

Využitie elipsometrie v biosenzorových aplikáciách

Teoretická časť

Spektroskopická elipsometria s využitím plazmónovej rezonancie (SPR – *surface plasmon resonance*) je veľmi citlivá metóda vhodná na meranie adsorpčných povrchových procesov, pri ktorých dochádza k naväzovaniu meraných molekúl na povrchovo upravený senzor. Z optického hľadiska hovoríme o zmene hrúbky vrstvy na úrovni zlomkov nanometrov, prípadne ide o nepatrnú zmenu indexu lomu, rádovo 10^{-5} . Táto metóda sa v literatúre často uvádza pod názvom elipsometria úplného vnútorného odrazu (TIRE – *total internal reflection ellipsometry*).

Povrchový plazmón

Povrchový plazmón (*surface plasmon polariton* – SPP) je typ elektromagnetickej vlny, ktorá môže za určitých podmienok vzniknúť na rozhraní kovu a dielektrika. Vlna sa pohybuje po ploche rozhrania a nešíri sa do okolitého prostredia. Jej amplitúda exponenciálne klesá so vzdialenosťou od rozhrania, pričom logaritmický dekrement je na úrovni niekoľkých desiatok nanometrov. Takéto vlnenie je viazané na rozhranie a okolo neho má charakter *evanescentnej vlny*. Je dôsledkom interakcie elektromagnetického žiarenia s vodivostnými elektrónmi kovu v tesnej blízkosti rozhrania. Ak tieto elektróny kmitajú priečne vzhľadom na rozhranie, nachádzajú sa časť periódy v priestore kovu a ďalšiu časť periódy v priestore dielektrika. Lord Rayleigh koncom 19. storočia ukázal, že takáto zmena prostredia umožňuje vznik stabilnej vlny viazanej na rozhranie. Povrchový plazmón môžeme vybudiť elektromagnetickým žiarením (napr. svetlom), ak splníme rezonančnú podmienku

$$k_{\parallel} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \quad (8.1)$$

kde k_{\parallel} je priemet vlnového vektora budiacej elektromagnetickej vlny do roviny rozhrania a zároveň je to vlnový vektor povrchového plazmónu. Vzťah (8.1) je disperzný vzťah plazmónovej vlny skomplikovaný tým, že relatívna permitivita kovu ε_m silne závisí od frekvencie ω a v prípade generácie plazmónu musí byť záporná. Relatívna permitivita dielektrika ε_d závisí od frekvencie len málo, môžeme ju považovať za reálnu kladnú konštantu.

Nakoľko je k_{\parallel} väčšie ako vlnový vektor dopadajúcej vlny, nie sme schopní povrchový plazmón priamo vybudiť. Experimentálna realizácia si vyžaduje použitie vhodného väzbového prvku, napr. optického hranola alebo mriežky.

Spektroskopická elipsometria

Elipsometer ako optické zariadenie zaznamenáva zmenu stavu polarizovaného svetla po odraze od meraného povrchu. Výsledkom jedného elipsometrického merania je pomer amplitúdových odrazností p a s polarizovanej vlny, ktorý je vo všeobecnosti komplexné číslo.

Môžeme ho vyjadriť v exponenciálnom tvare

$$\frac{r_p}{r_s} = \tan \psi \exp(i\Delta) \quad (8.2)$$

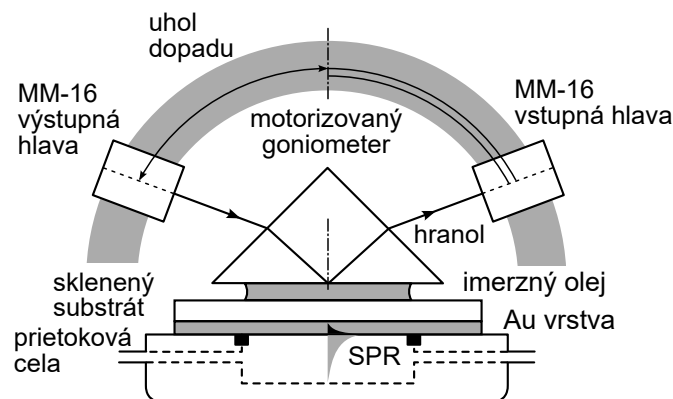
kde ψ a Δ sú elipsometrické uhly. Vzťah (8.2) sa nazýva *elipsometrická rovnica*. Spektroskopický elipsometer poskytuje závislosť elipsometrických uhlov od vlnovej dĺžky dopadajúceho svetla, $\psi(\lambda)$ a $\Delta(\lambda)$. Analýzou týchto spektrálnych závislostí a riešením inverznej úlohy dokážeme zistiť štruktúru objektu, od ktorého sa svetlo pri meraní odrážalo. Takto sa určujú hrúbky tenkých vrstiev a ich komplexné indexy lomu alebo permitivity. Metóda je natoľko citlivá, že dokáže zaznamenať hrúbky tenkých vrstiev rádovo desiatin nanometra.

Existuje niekoľko konštrukčných typov spektroskopických elipsometrov. V tomto meraní budeme pracovať so spektroskopickým elipsometrom Horiba Jobin Yvon MM-16, ktorý zabezpečuje premenlivú polarizáciu dopadajúceho svetla a jeho detekciu pomocou elektricky ovládaných polarizátorov na báze tekutých kryštálov.

Elipsometria povrchových plazmónov

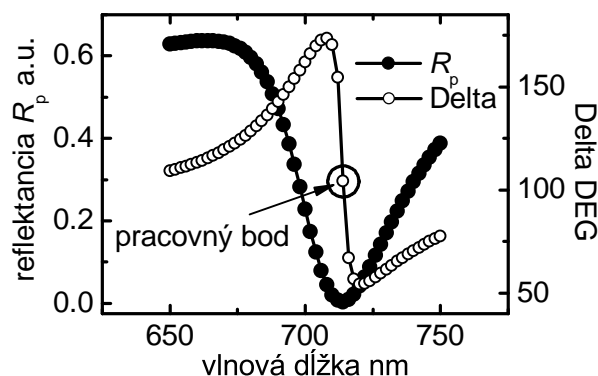
Spojenie spektroskopického elipsometra a povrchových plazmónov má názov elipsometria úplného vnútorného odrazu (TIRE). Využitím elipsometrie a SPR dostávame experimentálnu metódu schopnú zaznamenávať veľmi malé zmeny na povrchu meranej vzorky, ktoré sa dejú napríklad pri adsorpčných procesoch v biosenzoroch. Schéma merania je na obrázku 8.1. Biele svetlo dopadá na väzbový hranol, pričom na rozhraní sklo a kov dochádza k úplnému odrazu. Zaznamenávame odrazivosť len o niečo menšiu ako 1 a to v oboch polarizáciách. V časti spektra, kde je splnená podmienka plazmónovej rezonancie, dostávame v odrazivosti p polarizovaného svetla $R_p = r_p^* r_p$ výrazné minimum, pretože veľká časť energie sa preliala do povrchového plazmónu. Elipsometrickú rovnicu vzhľadom na úplný odraz v s polarizácii ($|r_s| \doteq 1$) možno v tomto prípade zjednodušiť na tvar

$$r_p \approx \tan \psi \exp(i\Delta) \quad (8.3)$$



Obr. 8.1: Schéma elipsometrie úplného vnútorného odrazu – TIRE

Ak dôjde k plazmónovej rezonancii, amplitúda $\tan \psi$ dosiahne minimum a v spektre fázy Δ sa objaví výrazná zmena. Na obr. 8.2 je príklad TIRE merania.



Obr. 8.2: Reflektancia p polarizovaného svetla R_p a elipsometrický parameter Δ pri TIRE. K excitácii povrchového plazmónu dochádza v tomto prípade pri vlnovej dĺžke 712 nm. Rezonancia dopadajúceho svetla s SPP je sprevádzaná minimumom v spektre odrazivosti R_p , nakoľko sa všetka energia dopadajúceho svetla preleje do SPP. Rezonančný charakter tohto javu je sprevádzaný výraznou zmenou vo fáze Δ . Pracovný bod leží na lineárnej časti fázovej krivky.

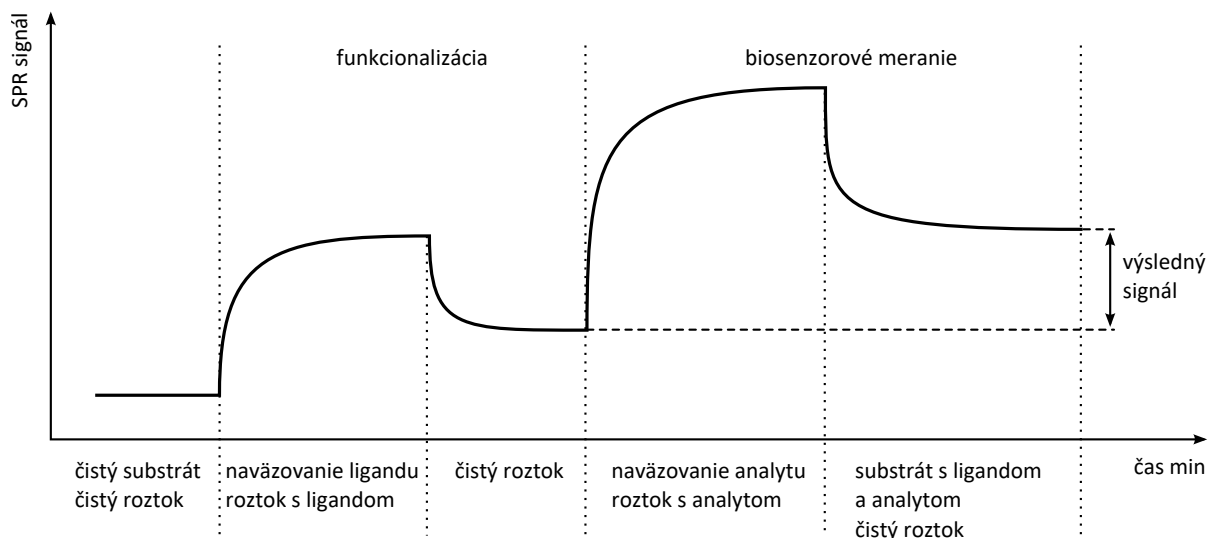
Ak sa čokoľvek udeje v blízkosti rozhrania kovu a kvapaliny, dochádza k zmene rezonančnej podmienky a plazmónové minimum sa posunie, prípadne sa zmení hodnota parametra Δ . Keďže elipsometrické uhly predstavujú amplitúdu a fázu komplexnej veličiny r_p v rezonancii, spektrum fázy Δ je úmerné derivácii amplitúdy $\tan \psi$ podľa frekvencie. Zmeny fázy sú preto omnoho výraznejšie než zmeny amplitúdy a na zvýšenie citlivosti merania je potom možné namiesto posunu minima odrazivosti pozorovať posun hodnoty Δ v pracovnom bode.

Biosenzory

Princíp činnosti biosenzorov je založený na selektívnom zachytávaní špecifických molekúl z roztoku. Na substrát sa najprv naviaže senzorickej molekula, tzv. *ligand*, ktorá môže byť napr. sekvencia báz molekúl DNA alebo RNA (adenín, guanín, cytozín, tymín alebo uracil). Takto pripravené senzory reagujú iba so špecifickými biologickými molekulami v roztokoch. Naviazanie senzorickej molekuly na substrát, tzv. *funkcionalizácia*, sa v prípade zlatých substrátov realizuje pomocou tiolovej SH skupiny, ktorú musia obsahovať molekuly ligandu. Síra vytvára so zlatom kovalentnú väzbu. Substrát sa môže ponoriť do roztoku, prípadne sa vystaví parám, alebo sa roztok s ligandom nechá pretekať priamo v komore biosenzora. Následne sa očistí čistým rozpúšťadlom, čo zabezpečí depozíciu senzorickej monovrstvy.

Na začiatku zaznamenáme signál na pripravenom biosenzore s čistým rozpúšťadlom. Potom do prietokovej cely rovnomerne vpúšťame analyzovaný roztok, v ktorom chceme zistiť prítomnosť konkrétnej biologicky aktívnej látky, tzv. *analytu*. Ak sa v roztoku takéto molekuly nachádzajú, naväzujú sa postupne na senzorickej molekuly a dochádza k zmene

podmienok generácie povrchového plazmónu. Po nasýtení a ustálení signálu necháme systémom pretekať opäť čisté rozpúšťadlo, aby sa odstránili analyty, ktoré nie sú naviazané na senzorické molekuly, ale držia na substráte pomocou slabších Van der Waalsových síl, či prostredníctvom vodíkových mostíkov. Po určitej dobe sa signál ustáli na konečnej hodnote. Získame časový záznam signálu, tzv. *senzogram* ako na obrázku 8.3.



Obr. 8.3: Príklad časového senzogramu s počiatočnou fázou prípravy funkcionalizovaného substrátu. Vyhodnocuje sa rozdiel signálu po naviazaní analyzovanej látky voči signálu s funkcionalizovaným substrátom. SPR signál môže byť vlnová dĺžka minima odrazivosti R_p alebo hodnota elipsometrického parametra Δ v pracovnom bode.

Experimentálna časť

Úlohy

1. Odmerajte a vyhodnoťte závislosť rezonančnej vlnovej dĺžky SPR od uhla dopadu na rozhraní zlato-voda alebo etanol.
2. Vyhodnoťte závislosť parametra Δ v pracovnom bode od uhla dopadu.
3. Nájdite kalibračnú krivku senzora pre rôzne koncentrácie etanolu vo vode.
4. Vyhodnoťte citlivosť metódy vzhľadom na zmenu uhla dopadu a zmenu indexu lomu kvapaliny v prietokovej cele.

Prístroje a pomôcky

Spektroskopický elipsometer Horiba Jobin-Yvon MM-16, prietoková cela, SPR substrát, optický hranol, imerzný olej, elektricky ovládaná pumpa so striekačkou, hadičky, ampulky, pipeta.

Chemikálie

Destilovaná voda, čistý etanol.

Opis zariadenia a metóda merania

Schéma merania sa nachádza na obrázku 8.1. Hlavné meracie zariadenie je spektroskopický elipsometer Horiba Jobin-Yvon MM-16 so spektrálnym rozsahom 430 nm až 850 nm s rozlíšením $\Delta\lambda = 2$ nm. Presné nastavenie uhlov dopadu zabezpečuje motorizovaný goniometer elipsometra, ktorý pracuje v rozsahu $45^\circ - 90^\circ$ s krokom $0,01^\circ$. Činnosť elipsometra je plne automatická, nastavenie jednotlivých prvkov, riadenie merania a analýzu výsledkov zabezpečuje softvér DeltaPsi2.

SPR senzor je homogénna vrstva zlata s hrúbkou 42 nm na sklenenom substráte. Úlohu väzbového prvku plní pravouhlý hranol so štvorcovou základňou so stranou 10 mm. Materiál substrátu a hranolu je optické sklo BK-7.

Rovnomerný prietok analyzovanej kvapaliny zabezpečuje pumpa s mikroposuvným kontinuálnym motorom, do ktorej sa prichytí injekčná striekačka. Motor pumpy ťahá piest striekačky požadovanou rýchlosťou. Hodnota rýchlosti sa nastavuje na ovládacom paneli zariadenia od $1 \mu\text{l}/\text{min}$. Kvapalina sa do prietokovej cely dostáva cez hadičku ponorenú v ampulke. Počas merania treba zabezpečiť, aby sa pod substrátom nevytvárala stabilná vzduchová bublina, ktorá zabraňuje pretekaniu, ale najmä zamedzuje kontaktu kvapaliny s povrchom senzora. Odstránenie bubliny predstavuje nemalý experimentálny problém. Niekedy pomôže dočasná zmena rýchlosti prietoku. Ak nie, je potrebné celu otvoriť, prvky vyčistiť a experiment zopakovať.

Postup merania a vyhodnotenie

1. Väzbový hranol položte na tú stranu substrátu, ktorá nie je pokrytá kovovou vrstvou. Medzi hranol a substrát kvapnite malé množstvo imerzného oleja.
2. Do prietokovej cely vložte tesniaci gumový krúžok a umiestnite naň substrát s hranolom. Hranol upevnite pomocou fixačného ramienka.
3. Prietokovú celu položte na stolček elipsometra a nastavte maximálny signál. Uhol dopadu elipsometra zvolte 82° .
4. Zapojte prietokový systém: Do pumpy umiestnite striekačku a pripojte k nej výstupnú hadičku z prietokovej cely.

5. Ampulku s roztokom umiestnite do držiaka a ponorte do nej vstupnú hadičku prietokovej cely.
6. Na pumpe nastavte rýchlosť prietoku 20 ml/min a spustite motor v režime spätného ťahu.
7. Sledujte signál v elipsometri. Keď kvapalina zaplní prietokovú celu, v spektre signálu sa objaví pokles intenzity.
8. Po ustálení signálu zaznamenajte elipsometrické meranie.
9. Meňte uhol dopadu po malých krokoch – $0,01^\circ$ a zaznamenajte sériu meraní.
10. Pripravte roztoky s rôznymi koncentraciami etanolu vo vode, merajte pri jednom uhle dopadu.

Spracovanie výsledkov

Pomocou softvéru DeltaPsi2, ktorý je súčasťou elipsometra MM-16 exportujte spektrá $R_p(\lambda)$ a $\Delta(\lambda)$. Identifikujte minimá v spektrách odrazivosti fitovaním extrémálnou funkciou (napr. parabolou). Vyneste grafy závislostí λ_{SPR} od uhla dopadu a od koncentrácie. Pri uhloch dopadu spracujte posun paramtera Δ v pracovnom bode a zaznačte hodnoty do grafu závislosti od uhla dopadu.

Kvalitatívne porovnajte závislosť vlnovej dĺžky excitácie SPR od koncentrácie kvapaliny s priebehom indexu lomu roztoku etanolu vo vode.