

Charaf Cherkouk

Östrogennachweis in wässrigen Lösungen mit Hilfe Silizium-basierter Lichtemitter

im Fachbereich Physik
der TU Dresden
eingereichte Dissertation

Dresden, April 2010

Abgabe der Dissertation: Am 7.04.2010
Tag der Disputation: Am 06.10.2010

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. D. Stöckinger

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Helm

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Kunze

Prof. Dr. W. Möller

Prof. Dr. C. Laubschat

PD Dr. D. Lehmann

À mes Parents,

qui n'arriveront jamais à lire ce travail.

In Liebe und Dankbarkeit.

Charaf Cherkouk: **Östrogennachweis in wässrigen Lösungen mit Hilfe Silizium-basierter Lichtemitter**

Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Sensorkonzept mit Hilfe der Si-basierten Lichtemitter (MOSLED) zum Östrogennachweis in wässrigen Lösungen entwickelt. Das Sensorkonzept basiert auf einer direkten Fluoreszenzanalyse und besteht aus der Anordnung der Bio-Komponenten und dem Verfahren zu ihrer Herstellung sowie dem eigentlichen Meßverfahren.

Die Anordnung besteht aus drei Teilen: die Funktionalisierung der MOSLED-Oberfläche, die Immobilisierung des hER_{α} -Rezeptors und die Herstellung der Referenzlösung. Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Ausführung dieser drei Teile.

Die Funktionalisierung der SiO_2 -Oberfläche der MOSLED wurde mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SSC (Spraying Spin Coating)- Verfahrens realisiert. Die Ausgangsmaterialien dieses Verfahrens sind organofunktionelle Silangruppen mit drei unterschiedlichen funktionellen Gruppen, nämlich die Amino-, Carboxyl- und die Thiolgruppen. Die Optimierung dieser Methode erfolgte mittels der zwei Silangruppen APMS ((3-Aminopropyl)trimethoxysilane und Triamino-APMS (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine mit der gleichen Molekülstruktur, aber mit einer unterschiedlichen Anzahl an funktionellen Gruppen. Diese Resultate wurden mit in der Literatur beschriebenen Verfahren verglichen. Die Optimierung der SSC-Methode wurde zuerst auf einfache SiO_2 -Oberflächen und dann auf der Oberfläche der MOSLED angewendet. Die Proben wurden mit Hilfe üblicher Methoden der Oberflächenphysik- wie FTIR-, Raman- und XPS-Spektroskopie untersucht. Die Oberflächenrauigkeit wurde mittels AFM-Spektroskopie ermittelt, deren Aufnahmen eine glatte Oberfläche bei den mit der SSC-Methode silanisierten Proben zeigen. Während die Hydrophobizität der funktionalisierten SiO_2 -Oberflächen zunimmt, sinkt dabei die Oberflächenenergie, welche die Anbindung eines hER_{α} -Rezeptors mit großer Bindungsenergie begünstigt.

Zur Immobilisierung des hER_{α} -Rezeptors wurde dieser erst an das Hüllenmolekül des QDots[®]-655-Farbstoffs gebunden und anschließend an der SSC-silanisierten SiO_2 -Oberflächen adsorbiert. Der Anteil der immobilisierten Rezeptoren wurde mittels PL-Messung kontrolliert.

Eine andere Immobilisierungstrategie des hER_{α} -Rezeptors an die SiO_2 -Oberfläche kann mit Hilfe eines Aminosäure-Derivates um den Rezeptor realisiert werden. Eine Adsorption der Lysinaminosäure an die SSC-APMS silanisierten SiO_2 - Oberflächen als Funktion des pH-Wertes wurde durchgeführt, und der Adsorbatsanteil des Lysins mittels XPS-Messung durch die Bindungsenergien der Energieniveaus C_{1s} und N_{1s} berechnet.

Eine Referenzlösung mit QDots[®]800-Farbstoff markierten Östrogenmolekülen kommt zum Einsatz. Dabei wird die Position 17 des β -Estradiolmoleküls, welches mit einem N-Hydroxy-succinimide Derivat versehen ist, an das Hüllenmolekül des QDots[®]800-Farbstoff gebunden, sodass der Phenolring des β -Estradiols frei bleibt. Insbesondere ist bei den FTIR-Spektren eine nichtgebundene OH-Gruppe des β -Estradiolmoleküls gut erkennbar.

Das gesamte Sensorkonzept wurde an zwei mit Östrogen mit einer Konzentration von 1mM und 1 μ M versetzten Wasserproben getestet. Die Anordnung der Bio-Komponenten wurde mittels PL nachgewiesen. Der Östrogennachweis wurde mit Hilfe des Ge- und Tb-basierten Lichtemitters demonstriert.

Charaf Cherkouk: **Estrogen detection in waterish solutions by Silicon based light emitters**

Abstract

A sensor concept for estrogen detection in waterish solutions by Silicon based light emitters (MOSLED) was developed. This concept is based on direct fluorescence analysis and consists of a certain arrangement of the bio- components and their fabrication methods as well as the measurements protocol, which consists of for main steps: Passing the prepared MOSLED surface by the water sample, a washing step, passing the MOSLED surface by the reference solution, and the final optical measurement

The arrangement consists of three parts: the functionalisation of the MOSLEDs surface, the immobilization of the hER α receptor und finally the fabrication of the reference solution. The focus of this work is set on the achievement of these three parts.

The functionalisation of the SiO $_2$ -surface of the MOSLED was realized by means of the new developed SSC (Spraying Spin Coating) method. The chemical precursor of this method are the organofunctional silane groups with three different functional groups, namely the amino-, carboxyl-, and thiolgroups. The optimization of the procedure was investigated with two types of silane groups APMS ((3-Aminopropyl)trimethoxysilane und Triamino-APMS (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine), which have the same molecular structure but a different number of functional groups per molecule. These results have been compared with those of the literature. The optimization of the SSC-method was analyzed by means of standard surface science techniques like FTIR-, Raman-, and XPS-spectroscopy. The surface roughness was applied by using AFM-spectroscopy, which showed a smooth surface by the samples treated with the SSC-method. Whereas the hydrophobicity of the functionalized SiO $_2$ surface increases, the surface energy decreases, which favours the binding of a hER α receptor with large binding energy.

In order to immobilize the hER α receptor at the surface, the receptor was bound to the molecular shell of the QDots[®]655-dye and finally adsorbed to the silanized SiO $_2$ surfaces. The fraction of the immobilized hER α receptors was controlled via PL-measurements. Another

labelling strategy to immobilize the receptor at the SiO₂ surface can be realized by using the amino acid as derivate to modify the receptor. For this aim the adsorption of the lysine at silanized SiO₂ surfaces was investigated as function of the pH-value. The adsorbent part of the lysine was calculated via XPS by measuring the binding energy of both energy levels C_{1s} and N_{1s}.

The reference solution with QDots[®]800-dye marked estrogen molecules was used. The optimal binding was achieved by attaching the molecular shell of the QDots[®]800-dye to position 17 of the β -Estradiol molecule, which contains of a N-Hydroxysuccinimid derivate so that the phenol ring of the β -Estradiol remains free. In particular the FTIR-spectra showed the non-binding OH-groups of the β -Estradiol molecule.

The whole concept of the sensor was tested at two water samples containing estrogen in a concentration of 1mM and 1 μ M. The adjustment of the Biokomponenten was proven by PL, and the estrogen detection was demonstrated by using the Ge- and Tb-based light emitters.

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

1. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa, T. Strache, H. Reuther, M. Helm
Spraying spin coating silanization at room temperature of a SiO₂ surface for silicon-based integrated light emitters, Journal of Colloid and Interface Science **337**, 375 - 380, 2009.
2. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa
Verfahren und Anordnung zum Nachweis von Östrogen in wässrigen Lösungen,
Patentsnummer: DE102008024526A1, 2009.
3. L. Rebohle, C. Cherkouk, S. Prucnal, M. Helm, W. Skorupa
Rare-earth implanted Si-based light emitters and their use for smart biosensor applications, Vacuum **83**, 24-28, 2009.
4. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa, M. Helm
Nachweis von Östrogen- wirkenden Substanzen in wässrigen Lösungen, Das 8. Dresdener BioSensor-Symposium 2007, Dresden.
5. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa, M. Helm
Nachweis von Östrogen- wirkenden Substanzen in wässrigen Lösungen, Das 2. Dresdener Medizintechnik-Symposium 2008, Dresden, Poster
6. L. Rebohle, C. Cherkouk, S. Prucnal, W. Skorupa, M. Helm
Si-based light emitters as a key element for smart Biosensors, Eurosensor XXII 2008, Dresden- Vortrag
7. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa, M. Helm
Estrogen detection in drinking water by Silicon based light emitters, EMRS-Spring 2008, Strassburg, Vortrag

8. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa
Estrogen detection in drinking water by Silicon based light emitters, DPG Frühjartagung 2008, Berlin, Vortrag
9. A. Kanjilal, L. Rebohle, C. Cherkouk, M. Voelskow, W. Skorupa, M. Helm
Strong Er luminescence at 1533 nm in rapid thermal annealed Si-rich SiO₂ layers co-implanted with Er, DPG Frühjartagung 2008, Berlin, Poster
10. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa, M. Helm
Surface modification of Silicon-Based Light Emitters for smart Biosensing, Das 6. Deutsche BioSensor-Symposium 2009, Freiburg, Poster
11. C. Cherkouk, L. Rebohle, W. Skorupa, M. Helm
Surface modification of Silicon-Based Light Emitters for smart Biosensing, DPG Frühjartagung 2009, Dresden, Poster

Sommer shoos

- *School on synchrotron x-ray and IR methods focusing on enviromental sciences*, ANKA Hall 2008, Karlsruhe
- *School on biophysics at interfaces*, Bad Honnef 2008 and Bad Honnef 2009

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xvii
Abkürzungsverzeichnis	xix
Symbolverzeichnis	xxi
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	2
1.2 Stand der Forschung	4
1.2.1 Klassische Detektionsverfahren	4
1.2.2 Analyse bestehender Alternativlösungen	4
1.2.2.1 ELISA- E nzyme L inked I mmunosorbent A ssay	4
1.2.2.2 Biologische Assays	4
1.2.2.3 Totale Interne Reflexions-Fluoreszenz	5
1.3 Zielsetzung der Arbeit und Kapitelübersicht	6
2 Grundlagen	9
2.1 Grenzflächenerscheinungen	9
2.1.1 Grenzflächen- und Oberflächenspannung	9
2.1.2 Kontaktwinkel	10
2.1.3 Der hydrophobe Effekt	12
2.2 Adsorption	13
2.2.1 Adsorption aus der Gasphase am Beispiel eines H ₂ Moleküls	13
2.2.2 Adsorption einer flüssigen Phase an Festkörperoberflächen	15
2.2.3 Das Adsorbat: Östrogen- <i>hER</i> _α -Rezeptor	17
2.2.3.1 Die Östrogen- <i>hER</i> _α -Rezeptor-Bindung	17

2.2.3.2	Kreuzreaktivität	18
2.3	Modell der Elektrolumineszenz des Si-basierten Lichtemitters	19
2.4	Farbstoffemission in Anwesenheit von mehreren Biofilmbeschichtungen . . .	22
2.4.1	Geometrie der Biofilme auf der MOSLED-Oberfläche	22
2.4.2	Anzahl der zu bindenden Östrogenmoleküle	24
2.5	Oberflächenanalytik	24
2.5.1	Molekülschwingung eines zweiatomiges Moleküls	24
2.5.2	Schwingungs-Raman-Spektren	25
2.5.3	Schwingungs-Infrarot-Spektren	27
2.5.4	Oberflächenempfindlichkeit bei XPS-Spektren	29
3	Material und Methoden	31
3.1	Das Sensorkonzept	31
3.2	Probenpräparation	33
3.2.1	Lichtemitter-Prozessierung	33
3.2.2	Lichtemitter-Reinigung	35
3.2.3	Masken für den Schutz der Kontaktflächen	36
3.2.4	Funktionalisierung der Sensoroberfläche	37
3.2.4.1	Hybridisierungsprozess	37
3.2.4.2	Silanisierungsprozess	38
3.2.5	Referenzlösung	41
3.2.5.1	Analyte und deren Derivate	41
3.2.5.2	Farbstoffe	43
3.2.5.3	Puffer und Lösungen	46
3.2.6	Rezeptor-Adsorption an der Sensoroberfläche	46
3.3	Charakterisierungsmethoden	47
3.3.1	XPS- R öntgen p hotoelektronens s pektroskopie	47
3.3.2	FTIR- F ourier- T ransformations i nfrarot s pektroskopie	48
3.3.3	Raman-Spektroskopie	48
3.3.4	Rasterkraftmikroskopie AFM (A tomic F orce M icroscopy)	48
3.3.5	Elektro- und Photolumineszenzmessung	48
3.3.6	UV-Vis- und zeitaufgelöste Photolumineszenzmessung	49
3.3.7	T ransmissionselektronen m ikroskopie (TEM)	49
3.3.8	Micro-Plotter [®]	50
3.3.9	Titration	50

4	Probencharakterisierung	53
4.1	MOSLED: Optische und elektrische Eigenschaften	53
4.2	Funktionalisierung der Sensoroberfläche	57
4.2.1	Hybridisierungsprozess	58
4.2.2	Silanisierungsprozess	60
4.2.3	SSC-Verfahren (S praying S pin C oating)	62
4.2.4	Anwendung des SSC-Verfahrens an der MOSLED-Oberfläche	69
4.2.5	Chemische Stabilität des Silanfilms	69
4.2.6	Temperung der Silanschicht	71
4.2.7	SSC-Silanisierung mit funktionellen Carboxyl- und Thiol-Gruppen	76
4.3	Farbstoffe	78
4.3.1	Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoff	78
4.3.2	4,4''-Bis-(2-Butyl-Octyloxy)-(1,1',4',1'',4'',1''')Quaterphenyl (BBQ)	82
4.3.3	QDots [®] -Farbstoffe	83
4.4	Östrogen	88
4.4.1	Biologischer Hintergrund	88
4.4.2	Struktur	90
4.5	Referenzlösung	93
5	Adsorption	97
5.1	Adsorption von L-Lysin an einer SSC-APMS silanisierten SiO ₂ -Oberfläche	97
5.2	Immobilisierung des hER _α -Östrogenrezeptors	105
5.2.1	Biologischer Hintergrund	105
5.2.2	Immobilisierung des hER _α -Östrogenrezeptors auf der SSC-APMS-SiO ₂ -Oberfläche	106
6	Östrogennachweis	111
6.1	Die Anordnung der Bio-Komponenten	111
6.2	Testmessung mit Hilfe des Si-basierten Lichtemitters	112
7	Zusammenfassung	115
8	Ausblick	119
8.1	BMBF-Projekt: Bio-LED	119
8.2	Legionellennachweis im Trinkwasser	119

Literaturverzeichnis	121
Anhang A1: Filmstabilität	137
Anhang A2: SSC Temperung mit Sauerstoffgas Zufuhr	139
Anhang A3: Thesenpapier	141
Danksagung	145

Abbildungsverzeichnis

2.1.1	Kontaktwinkel θ eines Flüssigkeitstropfen auf einer ebenen festen Oberfläche	10
2.2.1	Schematische Darstellung des Potenzialverlaufes der Physi- (rechte Kurve) und Chemisorption (linke Kurve) des H_2 Molekül in der Nähe einer Oberfläche [1]	13
2.2.2	Schematische Darstellung der Adsorptionsisotherme	16
2.3.1	Injektions- und Leitungsmechanismus in einer MOS-Struktur	19
2.4.1	Schematische Darstellung der Geometrie des MOSLEDs mit Biofilm	22
2.5.1	Termschemata für Infrarot-Absorption, Fluoreszenz und Raman-Streuung	26
2.5.2	Schematische Darstellung der Schwingungsarten	28
2.5.3	Universelle Abhängigkeit der Austrittstiefe von der kinetischen Energie der Photoemittierten Elektronen bei XPS Messung	29
3.1.1	Das Sensorkonzept [2]	32
3.2.1	Schematischer Aufbau des Si-basierten Lichtemitters.	33
3.2.2	Dimension eines Si-basierten Lichtemitters	33
3.2.3	TRIM berechnete Implantationsprofil für Terbium in eine 100 nm dicke SiO_2 -Schicht	34
3.2.4	FTIR-Spektrum der gereinigten MOSLED-Oberfläche	35
3.2.5	Maskeneinheit für den Schutz der Kontaktflächen	36
3.2.6	In-situ-Hybridisierungskammer	38
3.2.7	Grundreaktion für den Silanisierungsprozess [3]	39
3.2.8	Silanisierungskammer	40
3.2.9	Schematische Darstellung der verschiedenen Analyte und deren Derivate	42
3.2.10	Schematische Darstellung der Reaktion zur QDot -Rezeptor Bindung	44
3.3.1	Optischer Messaufbau für die Elektro- und Photolumineszenzmessung	49
3.3.2	Der μ -Plotter	50

3.3.3 Titrationskurve der EDTA-Säure	51
3.3.4 Titrationskurve der APMS Lösung	52
3.3.5 Titrationskurve der PBS-Pufferlösung	52
4.1.1 Emittierte Lichtleistung in Abhängigkeit von der elektrischen Eingangsleistung für Gd-, Ge-, Tb-basierte MOSLEDs.	54
4.1.2 Injektionsstrom-Spannung I(V) Abhängigkeit und EL-Strom-Abhängigkeit der Tb-basierten-MOSLED	55
4.1.3 Normierte EL-Intensität der Gd-, Ge-, Tb-basierten MOSLEDs als Funktion der Injektionsladungen.	56
4.1.4 Normierte EL-Intensität der Gd-, Ge-, Tb-basierten MOSLEDs als Funktion der Wellenlänge.	57
4.2.1 Normiertes FTIR-Spektrum einer mit MES hybridisierten SiO ₂ -Oberfläche .	59
4.2.2 XPS-Spektrum des N _{1s} -Energieniveaus einer hybridisierten SiO ₂ -Oberfläche	59
4.2.3 Schematische Darstellung der Silangruppe	60
4.2.4 FTIR-Spektrum der silanisierte SiO ₂ -Oberfläche nach Hong et al.	61
4.2.5 FTIR Ergebnisse der SSC Optimierung	63
4.2.6 Ringstrukturen der APMS-Moleküle	64
4.2.7 FTIR Spektrum einer silanisierte SiO ₂ -Oberfläche mit APMS und Tiamino-APMS	65
4.2.8 Ramanspektrum einer mit APMS silaniserten SiO ₂ -Oberfläche	67
4.2.9 XPS-Spektrum vom Energieniveaus Si2p (a), C1s (b), und N1s (c)	68
4.2.10 AFM Abbildungen der SiO ₂ -Oberfläche nach der Silanisierung	69
4.2.11 FTIR und EL-Spektrum einer mit SSC-APMS silaniserten MOSLED . . .	70
4.2.12 FTIR-Spektrum zur chemischen Stabilität des Silanfilms	71
4.2.13 FTIR-Spektrum der getemperten Silanschichten	72
4.2.14 FTIR-Intensitätsverhältnis in Abhängigkeit von der Temperatur der getemperten silaniserten Proben	73
4.2.15 Ramanspektrum der getemperten Proben	74
4.2.16 FTIR-Spektrum von mittels SSC-silanisierten SiO ₂ -Oberflächen mit Amino-, Carboxyl- und Thiol-funktionelle Gruppen	76
4.3.1 Absorptions- und Emissionsspektrum sowie das EL-Spektrum des Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoffes	79
4.3.2 Ramanspektrum des an der SiO ₂ -Oberfläche adsorbierten Europium(III) Nitrat-Hydrat-Farbstoffs	79

4.3.3 XPS-Eu4d Spektrum des Europium(III) Nitrat-Hydrat-Farbstoffs	80
4.3.4 Photolumineszenzspektrum des Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoffes in drei verschiedenen Lösungen	81
4.3.5 Absorptions- und Emissionsspektrum sowie EL-Spektrum des BBQ-Farbstoffes	82
4.3.6 Quantitative Konzentrationsmessung des an der Gd-MOSLED adsorbierten BBQ-Farbstoffes	83
4.3.7 Schematische Darstellung der Bandlücke eines Nanopartikels	84
4.3.8 TEM-Aufnahmen des Nanopartikel-Farbstoffes QDots800	85
4.3.9 Elektrolumineszenzspektrum des mit Nanopartikeln adsorbierten MOSLEDs	86
4.3.10 XPS-Übersichtsspektrum des QDots [®] -Farbstoffs mit einem Carboxyl- Hüllenmolekül	87
4.4.1 Schematische Darstellung der biologischen Östrogensynthese [4].	89
4.4.2 Ramanspektrum des Estron-Steroidmoleküls	93
4.4.3 FTIR-Spektrum der Steroidhormone	94
4.5.1 FTIR-Spektrum der Referenzlösung	95
4.5.2 XPS-Spektrum einer mit QDots [®] -Farbstoff und Referenzlösung adsorbier- ten SiO ₂ -Oberfläche	96
5.1.1 Schematische Darstellung einer der Immobilisierungsstrategien des Rezep- tors an die mit SSC-APMS silanierten Lichtemitter-Oberfläche	97
5.1.2 Schematische Darstellung der verschiedenen Dissoziationsstufen des L-Lysin	99
5.1.3 FTIR-Spektrum der an die SSC-APMS-SiO ₂ -Oberfläche adsorbierten Lysin- Aminosäure als Funktion des pH-Wertes	100
5.1.4 XPS-Spektrum des C1s Energieniveaus einer mit L-Lysin adsorbierten SSC- AMPS SiO ₂ -Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes	101
5.1.5 Gemessenen C1s-Peak-Intensitätsflächen als Funktion des pH-Werts	102
5.1.6 XPS-Spektrum des N1s Energieniveaus einer mit L-Lysin adsorbierten SSC- AMPS SiO ₂ -Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes	104
5.1.7 Gemessene N1s-Peaks-Intensitätsflächen als Funktion des pH-Werts	104
5.2.1 Simulationsausschnitt der <i>hER_α</i> -Rezeptor - β -Estradiol -Bindung	106
5.2.2 FTIR-Spektrum einer mit <i>hER_α</i> -Rezeptor -QDots [®] 655-Farbstoff immobi- lisierten SiO ₂ -Oberfläche nach den verschiedenen Waschmethoden.	107
5.2.3 PL-Spektrum von den silanierten SiO ₂ -Oberflächen nach der Immobilisie- rung der mit QDots [®] 655-Farbstoff gebundenen <i>hER_α</i> -Rezeptoren	108

6.1.1 PL-Spektrum von den silanisierten SiO ₂ -Oberflächen nach einer Testmessung an zwei mit Östrogen versetzten Wasserproben	112
6.2.1 EL-Spektrum von einem Ge- und Tb-basierten Lichtemitter nach einer Testmessung an einer mit Östrogen versetzten Wasserprobe	113
8.2.1 FTIR-Spektrum einer mit Anti-Legionella immobilisierten SSC- SiO ₂ -Oberfläche mit Thiol Gruppen	120
.0.2 FTIR Spektrum der Chemischen Filmstabilität über die Zeit	137
.0.3 FTIR-Spektrum der getemperten silanisierten Proben mit O ₂ Zufuhr	139

Tabellenverzeichnis

2.1.1 Wasserkontaktwinkelmessung der verschiedenen silanisierten Ti-Proben und deren freien Oberflächenenergien [5]	11
2.1.2 Thermodynamische Daten für das Lösen unpolarer Moleküle im Wasser bei RT. Entnommen aus [6]	12
3.2.1 Parameteroptimierung des SSC-Verfahrens	40
3.2.2 Strukturformel und Molekulargewicht der verwendeten Analyte und deren Derivate	43
3.2.3 Farbstoffe, ihre Anregungswellenlänge und die dazu geeigneten MOSLED-Typen	43
3.2.4 Das Protokoll für die Herstellung der Referenzlösung und der Rezeptoradsorption [3]	45
3.2.5 Strukturformel und Molekulargewicht der Puffer und Lösungen	46
3.2.6 Strukturformel und Molekulargewicht der verwendeten Rezeptoren	46
3.3.1 Vergleich der verschiedenen Anregungsquellen für XPS und UPS	47
4.2.1 Charakteristische Absorptionfrequenzen für APMS und Triamino-APMS	66
4.2.2 relative Zusammensetzung der chemischen Elemente auf der SiO ₂ -Oberfläche	66
4.2.3 Gemessene Bindungsenergien der getemperten SSC-APMS Proben	75
4.3.1 Gemessene Bindungsenergien (BE) Eu4d und O1s des Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoffes	80
4.3.2 Gemessene Bindungsenergien (BE) des an die SiO ₂ -Oberfläche adsorbierten QDots [®] -Farbstoffs	88
4.4.1 Raman und FTIR Schwingungsfrequenzen der Steroidhormone	90
5.1.1 Gemessene C1s- und N1s-Bindungsenergien (BE) und deren Halbwertsbreiten (FWHM) der Lysin-Aminosäure als Funktion des pH-Wertes	103

8.2.1 Mögliche Schlüssel-Schloß-Partner für andere Einsatzmöglichkeiten des Bio- LED [7]	119
---	-----

Abkürzungsverzeichnis

A	Analyt
BBQ	4,4''-Bis-(2-Butyl-Octyloxy)-(1,1',4',1'',1''')Quaterphenyl
BPEA	(Bis(3-Trimethoxysilyl)propylethylenediamine)
dest.	destilliert
DMF	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid
Da	Dalton
Diss	Dissoziation
EA	Elektronenaffinität
E1	Estron
E2	β -Estradiol
E3	Estron 3-methyl-ether
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EL	Elektrolumineszenzmessung
Fish	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FTIR	Fourier-Transformationsinfrarotspektroskopie
FS	Farbstoff
FWHM	Halbwertsbreite
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
Konz.	Konzentration
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfone-Hydratsäure
MOSLED	Si- basierter Lichtemitter auf MOS (Metall-Oxid-Halbleiter)-Basis
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PL	Photolumineszenzmessung
RBS	Rutherford Rückstreuung
Rcp	Rezeptor
RE	Metallen der Seltenen Erden
Reakt. Bed.	Reaktionsbedingungen
RT	Raumtemperatur
SSC	Spraying Spin Coating
TBS	Tris gepufferte Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TPCY	(Tris(3-Trimethoxysilyl)isocyanurat)
TRIM	transport of ions in matter
TWEEN	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
UV	Ultraviolett
Vis	Sichtbar
XPS	Röntgen-Photoelektronenspektroskopie
XRD	Röntgenbeugung

Symbolverzeichnis

A_n	Absorbierter Anteil der Lichtleistung am Biofilm n
γ	Grenzflächenspannung
δ_i	Oberflächenspannung
δ_i	Oberflächenspannung der Phase i
ΔH°	Enthalpieänderung
ΔS°	Entropieänderung
$c_{fl.}$	Anzahl der adsorbierten Teilchen
$c_{fl.,0}$	Max. Anzahl der adsorbierten Teilchen
c_i	Konzentration des Stoffes i
$c_{0,i}$	Anfangskonzentration des Stoffes i
E_{ab}	Adsorptionsenergie
E_{ad}^*	Aktivierungsenergie
E_{Diss}	Dissoziationsenergie
E_ν	Schwingungsenergie
ν	Schwingungsquantenzahl
f	Flächenbelegung der Moleküle
F	Teilchenstrom
k	Ratenkonstante
$k_{ads.,des.}$	Geschwindigkeitskonstante der Adsorption bzw. der Desorption
$k_{a,d}$	Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante
K	Adsorptionsgleichgewichtskonstante
$K_{aff.}$	Affinitätskonstante
I_i	Lichtleistung am Biofilm i
M_{i*}	Molarität des Biofilms i
d_i	Dicke des Biofilm i
J	Stromdichte

R	Verhältnis von Lichtstärke des Farbstoffs zur Lichtstärke des Emitters
R_{ad}	Absorptionsrate
m	Masse
n	Molmenge
n_A	Molmenge pro Fläche
S	Haftkoeffizient
Θ	Bedeckung
η	Effizienz (des Farbstoffs)
ϕ_B	Traptiefe
$\alpha(R)$	Polarisierbarkeit
$\mu(R)$	Dipolmoment
λ	Austrittstiefe
V	Volumen
T	Temperatur
p	Partialdruck
$p(t)$	Induziertes Dipolmoment
$\%CR$	Kreuzreaktivität
W_{ij}	Adhäsionsarbeit zwischen zwei Grenzflächen oder zwei Phasen i und j

1 Einleitung

„ Bei einem Mann der Wissenschaft darf man ein unmittelbares, durchdringendes und vollständiges Wissen in einem begrenzten Stoffgebiet voraussetzen. Darum erwartet man von ihm gewöhnlich, dass er von einem Thema, das er nicht beherrscht, die Finger lässt. Das gilt als eine Frage des *noblesse oblige*. Man erlaubt mir, hier für den vorliegenden Zweck auf die *noblesse*, sofern überhaupt vorhanden, zu verzichten und mich von den an sie geknüpften Verpflichtungen zu befreien. Folgendes ist meine Entschuldigung:
Wir haben von unseren Vorfahren das heftige Streben nach einem ganzheitlichen, alles umfassenden Wissen geerbt. Bereits der Name der höchsten Lehranstalten erinnert uns daran, dass seit dem Altertum und durch viele Jahrhunderte nur die universale Betrachtungsweise voll anerkannt wurde. Aber das Wachstum in die Weite und Tiefe, das die mannigfaltigen Wissenszweige seit etwa einem Jahrhundert zeigen, stellt uns vor ein seltsames Dilemma. Es wird uns klar, dass wir jetzt beginnen, verlässliches Material zu sammeln, um unser gesamtes Wissensgut zu einer Ganzheit zu verbinden. Andererseits aber ist es einem einzelnen Verstande beinahe unmöglich geworden, mehr als nur einen kleinen spezialisierten Teil zu beherrschen. Wenn wir unser wahres Ziel nicht für immer aufgeben wollen, dann dürfte es nur den einen Ausweg aus dem Dilemma geben: dass einige von uns sich an die Zusammenschau von Tatsachen und Theorien wagen, auch wenn ihr Wissen teilweise aus zweiter Hand stammt und unvollständig ist- und sie Gefahr laufen, sich lächerlich zu machen.
Soviel zu meiner Entschuldigung“

Aus „Was ist Leben?“ vom Erwin Schrödinger (Dublin, 1944) [8].

1.1 Motivation

Das saubere Trinkwasser ist ein unersetzlicher Grundstoff und eines der wichtigsten Konfliktthemen der Zukunft. Wasserressourcen zu schützen und zu überwachen wird zu einer zentralen Aufgabe der Forschung und der Entwicklung. Die Umwelthormone oder sogenannte EDCs (**e**ndocrine **d**isrupting **c**hemicals) zählen zu den gefährlichsten Schadstoffen im Trinkwasser. Die EDCs lassen sich definieren als: „...*exogenous substance that causes adverse health effects in an intact organism or its progeny, secondary (consequent) to changes in endocrine functions*“ [9]. Damit sind die natürlichen Steroidhormone, die synthetischen (z.B. Ethynilestradiol aus der „Pille“) und auch die steroid-hormonell wirksamen Substanzen (z.B. Bisphenol) gemeint. Bereits in der Mitte der achtziger Jahre berichteten eine Vielzahl von Studien über die Missbildung der Sexualorgane, Fruchtbarkeitsstörungen und hohe Sterblichkeitsraten beim Tiernachwuchs. Solche Beobachtungen machten Beland et al. bei den Belugawalen im St. Lawrence Fluß (Quebec, Canada) [10]. Ähnliche Studien machten Guillette et al. bei ihren Untersuchungen der Penisverkrümmungen bei den Alligatorenmännchen in kontaminierten Gewässern [11]. Da das Hormonsystem bei Mensch und Tier einer ständigen Autoregulation unterliegt, verursacht jeder äußere Eingriff speziell durch exogene Steroidhormone eine Vielzahl an Nebenwirkungen, die genotoxische, neurobiologische und karzinogene Effekte umfassen. Beispiele hierfür sind Messungen von östrogen-wirksamen Substanzen in Oberflächengewässern und die damit immer wieder zu beobachtenden Entwicklungsstörungen bei aquatischen Organismen. Seit 2000 gehören die Steroidhormone zu der *Priority list* der beschlossenen Richtlinien der Wasserpolitik in der Europäischen Union [12]. Dennoch rückt die Gefahr solcher Substanzen immer mehr ins Bewusstsein der Öffentlichkeit. Einige Beispiele solcher Debatten: Die Baby- und Mineralwasserflaschen-Diskussionen (insbesondere der Polymerbestandteil Bisphenol A und Phthalsäureester, die als Weichmacher bei Kunststoffen dienen und zu den Östrogen-wirksamen Stoffe zählen), in der Zeitschrift *Der Spiegel* im Juli 2009 erschienen. Ein anderer Artikel über das verfrühte Wachstum bei den Kindern, in der *New York Times* im Okt. 2006 erschienen. Während bei den Experten Konsens über die Gefahr solcher Substanzen auch in sehr kleinen Dosen herrscht, gibt es zurzeit keinen gesetzlich festgelegten Maximalwert auf der nationalen, aber auch auf der europäischen Ebene für die Östrogenkonzentration im Wasser.

Eine empfindliche und selektive Bestimmung einer Vielzahl von steroid-hormonell wirksamen Substanzen wie z.B. östrogen-wirksame Substanzen, Glucocorticoide und Androgene ist in der Prozessüberwachung von Kläranlagen und Oberflächengewässern, aber auch in der Lebensmittelindustrie, in der staatlichen Lebensmittelüberwachung, beim Tierschutz und bei

der Diagnose von Erkrankungen sowie für Dopingkontrollen von großer Bedeutung.

1.2 Stand der Forschung

1.2.1 Klassische Detektionsverfahren

Gegenwärtige Standardmethoden zum Nachweis organischer Substanzen in kleinen Mengen basieren vor allem auf bereits etablierten Methoden wie HPLC, Massenspektrometrie, Gaschromatographie bzw. davon abgeleitete Kombinationen, die jedoch bereits im $\mu\text{g/l}^{-1}$ -Bereich sehr aufwendige und kostenintensive Aufreinigungs- und Anreicherungsverfahren erfordern; abgesehen von hochqualifiziertem Personal und Speziallaboratorien, die das System voraussetzt.

1.2.2 Analyse bestehender Alternativlösungen

1.2.2.1 ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Eine kostengünstige Alternative zur klassischen Analytik besteht in der Anwendung von enzymgekoppelten Immunadsorptionstests, bei denen die nachzuweisende Substanz über eine enzymatische Farbreaktion detektiert wird. Die Reaktion erfolgt in einer Multititerplatte, die entweder manuell oder im Automaten pipettiert wird. Der Nachteil des Verfahrens besteht darin, dass für viele Substanzen keine geeigneten Antikörper verfügbar sind oder die bekannten Antikörper gegenüber Matrixeffekten sehr empfindlich reagieren.

1.2.2.2 Biologische Assays

Sehr einfach handhabbar sind viele biologische Assays bzw. Biosensoren, die Antikörper [13], Rezeptoren [14] bzw. Enzyme [14] [15] als biologische Komponente einzeln oder in Kombination auf einer Oberfläche immobilisiert haben. In Gegenwart eines sog. Analyten (zu detektierende Komponente) bindet oder interagiert dieser mit der biologischen Komponente, was messtechnisch verfolgt werden kann. Diese einfachen und sensitiven Tests sind nicht an ein Labor gebunden und in einem großen Anwendungsbereich nutzbar. In den letzten Jahren werden auch mehr und mehr ganze Zellen als mikrobiologische Komponente für derartige Systeme genutzt. Manche dieser mikrobiellen Assaysysteme bzw. mikrobiellen Biosensoren zeichnen sich besonders durch ihre lange Lebensdauer und hohe Beständigkeit gegenüber Matrixeinflüssen aus. So kann mit derartigen Systemen u.a. die Analytkonzentration über die Veränderungen der Atmungsaktivität der Zelle mittels Sauerstoffelektrode

gemessen werden [16] [17]. Auch gentechnisch veränderte Mikroorganismen lassen sich einsetzen, die in Gegenwart des zu detektierenden Analyten eine Veränderung anzeigen, welche in ein physikalisch messbares Signal umgewandelt werden kann. Derartige mikrobielle Biosensorsysteme sind bereits für die Bestimmung von östrogenen Aktivitäten beschrieben. Zu deren Erfassung können verschiedene in-vitro Assays, wie der mit menschlichen Krebszellen arbeitende E-Screen-Assay [18], der Vitellogeninassay [19], sowie der Hefezellassay (YES) [20] eingesetzt werden. Der E-Screen-Assay erreicht Nachweisgrenzen von $0,1-10 \text{ ng l}^{-1}$ [18]. Nachteile dieses Tests und Grund für die bisher nicht erfolgte Etablierung zur Östrogenanalyse sind die geringe Robustheit, die mit 4 Tagen zu lange Messzeit und die hohen Kosten. Auch mit dem Vitellogeninassay lassen sich östrogene Aktivitäten messen. Bei diesem Test ist für 17β -Östradiol eine Nachweisgrenze von 10 ng l^{-1} angegeben [20]. Er ist jedoch teuer und aus ethischen Gründen nicht mehr zeitgemäß. Der Hefezellassay YES basiert auf transgenen Hefestämmen von *S. cerevisiae* mit Rezeptor- und Reporterplasmid. Die von den verschiedenen Autoren ermittelten Testmittelpunkte IC_{50} liegen beim klassischen YES-Test für Östradiolstandards übereinstimmend bei $200 - 300 \text{ ng l}^{-1}$ [21] [22]. Auch wenn dieser Test bei Verwendung anderer Reportergene (*luc*, GFP) in seiner Sensitivität auf $27 - 80 \text{ ng l}^{-1}$ gesteigert werden konnte [22] [23], so ist er jedoch für die Analytik von Proben im einstelligen ng l^{-1} -Bereich nicht nutzbar.

1.2.2.3 Totale Interne Reflexions-Fluoreszenz

Ein weiterer vielversprechender Ansatz war die Entwicklung der Analysesysteme RIANA (River ANALyzer) [24] und AWACSS (Automated Water Analyzer Computer Supported System) [25], die beide auf der Methode der Totalen Internen Reflexions-Fluoreszenz (TIRF) basieren. Dabei wird das Licht einer externen Laserdiode in einen Wellenleiter eingekoppelt, auf dessen Oberfläche ein farbstoffmarkierter Analyt immobilisiert ist. Das evaneszente Feld der den Wellenleiter durchlaufenden Lichtwelle kann den Farbstoff anregen, dessen Fluoreszenz durch ein Array von Fotodioden detektiert wird. Die Intensität dieser Fluoreszenz ist ein Maß für die Konzentration des Analyten. In Tschmelak [25] wurden vier endokrine Disruptoren im Konzentrationsbereich $0,1 - 10 \mu\text{g l}^{-1}$ nachgewiesen. Diese Systeme weisen bereits einen hohen Automatisierungsgrad auf und können stationär zur Überwachung der Wasserqualität eingesetzt werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit und Kapitelübersicht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konzept entwickelt, das mittels Si-basierter Lichtemitter den Nachweis von Östrogen in wässrigen Lösungen ermöglicht. Dabei wird die Lichtquelle direkt auf dem Chip integriert. Dies führt zu einer Miniaturisierung des Gerätes und damit zur Reduktion von Ressourcen, Energie und Herstellungskosten.

Diese Arbeit wird wie folgt gegliedert:

Nach der Einleitung im **Kapitel 1** werden im **Kapitel 2** die wesentlichen Grundlagen zu Grenzflächenerscheinungen der Oberflächen- und Grenzflächenspannung behandelt. Da die Adsorption bei der Rezeptorimmobilisierung im Fokus dieser Arbeit steht, wurde im nachfolgenden Teil die Adsorption am Beispiel eines H_2 Molekül aus der Gasphase und allgemein von Flüssigkeiten an Festkörperoberflächen geschildert. Speziell wurden das Adsorbat hER_α -Rezeptor-Östrogen und das die Detektionsmessung begleitende Phänomen der Kreuzreaktivität behandelt. Den Charakterisierungsmethoden der Oberflächenanalytik wurde der letzte Teil gewidmet.

Das Sensorkonzept wird im **Kapitel 3** vorgestellt, dessen Realisierung die weiteren experimentellen Kapitel beschäftigen wird. Dabei wurden die Materialien und Methoden, die in der vorliegenden Arbeit verwendet und entwickelt wurden, beschrieben. Die Funktionalisierung der Sensoroberfläche besteht aus zwei Prozessschritten und erfolgte zuerst an mit PECVD (Plasma-enhanced chemical vapor deposition) abgeschiedenen $1 \times 1 \text{ cm}^2$ großen und 200 nm dicken SiO_2 Schichten auf Si-Substraten. Dieses Verfahren wurde anschließend auf die Lichtemitter angewendet. Der erste Prozessschritt enthält eine Reinigung der Sensoroberfläche und die für die Funktionalisierung nötige Belegung mit endständigen Hydroxylgruppen, die in der Literatur z.B. bei Hong et al. [26] in Verbindung mit Ultraschallbad und einer chemischen Behandlung beschrieben sind, was für die Lichtemitter eine Ätzung der Sensoroberfläche bewirken kann. Der zweite Prozessschritt, die Silanisierung, hängt stark vom ersten Prozessschritt, d.h. von der Hydroxygruppensdichte pro nm^2 , ab, und folgte in der Flüssigphase mit Hilfe einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SSC (Spraying Spin Coating) Methode. Die Funktionalisierung der Sensoroberfläche stellt die erste Voraussetzung für eine erfolgreiche Anbindung biologischer Moleküle, z.B. des hER_α -Rezeptors, an die Sensoroberfläche dar. Libertino et al. [27] konnten mit einer mit aminofunktionellen Gruppen funktionalisierten Glas-Oberfläche erfolgreich das Enzym Glucose-Oxidase anbinden. Eine Referenzlösung aus einem QDots[®]800-Farbstoff und einem Östrogenmolekül kommt zum Einsatz, die nach der Methode von Hermanson et al. [3] realisiert wurde. Das glei-

che Bindungsprotokoll wurde auf den Rezeptor mit QDots[®]655-Farbstoff angewendet, und mittels PL wurde die Immobilisierung der Rezeptoren auf der SiO₂-Oberfläche kontrolliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in **Kapitel 4 und 5** vorgestellt. Das Kapitels 4 wurde in fünf Unterkapitel eingeteilt: „MOSLED: Optische und elektrische Eigenschaften“, „Funktionalisierung der Sensoroberfläche“, „Farbstoffe“, „Östrogen“ und „Referenzlösung“. Anschließend werden im Kapitel 5 die Resultate der Adsorptionsversuche der Lysinaminsäure an die mit der SSC-Methode silanisierte SiO₂-Oberfläche in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Im letzten Teil werden die Ergebnisse der Immobilisierung des Östrogenrezeptors *hER_α* gezeigt. Zum Abschluß wurde die Anordnung der Bio-Komponenten mittels PL an zwei mit verschiedenen Östrogenkonzentrationen versetzten Wasserproben nachgewiesen und den Östrogennachweis mit Hilfe Ge- und Tb- basierten Lichtemitter demonstriert. Alle Prozessschritte wurden mit Hilfe üblicher Methoden der Oberflächenanalyse, d.h. mittels FTIR-, Raman- und XPS- Spektroskopie kontrolliert. Die Kombination aus Lichtemitter-Biofilm wurde vorzugsweise mittels PL und EL untersucht. Anschließend werden die wichtigsten Ergebnisse im **Kapitel 6** zusammengefasst.

Im **Anhang A1** und **A2** werden die FTIR-Spektren der mit dem SSC-Verfahren silanisierten Proben als Funktion der Zeit bzw. als Funktion der Temperatur mit O₂-Zufuhr dargestellt.

2 Grundlagen

2.1 Grenzflächenerscheinungen

2.1.1 Grenzflächen- und Oberflächenspannung

Oberflächenspannung ist eine Eigenschaft der Oberfläche, z.B. eines Wassertropfens an einer festen Oberfläche, die Trennfläche geringer wie möglich aufrechtzuerhalten. Die molekulare Ursache liegt darin, dass Teilchen an der Oberfläche weniger nächste Nachbarn, also eine geringere Anziehungsenergie, als die Teilchen im inneren besitzen. Die Oberfläche verhält sich dabei wie eine gespannte, scheinbar elastische Haut.

Die Grenzflächenspannung γ [$\frac{N}{m}$] ist proportional zu der Arbeit dW , die notwendig ist, um die Oberfläche A einer Probe um einen Betrag dA zu verändern:

$$dW = \gamma \cdot dA \quad (2.1.1)$$

Dupré definierte die Adhäsionsarbeit als Arbeit, die bei der Teilung einer Flächeneinheit zweier in Kontakt stehender Phasen zu leisten ist [28]. Bei der Teilung einer homogenen Flüssigkeit entstehen zwei Flächen. Die notwendige Adhäsionsarbeit pro Flächeneinheit ist $W_{ij} = 2\sigma$, wobei σ die Oberflächenspannung ist (definiert analog zu der Grenzflächenspannung in der Gleichung 2.1.1). Bei zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten ist die Adhäsionsarbeit gegeben durch die Dupré-Gleichung:

$$W_{ij} = \sigma_i + \sigma_j - \gamma_{ij} \quad (2.1.2)$$

Dabei beschreiben die $\sigma_{i,j}$ die Oberflächenspannung der Phasen (i, j) und γ_{ij} die Grenzflächenspannung zwischen den Phasen i und j.

Eine nähere Definition der Adhäsionsarbeit liefert die Gleichung von Good und Girifalco [29][30]:

$$W_{ij} = 2\phi\sqrt{\sigma_i\sigma_j} \quad (2.1.3)$$

Dabei ist ϕ eine empirische Größe und beschreibt die Wechselwirkung zwischen den Teilen der Einzelphasen. Setzt man die Gleichung 2.1.3 in 2.1.2 ein, erhält man den Ausdruck für die Grenzflächenspannung zwischen zwei Phasen:

$$\gamma_{ij} = \sigma_i + \sigma_j - 2\phi\sqrt{\sigma_i\sigma_j} \quad (2.1.4)$$

2.1.2 Kontaktwinkel

Ein Dreiphasensystem Festkörper (s)/ Flüssigkeit (l)/ Gas (g) wird in der Abbildung 2.1.1 schematisch dargestellt, wo alle drei Phasen einander berühren. Wie die Grenzflächenspan-

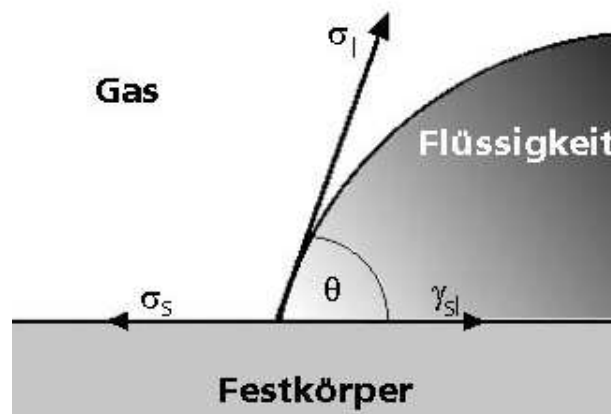


Abbildung 2.1.1: Kontaktwinkel θ eines Flüssigkeitstropfen auf einer ebenen festen Oberfläche

nung γ_{sl} zwischen Festkörper und Flüssigkeit mit den Oberflächenspannungen σ_s und σ_l zusammenhängen, beschreibt die Young-Gleichung:

$$\sigma_s = \sigma_l \cdot \cos(\theta) + \gamma_{sl} \quad (2.1.5)$$

Die Größe des Kontaktwinkels gibt Auskunft über das Benetzungsverhalten der Flüssigkeit. Zum Beispiel bei $\theta \leq 90^\circ$ benetzt die Flüssigkeit den Festkörper. Ist der Kontaktwinkel größer als 90° , erfolgt eine schlechte Benetzung des Festkörpers. Bei glatten Oberflächen

misst man ebenso einen großen Kontaktwinkel und bezeichnet sie als hydrophob. Die Hydrophobizität steht im Zusammenhang mit der freien Energie der Oberfläche, wie aus den Messungen von Matinlinna et al. [5] hervorgeht. Die Tabelle 2.1.1 zeigt, dass die Oberflächenenergie bei zunehmenden Kontaktwinkel sinkt, was die Bindung eines Adsorbats mit große Bindungsenergie (z.B. der Östrogenrezeptor) begünstigt. Deshalb ist die Funktionalisierung der Substrate für die Bio-Anwendung wichtig.

Tabelle 2.1.1: Wasserkontaktwinkelmessung der verschiedenen silanisierten Ti-Proben und deren freien Oberflächenenergien [5]. Die Abkürzungen in der Tabelle 2.1.1 lauten: APMS ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$), BPEA (Bis(3-Trimethoxysilyl)propylethylenediamine), TPCY (Tris(3-Trimethoxysilyl)isocyanurat), OC (Ofentemperatur bei 110°), und RT (Raumtemperatur)

Proben	Kontaktwinkel $\theta(^{\circ})$	Oberflächenenergie (mN m^{-1})
Ti(Referenz)	48.6	51.72
Ti+APMS+OC	61.8	42.90
Ti+BPEA+RT	61.6	43.09
Ti+BPEA+OC	62.8	41.91
Ti+TPCY+RT	68.1	40.15
Ti+TPCY+OC	63.8	43.81

2.1.3 Der hydrophobe Effekt

Mit dem Begriff „hydrophober Effekt“ beschreibt man die Neigung unpolarer Moleküle in wässriger Lösung, eher miteinander Aggregate zu bilden als sich einzeln mit Wassermolekülen zu umgeben. Die Aggregatbildung ist ein Ausdruck der Entropieänderung, die die Löslichkeit bzw. Verteilungsgleichgewichte bestimmen [6]. In der Tabelle 2.1.2 wird die Änderung der Löslichkeit (Henrysche Konstante) einiger unpolaren Substanzen als Funktion der Enthalpieänderung und der Entropieänderung dargestellt. Die negativen Werte für die Enthalpieänderung belegen, dass das Lösen der unpolaren Moleküle im Wasser exotherm erfolgt. Die abnehmenden Werte der Löslichkeit zeigen dagegen die geringe Löslichkeit der Kohlenwasserstoffe in Wasser, die mit wachsender Kettenlänge sinkt. Was die Verteilung der unpolaren Moleküle im Wasser im Gleichgewichtszustand angeht, zeigte sich, dass die Affinität unpolarer Moleküle zueinander weitaus größer ist als zum polaren Wasser [6]. Der

Tabelle 2.1.2: Thermodynamische Daten für das Lösen unpolarer Moleküle im Wasser bei RT.
Entnommen aus [6]

Substanz	Löslichkeit ($\text{mmol l}^{-1}\text{bar}^{-1}$)	ΔH° (kJ mol^{-1})	ΔS° ($\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$)
CH_4	1.33	-13.4	-133
$\text{CH}_3\text{-CH}_3$	1.45	-18.5	-148
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	1.45	-21.2	-158
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	1.15	-24.1	-170

hydrophobe Effekt der Silanlösung [5] ist eins der Probleme, das gelöst werden muss, um eine gute Benetzung bei der Silanisierung der SiO_2 -Oberfläche in der Flüssigphase zu erzielen. Das heißt, allein das Eintauchen der mit endständigen Hydroxylgruppen (OH-Gruppen) belegten SiO_2 -Oberflächen reicht nicht aus. Das geht aus den Arbeiten u.a. von Hong et al. [26] hervor. Erst wenn die Oberfläche dem Stoß der Silangruppenmoleküle durch sprühen (Kap. 3.2.3) ausgesetzt wird, wird der hydrophobe Effekt minimiert und es kommt zu einer Bindung mit den bereits belegten OH-Gruppen auf der Oberfläche (Kap. 4.2.3).

Der hydrophobe Effekt wird vorteilhaft in der Biologie verwendet, um die sogenannte "Hydrophobe Interaktionschromatographie" zu betreiben. Dabei wird die unpolare Oberflächenregion eines Proteins bei hohen Salzkonzentrationen an die schwach hydrophoben Liganden einer stationären Phase adsorbiert, wodurch das Protein aus einer komplexen Matrix getrennt wird, ohne dass seine biologische Aktivität verloren geht [7].

2.2 Adsorption

In diesem Abschnitt wird die Physi- und Chemisorption aus der Gasphase am Beispiel des H_2 Moleküls, das sich einer Oberfläche nähert, behandelt. In der Adsorptionskinetik wird die Abhängigkeit der Anzahl der adsorbierten Teilchen pro Fläche $c_{f,l}(t)$ von der Zeit bei gegebenem Druck und der Temperatur beschrieben. Anschließend werden die Adsorptionsisothermen hergeleitet. In Analogie dazu wird die Adsorption von Teilchen aus einer flüssigen Phase an Festkörperoberflächen behandelt, die der Gegenstand des Adsorptionsverfahrens im Rahmen dieser Arbeit gewesen ist.

2.2.1 Adsorption aus der Gasphase am Beispiel eines H_2 Moleküls

Wird eine Oberfläche einem Gasstrom bei einem Druck p und einer Temperatur T ausgesetzt, so wird eine bestimmte Anzahl der Gasteilchen von der Oberfläche reflektiert, und ein Teil der Teilchen wird eine Bindung mit der Oberfläche eingehen. Diese Bindung nennt sich **Adsorption**. Dabei unterscheidet man zwei Arten der Adsorption: Die Physi- und Chemisorption, wobei die Bindungsenergie der Teilchen ≤ 0.5 bzw. ≥ 0.5 eV ist. In Abbildung 2.2.1 wird der Potentialverlauf eines H_2 Moleküls, das sich mit dem Abstand r einer Oberfläche nähert, gezeigt. $E_{ab}(H_2)$ steht für die Adsorptionsenergie des physisorbierten H_2 Moleküls. Eine Aktivierungsenergie E_{ad}^* wird geleistet, damit eine Bindung M-H zwischen einem Oberflächenatom M und einem Wasserstoffatom entsteht [31] [1] [32]. Bei einer

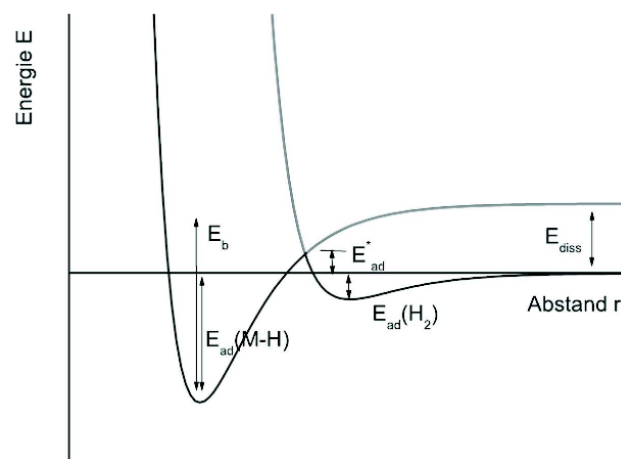


Abbildung 2.2.1: Schematische Darstellung des Potentialverlaufes der Physi- (rechte Kurve) und Chemisorption (linke Kurve) des H_2 Moleküls in der Nähe einer Oberfläche [1]

Adsorptionsisotherme ($T = \text{konstant}$) aus der Gasphase gilt für die Adsorptionsrate R_{ad} [33]:

$$R_{ad} = \frac{dc_{fl.}}{dt} = F \cdot S \quad (2.2.1)$$

mit

$$S = s_0 \cdot c_{fl.} \quad (2.2.2)$$

und

$$s_0(T) \propto e^{\frac{-E_{ad}^*}{k_B T}} \quad (2.2.3)$$

wobei $c_{fl.}(t)$ die Anzahl der adsorbierten Teilchen pro Fläche ist. S ist der Haftkoeffizient und s_0 die Wahrscheinlichkeit, dass das Teilchen die Oberfläche erreicht und daran bindet. F erhält man aus der kinetischen Gastheorie und beschreibt den Teilchenstrom pro Fläche:

$$F := \frac{p}{\sqrt{2\pi m k_B T}} \quad (2.2.4)$$

Die Bedeckung lässt sich als das Verhältnis von $c_{fl.}$ zu der Anzahl der maximal möglich zu besetzenden Plätze pro Fläche $c_{fl.,0}$ definieren [34]:

$$\Theta := \frac{c_{fl.}}{c_{fl.,0}} \quad (2.2.5)$$

Die Gleichung 2.2.3 lässt sich auch schreiben als:

$$\dot{\Theta} = k_a p \cdot (1 - \Theta) \quad (2.2.6)$$

mit

$$k_a = \frac{1}{c_{fl.,0}} \frac{p}{\sqrt{2\pi m k_B T}} \cdot s_0 \quad (2.2.7)$$

wobei k_a die Ratenkonstante für die Adsorption, $(1 - \Theta)$ die Anzahl der unbesetzten Plätze [33] und p der Partialdruck sind. Die Gleichung 2.2.6 wird als Langmuir-Adsorption erster Ordnung bezeichnet.

Für zwei Adsorptionsplätze Θ_1 und Θ_2 , die nur nacheinander besetzt werden können, lauten

die gekoppelte Differentialgleichungen [1]:

$$\dot{\Theta}_1 = k_1\Theta_0 - \dot{\Theta}_2 \quad (2.2.8)$$

$$\dot{\Theta}_2 = k_2\Theta_1 \quad (2.2.9)$$

mit

$$\Theta_0 = 1 - \Theta_1 - \Theta_2$$

wobei Θ_0 als die Zahl der unbesetzten Adsorptionsplätze bezeichnet. Für die Langmuir-Adsorption wird vorausgesetzt, dass

- die Adsorption ein Ensemble von n unbesetzten Plätzen erfordert
- die n Adsorptionsplätze identisch sind
- die Oberfläche sich im thermodynamischen Gleichgewicht befindet
- es keine Wechselwirkung zwischen den adsorbierten Teilchen gibt
- die Adsorption mit einer Wahrscheinlichkeit s_0 stattfindet. Anderenfalls wird das Teilchen reflektiert.

2.2.2 Adsorption einer flüssigen Phase an Festkörperoberflächen

Analog zu der Adsorption aus der Gasphase kann man die Adsorption von Teilchen aus einer flüssigen Phase betrachten. Dabei wird die Adsorption in der flüssigen Phase als Anlagerung der Teilchen an die Oberfläche definiert. Man führt analog zu der bereits eingeführten Größe aus der Gasphase c_{fl} , die Größe der Oberflächenkonzentration als Quotient $\frac{x}{m}$ aus der Masse x des adsorbierten Stoffes entweder pro Adsorbensfläche oder pro Adsorbensmasse m ein. $(\frac{x}{m})_\infty$ steht für die maximal zu adsorbierende Masse und ist analog zu $c_{fl,0}$ aus der Gasphase. So lässt sich der Bedeckungsgrad als Verhältnis adsorbierter Masse zu maximal zu adsorbierender Masse analog zu der Gleichung 2.2.5 definieren als [35] [33]:

$$\Theta := \frac{(\frac{x}{m})}{(\frac{x}{m})_\infty} \quad (2.2.10)$$

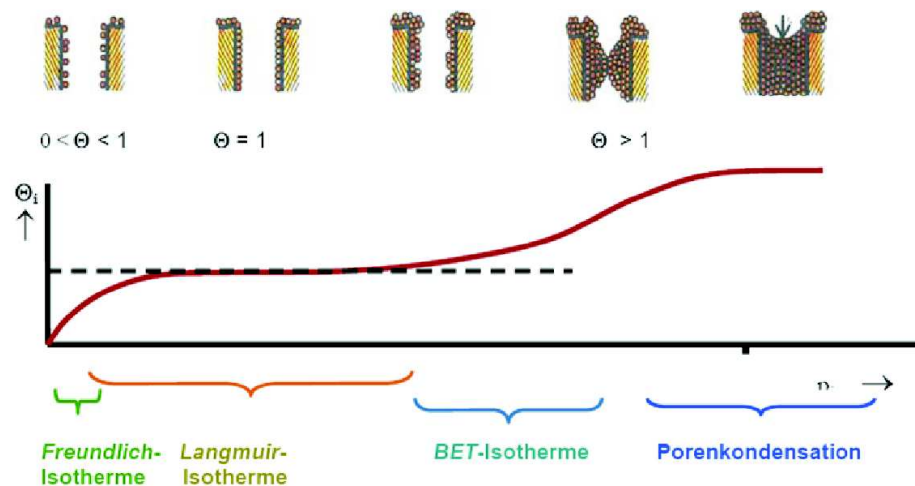


Abbildung 2.2.2: Schematische Darstellung der Adsorptionsisotherme in Abhängigkeit des Partialdruck p_i . Entnommen aus [36]. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Es wurden verschiedene Modellvorstellungen entwickelt, wie die Abbildung 2.2.2 zeigt. Hier werden einige Adsorptionsverläufe erläutert:

- Nach Freundlich [37] [33] wird die Adsorptionsisotherme bei niedrigen Partialdruck p als Typus I (Abbildung 2.2.2) bezeichnet, und die Bedeckung kann so beschrieben werden durch:

$$\Theta = \alpha p^\beta \quad (2.2.11)$$

Wobei α und β stoffspezifische Konstanten mit $(0 \leq \beta \leq 1)$ sind.

- Berücksichtigt man die bereits am Ende von 2.2.1 diskutierten Annahmen, so erhält man die Langmuir-Isotherme Abbildung 2.2.2 durch:

$$\Theta = \frac{Kp}{1 + Kp} \quad (2.2.12)$$

Wobei $K = \frac{K_{des.}}{K_{ads.}}$ die Adsorptionsgleichgewichtskonstante bzw. das Verhältnis aus den Geschwindigkeitskonstanten der Desorption bzw. der Adsorption ist. Man unterscheidet folgende Grenzfälle:

1. Bei schwacher Adsorbierbarkeit und niedrigerem Partialdruck, folgt $Kp \ll 1$. Damit lässt sich die Gleichung 2.2.12 schreiben als $\Theta = Kp$, was auf die Freundlich-Isotherme zurückführt (Gleichung 2.2.11).

2. Bei hoher Adsorbierbarkeit und hohem Partialdruck folgt $Kp \gg 1$. Das heißt $\Theta = 1$, was eine monomolekulare Schicht ergibt.

- Die bisherigen Adsorptionsisothermen beschreiben nur die Chemisorption. Ein umfassenderes Modell, das die Physisorption und die Mehrfachbedeckung berücksichtigt, wurde von Brunauer, Emmett und Teller entwickelt, und resultiert in der BET-Isotherme in der Abbildung 2.2.2. Für mehr Details siehe [38].
- Schließlich kann es auch zur mehrschichtigen Adsorption mit Sättigung, auch Porenkondensation genannt, kommen, wie die Abbildung 2.2.2 zeigt.

In Analogie zu der Gleichung 2.2.6, die die Zahl der pro Zeiteinheit adsorbierten Teilchen $\dot{\Theta}$ als Funktion der Konzentration c der Lösung (des adsorbierten Stoffes) angibt, folgt:

$$\dot{\Theta} = k_{ads}c \cdot (1 - \Theta) \quad (2.2.13)$$

wobei k_{ads} die Geschwindigkeitskonstante der Adsorption und Θ die Bedeckung ist. Daraufhin ist $1 - \Theta$ die Anzahl der unbesetzten Plätze. Für mehr Details siehe [34], [31], [33], [32], [35] und [38].

2.2.3 Das Adsorbat: Östrogen- hER_{α} -Rezeptor

2.2.3.1 Die Östrogen- hER_{α} -Rezeptor-Bindung

Die Östrogen (A)-Rezeptor (Rcp)-Bindung ist eine Schlüssel-Schloss-Bindung [39] und erfolgt im Bereich der Bindungstasche im Rezeptor. Die allgemeine Reaktionsgleichung im Gleichgewicht lässt sich schreiben als:



wobei (A-Rcp) den Östrogen- hER_{α} -Rezeptor-Komplex bezeichnet. k_a und k_d stellen die Assoziations- bzw. die Dissoziationsratenkonstanten dar. Aus dem Massenwirkungsgesetz im Gleichgewicht erhält man die Affinitätskonstante:

$$K_{aff.} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{c_{A-Rcp}}{c_A \cdot c_{Rcp}} = \frac{c_{A-Rcp}}{(c_{0,A} - c_{A-Rcp}) \cdot (c_{0,Rcp} - c_{A-Rcp})} \quad (2.2.15)$$

wobei $K_{aff.}$, c_{A-Rcp} , $c_{0,Rcp}$ und $c_{0,A}$ die Affinitätskonstante, die Gleichgewichtskonzentration des Rezeptor-Östrogen-Adsorbats, die Anfangskonzentration des Rezeptors bzw. des Östrogens bezeichnen. Die Affinitätskonstante soll größer als die bei der Antikörper-Analyt-Bindung ($K_{aff.} \geq 10^5-10^{11}$) [40]) sein.

2.2.3.2 Kreuzreaktivität

Mit der Kreuzreaktivität wird das Phänomen beschrieben, dass die Rezeptor-Östrogen-Bindung (in unserem Fall β -Estradiol- hER_{α} -Rezeptor) während der Nachweismessung nicht erfolgt, und stattdessen durch eine konkurrierende Reaktion (z.B. mit strukturverwandte Verbindungen des Rezeptors) ersetzt worden ist. Handelt sich um die Kreuzreaktivität innerhalb eines Multianalyt-Assay mit verschiedenen Rezeptor-Analyt-Bindungen $Recp_i-A_i$ (mit $i \geq 1$), so kann eine prozentuelle Kreuzreaktivität %CR berechnet werden [41] [42] [43] durch:

$$\%CR = \frac{c_{Analyt}}{c_{Kreuzanalyt}} \cdot 100 \quad (2.2.16)$$

wobei c_{Analyt} und $c_{Kreuzanalyt}$ die Konzentration-des spezifischen Östrogens bzw. des kreuzreaktiven Östrogens sind. Dabei wird die Kreuzreaktivitätsgröße %CR durch die Affinitätstiration des Rezeptors mit dem spezifischen Östrogen und dem potentiell kreuzreagierenden Analyten gemessen. Trägt man die normierten Messwerte gegen den Logarithmus der Konzentration auf, erhält man die Affinitätstirationskurve, deren Verlauf durch Anpassung der "LogisticFunktion beschrieben werden kann[44] [42] [43]:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (2.2.17)$$

mit:

A_1 obere Asymptote an die Kurve

A_2 untere Asymptote an die Kurve

x Analytkonzentration

x_0 Testmittelpunkt (Analytkonzentration am Wendepunkt)

p Steigung im Testmittelpunkt

Für mehr Details ist diese Methode der Kreuzreaktivitätsbestimmung ausführlich bei Winkelmayr et al. beschrieben [45]. .

2.3 Modell der Elektrolumineszenz des Si-basierten Lichtemitters

In diesem Abschnitt wird eine komprimierte Fassung des Modells der Elektrolumineszenz des Si-basierten Lichtemitters (MOSLED) behandelt (das wurde in vielen Arbeiten in unserer Gruppe ausführlich beschrieben). Deshalb wird für mehr Details auf die folgenden Arbeiten [46] und [47] hingewiesen. In den Gleichungen 2.3.2 bis 2.3.6 wurden folgende Konstanten verwendet:

J	Stromdichte
Φ_B	Barrierrhöhe
E	Elektrisches Feld
T	Temperatur
k_B	Bolzmann Konstante
e	Elementarladung
ϵ_0	Dielektrizitätskonstante, ϵ_r relative Dielektrizitätskonstante
m^*	effektive Masse des Elektrons
\hbar	Plancksche Konstante

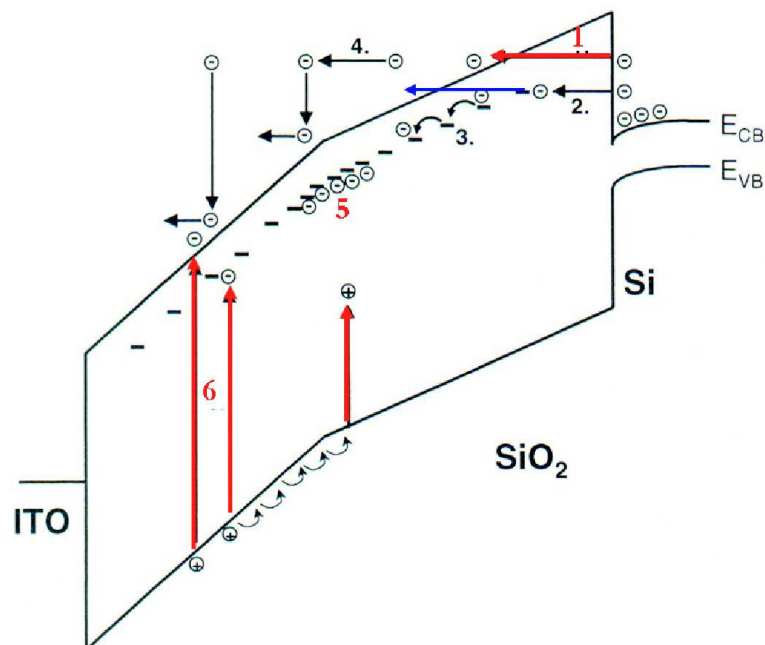


Abbildung 2.3.1: Injektions- und Leitungsmechanismen in einer MOS-Struktur [48]. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

In der Abbildung 2.3.1 wird das Modell der Injektions- und Leitungsmechanismen in einer MOS-Struktur gezeigt, deren wesentlichen Prozesse wie folgt beschrieben werden können:

- Der Prozess 1: Aufgrund der Barrierenhöhe von etwa 3.1 eV zwischen dem Leitungsband von Si zu dem von von SiO_2 scheiden thermisch aktivierte Injektionsmechanismen aus [49]. Das sogenannte Fowler-Nordheim (FN) Tunneln, welches 1928 von Fowler und Nordheim beobachtet wurde [50], tritt als Injektionsmechanismus auf, und wird durch folgende Fowler-Nordheim-Gleichung beschrieben [51]:

$$J_{FN} \propto \frac{E^2}{\Phi_B} \cdot \exp\left(-C \cdot \frac{\Phi_B^{3/2}}{E}\right) \quad (2.3.1)$$

$$(2.3.2)$$

mit

$$C = \frac{4}{3} \cdot \frac{\sqrt{2e m^*}}{\hbar}$$

Ein anderer Leitungsmechanismus wurde bei Fujii et al. beobachtet, indem ein Elektron bei niedrigerer angelegten Spannung von einem Ge- Nanocluster zum anderen tunnelt [52]. Ein direktes Tunneln kann bei einer SiO_2 -Dicke von $< 4\text{nm}$ stattfinden, wie in [53] beschrieben ist.

- Der Prozess 2: Die Störstellenentstehung und die durch Ladungsträger entstehenden Schäden im SiO_2 sind bei DiMaria et al. [54] [55] beschrieben. Bei hinreichend vielen Störstellen in Grenzflächennähe nimmt die Elektroneninjektion bei zunehmenden elektrischen Feldern (ab Feldstärke 4MVcm^{-1}) zu. Das beschreibt das von Cheng et al. [56] vorgeschlagene "Trap assisted tunneling" (TAT) und lässt sich schreiben als:

$$J_{TAT} \propto \exp\left(-C \cdot \frac{\Phi_t^{3/2}}{E}\right) \quad (2.3.3)$$

$$(2.3.4)$$

mit

$$C = \frac{4}{3} \cdot \frac{\sqrt{2e m^*}}{\hbar}$$

- Die Prozesse 3 und 5 beschreiben die Poole-Frenkel-Leitung [57]. Dabei hängt die Leitung von der Traptiefe ab. Die I-U-Kennlinie hängt stark von der Temperatur ab [58] [59]. Bei hinreichend hohen Feldern wird die Traptiefe kleiner und damit können die Elektronen mit thermischer Energie die Barriere überwinden und zur Leitung beitragen. Diesem Verhalten ähnelt die Hopping-Leitung (Prozess 5) mit dem Unterschied, dass die Elektronen bei kleinen Feldern von einer Störstelle in die nächste tunneln können. Die Leitung ist proportional zu T^{-1} [60]:

$$J_{PF} \propto E \cdot \exp\left(\frac{C \cdot E^{1/2} - e \Phi_t}{2kT}\right) \quad (2.3.5)$$

$$J_{hopping} \propto E \cdot \frac{a^2}{kT} \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{kT} - \frac{2m^* a}{\hbar} \cdot \Phi_m\right) \quad (2.3.6)$$

mit

$$C = \frac{e^{3/2}}{\pi \epsilon_0 \epsilon_r}$$

wobei a und E_a der Abstand zwischen zwei Störstellen bzw. die Aktivierungsenergie ist.

- Der Prozess 4 beschreibt die Leitung durch die quasi-freie Bewegung der Elektronen im SiO_2 . Bei hinreichend hohen Feldern werden die Elektronen beschleunigt, das heißt die resultierende kinetische Energie der Elektronen wird zum Teil durch inelastische Streueignisse an Defekten bzw. strukturelle Defekten (implantierte Seltenerdionen) abgegeben. Die Wahrscheinlichkeit solcher Streueignisse wächst mit zunehmender Defektdichte. Die durch angelegte Spannung erreichte kinetische Energie der Elektronen kann je nach Feldstärke bis einige eV erreichen [61], welche ausreichend ist, die 4f-Elektronen der Seltenerdionen anzuregen, und dadurch die Elektrolumineszenz erzeugt.
- Der Prozess 6 stellt Degradationsprozesse in der MOSLED dar. Bei hohen elektrischen Feldern werden Elektronen aus dem Valenzband in das Leitungsband angeregt. Die Energie ist größer als die Bandlücke des SiO_2 . Es kommt zur lawinenartigen Elektronenerzeugung im Leitungsband des SiO_2 , während das angelegte elektrische Feld konstant bleibt, welches als Bremsseffekt wirkt. Das führt zu einem Durchbruch.

2.4 Farbstoffemission in Anwesenheit von mehreren Biofilmbeschichtungen

2.4.1 Geometrie der Biofilme auf der MOSLED-Oberfläche

Abbildung 2.4.1 zeigt die angenommene Geometrie der Biofilme auf der MOSLED-Oberfläche. Im Allgemeinen wird die Absorption eines Moleküls als molarer Extinktionskoeffizient ϵ mit der Einheit $M^{-1}cm^{-1}$ angegeben. Dabei bedeutet $1 M^{-1}cm^{-1}$, dass ein Lichtstrahl beim Passieren einer 1 cm langen Strecke in einer 1 molaren Lösung auf $1/e$ geschwächt wird. 1 molar M bedeutet 1 mol pro Liter. ϵ kann demnach auch in der Einheit cm^2mol^{-1} ausgedrückt werden. Pro Molekülsorte (Linker, Rezeptor, Östrogen selbst etc.) kann man einen

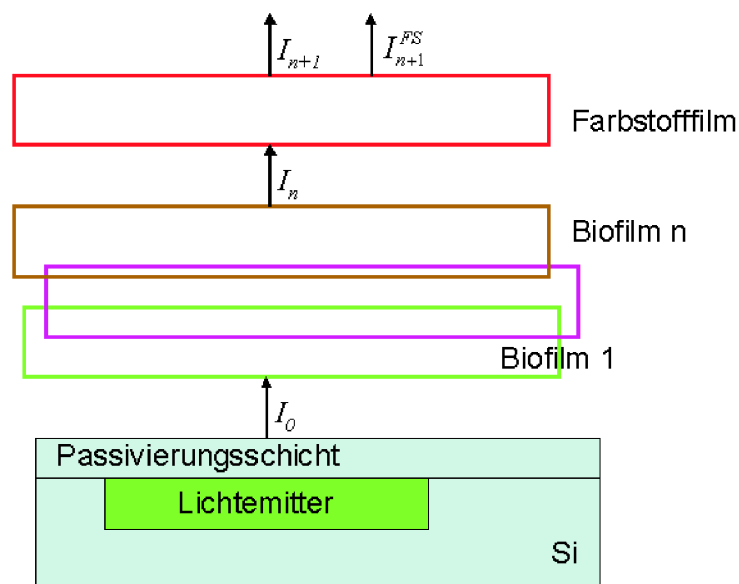


Abbildung 2.4.1: Schematische Darstellung der Geometrie des MOSLEDs in Anwesenheit mehrerer Biofilme

„Film“ definieren, wobei diese auch ineinander übergehen können. Hat man n derartige Filme, so ergibt sich für die Lichtleistung I_n :

$$I_n = I_0 \prod_{i=1}^n \exp(-\epsilon_i M_i^* d_i) \quad (2.4.1)$$

2 Grundlagen 2.4 Farbstoffemission in Anwesenheit von mehreren Biofilmbeschichtungen

mit M_i^* bzw d_i als Molarität bzw. Dicke des Biofilms. Die Molarität kann man ausdrücken als:

$$M_i^* = \frac{n}{V} = \frac{n_A}{d} = \frac{f}{N_A d}$$

mit n , n_A , f und N_A als Molmenge, Molmenge pro Fläche, Flächenbelegung der Moleküle (Moleküle pro cm^2) und Avogadrokonstante. Damit ergibt sich die Gleichung 2.4.1 zu:

$$I_n = I_0 \prod_{i=1}^n \exp\left(-\epsilon_i \frac{f_i}{N_A}\right) \quad (2.4.2)$$

Hat der Farbstoffilm den Index $n+1$, so wird in diesem der Anteil

$$A_{n+1} = I_n \left[1 - \exp\left(-\epsilon_{n+1} \frac{f_{n+1}}{N_A}\right)\right] \quad (2.4.3)$$

absorbiert. Geht man noch davon aus, dass der Farbstoff (FS) mit der Effizienz η emittiert, so ergibt sich für die detektierbare Lichtintensität des Farbstoffs:

$$I_{n+1}^{FS} = \frac{1}{2} \eta A_{n+1} \quad (2.4.4)$$

Der Faktor $\frac{1}{2}$ berücksichtigt, dass der FS isotrop abstrahlt, aber nur der obere Halbraum detektiert werden kann. Bei ungünstigeren Geometrieverhältnissen müsste dieser Faktor noch nach unten korrigiert werden. Das Verhältnis R von Lichtstärke FS zu Lichtstärke Emitter ist:

$$\begin{aligned} R &= \frac{I_{n+1}^{FS}}{I_{n+1}} = \frac{\eta}{2} I_n \left[1 - \exp\left(-\epsilon_{n+1} \frac{f_{n+1}}{N_A}\right)\right] \left[I_n \exp\left(-\epsilon_{n+1} \frac{f_{n+1}}{N_A}\right) \right]^{-1} \\ &= \frac{\eta}{2} \left[\exp\left(+\epsilon_{n+1} \frac{f_{n+1}}{N_A}\right) - 1 \right] \end{aligned} \quad (2.4.5)$$

Formel 2.4.5 ist ohne Eigenabsorption gerechnet.

Das Verhältnis R am Beispiel des QDots[®]800-Farbstoffs:

Mit:

$$\begin{aligned}\epsilon &= 1.8 \cdot 10^6 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ &= 1.8 \cdot 10^9 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1} \text{ (etwa bei 550 nm)} \\ f &= 1 \cdot 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ (entspricht } 10 \times 10 \text{ nm pro Molekül)} \\ N_A &= 6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \\ \eta &= 0.5\end{aligned}$$

erhält man $R=7.5 \cdot 10^{-4}$. Typische Lichtstärken eines optimierten Lichtemitters bei einer angenommenen Fläche von 1 mm^2 liegen bei circa $4 \mu\text{W}$, was bei dem angenommenen R-Wert einer Signalstärke von etwa 3 nW entspricht. Gute Photodioden haben einen Rauschpegel von einigen pW.

2.4.2 Anzahl der zu bindenden Östrogenmoleküle

Man nehme an, eine Wasserprobe beinhalte β -Estradiol in einer Konzentration von 0.1 ng/l (untere Nachweisgrenze). Das wäre bei einer Molmasse von 272.4 g mol^{-1} eine Konzentration von circa $3.7 \cdot 10^{-13} \text{ mol/l}$ bzw. $2.2 \cdot 10^{11}$ Moleküle pro l. Will man, entsprechend dem obigen Beispiel, eine Flächenbelegung von 10^{12} cm^{-2} auf einer Fläche von 1 mm^2 erreichen, braucht man 10^{10} Moleküle bzw. ein Probenvolumen von c. 45 ml bei einer Ausbeute von 100% . Da jedoch ein Großteil der Moleküle ohne Bindung vorbeischwimmen wird (abhängig von Fließgeschwindigkeit, Kanalquerschnitt etc.), bräuchte man ein entsprechend größeres Volumen.

2.5 Oberflächenanalytik

2.5.1 Molekülschwingung eines zweiatomiges Moleküls

In diesem Abschnitt werden die Grundlagen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden, die zur Untersuchung der adsorbierenden Schichten silanisierten und nicht silanisierten SiO_2 -Oberflächen eingesetzt wurden, behandelt. Dafür wurden zwei Methoden verwendet, die ein ergänzendes Bild liefern sollen: Zum einen wurde die Struktur des Adsorbates durch Raman- und -Infrarotspektroskopie untersucht, die eine größere Auswahl anregbarer Schwingung anbieten, und sich damit gut ergänzen. Zum anderen wurde

die Bindungsenergie mit Hilfe der XPS (**X**-ray **P**hotoelectron **S**pectroscopy)-Methode gemessen, was Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Oberfläche zulässt.

Die Schwingungsenergie E_ν eines zweiatomigen Moleküls wird näherungsweise als die Energie eines harmonischen Oszillators betrachtet. E_ν ist gegeben durch:

$$E_\nu = \hbar\omega\left(\nu + \frac{1}{2}\right) \quad (2.5.1)$$

wobei die Schwingungsquantenzahl ν die folgenden Werte annimmt:

$$\nu = 0, 1, 2, \dots$$

Darin ist ω die klassische Oszillatorkreisfrequenz, welche proportional zu der reduzierten Masse μ und der Kraftkonstante k ist:

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.5.2)$$

Beispiel: $k=5.16$ [aJ/ Å²] für das zweiatomige HCl [62].

In der Molekülspektroskopie werden die Schwingungsenergien in Wellenzahlen cm^{-1} angegeben und die Schwingungsterme mit G_ν bezeichnet:

$$G_\nu = \frac{E_\nu}{hc} = \nu_e\left(\nu + \frac{1}{2}\right) [cm^{-1}] \quad (2.5.3)$$

mit

$$\nu_e = \frac{\hbar\omega}{hc} = \frac{\nu}{2\pi c} = \frac{1}{\lambda}$$

2.5.2 Schwingungs-Raman-Spektren

Das Licht kann von Molekülen absorbiert werden, wenn die Resonanzbedingung $E = h\nu$ erfüllt ist. Nach der klassischen Elektrodynamik würde bei der Rayleigh-Streuung das Licht

den E-Vektor des Lichtfeldes an den Hüllenelektronen im Molekül beeinflussen und ein induziertes Dipolmoment ($p_i = \alpha E$) erzeugen, das mit der gleichen Frequenz wie die des Lichtes oszilliert und wiederum als Hertzscher Oszillator eine Lichtwelle der gleichen Frequenz ausstrahlt. Das Rayleigh-gestreute Licht ist mit dem Primärlicht kohärent. Eine spektrale Verschiebung, d.h. eine Nichtkohärenz zwischen dem Primärlicht und dem gestreuten Licht, wurde 1928 von Raman beobachtet [63], und von Smekal bereits 1925 vorausgesagt und theoretisch begründet [64]. Dabei bringt Primärlicht das Molekül vom Grundzustand

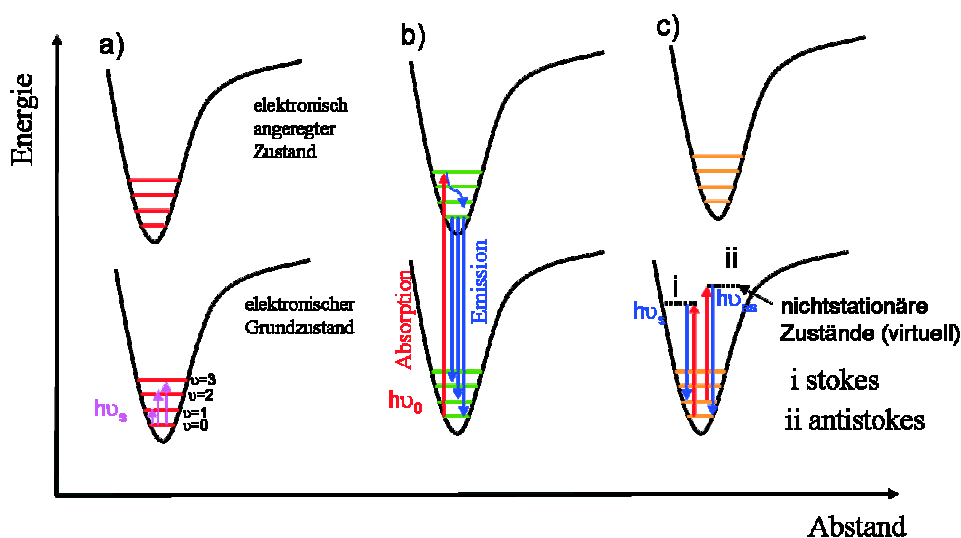


Abbildung 2.5.1: Termschemata für Infrarot-Absorption (a), Fluoreszenz (b) und Raman-Streuung (c), Stokes (i) und Anti-Stokes (ii). Skizziert nach [65]

($\nu = 0$) in einen höheren Zustand (auch virtueller Zustand genannt). Im gestreutem Licht beobachtet man spektrale Frequenzverschiebungen nach kleineren Energien (Stokes-Linien) und welche nach höheren Energien (Anti-Stokes-Linien) hin, wie in der Abbildung 2.5.1 (c) im Termschema für Raman-Streuung dargestellt.

Bei dem Schwingungs-Raman-Effekt geht man von der bereits erwähnten Rayleigh-Streuung aus. Das Primärlicht mit der Frequenz ν_p und einer Feldstärke von $E = E_0 \cos(2\pi\nu_p t)$ erzeugt ein induziertes Dipolmoment $p(t) = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_p t)$, das mit der gleichen Frequenz ν_p schwingt, wobei α die Polarisierbarkeit ist. Wenn das Molekül mit einer Eigenschwingung schwingt, dann wird zum induzierten Dipolmoment ein zusätzliches Term addiert:

$$p(t) = \alpha E = \alpha(R_0)E + \left(\frac{d\alpha}{dR}\right)(R - R_0)E + \dots \quad (2.5.4)$$

mit

$$R = R_0 + q \cos(2\pi\nu_{vib}t) \quad (2.5.5)$$

$$\alpha(R) = \alpha(R_0) + \left(\frac{d\alpha}{dR}\right)(R - R_0) + \dots \quad (2.5.6)$$

wobei $\alpha(R)$ nach einer Taylorreihe um den Abstand R der schwingenden Atomkerne entwickelt wurde. Damit lässt sich die Gleichung für das induzierte Dipolmoment durch Einsetzen der Gleichung 2.5.6 schreiben als:

$$p(t) = \alpha E = \left[\alpha(R_0) + \frac{d\alpha}{dR} q \cos(2\pi\nu_{vib}t) \right] E_0 \cos(2\pi\nu_{vib}t) \quad (2.5.7)$$

Mit Hilfe von:

$$\cos\alpha \cdot \cos\beta = \frac{1}{2} [\cos(\alpha + \beta) + \cos(\alpha - \beta)] \quad (2.5.8)$$

lässt sich die Gleichung 2.5.7 umformen zu:

$$p(t) = \alpha(R_0)E_0 \cos(2\pi\nu_p t) + \frac{1}{2} \frac{d\alpha}{dR} E_0 q [\cos(2\pi(\nu_p + \nu_{vib})t) + \cos(2\pi(\nu_p - \nu_{vib})t)] \quad (2.5.9)$$

Eine Schwingung ist also Raman-aktiv, wenn gilt $\frac{d\alpha}{dR} \neq 0$. Das heißt die Polarisierbarkeit muss sich mit dem Abstand R der Kerne im Molekül bei der Schwingung ändern. Das gilt immer für alle zweiatomigen Moleküle, insbesondere die homonuklearen bzw. unpolaren Moleküle [66] [62].

2.5.3 Schwingungs-Infrarot-Spektren

Der Unterschied zwischen der Infrarot- und Raman-Spektroskopie ist die Auswahl der anregbaren Schwingungen. Bei der Infrarot-Spektroskopie werden Schwingungen angeregt (Abbildung 2.5.1 **(a)**), bei denen sich das Dipolmoment des Moleküls ändert, oder Moleküle, die ein permanentes Dipolmoment aufweisen. Die Analogie zu der Gleichung 2.5.6 erhält

man:

$$\mu(R) = \mu(R_0) + \left(\frac{d\mu}{dR} \right) (R - R_0) + \dots \quad (2.5.10)$$

wobei μ das Dipolmoment des Moleküls ist. Die Berechnung der Auswahlregeln zeigt, dass

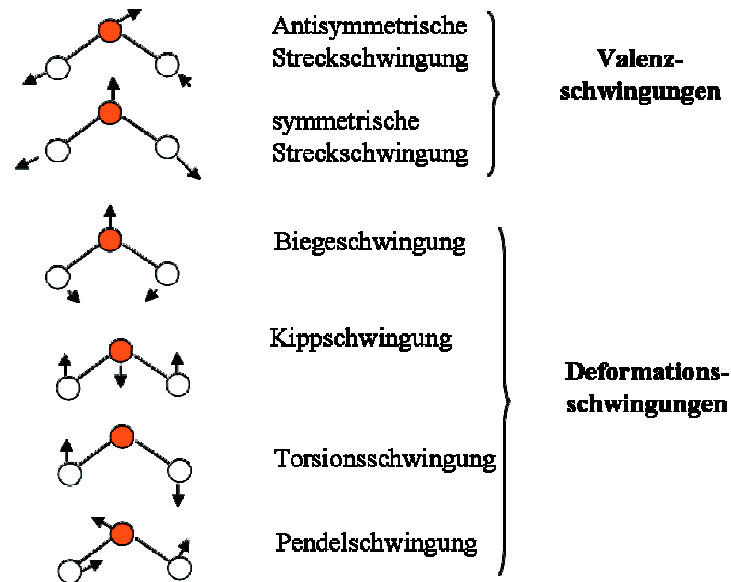


Abbildung 2.5.2: Schematische Darstellung der Schwingungsarten nach [67] skizziert. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden

alle Übergänge $\Delta\nu_e = \pm i$ möglich sind. Die Intensität der Oberschwingungen ($i \geq 2$) nimmt mit steigenden $\Delta\mu$ ab. Die Anzahl von beobachteten Schwingungen eines mehratomiges Moleküls hängt von dessen geometrischem Aufbau und der Zahl n der Atome des Moleküls ab. Die Schwingungsformen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

- Valenz- oder Streckschwingungen: Die Auslenkung der Atome aus der Ruhelage erfolgt hier in Richtung der Bindungsachse, der Bindungsabstand verändert sich periodisch. Bei Symmetrieäquivalenten Atomgruppen lassen sich die Valenzschwingungen koppeln, als symmetrisch μ_s , oder asymmetrisch μ_{as} bezeichnet werden können, wenn die Molekülsymmetrie nicht erhalten bleibt (Abbildung 2.5.2)
- Deformationsschwingung: Dabei bleibt der Bindungsabstand annähernd konstant, es ändert sich aber der Bindungswinkel. Die unterschiedlichen Deformationsschwingungsformen werden in Abbildung 2.5.2 schematisch dargestellt.

2.5.4 Oberflächenempfindlichkeit bei XPS-Spektren

Eine Messmethode ist oberflächenempfindlich, wenn die Meßgröße im wesentlichen durch die Atome der obersten Schicht bestimmt ist [68]. Die Oberflächenempfindlichkeit bei XPS hängt von der inelastischen freien Weglänge λ der austretenden Photoelektronen und damit von deren kinetischer Energie ab. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photoelektron die Oberfläche erreicht, ist von der Energie und dem Impuls abhängig. Seah et al. [69] fanden aus

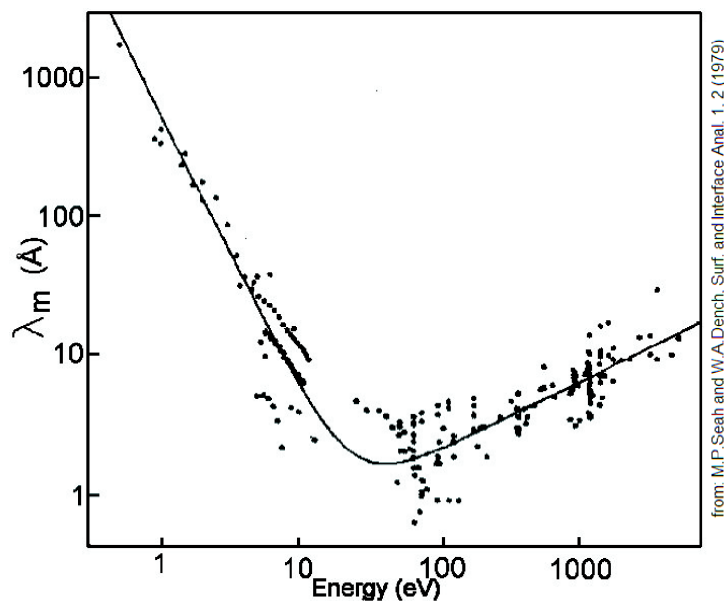


Abbildung 2.5.3: Universelle Abhängigkeit der Austrittstiefe von der kinetischen Energie der Photoemittierten Elektronen nach [69] bei einer Anregungsenergie von 1486.6 eV (siehe Tabelle 3.3.1)

einer Zusammentragung empirisch ermittelter freier Weglängen, dass für kleine kinetische Energien $\lambda \propto E_{kin}^{-2}$ und für Energien der Größenordnung $E_{kin} \geq 150\text{eV}$ ein Verhalten der Form $\lambda \propto \sqrt{E_{kin}}$ gilt. Das führt zu einer allgemeinen Gleichung:

$$\lambda = d \left(\frac{\alpha}{E_{kin}^2} + \beta \sqrt{d \cdot E_{kin}} \right) \quad (2.5.11)$$

wobei d ein typischer Dickenparameter ist und α und β die materialspezifischen Konstanten sind. Für anorganische Verbindungen sind die Konstanten empirisch $\alpha=641\text{nm}(\text{eV})^2$, $\beta=0,096\text{nm}/\sqrt{\text{eV}}$ bestimmt worden, und für reine Elemente $\alpha=143\text{nm}(\text{eV})^2$ und $\beta=0,054\text{nm}/\sqrt{\text{eV}}$.

Beispiel: Für eine ZnO Schicht mit dem Dickenparameter $d = 0,228\text{nm}$ hat man eine freie

Weglänge von [70]:

$$\lambda = 0.228 \left(\frac{641(\text{eV})^2}{E_{kin}^2} + \frac{0,096}{\sqrt{\text{eV}}} \sqrt{0,228 \cdot E_{kin}} \right) \quad (2.5.12)$$

Das Minimum der Austrittstiefe, die größte Oberflächenempfindlichkeit, liegt bei etwa 40-70 eV. Das ergibt eine Austrittstiefe von $\lambda = 0.15\text{-}0.11$ nm, was einer Dicke von einer bis zwei Monolagen entspricht [71] [70].

3 Material und Methoden

3.1 Das Sensorkonzept

Das Sensorkonzept basiert auf der direkten Fluoreszenzanalyse. Dabei befindet sich die bioaktive Schicht direkt über dem Lichtemitter. Das Messverfahren setzt voraus, dass die bioaktive Schicht mit endständigen funktionellen Gruppen mit Hilfe der Silangruppen (Abschnitt 3.2.2) beschichtet und mit dem zum Analyten geeigneten Rezeptor adsorbiert (Abbildung 3.1.1-a) ist. Eine Referenzprobe kommt zum Einsatz, die aus farbstoffmarkierten Östrogenmolekülen besteht. Die optische Anregungswellenlänge des verwendeten Farbstoffs muss mit der Emissionswellenlänge des integrierten Lichtemitters übereinstimmen (Tabelle 3.2.3). Das Messverfahren besteht aus vier Schritten:

1. Das Aufbringen der östrogenhaltigen Probe auf die Chip-Oberfläche durch Pipettieren, Eintauchen oder Vorbeiströmen in einer Mikrofluidik (Abbildung 3.1.1-b). Eventuell vorhandene Östrogenmoleküle werden an den Rezeptoren immobilisiert.
2. Das Spülen der Probe mit destilliertem Wasser, um leicht gebundene Östrogenmoleküle bzw. Fremdmoleküle zu beseitigen.
3. Das Aufbringen einer Referenzprobe auf die Chip-Oberfläche durch Pipettieren, Eintauchen oder Vorbeiströmen in einer Mikrofluidik (Abbildung 3.1.1-c). Noch nicht abgesättigte Rezeptoren werden dabei mit farbstoffmarkierten Östrogenmolekülen belegt.
4. Durch Anlegen einer Spannung regt der integrierte Lichtemitter den Farbstoff der Referenzprobe zur Lumineszenz an. Das Lichtsignal des Farbstoffes wird mit Hilfe eines

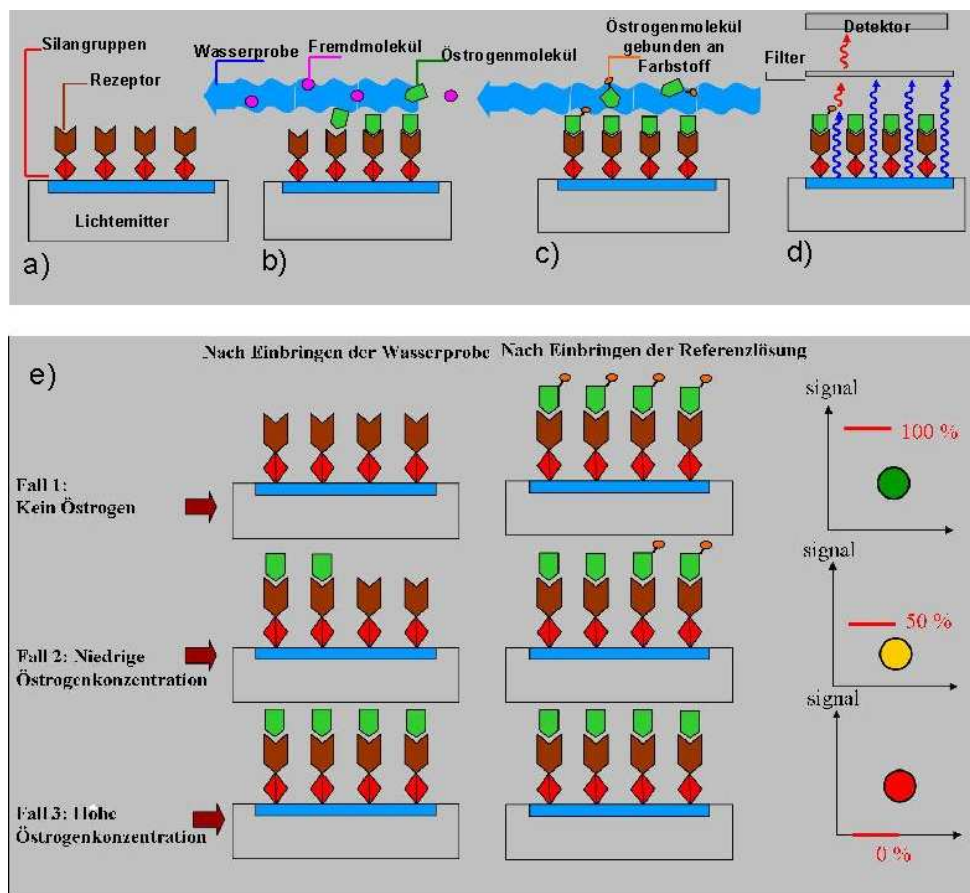


Abbildung 3.1.1: Das Sensorkonzept [2]. Nähere Erläuterung finden sich im dazugehörigen Text.

Filters vom Signal des integrierten Lichtemitters getrennt und mit einem Detektor gemessen (Abbildung 3.1.1-d). Für die Verwendung dieses Verfahrens sind nur sehr geringe Farbstoffmengen in der Referenzprobe notwendig, wodurch die Kosten pro Nachweis reduziert werden.

Je nach Kontaminierungsgrad der Probe ergeben sich unterschiedliche Signalstärken, die in Abbildung 3.1.1-e dargestellt sind.

1. Eine östrogenfreie Wasserprobe ergibt ein Fluoreszenz-Signal von 100%, da alle Rezeptoren mit farbstoffmarkierten Östrogen der Referenzprobe belegt werden können ((Abbildung 3.1.1-e)- **Fall 1**).
2. Eine leicht mit Östrogenen kontaminierte Wasserprobe ergibt ein Fluoreszenz-Signal zwischen 0 und 100% (z. B. 50 %), da nur ein Teil der Rezeptoren mit farbstoffmarkierten Östrogen belegt ist ((Abbildung 3.1.1-e)- **Fall 2**).

3. Eine mit Östrogenen stark kontaminierte Wasserprobe liefert kein Fluoreszenz-Signal, da alle immobilisierten Rezeptoren vollständig mit Östrogen aus der Wasserprobe belegt sind ((Abbildung 3.1.1-e)- **Fall 3**).

3.2 Probenpräparation

3.2.1 Lichtemitter-Prozessierung

In Abbildung 3.2.1 wird der schematische Aufbau des Si-basierten Lichtemitters (MOSLED) gezeigt. Die Struktur des MOSLEDs ist eine MOS-Struktur (**M**etall- **O**xide-**S**emiconductor), die aus einem Metall, dotiertem SiO_2 und Si mit einer zusätzlichen SiON-Schicht besteht. Dadurch können sie mit den herkömmlichen Methoden der Si-Technologie monolithisch auf Silizium prozessiert werden, was eine starke Reduzierung der Herstellungskosten mit sich bringt.

Eine dünne SiO_2 -Schicht (3) (Dicke 20 bis 500 nm) wird durch thermische Oxidation bei

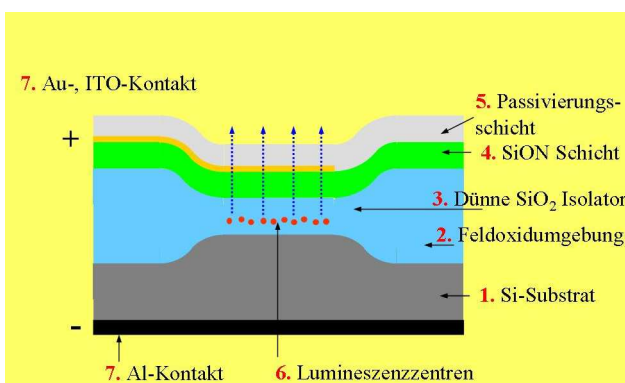


Abbildung 3.2.1: Schematischer Aufbau des Si-basierten Lichtemitters.

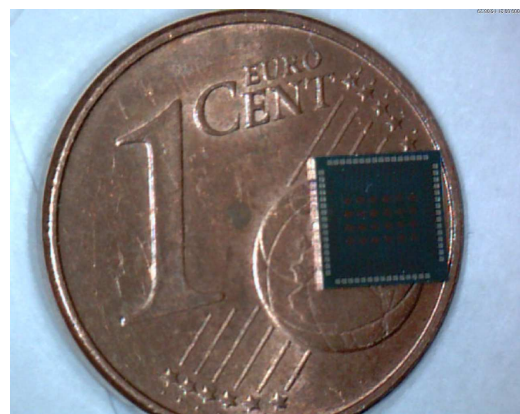


Abbildung 3.2.2: 5x5 mm² großer Si-basierter Lichtemitter chip mit 24 Dots (mittig) (300 µm Durchmesser)

1050°C aufgebracht. Diese Schicht wird mit Fremdatomen, insbesondere mit Ge, Sn und Elementen der Seltenen Erden, implantiert. In der Abbildung 3.2.3 ist ein mit Hilfe des TRIM (**T**Ransport of **I**ons in **M**atter)-Programms berechnetes Implantationsprofil für Terbium in einer 100 nm dicke SiO_2 -Gateoxideschicht (MOSLED-Aufbau in Abbildung 3.2.1) nach einer Einzelimplantation mit einer Energie von 100 keV (mit einer Dosis von $6 \cdot 10^{15}$

cm^{-2} und einer Tb-Konzentration von 1.5 % im Maximum) dargestellt. Diese TRIM-Profil-Berechnung wurde durch RBS-Messung bestätigt.

Anschließend wurden die implantierten SiO_2 Schichten mit Hilfe von verschiedenen Aushei-

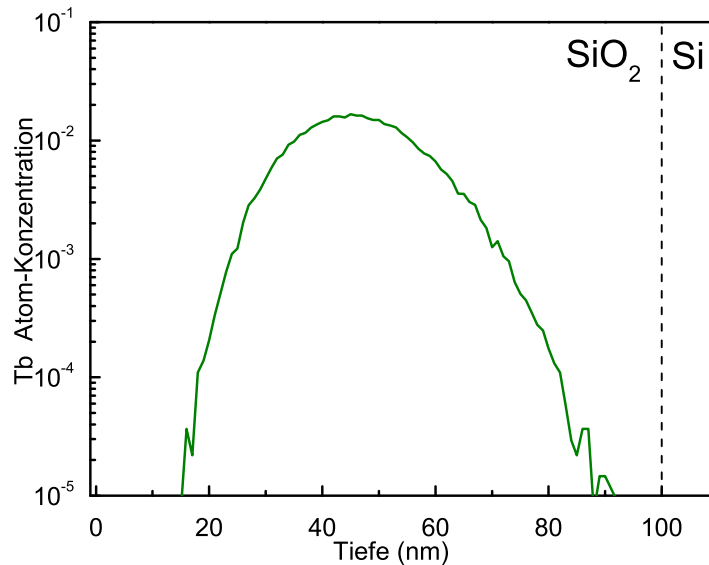


Abbildung 3.2.3: Mit TRIM berechnete Implantationsprofil für Terbium in eine 100 nm dicke SiO_2 -Schicht

lungsprozessen zwischen (400- 1200°C) mittels Blitzlampe FLA (**F**lash **L**amp **A**nnealing)(20 ms), Kurzzeitausheilung RTA (**R**apid **T**hermal **A**nnealing) (6 bis 10 s) und mittels eines Quarzrohrfens FA (**F**urnace **A**nnealing) (30 min) behandelt. Durch die Kombination von Implantation und Ausheilung entstehen Lumineszenzzentren (6) im Gateoxid. Eine SiO_xN_y Schutzschicht (4) (20 bis 500 nm) wird mittels PECVD (**P**lasma-**E**nhanced **C**hemical **V**apor **D**eposition) abgeschieden. Diese Schicht sorgt für eine bessere elektrische Stabilität und längere Lebensausdauer des MOSLEDs. Die Lichtemission erfolgt beim Anlegen einer elektrischen Spannung. Dabei werden Ladungsträger vom Metall oder vom Halbleiter (1) in das vom Feldoxid (2) umgebenden Gateoxid (3) injiziert. Die Bioschicht wird auf die Passivierungsschicht (200 nm dicke SiO_2 Schicht) aufgebracht (5). Die Kontaktierung des MOSLEDs erfolgt durch eine **I**ndium **T**in **O**xide (ITO)- und Aluminium-Schicht als Front- und Rückseitekontakt (7).

Nähere Information zu der MOSLED-Struktur und ihren elektrischen und optischen Eigenschaften sind in den folgenden Patentanmeldungen und Arbeiten [72] [73] [74] [46] [75] [76] [77] zu finden.

3.2.2 Lichtemitter-Reinigung

Die Abbildung 3.2.4 zeigt das IR-Spektrum der Lichtemitteroberfläche vor und nach der Reinigung. Die zwei eingekreisten Bereiche zeigen zwei Banden zwischen $1870\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ und $4000\text{-}3560\text{ cm}^{-1}$, die auf die Schwingungsbanden der üblichen Kohlenstoffverbindungen (z. B. die Carbonylgruppe $\text{C}=\text{O}$ Streckschwingung dominiert im Bereich $1800\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$) und der Wasserstoffverbindungen (für Feuchtigkeit typische Schwingungsbanden) hindeuten. Für die Reinigungsprozedur werden folgende Schritte ausgeführt:

1. Der Lichtemitter wird in eine mit dest. Wasser verdünnte (3:1) 1,1,1-trichloroethanol-Lösung für 5 Minuten getaucht und danach mit N_2 -Gas getrocknet.
2. Der Lichtemitter wird in eine Aceton-Lösung für 5 Minuten getaucht und anschließend wieder mit N_2 -Gas getrocknet.
3. Der Lichtemitter wird für 5 Minuten in eine Methanol-Lösung eingetaucht und danach wieder mit N_2 -Gas getrocknet.

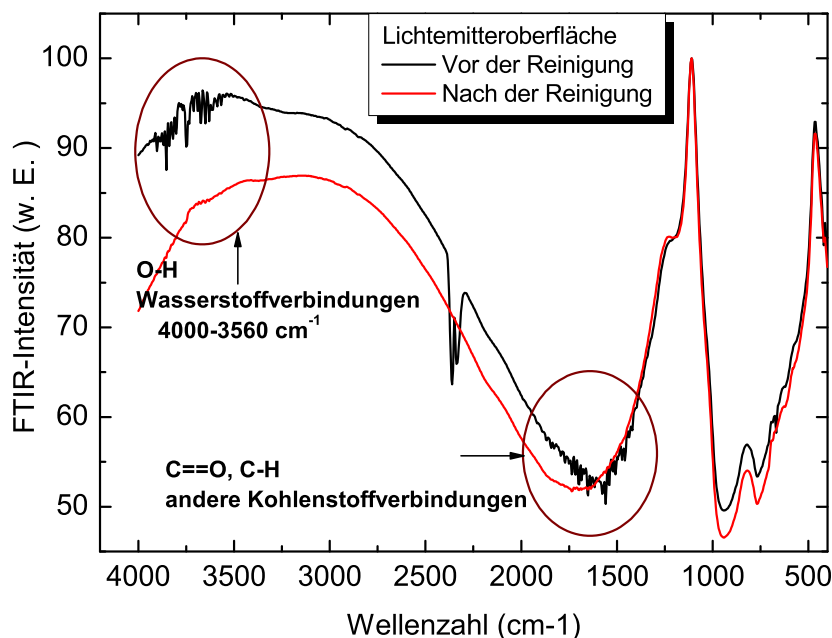


Abbildung 3.2.4: Infrarot Spektrum im Reflexionsmodus der Sensoroberfläche vor (schwarz) und nach der Reinigung (rot)

1,1,1-Trichloroethan ist eine Wasser basierte Variante von der Trichloroethan-Lösung, welche sich gut für Metall und Glas Reinigung eignet. Die erprobte Verdünnung bewirkte keine Ätzung für den Lichtemitter. Der anschließende Einsatz von Aceton und Methanol soll die Oberfläche von den Rückständen, die aus der Reaktion des ersten Schritts hervorgerufen sind, zu beseitigen.

3.2.3 Masken für den Schutz der Kontaktflächen

In der Abbildung 3.2.5 wird eine Maskeneinheit für drei MOSLEDs dargestellt. Die Masken sind speziell für dieses MOSLED Design konzipiert worden, damit die Front- und Rückseitenkontaktflächen verschont bleiben. Die Masken bestehen aus rostfreiem Stahl und sind gegen die Ätzung und Oxidation resistent. Die MOSLEDs werden in einer 600 μm tiefe Aussparung gebracht und sind im Laufe sowohl des SSC- Verfahrens als auch der Adsorptionsexperimente wasserdicht. Mit Hilfe der Bohrungen G1 und G2 können die Masken mit dem Chip leicht an der Silanisierungs- bzw. Adsorptionskammer angebracht werden.

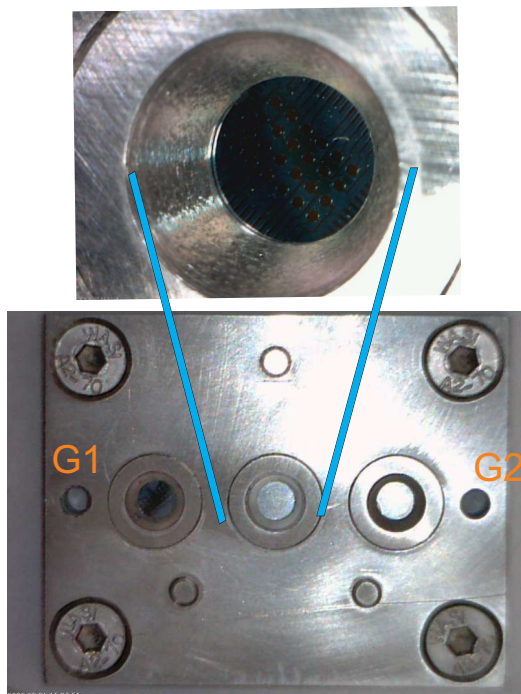


Abbildung 3.2.5: Maskeneinheit für den Schutz der Kontaktflächen für drei Si-basierte Lichtemitter (unten). Die Masken sind wasserdicht gebaut. An den Positionen G1 und G2 wurden Bohrungen eingelassen, welche eine bequemere Handhabung zwischen Silanisierungskammer und weiteren Adsorptionsexperimenten ermöglichen. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden

3.2.4 Funktionalisierung der Sensoroberfläche

Die Funktionalisierung der Sensoroberfläche erfolgte zuerst an mit PECVD (Plasma-enhanced chemical vapor deposition) abgeschiedenen $1 \times 1 \text{ cm}^2$ großen und 200 nm dicken SiO_2 Schichten auf Si-Substraten, und dann an den Lichtemittern. Die herkömmlichen Reinigungsmethoden verwenden häufig ein Ultraschallbad in Verbindung mit einer Piranhasäure-Lösung, auch Peroxomonoschwefelsäure genannt, mit der Summenformel H_2SO_5 . Hong et al. verwenden zur Reinigung der Glasoberfläche eine Mischlösung im Verhältnis von 1:4 von H_2O_2 und NH_4^+ mit OH mit einer Einwirkungszeit von 10 Min, der sich eine Spülung mit dest. Wasser anschließt. Danach wird das Substrat mit Heißschwefelsäure 30 Min lang gereinigt und schließlich im Ultraschallbad behandelt [26]. Diese Reinigungsschritte können eine Ätzung des oberen ITO (**I**ndium **T**in **O**xide)- Kontakts bewirken. Dies betrifft sowohl den Reinigungsschritt im letzten Abschnitt als auch den Hybridisierungsprozess im nächsten Abschnitt. Das war der Anlass dafür, die gesamte Prozedur zur Funktionalisierung der SiO_2 -Lichtemitteroberfläche, die in der Literatur für reines SiO_2 gut beschrieben ist, an den Lichtemitter anzupassen.

3.2.4.1 Hybridisierungsprozess

Mit Hilfe der Hybridisierung wird die SiO_2 -Oberfläche mit endständigen Hydroxylgruppen belegt, an die im folgenden Silanisierungsschritt Silangruppen anbinden sollen. Die Hybridisierung wird dabei in-situ ausgeführt. Ein derartiges, aus der DNA- oder Proteinhybridisierung bekanntes Verfahren wurde bisher noch nicht zur Oberflächenbehandlung von SiO_2 eingesetzt. Zwei Katalyslösungen wurden verwendet: MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfone-Hydratsäure bzw. und HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure mit den Summenformeln $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$) bzw. $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$. Die Probenvorbereitung kann in zwei Schritten zusammengefasst werden:

- Der Chip wird in einer Hybridisierungskammer vom Typ Slides auf einem Thermomixer der Firma Eppendorf fixiert und die Katalyselösung MES bzw. HEPES (0.27 Vol% Lösung in Wasser) in einer Menge von circa $17 \mu\text{l}$ auf die Oberfläche pipettiert .
- Die Oberfläche wird mit einer geeigneten Folie ¹ luftdicht ($1 \times 1 \text{ cm}^2$) verschlossen. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt in einer Hybridisierungskammer bei Temperaturen um 50°C /16 Stunden und bei Rotationsgeschwindigkeiten um 500 rpm.

¹Firma ABgene

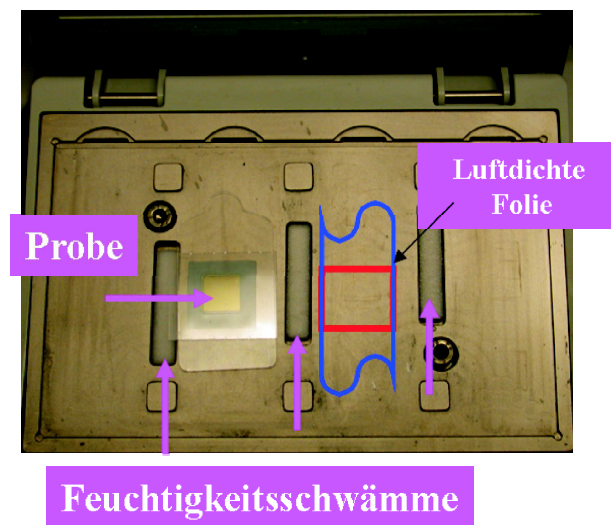


Abbildung 3.2.6: In-situ-Hybridisierungskammer. Es wurde ein luftdichtes Foliensystem verwendet. Eine Folie für die Befestigung der Probe (rot), und eine für die Probe mit der pipettierten Katalyselösung MES zusammen (blau).

3.2.4.2 Silanisierungsprozess

Die Silanisierung ist stark von der Hybridisierungsqualität abhängig, wird aber im vorliegenden Fall durch den Einsatz der Katalyselösung MES bei der Hybridisierung begünstigt. Die Silanisierung wurde mit einer Reihe von Haftvermittlern mit verschiedenen funktionellen Gruppen durchgeführt:

- APMS-Lösung (3-Aminopropyl)trimethoxysilane mit der Summenformel $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$
- Triamino-APMS-Lösung (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine mit der Summenformel $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
- (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane mit der Summenformel $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$

Dafür wurde ein spezielles nasschemisches SSC- Verfahren (**S**praying **S**pin **C**oating) entwickelt [78], bei dem die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt werden:

- Die APMS Lösung wird mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser verdünnt, deren pH- Wert auf circa 5 eingestellt wurde. Dabei findet eine Hydrolyse der Methoxygruppen zu OH-Gruppen statt, wie die Grundreaktion in der Abbildung 3.2.7 **-I--II** zeigt.

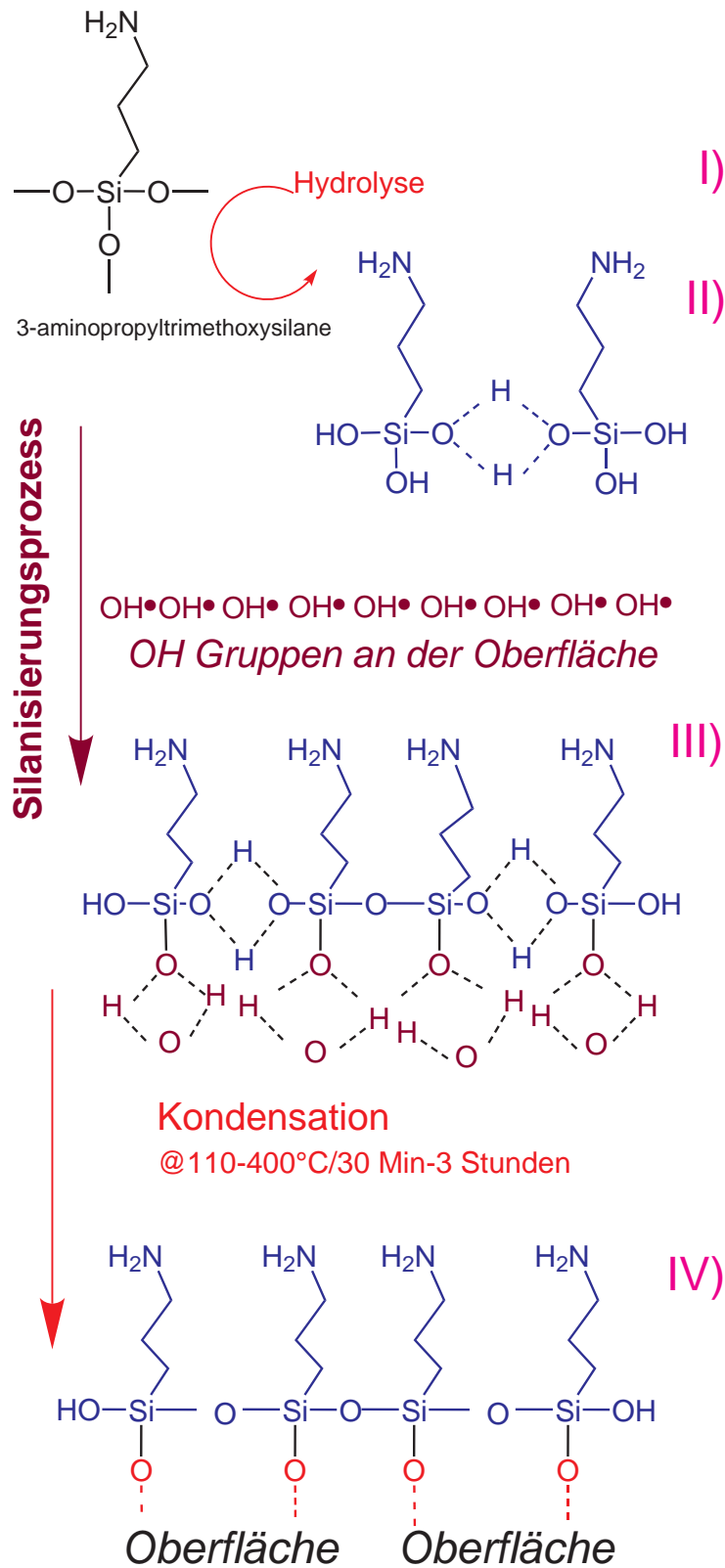


Abbildung 3.2.7: Grundreaktion für den Silanisierungsprozess [3]

- Nach 5 Min kann die Lösung mit Hilfe des SSC-Verfahrens aufgesprüht werden. Die hybridisierten Lichtemitter werden dazu in eine spezielle, selbst konstruierte Reaktionskammer gebracht, die über eine Sprühöffnung und eine Gasöffnung verfügt. Die Kammer ist durch einen Verlängerungsarm mit einem Mischer gekoppelt. Die anschließende Inkubation wird für 10 Min in einer Stickstoffatmosphäre bei RT und bei etwa 350 rpm durchgeführt (Abbildung 3.2.8). Für eine Optimierung des Verfahrens wurde

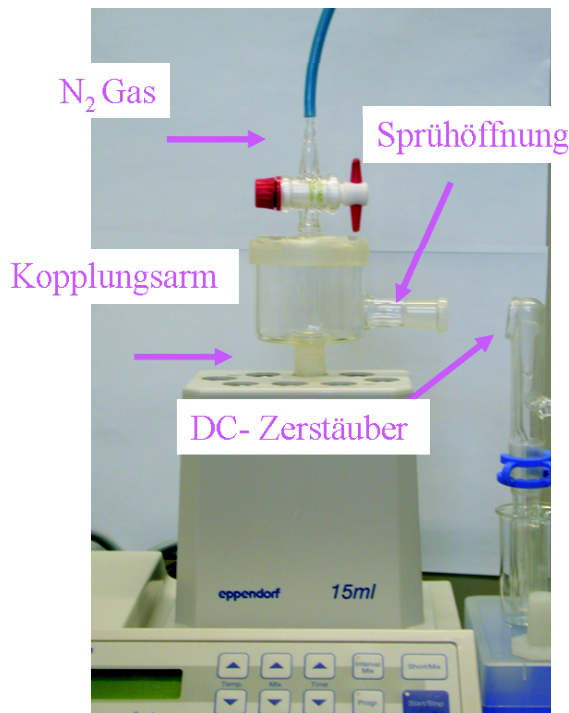


Abbildung 3.2.8: Silanisierungskammer.
Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden

insgesamt 7 Proben vorbereitet. Die Tabelle 3.2.1 fasst die untersuchten Parameter zusammen:

Tabelle 3.2.1: Parameteroptimierung des SSC-Verfahrens

Probe	N ₂ Atm.	Luft/ Pressluft	Waschen
P1	o	x / x	x
P2	o	o / o	o
P3	x	o / x	x
P4	o	30 min / x	x
P5	x	o / o	o
P6	o	x / o	o
P7	x	o / x	o

Die Proben in der Tabelle 3.2.1 werden mit Hilfe des SSC-Verfahrens eine Silanfilm-

konfiguration erreichen, die in der Abbildung 3.2.7 -**III**) schematisch dargestellt wird. Die silanisierten Proben wurden sowohl bei RT als auch mit einer zusätzlichen Temperung (110-400 °C/ 30 Min-3h) präpariert. Durch das Tempern baut man die Wasserstoffbrücken ab und erzielt eine kovalente Bindung des Silanfilms über die Sauerstoffbindung an die SiO₂ Oberfläche, wie die Abbildung 3.2.7 -**IV**) darstellt.

Um eine bioaktive Schicht mit funktionellen Carboxylgruppen zu bilden, wurden die mit SSC-APMS silanisierten Schichten einem weiteren Prozessschritt unterzogen. Das Protokoll ist in [3] beschrieben und wird in folgende Teilschritte untergliedert:

1. Eine Lösung aus Glutarsäureanhydrid und DMF N,N-Dimethylformamide Lösung mit der Summenformel C₅H₆O₃ bzw. HCON(CH₃)₂ wird gebildet. Die Reaktion wird mit einer Trimethylamin Lösung mit der Summenformel (CH₃)₃N (1 mg/ml) gestoppt.
2. Die Lösung aus Schritt 1 wird auf die mit SSC-APMS silanierte Schicht pepittiert und dann 2-4 h bei RT in die Silanisierungskammer inkubiert.
3. Schließlich werden die Proben mit DMF Lösung und dest. Wasser gewaschen und getrocknet.

3.2.5 Referenzlösung

Die Referenzlösung besteht aus dem Analyten (z. B. Östrogene) und einem gebundenen Farbstoffmolekül (z. B. QDot-Nanopartikel), das nach einem Bindungsprotokoll von Hermanson et al. [3] gebunden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Analyse drei Typen von Östrogene nämlich Estron (3.2.9-a), β -Estradiol (3.2.9-b), und Estron 3-methyl-ether (3.2.9-c) verwendet. Das β -Estradiolmolekül wurde durch das N-Hydroxysuccinimid-Derivat an der 17-Position Ring D modifiziert (3.2.9-d) und für die Herstellung der Referenzlösung eingesetzt. Die L-Lysine- Aminosäure wurde an der silanierte Oberfläche adsorbiert und in Abhängigkeit vom pH- Wert untersucht. Die Tabelle 3.2.2 gibt die Strukturformel und das Molekulargewicht der verwendeten Analyte und deren Derivate an.

3.2.5.1 Analyte und deren Derivate

Die Analyte und deren Derivate in der Tabelle 3.2.2 wurden bei der Firma Aldrich Germany erworben.

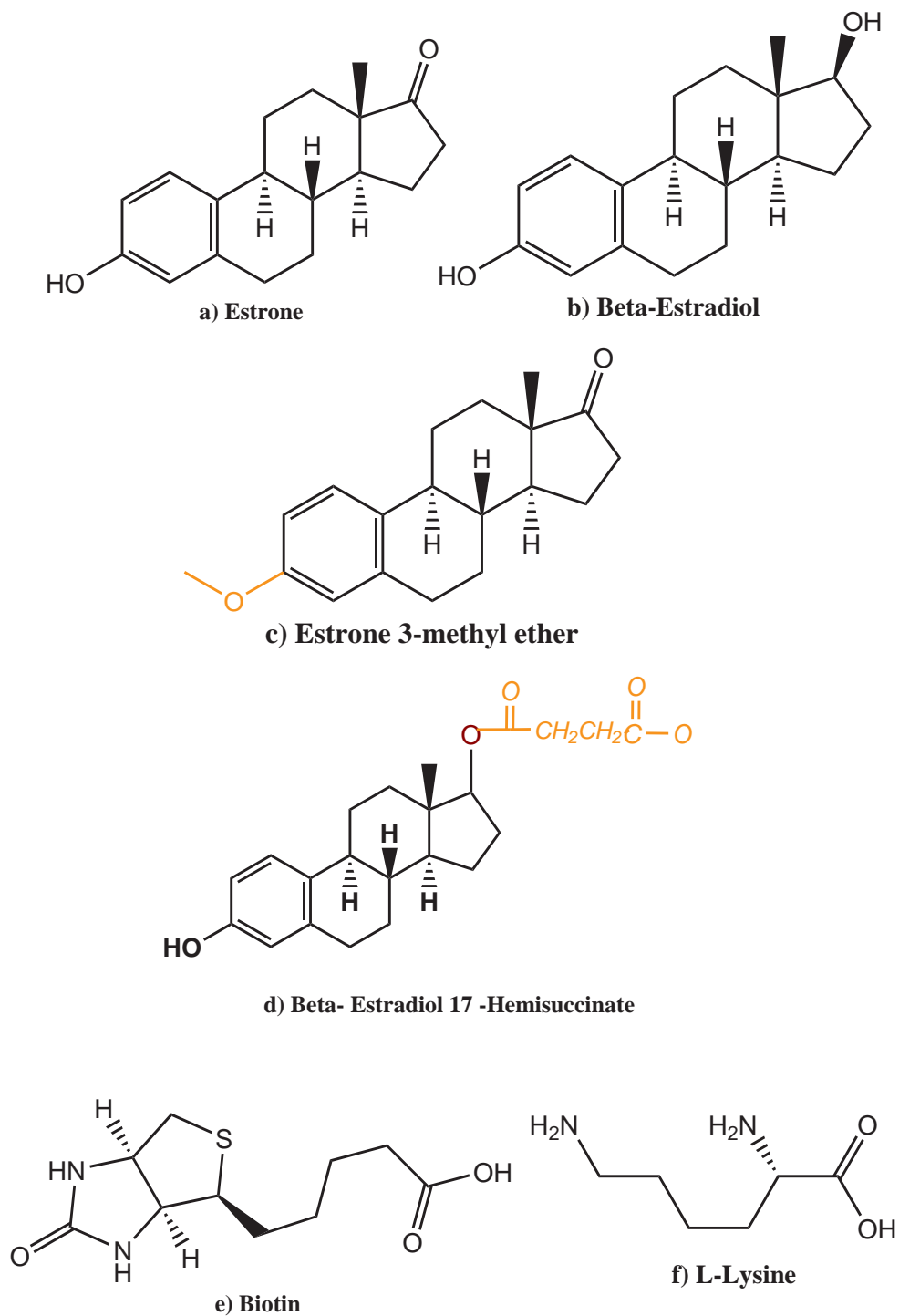


Abbildung 3.2.9: Schematische Darstellung der verschiedenen Analyte und deren Derivate (orange)

Tabelle 3.2.2: Strukturformel und Molekulargewicht der verwendeten Analyte und deren Derivate

Name	Summenformel	Molekulargewicht(g.mol ⁻¹)	Strukturformel
1. Estron	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270.37	Abb. 3.2.9 a)
2. β-Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	Abb. 3.2.9 b)
3. Estron 3-methyl-ether	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	284.39	Abb. 3.2.9 c)
4. β-Estradiol-NHS	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272.38	Abb. 3.2.9 d)
5. L-Lysine	H ₂ N(CH ₂) ₄ CH(NH ₂)CO ₂ H	146.19	Abb. 3.2.9 f)

3.2.5.2 Farbstoffe

Bei den verwendeten Farbstoffen wurde vorausgesetzt, dass sie eine große Stokesche Verschiebung besitzen und die Absorptionslinie des Farbstoffs mit der Emissionslinie des MOSLEDs übereinstimmt. Die große Stokesche Verschiebung hat den Vorteil, dass man das Signal des MOSLED von dem des Farbstoffs sehr gut trennen kann. Es wurden organische und inorganische Farbstoffe verwendet. Die Tabelle 3.2.3 fasst sie zusammen: BBQ² und

Tabelle 3.2.3: Farbstoffe, ihre Anregungswellenlänge und die dazu geeigneten MOSLED-Typen

Name	Summenformel	Anregungswellenlänge (nm)	MOSLED-Type
BBQ	C ₄₈ H ₆₆ O ₂	309	Gd
Europium(III) Nitrat-Hydrat	Eu(NO ₃) ₃ · xH ₂ O	396	Ge
QDot655	-	UV+ sichtbares Bereich	Ge, Gd und Tb
QDot800	-	UV+ sichtbares Bereich	Ge, Gd und Tb

Europium(III) Nitrat-Hydrat wurden bei Aldrich Germany erworben. Die QDot-Nanopartikel mit einer Konzentration von 8 μM/250 μl wurden von der Firma Invitrogen europe geliefert. Die QDot wurden nicht in der vom Hersteller empfohlenen Bufferlösung (EDTA) aufgelöst, weil die Adsorption des Farbstoffes an der Sensoroberfläche einen wachsartigen Film bilden würde, welcher die Lichtemission verhindert. Deshalb wurden Polyvinylalkohol und 2-(N-Morpholino)ethanesulfone-Hydratsäure in der Tabelle 3.2.5 im Wasser verwendet. Die beiden Substanzen sind wasserlöslich und funktionieren sehr gut mit der QDot Lösung. Die Adsorption der Farbstoffe an die MOSLED-Oberfläche erfolgte entweder durch das Handpipettieren oder mittels des Nano-Plotters (siehe 3.3.5).

Zur Realisierung der Referenzlösung wurde der Analyt an den mit einer Carboxylgruppe funktionalisierten Nanopartikel QDot 800 bzw. QDot 655 (Tabelle 3.2.3) angebunden.

²Abkürzung von 4,4''-Bis-(2-Butyl-Octyloxy)-(1,1',4',1'',4'',1''')Quaterphenyl

Dafür wurde ein Protokoll nach [3] in der Tabelle 3.2.4 verwendet, welches in Abbildung 3.2.10 schematisch dargestellt wird. Das N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Molekül reagierte auf die Carboxylgruppe an der Nanopartikelhülle **(1)** und bildet mit N-Hydroxysuccinimid einen aktiven Ester: N-Hydroxysuccinimid **(2)**. Die neue funktionelle Gruppe der QDot-Hülle kann auf ein beliebiges aminohaltiges Molekül reagieren und sich daran binden **(3)**.

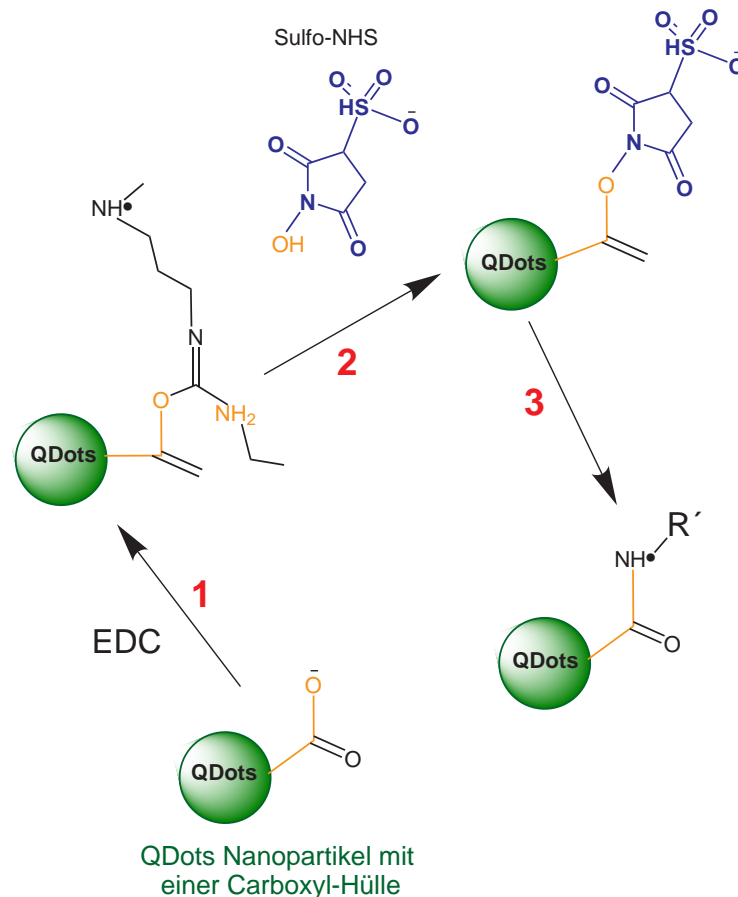


Abbildung 3.2.10: Schematische Darstellung der Reaktion zur Bindung des QDot an einem aminohaltigen Molekül bzw. Rezeptor [3]. Die einzelnen Reaktionschritte werden im Text erläutert

Dabei lauten die ergänzenden Angaben zu Tabelle 3.2.4 und die Abkürzungen:

- **S₁:** Die Lösung der QDot in 2-(N-Morpholino)ethanesulfone-Hydratsäurelösung.
- **S₂:** Die Lösung aus N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid, N-Hydroxysuccinimide, und die Quenclösung Ethanolamie.
- Bem. 1: 1-2 Min Ultraschall bei RT

Tabelle 3.2.4: Das Protokoll für die Herstellung der Referenzlösung und der Rezeptoradsorption [3]

Name	Konz./Menge	Reakt. Puffer	Gesamte Konz./Menge	Reakt. Bed.
QDot	3 μ M	MES (33%Vol/pH=4.7-6)	20 μ l/1 μ M (S ₁)	Bem. 1
EDC	40 mM	dest. Water S ₂	-	Bem. 2
NHS	63 mM	-	-	Bem. 2
Ethanolamine	1,4 μ l	pure	-	Bem. 2
<i>Beschreibung 1</i>				
β -Estradiol	1 mg/ml	dest. Water	57 μ l	Bem. 3
hER α -Rezeptor	1 mg/ml	PBS	57 μ l	Bem. 3

- Bem. 2: Sofortige Mischung der Lösung S₂ mit S₁ bei RT
- Bem. 3: Die gesamte Lösung wird eine Stunde bei 350 rpm geschüttelt.
- *Beschreibung 1: S*₁+*S*₂= *S*_{ges}: Für 1 ml S₁ Lösung wird 50 μ l S₂ zugefügt (circa Faktor 20). Die gesamte Lösung wird 10 Min geschüttelt, und danach 1.4 μ l Ethanolamine dazugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Die Lösung wird dann 15- 20 Min im Ultraschallbad für die Dispersion der QDot-Nanopartikeln behandelt.
- Zu der gesamten Lösung S_{ges} werden 57 μ l Analyt-Lösung zugegeben. Das Verhältnis der molaren Konzentration der QDots[®]-Lösung zu der molaren Konzentration des Analyten soll in der Größenordnung von 1-20 sein. Die Konzentration der QDots[®]-Lösung wurde auf 1 μ M eingestellt, und das nötige Volumen wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$Farbstoff(\mu l) = \frac{Protein\left(\frac{mg}{ml}\right) \times 0.05ml \times f \times MR \times MW_{QDs-FS}}{MW_{Protein}}, \quad (3.2.1)$$

Dabei steht MR für das Verhältnis der molaren Konzentration von Farbstoff zu dem Analyten, MW für das molare Gewicht (MW (QDs-FS)= 30000 g/Mol, MW (hER α)= 65 kDa) und f für einen Gewichtungsfaktor (f=100) .

3.2.5.3 Puffer und Lösungen

Die Pufferlösungen in der Tabelle 3.2.5 wurden bei Sigma Aldrich erworben. * TBST besteht

Tabelle 3.2.5: Strukturformel und Molekulargewicht der Puffer und Lösungen

Name	Summenformel	Molekulargewicht(g.mol ⁻¹)
MES	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S xH ₂ O)	195.24
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	238.30
Glutarsäurehydrid	C ₅ H ₆ O ₃	114.10
Formaldehyd	CH ₂ O	30.03
DMF	C ₈ H ₁₇ N ₃	155.24
N-Hydroxysuccinimid	C ₄ H ₅ NO ₃	115.09
Phosphat-gepufferte Salzlösung	-	-
Tris gepufferte Salin (TBS)	-	-
TWEEN	-	-
TBST*	-	-
Ethanolamin	NH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	61.8
Polyvinylalkohol	[-CH ₂ CHOH-] _n	13.000-23.000
Ethylacetat	CH ₃ COOC ₂ H ₅	88.11
Acetonitril	CH ₃ CN	41.05

aus TBS und 0.05 % Tween20

3.2.6 Rezeptor-Adsorption an der Sensoroberfläche

Zum Östrogenenachweis wurde der *hER_α*-Rezeptor in 50 mM Tris-HCl mit pH 8.0, 500 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadium und 10 % Glycerin mit einer 80 % Reinheit ³ verwendet. Gelagert wurde der Rezeptor bei -70°C. Biotin wurde als Testrezeptor eingesetzt (Tabelle 3.2.6)

Tabelle 3.2.6: Strukturformel und Molekulargewicht der verwendeten Rezeptoren

Name	Summenformel	Molekulargewicht(g.mol ⁻¹)	Strukturformel
<i>hER_α</i> -Rezeptor	-	66.4 kDa	-
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244.31	Abb. 3.2.9 e)

Es gibt eine Reihe von Techniken, mit deren Hilfe man die Adsorption des Rezeptors systematisch verfolgen kann, z.B. die QCMD (**Q**artz **C**ystal **M**icrobalance with **D**issipation

³Herstellangaben

Monitoring). Kommerzielle QCMD- Anlagen benutzen eine goldbeschichtete Membranoberfläche. Da die Bioschicht unseres Si-basierte Lichtemitters auf SiO_2 basiert, würden solche Untersuchungen nicht mit unserem System vergleichbar sein. Deshalb wird die Adsorption des Rezeptors an der Sensoroberfläche mit Hilfe der Fluoreszenzanalyse untersucht, in dem man den Rezeptor mit einem Farbstoffmolekül (Nanopartikel) verbindet und dann an der Oberfläche adsorbiert. Die silanisierte SiO_2 -Oberfläche mit dem adsorbierten Rezeptor wurde mit einer Lichtquelle angeregt, deren Emissionsenergie mit der Anregungsenergie des Farbstoffes übereinstimmt. Benutzt man zum Beispiel die QDot-Nanopartikel hat man dank ihres breiten Absorptionsspektrums eine große Auswahl an Lichtquellen.

Zur Realisierung der beiden Schritte wurden der Analyt bzw. der Rezeptor an die beiden mit einer Carboxylgruppe funktionalisierten Nanopartikeln QDots[®]800- bzw. QDots[®]655-Farbstoff (Tabelle 3.2.3) angebunden. Um die gebildeten Aggregate aus QDots[®]-Farbstoff- hER_α -Rezeptor zu beseitigen, wurde die Endlösung mit Hilfe eines Nylon-Filters mit 0.2 μm großen Poren bei 3000-4000 Umdrehungen 10 min lang zentrifugiert.

3.3 Charakterisierungsmethoden

3.3.1 XPS- Röntgenphotoelektronenspektroskopie

In dieser Arbeit wurde die XPS (**X**-ray **P**hotoelectron **S**pectroscopy) Methode zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche eingesetzt. Eine Fison instruments-Anlage für ESCA(**E**lectron **S**pectroscopy for **C**hemical **A**nalysis) bot die Möglichkeit, die XPS/XRD-Messungen unter UHV Bedingungen durchzuführen. Für die XPS-Messungen standen zwei Anregungsquellen zur Verfügung. Die Röntgenröhre war so konstruiert, dass man sowohl mit einer Aluminium- als auch mit einer Magnesiumanode messen konnte. Jedes Anodenmaterial hat ein charakteristisches Emissionsspektrum. Die wichtigsten Linien sind in der Tabelle 3.3.1 zusammengefasst. Der Elektronenanalysator (Microlab 310 F de-

Tabelle 3.3.1: Vergleich der verschiedenen Anregungsquellen für XPS und UPS

Emission	$\hbar\omega(\text{eV})$	FHWM $\Delta\hbar\omega$ (meV)	Photonenstrom $\Phi(\text{s}^{-1})$	Spektr.Bereich
MgK_α	1253,6	680	1×10^{12}	$E_B \leq 1200 \text{ eV}$
AlK_α	1486,6	830	1×10^{12}	$E_B \leq 1300 \text{ eV}$

vice) misst die kinetische Energie der einfallenden Elektronen mit Hilfe zweier metallischer

Hemisphären, die als Kondensator dienen.

3.3.2 FTIR- Fourier-Transformationsinfrarotspektroskopie

Mit Hilfe eines Nicolet MagnaFTIR-Spektrometers wurden die beschichteten SiO₂-Oberflächen untersucht. Die Methode eignet sich sehr gut, um die Funktionalisierung der Sensoroberfläche mit Hilfe des Reflektionsmodus zu erfassen. Der Einfallswinkel des Lichtstrahls betrug 9°. Die charakteristischen Schwingungsbanden der Moleküle wurden üblicherweise im Messbereich von 400- 4000 cm⁻¹ erfasst.

3.3.3 Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie wurde eingesetzt, um die Infrarotspektroskopie zu ergänzen. Sowohl die funktionalisierte SiO₂-Oberfläche als auch die Adsorbat-Proben wurden mittels eines LABRAM HR 800 Microspektrometers mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm untersucht. Die spektrale Auflösung und die spektrale Spaltbreite betragen 1 cm⁻¹ bzw. 4 cm⁻¹.

3.3.4 Rasterkraftmikroskopie AFM (Atomic Force Microscopy)

Die durchschnittliche Rauigkeit der Probenoberfläche wurde mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops Veeco Digital Instruments Multimode SPM im Nicht-Kontakt-Modus bei RT untersucht.

3.3.5 Elektro- und Photolumineszenzmessung

In Abbildung 3.3.1 ist der optische Messaufbau für Elektro- und Photolumineszenz schematisch dargestellt. Der Meßaufbau besteht aus einem Mikroskop mit Objektiven, die eine Vergrößerung von 10 bis 100 erlauben. Für die Anregung der Leuchtzentren in der Oxidschicht der MOSLED benötigt man eine Spannung in der Größenordnung von circa 100 bis 180 V bei einem konstanten Strom von etwa 0,1 µA. Dafür verwenden wir ein Keithley 237 SMU Source Meter als Strom. Das emittierte Licht wird durch ein Glasfaserkabel durchgeführt und mit einer Andor CCD-Kamera detektiert.

Für die PL-Messung verwenden wir den gleichen EL-Messungsaufbau. Die Anregung der

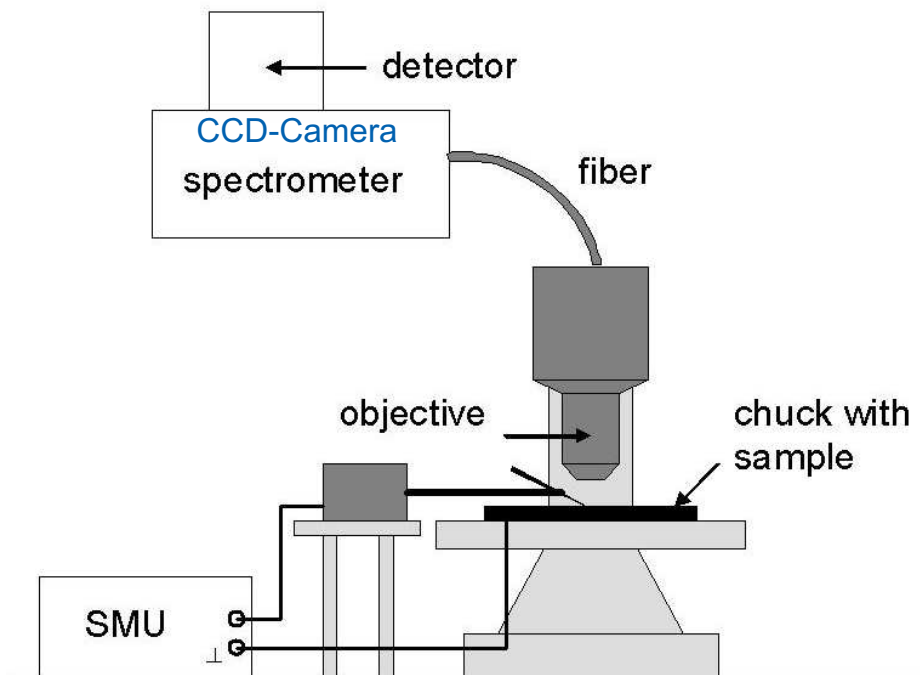


Abbildung 3.3.1: Optischer Messaufbau für die Elektro- und Photolumineszenzmessung

Proben erfolgt dabei durch eine externe Lichtquelle. Es wurden zwei Lichtquellen verwendet: Ein grüner und ein blauer Laser mit einer Wellenlänge von 532 bzw 405 nm.

3.3.6 UV-Vis- und zeitaufgelöste Photolumineszenzmessung

Die Photolumineszenz-Messung des Farbstoffes in der Lösung wurde mit Hilfe eines UV-Vis Spektrometers, welches über eine Halogenlampe mit einer Wellenlänge von 200 bis 800 nm verfügt, durchgeführt. Die zeitaufgelöste Photolumineszenz wurde mittels eines HORIBA Jobin-Yvon Spektrometers (vom Typ iHR550) gemessen und mit einer CCD Kamera detektiert.

3.3.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die TEM-Aufnahmen mit Hilfe eines Titan- 80-300 Mikroskops der Firma FEI gemacht. Die Anodenspannung betrug 300 keV.

3.3.8 Micro-Plotter[®]

Der Micro-Plotter[®] μ -CP2.1, ist ein mikrofluidisches System, und wurde im Jahr 1995 von der Firma GeSiM mbH entwickelt, siehe Abbildung 3.3.2 Die Anlage ist sehr gut geeignet

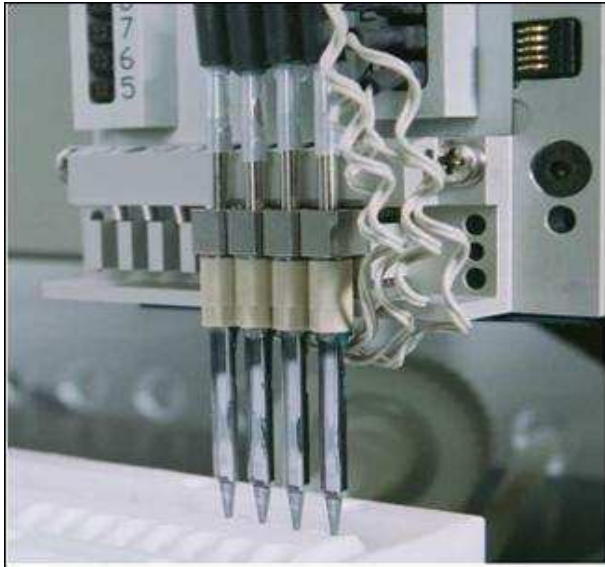


Abbildung 3.3.2: Der Ausschnitt des Micro-Plotters μ -CP2.1 zeigt die μ -Pipetten, die in der Lage sind, Biomoleküle mit einem Volumen im nI-Bereich auf die Arrays-Flächen aufzubringen [79].

für dichte Microarrays und hochpräzise Spotpositionierungen und wird mit einer xy-Robotik bedient. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Micro-Plotter für die Pipettierung von Farbstoffen bzw. der Rezeptor-Lösungen im μ l bis nI Bereich verwendet. Nach der Probenaufnahme werden die Microarrays pipettiert, und es wird schließlich eine intensive Reinigung durchgeführt, die die Kreuzkontamination zwischen aufeinanderfolgenden Pipettierschritten verhindert. Dabei werden die piezoelektrischen Spitzen in den Wells der Waschstation innen wie außen gespült.

3.3.9 Titration

Die Volumenbestimmung der Stoffmenge einer Substanzlösung, Titrand, wurde mit Hilfe des Titrationsverfahrens durchgeführt. Dabei befindet sich die Substanzlösung in der Vorlage. Die Maßlösung, der Titrator, wird portionsweise mit dem automatischen Titrationsgerät 736 GP Titrino von Metrohm (Schweiz) hinzugegeben, welches mit der zugehörigen Software TiNet 2.50 gesteuert wird. Die pH-Elektrode ist BlueLine16 von Schott.

In Abbildung 3.3.3 (links) ist die Titration der Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) sche-

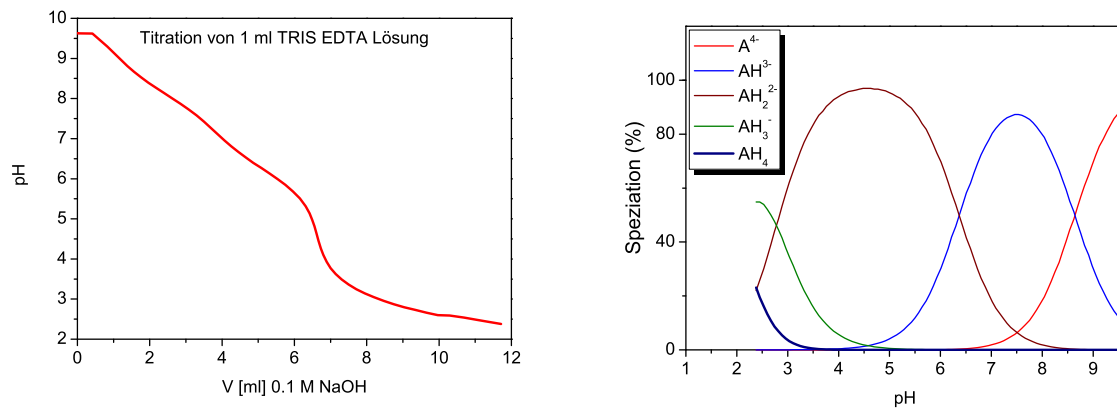
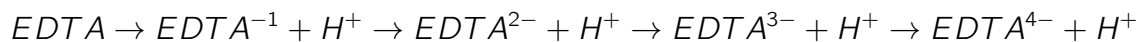


Abbildung 3.3.3: Titrationskurve der Titration der EDTA Säure (links). Die Speziation (prozentuale Verteilung) der verschiedenen protonierten EDTA-Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert (rechts).

matisch dargestellt. EDTA ist eine vierwertige Säure, d.h. vier Protonen werden in Abhängigkeit vom pH-Wert nach einer schrittweisen Dissoziation abgespalten :



(3.3.1)

Die Häufigkeit der verschiedenen Dissoziationsstufen ist in Abbildung 3.3.3 (rechts) als Funktion des pH-Wertes dargestellt. Es beginnt mit einer neutralen Säure (schwarz), gefolgt von der Säure mit einem abgespaltenem Proton EDTA¹⁻ (grün), und endet schließlich mit der Säure mit vier gespaltenen Protonen EDTA⁴⁻ (rot).

Das Titrationsverfahren wurde weiter an der APMS Lösung (Abbildung 3.3.4) und der Phosphat-gepufferten Salzlösung (Abbildung 3.3.5) durchgeführt.

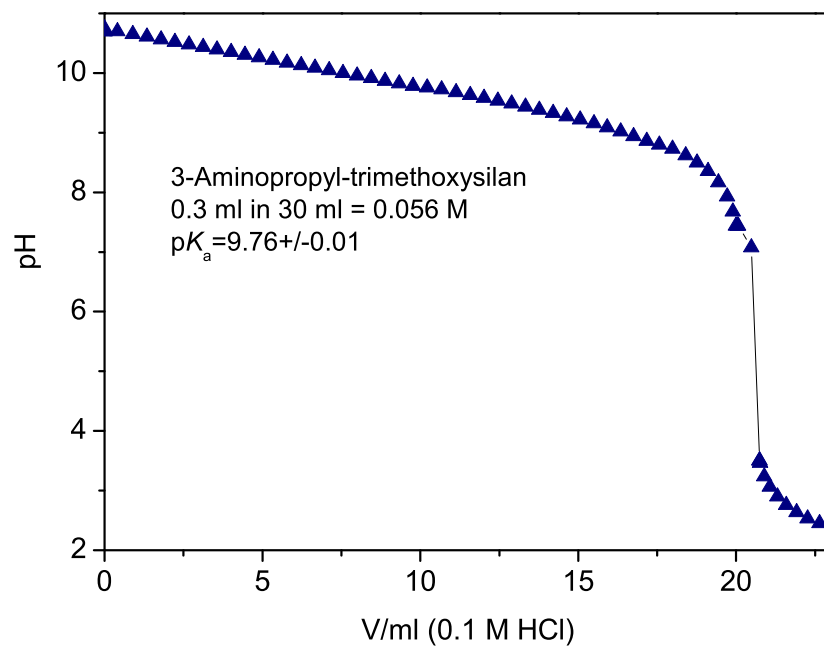


Abbildung 3.3.4: Titrationskurve der APMS Lösung

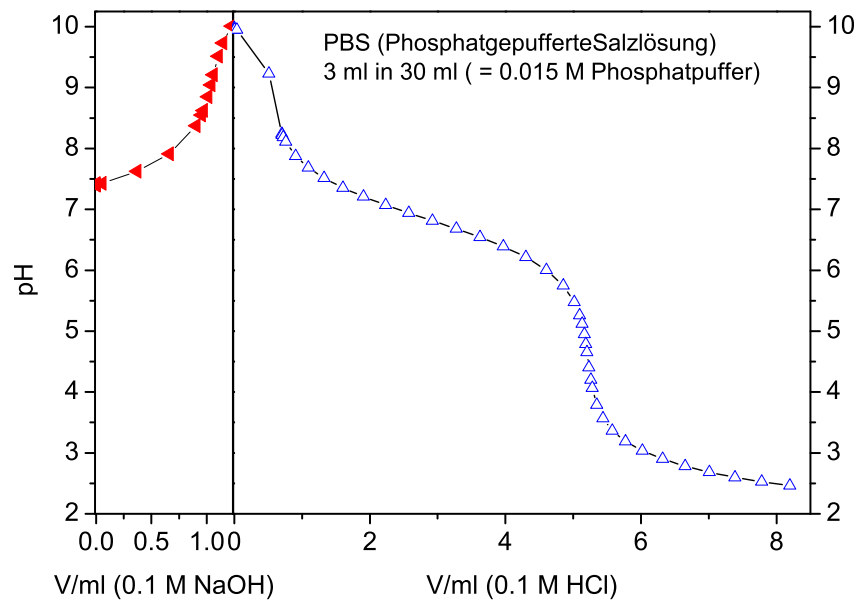


Abbildung 3.3.5: Titrationskurve der PBS Pufferlösung

4 Probencharakterisierung

4.1 MOSLED: Optische und elektrische Eigenschaften

In diesem Abschnitt werden die elektrischen und optischen Eigenschaften der verwendeten Si-basierten Lichtemitter (MOSLED) behandelt. Die Biosensorik-Anwendung, die der Gegenstand dieser Arbeit ist, stellt geringere Forderungen im Vergleich zu anderen möglichen Anwendungen, was Betriebslebensdauer und optische Effizienz angeht. Insbesondere wird das emittierte Licht von der Passivierungsschicht (Silangruppen) und von dem Biofilm (hER_{α} -Rezeptor-Schicht) leicht absorbiert. Der restliche durchgelassene Lichtanteil soll stark genug sein, um die Markermoleküle auf der Oberfläche anregen zu können.

Untersuchungen über die MOSLED stehen seit über einem Jahrzehnt lang im Fokus unserer Arbeitsgruppe, die in vielen Publikationen erschienen sind. Deshalb wird im folgenden nur kurz auf die wesentlichen, für diese Arbeit relevanten Eigenschaften der MOSLEDs eingegangen.

Für weitere Details über die MOSLED werden folgenden Arbeiten empfohlen:

- Zur MOSLED-Mikrostruktur in [80] [47] [81]
- Zum Injektionsmechanismus bei der EL-Messungen in [46] (siehe auch 2.3)
- Zum Ladungsträgereinfangverhalten in [80] [82] [83]
- TEM-Untersuchungen zu Ausheilungseffekten in [84]

In der Abbildung 4.1.1 ist die emittierte Leistung in Abhängigkeit von der elektrischen Eingangsleistung für Gd-(magenta), Ge-(blau) und Tb (grün)-basierte MOSLEDs darge-

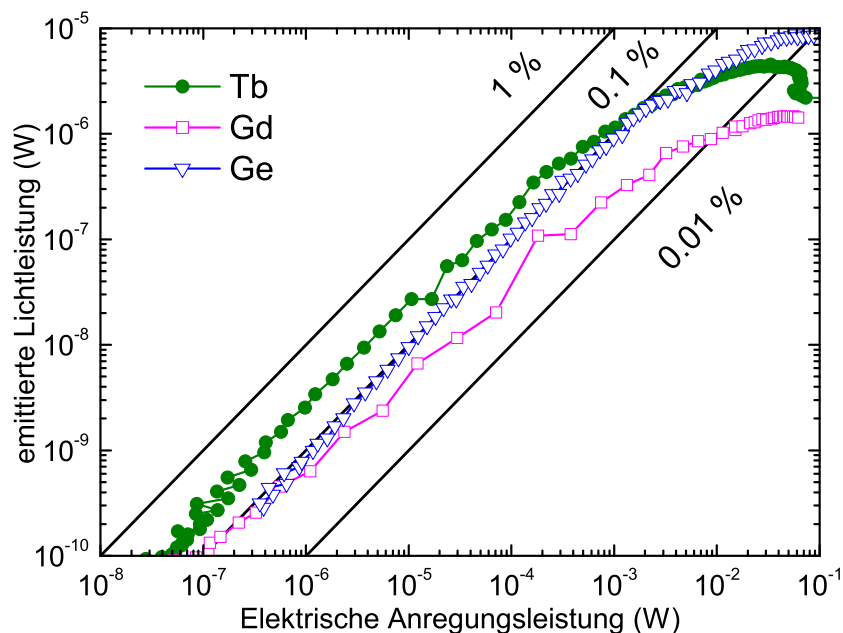


Abbildung 4.1.1: Emittierte Lichtleistung in Abhängigkeit von der elektrischen Eingangsleistung für Gd-, Ge-, Tb-basierte MOSLEDs.

stellt. Die elektrische Leistung lässt sich durch die angelegte Spannung und den Injektionsstrom berechnen. Die optische Leistung wird mittels einer kalibrierten Photodiode, die in einer bestimmten Entfernung von der MOSLED positioniert wird, gemessen. Die emittierte Lichtleistung hängt linear mit der elektrischen Eingangsleistung über mehrere Größenordnung zusammen, bevor die Sättigungseffekte auftreten. Während sich in der Regel bei einem doppelten Injektionsstrom die EL-Intensität verdoppelt, halbiert sich die Betriebsdauer der MOSLED [85]. Um die elektrische Stabilität zu verbessern, wurde eine zusätzliche SiON-Schicht abgeschieden (Abbildung 3.2.1). In der Abbildung 4.1.2 wird die Strom-Spannungs $I(V)$ -Kurve Charakterisierung (a) und die EL-Strom-Abhängigkeit (b) der Tb-basierten-MOSLED mit einer 50 nm Gateoxide-Schicht und mit unterschiedlich dicken SiON-Schichten dargestellt. Aus dem Diagramm (a) geht hervor, dass je dicker die SiON-Zusatzschicht ist, desto kleiner der Anstieg der IV-Kurve wird. Ohne zusätzliche SiON-Schicht würde man die MOSLEDs mit einer 50 nm SiO_2 -Schicht bis maximal 4 mA/cm^2 betreiben können. Das entspricht einem elektrisches Feld von circa 7.5 MV/cm , bei dem der Durchbruch der SiO_2 -Tb-Schicht einsetzt. Bei einem zweiten Vergleich wurde die MOSLED mit einer Konstantstrominjektion von 3 μA belastet. Dabei ergab sich eine Betriebsdauer von $\leq 20\text{s}$ für die MOSLED ohne und mehr als 25 000 s für die mit

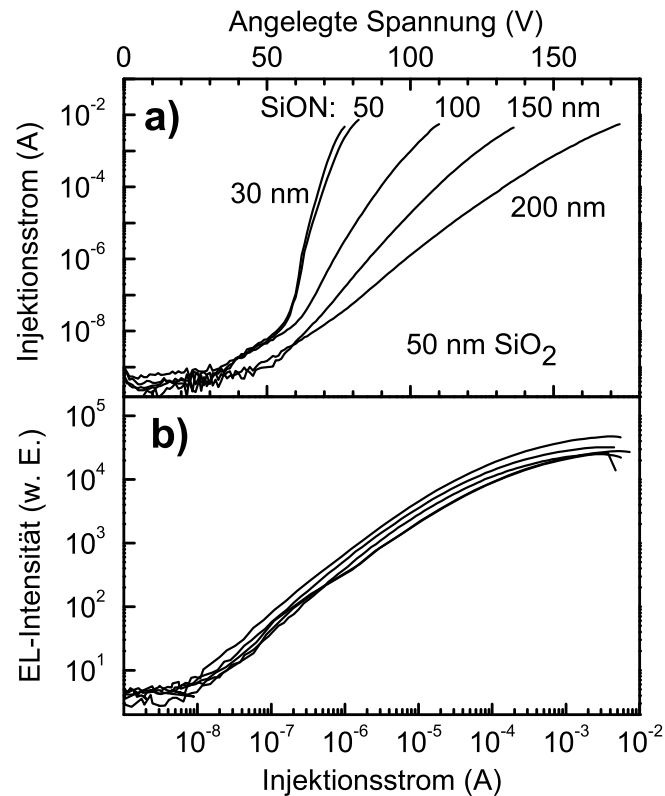


Abbildung 4.1.2: Spannung-Injektionsstrom $I(V)$ Charakterisierung (a) und EL-Strom-Abhängigkeit (b) der Tb-basierten-MOSLED mit einer 50 nm Gateoxide-Schicht und mit unterschiedlich dicken SiON-Schichten.

SiON-Schicht [85]. Die verwendeten MOSLEDs benötigen bei einer SiO₂-Dicke von 100 nm eine Spannung zwischen 100-200 V bei einer Konstantstrominjektion (circa $10^{-7} \mu\text{A}$). Die EL- Intensität im Diagramm b) entspricht der EL-Intensität der Emissionslinie bei 541 nm (optischen Übergang $^5D_4 - ^7F_5$ des Tb³⁺-Ions), die mit steigendem Injektionsstrom zunimmt und nur geringfügig von der Dicke der SiON-Schicht abhängt. Die Abhängigkeit der EL- Intensität von der Injektionsladung bei einem konstanten Strom für die Gd-, Ge-, Tb-basierten MOSLEDs zeigt die Abbildung 4.1.3. Die Lebensdauer der Tb-basierten ist am größten, gefolgt von der Gd- und Ge-basierten MOSLED. Die EL-Intensität zeigt sich stabil bis zu einer Injektionsladung von etwa $10^{18} \text{ e}^-/\text{cm}^{-2}$ (Ge) oder $10^{19} \text{ e}^-/\text{cm}^{-2}$ (Gd, Tb), bevor das EL-*quenching* eintritt [86]. Die Zeit bis zum Durchbruch der MOSLED wird als Betriebsdauer definiert und schwankt je nach Injektionsstrom zwischen wenigen Stunden bis zu wenigen Tagen, was für die Bio-Sensor-Anwendung vollkommen ausreichend ist, denn die Anregungszeit des Farbstoffes selbst liegt im Pikosekunden Zeitbereich [87]. Das Mess-

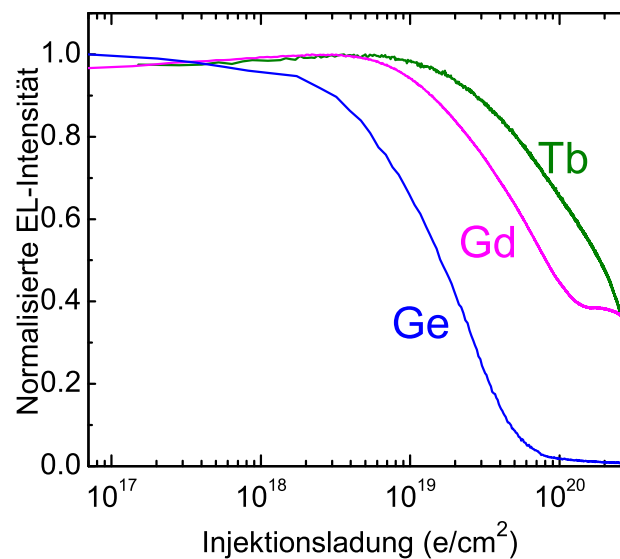


Abbildung 4.1.3: Normierte EL-Intensität der Gd-, Ge-, Tb-basierten MOSLEDs als Funktion der Injektionsladungen.

verfahren zum Östrogennachweis in einer wässrigen Lösung würde im Minuten Zeitbereich liegen. In der Abbildung 4.1.4 wird das Spektrum der Gd-, und Tb-basierten MOSLEDs im Vergleich zu einer Ge-basierten MOSLED dargestellt. Die Hauptlinien liegen bei 316 nm (Gd), 541 nm und (Tb), und sind auf die elektronischen Übergänge der 4f-Elektronen des RE-Ions zurückzuführen. Die Ge-basierte MOSLED emittiert ein starkes, mit bloßen Auge, blaues Licht bei 400 nm, und ist auf die reichlich vorhandene $\equiv\text{Ge}-\text{Ge}\equiv$ Lumineszenz-Zentren im SiO_2 [82]. Die energetische Position dieser Übergänge ist unabhängig von der chemischen Umgebung in der SiO_2 -Matrix, deren Intensität im Gegensatz dazu von der Konzentration der RE bzw. den $\equiv\text{Ge}-\text{Ge}\equiv$ Defekt-Zentren und den Anregungsbedingungen abhängt. Sun et al. [88] untersuchten die Abhängigkeit der EL-Leuchtdichte als Funktion der Tb-Konzentration zwischen 0.05- 3 % (Ausheilungstemperatur von 800°C für 1h) in der SiO_2 -Matrix und fanden heraus, dass die höchste Leuchtdichte ($\geq 2800 \text{ cd/m}^2$) bei einer Tb- Konzentration von 3 % erreichbar ist. Demnach wächst die EL-Intensität der Emissionslinie bei 541 nm linear mit der Tb-Konzentration bis 2 % und geht in die Sättigung über. Im Falle der Tb-basierten MOSLED gibt es neben der Hauptlinie eine blaue EL-Linie bei 413 nm, die auf den optischen Übergang ${}^5D_3 - {}^7F_5$ zurückzuführen ist. Diese EL-Linie konkurriert mit der grünen Linie bei 541 nm und erreicht ein Maximum bei einer Tb-Konzentration

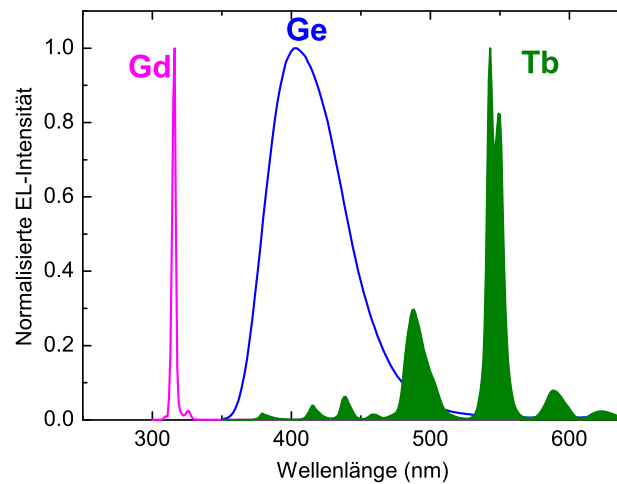


Abbildung 4.1.4: Normierte EL-Intensität der Gd-, Ge-, Tb-basierten MOSLEDs als Funktion der Wellenlänge.

von 0.15 %, während bei zunehmender Konzentration die EL-Intensität der 541 nm Linie weiterhin linear ansteigt. Das bedeutet, dass wenn die Tb-Konzentration zunimmt, dann findet eine Energieübertragung zwischen der benachbarten Tb^{3+} -Ionen statt, die zu einer Abregung des 5D_3 -Niveaus und einer zusätzlich Anregung des 5D_4 -Niveaus führt [84]. Mehr Details über das Lumineszenzmodell der EL wurde in 2.3 erläutert [80]. Die Tb- basierte MOSLED zeigt sich als das effizienteste Bauelement mit 15 % externer Quanteneffizienz (EQE) (0.3 % Leistungseffizienz) und einer Lichtausbeute von 2.1 lm/W [88] [85]. Die Diskussion über die Leistungseffizienz wurde auf die Tb-basierte MOSLED als das effizienteste Bauelement eingeschränkt. Weitere Angaben zur Leistungseffizienz der Ge- bzw. Gd-basierte MOSLED sind in [82] bzw. [89] zu finden.

4.2 Funktionalisierung der Sensoroberfläche

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels werden die Ergebnisse der beiden Prozesse, des Hybridisierungs- und des Silanisierungsprozesses, dargestellt. Die beiden Prozessschritte bilden das Funktionalisierungsverfahren der Sensoroberfläche. Das Hybridisierungsverfahren weicht von den herkömmlichen Methoden ab. Es wurde dafür ein Verfahren verwendet, das unter dem Namen fish- Hybridisierungsverfahren bekannt ist [90]. Das wurde im Rahmen dieser Arbeit zuerst bei SiO_2 Substraten und abschließend auf mit SiO_2 passivierte Lichtemitter angewen-

det. Das Silanisierungsverfahren verläuft in der Flüssigphase. Mit den vielen Nachteilen, die dieses Verfahren mit sich bringt, wie der großen Oberflächenrauigkeit, der ungeordneten Silangruppenschicht, und nicht zuletzt einer geringen Filmstabilität, ist es nicht besonders beliebt in der Literatur. Da man wusste, dass die Qualität der Silanisierung davon abhängt, wie gut die Oberfläche mit Hydroxygruppen belegt ist, wurde das Silanisierungsverfahren in der Flüssigphase optimiert und weiterentwickelt. Zum Vergleich wurden auch SiO_2 Substrate nach der Methode von Hong et al. [26] silanisiert.

4.2.1 Hybridisierungsprozess

Um die SiO_2 -Oberfläche mit endständigen Hydroxygruppen, OH-Gruppen, zu belegen, wurden die Katalyselösungen MES bzw. HEPES, ein sogenannter Wasserkomplex, verwendet. Das Hybridisierungsverfahren, das im Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde, ist ein in-situ-Verfahren. In der Abbildung 4.2.1 wird ein FTIR-Spektrum im Bereich zwischen $4000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ dargestellt. Diesem Bereich kann man die Wasserverbindungen zuordnen. Das Spektrum zeigt eine mit Hydroxygruppen angereicherte SiO_2 -Oberfläche. Interessant ist der geringere Wassergehalt bei 3280 cm^{-1} . Der Bereich zwischen 3500 und 3100 cm^{-1} zeigt einen breiten Peak, welcher auf die an der Oberflächen gebundenen Silanol-Gruppen $\equiv\text{Si-OH}$ zurückzuführen ist [5]. Die Schwingungsbande bei 3748 cm^{-1} zeigt die Streckungsmode der Si-OH Gruppenschwingung, und bildet mit den Silanol-Gruppen ein Hydroxygruppen-Netzwerk an der Oberfläche. Der in-situ-Hybridisierungsprozess zeigt für die beiden Katalyselösungen MES bzw. HEPES mehr oder weniger die gleichen charakteristischen FTIR-Peaks. Deshalb wird hier nur auf die Ergebnisse der Hybridisierung mit der MES-Lösung eingegangen. Zur Optimierung des Hybridisierungsverfahrens wurden zwei Parametern untersucht, nämlich das pipettierte Lösungsvolumen pro 1 cm^2 Folie, und zum anderen die % Vol. Konzentration der Katalyselösung (MES und HEPES). Es wurde festgestellt, dass das Hybridisierungsverfahren optimal bei $17\text{ }\mu\text{l}$ Lösung pro 1 cm^2 Folie und 0.27 die % Vol. Konzentration der Katalyselösung durchgeführt werden kann. Das gilt sowohl für die SiO_2 -Substrate als auch für die MOSLEDs. In der Abbildung 4.2.2 ist das XPS-Spektrum für das N1s Energieniveaus der mit MES hybridisierten SiO_2 -Oberflächen dargestellt. Die Aufspaltung des XPS N1s Peaks in zwei Peaks mit einem Gaußmaximum von 405 bzw. 402.8 eV deutet auf die Öffnung des Rings des MES Moleküls an der Stickstoffstelle hin.

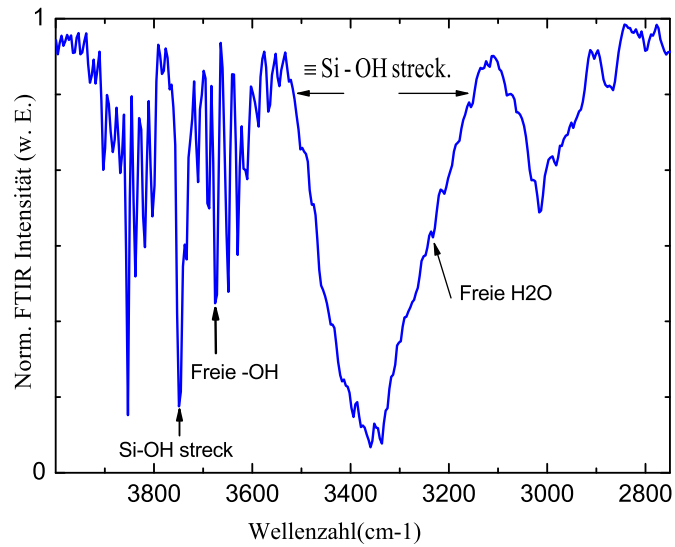


Abbildung 4.2.1: Normiertes FTIR-Spektrum einer mit MES hybridisierte SiO_2 -Oberfläche im Bereich zwischen $4000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$. Die hybridisierten SiO_2 -Oberfläche mit HEPES-Lösung zeigt mehr oder weniger die gleichen Peaks.

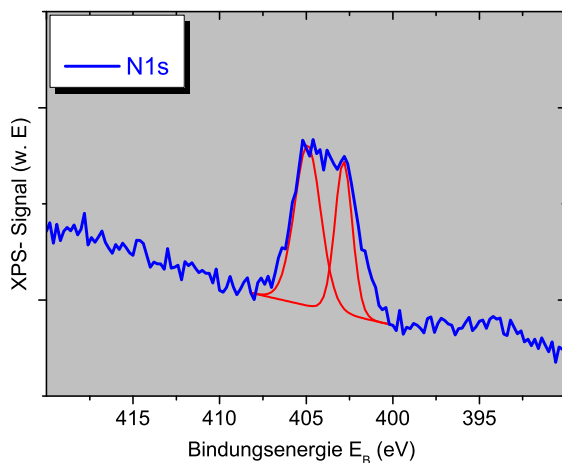


Abbildung 4.2.2: Bindungsenergie der N_{1s} -Rumpfelektronen der mit MES hybridisierten SiO_2 -Oberfläche

4.2.2 Silanisierungsprozess

Organofunktionelle Silane besitzen in der Gruppe der Haftvermittler eine herausragende Rolle, da sie eine starke Bindung zwischen einer organischen Verbindung und den Hydroxylgruppen eines anorganischen Substrats herstellen können. Üblicherweise besitzen die Silane die Struktur $(RO)_3Si-R'-F$, wobei $RO-$ eine leicht hydrolysierbare Methoxygruppe, der sogenannte Oberflächenreaktant ist, wie die schematische Darstellung in Abbildung 4.2.3 zeigt, der die Anbindung an das anorganische Substrat (z.B. Metalloxide, Glas) ermöglicht. Das geschieht durch die Reaktion der Siloxangruppe mit den Hydroxylgruppen der Substratoberfläche (durch den Hybridisierungsprozess) unter Abspaltung des entsprechenden Alkohols. Die Teilstruktur $R'-F$ ist ein hydrolysestabiler organischer Rest mit einer ter-

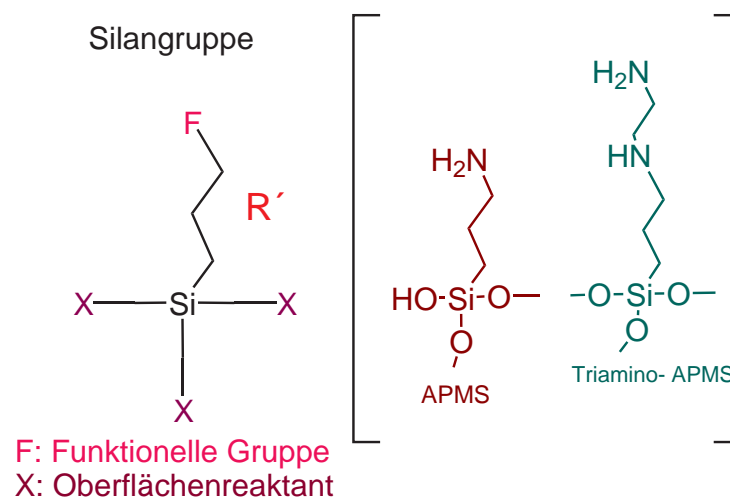


Abbildung 4.2.3: Schematische Darstellung des allgemeinen Silangruppen-Skeletts (links) des APMS (mittig)- und des Triamino- APMS (rechts)

minalen funktionellen Gruppe F, die eine kovalente Anbindung zum Rezeptor ermöglicht. Die zumeist verwendeten funktionellen Gruppen sind Amino-, Carboxy- und Thiol- Gruppen. Sebania et al. konnten eine erfolgreiche Immobilisierung des Enzyms Glucose-Oxidase an einer SiO_2 -Oberfläche mit Hilfe der Aminogruppen realisieren [27]. Zuerst werden die Ergebnisse des Silanisierungsverfahrens mit der Silangruppe APMS mit denen der in [26] beschriebenen Methode verglichen. Die Auswertung dieser Methode führte nach und nach zu dem SSC-Verfahren, welches im letzten Kapitel ausführlich beschrieben ist. Hong et al. führten die Silanisierung in der Flüssigphase durch Eintauchen des Substrates in der 2 % APMS Lösung für 3 bis 4 Stunden durch. Danach wurde das Substrate mit Trichlorethylen $CHCl_3$, Ethanol und mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend das Protein adsorbiert. In der Abbildung 4.2.4 wurde dieses Verfahren an der SiO_2 -Oberfläche für 30

s, 2 und 4 Stunden angewendet. Man kann drei Bereiche unterscheiden: Zum einen zeigen

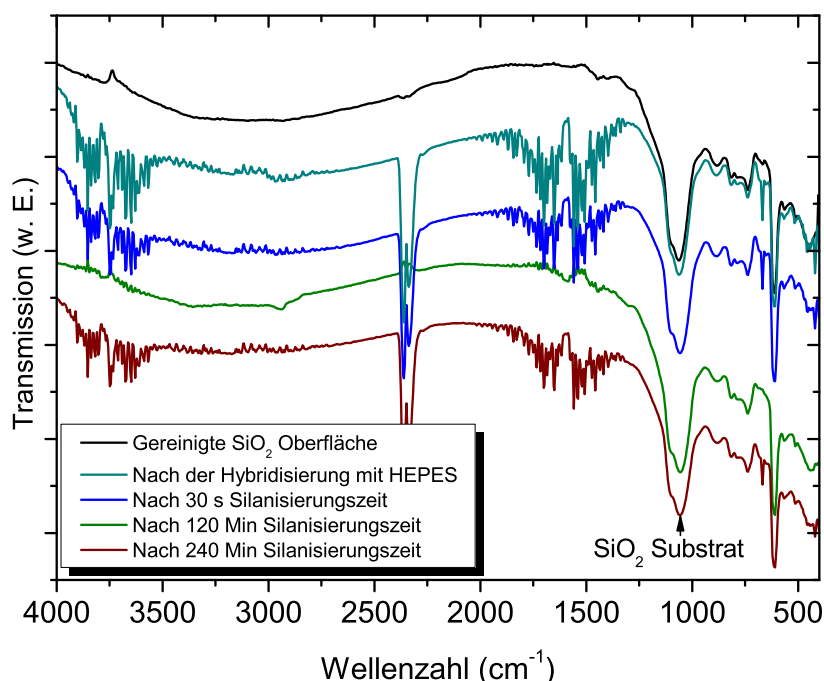


Abbildung 4.2.4: FTIR-Spektrum der silanisierter SiO₂-Oberfläche nach der Methode von Hong et al. [26]

die Proben im Bereich [1100- 500 cm⁻¹] keine Veränderung in der Oberflächenstruktur. In den Bereichen [2000-1300 cm⁻¹] und [4000-3000 cm⁻¹] erkennt man, dass die Kurve der Oberfläche nach der Silanisierung mit der nach der Hybridisierung mit HEPES identisch ist. Es konnte festgestellt werden, dass der Waschprozess (Trichlorethylene CHCl₃, Ethanol und mit destilliertem Wasser) den Silanfilm spült, denn bis auf die 2. Silanisierungszeit sind sowohl die Kurven für 30s und 4 Stunde Silanisierungszeit als auch die nach der Hybridisierung identisch. Im letzten Abschnitt wurde bereits auf die charakteristischen Peaks in dem Bereich [4000-3000 cm⁻¹] eingegangen.

Im zweiten Teil der Grundreaktion in der Abbildung 3.2.7 wird gezeigt, dass die Haftung des Silanfilms durch die Reaktion des hydrolysierten Teils (Teil I) der Silangruppen mit den Hydroxygruppen der Oberfläche stattfindet, wodurch eine Anbindung an die Oberfläche durch die Wasserstoffbrücken erreicht wird. Genau dieser Reaktionsverlauf ist beim einfachen Eintauchen der Proben in die Lösung nicht der Fall. Vielmehr ist der Film nur teilweise an die Oberfläche gebunden, sodass durch das Waschen der Film abgespült wird. Ein Grund dafür

könnte die Hydrophobizität der Silangruppenlösung beim Kontaktieren eines polaren Mediums (die OH-Gruppen durch die Hybridisierung an der Oberfläche) sein. Es ist allgemein bekannt, dass die Silangruppen sehr hydrophob sind. Das bedeutet, dass beim Kontaktieren eines polaren Mediums sich mehrere unpolare Moleküle zusammen lagern, die sogenannte Autopolymerisation, um einen Entropiegewinn zu erzielen, was die Bildung des Silanfilms außerhalb der SiO_2 -Oberfläche erklärt [91].

4.2.3 SSC-Verfahren (Spraying Spin Coating)

Von der gut mit Hydroxygruppen beschichteten Oberfläche ausgehend, wurden zur Optimierung der Silanisierung in der Flüssigphase folgende Punkte in Betracht gezogen:

1. Anstatt des Eintauchens der mit Hydroxygruppen belegten Proben in die Silangruppenlösung wird die Lösung auf die Oberfläche aufgesprüht. Dadurch bekommen die Lösungsmoleküle die nötige kinetische Energie, um den hydrophoben Effekt der Silangruppenlösung zu überwinden und damit die Oberfläche zu erreichen.
2. Für eine bessere Filmhomogenität wurden die Proben in eine Rotationsbewegung versetzt.
3. Die Bildung des Carbamate- und Wasserstoff-Salzes ($\text{R-NHCO}_2\text{-RNH}_3^+$ bzw. HCO_3^-) durch die Reaktion der Silangruppen mit dem atmosphärischen Kohlendioxid [5] wurde durch das Einfließen von N_2 Gas minimiert
Die Durchführung dieser Maßnahmen resultiert in den Methoden der Tabelle 3.2.1 und der selbstgebauten SSC-Kammer, die im letzten Abschnitt 4.2.2 beschrieben ist.

In der Abbildung 4.2.5 wird das FTIR-Spektrum der Proben der Tabelle 3.2.1 zur Optimierung des SSC-Verfahrens dargestellt. Um die Punkte 1 bis 3 zu realisieren, wurden drei zu optimierende Parameter festgelegt:

1. Die Haftung des Silanfilms an der SiO_2 -Oberfläche
2. Die Dicke des Films, die die Lichtdurchlässigkeit hinsichtlich der MOSLED beeinflusst
3. Minimierung der Ringstruktur des Silanfilms an der SiO_2 -Oberfläche (siehe Abbildung 4.2.6). Dabei wurden die Ringkonfigurationen wie in [92] beachtet. Boerio et al. ordneten die Infrarot Schwingungen der drei möglichen Ringkonfigurationen bei der AMPS

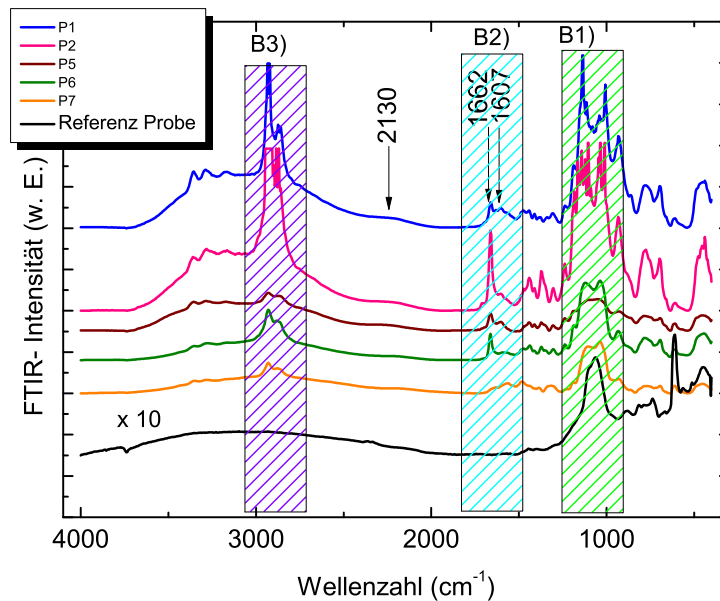


Abbildung 4.2.5: FTIR Ergebnisse der SSC Optimierung

ein, und unterschieden drei Schwingungsbanden: Die Schwingung des Stickstoffatoms im Ring bei 2130 cm^{-1} (Abbildung 4.2.6 -a), die NH-Deformationsschwingung bei 1662 und 1607 cm^{-1} **b**), und schließlich die Schwingung der N-C Bindung im Ring bei 1837 cm^{-1} **c**). Die drei Banden geben Rückschlüsse auf die Bindungsgeometrie und vor allem zur Ordnung des Silanfilms an der Oberfläche, was auch in AFM-Messungen bestätigt wird.

Es wurde bei allen Proben beobachtet, dass der Silanfilm an der Oberfläche haftet. Da im Bereich um die Bande **(B1)** die asymmetrische Schwingung des Siliziums mit zwei Sauerstoffatomen $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ des SiO_2 -Substrat es liegt, kann die Dicke des Silanfilms in **(B1)** abgeschätzt werden. Die Proben 6 und 7 (vgl. Tabelle 3.2.1) zeigen in diesem Bereich noch einen zusätzlichen Peak zu der $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ Bande, welcher dem $\equiv\text{Si-O-CH}_3$ zuzuordnen ist [5]. Wenn man das zweite Kriterium für das Optimum im Bereich **(B2)** untersucht, beobachtet man eine Zunahme der Ringstrukturen bei den 1662 und 1607 cm^{-1} Peaks und nicht zuletzt die leichte Abnahme von der Probe 1 bis 7 des Peaks bei 2130 cm^{-1} der Ringstruktur des Stickstoffatom. Die aminofunktionellen Gruppen sind ebenso bei den beiden Proben 6 und 7 besser erkennbar und liegen bei 1600 und 1565 cm^{-1} , die auf die protonierte Aminogruppe und die R-NH₂ Bindung zurückzuführen sind [5] [93] [94]. Der Bereich **(B3)** zeigt die symmetrische und die antisymmetrische Streckung der Bindung $\equiv\text{Si-O-CH}_3$ bei

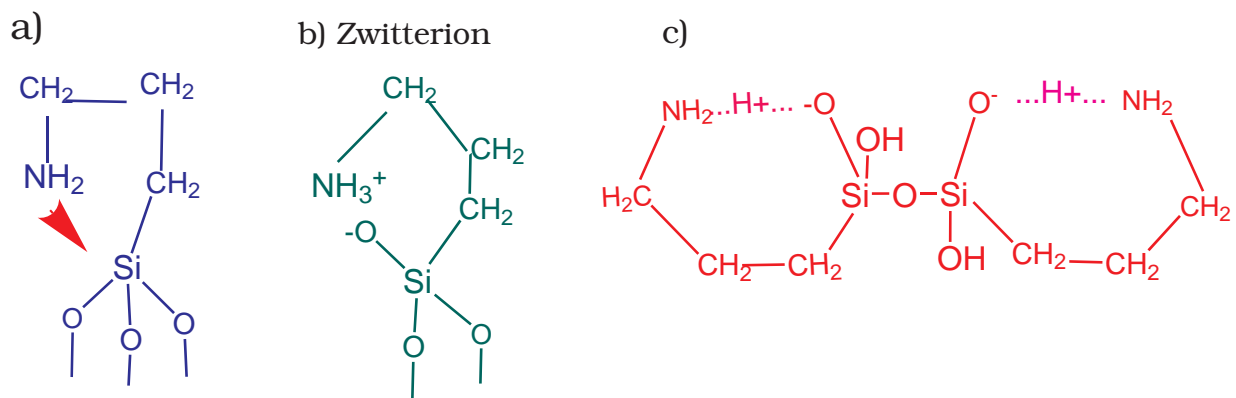


Abbildung 4.2.6: Ringstrukturen der APMS Moleküle bei der Anbindung an die SiO₂-Oberfläche: Die Schwingung des Stickstoffatoms im Ring bei 2130 cm⁻¹ a), NH-Deformationsschwingung bei 1662 und 1607 cm⁻¹ b) und Schwingung der N-C Bindung im Ring bei 1837 cm⁻¹ c) [92]. Der rote Pfeil zeigt die Richtung der Ringstruktur.

2940 und 2840 cm⁻¹. Die besten Ergebnisse wurden bei Probe 6 und 7 erzielt, sodass das Silanisierungsverfahren von Probe 7 im weiteren verwendet wurde. Probe 7 unterscheidet sich von Probe 6 nur durch das verwendete N₂ Gas, was vorteilhafter aufgrund der Bildung des Carbamate- und Wasserstoff-Salzes bei der Reaktion der Silangruppe mit dem CO₂ in der Luft ist. Das Verfahren wird zunächst an zwei Silangruppen mit der gleichen Struktur, aber einer unterschiedlichen Anzahl von aminofunktionellen Gruppen durchgeführt. Diese Gruppen sind die organofunktionelle Silangruppe (3-Aminopropyl)trimethoxysilane (APMS) mit einer Aminogruppe NH₂, und eine zweite Silangruppe mit identischer (RO)₃Si- Molekülstruktur: N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (Triamino-APMS) aber mit einer zweifach vorhandenen Amino Gruppe (Abbildung 4.2.3). Im folgenden soll die Frage nachgegangen werden, welches Molekül für die Funktionalisierung des SiO₂ besser geeignet ist. In der Abbildung 4.2.7 wird das FTIR-Spektrum im Transmissionsmodus der SiO₂-Oberfläche nach der Silanisierung mittels SSC-Verfahrens mit APMS und Triamino-APMS dargestellt. Unterschiede zwischen den beiden Molekülen zeigen sich am deutlichsten bei der Methoxygruppe der Silangruppe. Bei Triamino-APMS ist der Peak bei 2840 cm⁻¹ im Gegensatz zu dem Peak des APMS Moleküls nicht zu erkennen. Weitere Ergebnisse des FTIR-Spektrums werden in der Tabelle 4.2.1 zusammengefasst. In der Abbildung 4.2.8 wird das Raman-Spektrum der mit APMS silanisierten SiO₂-Oberfläche dargestellt. Das Spektrum zeigt die Valenzstreckungen $\nu(\text{CH}_x)$ und $\nu(\text{NH}_2)$ bei 2890 und 2810 cm⁻¹. Die Deformationsschwingung $\delta(\text{CH})$ liegt bei 1456, 1410, 1312, und 1140 cm⁻¹. Die Raman Ergebnisse der mit APMS silanisierten Oberflächen stimmen mit den FTIR-Messungen gut überein. Mit Hilfe der XPS-Messungen konnte die chemische Zusammensetzung auf der SiO₂-

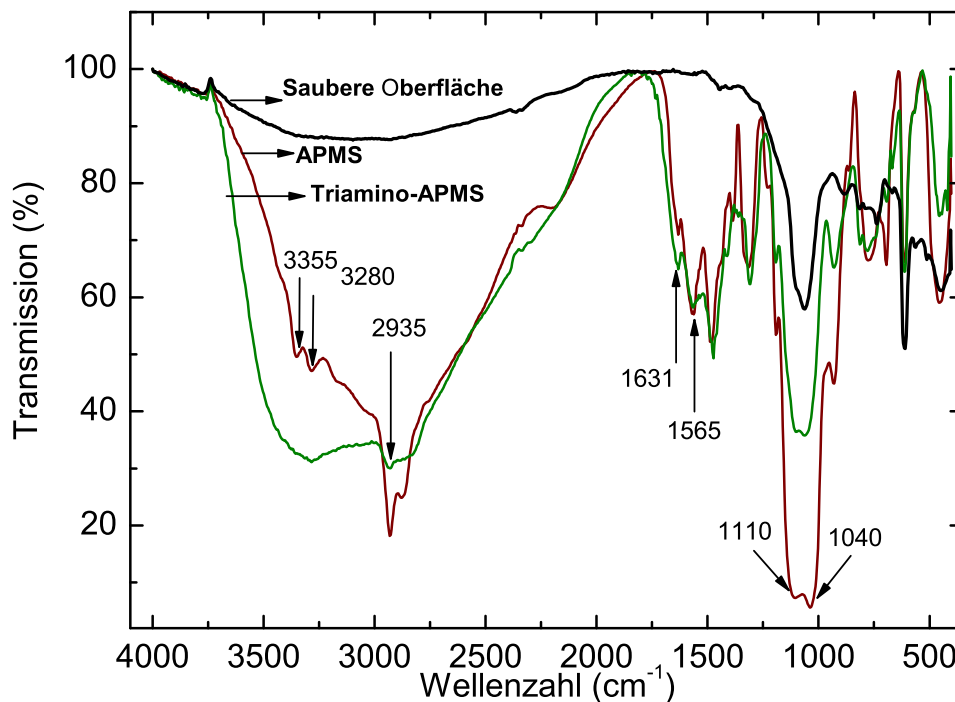


Abbildung 4.2.7: FTIR-Spektrum einer SiO_2 -Oberfläche nach der Silanisierung mit APMS und Triamino-APMS mit Hilfe der SSC Methode

Oberfläche ermittelt werden. In der Abbildung 4.2.9 werden die saubere SiO_2 -Oberfläche (**Kurve A**), eine mit APMS und Triamino-APMS silanierte Oberfläche nach dem SSC-Verfahren (**B und C**) und eine mit APMS silanierte SiO_2 -Oberfläche nach der 4h-APMS-Methode [26] (**D**) verglichen. Das Bindungsenergie-Spektrum des Energieniveaus $\text{Si}2p$ besteht aus zwei Peaks: dem Messsignal vom Si -Substrat Si° und dem zweiten Signal von der Schicht SiO_2 . Die beiden Signale Si° von den silanierten Oberflächen **B und C** zeigen eine bessere Bedeckung mit der Silangruppe im Vergleich zu der silanierten Oberfläche (**D**). In der Abbildung 4.2.9 - (**c**) wird das Bindungsenergie-Spektrum des Energieniveaus N_{1s} dargestellt. Während das XPS Signal der 4h-APMS-Methode zwei Gauß-Peaks bei 402.74 und 404.47 eV zeigt, konnte bei den SSC-silanierten Oberflächen nur ein Gauß-Peak bei 402.85 eV für APMS und bei 403.07 eV für Triamino-APMS gemessen werden, welche auf die Bindungsenergien von R-NH- [95] und der protonierten Aminogruppe [96] zurückzuführen sind. Dennoch konnte ein schwacher Peak bei 401 eV gemessen werden, welcher auf protoniertes NH_3^+ zurückzuführen ist. Matinilina et al. und Pavlovic et al. konnten die gleiche

Tabelle 4.2.1: Charakteristische Absorptionfrequenzen für APMS (a) und Triamino-APMS (b) -Silangruppen nach der Silanisierung mittels SSC-Verfahrens.

Abkürzungen: (vs) sehr stark, (s) stark, und (w) schwach

Frequenz (cm ⁻¹)	Frequenz (cm ⁻¹)/Literatur	Zugeordnete IR Region
(a)3280, 3355(s)	3400-3200 [5]	N-H Streckung
(b) 3280 (w)	3370,320	NH in CO ₂
(a)2935,2880(vs)	2940, 2840 [5] [93][92]	symm. und antisymm. Streckung ≡Si-O-CH ₃
(b)2935,2880 (w)		
(a)und (b)492(s)	487 [5]	Inorg. Silicate (≡Si-O-CH ₂ CH ₃)
a)und (b)1631(s)	1640- 1630	Carbonyl=CO des Carbonates R-NHCO ₂ -RNH ₃ ⁺
a)und (b)1565(s)	1560- 1640 [5] 1617 [93]	Freie Streck. R-NH ₂
	1500- 1700	Carbonyl Region der Aminogruppe
(a)1315, 1480(s)	1480- 1300 [92]	CH ₂ , CH ₃ Bindung
(b)1307, 1473(s)		
(a)1110 (vs)	1190, 1100 [5] [92]	≡Si-O-CH ₃
(b)1100 (vs)		
(a)1040	1130- 1000 [5]	≡Si-O-Si≡
(b)1060		

Bindungsenergie für den adsorbierten TPCY (tris-(3-trimethoxysilylpropyl) isocyanurate)-Film auf der SiO₂-Oberfläche sowohl bei RT als auch bei einer Nachttemperatur von 110 °C messen [5] [91].

Die verschiedenen Bindungsenergien, die mittels XPS ermittelt wurden, bestätigen die FTIR-Messung und die daraus abgeleitete Schwingungsmoden in der Tabelle 4.2.1. Die chemische Zusammensetzung der Oberfläche wurde mit Hilfe eines XPS-Fit-Programms ermittelt. Dabei wurden die XPS Spektren mit einem Gauß-Profil gefittet und dessen Fläche berechnet. Die Tabelle 4.2.2 gibt die relative Häufigkeit der Elemente auf der SiO₂-Oberfläche an, was wiederum Rückschlüsse auf die Anbindung der APMS und Triamino-APMS Silangruppen an die Oberfläche ermöglicht. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der aus der Literatur entnommene 4h-APMS-Methode in gleicher Weise ausgewertet. Dabei ent-

Tabelle 4.2.2: relative Zusammensetzung der chemischen Elemente auf der SiO₂-Oberfläche

Methode	Si(%)	C1s(%)	O1s(%)	N1s(%)
Saubere	18.3	-	-	0
4h-APMS	17.71	39.15	33.85	7.3 (P1)+ 2.25 (P2)
SSC-APMS	8.54	67.26	19.47	4.7
SSC-Triamino-APMS	4.3	30.86	8.27	10.78

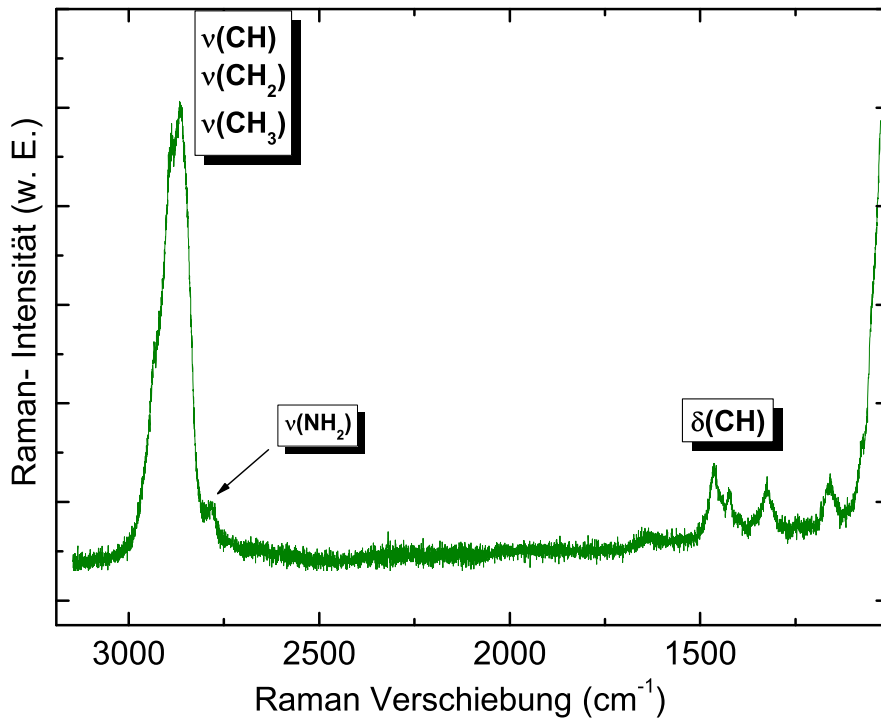


Abbildung 4.2.8: Raman-Spektrum einer mit APMS silaniserten SiO₂-Oberfläche mittels SSC-Verfahrens

sprechen die Abkürzungen P1 und P2 den Gauß-Fits für die Peaks bei 402.74 bzw. 404.47 eV. Der Si-Anteil in der Tabelle 4.2.2 gibt an, wie dicht die Beschichtung der Silangruppen auf der Oberfläche ist. Einerseits ist der Si-Anteil der gereinigten und der mit der 4h-APMS-Methode behandelten Probe beinahe gleich, was mit den FTIR Ergebnissen in Abbildung 4.2.4 übereinstimmt. Andererseits sinkt der Si-Anteil bei der SSC-APMS und SSC-Triamino-APMS-Methode, was auf einen dichten Silanfilm hindeutet. Der N1s-Anteil bei der SSC-Triamino-APMS-Methode ist zweimal höher als bei der SCC-Methode, da das Triamino-APMS-Molekül doppelt so viele aminofunktionelle Gruppen enthält. Es bleibt die Frage offen, ob der Film mit Triamino-APMS auch besser geordnet ist als mit APMS-Molekülen. Die laterale Auflösung bei der AFM-Methode ist wesentlich besser im Vergleich zu den FTIR- und XPS-Methoden. Im Kontaktmodus wird eine Auflösung von (≥ 1 nm) erreicht [97] [98]. In der Abbildung 4.2.10 werden die AFM-Bilder der silaniserten SiO₂-Oberflächen dargestellt. Es ist leicht zu erkennen, dass es Unterschiede in der durchschnittlichen Rauigkeit zwischen den silaniserten Sensoroberflächen gibt. Die mit den Methoden SSC-APMS und

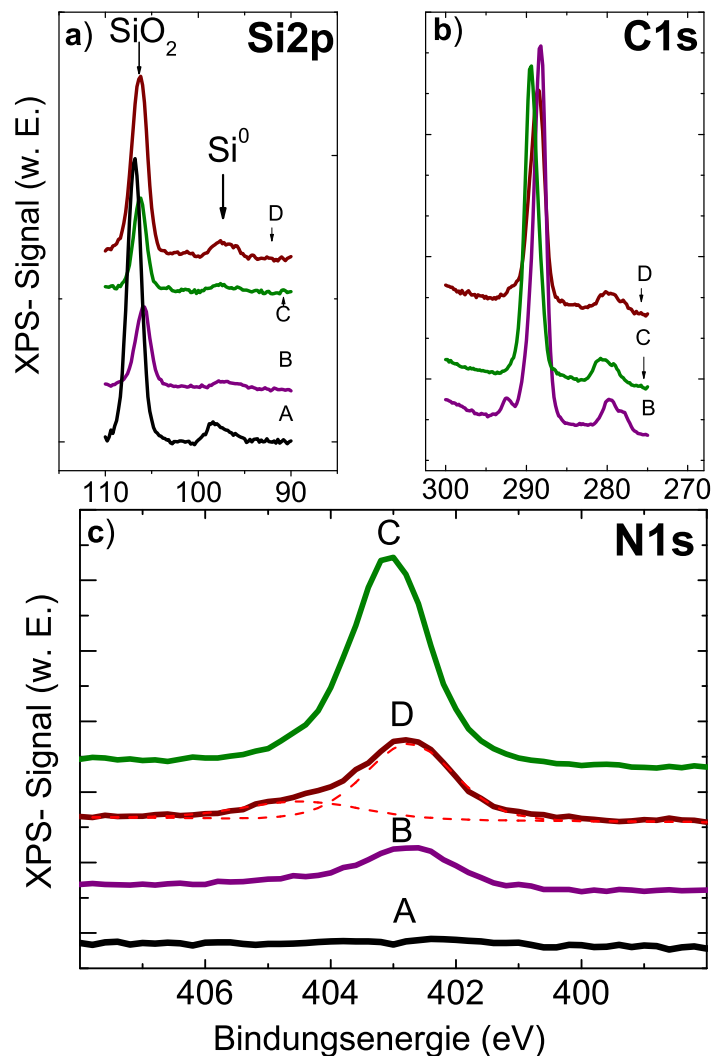


Abbildung 4.2.9: XPS-Spektrum vom Energieniveau Si2p (a), C1s (b), und N1s (c) der folgenden Proben: saubere SiO_2 -Oberfläche (A), SiO_2 -Oberfläche silanisiert mit SSC-APMS (B), und SSC-Triamino-APMS (C)

SSC-Triamino-APMS silanisierten Oberflächen mit einer durchschnittliche Rauigkeit von rms (root mean square)= 0.27 bzw.0.2 nm zeigen eine glattere Oberfläche im Vergleich zu der mittels 4h-APMS (2.18 nm) silanisierten Oberfläche. Dieses Ergebnis stimmt mit dem des XPS-Spektrums für das Energieniveau Si2p (das Substrat Signal Si^0) und der chemischen Zusammensetzung für den Si-Anteil in der Tabelle 4.2.2 überein. Üblicherweise wird zur Charakterisierung der Oberfläche eine Winkelkontaktmessung (2.1.2) durchgeführt. Dabei nimmt der Kontaktwinkel eines Flüssigkeitstropfens (Wasser) auf der Oberfläche mit der abnehmenden Rauigkeit und Oberflächenenergie zu [5]. Bei niedriger Rauigkeit, d.h. Oberflächenenergie, wird die Bindung eines Molekül bzw. eines Rezeptors (z.B. hER_α) mit

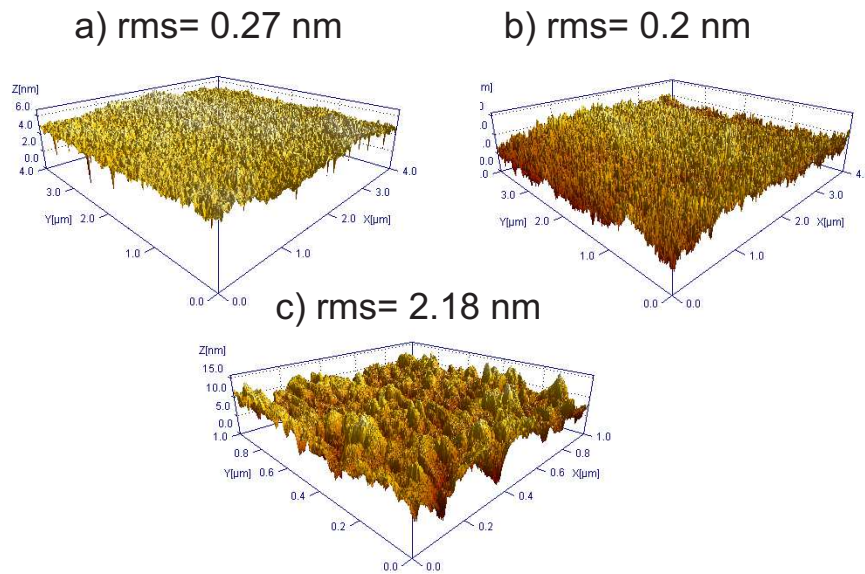


Abbildung 4.2.10: AFM Bilder der SiO₂-Oberfläche nach der Silanisierung mit SSC-APMS (a), SSC-Triamino-APMS (b), und 4h-APMS (c) Verfahren.

sehr großer Bindungsenergie begünstigt. Daher ist die Messung der Rauigkeit für die Beurteilung der Hydrophobizität der Oberfläche ausreichend.

4.2.4 Anwendung des SSC-Verfahrens an der MOSLED-Oberfläche

In der Abbildung 4.2.11 werden die FTIR (a) und EL-Spektren (b) der Tb-basierten Lichtemitter vor und nach der Silanisierung dargestellt. Das FTIR-Spektrum wurde im Reflektionsmodus aufgenommen und zeigt die gleichen charakteristischen Peaks (siehe Tabelle 4.2.1) sowohl für die hybridisierte als auch für die silanierte Sensoroberfläche. Insbesondere zeigen die Peaks für die aminofunktionelle Gruppe schärfere Peaks. In der Abbildung 4.2.11 (b) wird das EL-Spektrum vor und nach der Silanisierung dargestellt. Die EL-Intensität der MOSLEDs betrug nach der Silanisierung 98 %, was die gute Transparenz des Silanfilms zeigt.

4.2.5 Chemische Stabilität des Silanfilms

Das SSC-Verfahren ist gut reproduzierbar. Die Messungen zur Filmstabilität nach mehreren Tagen bis Wochen (siehe Anhang-Stabilität) zeigen, dass die Silangruppen besser geordnet sind, als direkt nach der Beschichtung. Hier spielen die aus der Wechselwirkung der APMS

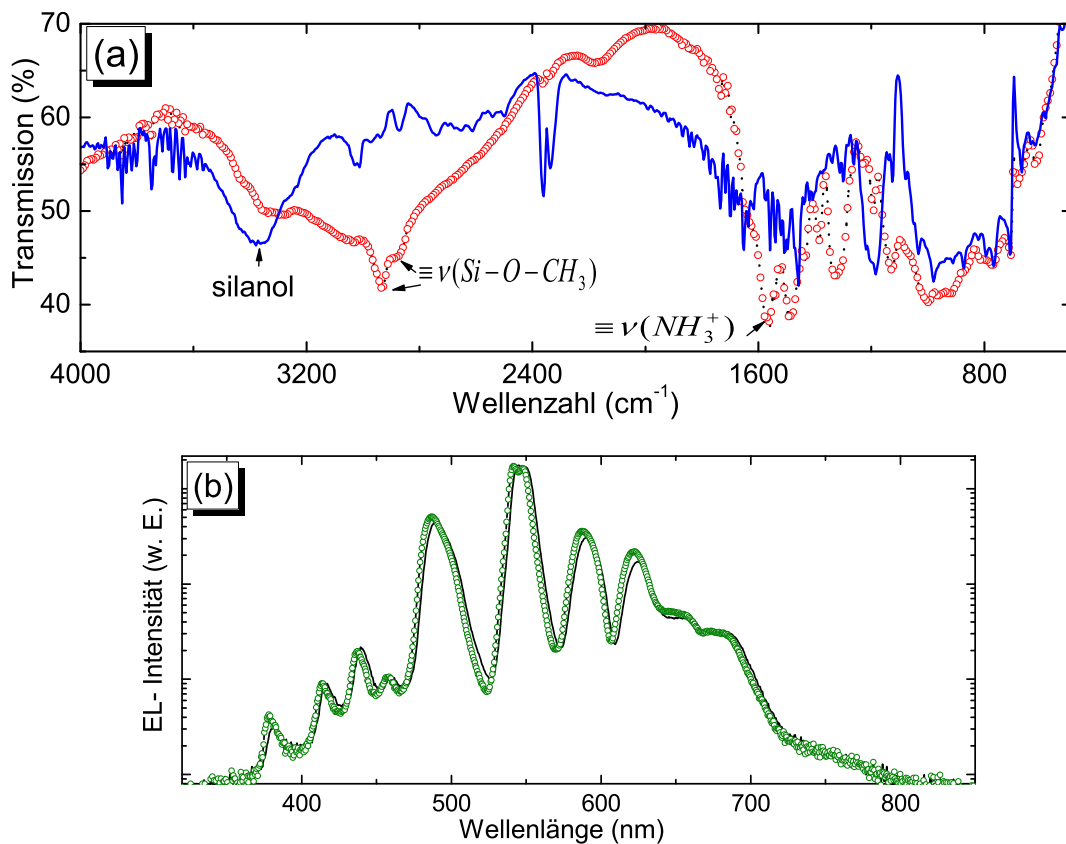


Abbildung 4.2.11: FTIR-Spektrum (a) einer hybridisierten (blau) und SSC-APMS silanisierten (rot) Sensoroberfläche. EL-Spektrum (b) der Tb-basierten MOSLED vor (schwarz) und nach (grün) der Silanisierung.

Moleküle resultierenden von der Waals-Kräfte eine Rolle. Dieser Effekt wurde auch bei Rocke et al. beobachtet [99].

In der Abbildung 4.2.12 wird das FTIR-Spektrum von SSC-silanisierten SiO_2 -Oberflächen nach dem Eintauchen in verschiedenen Lösungsmitteln für einen Tag dargestellt. Hier ist darauf hinzuweisen, dass der untersuchte Silanfilm der Konfiguration in der Abbildung 3.2.7- III) entspricht. Das heißt, dass der Silanfilm über Wasserstoffbrücken an die SiO_2 -Oberfläche gebunden ist. Das FTIR-Spektrum für Aceton bleibt unverändert (pink). Für Ethanol und Methanol beobachtet man, dass die bereits diskutierten Ringstrukturen (vgl. Abbildung 4.2.6 -a)) bei 2167 cm^{-1} (B2) auftauchen. Das zeigt die Unordnung des Silanfilms. Die geringe Breite der Peaks im Bereich (B1) deutet darauf hin, dass der Silanfilm sich durch die Hydrolyse der Wasserstoffbrücken nahe der SiO_2 -Oberfläche partiell ablöst.

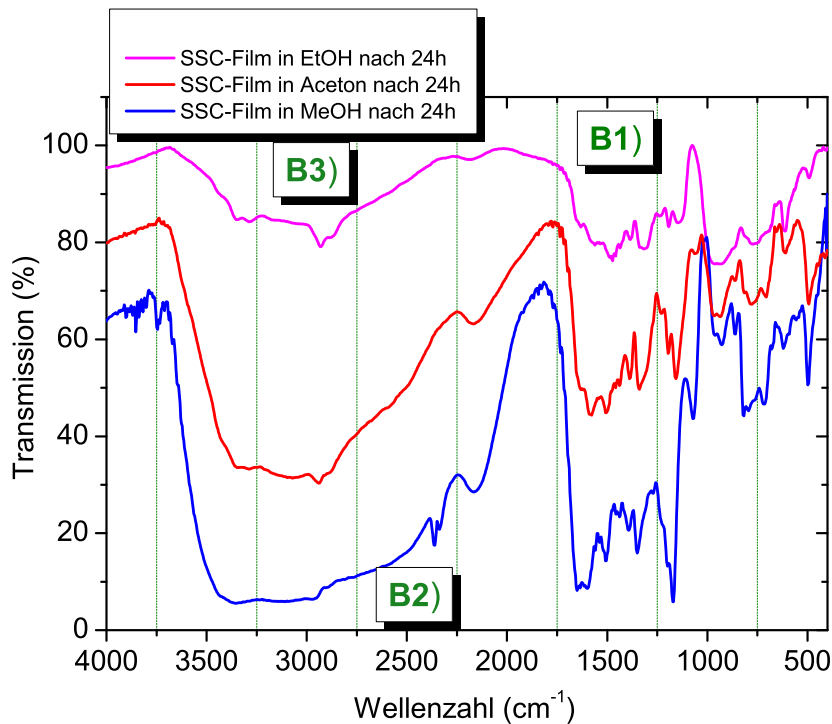


Abbildung 4.2.12: FTIR-Spektrum von SSC-silanisierten SiO₂-Oberflächen nach dem Eintauchen in verschiedenen Lösungsmitteln für einen Tag

Das bestätigt das Verschwinden der Propylamingruppe des APMS Moleküls bei 2930 cm⁻¹. Die Untersuchung der Filmstabilität über die Zeit ist aufgrund der längeren Inkubationszeiten bei der Rezeptoradsorption wichtig. Feng et al. untersuchten die Bindung des Östrogens mit dem Rezeptor hER_α und fanden heraus, dass die Inkubationszeit zwischen 1-24 Stunden liegt [100].

4.2.6 Temperung der Silanschicht

Um eine bessere Filmstabilität zu gewährleisten, wurde der letzte Teil der Grundreaktion in der Abbildung 3.2.7 untersucht. Der Übergang von dem Reaktionsschritt **III** zu **IV**, welcher durch die Kondensation die Wasserstoffbrückenbindung an der SiO₂-Oberfläche zu einer kovalenten Bindung durch die Sauerstoffbindung durch Temperung realisiert wird. Dabei werden die Silanschichten bei 110 bis 400 °C getempert [101] [5] [91]. Dabei wurden die Temperzeiten zwischen 1 und 5 Stunden variiert. In der Abbildung 4.2.13 wird ein FTIR-Spektrum in Abhängigkeit von der Temperatur (bei 1 Stunde Temperzeit) dargestellt.

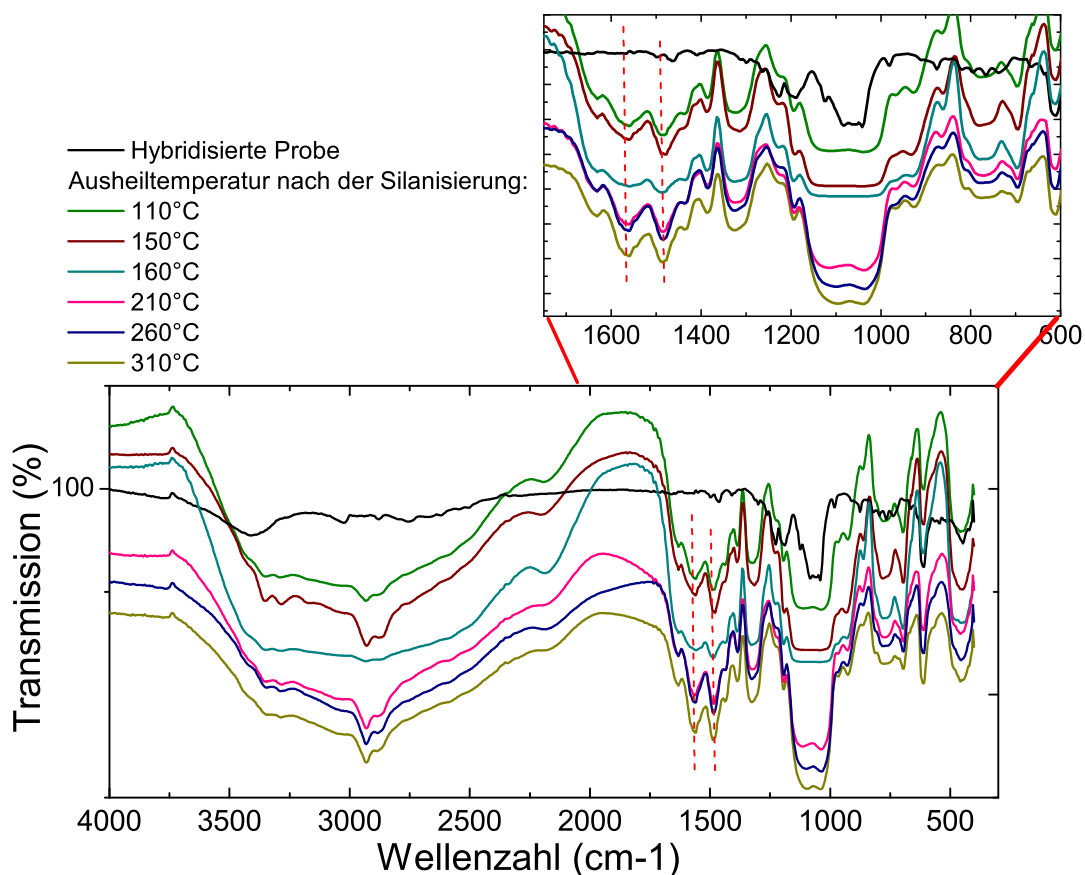


Abbildung 4.2.13: FTIR-Spektren der eine Stunde lang getemperten Silanschichten als Funktion der Ausheiltemperatur. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden

Es soll besonders auf die stabilen OH-Gruppen an der Oberfläche nach einer Stunde Tempern bei 150 °C hingewiesen werden. Wie in Tabelle 4.2.1 gezeigt, zeichnen sich die SSC-Silanschichten durch die typischen Schwingungen der $-(\text{CH}_2)_n$ -Gruppe ($n > 4$) aus, d.h. durch die C-H- Streckschwingung der Gruppe- CH_2 bei 2935 und 2880 cm^{-1} , die Deformationsschwingung bei 1484 cm^{-1} und die Schaukschwingung (Rocking mode) bei 725 cm^{-1} [62]. Diese Bande taucht ebenso bei allen SSC-silanisierten Oberflächen auf. Um Rückschlüsse aus dem FTIR-Spektrum in der Abbildung 4.2.13 zu ziehen, wurde das Intensitätsverhältnis zwischen dem Peak für die C-H Deformationsschwingung der Gruppe CH_2 (der Propylamingruppe des APMS Moleküls) bei 1484 cm^{-1} und dem Peak für die aminofunktionelle Gruppe (siehe die Tabelle 4.2.1) in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen. In der Abbildung 4.2.14 wird dieses Verhältnis über die Ausheiltemperatur dargestellt. Es wurde eine

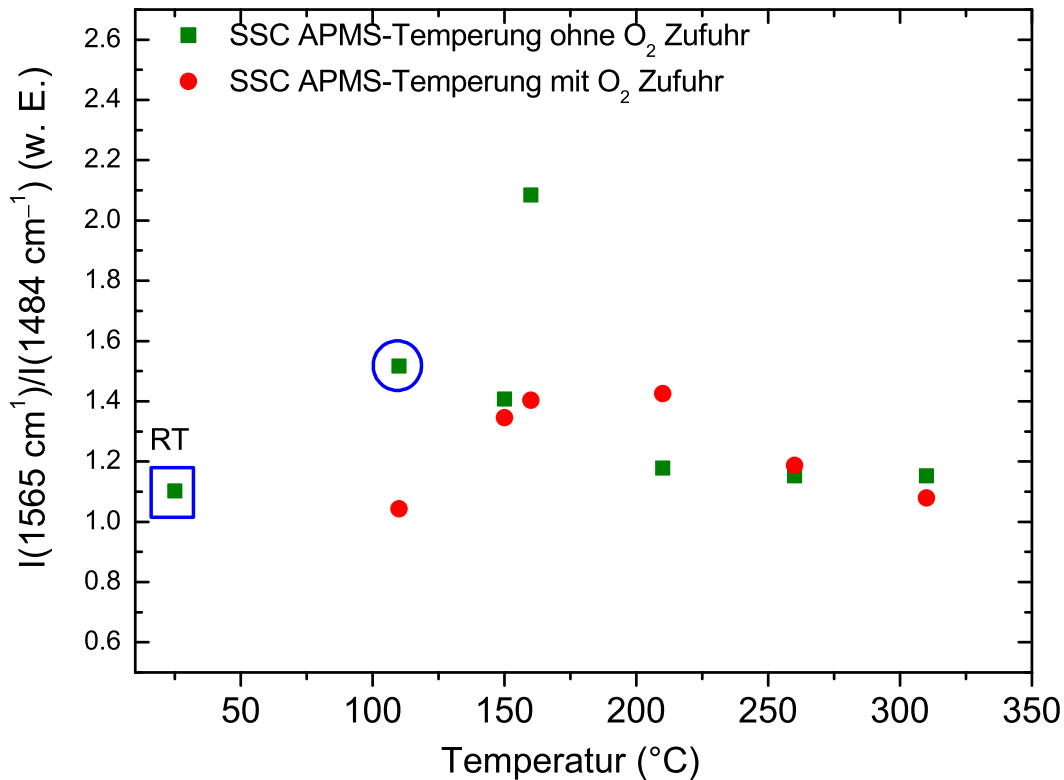


Abbildung 4.2.14: Intensitätsverhältnis in Abhängigkeit von der Temperatur der mit O₂ (rot) und ohne (grün) getemperten silaniserten Proben. Die Bestwerte bezüglich des Intensitätsverhältnisses sind eingekreist. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

Abnahme des Intensitätsverhältnisses sowohl für die Temperung mit und ohne O₂ Zufuhr (das entsprechende FTIR-Spektrum ist im Anhang-A2 zu finden) beobachtet. Diese Abnahme der Intensität bedeutet, dass sowohl die zur Verfügung stehenden aminofunktionelle Gruppen als auch die $-(\text{CH}_2)_n$ -Ordnung abnehmen. Der höchste Wert dieses Intensitätsverhältnisses beträgt 2 und wurde bei der mit 160 °C ohne O₂ Zufuhr getemperte Probe gemessen. Als Bestwert wurde das Intensitätsverhältnis bei 110 °C ermittelt, wie die Raman-Spektren der getemperten Proben in der Abbildung 4.2.15 zeigen. Pavlovich et al. fanden das gleiche Temperaturoptimum [102]. Ohne Temperung beträgt das Intensitätsverhältnis 1.1. Weitere Ergebnisse zu der kovalenten Bindung des Silanfilms an die SiO₂-Oberfläche, beschrieben durch den Reaktionsschritt in der Abbildung 3.2.7 -**IV**, und die Filmordnung an der Oberfläche, liefern die XPS- und Raman-Untersuchungen. In der Abbildung 4.2.15 wird ein Raman-

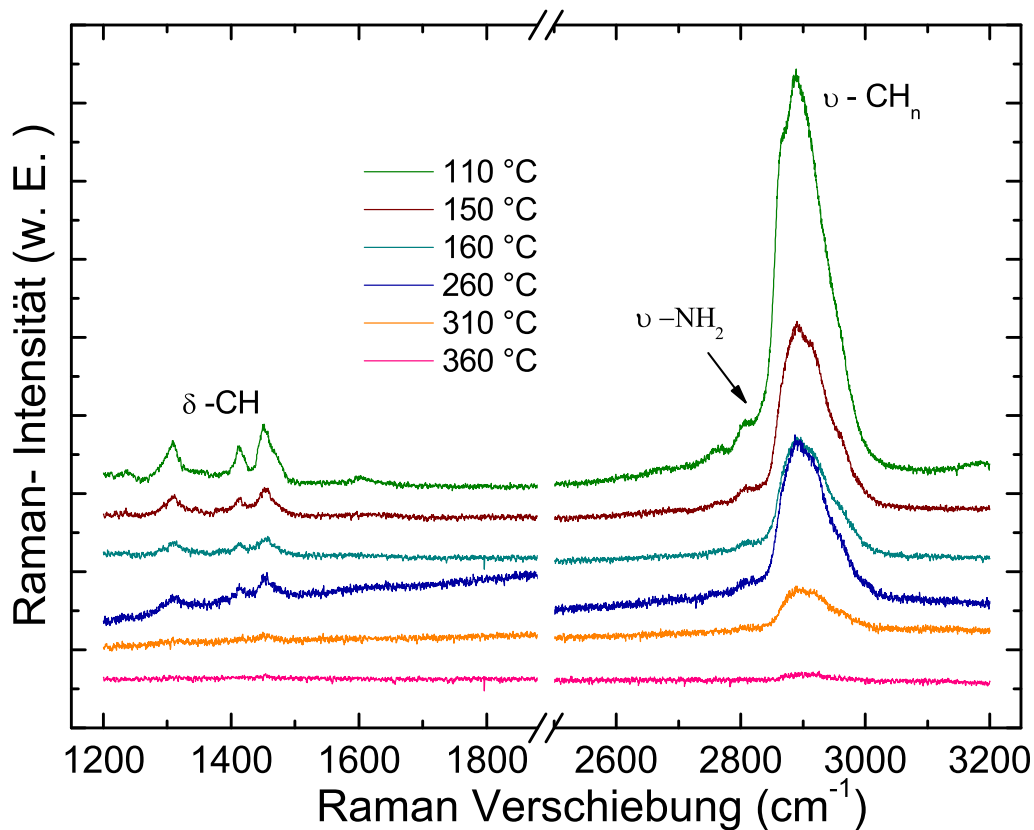


Abbildung 4.2.15: Ramanspektrum der getemperten Proben in zwei charakteristischen Bereichen $[3200, 2500 \text{ cm}^{-1}]$ und $[1800, 1200 \text{ cm}^{-1}]$. Während bei den FTIR-Spektren nur die Schwingung von R-NH_2 gemessen wurde, ist die Valenzstreckung $\nu(\text{NH}_2)$ bei 2810 cm^{-1} in Raman-Spektren gut erkennbar.

spektrum der getemperten Proben in zwei charakteristischen Bereichen $[3200, 2500 \text{ cm}^{-1}]$ und $[1800, 1200 \text{ cm}^{-1}]$ dargestellt. Mit zunehmender Temperatur verschwinden die charakteristische Peaks der Silangruppe (vgl. Abbildung 4.2.8): die Valenzstreckung $\nu(\text{CH}_x)$ und $\nu(\text{NH}_2)$ bei 2890 und 2810 cm^{-1} und die Deformationsschwingung $\delta(\text{CH})$ bei 1456 , 1410 , 1312 , und 1140 cm^{-1} . Die geringe Breite der Peaks deutet auf einen bessere Molekülorientierung hin [103] [104]. Die kovalente Bindung des Silanfilms an die SiO_2 -Oberfläche kann man anhand der XPS-Messung feststellen. Tabelle 4.2.3 fasst die wichtigsten Ergebnisse der gemessenen Bindungsenergien der Energie-Niveaus $\text{Si}2p$ und $\text{O}1s$ und deren Halbwertbreite FWHM (**F**ull **w**idth at **h**alf **m**aximum) an einer mit SSC-APMS silanisierten Probe und an zwei getemperten SSC-APMS Proben (110 und 150 °C für 1 Stunde) zusammen.

Die chemische Verschiebung des Energieniveaus Si2p beträgt circa 5 eV zwischen einem

Tabelle 4.2.3: Gemessene Bindungsenergien der Energie-Niveaus Si2p und O1s und deren Halbwertbreite an den getemperten und mit SSC-APMS silanierten Proben

Probe	BE(Si2p)/FWHM	BE(O1s)/FWHM
Si-Substrate (Lit.)	99.2 [105]	-
SSC-APMS	104.32/1.94	534.58/1.91
SSC-APMS-110°C	105.63/1.7	535.2/1.92
SSC-APMS-150°C	104.84/2.04	534.04/1.88

gereinigten Substrat und der mit APMS beschichtete SiO₂-Oberfläche. Man erwartet eine chemische Verschiebung zu höheren Bindungsenergien beim Vergleich einer mit SSC silanierten Oberfläche mit und ohne Zusatztemperatur. Es wurde eine chemische Verschiebung von 0.01 eV und 0.03 eV bei den 110 und 150 °C getemperten Proben gemessen.

4.2.7 SSC-Silanisierung mit funktionellen Carboxyl- und Thiol-Gruppen

Das SSC- Verfahren bietet die Möglichkeit, die aminofunktionelle Gruppe auf der Oberfläche zu variieren. Um die SiO_2 -Oberfläche mit den Carboxylgruppen zu belegen, wurde der am Ende von Abschnitt 3.2.3 beschriebene Prozessschritt durchgeführt. Um die Thiolgruppenbelegung zu erreichen, wurde das SSC-Verfahren mit der Silangruppe $\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ durchgeführt. In der Abbildung 4.2.16 wird ein FTIR-Spektrum der SiO_2 -Oberfläche mit den drei funktionelle Gruppen der Amino- Carboxyl- und Thiolgruppe dargestellt, deren Streck-schwingung bei 1565 , 1600 , und 2500 cm^{-1} liegen. Diese drei funktionellen Gruppen zählen

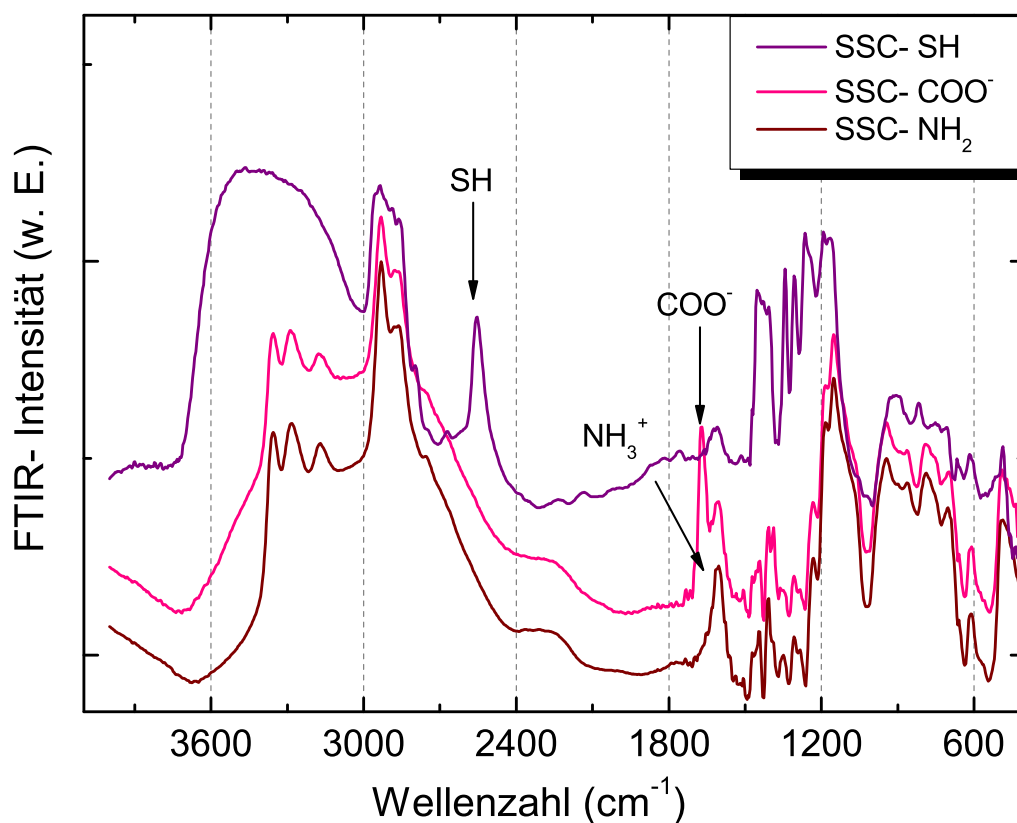


Abbildung 4.2.16: FTIR-Spektrum von mittels SSC-Verfahren silanisierter SiO_2 -Oberflächen mit Amino-, Carboxyl- und Thiol-funktionelle Gruppen

zu den wichtigsten organische Verbindungen zur Anbindung Biomoleküle wie Proteine oder

DNA, indem sie sich an die Oberfläche kovalent ankoppeln lassen, ohne dass deren Bioaktivität verloren geht.

4.3 Farbstoffe

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Farbstoffuntersuchungen gezeigt. Die Farbstoffe wurden an die MOSLED-Oberfläche adsorbiert und angeregt. Der zu verwendende Farbstoff muss eine große Stokesche Verschiebung besitzen, um das Signal des Markers vom dem des Lichtemitters gut unterscheiden zu können. Es gibt nicht viele organische Farbstoffe, die dieses Kriterium erfüllen. Für den Gd- und Ge-basierten MOSLED wurden das 4,4'''-Bis-(2-Butyl-Octyloxy)-(1,1',4',1'',4'',1''')Quaterphenyl (BBQ) bzw. Europium(III) Nitrat-Hydrat (Tabelle 3.2.3) erprobt. Die besten Ergebnisse bezüglich der Stokeschen Verschiebung liefern uns die Halbleiternanopartikel, nämlich QDots800 bzw. 655. Die Ergebnisse der Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen und den Ge-, Gd- und Tb- basierten MOSLEDs können mittels der PL- und Elektrolumineszenzmessungen ermittelt werden. Der auf der MOSLED-Oberfläche adsorbierte Europium(III) Nitrat-Hydrat-Farbstoff zeigt keine Lumineszenz bei der EL-Messung im Vergleich zu der UV-Vis-Messung des Farbstoffes in der Lösung. Um dieses Fluoreszenz-Quenching besser verstehen zu können, wurden die Proben mittels XPS untersucht.

4.3.1 Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoff

Der Europium(III) Nitrat-Hydrat -Farbstoff mit der Summenformel $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ basiert auf Eu^{3+} und besitzt eine C_{2h} Symmetrie, welche einen Dodekaeder mit dreieckigen Flächen darstellt [106]. In der Abbildung 4.3.1 (**links**) wird ein UV-Vis-Spektrum des Farbstoffes in Ethylacetate-Lösung (vgl. Tabelle 3.2.5) dargestellt. Das Absorptionsmaximum des Europium(III) Nitrat-Hydrat -Farbstoffs liegt bei 396 nm. Das entspricht einer Energie von 3.13 eV, die notwendig ist, um ein Elektron vom Grundzustand 7F_0 des Eu^{3+} -Ions in den angeregten Zustand 5D_3 anzuheben [107]. Es handelt sich um Übergänge der 4f-Schale. Das Emissionsmaximum liegt bei 617.5 nm für den Übergang 5D_0 - 7F_2 neben weiteren Maxima bei 591.5 nm und 685.5 nm für die Übergänge 5D_0 - 7F_1 , bzw. 5D_0 - 7F_4 mit einem nicht zugeordneten Peak bei 696.5 nm [108] [109] [110], was damit einer Stokesche Verschiebung von circa 221 nm entspricht. Das EL-Spektrum des an der Sensoroberfläche adsorbierten Farbstoffs zeigt keine Eu-Linie (wie die Abbildung 4.3.1, **rechts**). Das Europiumion in der Europium(III) Nitrat-Hydrat-Struktur in der Lösung ist ein positiv geladenes Eu^{3+} -Ion, was die Emissionsmaxima im UV-Vis Spektrum belegen. Für die Transparenz des Farbstofffilms sorgt die gute Vernetzungseigenschaft der Ethylacetat-Lösung. In der Abbildung 4.3.2 wird ein Ramanspektrum des Europium(III) Nitrat-Hydrat-Farbstoff an der SiO_2 -Oberfläche

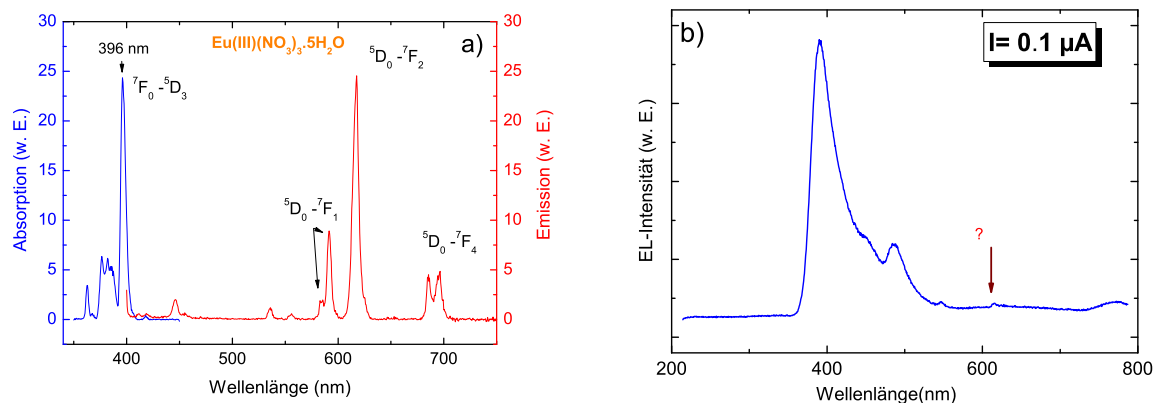


Abbildung 4.3.1: Absorptions- und Emissionsspektrum des Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoffes in Ethylacetate-Lösung (a). Elektrolumineszenzspektrum des Europium(III) Nitrat-Hydrat-Farbstoffs an der Ge-basierten MOSLEDs Oberfläche (b). Das Emissionsmaximum der MOSLED liegt bei 416 nm. Es konnte keine EL des Farbstoffes festgestellt werden.

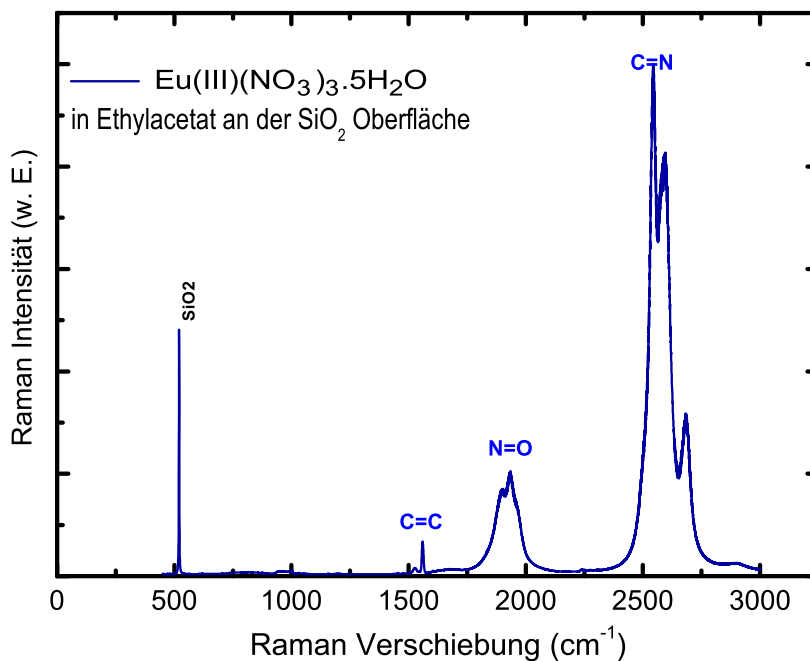


Abbildung 4.3.2: Ramanspektrum des an der SiO₂-Oberfläche adsorbierten Europium(III) Nitrat-Hydrat-Farbstoffs

dargestellt. Neben dem Si-Peak bei 520 cm^{-1} erkennt man die schwache Schwingung der

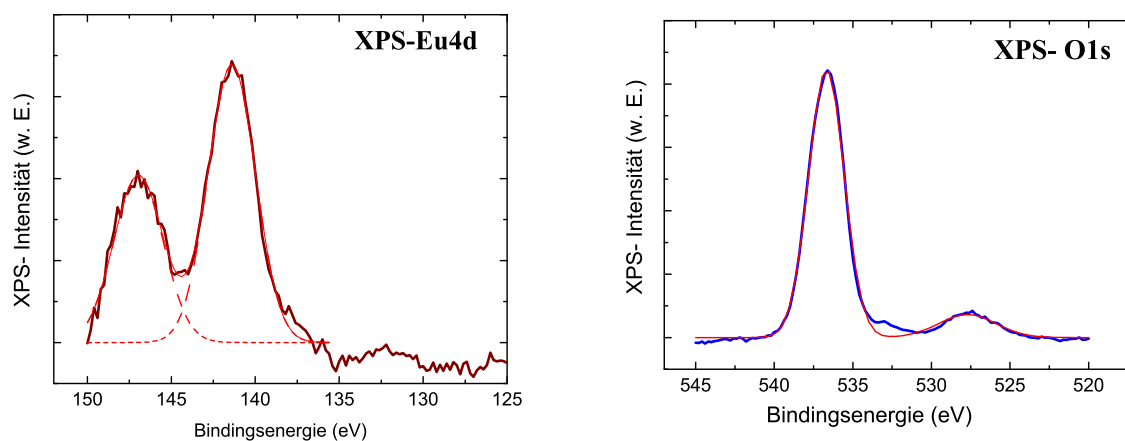


Abbildung 4.3.3: XPS-Spektrum des Energieniveaus Eu4d (links) und O1s (rechts) des an der SiO_2 -Oberfläche adsorbierten Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoffes

Doppelbindung C=C bei 1560 cm^{-1} , die starke Schwingung N=O bei 1896 und 1934 cm^{-1} , und schließlich die sehr starke Schwingung der Doppelbindung C=N bei 2542.8 mit zusätzlichen Satelliten bei 2595.5 und 2683 cm^{-1} . Die XPS-Messung an der mit Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoff adsorbierten SiO_2 -Oberfläche ist erforderlich, um herauszufinden, um welchen Oxidationszustand des Eu^{3+} -Ion es sich auf der SiO_2 -Oberfläche handelt. In der Abbildung 4.3.3 werden die XPS-Messungen von den Energieniveaus Eu4d (**links**) und des dazugehörigen O1s Energieniveaus (**rechts**) dargestellt. Ein Vergleich der XPS-Werte des

Tabelle 4.3.1: Gemessene Bindungsenergien (BE) Eu4d und O1s des Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoffes an der SiO_2 -Oberfläche

Gem.BE(Eu4d)/BE(Eu4d)(Lit.)	Gem.BE(O1s)/BE(O1s)(Lit.)
141/137 [111]	536/532.5 [111]
146/142 [111]	-

Eu^{3+} -Oxids mit denen der Literatur, wie in Tabelle 4.3.1 angegeben, gibt Aufschluß über eine chemische Verschiebung von circa 4 eV für sowohl das Eu4d als auch für das dazugehörige O1s Energieniveau zu höheren Bindungsenergien hin, was auf einen anderen Oxidationszustand als $3+$ für das Eu-Ion auf der Oberfläche hindeutet. Das Europium ist ein unedles Metall, das an der Luft oxidiert. Das kann man als einen Grund für die fehlende Lumineszenz des Eu-Farbstoffes nicht ausschließen. Die Oxidation des Eu-Farbstoffes könnte auch

durch einen Elektronentransfer der SiO_2 -Oberfläche (Oberflächenzustände z.B. Silanolbildung durch das Wasser) begünstigt gewesen sein. In der Abbildung 4.3.4 wird das Photo-

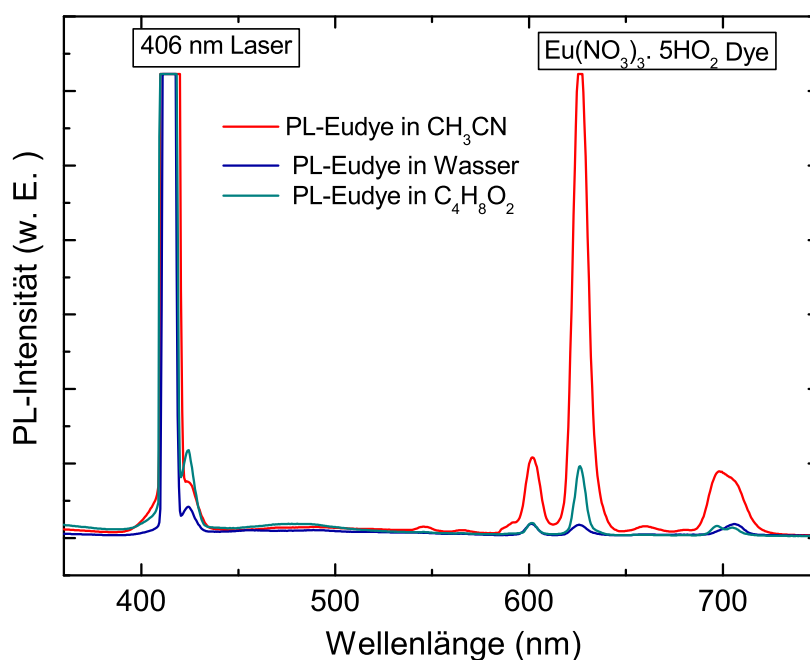


Abbildung 4.3.4: Photolumineszenzspektrum des Europium(III) Nitrat-Hydrat Farbstoffes in drei verschiedenen Lösungen

lumineszenzspektrum des Eu-Farbstoffes an einer mit APMS-silanisierten SiO_2 -Oberfläche in drei verschiedenen Lösungen dargestellt. Der Farbstoff wurde mit einem blauen Laser (405 nm) angeregt. Das Spektrum zeigt eine starke Photolumineszenz insbesondere in der Acetonitril-Lösung. Die Photolumineszenzausbeute unterscheidet sich sehr stark zwischen Wasser, Ethylacetat und Acetonitril. Hier könnte der hohe Hintergrund durch Lichtemitter verantwortlich sein für die fehlende Lumineszenz des Eu-Farbstoffes. Trotz der breiten Stokeschen Verschiebung ist der Eu-Farbstoff aufgrund der starken Abhängigkeit vom Lösungsmittel nicht für den Einsatz als Fluoreszenzmarker geeignet.

4.3.2 4,4'''-Bis-(2-Butyl-Octyloxy)-(1,1',4',1'',4'',1''')Quaterphenyl (BBQ)

Der BBQ-Farbstoff ist ein organisches Molekül aus vier Benzolringen mit der Summenformel $C_{48}H_{66}O_2$ (vgl. Tabelle 3.2.3). Er ist wegen des hohen molaren Extinktionskoeffizienten von $5.45 \cdot 10^4 \text{ L}\cdot\text{Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Herstellerangabe) mit einem Absorptionsmaximum bei 309 nm als Laserfarbstoff in der Pikosekundenspektroskopie weit verbreitet [112][113]. In Abbildung

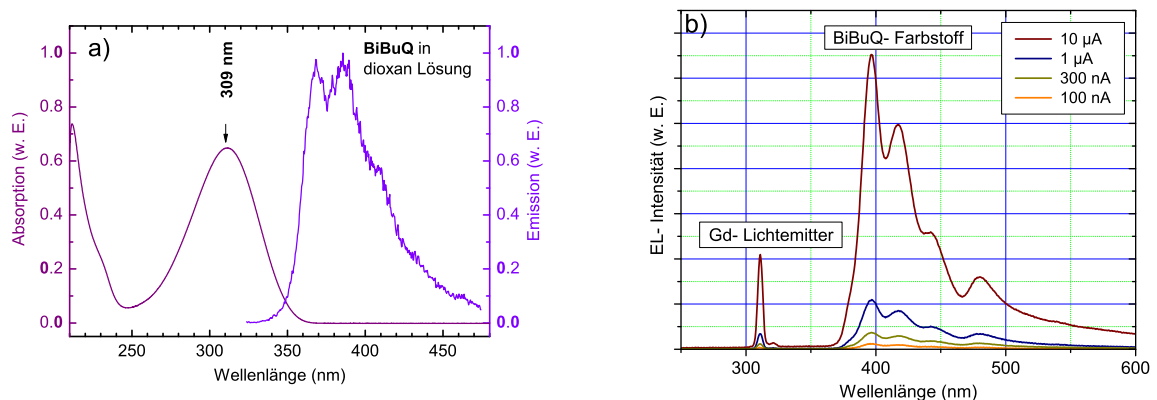


Abbildung 4.3.5: Absorptions- und Emissionsspektrum des BBQ-Farbstoffes in der Dioxan Lösung (a) und das Elektrolumineszenzspektrum (b) des BBQ-Farbstoff an der Gd-basierten MOSLEDs (Emissionsmaximum bei 416 nm) Oberfläche in Abhängigkeit vom Injektionsstrom.

4.3.5 wird ein PL-Spektrum des BBQ-Farbstoffes in Dioxan (vgl. Tabelle 3.2.5) ([links](#)) dargestellt. Das Absorptionsspektrum des BBQ-Farbstoffes ist ein breiter Peak, welcher ein Maximum bei 309 nm besitzt. Das Emissionsmaximum des Gd-basierten MOSLEDs ist nur um 2 nm im Vergleich zum Absorptionsmaximum des BBQ Farbstoffes verschoben. In der Abbildung 4.3.5 ([rechts](#)) wird ein Elektrolumineszenzspektrum des an die SiO_2 -Oberfläche eines Gd-basierten MOSLEDs adsorbierten Farbstoffs in Abhängigkeit vom Strom von 0.1 bis 10 μA dargestellt. Die Elektrolumineszenzintensität nimmt mit dem Strom zu. Eine quantitative Konzentrationsmessung wurde mit Hilfe des Micro-Contact-Printing Systems $\mu\text{-CP}2.1$ 1 (Nähere Beschreibung des Systems ist in 3.3.8 zu finden) durchgeführt. Dabei wird ein Chip mit Gd-basierten MOSLEDs (siehe Abbildung 3.2.2) mit unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen von nl bis μl Volumen pipettiert. Die Verteilung der Lösung auf der Dot-Fläche wird mit Hilfe einer Kamera kontrolliert. In der Abbildung 4.3.6 ([links](#)) wird

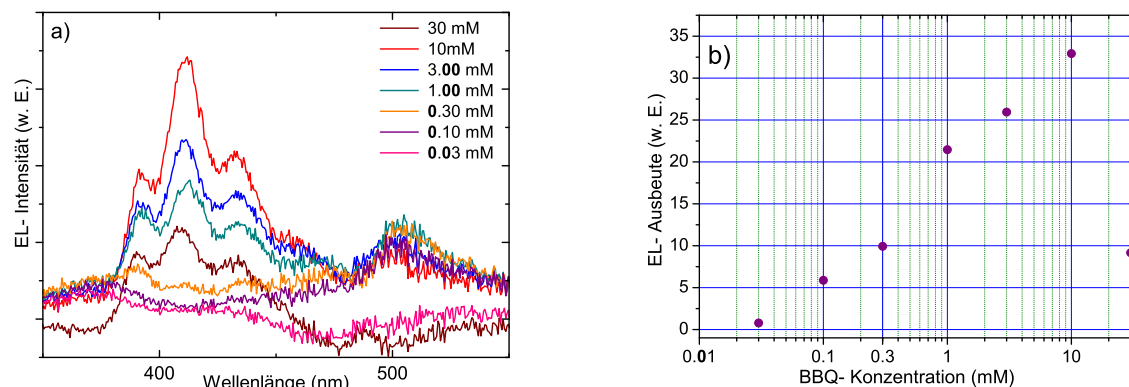


Abbildung 4.3.6: Quantitative Konzentrationsmessung des an der Gd-MOSLED adsorbierten BBQ-Farbstoffes mit Hilfe des Micro-Contact-Printing Systems μ -CP2.1 1 (a) und Elektrolumineszenzausbeute in Abhängigkeit der BBQ-Farbstoffkonzentration (b).

ein Elektrolumineszenzspektrum in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration dargestellt. Die integrierte EL-Intensität wurde berechnet, indem man über das gleiche Wellenlängenintervall um das Photolumineszenzmaximum integriert. In der Abbildung 4.3.6 (**rechts**) wird die integrierte EL-Intensität über die Farbstoffkonzentration aufgetragen. Die integrierte EL-Intensität steigt bei zunehmender Farbstoffkonzentration, mit der Ausnahme der Konzentration von 30 mM, was auf die Sättigung der Lösung zurückzuführen ist.

Der BBQ-Farbstoff eignet sich sehr gut zu der Gd-basierten MOSLED. Bezüglich der Referenzlösung in Kap. 4.5 soll für jede MOSLED einen passenden Farbstoff finden und dafür das Bindungsprotokoll der Referenzlösung einzeln optimiert werden. Deshalb wurde für die QDots[®]-Farbstoffe wegen ihrem breitbandigen Spektrum entschieden.

4.3.3 QDots[®]-Farbstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nanopartikel (QDots) aus CdSeTe mit einer Hülle aus ZnS als Farbstoff verwendet. Diese Nanopartikel haben die Eigenschaft, ein sehr breitbandige Absorption zu besitzen, deren Absorptionsmaximum mit zunehmender Wellenlänge abnimmt. Bei zunehmendem Radius des Nanopartikels nimmt ebenso die Emissionswellenlänge zu [114]. In der Abbildung 4.3.8 wird eine TEM-Aufnahme des Nanopartikel-Farbstoffes QDots800 in einer PVA Lösung mit einer Konzentration von 3 μ M dargestellt. Es wurde für QDots800 ein Radius von 5 nm gemessen. Da der Radius von der Emissionswellenlänge

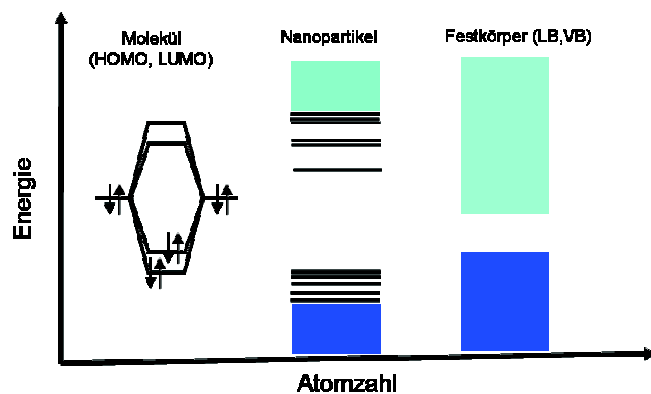


Abbildung 4.3.7: Nanopartikel stellen eine Schnittstelle zwischen eines Moleküls und einem Festkörper dar. Bei sehr kleinem Radius ($r \leq 10$ nm) spalten die Energiebänder in diskreter Banden auf. Die Bandlücke nimmt mit abnehmendem Radius zu.

ge abhängt, haben Yu et al. [114] eine empirische Gleichung aufgestellt, womit man den Durchmesser des Nanopartikels ermitteln kann. Die Gleichung lautet:

$$D = (1.6122 \cdot 10^9)\lambda^4 + (2.6575 \cdot 10^6)\lambda^3 + (1.6242 \cdot 10^3)\lambda^2 - 0.4277\lambda^1 + 41.57 \quad (4.3.1)$$

Dabei ist D der Durchmesser des Nanopartikels und λ das erste Emissionswellenlängenmaximum. Der Extinktionskoeffizient des Nanopartikels wird laut Yu et al. ebenso empirisch bestimmt und durch die folgende Gleichung ermittelt:

$$\epsilon = 5857 \cdot D^{2.65}, \quad (4.3.2)$$

Die Stokesche Verschiebung bei dem QDots[®]800-Farbstoff liegen zwischen 180 nm (vom Eu-Emissionsmaximum bei 620 nm) und 484 nm (vom Gd-Emissionsmaximum bei 316 nm). In Abbildung 4.3.9 wird das Elektrolumineszenzspektrum von drei verschiedenen MOSLEDs mit adsorbierten QDots[®]-Farbstoff dargestellt. Das Elektrolumineszenzmaximum des QDots800-Farbstoff bei 800 nm nimmt für den gleichen Strom von **(c)** (Tb-basierten MOSLED mit einem Emissionsmaximum bei 532 nm) über **(b)** (Ge-basierten MOSLED mit einem Emissionsmaximum bei 398 nm) bis **(a)** (Gd-basierten MOSLED mit einem Emissionsmaximum bei 316 nm) aufgrund der zunehmenden Absorption des Farbstoffes zu. Die EL-Intensität des QDots800-Farbstoffes ist wie erwartet linear vom Injektionsstrom abhängig. Die Spektren **(b)** und **(c)**, wo die MOSLEDs im sichtbaren Bereich das Licht emittieren, wurden mittels der Meßapparatur in 3.3.5 aufgenommen. Für die Messung vom Spektrum **(a)** wurde, wegen der Absorption des Glasfaserkabels im UV-Bereich, der Probenträger direkt an den Spektrometeröffnung gestellt und gemessen. Beim QDots[®]800-Farbstoff besteht das Hüllenmolekül nur aus einer organischen Carboxyl-Hülle. Die Angaben des Herstellers geben keinen Hinweis darüber, wie dicht diese organische Hül-

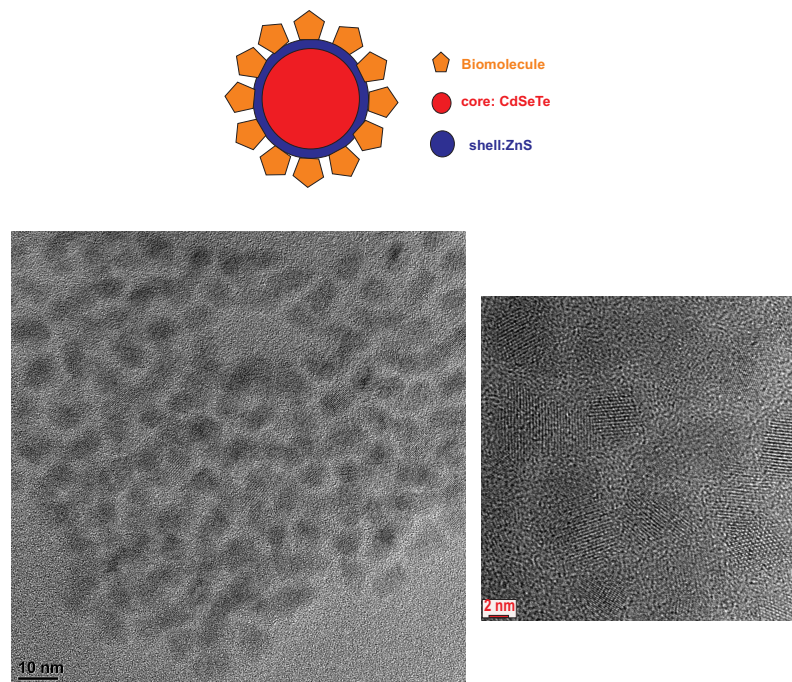


Abbildung 4.3.8: Schematische Darstellung des Nanopartikel-Farbstoffes QDots800 aus einem CdSeTe Kern und einer Hülle aus ZnS, wo ein Hüllenmolekül als Biomolekül angebunden ist (oben). TEM- Aufnahmen des Nanopartikel-Farbstoffes QDots800 in einer PVA Lösung auf einem Kupfergitter pipettiert (unten).

le ist und ob es eine freie Bindungsstelle gibt. Beim Modifizieren des QDots[®]-Farbstoffs, was die Realisierung der Referenzlösung bzw. den Nachweis der Rezeptoradsorption an der silanisierten MOSLED Oberfläche (vgl. 3.2.4 und Abbildung 3.2.10) betreffen, bekommt der QDots[®]-Farbstoff eine zusätzliche Außenhülle. Dabei stellt sich die Frage: Wie beeinflusst das an die Außenhülle angebundene Hüllenmolekül die optischen Eigenschaften des QDots[®]-Farbstoffs? Von Holt et al. untersuchten mittels der Picosekundenspektroskopie die Dynamik der CdSe Nanopartikel mit einer organischen Trioctylphosphinoxid (TOPO)-Hülle. Diese organische Hülle wurde durch ein Überangebot an konkurrierenden Hüllenmolekülen wie Octanthiol (SH), Octylamin (AMIN) und Octansäure (COOH) ersetzt [115]. Es stellte sich heraus, dass durch diese Passivierungsänderung der organischen Hülle mittels Ligandenaustausch die Effizienz der Nanopartikel zwar eine leichte Veränderung im Picosekundenbereich erfährt, aber für die Verwendung des Farbstoffes als Marker keine signifikante Abnahme erfährt. Die Untersuchungen an der Referenzlösung bzw. zur Anbindung des Rezeptors an den QDots[®]-Farbstoff folgten mittels FTIR und XPS. Der QDots[®]-Farbstoff mit einer Außenschale aus ZnS und einer organischen Hülle aus Carboxylgruppen lässt sich sehr gut im Bereich um die Carboxylgruppen-Schwingung bei 1700

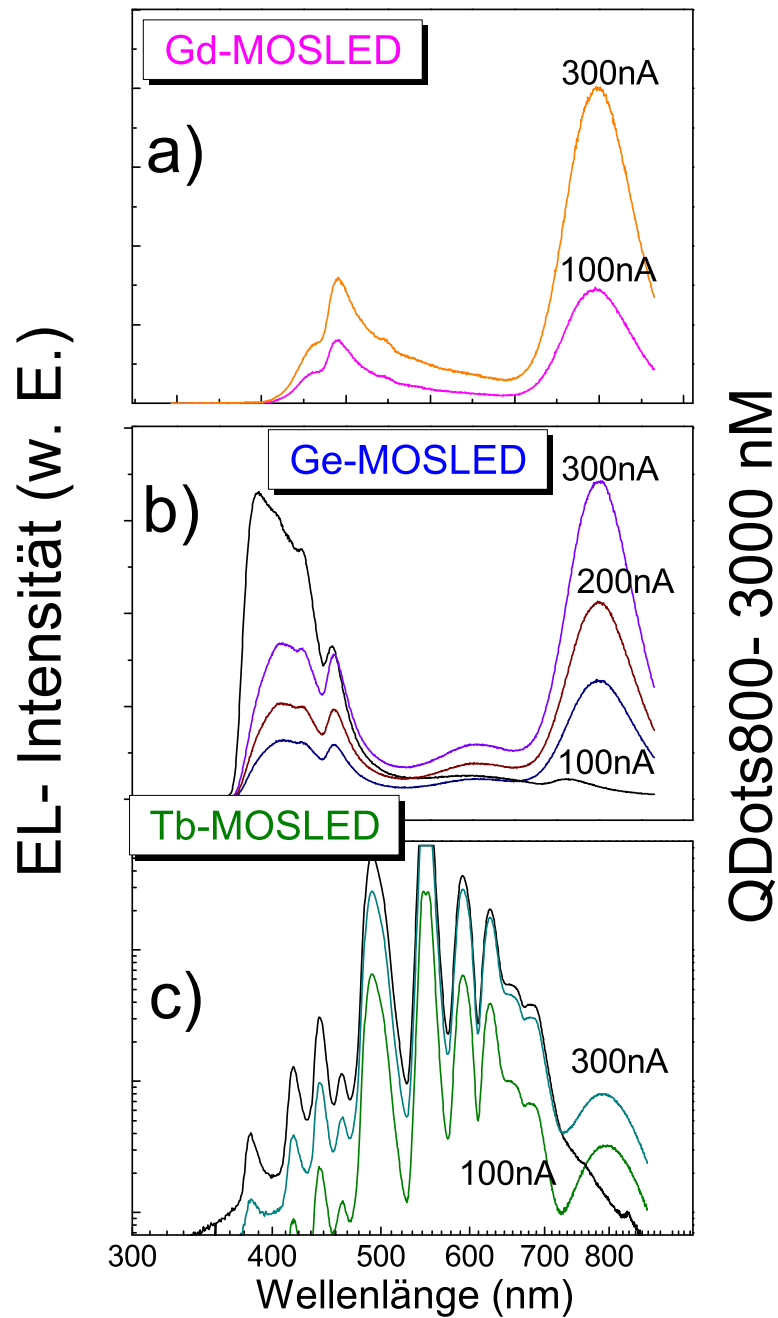


Abbildung 4.3.9: Elektrolumineszenzspektrum der mit QDots[®]-Farbstoff bei einer Konzentration von 3 μ M adsorbierten Gd- (a), Ge- (b) und Tb (c)-basierten MOSLEDs in Abhängigkeit vom injizierten Strom. Die Lichtstärke der MOSLEDs ist gut genug, eine QDots[®]800-Farbstoff-Emission bei 800 nm zu erzeugen. weitere Erläuterungen sind im Text zu finden

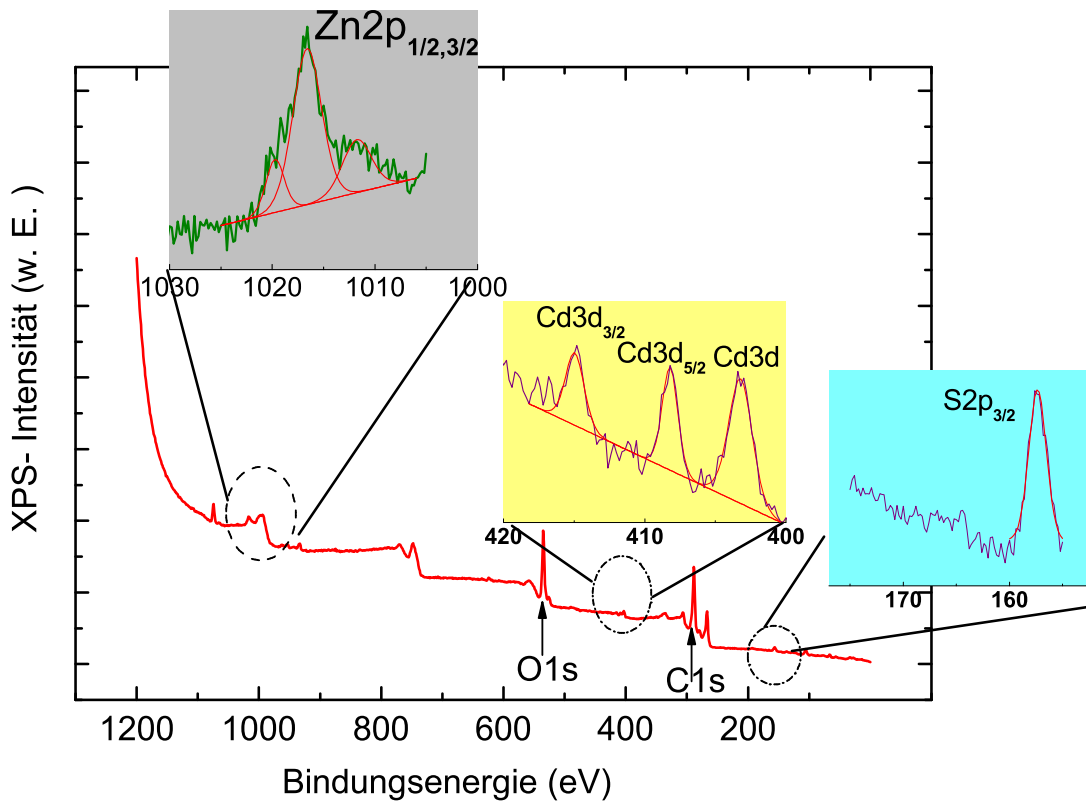


Abbildung 4.3.10: XPS- Übersichtsspektrum des QDots[®]-Farbstoffs mit einem Carboxyl-Hüllenmolekül

cm^{-1} mittels FTIR- Messung bzw. um die Bindungsenergien von den elektronischen Energieniveaus $\text{Zn}2p_{\frac{1}{2}, \frac{3}{2}}$ und $\text{S}2p$ mittels XPS- Messung untersuchen. In der Abbildung 4.3.10 wird ein Übersichtsspektrum des QDots[®]-Farbstoffs mit dem Carboxyl-Hüllenmolekül dargestellt. In dem Spektrum sind Teilspektren mit großer Scanzahl für die Bindungsenergien der Niveaus $\text{Zn}2p_{\frac{1}{2}, \frac{3}{2}}$ (grau), $\text{S}2s$ (cyan) und $\text{Cd}(3d, 3d_{\frac{5}{2}}, \text{und } 3d_{\frac{3}{2}})$ (gelb) zu sehen. Die Bindungsenergie des $\text{Zn}2p_{\frac{1}{2}, \frac{3}{2}}$ Peaks liegt bei 1016 eV mit zwei breiten Schultern bei 1020 und 1011 eV. (mit einem FWHM von 3.43 bzw. 3.46 eV [117] [118]. Das Energieniveau $\text{S}2p_{\frac{3}{2}}$ besitzt in gleicher Weise einen breiten Peak bei 157.3 eV (FWHM von 2.46 eV) [117]. Im Gegensatz dazu besitzen die Elektronischen Energieniveaus der Elemente im QDot-Kern eine schmalere Peakbreite und konnten nur für Cadmium gemessen werden. Die Bindungsenergien für $\text{Cd}(3d, 3d_{\frac{5}{2}}, \text{und } 3d_{\frac{3}{2}})$ liegen bei 403.22, 408.21 und 415 eV [116]. Diese XPS-Ergebnisse des QDots[®]-Farbstoffs sind Ausgangsdaten für die Auswertung der Referenzlösung (QDots[®]800-Farbstoff + Östrogen) und des Adsorptionsnachweises des

Tabelle 4.3.2: Gemessene Bindungsenergien (BE) des an die SiO₂-Oberfläche adsorbierten QDots[®]-Farbstoffs

Element	Peak BE(eV)	FWHM(eV)	Literatur(eV)
Si2p	106.25	1.89	-
C1s	288.57	1.64	-
C1sA	290.05	1.3	-
C1sB	291.66	1.43	-
Cd3d	403.22	2.04	404.5 [116]
Cd3d _{5/2}	408.21	1.34	-
Cd3d _{3/2}	414.95	1.61	-
O1s	535.12	2.3	-
O1sA	531.76	2.03	-
Zn2p _{1/2} , _{3/2} A	1016.6	3.43	-
Zn2p _{1/2} , _{3/2} B	1019.73	2.18	1021.6 [117]/ 1021.8[118]
Zn2p _{1/2} , _{3/2} C	1011.75	3.46	-
S2p _{3/2}	157.34	2.01	161.6 [117]

Rezeptors an der SiO₂-Oberfläche (QDots[®]800-Farbstoff + hER α). Weitere gemessene Elemente des an der SiO₂-Oberfläche adsorbierten QDots[®]-Farbstoffs sind in der Tabelle 4.3.2 zusammengefasst.

Wegen seiner optischen Eigenschaften und seines Hüllenmoleküls aus Carboxylgruppen ist der QDots[®]-Farbstoff der ideale Kandidat zur Realisierung der Referenzlösung, die im Kap. 4.5 ausgeführt wird.

4.4 Östrogen

4.4.1 Biologischer Hintergrund

Cholesterin ist ein Steroidbestandteil tierischer Membranen und wird aus Rinder-Rückenmark oder dem Wollwachs von Schafen gewonnen. Das Cholesterinmolekül ist die Vorstufe der fünf Hauptklassen von Steroidhormonen: **Progestagene**, **Glucocorticoide**, **Mineralocorticoide**, **Androgen** und **Östrogen** (Abbildung 4.4.1). Diese Hormone sind wirkungsvolle Signalmoleküle, die eine Reihe von Körperfunktionen regulieren. Progesteron und Progestagene bereiten den Uterus für die Einnistung des befruchteten Eis vor und sind außerdem für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft verantwortlich. Androgene (wie etwa Testosteron) bewirken die Ausprägung der sekundären männlichen, Östrogene (z.B. Östron) die der

sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale. Die Hormone werden in den folgenden Organen synthetisiert: Gestagene im Corpusluteum, Östrogene in den Ovarien, Androgenen in den Hoden, Glucocorticoide und Mineralocorticoide in der Nebennierenrinde. Steroidhormone

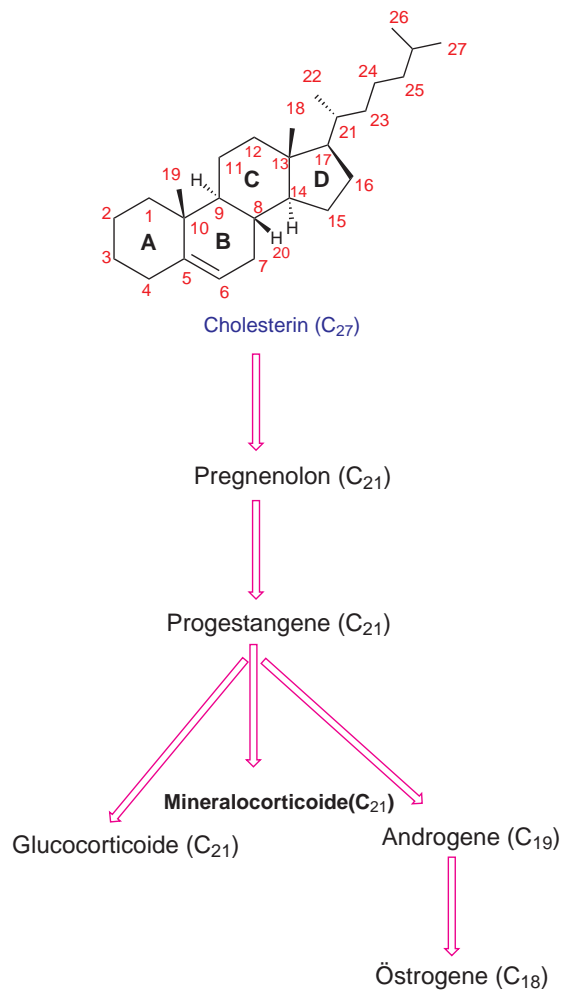


Abbildung 4.4.1: Schematische Darstellung der biologischen Östrogensynthese [4].

sind kleine, einander relativ ähnliche Moleküle, die sehr unterschiedliche Wirkung haben, da bereits geringe strukturelle Unterschiede Wechselwirkung mit jeweils anderen spezifischen Rezeptoren ermöglichen [4]. Hormone sind hochaktiv; noch bei größter Verdünnung entfalten sie signifikante Wirkungen. Zum Beispiel: Adrenalin im Blut erhöht den Blutdruck noch in einer Verdünnung von 1: 400 000 000 [119].

4.4.2 Struktur

Cholesterin besitzt axiale Methylgruppen: Die C-19-Methylgruppe ist an C-10, die C-18-Methylgruppe an C-13 angehängt (siehe Abbildung 4.4.1). Die C-18- und die C-19-Methylgruppen liegen über der Ebene, die durch die vier Ringe gebildet und durch einen ausgezogenen Bindestrich symbolisiert wird. Einen solchen Substituenten bezeichnet man als β -orientiert oder β -Stellung. Ein Substituent, der unter der Ringebene liegt, ist α -orientiert. Axiale Substituenten sind sterisch behindert und damit weniger reaktiv als äquatoriale Substituenten (liegen in der Ringebene) [4] [120]. Die Steroide sind asymmetrische Moleküle, und können deshalb je nach Dipolmoments- oder Polarisierbarkeitsänderung mit Hilfe von FTIR und Raman gemessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Typen von Hormonen verwendet (siehe Tabelle 3.2.2 (1-3), S.43), deren Struktur mittels FTIR und Raman untersucht wurde. Das Molekül ist wegen dem hydrophoben Zentrums an der B- und C-Ring leicht in Acetonlösung löslich. Das Östrogen ist geringfügig im dest. Wasser mischbar. Nachdem man das Östrogenmolekül auf dem KBr Substrat adsorbiert hat, bildet sich aufgrund der Flüchtigkeit der Acetonlösung ein kristalliner Film. In der Abbildung 4.4.2 wird ein Ramanpektrum solcher Hormonkristallite eines Estrons Steroidmoleküls auf einem KBr-Substrat gemessen. Die starken Raman- und FTIR- Banden, die den Schwingungen unpolarer Mehrfachbindungen und den Gleichtaktschwingungen des Gerüsts zuzuordnen sind, werden in der Tabelle 4.4.1 aufgelistet und mit den Literaturwerten verglichen.

Tabelle 4.4.1: Raman und FTIR Schwingungsfrequenzen der Steroidhormone Estron (E_1), β -Estradiol (E_2) und Estron 3-methyl-ether(E_3). Weitere Abkürzungen lauten: w (schwach), s (stark), vs (sehr stark), R und IR (die zugeordnete Region für die Raman- bzw. FTIR-Messung)

Raman(cm^{-1})	FTIR(cm^{-1})	Raman- FTIR-Frequenzen (cm^{-1})-Lit./Zugeordnete Region
$E_1/E_2/E_3$	$E_1/E_2/E_3$	-
-/-/-	-/455w/-	
-/-/-	-/458w/-	
472/-/-	-/-/495w	
495/-/-	-/-/-	
509/-/-		500[121] gesättigte β -Steroide(R)
572/-/-	-/574w/578sw	
583/-/-	582w/-/-	-
625/-/-	-/-/-	
643/-/-	-/-/640w	

-/-/-	667w/698w/667s	-
720/-/-		725[121] Aromatischer Ring A(R)
733/-/-		
786/-/-	786w/786s/786s	-
824/-/-	817s/817s/817s	-
-/-/-	875s/871s/-	
-/-/-	-/887ws/890s	
933/-/-	917w/925w/910s	-
961/-/-	-/-/994s	955[121] C=O/C=C konjugierte Gruppierung (R)
984/-/-		
1003/-/-	1006s/1025w/1010s	1003 C-CH ₃ [121]
1040/-/-	1052s/1053vs/1037s	-
1088/-/-	1083w/-/1083w	-
1134/-/-	1153w/1133w/1133w	1151 [121] C-C Valenzschwingung (R)
1187/-/-	-/-/1187s	
1215/-/-	-/-/1211	1230-1270[121] C=O/C=C konjugierte Gruppierung(R)
1225/-/-		
1251/-/-	1260s/1253vs/1238s	
1286/-/-	1289s/1288s/-	1270-1290[121] C=O/C=C konjugierte Gruppierung (R)
-/-/-	-/1315w/1315s	
1395/-/-	1392s/1365w/1373w	1350 [121]
1436/-/-	1442w/1438w/1446w	1440[122]CH ₂ ,CH ₃ Deformationsschwingung (R)
1453/-/-		
1462/-/-	-/1473w/1475vs	1468 [123], asymmetrische Deformationsschwingung CH ₃
1500/-/-	1496s/1500vs/1500w	
1582/-/-	1581s/1585s/1581w	1590-1670 [121] Aromatische Ring A (R)
1620/-/-	1627w/1623w/1608s	1660-1675 [121] [122] C=C Streckungsschwingung (R)
-/-/-		1690-1750 [121](R)
-/-/-	1716vs/1743w/1735vs	
-/-/-		2105[121] C≡C (R)
2841/-/-		2830-2815 [124] CH ₃ O (IR)
2854/-/-	2850vs/2850vs/2850s	2970-2850[124] CH ₂ ,CH ₃ Schwingung
2886/-/-		
2913/-/-	2915vs/2919vs/2919s	2970-2850[124] CH ₂ ,CH ₃ Schwingung (R)
2937/-/-		2970-2850[124] CH ₂ ,CH ₃ Schwingung (R)

2950/-/-/	2950/-/2946(69)w	2970-2850[124] CH ₂ ,CH ₃ Schwingung (R)
2971/-/-/		
3000/-/-/	-/-/3031s	3000-3100[124], Aromatisch C-H (IR)
-/-/-/	-/-/3116s	
-/-/-/	3350s/3386w/-	-C≡C-H Valenzschwingung [124](IR)
-/-/-/		O-H Schwingung in Carboxylsäure [124](IR)
-/-/-/	3417w/3456w/3448vs	Gebundenes O-H [124](IR)
-/-/-/	3714w/-/-	-

Hier werden das Ramanspektrum in der Abbildung 4.4.2 sowie die FTIR-Spektren in der Abbildung 4.4.3 diskutiert. Im Bereich **[800-400]** cm⁻¹ zeigt das Spektrum starke Raman-Banden des Molekülgerüsts. Dabei wird neben einem starken akustischen Phonon auch ein optisches Phonon gemessen. Insbesondere die starke Bande bei 720 cm⁻¹ deutet auf den aromatischen Ring A hin, welcher charakteristisch zur Identifizierung der meisten Steroidhormone ist [121] [125]. Mehr noch haben Steigner et al. [121] eine Bande mittlerer Intensität bei 500 cm⁻¹ gemessen, die für gesättigte 5 β -Steroide typisch ist, und die bei den 5 α -Steroiden sehr schwach auftaucht. Dies bestätigen auch die Messungen von Pouskouleli et al. bei 500 \pm 5 cm⁻¹ [125]. Wir haben eine Bande bei 495 cm⁻¹ für das optische Phonon und bei 509 cm⁻¹ für das akustische Phonon gemessen, ohne dass das Estron Molekül an der Stelle C5 über eine β oder α Orientierung verfügt (siehe Abbildung 3.2.9). Zur Identifizierung der verschiedenen Steroidhormonklassen wurde in [125] ein Diagramm, welches auf Ramandaten basiert, entworfen. Die 500 cm⁻¹ Banden treten mittels FTIR-Messung für die drei Steroidhormone (Tabelle 4.4.1) mit einer schwachen Intensität auf. Im Bereich zwischen **[1350-800]** cm⁻¹ zeigten sowohl die Raman- als auch FTIR-Spektren mit einer schwachen bis starken Intensität die "wagging", "rocking" und "twisting" Deformationsschwingung der CH₂ und CH₃-Gruppen, zugleich mit der Valenzschwingung der Einfachbindung C-C und C-O des Molekülgerüsts. Im Bereich **[2800-1580]** cm⁻¹ konnten wir die Valenzschwingung der Carbonylgruppen C=O bei 1620 und 1582 cm⁻¹ mittels Raman messen, die auch im FTIR-Spektrum mit höherer Intensität auftritt, und nicht zuletzt die starke Valenzschwingung der Doppelbindung C=C zwischen 1716 cm⁻¹ (für E₁) und 1735 cm⁻¹ (für E₃). Die Valenzschwingung der Dreifach- und Doppelbindungen C≡C, C=C und C=O zwischen 2130 und 2230 cm⁻¹ [121] konnten sowohl bei Raman- als auch bei FTIR-Spektren nicht beobachtet werden. Im Bereich **[4000-2800]** cm⁻¹ treten die CH-Valenzschwingungen der gesättigten Molekülteile oder Olefinischen C-Atome ins-

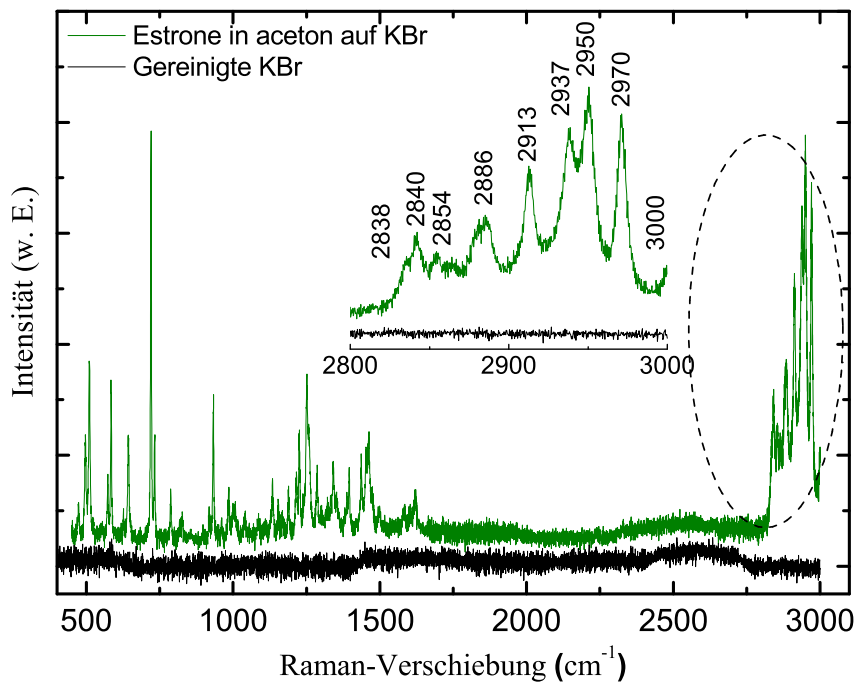


Abbildung 4.4.2: Ramanspektrum des Estron-Steroidmoleküls. Das Estron-Steroidmolekül wurde als kristalliner Film auf einem KBr-Substrat gemessen.

besondere zwischen 3030 und 3070 cm^{-1} im Ramanspektrum auf. Schließlich treten die OH-Valenzschwingung im Gegensatz zur IR-Spektroskopie bei den Raman-Spektren nur sehr schwach auf. Das gilt auch für die Valenzschwingung der H- Atome an C=C-Gruppen bei 3350 cm^{-1} (E_1). Die O-H Streckungsbande zwischen **[3625-3200]** cm^{-1} ist die charakteristische Bande in einem Steroidspektrum. Ihr Auftauchen und Verschwinden im Spektrum ist charakteristisch für die Bindungsstelle des Steroidhormons.

4.5 Referenzlösung

In diesem Abschnitt wird die Referenzlösung diskutiert (nähere Erläuterungen sind im Kap. 3.2.4 zu finden), und es wird darum gehen, eine gezielte Bindung des QDots[®]-Farbstoffs zu erreichen. Das heißt eine optimale Bindung des QDots[®]-Farbstoffs an der Position 17 zu erzielen und eine Bindung an der Position 3 zu vermeiden, sodass die hohe Affinität (10^{10-15}) der hER α -Rezeptor-Östrogen-Bindung durch den Ring A im Östrogengerüst

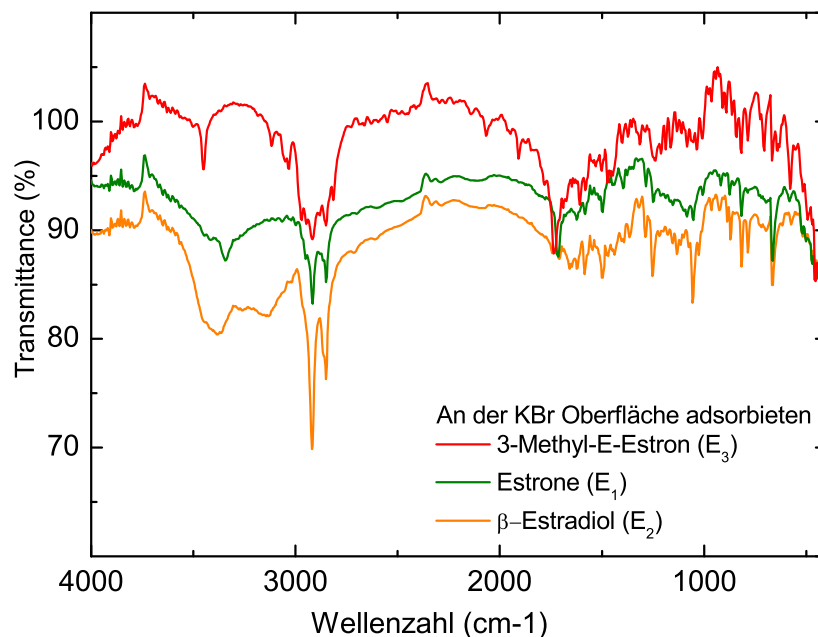


Abbildung 4.4.3: FTIR-Spektrum der Steroidhormone von β -Estradiol (orange), Estrone (grün) und Estron 3-methyl-ether (rot)

aufrechterhalten bleibt. In der Abbildung 4.5.1 wird ein FTIR-Spektrum einer mit Referenzlösung adsorbierten SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche gezeigt. Die Referenzlösung ist im Abschnitt 3.2.4 beschrieben und besteht aus β -Estradiol -17-Hydroxysuccinimid, das mit einem QDots[®]-Farbstoff markiert ist. Das Spektrum **A** stellt eine mit SSC-APMS silanierte SiO₂-Oberfläche dar. Der Silanfilm weist die gleiche Form mit den charakteristischen Merkmalen der aminofunktionelle Gruppe bei 1565 cm⁻¹ und der symmetrischen und anti-symmetrischen Streckung \equiv Si-O-CH₃ bei 2850 und 2915 cm⁻¹ auf. Das Spektrum **B** zeigt die adsorbierte Referenzlösungsschicht auf dem Silanfilm. Man erkennt eine Zusatzstruktur im Bereich [1700-1000] cm⁻¹. Das Referenzlösungsprotokoll, das in der Abbildung 3.2.10 schematisch dargestellt ist, sieht vor, dass das Hüllmolekül des QDots[®]-Farbstoffs an der Position 17 des Östrogengerüsts (Abbildung 4.4.1) bindet. Die Position 17 ist mit einem N-Hydroxysuccinimid Derivat modifiziert, das dazu führt, dass der Ring A im Östrogengerüst frei bleibt. Diese Information steckt im Spektrum **B** und kann erst abgelesen werden, wenn man ein Differenzspektrum aus den Spektren A und B bildet. Darauf hin gibt das Differenzspektrum **B-A** die Substruktur im Bereich [1700-1000] cm⁻¹ des Spektrums **A** wieder, und zeigt einige wichtige Merkmale des β -Estradiolmoleküls. Einerseits erkennt

man die sehr starken, typischen CH_2 , CH_3 Schwingungen bei 2850 und 2915 cm^{-1} (siehe Tabelle 4.4.1), die mit den Banden $\equiv\text{Si-O-CH}_3$ des Silanfilms im Spektrum **A** überlagert sind. Andererseits zeigen sich die Banden der gebundenen O-H Valenzschwingung zwischen 3394 - und 3328 (Bereich 2), und die nicht gebundene O-H Valenzschwingung zwischen 3690 und 3400 (Bereich 1) [124]. Dies belegt eine optimale Bindung der Referenzlösung an der 17-Position des β -Estradiol -Gerüsts. Man kann den Bereich $[1700-1000]\text{ cm}^{-1}$

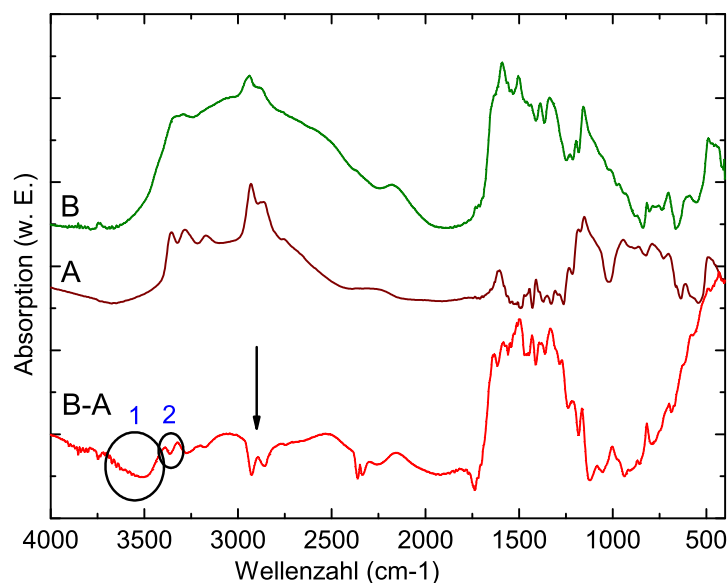


Abbildung 4.5.1: FTIR-Spektrum einer mit SSC-APMS silanisierten Oberfläche ohne (A), und mit östrogengebundenen QDots[®]800-Farbstoff (B), und die Differenz zwischen den Spektren A und B (B-A)

als Fingerabdruck des Hüllenmoleküls des QDots[®]-Farbstoffs mit der Bindungsstelle des β -Estradiolmoleküls betrachten. Die Bande bei 1590 cm^{-1} ist noch eine charakteristische Bande zu den vorher erläuterten Merkmalen des Rings A [121] (Tabelle 4.4.1). Weitere Schwingungsbänder in diesem Bereich wurden bei 1500 , 1438 , 1388 , 1338 , 1230 , 1195 und 1160 cm^{-1} beobachtet, konnten aber nicht eindeutig identifiziert werden.

In der Abbildung 4.5.2 wird ein XPS-Spektrum des Energieniveaus $\text{Zn}2p_{\frac{1}{2}, \frac{3}{2}}$ von einer mit QDots[®]-Farbstoff und Referenzlösung (Kreise) adsorbierten SiO_2 -Oberfläche dargestellt. Die Kurve nach der Adsorption der Referenzlösung zeigt nur einen schwachen Peak des Energieniveaus $\text{Zn}2p_{\frac{1}{2}, \frac{3}{2}}$, welcher ein kleines Maximum bei 1015.8 eV hat, und damit eine chemische Verschiebung von etwa 0.8 eV im Vergleich zum QDots[®]-Farbstoff mit der Ca-

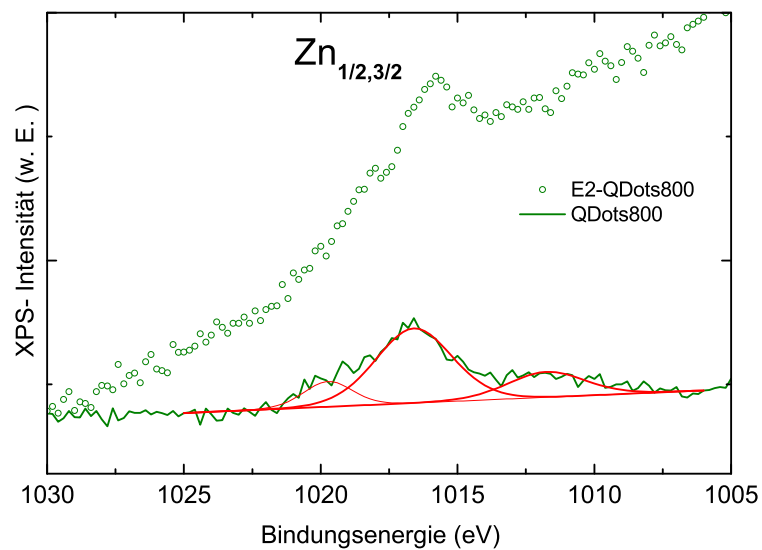


Abbildung 4.5.2: XPS-Spektrum einer mit QDots[®]-Farbstoff (grün) und Referenzlösung (Kreise) adsorbierten SiO₂-Oberfläche

boxylhülle (siehe Tabelle 4.3.2) aufweist. Mehr noch konnte man auch das Verschwinden der beiden Schultern bei 1020 und 1011 eV feststellen, was auf eine Belegung durch das Hüllenmolekül des QDots[®]-Farbstoffs mit β -Estradiol hindeutet.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass man eine Referenzlösung aus farbstoffmarkierten β -Estradiol durch eine optimale Bindung des QDots[®]-Farbstoffs an die 17-Position des β -Estradiolmolekül erfolgreich realisieren kann. Die FTIR-Messungen zeigen die charakteristischen Merkmale des Rings A, welcher die Bindung an den Östrogenrezeptor hER _{α} begünstigt.

5 Adsorption

5.1 Adsorption von L-Lysin an einer SSC-APMS silanisierten SiO₂-Oberfläche

In diesem Kapitel wird zuerst die Adsorption der Aminosäure L-Lysin an einer SSC-APMS silanisierten SiO₂-Oberfläche behandelt. Das Ziel ist eine Vorarbeit zu dem Rezeptorad-

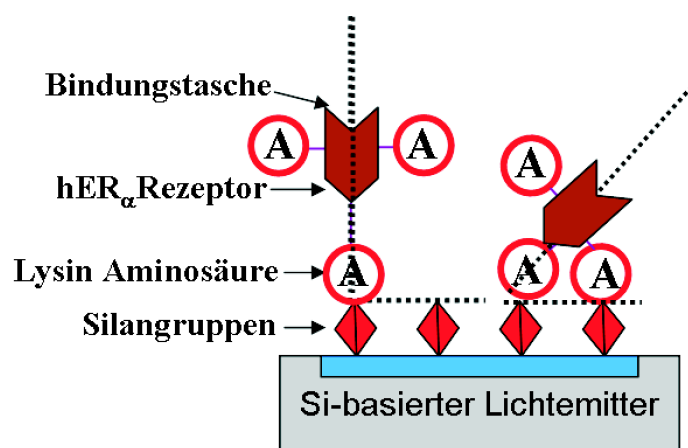


Abbildung 5.1.1: Schematische Darstellung einer der Immobilisierungsstrategien des Rezeptors an die mit SSC-APMS silanisierten Lichtemitter-Oberfläche

sorptionsschritt an der MOSLEDs -Oberfläche, die auch aus einer SiO₂-Schicht besteht, zu leisten. Zum einem bekommt man eine Information, wie sich die Silanschicht der SiO₂-Oberfläche, die bereits in 4.2 diskutiert wurde, in Anwesenheit einer adsorbierten Substanz, eines Adsorbats (z.B. eines Rezeptors), in Abhängigkeit des pH-Wertes verhält. Man kann sich eine Aminosäure als eine Hantel, die je ein Carboxyl- und ein Amino-terminiertes Ende besitzt, vorstellen. Mit der Änderung des pH-Wertes ändert das Aminosäuremolekül seine Ladung an einem der beiden Enden, wie in der Abbildung 5.1.2 schematisch dargestellt

ist, und bindet damit das Aminosäuremolekül je nach dem pH-Wert mit dem einen oder anderen Ende an die silanierte SiO₂-Oberfläche. Auf der SSC-APMS silanisierten SiO₂-Oberfläche sind aminofunktionelle Gruppen vorhanden, die reaktiv auf das Carboxylende des Lys.-Moleküls agieren. Außerdem besitzt der Östrogenrezeptor eine Bindungstasche, wie es schematisch in der Abbildung 3.1.1 dargestellt ist. Dem Sensor-konzept liegt eine optimale Adsorption des Östrogenrezeptors mit der Bindungstasche nach oben zugrunde, denn so kann das Schlüssel-Schloss Prinzip der Östrogen-Rezeptor-Bindung gewährleistet werden. Dafür könnte einer der Adsorptionsstrategien des Rezeptors an der mit SSC-APMS silanisierten SiO₂-Oberfläche so aussehen, dass der Rezeptor erst mit einem Derivat, z.B. L-Lysin (ein polares Molekül ähnlich wie Histidin mit einem isoelektrischen Punkt (PI) bei pH=9.59, d.h. elektrisch neutral [126]) modifiziert wird. Diese Untersuchungen werden genaue Details über das Hantelverhalten des L-Lysin-Aminosäuremoleküls, d.h. die Adsorptionsbedingungen, geben, die auf den Rezeptor übertragen werden können. Darüber hinaus werden XPS-Messungen der einzelnen Energieniveaus N1s und C1s und die FTIR-Messung der mit Lysin adsorbierten SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche, insbesondere im Bereich [2000-400] cm⁻¹ der aminofunktionellen Gruppen, als Funktion des pH-Wertes durchgeführt.

5 Adsorption 5.1 Adsorption von L-Lysin an einer SSC-APMS silanisierten SiO₂-Oberfläche

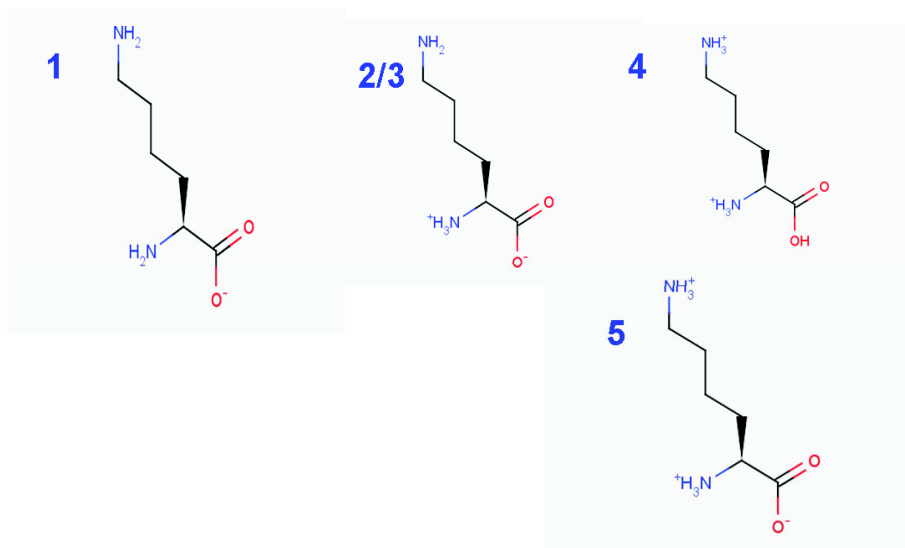
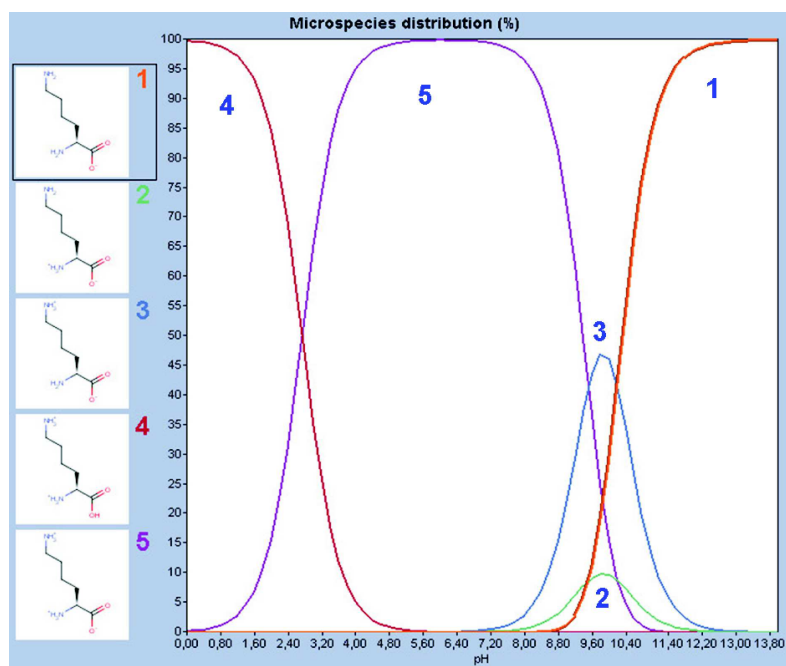


Abbildung 5.1.2: Schematische Darstellung der Häufigkeit der verschiedenen Dissoziationsstufen als Funktion des pH-Wertes (oben). Unten die entsprechende anionische (1), zwitterionische (2/3), Di-Kationische (4) und kationische (5) Molekülkonfiguration des Lysinmoleküls nach [127]

Es wurden 20 μ l einer 200-mmol L-Lysin-Lösung (siehe Tabelle 3.2.2) an die mit SSC-APMS silanisierte SiO₂-Oberfläche adsorbiert [128]. Durch eine Titration der Lysin-Lösung wurden 5 pH-Werte (2.5, 7.5, 8.7, 9.5 und 13) ausgewählt. Jeder pH-Wert beschreibt eine Dissoziationsstufe in der Abbildung 5.1.2, die als Molekülkonfiguration (1-5) dargestellt ist. Der Adsorptionsversuch wurde in einer Adsorptionskammer (die Silanisierungskammer wie in Abbildung 3.2.8 mit zusätzlichen zylindrischen Glasbehältern, wo die Proben eingebracht

und dann pipettiert werden) durchgeführt. In Abbildung 5.1.3 wird ein FTIR-Spektrum im

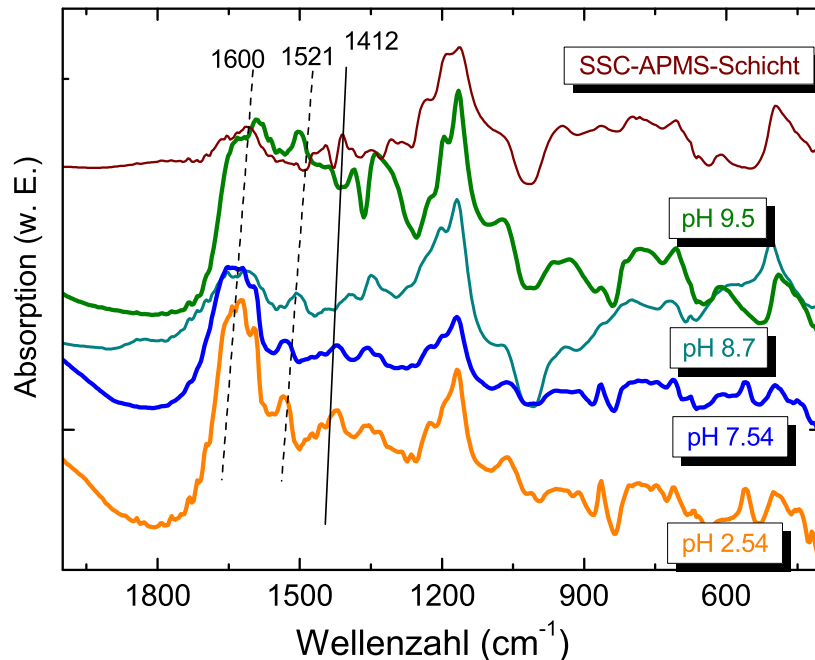


Abbildung 5.1.3: FTIR-Spektrum im Bereich [2000-400] cm⁻¹ des an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche adsorbierten Lysin-Aminosäure als Funktion des pH-Wertes. Die Entwicklung der Banden bei 1600, 1521 und 1412 cm⁻¹ wird durch die Linien dargestellt.

Bereich [2000-400] cm⁻¹ des an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche adsorbierten Lysins als Funktion des pH-Wertes dargestellt. Angefangen mit der SSC-APMS-Schicht (weinrot) wird die funktionelle Gruppe, die entweder als R-NH₂ bei 1565 cm⁻¹ oder als protonierte Aminogruppe NH₃⁺ bei 1600 cm⁻¹ erscheint, durch die Carboxylgruppe, die ebenfalls bei 1600 cm⁻¹ liegt, überlagert [129]. Das erkennt man an dieser Stelle (1600 cm⁻¹) als eine Zusatzstruktur des Adsorbats (der L-Lysin-Aminosäure). Die Schwingungsbande bei 1521 cm⁻¹ taucht bei allen pH-Werten auf und ist der symmetrischen Deformationsschwingung der Aminogruppe NH₃⁺ zuzuordnen [126] [130]. Der Peak bei 1412 cm⁻¹ ist der symmetrischen Streckung der COO⁻-Gruppe [126] [128] zuzuordnen. Insbesondere der Peak um die 1600 cm⁻¹ bekommt eine symmetrische Form erst bei pH= 2.5 und 7.5 (orange bzw. blau), was auf eine optimale Adsorption des Lysin-Moleküls hindeutet. Dieser Sachverhalt wird genauer mittels XPS-Messung untersucht. Dabei werden Schwingungsbanden um den 1600 cm⁻¹-Peak der Carboxylgruppe des Lysinmoleküls mit den Bindungsenergien der Ener-

geniveaus des Kohlenstoffes bzw. Stickstoffes als Funktion des pH-Wertes verglichen. In den Abbildungen 5.1.4 und 5.1.6 wird ein XPS-Spektrum des C1s bzw. N1s Energieniveaus einer mit L-Lysin adsorbierten SSC-AMPS SiO₂-Oberfläche als Funktion des pH-Wertes dargestellt. Vom höchsten pH-Wert ausgehend wurden die Bindungsenergien des C1s Ener-

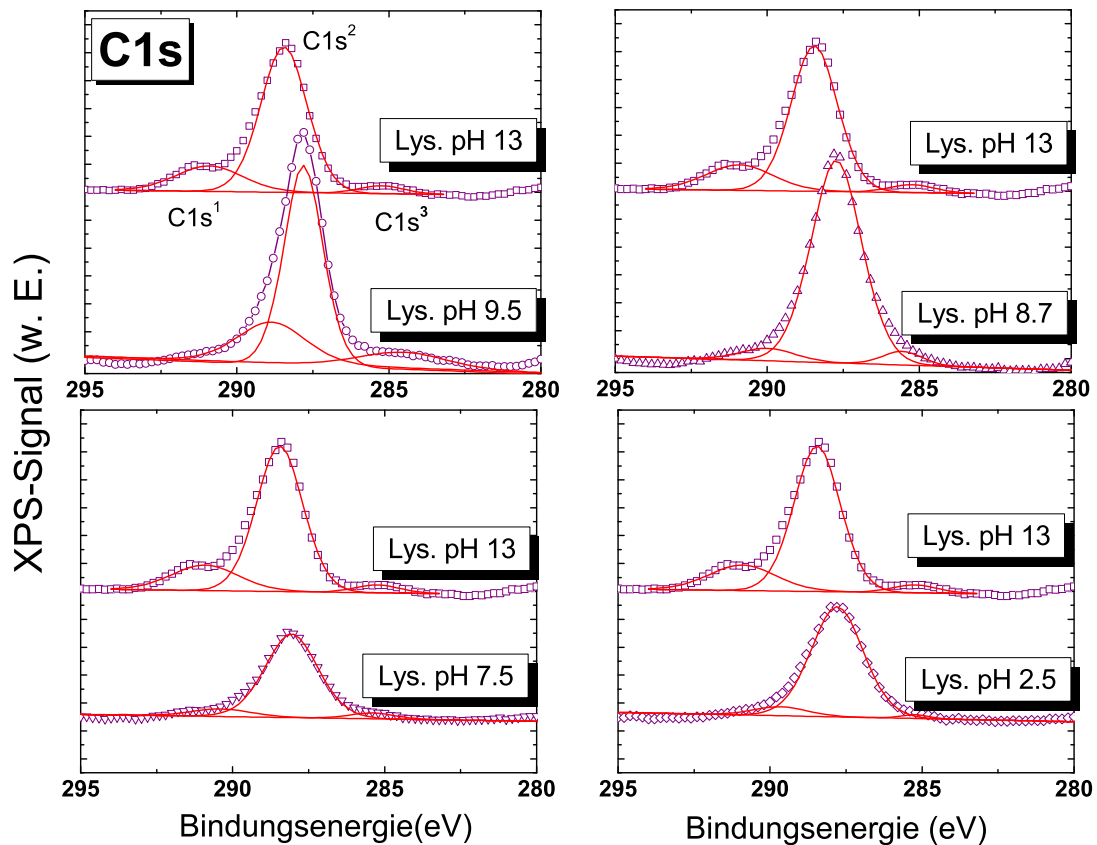


Abbildung 5.1.4: XPS-Spektrum des C1s Energieniveaus einer mit L-Lysin adsorbierten SSC-AMPS SiO₂-Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes

geniveaus verglichen. Es wurden drei Bindungsenergien des C1s Energieniveaus bei 285 ± 1 eV [131] [132], 287 ± 1 eV [133] und 290 ± 1 eV [134] und eine circa 1eV große chemische Verschiebung bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Insbesondere die C1s-Peak-Intensität bei 290 eV (**C1s¹**) und 285 eV (**C1s³**) nehmen bei abnehmendem pH-Wert ab. Nolting et al. [96] untersuchten die Lysin-Aminosäure in der Lösung als Funktion des pH-Wertes (pH=13, 9.5 und 5.5) mittels der Synchrotronstrahlung bei Energien von 380, 480 und 600 eV und fanden sechs Peaks für die C1s Energieniveaus zwischen 294 und 289 eV, was auf die zusätzlichen Freiheitsgrade in der Lösung im Vergleich zu der Oberfläche

zurückzuführen ist. Dabei war der Peak bei 290 eV der breiteste der sechs Peaks.

In Abbildung 5.1.5 werden die drei gemessenen C1s-Peak-Intensitätsflächen als Funktion

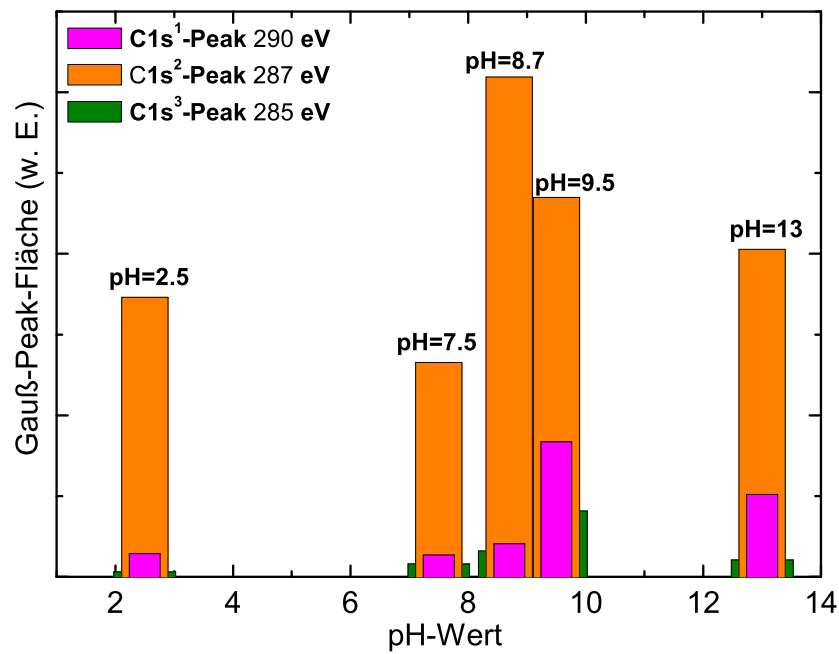


Abbildung 5.1.5: Gemessenen C1s-Peak-Intensitätsflächen als Funktion des pH-Werts. Die optimale Adsorption des Lysin an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche liegt bei pH= 7.5. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

des pH-Werts aufgetragen. Die Abnahme der drei C1s-Peak-Intensitätsflächen wird als Adsorption des Lysin-Moleküls an der SSC-APMS silanisierten SiO₂-Oberfläche interpretiert. Wie bereits erwähnt wirken die aminofunktionellen Gruppen reaktiv auf das Carboxylende der Lysin-Aminosäure. Je kleiner diese Intensitätsfläche, desto größer der Adsorbatsgehalt (Lysin) an der SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche. Dabei zeigt pH= 7.5 die optimale Adsorption des Lysins an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche an. Dem entspricht der kationische Zustand des Lysin Moleküls in der Abbildung 5.1.2 (2). Die Tabelle 5.1.1 fasst die gemessenen Bindungsenergien und deren Halbwertbreiten (FWHM) der C1s- und N1s Energieniveaus für die verschiedenen pH-Werte zusammen.

In Abbildung 5.1.6 wird ein XPS-Spektrum des N1s Energieniveaus einer mit Lysinmolekül adsorbierten SSC-AMPS SiO₂-Oberfläche (a) dargestellt. Die funktionalisierte Oberfläche zeigt die gewohnte Bindungsenergie Position bei 402.8 eV (N1s⁰), welche durch die Silanierung auf die protonierte Amino funktionelle Gruppe NH⁺₃ des Silanfilms zurückzuführen

Tabelle 5.1.1: Gemessene C1s- und N1s-Bindungsenergien (BE) und deren Halbwertsbreiten (FWHM) der an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche adsorbierten Lysin-Aminosäure als Funktion des pH-Wertes. Schwankungen der einzelnen Energiewerte sind auf die Unsicherheiten, die bei den pH-Messungen aufgetreten sind, zurückzuführen.

BE/FWHM(eV)	pH=2.5	pH=7.5	pH=8.7	pH=9.5	pH=13
C1s ¹	289.65	290.37	289.99	288.86	290.91
FWHM	2.15	2.39	2.21	2.74	2.68
C1s ²	287.79	288.06	287.72	287.81	288.45
FWHM	2.1	2.12	2.04	1.57	1.87
C1s ³	285.22	285.4	285.56	284.53	285.23
FWHM	1.09	1.81	1.57	3.5	1.79
N1s ¹	404.14	404.18	404.36	403.86	404.33
FWHM	1.75	1.91	1.23	1.9	1.94
N1s ⁰	402.27	402.4	402.21	402.16	402.48
FWHM	2.13	1.62	2.43	1.83	1.7

ist (siehe Kap.4.2.3). Nach der Lysin-Adsorption bei pH 13 (**b**) taucht der Peak **N1s¹** bei 404.3 eV auf, welcher auf die zwei mit der gleichen Bindungsenergien liegende Aminogruppen NH₂ des Lysinmoleküls, welche dem anionische Zustand entspricht (siehe Abbildung 5.1.2 -**1**). Dieses Ergebnis bei pH 13 wurde auch von Nolting et al. bei der mit Synchrotronstrahlung untersuchte Lysinmolekül in der Lösung gemessen [96]. Bei pH 9.5 (**c**) nähert sich das Lysinmolekül dem isoelektrischen Punkt (liegt bei pH 9.74), wo eine Aminogruppe des Lysins neutral bleibt, und eine zweite protoniert wird (es entspricht dem zwitterionischen Zustand in Abbildung 5.1.2 -**2/3**). Das kann man im Spektrum (**c**) feststellen. Dabei nimmt die Amplitude des Peaks **N1s¹** ab, während sich die Halbwertsbreite des Peaks **N1s⁰** von 1.7 eV auf 1.83 steigt und das Maximum von 2.43 eV bei pH 8.7 (**d**) erreicht (weitere FWHM-Angaben sind in Tabelle 5.1.1 zu finden). Bei dem gleichen pH-Wert sinkt die Amplitude des Peaks **N1s¹** auf das Minimum. Das heißt, dass die Aminogruppen zum großen Teil vom neutralen Ladungszustand in den protonierten Ladungszustand NH⁺₃ übergehen. Damit ist die Konfiguration des Lysinmoleküls in Abbildung 5.1.2 -**4** erreicht. Nolting et al. machten die gleiche Beobachtung bei pH 5.5. Allerdings ändert sich die Bindungsenergie von 404.3 eV zu der höheren Bindungsenergie bei 406.5 eV [96]. Bei pH 7.5 (**e**) nimmt die Amplitude des Peaks **N1s⁰** stark ab, welche auf die Bindung des Lysinmoleküls durch die Carboxylgruppe an die silanisierte Oberfläche hindeutet. Dieses Resultat bestätigt die Auswertungen des C1s Energieniveaus, die beim gleichen pH Wert eine optimale Adsorption des Lysins an die SiO₂-Oberfläche ergaben.

In Abbildung 5.1.7 werden die zwei gemessenen N1s-Peak-Intensitätsflächen als Funktion

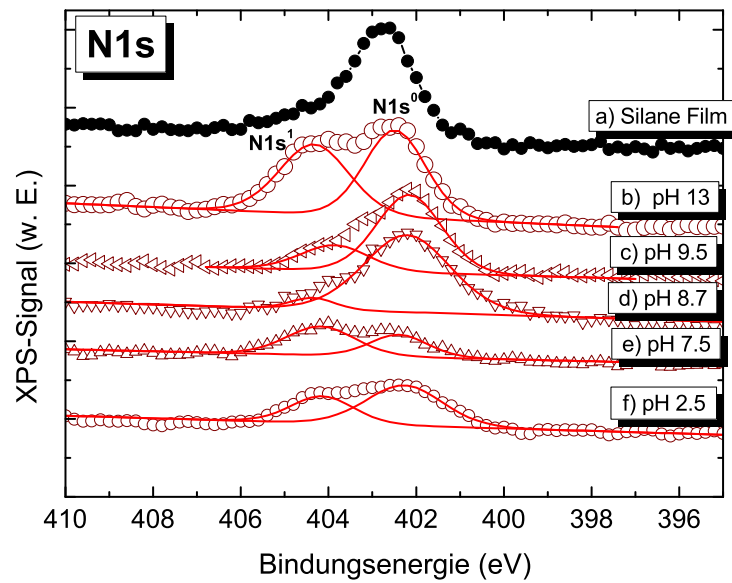


Abbildung 5.1.6: XPS-Spektrum des N1s Energieniveaus einer mit L-Lysin adsorbierten SSC-AMPS SiO₂-Oberfläche in Abhängigkeit des pH-Wertes

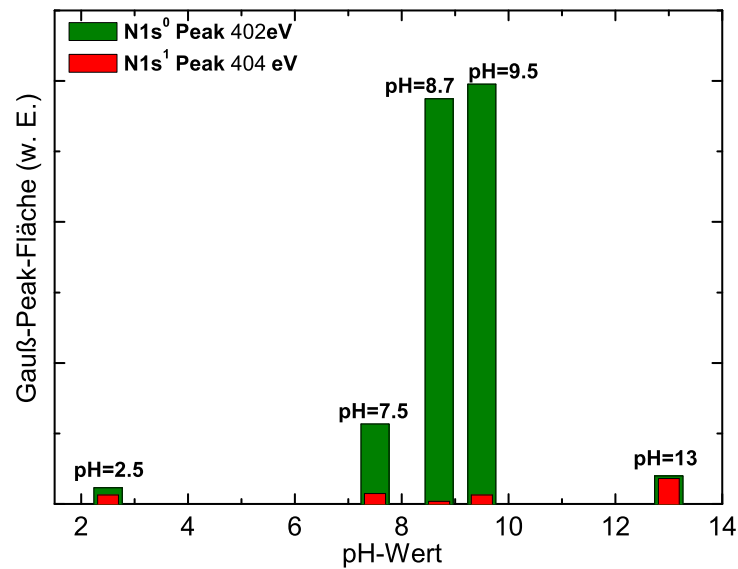


Abbildung 5.1.7: Gemessene N1s-Peaks-Intensitätsflächen als Funktion des pH-Werts. Nähere Erläuterungen sind im Text zu finden.

des pH-Werts aufgetragen. Das pH-Optimum für die optimale Adsorption des Lysins ist nicht eindeutig aus den Intensitätsflächen wie bei C1s ablesbar. Dennoch kann man die beiden pH 8.7 und 9.5 aufgrund der großen Anteil von der protonierten Aminogruppen ausschließen. Im Säurebereiche ist mit der Gefahr biologische Aktivität der Biomoleküle zu beeinflussen gebunden und damit fällt der pH 2.5 als Optimum aus. Es bleibt der Wert pH 7.5 als das Optimum für eine optimale Adsorption des Lysins an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche anzunehmen, welches mit der Auswertung der C1s Energieniveau in Abbildung 5.1.5 übereinstimmen.

5.2 Immobilisierung des hER_{α} -Östrogenrezeptors

5.2.1 Biologischer Hintergrund

Da die Östrogene hydrophobe Moleküle sind [4], diffundieren sie ohne weiteres durch Zellmembrane. In der Zelle heften sie sich an hochspezifische, lösliche Rezeptorproteine [135]. Der Östrogenrezeptor gehört zu der Super-Familie der Zellkernhormonrezeptoren und ist einer von 50 Proteinen dieser Familie, die im menschlichen Genom codiert sind [4] [100]. Der humane Östrogenrezeptor (hER_{α} wurde laut Hersteller (siehe Tabelle 3.2.6) mit Hilfe der Virenexpression der Familie Bucalovieren mutiert, die auch in der Gentechnologie zur Erzeugung von komplexen Eukaryotenproteinen in Zellkulturen verwendet wird [136]. Der hER_{α} -Rezeptor besteht aus 595 Aminosäuren mit Amino N-terminiertem Methionin und Carboxyl C-terminiertem Valin und besitzt einen isoelektrischen Punkt bei pH= 7.68 [100]. Alle Rezeptoren haben einen ähnlichen Mechanismus [137] [138]: Nach dem sich der Rezeptor an ein Signalmolekül (**Ligand**) im Körper bindet, heftet sich der Komplex aus Rezeptor und Ligand in der DNA an spezifische Stellen, den sogenannten **Östrogen-Response-Elementen** (EREs), an, und beeinflusst damit spezifisch die Expression einzelner Gene [4] [100]. Die EREs-Domäne hat die folgende Aminosäuresequenz **5'-AGGTCANNNTGACCT-3'** [139]

¹. Aufgrund der Symmetrie dieser Sequenz bindet sich der Rezeptor als Dimer an solcher Stelle. Schwabe et al. untersuchten diese Bindungsstelle mittels Röntgen-Kristallographie und NMR (Nuclear Magnetic Resonance) [141]. Sie fanden heraus, dass bei der Bindung an das Signalmolekül die Dimerbildung erfolgt, und dass dann der Komplex Rezeptor-Dimer mit sehr großer Affinität an die EREs-Domäne gebunden wird, welche wiederum an die

¹Die Konvertierung der Aminosäuresequenzen der EREs-Domäne ergibt: Serine (agg →ucc), Serine (tca → agu), Threonine (tga →acu) Glycine (cct → gga) [140]

DNA-bindende Domäne bindet [141] [142]. Diese bindende Domäne liegt mehr in der Mitte des Moleküls und besteht aus Cys-Zinkfingerproteinen, wo ein Zinkatom Chelatgebunden an vier Cystein-Aminosäuren ist [141] [143] [4] [100].

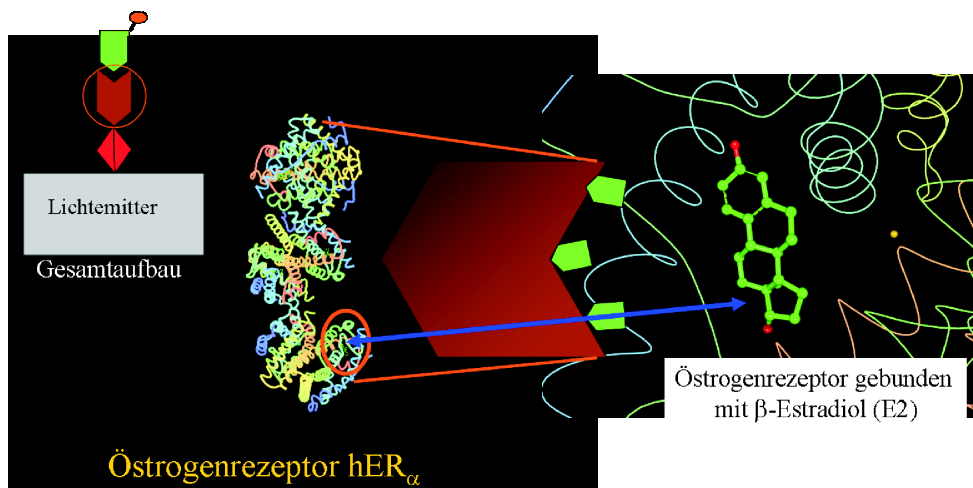


Abbildung 5.2.1: Simulationsausschnitt der hER_{α} -Rezeptor- β -Estradiol-Bindung. Die Simulation wurde nach 1HCQ.pdb in [144] durchgeführt.

5.2.2 Immobilisierung des hER_{α} -Östrogenrezeptors auf der SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche

Im Rahmen dieser Arbeit wird der hER_{α} -Rezeptor in isolierter Form verwendet. Es geht an erster Stelle um die Immobilisierung des Rezeptors auf den Silangruppen auf der SiO₂-Oberfläche, um eine optimale Bindung des Östrogen-Rezeptor Komplexes zu ermöglichen, wie in der Abbildung 5.2.1 schematisch dargestellt wird. Dadurch könnte die Messgenauigkeit des Sensors erheblich verbessert werden. Ein funktionierender SPR (surface plasmon resonance)-Sensor mit Hilfe der Östrogen-Rezeptor-Bindung ist bereits von Butala et al. realisiert worden [145] [146]. Die Abbildung 5.2.1 enthält auch einen Simulationsausschnitt dieser Bindung. Die Bindungstasche des Rezeptors soll nach der Immobilisierung auf den Silangruppen nach oben gerichtet sein. Wie bereits in 5.1 erwähnt, könnte einer der Immobilisierungsstrategien so aussehen, dass der Rezeptor mit einem Derivat (z.B. Lysin oder Histidine (His)) [147] modifiziert wird und dann auf der silanisierten MOSLED-Oberfläche immobilisiert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die aus den Lysin Untersuchungen gewonnene Ergebnisse dazu genutzt werden können, um eine kontrollierte Immobilisierung des Rezeptor-Derivats zu erzielen. Dadurch binden sich die Rezeptoren unter einem

bestimmten Winkel an die Oberfläche, die die Andockstelle für Östrogenmoleküle in der Bindungstasche des Rezeptor zugänglich machen. Eine andere Immobilisierungsstrategie, die in 3.2.5 beschrieben ist, wurde in diesem Schritt verwendet. Dabei wurde ein an den QDots[®]655-Farbstoff gebundener hER_{α} -Rezeptor immobilisiert, und mittels PL (siehe 3.3.5) untersucht. Diese Markierungsmethode mittels QDots[®]-Farbstoff Bindung und anschließend der PL Messung wurde an Krebszellen [148] [149], an Peptiden [150] und an Antikörpern [151] erfolgreich durchgeführt. Der verwendete QDots[®]655-Farbstoff emittiert bei

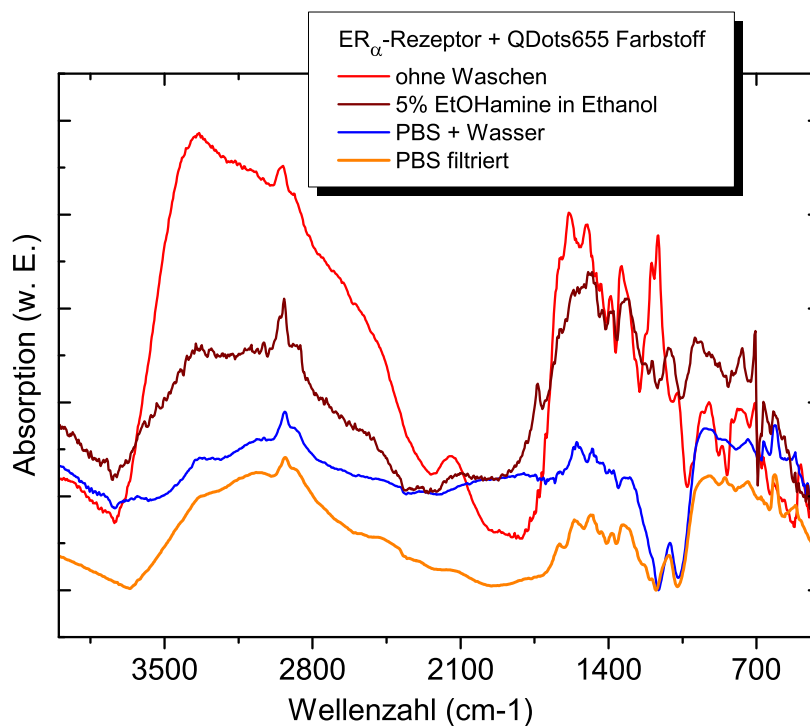


Abbildung 5.2.2: FTIR-Spektrum einer mit hER_{α} -Rezeptor -QDots[®]655-Farbstoff immobilisierten SiO_2 -Oberfläche nach den verschiedenen Waschmethoden.

655 nm und liegt damit weit ab von der Emissionslinie bei 800 nm des zweiten QDots[®]800-Farbstoffs der Referenzlösung. Die immobilisierten hER_{α} -Rezeptor -QDots[®]655-Farbstoff (Recpt-FS655)-Komplexe auf der SSC-APMS- SiO_2 -Oberfläche wurden dann gewaschen, um die Fremdmoleküle und nicht gebundenes Recpt-FS655 zu beseitigen. In Abbildung 5.2.2 wird ein FTIR-Spektrum einer mit Recpt-FS655 immobilisierten SSC-APMS- SiO_2 -Oberfläche nach verschiedenen Waschmethoden dargestellt. Die nicht gewaschene (rot) SiO_2 -Oberfläche zeigt einen starken Untergrund im Vergleich zu den übrigen Proben. Der Untergrund ist nach der Immobilisierung mit der filtrierten (siehe 3.2.5) Recpt-FS655-

Lösung (orange) gering. Die mit 5 % Ethanolamin in Ethanol gewaschene Probe zeigt einen geringen Untergrund nur im Bereich um 3000 cm^{-1} (weinrot). Im Bereich $[3000-2800]\text{ cm}^{-1}$ ist die Si-Propylgruppe des Silanfilms sehr gut zu erkennen. Die Peaks im Bereich $[1700-1000]\text{ cm}^{-1}$, die auf die gleiche Weise bei der Untersuchung der Referenzlösung (vgl. die Abbildung 4.5.1) auftauchen, sind auf die Bindungsstelle im Hüllmolekülbereich des QDots[®]-Farbstoffs zu dem hER_{α} -Rezeptor zurückzuführen. Die Schwingungsbanden in diesem Bereich konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Dennoch liefern die FTIR-Messungen bei dem Vergleich der verschiedenen Waschmethoden eine qualitative Auswertung, um die optimale Waschmethode einzuschätzen. Des Weiteren wurde das Waschen der immobilisierten Recpt-FS655 mit PBS als geeignete Waschmethode verwendet. In Abbildung 5.2.3 wird eine PL-Messung der silanisierten SiO_2 -Oberflächen nach der

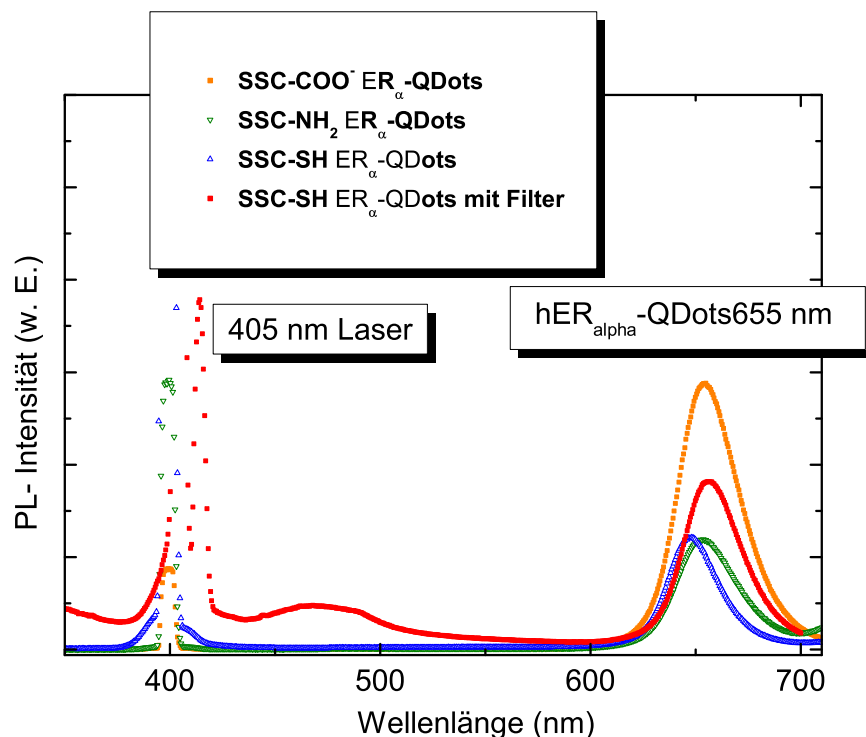


Abbildung 5.2.3: PL-Spektrum von den silanisierten SiO_2 -Oberflächen nach der Immobilisierung der mit QDots[®]655-Farbstoff gebundenen hER_{α} -Rezeptoren

Immobilisierung der mit QDots[®]655-Farbstoff gebundenen hER_{α} -Rezeptoren dargestellt. Dabei wurden drei silanierte SiO_2 -Oberflächen mit NH_2 -, COO^- - und SH -funktionellen Gruppen verwendet. Eine wiederholte Messung mit SH -funktionellen Gruppen wurde mit filtrierter Recpt-FS655-Lösung durchgeführt (rot). Bei dieser Messung wurde die Konzen-

tration des Östrogenmoleküls auf $1\mu\text{M}$ eingestellt. Die höchste PL- Intensität wurde bei der SSC-silanisierten- SiO_2 -Oberfläche mit Carboxyl-funktioneller Gruppe gemessen, was eine bessere Belegung mit den Rezeptoren bedeutet (orange). Ohne Filtrierung der Recpt-FS655-Lösung wurde bei den silanisierten Oberflächen mit NH_2 - bzw. mit SH-funktionellen Gruppen eine ähnliche Belegung mit Rezeptoren erzielt (grün bzw. blau). Die wiederholte Messung an der mit SH-funktionellen Gruppen silanisierten SiO_2 -Oberfläche unter Verwendung der Filtrierung der Recpt-FS655-Lösung zeigt eine deutlich bessere PL- Intensität (rot). Das bedeutet, dass eine bessere Immobilisierung mit Hilfe der Filtrierung erreicht werden kann.

6 Östrogennachweis

6.1 Die Anordnung der Bio-Komponenten

Um die Anordnung der Bio-Komponenten nachweisen zu können, wurden SiO_2 -Oberflächen mit SSC-APMS silanisiert, worauf die Recpt-FS655, wie in 5.2.2 beschrieben, immobilisiert wurden. Die Proben wurden mit PBS gewaschen. Eine Referenzlösung (mit QDots[®]800-Farbstoff gebundenen β -Estradiolmoleküle) wurde wie in 3.2.4 präpariert. Zwei Wasserproben wurden mit zwei Östrogenkonzentrationen von $1 \mu\text{M}$ - und 1mM versetzt. Die weiteren Messschritte sind ausführlich im Sensorconcept in 3.1 beschrieben. Die Wasserprobe wird auf der mit Recpt-FS655 immobilisierten SiO_2 -Oberfläche aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wird die Probe mit dest. Wasser gespült, um die nicht gebundenen Östrogenmoleküle zu beseitigen. Die Rezeptoren sollen mit den Östrogenmolekülen belegt werden. Schließlich wurde die Referenzlösung aufgebracht, wodurch die übrigen Rezeptoren mit den markierten β -Estradiol-Molekülen gesättigt werden. Die Proben wurden unter das Mikroskop gebracht und mit einem externen Laser bestrahlt, wie in 3.3.5 beschrieben ist. Die Messung dient dazu, eine qualitative Messung zur Anordnung der Bio-Komponenten und der Reihenfolge der im Sensorconcept in 3.1 beschriebenen Messschritte zu überprüfen. Wie in der Abbildung 6.1.1 gezeigt wird, sind die PL-Intensitäten bei 655 nm bei den beiden Testmessungen (μM - (blau) und mM - (grün) Östrogenkonzentration) gleich, was auf die gleiche Belegung der silanisierten Oberflächen mit den Rezeptoren hindeutet. Das zeigt auch die gute Reproduzierbarkeit der Immobilisierung mit Recpt-FS655 an. Das Messsignal bei 800 nm der Referenzlösung für die beiden Proben deutet daraufhin, dass es keinen großen Unterschied macht, ob man eine 1mM oder $1 \mu\text{M}$ Konzentration misst. Da beim Aufbringen der Wasserproben auf der mit Recpt-FS655 immobilisierten Oberfläche wegen der hohen Konzentration ($1 \mu\text{M}$) sowieso fast alle Rezeptoren belegt sind, ist der Unterschied im Messsignal zwischen den Testmessungen gering. Hier ist darauf hinzuweisen, dass die Nachweisgrenze des Östrogenmoleküls im Trinkwasser 1ng/l beträgt (das entspricht einer Konzentration von 3pM). Die Testmessung zeigt insbesondere, dass das Zusam-

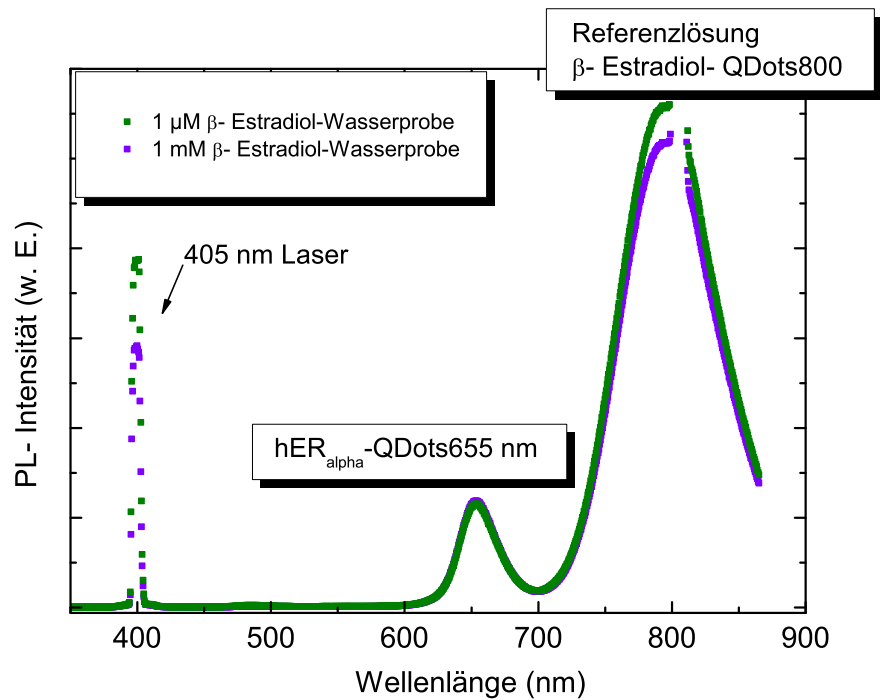


Abbildung 6.1.1: PL-Spektrum von den silanisierten SiO_2 -Oberflächen nach der Immobilisierung der mit Recpt-FS655, dem Aufbringen der Wasserproben und dem anschließenden Aufbringen der Referenzlösung (siehe Sensorkonzept in 3.1). Nähere Erläuterungen im Text.

menwirken der verschiedenen Schritte, nämlich die Silanisierung mit NH_2 -, COO^- - und SH-funktionellen Gruppen, die $h\text{ER}_\alpha$ -Rezeptor-Immobilisierung und die Östrogen- $h\text{ER}_\alpha$ -Rezeptor-Bindung, dazu führt, dass das Sensorkonzept, bestehend aus der Anordnung der Bio-Komponenten, dem Verfahren zu ihrer Herstellung sowie dem eigentlichen Meßverfahren erfolgreich realisiert werden kann.

6.2 Testmessung mit Hilfe des Si-basierten Lichtemitters

Für die Testmessung mittels EL wurden zwei Ge- und Tb-basierte Lichtemitter mit 24 Dots (300 μm Durchmesser) mit der SSC-APMS-Methode silanisiert. Die $h\text{ER}_\alpha$ Rezeptoren wurden mittels des Micro-Plotters[®] $\mu\text{-CP2.1}$ (siehe 3.3.8) mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (75, 37.5 und 18.75 pmol) auf den Lichtemitter-Oberflächen pipettiert. Das aufgebrauchte Volumen beträgt 2.5 nl pro Dotfläche. Eine mit β -Estradiol versetzte Wasserprobe mit einer Konzentration von 1 μM wurde auf die Lichtemitter-Oberflächen aufgebracht.

Dabei werden hER_{α} -Rezeptoren von den Östrogenmolekülen der Stichprobe gesättigt. Die Proben wurden mit TBST-Puffer mehrmals gewaschen. Danach wurde die Referenzlösung auf der Oberfläche aufgebracht und mehrmals mit der gleichen Pufferlösung gewaschen. Dieser Waschschrift ist im Sensorkonzept im Kap. 3.1 nicht vorgesehen. Das mehrmalige Waschen sollte die Dicke des Films reduzieren und dessen Transparenz erhöhen. Die Nachteile dieser Maßnahme besteht natürlich darin, dass die Bio-Komponenten (Silanfilm+ Östrogen der Testprobe + Referenzlösung) heruntergespült werden können, und damit die Effizienz des Sensors stark beeinträchtigt ist. Bei einer realen Anwendung würde man alle Substanzen in genau definierten Mengen mit Hilfe einer Mikrofluidik aufbringen, sodass dieses Problem nicht besteht. In Abbildung 6.2.1 wird ein EL-Spektrum von einem Ge- (a) und

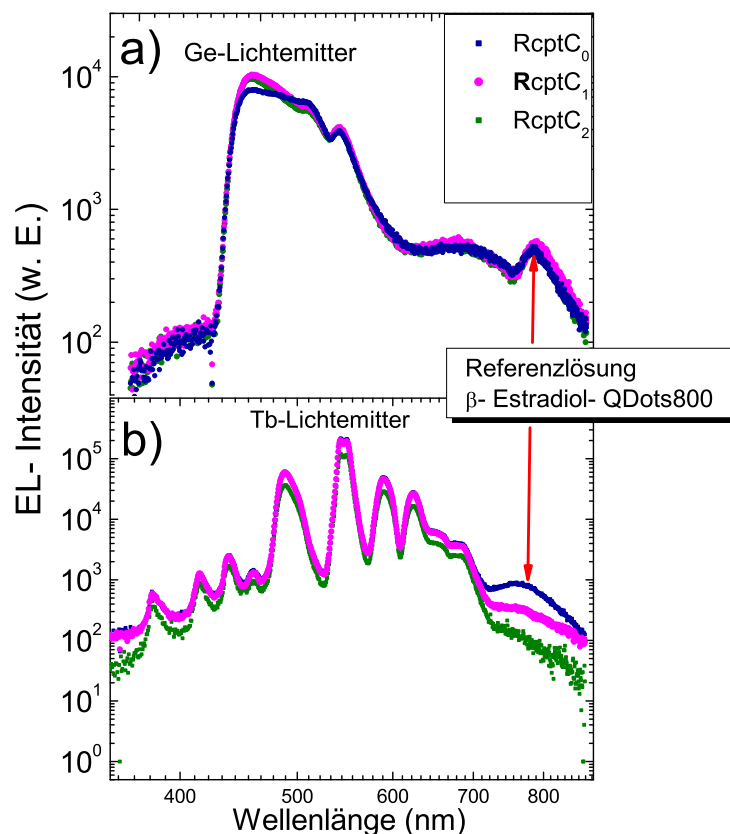


Abbildung 6.2.1: EL-Spektrum von einem Ge-(a) Tb-basierten (b) Lichtemitter nach der Immobilisierung der hER_{α} -Rezeptoren mit drei unterschiedlichen Konzentrationen ($RcptC_0 \geq RcptC_1 \geq RcptC_2$) mittels des Micro-Plotters, dem Aufbringen der Wasserprobe und schließlich dem Aufbringen der Referenzlösung (siehe Sensorkonzept in 3.1). Das Lichtsignal bei 800 nm ist proportional zu der Konzentration des Östrogens in der Wasserprobe.

Tb-basierten Lichtemitter (b) nach der Immobilisierung der hER_{α} -Rezeptor-Rezeptoren mit drei unterschiedlichen Konzentrationen ($RcptC_0 > RcptC_1 > RcptC_2$), dem Aufbringen der Wasserprobe und schließlich dem Aufbringen der Referenzlösung dargestellt. Dabei betrug der Injektionsstrom 300 nA bei einer konstanten Spannung von 160 V. Das Lichtsignal aus der Referenzlösung wurde für die drei Rezeptorkonzentrationen bei dem Ge- basierten Lichtemitter gemessen. Im Gegensatz dazu konnte bei dem Tb-basierten Lichtemitter nur bei der höchsten Rezeptorbelegung ein Lichtsignal der Referenzlösung gemessen werden. Der QDot besitzt eine breitbandige Absorption, die mit zunehmender Wellenlänge abnimmt (siehe Kap. 4.3.3). Dennoch ist die EL-Testmessung ein Beweis dafür, dass der Lichtemitter nach dem Passieren von mehreren Biofilmen auf der Oberfläche in der Lage ist, den Farbstoff anzuregen. Die Intensitätsberechnung ist in 2.4 zu finden. Die EL-Messung kann als Ergänzung zu den bereits im letzten Abschnitt dargestellten PL-Messungen verstanden werden, wo die Aufgabe in der ersten Linie darin bestand, das erfolgreiche Aufbringen der Bio-Komponenten aus den Schritten eins bis drei des Sensorkonzepts aus dem Kap. 3.1 zu belegen.

Dem systematischen Nachweis des Östrogens mit Hilfe des Si-basierten Lichtemitters liegen zwei weitere Untersuchungen zugrunde. Zum einen soll eine höhere Transparenz der Rezeptorbelegung erreicht werden, und zum anderen ist der Rezeptor mit einem Aminosäure-Derivat so zu modifizieren, dass nach der Immobilisierung auf der Lichtemitter-Oberfläche die Bindungstasche des Rezeptors frei bleibt. Als Derivat könnte eine Lysin-ähnliche Aminosäure eingesetzt werden, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde (Kap. 5.1). Ein solcher hER_{α} -Rezeptor mit einem Aminosäure-Derivat ist nicht käuflich erwerbbar, und wird im Rahmen des Bio-LED-Projekts (siehe Ausblick im nächsten Kap.) synthetisiert. Das wird zu einer kontrollierbaren und effizienten Immobilisierung der Rezeptoren führen.

7 Zusammenfassung

Bei der vorgestellten Arbeit wurde ein Sensorkonzept mit Hilfe der Si-basierten Lichtemitter (MOSLED) zum Östrogennachweis im Trinkwasser entwickelt. Das Sensorkonzept basiert auf der direkten Fluoreszenzanalyse, wobei eine im Chip integrierte Lichtquelle mit einer Bioschicht verwendet wird. Die Messung erfolgte durch die Detektion farbstoffmarkierter Östrogenmoleküle, die die hER_{α} -Rezeptoren belegen, die noch nicht durch die Messprobe gesättigt worden sind.

Um die Östrogenrezeptoren an die SiO_2 -Oberfläche anzubinden, wurden organofunktionelle Silane als Haftvermittler verwendet, die sich an ein anorganisches Substrat haften und funktionelle Gruppen wie die Amino-, Carboxyl-, und Thiolgruppen für eine kovalente Bindung des Rezeptors an die MOSLED-Oberfläche zur Verfügung stellen.

Mittels eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SSC (Spraying Spin Coating)-Verfahrens wurden Silangruppen an die SiO_2 -Oberflächen und anschließend an die MOSLED-Oberfläche gebunden. Dieses Verfahren besteht aus zwei Prozessschritten: Die Hybridisierung ermöglicht eine endständige Belegung mit Hydroxygruppen, die in der Literatur in Verbindung mit Ultraschallbad und einer aufwendigen chemischen Behandlung beschrieben ist, was eine Ätzung der MOSLED-Oberfläche bewirken kann. Als Ersatzmethode kam eine In-situ-Hybridisierungsmethode zum Einsatz. Diese Methode wurde noch nicht an Oberflächen verwendet. Das Ausgangsmaterial dieses Verfahrens ist die MES-Katalyselösung, ein sogenannter Wasserkomplex. Die FTIR-Messungen zeigten eine Streckungsmode der Si-OH Bildung und eine Schwingungsbande bei 3687 cm^{-1} der Silanolgruppen, die ein Hydroxygruppen-Netzwerk an der Oberfläche bilden. Der zweite Prozessschritt der Silanisierung folgte in der Flüssigphase. Mit den vielen Nachteilen, die dieses Verfahren mit sich bringt, wie die große Oberflächenrauigkeit, eine ungeordnete Silangruppenschicht, und nicht zuletzt eine geringe Filmstabilität, wird die Silanisierung in der Flüssigphase in der Literatur nicht empfohlen, sodass das alleinige Eintauchen des Substrates in die Silanlösung nicht ausreichend ist, um chemisch stabile Silanfilme zu erreichen. Es wurde gezeigt, dass die schlechte Filmschichtqualität auf die hohe Hydrophobizität der Silanlösung zurückzuführen ist. Beim

SSC-Verfahren wird die Silanlösung gesprüht, und dadurch konnte der hydrophobe Effekt der Silanlösung, der beim Kontaktieren eines polaren Mediums eintritt, überwunden werden. Es wurde gezeigt, dass man mittels SSC-Verfahren erfolgreich die SiO₂-Oberflächen mit drei unterschiedlichen funktionellen Gruppen (Amin-, Carboxyl- und Thiolgruppen) funktionalisieren kann. Danach wurde das Verfahren auf die MOSLED-Oberfläche angewendet. Die EL-Messung zeigte eine transparente Silanschicht (bis zu 98 % Lichtdurchlässigkeit). Die Filmqualität wurde mit der Literatur [26] verglichen.

Eine Referenzlösung mit QDots[®]-Farbstoff markierten Östrogenmolekülen kommt zum Einsatz. Die verwendeten Farbstoffe sollen eine breite Stokesche Verschiebung besitzen, um das Lichtemittersignal von dem des mit Farbstoff markierten Östrogenmoleküls unterscheiden zu können. Die besten Ergebnisse wurden mit dem QDots[®]800-Farbstoff mit einem breiten Absorptionsspektrum und einer Emissionslinie bei 800 nm erzielt. Damit hat letztere einen ausreichenden Abstand von der Anregungswellenlänge der drei im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ge-, Gd- und Tb-basierten MOSLEDs.

Durch die TEM-Aufnahmen konnte ein Durchmesser der QDots[®]-Farbstoff-Prezipitate von 5 nm gemessen werden. Die Realisierung der Referenzlösung bestand darin, dass das Hüllenmolekül des QDots[®]-Farbstoffs an der 17-Position des Östrogengerüsts bindet, sodass der Ring A des Phenolrings im Östrogengerüst frei bleibt. In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass der Ring A für die Affinität zum Östrogenrezeptor verantwortlich ist. Die FTIR-Messungen an die Referenzlösung belegen eine optimale Bindung der Referenzlösung an der Position 17 des β -Estradiol -Gerüsts. Insbesondere im FTIR-Spektrum sind die nicht Valenzschwingung gebundenen OH-Gruppen zwischen 3690 und 3400 cm⁻¹ des Phenolrings erkennbar.

Der Ansatz dieser Arbeit basiert auf einer optimalen Adsorption des *hER α* -Rezeptor an die MOSLED-Oberfläche. In der Literatur ist bekannt, dass die Schlüssel-Schloß-Bindung der Östrogen-*hER α* -Rezeptor-Bindung über eine Bindungstasche stattfindet, indem das Östrogen sich an den Rezeptor andockt. Eine direkte Bindung des Rezeptors an die funktionelle Gruppe der SSC-silanisierten SiO₂-Oberfläche kann eine optimale Ausrichtung der Bindungstasche des Rezeptors nicht gewährleisten. Dafür wurden zwei Strategien entwickelt. Zum einen kann der Rezeptor mit einem Derivat vor der Adsorption an die MOSLED-Oberfläche modifiziert werden. Als Derivat wurde die L-Lysin-Aminosäure eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde die Adsorption des Lysins an die SSC-silanisierten-Oberflächen als Funktion des pH-Wertes untersucht. Es wurde mittels XPS-Messung die Bindungsenergien der N_{1s} und C_{1s} gemessen. Die Resultate der XPS-Messung des adsorbierten Lysins an die SSC-silanisierten SiO₂-Oberflächen wurden mit der Messung von Nolting et al. [96] ge-

messenen und mit den berechneten Bindungsenergien des Lysins in der Lösung verglichen. Die Auswertung des Adsorbatsanteils der an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche gebundenen Lysinmoleküle als Funktion des pH-Wertes belegten das erwartete Hantelverhalten des Lysinmoleküls, das die pH-Änderung bewirkt. Es wurde gezeigt, dass beim pH-Wert 7.5 eine optimale Absorption des Lysins an die SSC-APMS-SiO₂-Oberfläche erreicht werden kann. Die zweite Strategie besteht darin, eine Modifizierung des *hER_α*-Rezeptor mit einem QDots[®]655-Farbstoff nach [3] zu erzielen. Diese Bindungsstrategie hat im Gegensatz zu der Methode mittels des Lysins den Vorteil, dass die Immobilisierung mittels PL-Messung kontrollierbar ist. Mehrere Waschmethoden wurden erprobt, um die immobilisierten Proben von den nicht gebundenen Rezeptoren zu reinigen. Die FTIR-Messungen zeigten einen geringeren Untergrund bei den mit PBS gewaschenen Proben. Die Immobilisierung des Rezeptors wurde an drei SSC-silanisierte-Oberflächen mit Hilfe von Amino-, Carboxyl-, und Thiolgruppen durchgeführt. Die PL-Messungen zeigten, dass die beste Belegung mit dem *hER_α*-Rezeptor auf einer SSC-silanisierten-SiO₂-Oberfläche mit Carboxylgruppen erzielt wurde. Im gleichen Kontext zeigt die PL-Messung, dass die Filtrierung des *hER_α*-Rezeptor-QDots[®]655-Farbstoff-Komplexes eine deutlich bessere PL-Intensität ergibt.

Die Anordnung der Bio-Komponenten wurde mit Hilfe der PL-Messung nachgewiesen. Dabei wurden zwei mit Östrogen versetzte Wasserproben mit einer Konzentration von 1 mM und 1 μM präpariert. Es wurde gezeigt, dass für das gleiche Immobilisierungsprotokoll des *hER_α*-Rezeptors die gleiche PL-Intensität gemessen wurde. Das Messsignal des QDots[®]-Farbstoffs der Referenzlösung bei 800 nm mittels PL-Messung zeigt, dass es keinen messbaren Unterschied zwischen der 1 mM und 1 μM Lösung mit Östrogenkonzentration gibt. Das bedeutet, dass die Östrogenmoleküle alle Rezeptoren zur Sättigung geführt haben sollen, was in der Zukunft mit wesentlich kleineren Konzentrationen getestet werden muss.

Bezüglich des Messverfahrens mit Hilfe des Ge- und Tb- basierten Lichtemitters wurden drei Rezeptorkonzentrationen (75, 37.5 und 18.75 pmol) mittels des Micro-Plotters[®] μ-CP2.1 auf den Lichtemitter-Oberflächen pipettiert. Für den Test kam eine mit einer Konzentration von 1 μM β-Estradiol versetzte Probe zum Einsatz. Die EL-Messungen zeigten ein Messsignal der Referenzprobe beim Ge-basierten Lichtemitter für die drei Rezeptorbelegungen. Der Messtest beim Tb-basierten Lichtemitter zeigt ein Messsignal nur bei der Rezeptorbelegung mit der höchsten Konzentration. Hier ist darauf hinzuweisen, dass ein mehrmaliger Waschprozess mit TBST-Pufferlösung notwendig war, um die Transparenz der Rezeptorschicht zu erhöhen.

8 Ausblick

8.1 BMBF-Projekt: Bio-LED

Mittelfristig wird das Sensorkonzept der vorliegenden Arbeit im Rahmen des seit Juli 2009 im Rahmen der BMBF-Förderlinie „KMU-innovativ: Biotechnologie-Biochance“ geförderten Projekts Bio-LED, das bis Ende 2012 mit dem Ziel der Entwicklung einer neuartigen und miniaturisierten Sensorplattform für die selektive Bestimmung von Steroid-hormonell-wirksamen Substanzen in wässrigen Proben mittels Si-basierter Lichtemitter finanziert wird, weiter optimiert. Dabei werden in der ersten Phase des Projektes hER_{α} -Rezeptoren mit dem Histidin Derivat am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) synthetisiert und an den mit SSC-silanisierten MOSLED-Oberflächen immobilisiert. Das Aufbringen der Biokomponente wird mit Hilfe des Microplotters[®] der Firma GeSiM mbH (siehe 3.3.8) durchgeführt. Schließlich wird die Validierung des Systems von der Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik mbH (quo data GmbH) übernommen.

8.2 Legionellennachweis im Trinkwasser

Das Sensorkonzept der vorliegenden Arbeit konnte den Nachweis anderer Analyte motivieren. Wie die Tabelle 8.2.1 zeigt, käme der Nachweis anderer Analyte in Frage, wenn die entsprechende Schlüssel-Schloß-Bindung vorhanden ist. Im Rahmen der Vorbereitung einer

Tabelle 8.2.1: Mögliche Schlüssel-Schloß-Partner für andere Einsatzmöglichkeiten des Bio-LED [7]

Bio-Schlüssel	Bio-Schloß
Hormon	Rezeptor
Antikörper	Antigen
Enzyminhibitoren	Enzym

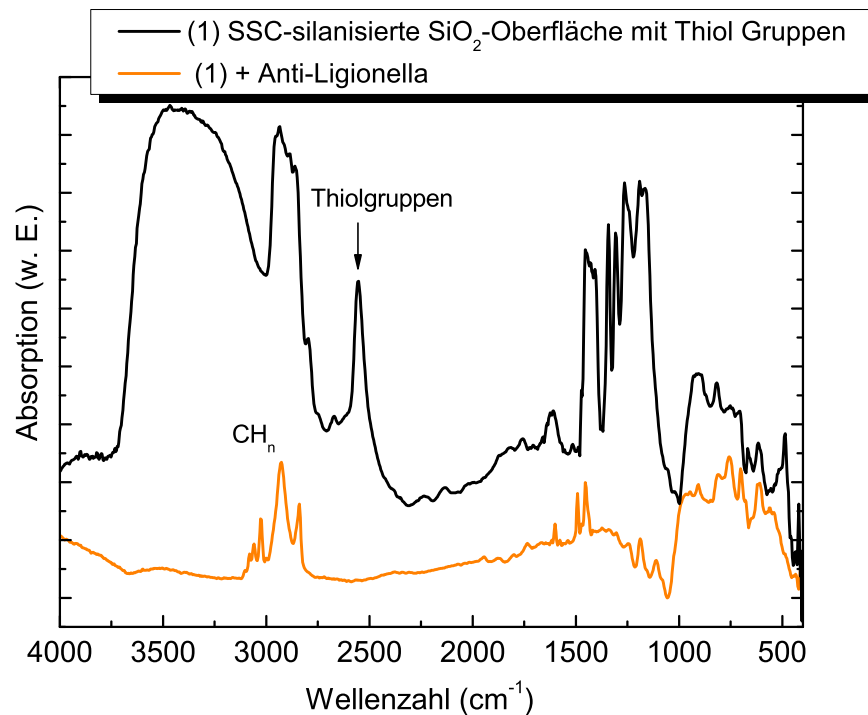


Abbildung 8.2.1: FTIR-Spektrum einer mit Anti-Legionella immobilisierten SSC- SiO₂-Oberfläche mit Thiol Gruppen

Zusammenarbeit mit dem Institut für Hydrobiologie der TU-Dresden wurde das Sensor-konzept für den Legionellennachweis im Trinkwasser getestet. Dabei wurde die Antikörper-Antigen-Bindung (Tabelle 8.2.1) verwendet. In der Abbildung 8.2.1 wird ein FTIR-Spektrum einer mit Anti-Legionellen immobilisierten SSC- SiO₂-Oberfläche mit Thiol Gruppen dargestellt. Es zeigt, dass die Anti-Legionella sich sehr gut an den Thiolgruppen immobilisieren lassen. Es ist durch die Abnahme der Schwingungsbande der Thiolgruppen bei 2500 cm^{-1} und das Auftauchen der symmetrischen und antisymmetrischen Schwingungen der CH_n Bande um die 3000 cm^{-1} im Spektrum erkennbar.

Literaturverzeichnis

- [1] Letzig, T. *Wasserstoffbindungen auf rekonstruierten InP(100) Oberflächen*. Ph.D. thesis, Fakultät für Physik und Astronomie der Ruhr-Universität Bochum (2005).
- [2] Cherkouk, C., Rebohle, L. & Skorupa, W. Patentnummer:de102008024526a1: Verfahren und anordnung zum nachweis von Östrogen in wässrigen lösungen (2009).
- [3] Hermanson, G. *Bioconjugate Techniques* (Elsevier, 2008).
- [4] Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. *Biochemie* (Elsevier, 2007).
- [5] Matinlinna, J. P., Areva, S., Lassila, L. V. J. & Vallittu, P. K. Characterization of siloxane films on titanium substrate derived from three aminosilanes. *Surface and Interface Analysis* **36**, 1314–1322 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1002/sia.1910>.
- [6] Meier, H. & Ullrich, V. *Grundlagen der Organischen Chemie* (Gustav Fischer Verlag, 1995).
- [7] Lottspeich, F. & Zorbas, H. *Bioanalytik* (Spektrum, 1998).
- [8] Schrödinger, E. *Was ist Leben?* (Piper Verlag (5. Deutsche Ausgabe 2001), 1944).
- [9] Weybridge (1996): European workshop on the impact of indocrine disruptors on human health and wildlife. Weybridge UK.
- [10] P.Béland *et al.* Toxic compounds and health and reproductive effects in st. lawrence beluga whales. *J. Great Lakes Res.* **19(4)**, 766–775 (1993).
- [11] Guillette, L. J. J., Pickford, D. B., Crain, D. A., A.Rooney, A. & Percival, H. F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentration in juvenile alligators

- living in a contaminated environment. *General and comparative endocrinology* **101**, 32–42 (1996).
- [12] Communities, E. Directive 2000/60/ec, establishing a framework for community action in the field of water policy. Tech. Rep., The European Parliament and of the Council (2000).
- [13] Cuong, N. V., Bachmann, T. T. & Schmid, R. D. Development of a dipstick immunoassay for quantitative determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water, fruit and urine samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **364**, 584–589 (1999). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s002160051390>.
- [14] Seifert, M. Luminescent enzyme-linked receptor assay for estrogenic compounds. *Analytical Bioanal. Chemistry* **378**, 684–687 (2004).
- [15] Guilbault, G. & Schmid, R. D. Biosensors for the determination of drug substances. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **14**, 133–145 (1991). URL <http://www.babonline.org/bab/014/bab0140133.htm>. <http://www.babonline.org/bab/014/0133/0140133.pdf>.
- [16] Mak, W. C., Ng, Y. M., Chan, C., Kwong, W. K. & Renneberg, R. Novel biosensors for quantitative phytic acid and phytase measurement. *Biosensors and Bioelectronics* **19**, 1029 – 1035 (2004). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFC-4B540FP-3/2/6dab15b04b63ca475ea64e9a023b3f2b>.
- [17] Renneberg, R., Kwong, W., Chan, C., Kunze, G. & Riedel, K. *Advances in Biosensors* **4**, 195–213 (1999).
- [18] Soto, A. M. *et al.* The e-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect.* **103**(Suppl 7), 113–122 (1995).
- [19] Riffeser, M. & Hock, B. Vitellogenin levels in mussel hemolymph—a suitable biomarker for the exposure to estrogens? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **132**, 75 – 84 (2002). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6W89-45HWNP0-6/2/a1253f187baed93ae083d1111715afbf>.

- [20] Routledge, E. J. & Sumpter, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 241–248 (1996).
- [21] Hock, B. & Seifert, M. Detecting estrogens in food and the environment. *Nature Biotechnology* **17**, 1162–1163 (1999).
- [22] Fine, T. *et al.* Luminescent yeast cells entrapped in hydrogels for estrogenic endocrine disrupting chemical biodetection. *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 2263 – 2269 (2006). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFC-4J6WP30-1/2/2cf4221a3b2a648d989c768c9c9ac910>.
- [23] Wozel, E., Hermanowicz, S. & Holman, H.-Y. Developing a biosensor for estrogens in water samples: Study of the real-time response of live cells of the estrogen-sensitive yeast strain *rmy/er-ere* using fluorescence microscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 1654 – 1658 (2006). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFC-4H21K6M-1/2/127971225dc563b58ed9c675ebdffa03>.
- [24] Rodriguez, S., Reder, S., de Alda, M. L., Gauglitz, G. & Barceló, D. Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. *Biosens Bioelectron.* **19**, 633–640 (2004).
- [25] Tschmelak, J. *et al.* Automated water analyser computer supported system (awacss) part i: Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design and networking. *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 1499 – 1508 (2005). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFC-4D60G3T-1/2/d2e5841f07a35347e4e1f2b6f226764d>. Selected Papers from the Eighth World Congress on Biosensors, Part I.
- [26] Hong, H. G., Jiang, M., Sligar, S. G. & Bohn, P. W. Cysteine-specific surface tethering of genetically engineered cytochromes for fabrication of metalloprotein nanostructures. *Langmuir* **10**, 153–158 (1994). URL <http://dx.doi.org/10.1021/1a00013a023>.
- [27] Libertino, S. *et al.* Layer uniformity in glucose oxidase immobilization on SiO_2 surfaces. *Applied Surface Science* **253**, 9116–9123 (2007).
- [28] Göpel & Ziegler. *Einführung in die Materialwissenschaften: Physikalisch-chemische Grundlagen und Anwendung* (Teubner-Verlag, 1996).

- [29] Good, R. J. & Girifalco, L. A. A theory for estimation of surface and interfacial energies. iii. estimation of surface energies of solids from contact angle data. *The Journal of Physical Chemistry* **64**, 561–565 (1960). URL <http://dx.doi.org/10.1021/j100834a012>.
- [30] Kammer, H. W. & Gräfe, F. Bestimmung der kritischen oberflächenspannung der adsorption fester polymere mittels flüssigkeitsspreitungsdruck. *Acta Polymerica* **36**, 378–381 (1985). URL <http://dx.doi.org/10.1002/actp.1985.010360709>.
- [31] Desjonqueres, M. C. & Spanjaard, D. *Concepts in surface physics* (Springer series in surface science (volume 30), 1993).
- [32] Heinrich, V. & Cox, P. A. *The surface science of metal oxides* (V.E. Heinrich and P. A. Cox, 1994).
- [33] Atkins, P. *Physical Chemistry* (Oxford university Press, 1998).
- [34] Maser, R. *Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces* (Wiley series in chemical engineering, 1996).
- [35] Adam, G., Lägner, P. & Stark, G. *Physikalische Chemie und Biophysik* (Springer, 1995).
- [36] Adsorption: Adsorptionsisotherme. www.uni-oldenburg.de/tchemie.
- [37] Freundlich, H. Über die Adsorption in Lösungen. *Z. Phys. Chem.* **57**, 385–470 (1907).
- [38] Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* **60**, 309–319 (1938). URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja01269a023>.
- [39] Witorsch, R. J. Endocrine disruption history: Fact and fantasy of gender bending chemicals. Tech. Rep., Physiology at the School of Medicine and Medical College of Virginia and Virginia Commonwealth University and Richmond VA. (2002).
- [40] Lodisch, H., Baltimore, D., Berk, A. & Darnell, S. Z. P. M. J. *Molekulare Zellbiologie* (Spektrum, 2001).
- [41] Bilitewski, U. *Biosensors for environmental monitoring* (Harwood academic publishers, 2000).

- [42] Abraham, G. E. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17beta. *J Clin Endocrinol Metab* **29**, 866–870 (1969). URL <http://jcem.endojournals.org>. <http://jcem.endojournals.org/cgi/reprint/29/6/866.pdf>.
- [43] Morf, W. E. Theoretical treatment of the current vs. time response of microelectrode arrays to changes of potential, concentration, or flow. *Analytica Chimica Acta* **341**, 121 – 127 (1997). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TF4-3S9K164-1P/2/30dd2c52af3998dc03f7c12db98f453f>.
- [44] Proll, G. *Biosensorssystem für vollständig automatisierte ultra-sensitve Multianalyt-Immunoassays*. Ph.D. thesis, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2005).
- [45] Winklmaier, M., Schuetz, A. J., Weller, M. G. & Niessner, R. Immunochemical array for the identification of cross-reacting analytes. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **363**, 731–737 (1999). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s002160051282>.
- [46] Prucnal, S. *Stable Metal-Oxide-Silicon structures containing Rare Earth and Germanium: Electroluminescence Mechanisms*. Ph.D. thesis, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland (2008).
- [47] Rebohle, L. *Lumineszenzeigenschaften ionenimplantierter nanokristalliner SiO₂-Schichten*. Ph.D. thesis, TU-Dresden (1999).
- [48] Gebel, T. *Nanocluster-rich SiO₂ layers produced by ion beam synthesis: Electrical and optoelectronic properties*. Ph.D. thesis, TU Dresden (2002).
- [49] Hest, P. *Instabilities in Silicon devices* (Elsevier Science Publishers B.V., North-Holland, 1986 (263)).
- [50] Fowler, N. *Proc. Roy. Soc. London ser.* **A119**, 173 (1928).
- [51] Hori, T. *Gate Dielectrics and MOS ULSIs* (Springer Series in Electronics and Photonics 34, Springer Verlag, 1997).
- [52] Fujii, M., Mamezaki, O., Hayashi, S. & Yamamoto, K. Current transport properties of SiO₂ films containing ge nanocrystals. *Journal of Applied Physics* **83**, 1507–1512 (1998). URL <http://link.aip.org/link/?JAP/83/1507/1>.

- [53] Ravindra, N. M. & Zhao, J. Fowler-nordheim tunneling in thin SiO_2 films. *Smart Materials and Structures* **1**, 197–201 (1992). URL <http://stacks.iop.org/0964-1726/1/197>.
- [54] DiMaria, D. J., Cartier, E. & Arnold, D. Impact ionization, trap creation, degradation, and breakdown in silicon dioxide films on silicon. *Journal of Applied Physics* **73**, 3367–3384 (1993). URL <http://link.aip.org/link/?JAP/73/3367/1>.
- [55] DiMaria, D. J. Defect generation under substrate-hot-electron injection into ultrathin silicon dioxide layers. *Journal of Applied Physics* **86**, 2100–2109 (1999). URL <http://link.aip.org/link/?JAP/86/2100/1>.
- [56] Cheng, X. R., Cheng, Y. C. & Liu, B. Y. Nitridation-enhanced conductivity behavior and current transport mechanism in thin thermally nitrated SiO_2 . *Journal of Applied Physics* **63**, 797–802 (1988). URL <http://link.aip.org/link/?JAP/63/797/1>.
- [57] Frenkel, J. On pre-breakdown phenomena in insulators and electronic semiconductors. *Phys. Rev.* **54**, 647–648 (1938).
- [58] Isai, G. I., Holleman, J., Wallinga, H. & Woerlee, P. H. Conduction and trapping mechanisms in SiO_2 films grown near room temperature by multipolar electron cyclotron resonance plasma enhanced chemical vapor deposition. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* **22**, 1022–1029 (2004). URL <http://link.aip.org/link/?JVB/22/1022/1>.
- [59] Yeagan, J. R. & Taylor, H. L. The poole-frenkel effect with compensation present. *Journal of Applied Physics* **39**, 5600–5604 (1968). URL <http://link.aip.org/link/?JAP/39/5600/1>.
- [60] Fujii, M., Inoue, Y., Hayashi, S. & Yamamoto, K. Hopping conduction in SiO_2 films containing C, Si, and Ge clusters. *Applied Physics Letters* **68**, 3749–3751 (1996). URL <http://link.aip.org/link/?APL/68/3749/1>.
- [61] DiMaria, D. J. *et al.* Direct observation of ballistic electrons in silicon dioxide. *Phys. Rev. Lett.* **57**, 3213–3216 (1986).
- [62] Schrader, B. *Infrared and Raman Spectroscopy* (VCH Weinheim, 1995).

- [63] Raman, C. V. & Krishnan, K. A new type of secondary radiation. *Nature* **121**, 501–502 (1928).
- [64] Smekal, A. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Die Naturwissenschaften* **43**, 873–875 (1923).
- [65] Mandal, O. *Erstellung und Validierung einer kombinierten NIR/Raman-Bibliothek zur Identitätskontrolle organischer und anorganischer Substanzen*. Ph.D. thesis, Gerhard-Mercator-Universität – Gesamthochschule Duisburg (1999).
- [66] Hacken, H. & Wolf, H. *Molekülphysik und Quantenchemie* (Springer, 1998).
- [67] Amey, R. & Chapman, D. *Biomembrane structure and function* (VCH Weinheim, 1984).
- [68] Göpel, H. *Oberflächenphysik des Festkörpers* (Teubner Studienbücher, 1994).
- [69] Seah, M. & Dench, W. Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standard data base for electron inelastic mean free paths in solids. *J.Surf. Int. Anal* **1**, 2 (1979).
- [70] Meier, U. *Grenzflächenverhalten und Morphologie des ZnO/Si-Heterokontaktes: Eine Photoemissionsstudie*. Ph.D. thesis, Technische Universität Cottbus (2004).
- [71] Meyerheim, H. L. *et al.* Wurtzite-type coo nanocrystals in ultrathin zncoo films. *Phys. Rev. Lett.* **102**, 156102 (2009).
- [72] Rebohle, L., Gebel, T., Skorupa, W. & Sun, J. Patentnummer: De 10 2005 052 582 a1: Si-basierter Lichtemitter mit verbesserter Lebensdauer und Stabilität (2007).
- [73] Gebel, T. & Howitz, S. Patentnummer: De 101 30 568 c2: Optoelektrisches Analysesystem für die Biotechnologie (2001).
- [74] Prucnal, S., Sun, J. M., Skorupa, W. & Helm, M. Switchable two-color electroluminescence based on a si metal-oxide-semiconductor structure doped with eu. *Applied Physics Letters* **90**, 181121 (2007). URL <http://link.aip.org/link/?APL/90/181121/1>.
- [75] Prucnal, S. *et al.* Optical and microstructural properties of doubly ge-si implanted sio2 layers. *Vacuum* **78**, 693 – 697 (2005). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TW4-4FW7PYY-6/2/98379cfc9e1369c08d25ad985e15516>.

Proceedings of the fifth International Conference on Ion Implantation and other Applications of Ions and Electrons (ION 2004).

- [76] Skorupa, W. *et al.* Rare earth ion implantation for silicon based light emission. *Solid state phenomena* **108-109**, 755–760 (2005).
- [77] Nazarov, A. *et al.* Quenching of electroluminescence and charge trapping in high-efficiency ge-implanted mos light-emitting silicon diodes. *Applied Physics B: Lasers and Optics* **87**, 129–134 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00340-006-2534-1>.
- [78] Cherkouk, C. *et al.* Spraying spin coating silanization at room temperature of a sio₂ surface for silicon-based integrated light emitters. *Journal of Colloid and Interface Science* **337**, 375 – 380 (2009). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHR-4WC115X-5/2/e5a4bdb02588f55734e4753c76ba1e9d>.
- [79] Gesim gmbh. http://www.gesim.de/front_content.php?idcat=39&lang=2.
- [80] Rebohle, L., von Borany, J., Fröb, H. & Skorupa, W. Blue photo- and electroluminescence of silicon dioxide layers ion-implanted with group iv elements. *Applied Physics B: Lasers and Optics* **71**, 131–151 (2000). URL <http://dx.doi.org/10.1007/PL00006966>.
- [81] Lehmann, J. *Correlation between electrical and optical properties of Europium doped SiO₂-layers*. Master's thesis, TU-Dresden (2009).
- [82] Rebohle, L. *et al.* Strong blue and violet photoluminescence and electroluminescence from germanium-implanted and silicon-implanted silicon-dioxide layers. *Applied Physics Letters* **71**, 2809–2811 (1997). URL <http://link.aip.org/link/?APL/71/2809/1>.
- [83] Litovskii, R. N. *et al.* The influence of defect surface layers on the capacitive properties of mos structures. *Physica Status Solidi (a)* **77**, 699–707 (1983). URL <http://dx.doi.org/10.1002/pssa.2210770236>.
- [84] Rebohle, L. & Skorupa, W. *Advances in Light Emitting Materials*, chap. MOS light emitting devices based on rare-earth ion implantation, 117–138 (Trans Tech Publications, 2008).

- [85] Sun, J. M., Rebohle, L., Prucnal, S., Helm, M. & Skorupa, W. Giant stability enhancement of rare-earth implanted SiO₂ light emitting devices by an additional SiON protection layer. *Applied Physics Letters* **92**, 071103 (2008). URL <http://link.aip.org/link/?APL/92/071103/1>.
- [86] Rebohle, L., Cherkouk, C., Prucnal, S., Helm, M. & Skorupa, W. Rare-earth implanted si-based light emitters and their use for smart biosensor applications. *Vacuum* **83**, S24 – S28 (2009). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TW4-4VKP3TX-B/2/f66af9179d1335f854baf9e03bd05a11>. Proceedings of the seventh International Conference on Ion Implantation and other Applications of Ions and Electrons (ION 2008), 16-19 June 2008, Kazimierz Dolny, Poland.
- [87] Bolivar, P. H. *et al.* Dynamics of excitation transfer in dye doped [pi]-conjugated polymers. *Chemical Physics Letters* **245**, 534 – 538 (1995). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFN-3YF4B9H-14/2/6fabb4f453b0509537b53bea0fa596a4>.
- [88] Sun, J. M. *et al.* Bright green electroluminescence from Tb³⁺ in silicon metal-oxide-semiconductor devices. *Journal of Applied Physics* **97**, 123513 (2005). URL <http://link.aip.org/link/?JAP/97/123513/1>.
- [89] Sun, J. M. *et al.* Electroluminescence properties of the Gd³⁺ ultraviolet luminescent centers in SiO₂ gate oxide layers. *Journal of Applied Physics* **99**, 103102 (2006). URL <http://link.aip.org/link/?JAP/99/103102/1>.
- [90] Ji, W. *et al.* A method for gene expression analysis by oligonucleotide arrays from minute biological materials. *Analytical Biochemistry* **331**, 329 – 339 (2004). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6W9V-4CBV26Y-7/2/3686251cb443b0e16246eb73b566b8dd>.
- [91] Pavlovic, E., Quist, P., Gelius, U. & Oscarsson, S. Surface functionalization of silicon oxide at room temperature and atmospheric pressure. *Journal of Colloid and Interface Science* **254**, 200–203 (2002).
- [92] F.J. Boerio, S. C., L. Armogan. The structure of aminopropyltrimethoxysilane films on irons mirrors. *J. Colloid Interface Sci.* **73(2)**, 416–424 (1980).

- [93] K.J., B., Barolo, A. & Dreyfuss, P. New evidence related to reactions of aminated silane coupling agents with carbon dioxide. *Journal of Adhesion Science and Technology* **5 (10)**, 785–799 (1991).
- [94] Wu, X. L., Xiong, S. J., Fan, D. L., Gu, Y. & Bao, X. M. Stabilized electronic state and its luminescence at the surface of oxygen-passivated porous silicon. *Physical Review B* **62**, R7759 (2000).
- [95] Kumar S.N., G. F., Bouyssoux G. electrochemical reduced in presence of hcl poly(aniline). *Surf. Interface Anal.* **15**, 531 (1990).
- [96] Nolting, D. *et al.* ph-induced protonation of lysine in aqueous solution causes chemical shifts in x-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 14068–14073 (2007). URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja0729711>.
- [97] Nguyen, C. V. *et al.* Carbon nanotube tip probes: stability and lateral resolution in scanning probe microscopy and application to surface science in semiconductors. *Nanotechnology* **12**, 363–367 (2001). URL <http://stacks.iop.org/0957-4484/12/363>.
- [98] Cohen, S. H., Bray, M. T. & Lightbody, M. L. *Atomic Force Microscopy/scanning Tunneling Microscopy* (Plenum Press New York and London, 1994).
- [99] Roke, S., Berg, O., Buitenhuis, J., van Blaaderen, A. & Bonn, M. Surface molecular view of colloidal gelation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 13310–13314 (2006). URL <http://www.pnas.org/content/103/36/13310.abstract>. <http://www.pnas.org/content/103/36/13310.full.pdf+html>.
- [100] Feng, M. W. *Affinity purification of recombinant estrogen receptor ERalpha expressed in Saccharomyces Cerevisiae*. Ph.D. thesis, Institut für angewandte Mikrobiologie der universität für Bodenkultur Wien (1998).
- [101] Hu, M., Noda, S., Okubo, T., Yamaguchi, Y. & Komiyama, H. Structure and morphology of self-assembled 3- mercaptopropyltrimethoxysilane layers on silicon oxide. *Applied Surface Science* **181**, 307–316 (2001).
- [102] Pavlovich, E. *Spatially controlled covalent immobilization ob Biomolecules on silicon surfaces*. Ph.D. thesis, Phdthesis, Acta Universitatis Upsaliensis (2003).

- [103] Presser, V. *et al.* Raman polarization studies of highly oriented organic thin films. *Journal of Raman Spectroscopy* **9999**, n/a (2009). URL <http://dx.doi.org/10.1002/jrs.2361>.
- [104] Zhu, X., Zhu, T., Liu, Z. & Ming, N. Microstructures of grain boundaries in (001)-oriented strontium bismuth tantalate thin films grown by pulsed laser deposition. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **72**, 503–507 (2001). URL <http://dx.doi.org/10.1007/s003390100820>.
- [105] Xps- database: Si2p. <http://www.lasurface.com/database/spectrexp.php>.
- [106] Bergman, H. *Gmelin Handbook of inorganic chemistry Part C 4a* (Springer Berlin, 1982).
- [107] Liu, G. & Jacquier, B. *Spectroscopic properties of rare earth in optical materials* (Springer, 2005).
- [108] Zolin, V. F., Popov, A. P., Samokhina, M. A. & Tsaryuk, V. I. The luminescence spectra and structure of crystalline hydrates of europium nitrate (translated article). *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii* **19(1)**, 74–77 (1973).
- [109] Murray, C. B., Norris, D. J. & Bawendi, M. G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse cde (e = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 8706–8715 (1993). URL <http://dx.doi.org/10.1021/ja00072a025>.
- [110] Martin, J. P. D. *et al.* Resolved isotopic energy shift and hole burning in eucl36h2o. *Journal of Luminescence* **78**, 19 – 24 (1998). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TJH-3WHCHPS-3/2/bd0ce719051d4d4b7e89f192cda3dc92>.
- [111] Qi, J., Matsumoto, T., Tanaka, M. & Masumoto, Y. Europium silicate thin films on si substrates fabricated by a radio frequency sputtering method. *Journal of Physics D: Applied Physics* **33**, 2074–2078 (2000). URL <http://stacks.iop.org/0022-3727/33/2074>.
- [112] Telle, H., Hüffer, W. & Basting, D. The XeCl excimer laser: A powerful and efficient uv pumping source for tunable dye lasers. *Optics Communications* **38**, 402 – 406 (1981). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TVF-46JGSF6-54/2/97d2ce1a038fb6e659d128a50a6a5b02>.

- [113] Zhou, G. & Casperson, L. W. Modes of a laser resonator with a retroreflecting roof mirror. *Appl. Opt.* **20**, 3542–3546 (1981). URL <http://ao.osa.org/abstract.cfm?URI=ao-20-20-3542>.
- [114] Yu *et al.* Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials* **15**, 2854–2860 (2003). URL <http://dx.doi.org/10.1021/cm034081k>.
- [115] von Holt, B. E. *Zeitaufgelöste Messungen an CdSe Nanopartikeln*. Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München (2006).
- [116] Agostinelli, E., Battistoni, C., Fiorani, D., Mattogno, G. & Nogues, M. An XPS study of the electronic structure of the $Zn_xCd_{1-x}Cr_2$ ($X = S, Se$) spinel system. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **50**, 269 – 272 (1989). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TXR-46R000D-22D/2/f2717fbbfc2615dfdfdd5a06fb5d454f>.
- [117] Langer, D. W. & Vesely, C. J. Electronic core levels of zinc chalcogenides. *Phys. Rev. B* **2**, 4885–4892 (1970).
- [118] Dake, L. S., Baer, D. R. & Zachara, J. M. Auger parameter measurements of zinc compounds relevant to zinc transport in the environment. *Surface and Interface Analysis* **14**, 71–75 (1989). URL <http://dx.doi.org/10.1002/sia.740140115>.
- [119] Hopp, V. *Grundlagen der Life Sciences* (Wiley-VCH, 2000).
- [120] Strauss, D. *Chemie für die Pharmazeutische Praxis* (Deutsche Apotheker verlag Stuttgart, 2000).
- [121] Schrader, B. & Steigner, E. Raman-Spektroskopie und Molekularstruktur. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **254**, 177–183 (1971). URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00453195>.
- [122] Hanlon, E. B. *et al.* Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology* **45**, R1–R59 (2000). URL <http://stacks.iop.org/0031-9155/45/R1>.
- [123] Zhang, Q. *et al.* Hexanedioic acid mediated surface-ligand-exchange process for transferring NaYF₄:Yb/Er (or Yb/Tm) up-converting nanoparticles from hydrophobic to hydrophilic. *Journal of Colloid and Interface Science* **336**, 171 – 175 (2009).

URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHR-4W2NDRN-G/2/b3d63bdd56f795ce4e7e20f0868d6cb3>.

- [124] Makin, H., Gower, D. & Kirk, D. *Steroid analysis* (Blackie academic & professional, 1995).
- [125] Pouskouleli, G., Butler, I. S. & Kourounakis, P. Laser raman spectra of some representative hormonal steroids. *Journal of Molecular Structure* **102**, 93 – 101 (1983). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TGS-44FFM47-1W/2/2ebfd01bd686b904d573401e51c12402>.
- [126] Zhao, Y., Li, F., Carvajal, M. T. & Harris, M. T. Interactions between bovine serum albumin and alginate: An evaluation of alginate as protein carrier. *Journal of Colloid and Interface Science* **332**, 345 – 353 (2009). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHR-4V75YSX-6/2/8ab2bc2492901073ab174b7e3c904b54>.
- [127] Binding database. <http://www.bindingdb.org/bind/chemsearch/marvin/index.jsp>.
- [128] Kitadai, N., Yokoyama, T. & Nakashima, S. Atr-ir spectroscopic study of l-lysine adsorption on amorphous silica. *Journal of Colloid and Interface Science* **329**, 31 – 37 (2009). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHR-4TK47C5-6/2/358da6d6ab3fde2d31e08d99051d5299>.
- [129] Kitadai, N., Yokoyama, T. & Nakashima, S. In situ atr-ir investigation of l-lysine adsorption on montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science* **338**, 395 – 401 (2009). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHR-4WNGW8G-1/2/68eb95a7ae862856105816325df7648f>.
- [130] Roddick-Lanzilotta, A. D. & McQuillan, A. J. An in situ infrared spectroscopic investigation of lysine peptide and polylysine adsorption to TiO₂ from aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **217**, 194 – 202 (1999). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHR-45GMV32-73/2/1d77499c2c5e5ee0ef956ecbd8442e6c>.
- [131] Esca300 database: High resolution xps of organic polymers. High Resolution XPS of Organic Polymers: the Scienta ESCA300 Database. By G. Beamson and D. Briggs.

- [132] Salmain, M., Fischer-Durand, N., Roche, C. & Pradier, C.-M. Immobilization of atrazine on gold, a first step towards the elaboration of an indirect immunosensor: characterization by xps and pm-irras. *Surface and Interface Analysis* **38**, 1276–1284 (2006). URL <http://dx.doi.org/10.1002/sia.2390>.
- [133] Kishi, K. & Ehara, Y. Interaction of acetic acid with ethylenediamine on a ni(111) surface studied by xps. *Surface Science* **176**, 567 – 577 (1986). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TVX-46PB9HD-J5/2/b851c62628380d14b6ca9856afbaedbd>.
- [134] Barth, G., Linder, R. & Bryson, C. Advances in charge neutralization for xps measurements of nonconducting materials. *Surface and Interface Analysis* **11**, 307–311 (1988). URL <http://dx.doi.org/10.1002/sia.740110607>.
- [135] Greene, G. L. & Press, M. F. Structure and dynamics of the estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry* **24**, 1 – 7 (1986). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B73GT-47KHCVS-17X/2/12b779d27ca34a4ffe5143cee10fbc7b>.
- [136] Klinge, C. M., Brolly, C. L., Bambara, R. A. & Hilf, R. hsp70 is not required for high affinity binding of purified calf uterine estrogen receptor to estrogen response element dna in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **63**, 283 – 301 (1997). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T8X-3S3MPFK-G/2/67b9d5b703106dd91ac490f4feea4288>.
- [137] Barkhem, T. *et al.* Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology* **54**, 105–112 (1998). URL <http://molpharm.aspetjournals.org/content/54/1/105.abstract>. <http://molpharm.aspetjournals.org/content/54/1/105.full.pdf+html>.
- [138] Escande, A. *et al.* Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochemical Pharmacology* **71**, 1459 – 1469 (2006). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4P-4JJ2BHB-1/2/4ccaa42314fbde49cba9edaeb646bb6b>.
- [139] McDonnell, D. *et al.* high level expression of biologically active estrogen receptor in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **39**, 291–297 (1991).

- [140] Dna to amino acid conversion. <http://http://www.geneseo.edu/~eshamb/php/dna.php>.
- [141] Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., Rhodes, D. & Neuhaus, D. Dna recognition by the oestrogen receptor: from solution to the crystal. *Structure* **1**, 187 – 204 (1993). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VSR-4CT6089-N/2/ab4524c1818e904d7af045c1470a4850>.
- [142] Goldstein, S. W., Bordner, J., Hoth, L. R. & Geoghegan, K. F. Chemical and biochemical issues related to x-ray crystallography of the ligand-binding domain of estrogen receptor. *Bioconjugate Chemistry* **12**, 406–413 (2001). URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc000127d>. <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bc000127d>.
- [143] Schwabe, J. W., Neuhaus, D. & Rhodes, D. Solution structure of the dna-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* **348**, 458–461 (1990). URL <http://dx.doi.org/10.1038/348458a0>.
- [144] Pdb-protein data bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- [145] Butala, H. D. & Sadana, A. A fractal analysis of analyte-estrogen receptor binding and dissociation kinetics using biosensors: environmental effects. *Journal of Colloid and Interface Science* **263**, 420 – 431 (2003). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHR-48S31KK-D/2/2cd13e13b3e811449ea8be80e5bd2298>.
- [146] Sumbayev, J. A. H. V. V. & Gothelf, K. V. An electrochemical sensor based on the human estrogen receptor ligand binding domain. *Nano Letters* **7(9)**, 2831–2834 (2007).
- [147] Ikeda M, K. T., Watanabe S. Covalent immobilization of the estrogen receptor to a cationic n-hydroxysuccinimide ester derivative of agarose. *Steroids* **52(3)**, 187–203 (1988).
- [148] Tada, H., Higuchi, H., Wanatabe, T. M. & Ohuchi, N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-her2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res* **67**, 1138–1144 (2007). URL <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/67/3/1138>. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/reprint/67/3/1138.pdf>.

- [149] Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K. & Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotech* **22**, 969–976 (2004). URL <http://dx.doi.org/10.1038/nbt994>.
- [150] Goldman, E. R., Mattoussi, H., Anderson, G. P., Medintz, I. L. & Mauro, J. M. Fluoroimmunoassays using antibody-conjugated quantum dots (2005). URL <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-901-X:019>.
- [151] Ness, J. M., Akhtar, R. S., Latham, C. B. & Roth, K. A. Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 981–987 (2003). URL <http://www.jhc.org/cgi/content/abstract/51/8/981>. <http://www.jhc.org/cgi/reprint/51/8/981.pdf>.

Anhang A1: Filmstabilität

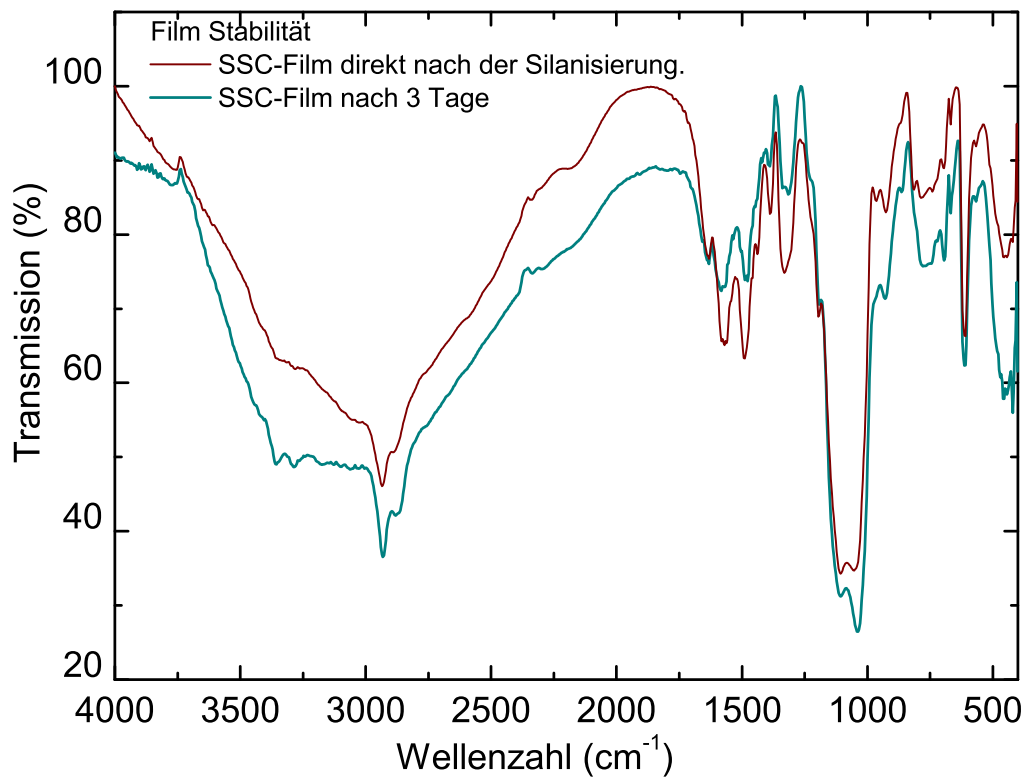


Abbildung .0.2: FTIR Spektrum der Chemischen Filmstabilität über die Zeit. Die Messungen zu dem Filmstabilität nach Tagen bis Wochen zeigen, dass die Silangruppen besser geordnet als direkt nach der Beschichtung. Hier spielen van der Waals-Kräfte eine Rolle und wurde bei Rocke et al. beobachtet [99].

Anhang A2: SSC Temperung mit Sauerstoffgas Zufuhr

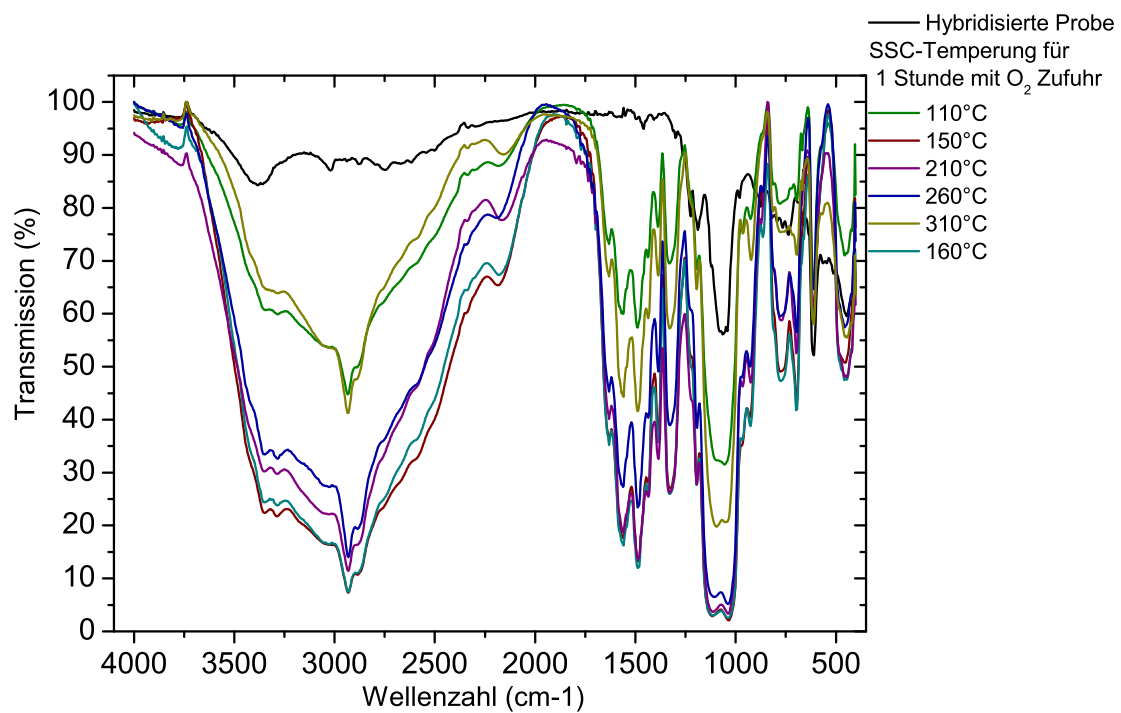


Abbildung .0.3: FTIR-Spektrum in Transmissionsmodus der getemperten SSC-silanisierten Proben mit O₂ Zufuhr in Abhängigkeit von der Temperatur.

Anhang A3: Thesenpapier

These 1:

Östrogene sind Steroidhormone, so genannte Umwelthormone aus Klasse der Endokrine Disruptoren, und zählen zu den gefährlichsten Schadstoffe im Trinkwasser. Da das Hormonsystem bei Mensch und Tier einer ständigen Autoregulation unterliegt, verursacht jeder äußere Eingriff speziell durch exogene Steroidhormone eine Vielzahl an Nebenwirkungen, die genotoxische, neurobiologische und karzinogene Effekte umfassen.

These 2:

Die gegenwärtigen Messmethoden beanspruchen lange Messzeiten (Tage bis eine Woche), sind laborintensiv, (Fachpersonal notwendig) und damit kostspielig. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Nachweisprinzip basiert auf der direkten Fluoreszenzanalyse. Dabei ist die interne Lichtquelle, ein Silizium-basierter Lichtemitter (MOSLED), im Chip integriert.

These 3:

Die Biofunktionalisierung des MOSLED wurde durch eine Silanisierung mittels einer neuen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode durchgeführt. Diese Methode ermöglicht, die MOSLED-Oberfläche mit endständigen funktionellen Gruppen (Amino-, Carboxyl-, und Thiol-Gruppen) zu belegen, die in der Lage sind Biomoleküle an die MOSLED anzubinden. Die funktionalisierten MOSLED-Oberflächen weisen folgende Eigenschaften auf:

- sie sind glatt und hydrophob
- sie haben eine hohe Transparenz (bis zu 98% Lichtdurchlässigkeit)

These 4:

Die Referenzprobe aus β -Estradiol mit QD800 (Quantum-dots-Farbstoff mit einer Emissionswellenlänge bei 800 nm) markiertem Farbstoff wurde erfolgreich realisiert. Dabei wurde die Molekülhülle des QD800-Farbstoffs so modifiziert, dass eine optimale Bindung des Farbstoffes an die Position 17 des β -Estradiol-Gerüsts gewährleistet wird

These 5:

Der Östrogenrezeptor hER_{α} weist gegenüber dem Östrogen eine hohe Affinität auf ($\geq K_A=10^{15}$). Diese molekulare Erkennung ist als Schlüssel-Schloss-Bindung bekannt. Die Immobilisierung des Östrogenrezeptors hER_{α} ist ein weiterer wichtiger Schritt der Biofunktionalisierung. Dabei werden die hER_{α} Rezeptoren kovalent an die auf die MOSLED-Oberfläche endständigen funktionellen Gruppen gebunden. Die Spezifität bzw. die Empfindlichkeit des Biosensors hängt davon ab, ob die im Rezeptor enthaltene Bindungstasche unter einem bestimmten Winkel zu der MOSLED-Oberfläche gerichtet ist. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Immobilisierungsstrategien verfolgt:

1. Der Östrogenrezeptor wurde mit Hilfe eines QD655- Farbstoffs (Quantum-dots-Farbstoff mit einer Emissionswellenlänge bei 655 nm), welcher eine definierte Molekülhülle enthält, modifiziert. Bei einem Verhältnis der molaren Konzentration (bis einer Größenordnung von 20) zwischen dem Rezeptor und dem QD655 bindet sich das Biokonjugat (Rezeptor+QD655) über die definierte Molekülhülle des QD655 an drei silanisierte MOSLED-Oberflächen (Amino-, Carboxyl-, und Thiol-Gruppen):
2. Der Östrogenrezeptor kann mit Hilfe eines Linkers an die Sensoroberfläche gebunden werden. Lysin-Aminosäure wurde wegen der einfachen Ionisierung der Seitenketten als Linker ausgesucht. Die Lysinadsorption an die silanisierte Sensoroberfläche als Funktion des pH-Wertes wurde mittels Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) untersucht. Die optimalen Adsorptionsparameter wurden vorbestimmt, wobei die optimale Adsorption bei pH= 7.5 stattfindet. Für zukünftige Arbeiten können die mit Lysin (oder ähnliches, z. B. Polyhistidin) flankierten Rezeptoren verwendet werden.

These 6:

Das gesamte System wurde durch zwei Methoden erprobt:

1. Die Anordnung der Biokomponenten (zum einen Silangruppen + Östrogenrezeptor hER und zum zweiten die Affinität zwischen dem Rezeptor und dem Analyten β -Estradiol) auf der Sensoroberfläche wurde mittels Photolumineszenz (PL) untersucht.
2. Für das Messverfahren mit Hilfe des Germanium- und Terbiumbasierten Lichtemitters wurden drei Rezeptorkonzentrationen mittels des Nano-Plotters auf den Lichtemitter immobilisiert. Eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ β -Estradiol wurde dabei verwendet. Schließlich wurde mittels Elektrolumineszenz (EL) gemessen:

- EL-Signal der Referenzprobe für die drei Rezeptorkonzentrationen mittels Ge-Lichtemitter und nur bei höchster Rezeptorkonzentration mittels Tb-Lichtemitter
- Der Lichtemitter kann nach Passieren von mehreren Biofilmen auf der Oberfläche den Farbstoff anregen.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

Östrogennachweis in wässrigen Lösungen mit Hilfe Silizium-basierter Lichtemitter

selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder anderen Quellen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der Zeit von 03/2007 bis 03/2010 am Institut für Ionenstrahlphysik und Materialforschung des Forschungszentrums Dresden-Rossendorf e.V. unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. M. Helm angefertigt.

Die Promotionsordnung der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden erkenne ich an.

Dresden, den 15.Januar.2010

Charaf Cherkouk

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich danke den Direktoren des Instituts für Ionenstrahlphysik und Materialforschung Herrn Prof. Dr. M. Helm und Herrn Prof. Dr. W. Möller für die freundliche Aufnahme und für die Betreuung,

Herrn Prof. Dr. G. Kunze für die Übernahme der Gutachtertätigkeit sowie

Herrn Dr. W. Skorupa für das Ermöglichen dieser Arbeit und für die Begleitung des Verlaufs der experimentellen Ergebnisfindung mit stetem Interesse und Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt Herrn Dr. L. Rebohle für die vielen Gespräche über die Arbeit und insbesondere die Korrekturen in der Rohfassung.

Für den experimentellen Teil dieser Arbeit bedanke ich mich:

im FWI bei Frau S. Germer und Herrn S. Probst,

im Institut für Radiochemie bei Herrn Dr. M. Merroun, Herrn T. Reitz, Frau Dr. A. Barkleit, Herrn Dr. M. Sczepan und Herrn R. Steudtner für die Probenlagerung und die Unterstützung mit Geräten und Materialien sowie

in der Gesim gmbh bei Herrn Dr. S. Howitz und Herrn T. Wegener für den μ -Plotter-Einsatz.

Für die technische Unterstützung geht mein Dank an Frau I. Skorupa, Frau G. Schneider, Frau R. Aniol, Frau H. Felsmann und Herrn T. Schumann.

Herzlichen Dank an alle Mitglieder des Instituts für Ionenstrahlphysik und Materialforschung für die nette Arbeitsatmosphäre sowie die Gruppe FWIM für die geistreichen Diskussionen und Anregungen, die ich sehr genoss und genießen werde.

Nicht zuletzt danke ich allen, die direkt oder indirekt durch ihre Anteilnahme zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bernadette, Magda und Ulrich sowie

toute la famille au Maroc pour leur soutien et support malgré la distance. Merci beaucoup.