

C. 西北大学研究情况

美国西北大学的 Van Duyne 教授等利用 SERS 开展了芥子气(HD)、炭疽杆菌生物标记分子的快速探测、活体葡萄糖实时传感器的研究工作^[99,100,124]。在炭疽探测方面, Van Duyne 等采用 AgFON 作 SERS 基底, 通过对一种炭疽杆菌孢子生物标记物(Biomarker) CaDPA (Calcium dipicolinate) 的探测实现了 2.6×10^3 个炭疽杆菌孢子的探测限(limit of detection, LOD), 并在该探测限以 11 分钟的响应时间成功地实现了低于致病限(10^4 个孢子)的快速探测^[100]; 在葡萄糖实时探测方面, 由于糖尿病是一种慢性病, 需要对糖尿病人体内葡萄糖进行长期的监控。传统的指尖血液采样法由于不能实现连续监测, 可能导致对葡萄糖大幅波动的失败观察, 从而不能及时抢救病人, 因而需要发展可植入体内的生物传感器。目前最先进的商业葡萄糖传感器采用葡萄糖氧化酶的电化学间接测量实现, 由于葡萄糖氧化酶的损耗, 该传感器寿命有限, 而且酶的固有属性也导致该类传感器缺乏稳定性。因而 Van Duyne 等^[124]采用 SERS 传感机制发展实时嵌入式葡萄糖传感器, 并以 8s 和 28s 的响应时间分别对水溶液中的葡萄糖和牛血液中的葡萄糖实现了实时探测; 在芥子气(HD)探测方面, 气相色谱-质谱法(Gas chromatography-mass spectroscopy, GC-MS)具有操作复杂、价格昂贵、不方便携带的缺点, 而美国军方使用的化学试纸又具有灵敏度低、特异性差的劣势; IMS (Ion-mobility spectrometry) 法所获得的化学信息十分有限, 同时在远程传感方面不具有优势, 而采用 SERS 传感机制探测 HD 将克服上述缺点, 提高性价比。因此包括 Van Duyne 在内的几个团队都对 SERS 探测 HD 开展了研究。Van Duyne 团队^[99]在 2006 年, 研究了 HD 模仿物 CEES (2-chloroethyl ethyl sulfide) 的蒸汽相探测和探测仪器的便携化, 并将气相芥子气的实时探测作为长远研究目标。

2.4 针尖增强拉曼光谱技术 (TERS)

由于受光学衍射的限制, 拉曼光谱技术即使在理想条件下其空间分辨率也无法优于激发光的半波长 $\lambda/2$ 。为解决这一在拉曼光谱技术中似乎无法克服的问题, 世界上不同国家的几个小组都于 2000 年利用不同的扫描探针显微技术 (scanning probe microscopy, SPM) 和拉曼光谱联用, 不但获得较高的空间分辨率, 而且还可以得到用扫描近场光学显微 (scanning near-field microscopy, SNOM)

技术难以得到的高检测灵敏度^[195-199]。针尖增强拉曼光谱技术 (tip enhanced Raman spectroscopy, 简称为TERS), 因为是利用SPM针尖使样品的信号得到增强而得名, 相对于SERS来说TERS技术还是一个全新的技术; 其技术原理如下: 将一根曲率半径为几十纳米的非常尖的Ag或Au针尖 (根据使用的SPM仪器的不同可以是AFM, SNOM或STM针尖), 通过SPM将针尖控制在和样品非常近的距离(1nm)。此时, 若将适当波长的激光照射在针尖上, 就可能在针尖和样品之间的间隙激发出局域化的等离子体, 使该区域内的电磁场得到极大的增强。理论上增强可达 10^9 , 而实验上到目前为止已发现的最高增强为 10^6 。正是由于增强的电磁场是高度局域化的, 它只能使那些处于针尖正下方基底上的吸附分子的拉曼信号得到增强, 因而可以得到与针尖曲率半径相近的空间分辨率。也正是因为它利用的是针尖的增强效应, 所以对基底和吸附分子没有特殊要求, 可以研究包括单晶和一些无任何增强的基底上的物种。

TERS 的实验装置主要有两种^[118]: 垂直入射垂直收集方式和 60° 斜入射斜收集方式。如图2-10所示, 这两种方式上部都是SPM系统, 被检测的物种固定在载玻片上表面, 从而可以通过SPM表征样品的表面形貌。激光的入射和拉曼的收集都通过一个高数值孔径的显微镜来实现, 而且实验过程中位置始终保持不变。针尖在扫描过程中, 针尖下方所产生的增强的拉曼信号可以通过CCD或雪崩式光二极管 (Avalanche Photodiode, APD) 检测器检测, 从而得到增强的拉曼信号或对样品进行拉曼成像以和表面形貌图像对照。在垂直方式中, 显微镜物镜与针尖分别在样品的两侧, 基底采用透明的载玻片; 而在斜入射方式中, 针尖和显微镜物镜在样品的同侧, 基底可以采用非透明材料, 但同时要求必须合理地设计SPM探头和拉曼收集光路系统, 使得两套系统可以良好耦合而且互不干扰。

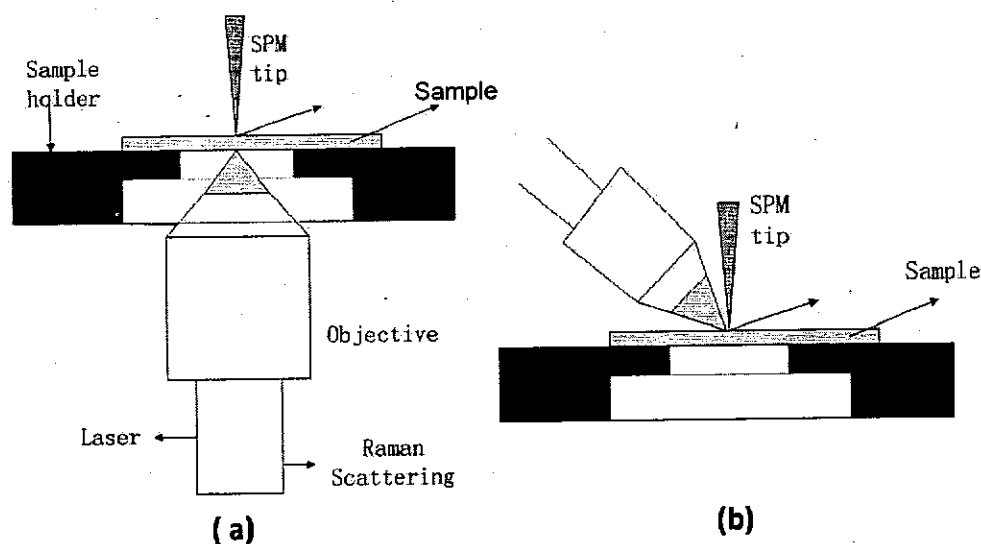


图 2-10 两种典型的 TERS 实验装置。(a) 垂直入射垂直收集方式, (b) 斜入射和斜收集方式^[118]。

目前TERS已经用于单晶电极上分子吸附的TERS 研究。通过合适地选择基底材料,使针尖增强效应和基底的光学性质相互耦合,从而产生比针尖单独存在下更强的增强,利用这种增强,便可以研究采用常规研究手段不能研究的在单晶电极上的吸附物种的表面拉曼信号,如基底单晶电极上吸附的 CN^- 的信号。另外,利用TERS,可以很容易得到优于100nm的空间分辨率,而这种尺度的单晶电极的台阶面在实验中比较容易获得。这样,在实验中就可以通过SPM寻找平整的台阶面开展TERS研究,从根本上排除缺陷的干扰,从而可以在尽量简化的实验条件基础上研究用传统拉曼光谱难以解决的SERS机理。此外,利用TERS还可以很方便地研究从单晶电极到粗糙电极等一系列不同粗糙度的基底材料,从而允许系统地研究电极粗糙度和催化活性以及SERS活性的关系,以及判断SERS活性表面上的SERS活性位。

虽然TERS技术具有空间分辨率高等优点,但是目前其发展过程存在以下几个难点,制约了TERS的广泛应用,目前还主要处于实验室阶段^[118]: (1) 如何建立稳定的TERS 系统,因为TERS是SPM和拉曼的联用系统,仪器的稳定性同时受两台仪器的工作状况所制约。(2) 如何高重复性地得到TERS实验要求的尖端小,锥度小,表面光亮且无碳物种污染的高TERS活性的针尖。(3) TERS检测过程中如何避免针尖不被基底上所吸附的分子污染。(4) 实验操作时如何实现激光光斑和TERS针尖的快速准确耦合。

2.4 小结

最近几年有关SERS研究的文章和报道明显增多,反映SERS研究的复苏,形成有关单分子体系、过渡金属体系、纳米结构以及进行生物分子鉴别的研究热点。综合上面章节所叙述的情况,可以看出在SERS生物分子探测方面以及SERS机理研究中,增强能力高、稳定性高的SERS活性基底是利用SERS的放大效应实现在生物、化学、国防安全等领域高灵敏度探测的关键因素之一,同时也是深入研究表面纳米结构体系的各种独特的物理和化学性质的关键。由于金属纳米结构阵列较单体更高的增强能力来自于粒子之间的电磁场耦合,特别是相邻粒子间的短程耦合,要提高阵列基底的增强能力往往要求缩短粒子间的间隙,而目前还比较匮乏能够低成本制作小周期结构的技术。因此目前新型SERS基底的研究重点还是在于发展具有高拉曼增强能力且易于阵列化的金属纳米结构单体或双聚体。从金属纳米结构的LSPR特性与其SERS增强能力的关系来看,发展LSPR特性可调控的金属纳米结构单体,以匹配激励光源获得高局部电场增强能力,从而获得高的SERS增强性能是提高金属纳米结构单体以及阵列的拉曼增强能力的一个重要途径;另外为了拓展SERS应用走出实验室,走向现场化、实用化,需要大力发展低成本且容易实现批量生产的纳米加工工艺,从而发展低成本具有普适性的SERS基底,并最终实现集成化、小型化、实用化的SERS传感系统。

我们的工作就将从这两个角度开展研究:一是发展低成本具有普适性的SERS基底——AgFON结构;二是发展高拉曼增强能力的SERS活性基底——Bowtie结构和新月自相似链结构。

第三章 AgFON 结构上葡萄糖溶液的 SERS 探测

表面增强拉曼光谱(SERS)在灵敏度和选择性方面具有传统的基于葡萄糖酶的葡萄糖流行分析方法所不可比拟的优势,但是由于葡萄糖分子的弱拉曼散射截面以及葡萄糖分子与币族金属如 Ag 等的低亲和力,使利用 SERS 探测葡萄糖很难实现。另一方面,纳米球光刻技术(NSL)具有工艺成熟、成本低、方法简单等优点,可以大面积制作多种纳米结构。本章采用 NSL 技术制作了表面具有纳米粗糙度的 AgFON 结构,将其作为 SERS 活性表面,通过具有特殊官能团的分子自组装单层(SAM)活化 AgFON 表面,提高葡萄糖与表面的亲和力,最终成功地在 10 秒内获得大气环境下浓度为 100 mmol/L 葡萄糖的 9 个主要特征峰。该结果一方面表明通过 NSL 技术,可以制作具有中等拉曼增强能力和普适性的 SERS 基底,另一方面也表明 SERS 技术在快速探测生理浓度范围的葡萄糖(0mmol/L~25 mmol/L)方面进而在血糖连续探测方面具有很大的潜力。

3.1 葡萄糖探测概述

葡萄糖是动、植物体内的主要组成部分,葡萄糖浓度连续测定在食品分析质量监控^[200-201]、生物化学和临床化学中都占有很重要的地位,特别是征对全球目前人数已经超过2亿的糖尿病患者。糖尿病是由于体内胰岛素缺乏,引起的代谢紊乱性疾病或内分泌疾病,长期研究证明,若能将血糖值控制在正常范围内即 $110 \pm 25 \text{ mg/dL}$,即可控制糖尿病。为了将血糖值控制在正常范围内,了解患者体内血糖水平是必需的,有时一日可能要对患者进行数次血糖值测定。因此,血糖值的监测成了糖尿病治疗的一个重要组成部分。由于糖尿病的诊断、治疗和管理阶段都要求对血糖水平进行紧密、可靠地监测,因此需要性能可靠、灵敏度较高的传感器件来实现对病人血液中葡萄糖含量变化进行监测^[202-206]。

在过去几十年内,已经发展了许多探测葡萄糖的方法,但往往很难兼顾血糖监测所要求的选择性、灵敏度和稳定性。采用对葡萄糖高度特异的葡萄糖氧化酶、以过氧化氢产物为探测对象的电流型酶催化电化学葡萄糖探测方法是最普遍的一种方法,虽然能够对生理浓度甚至痕量浓度葡萄糖进行检测,具有很高的灵敏度,但维生素C酸、尿酸等其他电活性物质容易产生干扰^[207]、连续工作时间短(酶需要补充、酶的不稳定性)等因素限制这类技术在血糖监测方面的应用^[208-211];

荧光技术, 能够提供快速、无扰(noninvasive)的探测^[200,212], 同样面临着选择性的问题。近红外吸收光谱, 不需要消耗品、直接检测, 是目前很有潜力的连续探测技术, 却存在水的强烈吸收导致灵敏度偏低、谱带重叠导致难以解析的问题^[200,213]。

近年来分子振动拉曼光谱逐渐发展成为一种葡萄糖探测技术, 作为分子指纹谱, 它能对葡萄糖分子进行直接免标记痕量探测, 所以能很好地兼顾血糖监测所要求的选择性、灵敏度和稳定性, 但是由于葡萄糖的拉曼散射截面很小, 需要高的激光功率和长的获取时间^[206,210,214-215]。如A. Ergin等通过功率67.5mW、激发线830nm的固体激光器和60秒的获取时间获得了浓度为1g/L(约5nM)的葡萄糖水溶液的拉曼光谱^[206], 并通过结合化学计量学方法来提高信噪比。James L. Lambert等建立了眼房的物理模型并探讨了共聚焦显微拉曼技术对与血糖相关的眼房水葡萄糖浓度在体测定的可行性^[216]。

表面增强拉曼散射是一种具有表面选择性的光学增强效应, 能对吸附到基底上的分子的信号增强 10^8 - 10^{14} 倍^[217,129-130], 其准确的增强机制尚在研究中。基于其巨大的增强效应, 相比普通拉曼光谱技术(NRS), 表面增强拉曼光谱技术能够有效提高散射截面, 降低激发功率和光谱获取时间^[212,218]。先前 Melissa 等通过50mW 的激发功率和30秒的获取时间, 成功地探测到非液相环境下, 银溶胶上痕量(5 μ l)葡萄糖分子的 SERS 谱^[219], Wu ZaiSheng 等通过探测金溶胶上酶反应产物的 SERS 光谱, 获得了(0.5-32)mmol/L 的葡萄糖溶液动态响应范围^[212], 但是溶胶制备的低重复性和银溶胶易氧化的特性限制了这类基底的商业化应用^[220,127]。

在本工作中采用在自组装的聚苯乙烯纳米球上沉积一定厚度的银膜的方法, 形成表面具有纳米粗糙度的 SERS 活性表面—AgFON 结构, 并通过具有直链结构、带-HS 基团的巯硫醇(1-DT)和巯基正己醇(MH)在银膜表面自组装形成单层修饰和活化该表面, 提高葡萄糖分子与金属表面的亲和力, 将葡萄糖分子更为有效地限域在电磁场增强范围内, 采用激光共聚焦光路抑制杂散光、提高信噪比。采用 DT/MH SAM 修饰的 AgFON 结构, 不仅有效地解决了 Ag 易氧化、溶胶重复性低的问题, 而且最终成功地在10秒内获得浓度100 mmol/L 的葡萄糖溶液的9个主要特征峰。实验结果表明通过 NSL 技术, 可以制作具有中等拉曼增强能力和普适性的 SERS 基底—AgFON 结构, 结合 SERS 技术在选择性方面的优势,

与共聚焦光路在提高信噪比方面的优势,这种基底所表现的灵敏度和稳定性具有在血糖监测方面的应用潜力。

3.2 激光共聚焦显微拉曼光谱技术

在葡萄糖的SERS探测实验中,将主要用到共聚焦显微拉曼光谱技术作为光谱获取技术,因此在此对该技术作一简单的介绍。

显微拉曼光谱技术是将拉曼光谱分析技术与显微分析技术结合起来的一种应用技术。显微拉曼技术可将激发光的光斑聚焦到微米量级,进而对样品的微区进行精确分析,激光在样品上产生作用的确切部位,可以通过CCD鉴定仪和一个TV监视仪,清晰地显示出来,通过TV屏幕,可以选择有关分析所感兴趣的任何样品的任意部位,整个分析鉴定过程,都非常直观,易于进行观察和控制^[221-222]。

目前激光显微拉曼光谱仪可以认为由两大主要部件构成:激光共聚焦显微镜和光谱仪系统。激光共聚焦显微镜的无限光学系统保证了最大的光通量,其关键技术是共聚焦技术。所谓共聚焦技术,其原理如下:在结构上采用双针孔(Pinhole)装置,形成物像共轭的独特设计,激光经物镜焦平面上针孔形成点光源对样品扫描,于测量透镜焦平面的探测针孔处经空间滤波后,有效地抑制同焦平面上非测量光点形成的杂散荧光和样品不同焦平面发射来的干扰荧光。这是因为光学系统物像共轭,只有物镜焦平面上的点经针孔空间滤波才能形成光点图像,扫描后可得到信噪比极高的光学横断面,分辨率比普通光学显微镜提高1.4倍。共聚焦设计不仅可以使该仪器在不破坏样品的情况下对样品进行不同深度的探测而同时排除其他深度样品的干扰信息,从而获得不同深度样品的真实信息;还能够消除物镜自身产生的光谱,当入射光和散射光通过光学系统特别是通过显微镜的物镜时,物镜材料的拉曼和荧光光谱会出现并叠加到样品的拉曼光谱上,而共聚焦系统主要给出聚焦区域的光谱,能避免物镜光谱出现。值得注意的是,在测试生物样品时,入射光通过显微物镜把能量集中在一个微区,因此必须采用低功率的激光以避免样品的热和光化学反应。共聚焦显微镜上有完全自动的XYZ样品台,并可增加冷却加热装置。与普通光学显微镜相比,激光拉曼显微镜采用激光作光源,单色性好,基本消色差,成像聚焦后焦深小,纵向分辨率高。典型的如Renishaw显微拉曼光谱仪,其空间分辨率好于 $1\mu\text{m}$,纵向分辨率达 $2\mu\text{m}$ 。

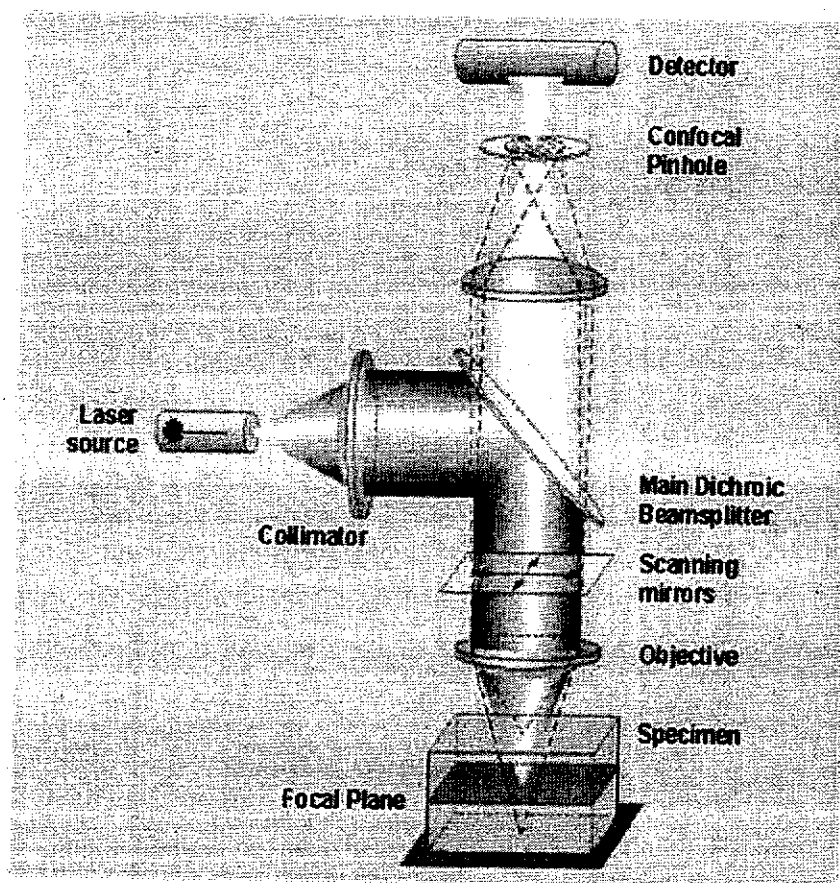


图 3-1 激光共焦显微镜的 3D 立体示意图。

激光共聚焦拉曼光谱仪的光谱仪系统包括全息滤光片、高分辨率衍射光栅、二维CCD探测器三个主要部件。全息滤光片既能抑制瑞利散射，又能高效透过拉曼信号；二维CCD探测器，能够在可见和近红外区进行有限噪声关闭检测。通过显微镜物镜180度背散射方式收集的散射光经显微镜像平面上的共焦针孔(pinhole)空间滤波后，同焦平面上非测量物点形成的杂散光和样品不同焦平面产生的干扰光被有效滤除，滤波后的散射光通过光谱仪系统的全息陷波滤光片滤除Rayleigh散射光，只留下Stokes和anti-Stokes光，然后经单色仪光栅色散分光、CCD光电转换后获得拉曼光谱。

共聚焦显微拉曼光谱仪具有很好的空间分辨率，利用共聚焦显微拉曼光谱仪可以得到体积很小的样品在不同深度的光谱信息。它采用干涉窄带滤光片技术，实现了拉曼光谱二维直接成像，可方便快捷地获得物质成分的微观空间分布；使用计算机控制高精度XYZ三维平台，可实现逐点扫描，获得高分辨率的三维Raman图像。

3.3 纳米球光刻 (NSL) 技术

纳米结构的制备一直是 SERS 基底、SERS 传感芯片乃至 SERS 传感系统的重点和关键。另一方面,近年来,微电子、通信和数据存储行业因需要改善产品性能、降低产品成本而需要制备尺寸在 100nm 以下的具有独特光学特性的纳米结构。目前,100nm 以下的纳米粒子和纳米孔阵列广泛地应用在催化反应、传感、光学、分子分离、分子反应动力学、单分子探测和电子学领域中,而制备该尺度范围的纳米结构成为制约纳米技术发展的关键因素。

理想纳米加工技术应该具有如下特点:所用材料和基底非常常见、加工成本低,而且纳米粒子大小、形状和间距参数易于控制,而且在大规模制作时重复性高,均匀性好。

现有流行的纳米加工技术主要有^[223]影印光刻 (photolithography)、电子束光刻 (EBL)、X 射线光刻 (XRL)、离子束光刻 (IBL) 和聚焦粒子束光刻 (FIB)。影印光刻 (photolithography) 是使用广泛的一种光刻技术,但是其分辨率由于受 $\lambda/2$ 的衍射极限分辨率所限只能达到 100nm 左右;电子束光刻 (EBL) 和聚焦粒子束光刻 (FIB) 具有超高的分辨率,EBL 分辨率可达到 2nm, FIB 分辨率可达到 6nm,这两种光刻技术都可以制备任意形状的纳米粒子和纳米孔,但实现方法不同。常规 EBL 过程包括涂胶、曝光、显影、沉积和 “lift-off” 五个步骤 (如图 3-2 所示),而 FIB 则是先沉积金属,然后直接用聚焦离子束刻蚀形成图形,步骤比 EBL 简单,这两种方法都具有 “样品产出量小、样品成本高” 的特点,是目前主要用于制作小面积、高精度科研用纳米结构的方法。为寻找成本低、可大面积加工的纳米加工方法,1981 年 Fischer 和 Zingsheim 提出了源于聚苯乙烯纳米球的自组装的 “自然光刻”,1982 年 Deckman 和他的团队拓展了 Fischer 的研究范

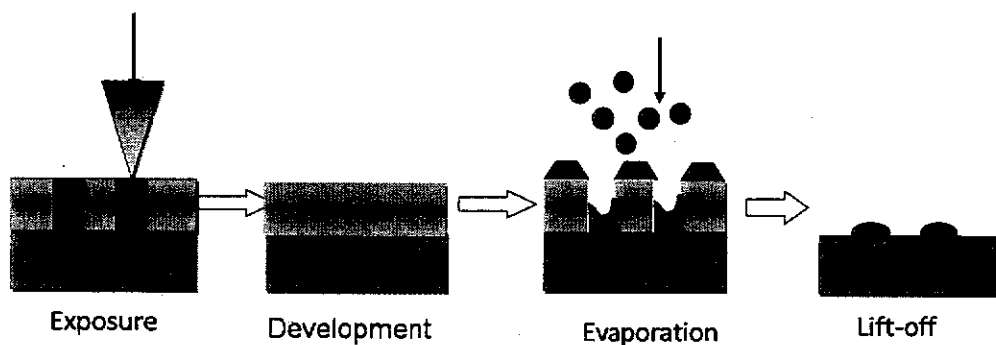


图 3-2 EBL 技术主要流程.

围,论证了自组装单层可以应用于材料沉积和掩模蚀刻,Deckman用“自然光刻”来描述其过程,后来 Van Duyne 等人将其改为“球形纳米光刻”(即 Nanosphere Lithography),并将单层纳米球光刻技术拓展到了两层纳米球光刻技术,并且借助原子力显微镜,研究了云母基底上的单层和双层周期银粒子阵列,他们采用 NSL 技术加工出了在 $(10-100) \mu\text{m}^2$ 范围内均匀分布的单层和双层周期银粒子阵列,并在这些纳米粒子阵列基础上开展了多项 LSPR 和 SERS 生化传感实验 [79,223]。

NSL 技术适合制备尺寸在 20-1000nm 范围内的贵金属纳米粒子 [79-81,223-225]。常规的球形纳米光刻过程是首先在基底上进行纳米球的自组装形成掩模,然后再在被掩模覆盖的基底上沉积金属,最后通过超声法去除底层的纳米球获得均匀分布的纳米粒子阵列。由于纳米球自组装最容易形成六角密堆排列(单层),因此制备出六边形晶格的三角形纳米粒子是较为常见的,最终成形的阵列的均匀性在很大程度上取决于自组装过程所结晶的质量,纳米粒子的尺寸和纳米粒子之间的间距主要由纳米球直径的大小决定(如图 3-3 所示),图 a 中中间红色部分即为用 NSL 技术制得的纳米三角形粒子,三角形的高 $GH = 3d/2 \times (\sqrt{3} - 1 - 1/\sqrt{3})$,纳米粒子之间的间距为 $d/\sqrt{3}$,其中 d 为纳米球直径。纳米球的材料一般采用聚苯乙烯

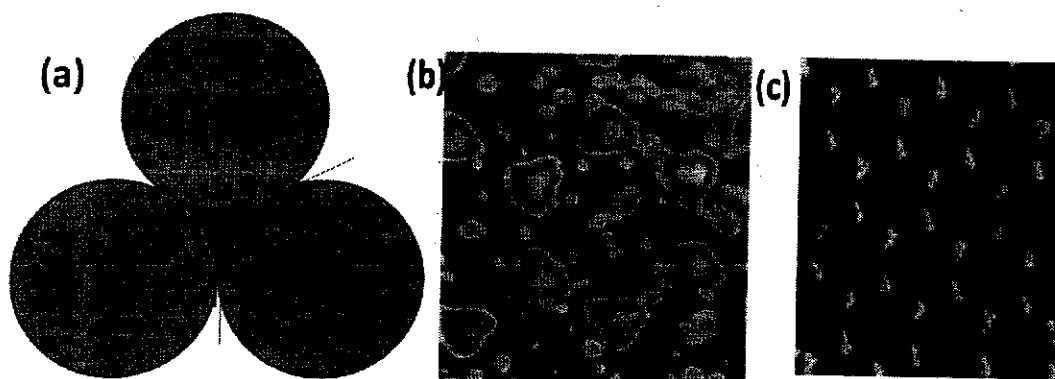


图 3-3 NSL 技术形成的三角形粒子示意图。(a) 单个三角形几何示意图,(b) 六边形排列的三角形纳米粒子,(c) 六边形排列的三角形纳米粒子阵列。

或者硅,常用的基底材料有:玻璃、云母、硅、铜以及 ITO。将纳米球悬浮液涂覆在基底上的方法主要有旋转涂覆 (spin coating)、点滴覆盖 (drop coating) 和热电冷却覆盖 (thermoelectrically cooled angle coating) 三种,而接下来的金属沉积方法有热蒸镀 (thermal evaporation)、电子束沉积 (electron beam deposition)、激光脉冲

沉积(pulsed laser deposition)等方法。

迄今为止, NSL 技术或拓展 NSL 技术已经能够制备三角形、菱形、六边形、新月形、纳米棒、纳米环、纳米孔等多种纳米粒子, 另外若在金属沉积完后不做进一步地去除纳米球的处理, 还可以制得表面连续且具有纳米粗糙度的薄膜即 MFON (metal film over nanosphere) 结构, 这种结构已成功应用于 SERS 传感中。

以纳米孔的制备为例^[224], 其基本步骤如图 3-4 所示, 首先在 Si(111) 基底上涂覆一定浓度的纳米 PS 球悬浮液, 然后将已完成单层纳米 PS 球自组装的样片放入反应离子蚀刻 (Reactive Ion Etching, RIE) 系统中, 使用 CF_4 等离子体进行蚀刻, CF_4 与 PS 球作用时 PS 球被氟化, 而仍然保持完整, 但 CF_4 与 Si 作用将在 Si(111) 基底上形成易挥发性化合物 SiF_4 , 从而使得没被 PS 遮挡的区域的 Si(111) 基底区域将被蚀刻, 这样就在基底上形成三角形的纳米孔 (nanopore) 周期阵列。

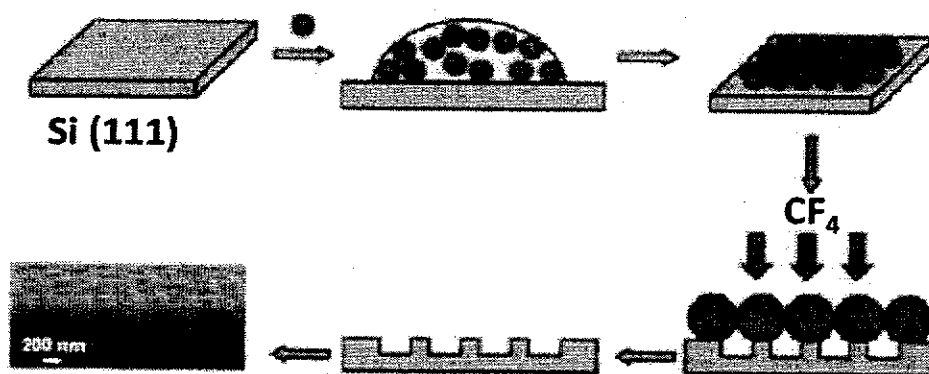


图 3-4 NSL 技术制备三角形纳米孔阵列示意图^[224]。

角度分辨纳米球光刻 (Angle-Resolved Nanosphere Lithography, AR-NSL) 技术是在普通的 NSL 基础上发展而来, 是为了制备更多形状的纳米粒子和更小的纳米粒子而发展起来的, 该技术是通过改变基底和金属沉积方向之间的角度 θ_{dep} 来实现的^[225]。角度的改变会使空隙在基底上的投影面积发生改变, 通过单层或双层纳米球作掩膜, 仅仅单次沉积就可制作出比普通 NSL 尺度范围更小的不同尺寸和形状的纳米结构, 如果采用多次沉积, 而且每次沉积采用不同 θ_{dep} 的话, 那么更多形状如纳米链和纳米间隙的双体都可以实现, 如图 3-5 所示。

总之, NSL 技术成本低、方法简单, 适合大面积制作, 而且既能制作三角形、菱形、六边形、纳米孔等多种纳米粒子阵列, 又能通过拓展的 AR-NSL 技术制作纳米粒子链、新月形、纳米间隙的双体等新结构, 是目前 LSPR、SERS 生物化学

传感应用中纳米结构制作所采用的普遍方法,已获得广泛应用。在葡萄糖的SERS探测实验中,我们也将主要采用NSL技术作为SERS基底上纳米结构的制备技术。

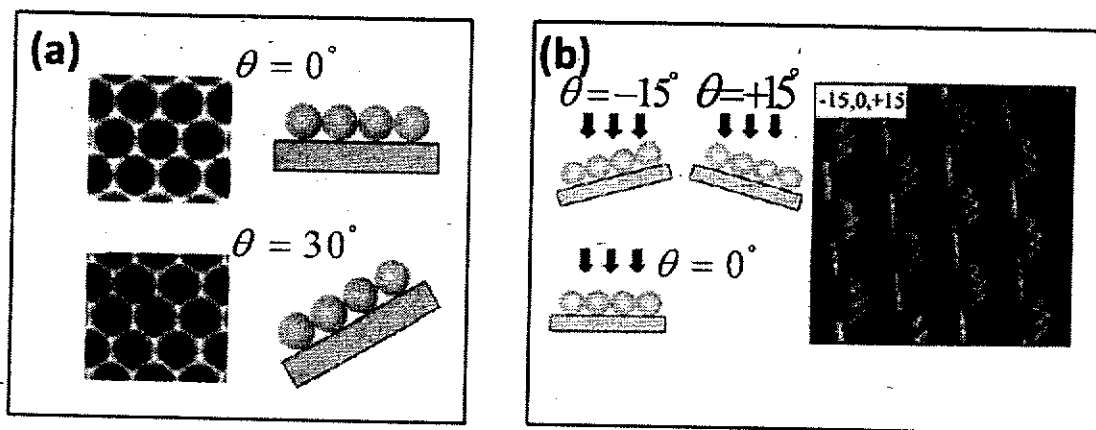


图 3-5 (a) AR-NSL 技术不同沉积角度的金属沉积, (b) AR-NSL 技术多次沉积制备纳米链^[225]。

3.4 SERS 基底设计—DT/MH 修饰的 AgFON 结构

前面第 2 章中提到,在纳米球上覆盖纳米厚度的金属膜,以形成表面具有纳米粗糙度的金属结构即 MFON (metal film over nanosphere),是当前一种比较流行的 SERS 活性基底制作方法。由于在币族贵金属中,银成本低,而增强性能最好,因此 AgFON 是比较常用的结构。这种结构制作方法简单,使用的纳米球可以是聚苯乙烯 (polystyrene nanosphere, 简称 PS) 球,也可以是硅球,根据需要,直径可在几十到几百纳米间选择。将尺寸均匀分布 (具有单分散性) 的纳米球悬浮液滴覆在硅或玻璃衬底上,通过自组装和结晶形成六角密堆排列或方形排列,然后上面垂直沉积数十或数百纳米的银膜即可。这种结构成本低,通过表面做功能修饰,可以实现对不同探测对象的探测。如 EIC 实验室采用 AuFON 结构实现对地雷逸出的痕量蒸汽的外场探测,而西北大学 Van Duyne 研究组则采用 AgFON 结构实现对炭疽、芥子气、葡萄糖的探测。在此基础上,发展出纳米球光刻 (nanosphere lithography, 简称 NSL) 技术,可以制作出三角形、六边形、菱形、月牙形等多种纳米粒子 (阵列),以及三角形链、bowtie 孔、纳米杯、纳米环、纳米棒等纳米结构,这些结构既可用作 LSPR 生物传感、生物探针,也可用作 SERS 基底。但是 AgFON 结构由于表面是 Ag,容易氧化,其结构的 SERS 活性随时间的推移会迅速衰减,这也是很多表面为 Ag 的纳米结构所面临的问题,所以 EIC 才会采用性能稳定的 AuFON,但这样以牺牲增强性换取稳定性,并不是解决问

题的最好办法, 因为还会带来成本上升的问题。在很多生物应用中, 通过在金属纳米结构表面做功能修饰, 如增加对液体中目标分子的富集或选择能力, 不仅可以提高探测灵敏度, 还可以避免易氧化的 Ag 裸露在外面所造成 SERS 基底的稳定性降低。自组装单层 (self-assemble monolayer, SAM) 就是一种比较好的修饰方法, 选择两端具有特殊官能团的分子, 一端通过其官能团 (如 -HS) 与 Ag 表面通过共价键结合, 另一端通过官能团与目标分子结合, 达到拉近或固定目标分子的作用, 如在抗原抗体免疫传感中, 就采用这种方法将抗体结合在基底上。SAM 修饰 SERS 基底是相对成本较低的方法, 而且由于是自组装所以不会对下面的纳米结构造成破坏, 但是其困难往往在于选择合适的 SAM 材料, 以及 SAM 分子的长度不能太长以免使目标分子离 SERS 活性区域太远。正如表面声波 (surface acoustic wave, SAW) 传感技术发展中只要出现一种新的对某种目标分子具有选择性的 SAM 材料, 就马上会出现针对该目标分子的 SAW 传感器一样, 在 SERS 领域, 只要相应的 SAM 材料得到发展了, 很多基于 Ag 的 SERS 活性基底就能得到发展, 克服易氧化不稳定的缺点, 而从实验室走向工业应用现场。在我们设计的葡萄糖溶液 SERS 探测实验中, 作为 SERS 基底的 AgFON 结构也存在表面易氧化和缺少对葡萄糖分子的亲和力两个主要缺点。于是采用具有直长链结构、链头带有 -HS 基团、链尾带疏水基团的葵硫醇溶液在 AgFON 结构表面自组装, 然后再自组装具有直短链结构、链头带有 -HS 基团、链尾带亲水基团的巯基正己醇溶液, 通过形成 Ag-HS 键进行有序自组装层, 通过长短链、亲疏水基团交错排列形成亲葡萄糖的空位, 从而修饰和活化该表面, 达到解决上述 AgFON 结构的两个缺点的目的, 使之能应用到葡萄糖溶液的探测中。

3.5 实验

材料: 纯度 99.99% 的 Ag 购自北京有色金属研究院, 采用直径 25 mm 的 K9 硅酸盐玻片作为支撑基底。基底清洗液氨水 (NH_4OH)、双氧水 (H_2O_2)、乙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) 购自国药化试, 聚苯乙烯 (PS) 纳米球 (浓度 1.5%, 直径 $400 \pm 4\text{nm}$) 购自 Duke 公司, D-(+) 葡萄糖购自 Sigma_aldrich, 葵硫醇 (1-DT, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SH}$) 和巯基正己醇 (MH, $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$) 购自 Aldrich 公司。自制清洗和溶液配置所用去离子水、二次蒸馏水。

AgFON 基底制作：首先，将支撑玻璃基片放入体积比 3:1 的浓硫酸:30% H_2O_2 溶液中清洗 1h，温度保持在 80 $^{\circ}\text{C}$ ；然后在 5:1:1 的 $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}:30\%\text{H}_2\text{O}_2$ 中超声 1h；接着将大约 $5\mu\text{L}$ 的 PS 悬浮液滴在玻片上，室温下干燥。最后在 2.25×10^{-7} 托的气压下，真空气相沉积系统沉积厚度 200nm 的 Ag 膜。

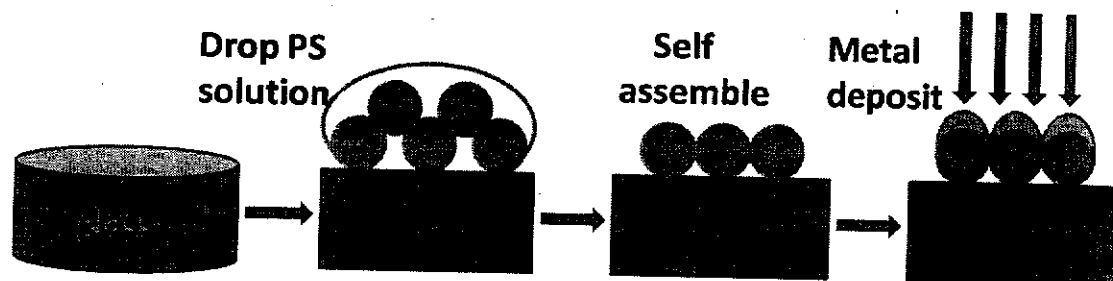


图 3-6 NSL 制造金属纳米结构—AgFON 结构。

DT/MH SAM 形成：将制作好的 AgFON 基片放入浓度 1 mmol/L 的 DT 乙醇溶液，浸泡 45 分钟，然后放入浓度 1 mmol/L 的 MH 乙醇溶液，浸泡 13 小时形成自组装单层。

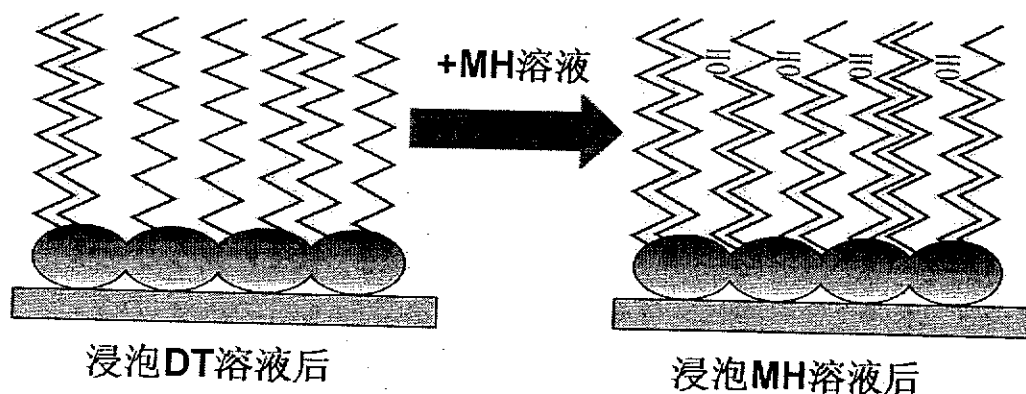


图 3-7 DT/MH 修饰的 AgFON 结构形成。

SERS 光谱测量：所有测量均由 Nicolet 公司 Almega XR 激光显微拉曼光谱仪在波长为 532nm 的半导体激光器的激发下获得。激光通过显微镜(olympus BX51)的 50 $\times$ 物镜，垂直入射到样品上，散射光通过显微镜并经全息陷波滤波器滤除瑞利散射光后耦合到单色仪，单色仪分光光栅为 2400 条/mm，谱分辨率 2 cm^{-1} ，狭缝宽度 25 μm ，经单色仪分光后进入 CCD。激光功率 25mW，高分辨率获取模式。单次曝光时间 10s，曝光次数 4 次。基底在葡萄糖溶液中浸泡几分钟后取出直接放置在显微镜载物台上测量。

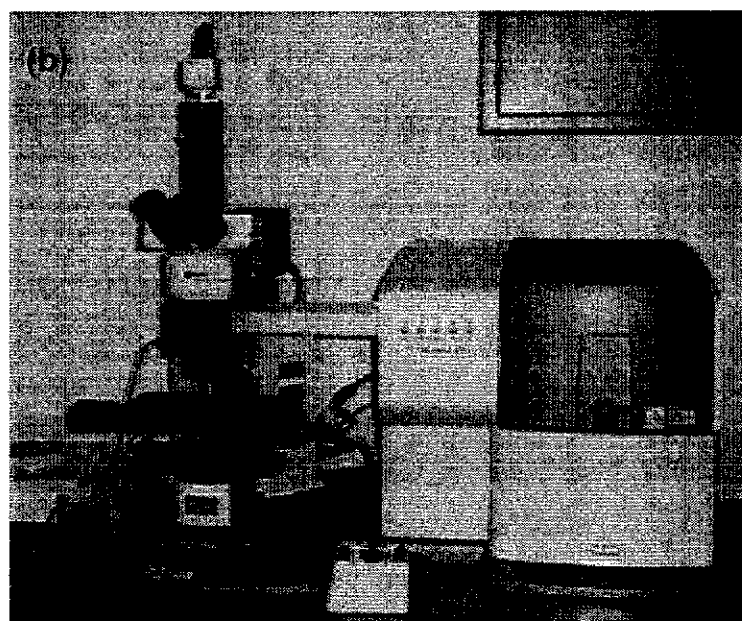
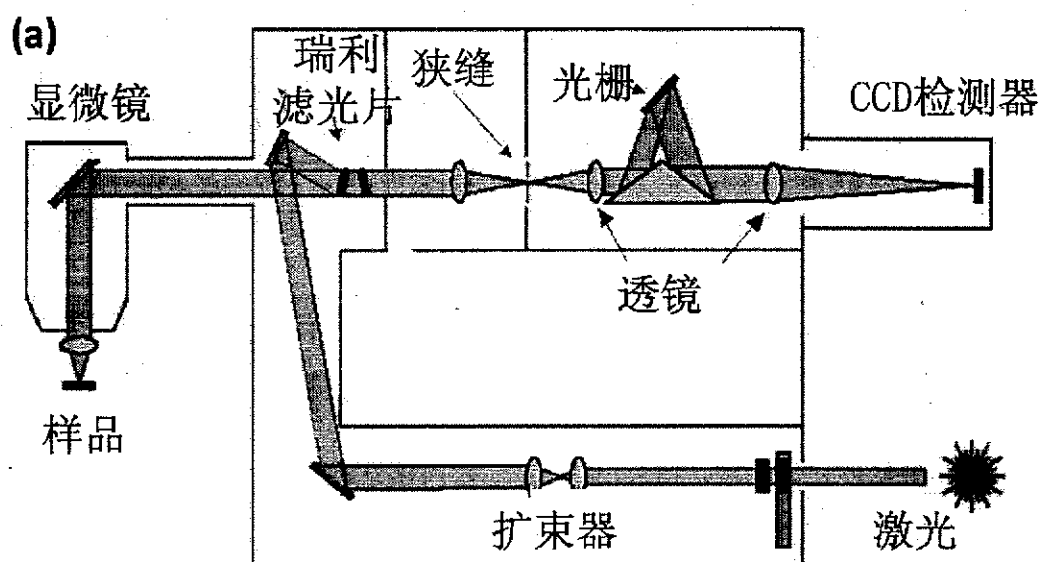


图 3-8 葡萄糖 SERS 实验所用激光共聚焦显微拉曼光谱平台。(a) 示意图, (b) 实物图。

3.6 结果与讨论

由 DT/MH 修饰的 AgFON 基底的 AFM 图像见图 3-9。根据该图, 直径 400nm 的 PS 球以六角密堆的方式排布, 在经过 DT 和 MH 溶液浸泡后仍然整齐地排列在一起, 没有脱落和松动。从图 3-9a 可以看出, 自组装后在 $20\mu\text{m}$ 大的区域内会存在有 PS 球自组装过程产生的点缺陷和线缺陷, 但从图 3-9b 却可以看出, 在 $5\mu\text{m}$ 的区域内 PS 球排列均匀, 几乎没有缺陷。

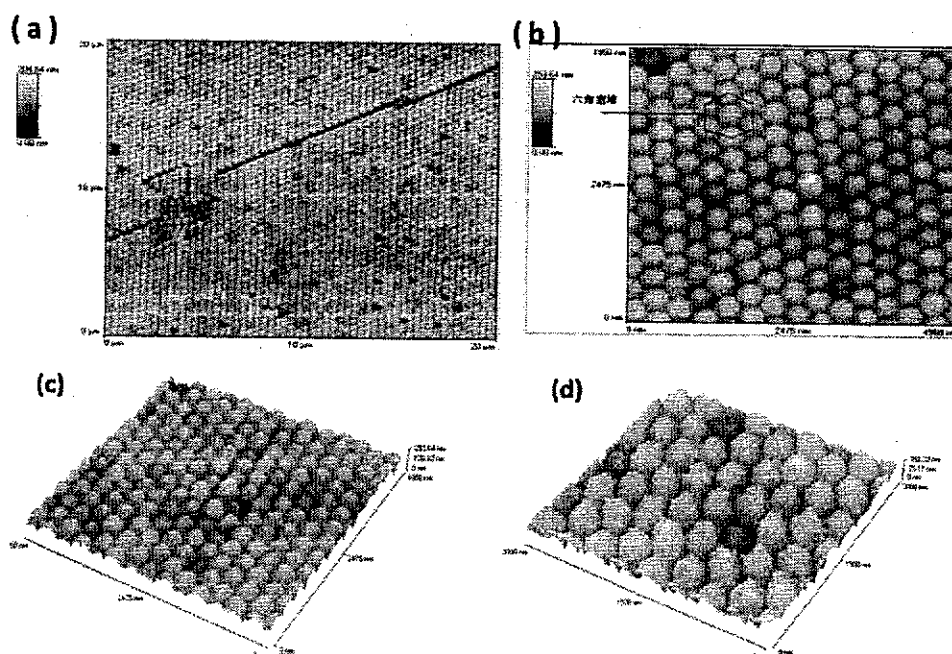


图 3-9 DT/MH 修饰的 AgFON 基底的 AFM 图像. (a) 2D 图像 $20 \times 20 \mu\text{m}$, (b) 2D 图像 $5 \times 5 \mu\text{m}$, (c) 3D 图像 $5 \times 5 \mu\text{m}$, (d) 3D 图像 $3 \times 3 \mu\text{m}$, 仪器: Veeco Instrument Explore SPM.

图 3-10 是使用波长为 532nm 的激光激发获得 DT/MH、葡萄糖在 DT/MH 修饰的 AgFON 基底上的 SERS 谱, 并通过差谱得到 100mmol/L 葡萄糖溶液的 SERS 光谱。在图 A 中展示了 DT 的特征峰: 875 、 1053 、 1146cm^{-1} , 在图 B 中清楚地显示了九个葡萄糖的特征峰: 1455 、 1373 、 1272 、 1200 、 1146 、 1060 、 1011 、 907 、 850cm^{-1} , 这些峰与图 D 的 4mol/L 葡萄糖溶液的 NRS 谱中的特征峰: 1462 、 1369 、 1265 、 1200 、 1124 、 1063 、 1015 、 917 、 844cm^{-1} 相对应。通过图 B 与图 A 相减做差谱运算, 获得图 C 所示葡萄糖溶液的 SERS, 该图与图 D 葡萄糖溶液的 NRS 存在一些差异, 这主要在于一些拉曼峰位置的偏移, 最大偏移发生在 NRS 中的 1124cm^{-1} , 对应 SERS 的 1146cm^{-1} , 偏移量为 22cm^{-1} , 根据 Van Duyne 的论述^[136], SERS 谱峰的位置相对于对应的 NRS 峰的偏移量最高可达 25cm^{-1} 。另外, 根据电磁增强理论, 拉曼增强因子可近似描述为入射场增强因子和散射场增强因子的乘积^[8,48], 即

$$R(\omega, \omega') = F(\omega)F(\omega') \quad (3.1)$$

式(3.1)中, ω 和 ω' 分别表示入射光频率和散射光频率, $F(\omega)$ 和 $F(\omega')$ 为对应的入射电场、散射电场增强因子, 可见对于不同的特征峰其 $F(\omega')$ 不同, 因而拉曼增强能力不同。比较图 C 和图 D, 可以看出, 对峰 917 、 1015 、 1200cm^{-1} 的增强

较显著,这使得这三个在 NRS 中不明显的峰在 SERS 中清晰可见,而对 1124 cm^{-1} 峰的增强相对较弱,降低了 1124 cm^{-1} 与其它峰的强度差异。

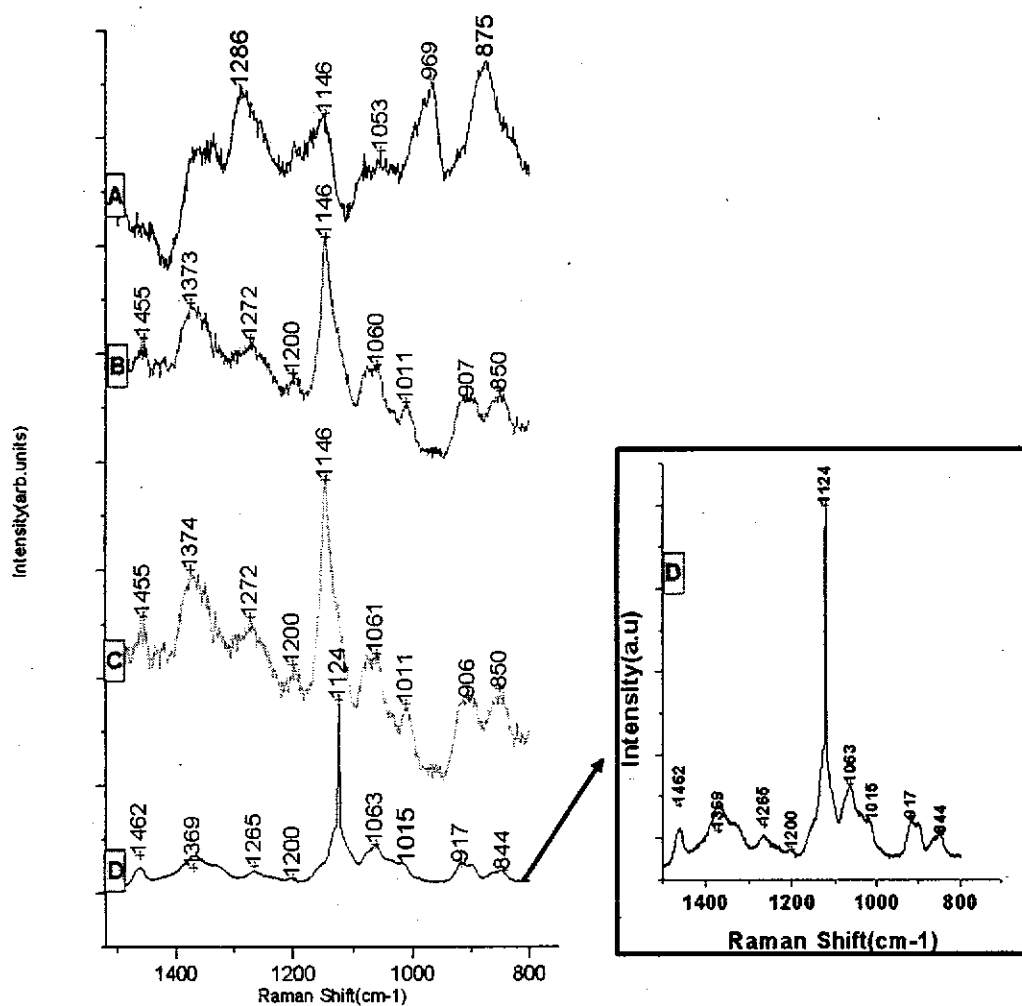


图 3-10 (A) AgFON 基底上 DT/MH 的 SERS. (B) AgFON 基底上 DT/MH 和 100 mmol/L 葡萄糖的 SERS. (C) 差谱获得的 100 mmol/L 葡萄糖的 SERS. (D) 4 mol/L 葡萄糖的 NRS. 其中 A、B、C 的测量条件同为: $t=10\text{s}\times 4$, $P_{\text{laser}}=25\text{mW}$, $\lambda_{\text{ex}}=532\text{nm}$; D 的测量条件为: $t=10\text{s}$, $P_{\text{laser}}=20\text{mW}$, $\lambda_{\text{ex}}=514.5\text{nm}$.

作为比较,在相同的测量条件下测量了 100 mmol/L 葡萄糖的 NRS(图 3-11A)和未经 DT/MH 修饰的 AgFON 上葡萄糖的 SERS(图 3-11B),结果显示,没有 DT/MH 对葡萄糖分子的分区作用,直接使用 AgFON 基底探测葡萄糖,就不能将葡萄糖限域在电磁场增强范围内,其结果同直接探测该浓度的葡萄糖的 NRS 一样,几乎没有任何葡萄糖的特征峰出现。

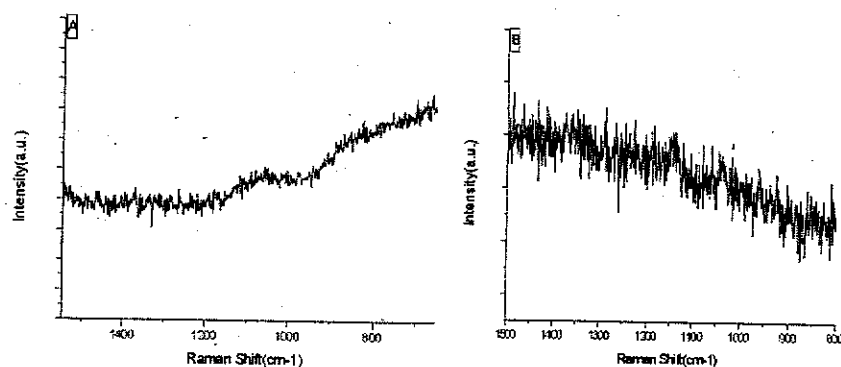


图 3-11 (A) 100 mmol/L 葡萄糖的 NRS. $t=10s \times 4$, $P_{\text{laser}}=25mW$, $\lambda_{\text{ex}}=532nm$; (B) AgFON 基底上 100 mmol/L 葡萄糖的 SERS. $t=10s \times 5$, $P_{\text{laser}}=25mW$, $\lambda_{\text{ex}}=514nm$.

针对 DT/MH 自组装单层的稳定性, 还测量了在常温环境下放置一周后的 DT/MH AgFON 基底的 SERS 光谱(见图 3-12), 该测量在 Renishaw 公司的激光共聚焦显微拉曼光谱平台上完成。在 514nm 激发线, 3mW 激发功率的激发下, 仅在 10s 单次曝光时间内就获得了 DT/MH 的 5 个主要特征峰: 703、894、1062、1121、1432 cm^{-1} , 可见, 在经过一周的放置后, DT/MH 仍然保持着较好的特性。

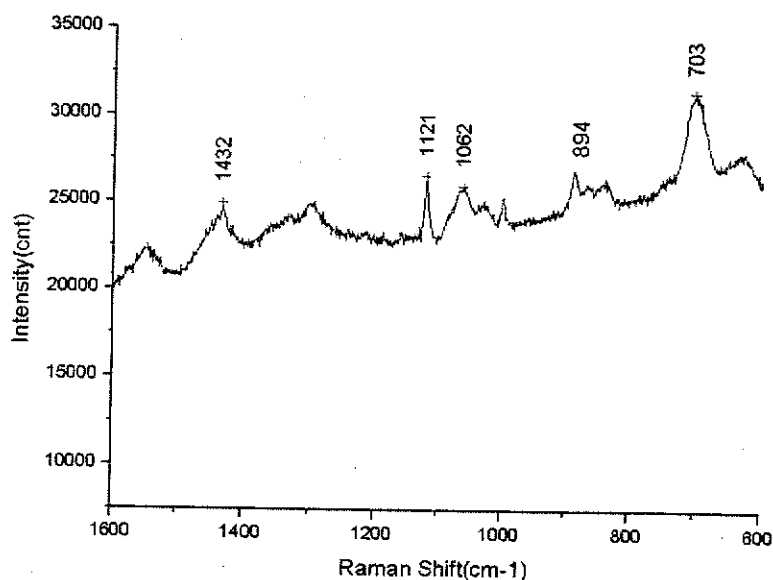


图 3-12 放置一周后的 DT/MH 的 SERS 谱, $\lambda_{\text{ex}}=785nm$, $t=10s$, $P=8mW$.

可见, 采用 Ag 膜覆盖自组装纳米 PS 球的方法, 形成粗糙度在纳米量级、均匀分布的 SERS 活性表面, 采用 DT/MH 自组装单层修饰该活性表面, 实现对

葡萄糖的限域、提高基底抗氧化的能力,采用共聚焦光路提高信噪比,并成功地在 10s 内探测到非液体环境中 100 mmol/L 葡萄糖分子的九个主要特征峰。这种方法基底制作简单、性能稳定,能够在大气环境下在极短时间内获得较低浓度的葡萄糖的足够多的特征峰,其所表现的灵敏度对实现生理浓度范围的葡萄糖的快速探测具有潜在的意义,结合其所表现的稳定性 SERS 技术可被进一步应用到血糖监测领域。该结果同时还表明通过 NSL 技术,可以制作具有中等拉曼增强能力和普适性的 SERS 基底,通过对表面做特定的活化和修饰,可用于其他生物分子的探测。

3.7 小结

本章介绍了纳米球光刻加工技术、共聚焦显微拉曼光谱技术和金属银覆盖纳米球的纳米结构。然后利用成本低、制作简单的纳米球光刻技术加工出了在 5 μ m 的区域内 PS 球排列均匀、几乎没有缺陷的 AgFON 结构,通过具有 -HS 官能团的 decanethiol (DT) 和 mercaptohexanol (MH) 溶液的自组装单层修饰该活性表面,提高 AgFON 结构的抗氧化能力和对葡萄糖分子的亲和力,具有长链结构疏水官能团的 DT 和具有短链结构亲水官能团的 MH 交错排列,实现了对葡萄糖的限域,采用共聚焦光路提高信噪比,并最终成功地在 10s 内探测到非液体环境中浓度 100 mmol/L 葡萄糖分子的九个主要特征峰。这种 AgFON 金属纳米结构拉曼增强因子小于 10^9 ,但是其制备简单、成本低,又能通过不同的 SAM 层对 Ag 表面的修饰和活化来实现对不同溶液的探测,是一种比较经济和成熟的 SERS 活性基底,该实验表明 NSL 技术可以用来制作这种具有中等拉曼增强能力和普适性的纳米结构,同时表明 SERS 技术对实现生理浓度范围的葡萄糖的快速探测进而实现血糖监测具有潜在的意义。

第四章 金属纳米蝶形 (Bowtie) 结构的 SERS 活性研究

Bowtie 结构因为巨大的局部电场增强能力而具有作为新型 SERS 基底的潜力。离散偶极子近似 (DDA) 方法可应用于复杂介质环境中任意形状及尺寸的消光等光学特性的计算, 且计算结果与实验结果吻合较好。本章我们采用离散偶极子近似 (DDA) 方法系统地研究了单层和多层 bowtie 结构的光学特性。

在单层 bowtie 结构的研究中, 从 bowtie 结构制作过程中可能出现的加工误差出发, 重点研究了间隙、顶尖错位、尺寸加工误差对 bowtie 结构光学特性的影响: (1) 在顶尖之间的间距 (gap) 和顶尖错位对 bowtie 结构光学特性的影响的研究中, 计算了 bowtie 结构的消光谱、电场分布, 获得了 LSPR 波长激励下的最大电场增强因子和“热点”处电场场斑的半高全宽 (FWHM)。结果表明随着间距的增加, LSPR 峰蓝移, 电场增强因子迅速衰减, 电场的 FWHM 变宽; 随着错位距离的增加, Y 方向偏振激励下的 LSPR 峰蓝移, 消光效率略有增加, 电场增强因子减小, “热点”处电场场斑展宽且不再是规则的矩形, 而 Z 方向偏振激励下的 LSPR 峰的位置不变, 消光效率略有减少, 电场增强因子略有增加; (2) 在尺寸对 bowtie 结构光学特性的影响的研究中, 研究了由于加工误差导致 Bowtie 结构两个三角形尺寸不相等的情况, 即非对等大小 Bowtie 结构的光学特性, 计算了非对等参数 R 对 bowtie 结构的消光谱及最大电场增强因子的影响。

而在多层 bowtie 结构的研究中, 则重点研究了三层三明治 bowtie 结构的光学特性: 研究了介质层厚度、金属层厚度对三明治 bowtie 结构的 LSPR 调节作用, 研究了三明治 bowtie 结构与单层 bowtie 结构的差异, 研究了三明治 bowtie 结构的电场分布及最大电场增强能力。

在本章及下一章中, 电场增强因子和拉曼增强因子的计算按如下约定:

(1) 电场增强因子计算公式:

$$EF = |E(\omega)|^2 \quad (4.1)$$

(2) 拉曼增强因子计算公式:

$$EF_{SERS} = |E(\omega)|^2 |E(\omega')|^2 \quad (4.2)$$

式中 ω 和 ω' 分别代表入射光频率和 Stokes 位移频率, 在常规的 SERS 中, EF_{SERS} 一般是取目标分子所吸附的纳米粒子的表面上所有增强因子的平均, 但是

在单分子 SERS 中, 更关注最大增强因子 $EF_{SERS, max}$, 而且因为 ω 和 ω' 很接近, 通常认为 $E(\omega') \approx E(\omega)$, 于是上式进一步近似为:

$$EF_{SERS} = |E(\omega)|^4 \quad (4.3)$$

4.1 Bowtie 结构概述

近年来, 出现了各种各样的等离子体结构^[226-228, 235], 它们具有异常增强的光学性能。其中贵金属纳米粒子由于可在可见光-近红外波段激励局部表面等离子体共振, 从而在该波段展现出良好的光学特性。特别是那些光学特性可调的金属纳米粒子被应用作为 SERS 基底以获得较高的增强能力, 被用于高分辨率光刻等领域, 目前已经成为研究的热点^[227]。新月结构(crescent)^[228]、多层椭圆柱体^[235]、以及纳米三角形^[45]等金属纳米结构就是其中的代表^[236-240]。其中“tip to tip”结构的三棱柱金属纳米粒子的双聚物(又称 Bowtie), 因为在双聚物的间隙间存在巨大的局部电场增强能力形成所谓的“热点”而受到光天线、LSPR、SERS 等领域的广泛关注^[241-243]。

J. N. Farahani 等人通过聚焦离子束光刻 (FIB) 在原子力显微镜的 Si₃N₄ 尖端上制作 Bowtie 光天线^[241-242], 同时实验证明了这种新颖的光学天线探针通过馈隙处的增强和光近场集中, 既可使单量子点的光致发光增强, 又可以实现高空间分辨率的单量子点成像和光谱研究。

斯坦福大学研究小组长期以来从事对纳米光天线的研究, 他们对耦合 Bowtie 天线在可见光波段的性质进行了理论和应用研究。由于 Bowtie 的局域电场增强性质, 斯坦福大学研究小组还对其应用进行了探索, 包括用 Bowtie 结构探索表面增强拉曼散射的化学增强因子^[243]、将 Bowtie 结构用于纳米尺寸光学光刻等。正如前面的章节所述, 表面增强拉曼散射的增强包括物理增强和化学增强, 对化学增强效应特别是化学增强因子至今仍不是非常明确。斯坦福大学研究小组首次采用 Bowtie 结构作为 SERS 基底, 采用对巯基苯氨分子作为探针分子, 对 SERS 中的化学增强进行了探索。他们采用电子束光刻制作 gap≤20nm 的 Bowtie 纳米结构, 并在结构上方自组装一层对巯基苯胺 pMA 分子。实验采用波长为 830nm 的线偏振连续激光二极管进行激励, 用共聚焦显微镜进行成像, 采用光栅光谱仪和冷 Si CCD 探测器获得拉曼光谱^[243]。实验结果表明在金 bowtie 结构上, 获得

了大于 10^7 的化学增强因子, 这比先前的研究要高, 分析是由于在 bowtie 的 Au 表面与 pMA 分子间发生了电荷转移。

超小尺寸光刻是当今集成芯片技术发展的基础, 而光天线局域增强的特性为在光刻胶上产生超小尺寸结构提供了一种可能。斯坦福大学研究小组首次采用 Bowtie 结构作为制作工具, 在低入射多光子能量密度的情况下, 在聚合光刻胶 (SU-8) 上制作出了直径小于 30nm 的纳米结构。这种纳米结构的制作是由于局域增强导致非线性聚合实现, 其制作过程大体如下: 首先通过旋转涂胶在 bowtie 结构上形成 75nm 厚的 SU-8 光刻胶膜, 然后在样品扫描光学显微镜下完成曝光, 采用锁模的钛蓝宝石激光器 (mode-locked Ti:sapphire laser), 激光波长为 800nm, 激光通过数值孔径 NA=1.3 的 100 $\times$ 物镜在样品上聚焦于衍射极限点, 曝光平均功率介于 10 μ W 到 10mW 之间。观察不同曝光功率下的样品 AFM 图和 SEM 图^[243], 发现在高平均功率曝光时, bowtie 周围的光刻胶都得到了有效曝光, 这是由于 bowtie 处的局部增强电场使得其周围的光刻胶融化或者热脱胶, 而在入射光功率仅为 120 μ W 时, 只有在 bowtie 间隙处得到变暗的区域, 这为 bowtie 结构间隙处局域电场增强的性质给出了很好的实验证实。

除了斯坦福大学外, 还有许多团队致力于 bowtie 结构的研究, 如哈佛大学 Ertugrul Cubukcu 团队, 他们将纳米 bowtie 结构集成到商业二极管激光器表面, 并定义其为等离子体激光天线, 又提出将耦合金属条形光天线阵列集成到光纤平面上, 形成表面等离子体光学天线光纤探针, 可应用于化学和生物探测以及表面增强拉曼散射等领域^[244-245]。Rice 大学的 Ward 等人采用电子束光刻 EBL 形成多 bowtie (“multibowtie”) 结构, 其间隙最小可小于 5nm, 在该结构上, 采用浓度 1 mmol/L 的 pMA 溶液作为拉曼探针分子, 观察该 pMA 分子的 SERS 谱, 实验结果表明能够在 bowtie 结构上观察到单分子所特有的闪烁 (“blinking”) 和谱漂移 (“spectral diffusion”) 现象, 表明该结构的拉曼增强能力可以达到单分子探测水平^[246]。

可见, Bowtie 结构因为巨大的局部电场增强能力而具有作为新型 SERS 基底的潜力。在本章中, 若无特别声明, 我们研究的 Bowtie 结构的基本形状为如图 4-1 所示的两个纳米三棱柱体以顶尖相对 (tip to tip) 的形式布局, 其中三角形的顶尖处理为将其中一个尖角切去, 定义 Y 方向为沿 gap 的方向, Z 方向为三角形平面中与 Y 垂直的方向, 右边三角形边长为 b , 左边三角形边长为 a , Bowtie 的