

Untersuchungen zur oberflächenverstärkten Raman-Streuung an chemisch modifizierten Metallsubstraten

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät Chemie der Universität Dortmund

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Stefan Kostrewa

aus Fröndenberg

Dortmund 2001

Als Dissertation genehmigt vom Fachbereich Chemie der Universität Dortmund.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2001

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. R. W. Schmutzler

Erstberichterstatter: Prof. Dr. D. Klockow

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. T. N. Mitchell

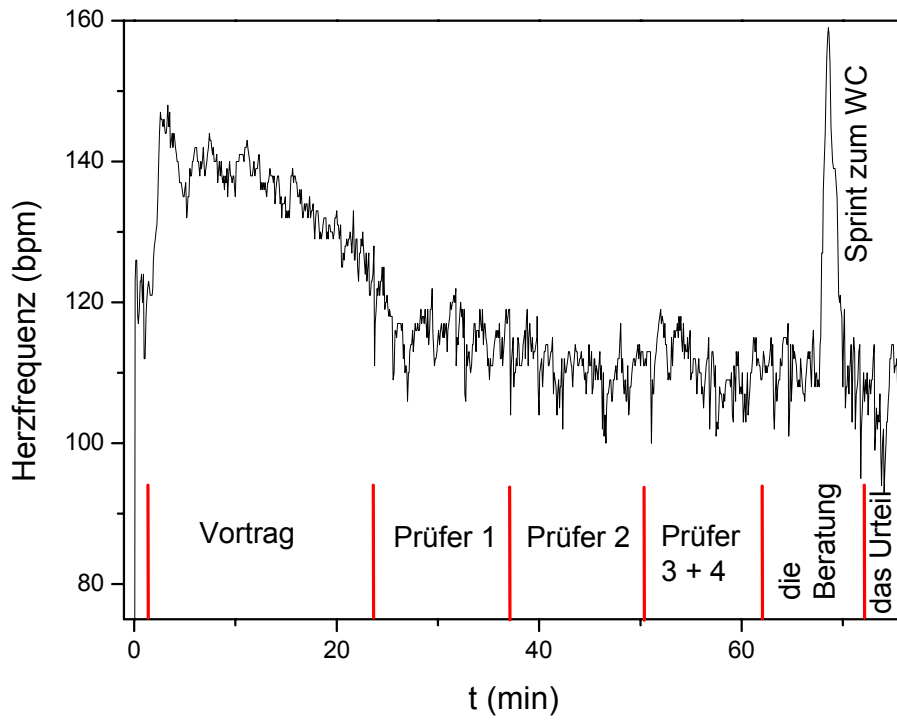


Abbildung 1 : Die Herzfrequenz des Prüflings während der Promotion.

Lebenslauf

Name: Stefan Kostrewa
Geburtstag 30. September 1969
Geburtsort Bülach (Schweiz)
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1975 - 1979 Grundschule Fröndenberg-Dellwig
1979 - 1988 Walram Gymnasiums Menden
15.06.1988 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 1988 - 1990 4. PzLBtl 94, Munster

Hochschulstudium: Nov. 1990 Studienbeginn mit Fachrichtung Chemie-
Diplom an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
Nov. 1992 Diplomchemiker-Vorprüfung
Juli 1995 Diplomchemiker-Hauptprüfung
Okt. 1995 - Mai 1996 Diplomarbeit bei Prof. Dr. J. Gasteriger
"Untersuchungen zur infrarotspektrometrischen
Blutvolumenbestimmung"
Juli –Sept 1996 Wiss. Hilfskraft am Institut für Organische
Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.
Nov. '96 – Nov 2001 Promotion am Institut für Spektrochemie und
Angewandte Spektroskopie (ISAS),Dortmund

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen November 1996 und September 2000 am Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie (ISAS) in Dortmund.

Bei Prof. Dr. D. Klockow bedanke ich mich für die Ermöglichung dieser Arbeit und für die Übernahme des Gutachtens.

Bei Prof. Dr. T. N. Mitchell, Universität Dortmund, bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. W. Hill für die Einführung in die Welt der Raman- und SERS-Spektroskopie, die vielen fachlichen Diskussionen, die sportlichen Herausforderungen sowie für die Finanzierung großer Teile dieser Arbeit im Rahmen des BMBF-Projekts „Grundlegende Untersuchungen zur Diodenlaser-Raman-Sensorik für die organische Spurenanalyse von Böden“ (FKZ 13N6886).

Herrn Dr. M. Kahl danke ich für die elektronenstrahlolithographisch hergestellten SERS-Substrate, Herrn Dr. F. Katzenberg für die ‚rauh‘ Polymere.

Herrn Dipl.-Chem. M. Emgenbroich danke ich die Bereitstellung der molekular geprägten Polymere und für die vielen Diskussionen während unserer Zusammenarbeit.

Den wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern des ISAS danke ich für die Schaffung eines produktiven Arbeitsklimas.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen wahren Freunden, die durch ihre Geduld, Unterstützung und Nachsicht einen wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

1. EINLEITUNG	1
2. GRUNDLAGEN	3
2.1 Raman-Streuung und ihre Deutung	3
2.2 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (Surface Enhanced Raman-Scattering SERS).....	9
2.2.1 Elektromagnetischer Anteil.....	10
2.2.2 Chemischer Anteil.....	13
2.2.3 SERS-aktive Oberflächen.....	14
2.2.4 Adsorption an SERS-Substraten.....	18
2.3 Chemo-optische Sensoren.....	20
2.3.1 Aufbau eines Chemosensors.....	20
2.3.2 Sensor-Analyt-Wechselwirkungen	21
2.3.3 Sensorschichten.....	23
2.3.4 Chemo-optische Sensoren auf der Basis von SERS	27
3. EXPERIMENTELLER TEIL	29
3.1 Raman-Spektroskopie	29
3.1.1 Diodenlaser-Kompaktspektrometer Kaiser HoloSpec f / 1.8.....	29
3.1.2 Dreifachmonochromator-Spektrometer Dilor XY.....	30
3.2 Herstellung SERS-aktiver Substrate.....	32
3.3 Synthese der Beschichtungssubstanzen.....	38
3.3.1 Cyclodextrine.....	39
3.3.2 Calixarene.....	44
3.4 Beschichtung von SERS-Substraten.....	51
3.5 Adsorption von Analyten an beschichtete Substrate.....	53
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	55
4.1 Charakterisierung der Beschichtungssubstanzen.....	55
4.1.1 Cyclodextrine.....	55
4.1.2 Calixarene.....	58
4.2 Charakterisierung beschichteter Substrate.....	63
4.2.1 Cyclodextrine.....	63
4.2.2 Calixarene.....	64
4.3 Nachweis von gasförmigen Duftstoffen mit Hilfe der SERS-Spektroskopie an unbeschichteten SERS-Substraten	65
4.4 Nachweis halogener Kohlenwasserstoffe in der Gasphase mit SERS-Substraten mit Cyclodextrin-Beschichtungen.....	71
4.5 Adsorption aromatischer Verbindungen an unterschiedlich beschichteten SERS-Substraten	74
4.5.1 Adsorption aus der Gasphase	75
4.5.2 Adsorption aus der wäßrigen Phase.....	81
4.6 SERS-Substrate mit molekular geprägten Polymeren	88

4.7 Untersuchung biochemischer Reaktionen von Streptavidin mit SERS.....	96
4.8 SERS-Untersuchungen zur Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	101
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	109
6. ANHANG	112
7. LITERATURVERZEICHNIS	116

1. Einleitung

Chemo-optische Sensoren stellen heute eine preiswerte und von Vielseitigkeit und Geschwindigkeit der Signalerzeugung her überzeugende Alternative zu konventionellen Analysemethoden wie etwa mit geeigneten Detektoren gekoppelte GC oder HPLC dar^{1,2,3}. Sie werden vor allem in jenen Bereichen angewendet, die eine ständige Überwachung von Stoffkonzentrationen oder -strömen erfordern. Vorteile dieser Sensoren liegen vor allem darin, daß optische Signale nicht durch elektromagnetische Felder gestört werden, eine Signalübertragung mittels Lichtleiter über weite Entfernungen möglich ist und eine Vielzahl an spektroskopischen Detektionsverfahren zur Verfügung steht. So spielen chemo-optische Sensoren z.B. in der Prozeßsteuerung und -überwachung eine wichtige Rolle und können an unzugänglichen Meßorten, in aggressiver chemischer Umgebung oder bei Langzeitüberwachungen eingesetzt werden. Der wohl am meisten verbreitetste Chemosensor - wenn auch kein optischer - ist die Lambda-Sonde, mit deren Hilfe das Kraftstoff/Luft-Gemisch in Verbrennungsmotoren geregelt wird.

Chemische Sensoren bestehen zumeist aus einer stoffsensitiven Rezeptorschicht, die auf einem Träger adsorbiert ist. Die bei der Wechselwirkung mit dem Analyt auftretenden Änderungen von chemischen oder physikalischen Eigenschaften der Schicht können mit geeigneten Methoden detektiert und in ein Meßsignal umgewandelt werden. Die Empfindlichkeit der Schicht gegenüber solchen Veränderungen sollte daher hinreichend hoch und das Meßsignal möglichst linear zur Analytkonzentration sein. Weitere wichtige Kenngrößen sind die Reproduzierbarkeit der Meßsignale, eine möglichst kurze Ansprechzeit, die Reversibilität der Adsorption und die Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse.

Ein Prozeß, welcher bei allen Chemosensoren abläuft, ist die Adsorption der Analyte an der Rezeptorschicht. Ist diese nicht ausreichend selektiv, wie z.B. im Falle von Antikörpern oder ionenselektiven Komplexbildnern, dann kann nur die Adsorption an sich detektiert werden, ohne dabei Analyt-spezifische Meßsignale zu erhalten.

In diesem Zusammenhang können molekülspektroskopische Verfahren interessante Methoden der Detektion darstellen, da sie mit den Spektren substanzspezifische Informationen liefern. Intensive und gut aufgelöste Signale in Form von Molekülschwingungsbanden können insbesondere mit Hilfe der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) erhalten werden.

Die Raman-Streuung (s. Kap. 2) ist bereits seit 1928 bekannt, stand aber bedingt durch den hohen experimentellen Aufwand lange im Schatten der Infrarot-Spektroskopie. Geringe Wirkungsquerschnitte der Analyte und das Fehlen intensiver monochromatischer Strahlungsquellen bis Anfang der 60'er Jahre erforderten für einen sicheren Nachweis relativ

hohe Stoffkonzentrationen und lange Meßzeiten. Durch den Einsatz von Lasern als Strahlungsquellen, Vielkanaldetektoren und konfokalen Raman-Mikroskopen lassen sich heutzutage Mengen unterhalb eines Picogramms detektieren. Die Verwendung moderner Bauteile wie Diodenlaser, Faseroptiken, Phasengitter und Peltier-gekühlte Detektoren ermöglicht den Bau miniaturisierter, robuster und transportabler Kompaktspektrometer. Besonders für die Messung in wäßrigen Medien ist die Raman-Spektroskopie prädestiniert, da Wasser ein nur schwacher Raman-Streuer ist und keine störenden Banden liefert.

Eine Verstärkung der an sich schwachen Raman-Signale um bis zu sechs Größenordnungen kann auf nanostrukturierten Gold-, Silber oder Kupferoberflächen erzielt werden. Diese SERS-Verstärkung ermöglicht den Nachweis äußerst geringer Substanzmengen. Voraussetzung ist jedoch eine Adsorption der Analyte auf der Metalloberfläche. Dies kann über entsprechende funktionelle Gruppen wie z.B. Thiole, Amine oder Carbonsäuren erfolgen. Die Adsorption ist hier meistens irreversibel, und die daraus resultierenden Schichten sind in der Regel sehr stabil.

Die Beschichtung von SERS-aktiven Oberflächen mit Hohlraumolekülen lieferte ausgewiesene Adsorptionszentren auch für Moleküle ohne Funktionalitäten zur Kopplung. Als Hohlraumoleküle kommen generell alle Verbindungen in Frage, die aus der Wirt-Gast-Chemie bekannt sind. Hierzu zählen Calixarene, Cyclodextrine, Kronenether, Paracyclophane und in neuerer Zeit molekular geprägte Polymere (MIP). Da die meisten dieser Wirtsmoleküle nicht über entsprechende Kopplungsfunktionen verfügen, sind zunächst mehrstufige Synthesen zur Derivatisierung erforderlich, um eine dauerhafte und stabile Beschichtung der SERS-Substrate zu gewährleisten.

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, daß Sensoren auf der Basis von SERS neue Meßverfahren der medizinischen Diagnostik oder der molekularbiologischen Analytik ermöglichen können. Die Messungen zwischen oberflächengebundener Sonde und ihren Reaktionspartnern können hierbei sogar problemlos in den zumeist wäßrigen nativen Umgebungen erfolgen, was bei anderen molekülspektroskopischen Methoden nicht immer möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit werden mehrere Ansätze zu Herstellung von chemo-optischen Sensoren auf der Basis von SERS beschrieben. Als Rezeptorschichten wurden Wirtsmoleküle unterschiedlicher Größe, molekular geprägte Polymere und biologisch aktive Moleküle verwendet. Die Wirtsmoleküle mußten hierbei zuerst in mehrstufigen Synthesen derivatisiert werden, um eine dauerhafte und stabile Beschichtung der Substrate zu ermöglichen. Sämtliche Beschichtungen wurden durch die Adsorption unterschiedlicher Verbindungen auf ihre Sensoreigenschaften hin untersucht.

2. Grundlagen

2.1 Raman-Streuung und ihre Deutung

In Bereich der Molekülspektroskopie war die Raman-Spektroskopie aufgrund ihrer geringen Streuquerschnitte und des hohen apparativen Aufwandes lange Zeit nicht sehr verbreitet. Dies änderte sich mit der Einführung von Lasern Anfang der 60'er Jahre und mit dem Einsatz von Vielkanaldetektoren. Beim Raman-Effekt handelt es sich um einen inelastischen Streuvorgang von Photonen an Molekülen oder Kristallen. Dieser Effekt wurde 1923 von G. A. Smekal theoretisch vorausgesagt⁴ und 1928 vom indischen Physiker C. V. Raman experimentell mit gefiltertem und fokussiertem Sonnenlicht nachgewiesen⁵.

Bestrahlt man eine Probe mit monochromatischer Strahlung, so kommt es neben Absorption, Reflexion und der überwiegenden elastischen Streuung in einem geringeren Anteil auch zu inelastischer Streuung. Bei der elastischen Streuung besitzen die gestreuten Photonen die gleiche Energie wie die einfallenden Photonen und somit auch die gleiche Wellenlänge, man spricht in diesem Fall von Rayleigh- oder Mie-Streuung. Bei der inelastischen Streuung unterscheiden sich die Energien der einfallenden und der gestreuten Photonen und somit auch deren Wellenlängen. Der Grund hierfür liegt in der Anregung von Molekül- oder Kristallschwingungen. Da Moleküle und Kristalle nur eine gewisse, ihrer Geometrie entsprechende Anzahl diskreter Schwingungszustände einnehmen können, weisen die Raman-Spektren auch nur diskrete Banden, die bestimmten Molekülschwingungen zugeordnet werden können, auf. So können die charakteristischen Energiedifferenzen bzw. die damit verbundenen Frequenzverschiebungen die Identifizierung funktioneller Gruppen bzw. der gesamten Verbindung anhand von Referenzspektren ermöglichen. Die Raman-Spektren sind stark symmetrieabhängig und erlauben daher insbesondere die Unterscheidung von Isomeren. Problematisch sind bei der Raman-Streuung die geringen Streuquerschnitte der Moleküle, die im Bereich 10^{-13} \AA^2 liegen, so daß an das Experiment gewisse meßtechnische Anforderungen gestellt sind.

Die bei der elastischen und inelastischen Streuung an Molekülen oder Kristallen beteiligten Prozesse seien kurz anhand von Abbildung 2.1 erläutert.

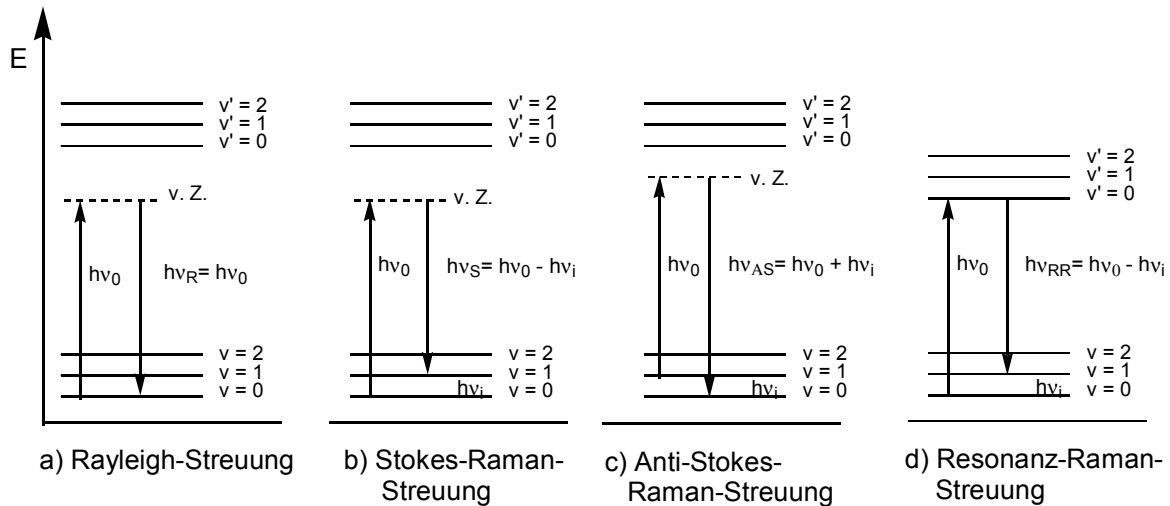


Abbildung 2.1 *Energieebenen bei der elastischen (a) und inelastischen Streuung (b-d) von Photonen an Molekülen und Kristallen.*

Die Raman-Streuung ist ein einstufiger Prozeß, zu dessen besserem Verständnis ein virtueller Zwischenzustand (v. Z.), der unterhalb des ersten angeregten elektronischen Niveaus (v') liegt, angenommen wird. Vor der Wechselwirkung mit dem Photon befindet sich das Molekül in der Regel im nicht schwingungsangeregten elektronischen Grundzustand ($v = 0$).

Bei der Rayleigh-Streuung (a) wechselwirkt das Molekül mit dem einfallenden Photon, nimmt im virtuellen Zwischenzustand keine Energie vom Photon auf und befindet sich abschließend wieder im nicht schwingungsangeregten elektronischen Grundzustand. Die Wellenlängen von einfallender und gestreuter Strahlung sind identisch.

Bei der Stokes-Raman-Streuung (b) werden beim Streuprozess Schwingungen im Molekül angeregt. Die gestreute Strahlung ist um den Betrag der zur Schwingungsanregung benötigten Energie ärmer und weist somit eine größere Wellenlänge als die einfallende Strahlung auf.

Bei der Anti-Stokes-Raman-Streuung (c) befindet sich das Molekül vor dem Streuprozess in einem schwingungsangeregten Zustand (z.B. $v = 1$) und relaxiert nach der Wechselwirkung mit dem Photon in den nicht schwingungsangeregten Zustand ($v = 0$). Die Energie der Schwingung wird auf das gestreute Photon übertragen, welches dadurch eine höhere Energie und damit eine kürzere Wellenlänge als das einfallende Photon aufweist. Dieser Streuvorgang tritt üblicherweise mit geringerer Wahrscheinlichkeit als die Stokes-Streuung auf, da er von der Besetzungsdichte des schwingungsangeregten Zustandes abhängt. Diese Besetzung folgt der Boltzmann-Statistik ($n = n_0 e^{-E/kT}$) und ist stark temperaturabhängig. So befindet sich bei Raumtemperatur nur ein geringer Bruchteil der Moleküle in einem angeregten Schwingungszustand, weshalb bei der Raman-Spektroskopie hauptsächlich die Stokes-Raman-Banden beobachtet werden.

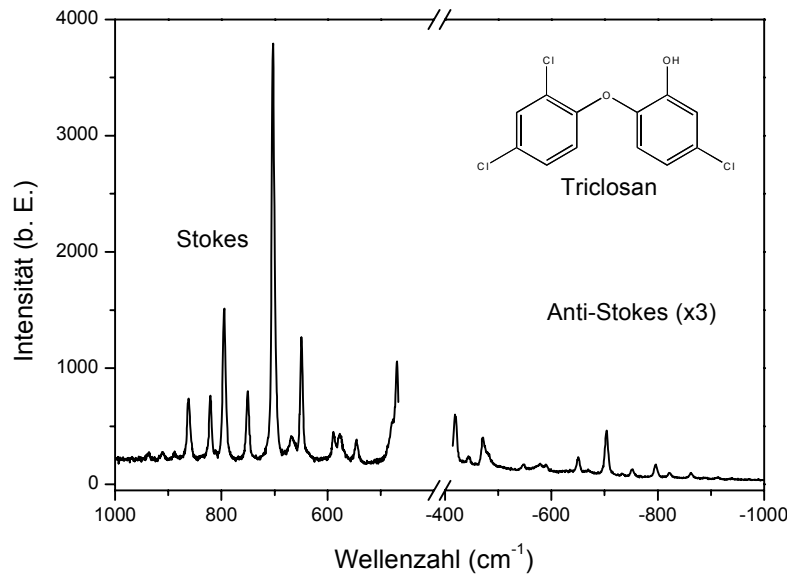
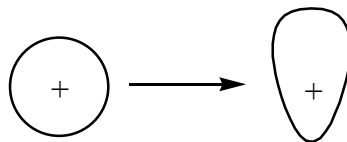


Abbildung 2.2 Stokes- und Anti-Stokes-Raman-Spektren von Triclosan bei Raumtemperatur.

In Abbildung 2.2 sind Ausschnitte der Stokes- und Anti-Stokes-Raman-Spektren am Beispiel des Triclosans [5-Chlor-2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenol] dargestellt. Trotz der dreifachen Integrationszeit sind die Anti-Stokes-Banden erheblich schwächer als die Stokes-Banden. Darüber hinaus zeigt sich, daß das Intensitätsverhältnis von Anti-Stokes- zu Stokes-Banden gemäß der Boltzmann-Verteilung mit zunehmender Wellenzahl deutlich abnimmt. Das Verhältnis der Intensitäten kann gemäß der genannten Verteilung zur Bestimmung von Temperaturen genutzt werden.

Die klassische Deutung des Raman-Effektes⁶ basiert auf einem Wellenmodell. Bei der Wechselwirkung zwischen dem Molekül und der elektromagnetischen Welle induziert der Feldvektor $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t$ eine Polarisation der Elektronenhülle des Moleküls:



Das Gesamtdipolmoment des Moleküls ist dann gegeben durch das permanente Dipolmoment μ_0 und das induzierte Dipolmoment p_{ind} , welches seinerseits durch den Polarisierbarkeitstensor α und die Feldstärke beschrieben wird:

$$p = \mu_0 + p_{ind} = \mu_0 + \alpha \vec{E}_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (1)$$

Der Polarisationsstensor α ist ein molekülspezifischer, dreidimensionaler Parameter (Tensor) und von der Molekülsymmetrie abhängig:

$$\alpha_i = \alpha_0 + q_i \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q_i} \right); \quad (i = \text{ite Normalschwingung}) \quad (2)$$

Bei der Polarisierung der Elektronenhülle werden die Kernkoordinaten q_i verändert. Bei kleinen Veränderungen kann dieser Vorgang durch eine harmonische Schwingung der Normalkoordinaten dargestellt werden:

$$q_i(t) = q_0(t) \cos 2\pi \nu t \quad (3)$$

Einsetzen von (3) in (2) und Reihenentwicklung von α hinsichtlich der Normalkoordinaten

$$\alpha_i = \alpha_0 + \sum_i \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q_i} \right) q_i + \dots \quad (4)$$

liefert, wenn sie (1) kombiniert und nach dem 2. Glied abgebrochen wird:

$$p_i(t) = \mu_0 + \underbrace{\alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t}_{\text{Rayleigh-Streuung}} + \underbrace{\frac{1}{2} E_0 \sum_i \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q_i} \right) q_i \cos 2\pi (\nu_0 - \nu_{i,\text{vib}}) t}_{\text{Stokes}} + \underbrace{\frac{1}{2} E_0 \sum_i \left(\frac{\partial \alpha_0}{\partial q_i} \right) q_i \cos 2\pi (\nu_0 + \nu_{i,\text{vib}}) t}_{\text{Anti-Stokes}} \quad (5)$$

Gleichung 5 zeigt, daß die Streustrahlung drei Anteile mit unterschiedlichen Frequenzen aufweist. Der erste Term beschreibt die Rayleigh-Streuung, der zweite die Stokes-, der dritte die Anti-Stokes-Signale. Der Polarisationsstensor α ändert sich nicht im Term für die Rayleigh-Streuung, dafür jedoch in den Termen für Stokes- und Anti-Stokes-Linien. Hierdurch zeigt sich die fundamentale Bedingung für das Auftreten der Raman-Streuung:

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q_i} \right) \neq 0, \quad (6)$$

was bedeutet, daß eine Schwingung nur dann Raman-aktiv ist, wenn sich in ihrem Verlauf die Polarisierbarkeit ändert. Andererseits ist eine Schwingung nur dann Infrarot-aktiv, wenn sie das Dipolmoment eines Moleküls ändert. Hierdurch erklärt sich auch die Komplementarität von IR- und Raman-Spektroskopie.

Die Intensität eines Raman-Streuvorgangs ist proportional zum Quadrat der mittleren Polarisierbarkeit $|\alpha|^2$ und als Dipolabstrahlung zur vierten Potenz der reziproken Streuwellenlänge:

$$I_R \propto \nu^4 |\alpha|^2 \bar{E}^2 \quad (7)$$

So liefert z.B. die Anregung mit einem Argon-Ionen-Laser bei 488 oder 515 nm intensive Raman-Spektren, führt aber auch leicht zu Fluoreszenz. Bei Anregung mit einem Nd:YAG-Laser bei 1064 nm tritt praktisch keine Fluoreszenz mehr auf, allerdings werden bei dieser Wellenlänge im Vergleich zum Argon-Ionen-Laser nur fünf Prozent der Streuintensität erzielt. Aussagen über mittlere Polarisierbarkeiten lassen sich mit Hilfe der Gruppentheorie treffen. Sie sind in verschiedenen Tabellenwerken zu finden^{7,8}.

Obwohl nach der klassischen Deutung des Raman-Effekts die Frequenzen der Streustrahlung gut beschrieben werden, können die Intensitäten nur mit Hilfe der Quantenmechanik vorausgesagt werden⁶.

Wie schon erwähnt, war in der Vergangenheit die Anwendung der Raman-Spektroskopie durch experimentelle Begrenzungen recht eingeschränkt. Die nur geringen Streuquerschnitte von freien Molekülen um 10^{-13} \AA^2 bedeuten, daß man relative hohe Konzentrationen, leistungsstarke Laser und eine entsprechend lange Meßdauer benötigt. Bei der Raman-Streuung entsteht das gesamte Spektrum simultan. Die Intensität der erhaltenen Spektren ist mit $1/\lambda^4$ abhängig von der Frequenz der anregenden Strahlung. Je kürzer also die Anregungswellenlänge gewählt wird, um so intensiver sind die erhaltenen Signale. Bei der Verwendung der kürzeren Wellenlängen besteht allerdings die Gefahr, Fluoreszenz als konkurrierenden Prozeß zur Raman-Streuung anzuregen. Reicht die gewählte Wellenlänge aus, um das Molekül oder in der Probe enthaltene Verunreinigungen in einen elektronisch angeregten Zustand zu überführen, kann die auftretende Fluoreszenz aufgrund größerer Adsorptionsquerschnitte und hoher Quantenausbeute die Raman-Signale völlig überlagern. Ein Spezialfall der Raman-Streuung ist die Resonanz-Raman-Streuung (Abb. 2.1d). Hier führt das einfallende Photon zu einem elektronisch angeregten Zustand des Moleküls. Ein solcher Vorgang ist zu beobachten, wenn die eingesetzte Anregungswellenlänge einer Absorptionsbande des Moleküls entspricht, wie es z.B. durch ein Chromophor gegeben sein kann. Durch die Anregung kann dann selektiv das chromophore System im Molekül zur Streuung angeregt werden, während die restlichen Teile des Moleküls keinen wesentlichen Beitrag zum Raman-Spektrum liefern.

In der Praxis arbeitet man heute mit intensiven, monochromatischen Strahlungsquellen. Die zunächst verwendeten Hg-Dampf lampen wurden Anfang der 60'er Jahre durch Laser abgelöst. Der Vorteil der Laser liegt darin begründet, daß sie eine hohe Strahlqualität aufweisen und scharfe spektrale Linien hoher Intensität emittieren, wodurch eine gute

Fokussierung ermöglicht wird. Wird die Anregungswellenlänge des Lasers im roten (He/Ne- oder Dioden-Laser) oder nahen infraroten Spektralbereich (Nd:YAG-Laser) gewählt, so kann die Fluoreszenz wirkungsvoll unterdrückt werden. Die Energie der Strahlung reicht dann im allgemein nicht dazu aus, die Probenmoleküle sowie evtl. Verunreinigungen in einen elektronisch angeregten Zustand zu überführen. Weiterhin zeigt Wasser in diesem Bereich nur eine sehr geringe Absorption, so daß auch wäßrige Medien gut mit der Raman-Spektroskopie untersucht werden können (s. auch weiter unten).

Um die im Experiment erhaltenen Raman-Spektren unabhängig von der Anregungswellenlänge darzustellen, werden die Intensitäten gegen die Wellenzahldifferenz zwischen eingestrahltm Licht und Streulicht aufgetragen. Diese Wellenzahldifferenzen entsprechen den aus Schwingungsanregungen resultierenden Energiedifferenzen zwischen anregender und gestreuter Strahlung. Dies liefert zudem eine Vergleichsmöglichkeit mit IR-Spektren. Während bei der IR-Spektroskopie die Wellenzahl die reziproke Zahl der Wellenzüge der absorbierten Strahlung pro Zentimeter angibt, beschreibt sie bei der Raman-Spektroskopie die relative Verschiebung der Streustrahlung zur Anregungswellenlänge. So entspricht z.B. eine Raman-Bande von 1000 cm^{-1} bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm ($12738,85\text{ cm}^{-1}$) einer Wellenlänge von $851,8\text{ nm}$ ($11738,85\text{ cm}^{-1}$).

Vergleicht man die Raman- und die IR-Spektroskopie, lassen sich einige entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Methoden feststellen. So treten im Raman-Spektrum unpolare Bindungen, wie sie z. B. in Molekülgerüsten gegeben sind, stärker hervor. Raman-Banden sind im allgemeinen schärfer als IR-Banden, da weniger Kombinations- und Oberschwingungen angeregt werden. Symmetrische, d. h. nicht deformierende Schwingungen liefern im Raman-Spektrum intensivere Banden als im IR-Spektrum. Weiterhin zeichnen sich im Raman-Spektrum Streckschwingungen durch stärkere Banden aus als Deformationsschwingungen und Mehrfachbindungen durch stärkere Banden als Einfachbindungen.

Eine Besonderheit im Zusammenhang mit Raman- und IR-Spektroskopie ist das sog. Alternativverbot. Dieses besagt, daß beim Vorhandensein eines Inversionszentrums im Molekül eine Schwingung nicht gleichzeitig IR- und Raman-aktiv sein kann.

Die Nachteile der Raman-Spektroskopie gegenüber der IR-Spektroskopie liegen, wie schon erwähnt, in den geringen Wirkquerschnitten und in der Anfälligkeit gegen Fluoreszenzanregung. Bis in die letzten Jahre hinein stand auch der beachtliche apparative Aufwand einer weiten Verbreitung der Methode entgegen.

Im Laufe der Entwicklung der Raman-Spektroskopie traten jedoch einige entscheidende Vorteile dieser Methode zu Tage. So können flüssige oder feste Proben zerstörungsfrei untersucht werden, während sie bei der IR-Spektroskopie für gewöhnlich in eine Matrix wie Kaliumbromid oder Nujol-Öl eingebettet werden müssen. Bei der Verwendung von Raman-Mikroskopen können Partikel mit Durchmessern unter 1 μm mit Massen unter 1 pg untersucht werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, niederenergetische Schwingungen im sichtbaren bzw. NIR-Bereich erfassen zu können, wodurch Messungen in Bezug auf die verwendeten Materialien und Detektoren vereinfacht werden. Der wohl prägnanteste Vorteil liegt darin, daß Wasser ein nur schwacher Raman-Streuer ist und damit Messungen in wäßrigen Medien ohne störende Einflüsse des Lösungsmittels ausgeführt werden können.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die Raman- und die IR-Spektroskopie nicht gegenseitig ersetzen, dafür aber ergänzen können.

2.2 Oberflächenverstärkte Raman-Streuung (Surface Enhanced Raman-Scattering SERS)

1974 wurde von Fleischmann et al.⁹ eine außerordentliche Verstärkung von Raman-Banden des Pyridins in Gegenwart von Chlorid an einer elektrochemisch aufgerauhten Silberelektrode beschrieben. Drei Jahre später wurde dieser Effekt von zwei weiteren Gruppen als besonderer Effekt von Oberflächenverstärkung beschrieben^{10,11}. Bei diesem Surface Enhanced Raman-Scattering (SERS)-Effekt kann eine Verstärkung des Streuquerschnitts gegenüber dem freien Molekülen um bis zu sechs Größenordnungen auftreten, sofern das Molekül hierbei an der SERS-aktiven Metalloberfläche adsorbiert ist. SERS-Aktivität tritt dann auf, wenn die Metalloberflächen Nanostrukturen im Bereich von 10 bis 300 nm aufweisen. Als Metalle kommen einige Übergangsmetalle in Betracht, von denen Silber, Gold und Kupfer am gebräuchlichsten sind.

Die Theorie zum SERS-Effekt gilt mittlerweile als gesichert, obwohl immer noch einige Detailfragen ungeklärt sind. Da die Intensität der Raman-Streuung abhängig ist von der Stärke des induzierten Dipols, der seinerseits von der Molekulpolarisierbarkeit und dem lokalen elektrischen Feld bestimmt wird, $\mu = \alpha E$, werden zwei Teileffekte für die enormen Verstärkungen verantwortlich gemacht :

- die Verstärkung des lokalen elektrischen Feldes, welches durch den elektrischen Feldvektor des einfallenden und des abgestrahlten Lichtes an der Oberfläche erzeugt wird, der sog. elektromagnetische Anteil;
- die Erhöhung der Molekülpolarisierbarkeit α , der sog. chemische Anteil.

2.2.1 Elektromagnetischer Anteil

Elektromagnetische Wellen können kollektive Schwingungen gequantelter Energie von freien Elektronen (Plasmonen) anregen. In glatten Metallfilmen breiten sich die Plasmonen als Oberflächenwellen aus. Zur Kopplung des Lichtes an diese Wellen ist eine Phasenanpassung erforderlich, die nur unter einem bestimmten Winkel in Totalreflexion erreicht werden kann. Kaum winkelabhängig ist hingegen die Anregung lokalisierter Plasmonen in kleinen Metallpartikeln oder Oberflächenstrukturen bzw. – rauhigkeiten. Da hier auch die höchsten Feldstärken auftreten, werden derartige Partikel oder aufgerauhte Metalloberflächen häufig für SERS verwendet. In Resonanz und bei geringer Dämpfung können die Plasmonen erhebliche Feldüberhöhungen auf der Metalloberfläche erzeugen. Dies hängt von den dielektrischen Eigenschaften der Metalle ab, wobei sich Silber, Gold und eingeschränkt Kupfer als am geeignetsten erwiesen. Weiterhin sind einige Alkalimetalle sowie bedingt die Metalle Al, Zn, Ga, Cd, In, Pt und Hg geeignet.

Der elektromagnetische Anteil der Verstärkung ist der mit der größeren Reichweite. Sie beträgt etwa 10 nm, und es können Verstärkungen von vier bis fünf Größenordnungen erreicht werden. Im Gegensatz zum chemischen Anteil ist er nicht von der adsorbierten Spezies, dafür jedoch stark von der Beschaffenheit der Oberfläche abhängig.

Die Anwesenheit eines schwingenden Dipols auf einer Oberfläche kann die Elektronen im Metall polarisieren und Plasmonen anregen, was zu einer Energieabstrahlung von der Oberfläche mit der Frequenz der Dipolschwingung führt.

Nach der elektromagnetischen Theorie müssen folgenden Bedingungen erfüllt sein:

- der Ramanstreuer (Molekül) ist an einer SERS-aktiven Oberfläche adsorbiert, deren Nanostrukturen Dimensionen von $a \leq \lambda / 15$ aufweisen. Die Anregungsstrahlung der Wellenlänge λ regt im Metall Oberflächenplasmonen an und wird dabei gestreut.
- durch die Überlagerung von einfallender und gestreuter Strahlung wird im Molekül ein Dipol induziert.
- die inelastisch gestreute Welle ist resonant zu den Oberflächenplasmonen¹².

Zum besseren Verständnis geht man von sphärischen Metallpartikeln (M) aus, in deren Nähe sich das polarisierbare Molekül im Abstand r' zum Mittelpunkt der Metallkugel mit dem

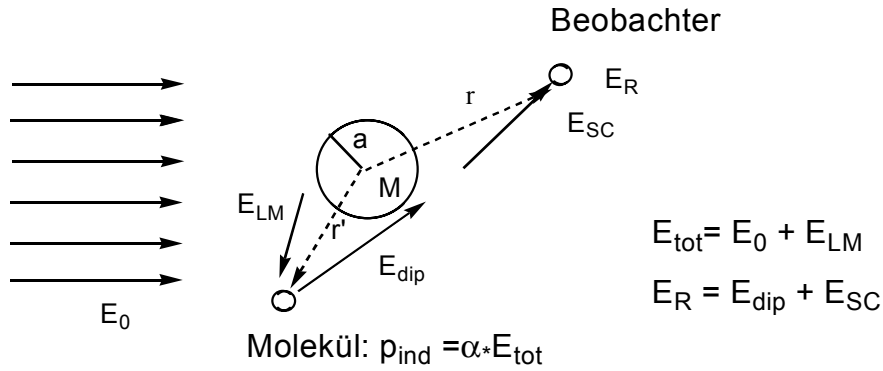


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der elektrischen Felder nahe einer Metallkugel.

Radius a (im Bereich von $10 \text{ nm} < a < 100 \text{ nm}$) befindet (s. Abb. 2.3). Die elektromagnetische Welle der Erregerstrahlung mit der Frequenz ν_0 trifft nun auf das Molekül und die Metallkugel. Im Molekül wird ein Dipol induziert, der mit der Ramanfrequenz ν_R oszilliert. Das induzierte Dipolmoment ist dem Raman-Polarisierbarkeitstensor und dem anregenden Feld $\vec{E}_{\text{tot}}(\vec{r}', \nu_0)$ proportional:

$$\vec{p}_{\text{ind}}(\vec{r}', \nu_R) = \alpha \vec{E}_{\text{tot}}(\vec{r}', \nu_0) \quad (8)$$

welches sich wiederum aus dem eingestrahlenen Feld E_0 und dem an der Metallkugel nach der Lorenz-Mie-Theorie elastisch gestreuten Feld $E_{\text{LM}}(r', \nu_0)$ zusammensetzt:

$$\vec{E}_{\text{tot}}(\vec{r}', \nu_0) = \vec{E}_0(\vec{r}', \nu_0) + \vec{E}_{\text{LM}}(\vec{r}', \nu_0). \quad (9)$$

Der mit der Frequenz ν oszillierende Dipol erzeugt seinerseits ein Feld $\vec{E}_{\text{dip}}(\vec{r}', \nu)$, welches proportional zu dem erzeugenden Feld $\vec{E}_{\text{tot}}(\vec{r}', \nu_0)$ ist. Dieses vom Dipol ausgestrahlte Feld wir nun, wie auch das ursprünglich eingestrahelte Feld, an der Metallstruktur gestreut (\vec{E}_{SC}), so daß sich die resultierende elektrische Feldstärke \vec{E}_R der Ramanfrequenz ν_R an dem Beobachtungspunkt im Abstand r vom Mittelpunkt der Kugel folgendermaßen ergibt:

$$\vec{E}_R(\vec{r}, \nu) = \vec{E}_{\text{dip}}(\vec{r}'', \nu) + \vec{E}_{\text{SC}}(\vec{r}', \nu). \quad (10)$$

Die Variable $|\vec{r}''|$ in $\vec{E}_{\text{dip}}(\vec{r}'', \nu)$ entspricht dabei dem Ortsvektor, der vom Molekül zum Beobachtungspunkt zeigt. Da allerdings $|\vec{r}| \approx |\vec{r}''|$ ist, kann \vec{r}'' in guter Näherung durch einen Ortsvektor \vec{r} ersetzt werden, dessen Ursprung im Mittelpunkt der Kugel liegt

\vec{E}_R ist dann besonders hoch, wenn die Frequenz der einfallenden Strahlung, ν_0 , mit der Frequenz von Oberflächenplasmonen übereinstimmt. Letztere ist ihrerseits von Form und Größe der Metallpartikel abhängig¹³. Für Alkalimetalle, Kupfer, Silber und Gold sind die Resonanzbedingungen im sichtbaren Bereich zu erfüllen, was die gute Anwendbarkeit insbesondere der drei Übergangsmetalle in der SERS-Spektroskopie erklärt. Sphärische Metallpartikel zeigen mit zunehmenden Radien eine geringer werdende Verstärkung und eine Verschiebung der Resonanzbedingungen zu größeren Wellenlängen hin.

Geht man von Kugeln zu ellipsoiden Teilchen über und behält die Größe der Teilchen in soweit bei, daß diese noch immer wesentlich kleiner als die Wellenlänge sind^{14,15}, so verschiebt sich die Plasmonenresonanz zum Roten. Moleküle, die an der stärker gekrümmten Fläche eines ellipsoiden Teilchens lokalisiert sind liefern höhere SERS-Intensitäten als Moleküle an den schwächer gekrümmten Stellen oder an Kugeln. Dieser sog. „Spitzen-“ oder „lightning-rod“- Effekt beruht auf der Ballung elektromagnetischer Feldlinien in Oberflächenbereichen mit hoher Krümmung¹⁶. Die mittlere Verstärkung einer Monoschicht um ein Ellipsoid wächst um nahezu zwei Größenordnungen, wenn das Achsenverhältnis a/b von eins (Kugel) auf drei erhöht wird (s. Abb. 2.4).

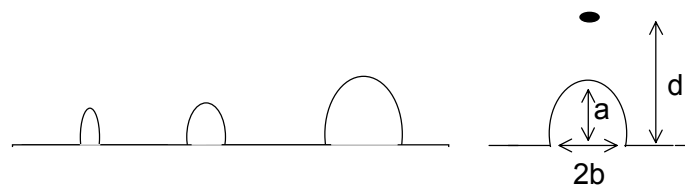


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung des Modells einer Oberfläche aus isolierten halbellipsoiden Strukturen. Ein Molekül befindet sich im Abstand d zum Mittelpunkt eines Ellipsoids.

Das Modell für kolloidale Lösungen basiert auf einer großen Anzahl von ellipsoiden Partikeln mit unterschiedlichen Größen und Achsenverhältnissen, wobei Wechselwirkungen zwischen benachbarten Teilen zunächst nicht berücksichtigt werden. Dieses Modell läßt sich auch auf rauhe Oberflächen (z.B. Elektroden, Silberfilme über Nanopartikeln usw.) übertragen, wenn man eine Vielzahl von Halbellipsoiden annimmt, die aus einem planaren Substrat hervortreten¹⁷, wie in Abb. 2.4 gezeigt. In beiden Fällen zeigen die Berechnungen im Vergleich zu den kugelförmigen Teilchen eine bathochrome Verschiebung der Plasmonenresonanz, was auch im Experiment zu beobachten ist. Diese Verschiebung wird im allgemeinen auf eine Aggregatbildung zurückgeführt¹⁸.

Eine wichtige Voraussage der Theorie zum elektromagnetischen Anteil ist, daß die Verstärkung mit zunehmenden Abstand des Moleküls zur Oberfläche deutlich abnimmt. Dies folgt daraus, daß die elektrische Feldstärke an einer Kugel mit dem Radius a (oder an einer

Krümmung mit dem lokalen Radius a) proportional zu $(a/d)^3$ ist, wobei d der Abstand eines Moleküls zum Zentrum der Kugel ist. Berücksichtigt man sowohl die ein- als auch die auslaufende Welle, so gilt für die Abstandsabhängigkeit der SERS-Intensität¹⁹:

$$I_{SERS} \sim E_{ein}^2 * E_{aus}^2 \sim (a/d)^{12}. \quad (11)$$

Damit ist dieser Anteil zur Gesamtverstärkung aber nicht auf die erste Monolage adsorbierter Moleküle beschränkt, sondern zeichnet sich durch größere Reichweite (ca. 10 nm) aus. Man spricht von einer „long-range“-Verstärkung. Die Theorie sagt für alle adsorbierten Moleküle die gleiche elektromagnetische Verstärkung voraus, d. h. die SERS-Intensität sollte im wesentlichen vom Streuquerschnitt des freien Moleküls abhängen. Die in der Praxis beobachteten unterschiedlichen Verstärkungen für verschiedene adsorbierte Moleküle zeigen jedoch, daß auch ein chemischer Effekt zur Gesamtverstärkung beiträgt. Auch die typischen Verschiebungen der Banden in den SERS-Spektren gegenüber den Raman-Spektren der gleichen Substanzen im freien Zustand lassen sich ohne die Annahme von chemischen Wechselwirkungen zwischen Molekül und Oberfläche nicht erklären.

2.2.2 Chemischer Anteil

Dieser Anteil zur Gesamtverstärkung wird auch als charge-transfer (CT) Anteil beschrieben. Er basiert im wesentlichen auf der Möglichkeit eines Ladungstransfers zwischen den Molekülen und dem Metall, z. B. bei Lichteinstahlung. Der CT-Effekt hat nur eine sehr kurze Reichweite und beschränkt sich auf die erste adsorbierte Moleküllage. Die Verstärkungsfaktoren liegen für diesen Anteil zum SERS bei etwa 100 und sind hierbei sehr von der adsorbierten Spezies und deren chemischen Eigenschaften abhängig. Für bestimmte Moleküle und Anregungswellenlängen kann ein resonanter SERS (SERRS: surface enhanced resonance Raman-Scattering) auftreten.

So wurde z.B. beobachtet, daß CO auf kalt abgeschiedenen Silber unter gleichen Bedingungen etwa 100 mal stärkere Banden ergab als N₂, obwohl beide Moleküle ohne Adsorption einen vergleichbaren Streuquerschnitt aufweisen. Zusätzlich ergab sich für das CO eine Bandenverschiebung um 28 cm⁻¹, während das Spektrum von N₂ durch die Adsorption kaum verändert wurde²⁰.

Die chemische Verstärkung beruht auf einer Änderung der Polarisierbarkeit, die durch einen resonanten charge-transfer (CT) vom Metall zum Molekül (oder auch umgekehrt) erzeugt wird. Damit beschreibt die chemische oder CT-Theorie einen besonderen Fall der Resonanz-Raman-Streuung. Eine besondere Rolle beim CT-Effekt spielen an der Oberfläche eines

Substrates angelagerte Metallatome oder -cluster, die atomare Dimensionen (atomic scale roughness : ASR)²¹ aufweisen. Diese Metallatome oder -cluster mit nicht mehr als sechs Atomen stellen sogenannte „active sites“ dar und finden sich häufig an Stufen und Versetzungen auf der Oberfläche. An solchen exponierten Stellen treten nach UPS-Experimenten^{22,23} lokalisierte Ag 4d Zustände auf, die oberhalb des Silber d-Bandes und unterhalb des Fermi-Niveaus liegen. Diese Zustände bilden einen schmalen Bereich (0.5 – 1 eV) elektronischer Zustandsdichte als möglichen Ausgangspunkt für einen photoinduzierten Elektronenübergang zu einem Molekülorbital des Adsorbats. Je nach der chemischen Natur des adsorbierten Moleküls kann es durch Wechselwirkung mit einem Photon geeigneter Wellenlänge zu einem Elektronenübergang vom Metall zum LUMO oder vom HOMO zum Metall kommen. Diese beiden Fälle sind für Cyanid²⁴ und Pyridin²⁵ beschrieben worden. An elektrochemisch aufgerauhten Oberflächen, an die ein variables Potential angelegt wird, ist die Spannung U_{\max} (gegen eine Kalomel-Elektrode), bei der maximale SERS-Intensität auftritt, linear von der Anregungsfrequenz abhängig. Anhand der Steigung der Geraden kann man bestimmen, ob es sich um einen CT-Übergang vom Molekül zum Metall (negative Steigung) oder vom Metall auf das Molekül (positive Steigung) handelt. Je nach Spannung kann man sogar von einem Übergang auf den anderen „umschalten“²⁶.

2.2.3 SERS-aktive Oberflächen

Zu den gebräuchlichsten SERS-aktiven Oberflächen zählen elektrochemisch aufgerauhte Elektroden, Metallkolloide, Metallinseln und nanostrukturierte Metallfilme der entsprechenden Übergangsmetalle. Ziel ist es, Substrate zu erzeugen, die :

- hohe SERS-Intensität aufweisen,
- in standardisierter Form herstellbar sind,
- sich lange ohne Verlust der Verstärkung und Adsorptionseigenschaften lagern lassen,
- räumlich homogen sind,
- beständig gegenüber Lösungsmitteln sind,
- leicht regenerier- oder austauschbar sind,
- problemlos entsorgt werden können,
- kostengünstig und umweltschonend sind.

Unter Berücksichtigung dieser Punkte sollen hier die verbreitetsten Methoden zur Herstellung von SERS-Substraten kurz beschrieben werden.

Aufgerauhte Elektroden^{27,28}

Die ersten Untersuchungen zu SERS wurden an elektrochemisch aufgerauhten Silberelektroden durchgeführt. Zu deren Herstellung gibt es eine Vielzahl von Prozeduren, so ist z.B. ein Redoxzyklus mit dreimaligem Durchfahren einer Spannung von -0.5V bis 0.6V (gegen eine Kalomel-Elektrode) bei Verwendung einer 1M NaClO₄-Lösung als Elektrolyt üblich.

Aufgerauhte Elektroden sind recht einfach herzustellen und liefern hohe Verstärkungsfaktoren von bis zu 10⁶. Allerdings verlieren die Signale schon nach kurzer Zeit merklich an Intensität, da die rauhen Oberflächen chemisch reaktiv und daher nicht sehr stabil sind. Durch erneutes Anwenden von Redoxzyklen lassen sich jedoch Elektroden nach Gebrauch leicht regenerieren.

Metallkolloide

Metallkolloide stellen eine Dispersion von kleinen Metallpartikeln in einem homogenen Medium, meist Wasser (Hydrosol), dar. Die Partikel haben Abmessungen zwischen 1 nm und 1 µm und zeichnen sich durch ihre charakteristische Lichtstreuung aus. Bei der ersten Darstellung von Kolloiden für SERS im Jahr 1979²⁹ wurde eine Silbernitrat-Lösung mit Natriumborhydrid reduziert. Es sind jedoch auch andere Reduktionsmittel üblich. Eine sehr gebräuchliche Methode ist die nach Lee und Meysel³⁰, bei der Wasserstoff, Natriumcitrat oder Natriumborhydrid verwendet wird.

Die kolloidalen Lösungen der Edelmetalle Gold und Silber sind farbig und weisen ein Absorptionsmaximum bei ca. 390 nm für Silber bzw. 520 nm für Gold auf. Die Absorption ist auf eine Anregung von Oberflächenplasmonen in den Metallpartikeln zurückzuführen. Wie Rechnungen zeigten, ist die Lage der Absorptionsmaxima von der Größe der Partikel abhängig¹².

Kolloide sind unkompliziert herzustellen und liefern hohe Verstärkungen. Da sie jedoch zur Aggregation neigen, verlieren die SERS-Spektren mit der Zeit an Intensität. Zudem läßt sich die Größe der Partikel nicht reproduzierbar einstellen, weshalb auch räumliche Inhomogenitäten auftreten. Die Mischung von Kolloid und gelöstem Analyt ist irreversibel, weshalb Kolloide als SERS-Substrate nicht regenerierbar sind und nur für ein Experiment verwendet werden können.

*Metallinselfilme*³¹

Werden Metalle mit geringen Aufdampfraten von ca. 6 pm/s auf saubere Glasträger aufgedampft, so bilden sich spontan sog. Inselfilme von etwa 5 nm Schichtdicke. Da das Metall auf dem sauberen Glas schlecht haftet, läuft es während des Aufdampfprozesses zu

Inseln zusammen (s. Abb. 2.5). Die Dimensionen der Inseln liegen dann in der für SERS-Aktivität erforderlichen Größenordnung.

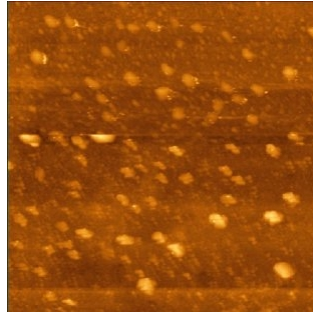


Abbildung 2.5 Atomkraftmikroskopische Aufnahme eines Ag-Inselfilms (5 µm x 5 µm).

Die Herstellung der Inselfilme ist nicht aufwendig. Die erhaltenen Oberflächen sind homogen strukturiert. Die Träger der Substrate können nach Auflösen der Metallfilme wiederverwendet werden. Nachteilig sind die große Empfindlichkeit gegen chemische und physikalische Einflüsse. Die für SERS übliche Verstärkung läßt bereits nach wenigen Tagen merklich nach. Außerdem darf die Laserintensität im Experiment nicht zu groß sein, da ansonsten Löcher in die Filme gebrannt werden.

Nanostrukturierte Metalloberflächen

Derartige Substrate können entweder durch direkte Strukturierung einer Metalloberfläche oder durch Aufdampfen von Metallfilmen auf strukturierte Träger erzeugt werden.

Eine Strukturierung von Metallen wird für gewöhnlich an Metallblechen oder -folien durchgeführt. So können die Strukturen durch Ätzen mit halbkonzentrierter Salpetersäure³² oder - entsprechend der Methoden für Elektroden – elektrochemisch über Redoxzyklen erzeugt werden.

Beide Methoden liefern ohne größeren präparativen Aufwand SERS-aktive Metalloberflächen, die allerdings nicht sehr homogen sind. Von Vorteil ist jedoch, daß diese Metallbleche bzw. -folien mehrfach wiederverwendet werden können.

Für Metallfilme auf strukturierten Trägern gibt es eine Vielzahl von Präparationsmethoden. Besonders für solche Filme, die auf Nanopartikel-bedeckte Oberflächen aufgebracht werden, existiert eine große Auswahl an Substraten. Als Nanopartikel können z.B. Teflonpartikel³³, Metalloxidpulver³⁴, Polystyrolkugeln³⁵ oder Diamantkristallite³⁶ verwendet werden.

Die Herstellung solcher Substrate ist aufgrund der Zahl der benötigten Prozeß-Schritte recht arbeitsintensiv. Sie liefern aber hohe Verstärkungen, die über Wochen stabil bleiben. Aufgrund der Präparationen und der Beschaffenheit der Partikel sind die Oberflächen i. a. nicht sehr homogen wie in Abbildung 2.6 am Beispiel von Silberfilmen über Aluminiumoxid-

bzw. Diamantpartikeln dargestellt ist. Die Träger könne nach Ablösen der Metallschichten und Entfernung der Nanopartikel wieder verwendet werden.

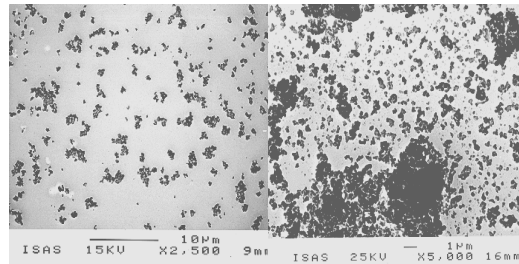


Abbildung 2.6 SEM Bilder von Silberfilmen über Diamantpartikeln (links) und Aluminiumoxid (rechts)

Direkt strukturierte Substrate, die mit Metallfilmen bedampft werden, weisen deutliche Vorteile gegenüber den Metallfilmen über Nanopartikeln auf. Als strukturierte Träger können z. B. angeschliffene oder sandgestrahlte Glasoberflächen³⁷, selbststrukturierende „rauhe“ Polymere³⁸ oder mittels Elektronenstrahlolithographie strukturierte Siliziumwafer³⁹ verwendet werden.

Diese Substrate können durch Ablösen der Metallschicht und erneutes Bedampfen leicht regeneriert werden. Die Stabilität der Substrate entspricht der von Metallfilmen über Nanopartikeln. Die erzielten Verstärkungen hängen deutlich von der Präparation der Proben ab. Die „rauh“ Polymere und die sandgestrahlten Substrate liefern bereits hohe, die elektronenstrahlolithographisch hergestellten Substrate noch höhere Verstärkungen. Angeschliffene und sandgestrahlte Träger sind relativ leicht herzustellen, dafür entstehen hierbei rein zufällig strukturierte Oberflächen geringer Reproduzierbarkeit (s. Abb. 2.7).

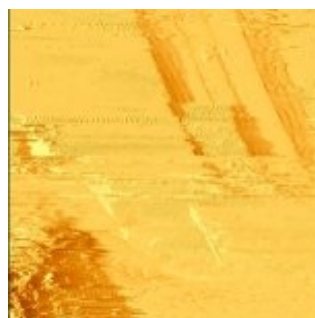


Abbildung 2.7 Atomkraftmikroskopische Aufnahme eines sandgestrahlten Trägers für SERS-Substrate (50 μm x 50 μm).

Die elektronenstrahlolithographische Strukturierung von Siliziumwafern ist demgegenüber technologisch sehr aufwendig. In Abbildung 2.8 sind die Arbeitsschritte in einem

vereinfachten Schema dargestellt. Es lassen sich reguläre Strukturen wie etwa Gitter einzelner Metallpartikel oder gekreuzte Metallgitter erstellen, wobei die maximale Größe der strukturierten Felder auf den Wavern derzeit $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ nicht übersteigt. Aufgrund der Variabilität der Technologie können diese Substrate durch numerische Simulationen für SERS optimiert werden⁴⁰.

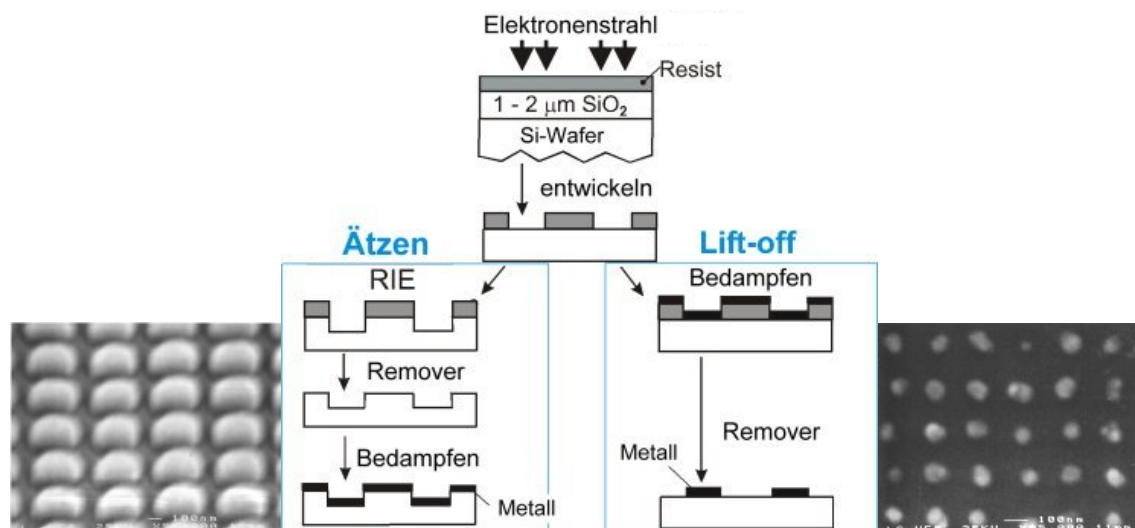


Abbildung 2.8 Schema zur Herstellung von SERS-Substraten mittels Elektronenstrahl-Lithographie. (RIE = reaktives Ionen-Ätzen)

2.2.4 Adsorption an SERS-Substraten

Für die SERS-Spektroskopie sind besonders Monolagen adsorbierter Moleküle von Interesse. Diese Schichten können durch das Langmuir-Blodgett-Verfahren⁴¹ oder mittels Selbstorganisation von chemischen Beschichtungen hergestellt werden. Man erhält dann ultradünne Filme mit einer hohen Ordnung auf molekularer Ebene. Die Ausbildung dieser Monolagen erfordert eine Physi- oder Chemisorption der Beschichtungssubstanzen an das Substrat. Die Grenze zwischen Physisorption und Chemisorption ist dabei allerdings fließend und durch die Bindungsenergie an der Oberfläche gegeben. Während diese bei Physisorption ca. $20\ \text{kJ/mol}$ beträgt, ist sie bei Chemisorption etwa zehnmal so groß. Die höhere Bindungsenergie wird durch eine chemische Bindung zwischen dem Adsorbat und der Oberfläche bedingt. Dabei werden u. U. Bindungen im adsorbierenden Molekül gebrochen, was diese Art der Sorption auch für die chemische Katalyse interessant macht. Im Langmuir-Blodgett-Verfahren werden Monolagen oberflächenaktiver Moleküle von einer Wasseroberfläche auf den Träger überführt. Da diese Methode in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurde, sei hier auf die Literatur verwiesen⁴¹.

Monolagen, die durch selbstorganisierende Molekülbeschichtungen entstehen, werden kurz als SAM (engl. self-assembled monolayer) bezeichnet. Die Ausbildung dieser Schichten beruht auf Wechselwirkungen zur Oberfläche sowie zwischen den Molekülen. Die Stärke der Wechselwirkung mit der Oberfläche bestimmt die Stabilität der SAM. Die beste Haftung wird durch kovalente Bindung der Moleküle an das Substrat erzielt. Voraussetzung für die Ausbildung einer solchen Bindung sind entsprechende Funktionalitäten auf Seiten des Substrats und der Beschichtungsmoleküle. Die Wechselwirkung der Moleküle untereinander, wie z. B. van-der-Waals-Kräfte und Kristallisationseffekte, bewirken, daß sich auf der Oberfläche eine sehr dicht gepackte Lage ausbildet.

So kann z. B. ein silanisiertes Glas als Träger einer SAM aus Alkylsilanen betrachtet werden. Werden Metalle als Substrate verwendet, so werden andere funktionelle Gruppen im Molekül benötigt, die eine Chemisorption der Moleküle an das Metall ermöglichen. Hierzu zählen Thiole, Disulfide, Amine, und Carbonsäuren. Häufig werden Thiole eingesetzt, die sich problemlos auf Gold- und Silberoberflächen chemisorbieren lassen. Alkylthiole bilden mit Schichten der genannten Metalle kovalente Bindungen aus. Die Alkylreste stehen dabei wie ein Rasen in einem Winkel von ca. 70° zur Oberfläche^{42,43}. Diese Ausrichtung der Alkylketten wird durch schwache zwischenmolekulare Kräfte verursacht. Solche Monolagen können dazu verwendet werden, die Oberfläche von wasserempfindlichen Bauteilen zu hydrophobieren, um Hohlräumoleküle kovalent am Sensorelement zu verankern oder um eine bessere Haftung von Polymerschichten auf einem Metall zu erzielen.

Da insbesondere Thiol-Verbindungen dauerhafte und stabile Beschichtungen gewährleisten, sind sie die am besten untersuchten Beschichtungssubstanzen für SERS. Zur Sorption von Molekülen, die an sich keine der Voraussetzungen zur Immobilisierung an eine Metalloberfläche erfüllen, sind daher Syntheserouten gefragt, die die entsprechenden Funktionalitäten in die Moleküle einführen, wobei die Thiol-Gruppe als beste Wahl gilt.

Vergleichend kann man über die beiden Präparationsmethoden sagen, daß Langmuir-Blodgett-Filme aufwendiger herzustellen, chemisch und mechanisch weniger stabil und auf langkettige oberflächenaktive Moleküle beschränkt sind. Die selbstorganisierenden Monolagen bieten hingegen die Möglichkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle auf einer Oberfläche zu immobilisieren, sofern die benötigten funktionellen Gruppen im Molekül vorliegen.

2.3 Chemo-optische Sensoren

Optische Sensoren sind Meßanordnungen, die eine kontinuierliche Erfassung physikalischer oder chemischer Parameter mit Hilfe optischer Methoden ermöglichen. Es können hiermit z.B. chemische Verbindungen oder Ionen, im günstigsten Fall selektiv und reversibel, über konzentrationsabhängige Signale erfaßt werden. Der Vorteil liegt vor allem darin, daß optische Signale nicht durch elektromagnetische Felder gestört werden, eine Signalübertragung mittels Lichtleiter über weite Entfernungen möglich ist und eine Vielzahl an Detektionsverfahren zur Verfügung steht. Für optische Sensoren kann grundsätzlich der gesamte Bereich vom UV bis zum fernen IR verwendet werden. Chemo-optische Sensoren spielen z.B. in der Prozeßsteuerung und -überwachung zunehmend eine Rolle. Optische Sensoren werden aber auch generell dort eingesetzt, wo ein Meßort gar nicht oder nur schwer zugänglich ist oder wo Langzeitüberwachungen notwendig sind.

Der wohl verbreitetste Chemosensor - wenn auch kein optischer - ist die Lambda-Sonde, mit deren Hilfe insbesondere der NO-Ausstoß bei Kraftfahrzeugen reduziert worden ist.

2.3.1 Aufbau eines Chemosensors.

Die sensitive Einheit eines Chemosensors ist die Rezeptorschicht, welche selektiv mit dem Analyten in Wechselwirkung tritt. Hierdurch kommt es entweder zur Änderung von physikalischen oder chemischen Eigenschaften der Rezeptorschicht oder aber zum direkten Nachweis des adsorbierten Analyten. Dieser Vorgang wird durch einen sog. Transducer in ein elektrisch verwertbares Signal umgewandelt, welches anschließend von der Messelektronik ausgelesen und zur Datenverarbeitung an den Computer weitergeleitet wird. Zu den messbaren Parametern gehören z. B. Temperatur, Masse, elektrische Kenngrößen wie Spannung, Strom, Leitfähigkeit und Kapazität oder eben optische Eigenschaften wie Brechungsindex, Absorption, Streuung, optische Schichtdicke oder Fluoreszenz.

So können z.B. PAHs in sensitiven Schichten zunächst angereichert und dann fluoreszenzspektroskopisch vermessen werden.

An Chemosensoren wird eine Reihe von Anforderungen gestellt. Hierzu gehören:

- eine hohe Selektivität für einen bestimmten Analyten oder eine Analytgruppe;
- eine hohe Sensitivität zur Erfassung geringer Konzentrationen;
- die Umwandlung chemischer Information in ein elektrisches Signal (Transducerprinzip);
- ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem elektrischen Signal und der Analytkonzentration;

- die Reversibilität und Reproduzierbarkeit der Meßeffekte;
- ein schnelles Ansprechverhalten;
- Langzeitstabilität der sensitiven Schicht;
- niedrige Kosten in Produktion, Betrieb und Wartung;
- eine mögliche Miniaturisierbarkeit.

Realität ist allerdings, daß kein Chemosensor allen Anforderungen in gleicher Weise gerecht werden kann, sondern daß je nach Analysenproblem den verschiedenen Aspekten unterschiedliches Gewicht zukommt.

Optische Untersuchungsmethoden sind in der analytischen Chemie seit langem bekannt. UV/Vis-, IR-, Fluoreszenz- und Raman-Spektroskopie zählen heute in der qualitativen und quantitativen Analyse zu den Standardmethoden, da sie mit einem relativ geringen apparativen Aufwand verbunden sind. Eine räumliche Trennung der Messapparatur vom Ort der Messung ermöglicht den Einsatz in chemisch aggressiver Umgebung. Dies kann durch die Führung der Strahlung in Lichtleitern erzielt werden, die meistens aus Quarz oder Glas hergestellt werden. Bei den entsprechenden apparativen Voraussetzungen können mitunter mehrere Meßstellen gleichzeitig mit demselben Spektrometer überwacht werden. Quarzfasern haben den Vorteil, dass sie UV-durchlässig sind und daher in der Chemosensorik für Fluoreszenzmessungen eingesetzt werden können. Sie sind allerdings nicht für den Einsatz in der IR-Spektroskopie geeignet, weshalb hier Fasern aus Materialien wie Zirkoniumfluorid oder Silberhalogeniden eingesetzt werden.

Viele Sensormeßgrößen sind unspezifisch für den Analyten, so daß die Selektivität alleine über die Wechselwirkung mit der Sensoroberfläche gegeben ist und die Adsorption von Verunreinigungen zu Querempfindlichkeiten führt. Bei der Detektion über molekulspezifische Meßgrößen wie z.B. IR-Absorption oder Raman-Streuung wird durch die Kombination von selektiver Adsorption und spezifischer Detektion eine hohe Selektivität erreicht. Dies kann dann auch den Multikomponentennachweis mit einem einzelnen Sensor ermöglichen.

2.3.2 Sensor-Analyt-Wechselwirkungen

Obwohl verschiedene physikalisch-chemische Mechanismen bei der Analyterkennung durch chemische Sensoren zum Einsatz kommen, so treten doch gewisse Phänomene auf, die allen sensitiven Schichten gemeinsam sind. Vor der eigentlichen molekularen Erkennung tritt in der Regel eine Sorption des Analyten an der Rezeptorschicht auf.

Das einfachste mathematische Modell zur Beschreibung der Adsorption von z.B. Gasen an

der Oberfläche eines Festkörpers ist durch die Langmuirsche Adsorptionsisotherme gegeben. Hierdurch kann der Grad der Oberflächenbedeckung θ in Abhängigkeit vom Partialdruck des Gases bei konstanter Temperatur berechnet werden. Der Bedeckungsgrad θ ist definiert als das Verhältnis der besetzten Adsorptionsstellen zur Gesamtzahl der möglichen Adsorptionsstellen.

Die Langmuir-Isotherme beruht auf folgenden Annahmen:

- Die Oberfläche des Festkörpers besitzt eine bestimmte Anzahl von gleichartigen Adsorptionsstellen.
- Es tritt keine Wechselwirkung der adsorbierten Moleküle untereinander auf.
- Die Wahrscheinlichkeit der Adsorption an einer Adsorptionsstelle ist unabhängig vom Bedeckungsgrad θ .
- Der maximal erreichbare Bedeckungsgrad ist 1, was einer vollständigen Monolage entspricht.

Die Herleitung des Bedeckungsgrades kann Lehrbüchern der Physikalischen Chemie⁴⁴ entnommen werden. Abbildung 2.9 zeigt den Bedeckungsgrad θ in Abhängigkeit vom Partialdruck des Adsorbates bei konstanter Temperatur. Die Konstante K_p entspricht dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten für Adsorption und Desorption. Der Bedeckungsgrad steigt zunächst linear mit dem Partialdruck des Adsorbates an, flacht dann ab und strebt asymptotisch dem Wert 1 zu. Für chemische Sensoren ist der lineare Bereich für analytische Zwecke am besten geeignet, da hier der gemessene Effekt der Konzentration in der Gasphase proportional ist. Dieses Konzept lässt sich auch auf die Lösungsphase übertragen.

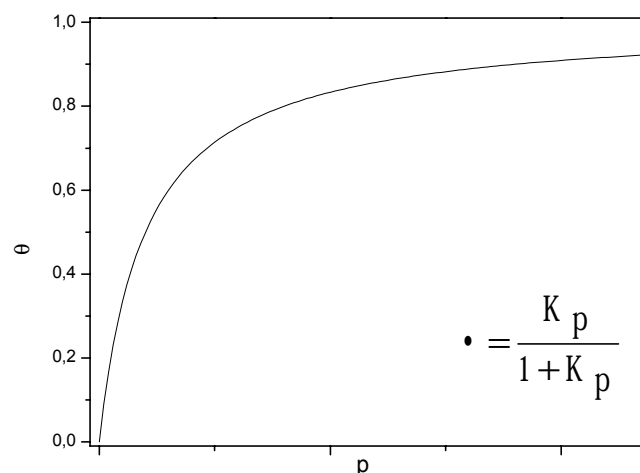


Abbildung 2.9 Langmuirsche Adsorptionsisotherme.

Nach der Adsorption folgt der eigentliche Erkennungsschritt, der auf verschiedenen Effekten wie z.B. Redox- oder Säure-Basen-Reaktionen basieren kann. Andererseits ist auch eine

Größenerkennung möglich, wenn die sensitive Schicht Hohlräume aufweist, die der Größe des Analyten entsprechen. Während im ersten Fall die Funktionalitäten des Analyten entscheidend sind, bestimmen im zweiten Fall unselektive van-der-Waals Wechselwirkungen den Erkennungsmechanismus. Wichtig ist auch, daß die Bindung an die sensitive Schicht reversibel ist. Daher wird bei der Entwicklung von Sensoren meist schwächeren Wechselwirkungen der Vorzug gegeben, eben den van-der-Waals Kräften oder etwa Wasserstoffbrückenbindungen.

Die bekannten Wechselwirkungen können nach ihrer Stärke und ihrer Reichweite unterschieden werden. Die folgende Tabelle 2.1 gibt hierzu eine Übersicht.

Wechselwirkung	Bindungsenthalpie [kJ/mol]	Abstandsabhängigkeit der Wechselwirkungsenergie
Kovalente Bindung	50 - 1000	komplex (intermolekular und abhängig von der Wellenfunktion Ψ)
Ionen-Ionen	20 - 50	$1/r^2$
Wasserstoffbrücke	< 30	$1/r^4$
Ion - Dipol	< 20	$1/r^3$
Dipol - Dipol	< 20	$1/r^4$
Ion – induzierter Dipol	< 20	$1/r^5$
Dipol – induzierter Dipol	< 20	$1/r^6$

Tabelle 2.1: Bindungsenergien und Reichweiten der verschiedenen Arten von Wechselwirkungen. (r = Abstand vom Ladungszentrum)

Die letztgenannten vier Wechselwirkungstypen werden auch unter dem Namen van-der-Waals Kräfte zusammengefaßt. Hinzu kommen noch Wasserstoffbrückenbindungen sowie Ionen-Ionen-Wechselwirkungen. Kovalente Bindungen sind meist zu stark, um in Sensoren Anwendung finden zu können.

2.3.3 Sensorschichten

Im folgenden werden die einzelnen Konzepte zur Erzeugung und Nutzung sensitiver Schichten - Rezeptoren - vorgestellt, wie sie in den meisten Fällen auf chemo-optischen Sensorelementen vorhanden sind.

Adsorptionsschichten

Vor allem massensensitive Sensoren tragen häufig Adsorptionsschichten aus Materialien wie etwa Silicagel. Letztere sind leicht verfügbar und kostengünstig, da sie auch in der Chromatographie eingesetzt werden. Der wesentliche Nachteil der Schichten ist ihre nur geringe Selektivität, die aber teilweise durch Aufbau von sog. Sensorarrays kompensiert werden kann. In den Arrays werden mehrere Sensoren mit voneinander verschiedenen Schichten verwendet. Ihre Signale werden dann mit chemometrischen Methoden, z.B. neuronalen Netzen oder anderen Mustererkennungsmethoden ausgewertet⁴⁵

Schichten zur Ausbildung von Donor-Akzeptor-Komplexen

Die Selektivität der Rezeptorschichten beruht hier auf die Bildung von Wasserstoffbrücken oder Komplexen. Donor-Akzeptor-Schichten werden häufig zur Detektion von Ionen - meist Kationen - in Wasser oder in anderen Lösungsmitteln verwendet. Kationen, besonders die der Übergangsmetalle, bilden bevorzugt Komplexe mit Stickstoff-, Schwefel- oder Sauerstoffhaltigen Liganden. Hierbei sind Liganden mit mehreren Bindungsstellen im Molekül besonders effizient, da die gebildeten Komplexe sehr stabil sind. Alkalimetalle lassen sich dagegen mit Kryptanden und Kronenethern komplexieren^{46,47}. Diese ringförmigen Liganden lagern das Metall in ihre Mitte ein und bieten die Option, eine Größenselektion durch maßgeschneiderte Ringe vorzunehmen. Nachteilig bei dieser Art von Schichten ist die häufig fehlende Reversibilität der Wechselwirkung.

Supramolekulare Strukturen

Als "supramolekulare Strukturen" werden stabile Verbindungen von mindestens zwei abgeschlossenen molekularen Einheiten bezeichnet, die nicht kovalent miteinander verknüpft sind. Eng mit den supramolekularen Strukturen ist die Selbstorganisation von Molekülpopulationen verbunden. So beruht die Funktionsweise von biologischen Systemen, wie sie z.B. bei der Tertiärstruktur von Proteinen, der DNA-Doppelhelix oder bei Lipidmembranen zu finden ist, auf Selbstorganisation. Außerhalb biologischer Systeme lassen sich solche Phänomene z.B. bei der Micellenbildung von Tensiden beobachten. Die Kräfte, die für die Selbstorganisation ausschlaggebend sind, sind van-der-Waals Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Die Ausbildung von selbstorganisierten Strukturen ist meist ein kooperativer Prozeß, d.h. existiert einmal ein kleiner geordneter Bereich, so steigt die Wachstumsgeschwindigkeit stark an.

In der Chemosensorik werden zunehmend selbstorganisierende Monolagen als Rezeptorschichten verwendet, z.B. Thiol-Monolagen auf Gold- oder Silberoberflächen oder Alkyl-Monolagen, die mit Alkylsilylchloriden auf Quarzoberflächen aufgebracht werden. Eine interessante Anwendung besteht in der Verwendung von aliphatischen Thiolen mit

verschieden langen Ketten. Es können dadurch kleine hydrophobe Taschen entstehen, die sich für die Anlagerung von lipophilen Molekülen eignen⁴⁸.

Sterisch selektive Schichten

Eine Vielzahl von Sensoren verwendet Größenerkennung in unterschiedlichen Formen. Grundlage hierfür Prinzip bildet das Schlüssel-Schloß-Prinzip von Enzymen. Bei den Chemosensoren werden hierfür Schichten mit Hohlräumen eingesetzt, deren Öffnungen der Größe der Analyten angepaßt werden können. Die wirkenden Kräfte sind wie bei den supramolekularen Strukturen relativ schwache Wechselwirkungen. Darüber hinaus können u.U auch weitere Phänomene wie z.B. Wasserstoffbrücken auftreten. Zwei Möglichkeiten zur Erzeugung von "maßgeschneiderten" Hohlräumen basieren auf Kenntnissen der Gast-Wirts-Chemie und auf der Methode des molekularen Prägens.

Weist die Rezeptorschicht (Wirt) für den Analyten (Gast) geeignete Hohlräume auf, so wird der Gast durch van-der-Waals oder elektrostatische Wechselwirkungen eingelagert. Um sich für die Sensorik zu eignen, muß dieser Bindungsschritt reversibel sein. Die bereits erwähnten Kronenether und Kryptanden waren die ersten Wirts-Moleküle, die näher untersucht wurden. Mit ihrer Hilfe wurde es möglich, anorganische Salze in organischen Lösungsmitteln zu lösen⁴⁶.

Eine weitere Art von Wirts-Molekülen stellen Cyclodextrine dar. Es handelt sich hierbei um cyclische Oligomere aus α -1,4-verknüpften Glucopyranoseeinheiten, die bereits seit 1891 bekannt sind. Die Cyclodextrine weisen einen hydrophilen äußeren Bereich und einen lipophilen Hohlraum auf. Weil Cyclodextrine nicht toxisch und biologisch abbaubar sind, haben sie in vielen Bereichen Anwendung gefunden. So werden lipophile Arzneiwirkstoffe in Cyclodextrine eingeschlossen, um die Aufnahme in das wäßrige System des Körpers zu verbessern. In der Chemosensorik eignen sie sich zur Detektion von Lösungsmitteldämpfen. Der Käfig kann ggf. durch chemische Modifikationen dem Analyten weiter angepaßt werden. Dies kann durch die Änderung entweder der Polarität oder der Form des Hohlraumes erreicht werden.

Calix[n]arene sind Käfigverbindungen, die durch Kondensation von para-substituierten Phenolen mit Aldehyden, meist Formaldehyd, entstehen. Die Namen der para-Substituenten werden meist vorangestellt, die Anzahl der Phenyleinheiten im Molekül wird durch die Ziffer n in den eckigen Klammern ausgedrückt. Calixarene weisen je nach Anzahl ihrer Phenyleinheiten - vier bis acht – einen entsprechend großen und recht tiefen Hohlraum auf, der die Einlagerung vieler organischer Verbindungen ermöglicht.

Abschließend seien noch Paracyclophane genannt. Sie bestehen aus aromatischen Einheiten, die über aliphatische Ketten miteinander verbunden sind. "Para" bezeichnet die

Position der aliphatischen Ketten zueinander. Es existieren demnach auch Meta- und Orthocyclophane, obwohl letzere meist als Benz[o] annelierte Cycloalkene bezeichnet werden. Paracyclophane eignen sich hervorragend zur Detektion von organischen Lösungsmitteln, da sie einen stark hydrophoben Hohlraum aufweisen.

Abbildung 2.10 zeigt die Kalottenmodelle von 18-Krone-6, α -Cyclodextrin (als Thiol) und *p*-*tert*-Butylcalix[6]aren im Vergleich; die Protonen wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen. Die Hohlräume der beiden letztgenannten Verbindungen unterscheiden sich mehr in ihrer Tiefe als in ihrer Größe, wobei der Hohlraum des abgebildeten Calix[6]arens deutlich tiefer ist.

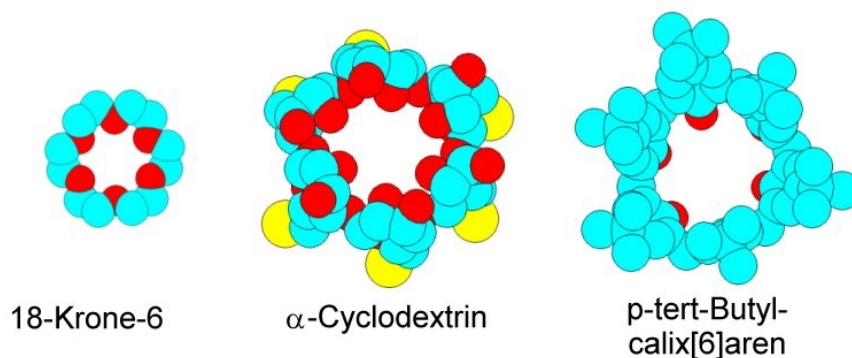


Abbildung 2.10 Die Kalottenmodelle einiger als Wirts-Moleküle verwendeter Verbindungen.

Alle oben erwähnten Molekülklassen eignen sich zur Herstellung chemisch sensibler Schichten. Dabei können sie entweder in einer Polymermatrix immobilisiert oder miteinander so quervernetzt werden, daß sie stabile Schichten liefern. Eine Möglichkeit, sie auf Gold- oder Silberflächen zu immobilisieren, besteht in der vorherigen Derivatisierung zu Thiolen, die, wie schon erwähnt, stabile Monolagen auf den Metallen ausbilden. Ein erheblicher Nachteil dieses Vorgehens besteht darin, daß es einen beträchtlichen synthetischen Aufwand mit sich bringt und daher eine Anpassung an ein bestimmtes analytisches Problem sehr zeitraubend werden kann. Teilweise kann hier jedoch eine Voroptimierung mit den Methoden des Molecular Modelling Abhilfe schaffen.

Das molekulare Prägen liefert eine Polymermatrix mit definierten Hohlräumen⁸⁶. Das Prinzip der Herstellung dieser MIPs (engl.: Molecular Imprinted Polymeres) wird in Abschnitt 4.6 detaillierter beschrieben. Bei einer Polymerisation in Gegenwart von geeigneten Templatmolekülen entstehen ausgewiesene Sorptionszentren für das Templat. Durch die Änderung von chemischen Parametern, wie z.B. des pH-Wertes, kann das Templatmolekül aus dem Polymer herausgewaschen und anschließend als Analyt wieder eingebracht werden. Die Vorteile dieser Methode sind vielfältig. Die Polymere sind relativ unproblematisch herzustellen, die verwendeten Komponenten sind kostengünstig. Durch

entsprechende Erfahrungen aus dem Gebiet der MIPs ist es möglich, für beinahe jede Anwendung ein geeignetes Polymer zu finden, sofern das Templat nicht an der Polymerisationsreaktion beteiligt ist. Die entstehenden Polymere sind in den meisten Lösungsmitteln unlöslich und weisen in der Regel gute thermische und mechanische Beständigkeit auf. Es können nach dieser Methode sogar Rezeptorschichten für kleine Moleküle ohne ausgeprägte Funktionalität hergestellt werden. Werden Monomere mit speziellen funktionellen Gruppen eingesetzt, dann können dem Analyten sogar noch zusätzlich spezielle Bindungsstellen angeboten werden.

2.3.4 Chemo-optische Sensoren auf der Basis von SERS

Zur spektroskopischen Untersuchung von Sensorschichten auf Metalloberflächen steht mittlerweile eine Reihe von Methoden zur Verfügung.

Eine neuere Methode, die in optischen Sensoren zum Einsatz kommt, ist die Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (SPR)⁴⁹. Wird auf eine Metalloberfläche Licht eingestrahlt, so tritt in Abhängigkeit von der Wellenlänge und dem Einfallswinkel ein Minimum im Reflexionskoeffizienten auf. Bei diesem Winkel kann das Licht mit Oszillationen im Elektronengas des Metalls, sogenannten Plasmonen, in Wechselwirkung treten. In der Chemosensorik kann dieser Effekt an dünnen Metallfilmen genutzt werden. Die Reflektivität in Abhängigkeit vom Winkel wird an einer Seite des Metallfilms gemessen, an der anderen befindet sich die sensitive Schicht. Durch die Änderung des Brechungsindex der Erkennungsschicht auf dem Metall kommt es bei Einlagerung eines Analyten zu geänderten Bedingungen für die Plasmonresonanz. Damit ändert sich der Winkel, bei dem das Reflexionsminimum auftritt. Die Selektivität dieser Methode ist allerdings rein durch die Rezeptorschicht gegeben. Querempfindlichkeiten können nicht ausgeschlossen werden, so daß dieses Verfahren teilweise mit großen Unsicherheiten behaftet ist. Es kann hier nur die Reaktion des Sensors auf einen Analyten registriert werden, um welche Substanz es sich dabei handelt, ist nicht sicher zu ermitteln.

Die oberflächenverstärkte Raman-Streuung liefert im Vergleich zur SPR bei der Untersuchung von Sorptionen an metallischen Oberflächen einige Vorteile. Wenn die Sensorschicht kovalent an die SERS-aktive Metalloberfläche gebunden ist und die Adsorptionszentren innerhalb der Reichweite der verstärkenden Felder liegen, können die Raman-Banden der angelagerten Analyte registriert werden. Da diese Schwingungsbanden für jede chemische Verbindung charakteristisch sind, kann der entsprechende Analyt anhand des Raman-Spektrums der Reinsubstanz oder von SERS-Referenzspektren zweifelsfrei identifiziert werden.

Für den Einsatz als Detektionsmethode für chemo-optische Sensoren bringt die SERS-Spektroskopie mehrere Vorteile. Durch den Einsatz von Lichtleitern kann die freilaufende Laserstrahlung minimiert und auch weiter vom Spektrometer entfernt in möglicherweise aggressiver chemischer Umgebung gemessen werden. Der Einsatz von Kompaktspektrometern und Diodenlasern liefert einen wartungsarmen und bei Bedarf transportablen apparativen Aufbau, der für vor-Ort-Messungen geeignet ist. Die detektierten Analyte können anhand von Referenz-Spektren identifiziert werden, wobei die Verstärkung durch den SERS-Effekt um bis zu sechs Größenordnungen die Detektion bis in den Ultra-Spurenbereich ermöglicht.

Ein nicht unerhebliches Problem stellt die Immobilisierung der Rezeptorschichten an den Metalloberflächen dar. Die kommerziell erhältlichen Wirts-Moleküle wie Calix[n]arene, Cyclodextrine, Kronenether oder Paracyclophane enthalten keine zur Kopplung geeigneten funktionellen Gruppen. Diese müssen erst in mehrstufigen Synthesen in die Moleküle eingeführt werden, was einen nicht zu unterschätzenden Aufwand an Zeit und Arbeit bedingt. Liegen derartig modifizierte Verbindungen vor, dann kann das Potential der chemo-optischen Sensoren auf der Basis der SERS-Spektroskopie erfolgreich genutzt werden.

Für eine Miniaturisierung solcher Spektrometer sind faseroptische SERS-Sensoren denkbar, bei denen die Sensorschicht direkt auf dem Ende einer optischen Faser aufgebracht wird. Die Anregungs- und die Streustrahlung werden dann in der gleichen Faser geführt, wodurch die freilaufende Laserstrahlung weiter minimiert werden kann. Erste Versuche in dieser Richtung zeigten jedoch, daß dieser Aufbau insofern problematisch ist, da hier eine störende Überlagerung der SERS-Spektren durch die Raman-Streuung im Faserkern erfolgt.⁵⁰ Daher ist eine sorgfältige Optimierung der Aufbringung der SERS-aktiven Schicht auf der Faserendfläche erforderlich.

3. Experimenteller Teil

3.1 Raman-Spektroskopie

Zur Aufnahme der Raman- und SERS-Spektren standen zwei dispersiv arbeitende Spektrometer zur Verfügung, die hier kurz beschrieben werden sollen.

3.1.1 Diodenlaser-Kompaktspektrometer Kaiser Holospec f / 1.8

Der größte Teil der Spektren wurde mit einem Spektrometer vom Typ Holospec f / 1.8 der Firma Kaiser Optical Systems Inc. (Ann Arbor, MI, USA) aufgenommen (s. Abb. 3.1).

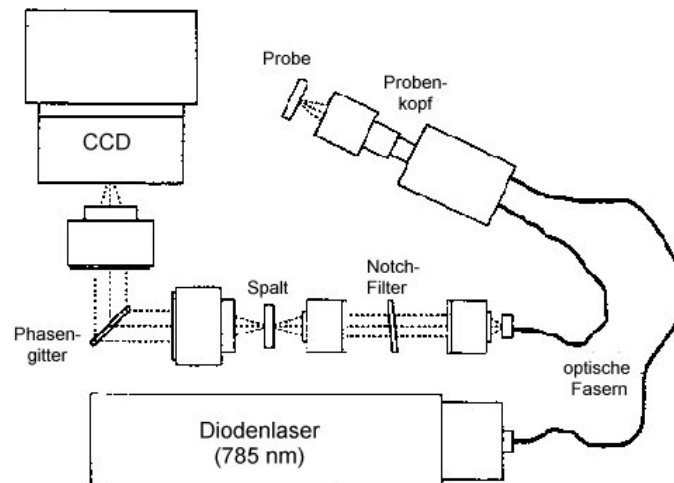


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des Kaiser Holospec f / 1.8.

Die Anregungswellenlänge von 785 nm liefert ein extern stabilisierter SDL-8530 Diodenlaser (SDL, San Jose, CA, USA) mit einer maximalen Leistung von 300 mW. Durch eine optische Faser wird die Strahlung zum Probenkopf und weiter zur Probe in einer geschlossenen Kammer geleitet. Die maximale Laserleistung an der Probe beträgt etwa 65 mW. Das Raman-Streulicht wird in Rückstreugeometrie gesammelt und über eine zweite optische Faser zum Spektrometer geleitet. Im Spektrometer wird die Laserlinie (Rayleigh-Streuung) mittels eines Notch-Filters eliminiert, die Streustrahlung über Linsen, einen Spalt und ein Phasengitter als dispersives Element auf einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten CCD-Detektor (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) abgebildet und dort registriert. Die beim Auslesen erhaltenen Signale werden zur Auswertung an einen PC weitergeleitet.

Das besondere an diesem kommerziell erhältlichen Aufbau ist zum einem die Minimierung der freilaufenden Laserstrahlung durch die Führung in optischen Fasern und einer selbst angefertigten geschlossenen Probenkammer und zum anderen das dispersive Element, das ohne bewegliche Teile aufgebaut ist. Es besteht aus zwei hintereinander angeordneten und zwischen Glasplatten eingebetteten periodisch strukturierten Schichten, die unterschiedliche Wellenlängenbereiche der gestreuten Strahlung mit einer Auflösung von 5 cm^{-1} auf verschiedene Bereiche des Detektors abbilden, wie in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Durch diesen Aufbau kann das gesamte Spektrum mit einer guten Auflösung simultan registriert werden.

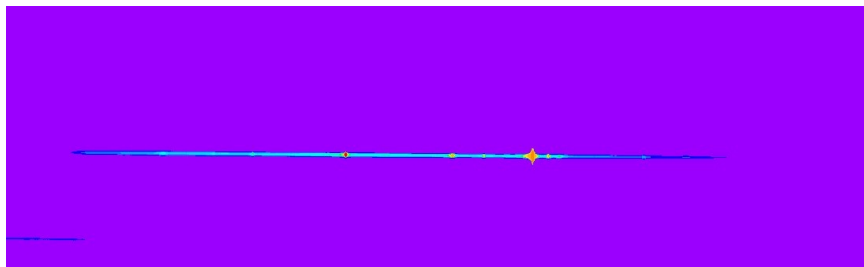


Abbildung 3.2 „Binning“ auf dem Detektor am Beispiel von Nicotin. Das Spektrum wird durch die dispersiven Schichten des Phasengitters auf unterschiedliche Detektor-Bereiche abgebildet.

Der Tatsache, daß die Quantenausbeute des Detektors zu größeren Wellenlänge hin abnimmt, wird durch eine Intensitätskalibrierung der Steuerungssoftware Rechnung getragen. Das Fehlen beweglicher Teile und die Möglichkeit, das zwischen Glasplatten eingebettete dispersive Element reinigen zu können, liefert ein robustes, wartungsfreundliches und leicht zu bedienendes Kompaktspektrometer mit einer hohen Nachweisstärke bei mittlerer Auflösung.

3.1.2 Dreifachmonochromator-Spektrometer Dilor XY

Das zweite eingesetzte Gerät (s. Abb. 3.3), ein Dilor XY mit Dreifachmonochromator (Dilor, Lyon, Frankreich) und subtraktiver Dispersion der ersten beiden Stufen, weist einen erheblich komplexerer Aufbau auf, bietet aber auch variabelere Meßmöglichkeiten. Zur Anregung wird ein Coherent 890 Ti:Saphir-Laser (Coherent, Santa Clara, CA, USA) eingesetzt, der von einem Spectra Physics Series 2000 Argon-Ionen-Laser (Spectra Physics, Mountain View, CA, USA) gepumpt wird. Die Strahlung wird zur Eliminierung von Laser-Seitenmoden und des Fluoreszenzuntergrundes durch ein Laserfilter (Laserspec III, Spectrolab Electro-optics, Newbury, GB) und danach weiter in die Eingangsoptik des

Spektrometers geleitet. Bei entsprechender Justage des Strahlenganges kann an der Eingangsoptik mittels eines beweglichen Spiegels zwischen einer makroskopischen Optik und einem konfokalen Raman-Mikroskop (Olympus BX40, Olympus, Hamburg) umgeschaltet werden. An den Proben wird die Streustrahlung in Rückstreugeometrie gesammelt und ins Spektrometer geleitet. Die Laserlinie wird mittels des Doppel-Vormonochromators mit subtraktiver Dispersion der beiden Stufen eliminiert. Danach wird die Strahlung in einen dritten Monochromator - den eigentlichen Spektrographen - geleitet und von diesem auf den Detektor abgebildet. Als Detektor dient eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte CCD-Kamera (Wrights Instruments Ltd., Enfield, GB) mit einem 298 x 1152 EEV 88131 Chip. Da bei diesem Aufbau nicht das gesamte Spektrum mit einem Mal auf den Detektor abgebildet werden kann, wird der dritte Gittermonochromator (Spektrograph) durch eine Mechanik nach und nach gedreht, so daß ein komplettes Spektrum – z.B. von 100 bis 3600 cm^{-1} - in mehreren Abschnitten entsteht.

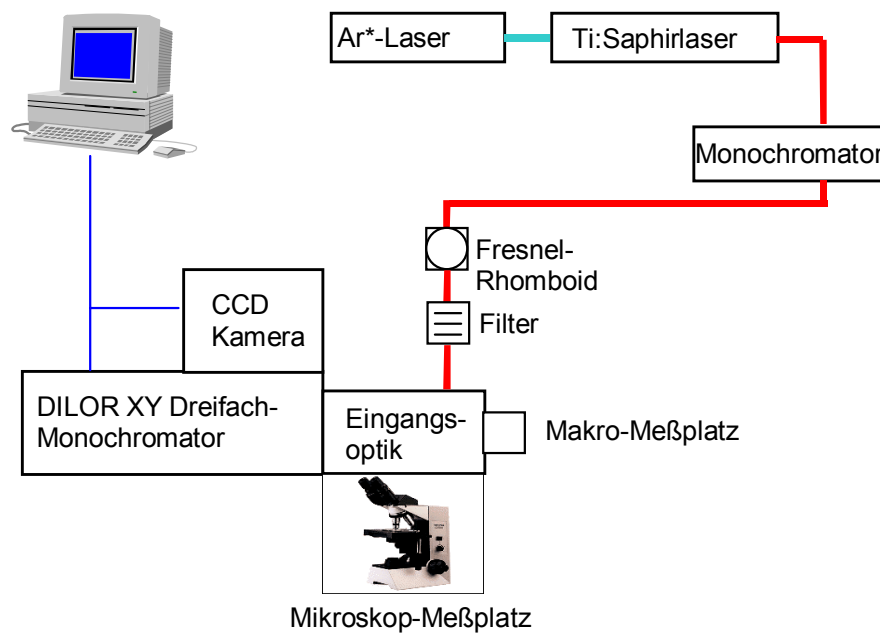


Abbildung 3.3 Schematischer Aufbau des Dilor XY Raman-Spektrometers.

Zur Anregung stehen bei diesem Aufbau neben den Linien des Argon-Ionen-Lasers bei 485 und 515 nm noch der Emissionsbereich des Ti:Saphir-Lasers zwischen 690 und 1060 nm zur Verfügung. Sofern nicht anders erwähnt, wurde bei den dargestellten Messungen mit dem Ti:Saphir-Laser bei 702 nm angeregt.

Das konfokale Mikroskop ist mit einem Doppelscanner für das Raman-Imaging ausgestattet. Dieser Aufbau besteht aus einem Scanner zur Erzeugung eines Linienfokus im Mikroskop, der Abbildungsoptik auf das konfokale System, dem Scanner zur Projektion des optischen

Signals auf den Eingangspalt inklusive einer Steuerungselektronik und einem motorgetriebenen XY-Tisch mit einer Schrittauflösung von 0,1 μm .

3.2 Herstellung SERS-aktiver Substrate

SERS-aktive Substrate wurden auf Objektträgern für die Mikroskopie (reinweiß, Fischer Scientific), in geeigneter Weise vorbehandelt bzw. mit Nanostrukturen belegt, durch Aufdampfen von Metallfilmen - Silber (99,99%, Balzers) oder Gold (99,9%, Balzers) - in einer Vakuumbdampfungsanlage vom Typ Balzers BA 710 (Balzers, Bingen) erzeugt. Für die meisten Untersuchungen wurden Substrate mit Silberschichten eingesetzt. Silber stellt einen guten Kompromiß zwischen SERS-Verstärkung, chemischer Stabilität, Kosten und Entsorgung dar. Die Gold-Substrate erwiesen sich zwar gegen chemische Einflüsse als stabiler, sie zeigten allerdings geringere SERS-Verstärkungen, und zur Wiederverwertung der Träger mußte das Gold in Königswasser abgelöst werden.

Vor dem Bedampfen wurden die Substrate zum Reinigen für eine Minute einer 100 mA-Glimmentladung in einer Argonatmosphäre ausgesetzt. Der Druck in der Anlage betrug während des Aufdampfprozesses weniger als $1,3 \cdot 10^{-3}$ Pa. Die unterschiedlichen Typen der Substrate wurden wie folgt hergestellt:

Inselfilme:

Die Objektträger für die Inselfilme wurden zur Reinigung für sechs Stunden heißen Salpetersäuredämpfen ausgesetzt und anschließend für drei Stunden mit Wasserdampf von ca. 70°C gespült. Nach Trocknung in einem Exsikkator wurden die Substrate mit Metallfilmen von etwa 5 nm Schichtdicke bedampft. Bei einer entsprechend geringen Aufdampftrate von etwa 6 pm/s bildeten sich spontan SERS-aktive Metallinseln auf dem Glas aus.

Metallfilme über Nanopartikeln:

Die Objektträger für die Silberfilme über Nanopartikeln (engl.: Ag films over nanoparticles – AgFON's) wurden für vier Stunden in Caroscher Säure (konz. H_2SO_4 : konz. H_2O_2 = 1:1) gereinigt und anschließend mit deionisiertem Wasser (seralpur[®], Seral, Ransbach) gespült. Auf die noch feuchten Glasscheiben wurden 150 μl einer im Ultraschallbad homogenisierten Aluminiumoxid-Suspension (SEPP03, Pipelow & Brand, Henstedt, 5 % in Wasser) bei 2000 U/min aufgeschleudert³⁴. Das verwendete Aluminiumoxid weist eine nominelle Partikelgröße von 0.3 μm auf und wird üblicherweise zum Polieren von optischen Linsen eingesetzt. Alternativ zum Aluminiumoxid wurden kleine Diamantkristallite als Nanopartikel verwendet, die mittels eines kommerziell erhältlichen Sprays (DP-Spray, Typ M bzw. P, Struers,

Rodovre, Dänemark) auf die Objektträger gesprüht wurden. Eingesetzt wurden Diamanten mit Abmessungen von 0,25 (Typ P) und 1 μm (Typ M).

Die mit Nanopartikeln belegten Objektträger wurden in einem Exsikkator getrocknet und anschließend mit Metallfilmen bedampft. Zur Verbesserung der Haftung von Gold bzw. Silber wurde zuerst eine 2 nm dünne Chromschicht bei einer Rate von ca. 0,03 nm/s auf das Glas aufgebracht. Die SERS-aktiven Metallschichten wurden anschließend bei Raten um 0,2 nm/s bis zu einer Dicke von ungefähr 75 nm für Silber und 80 nm für Gold auf die Chromschicht aufgedampft. Die Aufdampfgeschwindigkeit wurde während des Prozesses mittels eines Quarzkristall-Oszillators kontrolliert.

Metallfilme über dauerhaft strukturierten Trägern:

Dauerhaft strukturierte Träger können auf unterschiedliche Methoden hergestellt werden. Eine recht einfache Methode ist das Sandstrahlen von Objektträgern. Hier wurde ein Silikonsand, dessen mittlere Körnung 135 μm betrug, mit 4 bar Druck auf die Glasträger gestrahlt. Anschließend wurden die sandgestrahlten Glasscheiben analog den mit Nanopartikeln beschichteten Trägern mit 2 nm Chrom und 75 nm Silber bedampft.

Mehrere Typen selbststrukturierenden „rauhem“ Polymere wurde von Dr. Katzenberg von Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert zur Verfügung gestellt. Über die Herstellung und die Oberflächenbeschaffenheit die Polymere wurden keine weiteren Angaben gemacht. Die Dicke der Silberschicht betrug 50 nm.

Mittels Elektronenstrahlolithographie strukturierte Siliciumwaver wurden am Lehrstuhl für Hochfrequenztechnik der Universität Dortmund hergestellt. Für die Methoden zur Herstellung sei an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen⁵¹. Wie bei allen anderen Substraten wurden auch auf diese Träger Silberfilme mit einer Schichtdicke von 75 nm aufgebracht.

Die SERS-Substrate waren in einem Exsikkator über einige Wochen haltbar, wobei sich die Inselfilme als empfindlicher gegenüber der Atmosphäre (Luft, Umgebungsdruck) im Exsikkator erwiesen. SERS-aktive Inselfilme zeigten direkt nach ihrer Herstellung für Silber eine schwach lila, für Gold eine bläuliche Färbung. Bei zu hoher Aufdampfgeschwindigkeit oder nach Alterung der Substrate verfärbten sich die Inselfilme gelblich.

Zur Überprüfung der SERS-Aktivität der verschiedenen Substrattypen wurden diese mit einer Testsubstanz beschichtet und die SERS-Spektren gemessen. Parallel dazu wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt, wie in Abbildung 2.6 an Beispielen dargestellt. Als Testsubstanz für die Beschichtung wurde Thiophenol verwendet, welches durch Einlegen der Substrate für 30 min in eine 10 mM ethanolische Lösung auf dem Metall immobilisiert wurde. Die Vorteile von Thiophenol als Testsubstanz liegen darin, daß es über den Schwefel

kovalent an das Metall bindet, auf den Substraten eine dichte molekulare Monolage ausbildet und einen vergleichsweise großen Streuquerschnitt aufweist. Von Nachteil sind die Toxizität der Verbindung (CH-Giftkl. 2) und der sehr lästige Geruch. Die Chemisorption des Thiophenols auf den Metalloberflächen zeigt sich anhand des SERS-Spektrums, da dieses einige deutliche Unterschiede zum Raman-Spektrum der Reinsubstanz aufweist (s. Abb. 3.4).

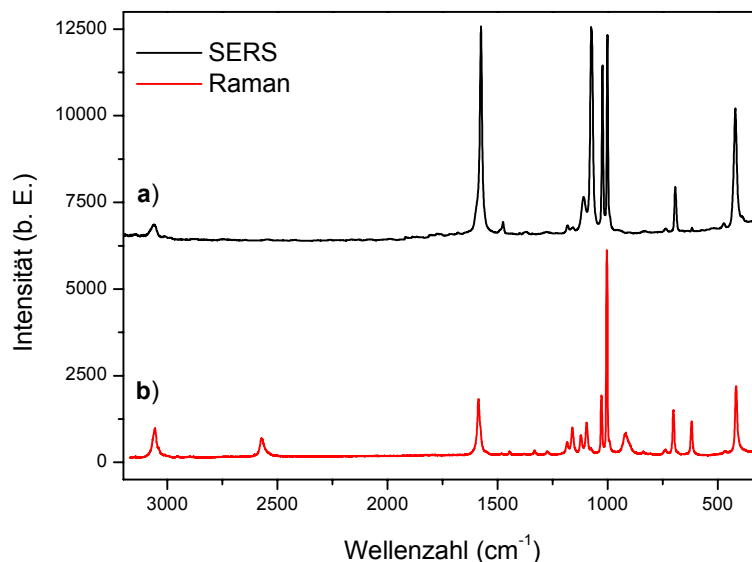


Abbildung 3.4 Raman- (b) und SERS-Spektrum (a, mit einem Silbersubstrat gemessen) von Thiophenol.

Ein sicheres Indiz für die Bindung des Thiophenols über das Schwefelatom an das Metall sind das Verschwinden der SH-Streckschwingung bei 2575 cm^{-1} und der SH-Deformationsschwingung bei 914 cm^{-1} . Anstelle der beiden aromatischen Schwingungsbanden bei 1003 (sehr stark) und bei 1028 cm^{-1} (mittelstark) im Raman-Spektrum treten im SERS-Spektrum drei sehr intensive Signale bei 998 , 1022 und 1078 cm^{-1} auf. Eine weitere aromatische Ringschwingung verschiebt sich von 1587 cm^{-1} (Raman) nach 1575 cm^{-1} (SERS) und nimmt dabei deutlich an Intensität zu. Die meisten der beschriebenen Banden sind Streck- oder Deformationsschwingungen des Phenylrings. Eine Erklärung für die Aktivität dieser Schwingungen und damit ihr Auftreten in den Spektren benötigt eine detaillierte Analyse sowohl der Symmetrie der Schwingung als auch der geänderten Auswahlregeln für SERS⁵². Wichtig ist, daß die Banden zweifelsfrei den adsorbierten Molekülen zugeordnet und die Intensitäten der Signale zur Bewertung der verschiedenen Substrate verwendet werden können.

Alternativ wurden auch weitere Verbindungen, wie z.B. aliphatische Thiole und Disulfide, Rhodamin-B-isothiocyanat, Dithizon, Kristallviolett oder 2-Naphthalinthiol eingesetzt. Die untersuchten aliphatischen Thiole bzw. Disulfide sind allesamt leicht flüchtig und von sehr

unangenehmem Geruch, wodurch eine große Sorgfalt in ihrem Umgang erforderlich wird und eine ständige Belastung am Arbeitsplatz nicht ausgeschlossen werden kann. Die Farbstoffe, deren Spektren nicht über mehrere Wochen stabil sind wie die des Thiophenols, erforderten eine sehr sorgfältige Präparation der Proben. Einzig 2-Naphthalinthiol erwies sich als interessante Alternative zum Thiophenol, da es kristallin und wenig geruchsbelästigend ist und im Vergleich zu den Farbstoffen ein recht klares SERS-Spektrum liefert, wie in Abbildung 3.5 dargestellt ist.

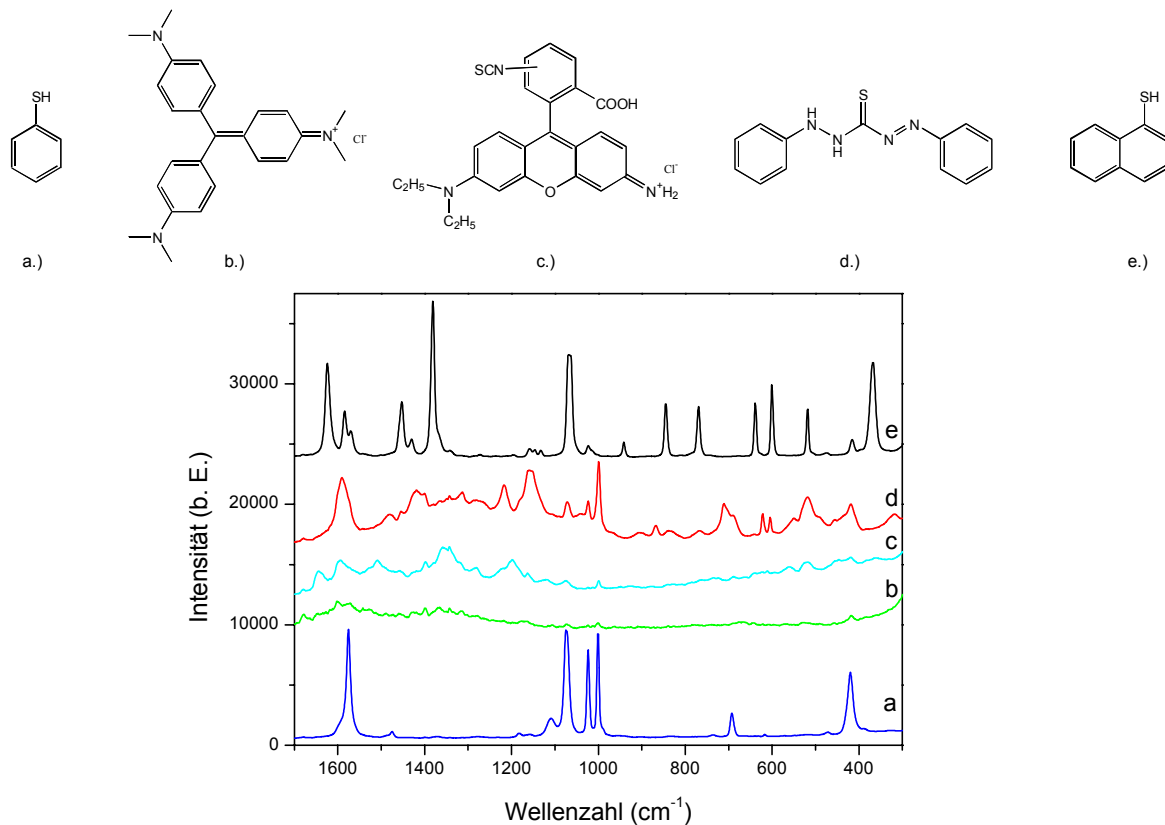


Abbildung 3.5 *SERS-Spektren verschiedener Testsubstanzen und deren Strukturen (a = Thiophenol, b = Kristallviolett, c = Rhodamin-B-isothiocyanat, d = Dithizon, e = 2-Naphthalinthiol).*

Für eine Berechnung der SERS-Verstärkungsfaktoren unterschiedlich hergestellter Substrate durch Vergleich mit den Raman-Spektren der Reinsubstanz müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Hierzu gehören die Laserleistung, die Integrationszeit und die Anzahl der Moleküle im Laserfokus. Die Messung der Reinsubstanz – etwa als Flüssigkeit ($\rho_{\text{PhSH}} = 1,08$; $M = 110,6$) in einer Silikatglas-Kapillare - erfaßt unter Berücksichtigung des vom Laser durchstrahlten Meßvolumens v (ca. 10^{-3} mm³, Fokustiefe ca. 100 μm) etwa $N_{\text{fl}} = 1 \times 10^8$ Moleküle:

$$N_{\text{fl}} = \frac{v \cdot \rho_{\text{PhSH}}}{M} \quad (12)$$

Die Anzahl der Thiophenol-Moleküle auf den Metalloberflächen kann über die Molekülgröße abgeschätzt werden. Der Phenylrest des Moleküls weist einen minimalen Platzbedarf von $0,16 \text{ nm}^2$ auf, der sich aus dem Durchmesser von $0,5 \text{ nm}$ und der Ringdicke von $0,32 \text{ nm}$ ergibt. Hieraus läßt sich dann für glatte Silberoberflächen ein maximaler Wert von 2×10^9 Molekülen im Laserfokus ($10 \text{ }\mu\text{m}$) errechnen, was einer Moleküldichte von $6 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ entspricht. Für exaktere Abschätzungen werden noch weitere Parameter benötigt. So beträgt z.B. der Abstand zwischen zwei Silberatomen in einer dichtesten Kugelpackung 290 pm^{53} , weshalb unter Berücksichtigung der Größe eines Thiophenol-Moleküls eine Bindung nur zu jedem zweiten Silberatom ausgebildet werden kann und der Platzbedarf des Moleküls auf der Oberfläche auf ca. $0,33 \text{ nm}^2$ ansteigt. Sind schon für glatte Silberoberflächen genauere Abschätzungen von Moleküldichten nicht möglich, so wird bei aufgerauhten Oberflächen eine Aussage noch unsicherer, da zusätzlich die Vergrößerung der Oberfläche durch die Strukturierung eine Rolle spielt.

Die Berechnung der Verstärkungsfaktoren für einen Silberinselfilm und einen Silberfilm über einem elektronenstrahlolithographisch hergestellten SiO_2 -Gitter wurden anhand von SERS-Spektren wie in Abbildung 3.4 vorgenommen. Mit Hilfe der auf Laserleistung und Integrationszeit normierten Intensitäten I der Banden, wurde anhand von Gleichung 13 die Verstärkungsfaktoren G_{SERS} bestimmt:

$$G_{\text{SERS}} = \frac{I_{\text{Ag}} N_{\text{FI}}}{I_{\text{FI}} N_{\text{Ag}} G_{\text{Of}}} \quad (13)$$

Der Oberflächenzunahme durch die unterschiedlichen Strukturen wird durch den Faktor G_{Of} Rechnung getragen. Für den Inselfilm wird eine dichte Lage aus Halbkugeln angenommen, so daß $G_{\text{Of}} = 2\pi R^2 / (2R)^2$, also etwa $\pi/2$ beträgt. Für das verwendete SiO_2 -Gitter wurde für G_{Of} von $1,26$ bestimmt³⁹.

Die ermittelten Verstärkungsfaktoren liegen im Bereich von 10^5 bis 10^7 . Die für den Inselfilm ermittelten Verstärkungen von 2×10^5 bis 2×10^6 liegen im Bereich von vergleichbaren Untersuchungen⁵⁴. Daß die Verstärkungsfaktoren der hier beschriebenen mit Werten zwischen 10^6 und 2×10^7 sich noch nicht sehr deutlich von den stochastisch strukturierten Substraten unterscheiden ist darin begründet, daß diese Gitter noch nicht für eine maximale SERS-Verstärkung optimiert waren.

Zur Untersuchung der Morphologie verschiedener Silber-Substrattypen wurde an diesen nach der Immobilisierung von Thiophenol ein Imaging unter dem Raman-Mikroskop des Dilor-XY-Spektrometers durchgeführt. Mit Hilfe des steuerbaren XY-Tisches wurden etwa $600 \text{ }\mu\text{m} \times 600 \text{ }\mu\text{m}$ große Flächen mit ca. 700 Meßpunkten abgerastert und die Integrale der 998 cm^{-1} -Bande ausgewertet. Abbildung 3.6 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Substrattypen, die mittels der Steuerungssoftware einer CCD-Kamera im

Strahlengang des Mikroskops erhalten wurden. Das jeweils eingezeichnete Rechteck kennzeichnet den untersuchten Bereich der Substrate. Vermessen wurden neben AgFON's (Aluminiumoxid bzw. Diamantpartikel) ein Silber-Inselfilm sowie Silberfilme über direkt nanostrukturierten Oberflächen (sandgestrahlt, Elektronenstrahlithographie, selbststrukturierendes Polymer). Weiterhin sind in der Abbildung xy-Scans an Hand der 998 cm^{-1} Bande dargestellt.

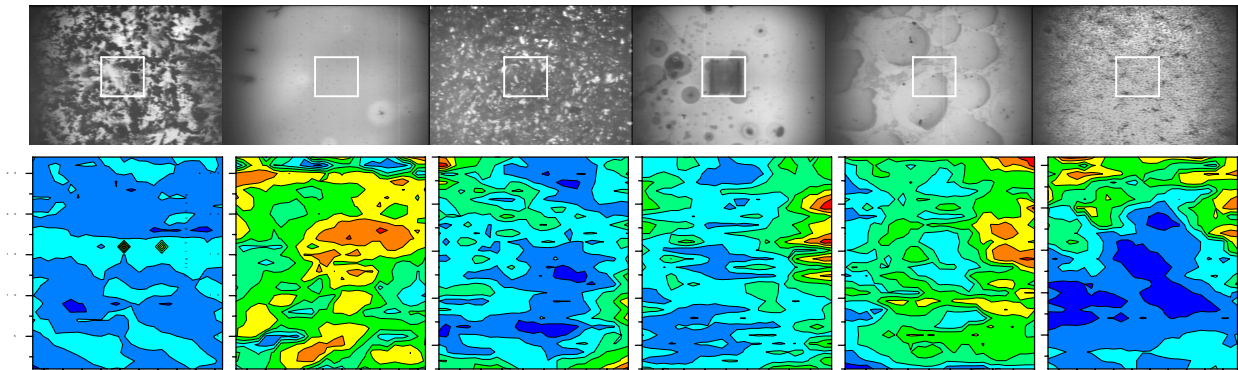


Abbildung 3.6 Lichtmikroskopische Aufnahmen (obere Reihe), sowie xy-Scans anhand der Intensität der 998 cm^{-1} Thiophenol-Bande unterschiedlicher SERS-Substrate (Von links: Diamantpartikel, selbststrukturierendes Polymer, sandgestrahlte Oberfläche, elektronenstrahlithographisch erzeugtes SiO_2 -Gitter, Inselfilm, Aluminiumoxid).

Es zeigte sich, daß alle Substrate auf der relativ kleinen untersuchten Fläche große Variationen ihrer SERS-Aktivitäten aufweisen. Die Intensitäten sind in der Abbildung nicht skaliert, d.h. die Oberflächenscans nur qualitativ miteinander vergleichbar. Durchschnittliche Spektren der Oberflächenscans sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Die höchsten Verstärkungen lieferte das elektronenstrahlithographisch hergestellte Substrat. Die Intensitätsvariationen bei diesem speziellen Substrat erklären sich daraus, daß es sich um einen noch nicht optimierten Gittertyp handelte. Hohe Verstärkungen lieferten auch die AgFON's (Diamant, Aluminiumoxid) sowie die dauerhaft strukturierten Substrate (sandgestrahlt, selbststrukturierendes Polymer); der Inselfilm zeigte die geringste Verstärkung, wies dafür jedoch eine homogene Struktur auf. Die Mittelwertspektren des adsorbierten Thiophenols für die jeweils über 700 gemessenen Einzelspektren sind in Abbildung 3.7 für den ausgewerteten Bereich dargestellt.

Trotz des hohen Meßaufwandes ließen sich keine eindeutigen Korrelationen zwischen sichtbaren Oberflächenstrukturen und SERS-Intensitäten herstellen. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die SERS-aktiven Strukturen zu klein sind, um mit dem Lichtmikroskop aufgelöst werden zu können.

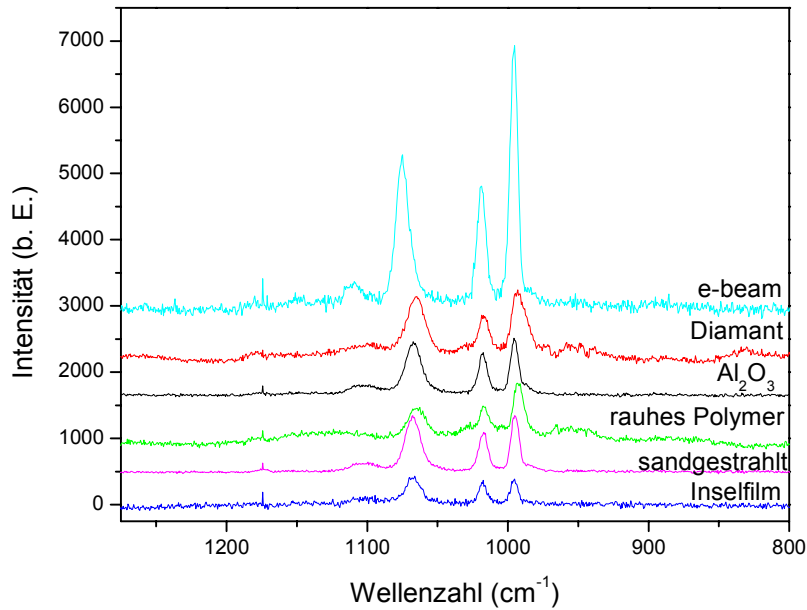


Abbildung 3.7 Mittelwertspektren von Thiophenol auf den unterschiedlich präparierten Silbersubstraten.

3.3 Synthese der Beschichtungssubstanzen

Um Sensorbeschichtungen zu realisieren, die eine zur Adsorption geeignete Struktur aufweisen und sich darüber hinaus dauerhaft auf den Substraten immobilisieren lassen, mußten kommerziell erhältliche Verbindungen nach bekannten Vorschriften derivatisiert werden. Auf der Grundlage von bereits früher durchgeführten Messungen an mit Käfigmolekülen beschichteten SERS-Substraten^{55,56} wurden Calixarene und Cyclodextrine als Beschichtungssubstanzen gewählt. Diese Verbindungen sollten nach bekannten Methoden der organischen Chemie zu Thiolen derivatisiert werden, um die Bildung von SAM auf den SERS-Substraten zu ermöglichen. Im folgenden werden die Verbindungsklassen, sowie die durchgeführten Synthesen beschrieben. Zur Charakterisierung der Reaktionsprodukte wurden folgende Geräte verwendet:

Raman und SERS-Spektren: Kaiser Holopec f/1.8 (Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, USA).

Dilor XY (Dilor, Lyon, Frankreich).

NMR-Spektren: Jeol GX 400 (Jeol, Tokyo, Japan).

Interner Standard: Tetramethylsilan

Heizmikroskop: Wagner & Munz, München.

Der größte Teil der Synthesen wurde unter Ausschluß von Sauerstoff und Feuchtigkeit in einer Argonatmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung nach Standardmethoden getrocknet und unter Argon aufbewahrt.

Die eingesetzten Cyclodextrine und Calixarene wurden vor Durchführung der Derivatisierung für 3 Tage bei 60 °C über Phosphorpentoxid getrocknet. Alle anderen Chemikalien wurden vor ihrer Verwendung frisch destilliert, sublimiert oder über Phosphorpentoxid getrocknet.

Die angegebenen Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte sind unkorrigiert.

Zur Bestimmung der R_f -Werte und zur Reaktionskontrolle wurden Merck Kieselgelplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) verwendet. Säulenchromatographische Aufarbeitungen erfolgten am Kieselgel 60 (0.2-0.063 mm) der Firma Macherey & Nagel (Düren).

3.3.1 Cyclodextrine

Cyclodextrine, auch Cycloamylosen genannt, sind enzymatisch gewonnene Abbauprodukte der Stärke und schon seit 1891 bekannt. Diese zyklischen Oligosaccharide zeigen einen konusartigen Aufbau und bestehen aus bis zu zwölf α -1,4-glycosidisch verknüpften D-Glucopyranose-Einheiten (s. Abb. 3.8), wobei die mit sechs, sieben und acht Bausteinen (α -, β - und γ -Cyclodextrin) am besten untersucht sind. Die primären Hydroxygruppen am C₆ bilden den einen Rand des Konus, die sekundären an C₂ und C₃ den zweiten. Im Inneren überwiegen aliphatische CH-Bindungen. Je nach Anzahl der Glucose-Einheiten erhält man mehr oder weniger große endolipophile und exohydrophile konusförmige Hohlräumoleküle, die Einschlußverbindungen mit einer Vielzahl organischer Moleküle eingehen. Die Hohlräume haben Durchmesser von 47-60 (α -), 70-80 (β -) und 90-100 (γ -Cyclodextrin) pm.

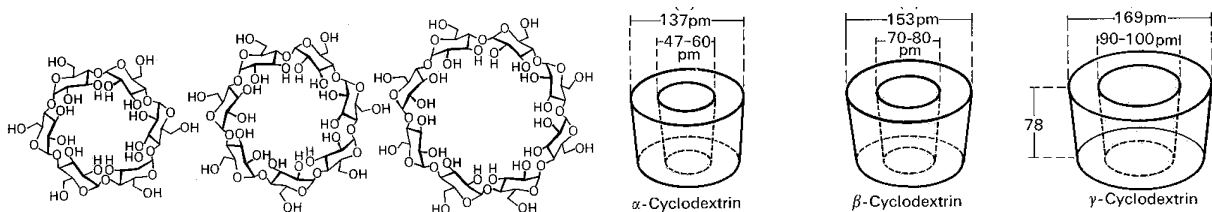


Abbildung 3.8 Schematischer Aufbau von α -, β - und γ -Cyclodextrin.

Entsprechend ihrer Käfiggrößen können die verschiedenen Cyclodextrine Einschlußverbindungen mit unterschiedlich großen Moleküle bilden. α -Cyclodextrin schließt z. B. Edelgase, Wasser oder Methanol ein, β -Cyclodextrin nimmt größere Moleküle wie substituierte Benzole, Naphthalin u. a auf, während γ -Cyclodextrin groß genug ist, um sogar Anthracen oder Kronenether einzulagern.

Beim 'Einnisten' von Gastmolekülen in α -Cyclodextrin wurde eine Konformationsänderung beobachtet. Das 'leere' α -Cyclodextrin enthält in wässriger Lösung wenigstens zwei Moleküle Wasser im Hohlraum. Wegen ihrer geringeren Größe zwingen sie den Hohlraum teilweise zu kollabieren, wobei Cyclodextrin-Ring Spannungsenergie aufnimmt, die beim Einschluß einer passenden Gastsubstanz wieder frei wird.

Cyclodextrine verfügen über keine geeigneten funktionellen Gruppen, die eine Immobilisierung an eine SERS-aktive Metalloberfläche ermöglichen. Die Fixierung gelingt jedoch sehr gut nach Modifizierung zu Thiol-Derivaten. Durch die Einführung der Thiol-Gruppen in die 6'er Positionen der Moleküle ist deren Chemisorption an die Oberflächen unter Erhalt des freien Zugangs zum Hohlraum möglich. Als zweckmäßig erwies sich die Kombination zweier Synthesevorschriften, die zu Bromderivaten als Zwischenstufen führten (s. Abb. 3.9). Hierbei wurde zunächst Methansulfonylbromid, wie von Sieber beschrieben⁵⁷, frisch hergestellt. Eine Umsetzung mit den Cyclodextrinen entsprechend einer von Tabushi veröffentlichten Synthese⁵⁸ zur Bromierung der Hydroxygruppen an den C₆-Atomen der Cyclodextrine lieferte die Bromverbindungen in Ausbeuten von 60 bis 90 Prozent. Die Bromverbindungen wurden ihrerseits mit Kaliumthioacetat zu Thioestern umgesetzt, welche in-situ zu den entsprechenden Thiolen verseift wurden.

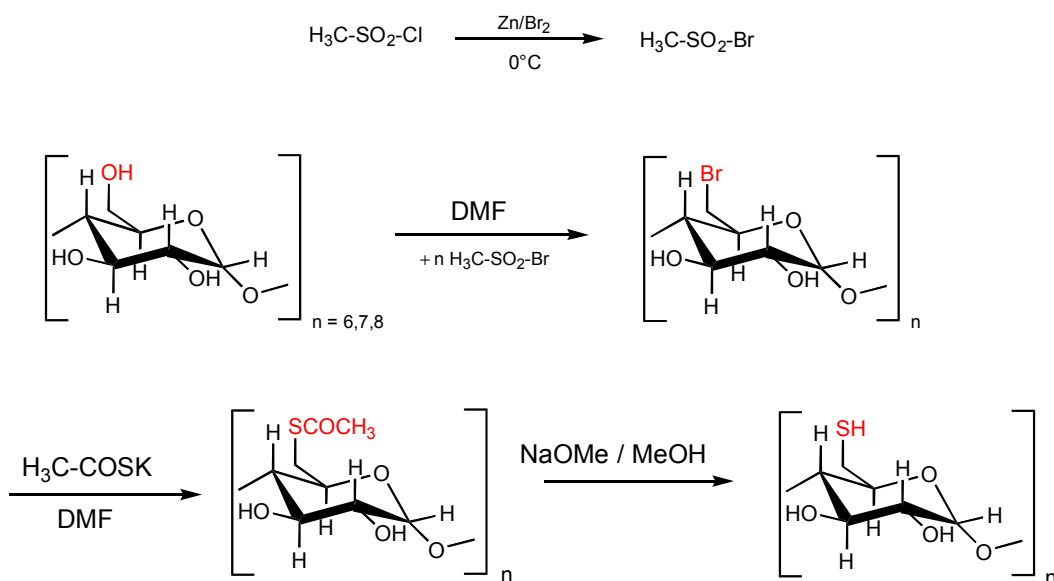
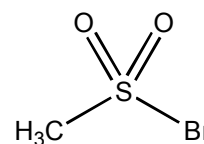


Abbildung 3.9 Synthese-Route für poly-(6-thio-6-deoxy)-Cyclodextrinen nach Tabushi⁵⁸.

Darstellung von Methansulfonylbromid:

117g (77.3 ml, 1.02 mol) Methansulfonylchlorid wurden innerhalb von 90 min unter starkem Rühren zur einer eisgekühlten Suspension von 102 g (1.56 mol) Zinkstaub in 300 ml Wasser gegeben. Nach beendeter Zugabe wurde noch 30 Minuten weiter gerührt, wobei die Temperatur unter 5°C gehalten wurde. Die erhaltene Mischung wurde kalt filtriert und zweimal mit wenig Eiswasser gewaschen. Zu dieser Lösung wurde bei einer Temperatur unter 5°C unter heftigem Rühren Brom langsam zugetropft, bis eine Bromfärbung bestehen blieb. Das entstandene Zweiphasengemisch wurde mit Chloroform extrahiert, die organische Phase zur Entfernung von überschüssigem Brom mit gesättigter Na₂SO₃-Lösung und zweimal mit Eiswasser gewaschen. Trocknung über Na₂SO₄, Abziehen des Lösungsmittels und Destillation im Vakuum (K_{p0.1} 36°C) lieferten 65.15 g (M 159, 40 %) Methansulfonylbromid.



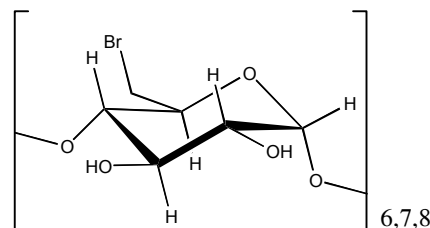
Raman Wellenzahl (cm⁻¹) : 2930 st; 1404, 1357, 1316 w; 1153 st; 963 w; 740 st; 522 m, br; 474 st; 351 m; 277 sst; 228 m, br.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) : δ = 3.82 s, -CH₃.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) : δ = 59.91 C.

Darstellung der Bromderivate der Cyclodextrine⁵⁹:

Methansulfonylbromid wurde tropfenweise zu einer Lösung der Cyclodextrine in 60 ml trockenem Dimethylformamid gegeben und die Mischung für 24 h bei 60°C gerührt. Vom entstandenen gelben Sirup wurde ein Teil des Lösungsmittels abgezogen und der Rest mit einer kleinen Menge wasserfreien Methanols verdünnt. Nach der Neutralisation mit einer 3 M NaOMe/MeOH-Lösung wurde das gesamte Reaktionsgemisch in Eiswasser gegossen, filtriert und anschließend zweimal mit wenig Eiswasser gewaschen. Trocknen bei 50 °C über Phosphorpentoxid im Vakuum lieferte die Bromverbindungen.



Charakterisierung der bromierten Verbindungen

Hexakis-(6-bromo-6-deoxy)-α-cyclodextrin

4.7 g (3.5 mmol, 86 %) aus der Reaktion von 5 g (30 mmol) Methansulfonylbromid mit 4 g (4.1 mmol) α-Cyclodextrin.

Beilstein-Test stark positiv.

Schmelzpunkt (Zersetzung) : 190 – 195 °C (Lit.195 – 196 °C)

Raman Wellenzahl (cm^{-1}): 2975, 2913 st, br ($\nu_{\text{C-H}}$); 1426, 1398, 1368, 1341 st; 1259, 1220, 1178 m; 1114 st; 1012, 1000, 981, 948, 900, 812 m; 679, 619 sst ($\nu_{\text{C-Br}}$); 483 sst; 429 m

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 4.99 \text{ H}_1, 3.99 \text{ H}_{6a}, 3.83 \text{ H}_5, 3.67 \text{ H}_{6b}, \text{H}_3, 3.38 \text{ H}_4, 3.36 \text{ H}_2$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 102.2 \text{ C}_1, 85.1 \text{ C}_4, 72.8 \text{ C}_3, 71.9 \text{ C}_2, 71.0 \text{ C}_5, 35.0 \text{ C}_6$.

Heptakis-(6-bromo-6-deoxy)- β -cyclodextrin

4.9 g (3.1 mmol, 89 %) aus der Reaktion von 4 g (25 mmol) Methansulfonylbromid mit 4 g (3.5 mmol) β -Cyclodextrin.

Beilstein-Test stark positiv.

Schmelzpunkt (Zersetzung): 185 – 190 °C (Lit. 205 – 206 °C).

Raman Wellenzahl (cm^{-1}): 2974, 2933 st ($\nu_{\text{C-H}}$); 1774 m; 1676 w; 1416, 1403, 1379, 1342 st; 1265, 1238, 1218, 1170 m; 1110, 1073, 1023, 981, 949, 813 m; 683 sst, 617 st; 582, 545 m; 504, 483 st; 434, 393, 295 w.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 4.96 \text{ H}_1, 4.00 \text{ H}_{6a}, 3.81 \text{ H}_5, 3.65 \text{ H}_{6b}, 3.62 \text{ H}_3, 3.37 \text{ H}_2, 3.35 \text{ H}_4$

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 102.0 \text{ C}_1, 84.5 \text{ C}_4, 72.0 \text{ C}_3, 71.9 \text{ C}_2, 70.9 \text{ C}_5, 34.1 \text{ C}_6$

Oktakis-(6-bromo-6-deoxy)- γ -cyclodextrin

2 g (1.12 mmol, 56 %) aus der Reaktion von 2.5 g (15.7 mmol) Methansulfonylbromid mit 2.5 g (2 mmol) γ -Cyclodextrin.

Beilstein-Test stark positiv

Schmelzpunkt. (Zersetzung) : 195 – 200 °C (Lit. 201 – 202 °C).

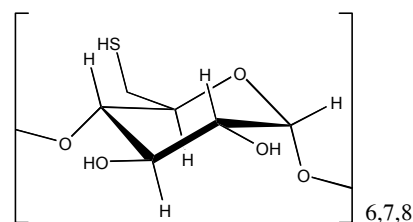
Raman Wellenzahl (cm^{-1}): 2977, 2923 st; 1786, 1776, 1678 m; 1412, 1398, 1377, 1342, 1330 m; 1177 w; 1108, 1076, 1014, 1002 m; 978, 810 w; 691 sst, 619 st, br; 586 m; 484 st, br; 428, 357m.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 5.02 \text{ H}_1, 3.97 \text{ H}_{6a}, 3.82 \text{ H}_5, 3.67 \text{ H}_{6b}, 3.58 \text{ H}_3, 3.40 \text{ H}_2, 3.35 \text{ H}_4$

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 102.1 \text{ C}_1, 84.1 \text{ C}_4, 72.3 \text{ C}_2, 72.2 \text{ C}_3, 71.1 \text{ C}_5, 34.4 \text{ C}_6$

Darstellung der Thiolderivate der Cyclodextrine

Die Bromverbindungen wurden in 20 ml trockenem DMF gelöst und tropfenweise mit in wenig DMF gelöstem Kaliumthioacetat (s. unten) bei Raumtemperatur versetzt. Nach Rühren über Nacht wurde die Lösung auf 0 °C heruntergekühlt und langsam eine zur Menge der zu spaltenden Thioester stöchiometrische



Menge Kaliumhydroxid in Methanol zugegeben. Die Lösung wurde für 2 h bei 40°C gerührt, anschließend in Eiswasser gegossen und mit 1N HCl neutralisiert. Das Rohprodukt wurde abfiltriert, einige male mit Eiswasser gewaschen, aus DMF/Methanol umkristallisiert und im bei 50 °C über P₄O₁₀ im Vakuum getrocknet.

Charakterisierung der Thiolderivate

Hexakis-(6-thio-6-deoxy)- α -cyclodextrin

0.8 g (0.75 mmol, 25 %) Produkt aus der Reaktion von 4 g (3 mmol) der Bromverbindung mit 3.25 g (28 mmol) Kaliumthioacetat.

Schmelzpunkt (Zersetzung) : 280 – 285 °C

Raman Wellenzahl (cm⁻¹) : 2941 st (v_{CH}); 2579 st (v_{SH}), 1416, 1398, 1374, 1347 st; 1111 m, br; 1024, 1015, 1003 w; 951 m; 894 m, br; 782, 761, 731, 670 m; 640 w; 501, 489 st, br

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ = 4.93 H₁, 3.68 H₅, 3.59 H₃, 3.36 H₂, 3.34 H₄, 3.20 H_{6a}, 2.75 H_{6b}, 2.12 -SH

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) : δ = 102.1 C₁, 85.1 C₄, 72.3 C₃, 72.2 C₂, 71.6 C₅, 25.9 C₆

Heptakis-(6-thio-6-deoxy)- β -cyclodextrin

0.95 g (0.76 mmol, 30 %) Produkt aus der Reaktion von 4 g (2.5 mmol) der Bromverbindung mit 2.75 g (25 mmol) Kaliumthioacetat.

Schmelzpunkt (Zersetzung): 270 – 280 °C

Raman Wellenzahl (cm⁻¹): 2930 sst, br; 2576 m (v_{SH}); 1414, 1399, 1381, 1336 st; 1231 w, br; 1117 st; 1043, 947 m; 908 w; 751, 729, 663, 509, 490 st.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 4.92 H₁, 3.66 H₅, 3.60 H₃, 3.34 H₂, 3.33 H₄, 3.18 H_{6a}, 2.77 H_{6b}, 2.10 -SH

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 102.0 C₁, 84.8 C₄, 72.4 C₃, 72.1 C₂, 71.9 C₅, 25.7 C₆

Oktakis-(6-thio-6-deoxy)- γ -cyclodextrin

0.3 g (0.22 mmol, 20 %) Produkt aus der Reaktion von 2 g (1.1 mmol) der Bromverbindung mit 1.5 g (13 mmol) Kaliumthioacetat.

Schmelzpunkt (Zersetzung): 285 – 290 °C

Raman Wellenzahl (cm⁻¹): 2930, 2917, 2898 st (v_{CH}); 2573 m (v_{SH}); 1460, 1413, 1398, 1376, 1343, 1331 m; 1290, 1280, 1256 w; 1129, 1106, 1091, 1075, 1025, 1014, 1002 m; 978, 964, 939, 897, 839 w; 732, 665, 645 m; 580 m; 509, 491 st; 420, 397, 383 358, 298, 277 m.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : δ = 4.96 H₁, 3.73 H₅, 3.57 H₃, 3.41 H₄, 3.35 H₂, 3.16 H_{6a}, 2.80 H_{6b}, 2.15 -SH

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) : δ = 101.9 C₁, 84.7 C₄, 72.3 C₂, 72.1 C₃, 71.5 C₅, 25.4 C₆

3.3.2 Calixarene

Calixarene entstehen bei der basisch katalysierten Kondensation von Formaldehyd mit *para*-substituierten Phenolen. Es sind ringförmige Käfigmoleküle mit mindestens vier Phenyleinheiten, die sich durch einen hohen Schmelzpunkt und ihre Unlöslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln ausweisen. Den Namen erhielten sie aufgrund ihrer Form, da die Gestalt ihrer Kalottenmodelle antiken griechischen Vasen (Lat.: ‚calix‘) gleichen kann (s. Abb. 3.10). Am besten untersucht sind Calix[4]-, Calix[6] und Calix[8]arene mit *tert*-Butyl-Resten, wobei die Anzahl der Phenyleinheiten im Molekül durch die Ziffer in den eckigen Klammern angegeben wird.



Abbildung 3.10 Das Kalottenmodell eines cyclischen Tetramers (links) und die Abbildung einer antiken griechischen Vase (rechts).

Die Formaldehyd-Phenol-Chemie wurde um 1870 von Adolph von Bayer begründet. Er berichtete über die Reaktion von Aldehyden mit Phenolen in Gegenwart starker Säuren⁶⁰, die zur Bildung ‚kittartiger Substanzen‘ führte. Später, 1894, berichteten L. Lederer und O. Manasse unabhängig voneinander von der basisch induzierten Reaktion zwischen Formaldehyd und Phenol unter sehr milden Bedingungen, als deren Produkt sie *o*- und *p*-Hydroxymethylphenol als definierte kristalline Substanzen isolieren konnten⁶¹. Bei weniger schonenden Bedingungen entstanden auch bei diesen Reaktionen die sonst üblichen teerartigen Substanzen. Leo Baekeland stellte Anfang des 20. Jahrhunderts durch den kontrollierten Einsatz geringer Mengen Basen bei der Kondensation von Phenol mit Formaldehyd ein interessantes Produkt her, dem er den Namen ‚Bakelit‘ gab⁶². Die Struktur des Bakelits blieb aber noch über lange Zeit unbekannt; wie schon von Baeyer 1872 vorgeschlagen ging man allgemein von in *ortho*- und *para*-Stellung über CH₂- und CH₂OCH₂-Gruppen verbrückte Aromaten im Kondensationsprodukt aus. Alois Zinke und Erich Ziegler setzten 1941 *para*-substituierte Phenole, welche nur an den beiden *ortho*-Positionen reagieren können, für die Kondensation mit Formaldehyd ein. In ihrer Veröffentlichung beschrieben sie Reaktionen und Eigenschaften des Produkts⁶³, schlugen aber erst drei

Jahre später die Struktur eines zyklischen Tetramers⁶⁴ vor. Diese cyclischen Oligomere erhielten ab den 70'er Jahren den Namen Calixarene. In den 60'er und 70'er Jahren wurden Synthesevorschriften für verschiedene Calixarene entwickelt. Neben den Tetrameren wurde dann auch Hexa- und Oktamere beschrieben, bei deren Synthese die eingesetzte Base und deren Konzentration die entscheidende Rolle spielt⁶⁵.

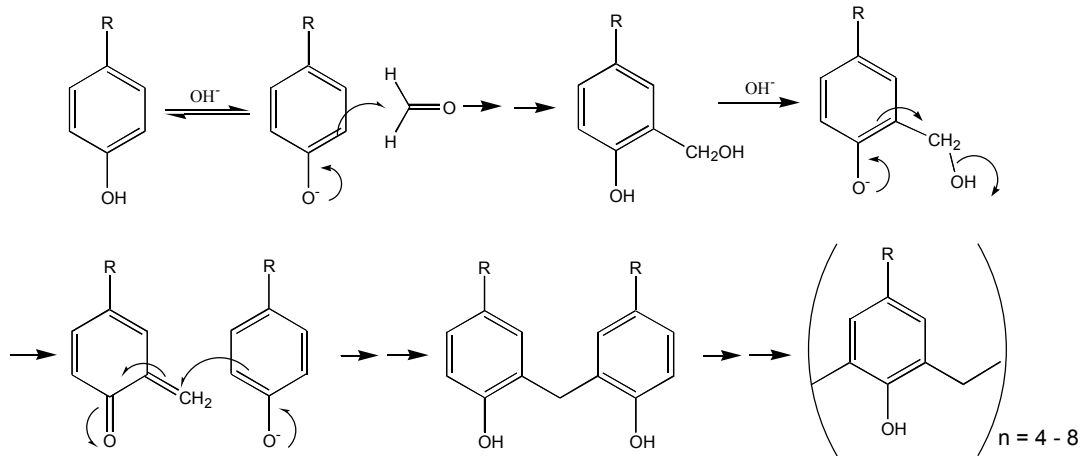


Abbildung 3.11 Mechanismus der basenkatalysierten Calixaren-Synthese.

Es gilt als gesichert, daß die baseninduzierte Oligomerisierung von para-substituierten Phenolen und Formaldehyd über den in Abbildung 3.11 dargestellten Mechanismus abläuft. Der erste Schritt wird durch die Bildung eines Phenolations eingeleitet, welches sich als Nukleophil an den Carbonylkohlenstoff des Formaldehyds addiert. Unter milden Bedingungen stoppt die Reaktion auf dieser Stufe und es können, wie schon erwähnt, Hydroxymethylphenole isoliert werden. Unter etwas drastischeren Bedingungen verläuft die Reaktion weiter über eine Diarylmethylverbindung, die in einer Michael-artigen Reaktion aus einem Chinonmethid und einem Phenolation gebildet wird, hin zu einer linearen Vorstufe. Bei entsprechender Wahl der Reaktionsbedingungen führen die Vorstufen aus vier, sechs oder acht methylenverbrückten Phenyleinheiten einen Ringschluß zum entsprechenden Calixaren aus.

Im Festkörper können die Calixarene eine Anzahl unterschiedlicher Konformationen aufweisen, die sich durch die Stellungen der Alkylreste zum Käfig hin unterscheiden. Von besonderem Interesse in Hinsicht auf die Bildung von Einschlußverbindungen oder die Modellierung enzymatischer Systeme ist die sog. ‚cone‘-Konformation, bei der alle Alkylreste auf der gleichen Seite des Moleküls stehen. Die Calixarene weisen dann einen tiefen Hohlraum auf, der sich zur Einlagerung von Molekülen entsprechender Größe eignet. So sind Komplexe von Calixarenen mit Alkalimetall-Kationen sowohl im Festkörper als auch in wässrigen Lösungen bekannt^{66,67}. Die Komplexierung von neutralen organischen Verbindungen wurde zumeist mittels NMR-Spektroskopie untersucht, wobei allerdings die

schlechte Löslichkeit der Calixarene in den meisten organischen Lösungsmitteln erschwerend wirkte.

SERS-spektroskopische Untersuchungen von mit Calixaren beschichteten Metalloberflächen setzt die Chemisorption der Käfige voraus, wozu die entsprechenden Funktionalitäten in die Moleküle eingeführt werden müssen. Generell stehen zur Modifikation von Calixarenen Reaktionen am oberen (Alkylrest) bzw. am unteren Ende (OH-Gruppe) zur Verfügung. Für erstgenannte Möglichkeit kommen Dealkylierungen, elektrophile Substitutionen und Funktionalisierungen via *para*-Claisen-Umlagerung, *p*-Quinonmethide-Route oder *p*-Chlormethylierung in Frage⁶⁸. Die Reaktionen am unteren Ende sind zumeist Veretherung bzw. Veresterung mit mono- oder polyfunktionalen Reagentien und Folgereaktionen an den Resten.

Vielversprechend erwies sich eine von Gibbs und Gutsche¹⁹⁹⁵ veröffentlichte Synthese eines *p-tert*-Butylcalix[4]arenthiols⁶⁹ (s. Abb. 3.12). Hierbei wird die seit den späten 60'er Jahren bekannte Newman-Kwart-Umlagerung von Phenolen zu Thiophenolen angewandt.

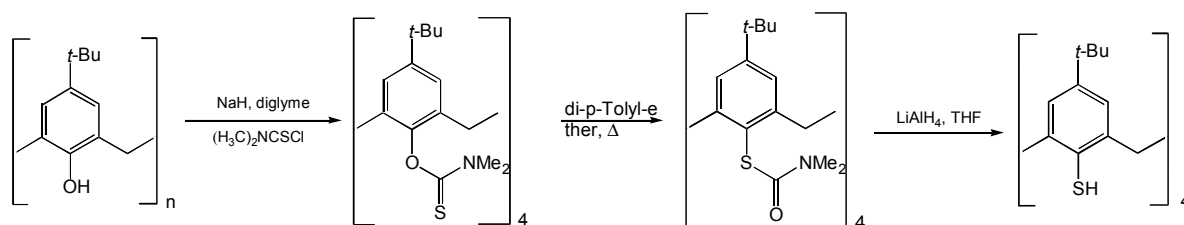


Abbildung 3.12 Darstellung von *p-tert*-Butylcalix[4]arentetrathiol nach Gibbs und Gutsche⁶⁹.

Das *p-tert*-Butylcalix[4]aren wird hierbei zuerst mit Natriumhydrid in Diethylen glykoldimethylether (Diglyme) deprotoniert und anschließend mit N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid umgesetzt. Nach Isolierung, Reinigung und Trocknung wird im folgenden Schritt das resultierende (Dimethyl(thiocarbamoyl)oxy)-calix[4]aren thermisch unter Rückfluß in *p*-Tolylether zu ((Dimethylcarbamoyl)thio)-calix[4]aren umgelagert. Dieser Schritt entspricht der von Newman⁷⁰ und Kwart⁷¹ beschriebenen Methode zur Konvertierung von Phenolen in Thiophenole. Eine abschließende Hydrierung des Zwischenproduktes mittels Lithiumaluminiumhydrid liefert das *p-tert*-Butylcalix[4]arenthiol.

Mit diesem Tetrathiol beschichtete SERS-Substrate wurden bereits zur Adsorption von BTXE-Aromaten aus wäßrigen Lösungen⁵⁶ und aus der Gasphase eingesetzt⁷². Berechnungen zeigen jedoch, daß der Käfig des Calix[4]arens recht klein ist und der Zugang durch die sperrigen *tert*-Butylreste noch erschwert wird, so daß die meisten Analyte nur schwach zwischen den Alkylresten absorbiert werden⁷³. Um eine bessere Adsorption auch von größeren Molekülen zu erzielen, sind Calixarene mit kleineren *para*-ständigen Alkylresten oder mit größeren Hohlräumen nötig. Es sollten daher *p-iso*-Propylcalix[4]-, *p*-

tert-Butylcalix[6]- und *p-tert*-Butylcalix-[8]aren gemäß der o.a. Syntheseroute zu Thiolen derivatisiert werden.

Im folgenden werden die Synthesen beschrieben, die substituierte Produkte lieferten. Die Reinigung und Isolierung der Produkte erfolgte säulenchromatographisch über Silikagel (Macherey & Nagel, Düren). Das Rohprodukt wurde in Methylenchlorid/Petrolether (60:40) aufgenommen und auf eine mit Silikagel gefüllte Säule gegeben, die mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch vorbereitet wurde. Eluiert wurde anschließend in einem Gradienten von Methylenchlorid/Petrolether, ausgehend von einem 60:40-Gemisch und mit einer Steigerung des Methylenchlorid-Anteils in zehn Prozent Schritten bis hin zu reinem Methylenchlorid. Das gereinigte Produkt wurde durch Verreiben mit kleinen Mengen Methanol erhalten und anschließend aus Methanol/Chloroform umkristallisiert.

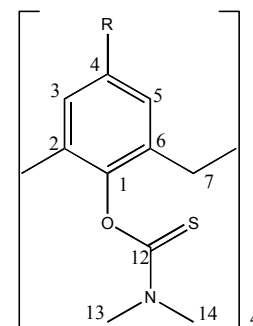
Von allen synthetisierten Calixarenderivaten ließen sich nur die Dimethyl(thiocarbamoyl)oxy-Verbindungen auf SERS-Substraten immobilisieren und konnten dort auf ihre Sorptionseigenschaften hin untersucht werden. Zu den Schwierigkeiten, die Thiocarbamoyl-Derivate in Thiol-Verbindungen zu überführen vgl. Abschn. 4.1.2.

Synthesen und Charakterisierung der Produkte

Synthese von *p*-Alkyl-tetrakis(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy)calix[4]arenen

(Methode nach Gutsche):

Zu einer Suspension von NaH in wasserfreiem, frisch destilliertem Diglyme wird das Calixaren gegeben und die Mischung für 1,5 Stunden auf 130-135 °C erhitzt. Eine Lösung von N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid in trockenem Diglyme wird tropfenweise zu der gerührten Mischung gegeben, daß die Temperatur bei etwa 130 °C bleibt. Nach beendeter Zugabe wird der Ansatz für 18 h bei 130 °C gerührt, anschließend gekühlt und in etwa einen Liter Wasser gegossen. Das luftgetrocknete Rohprodukt enthält mono-, di-, tri- und tetrasubstituiertes Calixaren.



Das luftgetrocknete Rohprodukt enthält mono-, di-, tri- und tetrasubstituiertes Calixaren.

Tetra-*iso*-propyl-tetrakis(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy-calix[4]aren

0.88 g (1.08 mmol, 18 %) nach Reinigung aus der Reaktion von 3.56 g (6 mmol) *p-iso*-Propylcalix[4]aren mit 0.75 g (30 mmol) NaH in 150 ml Diglyme und Zugabe von 6.05 g (49 mmol) N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid in 30 ml Diglyme.

DC: $R_f = 0.58$ (CH_2Cl_2 : PE = 70 : 30).

Schmelzpunkt: > 315°C.

Raman Wellenzahl (cm^{-1}) : 2965, 2930 sst; 2780, 2720 w; 1774, 1685 m; 1603, 1448 st; 1398, 1367 m; 1306 st; 1214, 1102 st; 1001 w; 928 st; 819 sst; 758, 666 st; 639, 609, 580 m; 553 st; 521 m; 481 w.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.13 s, 2 H, H_3 , H_5 ; 4.0 d, J = 13.9 Hz, 1 H, $\text{H}_{7\text{en}}$; 3.50 d, J = 13.9 Hz, 1 H, $\text{H}_{7\text{ex}}$; 3.21 s, 6 H, N- CH_3 ; 2.87 septett, J = 7 Hz, 1H, - $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; 1.27 d, J = 1.4 Hz, 6H, - CH_3 .

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 184.2 C_8 ; 147.1 C_1 ; 141.5 C_4 ; 133.6 C_3 , C_5 ; 127.0 C_2 , C_6 ; 43.1 N- CH_3 ; 37.4 N- CH_3 ; 34.8 C_7 ; 34.2 i-Pr (tertiär); 23.6 i-Pr (- CH_3)

Tetra-*tert*-butyl-tetrakis(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy-calix[4]aren

1.23 g (1.23 mmol, 16 %) nach Reinigung aus der Reaktion von 5 g (7.7 mmol) *p-tert*-Butylcalix[4]aren mit 1.5 g (62.5 mmol) NaH in 180 ml Diglyme und Zugabe von 9.27 g (75 mmol) N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid in 40 ml Diglyme.

DC: R_f = 0.57 (CH_2Cl_2 : PE = 70 : 30)

Schmelzpunkt: $>315^\circ\text{C}$.

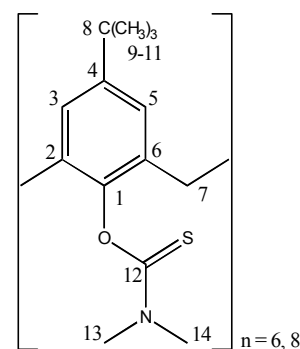
Raman Wellenzahl (cm^{-1}) : 2969, 2938 sst; 2783, 2715 w; 1777, 1680 m; 1604, 1444 st; 1399, 1360 m; 1304 st; 1211, 1098 st; 1003 w; 925 st; 823 sst; 759, 663 st; 643, 614, 588 m; 557 st; 524 m.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : δ = 7.2 s, 2 H, H_3 , H_5 ; 3.64 d, J = 13.2 Hz, 1 H, $\text{H}_{7\text{en}}$; 3.35 d, J = 13.4 Hz, 1 H, $\text{H}_{7\text{ex}}$; 3.43 s, 3 H, N- CH_3 ; 3.17 s, 3 H, N- CH_3 ; 1.34 s, 9H, *t*-Bu.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : δ = 185.7 C_8 ; 148.2 C_1 ; 143.6 C_4 ; 134.5 C_3 , C_5 ; 126.1 C_2 , C_6 ; 43.4 N- CH_3 ; 37.7 N- CH_3 ; 33.4 C_7 ; 34.2 4-Bu (quartär); 31.6 *t*-Bu (- CH_3)

Synthese von [6] bzw. [8] *p-tert*-Butyl(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy)calixarenen

Das Calixaren wurde in wenig Toluol vorgelegt und zu dieser Lösung wurde in Toluol suspendiertes Natriumhydrid langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde für zwei Stunden unter Rückfluß gerührt und anschließend in wenig Toluol gelöstes N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid portionsweise zugegeben. Nach 18 Stunden Rühren unter Rückfluß wurde ein Teil des Lösungsmittels entfernt, überschüssiges Hydrid vorsichtig mit Methanol vernichtet, die Lösung mit 1 N HCl neutralisiert und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Methylenechlorid aufgenommen und über eine Silikagelsäule gereinigt (CH_2Cl_2 : PE = 70 : 30).



Hexa-*tert*-butyl-hexakis(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy-calix[6]aren

0.86 g (0.6 mmol, 42 %) aus der Reaktion von 1.25 g (1.3 mmol) Calix[6]aren mit 2 g (16 mmol) N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid und 0.4 g (17 mmol) Natriumhydrid in 100 ml Toluol.

DC: $R_f = 0.51$ (CH_2Cl_2 : PE = 70 : 30)

Schmelzpunkt > 315°C

Raman Wellenzahl (cm^{-1}) : 2960, 2933 sst; 2781, 2711 w; 1776, 1679 m; 1603, 1448 st; 1413, 1398 m; 1367 w; 1303 st; 1237 w; 1204, 1107 st; 1029, 1001 w; 925 st; 876 m; 821 sst; 754, 693, 667 st; 637, 601, 581 m; 550 st; 519 m; 486 w; 426, 366, 261 st.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : $\delta = 7.16$ s, 2 H, H_3 , H_5 ; 4.59 dd (AB-System), $J = 7$ Hz, 2 H, H_7 ; 3.47 s, 3 H, N- CH_3 ; 3.21 s, 3 H, N- CH_3 ; 1.30 s, 9 H, *t*-Bu.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : $\delta = 183.7$ C_8 ; 148.6 C_1 ; 146.9 C_4 ; 132.0 C_3 ; 126.6 C_2 ; 67.6 C_7 ; 43.8 N- CH_3 ; 37.6 N- CH_3 ; 34.7 *t*-Bu (quartär); 31.9 *t*-Bu, ($-\text{CH}_3$).

Okta-*tert*-butyl-oktakis(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy)calix[8]aren

0.79 g (0.4 mmol, 51 %) aus der Reaktion von 1 g (0.79 mmol) Calix[8]aren mit 2 g (16 mmol) N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid und 0.4 g (17 mmol) Natriumhydrid in 100 ml Toluol.

DC: $R_f = 0.49$ (CH_2Cl_2 : PE = 70 : 30)

Schmelzpunkt > 315°C

Raman Wellenzahl (cm^{-1}) : 2959, 2934 sst; 2779, 2714 w; 1775, 1679 m; 1603, 1451 st; 1399, 1367 w; 1303 st ; 1260 w; 1204, 1127 st; 1105 m; 1026, 1002 w; 925 st; 876 w; 816 sst; 759, 688, 677 st; 631 w; 601 m; 576 w; 530 st; 455 m; 234 st.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : $\delta = 7.13$ s, 2 H, H_3 , H_5 ; 4.51 AB-System, $J = 7$ Hz, 2 H, H_7 ; 3.31 s, 3 H, N- CH_3 ; 3.11 s, 3 H, N- CH_3 ; 1.27 s, 9 H, *t*-Bu.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : $\delta = 188.3$ C_8 ; 147.1 C_1 ; 144.9 C_4 ; 129.1 C_3 ; 126.0 C_2 ; 68.8 C_7 ; 43.2 N- CH_3 ; 37.8 N- CH_3 ; 34.0 C (*t*-Bu, quartär); 31.2 (*t*-Bu, $-\text{CH}_3$).

Veretherungen mit Halogenalkanen (s. hierzu Abschn. 4.1.2)

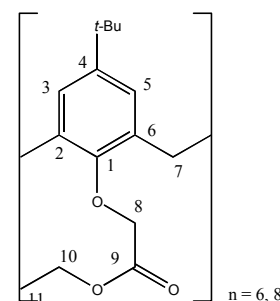
Das Calixaren wurde in wenig Lösungsmittel (Aceton oder Diglyme) vorgelegt und die Base (s. Tabelle 4.3) zugegeben. Nach 2 Stunden Rühren unter Rückfluß wurde das Halogenalkan tropfenweise zugegeben und die Mischung einige Stunden weiter unter Rückfluß gerührt. Der Fortgang der Reaktion wurde mittels DC (CH_2Cl_2 /PE 70:30) kontrolliert. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in

wenig Methylenchlorid oder Chloroform aufgenommen, filtriert und anschließend säulenchromatographisch getrennt und gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE}$ 70:30).

Bei den durchgeführten Synthesen wurden das Calixaren, die Base, das Halogenalkan, das Lösungsmittel sowie die Reaktionsbedingungen variiert. Bei den meisten Ansätzen fand keine Umsetzung statt, bei Ansätzen mit *n*-Butyllithium als Base entstanden beim Erwärmen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur braune teerartige Substanzen. Einzig die Umsetzung von Calix[6]aren mit Bromchlormethan in Aceton und Kaliumcarbonat als Base lieferte nach Aufarbeitung 15 % disubstituiertes Produkt.

Veresterungen mit Bromessigsäureethylester (s. hierzu Abschn. 4.1.2)

Das Calixaren wurde mit wasserfreiem Kaliumcarbonat in Aceton suspendiert und für 2 Stunden unter Rückfluß gerührt. Anschließend wurde frisch destillierter Bromessigsäureethylester langsam zugegeben und die Mischung für 5 Tage unter Rückfluß gerührt. Der Ablauf der Reaktion wurde hierbei mittels DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE}$ 70:30) kontrolliert. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in wenig Methylenchlorid aufgenommen, filtriert und über eine mit Silikagel gefüllte Säule ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{PE}$ 70:30) gereinigt.



p-tert-Butylcalix[6]aren-hexaessigsäure-hexaethylester

2.35 g (1.58 mmol, 43.3 %) aus der Reaktion von 3.65 g (3.75 mmol) Calix[6]aren mit 4.18 g (25 mmol) Bromessigsäureethylester und 5 g (36 mmol) K_2CO_3 in 50 ml Aceton.

DC: $R_f = 0.51$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{PE} = 70 : 30$)

Schmelzpunkt : 160 – 170 °C

Raman Wellenzahl (cm^{-1}) : 2973, 2933 sst; 2781, 2714 w; 1769, 1727 m; 1679 w; 1606, 1449 st; 1398, 1367 w; 1327 m; 1303 st; 1241 m; 1206, 1117 st; 1077, 1050, 1032, 1001 w; 937, 928m; 905 w; 874 st; 817 sst; 766, 705, 686, 672 w; 565, 534, 490 m; 445, 427, 383 w; 253 st; 208 sst.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) : $\delta = 7.0$, s, 2H, H_3 , H_5 ; 4.14, s, 1H, $\text{H}_{7\text{en}}$; 4.05, s, 2H, H_8 ; 4.02, s, 1H, $\text{H}_{7\text{ex}}$; 4.0 s, 2H, H_{10} ; 1.13, s, 9H, *t*-Bu; 1.0, t ($J = 7$ Hz), 3H, H_{11} .

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) : $\delta = 168$ C_9 ; 153 C_1 ; 148 C_4 ; 132 C_3 , C_5 ; 126.5 C_2 , C_6 ; 72 C_8 ; 63 C_{10} ; 34 C_7 ; 30 *t*-Bu; 12 C_{11} .

p-tert-Butylcalix[8]aren-oktaessigsäure-oktaethylester

1.42 g (0.74 mmol, 48.6 %) aus der Reaktion von 2 g (1.54 mmol) Calix[8]aren mit 3.34 g (20 mmol) Bromessigsäureethylester und 3.5 g (25 mmol) K_2CO_3 in 50 ml Aceton.

DC: $R_f = 0.48$ (CH_2Cl_2 : PE = 70 : 30)

Schmelzpunkt : 170 – 175 °C

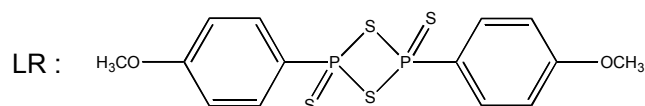
Raman Wellenzahl (cm^{-1}): 2968, 2907 st, br; 2780, 2712 w; 1776, 1680 m; 1604, 1452 st; 1400, 1365 w; 1335 m; 1304 st; 1241, 1209 m; 1121 st; 1032 m; 1002 m; 927 st, br; 876 m, br; 834, 827 st; 807, 791, 761, 711, 625, 587, 530, 498, 383 m; 241 st.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 6.9$, s, 2H, H_3 , H_5 ; 4.13, s, 1H, H_{7en} ; 4.05, s, 2H, H_8 ; 4.03, s, 1H, H_{7ex} ; 4.01 s, 2H, H_{10} ; 1.1, s, 9H, *t*-Bu; 1.0, t ($J = 7$ Hz), 3H, H_{11} .

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) : $\delta = 169$ C_9 ; 153 C_1 ; 147 C_4 ; 133 C_3 , C_5 ; 126 C_2 , C_6 ; 70 C_8 ; 62 C_{10} ; 34 C_7 ; 31 *t*-Bu; 14 C_{11} .

Reaktionen mit Lawesson Reagenz (LR) zur Thionylierung (s. hierzu Abschn. 4.1.2):

Die Essigsäureethylestercalixarene wurden nach Trocknung in wenig Xylol (Isomerengemisch) gelöst und mit in Xylol suspendiertem LR portionsweise versetzt. Die Mischungen wurden solange unter Rückfluß gerührt, bis alles LR aufgebraucht war (Kontrolle mittels DC). Die Reinigung und Aufarbeitung wurde an einer mit Silikagel gefüllten Säule durchgeführt.



2,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetan 2,4-disulfid

3.4 Beschichtung von SERS-Substraten

Zur Herstellung der SAM (‘self assembled monolayers’, s. Abschn. 2.2.4) der unterschiedlichen Beschichtungssubstanzen wurden SERS-Substrate (Metallfilme über Nanopartikeln bzw. mikrostrukturierte Substrate) in Lösungen der Verbindungen eingelegt.

Aliphatische und aromatische Thiole wurden aus 10 mM ethanolischen Lösungen der jeweiligen Verbindung immobilisiert. Die Beschichtung war entsprechend der gemessenen SERS-Intensitäten innerhalb weniger Minuten abgeschlossen. Zur Sicherung einer tatsächlich vollständigen Bedeckung wurden die Substrate für 30 min in die Lösungen eingelegt. Die verschiedenen Farbstoffe (Rhodamin-B-isothiocyanat, Dithizon, Kristallviolett) wurden innerhalb von zwei Stunden aus 1 mM ethanolischen Lösungen immobilisiert.

Calixaren-Beschichtungen wurden durch Einlegen der Substrate für drei Stunden in 10 mM Lösungen der Thiocarbamoyl-Derivate in Chloroform hergestellt.

Für die Beschichtungen mit 6-Thio-6-deoxy-cyclodextrinen wurden diese in Konzentrationen von 10 mg/mL in Wasser (seralpur[®]) suspendiert und die Substrate für zwölf Stunden in die Suspension eingelegt.

Für Messungen an mit Oligonukleotiden beschichteten Substraten wurden die Nucleobasen, Einzelnucleoside, Einzelstränge und Hybridisierungsprodukte der Einzelstränge für 18 Stunden aus wässrigen Lösungen immobilisiert. Die Konzentration der Basen wurde mit 5 mg/ml vorgegeben. Die Einzelstrang-DNA wurde nach Herstellerangaben in Portionen zu 5 nmol pro Packungseinheit geliefert. Bei der Immobilisierung ergaben sich daher für die Einzelstränge Konzentrationen von 5nmol/10 μ L (entsp. 500 mM) und für die Hybridisierungsprodukte von 5 nmol/20 μ L (entsp. 250 mM).

Eine zusammenfassende Übersicht über die Beschichtungsbedingungen ist in Tabelle 3.1 gegeben.

Verbindung	Konzentration	Lösungsmittel	Dauer [h]
aliphatische und aromatische Thiole	10 mM	Ethanol (uvasol [®])	0,5
Farbstoffe	1 mM	Ethanol (uvasol [®])	2
Calixarene	10 mM	Chloroform (puriss. p.a.)	3
Cyclodextrine	10 mg/mL	Wasser (seralpur [®])	12
Nucleinbasen	5 mg/mL	Wasser (seralpur [®])	12
Nucleoside	5 mg/mL	Wasser (seralpur [®])	18
DNA-Proben	250 mM (5 nM/20 μ L)	Wasser (seralpur [®])	18

Tabelle 3.1 Übersicht über die Bedingungen zur Beschichtung von SERS-Substratne mit unterschiedlichen Verbindungen.

Nach beendeter Beschichtung wurden die Substrate mehrfach mit dem entsprechenden Lösungsmittel gespült. Besonders bei den flüchtigen Thiolen war aufgrund der Geruchsbelästigung eine gründliche Reinigung nötig. Nach dem Spülen wurden die Substrate, sofern nicht direkt eingesetzt, in einem Exsikkator aufbewahrt.

Thiol-Beschichtungen erwiesen sich über Wochen als stabil. Substrate, die mit Calixaren beschichtete waren, hielten sich etwa 4 Wochen, solche mit Cyclodextrin-Beschichtungen etwa 2 Wochen. Mit Ausnahme der bei den Langzeitmessungen verwendeten, mit

Cyclodextrin beschichteten Substrate, wurde kein Substrat länger als eine Woche nach der Beschichtung verwendet.

3.5 Adsorption von Analyten an beschichtete Substrate

Die Adsorption der unterschiedlichsten Verbindungen an beschichtete SERS-Substrate wurde entweder aus der gasförmigen oder der flüssigen Phase vorgenommen.

Zur Adsorption aus der Gasphase wurde das beschichtete Substrat in einem handelsüblichen 250 ml Zweihalskolben im Fokus des Lasers positioniert. Bei leichtflüchtigen Verbindungen wurde der Kolben mit einem Septum verschlossen und dann eine definierte Menge des Analyten in den Kolben eingespritzt. Feste Verbindungen wurden direkt nach der Positionierung des SERS-Substrates in den Kolben gegeben und der Kolben direkt nach der Zugabe verschlossen.

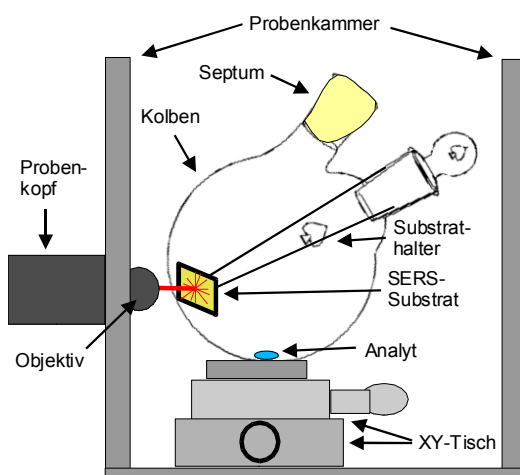


Abbildung 3.13 Experimenteller Aufbau zur SERS-Messung von Adsorptionen aus der Gasphase.

Adsorptionen aus der flüssigen - meist der wäßrigen - Phase wurden in Küvetten für die Spektroskopie untersucht (s. Abb. 3.14). Hierzu wurde das Substrat in der Küvette im Laserfokus justiert und die Lösung mit dem Analyten über eine Pipette zugegeben. Da sich der Fokus in der Lösung gegenüber der Luft veränderte mußte nach Zugabe der Probe nachjustiert werden.

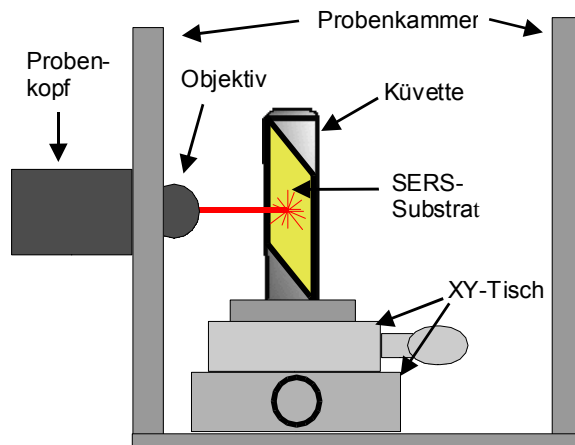


Abbildung 3.14 Experimenteller Aufbau zur SERS-Messung von beschichteten Substraten und zur Adsorption von Analyten aus Lösungen.

Der in Abbildung 3.15 dargestellte Aufbau zur Messung in Quarzkapillaren wurde zur Aufnahme von Raman-Spektren für übel riechende Verbindungen, wie z.B. Thiole, organische Disulfide o.ä. genutzt sowie für SERS-Messungen an Hydrosolen, wie in Abschnitt 4.7 beschrieben. Um einen schnellen Wechsel der Kapillaren bzw. ein schnelles Homogenisieren des Hydrosols zu ermöglichen waren die Kapillaren im Probenhalter nur geklemmt.

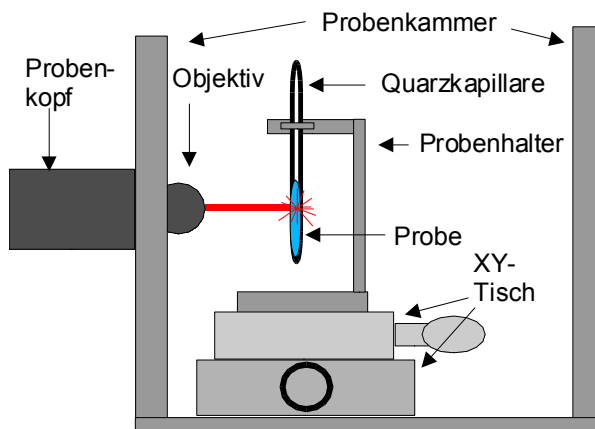


Abbildung 3.15 Experimenteller Aufbau zur Raman-Messung von übelriechenden Reinsubstanzen sowie zur SERS-Messung an Hydrosolen (vgl. Abschn. 4.7).

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der Beschichtungssubstanzen

4.1.1 Cyclodextrine

Die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Synthesen mit Cyclodextrinen lieferten Verbindungen, die sich zur Beschichtung von SERS-aktiven Oberflächen nutzen ließen. Die einzelnen Verbindungen wurden nach Standardmethoden isoliert, gereinigt und charakterisiert.

Es zeigte sich, daß die Ausbeuten bei Arbeiten unter Schutzgasatmosphäre mit wasserfreien Reagentien und Lösungsmitteln erhöht werden können. Besonders bei der Verseifung des Thioesters mit 3M Natriummethanolat/Methanol-Lösung erhöhte der Einsatz von wasserfreiem Methanol die Ausbeute signifikant. Einbußen an Produkt kamen jedoch während der Aufarbeitung der Produkte zustande. Da durch das Kaliumthioacetat selbst nach mehrfachem Umkristallisieren noch fluoreszierende Verunreinigungen eingeschleppt wurden, mußten die Rohprodukte wiederholt aus DMF/Methanol umkristallisiert werden. Die Ausbeuten sanken im Zuge der Reinigung auf Werte um 20 bis 30 Prozent. Als Ergebnis erhielt man nach der Trocknung über Phosphorpentoxid weiße, geruchlose Feststoffe, die in DMF, DMSO und Pyridin löslich waren und im Raman-Spektrum keine Fluoreszenz mehr aufwiesen.

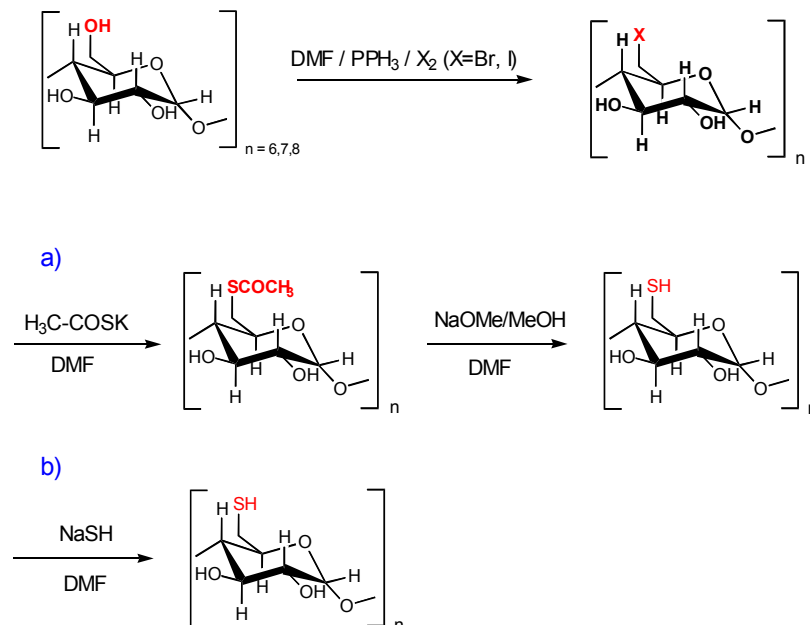


Abbildung 4.1 Reaktionsschema der Alternativroute nach Gadelle und Defaye⁷⁴.

Alternativ wurde eine weitere Syntheseroute⁷⁴ verfolgt. Bei dieser sollten die Edukte mit einem Halogen (Brom oder Iod) und Triphenylphosphin in DMF umgesetzt werden. Für diese

Reaktion wird ein ähnlicher Verlauf wie bei der Aktivierung von Alkoholen bei nukleophilen Substitutionen über Vilsmeier-Haack-Komplexe⁷⁵ angenommen; das halogenierende Agens wird in-situ erzeugt.

Die Substitution zum Thiol erfolgte dann vergleichend zum einem über die bekannte Spaltung des Thioesters (Fall a in Abb. 4.1) und zum anderen direkt mittels eines Hydrogensulfids (Fall b in Abb. 4.1). Während sich über die Spaltung von Thioestern noch geringe Ausbeuten an den gewünschten Produkten isolieren ließen, brachte die Umsetzung mit Natriumhydrogensulfid keinen Erfolg. Zudem waren die Ausbeuten sehr gering, da im Vergleich zu der o. g. Synthese nach Tabushi die Rohprodukte stark verunreinigt und im Zuge der Reinigung die Verluste an Produkt zu groß waren.

NMR-Spektren (s. Tab. 4.1 und 4.2). Die gemessenen Verschiebungen der ¹H und ¹³C NMR-Signale sämtlicher Produkte und Zwischenstufen stimmen gut mit den Literaturwerten⁷⁶ überein. Die Modifizierung der Cyclodextrine am C₆-Atom zeigt sich in der chemischen Verschiebung der Methylenprotonen (H₆) des primären Alkohols. Nach der Einführung des Broms wird das Signal Hochfeld verschoben und spaltet merklich auf. In den ¹H-Spektren der Thiolcyclodextrine tritt ein zusätzliches Protonensignal zwischen 2.10 und 2.15 ppm auf, welches von der Verschiebung her dem Thiol zuzuordnen ist. Durch ¹H-COSY erhaltene Crosspeaks liefern den Nachweis, daß sowohl Brom als auch Schwefel an der gewünschten Position, dem C₆ Atom, im Molekül gebunden sind. Die Integration der Signale zeigte jeweils eine nahezu vollständige Substitution bei Werten um 0,9 SH-Gruppen pro Glucoseeinheit.

		H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆		SH
CD	α	4.85	3.27	3.53	3.36	3.55	3.63		
	β	4.82	3.28	3.53	3.35	3.59	3.64		
	γ	4.87	3.29	3.57	3.34	3.51	3.60		
BrCD	α	4.99	3.36	3.67	3.38	3.83	3.99	3.67	
	β	4.96	3.37	3.62	3.35	3.81	4.00	3.65	
	γ	5.02	3.40	3.58	3.35	3.82	3.97	3.67	
TCD	α	4.93	3.36	3.59	3.34	3.68	3.20	2.75	2.12
	β	4.92	3.34	3.60	3.33	3.66	3.18	2.77	2.10
	γ	4.96	3.35	3.57	3.41	3.73	3.16	2.80	2.15

Tabelle 4.1 ¹H-Verschiebungen der Cyclodextrine und ihrer Derivate
(CD = Cyclodextrin; BrCD = Bromderivat; TCD = Thiolderivat).

Die Verschiebung des ^{13}C -Signals für das C_6 -Atom nimmt von ca. 60 ppm auf 34-35 ppm bei den Bromverbindungen und 25-26 ppm bei den Thiolverbindungen ab. Da die Signale der anderen Kohlenstoffatome während der Synthese stabil bleiben, ist davon auszugehen, daß das Kohlenstoffgerüst der Verbindungen während der Synthesen erhalten bleibt und keine Reaktionen an den anderen Kohlenstoffatomen stattfinden, bzw. daß die Nebenprodukte abgetrennt werden.

		C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
CD	α	102.0	72.1	73.3	82.1	72.1	60.0
	β	102.0	72.5	73.3	81.6	72.2	60.0
	γ	102.1	72.7	73.7	81.2	72.2	59.9
BrCD	α	102.2	71.9	72.8	85.1	71.0	35.0
	β	102.2	72.1	72.4	84.7	71.1	34.6
	γ	102.1	72.3	72.2	84.1	71.1	34.4
TCD	α	102.0	72.1	72.4	84.8	71.9	25.7
	β	102.1	72.2	72.3	85.1	71.6	25.9
	γ	101.9	72.3	72.1	84.7	71.5	25.4

Tabelle 4.2 ^{13}C -Verschiebungen der Cyclodextrine und ihrer Derivate.

Raman-Spektren. Die Raman-Spektren der Cyclodextrinderivate sind am Beispiel des α -Cyclodextrins in Abbildung 4.2 dargestellt. Alle reinen Verbindungen zeigen typische CH_x Streckschwingungsbanden um 2900 cm^{-1} . Die Ausgangsverbindungen weisen außerdem noch eine ganze Reihe Banden in der Fingerprint-Region auf, die allerdings nicht im einzelnen zugeordnet werden konnten.

Bei den Bromverbindungen fallen zwei starke Banden um 620 und 680 cm^{-1} auf, die im zu erwartenden Bereich⁷⁷ der C-Br Streckschwingung in zwei unterschiedlichen Konformationen liegen. Diese beiden Signale sind in den Spektren der Thiolverbindungen nicht mehr detektierbar. Dafür tritt eine weitere Bande bei 669 cm^{-1} auf, die einer C-S Streckschwingung zugeordnet werden kann. Allerdings liegt diese Bande sehr nah an einer der stärksten Banden von DMF, welches in der Synthese als Lösungsmittel verwendet wird und in die Hohlräume der Cyclodextrine eingelagert werden kann. Die nur in den Spektren der Thiolverbindungen auftretende starke Bande bei etwa 2575 cm^{-1} liegt dagegen eindeutig im charakteristischen Bereich für S-H Streckschwingungen. Diese Zuordnungen deuten in Verbindung mit den NMR-Daten auf eine erfolgreiche Syntheseroute hin.

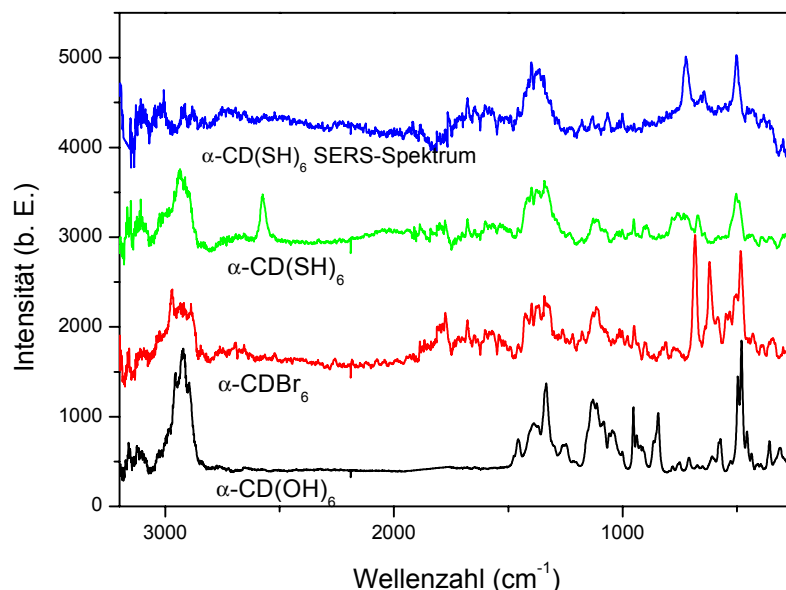


Abbildung 4.2 Raman-Spektren der in der Synthese auftretenden CDs, sowie das SERS-Spektrum des TCDs am Beispiel des α -CD. SH-Streckschwingung in der am Substrat immobilisierten Form (oberstes Spektrum) nicht mehr erkennbar.

4.1.2 Calixarene

Hier zeigte sich, daß trotz sorgfältiger Trocknung aller Reagentien und Lösungsmittel bei Reaktionen nach der Gibbs/Gutsche-Methode keine vollständige Substitution der Phenole mittels N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid zu erreichen war. Selbst bei Wiederholung der Operationen wurden insbesondere für die größeren Calixarene nur geringe Ausbeuten an vollständig substituierten Produkten erzielt. Durch die nötige säulenchromatographische Abtrennung des Reaktionsprodukte wurden die Ausbeuten noch weiter reduziert. Eine Änderung der Reaktionsbedingungen hin zu einer Deprotonierung der Calixarene mit Natriumhydrid in wasserfreiem Toluol lieferte deutliche bessere Ausbeuten von ca. 50 Prozent nach Reinigung.

Eine Umlagerung nach Newman-Kwart zu den Thiophenolderivaten (s. Abb. 3.11) verlief in keinem Fall in die gewünschte Richtung. Es bildeten sich im Laufe der Reaktion stets braune teerartige Produkte, welche sich weder mittels Säulenchromatographie trennen noch mit NMR-, IR- oder Raman-Spektroskopie identifizieren ließen. Mehrere Ansätze dieser Umlagerung lieferten für alle eingesetzten Calixarene stets das gleiche Ergebnis, so daß nach einiger Zeit diese Reaktionsführung letztendlich nicht weiter verfolgt wurde.

Alternativ wurde versucht, die Calixarene gemäß einer Williamson'schen Ethersynthese mit Halogenalkanen umzusetzen (s. S. 52), um über eine weitere funktionelle Gruppe im Alkylrest die Einführung von Schwefel zu ermöglichen. Versuche mit Bromchlor- oder Diiodmethan lieferten bei Variierung der Reaktionsbedingungen nur in einem Fall einen geringen Umsatz zu einem teilsubstituierten Produkt. Im größten Teil der durchgeführten Ansätze konnten die Edukte nach Trennung über eine Säule wiedergewonnen werden. Die Umsetzungen von Calix[6] bzw. Calix[8]aren mit Bromessigsäureethylester lieferte vollsubstituierte Produkte in Ausbeuten von 43 % für Calix[6]- und 59 % für Calix[8]aren. Diese Verbindungen sollten im folgenden Schritt mit Lawesson-Reagenz zu Thionessigsäureestern und weiter zu Thiolen umgesetzt werden (s. S. 52/53). Obwohl Umsetzungen mit Lawesson-Reagenz mittlerweile zu den Standardreaktion der organischen Chemie zählen und hohe Produktausbeuten liefern^{78,79,80}, bildeten sich bei allen durchgeführten Ansätzen braune teeartige Produkte. Selbst wiederholte intensive Trocknung sämtlicher Reagenzien lieferte keine verwertbaren Produkte, so daß auch diese Reaktionsführung keine thiol-funktionalisierten Calixarene lieferte und ebenfalls nicht weiter verfolgt wurde.

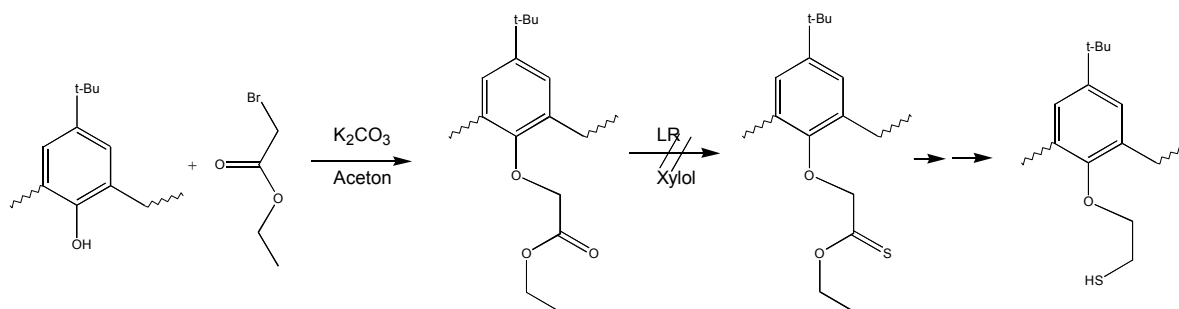


Abbildung 4.3 *Geplante Umsetzung der Calixarenessigsäureethylester mit Lawesson-Reagenz.*

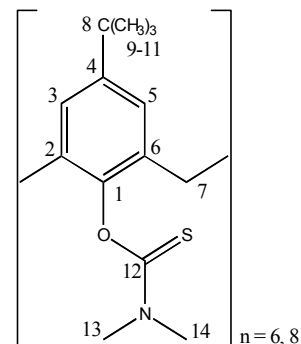
In Tabelle 4.3 ist eine Übersicht über die mit Calixarenen durchgeführten Synthese-Versuche dargestellt.

Edukt	Reagenz	Base	Bedingungen	Ausbeute
p-iso-Propylcalix[4]aren	Me ₂ NCSCl	NaH	Diglyme, Δ, 12 h	18 %
p-iso-Propylcalix[4]aren	CH ₂ BrCl	NaH	Diglyme, Δ, 12 h	kein Umsatz
p-iso-Propylcalix[4]aren	CH ₂ I ₂	K ₂ CO ₃	Aceton, Δ, 5 d	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[4]aren	Me ₂ NCSCl	NaH	Diglyme, Δ, 12 h	16 %
p-tert-Butylcalix[4]aren	CH ₂ BrCl	NaH	Diglyme, 60 °C, 18 h	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[4]aren	CH ₂ BrCl	NaH	DMF, 60 °C, 18 h	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[6]aren	Me ₂ NCSCl	NaH	THF, Δ, 18 h	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[6]aren	CH ₂ BrCl	n-BuLi	Hexan, -60 °C	teerartiges Produkt
p-tert-Butylcalix[6]aren	CH ₂ BrCl	K ₂ CO ₃	Aceton, Δ, 5 d	15% (trisubs.)
p-tert-Butylcalix[6]aren	CH ₂ I ₂	NaH	THF, Δ, 5 d	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[6]aren	Br-CH ₂ -CO-OC ₂ H ₅	K ₂ CO ₃	Aceton, Δ, 5 d	43 %
p-tert-Butylcalix[6]aren	Me ₂ NCSCl	NaH	Toluol, Δ, 24 h	42 %
p-tert-Butylcalix[8]aren	CH ₂ I ₂	NaH	Diglyme, Δ, 18 h	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[8]aren	CH ₂ BrCl	n-BuLi	Hexan, -60 °C	teerartiges Produkt
p-tert-Butylcalix[8]aren	CH ₂ I ₂	K ₂ CO ₃	THF, Δ, 5 d	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[8]aren	CH ₂ BrCl	K ₂ CO ₃	Aceton, Δ, 5 d	kein Umsatz
p-tert-Butylcalix[8]aren	Br-CH ₂ -CO-OC ₂ H ₅	K ₂ CO ₃	Aceton, Δ, 5 d	49 %
p-tert-Butylcalix[8]aren	Me ₂ NCSCl	NaH	Toluol, Δ, 24 h	51 %

Tabelle 4.3: Übersicht über die zur Modifizierung der Calixarene durchgeführten Synthesen.

Einzig die Calixarene, die mit N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid umgesetzt wurden, lieferten Verbindungen, die sich auf SERS-Substraten immobilisieren ließen. Die Auftrennung des Produktgemisches und die Reinigung der Rohprodukte wurde mittels Säulenchromatographie durchgeführt. Als Laufmittel wurde für die (Dimethyl(thiocarbamoyl)oxy)calixarene ein Gemisch von Methylenechlorid und Petrolether im Verhältnis 70:30 verwendet. Nach der Umkristallisation aus Methanol/Chloroform wurden die Verbindungen nach Standardmethoden charakterisiert.

NMR-Spektren In den ^{13}C -NMR Spektren (s. Tab. 4.4) treten zu den Peaks des Calixarengründgerüsts noch einige weitere Signale auf. Hierzu gehört das Signal des Thiocarbamoylkohlenstoffs bei 188.3 ppm. Diese Verschiebung liegt damit im Bereich der Literaturwerte⁸¹, die für diese Umgebung mit 185 bis 188 ppm angegeben werden. Die Peaks der Methylgruppen des Amids spalten weit auf und werden von 45.5 und 44.9 ppm im Edukt zu 43.2 und 37.8 ppm im Produkt hochfeld verschoben. Die



Signallagen der Gerüst-Kohlenstoffe bleiben weitestgehend stabil. Nur die Peaks der Kohlenstoffkerne nahe der Carbamoyl-Funktion ändern ihre Lage um maximal 1 ppm.

Die ^1H -NMR-Spektren (s. Tab. 4.5) zeigen ein ähnliches Bild. Das Signal des phenolischen Protons um 10 ppm tritt nicht mehr auf. Die Verschiebung der beiden aromatischen Protonen ändert sich von 7.3 auf 7.1 ppm. Die klar getrennten Dubletts der Protonen der Methylenbrücke zwischen den phenylischen Einheiten bei 4.4 und 3.6 ppm werden zu tieferem Feld und Werten um 4.5 ppm verschoben. Diese beiden Protonen stellen ein AB-System mit einer Kopplungskonstanten von 7 Hz dar. Die Protonen der beiden Methylgruppen am Stickstoff liefern in den Spektren Peaks bei 3.4 und 3.1 ppm. Die Protonen der *tert*-Butylgruppe ergeben sowohl bei Spektren von Edukt und Produkt ein scharfes Singulett bei 1.3 ppm.

	C ₁	C ₂ , C ₆	C ₃ , C ₅	C ₄	C ₇	C ₈	C ₉₋₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄
Edukt[6]	149	125.5	130.2	146.5	33.1	34.3	31.6	-	-	-
Edukt[8]	148.1	125.0	129.1	146.0	32.8	34.0	31.5	-	-	-
Produkt[6]	148.6	126.6	132.0	146.9	37.6	34.7	31.9	183.7	43.8	37.6
Produkt[8]	147.1	126.0	129.1	144.9	36.8	34.0	31.2	188.3	43.2	37.8

Tabelle 4.4 ^{13}C -Verschiebungen der Calixaren-Verbindungen

	H ₃ , H ₅	H _{7a} , H _{7b}	t-Bu	-OH	-NCH ₃	-NCH ₃
Edukt[6]	7.28	4.45/3.58	1.29	9.9	-	-
Edukt[8]	7.3	4.43/3.57	1.30	9.7	-	-
Produkt[6]	7.16	4.59	1.30	-	3.47	3.21
Produkt[8]	7.13	4.51	1.27	-	3.31	3.11

Tabelle 4.5 ^1H -Verschiebungen der Calixaren-Verbindungen

Die **Raman-Spektren** der (Dimethy(thiocarbamoyl)oxy)-calixarene sind von den Schwingungsbanden des Calixarengrundgerüsts dominiert. Außerdem zeigen sie die in Abbildung 4.4 mit Pfeilen gekennzeichneten zusätzlichen Schwingungsbanden. Hierzu gehören eine Thioamidbande (-C:S-N-) von mittlerer Intensität bei 1680 cm^{-1} und einige schwache CN-Schwingungen bei 1487 , 1399 und 1367 cm^{-1} . Die gemessene Thiocarbamoylbande liegt bei 1106 cm^{-1} und damit im zu erwartenden Bereich. Zusätzliche CC-, C:S- und CNC-Schwingungsbanden von mittlerer bis schwacher Intensität treten im Fingerprint-Bereich zwischen 1000 und 700 cm^{-1} auf. Weiterhin kann eine schwache Bande bei 428 cm^{-1} einer NC:S Deformationsschwingung zugeordnet werden. Einige der beschriebenen Struktureinheiten im Produkt können eine Kopplung an SERS-aktive Metalle ermöglichen wie in Abschnitt 4.2.2 gezeigt wird.

Die spektroskopischen Daten aus den Raman- und NMR-Spektren weisen damit auf eine erfolgreiche Synthese der Calixarene hin.

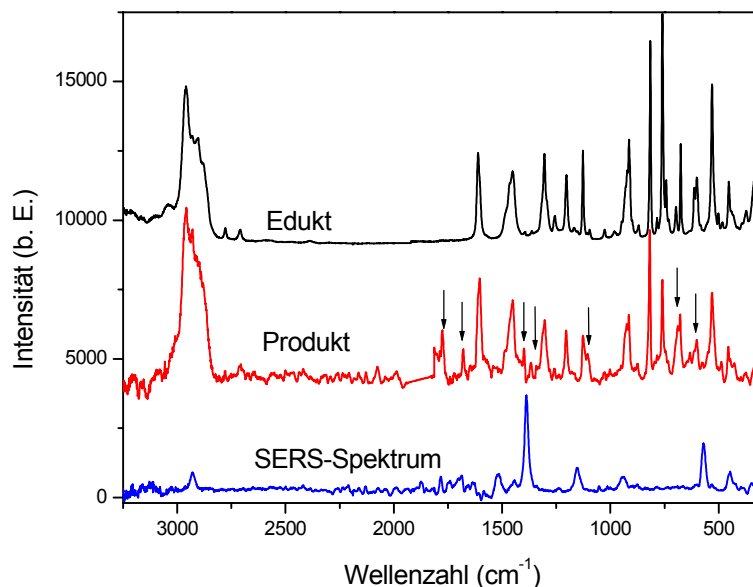


Abbildung 4.4 Raman-Spektren der Calixarenderivate am Beispiel des Calix[8]arens - im Produkt zusätzlich auftretende Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet - sowie das SERS-Spektrum nach Immobilisierung auf einem Silbersubstrat.

4.2 Charakterisierung beschichteter Substrate

4.2.1 Cyclodextrine

Die auf den SERS-Substraten immobilisierten Cyclodextrine zeigten nur wenige charakteristische Banden. Die Bande der S-H Streckschwingung bei 2575 cm^{-1} trat in den SERS-Spektren nicht mehr auf. Es ist davon auszugehen, daß der überwiegende Teil der Thiolgruppen eine kovalente Bindung zum Metall ausgebildet hatte, was zu einer erhöhten Stabilität der Beschichtung führte. Es wurden nur zwei beschichtungscharakteristische Banden bei 503 und 724 cm^{-1} detektiert. Die nicht ohne weiteres zuzuordnende intensive Bande bei 503 cm^{-1} trat bei allen immobilisierten Cyclodextrinen auf. Die Bande bei 724 cm^{-1} konnte einer C-S Streckschwingung für aliphatische Thiole in trans-Konformation⁸² zugeordnet werden. Aufgrund der wenigen charakteristischen SERS-Banden stören Cyclodextrin-Beschichtungen die Messung der Analytbanden nur in Ausnahmefällen. Andererseits sind die Cyclodextrinbanden vorteilhaft als interner Standard zur Normierung der Analytbanden zu verwenden. Durch die Normierung können die Einflüsse der variierenden Verstärkungen auf die Intensitäten der Spektren reduziert werden.

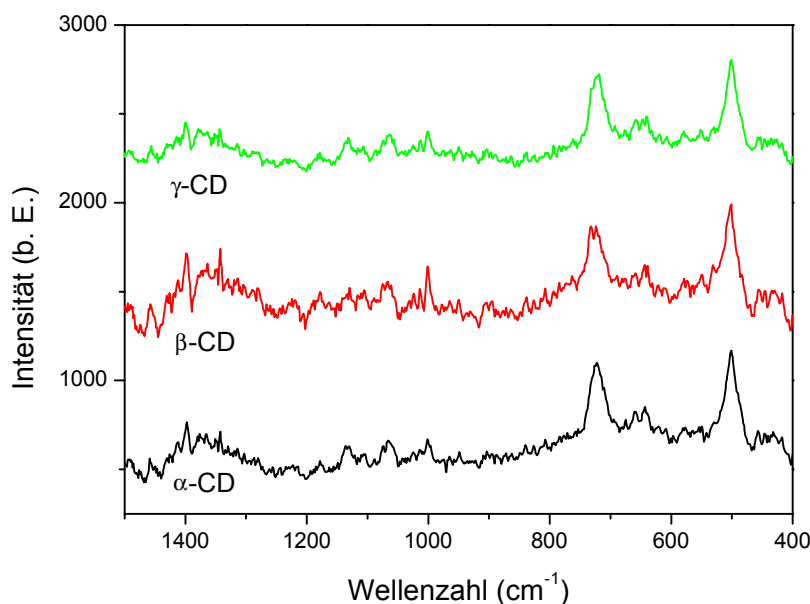


Abbildung 4.5 SERS-Spektren von α -, β - und γ -TCD auf Silber-Substraten.

Abbildung 4.5 zeigt die SERS-Spektren der drei verwendeten Cyclodextrine. Die Spektren sind weitgehend identisch. Die beiden stärksten Banden treten bei allen drei Beschichtungen im gleichen Intensitätsverhältnis auf. Auch die weiteren schwachen Cyclodextrinbanden finden sich in allen Spektren in einem ähnlichen Intensitätsverhältnis wieder. Der größte

Unterschied liegt im Signal/Rausch-Verhältnis der Spektren, das von der Verstärkung des jeweiligen SERS-Substrates abhängig ist.

4.2.2 Calixarene

Zur Vereinfachung werden die *p*-tert-Butyl-(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy)-calix[n]arene im Zusammenhang mit der Beschichtung von SERS-Substraten nur noch als Calix[n]aren bezeichnet. Die SERS-Spektren der Calixarene zeigen wenige scharfe Banden. Die Lage der Banden und deren Intensitätsverhältnisse ähneln denen des SERS-Spektrums von *N,N*-Dimethylthiocarbamoylchlorid. Die Spektren zeigen die Banden einer symmetrischen aliphatischen CH-Schwingung (2930 cm^{-1}), einer CN-Streckschwingung (1520 cm^{-1}), der NC:S-Gruppe (1386 cm^{-1}), einer CS-Streckschwingung (938 cm^{-1}), zweier NCS-Deformationsschwingungen (565 und 445 cm^{-1}) sowie einer CS-Deformationsschwingungen (um 350 cm^{-1}). Zusätzlich treten bei den Calixarenen Banden der aromatischen CH-Schwingung (3010 cm^{-1}), von Schwingungen des Calixarengerüsts (1868 und 1603 cm^{-1}) sowie eine Aromatenbande (1002 cm^{-1}) auf. Die Bande der CS-Schwingung war beim Calixaren (938 cm^{-1}) gegenüber dem *N,N*-Dimethylthiocarbamoylchlorid (932 cm^{-1}) um 6 cm^{-1} verschoben. Die Bande der antisymmetrischen aliphatischen CH-Schwingung im Spektrum des Eduktes bei 2965 cm^{-1} konnte in den Spektren der Calixarene nicht mehr registriert werden.

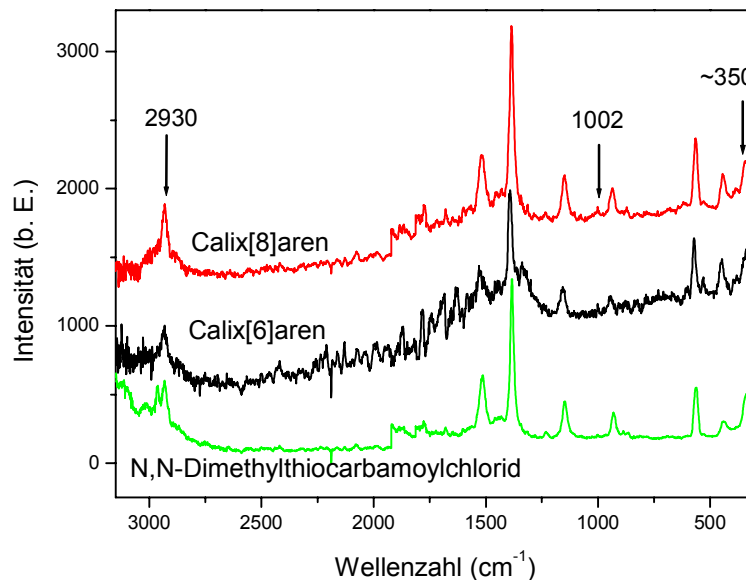


Abbildung 4.6 SERS-Spektren der modifizierten *p*-tert-Butyl-(dimethyl(thiocarbamoyl)oxy)-calixarene, sowie von *N,N*-Dimethylthiocarbamoylchlorid.

Aus den Spektren zeigt sich, daß die Calixarene eine zu N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid vergleichbare Bindung an die Metalloberfläche eingehen. Das Auftreten von CS-Streck- bzw. -deformationsschwingung deutet auf eine mögliche Anbindung der Verbindungen über den Schwefel an das Metall hin. Aus den vorliegenden Daten läßt sich jedoch nicht sicher sagen, ob hierbei Bindungen aufgebrochen werden. Da die Beschichtungen allerdings weniger stabil waren als Beschichtungen mit Thiolen, wie z.B. *p-tert*-Butylcalix[4]arentetrathiol⁵⁶, muß davon ausgegangen werden, daß die Bindung über das Schwefelatom der Thiocarbamoyl-Gruppe eher koordinativ als kovalent ist.

4.3 Nachweis von gasförmigen Duftstoffen mit Hilfe der SERS-Spektroskopie an unbeschichteten SERS-Substraten

Aufgrund des hohen Nachweisvermögens der SERS-Spektroskopie war es nicht überraschend, daß Messungen an vermeintlich sauberen SERS-Substraten nach einer gewissen Lagerungsdauer mitunter Spektren mit Banden sorbierter organischer Substanzen lieferten. Um reproduzierbare Messungen der zu untersuchenden Analyte an beschichteten SERS-Substraten zu gewährleisten, war es von Interesse, die Herkunft dieser Verunreinigungen zu untersuchen. Es zeigte sich schnell, daß diese Kontaminationen besonders nach Reinigung des Laborbodens oder während der Anwesenheit parfümierter Kollegen im Labor auftraten. Damit lag die Vermutung nahe, daß Duftstoffe aus Reinigungsmitteln, Parfums oder Rasierwässern die Quelle der Kontaminationen bildeten. Diese Duftstoffe sind zwar flüchtig, sorgen aber über funktionelle Gruppen zur Ankopplung an Oberflächen für lang anhaltende Duftwirkungen.

Eine detaillierte Untersuchung des Nachweises von Duftstoffen ist nicht nur aus Sicht der Vermeidung von Kontaminationen der Substrate interessant. Möglicherweise kann die SERS-Spektroskopie zur einer raschen Identifikation von Duftstoffen in geringen Konzentrationen dienen. Dieses würde die Authentifizierung teurer Markenprodukte oder auch die Identifikation unzulässiger oder gar gesundheitsschädlicher Begleitkomponenten erlauben. Die Banden von Duftstoffen traten nicht nur auf den als sauber betrachteten oder mit Wirtsmolekülen beschichteten Substraten auf. Selbst Substrate mit dichten Thiophenol-Beschichtungen zeigten gelegentlich die zusätzlichen Banden wie in Abbildung 4.7 dargestellt.

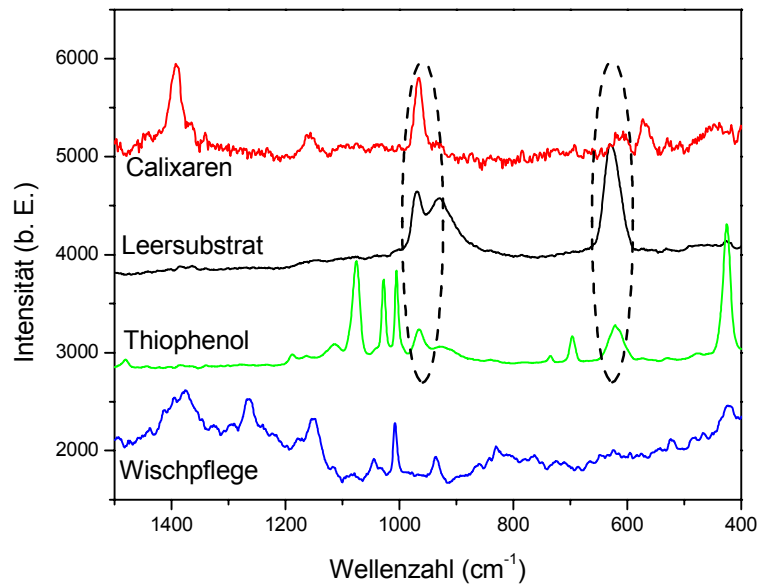


Abbildung 4.7 *SERS-Spektren eines Reinigungsmittels (Wischpflege) und von durch Duftstoffe unbrauchbar gemachten Substraten mit verschiedenen Beschichtungen. Die von unbekanntem Duftstoffen herrührenden Banden sind markiert.*

Zur systematischeren Überprüfung des Nachweises von Inhaltsstoffen von Parfums oder Rasierwässern wurden 50 verschiedene Produkte mit Raman-Spektroskopie und SERS-Spektroskopie an unbeschichteten Silbersubstraten untersucht.

In den Raman-Spektren der flüssigen Proben traten die Banden des als Lösungsmittel verwendeten Ethanols deutlich hervor. Durch skalierte Subtraktion ließen sich Differenzspektren gewinnen (s. Anhang), die häufig eine Vielzahl von Schwingungsbanden der Duftstoffe aufwiesen, wie es in Abbildung 4.8 exemplarisch dargestellt wird.

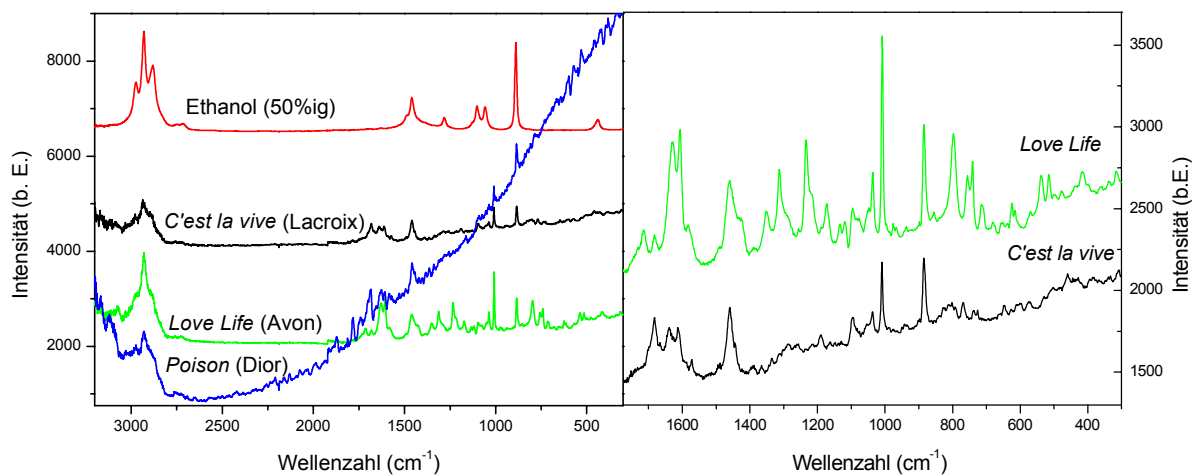


Abbildung 4.8 *Raman-Spektren von ausgewählten Parfums (Differenzspektren gegen wässriges Ethanol) sowie der Ausschnitt des Fingerprint-Bereichs zweier Proben.*

Einige Proben zeigten in den Raman-Spektren, bedingt durch Fluoreszenz, einen hohen Untergrund, der die Raman-Banden überlagerte. Bei allen Verbindungen konnten jedoch Aromatenbanden zwischen 1000 und 1009 cm^{-1} registriert werden, die auch in den SERS-Spektren der gasförmigen Duftstoffe auftraten. Die Banden zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} liegen im Bereich der Amid I-, C:C-, C:O- oder C:N-Schwingungen. Es zeigen sich weiterhin Banden in den für Ringschwingungen (um 1250 und 800-750 cm^{-1}) typischen Bereichen, sowie in den Bereichen der aliphatischen C-C-Schwingungen (1200 bis 1150 cm^{-1}). Auf eine detailliertere Zuordnung der Banden wird an dieser Stelle verzichtet, da die Zusammensetzungen der Produkte in der Regel als Betriebsgeheimnisse behandelt werden und damit nicht zugänglich sind.

Zur Adsorption der Duftstoffe wurden frisch präparierte Silber-Substrate (AgFON's, s. Abschn. 3.2) über Nacht in 250 mL Kolben mit 10 μL des entsprechenden Parfums gelagert. Bei vollständiger Verdunstung ergab sich hieraus eine Gasphasenkonzentration an Lösungsmittel von etwa 40 mg/L. Die Spektren der verschiedenen Proben wiesen erhebliche Unterschiede in Zahl und Intensität der Banden auf. Die untersuchten Substanzen sind in Tabelle 4.6 aufgeführt, wobei die Einteilung anhand der Intensitäten der jeweils stärksten Banden (um 1600 cm^{-1}) vorgenommen wurde. Eine hohe Intensität kann u.a. durch eine hohe Bedeckung der Oberfläche erklärt werden. Diese Proben enthalten dann Komponenten mit funktionellen Gruppen, wie z.B. Amine, Carbonsäuren, stickstoff- oder schwefelhaltige Heterocyclen etc, die eine gute Haftung an der Oberfläche ermöglichen.

Intensität der SERS-Banden um 1600 cm ⁻¹	Substanz (Hersteller)
Stark	<i>Angel</i> (Thierry Muggler), <i>Aria</i> (Aria Missoni), <i>Chanel No. 5</i> (Chanel), <i>CK One</i> (Calvin Klein), <i>CP Night</i> (CP), <i>Salvatore Dali</i> (Salvatore Dali), <i>Eau Svelte</i> (Christian Dior)
Mittel	<i>1 for 2</i> (Moara Shira), <i>Calandre</i> (Paco Rabanne), <i>Casran</i> (Chopard), <i>Cherruti 1881</i> (Cherruti), <i>Dali</i> (Salvatore Dali), <i>Jean Paul Gautier</i> (Gautier), <i>Gloria Vanderbilt</i> (Gloria Vanderbilt), <i>Homme</i> (Joop), <i>Irish Moos</i> (Sir), <i>Joop</i> (Joop), <i>Laura</i> (Laura Biagotti), <i>Lou Lou</i> (Cacharel), <i>Love Life</i> (Avon), <i>Marakech</i> (Mäurer & Wirtz), <i>Marine</i> (Axe), <i>Marbet Woman</i> (Marbet), <i>New Day</i> (Ypno), <i>Open</i> (Roger & Gallet), <i>Pamir</i> (Blue Up), <i>Roma</i> (Laura Biagotti), <i>Sotto Voce</i> (Laura Biagotti), <i>Tresor</i> (Lancome), <i>Voice</i> (?)
Schwach	<i>Casimir</i> (Chopard), <i>C'est la vive</i> (Christian Lacroix), <i>Emporio</i> (Armani), <i>Gabriela Sabatini</i> (Gabriela Sabatini), <i>Giorgio</i> (Beverly Hills), <i>L'eau D'Issey</i> (Issey Miyake), <i>Trés Jourdan</i> (Charles Jourdan), <i>Nature</i> (Yves Rocher), <i>Noa Noa</i> (Otto Kern), <i>Nuits Indienne</i> (Jean Louis Scherrer), <i>Organza</i> (Givenchy), <i>Paris</i> (Yves Saint Lorant), <i>Poison</i> (Christian Dior), <i>Woman III</i> (Jil Sander), <i>Scarlett</i> (?), <i>Sun Moon Stars</i> (Karl Lagerfeld), <i>Sun</i> (Jil Sander), <i>Sunwater</i> (Lancaster), <i>Tabac</i> (Mäurer & Wirtz), <i>Wish</i> (Chopard)

Tabelle 4.6 Eine Übersicht über die untersuchten Proben aufgeteilt nach der Intensität der stärksten SERS-Bande.

Bei allen untersuchten Verbindungen konnten Banden um 1585, 1364, 1165 und 865 cm⁻¹, sowie Aromatenbanden zwischen 1000 und 1009 cm⁻¹ registriert werden. Jedoch waren die Intensitätsverhältnisse dieser Banden sehr unterschiedlich. Zu den in allen SERS-Spektren auftretenden Banden trat noch eine Vielzahl probenspezifischer Banden hinzu, wie in Abbildung 4.9 an einigen Beispielen dargestellt ist.

Die Parfum-Proben sind anhand ihrer SERS-Spektren gut voneinander unterscheidbar. Die in allen Spektren auftretenden Banden lassen auf gewisse gemeinsame Komponenten schließen, die noch durch eine Reihe produktspezifischer Zutaten ergänzt werden.

Zur Auswertung bezüglich der Inhaltsstoffe wären zwei Strategien denkbar. Zum einen der Vergleich mit den SERS-Spektren bekannter Zutaten, zum anderen eine Faktorenanalyse

Jedoch ist die Zahl der Inhaltsstoffe wahrscheinlich zu groß, so daß der Aufwand zu hoch würde.

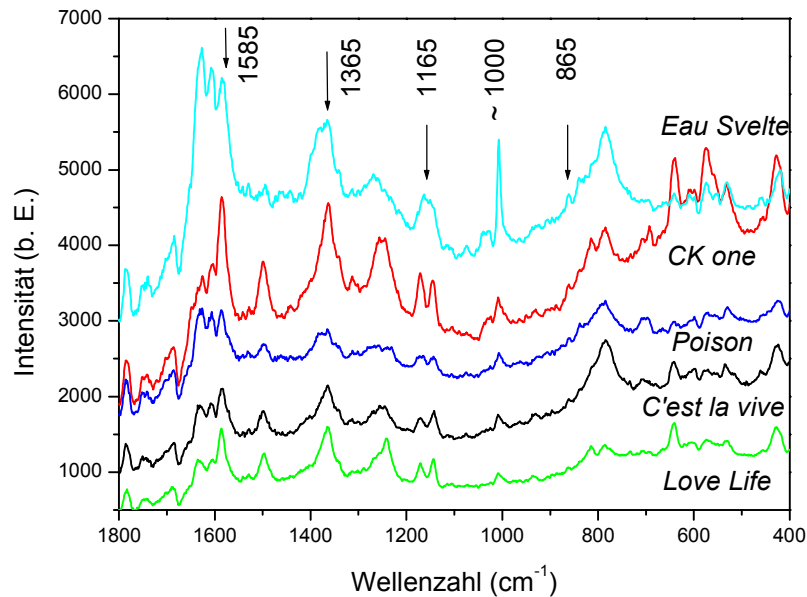


Abbildung 4.9 SERS-Spektren einiger ausgewählter Parfums nach 24 Stunden Exposition der Substrate.

Die Spektren wurden nach 24-stündiger Exposition der Substrate gemessen. Nach dieser Zeit kann - basierend auf den Erfahrungen bei der Beschichtung von SERS-Substraten mit Thiolen - von einer vollständigen Belegung der Metalloberfläche ausgegangen werden. Die Adsorptionsschichten waren derart stabil, daß sie nicht durch Spülen mit verschiedenen Lösungsmitteln entfernt werden konnten.

Bei den normalen experimentellen Arbeiten im Labor werden die SERS-Substrate natürlich erheblich geringeren Konzentrationen der Duftstoffe ausgesetzt. Zur Abschätzung der bei den üblichen Expositionszeiten im Labor bzw. Exsikkator zulässigen Duftstoffkonzentrationen wurde versucht, die Adsorptionsrate durch die Messung des Zeitverlaufs zu bestimmen. Dem beschriebenen Aufbau zur Adsorption aus der Gasphase entsprechend (Abschn. 3.5, Abb. 3.12) wurden verschiedene Konzentrationen von ausgewählten Parfums (Lösungsmittel + Duftstoffe) vorgegeben. In Abbildung 4.10 ist am Beispiel des Parfums *Marakech* (Mäurer & Wirtz) dargestellt, wie sich schon bei einer Konzentration von 5 mg/L im Gasraum des Kolbens die Aromatenbande bei 1008 cm^{-1} innerhalb weniger Minuten detektieren läßt. Die Bandenhöhe für Konzentration von 5 bzw. 20 mg/L zeigt, daß innerhalb von fünf bzw. einer Minute die Hälfte der Oberfläche belegt ist. Der Endzustand der Oberflächenbelegung ist für eine Konzentration von 20 mg/L nach knapp drei Minuten, und von 5 mg/L nach ca. 20 Minuten erreicht. Die Bandenhöhen für diesen Zustand liegen für beide dargestellten Konzentrationen im gleichen Bereich.

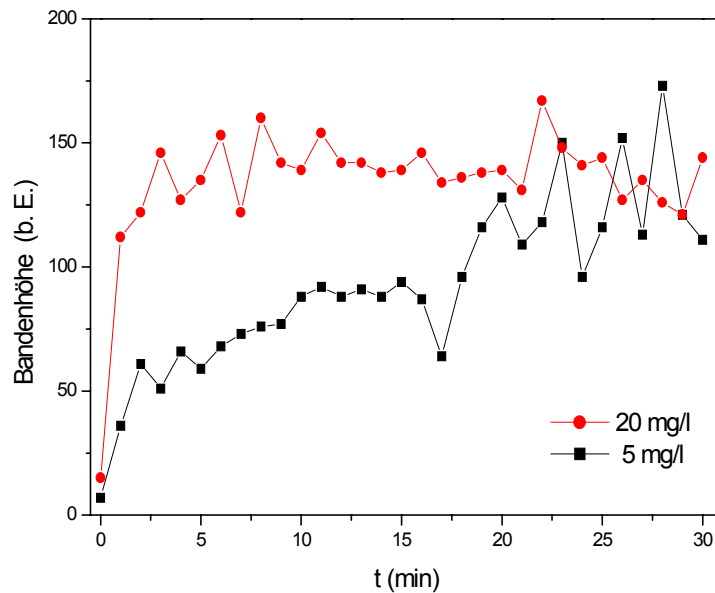


Abbildung 4.10 Höhe der 1008 cm^{-1} Aromatenbande des Parfums Marakech (Mäurer & Wirtz) auf einem Silber-Substrat. Konzentrationen an Parfum im Gasraum des Expositions Kolbens 5 bzw. 20 mg/L.

Schätzungen auf der Basis dieser Messungen führen zu dem Ergebnis, daß eine Gasphasenkonzentration von $20\text{ }\mu\text{g/L}$ in der Laborluft ausreicht, eine Substratoberfläche innerhalb eines Arbeitstages zu belegen. Bei einer einmonatigen Lagerung in einem Exsikkator würde schon eine Konzentration von nur 500 ng/L ausreichen, um die Substrate unbrauchbar zu machen. Setzt man das Volumen des Labors mit 100 m^3 und das des Exsikkators mit 5 l an, so ergeben sich Absolutmengen von 2 g für das gesamte Labor bzw. $2,5\text{ }\mu\text{g}$ für den Exsikkator. Da die Hauptbestandteile jedes Parfums Lösungsmittel sind (z.B. Ethanol, Isopropanol), liegen die Konzentrationen der Duftstoffe selbst um Größenordnungen unter den angegebenen Werten.

Die SERS-Messungen an Parfums zeigen, daß eine sichere Unterscheidung von Markenprodukten und Plagiaten allein anhand der Gasphasenzusammensetzung in kurzer Zeit möglich sein sollte. Abbildung 4.11 zeigt dies am Beispiel von *Casmir* (Chopard) und dessen kostengünstigem Plagiat *Pamir* (Blue Up). Diese Produkte ähneln sich in Verpackung, Farbe und Geruch, jedoch kostet das Original ca. das Fünffache. Beide Produkte zeigen eine Aromatenbande bei 1007 cm^{-1} , jedoch weist das Markenprodukt deutlich stärkere Banden in den Bereichen um 1600 , 1400 und 1150 cm^{-1} auf.

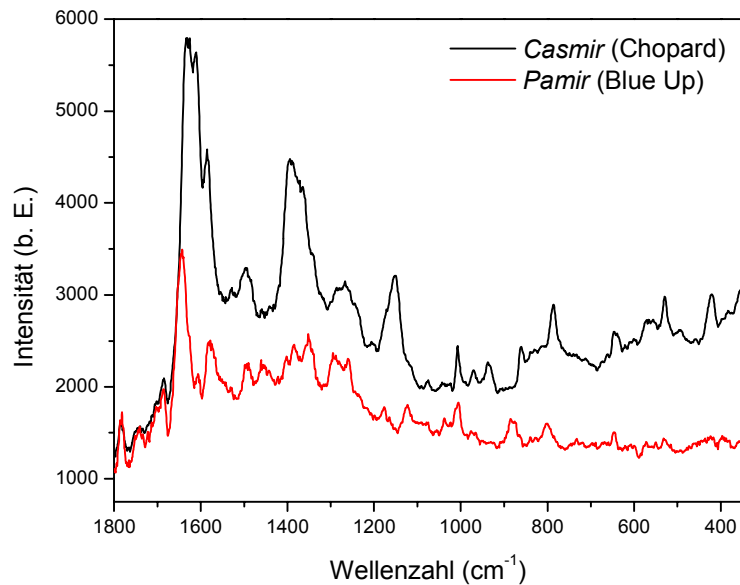


Abbildung 4.11 *SERS-Spektren eines teuren Markenduftes (Casmir von Chopard) und seines deutlich günstigeren Plagiats (Pamir von Blue Up).*

Die durchgeführten Experimente zeigen, daß durch Duftstoffe wie sie Parfums, Deodorants, Rasierwässern und Reinigungsmitteln enthalten sind, nicht zu unterschätzende Störungen von SERS-Messungen entstehen können. Da die Adsorption an beschichteten und an unbeschichteten Substraten irreversibel verläuft, ist eine entsprechende Sorgfalt und Planung bei den SERS-Experimenten und der Reinigung der Labors zwingend notwendig. So können die Metalloberflächen frisch hergestellter SERS-Substrate schon bei der Entnahme aus der Aufdampfanlage durch übermäßigen Duftstoff-Einsatz vergiftet und dadurch unbrauchbar gemacht werden. Substrate sollten daher über längere Zeit möglichst unter einer Schutzgasatmosphäre in einem Exsikkator gelagert werden.

4.4 Nachweis halogener Kohlenwasserstoffe in der Gasphase mit SERS-Substraten mit Cyclodextrin-Beschichtungen

Eine entscheidende Voraussetzung zur Anwendung der SERS-Spektroskopie für chemo-optische Sensoren liegt in der notwendigen Sorption an die SERS-aktive Metalloberfläche. Die reinen Metallschichten weisen nur sehr unselektive Sorptionseigenschaften auf und sind chemisch reaktiv. Dieses Problem kann durch die chemische Modifizierung der Metalle umgangen werden⁸³. Daher müssen für die Analyte selektive Sorptionszentren auf den Metalloberflächen geschaffen werden. Eine Möglichkeit hierfür bieten die in Kapitel 2 und 3

schon erwähnten Käfigmoleküle, die mit den Analyten Wirts-Gast-Komplexe bilden können. Diese nah an der Oberfläche eingelagerten Verbindungen sollten sich dann SERS-spektroskopisch detektieren und identifizieren lassen^{55,56}.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine Reihe umweltrelevanter Verbindungsklassen ausgewählt. Hierzu zählen z.B. leichtflüchtige halogenierte Kohlenwasserstoffe. Sie finden großtechnisch als Lösungsmittel Einsatz und weisen ein gesundheitsschädliches Potential auf⁶⁴. Zur Messung der Adsorption der halogenierten Kohlenwasserstoffen Di-, Tri-, und Tetrachlormethan, Tri- und Tertachlorethylen, 1,1-Dichlorethan sowie Bromchlormethan wurden mit Cyclodextrin beschichtete Substrate verwendet. Gemäß des in Abschn. 3.5 beschriebenen experimentellen Aufbaus wurden die vorgelegten Analytvolumina so gewählt, daß sich nach vollständiger Verdampfung im Kolben eine Gasphasenkonzentration von etwa 100 mg/L ergab.

In den SERS-Spektren finden sich zusätzlich zu den Banden der immobilisierten Cyclodextrine die stärksten Schwingungsbanden der Analyte. Abbildung 4.12 zeigt diese zusätzlich auftretenden Banden für alle verwendeten Cyclodextrine exemplarisch am Beispiel von Dichlormethan. Außerdem sind die SERS-Spektren verschiedener anderer Verbindungen gezeigt, die an den Substraten sorbiert wurden. Die Lage der Banden der adsorbierten Verbindungen entspricht denen der Reinsubstanzen, so daß eine eindeutige Zuordnung möglich ist. Dieses wird noch dadurch erleichtert, daß die untersuchten Verbindungen mehr als nur eine starke Bande im Bereich zwischen 200 und 1500 cm^{-1} aufweisen.

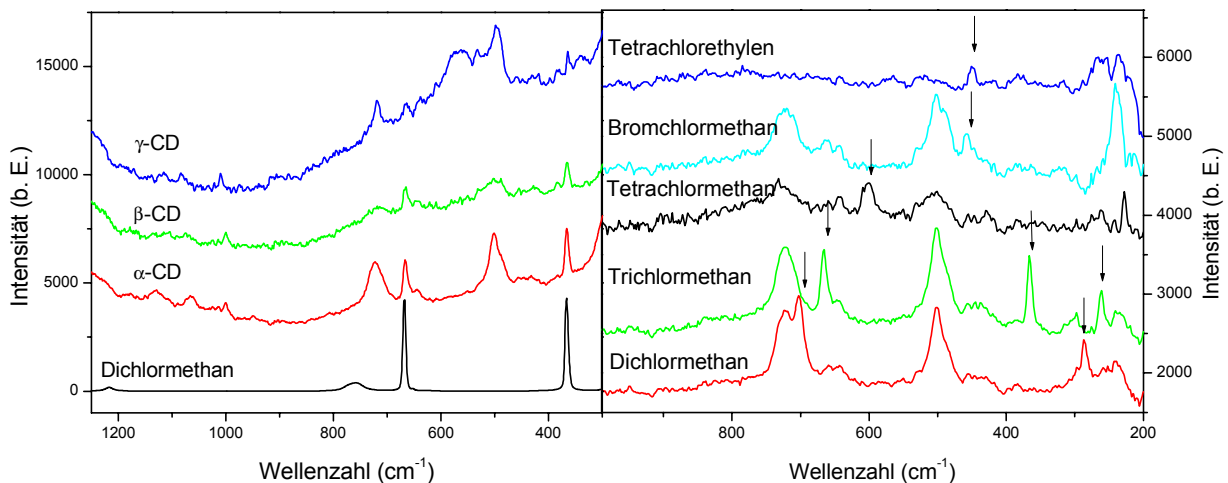


Abbildung 4.12 Zuordnung der Banden von adsorbiertem Dichlormethan anhand des Raman-Spektrums der Reinsubstanz (links), sowie typische SERS-Spektren von halogenierten Kohlenwasserstoffen an mit verschiedenen Cyclodextrinen(s. Tab. 4.7) beschichteten Substraten (rechts).

Der zeitliche Verlauf der Adsorption kann über das Verhältnis der Analytbanden zu den Banden der Beschichtung bestimmt werden. Ein solcher Zeitverlauf ist für Chloroform und die drei Cyclodextrine in Abbildung 4.13 dargestellt. Ausgewertet wurde das Verhältnis des Integral der Chloroformbande bei 665 cm^{-1} zum Integral der Cyclodextrinbande bei 503 cm^{-1} . Die Gestalt der Adsorption entspricht einer Langmuirschen Adsorptionsisotherme.

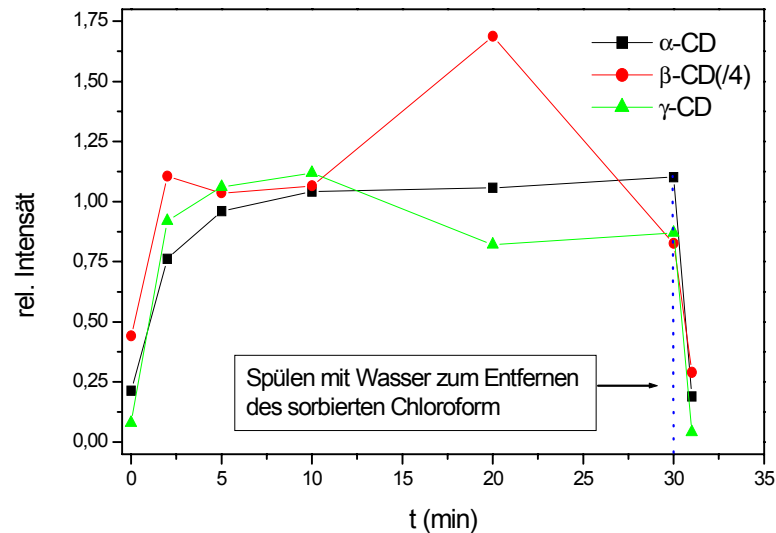


Abbildung 4.13 Zeitabhängigkeit der Chloroform-Bande bei 665 cm^{-1} während der Einlagerung des Analyten in die verschiedenen Cyclodextrine.

Der Gleichgewichtszustand der Adsorption ist nach wenigen Minuten erreicht. Zwischen den Substraten treten jedoch große Unterschiede in den Signalintensitäten auf, was insbesondere bei den Meßergebnissen für β -Cyclodextrin auffällt. Diese Unterschiede zeigen sich nicht nur bei Substraten mit unterschiedlichen Cyclodextrin-Beschichtungen sondern auch bei solchen mit derselben Cyclodextrin-Beschichtung. Sie werden im wesentlichen durch die Morphologie der Substrate bedingt, da deren Oberflächen durch die Aluminiumoxidpartikel rein stochastisch aufgeraut sind.

Derartige SERS-Substrate mit einer Rezeptorschicht aus Cyclodextrinen ermöglichen lediglich den qualitativen Nachweis von flüchtigen halogenierten Kohlenwasserstoffen. Sie arbeiten nicht reversibel und die Desorption der Analyte verlangte recht drastische Bedingungen, da die Wirts-Gast-Komplexe infolge vielfacher van-der-Waals-Wechselwirkungen sehr stabil sind⁸⁵. Durch intensives Spülen mit Wasser und anschließende Trocknung konnten die Analyte eliminiert und die Substrate für weitere Messungen verwendet werden. Für quantitative Bestimmungen bergen diese Sensoren zu viele Unsicherheiten, eine Verwendung als Dosimeter für Langzeitexpositionen ist jedoch denkbar. Eine Übersicht über die Adsorption verschiedener halogenerter Kohlenwasserstoffe ist in Tabelle 4.7 gegeben.

	Dichlormethan	Trichlormethan	Tertachlormethan	Bromchlormethan	1,2-Dichlorethan	Trichlorethylen	Tetrachlorethylen
α -CD	o	+	+	-	-	-	-
β -CD	+	+	+	-	-	-	-
γ -CD	+	+	+	-	-	-	o

Tabelle 4.7 Übersicht zur Adsorption verschiedener halogener Kohlenwasserstoffe an mit Cyclodextrin beschichteten Substraten aus der Gasphase (+ = nachgewiesen, - = nicht adsorbiert, o = schwache Signale).

4.5 Adsorption aromatischer Verbindungen an unterschiedlich beschichteten SERS-Substraten

Aromatische Verbindungen werden heutzutage vielfältig eingesetzt, wobei sich je nach Substituenten verschiedenste Verwendungsmöglichkeiten ergeben. Die BTXE-Aromaten (Benzol, Toluol, Xylole, Ethylbenzol) finden großtechnisch als Lösungsmittel Anwendung. Verbindungen wie Anisole, Anilin oder aromatische Aldehyde sind wichtige Ausgangsverbindungen der chemischen Industrie. Nitrierte Aromaten werden z.T. als Sprengstoffe und Triazine als Pestizide genutzt. Der größte Teil der hier gemessenen Verbindungen weist ein nicht unerhebliches umwelt- und gesundheitsschädigendes Potential auf, so daß neue Analysenmethoden stets von Interesse sind.

Mit Calixarenen und Cyclodextrinen standen zwei verschiedene Typen von Beschichtungsmolekülen zur Verfügung, deren Sorptionseigenschaften bezüglich aromatischer Verbindungen aus der Gas- und der wäßrigen Phase untersucht wurden. Für den Nachweis der verschiedenen Komponenten eines BTXE-Gemisches in Böden wurden Bodenproben mit verschiedenen Mengen dieses Gemisches versetzt und Headspace-Messungen in der Gasphase über den Böden durchgeführt.

4.5.1 Adsorption aus der Gasphase

Die Messungen von Aromaten aus der Gasphase wurden hauptsächlich mit Cyclodextrin-beschichteten Substraten durchgeführt. Von festen Verbindungen wurden jeweils 10 mg in den Kolben eingewogen, von flüssigen ein solches Volumen gewählt, welches bei vollständiger Verdampfung eine Gasphasenkonzentration von 100 mg/L geliefert hätte. Dieser Zustand wurde jedoch nicht abgewartet, da lediglich Messungen qualitativer Art beabsichtigt waren. Untersucht wurden substituierte einkernige Aromaten mit maximal drei Substituenten, sowie die beiden mehrkernigen Aromaten Naphthalin und Anthracen.

SERS-Substrate, die mit α -Cyclodextrin beschichtet waren, ermöglichten den Nachweis von mono- und disubstituierten Aromaten mit kleinen Resten. Hierzu zählen Anilin, die verschiedenen Kresole, Toluol, *o*-Xylol und Naphthalin. Verbindungen mit sperrigen Nitrogruppen als Substituent ließen sich nicht mit α -CD-Beschichtungen nachweisen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4.14 anhand von Beispielen dargestellt.

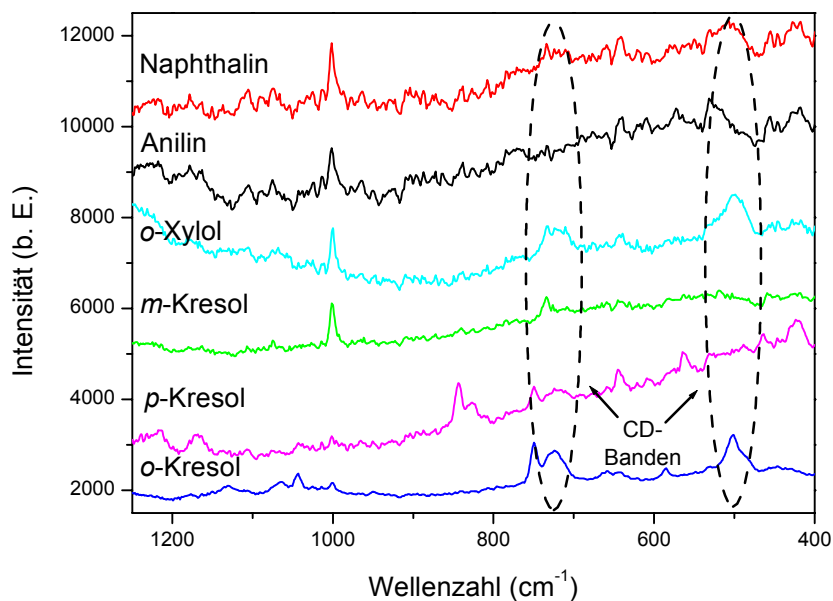


Abbildung 4.14 SERS-Spektren verschiedener aromatische Substanzen auf einem α -CD-Substrat nach zweistündiger Exposition. Die Bereiche der CD-Banden sind zusätzlich gekennzeichnet.

Die β -CD-Beschichtung ermöglichte zudem die Adsorption von höher substituierten Aromaten. Hier konnten im Vergleich zu α -CD-Käfigen zusätzlich auch nitrierte Verbindungen und Anthracen nachgewiesen werden. In Abbildung 4.15 sind einige typische mittels β -CD-Substraten erhaltene Spektren dargestellt.

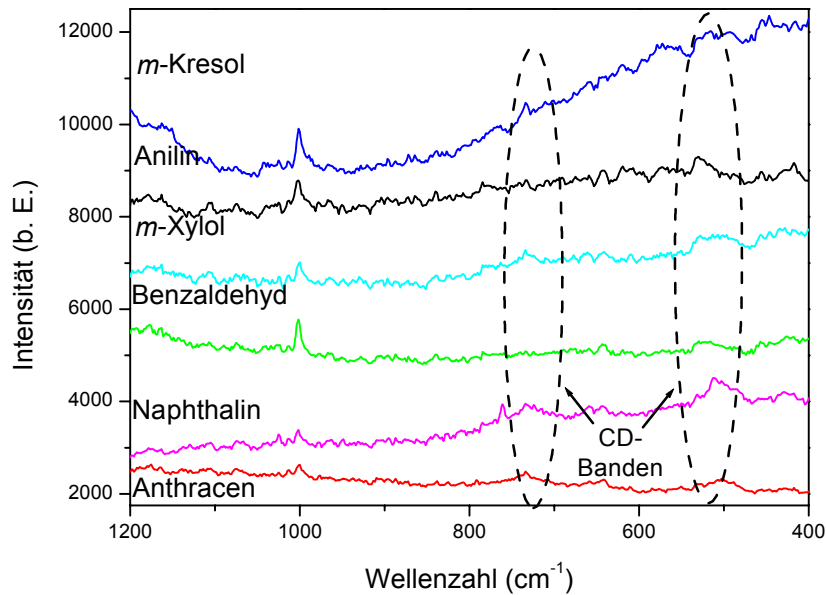


Abbildung 4.15 SERS-Spektren verschiedener aromatische Substanzen auf einem β -CD-Substrat nach zweistündiger Exposition (bei Anthracen 1 Tag). Die Bereiche der CD-Banden sind zusätzlich gekennzeichnet.

Mit γ -CD beschichtete Substrate ermöglichten den qualitativen Nachweis des größten Teils der untersuchten Verbindungen. Nicht nachgewiesen konnten 2,4- und 2,6-Dinitrotoluol, was auf den niedrigen Dampfdruck der Verbindungen zurückgeführt wird. In Abbildung 4.16 sind einige typische Spektren, die mit γ -CD-beschichteten Substraten erhalten wurden, dargestellt.

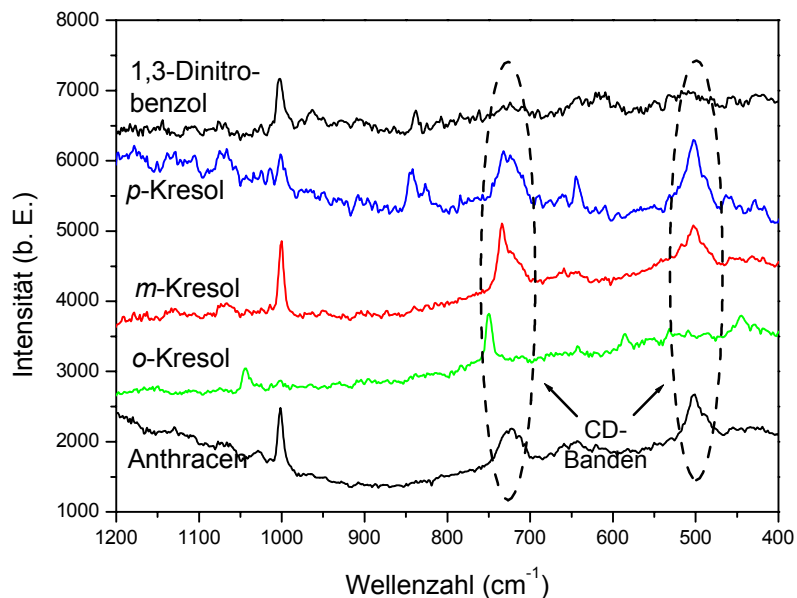


Abbildung 4.16 SERS-Spektren der Adsorption von aromatischen Substanzen nach Sorption an γ -CD-Substraten nach zweistündiger Exposition (für Anthracen nach zweitägiger Exposition). Die Bereiche der CD-Banden sind zusätzlich gekennzeichnet.

Die Identifizierung der adsorbierten Verbindungen kann auch in diesem Fall durch Vergleich mit den Raman-Spektren der Reinsubstanzen durchgeführt werden. Da alle untersuchten Verbindungen ähnliche Aromatenbanden im Bereich zwischen 995 und 1020 cm^{-1} aufweisen, müssen u. U. weitere Schwingungsbanden für die Identifizierung herangezogen werden. Hierzu kommen Ringdehnungsschwingungen unterhalb von 800 oder Gerüstschwingungen oberhalb von 1200 cm^{-1} in Betracht.

Eine Übersicht über den qualitativen Nachweis unterschiedlich substituierter aromatischer Verbindungen nach Adsorption an mit Cyclodextrin beschichteten SERS-Substraten ist in Tabelle 4.8 gegeben.

	Toluol	Benzaldehyd	o-Xylol	m-Xylol	p-Xylol	o-Kresol	m-Kresol	p-Kresol	1,3-Dinitrotoluol	1,4-Dinitrotoluol	2,4-Dinitrotoluol	2,6-Dinitrotoluol	Naphthalin	Anthracen
α -CD	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
β -CD	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
γ -CD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+

Tabelle 4.8 Übersicht zum Nachweis verschiedener substituierter Aromaten nach Sorption an mit Cyclodextrin beschichteten Substraten aus der Gasphase (+ nachgewiesen, - nicht nachgewiesen).

Ebenso wie die leichtflüchtigen halogenierten Kohlenwasserstoffe ließen sich auch die adsorbierten Aromaten durch Spülen mit Wasser wieder aus den Cyclodextrinen auswaschen. Die gespülten Substrate konnten nach anschließender Trocknung für weitere Messungen wiederverwendet werden. Da Wasser offensichtlich die Einschlußverbindungen zerstört, konnten Substrate mit Cyclodextrin-Beschichtungen nicht zur Untersuchung der Adsorption aus der wäßrigen Phase verwendet werden.

Die Adsorption mehrerer Komponenten aus Gemischen wurde für die BTXE-Aromaten untersucht. Das eingesetzte flüssige Gemisch setzte sich zu gleichen Volumenanteilen aus Benzol, Toluol, o-, m-, p-Xylol und Ethylbenzol zusammen. Gemessen wurde die Adsorption zum einen der verdunsteten Substanzen, zum anderen aus der Gasphase über zuvor mit dem BTXE-Gemisch präparierten Bodenproben. Als Boden wurde ein sandiger Lehmboden (Speyerer Boden, Typ 2.2, sandy loam, Charge SP 20100) mit dem BTXE-Gemisch versetzt,

so daß Konzentrationen von 10000, 5000, 2000 und 1000 ppm (als Gemisch) resultieren. Die Proben wurden homogenisiert und im Koben luftdicht verschlossen. Nach einer Wartezeit von zwei Stunden für die Einstellung der Gleichgewichtskonzentration in der Gasphase über den Bodenproben, wurden SERS-Substrate mit den verschiedenen Cyclodextrin- und Calixaren-Beschichtungen oberhalb der Böden im Laserfokus fixiert und vermessen. Die typischen erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4.18 am Beispiel zweier Substrate mit β -Cyclodextrin- und Calix[6]aren-Beschichtungen dargestellt.

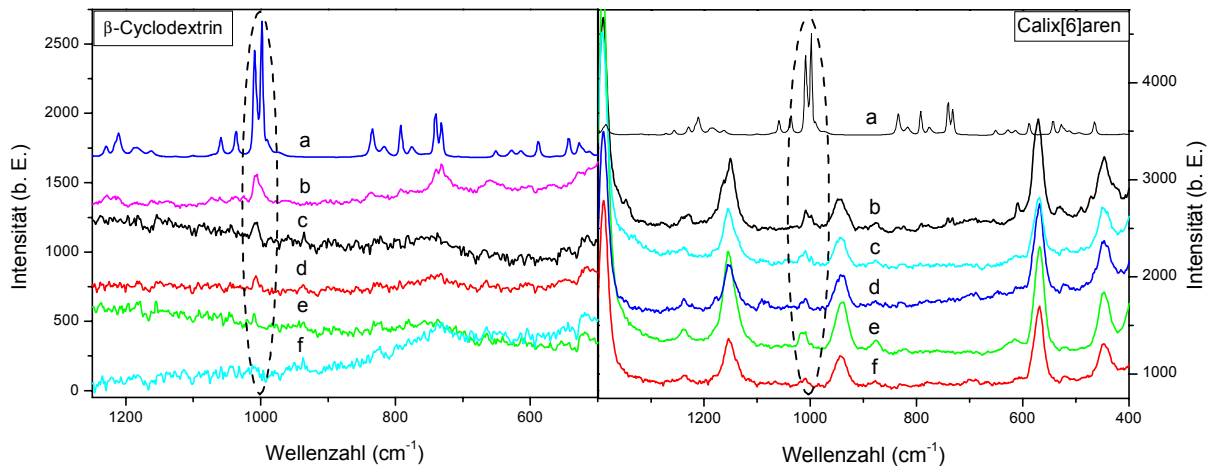


Abbildung 4.18 *Adsorption eines Gemisches von BTXE-Aromaten aus der Gasphase und aus mit unterschiedlichen Konzentrationen kontaminierten Böden an mit β -CD (links) und Calix[6]aren (rechts) beschichtete Substrate. [a = Raman-Spektrum des Gemisches, b = SERS-Spektren nach Exposition über BTXE-Gemisch, c-f = SERS-Spektren nach Exposition über Boden verschiedenen BTXE-Gehaltes (10000, 5000, 2000, 1000 ppm)].*

Die intensivsten Signale im Raman-Spektrum des BTXE-Gemisches sind die Aromatenbanden bei 998 und 1009 cm^{-1} . Bei der Adsorption an die verschiedenen Substrate treten diese Banden zusätzlich zu den Banden der Beschichtungsmoleküle in den SERS-Spektren auf. Die Messungen an mit Cyclodextrin beschichteten Substraten zeigen die stärksten Analytbanden für die Adsorption des BTXE-Gemisches aus der Gasphase ohne Vorliegen von Bodenmaterial. Bei den Messungen der präparierten Bodenproben nimmt die Intensität der Analyt-Banden mit den Konzentrationen des BTXE-Gemisches in den kontaminierten Böden zu. Konzentrationen von 10000 und 5000 ppm liefern noch ausreichend starke Banden, während dies bei 2000 ppm kaum noch der Fall ist, und eine Konzentration von 1000 ppm nicht mehr nachgewiesen werden kann. Vergleichend zu den Cyclodextrinen wurden Calixarene zur Einlagerung und Detektion der Bestandteile des

Gemisches eingesetzt. Diese Beschichtungen ermöglichen einen deutlich besseren Nachweis der BTXE-Aromaten. So konnten selbst bei der Konzentration von 1000 ppm die Banden des Gemisches noch sicher detektiert werden, wie in Abbildung 4.19 an einem Detailausschnitt der Spektren dargestellt ist.

Während eine Änderung des Partialdrucks an BTXE-Gemisch in der Gasphase über den Böden durch Spülen des Kolbens mit Stickstoff bei Substraten mit Calixaren-Beschichtungen zu rascher Verringerung der BTXE-Bandenintensitäten führte, reichte dies bei Substraten mit Cyclodextrin-Beschichtungen nicht aus, um die eingelagerten Moleküle aus den Käfigen zu entfernen.

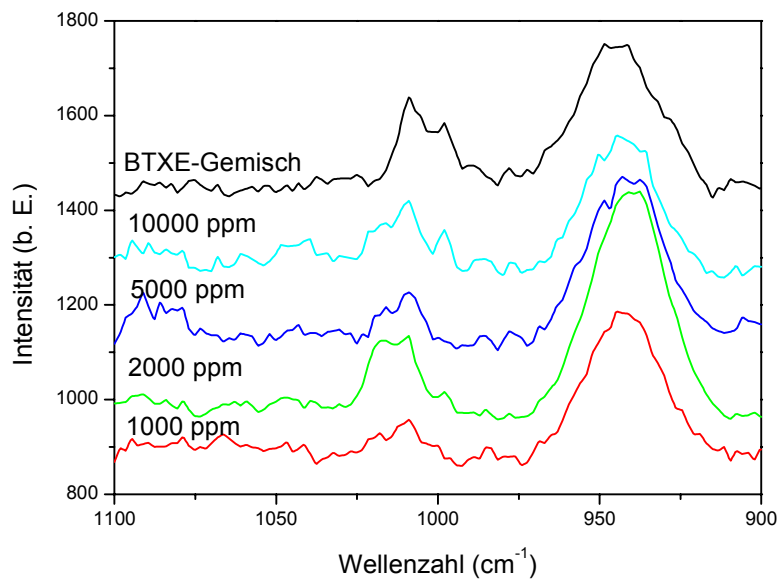


Abbildung 4.19 Adsorption eines Gemisches von BTXE-Aromaten aus der Gasphase und aus mit unterschiedlichen Konzentrationen angereicherten Böden mittels eines Calix[6]aren-Substrates (Detailausschnitt).

Die Spektren zeigen keinen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration der Aromaten im Boden und den relativen Banden-Intensitäten. Dies kann u.a. durch eine Sättigung der mit Calixarenen beschichteten Sensoroberfläche bei bereits bei kleinen Konzentrationen verursacht sein. Weiterhin spielt hierbei der Boden, insbesondere Komponenten wie z.B. Huminstoffe, eine entscheidende Rolle (s. auch weiter unten). Eine Zusammenfassung über die Adsorption eines BTXE-Gemisches aus der Gasphase und aus präparierten Bodenproben ist in Tabelle 4.9 gegeben.

	α -CD	β -CD	γ -CD	Calix[6]aren	Calix[8]aren
BTXE (ohne Boden)	+	+	+	+	+
10000 ppm	+	+	+	+	+
5000 ppm	+	+	+	+	+
2000 ppm	o	o	o	+	+
1000 ppm	-	-	-	+	+

Tabelle 4.9 Detektion von BTXE-Aromaten in Böden mit unterschiedlich beschichteten SERS-Substraten (+ = detektierbar, o = schwache Signale, - = nicht detektierbar).

SERS-Substrate mit Cyclodextrinen als Rezeptorschicht ermöglichen die Adsorption einer Reihe aromatischer Verbindungen. Hierbei besteht ein enger Zusammenhang zwischen den Größen von Analyt und Hohlraum des Cyclodextrins. Die niedrig substituierten Verbindungen mit kleinen Resten lassen sich in alle Cyclodextrine einlagern. Werden die Reste sperriger oder ändert sich das Substitutionsmuster, sind die kleineren Käfige zur Aufnahme der Moleküle nicht mehr geeignet. In diesen Fällen gelingt die Adsorption der entsprechenden Verbindungen nur noch an γ -Cyclodextrin. Die Identifizierung der Analyte kann wieder recht einfach anhand der Raman-Spektren der Reinsubstanzen vorgenommen werden. Wie bei den flüchtigen halogenierten Kohlenwasserstoffen sind die Wechselwirkungen zwischen Wirts- und Gastmolekül recht stark, so daß eine Desorption nur durch Spülen mit Wasser erzielt werden kann. Die so gereinigten Substrate sind nach Trocknung für mehrere Meßzyklen wiederverwendbar. Der zeitliche Verlauf der Adsorption ist hauptsächlich von der Konzentration der Analyte in der Gasphase abhängig. Bei Substraten mit entsprechend hoher Verstärkung und gutem Signal-Rausch-Verhältnis kann ein qualitativer Nachweis der Analyte, leichtflüchtige halogenierte Kohlenwasserstoffe oder aromatische Verbindungen, bis zu Analytkonzentrationen von etwa 5 bzw. 10 mg/L möglich werden. Eine Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde nicht vorgenommen, da sich bei den Messungen zeigte, daß die Morphologie der SERS-aktiven Oberfläche einen großen Einfluß auf die Güte der Spektren hat.

Die Adsorption aus einem Gemisch liefert die Banden mehrerer Analyte im Spektrum. Da diese Banden dicht nebeneinander auftreten, ist eine getrennte Auswertung nur mit entsprechendem Aufwand möglich. Die Adsorption aus der Gasphase über präparierten Bodenproben zeigt, daß die generell Intensitäten der Analytbanden mit der Konzentration der Aromaten im Boden zunehmen. Es ist jedoch davon auszugehen, daß bestimmte Anteile des BTXE-Gemisches fester an Bodenbestandteile, wie z.B. Huminstoffe, gebunden werden als

andere und demzufolge im Verlauf des Experiments nicht an die Gasphase abgegeben werden. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Cyclodextrinen als Sensorbeschichtung stellt die Feuchtigkeit der Böden dar, da diese vor der Präparation nicht durch Trocknung entfernt wurde und Wasserdampf bevorzugt an Cyclodextrine sorbiert wird. Messungen über nicht dotierten Böden führten zu keinen zusätzlichen Banden in den SERS-Spektren. Somit sind Störungen nicht zu erwarten, so daß sich trotz aller beschriebenen Probleme eine Bodenanalyse auf die beschriebene Weise als grundsätzlich möglich erweist. Die Verwendung von Calixarenen als Beschichtung ermöglichte den Nachweis geringerer Konzentrationen als die von Cyclodextrinen. Dieses ist u.a. auf die deutlich geringere Empfindlichkeit der Einschlußverbindungen gegenüber Wasser zurückzuführen. Deshalb wurden die im folgenden beschriebenen Versuche zur Adsorption von Aromaten aus der wäßrigen Phase ausschließlich mit Calixaren-beschichteten Substraten durchgeführt.

4.5.2 Adsorption aus der wäßrigen Phase

Die Adsorption aromatischer Verbindungen aus der wäßrigen Phase wurde an Substraten mit Calixaren-Beschichtungen untersucht. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Adsorption nitrierter Aromaten gelegt, insbesondere Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol).

Zur Überprüfung der Sensoreigenschaften von SERS-Substraten (AgFON's) mit unterschiedlichen Calixaren-Beschichtungen wurden vergleichende Messungen mit Pikrinsäure an verschieden beschichteten Substraten durchgeführt. In Abbildung 4.20 sind die SERS-Spektren von Pikrinsäure (Lösungen von 1 und 100 ppm) an Substraten mit Beschichtungen aus Calix[6]-, Calix[8]aren und N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid sowie an einem unbeschichteten Substrat dargestellt und darüber hinaus das Raman-Spektrum einer gesättigten wäßrigen Pikrinsäure-Lösung. Die Meßzeit betrug nach einer Exposition von 30 Minuten bei einer Laserleistung von 10 mW am Objektiv bei den SERS-Messungen 5x20 s, bei der Messung der wäßrigen Lösung 5x300 s. Bei einer Konzentration von 100 ppm Pikrinsäure in Wasser zeigten die Substrate mit Calixaren-Beschichtungen und das unbeschichtete Substrat eine starke Pikrinsäure-Bande. Die Lage der Bande bei 822 cm^{-1} war identisch mit der Pikrinsäure-Bande des Raman-Spektrums der wäßrigen Lösung, jedoch war die Bande hier trotz erheblich längerer Meßdauer deutlich schwächer. Das Substrat mit der N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid-Beschichtung zeigte bei einer Konzentration von 100 ppm keine Pikrinsäure-Banden. Bei einer Konzentration von 1 ppm trat nur noch in den Spektren der SERS-Substrate mit Calixaren-Beschichtungen die Pikrinsäure-Bande auf, so daß von einer Anreicherung der Pikrinsäure an immobilisierten Calixarenen ausgegangen werden kann.

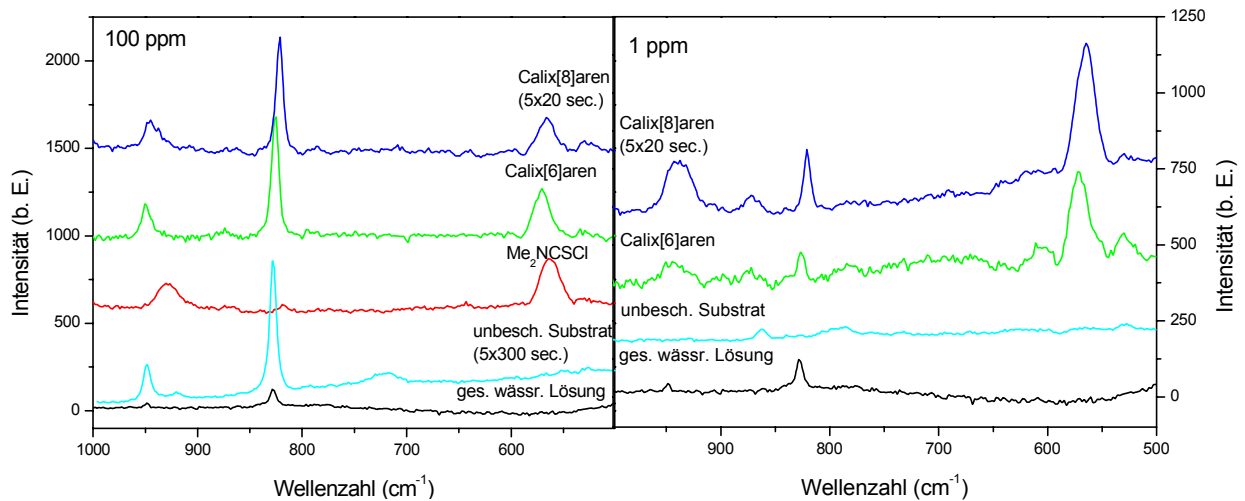


Abbildung 4.20 SERS-Spektren nach der Sorption von Pikrinsäure aus 100 (links) und 1 ppm (rechts) wässrigen Pikrinsäure-Lösungen an verschiedenen beschichteten Substraten, sowie das Raman-Spektrum einer gesättigten wässrigen Pikrinsäure-Lösung.

Wie schon bei den mit Cyclodextrin beschichteten Substraten können auch hier die Analyte anhand ihrer Raman-Banden identifiziert und typische Banden der Beschichtung als interner Standard für eine quantitative Auswertung genutzt werden. Die Calixaren-Beschichtung zeigt im Bereich zwischen 500 und 1500 cm^{-1} vier charakteristische breite Banden. Die SERS-Banden der adsorbierten Substanzen sind dagegen eher schmal. Sie entsprechen in ihrer Lage den Raman-Banden der jeweiligen Reinsubstanzen bzw. denen ihrer wässrigen Lösungen. In Abbildung 4.21 sind die Spektren einiger an Calix[6]aren-beschichtete Substrate adsorbierter Nitroaromaten dargestellt. Die wässrigen Lösungen von 1,3-Dinitrobenzol und 2,4-Dinitrotoluol waren gesättigt, die Konzentrationen von Pikrinsäure- und p-Nitroanilin-Lösungen betragen 100 ppm. Die Banden der adsorbierten Substanzen sind mit Pfeilen entsprechend gekennzeichnet.

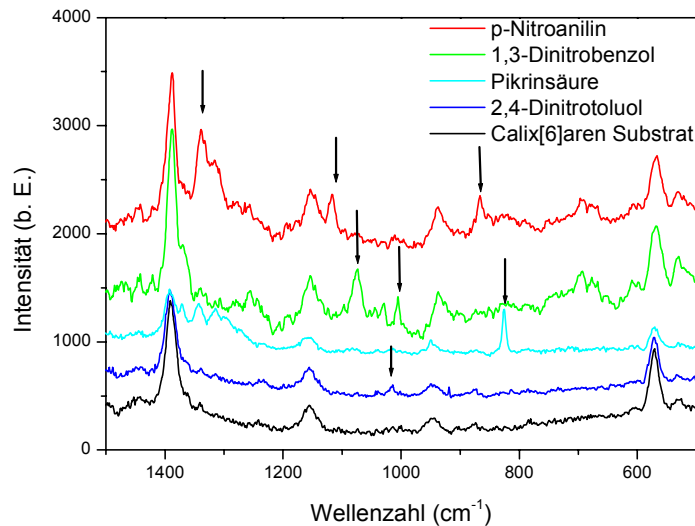


Abbildung 4.21 *SERS-Spektren von Nitroaromaten auf Calix[6]aren-Substraten. Die Banden der Aromaten sind durch Pfeile gekennzeichnet.*

Da die meisten nitrierten aromatischen Verbindungen in Wasser wenig löslich sind, ist es schwer, die Adsorption über einen größeren Konzentrationsbereich zu verfolgen. Eine Ausnahme bildet hier die Pikrinsäure, die mit ca. 13 g/L in Wasser gut löslich ist und damit die Möglichkeit einer Verdünnungsreihe bietet. Es zeigt sich, daß bei der Adsorption wie erwartet die relative Intensität des stärksten Analytsignals mit steigender Konzentration zunimmt. Abbildung 4.22 zeigt die gemessenen Spektren für einige Pikrinsäure-Konzentrationen an einem Calix[8]aren-Substrat.

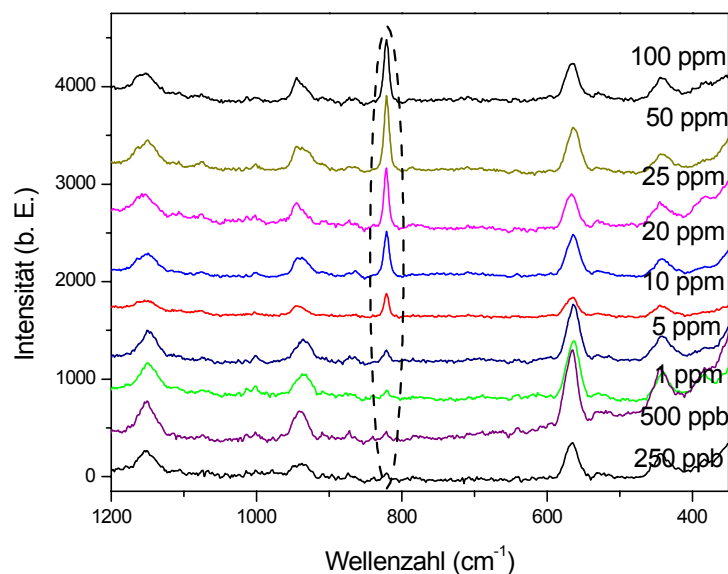


Abbildung 4.22 *SERS-Spektren nach der Adsorption von Pikrinsäure aus wäßrigen Lösungen verschiedener Konzentrationen an ein Calix[8]aren-Substrat.*

Die quantitative Auswertung der Analyt-Banden kann durch Normierung auf die Calixaren-Bande bei 565 cm^{-1} vorgenommen werden. Die Auftragung dieser relativen Intensität gegen die Zeit zeigt, daß sich das Adsorptionsgleichgewicht in Abhängigkeit von der Konzentration innerhalb weniger Minuten einstellt, wobei mit fallender Konzentration die Einstelldauer anwächst. Einige typische Adsorptionsisothermen sind in Abbildung 4.23 am Beispiel eines Calix[8]aren-Substrates dargestellt, mit dem zur Überprüfung der Reversibilität der Adsorption nacheinander verschiedene Konzentrationen wäßriger Pikrinsäure gemessen wurden. Zur Entfernung der sorbierten Moleküle wurde das Substrat nach beendeter Adsorption für eine Minute mit deionisiertem Wasser gespült.

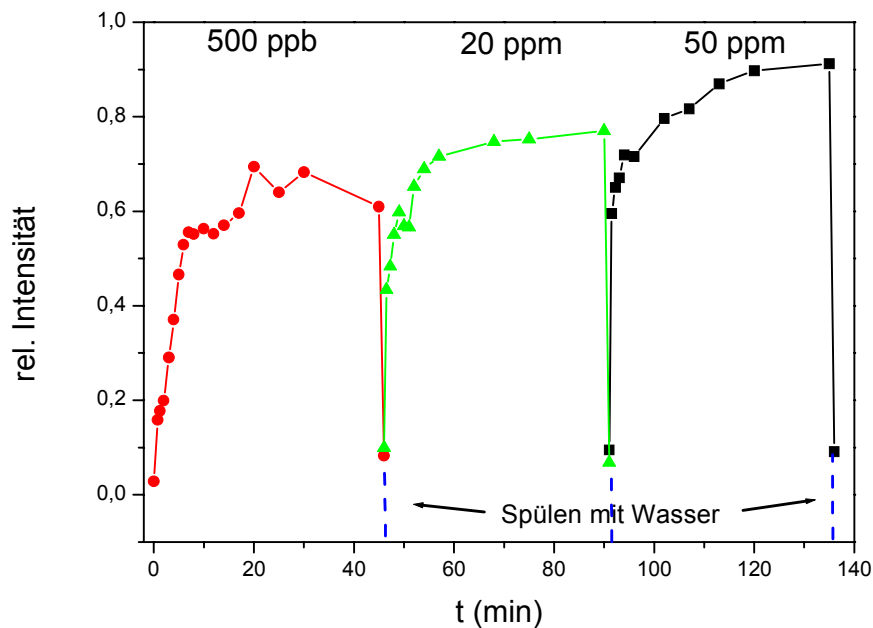


Abbildung 4.23 Reversibilität der Adsorption anhand der relativen Intensitäten der Pikrinsäure-Bande bei unterschiedlichen Konzentrationen, die nacheinander mit einem Calix[8]aren-Substrat gemessen wurden.

Qualitativ kann Pikrinsäure mit Beschichtungen aus Calix[8]aren bis herunter zu 250 ppb und mit Calix[6]aren bis 500 ppb nachgewiesen werden. Bei den quantitativen Auswertungen zeigt sich die erwartete Zunahme der relativen Intensität im Gleichgewicht mit steigender Analytkonzentration. Grundsätzlich eignen sich sowohl die Gleichgewichtsintensitäten als auch die Zeitverläufe zur Konzentrationsbestimmung. Die Auswertung der Gleichgewichtsintensitäten liefert hier aber die genaueren Ergebnisse. Abbildung 4.24 zeigt die Auswertung anhand der Gleichgewichtsintensitäten. Die Fehlerbalken wurden aus jeweils drei Meßreihen je Pikrinsäure-Konzentration ermittelt.

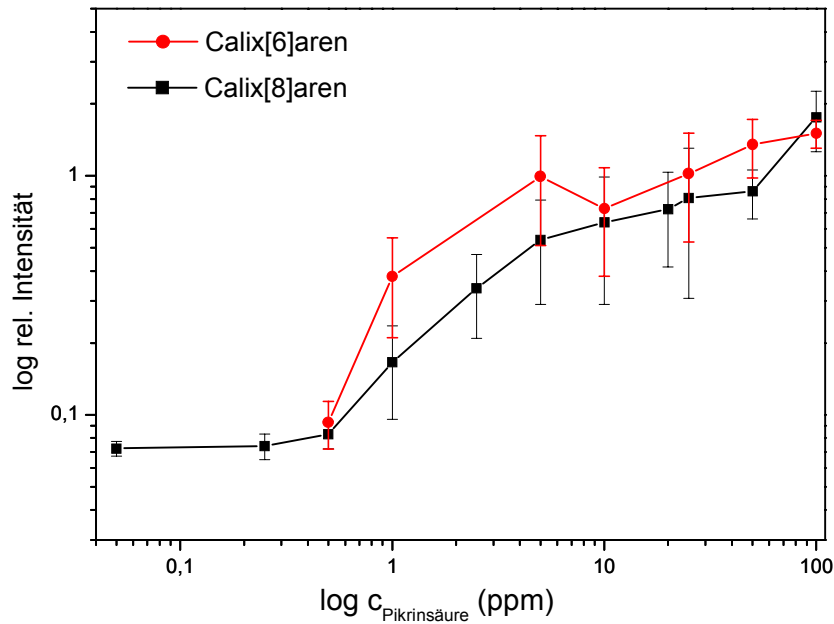


Abbildung 4.24 Abhängigkeit der SERS-Intensitäten von Pikrinsäure an mit Calixarenen beschichteten Substraten als Funktion der Konzentration.

Die quantitative Auswertung wird durch einige Faktoren erschwert. So liefern die höher konzentrierten Lösungen schon auf unbeschichteten SERS-Substraten ein Analytsignal, und bei den rein stochastisch aufgerauhten Substraten kommt es zu deutlichen Unterschieden in der Verstärkung. Zusammen mit anderen noch unbekanntem Faktoren führen diese Effekte zu Abweichungen von der Linearität, ohne daß aus den vorliegenden Daten eine exakte Analyse der Ursachen möglich wäre.

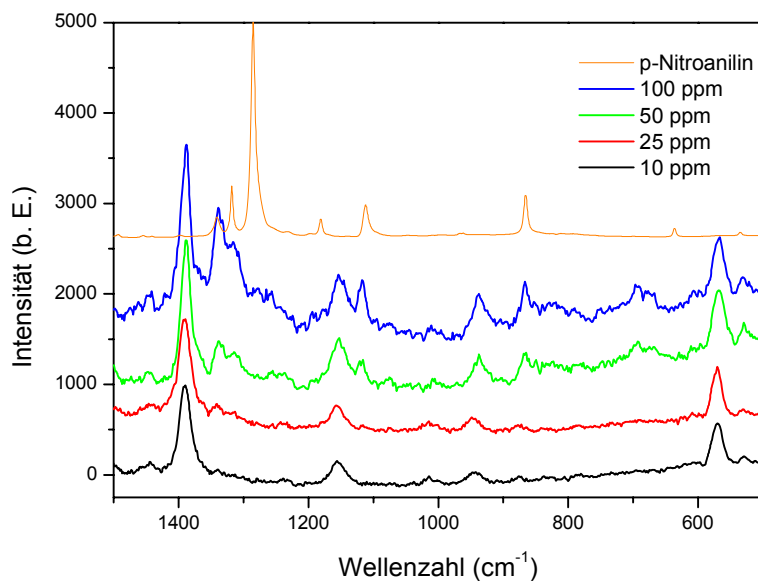


Abbildung 4.25 SERS-Spektren nach der Adsorption von p-Nitroanilin aus wäßrigen Lösungen verschiedener Konzentrationen an ein Calix[6]aren-Substrat.

Eine weitere Verbindung, die sich recht gut an Calixaren-Substraten adsorbieren lässt, ist das p-Nitroanilin. Es weist, wie auch Pikrinsäure, eine gewisse Wasserlöslichkeit auf und lässt sich mit den gewählten Substraten in Konzentrationen von 100, 50 und 25 ppm detektieren. Eine Lösung mit einer Konzentration von 10 ppm liefert nach der Adsorption kein Analytsignal mehr. Die Spektren der Messungen von p-Nitroanilin sind in Abbildung 4.25 zusammen mit dem Raman-Spektrum der Reinsubstanz abgebildet.

Für die in Wasser nicht detektierbaren Verbindungen wurde ein Wechsel des Lösungsmittels vorgenommen. Die verwendeten organischen Lösungsmittel führen allerdings selbst zu intensiven Raman-Banden, die sich in einigen Fällen den SERS-Banden der Analyte überlagern. Während bei wässrigen Lösungen im Zuge der Auswertung keine zusätzlichen Bearbeitungsschritte anfallen, sind die Auswertungen nach Adsorptionen aus organischen Lösungen aufwendiger. Das Problem ist am Beispiel der Messung von TNT (2,4,6-Trinitrotoluol) nach Sorption aus Methanol und Aceton in Abbildung 4.26 dargestellt. Im Bereich der stärksten TNT-Bande bei 1363 cm^{-1} weisen das immobilisierte Calixaren (1387 cm^{-1}) sowie Lösungsmittel Aceton (1425 cm^{-1}) bzw. Methanol (1452 cm^{-1}) selbst starke und breite Schwingungsbanden auf.

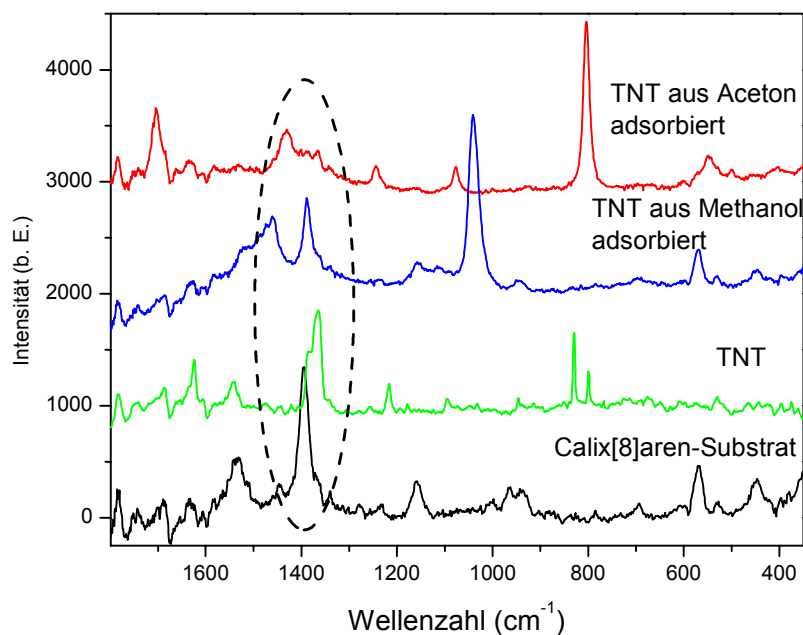


Abbildung 4.26 Das Raman-Spektren von TNT (2,4,6-Trinitrotoluol) sowie die SERS-Spektren eines leeren Calix[8]aren-Substrates und nach Adsorption von TNT aus Aceton bzw. Methanol an Calix[8]aren-Substrate. Der Bereich der Überlagerung von TNT-, Calixaren- und Lösungsmittelbanden ist gekennzeichnet.

Die Auswertung der Spektren erfordert skalierte Subtraktionen der Spektren der Lösungsmittel und ggf. auch der Calixaren-Beschichtung. Trotz des Mehraufwandes bei der Auswertung kann eine Reihe schlecht wasserlöslicher Verbindungen auf diese Weise detektiert werden.

So können 100 ppm TNT in einem Aceton/Wasser-Gemisch mittels eines Calix[8]aren-beschichteten Substrates eindeutig nachgewiesen werden. Der Zeitverlauf (Abbildung 4.27) zeigt, daß sich bis zum Erhalt des ersten Meßwertes das Adsorptionsgleichgewicht bereits eingestellt hatte. Kontrollversuche mit unbeschichteten Substraten bestätigten auch in diesem Fall die Beteiligung der Calixarenbeschichtung an der Adsorption des Analyten.

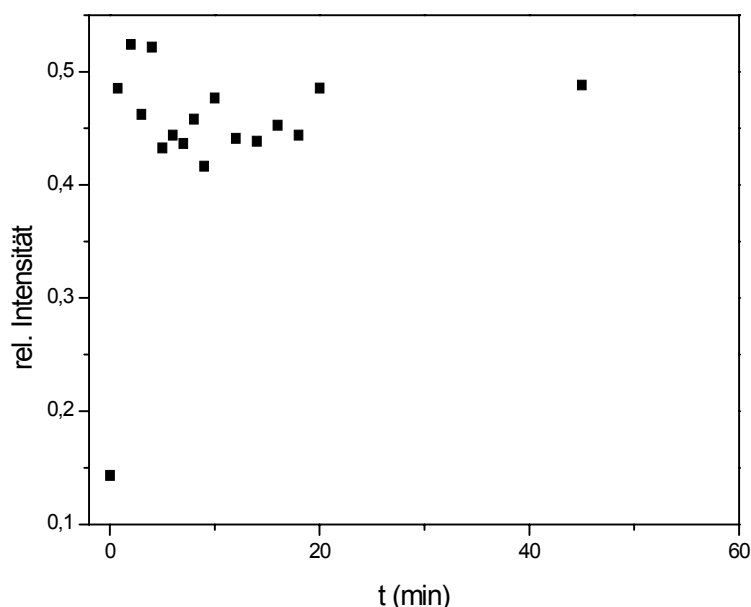


Abbildung 4.27 Zeitverlauf der relativen Intensität der TNT-Bande bei 1365 cm^{-1} während der TNT-Adsorption aus wäßrigem Aceton an ein Calix[8]aren-Substrat.

Eine Übersicht über den Nachweis verschiedener Nitroaromaten mit Hilfe Calixaren-beschichteter SERS-Substrate ist in Tabelle 4.10 gegeben. Die Messungen wurden in den meisten Fällen in gesättigten Lösungen vorgenommen. Die besser wasserlöslichen Verbindungen wie Pikrinsäure oder p-Nitroanilin konnten, wie beschrieben, auch in verdünnten Lösungen nachgewiesen werden. Allerdings gelang bei einigen Verbindungen der Nachweis selbst bei gesättigten wäßrigen Lösungen nicht.

	Naphthalin*	Atrazin*	Simazin*	4-Nitroanilin	1,3-Dinitrobenzol*	1,4-Dinitrobenzol*	2,4-Dinitrotoluol*	2,6-Dinitrotoluol*	2,4,6-Trinitrotoluol	Pikrinsäure
Calix[6]aren	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Calix[8]aren	-	+	-	+	+	-	+	-	o	+

*Tabelle 4.10 Übersicht über den Nachweis verschiedener organischer Verbindungen in wäßrigen Lösungen mittels Calixaren-beschichteter Substrate (+ = detektiert, - = nicht detektiert, o = in wäßrigem Aceton detektiert, * = gesättigte Lösung).*

Die Adsorption aus Wasser wurde vor allem für nitrierte Aromaten im Hinblick auf Sprengstoffe und deren Abbauverbindungen gemessen, aber auch für Pestizide und Naphthalin. Die ausreichend wasserlöslichen Verbindungen dieser Gruppe konnten zumindest auf einem der mit verschiedenen Calixarenen beschichteten Substrate nachgewiesen werden. Die Nichtdetektierbarkeit einiger Substanzen (Naphthalin, Simazin, 1,4-Dinitrobenzol, 2,6-Dinitrotoluol) kann auf deren geringe Wasserlöslichkeit zurückgeführt werden. Somit eignen sich die Calixaren-beschichteten SERS-Substrate grundsätzlich zum Nachweis wasserlöslicher Anteile der genannten Umweltkontaminanten. Leider treten noch merkliche Streuungen der Meßwerte durch die Verwendung der stochastisch strukturierten Substrate auf, was quantitative Bestimmungen erschwert. Eine Verbesserung wird durch die Verwendung von regulären, periodisch strukturierten SERS-Substraten erwartet (s. Abschn. 2.2.3). Diese liegen derzeit jedoch noch nicht in ausreichender Stückzahl vor. Bei der Verwendung anderer Lösungsmittel als Wasser treten Probleme durch zusätzliche Schwingungsbanden der Lösungsmittel in den Spektren auf. Eine Auswertung der Spektren wird in diesem Fall erheblich aufwendiger, sofern die Banden der Analyte nicht sogar gänzlich von denen der Lösungsmittel überlagert werden.

4.6 SERS-Substrate mit molekular geprägten Polymeren

Die Selektivität der SERS-Substrate mit Calixaren- und Cyclodextrin-Beschichtungen wird im wesentlichen durch die Hohlraumgrößen der Rezeptormoleküle bestimmt. Um noch selektivere Wechselwirkungen mit den Analyten zu erzielen, werden Rezeptorschichten benötigt, die auf das jeweilige Gastmolekül angepaßte Hohlräume aufweisen.

Einen vielversprechenden Ansatz in diese Richtung stellen molekular geprägte Polymere (engl.: Molecular Imprinted Polymers, MIPs) dar⁸⁶. Im Gegensatz zu den Rezeptoren auf der Basis von Käfigmolekülen werden hier keine speziellen Syntheserouten angewendet. Bei der Darstellung der MIPs bilden sich aufgrund der stöchiometrischen Wechselwirkung mit einem Templatmolekül sterisch passende Hohlräume. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, daß man eine gegebene Matrix durch Wahl des Templatmoleküls leicht an unterschiedliche Zielmoleküle anpassen kann und komplexe chemische und sterische Verhältnisse relativ einfach zu gestalten sind. MIPs werden bisher für Festphasenextraktionen, in der biologischen, pharmazeutischen und Umwelt-Analytik eingesetzt⁸⁷.

Sie stellen stabile und relativ leicht herzustellende molekulare Erkennungssysteme dar, die eine starke und praktisch spezifische Adsorption von Molekülen ermöglichen. Daher sind sie bei der Entwicklung von schnellen, empfindlichen und vor allen Dingen hochselektiven analytischen Methoden von großem Nutzen^{88,89,90,91}. Durch molekulares Prägen von Netzwerkpolymeren mit kleinen Templatmolekülen kann diese Art von Erkennungsreaktionen, so wie in Abbildung 4.28 dargestellt, realisiert werden.

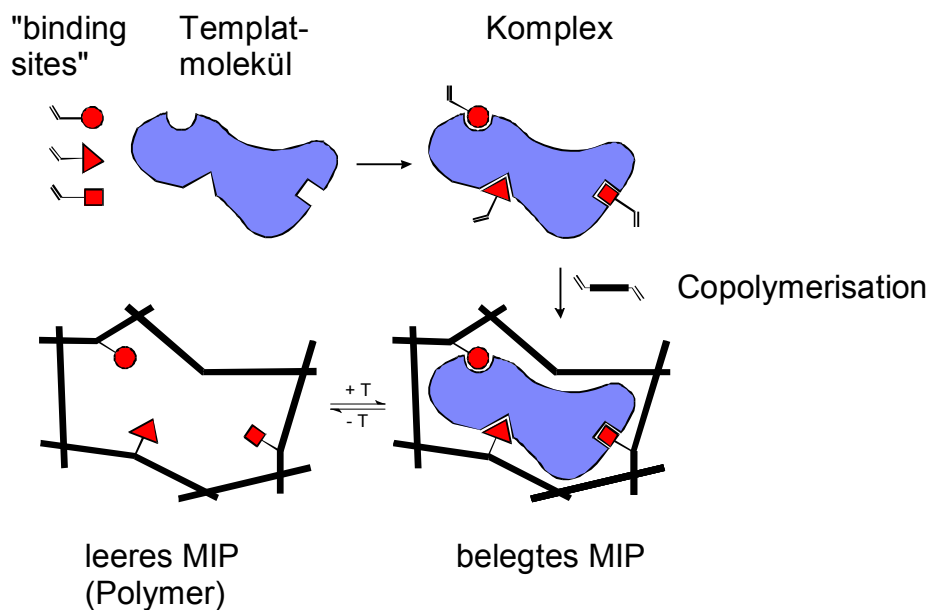


Abbildung 4.28 Vereinfachtes Schema zur Herstellung und Funktionsweise von molekular geprägten Polymeren (MIP)⁸⁶. Zur Erläuterung siehe nachfolgendes Beispiel (Nicotin).

Nach dieser Methode hergestellte MIPs können zum Teil das Templatmolekül mit einer solchen Affinität und Selektivität binden wie es von Immunoaffinitäts-Systemen bekannt ist^{92,93,94,95}. Eine vielversprechende Anwendung besteht in der Verwendung als selektive Phase bei der Festphasenextraktion⁹⁶ (Molecular Imprinted Solid Phase Extraction) von

Analyten in geringen Konzentrationen und in komplexen Matrices^{97,98,99,100,101,102,103}. Sie kann zur selektiven Anreicherung des Analyten in einem Maße führen, wie es mit Standardmethoden nicht zu erreichen ist. Beim Einsatz in der Bio-, Lebensmittel- oder Umweltanalytik ermöglicht die selektive Anreicherung eine effizientere chromatographische Trennung und eine geringere Nachweisgrenze in der nachfolgenden Detektion. Die Ausbeute beim Eluieren des Templates aus dem Polymer ist sehr von den Eigenschaften des Polymers und des Templates abhängig. Bei der Vielzahl der einflußnehmenden Faktoren auf die Entwicklung neuer MIPs wird ein systematisches Vorgehen Ansatz benötigt, das diese Faktoren bei der gewünschten Anwendung berücksichtigt.

Vorschriften zur Herstellung nichtkovalenter Imprints beruhen für gewöhnlich auf der Nutzung handelsüblicher Acryl- oder Methacrylmonomeren wie z. B. Methacrylsäure (MAA), die mit Ethylenglykoldimethacrylat (EDMA) vernetzt werden. Moleküle mit geringem Molekulargewicht und funktionellen Gruppen, die Wasserstoffbrückenbindungen oder Säure-Basen-Reaktionen mit den Monomeren eingehen können, sind geeignete Template. Die Methode ist in Abbildung 4.29 am Beispiel des Nicotins als Templat dargestellt.

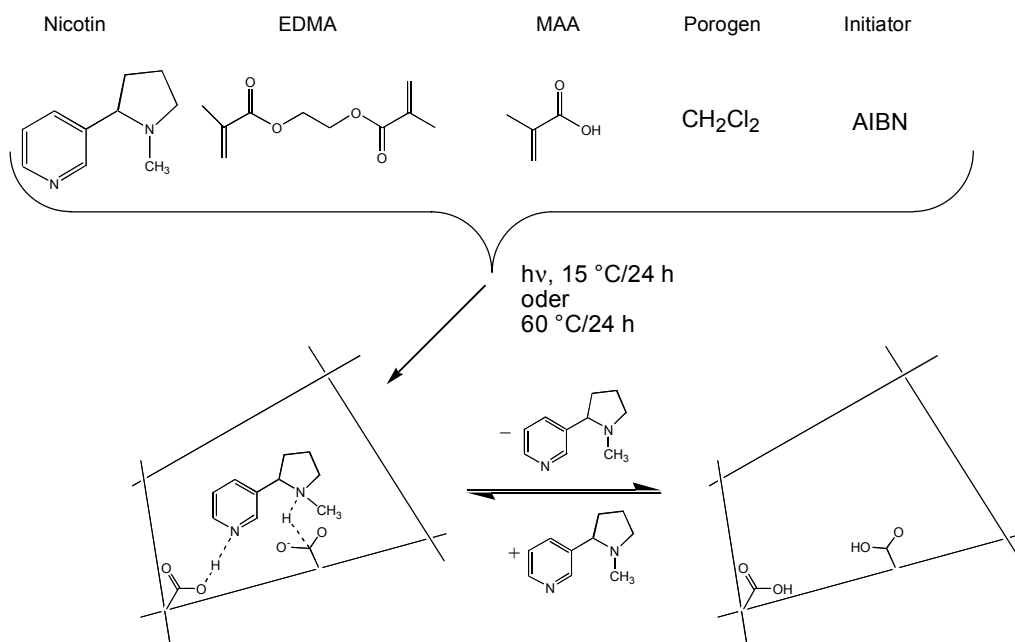


Abbildung 4.29 *Molecular Imprinting mit Methacrylsäure (MAA) als funktionellem Monomer und Nicotin als Templat.*

Im ersten Schritt werden das Templat (Nicotin), das funktionelle Monomer (MAA) und das vernetzende Monomer (EDMA) in einem schwach protischen und wenig polaren Lösungsmittel (Diluent oder Porogen) gelöst. Die radikalische Polymerisation wird dann durch einen Initiator wie z.B. N,N'-Azobisisobutyronitril (AIBN) entweder photochemisch¹⁰⁴

durch Belichtung bei Raumtemperatur oder thermisch¹⁰⁵ bei 60°C (oder höher) gestartet. Abschließend wird das Rohpolymer gemörsert, das Templat ausgewaschen (z.B. mit THF) und das Polymer nach Partikelgrößen gesiebt, so daß es als stationäre Phase bei der Chromatographie eingesetzt werden kann.

Um MIPs im Zusammenhang mit SERS verwenden zu können, müssen die Polymere auf den Substraten immobilisiert werden. Da die Polymere an sich keine entsprechenden Funktionalitäten aufweisen, werden hier zwei unterschiedlich Ansätze verfolgt. Im ersten wird das Reaktionsgemisch aus Monomeren, Templat, Porogen und Radikalstarter einfach auf die raue Oberfläche gegeben und dann dort photochemisch polymerisiert. Beim zweiten Ansatz werden die Substrate zuerst mit Cysteamin als Haftvermittler beschichtet bevor die Reaktionsmischung aufgebracht und polymerisiert wird. Die Beschichtungen der im folgenden dargestellten Substrate wurden durch Herrn Dipl.-Chem. Marco Emgenbroich (Arbeitskreis Prof. G. Wulff) am *Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie II* der Universität Düsseldorf hergestellt.

Abbildung 4.30 zeigt die SERS-Spektren zweier Substrate, deren MIP-Beschichtungen nach den beiden beschriebenen Methoden immobilisiert wurden. Neben den Spektren der Polymere, die auf (2S,3S)-Di-O-benzoylweinsäure als Templat geprägt wurden, ist auch das Raman-Spektrum von (2S,3S)-Di-O-benzoylweinsäure dargestellt.

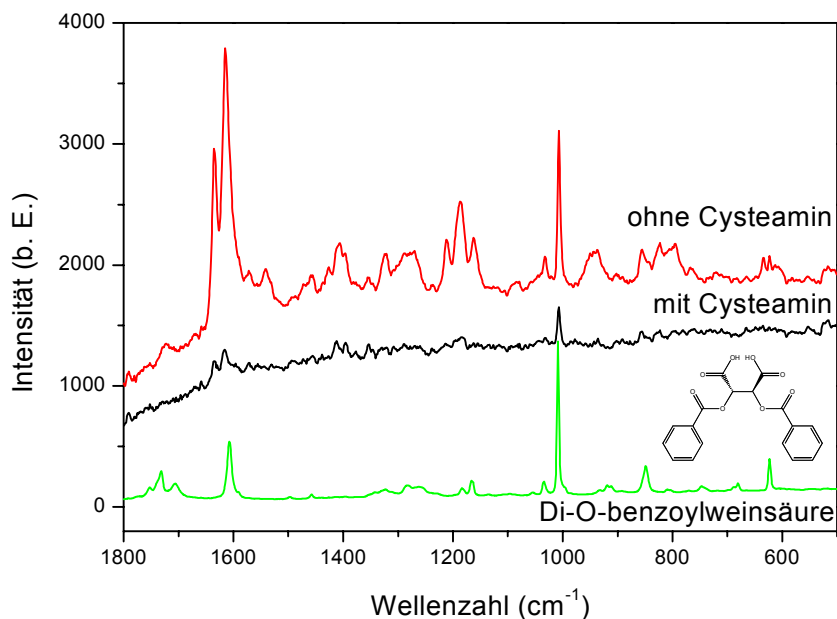


Abbildung 4.30 Raman-Spektrum von (2S,3S)-Di-O-benzoylweinsäure sowie die SERS-Spektren zweier mit belegten MIPs beschichteter Substrate.

Es zeigt sich, daß die SERS-Spektren von Polymeren mit Cysteamin als Haftvermittler nur vergleichsweise schwache Banden aufweisen. Die stärkste Bande ist die Aromatenbande des Templates Di-O-benzoylweinsäure bei 1008 cm⁻¹. Dagegen treten in den SERS-

Spektren der Substrate ohne Haftvermittler zusätzlich die Banden des Polymers deutlich hervor. Dieses Ergebnis bestätigt erneut die bekannte kurze Reichweite der SERS-Verstärkung. Anscheinend genügt der geringe durch den Haftvermittler Cysteamin bedingte Abstand zwischen Polymer und Metalloberfläche, um das Polymer außerhalb des Bereiches der oberflächenverstärkten Felder zu halten. Damit ist dieser Haftvermittler trotz der erzielten besseren Stabilität der Schichten letztendlich nicht für derartige SERS-Sensoren einsetzbar. Bei den Substraten ohne Cysteamin besteht die Möglichkeit, Banden des Polymers als internen Standard für quantitative Auswertungen zu nutzen. Da die Polymere auf dem Metall aber nur physisorbiert vorliegen, lösen sie sich im Laufe von Messungen in wässrigen Medien wieder vom Metall ab. Daher ist weiter nach geeigneten Möglichkeiten zur Verbesserung der Haftung zu suchen, die nicht mit einer Schwächung des SERS-Effektes verbunden sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch nicht mehr untersucht werden.

Die Belegung der Polymere mit dem Templat wird für gewöhnlich im neutralen Medium durchgeführt. Das Templat wird im hier untersuchten Fall mit einer Konzentration von 10 mM in einer 0,1 molaren wässrigen Lösung von 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES oder Pufferan[®]) als Puffer gelöst. Der pH-Wert der Pufferlösung wird mit Natriumhydroxid auf 7,3 eingestellt¹⁰⁶. Zum Auswaschen des Templates kann der pH-Wert entweder zum sauren oder zum basischen hin verändert werden. Durch die Änderung des pH-Wertes werden die funktionellen Gruppen in Polymer und Templat protoniert bzw. deprotoniert, so daß die ursprünglichen Wechselwirkungen zwischen Templat und Polymer nicht mehr aufrechterhalten werden und das Templat dann desorbiert wird.

In Abbildung 4.31 sind die SERS-Spektren eines auf Z-L-Asparaginsäure (Z = Benzyloxycarbonyl) geprägten MIPs ohne Haftvermittler auf einem Gold- und Silber-Substrat sowie die Raman-Spektren von Z-L-Asparaginsäure und einer 10 mM Lösung der Säure in Puffer (0,1 M HEPES) dargestellt. Das SERS-Spektrum auf dem Gold-Substrat zeigt im Vergleich zu dem auf dem Silber-Substrat stärkere Banden und ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis. Die Lage der Aromatenbande von Z-L-Asparaginsäure in den Spektren des Reinstoffs (1008 cm^{-1}), der Lösung (1009 cm^{-1}) und als Templat (1008 cm^{-1}) im MIP unterscheiden sich nur geringfügig.

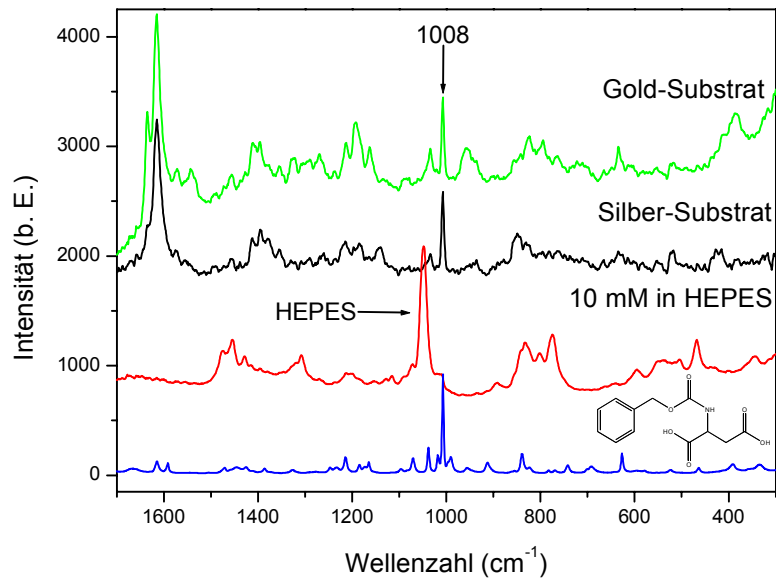


Abbildung 4.31 SERS-Spektren von Substraten mit MIP-Beschichtung sowie Raman-Spektren der Z-L-Asparaginsäure und der Säure im HEPES-Puffer.

Zum Auswaschen des Templates werden HEPES-Puffer mit pH-Werten von 9,3 oder 5,4 eingesetzt. Abbildung 4.32 zeigt die Spektren am Anfang und am Ende des Auswaschens von Z-L-Asparaginsäure aus der MIP-Beschichtung auf einem Gold-Substrat bei einem pH-Wert von 5,4. Zu den Banden von Polymer und Template tritt noch die intensivste HEPES-Bande bei 1048 cm⁻¹ auf. Für eine quantitative Auswertung müssen daher erst Differenzspektren gegen die Pufferlösung gebildet werden (s. Anhang), um störende Einflüssen der Matrix zu vermeiden.

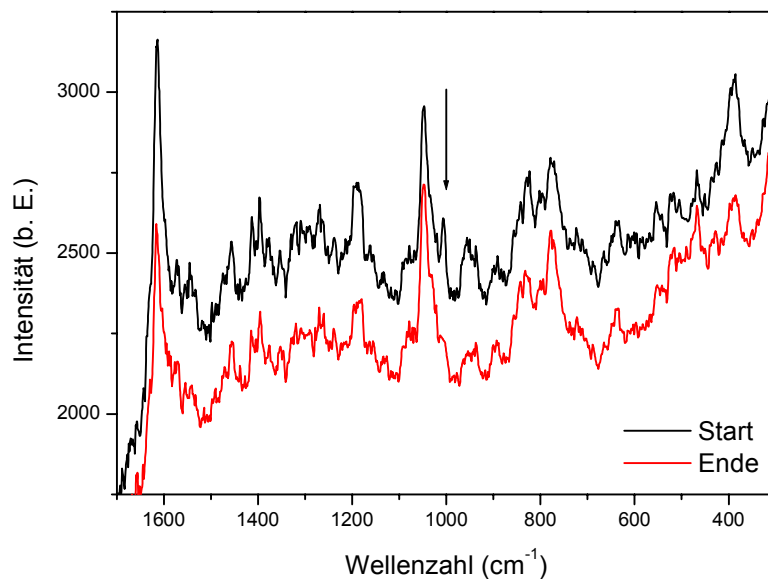


Abbildung 4.32 SERS-Spektren des MIP-Substrates zu Beginn und am Ende des Auswaschens von Z-L-Asparaginsäure bei pH 5,4. Die Bande des Templates ist mit einem Pfeil markiert.

Das Auswaschen des Templates wurde über 45 min verfolgt. Die Auswertung des zeitlichen Verlaufs der Z-L-Asparaginsäure-Bande normiert auf die Intensität der stärksten Bande des Polymers zeigt, wie in Abbildung 4.33 dargestellt, daß die Asparaginsäure schon nach drei Minuten weitestgehend aus dem Polymer ausgewaschen ist. Damit läßt sich mit dieser Messung erstmals direkt nachweisen, daß sich das bei der Polymerisation eingebundene Templat tatsächlich nahezu vollständig wieder entfernen läßt. Ein anschließendes Wiederbelegen mit dem Templat wurde aus einer 10 mM Z-L-Asparaginsäure-Lösung in HEPES bei pH 7,3 durchgeführt. Hier zeigt sich dann, daß unter den gewählten Bedingungen das Templat wieder ins Polymer einbaut wird. Der Vorgang ist nach etwa 15 Minuten abgeschlossen und damit merklich langsamer als das Auswaschen. Die erzielte Wiederbelegung betrug etwa 80% des Maximalwertes und liegt damit über den üblichen Werten für MIPs als stationäre Phase in der Chromatographie. Messungen an einem blanken, nicht auf Asparaginsäure geprägten Polymer zeigten keine Intensitätszunahme der Templatbande während einer versuchten Belegung. Damit kann davon ausgegangen werden, daß nur die Templatmoleküle in den geprägten Hohlräumen innerhalb der verstärkenden Felder zu Banden in den SERS-Spektren führen.

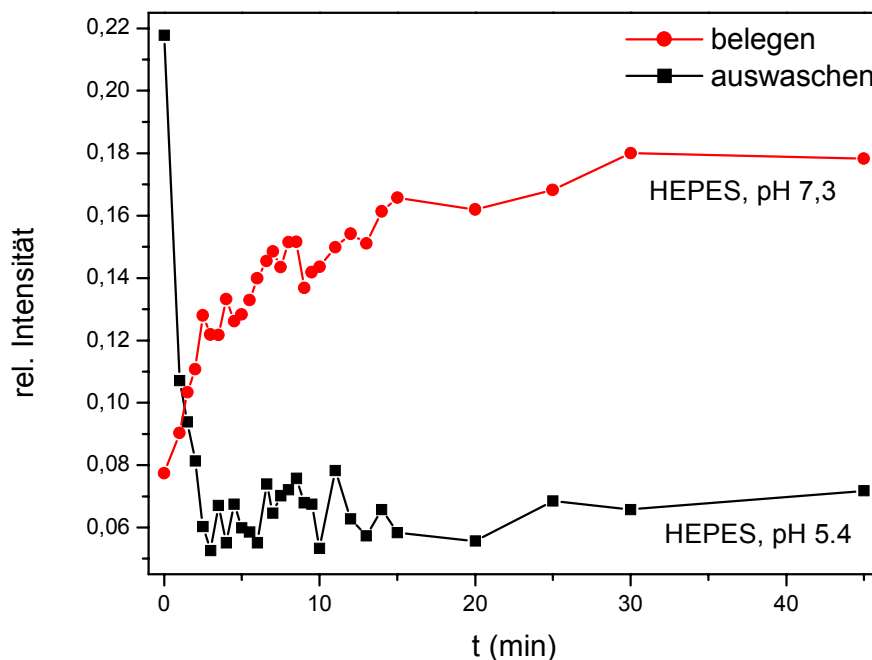


Abbildung 4.33 Auswaschen von Z-L-Asparaginsäure (Templat) aus einem MIP-Substrat (AuFON) und Wiedereinbau des Templates in das Polymer.

Leider ließen sich nicht immer Zeitverläufe im Stundenbereich verfolgen, da sich das Polymer häufig schon innerhalb weniger Minuten von der Metalloberfläche löste. Dies führte

dann zu einem deutliche Verlust der SERS-Intensitäten. Abbildung 4.34 zeigt dies am Beispiel der Belegung eines MIP-Silber-Substrates mit Z-L-Asparaginsäure bei pH 7,3.

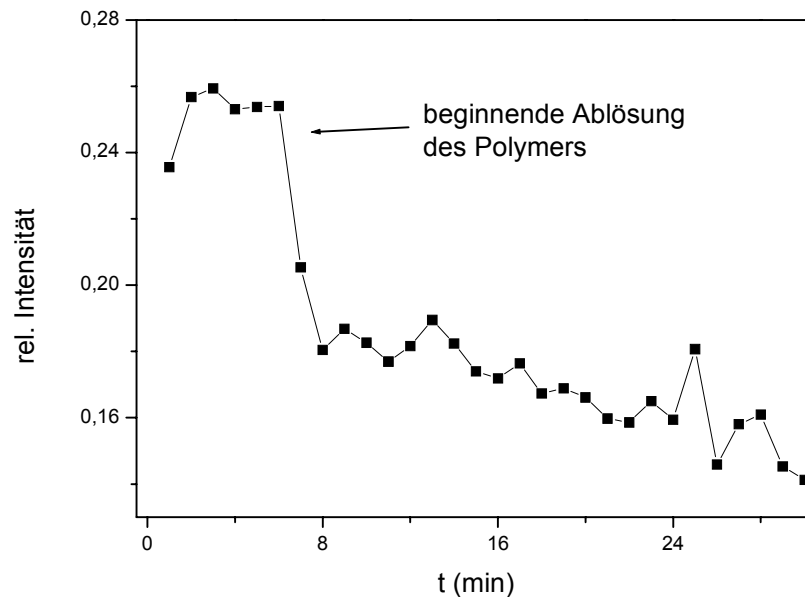


Abbildung 4.34 Ablösen der Polymerschicht von einem Silber-Substrat beim Versuch der Belegung mit Z-L-Asparaginsäure in HEPES bei pH 7,3.

Die Intensität der Asparaginsäure-Bande zeigte bereits nach drei Minuten in der Lösung einen Stopp des Anstiegs, und nach sechs Minuten setzte ein deutlicher Abfall ein. Da dieses Verhalten vergleichsweise häufig auftrat, sind Konzentrationsreihen mit den verfügbaren Substraten bisher kaum zu untersuchen.

Generell stellen aber die geprägten Polymere sehr interessante Rezeptorschichten für künftige SERS-Sensoren dar. Die Polymere können dem analytischen Problem angepaßt werden und bieten eine hohe Selektivität, die durch die spektrale Information noch gesteigert wird. Aus den erhaltenen SERS-Spektren können Informationen über das Templat und den zeitlichen Verlauf seines Einbaus in das Polymer abgeleitet werden. Die für diese Untersuchungen verwendeten Polymerschichten lagen nur physisch auf den SERS-Substraten vor, weshalb sich die Beschichtungen auch alle nach einiger Zeit ablösen und keine eingehenderen Untersuchungen erlaubten. Substrate mit Cysteamin als Haftvermittler für die Polymerschichten waren haltbarer, lieferten aber wenig intensive Spektren. Die Experimente mit Cysteamin zeigten aber auch, wie dicht an den Metalloberflächen die für den SERS-Effekt verantwortlichen Prozesse ablaufen und wie mit der wachsenden Entfernung vom Metall die Oberflächenverstärkung abnimmt. Eine mögliche Alternative liegt in der Verwendung von schwefelhaltigen polymerisierbaren Edukten wie z.B. Disulfiden. Bei der Polymerisierung lägen dann nach Spaltung der Disulfidbrücken über Schwefel kovalent

an das Metall gebundene Monomere vor, die eine chemisorbierte Polymerschicht auf den Substraten ausbilden sollten.

4.7 Untersuchung biochemischer Reaktionen von Streptavidin mit SERS

Die Untersuchung von biochemischen Reaktionen ist im allgemeinen mit hohem apparativen oder präparativen Aufwand verbunden. Da diese Reaktionen vornehmlich in wäßrigen Medien ablaufen, kann die Raman-Spektroskopie einen vielversprechenden Ansatz zu deren Untersuchung auch in nativen Umgebungen liefern. So wurden z.B. mit der Resonanz-Raman-Technik Untersuchungen an Chromophoren, die vielfach als aktive Zentren in Enzymen wirken¹⁰⁷, durchgeführt. Die resonante Anregung der Chromophore führt dabei nicht nur zu der gewünschten hohen Nachweisstärke, sondern erlaubt darüber hinaus die selektive Messung von Veränderungen der Chromophorstruktur ohne störende Banden des Restproteins. Viele Biomoleküle verfügen außerdem über funktionelle Gruppen zur Kopplung an Metalloberflächen, so daß schon früh Biomoleküle an SERS-aktiven Oberflächen immobilisiert und untersucht wurden¹⁰⁸.

Hier sollte nun am Beispiel des Streptavidins untersucht werden, ob biochemische Reaktionen von auf SERS-aktiven Oberflächen immobilisierten Proteinen zu nachweisbaren Veränderungen der SERS-Spektren führen und damit spektroskopisch verfolgt werden können. Die Klärung einer derartigen Frage ist insbesondere im Hinblick auf die Nutzung von Antigen-Antikörper-Reaktionen für analytische Zwecke von Interesse. Grundsätzlich führen die bei derartigen Reaktionen auftretenden Konformationsänderungen natürlich auch zu Änderungen in den stark symmetrieabhängigen Raman-Spektren. Die Frage war allerdings, ob Veränderungen eines kleinen Teils des Proteins tatsächlich über dem Untergrund der unveränderten Struktur beobachtbar sind und ob die Reichweite der oberflächenverstärkten Felder ausreicht, derartige Reaktionen an oberflächenfernen Bereichen der vergleichsweise ausgedehnten Proteinstruktur nachzuweisen.

Streptavidin ist ein gut untersuchtes tetrameres Protein mit einer Molmasse von 4 x 13 kDa und besitzt zahlreiche biochemische Anwendungsmöglichkeiten. Der Grund hierfür liegt in der hohen Affinität des Proteins zu dem Provitamin Biotin ($K_a \sim 10^{13} \text{ M}^{-1}$), auch Vitamin H genannt. Jedes Monomere des Streptavidins kann dabei ein Molekül Biotin in einer speziellen ‚Bindungstasche‘ aufnehmen.

Die Bindung des Biotins in dieser Tasche beruht auf drei verschiedenen Mechanismen¹⁰⁹ :

- hydrophobe und van der Waals Wechselwirkungen, hauptsächlich durch die vier Tryptophan Seitenketten des Streptavidins,
- Ausbildung eines Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen,
- „Verriegelung“ der Tasche durch eine bindende Oberflächenschleife, die sich über das Biotinmolekül legt.

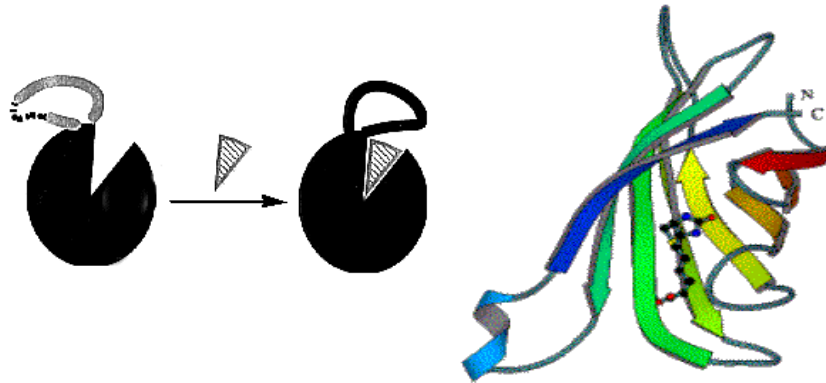


Abbildung 4.35 Schematische Darstellung der Komplexierung von Biotin, sowie Quartärstruktur des Streptavidin/Biotin-Komplexes¹¹⁰.

Die Kenntnisse über diese Vorgänge wurden durch Kristallisation der verschiedenen Komplexe und anschließende Röntgenstrukturanalyse gewonnen. Hierbei werden allerdings nur die Anfangs- und Endzustände der Komplexierung erfaßt, zudem werden bei der präparativ sehr aufwendigen Kristallisation von Proteinen entsprechend große Ansätze benötigt.

Eine Möglichkeit, den Verlauf der Komplexierungsreaktion des Biotins spektroskopisch zu verfolgen, kann die SERS-Spektroskopie liefern. Zu diesem Zweck wurde ein kommerziell erhältliches, mit Streptavidin gelabeltes Goldkolloid sukzessive mit definierten Volumina von Lösungen von (+)-Biotin-Lösung bzw. als Antikörper Anti-Streptavidin versetzt und vermessen.

Die verwendeten Lösungen von (+)-Biotin und Anti-Streptavidin wurden in Konzentrationen von 0.8 mg/mL keimfrei in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 7.2, s. Anhang Chemikalienliste) präpariert und unmittelbar im Anschluß eingesetzt. Die Raman-Spektren dieser Lösungen zeigten keine Banden, so daß im Rahmen der Auswertung die Zugabe dieser Lösungen vernachlässigt werden konnte.

Die Komplexierungsreaktionen wurden entsprechend dem im Abbildung 3.15 beschriebenen Aufbau - nur mit verändertem Probenhalter - in keimfreien Silikatglaskapillaren durchgeführt. Eingesetzt wurden 20 µl des homogenisierten Hydrosols mit einer Aktivität von 90 Prozent, zu dem im Abstand von 45 Minuten definierte Volumina der entsprechenden

Reaktionslösungen Biotin bzw. Anti-Streptavidin zugegeben wurden. Das Summenvolumen der zugegebenen Lösungen betrug im Verlauf der Untersuchung 5, 10 (5+5), 15, 20 bzw. 30 μL , so daß sich Gesamtkonzentrationen an Biotin zwischen 1,6 und 4,8 $\mu\text{g/mL}$ ergaben. Die im Laufe der Messungen auftretende Sedimentation des Kolloids bewirkte eine abnehmende Intensität der Spektren. Durch einfaches Homogenisieren (= Schütteln) der Kapillare ließ sich der Effekt jedoch weitgehend kompensieren. Verdünnungseffekte wurden durch Normierung der Spektren auf bestimmte Banden korrigiert.

Abbildung 4.36 zeigt ein Raman-Spektrum von reinem pulverförmigen Streptavidin (Raman-Mikroskop) sowie ein SERS-Spektrum des mit Streptavidin gelabelten Gold-Kolloids.

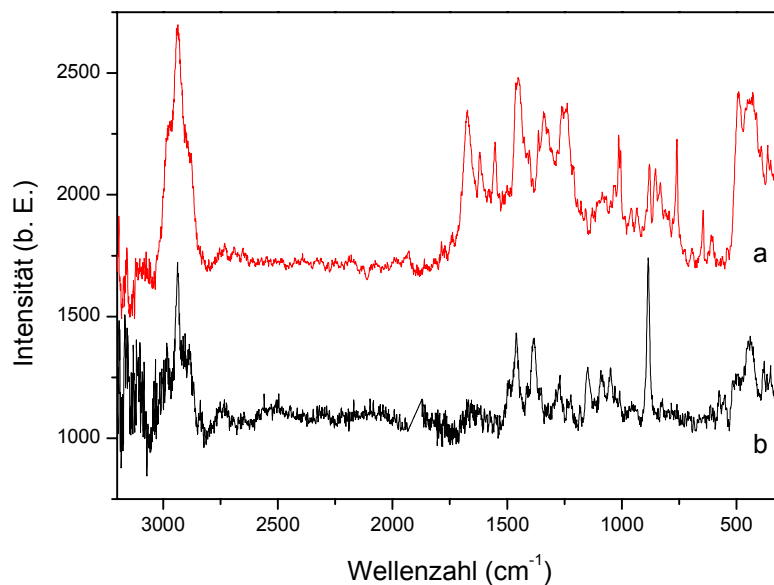


Abbildung 4.36 Raman- (a) und SERS-Spektrum (b, auf Gold-Kolloid) von Streptavidin.

Das Spektrum des Reinstoffs zeigt neben den Banden für aliphatische CH-Schwingungen um 2935 cm^{-1} noch eine Reihe proteintypischer Banden. Hierzu gehören die drei Amid-Banden bei 1673 cm^{-1} (Amid-I), 1552 cm^{-1} (Amid-II) und 1328 cm^{-1} (Amid-III), die Banden der in-plane bending-Schwingung CNH bei 1452 cm^{-1} , der Carboxylatschwingung (COO^-) bei 1337 , 930 und 645 cm^{-1} und der CN-Streckschwingung bei 1137 cm^{-1} . Die Banden im Bereich der aromatischen Schwingungen bei 1029 , 1014 und 1005 cm^{-1} stammen von den Phenylresten in den Seitenketten der Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin.

Weiterhin treten noch die symmetrische CNC-Streckschwingung bei 879 cm^{-1} und eine starke ν_{SS} -Schwingung der Disulfide bei 492 cm^{-1} auf. Die Banden bei 853 und 832 cm^{-1} können dem Tyrosin, die Bande bei 760 cm^{-1} dem Tryptophan zugeordnet werden.

Das Spektrum des immobilisierten Streptavidins zeigt demgegenüber deutlich weniger Banden. Wie auch schon beim Reinstoff zeigen sich im Spektrum die Banden der

aliphatischen CH-Schwingungen. Weiterhin treten Banden auf, die gewissen Struktureinheiten oder Aminosäuren im Molekül zugeordnet werden können. Hierzu gehören die ν_{CC} -Schwingung bei 1460 cm^{-1} , die ν_{COO^-} -Schwingung bei 1383 cm^{-1} und eine δ_{CH_2} -Schwingung bei 1050 cm^{-1} . Die schwachen Banden bei 1270 , 1183 , 1150 und 1009 cm^{-1} stammen von der Aminosäure Tyrosin, die starke Bande bei 885 cm^{-1} von der Aminosäure Tryptophan.

Während der Zugabe der Biotin-Lösung zum Streptavidin-Hydrosol, änderten sich die aufgenommenen Spektren wie in Abbildung 4.37 dargestellt.

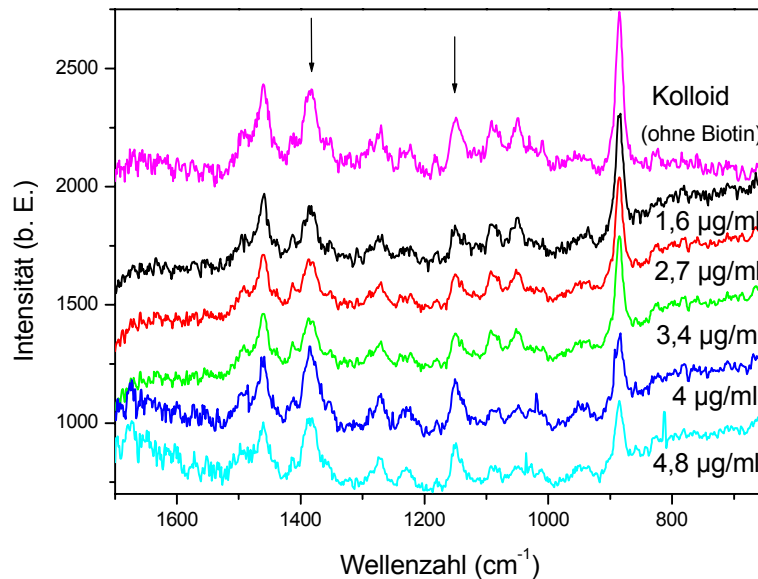


Abbildung 4.37 Änderung der SERS-Spektren von Streptavidin in Abhängigkeit von der Biotin-Konzentration. Die zur Normierung verwendeten Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Intensitäten der SERS-Banden bei 1383 und 1150 cm^{-1} blieben bei der Zugabe des Biotins nahezu konstant. Sie konnten zur Normierung der Spektren verwendet werden. Die so gewonnenen relativen Intensitäten der anderen Banden waren wenig durch Sedimentations- und Verdünnungseffekte beeinflusst. Im Laufe der Reaktion traten auch keine neuen Banden in den Spektren auf. Als für die Auswertung besonders geeignet erwiesen sich die Banden bei 1460 und 885 cm^{-1} . Abbildung 4.38 zeigt die Darstellung der relativen Intensitäten dieser beiden Banden, jeweils normiert auf die Referenzbande bei 1150 cm^{-1} , für Spektren, die jeweils 45 Minuten nach der Zugabe des Biotins aufgenommen wurden. Bei einer Gesamtkonzentration von $3,4\text{ }\mu\text{g/mL}$ Biotin trat eine deutliche Abnahme der Intensitäten auf, weitere Zugaben bewirkten keine deutliche Änderungen mehr. Die Auswertung des zeitlichen Verlaufs der Intensität nach der dritten Zugabe von $5\text{ }\mu\text{L}$ Biotin-Lösung zeigte zu Beginn eine gewisse Konstanz, bis die Werte nach etwa 20 Minuten

deutlich abnehmen. Die zugegebene Stoffmenge an Biotin zu diesen Zeitpunkt betrug ca. 50 nmol.

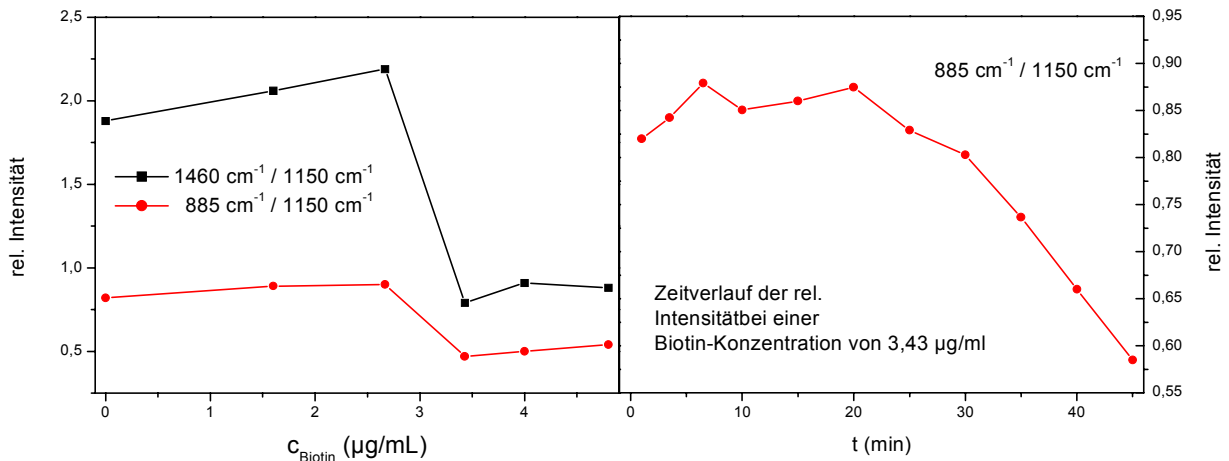


Abbildung 4.38 Die Abnahme der relativen Intensitäten der Streptavidinbanden bei 885 und 1460 cm^{-1} in Abhängigkeit von der (+)-Biotin-Konzentration (links) und der Verlauf der rel. Intensität bei einer (+)-Biotin-Konzentration von $3,4\text{ }\mu\text{g/ml}$ (rechts).

Während die Komplexierung des relativ kleinen Biotin-Moleküls durch das auf Gold immobilisierte Streptavidin spektroskopisch verfolgt werden kann, zeigen sich bei einem gleich angelegten Ansatz mit Streptavidin und Anti-Streptavidin keine derartigen Änderungen. Im Laufe dieses Experimentes läßt nur die Intensität der Spektren nach, was nicht auf Sedimentation oder Verdünnung sondern möglicherweise auf Koagulation zurückzuführen ist. Die Auswertung für alle Banden im Bereich zwischen 1500 und 800 cm^{-1} anhand der Referenzbande bei 1383 cm^{-1} ist in Abbildung 4.39 dargestellt.

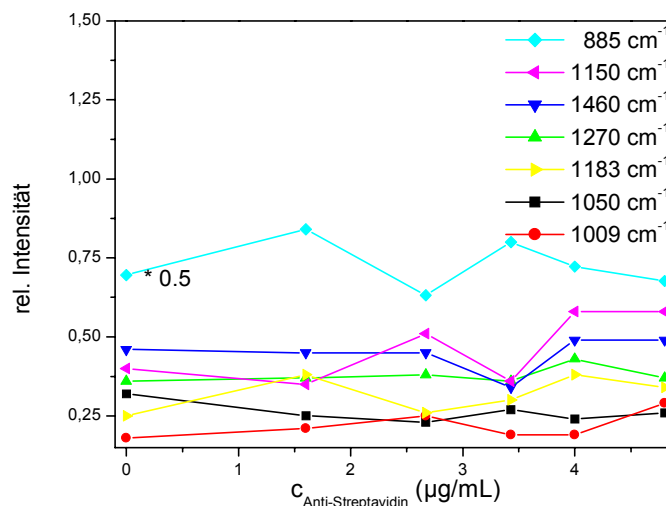


Abbildung 4.39 Die Änderung der relativen Intensitäten von Streptavidin-Banden normiert gegen die Referenzbande bei 1383 cm^{-1} , in Abhängigkeit von der Zugabe der Anti-Streptavidin-Lösung.

Die Komplexierung von Biotin mittels Streptavidin kann aufgrund der Änderungen in den SERS-Spektren verfolgt werden.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Streptavidin und Anti-Streptavidin ließ sich unter den gegebenen Bedingungen spektroskopisch nicht beobachten. Aus den Spektren konnten keine systematischen Änderungen abgeleitet werden, lediglich die Intensität der Spektren ließ deutlich nach. Die Homogenisierung des Hydrosols im Laufe der Reaktion brachte nicht die gleichen Verbesserungen wie bei der Komplexierungsreaktion des Biotins. Es ist daher möglich, daß die Zugabe von Ant-Streptavidin eine Aggregation des Kolloids durch Verbrückung von Streptavidinmolekülen auf verschiedenen Kolloidpartikeln begünstigt. Dieses könnte die Abnahme der SERS-Verstärkungen im Laufe des Experiments erklären. Insgesamt läßt sich festhalten, daß auf SERS-Substraten immobilisierte Proteine ihre Aktivität beibehalten können und daß sich bestimmte biochemische Reaktionen derartiger Proteine mit Hilfe der SERS-Spektroskopie verfolgen lassen.

4.8 SERS-Untersuchungen zur Hybridisierung von Oligonukleotiden

Der Nukleinsäureanalytik auf der Basis von DNA-Chips wird eine extrem weite Verbreitung vorhergesagt, unter anderem in den Anwendungsfeldern medizinische Diagnostik, Pharmaentwicklung und Gentechnik¹¹⁶. Praktisch alle bisher eingesetzten Chips beruhen auf Hybridisierungsreaktionen zwischen DNA-Einzelsträngen, die oberflächengebunden vorliegen und komplementären Nukleinsäuresonden in Lösung. Zum Nachweis der Hybridisierung wurde eine Reihe von Techniken entwickelt, die überwiegend auf der Verwendung von radioaktiv markierten oder fluoreszierenden molekularen Sonden beruhen. Vorteile dieser Marker sind die hohe Nachweisstärke und räumliche Auflösung bei der Detektion der Produkte. Von Nachteil sind der damit verbundene Aufwand, das jeweilige Sondenmolekül markieren zu müssen und das Problem, durch den Marker die Hybridisierungsreaktion eventuell zu stören. Des weiteren ist der Nachweis nicht zwingend substanzspezifisch, so daß Fehlmessungen durch unspezifische Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden können. Deshalb müssen derartige Chips zahlreiche Kontroll- und Kalibriermöglichkeiten (Spots) aufweisen, die Kosten und Auswerteaufwand erhöhen. Ein Weg, diese Probleme zu umgehen, liegt in der Entwicklung markierungsfreier, molekülspezifischer Detektionsverfahren, wie sie z.B. durch Messung von Molekülschwingungen gegeben sind.

In der Forschung bestehen daher Bestrebungen, markierungsfreie optische Biosensoren im Arrayformat zu entwickeln. Ein Ansatz liegt in der Surface-Plasmon-Resonanz (SPR), die als „SPR-Mikroskopie“ mit einer räumlichen Auflösung von 5 μm die Durchführung von Array-Analysen gestattet¹¹¹. Die Anforderungen an die Homogenität der Metallschicht und die Temperaturstabilität sind jedoch sehr hoch, wodurch diese Methode für größere Arrays bisher nur bedingt geeignet ist. Des Weiteren ist diese Methode nicht molekulspezifisch.

Ein weiterer Ansatz liegt in der RiFS-Technik (Reflektions-Interferometer-Spektroskopie)¹¹², jedoch gilt für diese Methode, wie auch für SPR, daß sie nicht nachweisstark genug ist und daher trotz Vervielfachung der Targetmoleküle durch PCR (Polymerase Chain Reaction) in vielen Fällen einfach nicht genug Material zur Verfügung steht.

Es zeigt sich also, daß für markierungsfreie Detektionsverfahren ein sehr großer wissenschaftlicher und wirtschaftlicher Bedarf existiert, adäquate Verfahren aber noch nicht entwickelt sind. Für eine mögliche Anwendung in diesem Bereich zeigt die SERS-Spektroskopie einige vorzügliche Eigenschaften. Es lassen sich, wie schon erwähnt, Schwingungsspektren submonomolekularer Schichten adsorbierter Moleküle in relativ kurzer Zeit erhalten. Als laseroptisches Meßverfahren ermöglicht es die Analyse optisch zugänglicher Proben mit einer Ortsauflösung im μm -Bereich. Unter Verwendung von Detektorarrays (CCD) ist die Methode zudem als bildgebendes Verfahren einsetzbar und könnte somit zur parallelisierten Analyse im Sinne von High-Throughput Screening (HTS) verwendet werden. Für biochemische und biomedizinische Anwendungen ist weiterhin bedeutsam, daß die Messungen unter Atmosphärendruck und auch in wäßriger Umgebung durchgeführt werden können, wodurch in-situ, in-vitro und vielleicht auch in-vivo Anwendungen denkbar sind.

Beschichtungsmethoden, die eine funktionelle Immobilisierung von Biomolekülen auf den Substratoberflächen ermöglichen sollen, sind in der Literatur beschrieben^{113,114}. So wurden auch schon sog. „SERS Gene Probes“ beschrieben, bei denen Raman-aktive Farbstoffmoleküle als Markierung eingesetzt wurden^{115,116}. Eine markierungsfreier Nachweis von DNA-Hybridisierungen wurde bisher noch nicht mit SERS untersucht. Aus Raman-spektroskopischen Untersuchungen von DNA in Lösung ist bekannt, daß Hybridisierungen Änderungen der Konformationen und der Symmetrie bedingen, die zu spezifischen spektralen Veränderungen führen^{117;118}. Diese Veränderungen sollten sich damit auch in den entsprechenden SERS-Spektren finden lassen, wobei SERS den Vorteil der um mehrere Größenordnungen höheren Nachweisstärke aufweist. Dieses könnte den benötigten Nachweis von Submonolagen bis hin zu einzelnen adsorbierten Molekülen ermöglichen¹¹⁹.

Die Aufbau der DNA ist in Abbildung 4.40 anhand einer kurzen Sequenz dargestellt. Die gesamte Desoxyribonukleinsäure besteht aus einer Kette sich wiederholender Bausteine, den Nukleotiden, welche sich ihrerseits aus einer Nukleobase, einem Zucker und

Phosphorsäure zusammensetzen. Als Zucker kommt in der DNA die 2-Desoxy-D-Ribose vor, als Nucleobasen treten die Purinderivate Adenin (A) und Guanin (G), sowie die Pyrimidinderivate Cytosin (C) und Thymin (T) auf. Die DNA als reines Speicherelement der genetischen Information in den Zellkernen unterscheidet sich von ihrer Arbeitskopie, der RNA, in zweierlei Hinsicht. Letztere enthält nämlich als Zucker die D-Ribose und zum anderen die Pyrimidinbase Uracil anstelle des Thymins.

Der Aufbau der DNA wurde 1953 von J. D. Watson und F. H. C. Crick mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt¹²⁰. Die DNA besteht aus zwei zueinander komplementären Nucleotidsträngen. Das Gerüst dieser Stränge wird aus Zucker- und Phosphorsäureeinheiten gebildet, wobei die Zucker durch Phosphat von 3'-Sauerstoff zum 5'-Sauerstoff des nächsten Moleküls miteinander verknüpft sind. An die Zucker sind 1'- β -glycosidisch die verschiedenen Nucleobasen gebunden. Die beiden Einzelstränge sind über Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleobasen miteinander verbunden und liegen als Dimer in Form einer α -Helix vor. Wechselwirkungen bilden sich immer spezifisch zwischen Adenin und Thymin (Uracil), bzw. Guanin und Cytosin aus.

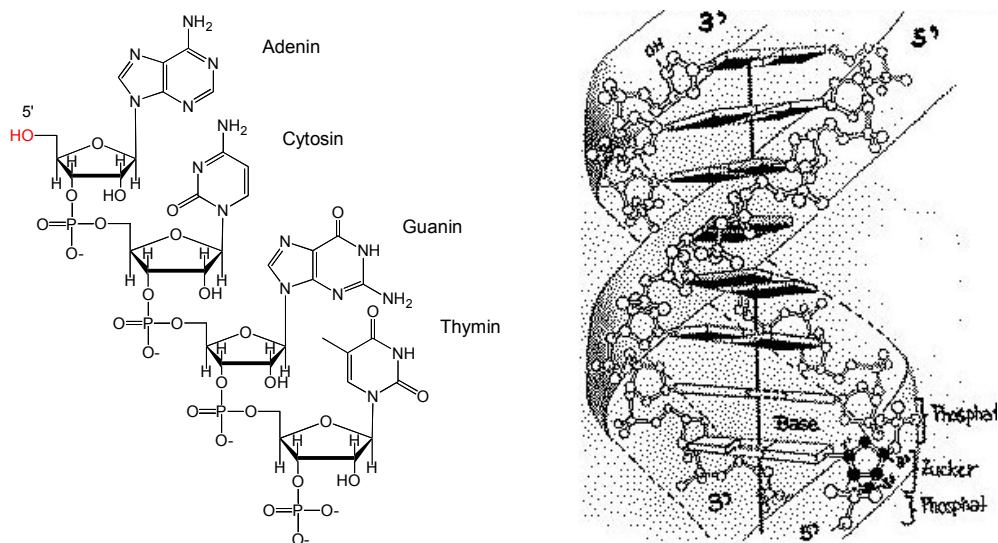


Abbildung 4.40 Schematischer Aufbau der DNA am Beispiel der kurzen Sequenz eines Einzelstranges (links) sowie ein Ausschnitt einer Doppelhelix (rechts).

Um die Zuordnung der Banden in den SERS-Spektren von Oligonucleotiden zu erleichtern, wurden Messungen an Nucleobasen und Einzelnucleosiden durchgeführt. Abbildung 4.41 zeigt die Raman- und SERS-Spektren der Purinbase Guanin und der Pyrimidinbase Thymin. Die Reinsubstanzen zeigen in den Raman-Spektren eine Vielzahl von Schwingungsbanden, für deren Zuordnung auf die Literatur verwiesen sei¹²¹. Beide dargestellten Basen zeigen charakteristische Ringdehnungsschwingungen bei 648 (Guanin) bzw. 782 cm^{-1} (Thymin),

aromatische Schwingungsbanden um 1000 cm^{-1} , sowie Gerüstschwingungen oberhalb von 1200 cm^{-1} .

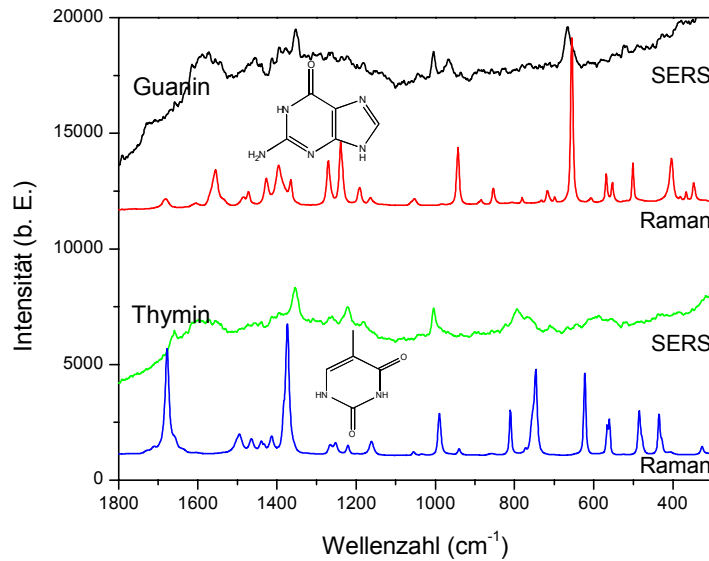


Abbildung 4.41 Raman und SERS-Spektren der Nucleobasen Guanin und Thymin. Zur Beschichtung der SERS-Substrate s. Abschn. 3.4.

Die Raman-Spektren der Nucleoside - Einheiten aus einem Zuckermolekül und einer Nucleinbase - zeigen ebenfalls eine Vielzahl an Banden. Besonders intensiv sind die Banden der Ringdehnungsschwingungen unterhalb von 800 cm^{-1} , die aromatischen Banden um 1000 cm^{-1} und die Banden der Gerüstschwingungen der Basen und Zuckermoleküle oberhalb von 1200 cm^{-1} . Die SERS-Spektren weisen erheblich weniger Banden auf. Die Spektren von Cytidin und Thymin zeigen starke Banden bei 1005 und 1035 cm^{-1} . Zusätzlich zeigen sich in den SERS-Spektren (s. Abb. 4.42) unterschiedlich starke Banden der Ringdehnungsschwingungen bei 743 (Adenosin), 804 (Cytidin), 670 (Guanidin) und 710 cm^{-1} (Thymin), sowie diverse Banden der Gerüstschwingungen oberhalb von 1200 cm^{-1} .

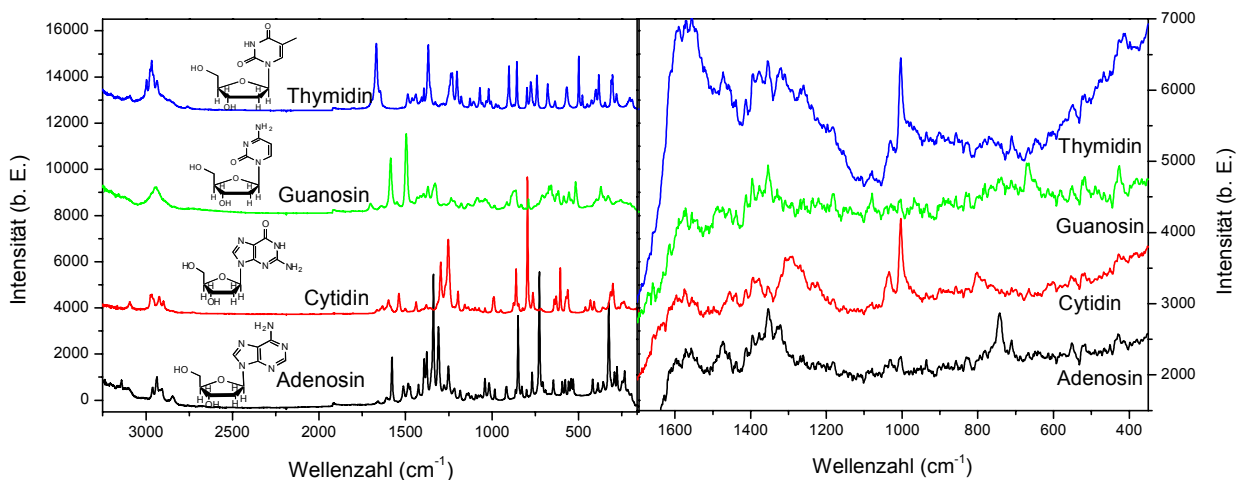


Abbildung 4.42 Die Raman- (links) und SERS-Spektren (rechts) der Nucleoside Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymin.

Zur Untersuchung von DNA-Hybridisierungen wurden von der Firma TIB Molbiol in Berlin drei Oligonukleotide erworben. Die Basenabfolge dieser Nukleotide ist in Tabelle 4.11 aufgeführt.

Name der Sequenz	Nukleotidsequenz (5'-3')
<i>Hill1</i>	GTT TTC CCA GTC ACG ACG
<i>Hill1SH</i>	HS - GTT TTC CCA GTC ACG ACG
<i>Hill-1</i>	CAA AAG GGT CAG TGC TGC

Tabelle 4.11 Basensequenzen der verwendeten Oligonukleotidstränge.

Das Oligonukleotid *Hill-1* ist der komplementäre Einzelstrang zu den Sequenzen *Hill1* und *Hill1SH*. Letztere unterscheiden sich nur am 5'-terminalen Ende der Sequenz derart, daß die Sequenz *Hill1SH* hier eine Thiofunktionalität aufweist, über die an das Metall des Substrates angekoppelt werden kann.

Die experimentellen Schritte zur Immobilisierung und Hybridisierung der in Tabelle 4.11 aufgeführten Oligonukleotide als Einzel- und Doppelstrang-Sequenzen sind in Abbildung 4.43 schematisch dargestellt:

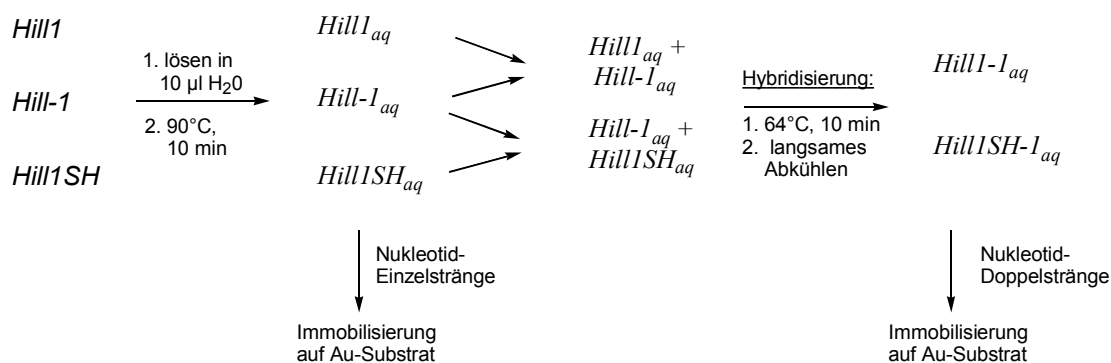


Abbildung 4.43 Schematische Darstellung zur Herstellung der mit DNA-Einzel- und -Doppelsträngen beschichteten SERS-Substrate.

Alle zur Immobilisierung und Hybridisierung benutzten Gerätschaften sowie das verwendete Wasser waren frisch autoklaviert und wurden möglichst steril gehandhabt. Die Oligonukleotide wurden in Eppendorf-Cups® in jeweils 10 µl sterilem Wasser gelöst und auf dem Wasserbad zur Zerstörung von eventuellen Aggregaten für 10 Minuten auf 90°C erhitzt.

Ein Teil der Proben wurde nach dem Erhitzen zur Immobilisierung der Einzelstränge auf Gold-Substraten (AuFON's) verwendet.

Zur Hybridisierung wurden Lösungen der komplementären Nukleotid-Einzelstränge (*Hill1* und *Hill-1*, bzw. *Hill1SH* und *Hill-1*) miteinander vermischt, für 10 Minuten auf einem zweiten Wasserbad auf 64°C erhitzt, anschließend langsam abgekühlt und zum Schluß auf Gold-Substrate aufgebracht. Die Temperatur von 64°C entspricht der vom Hersteller berechneten Temperatur („annealing temperature“) für PCR.

Um eine vollständige Immobilisierung zu gewährleisten, wurden alle belegten Substrate über Nacht in steril verschlossenen Petrischalen gelagert, anschließend mit autoklaviertem Wasser gespült, getrocknet und vermessen.

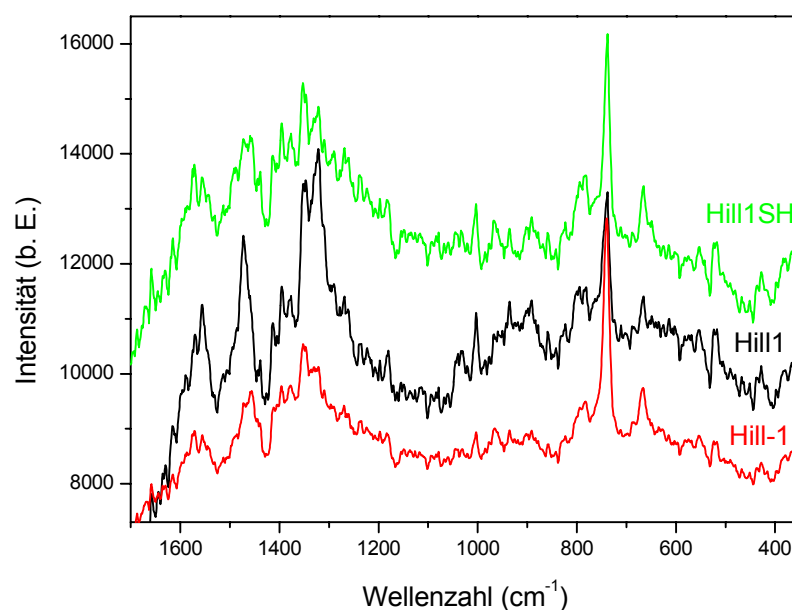


Abbildung 4.44 SERS-Spektren der verschiedenen DNA-Einzelstrangnukleotide auf Gold-Substraten.

Abbildung 4.44 zeigt die SERS-Spektren der auf Gold-Substraten immobilisierten Nukleotid-Einzelstränge. Sämtliche Spektren weisen eine starke Bande bei 742 cm^{-1} und eine Vielzahl von Banden im Bereich der Gerüstschwingungen oberhalb von 1200 cm^{-1} auf. Weiterhin treten einige schwächere Banden bei 666, 785 und 1005 cm^{-1} auf. Die größten Unterschiede zwischen den Spektren zeigen sich zwischen 1200 und 1700 cm^{-1} , sowie im Intensitätsverhältnis der Banden zueinander. Die Aromatenbande bei 1003 cm^{-1} entspricht in ihrer Lage den Aromatenbanden der Nucleoside Thymidin und Cytidin. Die starke Bande bei 742 cm^{-1} zeigt sich auch im SERS-Spektrum von Adenosin, ist aber dort weniger intensiv.

Die Spektren der Hybridisierungsprodukte sind im Vergleich zu denen der Einzelstränge in Abbildung 4.45 dargestellt. Die Hybridisierung der Sequenzen *Hill1* und *Hill-1* liefert einen Doppelstrang, dessen SERS-Spektrum weitgehend dem des Einzelstranges *Hill-1* ähnelt. Das Produkt der Hybridisierung der Sequenzen *Hill1SH* und *Hill-1* zeigt ein anderes

Verhalten. Hier hat die Intensität der Bande bei 742 cm^{-1} im Vergleich zu den Intensitäten der Banden bei 666 und 785 cm^{-1} deutlich abgenommen. Die stärkste Bande im Spektrum finden sich im Bereich der Gerüstschwingungen bei 1353 cm^{-1} . Dazu zeigen sich im Bereich zwischen 800 und 1000 cm^{-1} zusätzliche Banden.

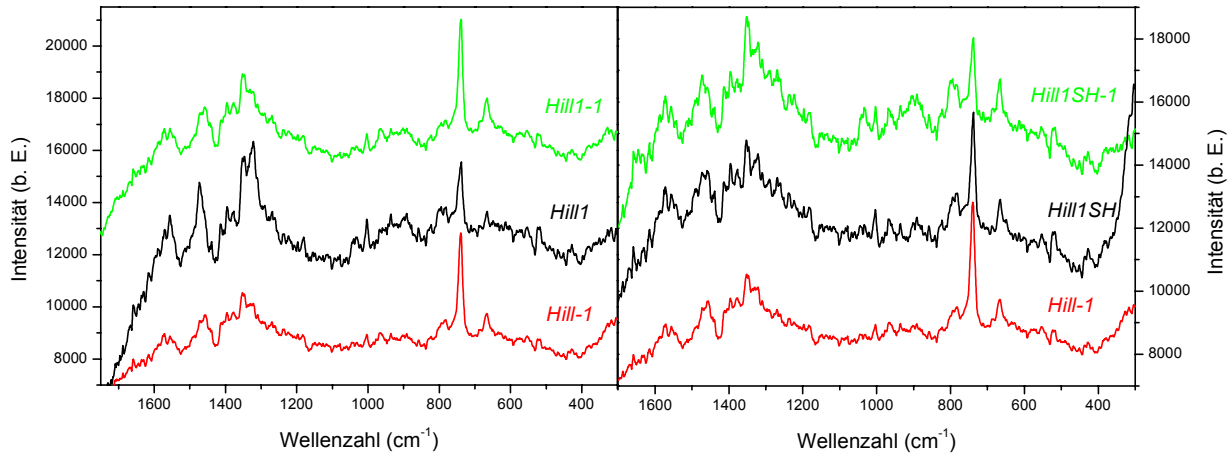


Abbildung 4.45 SERS-Spektren der Nukleotid-Einzelstränge (jeweils die beiden unteren) sowie der Hybridisierungsprodukte (jeweils das obere).

Bei den Messungen der Nukleotid-Proben auf SERS-Substraten zeigten sich Unterschiede besonders zwischen den Reaktionen mit und ohne thiofunktionalisierten Einzelsträngen. Die SERS-Spektren der nicht thiofunktionalisierten komplementären Oligonukleotide unterschieden sich hauptsächlich im Bereich der Gerüstschwingungen. Das SERS-Spektrum des Nukleotid-Doppelstranges *Hill1-1* nach Hybridisierung ähnelte dem Spektrum des Einzelstranges *Hill1-1*. Die Intensitätsverhältnisse der Banden zeigten sich als weitestgehend konstant und in den SERS-Spektren traten keine zusätzlichen Banden auf. Dieses läßt auf eine ähnliche Art der Oberflächenbindung der Sequenzen *Hill1* und *Hill1-1* schließen und darauf, daß möglicherweise die Doppelstränge im Laufe der Immobilisierung wieder aufgetrennt wurden.

Bei den Messungen der thiohaltigen Oligonukleotid unterschied sich das SERS-Spektrum des Hybridisierungsproduktes deutlich von den Spektren der Einzelstränge. Die Banden im Spektrum des Doppelstranges waren allgemein schwächer und es kam zu geänderten Intensitätsverhältnissen zwischen den verschiedenen Banden. Dies zeigte sich besonders an der Abnahme der Intensität der 742 cm^{-1} -Bande. Zusätzlich traten beim Doppelstrang einige zusätzliche Banden im Bereich zwischen 800 und 1100 cm^{-1} auf.

Die geringeren Intensitäten beim thiohaltigen Nukleotid-Doppelstrang können mehrere Ursachen haben. Bei einer Bindung über Schwefel an das Metall erhöht sich der Platzbedarf des Doppelstranges im Vergleich zum Einzelstrang, so daß weniger Analytmoleküle im Laserfokus erfaßt werden. Weiterhin ist davon auszugehen, daß nicht mehr alle Basenpaare

zum SERS-Spektrum beitragen, da sie außerhalb der oberflächenverstärkenden Felder liegen. Möglicherweise reichen aber die Banden der verschiedenen Nukleobasen doch schon für einen Nachweis von Hybridisierungsreaktionen aus. Die Intensitäten der Banden spiegeln nämlich die unterschiedlichen Anteile der jeweiligen Basen wieder, die sich bei den Hybridisierungen entsprechend der komplementären Sequenzen ändern.

Vorteilhaft wird sich sicherlich auch der Einsatz optimierter periodisch strukturierter SERS-Substrate auswirken. Durch die hier größeren Verstärkungen und Reichweiten der oberflächenverstärkten Felder lassen sich intensivere Spektren gewinnen, die auch entsprechend mehr Informationen liefern. Auf der Basis solcher SERS-Sensoren könnte sich der Nachweis oberflächengebundener Hybridisierungsreaktionen realisieren lassen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Chemo-optische Sensoren enthalten oberflächengebundene Rezeptorschichten, die Analyte aufnehmen und mit geeigneten spektroskopischen Methoden entsprechende optische Signale liefern können. Eine Immobilisierung dieser Rezeptorschichten auf nanostrukturierten Metallschichten erlaubt zur Untersuchung der Adsorptionsvorgänge den Einsatz der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS). Auf diese Weise kann die Adsorption mit einer analytspezifischen und empfindlichen Detektionsmethode gekoppelt werden und so den Nachweis kleinster Analytmengen ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Strategien zur Herstellung von Rezeptormolekülen und -schichten auf geeigneten Substraten verfolgt und deren Adsorptionseigenschaften mit Hilfe der SERS-Spektroskopie untersucht. Als Rezeptorschichten wurden Käfigmoleküle wie Cyclodextrine oder Calixarene, molekular geprägte Polymere sowie biologisch aktive Moleküle verwendet.

Die kommerziell erhältlichen Käfigmoleküle gehen keine Bindung an die Metalloberflächen der SERS-Substrate ein. Daher mußten zuerst in z.T. mehrstufigen Synthesen funktionelle Gruppen eingeführt werden, die eine dauerhafte Kopplung der Käfige an die Substrate ermöglichen.

Bei den Cyclodextrinen wurden Edukte mit sechs, sieben und acht Glucose-Einheiten (α -, β - und γ -Cyclodextrin) zu Thiolcyclodextrinen derivatisiert. Die erzielten Ausbeuten lagen aufgrund von Reinigungszyklen zwischen 20 und 30 %. Nach Immobilisierung dieser Verbindungen auf SERS-aktiven Oberflächen konnten Analyte aus der Gasphase an die Substrate adsorbiert werden. Zu den nachgewiesenen Verbindungen zählten halogenierte Kohlenwasserstoffe, substituierte einkernige aromatische Verbindungen sowie die kondensierten Aromaten Naphthalin und Anthracen. Hierbei bestand ein enger Zusammenhang zwischen den Größen von Analyt und Hohlraum des Cyclodextrins. Die in der Rezeptorschicht adsorbierten Moleküle lieferten im SERS-Spektrum charakteristische Schwingungsbanden. Eine Identifizierung der adsorbierten Verbindung konnte anhand der Raman-Spektren von Reinsubstanzen vorgenommen werden. In Abhängigkeit von der Gasphasenkonzentration stellte sich das Adsorptionsgleichgewichtes teilweise innerhalb weniger Minuten ein. Die gebildeten Einschlußkomplexe waren so stabil, daß sie nur durch Spülen mit Wasser wieder zersetzt werden konnten. Wegen dieser Anfälligkeit gegenüber Wasser konnten mit Cyclodextrin beschichtete SERS-Substrate nicht zu Messungen in wäßrigen Medien eingesetzt werden.

Für die Messungen in wäßrigen Medien wurden Calixaren-Beschichtungen verwendet. Dimethyl((thiocarbamoyl)oxy)calixarene ließen sich in Ausbeuten um 50 % synthetisieren und zeigten nach der Immobilisierung auf SERS-Substraten sehr gute Adsorptionseigenschaften für verschiedene Analyte. Untersucht wurden die Aufnahme von BTXE-Aromaten aus der Gasphase und von diversen Nitroaromaten aus der wäßrigen Phase. Am Beispiel der Pikrinsäure wurde das Ansprechverhalten der Sensorschicht für unterschiedliche Konzentrationen und die Reversibilität der Adsorption untersucht. Der qualitative Nachweis von 250 ppb Pikrinsäure in Wasser gelang innerhalb weniger Minuten. Die resultierenden Wirts-Gast-Komplexe waren nicht so stabil wie die mit Cyclodextrinen und daher leichter und schneller, z.B. durch Verdünnung, wieder aufzubrechen.

Die Selektivität der verwendeten Käfigmoleküle gegenüber Analyten beruhte überwiegend auf ihrer Größe. Eine weitaus selektivere Adsorption ließ sich durch den Einsatz von molekular geprägten Polymeren (Molecular Imprinted Polymers) als Rezeptorschicht erreichen. Mit ersten MIP-beschichteten SERS-Substraten konnte das Auswaschen und die anschließende Wiederbelegung mit Z-L-Asparaginsäure eindeutig anhand der Schwingungsbänder nachgewiesen werden. Diese Art von Beschichtungen läßt sich leicht auf verschiedene analytische Problemstellungen anpassen, indem bei der Synthese des Polymers die entsprechenden Template eingebaut werden. Auf den hier verwendeten Substraten lagen die Polymere nur physisorbiert vor und lösten sich nach einer gewissen Zeit vom Metall ab. Daher werden MIPs benötigt, die eine stabile kovalente Bindung an die Metalloberflächen eingehen können. Weitere Untersuchungen sollten darauf hinzielen, bei der Synthese Monomere einzusetzen, die geeignete funktionelle Gruppen, wie etwa Disulfide, zur Kopplung an die Metalle aufweisen.

Die Untersuchungen an den biologischen Systeme sollten dazu beitragen, Grundlagen für bio-optische Sensoren zu schaffen, die den selektiven Nachweis geringster Substanzmengen mit hoher Ortsauflösung erlauben.

Die Komplexierung von (+)-Biotin an Streptavidin wurde an einem kommerziell erhältlichen Streptavidin-gelabelten Goldkolloid untersucht. Das im Mikromaßstab durchgeführte Experiment führte zu charakteristischen Änderungen in den SERS-Spektren. Im Laufe der Komplexierungsreaktionen traten immer wieder unterschiedlichste Störungen, wie etwa Aggregation oder Sedimentation des Hydrosols, auf. Trotzdem zeigte sich, daß Proteinreaktionen grundsätzlich und unter gewissen Voraussetzungen sogar in-situ mit SERS nachweisbar sind.

Bei den Untersuchungen an Oligonukleotid-Proben konnte gezeigt werden, daß der markierungsfreie Nachweis von Hybridisierungsreaktionen komplementärer Nukleotid-Einzelstränge mit Hilfe der SERS-Spektroskopie möglich ist. Native Sequenzen verlieren aufgrund der Bindung an der Metalloberflächen ihre biologische Aktivität. Werden jedoch Nukleotid-Sequenzen verwendet, die am 5'-terminalen Ende des Zucker-Phosphat-Gerüsts mit einer Thiolgruppe derivatisiert wurden, dann bleibt auch nach der Immobilisierung die biologische Aktivität erhalten.

Auf dieser Basis sind die Vorbedingungen für oberflächengebundene DNA-Sonden gegeben, die einen schnellen, eindeutigen und markierungsfreien Nachweis von Hybridisierungsreaktionen erlauben.

Die hier untersuchten Rezeptorschichten zeigen durch die Adsorption unterschiedlicher Analyte die Möglichkeit des Einsatzes als chemo-optische Sensoren auf der Basis der SERS-Spektroskopie.

Durch die Verwendung von optimierten Nanostrukturen sollten sich Einflüsse der Substratmorphologie auf die Spektren reduzieren lassen. Die oberflächenverstärkten Felder solcher Substrate zeigen im Vergleich zu stochastisch strukturierten Oberflächen größere Reichweiten und bessere Verstärkungen⁴⁰. Aufgrund des technologisch aufwendigen elektronenstrahlolithographischen Herstellungsprozesses sind diese Substrate derzeit jedoch nur in Kleinstserien herstellbar.

Bei den Rezeptorschichten zeigten Calixarene und geprägte Polymere sehr gute Adsorptionseigenschaften. Um stabilere Beschichtungen zu erhalten, sind in diesem Bereich weitere präparative Arbeiten vonnöten.

Eine räumliche Trennung von Meßort und Spektrometer kann durch die Immobilisierung der Rezeptorschichten auf die Endflächen von Lichtleitfasern erzielt werden. Bei rückseitiger Anregung der SERS-aktiven Schicht können dann Laser- und gestreute Strahlung in einer einzelnen Faser geführt werden. Hierdurch entsteht ein kompakter apparativer Aufbau mit einer Minimierung der freilaufenden Laserstrahlung. Erste Untersuchungen⁵⁰ zu faseroptischen SERS-Sensoren zeigten die Möglichkeit, SERS-aktive Metallfilme auf Faserendflächen herzustellen und dort immobilisierte Testverbindungen zu detektieren. Die Adsorptionseigenschaften von Rezeptorschichten auf 'klassischen' SERS-Substraten liessen sich derzeit noch nicht auf diese Fasersensoren übertragen. Eine Optimierung des Aufbaus der SERS-aktiven Faserendflächen bietet jedoch auch in diesem Bereich Möglichkeiten für interessante künftige Untersuchungen.

6. Anhang

6.1 Chemikalienliste

Verbindung	Artikelnummer	Reinheit	Lieferant
Aceton	697522	Uvasol	Merck
Adenosin	01890	≥ 99%	Fluka
Aluminiumoxid	SEPP03		Pipelow & Brandt
Anti-Streptavidin (aus Ziegenblut)	Sp4000	99% Aktivität	Vector Laboratories
Anthracen	A8,920-0	98 % +	Aldrich
Atrazin		> 98 %	Jansen
Benzaldehyd	801756	z. S., > 99 %	Merck
Benzol	1780	p.A.	Merck
(+)-Biotin	15060	reinst	Serva
Brom	16050	purum p. A.	Fluka
Bromchlormethan	13,526-7	99%	Aldrich
Bromessigsäureethylester	17020	pract., ~ 95%	Fluka
Chloroform	2444	LiChrosolv	Merck
α-Cyclodextrin	28705	> 98%	Fluka
β-Cyclodextrin	28707	purum, > 99%	Fluka
γ-Cyclodextrin	28708	purum, > 98%	Fluka
Chrom		99%	Balzers
Cysteamin	30070	≥ 98%	Fluka
Cytidin	30270	≥ 99%	Fluka
Deuterioform (mit 0,3 Vol% Tetramethylsilan)	3296	Uvasol, > 99,8%	Merck
Diethylenglykoldimethylether	32220	purum, 98%	Fluka
Diiodmethan	15,842-9	99 %	Aldrich
1,1-Dichlorethan	95000	puriss., ≥ 99,5 %	Fluka
1,3-Dinitrobenzol	3114	> 99%	Fluka
1,4-Dinitrobenzol	10,236-9	98 %	Aldrich
2,4-Dinitrotoluol	42290	pract.	Fluka
2,6-Dinitrotoluol	42300	pract.	Fluka
2,4,6-Trinitrotoluol			
2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure)	80450	puriss. p.A.	Fluka
Dimethylformamid	40250	puriss. p.A.	Fluka
(2S,3S)-Di-O-benzoylweinsäure	818869	> 99%	Merck
Dithizon	1.03092	p.A., > 98%	Merck
DMSO-d ₆	17,594-3	99,5+% d	Aldrich
DNA-Proben		p.A.	Biomol
Ethylbenzol	03080	puriss. p.A., ≥ 99 %	Fluka
Gold		99,9 %	Balzers
Guanin	51020	purum, > 98 %	Fluka
Guanosin	51050	≥ 98%	Fluka
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	9105.4	≥ 99%	Roth
Iod	57660	puriss. p.A., > 99%	Fluka
Kaliumcarbonat wasserfrei	60109	puriss. p.A., > 99%	Fluka

Kaliumthioacetat	24,177-6	98 %	Aldrich
o-Kresol	60990	puriss. p. A., > 99%	Fluka
m-Kresol	61020	pract., 98%	Fluka
p-Kresol	61030	puriss. p. A., > 99%	Fluka
Kristallviolett	28390	≥ 96 %	Fluka
Lawesson Reagenz	61750	purum, ≥ 98 %	Fluka
Methanol	1.06002	Uvasol	Merck
Methansulfonylchlorid	64260	puriss., > 99,5 %	Fluka
Methylenchlorid	66750	purum	Fluka
N,N-Dimethylthiocarbamoylchlorid	41667	purum, ≥ 99%	Fluka
Naphthalin	70210	purum, ≥ 98 %	Fluka
2-Naphthalinthiol	8.2C858	z. S., > 98%	Merck
Natriumhydrid	22,344-1	95%	Aldrich
Natriumhydrogensulfid Monohydrat	71660	tech ≥ 90%	Fluka
Natriumhydroxid	71690	puriss. p.A. > 98%	Fluka
Natriummethylat	71750	pract., ~ 95 %	Fluka
n-Butyllithium, 1,6 M in Hexan	20160	pract.	Fluka
PBS (Kochsalzlösung, steril, 0.0067 M PO ₄ ³⁻ , pH 7,2)	17-516Q		Bio Whittaker
Petrolether	77379	puriss. p. A.	Fluka
Phosphorpentoxid	79612	purum	Fluka
p-iso-Propylcalix[4]aren	59375	pract. ~ 97%	Fluka
p-Nitroanilin	72680	puriss. p.A., > 99 %	Fluka
p-tert-Butylcalix[4]aren	19721	purum > 97%	Fluka
p-tert-Butylcalix[6]aren	19722	puriss, > 99%	Fluka
p-tert-Butylcalix[8]aren	19724	puriss, > 99%	Fluka
p-Tolyether	36,885-7	99%	Aldrich
Rhodamin-B-isothiocanat	28,392-4		Aldrich
Salpetersäure 65 %	6080	purum	J.T. Baker
Salzsäure 37 %	84426	puriss. p. A.	Fluka
Schwefelsäure 95-97%	1.00731	p.A.	Merck
Siamzin	45659	Pestanal	Riedel-de-Haen
Silber	99-311409	99,99%	Balzers
Silikagel			Macherey & Nagel
Silikagel-Platten 60 F ₂₅₄	5548		Merck
Streptavidin	SA500	98% Aktivität	Vector Laboratories
Streptavidin, Gold-gelabelt (30 nm Kolloidgröße)	CG3016	90% Aktivität	Nanoprobes
Tetrachlorethylen	86972	purum, ≥ 99 %	Fluka
Thiophenol	24,024-9	99,5+ %	Aldrich
Thymidin	85,500-6	99+ %	Aldrich
Thymin	8209		Merck
Toluol	89681	puriss. p. A., ≥ 99,5 %	Fluka
Trichlorethylen	91129	puriss. p.A., > 99 %	Fluka
Triclosan		purum	HiMos
Triphenylphosphin	93092	purum, ~ 97%	Fluka
Wasser		seralpur, bzw. millipor	
Wasserstoffperoxid 35%	95299	purum p.A.	Fluka
Xylol (Isomeregemisch)	95685	purum, ≥ 98 %	Fluka
o-Xylol	95662	puriss. p. A.	Fluka

m-Xylol	8688	reinst	Merck
p-Xylol	95682	puriss. p.A., ≥ 99 %	Fluka
Z-L-Asparaginsäure	95970	puriss, > 99%	Fluka
Zink (Pulver)	00618	p. A.	Fluka

6.2 Abkürzungsverzeichnis

α	Molekülpolarisierbarkeit
AgFON	<u>A</u> g <u>f</u> ilms <u>o</u> ver <u>n</u> anoparticles = Silberfilme über Nanopartikeln
ASR	<u>a</u> tomic <u>s</u> cale <u>r</u> oughness
AuFON	<u>A</u> u <u>f</u> ilms <u>o</u> ver <u>n</u> anoparticles = Goldfilme über Nanopartikeln
BrCD	Bromderivat eines Cyclodextrins
c	Lichtgeschwindigkeit
CCD	<u>c</u> harge <u>c</u> oupled <u>d</u> evice
CD	Cyclodextrin
CT	<u>c</u> harge <u>t</u> ransfer
Diglyme	<u>D</u> iethylenglykoldimethylether
δ	Deformationsschwingung (IR, Raman) chemische Verschiebung (NMR)
E	elektrische Feldstärke
IR	<u>I</u> nfrar <u>r</u> ot
G	Verstärkungsfaktor
h	Plancksche Konstante ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js)
HOMO	<u>h</u> ighest <u>o</u> ccupied <u>m</u> olecular <u>o</u> rbital
I	Intensität
k	Boltzmann-Konstante ($1,38 \cdot 10^{-23}$ JK ⁻¹)
λ	Wellenlänge
LR	Lawesson-Reagenz (2,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetan 2,4-disulfid)
LUMO	<u>l</u> owest <u>u</u> noccupied <u>m</u> olecular <u>o</u> rbital
μ	elektrisches Dipolmoment
ν	Valenzschwingung (IR, Raman) Frequenz
Nd:YAG	Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat
NMR	<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PE	<u>P</u> etro <u>l</u> e <u>t</u> her

REM	<u>R</u> aster <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskop
RIE	<u>r</u> eactive <u>i</u> on <u>e</u> tching
RiFS	Reflektions-Interferometer-Spektroskopie
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SAM	<u>s</u> elf <u>a</u> ssembled <u>m</u> onolayer
SEM	<u>s</u> canning <u>e</u> lectron <u>m</u> icroscope
SERS	<u>S</u> urface <u>E</u> nhanced <u>R</u> aman- <u>S</u> cattering
SPR	Surface Plasmon Resonance
TCD	Thiolderivat eines Cyclodextrins
THF	<u>T</u> etra <u>h</u> ydro <u>f</u> uran
s	Sekunden
t	Zeit
T	Temperatur (Kelvin)
V	Volt

6.3 Das Prinzip der Differenzspektrenbildung

Die Bildung von Differenzspektren dient zur Beseitigung störender und unbenötigter Banden, wie z.B. von Banden organische Lösungsmittel, in den Raman- oder SERS-Spektren. Am Beispiel des Parfums *Love Life* der Firma Avon ist die in Abbildung 6.1 dargestellt. Von Raman-Spektrum des Parfums wird das Spektrum des Lösungsmittels Ethanol skaliert subtrahiert. Das resultierende Differenzspektrum ist weitestgehend von den störenden Ethanol-Banden befreit, eine anschließende Auswertung wird so erleichtert.

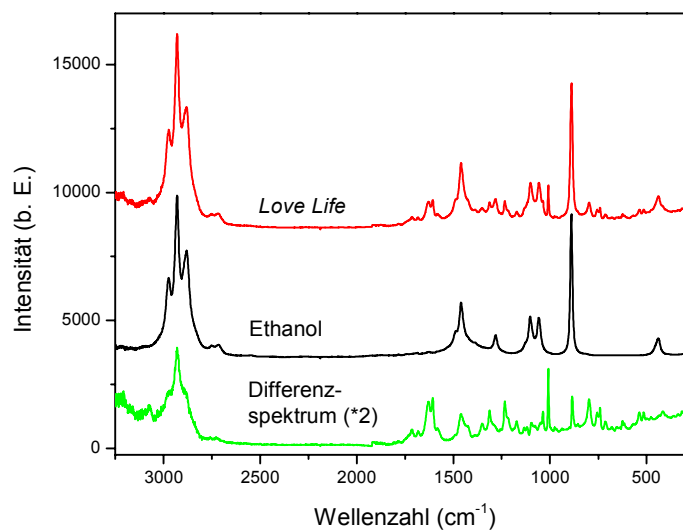


Abbildung 6.1 Das Prinzip der Differenzspektrenbildung am Beispiel des Parfums *Love Life* (Avon).

7. Literaturverzeichnis

- 1 B. Thomas, H. Seidel, Vom Airbag zum elektronischen Auge, *Spektrum der Wissenschaft* Dossier: Mikrosystemtechnik, **1996**, 22.
- 2 G. Gauglitz, A. Brecht, J. Ingenhoff, G. Kraus Optischen Chemo- und Biosensoren für die Umwelt und Bioanalytik, *Spektrum der Wissenschaft*, Dossier Mikrosystemtechnik, 1996, 66.
- 3 J. Bürck, B. Zimmermann, J. Mayer, H.-J. Ache *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1996**, 354, 284-290.
- 4 G. A. Smekal *Naturwiss.* **1923**, 11, 873-875.
- 5 C. V. Raman, K. S. Krishnan, *Nature* **1928**, 121, 501-502.
- 6 D.A. Long, *Raman Spectroscopy*, McGraw-Hill International Book Company, London, 1977.
- 7 K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
- 8 J.R. Ferraro, J.S. Ziomek *Introductory Group Theory*, Plenum Press, New York 1969.
- 9 M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J.M. Quillan *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26, 163-166.
- 10 M.G. Albrecht, J.A. Creighton *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 5215-5217.
- 11 D.J. Jeanmaire, R.P. VanDuyne, *J. Electroanal. Chem.* **1977**, 84, 1-20.
- 12 E. S. Brandt, T. M. Cotton, in *Investigations of Surfaces and Interfaces – Parts B*; B. W. Rossiter, R. C. Baetzold, Eds., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993.
- 13 M. Kerker, D. S. Wang, H. Chew, *Appl. Optics* **1980**, 19, 4159-4174.
- 14 D. S. Wang, M. Kerker, *Phys. Rev. B* **1981**, 24, 1777-1790.
- 15 J. I. Gersten, A. Nitzan, in *Surface-Enhanced Raman Scattering*; R. K. Chang, T. E. Furtak, Eds., Plenum Press, New York, 1982.
- 16 J.J. Gersten, A. Nitzau *J. Chem. Phys.* **1980**, 73, 3023-3037.
- 17 J.E. Rowe, C.V. Shank, D.A. Zwemer, C.A. Murray, *Phys. Rev. Lett.* **1980**, 44, 1770-1784.
- 18 E.S. Brandt, T.M. Cotton, in *Investigations of Surfaces and Interfaces – Part B*; B.W. Rossiter, R C. Baetzold, Eds.; John Wiley & Sons, Inc.; New York 1993.
- 19 J. A. Creighton in *Spectroscopy of Surfaces*; R. J. H. Clark, R. E. Hester, Eds., John Wiley & Sons Inc, New York, 1988.
- 20 M. Moskovitz, D.P. DiLella in *Surface-Enhanced Raman Scattering*; R.K. Chang, T.E. Furtak, Eds. Plenum Press: New York, 1982.
- 21 A. Otto, J. Billmann, U. Etürk, C. Pettenkofer *Surf. Science* **1984**, 138, 319-338.
- 22 E.E. Koch, J. Barth, J.H. Fock, A. Goldmann, A. Otto, *Solid State Commun.* **1982**, 42, 897-890.
- 23 J. Eickmann, A. Otto *Surf. Science* **1983**, 127, 153-164
- 24 J.R. Lombardi, R.L. Birke, T. Lu, J. Xu, *J. Phys. Chem.* **1986**, 84, 4174-4181.
- 25 A. Otto, J. Billmann, U. Etürk, C. Pettenkofer *Surf. Science* **1984**, 138, 319-338.
- 26 J. Korte, Diplomarbeit Universität Erlangen 1996.
- 27 M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26, 163-166.
- 28 B. Pettinger und H. Wetzel, in *Surface Enhanced Raman Scattering*, ed. by R.K. Chang and T.E. Furtak, Plenum Press, New York, 1982.
- 29 J.A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrecht, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, **1979**,

- 790-798.
- 30 P.C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391-3395.
- 31 J.G. Bergman, D.S. Chemla, P.F. Liao, A.M. Glass, A. Pinczuk, R.M. Hart, D.H. Olson, *Opt. Lett.* **1981**, *6*, 33-35.
- 32 Y. Lu, G. Xue, J. Dong, *J. Appl. Surf. Sci.* **1993**, *68*, 485-489.
- 33 J.P. Goudonnet, G.M. Begun, E.T. Arakawa, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *92*, 197-201.
- 34 J.M Bello, D.L. Stokes, T. Vo-Dinh, *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 1325-1330.
- 35 P. Freunschdt, G.Brehm, S. Schneider, Proceedings of the XVIth International Conference on Raman Spectroscopy, Cape Town, A.M. Heyns (Ed), John Wiley&Sons (1998) 414-415.
- 36 S. Kostrewa, W.Hill, D. Klockow, *Sens & Actuators B* **1998**, *51*, 292-297.
- 37 W. Hill, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 38 zur Verfügung gestellt von Dr. Katzenberg, Chemietechnik, Universität Dortmund.
- 39 M. Kahl, Dissertation Universität Dortmund, 2001.
- 40 M. Kahl, E. Voges, *Physical Review B*, **2000**, *61*, 14078-14088.
- 41 A. Ulman, *An Introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Academic Press, New York (1991).
- 42 M.A. Bryant, J.E. Pemberton *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3629-3637.
- 43 K.T. Carron, G. Hurley *Adv. Chem. Ser.* **1993**, *236*, 393-400.
- 44 G. Wedler, *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, VCH Weinheim, 1987.
- 45 H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester 1991, 73.
- 46 F. Vögtle, ed., *Topics Curr. Chem.*, 1981, 98-125.
- 47 J.B. Heyns, L.M. Sears, R.C. Corcoran, K.T. Carron, *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 1572-1574.
- 48 M.D. Porter, T.B. Bright, D.L. Allara, C.E.D. Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 3559-3568.
- 49 G. Gauglitz, *Microchim. Acta*, **1999**, *131*, 9-17.
- 50 C. Viets, Dissertation, Universität Dortmund, 2001.
- 51 M. Kahl, Dissertation, Universität Dortmund, 2001.
- 52 J.A. Creighton, in *Spectroscopy of Surfaces*, Ed.: R.J. Clark und R.E. Hester, John Wiley & Sons: New York, 1988.
- 53 K. Lopitzki, *Einführung in die Festkörperphysik*, 3. Auflage, Teubner, Stuttgart, 1985.
- 54 D.A. Weitz, S. Garoff, T.J. Gramila, *Opt. Lett.* **1982**, *7*, 168-170.
- 55 W. Hill, V. Fallourd, D. Klockow *J. Phys. Chem B* **1999**, *103*, 4707-4713.
- 56 W. Hill, B. Wehling, C.G. Gibbs, D. Gutsche, D. Klockow *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3187-3192.
- 57 C. Sieber, *Ann.* **1960**, *631*, 180.
- 58 I. Tabushi, *Stärke.*, **1974**, *26*, 111.
- 59 C. Chung, PhD Thesis, Iowa State University, 1991.
- 60 A. Bayer, *Ber.*, **1872**, *5*, 25;
A. Bayer, *Ber.*, **1872**, *5*, 280;
A. Bayer, *Ber.*, **1872**, *5*, 1094.
- 61 L. Lederer, *J. Prakt. Chemie*, **1894**, *27*, 2409;
O. Manasse, *Ber.* **1894**, *27*, 2409.

- 62 L. Baekeland, U.S. Patent 942,699, Oktober **1908**.
- 63 A. Zinke und E. Ziegler, *Ber.*, **1941**, B74, 1729.
- 64 A. Zinke und E. Ziegler, *Ber.*, **1944**, 77, 264.
- 65 C. D. Gutsche, B. Dhawan, K. H. No, R. Muthukrishnan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 3782-3792. *idem, ibid.*, **1984**, 106, 1891.
- 66 R.M. Izatt J.D. Lamb, R.T. Hawkins, P.R. Brown, S.R. Izatt, J.J. Christensen *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 1782-1785.
- 67 S.R. Izatt, R.T. Hawkins, J.J. Christensen, R.M. Izatt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 63-66.
- 68 C.D. Gutsche *Calixarenes*, in *Monographs in Supramolecular Chemistry*, J. Fraser Stoddart Eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
- 69 C. G. Gibbs, P.K. Sujeeth, J. S. Rogers, G. G. Stanley, M. Krawiec, W. H. Watson, C. D. Gutsche, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 8394-8402.
- 70 M. S. Newman und H.A. Karnes *J. Org. Chem.*, **1966**, 31, 3980-3984.
- 71 H. Kwart und E. R. Ewans *J. Org. Chem.*, **1966**, 31, 410-413.
- 72 B. Wehling, W. Hill und D. Klockow *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **Vol. 73** (3), 223-236.
- 73 W. Hill, unveröffentlichte Ergebnisse
- 74 A. Gadelle, J. Defaye, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 94-95.
- 75 T. Laue, A. Plagens, *Namen- und Schlagwort-Reaktionen in der Organischen Chemie*, Teubner Studienbücher, Stuttgart, 1994.
- 76 M.J. Gidley, S.M. Bociek, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 3820-3829.
- 77 F.R. Dollish, W.G. Fateley, F.F Bentley, *Characteristic Raman Frequencies of Organic Compounds*; J. Wiley Sons: New York, 1974.
- 78 R.A. Cherkasov G.A. Kutyrev, A.N. Pudovik *Tetrahedron* **1985**, 41, 2567-2624.
- 79 M.P. Cava, M. J. Levinson *Tetrahedron* **1985**, 41, 5061-5087.
- 80 I. Thomsen *Org. Synth* **1984**, 62, 158-164.
- 81 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1991.
- 82 M.A. Bryant, J.E. Pemberton *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8284-8294.
- 83 M.L. McGlashen, K.L. Davies, M.D. Morris, *Anal. Chem* **1990**, 62, 846-849.
- 84 Deutsche Forschungsgemeinschaft, *MAK- und BAT-Werte-Liste 1999*, VCH Weinheim 1999.
- 85 J. Szeftli *Cyclodextrins and their inclusion complexes*, Akadémiai Kiadó, Budapest 1982.
- 86 G. Wulff, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1958-1979.
- 87 A. Martin-Esteban, *Fresenius J Anal Chem* **2001**, 370, 795-802.
- 88 J. O. Nelson, A. E. Karu, R. B. Wong, *Immunoanalysis of Agrochemicals*, ACS Symposium Series, Vol. 586, American Chemical Society, Washington 1995.
- 89 T. E. Mallouk, D. J. Harrison, *Interfacial design and chemical sensing*, ACS Symposium Series 561, American Chemical Society, Washington DC 1994.
- 90 P. G. Edelman, J. Wang, *Biosensors and chemical sensors*, ACS Symposium Series, 487, American Chemical Society, Washington DC 1992.
- 91 K. Haupt, K. Mosbach *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2495-2504.
- 92 G. Vlatakis, L. I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Nature* **1993**, 361, 645-647.

-
- 93 L. I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 4788-4792.
- 94 L. I. Andersson, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 111-117.
- 95 K. J. Shea, D. A. Spivak, B. Sellergren, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3368-3369.
- 96 L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia* **1995**, 40, 474-483.
- 97 B. Sellergren, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1578-1582.
- 98 M. T. Muldoon, L. H. Stanker, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 803-808.
- 99 J. Matsui, M. Okada, M. Tsuruoka, T. Takeuchi, *Anal. Commun.* **1997**, 34, 85-87.
- 100 L. I. Andersson, A. Paprica, T. Arvidsson, *Chromatographia* **1997**, 46, 57-62.
- 101 B. A. Rashid, R. J. Briggs, J. N. Hay, D. Stevenson, *Anal. Commun.* **1997**, 34, 303-305.
- 102 P. Martin, I. D. Wilson, D. E. Morgan, G. R. Jones, K. Jones, *Anal. Commun.* **1997**, 34, 45-47.
- 103 W. M. Mullett, E. P. C. Lai, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 3636-3641.
- 104 D. J. O'Shannessy, B. Ekberg, K. Mosbach, *Anal. Biochem.* **1989**, 177, 144-149.
- 105 B. Sellergren, M. Lepistö, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 5853-5860.
- 106 N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, S. Seikichi, M.M. Raizada
Biochemistry, **1966**, 5, 467-477.
- 107 S. Döpner, P. Hildebrandt, A.G. Mauk, H. Lenk, W. Stempfle *Spectrochim. Acta Part A, Biolmol. Spectrosc.* **1995**, 51, 573-584.
- 108 G.D. Chumanov, R.G. Efremov, I.R. Nabiev, *J. Raman Spec.*, **1990**, 21, 43-48.
- 109 P.C. Weber, D.H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski, F.R. Salenne *Science*, **1989**, 243, 85-88.
- 110 S. Freitag, I Le Trong, L. Kumb, P.S. Stayton, R.E. Stenkamp *Protein Science*, **1997**, 6, 1157-1166.
- 111 C. Bubeck, D. Holtkamp, *Adv. Mater.* **1991**, 3, 32-38.
- 112 G. Gauglitz, *Microchim. Acta*, **1999**, 131, 9-17.
- 113 M.L. McGlashen, K.L. Davis, M.D. Morris, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 846-849.
- 114 A. Kudelski, W. Hill, *Langmuir*, **1999**, 15, 3162-3168.
- 115 T. Vo-Dinh, K. Houck, D.L. Stokes, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3379-3383.
- 116 N.R. Isola, D.L. Stokes, T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1352-1356.
- 117 E. Taillander, J. Liquier, M. Ghomi, *J. Molec. Structure* **1989**, 214, 185-211.
- 118 J.G. Duguid, V.A. Bloomfield, J.M. Benevides, G.J. Thomas Jr., *Biophys* **1996**, J71, 3350-3360.
- 119 S. Nie, S.R. Emroy, *Science* **1997**, 275, 1102-1106.
- 120 J.D. Watson, F.H.C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- 121 E. Koglin, J.M. Sequaris, P. Valenta, *J. Mol. Struct.*, **1982**, 79, 185-189 .