

# Direkte und markierungsfreie Detektion von festphasengebundenen Substanzen durch oberflächenverstärkte Raman-Streuung\*\*

Carsten Schmuck,\* Peter Wich, Bernd Küstner, Wolfgang Kiefer und Sebastian Schlücker\*

Festphasengebundene Substanzen finden heutzutage vielfältigen Einsatz in der Chemie: nicht nur bei der Synthese (z. B. für Nucleinsäuren, Peptide oder Kohlenhydrate), sondern auch für die weitere Untersuchung und direkte Anwendung in der supramolekularen Chemie<sup>[1]</sup> oder der medizinischen Chemie.<sup>[2]</sup> In der Regel wird dabei ein vernetztes Polystyrolharz mit einer Beladung von einigen 100 pmol Substanz pro Harzkügelchen verwendet. Wegen dieser sehr geringen Mengen ist es sehr schwierig, die gebundenen Substanzen auf den Harzkügelchen direkt zu analysieren. Meistens werden daher die Eigenschaften der harzgebundenen Substanzen (z. B. ihre Fähigkeit zur Bindung eines spezifischen Substrats) in Screening-Experimenten mit fluorophor- oder chromophormarkierten Substraten untersucht.<sup>[3]</sup> Dabei ist es aber oft nicht möglich, direkt die Identität der auf dem Harz befindlichen Substanz oder gar die Struktur der gebildeten Komplexe zu bestimmen.<sup>[4]</sup> Für Bibliotheken aus chemisch sehr unterschiedlichen Substanzen gelingt manchmal eine direkte massenspektrometrische (MS) Analyse,<sup>[5]</sup> da die Substanzen hierfür aber vom Harz abgespalten werden müssen, ist eine solche Analyse unmittelbar während eines Screening-Experiments nicht möglich. Eine Alternative besteht in der Einführung eines Markers („chemical tagging“), was aber den Aufwand der Festphasensynthese erhöht, da zusätzlich zur Substanz auch noch der Marker auf dem Harz angebracht werden muss, der es später ermöglicht, die Identität der harzgebundenen Substanz zu bestimmen. Weil der Marker weder bei der Synthese der Substanz noch beim anschließenden Screening stören darf,<sup>[4]</sup> stehen häufig nur wenige Marker zur Auswahl.<sup>[6]</sup>

Eine direkte und markierungsfreie Detektion einer festphasengebundenen Substanz wäre daher eine interessante Alternative. Allerdings muss jede spektroskopische Charak-

terisierung einer festphasengebundenen Substanz zwei Herausforderungen meistern: die geringe Beladung und den großen Überschuss an Harzmaterial, das meistens ebenfalls spektroskopisch erfasst wird. Bei picomolarer Beladung scheiden dadurch, zumindest für die üblichen Harzmaterien, Techniken wie die nicht ausreichend empfindliche Festkörper-NMR-Spektroskopie aus. Auch hoch empfindliche Techniken wie die UV-Absorptions- oder die Fluoreszenzspektroskopie sind nicht geeignet. Prinzipiell wären schwingungsspektroskopische Techniken wie die Raman-<sup>[7]</sup> oder die IR-Spektroskopie gut einsetzbar,<sup>[8]</sup> da sie nicht nur ausreichend empfindlich sind, sondern (im Unterschied zu UV-Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie) auch detaillierte Informationen über die chemische Zusammensetzung und Struktur der harzgebundenen Substanzen liefern.<sup>[9]</sup> Normalerweise gelingt es mit schwingungsspektroskopischen Techniken aber nicht, die eigentliche Substanz von dem ebenfalls spektroskopisch aktiven Harzmaterial zu unterscheiden. In diesem Zusammenhang berichten wir hier – unseres Wissens nach – erstmalig, dass die oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS, surface-enhanced Raman scattering) erfolgreich eingesetzt werden kann, um direkt und markierungsfrei innerhalb weniger Sekunden eine gebundene Substanz auf einem einzelnen Harzkügelchen zu detektieren.<sup>[10]</sup> SERS vereint dabei die Vorteile der Raman-Spektroskopie mit einer hoch empfindlichen Detektion von Substanzen in der Nähe der Oberfläche von Edelmetallnanostrukturen.<sup>[11]</sup>

Edelmetallnanopartikel verstärken Raman-Signale für Moleküle, die sich in unmittelbarer Nähe ihrer Oberfläche befinden, um bis zu 14 Größenordnungen. Die starke Abstandsabhängigkeit des SERS-Effekts ( $\sim r^{-10}$ ) lässt sich nun nutzen, um eine festphasengebundene Substanz vom Harzmaterial zu unterscheiden (Abbildung 1). Als Beispiel für die Anwendung von SERS zur direkten und markierungsfreien Detektion einer festphasengebundenen Substanz haben wir den künstlichen Peptidrezeptor CBS-Lys-Lys-Phe-NHR (**1**; CBS = Guanidinocarbonylpiperol-Kation) auf einem handelsüblichen TentaGel-NH<sub>2</sub>-Harz synthetisiert.<sup>[12]</sup>

Die Silbernanopartikel wurden durch die Reduktion einer Silbernitratlösung mit Natriumcitrat hergestellt. 400  $\mu$ L dieser kolloidalen Lösung wurden dann mit gequollenen Harzkügelchen vermischt, die vorher mindestens 3 h mit einer 0.1M KCl-Lösung versetzt worden waren. Auf dem Harz war zuvor durch Standard-Festphasenpeptidchemie mithilfe einer Fmoc-Schutzgruppenstrategie die Verbindung **1** synthetisiert worden.<sup>[12b]</sup> Die Aggregation der Nanopartikel wurde durch die Zugabe von 60  $\mu$ L einer 0.1M KCl-Lösung eingeleitet. Nach der Aggregation der Nanopartikel wurde durch Zugabe von 30  $\mu$ L 0.1M HCl der pH-Wert auf 2.5 eingestellt. Die Aufnahme der SERS-Spektren erfolgte dann mit

[\*] Prof. Dr. C. Schmuck, Dipl.-Chem. P. Wich

Institut für Organische Chemie

Universität Würzburg

Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)

Fax: (+49) 931-888-4625

E-Mail: schmuck@chemie.uni-wuerzburg.de

Dipl.-Chem. B. Küstner, Prof. Dr. W. Kiefer, Priv.-Doz. Dr. S. Schlücker

Institut für Physikalische Chemie

Universität Würzburg

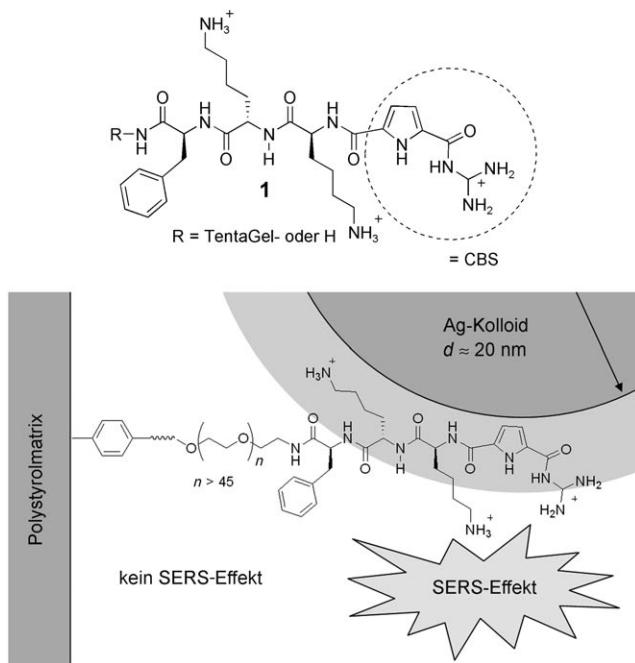
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)

Fax: (+49) 931-888-6332

E-Mail: sebastian.schluecker@uni-wuerzburg.de

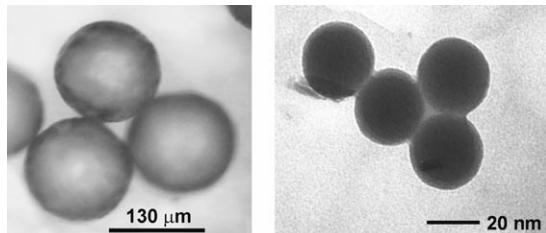
[\*\*] Wir danken der DFG (SFB 630, TP A3 und C1) und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



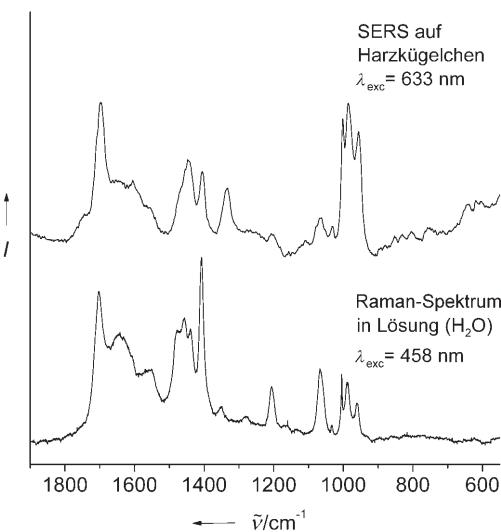
**Abbildung 1.** Kolloidale Silbernanopartikel als SERS-Substrat führen zu einer enormen Verstärkung der Raman-Signale von Substanzen, die sich in unmittelbarer Nähe der Oberfläche der Nanopartikel befinden. Somit werden selektiv nur die Signale von **1** verstärkt, nicht aber diejenigen der Polystyrolmatrix.

einem Raman-Mikrospektrometer (Anregungswellenlänge 633 nm). Da die Nanopartikel im vorliegenden Fall etwa um den Faktor 10000 kleiner sind als die Harzkügelchen (Abbildung 2), wechselwirken die Silbernanopartikel nur mit kleinen Ausschnitten der Oberfläche der Harzkügelchen. Das



**Abbildung 2.** Ein Mikroskopiebild der Polystyrolkügelchen (TentaGel), auf denen **1** synthetisiert wurde (links), und eine TEM-Aufnahme der Silbernanopartikel, die zum SERS-Effekt führen (rechts). Die Nanopartikel sind um den Faktor 10<sup>4</sup> kleiner als die Polystyrolkügelchen.

Nanopartikel „sieht“ daher im Wesentlichen nur die Moleküle von Verbindung **1**, die über lange Polyethylenglycol-Ketten ( $M \approx 2000 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $n > 45$ ) auf der Polystyrolmatrix angebracht sind. Die Matrix ist dagegen zu weit entfernt, um noch eine signifikante SERS-Verstärkung zu erfahren. Unter diesen Bedingungen war es uns möglich, mit 50 fmol der Verbindung **1** auf einem Harzkügelchen innerhalb weniger Sekunden ein Raman-Spektrum zu erhalten (Abbildung 3, oben). Ein qualitativer Vergleich mit dem konventionellen Raman-Spektrum einer Lösung von **1** ( $R = H$ ), für das eine

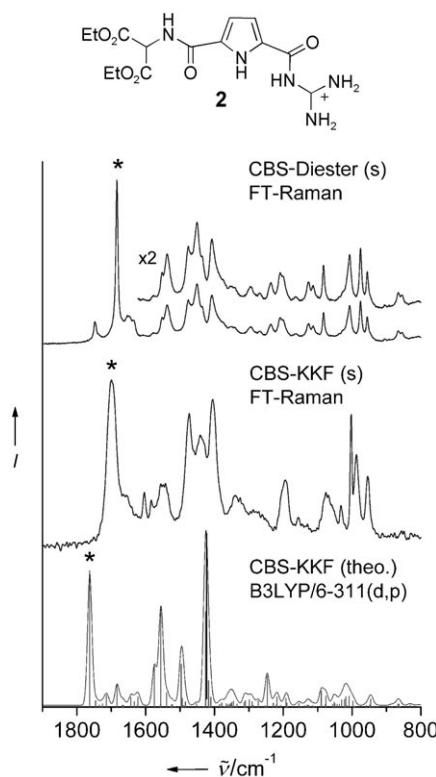


**Abbildung 3.** SERS-Spektrum von **1** auf einem einzelnen Harzkügelchen (oben). Als Referenz ist ein konventionelles Raman-Spektrum gezeigt, das in Lösung aufgenommen wurde (unten).

20 mM wässrige Lösung und etwa 30 Minuten Zeit benötigt wurden, bestätigt, dass im SERS-Spektrum keine Beiträge der Polystyrolmatrix zu beobachten sind (Abbildung 3, unten). Diese Methode zur direkten Detektion auf dem Harz mit SERS ist etwa 10<sup>6</sup>- bis 10<sup>7</sup>-mal empfindlicher als die Raman-Spektroskopie in Lösung und benötigt nur Sekunden gegenüber einigen Minuten.<sup>[13]</sup> Wir konnten somit zeigen, dass eine direkte und markierungsfreie Detektion von festphasengebundenen Substanzen auch auf den üblicherweise bei Synthesen verwendeten Harzen mit entsprechend geringer Beladung möglich ist.

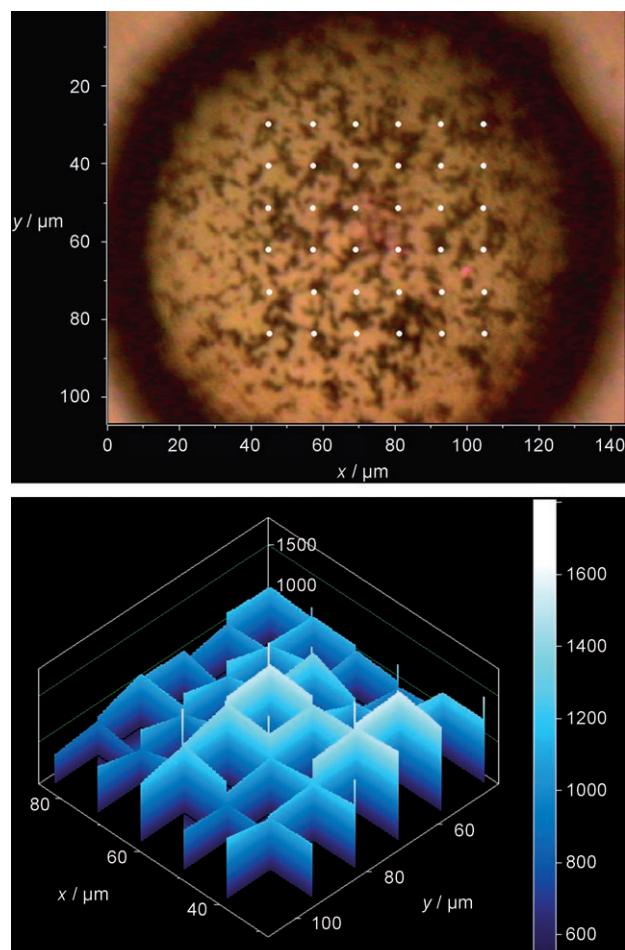
Ebenso wurde das FT-Raman-Spektrum von **1** im Festkörper aufgenommen (Abbildung 4, Mitte) und mit einem berechneten Raman-Spektrum verglichen (Abbildung 4, unten). Auf diese Weise können einzelne Banden im SERS-Spektrum von **1** zugeordnet werden: So stammt die mit einem Stern markierte Bande bei ca. 1700 cm<sup>-1</sup> im Wesentlichen von Schwingungsbeiträgen der CBS-Einheit. Dies konnte auch durch den Vergleich mit dem experimentellen Festkörper-Raman-Spektrum für den Guanidinocarbonylpyrrol-Diester **2** (CBS-Diester, Abbildung 4, oben) sichergestellt werden. Verbindung **2** fehlt der Tripeptid-Teil von **1**, aber ihr Spektrum weist trotzdem die gleiche charakteristische Bande bei 1700 cm<sup>-1</sup> auf.

Wir haben weiterhin die Reproduzierbarkeit unseres neuen schwingungsspektroskopischen Ansatzes zur direkten Detektion von festphasengebundenen Substanzen untersucht. Dazu wurden einerseits jeweils SERS-Spektren an unterschiedlichen Stellen der Oberfläche eines Harzkügelchens aufgenommen, andererseits Spektren von verschiedenen Harzkügelchen. In allen Fällen wurde nahezu das gleiche SERS-Spektrum für **1** erhalten (siehe die Hintergrundinformationen).<sup>[14]</sup> Selbst die Intensitäten der einzelnen Banden variierten nur sehr wenig, wie exemplarisch für die Markerbande bei 1700 cm<sup>-1</sup> an verschiedenen Stellen auf einem Harzkügelchen in Abbildung 5 gezeigt ist. Unsere Methode ist auch in der Lage, zwischen verschiedenen harzgebundenen



**Abbildung 4.** Experimentelle Festkörper-FT-Raman-Spektren eines CBS-Diesters **2** (oben) und von CBS-Lys-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (**1**; Mitte) bei einer Anregungswellenlänge von 1064 nm. Das unten abgebildete Raman-Spektrum wurde für **1** auf dem B3LYP/6-311G(d,p)-Niveau berechnet. Durch einen Vergleich dieser Spektren kann die mit einem Stern markierte Bande eindeutig der CBS-Einheit zugeordnet werden. Diese Bande wurde daher als Markerbande im Rasterexperiment in Abbildung 5 verwendet.

Substanzen zu unterscheiden. Dazu haben wir das SERS-Spektrum einer zu **1** strukturell ähnlichen Verbindung, CBS-Ala-Ile-Val-NHR, aufgenommen, die aber eine andere Aminosäuresequenz im Tripeptidteil enthält. Das SERS-Spektrum, das wir von dieser Substanz wiederum innerhalb weniger Sekunden direkt von einem einzelnen Harzkügelchen aufgenommen haben, entspricht dem konventionellen Raman-Spektrum im Festkörper. Allerdings weist dieses SERS-Spektrum charakteristische Unterschiede zum Spektrum von **1** auf, sodass unsere Methode zwischen verschiedenen harzgebundenen Substanzen unterscheiden kann. Dadurch eröffnen sich zusätzliche Möglichkeiten, diese Methoden zur Strukturbestimmung und Identifizierung unbekannter Substanzen einzusetzen oder anhand von Änderungen im Raman-Spektrum eine Komplexierung an der Harzoberfläche zu verfolgen. Die Technik ist zudem nicht auf das TentaGel-Harz beschränkt – auch andere Harze wie PAM (= Phenylacetamidomethyl-Harz) können eingesetzt werden. Allerdings ist die Qualität dann etwas schlechter als bei TentaGel, was wir auf den stärkeren Untergrund für die Polystyrolmatrix in diesen Spektren zurückführen. Wegen kürzerer Linker ist der Abstand zu den Nanopartikeln geringer als bei TentaGel (Abstandsabhängigkeit von SERS).



**Abbildung 5.** Mikroskopiebild eines einzelnen TentaGel-Harzkügelchens mit aggregierten Silbernanopartikeln auf der Oberfläche (oben). An jedem weiß eingezeichneten Punkt wurde ein SERS-Spektrum von 1 aufgenommen (Messdauer 10 Sekunden). Die Reproduzierbarkeit dieser Spektren zeigt sich anhand der 3D-Darstellung der grundlinienkorrigierten Raman-Intensitäten der Markerbande bei 1700 cm<sup>-1</sup> (siehe SERS-Spektrum in Abbildung 3) (unten).

Unseres Wissens ist dies der erste direkte und markierungsreduzierte Nachweis einer festphasengebundenen Substanz auf einem einzelnen Harzkügelchen mit SERS-Spektroskopie. Die ortsaufgelöste Detektion, d.h. die Kombination mit der Raman-Mikrospektroskopie,<sup>[15]</sup> sollte nun auch die Analyse von kombinatorischen Bibliotheken erlauben. In weiteren Arbeiten wollen wir testen, inwieweit SERS genutzt werden kann, um die Wechselwirkung von harzgebundenen Substanzen mit anderen Molekülen unmittelbar zu beobachten.

## Experimentelles

Zur Synthese der Silbernanopartikel wurde ein Ansatz von Lee und Meisel modifiziert.<sup>[16]</sup> Frisch entgastes und mit Argon gesättigtes deionisiertes Wasser (18 MΩ) wurde in allen Experimenten verwendet. Alle Glasgeräte wurden sorgfältig mit Königswasser gereinigt und mit deionisiertem Wasser gespült. Die Umsetzung erfolgte unter Argon in einem 500-mL-Rundkolben mit Kühlern. Zu einer siedenden

Lösung von  $\text{AgNO}_3$  (45 mg) in Wasser (250 mL) wurde unter heftigem Rühren eine 1-proz. Natriumcitrat-Lösung (5 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend weitere 90 min erhitzt.

Die SERS-Spektren wurden mit einem Raman-Mikrospektrometer (Horiba-Jobin-Yvon, Modell LabRam, holographisches Gitter mit 1800 Strichen pro Millimeter) aufgenommen. Die Strahlung eines HeNe-Lasers (632.8 nm) wurde mit einem 50fach vergrößernden Mikroskopobjektiv (Olympus, Modell LMPlanFL) auf die Probe fokussiert und in Rückstreuometrie gesammelt. Die Laserleistung auf der Probe betrug bei diesen Messungen etwa 10 mW. Die Detektion des Raman-Spektrums erfolgte mit einer Peltier-gekühlten CCD-Kamera. Die Autofluoreszenz der Verbindungen, wie sie bei den konventionellen Raman-Spektren auftritt, wird in den SERS-Experimenten auf dem Harz effizient gelöscht.

Eingegangen am 22. Dezember 2006  
Online veröffentlicht am 11. Mai 2007

**Stichwörter:** Analytische Methoden · Raman-Spektroskopie · SERS (oberflächenverstärkte Raman-Streuung) · Supramolekulare Chemie

- [1] Übersichten zum Einsatz von kombinatorischen Bibliotheken in der supramolekularen Chemie: a) N. Srinivasan, J. D. Kilburn, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 305–310; b) B. Linton, A. D. Hamilton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 307–312; c) Y. R. de Miguel, J. M. K. Sanders, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 417–421.
- [2] Beispiele zur Anwendung kombinatorischer Bibliotheken in der medizinischen Chemie: a) J. Buchardt, C. Bruun Schiødt, C. Krog-Jensen, J.-M. Delaisse, N. T. Foged, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 624–638; b) H. Smith, M. Brdaley, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 326–332; c) S. Leon, R. Quarrell, G. Lowe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2997–3002.
- [3] W. C. Still, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 155–163. In einigen Fällen fand man, dass die Chromophormarker, die zum Screening der Bibliotheken an den Substanzen angebracht worden waren, auch mit dem Harz und den dort gebundenen Substanzen wechselwirken. Ein Beispiel: H. Wennemers, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 6413–6416.
- [4] Übersichten zur Dekodierung und Dekonvolution von kombinatorischen Bibliotheken: a) R. L. Affleck, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 257–263; b) C. Barnes, S. Balasubramanian, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 346–350; c) A. W. Czarnik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 60–66.
- [5] a) X. Cheng, J. Hochlowski, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2679–2690; b) D. B. Kassel, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 255–267; c) C. Enjalbal, J. Martinez, J.-L. Aubagnac, *Mass Spectrom. Rev.* **2000**, 19, 139–161.
- [6] Ein aktuelles Beispiel zu den Einschränkungen, die sich durch einen Kodierungsstrang ergeben können: J. Shepherd, T. Gale, K. B. Jensen, J. D. Kilburn, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 713–720.
- [7] *Infrared and Raman Spectroscopy* (Hrsg.: B. Schrader), VCH, Weinheim, **1995**.
- [8] a) B. D. Larsen, D. H. Christensen, A. Holm, R. Zillmer, O. F. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6247–6253; b) J. Hochlowski, D. Whittern, J. Pan, R. Swenson, *Drugs Future* **1999**, 24, 539–554; c) B. Yan, H.-U. Gremlich, S. Moss, G. M. Coppola, Q. Sun, L. Liu, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1, 46–54; d) M. P. Houlne, C. M. Sjostrom, R. H. Uibel, J. A. Kleinmeer, J. M. Harris, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 4311–4319.
- [9] Harzgebundene Substanzen können in einigen Fällen unmittelbar durch IR- oder Raman-Spektroskopie detektiert werden, wenn charakteristische Markerbanden spezieller funktioneller Gruppen in einem Spektralbereich vorhanden sind, der normalerweise keine Beiträge der Matrix enthält: a) D. E. Pivonka, *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 33–38; b) G. S. Mandair, Z. Yu, N. Gallauf, M. Bradley, A. E. Russell, *Appl. Spectrosc.* **2004**, 58, 1282. Eine Übersicht zum Einsatz der optischen Spektroskopie in der kombinatorischen Chemie: H.-U. Gremlich, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 61, 179–187.
- [10] Bisher wurden lediglich festphasengebundene Nanopartikel zur Detektion von Analyten in Lösung eingesetzt (Methode der „On-Bead“-Injektion): M. J. A. Canada, A. R. Medina, J. Frank, B. Lendl, *Analyst* **2002**, 127, 1365–1369.
- [11] a) M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* **1985**, 57, 783–826; b) A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, W. Akemann, *J. Phys. Condens. Matter* **1992**, 4, 1143–1212; c) K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2957–2975; d) „Surface-enhanced Raman Spectroscopy: Advancements and Applications“: Z.-Q. Tian, *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 466–470; e) *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (Hrsg.: L. F. Cohen, R. Brown, M. J. T. Milton, W. E. Smith), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006** (*Faraday Discuss.* **2006**, 132); f) R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley, New York, **2006**; g) K. Kneipp, H. Kneipp, J. Kneipp, *Acc. Chem. Res.* **2006**, 39, 443–450.
- [12] a) C. Schmuck, M. Heil, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 1339–1348; b) C. Schmuck, M. Heil, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1232–1238; c) C. Schmuck, P. Wich, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4383–4387; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4277–4281.
- [13] Dieser Zahlenwert ergibt sich aus folgender Abschätzung: Der Laserfokus umfasst in erster Näherung ein zylindrisches Volumen ( $V_{\text{Fokus}} = \pi r^2 h$ ) mit einem Radius  $r$  (lateral) und einer Höhe  $h$  (axial). In unserem Experiment betragen die Obergrenzen  $r = 2 \mu\text{m}$  und  $h = 20 \mu\text{m}$ . Das Volumen eines einzelnen Harzkugelchens ( $V_{\text{Kugelchen}} = \frac{4}{3} \pi r^3$ ) berechnet sich mit einem Radius von  $r = 50 \mu\text{m}$ . Die absolute Menge an Verbindung **1** im Laserfokus ist daher gegeben durch  $V_{\text{Fokus}}/V_{\text{Kugelchen}}$  multipliziert mit der Menge an **1** auf dem gesamten Harzkugelchen (100 pmol), was ungefähr 50 fmol ergibt. Für das konventionelle Raman-Spektrum (Abbildung 3, unten) wurde eine 20 mm Lösung und eine kubische Küvette mit 5 mm Höhe verwendet. Der Radius des Laserstrahls betrug ca. 1 mm, woraus sich eine absolute Menge von etwa 300 nmol **1** im entsprechenden zylindrischen Volumen der Lösung ergibt. Die detektierte Menge an Verbindung **1** ist somit in unserem Experiment ungefähr um den Faktor  $10^6$ – $10^7$  kleiner als bei der konventionellen Raman-Spektroskopie in Lösung.
- [14] Eine Analyse von 36 Spektren zeigt, dass die relative Standardabweichung (RSD) nach Grundlinienkorrektur und Normierung der SERS-Spektren nur etwa 10 % beträgt (siehe die Hintergrundinformationen).
- [15] Der Zeitaufwand beim Einsatz der Raman-Mikroskopie in Rasterexperimenten hängt direkt von der Zahl der räumlich aufgelösten Messungen ab. Daher werden sehr kurze Messzeiten zur Aufnahme eines Raman- oder SERS-Spektrums benötigt: S. Schlücker, M. D. Schaeberle, S. W. Huffman, I. W. Levin, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4312–4318.
- [16] P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 3991–3995.