

**UNTERSUCHUNG MOLEKULARER  
ERKENNUNGSREAKTIONEN MIT EINEM  
INTEGRIERT-OPTISCHEN MACH-ZEHNDER-  
INTERFEROMETER**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
"Doktor der Naturwissenschaften"

vorgelegt am Fachbereich  
Chemie und Pharmazie der  
Johannes Gutenberg - Universität Mainz

von  
Stefan Busse  
aus Bonn

Mainz  
2000

Tag der mündlichen Prüfung:

28. Februar 2000

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Knoll und Frau Dr. Silvia Mittler in der Zeit vom Juli 1997 bis Dezember 1999 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, angefertigt.



# Abkürzungsverzeichnis

a.u.	willkürliche Einheiten (engl. <b>arbitrary units</b> )
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. <b>atomic force microscopy</b> )
bzw.	beziehungsweise
$c$	(Analyt-)Konzentration bzw. Lichtgeschwindigkeit
ca.	circa
CVD	chemische Dampfabscheidung (engl. <b>chemical vapour deposition</b> )
$d$	Dicke (des Wellenleiters)
engl.	englischer Ausdruck für ...
$h$	Stufenhöhe
HeNe-Laser	<b>Helium-Neon-Laser</b>
HMDS	<b>Hexamethyldisilazan</b>
$I$	Intensität
IMM	Institut für Mikrotechnik in Mainz
$K$	Bindungskonstante, $K_{MK}$ : Volumen-Bindungskonstante aus Mikrokalorimetrie
$\mathbf{k} = (k_x, k_y, k_z)$	Wellenzahlvektor, $k_0$ : Wellenzahl im Vakuum
$k_{off}, k_{on}$	Desorptionsrate, Adsorptionsrate
LaSFN 9	Hochindex Glas ( $n_{633} = 1,845$ ), Firma Schott
MK	<b>Mikrokalorimetrie</b>
MZI	<b>Mach-Zehnder-Interferometer</b>
$n$	Brechungsindex (indizes s. unten)
NHS-Ester	<b>N-Hydroxysuccinimidester</b>
OMCVD	metallorganische chemische Dampfabscheidung (engl. <b>organometallic CVD</b> )
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <b>phosphate buffered saline</b> )
PECVD	plasmaunterstützte chemische Dampfabscheidung (engl. <b>plasma enhanced CVD</b> )
RBS	Rutherford-Rückstreu-Spektrometrie (engl. <b>Rutherford back scattering</b> )
s.	siehe
SAM	selbstadsorbierte Monolagen (engl. <b>self assembled monolayer</b> )
s.o.	siehe oben

SDMS	spontane <b>D</b> esorptions- <b>M</b> assenspektrometrie
SIMS	<b>S</b> ekundärionen- <b>M</b> assenspektroskopie
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (surface <b>p</b> lasmon <b>r</b> esonance)
UV-Vis	Absorptionsspektrum von ultraviolettem und sichtbarem Licht
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
$w$	Breite eines Streifenwellenleiters
WaMS	Wellenleitermodenspektroskopie (engl. <b>w</b> aveguide <b>m</b> ode <b>s</b> pectroscopy)
$x$	molares Mischungsverhältnis
XPS	Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie (engl. <b>X</b> -ray <b>p</b> hotoelectron spectroscopy)
z.B.	zum Beispiel

### **griechische Zeichen**

$\beta$	Wellenzahl einer Wellenleitermode in Laufrichtung
$\gamma$	Abklingkonstante des evaneszenten Feldes
$\varepsilon = \varepsilon' + i \varepsilon''$	Dielektrizitätskonstante
$\phi$	Phasenverschiebung
$\theta$	Einfallswinkel, $\theta_g$ : Grenzwinkel der Totalreflexion
$\Theta$	relative Oberflächenbelegung (Bedeckungsgrad)
$\tau$	Kinetik-Zeitkonstante $\tau_{ad}$ : Adsorptions-, $\tau_{de}$ : Desorptionszeitkonstante

### **verwendete Indizes**

ad	Adsorbat
c	engl. cover: Deckschicht, Deckmedium
eff	$n_{eff}$ : effektiver Brechungsindex, $d_{eff}$ : effektive Wellenleiterdicke, $n_{eff,au\ddot{a}u\ddot{e}n/innen}$ : effektiver Brechungsindex au\ddot{a}u\ddot{e}r(/inner-)halb des Streifenwellenleiters, $n_{eff,ges}$ : effektiver Gesamtbrechungsindex nach der Methode des effektiven Brechungsindex
f	engl. film: Wellenleiter
s	engl. substrate: Substrat

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Langmuir-Modell von Gast-Wirt-Wechselwirkungen .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>Optik dünner Schichten .....</b>	<b>10</b>
2.2.1	Licht an einer Grenzfläche.....	11
2.2.2	Schichtwellenleiter.....	12
2.2.3	Streifenwellenleiter .....	16
2.2.4	Kopplungsverfahren.....	17
2.2.4.1	Prismenkopplung.....	17
2.2.4.2	Gitterkopplung .....	18
2.2.4.3	Stirnflächenkopplung .....	19
2.2.5	Oberflächen-optische Sensorik dünner Filme.....	20
2.2.5.1	Wellenleiterspektroskopie.....	21
2.2.5.2	Wellenleiter-Interferometrie .....	22
2.2.5.3	Oberflächenplasmonen-Spektroskopie .....	24
2.2.5.4	Zusammenfassung und Vergleich .....	25
<b>3</b>	<b>KONZEPTION, HERSTELLUNG UND ERPROBUNG DES INTEGRIERT- OPTISCHEN MACH-ZEHNDER-INTERFEROMETERS .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Konzeption.....</b>	<b>27</b>
3.1.1	Dimensionierung des Wellenleiters .....	28
3.1.2	Das Mach-Zehnder-Interferometer und seine Bauelemente .....	31
3.1.2.1	Wellenleiterübergänge (Taper) .....	31
3.1.2.2	Y-Verzweiger .....	32
3.1.2.3	Krümmen .....	34
3.1.2.4	Mach-Zehnder-Interferometer.....	35
<b>3.2</b>	<b>Herstellung.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Experimenteller Aufbau.....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Optik .....	38
3.3.2	Fluidik.....	40
<b>3.4</b>	<b>Erprobung und Auswertung des Meßsignals.....</b>	<b>41</b>
3.4.1	Refraktive Messungen an Salzlösung .....	41
3.4.2	Anpassung einer Sinuskurve an das Meßsignal.....	43
3.4.3	Direkte Umrechnung – Arcussinusverfahren.....	44

3.4.4	Vergleich der beiden Auswertungsmethoden.....	45
<b>3.5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>SILANISIERUNG OXIDISCHER OBERFLÄCHEN.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Reaktionsschema .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Oberflächen-Aktivierung.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Durchführung der Silanisierung.....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Silanadsorption.....</b>	<b>54</b>
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>GAST-WIRT-WECHSELWIRKUNGEN AN IMMOBILISIERTEN CYCLODEXTRINEN .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1</b>	<b>Cyclodextrine.....</b>	<b>57</b>
<b>5.2</b>	<b>Substanzen und Präparation.....</b>	<b>58</b>
5.2.1	Substanzen.....	58
5.2.1.1	Substanzen zur Immobilisierung von $\beta$ -Cyclodextrin.....	58
5.2.1.2	Gastsubstanzen .....	60
5.2.2	Präparation und Versuchsdurchführung.....	61
<b>5.3</b>	<b>Cyclodextrin an oxidischen Oberflächen - experimentelle Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
5.3.1	Adsorption von $\beta$ -Cyclodextrin .....	62
5.3.2	Adsorption von Gastmolekülen.....	64
5.3.2.1	Adamantancarbonsäure .....	65
5.3.2.2	4-tert.-Butyl-Benzoesäure.....	72
5.3.2.3	Methylorange.....	73
5.3.2.4	Wellenlängenabhängige Beobachtung der Methylorange-Adsorption...	74
<b>5.4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>UNTERSUCHUNG VON ANTIKÖRPER-ANTIGEN-REAKTIONEN AN IMMOBILISIERTEN ANTIKÖRPERFRAGMENTEN.....</b>	<b>79</b>
<b>6.1</b>	<b>Verwendete Substanzen.....</b>	<b>80</b>
6.1.1	Biotin und Streptavidin .....	80
6.1.2	Biotinderivate zur Funktionalisierung von Oberflächen.....	81
6.1.3	Biologische Komponenten .....	86
6.1.3.1	Monoklonale Antikörperfragmente .....	86

6.1.3.2	Antigen 1: TSH (thyroid stimulating hormone).....	87
6.1.3.3	Antigen 2: hCG (human chorionic gonadotropin) .....	87
<b>6.2</b>	<b>Immunoassay auf der Basis von Biotinsilanen und Streptavidin – experimentelle Ergebnisse.....</b>	<b>88</b>
6.2.1	Silanadsorption .....	88
6.2.2	Streptavidin-Adsorption an unterschiedliche Biotinsilanschichten .....	88
6.2.2.1	Laterale Biotin-Verdünnung .....	88
6.2.2.2	Einfluß des verwendeten Silans auf die Streptavidinadsorption.....	90
6.2.2.3	Reversible Streptavidin-Adsorption auf Desthiobiotinsilane.....	90
6.2.2.4	Charakterisierung von Streptavidin-Adsorbaten (WaMS, AFM) .....	91
6.2.3	Adsorption von Antikörperfragmenten.....	95
6.2.4	Antikörper-Antigen-Wechselwirkung .....	96
6.2.4.1	Kinetische Analyse der Antigen-Adsorption .....	97
6.2.4.2	Antigen-Adsorption aus verdünnten Lösungen - Nachweisgrenze.....	98
<b>6.3</b>	<b>Adsorption farbstoffmarkierter Proteine, simultaner Nachweis durch Fluoreszenz .....</b>	<b>100</b>
<b>6.4</b>	<b>Funktionalisierung von Wellenleitern durch CVD-Gold und Biotinthiole .....</b>	<b>104</b>
6.4.1	Erstellung goldfunktionalisierter Wellenleiter.....	105
6.4.2	Nachweis spezifischer Proteinbindung an das Substrat.....	106
<b>6.5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>109</b>



# 1 Einleitung

Die Einführung technischer Systeme hat der Biologie, Medizin und Pharmazie einen rapiden Fortschritt ermöglicht [EXP99]. Ein besonders prominentes Beispiel dieser Verknüpfung von Technik und Biologie ist das *Human Genome Project*, in dem das gesamte menschliche Genom entschlüsselt werden soll. Besondere Bedeutung für diese, aber auch für andere Anwendungen, wie beispielsweise in der Umweltanalytik oder der medizinischen Diagnostik, kommt dabei den Detektionseinheiten zu, den *Biosensoren*.

Biosensoren können als Schnittstelle zwischen lebender Welt und Technik verstanden werden. Sie beinhalten meist ein biologisches System, das durch einen Signalwandler ausgelesen werden kann. Dabei wird das biologische System häufig durch chemische Präparation für ein physikalisches Meßprinzip zugänglich gemacht, meist erfolgt der Nachweis optisch oder elektrisch.

Häufig besteht die Aufgabe eines Biosensors darin, das Vorkommen eines bestimmten Stoffes (Analyt) in einer Lösung nachzuweisen. Beispiele dafür sind

- eine bestimmte Abfolge von DNA-Sequenzen im Erbgut,
- ein Umweltgift im Abwasser,
- ein bestimmtes Protein in einer Körperflüssigkeit, das beispielsweise auf eine Krankheit hindeutet.

Besonders wichtige Eigenschaften eines solchen Biosensors sind *Sensitivität* und *Selektivität*. Sensoren mit hoher Sensitivität können auch noch sehr kleine Analytmengen nachweisen. Selektivität ist wichtig, damit der Sensor möglichst nur auf ein, vor der Messung wählbares, Analyt anspricht.

Ein besonders häufig verfolgter Ansatz für die Biosensorik sind Reaktionen nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip, wobei ein Analyt mit Hilfe von spezifisch bindenden Wirtmolekülen wie komplementären DNA-Sequenzen oder Antikörpern einer Beobachtung zugänglich gemacht wird. Der spezifische Schlüssel-Schloß- oder Gast-Wirt-Komplex läßt sich durch unterschiedliche Methoden nachweisen. Häufig werden Rezeptormoleküle auf einem festen Substrat immobilisiert, da sie dort besonders gezielt verschiedenen Lösungen ausgesetzt werden können. Zum Nachweis des Wirt-Gast-Komplexes werden die nachzuweisenden Gastmoleküle bei einem herkömmlichen Nachweisverfahren radioaktiv (z.B.  $^{125}\text{I}$ ) oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. An der Oberfläche lassen sich die markierten Gast-Wirt-Komplexe leicht mit physikalischen Methoden nachweisen. Die Markierung der Analytmoleküle ist jedoch aufwendig und kann zudem die Gast-Wirt-Wechselwirkung beeinflussen.

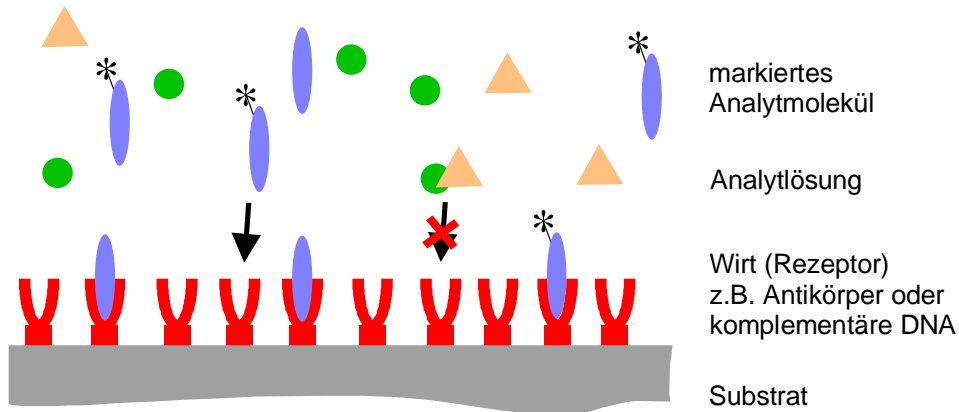


Abbildung 1-1: spezifische Adsorption von Analytmolekülen an eine Sensoroberfläche

Optische Wellenleiter-Sensoren detektieren die Änderung der Brechungsindexverteilung in der Nähe einer Oberfläche. Daher ist es mit Hilfe von Wellenleitersensorik möglich, Gast-Wirt-Komplexe auch ohne Markierung nachzuweisen. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Erprobung und Weiterentwicklung eines im Institut für Mikrotechnik in Mainz (IMM) entwickelten interferometrischen Wellenleitersensors [BRO97], einem integriert-optischen Mach-Zehnder-Interferometer mit Wellenleitern aus Siliziumoxinitrid.

Dabei war zum einen durch Optimierung von Wellenleiter und Meßaufbau die Sensitivität, zum anderen durch gezielte, flexible Oberflächenfunktionalisierung die Selektivität zu verbessern. Dementsprechend gliedert sich auch diese Arbeit in zwei Teile: Sensorik, und Oberflächenfunktionalisierung. Zunächst wird nach einem Grundlagenkapitel (Kapitel 2) das Interferometer eingeführt sowie die entscheidenden Einflüsse auf die Sensitivität diskutiert (Kapitel 3). Danach werden unterschiedliche Schichtsysteme, basierend auf Organosilanen (Kapitel 4) charakterisiert.

Zunächst wird ein einfaches Modell-Gastmolekül, das  $\beta$ -Cyclodextrin untersucht (Kapitel 5). Anschließend werden mehrere biologische Wirtmoleküle betrachtet, das Streptavidin und zwei unterschiedliche Antikörperfragmente.

*Streptavidin* bindet unterschiedlich stark verschiedene Gastmoleküle, besonders stark das Molekül *Biotin*. Streptavidin wird an verschiedenen funktionalisierte Oberflächen adsorbiert und charakterisiert. Abschließend wird eine Beschichtung für die mögliche Anwendung des Interferometers als Biosensor vorgestellt. Als Analyte werden zwei körpereigene Hormone untersucht, die relevant für eine medizinische Anwendung sind. Als Wirtmoleküle zum Nachweis der beiden Analytmoleküle werden monoklonale Antikörperfragmente der beiden Hormone verwendet (Kapitel 6).

## 2 Grundlagen

### 2.1 Langmuir-Modell von Gast-Wirt-Wechselwirkungen

Adsorptionsexperimente auf Festkörperoberflächen (Abbildung 2-1) werden meist mit Hilfe der Langmuir-Modells [LAN18] interpretiert. Das Modell ist gültig unter folgenden Annahmen:

1. Auf dem Substrat gibt es diskrete Bindungsstellen, an die Moleküle binden.
2. Alle Bindungsstellen sind gleich und unabhängig voneinander.
3. Jede Bindungsstelle kann nur ein Molekül binden.
4. Die Adsorptiv-Lösung bildet einen unendlich großen Halbraum, ihre Konzentration bleibt konstant.

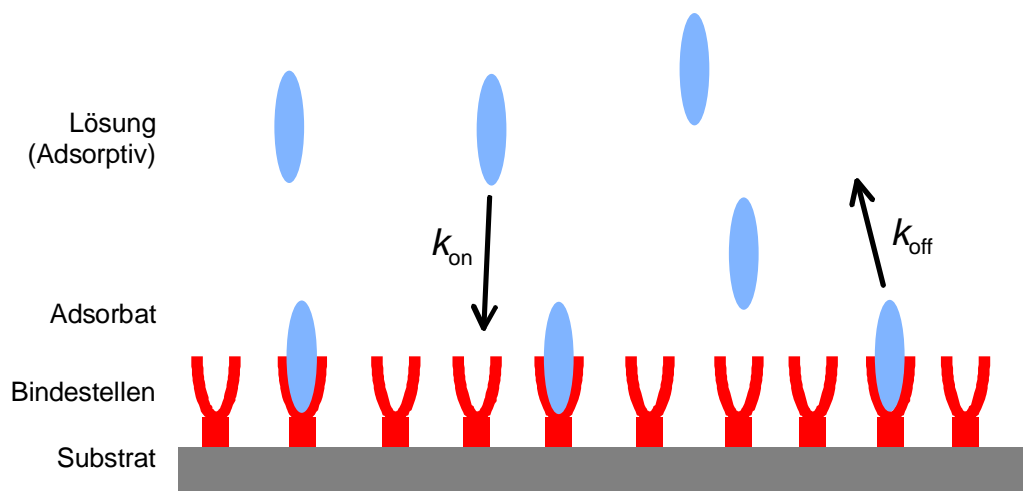
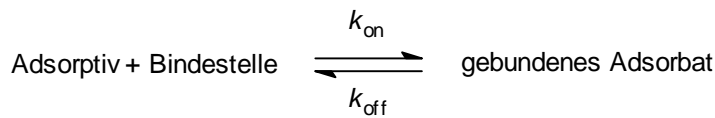


Abbildung 2-1: Langmuir-Modell einer Adsorption an Bindungsstellen auf einer Oberfläche

Das Langmuir-Modell ist eine Anwendung einfacher kinetischer Modelle, in dem sich ein Reaktionspartner als Bindestelle auf der Oberfläche, der andere in der Gasphase oder in Lösung darüber befindet. Mit Hilfe der vierten vorgestellten Annahme ergibt sich daraus direkt, daß das Adsorptiv im Überschuß vorhanden ist<sup>1</sup>. Man kann diese Reaktion zweiter Ordnung also als Reaktion pseudo-erster Ordnung auffassen und erhält als Reaktions- und Ratengleichungen

---

<sup>1</sup> Diese Bedingung gilt in guter Näherung, da man die Anzahl der Bindestellen mit der Anzahl der Moleküle in der gesamten Lösung vergleicht.



$$\frac{\partial \Theta}{\partial t} = c k_{\text{on}} (1 - \Theta) - k_{\text{off}} \Theta. \quad (2-1)$$

Dabei sind  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  die Adsorptions- bzw. Desorptionsrate,  $c$  die Konzentration des Adsorptivs und  $\Theta$  der relative Anteil belegter Bindungsstellen (Bedeckungsgrad).

Die Oberflächenbedeckung  $\Theta(c, t)$  resultiert aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption. Nullsetzen der Differentialgleichung (2-1, unten) liefert die Gleichgewichtsbedeckung

$$\Theta_{\infty}(c) = \frac{K c}{1 + K c} \quad (2-2)$$

mit der Gleichgewichtskonstanten  $K = k_{\text{on}} / k_{\text{off}}$ . Gleichung (2-2) bezeichnet man als *Langmuir-Isotherme* (Abbildung 2-2).  $\Theta$  konvergiert für große Konzentrationen gegen  $\Theta_{\infty} = 1$ , die Hälfte dieser Bedeckung der Oberfläche wird bei  $c = K^{-1}$  erreicht (Halbsättigungskonzentration).

Zeitabhängig lautet die Lösung von Gleichung (2-1) bei einer plötzlichen Änderung der Adsorptivkonzentration

$$\Theta(t) = \Theta_{\infty} + (\Theta_{\infty} - \Theta_0) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad \text{mit} \quad \frac{1}{\tau} = c k_{\text{on}} + k_{\text{off}}. \quad (2-3)$$

Dabei ist  $\Theta_0$  der Bedeckungsgrad bei  $t = 0$ ,  $\Theta_{\infty}$  der Endwert des Bedeckungsgrades nach (2-2). Anschaulich ausgedrückt bedeutet dies, daß bei einer Änderung der Konzentration  $c$  der neue Gleichgewichtszustand durch eine exponentiell verlaufende Kinetik mit der Zeitkonstante  $\tau$  erreicht wird. Für Desorption in eine adsorptivfreie Phase ist die Zeitkonstante  $\tau_{\text{de}} = 1 / k_{\text{off}}$  (wegen  $c = 0$ ). Bemerkenswert ist, daß bei Adsorptionen aus sehr geringen Konzentrationen die Zeitkonstante der Adsorption gegen  $\tau_{\text{ad}} = 1 / k_{\text{off}}$  konvergiert und nicht, wie man annehmen könnte, immer kleiner wird.

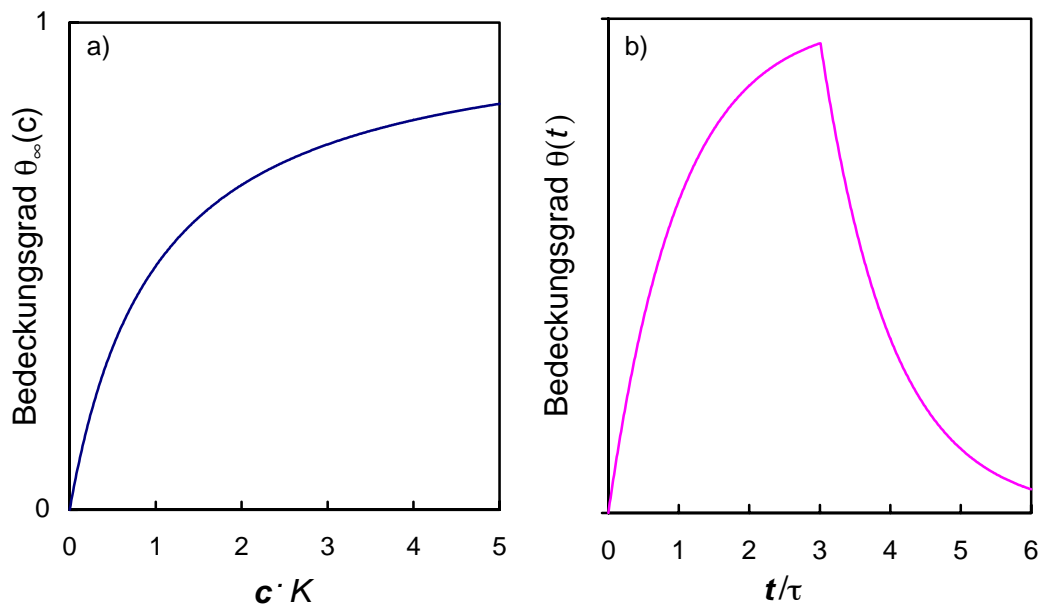


Abbildung 2-2: normierte Langmuir-Isotherme (a) und normierte Langmuir-Kinetik mit Ad- und Desorption (b)

Um die Bindungskonstante  $K$  im Experiment zu bestimmen, gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten:

- Zum einen kann man aus verschiedenen Konzentrationen adsorbieren und die resultierenden Wertepaare aus Gleichgewichtsbedeckungsgrad und Konzentration in einer Langmuir-Isotherme auftragen. Man erhält  $K$  als Anpassungsparameter aus Gleichung (2-2) (s. Abbildung 2-2 a)).
- Zum anderen kann man Gleichung (2-3) verwenden, um Kinetikkurven (Abbildung 2-2 b) zu beschreiben und daraus  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  bestimmen. Man erhält dann direkt  $K = k_{\text{on}} / k_{\text{off}}$ . Dabei ist allerdings zu beachten, daß es schwierig ist, die Konzentration stufenförmig zu ändern. Bei größeren Küvettenvolumen ist die Adsorptionskinetik häufig diffusionsbegrenzt [TOV95]. Nach dem einmaligen Austausch der Lösung verringert sich die Konzentration in der Nähe der Oberfläche und erholt sich durch Diffusion. Bei kleinen Küvettenvolumen und ständigem Spülen mit frischer Lösung ist kein diffusionsbegrenzt Kinetikverhalten meßbar. Ein erhöhter Aufwand sowie mögliche Probleme durch Luftblasen in der Küvette müssen allerdings dafür in Kauf genommen werden.

Bei idealem Langmuir-Verhalten ergeben beide Verfahren gleiche Werte der Bindungskonstante  $K$ .

## 2.2 Optik dünner Schichten

Im folgenden Abschnitt wird erläutert, wie entlang einer Oberfläche geführtes Licht Aufschluß über die Anlagerung von molekular dünnen Filmen geben kann. Zunächst wird das Verhalten von Lichtwellen an einer Grenzfläche betrachtet. Danach werden Systeme eingeführt, die aus mehreren aneinandergrenzenden Schichten unterschiedlichen Materials bestehen. Die Grenzflächen zwischen den einzelnen Materialien sollen dabei zueinander parallele Ebenen sein. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind Lichtwellenleiter - eine Schicht, die einen höheren Brechungsindex als die umgebenden Medien hat. Innerhalb dieses Wellenleiters kann Licht durch wiederholte Totalreflexion am Verlassen des Wellenleiters gehindert werden.

Nachfolgend sollen lineare, homogene, isotrope Medien ohne Dämpfung betrachtet werden. Ladungen und Ströme werden vernachlässigt. Es ergibt sich aus den Maxwell-Gleichungen die sogenannte *Wellengleichung*:

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{1}{\epsilon_r \epsilon_0 \mu_0} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0 \quad (2-4)$$

Dabei kann statt des elektrischen Feldes  $\mathbf{E}$  auch das magnetische Feld  $\mathbf{H}$  stehen. Als Lösung dieser Gleichung ergeben sich die elektromagnetischen Wellen:

$$\begin{aligned} \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) &= \mathbf{E}_0 \exp[i(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})] \\ \mathbf{H}(\mathbf{r}, t) &= \mathbf{H}_0 \exp[i(\omega t - \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})] \end{aligned} \quad (2-5)$$

Dabei ist  $\mathbf{k}$  der Wellenvektor in Ausbreitungsrichtung der Welle und  $\omega$  die Kreisfrequenz mit  $\omega = c |\mathbf{k}|$ . Die Ausbreitungsgeschwindigkeit  $c$  der elektromagnetischen Welle ist nach der Wellengleichung (2-4)

$$c = \sqrt{\frac{1}{\epsilon_r \epsilon_0 \mu_0}}. \quad (2-6)$$

Das Verhältnis zwischen der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum  $c_0$  zu der im betrachteten Medium wird als Brechungsindex  $n = c_0/c = \epsilon_r^{1/2}$  bezeichnet. Die Wellenlänge beträgt  $\lambda = 2\pi/|\mathbf{k}|$ . Im Bereich  $\lambda \in [0,1 \mu\text{m}, 1000 \mu\text{m}]$  nennt man elektromagnetische Wellen Licht [z.B. KNO95].

Es existieren jeweils zwei orthogonale Lösungen der Wellengleichung, die unterschiedlichen Polarisierungen. In Anwesenheit einer Grenzfläche werden sie üblicherweise als TE bzw. TM-Polarisation<sup>2</sup> bezeichnet (transversal elektrisch oder transversal magnetisch s. Abbildung 2-3), je nachdem, ob das elektrische oder das magnetische Feld senkrecht zur Einfallsebene liegt. Im folgenden wird aus Gründen der Übersichtlichkeit

---

<sup>2</sup> Gebräuchliche Bezeichnungen sind ebenfalls s-Polarisation (TE, elektrisches Feld senkrecht zur Einfallsebene) und p-Polarisation (TM, elektrisches Feld parallel zur Einfallsebene).

häufig nur TE-Polarisation betrachtet. Für die allgemeine Darstellung sei auf die Lehrbücher verwiesen [ADA81, HUN84, KAR91, TAM82].

### 2.2.1 Licht an einer Grenzfläche

Betrachtet man nun ein System aus zwei Schichten, so ergibt sich eine Grenzfläche. Wegen der Impulserhaltung kann Licht, das auf diese Grenzfläche trifft, nur in jeweils eine Richtung transmittiert oder reflektiert werden.

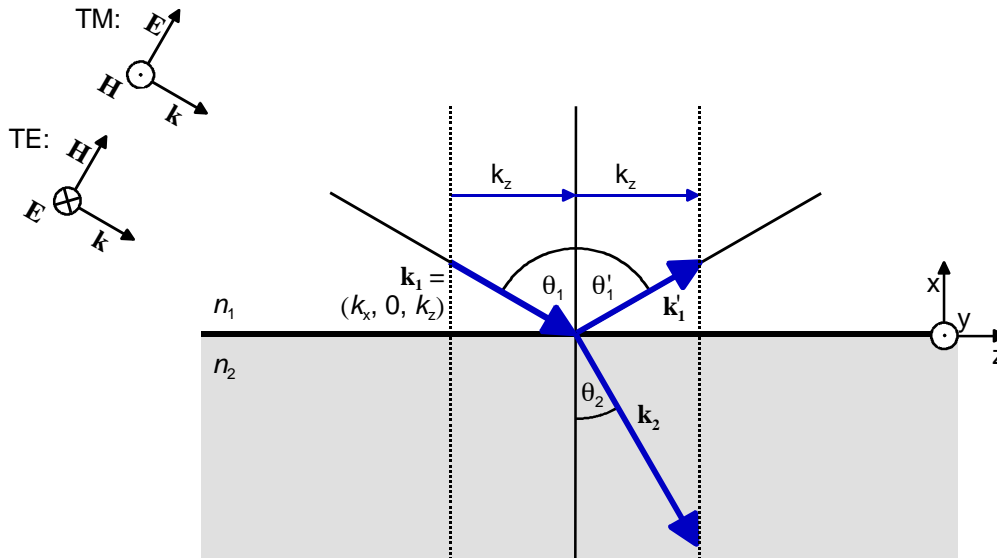


Abbildung 2-3: Licht an einer Grenzfläche (strahlenoptisch)

Wegen Impulserhaltung bleibt  $k_z$  unverändert, somit folgt  $\theta_1 = \theta_1'$  (Einfallswinkel = Ausfallswinkel) sowie das *Snellius'sche Brechungsgesetz*:

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2) \quad (2-7)$$

Betrachtet man den Übergang von optisch dichterem in optisch dünneres Medium, kann für  $n_1 \sin(\theta_1) > n_2$  kein Winkel  $\theta_2$  gefunden werden, der das Brechungsgesetz erfüllt. Folglich wird bei Winkeln  $> \theta_g$  das gesamte Licht reflektiert (*Totalreflexion*):

$$\sin(\theta_g) = n_2 / n_1 \quad (2-8)$$

Mit Hilfe der *Fresnel'schen Gleichungen* läßt sich der Transmission- sowie der Reflexionsgrad berechnen. Für Winkel  $\theta > \theta_g$  folgt daraus in x-Richtung eine imaginäre Wellenzahl  $k_x$ . Für die transmittierte Welle  $\mathbf{E}_t \sim \exp[i(\omega t - \mathbf{k}_t \cdot \mathbf{r})]$  bedeutet das, daß das transmittierte Feld senkrecht zu Oberfläche exponentiell gedämpft ist. Dieses exponentiell abfallende Feld nennt man evaneszentes Feld. Die Abklinglänge  $1/\gamma$  im Medium 2 beträgt

$$\gamma = k_0 \sqrt{n_1^2 \sin^2(\theta) - n_2^2} . \quad (2-9)$$

Das Feld wird also wegen der Totalreflexion nicht als laufende Welle transmittiert, dringt jedoch auch bei Totalreflexion in das Medium 2 ein.

### 2.2.2 Schichtwellenleiter

Nun führt man eine zweite Grenzfläche (Abbildung 2-4) mit einem dritten dielektrischen Medium ein ( $n_f > n_2 \geq n_1$ ). Die Dicke der Schicht  $d$  wird für die folgende strahlenoptische Beschreibung zunächst als makroskopisch angenommen ( $d \gg \lambda$ ). Neben dem einfachen transmittierten und reflektierten Wellen existiert in der hochbrechenden Mittelschicht eine Ausbreitungsform, in der das Licht durch fortgesetzte Totalreflexion innerhalb der mittleren Schicht geführt wird. Man bezeichnet die mittlere Schicht daher als Schichtwellenleiter.

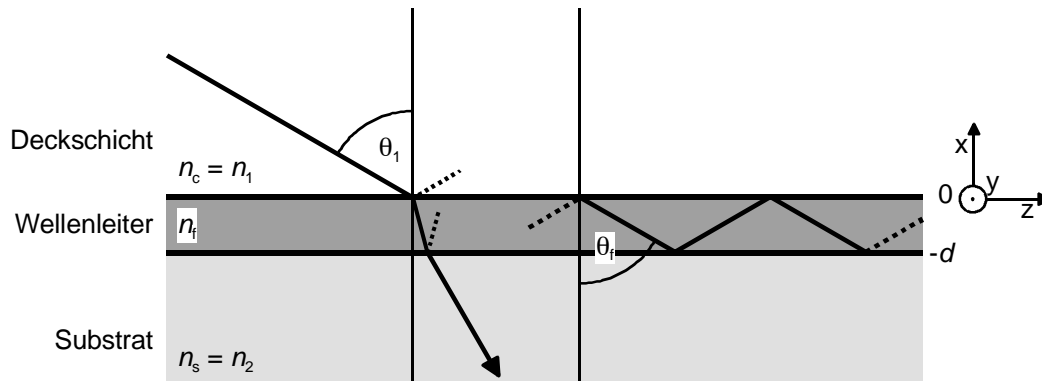


Abbildung 2-4: Mögliche Strahlengänge in einem Schichtwellenleiter; links: ungeführtes Licht, rechts: durch wiederholte Totalreflexion geführtes Licht

Das Licht ist allerdings im Wellenleiter nicht in allen Winkeln  $\theta < \theta_g$  ausbreitungsfähig. Es muß hingegen beachtet werden, daß sich die Wellenfronten eines an beiden Seiten des Wellenleiters reflektierten Strahls konstruktiv mit den Wellenfronten des ursprünglichen Strahls überlagert. Licht breitet sich also nur in endlich vielen, diskreten Winkeln  $\theta_f$  innerhalb des Wellenleiters aus. Eine solche Ausbreitungsform nennt man geführte Mode. Die Bedingung der konstruktiven Überlagerung wird durch die *charakteristische Gleichung* beschrieben (2-10). Sie besagt, daß die Phasenverschiebung durch geometrische Wegunterschiede  $\delta_{\text{geo}}$  zusammen mit den Phasenverschiebungen durch Totalreflexion an den Grenzflächen zu Substrat  $\phi_{f,s}$  und Deckmedium  $\phi_{f,c}$  ein ganzzahliges Vielfaches von  $2\pi$  ergeben muß:

$$\delta_{\text{geo}} + \phi_{f,s} + \phi_{f,c} = 2\pi\mu \quad \text{mit } \mu = 0, 1, 2, \dots \quad (2-10)$$

Den Index  $\mu$  bezeichnet man als Modennummer, der Winkel  $\theta_f(\mu) \equiv \theta_\mu$  steigt mit der Modennummer, die Mode für  $\mu = 0$  bezeichnet man als Grundmode.

Äquivalent zu den diskreten, ausbreitungsfähigen Winkeln läßt sich auch die Wellenzahl der geführten Wellen  $\beta$  in Ausbreitungsrichtung ( $z$ ) angeben. Für die strahlenoptische Betrachtung gilt:

$$\beta_\mu = k_0 n_f \sin(\theta_\mu) \quad (2-11)$$

Entsprechend dem Volumenbrechungsindex läßt sich auch ein "effektiver Brechungsindex"  $n_{\text{eff}}$  der Wellenleitermoden definieren, der angibt, um welchen Faktor die Wellenleitermode im Verhältnis zur Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c_0$  verzögert ist:

$$n_{\text{eff}} = c_0 / c = \beta / k_0 \quad (2-12)$$

Aus Gleichung (2-10) läßt sich für dicke Wellenleiter ( $d_f \gg \lambda$ ) eine Bestimmungsgleichung der ausbreitungsfähigen Moden finden. Betrachtet man allgemeiner auch dünne Wellenleiter, dann ist es zweckmäßig, das Problem allgemeiner zu betrachten. Das durch die Totalreflexion auftretende evaneszente Feld bewirkt, daß der Wellenleiter breiter wirkt als die Dicke der hochbrechenden Schicht. Für die wellenoptische Betrachtung stellt man sich die geführte Mode in x-Richtung als stehende Welle vor. Die Abhängigkeit von z und der Zeit kann absepariert werden. Daher macht man für die Feldverteilungen  $E_y(x)$  folgenden Ansatz (TE-Polarisation):

$$E_y(x) = \begin{cases} A \exp(\gamma_s x) & x \leq -d \quad (\text{Substrat}) \\ B \cos(k_x x) + C \sin(k_x x) & x \in [-d; 0] \quad (\text{Wellenleiter}) \\ D \exp(-\gamma_c x) & x \geq 0 \quad (\text{Deckschicht}) \end{cases} \quad (2-13)$$

$1/\gamma_s$  und  $1/\gamma_c$  sind dabei die Abklinglängen des evaneszenten Feldes der geführten Mode in Substrat und Deckmedium (s. Gleichung (2-9)),  $k_x$  ist die Wellenzahl der geführten Mode in x-Richtung.

$$\begin{aligned} \gamma_s &= k_0 \sqrt{n_{\text{eff}}^2 - n_s^2} \\ \gamma_c &= k_0 \sqrt{n_{\text{eff}}^2 - n_c^2} \\ k_x &= k_0 \sqrt{n_f^2 - n_{\text{eff}}^2} \end{aligned} \quad (2-14)$$

Aus den Anschlußbedingungen des elektrischen sowie des magnetischen Feldes lassen sich die Komponenten A bis D aus (2-13) bestimmen. Daraus folgt zum einen die effektive Dicke  $d_{\text{eff}} = d_f + 1/\gamma_s + 1/\gamma_c$  und die Feldverteilung (Abbildung 2-6), zum anderen eine Bedingung für die Wellenausbreitung, die *Dispersionsrelation* (für  $\text{TE}_\mu$ -Moden des Schichtwellenleiters):

$$\tan(k_x d - \mu\pi) = \frac{k_x (\gamma_s + \gamma_c)}{k_x^2 - \gamma_s \gamma_c} \quad (2-15)$$

Dies ist die Bestimmungsgleichung für den effektiven Brechungsindex  $n_{\text{eff}}$  des Schichtwellenleiters. Analog zu (2-13) läßt sich auch ein Gleichungssystem für  $H_y$  aufstellen ( $\text{TM}_\mu$ -Moden). Auch hier läßt sich durch Einsetzen der Randbedingungen eine Eigenwertgleichung (Dispersionsrelation) aufstellen:

$$\tan(k_x d - \mu\pi) = \frac{n_f^2 k_x (n_c^2 \gamma_s + n_s^2 \gamma_c)}{n_c^2 n_s^2 k_x^2 - n_f^4 \gamma_s \gamma_c} \quad (2-16)$$

Für beide Gleichungen (2-15) und (2-16) existieren wegen der Periodizität des Tangens von  $(k_x d - \mu\pi)$  mehrere Lösungen.

Die Dispersionsrelationen sind nicht analytisch lösbar. Als Randbedingung gilt, daß der effektive Brechungsindex größer ist als die Brechungsindizes der Randbereiche, jedoch kleiner als der Brechungsindex des Wellenleiters. Zur Lösung einer solchen Eigenwertgleichung trägt man systematisch für die effektiven Brechungsindizes die Differenz der beiden Seiten der Gleichung auf ("Fehler der Gleichung", Abbildung 2-5). Die Nullstellen dieser Darstellung sind die Lösungen der Eigenwertgleichung.

Abbildung 2-5 zeigt die TE-Dispersionsrelation für einen Beispielwellenleiter ( $n_f = 2$ ,  $d = 1 \mu\text{m}$ ) auf Glas ( $n_s = 1,46$ ) an Luft ( $n_c = 1$ ). Dieser Wellenleiter führt fünf TE-Moden mit effektiven Brechungsindizes zwischen  $n_{\text{eff}} = 1,476$  und  $1,980$ .

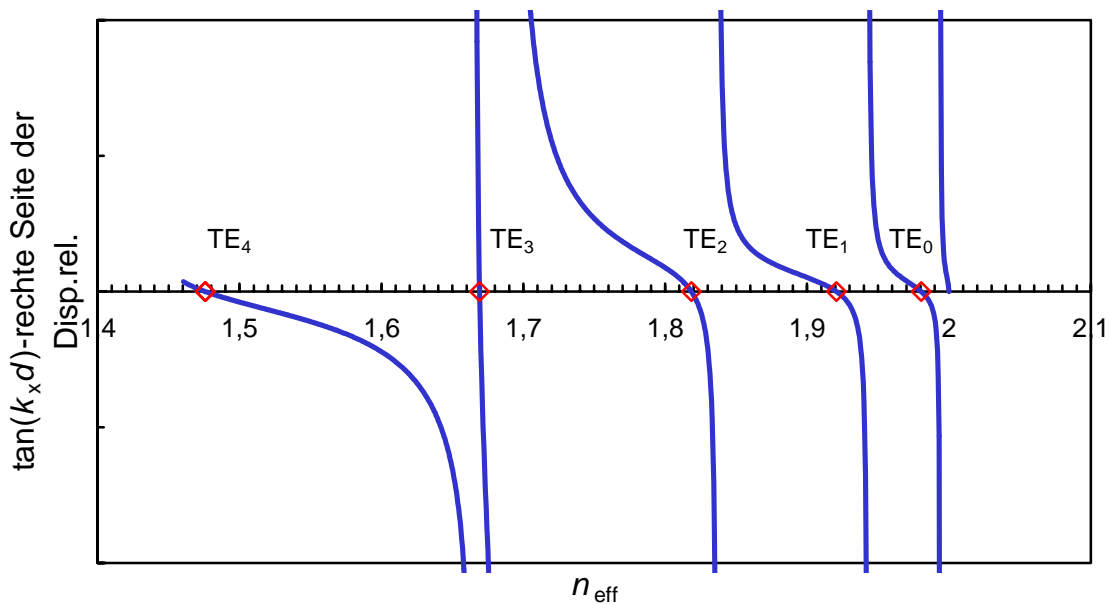


Abbildung 2-5: Numerische Lösung der Dispersionsrelation für ein ausgewähltes Beispiel ( $n_s = 1,46$ ,  $n_f = 2$ ,  $n_c = 1$ ,  $d = 1 \mu\text{m}$ ,  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ )

Betrachtet man die Feldverteilung der vier Moden des Beispielwellenleiters (Abbildung 2-6), so sieht man exemplarisch einige Effekte, die auch allgemeine Gültigkeit besitzen:

- Die Modennummer  $\mu$  gibt an, wieviele Knoten die Feldverteilung der Mode aufweist.
- Die Ausdehnung des evaneszenten Feldes sinkt mit dem effektiven Brechungsindex, steigt also mit der Modenzahl.
- Das evaneszente Feld reicht weiter in das Medium mit dem höheren Brechungsindex hinein.

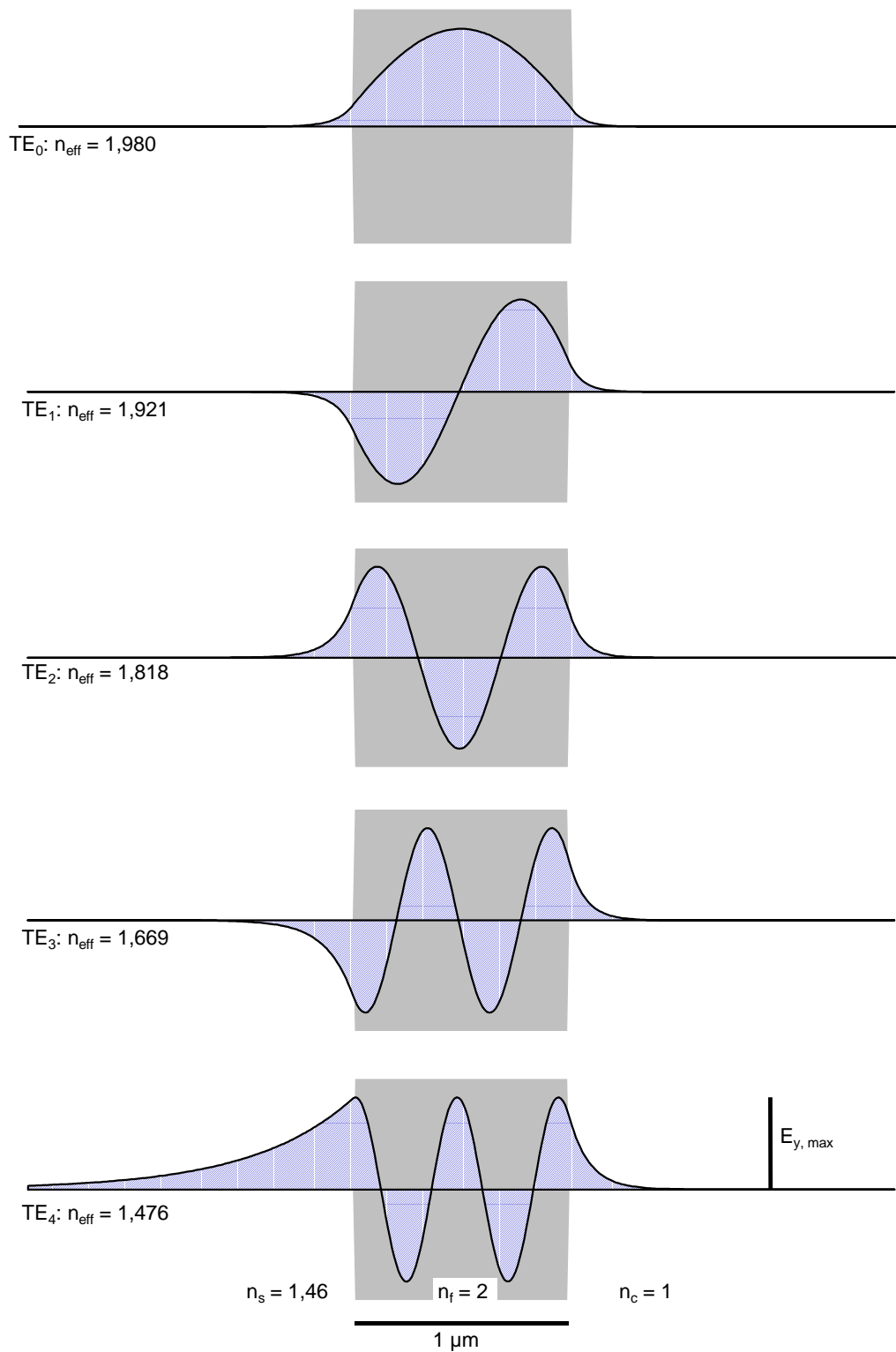


Abbildung 2-6: Feldverteilung von fünf Moden bei einem Beispielwellenleiter

Nimmt man eine vierte Schicht hinzu, so ist es auf ähnliche Art möglich, eine Dispersionsrelation dieses sog. *Vierschichtwellenleiters* zu bestimmen [KAR91].

Systeme vieler paralleler Schichten lassen sich mit Hilfe der Transfer-Matrix-Methode beschreiben [z.B. WEI98, KAR91]. Allgemein, auch in drei Dimensionen, kann eine Simulation mit der Bündelverfolgung (engl. **beam propagation method**, BPM) durchgeführt werden.

Die Herstellung von Wellenleitern kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Einige davon sind:

- Aufschleudern eines Polymerfilmes
- Vakuumbeschichtungsmethoden:
  - thermisches Aufdampfen
  - chemische Dampfabcheidung (engl. **chemical vapor deposition**, CVD)
  - Sputtern
- Ionenaustausch

### 2.2.3 Streifenwellenleiter

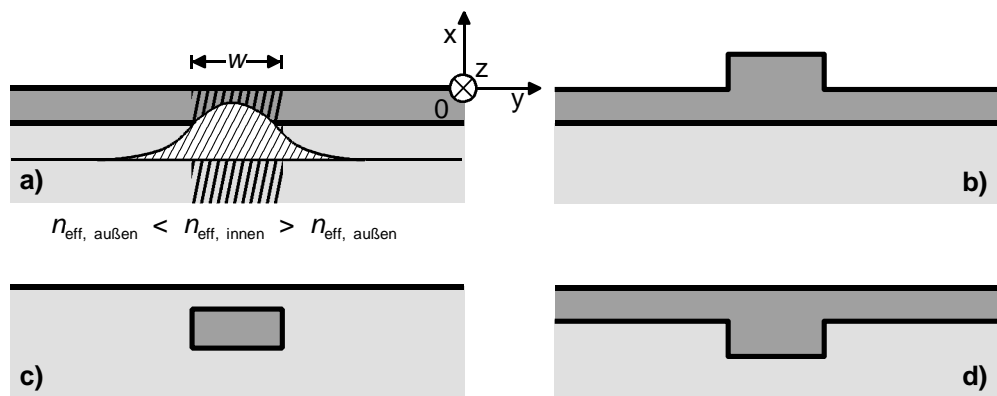


Abbildung 2-7: Querschnittsformen ausgewählter Streifenwellenleiter: a) schematisch, b) Rippenwellenleiter, c) vergrabener Wellenleiter, d) inverser Rippenwellenleiter

Mit Schichtwellenleitern ist es möglich, Licht in einer Dimension räumlich einzuschränken. Für viele Aufgaben ist es jedoch notwendig, das Licht auch lateral (in y-Richtung) zu führen. Dazu verwendet man eine laterale Strukturierung (y-Richtung), die in der Mitte einen höheren Brechungsindex aufweist als in den Außenregionen. Man kann für jede Region mit dem Schichtwellenleiteransatz einen effektiven Brechungsindex berechnen (Innenregion:  $n_{\text{eff, innen}}$ , Außenregion:  $n_{\text{eff, außen}}$ ). Bei  $n_{\text{eff, innen}} > n_{\text{eff, außen}}$  können die Schichtwellenleitermoden durch Totalreflexion in y-Richtung geführt werden.

Mit Hilfe dieser Betrachtungsweise läßt sich auch näherungsweise ein effektiver Gesamtbrechungsindex  $n_{\text{eff, ges}}$  der Struktur berechnen, (Methode des effektiven Brechungsindex). Man berechnet für die innere und äußere Region einen effektiven

Brechungsindex und berechnet mit diesen Brechungsindizes und der Strukturbreite  $w$  einen effektiven Gesamtbrechungsindex. Dabei ist zu beachten, daß der Wellenleiter senkrecht zur Oberfläche betrachtet wird (Führung in  $z$ -Richtung statt in  $x$ -Richtung). Man muß deshalb die jeweils andere Polarisation (z.B. TM statt TE) betrachten als im Schichtwellenleiter.

Abbildung 2-7 zeigt eine Auswahl solcher Streifenwellenleiter-Strukturen. Die Strukturierung erfolgt durch Aufschleudern von Photolack und Belichtung durch eine Maske. Anschließend kann die Struktur, beispielsweise durch Ätzen, übertragen werden. Organische Wellenleiter lassen sich auch direkt durch Belichtung strukturieren [BOC98].

### 2.2.4 Kopplungsverfahren

Wegen der Totalreflektion innerhalb des Wellenleiters muß die Wellenzahl einer geführten Mode  $\beta$  größer sein als die Wellenzahlen propagierender Wellen in Deckmedium und Substrat. Daher ist es nicht ohne weiteres möglich, eine propagierende Welle im Deckmedium an eine Wellenleitermode zu koppeln.

Mechanismen, mit denen es möglich ist, eine propagierende Welle an eine geführte Wellenleitermode zu koppeln, sind Prismen-, Gitter, und Stirnflächenkopplung. Sie werden im folgenden kurz vorgestellt.

#### 2.2.4.1 Prismenkopplung

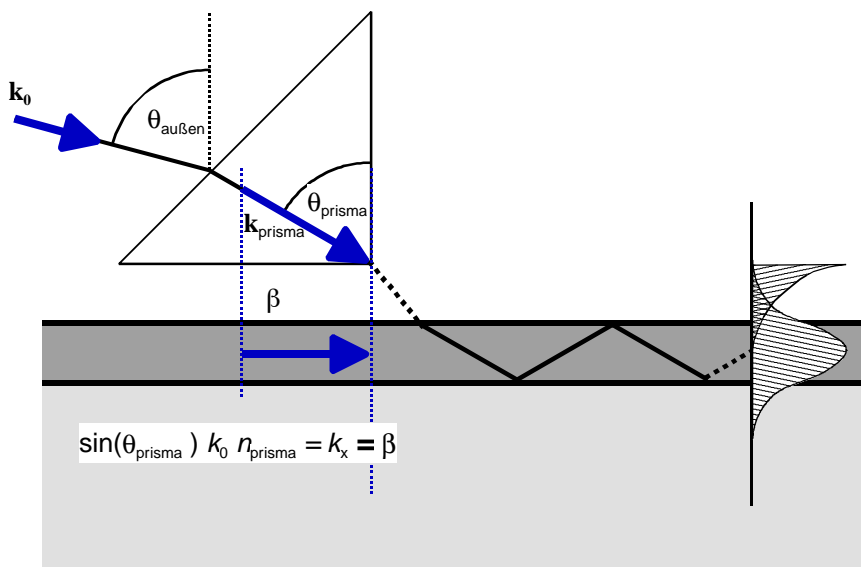


Abbildung 2-8: Prismenkopplung (schematisch)

Läuft die propagierende Welle nicht im Deckmedium, sondern in einem Dielektrikum mit höherem Brechungsindex, so vergrößert sich ihre Wellenzahl. Die  $x$ -Komponente des Wellenvektors kann dadurch gleich groß wie  $\beta$  werden und daher koppeln. Lenkt

man beispielsweise den einzukoppelnden Strahl durch ein Hochindexprisma (Abbildung 2-8) mit  $n_{\text{prisma}} > n_{\text{eff}}$ , so findet man einen Winkel  $\theta$ , bei dem eine Kopplung möglich ist:

$$\sin(\theta_{\text{prisma}}) k_0 n_{\text{prisma}} = k_{x, \text{prisma}} = \beta \quad (2-17)$$

Allerdings kann eine geführte Welle bei diesem Winkel auch auskoppeln. Daher wird das Prisma für die Kopplung meist ohne "index match"-Flüssigkeit an den Wellenleiter angedrückt. An der Unterseite des Prisma entsteht wegen Totalreflexion ein evaneszentes Feld, das durch den Luftspalt zwischen Prisma und Wellenleiter tunneln kann ("frustrierte Totalreflexion"). Wie in einem Richtkoppler koppelt also die Feldverteilung des evaneszenten Feldes der Prismen-Totalreflexion an das evaneszente Feld des Wellenleiters. Die Feldüberlappung und damit die Kopplungsstärke läßt sich durch die Breite des Luftspaltes einstellen.

Zur effizienten Prismenkopplung sind einige Parameter zu justieren:

- Lage des Prisma
- Auftreffpunkt des Strahls im Prisma
- Anpreßdruck (Luftspaltdicke)
- Einkoppelwinkel  $\theta$

Die Kopplung erfordert etwas apparativen Aufwand und Geschick. Prisma und Wellenleiter können bei diesem Kopplungsverfahren durch Verkratzen beschädigt werden.

#### 2.2.4.2 Gitterkopplung

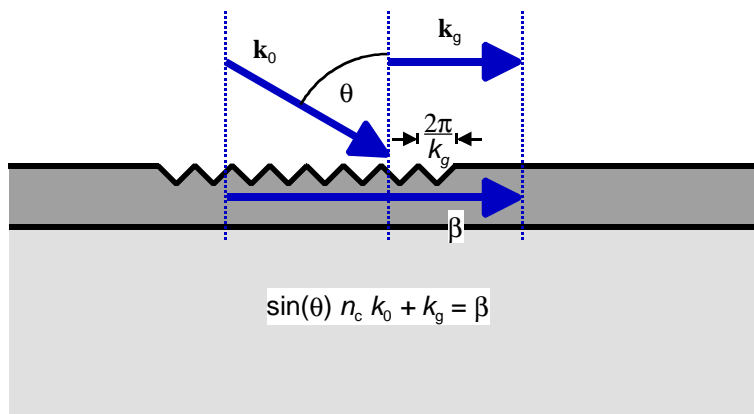


Abbildung 2-9: Gitterkopplung (schematisch)

Die Gitterkopplung beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die Prismenkopplung. Der zu kurze Wellenvektor der einfallenden Welle wird verlängert. In diesem Fall erfolgt die Verlängerung nicht durch einen hohen Brechungsindex sondern durch Beugung.

An einer periodisch modulierten Struktur kann zu einem Lichtwellenvektor nach dem Floquet-Bloch-Theorem ein ganzzahliges Vielfaches  $m$  der Wellenzahl der Modulation  $k_g = 2\pi / \Lambda$  ( $\Lambda$ : Gitterwellenlänge) addiert oder subtrahiert werden (Beugung am Gitter). Kopplung in den Wellenleiter erfolgt nach der Bedingung

$$\sin(\theta) k_0 n_c + m k_g = \beta m = \pm 1, \pm 2, \dots \quad (2-18)$$

Das Licht kann beim gleichen Winkel  $\theta$  auch wieder auskoppeln. Um möglichst viel Licht ein- aber wenig auszukoppeln, kann die Form des Gitters variiert werden (geneigte Gitter). Weiterhin sollte die Gitterform so gestaltet sein, daß möglichst viel Licht in die gewünschte Beugungsordnung  $m$  koppelt. Das Gitter sollte tief genug sein, um eine effektive periodische Störung zu erzielen. Damit das Modenspektrum des Wellenleiters durch das Gitter nicht zu stark beeinträchtigt wird, sollte es nicht zu tief sein.

Die Herstellung von Koppelgittern erfolgt durch Strukturierung von aufgeschleudertem Photolack und anschließendem Ätzen. Die Strukturierung des Photolacks kann durch verschiedene Methoden erfolgen:

- Mit kurzwelligem Laserlicht wird der Photolack durch eine holographische Belichtung strukturiert.
- Es ist auch möglich, optische Gitter mit Hilfe von Masken und Kontaktbelichtung zu erstellen. Die Strukturbreiten sind dabei beugungsbegrenzt.
- Ein durch andere Methoden hergestelltes Gitter läßt sich durch Stempeln in einen erwärmten Photolack- oder allgemeiner Polymerfilm übertragen.

Die Übertragung des Photolackgitters in das Substrat erfolgt naßchemisch oder durch Trockenätzen in einer Ionenätzenanlage. Mit Trockenätzen ist es auch möglich, durch einen schräg einfallenden Ionenstrahl geneigte Gitter herzustellen.

Nach der Fertigung des Gitters ist die Kopplung recht einfach durchführbar. Justiert werden müssen der Koppelwinkel und die Ausrichtung des Substrates (Kippwinkel und Positionierung). Im Gegensatz zur Prismenkopplung erfordern Gitter jedoch recht hohen präparativen Aufwand.

Gitterkopplung und Prismenkopplung haben gemeinsam, daß man mit ihnen nur in Schichtwellenleiter oder breite Streifenwellenleiter koppeln kann. Dadurch ist eine weitere Bündelung des Strahls auf der Wellenleiteroberfläche nötig (durch Taper [BUR77] oder Oberflächenlinsen [DÜB98]).

#### 2.2.4.3 Stirnflächenkopplung

Eine weitere Methode der Kopplung ist es, Licht durch die Stirnfläche des Wellenleiters zu koppeln. Weil Wellenleiter meist eine Ausdehnung von nur wenigen Wellenlängen haben, ist es dafür nötig, das Licht gut zu fokussieren. Für dünne Wellenleiter verwendet man Mikroskopobjektive als Sammellinse. Strahlenoptisch gesehen bietet man dadurch innerhalb des Wellenleiters ein Winkelspektrum an. Die im richtigen Winkel auf den Wellenleiter treffenden Strahlen koppeln. Wellenoptisch koppelt die Feldverteilung des fokussierten Lichts an die Feldverteilung einer Wellenleitermode (Abbildung 2-10).

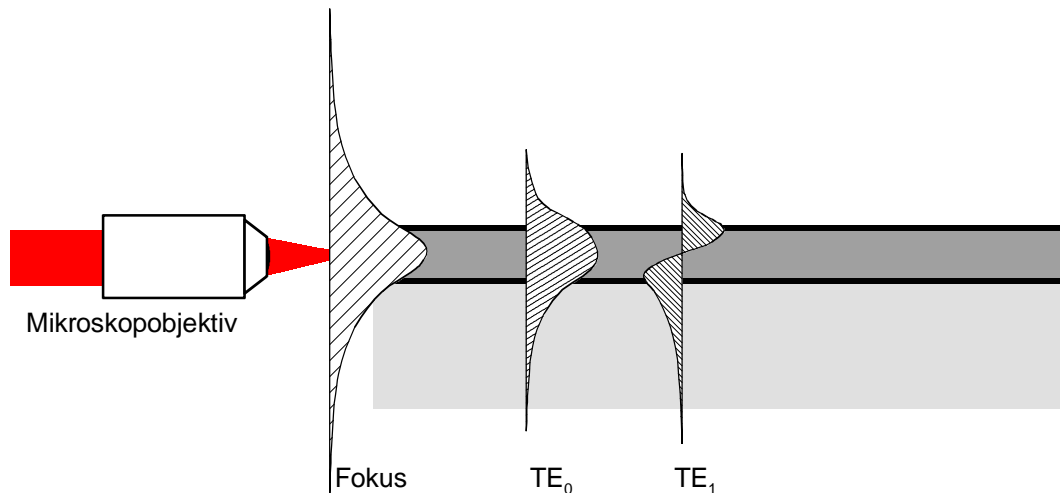


Abbildung 2-10: Stirnflächenkopplung (schematisch)

Stirnflächenkopplung hat in der Praxis zwei Schwierigkeiten:

- Der Wellenleiter muß auf Bruchteile einer Wellenlänge genau in allen drei Raumrichtungen im Fokus positioniert werden und stabil dort bleiben.
- Das Ende des Wellenleiters muß optisch glatt sein, entweder durch eine glatte Bruchkante oder durch Politur.
- Die beiden Wellenverteilungen müssen gut zueinander passen. Streifenwellenleiter für die Sensorik sind häufig flach und breit, während die Taille des Fokus eines Mikroskopobjektivs rotationssymmetrisch ist.
- Eine gezielte Auswahl einer Mode ist nicht möglich. Meist wird das meiste Licht wegen ihrer Feldverteilung in symmetrische Moden (Modenzahl  $\mu$  gerade) gekoppelt, vor allem in die Grundmode.

Auch bei optimaler Kopplung gelangt meist nur ein kleiner Bruchteil des Lichts in den Wellenleiter. Bedeutung hat die Stirnflächenkopplung, weil es nur geringen präparativen Aufwand erfordert, planare Lichtwellenleiter herzustellen, die für die Stirnflächenkopplung einsetzbar sind.

### 2.2.5 Oberflächen-optische Sensorik dünner Filme

Mit Hilfe des evaneszenten Feldes von Lichtwellen lassen sich Oberflächen gezielt untersuchen. Die am häufigsten verwendeten oberflächen-optischen Untersuchungsmethoden sind:

- die Oberflächenplasmonenspektroskopie (engl. surface plasmon spectroscopy SPS), unter anderem durch das kommerziell erhältliche BIAcore-System (Firma Pharmacia),
- Methoden auf der Basis von Lichtwellenleitern [KUN97],

- und Fluoreszenz-Methoden, die teilweise auf Lichtwellenleitern [PLO96] oder Oberflächenplasmonen [LIE99] aufbauen.

Ziel der Analyse dünner Filme kann zum einen sein, Eigenschaften eines dünnen Filmes zu bestimmen (z.B. die Eigenschaften eines aufgeschleuderten Polymerfilmes). Zum anderen werden Oberflächen-optische Methoden häufig verwendet, um Inhaltsstoffe des Deckmediums zu untersuchen. Dafür ist die Sensoroberfläche so funktionalisiert, daß ein bestimmtes Analyt spezifisch auf die Oberfläche adsorbiert und dort nachgewiesen werden kann indem es die Brechungsindexverteilung in der Nähe der Oberfläche ändert.

Im folgenden soll ausgeführt werden, wie dünne (Adsorbat-)Filme die Ausbreitungseigenschaften von Oberflächenwellen verändern und so charakterisiert werden können.

### 2.2.5.1 Wellenleiterspektroskopie

Bei der Wellenleiterspektroskopie wird der effektive Brechungsindex einer Mode durch eine Adsorbatschicht verändert.

Allgemein kann der effektive Brechungsindex eines Wellenleiters auf zwei Arten beeinflußt werden. Sowohl eine Adsorbatschicht (Dicke  $d_{ad}$ ) als auch ein geänderter Deckschicht-Brechungsindex  $n_c$  kann eine Verschiebung des effektiven Brechungsindex verursachen. In erster Näherung gilt für dünne Adsorbate<sup>3</sup>:

$$\Delta n_{eff} = \frac{\partial n_{eff}}{\partial n_c} \Delta n_c + \frac{\partial n_{eff}}{\partial d_{ad}} \Delta d_{ad} \quad (2-19)$$

Der Einfluß einer dünnen Adsorbatschicht auf den effektiven Brechungsindex läßt sich berechnen, indem man einen zum Dreischichtwellenleiter (2.2.2) analogen Ansatz für vier Schichten wählt. Man geht dafür davon aus, die Adsorbatschicht sei eine weitere homogene dielektrische Schicht mit definierter Schichtdicke  $d_{ad}$  und dem Brechungsindex  $n_{ad}$ . Lukosz und Tiefenthaler [LUK88] haben diesen Ansatz verwendet und erhalten für sehr dünne Filme eine näherungsweise lineare Beziehung zwischen Adsorbatdickenzuwachs  $\Delta d_{ad}$  und Verschiebung des effektiven Brechungsindex  $\Delta n_{eff}$ . Gleichung (2-20) zeigt die Sensitivität (TE-Moden):

$$\left. \frac{\partial n_{eff}}{\partial d_{ad}} \right|_{n_{ad}} = (n_{ad}^2 - n_c^2) \frac{(n_f^2 - n_{eff}^2)}{n_{eff} d_{eff} (n_f^2 - n_c^2)} \quad (TE) \quad (2-20)$$

Für TM-Moden muß dieser Ausdruck um Korrekturfaktoren ergänzt werden.

Auch der Einfluß eines geänderten Deckschicht-Brechungsindex  $n_c$  kann angegeben werden [LUK88], für TE-Moden gilt:

$$\frac{\partial n_{eff}}{\partial n_c} = n_c \gamma_s^{-1} \frac{(n_f^2 - n_{eff}^2)}{n_{eff} d_{eff} (n_f^2 - n_c^2)} \quad (TE) \quad (2-21)$$

---

<sup>3</sup> Zur Betrachtung dicker Filme muß ein Vierschichtsystem allgemein ausgewertet werden.

An den Gleichungen (2-20) und (2-21) sieht man, daß in beiden Fällen die Sensitivität wesentlich durch den Ausdruck

$$\frac{(n_f^2 - n_{\text{eff}}^2)}{n_{\text{eff}} d_{\text{eff}} (n_f^2 - n_c^2)} \quad (2-22)$$

bestimmt wird. Für eine maximale Sensitivität muß dieser Ausdruck maximiert werden. Man sieht, daß die Sensitivität mit der Modennummer steigt<sup>4</sup>. In der höchsten, sensitivsten Mode ist jeweils  $n_{\text{eff}} \approx n_c$ . Damit folgt direkt aus (2-22), daß zur Steigerung der Sensitivität der Ausdruck  $1/(n_c d_{\text{eff}})$  maximiert werden muß. Es sollten also Brechungsindex des Deckmediums und effektive Dicke des Wellenleiters möglichst klein sein. Um in einem sehr dünnen Wellenleiter noch Licht führen zu können, muß er einen großen Brechungsindex aufweisen.

Eine naheliegende Methode, den effektiven Brechungsindex zu detektieren, ist es, die Koppelbedingungen für Prismenkopplung (2-17) oder Gitterkopplung (2-18) zu verwenden. Es wird also die Adsorption eines dünnen Filmes in einen Koppelwinkel umgesetzt, der sich mit einfachen Mitteln detektieren läßt. Man kann dabei entweder die Intensität des eingekoppelten Lichts in Abhängigkeit des Koppelwinkels bestimmen [WEI99a], oder detektieren, bei welchen Winkeln durch Einkopplung weniger Licht reflektiert wird (sog. m-Linien-Spektroskopie [BRA96]).

Bei einem mehrmodigen Wellenleiter können mehrere Informationen über ein Adsorbat aus dem Modenspektrum gewonnen werden. Insbesondere ist es mit zwei Moden möglich, unabhängig voneinander Dicke und Brechungsindex eines Adsorbats zu bestimmen. Bei mehreren Moden kann man weitere Informationen über das Schichtsystem gewinnen wie Anisotropie (Doppelbrechung), Brechungsindex des Deckmediums oder das inhomogene Brechungsindexprofil einer Schicht. Dabei kann mit jeder vermessenen Mode ein Parameter bestimmt werden [KLE99, WEI99a].

### 2.2.5.2 Wellenleiter-Interferometrie

Eine alternative Methode, den effektiven Brechungsindex  $n_{\text{eff}}$  einer Mode zu bestimmen, ist, interferometrisch Laufzeitunterschiede ( $\sim \Delta n_{\text{eff}}$ ) von zwei geführten Lichtwellen zu messen. Durch seinen symmetrischen Aufbau besonders stabil ist das Mach-Zehnder-Interferometer.

Der Grundaufbau dieses Interferometers ohne Verwendung von Wellenleitern ist schon lange bekannt [MAC92] (Abbildung 2-11). Ein Lichtstrahl wird in zwei Lichtstrahlen aufgeteilt, die beiden Strahlen durchlaufen unterschiedliche optische Weglängen und werden miteinander zur Interferenz gebracht.

---

<sup>4</sup> Im Beispielwellenleiter (Abbildung 2-6) steigt die Sensitivität zwischen  $TE_0$  und  $TE_4$  um einen Faktor 23!

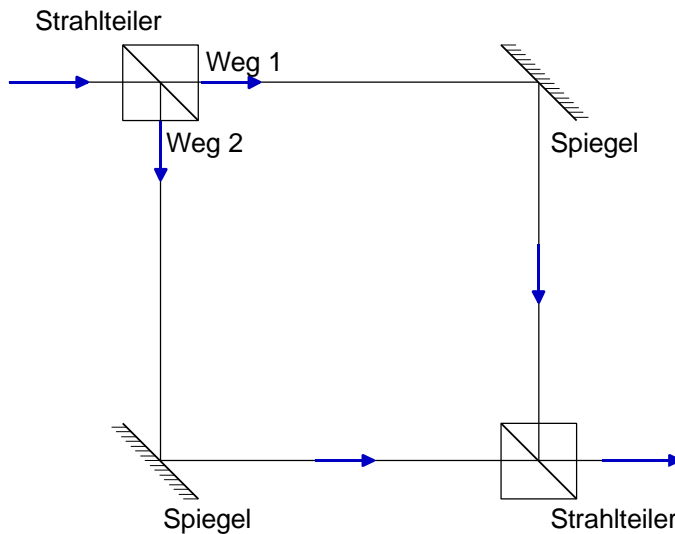


Abbildung 2-11: Das Mach-Zehnder Interferometer

Mit Hilfe integrierter Optik können einige oder sogar alle Komponenten des Interferometers auf einem Bauteil zusammengefaßt werden. Häufig wird die Strahlaufteilung und –zusammenführung außerhalb des Wellenleiters realisiert [SCH98]. Dabei werden die mit Strahlteilern aufgeteilten Lichtbündel separat ein- und ausgekoppelt. Durch integrierte Optik lassen sich diese Aufteiler als sog. Y-Verzweiger in den Wellenleiter integrieren [DRA97, BRO97]. Für diesen Ansatz wird nur ein Laserstrahl in einen einmodigen Wellenleiter eingekoppelt.

Ein weiterer Schritt der Miniaturisierung und Integration ist, Lichtquelle und Detektor mit in den Sensor zu integrieren [KUN97]. Die Integration kann sogar so weit gehen, daß die Flüssigkeitsführung in das Bauteil integriert wird ("Lab on a chip"), entweder durch Mikromechanik oder durch elektroosmotisches Pumpen [MAN94].

Anwendung finden integriert-optische Mach-Zehnder-Interferometer nicht nur im Nachweis dünner Adsorbatschichten. Sie eignen sich auch als Gas- [BRA93] oder Drucksensoren [WAG94, BRA98]. Mit elektrooptisch aktiven Materialien lassen sie sich auch als Intensitätsmodulatoren nutzen, z.B. für die optische Datenübertragung [ALT95, ROT95].

Im Gegensatz zur Wellenleiterspektroskopie benötigt ein vollständig integriert-optisches Mach-Zehnder-Interferometer keine beweglichen Teile. Ein weiterer Unterschied resultiert aus der Tatsache, daß das Interferometer nur die Differenz der Schichtdickenänderung zwischen den beiden Kanälen erfaßt. Dadurch wird zwar einerseits die absolute Bestimmung von Schichtdicken unmöglich, andererseits lassen sich durch die Differenzbildung manche unerwünschte Störeffekte ausschließen. So können mit Hilfe des zweiten Interferometerarms störende Effekte, wie etwa Temperaturdrift, Änderungen im Brechungsindex der Analytlösung und die unspezifische Adsorption aus dem Meßsignal entfernt werden.

Da das Mach-Zehnder-Interferometer auf eine Mode beschränkt ist (s. Abschnitt 3.1.2.2), kann nur ein Parameter bestimmt werden (z.B. Schichtdicke bei Annahme eines Brechungsindex). Zur genaueren Analyse von Adsorbatschichten erweist sich die Wellenleiterspektroskopie als vielseitiger. Mach-Zehnder-Interferometer erscheinen vielversprechend, wenn das Vorhandensein eines Analyts in Lösung geprüft werden soll.

### 2.2.5.3 Oberflächenplasmonen-Spektroskopie

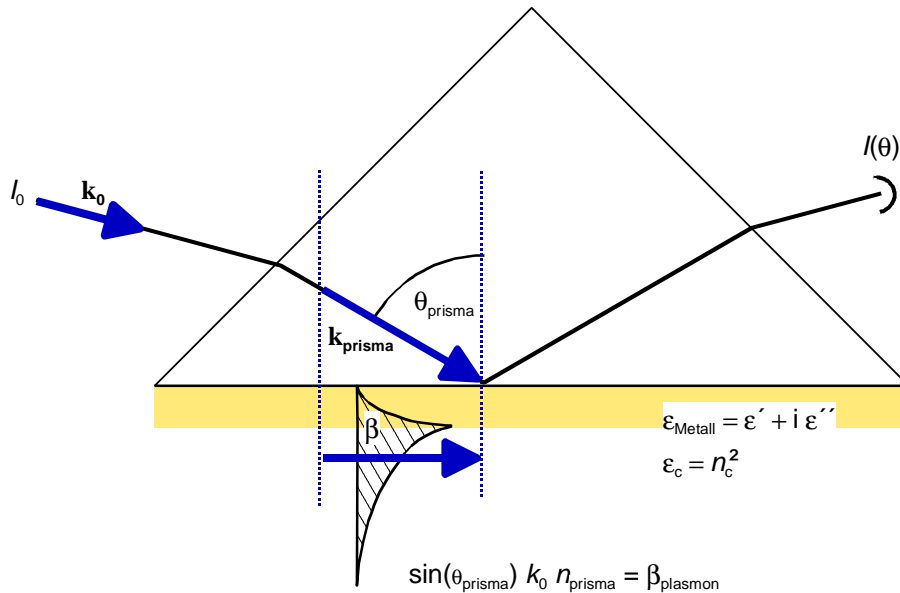


Abbildung 2-12: Oberflächenplasmonenresonanz (schematisch)

Eine weitere Methode zur optischen Charakterisierung von Adsorbaten ist die Oberflächenplasmonen-Spektroskopie. Oberflächenplasmonen sind Oberflächenwellen an der Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum durch resonante Anregung des semi-freien Elektronengases [RAE88]. Das elektrische Feld des Oberflächenplasmons fällt in Metall und Dielektrikum exponentiell ab. Weiterhin wird es durch Verluste im Metall in Ausbreitungsrichtung gedämpft. In Analogie zur Wellenleitung läßt sich eine Eigenwertgleichung (*Dispersionsrelation*) angeben<sup>5</sup>:

$$\frac{\beta}{k_0} = \sqrt{\frac{\epsilon_c \epsilon_{\text{Metall}}}{\epsilon_c + \epsilon_{\text{Metall}}}} < 1 \quad \epsilon = \epsilon' + i\epsilon'' = (n + i\alpha)^2 \quad (2-23)$$

mit dem Absorptionskoeffizienten  $\alpha$ . Oberflächenplasmonen lassen sich ähnlich wie Wellenleitermoden mit Hilfe von Gitter- oder Prismenkopplung anregen. Aus praktischen Gründen wird meist mit Hilfe eines Prisma durch einen thermisch aufgedampften, ca. 50 nm dicken, Gold- oder Silberfilm gekoppelt (Kretschmann-

<sup>5</sup> Der effektive Brechungsindex von Oberflächenplasmonen beträgt bei einem typischen Schichtsystem  $n_{\text{eff}} = 1,44$  (Gold/Wasser,  $\lambda = 633$  nm).

Konfiguration, Abbildung 2-12). Trägt man die Reflektivität gegen den Koppelwinkel auf, so kann man aus der Reflektivitätskurve  $I(\theta)$  zwei Größen bestimmen, aus der Oberflächenplasmonenresonanz die optische Schichtdicke des Adsorbats und aus dem Winkel der Totalreflexion den Brechungsindex des Deckmediums.

Da es nur eine Oberflächenplasmonenmode (TM-Polarisation) gibt, kann nur ein Meßparameter über das Adsorbat ermittelt werden (z.B. die Schichtdicke bei Annahme des Brechungsindex  $n_{ad}$ ). In einem dicken Adsorbat lassen sich auch Wellenleitermoden anregen, die Aufschluß über weitere Adsorbateigenschaften geben.

Oberflächenplasmonen werden häufig eingesetzt, da die Goldschicht durch Aufdampfen einfach herzustellen ist. Weiterhin hat die Goldschicht den Vorteil, daß sie leicht mit Organothiolen beschichtet werden sowie als Elektrode für elektrochemische Untersuchungen verwendet werden kann.

#### 2.2.5.4 Zusammenfassung und Vergleich

Durch Anregung von Oberflächenplasmonen und Wellenleitermoden lassen sich optische Eigenschaften von Adsorbaten ermitteln. Adsorbate verändern innerhalb des evaneszenten Feldes das Brechungsindexprofil und verändern so die Ausbreitungsgeschwindigkeit dieser Oberflächenwellen. Häufig werden die Veränderungen in der Ausbreitungskonstante durch Veränderung eines Koppelwinkels detektiert.

Die Resonanz von Oberflächenplasmonen ist durch die Dämpfung im Metall im Vergleich zu Wellenleitermoden sehr breit. Dies führt in Relation zu einem optimierten Wellenleiter zu geringerer Sensitivität. Die Form des evaneszenten Feldes im Deckmedium ist bei beiden Methoden ähnlich. Die Feldstärke fällt senkrecht zur Oberfläche exponentiell je nach Schichtsystem mit einer Reichweite von etwa  $(0,1 \text{ bis } 1) \cdot \lambda$  ab. Die absolute Feldstärke der Oberflächenplasmonen ist jedoch stärker, da ein größerer Anteil des Feldes evaneszent in der Deckschicht geführt wird.

Die Sensitivität der gezeigten Oberflächen-optischen Verfahren läßt sich noch steigern, indem man die zu adsorbierenden Moleküle mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert. Adsorbierte Farbstoffmoleküle werden durch das evaneszente Feld zum Leuchten in ihrer Emissionswellenlänge angeregt, die sich dann, z.B. im Streulicht, nachweisen läßt [LIE99, PLO96]. Der verbesserten Sensitivität steht der erhöhte Aufwand durch die Markierung gegenüber. Eine Übersicht optischer Dünnschicht-Sensorik findet sich unter anderem bei A. Brecht und G. Gauglitz [BRE95].



### 3 Konzeption, Herstellung und Erprobung des integriert-optischen Mach-Zehnder-Interferometers

Im vorangegangenen Grundlagenkapitel wurde erläutert, wie Analytmoleküle an Oberflächen adsorbieren und wie man diese Adsorption durch planare Lichtwellenleiter nachweisen kann. Im folgenden soll ein integriert-optisches Mach-Zehnder-Interferometer eingeführt werden, mit dem die Untersuchungen der nachfolgenden Kapitel durchgeführt wurden.

#### 3.1 Konzeption

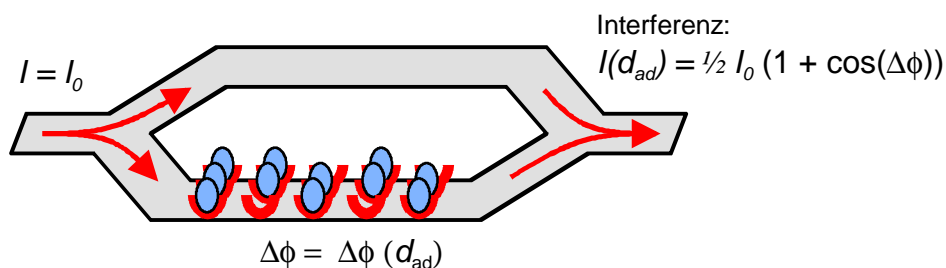


Abbildung 3-1: Funktionsprinzip eines integriert-optischen Mach-Zehnder-Interferometers

Ziel war es, einen Sensor zu realisieren, der sensitiv, einfach herzustellen und inert gegen möglichst viele Chemikalien ist. Zudem soll das Wellenleitermaterial möglichst günstige Wellenleitungseigenschaften aufweisen (wenig Dämpfung). Daher wurde als Wellenleitermaterial Siliziumoxinitrid gewählt. Die Verschiebung des effektiven Brechungsindex wird durch ein integriert-optisches Mach-Zehnder-Interferometer (MZI, Abbildung 3-1) nachgewiesen. Daher sollte ein in zwei Dimensionen monomodiger Wellenleiter hergestellt werden. Um die Herstellung möglichst einfach zu halten, wird die laterale Führung der Wellenleitermode durch einen Rippenwellenleiter (Abbildung 3-2, Abschnitt 2.2.3) realisiert.

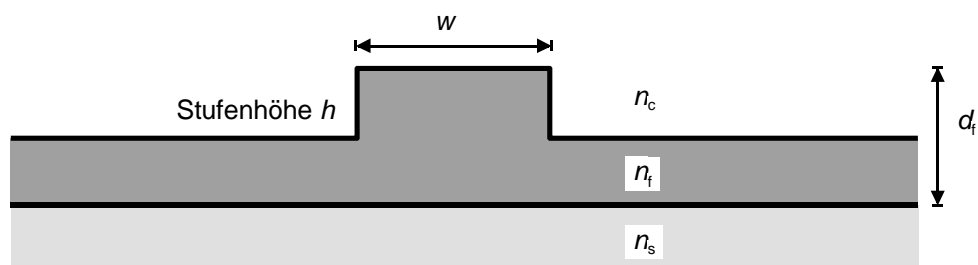


Abbildung 3-2: Rippenwellenleiter

### 3.1.1 Dimensionierung des Wellenleiters

Ein gutes Wellenleitersubstrat muß im Bereich des evaneszenten Feldes transparent und gut für alle weiteren Verarbeitungsschritte geeignet sein. Als Substrat kommen Quarz oder oxidierte Siliziumwafer in Frage. Die Herstellung der Wellenleiter erfolgte im Reinraum des Institutes für Mikrotechnik in Mainz (IMM), der für die Prozessierung von 125 mm-Wafer ausgelegt ist. Aufgrund größerer Erfahrung des IMM mit Siliziumsubstraten und für die Prozeßkontrolle mit Ellipsometrie wurden oxidierte Siliziumwafer verwendet. Um Dämpfung zu vermeiden, soll die Dicke der Oxidschicht so groß sein, daß nur ein geringer Anteil des evaneszenten Feldes in das Siliziumsubstrat hineinreicht. Wird ein zu großer Anteil der Wellenleitermode im (hochbrechenden und absorbierenden) Silizium geführt, so wird das Licht durch Leckwellen und Absorption gedämpft. Für die im folgenden beschriebenen Wellenleiter sind etwa 2,5 - 3,5  $\mu\text{m}$  Oxidschichtdicke ausreichend [GLE90]. Daher wurden etwa 2,5  $\mu\text{m}$  tief oxidierte Siliziumwafer verwendet.

Als Wellenleitermaterial kommen prinzipiell verschiedene Materialien in Frage. Da dünne Wellenleiter hergestellt werden sollen, die kein Lösungsmittel aufnehmen (nicht quellen) und auch sonst inaktiv gegenüber vielen Chemikalien sind, können organische Materialien nicht verwendet werden. Geeignete anorganische Materialien sind gesputterte, hochbrechende Metalloxide (z.B.  $\text{Ta}_2\text{O}_5$ :  $n = 2,2$ ;  $\text{TiO}_2$ :  $n = 2,35$ ), oder durch chemische Dampfabscheidung (CVD, engl. chemical vapour deposition) erzeugte Siliziumoxinitridschichten ( $\text{SiO}_x\text{N}_y$ ). CVD hat den Vorteil, daß sich durch Variation der Prozeßparameter verschiedene Brechungsindizes einstellen lassen.

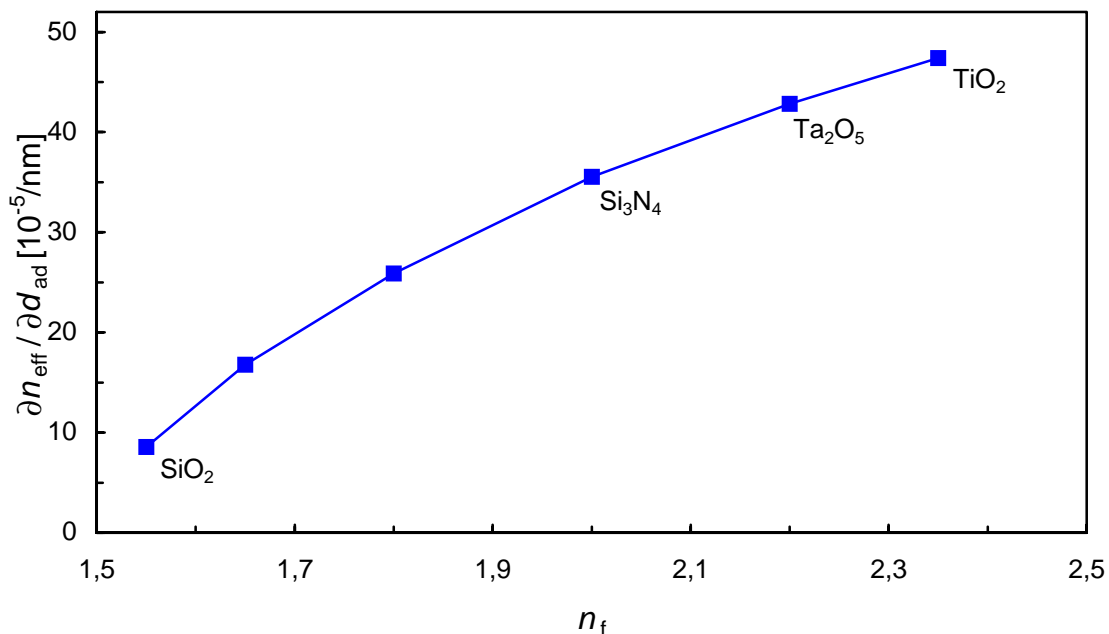


Abbildung 3-3: Sensitivität in Abhängigkeit des Wellenleiter-Brechungsindex (Strukturbreite  $w = 2 \mu\text{m}$ ,  $n_s = 1,46$ )

Für diese Arbeit wurde Siliziumoxinitrid verwendet, das mit Hilfe von plasmaunterstützter chemischer Dampfabscheidung abgeschieden wurde (PECVD, engl. **p**lasma **e**nhanced **CVD**)<sup>6</sup>. Mit PECVD lassen sich Siliziumoxinitride  $\text{SiO}_x\text{N}_y$  erstellen in Mischungsverhältnissen zwischen [PET91, GLE90]:

- $\text{SiO}_2$ , Siliziumoxid,  $n = 1,46$
- $\text{Si}_3\text{N}_4$ , Siliziumnitrid,  $n = 2,0$

Abbildung 3-3 zeigt die Sensitivität in Abhängigkeit des Wellenleiter-Brechungsindex  $n_f$  (Simulation, Methode des effektiven Brechungsindex). Man sieht, daß die Sensitivität mit dem Wellenleiter-Brechungsindex steigt, jedoch bei höheren Brechungsindizes etwas abflacht.

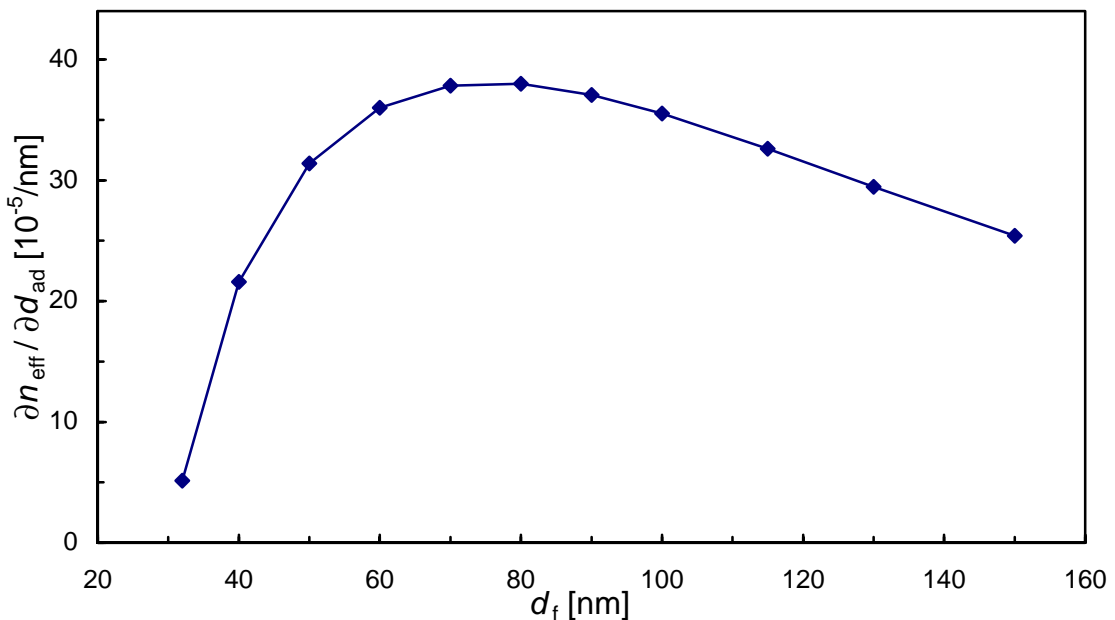


Abbildung 3-4: Sensitivität in Abhängigkeit der  $\text{Si}_3\text{N}_4$  Wellenleiterdicke ( $n_f = 2$ , monomodiger Schichtdickenbereich), Simulation mit Hilfe der Methode des effektiven Brechungsindex

In Abbildung 3-4 wird der Einfluß der Wellenleiterdicke  $d_f$  auf die Sensitivität untersucht. Man sieht am Beispiel von  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , daß die Sensitivität ein Maximum durchläuft. Für kleinere Schichtdicken als  $d_f = 75$  nm fällt sie stark ab, bei größeren Schichtdicken bleibt sie nahezu konstant.

Qualitativ liegt dieser Verlauf auch bei den anderen Brechungsindizes vor, jedoch verschiebt sich die optimale Wellenleiterdicke mit höherem Brechungsindex zu geringeren Schichtdicken (s. Abbildung 3-5). Um sicher eine Schichtdicke erzeugen zu können, die hohe Sensitivität verspricht, ist für  $n_f = 2$  ein Wert von etwa  $d_f = 100$  nm als optimal anzusehen.

<sup>6</sup> Eine alternative CVD-Herstellungsmethode ist LPCVD (engl. **l**ow **p**ressure **CVD**).

Damit der Schichtwellenleiter für die Herstellung eines Mach-Zehnder-Interferometers verwendet werden kann, muß er strukturiert werden und darf lateral nur die Grundmode führen. Um die dafür erforderliche Wellenleitermaske gut herstellen und abbilden zu können, sollte eine Wellenleiterbreite von  $w = 2 \mu\text{m}$  nicht unterschritten werden. Daraus ergibt sich für  $\text{Si}_3\text{N}_4$  eine maximale Rippenhöhe von etwa 2,5 nm, damit die Wellenleitermode lateral monomodig bleibt. Diese Höhe ist mit der verwendeten RIE-Plasmaätzanlage<sup>7</sup> nicht zu realisieren. Einen Ausweg bietet die Verwendung eines Wellenleiters mit niedrigerem Brechungsindex. Abbildung 3-5 zeigt optimale Wellenleiterdicke und Ätzhöhe in Abhängigkeit des Wellenleiter-Brechungsindex.

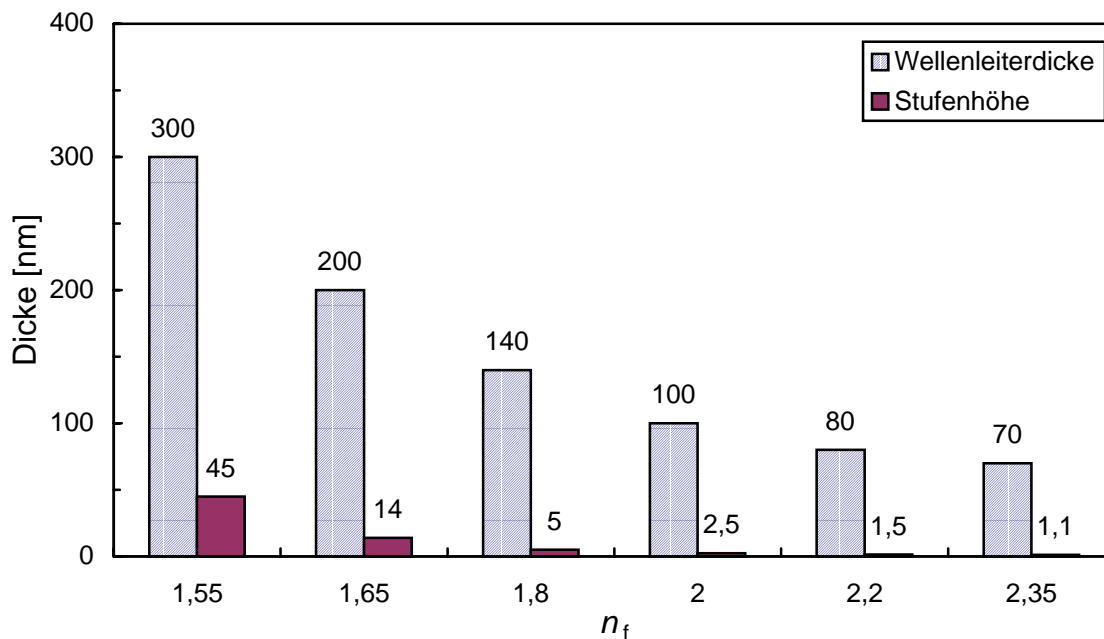


Abbildung 3-5: optimale Schichtdicke und Stufenhöhe in Abhängigkeit des Wellenleiter-Brechungsindex (jeweils optimiert auf gute Sensitivität bei optimaler Führung)

Gut realisieren läßt sich ein Wellenleiter mit einem Brechungsindex von  $n_f = 1,55$ , einer Schichtdicke von  $d_f = 350 \text{ nm}$  und einer Stufenhöhe von  $h = 55 \text{ nm}$  ( $\text{SiO}_x\text{N}_y$  mit  $n_f = 1,55$  entspricht etwa einem Verhältnis von Stickstoff zu Sauerstoff von 3 : 7 [PET91]).

<sup>7</sup> RIE: **R**eactive **I**on **E**tching

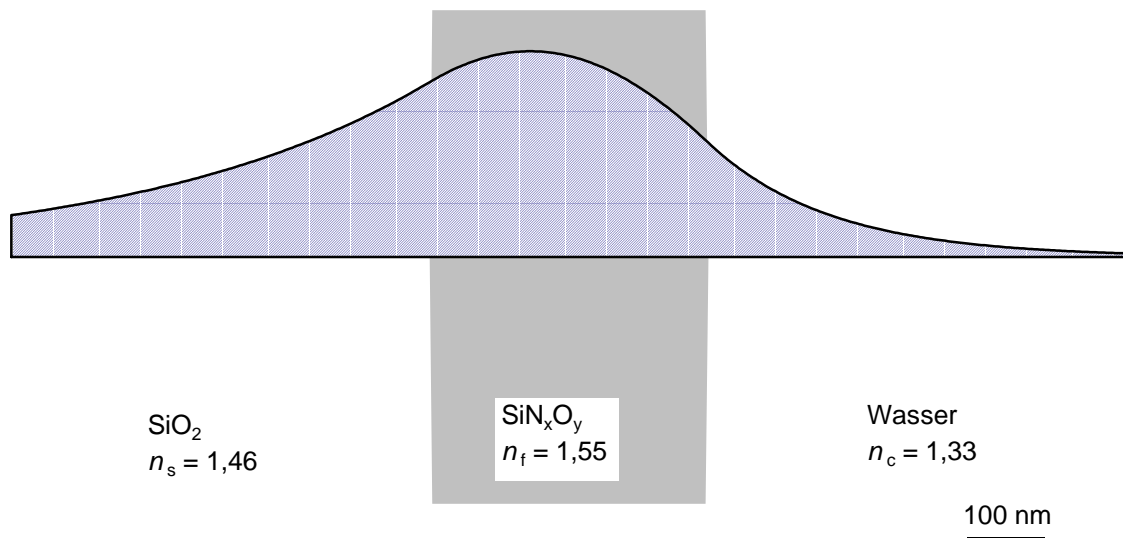


Abbildung 3-6: Feldverteilung der TE<sub>00</sub>-Mode des verwendeten Wellenleiters in x-Richtung

Aus diesen Parametern folgt ein effektiver Brechungsindex der TE<sub>00</sub>-Mode von  $n_{\text{eff}} = 1,486$ . Die Feldverteilung der TE<sub>00</sub>-Mode ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Das evaneszente Feld weist eine Abklinglänge von  $1 / \gamma_c = 150 \text{ nm}$  im Deckmedium auf. Mit den im Grundlagenkapitel eingeführten Beziehungen ergeben sich für die Sensitivitäten in wäßrigem Medium ( $n_c = 1,33$ ):

$$\frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial n_c} = 0,053 \quad (3-1)$$

$$\left. \frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial d_{\text{ad}}} \right|_{n_{\text{ad}} = 1,45} = 8,57 \cdot 10^{-5} \text{ nm}^{-1}$$

Man erreicht mit diesem Wellenleiter also ca. 22 % der maximal mit Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> möglichen Sensitivität (vgl. Abbildung 3-4).

Zur Verminderung oberflächeninduzierter Dämpfungsverluste ist es wichtig, Wellenleiter mit einem geringen Brechungsindexunterschied zum umgebenden Medium herzustellen [GLE90]. Daher wurde auf den Wellenleiter eine PECVD-Schicht aus SiO<sub>2</sub> mit einer Dicke  $\geq 2 \mu\text{m}$  aufgebracht, um den Wellenleiter vor äußeren Einflüssen zu schützen (Dämpfung durch Schmutz, Rauigkeit, Kratzer). Im Sensorfeld muß diese Deckschicht durch Ätzen entfernt werden (s. Abschnitt 3.2).

### 3.1.2 Das Mach-Zehnder-Interferometer und seine Bauelemente

#### 3.1.2.1 Wellenleiterübergänge (Taper)

Viele Komponenten in der integrierten Optik benötigen Übergänge zwischen breiten und schmalen Streifenwellenleitern. Minimale Verluste erhält man bei adiabatischen

Tapern. Adiabatisch heißt, daß die Grundmode des Wellenleiters vor dem Übergang nur an die Grundmode nach dem Übergang koppelt. Aus dieser Forderung ergibt sich eine parabolische Taperform [BUR76].

Sehr breite Taper lassen sich auch gut strahlenoptisch beschreiben. Hier wird das im breiten Wellenleiter einfallende Licht durch einfache Reflexion auf den Eingang des schmalen Wellenleiters reflektiert, der sich im Brennpunkt des parabelförmigen Tapers befindet (Abbildung 3-7). Für eine optimale Kopplung müssen die Strahlen so flach auf den Eingang des Wellenleiters treffen, daß eine Kopplung in die gewünschte Mode erfolgt. Daher laufen Taper in der Regel recht flach zu ( $\approx 1^\circ$ ).

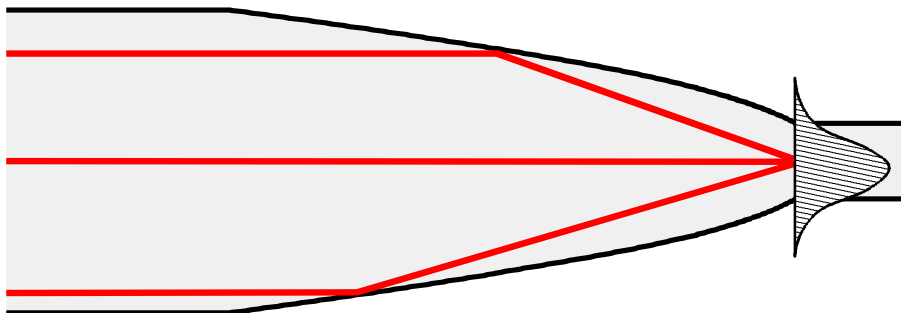


Abbildung 3-7: Strahlengang in einem breiten parabolischen Taper beim Übergang eines breiten in einen schmalen Wellenleiter

Wenn die Breite des ein- und des auslaufenden Wellenleiters ungefähr gleich sind, gleicht sich die Parabelform einer Trapezform an. In diesem Fall kann also der Taper durch gerade Linien konstruiert werden.

Taper werden in der integrierten Optik bei der Einkopplung (s. Abschnitt 2.2.4.2) und bei Verzweigen angewandt.

### 3.1.2.2 Y-Verzweiger

Y-Verzweiger sind Bauteile, mit denen das Licht eines einlaufenden Wellenleiters in zwei auslaufende aufgeteilt oder umgekehrt das aus zwei Wellenleitern einlaufende Licht zusammengeführt werden kann. Der Grundaufbau besteht aus zwei schräg einlaufenden und einem auslaufenden Wellenleiter, die miteinander durch einen Taper verbunden sind. Der Taper ist am Anfang so breit wie beide einlaufenden Wellenleiter zusammen und verjüngt sich zu der Breite des auslaufenden Wellenleiters.

Im Rahmen dieser Arbeit sind symmetrische Y-Verzweiger aus gleich breiten, monomodigen Wellenleitern relevant. Im Fall der Aufteilung einer einlaufenden Grundmode wird die Welle durch den Taper adiabatisch aufgeweitet. Bei der anschließenden Aufteilung kann sie verlustarm in zwei Grundmoden der auslaufenden Wellenleiter aufgeteilt werden.

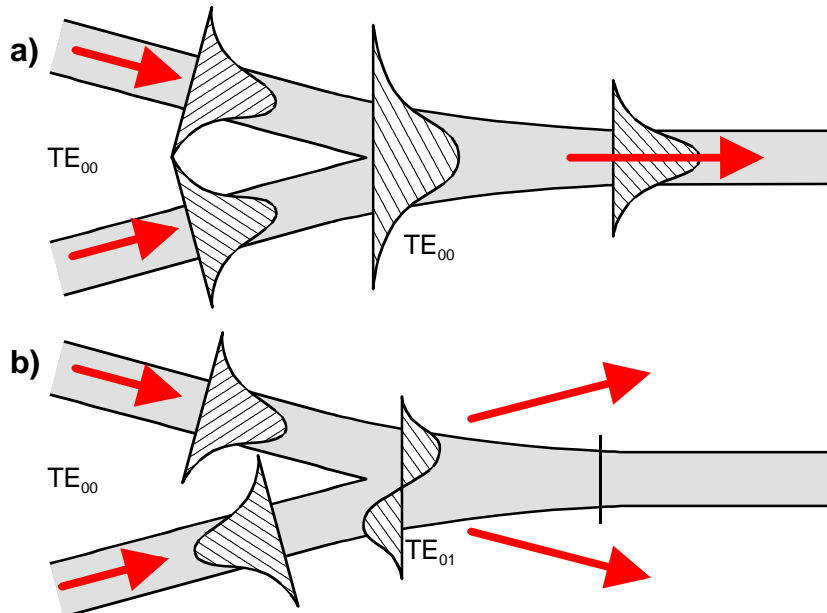


Abbildung 3-8: Konstruktive (a) und destruktive Interferenz (b) bei der Rekombination zweier monomodiger Wellenleiter in einem Y-Verzweiger

Bei der Zusammenführung zweier einlaufender Lichtwellen zu einer auslaufenden Welle muß man die relative Phasenlage der beiden Wellen zueinander betrachten (Abbildung 3-8). Schwingen die beiden Wellen in Phase, so rekombinieren sie gut zu der Grundmode. Sind die Wellen genau gegenphasig, so rekombinieren sie zur ersten asymmetrischen Mode  $TE_{01}$  [IIZ95]. Diese Mode ist zwar am breiten Anfang, nicht jedoch am Ende des Tapers ausbreitungsfähig. Sie wird deshalb als lateral nicht geführte Welle seitlich abgestrahlt (Abbildung 3-9). Innerhalb des Wellenleiters wird also kein Licht geführt ("destruktive Interferenz").

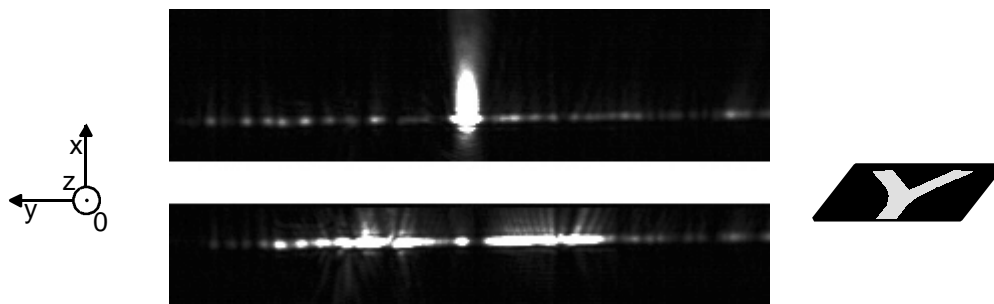


Abbildung 3-9: Streulichtaufnahme einer Wellenleiter-Endfläche nach einem Y-Verzweiger, oben: in Phase (konstruktive Interferenz, das Licht wird im Wellenleiter geführt), unten: gegenphasig (destruktive Interferenz, das Licht wird seitlich in Schichtmoden abgestrahlt)

Bei beliebiger Phasenlage erhält man allgemein eine Ausgangsintensität, die von der Phasendifferenz  $\Delta\phi$  abhängt nach der Beziehung

$$I \sim (1 + \cos(\Delta\phi)). \quad (3-2)$$

## 3.1.2.3 Krümmer

Um verschiedene Bauteile miteinander verbinden zu können und Strukturen auf kleinem Raum unterbringen zu können, sind gekrümmte Wellenleiter notwendig.

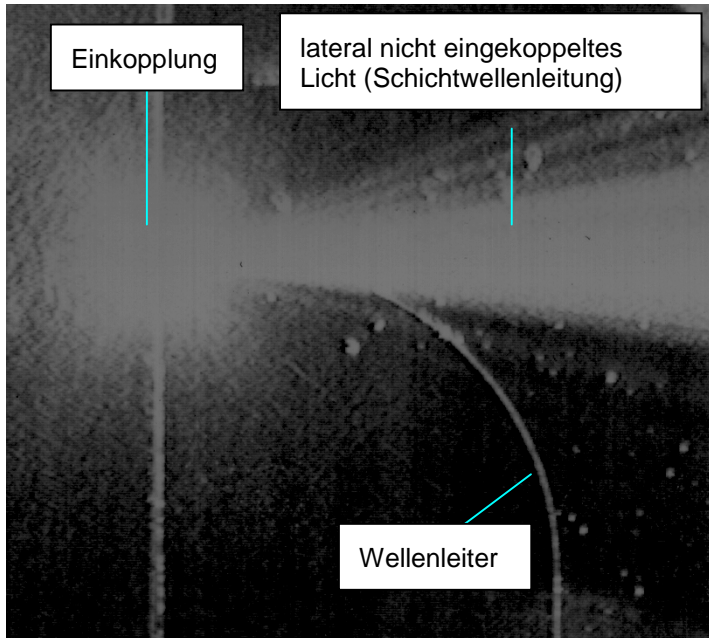


Abbildung 3-10: Streulichtbild eines um  $90^\circ$  gekrümmten Wellenleiters in Stirnflächenkopplung, Krümmungsradius  $R = 4$  mm, Dimensionierung des Wellenleiters wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Der Lichtfächer resultiert aus Stirnflächenkopplung in lateral nicht geführte Schichtwellenleitermoden.

Die Dämpfung eines Wellenleiters ist stark von seiner Krümmung abhängig, die durch den Krümmungsradius  $R$  angegeben wird. Für praktisch realistische Fälle gilt für die Dämpfung  $\alpha(R)$  [KAR91]

$$\alpha(R) = \alpha_0 \exp(-CR) \quad \text{mit } C = k_0 \sqrt{\frac{8(n_{\text{eff, ges}} - n_{\text{eff, außen}})^3}{n_{\text{eff, außen}}}} \quad (3-3)$$

mit den effektiven Brechungsindizes  $n_{\text{eff, außen}}$  und  $n_{\text{eff, ges}}$  aus der Methode des effektiven Brechungsindex. Die Abhängigkeit der Dämpfung vom Krümmungsradius  $R$  ist also wesentlich bestimmt durch den Kontrast der effektiven Brechungsindizes. Moden mit höherem effektiven Brechungsindex werden "stärker geführt". Eine Folge von Gleichung (3-3) ist also, daß die Dämpfung in gekrümmten Wellenleitern modenabhängig ist. Schwächer geführte, höhere Moden (z.B.  $TE_{01}$ ) strahlen eher in Schichtmoden ab als die am stärksten geführte Grundmode (z.B.  $TE_{00}$ ).

Mit dem dargestellten Schichtsystem lassen sich Krümmungsradien von  $R = 4$  mm realisieren (s. Abbildung 3-10).

## 3.1.2.4 Mach-Zehnder-Interferometer

Im verwendeten Mach-Zehnder-Interferometer wird das Licht eines monomodigen Wellenleiters in einem Y-Verzweiger aufgeteilt und durch Krümmern parallelisiert. Danach können die Wellen in beiden Armen phasenverschoben werden. Durch einen weiteren Y-Verzweiger werden die beiden Wellen zur Interferenz gebracht. Das hier vorgestellte Interferometer (Abbildung 3-11) besteht aus zwei Y-Verzweigern mit Krümmern, die durch ein Polynom fünften Grades definiert sind. Der Y-Verzweiger ist durch einen linearen Taper mit einem Öffnungswinkel von  $\approx 0,6^\circ$  realisiert. Der minimale Krümmungsradius beträgt etwa 6 mm. Die Länge des sensitiven Bereiches beträgt  $L_{\text{sens}} = 12$  mm. Die beiden Meßarme laufen parallel mit einem Abstand zwischen 1,5 und 4 mm (unterschiedliche Designs).

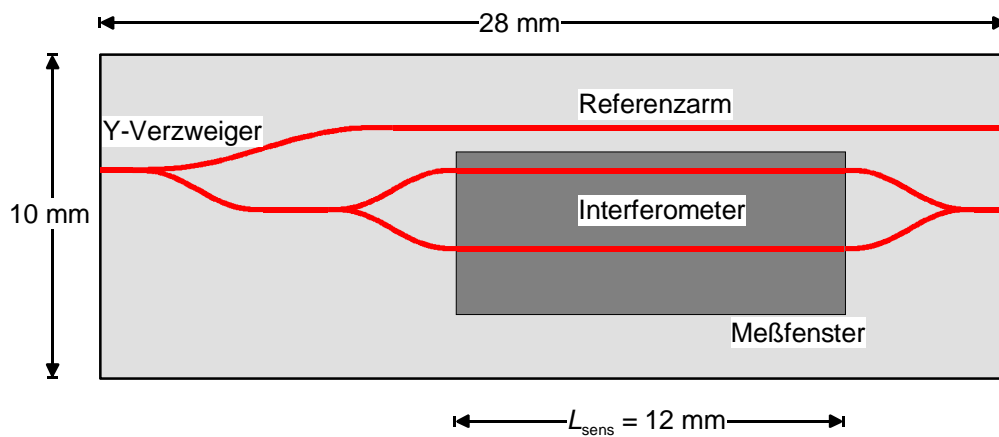


Abbildung 3-11: Design des Mach-Zehnder-Interferometers (Wellenleiter stark verbreitert dargestellt), siehe auch die vollständigen Masken im Anhang

Verstimmt man die Phase eines Arms, z.B. durch Änderung des Deckmediums, so ändert sich die Ausgangsintensität. In der hier vorgestellten Anwendung wird die Ausgangsintensität abhängig von Adsorbatdicke  $d_{\text{ad}}$  und Brechungsindex des Deckmediums  $n_s$  gemessen.

Aus der Interferenzbeziehung (3-2) und der Phasendifferenz der beiden Kanäle  $\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2 = k_0 L_{\text{sens}} \Delta n_{\text{eff}}$  ergibt sich:

$$\begin{aligned} \frac{I(\Delta n_c, \Delta d_{\text{ad}})}{I_{\text{max}}} &= \frac{1}{2} [1 + \cos(k_0 L_{\text{sens}} \Delta n_{\text{eff}})] \\ &= \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( k_0 L_{\text{sens}} \frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial n_c} \Delta n_c + k_0 L_{\text{sens}} \frac{\partial n_{\text{eff}}}{\partial d_{\text{ad}}} \Big|_{n_{\text{ad}}} \Delta d_{\text{ad}} \right) \right] \end{aligned} \quad (3-4)$$

Mit den aus dem Schichtsystem folgenden Sensitivitäten (Abschnitt 3.1.1) folgt für den verwendeten Sensor mit  $k_0 = 2\pi / 632,8$  nm und  $L_{\text{sens}} = 12$  mm sowie einem angenommenen Adsorbatbrechungsindex  $n_{\text{ad}} = 1,45$ :

$$\frac{I(\Delta n_c, \Delta d_{ad})}{I_{max}} = \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( k_0 L_{sens} 0,053 \Delta n_c + k_0 L_{sens} \cdot 8,57 \cdot 10^{-5} \text{ nm}^{-1} \Delta d_{ad} \right) \right] \quad (3-5)$$

$$= \frac{1}{2} \left[ 1 + \cos \left( 2000 \pi \Delta n_c + 3,25 \frac{\pi}{\text{nm}} \Delta d_{ad} \right) \right]$$

Die Intensität ändert sich also Kosinusförmig, wobei die Phasenverschiebung des Kosinus entweder durch Änderung des Brechungsindex des Deckmediums ( $\Delta n_c = 0,001 \Rightarrow \Delta\phi = 2\pi$ ), oder durch Adsorption einer dünnen Schicht ( $\Delta d_{ad} = 1 \text{ nm} \Rightarrow \Delta\phi = 3,25\pi$ ) beeinflusst werden kann.

Zusätzlich läßt sich die Stabilität der Einkoppelintensität messen, indem man durch einen dritten Y-Verzweiger einen separaten Referenzarm einführt. Abbildung 3-11 zeigt den Ausschnitt einer Wellenleitermaske (Interferometer mit Referenzarm). Es ist der Verlauf des Wellenleiters von der Einkoppelkante (Stirnflächenkopplung) links über den Abzweig des Referenzarmes und das Interferometer bis zur Auskoppelkante rechts dargestellt. Die vollständigen Masken sind im Anhang abgebildet.

## 3.2 Herstellung

Hauptprozessschritte der Bauteil-Fertigung im Reinraum des Instituts für Mikrotechnik in Mainz (IMM) waren das Aufbringen des Wellenleitersmaterials, das mit einer Maske (Wellenleitermaske) strukturiert wurde, sowie die Erstellung einer Deckschicht mit Strukturierung durch eine weitere Maske (Fenstermaske)<sup>8</sup>.

Die Herstellung des Interferometers beginnt mit der thermischen Oxidation eines 125 mm-Silizium-Wafers (Abbildung 3-12 a). In einer PECVD-Anlage wird dann Wellenleitersmaterial  $\text{SiO}_x\text{N}_y$  mit einem Brechungsindex von  $n_f \approx 1,55$  abgeschieden (Abbildung 3-12 b). Die Abscheidung erfolgt mit einer Aufwachsrate von ca. 70 nm/min bei einer Prozeßtemperatur von mindestens 300 °C<sup>9</sup>.

Danach wird die Struktur in den Wellenleiter geätzt (Abbildung 3-12 c). Dafür wird eine Photolackschicht aufgeschleudert, mit der Wellenleitermaske kontaktbelichtet und entwickelt. Die entstehende Photolackmaske kann dann durch Trockenätzen in den Wellenleiter übertragen werden. Es wurden zwei unterschiedliche Wellenleitermasken verwendet, eine mit Teststrukturen und einigen Mach-Zehnder-Interferometern zur Stirnflächenkopplung. Eine zweite, während dieser Arbeit erstellte Wellenleitermaske enthält Interferometer mit unterschiedlichen Einkoppel-Taperstrukturen zur Gitterkopplung.

<sup>8</sup> Die Masken wurden mit dem Konstruktionsprogramm AutoCAD erstellt und dann im Maskenzentrum Dresden mit einem Elektronenstrahl geschrieben. Die kleinste mögliche Strukturbreite dieses Prozesses war 0,5 µm, die Kantenunschärfe 0,1 µm.

<sup>9</sup> Die Wellenleiter mit der geringsten Dämpfung wurden bei einer Temperatur von 370 °C hergestellt.

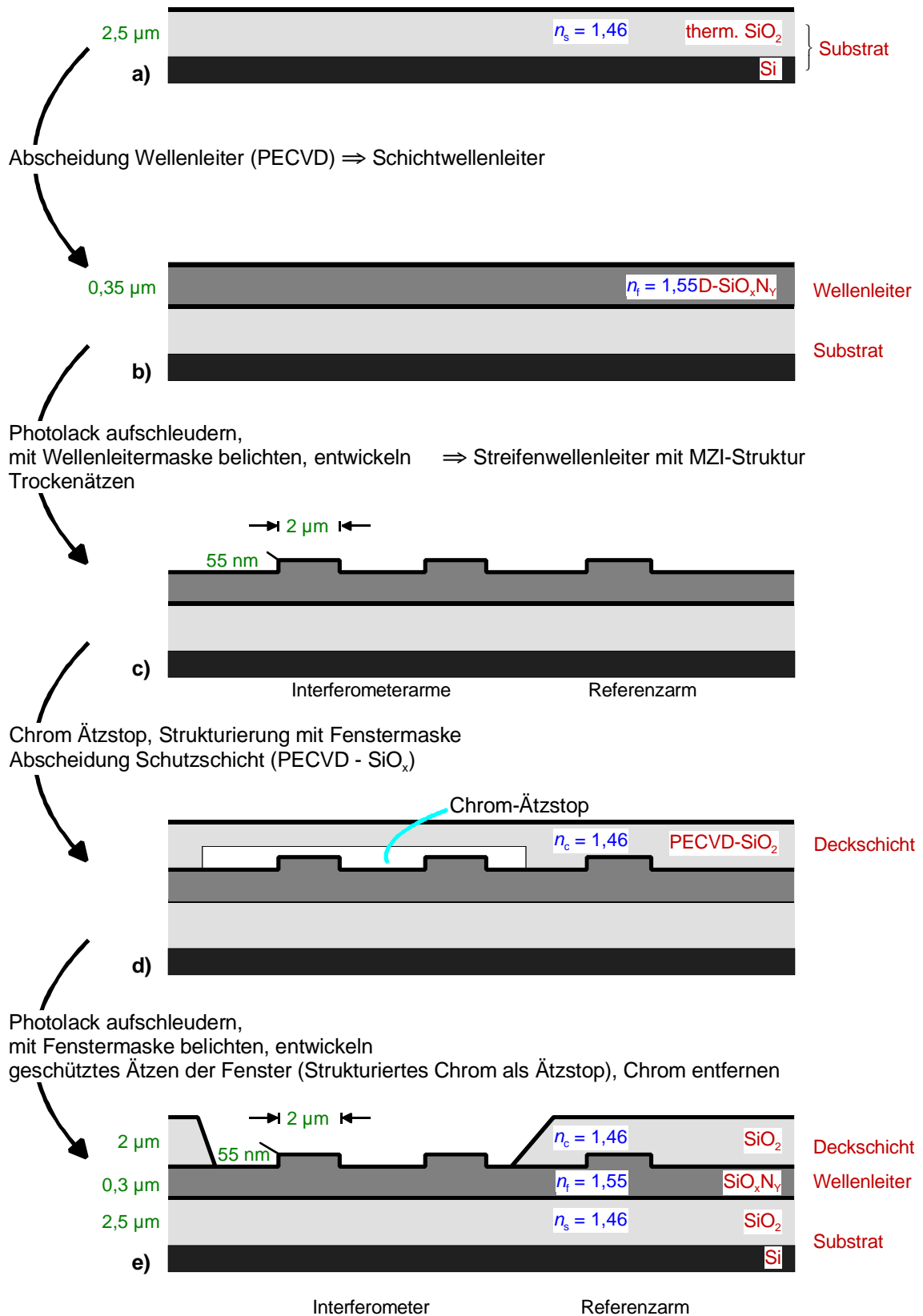


Abbildung 3-12: Herstellung des integriert-optischen Mach-Zehnder-Interferometers

Es folgt die PECVD-SiO<sub>2</sub>-Schutzschicht mit einem Brechungsindex von  $n_f \approx 1,46$  (Abbildung 3-12 d). Diese Schutzschicht verringert außerhalb des Meßbereiches die Wellenleiterdämpfung<sup>10</sup>. Im Meßbereich des Interferometers (Meßfenster) muß sie durch Ätzen entfernt werden, damit das Interferometer für Messungen zugänglich ist.

Um Meßfenster in diese Struktur ätzen zu können, ohne den Wellenleiter zu beschädigen, wird vor der Abscheidung der Schutzschicht eine Chromschicht als sog. "Ätzstop" thermisch aufgedampft. Da Metalle das geführte Licht stark dämpfen, muß diese Chromschicht wieder vollständig entfernt werden. Im Fensterbereich kann das Chrom nach dem Fensterätzen naßchemisch entfernt werden. Außerhalb des Fensterbereiches ist die Chromschicht nur vor der PECVD-Beschichtung zugänglich. Um sie nur außerhalb der Meßfenster selektiv zu beseitigen, wird Photolack aufgeschleudert und durch Kontaktbelichtung mit der Fenstermaske strukturiert. Um die Wellenleiter auch am Rand des Meßfensters vor dem Ätzen zu schützen, wird der belichtete Bereich durch zwei, je 10 µm diagonal verschobene, Belichtungen etwas vergrößert. Nach der Entwicklung des Photolacks wird der unbelichtete Außenbereich durch Naßätzen mit Cerammoniumnitratlösung von Chrom befreit.

Nach der Abscheidung der SiO<sub>2</sub>-Schutzschicht werden die Fenster geätzt (Abbildung 3-12 e). Dafür wird erneut eine Photolackschicht aufgeschleudert, durch die Fenstermaske kontaktbelichtet und entwickelt. Durch den strukturierten Photolack kann nun in der Ionenätzenanlage das Fenster geätzt werden. Der Chrom-Ätzstop wird anschließend naßchemisch mit Cerammoniumnitratlösung entfernt.

Schließlich werden die fertigen Wafer mit Schutzlack versehen, um in einzelne Bauteile zersägt werden zu können. Einkoppelkanten werden nur von der Rückseite angesägt und gebrochen, um möglichst glatte Kanten zu erhalten. Der Schutzlack, mit der Verschmutzung durch Sägemehl wird durch Remover oder Aceton entfernt.

Abschließend werden verbliebene Verschmutzungen durch konzentrierte Salpetersäure entfernt.

### 3.3 Experimenteller Aufbau

#### 3.3.1 Optik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Einkopplungsverfahren erprobt. In Stirnflächenkopplung wurde die Einkopplung mit Hilfe von unterschiedlichen Mikroskopobjektiven, die Auskopplung mit unterschiedlichen Glasfasern oder ebenfalls mit Mikroskopobjektiven getestet. Die Glasfaserauskopplung hat sich wegen geringer Signalstabilität und Schwierigkeiten in der Handhabung nicht bewährt. Als optimal erwies sich die Kombination von einem 20fach-Mikroskopobjektiv zur Ein- und einem 40fach-Mikroskopobjektiv zur Auskopplung (Abbildung 3-13).

---

<sup>10</sup> Besonders stark würde die Wellenleitermode durch die aufgesetzte Küvette gedämpft.

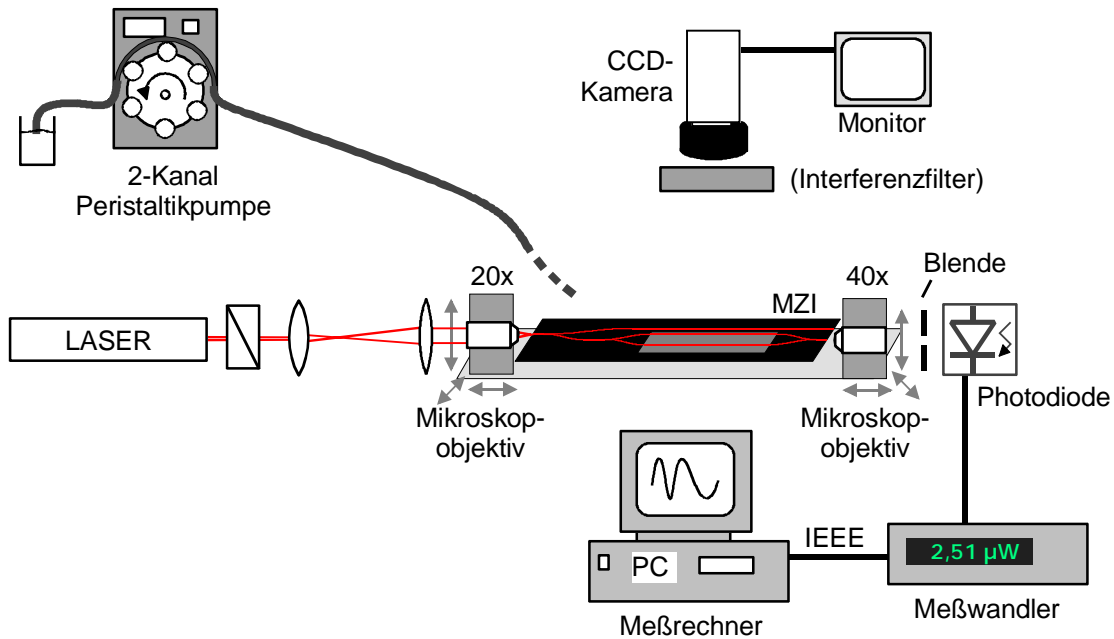


Abbildung 3-13: Optischer Aufbau in Stirnflächenkopplung (schematisch)

Der linear polarisierte Laserstrahl ( $440 \text{ nm} \leq \lambda \leq 632,8 \text{ nm}$ , meistens HeNe, Fa. Uniphase,  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ , 10 mW) wird zur optimalen Ausleuchtung des verschiebbaren Einkoppelobjektives (20 $\times$ , Fa. Will / Wetzlar) zehnfach aufgeweitet. Die Feinjustage der Einkopplung erfolgt dadurch, daß die optische Bank, auf der sich Einkoppeloptik, Interferometer, Auskoppeloptik und Detektor befinden, als ganzes gedreht oder gehoben wird. Die Lage dieser drei Bauelemente wird dadurch nicht verändert, aber durch den leicht unterschiedlichen Strahlengang im Einkoppelobjektiv läßt sich die Kopplung sehr genau justieren. Dadurch wird die Kopplung stabiler und eine Nachjustage der Auskopplung ist meist nicht notwendig. Für eine optimale Einkopplung ist besonders wichtig, daß der Abstand zwischen Mikroskopobjektiv und Einkoppelkante gut justiert ist, um mit einem möglichst kleinen Strahlquerschnitt in den Wellenleiter koppeln zu können.

Die Auskopplung erfolgt mit einem 40-fach-Mikroskopobjektiv (Fa. Zeiss). Zwischen Auskoppelobjektiv und Detektor (Photodiode 818SL Fa. Newport) befindet sich eine Blende, damit nur das Licht aus der propagierenden  $TE_{00}$ -Mode auf die Detektoroberfläche gelangt. Der Raum zwischen Mikroskopobjektiv und Detektor ist lichtdicht, so daß keine Lock-In-Technik erforderlich ist. Der Meßwandler (2832-c, Firma Newport) liest die gemessene Intensität genau und schnell aus und überträgt sie über eine IEEE-Schnittstelle zu einen Meßrechner.

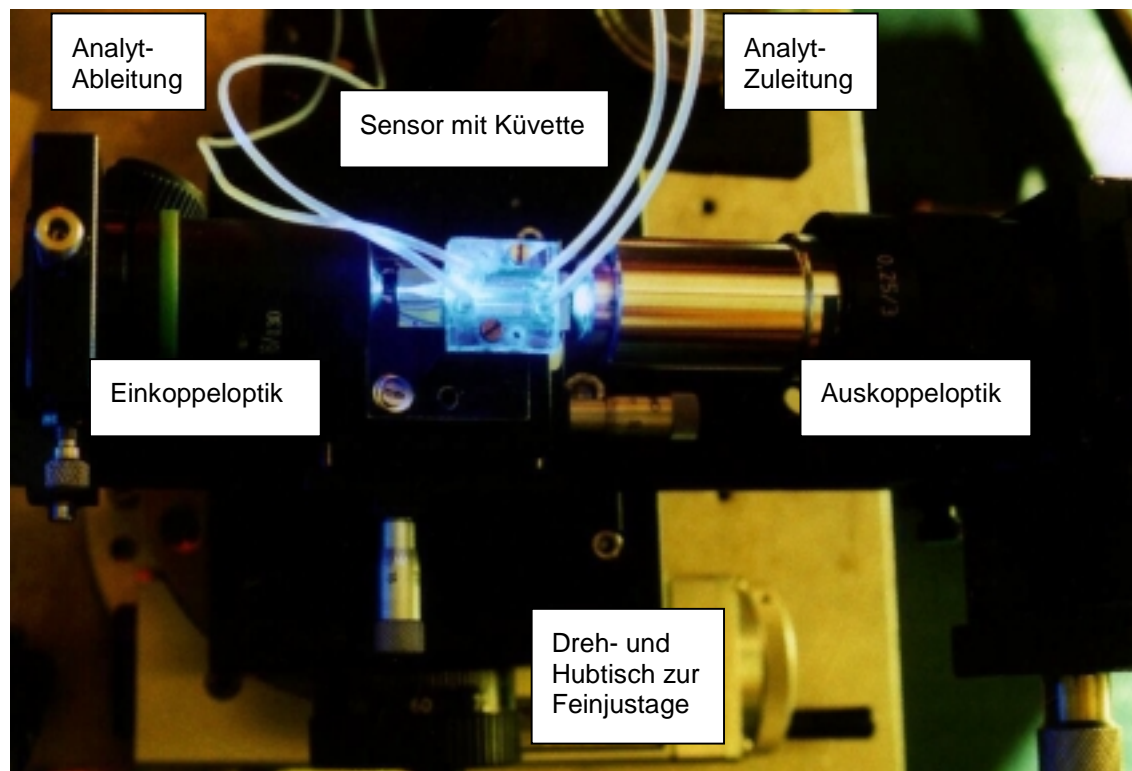


Abbildung 3-14: Meßaufbau mit Ein- und Auskopplung sowie der Fluidik

### 3.3.2 Fluidik

Aufgabe der Fluidik ist es, Analytmoleküle möglichst schnell und effektiv zu Oberfläche zu transportieren. Innerhalb einer Küvette kann die Lösung parallel zu Oberfläche transportiert werden. Senkrecht zur Oberfläche erfolgt der Transport von Molekülen hauptsächlich durch Diffusion. Dadurch wird bei großen Küvettenvolumen die Kinetik von Oberflächenreaktionen behindert, da die Moleküle einen zu weiten Weg zur Oberfläche zurückzulegen haben [TOV95]. Andererseits kann bei kleinem Küvettenvolumen die Analytkonzentration so gering sein, daß die Menge der Analytmoleküle in Lösung durch die Adsorption merklich sinkt. Dies macht es erforderlich, die Lösung kontinuierlich auszutauschen.

Die Küvette sollte, damit möglichst viele Moleküle dicht an der Sensoroberfläche vorbeiströmen, flach und im Verhältnis dazu recht breit sein.

Um vergleichende Versuche mit beiden Meßkanälen machen zu können, ist eine Zweikanal-Küvette von Vorteil. Die zwei Kanäle wurden realisiert, indem in die Dichtungsfolie (Reinraum-Adhäsionsfolie aus Polyvinylfluorid, PVF, 300  $\mu\text{m}$ ) zwischen Küvette und Sensoroberfläche zwei rechteckige Löcher geschnitten wurde. In der Küvette befinden sich vier Löcher, in die Stahlkapillare zum Anschluß von Schläuchen geklebt sind (Abbildung 3-15).

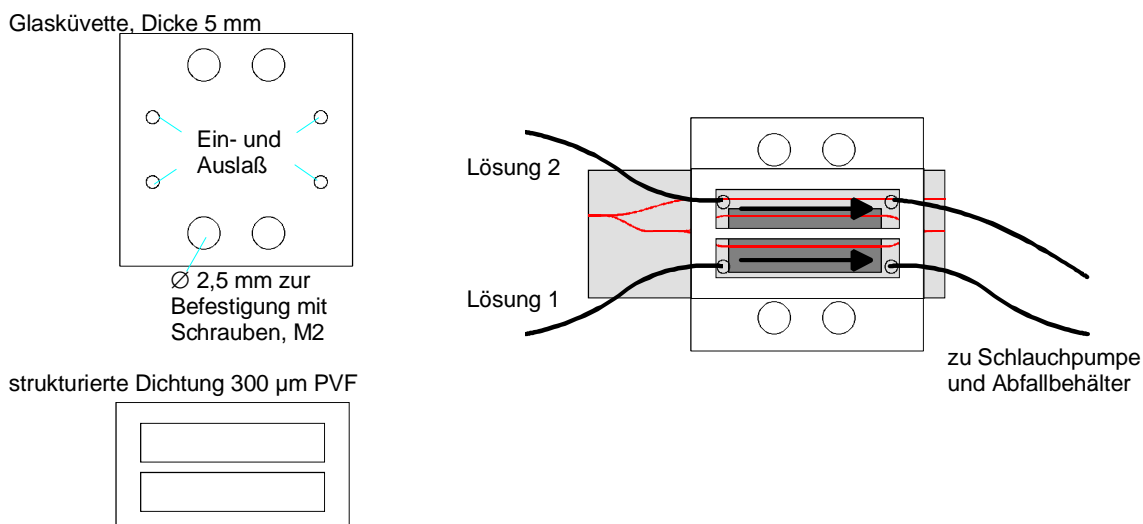


Abbildung 3-15: Zweikanal-Küvette zum separaten Überspülen der beiden Interferometerarme

Das Volumen der Küvette wird durch die Dicke der Dichtungsfolie und die Größe der Löcher bestimmt:  $3 \text{ mm} \cdot 14 \text{ mm} \cdot 0,3 \text{ mm} = 12,6 \text{ µl}$ . Durch das kleine Küvettenvolumen können Luftblasen entstehen, die die Messung erheblich stören. Sobald sich jedoch ein hydrophiles Adsorbat auf der Sensoroberfläche befindet, lassen sich Luftblasen meist sehr schnell wieder abspülen.

Die Lösungen wurden mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Gilson M312) durch die Küvette gezogen. Die Pumpe wurde im Saugbetrieb verwendet, um Verunreinigungen durch die weichen Schläuche der Pumpe zu vermeiden.

### 3.4 Erprobung und Auswertung des Meßsignals

#### 3.4.1 Refraktive Messungen an Salzlösung

Zur Erprobung des Mach-Zehnder-Interferometers wurde zunächst keine Adsorption von Molekülen durchgeführt, sondern der Brechungsindex der Deckschicht variiert. Dafür wurde der Sensor mit zwei Salzlösungen unterschiedlicher Konzentration überspült. Der Brechungsindexunterschied dieser Lösungen wurde mit einem Abbé-Refraktometer zu  $\Delta n_s = 1,5 \cdot 10^{-3}$  bestimmt. Mit der theoretischen Empfindlichkeit von  $\partial\phi/\partial n_c \cong 2000 \pi$  erwartet man für diesen Brechungsindexunterschied eine Phasenverschiebung  $\phi \cong 3 \pi$ .

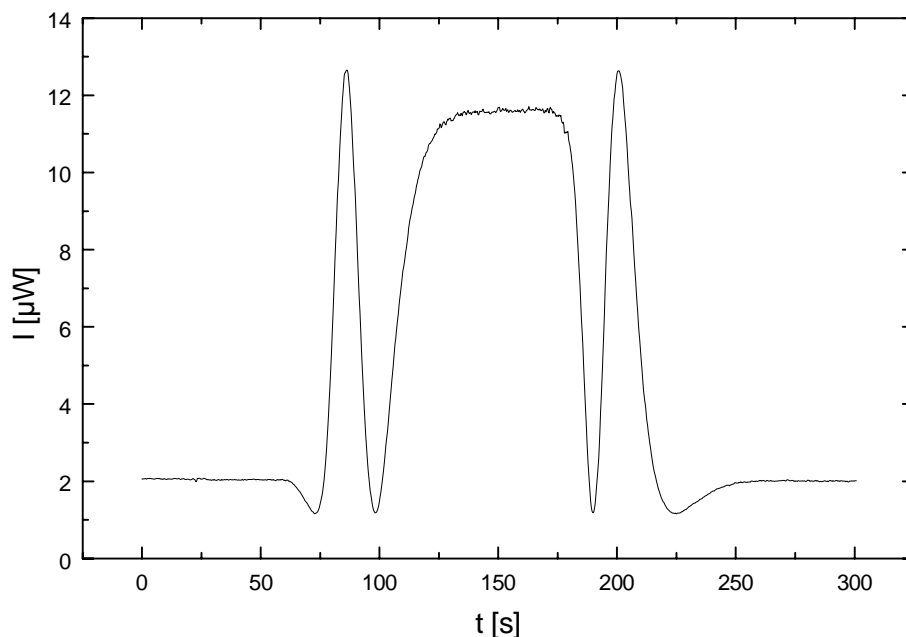


Abbildung 3-16: Referenzsignal durch Änderung des Deckschicht-Brechungsindex um  $\Delta n_c = 1,5 \cdot 10^{-3}$ .

Abbildung 3-16 zeigt die Messung der zeitabhängigen Ausgangsintensität bei Hin- und Rücktausch der Salzlösungen bei  $t = 60$  s bzw.  $t = 180$  s. Man beobachtet, daß die gemessene Intensität jeweils zwei Minima und ein Maximum durchläuft. 30 s nach Beginn der Intensitätsänderung erreicht das Meßsignal wieder ein Plateau. Beim Rücktausch der Lösungen stellt sich wieder die ursprüngliche Intensität ein.

Obwohl das Küvettenvolumen etwa  $V = 12,6 \mu\text{l}$  und der Durchfluß etwa  $\Delta V/\Delta t = 15 \text{ ml/h} \cong 4,2 \mu\text{L/s}$  betragen, benötigt der Austauschprozeß etwa 30 s, also wesentlich länger, als im Idealfall zu erwarten wäre ( $12,6 \mu\text{l} / 4,2 \mu\text{l/s} \cong 3 \text{ s}$ ). Es ist also in der Küvette nicht von einem gleichmäßigen Durchströmen sondern von einer kontinuierlichen Durchmischung der alten Lösung mit neuer Lösung auszugehen. Die Adsorption oberflächenaktiver Substanzen wird kinetisch nicht so stark behindert, da oberflächenaktive Moleküle auch schon bei geringerer Konzentration auf die Oberfläche zu adsorbieren beginnen.

An Abbildung 3-16 fällt auf, daß die Intensität in den Minima nicht ganz auf Null zurückgeht. Dieser Effekt kann unterschiedliche Ursachen haben:

- ungleichmäßige Aufteilung der Intensität an einem der Y-Verzweiger
- unterschiedliche Wellenleiterdämpfung der beiden Interferometerarme
- Detektion unerwünschter Strahlung im Detektor, z. B. aus Schichtwellenleitermoden

Der Effekt ist allerdings für die Anwendung des Mach-Zehnder-Interferometers als Sensor unerheblich, da die Minimalintensität sich im Laufe einer Messung nur unwesentlich ändert.

Eine Abschätzung der Phasenverschiebung ergibt einen Wert von etwa  $\phi = 3 \pi$ , wie es durch Sensitivität und Brechungsindexunterschied der Salzlösungen zu erwarten war. Für die kinetische Untersuchung von Adsorptionsprozessen ist es nötig, die gemessene Intensität reproduzierbar zeitabhängig in eine Phasenverschiebung umrechnen zu können. Dazu werden in den folgenden beiden Abschnitten zwei Verfahren vorgestellt.

### 3.4.2 Anpassung einer Sinuskurve an das Meßsignal

Im Abschnitt 3.1.2 wurde bereits gezeigt, daß die Ausgangsintensität  $I$  Kosinusförmig von der Phasendifferenz der beiden Meßarme abhängt. Daher wurde zur Auswertung zunächst der Ansatz gewählt, eine Kosinus- oder Sinuskurve mit den Parametern  $I_{\min}$ ,  $I_{\max}$  und  $\phi_0$  an das Meßsignal anzupassen:

$$\frac{I(t) - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} = \sin(\phi_0 + \omega(t) \cdot t) \quad (3-6)$$

Da die Änderung der Phasenverschiebung zeitabhängig ist, kommt als weiterer Parameter die zeitabhängige Kreisfrequenz  $\omega(t)$  hinzu. Die Zeitabhängigkeit wurde eingebracht, indem  $\omega$  für Zeitintervalle von etwa 10 s als stückweise konstant angenommen wird. Abbildung 3-17 zeigt eine solche Auswertung, die mit Hilfe eines MS Excel-Blattes durchgeführt wurde. Dabei wurden die Parameter so optimiert, daß die Abweichung der angepaßten Kurve von der Meßkurve möglichst klein wird.

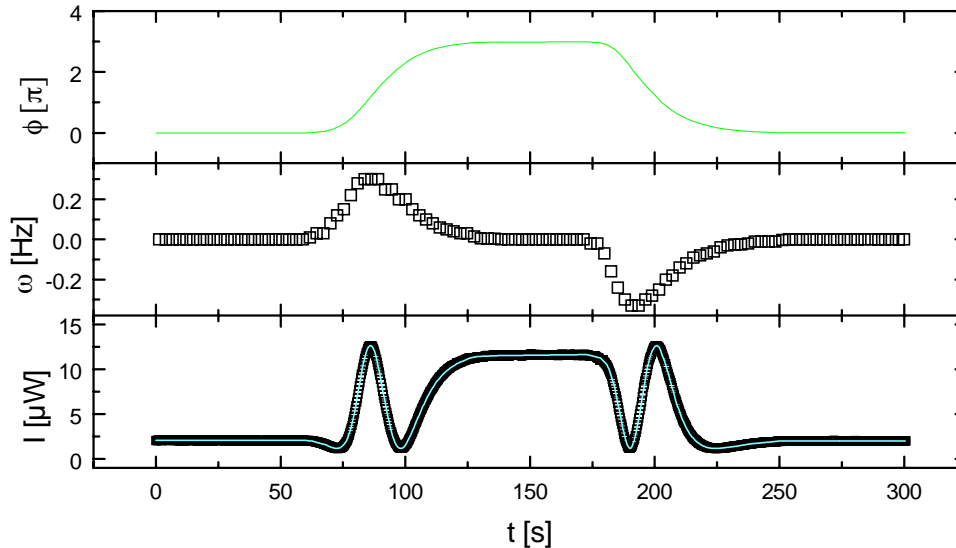


Abbildung 3-17: Ermittlung der Phasenverschiebung  $\phi(t)$  (oben) durch Anpassung einer Sinuskurve an das Meßsignal  $I(t)$  aus dem Beispiel der Salzlösungen (unten) mit den Anpassungsparametern  $\phi_0 = 4,15 \pi$ ,  $I_{\max} = 12,65 \mu\text{W}$ ,  $I_{\min} = 1,16 \mu\text{W}$  und den in der Mitte dargestellten lokalen Kreisfrequenzen  $\omega(t)$

Man sieht, daß die Anpassung sehr gut mit den Meßwerten übereinstimmt (Abbildung 3-17 unten). Die ermittelte Phasenverschiebung  $\phi(t)$  steigt wie erwartet ab ca. 60 s an und fällt dann bei etwa 180 s wieder auf den ursprünglichen Wert zurück.

Zu dieser Auswertungsmethode ist anzumerken, daß es wegen der Zahl anzupassender Parameter einige Zeit in Anspruch nimmt, eine solche Anpassung durchzuführen. Auch ist eine solch gute Übereinstimmung nur möglich, wenn  $I_{\max}$  und  $I_{\min}$  zeitlich konstant bleiben, was nicht für alle Messungen gleich gut der Fall ist.

### 3.4.3 Direkte Umrechnung – Arcussinusverfahren

Eine naheliegende Methode, um die sinusförmige Intensität in die Phasenverschiebung umzurechnen, ist es natürlich, die gemessenen Intensitäten mit Hilfe der bereits eingeführten Größen  $I_{\max}$  und  $I_{\min}$  auf Werte  $\in [-1, +1]$  umzunormieren, um die normierten Werte  $\hat{I}(t)$  direkt mit dem Arcussinus in die Phase  $\phi(t)$  umzurechnen.

$$\hat{I}(t) = 2 \cdot \frac{I(t) - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} - 1 \quad (3-7)$$

Für den Bereich zwischen einem Maximum und einem Minimum funktioniert diese Vorgehensweise auch nahezu problemlos. Etwas komplizierter wird es, wenn man Meßkurven betrachtet, die mindestens ein Maximum oder Minimum überschreiten.

Dann muß man beachten, daß je nachdem, ob man sich gerade vor oder nach einem Maximum befindet, steigende bzw. fallende Intensität einem steigenden Brechungsindex entspricht. In Abbildung 3-18 c wird dieser Effekt berücksichtigt.

Nun muß nur noch dafür Sorge getragen werden, daß die Anschlußbedingungen zwischen den einzelnen Bereichen stimmen. Dafür wird eine Größe "ganzzahliger Sinus" eingeführt, die in jedem Maximum bzw. Minimum bei steigender Phase um  $1 \pi$  steigt, bei fallender Phase um  $1 \pi$  sinkt (Abbildung 3-18 d: Stufenfunktion). Addiert man diese Funktion zu der vorher bestimmten Funktion (Abbildung 3-18 c), so resultiert die Phasenverschiebung  $\phi(t)$  (Abbildung 3-18 d). Der ganzzahlige Sinus kann entweder von Hand vorgegeben, oder automatisch ermittelt werden.

Das Resultat entspricht dem des vorherigen Abschnittes. Für diese Auswertung sind jedoch weniger Parameter erforderlich. Es sind lediglich  $I_{\max}$  und  $I_{\min}$  sowie die Zeitbereiche steigender und fallender Phase  $\phi$  vorzugeben.

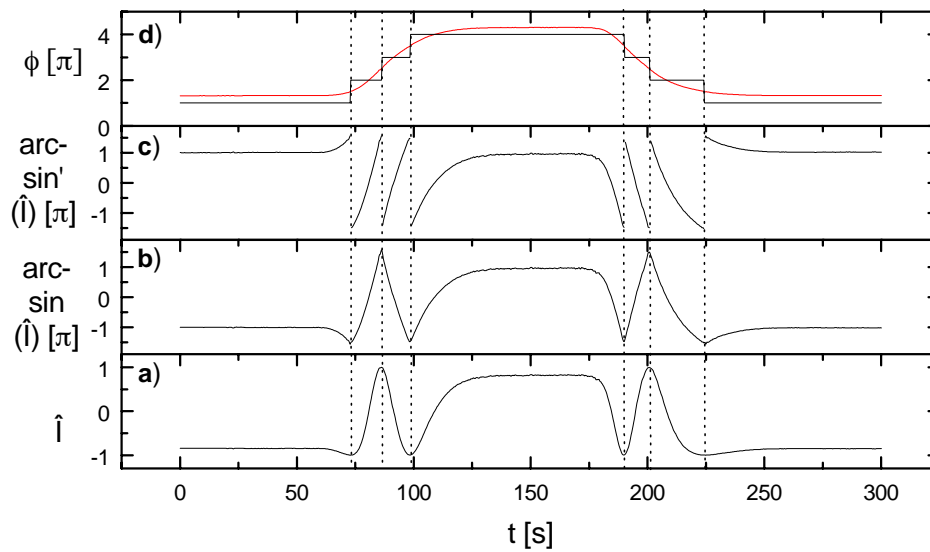


Abbildung 3-18: Ermittlung der zeitabhängigen Phasenverschiebung  $\phi(t)$  durch direkte Umrechnung, normierte Intensität (a), aus der normierten Intensität berechneter Arcussinus (b, c siehe Text), daraus ermittelte Phasenverschiebung (d)

### 3.4.4 Vergleich der beiden Auswertungsmethoden

Abbildung 3-19 zeigt, daß sich die Resultate beider Auswertungsverfahren sehr stark ähneln. Die maximale Abweichung der gezeigten Kurven voneinander beträgt  $0,05 \pi$ , im Mittel lediglich  $0,006 \pi$ .

Als Phasenverschiebung durch die Salzlösungen ergibt sich mit den beiden Auswertungsmethoden:

Kurvenanpassung:  $\phi = 2,983 \pi \pm 0,004 \pi^{11}$

Arcussinusverfahren:  $\phi = 2,980 \pi \pm 0,006 \pi$

Die beiden Verfahren liefern also für die Beispielmessung innerhalb ihres Fehlers gleiche Werte. Unter Annahme einer Sensitivität von  $\partial\phi / \partial n_c = 2000 \pi$  (Gleichung (3-5)) ergibt sich ein Brechungsindexunterschied von  $\Delta n_c = 1,5 \cdot 10^{-3}$ , in guter Übereinstimmung mit der Refraktometer-Messung. Für beide Verfahren gilt, daß die Signalstabilität über Zeiträume ohne Lösungsmittelaustausch weniger als  $0,002 \pi$  betragen kann. Dies entspräche bei Adsorptionsexperimenten einer Schichtdicke ( $n_{ad} = 1,45$ ) von ca.  $0,5 \text{ pm}$ ! Es ist also zu erwarten, daß sich Adsorptionsexperimente weit im Submonolagenbereich durchführen lassen.

<sup>11</sup> Die Werte errechnen sich aus Mittelwert und Standardabweichung über je 40 s lange Meßintervalle.

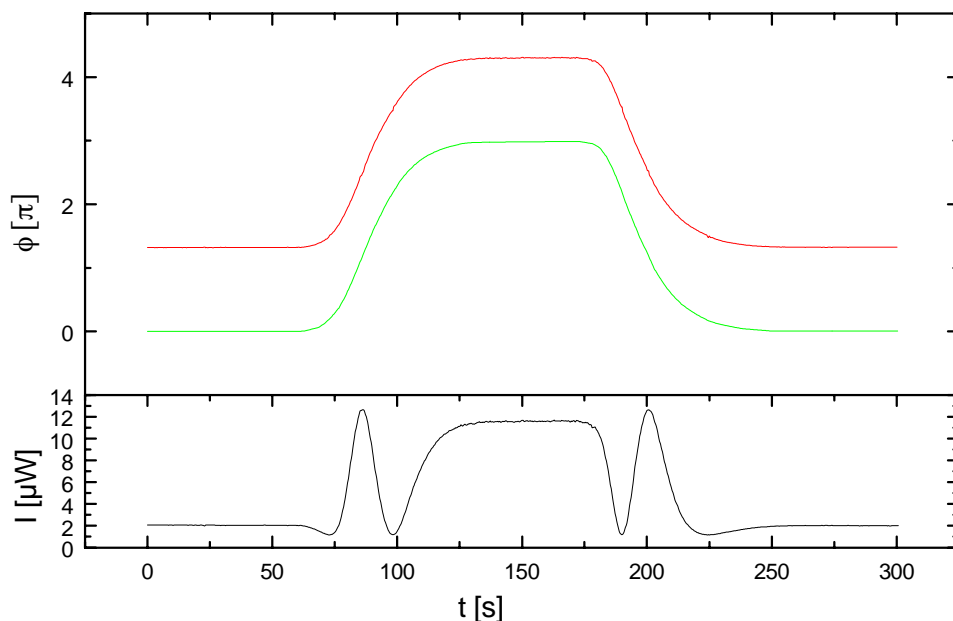


Abbildung 3-19: Vergleich der durch die beiden Umrechnungsverfahren ermittelten Phasenverschiebungen  $\phi(t)$  (oben, relative Auftragung), Meßintensität (unten)

Unterschiede ergeben sich jedoch, wenn das Meßsignal stärker rauscht oder die Maximalintensität nicht konstant bleibt:

- Das Kurvenanpassungsverfahren läßt sich auf Meßkurven anwenden, die verrauscht sind oder deren Maximalintensität driftet. Ist die Maximalintensität nicht konstant, so fällt die Wahl der Anpassungsparameter schwerer.
- Das Arcussinusverfahren gibt das Rauschen so wieder, wie es gemessen wurde, teilweise entstehen Unstetigkeiten in Maxima und Minima. Auch Drift der Maximalintensität  $I_{\max}$  führen zu Sprüngen. Beides führt zu einem Fehler von  $\phi(t)$  in Größenordnung der "Sprunghöhe".

Meist lassen sich jedoch durch sorgfältige Einkopplung und ausreichendes Spülen Intensitätsschwankungen klein halten. Deshalb wurde für die im folgenden gezeigten Messungen das Arcussinusverfahren verwendet.

### 3.5 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, daß es möglich ist, mit Siliziumtechnik ("silica on silicon") ein Mach-Zehnder-Interferometer herzustellen, das sensitiv auf Brechungsindexunterschiede der Deckschichten reagiert und deshalb geeignet zur Detektion dünner Adsorbatschichten ist.

Durch die verwendete Zweikanal-Küvette lassen sich beide Interferometerarme mit unterschiedlichen Lösungen überspülen. Man kann stabile und rauscharme Messungen des Interferenzsignals in Abhängigkeit des Deckmedium-Brechungsindex durchführen.

Die Signalstabilität der vorgestellten Messungen läßt erwarten, daß sehr dünne Adsorbatschichten nachweisbar sind ( $d_{\text{ad}} \leq 1 \text{ pm}$ ).

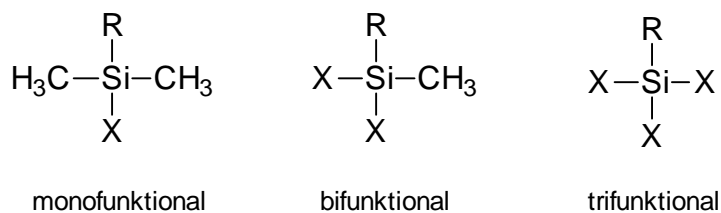
Um aus der gemessenen Intensität die Phasenverschiebung des Interferometers zu bestimmen, wurden zwei Verfahren vorgestellt, die mit sehr großer Genauigkeit übereinstimmen.



## 4 Silanisierung oxidischer Oberflächen

In diesem und den folgenden Kapiteln soll dargestellt werden, wie durch selbstadsorbierende Adsorbatschichten oxidische Oberfläche gezielt so modifiziert werden können, daß sie spezifische Adsorptionseigenschaften aufweisen.

Selbstadsorbierte Monolagen bilden sich aus Stoffen, die aus einer Lösung oder aus der Gasphase an eine Oberfläche chemisorbieren. Durch Selbstadsorption lassen sich Oberflächeneigenschaften gezielt modifizieren (Reibungskoeffizient, Hydrophilizität, Affinität gegenüber bestimmten Molekülen etc.) Die häufigste in der Literatur beschriebenen selbstadsorbierten Monolagen sind Alkanthiole auf Gold oder Silber [ULM91, ULM96, KNO97, MIT95, HAR96, WEI98]. Viele Substratoberflächen sind allerdings Metalloxide, häufig vor allem Silikate. Gebräuchlich sind beispielsweise Gläser, Quarz, Glimmer oder andere Metalloxide, wie sie in Wellenleiter-Sensoren verwendet werden (z.B. Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oder TiO<sub>2</sub>). Auch andere Oberflächen, die im Volumen nicht oxidiert sind, bilden an Raumluft einen dünnen Oxidfilm. Ihre Oberflächen verhalten sich daher chemisch ähnlich. Zum Beispiel bilden Siliziumwafer bereits bei Raumtemperatur einen etwa 2 nm dicken Siliziumdioxidfilm [TOV95].



R: organischer Rest  
**hydrolysierbare Gruppe -X:**  
-OCH<sub>3</sub>: Methoxysilan  
-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>: Ethoxysilan  
-Cl: Chlorosilan

Abbildung 4-1: Unterschiedliche Organosilane im Vergleich

Für diese Art von Oberflächen bietet sich eine andere Gruppe selbstadsorbierender Substanzen an: die Organosilane (im folgenden auch kurz Silane). Mit Organosilanen ist es möglich, Oxide direkt zu beschichten, allerdings werden Silanadsorbate zur Verbesserung der Bindung meist ausgeheizt. Dieses Ausheizen ist ein wichtiger Grund dafür, daß bei Untersuchungen selbstadsorbierter Monolagen seltener Silane auf oxidischen Substraten als Thiole auf Edelmetallen verwendet werden<sup>12</sup>. Empfindliche

---

<sup>12</sup> Manche Autoren berichten allerdings über gleich gute Bindungseigenschaften ohne auszuheizen [SPR97].

Biomoleküle mit Silanköpfen zu versehen und direkt zu adsorbieren - wie es bei Thiolen häufig praktiziert wird - findet deshalb nur selten Verwendung. Statt dessen wird bei Oxidoberflächen häufig das Verfahren angewandt, ein einfaches Silan zu immobilisieren und den gewünschten Stoff über Verbindungsmoleküle (engl. interlinker) zu adsorbieren [MAT96].

Monolagen aus Silanen bilden das Bindeglied zwischen Oxiden (z.B.  $\text{SiO}_2$ ) und organischen Adsorbaten. Das wird auch in Ihrer Struktur deutlich; sie bestehen aus einer oberflächenreaktiven Silan-Kopfgruppe, die an die Oxidoberfläche chemisorbieren kann und einem organischen Rest, der je nach Anwendung sehr unterschiedlich aussehen kann. Durch eine geeignete Auswahl des organischen Restes können die Oberflächeneigenschaften gezielt beeinflusst werden [MAT96, PLU90, PRU98, PRU98a, QUI97, SPR97, BRA93]. Viele dieser Silane sind kommerziell erhältlich [ABC95] und werden auch in großtechnischem Maßstab verwendet (z.B. Hexamethyldisilazan (HMDS) zur Hydrophobisierung von Oberflächen in der Halbleiterindustrie).

Der Silankopf besteht aus einem Siliziumatom, das von einer oder mehreren hydrolysierbaren Gruppen sowie einem organischen Rest umgeben ist (Abbildung 4-1). Die hydrolysierbare Gruppe kann eine Chlor- oder Alkoxygruppe (v.a. Methoxy- oder Ethoxy-) sein. Dabei sind Chlorosilane reaktiver, haben jedoch den Nachteil, daß sie möglicherweise mit funktionalen Gruppen des organischen Restes reagieren können. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Methoxysilane verwendet.

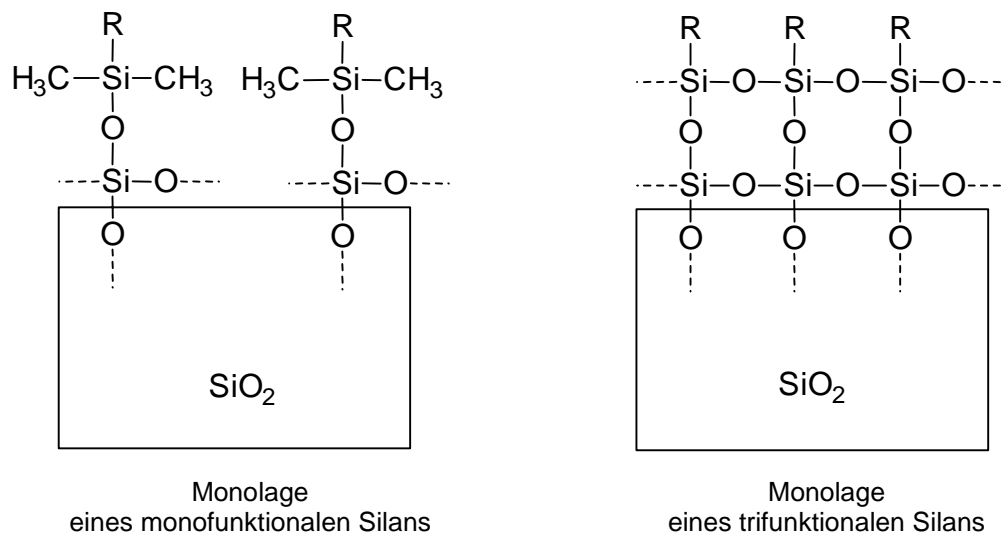


Abbildung 4-2: Vergleich der Monolagen eines mono- und eines trifunktionalen Silans (schematisch)

Je nachdem, wieviele hydrolysierbare Gruppen der Silankopf aufweist, bezeichnet man die Silane als mono-, bi- oder trifunktional. Monofunktionale Silane binden einzeln an die Oberfläche, als Konkurrenzreaktion können sie in Lösung Dimere ausbilden. Bifunktionale Organosilane bilden sowohl an der Oberfläche als auch in Lösung Oligomere. Trifunktionale Silane bilden an der Oberfläche ein zweidimensionales polymeres Netzwerk (Abbildung 4-2, [TOV95]). In Lösung können sie wie bifunktional

tionale Silane Oligomere ausbilden<sup>13</sup>. Wegen ihrer größeren Stabilität durch Quervernetzung an der Oberfläche wurden für diese Arbeit trifunktionale Silane verwendet.

## 4.1 Reaktionsschema

Silane können aus einer Lösung oder aus der Gasphase abgeschieden werden. Besonders für kleine, leicht verdampfbare Adsorbatmoleküle ist die Abscheidung aus der Gasphase gut geeignet. Für größere Moleküle oder die Koadsorption kleiner und großer Silane verwendet man die Adsorption aus Lösung. Bei der Verwendung von Methoxysilanen bietet sich Methanol als Lösungsmittel an.

Aus Lösung findet die Chemisorption von Organosilanen an oxidische Oberflächen nach allgemeinem Verständnis [TRI95] durch folgenden Mechanismus statt (Abbildung 4-3):

- Das Silan wird durch im Lösungsmittel befindliches Wasser hydrolysiert.
- Das hydrolysierte Silan physisorbiert an die oxidische Oberfläche.
- In einem dritten Schritt binden die Silanolgruppen von Substrat und Silan kovalent unter Abgabe von Wasser. Indem das Wasser durch Ausheizen unter Vakuum entfernt wird, kann dieser Schritt beschleunigt werden.

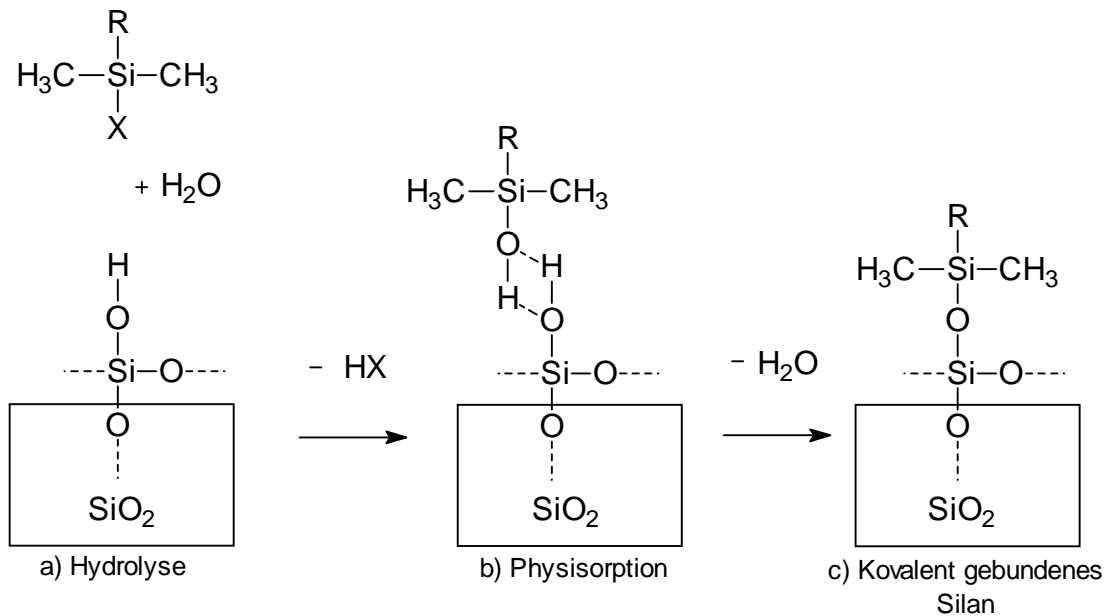


Abbildung 4-3: Mechanismus der Silanisierungsreaktion

<sup>13</sup> Dreidimensionale Polymere in Lösung können auch bei trifunktionalen Silanen wegen sterischer Behinderung durch den organischen Rest kaum auftreten.

## 4.2 Oberflächen-Aktivierung

Sauerstoff tritt an Silikatoberflächen in zwei unterschiedlichen Gruppen auf, Siloxan (-Si-O-Si-) und Silanol (-Si-OH)<sup>14</sup>. Da zur Chemisorption von Silanen Silanolgruppen notwendig sind, ist es nötig, vor der Adsorption möglichst viele Siloxangruppen in Silanolgruppen umzuwandeln (Aktivierung). Diese Umwandlung erfolgt unter Aufnahme von Wasser.

Verschiedene Verfahren zur Erzeugung von Silanolgruppen sind bekannt. Die einfachste Methode ist, die Oberfläche mit kochendem Wasser zu behandeln. Sowohl Säuren als auch Basen können den Prozeß katalysieren (Abbildung 4-4). Manche Substrate (z.B. LaSF N 9-Glas) sind instabil gegenüber solcher Behandlung. Für diese Substrate bietet sich eine Aktivierung mit Wasserplasma oder gepufferten alkalischen Lösungen an. Kaliumionen begünstigen dabei den Aktivierungsprozeß. Nach einer Aktivierung können die Silanolgruppen mit einer Dichte bis zu  $5 \text{ nm}^{-2}$  vorliegen [TOV95].

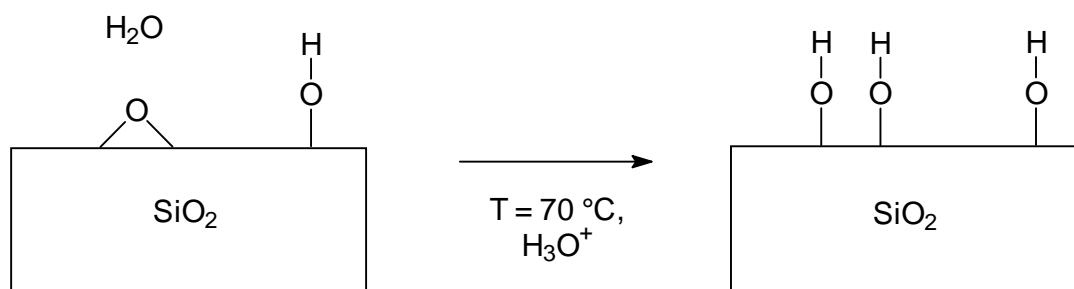


Abbildung 4-4: Aktivierung einer oxidischen Oberfläche

Umgekehrt zur Aktivierung findet auch die Rückreaktion von Silanolgruppen in Siloxangruppen unter Abgabe von Wasser statt. Bis  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  bleiben die Silanolgruppen weitgehend stabil. Im Vakuum werden die Silanolgruppen bei Temperaturen ab  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  und darüber zunehmend in Siloxangruppen abgebaut. Bei  $700 \text{ }^\circ\text{C}$  verringert sich die Zahl der Silanolgruppen auf  $1 \text{ nm}^{-2}$ . Um eine optimale Silanoldichte zu gewährleisten, sollten aktivierte Substrate möglichst ohne längere Zeitverzögerung weiterverarbeitet werden.

Nach der Aktivierung ist es zweckmäßig, die Substrate gut zu trocknen, da ein eventuell zurückbleibender Wasserfilm die Silanisierungsreaktion behindern könnte.

<sup>14</sup> Für andere oxidische Oberflächen wie z.B.  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  oder  $\text{TiO}_2$  gelten diese Ausführungen analog.

### 4.3 Durchführung der Silanisierung

Die Erstellung silanisierter Oberflächen gliedert sich in der Praxis in drei Teile. Zuerst wird der Träger gereinigt. Als zweiter Schritt wird die Oberfläche aktiviert. Dann folgt die Adsorption aus der Silanlösung mit abschließendem Ausheizen unter Vakuum.

Reinigung:

- Abspülen mit Aceton und Reinstwasser
- Entfernung eines bereits vorhandenen organischen Belags:
  - 30 min. 10 % Salpetersäure (bei 70 °C)
  - oder: Plasmareinigung (5 min, 200 W mit 0,1 hPa O<sub>2</sub>/ 0,9 hPa Ar)
- Reinigung mit alkalischer Reinigungslösung, 30 min bei 40 °C (2 % Hellmanex Küvettenreiniger, Firma Hellma, in Reinstwasser)
- erneutes Abspülen mit Reinstwasser
- im Stickstoffstrom trocknen und die Reinigung optisch kontrollieren

Aktivierung:

- 30 min. 10 % Salpetersäure bei 70 °C (Mach-Zehnder-Interferometer, Siliziumwafer, Glas)  
bzw. 30 min. 0,1 M Kaliumhydrogenphosphatpuffer, pH 9,4 (bei Plasmonensubstraten, empfindlichen Gläsern wie LaSF N 9)
- Abspülen mit Reinstwasser
- Trocknen im Stickstoffstrom
- 30 min. trocknen bei 60 °C im Vakuumtrockenschrank zur Entfernung physisorbierteren Wassers

Die Adsorption sollte sich direkt an die Aktivierung anschließen, da nur so gewährleistet ist, daß eine maximale Oberflächendichte der Silanolgruppen vorhanden ist.

Silanadsorption:

- Immersion in Silanlösung (0,2 mM Silan in Methanol<sup>15</sup>) mind. 2 h (oder über Nacht)
- Abspülen mit Methanol (wichtig besonders für trifunktionale Silane)
- Trocknen im Stickstoffstrom
- 2 h Ausheizen bei 120 °C im Vakuumtrockenschrank

Danach bleiben die präparierten Schichten über Wochen stabil und können, möglichst staubfrei, bei Raumtemperatur gelagert werden. Vor der Verwendung sollten die Substrate mit Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet werden.

---

<sup>15</sup> Methanol 99,8%, Firma Riedel-de Haën

#### 4.4 Silanadsorption

Mit Hilfe von Wellenleitermodenspektroskopie (WaMS, Sensor und Aufbau wie bei Weisser und Menges [WEI99a] beschrieben) wurde die Kinetik der Adsorption eines Silans (0,2 mM Biotinsilan, siehe Kapitel 6) beobachtet. Man sieht, daß die Kinetik in den ersten 5 min. schnell verläuft, sich danach längere Zeit mit geringerer Adsorptionsgeschwindigkeit fortsetzt.

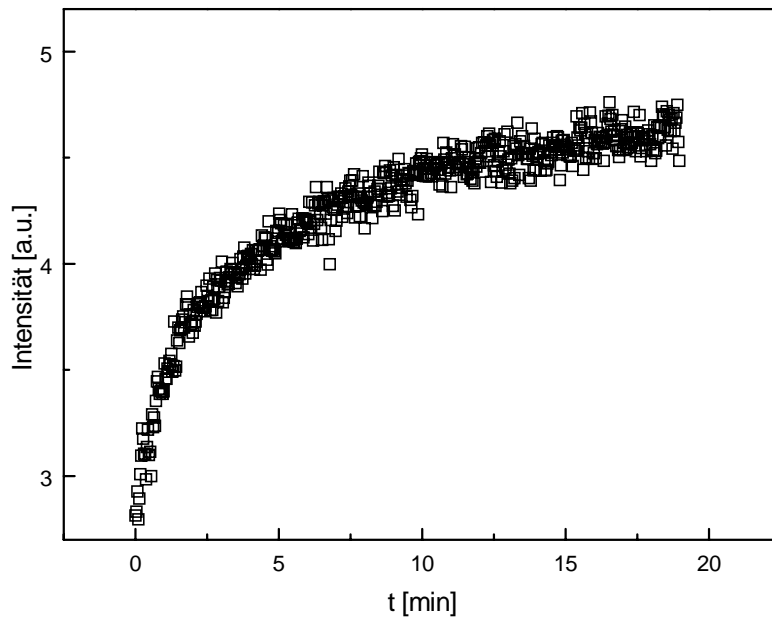


Abbildung 4-5: Kinetik der Adsorption eines Organosilan, beobachtet mit Wellenleitermodenspektroskopie (Intensitätsänderung bei festem Winkel auf der Flanke einer Mode)

#### 4.5 Zusammenfassung

Vergleicht man die durch Organosilane erstellten selbstadsorbierten Monolagen auf oxidischen Oberflächen mit Thiolmonolagen auf Gold, so sind folgende Unterschiede festzustellen:

- Thioladsorption erfordert keine Aktivierung und kein Ausheizen.
- Die Anwendung von Thiolen ist weniger komplex, da es bei der Anwendung von Organosilanen viel mehr Parameter gibt.
- Empfindliche Moleküle lassen sich, mit einer Thiolgruppe versehen, direkt adsorbieren, bei Organosilanen ist das wegen des Ausheizens nicht möglich.
- Organosilane können auf eine größere Vielfalt von Oberflächen gebunden werden.

- 
- Oxidische Oberflächen sind weniger anfällig für unspezifische Adsorption als z.B. Goldoberflächen, im besonderen für Proteine (Proteine enthalten meistens Cystein, das wiederum Thiol enthält.)
  - Während bei Thiolen häufig Desorption zu beobachten ist, sind Organosilane auch über längere Zeit stabil.



## 5 Gast-Wirt-Wechselwirkungen an immobilisierten Cyclodextrinen

Bisher wurden Herstellung und Beschichtung des verwendeten Mach-Zehnder-Interferometers beschrieben. In diesem Kapitel wird der beschriebene Sensor mit Cyclodextrinen, einem Modellsystem der Gast-Wirt-Wechselwirkung, erprobt. Dabei wird  $\beta$ -Cyclodextrin auf dem Interferometer immobilisiert. Anschließend wird die Wechselwirkung verschiedener Gastmoleküle mit dem immobilisierten Wirtmolekül untersucht.

### 5.1 Cyclodextrine

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide aus sechs, sieben oder acht miteinander verknüpften Anhydroglucoseeinheiten. Diese drei Cyclodextrine werden auch als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin bezeichnet. Sie kommen als natürliche Produkte der Stärke vor, können jedoch auch mit Hilfe des Enzyms Cyclodextrin-Glycosyltransferase katalytisch aus Stärke gewonnen werden [FAL97]. Cyclodextrin-Glycosyltransferase ist ein Enzym, das von verschiedenen Bazillen gebildet wird. Mit Hilfe von *Bacillus macerans* oder *Bacillus megaterium* wird beispielsweise zu nahezu gleichen Teilen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin ausgebildet. Allerdings sind auch Bazillen bekannt, mit deren Enzym sich gezielt vorwiegend eine Sorte erstellen läßt [SZE88, Seite 26].

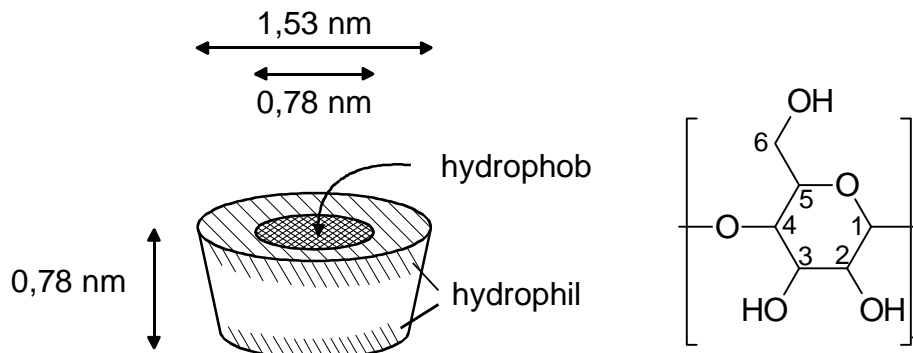


Abbildung 5-1:  $\beta$ -Cyclodextrin; links: schematische Darstellung (nach [SZE88]), rechts: Strukturformel

Cyclodextrine sind torusförmig. An der größeren Öffnung des Torus ("oben") befinden sich außen pro Monomereinheit zwei, an der kleineren je eine Hydroxylgruppe. Daher ist der Innenraum eher hydrophob, während die Außenhülle aufgrund der Hydroxylgruppen weitgehend hydrophil ist (Abbildung 5-1). Dies macht die Cyclodextrine wasserlöslich. Sie können aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung Gastmoleküle einschließen [WEN94, HÖF95]. Cyclodextrine haben umfangreiche wirtschaftliche Bedeutung. Sie finden Einsatz in der Pharmazie, der

Nahrungsmittelherstellung, sowie in verschiedenen anderen Bereichen der chemischen Industrie. Deshalb werden die Cyclodextrine seit einigen Jahren intensiv wissenschaftlich untersucht (1998 über 900 Veröffentlichungen, eine umfangreiche Zusammenfassung findet sich z.B. in [REH98]).

In wäßriger Lösung ist der Einschluß eines Gastes in den Innenraum des Cyclodextrins im wesentlichen die Substitution eingeschlossener Wassermoleküle durch das Gastmolekül. Obwohl dabei keine kovalente Bindung ausgebildet wird, ist der Gast-Wirt-Komplex doch energetisch begünstigt. Da mehrere Effekte zur Komplexierung beitragen, ist in der Literatur bislang strittig, welcher dabei den entscheidenden Anteil hat. Wesentlichen Anteil haben jedoch [SZE88]

- die van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Wirt und Gast, je nach Gast auch Wasserstoffbrückenbindungen,
- die Entfernung energetisch ungünstiger Wassermoleküle um den Gast und aus dem Cyclodextrin-Hohlraum,
- Entropiegewinn durch freiwerdende Wassermoleküle.

Im Gegensatz zu anderen Wirtmolekülen (z. B. monoklonale Antikörper) ist die Einlagerung in native Cyclodextrine unselektiv. Da sich sehr viele unterschiedliche Gastmoleküle einlagern können, sind native Cyclodextrine ungeeignet für die Sensorik. Sie eignen sich jedoch, um Gast-Wirt-Wechselwirkungen an einem möglichst einfachen Modellsystem zu studieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden Einlagerungsreaktionen an immobilisierten  $\beta$ -Cyclodextrinen untersucht. Dies ermöglicht es, die Gast-Wirt-Wechselwirkung in eingeschränkter Geometrie und unter Einfluß einer benachbarten oxidischen Oberfläche zu beobachten.

## 5.2 Substanzen und Präparation

### 5.2.1 Substanzen

#### 5.2.1.1 Substanzen zur Immobilisierung von $\beta$ -Cyclodextrin

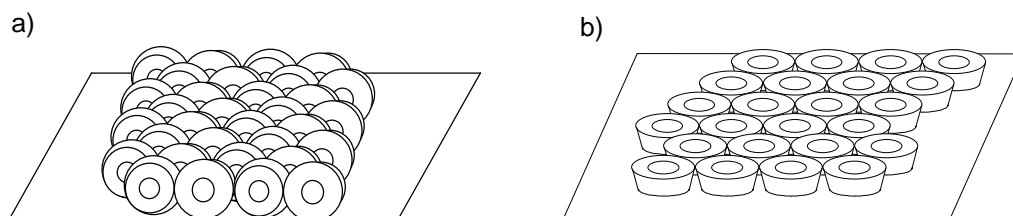


Abbildung 5-2: zwei mögliche Cyclodextrinanordnungen: a) Backsteinstruktur, b) idealisierte dichteste Anordnung, aus Weisser 1995 [WEI95]

Um Komplexierungsreaktionen an immobilisiertem  $\beta$ -Cyclodextrin untersuchen zu können, ist es notwendig, daß es sich nicht nur in der nötigen Oberflächendichte sondern auch in der richtigen Orientierung vorliegt. Für Cyclodextrine ist es energetisch günstig, sich in einer Kanal-, Gräten oder Backsteinstruktur anzuordnen, wie sie sich auch im Volumenkristall ausrichten. Um allerdings eine optimierte Gasteinlagerung zu ermöglichen, möchte man eine Anordnung erreichen, in der die Cyclodextrine flach mit der größeren Öffnung zur Lösung liegen (Abbildung 5-2 b). Wenn die Cyclodextrine mit nur einer Ankergruppe an die Oberfläche binden, werden sie eher eine der anderen Konformationen einnehmen und eine geringere Affinität für Gastmoleküle aufweisen [NEL96, WEI97]. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Ansatz verfolgt, das Cyclodextrin mit mehreren Ankergruppen an die Oberfläche zu binden.

Als Ankergruppe wurden für die vorliegende Arbeit Aminogruppen verwendet (Abbildung 5-3). Dafür werden die sieben C6-Hydroxylgruppen an der schmalen Öffnung des  $\beta$ -Cyclodextrins durch Jod substituiert. In zwei weiteren Schritten wird das Jod durch eine primäre Aminogruppe ersetzt. Das Produkt *per-Amino- $\beta$ -Cyclodextrin* weist an der schmalen Seite des Torus pro Monomer jeweils eine Aminogruppe auf. Die aminierte Cyclodextrine wurden von M. DePaoli an der Universität Karlsruhe (Arbeitsgruppe G. Wenz) synthetisiert und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt [DEP99]. Das *per-Amino- $\beta$ -Cyclodextrin* wurde 0,5 mM in wäßriger Pufferlösung (PBS<sup>16</sup>) verwendet.<sup>17</sup>

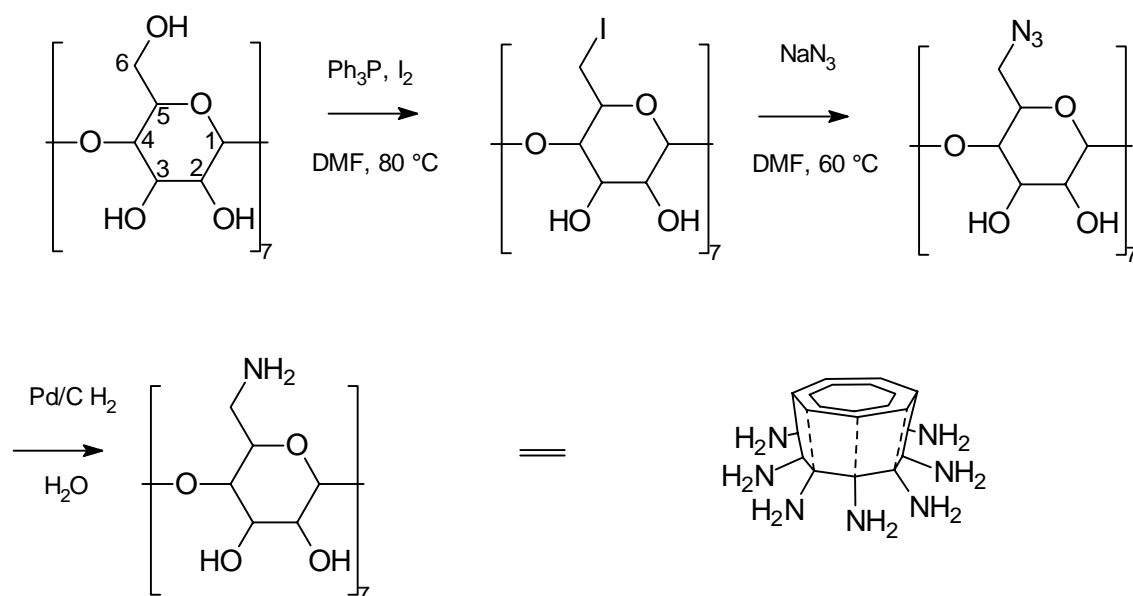


Abbildung 5-3: Aminierung des  $\beta$ -Cyclodextrin zu *per-Amino- $\beta$ -Cyclodextrin*

<sup>16</sup> PBS von Sigma: Eine Tablette, aufgelöst in Reinstwasser, ergibt laut Hersteller 0,01 M Natrium- und Kaliumphosphatpuffer; pH 7,4; 0,0027 M Kaliumchlorid und 0,137 M Natriumchlorid; Reinstwasser MilliQ von Millipore

<sup>17</sup> Bei unzureichender Löslichkeit kann das Cyclodextrin zunächst in etwas Salzsäure bei pH 5 gelöst werden.

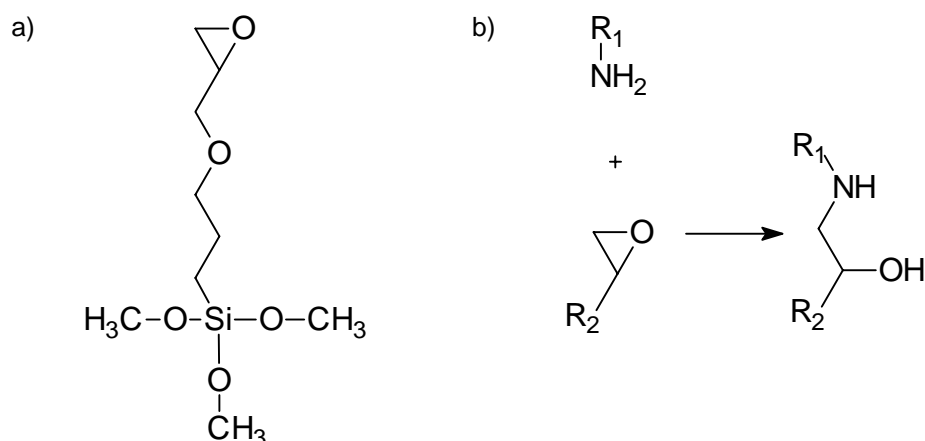


Abbildung 5-4: Glycidoxypropyltrimethoxysilan (a), ein möglicher Bindungsmechanismus (b)

Durch die Lage der Amingruppen sollte es möglich sein, die Cyclodextrine in der gewünschten Konformation auf eine spezifisch aminbindenden Oberfläche aufzubringen. Mit den im vorigen Kapitel eingeführten Organosilanen kann man Oberflächeneigenschaften gezielt verändern. Das kommerziell erhältliche Organosilan Glycidoxypropyltrimethoxysilan (z.B. Firma Sigma) bindet spezifisch Amine. Der Bindungsmechanismus der Amine an die Epoxidgruppe [MAR77] wird in Abbildung 5-4 verdeutlicht.

### 5.2.1.2 Gastsubstanzen

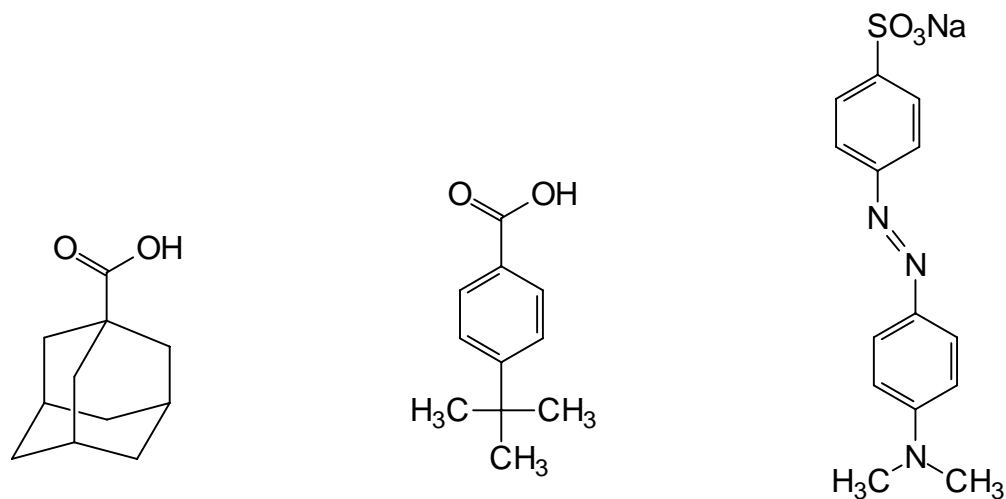


Abbildung 5-5: verwendete Gastmoleküle: Adamantancarbonsäure (links), 4-tert.-Butyl-Benzoessäure (Mitte), Methylorange (rechts)

Als Gäste wurden für die nachfolgende Untersuchung drei unterschiedliche Moleküle verwendet, die wasserlöslich sind, dabei jedoch einen hydrophoben Teil aufweisen. Es wurden Gäste ausgewählt, deren Einlagerung in  $\beta$ -Cyclodextrin schon aus vorhergehenden Untersuchungen bekannt ist. Die Bindungskonstanten der Einlagerungskomplexe von Adamantancarbonsäure, 4-tert.-Butyl-Benzoessäure und Methylorange

wurde durch Mikrokalorimetrie in Wasser bestimmt ([WEK98], Tabelle 5-1). Die drei Gastmoleküle decken einen weiten Bereich von Bindungskonstanten ab ( $\approx 10000 \text{ M}^{-1}$  –  $\approx 30000 \text{ M}^{-1}$ ) und sind wasserlöslich. Methylorange ist zudem ein Farbstoffmolekül, an dem man  $\chi^{(2)}$ -Effekte (z.B. Elektrooptik) auch im evaneszenten Feld untersuchen kann [WEI97].

Tabelle 5-1: Bindungskonstanten der Gäste im Vergleich, aus Weikenmeier [WEK98] und Weisser [WEI97]

	Adamantancarbonsäure	4-tert.-Butyl-Benzoessäure	Methylorange
$K_{\text{MK}} [\text{M}^{-1}]$	32600	18400	12000

Von Weisser *et. al.* [WEI97] wurden bereits die Einlagerungskomplexe von Methylorange und 4-tert.-Butyl-Benzoessäure in Cyclodextrinderivate auf einer Goldoberfläche untersucht. Während bei Weisser die Orientierung der Gäste sowie das Verhalten unterschiedlich immobilisierter Cyclodextrine im Vordergrund stand, soll hier genauer der Einfluß der Oberfläche auf die Bindungskonstante untersucht werden.

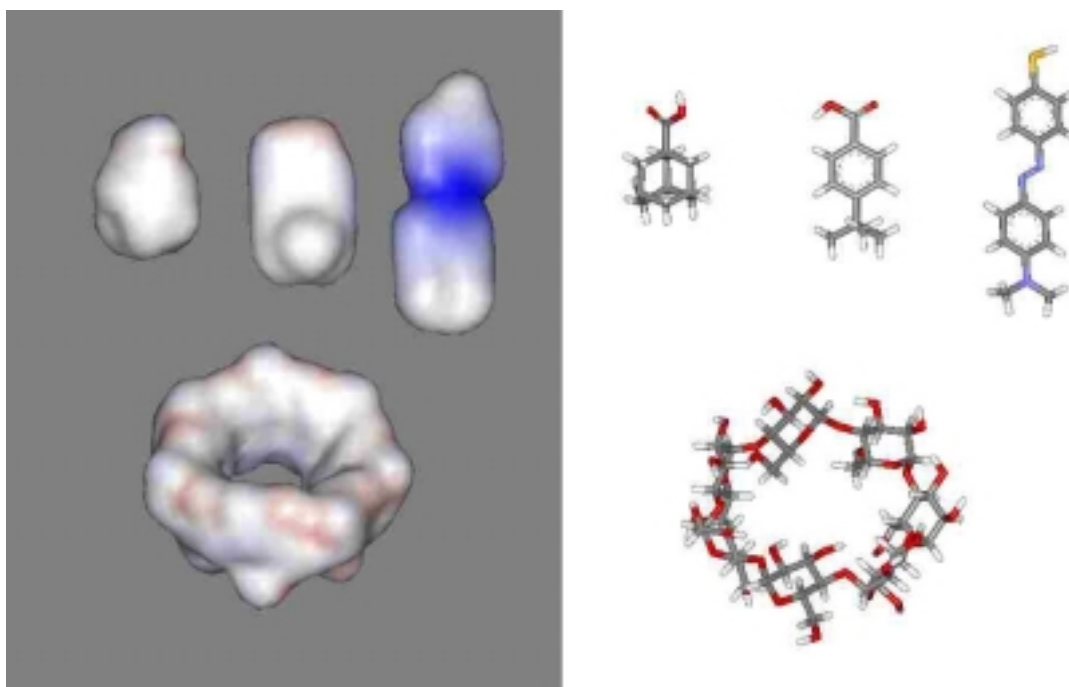


Abbildung 5-6: Räumliche WebLab-Darstellung von  $\beta$ -Cyclodextrin (jeweils unten) sowie den Gastmolekülen Adamantancarbonsäure (oben links), 4-tert.-Butyl-Benzoessäure (oben Mitte) und Methylorange (oben rechts)

### 5.2.2 Präparation und Versuchsdurchführung

Die nachfolgenden Adsorptionsexperimente wurden ausschließlich mit dem bereits eingeführten Mach-Zehnder-Interferometer durchgeführt. In der Literatur werden bereits Versuche an Oberflächen-immobilisiertem  $\beta$ -Cyclodextrin beschrieben [WEI96,

WEI97]. Hier wurden Versuche u.a. mit der etwas weniger sensitiven Oberflächen-Plasmonen-Spektroskopie an Goldoberflächen durchgeführt.

Einige Interferometer wurden durch das im vorigen Kapitel vorgestellte Verfahren mit Glycidoxypropyltrimethoxysilan funktionalisiert. Nach dem Einbau des Interferometers in den Versuchsaufbau und dem Anschluß der Zweikanal-Küvette wurden Ein- und Auskopplung justiert. Es folgte eine Spülung beider Kanäle kurz mit Ethanol<sup>18</sup>, dann gründlich mit PBS (Fluß der Schlauchpumpe wie auch im folgenden ca. 15 ml/h), um ein konstantes Meßsignal zu erhalten. Bei ausreichender Signalstabilität begann die Datenaufnahme und ca. eine Minute später das Überspülen mit der 0,5 mM Cyclodextrinlösung (nur auf einem Kanal der Küvette). Danach wurden jeweils mehrere Adsorptionsexperimente mit dem Interferometer durchgeführt. Zeitliche Abfolge des Experiments im Überblick:

- 1) Spülen mit Ethanol und PBS
- 2) Cyclodextrinadsorption 0,5 mM in PBS (10 min. bei 15 ml/h, 30 min. ohne Fluß)
- 3) Spülen mit PBS, bis die Intensität hinreichend konstant ist (ca. 1 h)
- 4) Nachjustage der Ein- und Auskopplung
- 5) Beginn einer neuen Meßdatei mit einem Referenzexperiment: Überspülen des unfunktionalisierten Interferometerarmes mit Salzlösung ( $\Delta n = 1,5 \cdot 10^{-3}$ ). Dies ist für die spätere Auswertung notwendig, um
  - für die Auswertung  $I_0$  und  $I_{\max}$  zu kennen,
  - festzustellen, ob steigende oder fallende Intensität einem Schichtdickenwachstum entspricht.
- 6) Ad- und Desorption von Gastmolekülen, anschließend Wiederholung ab 4)

## 5.3 Cyclodextrin an oxidischen Oberflächen - experimentelle Ergebnisse

### 5.3.1 Adsorption von $\beta$ -Cyclodextrin

Abbildung 5-7 zeigt den typischen Verlauf einer Cyclodextrinadsorption. Man beobachtet eine anfangs recht schnelle Intensitätsänderung (Abbildung 5-7 unten). Das Signal durchläuft mindestens ein Maximum und ein Minimum. Nach zehn Minuten hat die Reaktionsgeschwindigkeit bereits deutlich nachgelassen. Es hat sich als günstig erwiesen, die Lösung danach (ohne zu pumpen) noch mindestens 30 min in der Küvette zu belassen (kaum Intensitätsänderung in dieser Zeit). Die Adsorptionsphasenverschiebung beträgt im gezeigten Beispiel  $3,7 \pi$ .

---

<sup>18</sup> Ethanol 99,8%, Firma Riedel-de Haën

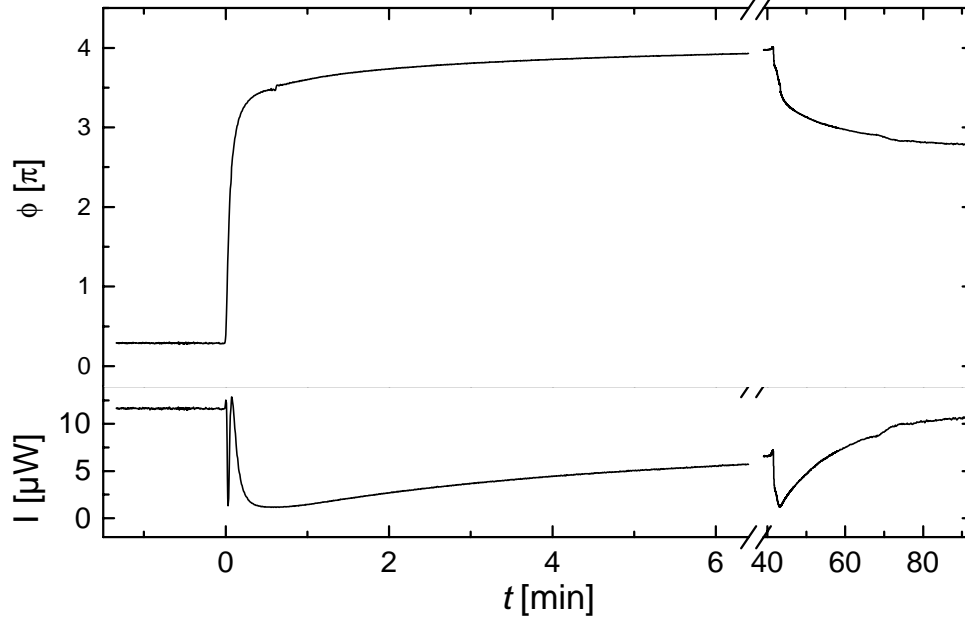


Abbildung 5-7: Cyclodextrinadsorptionskinetik (0,5 mM) an ein mit Glycidoxypropyltrimethoxysilan funktionalisiertes Interferometer, unten: gemessene Intensität, oben: daraus errechnete Phasenverschiebung

Beim anschließenden Spülen wird ein Teil des adsorbierten Cyclodextrins desorbiert (hier:  $1,2 \pi$ ). Grund dafür ist die Entfernung des physisorbierten Cyclodextrins. Möglicherweise trägt auch eine Umorientierung bei.

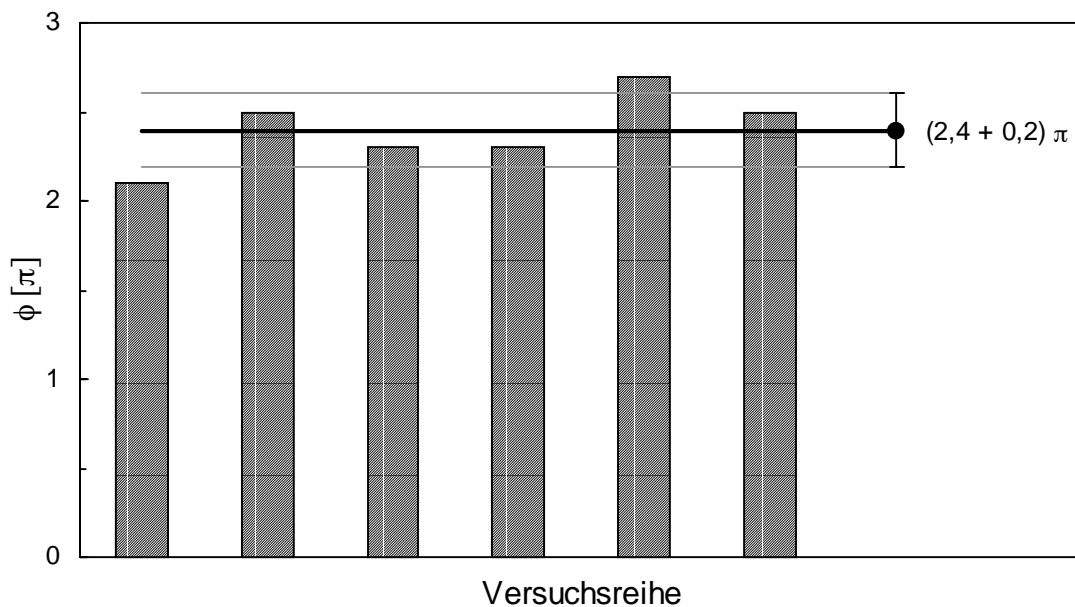


Abbildung 5-8: Cyclodextrin-Adsorptionen im Vergleich

Insgesamt bleibt nach dem Spülen in der gezeigten Beispielmessung eine Phasenverschiebung von  $\phi = 2,5 \pi$ . Gemittelt über alle ausgewerteten Messungen ergibt sich eine mittlere Phasenverschiebung von  $\bar{\phi} = 2,4 \pi \pm 0,2 \pi$  (Abbildung 5-8).

Dies entspricht bei der Annahme eines Brechungsindex von  $n_{\text{ad}} = 1,45$  und einer Sensitivität von  $\partial\phi/\partial n = 3,25 \pi / \text{nm}$  einer Schichtdicke von  $d_{\text{ad}} = (0,74 \pm 0,06) \text{ nm}$ . Dies steht in sehr gutem Einklang mit der Größe der Cyclodextrin-Moleküls (Abbildung 5-1).

Die Umrechnung der Phasenverschiebung in eine Schichtdicke geht von einigen schlecht überprüfbareren Annahmen aus (genaue Dicken und Brechungsindizes des Wellenleiters, v.a. der Brechungsindex der Adsorbatschicht). Gleichwohl kann man von einer relativ dichten Monolage des Cyclodextrins ausgehen.

### 5.3.2 Adsorption von Gastmolekülen

Nach der Adsorption von Cyclodextrin auf nur einen Kanal steht ein teilweise funktionalisiertes Mach-Zehnder-Interferometer zur Verfügung. Durch Überspülen von je einem Kanal kann man zwei unterschiedliche Gast-Adsorptionsversuche mit dem gleichen Interferometer durchführen:

1. Man kann durch Überspülen des unfunktionalisierten Kanals mit Gast-Lösung die unspezifische Adsorption auf eine nicht mit Cyclodextrinen bedeckte Silanoberfläche beobachten. Als weiterer Störeffekt verursacht der höhere Brechungsindex der Cyclodextrinlösung  $n_c$  eine zusätzliche geringe Phasenverschiebung.
2. Auf dem funktionalisierten Küvettenkanal kann die spezifische Adsorption auf die Cyclodextrin-funktionalisierte Oberfläche beobachtet werden, überlagert durch die unspezifischen Effekte (unspezifische Adsorption sowie Volumen-Brechungsindex-Unterschied).

Es lassen sich also auf dem gleichen Substrat nacheinander unspezifische (1) und spezifische (2) Adsorption beobachten.

Mit Adamantancarbonsäure als Gastmolekül wurden beide Experiment-Varianten durchgeführt (Abbildung 5-9). Man beobachtet, daß sowohl spezifisch als auch unspezifisch eine Adsorption zu beobachten ist. In Anwesenheit des Cyclodextrins findet zunächst eine schnelle Adsorption statt, die nach etwa 30 s abflacht, jedoch keine vollständige Sättigung erreicht, sondern immer weiter ansteigt. Die unspezifische Adsorption ist deutlich schwächer. Sie ist vor allem in den ersten 30 s wesentlich flacher. Sie steigt jedoch immer weiter an, und verläuft nach 45 s etwa parallel zu der spezifischen Kinetik. Das führt dazu, daß die Differenz der beiden Kurven nach einem schnellen Anstieg in Sättigung geht. Es läßt sich sehr gut eine Langmuir-Kinetik anpassen.

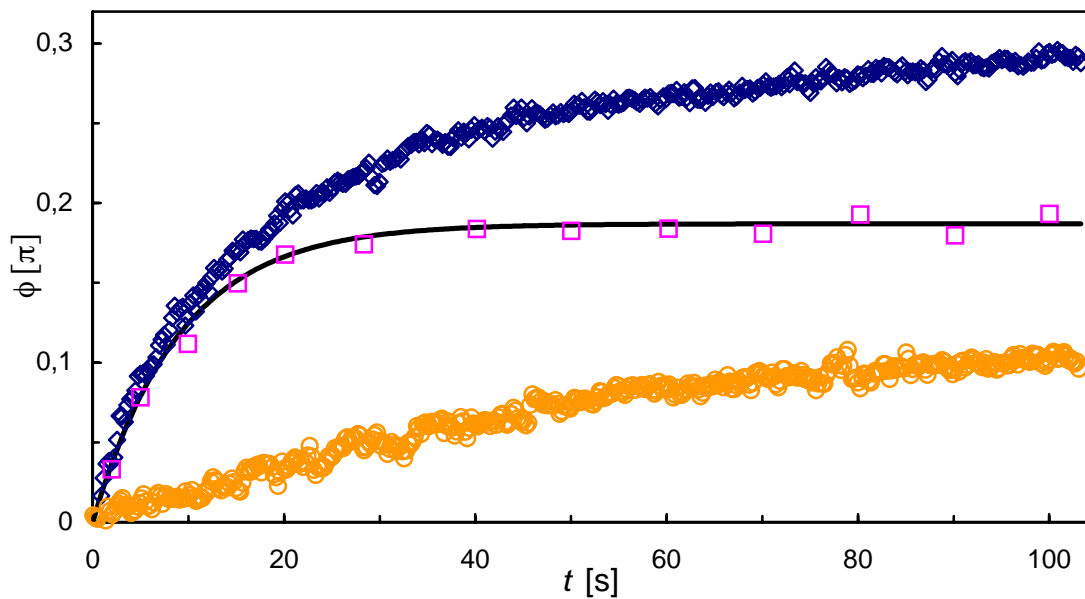


Abbildung 5-9: Adsorptionskinetiken Adamantancarbonsäure 0,5 mM, funktionalisierter Kanal (Rauten), unfunktionalisierter Kanal (Kreise), sowie einzelne Differenzwerte (Quadrate) mit Langmuir-Kinetikanpassung (Linie, Parameter  $\tau = 9$  s,  $\phi_{\max} = 0,19 \pi$ )

Unter der Annahme, daß die unspezifischen Effekte in beiden Kanälen gleich groß sind, kann man sich eine spezielle Eigenschaft des Mach-Zehnder-Interferometers zunutze machen. Wenn ein Effekt gleich stark auf beide Kanäle des Interferometers einwirkt, führt das zu keiner Intensitätsänderung am Ausgang. Wenn man nun also beide Kanäle gleichzeitig mit Gastmolekülen überspült, wirkt sich im Idealfall nur die spezifische Adsorption auf das Ausgangssignal aus. Durch physikalische Differenzbildung im Mach-Zehnder-Interferometer ist es also möglich, die spezifische Adsorption ohne Störung durch unspezifische Adsorption zu beobachten.

Dieses Differenzverfahren wurde für die im folgenden präsentierten Versuche verwendet.

#### 5.3.2.1 Adamantancarbonsäure

Abbildung 5-10 zeigt verschiedene Adsorptionskinetiken von Adamantancarbonsäure auf die immobilisierten Cyclodextrine. Die Messung beginnt mit einem Referenzexperiment mit Salzlösung ( $\Delta n = 1,5 \cdot 10^{-3}$ ). Danach sieht man jeweils eine positive Phasenverschiebung durch Adsorption und eine negative Phasenverschiebung durch Desorption von Adamantancarbonsäure. Die gemessene Intensität geht nach ca. 4 min Spülen wieder vollständig und reproduzierbar auf die Anfangsintensität zurück. Das ermöglicht es, mit demselben Träger mehrere Zyklen von Adsorption und Desorption nacheinander zu beobachten. Es wurden für die folgenden Versuche nacheinander verschiedene Gastmoleküle in unterschiedlichen Konzentrationen auf demselben Interferometer beobachtet.

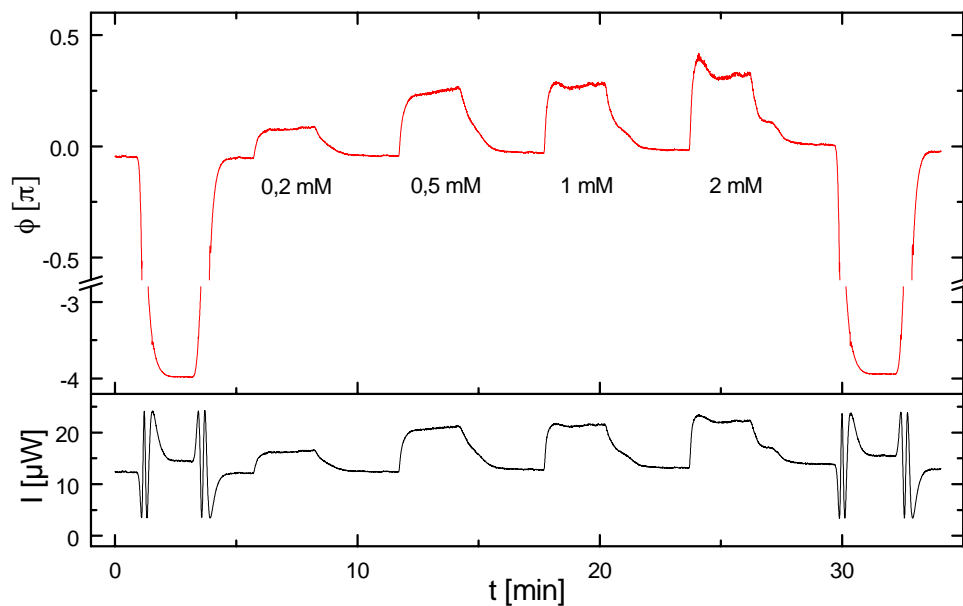


Abbildung 5-10: Adsorptionskinetiken der Adamantancarbonsäure auf immobilisiertes Cyclodextrin; unten: Intensität, oben Phasenverschiebung; 0 - 5 min: Referenzmessung mit höherer Salzkonzentration; 10 - 29 min: Überspülen beider Kanäle mit verschiedenen Konzentrationen Adamantancarbonsäure, anschließendes Spülen; 29 - 34 min: erneute Referenz

Abbildung 5-10 zeigt, daß bei  $c_{\text{Gast}} = 0,2 \text{ mM}$  etwa halb so viel Adamantancarbonsäure adsorbiert wie bei den höheren Konzentrationen. Man kann also bereits eine Bindungskonstante von ca.  $K \approx 1 / 0,2 \text{ mM} = 5000 \text{ M}^{-1}$  abschätzen.

Bei kleinen Konzentrationen ist in Abbildung 5-10 die Form der Kinetiken so, wie man es bei Langmuir-Kinetiken erwartet (2-3). Sowohl bei Adsorption wie auch bei Desorption sieht man einen exponentiellen Verlauf vom Anfangswert zum Endwert. Bei Konzentrationen von 1 mM und 2 mM tritt jedoch ein "Überschwinger" in der Adsorption und eine Schulter in der Desorption auf. Dieser Effekt ist reproduzierbar aber unphysikalisch. Er ist vermutlich auf die Methode der Differenzmessung zurückzuführen. Bei der Differenzbildung wurde davon ausgegangen, daß die unspezifische Adsorption auf beiden Kanälen gleich ist. Offensichtlich unterscheidet sich jedoch die unspezifische Kinetik beider Kanäle durch die Anwesenheit der Cyclodextrinmoleküle. Der Effekt wird erst bei höheren Konzentrationen sichtbar, da die unspezifische Anlagerung bei den kleineren Konzentrationen sehr klein ist, jedoch bei höheren Konzentrationen weiter mit der Konzentration ansteigt, während die spezifische Adsorption ab einer bestimmten Gastkonzentration abgesättigt ist.

Die gezeigten Adsorptionskinetiken können auf zwei unterschiedliche Arten ausgewertet werden:

- Die Phasenverschiebung wird in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen und eine *Langmuir-Isotherme* (2-7) angepaßt.
- Die Phasenverschiebung wird gegen die Zeit aufgetragen und eine *Langmuir-Kinetik* (2-3) angepaßt (unterschiedliche Konzentrationen).

Beide Verfahren werden im folgenden an Adamantancarbonsäure-Adsorptionen demonstriert.

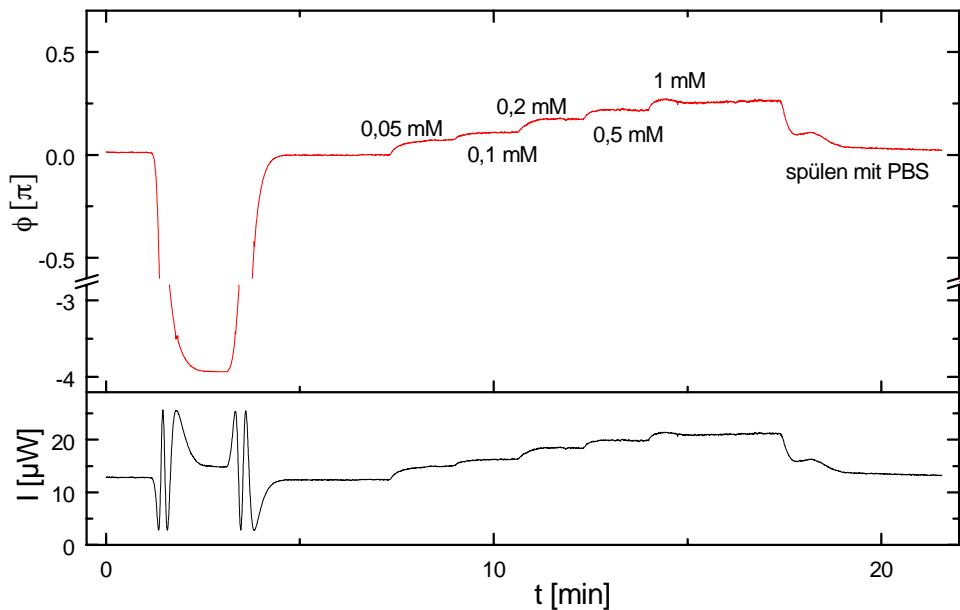


Abbildung 5-11: Adsorptionskinetiken von Adamantancarbonsäure bei sukzessiver Erhöhung der Konzentration; 0 – 5 min: Referenz

Abbildung 5-11 zeigt Adsorptionen aus fünf Konzentrationen Adamantancarbonsäure zwischen 0,05 mM und 1 mM. Die verschiedenen Konzentrationen wurden in steigender Reihenfolge ohne Zwischenspülen eingespült, um in schnellerer zeitlicher Abfolge Gleichgewichts-Phasenverschiebungen zu erhalten.

Man sieht in den ersten fünf Minuten erneut ein Referenzexperiment mit Salzlösung, dann folgt ein stufenweiser Anstieg der Intensität, entsprechend einer Adsorption von Gastmolekülen. Die einzelnen Kinetiken erreichen jeweils ihre Sättigung, bevor die Adsorption aus der nächsthöheren Konzentration beginnt. Bei 1 mM und dem abschließenden Spülen ist das bereits erwähnte Differenzbildungs-Artefakt zu beobachten.

Die aus Abbildung 5-11 resultierenden Gleichgewichts-Phasenverschiebungen sowie weitere aus einer unmittelbar vorhergehenden Messung sind in Abbildung 5-12 als Langmuir-Isotherme dargestellt. Die Abbildung zeigt, daß man an die ermittelten Meßwerte gut eine Langmuir-Isotherme mit  $K = 7100 \text{ M}^{-1}$  anpassen kann. Zum Vergleich liegt die Bindungskonstante in Lösung bei  $32600 \text{ M}^{-1}$  (siehe Tabelle 5-3, Seite 77). Die Bindung in die immobilisierten Cyclodextrine ist schwächer als in Lösung.

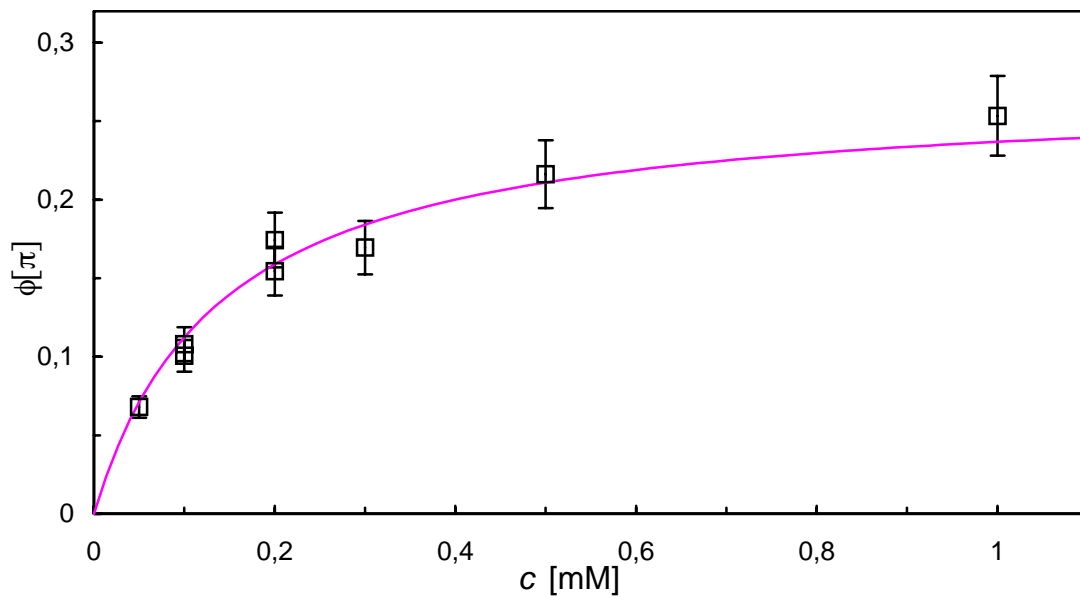


Abbildung 5-12: Adsorptionsisotherme der Adamantancarbonsäure auf immobilisiertes Cyclodextrin (u.a. Werte aus Abbildung 5-11) mit Langmuir-Anpassung ( $K = 7100 \text{ M}^{-1}$ ,  $\phi_{\text{max}} = 0,27 \pi$ )

Die zweite Möglichkeit, die Bindungskonstante  $K$  zu ermitteln, ist es, an die Kinetikkurven für Adsorption und Desorption einzeln eine Langmuir-Kinetikkurve anzupassen. Aus den Zeitkonstanten  $\tau_{\text{ad}}$  und  $\tau_{\text{de}}$  lassen sich dann  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  bestimmen (s. Gleichung (2-3)):

$$k_{\text{off}} = 1 / \tau_{\text{de}}$$

$$k_{\text{on}} = (1 / \tau_{\text{ad}} - 1 / \tau_{\text{de}}) / c$$

Diese Auswertung ist nur möglich, falls die Kinetiken nicht diffusionsbegrenzt sind. Die Meßanordnung mit schnellem, kontinuierlichem Austausch des sehr kleinen Küvettenvolumens sollte nicht zu einer Diffusionsbegrenzung führen. Tatsächlich läßt sich keine diffusionsbegrenzte Kinetik an die Meßwerte anpassen (vgl. Tovar [TOV95]). Falls dennoch eine Diffusionsbegrenzung vorliegt, würden vor allem die Adsorptionen aus niedrig konzentrierter Lösung als zu langsam erscheinen.

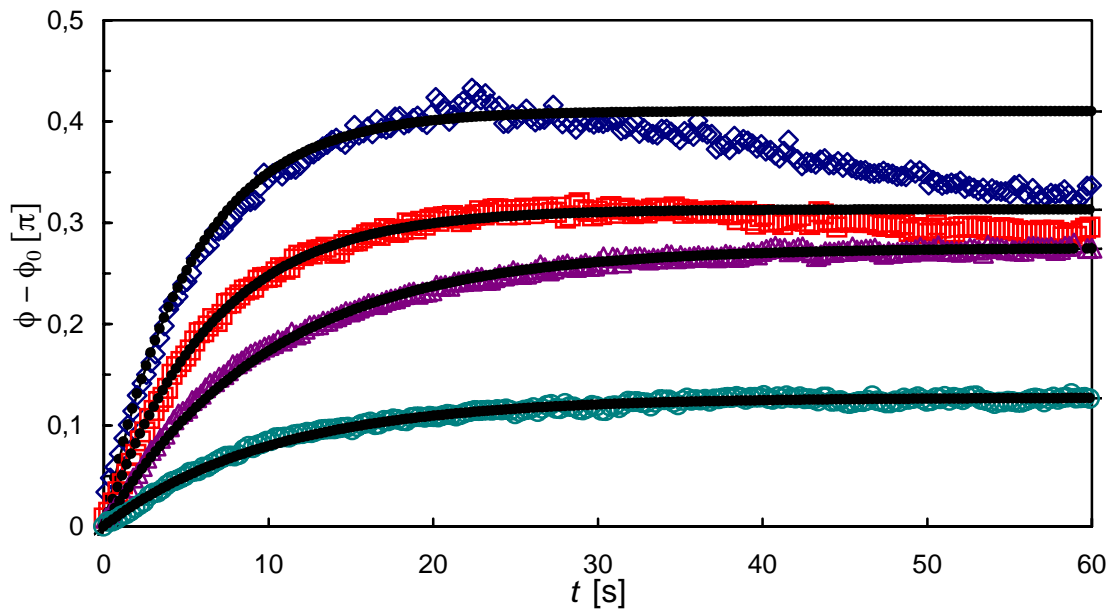


Abbildung 5-13: Langmuir-Kinetikanpassungen 0,2 mM (Kreise), 0,5 mM (Dreiecke), 1 mM (Quadrate), 2 mM (Rauten); zum Teil aus der in Abbildung 5-10 dargestellten Kinetik

In Abbildung 5-13 ist statt der Oberflächenbedeckung  $\Theta$  die Phasenverschiebung  $\phi$  aufgetragen ( $\phi \sim \theta$ , s. Gleichung (2-3) a). Die resultierenden Zeitkonstanten  $\tau_{ad}$  sind in Tabelle 5-2 dargestellt. Eine zu Abbildung 5-13 gleichartige Auftragung für die Desorptionskinetiken ergibt  $\tau_{de}$ . Daraus läßt sich dann wiederum  $K = k_{on} / k_{off}$  ermitteln (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Kinetikkonstanten in Abhängigkeit der Konzentration (Adamantancarbonsäure)

	0,2 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM
$1/\tau_{de} (=k_{off}) [s^{-1}]$	0,032	0,027	0,040	0,045
$1/\tau_{ad} [s^{-1}]$	0,098	0,099	0,156	0,19
$k_{on} [s^{-1}M^{-1}]$	330	144	116	73
$K = k_{on} / k_{off} [M^{-1}]$	10300	5300	2900	1600

Die Tabelle zeigt, daß die ermittelte Konstante  $K$  für  $c = 0,5$  mM in befriedigender Genauigkeit mit der Isothermen-Anpassung übereinstimmt (Abbildung 5-12). Für  $c = 1$  mM und 2 mM ist der Wert allerdings deutlich kleiner, während die Bindung für 0,2 mM wesentlich stärker ist. Die Abweichung für hohe Konzentrationen ist durch den Einfluß unspezifischer Adsorption und Verzögerung durch zu Austauschgeschwindigkeit in der Küvette zu erklären.

Bei geringen Konzentrationen gelingt es jedoch nicht, eine schlüssige Erklärung innerhalb des Langmuir-Modells zu finden.

Daher stellt sich die Frage, ob die ermittelte Desorptionskonstante  $\tau_{de}$  möglicherweise nicht der Desorptionsrate  $k_{off}$  entspricht, weil die Konzentration durch Spülen nicht beliebig schnell auf  $c = 0$  eingestellt werden kann. Um diesem Fehler aus dem Weg zu gehen, kann man die Desorptionskonstante auch aus Adsorptionsexperimenten ermitteln. Man erhält  $k_{off}$  durch Anpassung einer Geraden an die gemessenen Adsorptionszeitkonstanten nach (2-3):

$$\frac{1}{\tau_{ad}}(c) = ck_{on} + k_{off}$$

Abbildung 5-14 zeigt eine solche Auswertung.

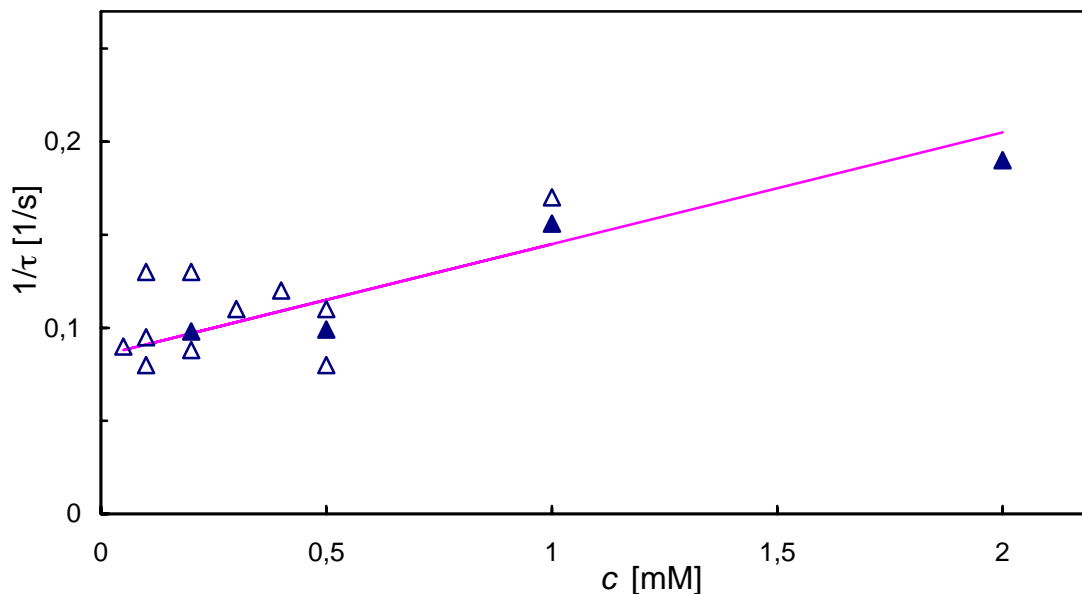


Abbildung 5-14: Konzentrationsabhängigkeit der Adsorptionsgeschwindigkeit; die Werte aus Abbildung 5-13 sind ausgefüllt dargestellt. Die Anpassung ergibt:  $k_{on} = 60 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ,  $k_{off} = 0,085 \text{ s}^{-1}$ ,  $K = 700 \text{ M}^{-1}$

Die resultierende Bindungskonstante von  $K = 700 \text{ M}^{-1}$  steht jedoch ebenfalls in deutlichem Gegensatz zur Langmuir-Isotherme. Es gelingt also auch mit dieser Auswertung nicht, eine Bindungskonstante  $K$  zu finden, die alle Konzentrationen gleich gut beschreibt. Daher ist davon auszugehen, daß die Bindungskonstante, wie es bereits Tabelle 5-2 nahelegt, konzentrationsabhängig ist. Mögliche Erklärungen für die erhöhte Bindungskonstante bei kleinen Konzentrationen sind:

- Die einzelnen Bindestellen sind nicht unabhängig voneinander. Die Bindungsfähigkeit eines Cyclodextrin sinkt, wenn benachbarte Cyclodextrine bereits ein Wirtmolekül enthalten, die Bindungskonstante wird abhängig von der bereits vorliegenden Oberflächenbedeckung  $K = K(\Theta)$ . Dieser Effekt könnte durch Wechsel-

wirkungen zwischen den Cyclodextrinmolekülen hervorgerufen werden, wahrscheinlicher ist allerdings eine elektrostatische Abstoßung der Gastmoleküle, deren Ladungen durch die Ionen der Salzlösung nicht vollständig abgeschirmt werden.

- Nicht alle immobilisierten Cyclodextrine haben die gleiche Bindungskonstante (z.B. wegen Oberflächenrauigkeit). Bei kleinen Konzentrationen werden bevorzugt die leichter zu besetzenden Cyclodextrine belegt. In diesem Fall betragen die Bindungskonstanten für hohe Konzentrationen  $K \geq 1000 \text{ M}^{-1}$ . Für geringe Gastkonzentrationen nähern sich die Bindungskonstanten den Volumenwerten ( $K \leq 25000 \text{ M}^{-1}$ ).

Diese beiden Hypothesen könnten die experimentellen Ergebnisse erklären. Auch in der Literatur werden häufig Effekte [SCH89] beschrieben, die eine Erweiterung des einfachen Langmuir-Modells nötig machen. Mögliche Erweiterungen der Langmuir-Adsorptionsisotherme sind [PLO96]

- die Einführung eines Heterogenitätsexponenten  $\alpha$

$$\Theta(c) = \frac{(K c)^\alpha}{1 + (K c)^\alpha},$$

- oder die Überlagerung von zwei Langmuir-Isothermen mit unterschiedlichen Bindungskonstanten  $K_1$  und  $K_2$  mit dem Gewichtungsfaktor  $F$

$$\Theta(c) = F \frac{K_1 c}{1 + K_1 c} + (1 - F) \frac{K_2 c}{1 + K_2 c}.$$

Für eine Klärung, welches Verhalten hier zutrifft, sind noch weitere Untersuchungen, vor allem bei sehr kleinen Konzentrationen notwendig.

## 5.3.2.2 4-tert.-Butyl-Benzoessäure

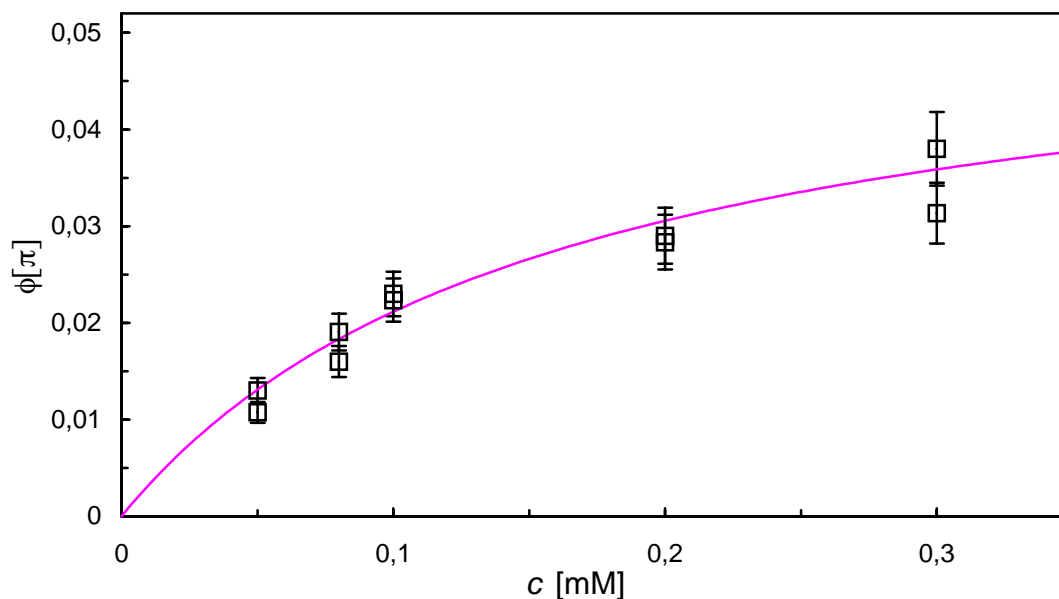


Abbildung 5-15: Adsorptionsisotherme 4-tert.-Butyl-Benzoessäure auf immobilisiertes Cyclodextrin;  
 $K = 6300 \text{ M}^{-1}$ ,  $\phi_{\text{max}} = 0,055 \pi$

Die Adsorptionsisotherme von 4-tert.-Butyl-Benzoessäure (Abbildung 5-15) unterscheidet sich in zwei Punkten von der Adamantancarbonsäure-Isotherme (Abbildung 5-12):

- Die Bindungskonstante ist etwas kleiner als die von Adamantancarbonsäure, der Unterschied ist jedoch nicht so groß, wie sich aus den Bindungskonstanten in Lösung erwarten ließe (Tabelle 5-3).
- Die gemessenen Phasenverschiebungen sind wesentlich kleiner als die von Adamantancarbonsäure. Ein Vergleich von Schichtdicken oder besser Oberflächenkonzentrationen wäre allerdings nur durch Schätzung eines Brechungsindex möglich. Daher kann dieser Effekt entweder auf einen geringeren Brechungsindex adsorbierter 4-tert.-Butyl-Benzoessäure hindeuten oder auf eine geringere Oberflächendichte. Die Interpretation der Isotherme ist unabhängig von der Schätzung eines Brechungsindex, da sich der Brechungsindex gleichmäßig auf alle Meßwerte auswirkt.

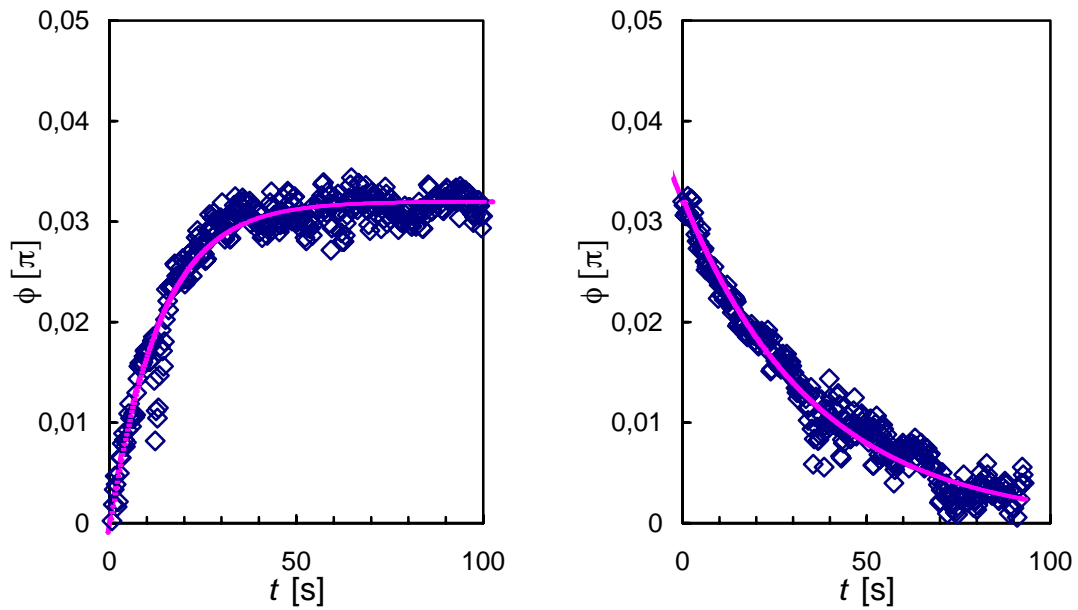


Abbildung 5-16: Ad- und Desorptionskinetik von 4-tert.-Butyl-Benzoesäure (0,3 mM):  $k_{\text{on}} = 160 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_{\text{off}} = 0,028 \text{ s}^{-1} \Rightarrow K = 5600 \text{ M}^{-1}$

Kinetisch wurde die Adsorption der 4-tert.-Butyl-Benzoesäure nur bei  $c = 0,3 \text{ mM}$  untersucht (Abbildung 5-16). Es ergibt sich eine Bindungskonstante von  $K = 5600 \text{ M}^{-1}$ , die recht gut mit der aus der Langmuir-Isothermen bestimmten Bindungskonstante ( $K = 6300 \text{ M}^{-1}$ ) übereinstimmt.

### 5.3.2.3 Methylorange

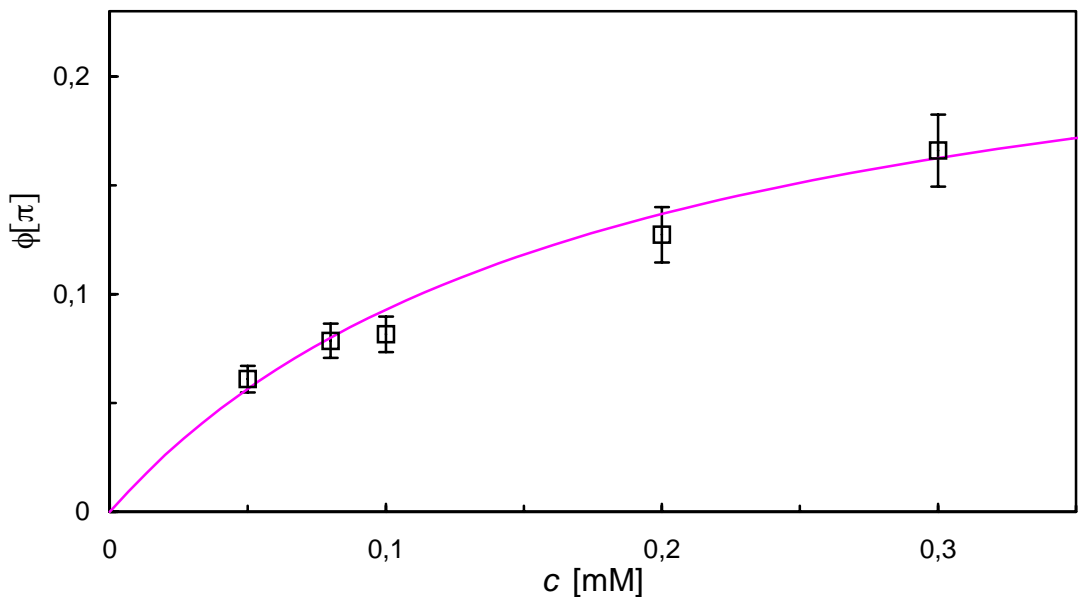


Abbildung 5-17: Adsorptionsisotherme von Methylorange auf immobilisiertes Cyclodextrin;  $K = 5600 \text{ M}^{-1}$ ,  $\phi_{\text{max}} = 0,26 \pi$

Als drittes Gastmolekül wurde Methylorange verwendet. Abbildung 5-17 zeigt die Adsorptionsisotherme für Konzentrationen zwischen  $0,05 \text{ M}^{-1}$  und  $0,3 \text{ M}^{-1}$ . Die maximale Phasenverschiebung ist im Rahmen der Meßgenauigkeit genauso groß wie die von Adamantancarbonsäure.

Die Bindungskonstante ist noch etwas kleiner als die von 4-tert.-Butyl-Benzoessäure. Wiederum ist der Unterschied der Bindungskonstanten nicht so groß wie aus den Mikrokalorimetriemessungen in Lösung zu erwarten wäre.

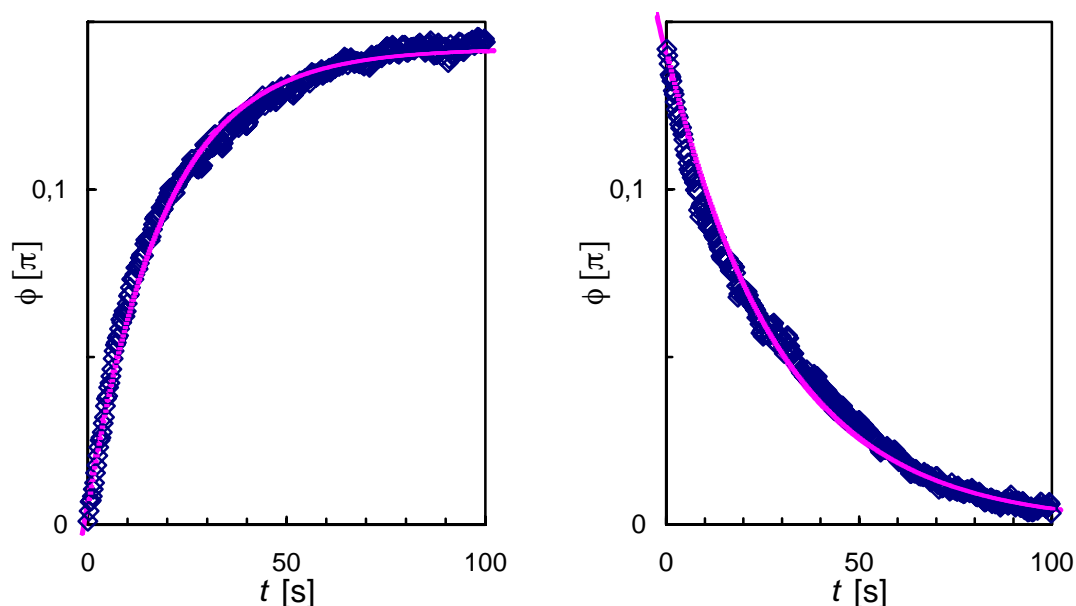


Abbildung 5-18: Ad- und Desorptionskinetik von Methylorange  $0,3 \text{ mM}$   $k_{\text{on}} = 63 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_{\text{off}} = 0,034 \text{ s}^{-1}$   
 $\Rightarrow K = 1900 \text{ M}^{-1}$

Bei der Methylorange-Adsorption ergibt die kinetische Untersuchung bei  $0,3 \text{ mM}$  (Abbildung 5-18) eine Bindungskonstante von  $K = 1900 \text{ M}^{-1}$ , wesentlich kleiner als die aus der Langmuir-Isothermen berechneten  $K = 5600 \text{ M}^{-1}$ .

#### 5.3.2.4 Wellenlängenabhängige Beobachtung der Methylorange-Adsorption

Methylorange ist ein Farbstoffmolekül, das als pH-Indikator Verwendung findet. In der Nähe des Absorptionsmaximums lassen sich möglicherweise interessante, frequenzabhängige Effekte beobachten. Das UV-Vis-Absorptionsspektrum des Moleküls (pH 7,4) ist in Abbildung 5-19 dargestellt. Das Absorptionsmaximum liegt bei  $462 \text{ nm}$  und damit in der Nähe der Wellenlänge eines Helium-Cadmium-Lasers ( $\lambda = 442 \text{ nm}$ ). Die in dieser Untersuchung hauptsächlich verwendete Wellenlänge von  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$  (HeNe-Laser) ist deutlich außerhalb der Absorption des Methylorange. Dazwischen befindet sich eine weitere zur Verfügung stehende Wellenlänge ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ : frequenzverdoppelter Nd-YAG<sup>19</sup>-Laser).

<sup>19</sup> Nd-YAG: engl. neodymium-doped yttrium aluminum garnet

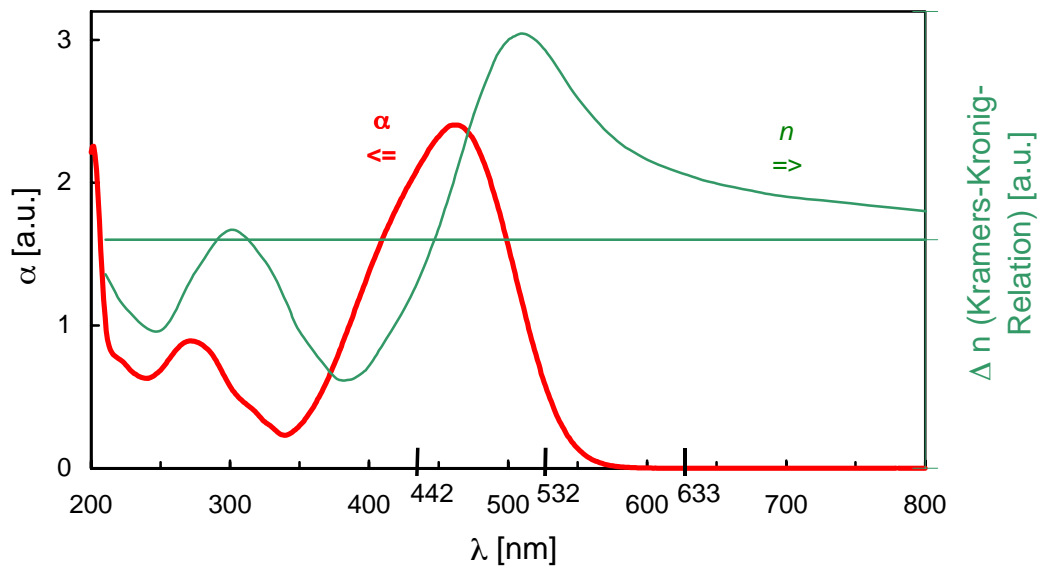


Abbildung 5-19: Verlauf von Absorption und Brechungsindex für Methylorange (UV-Vis-Spektrum, aufgenommen mit einem Spektrometer der Firma Perkin-Elmer)

In der Nähe des Absorptionsmaximums des Farbstoffes erwartet man nach der Kramers-Kronig-Relation eine starke Dispersion. Da das verwendete Mach-Zehnder-Interferometer in allen genannten drei Wellenlängen monomodig Licht leitet, kann man eventuell die Adsorption des Methylorange wellenlängenabhängig beobachten. Man erwartet dann nach der Kramers-Kronig-Relation eine erhöhte Sensitivität durch eine Brechungsindexerhöhung des Methylorange bei etwa 500 nm. Es hat sich bei den Versuchen jedoch herausgestellt, daß sich das Interferometersignal nicht eindeutig interpretieren läßt. Die beobachtete Intensitätsänderung durch Interferenz wird stark gestört durch eine Intensitätsänderung durch Absorption des Farbstoffes im evaneszenten Feld.

Eine direkte Beobachtung der Dispersion war nicht möglich. Bei Wahl einer geeigneten Geometrie läßt sich ein Meßsignal detektieren, das nahezu unabhängig von der Interferenz des Wellenleiters ist und nur die Absorptionseigenschaften der Adsorbate wiedergibt<sup>20</sup>. So läßt sich die Absorption wellenlängenabhängig beobachten (Abbildung 5-20).

<sup>20</sup> Die durch Rekombination im zweiten Y-Verzweiger gebildete, nicht geführte TE<sub>01</sub>-Mode ("destruktive Interferenz") wurde durch Öffnen der Lochblende vor dem Detektor mit aufgezeichnet (vgl. Abschnitt 3.1.2.2).

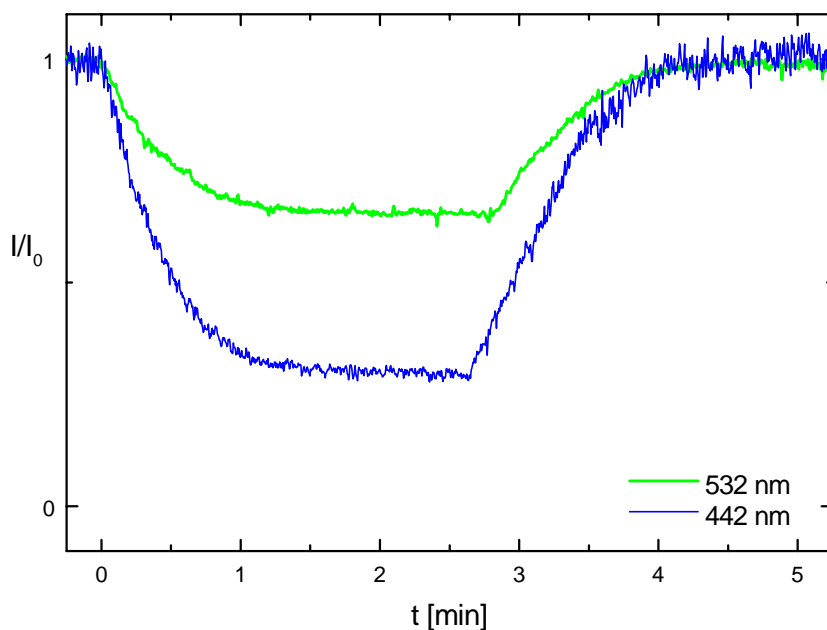


Abbildung 5-20: Wellenleiterdämpfung (keine Interferometrie) durch adsorbiertes Methylorange bei zwei Wellenlängen in der Nähe des Absorptionsmaximums (532 nm und 442 nm), bei 632,8 nm ist keine Dämpfung zu beobachten

Qualitativ sieht man, daß die Dämpfung im Absorptionsmaximum (bei  $\lambda = 442$  nm) deutlich stärker ist, als in der Flanke ( $\lambda = 532$  nm). Bei 632,8 nm war keine Dämpfung zu beobachten. Da die unterschiedlichen Wellenlängen im Lichtwellenleiter einen unterschiedlichen Anteil evaneszenten Lichts aufweisen, und die Dispersion der Schichten des Interferometers nicht bekannt ist, ist eine quantitative Auswertung nicht möglich.

Es ist also bei allen Interferometer-Messungen zu beachten, daß die verwendeten Substanzen bei der betreffenden Wellenlänge transparent sind. Andernfalls sind Intensitätsänderungen zu beobachten, die sich einer interferometrischen Interpretation entziehen.

## 5.4 Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, daß es möglich ist, ein Derivat des  $\beta$ -Cyclodextrins an eine oxidische Oberfläche zu chemisorbieren. Adsorbierte Cyclodextrinschichten bleiben für mehrere Tage stabil.

An den kovalent gebundenen Cyclodextrinen können reversibel Gast-Wirt-Wechselwirkungen beobachtet werden. An konzentrationsabhängige Sättigungs-Phasenverschiebungen lassen sich für verschiedene Gäste Langmuir-Isothermen anpassen (Abbildung 5-21).

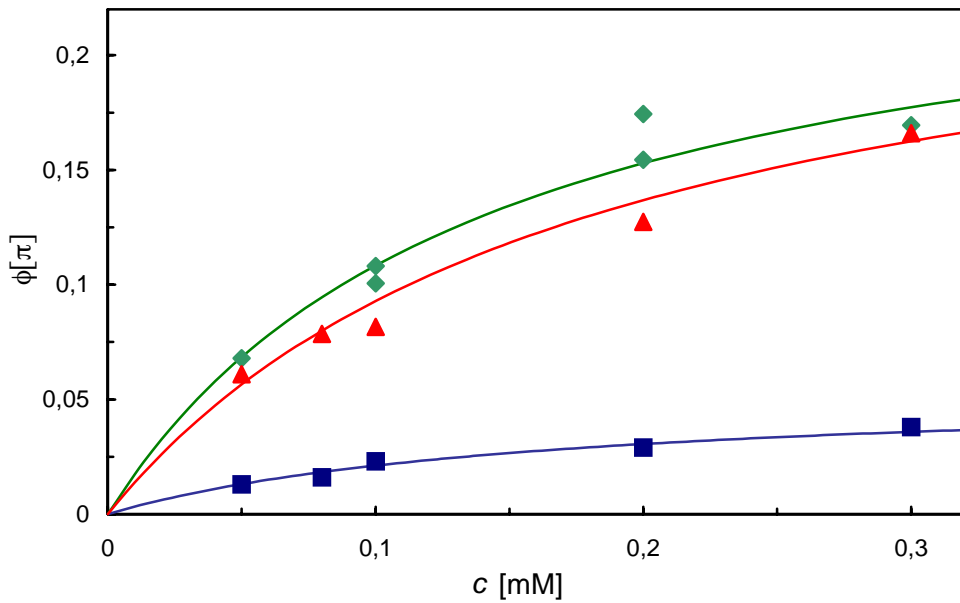


Abbildung 5-21: Vergleich der Adsorptionsisothermen Adamantancarbonsäure (Rauten), Methylorange (Dreiecke), 4-tert.-Butyl-Benzoessäure (Quadrate)

Abbildung 5-22 und Tabelle 5-3 zeigen die verschiedenen Meßwerte für die unterschiedlichen Gastmoleküle im Vergleich. Die Bindungskonstanten sind an der Oberfläche kleiner als in Lösung. Qualitativ läßt sich feststellen, daß die Rangfolge der Bindungsstärken analog zu der in Lösung ist.

Tabelle 5-3: Bindungskonstanten und Adsorptionsgeschwindigkeiten der Gäste im Vergleich

	Adamantan- carbonsäure	4-tert.-Butyl- Benzoessäure	Methylorange
$\phi$ bei 0,3 mM [ $\pi$ ]	0,17	0,04	0,17
$1/\tau_{ad}$ bei 0,3 mM [1/s]	0,11	0,075	0,055
$1/\tau_{de}$ [1/s]	0,030	0,029	0,034
$K_{Kinetik}$ [ $M^{-1}$ ] bei 0,3 mM	8800	5600	1900
$K_{Langmuir}$ [ $M^{-1}$ ]	7100	6300	5600
$K_{MK}$ [ $M^{-1}$ ]	32600	18400	12000

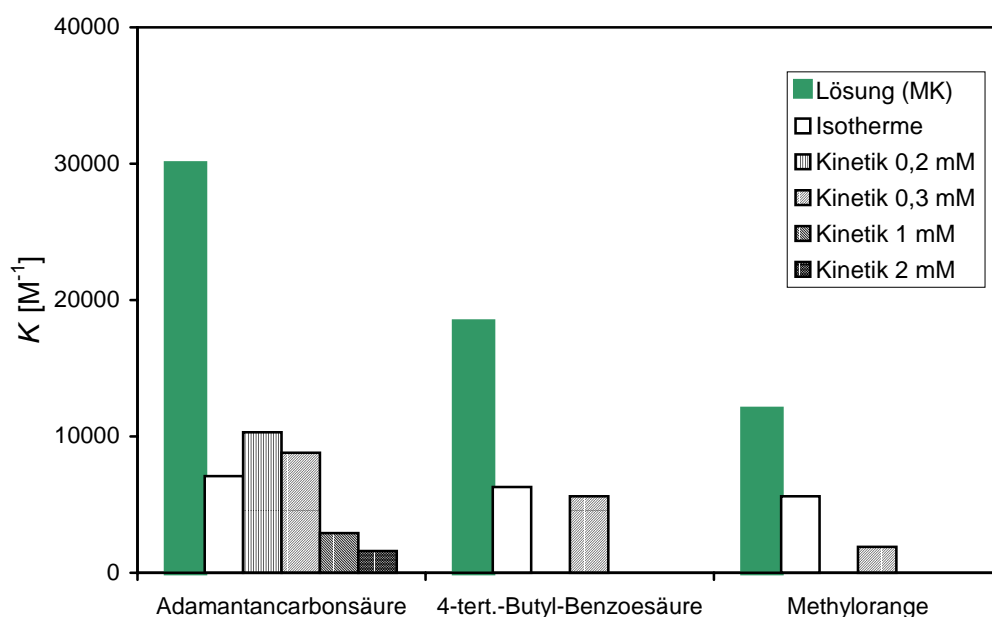


Abbildung 5-22: Bindungskonstanten der Gäste im Vergleich

Die Ergebnisse der kinetischen Experimente ließen sich nicht vollständig mit Hilfe des Langmuir-Adsorptionsmodells beschreiben. Es wurde jedoch eine Erweiterung des Langmuir-Modells diskutiert, das die ermittelten Kinetikkonstanten qualitativ richtig beschreibt.

Weiterhin wurde die Absorptivität von Methylorange in Abhängigkeit der Wellenlänge beobachtet. Die Wellenlängenabhängigkeit der Dämpfung durch Methylorange im evaneszenten Feld folgt qualitativ dem Verlauf des zum Vergleich gemessenen UV-Vis-Spektrums.

## 6 Untersuchung von Antikörper-Antigen-Reaktionen an immobilisierten Antikörperfragmenten

In diesem Abschnitt werden Untersuchungen zur Gast-Wirt-Wechselwirkung an biologischen Systemen vorgestellt. Zunächst wird das stark bindende System Biotin Streptavidin untersucht, wobei verschiedene Biotinderivat-Silane (und ein Biotin-Thiol) auf dem Interferometer immobilisiert wurden. Danach wird das Streptavidin als Bindematrix für die Immobilisierung von Antikörperfragmenten für die Biosensorik verwendet.

Biosensoren basieren häufig auf der Wechselwirkung zwischen Antikörpern und ihren Antigenen. Genauso spezifisch, wie unser Immunsystem auf jeweils einen bestimmten Fremdstoff anspricht, sprechen in Biosensoren eingesetzte Antikörper auf das nachzuweisende Analyt an. Aufgabe des Sensors ist es, die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung meßbar zu machen, um ein Antigen in Lösung nachzuweisen. Ziel ist es also, Analytmoleküle möglichst effektiv zu immobilisieren, damit auch kleinste Analyt-(Antigen-)Konzentrationen zu einem nachweisbaren Sensorsignal führen.

Während bei gegenwärtig angewandten Nachweismethoden Antikörper häufig unspezifisch an raue Kunststoffoberflächen oder Rinderserumalbumin adsorbiert werden und dadurch nicht gezielt ausgerichtet sind, soll hier durch die gezielt ausgerichtete Adsorption von Antikörperfragmenten eine Sensoroberfläche erzeugt werden, die eine maximale Zahl von Bindungsstellen für das nachzuweisende Analyt aufweist.

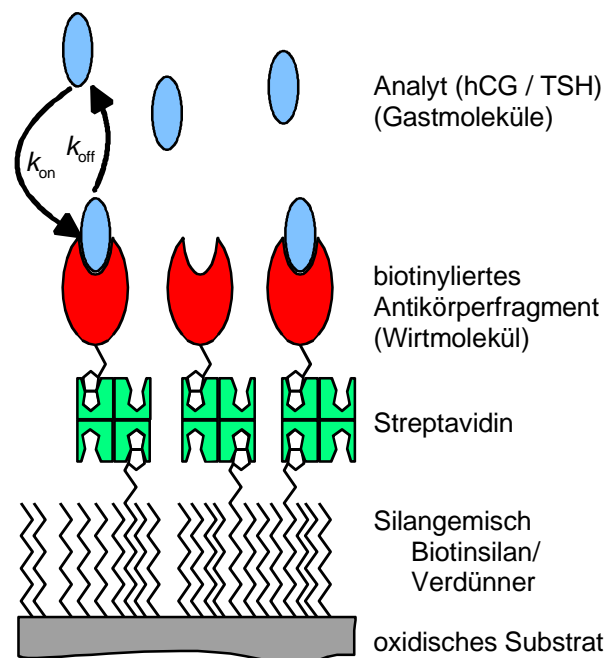


Abbildung 6-1: Universale Bindematrix mit Hilfe von Biotin und Streptavidin, nach [TOV95]

Dazu werden über ein Schichtsystem mehrerer aufeinander aufbauender selbstadsorbierender Monolagen Proteine spezifisch an die Oberfläche adsorbiert. Das Schichtsystem beginnt jeweils mit der Adsorption eines Silans auf die oxidische Oberfläche. Da Proteine bei Temperaturen über 60 °C degenerieren, ist die Verwendung von Zwischenschichten notwendig (Abbildung 6-1). Die Verwendung einer Zwischenschicht hat auch den Vorteil, daß leicht unterschiedliche Oberflächenfunktionalisierungen nach dem "Baukastenprinzip" erzeugt werden können.

Zur flexiblen und möglichst wiederverwendbaren Funktionalisierung wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Schichtsysteme erprobt. Basis war dabei jeweils das Affinitätssystem Biotin/Streptavidin. Es wurden verschiedene Biotin-Derivate (mit Silan- oder Thiol-Kopfgruppe) verwendet, um die Sensoroberfläche mit Biotin-(derivat)gruppen zu funktionalisieren. Um Qualität der Oberflächenfunktionalisierung zu bestimmen, war die Affinität von Streptavidin zu der jeweiligen Biotin-Oberfläche wesentlich. Daher wurde die Adsorption von Streptavidin an unterschiedliche Biotin-Schichten mit verschiedenen Untersuchungsverfahren (SPR, WaMS, AFM) charakterisiert.

## 6.1 Verwendete Substanzen

### 6.1.1 Biotin und Streptavidin

Biotin (Vitamin H) ist eine niedermolekulare Substanz (244 g/mol), die in verschiedenen Pflanzen vorkommt (z.B. Soja, Hülsenfrüchte). Streptavidin ist ein tetrameres Protein, das mit sehr hoher Affinität ( $K \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) vier Biotinmoleküle einlagert. Aus Röntgenstrukturanalyse ergibt sich eine Ausdehnung des Moleküls von 5,6 nm  $\times$  4,2 nm  $\times$  4,2 nm und zeigt, daß Streptavidin vier Biotin-Bindungstaschen hat (Abbildung 6-2). Streptavidin ist verwandt mit dem Avidin, das im Hühnereiweiß vorkommt. Avidin eignet sich jedoch wegen stärkerer unspezifischer Bindung weniger gut zur Erstellung einer Bindematrix. Streptavidin wird biotechnisch aus dem Kulturüberstand des Bakteriums *Streptomyces avidinii* gewonnen.

Eine Einlagerung von Biotin in die Bindungstaschen ist auch dann möglich, wenn dessen Carbonsäurefunktion zu einer Peptidbindung genutzt wird. Polymerisation von Streptavidin mit Dibiotinderivaten mit unterschiedlichen Spacerlängen zwischen den beiden Biotingruppen hat gezeigt, daß in Lösung mindestens 4 - 6 Methylgruppen (0,5 bis 0,7 nm) als Spacer erforderlich sind, damit das Biotin vollständig in die Bindungstasche eingebettet wird [WIL90].

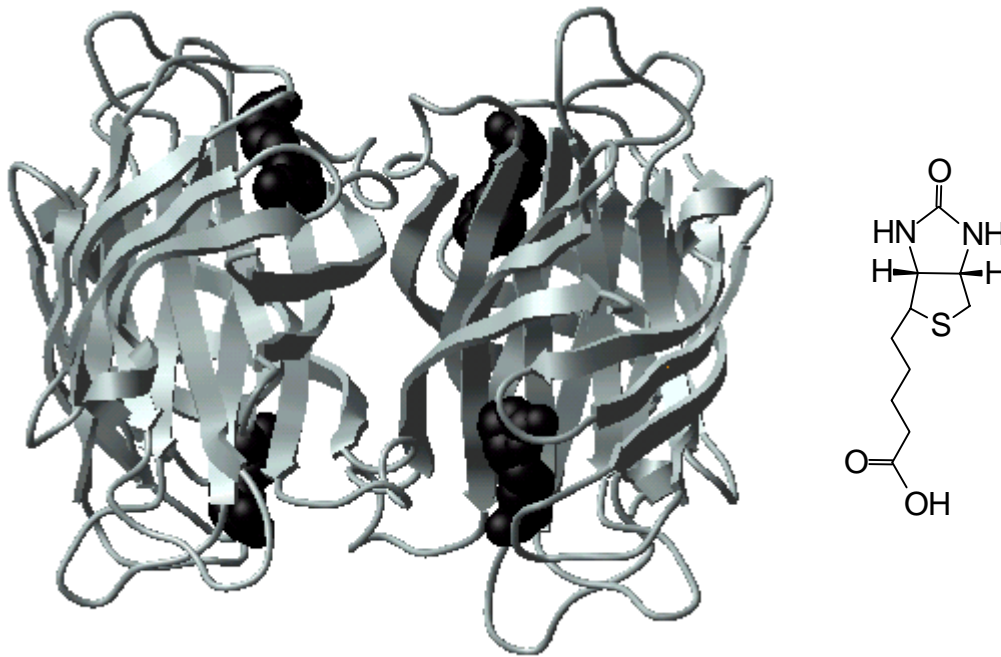


Abbildung 6-2: Kristallstruktur von Streptavidin (links), Biotinmoleküle sind als dunkle Kalotten dargestellt [LIE99], Strukturformel von Biotin (rechts)

Die hohe Affinität des Streptavidin-Biotin-Komplexes erlaubt die Herstellung eines stabilen Basissystems mit biotinylierten Komponenten und Streptavidin als Bindeglied. An ein immobilisiertes Streptavidin-Molekül lassen sich verschiedene molekulare Sonden binden, beispielsweise DNA-Einzelstränge, mit denen über die Hybridisierungsreaktion DNA nachgewiesen werden kann, oder aber Antikörper, so daß mit Hilfe von Streptavidin ein Immunoassay realisiert werden kann.

### 6.1.2 Biotinderivate zur Funktionalisierung von Oberflächen

J. Spinke beschreibt, wie mit Hilfe von Biotin-terminierten Thiolen, Sulfiden und Disulfiden Gold- und Silberoberflächen biotinfunktionalisiert werden können [SPI92, SPI93]. Er untersuchte auch die Bindungsfähigkeit von Streptavidin in Abhängigkeit der Biotindichte an der Oberfläche. Spinke fand, daß optimale Schichten resultieren, wenn man die biotinterminierten Thiole ("Biotinthiol") mit nichtbiotinylierten Thiolen ("Verdünerthiol") mischt (Abbildung 6-3), damit die Biotinmoleküle an der Oberfläche frei zugänglich sind. Aus SPR-Messungen resultierte ein optimales Mischungsverhältnis in Lösung von ca. 90 % Verdünerthiol zu 10 % Biotinthiol.

Spinke entdeckte weiterhin, daß das Biotinthiol einige Methylgruppen länger sein muß als das jeweilige Verdünermolekül, im Einklang mit den weiter oben vorgestellten Biotin-Polymerisationsversuchen. Während ein Biotinderivat, das nur um die Biotin-Gruppe länger ist als das Verdünermolekül, kaum Streptavidin bindet, findet effektive Bindung bei einem längeren Biotinthiol statt, das etwa acht Methylgruppen länger ist (ca. 1 nm). Noch größere Längenunterschiede zwischen Verdünerthiol und Biotinthiol

(1,2 nm Spacerlänge<sup>21</sup>, [LIE99]) haben offensichtlich keine weitere Verbesserung der Streptavidin-Affinität zur Folge.

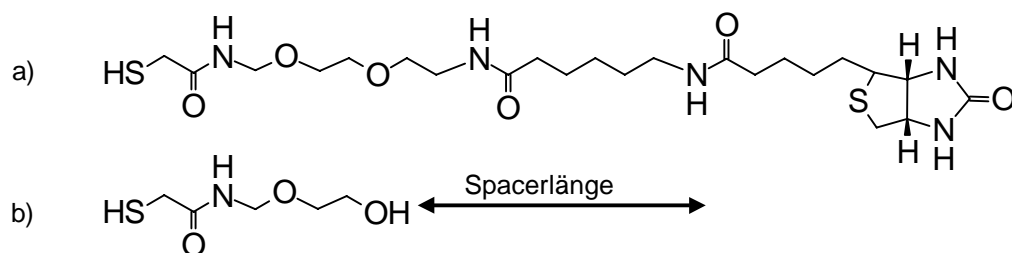


Abbildung 6-3: Thiole zur Biotin-Funktionalisierung von Goldoberflächen: Biotin-Thiol (a), Verdünnerthiol (b), nach [LIE99]

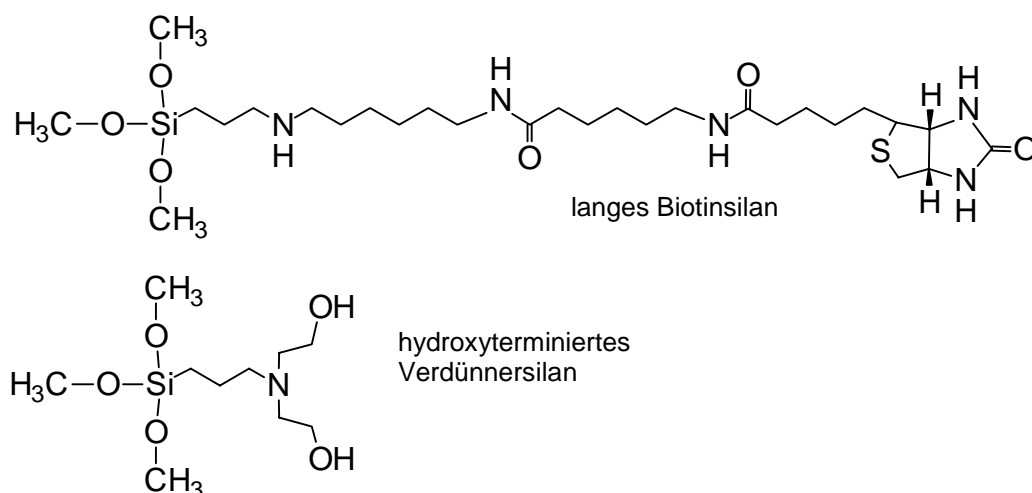


Abbildung 6-4: Das bereits von Tovar [TOV95] verwendete Biotinsilan mit seinem Verdünnersilan

G. Tovar wandte diese Erkenntnisse auf die Funktionalisierung von oxidischen Oberflächen mit Hilfe biotinylierter und nicht biotinylierter Silane an. Er verwendete ähnlich große Längendifferenzen zwischen Biotinsilan und Verdünnersilan (1,3 nm Spacerlänge, Abbildung 6-4). Bei den gezeigten Molekülen ist fraglich, ob diese Moleküle stets in einer gestreckter Konformation mit optimalen Bindungseigenschaften vorliegen. Daher liegt es nahe, eine Kombination von Molekülen zu erproben, die insgesamt kürzer sind, und deren Längenunterschiede so sind, wie es aus den Ergebnissen der Polystreptavidinexperimente mindestens erforderlich ist ( $> 0,5$  nm).

<sup>21</sup> Die Spacerlänge wird in Relation zum jeweiligen Verdünnermolekül (wie in Abbildung 6-3 eingezeichnet) festgelegt, da diese Länge für die Eindringtiefe in die Streptavidin-Bindungstasche entscheidend ist.

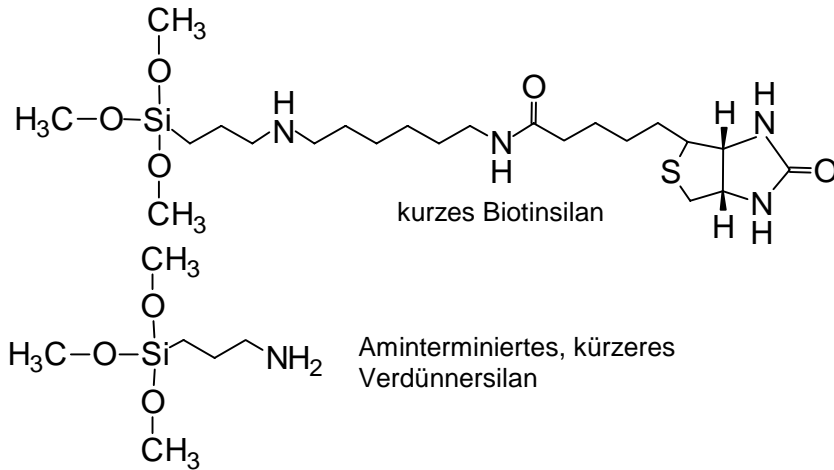


Abbildung 6-5: Kürzeres Biotinsilan mit seinem Verdünnersilan

Es wurden daher für diese Arbeit Biotinsilane synthetisiert und erprobt, die kürzer als die bisher verwendeten Biotinsilane sind; es wurde ebenfalls ein etwas kürzeres Verdünnermolekül verwendet (Aminopropyltrimethoxysilan, Firma ABCR). Aminopropylsilane werden häufig zur Biokompatibilisierung von Oberflächen verwendet [z.B. MAT96, ROS98] und erscheinen daher auch für diese Anwendung vielversprechend. Aus der Länge von Biotin- und Verdünnersilan ergibt sich eine Spacerlänge von 0,85 nm. Denkbar wäre auch die Verwendung hydroxyterminierter Silane, jedoch sind keine Hydroxysilane in der erforderlichen Länge kommerziell erhältlich.

Tabelle 6-1: Biotinderivate mit unterschiedlichen Bindungskonstanten

	$K$ [M <sup>-1</sup> ]	Strukturformel
Biotin	$10^{15}$	
Desthiobiotin	$10^{12}$	
2-Iminobiotin		
pH > 11:	$10^{11}$	
pH < 10:	$10^3$	

Wegen der hohen Bindungskonstante der Biotin-Streptavidin-Komplexierung ist es praktisch unmöglich, einmal gebundenes Streptavidin wieder zu desorbieren. Um Biosensoren mehrfach und mit unterschiedlicher Funktionalisierung verwenden zu können, wäre es nützlich, Streptavidin reversibel zu adsorbieren. Daher erscheint es aussichtsreich, auch Silane mit Biotinderivaten zu erproben, die eine niedrigere Bindungskon-

stante aufweisen. Es gibt verschiedene Biotinderivate, die eine niedrigere Affinität zu Streptavidin aufweisen als Biotin (Tabelle 6-1).

Für eine reversible Streptavidin-Bindung erscheint es vielversprechend, Silanderivate mit Desthiobiotinkopfgruppen oder dem pH-abhängig bindenden 2-Iminobiotin zu verwenden. Ein Thiolderivat des Desthiobiotin wurde schon erfolgreich zur reversiblen Goldbeschichtung mit Streptavidin verwendet [SPI92, SPI93]. 2-Iminobiotin wird zwar für die Reinigung von Streptavidin verwendet [WIL90], über die Anwendung in der Biosensorik wird in der Literatur bislang nicht berichtet.

Die kurzkettigen Silane unterschiedlicher Biotinderivate wurden jeweils ausgehend von den N-Hydroxysuccinimidestern (NHS-Ester) der Biotine in der Gruppe von J. Rühle durch stöchiometrische Umsetzung mit N-(6-Aminoheptyl)-aminopropyltrimethoxysilan in Methanol über Nacht synthetisiert. Der NHS-Ester des nativen Biotin ist kommerziell erhältlich<sup>22</sup>, die entsprechenden Aktivester des Desthiobiotinsilans sowie des 2-Iminobiotins wurden nach literaturbekannten Verfahren [z.B. WIL90] durch Umsetzung des entsprechenden Biotins mit N-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) erhalten. Abbildung 6-7 zeigt den Syntheseweg am Beispiel des "Desthiobiotinsilans".

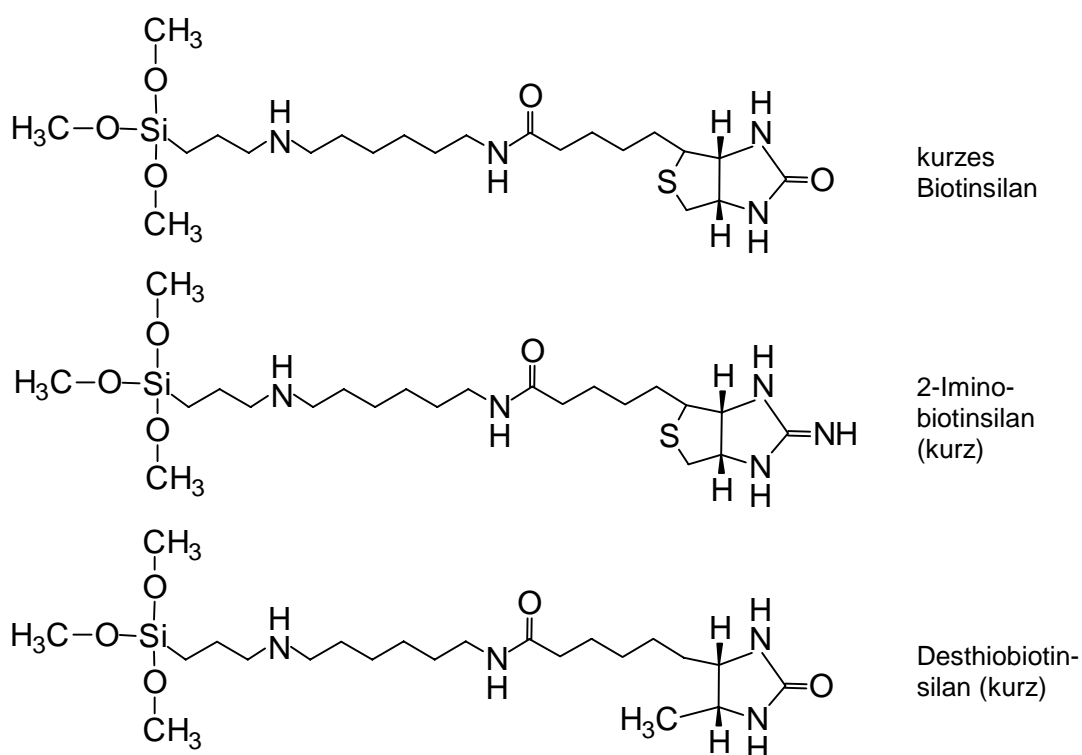


Abbildung 6-6: Strukturen der untersuchten kurzen Silane verschiedener Biotin-Derivate

<sup>22</sup> Alle verwendeten Ausgangssubstanzen sind bei Sigma erhältlich.

Das Produkt wurde mit Hilfe von Magnetresonanz (NMR<sup>23</sup>) kontrolliert. Die Lagerung der Silane erfolgte unter Argon bei 4 °C. Silanlösungen wurden wie in Abschnitt 4.3 angegeben verwendet und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

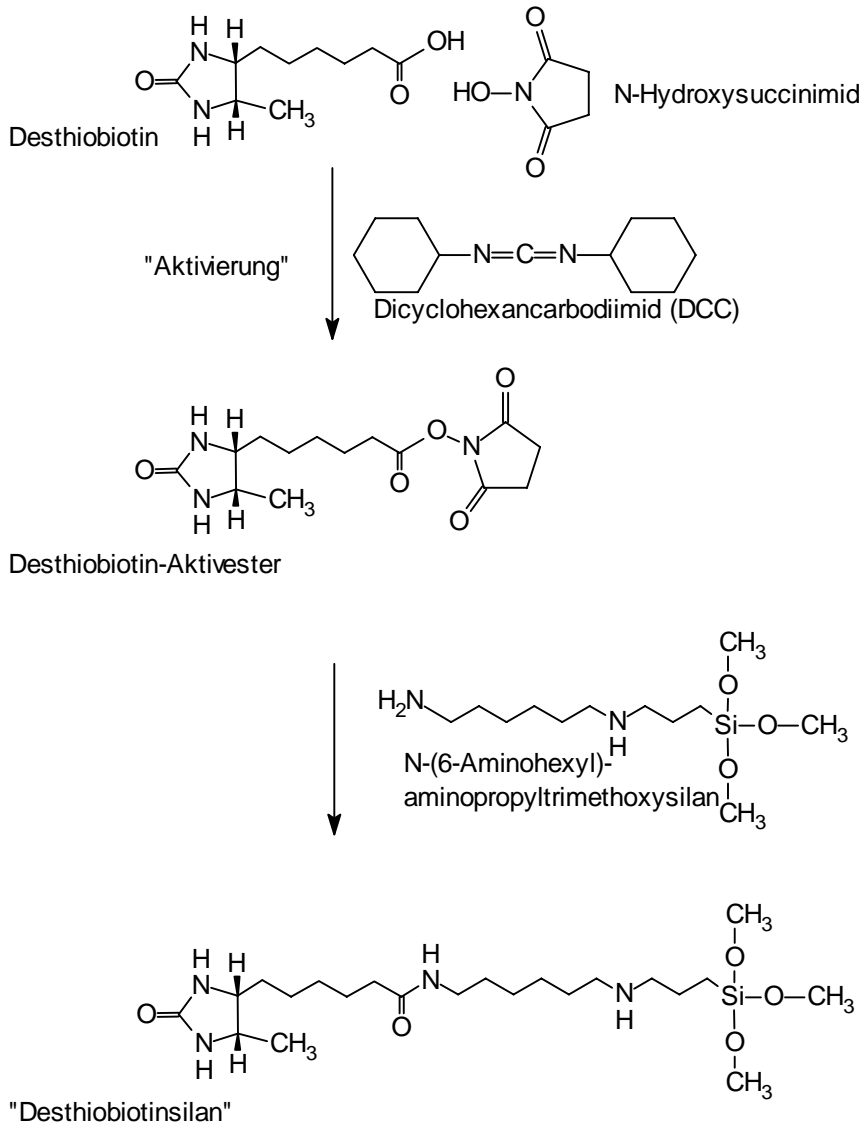


Abbildung 6-7: Reaktionsschema zur Darstellung des "Desthiobiotinsilans", die entsprechenden Silanderivate von Biotin und 2-Iminobiotin wurden analog synthetisiert.

<sup>23</sup> NMR, engl. **n**uclear **m**agnetic **r**esonance

### 6.1.3 Biologische Komponenten

Für die mögliche Anwendung des Mach-Zehnder-Interferometers als Biosensor werden die Hormone hCG und TSH als Gast-, ihre Antikörperfragmente als Wirtmoleküle verwendet. Beide Antikörper-Antigen-Paare haben durch Anwendung in medizinischen Tests erhebliche wirtschaftliche Bedeutung. In den folgenden drei Abschnitten werden die wichtigsten Eigenschaften von Antikörpern und der beiden Antigene, wie sie sich auch in Lehrbüchern nachlesen lassen [z.B. LEH83], kurz zusammengefaßt.

#### 6.1.3.1 Monoklonale Antikörperfragmente

Antikörper sind Immunglobuline, die von höheren Organismen als Reaktion des Immunsystems auf die Stimulierung durch körperfremde Stoffe (Antigene) gebildet werden. Antikörper binden sehr spezifisch an diese Antigene und markieren sie für folgende Schritte der Immunantwort. Die Gleichgewichtskonstante der Antikörper-Antigen-Reaktion beträgt häufig etwa  $1 \cdot 10^8 \text{M}^{-1}$ . Mögliche Antigene sind beispielsweise anorganische Moleküle, Bakterien oder Viren. Bei Proteinen findet eine Immunantwort ab einem Molekulargewicht von etwa 4000 g/mol statt.

Der häufigste Antikörper, das sog. Immunglobulin G (IgG) hat ein Molekulargewicht von 150.000 g/mol. Antikörper lassen sich gezielt biotechnisch herstellen, indem man das Antigen einem Versuchstier injiziert, dessen Immunsystem verschiedene Antikörper produziert. Durch Verschmelzung von B-Lymphozyten des Versuchstieres mit Krebszellen lassen sich Zellen ("Hybridome") erzeugen, die sich vermehren lassen und große Mengen Antikörper produzieren. Von monoklonalen Antikörpern spricht man, wenn man diese Hybridome durch kontinuierliche Vermehrung und Aufteilung soweit selektiert, daß miteinander identische Antikörper produziert werden, die spezifisch an eine bestimmte Stelle des Antigens adsorbieren.

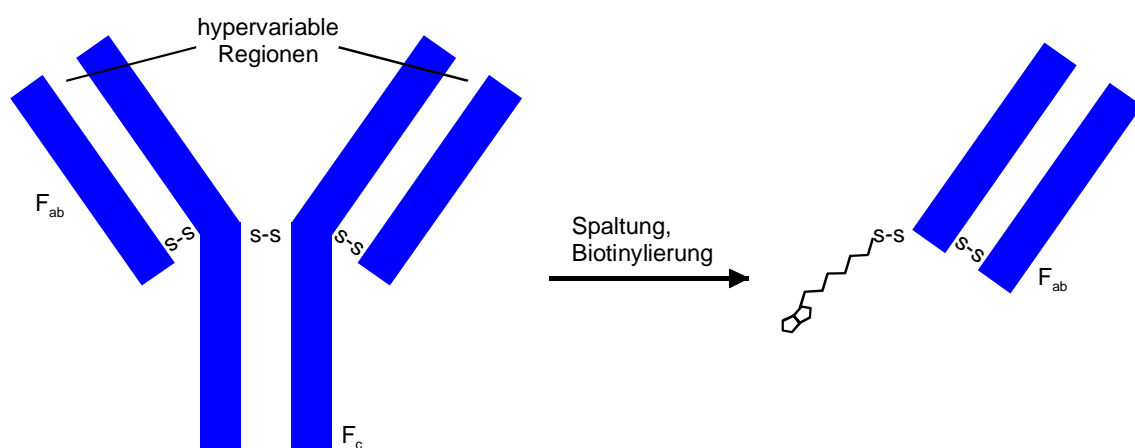


Abbildung 6-8: Struktur eines Immunglobulin G (IgG)

IgG (Abbildung 6-8) läßt sich enzymatisch in drei Teile spalten, von denen eines unabhängig von der Struktur des Antigens ist ( $F_c$ , crystallising fragment 40000 g/mol). Dieses Fragment ist von Bedeutung für das Immunsystem, besonders für die Bindung

der Makrophagen. Die anderen beiden Fragmente ( $F_{ab}$ , antigen binding fragment, 55000 g/mol) zeichnen sich durch variable Endgruppen aus, die für die spezifische Antikörper-Antigen-Wechselwirkung verantwortlich sind. Durch gerichtete Adsorption dieser  $F_{ab}$ -Fragmente läßt sich eine besonders hohe Oberflächenkonzentration von spezifischen Antigen-Bindestellen realisieren.

Zur Adsorption von Antikörperfragmenten läßt sich das in Kapitel 5 vorgestellte aminbindende Silan nicht verwenden, da das aminterminierte Ende des Antikörperfragmentes in der Erkennungsregion liegt. Zur Fixierung von Antikörperfragmenten läßt sich also das carboxyterminierte Ende des Proteins nutzen oder die Cysteingruppe, die vor der enzymatischen Spaltung die beiden  $F_{ab}$ -Fragmente durch eine Disulfidbrücke verbindet. Die hier verwendeten Antikörperfragmente wurden über die Cysteingruppen mono-biotinyliert.

Eine Vielzahl von Antikörperfragmenten, teils sogar bereits biotinyliert, ist kommerziell erhältlich, die Biotinylierung erleichtern fertig zusammengestellte Biotinylierungspakete. Die für diese Arbeit verwendeten Antikörperfragmente wurden freundlicherweise von Boehringer Mannheim, Werk Tutzing, zur Verfügung gestellt. Die Antikörperfragmente wurden  $0,5 \mu\text{M}$  in PBS verwendet.

#### 6.1.3.2 Antigen 1: TSH (thyroid stimulating hormone)

Das Protein TSH (thyroid stimulating hormone, 28000 g/mol) ist ein Hormon, mit dem der Hypophysen-Vorderlappen die Funktion der Schilddrüse steuert. Aufgabe der Schilddrüse ist es, den Körper mit den Hormonen  $T_3$  und  $T_4$  zu versorgen, die entscheidenden Einfluß auf den Stoffwechsel haben. Liegt ein Mangel dieser Hormone im Blut vor, so gibt der Hypophysen-Vorderlappen vermehrt TSH ab, um die Schilddrüse zu verstärkter Aktivität zu stimulieren. Kann die Schilddrüse wegen einer Hypothyreose (Unterfunktion) trotz Stimulation ihre Hormonproduktion nicht verstärken, so wird die Ausschüttung von TSH neuerlich erhöht. Dadurch eignet sich der Nachweis erhöhter TSH-Konzentration im Blut, um eine Schilddrüsenerkrankung nachzuweisen. Bei Konzentrationen von  $c_{TSH} \leq 7 \cdot 10^{-10} \text{ M}$  ist eine Erkrankung der Schilddrüse auszuschließen, bei  $c_{TSH} \geq 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$  ist eine Hypothyreose wahrscheinlich.

#### 6.1.3.3 Antigen 2: hCG (human chorionic gonadotropin)

Das andere verwendete Antigen ist das humane Choriongonadotropin (45000 g/mol). Dieses Protein ist ein Schwangerschaftshormon, das verschiedene Stoffwechselprozesse der Schwangerschaft steuert. Das hCG wird direkt zu Beginn der Schwangerschaft in großen Mengen ausgeschüttet und findet sich auch im Harn. Daher wird es für Schwangerschaftstest eingesetzt.

Da Hoden- und Plazentagewebe entwicklungsgeschichtlich den gleichen Ursprung haben, wird hCG auch bei krankhaften Wucherungen dieses Gewebes verstärkt ausgeschüttet. Bei Männern ist hCG daher ein Indikator für Hodenkrebs.

## 6.2 Immunoassay auf der Basis von Biotinsilanen und Streptavidin – experimentelle Ergebnisse

### 6.2.1 Silanadsorption

Die Silanisierung wurde durchgeführt wie in Kapitel 4 beschrieben. Nach dem Ausheizen der Träger ergab sich ein Kontaktwinkel von  $60^\circ$ .

Zur Charakterisierung der Biotinsilanschichten wurde die Silanadsorption mit Hilfe von Wellenleitermodenspektroskopie in Lösung beobachtet. Die Adsorption erfolgt in den ersten 5 min sehr schnell und setzt sich dann langsamer werdend fort. Nach der Adsorption wurde jeweils ein Modenspektrum in Lösung und an einem getrockneten Wellenleiter vermessen. Es ist zu beobachten, daß die Silanschicht in Lösung gequollen vorliegt und beim Trocknen zu einem dichten Film kollabiert (Tabelle 6-2). Eine genauere Interpretation der beiden Schichtdicken und Brechungsindizes erscheint wegen der Heterogenität des Silanadsorbats nicht sinnvoll.

Tabelle 6-2: Schichtdicken und Brechungsindizes eines Biotinsilans (langes Biotinsilan,  $x = 0,1$ )

	Dicke $d_{\text{Silan}}$ [nm]	Brechungsindex $n_{\text{Silan}}$
Pufferlösung $n_c = 1,333$	$2,2 \pm 0,6$	$1,40 \pm 0,02$
getrocknet $n_c = 1$	$0,70 \pm 0,25$	$1,55 \pm 0,02$

### 6.2.2 Streptavidin-Adsorption an unterschiedliche Biotinsilanschichten

#### 6.2.2.1 Laterale Biotin-Verdünnung

Um das richtige Mischungsverhältnis zwischen Biotinsilan und Verdüner zu bestimmen, wurde in einem ersten Schritt die Untersuchung von G. Tovar [TOV95] wiederholt, in der bei einer gleichbleibenden Silan-Gesamtkonzentration von  $[\text{Biotinsilan}] + [\text{Verdüner}] = 0,2 \text{ mM}$  das molare Mischungsverhältnis  $x = [\text{Biotinsilan}] / 0,2 \text{ mM}$  variiert wird. Für unterschiedliche Werte von  $x$  wird mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanz<sup>24</sup> die optische Schichtdicke des Streptavidinadsorbats bestimmt (Abbildung 6-9).

<sup>24</sup> Um die Oberflächenplasmonenresonanz auf oxidische Oberflächen anwenden zu können wird ein mit Gold (50 nm) und Siliziumoxid (20 nm) thermisch bedampftes Hochindexglas (LaSF N 9) verwendet [LIE99, TOV95]. Das Gold (99,99 %, Balzers) wurde unter Vakuum aufgedampft, das Siliziumoxid durch Aufdampfen von SiO in Sauerstoffatmosphäre ( $p = 2 \cdot 10^{-4} \text{ hPa}$ ) erhalten. Gegen Phosphatpuffer stabiles Siliziumoxid erwies sich mit diesem Verfahren allerdings als schlecht reproduzierbar.

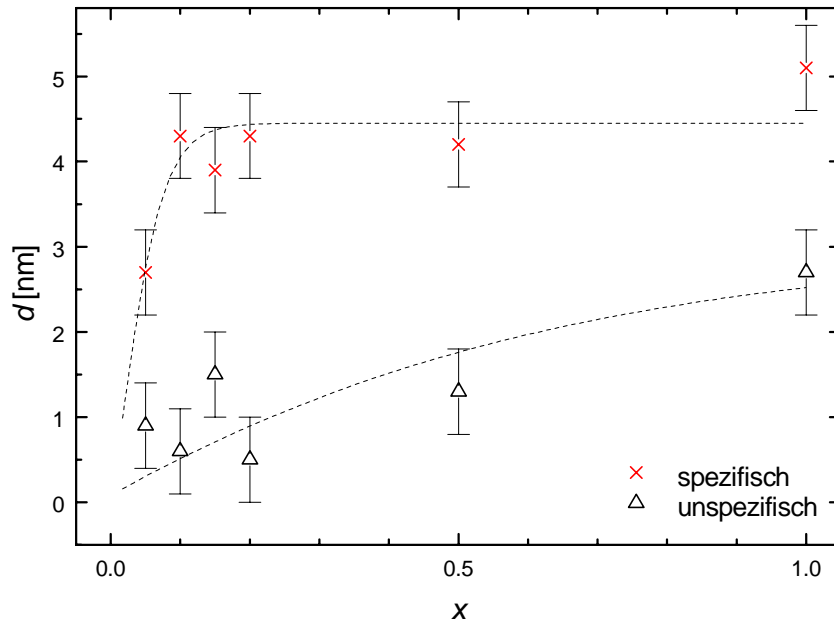


Abbildung 6-9: Abhängigkeit der Streptavidinschichtdicke ( $n_{\text{Strept}} = 1,45$ ) in Abhängigkeit der relativen Biotinsilankonzentration mit sigmoidalen Anpassungen, natives Streptavidin (Kreuze), mit Biotin abgesättigtes Streptavidin (Dreiecke)

Man sieht, daß die spezifisch bindende Schichtdicke zunächst mit steigender Biotinkonzentration steigt und ab einem Wert von  $x \approx 0,1$  nahezu gleich bleibt. Tovar wies nach, daß die Streptavidinmonolage die größte Affinität für biotinylierte  $F_{\text{ab}}$ -Fragmente hat, wenn die Biotinkonzentration auf diesem Plateau gleicher Streptavidindicken möglichst klein gewählt wird (in diesem Fall  $x \approx 0,1$ ). Bei den kürzeren Biotinsilanen sinkt die Streptavidinadsorption erst ab einer relativen Konzentration von  $x \leq 0,05$ , für  $x = 0,07$  werden noch maximale Adsorbatdicken erreicht. Daher wurde für die nachfolgenden Experimente mit kurzen Silanen  $x = 0,07$  verwendet.

## 6.2.2.2 Einfluß des verwendeten Silans auf die Streptavidinadsorption

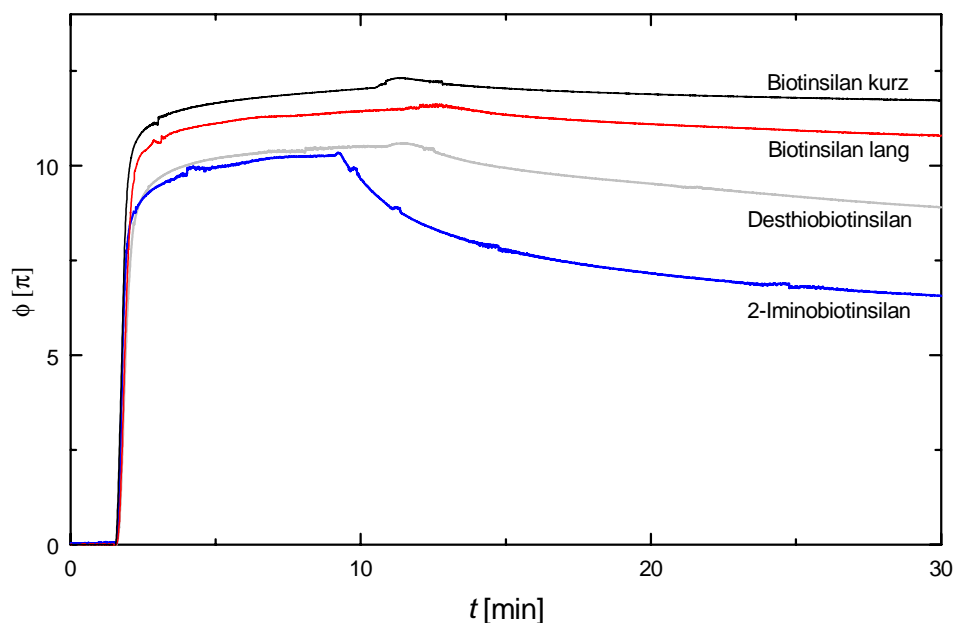


Abbildung 6-10: Streptavidin: Ad- und Desorption für unterschiedliche Biotinderivate ( $c = 0,5 \mu\text{M}$ )

Die Adsorption der unterschiedlichen Biotinderivate an funktionalisierte Interferometer wird in Abbildung 6-10 dargestellt. Nach etwa zehnmütiger Adsorption aus  $0,5 \mu\text{M}$  Streptavidinlösung wird der Träger mit PBS gespült. Man beobachtet, daß die Adsorption bei allen Biotinderivaten sowohl bezüglich Geschwindigkeit als auch Schichtdicke etwa gleich verläuft. In der Desorption beobachtet man jedoch zum Teil beträchtliche Unterschiede. Bei den Biotinderivaten wird unabhängig von der Spacerlänge wenig Streptavidin desorbiert (Volumen-Bindungskonstante Biotin - Streptavidin:  $K \approx 10^{15} \text{M}^{-1}$ ). Die Desorption von Desthiobiotinsilan erfolgt schon sichtbar stärker ( $K \approx 10^{12} \text{M}^{-1}$ ). Bei 2-Iminobiotinsilan ist eine deutlich stärkere Desorption zu beobachten, wie es wegen der Bindungskonstante des 2-Iminobiotins bei pH 7,4 zu erwarten ist. ( $K \approx 10^3 \text{M}^{-1}$  [WIL90]).

## 6.2.2.3 Reversible Streptavidin-Adsorption auf Desthiobiotinsilane

Die Bindung von Streptavidin an die Desthiobiotinsilan-Oberfläche ist zu stark, um Streptavidin durch einfaches Spülen von der Oberfläche vollständig zu desorbieren. Um die Desorption zu beschleunigen, könnte man das Streptavidinadsorbat mit Biotin überspülen. Durch die höhere Bindungskonstante des Biotins im Vergleich zum Desthiobiotin ist zu erwarten, daß Biotinmoleküle aus der Lösung das immobilisierte Desthiobiotin aus den Bindungstaschen des Streptavidin verdrängen. Dadurch sollte dann das Streptavidin leichter abzuspülen sein.

Zur Untersuchung dieses Ansatzes wurden Oberflächenplasmonensubstrate mit Desthiobiotinsilan beschichtet. Nach einer Streptavidin-Adsorption desorbiert das Streptavidin tatsächlich wesentlich schneller bei Anwesenheit von Biotin ( $c = 5 \text{mM}$ ). Nach ca. 18 Stunden in Biotinlösung wird gründlich mit PBS gespült. Das Minimum der

Oberflächenplasmonenresonanz kehrt fast zum ursprünglichen Minimum zurück (Abbildung 6-11), während sich die Form der Resonanz etwas verändert.

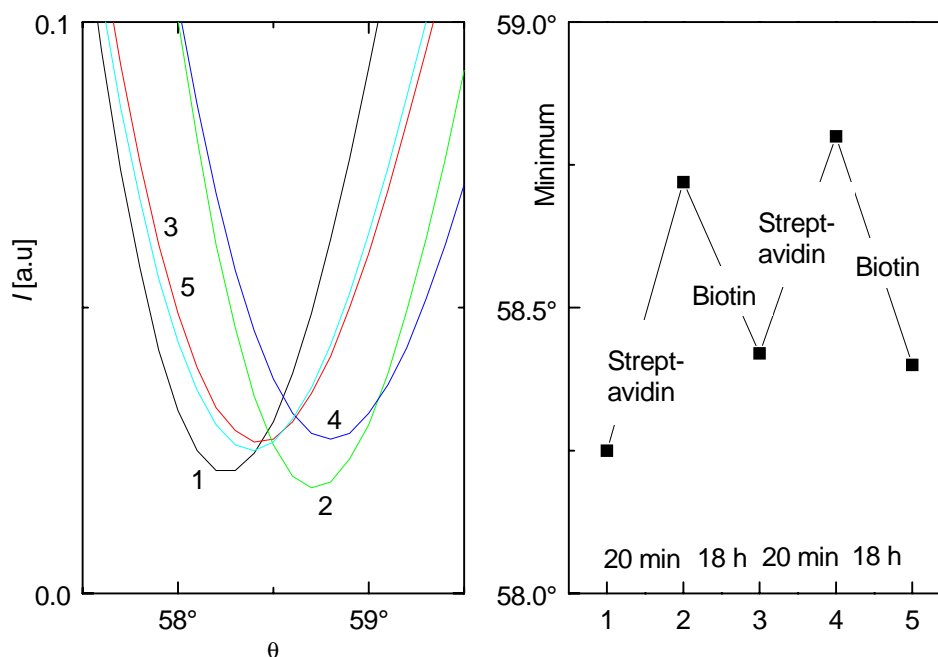


Abbildung 6-11: Reversible Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz durch Überspülen eines Desthiobiotin-Adsorbats ( $x = 0,05$ ) mit Streptavidin ( $0,5 \mu\text{M}$ ) und Biotin ( $5 \text{ mM}$ )

Um zu überprüfen, ob das Substrat immer noch eine Desthiobiotin-funktionalisiert ist, wird erneut mit Streptavidin gespült. Es ist eine erneute Adsorption zu beobachten. Die Resonanzverschiebung ist nahezu gleich groß wie beim erstenmal und findet ebenso schnell statt. Das zweite Streptavidin-Adsorbat läßt sich ebenfalls durch Überspülen mit Biotin desorbieren.

Es ist also prinzipiell möglich, dasselbe Substrat nacheinander mit zwei unterschiedlichen Adsorbaten reversibel zu beschichten. Das könnte es ermöglichen, mit einem Sensor nacheinander unterschiedliche Analytmoleküle nachzuweisen, ohne daß zwischen den Experimenten eine erneute Silanisierung erforderlich ist.

#### 6.2.2.4 Charakterisierung von Streptavidin-Adsorbaten (WaMS, AFM)

Um verschiedene Meßverfahren miteinander vergleichen zu können, stellt sich die Frage, durch welche physikalisch meßbare Größe der Adsorptionsprozeß am Besten charakterisiert wird. Optische Schichtmodelle zur Auswertung von SPR, WaMS oder Mach-Zehnder-Interferometrie liefern bei Vorgabe eines Brechungsindex eine "Schichtdicke", auch wenn gerade im Submonolagenbereich der Begriff einer Schicht kaum noch sinnvoll anwendbar ist. Gleichwohl wird in der Literatur für Proteinschichten häufig eine Schichtdicke bei angenommenem Brechungsindex von  $n_{\text{ad}} = 1,45$  angegeben [z.B. KUN97, TOV95, SPI92].

Betrachtet man die Schichtdicken in Abbildung 6-9 und vergleicht die angegebenen Maximalschichtdicken mit der durch Röntgenstrukturanalyse gefundenen Ausdehnung des Streptavidinmoleküls von etwa 4,6 nm, so erscheint die Annahme ( $n_{ad} = 1,45$ ) zunächst sinnvoll. Allerdings kann die Röntgenstrukturanalyse nicht auf gelöste und dadurch möglicherweise gequollene Moleküle angewandt werden. Es ist also durchaus möglich, daß das Streptavidin durch Einlagerung von Wassermolekülen größer ist, jedoch einen geringeren Brechungsindex aufweist. Mit Hilfe von Oberflächenplasmonen läßt sich die Schichtdicke lediglich in Abhängigkeit des angenommenen Brechungsindex bestimmen  $d_{ad} = d_{ad}(n_{ad})$ . Für dünne Schichten ist die "optische Schichtdicke"  $d_{ad} \cdot (n_{ad} - n_c)$  in guter Näherung unabhängig von  $n_{ad}$ . Daraus folgt, daß sich die physikalische Dicke von Schichten, für die sich der Brechungsindex kaum von dem des Deckmediums unterscheidet ( $n_{ad} \cong n_c$ ), die Bestimmung der Schichtdicke nur recht ungenau ist, wenn ihr Brechungsindex nicht genau bekannt ist.

Um die Annahme des Brechungsindex eines Streptavidinadsorbats von  $n_{ad} = 1,45$  zu überprüfen, wurde mit Hilfe der Wellenleitermodenspektroskopie (WaMS) eines zweimodigen  $Ta_2O_5$ -Wellenleiters eine Streptavidinadsorption beobachtet. Dadurch lassen sich mit kombinierter Auswertung der beiden Moden Schichtdicke und Brechungsindex der Streptavidinschicht unabhängig voneinander bestimmen. Zur Auswertung des Modenspektrums trägt man für beide Moden die möglichen Kombinationen des Brechungsindex und der Schichtdicke gegeneinander auf und erhält die beiden Werte aus dem Schnittpunkt der beiden Moden (Abbildung 6-12).

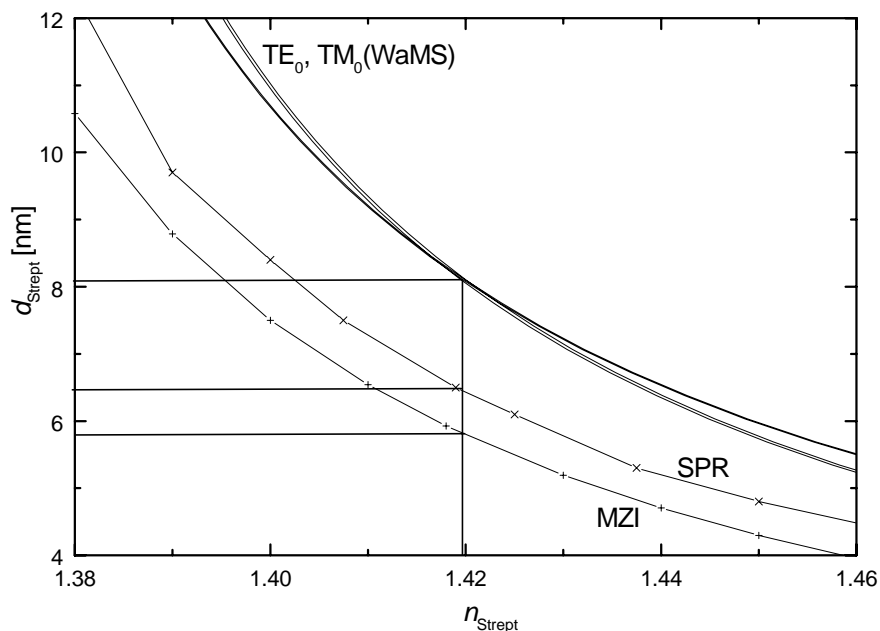


Abbildung 6-12: Wellenleitermodenspektroskopie an einem zweimodigen Wellenleiter ( $Ta_2O_5$ ),  $n_{Strept} = 1,420 \pm 0,005$ ,  $d_{WaMS} = 8$  nm, zum Vergleich sind auch die entsprechenden Relationen für SPR ( $-x-$ ) und MZI ( $-+-$ ) eingetragen

Daraus ergibt sich ein Brechungsindex der Streptavidinschicht von  $n_{ad} = 1,420 \pm 0,005$  und eine Schichtdicke von  $d_{WaMS} = 8$  nm. Eine für alle drei Methoden übereinstimmende Wahl von Brechungsindex und Schichtdicke war nicht möglich (kein Schnittpunkt aller Kurven in Abbildung 6-12). Von einem unterschiedlichen Brechungsindex einer Streptavidinschicht auf verschiedenen oxidischen Substraten ist allerdings nicht auszugehen. Daher ist am ehesten der Brechungsindex von 1,42 für alle Verfahren anzunehmen, mit denen Schichtdicke und Brechungsindex nicht unabhängig voneinander zu bestimmen sind. Es ergibt sich auf Siliziumoxidoberflächen für Oberflächenplasmonenspektroskopie und Mach-Zehnder-Interferometrie eine (im Verhältnis zu WaMS wesentlich kleinere) Schichtdicke von  $d_{SPR} = 6,5$  nm bzw.  $d_{MZI} = 6$  nm.

Um die Konformation des gebundenen Streptavidins genauer aufzuklären, wurden Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen (AFM<sup>25</sup>, [PRA90]) von gebundenem Streptavidin auf einem mit kurzem Biotinsilan ( $x = 0,07$ ) funktionalisierten Siliziumwafer aufgenommen (Abbildung 6-13).

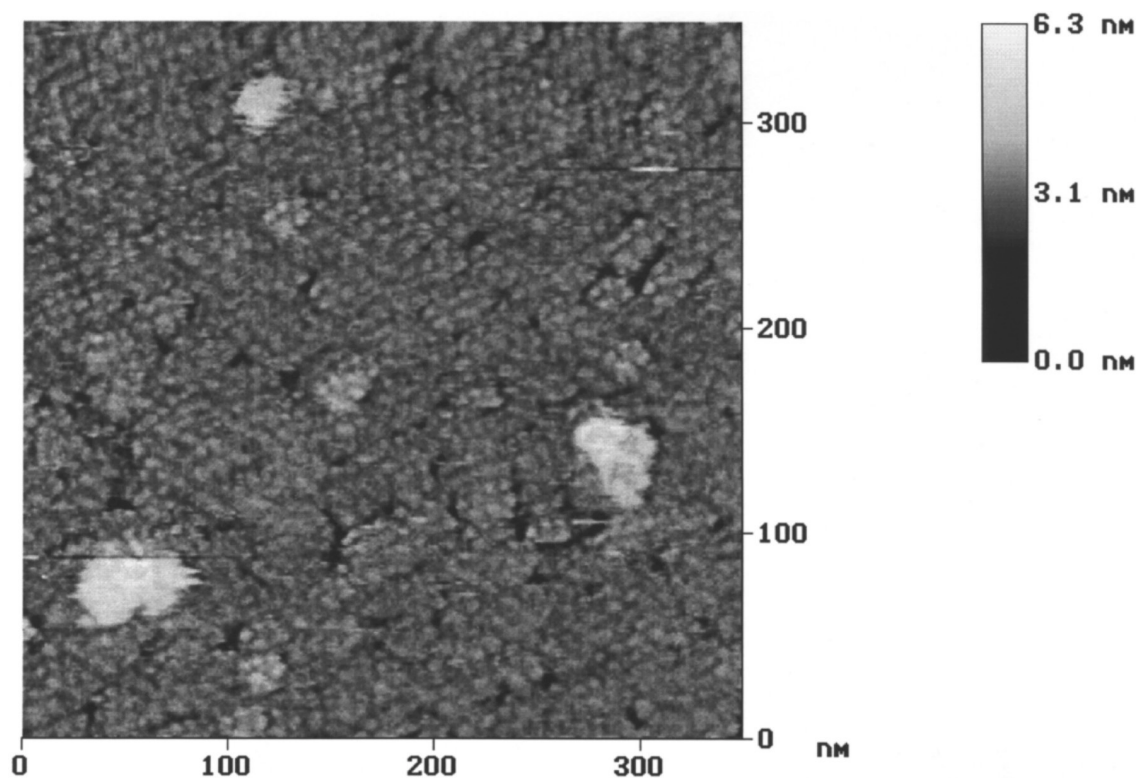


Abbildung 6-13: Rasterkraftmikroskopie-Aufnahme einer Streptavidinmonolage in PBS-Pufferlösung

In der Rasterkraftmikroskopie-Aufnahme der silanisierten Substrate (nicht abgebildet) ist keine Struktur des Silans zu erkennen. Die Silanisierung des Substrates ist also über die betrachtete Fläche weitgehend homogen.

<sup>25</sup> Nanoscope 3a Multimode, Digital Instruments, Santa Barbara, tapping mode, AFM-Spitze aus Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Nun wird das Substrat mit gefilterter Streptavidinlösung überspült. Man erkennt die Adsorption einer Struktur, die sehr gut einer Monolage vereinzelter Streptavidinmoleküle zugeordnet werden kann. Lediglich einige größere Verunreinigungen mit einem Durchmesser von etwa 30 bis 40 nm fallen auf<sup>26</sup>. Die Anordnung der Moleküle ist zwar nahezu dicht, jedoch nicht geordnet; eine geordnete Struktur könnte auch nur auftreten, wenn sich die Moleküle auf der Oberfläche bewegen könnten. Wegen der starken Bindungskonstante haben die Moleküle diese Beweglichkeit jedoch nicht. Durch Abzählen konnte eine mittlere Streptavidindichte von etwa  $0,011 \text{ nm}^{-2}$  ermittelt werden. Bei einer dichtesten Kugelpackung würde das einem Durchmesser der Kugeln von etwa 10 nm entsprechen. Tatsächlich findet man auch Stellen, wo die Streptavidinmoleküle nur etwa 6 bis 7 nm voneinander entfernt sind.

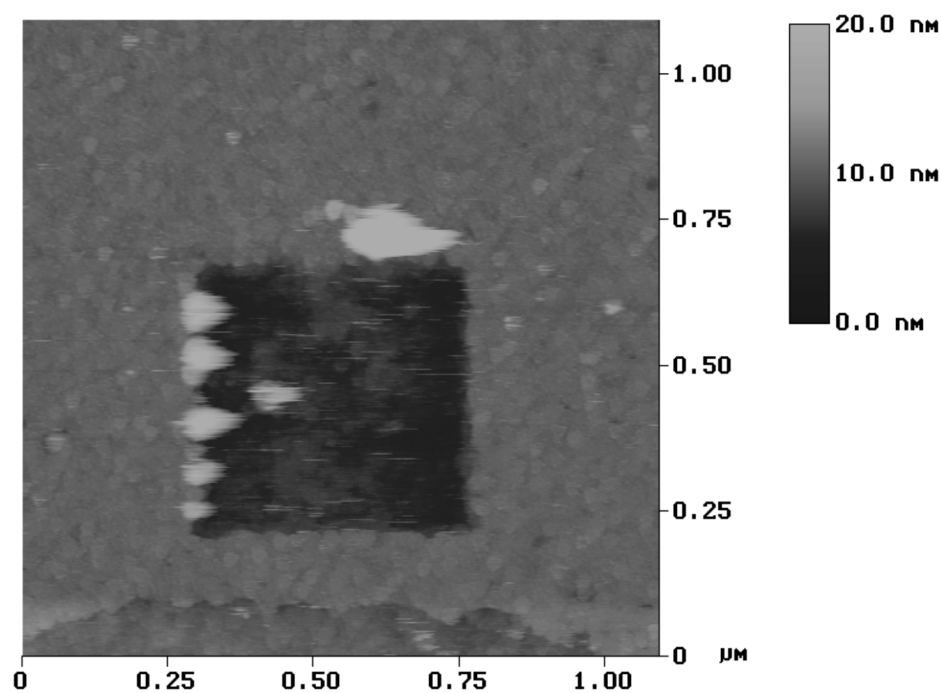


Abbildung 6-14: Rasterkraftmikroskopie-Aufnahme, in der in einem Bereich von  $350 \text{ nm} \times 350 \text{ nm}$  die Streptavidin-Moleküle mit der AFM-Spitze weggeschoben wurden

Adsorbierte Streptavidinmoleküle lassen sich durch die AFM-Spitze mit leichtem Druck von der Oberfläche wegschieben (Kontaktmodus). Abbildung 6-14 zeigt eine Aufnahme, in der dieses Verfahren angewandt und anschließend der Meßbereich vergrößert wurde. Man sieht, daß die Streptavidinmoleküle nach links aus dem ca.  $350 \text{ nm} \times 350 \text{ nm}$  großen Quadrat weggeschoben wurden. Die resultierenden Schichtdicken lassen darauf schließen, daß die Silanschicht auf der Oberfläche bleibt, während die Streptavidinmoleküle beiseite geschoben werden. Vermutlich werden die Biotinmoleküle dabei aus ihren Bindungstaschen gezogen. Als Höhe der Streptavidin-

<sup>26</sup> Bei einem anderem Versuch mit identischer Probenpräparierung wurde trotz frischer Silanlösung eine Vielzahl von Silanagglomeraten beobachtet. Dies läßt darauf schließen, daß in diesem Fall die Probe möglicherweise vor dem Ausheizen nicht sorgfältig genug gespült wurde.

Monolage kann man durch den Vergleich unbedeckter und bedeckter Stellen einen Wert von etwa 5 bis 6 nm abschätzen. Dieser Wert darf jedoch aufgrund der Wechselwirkung zwischen dem weichen Protein und der harten AFM-Spitze nicht überbewertet werden [WEI93]. Durch Komprimierung kann das Streptavidin hingegen dicker sein als es im AFM erscheint.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit Hilfe der vorgestellten Silanfunktionalisierung die Adsorption einer dichten, homogenen Streptavidinmonolage auf oxidische Oberflächen möglich ist. Weiterhin erscheint es wenig wahrscheinlich, daß die Streptavidinmoleküle bei den gegebenen Randbedingungen den gleichen Durchmesser wie im Kristall (4,6 nm) und einen Brechungsindex von 1,45 aufweisen. Durch die vorgestellten Messungen erscheint eher eine Größe von etwa  $d_{\text{Streptavidin}} = 6 \text{ nm}$ , ein Brechungsindex von ca.  $n_{\text{Streptavidin}} = 1,42$  plausibel.

### 6.2.3 Adsorption von Antikörperfragmenten

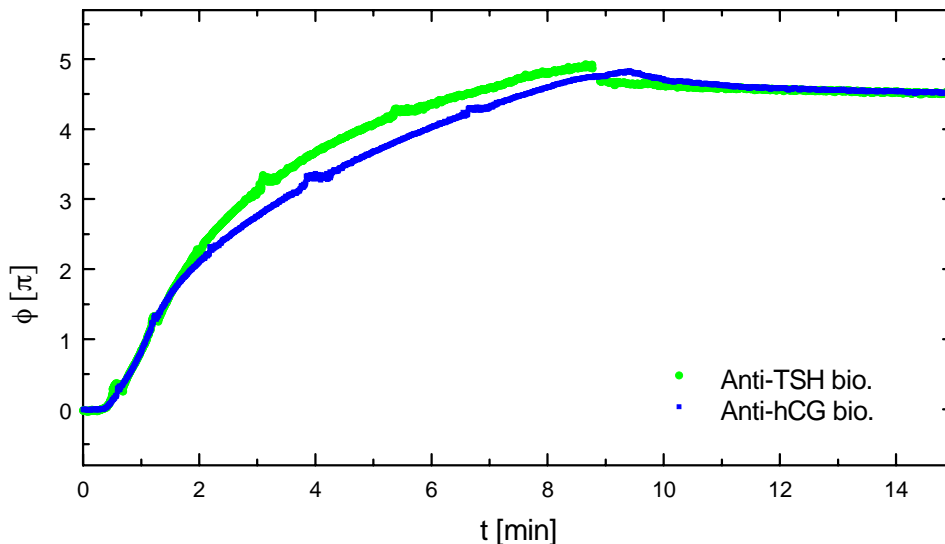


Abbildung 6-15: Adsorption zweier unterschiedlicher biotinylierter Antikörperfragmente im Vergleich; die Messung wurde an den beiden Meßarmen des gleichen Interferometers durchgeführt ( $c = 0,5 \mu\text{M}$ ).

Als nächster Schritt des Immunoassays schließt sich die Adsorption des biotinylierten Antikörperfragmentes an ( $0,5 \mu\text{M}$  in PBS, Abbildung 6-15). Man beobachtet, daß die Adsorption dieser Schicht trotz gleicher Konzentration etwas langsamer verläuft als die Streptavidinadsorption. Diese Beobachtung ist dadurch zu erklären, daß das Streptavidin durch seine vier Bindungstaschen in verschiedenen Orientierungen adsorbieren kann, während das Antikörperfragment mit nur einer Biotingruppe bereits richtig orientiert vorliegen muß, um an die Oberfläche adsorbieren zu können. Es lassen sich, wie in Abbildung 6-15 zu sehen ist, unterschiedliche Antikörperfragmente etwa gleich gut adsorbieren. In diesem Fall war eine Adsorptionsphasenverschiebung von je  $4,5 \pi$  zu beobachten, dies entspricht bei  $n_{\text{ad}} = 1,45$  etwa 1,4 nm. Die Adsorption der Antikörper-

fragmente verlief allerdings aus nicht geklärten Gründen bei gleichartig durchgeführten Messungen unterschiedlich effektiv. In der Abbildung ist ein typischer Verlauf dargestellt.

### 6.2.4 Antikörper-Antigen-Wechselwirkung

Das gesamte Schichtsystem wurde zunächst (analog zu [TOV95]) mit Oberflächenplasmonenresonanz untersucht. Die dort gefundenen Schichtdicken konnten reproduziert werden (Abbildung 6-16). Durch die größere Sensitivität des Mach-Zehnder-Interferometers wird erhofft, die hCG-Nachweisgrenze gegenüber der Oberflächenplasmonenresonanz ( $c = 1 \cdot 10^{-8} \text{M}$ ) verringern zu können. Andererseits ist auch die Antikörper/Antigen-Bindungskonstante an der Oberfläche von grundsätzlichem Interesse.

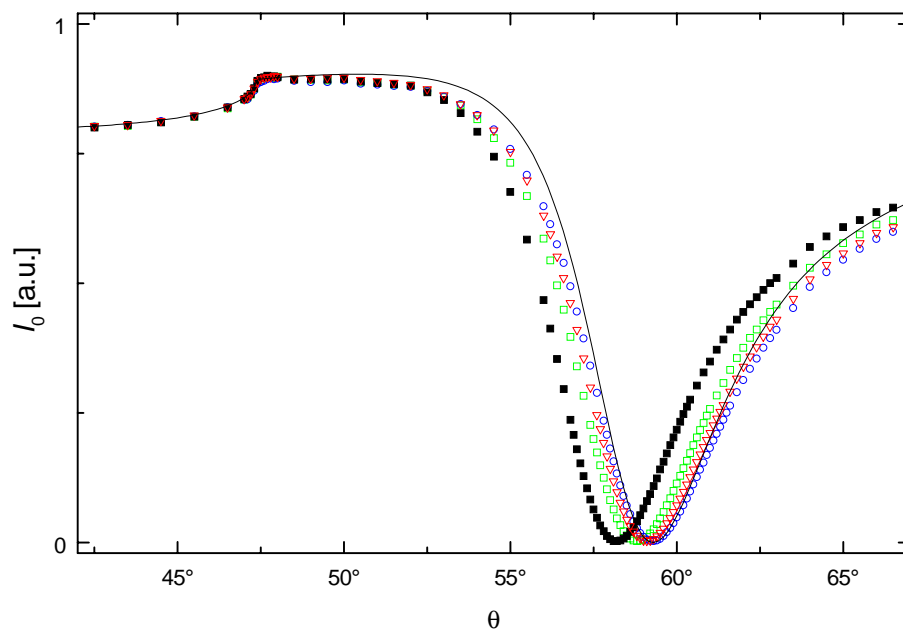


Abbildung 6-16: Immunoassay vermessen durch Oberflächenplasmonenresonanz: Substrat (■), nach Streptavidinadsorption (□), nach Antikörperadsorption (▼), nach Antigenadsorption (○), jeweils  $c = 0,5 \mu\text{M}$  in PBS. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung mit den Schichtdicken aus Tabelle 6-3.

Tabelle 6-3: Aus Oberflächenplasmonenresonanz (Abbildung 6-16) ermittelte Schichtdicken in Abhängigkeit des angenommenen Brechungsindex

	angenommener Brechungsindex $n_{ad}$	Schichtdicke $d_{ad}$ [nm]
Streptavidin oder	1,42	6,4
	1,45	4,6
$F_{ab}$ (Anti-hCG)	1,45	2,2
hCG	1,45	1,4

Um für die Biosensorik eine Analyt-Konzentration bestimmen zu können, müssen zwei Größen bekannt sein, die Bindungskonstante des Antikörper-Antigen-Paares und die maximale Phasenverschiebung (bzw. maximale Schichtdicke). Bei starker Verdünnung ergibt sich die Analytkonzentration direkt aus der Langmuir-Isotherme. Ist die Konzentration deutlich größer als die Halbsättigungskonzentration  $1/K$ , so muß zusätzlich die Kinetik von Ad- und Desorption herangezogen werden. Wieviel größer die Konzentration im Verhältnis zur Halbsättigungskonzentration ist, ergibt sich dann daraus, wieviel schneller die Adsorption im Vergleich zur Desorption ist.

#### 6.2.4.1 Kinetische Analyse der Antigen-Adsorption

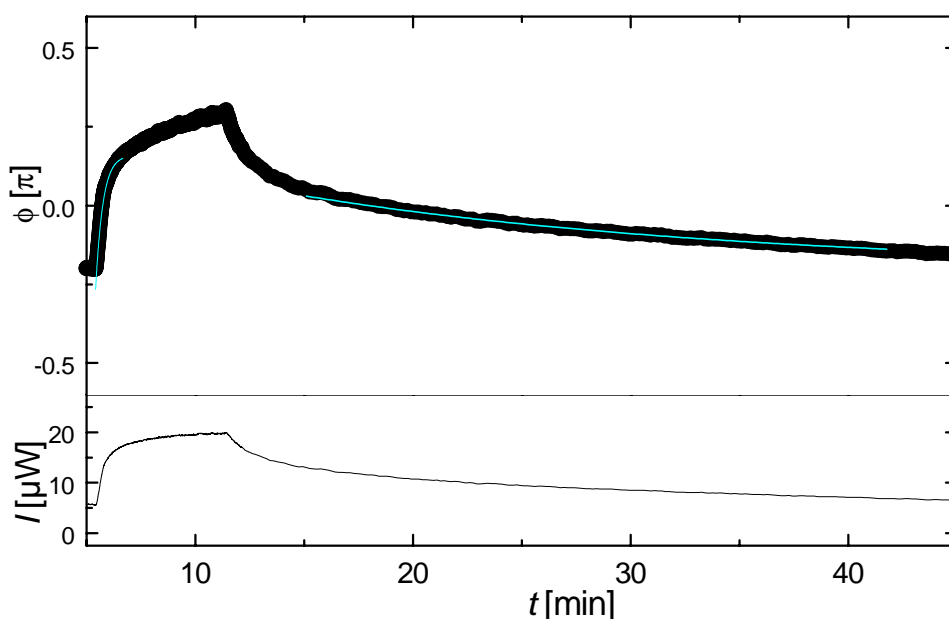


Abbildung 6-17: Ad- und Desorption von hCG ( $0,5 \mu\text{M}$ ) auf eine mit Anti-hCG funktionalisierte Oberfläche. Die kinetische Analyse ergibt  $K = 1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ .

Abbildung 6-17 zeigt Ad- und Desorption aus  $0,5 \mu\text{M}$  hCG-Lösung (in PBS). Man erkennt, daß die Adsorption wesentlich schneller verläuft als die Desorption. Aus den eingezeichneten Anpassungskurven ergibt sich eine Bindungskonstante von  $K = 1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Diese Bindungskonstante ist typisch für eine Antikörper-Antigen-Reaktion.

Die Maximalphasenverschiebung ist in dem gezeigten Beispiel geringer als aus den vorangegangenen SPR-Messungen zu erwarten wäre, die kinetische Analyse macht jedoch deutlich, daß das Antigen spezifisch auf die Sensoroberfläche adsorbiert.

#### 6.2.4.2 Antigen-Adsorption aus verdünnten Lösungen - Nachweisgrenze

Für die Anwendung als Biosensor ist eine wichtige Größe die Nachweisgrenze, die Konzentration, die noch gerade sicher nachweisbar ist. Um für den funktionalisierten Wellenleiter die Nachweisgrenze zu bestimmen, wurden Antikörper-Antigen-Reaktionen bei geringen Analytkonzentrationen beobachtet. Abbildung 6-18 a zeigt eine Adsorptionskinetik mit einer hCG-Konzentration von  $c = 3$  nM. Abbildung 6-18 b zeigt die Gesamtphasenverschiebung mehrerer Analytkonzentrationen. Mit der aus dem vorigen Abschnitt ermittelten Bindungskonstante läßt sich eine Langmuir-Isotherme an die ermittelten Werte anpassen. Die im wesentlichen durch Signalrauschen begrenzte Nachweisgrenze für diese Antigen-Antikörper-Kombination beträgt etwa  $c_{\min} \in [0,5; 1]$  nM.

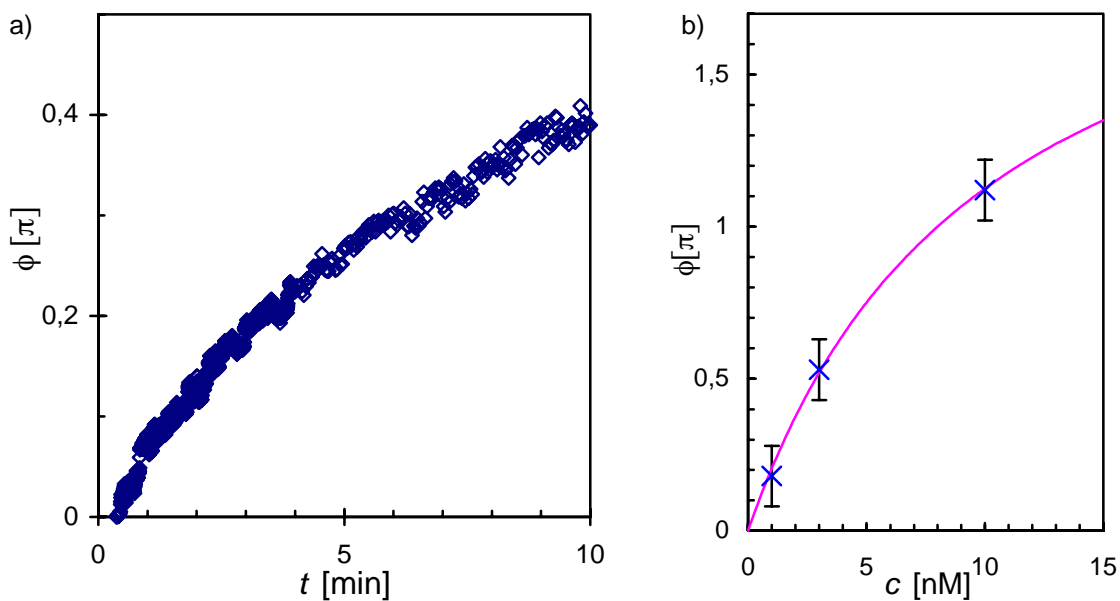


Abbildung 6-18: Adsorptionskinetik von hCG (3 nM) auf eine mit Antikörperfragmenten (Anti-hCG) funktionalisierte Oberfläche (a), Gesamtphasenverschiebung durch Adsorption in Abhängigkeit der Konzentration, im Vergleich mit einer Langmuir-Anpassung (durchgezogene Linie) die aus der Bindungskonstante von Abbildung 6-17 ( $K = 1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) und einer Maximalphasenverschiebung von  $\phi_{\infty} = 2,25 \pi$  errechnet wurde (b).

Eine Adsorptionskinetik für TSH ist in Abbildung 6-19 dargestellt. Man sieht erneut eine Phasenverschiebung von etwa  $\phi = 0,1 \pi$ , deutlich weniger als bei der gleichen Konzentration für hCG beobachtet wurde. Dieser Effekt, der durch die kleineren Abmaße des Antigens zu erklären ist, läßt für TSH nur eine Nachweisgrenze von  $c_{\min} \in [5; 10 \text{ nM}]$  zu.

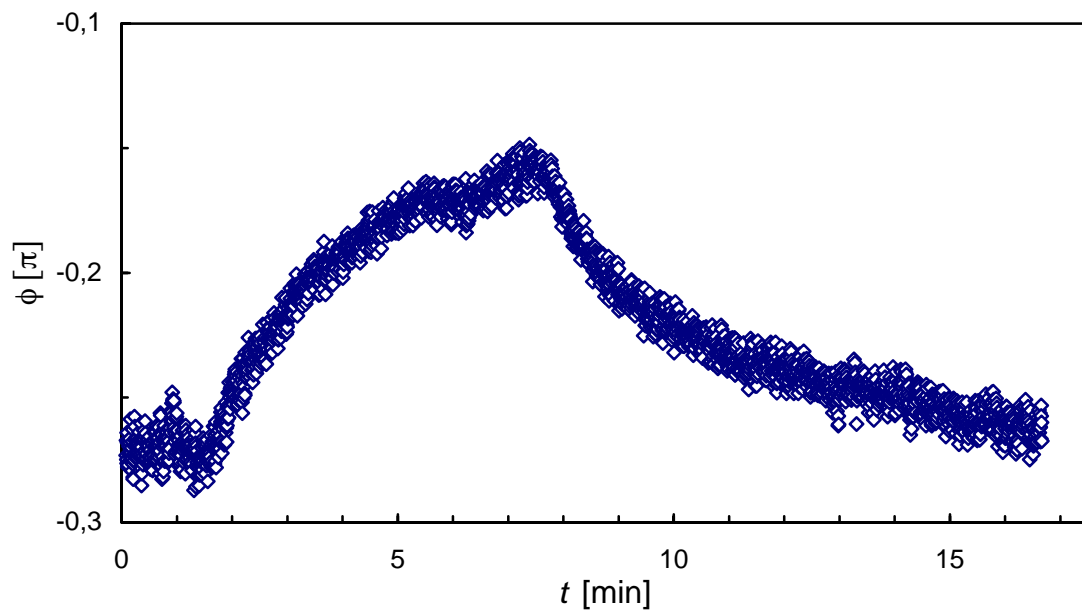


Abbildung 6-19: Ad- und Desorption von TSH ( $c = 10$  nM) auf eine mit Antikörperfragmenten (Anti-TSH) funktionalisierte MZI-Oberfläche,  $\Delta\phi = 0,1 \pi$

### 6.3 Adsorption farbstoffmarkierter Proteine, simultaner Nachweis durch Fluoreszenz

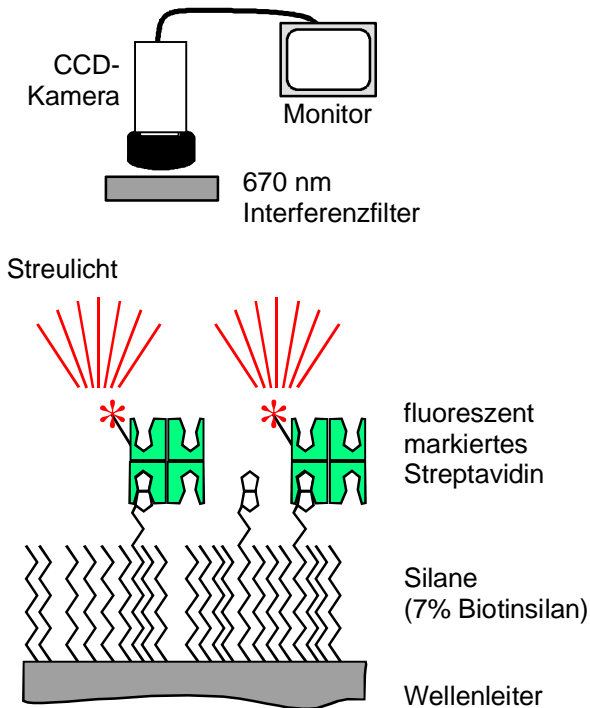


Abbildung 6-20: Testsystem zum Nachweis von Adsorbaten durch evaneszent zur Fluoreszenz angeregtes Farbstoff-markiertes Streptavidin

Für die Biosensorik werden häufig Fluoreszenzfarbstoff-markierte Analytmoleküle eingesetzt. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlen dann längerwelliges Fluoreszenzlicht ab. Das Mach-Zehnder-Interferometer bietet zum einen die Möglichkeit, gezielt oberflächennahe Farbstoffmoleküle durch das evaneszente Feld anzuregen, zum anderen, detektierte Fluoreszenzintensität mit gleichzeitig gemessener Phasenverschiebung zu vergleichen.

Von der Oberfläche abgestrahltes Fluoreszenzlicht läßt sich durch Interferenzfilter von dem anregenden Licht trennen. Kombiniert man Fluoreszenzfarbstoffe mit Anregung durch evaneszentes Licht an einer Oberfläche, so werden nur die Moleküle zur Fluoreszenz angeregt, die sich in der Nähe der Oberfläche befinden. Fluoreszenz in Lösungsvolumen verbliebener Moleküle wird dadurch unterdrückt. Liegt eine spezifisch funktionalisierte Oberfläche vor, so fluoreszieren nur die adsorbierten (Analyt-)moleküle, auch wenn auch darüber hinaus noch mehr Moleküle markiert wurden. Über evaneszente Anregung durch Oberflächenplasmonen wurde bereits in der Literatur berichtet [z.B. LIE99]. Auch die evaneszente Anregung durch Wellenleitermoden ist bereits untersucht worden [PLO96]. Dabei wurde festgestellt, daß sich gerade Siliziumoxinitrid-Wellenleiter für Fluoreszenzexperimente besonders gut eignen, da sie eine geringe Eigenfluoreszenz aufweisen.

Es ist also prinzipiell möglich, Adsorption Fluoreszenz-markierter Moleküle auf eine funktionalisierte Sensoroberfläche simultan durch zwei unterschiedliche Methoden zu beobachten (Fluoreszenz und Mach-Zehnder-Interferometer). Als einfaches Testsystem wurde ein mit dem kurzen Biotinsilan funktionalisiertes Interferometer in Verbindung mit Fluoreszenz-markierten Streptavidinmolekülen verwendet. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde Cy-5 (Amersham Pharmacia) verwendet (Abbildung 6-21, Abbildung 6-22), der sich bei  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$  (HeNe) anregen läßt.

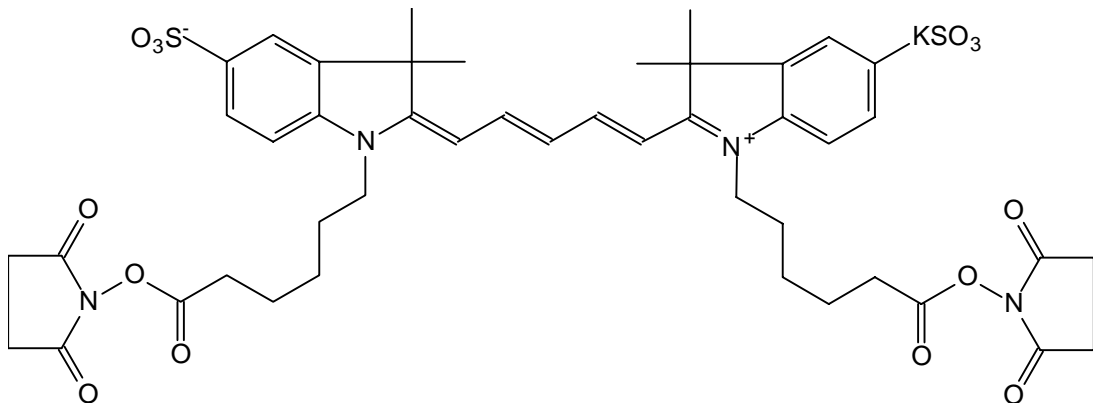


Abbildung 6-21: Struktur des Farbstoffes Cy-5. Der Farbstoff bindet über die beiden Aktivester an funktionale Gruppen des Streptavidins, nach [AME99]

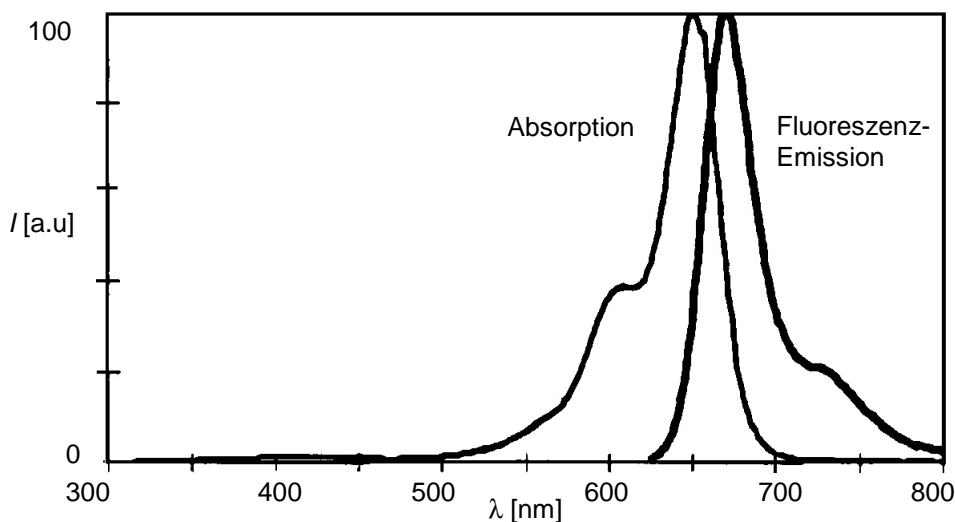


Abbildung 6-22: Anregungsspektrum des Farbstoffes Cy-5, Absorptionsmaximum  $\lambda = 649 \text{ nm}$ , Emissionsmaximum  $\lambda = 670 \text{ nm}$ , nach [AME99]

Dazu wurde in Erweiterung des bestehenden Meßaufbaus eine CCD-Kamera (Fa. Hamamatsu, Typ C3077) über dem Meßaufbau angebracht. Zur Ausblendung des Lichts der Anregungswellenlänge ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ), wurde zusätzlich ein Interferenzfilter verwendet ( $\lambda = 670 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ). Die mit der CCD-Kamera aufgezeichneten Bilder las-

sen sich digitalisieren (Framegrabber) und mit einem Grafikanalyseprogramm quantitativ auswerten.

Abbildung 6-23 zeigt einige Streulichtaufnahmen, die während einer Cy-5-Streptavidin-Adsorption aufgezeichnet wurden. Zunächst wurde vor Beginn der Messung das Streulicht ohne Interferenzfilter aufgezeichnet (Abbildung 6-23 b). Abbildung 6-23 c zeigt, daß durch Einsatz des Interferenzfilters trotz Öffnung der Blende des Kameraobjektivs keine Intensität mehr nachweisbar ist (keine meßbare Eigenfluoreszenz des Wellenleiters). Um in einem Kanal spezifische, in dem anderen unspezifische Adsorption des Streptavidin beobachten zu können, wurde zunächst ein Kanal mit unmarkiertem Streptavidin (Abbildung jeweils unten) abgesättigt. Danach wurden beide Küvettenkanäle mit Cy-5-Streptavidinlösung ( $0,5 \mu\text{M}$ ) überspült.

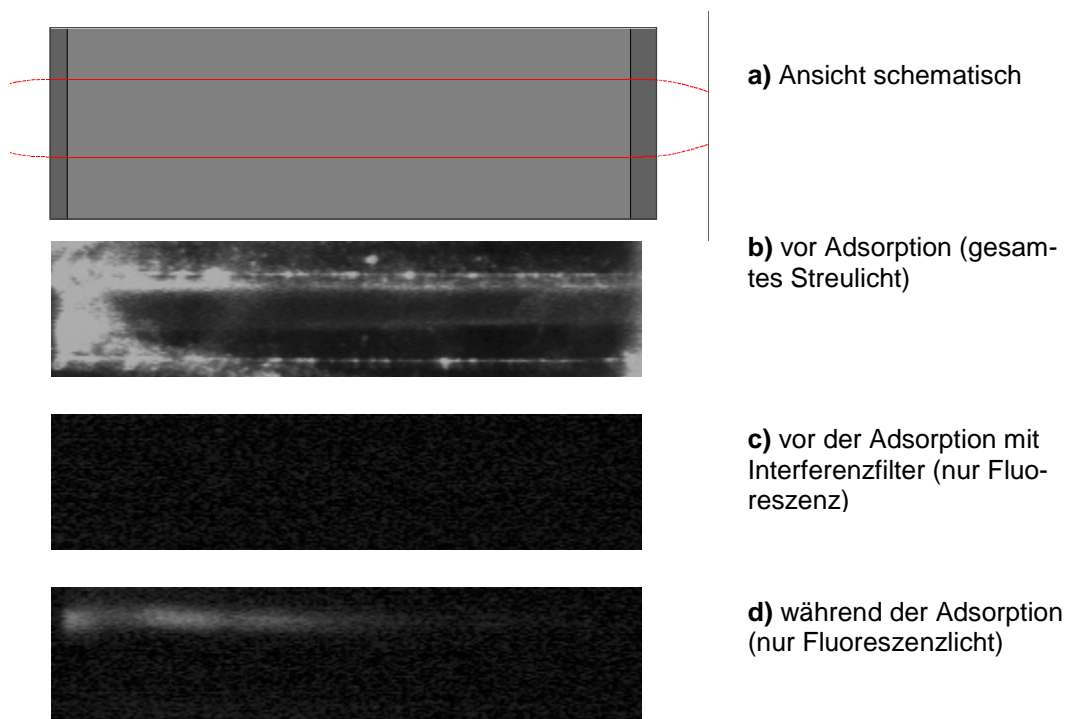


Abbildung 6-23: Streulichtaufnahmen während der Adsorption von Cy-5-modifiziertem Streptavidin (Der untere Meßarm wird mit der gleichen Lösung überspült, wurde jedoch vorher mit Streptavidin abgesättigt.)

In der quantitativen Darstellung (Abbildung 6-24 a) sieht man, daß von dem nicht abgesättigten Kanal Fluoreszenzlicht ausgesandt wird, von dem zweiten, unspezifischen Kanal nur sehr wenig. Zusätzlich wird auch mit dem Interferenzsignal des MZI eine Phasenverschiebung nachgewiesen (Abbildung 6-24 b), entsprechend einer unterschiedlich starken Adsorption auf beide Kanäle. Die ermittelte Phasenverschiebung stimmt zunächst mit der quantitativen Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen überein. Etwa eine Minute nach Beginn der Adsorption ist jedoch zu beobachten, daß die Fluoreszenzintensität wieder nachläßt, sogar schließlich nahezu verschwindet, während die durch Interferometrie beobachtete Streptavidinadsorption sich langsam fortsetzt und

allmählich in Sättigung geht. Auch die geringe Fluoreszenzintensität auf dem unspezifisch adsorbierenden Kanal fällt wieder auf den ursprünglichen Wert.

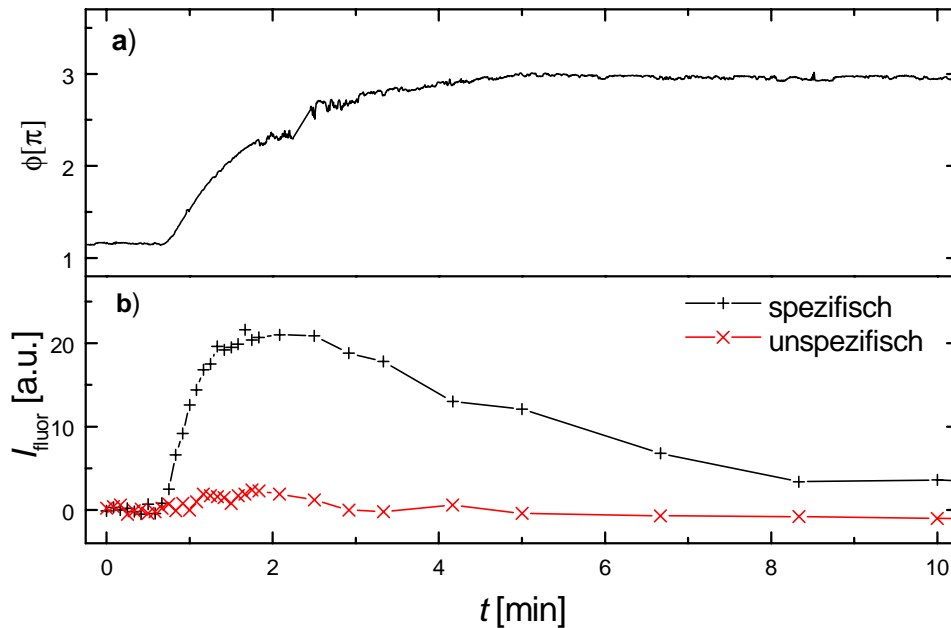


Abbildung 6-24: Fluoreszenzintensität (a) und Interferenzsignale (b) im Vergleich; die Fluoreszenzintensität wurden aus einer Bilderserie ausgelesen, von der einige Bilder in Abbildung 6-24 dargestellt sind.

Die Beobachtung, daß die Fluoreszenzintensität bei steigender Phasenverschiebung deutlich fällt, läßt sich nicht als Desorption der Streptavidinmoleküle interpretieren. Der unterschiedliche Verlauf der Kinetiken läßt sich jedoch durch Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes durch hohe Anregungsintensität im evaneszenten Feld erklären.

Die beobachtete Phasenverschiebung des Interferometers ist geringer als für nicht markiertes Streptavidin; vermutlich wird die Biotineinlagerung in die Bindungstaschen des Streptavidin durch das Farbstoffmolekül behindert.

## 6.4 Funktionalisierung von Wellenleitern durch CVD-Gold und Biotinthiole

In den vorhergehenden Abschnitten wurde die oxidische Sensoroberfläche durch Adsorption von Organosilanen funktionalisiert. In der Literatur wird häufig Oberflächenfunktionalisierung durch die Adsorption von Organothiolen auf Edelmetalloberflächen beschrieben. Organothirole eignen sich besonders gut zur Oberflächenfunktionalisierung, da sie auch bei Raumtemperatur selbstadsorbierende Monolagen ausbilden. Eine thermisch aufgedampfte Gold- oder Silberschicht führt jedoch zu einer stark erhöhten Wellenleiterdämpfung, da das evaneszente Feld durch den elektrischen Widerstand des Metalls gedämpft wird [WEI98]. Die Anwendung der Organothirole auf oxidische Oberflächen ist daher ohne weiteres nicht möglich.

Einen Ausweg könnte die Verwendung von Verbindungsmolekülen (interlinker) oder die Abscheidung eines extrem dünnen Edelmetallfilmes auf die Sensoroberfläche sein, auf den dann eine Thioladsorption mit der Vielfalt möglicher Organothirole möglich ist. Extrem dünne Goldschichten lassen sich mit Hilfe organometallischer Dampfabscheidung (OMCVD) realisieren. Dabei chemisorbiert Gold mit Hilfe eines Vorläufermoleküls (Precursor) an Thiol-funktionalisierte Oberflächen. Ziel dieser Untersuchung war der Nachweis, daß die mit CVD erstellten Goldschichten sich für die Adsorption von Organothiolen und Proteinschichten eignen.

Die Untersuchung von CVD-Gold auf oxidischen Oberflächen wurde in enger Zusammenarbeit mit J. Käshammer [KÄS99], S. Krämer [KRÄ97] und C. Winter<sup>27</sup> [WIN97] durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung des metallorganischen Vorläufermoleküls ("Precursor") war Thema der Arbeit von Winter. Bei Käshammer stand die Abscheidung dünner Goldschichten sowie deren Charakterisierung mit Hilfe unterschiedlicher oberflächensensitiver Untersuchungsmethoden (u.a. RBS, XPS, SDMS, SPR, AFM) im Vordergrund. Die Ergebnisse dieser Untersuchung faßte Käshammer wie folgt zusammen [KÄS99]:

*"Mit der SDMS war eine Goldabscheidung auf dem Dithiol-SAM nachzuweisen. Die Frage nach der Belegungsart und -dichte des Goldes auf der Oberfläche wurde mit Rasterkraftmikroskopie-Messungen und mit RBS-Messungen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die Abscheidung von Gold zum einen zeitabhängig und zum anderen druckabhängig ist und nur dort stattfindet, wo Schwefel als Reaktand angeboten wird. Durch Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß es zwischen dem OMCVD-Gold und den angebotenen Thiolen der organischen Monolage zu einer kovalenten Bindung kommt."*

Krämers wesentlicher Beitrag war die Untersuchung des Einflusses dünner CVD-Goldfilme auf Wellenleitung. Er stellte fest, daß Wellenleiterdämpfung trotz Goldschicht

---

<sup>27</sup> Arbeitskreis Fischer, Universität Bochum

nicht stärker als 17 dB/cm war, gering genug, um die Verwendung in integriert-optischen Bauelementen zu erproben.

Die Anwendbarkeit dieser dünnen Goldschichten für die Biosensorik sollte anschließend durch eine Beschichtung des beschriebenen integriert-optischen Interferometers überprüft werden<sup>28</sup>.

#### 6.4.1 Erstellung goldfunktionalisierter Wellenleiter

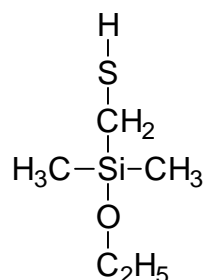


Abbildung 6-25: Das zur Erstellung einer Thiol-terminierten oxidischen Oberfläche verwendete Mercaptomethyldimethylethoxysilan

Die Goldfunktionalisierung erfolgte in mehreren Schritten:

- Zunächst wurden die Träger wie in Abschnitt 4.4 beschrieben gereinigt und aktiviert.
- Dann wurde ein Thiol-terminiertes Silan (Abbildung 6-25) auf den Wellenleiter adsorbiert, um eine hohe Affinität der Oberfläche für Gold zu realisieren. Die Adsorption erfolgte in 12 h aus Toluol (1 % Silanlösung).
- Zur Ausbildung einer kovalenten Silanbindung wurden die Proben anschließend ausgeheizt (2 h, 120 °C).
- Das Gold wurde dann durch CVD mit dem Precursor Trimethylphosphin-gold(I)-methyl ( $\text{Me}_3\text{-P-AuMe}$ ) erstellt. Die Abscheidung erfolgte in einem abgeschlossenen Reaktionsvolumen bei 70 °C und einem Druck von etwa  $2 \cdot 10^{-2}$  hPa. Bei 30 min Reaktionszeit wurde ein ca. 10 nm dicker, lateral nicht homogener Goldfilm abgeschieden. Die laterale Struktur eines CVD-Golffilmes ist in Abbildung 6-26 dargestellt.

---

<sup>28</sup> Diese Untersuchung wurde bereits in [BUS99] und [KÄS99] vorgestellt.

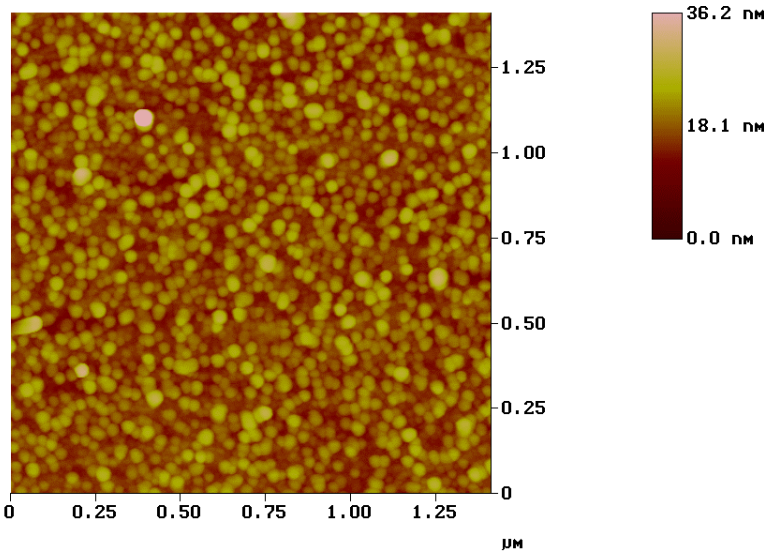


Abbildung 6-26: AFM-Aufnahme einer mit CVD-Gold beschichteten oxidischen Oberfläche (aus [KÄS98])

#### 6.4.2 Nachweis spezifischer Proteinbindung an das Substrat

Der Nachweis spezifischer Bindung an den goldbeschichteten Wellenleiter erfolgte durch Funktionalisierung der Oberfläche mit Biotinthiol (Abbildung 6-3,  $x = 0,1, 0,5 \text{ mM}$ ) über Nacht und anschließender Überprüfung einer spezifischen Streptavidin-Adsorption (Abbildung 6-27). Dieses Schichtsystem wurde gewählt, damit die gemessenen Adsorptionen mit den durch Biotinsilanen erhaltenen Streptavidin-Adsorptionen vergleichbar sind.

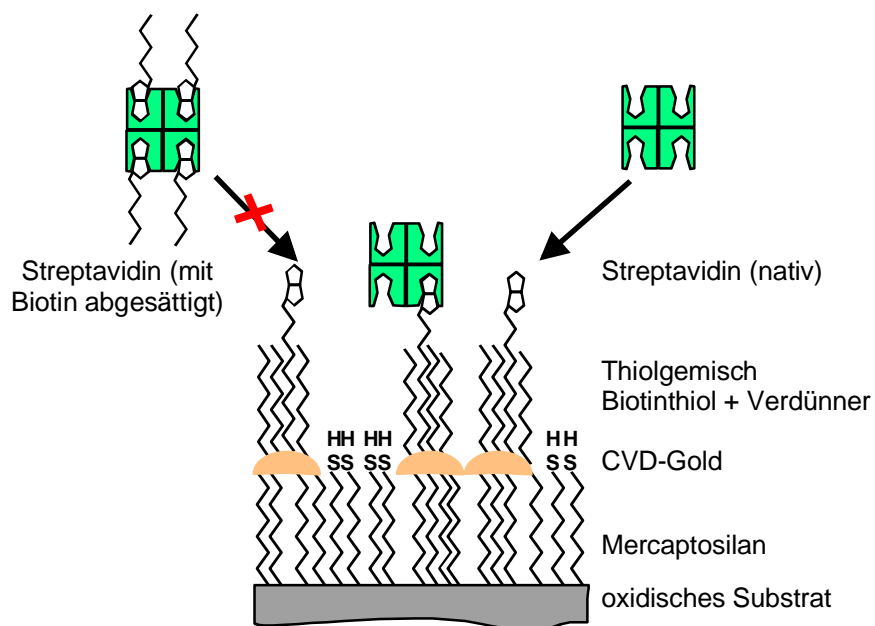


Abbildung 6-27: Nachweis immobilisierten Biotinthiols durch Adsorption nativen und abgesättigten Streptavidins

Die Interferometermessung (Abbildung 6-28) beginnt mit einer Referenzmessung mit Salzlösung ( $\Delta n_c = 1,7 \cdot 10^{-3}$ ). Um die unspezifische Streptavidinadsorption an die funktionalisierte Sensoroberfläche zu bestimmen, wurde zuerst mit Überschuß an Biotin abgesättigtes Streptavidin über einen Küvettenkanal gespült. Man beobachtet innerhalb von 5 min eine Intensitätsänderung, die einer Phasenverschiebung von  $\phi = 0,35 \pi$  entspricht (Abbildung 6-28 a). Durch Spülen mit PBS geht das Signal wieder auf den ursprünglichen Wert zurück. Nach erneuter Referenz wird derselbe Küvettenarm mit nicht abgesättigtem Streptavidin überspült. Man beobachtet eine deutlich größere Phasenverschiebung von  $\phi \approx 2 \pi$  (Abbildung 6-28 b), die durch Spülen mit Pufferlösung nur leicht um etwa  $0,6 \pi$  zurückgeht. Die Adsorption des Streptavidins auf die Sensoroberfläche ist also spezifisch, auch wenn die beobachtete Phasenverschiebung neunfach geringer ausfällt als bei direkter Funktionalisierung mit Biotinsilanen. Um sicherzustellen, daß die adsorbierten Streptavidinmoleküle weiterhin zugängliche Biotin-Bindungstaschen aufweisen, wurde die Sensoroberfläche (nach einer erneuten Referenzmessung) abschließend mit einem mehrfach biotinylierten Antikörper überspült (150.000 g/mol). Man beobachtet eine gegen Abspülen stabile Adsorptionsphasenverschiebung von  $\phi = 5,1 \pi$ .

Es konnte also eine spezifisch bindende Adsorption mehrerer Proteinmonolagen an eine mit CVD-Gold und einer darauf adsorbierten Thiolmonolage nachgewiesen werden. Die geringere Streptavidinaffinität ist vermutlich auf die unvollständige Bedeckung der Oberfläche mit Gold zurückzuführen. Möglich ist auch, daß die Biotingruppen aufgrund der Oberflächenstruktur des CVD-Goldes für das Streptavidin schlecht zugänglich sind.

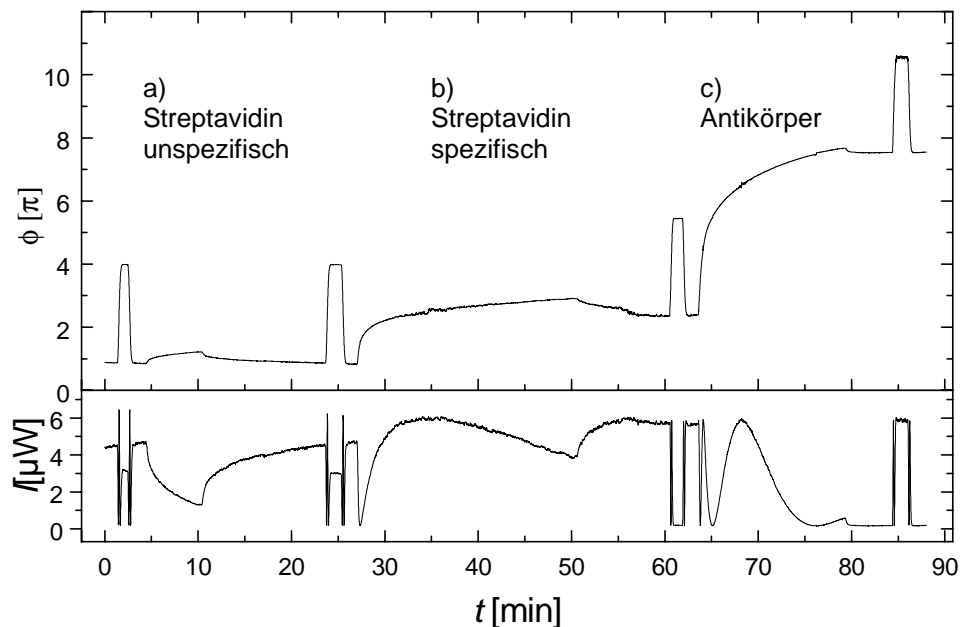


Abbildung 6-28: Adsorptionen auf ein mit CVD-Gold und Biotin-Thiol beschichtetes Interferometer: a) Ad- und Desorption von abgesättigtem Streptavidin, b) Ad- und Desorption von Streptavidin, c) Ad- und Desorption eines mehrfach biotinylierten Antikörpers, zwischen den einzelnen Versuchsteilen wurde jeweils eine Referenzmessung mit Salzlösung durchgeführt.

## 6.5 Diskussion

Grundlage der durchgeführten Adsorptionsversuche war die Immobilisierung von Biotinderivaten und die anschließende Adsorption von Streptavidin. Besonders die Streptavidin-Adsorbatschicht wurde genauer charakterisiert. Dabei ergab sich ein Brechungsindex von  $n_{\text{Strept}} = 1,42$  im Widerspruch zu dem bisher angenommenen Brechungsindex von  $n_{\text{Strept}} = 1,45$ . Dementsprechend sind auch die Schichtdicken größer als in vorangegangenen Untersuchungen beschrieben.

Auf die Streptavidinmonolage konnten unterschiedliche Antikörperfragmente adsorbiert werden. Die Adsorption erfolgte schnell und irreversibel.

Die Gast-Wirt-Wechselwirkung des Antigens auf das immobilisierte Antikörperfragment erfolgt spezifisch und reversibel. Die Nachweisgrenze des Antigen hCG beträgt höchstens 1 nM, die Nachweisgrenze für TSH liegt etwa eine Größenordnung höher. Damit ist die Sensitivität in beiden Fällen noch nicht ausreichend für eine kommerzielle Anwendung. Bei dem Schilddrüsentest würde die Sensitivität genügen, um die deutlich erhöhte TSH-Konzentration eines vermutlich erkrankten Patienten nachweisen zu können.

Weiterhin wurde nachgewiesen, daß sich die Adsorption von Proteinen an eine spezifisch funktionalisierte Wellenleiteroberfläche simultan auch durch evaneszent angeregte Fluoreszenz beobachten läßt. Dabei ist zu beachten, daß Farbstoffmoleküle im evaneszenten Feld leicht ausbleichen können. Bei der Anwendung von Farbstoffmolekülen im evaneszenten Feld einer Wellenleitermode muß also dieser Effekt berücksichtigt werden oder mit entsprechender Abschwächung der Anregung gearbeitet werden.

Eine alternative Oberflächenbeschichtung oxidischer Substrate mit Hilfe von CVD-Gold und Biotin-Thiol wurde erfolgreich am Interferometer erprobt. Dabei wurde eine geringere, jedoch gleichwohl spezifische, Streptavidinadsorption festgestellt.

## 7 Zusammenfassung

Zielsetzung dieser Arbeit war die Charakterisierung, Erprobung, und Weiterentwicklung eines integriert-optischen Mach-Zehnder-Interferometers für eine mögliche Anwendung als Biosensor. Die Aufgabenstellung gliederte sich im wesentlichen in zwei Teile. Zum einen war im optisch-technischen Teil das Ziel, den durch Reinraum-Siliziumtechnik herzustellenden Sensor zu optimieren, um seine Sensitivität zu steigern. Zum anderen galt es, die Oberfläche möglichst effizient zu funktionalisieren, um spezifisch und auch bei kleinen Konzentrationen möglichst viele Analytmoleküle auf die Oberfläche zu adsorbieren.

Zur Erläuterung des Nachweisprinzips wurde nach einem Grundlagenkapitel das verwendete Mach-Zehnder-Interferometer eingeführt (Kapitel 3). Es besteht aus einem Siliziumoxinitrid-Wellenleiter auf einem thermisch oxidierten Siliziumwafer. Meßprinzip ist der interferometrische Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeit des Lichtes in zwei parallelen Rippenwellenleitern. Diese Ausbreitungsgeschwindigkeit (charakterisiert durch den effektiven Brechungsindex  $n_{\text{eff}}$ ), wird wesentlich beeinflusst durch den Brechungsindex in der Nähe der Wellenleiteroberfläche, beispielsweise durch eine dünne Adsorbatschicht. Außerhalb des Meßfensters ist der Wellenleiter durch eine Siliziumoxid-Deckschicht geschützt. Schichten wurden durch PECVD abgeschieden und durch Lithographie und Plasmaätzen strukturiert. Für die Strukturierung wurden mehrere Masken verwendet. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener Parameter des Schichtsystems auf die Sensitivität des Sensors untersucht.

Für die Durchführung konkreter Messungen wurde eine Zweikanal-Küvette zum separaten Überspülen beider Interferometerarme realisiert. Für die Sensitivität kommt der Ausgangssignalstabilität, die meist für die Einschränkung der Sensitivität ausschlaggebend ist, und damit dem optischen Aufbau besondere Bedeutung zu. Mit dem vorgestellten Aufbau zur Stirnflächenkopplung konnte eine Signalstabilität erreicht werden, die bei einem typischen Adsorbat einer Schichtdicke von 0,5 pm entspricht.

Die Funktionalisierung der oxidischen Sensoroberfläche wurde mit Hilfe der Molekülgruppe der Organosilane realisiert. Mit Hilfe unterschiedlicher Organosilane ließen sich verschiedene Oberflächenfunktionalisierungen realisieren.

Zur prinzipiellen Untersuchung von Gast-Wirt-Wechselwirkung an einer oxidischen Oberfläche wurde  $\beta$ -Cyclodextrin immobilisiert und daran mit unterschiedlichen Gastmolekülen in verschiedenen Konzentrationen Adsorptionsexperimente durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß sich das Adsorptionsverhalten nicht befriedigend mit einer Langmuir-Isotherme in Einklang bringen läßt. Sowohl kinetische Analysen von Ad- und Desorptionsexperimenten sowie Auswertung durch eine Langmuir-Isotherme ergeben meist untereinander nicht übereinstimmende Bindungskonstanten. Die an der Oberfläche gefundenen Bindungskonstanten unterschiedlicher Gastmoleküle

sind durchweg kleiner als in den Volumenmessungen (Mikrokalorimetrie). Gleich ist hingegen die Reihenfolge der Bindungsstärken unterschiedlicher Gastmoleküle. Durch kinetische Untersuchungen von Ad- und Desorptionsexperimenten wurde festgestellt, daß die Bindungskonstante eines Gastmoleküls konzentrationsabhängig ist. Dies wurde darauf zurückgeführt, daß bereits vorhandenes Adsorbat die Adsorption weiterer Gastmoleküle behindert.

Für eine mögliche Anwendung des Mach-Zehnder-Interferometers als Biosensor wurde zur Funktionalisierung ein Schichtsystem gewählt, das auf der Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin beruht. Während sich das Biotin leicht chemisch an biologische Wirtmoleküle und (über Organosilane) an oxidische Oberflächen binden läßt, kann das Streptavidinmolekül bis zu vier Biotinmoleküle irreversibel miteinander verketteten. Streptavidin kann also sozusagen als Haftvermittler zwischen einer Biotinfunktionalisierten Oberfläche und biotinylierten Wirtmolekülen verwendet werden.

Da der Streptavidinschicht somit für die Oberflächenbeschichtung erhebliche Bedeutung zukommt, wurde sie eingehender durch Wellenleitermodenspektroskopie und Rasterkraftmikroskopie charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, daß die Streptavidinschicht in wäßriger Lösung vermutlich gequollen vorliegt. Die Dicke der Streptavidinlage erscheint größer, ihr Brechungsindex jedoch kleiner als bislang angenommen wurde. Weiterhin wurden für unterschiedliche immobilisierte Biotinderivate verschiedener Bindungsstärke unterschiedlich stabile Streptavidinschichten gefunden, was die mehrfache Verwendung eines Biotinderivat-funktionalisierten Biosensors mit unterschiedlichen Gastmolekülen denkbar macht.

Zum Nachweis einer biologischen Erkennungsreaktion wurden an immobilisierte Streptavidinschichten verschiedene biotinylierte Antikörperfragmente irreversibel immobilisiert. An diese Antikörperfragmente ließen sich danach reversibel und spezifisch die Antigene aus einer Analytlösung adsorbieren. Dafür wurden zwei verschiedene Antikörper-Antigen-Paare verwendet. Erkennungsreaktionen des Hormons hCG mit seinem Antikörperfragment wurden auch bei Konzentrationen beobachtet, die deutlich unter denen liegen, die sich beispielsweise mit Oberflächenplasmonenspektroskopie nachweisen lassen.

Als alternative Oberflächenfunktionalisierung wurden Biotin-Thiole an ein mit OMCVD-Gold beschichtetes Interferometer adsorbiert. Die Streptavidin-Affinität dieser Biotinschicht war etwa neun mal geringer als bei der direkten Funktionalisierung mit Biotin-Silanen.

Als alternative Nachweismethode wurde die Emission des Fluoreszenzlichtes adsorbierter Moleküle nachgewiesen. Dafür wurde die Anlagerung Cy-5-markierten Streptavidins simultan mit dem Interferometer und durch Detektion evaneszent angeregten Fluoreszenzlichtes beobachtet. Beide Verfahren ergaben ähnliche Ergebnisse, jedoch wird der Farbstoff im Lauf des Versuches gebleicht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich das Mach-Zehnder-Interferometer als robustes und sensitives Werkzeug für die Untersuchung molekularer Erkennungsreaktionen erwiesen hat. Durch das interferometrische Meßprinzip lassen sich nur Schichtdickenunterschiede nachweisen, was zwar einerseits die Anwendungsvielfalt einschränkt, jedoch andererseits Vergleichsmessungen zum Ausschluß unspezifischen Adsorptionsverhalten ermöglicht. Silanisierung erwies sich als vielseitiges, effektives Verfahren, um Eigenschaften oxidischer Oberflächen gezielt zu modifizieren.



## Anhang: Zwei unterschiedliche Maskensätze

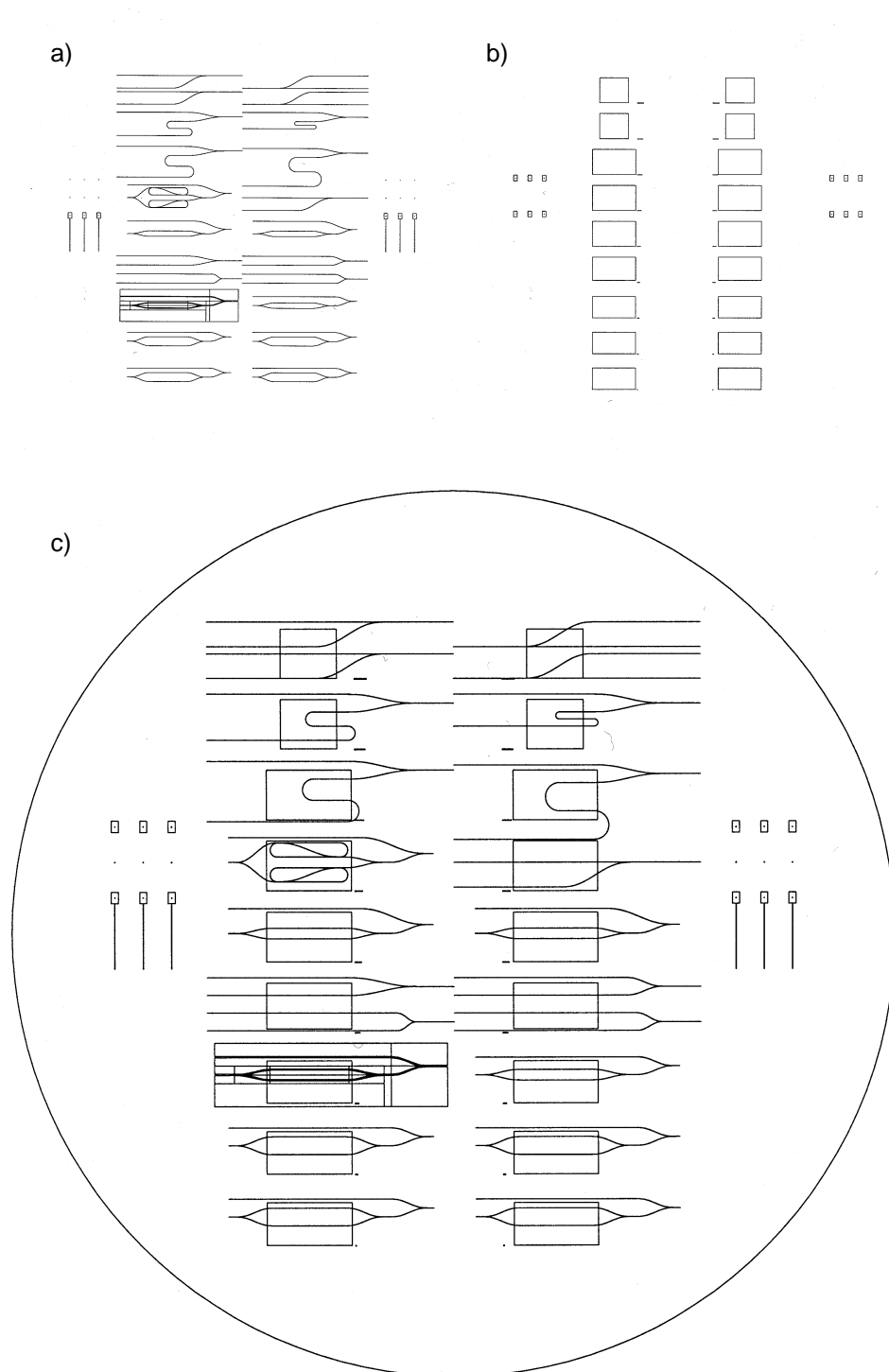


Abbildung A 1: Von F. Brosinger [BRO95] erstellte Masken mit unterschiedlich dimensionierten Interferometern zur Verwendung in Stirnflächen- oder Faserkopplung; weiterhin verschiedene Teststrukturen, a) Wellenleitermaske, b) Fenstermaske, c) Beide Masken zusammen in Originalgröße

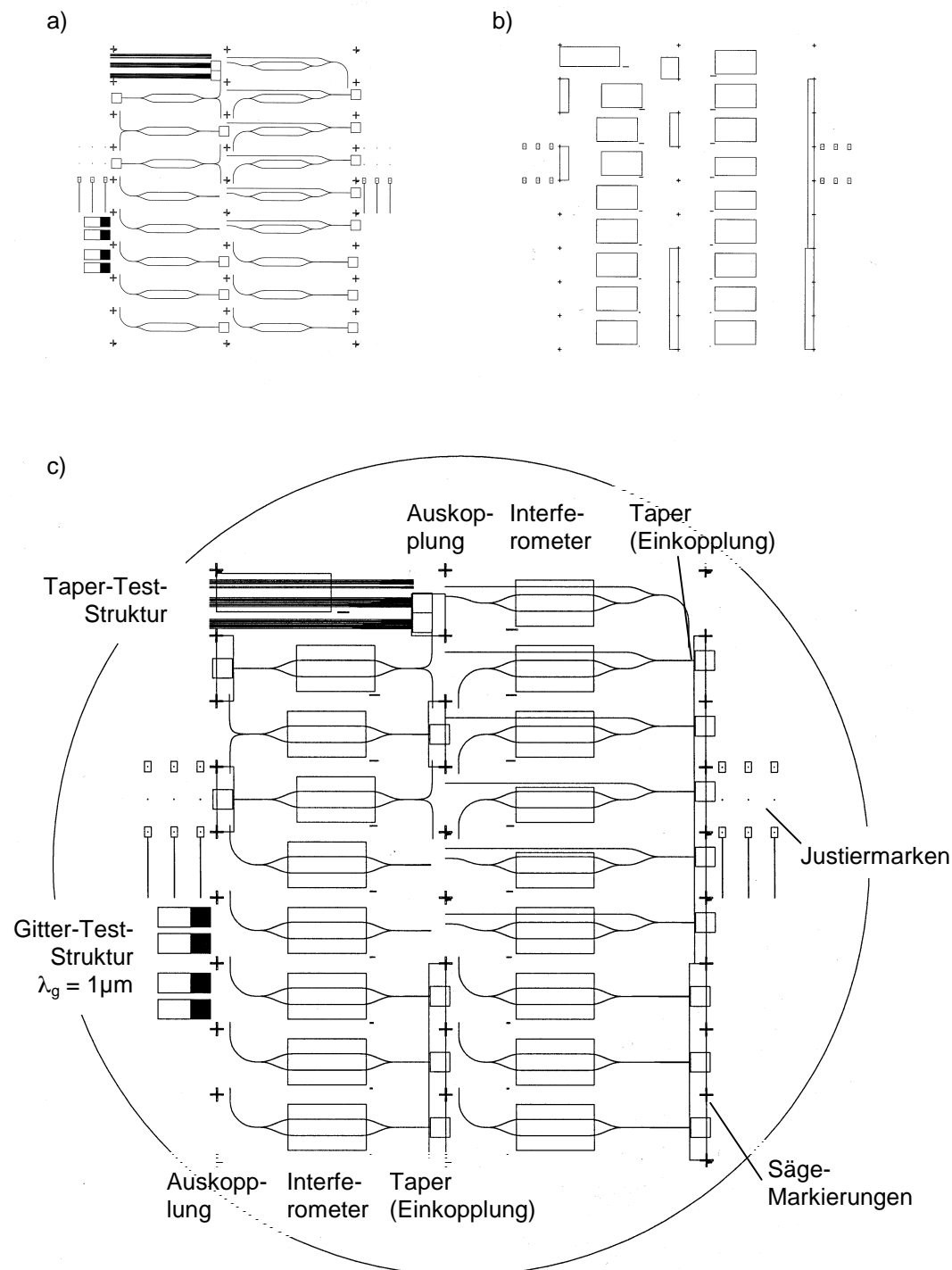


Abbildung A 2: Im Rahmen dieser Arbeit erstellte Masken a) Wellenleitermaske, b) Fenstermaske, c) Beide Masken übereinander in Originalgröße, die Masken enthalten Taperstrukturen zur Gitter- oder Prismenkopplung und Wellenleiterkrümmen zum Ausblenden der  $TE_{01}$ -Mode, 17 Interferometer mit verschiedenen Taperbreiten und -längen, Teststrukturen zur Integration von Einkoppelgittern in die Wellenleitermaske

## Literaturverzeichnis

- ABC95 ABCR GmbH, Silicon, germanium, tin and lead compounds metal alkoxides diketones and carboxylates, Chemischer Katalog, Karlsruhe (1995)
- ADA81 M.J. Adams, An introduction to optical waveguides, John Wiley & Sons, Chichester, (1981)
- ALT95 L. Altwegg, Properties of polymeric Mach-Zehnder modulators, *Optical Engineering* **34**, (1995), 2651-2656
- AME99 Amersham Pharmacia, Produktinformation (1999)
- BOC98 H. Bock, Supramolekulare Polymerarchitekturen: Entwicklung organischer Materialien für die integrierte Optik, Dissertation, Universität Mainz, (1998)
- BRA93 A. Brandenburg, R. Edelhäuser, H. Hutter, Integrated optical gas sensors using organically modified silicates as sensitive films, *Sensors and Actuators B* **11**, (1993), 361-374
- BRA96 A. Brandenburg, R. Polzius, F. Bier, U. Biletewski, E. Wagner, Direct observation of affinity reactions by reflected-mode operation of integrated optical grating coupler, *Sensors and Actuators B* **30**, (1996), 55 – 59
- BRA98 G. N. De Brabander, G. Beheim, J. T. Boyd, Integrated optical micromachined pressure sensor with spectrally encoded output and temperature compensation, *Applied Optics* **37**, (1998), 3264-3267
- BRE95 A. Brecht, G. Gauglitz, Optical probes and transducers, *Biosensors & Bioelectronics* **10**, (1995), 923-936
- BRO95 F. Brosinger, unveröffentlichter Bericht
- BRO97 F. Brosinger, H. Freimuth, M. Lacher, W. Ehrfeld, E. Gedig, A. Katerkamp, F. Spener, K. Cammann, A direct optical immunosensor with compensation of nonspecific protein binding by a highly sensitive optical Mach-Zehnder interferometer on silicon, *Sensors & Actuators B* **44**, (1997), 350-355
- BUR77 W. K. Burns, A. F. Milton, A. B. Lee, Optical waveguide parabolic coupling horns, *Applied Physics Letters* **30**, (1977), 28-30
- BUS99 S. Busse, J. Käshammer, S. Krämer, S. Mittler, Gold and thiol functionalized integrated optical Mach-Zehnder interferometer for sensing purposes, *Sensors & Actuators B* **60**, (1999), 148-154

- DEP99 M. De Paoli, Dissertation, Universität Karlsruhe, in Vorbereitung
- DRA97 B. Drapp, J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, B. J. Luff, J. S. Wilkinson, J. Ingenhoff, Integrated optical Mach-Zehnder interferometers as simazine immunoprobes, *Sensors & Actuators B* **38-39**, (1997), 277-282
- DÜB98 J. Dübendorfer, R. E. Kunz, Compact integrated optical immunosensor using replicated chirped grating coupler sensor chips, *Applied Optics* **37**, (1998), 1890-1894
- EXP99 B. Experton, Health, markets, and intervention, *Nature Biotechnology* **17**, (1999), Supplement 23-24
- FAL97 J. Falbe (Hrsg.), Römpp-Lexikon Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997)
- GLE90 W. Gleine, Technologie und Eigenschaften von integriert-optischen Komponenten, *Fortschr. Ber. VDI* **10**, VDI-Verlag, Düsseldorf, (1990)
- HAR96 M. Hara, H. Sasabe, W. Knoll, Ordered nucleation of a self assembled monolayer on Au (111) studied by scanning tunneling microscopy, *Thin Solid Films* **273**, (1996), 66-69
- HÖF95 Th. Höfler, G. Wenz, H. Eierdanz (Hrsg), Einschluß von Aromaten in  $\beta$ -Cyclodextrin und  $\beta$ -Cyclodextrinsulfonaten, VCH, Weinheim (1995), 276-279.
- HUN84 R.G. Hunsperger, Integrated optics: theory and technology, Springer Verlag Berlin (1984)
- IIZ95 K. Iizuka, Engineering optics, Springer Verlag, Heidelberg, (1985)
- KAR91 W. Karthe, R. Müller, Integrierte Optik,,: Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig (1991)
- KÄS99 J. Käshammer, Abscheidung von anorganischen Materialien auf organisch funktionalisierten Oberflächen und deren massenspektroskopische Untersuchungen, Dissertation, Universität Mainz, (1999)
- KLE99 G. Kleideiter, M. D. Lechner, W. Knoll, Pressure dependence of thickness and refractive index of thin PMMA-films investigated by surface plasmon and optical waveguide spectroscopy, *Macromolecular Chemistry & Physics.*, **200**, (1999), 1028 – 1033
- KNO95 Knoll, W., Optical properties of polymers, *Encyclopedia of Applied Physics* **14**, (1996), 569-605
- KNO97 W. Knoll, M. Liley D. Piscevic, J. Spinke, M.J. Tarlov, supramolecular architectures for the functionalisation of solid surfaces, *Adv. Biophys.* **34**, (1997), 231-251

- KRÄ97 S. Krämer, Gold-Schwefel-Funktionalisierung auf Wellenleitern mit oxidischen Oberflächen für integriert-optische Sensoren, Diplomarbeit, Universität Mainz, (1997)
- KUN97 R. E. Kunz, Miniature integrated optical modules for chemical and biochemical sensing, *Sensors and Actuators B* **38-39**, (1997), 13-28
- LAN18 I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **40**, (1918) 1361ff
- LEH83 A. L. Lehninger, Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim, (1983)
- LIE99 T. Liebermann, Oberflächenplasmonen-Fluoreszenzspektroskopie zur Detektion molekularer Erkennungsreaktionen, Dissertation, Universität Mainz, (1999)
- LUK88 W. Lukosz, K. Tiefenthaler, Sensitivity of integrated optical grating and prism couplers as (bio)chemical sensors, *Sensors and Actuators*, **15**, (1988), 273-284
- MAC92 E. Mach, *Z. Instrumentenkunde* **12**, (1892), 89ff
- MAN94 A. Manz, C. S. Effenhauser, N. Burggraf, D. J. Harrison, K. Seiler, K. Fluri, Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems, *J. Micromech. Microeng.* **4**, (1994), 257-265
- MAR77 J. March, Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure, McGraw-Hill, New York, (1977)
- MAT96 M. Matsuzawa, P. Liesi, W. Knoll, Chemically modifying glass surfaces to study substratum guided neurite outgrowth in culture, *Journal of Neuroscience Methods* **69** (1996), 189-196
- MIT95 S. Mittler-Neher, J. Spinke, M. Liley, G. Nelles, M. Weisser, R. Back, G. Wenz, W. Knoll, Spectroscopic and surface-analytical characterization of self-assembled layers on Au, *Biosensors & Bioelectronics* **10**, (1995), 903-916
- MIT99 S. Mittler, Integriert optische Bauteile: Chemo-Sensoren und deren Oberflächenfunktionalisierungen - Linear optische Charakterisierung von Polymeren für aktive Elemente, Habilitationsschrift, Universität Mainz, (1999)
- NEL96 G. Nelles, M. Weisser, R. Back, P. Wohlfahrt, G. Wenz, S. Mittler-Neher, Controlled orientation of cyclodextrin derivatives immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, (1996), 5039-5046
- NOL85 H.-P. Nolting, R. Ulrich, Integrated optics: proceedings of the Third European Conference, ECIO'85, Springer Verlag, Berlin, (1985)

- PET91 D. Peters, Herstellung und Untersuchung von PECVD-Siliziumoxinitridschichten für die integrierte Optik, *Fortschr. Ber. VDI* **10**, VDI-Verlag, Düsseldorf, (1991)
- PLO96 T. E. Plowman, W. M. Reichert, C. R. Peters, H. K. Wang, D. A. Christensen, J. N. Herron, Femtomolar sensitivity using a channel-etched thin film waveguide fluoroimmunosensor, *Biosensors & Bioelectronics*, **11**, (1996), 149-160
- PLU90 E. P. Plueddemann, Silane coupling agents, Plenum Press, New York, (1990)
- PRA90 C.B. Prater, H.J. Butt, P.K. Hansma, Atomic force microscopy, *Nature* **345**, (1990), 839-840
- PRU98 O. Prucker, J. Rühle, Polymer layers through self-assembled monolayers of initiators. *Langmuir* **24** (1998), 6893-6898
- PRU98a O. Prucker, M. Schimmel, G. Tovar, W. Knoll, J. Rühle, Microstructuring of molecularly thin polymer layers by photolithography, *Advanced Materials* **10**, (1998), 1073-1077
- QUI97 J. Quinton, L. Thomsen, P. Dastoor, Adsorption of organosilanes on iron and aluminium oxide surfaces, *Surface & Interface Analysis* **25**, (1997), 931-936
- RAE88 H. Raether, Springer tracts in modern physics, vol 111: surface plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings, Springer Verlag, Berlin (1988)
- REH98 M. V. Reharsky, Y. Inoue, *Chem. rev.* **98** (1998) 1875-
- ROS98 R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Plückthun, L. Tiefenauer, Antigen binding forces of individually addressed single-chain Fv antibody molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, (1998), 7402-7405
- ROT95 M. Rottschalk, J. P. Ruske, K. Hornig, S. Steinberg, G. Hagner, A. Rasch, Singlemode channel waveguides and electrooptic modulators in  $\text{KTiOPO}_4$  for the short visible waveguide region, *Journal of Lightwave Technology* **13**, (1995), 2041-2048
- SAL99 I. W. M. Salemink, B. J. Offrein, G. L. Bona, R. Germann, F. Horst, High-contrast, low-loss SiON optical waveguides by PECVD, MRS Spring Meeting '99, San Francisco, (1999)
- SCH89 P. Schaaf, J. Talbot, Surface exclusion effects in adsorption processes, *J. Chem. Phys.* **91**, (1989)

- SCH98 E. F. Schipper, S. Rauchalles, R. P. H. Kooyman, B. Hock, J. Greve, The waveguide Mach-Zehnder interferometer as atrazine sensor, *anal. Chem.* **70**, (1998), 1182-1197
- SPI92 J. Spinke, Spezifische Proteinbindung an funktionalisierte, selbstorganisierte Adsorptionsschichten, Dissertation, Universität Mainz, (1992)
- SPI93 J. Spinke, M. Liley, F-J. Schmitt, H-J. Guder, L. Angermaier, W. Knoll, Molecular recognition at self-assembled monolayers: optimization of surface functionalization, *Journal of Chemical Physics* **99**, (1993), 7012-7019
- SPR97 C. Sprößler, Extrazelluläre Signalableitung durch ein Sensorfeld mit Feldeffekttransistoren, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, (1997)
- SZE88 J. Szejtli, Cyclodextrin Technology, Topics in inclusion science, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988)
- TAM82 T. Tamir, Integrated optics, Springer Verlag, Berlin, (1982)
- TOV95 G. Tovar, Funktionalisierung und Strukturierung von oxidischen Oberflächen mit biologischen und synthetischen Polymeren, Dissertation, Universität Mainz, (1995)
- TRI95 C. P. Tripp, M. L. Hair, Reaction of Methylsilanols with Hydrated Silica Surfaces: The Hydrolysis of Trichloro-, Dichloro-, and Monochloromethylsilanes and the Effects of Curing, *Langmuir* **11**, (1995), 149ff.
- ULM91 A. Ulman, An introduction to ultrathin organic films : from Langmuir-Blodgett to self-assembly, Academic Press, Boston, (1991)
- ULM96 A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chemical Reviews* **96**, (1996), 1553-1554
- WAG89 E. Wagner (Hrsg.), Sensors : a comprehensive survey, Vol. 6 ; Optical sensors, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, (1989)
- WAG94 D. Wagner, J. Frankenberger, D.D. Deimel, Optical pressure sensor using two Mach-Zehnder interferometers for the TE and TM polarisation, *J. Micromech. Microeng.* **4**, (1994), 35-39
- WEI93 A.L. Weisenhorn, M. Khorsandi, S. Kasas, V. Gotzos, H.J. Butt, Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM, *Nanotechnology* **4**, (1993), 106-113
- WEI95 M. Weisser, Wirt/Gast-Wechselwirkungen an Oberflächen: Immobilisierung von Cyclodextrinen auf Gold, Diplomarbeit, Universität Mainz, (1995)

- WEI96 M. Weisser, G. Nelles, P. Wohlfahrt, G. Wenz, S. Mittler-Neher, Immobilization Kinetics of Cyclodextrins at Gold Surfaces, *J. Phy. Chem.* **100**, (1996), 17893-17900
- WEI97 M. Weisser, G. Nelles, G. Wenz, S. Mittler-Neher, Guest-Host Interactions with immobilized cyclodextrins, *Sensors & Actuators B* **39-39**, (1997), 58-67
- WEI98 M. Weisser, Integriert-optischer Chemo-/Biosensor auf der Basis resonanter Wellenleitermoden-Oberflächenplasmonen-Kopplung, Dissertation, Universität Mainz, (1998)
- WEI99 M. Weisser, G. Tovar, S. Mittler-Neher, W. Knoll, F. Brosinger, H. Freimuth, M. Lacher, W. Ehrfeld, Specific bio-recognitions observed with an integrated Mach-Zehnder interferometer, *Biosensors & Bioelectronics* **14**, (1999), 405-411
- WEI99a M. Weisser, B. Menges, S. Mittler-Neher, Refractive index and thickness determination of monolayers by multi mode waveguide coupled surface plasmons, *Sensors & Actuators B* **56**, (1999), 189-197
- WEK98 M. Weickenmeier, Gelbildner durch Selbstorganisation von wasserlöslichen Polymeren mit Cyclodextrinpolymeren, Doktorarbeit Universität Karlsruhe, (1998)
- WEN94 G. Wenz, Cyclodextrins as building blocks for supramolecular structures and functional units, *Angew. Chem. Int. Ed.* **33** (1994), 803-822
- WIL90 M. Wilchek, E. Bayer (Hrsg.), Methods in enzymology, Vol. 184: Avidin-biotin technology, Academic Press, San Diego, (1990)
- WIN97 C. Winter, Zum Wachstum ultradünner Gold- und GaN-Schichten auf funktionalisierten SAMs, Diplomarbeit, Universität Heidelberg, (1997)

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Prof. Wolfgang Knoll und Dr. Silvia Mittler sei für die interessante, abwechslungsreiche Aufgabenstellung und die gute, mir alle Freiheiten lassende, Betreuung gedankt. Prof. Butt möchte ich meinen Dank für die freundliche Übernahme der Mitbetreuung am Fachbereich Chemie und Pharmazie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz ausdrücken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Herbert Freimuth und Franz Brosinger, ohne deren vorangegangene Entwicklungsarbeit an dem Interferometer diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, Herbert Freimuth darüber hinaus für die vielen hilfreichen Diskussionen und seine stete Unterstützung.

Für aktive Hilfe möchte ich danken:

- Bernhard Menges (WaMS),
- Volker Scheumann (AFM),
- Dr. Josua Käshammer, Carl Winter und Stephan Krämer (CVD-Gold).

Dr. Oswald Prucker und Martina Knecht mit Jürgen Rühle danke ich für die Synthese der kurzketigen, Boehringer Mannheim für die freundliche Überlassung der langkettigen Biotinsilane. Weiterhin sei Marc DePaoli und Prof. Gerhard Wenz für die Synthese des Cyclodextrinderivats und die gute Zusammenarbeit gedankt.

Für die Einführung in verschiedene Techniken möchte ich mich bedanken bei Dr. Gerd Kleideiter (SPR), Dr. Thorsten Liebermann (Silanisierung), Dr. Michael Harder (Grundlagen der Stirnflächenkopplung) sowie Herbert Wieder für seine geduldige Beantwortung meiner vielen chemikalischen Fragen.

Weiterhin möchte ich mich beim Institut für Mikrotechnik in Mainz (IMM) für die Mach-Zehnder-Interferometer bedanken, besonders beim Reinraum-Team und für die Unterstützung beim Maskendesign.

Bei den technischen Abteilungen des Institutes möchte ich mich für die zügige Ausführung verschiedener Arbeiten bedanken: Glasbläserei, Mechanikwerkstatt, Elektronik sowie EDV-Abteilung, besonders Andreas Scheller

Für hilfreiche Diskussionen und vielfältige Unterstützung sei gedankt: Dev Kambhampati, Dr. Josua Käshammer, Stephan Krämer, Maximilian Kreiter, Dr. Eva-Kathrin Schmidt, Dr. Michael Weisser und dem gesamten Arbeitskreis Knoll.

Außerhalb der Wissenschaft haben meine Eltern, die gesammelten Volleyballer sowie Kathrin Rehmke ihren Beitrag am Gelingen dieser Arbeit gehabt.