

Grensvlak Onderzoek met Oppervlakte Plasmon Resonantie

R.P.H. Kooyman, Biogrenslaaggroep, MESA Instituut,
Faculteit Technische Natuurkunde, Universiteit Twente

Inleiding

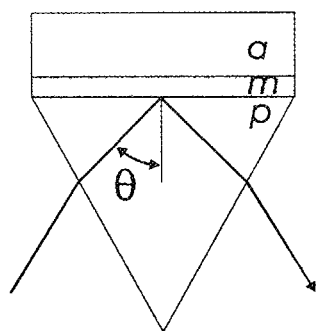
In de laatste tien jaar heeft surface plasmon resonantie (SPR) zich ontwikkeld van een nogal esoterische optische methode tot een populair stuk gereedschap bij het karakteriseren en onderzoeken van allerlei processen die zich op of aan een oppervlak afspelen. Met name bij de ontwikkeling van chemo-optische sensoren, die bedoeld zijn om selectief de aanwezigheid van lage concentraties molekulen te kunnen detecteren speelt SPR een belangrijke rol, door de relatief simpele en compacte instrumentatie die benodigd is om een hoge gevoeligheid te behalen.

In het volgende zal een kort overzicht worden gegeven van de fysica achter SPR, en zullen enige uitvoeringsvormen van een SPR-instrument de revue passeren. Een en ander zal geïllustreerd worden aan de hand van enige specifieke voorbeelden.

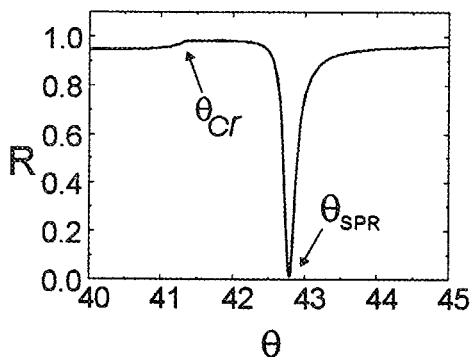
Het verschijnsel SPR

De fysica van SPR is tamelijk gecompliceerd, ik zal me daarom beperken tot een oppervlakkige beschrijving; de meer dan oppervlakkig geïnteresseerde lezer wordt verwezen naar ref.1.

In fig.1a is een rudimentair SPR-instrument weergegeven. We zien een prisma met



(a)



(b)

Figuur 1

Het SPR experiment. (a) Een dunne metaallaag m is aan weerszijden aangesloten tussen twee dielectrische media, a en n ; (b) een representatieve SPR curve wanneer het medium a gevormd wordt door lucht met brekingsindex $n_b=1$. De hoek θ_c correspondeert met de kritische hoek voor de prisma/lucht overgang.

brekingsindex n_p , waarop een zeer dunne metaalfilm (goud of zilver) is aangebracht. Boven de metaallaag is een materiaal met brekingsindex n_b aanwezig, b.v. water. Een gecollimeerde lichtbundel bestraalt het grensvlak metaal/prisma en wordt daar gereflecteerd. Wanneer men nu de reflectiecoëfficiënt bekijkt als functie van de invalshoek blijkt voor een bepaalde hoek (de 'plasmonhoek') een scherp minimum op te treden, geheel tegen de verwachting in (zie fig 1b). Een nadere beschouwing met behulp van de Maxwell-vergelijkingen leert dat iets dergelijks alleen kan plaatsvinden indien de dunne laag een imaginaire brekingsindex heeft; vandaar dat het metaal hier een essentiële rol speelt. Bovendien treedt dit effect alleen op wanneer het aangeboden elektrisch veld een component heeft loodrecht op het metaaloppervlak (*p-polarisatie*): alleen in dat geval is er een elektrisch veld aanwezig aan het metaaloppervlak. Het blijkt nu dat bij bestraling onder de plasmonhoek θ_p de geleidings-elektronen in het metaal een collectieve oscillatie gaan uitvoeren met een vaste faserelatie t.o.v. die van het licht: er is een *plasmon* geëxciteerd. Deze collectieve beweging veroorzaakt een oscillerend elektrisch veld aan de bovenkant van het metaal dat zich tot een afstand van ruwweg de halve golflengte van het gebruikte licht uitstrekt in het medium n_b . Dit veld is sterk verwant aan het z.g. 'evanescente' veld dat optreedt wanneer een grensvlak boven de kritische hoek wordt aangestraald.

Tevens wordt aan de onderzijde van het metaal een elektrisch veld gegenereerd dat in tegenfase is met het invallende licht. Destructieve interferentie van deze beide velden leidt dan tot een minimum in de reflectiecoëfficiënt.

De hoek θ_p is sterk afhankelijk van de waarde van de brekingsindex n_b . Samen met het feit dat het plasmonveld sterk gelokaliseerd is aan het oppervlak verklaart dit waarom SPR zo'n krachtige methode is om oppervlakken te onderzoeken: alleen wanneer molekulen het oppervlak naderen en eventueel een extra laag op de metaalop-

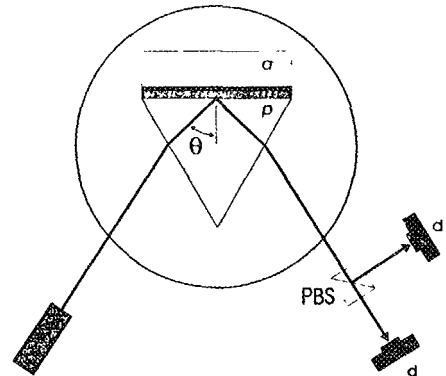
pervlak zullen vormen zal de lokale brekingsindex veranderen en leiden tot een veranderde θ_p .

SPR kan zeer goed kwantitatief beschreven worden met de Maxwell-vergelijkingen; berekeningen laten zien dat een laag-aangroei van 1 nm op het metaaloppervlak correspondeert met een hoekverandering van ca. 0.1 graad, wanneer gebruik gemaakt wordt van rood licht.

SPR instrumentatie

Draaitafel

De meest eenvoudige methode om een SPR experiment te doen is weergegeven in fig.2 waar de prisma/metaallaag combina-



Figuur 2

Goniometer-opstelling; d: detectoren; PBS: polariserende bundelsplitser

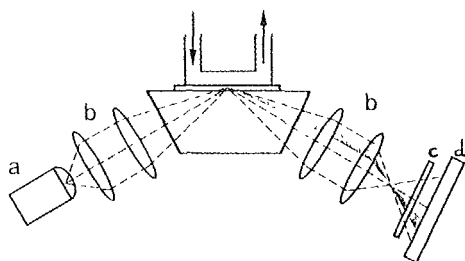
tie geplaatst is op een goniometer met een hoekoplossend vermogen van ca. 0.01 graad. Met deze opstelling kunnen alle eigenschappen van een SP resonantie (resonantiehoek, breedte en diepte van het minimum) nauwkeurig worden bepaald. Simpele fotodiodes worden gebruikt om de gereflecteerde lichtintensiteit te bepalen. Als excitatiebron worden goedkope laag-vermogen lasers (HeNe, diode) gebruikt; de polarisatie-richting van het binnenvallende licht is zodanig dat zowel s- als p-gepolariseerd licht de metaallaag treft. Met

behelp van een polariserende bundelsplitser, geplaatst in de gereflecteerde lichtbundel, wordt de p-polarisatie door de ene detector gemeten, en de s-polarisatie door de andere. Deze laatste detector meet dus alleen (Fresnel-) reflectieverliezen, terwijl de eerste bovendien SPR effecten meet. Door de verhouding tussen de beide responsies te bepalen wordt een signaal verkregen dat evenredig is met de netto SPR responsie.

Voordeel van deze opstelling is, zoals gezegd, dat alle SPR eigenschappen nauwkeurig kunnen worden bepaald; echter, wanneer men tijdsafhankelijke processen wil bestuderen, blijkt deze opstelling vaak een te lage tijdsresolutie te hebben.

Gebruik van gefocusseerde bundel

Een wat meer geavanceerde opstelling is te zien in fig. 3 [2]. Hier worden SPs geëx-



Figuur 3

Gebruik van een gefocusseerde bundel. a: laser diode; b: focuserende optiek; c: grijsfilter; d: diode-array. Bovenop de metaallaag is een stromingscuvet geplaatst.

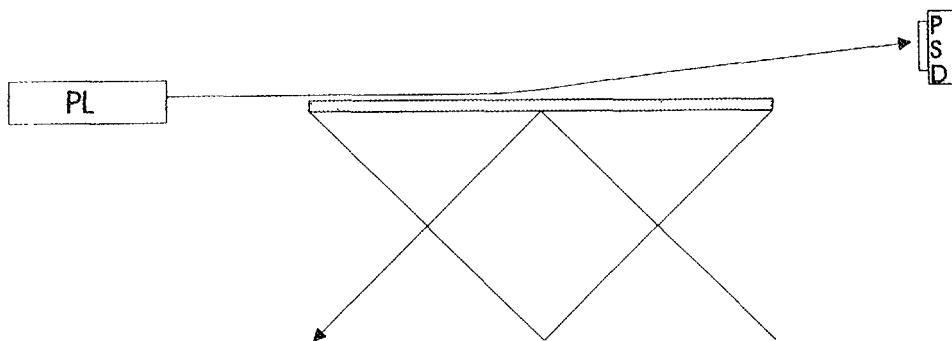
citeerd door een gefocusseerde diode laser. Op deze manier wordt een zeker bereik aan hoeken aangeboden aan het grensvlak. De gereflecteerde bundel wordt afgebeeld op een diode-array. Het hoekbereik waaronder resonantie plaatsvindt zal een lage intensiteit hebben; de output van het diode-array is dus een maat voor de hoekafhankelijke reflectantie. Hoewel de afstand tussen de individuele diodes in het

array relatief groot is ($\sim 20 \mu\text{m}$) maakt het gebruik van numerieke interpolatie technieken een hoekresolutie van ca. 1 milligrad mogelijk. Omdat dit systeem geen bewegende elementen bevat kan het ook snelle SPR veranderingen volgen: de tijdsresolutie zal nu bepaald worden door de haalbare uitleessnelheid van het diode-array. Nadeel van dit systeem is dat het verkrijgen van absolute SPR hoeken niet zo eenvoudig is als in het geval van de boven besproken goniometer. Voor sensor-toepassingen waar men voornamelijk geïnteresseerd is in hoekveranderingen hoeft dit geen probleem te zijn.

Fothermische detectie

Wanneer een SP verval genereert het warmte aan het metaal/dielectricum grensvlak. Dit verschijnsel kan gebruikt worden om de aanwezigheid van een SP te detecteren. In een fotoakoestisch experiment wordt de prisma/metaal combinatie geplaatst in een luchtdichte container. SPs worden aangeslagen door een intensiteits gemoduleerde laser; de resulterende periodieke warmtestroom tengevolge van SP verval veroorzaakt een drukmodulatie in het kamertje die gedetecteerd wordt door een microfoon in het kamertje. Verschil met voorgaande methoden is dat de aanwezigheid van een SP nu wordt waargenomen als een maximum in de responsie. De methode wordt voornamelijk gebruikt in fundamenteel werk waar men geïnteresseerd is in plasmon verval, en is minder geschikt in situaties waar het dielectricum gevormd wordt door een vloeistof zoals water.

Verwant hiermee is een methode waar de warmtestroom optisch gedetecteerd wordt (*fothermische deflectie spectroscopie*). Het principe is weergegeven in fig. 4. Het prisma wordt geplaatst op een goniometer en SPs worden op de conventionele manier aangeslagen. Warmte geproduceerd door vervallende SPs veroorzaakt een gradiënt in de brekingsindex vlak boven de metaallaag. Als gevolg hiervan wordt de voortplantingsrichting van een laserbundel



Figuur 4

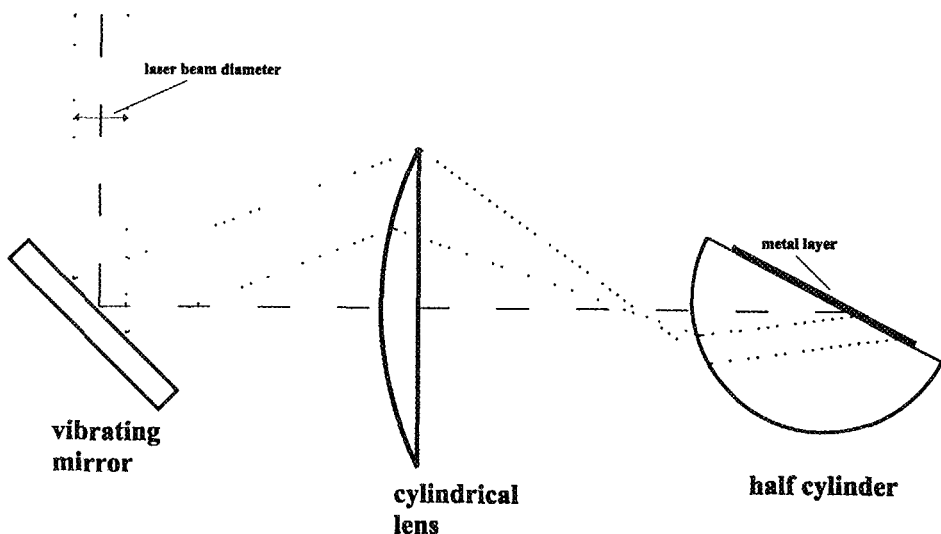
Photothermische deflectie opstelling. De positie van de afgebogen bundel wordt gedetecteerd met een positie-gevoelige detector PSD

die zich parallel aan het grensvlak voortbeweegt afgebogen. Dit wordt gemeten met een positie-gevoelige detector. Wanneer een HeNe laser als excitatiebron wordt gebruikt kan een hoekresolutie van ca. 0.01 graad worden behaald; in tegenstelling tot methodes waarbij de reflectantie wordt bepaald kan hier de resolutie worden opgevoerd door hogere laser vermogens te gebruiken.

Sensor configuraties

Voor sensoroepassingen is naast een hoge hoekresolutie evenzeer van belang dat het systeem compact, eenvoudig en relatief goedkoop is. Er zijn inmiddels een aantal configuraties die min of meer aan deze eisen voldoen.

In fig. 5 is het principe van het gebruik van een *kantelspiegel* weergegeven[3]. De hoek waaronder het licht van een laser-



Figuur 5

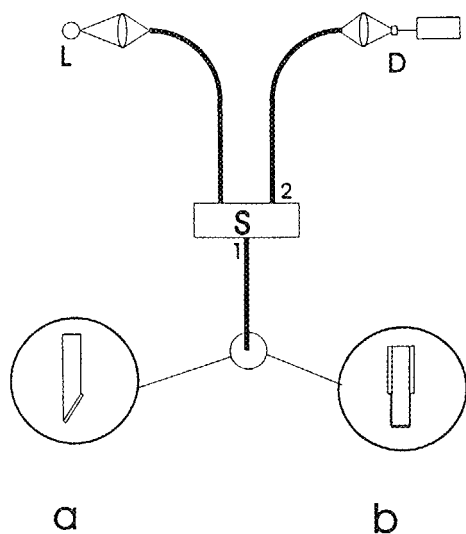
Kantelspiegel opstelling. a: kantelspiegel; b: cilindrische lens.

diode het grensvlak raakt wordt tijdsafhankelijk gemaakt met behulp van een spiegel die vibreert met een frequentie van ca. 50 Hz. Bij goede dimensionering van het optische excitatiepad kan de lichtvlek over een hoekbereik van 5 graden stationair zijn op het grensvlak tot op 0.2 mm, met een bundeldivergentie van 0.02 graad. Hoewel dit systeem in staat is om de volledige plasmoncurve op te meten is het primair ontworpen om alleen het SPR reflectieminimum te bepalen. Dit wordt als volgt gedaan: gedurende één vibratieperiode van de spiegel doorloopt de lichtbundel het reflectieminimum tweemaal. Het tijdsverloop Δt tussen deze twee minima wordt elektronisch gemeten. Als de plasmonhoek verandert, zal Δt ook veranderen. Aangeboden aan een PC kan Δt zo nauwkeurig gemeten worden dat een netto hoekresolutie van ca. 0.001 graad behaald wordt. De tijdsresolutie wordt bepaald door de vibratiefrequentie van de kantelspiegel, en kan bij geschikte keuze van de kantelspiegel gereduceerd worden tot ca 0.2 ms.

In de tot nog toe besproken configuraties worden SPs aangesteld door gebruik te maken van prisma's die het benodigde evanescente veld opwekken. Een dergelijk veld kan ook geproduceerd worden door in plaats van prisma's gebruik te maken van **buigingsroosters**, waarop een dunne metaallaag is opgedampt [4]. De voorwaarde voor SP excitatie wordt nu bepaald door de periodiciteit van het rooster (ca. 2000 lijnen/mm) en de invalshoek van de lichtbundel, terwijl de diepte van het minimum bepaald wordt door de groefdiepte (ca. 50 nm). Op deze manier ontstaat een potentieel fraai sensorsysteem, wanneer het mogelijk wordt deze metaal-gecoate roosters in bulk te produceren als sensorchip, bedoeld voor éénmalig gebruik.

In situaties waar het te onderzoeken oppervlak ruimtelijk gescheiden is van de excitatie- en detectie apparatuur (zoals in een mens-onvriendelijke omgeving of in een levend organisme) kan het gebruik van **optische fibers** een oplossing bieden. Naast het 'triviale' gebruik van fibers om

licht van en naar de meetplaats te transporteren blijkt het ook mogelijk te zijn de fiber als intrinsiek meetelement te gebruiken, waarbij het eindstuk van de fiber het prisma vervangt. Dit idee is schematisch aangegeven in fig. 6. Licht wordt ingekop-



Figuur 6

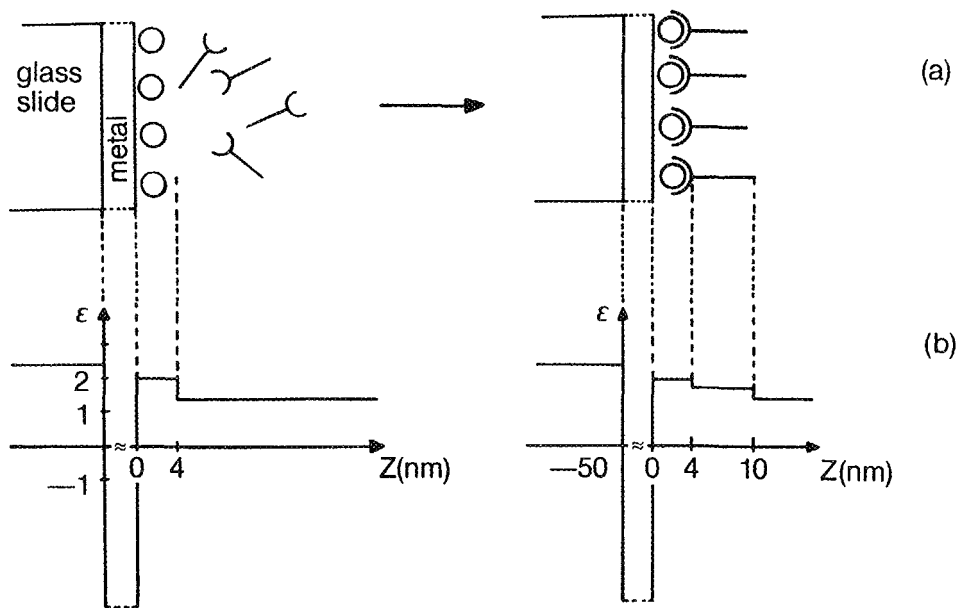
Gebruik van fiber-optiek. L: lichtbron; D: detector; S: fibersplitser; 1,2: uitgangspoorten. (a) single mode fiber; (b) multimode fiber (zie tekst)

peld in een fiber die verbonden is met een bundelsplitser S. Het uitgangskanaal 1 van S wordt verbonden met de meetfiber die aan het eind ontfaan is van de cladding. Na wisselwerking met dit eindvlak wordt het licht gereflecteerd en komt via S terecht in uitgangskanaal 2. Een fiber verbonden aan dit kanaal vervoert het licht naar een detector. Voor de tip van de meetfiber bestaan verschillende mogelijkheden. In fig. 6a wordt de tip van een single mode fiber gekliefd onder een welbepaalde hoek en vervolgens bedekt met een dunne metaallaag. In een single mode golfgeleider is de propagatieconstante van het getransporteerde licht zeer goed bepaald, en dit betekent dat de hoek waaronder het licht het gekliefd deel zal raken goed gedefi-

nieerd is. De hoek waaronder de fiber gekleefd moet worden kan dus zo gekozen worden dat in een zeker brekingsindexbereik SPR mogelijk is. Om voor de hand liggende redenen worden in deze configuratie meestal polarisatie-behoudende fibers gebruikt. In fig. 6b wordt een multimode fiber gebruikt. Hierbij wordt de omtrek van het eindstuk van een metaallaag voorzien; tevens wordt de kopse kant verspiegeld. Een multimode fiber heeft de eigenschap dat het licht getransporteerd wordt met een (discrete) verzameling propagatieconstanten; het licht zal in het eindstuk de metaallaag dan ook onder een aantal verschillende hoeken raken. Om nu een verandering in brekingsindex te kunnen detecteren aan het metaal/diëlectricum grensvlak is het nu voordelig om een breedbandige lichtbron, zoals een gloeilamp, te gebruiken: de SPR informatie zal nu aanwezig zijn in de golfengte-afhankelijke reflectantie.

SPR toepassingen

SPR wordt in fundamenteel onderzoek gebruikt om de complexe diëlectrische functie en de dikte van dunne lagen van metalen en halfgeleiders te bepalen, en zo iets meer te leren over de structuur van deze materialen afhankelijk van hun preparatie. In vele gevallen levert SPR eenzelfde soort informatie op als de meer bekende ellipsometrie. In meer chemisch getint werk wordt SPR vooral gebruikt om bindingsprocessen aan oppervlakken te volgen. Er wordt een (monomoleculaire) laag op het metaaloppervlak aangebracht en laat dit gemodificeerde oppervlak reageren met andere molekulen. Het hele proces kan gemodelleerd worden zoals aangegeven in fig. 7. SPR blijkt nu een van de weinige methoden die direct het volledige associatie- en dissociatieproces in realtime kunnen volgen. In principe is het zelfs mogelijk om levende cellen aan een metaaloppervlak te binden en dan met SPR



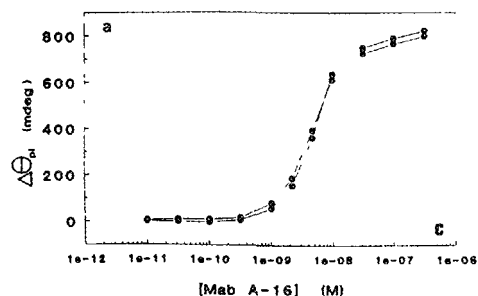
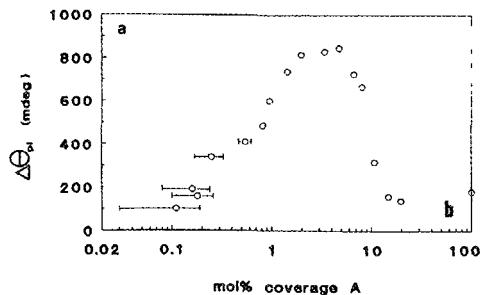
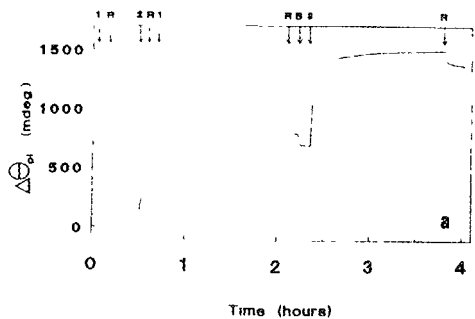
Figuur 7

Bindingsproces aan oppervlak (a), gemodelleerd als verandering van het brekingsindexprofiel (b)
N.B. $\epsilon = n^2$

bindingsprocessen aan zo'n cel te kunnen volgen.

Het gebruik van SPR in een sensor-systeem is in feite niets anders dan het volgen van een moleculaire binding aan het oppervlak zoals aangegeven in fig. 7. Twee belangrijke problemen in dit verband zijn het behalen van voldoende gevoeligheid ('hoe weinig molekulen kan ik meten') en het behalen van voldoende selectiviteit ('kan ik mijn weinige targetmolekulen detecteren tegen een grote overmaat van 'andere' molekulen'). Cruciaal is het vinden en prepareren van de receptorlaag op het metaaloppervlak die voor voldoende gevoeligheid en selectiviteit moet zorgen. Momenteel is dit de belangrijkste zorg van sensorontwikkelaars, en staat de ontwikkeling van verbeterde SPR apparatuur op de achtergrond.

Een voorbeeld van een toepassing is gegeven in fig. 8. Het metaaloppervlak is bedekt met een receptormolekuul voor een eiwit, en de vraag was (1) wat is de optimale receptorconcentratie, (2) wat is de haalbare gevoeligheid. In fig. 8a is de SPR responsie te zien wanneer verschillende componenten worden toegevoegd aan het water dat boven de metaallaag staat. Wanneer we over allerlei details heen kijken zien we dat bijna elke toevoeging resulteert in een vergroting van de plasmonhoek, hetgeen wordt geïnterpreteerd als een bindingsproces. Tevens ziet men dat deze aangroei geleidelijk gaat; dit is een gevolg van zowel de tijd die nodig is om het eiwit naar het oppervlak te laten diffunderen als de intrinsieke associatie-tijd. Een dergelijk experimenteel plaatje kan volledig kwantitatief geïnterpreteerd worden. In fig. 8b is de receptorconcentratie gevarieerd, terwijl steeds de hoeveelheid toegevoegd eiwit dezelfde is. Er is een duidelijke piek in de responsie waarneembaar: bij een receptorconcentratie boven het optimum zitten de receptoren te dicht op elkaar waardoor de (grotere) eiwitten niet meer alle receptoren kunnen bereiken. Fig. 8c, waarin de SPR responsie is uitgezet als functie van de eiwitconcentratie, vertelt iets over de haalbare detec-



Figuur 8

Een SPR-experiment waarbij een oppervlaktebinding gevolgd wordt (zie tekst)

tielgrens: concentraties tot 1.5 µg/liter zijn nog meetbaar, hetgeen vergeleken met andere, conventionele methoden geen slechte prestatie is.

SPR microscopie

Principe

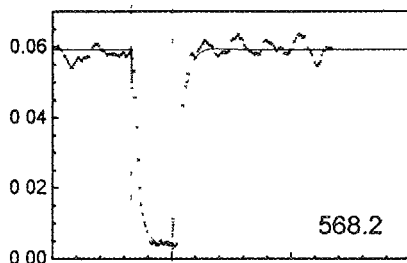
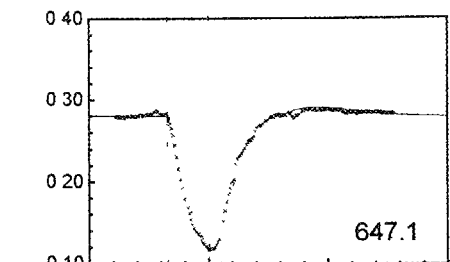
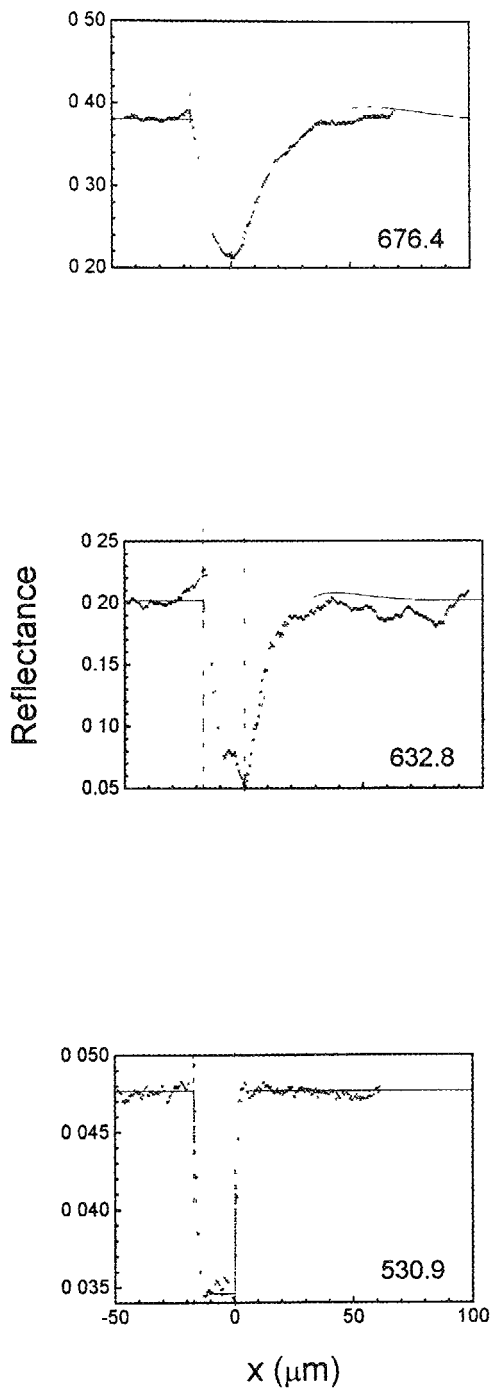
Totnogtoe ben ik voorbij gegaan aan een belangrijke eigenschap van SPs, nl dat de collectieve elektronoscillaties verantwoordelijk voor het ontstaan van SPs een zekere coherentielengte L_x hebben. Dit heeft tot gevolg dat in twee gebieden in het metaal die een grotere onderlinge afstand hebben dan L_x oppervlakteplasmonen ge-

genereerd kunnen worden die onderling onafhankelijk zijn. Dit geeft de mogelijkheid om structuren op een metaallaag af te beelden die verschillende brekingsindex hebben [5]: als de hoek van inval zodanig is dat een gebied met een bepaalde brekingsindex in resonantie is, dan zullen gebieden met een andere brekingsindex een grotere reflectantie hebben. Een voorbeeld van zo'n experiment is gegeven in fig. 9



Figuur 9

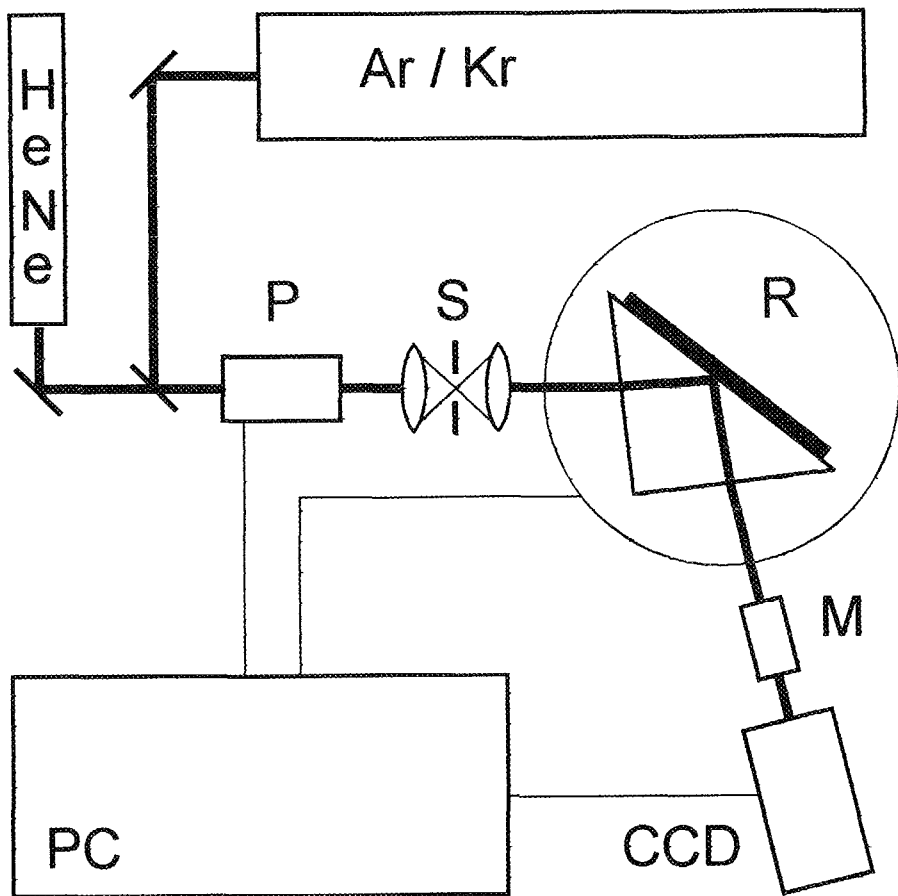
SPR microscopisch beeld van een niet-homogene monomoleculaire laag. Er is een oppervlak van $0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$ afgebeeld. Dikteverschil tussen beide domeinen ca 0.4 nm . Laterale resolutie ca. $3 \mu\text{m}$



Figuur 10
 Laterale resolutie in SPR microscopie. Vertikale
 lijnen geven de afmetingen aan van een SiO_2
 richel. De getallen corresponderen met de ge-
 gebruikte golflengtes.

waarin de ruimtelijk opgeloste reflectantie is te zien van een inhomogene monomoleculaire laag waar de molekulen parallel of loodrecht op het oppervlak georiënteerd zijn. In het algemeen probeert men natuurlijk het experiment zo uit te voeren dat de maximale laterale resolutie behaald wordt met behoud van de verticale (hoogte) resolutie. Een algemene regel is dat L_x afneemt met toenemende resonantie halfwaardebreedte en in het algemeen dus met slechter wordende hoogteresolutie. De

twee eisen werken elkaar dus tegen; voor elke praktische situatie dient een compromis gevonden te worden. Een en ander wordt geïllustreerd in fig. 10, waarin SPR resultaten zijn weergegeven voor een 2.5 nm dikke SiO_2 stap op goud. We zien dat voor de kortste golflengte die is gebruikt een relatief hoge laterale resolutie wordt behaald ($\sim 2\mu\text{m}$), maar de geassocieerde helling is laag; dit betekent dat het voor dit geval moeilijk is om voldoende contrast te krijgen om sub-nm verticale resolutie te be-



Figuur 11
SPR microscoop opstelling P: Pockels cel; S: ruimtelijk filter; M: objectief; CCD: videocamera

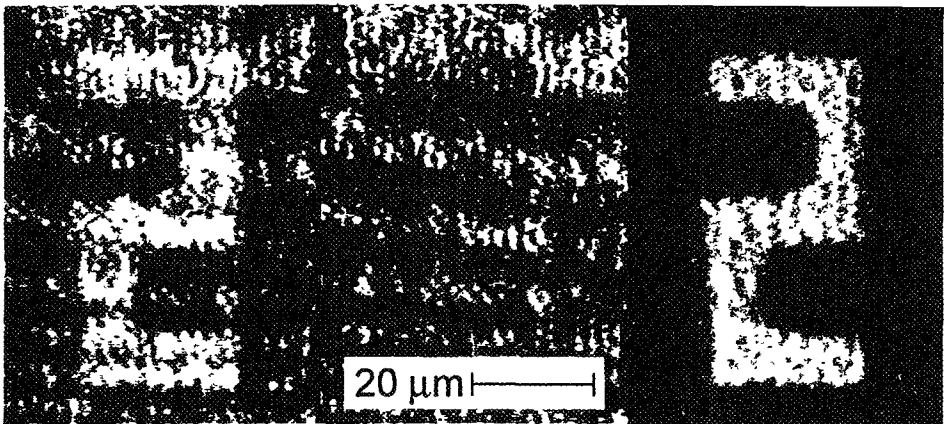
halen, hetgeen gewoonlijk absoluut geen probleem is met niet-microscopische SPR experimenten.

Instrumentatie

De SPR microscoop als instrument is vrij eenvoudig van opzet (zie fig. 11). Een gecollimeerde lichtbron valt via een Pockels-cel en een ruimtelijk laagdooraatfilter op de prisma/metaal combinatie die op een goniometer staat. Het gebruik van een Ar/Kr laser biedt het voordeel dat er een groot aantal gecollimeerde golflengtes beschikbaar is. Het gereflecteerde licht wordt via objectief M op een CCD array afgebeeld. Via een videoframegrabber wordt het beeld in een PC opgeslagen ter verdere verwerking. De combinatie van Pockels-cel en ruimtelijk filter zorgt voor een optimale beeldkwaliteit: analoog aan de eerder vermelde bundelsplitser schakelt de Pockels-cel periodiek tussen s en p-gepolariseerd invallend licht. Zowel het s als p-gepolariseerde beeld worden door de PC opgeslagen, en de verhouding tussen deze twee is het uiteindelijke SPR microscopie-beeld. Een voorbeeld van de opmerkelijke kwaliteitsverhoging die deze meetmethode oplevert is te zien in fig. 12.

Toepassing

Een veelbelovende toepassing lijkt het gebruik van SPR microscopie in een multi-sensorarray[6]. We kunnen ons voorstellen dat we een sensoroppervlak van ca 25 mm² hebben geprepareerd dat bestaat uit bakjes met een diameter van 10 bij 10 μm^2 gerangschikt in een raster. Omdat de coherentielengte van de orde 10 μm is, kan de brekingsindex van de vloeistof in elk van deze duizenden bakjes onafhankelijk bepaald worden in een SPR microscoop. Wanneer elk van die bakjes apart bedekt kan worden met een specifiek receptor molecule (en deze biochemische methoden zijn beschikbaar) en wanneer elk bakje optisch geadresseerd kan worden, hebben we een systeem tot onze beschikking dat in één keer duizenden chemische reacties kan quantificeren. Met name in de biotechnologie is hier grote behoefte aan: in DNA onderzoek heeft men te maken met grote aantallen samples die in een keer geanalyseerd moeten worden.



Figuur 12

Verbetering van beeldkwaliteit door de s en p responsie pixel voor pixel te delen. Van links naar rechts: p, s, p/s responsie

Besluit

In het voorgaande heb ik geprobeerd een overzicht te geven van de meer praktische aspecten van SPR. Een aantal onderwerpen is niet of nauwelijks aan bod gekomen, zoals de ultrasnelle SPR dynamica, de rol van plasmonen bij de verhoging van de gevoeligheid van vibratie-experimenten aan oppervlakken, de nieuwe informatie die combinatie van SPR met andere technieken oplevert, zoals voltammetrie, of atomaire kracht microscopie.

Ik hoop desondanks toch dat ik de lezer een idee heb kunnen geven van de betekenis van SPR voor het tegenwoordige oppervlakte-onderzoek, en van het soort opto-electronica dat men tegenkomt wanneer men efficiënte SPR-opstellingen wil ontwikkelen.

Literatuur

1. H. Raether (1988) *Surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, Springer Verlag, Berlin
2. S. Sjölander et al., *Anal. Chem.* 63 (1991) 2338
3. A.T.M. Lenferink et al., *Sens. Act. B3* (1991) 261
4. D. Cullen et al., *Biosensors* 3 (1987/88) 211
5. C.E.H. Berger, *SPR and AFM experiments on biological monolayers*, proefschrift, 1996, Universiteit Twente
6. C.E.H. Berger et al., *Anal. Chem.* 70 (1998) 703