

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(48) Ausgabetag der Berichtigung: 15.03.2023
(21) Anmeldenummer: A 50526/2021
(22) Anmeldetag: 25.06.2021
(43) Veröffentlicht am: 15.01.2023

(51) Int. Cl.: **G01N 21/65** (2006.01)
B82Y 20/00 (2011.01)

(71) Patentanmelder:
Phornano Holding GmbH
2100 Korneuburg (AT)

(72) Erfinder:
STINGL Andreas
1050 Wien (AT)
de FARIAS CARDOZO Olavo Dhyán
52050-050 Afritos, Recife (BR)

(74) Vertreter:
SONN Patentanwälte OG
1010 Wien (AT)

(54) **SERS-Substrat mit Nanopartikeln**

(57) Die Erfindung stellt ein für SERS geeignetes Substrat bereit, das einen Metallkörper (5) und eine auf einer Oberfläche des Metallkörpers (5) angeordnete Schicht aus Nanopartikeln (4) aufweist, wobei die Nanopartikel (4) einen mittleren Durchmesser oder eine mittlere Größe von 10 nm bis 100 nm haben, und wobei der Metallkörper (5) eine Dicke von 30 μm bis 500 μm unter der Oberfläche mit den Nanopartikeln hat und wobei die Oberfläche eine flache Oberfläche in einer angrenzenden Fläche von mindestens 1 mm^2 ist und/oder keine nanostrukturierte Oberfläche des Metallkörpers ist, wobei die nanostrukturierte Oberfläche durch Vertiefungen oder Erhöhungen mit einem Mittenabstand von mindestens 100 nm und mit einer Tiefe bzw. Höhe von mindestens 10 nm gebildet ist.

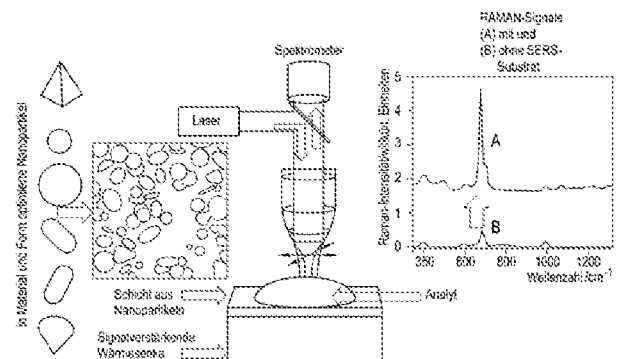


Fig. 1

Zusammenfassung

Die Erfindung stellt ein für SERS geeignetes Substrat bereit, das einen Metallkörper und eine auf einer Oberfläche des Metallkörpers angeordnete Schicht aus Nanopartikeln aufweist, wobei die Nanopartikel einen mittleren Durchmesser oder eine mittlere Größe von 10 nm bis 100 nm haben, und wobei der Metallkörper eine Dicke von mindestens 30 μm unter der Oberfläche mit den Nanopartikeln hat.

Die vorliegende Erfindung betrifft Substrate für die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS, engl. Surface Enhanced Raman Spectroscopy)-Substrate.

Allgemeiner Stand der Technik

Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)-Substrate für die oberflächenverstärkte Raman-Streuung erhöhen die Empfindlichkeit der Raman-Spektroskopie signifikant. Dies ermöglicht die Erfassung kleinster molekularer Spuren, um die strengen Auflagen in der (Lebensmittel-)Industrie und im Gesundheitswesen zu erfüllen und bietet eine schnelle, kostengünstige und vor Ort einsetzbare Alternative zu chromatographischen und laborgestützten Erfassungstechniken.

Die wichtigsten Arten von SERS-Substraten sind: Nanopartikel und papierbasierte Substrate, Tropfenguss oder -druck (Wei W. Yu und Ian M. White, Anal Chem. 2010, 82(23): 9626-9630, doi:10.1021/ac102475k); Nanopartikel und nicht papierbasierte Substrate, Tropfenguss oder -druck (Gudun et al. Hindawi Journal of Nanomaterials Band 2017, Artikel-Nr. 9182025, doi:10.1155/2017/9182025); sowie vakuumbehandeltes (Lithographie oder Sputtern), insbesondere das Hamamatsu-Substrat (Liu et al. Plasmonics 15, 743-752 (2020), doi:10.1007/s11468-019-01084-8).

Die CN 104949957 A beschreibt ein SERS-Substrat mit einem Gitter aus Nanopartikeln, die in ein nanostrukturiertes Array von Vertiefungen eingebettet sind.

Die US 2012/0242987 A1 beschreibt eine SERS-aktive Innenfläche eines zylindrischen Behälters.

Die WO 2020/227450 A1 beschreibt ein SERS-Substrat mit Spalten auf Basis von röhrenförmigen hohlen Nanostrukturen, die durch solare Dampferzeugung hergestellt werden.

Die CN 108823541 A beschreibt ein SERS-Substrat mit inversen hohlen Silber-Nanostrukturen in Form von vulkanischen Inseln auf einer porösen eloxierten Aluminiumoberfläche.

Die CN 106077697 A beschreibt ein Verfahren zur Erzeugung eines Silber-Nanoblumen-Clusters/Silber-Mikrochips für SERS-Anwendungen.

Kurzdarstellung der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, SERS-Substrate bereitzustellen, die verbesserte spektroskopische Messungen und Analyt-

Erfassungsparameter, insbesondere eine erhöhte Empfindlichkeit, ermöglichen.

Die Erfindung stellt ein Substrat bereit, das einen Metallkörper und eine auf einer Oberfläche des Metallkörpers angeordnete Schicht aus Nanopartikeln aufweist, wobei die Nanopartikel einen mittleren Durchmesser oder eine mittlere Größe von 10 nm bis 100 nm haben, und wobei der Metallkörper eine Dicke von mindestens 30 μm unter der Oberfläche mit den Nanopartikeln hat.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Substrats gemäß der Erfindung bereit, wobei das Verfahren folgendes aufweist: Das Abscheiden einer Suspension aus Nanopartikeln in einem Dispersionsmedium auf einer Oberfläche eines Metallkörpers, wobei der Metallkörper eine Dicke von mindestens 30 μm unter der Oberfläche hat, wobei die Suspension in Mengen abgeschieden wird, die 100 Millionen (Mio.) Nanopartikel/ mm^2 bis 100000 Mio. Nanopartikel/ mm^2 der Oberfläche aufweisen; und das Entfernen des Dispersionsmediums, wobei die Nanopartikel auf der Oberfläche verbleiben.

Die Erfindung stellt ferner ein Spektroskopieverfahren bereit, aufweisend das Bereitstellen eines Substrats der Erfindung; das Abscheiden einer Probe mit einem Analyten auf der Oberfläche des Substrats, welche die Nanopartikel aufweist; das Bestrahlen des Analyten auf dem Substrat mit Licht mit einer Wellenlänge von 200 bis 1200 nm, das Messen eines von dem Analyten reflektierenden Lichts, wobei das reflektierende Licht vorzugsweise Streulicht ist.

Alle Aspekte der Erfindung sind miteinander verbunden und die folgende ausführliche Offenbarung bestimmter oder bevorzugter Ausführungsformen betrifft alle Aspekte, auch wenn sie in Verbindung mit einem bestimmten Aspekt dargestellt ist. Beispielsweise kann jede Variante des Substrats durch ein erfinderisches Herstellungsverfahren produziert werden. Bestimmte Parameter von Substraten können in den Verfahren ausgewählt oder erzeugt werden, z. B. durch Auswahl geeigneter Materialien oder durch Anpassung von diesen. In den Spektroskopieverfahren kann jedes Substrat verwendet werden und eine Beschreibung der Substrate bezieht sich auch auf diese Verfahren, und umgekehrt kann ein Substrat für ein besonders beschriebenes

Spektroskopieverfahren geeignet sein.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

Figur 1: Aufbau eines SERS-Systems einschließlich eines Raman-Lasers (Lasers), eines Spektrometers (Detektors) und eines SERS-Substrats, bestehend aus einer Schicht aus Nanopartikeln sowie einem signalverstärkenden Metallkörper unter dieser Schicht.

Figur 2: SERS-Substrat, auf das ein einfallender Laserstrahl (1) aufgebracht wird, der ein Raman-Signal (2) erzeugt, und das mit der Analytprobe in Tropfenform (3) beladen ist, das aus einer Schicht aus Nanopartikeln (4) und einem signalverstärkenden Metallkörper (5) besteht.

Figur 3: Die Fläche der aktiven Nanopartikelbeschichtung entspricht der Fläche der signalverstärkenden Wärmesenke. Dieses Verfahren ist günstig, wenn die Nanopartikelbeschichtung großflächig aufgebracht und anschließend in einzelne SERS-Substrate geschnitten wird.

Figur 4: Die Fläche der aktiven Nanopartikelbeschichtung ist kleiner als die Fläche der signalverstärkenden Wärmesenke. Dieses Verfahren ermöglicht die Verwendung einer dünneren signalverstärkenden Wärmesenke (z. B. einer Al-Folie), erfordert jedoch zum sparsamen Umgang mit der Nanopartikelbeschichtung ein komplexeres Verfahren des Aufbringens der Beschichtung in einer begrenzten Weise.

Figur 5: Vergleich zwischen den Nanopartikeln in der Suspension (strichpunktiert) und zwei typischen Schichten, die von den Nanopartikeln auf der Oberfläche der signalverstärkenden Wärmesenke gebildet werden.

Figur 6: Die aus einzelnen Nanosphären gebildete Schichtstruktur enthält einzelne Nanosphären, aber auch Aggregate, die Nanostäbchen unterschiedlicher Größe bilden.

Figur 7: Auch bei einem Leistungsniveau des Raman-Lasers von 100 % konnten keine Schäden beobachtet werden. Das lineare Verhalten zeigt an, dass die Zerstörschwelle noch nicht erreicht wurde.

Figur 8: Drei Messungen an verschiedenen Punkten zur Demonstration der Wiederholbarkeit.

Figur 9: Ein Metallkörper (A) mit einer Schicht aus Nanopartikeln (B) auf einem Träger (C) und einem Deckblatt (D) obendrauf.

Ausführliche Offenbarung der Erfindung

Die Erfindung stellt ein Substrat bereit, das einen Metallkörper und eine auf einer Oberfläche des Metallkörpers angeordnete Schicht aus Nanopartikeln aufweist. Die Nanopartikel haben einen mittleren Durchmesser oder eine mittlere Größe von 10 nm bis 100 nm. Der Metallkörper hat unter besagter Oberfläche mit den Nanopartikeln eine Dicke von mindestens 30 μm , d. h. eine Dicke in Richtung senkrecht zu der Oberfläche.

„Metallkörper“ bezieht sich auf die metallische Eigenschaft oder den metallischen Aggregatzustand des Körpers. Metalle haben eine hohe Wärmeleitfähigkeit, was in Verbindung mit der erfinderischen Mindestdicke des Substrats zu einer effizienten Temperaturregulierung der Substratoberfläche - und jeder für eine spektroskopische Messung aufgetragenen Analyten oder Medien - führt.

Die Erfindung stellt Substrate bereit, die für die oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS) geeignet sind, wobei Nanopartikel (wie Gold- oder Silbernanopartikel, abgekürzt AuNP bzw. AgNPs) an einem Basiskörper aus Metall befestigt sind. In besonderen Ausführungsformen sind die erhaltenen erfinderischen SERS-Substrate homogen und zeigen eine außerordentlich hohe Zerstörschwelle von mehr als 3 kW/cm^2 . Sie eignen sich für Raman-Laser von bis zu 300 mW bis 500 mW oder noch mehr im VIS/NIR-Spektralbereich oder für sogar noch höhere Laserleistungen bei einer größeren Metallkörperdicke und/oder -abmessung im Allgemeinen.

Aufgrund der Wärmeleitfähigkeit des Metalls kann der Metallkörper (auch als Metallbasis bezeichnet) daher auch als Wärmesenke betrachtet werden und wird hierin als solche bezeichnet.

Das Zulassen einer höheren Laserleistung von immer leistungsfähigeren, kompakteren und erschwinglicheren Lasern bedeutet mehr Signal und eine niedrigere Erfassungsgrenze (EG). Andererseits besteht die Gefahr der Schädigung des Substrats sowie der Veränderung des zu charakterisierenden Analyten durch große Temperaturanstiege.

Mit dem Ziel, die EG der SERS-Technologie zu senken, um in Märkte vorzudringen, die derzeit nur für chromatographische und laborgestützte Detektionstechniken zugänglich sind, muss die

Verwendung attraktiver, diodenbasierter, kostengünstiger und leistungsstarker Laser bei z. B. Lasern mit einer Wellenlänge von 785 nm mit SERS-Substraten abgestimmt werden, welche der hohen aufgebrachten Laserleistung standhalten können, ohne beschädigt zu werden und den auf der Oberfläche des Substrats aufgebrachten Analyten vor einer Veränderung durch übermäßige Wärme zu schützen.

Durch die Verstärkung des von dem SERS-Substrat bereitgestellten elektrischen Feldes tritt eine Verstärkung eines Raman-Signals auf. Wenn das einfallende Licht (normalerweise Laserlicht) auf die aktive Oberfläche des SERS-Substrats trifft, werden lokalisierte Oberflächenplasmonen angeregt (Figur 1). „Aktive Oberfläche“ oder „aktive Fläche“ bezieht sich auf den Teil der Oberfläche des Metallkörpers, der bei spektroskopischen Messungen bestrahlt wird, oder auf die Fläche auf dem Substrat, die bei solchen Anwendungen bestrahlt werden soll. Es ist die Fläche der Oberfläche, die durch die Nanopartikel bedeckt wird. Die den Nanopartikeln zugewandte Seite des Metallkörpers kann größer sein, d. h. nur ein Teil dieser Seite des Metallkörpers ist mit Nanopartikeln beschichtet (Fig. 4), oder der Metallkörper darf sich auf dieser den Nanopartikeln zugewandten Seite nicht über die mit Nanopartikeln beschichtete Fläche hinaus erstrecken (Fig. 3).

Die eingesetzten Nanopartikel sind für eine resonante Verstärkung des Signals während der Raman-Spektroskopie (SERS) verantwortlich. Der SERS-Effekt ist so ausgeprägt, weil die Feldverstärkung zweimal auftritt. Zunächst verstärkt die resonante Feldverstärkung die Intensität des einfallenden Laserlichts, welches die Raman-Moden der Moleküle des Analyten anregt. Das resultierende verstärkte Raman-Signal wird dann durch das SERS-Substrat aufgrund des gleichen Resonanzeffekts, welcher das elektrische Feld des einfallenden Laserlichts verstärkt, weiter verstärkt (Figur 1 und Figur 2).

Das Material des Metallkörpers ist ein Metall, welches das Raman-Signal verstärkt, indem es entweder (i) mit den aufgebrachten Nanopartikeln interagiert und/oder (ii) Licht reflektiert und dadurch den einfallenden Strahl von dem Raman-Laser, der mit den Nanopartikeln interagiert, erhöht (zweifacher Durchlauf) und/oder (iii) das Raman-Signal reflektiert und es dadurch verstärkt. Diese Eigenschaften tragen zu dem signalverstärkenden Merkmal bei.

Das Metall kann aufgrund seiner spezifischen Wärmekapazität und seiner Masse (i) eine gute Wärmeleitfähigkeit und (ii) eine gute Wärmekapazität bieten. Ein Beispiel für ein solches Material ist ein Bulk-Aluminium oder ein Aluminiumblech mit einer Masse und einer spezifischen Wärmekapazität, um eine Überhitzung davon während der Expositionszeit des Raman-Lasers zu verhindern.

Wenn die Oberfläche der signalverstärkenden Wärmesenke (Metallkörper) auf die aktive Fläche beschränkt ist (Fig. 3), wobei die aktive Fläche im Bereich von z. B. 5 mm Durchmesser liegt, sollte die Dicke des Metallkörpers je nach beabsichtigter Laserleistung 30 μm oder mehr, üblicherweise 50 μm oder mehr, betragen. Dies ist wesentlich dicker als eine haushaltsübliche oder professionelle Aluminiumfolie, die eine Dicke von üblicherweise 18 bis 25 μm hat. Vorzugsweise hat der Metallkörper eine Dicke (Abmessung senkrecht zu der Oberfläche mit den Nanopartikeln) von 30 μm oder mehr, 35 μm oder mehr, 40 μm oder mehr, 45 μm oder mehr, 50 μm oder mehr, 60 μm oder mehr, 70 μm oder mehr, 80 μm oder mehr, 90 μm oder mehr, 100 μm oder mehr, 150 μm oder mehr, 200 μm oder mehr, 300 μm oder mehr, 400 μm oder mehr, 500 μm oder mehr, 1 mm oder mehr oder einen beliebigen Bereich zwischen diesen Werten.

Wenn die Größe der signalverstärkenden Wärmesenke größer als die aktive Fläche sein kann (Fig. 4), kann ein dünnerer Metallkörper verwendet werden. Es muss jedoch darauf geachtet werden, dass der Metallkörper dick genug ist, um zu ermöglichen, dass die erzeugte Wärme von den Nanopartikeln und der darauf abgelagerten Probe abgeführt wird, und seine Masse und spezifische Wärmekapazität müssen wiederum das Überhitzen der aktiven Fläche verhindern.

Weitere Einzelheiten zu Wärmekapazität, Wärmeleitfähigkeit und Abmessungen des Metallkörpers sind nachfolgend in einem separaten Kapitel bereitgestellt.

In einigen Ausführungsformen weist die Oberfläche des Metallkörpers ein Metalloxid, vorzugsweise Aluminiumoxid, auf. Ein Metalloxid, insbesondere in einer Schicht auf der Oberfläche, kann eine gewisse Trennung des metallischen Körpers von den Nanopartikeln bereitstellen und dazu beitragen, die Plasmonenresonanz der Nanopartikel zu verbessern. In anderen Ausführungsformen sind die Nanopartikel in Kontakt mit der

metallischen Oberfläche, z. B. ohne oder mit einer nicht signifikanten trennenden Oxidschicht.

Vorzugsweise ist die Oberfläche eine im Wesentlichen flache Oberfläche auf einer angrenzenden Fläche von mindestens 1 mm² und/oder hat keine nanostrukturierte Oberfläche, die aus dem Metallkörper mit einer nanostrukturierten Oberfläche, die durch Vertiefungen oder Erhöhungen mit einem Mittenabstand von mindestens 100 nm, vorzugsweise mindestens 80 nm, und mit einer Tiefe bzw. Höhe von mindestens 10 nm ausgebildet ist, besteht. Der Mittenabstand ist der Abstand von der Mitte einer Vertiefung oder einer Erhöhung zu der Mitte der nächstgelegenen Vertiefung bzw. Erhöhung. Die Mitte ist die Mitte der Fläche an der Basis der Vertiefung oder Erhöhung in der Ebene der Oberfläche des Metallkörpers (Positionierungsmittelpunkt auf der Oberfläche). Diese Oberflächeneigenschaft berücksichtigt die Nanopartikel nicht, die natürlich ein nanostrukturiertes Material sind. Der Metallkörper selbst ist jedoch vorzugsweise glatt und mit begrenzter oder keiner Krümmung, um eine starke spiegelartige oder regelmäßige Reflexion in einer Richtung, d. h. einer Richtung, in welcher das reflektierende Licht zu einem Detektor geleitet werden kann, zu ermöglichen. Eine gewisse Krümmung des Metallkörpers ist möglich, wenn sie die optischen Messungen nicht behindert. Für gewöhnlich sind Krümmungen mit einem Radius von 1 mm oder mehr nicht problematisch. Je nach Punktgröße des Lichts (z. B. Laser) für die Bestrahlung kann die Krümmung auch kleiner sein. Eine Licht-/Laserpunktgröße von 10 µm erlaubt beispielsweise so begrenzte Krümmungen, dass die Oberfläche des Metallkörpers für kleine Krümmungsradien im mm-Bereich ausreichend eben ist. In einigen Ausführungsformen kann der Krümmungsradius mindestens das 50-Fache, vorzugsweise mindestens das 100-Fache der Dicke des Metallkörpers betragen. Beispielsweise kann der Krümmungsradius mindestens 0,5 mm, vorzugsweise mindestens 1 mm oder bevorzugter mindestens 2 mm betragen.

Die Nanopartikel können verschiedene Formen oder Größen im Nanometerbereich haben. Die Form kann isotrop oder anisotrop sein, wie kugelförmig, pyramidenförmig, ellipsenförmig, zylinderförmig usw. Die „Größe“ oder der „Durchmesser“ des Nanopartikels bezieht sich auf die Abmessung mit der längsten Ausdehnung. Die mittlere Größe oder der mittlere Durchmesser kann im Bereich von 10 nm bis

100 nm, z. B. vorzugsweise 15 nm bis 90 nm, 20 nm bis 80 nm, 25 nm bis 70 nm, 30 nm bis 60 nm, 35 nm bis 55 nm oder noch bevorzugter 40 nm bis 50 nm liegen. Vorzugsweise haben mindestens 50 % oder mindestens 75 % der Nanopartikel diese Größen oder Durchmesser, z. B. 10 nm bis 100 nm, z. B. bevorzugt 15 nm bis 90 nm, 20 nm bis 80 nm, 25 nm bis 70 nm, 30 nm bis 60 nm, 35 nm bis 55 m oder noch bevorzugter 40 nm bis 50 nm.

Die Nanopartikel können auch als „hergestellte Nanomaterialien“ bezeichnet werden, bei denen es sich um künstliche Nanomaterialien im Größenbereich von 1 nm bis 100 nm handelt, die vorzugsweise die oben genannten Formen und/oder Größen oder Durchmesser haben. Daher kann der Begriff „Nanopartikel“ in dieser Beschreibung auch durch „hergestelltes Nanomaterial“ ersetzt werden. „Hergestellte Nanomaterialien“ werden in einer Suspension gehalten. Solche Suspensionen können auf die Oberfläche des Metallkörpers aufgebracht werden, um die Nanomaterialien oder Nanopartikel abzuscheiden.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen aller Aspekte und anderer Ausführungsformen der Erfindung ist ein Teil der Nanopartikel in Kontakt mit anderen Nanopartikeln, wie 0,01 % oder mehr oder 0,1 % oder mehr der Nanopartikel, z. B. 0,1 % bis 30 % der Nanopartikel. Solche kontaktierenden Nanopartikel können Nanopartikelaggregate oder -agglomerate bilden, wie Nanopartikelmultimere und/oder Nanopartikel-Nanostäbchen. Vorzugsweise bilden mindestens 0,01 % oder mehr, vorzugsweise 0,1 % oder mehr der Nanopartikel Aggregate oder Agglomerate, wie Nanopartikelmultimere und/oder -Nanostäbchen. Einige Aggregate, Agglomerate, Multimere und/oder Nanostäbchen können in ihrer längsten Abmessung (Länge oder Durchmesser bei gleichmäßiger Form) eine Größe von mindestens 100 nm, vorzugsweise mindestens 120 nm oder mindestens 150 nm, haben. Vorzugsweise haben mindestens 1 % der Nanopartikelaggregate, -agglomerate, -multimere und/oder Nanopartikel-Nanostäbchen eine Größe in ihrer längsten Abmessung (Länge oder Durchmesser bei gleichmäßiger Form) von mindestens 100 nm, z. B. 100 nm bis 600 nm, vorzugsweise mindestens 120 nm. Die Nanopartikelaggregate, -agglomerate, -multimere und/oder Nanopartikel-Nanostäbchen in einem beliebigen der obigen Prozentsätze oder in einer Menge von mindestens 50 % der Nanopartikel, die in Nanopartikelaggregaten, -agglomeraten, -

multimeren und/oder Nanopartikel-Nanostäbchen vorliegen, können eine Größe von bis zu 600 nm, bis zu 500 nm, bis zu 400 nm, bis zu 300 nm, bis zu 200 nm haben. Solche kontaktierenden Nanopartikel, insbesondere die Aggregate, Agglomerate, Multimere und Nanostäbchen, erweitern das Resonanzspektrum und machen das Substrat für einen größeren Wellenlängenbereich reaktiv (Fig. 5). Beispielsweise kann die Aggregation oder Agglomeration den Spektralbereich der Absorbanz zum NIR-Spektralbereich (700 bis > 1000 nm) erhöhen. Vorzugsweise sind mindestens 0,01 %, bevorzugter mindestens 0,1 %, noch bevorzugter mindestens 1 % der Nanopartikel in Kontakt mit anderen Nanopartikeln, vorzugsweise um Nanopartikelmultimere und/oder -Nanostäbchen zu bilden.

Die Nanopartikel können aus jedem im Stand der Technik bekannten SERS-aktivem Material bestehen. Vorzugsweise weisen die Nanopartikel ein Edelmetall, wie vorzugsweise Gold oder Silber auf oder bestehen im Wesentlichen aus diesem.

Vorzugsweise weist der Metallkörper Aluminium oder Kupfer auf. Aluminium ist besonders bevorzugt, da es das Raman-Signal verstärken kann, da es über eine hohe Reflektivität und vorteilhafte Effekte der Nanopartikel verfügt. Das Raman-Signal kann durch Folgendes verstärkt werden: (i) Interagieren mit den aufgebrachtten Nanopartikeln und/oder (ii) Reflektieren und dadurch Verstärken des einfallenden Strahls von dem Raman-Laser durch die Nanopartikelschicht (zweifacher Durchlauf) und/oder (iii) Reflektieren und dadurch Verstärken des Raman-Signals. Ein Beispiel für ein solches Material ist eine Aluminiumfolie. Diese Eigenschaften tragen zu dem Signalverstärkenden Merkmal bei. Kupfer hat ähnliche Vorteile.

Vorzugsweise werden die Nanopartikel in einer solchen Menge abgeschieden, dass sich die meisten in einem Abstand voneinander (interpartikulärer Abstand) von etwa 0 nm bis 100 nm befinden. Dieser Abstand bezieht sich auf das zu einem gegebenen Nanopartikel nächstgelegene Nanopartikel. Insbesondere sind vorzugsweise mindestens 90 % der Nanopartikel in interpartikulären Abständen im Bereich von 0 nm bis 100 nm angeordnet. Vorzugsweise sind mindestens 90 % der Nanopartikel noch näher oder dichter in einem Abstand von 0 nm bis 60 nm angeordnet.

Die Nanopartikel können eine Schicht aus Nanopartikeln bilden. Diese Schicht kann eine bestimmte Dicke oder einen

bestimmten Dickenbereich haben, wie eine maximale Dicke von 10 Nanopartikeln oder 6 Nanopartikeln. Die Dicke kann variabel sein, da kleine Stellen auf der Oberfläche des Metallkörpers frei von einem Nanopartikel sein können, während andere mehrere Nanopartikel übereinander haben können, insbesondere wenn die Nanopartikel Aggregate bilden. Daher hat die Schicht aus Nanopartikeln vorzugsweise eine Dicke von 0 bis 6 Nanopartikeln. Diese variable Dicke kann an einer Oberfläche bei mindestens 1 mm² oder mindestens 2 mm², mindestens 3 mm², mindestens 5 mm² oder mehr auf dem Metallkörper oder an der oben erwähnten sogenannten aktiven Fläche liegen.

Die Nanopartikel oder zumindest ein Großteil davon sollten oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie(SERS)-aktiv sein, d. h. sie stellen im Vergleich zu der Raman-Spektroskopie ohne die Nanopartikel (ansonsten identische Spektroskopie) eine Raman-Signalverstärkung in der SERS bereit. Solche Partikel sind im Stand der Technik bekannt, wie z. B. in dem obigen Abschnitt zum allgemeinen Stand der Technik erläutert.

Vorzugsweise weist die Oberfläche des Metallkörpers 100 Mio. Nanopartikel/mm² bis 100000 Mio. Nanopartikel/mm², vorzugsweise 1000 Mio. Nanopartikel/mm² bis 10000 Mio. Nanopartikel/mm², noch bevorzugter 2000 Mio. Nanopartikel/mm² bis 3000 Mio. Nanopartikel/mm² oder noch mehr Nanopartikel auf. Höhere Mengen oder Dichten von Nanopartikeln verbessern den SERS-Effekt.

Vorzugsweise hat die Oberfläche mit den Nanopartikeln bei Bestrahlung im rechten Winkel zu der Oberfläche ein Reflexionsvermögen von mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 70 %, bei 785 nm, wobei die Reflexion im rechten Winkel zur Oberfläche ist. Ein höheres Reflexionsvermögen führt zu einem stärkeren Signal, da Licht zurück zu den Nanopartikeln reflektiert wird und daher die Nanopartikel zweimal durchlaufen kann (als einfallendes Licht und dann erneut als reflektiertes Licht). Dadurch wird die Erfassungsqualität jeder spektroskopischen Messung weiter verbessert. Das Reflexionsvermögen kann durch eine glatte Oberfläche und durch die Verwendung eines hochreflektierenden Materials verbessert werden. Glatte Aluminiumoberflächen sind eine gute Option für diesen Effekt.

Für einen guten spektroskopischen Aufbau ist das Volumen über der Oberfläche von jedem Teil des Substrats frei. Die Oberfläche

ist z. B. nicht die Innenfläche eines Rohrs oder dergleichen. Das Volumen über der Oberfläche bedeutet, dass dort spektroskopische Vorrichtungen platziert werden können, die reflektiertes und/oder gestreutes Licht, insbesondere ein Raman-Signal, von den Nanopartikeln und/oder einem darauf abgeschiedenen Analyten erfassen können. Bis zu einem Abstand von z. B. 0,5 cm oder noch mehr sollte ein freies Volumen über der Oberfläche mit den Nanopartikeln vorhanden sein.

Die Erfindung stellt ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Substrats gemäß der Erfindung bereit, welches Folgendes aufweist: Das Abscheiden einer Suspension aus Nanopartikeln in einem Dispersionsmedium auf einer Oberfläche eines Metallkörpers, wobei der Metallkörper unter der Oberfläche eine Dicke von mindestens 30 μm hat, wobei die Suspension in Mengen abgeschieden wird, die 100 Millionen (Mio.) Nanopartikel/ mm^2 bis 100000 Mio. Nanopartikel/ mm^2 der Oberfläche aufweisen; und das Entfernen des Dispersionsmediums, wobei die Nanopartikel auf der Oberfläche verbleiben. Natürlich können beliebige Parameter und Optionen, wie oben erörtert, auch auf das Herstellungsverfahren angewendet werden, wie etwa, dass der Metallkörper eine höhere Dicke haben kann, dass es eine größere Anzahl von Nanopartikeln geben kann, dass der Metallkörper aus einem wie oben erörterten Material sein kann usw. Bei dem Dispersionsmedium kann es sich um jedes für eine solche Nanopartikeldispersion geeignete Medium, wie Wasser, handeln. Das Medium kann einen Stabilisator, wie Citrat, haben. Der Stabilisator kann sich auf der Oberfläche befinden oder z. B. durch Waschen entfernt werden. Ein solches Verfahren ist im Grunde genommen ein Tropfenguss- oder Tropfendruckverfahren, wobei sich der Tropfen auf die Dispersion bezieht.

Vorzugsweise wird die Suspension aus Nanopartikeln in einem Gefäß mit Seitenwänden und/oder mit einer Höhe der abgeschiedenen Suspension von mindestens 0,1 mm auf die Oberfläche des Metallkörpers abgeschieden. Die Seitenwände ermöglichen die Abscheidung größerer Mengen der Dispersion in einem Schritt, um ein Überlaufen zu verhindern. Die Seitenwände können mit dem Metallkörper verbunden sein. Ein Beispiel ist ein Metallbecher, bei dem gegebenenfalls die Seitenwände aus dem gleichen Material wie der Metallkörper bestehen. Nach dem Abscheiden der Nanopartikel können solche Seitenwände entfernt werden, z. B. kann

der Boden eines Bechers ausgeschnitten werden.

Wie oben erwähnt, kann der Metallkörper in der Abmessung der Oberfläche größer als die aktive Fläche sein (Figur 4) oder nicht (Figur 3). Falls die Wärmesenke (Metallkörper) auf die aktive Fläche beschränkt ist (natürlich mit der beliebigen Dicke, wie oben erwähnt), kann die Schicht aus Nanopartikeln durch Tropfenguss auf einer großen Fläche von z. B. mehreren mm, cm oder Zoll Durchmesser durch Verdampfung des Dispersionsmediums aufgebracht werden. Einzelne aktive SERS-Elemente können durch Ausschneiden der beschichteten SERS-Substrate erhalten werden. Auf diese Weise kann eine homogene Beschichtung erhalten und die gesamte beschichtete Fläche genutzt werden (Figur 3). Das Volumen der signalverstärkenden Wärmesenke berechnet sich aus der Fläche der Schicht aus Nanopartikeln (z. B.: $(D1/2)^2 \times \pi$ mal die Dicke $T1$ der signalverstärkenden Wärmesenke). Dieses Volumen und seine resultierende Masse in Kombination mit seiner spezifischen Wärmekapazität verhindert eine Überhitzung des SERS-Substrats und des darauf aufgetragenen Analyten.

Falls die signalverstärkende Wärmesenke (Metallkörper) größer als die aktive Fläche ist (unabhängig von der Dicke, die, wie oben angegeben, beliebig sein kann), sollten bei der Herstellung spezifische Maßnahmen ergriffen werden, um ein Überlaufen der Nanomaterialien auf eine Fläche zu verhindern, die nur als Wärmesenke dient, um die Kosten zu senken. Die Nanomaterialien sind die teuerste Komponente. Um eine homogene Beschichtung zu erhalten, wird statt einzelner Tröpfchen eine große Fläche beschichtet. Es ist jedoch nicht wirtschaftlich, eine große Fläche zu beschichten und nur einen Bruchteil davon für die SERS zu verwenden. Alternativen wären Drucktechniken, um die Beschichtung auf eine kleine Fläche zu beschränken und eine größere signalverstärkende Wärmesenke zu verwenden (Figur 4). In diesem Fall berechnet sich die Wärmekapazität der signalverstärkenden Wärmesenke aus $L2 \times W2 \times T2$ mal die spezifische Wärmekapazität ihres Materials.

Die Erfindung kombiniert ein hochschwelliges Substrat mit einer einfachen, kostengünstigen Beschichtung (z. B. Tropfenguss). Die Nanopartikel können während der Abscheidung oder während der Lösungsmittelverdampfung Aggregate bilden. Hierfür kann ein kostengünstiges Tropfengussverfahren für große Flächen verwendet

werden.

Die Erfindung stellt ferner ein Spektroskopieverfahren bereit, das Folgendes aufweist: Das Bereitstellen eines Substrats der Erfindung; das Abscheiden einer Probe mit einem Analyten auf der Oberfläche des Substrats, welche die Nanopartikel aufweist; das Bestrahlen des Analyten auf dem Substrat mit Licht mit einer Wellenlänge von 200 bis 1200 nm, das Messen eines reflektierenden Lichts von dem Analyten. Das reflektierende Licht ist gegebenenfalls und vorzugsweise Streulicht, wie ein Raman-Signal.

Der Analyt kann z. B. in löslicher Form, z. B. in einem Lösungsmittel gelöst, abgeschieden werden. Vorzugsweise wird dann ein Lösungsmittel vor der Bestrahlung und optischen Messung entfernt. Beispielsweise kann ein Analyt in einem Lösungsmittel (Wasser, Ethanol usw. 0) gelöst, auf den Nanopartikeln abgeschieden und dann getrocknet werden.

Die Wellenlänge liegt vorzugsweise in den Bereichen von 400 nm bis 1200 nm, 400 nm bis 600 nm, 500 nm bis 700 nm, 600 nm bis 800 nm, 800 nm bis 1200 nm oder 1000 nm bis 1200 nm, wie 532 nm, 633 nm, 785 nm, 830 nm oder 1064 nm, oder in beliebigen Bereichen zwischen beliebigen dieser Werte.

Vorzugsweise erfolgt die Bestrahlung mit Licht mit einer Intensität von mindestens 1 kW/cm², vorzugsweise mindestens 1,5 kW/cm², mindestens 2 kW/cm², mindestens 2,5 kW/cm² oder mindestens 3 kW/cm² oder mehr, wie 3 kW/cm² bis 10 kW/cm², je nach durchschnittlicher Laserleistung und Punktgröße, die zwischen etwa 2 µm bis etwa 4000 µm, für gewöhnlich zwischen 10 µm bis 3000 µm oder etwa 50 µm bis 1500 µm variieren kann. Das erfinderische Substrat eignet sich für solche Lichtbehandlungen hoher Intensität, die in dem Substrat Wärme verursachen können. Diese Wärme kann abgeführt werden, wodurch eine niedrige Temperaturerhöhung auch bei Hochleistungslichtquellen, wie Lasern, aufrechterhalten wird. Alternativ oder in Kombination damit kann die Bestrahlung mit Licht (z. B. von einem Laser) mit einer Leistung von mindestens 200 mW für mindestens 1 s erfolgen. Die Lichtquelle/der Laser kann selbstverständlich leistungsstärker sein, wie ein Laser von mindestens 250 mW oder mindestens 300 mW, mindestens 400 mW, mindestens 500 mW oder noch schwächer (was auch dazu führen kann, dass Wärme durch die/den erfinderische(n) Wärmesenke/Metallkörper dispergiert wird), wie eine Leistung von

mindestens 150 mW oder mindestens 100 mW an mittlerer Laserleistung. Die Bestrahlungszeit kann mindestens 0,5 s, mindestens 1 s, mindestens 2 s, mindestens 3 s, mindestens 4 s, mindestens 5 s, mindestens 6 s, mindestens 8 s, mindestens 10 s, mindestens 12 s, mindestens 15 s, mindestens 20 s, mindestens 25 s, mindestens 30 s oder mehr und einen beliebigen Bereich zwischen diesen Werten, wie 0,5 s bis 5 s oder höher, z. B. bis zu 30 s oder bis zu 20 s betragen (insbesondere längere Bestrahlungszeiten mit schwächeren Lichtquellen und umgekehrt). Ein Beispiel ist eine Lichtquellenleistung von etwa 100 mW bis 400 mW und eine Bestrahlung für etwa 2 s bis 4 s, z. B. unter Verwendung eines Lasers mit einer Leistung von 300 mW und einer Exposition von 3 s. Im Falle der Aufnahme mehrerer Spektren zur Mittelwertbildung beträgt die gesamte Expositionszeit bis zu 20 s oder mehr. Die gesamte aufgebrachte Energie eines Lasers mit einer Leistung von 100 mW über 10 s beträgt somit 1 Ws. Möglich ist auch eine Bestrahlung mit Licht mit einer Leistung von mindestens 100 mW für mindestens 1 s, was einer Energie von mindestens 0,1 s entspricht. In bevorzugten Ausführungsformen beträgt die aufgebrachte Energie mindestens 0,1 Ws, vorzugsweise mindestens 0,2 Ws. Die aufgebrachte Energie ist die Energie der von dem Substrat absorbierten Licht- (Laser-) Strahlung.

Vorzugsweise erfolgt die Bestrahlung in einem Winkel zwischen einem Lichtstrahl und der Fläche der Oberfläche von mindestens 40° , vorzugsweise mindestens 60° . Steile Winkel, insbesondere mindestens 80° oder ein im Wesentlichen senkrechter Winkel, ermöglichen eine hohe Reflektivität und eine Sammlung von reflektiertem und gestreutem Licht, das nicht in die gleiche Richtung reflektiert wurde (siehe Figur 1).

Vorzugsweise ist ein Detektor für reflektiertes Licht konfiguriert, um Licht zu empfangen, das von der Oberfläche in einem Winkel von mindestens 40° , vorzugsweise mindestens 60° reflektiert wird; wobei vorzugsweise ein oder mehrere optische Elemente, wie z. B. vorzugsweise Spiegel oder optische Fasern, welche das Licht, das in dem Winkel von der Oberfläche reflektiert wird, zu dem Detektor führen (siehe Figur 1). „Konfiguriert“ bedeutet, dass das reflektierte Licht auf den Detektor gerichtet werden kann, wie durch einen Spiegel. Alternativ kann der Detektor in diesem Winkel angeordnet sein. Auf diese Weise kann er das Licht

von der Oberfläche empfangen, ohne der Notwendigkeit eines Spiegels.

Das erfinderische SERS-Substrat kann zur Erfassung und Charakterisierung (quantitative und qualitative Analytik) in verschiedenen Bereichen verwendet werden, einschließlich in der Biochemie, Forensik, Lebensmittelsicherheit, Bedrohungserkennung und medizinischen Diagnostik. Point-of-care(POC)-Vorrichtungen vor Ort übertreffen aufgrund der minimalen Probenvorbereitung möglicherweise ihre teuren laborgestützten Pendanten.

Das Substrat kann ein flexibles Substrat sein. Aus thermischen Gründen wird ein Substrat mit einer Dicke in der Größenordnung von 50 µm oder weniger bevorzugt. Dies ermöglicht immer noch eine ausgezeichnete Flexibilität, wenn es auf eine Klebefolie aufgebracht wird.

Das SERS-Substrat der Erfindung kann auf einen Träger, z. B. einen Träger aus Klebefolie, Papier, Kunststoff, Metall oder Glas, platziert werden. Die SERS-aktiven Substrate können zusammen mit einer Klebefolie auf einen Träger platziert und gegebenenfalls auf diesem Träger, z. B. durch einen Kleber, fixiert werden. Der Träger kann Papier, Kunststoff oder Glas sein. Der Träger kann eine ebene oder gekrümmte Oberfläche haben.

Das klebende SERS-Substrat der Erfindung ist mit einer 96-Well-Plattenkonstruktion kompatibel, um eine große Durchsatz-Charakterisierung zu unterstützen. Daher kann eine 96-Well-Platte als Träger verwendet werden.

Der Metallkörper mit den Nanopartikeln kann flexibel oder elastisch sein, z. B. durch Verwendung von flexiblem Material und/oder flexibler Dicke, wobei der Metallkörper seine Flexibilität beibehält. Die Flexibilität kann genutzt werden, um den Metallkörper mit einer Krümmung auszubilden, wie oben erwähnt, z. B. durch Anbringen des Metallkörpers an einem Träger, sodass der Metallkörper einer Krümmung des Trägers folgt.

Darüber hinaus kann auch ein Deckblatt, beispielsweise eine Deckfolie, obendrauf vorhanden sein. Fig. 9 zeigt einen Metallkörper (A) mit einer Schicht aus Nanopartikeln (B) auf einem Träger (C) und einem Deckblatt (D) obendrauf. Das Deckblatt kann Löcher oder Öffnungen haben, um den Zugang zu der Oberfläche mit den Nanopartikeln für optische Messungen und/oder für die Probenhandhabung zu ermöglichen (eine Analytprobe kann für

optische Messungen auf der Oberfläche platziert werden). Das Deckblatt kann einen Teil der Oberfläche, z. B. an ihrem Rand, überlappen und bedecken. Dies kann bei der Fixierung oder alleinigen Fixierung des Metallkörpers auf einem Träger helfen. Die Öffnungen können eine beliebige Form haben, die einen Zugang zu der Oberfläche ermöglicht, wie z. B. runde, kreisförmige oder quadratische Formen.

Basis für die Temperaturänderung und Wärmekapazität

Ein Körper erhöht seine Temperatur T auf $T_0 + \Delta T$ unter dem Einfluss der Laserstrahlung von dem Raman-Laser. Die absorbierte Laserenergie berechnet sich aus $Q = P \times t$, wobei P die mittlere Leistung des Raman-Lasers und t die Expositionszeit ist. Die quantitative Beziehung zwischen Wärmeübertragung und Temperaturänderung enthält alle drei Faktoren: $Q = mc\Delta T$, wobei Q das Symbol für die absorbierte Laserenergie ist, m die Masse der Substanz ist, und ΔT die Temperaturänderung ist. Das Symbol c steht für spezifische Wärme und ist abhängig von dem Material und der Phase. Diese Formel gibt somit die Temperaturerhöhung ΔT eines Volumens mit einer gegebenen Masse m und einer Wärmekapazität c an.

Die Temperaturänderung berechnet sich aus: $\Delta T = Q (1-R)/mc$ mit der Reflektivität des SERS-Substrats, welches die absorbierte Energie Q reduziert, wobei die Endtemperatur T zu den nachfolgenden Werten führt:

Raman-Laserleistung	Expositionszeit	Energie bei Reflektivität R=90 %	Oberfläche für Durchmesser von 5mm	Dicke	Volumen	Masse für Al mit 2,7 g/cm ³	Temperaturanstieg für Al mit c=0,9 Ws/g°C	Signalverstärkende Wärmesenke
P (W)	t (s)	Q (Ws)	A (cm ²)	d (cm)	V (cm ³)	g	ΔT (°C)	μm
0,3	3	0,09	0,20	0,0018	0,00035	0,0010	105	Haushaltsübliche Al-Folie mit 18 μ
0,3	3	0,09	0,20	0,0025	0,00049	0,0013	75	Professionelle Al-Folie mit 25 μ
0,3	3	0,09	0,20	0,005	0,00098	0,0026	38	SERS-Substrat mit 50 μ

Tabelle 1: Berechnung des Anstiegs der Temperatur des SERS-Substrats in verschiedenen Dicken der signalverstärkenden Wärmesenke unter der Annahme, dass während der Expositionszeit keine Wärme von dem SERS-Substrat weg übertragen wird. Dieses berechnete Modell berücksichtigt die Wärmeübertragung an die Umgebung nicht.

In der nachfolgenden Tabelle 2 werden verschiedene Auswahlkriterien für den Laser erläutert. Obwohl die Raman-Streuung bei kürzeren Wellenlängen am stärksten ist, kann die Autofluoreszenz die Erfassung stark behindern (Tabelle 2a). Dies ist der Hauptgrund, warum billige Papiersubstrate möglicherweise nicht nützlich sind. Sie sind durch die aufgebrachte Laserleistung auf zwei Arten begrenzt. Ihre Zerstörschwelle ist sehr niedrig und das Autofluoreszenzsignal steigt mit der Raman-Laserleistung dramatisch an. Obwohl Si-Detektoren im VIS-Bereich sehr gut funktionieren, sind grüne Laser komplexer als alle ihre längerwelligen Pendanten.

Eine weitere Schlussfolgerung gibt ein günstiges Fenster für einen einfachen Si-Detektor, gepaart mit einem Direktioden-Raman-Laser bei etwa 785 nm, wo sich die meisten Raman-Systeme konzentrieren (Tabelle 2b). Dies erfordert jedoch ein SERS-

Substrat mit einer angemessenen Zerstörschwelle, da mehr Laserleistung als im VIS-Bereich erforderlich ist. Bei 1064 nm, wo leistungsstärkere Laser erforderlich und verfügbar sind, ist eine noch höhere Zerstörschwelle des SERS-Substrats erforderlich. Die Erfindung ermöglicht daher effektive Anwendungen im NIR Wellenlängenbereich (Tabelle 2c).

Wellenlänge	Kurz	Mittel	Lang
Positiv: Raman-Streuung	Stark	Mittel	Schwach
Negativ: Autofluoreszenz	Stark	Mittel	Schwach
Bester Kompromiss	Sichtbar (532 nm)	NIR (785 nm)	NIR (1 064 nm)

Tabelle 2a: Eine starke Autofluoreszenz kann oft nicht durch ein stärkeres Raman-Signal aufgewogen werden. Daher sind mittlere bis lange Wellenlängen bevorzugt.

Wellenlänge	Kurz	Mittel	Lang
Detektor auf Si-Basis	Ausgezeichnet	Gut	Schlecht bis nicht - erfordert InGaAs
Raman-Laser	Am Komplexesten - Diode + Laser + Umwandlung	Am kostengünstigsten: Direkte Diode	Komplex - Diode + Laser
Beste Wahl	Sichtbar (532 nm)	NIR (785 nm)	NIR (1 064 nm)

Tabelle 2b: 785 nm bietet das einmalige Fenster, einen Diodenlaser direkt in Kombination mit einem kostengünstigen Detektor auf Si-Basis zu verwenden.

Wellenlänge	Kurz	Mittel bis lang
Erforderliche Laserleistung	Niedrig	Mittel bis hoch
Erforderliche Zerstörschwelle	Niedrig - papierbasierte SERS- Substrate	Mittel bis hoch Gebiet der Erfindung
Beste Wahl	Sichtbar (532 nm)	NIR (785 bis 1 064 nm)

Tabelle 2c: Die Erfindung ermöglicht die Verwendung eines leistungsfähigen Lasers im NIR-Wellenlängenbereich.

Ein SERS-Substrat mit hoher Zerstörschwelle für den NIR-Bereich verwendet einen Metallkörper als signalverstärkende Wärmesenke mit einer Masse, welche Folgendes kann:

- a. Absorbieren der Leistung des Raman-Lasers von 300 mW für >2 s (z. B. Al, 50 μm dick)
- b. Aufrechterhalten einer Zerstörschwelle von >2 kW/cm² (z. B.: 300 mW an einem Punkt von $1/e^2 = 200$ μm)
- c. Verhindern einer Überhitzung des Analyten (z. B. Begrenzen des Anstiegs seiner Temperatur auf <50 °C).

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung des SERS-Substrats

Der Basiskörper aus Metall wird aus dem Boden eines Einweg-Aluminiumbechers (Al-Becher, rund mit flachem Boden, 45 ml, \varnothing 25 bis 70 mm x 23 mm) mit der gewünschten Dicke der unteren Basis (z. B. 50 μm bis 500 μm) gebildet.

Der Al-Becher wird mit 70 % Alkohol und Aceton p.a. gereinigt. Goldnanosphären (Au-NP) werden in einer Suspension mit Citrat als Stabilisator bereitgestellt (Handelsprodukt, HighQuant (Phornano), 0,8 mg/ml, Durchmesser 40 nm, etwa $1,20E + 12$ NP/ml). 1 ml der Au-NP-Suspension wird in den Becher gefüllt, um dessen flachen Boden zu bedecken (Bodendurchmesser 2,5 cm; Füllhöhe etwa 2 mm). Die Suspension wird etwa 3 Stunden bei 50 °C getrocknet. Als Ergebnis bleibt eine Schicht Au-NPs zurück. Au-NPs bilden im Durchschnitt etwa 3 bis 5 Schichten am Boden. Bei höheren Packungen wären 3 Schichten mit sechseckiger Packung zu erwarten. Dies entspräche einer Dicke von > 100 nm bei dichter Packung. In Fig.

6 ist die Packung zufällig und somit kann die Schicht an einigen Stellen dicker sein. Zur vollständigen Entfernung von Feuchtigkeit werden weitere 72 Stunden empfohlen.

Anschließend wird der flache Boden ausgeschnitten und in Scheiben von 6 mm gestanzt. Diese Scheiben werden anschließend auf einen klebenden Kunststoffträger aufgeklebt und bilden die aktiven SERS-empfindlichen Punkte. Abschließend wird die Deckfolie (Polyethylenlaminat) mit 8 Löchern von 5 mm Durchmesser auf den transparenten Streifen aufgeklebt. Der Abstand zwischen den Mitten der Löcher beträgt 9 mm, kompatibel mit einer 96-Well-Platte.

Das Endprodukt bietet mehrere aktive SERS-empfindliche Scheiben (Punkte) auf einem flexiblen, klebenden Träger. Obendrauf befindet sich ein Deckblatt mit 5 mm freier Öffnung für jeden aktiven SERS-empfindlichen Punkt. Diese Anordnung wird auch als Streifen bezeichnet. Auf die Oberseite des Streifens wird ein Deckblatt mit Löchern, die kleiner als die Öffnungen sind, aufgeklebt, um eine fixierende Überlappung zu schaffen, welche die offene Öffnung der SERS-empfindlichen Punkte definiert und außerdem den Metallkörper auf dem Träger sichert. Andere Beispiele für einen Träger sind ein Mikroskopie-Objektträger oder ein starres oder flexibles Material oder eine Folie, die ein- oder beidseitig klebend sein kann.

Beispiel 2: Erhöhte Absorbanz in Richtung der NIR-Region

Die Absorbanz basiert auf der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) der Nanopartikel. Während des Tropfengussverfahrens bilden Nanopartikel eine Schicht und aggregieren teilweise. Dies ermöglicht es, das Absorbanzspektrum von einer Spitze in der sichtbaren Region in Richtung der gesamten NIR-Region zu erweitern, wodurch sich die Absorption von 530 nm auf 785 bis 1 064 nm erstreckt (Figur 5).

Die im Allgemeinen sphärischen Nanopartikel neigen dazu, während des Tropfengussverfahrens zu aggregieren und daher größere Aggregate zu bilden. Infolgedessen verschiebt sich die Spitze der LSPR-Absorbanz von der sichtbaren Region zu der NIR-Region und eine deutliche LSPR-Spitze wird zu einer gesamten Region modifiziert, in welcher das SERS-Substrat hochabsorbierend ist (Figur 6). Diese Ergebnisse stimmen mit einer LSPR-Reaktion überein, die bei einer Mischung aus kleineren und größeren Nanopartikeln sowie Nanostäbchen beobachtet wurde.

Beispiel 3: Zerstörschwelle

Die Zerstörschwelle wurde aus den Ergebnissen unter Verwendung von bis zu 373 mW Laserleistung und einer Punktgröße von 160 μm ($1/e^2$) bestimmt. Selbst bei einer maximalen Laserleistung von 373 mW war weder eine Schädigung noch eine Hysterese in dem Ergebnis zu beobachten. Es kann festgehalten werden, dass die Zerstörschwelle jenseits der maximal erreichten Leistungsdichte liegt. Aus diesen Werten wurde unter der Annahme eines Gaußschen Strahls eine Intensität von $>3 \text{ kW/cm}^2$ berechnet, ohne dass es Anzeichen einer Schädigung des SERS-Substrats oder des Signals durch Degeneration des Analyten gab.

Beispiel 4: Thermische Eigenschaften der SERS-Substrate

Raman-Laserleistung	Expositionszeit	Laserwellenlänge	Oberfläche bei 5 mm Durchmesser	Dicke	Volumen	Masse für Al mit 2,7 g/cm ³	Temperaturanstieg für Al mit c=0,9 Ws/g°C	Dicke der signalverstärkenden Wärmesenke
P (W)	t (s)	nm	A (cm ²)	d (cm)	V (cm ³)	g	ΔT (°C)	μm
0,35	10*)	785 nm	0,20	0,002	0,00039	0,0011	55	20
0,35	10*)	1 064 nm	0,20	0,002	0,00039	0,0011	42	20
0,35	10*)	785 nm	0,20	0,004	0,00079	0,0021	11	40
0,35	10*)	1 064 nm	0,20	0,004	0,00079	0,0021	16	40

Tabelle 3: Gemessener Temperaturanstieg nach Laserbestrahlung des SERS-Substrats.

*) Dauerzustandssituation: Die Temperatur hat sich aufgrund des Gleichgewichts zwischen aufgebrachtener Energie und Energie, die in die Umgebung transportiert (konvektiert und abgestrahlt) wird, stabilisiert.

Die Temperaturanstiege wurden mit einer Wärmekamera gemessen. Die Auflösung der Kamera betrug $\gg 100 \mu\text{m}$ und die Temperatur wurde über diese Auflösungsgröße gemittelt. Kleinere heißere Wärmespitzen $<100 \mu\text{m}$ sind mit den vergleichsweise kleinen Wärmesenken mit einer Dicke von 20 μm möglich, wenn die Kamera den Temperaturanstieg von 55 °C erfasst. Die dickere Wärmesenke transportiert die Wärme viel besser auf das gesamte Volumen und nutzt die gesamte Oberfläche besser zur Wärmeübertragung, wodurch

eine heiße Stelle vermieden wird. Das dünnere Substrat verursacht aufgrund der geringen Wärmekapazität und der schlechten Wärmeübertragung an seinen Rand eine heiße Stelle bei etwa 70 bis 85 °C.

Beispiel 5: Messungen des Analyten (Melamin)

Eine Probe von Melamin in Wasser (10 µl, 0,5 ppm) wurde auf dem SERS-Substrat platziert. Das Lösungsmittel (Wasser) wurde verdampft, wobei eine trockene Oberfläche für Raman-Messungen zurückblieb.

Mit ihrer außergewöhnlich hohen Zerstörschwelle von $>3 \text{ kw/cm}^2$ zeigten die SERS-Substrate nach mehrfachen Hoch- und Runterfahrzyklen der Laserleistung keine Anzeichen von Degradation oder Hysterese, selbst wenn die volle Leistung eines $>400 \text{ mW}$ Raman-Lasers aufgebracht wurde, um das stärkstmögliche Raman-Signal zu erhalten (Fig. 7).

Die hergestellten SERS-Substrate verbesserten die punktweise Wiederholbarkeit und damit Geschwindigkeit, Kosten und Zuverlässigkeit der Messungen signifikant. Figur 8: punktweise Abweichung des Raman-Signals von $<12 \%$ (Punkte D, E und F). Zum Vergleich sind die „sauberen“ Punkte Hintergrundkontrollen ohne Melamin. Die Erfassung bei 0,5 ppm Melamin in Wasser lag nahe, aber oberhalb der Erfassungsgrenze (Figur 8).

Es wurde beobachtet, dass es möglich ist, die Leistung des Raman-Lasers zu erhöhen, ohne das SERS-Substrat zu schädigen und ohne den Analyten extremen Temperaturen auszusetzen.

In der gesamten vorliegenden Offenbarung werden die Artikel „ein“, „eine“ und „der“, „die“, „das“ hierin verwendet, um sich auf einen oder mehrere (d. h. auf mindestens einen) des grammatikalischen Objekts des Artikels zu beziehen.

Wie hierin verwendet, beziehen sich Näherungswörter wie, ohne Einschränkung, „etwa“, „wesentlich“ oder „im Wesentlichen“ auf eine Bedingung, die, wenn sie so modifiziert wird, nicht notwendigerweise als absolut oder perfekt zu verstehen ist, aber von dem Fachmann als nahe genug verstanden würde, um die Bezeichnung des Zustandes als vorliegend zu rechtfertigen. Der Umfang, in welchem die Beschreibung variieren kann, hängt davon ab, wie groß eine Änderung sein kann, und ob ein Fachmann dennoch erkennen wird, dass das modifizierte Merkmal immer noch die

erforderlichen Eigenschaften und Fähigkeiten des nicht modifizierten Merkmals hat. Im Allgemeinen, jedoch vorbehaltlich der vorhergehenden Erörterung, kann hierin ein numerischer Wert, der durch ein Näherungswort wie „etwa“ modifiziert wird, von dem angegebenen Wert um z. B. $\pm 10\%$ variieren.

Wie hierin verwendet, sind die Wörter „aufweisend“ (und jede Form von aufweisen, wie „weisen auf“ und „weist auf“), „habend“ (und jede Form von haben, wie „haben“ und „hat“), „einschließlich“ (und jede Form von einschließen, wie „schließt ein“ und „schließen ein“) oder „enthaltend“ (und jede Form von enthalten, wie „enthält“ und „enthalten“) mitinbegriffen oder offen und schließen zusätzliche, nicht aufgeführte Elemente oder Verfahrensschritte nicht aus. Die „aufweisend“-Ausdrücke, wenn sie für ein Element in Verbindung mit einem numerischen Bereich eines bestimmten Wertes dieses Elements verwendet werden, bedeuten, dass das Element auf diesen Bereich beschränkt ist, und „aufweisend“ bezieht sich auf das optionale Vorhandensein anderer Elemente. Beispielsweise kann das Element mit einem Bereich einer impliziten Bedingung unterliegen, welche das Vorhandensein dieses Elements in einer Menge außerhalb dieses Bereichs ausschließt. Wie hierin verwendet, erfordert der Ausdruck „im Wesentlichen bestehend aus“ die angegebene(n) ganze(n) Zahl(en) oder Schritte sowie solche, welche den Charakter oder die Funktion der beanspruchten Erfindung nicht erheblich beeinflussen. Wie hierin verwendet, wird der geschlossene Begriff „bestehend“ nur verwendet, um das Vorhandensein der genannten Elemente anzuzeigen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Substrat, aufweisend einen Metallkörper und eine auf einer Oberfläche des Metallkörpers angeordnete Schicht aus Nanopartikeln, wobei die Nanopartikel einen mittleren Durchmesser oder eine mittlere Größe von 10 nm bis 100 nm haben und wobei der Metallkörper unter besagter Oberfläche mit den Nanopartikeln eine Dicke von mindestens 30 μm hat.
2. Substrat nach Anspruch 1, wobei die Oberfläche des Metallkörpers ein Metalloxid, vorzugsweise Aluminiumoxid, aufweist.
3. Substrat nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Oberfläche eine flache Oberfläche in einer angrenzenden Fläche von mindestens 1 mm^2 ist und/oder keine nanostrukturierte Oberfläche des Metallkörpers ist, wobei die nanostrukturierte Oberfläche durch Vertiefungen oder Erhöhungen mit einem Mittenabstand von mindestens 100 nm und mit einer Tiefe bzw. Höhe von mindestens 10 nm gebildet ist.
4. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens 0,01 % der Nanopartikel Aggregate oder Agglomerate bilden, wie Nanopartikelmultimere und/oder Nanostäbchen, vorzugsweise Aggregate oder Agglomerate mit einer Größe in ihrer längsten Abmessung von mindestens 100 nm.
5. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nanopartikel aus einem Edelmetall, vorzugsweise Gold oder Silber, bestehen.
6. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Metallkörper Aluminium oder Kupfer aufweist.
7. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei mindestens 90 % der Nanopartikel in interpartikulären Abständen im Bereich von 0 nm bis 100 nm angeordnet sind.
8. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Schicht aus Nanopartikeln eine Dicke von 0 bis 6 Nanopartikeln auf einer Oberfläche von mindestens 1 mm^2 auf dem Metallkörper hat.
9. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die

Nanopartikel oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)-aktiv sind.

10. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei mindestens 0,1 % der Nanopartikel in Kontakt mit anderen Nanopartikeln sind.

11. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Oberfläche 100 Mio. Nanopartikel/mm² bis 100000 Mio. Nanopartikel/mm² aufweist.

12. Substrat nach Anspruch 11, wobei die Oberfläche 2000 Mio. Nanopartikel/mm² bis 10 000 Mio. Nanopartikel/mm² aufweist.

13. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Volumen über der Oberfläche von einem beliebigen Teil des Substrats frei ist.

14. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Substrat flexibel oder elastisch ist.

15. Verfahren zur Herstellung eines Substrats nach einem der Ansprüche 1 bis 14, aufweisend das Abscheiden einer Suspension aus Nanopartikeln in einem Dispersionsmedium auf einer Oberfläche eines Metallkörpers, wobei der Metallkörper unter der Oberfläche eine Dicke von mindestens 30 µm hat, wobei die Suspension in Mengen abgeschieden wird, die 100 Mio. Nanopartikel/mm² bis 100000 Mio. Nanopartikel/mm² der Oberfläche aufweisen, und das Entfernen des Dispersionsmediums, wobei die Nanopartikel auf der Oberfläche verbleiben.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Suspension aus Nanopartikeln auf der Oberfläche des Metallkörpers in einem Gefäß mit Seitenwänden und/oder mit einer Höhe der abgeschiedenen Suspension von mindestens 0,1 mm abgeschieden wird.

17. Spektroskopieverfahren, aufweisend das Bereitstellen eines Substrats nach einem der Ansprüche 1 bis 14, das Abscheiden eines die Nanopartikel aufweisenden Analyten auf der Oberfläche des Substrats, das Bestrahlen des Analyten auf dem Substrat mit Licht mit einer Wellenlänge von 200 bis 1200 nm, das Messen eines reflektierenden Lichts von dem Analyten, wobei das reflektierende Licht vorzugsweise Streulicht ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Bestrahlung mit Licht mit einer Intensität von mindestens 1 kW/cm^2 erfolgt und/oder die aufgebrachte Energie mindestens $0,1 \text{ Ws}$ beträgt und/oder eine Bestrahlung mit Licht von einem Laser mit einer Leistung von mindestens 100 mW für mindestens 1 s .

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Bestrahlung in einem Winkel zwischen einem Lichtstrahl und der Fläche der Oberfläche von mindestens 40° , vorzugsweise mindestens 60° , erfolgt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei ein Detektor für reflektiertes Licht konfiguriert ist, um Licht, das in einem Winkel von mindestens 40° , vorzugsweise mindestens 60° von der Oberfläche reflektiert wird, zu empfangen; wobei vorzugsweise ein oder mehrere optische Elemente, vorzugsweise ein oder mehrere Spiegel oder eine oder mehrere optische Faser(n), das Licht, das in dem Winkel von der Oberfläche reflektiert wird, zu dem Detektor leiten.

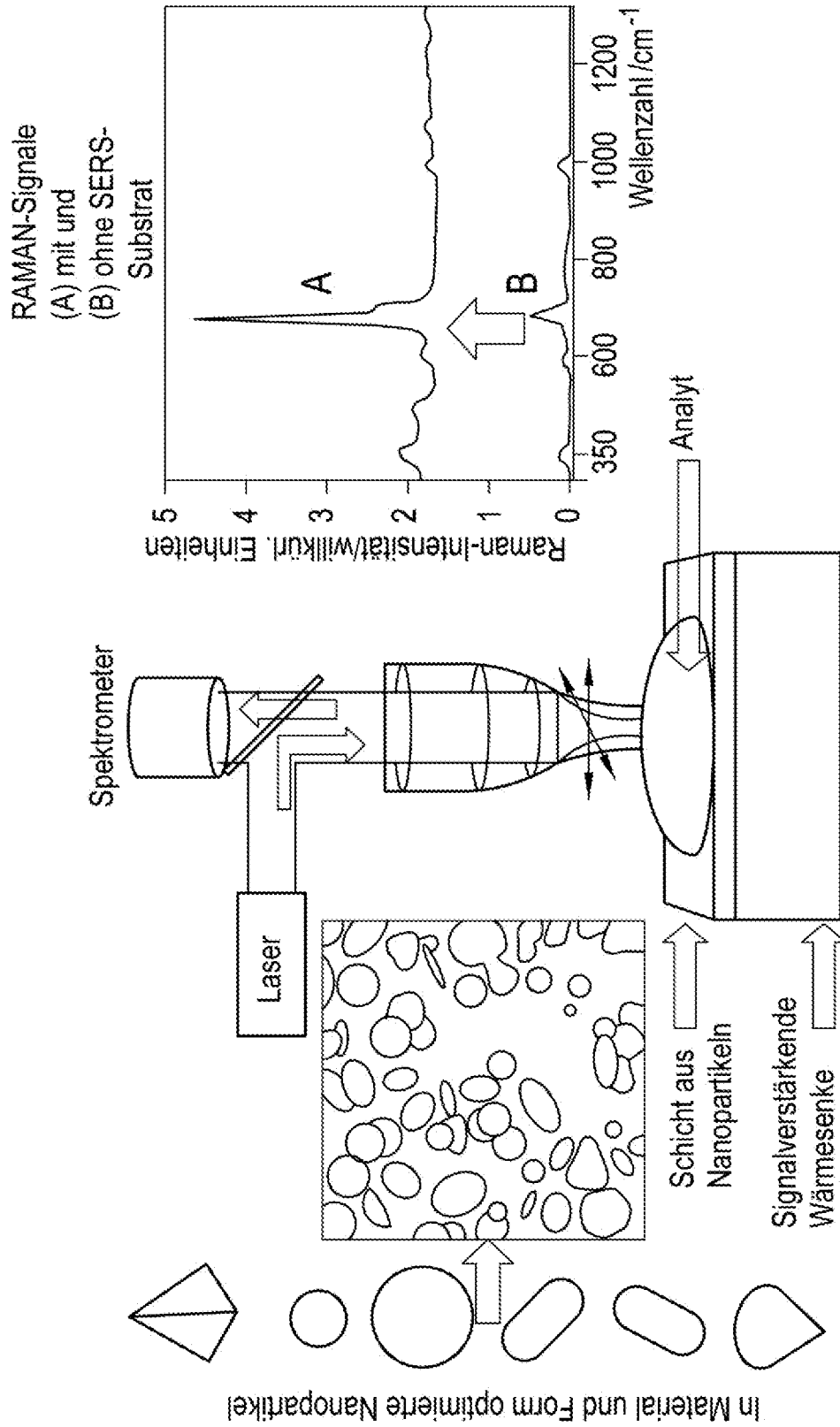


Fig. 1

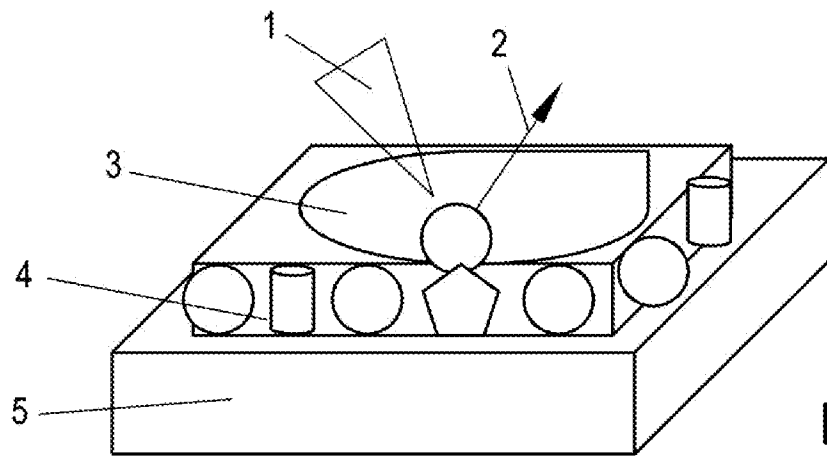


Fig. 2

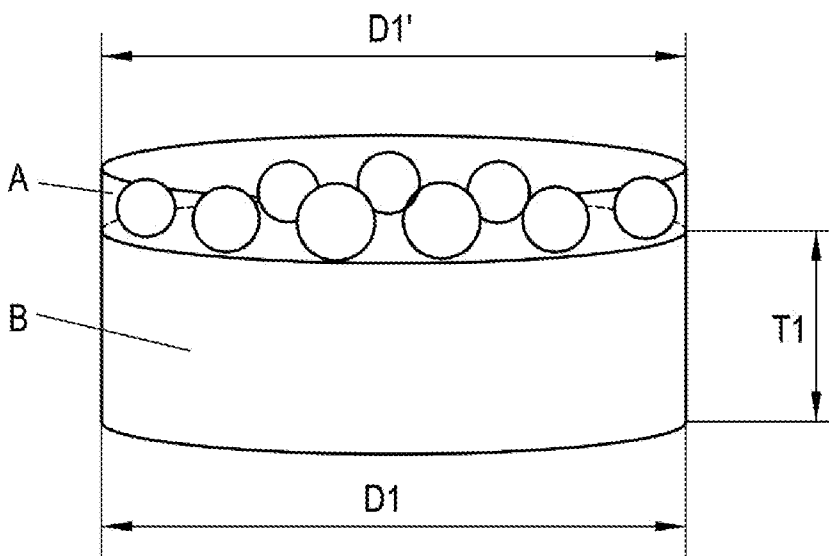


Fig. 3

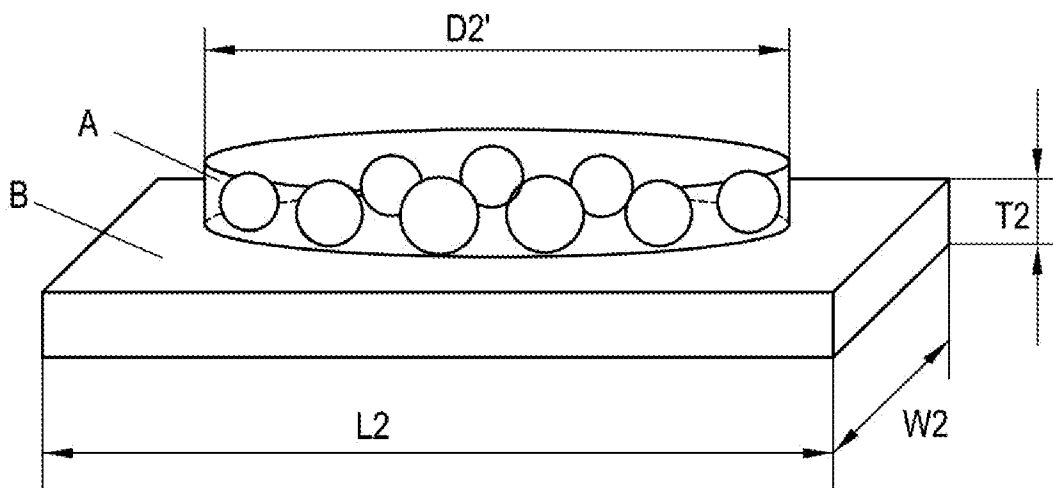


Fig. 4

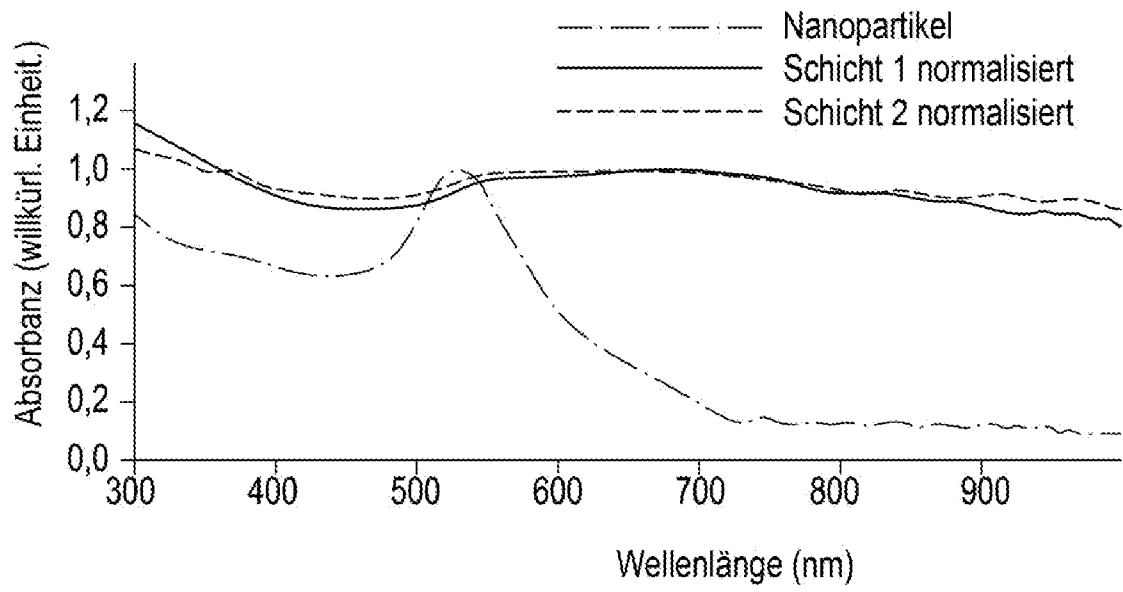


Fig. 5

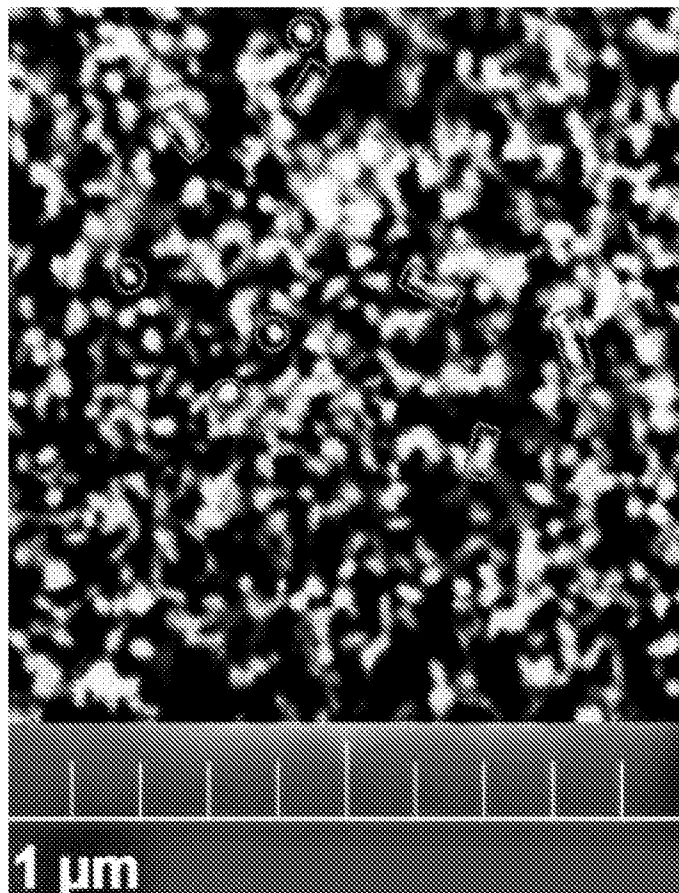


Fig. 6

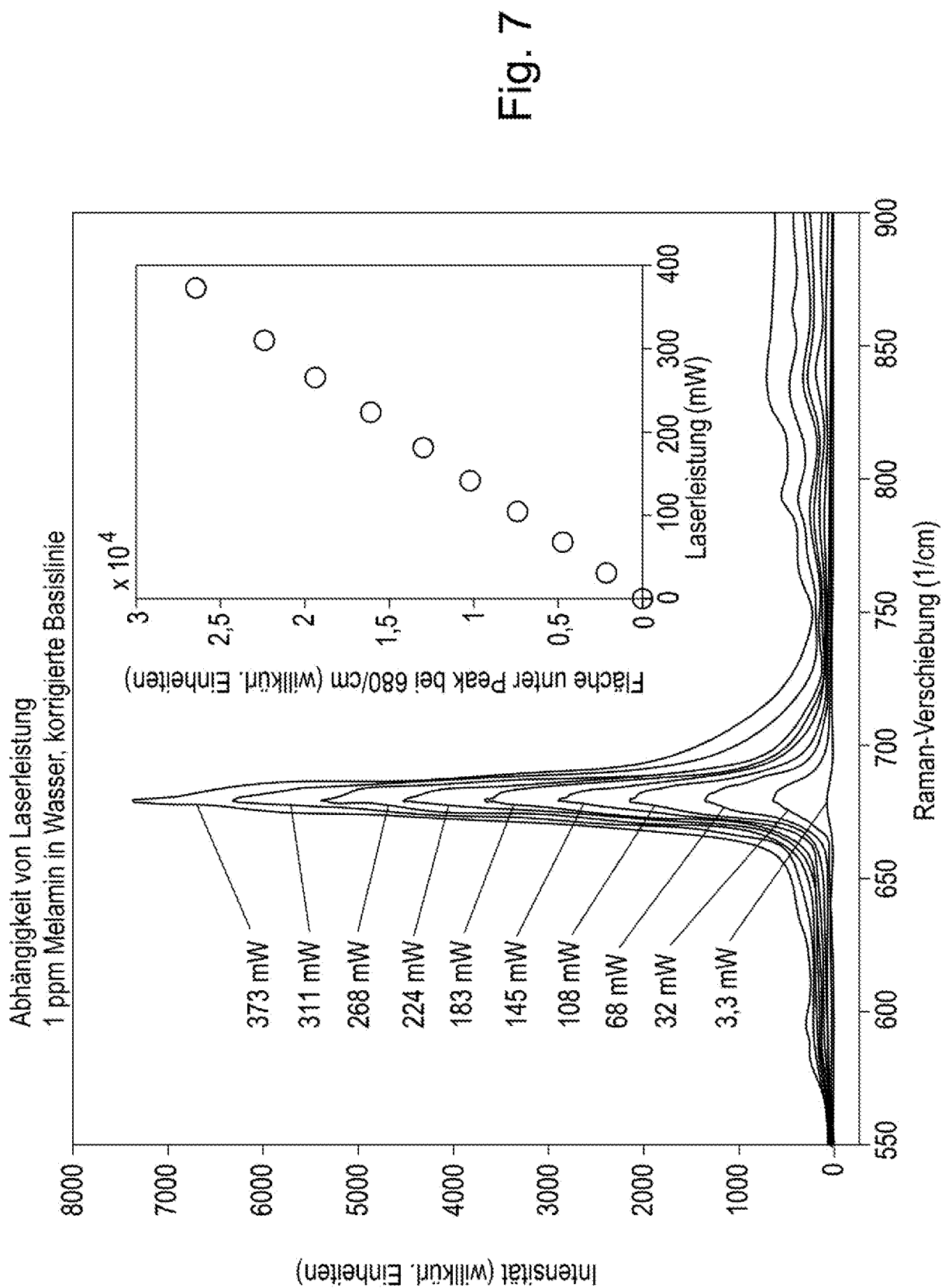


Fig. 7

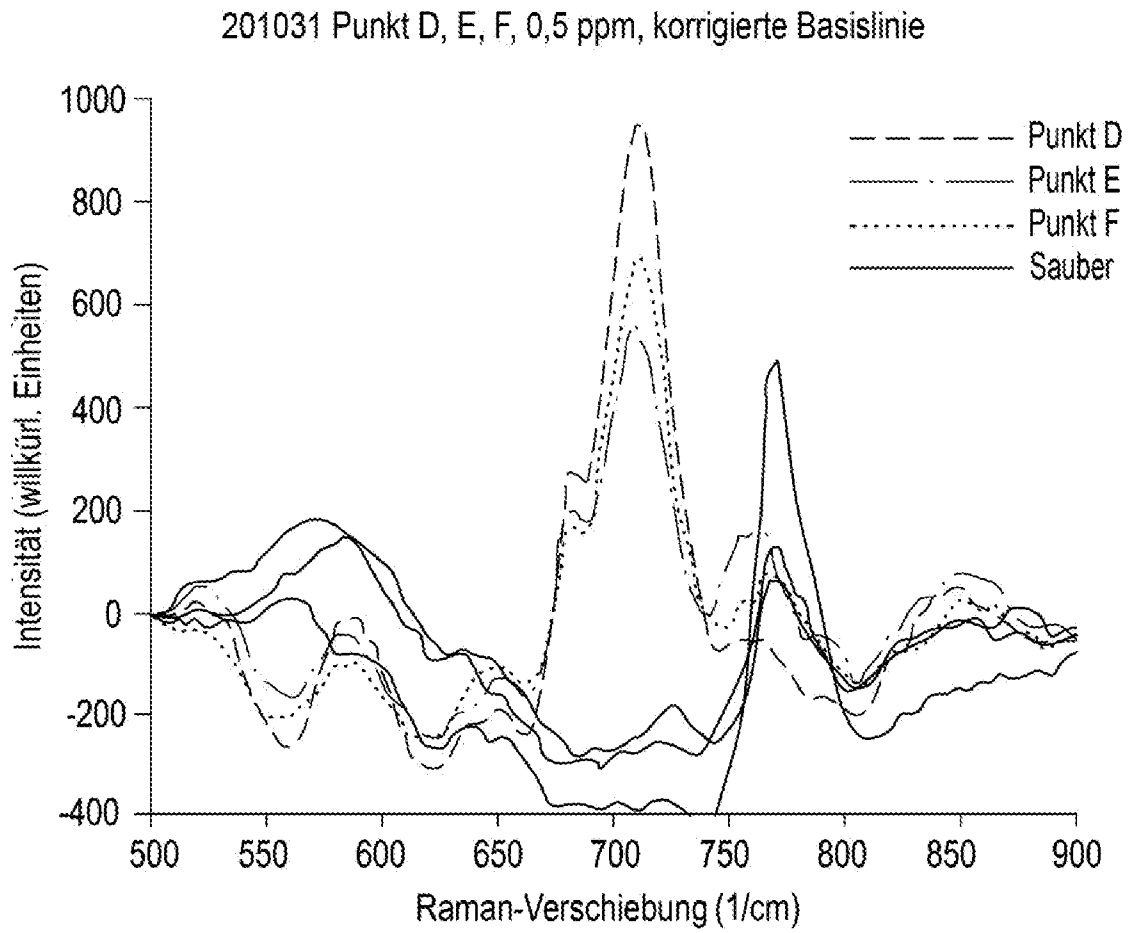


Fig. 8

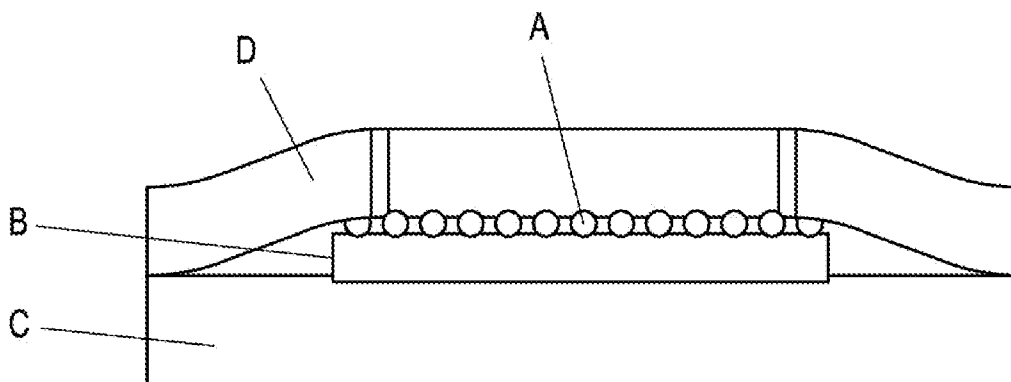


Fig. 9

PATENTANSPRÜCHE

1. Substrat, aufweisend einen Metallkörper und eine auf einer Oberfläche des Metallkörpers angeordnete Schicht aus Nanopartikeln, wobei die Nanopartikel einen mittleren Durchmesser oder eine mittlere Größe von 10 nm bis 100 nm haben und wobei der Metallkörper unter besagter Oberfläche eine Dicke von 30 μm bis 500 μm hat, und wobei die Oberfläche eine flache Oberfläche in einer angrenzenden Fläche von mindestens 1 mm^2 ist und/oder keine nanostrukturierte Oberfläche des Metallkörpers ist, wobei die nanostrukturierte Oberfläche durch Vertiefungen oder Erhöhungen mit einem Mittenabstand von mindestens 100 nm und mit einer Tiefe bzw. Höhe von mindestens 10 nm gebildet ist.
2. Substrat nach Anspruch 1, wobei die Oberfläche des Metallkörpers ein Metalloxid aufweist.
3. Substrat nach Anspruch 2, wobei das Metalloxid Aluminiumoxid ist.
4. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens 0,01 % der Nanopartikel Aggregate oder Agglomerate bilden, wie Nanopartikelmultimere und/oder Nanostäbchen, vorzugsweise Aggregate oder Agglomerate mit einer Größe in ihrer längsten Abmessung von mindestens 100 nm.
5. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nanopartikel aus einem Edelmetall, vorzugsweise Gold oder Silber, bestehen.
6. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Metallkörper Aluminium oder Kupfer aufweist.
7. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei mindestens 90 % der Nanopartikel in interpartikulären Abständen im Bereich von 0 nm bis 100 nm angeordnet sind.
8. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Schicht aus Nanopartikeln eine Dicke von 0 bis 6 Nanopartikeln auf einer Oberfläche von mindestens 1 mm^2 auf dem Metallkörper hat.
9. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die

Nanopartikel oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)-aktiv sind.

10. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei mindestens 0,1 % der Nanopartikel in Kontakt mit anderen Nanopartikeln sind.

11. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Oberfläche 100 Mio. Nanopartikel/mm² bis 100000 Mio. Nanopartikel/mm² aufweist.

12. Substrat nach Anspruch 11, wobei die Oberfläche 2000 Mio. Nanopartikel/mm² bis 10000 Mio. Nanopartikel/mm² aufweist.

13. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Volumen über der Oberfläche von einem beliebigen Teil des Substrats frei ist.

14. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Substrat flexibel oder elastisch ist.

15. Verfahren zur Herstellung eines Substrats nach einem der Ansprüche 1 bis 14, aufweisend das Abscheiden einer Suspension aus Nanopartikeln in einem Dispersionsmedium auf einer Oberfläche eines Metallkörpers, wobei der Metallkörper unter der Oberfläche eine Dicke von 30 µm bis 500 µm hat, wobei die Suspension in Mengen abgeschieden wird, die 100 Mio. Nanopartikel/mm² bis 100000 Mio. Nanopartikel/mm² der Oberfläche aufweisen, und das Entfernen des Dispersionsmediums, wobei die Nanopartikel auf der Oberfläche verbleiben.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Suspension aus Nanopartikeln auf der Oberfläche des Metallkörpers in einem Gefäß mit Seitenwänden und/oder mit einer Höhe der abgeschiedenen Suspension von mindestens 0,1 mm abgeschieden wird.

17. Spektroskopieverfahren, aufweisend das Bereitstellen eines Substrats nach einem der Ansprüche 1 bis 14, das Abscheiden eines die Nanopartikel aufweisenden Analyten auf der Oberfläche des Substrats, das Bestrahlen des Analyten auf dem Substrat mit Licht mit einer Wellenlänge von 200 bis 1200 nm, das Messen eines reflektierenden Lichts von dem Analyten, wobei das reflektierende Licht vorzugsweise Streulicht ist.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Bestrahlung mit Licht mit einer Intensität von mindestens 1 kW/cm^2 erfolgt und/oder die aufgebrachte Energie mindestens $0,1 \text{ Ws}$ beträgt und/oder eine Bestrahlung mit Licht von einem Laser mit einer Leistung von mindestens 100 mW für mindestens 1 s .

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Bestrahlung in einem Winkel zwischen einem Lichtstrahl und der Fläche der Oberfläche von mindestens 40° , vorzugsweise mindestens 60° , erfolgt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei ein Detektor für reflektiertes Licht konfiguriert ist, um Licht, das in einem Winkel von mindestens 40° , vorzugsweise mindestens 60° von der Oberfläche reflektiert wird, zu empfangen; wobei vorzugsweise ein oder mehrere optische Elemente, vorzugsweise ein oder mehrere Spiegel oder eine oder mehrere optische Faser(n), das Licht, das in dem Winkel von der Oberfläche reflektiert wird, zu dem Detektor leiten.