relativen Wellenzahlen wird als *blue shift* bezeichnet. Die

betroffene Bande entspringt der  $\text{NH}_2$ -Scherschwingung ( $\sigma_{\text{NH}_2}$ ). Dies deutet darauf hin, dass die Methylaminogruppe bei beiden Kolloiden mit der Metalloberfläche wechselwirkt. Im Fall von h-SERS zeigt sich auch eine Verstärkung der Signalintensität dieser Bande im Vergleich zu c-SERS und Raman.

Weiterhin lässt sich beobachten, dass generell die *in-plane*-Schwingungsbanden in der Reihenfolge Raman > c-SERS > h-SERS relativ zu der sehr dominanten Bande bei  $1035\text{ cm}^{-1}$  in der Intensität abnehmen. Die Bande um  $1035\text{ cm}^{-1}$  [in Abbildung 4.5 a) markiert mit \*] wird ebenso von einer *in-plane*-Normalmode hervorgerufen, der trigonalen Ringatmung  $\nu_8$ . An dieser Schwingung sind die Kohlenstoffatome C2, C4 und C6 beteiligt (siehe Abbildung 4.2). Die aufgezeigten Veränderungen in den drei Spektren lassen darauf schließen, dass die 3-picam-Moleküle auf ähnliche Weise wie die 4-picam-Moleküle mit den beiden Metalloberflächen wechselwirken.

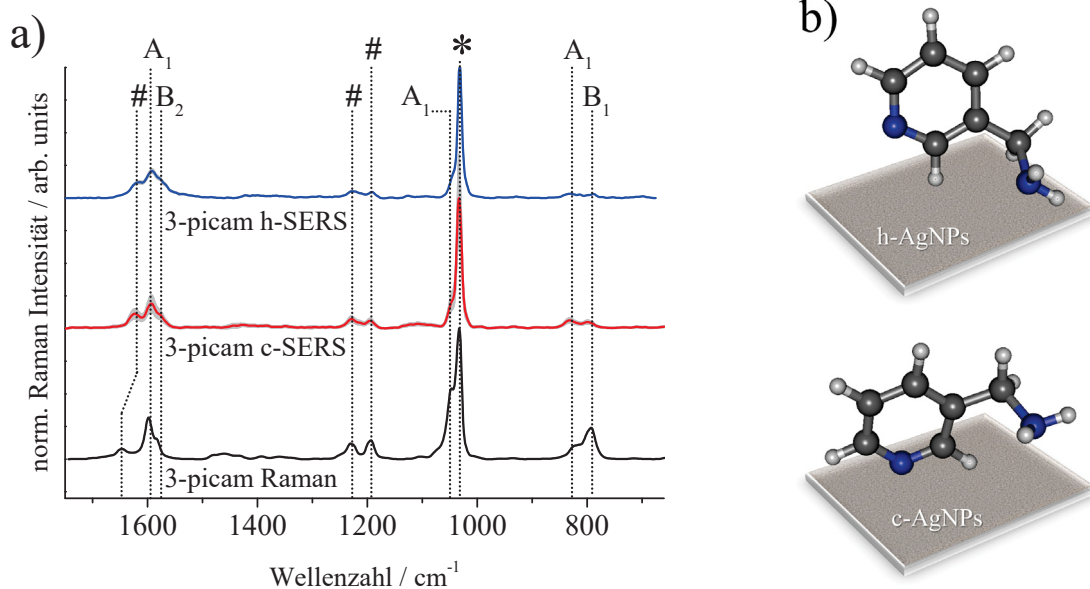


Abbildung 4.5.: In a) sind die Mittelwert-Spektren von 3-picam dargestellt: Raman (aq), gemessen in wässriger Lösung (schwarz), c-SERS (rot) und h-SERS (blau). Die Standardabweichungen sind in grau abgebildet. Die Banden der  $A_1$ -,  $B_1$ - und  $B_2$ -Symmetrieklasse sind als solche markiert. Die Banden welche von Schwingungsmoden der funktionellen Gruppe hervorgerufen werden sind durch # markiert. Die Referenzschwingungsbände  $\nu_8$  ist durch \* markiert. In b) sind schematische Darstellungen der Orientierung der 3-picam Moleküle relativ zur Metalloberfläche abgebildet. Im oberen Teil für h-AgNPs, im unteren Teil für c-AgNPs.

Allerdings führt die erwähnte Wechselwirkung bei 3-picam zu anderen Orientierungen (relativ zur Oberfläche) als bei 4-picam. Das Schema in Abbildung 4.5 b) stellt dar, wie 3-picam dementsprechend zur Oberfläche orientiert sind.

Es zeigt sich anhand der schematischen Darstellung, dass die  $C_2$ -Symmetrieachse bei der

Orientierung zur Oberfläche der h-AgNPs nicht mit der  $\alpha_{33}$ -Raman-Tensorkomponente koinzidiert. Die Atombewegung des C2-Kohlenstoffs erfolgt nun weitestgehend orthogonal zur Metalloberfläche. Das heißt die  $\nu_8$ -Schwingungsmode wird intensiver verstärkt als es bei der Orientierung relativ zu den c-AgNPs der Fall ist. Bei der Orientierung der 3-picam Moleküle zur Oberfläche der c-AgNPs [vgl. Abbildung 4.5 b) unterer Teil] erfolgt die Atombewegung des C2-Kohlenstoffes ebenfalls in Richtung der  $\alpha_{33}$ -Raman-Tensorkomponente, jedoch ist das Atom selbst weiter von der Oberfläche entfernt und erfährt daher einen schwächeren Einfluss des EM-Felds. Weiterhin folgt aus der signifikanten Verstärkung der  $\nu_8$ -Schwingungsbande im h-SERS-Spektrum, dass sämtliche Schwingungsbanden des h-SERS-Spektrums relativ zur  $\nu_8$ -Schwingungsbande an Signalintensität verlieren.

Einige Schwingungsbanden, welche durch Schwingungen der funktionellen Gruppe hervorgerufen werden, zeigen in den SERS-Spektren größere Intensitäten als im Raman-Spektrum. Hierbei sei vor allem auf die Bande bei  $1530\text{ cm}^{-1}$  hingewiesen. Diese Bande erscheint im Raman-Spektrum nicht. Im c-SERS-Spektrum ist sie zwar vorhanden, aber im h-SERS-Spektrum erscheint sie etwa mit zehnfacher Intensität (relativ zu c-SERS). Diese Bande wird von der  $\text{CH}_2$ -Scherschwingung ( $\sigma_{\text{CH}_2}$ ) verursacht. Eine weitere von Schwingungen der funktionellen Gruppe hervorgerufene Bande ist die bereits diskutierte bei  $1625\text{ cm}^{-1}$ . Die Nähe der Methylaminogruppe zur Metalloberfläche der h-AgNPs wird durch diese verstärkten Signalintensitäten bestätigt.

Im Folgenden werden Raman-, c-SERS- und h-SERS-Datensätze von 2-picam untersucht. Die entsprechenden Mittelwert-Spektren werden in Abbildung 4.6 a) präsentiert. Während zwischen dem c-SERS- und dem h-SERS-Spektrum kaum Unterschiede auszumachen sind, unterscheiden sich die beiden SERS-Spektren signifikant vom Raman-Spektrum. Die Banden um  $772\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{16}$ ) und  $970\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{12}$ ), beides *out-of-plane*-Schwingungsbanden, sind im Raman-Spektrum nur mit sehr schwachen Intensitäten zu finden. In den SERS-Spektren hingegen treten sie deutlich hervor.

Des Weiteren sind die Banden bei  $826\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{10}$  und  $\omega_{\text{NH}_2}$ ),  $1049\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_7$ ),  $1312\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_6$  und  $\tau_{\text{CH}_2}$  sowie  $\tau_{\text{NH}_2}$ ),  $1500\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_5$ ) und  $1565\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ) deutlich verstärkt in ihrer Intensität, sie gehören zur  $A_1$ -Symmetrieklasse. Bei einigen der genannten Banden ist allerdings auch ein Einfluss der Schwingungen der funktionellen Gruppe vorhanden. Außerdem werden auch Banden der  $B_2$ -Symmetrieklasse in den SERS-Spektren mit sehr viel größerer Intensität als in dem Raman-Spektrum wahrgenommen. Dabei handelt es sich um die Banden bei  $1470\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{22}$ ) und  $1590\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{21}$ ), beide Banden weisen einen *blue shift* auf. Dies deutet darauf hin, dass die heteroaromatische Ringstruktur mit der Oberfläche in Wechselwirkung tritt.

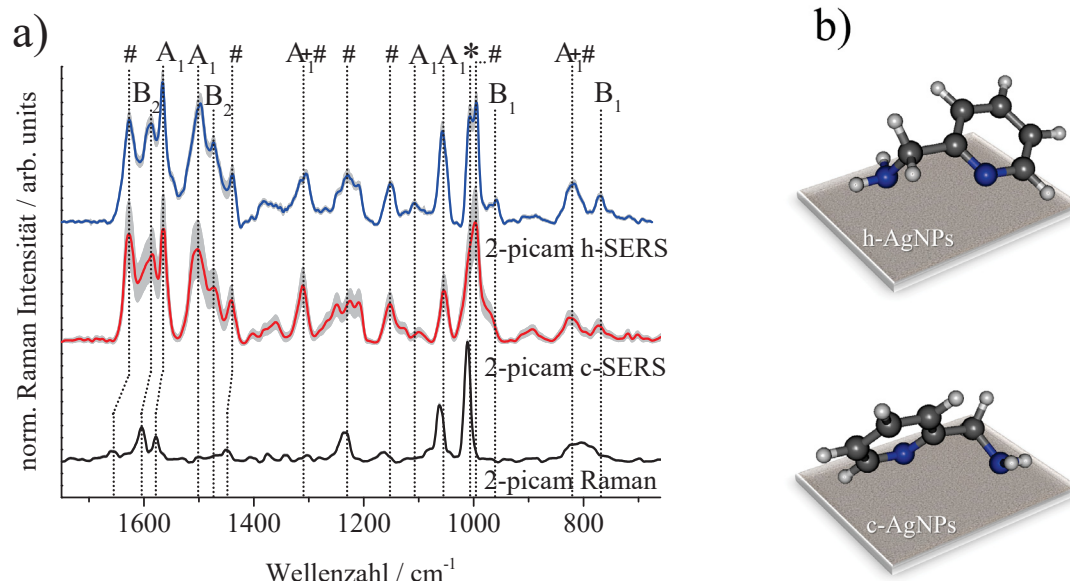


Abbildung 4.6.: In a) sind die Mittelwert-Spektren von 2-picam dargestellt: Raman (aq), gemessen in wässriger Lösung (schwarz), c-SERS (rot) und h-SERS (blau). Die Standardabweichungen sind grau abgebildet. Die Banden der  $A_1$ -,  $B_1$ - und  $B_2$ -Symmetrieklasse sind als solche markiert. Die Banden welche von Schwingungsmoden der funktionellen Gruppe hervorgerufen werden sind durch # markiert. Die Referenzschwingungsbande  $\nu_9$  ist durch \* markiert. In b) sind schematische Darstellungen der Orientierung der 2-picam Moleküle relativ zur Metalloberfläche abgebildet. Im oberen Teil für h-AgNPs, im unteren Teil für c-AgNPs.

Weitere Banden, die in den beiden SERS-Spektren sehr viel größere Intensität als in dem Raman-Spektrum haben, sind bei  $995\text{ cm}^{-1}$  ( $\tau_{\text{NH}_2}$  und  $\rho_{\text{CH}_2}$ ),  $1166\text{ cm}^{-1}$  ( $\tau_{\text{CH}_2}$  und  $\tau_{\text{NH}_2}$ ),  $1268\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{CH}_2}$ ),  $1430\text{ cm}^{-1}$  ( $\omega_{\text{CH}_2}$ ) und  $1623\text{ cm}^{-1}$  ( $\sigma_{\text{NH}_2}$ ) lokalisiert. Es wird deutlich, dass die Schwingungen der funktionellen Gruppe des 2-picam einen sehr starken Beitrag zu den SERS-Spektren leisten. Für sämtliche Methylamino-Schwingungsbanden gilt, dass sie einen *blue shift* erfahren. Das lässt darauf schließen, dass auch die funktionelle Gruppe mit beiden AgNP-Oberflächen in Wechselwirkung steht.

Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Stickstoffatome in 2-picam kann davon ausgegangen werden, dass beide mit der Metalloberfläche wechselwirken. Dies gilt sowohl für c-AgNPs als auch für h-AgNPs. Ein Schema der zu erwartenden Orientierung der 2-picam Moleküle relativ zu den Metalloberflächen ist in Abbildung 4.6 b) zu finden. Bei der Erstellung der beiden schematischen Darstellungen wird davon ausgegangen, dass 2-picam den Oberflächen gegenüber ein ähnliches Verhalten wie 3-picam und 4-picam aufweist. Da sich in 2-picam die funktionelle Gruppe in *ortho*-Position des Pyridinrings befindet, führen beide bevorzugten Wechselwirkungs-Optionen zu nahezu identischen Orientierungen zur Oberfläche, unabhängig davon, ob das Stickstoffatom des Pyridinrings bevorzugt

wechselwirkt (c-AgNPs) oder das Stickstoffatom der Aminogruppe (h-AgNPs). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion an der Oberfläche der Struktur einer Chelatbrücke entspricht. Dieser Effekt wurde bereits für ähnliche Moleküle in der Literatur beschrieben [93].

In dieser Orientierung zur Oberfläche ist die  $yz$ -Molekülebene stark gekippt. Das heißt es werden sowohl die *in-plane*- als auch die *out-of-plane*-Schwingungen verstärkt. Die Methylaminogruppe befindet sich in beiden Fällen sehr nahe an der Oberfläche. Folglich sind ihre Schwingungssignale ebenso sehr viel intensiver.

Zusammenfassend lässt sich für die verwendeten Kolloide und die Analyten (4-picam, 3-picam und 2-picam) folgendes feststellen. Die c-AgNPs wechselwirken bevorzugt mit dem Stickstoffatom der heteroaromatischen Ringstruktur, wohingegen die h-AgNPs bevorzugt mit der Aminogruppe des Substituenten wechselwirken. Dies konnte anhand der erhaltenen Daten für 4-picam und 3-picam gezeigt werden.

Bei der Methylaminogruppe in *meta*-Position führt die Interaktion der funktionellen Gruppe mit den h-AgNPs zu einer intensiven Verstärkung der  $\nu_8$ -Schwingungsbande, dadurch erscheinen sämtliche Banden des h-SERS-Spektrums relativ zu dieser Bande schwächer.

Befindet sich die funktionelle Gruppe in *ortho*-Position, wird die Bevorzugung vernachlässigbar. Beide Stickstoffatome können simultan in Wechselwirkung treten. Dieses Verhalten konnte durch die c-SERS- und h-SERS-Messungen von 2-picam bestätigt werden.

Nachdem der Einfluss der AgNPs an diesem konkreten Beispiel analysiert wurde, soll im nächsten Abschnitt die Abhängigkeit der Normalmoden des Pyridinrings von der Substitutionsposition untersucht werden. Zunächst wird die Erscheinung der Normalmoden von Pyridin in den Raman- und SERS-Spektren besprochen. Im Anschluss werden noch einmal die Raman- und c-SERS-Spektren von 4-picam, 3-picam und 2-picam herangezogen und mit den Raman- und c-SERS-Spektren von *para*-, *meta*- und *ortho*-Pyridinmethanol verglichen. Dabei werden Veränderungen gegenüber den Pyridin-Messdaten herausgestellt sowie vorhandene Differenzen zwischen den jeweiligen Spektren der an gleicher Position substituierten Derivate.

## 4.2. Einfluss der Substitutionsposition

Die im vorangegangenen Abschnitt bereits besprochenen Einflüsse der AgNPs schlossen einige Daten in die Diskussion ein, welche auch in diesem Abschnitt noch einmal betrachtet werden sollen. Um die Beeinflussung der SERS-Spektren durch verschiedene Substitutionspositionen genauer zu untersuchen, werden die Raman- und c-SERS-Daten von 4-picam, 3-

picam und 2-picam (bekannt aus Abschnitt 4.1) mit den Raman- und c-SERS-Spektren von *para*-Pyridinmethanol, *meta*-Pyridinmethanol und *ortho*-Pyridinmethanol verglichen. Die Pyridinmethanol-Isomere werden im Weiteren durch 4-pymeth für *para*-Pyridinmethanol, 3-pymeth für *meta*-Pyridinmethanol und 2-pymeth für *ortho*-Pyridinmethanol abgekürzt. Für 4-picam, 3-picam und 2-picam wurde bereits festgestellt, dass sie bevorzugt über das Stickstoffatom des heteroaromatischen Ringsystems mit der Oberfläche der c-AgNPs wechselwirken.

In der nun folgenden Analyse werden die vorliegenden Spektren der picam-Isomere mit denen der zugehörigen pymeth-Isomere verglichen. Dabei soll untersucht werden, ob die Feststellungen aus Abschnitt 4.1 bezüglich der Orientierung der Analyten auch auf andere funktionelle Gruppen übertragbar sind, wenn sie sich an derselben Substitutionsposition befinden.

Die Raman- und SERS-Spektren der an gleicher Position substituierten Derivate sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Jeweils zwischen den beiden Raman- bzw. c-SERS-Spektren ist die Differenz der Signalintensitäten aufgetragen. In Abbildung 4.7 a) sind die Raman- und SERS-Spektren von Pyridin zu sehen. Bevor die Diskussion der Normalmoden der Pyridinderivate begonnen werden kann, sollen hier zuerst die Änderungen der Normalmoden von Raman- zu SERS-Messungen bei Pyridin besprochen werden. Dies ist erforderlich, um das Verhalten der von Substituenten beeinflussten Normalmoden zu analysieren.

In Tabelle 4.3 sind die Wellenzahlen der Normalmoden für Pyridin aufgeführt. Es sind die berechneten Wellenzahlen sowie die erhaltenen Wellenzahlen der Raman- und der c-SERS-Messung angegeben. Weiterhin sind die Daten für 4-pymeth, 3-pymeth und 2-pymeth aufgeführt. Die Wellenzahlen der Normalmoden der picam-Isomere können aus Tabelle 4.1 in Abschnitt 4.1 entnommen werden.

Betrachtet man die Raman- und SERS-Spektren von Pyridin, so zeigt sich, dass die beiden Spektren sich sehr ähneln. Beide werden stark durch die trigonalen Ringschwingungsbanden bei  $1040\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_8$ ) und bei  $1006\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_9$ ) dominiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese beiden Normalmoden besonders verstärkt werden, wenn das Pyridin-Molekül über das Stickstoffatom mit der Metalloberfläche wechselwirkt und die  $z$ -Achse orthogonal zur Oberfläche orientiert ist [25, 31, 94].

Weitere Schwingungsbanden der  $A_1$ -Symmetrieklasse befinden sich bei  $1600\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ),  $1494\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_5$ ),  $1220\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_6$ ),  $1070\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_7$ ) und  $620\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{10}$ ). Eine signifikante Verschiebung der Wellenzahlen ( $\Delta\nu < 10\text{ cm}^{-1}$ ) ist nur bei der Normalmode  $\nu_5$  zu beobachten. Die Schwingungssignale der  $B_2$ -Symmetrieklasse erscheinen bei  $1581\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{21}$ ),  $1484\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{22}$ , nur SERS),  $1404\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{23}$ , nur SERS),  $1387\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{24}$ , nur SERS)  $1157\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{25}$ ),  $1055\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{26}$ , nur Raman) und  $655\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{27}$ ).



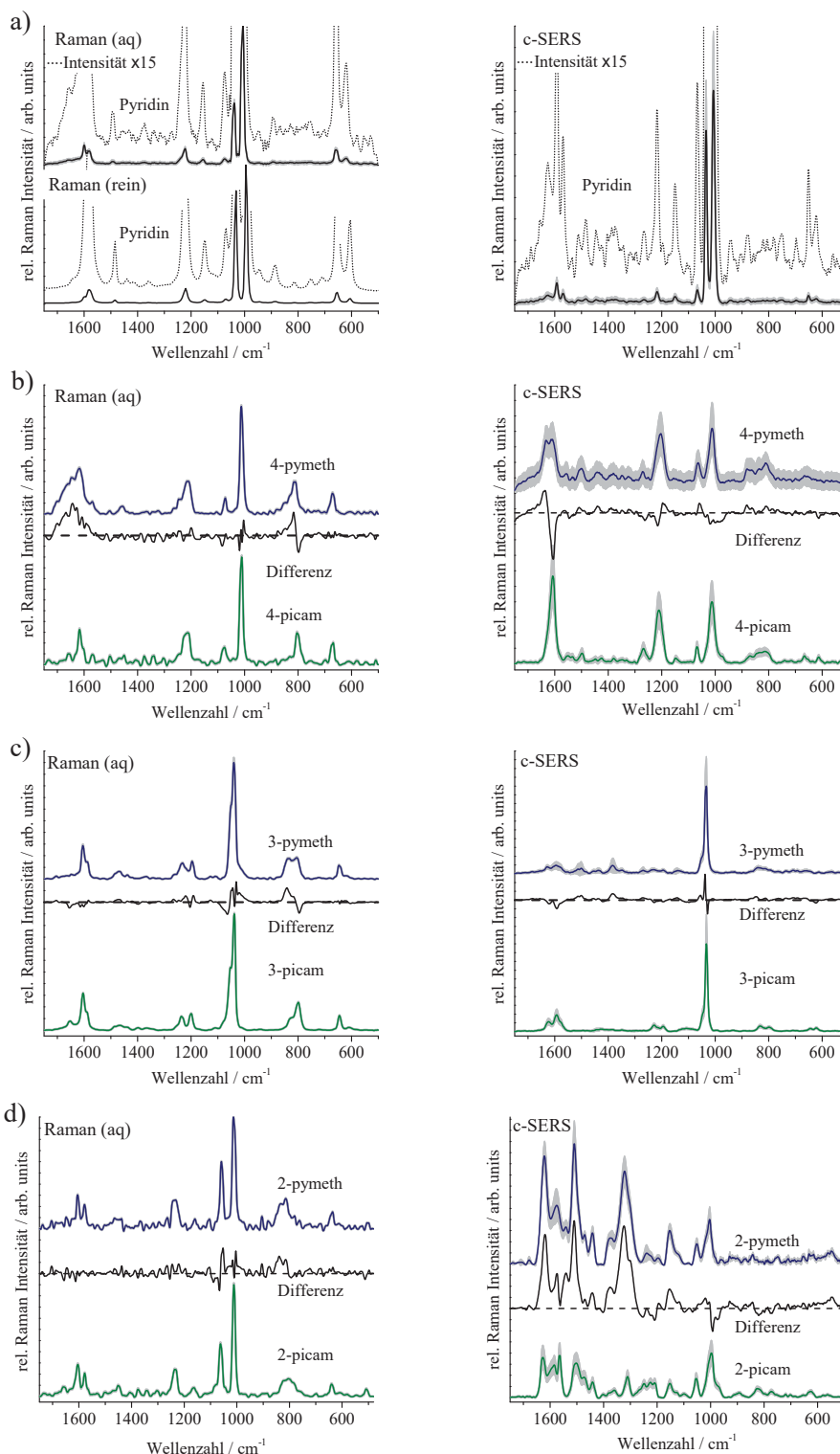


Abbildung 4.7.: Mittelwert-Raman- und c-SERS-Spektren. Alle Spektren wurden auf die Intensität der trigonalen Ringschwingungsbande  $\nu_9$  bzw.  $\nu_8$  normiert. Raman- und c-SERS-Spektren von a) Pyridin, b) 4-picam und 4-pymeth, c) 3-picam und 3-pymeth und d) 2-picam und 2-pymeth. Alle Raman-Spektren sind gemessen in wässriger Lösung (aq), die einzige Ausnahme bildet das Raman-Spektrum von flüssigem Pyridin (rein). Die Spektren der pymeth-Isomere sind blau, die der picam-Isomere grün dargestellt. Für alle Mittelwert-Spektren sind die Werte der Standardabweichung grau abgebildet. Für die Raman- bzw. SERS-Spektren der Pyridinderivate mit gleicher Substitutionsposition sind jeweils die Differenzen schwarz dargestellt.

Die Schwingungen der  $A_1$ - und  $B_2$ -Symmetrieklasse sind sogenannte *in-plane*-Schwingungen, sie haben keinen Beitrag in  $x$ -Richtung. Einige der erwähnten  $B_2$ -Normalmoden sind im Raman-Spektrum in wässriger Umgebung nicht detektierbar. Allerdings können sie bei der Messung des Raman-Spektrums von reinem, flüssigen Pyridin vollständig zugeordnet werden (vgl. Tabelle 4.4). Für die Diskussion der durch SERS-Effekte beeinflussten Normalmoden erscheint es jedoch sinnvoller, sich auf das Raman-Spektrum der wässrigen Lösung des Pyridins zu beziehen. Wasser als umgebendes Medium hat bereits Einfluss auf die Bandenlage. Dies fällt besonders gravierend bei der  $\nu_9$ -Normalmode auf. Im Raman-Spektrum des flüssigen Pyridins ist sie bei  $994\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten [95]. Wird das Raman-Spektrum von Pyridin allerdings in wässriger Umgebung aufgenommen, so findet sich die  $\nu_9$ -Schwingungsmode bei  $1008\text{ cm}^{-1}$  [96].

Weiterhin sind in dem Raman- und SERS-Spektrum aus Abbildung 4.7 a) auch einige Signale der *out-of-plane*-Normalmoden ( $A_2$  und  $B_1$ ) zu finden. Es handelt sich um Banden bei den Wellenzahlen  $879\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{11}$ ),  $944\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{14}$ ),  $922\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{15}$ ),  $697\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{16}$ ) und  $753\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{17}$ ). Die meisten dieser Banden sind im Raman-Spektrum nur bei der Messung von reinem, flüssigen Pyridin zu finden (vgl. Tabelle 4.4). Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit den von Creighton et al. [52] berechneten Verstärkungsfaktoren für Pyridin (in senkrechter Position über der Metalloberfläche) überein.

Nachdem nun die Bandenlage der Normalmoden für nicht substituiertes Pyridin geklärt wurde, soll der Einfluss der Substitutionsposition auf die Lage der Normalmoden sowie auf deren Intensitätsverhältnisse geklärt werden. Anhand der Differenz-Graphen in Abbildung 4.7 b) bis d) lassen sich vorhandene Unterschiede leicht feststellen. Es zeigt sich jedoch, dass im Fall der Raman-Messungen die Art der funktionellen Gruppe (Methylamino- bzw. Hydroxymethylgruppe) keinen signifikanten Unterschied hervorruft. Dies wurde bereits für die *pymeth*-Isomere festgestellt [97]. Die Substitutionsposition an sich beeinflusst das Erscheinungsbild der Raman-Spektren hingegen entscheidend. Bedingt durch die *para*-, *meta*- oder *ortho*-substituierte funktionelle Gruppe kommt es zu einer veränderten Symmetrie der Grundstruktur des Pyridinrings.

In den Raman-Spektren der *para*-substituierten Derivate tritt eine starke Verschiebung der  $\nu_8$ -Schwingungsmode auf. Diese wechselt von  $1040\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_8$ ) (im Raman-Spektrum von Pyridin) zu  $1213\text{ cm}^{-1}$  (4-*pymeth*) bzw.  $1224\text{ cm}^{-1}$  (4-*picam*). Weiterhin ist die Signalintensität geringer als im Fall von Pyridin. Die Zuordnung der  $\nu_8$ -Normalmode wird durch die berechneten Werte bestätigt. Im nächsten Abschnitt wird gezeigt, dass auch andere *para*-substituierte Pyridinderivate das gleiche Verhalten zeigen. In der Literatur lassen sich mitunter stark abweichende Bandenzuordnungen finden [32]. Jedoch liegen diesen Zuordnungen augenscheinlich keine berechneten Werte zugrunde, hier ist also Vorsicht geboten.



Tabelle 4.3.: Wellenzahlen in  $\text{cm}^{-1}$  der Normalmoden des Pyridinrings von Pyridin, 4-pymeth, 3-pymeth und 2-pymeth. Für jeden Analyten werden von links nach rechts die berechnete Werte (Sim.), die Maxima der Raman-Banden (RS) und die Maxima der c-SERS-Banden (SERS) angegeben. Die Wellenzahlen der Raman-Signale beziehen sich hier auf die Raman-Spektren der Analyten gemessen in wässriger Lösung. Die Bandenzuordnung für die Raman- und SERS-Spektren der picam-Isomere ist in den Tabellen 4.1 und 4.2 in Abschnitt 4.1 wiedergegeben. Im unteren Teil der Tabelle sind die Schwingungen der funktionellen Hydroxymethylgruppe mit den zugehörigen Wellenzahlen aufgeführt.

Mode	Pyridin			4-pymeth			3-pymeth			2-pymeth		
	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS
Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$												
$A_1$												
$\nu_4^*$ (8a)**	1628	1600	1593	1648	1646	1633	1638	1605	1630	1618	1578	1575
$\nu_5$ (19a)	1506	1494	1512	1522	1505	1502	1511	1484	1499	1508	1502	1510
$\nu_6$ (9a)	1245	1223	1218	1243	1247	1250	1228	1216	1227			
$\nu_7$ (18a)	1091	1074	1067	1088	1073	1065	1054	1053	1053	1086	1103	1120
										1066	1058	1053
$\nu_8$ (12)	1043	1040	1035	1213	1213	1206	1041	1039	1034			
$\nu_9$ (1)	1007	1008	1006	1008	1011	1013				1012	1011	1003
$\nu_{10}$ (6a)	604	620	623	818	812	810	645	645	661	817	812	844
										635	644	653
$A_2$												
$\nu_{11}$ (17a)	861			870	879	882						
$\nu_{12}$ (10a)	840	892	879	935						890	880	870
$B_1$												
$\nu_{14}$ (5)	884	949	944							913	904	900
$\nu_{15}$ (10b)	867		922	911						928		922
$\nu_{16}$ (11)	705		697	783		785	769	805	813	746	761	752
$\nu_{17}$ (16b)	517		753	618	672	659	620	614	613	620	635	632
$B_2$												
$\nu_{21}$ (8b)	1618	1581	1569	1609	1617	1607	1619	1588	1592	1638	1604	1622
$\nu_{22}$ (19b)	1470		1484	1446	1453	1440	1449	1437	1435	1465	1466	1470
$\nu_{23}$ (14)	1392		1404	1390	1380	1382	1402	1372	1384	1404	1365	1378
$\nu_{24}$ (3)	1381		1387	1357	1344	1348	1364	1341	1348	1323	1319	1323
$\nu_{25}$ (15)	1172	1157	1150				1140	1129	1128	1173	1194	1195
$\nu_{26}$ (18b)	1077	1055		1114			1073	1107	1105	1124	1128	1154
$\nu_{27}$ (6b)	659	658	651	675	686	700				590		
Schwingungen der funktionellen Hydroxymethyl-Gruppe												
$\rho_{\text{CH}_2}$				1023			1021			1028		1018
$\tau_{\text{CH}_2}$				1281		1272	1280	1265	1271	1277	1264	1299
$\omega_{\text{CH}_2} + \delta_{\text{OH}}$				1267			1277	1234	1239	1265	1245	1243
$\delta_{\text{OH}}$							1216	1196	1194	1210	1231	1223
$\omega_{\text{CH}_2} + \delta_{\text{OH}}$				1465	1462	1498	1480	1468	1457	1452	1437	1441
$\sigma_{\text{CH}_2}$				1529	1569	1557	1533	1528	1514	1524	1529	1542

\* Herzberg-Notation

\*\* Wilson-Notation

Erklärung der Symbole:  $\rho$  Schaukelschwingung,  $\tau$  Drehschwingung,  $\omega$  Wippschwingung,  $\sigma$  Scherschwingung,  $\delta$  Deformationsschwingung.

Des Weiteren tritt die Bande bei  $1073\text{ cm}^{-1}$  (4-pymeth) bzw.  $1068\text{ cm}^{-1}$  (4-picam) sehr viel deutlicher hervor. Sie wird von der  $\nu_7$ -Normalmode verursacht. Eine erhöhte Signalintensität kann ebenfalls für die Bande bei  $812\text{ cm}^{-1}$  (4-pymeth) bzw.  $806\text{ cm}^{-1}$  (4-picam) festgestellt werden. Ihr liegt die  $\nu_{10}$ -Normalmode zugrunde. Weiterhin findet sich die  $\nu_{27}$ -Schwingungsbande bei  $689\text{ cm}^{-1}$  (4-pymeth) bzw.  $676\text{ cm}^{-1}$  (4-picam). Auch sie tritt im Vergleich zum Raman-Spektrum von Pyridin intensiver hervor.

Die Raman-Spektren der beiden *para*-substituierten Pyridinderivate (4-picam und 4-pymeth) unterscheiden sich nur an einer Bande signifikant. Diese Bande befindet sich bei  $812\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{10}$  und  $\omega_{\text{CH}_2}$  sowie  $\delta_{\text{OH}}$ ) für 4-pymeth und bei  $797\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{16}$  und  $\tau_{\text{NH}_2}$ ) für 4-picam. Weitere kleine Unterschiede finden sich bei  $1083\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_7$  und  $\omega_{\text{CH}_2}$ ), wo 4-picam eine etwas höhere Signalintensität aufweist. Gleiches gilt für die Banden bei  $1341\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{24}$  und  $\tau_{\text{CH}_2}$ ) und  $1375\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{23}$  und  $\tau_{\text{CH}_2}$ , sowie  $\tau_{\text{NH}_2}$ ). Die Erhebung der Signalintensität im Bereich von  $1550\text{ cm}^{-1}$  bis  $1650\text{ cm}^{-1}$  wird der O-H-Schwingung des Wassers zugeordnet. Wasser wird als Lösungsmittel bei den Raman-Messungen aller in diesem Abschnitt betrachteten Analyten verwendet.

Für beide Analyten ändert sich das Erscheinungsbild des gesamten Spektrums beim Wechsel von den Raman- zu den SERS-Messdaten dramatisch. Bei dem Vergleich mit dem SERS-Spektrum von Pyridin zeigt sich, dass sich die Intensitätsverhältnisse der  $\nu_8$ - zur  $\nu_9$ -Schwingungsbande für die *para*-substituierten Pyridinderivate umkehren. Das heißt die  $\nu_8$ -Schwingungsbande ist in den SERS-Spektren von 4-pymeth und 4-picam die intensivste Bande. Im Fall des SERS-Spektrums von Pyridin hingegen weist die  $\nu_8$ -Schwingungsbande zwar eine deutlich höhere Intensität (relativ zu der  $\nu_9$ -Schwingungsbande) auf, jedoch bleibt die  $\nu_9$ -Schwingungsbande die dominantere der beiden.

Auch für die beiden SERS-Spektren der *para*-substituierten Pyridinderivate gilt, dass sie sich nur in sehr wenigen Details voneinander unterscheiden. Der einzige signifikante Unterschied findet sich in der Doppelbande bei  $1607\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{21}$ ) und  $1633\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ) im SERS-Spektrum von 4-pymeth. Die  $\nu_4$ -Normalmoden wird bei 4-picam stark von der  $\text{NH}_2$ -Scherschwingung ( $\sigma_{\text{NH}_2}$ ) der Methylaminogruppe beeinflusst. Die Schwingung der funktionellen Gruppe spaltet die  $\nu_4$ -Normalmode in ein Dublett (siehe hierzu die angegebenen Werte der berechneten Schwingungsmoden in Tabelle 4.1, sowie die Darstellung der Molekülbewegungen der Normalmoden in Anhang B). Die drei resultierenden Schwingungsmoden überlagern sich im SERS-Spektrum von 4-picam. Sie bilden eine Hauptbande bei  $1605\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{21}$ ) mit zwei Schultern bei  $1615\text{ cm}^{-1}$  und  $1630\text{ cm}^{-1}$  (Dublett von  $\nu_4$  und  $\sigma_{\text{NH}_2}$ ).

Weitere, weniger deutliche Unterschiede sind bei den Banden um  $1440\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{22}$  und  $\omega_{\text{CH}_2}$  sowie  $\delta_{\text{OH}}$ ) im 4-pymeth SERS-Spektrum und bei  $613\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{17}$  und  $\omega_{\text{CH}_2}$ ) im

SERS-Spektrum von 4-picam erkennbar.

Aus den genannten Beobachtungen erschließt sich, dass die *para*-substituierte funktionelle Gruppe keinen wesentlichen Einfluss auf die Signale des Raman- und SERS-Spektrums hat. Die Änderungen im Vergleich zu den Raman- und SERS-Spektren von Pyridin werden lediglich durch die *para*-Position des Substituenten bestimmt. Aus der großen Übereinstimmung der SERS-Spektren von 4-picam und 4-pymeth erschließt sich, dass beide Pyridinderivate in gleicher Weise mit der Metalloberfläche interagieren. Beide *para*-substituierten Pyridinderivate wechselwirken über das Stickstoffatom des heteroaromatischen Ringsystems mit der Oberfläche der *c*-AgNPs [vgl. Abbildung 4.4 b)].

Betrachtet man nun die Raman- und SERS-Datensätze der beiden *meta*-substituierten Pyridinderivate (3-picam und 3-pymeth), haben beide Raman-Spektren auch hier ein sehr ähnliches Erscheinungsbild. Es fällt auf, dass die dominierende Bande dieser Raman-Spektren die Bande bei  $1039\text{ cm}^{-1}$  ist, welche von der  $\nu_8$ -Schwingungsmode hervorgerufen wird. Eine Bande, die von der  $\nu_9$ -Schwingungsmode verursacht wird, kommt laut den berechneten Werten bei diesen beiden *meta*-substituierten Pyridinderivaten nicht vor. Die trigonale Ringschwingung der N1-C3-C5 Atome wird offensichtlich durch die funktionellen Gruppen am C3- bzw. C5-Kohlenstoffatom unterdrückt.

Gelegentlich wird die sehr dominante  $\nu_8$ -Schwingungsbande fälschlich als verschobene  $\nu_9$ -Schwingungsbande interpretiert [28]. Aus Abbildung 4.2 geht hervor, dass die Atombewegungen beider Normalmoden genau die gegensätzlichen Atome des Ringes einschließen. Es kann demzufolge nicht von einer Verschiebung der Ringschwingungsbande gesprochen werden.

Vier weitere Banden treten in den beiden Raman-Spektren der *meta*-substituierten Pyridinderivate deutlich hervor. Hierbei handelt es sich um die Bande bei den Wellenzahlen  $805\text{ cm}^{-1}$  (3-pymeth) bzw.  $800\text{ cm}^{-1}$  (3-picam), verursacht von der *out-of-plane*-Schwingungsmode  $\nu_{16}$ . Weiterhin gibt es eine Verschiebung der Bande bei  $837\text{ cm}^{-1}$  (3-pymeth) bzw.  $827\text{ cm}^{-1}$  (3-picam), von der  $\nu_{10}$ -Schwingungsmode hervorgerufen. Eine weitere Bande, welche sich signifikant von den Raman-Schwingungsbanden des Pyridins unterscheiden, befinden sich bei  $1196\text{ cm}^{-1}$  (3-pymeth) bzw.  $1198\text{ cm}^{-1}$  (3-picam), verursacht von Schwingungen der funktionellen Gruppen. Für 3-picam ist bereits aus Abschnitt 4.1 bekannt, dass diese Bande des 3-picam Raman-Spektrums von der  $\tau_{\text{CH}_2}$ -Schwingung und der  $\tau_{\text{NH}_2}$ -Schwingung herrühren. Im Fall von 3-pymeth handelt es sich bei der Bande bei  $1196\text{ cm}^{-1}$  allerdings um die O-H-Deformationsschwingung  $\delta_{\text{OH}}$ . Die letzte Bande in dieser Reihe ist bei  $1234\text{ cm}^{-1}$  (3-pymeth) bzw.  $1237\text{ cm}^{-1}$  (3-picam) lokalisiert und wird bei beiden Derivaten der  $\omega_{\text{CH}_2}$  zugeschrieben. Im Fall von 3-pymeth wird die Schwingung

zusätzlich von der  $\delta_{\text{OH}}$ -Schwingungen verursacht.

Die Bande bei  $1653\text{ cm}^{-1}$  ( $\sigma_{\text{NH}_2}$ ) erscheint ausschließlich in dem Raman-Spektrum von 3-picam. Diese Schwingungsmode hat keine korrespondierende Schwingung in 3-pymeth, da hier keine  $\text{NH}_2$ -Gruppe vorhanden ist. Die Unterschiede zum Raman-Spektrum von Pyridin bilden die dominante  $\nu_8$ -Schwingungsbande sowie die nicht vorhandene  $\nu_9$ -Schwingungsbande. Weiterhin bilden die fünf genannten Banden bei den Wellenzahlen  $\sim 800\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 830\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1197\text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1235\text{ cm}^{-1}$  und  $\sim 1653\text{ cm}^{-1}$  Unterschiede zum Raman-Spektrum von Pyridin. Gleichzeitig handelt es sich bei ihnen auch um die minimalen Unterschiede, welche zwischen den Raman-Spektren der beiden hier besprochenen *meta*-substituierten Pyridinderivaten zu finden sind. Dabei handelt es sich um leichte Wellenzahlverschiebungen der Bandenposition.

Übergehend zu den SERS-Spektren der beiden untersuchten *meta*-substituierten Pyridinderivate bleibt das generelle Erscheinungsbild der entsprechenden Raman-Spektren erhalten. Eine kleine Bande bei  $1384\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{23}$  und  $\delta_{\text{OH}}$ ) erscheint im SERS-Spektrum von 3-pymeth mit geringer Intensität, aber dennoch stärker als in dem Raman-Spektrum relativ zu der  $\nu_8$ -Schwingungsmode. Diese Verstärkung könnte ein Hinweis darauf sein, dass 3-pymeth auf dieselbe Art mit der Oberfläche der c-AgNPs wechselwirkt wie 3-picam. Darauf deutet auch die große Übereinstimmung der beiden erhaltenen SERS-Spektren hin. Alle sichtbaren Banden nehmen relativ zu der  $\nu_8$ -Schwingungsbande im SERS-Spektrum ab (im Vergleich zum Raman-Spektrum). Dieses Verhalten wurde für 3-picam bereits ausführlich in Abschnitt 4.1 beschrieben und interpretiert. Es ist auf die nahezu senkrechte Orientierung der *yz*-Molekülebene (bei 3-picam und 3-pymeth) relativ zur Metalloberfläche zurückzuführen. Daraus erschließt sich auch, dass 3-pymeth ebenso wie 3-picam vorrangig über das Stickstoffatom des Pyridinrings mit den c-AgNPs wechselwirkt, jedoch auch eine Interaktion durch die funktionelle Gruppe stattfindet [vgl. hierzu Abbildung 4.6 b) in Abschnitt 4.1 unteres Schema].

Als letzte in dieser Diskussionsreihe werden die Schwingungsspektren der beiden *ortho*-substituierten Pyridinderivate 2-pymeth und 2-picam untersucht. Das Erscheinungsbild der Raman-Spektren ähnelt in seinen Grundzügen demjenigen von Pyridin. Es können zwei dominante Banden bei  $1011\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_9$ ) und bei  $1085\text{ cm}^{-1}$  (2picam) bzw.  $1058\text{ cm}^{-1}$  (2-pymeth) ( $\nu_7$ ) erkannt werden. Lägen nur die Spektren ohne die berechneten Werte vor, könnte fälschlicherweise auf eine Bandenverschiebung der  $\nu_8$ -Schwingungsbande geschlossen werden. Nur mit Hilfe der simulierten Raman-Daten ist es möglich, die tatsächlich vorliegende Situation zu erkennen. Unter den Normalmoden der beiden untersuchten *ortho*-Pyridinderivate findet sich keine, die der  $\nu_8$ -Schwingung des Pyridinrings äquivalent wäre.

Im Unterschied zum Raman-Spektrum von Pyridin gibt es keine Bande bei  $1220\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_6$ ), stattdessen erscheint eine Bande bei  $1237\text{ cm}^{-1}$  (2-picam:  $\omega_{\text{CH}_2}$ ) bzw.  $1234\text{ cm}^{-1}$  (2-pymeth:  $\omega_{\text{CH}_2}$  und  $\delta_{\text{OH}}$ ). Auch hier könnte bei ungenügend exakter Bandenzuordnung eine Verschiebung der  $\nu_6$ -Schwingungsbande interpretiert werden.

Eine Differenz zwischen den beiden Raman-Spektren von 2-picam und 2-pymeth ist in der Region um  $800\text{ cm}^{-1}$  zu finden. Hier erscheint in beiden Spektren eine breite Bande, verursacht von der  $\nu_{10}$ -Schwingungsmode. Sie ist jedoch im Fall von 2-pymeth stark korreliert mit der  $\omega_{\text{CH}_2}$ -Schwingung sowie der  $\delta_{\text{OH}}$ -Schwingung der funktionellen Hydroxymethylgruppe. Die Bande ist im Raman-Spektrum von 2-pymeth bei  $812\text{ cm}^{-1}$  zu finden, wohingegen sich die Bande bei 2-picam bei  $802\text{ cm}^{-1}$  befindet. Auch für die beiden *ortho*-substituierten Pyridinderivate lässt sich feststellen, dass die Veränderungen der im Spektrum sichtbaren Normalmoden im Wesentlichen auf die Position der funktionellen Gruppe zurückzuführen ist. Die Art der funktionellen Gruppe spielt eine sehr untergeordnete Rolle.

Durch die Diskussion in Abschnitt 4.1 ist bereits bekannt, dass das c-SERS-Spektrum von 2-picam stark von Schwingungen der Methylaminogruppe geprägt ist. Dementsprechend sollten zwischen den beiden SERS-Spektren der hier betrachteten Derivate deutliche Differenzen auftreten. Diese Erwartung wird durch die erhaltenen SERS-Messdaten bestätigt. Es lassen sich beträchtliche Unterschiede zwischen den beiden SERS-Spektren in Abbildung 4.7 d) feststellen. Die Änderungen erstrecken sich über den gesamten untersuchten Wellenzahlbereich. Die Banden, welche von *in-plane*-Schwingungen hervorgerufen werden, erscheinen extrem verstärkt (relativ zur  $\nu_9$ -Schwingungsbande). Dies gilt besonders für die Normalmoden der  $B_2$ -Symmetrieklasse. Die meisten dieser Normalmoden treten in Kombination mit Schwingungen der funktionellen Gruppen auf. Ebenso werden einige der *out-of-plane*-Normalmoden intensiv verstärkt (relativ zur  $\nu_9$ -Schwingungsbande). Die integrierten relativen Intensitäten sind in Abbildung 4.8 aufgetragen. Es zeigt sich deutlich, dass der Verstärkungseffekt bei 2-pymeth sogar noch intensiver auf die  $B_2$ -*in-plane*-Normalmoden als bei 2-picam wirkt. Bei vielen dieser Schwingungsbanden kommt es zu einer Intensitätsinversion. Das heißt das SERS-Spektrum wird nicht mehr von der  $\nu_9$ -Schwingungsbande dominiert.

Die zusätzliche Verstärkung der  $B_2$ -*in-plane*-Normalmoden (mit Einfluss von Schwingungen der Hydroxymethylgruppe) im Fall von 2-pymeth deutet darauf hin, dass die Hydroxylfunktion stärker mit der Metalloberfläche wechselwirkt als die Methylaminogruppe von 2-picam. Dass auch die  $\nu_{12}$ -Schwingungsmode ( $A_2$ -Symmetrieklasse) intensiver als im Raman-Spektrum detektiert wird deutet darauf hin, dass sich die 2-pymeth-Moleküle mit ihrer *yz*-Molekülebene noch intensiver waagrecht zur Metalloberflächen orientieren (verglichen mit 2-picam).

Die signifikanten Unterschiede in den beiden SERS-Spektren von 2-pymeth und 2-picam befinden sich bei  $1510\text{ cm}^{-1}$  (2-pymeth:  $\nu_5$  und  $\omega_{\text{CH}_2}$ ),  $1378\text{ cm}^{-1}$  (2-pymeth:  $\nu_{23}$  und  $\delta_{\text{OH}}$ ),  $1323\text{ cm}^{-1}$  (2-pymeth:  $\nu_{24}$  und  $\tau_{\text{CH}_2}$ , sowie  $\delta_{\text{OH}}$ ) und  $1378\text{ cm}^{-1}$  (2-pymeth:  $\nu_{26}$  und  $\omega_{\text{CH}_2}$ , sowie die C-OH-Streckschwingung  $\nu_{\text{C-OH}}$ ). Sie sind alle auf Schwingungen zurückzuführen, welche sowohl Anteile der Normalmoden aufweisen als auch Anteile der Schwingungen der funktionellen Hydroxymethylgruppe.

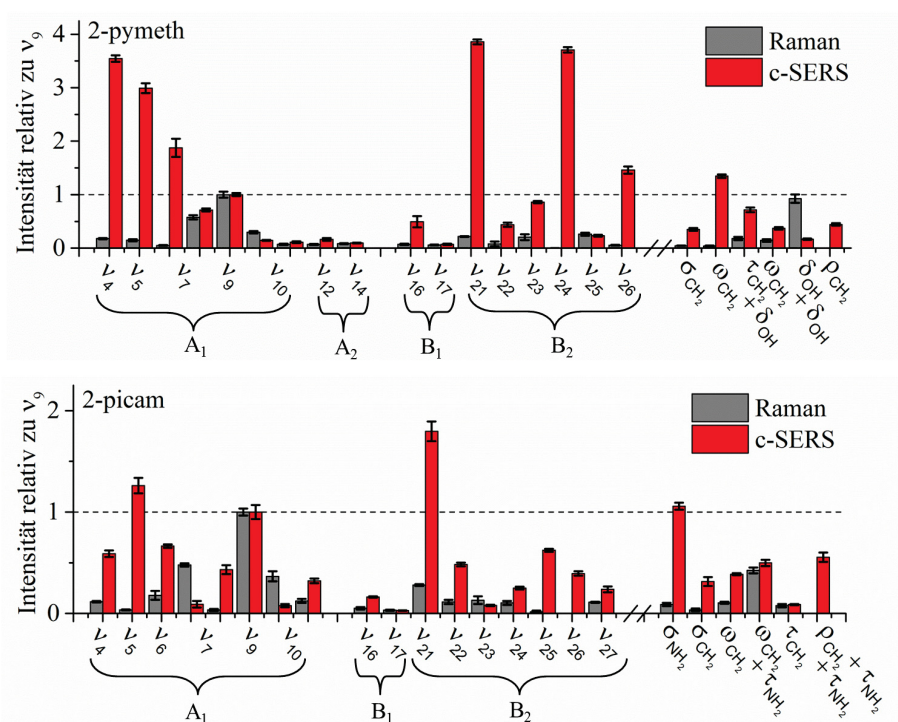


Abbildung 4.8.: Intensitäten der Normalmoden sowie der Schwingungen der funktionellen Gruppen, angegeben für die untersuchten *ortho*-substituierten Pyridinderivate. Im oberen Teil sind die Intensitäten der Raman- (grau) und SERS-Signale (rot) von 2-pymeth dargestellt. Im unteren Teil werden die Intensitäten der Raman- (grau) und SERS-Signale (rot) von 2-picam präsentiert. Alle Intensitäten werden relativ zu der  $\nu_9$ -Schwingungsmode dargestellt.

In diesem Abschnitt wurde die Änderung von Signalintensitäten der Normalmoden des heteroaromatischen Ringsystems betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Substitutionsposition der funktionellen Gruppe von fundamentaler Bedeutung ist. Anhand der Raman-Spektren der *ortho*-, *meta*- und *para*-substituierten Pyridinderivate ergab sich, dass die Schwingungen der beiden funktionellen Gruppen (Hydroxymethyl- und Methylamino-



gruppe) keinen signifikanten Einfluss auf die erhaltenen Raman-Signale haben. Die Abweichungen vom Raman-Spektrum des Pyridins resultieren im Wesentlichen aus den geänderten Symmetrien der Moleküle. Dadurch kommt es zu Bandenverschiebungen, sowie zu relativen Intensitätsänderungen innerhalb des Spektrums. Dies konnte sehr gut an den beiden trigonalen Ringschwingungsmoden  $\nu_8$  und  $\nu_9$  veranschaulicht werden. Diese sind im Raman-Spektrum von Pyridin sehr dominant. Die  $\nu_9$ -Normalmode kommt bei den *meta*-substituierten Derivaten nicht vor. Die  $\nu_8$ -Normalmode verschwindet im Fall der *ortho*-substituierten Derivate und erfährt eine starke Wellenzahlverschiebung im Fall der *para*-substituierten Derivate.

Eine korrekte Bandenzuordnung ist ausschließlich durch die Berücksichtigung der quantenchemischen Daten möglich. Die symmetriebedingte Änderung der Schwingungssignale trifft sowohl für Raman- als auch für SERS-Messungen zu, jedoch kann es bei den SERS-Messungen je nach Substitutionsposition auch zu Verstärkungen der Schwingungssignale der funktionellen Gruppe kommen. Die Intensität der Verstärkung wird durch den evaneszenten Charakter des EM-Feldes auf der Oberfläche der AgNPs bedingt. Im Fall einer Wechselwirkung zwischen Substituent und Metalloberfläche befindet sich die funktionelle Gruppe nahe der Oberfläche, ihre Schwingungssignale werden intensiver verstärkt. Findet keine Wechselwirkung zwischen dem Substituenten und der Oberfläche statt, z.B. im Fall von sterischen Hinderungen, ist die funktionelle Gruppe weiter von der Oberfläche entfernt. Dadurch wirkt das EM-Feld schwächer auf die funktionelle Gruppe.

Bei den in dieser Studie verwendeten Pyridinderivate interagiert das Stickstoffatom des Pyridinrings bevorzugt mit der Metalloberfläche der c-AgNPs. Durch die daraus resultierende sterische Hinderung der *para*- und *meta*-substituierten funktionellen Gruppen wird eine Wechselwirkung mit der Oberfläche weitestgehend verhindert. Die Verstärkung der Substituentenschwingungen nimmt in der Reihenfolge *para* < *meta* < *ortho* zu. Weiterhin führen zunehmende Wechselwirkungen der funktionellen Gruppe mit der Oberfläche zu einer Neigung der *yz*-Molekülebene (relativ zu der Metalloberfläche). Durch die erwähnte Neigung kommt es wiederum zur Verstärkung von  $A_2$ -Normalmoden. Die beobachtete Verstärkung der  $B_2$ -Normalmoden resultiert aus dem Anteil der Substituentenschwingungen in diesen Moden.

In diesem Abschnitt wurde analysiert, welchen Einfluss die Substitutionsposition auf Raman- und SERS-Spektren hat. Dabei konnte beobachtet werden, dass die verwendeten funktionellen Gruppen in *para*-Position keinen signifikanten Beitrag zu den Raman und SERS-Spektren liefern. Diese Feststellung soll im nächsten Abschnitt durch die Verwendung wei-

terer funktioneller Gruppen in *para*-Position auf ihre Gültigkeit überprüft werden. Hierfür werden 4-picam, 4-pymeth, *para*-Picolin, *para*-Formylpyridin und *para*-Cyanopyridin als Analyten eingesetzt.

### 4.3. Der Einfluss der funktionellen Gruppe

Aus den vorhergehenden Abschnitten ist bekannt, dass 4-picam und 4-pymeth bevorzugt über das Stickstoffatom des Pyridinrings mit der Metalloberfläche der *c*-AgNPs wechselwirken. Weiterhin haben die Schwingungen der funktionellen Gruppe selbst keinen großen Einfluss auf die Raman- und SERS-Spektren. Demzufolge ist zu klären, welchen Einfluss verschiedene funktionelle Gruppen an der gleichen Substitutionsposition auf die Normalmoden der Molekülgrundstruktur haben. In diesem Abschnitt werden ganz bewusst die *c*-AgNPs verwendet, um die verstärkten Signale der Normalmoden zu erhalten.

Es wird davon ausgegangen, dass sich Pyridinderivate mit anderen funktionellen Gruppen in *para*-Position ähnlich wie 4-picam und 4-pymeth verhalten. Das heißt sie wechselwirken bevorzugt über das Stickstoffatom des heteroaromatischen Ringsystems mit der Oberfläche. In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass die Moleküle weitestgehend mit der *yz*-Molekülebene senkrecht zur Metalloberfläche angeordnet sind.

Die Molekülstrukturen der verwendeten *para*-substituierten Pyridinderivate sind in Abbildung 4.1 in der oberen Reihe abgebildet. Es handelt sich dabei um 4-picam, 4-pymeth, *para*-Picolin (4-pic), *para*-Formylpyridin (4-formpy) und *para*-Cyanopyridin (4-cypy). Um die unbeeinflussten Normalmoden festzustellen, werden auch Daten von Pyridin selbst erfasst. Hierbei werden die Raman-Spektren von reinem flüssigen Pyridin gemessen. Die Mittelwert Raman- und SERS-Spektren sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

Auf den ersten Blick fällt auf, dass sich die Raman-Spektren von 4-pymeth und 4-picam in dieser Reihe am meisten ähneln, während die Spektren von 4-cypy, 4-formpy und 4-pic einige Unterschiede aufweisen. Gleiches gilt für die SERS-Spektren. Die Raman- und SERS-Spektren von 4-picam und 4-pymeth wurden bereits im vorangegangenen Abschnitt ausführlich besprochen, daher soll nun nicht noch einmal im einzelnen darauf eingegangen werden.

In den Raman- und SERS-Spektren von 4-cypy treten im Bereich ( $1800\text{ cm}^{-1}$  bis  $500\text{ cm}^{-1}$ ), dem *fingerprint*-Bereich, kaum Änderungen zu den Spektren von 4-picam und 4-pymeth auf, während eine sehr intensive Bande bei  $2242\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}\equiv\text{N}$ -Streckschwingung) detektiert wird. Die funktionelle Cyanogruppe ist stark Raman-aktiv. Daher ist zu erwarten, dass sie sowohl im Raman- als auch im SERS-Spektrum deutlich hervortritt. Eine detaillierte



Übersicht der Normalmoden aller untersuchten *para*-substituierten Pyridinderivate findet sich in Tabelle 4.4.

Im Raman-Spektrum von 4-formpy sind im *fingerprint*-Bereich ebenfalls keine zusätzlichen Banden zu beobachten. Allerdings sind deutliche Unterschiede in der Signalintensität erkennbar. So hat die Bande bei  $812\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{10}$  und  $\delta_{\text{CHO}}$ ) eine signifikant geringere Signalintensität (relativ zur  $\nu_9$ -Schwingungsbande) im Vergleich zu den Raman-Spektren von 4-picam, 4-pymeth, 4-cypy und 4-pic. Gleiches gilt auch für die Banden bei  $1200\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_8$  und  $\delta_{\text{CHO}}$ ) und bei  $1236\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_6$  und  $\delta_{\text{CHO}}$ ). Die drei genannten Banden werden sowohl von Normalmoden als auch von Schwingungen der funktionellen Gruppe verursacht.

Im SERS-Spektrum von 4-formpy zeigen sich die gleichen Verstärkungstendenzen wie bei den zuvor besprochenen *para*-substituierten Derivaten (4-picam und 4-pymeth, vgl. Abschnitt 4.2). Die  $\nu_8$ -Schwingungsbande bei  $1207\text{ cm}^{-1}$  wird extrem verstärkt im SERS-Spektrum (relativ zur  $\nu_9$ -Schwingungsbande).

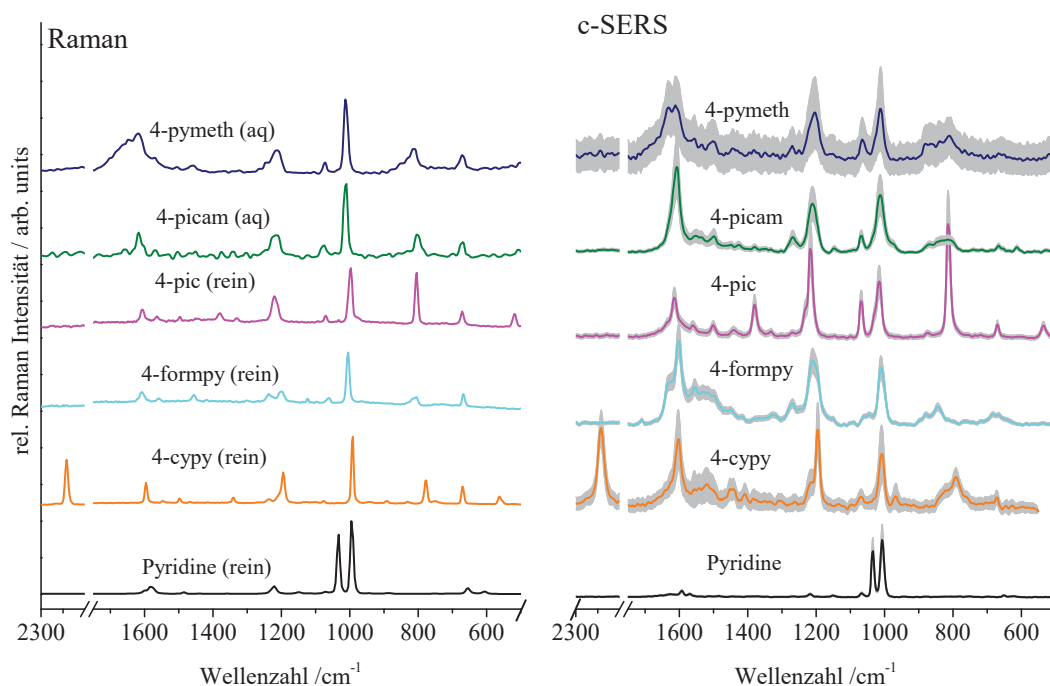


Abbildung 4.9.: Mittelwert-Raman- und c-SERS-Spektren. Alle Spektren werden auf die Intensität der trigonalen Ringschwingungsbande  $\nu_9$  normiert. Von unten nach oben sind dargestellt: die Raman- und SERS-Spektren von Pyridin (schwarz), 4-cypy (orange), 4-formpy (cyan), 4-pic (pink), 4-picam (grün) und 4-pymeth (blau). Für die c-SERS-Messungen sind die Werte der Standardabweichung grau hinterlegt. Die Raman-Spektren ist teils in wässriger Lösung (aq), teils am Reinstoff (rein) gemessen.

Tabelle 4.4.: Wellenzahlen in  $\text{cm}^{-1}$  der Normalmoden des Pyridinrings von Pyridin, 4-cypy, 4-formpy und 4-pic, 4-pymeth und 4-picam. Für jeden Analyten werden von links nach rechts die berechneten Werte (Sim.), die Maxima der Raman-Banden (RS) und die Maxima der c-SERS-Banden (SERS) angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Werte für 4-picam aus Tabelle 4.1 und die Werte für 4-pymeth aus Tabelle 4.3 hier noch einmal aufgeführt. Die Bezeichnungen (aq) und (rein) beziehen sich auf die Raman-Messungen in wässriger Lösung (aq) bzw. am Reinstoff (rein).

Mode	Pyridin (rein)			4-cypy (rein)			4-formpy (rein)			4-pic (rein)			4-pymeth (aq)			4-picam (aq)					
	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS	Sim.	RS	SERS			
Wellenzahl / $\text{cm}^{-1}$																					
$A_1$																					
$\nu_4^*$ (8a)**	1628	1601	1593	1631	1595	1603	1633	1607	1602	1648	1606	1614	1648	1646	1633	1651	1657	1630/ 1641	1617	1615	
$\nu_5$ (19a)	1506	1485	1512	1514	1497	1499	1515		1498	1523			1522	1505	1502	1523	1569	1552	1517	1503	1500
$\nu_6$ (9a)	1245	1221	1218	1250	1238	1218	1252	1236	1273	1261	1221	1234	1243	1247	1250	1258	1224	1271			
$\nu_7$ (18a)	1091	1069	1067	1089	1077	1070	1080	1062	1056	1089	1071	1068	1088	1073	1065	1087	1075	1068			
$\nu_8$ (12)	1043	1033	1035	1223	1194	1195	1224	1200	1207	1242	1211	1216	1213	1213	1206	1234	1210	1210			
$\nu_9$ (1)	1007	994	1006	1004	992	1008	1003	1005	1009	1010	998	1015	1008	1011	1013	1008	1012	1013			
$\nu_{10}$ (6a)	604	606	623	775	746		847	812	844	813	805	813	818	812	810	809	806	813			
$A_2$																					
$\nu_{11}$ (17a)	861	814		862	830					859			870	879	882						
$\nu_{12}$ (10a)	840		879				899		880	902			935			937					
$B_1$																					
$\nu_{14}$ (5)	884	947	944	921	892	968				900											
$\nu_{15}$ (10b)	867	887	922										911								
$\nu_{16}$ (11)	705	707	697	787	778	793	780			776			783		785	787	797	798			
$\nu_{17}$ (16b)	517	753	753	601			567			579			618	672	659	630	668	613			
$B_2$																					
$\nu_{21}$ (8b)	1618	1580	1569	1587	1564	1520	1608	1558	1555	1608	1563	1560	1609	1617	1607	1607	1601	1605			
$\nu_{22}$ (19b)	1470	1441	1484	1447		1451	1447	1456	1450	1449		1442	1446	1453	1440	1449	1451	1450			
$\nu_{23}$ (14)	1392	1414	1404	1391		1409	1393		1414	1386	1380	1379	1390	1380	1382	1391	1375	1379			
$\nu_{24}$ (3)	1381	1358	1387	1346	1340		1343			1354	1331	1334	1357	1344	1348	1364	1341	1351			
$\nu_{25}$ (15)	1172	1149	1150																		
$\nu_{26}$ (18b)	1077			1105		1099	1101	1123	1154	1113			1114			1109	1123				
$\nu_{27}$ (6b)	659	655	651	678	670	673	672	668	680	678	671	670	675	686	700	676	676	667			

\* Herzberg-Notation

\*\* Wilson-Notation

Eine kleine Bande erscheint im SERS-Spektrum von 4-formpy bei  $1710\text{ cm}^{-1}$ . Diese wird der C=O-Streckschwingung zugeordnet. Einflüsse der Schwingungen der funktionellen Gruppe sind auch an den Schwingungsmoden beteiligt, welche die Banden bei  $1602\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ) und bei  $1555\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{21}$ ) verursachen.

Besonders heben sich die Spektren von 4-pic von denen der anderen Derivate ab. Sehr markant sind dabei die Banden bei  $805\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{10}$  und  $\omega_{\text{CH}_3}$ ), bei  $1030\text{ cm}^{-1}$  ( $\sigma_{\text{CH}_3}$ ) und  $1211\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_8$  und  $\omega_{\text{CH}_3}$ ). Alle drei Banden werden hauptsächlich durch Schwingungen der funktionellen Gruppe hervorgerufen.

Sie werden im SERS-Spektrum deutlich mehr verstärkt als die äquivalenten Schwingungsbanden der anderen *para*-substituierten Derivate. Für die funktionelle Methylgruppe  $\text{CH}_3$  gilt ebenso wie für die Cyanogruppe, dass sie sehr Raman-aktiv ist. Daher verwundern die genannten Veränderungen im Spektrum nicht.

Für keine der untersuchten Substanzen treten signifikant verstärkte Signale von  $A_2$ -Schwingungen (*out-of-plane*) auf, aber die meisten der *in-plane*-Schwingungen sind deutlich verstärkt. Aus den Raman- und SERS-Spektren und der geführten Diskussion kann man schließen, dass sich die untersuchten Analytmoleküle orthogonal zur Oberfläche anordnen. Dies folgt entsprechend den Oberflächenauswahlregeln (siehe Abschnitt 2.7) aus der Abwesenheit der  $A_2$ -Schwingungsbanden und der intensiven Signalverstärkung der *in-plane*-Schwingungsbanden.

Im Falle von stark Raman-aktiven funktionellen Gruppen verursachen die Schwingungen der Substituenten intensive charakteristische Banden in den Raman- und SERS-Spektren. Dies konnte bei den Spektren 4-cypy und 4-pic gezeigt werden. Für andere funktionelle Gruppen mit geringerem Streuquerschnitt ähneln sich die Raman-Spektren untereinander sehr, ebenso wie die SERS-Spektren.

Dies gilt für die funktionellen Carboxyl- (4-formpy), Methylamino- (4-picam) und Hydroxymethyl- (4-pymeth) Gruppen.

Im *fingerprint*-Bereich des Raman- und SERS-Spektrums von 4-cypy lässt sich ebenfalls eine große Übereinstimmung mit den jeweiligen Spektren der anderen Pyridinderivate feststellen. Die Signale der Normalmoden des Pyridinrings werden (im Fall von *para*-Substituenten) von der Art der funktionellen Gruppen nicht signifikant beeinflusst. Hier seien die Spektren von 4-pic ausgenommen, da sich die Raman- und SERS-Spektren dieses Derivates, wie bereits besprochen, grundlegend von den Spektren der anderen *para*-substituierten Pyridinderivate unterscheidet.

Für die 4-formpy-, 4-picam- und 4-pymeth-Moleküle lässt sich aus den erhaltenen Daten

schließen, dass sie über das Stickstoffatom mit der Metalloberfläche wechselwirken. Wie bereits in Abschnitt 4.1 diskutiert gilt somit, dass die funktionelle Gruppe sehr weit von der Oberfläche entfernt ist. Aufgrund des evaneszenten Charakters des EM-Feldes auf der Oberfläche der AgNPs werden die Schwingungen der funktionellen Gruppe nicht oder kaum verstärkt.

Bei 4-pic und 4-cypy kann keine ganz so klare Aussage über die bevorzugte Wechselwirkungsposition getroffen werden, da hier starke Schwingungssignale der funktionellen Gruppe detektiert werden. Allerdings treten die Schwingungen der A<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Symmetrieklassen in den beiden SERS-Spektren ähnlich stark auf, wie in den SERS-Spektren von 4-formpy, 4-picam und 4-pymeth. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sie sich ähnlich wie die anderen Moleküle verhalten. Das heißt sie wechselwirken über das Stickstoffatom des Pyridinrings mit der Oberfläche der c-AgNPs.

Zur Zusammenfassung des gesamten Kapitels seien die erlangten Erkenntnisse nun noch einmal kurz resümiert: Bei der Untersuchung von 2-picam, 3-picam und 4-picam mit c-AgNPs und h-AgNPs konnte gezeigt werden, dass die Analyten auf unterschiedliche Arten mit den beiden verwendeten AgNPs interagierten. Mit der Oberfläche der c-AgNPs wechselwirken die Analyten bevorzugt über das Stickstoffatom des heteroaromatischen Ringsystems, während im Fall der h-AgNPs die Interaktion bevorzugt über das Stickstoffatom der funktionellen Methylaminogruppe stattfindet. Dies führte besonders in den SERS-Spektren von 4-picam zu gravierenden Änderungen der detektierten Signale. Lässt die räumliche Anordnung des Analytmoleküls es zu, so können sich die Moleküle trotz unterschiedlicher bevorzugter Wechselwirkungspositionen in eine ähnliche Orientierung gegenüber der Oberfläche anordnen. Dieses Verhalten führt zu einer Angleichung der SERS-Spektren für die unterschiedlichen AgNPs. Dies war im Fall von 2-picam und zum Teil auch von 3-picam zu beobachten. Hier zeigt sich, dass Zusammenhänge zwischen den Einflussfaktoren bestehen.

Anhand von Raman-spektroskopischen Daten waren die äquivalenten picam- und die pymeth-Isomere kaum unterscheidbar. Bei Verwendung eines Kolloids, in dieser Arbeit c-AgNPs, und variierenden Pyridinderivaten konnte festgestellt werden, dass durch die Anwendung von SERS-Spektroskopie die Schwingungen der funktionellen Gruppe hervorgehoben werden können. Dies ist der Fall, wenn der Substituent direkt mit der Metalloberfläche wechselwirkt, wie anhand der SERS-Spektren von 2-picam und 2-pymeth gezeigt werden konnte. Mit beiden Methoden war es jedoch gut möglich, die Substitutionsposition anhand des Raman- bzw. SERS-Spektrums zu bestimmen. Dies gelang durch die Analyse von Wellenzahlenverschiebungen der Schwingungsbanden sowie relativer Intensitätsunterschiede in

den Spektren. Grundlegende Voraussetzung für eine valide Auswertung der Spektren ist die exakte Bandenzuordnung, welche nur mit Hilfe der quantenchemischen Berechnungen möglich ist.

Funktionelle Gruppen in *para*-Position des Pyridinrings wurden spektroskopisch untersucht. Hierbei wurden sowohl Raman- als auch c-SERS-Spektren aufgezeichnet. Es konnte bestätigt werden, dass die Art der funktionellen Gruppe wenig signifikanten Einfluss auf die erhaltenen Signale der Raman- und SERS-Spektren hat. Eine Ausnahme bilden hierbei funktionelle Gruppen mit einer sehr hohen Raman-Aktivität. Dies konnte bei den Spektren von 4-cypy und 4-pic beobachtet werden.

In dieser Studie wurden die Einflussfaktoren von AgNPs, der Substitutionsposition und der Art der funktionellen Gruppe anhand von Pyridin und Pyridinderivaten untersucht. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Einflüssen wurden aufgezeigt. Die Erkenntnisse dieser Studie sind nicht allgemein gültig. Liegen geänderte Versuchsbedingungen vor, werden beispielsweise andere Metallnanopartikel eingesetzt oder die Analyten variiert, so kann es durch die Änderung der funktionellen Gruppe, der Substitutionsposition und der präferierten Wechselwirkungsposition zu abweichenden Beobachtungen kommen.

Es ist dennoch möglich die Erkenntnisse auf chemisch ähnliche molekulare Systeme zu übertragen, dies wird in Kapitel 5 anhand eines komplexen Moleküls (Methotrexat) gezeigt. Mit Hilfe des LOC-SERS-Aufbaus wird Methotrexat (MTX) quantitativ detektiert. Das MTX-Molekül ist aus zwei großen Bestandteilen aufgebaut. Ein Bestandteil ist ein Pteridinringsystem (ein heteroaromatisches Ringsystem, ähnlich dem Pyridin), substituiert mit Aminogruppen. Ein weiterer Bestandteil ist ein *para*-substituierter Phenyling (ähnlich den *para*-substituierten Pyridinderivaten). Es soll gezeigt werden, dass die Erkenntnisse des gegenwärtigen Kapitels auch auf andere molekulare Systeme übertragbar sind. Um eine valide Auswertung zu ermöglichen, werden zunächst durch Verwendung verschiedener pH-Werte die optimalen Messbedingungen für die SERS-Experimente bestimmt. Weiterhin wird eine Analyse der Orientierung der Analytmoleküle zur Oberfläche durchgeführt, hierbei werden die bereits gewonnenen Erkenntnisse angewandt. Als Kolloid werden sowohl c-AgNPs als auch h-AgNPs eingesetzt. Die quantitative Detektion wird in basischer Pufferlösung sowie in artifiziellem Blutplasma erfolgreich durchgeführt. Weiterhin werden SERS-Messungen unterschiedlicher Konzentrationen von MTX in realem Blutplasma präsentiert.

## 5. Quantitative Detektion von Methotrexat

Bei der Chemotherapie von Brust- und Darmkrebs, sowie weiteren soliden Tumoren und Leukämie, kommen häufig Antimetaboliten zum Einsatz. Antimetabolite wirken indem sie als falsche Bausteine in die DNA oder RNA eingebaut werden. So wird die Zellteilung und der Stoffwechsel gestört. Bei der Anwendung von Antimetaboliten kann es zu gravierenden Nebenwirkungen kommen (unter Anderem: Übelkeit, Anämie, Nierenschäden und Zellabsterben). Die Nebenwirkungen treten vermehrt bei einer sogenannten Überdosierung auf und können bis hin zum Tode führen [98–100].

Die Konzentration des verabreichten Wirkstoffes darf demzufolge keinesfalls zu hoch sein. Ist sie jedoch zu niedrig, zeigt das Medikament keine ausreichende Wirkung. Die chemische Substanz Methotrexat (MTX) ist ein solcher Antimetabolit. MTX zählt zu den Folsäureantagonisten und wirkt, indem es kompetitiv und reversibel das Enzym Dihydrofolat-Reduktase inhibiert. Dabei werden gezielt Zellen mit einer hohen Teilungs- bzw. Regenerationsrate angegriffen. Dies sind neben den Krebszellen auch die Schleimhautzellen und Zellen des Knochenmarks.

Der therapeutische Bereich der MTX-Konzentration in der chemotherapeutischen Anwendung wird zwischen  $1 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$  (Konzentration in Blutplasma 42 Stunden nach der Verabreichung) angegeben [101–103]. Da die Abbaugeschwindigkeit von MTX im menschlichen Körper (Pharmakokinetik) von verschiedenen Faktoren abhängt, wird bei der Behandlung mit hoch dosiertem MTX routinemäßig die Konzentration des Medikaments im Blutplasma gemessen. Diese Messungen werden in bestimmten Zeitintervallen nach Verabreichung des Medikaments durchgeführt. So ist es möglich, die individuelle Pharmakokinetik des Patienten zu beobachten. Auf diese Art können Über- oder Unterdosierungen verhindert werden. Das beschriebene Vorgehen wird als „*therapeutic drug monitoring*“ (TDM) bezeichnet. Zur Umsetzung von TDM haben sich bereits verschiedene Messmethoden etabliert. Dies sind zum Beispiel Immunassays [104, 105] oder gas- bzw. hochdruckflüssigchromatographische Verfahren [106, 107]. Mit diesen Methoden wird eine sehr hohe Spezifizierung und Sensitivität erreicht. Jedoch sind diese Methoden zeitaufwendig und erfordern hochqualifiziertes Personal. In der Folge ist TDM ein sehr kostenintensives Verfahren. Durch die Entwicklung neuer Methoden für TDM sollen die technische Komplexität sowie der Zeitaufwand reduziert werden. Dabei werden in der Forschung verschiedene Ansätze

verfolgt [74, 108]. Eine vielversprechende Methode ist die SERS-Spektroskopie. Wird ein tropfenbasierter mikrofluidischer Aufbau verwendet, können trotz der auftretenden Signalfuktuationen sehr valide quantitative Ergebnisse erzielt werden [12, 74]. In den folgenden Abschnitten werden bereits publizierte Ergebnisse der quantitativen Detektion von MTX in basischer Pufferlösung [109] zusammengefasst. Ergänzend folgen weiterführende Studien in artifiziellem Blutplasma sowie in realem Blutplasma.

Mit Hilfe eines LOC-SERS Aufbaus wird eine Konzentrationsreihe von MTX in basischer wässriger Lösung gemessen. Zuvor werden UV/Vis-Absorptions-Messungen an dem Analyt-Kolloid-Gemisch durchgeführt. In Abschnitt 5.1 wird durch die Variation des pH-Werts die Signalintensität optimiert. Weiterhin wird in Abschnitt 5.2 die Orientierung der MTX-Moleküle relativ zur Metalloberfläche bestimmt. Hierbei werden die Erkenntnisse aus Kapitel 4 angewandt, da das MTX-Molekül aus zwei großen Bestandteilen aufgebaut ist, welche den zuvor untersuchten Pyridinderivaten ähnlich sind. Es handelt sich dabei um ein Pteridinringsystem (ein heteroaromatisches Ringsystem mit mehreren Stickstoffatomen, ähnlich dem Pyridin), substituiert mit Aminogruppen sowie einen *para*-substituierter Phenylring (ähnlich den *para*-substituierten Pyridinderivaten).

Die SERS-Messungen einer Konzentrationsreihe von MTX in basischer Pufferlösung im Konzentrationsbereich vom  $0,17 \mu\text{M}$  bis  $100 \mu\text{M}$  werden in Abschnitt 5.3 vorgestellt und analysiert. Im letzten Abschnitt 5.4 dieses Kapitels wird zunächst eine quantitative Detektion von MTX in artifiziellem Blutplasma durchgeführt (Konzentrationsbereich  $0,08 \mu\text{M}$  bis  $34 \mu\text{M}$ ). Anschließend werden erste Experimente zur konzentrationsabhängigen Detektion von MTX in realem Blutplasma präsentiert.

## 5.1. SERS-Signal in Abhängigkeit des pH-Wertes

In diesem Abschnitt soll die pH-Wert-Abhängigkeit der SERS-Signale von Methotrexat (MTX) untersucht werden. Als SERS-Substrat werden für die SERS-Messungen Citrat-reduzierte Silbernanopartikel (c-AgNPs) in Kolloid-Lösung verwendet. Um MTX unter Verwendung von SERS quantitativ zu detektieren, sollte zunächst sichergestellt werden, dass die zu untersuchende Substanz mit den c-AgNPs in Wechselwirkung tritt. Ob die MTX-Moleküle mit den c-AgNPs interagieren wird durch die Messung von UV/Vis-Absorptions-Spektren überprüft. Ändert sich die Absorbanz der Analyt-Kolloid-Mischung relativ zu den Absorbanzen der separaten Substanzen, so ist davon auszugehen, dass die Analytmoleküle an der Metalloberfläche adsorbiert werden. Im Fall von Kolloid-Lösungen geht dies meist einher mit einer Agglomeration der AgNPs, d.h. die Absorptionsbande im UV/Vis-Spektrum wird aufgrund der geänderten Größenverteilung der Partikel in der Regel breiter



und verliert an Intensität. Die erhaltenen Daten der UV/Vis-Messung sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Das Absorptionsmaximum der *c*-AgNPs liegt in neutraler wässriger Umgebung bei 426 nm. Durch die Zugabe von saurer Pufferlösung (pH-Wert 2) wird das Maximum leicht verschoben, zu 404 nm. In basischer Umgebung (pH-Wert 12) ist das Absorptionsmaximum bei 406 nm zu finden und die Bande ist deutlich breiter. Dies deutet auf eine Agglomeration der AgNPs hin.

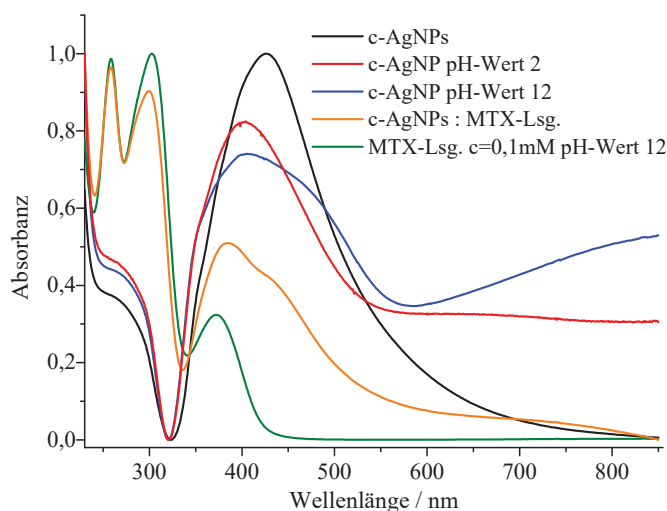


Abbildung 5.1.: UV/Vis-Absorptions-Spektren des Kolloids (*c*-AgNPs) in neutraler wässriger Umgebung (schwarz), *c*-AgNPs bei pH-Wert 2 (rot) bzw. bei pH-Wert 12 (blau), der basischen Methotrexatlösung (grün) und der Mischung von MTX und *c*-AgNPs bei pH-Wert 12 (orange). Die Absorbance wird relative zum Absorptionsmaximum der Kolloid-Lösung in neutraler Umgebung angegeben.

Bei der UV/Vis-Absorptions-Messung von MTX in basischer wässriger Lösung (pH-Wert 12) sind mehrere Absorptionsmaxima zu beobachten. Diese befinden sich bei 258 nm, 303 nm und 372 nm. Die starken Absorptionsmaxima resultieren aus den  $\pi \rightarrow \pi^*$  und  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  Elektronenanregungen im MTX-Molekül. Nach dem Mischen der beiden Substanzen bei pH-Wert 12 wird aus den Absorptionsbanden bei 406 nm (*c*-AgNPs) und 372 nm (MTX) eine breite Bande mit einem Maximum bei 386 nm und einer Schulter bei etwa 445 nm. Daraus lässt sich schließen, dass eine Agglomeration stattfindet, somit ist ein SERS-Effekt zu erwarten.

Weiterhin sollten vor dem Messen von SERS-Datensätzen verschiedener Konzentrationen die Messbedingungen optimiert werden. Dies trägt wesentlich dazu bei, das bestmögliche Messergebnis zu erzielen. In diesem Zusammenhang werden SERS-Messungen in einer Quarzküvette bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die erhaltenen SERS-Spektren sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Während in saurer Umgebung kaum markante Banden



wahrgenommen werden, zeigen sich bei pH-Wert 10 bereits einige deutliche Banden. In der Lösung mit pH-Wert 12 wird ein sehr gut ausgeprägtes SERS-Spektrum detektiert. Das heißt, dass die Signalintensität mit zunehmenden pH-Wert signifikant ansteigt. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass sich das MTX-Molekül in Abhängigkeit des pH-Wertes unterschiedlich verhält.

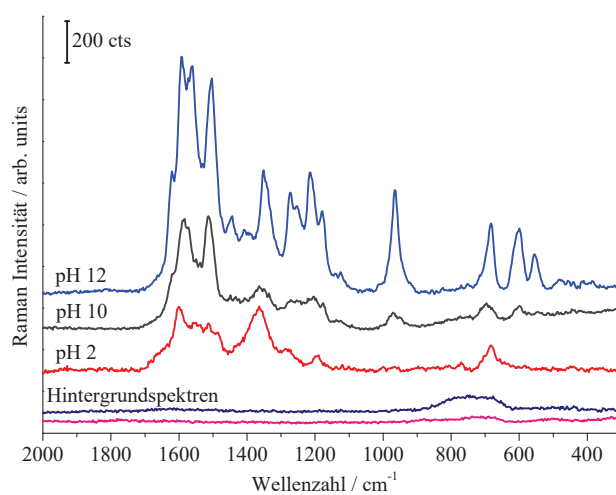


Abbildung 5.2.: SERS-Spektren von MTX in wässriger Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten. Im unteren Bereich sind die Hintergrund-SERS-Spektren von Kolloid in Wasser bei pH-Wert 2 (pink) und pH-Wert 12 (dunkelblau) abgebildet. Im oberen Bereich sind von oben nach unten die SERS-Spektren von MTX bei pH-Wert 12 (blau), bei pH-Wert 10 (grau) und pH-Wert 2 (rot) dargestellt.

In Abbildung 5.3 ist auf der linken Seite die Molekülstruktur als Skelettformel, auf der rechten Seite in der sterischen Anordnung im Raum angegeben. Es zeigt sich anhand der sterischen Anordnung, dass das Molekül aus zwei großen Bestandteilen aufgebaut ist, dem Pteridinringsystem und einem *para*-substituierten Phenylring.

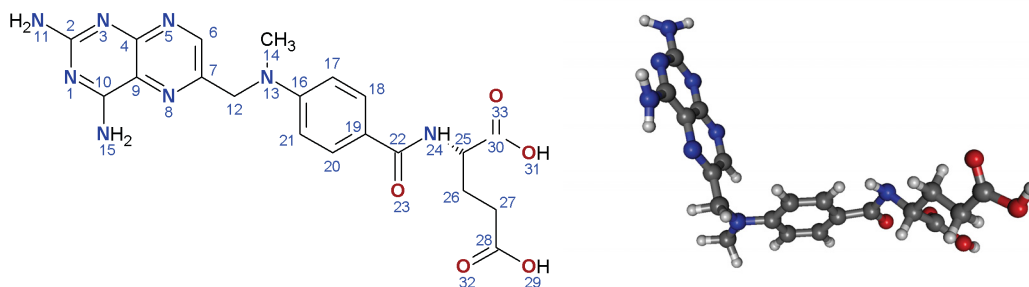


Abbildung 5.3.: Molekülstruktur von MTX: auf der linken Seite als Skelettformel, auf der rechten Seite in der sterischen Anordnung im Raum.

Der Substituent des Phenylrings besteht aus einer L-Glutaminsäure. Diese ist über eine Carbonylbrücke in *para*-Position des Phenylrings gebunden. Die beiden Teile des Moleküles stehen dabei fast senkrecht zu einander. Der Diederwinkel (C7-C12-N13-C21) beträgt  $-83,64^\circ$ , dieser wurde unter Verwendung quantenchemischer Methoden von Ayyappan et al. [110] berechnet.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie das MTX-Molekül mit der Metalloberfläche in Wechselwirkung treten kann. Zum einen über die  $\text{NH}_2$ -Gruppen, welche an dem Pteridinringsystem gebunden sind. Weiterhin über die delokalisierten  $\pi$ -Elektronen der beiden verschiedenen Ringsysteme. Einerseits die  $\pi$ -Elektronen des Pteridinringsystems, andererseits die  $\pi$ -Elektronen des Phenylrings. Im Fall des heteroaromatischen Ringsystems ist auch eine Wechselwirkung über die freien Elektronenpaare der Stickstoffatome möglich. Eine weitere Option ist die Interaktion über die Carboxylgruppen der L-Glutaminsäure. Aus dem vorangegangenen Kapitel ist bereits bekannt, dass die *c*-AgNPs bevorzugt mit den freien Elektronenpaaren der Stickstoffatome des heteroaromatischen Ringsystems wechselwirken. Weiterhin findet auch eine Interaktion mit funktionellen Aminogruppen statt, wenn dies sterisch möglich ist. Dies wird durch die erhaltenen SERS-Spektren von MTX mit *c*-AgNPs bei verschiedenen pH-Werten bestätigt. In saurerer Umgebung werden die  $\text{NH}_2$ -Gruppen zu  $\text{NH}_3^+$  protoniert. Somit befindet sich das bei  $\text{NH}_2$  vorhandene freie Elektronenpaar nun in einer Bindung zu einem Wasserstoffion. Das heißt, die  $\text{NH}_3^+$ -Gruppen sind für eine Interaktion mit der Metalloberfläche blockiert. Dadurch kommt es zu einer sterischen Hinderung, welche die Wechselwirkung über die  $\pi$ -Elektronen des Pteridinringsystems bzw. die freien Elektronenpaare der Stickstoffe unwahrscheinlich macht. In der Folge können die MTX-Moleküle nur über die  $\pi$ -Elektronen des Phenylrings oder über die Carboxylfunktionen mit der Metalloberfläche wechselwirken.

Aus Abbildung 5.2 kann entnommen werden, dass bei dem pH-Wert 2 SERS-Spektren mit schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis erhalten werden. Diese Spektren enthalten sehr schwach ausgeprägte Banden mit wenig Signalintensität. Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass weder über die  $\pi$ -Elektronen des aromatischen Ringsystems, noch über die Carboxylgruppen eine effektive Interaktion mit den *c*-AgNPs erzielt wird.

Im Gegensatz dazu werden in basischer Umgebung die Carboxylgruppen deprotoniert. In dieser Situation stehen sowohl die  $\text{NH}_2$ -Gruppen als auch die deprotonierten Carboxylgruppen potentiell zur Wechselwirkung mit der Metalloberfläche zur Verfügung. Da die Aminogruppen nun keine sterische Hinderung mehr darstellen, ist auch die Interaktion über die  $\pi$ -Elektronen des Pteridinringsystems und die freien Elektronenpaare der Stickstoffe möglich.

Da in basischer Umgebung sehr starke SERS-Signale detektiert werden, findet definitiv eine Wechselwirkung zwischen den MTX-Molekülen und den *c*-AgNPs statt. Im nächsten Abschnitt wird anhand einer detaillierten Bandenzuordnungen die Orientierung der Analytmoleküle relativ zur Oberfläche analysiert. So kann die Position der Interaktion genau bestimmt werden.

## 5.2. Orientierung der MTX-Moleküle relativ zur Oberfläche

Aus dem vorangegangenen Abschnitt geht hervor, dass unter basischen Bedingungen optimale SERS-Signale von MTX erhalten werden. Nun soll die Orientierung der vorliegenden deprotonierten MTX-Moleküle zur Metalloberfläche analysiert werden. Hierfür wird das Raman-Spektrum von MTX-Pulver bei einer Laserwellenlänge von 785 nm gemessen, sowie ein SERS-Spektrum von MTX in basischer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 12. Beide erhaltenen Spektren sind in Abbildung 5.4 wiedergegeben. Die Markerbanden sind unter Angabe der Wellenzahlen markiert.

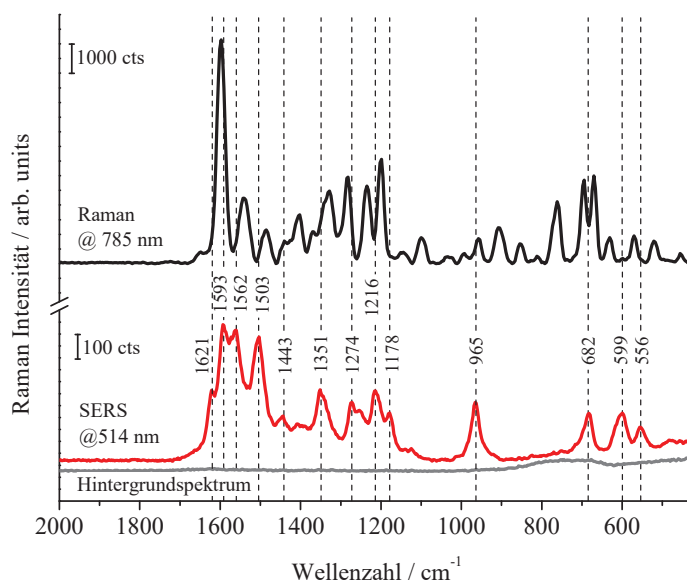


Abbildung 5.4.: Im oberen Teil ist das Raman-Spektrum von MTX-Pulver dargestellt, gemessen bei einer Laserwellenlänge von 785 nm. Im unteren Bereich ist das SERS-Spektrum von MTX (rot) (pH-Wert 12) und das Hintergrundspektrum (grau) zusehen, gemessen bei einer Laserwellenlänge von 514 nm.

Für die Zuordnungen der Banden werden die Daten von Ayyappan et al. [110] verwendet. In Ref. [110] wurde MTX mittels Dichtefunktionaltheorie (DFT) untersucht. Dabei wurde zunächst eine Strukturoptimierung durchgeführt, in dem ein energetisches Minimum auf der Potentialenergieebene berechnet wurde. Anschließend wurden die IR- und Raman-

aktiven Schwingungen berechnet. Die berechneten Wellenzahlen der Schwingungsmoden sowie die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Raman- und SERS-Signale sind in Tabelle 5.1 angegeben.

Bei dem Vergleich der detektierten Raman- und SERS-Schwingungsbanden fällt auf, dass einige Banden im Raman- aber nicht im SERS-Spektrum beobachtet werden können. Dabei handelt es sich um die Banden bei  $1403\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ ), bei  $1100\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta_{\text{C6-H}}$  und  $\rho_{\text{NH}_2}$ ) und bei  $630\text{ cm}^{-1}$  ( $\beta_{\text{N-C-N}}$ ). Diese drei Banden werden von *in-plane*-Schwingungen des Pteridinringsystems und den daran substituierten Aminogruppen hervorgerufen. Eine weitere Bande ist im Raman-Spektrum aber nicht im SERS-Spektrum sichtbar. Diese befindet sich bei  $521\text{ cm}^{-1}$ . Sie wird den Schwingungen der Hydroxylgruppe (der L-Glutaminsäure) zugeordnet. Andererseits erscheint die Bande bei  $556\text{ cm}^{-1}$  mit relativ großer Signalintensität im SERS-Spektrum, jedoch nicht im Raman-Spektrum. Diese Bande wird der N-C-N-*out-of-plane*-Schwingung ( $\gamma_{\text{N-C-N}}$ ) zugeschrieben.

Tabelle 5.1.: Wellenzahlen in  $\text{cm}^{-1}$  der Normalmoden des MTX-Moleküls. Von links nach rechts werden die zugeordneten Schwingungen, die skalierten berechneten Werte (Sim.) (Zuordnung und Berechnung aus Ref. [110]), die Maxima der Raman-Banden (RS) und die Maxima der SERS-Banden (SERS) angegeben.

Mode	Wellenzahl in $\text{cm}^{-1}$		
	Sim.	RS	SERS
$\nu_{\text{C-C}}, \nu_{\text{C-N}}, \sigma_{\text{NH}_2}$	1601	1651	1621
$\nu_{\text{C-C}}$ in Phenyl	1596	1598	1593
$\nu_{\text{C-C}}$ in Phenyl	1549	1540	1562
$\nu_{\text{C16-N13}}$	1501	1485	1503
$\nu_{\text{C-C}}$ in Phenyl, $\nu_{\text{N13-C12}}, \nu_{\text{C-N}}$	1458 / 1454	1440	1443
$\nu_{\text{C-CH}_3}, \nu_{\text{C=N}}$	1419	1403	
$\nu_{\text{C-C}}$ in Phenyl, $\sigma_{\text{C12-H}_2}$	1346	1327	1351
$\delta_{\text{CH}_3}$	1273	1282	1274
$\beta_{\text{C-H}}$ in Phenyl	1236	1235	1216
$\sigma_{\text{C12-H}_2}$	1204	1199	1178
$\beta_{\text{C6-H}}, \rho_{\text{NH}_2}$	1102	1100	
$\rho_{\text{CH}_3}, \nu_{\text{C7-C12}}$	959	958	965
$\beta_{\text{C-C-C}}$ in Phenyl, $\gamma_{\text{C10-N15}}$	682 / 676	694 / 670	682
$\beta_{\text{N-C-N}}$	630	630	
$\gamma_{\text{N-C-N}}$	583	570	599
$\gamma_{\text{N-C-N}}$	559		556
$\gamma_{\text{OH}}$	530	521	

Erklärung der Symbole:  $\rho$  Schaukelschwingung,  $\tau$  Drehschwingung,  $\omega$  Wippschwingung,  $\sigma$  Scherschwingung,  $\nu$  Streckschwingung,  $\beta$  *in-plane*-Biegeschwingung,  $\gamma$  *out-of-plane*-Biegeschwingung,  $\delta$  Deformationsschwingung.

Des Weiteren sind signifikante Änderungen in der Signalintensität zu beobachten. Im SERS-Spektrum ist die Banden bei  $1621\text{ cm}^{-1}$  mit großer Signalintensität vertreten. Sie wird von der  $\text{NH}_2$ -Scherschwungung ( $\sigma_{\text{NH}_2}$ ) verursacht. Weiterhin ist die Bande bei  $1503\text{ cm}^{-1}$  sehr viel intensiver im SERS-Spektrum als im Raman-Spektrum sichtbar. Diese Bande wird der C16-N13-Streckschwungung zugeordnet. Die Bande bei  $965\text{ cm}^{-1}$  wird von der C7-C12-Streckschwungung und der  $\text{CH}_3$ -Schaukelschwungung verursacht. Auch diese Bande tritt im SERS-Spektrum intensiver auf als im Raman-Spektrum. Eine weitere Bande bei  $599\text{ cm}^{-1}$  ist im SERS-Spektrum deutlich intensiver als im Raman-Spektrum. Diese Bande wird der N-C-N-*out-of-plane*-Schwingungen ( $\gamma_{\text{N-C-N}}$ ) zugeordnet, ebenso wie die bereits erwähnte Bande bei  $556\text{ cm}^{-1}$ .

Unter Beachtung der Oberflächenauswahlregeln (siehe Abschnitt 2.7) kann aus den genannten Änderungen im SERS-Spektrum geschlossen werden, dass das Pteridinringsystem mit der Ringebene parallel zur Oberfläche orientiert sein muss. Die hergeleitete Orientierung der MTX-Moleküle relativ zur Oberfläche ist in Abbildung 5.5 schematisch dargestellt.

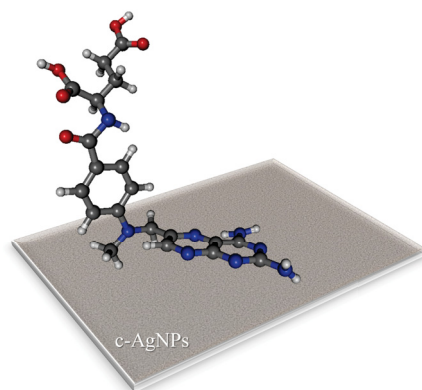


Abbildung 5.5.: Schematische Darstellung der Orientierung der MTX-Moleküle relativ zur Metalloberfläche.

Durch diese Orientierung kann das Fehlen der  $\nu_{\text{C=N}}$ -Schwingungsbande, sowie der *in-plane*-Schwingungsbanden des Pteridinringsystems begründet werden. Weiterhin liegt darin die Erklärung für die sehr intensiv beobachtete  $\gamma_{\text{N-C-N}}$ -Schwingungsbande. Die Verschiebung der  $\sigma_{\text{NH}_2}$ -Schwingungsbande von  $1651\text{ cm}^{-1}$  (Raman) zu  $1621\text{ cm}^{-1}$  (SERS) indiziert eine Interaktion der Aminogruppen mit der Oberfläche. Diese Beobachtungen stimmen sehr gut mit den Erkenntnissen aus Kapitel 4 überein. Davon ausgehend, dass die Stickstoffatome des heteroaromatischen Ringsystems gleichberechtigt über die freien Elektronenpaare mit der Metalloberfläche wechselwirken, ergibt sich, dass die Pteridinringebene nahezu parallel zur Oberfläche orientiert ist. In dieser Position ist auch eine simultane Interaktion mit den am Pteridinringsystem substituierten Aminogruppen möglich. Die nahezu waa-

gerechte Orientierung des Pteridinringsystems (zur Metalloberfläche) führt dazu, dass der substituierte Phenylring senkrecht zur Metalloberfläche positioniert ist. Das erklärt die deutlich verstärkten Signale der  $\nu_{C-C}$ -Schwingungsbanden des aromatischen Ringsystems bei  $1351\text{ cm}^{-1}$  und  $1562\text{ cm}^{-1}$ .

In dieser Orientierung befindet sich die  $\text{CH}_3$ -Gruppe sehr nahe der Metalloberfläche. In der Folge sind die Schwingungssignale der funktionellen Gruppe bei  $965\text{ cm}^{-1}$  ( $\rho_{\text{CH}_3}$ ) und  $1274\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{CH}_3}$ ) deutlich verstärkt. Sowohl die C16-N13 Bindung als auch die C7-C12 Bindung befinden sich nahe der Oberfläche. Beide Bindungen verlaufen senkrecht zur Metalloberfläche. Daher werden ihre Streckschwingungssignale bei  $965\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1503\text{ cm}^{-1}$  mit großer Intensität im SERS-Spektrum sichtbar. Im Gegensatz dazu befinden sich die Hydroxylgruppen in maximaler Entfernung zur Oberfläche. Das evaneszente EM-Feld hat eine geringere Intensität. Daher wird die OH-Schwingungsbande bei  $521\text{ cm}^{-1}$  (im Raman-Spektrum) nicht verstärkt.

Nachdem die optimalen Messbedingungen bestimmt wurden und die Orientierung der MTX-Moleküle zur Oberfläche geklärt ist, soll im nächsten Abschnitt die Messung der Konzentrationsreihe von MTX in basischer Pufferlösung mit c-AgNPs präsentiert werden.

### 5.3. Quantitative Detektion von MTX in wässriger Umgebung

Aus den vorangegangenen Abschnitten sind die optimalen Bedingungen für SERS-Messungen und die Orientierung der MTX-Moleküle zur Metalloberfläche bekannt. Nun werden im LOC-SERS-Aufbau insgesamt zehn verschiedene Konzentrationen zwischen  $0,17\text{ }\mu\text{M}$  und  $100\text{ }\mu\text{M}$  gemessen. Dabei wird der pH-Wert in den Tropfen auf einen Wert von 12 eingestellt. Die Mittelwert-Spektren einiger Konzentrationsstufen sind in Abbildung 5.6 a) dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur ausgewählte Konzentrationen gezeigt. Die unterschiedlichen Konzentrationen in den Tropfen werden erzeugt durch das Verwenden eines Flussprofils bei der Einspritzung der verschiedenen Flüssigkeiten. Dabei wird eine Spritze mit einer Stammlösung von MTX befüllt, eine weitere enthält nur die Pufferlösung ohne MTX. Die Spritzen werden mit unterschiedlichen Flussraten betrieben, somit entstehen die variierenden Konzentrationen in den Tropfen.

Da aus Abschnitt 5.2 die Bandenzuordnung bekannt ist, kann bewusst eine signifikante Bande ausgewählt werden, anhand derer der Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der MTX-Konzentration bestimmt wird. Zu diesem Zweck wird die Bande bei  $965\text{ cm}^{-1}$  ausgewählt. Sie wird von der  $\rho_{\text{CH}_3}$ -Schwingung und der  $\nu_{\text{C7-C21}}$ -Streckschwingung hervorgerufen. Um den Zusammenhang deutlich darzustellen, werden die Spektren von je drei Tropfen zu einem Mittelwert-Spektrum zusammengefasst. In den so erhaltenen Mittelwert-

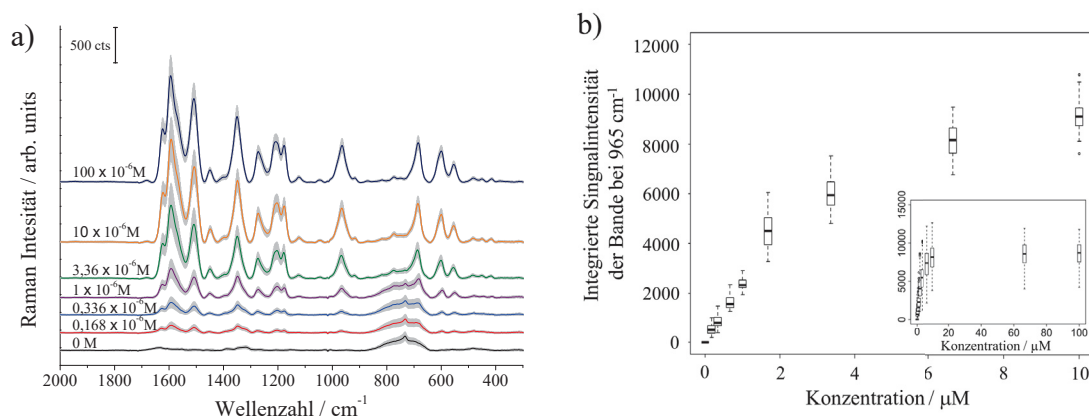


Abbildung 5.6.: a) LOC-SERS-Spektren verschiedener Konzentrationen von MTX, von oben nach unten:  $100 \mu\text{M}$  (dunkelblau),  $10 \mu\text{M}$  (gelb),  $3,36 \mu\text{M}$  (grün),  $1 \mu\text{M}$  (violett),  $0,336 \mu\text{M}$  (blau),  $0,168 \mu\text{M}$  (rot) und  $0 \mu\text{M}$  (schwarz). Die doppelten Standardabweichungswerte sind grau hinterlegt. b) Boxplot der integrierten Signalintensität der Bande bei  $965 \text{ cm}^{-1}$  gegen die MTX-Konzentration. Inset: Konzentrationsbereich von 0 bis  $100 \mu\text{M}$ .

Spektren wird die Bande bei  $965 \text{ cm}^{-1}$  mit Hilfe eines Lorentzprofils gefittet. Anschließend wird die erhaltene Lorentzfunktion integriert und gegen die MTX-Konzentration der in die Tropfen eingetragenen MTX/Puffer-Lösung aufgetragen. Anhand der in Abbildung 5.6 b) dargestellten integrierten Intensität der Bande bei  $965 \text{ cm}^{-1}$  gegen die MTX-Konzentration lässt sich ein linearer Zusammenhang im Konzentrationsbereich von  $0,17 \mu\text{M}$  bis  $2 \mu\text{M}$  beobachten. Bei höheren Konzentrationen stagniert die Signalintensität. Dies weist darauf hin, dass in diesem Bereich die Oberfläche der AgNPs gesättigt ist. Das heißt, es können keine weiteren MTX-Moleküle mit der Oberfläche in Interaktion treten. Aus diesem Grund steigt die Signalintensität mit höherer Konzentration nicht linear an.

Die niedrigste Konzentration von  $0,17 \mu\text{M}$  ist noch deutlich nachweisbar. Sie liegt außerhalb des  $3\sigma$ -Bereichs des integrierten Hintergrundsignals, und damit oberhalb des Detektionslimits (LOD).

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass MTX in basischer Lösung im therapeutisch relevanten Bereich von  $1 \mu\text{M}$  bis  $10 \mu\text{M}$  mit hervorragender Signalintensität detektiert werden kann. Es wurde dabei ein Bereich festgestellt, in dem sich der Zusammenhang der integrierten Signalintensität und der MTX-Konzentration linear verhält. Die kleinste untersuchte Konzentration von  $0,17 \mu\text{M}$  war eindeutig nachweisbar.

Für die Anwendung von LOC-SERS im klinischen Umfeld wird in weiteren Untersuchungen getestet werden, ob die erhaltenen Ergebnisse in Blutplasma reproduzierbar sind. Blutplasma stellt eine hochkomplexe Matrix dar. Daher wird im nächsten Abschnitt zunächst die Messung einer Konzentrationsreihe in artifiziellem Blutplasma durchgeführt, bevor reale



Blutplasmaproben mit zugegebener MTX-Lösung gemessen werden. Für die weiterführenden Experimente werden h-AgNPs verwendet. Sie eignen sich aufgrund des schnellen und simplen Produktionsprotokolls (vgl. Abschnitt 3.1.1 in Kapitel „Material und Methoden“) für eine Applikation im klinischen Umfeld besser. Aus Kapitel 4 ist bekannt, dass die h-AgNPs präferenziert mit vorhandenen Aminogruppen des Analytmoleküls wechselwirken. Daher ist zu erwarten, dass die Orientierung der Moleküle zur Oberfläche der h-AgNPs die Gleiche ist wie im Fall der c-AgNPs. Das Pteridinringsystem des MTX-Moleküls ist nahezu waagrecht zur Metalloberfläche orientiert.

#### 5.4. Quantitative Detektion von MTX in Blutplasma

Die quantitative Detektion von MTX in basischer Lösung wurde im vorhergehenden Abschnitt präsentiert. Der nächste Schritt ist nun die quantitative Detektion in artifiziellem Blutplasma. Dieses sogenannte „*simulated body fluid*“ (SBF) enthält alle im menschlichen Blutplasma vorkommenden Ionen in den entsprechenden Konzentrationen, ist aber frei von Proteinen<sup>1</sup>. Um die Konzentrationsreihe zu messen, wird MTX in SBF direkt gelöst und mit h-AgNPs gemischt. Aufgrund der schnellen und simplen Synthetisierung der h-AgNPs eignen sich diese besser als die c-AgNPs für eine Applikation im klinischen Bereich. Des Weiteren konnten Bonifacio et al. [111] in einer detaillierten Studie zu SERS-Spektren von Blutplasma zeigen, dass h-AgNPs besser als c-AgNPs für diese Experimente geeignet sind. Eine basische Pufferlösung oder weitere Agglomerationsmittel sind in diesem Fall nicht notwendig, da bereits mit der Mischung der MTX-SBF-Lösung und den AgNPs hervorragende Signal-Rausch-Verhältnisse erreicht werden. Dies kann aus den in Abbildung 5.7 a) dargestellten SERS-Spektren entnommen werden. In Abbildung 5.7 a) sind SERS-Spektren ausgewählter MTX-Konzentrationen (0  $\mu\text{M}$  bis 9,6  $\mu\text{M}$ ) in SBF dargestellt. Die erhaltenen SERS-Spektren von MTX gelöst in SBF, gemessen mit den h-AgNPs, haben ein leicht verändertes Erscheinungsbild im Vergleich zu den SERS-Spektren von MTX in basischer Pufferlösung mit c-AgNPs (siehe Abschnitt 5.3). Dies kann bedingt sein durch die zusätzlich in der SBF-Lösung vorhandenen Ionen sowie durch die veränderten Eigenschaften der h-AgNPs. Jedoch sind die in Abschnitt 5.2 indizierten Markerbanden auch in den SERS-Spektren von MTX gelöst in SBF mit h-AgNPs zu finden.

---

<sup>1</sup> Das Protokoll zur Herstellung des SBF ist in Anhang D beigefügt.



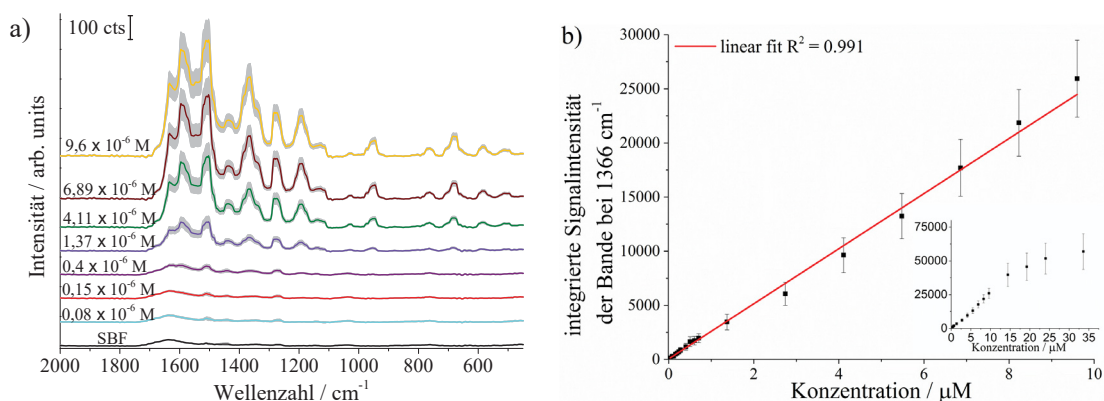


Abbildung 5.7.: a) LOC-SERS-Spektren verschiedener Konzentrationen von MTX in SBF, von oben nach unten:  $9,6 \mu\text{M}$  (gelb),  $6,89 \mu\text{M}$  (weinrot),  $4,11 \mu\text{M}$  (grün),  $1,37 \mu\text{M}$  (violett),  $0,4 \mu\text{M}$  (lila),  $0,15 \mu\text{M}$  (rot) und  $0,08 \mu\text{M}$  (türkis) und SBF ohne MTX (schwarz). Die doppelten Standardabweichungswerte sind grau hinterlegt. b) Integrierte Signalintensität der Bande bei  $1366 \text{ cm}^{-1}$  aufgetragen gegen die MTX-Konzentration. Lineare Anpassung in rot, mit  $R^2 = 0,991$ . Inset: Konzentrationsbereich von 0 bis  $35 \mu\text{M}$ .

Aufgrund der leicht veränderten Bandenintensitäten wird der Zusammenhang der Signalintensität und der MTX-Konzentration in SBF-Lösung über das integrierte Lorentzprofil der Bande bei  $1366 \text{ cm}^{-1}$  angegeben. Die Bande bei  $965 \text{ cm}^{-1}$  ist in den h-SERS-Spektren weniger intensiv, daher eignet sie sich nicht für eine Angabe des Zusammenhangs von Konzentration und Signalintensität. Für die Darstellung der integrierten Signalintensität (der Bande bei  $1366 \text{ cm}^{-1}$ ) gegen die Konzentration in Abbildung 5.7 b) wird die angepasste Lorentzfunktion des Mittelwert-Spektrums jeder Konzentrationsstufe integriert. Es kann deutlich eine Linearität über den gesamten therapeutisch relevanten MTX-Konzentrationsbereich ( $0,08 \mu\text{M}$  bis  $9,6 \mu\text{M}$ ) festgestellt werden. Die Detektionsgrenze wird mit einem  $3\sigma$ -Standard des Hintergrundsignals auf  $0,12 \mu\text{M}$  festgelegt. Bei MTX-Konzentrationen größer  $10 \mu\text{M}$  tritt ein Sättigungseffekt an der Metalloberfläche auf. Daher weisen die Konzentrationen im Bereich  $c_{\text{MTX}} > 10 \mu\text{M}$  keinen linearen Zusammenhang mit der Signalintensität auf. Es gilt nun zu validieren, ob diese quantitative Detektion in realem Blutplasma reproduzierbar ist.

Nachdem für MTX in SBF-Lösung eine quantitative Detektion erfolgreich durchgeführt werden konnte, wird im Folgenden reales Blutplasma mit einer MTX-SBF-Lösung präpariert. Auf diese Weise wird zunächst getestet, ob die SERS-Signale von MTX auch in realem Blutplasma detektierbar sind. Es ist bekannt, dass die Proteine des Blutplasmas eine Korona um die AgNPs herum bilden [112,113]. Dadurch wird eine Agglomeration der AgNPs weitestgehend verhindert und es können keine SERS-Signale detektiert werden. Um also MTX in Blutplasma nachzuweisen, wird das mit MTX präparierte Blutplasma

mit einem 3 kDa Zentrifugenfilter der Firma Amicon zentrifugiert. Auf diese Weise kann ein Großteil der Proteine aus dem Blutplasma entfernt werden, während die niedermolekularen Substanzen ( $M > 3$  kDa) enthalten bleiben.

Nach Zugabe der MTX-SBF-Lösung bzw. reiner SBF-Lösung und Filtern werden zunächst Messungen einer Blutplasmaprobe ohne MTX durchgeführt. Weiterhin werden zwei Blutplasmaproben mit den MTX-Konzentrationen  $4,6 \mu\text{M}$  und  $9,2 \mu\text{M}$  im LOC-SERS-Aufbau gemessen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 5.8 a) dargestellt. Die Blutplasmaprobe ohne MTX zeigt bereits ein sehr starkes Hintergrundsignal. Dennoch sind im Vergleich dazu Änderungen in den zwei Blutplasmaproben mit MTX zu beobachten. Um die Unterschiede hervorzuheben, werden Differenzgraphen erstellt. Hierfür wird das Spektrum der Blutplasmaprobe ohne MTX von den beiden Spektren der Blutplasmaproben mit MTX subtrahiert. Die resultierenden Graphen sind in Abbildung 5.8 b) dargestellt.

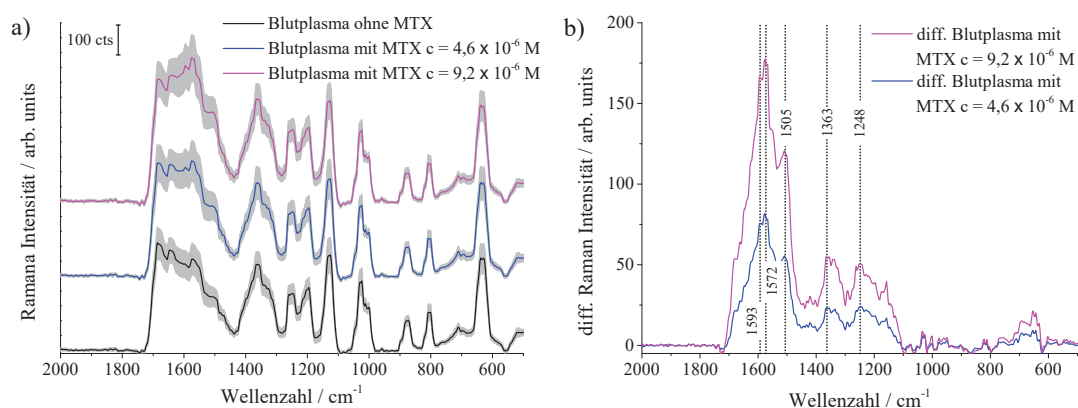


Abbildung 5.8.: a) LOC-SERS-Spektren verschiedener Konzentrationen von MTX in Blutplasma, von oben nach unten:  $9,2 \mu\text{M}$  (rosa),  $4,6 \mu\text{M}$  (blau), Blutplasma ohne MTX (schwarz). Die doppelten Standardabweichungswerte sind grau hinterlegt. b) Differenzgraphen: das Spektrum von Blutplasma ohne MTX wurde von den Spektren der Blutplasmaproben mit MTX subtrahiert.

In der Darstellung der Differenzgraphen sind deutlich einige der Markerbanden von MTX zu beobachten. Die Integration der angepassten Lorentzfunktion der Bande bei  $1363 \text{ cm}^{-1}$  führt bei der Blutplasmaprobe mit MTX-Konzentration von  $4,6 \mu\text{M}$  zu einem Wert von 487 bei der Blutplasmaprobe mit MTX-Konzentration von  $9,2 \mu\text{M}$  zu 1001. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen MTX-Konzentration und integrierter Signalintensität auch für die Messungen in filtriertem Blutplasma vorhanden ist. Welcher Art der Zusammenhang ist, kann anhand der Ergebnisse nicht festgestellt werden.

Bei den Messungen von MTX in Blutplasma wurden bisher nur erste Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse sind sehr vielversprechend für eine potentielle Anwendung von LOC-SERS als TDM-Verfahren. Um konkrete Informationen über den Zusammenhang der

MTX-Konzentration und der Signalintensität zu erhalten, sind allerdings weitere Experimente im LOC-SERS-Aufbau nötig. Des Weiteren muss der Einfluss des Blutplasmas untersucht werden. Bei den bisher durchgeführten Versuchen wurde das Blutplasma eines einzelnen Patienten verwendet. Es ist jedoch bekannt, dass verschiedene Faktoren, unter anderem das Alter, Geschlecht, Ernährung und der Gesundheitszustand die Zusammensetzung des Blutplasmas beeinflussen. Anhand der bisher durchgeführten Versuche kann nicht abgeschätzt werden, inwiefern diese Faktoren die SERS-Daten beeinflussen.

In diesem Kapitel wurde erfolgreich gezeigt, dass MTX mittels LOC-SERS quantitativ nachgewiesen werden kann. Um optimale SERS-Signale zu erhalten, wurden Testmessungen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass mit c-AgNPs das beste Signal-Rausch-Verhältnis in basischer Pufferlösung (pH-Wert 12) erhalten wird. Im Anschluss wurde eine Bandenzuordnung und die Analyse der Orientierung der MTX-Moleküle relativ zur Metalloberfläche durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse aus Kapitel 4 bestätigt. Das heteroaromatische Pteridinringsystem und die daran substituierten Aminogruppen treten mit der Metalloberfläche in Wechselwirkung. Dadurch ist das MTX-Molekül mit der Pteridinringebene nahezu parallel zur Metalloberfläche orientiert.

Um den Zusammenhang zwischen Signalintensität und MTX-Konzentration einschätzen zu können wurden zehn verschiedene Konzentrationen von MTX in basischer Pufferlösung gemessen. Dabei wurde der Konzentrationsbereich von  $0,17 \mu\text{M}$  bis  $100 \mu\text{M}$  abgedeckt. Es zeigte sich, dass eine Linearität zwischen Signalintensität und Konzentration unter diesen Messbedingungen nur im Bereich von  $0,17 \mu\text{M}$  bis  $2 \mu\text{M}$  zu erkennen ist. Ein solider linearer Zusammenhang zwischen der MTX-Konzentration (Bereich  $0,08 \mu\text{M}$  bis  $9,6 \mu\text{M}$ ) und der SERS-Signalintensität wurde bei den Messungen von MTX in artifiziellm Blutplasma mit h-AgNPs festgestellt. Des Weiteren wurden erste Versuche in realem Blutplasma durchgeführt. Nach dem Entfernen der Proteine durch einfache Filtration gelang es, MTX erfolgreich in Blutplasma zu detektieren. Dabei konnten die beiden eingesetzten Konzentrationen von MTX in Blutplasma eindeutig von einander unterschieden werden. Die präsentierten Ergebnisse dieses Kapitels zeigen das große Potential der LOC-SERS-Methode für die therapeutische Medikamentenüberwachung von MTX in Blutplasma deutlich auf. Für eine Anwendung im klinischen Umfeld ist es erforderlich die Einflüsse individueller Blutplasmaproben anhand von Patientenproben zu untersuchen. So kann der Zusammenhang der Signalintensität und der MTX-Konzentration in Blutplasma erforscht werden.

MTX kommt nicht nur in der Chemotherapie zum Einsatz, es wird auch als Medikament zweiter Stufe bei der Dauertherapie von Autoimmunerkrankungen als Immunsuppressivum

verwendet. Es wird verabreicht, wenn die Medikamente der ersten Stufe (zum Beispiel Cortison) nicht ausreichen oder unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Einige Erkrankungen bei denen MTX verabreicht wird sind z.B. rheumatische Arthritis sowie Morbus Crohn und Sarkoidose. Die beiden zuletzt genannten Erkrankungen zählen zwar zu den Autoimmunerkrankungen, jedoch wird ihr Erscheinen auch mit bakteriellen Erregern assoziiert. Dabei handelt es sich sowohl bei Morbus Crohn [38, 39] als auch bei Sarkoidose [40] um Mykobakterien.

Die Gattung *Mycobacterium* umfasst eine große Anzahl von Spezies. Darunter finden sich auch die Spezies des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (MTC), dies sind zum Teil humanpathogene Spezies (z.B. *M. tuberculosis*) und zum Teil tierpathogene Spezies (z.B. *M. bovis*). Eine Vielzahl der Stämme des MTCs verursacht Tuberkulose.

Im nächsten Kapitel wird die erfolgreiche Identifizierung von Mykobakterien auf Genotypenebene anhand eines LOC-SERS-Datensatzes präsentiert. Die SERS-Spektren der Bakterien suspension werden von Schwingungssignalen der Mykolsäure dominiert. Da die Mykolsäure stammspezifische strukturelle Unterschiede aufweist [42], eignet sich die Mykolsäure als Markermolekül für eine valide Identifizierung.

## 6. Identifizierung von Mykobakterien

Es gibt weltweit jährlich etwa 9,6 Millionen Neuerkrankungen an akuter Tuberkulose (TB). Im Jahr 2014 sind 1,5 Millionen Todesfälle infolge von Tuberkuloseerkrankungen registriert worden [114]. Akute Tuberkulose ist eine schwerwiegende Erkrankung der Atemwege. Diese wird von verschiedenen Spezies des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes (MTC) verursacht. Darin vereint sind sowohl die humanpathogene Spezies *M. tuberculosis* als auch tierpathogene Spezies wie z.B. *M. bovis*. Neben den MTC-Stämmen existieren auch nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM), welche ebenfalls gravierende Lungenkrankheiten hervorrufen können. Von derartigen Krankheiten werden hauptsächlich immungeschwächte Personen befallen [41]. Weiterhin werden auch Autoimmunerkrankungen mit Mykobakterien assoziiert, wie zum Beispiel Morbus Crohn [38,39] sowie Sarkoidose [40]. Bei beiden Erkrankungen kommt der Antimetabolit Methotrexat (siehe Kapitel 5) als Präparat zweiter Stufe zu Einsatz.

Die Mykobakterien besitzen eine mehrschichtige Zellmembran. Sie besteht aus der inneren Cytoplasmamembran. Darüber befindet sich eine Peptidoglykanschicht. Diese wird von einer Polysaccharidschicht umgeben, an welcher die langkettige Fettsäure Mykolsäure gebunden ist. Sie bildet gemeinsam mit weiteren Lipiden die äußere Membranschicht. Die Mykolsäure verhilft den Bakterien zu erhöhter Resistenz gegenüber chemischen Einflüssen und Dehydration. Weiterhin verhindert die Mykolsäure die Wirkung hydrophober Antibiotika [115,116]. In der Folge sind TB-Erkrankungen außergewöhnlich schwer zu behandeln. Unter den MTC-Stämmen gibt es eine Gruppe der sogenannten modernen *M. tuberculosis* Stämme. Dazu gehören unter anderem die Familie der *M. tuberculosis Beijing* sowie die Superfamilie *M. tuberculosis Euro-American*. Sie sind weltweit verbreitet und die Hauptverursacher der pulmonalen TB. Der Hauptübertragungsweg von TB ist das Einatmen infektiöser Tröpfchen. Enthält der Auswurf einer mit TB infizierten Person Mykobakterien, so spricht man von einer „offenen“ TB.

Es existieren mittlerweile verschiedene Stämme, welche gegen ein Antibiotikum resistent sind. Zum Teil liegen sogar Resistenzen gegen mehrere Antibiotika gleichzeitig vor (*multi drug resistant* - MDR). Die Stämme der modernen MTC werden oft mit Antibiotikaresistenz in Verbindung gebracht [117,118]. Da die TB-Behandlung bei MDR-TB ungleich mehr Zeit und extrem kostenintensive Ersatzprodukte erfordert, ist eine schnelle und zuverlässige

sige Identifizierung des TB-verursachenden Genotyps entscheidend. Bis zum heutigen Tag werden für die Identifizierung standardmäßig Kultivierungsmethoden angewandt. Dabei kann die Diagnose bis zu sechs Wochen dauern. Neuere Methoden basieren auf molekular-diagnostischen Verfahren wie z.B. Nukleinsäuren-Amplifizierungstests (NAAT) [119, 120]. Diese Verfahren erfordern hochtechnologisierte Laboratorien, wodurch ihre Anwendbarkeit stark limitiert ist.

Eine mögliche Alternative bieten spektroskopische Methoden. Bei der Anwendung von SERS wird durch die Nutzung des bereits beschriebenen LOC-SERS-Aufbaus (siehe Abschnitt 3.4 in Kapitel „Material und Methoden“) ein statistisch valider Datensatz erzeugt. Auf diese Weise wird die SERS-Spektroskopie zu einer hochpotenten Methode bei der Identifizierung von Bakterien. Walter et al. [121] konnten in einer Studie den LOC-SERS-Aufbau nutzen, um die erfolgreiche Diskriminierung von *E. coli* in Suspension zu demonstrieren.

Ein ähnlicher Aufbau wird auch in dieser Arbeit verwendet. Jedoch sind aufgrund der pathogenbedingten erhöhten Sicherheitsanforderungen einige Adaptionen bei der Probenvorbereitung erforderlich. Der Versuchsaufbau mit dem integrierten Probenvorbereitungsmodul ist in Abschnitt 3.4 beschrieben. Durch die Verwendung eines *bead-beating*-Moduls werden die Zellwände der Mykobakterien zerstört. Die resultierende Bakteriensuspension kann ohne den Versuchsaufbau zu verlassen in das Spritzenpumpensystem des LOC-SERS-Aufbaus überführt werden. Dabei kommt ein Auffangbehälter zum Einsatz in dem die Bakteriensuspension gesammelt wird. Anschließend kann sie direkt von diesem Auffangbehälter in eine Spritze aufgenommen werden. Durch einen T-Adapter an der Spritze ist es möglich, dieselbe Spritze sowohl mit dem Auffangbehälter als auch mit dem mikrofluidischen Chip zu verbinden. Somit ist ein kontaminationsfreier Arbeitsablauf gewährleistet.

Eine Übersicht aller in dieser Studie verwendeten Mykobakterien ist in Tabelle 6.1 gegeben. Es werden die Spezies, der Genotyp, die Stamm-Identifikationsnummer (ID), die im Folgenden verwendeten Abkürzungen sowie die Größe des erhaltenen Datensatzes angegeben.

Tabelle 6.1.: Übersicht der verwendeten Mykobakterien. Es werden die Spezies, der Genotyp, die Stamm-Identifikationsnummer (ID), die im Folgenden verwendeten Abkürzungen, sowie die Größe des erhaltenen Datensatzes aufgeführt. Die oberen vier Spezies gehören dem MTC an, während die unteren zwei Spezies zur Gruppe der NTM zählen.

Spezies	Genotyp	Stamm ID	Abkürzung	# der Spektren
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tub. Beijing</i>	1934/03	<i>M. tb Beij</i>	6131
	<i>M. tub. Beijing</i>	8304/09	<i>M. tb Beij</i>	6456
	<i>M. tub. H37Rv</i>	SR16b	<i>M. tb H37Rv</i>	4819
<i>M. bovis BCG</i>	<i>M. bovis BCG</i>	BCG Pasteur	<i>M. bov BCG</i>	4800
<i>M. canettii</i>	<i>M. canettii</i>	3040/99	<i>M. can</i>	4230
<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	5512/11	<i>M. abs</i>	5279
<i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>	8895/14	<i>M. szul</i>	3462

Im speziellen Fall der Mykobakterien wird das SERS-Spektrum der Bakteriensuspension von den Schwingungssignalen der Mykolsäure dominiert. Die Charakterisierung der erhaltenen SERS-Spektren wird in Abschnitt 6.1 präsentiert. Die erfolgreiche Identifizierung ist in Abschnitt 6.2 gezeigt. Dabei kommt ein chemometrisches Modell zum Einsatz, basierend auf einer Kombination von Hauptkomponentenanalyse (PCA) und linearer Diskriminanzanalyse (LDA). Diese beiden Methoden sind in Abschnitt 3.7 im Kapitel „Material und Methoden“ kurz erklärt.

### 6.1. Spektroskopische Charakterisierung der Mykolsäure

Das Ziel dieser Studie ist es, Mykobakterien anhand von SERS-Spektren zu identifizieren. Die untersuchten Mykobakterien werden vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien in Borstel bezogen. Eine Beschreibung der Kultivierungsbedingungen und der Probenvorbereitung ist in Abschnitt 3.1.2 angegeben. Es werden von jedem Bakterienstamm drei distinkte Proben untersucht. Dabei besteht jede der Proben wiederum aus drei gemischten Kultivierungsansätzen. Das heißt, es werden in der Summe SERS-Spektren von neun Kultivierungsansätzen jedes Stammes gemessen. Mit Hilfe des *bead-beating*-Moduls werden die Bakterien mechanisch lysiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension enthält alle Bestandteile der Bakterien. Diese liegen frei in der Suspension vor, da die Zellwände zerstört sind. Es ist also zu erwarten, dass die erhaltenen SERS-Spektren charakteristische Banden sowohl von den Zellwandkomponenten als auch von den inneren Zellbestandteilen aufweisen. Dies konnten Walter et al. [121] bei der Untersuchung von ultraschalllysierten *E. coli* Bakterien beobachten. Dort wurden zum Teil Übereinstimmungen der erhaltenen SERS-Spektren mit Raman-Spektren ganzer Bakterien festgestellt. In Abbildung 6.1 sind die Mittelwert-Spektren der SERS- und Raman-Messung von *M. tb Beijing* wiedergegeben. Es ist eklatant, dass zwischen den Raman- und SERS-Spektren signifikante Unterschiede bestehen. Im Raman-Spektrum der intakten Mykobakterien sind dominante Banden bei  $1441\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{CH}_2}$ ),  $1309\text{ cm}^{-1}$  ( $\tau_{\text{CH}_2}$ ) und  $1004\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{Phenylalanin}}$ ) zu beobachten. Einige weitere Banden werden den Schwingungen der DNA-Komponenten zugeordnet. Eine detaillierte Zuordnung ist in Tabelle 6.2 angegeben. Die SERS-Spektren der Bakteriensuspension zeigen keine typischen Schwingungsbanden von Bakterien, vielmehr wird das gesamte Spektrum stark von Schwingungen der Mykolsäure dominiert. SERS-Spektren von isolierter Mykolsäure wurden von Rivera-Betancout et al. [122] untersucht. Die aus der Bakteriensuspension erhaltenen SERS-Spektren der vorliegenden Arbeit stimmen sowohl in der Bandenlage als auch in den relativen Signalintensitäten exzellent mit den Ergebnissen von Rivera-Betancout et al. überein. Dies kann aus Tabelle 6.2 entnommen werden.



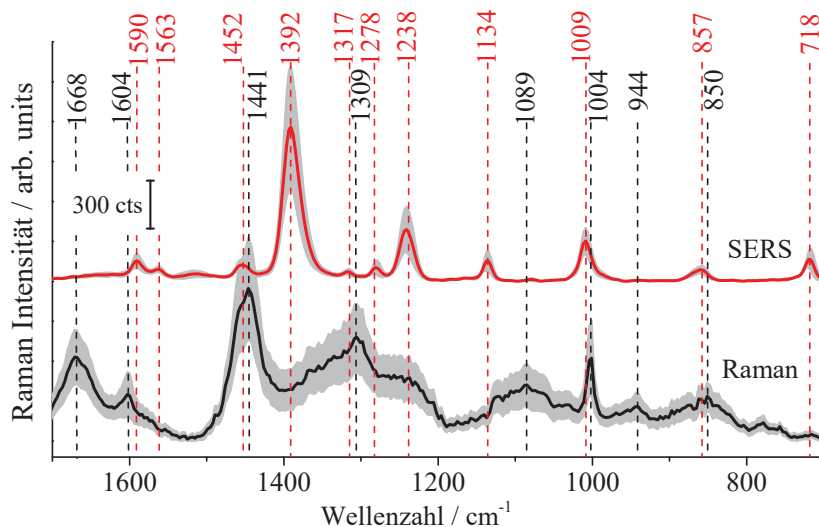


Abbildung 6.1.: Mittelwert-Raman- und SERS-Spektren von *M. tb Beij.* Die Raman-Spektren (schwarz) stammen von inaktiven Mykobakterien. Die SERS-Spektren (rot) stammen aus der Bakteriensuspension gemessen mit Hilfe des LOC-SERS-Aufbaus. Für jedes Mittelwert-Spektrum ist die einfache Standardabweichung grau angegeben.

Tabelle 6.2.: Bandenzuordnung der Raman- und SERS-Spektren von Mykobakterien. Die Wellenzahlen sind in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben. Von links nach rechts werden die zugeordneten Schwingungen angegeben (Mode), die Maxima der Raman-Banden (RS), die Maxima der SERS-Banden (SERS) und die Zuordnung der Schwingungsbanden eines SERS-Spektrums von extrahierter Mykolsäure aus Ref. [122] angegeben.

Mode	Wellenzahl in $\text{cm}^{-1}$		
	RS	SERS	Ref [122]
Amid I	1668		
$\nu_{\text{C}-\text{C}}$ in Phenylalanin	1604		
$\nu_{\text{C}=\text{O}}$ in Alkylketon, $\beta$ konjugiert und in Carbonsäuren, $\nu_{\text{C}=\text{C}}$		1590	1592
$\nu_{\text{C}=\text{C}}$		1565	1564
$\delta_{\text{CH}_2}$	1441	1452	1457
$\beta_{\text{C}-\text{O}-\text{H}}$		1392	1392
$\beta_{\text{C}-\text{O}-\text{H}}$ und $\tau_{(\text{CH}_2)_n}$	1309	1317	1314
$\beta_{\text{C}-\text{O}-\text{H}}$		1278	1280
$\beta_{\text{C}-\text{O}-\text{H}}$		1238	1241
$\nu_{\text{C}-\text{C}}$ in Alkan		1134	1130
Nukleinsäure	1089		
$\gamma_{\text{C}-\text{C}-\text{O}}$ in prim. Alkohol		1009	1008
$\nu_{\text{C}-\text{C}}$ in Phenylalanin	1004		
$\beta_{\text{C}-\text{C}-\text{O}}$ in prim. Alkohol, $\beta_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$ und $\nu_{\text{C}-\text{C}}$ in Alkan		857	852
Tyrosin	830		
Cytosin, Urazil	781		
$\rho_{\text{CH}_2}$ , $\nu_{\text{CHR}_2}$ mit $\text{R} \neq \text{CH}_3$ und $\nu_{\text{C}-\text{C}}$		718	713

Erklärung der Symbole:  $\rho$  Schaukelschwingung,  $\tau$  Drehschwingung,  $\nu$  Streckschwingung,  $\beta$  *in-phase*-Streckschwingung,  $\gamma$  *out-of-phase*-Streckschwingung,  $\delta$  Deformationsschwingung.



Zum besseren Verständnis soll die Struktur der Mykolsäure kurz beschrieben werden. Die Mykolsäure ist die langkettigste in der Natur vorkommende Fettsäure. Sie besteht aus einer langkettigen  $\beta$ -Hydroxyfettsäure (bis zu 60 Kohlenstoffatome) mit einer langen  $\alpha$ -Alkyl-Seitenkette (20 bis 24 Kohlenstoffatome) [123]. Einige Beispiele für häufig vorkommende Mykolsäuren sind in Abbildung 6.2 angegeben. Mykolsäure bildet den Hauptbestandteil der äußeren Schutzschicht von Mykobakterien. Sie trägt entscheidend zu der außergewöhnlichen Integrität der Bakterien bei. Durch den Cyclopropanring in  $\alpha$ -Mykolsäure wird die Bakterie vor oxidativem Stress bewahrt [124]. Die Schutzschicht von *M. tuberculosis* besteht zu etwa 70% aus  $\alpha$ -Mykolsäure. Die exakte Struktur der Mykolsäure variiert zwischen den Mykobakterienstämmen, bleibt jedoch in der Grundstruktur konsistent. Daher eignet sich Mykolsäure hervorragend als Markermolekül zur Identifizierung von Mykobakterien auf Genotyp- und Stammesebene [125–128].

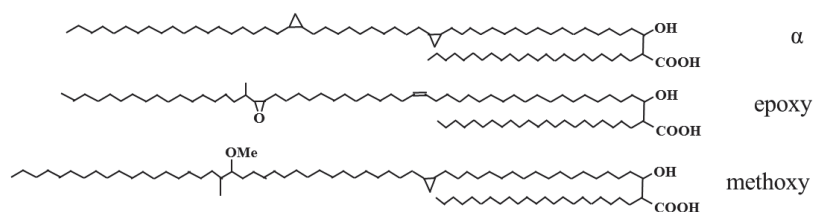


Abbildung 6.2.: Strukturformeln von Mykolsäuren die häufig in *Mycobacterium tuberculosis* auftreten. Die exakte Struktur der Mykolsäure variiert zwischen den Bakterienstämmen, während die Grundstruktur für alle Mykobakterienspezies bestehen bleibt. Auf der rechten Seite sind die Präfixe der entsprechenden Mykolsäure angegeben.

Die Schwingungsbanden der erhaltenen SERS-Spektren werden wie folgt zugeordnet: Die dominierende Bande im SERS-Spektrum bei  $1392\text{ cm}^{-1}$  wird von den C-O-H-Biegeschwingungen ( $\beta_{\text{C-O-H}}$ ) verursacht, wie auch die Banden bei  $1278\text{ cm}^{-1}$  und  $1238\text{ cm}^{-1}$ . Eine weitere Bande mit Anteilen der  $\beta_{\text{C-O-H}}$ -Schwingung sowie der  $\tau_{(\text{CH}_2)_n}$ -Schwingung ist bei  $1317\text{ cm}^{-1}$  zu beobachten. Ähnlich zum Raman-Spektrum wird eine Bande bei  $1009\text{ cm}^{-1}$  registriert, jedoch wird sie im Fall des SERS-Spektrums von der C-C-O-*out-of-phase*-Streckschwingung ( $\gamma_{\text{C-C-O}}$ ) hervorgerufen. Die Banden bei  $1590\text{ cm}^{-1}$  und  $1565\text{ cm}^{-1}$  werden von C=C-Streckschwingungen ( $\nu_{\text{C=C}}$ ) verursacht, letztere wird weiterhin durch die C=O-Streckschwingung ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) beeinflusst. Der C-C-Streckschwingung ( $\nu_{\text{C-C}}$ ) in Alkanen werden die Banden bei  $1134\text{ cm}^{-1}$  und  $857\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet, wobei die letzte gleichzeitig von C-C-O- und C-O-C-*in-phase*-Streckschwingungen ( $\beta_{\text{C-C-O}}$  und  $\beta_{\text{C-O-C}}$ ) beeinflusst wird. Die Bande bei  $718\text{ cm}^{-1}$  wird von  $\text{CH}_2$ -Schaukelschwingungen ( $\rho_{\text{CH}_2}$ ) und C-C-Streckschwingungen ( $\nu_{\text{C-C}}$ ) verursacht sowie von  $\text{CHR}_2$ -Streckschwingungen ( $\nu_{\text{CHR}_2}$ ),

wobei R keine Methylgruppe ist. Es werden keine Banden im SERS-Spektrum der Bakteriensuspension detektiert, welche nicht den Schwingungen der Mykolsäure zugeordnet werden können.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass durch mechanische Lyse der Mykobakterien SERS-Spektren erhalten werden, welche von den Schwingungssignalen der Mykolsäure dominiert werden. Es bleibt zu vermuten, dass die Mykolsäure eine Korona um die h-AgNPs bildet. Das kann erklären, warum keine Signale der anderen Bestandteile der Bakterien detektiert werden. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich SERS-Spektren von Mykolsäure zu erhalten. Dabei sind keine weiteren Extraktionsvorgänge erforderlich. Im nächsten Abschnitt soll eine Identifizierung der Mykobakterien auf Genotypebene durchgeführt werden, dabei wird Mykolsäure als Markermolekül verwendet.

## 6.2. Identifizierung auf Genotypebene

In diesem Abschnitt wird eine Identifizierung der Mykobakterien anhand der gemessenen SERS-Spektren durchgeführt. Es werden sieben Mykobakterienstämme untersucht (siehe Übersicht in Tabelle 6.1). Die Mittelwert-Spektren je einer gemessenen Probe pro Mykobakterienstamm sind in Abbildung 6.3 dargestellt (Die Mittelwert-Spektren aller drei Proben jedes Mykobakterienstamms sind in Anhang E dargestellt).

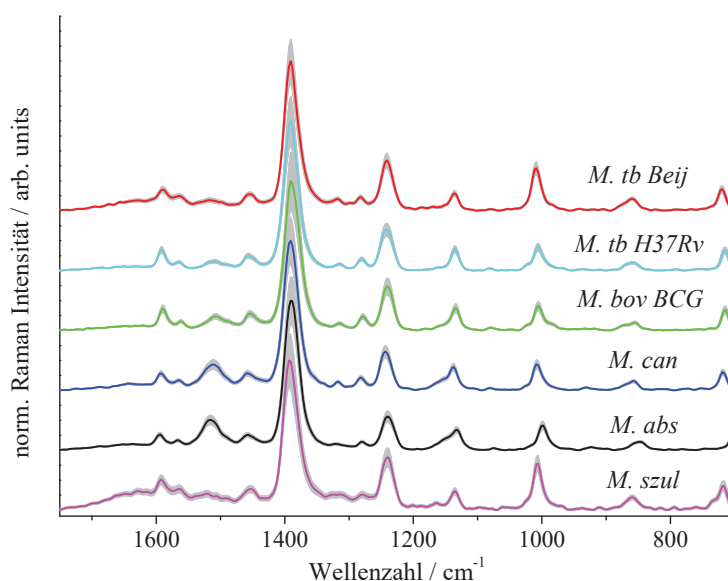


Abbildung 6.3.: Mittelwert-SERS-Spektren der Mykobakteriensuspension von oben nach unten: *M. tb Beij* (rot), *M. tb H37Rv* (türkis), *M. bov BCG* (grün), *M. can* (blau), *M. abs* (schwarz), *M. szul* (pink). Die Intensität aller SERS-Spektren ist auf die Signalintensität der Bande bei  $1392\text{ cm}^{-1}$  normiert. Die doppelte Standardabweichung ist grau abgebildet.

Die SERS-Spektren aller untersuchten Mykobakterien werden signifikant von den Schwingungssignalen der Mykolsäure dominiert. Die SERS-Spektren unterscheiden sich nur in einigen visuell kaum erfassbaren Details von einander, da die Grundstruktur der Mykolsäure bei allen Mykobakterienstämmen identisch ist. Die funktionellen Gruppen haben in der Regel keinen signifikanten Einfluss auf das SERS-Spektrum (siehe hierzu Abschnitt 4.3). Jedoch ist es möglich, diese marginalen Unterschiede mit Hilfe chemometrischer Methoden für eine Identifizierung zu nutzen [129, 130]. Um die chemometrischen Methoden, welche auf statistischer Auswertung basieren, anwenden zu können, muss sichergestellt sein, dass der zu analysierende Datensatz statistisch valide ist. Um Variationen aufgrund verschiedener Kolloidansätze zu vermeiden werden für alle SERS-Messungen h-AgNPs einer Charge verwendet. Weiterhin werden die drei Proben jedes Stammes an unterschiedlichen Tagen und in unterschiedlicher Reihenfolge gemessen, sodass eine Zuordnung nach Tagen ausgeschlossen werden kann. Für jede Messung wird ein neuer, frisch präparierter Mikrofluidikchip verwendet. Vor und nach jeder Messung wird eine Hintergrundmessung mit Wasser durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Memory-Effekte auftreten. Zusätzlich spielt die Größe des Datensatzes eine signifikante Rolle. Durch die Verwendung des tropfenbasierten LOC-SERS-Aufbaus, können Datensätze mit einer großen Anzahl von SERS-Spektren gewonnen werden. Dabei ist das benötigte Probenvolumen sowie der zeitliche Aufwand minimal. Jeder Tropfen stellt eine einzelne Probe dar. Für die Erstellung des Datensatzes für die chemometrische Analyse werden Mittelwert-Spektren aus je 15 SERS-Spektren (Mittlung über fünf Tropfen) gebildet. So entstehen pro Mykobakterienstamm drei Datensätze, welche etwa 100 Mittelwert-Spektren enthalten. Der gesamte SERS-Datensatz der sieben Mykobakterienstämmen beinhaltet 2350 Mittelwert-Spektren.

Für die Behandlung von TB ist die wesentliche Fragestellung in erster Instanz, ob tatsächlich eine TB-Erkrankung vorliegt. Da die Symptome von TB nicht spezifisch sind, kann dies in einer Anamnese nicht sicher bestimmt werden. Sollte eine TB-Erkrankung vorliegen, kann durch die Identifizierung des Genotyps eine erfolgversprechende Behandlung sichergestellt werden. Gibt es einen Verdacht auf Antibiotikaresistenz des Erregers, werden drastischere Maßnahmen erforderlich als bei suszeptiblen Mykobakterienstämmen. Um die beiden genannten Fragestellungen gezielt zu adressieren, wird ein chemometrisches Modell entworfen, bei dem hierarchisch zunächst zwischen MTC und NTM unterschieden wird. Im Anschluss werden in beiden Klassen die Genotypen unterschieden. Die sieben untersuchten Mykobakterienstämmen werden dabei in nur sechs Genotypen aufgeteilt, da die beiden Stämme des *M. tb* *Beij* demselben Genotyp angehören. Für das Erstellen des Modells werden die Daten von zwei Proben je Mykobakterienstamm verwendet. Die Daten der dritten Probe werden für die Identifizierung genutzt.

Nach der Vorbehandlung der SERS-Spektren (siehe Abschnitt 3.5 in Kapitel „Material und Methoden“) wird eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt, um den multidimensionalen spektralen Raum (1024 Dimensionen pro Spektrum) auf 30 Dimensionen zu reduzieren. Die erhaltenen 30 Dimensionen werden Hauptkomponenten (PCs) genannt. Unter Anwendung einer linearen Diskriminanzanalyse (LDA) wird daraufhin das optimierte Modell unter Berücksichtigung der ersten 16 PCs erstellt. Die resultierenden *loadings* (LD) repräsentieren die spektralen Variablen im Raum der PCs. Die ersten beiden LDs sind in Abbildung 6.4 angegeben.

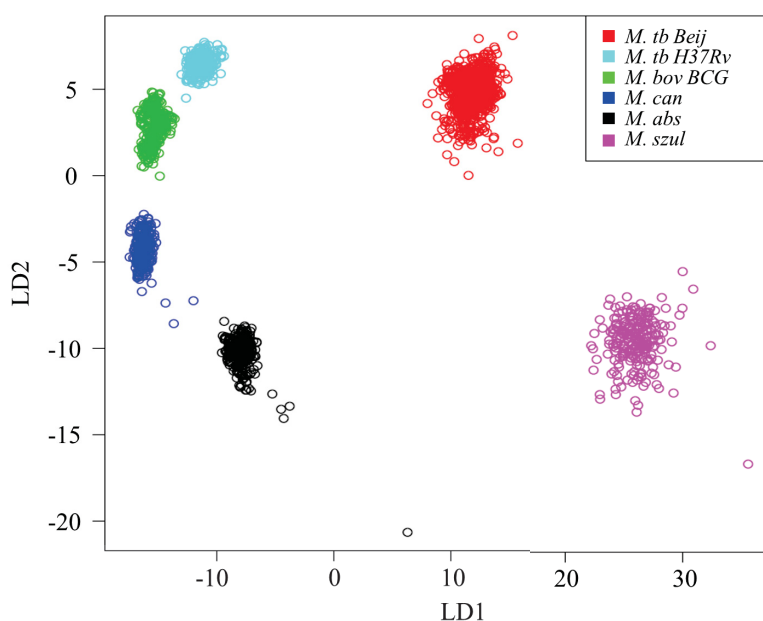


Abbildung 6.4.: LD1 aufgetragen gegen LD2. Ein PCA-LDA-Modell für die Unterscheidung der sechs Mykobakteriengenotypen wird für die Visualisierung erstellt.

Die Qualität der Unterscheidung wird zum Einen über die Sensitivität angegeben, sie ist definiert durch

$$\text{Sensitivität} = \frac{RP}{RP + FN} \quad ,$$

dabei ist  $RP$  die Anzahl der richtig positiv und  $FN$  die Anzahl der falsch negativ zugeordneten Spektren. Zum Anderen über die Spezifikation, diese ist definiert durch

$$\text{Spezifikation} = \frac{RN}{RN + FP} \quad ,$$

wobei  $RN$  die Anzahl der richtig negativ und  $FP$  die Anzahl der falsch positiv zugeordneten Spektren angibt.

Die erste Stufe des hierarchischen Modells ist die Separation der MTC- und NTM-Klassen, für diese Stufe beträgt die Sensitivität 98,2% und die Spezifikation 77,8%. Das heißt, es wird eine Genauigkeit<sup>1</sup> von 93,3% erreicht. Nach der Trennung des Datensatzes in MTC und NTM werden in beiden Klassen die Genotypen differenziert. Eine schematische Darstellung des chemometrischen Modells ist in Abbildung 6.5 wiedergegeben.

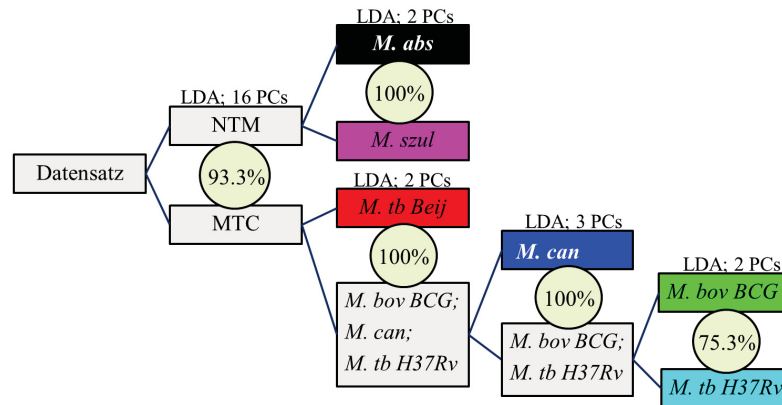


Abbildung 6.5.: Schematische Darstellung des chemometrischen Modells mit Angabe der Genauigkeit für jede einzelne Stufe.

Die beiden NTM-Spezies *M. abs* und *M. szul* können mit 100% Genauigkeit zugeordnet werden. In der Klasse der MTC befinden sich die Spektren der Genotypen *M. tb Beij*, *M. can*, *M. tb H37Rv* und *M. bov BCG*. Diese vier Genotypen werden nun sukzessive getrennt. Dabei können sowohl die Spektren der *M. tb Beij* als auch die der *M. can* mit 100% Genauigkeit identifiziert werden. Die Genauigkeit bei der Trennung von *M. tb H37Rv* und *M. bov BCG* beträgt 75,3%. Das heißt, die Unterscheidung dieser beiden Genotypen ist unter Verwendung des entworfenen Modells relativ ungenau. Bei der Betrachtung der Sensitivität für *M. bov BCG* (diese beträgt lediglich 60%) fällt auf, dass 40% der Spektren falsch negativ zugeordnet werden.

Der in dieser Studie verwendete *M. bov BCG* Stamm wurde in der Vergangenheit als Impfstoff eingesetzt. Es handelt sich um einen genetisch veränderten Mykobakterienstamm (*M. bovis BCG pasteur*) er kommt nicht in der natürlichen Umgebung vor. Daher kann von einer erfolgreichen Identifizierung auf Ebene der Genotypen gesprochen werden.

Um den in dieser Arbeit präsentierten LOC-SERS-Aufbau im klinischen Alltag zu integrieren, sollte in einer weiteren Studie untersucht werden, ob die Identifizierung der Mykobakterien auch aus Sputum reproduzierbar ist. Des Weiteren sollte eine Datenbank, mit einer Vielzahl von Mykobakterienstämmen generiert werden.

<sup>1</sup> Die Genauigkeit ist der Quotient aus allen richtig zugeordneten Spektren und allen im Datensatz enthaltenen Spektren.

Zusammenfassend wurde mit Hilfe des LOC-SERS-Aufbaus ein Datensatz von SERS-Spektren zur Identifizierung von Mykobakterien erzeugt. Die SERS-Spektren wurden dabei stark von den Schwingungssignalen der Mykolsäure dominiert. Dies konnte bei der Charakterisierung der SERS-Spektren festgestellt werden. Da die Mykolsäure spezifisch für Mykobakterien auf Stammebene ist, eignet sie sich als Markermolekül. Um die SERS-Spektren der Mykolsäure zu erhalten waren nach der mechanischen Lyse mit Hilfe des *bead-beating*-Moduls keine zusätzlichen Extraktionsschritte notwendig. Durch die Integration des *bead-beating*-Moduls in den Messaufbau konnten kontaminationsfreie Arbeitsbedingungen geschaffen werden. So können die erhöhten Sicherheitsbedingungen bei der Arbeit mit Mykobakterien erfüllt werden. Die erhaltenen Informationen sind hervorragend für die Identifizierung von Mykobakterien auf Genotypebene geeignet. Die Identifizierung wurde unter Verwendung eines hierarchischen chemometrischen Modells erfolgreich durchgeführt. Die Identifizierung auf Genotypebene konnte mit exzellenter Genauigkeit und Zuverlässigkeit für die untersuchten Wildtypen realisiert werden. Damit wurde gezeigt, dass die LOC-SERS-Methode im Bereich der Identifizierung von Pathogenen ein vielversprechender Ansatz ist.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Erkenntnisse zu Einflussfaktoren auf SERS-Spektren erlangt. In der präsentierten Studie wurden an einem System sowohl der Einfluss der Silbernanopartikel, als auch der Einfluss der Art der funktionellen Gruppe und der Substitutionsposition untersucht. Es zeigte sich, dass Zusammenhänge zwischen den einzelnen Faktoren vorhanden sind. Die Anwendung quantenchemischer Methoden erwies sich nicht nur als sinnvoll, sondern vielmehr als notwendig, um eine akkurate Bandenzuordnung zu erzielen.

Am Beispiel von Methotrexat (MTX) konnte gezeigt werden, dass die zuvor erlangten Erkenntnisse auf chemisch ähnliche Substanzen übertragbar sind. MTX wurde sowohl in basischer Pufferlösung als auch in artifiziellem Blutplasma quantitativ detektiert. Es gibt Bereiche, in denen die Signalintensität der SERS-Spektren linear mit der Konzentration zusammenhängt. Der Bereich der Linearität konnte durch die Verwendung von h-AgNPs mit dem therapeutisch relevanten Bereich in Übereinstimmung gebracht werden. Auch zwei unterschiedliche Konzentrationen von MTX in realem Blutplasma konnten eindeutig voneinander separiert werden. Die Ergebnisse zeigen das große Potential der LOC-SERS-Methode für die therapeutische Medikamentenüberwachung auf.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Identifizierung von Mykobakterien auf Genotypebene. Dabei wurde, durch die Implementierung des *bead-beating*-Moduls vor dem mikrofluidischen Chip, die Probenvorbereitung direkt in das System integriert. Dadurch kann eine sichere und kontaminationsfreie Arbeitsumgebung gewährleistet werden. Die SERS-Spektren der Bakteriensuspension werden von den Schwingungssignalen der Mykolsäure dominiert, diese fungiert bei der Identifizierung als Markermolekül. Durch die schnelle Identifizierung von Pathogenen wird eine gezielte individuelle Behandlung von Patienten ermöglicht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchung noch einmal kurz zusammengefasst. Verschiedene Einflussfaktoren auf die SERS-Spektren wurden in Kapitel 4 untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die mit einer Methylaminogruppe substituierten Pyridinderivate bei unterschiedlichen AgNPs verschiedene bevorzugte Wechselwirkungspositionen aufweisen. Die beiden möglichen Positionen sind dabei zum einen das

Stickstoffatom des heteroaromatischen Ringsystems und zum anderen das Stickstoffatom der funktionellen Methylaminogruppe. Dies führte besonders in den SERS-Spektren des *para*-Isomers zu gravierenden Änderungen der detektierten Signale. Dabei wurden bei der Interaktion über das Stickstoffatom des Pyridinrings (im Falle von c-AgNPs) im Wesentlichen nur die Normalmoden des Ringsystems verstärkt. Erfolgt die Wechselwirkung präferiert über das Stickstoffatom der funktionellen Gruppe (im Fall von h-AgNPs), so werden auch deren Schwingungen verstärkt. Lässt die räumliche Anordnungen des Analytmoleküls es zu, so können sich die Moleküle trotz unterschiedlicher bevorzugter Wechselwirkungspositionen in einer ähnlichen Orientierung zur Oberfläche anordnen. Dieses Verhalten führt zu einer Angleichung der SERS-Spektren für die unterschiedlichen AgNPs, hier zeigt sich ein Zusammenhang der Einflüsse der AgNPs und der Substitutionsposition. Dies war im Fall von 2-picam und zum Teil auch von 3-picam zu beobachten. Unter Verwendung der picam- und pymeth-Isomere konnte festgestellt werden, dass die unterschiedlichen funktionellen Gruppen anhand von Raman-spektroskopischen Daten kaum unterscheidbar sind. Durch die Anwendung von SERS-Spektroskopie konnten die Schwingungen der funktionellen Gruppe hervorgehoben werden, wenn der Substituent direkt mit der Metalloberfläche wechselwirkt. Sowohl aus den Raman- als auch aus den SERS-Spektren ist die Unterscheidung zwischen den möglichen Substitutionspositionen sehr sicher möglich. Eine grundlegende Voraussetzung für eine valide Charakterisierung der Spektren ist die exakte Bandenzuordnung. Hierfür ist es notwendig, quantenchemische Methoden anzuwenden, da es ansonsten leicht zu Fehlinterpretationen kommen kann. Verschiedene funktionelle Gruppen in *para*-Position des Pyridinrings wurden Raman- und SERS-spektroskopisch untersucht. Es zeigt sich, dass die Art der funktionellen Gruppe kaum signifikanten Einfluss auf die erhaltenen Signale der Raman- und SERS-Spektren hat, wenn der Substituent nicht direkt mit der Oberfläche interagiert. Eine Ausnahme bilden hierbei funktionelle Gruppen, die einen großen Streuquerschnitt haben.

Die Erkenntnisse dieser Grundlagenstudie konnten erfolgreich auf ein chemisch ähnliches Molekül mit medizinischer Relevanz übertragen werden. So wurde in Kapitel 5 Methotrexat mit Hilfe des LOC-SERS-Aufbaus quantitativ detektiert. Um eine valide Auswertung zu ermöglichen, sind zunächst die optimalen Bedingungen für die SERS-Experimente bestimmt worden. Weiterhin wurde eine Analyse der Orientierung der Analytmoleküle zur Oberfläche durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch hier die Interaktion zwischen Molekül und AgNPs bevorzugt über die Stickstoffe des heteroaromatischen Ringsystems, bzw. die funktionellen Aminogruppen stattfindet. Für die basische wässrige MTX-Lösung wurden c-AgNPs als Kolloid verwendet. Für die SERS-Messungen in artifiziellem Blutplasma



wurden h-AgNPs eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen der Signalintensität und der MTX-Konzentration ein linearer Zusammenhang im therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich und darüber hinaus existiert. Die Detektionsgrenze liegt dabei mit  $0.12 \mu\text{M}$  ( $54,07 \frac{\text{ng}}{\text{mol}}$ ) signifikant unterhalb dieses Bereiches. Die Linearität des Signal-Konzentrations-Verhältnisses konnte mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,991$  im Bereich von  $0,08 \mu\text{M}$  bis  $9,6 \mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Es gelang des Weiteren, verschiedene Konzentrationen von MTX in realem Blutplasma eindeutig voneinander zu unterscheiden. Damit ist die LOC-SERS-Methode eine vielversprechende Alternative zu den derzeit existierenden quantitativen Standardmethoden, wie Immunassays oder den auf Chromatographie basierenden Verfahren. Durch die konkret definierte Versuchsumgebung im mikrofluidischen Chip, den einfachen Umgang mit den Proben (in Spritzen) und das geringe benötigte Probenvolumen ergibt sich die Möglichkeit eines leicht zu transportierenden Systems. Erste Ansätze das LOC-SERS-System mit einem portablen Raman-Mikroskop-System zu kombinieren, wurden jüngst in der Literatur dokumentiert [74].

Eine andere mögliche Anwendung des LOC-SERS-Aufbaus liegt in der Identifizierung von Pathogenen. Da MTX unter anderem bei Mykobakterien-assoziierten Erkrankungen zum Einsatz kommt, wurden in Kapitel 6 Mykobakterien anhand der SERS-Spektren auf Genotypebene identifiziert. Die SERS-Spektren der lysierten Mykobakterien in Suspension wurden stark von den Signalen der Mykolsäure dominiert. Die Mykolsäure eignet sich auf Grund ihrer Stamm-spezifischen funktionellen Gruppen sehr gut als Markermolekül für die Identifizierung von Mykobakterien. Um die SERS-Signale der Mykolsäure zu detektieren waren nach der mechanischen Lyse der Mykobakterien keine zusätzlichen Extraktionsschritte notwendig. Für die Identifizierung der Mykobakterien auf Genotypebene kam ein hierarchisches chemometrisches Model, basierend auf PCA und LDA, zur Anwendung, wodurch die marginalen Unterschiede in den SERS-Spektren der Mykobakteriensuspension valide ausgewertet werden konnten. Eine Unterscheidung zwischen MTC und NTM wurde mit 93,3% Genauigkeit erreicht. Durch die Implementierung des *bead-beating*-Moduls vor dem mikrofluidischen Chip wurde die Probenvorbereitung direkt in das System integriert. Dadurch wurde eine sichere und kontaminationsfreie Arbeitsumgebung geschaffen. Durch die Verwendung des LOC-SERS-Systems können große, statistisch valide Datensätze im Hochdurchsatz und unter Verwendung geringer Probenvolumina erzeugt werden. Nun gilt es, die Identifizierung auch in Körperflüssigkeiten (z. B. Sputum) erfolgreich durchzuführen.

Die vorliegende Arbeit zeigt verschiedene vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten des LOC-SERS-Systems auf. Die grundlegenden Erkenntnisse der Studie zu den Einflussfakto-

ren auf SERS-Spektren sind ein wichtiger Beitrag zur Erforschung der SERS-Mechanismen. Ihre Übertragbarkeit auf chemisch ähnliche Moleküle konnte anhand der SERS-Spektren von MTX erfolgreich gezeigt werden. Weiterhin konnten sowohl die SERS-Messungen von MTX als auch von Mykolsäure in komplexen Medien realisiert werden. Damit zeigt sich das große Potential des LOC-SERS-Systems für medizinisch relevante Anwendungen.

## Literaturverzeichnis

- [1] S. H. Jang, Z. Yan, and J. A. Lazor. Therapeutic drug monitoring: A patient management tool for precision medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 99(2):148–150, 2016.
- [2] F. Pene, E. Courtine, A. Cariou, and J.-P. Mira. Toward theragnostics. *Critical care medicine*, 37(1):S50–S58, 2009.
- [3] I. R. Edwards and J. K. Aronson. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *The Lancet*, 356(9237):1255 – 1259, 2000.
- [4] D. J. Touw, C. Neef, A. H. Thomson, A. A. Vinks, et al. Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: A systematic review. *Therapeutic drug monitoring*, 27(1):10–17, 2005.
- [5] D. Cialla, A. März, R. Bohme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, and J. Popp. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(1):27-54, 2012.
- [6] M. Jahn, S. Patze, I. J. Hidi, R. Knipper, A. I. Radu, A. Mühlig, S. Yüksel, V. Peksa, K. Weber, T. Mayerhöfer, et al. Plasmonic nanostructures for surface-enhanced spectroscopic methods. *Analyst*, 141(3):756-793, 2016.
- [7] C. De Rosa, F. Auriemma, C. Diletto, R. Di Girolamo, A. Malafronte, P. Morvillo, G.i Zito, G. Rusciano, G. Pesce, and A. Sasso. Toward hyperuniform disordered plasmonic nanostructures for reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(12):8061–8069, 2015.
- [8] S. Pahlow, A. März, B. Seise, K. Hartmann, I. Freitag, E. Kämmer, R. Böhme, V. Deckert, K. Weber, D. Cialla, and J. Popp. Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy. *Engineering in Life Sciences*, 12(2):131–143, 2012.
- [9] W. Xie and S. Schlücker. Medical applications of surface-enhanced Raman scattering. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(15):5329–5344, 2013.

- [10] E. C. Le Ru, M. Meyer, and P. G. Etchegoin. Proof of single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering (SERS) by means of a two-analyte technique. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(4):1944–1948, 2006.
- [11] A. Kudelski and B. Pettinger. SERS on carbon chain segments: monitoring locally surface chemistry. *Chemical Physics Letters*, 321(5-6):356–362, 2000.
- [12] A. März, K. R. Ackermann, D. Malsch, T. Bocklitz, T. Henkel, and J. Popp. 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, 2009.
- [13] K. R. Ackermann, T. Henkel, and J. Popp. Quantitative Online Detection of Low-Concentrated Drugs via a SERS Microfluidic System. *ChemPhysChem*, 8(18):2665–2670, 2007.
- [14] J. H. Jung, J. Choo, D. J. Kim, and S. Lee. Quantitative determination of nicotine in a PDMS microfluidic channel using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 27(2):277–280, 2006.
- [15] L. Wu, Z. Y. Wang, S. F. Zong, and Y. P. Cui. Rapid and reproducible analysis of thiocyanate in real human serum and saliva using a droplet SERS-microfluidic chip. *Biosensors & Bioelectronics*, 62:13–18, 2014.
- [16] K. K. Strelau, R. Kretschmer, R. Möller, W. Fritzsche, and J. Popp. SERS as tool for the analysis of DNA-chips in a microfluidic platform. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(4):1381–1384, 2010.
- [17] J. Qi, J. Zeng, F. Zhao, S. H. Lin, B. Raja, U. Strych, R. C. Willson, and W.-C. Shih. Label-free, in situ SERS monitoring of individual DNA hybridization in microfluidics. *Nanoscale*, 6(15):8521–8526, 2014.
- [18] M. Wang, M. Benford, N. Jing, G. Cote, and J. Kameoka. Optofluidic device for ultra-sensitive detection of proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Microfluidics and Nanofluidics*, 6(3):411–417, 2009.
- [19] A. März, B. Mönch, P. Rösch, M. Kiehntopf, T. Henkel, and 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(9):2755–2761, 2011.

- [20] X. L. Zhang, H. B. Yin, J. M. Cooper, and S. J. Haswell. Characterization of cellular chemical dynamics using combined microfluidic and Raman techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(3):833–840, 2008.
- [21] N. Qi, B. W. Li, H. Y. You, W. Zhang, L. W. Fu, Y. Q. Wang, and L. X. Chen. Surface-enhanced Raman scattering on a zigzag microfluidic chip: towards high-sensitivity detection of As(III)ions. *Analytical Methods*, 6(12):4077–4082, 2014.
- [22] A. März, T. Henkel, D. Cialla, M. Schmitt, and J. Popp. Droplet formation via flow-through microdevices in Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy - concepts and applications. *Lab on a Chip*, 11(21):3584–3592, 2011.
- [23] Q. Zhou and T. Kim. Review of microfluidic approaches for surface-enhanced Raman scattering. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 227:504–514, 2016.
- [24] A. Kaczor, K. Malek, and M. Baranska. Pyridine on colloidal silver. Polarization of surface studied by surface-enhanced Raman scattering and density functional theory methods. *Journal of Physical Chemistry C*, 114(9):3909–3917, 2010.
- [25] L. L. Zhao, L. Jensen, and G. C. Schatz. Pyridine-ag-20 cluster: A model system for studying surface-enhanced Raman scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 128(9):2911–2919, 2006.
- [26] R. Wen and Y. Fang. Adsorption of pyridine carboxylic acids on silver surface investigated by potential-dependent SERS. *Vibrational Spectroscopy*, 39(1):106–113, 2005.
- [27] F. W. King, R. P. Van Duyne, and G. C. Schatz. Theory of Raman scattering by molecules adsorbed on electrode surfaces. *The Journal of Chemical Physics*, 69(10):4472–4481, 1978.
- [28] J. Barthelmes and W. Plieth. SERS investigations on the adsorption of pyridine carboxylic-acids on silver - influence of pH and supporting electrolyte. *Electrochimica Acta*, 40(15):2487–2490, 1995.
- [29] H. Yamada, H. Nagata, K. Toba, and Y. Nakao. Charge-transfer band and SERS mechanism for the pyridine-Ag system. *Surface Science*, 182(1-2):269–286, 1987.
- [30] J. F. Arenas, I. L. Tocon, J. C. Otero, and J. I. Marcos. Charge transfer processes in surface-enhanced Raman scattering. Franck-Condon active vibrations of pyridine. *Journal of Physical Chemistry*, 100(22):9254–9261, 1996.

- [31] C. Zuo and P. W. Jagodzinski. Surface-enhanced Raman scattering of pyridine using different metals: Differences and explanation based on the selective formation of alpha-pyridyl on metal surfaces. *Journal of Physical Chemistry B*, 109(5):1788–1793, 2005.
- [32] T. Osaki, T. Yoshikawa, Y. Satoh, and R. Shimada. Adsorption of pyridine, gamma-picoline and isonicotinonitrile on Ag colloidal particles studied by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36(3):199–207, 2005.
- [33] Y. Ikezawa, H. Saito, K. Matsui, and G. Toda. A study of the competitive adsorption of pyridine and monosubstituted pyridines on a silver electrode by the SERS method. *Surface Science*, 176(3):603–609, 1986.
- [34] J. F. Arenas, M. A. Montanez, J. C. Otero, and J. I. Marcos. Surface-enhanced Raman spectra of 2-cyanopyridine and picolinamide. *Journal of Molecular Structure*, 293:341–344, 1993.
- [35] L. R. Wang and Y. Fang. IR-SERS study and theoretical analogue on the adsorption behavior of pyridine carboxylic acid on silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63(3):614–618, 2006.
- [36] K. A. Bunding, J. R. Lombardi, and R. L. Birke. Surface-enhanced Raman spectra of methylpyridines. *Chemical Physics*, 49(1):53–58, 1980.
- [37] M. Kobayashi and M. Imai. SERS intensities of pyridine and its derivatives adsorbed on Ag electrodes. *Surface Science*, 158(1-3):275–285, 1985.
- [38] S. A. Naser, S. R. Sagramsingh, A. S. Naser, and S. Thanigachalam. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn’s disease in some inflammatory bowel disease patients. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23):7403–7415, 2014.
- [39] S. A. Naser and M. T. Collins. Debate on the lack of evidence of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Crohn’s disease. *Inflammatory bowel diseases*, 11(12):1123, 2005.
- [40] D. Gupta, R. Agarwal, A. N. Aggarwal, and S. K. Jindal. Molecular evidence for the role of mycobacteria in sarcoidosis: A meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 30(3):508–516, 2007.
- [41] D. E. Griffith, T. Aksamit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M. F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier,

- S. Ruoss, C. F. von Reyn, R. J. Wallace, and K. Winthrop. An official ats/idsa statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(4):367–416, 2007.
- [42] C. E. Barry, R. E. Lee, K. Mdluli, A. E. Sampson, B. G. Schroeder, R. A. Slayden, and Y. Yuan. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Progress in lipid research*, 37(2):143–179, 1998.
- [43] E. Schrödinger. Quantisierung als Eigenwertproblem. *Annalen der Physik*, 385(13):437–490, 1926.
- [44] M. Born and R. Oppenheimer. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik*, 389(20):457–484, 1927.
- [45] F. Hund. Symmetriecharaktere von Termen bei Systemen mit gleichen Partikeln in der Quantenmechanik. *Zeitschrift für Physik*, 43(11):788–804, 1927.
- [46] W. Pauli. Über den Zusammenhang des Abschlusses der Elektronengruppen im Atom mit der Komplexstruktur der Spektren. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 31(1):765–783, 1925.
- [47] R. S. Mulliken. Electronic structures of polyatomic molecules and valence VI. on the method of molecular orbitals. *The Journal of Chemical Physics*, 3(7):375–378, 1935.
- [48] P. M. Morse. Diatomic molecules according to the wave mechanics. II. vibrational levels. *Physical Review*, 34(1):57, 1929.
- [49] C. V. Raman and K. S. Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121:501–502, 1928.
- [50] J. Popp, V. V. Tuchin, A. Chiou, and S. H. Heinemann. *Handbook of Biophotonics*, volume 2. John Wiley & Sons, 2011.
- [51] R. L. McCreery. *Raman spectroscopy for chemical analysis*, volume 225. John Wiley & Sons, 2005.
- [52] J. A. Creighton. Surface Raman electromagnetic enhancement factors for molecules at the surface of small isolated metal spheres: The determination of adsorbate orientation from SERS relative intensities. *Surface Science*, 124(1):209 – 219, 1983.
- [53] P. R. Griffiths. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Wiley Online Library, 2006.

- [54] D. Cialla, J. Petschulat, U. Hübner, H. Schneidewind, M. Zeisberger, R. Mattheis, T. Pertsch, M. Schmitt, R. Möller, and J. Popp. Investigation on the second part of the electromagnetic SERS enhancement and resulting fabrication strategies of anisotropic plasmonic arrays. *ChemPhysChem*, 11(9):1918–1924, 2010.
- [55] E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin. Rigorous justification of the  $|E|^4$  enhancement factor in surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 423(1):63–66, 2006.
- [56] E. C. Le Ru, M. Meyer, E. Blackie, and P. G. Etchegoin. Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot. *Journal of Raman Spectroscopy*, 39(9):1127–1134, 2008.
- [57] H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, and P. Apell. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Physical Review E*, 62:4318–4324, Sep 2000.
- [58] L. Jensen, C. M. Aikens, and G. C. Schatz. Electronic structure methods for studying surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 37(5):1061–1073, 2008.
- [59] N. S. Ostlund and A. Szabo. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Dover Publications Inc, 1996.
- [60] D. R. Hartree. The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field. part I. theory and methods. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 24:89–110, 1928.
- [61] I. N. Levine. *Quantum chemistry*. Allyn Bacon, New York, USA, 2000.
- [62] L. Brillouin. *Les champs self-consistents de Hartree et de Fock*. Number 159. Paris, 1934.
- [63] F. Jensen. *Introduction to computational chemistry*. John Wiley & Sons, 2013.
- [64] R. S. Mulliken. Report on notation for the spectra of polyatomic molecules. *Journal of Chemical Physics*, 23:1997–2011, 1955.
- [65] E. C. Le Ru, E. Blackie, M. Meyer, and P. G. Etchegoin. Surface-enhanced Raman scattering enhancement factors: A comprehensive study. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(37):13794–13803, 2007.



- [66] E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin. Quantifying SERS enhancements. *Mrs Bulletin*, 38(8):631–640, 2013.
- [67] M. Moskovits. Surface selection-rules. *Journal of Chemical Physics*, 77(9):4408–4416, 1982.
- [68] M. Moskovits and J. S. Suh. Surface selection-rules for surface-enhanced Raman spectroscopy - calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver. *Journal of Physical Chemistry*, 88(23):5526–5530, 1984.
- [69] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro. Chemical-reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body-fluid. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 3(2):79–83, 1992.
- [70] P. C. Lee and D. Meisel. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86(17):3391–3395, 1982.
- [71] N. Leopold and 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(24):5723–5727, 2003.
- [72] S. E. J. Bell and N. M. S. Sirimuthu. Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, 37(5):1012–1024, 2008.
- [73] E. Kämmer, K. Olschewski, S. Stöckel, P. Rösch, K. Weber, D. Cialla-May, T. Bocklitz, and J. Popp. Quantitative SERS studies by combining LOC-SERS with the standard addition method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(29):8925–8929, 2015.
- [74] I. J. Hidi, M. Jahn, M. W. Pletz, K. Weber, D. Cialla-May, and J. Popp. Toward levofloxacin monitoring in human urine samples by employing the LOC-SERS technique. *The Journal of Physical Chemistry C*, online-puplication, 2016.
- [75] E. Kämmer, K. Olschewski, T. Bocklitz, P. Rösch, K. Weber, D. Cialla, and J. Popp. A new calibration concept for a reproducible quantitative detection based on SERS measurements in a microfluidic device demonstrated on the model analyte adenine. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(19):9056–9063, 2014.
- [76] B. Zheng, J. D. Tice, and R. F. Ismagilov. Formation of droplets of alternating composition in microfluidic channels and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays. *Analytical Chemistry*, 76(17):4977–4982, 2004.

- [77] T. Henkel, T. Bermig, M. Kielpinski, A. Grodrian, J. Metze, and J. M. Kohler. Chip modules for generation and manipulation of fluid segments for micro serial flow processes. *Chemical Engineering Journal*, 101(1-3):439–445, 2004.
- [78] K. R. Strehle, D. Cialla, P. Rösch, T. Henkel, M. Köhler, and J. Popp. A reproducible surface-enhanced Raman spectroscopy approach. Online SERS measurements in a segmented microfluidic system. *Analytical Chemistry*, 79(4):1542–1547, 2007.
- [79] R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria, 2011.
- [80] C. G. Ryan, E. Clayton, W. L. Griffin, S. H. Sie, and D. R. Cousens. Snip, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative-analysis of pixe spectra in geoscience applications. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, 34(3):396–402, 1988.
- [81] D. M. Zhang, K. N. Jallad, and D. Ben-Amotz. Stripping of cosmic spike spectral artifacts using a new upper-bound spectrum algorithm. *Applied Spectroscopy*, 55(11):1523–1531, 2001.
- [82] A. März, T. Bocklitz, and 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(21):8337–8340, 2011.
- [83] K. Pearson. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, 2:559–572, 1901.
- [84] V. N. Vapnik. *The nature of statistical learning theory*. Springer, New York, 2013.
- [85] R. A. Fischer. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics*, 7:179–188, 1936.
- [86] M. Otto. *Chemometrie*. VCH. Verlag, Weinheim, 1997.
- [87] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson et al. GAUSSIAN 09, 2009.
- [88] G. Schaftenaar and J. H. Noordik. Molden: A pre- and post-processing program for molecular and electronic structures, 2000.
- [89] A. R. Allouche. Gabedit- a graphical user interface to computational chemistry, 2011.

- [90] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. Mcquilla. Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2):163–166, 1974.
- [91] F. A. Miller. Misassignment of the strong Raman band near  $1000\text{ cm}^{-1}$  in some substituted benzenes, and the Herzberg versus Wilson convention for numbering the vibrations of benzene. *Journal of Raman Spectroscopy*, 19(3):219–221, 1988.
- [92] S. H. Choi and H. G. Park. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of sodium benzoate and 4-picoline in Ag-colloids prepared by gamma-irradiation. *Applied Surface Science*, 243(1-4):76–81, 2005.
- [93] S. Sarkar, M. Pradhan, A. K. Sinha, M. Basu, and T. Pal. Chelate effect in surface-enhanced Raman scattering with transition metal nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 1(1):439–444, 2010.
- [94] S. Bhunia, S. Forster, N. Vyas, H. C. Schmitt, and A. K. Ojha. Direct visual evidence of end-on adsorption geometry of pyridine on silver surface investigated by surface-enhanced Raman scattering and density functional theory calculations. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151:888–894, 2015.
- [95] T. D. Klots. Raman vapor spectrum and vibrational assignment for pyridine. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 54(10):1481–1498, 1998.
- [96] A. Dkhissi, L. Adamowicz, and G. Maes. Density functional theory study of the hydrogen-bonded pyridine-H<sub>2</sub>O-complex: A comparison with RHF and MP2 methods and with experimental data. *Journal of Physical Chemistry A*, 104(10):2112–2119, 2000.
- [97] V. Arjunan, P. S. Balamourougane, S. T. Govindaraja, and S. Mohan. A comparative study on vibrational, conformational and electronic structure of 2-(hydroxymethyl)pyridine and 3-(hydroxymethyl)pyridine. *Journal of Molecular Structure*, 1018:156–170, 2012.
- [98] I. Sinicina, B. Mayr, G. Mall, and W. Keil. Deaths following methotrexate overdoses by medical staff. *Journal of Rheumatology*, 32(10):2009–2011, 2005.
- [99] N. Jahovic, G. Sener, H. Cevik, Y. Ersoy, S. Arbak, and B. C. Yegen. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. *Cell Biochemistry and Function*, 22(3):169–178, 2004.

- [100] M. Gulgun, O. Erdem, E. Oztas, V. Kesik, N. Balamtekin, S. Vurucu, M. Kul, E. Kismet, and V. Koseoglu. Proanthocyanidin prevents methotrexate-induced intestinal damage and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(2):109–115, 2010.
- [101] K. R. Crews, T. Liu, C. Rodriguez-Galindo, M. Tan, W. H. Meyer, J. C. Panetta, M. P. Link, and N. C. Daw. High-dose methotrexate pharmacokinetics and outcome of children and young adults with osteosarcoma. *Cancer*, 100(8):1724–1733, 2004.
- [102] B. C. Widemann and P. C. Adamson. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, 11(6):694–703, 2006.
- [103] K. R. Crews, Y. Zhou, J. L. Pauley, S. C. Howard, S. Jeha, M. V. Relling, and C.-H. Pui. Effect of allopurinol versus urate oxidase on methotrexate pharmacokinetics in children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 116(1):227–232, 2010.
- [104] S. Marubashi, H. Nagano, S. Kobayashi, H. Eguchi, Y. Takeda, M. Tanemura, K. Umeshita, M. Monden, Y. Doki, and M. Mori. Evaluation of a new immunoassay for therapeutic drug monitoring of tacrolimus in adult liver transplant recipients. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 50(6):705–709, 2010.
- [105] C. Ritzmo, F. Albertioni, K. Cosic, S. Soderhall, and S. Eksborg. Therapeutic drug monitoring of methotrexate on the pediatric oncology ward: Can blood sampling from central venous accesses substitute for capillary finger punctures? *Therapeutic Drug Monitoring*, 29(4):447–451, 2007.
- [106] E. den Boer, S. G. Heil, B. D. van Zelst, R. J. W. Meesters, B. C. P. Koch, M. L. te Winkel, M. M. van den Heuvel-Eibrink, T. M. Luider, and R. de Jonge. A U-HPLC-ESI-MS/MS-based stable isotope dilution method for the detection and quantitation of methotrexate in plasma. *Therapeutic Drug Monitoring*, 34(4):432–439, 2012.
- [107] S. Belz, C. Frickel, C. Wolfrom, H. Nau, and G. Henze. High-performance liquid-chromatographic determination of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, 5-methyltetrahydrofolic acid and folinic acid in serum and cerebrospinal-fluid. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 661(1):109–118, 1994.
- [108] H. Yockell-Lelievre, N. Bukar, J. L. Toulouse, J. N. Pelletier, and J.-F. Masson. Naked-eye nanobiosensor for therapeutic drug monitoring of methotrexate. *Analyst*, 141:697–703, 2016.

- [109] I. J. Hidi, A. Mühlig, M. Jahn, F. Liebold, D. Cialla, K. Weber, and J. Popp. LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate. *Analytical Methods*, 6(12):3943–3947, 2014.
- [110] S. Ayyappan, N. Sundaraganesan, V. Aroulmoji, E. Murano, and S. Sebastian. Molecular structure, vibrational spectra and DFT molecular orbital calculations (TD-DFT and NMR) of the antiproliferative drug methotrexate. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 77(1):264–275, 2010.
- [111] A. Bonifacio, S. Dalla Marta, R. Spizzo, S. Cervo, A. Steffan, A. Colombatti, and V. Sergo. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood plasma and serum using Ag and Au nanoparticles: A systematic study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(9-10):2355–2365, 2014.
- [112] D. M. Zhang, S. M. Ansar, K. Vangala, and D. P. Jiang. Protein adsorption drastically reduces surface-enhanced Raman signal of dye molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(9):952–957, 2010.
- [113] J. S. Gebauer, M. Malissek, S. Simon, S. K. Knauer, M. Maskos, R. H. Stauber, W. Peukert, and L. Treuel. Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure. *Langmuir*, 28(25):9673–9679, 2012.
- [114] WHO. *Global Tuberculosis Report 2015*. WHO Press, Geneva, 2015.
- [115] S. Bhamidi, L. B. Shi, D. Chatterjee, J. T. Belisle, D. C. Crick, and M. R. McNeil. A bioanalytical method to determine the cell wall composition of mycobacterium tuberculosis grown in vivo. *Analytical Biochemistry*, 421(1):240–249, 2012.
- [116] P. J. Brennan. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*, 83(1-3):91–97, 2003.
- [117] M. Merker, C. Blin, S. Mona, N. Duforet-Frebourg, S. Lecher, E. Willery, M. G. B. Blum, S. Ruch-Gerdes, I. Mokrousov, E. Aleksic, C. Allix-Beguec, A. Antierens, et al. Evolutionary history and global spread of the mycobacterium tuberculosis beijing lineage. *Nature Genetics*, 47(3):242–249, 2015.
- [118] K. A. Cohen, T. Abeel, A. M. McGuire, C. A. Desjardins, V. Munsamy, T. P. Shea, B. J. Walker, N. Bantubani, D. V. Almeida, L. Alvarado, S. B. Chapman, N. R. et al. Evolution of extensively drug-resistant tuberculosis over four decades: Whole genome sequencing and dating analysis of mycobacterium tuberculosis isolates from kwazulu-natal. *Plos Medicine*, 12(9), 2015.

- [119] H. Soini and J. M. Musser. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clinical Chemistry*, 47(5):809–814, 2001.
- [120] S. Greco, E. Girardi, A. Navarra, and C. Saltini. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 61(9):783–790, 2006.
- [121] A. Walter, A. März, W. Schumacher, P. Rösch, and 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(6):1013–1021, 2011.
- [122] O. E. Rivera-Betancourt, R. Karls, B. Grosse-Siestrup, S. Helms, F. Quinn, and R. A. Dluhy. Identification of mycobacteria based on spectroscopic analyses of mycolic acid profiles. *Analyst*, 138(22):6774–6785, 2013.
- [123] J. Asselineau and E. Lederer. Structure of the mycolic acids of mycobacteria. *Nature*, 1950.
- [124] Y. Yuan, Y. Q. Zhu, D. D. Crane, and C. E. Barry III. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in mycobacterium tuberculosis. *Molecular microbiology*, 29(6):1449–1458, 1998.
- [125] R. Szewczyk, K. Kowalski, B. Janiszewska-Drobinska, and M. Druszczyńska. Rapid method for mycobacterium tuberculosis identification using electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of mycolic acids. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(3):298–305, 2013.
- [126] M. M. Floyd, V. A. Silcox, W. D. Jones, W. R. Butler, and J. O. Kilburn. Separation of mycobacterium-*bovis* BCG from mycobacterium-tuberculosis and mycobacterium-*bovis* by using high-performance liquid-chromatography of mycolic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5):1327–1330, 1992.
- [127] W. R. Butler and L. S. Guthertz. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of mycobacterium species. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4):704–726, 2001.
- [128] T. Balazova, J. Makovcova, O. Sedo, M. Slany, M. Faldyna, and Z. Zdrahal. The influence of culture conditions on the identification of mycobacterium species by MALDI-TOF MS profiling. *Fems Microbiology Letters*, 353(1):77–84, 2014.

- [129] S. Kloss, P. Rösch, W. Pfister, M. Kiehntopf, and J. Popp. Toward culture-free Raman spectroscopic identification of pathogens in ascitic fluid. *Analytical Chemistry*, 87(2):937–943, 2015.
- [130] S. Stöckel, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch, and J. Popp. Identification of bacillus anthracis via Raman spectroscopy and chemometric approaches. *Analytical Chemistry*, 84(22):9873–9880, 2012.





## Publikationsliste

### Peer-reviewed Publikationen

**LOC-SERS: towards point-of-care diagnostic of methotrexate**, I. J. Hidi\*, A. Mühlig\*, M. Jahn, F. Liebold, D. Cialla, K. Weber, J. Popp, *Analytical Methods* 6(12):3943-3947, 2014.

**Plasmonic nanostructures for surface enhanced spectroscopic methods**, M. Jahn, S. Patze, I. J. Hidi, R. Knipper, A. I. Radu, A. Mühlig, S. Yüksel, V. Peksa, K. Weber, T. Mayerhofer, D. Cialla-May, J. Popp, *Analyst* 141(3):756-793, 2016.

**LOC-SERS: A promising closed system for the identification of mycobacteria**, A. Mühlig, T. Bocklitz, I. Labugger, S. Dees, S. Henk, E. Richter, S. Andres, M. Merker, S. Stöckel, K. Weber, D. Cialla-May, J. Popp, *Analytical Chemistry* 88(16):7998-8004, 2016.

**Fundamental SERS investigation on functional groups, their substitution position and the interaction with silver nanoparticles**, A. Mühlig, D. Cialla-May, K. Weber, J. Popp, *in preparation*



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Popp für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Durch die hervorragende Infrastruktur hast du optimale Arbeitsbedingungen für die Experimente und deren Auswertung bereit gestellt. An dem sehr interessanten Thema, welches du für mich zur Verfügung gestellt hast, konnte ich meine Fähigkeiten erweitern und meine Kreativität einbringen. Ich danke dir auch für die Unterstützung bei meinem Forschungsaufenthalt in Neuseeland bei Prof. Eric Le Ru. Ich hatte dadurch die Möglichkeit das SERS-Forschungsgebiet von einer anderen Seite kennen zu lernen. Weiterhin bedanke ich mich für die hilfreichen und auch kritischen Diskussionen und Kommentare zu meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Ich danke ganz herzlich Frau Dr. Dana Cialla-May und Frau Dr. Karina Weber für ihre liebe und aufopferungsvolle Art der Betreuung. Mit den vielen Diskussionen und eurer fachlichen Kompetenz habt ihr maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihr habt mich stets unterstützt und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Dank euch konnte ich die beiden schwer vereinbaren Konzepte Familie und Promotion parallel realisieren. Vielen Dank dafür.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Matthias Merker und der Arbeitsgruppe des nationalen Referenz Zentrums für Mykobakterien in Borstel für das Bereitstellen der Mykobakterien und die fachlichen Diskussionen während der erfolgreichen Zusammenarbeit.

Ebenso danke ich in diesem Zusammenhang Frau Dr. Ines Labugger, Stefan Dees und Sandra Henk von Alere Technologies für die Kooperation bei der Probenvorbereitung der Mykobakterien und die vielen hilfreichen und interessanten Diskussionen.

Herrn Dr. Thomas Bocklitz danke ich für seine Unterstützung bei der chemometrischen Auswertung der Mykobakteriendaten und das Bereitstellen der R-Skripte. Nachdem wir uns damit abgefunden hatten, dass wir immer aneinander vorbei reden, kamen wir ganz gut miteinander aus. Ohne deine schnellen Lösungen der vielen R-Probleme säße ich wohl heute noch an der Chemometrie der Mykobakteriendaten.

Ich bedanke mich bei Izabella Hidi für die ausgezeichnete Zusammenarbeit in dem MTX-Projekt. Ich danke dir für die vielen kleinen Hilfestellungen, ob beim Funktionalisieren der Chips, beim Reinigen der Spritzen oder beim Besorgen von Substanzen.

Ich danke Dr. Stephan Stöckel und Martin Jahn, welche ich im Laufe der Zeit immer wieder mit Kleinigkeiten behelligt habe. Ihr wart immer super hilfsbereit und habt mir damit oft viel Zeit erspart.

Ein großes Dankeschön auch an meine Arbeitskollegen der JBCI, der gesamten AG Popp, des IPHT und des IPC. Durch eure herzliche und offene Art entstand eine freundliche und produktive Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Dr. Thomas Henkel sowie Anett Reichert und Mark Kielpinski für die gute Zusammenarbeit in der Mikrofluidik. Wir haben viele interessante und lehrreiche Experimente durchgeführt und Anett hat viele Stunden mit mir im Physiklabor durchgestanden und sich nie beschwert. Auch Mark hat einige Arbeit in den VIM 6 Chip gesteckt. Vielleicht fällt uns ja doch noch irgendwann eine sinnvolle Lösung dafür ein.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Anne März bedanken. Dafür, dass du mich in der ersten Stunde an die Hand genommen hast und mir die Möglichkeiten des LOC-SERS nahe gebracht hast. Außerdem hast du mir die ersten Impulse für eigene Forschungsideen zur fundamentalen Untersuchung des SERS-Mechanismus gegeben.

Für die herzliche Aufnahme und die großzügige Bereitstellung der Infrastruktur seiner Arbeitsgruppe danke ich Prof. Eric Le Ru und seinen Mitarbeitern der Viktoria Universität Wellington, Neuseeland. Besonders möchte ich mich hier bei Dr. Stefan A. Mayer und Dr. Baptiste Auguie bedanken.

Dr. Angela Fahr, Dr. Katharina Bräutigam, Dr. Anja Silge, Dr. Sandra Kloss, Dr. Christian Matthäus und Sezin Yüksel danke ich für die vielen schönen Stunden, Mittagessen und Kaffeerunden bei denen viele neue Ideen entstanden, anregende Diskussion geführt wurden und auch mal Dampf über missglückte Experimente und unerwartete Komplikationen abgelassen werden konnte.

Der Panna-Crew danke ich für ihre Unterstützung bei der Kommasetzung. Ohne euch hätte

ich das Mysterium der Grammatik nie gelöst. Und jetzt, wo wir alle wissen, dass Absorption und Absorbanz zusammen gehören und nicht nur ein Schreibfehler vorliegt, können alle wieder ruhig schlafen. Von nun an werden die Ausschweifungen über Schwingungsmoden und falsch zugeordnete Banden deutlich abnehmen, so denke ich.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre Hilfe in jeder Hinsicht und das intensive Betreuen der Kinder. Meinem Mann Stefan danke ich für seine unermüdlige Unterstützung und Aufmunterung und die fleißige Korrektur dieser Arbeit. Meinen geliebten Kindern Clara, Martha und Paul danke ich, dass sie mir immer wieder zeigen, was wirklich zählt im Leben.



# Appendices

# A. Zertifikat für die Verwendung von Mykobakterien im S1 Labor



**Forschungszentrum Borstel**  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

**PD Dr. Elvira Richter**  
Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien  
Parkallee 18  
D-23845 Borstel

Tel: +49.4537.188 7600  
Fax: +49.4537.188 3100

erichter@fz-borstel.de  
www.fz-borstel.de

Borstel, 05.01.2015

## GUTACHTEN

**Kulturelle Überprüfung der thermischen Inaktivierung von Spezies des *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)-Komplexes**

### Zielstellung :

Die Wirksamkeit einer thermischen Inaktivierung von Spezies des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes sollte kulturell auf Festmedien und in Flüssigmedium überprüft werden.

### Prüfbeschreibung:

**Auftraggeber:** Alere Technologies GmbH

**Testorganismen:** *M. tuberculosis* (NRZ ID 5729/14, 5730/14), *M. bovis* (NRZ ID 5740/14, 5741/14), *M. africanum* (NRZ ID 5751/14, 5752/14), *M. canettii* (NRZ ID 5762/14, 5763/14)

**Probenart:** Bakteriensuspensionen in PBS Puffer (1E8/ml)

### Methodik:

#### **1. Thermische Inaktivierung von Spezies des *Mtb*-Komplexes**

Die thermische Behandlung zur Inaktivierung von Spezies des *Mtb*-Komplexes wurde für 15min bei 99°C am Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien (Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

Für die thermische Behandlung wurden 1,5 ml einer Bakteriensuspension (in PBS) über eine OD Messung (Kalibriergerade mittels McFarland) auf eine Konzentration von 1E8/ml eingestellt. Ein 1ml Aliquot dieser Bakteriensuspension wurde in einem aerosoldichten Probengefäß (1,5ml) für 15min bei 99°C in einem Thermoblock inkubiert. Die thermisch behandelten und die unbehandelten Bakteriensuspension wurden im MGIT960-System und auf festen Nährmedien im Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien (Forschungszentrum Borstel) kultiviert.







## 2. Kultivierung von Spezies des *Mtb*-Komplexes in Flüssig – und Festkultur

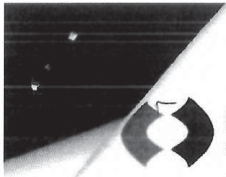
Die unter Punkt 1) erstellten und thermisch behandelten Proben sowie die entsprechenden Kontrollproben wurden im Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien kulturell untersucht. Dazu wurden jeweils 500 µl der Suspension in vorbereiteter MGIT-Kulturröhrchen inokuliert, die in das automatisierte MGIT-Kultursystem eingelesen wurden. Darin erfolgen eine Inkubation bei 37°C und eine stündliche Messung der Fluoreszenz. Sobald die Fluoreszenz einen bestimmten Grenzwert überschreitet, wird die Probe als positiv gemeldet und kann entnommen werden. Proben verbleiben für 6 Wochen im Kultursystem, wenn sie nicht positiv gemeldet werden. Nach 6 Wochen Kultivierungszeit werden sie vom System als negativ gemeldet. Parallel wurden von allen Suspensionen zwei Festkulturen (jeweils 1 Löwenstein-Jensen und 1 Stonebrink-Medium) mit 100 µl der Suspension beimpft. Die Festkulturen wurden bei 37°C bebrütet und einmal wöchentlich optisch abgelesen. Als final negativ wurden Proben bewertet, bei denen nach 8 Wochen kein Wachstum sichtbar wurde.

**Probeneingang:** 03.06.2014  
**Prüfzeitraum:** 03.06.2014 bis 28.07.2014  
**Prüftemperatur:** 37°C

**Grundlage:** Mikrobiologische Referenzmethode zum Nachweis von Spezies des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes

Im Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien werden Kultivierungsverfahren zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mykobakterien aus unterschiedlichen Probenmaterialien nach aktuellen Richtlinien (DIN 58943-3, MIQ 5) mit den modernsten Verfahren (Flüssig- und Festkulturen) durchgeführt. Automatisierte Flüssigkulturen stellen zurzeit die sensitivste Nachweismethode von vermehrungsfähigen Tuberkulosebakterien dar. Im Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien werden das Flüssigkultursystem BACTEC MGIT960 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) sowie selbstproduzierte Festnährböden (Löwenstein-Jensen, Stonebrink-Medium) eingesetzt. Das Probenmaterial besteht in der Regel aus humanem Untersuchungsgut; es können Proben eingesetzt werden, deren Tuberkulosebakterien durch verschiedene Inaktivierungsverfahren abgetötet werden sollen, um den Erfolg dieser Inaktivierung zu überprüfen





**Forschungszentrum Borstel**  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

**Ergebnisse:**

Es konnte für alle getesteten Spezies des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes kulturell gezeigt werden, dass durch eine thermische Behandlung für 15min bei 99°C eine ausreichende Inaktivierung erfolgt (negatives Kulturergebnis auf LJ Festmedium nach 8 Wochen und im MGIT nach 6 Wochen). Die Viabilität der verwendeten Subkulturen von den *Mtb*-Komplex Stämmen (1E8/ml) wurde durch positives Wachstum der jeweiligen unbehandelten Bakteriensuspensionen (NRZ IDs 5727/14, 5728/14, 5738/14, 5739/14, 5749/14, 5750/14, 5760/14, 5761/14) kulturell bestätigt.

E. RL

PD Dr. Elvira Richter



**Forschungszentrum Borstel**  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

**PD Dr. Elvira Richter**  
Nationales Referenzzentrum für Mykobakterien  
Parkallee 18  
D-23845 Borstel

Tel: +49.4537.188 7600  
Fax: +49.4537.188 3100

erichter@fz-borstel.de  
www.fz-borstel.de

Borstel, 05.01.2015

## GUTACHTEN

**Kulturelle Überprüfung der thermischen Inaktivierung von Nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) und dem Impfstamm *Mycobacterium bovis* BCG**

### Zielstellung :

Die Wirksamkeit einer thermischen Inaktivierung von NTM und dem Impfstamm *Mycobacterium bovis* BCG sollte kulturell auf Festmedium und in Flüssigmedium überprüft werden.

### Prüfbeschreibung:

**Auftraggeber:** Alere Technologies GmbH

**Testorganismen:** *M. bovis* BCG (DSMZ 45071, NRZ ID 4968/14), *M. avium* subsp. *avium* (DSMZ 43216, NRZ ID 4980/14), *M. chelonae* (DSMZ 43804, NRZ ID 4986/14), *M. abscessus* (DSMZ 44196, NRZ ID 4992/14), *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (DSMZ 43075, NRZ ID 4998/14), *M. intracellulare* (DSMZ 43223, NRZ ID 5004/14), *M. scrofulaceum* (DSMZ 43226, NRZ ID 5010/14), *M. kansasii* (DSMZ 44162, NRZ ID 5016/14), *M. malmoense* (DSMZ 44053, NRZ ID 5022/14), *M. marinum* (DSMZ 44344, NRZ ID 5028/14), *M. xenopi* (DSMZ 43995, NRZ ID 5034/14), *M. simiae* (DSMZ 44165, NRZ ID 5040/14), *M. celatum* (DSMZ 44243, NRZ ID 5046/14), *M. lentiflavum* (DSMZ 44419, NRZ ID 5052/14), *M. heckeshornense* (DSMZ 44482, NRZ ID 5058/14), *M. szulgai* (DSMZ 44166, NRZ ID 5064/14), *M. shimoidei* (DSMZ 44152, NRZ ID 5070/14), *M. terrae* (DSMZ 43227, NRZ ID 5076/14), *M. interjectum* (DSMZ 44064, NRZ ID 5082/14), *M. gastri* (DSMZ 43505, NRZ ID 5088/14), *M. peregrinum* (DSMZ 43271, NRZ ID 5094/14), *M. asiaticum* (DSMZ 44297, NRZ ID 5100/14), *M. mucogenicum* (DSMZ 44124, NRZ ID 5106/14), *M. phlei* (DSMZ 43239, NRZ ID 5112/14), *M. smegmatis* (DSMZ 43078, NRZ ID 3318/14)

**Probenart:** Bakteriensuspensionen in PBS Puffer (1E8/ml)





**Methodik:**

**1. Thermische Inaktivierung von Nicht-tuberkulösen Mykobakterien und *M. bovis BCG***

Die thermische Behandlung zur Inaktivierung von Nicht-tuberkulösen Mykobakterien und dem Impfstamm *M. bovis BCG* wurde für 15min bei 99°C durchgeführt.

Für die thermische Behandlung wurden 1,5 ml einer Bakteriensuspension (in PBS) über eine OD Messung (Kalibriergerade mittels McFarland) auf eine Konzentration von 1E8/ml eingestellt. Ein 1ml Aliquot dieser Bakteriensuspension wurde in einem aerosoldichten Probengefäß (1,5ml) für 15min bei 99°C in einem Thermoblock inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die thermisch behandelten und die unbehandelten Bakteriensuspension zur kulturellen Überprüfung mittels MGIT960 System und Anzucht auf festen Nährmedien an das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für Mykobakterien (Forschungszentrum Borstel) geschickt.

**2. Kultivierung von Nicht-tuberkulösen Mykobakterien und *M. bovis BCG* in Flüssig – und Festkultur**

Die unter Punkt 1) erstellten und thermisch behandelten Proben sowie die entsprechenden Kontrollproben wurden im Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien kulturell untersucht. Dazu wurden jeweils 500 µl der Suspension in vorbereitetes MGIT-Kulturröhrchen inokuliert, die in das automatisierte MGIT-Kultursystem eingelesen wurden. Darin erfolgen eine Inkubation bei 37°C und eine stündliche Messung der Fluoreszenz. Sobald die Fluoreszenz einen bestimmten Grenzwert überschreitet, wird die Probe als positiv gemeldet und kann entnommen werden. Proben verbleiben für 6 Wochen im Kultursystem, wenn sie nicht positiv gemeldet werden. Nach 6 Wochen Kultivierungszeit werden sie vom System als negativ gemeldet. Die MGIT-Kulturröhrchen von zwei Mykobakterienspezies (*M. malmoense* und *M. marinum*), die nicht bei 37°C Inkubationstemperatur wachsen, wurden nach der Inokulation im Brutschrank bei 31°C inkubiert und täglich mit Hilfe eines speziellen UV-Readers auf Fluoreszenz überprüft. Auch hier betrug die Inkubationszeit 6 Wochen, wenn keine Fluoreszenz gemessen werden konnte.

Parallel wurden von allen Suspensionen zwei Festkulturen (jeweils 1 Löwenstein-Jensen und 1 Stonebrink-Medium) mit 100 µl der Suspension beimpft. Die Festkulturen wurden bei 37 °C bzw. 31°C (*M. malmoense* und *M. marinum*) bebrütet und einmal wöchentlich optisch abgelesen. Als final negativ wurden Proben bewertet, bei denen nach 8 Wochen kein Wachstum sichtbar wurde.

**Probeneingang:** 26.03.2014 und 14.05.2014

**Prüfzeitraum:** 26.3.2014 bis 21.05.2014

14.05.2014 bis 09.07.2014

**Prüftemperatur:** 37°C und 31°C







**Grundlage:** Mikrobiologische Referenzmethode zum Nachweis von Nicht-tuberkulösen Mykobakterien und *M. bovis BCG*

Im Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien werden Kultivierungsverfahren zum Nachweis von vermehrungsfähigen Mykobakterien aus unterschiedlichen Probenmaterialien nach aktuellen Richtlinien (DIN 58943-3, MIQ 5) mit den modernsten Verfahren (Flüssig- und Festkulturen) durchgeführt. Automatisierte Flüssigkulturen stellen zurzeit die sensitivste Nachweismethode von vermehrungsfähigen Tuberkulosebakterien dar. Im Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien werden das Flüssigkultursystem BACTEC MGIT960 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) sowie selbstproduzierte Festnährböden (Löwenstein-Jensen, Stonebrink-Medium) eingesetzt. Das Probenmaterial besteht in der Regel aus humanem Untersuchungsgut; es können Proben eingesetzt werden, deren Tuberkulosebakterien durch verschiedene Inaktivierungsverfahren abgetötet werden sollen, um den Erfolg dieser Inaktivierung zu überprüfen

**Ergebnisse:**

Es konnte für alle getesteten Spezies der Nicht-tuberkulösen Mykobakterien und für den Impfstamm *M. bovis BCG* kulturell gezeigt werden, dass durch eine thermische Behandlung für 15min bei 99°C eine ausreichende Inaktivierung erfolgt (negatives Kulturergebnis auf Festmedien nach 8 Wochen und im MGIT nach 6 Wochen). Die Viabilität der verwendeten Subkulturen von den NTM (1E8/ml) und dem Impfstamm *M. bovis BCG*(1E8/ml) wurde durch positives Wachstum der jeweiligen unbehandelten Bakteriensuspensionen (NRZ IDs 4970/14, 4982/14, 4988/14, 4994/14, 5000/14, 5006/14, 5012/14, 5018/14, 5024/14, 5030/14, 5036/14, 5042/14, 5048/14, 5054/14, 5060/14, 5066/14, 5072/14, 5078/14, 5084/14, 5090/14, 5096/14, 5102/14, 5108/14, 5114/14, 3350/14) kulturell bestätigt.

*E. Richter*

PD Dr. Elvira Richter

# **Inaktivierung von Mykobakterien**

**Gutachten des FZ Borstel**

**Stand Januar 2015**

**Betriebsanweisung**  
**I. Anlagenspezifischer Teil**

Stand: 01/2014

**Es ist das Ziel, durch die strikte Einhaltung dieser Betriebsanweisung und des Hygieneplanes das Risiko für die Gesundheit der Beschäftigten und die Umwelt zu minimieren.**

**I. 1 Geltungsbereich**

Diese Betriebsanweisung gilt für die Gentechnische Anlage der Sicherheitsstufe **S1** Friedrich-Schiller-Universität Jena, Zentrum für Angewandte Forschung, Philosophenweg 7, Laborebene 2. Die Verantwortung für die Räume 224, 225, 226, 227, 235, 239 und 242C liegt bei Projektleiter Dr. David Pretzel. Die Verantwortung für die Räume 220, 221, 228, 229, 230, 231, 232 liegt bei Projektleiter Dr. Jens Hellwage. Die Zustimmung nach GenTG durch das TLVvA erfolgte unter dem AZ 400.11-2694-21-001-005-01.

**I. 2 Namen und Telefonnummern**

Projektleiter:	Dr. David Pretzel	9-48581
Projektleiter:	Dr. Jens Hellwage	9-48309
Beauftragter für Arbeitssicherheit am Institut für organische und makromolekulare Chemie:	Dr. Uwe Köhn	9-49325
Beauftragter für Arbeitssicherheit am Institut für physikalische Chemie:	Dr. Beate Truckenbrodt	9-48312
Beauftragter für die Biologische Sicherheit:	Dr. Ralf Glaser	9-49030
Büro für Technisches Sicherheitswesen:	Volker Klaus	9-31490
Stabsstelle Arbeitssicherheit:	Herr Roland Beibst	9-35181
Betriebsärztliche Untersuchungsstelle:	Dr. Mandy Rückert	9-35279
Feuerwehr / Rettungsleitstelle:		0 / 112
Polizei:		0 / 110

**I. 3 Risikobewertung nach GenTG und Gefährdungsbeurteilung nach BioStoffV**

In den Räumen finden labortypische Arbeiten mit etablierten natürlichen und transfizierten Zellen aus Säugern sowie mit Sicherheitsstämmen von *Escherichia coli* K12 statt. Sie beinhalten insbesondere die Klonierung von Sequenzen aus Genen, die für EGFP und ähnliche fluoreszierende Proteine kodieren in diese Organismen. Weitere Arbeiten bestehen in der Aufarbeitung von GVO-Kulturen und der Isolation von Plasmiden.

Es wird nicht mit primären humanen Zellen oder anderem Material, bei dem der Verdacht einer Kontamination mit Erregern höherer Risikogruppen bestehen kann, gearbeitet.

Weitere biologische Arbeitsstoffe werden nicht verwendet.

Alle natürlichen und als GVO einzustufende biologische Arbeitsstoffe gehören der Risikogruppe **1** an. Die Tätigkeiten sind deshalb unter den Maßnahmen der Sicherheitsstufe 1 bzw. Schutzstufe durchzuführen.

**Betriebsanweisung**  
**I. Anlagenspezifischer Teil**

Stand: 01/2014

Bei bestimmungsgemäßem Umgang entsprechend dieser Betriebsanweisung ist nicht von einer Gefährdung für abwehrgesunde Menschen und die Umwelt auszugehen. Toxische oder allergene Gefährdungen sind durch die verwendeten Organismen ebenfalls nicht zu erwarten.

Mit Humanmaterial darf nur gearbeitet werden, wenn dieses HIV; HBV; HCV-negativ getestet ist und kein Verdacht einer Erkrankung des Spenders vorliegt.

Sollten weitere gentechnische Arbeiten in der Sicherheitsstufe 1 mit anderen Organismen der Risikogruppe 1 aufgenommen werden, ist die Risikobewertung ggf. zu ergänzen.

**I. 4 Gefährdungsbeurteilung nach GefStoffV**

Es werden bei den in der Anlage durchgeführten Arbeiten Chemikalien nur in Kleinstmengen benötigt, so dass selbst bei Havarien im Labor keine Gefahr besteht, dass Chemikalien in die Umwelt, insbesondere in das Abwasser, gelangen können.

Die in den Einzel- und Gruppen-Betriebsanweisungen für die jeweiligen Gefahrstoffe festgelegten Maßnahmen sind zum Schutz der Beschäftigten ausreichend. Messungen von Gefahrstoffkonzentrationen, oder auf den Umgang mit Gefahrstoffen ausgerichtete arbeitsmedizinische Untersuchungen sind nicht erforderlich.

Sicherheitsdatenblätter zu den verwendeten Stoffen sind bei dem Beauftragten für Arbeitssicherheit, Herrn Dr. Uwe Köhn, erhältlich oder unter <http://www.eusdb.de/> abgerufen werden.

Folgende Abfälle werden gesondert gesammelt:

organische Lösungsmittel      Kanister im Sicherheitsschrank Raum 129

Die Entsorgung der Behälter kann 1x wöchentlich an der im Hause vorhandenen Chemikaliensammelstelle durchgeführt werden.

**I. 5 Anlagenspezifische Schutzmaßnahmen**

Die Aufbewahrung der GVO erfolgt im -80°C Tiefkühlschrank in Raum 229 bzw. im drucklosen Stickstoffbehälter im Raum 223. Tiefkühlschrank und Stickstoffbehälter sind mit der Aufschrift „Lagerung GVO-S1“ gekennzeichnet.

Alle kontaminierten Abfälle werden in dem vorgesehenen Behälter mit der Aufschrift „S1-GVO/Abfall“ gesammelt (jeweils 1 Behälter in den Räumen 220, 221, 228, 229, 230 und 234). Dieser Behälter ist nach Bedarf; mindestens jedoch einmal wöchentlich zu autoklavieren; der Inhalt ist anschließend mit dem Hausmüll in dem dafür vorgesehenen Behälter zu entsorgen. Über die Autoklavievorgänge ist Buch zu führen. Außerhalb der primären physikalischen Einschließung ist das Vorhandensein lebensfähiger, in der Anwendung eingesetzter Organismen zu prüfen.



**Betriebsanweisung**  
**I. Anlagenspezifischer Teil**

Stand: 01/2014

**Testung der verwendeten Organismen**

Zellkulturen von Säugerzellen sind bei Verdacht, mindestens jedoch stichprobenartig alle 2 Jahre, auf Mycoplasmen zu testen. Alle Veränderungen in Zellmorphologie und Proliferationsverhalten oder sonstige Verdachtsmomente auf Kontaminationen sind unverzüglich dem Projektleiter mitzuteilen. Bei Verdacht auf Kontaminationen der Zellkulturen sind diese umgehend zu testen oder zu vernichten.

Für alle Zelllinien, die in die Anlage eingebracht werden, ist mit dem Projektleiter zu klären, welche Testungen erforderlich sind.

**Arbeitsmedizinische Untersuchungen**

Aus den Arbeiten mit E.coli K12 und Säugetierzellen der RG1 ergibt sich keine Notwendigkeit spezifischer arbeitsmedizinischer Untersuchungen.

**Schutzkleidung**

Beim Betreten der gentechnischen Anlage ist ein Schutzkittel anzulegen. Diese befinden sich in den Räumen 220, 221, 228, 229, 230 und 234. Straßenschuhe, private Straßenoberbekleidung sowie Taschen sind ebenfalls im Raum R120 bzw. in den Büros und Sozialräumen abzulegen. Die Schutzkittel sind vor Verlassen der gentechnischen Anlage wieder an die entsprechende Stelle zu hängen. Mit Schutzkitteln dürfen die Sozialräume nicht betreten werden. Die Schutzkittel sind eigenverantwortlich regelmäßig, mindestens jedoch halbjährlich reinigen zu lassen.

**Anhänge**

Folgende Anhänge und Benutzerhinweise sind Bestandteil der Betriebsanweisung:

- Betriebsanweisung II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 der FSU Jena
- Hygieneplan

**Betriebsanweisung**  
**I. Anlagenspezifischer Teil**

Stand: 01/2014

**Es ist das Ziel, durch die strikte Einhaltung dieser Betriebsanweisung und des Hygieneplanes das Risiko für die Gesundheit der Beschäftigten und die Umwelt zu minimieren.**

**I. 1 Geltungsbereich**

Diese Betriebsanweisung gilt für die Gentechnische Anlage der Sicherheitsstufe **S1** Friedrich-Schiller-Universität Jena, Zentrum für Angewandte Forschung, Philosophenweg 7, Laborebene 2. Die Verantwortung für die Räume 224, 225, 226, 227, 235, 239 und 242C liegt bei Projektleiter Dr. David Pretzel. Die Verantwortung für die Räume 220, 221, 228, 229, 230, 231, 232 liegt bei Projektleiter Dr. Jens Hellwage. Die Zustimmung nach GenTG durch das TLVwA erfolgte unter dem AZ 400.11-2694-21-001-005-01.

**I. 2 Namen und Telefonnummern**

Projektleiter:	Dr. David Pretzel	9-48581
Projektleiter:	Dr. Jens Hellwage	9-48309
Beauftragter für Arbeitssicherheit am Institut für organische und makromolekulare Chemie:	Dr. Uwe Köhn	9-49325
Beauftragter für Arbeitssicherheit am Institut für physikalische Chemie:	Dr. Beate Truckenbrodt	9-48312
Beauftragter für die Biologische Sicherheit:	Dr. Ralf Glaser	9-49030
Büro für Technisches Sicherheitswesen:	Volker Klaus	9-31490
Stabsstelle Arbeitssicherheit:	Herr Roland Beibst	9-35181
Betriebsärztliche Untersuchungsstelle:	Dr. Mandy Rückert	9-35279
Feuerwehr / Rettungsleitstelle:		0 / 112
Polizei:		0 / 110

**I. 3 Risikobewertung nach GenTG und Gefährdungsbeurteilung nach BioStoffV**

In den Räumen finden labortypische Arbeiten mit etablierten natürlichen und transfizierten Zellen aus Säugern sowie mit Sicherheitsstämmen von *Escherichia coli* K12 statt. Sie beinhalten insbesondere die Klonierung von Sequenzen aus Genen, die für EGFP und ähnliche fluoreszierende Proteine kodieren in diese Organismen. Weitere Arbeiten bestehen in der Aufarbeitung von GVO-Kulturen und der Isolation von Plasmiden.

Es wird nicht mit primären humanen Zellen oder anderem Material, bei dem der Verdacht einer Kontamination mit Erregern höherer Risikogruppen bestehen kann, gearbeitet.

Weitere biologische Arbeitsstoffe werden nicht verwendet.

Alle natürlichen und als GVO einzustufende biologische Arbeitsstoffe gehören der Risikogruppe **1** an. Die Tätigkeiten sind deshalb unter den Maßnahmen der Sicherheitsstufe 1 bzw. Schutzstufe durchzuführen.

**Betriebsanweisung**  
**I. Anlagenspezifischer Teil**

Stand: 01/2014

Bei bestimmungsgemäßem Umgang entsprechend dieser Betriebsanweisung ist nicht von einer Gefährdung für abwehrgesunde Menschen und die Umwelt auszugehen. Toxische oder allergene Gefährdungen sind durch die verwendeten Organismen ebenfalls nicht zu erwarten.

Mit Humanmaterial darf nur gearbeitet werden, wenn dieses HIV; HBV; HCV-negativ getestet ist und kein Verdacht einer Erkrankung des Spenders vorliegt.

Sollten weitere gentechnische Arbeiten in der Sicherheitsstufe 1 mit anderen Organismen der Risikogruppe 1 aufgenommen werden, ist die Risikobewertung ggf. zu ergänzen.

**I. 4 Gefährdungsbeurteilung nach GefStoffV**

Es werden bei den in der Anlage durchgeführten Arbeiten Chemikalien nur in Kleinstmengen benötigt, so dass selbst bei Havarien im Labor keine Gefahr besteht, dass Chemikalien in die Umwelt, insbesondere in das Abwasser, gelangen können.

Die in den Einzel- und Gruppen-Betriebsanweisungen für die jeweiligen Gefahrstoffe festgelegten Maßnahmen sind zum Schutz der Beschäftigten ausreichend. Messungen von Gefahrstoffkonzentrationen, oder auf den Umgang mit Gefahrstoffen ausgerichtete arbeitsmedizinische Untersuchungen sind nicht erforderlich.

Sicherheitsdatenblätter zu den verwendeten Stoffen sind bei dem Beauftragten für Arbeitssicherheit, Herrn Dr. Uwe Köhn, erhältlich oder unter <http://www.eusdb.de/> abgerufen werden.

Folgende Abfälle werden gesondert gesammelt:

organische Lösungsmittel      Kanister im Sicherheitsschrank Raum 129

Die Entsorgung der Behälter kann 1x wöchentlich an der im Hause vorhandenen Chemikaliensammelstelle durchgeführt werden.

**I. 5 Anlagenspezifische Schutzmaßnahmen**

Die Aufbewahrung der GVO erfolgt im -80°C Tiefkühlschrank in Raum 229 bzw. im drucklosen Stickstoffbehälter im Raum 223. Tiefkühlschrank und Stickstoffbehälter sind mit der Aufschrift „Lagerung GVO-S1“ gekennzeichnet.

Alle kontaminierten Abfälle werden in dem vorgesehenen Behälter mit der Aufschrift „S1-GVO/Abfall“ gesammelt (jeweils 1 Behälter in den Räumen 220, 221, 228, 229, 230 und 234). Dieser Behälter ist nach Bedarf; mindestens jedoch einmal wöchentlich zu autoklavieren; der Inhalt ist anschließend mit dem Hausmüll in dem dafür vorgesehenen Behälter zu entsorgen. Über die Autoklaviervorgänge ist Buch zu führen. Außerhalb der primären physikalischen Einschließung ist das Vorhandensein lebensfähiger, in der Anwendung eingesetzter Organismen zu prüfen.

**Betriebsanweisung**  
**I. Anlagenspezifischer Teil**

Stand: 01/2014

**Testung der verwendeten Organismen**

Zellkulturen von Säugerzellen sind bei Verdacht, mindestens jedoch stichprobenartig alle 2 Jahre, auf Mycoplasmen zu testen. Alle Veränderungen in Zellmorphologie und Proliferationsverhalten oder sonstige Verdachtsmomente auf Kontaminationen sind unverzüglich dem Projektleiter mitzuteilen. Bei Verdacht auf Kontaminationen der Zellkulturen sind diese umgehend zu testen oder zu vernichten.

Für alle Zelllinien, die in die Anlage eingebracht werden, ist mit dem Projektleiter zu klären, welche Testungen erforderlich sind.

**Arbeitsmedizinische Untersuchungen**

Aus den Arbeiten mit E.coli K12 und Säugetierzellen der RG1 ergibt sich keine Notwendigkeit spezifischer arbeitsmedizinischer Untersuchungen.

**Schutzkleidung**

Beim Betreten der gentechnischen Anlage ist ein Schutzkittel anzulegen. Diese befinden sich in den Räumen 220, 221, 228, 229, 230 und 234. Straßenschuhe, private Straßenoberbekleidung sowie Taschen sind ebenfalls im Raum R120 bzw. in den Büros und Sozialräumen abzulegen. Die Schutzkittel sind vor Verlassen der gentechnischen Anlage wieder an die entsprechende Stelle zu hängen. Mit Schutzkiteln dürfen die Sozialräume nicht betreten werden. Die Schutzkittel sind eigenverantwortlich regelmäßig, mindestens jedoch halbjährlich reinigen zu lassen.

**Anhänge**

Folgende Anhänge und Benutzerhinweise sind Bestandteil der Betriebsanweisung:

- Betriebsanweisung II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 der FSU Jena
- Hygieneplan



## **Betriebsanweisung**

### **II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

#### **II. 1 Allgemeines**

Es ist das Ziel, durch die strikte Einhaltung der Betriebsanweisung und ihrer Anhänge das Risiko für die Gesundheit der Beschäftigten und die Umwelt zu minimieren.

Für die Durchsetzung der Betriebsanweisung ist der jeweils zuständige Projektleiter verantwortlich. Alle MitarbeiterInnen haben diesen bei der Einhaltung der Betriebsanweisung zu unterstützen. Jeder Beschäftigte muss immer bemüht sein, sich und andere nicht zu gefährden.

Jeder Mitarbeiter darf nur solche Tätigkeiten ausführen, für die er ausreichend qualifiziert und eingewiesen ist, für die eine Gefährdungsbeurteilung erfolgt ist und die Räumlichkeiten die vorgeschriebene Zulassung und erforderliche Sicherheitsausstattung haben. Im Zweifelsfall ist immer der Projektleiter, gegebenenfalls der Beauftragte für Biologische Sicherheit, der Gefahrgutbeauftragte oder andere Fachkräfte zu befragen.

#### **II. 2 Rechtsgrundlagen**

- Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik (Gentechnikgesetz - [GenTG](#))
- Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung - [GenTSV](#))
- Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen ([BioStoffV](#))
- Infektionsschutzgesetz ([IfSG](#))
- Verordnung zum Schutz vor Gefahrstoffen ([GefStoffV](#))
- Verordnung zur arbeitsmedizinischen Vorsorge ([ArbMedVV](#))
- Laborrichtlinien BGI/[GUV-I 850](#): Sicheres Arbeiten in Laboratorien - Grundlagen und Handlungshilfen
- [TRBA 100](#): Schutzmaßnahmen für gezielte und nicht gezielte Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen in Laboratorien
- [TRBA 120](#): Versuchstierhaltung
- Gefahrgutverordnung und Europäisches Übereinkommen über die internationale Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße (ADR)

Diese Regelungen sind alle über das Internet frei zugänglich. Bei allen Gesetzen/Verordnungen ist die aktuell gültige Fassung zugrunde zu legen.

#### **II. 3 Kennzeichnungs- und Zugangsregelungen**

Die unter I.1. genannten gentechnischen Arbeitsräume sind als Gentechnischer Arbeitsbereich S1 gekennzeichnet. In nicht gekennzeichneten Räumen darf nicht mit GVO umgegangen werden.

Arbeiten mit natürlichen Organismen der Risikogruppe 2 sowie Arbeiten der Schutzstufe 2 dürfen nur in Räumen und an Arbeitsplätzen durchgeführt werden, die mit dem Warnzeichen **Biogefährdung** gekennzeichnet sind.

Arbeiten mit impfpräventablen oder chronisch schädigenden Organismen der Risikogruppe 2 (siehe Tabelle ArbMedVV) dürfen nur von solchen Personen durchgeführt werden, die an arbeitsmedizinischen Vorsorgeuntersuchungen (Pflichtuntersuchungen: vor Arbeitsaufnahme, Folgeuntersuchung nach 1 Jahr, dann regelmäßig mindestens alle 3 Jahre) teilgenommen haben.

Allen anderen Personen, die Arbeiten mit Organismen der Risikogruppe 2 durchführen, müssen Vorsorgeuntersuchungen *angeboten* werden.

Im gentechnischen Arbeitsbereich dürfen nur Personen arbeiten, die nachweislich über die erforderlichen allgemeinen und aufgabenspezifischen Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten unterwiesen worden sind und die ausdrückliche Erlaubnis des Projektleiters besitzen.

Zeitweilig im Arbeitsbereich tätige Personen (Aushilfskräfte, Studenten, Praktikanten, Gäste aus anderen Instituten) dürfen erst mit ihren Arbeiten beginnen, nachdem sie vom Projektleiter unterwiesen wurden.

Besucher dürfen diesen Bereich nur in Anwesenheit von unterwiesenen Mitarbeitern betreten. Sie dürfen keine Arbeiten mit biologischen Arbeitsstoffen durchführen.

## **Betriebsanweisung**

### **II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

Alle persönlichen Veränderungen, die zu Beeinträchtigungen des körpereigenen Abwehrsystems führen können (z.B. Leukämie, Krebserkrankungen in fortgeschrittenem Stadium, AIDS, angeborene Immundefekte, schwere Zuckerkrankheit, langfristige innerliche Behandlung mit kortisonähnlichen Medikamenten oder Zytostatika) sind so früh wie möglich dem Projektleiter mitzuteilen, damit gegebenenfalls geeignete zusätzliche Schutzmaßnahmen oder ein Arbeitsplatzwechsel veranlasst werden können.

Personen, die gegen die Betriebsanweisung verstoßen, kann das Arbeiten im gentechnischen Arbeitsbereich verboten werden.

#### **II. 4 Unterweisungspflicht**

Vor Aufnahme der Arbeiten ist durch den Projektleiter für alle Beschäftigten (einschließlich Studenten) eine ausführliche tätigkeits- und arbeitsplatzbezogene Unterweisung über die Gefahren und Risiken der Arbeiten, sowie der Maßnahmen zu deren Vermeidung einschließlich einer allgemeinen arbeitsmedizinischen Beratung auf der Grundlage der Betriebsanweisung durchzuführen. Frauen sind über die Gefahren für werdende und stillende Mütter zu unterrichten. Vor jeder sicherheitsrelevanten Änderung der Arbeiten oder Einrichtungen muss eine erneute Unterweisung erfolgen. Zu den Inhalten der Unterweisung erfolgt eine Abstimmung und Beratung durch den Betriebsarzt.

Arbeiten mit weiteren natürlichen oder gentechnisch veränderten Organismen oder neuen Zelllinien dürfen nur mit Erlaubnis des Projektleiters aufgenommen werden, nachdem eine Gefährdungsbeurteilung auch in Bezug auf Wechselwirkungen mit den bisherigen Arbeiten durchgeführt wurde. Ergeben sich daraus zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen, so ist das Ergebnis der Gefährdungsbeurteilung schriftlich festzuhalten und die Mitarbeiter sind darüber vor Beginn der Arbeiten zu belehren.

Die Unterweisungen sind schriftlich festzuhalten und von den Unterwiesenen durch Unterschrift zu bestätigen.

Vor der Aufnahme der Arbeiten hat sich jeder im Arbeitsbereich Tätige über Standort und Funktion von Notsperrrichtungen (Strom, Wasser, Gas), Desinfektionsmitteln, Feuerlöscheinrichtungen, Erste-Hilfe-Einrichtungen, Augenduschen, Körperduschen sowie über die Fluchtwege zu informieren. Eingriffe in die Absperrvorrichtungen dürfen nur bei Notfällen erfolgen. Nach Eingriff in diese Systeme sind unverzüglich die für die Haustechnik Verantwortlichen zu informieren. Alle Betroffenen sind umgehend zu benachrichtigen / warnen.

Die Beschäftigten müssen in Arbeitsverfahren, bei denen mit einer erhöhten Unfallgefahr zu rechnen ist, gesondert eingewiesen werden (z.B. Umgang mit Autoklaven, Zentrifugen und Gefahrstoffen).

Mitarbeiter von Reinigungsfirmen sind arbeitsplatz- und tätigkeitsbezogen über die möglichen Gefahren und Schutzmaßnahmen zu unterweisen.

Alle Unterweisungen sind einmal jährlich zu wiederholen.

Die Betriebsanweisung ist in den Räumen der gentechnischen Anlage sichtbar auszulegen oder auf den Desktop der Computer zu verlinken.

#### **II. 5 Verlagerung von Geräten, Wartungs- und Instandsetzungsarbeiten**

Beschäftigte von Fremdfirmen (z. B. für Reparatur- oder Wartungsarbeiten) dürfen den gentechnischen Arbeitsbereich nur unter Aufsicht unterwiesener und festangestellter Mitarbeiter betreten. Diese Beschäftigten sind arbeitsplatz- und tätigkeitsbezogen zu unterweisen; die Unterweisung ist zu dokumentieren.

Arbeiten in oder an Anlagen, Apparaten, Einrichtungen oder Räumen, in denen mit Organismen oder mit Gefahrstoffen umgegangen wird, dürfen nur mit Erlaubnis und nach Unterweisung über die bei Ihrer Arbeit erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen durch den Projektleiter durchgeführt werden. Die Unterweisung und die Erlaubnis zu den Arbeiten ist schriftlich zu dokumentieren.

Wenn nötig müssen vor Arbeitsaufnahme die betroffenen Arbeitsbereiche, Einrichtungen oder Geräte desinfiziert werden (Entscheidung durch den Projektleiter). Bei Geräten oder Einrichtungen die mit Organismen der Risikogruppe 2 kontaminiert sind ist grundsätzlich die Dekontamination durch das Laborpersonal durchzuführen oder zu veranlassen.



## **Betriebsanweisung**

### **II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

Werden Geräte die möglicherweise kontaminiert sind aus der Anlage entfernt oder innerhalb der Anlage umgestellt, sind diese entsprechend der Anweisungen des Projektleiters zu desinfizieren. (siehe auch II.7.2).

#### **II. 6.1 Sicherheitsmaßnahmen für gentechnische Arbeiten (S1)**

Vor dem Beginn des Umgangs mit gentechnisch veränderten Organismen bzw. biologischen Arbeitsstoffen muss durch den Projektleiter, wenn nötig in Zusammenarbeit mit weiteren sachkundigen Personen, eine Risikobewertung und Sicherheitseinstufung für die geplanten Arbeiten erfolgen.

Türen der Arbeitsräume sollen während der Arbeiten geschlossen sein. Mundpipettieren ist untersagt, Pipettierhilfen sind zu benutzen.

Nadeln, Spritzen, Kanülen und andere spitze und scharfe Instrumente und Gegenstände sind nur, wenn unbedingt erforderlich zu verwenden. Nach Gebrauch sind diese in stich- und bruchfesten Einmalbehältnissen zu sammeln und zu entsorgen, dazu müssen spezielle Abwurfbehälter aufgestellt werden. Kanülen dürfen nicht geknickt oder in die Hüllen zurückgesteckt werden. Vorrangig sind sichere Instrumente und Gegenstände zu verwenden.

Bei allen Arbeiten muss darauf geachtet werden, dass Aerosolbildung so weit wie möglich vermieden wird. Bei Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen der Risikogruppe 1 mit sensibilisierenden oder toxischen Wirkungen sind entsprechende Maßnahmen zu treffen, die eine Exposition der Beschäftigten minimieren, in der Regel sind diese Arbeiten an einer Sicherheitswerkbank durchzuführen.

Nach Beendigung der Tätigkeit und vor Verlassen des Arbeitsbereiches müssen die Hände ggf. desinfiziert, sorgfältig gewaschen, und rückgefettet (Hautschutzplan) werden.

Laborräume sollen aufgeräumt und saubergehalten werden. **Auf den Arbeitstischen sollen nur die tatsächlich benötigten Geräte und Materialien stehen. Die Laborräume sind kein Lagerplatz für Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien!** Vorräte sollen nur in dafür bereitgestellten Räumen oder Schränken gelagert werden. (z. B. keine Kartons oder Geräte auf dem Fußboden, da sie eine evtl. notwendige Desinfektion erschweren!)

Nach Beendigung der Arbeiten sind alle Arbeitsflächen desinfizierend zu reinigen. Die Organismen und Proben sind so aufzubewahren, dass von ihnen keine Gefahr ausgehen kann oder sie sind entsprechend Hygieneplan zu inaktivieren und zu beseitigen.

Die Nutzung von in den Laboren vorhandenen Schreibplätzen ist auf die Protokollierung der Versuche / Arbeiten zu beschränken. **Die Laborräume sind kein Büro-Ersatz!** Es ist eine klare Trennung durchzuführen zwischen Protokollierungsplätzen und Arbeitsplätzen an denen mit Mikroorganismen, Flüssigkeiten oder Gefahrstoffen umgegangen wird.

Die Identität und Reinheit der benutzten Organismen ist regelmäßig zu überprüfen, wenn dies für die Beurteilung des Gefährdungspotentials notwendig ist. Konkrete Maßnahmen sind je nach möglichen Gefährdungspotential vom Projektleiter festzulegen. Falls Ungeziefer und Überträger von GVO (z. B. Nagetiere und Arthropoden) beobachtet werden, ist der Projektleiter zu informieren, der Maßnahmen zur Bekämpfung festlegt.

Verletzungen sind dem Projektleiter unverzüglich zu melden.

In Arbeitsräumen darf nicht gegessen, getrunken, geraucht, geschnupft oder geschminkt werden. Nahrungs- und Genussmittel sowie Kosmetika dürfen im Arbeitsbereich nicht aufbewahrt werden.

Der innerbetriebliche Transport von GVO und biologischen Arbeitsstoffen der Risikogruppe 2 zwischen den Laborräumen, zum Lager und dem Autoklaven darf nur in fest verschlossenen, bruchsicheren, flüssigkeitsdichten, gekennzeichneten ("GVO S1 bzw. Biogefährdung") und von außen desinfizierbaren Behältern erfolgen. Die Transporte dürfen nur von aktenkundig dazu belehrten und vom Projektleiter beauftragten Personen durchgeführt werden. Der außerbetriebliche Transport (Transport im öffentlichen Verkehrsraum) unterliegt den Bestimmungen des Gefahrgutrechts (Ansprechpartner FSU Herr M. Fleischer, 31495; Klinikum Herr M. Hoffmann, 35330).

Für den Fall des Austretens von GVO müssen wirksame Desinfektionsmittel und spezifische Desinfektionsverfahren zur Verfügung stehen.

Desinfektionsmittel-, Handwaschmittel- und Einmalhandtuchspender müssen stets gefüllt sein. Zur Vermeidung von Keimentwicklungen sind die Augenduschen regelmäßig zu spülen und möglichst im Routinebetrieb mit zu benutzen. Sofern sterile Augenspülflaschen verwendet werden, ist

## **Betriebsanweisung**

### **II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

halbjährlich das Haltbarkeitsdatum zu kontrollieren. Augenspülflaschen müssen nach Verwendung sofort ersetzt werden.

Beim Umgang mit den biologischen Arbeitsstoffen sind grundsätzlich die Regeln für „Gute mikrobiologische Technik“ einzuhalten.

#### **II. 6.2 Zusätzliche Sicherheitsmaßnahmen für Arbeiten der Schutzstufe S2 nach BioStoffV**

Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen der Risikogruppe 2 sollen so erfolgen, dass eine Exposition der Beschäftigten vermieden wird, da diese biologischen Arbeitsstoffe Infektionskrankheiten beim Menschen hervorrufen können. Dies gilt auch für nicht gezielte Tätigkeiten, die aufgrund der Gefährdungsbeurteilung der Schutzstufe 2 zugeordnet sind.

Fenster und Türen sind während der Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen geschlossen zu halten. Sichtfenster in den Labortüren dürfen nicht zugeklebt werden.

Die Zahl der Zugangsberechtigten ist auf ein Mindestmaß zu beschränken. Betriebsfremde Personen dürfen Laboratorien nur mit Erlaubnis der Verantwortlichen betreten.

Werdende und stillende Mütter dürfen nicht mit infektiösen humanpathogenen biologischen Agenzien oder Materialien, die diese Agenzien enthalten, umgehen.

Schutzhandschuhe sind in Abhängigkeit von der Tätigkeit zu tragen, immer jedoch dann, wenn die Hände Kontakt zu potentiell ansteckenden Materialien, kontaminierten Oberflächen und Ausrüstungen haben können.

Arbeitsgeräte und -flächen müssen nach Beendigung der Tätigkeit desinfiziert werden. Akzidentelle Kontaminationen sind sofort zu beseitigen. Geräte, die in unmittelbarem Kontakt mit pathogenem Material waren, müssen vor der Reinigung autoklaviert oder desinfiziert werden.

Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen der Risikogruppe 2, bei denen mit einer Gefährdung durch Bioaerosole zu rechnen ist, müssen in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank oder vergleichbaren Einrichtung (z. B. Abzug mit Hochleistungsschwebstoff-Filter) durchgeführt werden. Dies gilt auch für Tätigkeiten mit Materialien, die biologische Arbeitsstoffe enthalten oder enthalten können, bei denen mit einer Gefährdung durch Bioaerosole zu rechnen ist. Es sind Geräte zu verwenden, die keine Aerosole freisetzen (Zentrifugen mit abgedichteten Rotoren oder Zentrifugenbechern). Sind technische und organisatorische Maßnahmen nicht ausreichend oder nicht anwendbar, ist geeignete Schutzausrüstung zu tragen. Wenn mit Spritzern ins Gesicht zu rechnen ist, ist ein Gesichtsschutz (Schutzbrille, Maske, Gesichtsschild oder anderer Spritzschutz) anzuwenden.

Biologische Arbeitsstoffe der Risikogruppe 2 sind dicht verschlossen und sicher aufzubewahren. Sämtliche Einrichtungen (z.B. Kühl- und Gefrierschränke, Gefriertruhen, Kryobehälter, Sicherheitswerkbänke), in denen vermehrungsfähige pathogene und / oder potentiell pathogene Mikroorganismen aufbewahrt werden, sind mit dem Warnzeichen „Biogefährdung“ zu kennzeichnen

Kontaminierte flüssige und feste Abfälle (z. B. Kulturen, Gewebe, Proben mit Körperflüssigkeiten) sind in geeigneten (verschießbar, von außen desinfizierbar, flüssigkeitsbeständig) Behältern sicher zu sammeln. Abfälle gemäß aus gezielten Tätigkeiten sind vor der Entsorgung entsprechend der Festlegungen des Hygieneplans zu inaktivieren. Kontaminierte Abfälle aus nicht gezielten Tätigkeiten sind gleichermaßen zu behandeln oder einer sachgerechten Entsorgung (Med. Patientenabfall, Klinikum) zuzuführen..

Kontaminierte Abluft von Autoklaven, Pumpen, Bioreaktoren u.ä. darf nicht in den Arbeitsbereich abgegeben werden. Sie muß zuvor durch Filtrierung oder thermische Nachbehandlung dekontaminiert werden.

Der innerbetriebliche Transport von biologischen Arbeitsstoffen oder kontaminiertem Material, muss in geschlossenen, formstabilen, bruchsicheren, flüssigkeitsdichten und von außen desinfizierbaren Gefäßen erfolgen, die mit dem Symbol für Biogefährdung gekennzeichnet sind.

#### **II. 7 Aufzeichnungspflichten und Mitteilungspflichten**

Die Leitlinien des TLVwA (siehe <http://pinguin.biologie.uni-jena.de/bbs/>) sind zu beachten)

##### **II.7.1 Aufzeichnung gentechnischer Arbeiten**

Über die Durchführung der gentechnischen Experimente sind Aufzeichnungen (Formblatt Z, in der jeweils aktuellen Fassung) nach GenTAufzV zu führen. Formular und Hinweise dazu sind unter



## **Betriebsanweisung**

### **II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

<http://pinguin.biologie.uni-jena.de/bbs/> zu finden. Aufzeichnungen über gentechnische Arbeiten S1 sind 10 Jahre lang aufzubewahren, diese Frist gilt vom Abschluss der Arbeiten, d.h. der Vernichtung der letzten GVO an.

Da die Angaben zum Spender- und Empfängerorganismus, zum GVO, zum Vektor und zum übertragenen Gen Bestandteil der Risikobewertung sind, müssen sie in den Aufzeichnungen vollständig enthalten sein.

Auf eine strenge Übereinstimmung der in den Aufzeichnungstabellen enthaltenen GVO mit den gelagerten GVO ist zu achten. Die Kennzeichnung der gelagerten GVO muss eine eindeutige Zuordnung zu den Aufzeichnungen erlauben.

Die Aufzeichnungen dürfen weder durch Streichung noch auf andere Weise unleserlich gemacht werden. Es dürfen keine Veränderungen vorgenommen werden, die nicht erkennen lassen, ob sie bei der ursprünglichen Eintragung oder erst später vorgenommen worden sind.

#### **II.7.2 Mitteilungspflichten**

Jede beabsichtigte Änderung der sicherheitsrelevanten Einrichtungsgegenstände und Vorkehrungen, und jedes Vorkommnis, das nicht dem erwarteten Verlauf der gentechnischen Arbeit entspricht und bei dem der Verdacht einer Gefährdung nach §1 (1) GenTG besteht, ist unverzüglich der Behörde mitzuteilen. Die Mitteilung erfolgt durch den Betreiber (Kanzler bzw. Klinikumsvorstand) und ist vom Projektleiter über den Beauftragten für Biologische Sicherheit zu veranlassen.

Jeder Mitarbeiter ist somit zur unverzüglichen Informationsweitergabe an den Projektleiter verpflichtet. Ist der Projektleiter nicht innerhalb einer der Gefährdung angemessenen Zeit zu erreichen, ist ein mit den betreffenden Organismen erfahrener Projektleiter einer anderen Anlage beratend hinzuzuziehen und der BBS unverzüglich zu informieren.

Routinemäßige Änderungen sicherheitsrelevanter Geräte sind der Behörde über den BBS mitzuteilen.

## **II. 8 Umgang mit Gefahrstoffen**

### **II.8.1 Gefährdungsbeurteilung**

Wenn Tätigkeiten mit Gefahrstoffen durchgeführt werden, so ist dazu eine Gefährdungsbeurteilung nach §6 GefStoffV zu erstellen und zu dokumentieren, in der die notwendigen Schutzmaßnahmen nach Abschnitt 4 GefStoffV festgelegt werden. Ein Kataster der verwendeten Gefahrstoffe ist zu erstellen. Gefährdungsbeurteilung und Gefahrstoffkataster sind regelmäßig zu aktualisieren, insbesondere ist stets bei der Beschaffung neuer Gefahrstoffe eine Gefährdungsbeurteilung durchzuführen.

Die Gefährdung der Gesundheit und der Sicherheit der Beschäftigten bei Tätigkeiten mit Gefahrstoffen ist durch Gestaltung des Arbeitsplatzes und Arbeitsorganisation, Bereitstellung geeigneter Arbeitsmittel, Begrenzung der Anzahl der Beschäftigten, die Gefahrstoffen ausgesetzt sind, der Dauer und des Ausmaßes der Exposition, angemessene Hygienemaßnahmen, Begrenzung der am Arbeitsplatz vorhandenen Gefahrstoffe auf die für die betreffende Tätigkeit erforderliche Menge, und Auswahl geeigneter Arbeitsmethoden und Verfahren zu beseitigen oder auf ein Minimum zu reduzieren. Der Laborleiter hat zu prüfen, ob bei einer Gefährdung durch die verwendeten Stoffe diese durch weniger gefährliche Stoffe substituiert werden können. Er hat festzulegen, in welchem Umfang technische Schutzmaßnahmen, organisatorische Maßnahmen und die Verwendung persönlicher Schutzausrüstung notwendig sind. Über die allgemeinen Schutzmaßnahmen nach §8 GefStoffV hinausgehende Festlegungen sind schriftlich zu dokumentieren. Gefährliche Abfälle sind zu vermeiden bzw. zu minimieren. Restmengen sollten möglichst gering gehalten werden.

Sicherheitsdatenblätter zu den üblicherweise verwendeten Gefahrstoffen können von <http://www.eusdb.de> oder anderen Datensammlungen heruntergeladen werden. Sicherheitsdatenblätter seltener Chemikalien sind ausgedruckt in einem Hefter zu sammeln. Sofern sie den Lieferungen der Chemikalien nicht beiliegen sind sie direkt vom Lieferanten oder über den Beauftragten für Umweltschutz und Abfall (für den Bereich der Kernuniversität Herr M. Fleischer, 31495, Klinikum Herr M. Hoffmann, 35330) zu beziehen.

## **Betriebsanweisung**

### **II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

#### **II.8.2 Schutzmaßnahmen**

Experimente mit Gefahrstoffen sind nach Möglichkeit im Abzug durchzuführen.

Arbeiten mit sehr giftigen, kanzerogenen, mutagenen und fruchtbarkeitsschädigenden Stoffen müssen im Abzug durchgeführt werden, die Mitarbeiter müssen dazu unterwiesen werden. Wenn eine Aufnahme der Stoffe über die Haut möglich ist, müssen geeignete Schutzhandschuhe getragen werden. Der Aufbewahrungsort für dieses Material ist zusätzlich zum Behälter selbst mit dem entsprechenden Pictogramm zu kennzeichnen, unbefugter Zugang ist zu verhindern. Flaschen, die Lösungen kanzerogener oder mutagener Substanzen enthalten, dürfen nur in verschließbaren Kunststoffbehältern transportiert werden und sind entsprechend zu kennzeichnen.

Wenn eine Exposition der Mitarbeiter trotz dieser Maßnahmen nicht ausgeschlossen werden kann, ist die Betriebsärztliche Untersuchungsstelle zur Festlegung der arbeitsmedizinischen Maßnahmen nach ArbMedVV einzubeziehen. Pflichtuntersuchungen müssen auch bei Tätigkeiten mit einer Exposition mit Gesundheitsgefährdung durch Labortierstaub und bei Feuchtarbeit von regelmäßig vier Stunden oder mehr je Tag erfolgen. Bei Feuchtarbeit von regelmäßig mehr als zwei Stunden je Tag sind Untersuchungen anzubieten.

Die Lagerung von Gefahrstoffen muss nach Stoffgruppen systematisiert werden. Zusammenlagerungsverbote müssen beachtet werden. Brenn- und explosionsgefährliche Stoffe dürfen nur in den für den täglichen Gebrauch erforderlichen Mengen im Labor vorrätig gehalten werden (üblicherweise maximal 1l-Flaschen für brennbare Lösungsmittel). Die Lagerung hat in speziellen Lagern oder in abgesaugten Sicherheitsschränken zu erfolgen.

Gebinde mit Gefahrstoffen dürfen nicht in Regalen und auf Flächen über 1,7 m Höhe gelagert werden.

(siehe auch II.10 Entsorgung)

#### **II.8.3 Nukleinsäuren mit onkogenem Potential**

DNA kann in geringem Maße direkt von Zellen aufgenommen werden und folglich ein Gefährdungspotential besitzen. Die Stellungnahme der ZKBS "Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Nukleinsäuren mit onkogenem Potential" zu ist beachten. Es sind folgende Maßnahmen vorgeschrieben:

- Bei Arbeiten mit potentiell onkogenen Nukleinsäuren sind Einmalhandschuhe zu tragen.
- Der Gebrauch von scharfen, spitzen oder zerbrechlichen Laborgegenständen soll nach Möglichkeit vermieden werden.
- Laborplatz und Laborgeräte, die mit diesen Nukleinsäuren in Berührung kommen, sollen nach Beendigung der Tätigkeit sorgfältig gereinigt werden.
- Abfälle, die solche Nukleinsäuren enthalten, sind wie GVO zu autoklavieren. Kontaminierte Kittel sind umgehend zu autoklavieren oder in die medizinische Desinfektionsreinigung zu geben.
- Personen mit erheblichen Hautverletzungen (offene Ekzeme, Wunden und Infektionen) oder mit einer ausgeprägten Verrucosis (Warzenausbildung) sollten keine Arbeiten mit diesen Nukleinsäuren durchführen.

Besondere Vorsicht ist beim Umgang mit konzentrierter DNA mit Transfektionsreagenzien geboten, wenn potentielle Onkogene mit eukarontischem Promotor transfiziert werden.

Starke eukarontische Promotoren können auch unabhängig vom Gen bei Insertion in Körperzellen onkogene Wirkung haben und sind daher zusammen mit Transfektionsreagenzien als Gefahrstoffe zu betrachten.

#### **II.8.4 Desinfektion mit 70% Ethanol**

Nicht mehr als 50 ml Ethanol pro m<sup>2</sup> verwenden, nicht mehr als 2 m<sup>2</sup> desinfizieren. Auf ausreichende Entlüftung achten. Es dürfen keine Zündquellen (offene Flamme, heiße Oberflächen) in der Nähe sein und die zu desinfizierende Fläche darf nicht wärmer als 37 °C sein.

Bei der Verwendung von Ethanol in einer Sicherheitswerkbank muss diese eingeschaltet sein.

#### **II. 9 Einsatz von persönlicher Schutzausrüstung**

Im gentechnischen Arbeitsbereich besteht die Verpflichtung zum **Tragen eines Schutzkittels** (langärmelig, kniebedeckend). Dieser ist getrennt von normaler Kleidung aufzubewahren. Bei



## **Betriebsanweisung**

### **II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

Kontamination ist der Kittel umgehend zu wechseln. Kittel die mit GVO oder Organismen der RG 2 kontaminiert sind, müssen vor der Reinigung autoklaviert werden. Die Reinigung der Schutzkleidung ist vom Betreiber durchzuführen und erfolgt nach dem Hygieneplan.

Beim Arbeiten mit Arbeitsstoffen, die bei Hautkontakt gesundheitsgefährdend sein können (z. B. Ethidiumbromid), sind Einmalhandschuhe zu verwenden (Chemikalienbeständigkeit beachten, z. B. EtBr nur mit Nitrilhandschuhen!). Einmalhandschuhe sind durch Umstülpen auszuziehen und nicht wieder zu verwenden und auch nicht außerhalb des Gentechnischen Arbeitsbereiches zu tragen!

Latexhandschuhe sind aufgrund ihrer allergieauslösenden Eigenschaften zu vermeiden, insbesondere ist der Gebrauch gepudertes Latexhandschuhe nicht zulässig.

Allgemein genutzte Gegenstände (z. B. Telefonhörer, Türklinken, Computertastaturen) dürfen nicht mit Schutzhandschuhen benutzt werden.

Beim Verlassen der gentechnischen Anlage ist der Kittel abzulegen, sofern nicht in Teil I ein anderes Kittelregime entsprechend der Gefährdungsbeurteilung festgelegt ist. Sozialräume und Büros dürfen nicht mit Schutzkleidung betreten werden.

#### **II. 10 Entsorgung**

Alle Abfälle, die gentechnisch veränderte Organismen enthalten, sowie kontaminierte Labormaterialien (Einwegartikel!) sind entsprechend den Regeln guter mikrobiologischer Praxis vor der Entsorgung durch Autoklavieren zu inaktivieren. Nach dem Autoklavieren erfolgt die Entsorgung in die grauen Abfallsäcke/-behältern (AS180104) im Abfallraum (Klinikum) bzw. in die Container (Kernuni).

Spitzen oder scharfkantiges Material (z. B. Injektionsnadeln) muss so gesammelt werden, dass eine Verletzung von Mitarbeitern ausgeschlossen ist. Hierfür sind Kunststoffbehälter für Spitze oder scharfe Gegenstände (AS180101) vorzusehen.

Der Laborleiter hat dafür zu sorgen, dass gefährliche Abfälle so gesammelt werden, dass eine Gefährdung der Beschäftigten, insbesondere des Labor- und Entsorgungspersonals, und der Umwelt ausgeschlossen wird. Chemikalienabfälle, die Lösemittel, Acrylamid oder Ethidiumbromid enthalten, sind separat zu sammeln. Wassergefährdende Stoffe dürfen nicht in die Abwasserleitung gegeben werden, sie müssen ebenfalls gesammelt werden. Der Laborleiter muss sicherstellen, dass beim Sammeln keine gefährliche chemische Reaktion eintritt.

Um die gesammelten Abfälle einer sachgerechten Entsorgung zuzuführen, sind diese beim Gefahrstoff- bzw. Abfallbeauftragten zur Abholung anzumelden: für den Bereich der Kernuniversität Herr M. Fleischer, 31495, Klinikum Anmeldung/Beratung Herr M. Hoffmann, 35330, Behältertausch Herr P. Blaesing, 33234, Informationen sind ebenso im Intranet-Bereich der Stabsstelle Umweltschutz ersichtlich (<http://cms.med.uni-jena.de/Umweltschutz.html>).

#### **II. 11 Störfälle, Notfälle, Kontaminationen, sonstige Zwischenfälle**

Alle Stör- und Unfälle, sowie alle Abweichungen vom normalen Betrieb der Anlage und vom erwarteten Verlauf der Arbeiten sind unverzüglich dem Projektleiter mitzuteilen und zu dokumentieren (siehe II.7.2). Der Projektleiter ordnet geeignete Maßnahmen an.

##### **II. 11.1. Austreten biologischen Materials**

Verschüttetes biologisches Material wird sofort mit Flächendesinfektionsmittel entsprechend Hygieneplan inaktiviert. Nach der Einwirkungszeit des Desinfektionsmittels wird die Flüssigkeit mit Einwegmaterial aufgenommen. Dieses ist danach zu autoklavieren.

Beim Aufwischen sind Einmalhandschuhe zu tragen. Kontaminierte Kleidungsstücke sind zu sammeln und zu desinfizieren oder zu autoklavieren. Kontaminierte Schutzkittel sind - auch bei kleineren Kontaminationen - unverzüglich zu autoklavieren.

Der Transport von kontaminiertem Material zum Autoklaven hat in dichten, bruch sicheren und gekennzeichneten Behältnissen zu erfolgen um weitere Kontaminationen des Arbeitsbereiches oder des Transportweges sicher zu verhindern.

Bei Infektionsgefährdung, Verschleppungsgefahr oder beim Austritt von Mengen, die nicht umgehend inaktiviert werden können sind alle Arbeiten einzustellen und der Bereich ist unverzüglich zu räumen.

**Betriebsanweisung**

**II. Allgemeiner Teil: gentechnische Laboratorien der Sicherheitsstufe S1 an der FSU Jena, in denen Arbeiten der Schutzstufe 2 nach BioStoffV durchgeführt werden**

Stand: 05/2013

**II. 11.2. Hautkontakt mit biologischem Material**

Tritt trotz der Sicherheitsmaßnahmen Hautkontakt ein, sind die entsprechenden Hautstellen sorgfältig mit Hautdesinfektionsmittel laut Hygieneplan zu desinfizieren. Haut und Schleimhäute sind ausgiebig mit fließendem Wasser zu spülen.

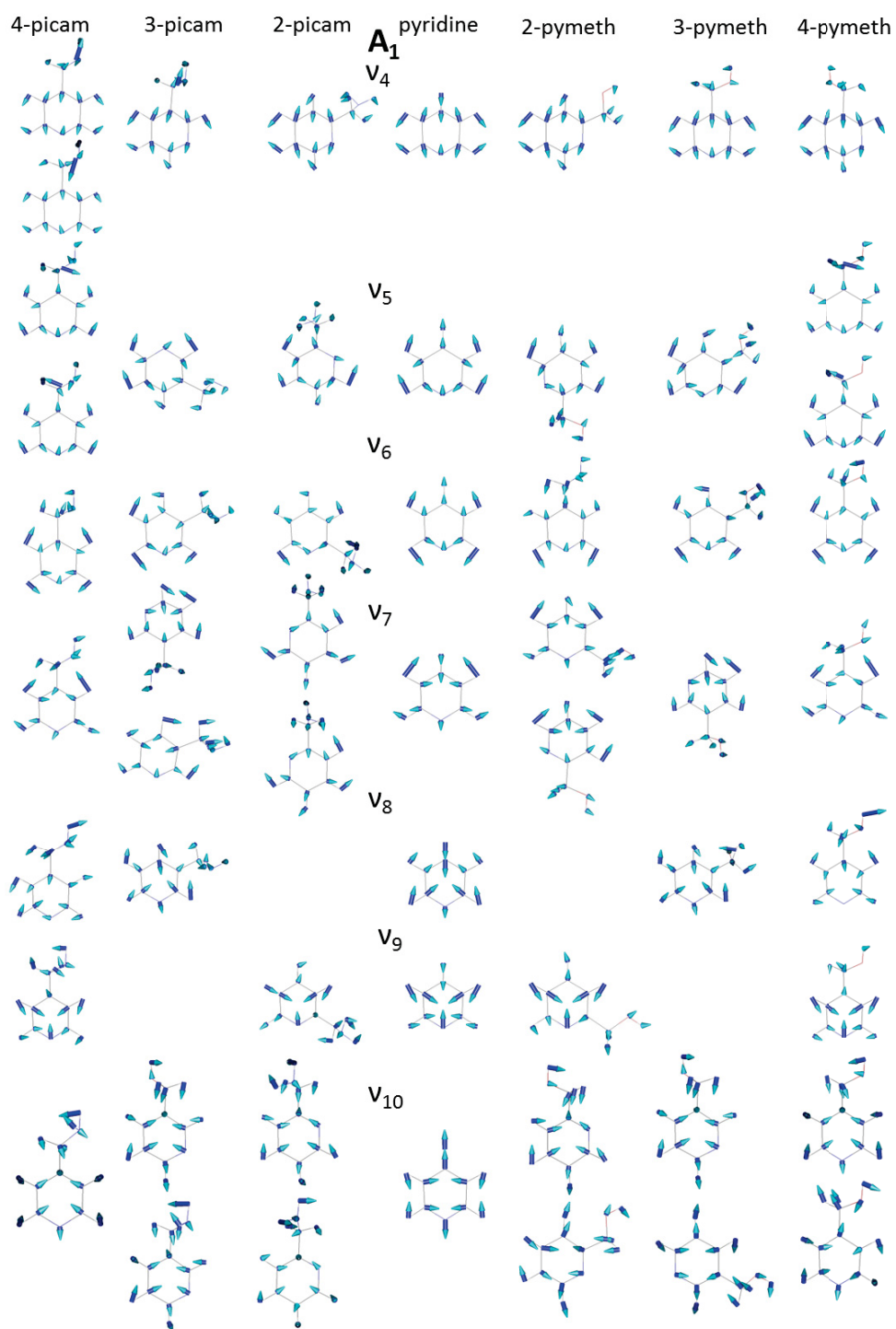
Augen sind ausgiebig mit fließendem Wasser aus der Augendusche zu spülen.

**II. 11.3. Verletzung, Unfall**

Wunden sind im Rahmen der Erstversorgung zu desinfizieren und zu verbinden. Bei Bedarf ist ein Krankenwagen anzufordern. Arzt und Rettungspersonal sind über die Möglichkeit einer Kontamination mit biologischem Material zu unterrichten. Beschäftigte, die mit humanpathogenen Erregern in Berührung gekommen sein können, müssen nach Durchführung der Erste Hilfe Maßnahmen einen D-Arzt aufsuchen (z.B. Zentrale Notaufnahme Klinikum, Tel. 9-322050).

Unabhängig von dem oben Aufgeführten hat bei allen Unfällen eine Unfallmeldung auf dem normalen Dienstweg zu erfolgen (an Dez. 4 Kernuni bzw. ZGS Klinikum).

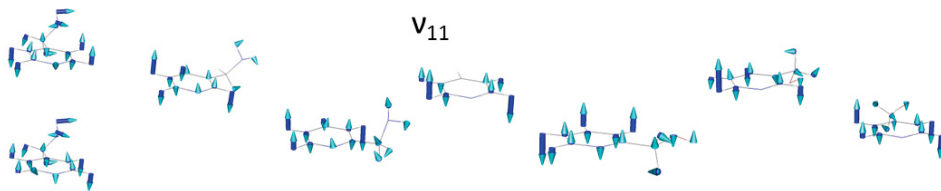
B. Darstellung der Atombewegungen der Normalmoden in Pyridinderivaten (spektraler Bereich:  $1750 - 500 \text{ cm}^{-1}$ )



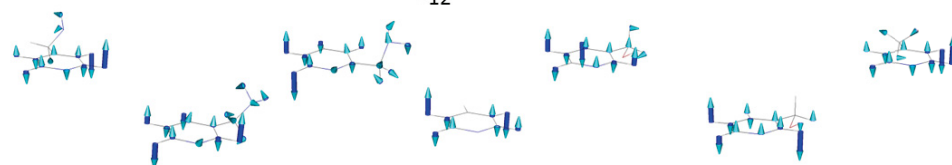
4-picam    3-picam    2-picam    pyridine    2-pymeth    3-pymeth    4-pymeth

**A<sub>2</sub>**

V<sub>11</sub>

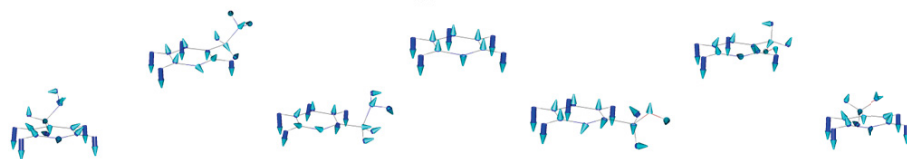


V<sub>12</sub>

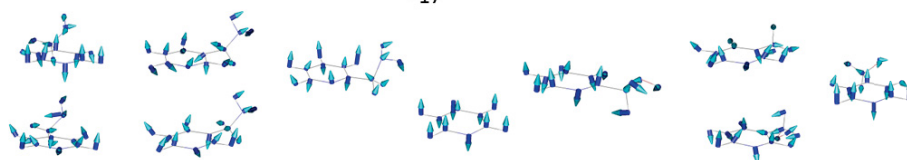


**B<sub>1</sub>**

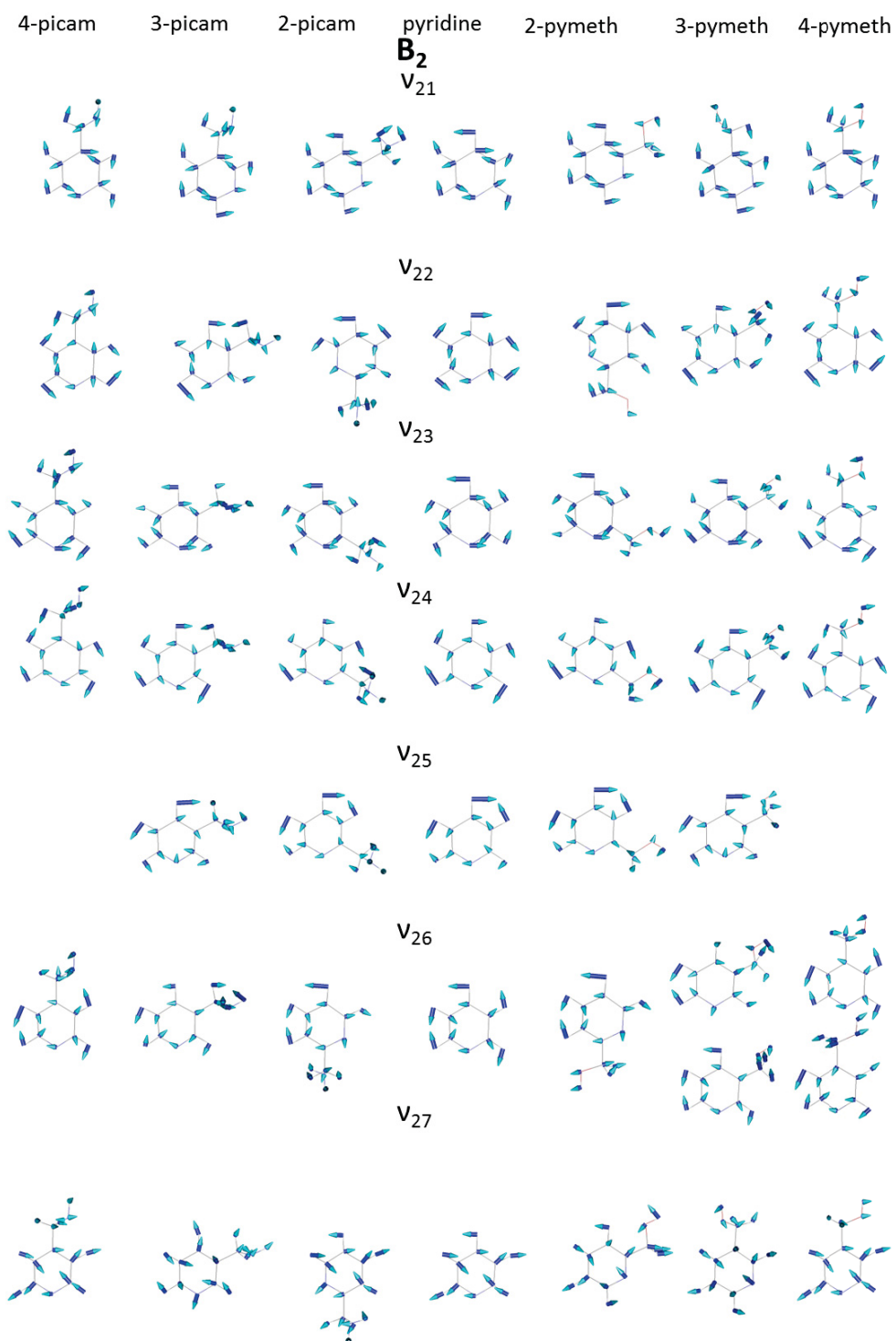
V<sub>16</sub>



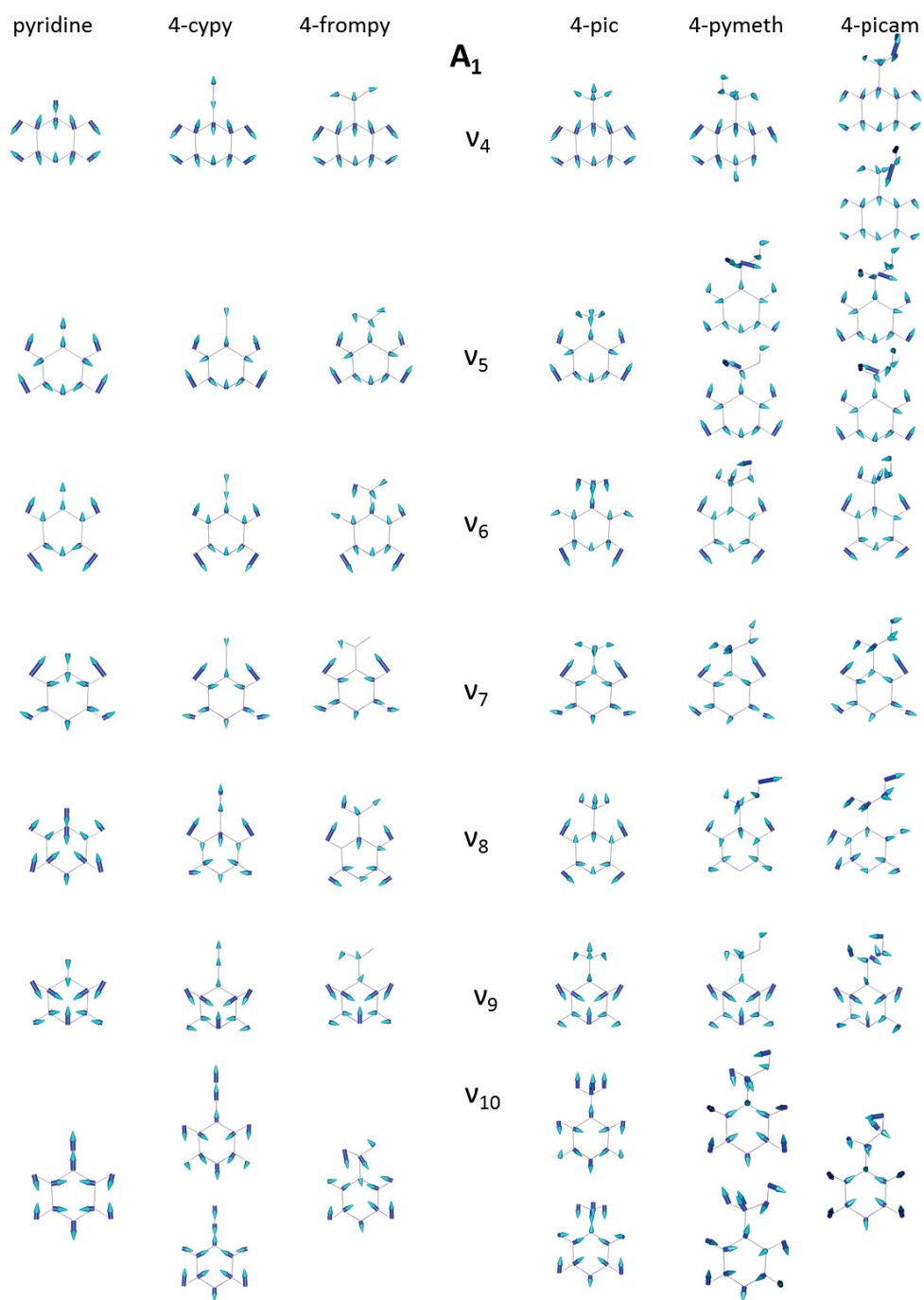
V<sub>17</sub>



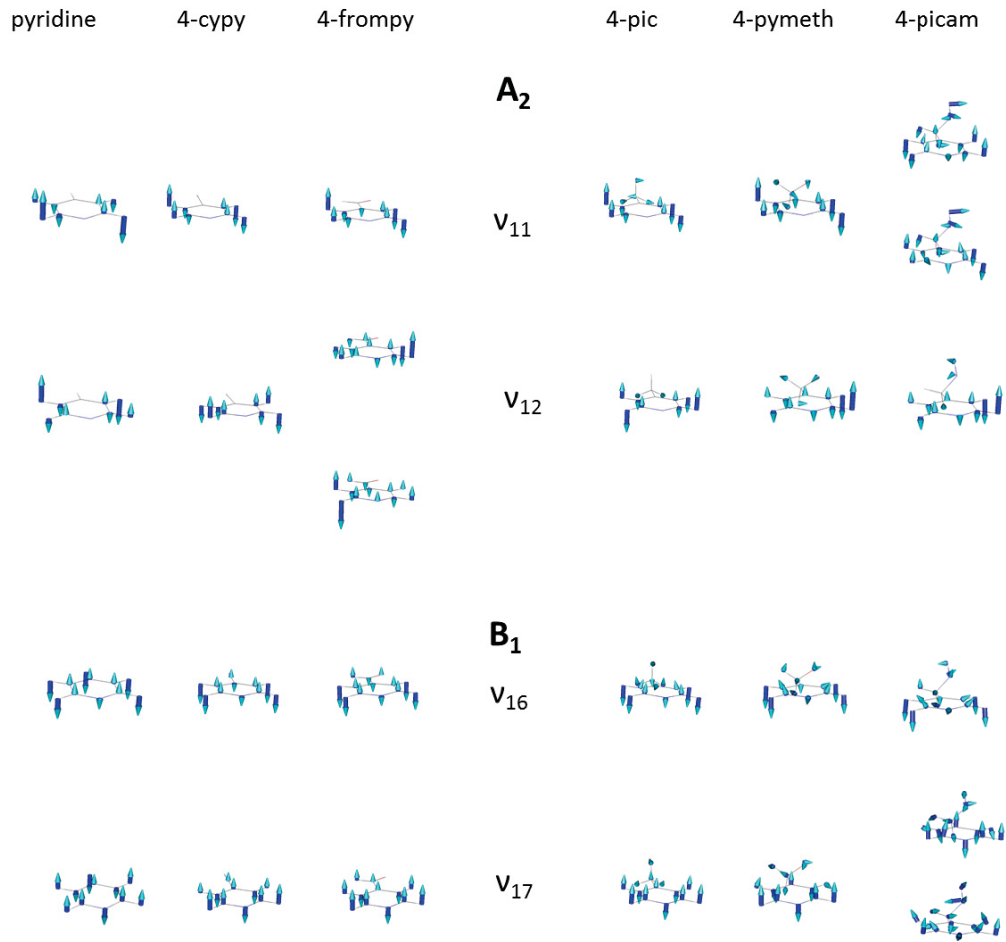
XXIV B. Darstellung der Atombewegungen der Normalmoden in Pyridinderivaten  
 (spektraler Bereich:  $1750 - 500 \text{ cm}^{-1}$ )







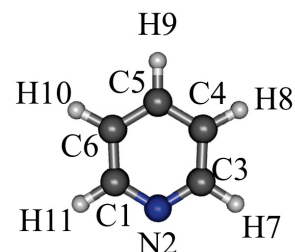
XXVI B. Darstellung der Atombewegungen der Normalmoden in Pyridinderivaten  
 (spektraler Bereich: 1750 – 500 cm<sup>-1</sup>)



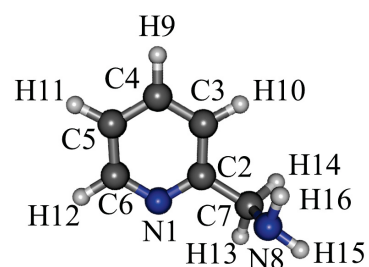


## C. Optimierte Strukturparameter der Pyridinderivate

Optimierte Strukturparameter von Pyridin						
MP2 /6-311++G ** <i>Level of Theory</i>						
Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
C1						
N2	C1	1,344776				
C3	N2	1,344777	C1	116,762749		
C4	C3	1,399055	N2	123,849571	C1	0
C5	C4	1,397525	C3	118,633217	N2	0
C6	C5	1,397524	C4	118,271629	C3	0
H7	C3	1,088030	N2	115,837265	C1	180
H8	C4	1,086011	C3	120,097725	N2	180
H9	C5	1,086407	C4	120,864197	C3	180
H10	C6	1,086012	C5	121,269073	C4	180
H11	C1	1,088030	N2	115,837204	C3	180



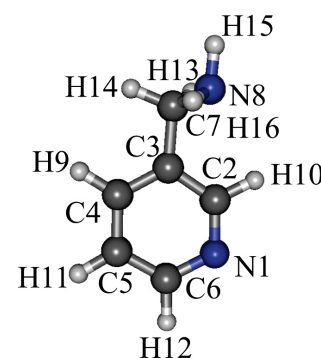
Optimierte Strukturparameter von 2-picam						
MP2 /6-311++G ** <i>Level of Theory</i>						
Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
N1						
C2	N1	1,347452				
C3	C2	1,402742	N1	122,637009		
C4	C3	1,397045	C2	119,3573	N1	1,199314
C5	C4	1,396733	C3	118,221535	C2	-0,435042
C6	C5	1,399311	C4	118,425797	C3	-0,571159
C7	C2	1,507278	C3	120,469284	C4	-176,015900
N8	C7	1,470938	C2	109,211533	C3	86,426796
H9	C4	1,086634	C3	120,815742	C2	179,851028
H10	C3	1,087649	C2	119,873817	N1	-179,524643
H11	C5	1,085953	C4	121,362396	C3	-179,869263
H12	C6	1,088284	C5	120,356079	C4	-179,932220
H13	C7	1,092502	C2	108,054565	C3	-156,194046
H14	C7	1,101459	C2	109,100395	C3	-38,274544
H15	N8	1,016205	C7	110,169731	C2	176,236160
H16	N8	1,016306	C7	109,868195	C2	-65,987801



## Optimierte Strukturparameter von 3-picam

MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

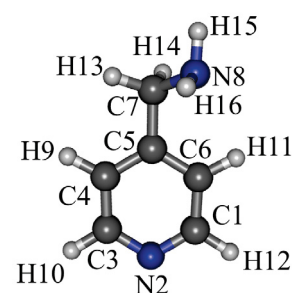
Atom	Bindungslänge		Bindungswinkel		Diederwinkel	
	in Å		in °		in °	
N1						
C2	N1	1,342755				
C3	C2	1,404954	N1	124,314003		
C4	C3	1,398758	C2	117,631691	N1	0,756856
C5	C4	1,398356	C3	118,975075	C2	-0,643721
C6	C5	1,397525	C4	118,562469	C3	0,323641
C7	C2	1,508504	C2	120,278091	N1	179,268066
N8	C7	1,467726	C3	109,586090	C2	-57,783798
H9	C4	1,088355	C3	120,22367	C2	179,595215
H10	C2	1,088250	C3	119,393105	C4	-178,814148
H11	C5	1,086177	C4	121,219231	C3	-179,948120
H12	C6	1,087943	C5	120,475006	C4	-179,950394
H13	C7	1,095886	C3	109,532921	C2	59,998547
H14	C7	1,100934	C3	108,580582	C2	176,845505
H15	N8	1,016217	C7	110,478194	C3	178,763428
H16	N8	1,016273	C7	109,782280	C3	-63,217846



## Optimierte Strukturparameter von 4-picam

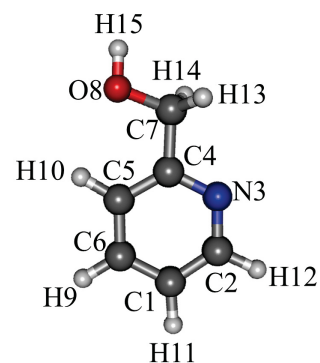
MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

Atom	Bindungslänge		Bindungswinkel		Diederwinkel	
	in Å		in °		in °	
C1						
N2	N1	1,343851				
C3	C2	1,346133	C1	116,348717		
C4	C3	1,397937	N2	124,116791	C1	-0,124610
C5	C4	1,401176	C3	119,077003	N2	-0,004439
C6	C5	1,399246	C4	117,240104	C3	0,319125
C7	C2	1,510996	C4	121,169357	C3	-179,336273
N8	C7	1,465961	C5	110,374175	C4	-41,925171
H9	C4	1,085853	C3	120,808800	N2	179,226898
H10	C3	1,088248	C2	115,750725	C1	179,848572
H11	C6	1,087785	C5	120,721443	C4	179,375977
H12	C1	1,088307	C2	115,929337	C3	-179,704544
H13	C7	1,100655	C5	108,498001	C4	-167,704834
H14	C7	1,096636	C5	109,052116	C4	75,983231
H15	N8	1,015558	C7	110,364624	C5	175,734863
H16	N8	1,016268	C7	109,820297	C5	-66,383385



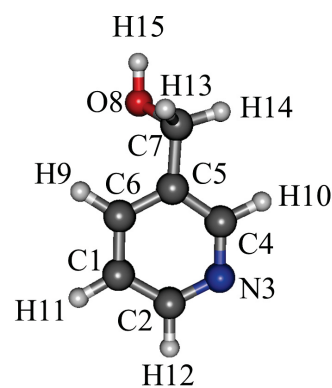
Optimierte Strukturparameter von 2-pymeth  
MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
C1						
C2	C1	1,398928				
N3	C2	1,343217	C1	123,614609		
C4	N3	1,345834	C2	117,391510	C1	0,505204
C5	C4	1,399562	N3	123,385269	C2	0,157452
C6	C5	1,397723	C4	118,477074	N3	0,361507
C7	C4	1,508775	N3	114,719315	C2	-179,027267
O8	C7	1,424243	C4	109,247910	N3	-167,699219
H9	C6	1,086715	C4	120,487671	C4	179,564026
H10	C5	1,084128	C5	119,593750	C3	179,820816
H11	C1	1,085899	C2	120,194893	C3	-179,484695
H12	C2	1,088169	N3	115,842865	C4	179,921661
H13	C7	1,096438	C4	108,258888	C3	-46,042042
H14	C7	1,098287	C4	108,490219	C3	71,103683
H15	O8	0,960288	C7	107,365150	C4	-166,024551



Optimierte Strukturparameter von 3-pymeth  
MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

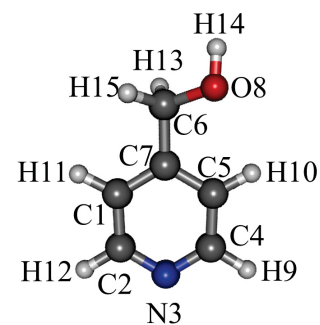
Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
C1						
C2	C1	1,400343				
N3	C2	1,343690	C1	123,627457		
C4	N3	1,344352	C2	116,700615	C1	0,067081
C5	C4	1,400558	N3	124,376450	C2	0,644592
C6	C5	1,400543	C4	117,933998	N3	-0,847660
C7	C5	1,502921	C4	121,098724	N3	178,908188
O8	C7	1,427681	C4	107,884789	N3	130,000824
H9	C6	1,086594	C4	120,086449	C4	-178,608902
H10	C5	1,089699	C5	115,788696	N3	-179,127838
H11	C1	1,086177	C2	120,068932	N3	179,483521
H12	C2	1,087962	N3	115,927589	C4	179,820862
H13	C7	1,098890	C4	109,549995	N3	-109,834373
H14	C7	1,097630	C4	109,484131	N3	8,754027
H15	O8	0,961864	C7	107,386017	C4	172,591049



## Optimierte Strukturparameter von 4-pymeth

MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

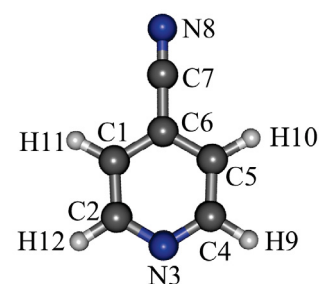
Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
C1						
C2	C1	1,397942				
N3	C2	1,344755	C1	123,848961		
C4	N3	1,344736	C2	116,374191	C1	0,075539
C5	C4	1,398947	N3	124,185799	C2	0,368826
C6	C5	1,398605	C4	118,827019	N3	-0,279770
C7	C6	1,504773	C5	121,530579	C4	178,319778
O8	C7	1,423203	C6	108,865059	C5	27,324274
H9	C4	1,088197	C3	115,770271	C2	-179,561690
H10	C5	1,084836	C4	120,782547	N3	-179,398010
H11	C1	1,087840	C2	119,885010	N3	179,194717
H12	C2	1,088151	N3	115,938988	C4	179,551773
H13	C7	1,099341	C6	108,898521	C5	-93,312775
H14	O8	0,941002	C7	107,491081	C6	-167,885849
H15	C7	1,098095	C6	109,225067	C5	148,874435



## Optimierte Strukturparameter von 4-cypy

MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
C1						
C2	C1	1,397186				
N3	C2	1,345151	C1	124,077583		
C4	N3	1,345135	C2	116,885605	C1	0
C5	C4	1,397192	N3	124,078163	C2	0
C6	C5	1,403365	C4	118,101562	N3	0
C7	C5	1,435801	C5	120,628746	C4	180
N8	C7	1,177900	C6	179,994095	C5	180
H9	C4	1,087713	N3	115,894035	C2	180
H10	C5	1,085519	C4	121,025398	N3	180
H11	C1	1,085520	C2	121,027420	N3	180
H12	C2	1,087711	N3	115,894226	C4	180

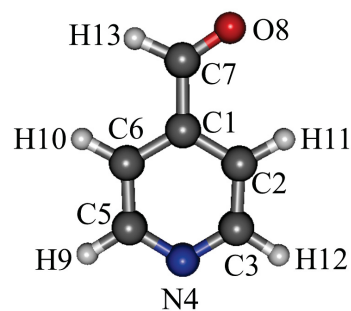




## Optimierte Strukturparameter von 4-formpy

MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

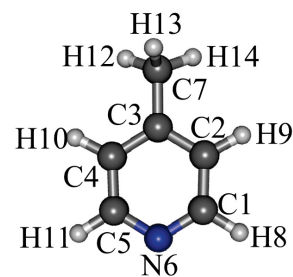
Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
C1						
C2	C1	1,401419				
C3	C2	1,396019	C1	118,249313		
N4	C3	1,347820	C2	123,988945	C1	0
C5	N4	1,344185	C3	116,985825	C2	0
C6	C5	1,399078	N4	123,652054	C3	0
C7	C1	1,488765	C2	121,192749	C3	180
O8	C7	1,217424	C1	123,961624	C2	0
H9	C5	1,087804	N4	115,888939	C3	180
H10	C6	1,087763	C5	120,531631	N4	180
H11	C2	1,086014	C3	121,569984	N4	180
H12	C3	1,087700	C2	120,364243	C1	180
H13	C7	1,109460	C1	114,962967	C2	180



## Optimierte Strukturparameter von 4-pic

MP2 /6-311++G \*\* *Level of Theory*

Atom	Bindungslänge in Å		Bindungswinkel in °		Diederwinkel in °	
C1						
C2	C1	1,398346				
C3	C2	1,400779	C1	119,619064		
C4	C3	1,400779	C2	116,629532	C1	0,641934
C5	C4	1,398166	C3	119,619270	C2	-0,641861
N6	C5	1,344510	C4	123,950935	C3	0,364674
C7	C3	1,506932	C2	121,683243	C1	-178,695389
H8	C1	1,088260	C2	120,159286	C3	179,973633
H9	C4	1,087582	C3	120,594940	C2	179,55842
H10	C5	1,088259	C4	120,159805	C3	-179,972046
H11	C7	1,093423	C3	110,965134	C2	-30,031755
H12	C7	1,095517	C3	110,669716	C2	89,657639
H13	C7	1,093425	C3	110,964973	C2	-150,653030



## D. Protokoll zur Herstellung von SBF

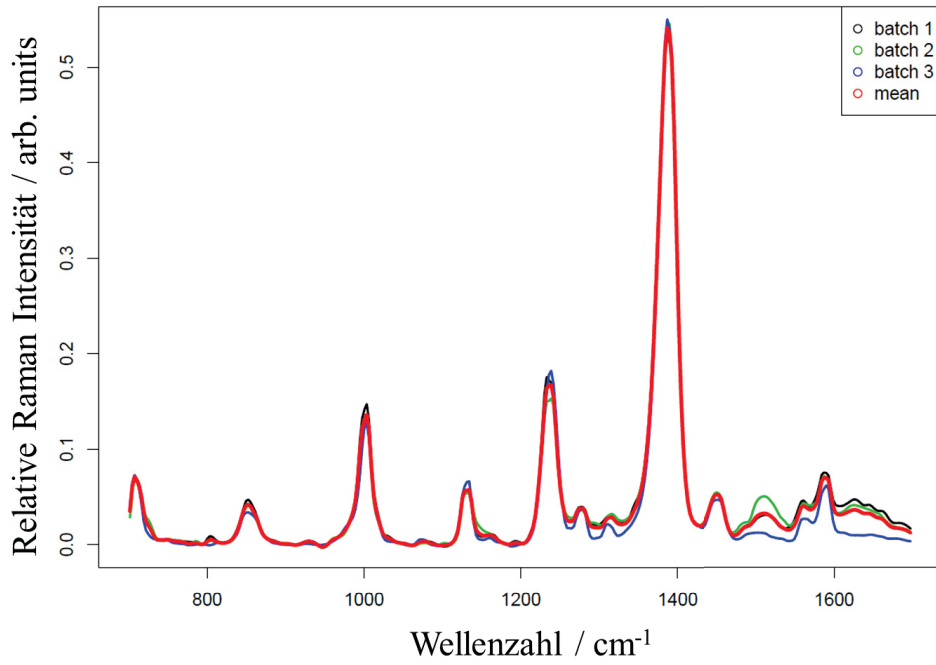
Für die Herstellung des artifiziellen Blutplasmas werden die in Tabelle D.1 angegebenen Konzentrationen von Ionen verwendet. Es werden NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O und CaCl<sub>2</sub> in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird mit einer 50 mM Trishydroxymethylaminomethan-Lösung auf den pH-Wert 7,25 eingestellt. Die so präparierte Lösung wird im Anschluss bei 4°C gelagert.

Tabelle D.1.: Vergleich der Ionen Konzentration in artifizielltem Blutplasma (SBF) und realem Blutplasma. Die Konzentrationen werden in mM angegeben.

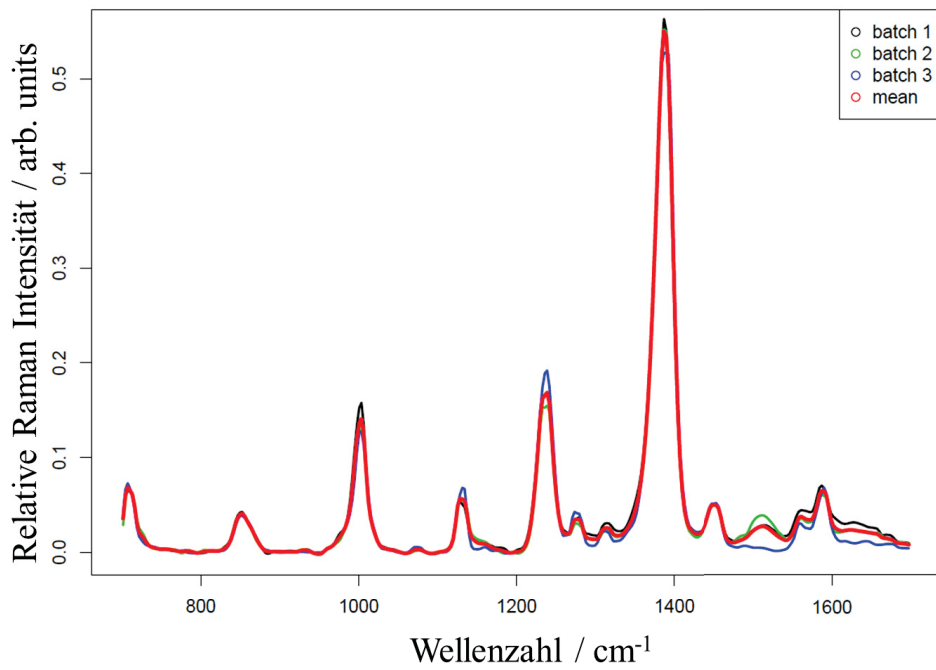
Ionen	Konzentration in mM	
	artifiziell	real
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	148,8	103,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2	13,5
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0

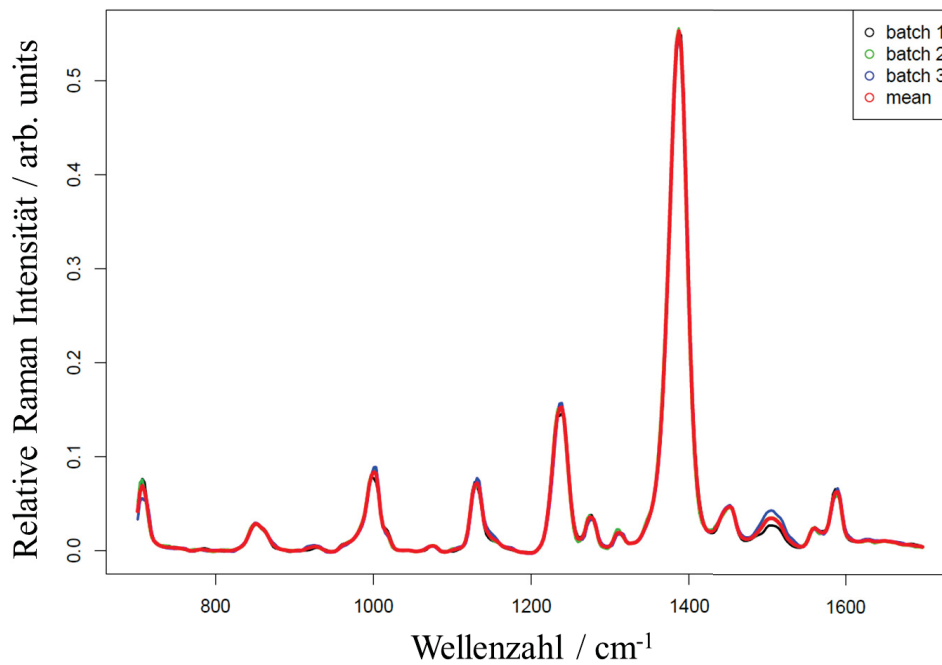
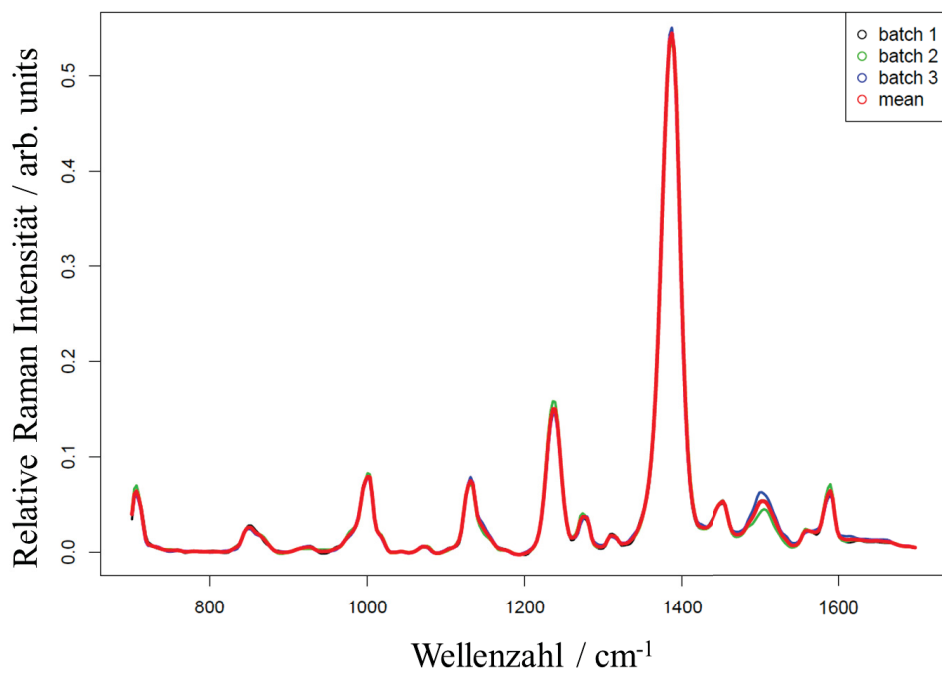
## E. LOC-SERS-Spektren der sieben Mykobakterienstämme

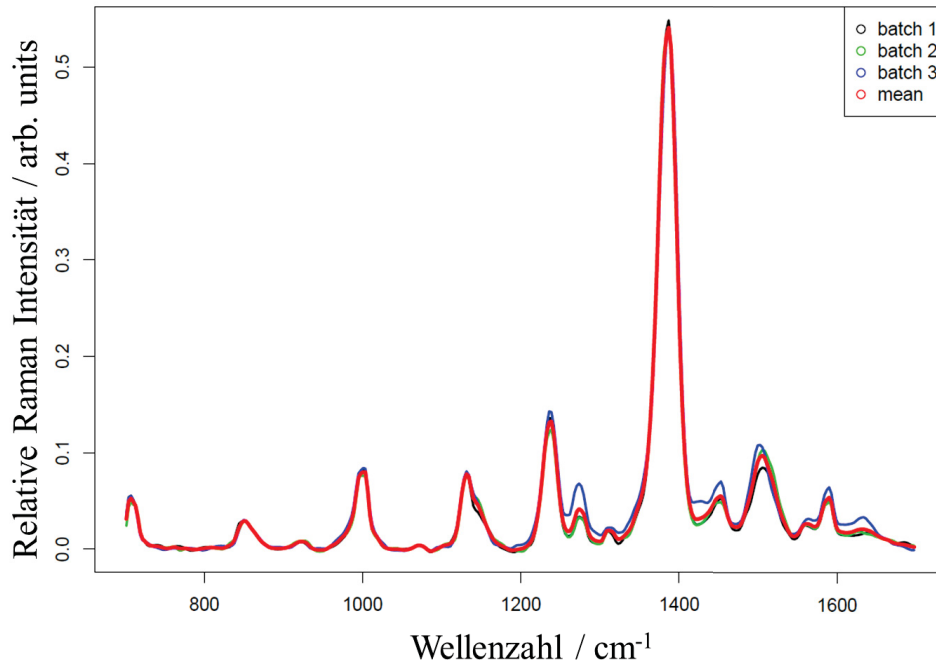
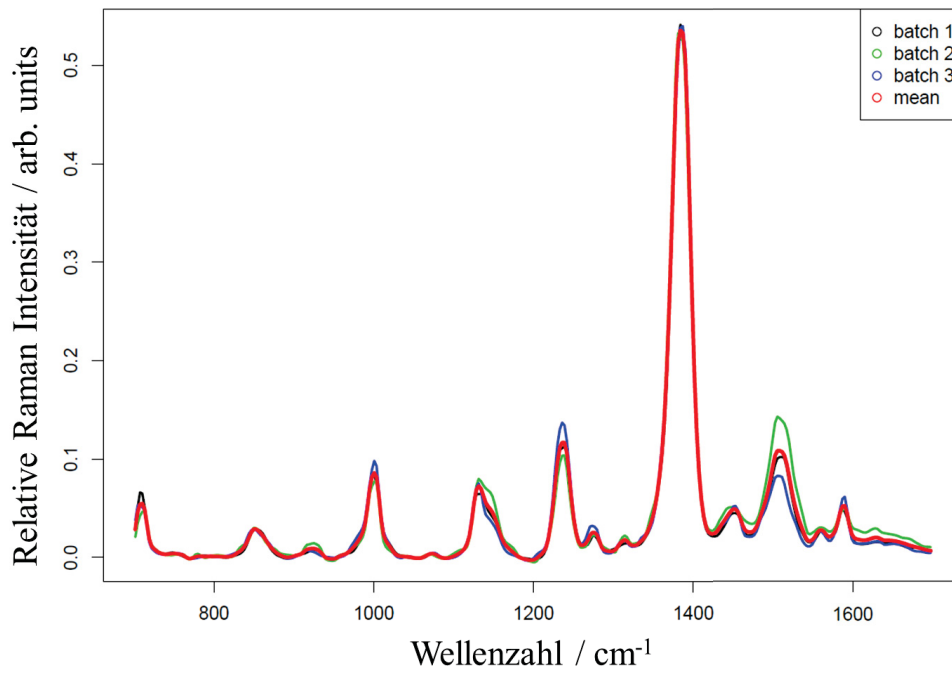
*M. tb* Beij (1934/03)



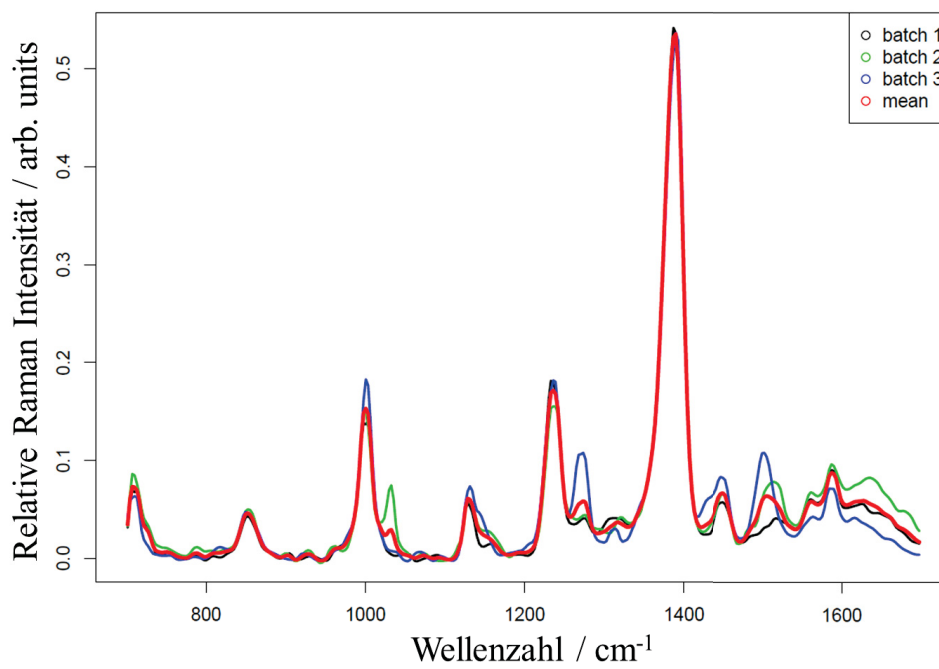
*M. tb* Beij (8304/09)



*M. tb H37Rv* (SR16b)*M. Bov BCG* (BCG pasteur)

*M. can* (3040/99)*M. abs* (5512/11)

*M. szul* (8895/14)



# Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre,

dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen

Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift der Verfasserin



