

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6456

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SIGNALSTABILISIERUNG
MINIATURISierter OPTOCHEMISCHER SENSOREN
DURCH SPEKTRALE REFERENZIERUNG
ODER PHASENSENSITIVE LUMINESZENZDETEKTION**

Ilona Koronczí

Institut für Instrumentelle Analytik

Von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2000

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit der Entwicklung *miniaturisierter optochemischer Sensoren* zur Bestimmung der Kalium- bzw. Chloridionenkonzentration sowie des pH-Wertes, deren sensitive Fläche einen Durchmesser von 50 nm aufwies. Die Signalübertragung erfolgte mit Lumineszenzfarbstoffen, zur Detektion wurde einerseits die *Intensität*, andererseits die *Lebensdauer* der Lumineszenz herangezogen.

Als Beispiel für die Auswertung der *Intensität* wurde ein Kalium-Sensor hergestellt, der auf dem Prinzip von Ionenaustausch-Optoden basierte, bei denen die Protolyse eines pH-sensitiven Lumineszenzfarbstoffs mit der Komplexbildung von Kaliumionen gekoppelt wird. Zusätzlich zu dem Messfarbstoff mit seinem veränderlichen Signal wurde noch ein Referenzfarbstoff mit konstantem Signal in die Rezeptorschicht eingebracht. Durch Auswertung des relativen Signals konnte eine deutliche Verbesserung der Signalstabilität erzielt werden. Der dynamische Kalium-Messbereich der Sensoren deckte extrazelluläre Kaliumionenkonzentrationen ab, und eine Unterscheidung von extra- und intrazellulären Konzentrationen war bis hin zur Nano-Version möglich. Die maximale Genauigkeit, die mit Nano-Sensoren erzielt werden konnte, lag bei 0,2 pK-Einheiten. Die Photostabilität sowohl des Mess- als auch des Referenzfarbstoffs war sehr gut. Selbst mit dem Nano-Sensor, der wegen seiner geringen Dimension die höchste Beleuchtungsstärke erfuhr, lassen sich gemäß einer Extrapolation der Bleichkurven etwa 23000 Messungen bis zum Auftreten eines 1%igen Messfehlers durch Photobleichen durchführen. Der Farbstoffaustrag war ebenfalls gering, ein 1%iger Fehler trat erst nach 17 Stunden kontinuierlicher Beprobung im Durchfluss auf. Eine Sauerstoffquerempfindlichkeit der Sensoren konnte nicht festgestellt werden.

Als alternativer Ansatz wurden *Lebensdauer*-Messungen durchgeführt, bei denen das Messsignal mittels phasenaufgelöster Detektion erhalten wurde. Bei dem pH-Sensor erfolgte die Änderung der Lumineszenz-Lebensdauer durch Resonanz-Energietransfer von angeregten Ruthenium-Komplexen auf Moleküle eines pH-Absorptionsindikators. Durch eine Kombination beider Farbstoffe mit verschiedenen Ionophoren wurden weiterhin Kalium- und Chlorid-Sensoren hergestellt. Sowohl der pH- als auch der Chlorid-Sensor waren geeignet für Messungen im physiologischen Bereich. Mit beiden Sensoren konnten bis zur Nano-Variante auf 0,1 pH- bzw. 0,1 pCl-Einheiten genaue Messungen durchgeführt werden. Bei Untersuchungen zur Photostabilität wie zum Farbstoffaustrag erwies sich die deprotonierte Form des Absorptionsindikators als limitierender Parameter. Dennoch können mit beiden Nano-Sensoren unter physiologischen Bedingungen etwa 1800 Messungen ohne Änderung des Sensorsignals durch Photobleichen durchgeführt werden. Beim Chlorid-Sensor war eine

Sauerstoffquerempfindlichkeit gegeben, beim pH-Sensor konnte sie durch eine geeignete Wahl des Polymers eliminiert werden.

Summary

Investigations on Signal Stability of Miniaturised Optochemical Sensors based on Detection of Luminescence Intensity or Decay Time

Miniaturised optochemical sensors with a sensitive area of 50 nm diameter were developed to determine potassium and chloride concentrations as well as pH. The signal was transmitted by luminescent dyes the intensity or decay time of which was detected, respectively.

As an example for *intensity based measurement* a potassium sensor was developed based on the principle of ion-exchange optodes, combining the specific molecular recognition of potassium by a ligand with the optical transduction by a luminescent pH indicator. Additionally to the measuring dye with its changing intensity a reference dye with constant intensity was added, thus providing a highly reproducible ratio signal. The dynamic range of the sensors covered extracellular potassium concentration, a distinction of extra- and intracellular concentrations was possible. The measuring accuracy was 0.2 units of pK. Photostability of both the measuring and reference dye was excellent. Even with the nano-sensor (50 nm) 23000 measurements can be carried out before an error of 1% occurs. An error of 1% due to dye leaching occurred only after 17 hours of continuous rinsing of the sensor. The sensor showed no cross-sensitivity to oxygen.

Alternatively, *decay time measurements* were carried out using phase-modulated detection technique. A pH sensor was made combining a luminescent ruthenium-complex with the absorption indicator bromothymol blue the deprotonated form of which can diminish the luminescence lifetime by resonance energy transfer. By addition of a ionophore a chloride sensor based on the principle of ion coextraction was made. Both sensors were suitable for measurements at physiological concentrations and yielded an accuracy of 0,1 pH and 0,1 pCl, respectively. With respect to photostability and dye leaching, the deprotonated form of the absorption indicator was found to be the limiting factor. Yet with both sensors more than 1800 measurements can be carried out without a signal loss due to leaching or photobleaching at physiological concentrations. The chloride sensor is sensitive to quenching by oxygen, whereas the pH sensor shows no cross-sensitivity.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2	EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	3
2.1	Chemische Sensoren	3
2.1.1	Definition und Klassifizierung chemischer Sensoren	3
2.1.2	Optochemische Sensoren	5
2.1.3	Faseroptische Sensoren	6
2.1.3.1	Bau und Funktionsweise von Lichtwellenleitern	6
2.1.3.2	Miniaturisierte faseroptische Sensoren	8
2.1.4	Anwendungsbeispiele für optochemische Sensoren	10
2.2	Lumineszenzanalyse	11
2.2.1	Grundlagen der Photolumineszenz	11
2.2.2	Lumineszenzspektrophotometrie	12
2.2.3	Lebensdauer-Messungen	14
2.2.4	Resonanz-Energietransfer (RET)	16
2.3	pH-Wert und -Indikatoren	18
2.3.1	pH-Wert	18
2.3.2	pH-Indikatoren	18
2.4	Optoden auf der Basis von Ionophoren	21
2.4.1	Einführung	21
2.4.2	Kationenbestimmung durch Ionenaustausch	22
2.4.3	Anionenbestimmung durch Koextraktion	24
2.5	Verwendete Substanzen	25
2.5.1	Polymer-Matrices	25
2.5.1.1	Weichgemachtes Polyvinylchlorid (PVC)	25
2.5.1.2	Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat (PolyHEMA)	26
2.5.2	Farbstoffe	26
2.5.2.1	Allgemeine Kriterien für die Lumineszenz von Stoffen	26
2.5.2.2	Fluoreszenzfarbstoffe für die Spektrale Referenzierung	27
2.5.2.3	Donor-Akzeptor-Ionenpaare für die Lebensdauer-Messungen	30
2.5.3	Ionophore	32
2.5.3.1	Kalium-Ionophor: Valinomycin	32
2.5.3.2	Chlorid-Ionophor: Tridodecylmethylammoniumchlorid	33
3	EXPERIMENTELLER TEIL	35
3.1	Chemikalien und Reagenzien	35
3.1.1	Rezeptorschichten - Spektrale Referenzierung	35
3.1.2	Rezeptorschichten - Lebensdauer-Messung	35
3.1.3	Präparierte Substanzen	36

3.1.4	Silanisierung	37
3.1.5	Messpuffer	37
3.1.5.1	Universalpuffer	37
3.1.5.2	Phosphatpuffer	38
3.2	Silanisierung der Glaträger	39
3.3	Herstellung der Sensoren - Spektrale Referenzierung	39
3.3.1	Beschichtungslösungen	39
3.3.2	Beschichtung der Makro-Sensoren	40
3.3.3	Herstellung und Beschichtung der Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren	41
3.3.4	Physikalische Charakterisierung der Sensoren	42
3.4	Herstellung der Sensoren - Lebensdauer-Messungen	42
3.4.1	Beschichtungslösungen	42
3.4.2	Beschichtung der Makro-Sensoren	44
3.4.3	Beschichtung der Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren	45
3.5	Messanordnungen - Spektrale Referenzierung	45
3.5.1	Makro-Sensoren	45
3.5.2	Mikro- bis Nano-Sensoren	46
3.6	Messanordnungen – Lebensdauer-Messung	49
3.6.1	Aufnahme von Absorptions- und Lumineszenzspektren	49
3.6.2	Lebensdauer-Messungen	49
3.7	Auswertungen und Kurvenanpassungen	51
3.7.1	Kalibrationen	51
3.7.2	Photobleichen	52
3.7.3	Ansprechzeit	52
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION: SPEKTRALE REFERENZIERUNG - KALIUM-SENSOR	53
4.1	Voruntersuchungen an Makrosensoren	53
4.1.1	Wahl des Messfarbstoffs, des Ionophors und der Polymermatrix	53
4.1.2	Interne Referenzierung	54
4.1.2.1	Zielsetzung und Auswahlkriterien	54
4.1.2.2	Wahl des Referenzfarbstoffs	55
4.1.2.3	Referenzfarbstoff Nilrot	57
4.1.3	Optimierung für den physiologischen Einsatzbereich	58
4.1.3.1	Zielsetzung und Durchführung	58
4.1.3.2	Beobachtete Einflussparameter	59
4.1.3.3	Optimierte Sensoren	60
4.1.4	Charakterisierung des optimierten Sensors SR 2	62
4.1.4.1	Vorgehensweise	62
4.1.4.2	pH-Arbeitsbereich	62
4.1.4.3	Kalium-Messbereich	63

4.1.4.4	Ansprechverhalten	64
4.1.4.5	Schichtdickenbestimmung	65
4.2	Miniaturisierung	65
4.2.1	Einführung	65
4.2.2	Silanisierung der Quarzfasern	66
4.2.3	Mikro-Sensoren	66
4.2.3.1	Physikalische Charakterisierung der Faserenden	66
4.2.3.2	Messungen mit Rezeptorschicht SR 2	67
4.2.3.3	Messungen mit Rezeptorschicht SR 3	68
4.2.4	Submikro-Sensoren	70
4.2.4.1	Physikalische Charakterisierung der Faserspitzen	70
4.2.4.2	pH- und Kalium-Messungen	70
4.2.5	Nano-Sensoren	73
4.2.5.1	Physikalische Charakterisierung der SNOM-Spitzen	73
4.2.5.2	pH- und Kalium-Messungen	74
4.2.6	Dynamischer Kalium-Messbereich bei Submikro- und Nano-Sensoren	75
4.3	Signalstabilität	77
4.3.1	Einführung	77
4.3.2	Variation der Anregungsintensität	77
4.3.3	Photobleichen	78
4.3.4	Farbstoffaustrag	80
4.3.5	Fluoreszenzlöschung (Quenching)	80
4.3.6	Langzeittest	81
4.4	Zusammenfassung – Kalium-Sensor	82
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION: LEBENSDAUER-MESSUNGEN	83
5.1	pH-Sensoren	83
5.1.1	Voruntersuchungen	83
5.1.1.1	Wahl der Farbstoffe und des Polymers	83
5.1.1.2	Optimierung der Zusammensetzung der sensitiven Schicht	86
5.1.1.3	Untersuchungen an Makrosensoren	87
5.1.1.4	Vergleich zwischen Lebensdauer- und Intensitäts-Messungen	89
5.1.1.5	Wahl der Modulationsfrequenz	90
5.1.2	Miniaturisierung	92
5.1.2.1	pH-Messungen mit Mikro-Sensoren	92
5.1.2.2	Vergleich der Anregungslichtquellen: LED – Laser	93
5.1.2.3	pH-Messungen mit Submikro-Sensoren	94
5.1.2.4	pH-Messungen mit Nano-Sensoren	94
5.1.2.5	Ansprechverhalten	96
5.1.2.6	Dynamischer pH-Messbereich bei Submikro- und Nano-Sensoren	96

5.1.3	Signalstabilität	98
5.1.3.1	Einführung	98
5.1.3.2	Variation der Anregungsintensität	98
5.1.3.3	Photostabilität	98
5.1.3.4	Farbstoffaustrag	103
5.1.3.5	Sauerstoff-Querempfindlichkeit	104
5.1.4	Zusammenfassung – pH-Sensor	104
5.2	Kalium-Sensoren	106
5.2.1	Einführung	106
5.2.2	Farbstoffspektren	106
5.2.3	Untersuchung des pH-Arbeitsbereichs	107
5.3	Chlorid-Sensoren	109
5.3.1	Voruntersuchungen	109
5.3.1.1	Einfluss des Weichmachers auf die Sensoreigenschaften	109
5.3.1.2	Verwendete Farbstoffe	112
5.3.1.3	pH-Arbeitsbereich	112
5.3.1.4	Wahl der Modulationsfrequenz	114
5.3.2	Miniaturisierung	114
5.3.2.1	Chlorid-Messungen mit Mikro-Sensoren	114
5.3.2.2	Chlorid-Messungen mit Submikro-Sensoren	115
5.3.2.3	Chlorid-Messungen mit Nano-Sensoren	115
5.3.2.4	Vergleich der miniaturisierten Sensoren	116
5.3.2.5	Dynamischer Chlorid-Messbereich bei Submikro- und Nano-Sensoren	117
5.3.3	Signalstabilität	118
5.3.3.1	Variation des Anregungslichtes	118
5.3.3.2	Photostabilität	118
5.3.3.3	Farbstoffaustrag	121
5.3.3.4	Sauerstoff-Querempfindlichkeit	122
5.3.4	Zusammenfassung – Chlorid-Sensor	122
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	125
7	LITERATURVERZEICHNIS	129
8	ANHANG	135
8.1	Abkürzungen	135
8.2	Synthese der Ionenpaare und Ruthenium-Komplexe	136
8.3	Silanisierungsvorschriften	138
8.4	Kurvenanpassungen	139

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Die klassische Laboranalytik hat in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Messmethoden hervorgebracht, z.B. chromatographische, spektroskopische oder elektrochemische Verfahren, mit deren Hilfe sehr empfindliche oder sehr genaue Gehaltsanalysen durchgeführt werden können. Diese Methoden sind von ihrer Aussagekraft her unerreicht, sie sind jedoch mit gewissen Einschränkungen behaftet: In der Regel ist eine Probennahme und -aufbereitung nötig, daher sind weder kontinuierliche noch in situ-Messungen möglich. Weiterhin setzen diese Methoden geschultes Personal voraus, und ihre Durchführung ist mit einem hohen apparativen sowie Zeitaufwand verbunden.

Für einige wichtige Anwendungen in der Analysenpraxis sind diese Einschränkungen von Nachteil, z.B. bei der *Automatisierung von industriellen Prozessen*, bei der eine kontinuierliche und schnelle Messwerterfassung als Grundlage des Steuer- und Regelmechanismus' nötig ist, bei der *Überwachung der Gewässer- oder Luftqualität* hinsichtlich Umweltschutz oder Arbeitssicherheit, bei der Grenzwertüberschreitungen sofort detektiert werden müssen, oder bei *in-situ Messungen in der Medizin*, welche die zeitaufgelöste Messung von Wirkstoffen im Körper oder die Überwachung (bio)chemischer Parameter während Operationen ermöglichen.

Für solche Anwendungen würden sich bevorzugt chemische Sensoren eignen. Bei diesen handelt es sich um Messeinrichtungen, die den chemischen Zustand einer Probe (z.B. Konzentration oder Partialdruck einer Komponente) erfassen und in ein elektrisches Signal umsetzen. Die Vorteile chemischer Sensoren liegen in ihrer einfachen Bedienbarkeit, sie sind kostengünstig, arbeiten zerstörungsfrei und kontinuierlich, sind in vielen Fällen in sehr kleiner Bauform herstellbar und können daher für vor-Ort oder in-situ Messungen eingesetzt werden. Als Nachteile beim Einsatz chemischer Sensoren müssen die meist geringere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ihrer Analyseergebnisse und ihr bezüglich des Analyten und der Betriebsbedingungen beschränkter Einsatzbereich toleriert werden. Chemische Sensoren sollten daher nicht als Konkurrenz, sondern als sinnvolle Ergänzung zur herkömmlichen Laboranalytik für bestimmte Anwendungszwecke verstanden werden.

Große Vorteile bietet die Möglichkeit der Miniaturisierung chemischer Sensoren für das Vordringen der Analytik in immer kleinere Dimensionen, die der klassischen Analytik nicht zugänglich sind. Insbesondere optochemische Sensoren bieten durch die Verwendung von Lichtleitern die Möglichkeit der Miniaturisierung und der Konzeption als Messsonde. Bereits kommerziell erhältlich sind faseroptische Sensoren, bei denen das Ende des Lichtleiters mit einer sensitiven Schicht versehen ist, die einen Indikatorfarbstoff enthält, der bei Kontakt mit dem Analyten seine spektralen Eigenschaften (z.B. Absorption, Lumineszenz) ändert. Solche

Sensoren können z.B. als Messsonden in der Umweltanalytik eingesetzt werden. Eine weitere drastische Miniaturisierung der Messfühler in den Submikrometerbereich führt zu Nano-Sensoren, deren Anwendung hauptsächlich in der Bio- und Medizin-Forschung zu suchen ist. So sind bereits pH- und Ionen-Messungen mit solchen Sensoren in lebenden Zellen durchgeführt worden. Auch das Abrastern von Oberflächen oder Gewebestrukturen wäre wegen der hohen erzielbaren Ortsauflösung als Anwendung denkbar. Die zentrale Aufgabe bei solch extremen Miniaturisierungen ist es, ein stabiles und zuverlässiges Messsignal zu gewährleisten. Dies betrifft zum einen die *physikalische und chemische Stabilität* der sensitiven Schicht, also deren Haftung auf dem Lichtleiter sowie die Verankerung der funktionellen Bestandteile in dieser. Weiterhin ist die *Signalstabilität* gemeint, da bereits geringfügige Schwankungen der Anregungsintensität oder Änderungen der Messgeometrie zu unerwünschten Störungen führen können.

In der vorliegenden Arbeit sollen faseroptische Sensoren entwickelt werden, die das optische Signal von Lumineszenzfarbstoffen nutzen. Der Schwerpunkt der Arbeit liegt dabei auf einer möglichst weitgehenden Miniaturisierung der Sensoren bei gleichzeitiger Gewährleistung eines zuverlässigen Messsignals. Hierfür sollen zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden:

Der erste besteht darin, das aus der Lumineszenz-*Intensität* gewonnene Signal durch eine *interne Referenzierung* zu stabilisieren. Durch Auswertung des Quotienten aus dem veränderlichem Messsignal und einem konstanten Referenzsignal soll darüber hinaus eine Unabhängigkeit von störenden Intensitätsschwankungen des Anregungslichts bzw. Änderungen der Messgeometrie erreicht werden (Kapitel 4).

Der zweite Ansatz besteht in der Nutzung der *Lebensdauer* der Lumineszenz als Messsignal, die von sich aus unabhängig von der eingestrahltten Intensität ist. Um den apparativen Aufwand in Grenzen zu halten, wird auf langlebige Phosphoreszenzfarbstoffe und eine *phasensensitive Auswertung* bei moduliertem Anregungslicht zurückgegriffen (Kapitel 5).

Für beide Messmethoden soll untersucht werden, inwiefern die Unabhängigkeit von der Anregungsintensität gegeben ist, inwieweit die sensitiven Schichten unter Messbedingungen stabil sind und zuverlässige Messwerte ergeben.

Die Untersuchungen sollen exemplarisch mit pH- bzw. ionensensitiven Schichten vorgenommen werden. Die Wahl der Analyten orientiert sich dabei an dem möglichen Einsatz solcher Sensoren für bio-medizinische Messungen.

2 EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK

2.1 Chemische Sensoren

2.1.1 Definition und Klassifizierung chemischer Sensoren

Nach einem Nomenklaturvorschlag der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) handelt es sich bei chemischen Sensoren um Messwertaufnehmer, die chemische Informationen kontinuierlich in analytisch auswertbare Signale umwandeln können [1]. Die *chemische Information* kann z.B. die Aktivität oder der Partialdruck eines Analyten in dem den Sensor umgebenden Medium sein. Chemische Sensoren setzen sich aus mindestens zwei funktionellen Einheiten zusammen, einem *Rezeptor*, d.h. einer für Analytmoleküle sensitiven Schicht, deren physikalische oder chemische Eigenschaften sich durch Wechselwirkung mit dem Analyten ändern, und einem *Transducer*, der den im Rezeptor erhaltenen Effekt in ein elektrisches Signal umwandelt [2]. Der schematische Aufbau eines solchen chemischen Sensors ist in Abbildung 2-1 dargestellt. Im Rezeptorteil des Sensors wird die chemische Information durch eine spezifische Reaktion in ein Messsignal umgewandelt, das wiederum vom Transducer (unselektiv) in ein analytisches - meist elektronisches - Signal übersetzt wird. Dieses wird in der Auswerteeinheit erfasst und weiterverarbeitet.

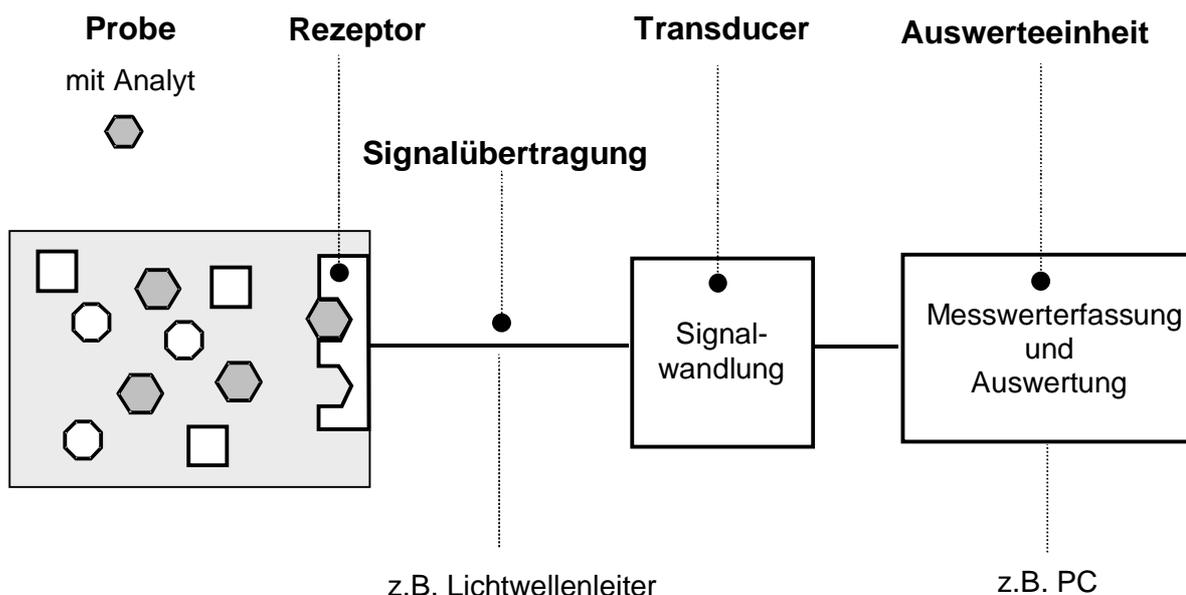


Abbildung 2-1

Schematischer Aufbau eines chemischen Sensors.

Chemische Sensoren können anhand der eingesetzten Transducer und deren Messgrößen in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden [1]. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Klassen.

Tabelle 2-1 *Klassifizierung chemischer Sensoren.*

Transducer	Messprinzip / Messgröße
elektrochemisch	Potentiometrie, Amperometrie, Voltammetrie
elektrisch	Oberflächenleitfähigkeit, Elektrolytleitfähigkeit
optisch	Lumineszenz (Intensität / Lebensdauer), Absorption, Reflexion, Lichtstreuung, Brechungsindex
massensensitiv	Oberflächenwellen, Piezoelektrizität
magnetisch	Paramagnetismus
thermisch	Reaktionswärme

Die weiteste Verbreitung haben die elektrochemischen Sensoren gefunden, zu denen die ionenselektiven Elektroden (ISE) und die pH-Glaselektrode zählen, und die seit vielen Jahren als Standard-Laborgeräte etabliert sind [3,4]. Aber auch optische Sensoren erlangen zunehmende Bedeutung, insbesondere durch ihre gute Eignung zur Miniaturisierung und Multikomponentenanalyse [5,6].

An die Funktionsweise und den Aufbau von chemischen Sensoren werden eine Reihe von Anforderungen gestellt, die sich zum einen aus allgemeinen Qualitätskriterien für Analysenmethoden, zum anderen aus für den jeweiligen Einsatzbereich spezifischen Forderungen ableiten.

- ☞ **Dynamischer Messbereich und Sensitivität:** Der Sensor sollte einen möglichst großen dynamischen Messbereich besitzen und seine größte Sensitivität im Bereich der üblicherweise in der Probelösung vorliegenden Konzentration des Analyten haben. Bei der Schadstoffanalytik sind in der Regel niedrige Nachweisgrenzen gefordert, bei biologischen oder medizinischen in-situ Messungen muss der dynamische Bereich physiologische Konzentrationen abdecken.
- ☞ **Selektivität:** Der Sensor soll die Analytkonzentration möglichst ohne Störung durch andere Probenbestandteile bestimmen können. Dazu ist entweder eine hohe Selektivität der Rezeptorschicht erforderlich, oder das Vorhandensein von Störanalyten in der Probe muss ausgeschlossen werden.
- ☞ **Stabilität:** Je nach Anwendungsgebiet der Sensoren wird eine mechanische und chemische Stabilität der Sensoren gefordert. Insbesondere die Rezeptorschicht kann Alterungsprozessen unterliegen, Reaktionen mit Probenbestandteilen eingehen oder durch sonstige Einflüsse wie Licht oder Temperatur verändert werden.

- ☞ **Ansprechzeit:** Da die Zeitersparnis in vielen Fällen ein wichtiges Kriterium für den Einsatz chemischer Sensoren ist, sind in der Regel kurze Ansprechzeiten erforderlich.
- ☞ **Reversibilität:** Um zuverlässige kontinuierliche Messungen oder hohe Probendurchsätze zu gewährleisten, muss ein chemischer Sensor reversibel auf den Analyten reagieren und nach möglichst kurzen Regenerationszeiten wieder messbereit sein [7].
- ☞ **Miniaturisierbarkeit:** Wenn eine hohe Mobilität des Sensors für den Einsatz bei vor-Ort-Analysen gefordert ist, muss das gesamte Sensorsystem klein und kompakt aufgebaut sein. In vielen Fällen ist aber nur eine geringe Abmessung des Sensorkopfes verlangt, entweder um auf kleinstem Raum sehr viele Sensorelemente zu integrieren (Sensorarrays) oder um mit einem Sensorelement in kleinsten Probenvolumina zu messen. Weiterhin kann man durch Kombination und Integration von Mikrosensoren und Mikroaktoren (z.B. Mikropumpen und -ventile) Mikrosysteme aufbauen [5].

2.1.2 Optochemische Sensoren

Bei den optischen Sensoren unterscheidet man drei technologische Generationen: *Optische Sensoren der 1. Generation* bestehen im Wesentlichen aus einem an ein Spektrometer angekoppelten Lichtleiter, der in die Probe getaucht wird und die vorhandenen optischen Eigenschaften des Analyten überträgt. Bei *optischen Sensoren der 2. Generation* besitzt der Analyt selbst keine optischen Eigenschaften, sondern es ist eine Rezeptorschicht nötig, die bei einer selektiven Reaktion mit dem Analyten ihre optischen Eigenschaften (z.B. Lumineszenz oder Absorption) ändert. Die ersten Sensoren dieser Art wurden für pH-Messungen entwickelt, indem pH-Indikatoren in quellbaren Polymermatrices immobilisiert wurden. Diese Art der Sensoren nennt man auch *optochemische* Sensoren. Bei *optischen Sensoren der 3. Generation* werden neue Wirkprinzipien ausgenutzt, wie z.B. evaneszierende Wellen in Lichtleitern, Interferenzphänomene oder die Polarisation des Lichtes [7].

Von der Größe her unterscheidet man zwischen Makro- und miniaturisierten faseroptischen Sensoren. Bei *Makro-Sensoren* befindet sich die Rezeptorschicht auf einem planaren Träger, der in den Strahlengang eines herkömmlichen Analysengerätes eingebracht wird. Bei den *faseroptischen Sensoren* werden die Enden von Lichtwellenleitern (LWL) beschichtet, wobei diese nicht nur als Träger der Rezeptorschicht, sondern auch zur Übertragung des Anregungs- bzw. Messlichtes dienen.

Gegenüber den etablierten elektrischen und elektrochemischen Sensoren eröffnen optische Sensoren neue Möglichkeiten und bieten einige Vorteile [7]:

- ☞ Optische Sensoren benötigen keine Referenzelektrode.
- ☞ Bei wellenlängenaufgelösten Messungen steht stets die gesamte spektrale Information zur Verfügung. Verschiedene Analyten können unterschiedliche Änderungen im Spektrum hervorrufen, wodurch eine Multikomponentenanalyse möglich wird [8].
- ☞ Durch den Einsatz von Lichtwellenleitern kann das analytische Signal über längere Distanzen störungsfrei übertragen werden.
- ☞ Es treten keine elektrischen Interferenzen auf.
- ☞ Magnet- und elektrische Felder stören nicht.
- ☞ Die Rezeptorschicht kann teilweise leicht gewechselt werden, sodass häufig auch Einwegsensoren praktikabel sind.
- ☞ Durch die gute Eignung faseroptischer Sensoren zur Entwicklung von Mikro- und Nano-Sensoren können entweder Mikroanalysensysteme aufgebaut [5] oder Analysen in kleinsten Volumina durchgeführt werden [9].

Jedoch besitzen optische Sensoren auch einige Nachteile:

- ☞ Umgebungslicht kann die Messungen stören.
- ☞ Der dynamische Messbereich ist begrenzter als bei elektrochemischen Sensoren, die z.T. über mehr als zehn Größenordnungen hinweg einsetzbar sind (z.B. pH-Elektroden).
- ☞ Die Langzeitstabilität kann bei Sensoren, die mit immobilisierten Indikatorfarbstoffen arbeiten, durch deren Auswaschen oder durch Photobleichen beeinträchtigt werden.

2.1.3 Faseroptische Sensoren

2.1.3.1 Bau und Funktionsweise von Lichtwellenleitern

Bereits im vorigen Kapitel wurden die faseroptischen Sensoren erwähnt, bei denen das Anregungs- bzw. Messlicht mit Lichtwellenleitern (LWL) übertragen wird.

Der Aufbau eines Lichtwellenleiters ist in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt. Er besteht aus einem Kern (engl. „core“), einem Mantel (engl. „cladding“) und einer Schutzhülle (engl. „coating“). Kommerziell erhältliche Fasern haben einen Durchmesser von ca. 1 µm bis 6 mm. Je nach Wellenlängenbereich wird als Material Quarz (UV-VIS), Glas oder Plastik (VIS) bzw. Chalkogenidgläser oder polykristalline Silberhalogenidfasern (IR) verwendet [7].

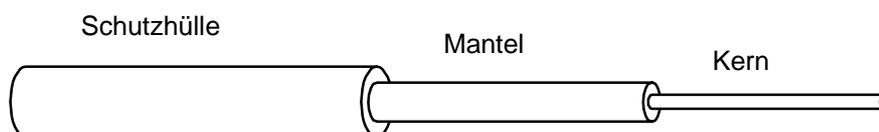


Abbildung 2-2 *Aufbau eines Lichtwellenleiters.*

Die Lichtleitung in einer optischen Faser beruht auf der Reflexion an der Kern-Mantel-Grenzschicht. Man unterscheidet *Stufenindex*- und *Gradientenindex*-Fasern, je nachdem, ob sich der Brechungsindex zwischen Kern und Mantel sprunghaft oder kontinuierlich ändert. Die Leitung des Lichtes in einer Stufenindexfaser ist in Abbildung 2-3 a wiedergegeben. Fällt Licht unter verschiedenen Winkeln auf das Faserende, so wird ein Teil des Lichtes durchgelassen und ein anderer Teil reflektiert. Zur Reflexion muss das Licht in einem Winkel, der kleiner ist als der Grenzwinkel θ , auf die Faser treffen und der Brechungsindex des Faserkerns n_1 muss größer als der des umhüllenden Fasermantels n_2 sein. Der Grenzwinkel θ errechnet sich aus den Brechungsindices beider Medien. Als Kenngröße für optische Fasern wird die Numerische Apertur NA verwendet:

Gleichung 2-1
$$NA = \sin \theta = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$

Je größer die numerische Apertur, desto mehr Licht kann der Lichtwellenleiter aus der Umgebung aufnehmen bzw. um so größer ist der Raumwinkel, unter dem das Licht abgestrahlt wird.

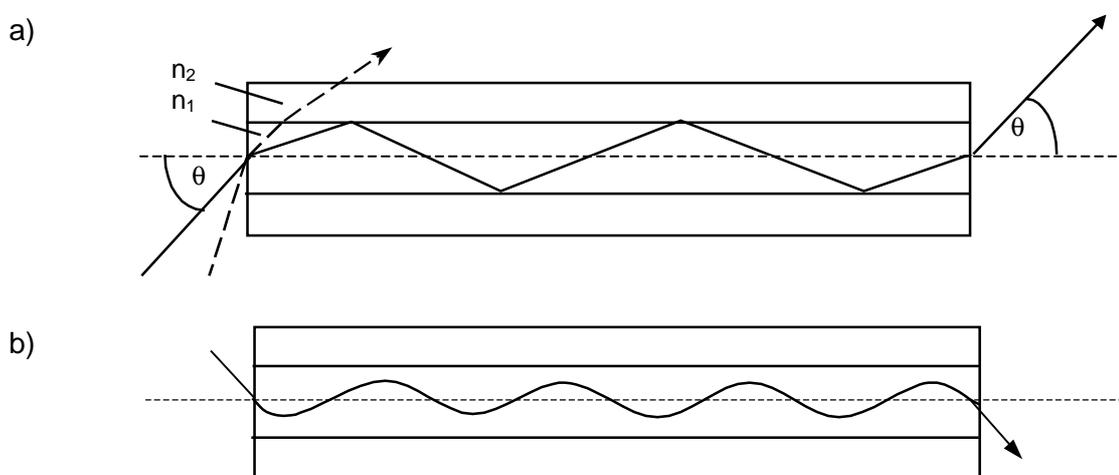


Abbildung 2-3 *Lichtführung in einer Stufenindexfaser (a) [n₁; n₂: Brechungsindices von Kern und Mantel. θ : Grenzwinkel] und einer Gradientenindexfaser (b).*

Bei Gradientenindexfasern, die einen kontinuierlichen Übergang des Brechungsindex' vom Zentrum des Kerns zum Mantel hin besitzen, wird das Licht näher am Kernmittelpunkt geführt, was in Abbildung 2-3 b veranschaulicht ist [10].

Außer nach dem Brechungsindex-Profil unterscheidet man Lichtwellenleiter noch nach der Fähigkeit, bei Einstrahlung von kohärentem Licht (z.B. Laserlicht) eine oder mehrere Moden zu tragen. *Monomode*-LWL weisen ein Stufenindexprofil auf und haben Kerndurchmesser

von wenigen Mikrometern. Sie tragen bei der spezifizierten Wellenlänge nur eine gelenkte Mode und erfordern eine höhere Sorgfalt bei der Handhabung, z.B. beim Einkoppeln des Lichtes. Ihr großer Vorteil liegt in der sehr geringen Abschwächung des Lichtes sowie in der Tatsache, dass keine modale Dispersion auftritt, was den Transport von Licht und Informationen über weite Entfernungen ermöglicht. *Multimode*-Fasern können ein Stufen- bzw. Gradientenindexprofil besitzen, wobei die modale Dispersion bei letzteren geringer ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Multimode-Fasern mit Gradientenindex und Monomode-Fasern verwendet.

2.1.3.2 Miniaturisierte faseroptische Sensoren

Eine Miniaturisierung optischer Sensoren ist mit Hilfe von Lichtleitern leicht möglich. Dabei können diese entweder nur als Signalübermittler dienen (faseroptische Sensoren der 1. Generation) oder an einem Ende mit einer Rezeptorschicht versehen werden, in der die optisch aktiven Substanzen immobilisiert sind (faseroptische Sensoren der 2. Generation). Letztere werden in Analogie zu den Elektroden auch als Optoden (in der angelsächsischen Literatur: Optroden) bezeichnet.

Die ersten Optoden wurden durch Beschichten abgeschnittener Faserenden mit einer Rezeptorschicht hergestellt. Dabei entspricht die Größe der sensitiven Fläche der Stirnfläche des Faserkerns, da nur dieser Bereich angestrahlt und somit zur Messung genutzt wird, während die Beschichtung selbst meist noch den Fasermantel mit umschließt (vgl. Abbildung 2-4 a). Die Durchmesser solcher optischen Fasern liegen in der Regel unter einem Millimeter, weshalb man solche Sensoren als *Mikro-Sensoren* bezeichnen kann.

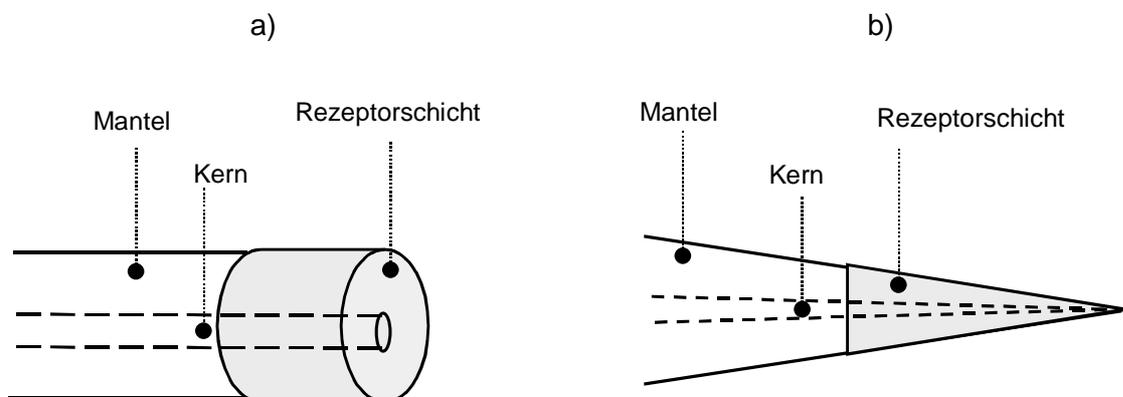


Abbildung 2-4 Faseroptische Sensoren. a) Abgelaugtes Faserende. b) Zur Spitze ausgezogene Faser.

Die Anregung für eine weitere Miniaturisierung stammt von der sogenannten „Scanning Near-Field Optical Microscopy (SNOM)“ [11,12]. Bei dieser Methode der optischen Mikroskopie werden verjüngte Faserspitzen als Lichtquellen verwendet, bei denen die Seitenflächen des Kegels metallbedampft sind, sodass nur im Spitzenbereich noch Licht austritt. Typische Aperturen liegen bei 20...50 nm, also unterhalb der Wellenlänge des verwendeten Anregungslichtes. Im Nahfeldbereich der Spitze kann der austretende Strahl noch als parallel angesehen werden, während er im Fernfeld divergiert. Das Nahfeld reicht etwa um den Durchmesser der Apertur aus der Spitze heraus [13], in der Praxis wird die Spitze auf 1...20 nm an das beobachtete Objekt geführt [14]. Mit solchen Spitzen kann man durch Abtasten von Objekten, die sich in deren Nahfeld befinden, mikroskopische Bilder erzeugen, deren räumliche Auflösung durch die Apertur der Faserspitze bestimmt wird. 10 nm Ortsauflösung wurden auf diese Weise bisher erreicht, was deutlich unter dem Auflösungsvermögen der herkömmlichen Lichtmikroskope ($\lambda/2$ des verwendeten Lichtes) liegt.

Ausgehend von derartigen Faserspitzen erhält man faseroptische *Nano-Sensoren* [9,15,16], indem man auf die Spitze eine Rezeptorschicht aufbringt (vgl. Abbildung 2-4 b).

In einer speziellen Anwendung wurde durch Photoimmobilisierung eines pH-Fluoreszenzindikators auf der Faserspitze ein Nano-Sensor zur Messung von intrazellulären pH-Werten entwickelt [17]. Mit Hilfe solcher Nano-Sensoren können in-situ Analysen in extrem kleinen Volumina bzw. mit sehr hoher Ortsauflösung ausgeführt werden, die der klassischen Laboranalytik nicht zugänglich sind.

Wie bereits erwähnt werden SNOM-Spitzen mit einer Metallbeschichtung versehen, welche die Flanken des verjüngten Bereichs abdeckt, um eine definierte Größe der Apertur einzustellen. Jedoch können auch mit unbeschichteten SNOM-Spitzen topographische Rasterungen durchgeführt werden [18]. In unserer Arbeitsgruppe wurde anhand von nicht-metallisierten Spitzen mit einem Durchmesser von 300 nm demonstriert, dass nach sorgfältiger Einkopplung und Anpassung der verwendeten Lichtintensität der Lichtaustritt hauptsächlich an der Spitze erfolgt, sodass auch solche Spitzen zur Herstellung von Submikro-Sensoren verwendet werden können. Als Dimension der Apertur ist dann der Spitzendurchmesser anzunehmen [19].

Neben der hohen Ortsauflösung bieten miniaturisierte Sensoren noch weitere Vorteile, wie z.B. verminderten Probenverbrauch, niedrigere absolute Detektionsgrenzen, geringere Störung der Mikroumgebung bei Messung in biologischen Proben sowie schnellere Ansprechzeiten [20].

2.1.4 Anwendungsbeispiele für optochemische Sensoren

In der Literatur vielfach beschrieben sind optochemische Sensoren, in deren Rezeptorschicht absorbierende oder lumineszierende Indikatorfarbstoffe immobilisiert sind [21-36]. Die Immobilisierung kann durch Adsorption an die Oberfläche bzw. ein Austauschharz, oder den Einschluss in bzw. die kovalente Bindung an eine Polymermatrix erfolgen. Auf diese Weise lassen sich selektive Sensoren für Ionen, Gase oder Bioanalyte (Biosensoren) entwickeln. Dabei können verschiedene optische Eigenschaften, wie z.B. die Intensität oder Wellenlänge am Maximum eines Absorptions- bzw. Lumineszenzspektrums oder die Lumineszenz-Lebensdauer, ausgewertet werden. Im Folgenden wird eine Literaturliste für die Analyte aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind.

Den ersten faseroptischen *pH-Sensor* entwickelte Peterson im Jahre 1980 durch Copolymerisation des Absorptionsfarbstoffs Phenolrot mit Acrylamid [37]. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses, das besonders im Hinblick auf die weitere Miniaturisierung ein limitierender Faktor ist, wurde vielfach auf Fluoreszenz-Indikatoren zurückgegriffen [15,21-23]. Mit Sensoren, die Fluoreszenzfarbstoffe enthielten, gelangen dann auch die ersten Messungen in lebenden Zellen [17]. Messgröße dieser Sensoren war die Fluoreszenz-Intensität.

Als weiteres Messprinzip hat sich inzwischen die Bestimmung der Lumineszenz-Lebensdauer etabliert. In der Literatur sind bereits zahlreiche optische pH-Sensoren basierend auf diesem Prinzip beschrieben [24-26]. Bisher ist die Miniaturisierung jedoch nur bis in den Mikrometerbereich durchgeführt worden.

Zur Detektion von *Ionenkonzentrationen* gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten. Die eine beruht auf der Verwendung von ionensensitiven Farbstoffen, die bei der Reaktion mit dem Analyten ihre optischen Eigenschaften ändern. Derartige Sensoren wurden z.B. für Calcium [27], Natrium, Kalium und auch Schwermetallionen entwickelt [8,28,29].

Eine weitere, universellere Möglichkeit der Ionenbestimmung ist die Kopplung der Reaktion von pH-Indikatoren, die lediglich das optische Signal übertragen, mit Komplexbildnern zur selektiven Erkennung des Analyten (siehe Kapitel 2.4). Mit Hilfe dieser Methode lassen sich pH-Sensoren zu ionensensitiven Sensoren „umfunktionieren“, wobei sich das Analytenspektrum durch Wechsel des Komplexbildners erweitern lässt. Sensoren basierend auf diesem Prinzip sind vor allem für Intensitäts-Messungen etabliert (z.B. zur Bestimmung von Kaliumionen [30-32]).

Auch ionensensitive Sensoren basierend auf Lumineszenz-Lebensdauer-Messungen wurden in jüngster Zeit entwickelt [34,35] und bis in den Mikrometerbereich hinein miniaturisiert [38].

2.2 Lumineszenzanalyse

2.2.1 Grundlagen der Photolumineszenz

Lumineszenzerscheinungen sind Vorgänge, bei denen Stoffe Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung abgeben. Die Anregung kann z.B. thermisch (Thermolumineszenz), chemisch (Chemolumineszenz) oder durch elektromagnetische Strahlung (Photolumineszenz) erfolgen. Liegt die emittierte Strahlung im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums, so spricht man von optischer Lumineszenz. In diesem spektralen Bereich werden elektronische Zustände eines Moleküls angeregt.

In Abbildung 2-5 sind die elektronischen Vorgänge der Lumineszenz für ein zweiatomiges Molekül schematisch dargestellt. Die direkte Absorption bei organischen Molekülen erfolgt gewöhnlich von einem elektronischen Singulettzustand aus in einen angeregten Singulettzustand. Wegen des Franck-Condon-Prinzips erfolgt der Übergang vom Schwingungsgrundzustand in einen angeregten Schwingungszustand des oberen Elektronenzustands. Durch Schwingungsrelaxation gelangt das Molekül zunächst in den Schwingungsgrundzustand des oberen elektronischen Niveaus. Von dort aus kann es entweder spontan emittieren (Fluoreszenz) oder durch Spinumkehr in den Triplett-Zustand wechseln und von dort aus emittieren (Phosphoreszenz). Da die Rückkehr aus dem Triplett- in den Singulett-Grundzustand ein sehr unwahrscheinlicher Übergang ist, ist die Lebensdauer des Triplettzustands groß. Fluoreszenz und Phosphoreszenz lassen sich daher phänomenologisch anhand ihrer Lebensdauer unterscheiden (Fluoreszenz: 10^{-9} ... 10^{-6} s; Phosphoreszenz: 10^{-3} ...einige s) [39].

Wegen des kleineren Termabstandes erfolgt die Emission bei längeren Wellenlängen als die Absorption (Stokes-Verschiebung). Diese Tatsache begründet die enorme Leistungsfähigkeit von Lumineszenz- gegenüber Absorptions-Messungen: Da die Anregung bei anderen Wellenlängen erfolgt als die Detektion, wird das Messsignal gegen einen Untergrund aufgenommen, der nahe bei null liegt [40]. Eine weitere Charakteristik der Lumineszenz ist, dass das Licht ungerichtet emittiert wird. Handelsübliche Lumineszenz-Spektrometer machen insofern von dieser Tatsache Gebrauch, dass der Detektor rechtwinklig zum Anregungsstrahl angebracht ist, damit möglichst wenig Anregungslicht auf den Detektor gelangt.

Außer durch Lumineszenzerscheinungen können die angeregten Moleküle durch weitere Relaxationsvorgänge in den elektronischen Grundzustand zurückkehren. Hierfür kommen z.B. der strahlungslose Energietransfer auf andere Moleküle (dynamische Lumineszenzlöschung), (photo-) chemische Reaktionen oder die Abgabe der Energie als Schwingungsenergie („internal conversion“) in Frage [41]. In der Regel laufen mehrere dieser Prozesse

gleichzeitig ab, und nur ein Teil der Moleküle in der Probe luminesziert. Das Verhältnis aus emittierten zu absorbierten Lichtquanten wird als Quantenausbeute bezeichnet:

Gleichung 2-2
$$\Phi_L = \frac{I_L}{I_a}$$

Φ_L Quantenausbeute
 I_L Zahl der emittierten Photonen
 I_a Zahl der absorbierten Photonen

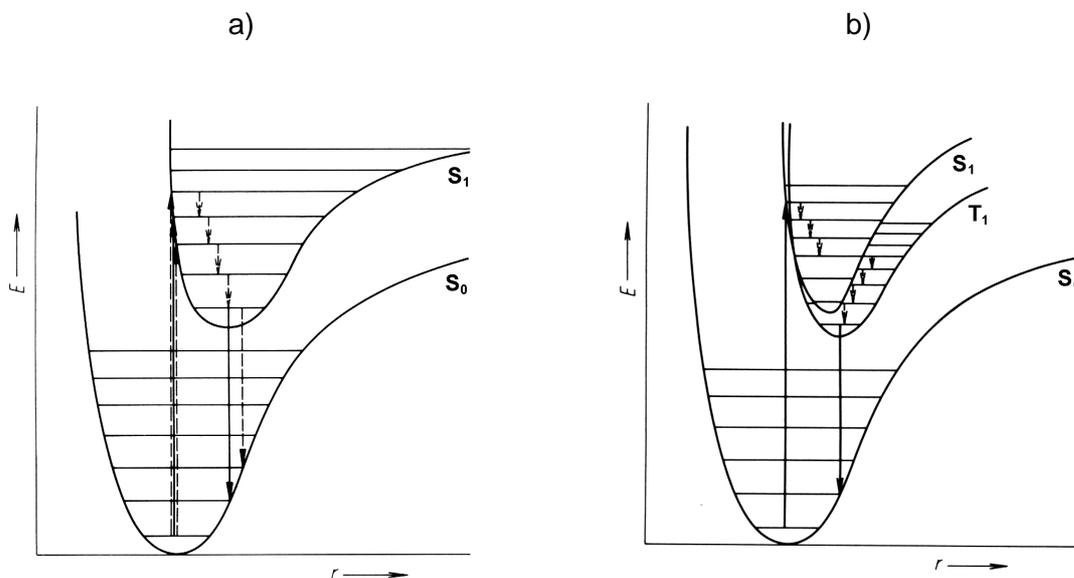


Abbildung 2-5 Schematische Energiedarstellung zur Fluoreszenz (a) und Phosphoreszenz (b) nach Wedler [42]. [S_0 , S_1 : Potentialkurven des elektronischen Singulett-Grundzustands bzw. des ersten angeregten Zustands. T_1 : angeregter Triplett-Zustand. Schwingungsniveaus durch waagrechte Linien gekennzeichnet].

2.2.2 Lumineszenzspektrophotometrie

Bei den spektralen Methoden der Lumineszenzanalyse unterscheidet man die *Lumineszenzspektralanalyse*, d.h. die qualitative Identifizierung von Substanzen anhand ihrer Lumineszenzspektren, und die *Photometrie*, die sich den Zusammenhang zwischen der Lumineszenz-Intensität und der Konzentration eines Stoffes zunutze macht [43]. Aus Gleichung 2-2 und dem Lambert-Beerschen Gesetz für die Absorption lässt sich folgender Zusammenhang ableiten:

Gleichung 2-3 $I_L = \Phi_L \cdot I_0 \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot c \cdot d})$

I_L	Lumineszenz-Intensität
Φ_L	Quantenausbeute
I_0	Intensität des Anregungslichtes
α	Extinktionskoeffizient
c	Konzentration
d	optische Weglänge

Der Extinktionskoeffizient ist wellenlängenabhängig, daher legt man sich zur Auswertung auf eine Wellenlänge, in der Regel die des Emissions-Maximums, fest. Für geringe Konzentrationen des Lumineszenzfarbstoffs ($\alpha c d < 0,05$) vereinfacht sich Gleichung 2-3 aufgrund der Potenzreihenentwicklung der Exponentialfunktion zu Gleichung 2-4, wodurch ein linearer Zusammenhang zwischen der Lumineszenz-Intensität und der Konzentration entsteht [41]. In der Regel arbeitet man in diesem Konzentrationsbereich.

Gleichung 2-4 $I_L = 2,3 \cdot \Phi_L \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d$

ε dekadischer Extinktionskoeffizient, $\varepsilon = \alpha / 2,3$

In dieser Arbeit wurden Messungen mit einem Fluoreszenzindikator durchgeführt, dessen verschiedene Protolysestufen unterschiedliche Fluoreszenzspektren besitzen. In diesem Falle bleibt die Gesamtkonzentration des Fluoreszenzfarbstoffs konstant, jedoch ändert sich der Anteil der einzelnen Protolysestufen bei der Beprobung mit dem Analyten. Die Fluoreszenz-Intensität setzt sich dann additiv aus den Beiträgen der einzelnen Komponenten i zusammen:

Gleichung 2-5 $I_f = \sum_i 2,3 \cdot \Phi_{f,i} \cdot I_0 \cdot \varepsilon_i \cdot c_i \cdot d$

Durch die große Zahl an Einflussparametern sind die Fehlerquellen bei Lumineszenz-Intensitäts-Messungen zahlreich. Es ist daher unerlässlich, durch eine sorgfältige Abstimmung und genaue Einhaltung der Mess- und Kalibrationsbedingungen diese Einflussparameter konstant zu halten. Im Folgenden sind die häufigsten Fehlerquellen aufgeführt.

Die Quantenausbeute wird sowohl von den ablaufenden Konkurrenzreaktionen als auch von weiteren Einflussparametern, wie z.B. der *Temperatur*, bestimmt. *Lumineszenzlöschung* tritt in der Praxis häufig durch paramagnetische Gase, z.B. Sauerstoff, oder schwere Atome (z.B. Iodidionen) auf. Bei hohen Konzentrationen kann auch das lumineszierende Molekül selbst als Löscher wirken. Tritt eine Lumineszenzminderung durch Reabsorption des emittierten Lichtes auf, so spricht man von einem „*inneren Filter-Effekt*“. Weiterhin kann – vor allem bei hohen Anregungsintensitäten oder kurzen Anregungswellenlängen – auch eine *Photodekomposition* des Moleküls stattfinden.

Auch eine schwankende Anregungsintensität führt zu einer Änderung der Lumineszenz-Intensität. Hier bietet die spektrale Auswertung dann Abhilfe, wenn im Spektrum ein Referenzpunkt mit konstanter Lumineszenz-Intensität auftritt. Um einen solchen Referenzpunkt zu erhalten, kann man zusätzlich zu dem Messfarbstoff einen Referenzfarbstoff in das System einbringen, dessen – vom Messfarbstoff getrenntes – Spektrum einen konstanten, vom Analyten unabhängigen Intensitätswert am Maximum besitzt. Beide Werte, also Mess- und Referenzintensität, werden von Schwankungen des Anregungslichtes gleichermaßen beeinflusst. Über die Auswertung des Quotienten beider Lumineszenz-Intensitäten erhält man einen von der Anregungsintensität unabhängigen Wert. Dieses Verfahren wurde bereits mit Submikro-Sensoren erfolgreich getestet [19].

Eine weitere Möglichkeit der Referenzierung bieten Lumineszenzindikatoren, bei denen die protonierte und deprotonierte Form Maxima an unterschiedlichen Wellenlängen aufweisen. In deren Spektren verschieben sich folglich die Intensitäten der Maxima in Abhängigkeit vom Protolysegrad. Besitzen solche Indikatoren zwischen den Maxima einen isosbestischen Punkt, in dem sich alle Spektren schneiden, so kann dieser direkt als Referenzpunkt verwendet, und der veränderliche Wert eines der beiden Maxima darauf bezogen werden. In der Literatur sind bereits pH-Messungen in Lösung [44], mit Makro-Sensoren [45] und faseroptischen Sensoren [46,47] nach diesem Prinzip beschrieben.

2.2.3 Lebensdauer-Messungen

Die Lebensdauer τ des angeregten Zustands ist definiert als die mittlere Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verweilt, bevor es in den Grundzustand zurückkehrt. Wie die Lumineszenz-Intensität wird sie von allen ablaufenden Relaxationsprozessen des angeregten Zustands beeinflusst. Die Lebensdauer lässt sich prinzipiell auf zwei Arten ermitteln, zum einen direkt durch Auswertung des Lumineszenz-Abklingverhaltens nach einem kurzen Anregungspuls, zum anderen indirekt durch die Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Lumineszenzlicht bei modulierter Anregung.

Gehorcht das Abklingen der Lumineszenz nach einem Anregungspuls einem Zerfall erster Ordnung, so ist die Lebensdauer τ gegeben durch die Zeit, in der die Intensität auf den e-ten Teil abgeklungen ist [48]:

Gleichung 2-6 $I(t) = I_0 \cdot e^{(-t/\tau)}$

$I(t)$	Intensität zum Zeitpunkt t
I_0	Intensität unmittelbar nach dem Anregungspuls
τ	Lebensdauer

Die Lebensdauer-Bestimmung nach dem Pulsverfahren ist vor allem bei den sehr kurzlebigen Fluoreszenzfarbstoffen mit einem hohen apparativen Aufwand verbunden.

Ein alternatives Verfahren, das anstelle eines kurzen Anregungspulses eine kontinuierliche, modulierte Anregung verwendet, bietet die phasensensitive Detektion.

Moduliert man das Anregungslicht mit der Frequenz ν , so ist auch das Lumineszenzlicht mit derselben Frequenz moduliert, es hinkt jedoch zeitlich der Anregung hinterher (siehe Abbildung 2-6). Daraus resultiert eine Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und emittiertem Licht. Der Phasenwinkel Φ hängt bei konstanter Frequenz nur von der Relaxationszeit τ der Lumineszenz ab [48,49]:

Gleichung 2-7 $\tan(\Phi) = 2\pi\nu\tau$

Φ Phasenwinkel
 ν Modulationsfrequenz
 τ Lebensdauer

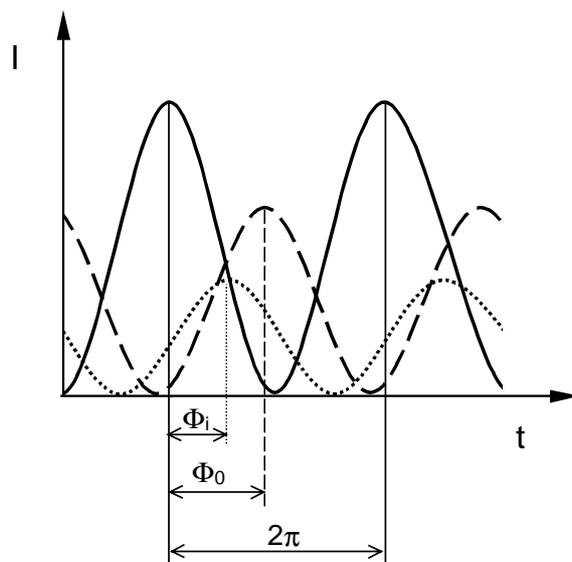


Abbildung 2-6 Phasenverschiebung zwischen Anregungs- (—) und Lumineszenzlicht (- - - bzw. · · ·).

Im ungestörten System (Lumineszenzfarbstoff im Lösemittel) stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Anregung und den verschiedenen Relaxationsvorgängen (vgl. Kapitel 2.2.1) ein, es resultiert eine mittlere Lebensdauer τ_0 , die als Phasenwinkel Φ_0 beobachtbar ist. Tritt nun durch die Anwesenheit von Löschermolekülen eine dynamische Lumineszenzlöschung auf, so verringert sich die Lebensdauer zu τ_i und in Konsequenz auch der Phasenwinkel zu Φ_i . Der Rückgang der Amplitude spiegelt die Abnahme der Lumineszenz-Intensität durch die Anwesenheit des Löschers wieder.

Das bekannteste Beispiel eines dynamischen Löschers ist Sauerstoff, der durch Stöße eine strahlungslose Rückkehr in den Grundzustand bewirken kann („collisional quenching“). Die dadurch bewirkte Lebensdauerverringerung kann analytisch zur Gehaltsbestimmung genutzt werden [50,51]. Den Zusammenhang zwischen der Lebensdauer und der Konzentration eines Löschers L beschreibt die Stern-Volmer-Gleichung [48]:

Gleichung 2-8
$$\frac{\tau_0}{\tau_i} = 1 + K_{dQ} \cdot [L]$$

τ_0	Lebensdauer ohne Löscher
τ_i	Lebensdauer mit Löscher in der Konzentration [L]
K_{dQ}	dynamische Quenchkonstante
[L]	Konzentration des Löschers

2.2.4 Resonanz-Energietransfer (RET)

Weitere analytische Methoden beruhen auf der Lebensdauer-Verringerung durch den sogenannten „Resonanz-Energietransfer“ (RET, auch Förster-Mechanismus). Kombiniert man einen Lumineszenzfarbstoff (Donor) mit einem Absorptionsfarbstoff (Akzeptor), dessen Absorptionsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt (vgl. Abbildung 2-7), so kann durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen über beträchtliche Distanzen hinweg (bis zu 10 nm) ein strahlungsloser Energietransfer stattfinden [52].

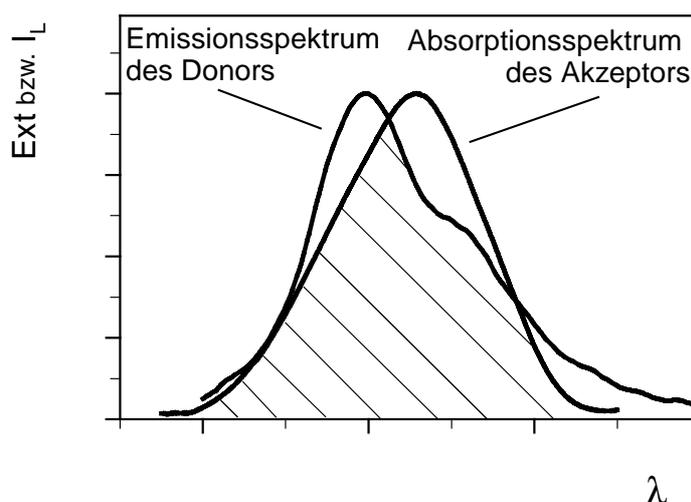


Abbildung 2-7 *Überlappung der Spektren von Donor und Akzeptor als Voraussetzung für einen RET.*

Die Effizienz des Energietransfers hängt vom Donor-Akzeptor-Abstand ab und steht nach Gleichung 2-9 in Zusammenhang mit der Lebensdauer der Lumineszenz [49].

$$\text{Gleichung 2-9} \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{\tau_i}{\tau_0}$$

E	Effizienz des Energietransfers
R_0	Förster-Abstand
r	Donor-Akzeptor-Abstand
τ_i	Lebensdauer der Donorlumineszenz im Beisein des Akzeptors
τ_0	Lebensdauer der Donorlumineszenz ohne Akzeptor

Befinden sich Donor und Akzeptor im Förster-Abstand R_0 , so beträgt die Effizienz des RET 50%. Bei größer werdenden Abständen sinkt die Effizienz wegen der r^{-6} -Abhängigkeit rapide. Der Förster-Abstand R_0 beträgt üblicherweise 2...5 nm und hängt von folgenden Parametern ab [49]:

$$\text{Gleichung 2-10} \quad R_0 = 979 \cdot (\kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi_0 \cdot J \cdot \text{mol})^{1/6} \quad \text{in nm}$$

κ	Faktor für die räumliche Orientierung der Übergangs-Dipolmomente
n	Brechungsindex des Mediums
Φ_0	Quantenausbeute des Donors ohne Akzeptor
J	Überlappungsintegral in [$\text{l} \cdot \text{cm}^3/\text{mol}$]

$$\text{Gleichung 2-11} \quad J = \int_0^{\infty} I_L(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 \quad d\lambda$$

I_L	normierte Lumineszenz-Intensität des Donors
ε	dekadischer Extinktionskoeffizient des Akzeptors in [$\text{l}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$]
λ	Wellenlänge in [cm]

Die Abstandsabhängigkeit der Transfer-Effizienz nach Gleichung 2-9 kann analytisch genutzt werden: Erhöht man die Konzentration des Akzeptors, so verringert sich der mittlere Donor-Akzeptor-Abstand r und somit die Lebensdauer der Lumineszenz. Verwendet man als Akzeptor zum Beispiel einen Absorptionsindikator, bei dem nur das Spektrum einer der protolytischen Stufen gut mit dem des Lumineszenzfarbstoffs überlappt, so kann nur diese eine Lebensdauerverkürzung der Lumineszenz durch RET bewirken. Eine Änderung des Protolysegleichgewichts, z.B. durch eine pH-Wert-Änderung, bewirkt daher auch eine Veränderung der Lebensdauer. Auf dieses Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit zurückgegriffen.

2.3 pH-Wert und -Indikatoren

2.3.1 pH-Wert

Der pH-Wert wurde 1909 von Sørensen als negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration einer Lösung definiert, heutzutage bevorzugt man die Definition über die Aktivität:

Gleichung 2-12
$$\text{pH} = -\log \frac{a(\text{H}^+)}{\text{mol/l}} \quad a(\text{H}^+): \text{Wasserstoffionenaktivität}$$

Damit ist einer der elementaren Parameter zur Beschreibung wässriger Systeme so definiert, dass er praktisch gar nicht messbar ist, da sich nur mittlere Aktivitätskoeffizienten für Ionenpaare, nicht aber einzelne Ionenaktivitäten experimentell bestimmen lassen [53]. Daher hat sich die IUPAC [54] auf eine anwendungsbezogene Definition des pH-Werts über das Potential einer Normal-Wasserstoffelektrode geeinigt.

Gleichung 2-13
$$\text{pH}(X) = \text{pH}(S) + \frac{E(S) - E(X)}{(RT/F) \cdot \ln 10}$$

X	Messlösung
S	Standard-Referenzlösung
E	elektromotorische Kraft der Zelle: Referenzelektrode KCl _{ges} X/S H ₂ Pt
R	molare Gaskonstante
T	Temperatur
F	Faraday-Konstante

Die Standard-Referenzlösung ist eine 0,05 molale Kaliumhydrogenphthalat-Lösung, zur Kalibration werden noch weitere Standards, die den pH-Bereich von 3...11 abdecken, angegeben [54].

2.3.2 pH-Indikatoren

pH-Indikatoren sind schwache Säuren bzw. Basen, deren konjugierte Base bzw. Säure eine andere Farbe besitzt [55]. Setzt man Indikatoren in geringen Konzentrationen zu einer Messlösung zu, so erhält man aus deren Farbe eine Aussage über den pH-Wert der Lösung.

Die Wirkungsweise eines Indikators wird im Folgenden am Beispiel einer Indikatorsäure HInd verdeutlicht. In Lösung dissoziiert sie wie folgt:



Das Massenwirkungsgesetz für diese Reaktion formuliert sich wie folgt:

$$\text{Gleichung 2-15} \quad K_a = \frac{a(\text{H}^+) \cdot a(\text{Ind}^-)}{a(\text{HInd})} = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{Ind}^-]}{[\text{HInd}]} \cdot \frac{f(\text{H}^+) \cdot f(\text{Ind}^-)}{f(\text{HInd})}$$

K_a Dissoziationskonstante
 a Aktivität
 $[]$ Konzentration
 f Aktivitätskoeffizient

Die Gleichgewichtslage der Protolyse wird vom pH-Wert der Lösung bestimmt. Dieser Zusammenhang wird durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben:

$$\text{Gleichung 2-16} \quad \text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{a(\text{Ind}^-)}{a(\text{HInd})} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Ind}^-]}{[\text{HInd}]} + \log \frac{f(\text{Ind}^-)}{f(\text{HInd})}$$

mit $\text{p}K_a = -\log(K_a)$

Der Umschlagspunkt eines zweifarbigen Indikators ist erreicht, wenn deprotonierte und protonierte Form in gleichen Konzentrationen vorliegen. Mit dem Auge erkennbar wird der Farbumschlag bei einem zehnfachen Überschuss einer Komponente. Dazwischen ist eine Mischfarbe zu sehen [56]. Unter der Annahme einer ideal verdünnten Lösung, bei der die Aktivitätskoeffizienten gleich 1 gesetzt werden können, ergeben sich aus Gleichung 2-16 folgende Beziehungen für den Umschlagspunkt bzw. Umschlagsbereich:

$$\text{Gleichung 2-17} \quad \text{Umschlagspunkt:} \quad \text{pH} = \text{p}K_a$$

$$\text{Gleichung 2-18} \quad \text{Umschlagsbereich:} \quad \text{pH} = \text{p}K_a \pm 1$$

In der klassischen Laboranalytik werden Indikatoren in der Regel zur Endpunktsanzeige von Säure-Base-Titrations eingesetzt, d.h. ein scharfes Umschlagen am Endpunkt der Titration ist erwünscht. Man kann Indikatoren jedoch auch zur Messung des pH-Wertes verwenden, indem man spektroskopisch die Farbänderung im Umschlagsbereich verfolgt. Für eine solche Anwendung ist der auf ca. zwei pH-Einheiten begrenzte Einsatzbereich von Nachteil. Besser geeignet sind hierfür Indikatoren, die über mehrere Dissoziationsstufen und somit einen breiteren Umschlagsbereich verfügen. Ein solches Beispiel ist der Fluoreszenzindikator Fluorescein, der für die spektralen Messungen in dieser Arbeit verwendet wurde. Für eine derartige Anwendung wird der Indikator zunächst mit Messpuffern bekannter pH-Werte durchtitriert. Trägt man die Absorptions- bzw. Fluoreszenz-Intensität über dem pH-Wert auf, erhält man eine Kalibrationskurve, welche die übliche sigmoidale Form von Titrationskurven besitzt. Für die Herstellung von pH-Sensoren wird der Indikator auf einem transparenten Untergrund immobilisiert.

Im Folgenden sind die häufigsten Fehlerquellen beim Einsatz von pH-Indikatoren aufgeführt:

1. Indikatorfehler: Der Indikator ist selbst eine Säure oder Base, und kann daher den pH-Wert in schwach gepufferten Probelösungen beeinflussen. Zur Vermeidung dieses Fehlers sollte die Lösung eine etwa hundertfach größere Pufferkapazität als der Indikator aufweisen.

2. Salzeffekt: In realen Lösungen muss die Abweichung der Aktivitäten von den Konzentrationen berücksichtigt werden. Die Aktivitätskoeffizienten hängen von der Ionenstärke ab. Diese wird von der Konzentration sowie der Wertigkeit aller ionischen Spezies in der Lösung bestimmt:

Gleichung 2-19 $I = 0,5 \cdot \sum_i [i] \cdot z_i^2$

I Ionenstärke
[i] Konzentration des Ions i
z_i Wertigkeit des Ions i

Der Zusammenhang zwischen Ionenstärke und Aktivitätskoeffizienten wird durch das Debye-Hückelsche Grenzgesetz beschrieben:

Gleichung 2-20 $\log f = -0,509 \cdot z^2 \cdot \sqrt{I}$ für Konzentrationen < 0,01 mol/l

Bei höheren Konzentrationen müssen die Aktivitätskoeffizienten experimentell bestimmt werden [39]. Da die Ladung der beiden protolytischen Stufen des Indikators ungleich ist, unterscheiden sich nach Gleichung 2-20 auch deren Aktivitätskoeffizienten. Somit ändert sich nach Gleichung Gleichung 2-16 der pH-Wert am Umschlagspunkt des Indikators in Abhängigkeit von der Ionenstärke. Für die Anwendung ergibt sich daraus die Forderung, die Ionenstärke während Kalibration und Messung konstant zu halten.

3. Proteinfehler: Geladene Makromoleküle wie z.B. Proteine können durch elektrostatische Wechselwirkungen Indikatormoleküle binden. Dadurch wird das Protolysegleichgewicht beeinflusst, und es kommt wie beim Salzeffekt zu einer Verschiebung der Titrationskurve. Abhilfe kann man schaffen, indem man für die Kalibration eine an die Probe angepasste Lösungs-Matrix verwendet.

2.4 Optoden auf der Basis von Ionophoren

2.4.1 Einführung

In Kapitel 2.1.4 wurden bereits Optoden erwähnt, die auf der molekularen Erkennung durch Komplexbildner ohne optische Eigenschaften beruhen. Die Erkennungsreaktion wird mit der Protolyse eines Absorptions- bzw. Fluoreszenzindikators gekoppelt, dessen optische Eigenschaften sich dadurch ändern. In der Literatur wird der Farbindikator als „Chromoionophor“, der Komplexbildner als „Ionophor“ für die entsprechende Ionenart bezeichnet [57]. Beide Stoffe sind lipophil und werden in einer ebenfalls lipophilen, stark weichgemachten Membran (meist PVC oder einem Copolymer des PVC) gelöst. Bei dieser Art von Sensoren beruht die Immobilisierung allein auf dem Polaritätsunterschied zwischen lipophiler Rezeptormembran und wässriger Messlösung. Eine kovalente Anbindung der funktionellen Membranbestandteile ist nicht erforderlich, was die Herstellung solcher Sensoren einfach und kostengünstig macht.

Durch den hohen Weichmacheranteil (66% der Gesamtmasse) können Ionen aus der Messlösung in die Membran hineindiffundieren. Die Reaktionen finden also nicht nur an der Oberfläche, sondern in der gesamten Tiefe der Membranschicht statt. Die Kopplung der beiden Reaktionen (molekulare Erkennung und Protolyse) ist durch die Elektroneutralitätsbedingung gegeben. Es gibt zwei prinzipielle Möglichkeiten der Reaktion: Bei Verwendung von kationenselektiven Ionophoren werden Kationen, also positive Ladungen aus der Lösung in die Membran aufgenommen. Die Ladungsausgleichsreaktion des Chromoionophors ist in diesem Fall eine Deprotonierung, wobei das Proton in die Messlösung abgegeben wird. Formal findet in der Membran also ein Ionenaustausch statt. Bei Verwendung von anionen-selektiven Ionophoren erfolgt der Ladungsausgleich in der Membran durch eine Protonierung des Chromoionophors, es läuft also eine Coextraktion von Anionen und Protonen aus der Lösung ab.

Diese Art von Optoden reagiert folglich sowohl auf eine Änderung der Protonen- als auch der Ionenkonzentration. Hält man erstere durch Pufferung auf einen bestimmten pH-Wert konstant, so sind die Gleichgewichte in der Membran und somit das optische Signal nur noch von der Ionenkonzentration abhängig.

Derartige Sensoren unter Verwendung von Absorptionsfarbstoffen wurden in der Arbeitsgruppe um W. Simon (ETH Zürich) theoretisch beschrieben [58-61] und für eine Vielzahl von Analyten entwickelt (z.B. Nitrat [62,63], Ammoniak [64], Chlorid [65], Calcium [66], Kalium und Natrium [30,67,68]).

Dieses Sensorprinzip lässt sich auf die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen übertragen [32], ebenso auf die Anwendung für Bioanalyte [69], und auch miniaturisieren [70-72].

Die vorgenannten Sensoren basieren auf Intensitäts-Messungen. Eine Ausweitung auf Verwendung der Lumineszenz-Lebensdauer als Messgröße ist ebenfalls möglich [34,35].

In den folgenden Abschnitten wird kurz die Wirkungsweise der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sensoren erläutert.

2.4.2 Kationenbestimmung durch Ionenaustausch

Das Sensorprinzip basiert auf einem gekoppelten Austausch von Kationen gegen Protonen in der Rezeptorschicht. Dieser Austausch wird über einen in der Schicht immobilisierten pH-Indikator verfolgt, der in Abhängigkeit vom Protolysegrad seine spektralen Eigenschaften ändert. Für die folgenden Betrachtungen wurden einwertige Metallionen sowie ein elektrisch neutraler Komplexbildner und Fluoreszenzindikator angenommen, wie es bei dem in Kapitel 4 beschriebenen Kalium-Sensor der Fall ist.

Als funktionelle Bestandteile enthält die Membran einen lipophilen, elektrisch neutralen Komplexbildner (K) für eine spezifische Metallionenart (Me^+) und einen elektrisch neutralen, sauer reagierenden Fluoreszenzindikator (HFI). Enthält die an die Membran angrenzende Messlösung die entsprechenden Metallionen, so diffundieren diese in die Membranschicht hinein und werden dort komplexiert (siehe Abbildung 2-8). Es resultiert ein positiv geladener Komplex KMe^+ . Zum Ladungsausgleich der Membran gibt der Fluoreszenzfarbstoff ein Proton ab, das in die Messlösung hinausdiffundiert.

Um die Aufnahme der Metallionen in die Membran zu erleichtern, enthält sie noch einen sog. „Phasentransferkatalysator“, der an der Reaktion selbst nicht beteiligt ist.

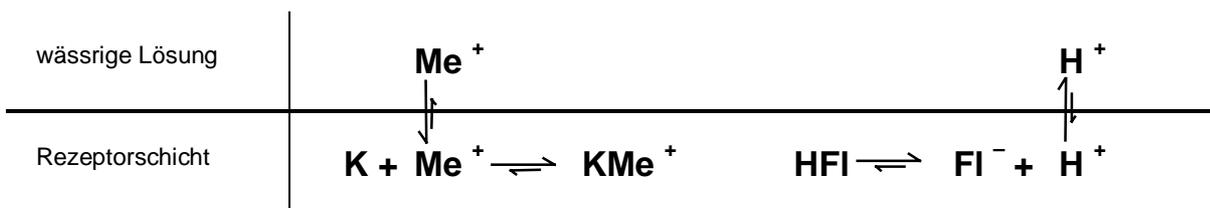


Abbildung 2-8 Ionenaustausch zwischen Metallkationen und Protonen.

Es liegen folglich vier Gleichgewichtsreaktionen vor: Die beiden Verteilungsgleichgewichte von Protonen bzw. Kationen zwischen Messlösung und Membran sowie die Komplexierung und die Protolyse in der Membran. Die Nettoreaktion ist ein Ionenaustausch:



Das Massenwirkungsgesetz für diese Reaktion formuliert sich wie folgt:

$$\text{Gleichung 2-22} \quad K_{\text{exch}} = \frac{a(\text{KMe}^+) \cdot a(\text{FI}^-) \cdot a(\text{H}^+)}{a(\text{Me}^+) \cdot a(\text{K}) \cdot a(\text{HFI})}$$

Es lässt sich folgendermaßen nach den Einflussgrößen der Messlösung umformulieren:

$$\text{Gleichung 2-23} \quad \text{pH} - \text{pMe} = \text{pK}_{\text{exch}} + \log \frac{a(\text{KMe}^+)}{a(\text{K})} + \log \frac{a(\text{FI}^-)}{a(\text{HFI})}$$

$$\text{mit} \quad \text{pMe} = -\log \frac{a(\text{Me}^+)}{\text{mol/l}} \quad \text{und} \quad \text{pK}_{\text{exch}} = -\log K_{\text{exch}}$$

Messtechnisch zugänglich ist der Quotient aus deprotonierter und protonierter Form des Chromoionophors über die Fluoreszenz-Intensität bzw. -Lebensdauer. In dieser Arbeit wurde zur spektralen Auswertung ein Fluorescein-Derivat verwendet, dessen Fluoreszenz-Intensität mit zunehmender Deprotonierung steigt. Die schematische Darstellung in Abbildung 2-9 a bezieht sich auf ein solches Verhalten, es gibt jedoch auch Chromoionophore, deren Intensität mit steigendem pH-Wert abnimmt.

Bei konstanter Metallionenkonzentration ist der Protolysegrad bzw. das Messsignal des Sensors nur noch abhängig von der Protonenkonzentration. Die Titrationskurven der pH-Messung sind je nach Metallionenkonzentration gegeneinander verschoben (s. Abbildung 2-9 a). Zur Charakterisierung eines kationensensitiven Sensors nimmt man daher zunächst die pH-Titrationskurven ohne Analyt und mit Analyt in der Sättigungskonzentration des Sensors auf. Aus dem Vergleich beider Kurven lässt sich vorhersagen, bei welchem pH-Wert die größte Signaländerung bei einer Ionen-Messung zu erwarten ist. Ionen-Messungen lassen sich mit solchen Sensoren in der Regel nur im Bereich von ± 1 pH-Einheit um den optimalen pH-Wert durchführen.

Hält man hingegen die Protonenkonzentration der Messlösung durch Pufferung konstant, so ist das Messsignal nur noch abhängig von der Metallionenkonzentration und man erhält einen den pH-Titrationskurven analogen Kurvenverlauf (s. Abbildung 2-9 b). Die Lage des Wendepunkts und die Breite des dynamischen Messbereichs hängen dabei entscheidend von der Art des verwendeten Komplexbildners ab.

Dieses Sensorprinzip bietet den Vorteil, dass man im Grunde jeden lipophilen Fluoreszenzfarbstoff mit jedem lipophilen Komplexbildner kombinieren und so gezielt die Sensor-Eigenschaften (gewünschter pMe-Messbereich bei einem bestimmten pH-Wert) beeinflussen kann. Hierzu ist jedoch eine genaue Abstimmung aller funktionellen Sensorkomponenten nötig.

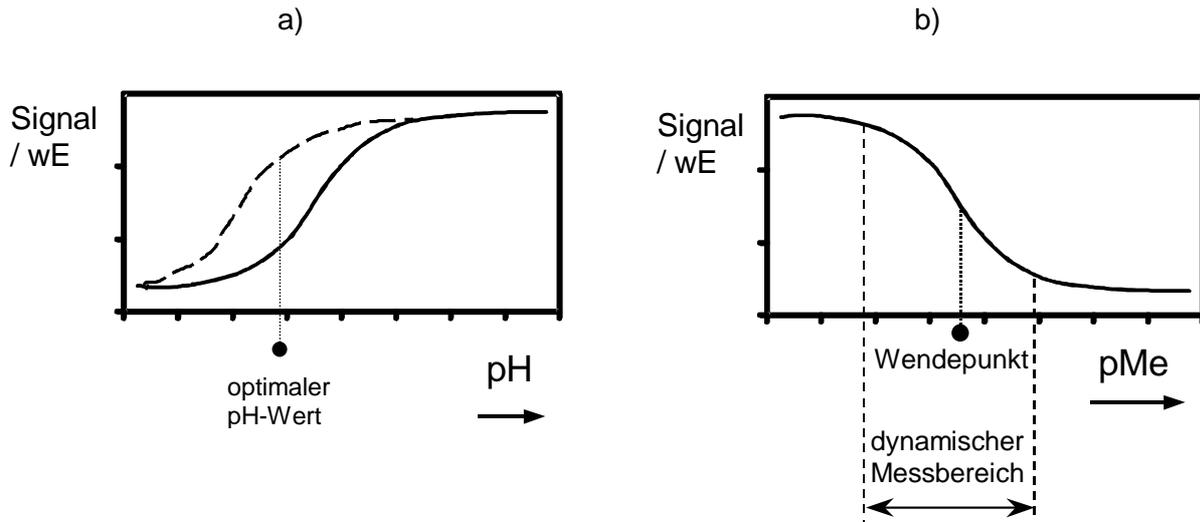


Abbildung 2-9 Verlauf des Sensorsignals. a) Bei konstanter Metallionenkonzentration [analytfrei (—); mit Analyt gesättigt (- - -)]. b) Bei konstantem pH-Wert.

2.4.3 Anionenbestimmung durch Koextraktion

Für den in dieser Arbeit hergestellten Chlorid-Sensor wurde ein lipophiler, positiv geladener Chlorid-Ionophor I^+ und ein zweifach negativ geladener Absorptionsfarbstoff Abs^{2-} verwendet. Befinden sich Chlorid-Anionen A^- in der Lösung, so diffundieren diese in die Membran hinein und werden dort vom Ionophor gebunden. Die Ladungsausgleichsreaktion des Chromoionophors ist eine Protonierung, es findet also eine Koextraktion von Chloridionen und Protonen in die Rezeptorschicht statt (siehe Abbildung 2-10).

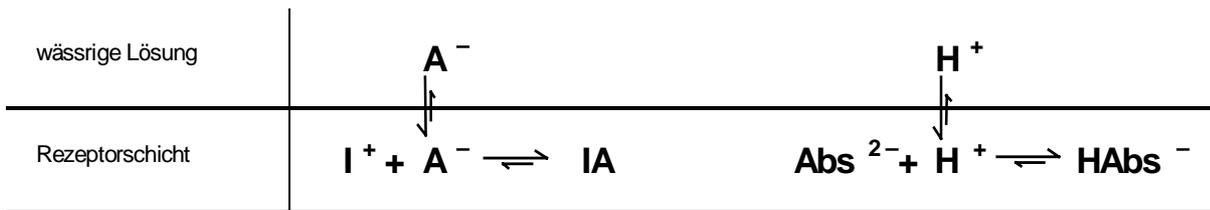


Abbildung 2-10 Koextraktion von Anionen und Protonen in die Sensormembran.

Die Nettoreaktion, das Massenwirkungsgesetz und dessen Umformung nach den Einflussparametern pH und pA-Wert formulieren sich wie folgt:

Gleichung 2-24

$$A^-_{aq} + I^+_{memb} + Abs^{2-}_{memb} + H^+_{aq} \xrightleftharpoons{K_{coex}} IA_{memb} + HAbs^-_{memb}$$

K_{coex} Koextraktionskonstante

$$\text{Gleichung 2-25} \quad K_{\text{coex}} = \frac{a(\text{IA}) \cdot a(\text{HAbs}^-)}{a(\text{A}^-) \cdot a(\text{I}^+) \cdot a(\text{Abs}^{2-}) \cdot a(\text{H}^+)}$$

$$\text{Gleichung 2-26} \quad \text{pH} + \text{pA} = -\text{pK}_{\text{coex}} + \log \frac{a(\text{I}^+)}{a(\text{IA})} + \log \frac{a(\text{Abs}^{2-})}{a(\text{HAbs}^-)}$$

$$\text{mit} \quad \text{pA} = -\log \frac{a(\text{A}^-)}{\text{mol/l}} \quad \text{und} \quad \text{pK}_{\text{coex}} = -\log K_{\text{coex}}$$

Optisch zugänglich ist der Quotient der beiden Protolysestufen des Absorptionsfarbstoffs über die Lebensdauerverkürzung, die dessen deprotonierte Form bei dem Lumineszenzfarbstoff bewirkt. Hält man den pH-Wert der Lösung konstant, so ist das Sensorsignal nur noch von der Anionenkonzentration abhängig und man erhält bei der Beprobung des Sensors mit dem Analyten einen sigmoidalen Signalkurvenverlauf.

2.5 Verwendete Substanzen

2.5.1 Polymer-Matrices

2.5.1.1 Weichgemachtes Polyvinylchlorid (PVC)

Hart-PVC besitzt eine hohe Beständigkeit gegen Wasser, Säuren, Laugen, Alkohole, Benzine u. Öle und eine ausgezeichnete mechanische Festigkeit [73]. Für die Verwendung als Matrix chemischer Sensoren muss das PVC daher weichgemacht werden, bei den in dieser Arbeit hergestellten Optoden sind Weichmacheranteile von 66% üblich [57]. Die Eigenschaften der Membran (z.B. Polarität, Viskosität) werden dann hauptsächlich durch den Weichmacher bestimmt. Das PVC dient lediglich als Gerüstpolymer, das als im Weichmacher gelöst zu betrachten ist. Die einzelnen Polymerketten bilden dabei statistische Knäuel aus, die sich gegenseitig durchdringen (sog. „Spaghetti-Struktur“), woraus die Festigkeit der Membranen resultiert [74].

Die funktionellen Membran-Inhaltsstoffe liegen quasi gelöst im Weichmacher vor; bestimmend für ihre Stabilität gegen einen Austrag in die wässrige Lösung ist demnach die Polarität des Weichmachers neben der des Gerüstpolymers. Tragen sie lange, unpolare Ketten, die ebenfalls Knäuel ausbilden können, so kommt es zu einer zusätzlichen Stabilisierung durch gegenseitige Durchdringung mit dem Polymer. Die Art des Weichmachers bestimmt ganz entscheidend die Eigenschaften der Rezeptormembran: Die Diffusionsrate der Analyten in der Membran bestimmt die Ansprechzeit des Sensors, die

Verteilungsgleichgewichte der Analyten zwischen wässriger und organischer Phase beeinflussen die Selektivität und den dynamischen Messbereich des Sensors [57].

Analoge Betrachtungen gelten für die Membranen aus weichgemachten Copolymeren des PVC, z.B. dem in dieser Arbeit verwendeten PVC-OH.

2.5.1.2 Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat (PolyHEMA)

PolyHEMA ist ein organisches Hydrogel, also ein hydrophiles, wasserhaltiges, aber wasserunlösliches Polymer, das als dreidimensionales Netzwerk vorliegt. Die dreidimensionale Vernetzung der linearen Kette erfolgt hierbei durch Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken. Ein Ausschnitt der Strukturformel von PolyHEMA ist in Abbildung 2-11 gezeigt.

Als Polyacrylat besitzt PolyHEMA eine hohe chemische Stabilität gegen saure Hydrolyse [75]. Im Gegensatz zu anderen Polyacrylaten ist PolyHEMA jedoch ein weiches, formbares Gel. In Wasser quillt PolyHEMA ohne Festigkeitsverlust auf, es kann sein Volumen um bis zu 40 % vergrößern [76]. In der analytischen Chemie werden Hydrogele zum Beispiel als Elektrophorese-Gele oder als Matrices für Rezeptormembranen von optochemischen Sensoren verwendet [46]. Die Reaktionen in einer PolyHEMA-Membran, wie sie für diese Arbeit verwendet wurde, laufen also quasi in wässriger Lösung ab.

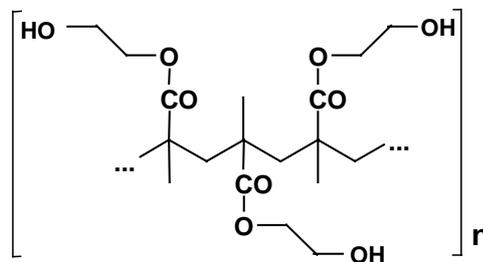


Abbildung 2-11 Struktur von PolyHEMA.

2.5.2 Farbstoffe

2.5.2.1 Allgemeine Kriterien für die Lumineszenz von Stoffen

Damit ein Stoff lumineszieren kann, muss er folgenden Bedingungen genügen [43]:

- ☞ er muss einen hohen Extinktionskoeffizienten besitzen,
- ☞ die Anregungsenergie darf nicht zur Photodissoziation führen und
- ☞ er muss ein möglichst starres Gerüst besitzen und keine strukturellen Einheiten oder funktionellen Gruppen, die strahlungslose Übergänge begünstigen.

Bei organischen Molekülen ist daher (mit wenigen Ausnahmen) ein ausgedehntes π -Elektronensystem die Voraussetzung für eine Lumineszenz. Die elektronischen Übergänge sind meistens $\pi \rightarrow \pi^*$ oder $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge. Aromaten zeigen in vielen Fällen eine sehr intensive Fluoreszenz, und zwar um so stärker, je ausgedehnter das π -Elektronensystem ist. Substituenten am aromatischen Kern beeinflussen die Fluoreszenz-Intensität stark, sie wird z.B. von Halogenatomen oder Carboxygruppen geschwächt, von Aminogruppen verstärkt und bleibt von Sulfonsäuregruppen unberührt. Heteroatome, vor allem Stickstoff, begünstigen das Auftreten von Phosphoreszenz anstelle der Fluoreszenz [43,77].

Auch viele (Schwer-) Metall-Chelat-Komplexe lumineszieren. Dabei finden entweder $d \rightarrow d^*$ -Übergänge im Zentralatom oder bei Charge-Transfer-Komplexen $d \rightarrow \pi^*$ -Übergänge zwischen Zentralatom und Liganden statt [78].

2.5.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe für die Spektrale Referenzierung

Messfarbstoff: Chromoionophor VI (4',5'-Dibrom-fluorescein-octadecylester)

Fluorescein ist der bekannteste Xanthen-Farbstoff. Wegen seiner ausgeprägten grünen Fluoreszenz wird er als Markierungssubstanz für biochemische Substrate und wegen seiner biologischen Abbaubarkeit auch zum Färben von Seifen und Badezusätzen verwendet [73]. Durch Halogenierung verschiebt sich die Wellenlänge der Fluoreszenz. So wird zum Beispiel Eosin (2',4',5',7'-Tetrabrom-fluorescein) zur Herstellung roter Tinte eingesetzt [79]. Die Fluoreszenz-Intensität des Fluoresceins ist pH-abhängig und nimmt von sauren zu alkalischen pH-Werten zu, weswegen es ein weit verbreiteter pH-Indikator ist. Die unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensitäten werden auf verschiedene protolytische Stufen des Fluoresceins zurückgeführt [80].

Für die Verwendung in organischen Lösungen oder Membranen werden lipophilisierte Fluorescein-Derivate eingesetzt, bei denen die Carboxyl-Gruppe des Fluoresceins mit einem unpolaren Rest verestert ist. Daher besitzen lipophilisierte Fluoresceine eine Protolysestufe weniger als das Fluorescein selbst. Dennoch wird auch bei ihnen der für Fluorescein typische breite Umschlagsbereich beobachtet. Martin und Lindqvist führten diese Beobachtung darauf zurück, dass die Carboxylgruppe ohnehin nicht mit der absorbierenden Xanthen-Einheit konjugiert ist, deren Protolyse also auch nicht für die Bildung einer anderen Fluoreszenzspezies verantwortlich ist [80]. Für die vorliegende Arbeit wurde 4',5'-Dibrom-fluorescein-octadecylester verwendet. Nach [80] ergeben sich für dieses Molekül drei protolytische Formen, die in Abbildung 2-12 wiedergegeben sind.

Die Säurekonstanten lipophiler Stoffe lassen sich in wässriger Lösung nicht bestimmen. Als groben Vergleich kann man die pK_a -Werte für das wasserlösliche decarboxylierte Fluorescein (6-hydroxy-9-phenyl-fluoron) heranziehen, das ebenfalls drei protolytische

Formen besitzt. Die pK_a -Werte für die Protolyse der kationischen bzw. neutralen Form liegen bei 3,1 bzw. 6,3 [80].

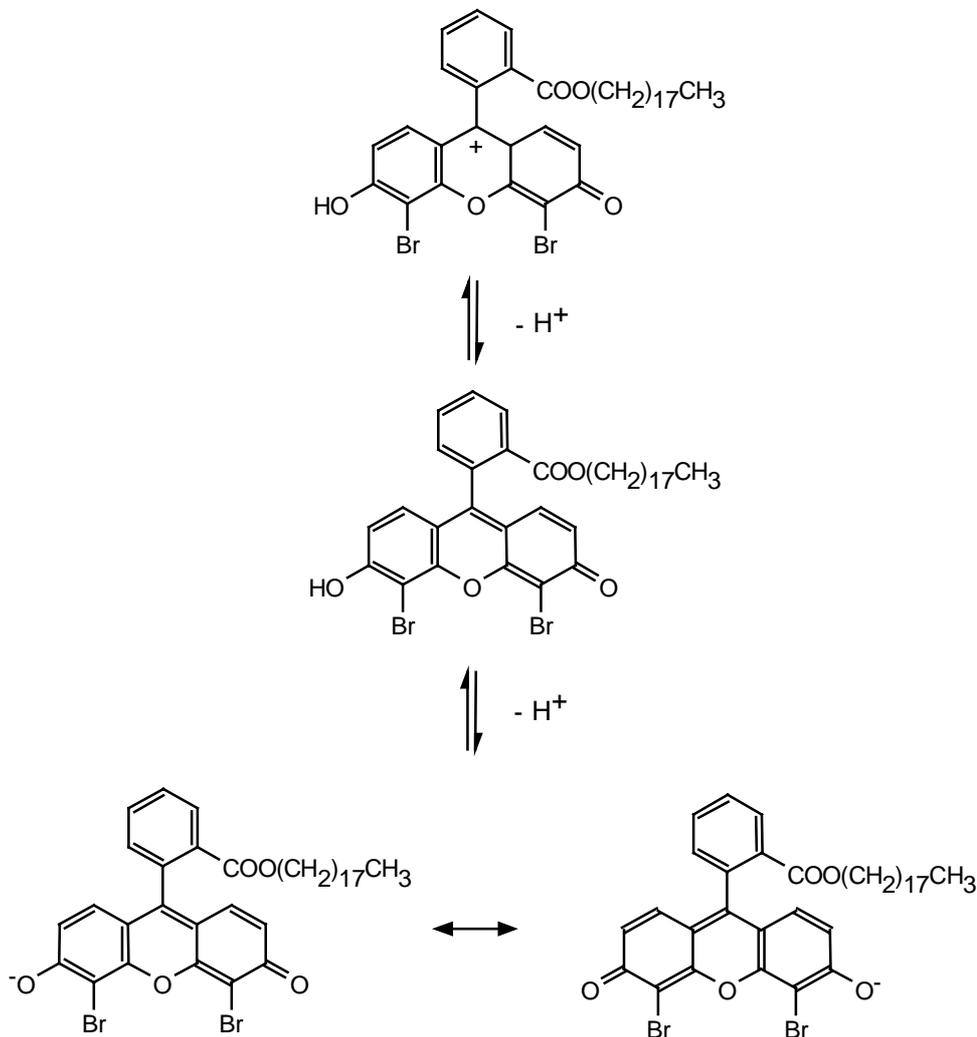


Abbildung 2-12 Protolysestufen von Chromoionophor VI (in Anlehnung an [80]).

Referenzfarbstoffe

Als Referenzfarbstoffe für die spektralen Messungen wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Nilrot, Rhodamin B-octadecylester-perchlorat, Texas Red-dodecylamin und ein Porphyrin getestet. Allen gemeinsam ist der lipophile Charakter, eine intensive Lumineszenz und eine gute Photostabilität. Die Strukturformeln sind in Abbildung 2-13 dargestellt, in der Legende stehen nach den Namen in Klammern noch die Farbstoff-Klassen, die sich auf das jeweilige Grundgerüst beziehen.

Wegen ihres ausgedehnten π -Elektronensystems und ihres starren Gerüsts zeigen Azine wie das Oxazin *Nilrot* eine intensive Fluoreszenz [79]. Nilrot wird wegen seiner guten Fettlöslichkeit zum Beispiel bei der Mikroskopie lebender Zellen zum Färben von

Lipidkügelchen im Cytoplasma [81] oder zur Sichtbarmachung von Fetten in der Dünnschichtchromatographie [82] verwendet. Wegen seiner guten Photostabilität dient es weiterhin als Laserfarbstoff [79].

Rhodamine und Sulforhodamine (Texas Red) besitzen eine intensive rote Fluoreszenz und werden zum Färben von Tinte, Papier, Kunststoffen und Wolle, wegen ihrer guten Quantenausbeute und Photostabilität auch als Laserfarbstoffe verwendet [79,83]. Da diese Farbstoffe wasserlöslich sind, wurden für die vorliegende Arbeit lipophilisierte Derivate verwendet, bei denen die Carbonsäure- bzw. Sulfonsäuregruppen unpolare Reste tragen.

Porphyrine besitzen als strukturgebendes Element einen Tetrapyrrol-Ring, der die Stammverbindung der Atmungspigmente in Pflanzen (Chlorophyll) und Tieren (Häm) ist [73]. Sie bilden mit nahezu allen Schwermetallionen Komplexe aus und werden daher intensiv zur Schwermetall-Analytik genutzt. Wegen der Stickstoff-Heteroatome zeigen Porphyrine neben der Fluoreszenz noch Phosphoreszenz [84,85].

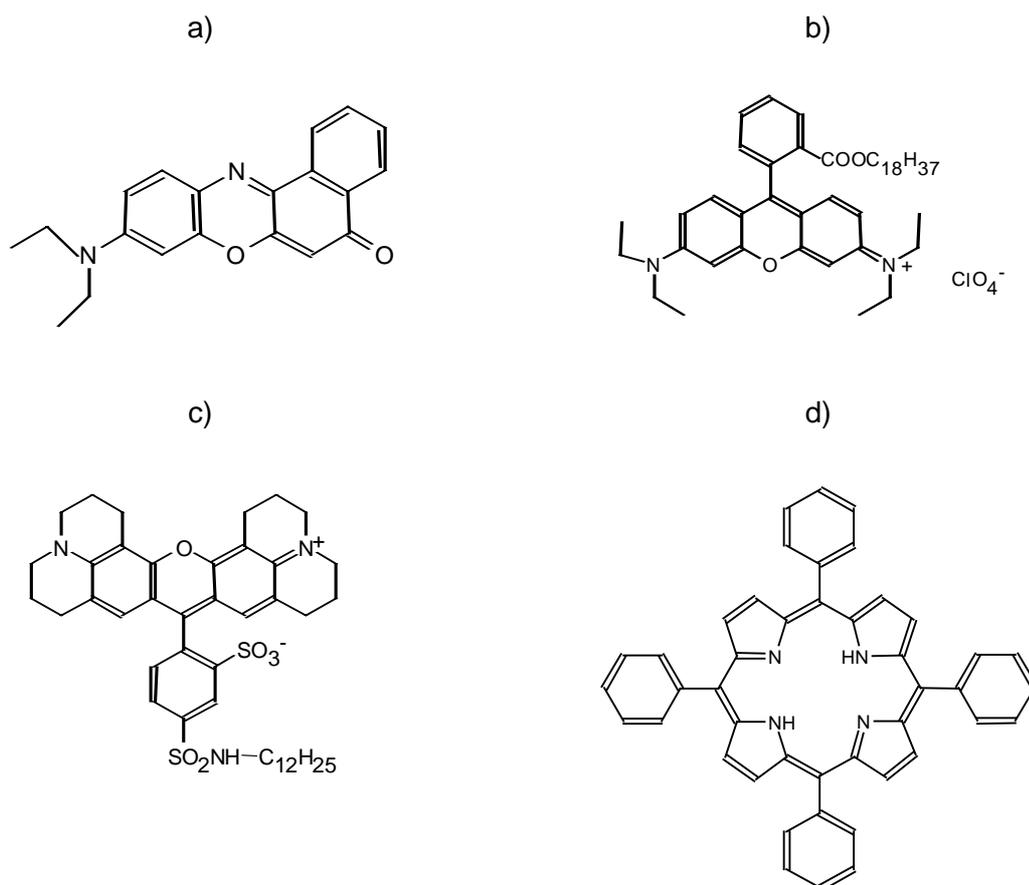


Abbildung 2-13

Strukturformeln der Referenzfarbstoffe. a) Nilrot (Oxazin). b) Rhodamin B-octadecylester-perchlorat (Aminoxanthen). c) Texas Red-dodecylamin (Aminoxanthen). d) 5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphin (Porphyrin).

2.5.2.3 Donor-Akzeptor-Ionenpaare für die Lebensdauer-Messungen

Ruthenium(II)-Komplexe

Ru^{2+} -Ionen bilden mit Liganden wie z.B. Derivaten des 2,2'-Bipyridins oder 1,10-Phenanthrolin oktaedrische Komplexe, die lumineszieren [78]. Diese besitzen eine $[\text{Kr}]4d^6$ -Elektronenkonfiguration. Die Absorptions- und Lumineszenzbanden werden in der Literatur als charge-transfer-Banden angesehen [86]. Die Halbwertszeiten der Lumineszenz dieser Komplexe liegen in der Größenordnung von $1 \mu\text{s}$. Sie sind damit länger, als man bei spinerlaubten Übergängen normalerweise beobachtet, und kürzer, als bei spinverbotenen Übergängen zu erwarten wäre [87]. Im Allgemeinen wird die Lumineszenz als Phosphoreszenz angesehen. Lytle und Hercules erklären deren extrem kurze Lebensdauer mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Singulett-Triplett-Übergangs durch Spin-Bahn-Kopplung im Komplex [88]. Die Strukturformeln der beiden verwendeten Komplexe sind in Abbildung 2-14 dargestellt.

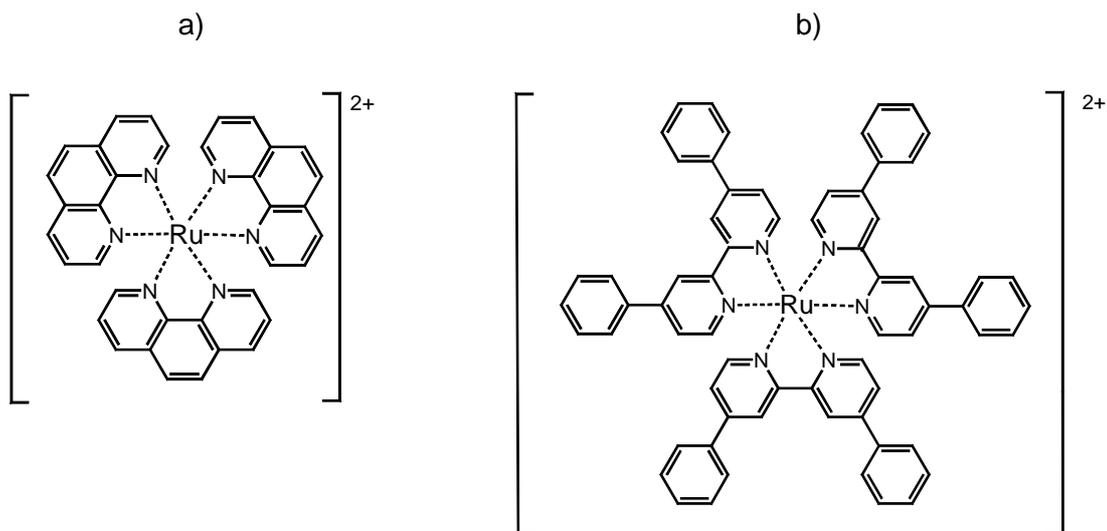


Abbildung 2-14 Strukturformeln von Ruthenium-phenanthrolin $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (a) und Ruthenium-diphenyl-dipyridyl $[\text{Ru}(\text{didipy})_3]^{2+}$ (b).

Bromthymolblau (BTB)

Bromthymolblau zählt zu den Sulfonylphthaleinen. Diese besitzen drei protolytische Formen und werden wegen ihrer scharfen Umschlagspunkte häufig als Absorptionsindikatoren eingesetzt [79]. Beim BTB ist die neutrale Form rot, das Monoanion gelb und das Dianion blau. Der pK_a -Wert für die zweite Protolyse des BTB beträgt 7,0, der Umschlagsbereich liegt bei $\text{pH} = 6,0 \dots 7,6$ [56]. Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit der neutralen Form kann die erste Protolyse in wässriger Lösung nicht beobachtet werden, beim verwandten Thymolblau

liegt der Umschlagsbereich bei $\text{pH} = 1,2 \dots 2,8$. Die mesomeren Grenzstrukturen des BTB für die einzelnen protolytischen Formen sind in Abbildung 2-15 dargestellt.

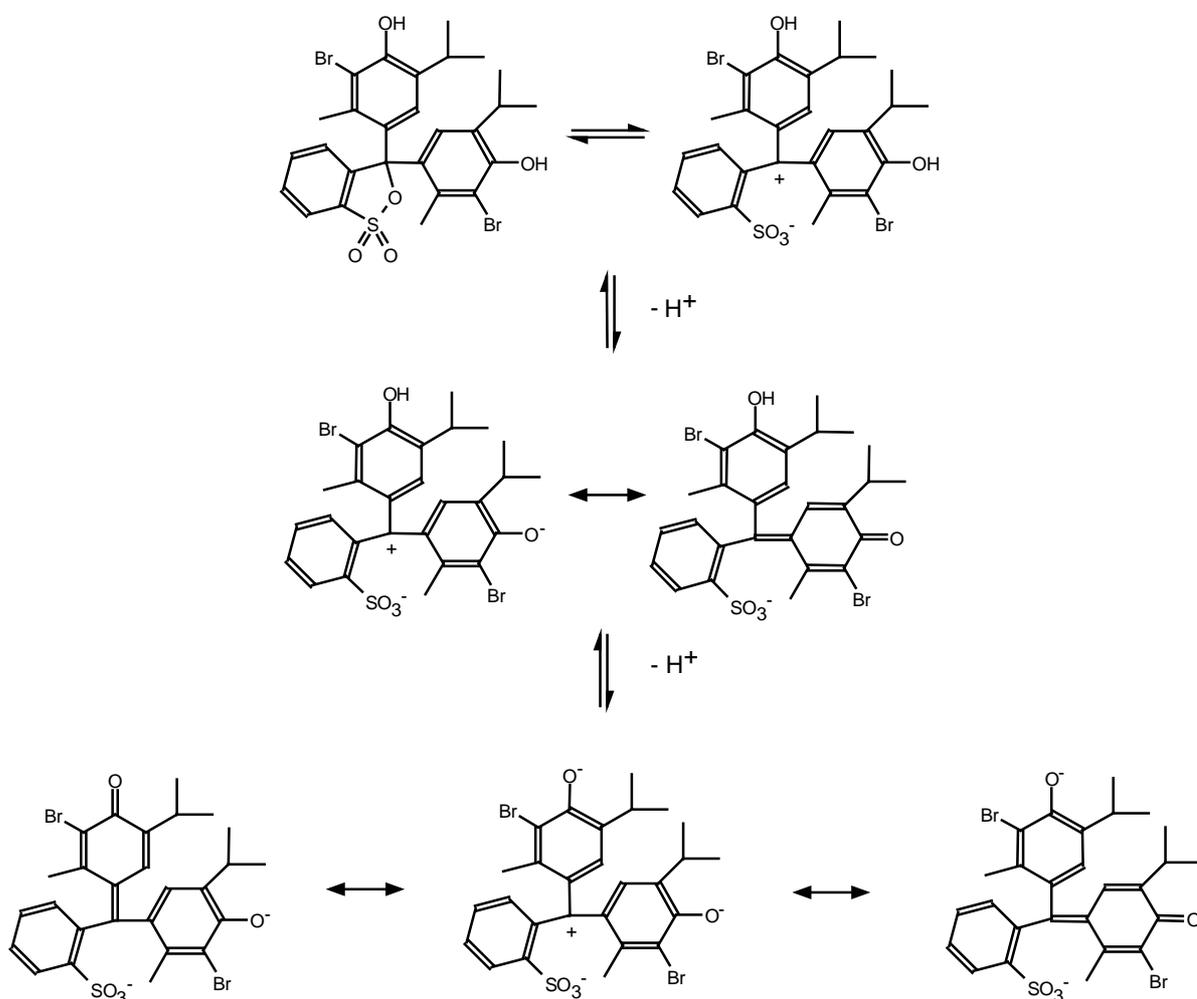


Abbildung 2-15 Protolysestufen des BTB (in Anlehnung an [79]).

Zur Immobilisierung können die beiden Farbstoffe (Ruthenium-Komplex und BTB) als gemeinsames Ionenpaar in die Rezeptorschicht eingebracht werden. Dabei reagieren je zwei Monoanionen des BTB mit einem Ruthenium(II)-Komplex zu einem wasserunlöslichen Ionenpaar $\text{Ru}(\text{Ligand})_3\text{BTB}_2$. Bei Beprobung des Sensors mit steigenden pH-Werten tritt eine weitere Protolyse zum Dianion auf, dessen Absorptionsspektrum mit dem Emissionsspektrum des Ruthenium-Komplexes überlappt. Mit steigendem pH-Wert steigt bei diesen Ionenpaaren folglich der strahlungslose Resonanz-Energietransfer, d.h. die Lebensdauer der Phosphoreszenz sinkt (vgl. Kapitel 2.2.4).

2.5.3 Ionophore

2.5.3.1 Kalium-Ionophor: Valinomycin

Zur Komplexierung von Metallkationen wurden zahlreiche Kronenether, Aza-Kronen und Kryptanden synthetisiert, einige wurden speziell für Kaliumionen entwickelt [31,89-91].

Jedoch ist gerade für Kaliumionen der natürlich vorkommende Komplexbildner Valinomycin bezüglich seiner Selektivität unübertroffen. Er findet häufige Anwendung für ionenselektive Elektroden, in neuerer Zeit auch für Optoden [92]. Valinomycin wird von einigen Mikroorganismen synthetisiert und stellt ein starkes Gift dar. Es wirkt als Transportantibiotikum, indem es Zellmembranen für Kaliumionen durchlässig macht, wodurch der Ionenhaushalt dieser Zellen bzw. Zellorganellen gestört wird [93].

Valinomycin ist ein cyclisches Depsipeptid, d.h. es enthält sowohl Ester- als auch Peptidbindungen, aus D-Hydroxyisovalerat, D-Valin, L-Lactat und L-Valin (siehe Abbildung 2-16 a).

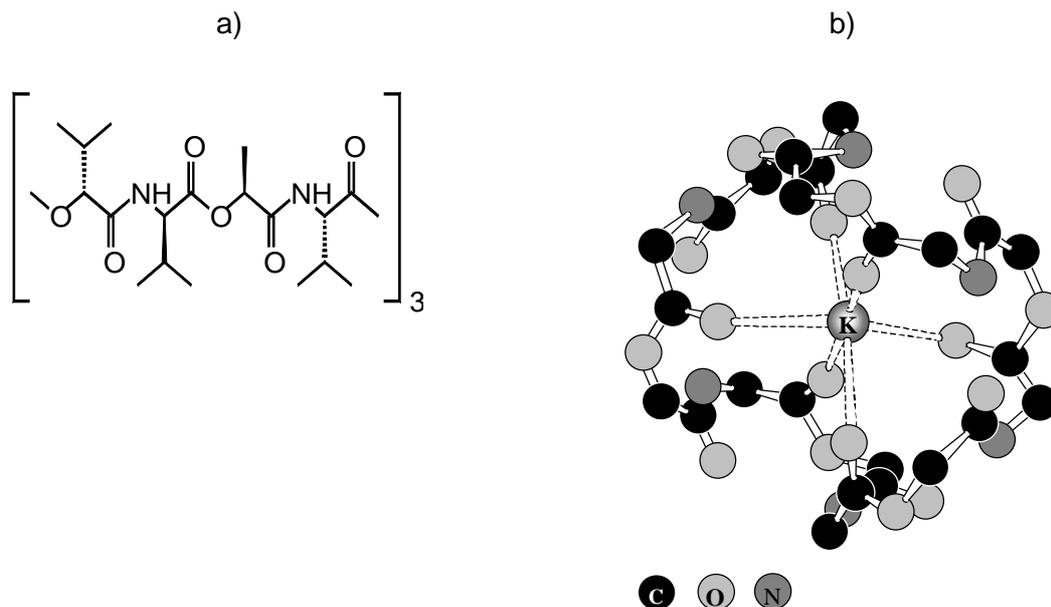


Abbildung 2-16 Valinomycin. a) Strukturformel. b) Struktur des Kalium-Komplexes (nach Stryer [93]).

Die Struktur des Kalium-Komplexes von Valinomycin zeigt, dass das Kaliumion von den Carbonylgruppen der sechs Valin-Reste oktaedrisch koordiniert ist. Das cyclische, durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisierte Valinomycin-Rückgrat ist zickzackförmig um das Zentralatom angeordnet. Die Methyl- und Isopropylseitenketten weisen zur Außenseite des Rings und verleihen dem Komplex eine hydrophobe Außenseite (vgl. Abbildung 2-16 b). Dadurch wird dieser in unpolaren Lösemitteln löslich. Kalium- (Ionenradius 133 pm) und

Rubidium-Ionen (149 pm) passen optimal in die Koordinationslücke des Valinomycins. Da Rubidium in den meisten Lösungen nicht enthalten ist, stört diese Querempfindlichkeit nicht. Für Natrium-Ionen (95 pm) ist die Lücke jedoch zu groß, wodurch eine 10000-fach höhere Affinität für Kalium als für Natrium resultiert. Kein anderer Komplexbildner unterscheidet so genau zwischen Kalium und Natrium [94]. Da Natrium allgegenwärtig und somit ein kritischer Störfaktor bei Kalium-Messungen ist, wurde in dieser Arbeit auf Valinomycin zurückgegriffen.

2.5.3.2 Chlorid-Ionophor: Tridodecylmethylammoniumchlorid

Für Anionen gibt es nur sehr wenige selektive Ionophore, daher muss eine andere Strategie angewandt werden. Man verwendet als Ionophore meist Kationen, die unselektiv die Aufnahme von Anionen aus der Messlösung in die Membran begünstigen. Die Verteilung unterschiedlicher Anionen zwischen der wässrigen und organischen Phase hängt von deren lipophilen Charakter bzw. von der Hydratisierungsenergie der Anionen ab. Je größer und schwächer geladen ein Anion ist, desto besser wird es demnach in die Membran aufgenommen [62]. Es handelt sich also um eine Art kompetitive flüssig-flüssig-Extraktion. Die genaue Reihenfolge der Selektivität hängt sowohl von dem verwendeten Ionophor als auch vom Weichmacher (und weiteren Membranbestandteilen) ab, in groben Zügen folgt sie aber den Hofmeisterschen Reihen (lyotropen Reihen), die jener für das Ausflockungsvermögen von Anionen (und Kationen) für Proteine aufgestellt hat [72].

In dieser Arbeit wurde Tridodecylmethylammoniumchlorid (TDMACl) als Ionophor verwendet. Bei Kontakt mit wässriger Lösung dissoziiert es zu TDMA⁺ und Chloridionen. TDMA⁺ ist ein kationisches Tensid, das aus einem polaren Kopf (dem quartären Amin) und drei langen, lipophilen Resten besteht. TDMACl wurde bereits vielfach für chloridionenselektive Elektroden und Optoden eingesetzt. Seine Selektivität wurde für verschiedene Membranzusammensetzungen untersucht. Für mit DOS weichgemachtes PVC, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, fand man folgende Reihenfolge [95]:



Aus dieser Reihenfolge ist abzulesen, dass es eine Vielzahl von Anionen gibt, auf die ein Sensor mit TDMACl als Ionophor selektiver reagiert als auf Chlorid. Da diese jedoch in biologischen Systemen in der Regel nicht vorkommen, ist ein solcher Sensor durchaus für Messungen in physiologischen Flüssigkeiten einsetzbar [96,97].

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Chemikalien und Reagenzien

3.1.1 Rezeptorschichten - *Spektrale Referenzierung*

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Polymer

Copolymer aus 91% Vinylchlorid, 3% Vinylacetat und 6% Vinylalkohol [Fluka]

Weichmacher

2-Nitrophenyl-octylether (NPOE) [Fluka]

Sebacinsäure-bis-2-ethylhexylester (Dioctylsebacat - DOS) [Fluka]

Chromoionophor

Chromoionophor VI (4',5'-Dibrom-fluorescein-octadecylester) [Fluka]

Ionophor

Kalium-Ionophor I (Valinomycin) [Fluka]

Referenzfarbstoffe

Nilrot (9-(Diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-on) [Aldrich]

5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphin (Porphyrin) [Aldrich]

Rhodamin B-octadecylester, Perchlorat-Salz (RBOE) [Lambda]

Texas Red-dodecylamin (TRDA), zur Verfügung gestellt von D. Radloff, FZK

Phasentransferkatalysator

Kalium-tetrakis-(4-chlorphenyl)-borat (KtCIPB) [Fluka]

Lösemittel

Tetrahydrofuran (THF) [Merck]

3.1.2 Rezeptorschichten - *Lebensdauer-Messung*

Polymere

Polyvinylchlorid hochmolekular (PVC) [Fluka]

Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat (PolyHEMA) [Aldrich]

Polymethacrylsäuremethylester (PMMA) [Aldrich]

Polystyrol, Durchschnitts-MG 45000 [Aldrich]

Polyvinylalkohol, 99+% hydrolysiert [Aldrich]

Weichmacher

Sebacinsäure-bis-2-ethylhexylester (DOS)	[Fluka]
2-Nitrophenyl-octylether (NPOE)	[Fluka]
2-Fluorophenyl-2-nitrophenylether (FPNPE)	[Fluka]
2-Cyanophenyl-dodecylether (CPDDE), zur Verfügung gestellt von Ch. Krause, Universität Regensburg	

Lumineszenzfarbstoffe

Ruthenium(II)-(1,10-phenanthrolin)chlorid-hydrat 98%	[Aldrich]
Ruthenium(III)-chlorid, wasserfrei	[Fluka]

Ligand

4,4'-Diphenyl-2,2'-dipyridyl, technisch (didipy)	[Aldrich]
--	-----------

Absorptionsfarbstoff

3',3''-Dibrom-thymolsulfonphthalein Natriumsalz (Bromthymolblau Natriumsalz)	[Fluka]
--	---------

Ionophore

Kalium-Ionophor I (Valinomycin)	[Fluka]
Tridodecylammoniumchlorid (TDMACl)	[Fluka]

Salze zur Ionenpaarbildung

Hexadecyltrimethylammoniumchlorid (Cetyltrimethylammoniumchlorid - CTACl)	[Fluka]
Tridodecylammoniumchlorid (TDMACl)	[Fluka]
Natrium-tetrakis-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-borat (NatFPB)	[Fluka]

Lösemittel

Tetrahydrofuran (THF)	[Merck]
Methanol	[Merck]
Chloroform	[Merck]
Dichlormethan	[Merck]

3.1.3 Präparierte Substanzen

Die folgenden Substanzen wurden nach den in Anhang 8.2 aufgeführten Herstellungsvorschriften präpariert:

- Ru(II)-tris-(4,4'-Diphenyl-2,2'-dipyridyl)-bis-Chlorid
- Ru(II)-tris-(1,10-phenanthrolin)-bis-tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borat
- Ru(II)-tris-(4,4'-Diphenyl-2,2'-dipyridyl)-bis-Bromthymolblau-Hexahydrat [25]
- Ru(II)-tris-(1,10-phenanthrolin)-bis-Bromthymolblau-Hexahydrat [25]
- Bromthymolblau-Tridodecylmethylammonium-Salz [25]
- Bromthymolblau-Cetyltrimethylammonium-Salz [25]

3.1.4 Silanisierung

γ -Aminopropyl-triethoxysilan	[ABCR]
Trichlorvinylsilan	[Aldrich]
Wasserstoffperoxid 30%	[Merck]
Ammoniumhydroxid-Lösung 25%	[Fluka]

3.1.5 Messpuffer

Sämtliche Puffer wurden in bidestilliertem Wasser mit Reagenzien der Firma Merck in p.a.-Qualität angesetzt.

3.1.5.1 Universalpuffer

Der folgende Universalpuffer wurde verwendet, da er über einen pH-Bereich von 2...12 eine nahezu konstante Pufferkapazität besitzt [98]. Er wurde für sämtliche Messungen der spektralen Referenzierung (pH- und Kalium-Messungen) sowie für die Lebensdauer-Messungen mit dem pH-Sensor verwendet.

Stammlösung	Natriumhydroxid	13,80 g	
	Borsäure	3,52 g	
	Citronensäure-Monohydrat	7,17 g	
	o-Phosphorsäure 85%	3,413 ml	ad 1 l mit bidest. Wasser

Zum Gebrauch wurde diese Lösung 1:5 mit bidestilliertem Wasser verdünnt (resultierender pH \approx 12,5) und mit 5 mol/l Salzsäure bzw. 8 mol/l Natriumhydroxidlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Kontrolle erfolgte mit einer Glaselektrode der Firma Metrohm (Modell 6.0202.100).

pH-Messpuffer für die spektrale Referenzierung

Beim Herstellen der Gebrauchslösung wurden entsprechende Mengen an Natriumchlorid bzw. Kaliumchlorid zugegeben, damit in der resultierenden Lösung 100 mmol/l NaCl bzw. KCl enthalten waren. Dieser Zusatz ist nötig, damit die pH-Puffer die gleiche Ionenstärke besitzen wie die folgenden Kalium-Messpuffer. Wenn im Ergebnisteil von *kaliumfreien* Puffern die Rede ist, so handelt es sich stets um *natriumhaltige* Puffer. Zur Vermeidung der Kontamination kaliumfreier Puffer mit Kaliumionen wurden bei der Herstellung und Aufbewahrung der Puffer lediglich PE- und Teflon-Geräte und -Gefäße benutzt.

Kalium-Messpuffer für die spektrale Referenzierung

Aus der Stammlösung wurden Gebrauchslösungen mit 100 mmol/l Kaliumchlorid bzw. 100 mmol/l Natriumchlorid hergestellt und dann auf pH = 7,0 eingestellt. Die verschiedenen Kaliumkonzentrationen wurden durch Mischen dieser beiden Gebrauchslösungen erzielt. Der

Zusatz von Natriumchlorid ist nötig, um die Ionenstärke bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen aufrechtzuerhalten.

pH-Messpuffer für die Lebensdauer-Messung

Beim Herstellen der Gebrauchslösung wurden 100 mmol/l Kaliumchlorid zugegeben, um etwa physiologische Ionenkonzentrationen zu erzielen.

3.1.5.2 Phosphatpuffer

Der Phosphatpuffer wurde für die Lebensdauer-Messungen mit den Kalium- und Chlorid-Sensoren verwendet, da er die hierfür benötigten pH-Bereiche abdeckt, aber nur eine Ionensorte enthält.

Aus Lösungen von 20 mmol/l tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat ($\text{pH} \approx 11,9$) bzw. 20 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{pH} \approx 4,9$) wurden durch Mischen der Lösungen die gewünschten pH-Werte eingestellt.

Kalium-Messpuffer für die Lebensdauer-Messung

Es wurden vier Stammlösungen hergestellt:

- 1) 20 mmol/l tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat und 100 mmol/l Kaliumchlorid;
- 2) 20 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 100 mmol/l Kaliumchlorid;
- 3) 20 mmol/l tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat und 100 mmol/l Natriumchlorid;
- 4) 20 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 100 mmol/l Natriumchlorid.

Aus den Lösungen 1) und 2) wurden kaliumhaltige Puffer verschiedener pH-Werte hergestellt, aus den Lösungen 3) und 4) natriumhaltige Puffer.

Chlorid-Messpuffer für die Lebensdauer-Messung

Es wurden vier Stammlösungen hergestellt:

- 1) 20 mmol/l tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat und 100 mmol/l Natriumchlorid;
- 2) 20 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 100 mmol/l Natriumchlorid;
- 3) 20 mmol/l tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat und 100 mmol/l Natriumfluorid;
- 4) 20 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 100 mmol/l Natriumfluorid.

Aus den Lösungen 1) und 2) wurden chloridhaltige Puffer verschiedener pH-Werte hergestellt, aus den Lösungen 3) und 4) fluoridhaltige Puffer.

Aus den Mischungen mit $\text{pH} = 7,0$, die jeweils 100 mmol/l Natriumchlorid bzw. 100 mmol/l Natriumfluorid enthielten, wurden durch erneutes Mischen Puffer mit unterschiedlichen

Chloridkonzentrationen hergestellt. Die Angabe *chloridfreie* Puffer im Ergebnisteil bezeichnet somit *fluoridhaltige* Puffer.

3.2 Silanisierung der Glasträger

Vor der Beschichtung mit PVC-OH, PVC oder PolyHEMA müssen die Glasträger zur Verbesserung der Haftung des Polymers silanisiert werden. Die Glasscheiben für Makro-Sensoren wurden in einer Halterung aus Edelstahl silanisiert, die komplett in die Lösungen eingetaucht wurde (Abbildung 3-1). Die Lichtleiter wurden in eine PVC-Halterung eingeschoben, wobei nur der Bereich in die Lösungen eingetaucht wurde, in dem wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben die Schutzhülle entfernt worden war. Die Silanisierung wurde in Teflongefäßen durchgeführt, da Glasgefäße ebenfalls silanisiert würden.

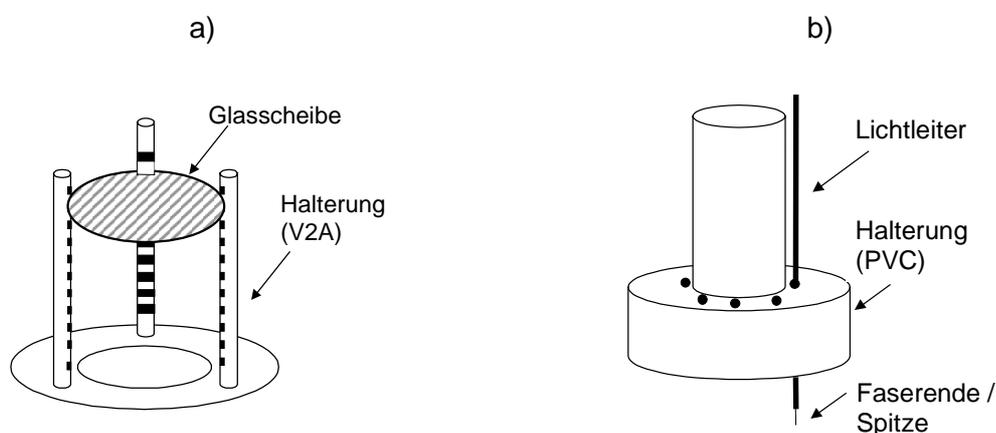


Abbildung 3-1 Halterung für Glasscheiben (a) bzw. Lichtleiter (b).

Die Silanisierungsvorschriften nach Mosbach [99] bzw. Plueddemann [100,101,101] sind in Anhang 8.3 beschrieben.

3.3 Herstellung der Sensoren - *Spektrale Referenzierung*

3.3.1 Beschichtungslösungen

Die Zusammensetzungen der Rezeptorschichten für die Makro-Sensoren, die zur Untersuchung der Eignung der Referenzfarbstoffe verwendet wurden, sind in Tabelle 3-1 wiedergegeben. Dabei wurden für jeden Referenzfarbstoff jeweils Sensoren mit und ohne Messfarbstoff (Chromoionophor VI) hergestellt.

Tabelle 3-2 gibt die Zusammensetzungen der Rezeptorschichten der optimierten Makro- bis Nano-Sensoren für die Kalium-Messung wieder.

Tabelle 3-1 Zusammensetzung der Rezeptorschichten für die Wahl des Referenzfarbstoffs.

	Art des Referenzfarbstoffs			
	RBOE	TRDA	Nilrot	Porphyrin
PVC-OH	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
DOS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
NPOE	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Chr. VI	0,1 mg (0,13 µmol)	0,008 mg (0,011 µmol)	0,1 mg (0,13 µmol)	0,1 mg (0,13 µmol)
Referenzfarbstoff	1,5 mg (1,9 µmol)	0,6 mg (0,77 µmol)	0,04 mg (0,13 µmol)	0,8 mg (1,2 µmol)
THF	ad 2 ml	ad 2 ml	ad 2 ml	ad 2 ml

Tabelle 3-2 Zusammensetzung der Rezeptorschichten für Kalium-Sensoren.

	Schicht SR 1	Schicht SR 2	Schicht SR 3
PVC-OH	100 mg	100 mg	100 mg
DOS	200 µl	100 µl	100 µl
NPOE	—	100 µl	100 µl
Chr. VI	0,1 mg (0,13 µmol)	0,1 mg (0,13 µmol)	0,1 mg (0,13 µmol)
Nilrot	0,04 mg (0,13 µmol)	0,04 mg (0,13 µmol)	0,04 mg (0,13 µmol)
Valinomycin	1,0 mg (0,90 µmol)	0,5 mg (0,45 µmol)	2,0 mg (1,8 µmol)
KtCIPB	0,2 mg (0,40 µmol)	0,2 mg (0,40 µmol)	0,8 mg (1,6 µmol)
THF	ad 2 ml	ad 2 ml	ad 2 ml
Verwendung für	Makro-Sensoren	Makro- und Mikro-Sensoren	Mikro bis Nano-Sensoren

3.3.2 Beschichtung der Makro-Sensoren

Soweit nicht anders vermerkt, wurden zur Herstellung von Makro-Sensoren als Träger Plexiglasplättchen der Dicke 1,5 mm sowie des Durchmessers 28 mm verwendet und nach dem *Spin-Coating-Verfahren* beschichtet (siehe Abbildung 3-2). Dazu wurden je 300 µl der jeweiligen Beschichtungslösung auf ein ruhendes Plexiglasplättchen, das sich in einem Adapter einer Zentrifuge befand, aufgegeben und gleichmäßig verteilt. Die überstehende Lösung wurde durch Rotation bei 4000 rpm abgeschleudert (Dauer: 15 s). Die Schichten wurden mindestens eine Stunde lang bei Raumtemperatur getrocknet und vor der Messung etwa eine Stunde lang in Messpuffer eingelegt (Vorkonditionierung).

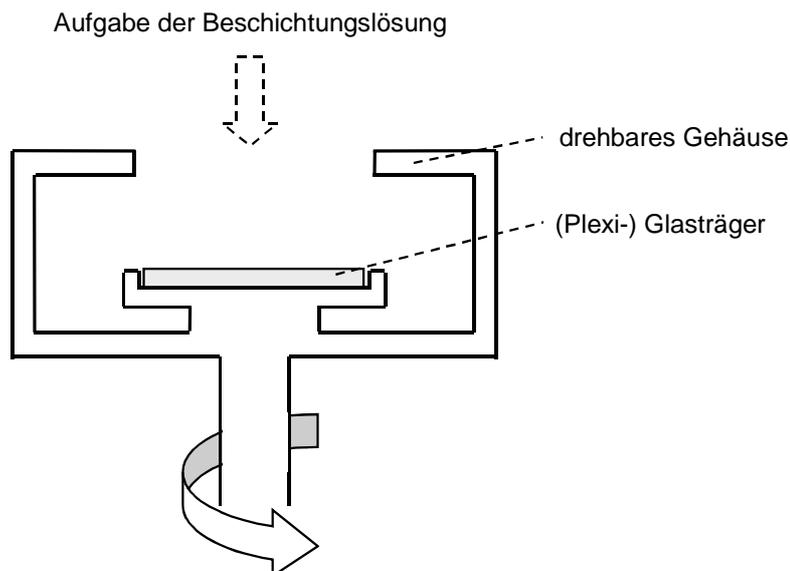


Abbildung 3-2 Sensorbeschichtung nach dem Spin-Coating-Verfahren.

3.3.3 Herstellung und Beschichtung der Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren

Mikro-Sensoren

Es wurden zwei verschiedene optische Fasern aus Quarz verwendet, eine Gradientenindexfaser mit einem Kerndurchmesser von $50\ \mu\text{m}$ (Typ: ACU-ME 050 D; Durchmesser: $50/125/500\ \mu\text{m}$; Fa. Laser Components, Olching) sowie eine Monomode-Faser (Typ: FS SN 3224; Fa. Topometrix, Darmstadt) mit einem Kerndurchmesser von $4\ \mu\text{m}$.

Ein von der Schutzhülle befreites Faserende wurde mit einem Faser-Schnittgerät (Modell Infocut, Fa. Laser Components, Olching) senkrecht zur Faserachse durchgetrennt. Dieses Faserende wurde zunächst silanisiert, dann 5...10 mal in die Beschichtungslösung eingetaucht und wieder herausgezogen (*Dip-Coating*). Zeitdauer des Eintauchens: beim ersten Mal eine Minute zur guten Benetzung, bei allen weiteren Malen fünf Sekunden. Zwischen zwei Eintauchvorgängen wurde zum Trocknen der Schicht je eine Minute gewartet.

Submikro-Sensoren

Ein 50 cm langes Stück der Gradientenindexfaser mit $50\ \mu\text{m}$ Kerndurchmesser wurde in der Mitte auf einem Stück von etwa 5 cm abgemantelt. Dazu wurde das Faserstück über Nacht in Toluol eingelegt, dann wurde die Schutzhülle mit Hilfe eines Skalpell vorsichtig abgeschält. Das freigelegte Stück der Faser wurde in ein Faserziehgerät mit Laserheizung (Micropipette Puller, Modell P-2000; Fa. Sutter Instrument Co., USA) eingespannt und zu einer Spitze ausgezogen. Die Faserspitzen wurden silanisiert und wie die Mikro-Sensoren mit der indikatorhaltigen Polymerlösung beschichtet.

Nano-Sensoren

Zur Herstellung von Nano-Sensoren wurden SNOM-Spitzen (Modell FS SN 3224; Fa. Topometrix, Darmstadt) verwendet. Die Seiten und der Kegelmantel dieser Spitzen waren mit Aluminium bedampft und ließen eine Apertur von 50 nm offen.

Die SNOM-Spitzen wurden direkt wie die Mikro-Sensoren durch Dip-Coating beschichtet. Eine Silanisierung war zum einen nicht möglich, da sich bei den dabei auftretenden pH-Werten die Aluminiumschicht auf der Faser aufgelöst hätte, zum anderen aber auch nicht nötig, da die Matrixpolymere gut auf der aluminiumbeschichteten Oberfläche hafteten.

3.3.4 Physikalische Charakterisierung der Sensoren

Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenz-Umkehr-Mikroskop (Modell IX 50; Fa. Olympus) und einer CCD-Kamera (Modell ICD-700P; Fa. Ikegami) aufgenommen.

Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Gerät der Firma International Scientific Instruments (Kalifornien, USA) vom Typ SR 50-A aufgenommen.

Profilometrie

Zur Bestimmung der Schichtdicken bei den Makro-Sensoren wurde ein Tastschnittgerät der Firma Tencor Instruments vom Typ P-2 verwendet. Um eine definierte Kante zu erhalten wurden Sensoren hergestellt, bei denen die Plexiglasträger vor dem Beschichten zu einem Drittel mit einem Tesafilmstreifen abgeklebt wurden. Dann wurde die Rezeptorschicht per Spin-Coating aufgebracht. Nach dem Trocknen der Schicht wurde der Streifen entfernt, und die entstandene Kante mit dem Tastschnittgerät untersucht.

3.4 Herstellung der Sensoren - *Lebensdauer-Messungen*

3.4.1 Beschichtungslösungen

pH-Sensoren auf PolyHEMA-Basis

Zur Herstellung dieser Sensoren mussten die Lösungen stets frisch angesetzt werden. Zudem musste der Sensor mindestens vier Stunden, besser noch über Nacht an Raumluft trocknen. Ansonsten wurde bei der Beprobung des Sensors mit Puffern von pH > 8 Bromthymolblau aus der Schicht ausgetragen, was bei Makro-Sensoren an der Blaufärbung der Pufferlösung deutlich zu erkennen war.

Nach dem Trocknen wurden die Sensoren eine Stunde lang in Puffer mit pH = 5 vorkonditioniert. Die Zusammensetzungen der Rezeptorschichten sind in Tabelle 3-3 wiedergegeben. Die Substanzen wurden jeweils in 2 ml Methanol gelöst.

Tabelle 3-3 *Zusammensetzung der Rezeptorschichten für pH-Sensoren.*

Schicht	Zusammensetzung auf 200 mg PolyHEMA
SL 1	Ru(phen) ₃ Cl ₂ : BTB·TDMA : CTACl 2,0 mg (2,8 μmol) : 7,0 mg (6,0 μmol) : 4,0 mg (12,5 μmol)
SL 2	Ru(phen) ₃ BTB ₂ 10 mg (5,0 μmol)
SL 3	Ru(phen) ₃ (tFPB) ₂ : BTB·TDMA 6,0 mg (2,5 μmol) : 7,0 mg (6,0 μmol)

Kalium-Sensor auf PVC-Basis

Die Zusammensetzung der Rezeptorschicht des Kalium-Sensors zeigt Tabelle 3-4. Nach einstündigem Trocknen wurde der Sensor eine weitere Stunde lang in kaliumfreiem Puffer mit pH = 7 vorkonditioniert.

Tabelle 3-4 *Zusammensetzung der Rezeptorschicht für den Kalium-Sensor.*

Stoff	Menge
PVC	100 mg
NPOE	200 μl
Ru(didipy) ₃ BTB ₂	1,0 mg (0,4 μmol)
Valinomycin	2,0 mg (1,8 μmol)
THF	ad 2,0 ml

Chlorid-Sensoren auf PVC-Basis

Zur Herstellung dieser Sensoren wurden alle Reagenzien zusammen eingewogen und in THF gelöst. Diese Beschichtungslösungen konnten über Wochen hinweg gekühlt in Glasgefäßen mit teflondichteten Schraubdeckeln aufbewahrt und zur Herstellung verwendet werden. In Tabelle 3-5 ist die Zusammensetzung der getesteten Chlorid-Sensoren angegeben. Mit Ausnahme der Variation des Weichmachers besaßen die Schichten die gleiche Zusammensetzung. Nach einstündigem Trocknen wurden die Sensoren eine Stunde lang in chloridfreiem Puffer mit pH = 7 vorkonditioniert.

Tabelle 3-5 *Zusammensetzung der Rezeptorschichten für Chlorid-Sensoren.*

Stoff	Menge
PVC	100 mg
Weichmacher (CPDDE / DOS / NPOE)	200 μ l
Ru(didipy) ₃ BTB ₂	1,3 mg (0,55 μ mol)
TDMACl	6,0 mg (10,5 μ mol)
THF	ad 2,0 ml

3.4.2 Beschichtung der Makro-Sensoren

Makro-Sensoren zur Absorptions-Messung

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren wurde die Beschichtungslösung auf eine Plexiglasscheibe (Dicke 2,2 mm; Durchmesser 30 mm) aufpipettiert, die in einem Aluminium-Block mit einer runden Vertiefung lag (Tiefe 2,4 mm). Dann wurde mit einem scharfkantigen Spachtel die überstehende Lösung abgestrichen (sogenanntes *Knife-Coating*, siehe Abbildung 3-3).

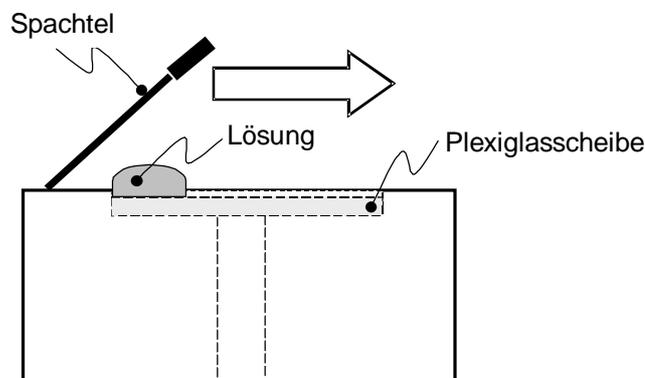


Abbildung 3-3 *Beschichtung von Makro-Sensoren durch Abstreifen der Lösung mit einem Spachtel (Knife-Coating).*

Makro-Sensoren zur Lumineszenz-Intensitäts-Messung

Zur Aufnahme der Lumineszenzspektren wurden wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben durch Spin-Coating Makro-Sensoren auf Plexiglasträgern hergestellt.

Makro-Sensoren für Lebensdauer-Messung

Für Messungen der Lebensdauer wurde die Beschichtungslösung auf runde Deckgläser (Dicke 400 µm; Durchmesser 10 mm; Fa. Kindler, Freiburg) aufpipettiert und in der jeweiligen Lösemittelatmosphäre trocknen lassen.

3.4.3 Beschichtung der Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren

Die Beschichtung der miniaturisierten Sensoren erfolgte analog zu Kapitel 3.3.3.

Als Träger für die Mikro-Sensoren wurde jedoch abweichend davon eine Quarzglasfaser mit 200 µm Kerndurchmesser (Typ HCN-M0200T-12, Fa. Laser Components) mit einer SMA-Schraubverbindung benutzt.

3.5 Messanordnungen - *Spektrale Referenzierung*

3.5.1 Makro-Sensoren

Die Untersuchung der Makro-Sensoren wurde in einem Fluorimeter der Firma Shimadzu (Typ RF 5001 PC; mit Software Version 2.1) durchgeführt. Zur Beprobung der Sensoren wurde eine Durchflusszelle aus Plexiglas verwendet (Abbildung 3-4), welche die Sensoren im 45°-Winkel zum Anregungslicht plazierte. Durch einen verschraubbaren Deckel konnten die Sensoren einfach von oben gewechselt werden. Das Innenvolumen der Durchflussvorrichtung inklusive Schlauchleitungen betrug 4,5 ml. Während der Messungen wurde mit einer Schlauchpumpe (Modell M 312, Fa. Gilson) eine Durchflussrate von 2 ml/min eingestellt. Beim Probenwechsel wurde die Durchflusszelle leerpumpt und anschließend mit der neuen Probelösung gefüllt, wodurch kurze Austauschzeiten erreicht wurden. Die Registrierung der Messwerte wurde während dieser Zeit angehalten. Als Korrektur gegen Streuung wurde von den gemessenen Spektren jeweils ein Nullwert der Messanordnung (Spektrum einer Glasscheibe in der Durchflusszelle) abgezogen.

Soweit im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurden alle Messungen bei einer Temperatur von 294 ± 1 K durchgeführt. Die weiteren experimentellen Daten sind bei den jeweiligen Abbildungen aufgeführt.

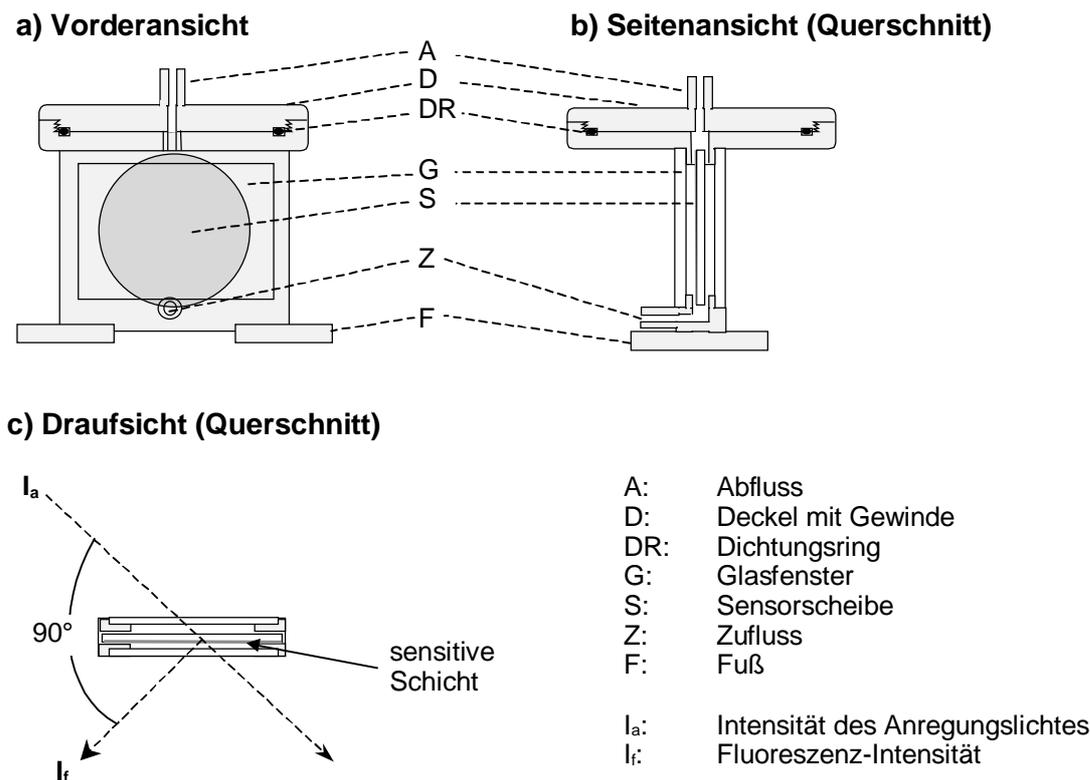


Abbildung 3-4 Aufbau der Durchflusszelle (a-c) und Geometrie der Messanordnung (c).

3.5.2 Mikro- bis Nano-Sensoren

Die Messanordnung für miniaturisierte Sensoren ist in Abbildung 3-5 gegeben. Folgende Geräte und Komponenten wurden verwendet:

- 1) Nd:YAG-Laser (Modell DTL 166 Q; Fa. Laser 2000, Wessling); $\lambda = 473 \text{ nm}$; mittlere Leistung: $P = 7 \text{ mW}$;
- 2) Neutralfilter unterschiedlicher Transmission (Fa. Schott, Mainz);
- 3) Monomode-Koppler (Modell F1015; Fa. Newport);
- 4) x-y-z-Positionier-Einheit (Modell SMK-02-Z; Fa. Owis GmbH, Staufen) mit Schrittmotorsteuerung (Modell SMS; Fa. Owis GmbH, Staufen);
- 5) Küvette (siehe Abbildung 3-6 und Beschreibung im weiteren Text);
- 6) Fluoreszenz-Umkehr-Mikroskop (Modell IX 50; Fa. Olympus) mit Objektiv (Typ UplanApo 60×0,90; 60-fache Vergrößerung);
- 7) Farb-CCD-Kamera (Modell ICD-700P; Fa. Ikegami);
- 8) Notch-Filter mit Transmission $<10^{-6}$ bei 473 nm (Fa. Laser Components);
- 9) Spektrograph (Fa. Spectroscopy Instruments GmbH, Gilching);
- 10) Optischer Multikanal-Analysator (OMA; Modell ST 120; Fa. Spectroscopy Instruments GmbH, Gilching), Software POSMA 3.0y.

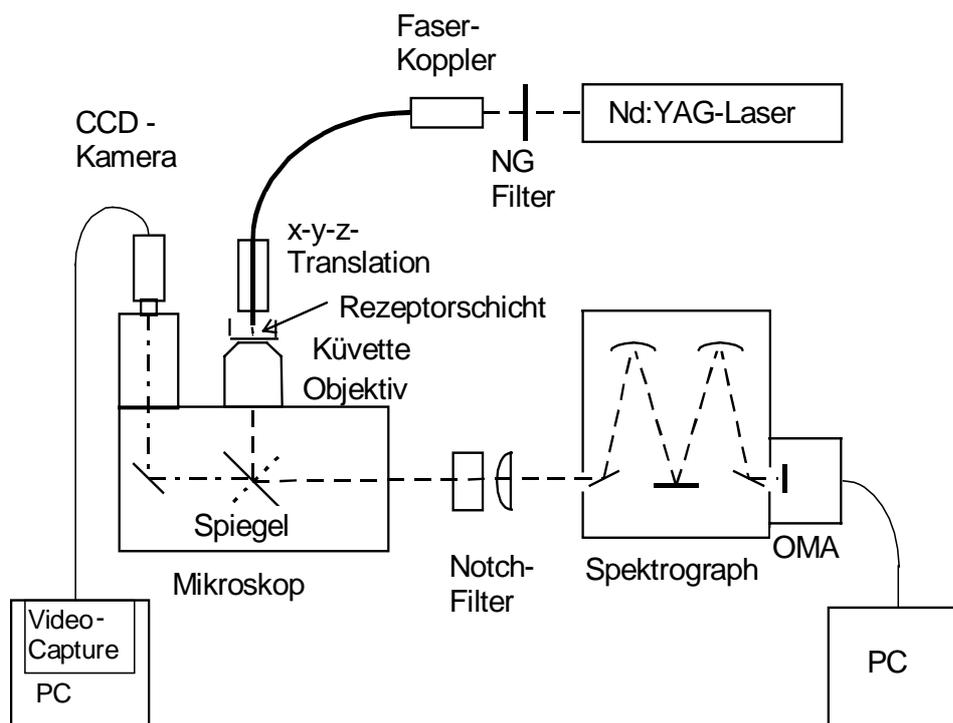


Abbildung 3-5 Messanordnung für Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren.

Das Licht des Anregungslasers (1) wurde nach Bedarf mit Neutralfiltern (2) abgeschwächt und mit einem Monomode-Koppler (3) in den Lichtleiter eingekoppelt, an dessen distalen Ende sich die Receptorschicht befand. Ein Shutter sorgte dafür, dass das Licht nur während der Messungen in die Faser gelangte. Das beschichtete Faserende war in einer in drei Dimensionen verstellbaren Positioniervorrichtung (4) eingespannt. Mit deren Hilfe wurde es in einer Küvette (5), die auf dem Mikroskop-Objektiv (6) angebracht war, in dessen Brennpunkt positioniert. Das Objektiv sammelte sowohl das aus der Faser austretende Anregungslicht als auch das von der Sensorschicht emittierte Fluoreszenzlicht.

Durch einen umlegbaren Spiegel im Mikroskop konnte das Licht wahlweise für Beobachtungen zum Okular des Mikroskops und einer CCD-Kamera (7) gelenkt werden. Zur Aufnahme von Emissionsspektren wurde das Licht zu einem Spektrographen (9) gelenkt. Vor dem Spektrographen wurde das Anregungslicht mit Hilfe eines Notch-Filters (8) herausgefiltert, um das Auftreten von Phantompeaks zu verhindern. In einem Spektrographen vom Czerny-Turner-Typ wurde das nunmehr noch verbleibende Fluoreszenzlicht an einem Gitter aufgespalten und zur Detektion auf das Dioden-Array eines optischen Multikanal-Analysators (10) geleitet. Zur Reduzierung des thermisch bedingten Dunkelstroms der Photodioden wurde das Diodenarray durch Peltier-Elemente auf ca. -30°C gekühlt. Die entstehende Abwärme wurde durch einen Labor-Thermostaten abgeführt. Um die Ausbildung von Kondenswasser zu verhindern, wurde gleichzeitig trockener Stickstoff

(100 ml/min) eingeblasen. Die Auswertung erfolgte über einen PC mit der geräteeigenen Software.

Soweit im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurden alle Messungen bei einer Temperatur von 294 ± 1 K durchgeführt.

Für die Spektrenaufnahme wurden je fünf Spektren akkumuliert und mit der Geräte-Software geglättet. Als Korrektur gegen Streu- und Fremdlicht wurde von den geglätteten Spektren jeweils ein gleichermaßen gewonnenes Nullspektrum der Messanordnung, das mit einer unbeschichteten Faser aufgenommen wurde, abgezogen. Die so erhaltenen Spektren wurden auf das Maximum des Referenzfarbstoffs normiert.

Die aus der Spitze austretende Lichtmenge wurde mit einem Photomultiplier (Modell H5783-01; Fa. Hamamatsu Photonics K.K., Japan) bestimmt. Die Umrechnung des Messwerts in den Lichtstrom in Watt erfolgte anhand der vom Hersteller angegebenen Empfindlichkeitskurven.

Es wurden zwei Arten von Küvetten verwendet, die in Abbildung 3-6 dargestellt sind. Beide waren so gearbeitet, dass sie mit Hilfe zweier Feststellschrauben direkt auf dem Mikroskopobjektiv befestigt werden konnten. Für Messungen mit Mikro- und Submikro-Sensoren wurde eine *Durchflussküvette* mit einem Innenvolumen von 250 μ l konstruiert. Nach unten hin wurde die Küvette (A1) durch ein rundes Deckglas (A2; Dicke 400 μ m, Durchmesser 10 mm; Fa. Kindler, Freiburg) abgedichtet. Das Deckglas wurde durch einen Konterring (A3) gehalten, dann wurde ein Ring mit Ein- und Auslasskanülen (A4) eingeschraubt. Bis zur Einstellung des Gleichgewichts wurde mit einer Schlauchpumpe (Modell M 312, Fa. Gilson, Villier le Bel, Frankreich) eine Durchflussrate von 0,5 ml/min eingestellt. Während der Messungen wurde die Pumpe angehalten, damit die Faser unbewegt im Brennpunkt des Objektivs verblieb. Zum Probenwechsel wurde die Küvette leergepumpt und anschließend mit der neuen Probelösung gefüllt.

Mit den SNOM-Spitzen (Nano-Sensoren) wurden die Messungen in einer *manuell befüllbaren Küvette* (Innenvolumen: 30 μ l) ausgeführt. Auch bei diesem Modell wurde in der Küvette (B1) ein Deckglas (B2) durch einen Konterring (B3) gehalten. Der Konterring besaß einen durchbohrten Stutzen, durch den der Innenraum der Küvette befüllt werden konnte. Für pH-Messungen sowie Kalium-Messungen steigender Konzentration wurde der Küvetteninhalt fünfmal ausgetauscht, bevor die jeweilige Messung ausgeführt wurde. Zur Regenerierung kaliumgesättigter Sensoren war ein 20...30 maliges Austauschen erforderlich.

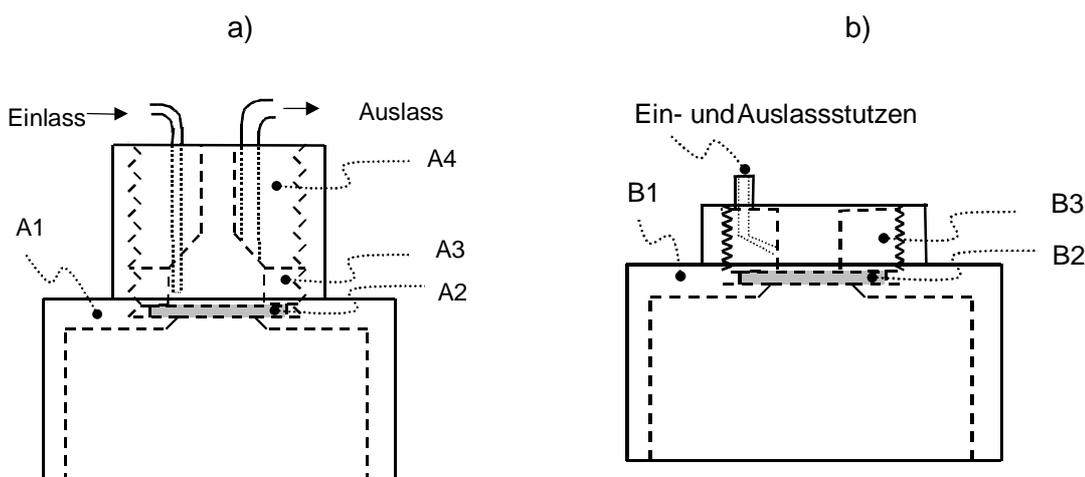


Abbildung 3-6 Aufbau der Durchflussküvette (a) und manuell befüllbaren Küvette (b).

3.6 Messanordnungen – Lebensdauer-Messung

3.6.1 Aufnahme von Absorptions- und Lumineszenzspektren

Die Aufnahme von *Absorptionsspektren* wurde mit einem Shimadzu UV 2100 Spektrophotometer mit der Software UV-2101PC durchgeführt. Der Sensor befand sich dabei in einer Durchflussküvette, die analog zu der Fluoreszenz-Durchflussküvette (Abbildung 3-4) aufgebaut ist, wobei jedoch der Sensor rechtwinklig zum Strahlengang positioniert wurde.

Lumineszenzspektren wurden wie in Kap. 3.5.1 beschrieben aufgenommen.

3.6.2 Lebensdauer-Messungen

Bei den Lebensdauer-Messungen wurde als Anregungslichtquelle wahlweise eine Leuchtdiode (LED) oder ein Laser verwendet, die Detektionseinheit war jeweils gleich.

Für Messungen mit Makro- und Mikro-Sensoren wurde eine blaue LED ($\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$, Typ ESB 44510; Fa. Oshino Lamps GmbH, Nürnberg) verwendet. Deren Licht wurde mit einer Sammellinse ($f = 15 \text{ mm}$) parallelisiert, die Begrenzung des Spektrums auf Wellenlängen unterhalb des Durchlassbereichs des zur Detektion verwendeten Kantenfilters erfolgte mit einem Interferenzfilter ($\lambda_0 = 458 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, $T_{\max} = 64\%$; Fa. Dr. Hugo Anders GmbH, Nabburg). Dann wurde das Licht wieder durch eine zweite Sammellinse fokussiert. Mit einer x-y-Positioniereinrichtung, die einen Lichtleiter-Schraubanschluss für SMA-Stecker hielt, wurde das Ende des Schraublichtleiters in den Brennpunkt der zweiten Sammellinse

einjustiert. Sämtliche Einzelteile dieser Einheit waren auf einer Mikrobank (Fa. Spindler&Hoyer) justiert. Die LED wurde direkt mit einem Funktionsgenerator (Modell HM8030-5; Fa. HAMEG Instruments) sinusförmig moduliert.

Für Messungen mit Submikro- und Nano-Sensoren wurde ein kontinuierlich emittierender Argon-Ionen-Laser (Modell Innova 200; Fa. Coherent, Kalifornien, USA) verwendet. Das Laserlicht wurde mit Hilfe von Neutralfiltern (Fa. Schott) auf die erforderliche Leistung abgeschwächt. Die Modulation erfolgte durch einen elektrooptischen Modulator (Modell LM0202; Fa. Gsänger Optoelektronik GmbH, Planegg) mit Pulsverstärker (Modell LIV8; Fa. Gsänger Optoelektronik GmbH, Planegg), der wiederum von einem Frequenzgenerator getrieben wurde. Die Einkopplung des Lichts in die Faser erfolgte mit Hilfe eines Monomode-Kopplers (Modell F1015; Fa. Newport). Sämtliche Einzelteile dieser Einheit waren auf einer optischen Bank (Fa. Spindler&Hoyer) justiert.

Bei allen Messungen wurde das distale Ende des Lichtleiters mit Hilfe einer x-y-z-Positioniereinrichtung in der Küvette (siehe Abbildung 3-6) etwa 500 μm über dem Deckglas positioniert. Die Küvette war direkt auf den Photomultiplier (Modell H5783-01; Fa. Hamamatsu Photonics K.K., Japan) aufgesetzt, in dessen Fenster noch ein auf passende Größe zugeschnittenes Kantenfilter (Modell KV550; Fa. Schott) eingelegt war, um das Anregungslicht zu unterdrücken. Der PMT sammelte das Lumineszenzlicht, sein Signal wurde über einen Strom-Spannungswandler (Modell PMT-5; Fa. Scientific Instruments, Gilching) vorverstärkt und dann auf einen Lock-in Verstärker (Modell 7220; Fa. EG&G Instruments) gegeben.

Der Lock-in Verstärker verglich die Phasenlage des Messlichts mit der des Funktionsgenerators, der die LED bzw. den Lasermodulator trieb. Die Phasenlage wurde vor der Messung mit dem Anregungslicht auf Null abgeglichen. Der Lock-in Verstärker wurde über einen PC mit der zugehörigen Software gesteuert.

Der Aufbau zur Durchführung von Messungen mit Makro-Sensoren ist schematisch in Abbildung 3-7 wiedergegeben. Die Rezeptorschicht war hierbei auf dem Deckglas am Boden der Küvette angebracht. Für diese Messungen wurde die Durchflussküvette von Abbildung 3-6 a verwendet.

Messungen mit Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren wurden mit dem in Abbildung 3-8 dargestellten Aufbau durchgeführt. Die Rezeptorschicht befand sich hierbei am Ende des Lichtleiters. Für diese Messungen wurde die manuell befüllbare Küvette von Abbildung 3-6 b verwendet.

Sofern im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurden alle Messungen bei einer Temperatur von 294 ± 1 K durchgeführt.

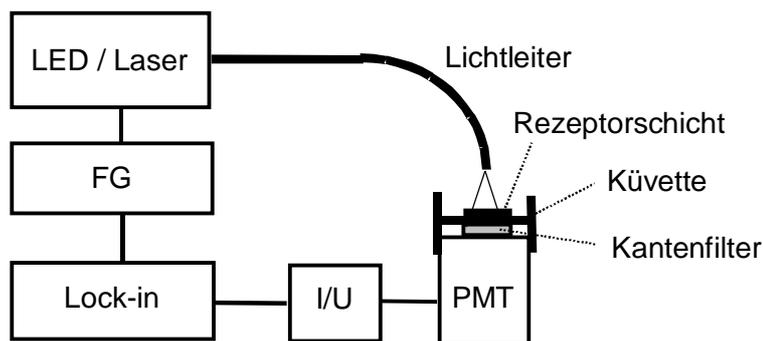


Abbildung 3-7 Messanordnung für Makro-Sensoren.

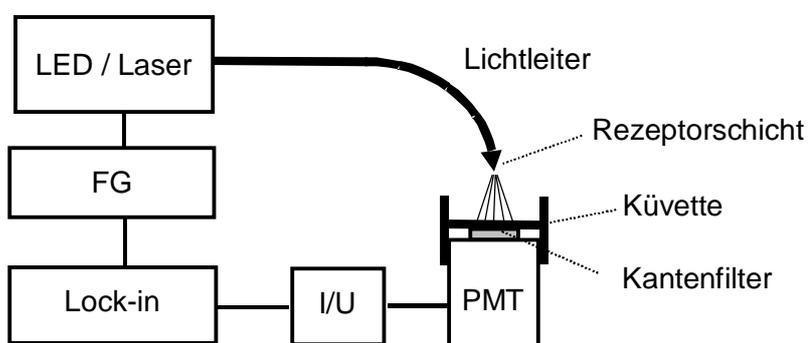


Abbildung 3-8 Messanordnung für Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren.

3.7 Auswertungen und Kurvenanpassungen

3.7.1 Kalibrationen

Zur Auswertung der Kalibrationen wurden *Kurvenanpassungen* mit der Software „MicroCal Origin“, Version 2.94 durchgeführt. Zur Charakterisierung der Titrationskurven wurde eine sigmoidale Anpassung gewählt. Das Programm ermittelt den x-Wert (pH, pCl, pK) der angepassten Kurve, bei dem 50% der Signaländerung (Intensität bzw. Phasenwinkel) erfolgt sind. Bei symmetrischem Kurvenverlauf entspricht dieser Punkt auch dem Wendepunkt, also dem Punkt der maximalen Steigung. Diese Werte wurden zur Charakterisierung der Sensoren herangezogen, sie werden im Ergebnisteil als Wendepunkt (Wdp) bezeichnet.

Für *Absorptions- bzw. Lumineszenz-Intensitäts-Messungen* begründet sich diese Art der Anpassung dadurch, dass die gemessene Extinktion bzw. Lumineszenz-Intensität proportional zur Konzentration der entsprechenden Farbstoffspezies ist.

Bei den *Lebensdauer-Messungen* findet sich in der Literatur kein linearer Zusammenhang zwischen Phasenwinkel und Konzentration. Dennoch konnten auch hier die gemessenen

Werte sigmoidal angepasst werden. Dies entspricht der in der Literatur praktizierten Vorgehensweise [34,35,35].

Als weitere charakteristische Größe wurde für die spektralen Messungen der *Signalhub* angegeben. Dieser wurde definiert als Quotient aus maximaler Signaländerung während einer Messreihe und maximalem Signal, also

$$\text{Gleichung 3-1} \quad \text{Signalhub} = \frac{S_{\max} - S_{\min}}{S_{\max}} \cdot 100\%.$$

S_{\max} größte gemessene Fluoreszenz-Intensität
 S_{\min} kleinste gemessene Fluoreszenz-Intensität

Bei den Lebensdauer-Messungen wurde die über den gesamten Messbereich beobachtete *Phasenänderung* $\Delta\Phi$ zur Charakterisierung angegeben.

$$\text{Gleichung 3-2} \quad \Delta\Phi = \Phi_{\max} - \Phi_{\min}$$

Φ_{\max} größter gemessener Phasenwinkel
 Φ_{\min} kleinster gemessener Phasenwinkel

3.7.2 Photobleichen

Es gibt eine Vielzahl von möglichen Vorgängen beim Photobleichen eines Farbstoffs. Die Primärreaktion ist immer die elektronische Anregung in den Singulett- oder Triplett-Zustand. Aus diesem Zustand heraus können unimolekulare Reaktionen, wie z.B. Isomerisierungen, homo- oder heterolytische Spaltungen ablaufen. Häufiger jedoch sind bimolekulare Reaktionen mit Lösemittelmolekülen, weiteren Inhaltsstoffen oder Verunreinigungen, anderen Farbstoffmolekülen oder Sauerstoff. Letzterer ist in der Regel der Hauptreaktionspartner bei Bleichvorgängen [102,103,103].

Die Abnahme der Lumineszenz-Intensität durch Photobleichen wird durch einen exponentiellen Zerfall beschrieben. Wegen der Komplexität der ablaufenden Vorgänge ist der beobachtete Zerfall oft nicht erster, sondern höherer Ordnung [103]. Die Anpassung an einen exponentiellen Zerfall erfolgte mit dem Programm GraFIT[®] Version 3.03, die ermittelten Gleichungen sind in Anhang 8.4 angegeben.

3.7.3 Ansprechzeit

Das Ansprechverhalten eines Sensors wird durch den zeitlichen Verlauf seines Signals bei Vorgabe einer sprunghaften Konzentrationsänderung beschrieben. Üblicherweise werden die t_{90} -Zeiten zur Beschreibung des Ansprechverhaltens angegeben, d.h. die Zeiten, bei denen 90 % der Signaländerung vollzogen sind [104]. In der Regel wird zum Erreichen des Endwertes die doppelte Zeit benötigt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION: SPEKTRALE REFERENZIERUNG - KALIUM-SENSOR

4.1 Voruntersuchungen an Makrosensoren

4.1.1 Wahl des Messfarbstoffs, des Ionophors und der Polymermatrix

Das den Sensoren zugrunde liegende Prinzip, bei dem die molekulare Erkennung durch einen Ionophor mit der optisch verfolgbaren Protolyse eines Fluoreszenzindikators gekoppelt ist, eröffnet eine breite Auswahl an möglichen Messfarbstoffen (Chromoionophoren). Allgemeine Kriterien für die *Wahl des Messfarbstoffs* sind ein möglichst breiter pH-Umschlagsbereich, wie ihn z.B. Fluorescein-Derivate zeigen, und eine gute Löslichkeit in der lipophilen Polymermatrix. Die Zielsetzung der Referenzierung und Miniaturisierung schränkt die Wahl des Messfarbstoffs darüber hinaus nach folgenden Kriterien ein: Der Stokes-Shift des Messfarbstoffs sollte möglichst gering und der des Referenzfarbstoffs möglichst groß sein oder umgekehrt, damit die Spektren beider Farbstoffe bei Anregung mit derselben Wellenlänge hinreichend getrennt sind. Beide Farbstoffe müssen bei der Wellenlänge des Lasers (473 nm) anregbar und hinreichend photostabil sein. Im Hinblick auf die Optimierung bezüglich Messung unter physiologischen Bedingungen muss der Umschlagsbereich des Messfarbstoffs bei physiologischen pH-Werten liegen.

Die genannten Kriterien erfüllt der Chromoionophor VI (4',5'-Dibrom-fluorescein-octadecylester). Abbildung 4-1 zeigt die Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren eines Sensors mit Chromoionophor VI bei verschiedenen pH-Werten. Das Anregungsmaximum der deprotonierten Form liegt bei 530 nm, regt man bei 473 nm an, ist die Emission etwa auf ein Viertel vermindert. Das Emissionsmaximum liegt bei 545 nm, der Stokes-Shift ist demnach gering (15 nm).

Wegen seiner hohen Selektivität für Kalium wurde der *Kalium-Ionophor* Valinomycin verwendet. Um die Aufnahme von Kalium-Ionen in die Membran zu erleichtern, wurde als *Phasentransferkatalysator* (vgl. Kapitel 2.4.2) Kalium-tetrakis-(4-chlorophenyl)-borat eingesetzt.

Als *Polymer* für die verwendeten Sensor-Membranen wird in der Literatur überwiegend PVC verwendet [30,57]. Enthält die Rezeptormembran jedoch Bestandteile, die wenig lipophil sind, kann auch auf hydrophilere Copolymere des PVC zurückgegriffen werden, um einen Austrag der Membranbestandteile in die Messlösung zu verhindern. Der Chromoionophor VI ist in dieser Hinsicht unkritisch, er ist auch für reine PVC-Matrices geeignet [65]. Da jedoch mehrere unterschiedlich polare Referenzfarbstoffe getestet werden sollten, wurde ein

Copolymer aus 91% Vinylchlorid, 3% Vinylacetat und 6% Vinylalkohol (PVC-OH) als Gerüstpolymer verwendet, das durch seine Hydroxygruppen auch zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen fähig ist.

Ebenfalls entscheidend für die Löslichkeit der funktionellen Membranbestandteile ist die Polarität des Weichmachers. Zur Wahl des Weichmachers siehe Kapitel 4.1.3.

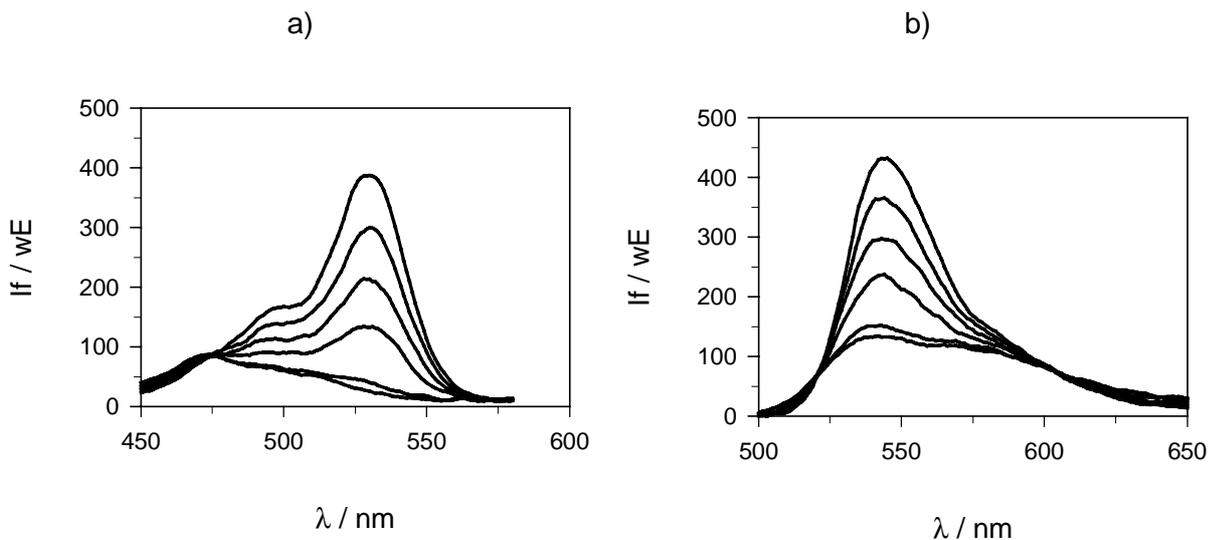


Abbildung 4-1 *Fluoreszenz-Anregungs- (a) und Fluoreszenz-Emissionsspektren (b) von Chromoionophor VI in PVC-OH in Abhängigkeit vom pH-Wert. [Experimentelle Daten: Sensorschicht SR 2 ohne Nilrot. Kaliumfreie Universal-puffer, pH = 4; 5; 6; 7; 8; 9, jeweils von unten nach oben. a) $\lambda_{em} = 600$ nm. b) $\lambda_{ex} = 473$ nm].*

4.1.2 Interne Referenzierung

4.1.2.1 Zielsetzung und Auswahlkriterien

Bei der Auswertung an nur einer Messwellenlänge ist das Sensorsignal abhängig von diversen Parametern, wie dem absoluten Farbstoffgehalt in der Schicht, der Schichtdicke, der Intensität des eingestrahlteten Lichtes, der Sammeleffizienz der Detektionsseite sowie der Empfindlichkeit der Messapparatur. Diese Abhängigkeiten können durch eine interne Referenzierung umgangen werden, indem man zusätzlich zu dem Chromoionophor, dessen Fluoreszenz-Intensität als Messsignal ausgewertet wird, noch einen Referenzfarbstoff in die Rezeptorschicht einbringt, dessen Fluoreszenz-Intensität im Verlauf der Messungen konstant bleibt. Das vom Protonierungsgrad abhängige Signal an der Messwellenlänge $I_f(\lambda_{Mess})$ wird auf das konstante Referenzsignal $I_f(\lambda_{Ref})$ bezogen:

Gleichung 4-1 $I_{f,rel} = I_f(\lambda_{Mess}) / I_f(\lambda_{Ref})$

Ein Referenzfarbstoff muss daher folgenden Bedingungen genügen:

- Er muss lipophil sein, damit er nicht aus der Membranschicht ausgetragen wird.
- Sein Fluoreszenzmaximum muss deutlich vom Maximum des Chromoionophors getrennt sein.
- Die Fluoreszenz-Intensität darf nicht von den Inhaltsstoffen der Messlösung beeinflusst werden.

Aus der Verwendung für miniaturisierte faseroptische Sensoren und dem dafür verwendeten Messaufbau ergeben sich weitere Forderungen:

- Auch der Referenzfarbstoff muss bei der Laserwellenlänge von 473 nm anregbar und hinreichend photostabil sein.
- Durch weitere apparative Vorgaben, insbesondere die Absorptionsbanden des verwendeten Notch-Filters, können Spektren nur bis zu einer Wellenlänge von 640 nm aufgenommen werden. Das Fluoreszenzmaximum des Referenzfarbstoffs sollte also bei kürzeren Wellenlängen liegen.

4.1.2.2 Wahl des Referenzfarbstoffs

Nach einer Literaturrecherche wurden vier in Frage kommende Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt und auf ihre Eignung zur Referenzierung getestet:

- 1) Rhodamin B-octadecylester Perchlorat-Salz (RBOE);
- 2) Texas Red-dodecylamin (TRDA);
- 3) 9-(Diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-on (Nilrot);
- 4) 5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphin (Porphyrin).

Mit diesen Farbstoffen wurden verschiedene Makrosensoren hergestellt, die nach den im Folgenden genannten Kriterien untersucht wurden. Die genaue Zusammensetzung der Rezeptorschichten ist dem Experimentellen Teil zu entnehmen. Tabelle 4-1 gibt die Zusammenstellung der erhaltenen Eignungsparameter wieder.

Zunächst wurden sogenannte *Einzelensoren* angefertigt, die keinen Chromoionophor, sondern nur den jeweiligen Referenzfarbstoff enthielten. Mit diesen wurden die Anregungs- und Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe aufgenommen.

Aus den Anregungsspektren wurde der Quotient der Fluoreszenzemission bei Anregung bei der Laserwellenlänge (473 nm) und beim Anregungsmaximum ermittelt. Er lag zwischen 2% beim Porphyrin und 23% bei Nilrot (beste Anregbarkeit bei 473 nm).

Die Emissionsspektren der getesteten Farbstoffe sind in Abbildung 4-2 mit den Emissionsspektren des Chromoionophors gegenübergestellt. Die Spektren verdeutlichen,

dass der Chromoionophor bei 606 nm, also am Maximum des Nilrots, einen isosbestischen Punkt aufweist, an dem sich seine Fluoreszenz-Intensität nicht ändert.

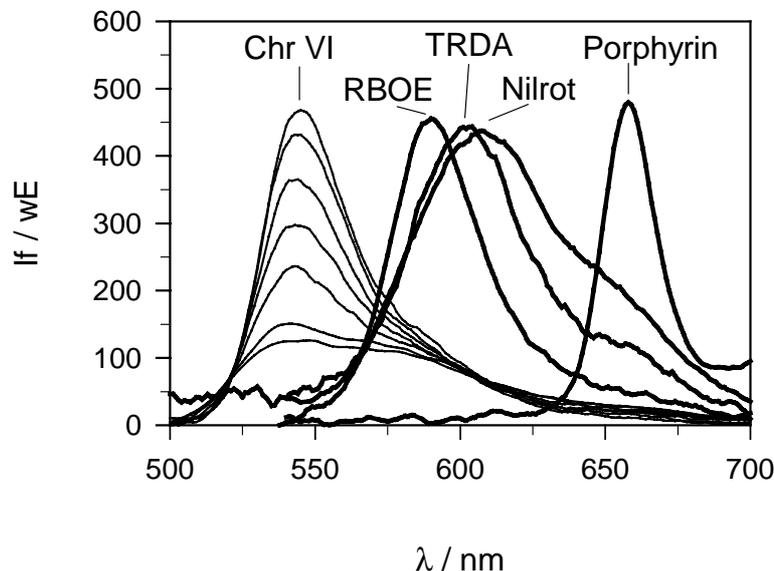


Abbildung 4-2 Fluoreszenz-Emissionsspektren des Messfarbstoffs und der Referenzfarbstoffe in PVC-OH. [Experimentelle Daten: Sensor mit Chr VI in kaliumfreien Universalpuffern, pH = 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10, von unten nach oben. Sensoren mit Referenzfarbstoffen in kaliumfreiem Universalpuffer, pH = 7. $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$].

Anschließend wurden *referenzierte Sensoren* hergestellt, die sowohl den Chromoionophor als auch den Referenzfarbstoff enthielten. Von diesen wurden lediglich die Emissionsspektren aufgenommen. Damit in den resultierenden Spektren zwei Maxima deutlich unterschieden werden konnten, wurde das Stoffmengenverhältnis von Referenzfarbstoff zu Messfarbstoff so gewählt, dass beide Maxima etwa die gleiche Fluoreszenz-Intensität besitzen. Die Verhältnisse schwankten zwischen 1:1 (Nilrot : Chr VI) und 70:1 (TRDA : Chr VI). Da die Rezeptormembranen möglichst geringe Stoffkonzentrationen enthalten sollten, erwies sich auch nach diesem Kriterium Nilrot als der geeignetste Referenzfarbstoff.

Mit diesen referenzierten Sensoren wurde noch die spektrale Trennung der beiden Farbstoffe, d.h. die Unterscheidbarkeit derer Maxima, untersucht. Weiterhin wurden die Emissions-Spektren der Sensoren bei Beprobung mit Puffern mit pH = 7 und steigender Kaliumkonzentration (0...100 mmol/l) aufgenommen. Anhand dieser Spektren wurde die Signalschwankung des Referenzwertes, d.h. der Fluoreszenz-Intensität am Maximum des Referenzfarbstoffs, untersucht. Auch nach diesem Kriterium erwies sich Nilrot als geeignetster Referenzfarbstoff. Dies steht in Einklang damit, dass sich die Spektren dieser Sensoren additiv aus den Einzelspektren des Chromoionophors und des jeweiligen Referenzfarbstoffs zusammensetzen. Die Schwankungen des Chromoionophors (vgl.

Abbildung 4-2) addieren sich daher zu den konstanten Referenzspektren, und nur beim Nilrot, dessen Maximum auf dem isosbestischen Punkt des Chromoionophors liegt, ist ein konstanter Referenzwert zu beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Nilrot als Referenzfarbstoff festgelegt.

Tabelle 4-1 Vergleich der getesteten Referenzfarbstoffe [hellgrau unterlegt: bester Wert im Vergleich; dunkelgrau: Ausscheidungskriterium].

	RBOE	TRDA	Nilrot	Porphyrin
Einzelsensoren				
Anregung: λ_{\max}	564 nm	590 nm	554 nm	424 nm
Halbwertsbreite	36 nm	43 nm	92 nm	19 nm
$I_f(473 \text{ nm}) / I_f(\lambda_{\max})$	20%	7%	23%	2%
Emission: λ_{\max}	580 nm	602 nm	606 nm	658 nm
Halbwertsbreite	36 nm	44 nm	76 nm	21 nm
Einsatz < 640 nm	+	+	+	—
Referenzierte Sensoren				
Emission: λ_{\max}	(577 nm)	599 nm	595 nm	656 nm
Molverhältnis Ref : Chr VI	14 : 1	70 : 1	1 : 1	10 : 1
spektrale Trennung	RBOE nur Schulter	Maxima getrennt	Maxima getrennt	Spektren getrennt
Signalschwankung bei Kalium-Messungen	4,8%	2,1%	<0,1%	3,9%

4.1.2.3 Referenzfarbstoff Nilrot

Abbildung 4-3 zeigt die Änderung des Fluoreszenz-Emissionsspektrums eines referenzierten Sensors mit Chromoionophor VI und Nilrot bei pH = 7 und unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen. Die Fluoreszenz-Intensität am Maximum des Nilrots bleibt konstant, während sich die Intensität am Maximum des Chromoionophors mit steigender Kaliumkonzentration erhöht. Somit kann bei Sensoren mit Nilrot die relative Fluoreszenz-Intensität (siehe Gleichung 4-1) zur Auswertung herangezogen werden.

Diese Art der Referenzierung durch einen zweiten Farbstoff war in unserer Arbeitsgruppe bereits bei ionensensitiven Farbstoffen durchgeführt worden. Die Immobilisierung der Farbstoffe erfolgte dabei durch kovalente Anbindung an Makromoleküle (Dextran), die in eine poröse Sol-Gel-Schicht eingebracht wurden [105]. Bei ionensensitiven Optoden, die wie der hier beschriebene Kalium-Sensor auf dem Ionenaustauschprinzip beruhen, wurde eine

derartige Referenzierung in dieser Arbeit erstmals ausgeführt. Zwar wurden bereits Ionenaustausch-Optoden mit Farbstoffen hergestellt, die zwei Maxima und somit einen isosbestischen Punkt als Referenzpunkt besitzen und daher selbst-referenzierend sind, doch wiesen diese eine mangelnde Sensor-Lebensdauer auf [33].

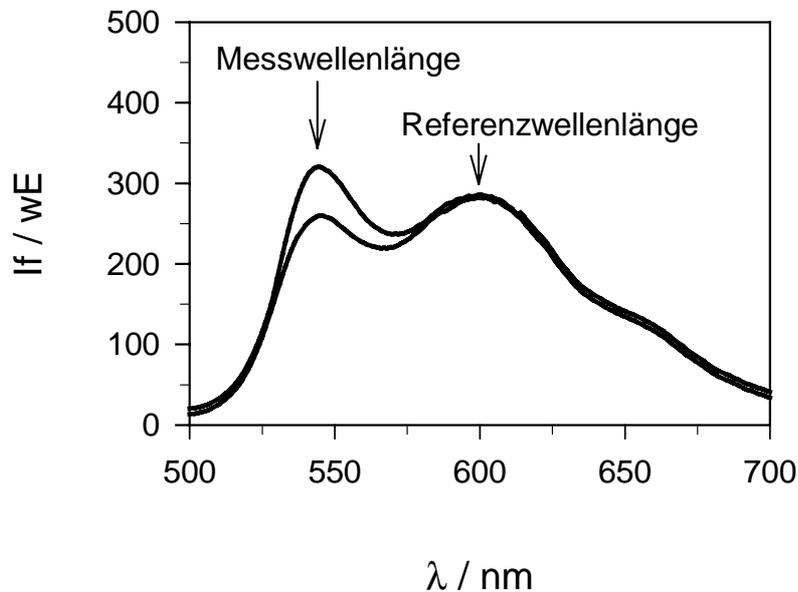


Abbildung 4-3 *Fluoreszenz-Emissionsspektren des referenzierten Sensors.* [Experimentelle Daten: Sensorschicht SR 2. Universalpuffer, pH = 7, $c(\text{KCl}) = 10^{-6} \text{ mol/l}$ (unten); 10^{-2} mol/l (oben). $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$].

4.1.3 Optimierung für den physiologischen Einsatzbereich

4.1.3.1 Zielsetzung und Durchführung

Im Hinblick darauf, dass derartige Sensoren, insbesondere die später beschriebenen Mikrobis Nano-Varianten, für in-situ Messungen in biologischen Systemen angewandt werden können, wurden die Sensoreigenschaften für Messungen unter physiologischen Bedingungen optimiert. Diese Vorgabe legte den pH-Arbeitsbereich auf 6,8...7,4 und den Kalium-Messbereich auf 100...150 mmol/l (intrazellulär) bzw. 1...10 mmol/l (extrazellulär) fest [106].

Weitere angestrebte Sensoreigenschaften waren ein möglichst großer Signalhub (Quotient aus Signaländerung und maximalem Signal), sowie kurze Ansprech- und Regenerationszeiten des Sensors.

Daher wurden zunächst die Einflüsse der Membrankomponenten auf die Sensoreigenschaften untersucht, indem einzelne Komponenten der Rezeptorschichten nach Art und Menge variiert wurden. Sämtliche Sensoren wurden so charakterisiert, wie es in Kapitel 4.1.4 für den optimierten Sensor SR 2 ausführlich erläutert ist. Dabei wurden folgende Schritte unternommen:

- ☞ Beprobung mit kaliumfreien und 100 mmol/l Kalium enthaltenden pH-Puffern:
 - Aufnahme von Fluoreszenz-Emissions-Spektren; Kalibration des Sensors zur Bestimmung des optimalen pH-Arbeitsbereichs.
 - Ermittlung der Ansprech- und Regenerationszeiten aus dem zeitlichen Verlauf des Sensorsignals bei Wechsel der Probelösung.
- ☞ Beprobung mit Puffern steigender Kaliumkonzentration bei gleichbleibendem pH-Wert:
 - Aufnahme von Fluoreszenz-Emissions-Spektren; Kalibration des Sensors zur Bestimmung des dynamischen Kalium-Messbereichs.
 - Ermittlung der Ansprech- und Regenerationszeiten.

4.1.3.2 Beobachtete Einflussparameter

Im Folgenden sind kurz die beobachteten Einflüsse der Zusammensetzung der Rezeptorschicht auf die Sensoreigenschaften aufgeführt. Wegen der Komplexität der gegenseitigen Einflüsse wurden diese lediglich beschrieben, damit basierend auf diesen Erkenntnissen eine Optimierung bezüglich der eingangs genannten Parameter durchgeführt werden konnte.

Art des Weichmachers

Es wurden zwei Weichmacher unterschiedlicher Polarität getestet: Dioctylsebacat (DOS) und 2-Nitrophenyl-octylether (NPOE), der durch die Nitrogruppe stärker polar ist.

Einfluss auf den pH-Arbeitsbereich und die Ansprechzeit

Bei Sensoren mit NPOE konnten pH-Arbeitsbereiche von 4,0...6,5 erzielt werden, wodurch sie für Messungen im physiologischen Bereich ungeeignet sind. Die Ansprech- und Regenerationszeiten lagen auch ohne Phasentransferkatalysator im Bereich weniger Sekunden.

Die Sensoren mit DOS wiesen pH-Arbeitsbereiche von 5,0...7,5 auf. Die Ansprech- und Regenerationszeiten lagen ohne Phasentransferkatalysator im Minuten-Bereich, konnten jedoch durch Zugabe des Katalysators auf wenige Sekunden gesenkt werden. Durch diese Zugabe verringerte sich jedoch auch der Signalhub.

Durch eine Kombination beider Weichmacher konnten Sensoren hergestellt werden, die bei pH = 7 im Sekundenbereich auf Kalium ansprechen.

Einfluss auf die Emissions-Maxima

Das Emissions-Maximum des Chromoionophors lag unabhängig von Weichmacher bei 545 nm. Das Maximum von Nilrot zeigte jedoch eine Wellenlängenverschiebung in Abhängigkeit von der Art des Weichmachers: In Sensoren mit NPOE lag das Maximum bei 600...608 nm, also gut getrennt vom Chromoionophor. Die Wellenlängenverschiebungen innerhalb dieses Bereiches sind auf unterschiedliche Konzentrationen von Valinomycin zurückzuführen (siehe dort). In Sensoren mit DOS lag das Maximum bei 580...590 nm, trat folglich eher als Schulter als als sauber getrenntes Maximum auf. Durch Mischen der Weichmacher wurde ein mittlerer Wellenlängenbereich von 590...600 nm mit einer guten Trennung der Maxima erzielt (vgl. Abbildung 4-3).

Kalium-Komplexbildner: Valinomycin

Steigende Konzentrationen von Valinomycin in der Rezeptorschicht verschieben den pH-Arbeitsbereich hin zu niedrigeren pH-Werten, senken das Wellenlängenmaximum von Nilrot um einige nm (was für die spektrale Trennung ungünstig ist), steigern zwar den Signalhub für Kalium-Messungen, verzögern jedoch die Regenerationszeit.

Weiterhin bestimmt der Komplexbildner den Kalium-Messbereich. Der dynamische Kalium-Messbereich lag bei allen getesteten Sensoren zwischen 10^{-5} und 10^{-2} mol/l, und schließt somit extrazelluläre Konzentrationen (10^{-3} mol/l) ein.

Phasentransferkatalysator: Kalium-tetrakis-(4-chlorphenyl)-borat [KtCIPB]

Steigende Konzentrationen verschieben den pH-Arbeitsbereich hin zu höheren pH-Werten, senken den Signalhub für Kalium-Messungen, beschleunigen die Ansprechzeit, verlängern allerdings die Regenerationszeit.

4.1.3.3 Optimierte Sensoren

Als Ergebnis der oben beschriebenen Untersuchungen wurden zwei optimierte Kalium-Sensoren erhalten:

- *Sensorschicht SR 1* ist auf maximal erzielbaren Signalhub bei pH = 7 optimiert. Sie enthält DOS als Weichmacher und viel Valinomycin, was den Signalhub für Kalium-Messungen verbessert, aber die Regenerationszeit verlängert.
- *Sensorschicht SR 2* ist hinsichtlich minimalen Ansprech- und Regenerationszeiten optimiert. Sie enthält als Weichmacher eine Mischung aus DOS und NPOE. Daraus resultieren einerseits schnelle Ansprech- und Regenerationszeiten, jedoch liegt der optimale pH-Arbeitsbereich bei pH-Werten < 7, was zu einem verringerten Signalhub für Kalium-Messungen bei pH = 7 führt.

Die genauen Zusammensetzungen sind im Experimentellen Teil beschrieben. Tabelle 4-2 zeigt die wichtigsten Eigenschaften beider Sensoren auf, deren Definitionen in Kapitel 3.7 erläutert sind. Eine ausführliche Charakterisierung des Sensors SR 2 folgt in Kapitel 4.1.4.

Tabelle 4-2 *Eigenschaften der optimierten Sensoren.*

	Sensorschicht SR 1	Sensorschicht SR 2
Spektrale Eigenschaften		
$\lambda_{em, max}$ (Chr VI)	546 nm	545 nm
$\lambda_{em, max}$ (Nilrot)	588 nm	595 nm
pH-Messung		
Signalhub (kaliumfrei)	61 %	63 %
Wdp (kaliumfrei)	pH = 7,3	pH = 7,1
Wdp (100 mmol/l Kalium)	pH = 4,5	pH = 5,9
Ansprechzeit (t_{90})	17 s	15 s
Regenerationszeit (t_{90})	68 s	16 s
Kalium-Messung		
Signalhub (bei pH = 6,0)	51 %	26 %
Wdp (bei pH = 6,0)	pK = 3,6	pK = 4,1
Signalhub (bei pH = 7,0)	28 %	16 %
Wdp (bei pH = 7,0)	pK = 4,6	pK = 4,5
Ansprechzeit (t_{90} , pH = 7,0)	13 s	10 s
Regenerationszeit (t_{90} , pH = 7,0)	5 min	43 s

Der dynamische Kalium-Messbereich lag bei pH = 7 für beide Sensoren etwa gleich ($10^{-6} \dots 10^{-2}$ mol/l; Wdp bei ca. 0,03 mmol/l). Sensor SR 1 besaß bei pH = 7 einen größeren Signalhub (28%) als Sensor SR 2 (16%). Jedoch lag die Regenerationszeit des mit Kalium gesättigten Sensors SR 1 mit 5 min deutlich höher als die des Sensors SR 2 (43 s).

Im Hinblick auf die Miniaturisierung wurde dem schneller ansprechenden Sensor SR 2 der Vorzug gegeben, da lange Regenerationszeiten, wie sie der Sensor SR 1 aufweist, für in-situ Messungen ungeeignet sind. Aus diesem Grunde wurde die Miniaturisierung ausgehend von der Rezeptur des Sensors SR 2 durchgeführt, der geringere Signalhub von 16% anstelle von 28% bei Sensor SR 1 wurde toleriert.

4.1.4 Charakterisierung des optimierten Sensors SR 2

4.1.4.1 Vorgehensweise

Der vorliegende Kalium-Sensor reagiert sowohl auf Änderungen der Kaliumionenkonzentration als auch des pH-Wertes. Bevor Kalium-Messungen mit einem solchen Sensor durchgeführt werden, ist daher zunächst der pH-Arbeitsbereich zu untersuchen (vergleiche auch die Erläuterung des Sensorprinzips im Einführungsteil). Dieser wird zwar hauptsächlich von dem verwendeten Messfarbstoff bestimmt, aber auch andere Membranbestandteile beeinflussen die letztendlich erhaltenen Spezifikationen (vgl. voriges Kapitel).

Da die Ionenstärke der Puffer die Gleichgewichte in der Membran und somit das Sensorsignal beeinflusst, musste sie bei allen verwendeten Puffern konstant gehalten werden. Dies wurde bei kaliumfreien Puffern bzw. Puffern niedriger Kaliumionenkonzentration durch Zugabe entsprechender Mengen von Natriumchlorid bewirkt (vgl. Kapitel 3.1.5.1).

4.1.4.2 pH-Arbeitsbereich

Zur Charakterisierung des Sensors wurde zunächst eine pH-Messreihe in kaliumfreien Puffern durchgeführt. Die Fluoreszenz-Emissionsspektren dieser Messung sind in Abbildung 4-4 gezeigt. Bei 545 nm erkennt man die sich ändernde Fluoreszenz-Intensität des Messfarbstoffs Chromoionophor VI, bei 595 nm die konstante Intensität des Referenzfarbstoffs Nilrot.

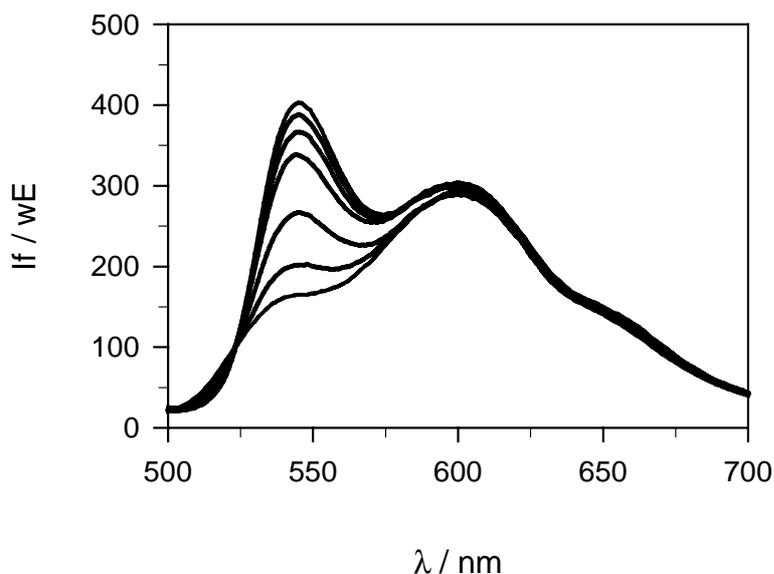


Abbildung 4-4 *pH-Messreihe mit Makro-Sensor SR 2.* [Experimentelle Daten: Kaliumfreier Universalpuffer, pH = 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11 von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$].

Daraufhin wurde eine weitere pH-Messreihe in Puffern mit 100 mmol/l Kalium durchgeführt, was einer Sättigung des Sensors mit Kaliumionen entspricht. Für jeden pH-Wert wurde aus dem entsprechenden Spektrum das relative Sensorsignal nach Gleichung 4-1 berechnet und in Abhängigkeit des pH-Wertes der Messlösung aufgetragen. Aus dem Vergleich der beiden Kurven für kaliumfreie bzw. kaliumgesättigte Lösung kann man für jeden pH-Wert den Signalhub für eine Kalium-Messung ermitteln. Dies ist in Abbildung 4-5 dargestellt. Nach dieser Auswertung liegt der optimale pH-Messwert bei 5,7. Bei pH = 6 ergibt sich ein Signalhub von 24%, bei pH = 7 von 17%.

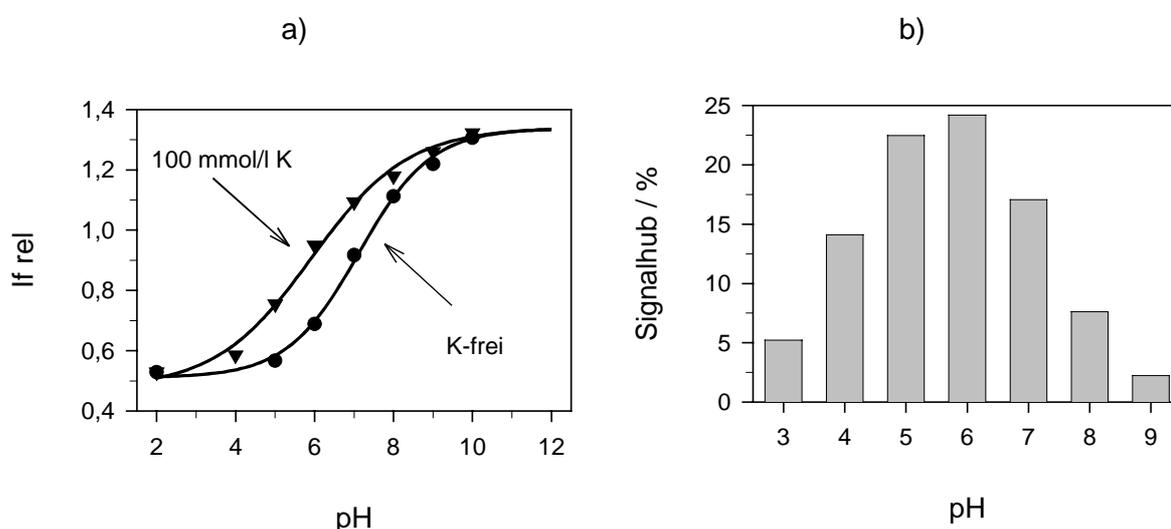


Abbildung 4-5 Makro-Sensor SR 2. a) pH-Abhängigkeit des relativen Signals in kaliumfreien (●) und kaliumhaltigen Puffern (▼). b) Signalhub für Kalium-Messungen in Abhängigkeit des pH-Wertes. [Experimentelle Daten: Universalpuffer ohne bzw. mit 100 mmol/l KCl; $\lambda_{ex} = 473$ nm].

4.1.4.3 Kalium-Messbereich

Anschließend wurden Kalium-Messungen durchgeführt. Die bei pH = 6 bzw. pH = 7 erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4-6 wiedergegeben. Bei beiden pH-Werten ist eine deutliche Änderung der Intensität am Maximum des Chromoionophors im Konzentrationsbereich von $10^{-6} \dots 10^{-2}$ mol/l Kalium zu erkennen.

Für die Kalibration wurden die relativen Fluoreszenz-Intensitäten über dem negativen dekadischen Logarithmus der Kaliumionenkonzentration (pK-Wert) aufgetragen, da sich bei diesem Auftrag die Messwerte analog zur pH-Bestimmung sigmoidal anpassen lassen.

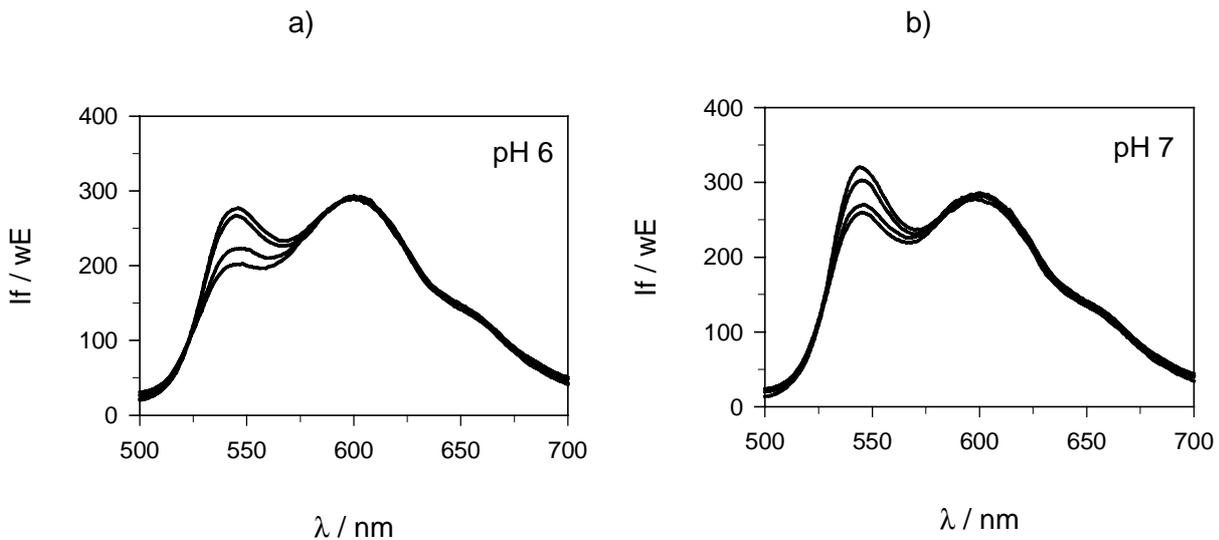


Abbildung 4-6 Makro-Sensor SR 2. Spektren in Abhängigkeit von der Kaliumionenkonzentration bei $\text{pH} = 6$ (a) bzw. $\text{pH} = 7$ (b). [Experimentelle Daten: a) Universalpuffer, $\text{pH} = 6$, $c(\text{KCl}) = 10^{-6}$; 10^{-5} ; 10^{-3} ; 10^{-2} mol/l von unten nach oben. b) Universalpuffer, $\text{pH} = 7$, $c(\text{KCl}) = 10^{-6}$; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-2} mol/l von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473$ nm].

Bei $\text{pH} = 6$ wurde ein Signalhub von 26% erhalten, der Wendepunkt der Kalibrationskurve lag bei $\text{pK} = 4,1$ (entsprechend einer Kaliumkonzentration von 0,08 mmol/l). Bei $\text{pH} = 7$ zeigte der Sensor einen Signalhub von 16% und einen Wendepunkt bei $\text{pK} = 4,5$ (entsprechend 0,032 mmol/l). Wie erwartet, nahm der Signalhub von $\text{pH} = 6$ nach $\text{pH} = 7$ ab. Die bei den Kalium-Messungen bestimmten Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den aus den pH-Messungen ermittelten Signalhüben.

4.1.4.4 Ansprechverhalten

Das Ansprechverhalten des Sensors wurde bestimmt, indem der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz-Intensität am Maximum des Messfarbstoffs bei sprunghaften Konzentrationsänderungen aufgenommen wurde (siehe Abbildung 4-7).

Bei pH-Messungen sprach der Sensor schnell an. Für den Wechsel von $\text{pH} = 2$ nach $\text{pH} = 12$ wurde die t_{90} -Zeit zu 15 s bestimmt, für den Wechsel von $\text{pH} = 12$ nach $\text{pH} = 2$ zu 16 s.

Auf eine Kalium-Zugabe bei $\text{pH} = 7$ sprach der Sensor ebenfalls im Sekundenbereich an ($t_{90} = 10$ s). Die Regenerierung eines kaliumgesättigten Sensors dauerte etwas länger ($t_{90} = 43$ s).

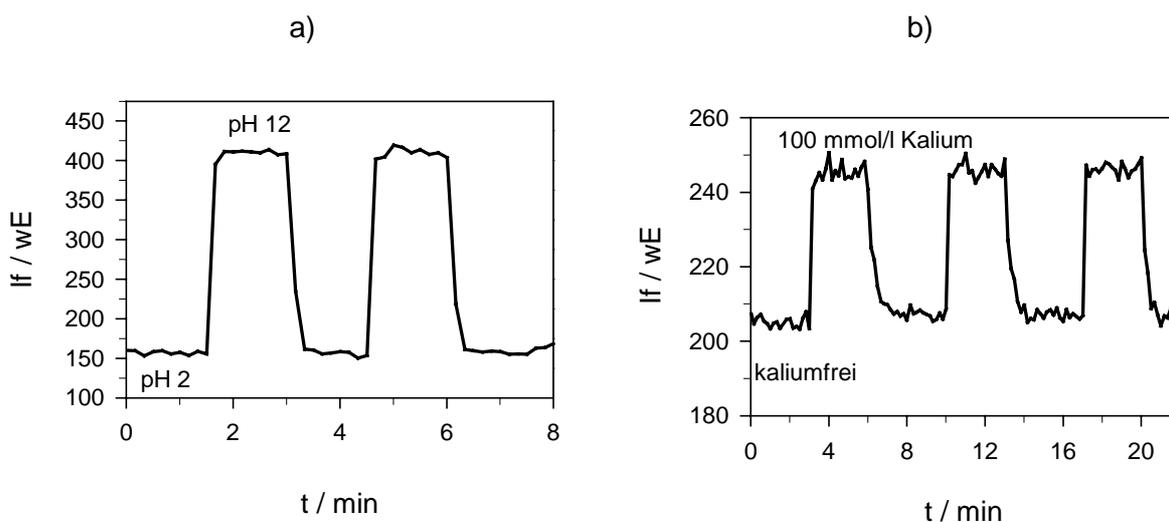


Abbildung 4-7 Zeitlicher Verlauf des Sensorsignals. a) pH-Abhängigkeit. b) Abhängigkeit von der Kaliumionenkonzentration. [Experimentelle Daten: Zusammensetzung Sensor SR 2. a) Kaliumfreie Universalpuffer, pH = 2; 12. b) Universal-puffer, pH = 7, ohne bzw. mit 100 mmol/l KCl; $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$].

4.1.4.5 Schichtdickenbestimmung

Mit einem Tastschnittgerät wurde an drei Makro-Sensoren SR 2 die Schichtdicke gemessen. Sie betrug $950 \pm 40 \text{ nm}$.

4.2 Miniaturisierung

4.2.1 Einführung

Der Messaufbau für miniaturisierte Sensoren ist im Experimentellen Teil beschrieben. Das von einem Laser stammende Anregungslicht wird in eine optische Faser eingekoppelt, die an ihrem distalen Ende die Rezeptorschicht trägt. Das Fluoreszenzlicht wird mittels eines Mikroskopobjektivs gesammelt und in einem Spektrographen analysiert. Dieser Aufbau ist zur Aufnahme von Fluoreszenz-Emissionsspektren ausgelegt, die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs ist im Zeittakt von einigen zehn Sekunden möglich.

Die Miniaturisierung wurde in drei Schritten durchgeführt:

- 1) Mikro-Sensoren bestehend aus Fasern mit $50 \mu\text{m}$ bzw. $4 \mu\text{m}$ Kerndurchmesser;
- 2) Submikro-Sensoren mit 300 nm Spitzendurchmesser (ausgezogene Faserspitzen);
- 3) Nano-Sensoren mit 50 nm Apertur (SNOM-Spitzen).

Für jeden Miniaturisierungsschritt wurden pH- und Kalium-Messungen durchgeführt, die entsprechend den Makro-Sensoren anhand der Spektren ausgewertet wurden. Die Spektren wurden wie im Experimentellen Teil beschrieben normiert. Das Ansprechverhalten der Sensoren wurde verfolgt, indem Spektren im 30 Sekunden Rhythmus aufgenommen wurden und der Zeitpunkt bestimmt wurde, ab dem sich das Sensorsignal nicht mehr änderte. Im Gegensatz zu den Messungen mit Makro-Sensoren, bei denen die t_{90} -Zeiten bestimmt wurden, werden in diesem Abschnitt die Zeiten zum Erreichen der Signalkonstanz gegeben. Diese sind etwa doppelt so lang wie die t_{90} -Zeiten anzusetzen.

4.2.2 Silanisierung der Quarzfasern

Erste Versuche mit miniaturisierten Sensoren zeigten, dass die Rezeptorschicht nur ungenügend auf den verwendeten Quarzfasern haftete. Nach nur wenigen Lösungswechseln war schlagartig keine Fluoreszenz mehr detektierbar, was darauf hinwies, dass sich die Schicht abgelöst hatte.

Da die Polymerschicht nicht kovalent an den Träger angebunden wurde, beruht die Haftung lediglich auf der Adsorption des Polymerfilms auf der Faseroberfläche. Diese ist um so besser, je ähnlicher die Polarität der beiden Materialien ist. Quarzglas besitzt eine höhere Polarität als PVC-OH. Die Anbindung von Silanen, die wenig polare Reste tragen, an die Glasoberfläche stellt eine Möglichkeit dar, die Polarität der Oberfläche zu verringern. Daher sollte sich die Haftung der Rezeptorschicht durch Silanisieren der Glasfasern verbessern lassen.

Zunächst wurde eine Silanisierung mit γ -Aminopropyl-triethoxysilan durchgeführt. Es wurde zwar eine Verbesserung der Haftung festgestellt, jedoch wurde immer noch beobachtet, dass sich die Schicht nach einigen Probenwechseln ablöste.

Daraufhin wurde eine Silanisierung mit Trichlorvinylsilan durchgeführt, das von seiner Polarität her dem PVC-OH recht nahe kommt. Dieses Vorgehen brachte den gewünschten Erfolg; die Rezeptorschichten hafteten sowohl während eines zweiwöchigen Langzeittests als auch während einer kontinuierlichen Beprobung im Durchfluss für 100 Stunden.

Daher wurden die Fasern für alle im Folgenden beschriebenen Mikro- und Submikro-Sensoren dieser Silanisierung mit Trichlorvinylsilan unterzogen.

4.2.3 Mikro-Sensoren

4.2.3.1 Physikalische Charakterisierung der Faserenden

Zur Herstellung von Mikro-Sensoren wurden silanisierte Faserenden mit der farbstoffhaltigen Polymerlösung beschichtet. Es wurden zwei verschiedene Fasertypen verwendet, eine mit

50 μm / 125 μm und eine mit 4 μm / 125 μm Kern- / Manteldurchmesser. Der Außendurchmesser der Faser ist dabei durch den Manteldurchmesser vorgegeben, an der Stirnfläche entsteht ein belichteter Spot vom Durchmesser des Kerns, der somit die Dimension der wirksamen Sensorfläche vorgibt.

Die Fasern wurden senkrecht zur Lichtleitungsrichtung durchtrennt. Bei lichtmikroskopischen Betrachtungen der Fasern war zu erkennen, dass die Stirnflächen plan waren, sodass ein gleichmäßiger Lichtaustritt aus der Faser unter dem jeweiligen Öffnungswinkel gewährleistet ist. Aus dem Größenvergleich von unbeschichteten und mit einer Rezeptorschicht versehenen Fasern konnte man ersehen, dass die Dicke der Beschichtung auf der Mantelfläche des Lichtleiters bei etwa einem Mikrometer lag. Aufgrund dieser Beobachtung kann davon ausgegangen werden, dass die Schichtdicke auf der Stirnfläche bei etwa dem gleichen Wert liegt.

4.2.3.2 Messungen mit Rezeptorschicht SR 2

Unter Verwendung einer Faser mit 50 μm Kerndurchmesser wurde ein Mikro-Sensor ausgehend von der Zusammensetzung des Makro-Sensors SR 2 hergestellt. Wiederholte Beschichtungen und Messungen mit der Faser ergaben, dass sich der pH-Arbeitsbereich deutlich von dem der Makro-Sensoren unterschied. Der Signalhub betrug ähnlich wie beim Makro-Sensor 56%, die einzelnen pH-Werte konnten zuverlässig unterschieden werden. Der Wendepunkt der Kalibration lag jedoch bei pH = 5,8 im Gegensatz zu pH = 7,1 beim Makro-Sensor. Bei pH = 7 war der Chromoionophor im Mikro-Sensor bereits fast vollständig deprotoniert, weshalb durch eine Kaliumzugabe kaum noch eine weitere Deprotonierung möglich war. Dementsprechend wurde bei Beprobung des Sensors mit unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen bei pH = 7 ein Signalhub von 3% beobachtet, der zu gering für aussagekräftige Messungen war.

Als Ursachen für die veränderten Sensoreigenschaften können zwei wesentliche Unterschiede zwischen den Mikro- und Makro-Sensoren in Betracht gezogen werden:

- 1) Die Beschaffenheit des Trägers der Rezeptorschicht. Im Falle der Makro-Sensoren wurde Plexiglas als Träger verwendet, bei den Mikro-Sensoren silanisiertes Quarzglas.
- 2) Das Beschichtungsverfahren. Bei den Makro-Sensoren wurde die Rezeptorschicht durch Spin-Coating aufgebracht, wobei der Großteil der Lösung radial abgeschleudert wird und das Lösemittel sehr schnell verdunstet, die Mikro-Sensoren hingegen wurden in die Beschichtungslösung getaucht und wieder herausgezogen.

Da diese beiden Parameter jedoch bei den miniaturisierten Sensoren nicht an die Gegebenheiten bei den Makro-Sensoren angeglichen werden konnten, wurde als alternativer Lösungsweg die Anpassung der Zusammensetzung der Rezeptorschicht besprochen.

4.2.3.3 Messungen mit Rezeptorschicht SR 3

Im Folgenden wurde - basierend auf den Erkenntnissen über die Einflüsse der Matrixkomponenten auf die Sensoreigenschaften aus Kap. 4.1.3.2 - die Zusammensetzung der Rezeptorschicht angepasst.

Dazu wurde die Konzentration des Phasentransferkatalysators KtCIPB gesteigert. Die daraus resultierende Erniedrigung des Kalium-Signalhubs wurde kompensiert, indem außerdem die Konzentration des Komplexbildners Valinomycin erhöht wurde. So wurde in mehreren Optimierungsschritten eine Rezeptur erarbeitet, bei der die Konzentration an KtCIPB und Valinomycin gegenüber der Rezeptur für Sensor SR 2 jeweils vervierfacht war. Eine weitere Erhöhung der Konzentrationen hatte keine Erweiterung des Messbereichs zur Folge, sondern verlangsamte nur das Ansprechverhalten des Sensors.

Mit dieser Zusammensetzung SR 3 wurden pH- und Kalium-Messungen zunächst auf einer Faser mit 50 μm Kerndurchmesser durchgeführt und dann auf einer Faser mit 4 μm Kerndurchmesser wiederholt. Auf beiden Fasern wiesen die Rezeptorschichten mit gleicher Zusammensetzung die gleichen Messbereiche für pH und Kalium auf. Der Mikro-Sensor SR 3 zeigte bei pH-Messungen einen Signalhub von 59%, der Wendepunkt der Kalibration lag bei $\text{pH} = 7,3$ (vgl. Abbildung 4-8). Die Eigenschaften bezüglich der pH-Messung entsprachen wieder dem Makro-Sensor SR 2.

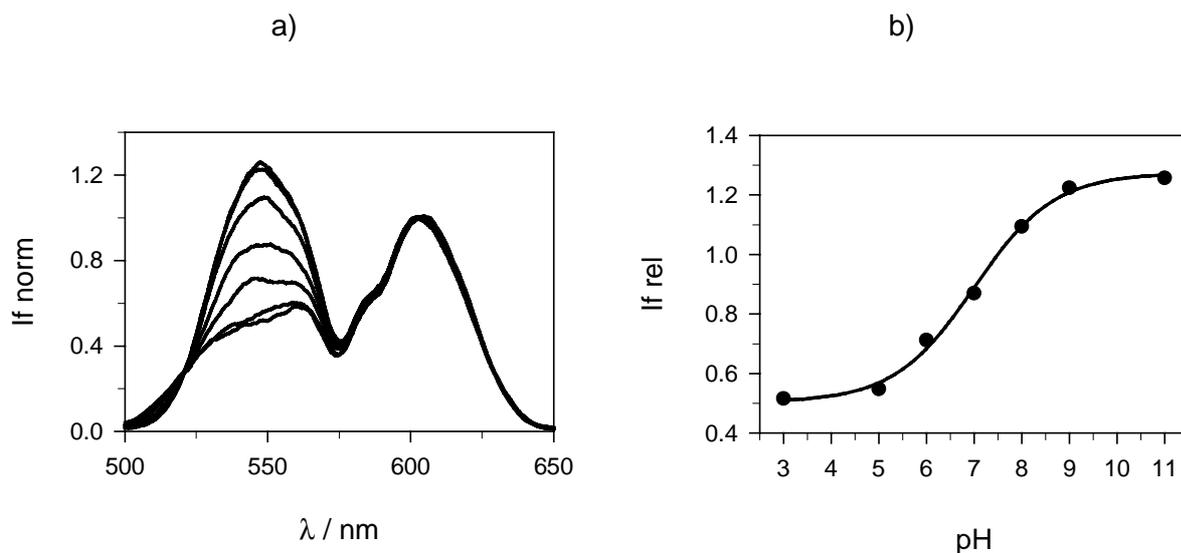


Abbildung 4-8 Mikro-Sensor SR 3. pH-Abhängigkeit. a) Spektren. b) Kalibration. [Experimentelle Daten: Kaliumfreie Universalpuffer, $\text{pH} = 3; 5; 6; 7; 8; 9; 11$ von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$. Kerndurchmesser $d = 4 \mu\text{m}$. Beleuchtungsstärke $E = 2,3 \cdot 10^4 \text{ W/m}^2$].

In Abbildung 4-8 fällt noch die veränderte Spektrenform gegenüber den Spektren der Makro-Sensoren (Abbildung 4-4 und 4-6) auf. Diese wird durch den Notch-Filter verursacht, der im Aufbau für miniaturisierte Sensoren das Anregungslicht im Strahlengang herausfiltert. Neben der Absorptionsbande bei 473 nm mit einer Transmission $< 10^{-6}$ besitzt dieser Filter noch zwei weitere schmale Absorptionsbanden bei 570 nm ($T \approx 0,4$) und 585 nm ($T \approx 0,3$). Durch diese werden die Maxima der beiden Farbstoffe nicht verändert, zwischen ihnen entsteht jedoch eine ausgeprägte Trennung.

Kalium-Messungen bei pH = 5,5 ergaben einen Signalhub von 34% und einen Wendepunkt der Kalibration bei pK = 3,7 (entsprechend 0,2 mmol/l). Bei pH = 7 betrug der Signalhub 30%, der Wendepunkt lag bei pK = 4,0 (entsprechend 0,1 mmol/l; vgl. Abbildung 4-9). Der Signalhub war nach der Anpassung der Rezeptur gegenüber dem Makro-Sensor SR 2 deutlich größer, auch der Kalium-Messbereich war etwas näher zu physiologischen Konzentrationen (1...10 mmol/l extrazellulär) hin verschoben.

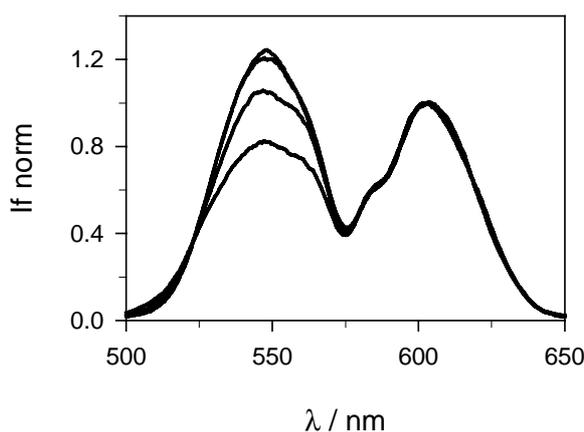


Abbildung 4-9

Mikro-Sensor SR 3. Abhängigkeit von der Kaliumionenkonzentration bei pH = 7. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, pH = 7, $c(\text{KCl}) = 10^{-5}$; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-1} mol/l von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473$ nm. Kerndurchmesser $d = 4$ μm . Beleuchtungsstärke $E = 2,3 \cdot 10^4$ W/m^2].

Die Ansprechzeit bei pH-Änderungen betrug etwa eine halbe Minute bis zur Signalkonstanz. Bei Erhöhung der Kaliumionenkonzentration war ein konstanter Signalwert ebenfalls nach einer halben Minute erreicht, die Regeneration dauerte vier Minuten. Diese verlängerte Regenerationszeit gegenüber dem Makro-Sensor SR 2 steht in Einklang mit den Beobachtungen, die bei einer Erhöhung der Konzentration des Komplexbildners wie auch des Phasentransferkatalysators an Makro-Sensoren gemacht wurden (vgl. Kap. 4.1.3.2).

4.2.4 Submikro-Sensoren

4.2.4.1 Physikalische Charakterisierung der Faserspitzen

Der nächste Miniaturisierungsschritt bestand in der Herstellung von Faserspitzen mit einem Durchmesser $< 1 \mu\text{m}$. Mit Hilfe von licht- und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die Länge des verjüngten Bereichs zu 0,8...1,5 mm bestimmt (vgl. Abbildung 4-10 a). Die verwendeten Spitzen zeigten einen geraden, kegelförmigen Verlauf und eine Form, die in Anlehnung an die Literatur als nadelförmig bezeichnet werden kann [107]. Der Spitzendurchmesser wurde anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu etwa 300 nm abgeschätzt (siehe Abbildung 4-10 b). Weiterhin wurde durch den Vergleich einer beschichteten und unbeschichteten Spitze eine Abschätzung der Schichtdicke vorgenommen. Der Durchmesser der beschichteten Spitze betrug etwa 600 nm (siehe Abbildung 4-10 c), woraus für die Rezeptorschicht eine Dicke von etwa 150 nm angenommen werden kann. Die Rezeptorschicht auf den Spitzen ist also deutlich dünner als bei den Makro- und Mikro-Sensoren.

Wie bereits im Einführungsteil diskutiert, kann davon ausgegangen werden, dass der Lichtaustritt bei derartigen Spitzen überwiegend im Bereich der maximalen Krümmung erfolgt. Als Größe der bestrahlten Fläche der sensitiven Schicht kann man demnach den Spitzendurchmesser zugrunde legen. Mit etwa 300 nm liegt dieser deutlich unter einem Mikrometer.

4.2.4.2 pH- und Kalium-Messungen

Mit diesen Faserspitzen wurden Sensoren basierend auf der Zusammensetzung SR 3 hergestellt. Zunächst wurden wieder pH-Messungen durchgeführt. Die entsprechenden Spektren und die Kalibration sind in Abbildung 4-11 dargestellt. Der Signalhub betrug 61%, der pH-Wert am Wendepunkt 7,0.

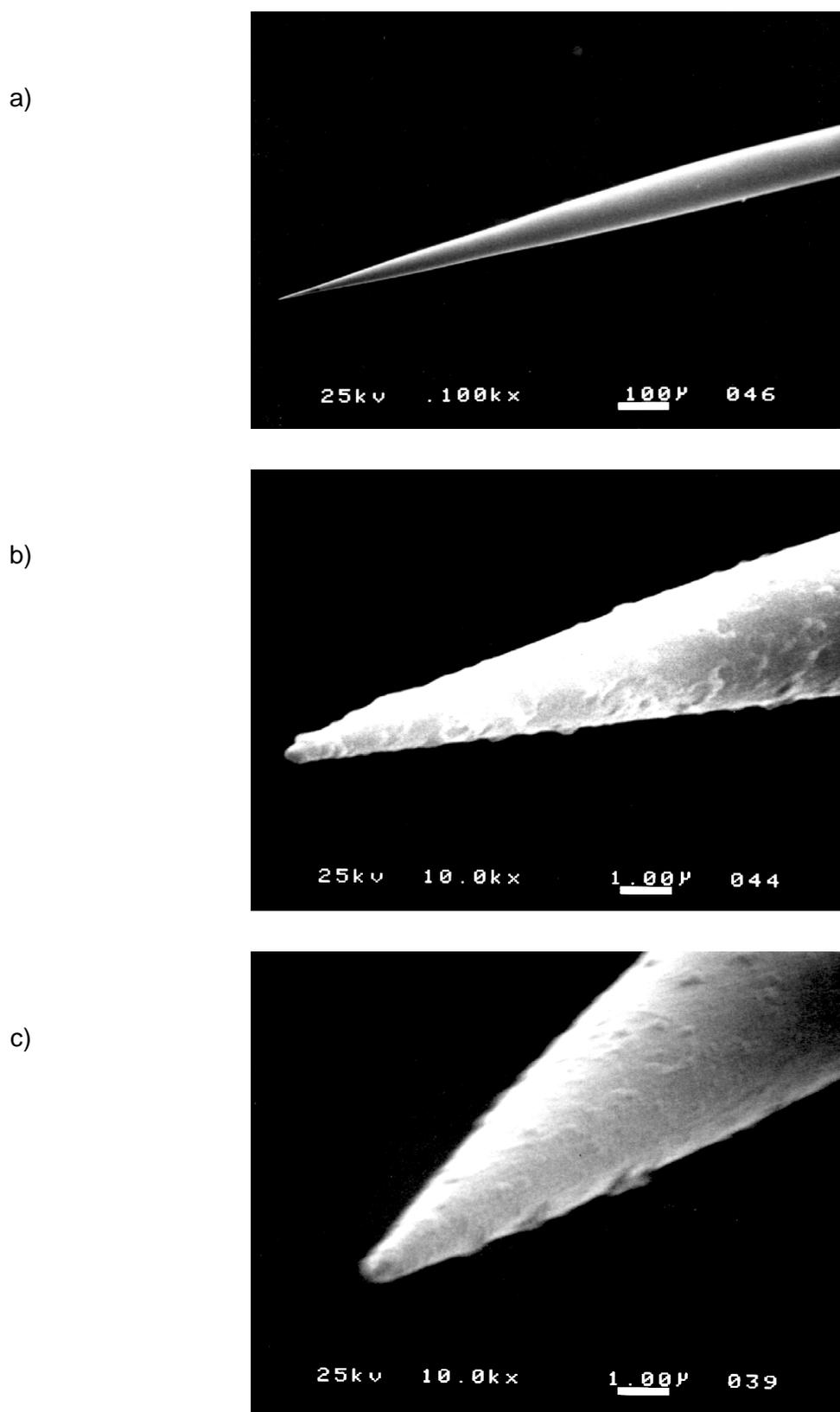


Abbildung 4-10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von einer unbeschichteten (a), (b) und beschichteten (c) Spitze. [Vergrößerung der Originalaufnahmen: (a) 100fach; (b) und (c) 10000fach].

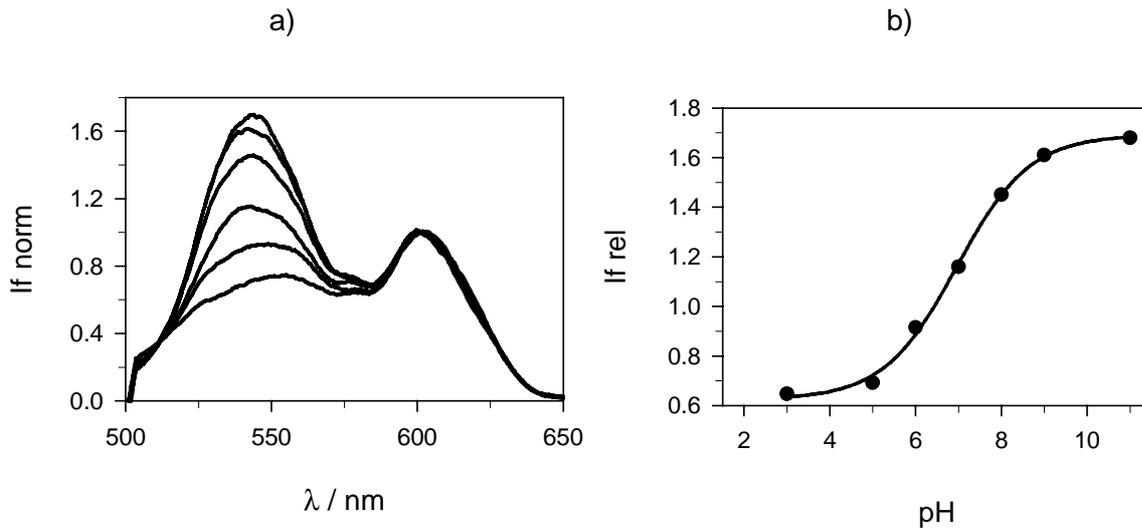


Abbildung 4-11 Submikro-Sensor SR 3. pH-Abhängigkeit. a) Spektren. b) Kalibration. [Experimentelle Daten: Kaliumfreie Universalpuffer, pH = 3; 5; 6; 7; 8; 9; 11 von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473$ nm. Spitzendurchmesser $d = 300$ nm. Beleuchtungsstärke $E = 4,2 \cdot 10^6$ W/m²].

Bei Kalium-Messungen bei pH = 7 zeigte der Sensor einen Signalhub von 24%, der Wendepunkt der Kalibration lag bei pK = 3,6 (entsprechend 0,25 mmol/l Kalium, vgl. Abbildung 4-12). Eine ausführliche Diskussion des dynamischen Messbereichs folgt in Kapitel 4.2.6.

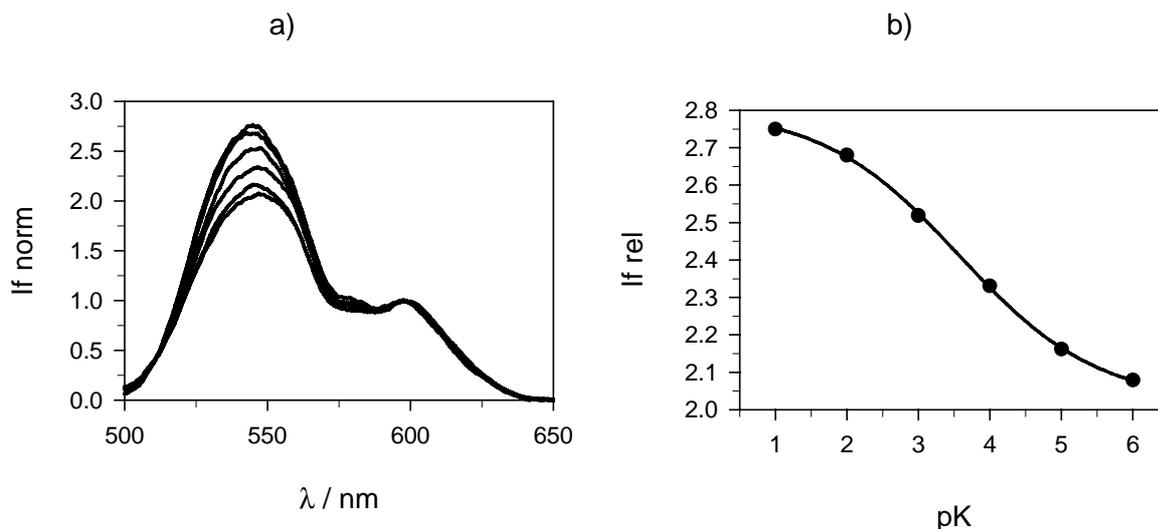


Abbildung 4-12 Submikro-Sensor SR 3. Abhängigkeit von der Kaliumionenkonzentration bei pH = 7. a) Spektren. b) Kalibration. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, pH = 7, $c(\text{KCl}) = 10^{-6}$; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} mol/l von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473$ nm. Spitzendurchmesser $d = 300$ nm. Beleuchtungsstärke $E = 4,2 \cdot 10^6$ W/m²].

Bei diesen Submikro-Sensoren wurde das gleiche Ansprech- und Regenerationsverhalten wie bei den Mikro-Sensoren mit gleicher Zusammensetzung der Rezeptorschicht beobachtet, d.h. 30 Sekunden bis zur Signalkonstanz bei pH-Änderungen bzw. Erhöhung der Kaliumionenkonzentration und 4 Minuten zur Regeneration des kaliumgesättigten Sensors. Der Miniaturisierungsschritt von „Mikro“ (4 μm) nach „Submikro“ (300 nm) und die damit verbundene Schichtdickenänderung von etwa einem Mikrometer auf etwa 150 nm hatte bezüglich des Ansprechverhaltens keinen Einfluss.

4.2.5 Nano-Sensoren

4.2.5.1 Physikalische Charakterisierung der SNOM-Spitzen

In einem weiteren Miniaturisierungsschritt wurden SNOM-Fasern verwendet. Bei diesen sind die Seiten des spitz zulaufenden Bereichs mit Aluminium bedampft, sodass das Licht nur durch die Austrittsöffnung austreten kann. Nach Herstellerangaben beträgt der Durchmesser dieser Apertur etwa 50 nm.

Aus dem Größenvergleich der beschichteten und unbeschichteten Spitze wurde die Dicke der Rezeptorschicht zu etwa 100 nm abgeschätzt.

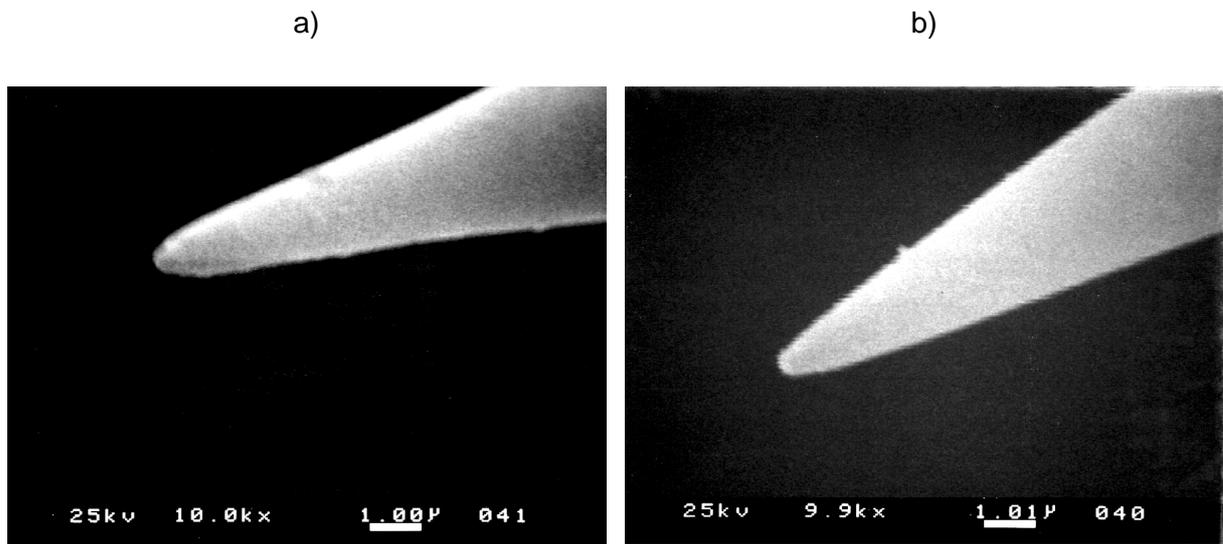


Abbildung 4-13 SNOM-Spitzen. a) Unbeschichtet. b) Beschichtet. [Vergrößerung der Originalaufnahmen: 10000fach].

4.2.5.2 pH- und Kalium-Messungen

Der Nano-Sensor zeigte über den untersuchten pH-Bereich einen Signalhub von 57% und einen Wendepunkt der Kalibration bei $\text{pH} = 7,0$ (vgl. Abbildung 4-14). Die Ansprechzeiten bei pH-Änderungen lagen bei einer Minute bis zur Signalkonstanz.

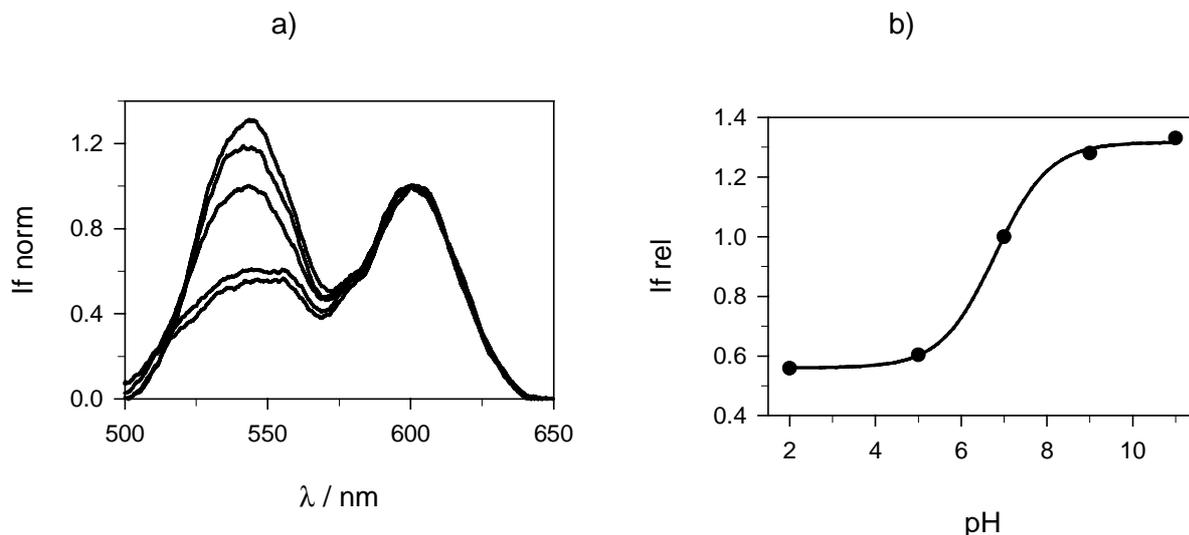


Abbildung 4-14 Nano-Sensor SR 3. pH-Abhängigkeit. a) Spektren. b) Kalibration. [Experimentelle Daten: Kaliumfreie Universalpuffer, $\text{pH} = 2; 5; 7; 9; 11$ von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$. Apertur $d = 50 \text{ nm}$. Beleuchtungsstärke $E = 1,2 \cdot 10^7 \text{ W/m}^2$].

Bei der Beprobung des Sensors mit verschiedenen Kaliumkonzentrationen bei $\text{pH} = 5,5$ wurde ein Signalhub von 45% und ein Wendepunkt bei $\text{pK} = 3,6$ (entsprechend $0,25 \text{ mmol/l}$ Kalium) gefunden. Bei $\text{pH} = 7$ betrug der Signalhub 35%, der Wendepunkt lag bei $\text{pK} = 4,1$ (entsprechend $0,08 \text{ mmol/l}$ Kalium). Die Ansprechzeit auf eine Erhöhung der Kaliumionenkonzentration betrug eine Minute bis zur Signalkonstanz, die Regenerationszeit 15 Minuten.

Bezüglich pH- und Kalium-Messbereich glichen die Sensoreigenschaften also denen des Mikro- und Submikro-Sensors gleicher Zusammensetzung. Die beobachteten Ansprech- und Regenerationszeiten lagen höher. Dies wird in erster Linie darauf zurückzuführen sein, dass die Mikro- und Submikro-Sensoren in einer Durchflussküvette beprobt wurden, die Nano-Sensoren hingegen in einer Küvette, bei der die Lösung manuell mit einer Pipette gewechselt wurde, und der Austausch der Lösung somit langsamer und diskontinuierlich vonstatten ging. Es ist anzunehmen, dass die beobachteten Unterschiede im Ansprechverhalten in der Art der Beprobung begründet liegen und die eigentlichen Ansprechzeiten der Rezeptorschichten der Nano-Sensoren denen der Mikro- und Submikro-Sensoren entsprechen.

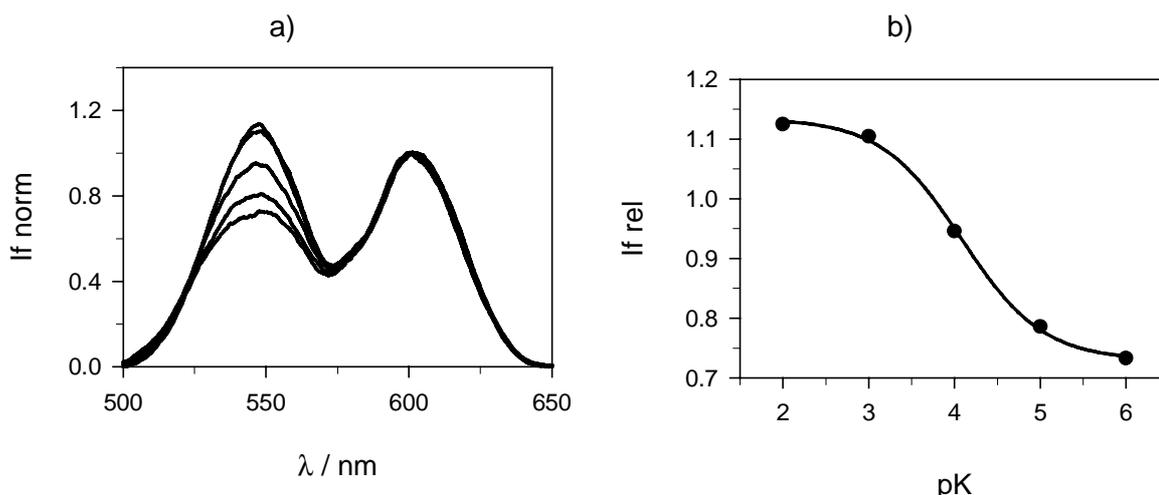


Abbildung 4-15 Nano-Sensor SR 3. Abhängigkeit von der Kaliumionenkonzentration bei $\text{pH} = 7$. a) Spektren. b) Kalibration. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, $\text{pH} = 7$, $c(\text{KCl}) = 10^{-6}$; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} mol/l von unten nach oben. $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$. Apertur $d = 50 \text{ nm}$. Beleuchtungsstärke $E = 1,2 \cdot 10^7 \text{ W/m}^2$].

Die hier vorgestellten Nano-Sensoren stellen die bisher weitgehendste Miniaturisierung faseroptischer Sensoren dar. Die kleinsten in der Literatur beschriebenen optochemischen Sensoren besaßen Aperturen von etwa 100 nm [15].

4.2.6 Dynamischer Kalium-Messbereich bei Submikro- und Nano-Sensoren

Bei den oben aufgeführten Messungen wurden pro Messlösung je fünf Spektren aufgenommen und die erhaltenen Spektren gemittelt. Für eine genauere Bestimmung der statistischen Schwankung der Messwerte (Rauschen) wurden pro Sensor zwanzig Messungen in kaliumfreiem Puffer mit $\text{pH} = 7$ durchgeführt. Dabei wurde nach je fünf Messungen die Lösung gewechselt, um diese Störung in die Streuung mit einzubeziehen.

Zum Problem der Nachweis- und Präzisionsgrenzen von analytischen Verfahren wurden verschiedene Methoden entwickelt [108,109]. Als Nachweisgrenze wird in der Literatur der Wert angegeben, der um die dreifache Standardabweichung (3σ) über dem Mittelwert einer Blindmessung (Messung ohne Analyten) liegt. Dies entspricht einer einseitigen statistischen Sicherheit von 99,86%. Um zwei Messwerte mit derselben Sicherheit voneinander unterscheiden zu können, ist für beide Werte die dreifache, also insgesamt die sechsfache Standardabweichung heranzuziehen.

In Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde hier eine Auswertung vorgenommen, die es ermöglicht, den Bereich anzugeben, in dem die Konzentration des Analyten mit einer vorgegebenen Genauigkeit gemessen werden kann.

Dazu wurde zunächst die Ableitung der Kalibrationskurve gebildet, indem für jeden pK-Wert die Signaländerung $\Delta I_{f, \text{rel}}$ für ein Inkrement ΔpK von 0,2 berechnet wurde. Die hieraus erhaltenen Werte sind für Submikro- und Nano-Sensoren in Abbildung 4-16 dargestellt. Zum Vergleich, in welchem Bereich eine Signaländerung zur Unterscheidung zweier Konzentrationswerte ausreicht, wurde jeweils die sechsfache Standardabweichung der zwanzig Blindmessungen als Waagrechte eingetragen. In den pK-Bereichen, in denen die Kurve über der 6σ -Marke liegt, können Änderungen um 0,2 pK-Einheiten noch mit 99,86% iger Sicherheit registriert werden.

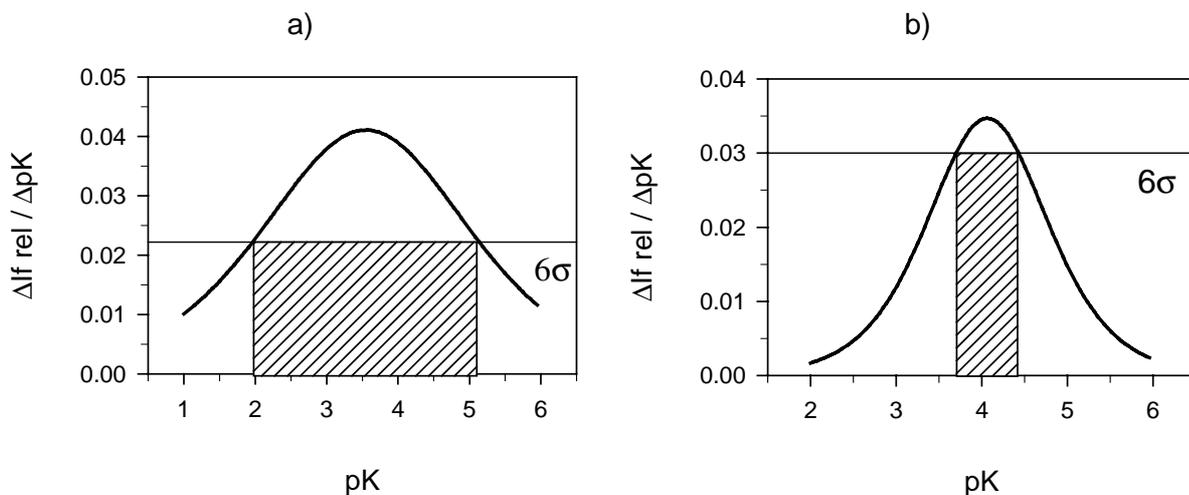


Abbildung 4-16 *Dynamischer Kalium-Messbereich bei pH = 7. a) Submikro-Sensor. b) Nano-Sensor. [Kurve: Signaländerung pro Inkrement von 0,2 pK-Einheiten. Waagrechte Linien: Werte der sechsfachen Standardabweichung (Rauschen). Schraffierte Bereiche: Messbereiche für 0,2 pK-Einheiten genaue Messungen].*

Für den *Submikro-Sensor* wurde das Messsignal $I_{f, \text{rel}}$ von zwanzig Blindmessungen zu $2,080 \pm 0,0037$ bestimmt, die sechsfache Standardabweichung beträgt somit 0,022. Aus dem Vergleich dieses Wertes mit der Ableitung ergibt sich ein Messbereich von $\text{pK} = 2,0 \dots 5,1$ (entsprechend 0,008...10 mmol/l Kalium). Mit diesem Sensor könnten folglich bei physiologischen Messungen im extrazellulären Bereich (1...10 mmol/l Kalium) auf 0,2 pK-Einheiten genaue Messungen durchgeführt werden, eine Unterscheidung zwischen extra- und intrazellulären Bereichen wäre qualitativ möglich.

Das Messsignal $I_{f, \text{rel}}$ des *Nano-Sensors* betrug $0,733 \pm 0,005$, die sechsfache Standardabweichung somit 0,03. Aus Abbildung 4-16 b ergibt sich ein Messbereich von $\text{pK} = 3,7 \dots 4,4$ (entsprechend 0,04...0,2 mmol/l Kalium), in dem noch 0,2 pK-Einheiten unterschieden werden können. Wegen der größeren Streuung der Messwerte bei Nano-Sensoren ist der Kalium-Messbereich mit der hier veranschlagten Genauigkeit eingeschränkt.

4.3 Signalstabilität

4.3.1 Einführung

Bei den oben beschriebenen Sensoren wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe, ein Mess- und ein Referenzfarbstoff, eingesetzt. Eine sichere Referenzierung ist nur dann gewährleistet, wenn sich der Quotient aus den Fluoreszenz-Intensitäten beider Farbstoffe nicht ändert. Eine solche Änderung wäre denkbar durch eine Änderung der Farbstoffkonzentrationen in der Rezeptorschicht, z.B. durch Photobleichen oder Austrag in die Lösung, oder aber durch Fluoreszenzlöschung, z.B. verursacht durch Sauerstoff. Auch eine Schwankung der Anregungsintensität kann zu einem Fehler führen, nämlich dann, wenn die Konzentration eines Farbstoffs so hoch ist, dass die Linearität zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht nicht mehr gegeben ist. Diese möglichen Fehlerquellen werden in diesem Kapitel eingegrenzt. Weiterhin wurde die Signalstabilität in einem Langzeittest über zwei Wochen untersucht.

4.3.2 Variation der Anregungsintensität

Um den Einfluss von Schwankungen in der Intensität des Anregungslichtes auf das absolute bzw. relative Sensorsignal zu testen, wurden mit einem Mikro-Sensor Spektren bei unterschiedlichen Anregungsintensitäten aufgenommen. Diese wurden erzielt, indem das Laserlicht vor der Einkopplung in die Faser mit verschiedenen Neutralfiltern abgeschwächt wurde. In Tabelle 4-3 sind die Fluoreszenz-Intensitäten I_f an den beiden Maxima sowie die relativen Fluoreszenz-Intensitäten $I_{f,rel}$ bei Neutralfiltern mit unterschiedlichen Transmissionswerten aufgeführt.

Tabelle 4-3 *Vergleich absoluter und relativer Fluoreszenz-Intensitäten.*

Filter (Transmission)	I_f / wE (Chromoionophor)	I_f / wE (Nilrot)	$I_{f,rel}$
NG (0,0025)	26	49	0,531
NG (0,005)	55	106	0,519
NG (0,01)	103	204	0,505
NG (0,025)	309	608	0,508

Diese Werte veranschaulichen, dass sich die Reproduzierbarkeit der Signale bei stark schwankenden Intensitäten des Anregungslichtes durch die interne Referenzierung entscheidend verbessern lässt. Während die absoluten Intensitäten um mehr als den Faktor 10 schwankten, lag der Wert des referenzierten Signals bei $0,516 \pm 0,012$, der relative Fehler betrug $\pm 2,3\%$.

Die Kalibrations-Messungen waren mit dem Filter NG 0,01 durchgeführt worden. Die Schwankungen, die dabei durch Instabilitäten des Lasers, unterschiedliche Biegung und somit unterschiedliche Lichtverluste des Lichtleiters oder die veränderte Sammeleffizienz durch Delokation der Faserspitze gegenüber dem Brennpunkt des Objektivs verursacht wurden, waren deutlich geringer als die hier getesteten.

4.3.3 Photobleichen

Jeder Farbstoff wird durch das Licht, das er absorbiert, auch zu einem gewissen Anteil zerstört (Photobleichen). Dies geschieht dadurch, dass die angeregten Farbstoffmoleküle entweder dissoziieren oder mit anderen Molekülen, meist von gelöstem Luftsauerstoff, reagieren.

Die Photostabilität der Farbstoffe wurde anhand eines Submikro-Sensors getestet. Das unabgeschwächte Laserlicht wurde kontinuierlich über einen Zeitraum von etwa acht Stunden in die Faser eingekoppelt. Auf der Spitze betrug die Beleuchtungsstärke $4,2 \cdot 10^8 \text{ W/m}^2$. Um einen Farbstoffaustrag als Konkurrenzreaktion sicher ausschließen zu können, befand sich die Rezeptorschicht dabei an Luft und nicht in Lösung.

Abbildung 4-17 zeigt die Abnahme der Fluoreszenz-Intensität der beiden Farbstoffe (linke Skala). Das referenzierte Signal sinkt ebenfalls (rechte Skala), was dadurch begründet ist, dass der Messfarbstoff etwas stärker gebleicht wird als der Referenzfarbstoff. Allerdings ist die Abnahme weniger stark ausgeprägt als beim absoluten Signal des Messfarbstoffs. Dies bedeutet, dass die beiden Farbstoffe in ähnlichem Ausmaß gebleicht werden, und somit die Referenzierung die Stabilität des Sensorsignals erhöht. Die Offsets der Kurven sind dadurch begründet, dass bei diesem Versuch keine Untergrundkorrektur der Spektren durchgeführt wurde.

Um quantitative Aussagen über die Photostabilität des Sensors treffen zu können, wurden die Messwerte an einen exponentiellen Zerfall angepasst. Die erhaltenen Funktionen sind im Anhang 8.4 gegeben. Die absoluten Intensitäten lassen sich an Zerfälle zweiter Ordnung anpassen, die relative Intensität lässt sich mit einem Zerfall erster Ordnung beschreiben. Üblicherweise wird das Photobleichen durch einen Zerfall erster Ordnung beschrieben. Die hier beobachtete Abweichung lässt sich dadurch erklären, dass außer der Zerstörung der Farbstoffe noch weitere Reaktionen ablaufen: Die Polymerschicht erwärmt sich unter der starken Bestrahlung, wodurch es zu einer räumlichen Ausdehnung kommt. Die Weichmacher, deren Siedebereiche zwischen 170°C und 200°C liegen, verdampfen allmählich, sodass sich die gesamte Umgebung der Farbstoffe im zeitlichen Verlauf des Versuchs ändert. Auch in der Literatur sind derartige Abweichungen vom Zerfall erster Ordnung beschrieben [103].

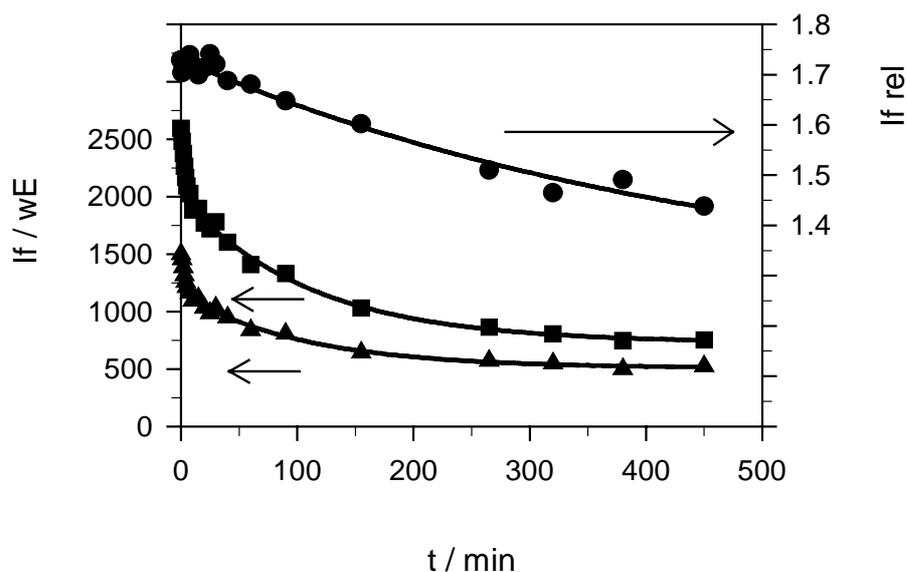


Abbildung 4-17 *Abnahme der Sensorsignale durch Photobleichen.* [Linke Achse: Fluoreszenz-Intensität des Messfarbstoffs (■) und des Referenzfarbstoffs (▲). Rechte Achse: relative Fluoreszenz-Intensität (●). $\lambda_{\text{ex}} = 473 \text{ nm}$. Beleuchtungsstärke $E = 4,2 \cdot 10^8 \text{ W/m}^2$].

Aus den angepassten Kurven wurde berechnet, dass unter den hier angesetzten Versuchsbedingungen die Fluoreszenz-Intensität des Messfarbstoffs nach 6,8 s um 1% gefallen ist. Beim referenzierten Signal war dies erst nach 670 s der Fall. Das referenzierte Signal ist demnach etwa 100mal so stabil wie das Signal des Messfarbstoffs allein.

Unter den für Kalibrationen üblichen Messbedingungen war die Beleuchtungsstärke deutlich geringer: Die Anregungsintensität wurde bei den Messungen mit Graufiltern abgeschwächt¹, und die Aufnahmedauer für ein Spektrum betrug eine Sekunde. Bezieht man diese Faktoren mit ein, so errechnet sich folgende Anzahl von Messungen bis zu einer 1% igen Signalabnahme: Mit dem Submikro-Sensor können bei Auswertung des relativen Signals ca. 67000 Messungen durchgeführt werden, bei Auswertung des absoluten Signals hingegen nur 680. Überträgt man diese Berechnung unter Annahme gleicher Schichtdicken, wie es die REM-Aufnahmen bestätigen, auf den Nano-Sensor, so sind es bei Auswertungen des relativen (bzw. absoluten) Signals ca. 23500 (bzw. 240) Messungen, bis durch Photobleichen ein 1% iger Messfehler auftritt.

Diese Berechnungen bzw. Abschätzungen zeigen, dass die Messfehler durch Photobleichen bei Auswertung des referenzierten Signals vernachlässigbar klein sind.

¹ Bei Submikro-Sensoren auf 1% der Beleuchtungsstärke dieses Versuchs, bei Nano-Sensoren auf etwa 3%; vgl. die jeweilige Angabe der Beleuchtungsstärke bei den vorangegangenen Abbildungen der Spektren.

4.3.4 Farbstoffaustrag

Bei Kontakt mit der wässrigen Messlösung können Membranbestandteile aus der Rezeptorschicht ausgetragen werden.

Die Stabilität des Sensorsignals bezüglich Farbstoffaustrag in die Lösung wurde getestet, indem ein Submikro-Sensor mehrere Tage lang mit kaliumfreiem Messpuffer bei pH = 7,0 umspült wurde, und täglich im Abstand von einigen Stunden Messungen durchgeführt wurden. Nur während der Messungen wurde der Sensor dem Laserlicht ausgesetzt, um den Einfluss des Photobleichens zu minimieren. Der Verlauf des relativen Sensorsignals ist in Abbildung 4-18 dargestellt.

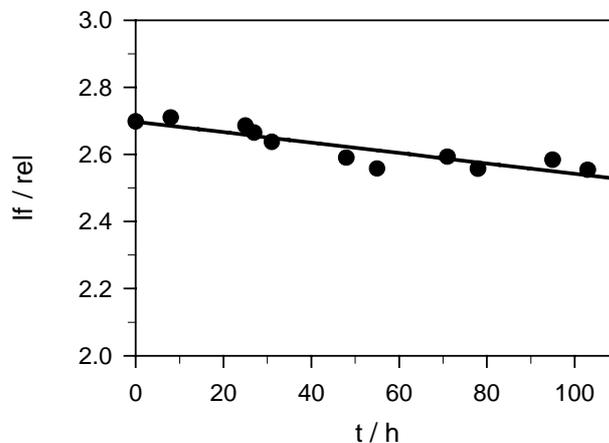


Abbildung 4-18 Abnahme der relativen Fluoreszenz-Intensität durch Farbstoffaustrag. [Experimentelle Daten: kontinuierliche Beprobung des Sensors mit kaliumfreiem Universalpuffer, pH = 7. Durchflussrate $\dot{V} = 0,5$ ml/min. $\lambda_{\text{ex}} = 473$ nm].

Aus der Abnahme des relativen Sensorsignals kann man folgern, dass der Messfarbstoff schneller ausgetragen wird als der Referenzfarbstoff. Aus der an die Messwerte angepassten Funktion (siehe Anhang 8.4) wurde errechnet, dass nach 17 h kontinuierlicher Beprobung das relative Sensorsignal um 1 % gefallen ist. Man kann folglich mit einem Sensor je nach Genauigkeitsanforderung Messungen über einige Stunden bis Tage hinweg ohne nennenswerten Fehler durch Farbstoffaustrag durchführen.

4.3.5 Fluoreszenzlöschung (Quenching)

Die Fluoreszenz vieler Farbstoffe wird durch Sauerstoff gequench, d.h. die angeregten Moleküle übertragen ihre Energie durch Stöße auf Sauerstoffmoleküle und erreichen somit strahlungslos den Grundzustand.

Um den Einfluss von in der Messlösung gelöstem Sauerstoff auf das Sensorsignal zu untersuchen, wurden Fluoreszenz-Emissionsspektren von Makro-Sensoren zunächst in

raumluftgesättigten, dann in stickstoff- und sauerstoffgesättigten Messpuffern aufgenommen. Der Vergleich der Spektren zeigte bei keinem der beiden Farbstoffe eine Änderung der Intensität, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Farbstoffe in der Rezeptormembran nicht sauerstoffempfindlich sind.

4.3.6 Langzeittest

Die oben genannten Experimente bezüglich der Signalstabilität haben jeweils einen Aspekt herausgegriffen und untersucht. Die Veränderungen, die in der Rezeptorschicht ablaufen, sind hingegen komplex und können nicht alle auf direktem Wege spektroskopisch untersucht werden. Bei der vorliegenden Membranzusammensetzung wäre nach Literaturangaben zum Beispiel ein Austrag des recht polaren Weichmachers NPOE [110] oder die Zersetzung des Phasentransferkatalysators KtCIPB in saurer Lösung [111] oder durch Lichteinwirkung [112] denkbar.

Um die Auswirkungen solcher Veränderungen auf die Sensoreigenschaften beurteilen zu können, wurde ein Submikro-Sensor hergestellt und über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg beprobt. Zwischen den etwa zehnstündigen Messtagen wurde der Sensor im Trockenen aufbewahrt. Eine länger andauernde Untersuchung schien hier nicht angebracht, da die Sensoren nicht für kontinuierliche Langzeitanwendungen, sondern vielmehr für gezielte Forschungsanwendungen konzipiert sind. Die im Folgenden beschriebenen Veränderungen der Sensoreigenschaften ließen sich größtenteils mit den in Kapitel 4.1.3.2 beschriebenen Einflüssen der Sensorkomponenten in Einklang bringen.

Auffällig war ein kontinuierlicher Anstieg der *Ansprech- bzw. Regenerationszeiten* bei Kalium-Messungen von 0,5 min bzw. 5 min am ersten Tag bis zu 5 min bzw. 35 min nach zwei Wochen. Dies deutet auf einen Austrag des Weichmachers NPOE hin, der weitgehendst für das rasche Ansprechen des Sensors verantwortlich ist.

Der Wendepunkt der *pH-Kalibrationskurve* verschob sich von $\text{pH} = 7,0$ am ersten Tag bis $\text{pH} = 8,0$ nach zwei Wochen, der Signalhub sank dabei von 61% auf 39%. Die Verschiebung des pH-Arbeitsbereichs kann vom Austrag bzw. der Zerstörung einer Matrixkomponente herrühren, die den pH-Arbeitsbereich senkt. Hierfür kommen NPOE bzw. Valinomycin in Frage.

Der Signalhub für *Kalium-Messungen* bei $\text{pH} = 5,5$ (nach der pH-Kalibration des ersten Tages zu urteilen der optimale pH-Wert für Kalium-Messungen) sank von eingangs 41% auf 8% am Ende der Untersuchungen. Bei $\text{pH} = 7$ sank er lediglich von 25% auf 12%. Das Sinken des Signalhubs lässt sich durch einen Austrag von Valinomycin aus der Schicht erklären. Dass der Signalhub bei $\text{pH} = 7$ weniger stark sinkt als bei $\text{pH} = 5,5$ steht im

Einklang damit, dass sich der pH-Arbeitsbereich zu höheren Werten hin verschiebt. Nach der pH-Messung des letzten Tages ist $\text{pH} = 7$ der optimale pH-Arbeitsbereich.

Die beobachteten Veränderungen der Sensoreigenschaften sind natürlich nur Hinweise auf die vermuteten Änderungen der Membranzusammensetzung. Abschließend kann bemerkt werden, dass eine Kalium-Messung bei $\text{pH} = 7$ über den gesamten Zeitraum von zwei Wochen möglich war. Allerdings verschoben sich die Kalibrationskurven von Tag zu Tag (möglicherweise auch durch die Trocknung über Nacht), was eine tägliche Nachkalibration erforderlich macht. Während eines Messtages hingegen blieben die Sensoreigenschaften jeweils konstant.

4.4 Zusammenfassung – Kalium-Sensor

In diesem Teil der Arbeit wurde ein Kalium-Sensor entwickelt, der in mehreren Schritten bis hin zu einem Nano-Sensor mit einer Apertur von 50 nm miniaturisiert wurde, ein Wert, der die bisher weitgehendste Miniaturisierung optochemischer Sensoren darstellt.

Ausgegangen wurde von einem flexiblen Sensorprinzip, der Kopplung einer optisch verfolgbarer Protolyse mit einer molekularen Erkennung durch einen Komplexbildner, das im Hinblick auf die Miniaturisierung ein stabiles Sensorsignal zu gewährleisten hatte. Daher wurde eine interne Referenzierung eingeführt, indem zusätzlich zu dem Messfarbstoff mit seinem veränderlichen Signal noch ein Referenzfarbstoff mit einem konstanten (Referenz-) Signal in die Rezeptorschicht eingebracht wurde. Es wurde gezeigt, dass die Auswertung des referenzierten Signals bei schwankenden Anregungsintensitäten eine deutliche Verbesserung gegenüber der Auswertung an nur einer Messwellenlänge bewirkt.

Der Sensor wurde in mehreren Schritten miniaturisiert, indem zunächst plan durchgetrennte optische Faserenden und dann zu Spitzen ausgezogene Fasern als Träger für die Rezeptorschicht verwendet wurden. Um die Haftung der Rezeptorschichten auf den optischen Fasern zu gewährleisten, wurden die Fasern mit Trichlorvinylsilan silanisiert. Nach einer Anpassung der Zusammensetzung der miniaturisierten Sensoren konnten den Makro-Sensoren analoge Messeigenschaften erzielt werden.

Stabilitätsuntersuchungen zeigten, dass das Sensorsignal bezüglich Quenching durch Sauerstoff, Farbstoffaustrag und Photobleichen eine gute Stabilität aufweist. Hinsichtlich der Photostabilität wurde durch die Referenzierung eine Verbesserung um etwa den Faktor 100 erzielt.

Die Sensoren sind bei $\text{pH} = 7,0$ im Kaliumkonzentrationsbereich von ca. $0,01 \dots 10 \text{ mmol/l}$ verwendbar. Physiologische Kaliumkonzentrationen liegen bei $1 \dots 10 \text{ mmol/l}$ (extrazellulär) bzw. $100 \dots 150 \text{ mmol/l}$ (intrazellulär). Mit den vorgestellten Kalium-Sensoren können somit extra- und intrazelluläre Bereiche unterschieden werden.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION: LEBENSDAUER-MESSUNGEN

5.1 pH-Sensoren

5.1.1 Voruntersuchungen

5.1.1.1 Wahl der Farbstoffe und des Polymers

Für die phasensensitiven Lebensdauer-Messungen werden zwei Farbstoffe benötigt: Ein Lumineszenzfarbstoff (Donor), dessen Lumineszenzverhalten nicht vom Analyten beeinflusst wird, und ein Absorptionsfarbstoff (Akzeptor), der in Abhängigkeit von der Analytkonzentration seine Absorption in dem Wellenlängenbereich, in dem der Donor emittiert, ändert. Ist dies gegeben, verringert sich die Lebensdauer der Lumineszenz bei steigender Konzentration der zur Absorption fähigen Spezies durch einen strahlungslosen Resonanz-Energietransfer (RET), und Änderungen der Analytkonzentration können durch Kalibration mit geänderten Lebensdauern korreliert werden. Zu beachten ist bei dieser Art von Sensoren die Sauerstoff-Querempfindlichkeit, da auch Sauerstoff durch Stöße mit dem angeregten Donormolekül eine strahlungslose Rückkehr in den Grundzustand bewirken kann, und somit in Konkurrenz zur Lumineszenzlöschung durch den Akzeptor tritt.

In der Literatur beschrieben finden sich pH-Sensoren mit Ruthenium-(1,10-phenanthrolin)-Komplexen (Ru(phen)-Komplexen) als Lumineszenzfarbstoff und Bromthymolblau (BTB) als Absorptionsfarbstoff in einer porösen Matrix, die mit dem Sol-Gel-Verfahren hergestellt wurde [25,113]. Die Rezeptorschicht des im vorigen Kapitel beschriebenen Kalium-Sensors war mit Hilfe eines gelösten Polymers (PVC-OH) hergestellt worden. Diese einfache und leicht handhabbare Art der Präparation hatte sich insbesondere im Hinblick auf die Miniaturisierung bewährt, sodass ihr auch für die in diesem Kapitel entwickelten Sensoren der Vorzug gegeben wurde. Ausgehend von den oben genannten Farbstoffen wurde daher für diese Arbeit ein Polymer gesucht, in dem der Ruthenium-Komplex eine möglichst geringe Sauerstoff-Querempfindlichkeit besitzt.

Zur Untersuchung der Sauerstoff-Querempfindlichkeit des Donors wurde das Ru(phen)₃(tFPB)₂-Ionenpaar in diversen Polymermatrixen getestet. Die Sensoren wurden in der Gasphase zunächst mit Stickstoff (keine Lumineszenzlöschung, Phasenwert Φ_0) und dann mit Sauerstoff beprobt (Abnahme des Phasenwertes durch Lumineszenzlöschung um $\Delta\Phi$). Wie erwartet, hing die Sauerstoff-Empfindlichkeit stark von der Polymermatrix ab. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5-1 dargestellt.

Tabelle 5-1 Einfluss der Polymer-Matrix auf die Sauerstoff-Querempfindlichkeit.

Polymer	Φ_0	$\Delta \Phi$
PVC ohne Weichmacher	36,0°	2,7°
PVC mit NPOE	8,1°	1,6°
PVC mit DOS	14,4°	4,2°
PVC mit FPNPE	8,7°	1,9°
Polystyrol	14,4°	4,2°
PMMA	45,7°	13,6°
Polyvinylalkohol	44,3°	13,6°
PolyHEMA	27,3°	0,0°

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eindeutig, dass der Ruthenium-phenanthrolin-Komplex von den getesteten Matrices lediglich in PolyHEMA keine Sauerstoff-Querempfindlichkeit besitzt, weswegen dieses Polymer für die Herstellung des pH-Sensors verwendet wurde.

In Abbildung 5-1 sind die Absorptionsspektren der protonierten und deprotonierten Form von Bromthymolblau sowie das Lumineszenz-Anregungs- und Emissionsspektrum des Ruthenium-Komplexes in PolyHEMA dargestellt (zur Vereinfachung wird in diesem Kapitel das BTB-Monoanion als „protonierte“ und das Dianion als „deprotonierte“ Form bezeichnet). Die Abbildung verdeutlicht, dass nur das Spektrum der deprotonierten Form des Bromthymolblau gut mit dem Emissionsspektrum des Ruthenium-Komplexes überlappt, der entsprechende Bereich ist schraffiert. Durch eine Kombination der beiden Farbstoffe in einer Membran können folglich Sensoren hergestellt werden, bei denen ein steigender pH-Wert zu einer steigenden RET-Effizienz und somit zu einer Verringerung der Lebensdauer der Lumineszenz führt.

Der Förster-Abstand R_0 , bei dem die RET-Effizienz 50% beträgt, ist durch folgende Gleichung gegeben (vgl. Kapitel 2.2.4):

$$\text{Gleichung 5-1} \quad R_0 = 979 \cdot (\kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi_0 \cdot \int_0^{\infty} I_L(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) \cdot \lambda^4 \, d\lambda \cdot \text{mol})^{1/6} \quad \text{in [nm]}$$

Zur Berechnung wurden folgende Werte verwendet:

$\kappa^2 = 2/3$ mittlerer Orientierungsfaktor für in Lösung frei rotierende Donoren und Akzeptoren [49];

$n = 1,33$ Brechungsindex von Wasser;

$\Phi_0 = 0,072$ Quantenausbeute von $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ in Wasser nach [114].

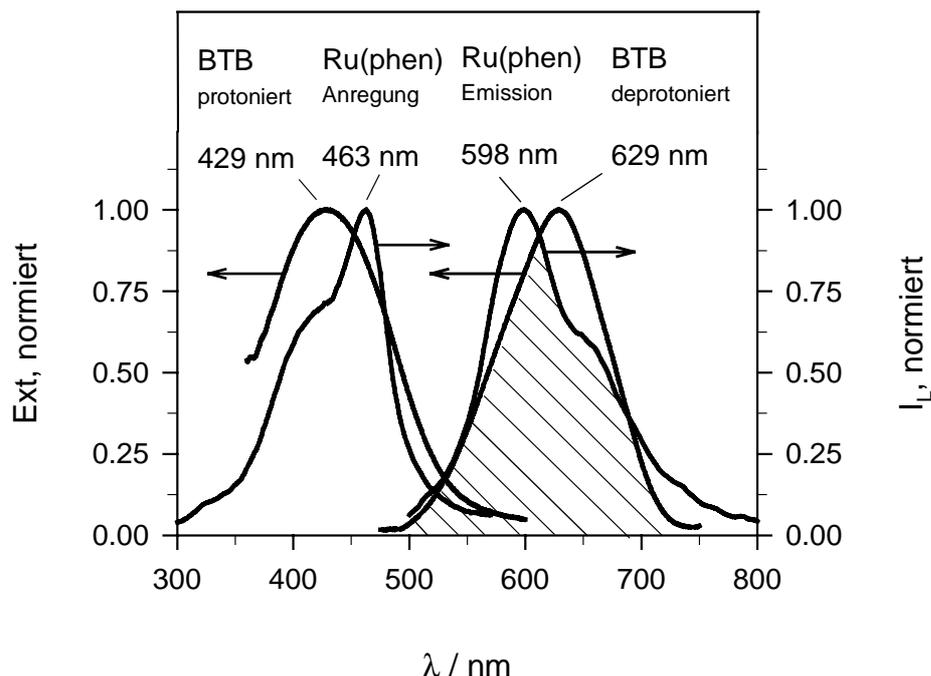


Abbildung 5-1 Absorptionsspektren von BTB und Lumineszenzspektren von Ru(phen). [Linke Achse: Absorptionsspektren von BTB-TDMA in PolyHEMA. Rechte Achse: Lumineszenz-Anregungs- ($\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$) und Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) von Ru(phen)₃(TFPB)₂ in PolyHEMA. Überlappungsbereich schraffiert].

Der Extinktionskoeffizient von BTB am Maximum der deprotonierten Form wurde in wässriger Lösung zu $\epsilon = 58000 \text{ l}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ bestimmt und für die Berechnung des Überlappungsintegrals zugrunde gelegt. Dessen Wert wurde näherungsweise aus den entsprechenden Spektren von BTB und Ru(phen) in Abbildung 5-1 mit Inkrementen von $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$ bestimmt.

Mit diesen Werten ergibt sich ein Förster-Abstand R_0 von 4,4 nm. Dieser Wert liegt trotz des relativ geringen Extinktionskoeffizienten des BTB im Bereich der üblichen Förster-Abstände von 2...5 nm [49], was auf die gute spektrale Überlappung der Spektren von Donor und Akzeptor zurückzuführen ist.

Damit Donor und Akzeptor in der Rezeptormembran zurückgehalten und nicht in die wässrige Messlösung ausgetragen werden, müssen beide Farbstoffe lipophilisiert werden. Eine Möglichkeit hierfür ist die Verwendung wasserunlöslicher Ionenpaare [115,116]. Mit den in diesem Kapitel verwendeten Farbstoffen wurden verschiedene Ionenpaare hergestellt, deren Synthesevorschriften in Anhang 8.2 gegeben sind.

5.1.1.2 Optimierung der Zusammensetzung der sensitiven Schicht

Der Sensor sollte im physiologischen Bereich einsetzbar sein, d.h. seine größte Messgenauigkeit sollte bei pH = 7 liegen. Da die Wahl des Polymers und der Farbstoffe feststand, wurde untersucht, ob der dynamische Messbereich des Sensors durch die Kombination der beiden Farbstoffe als unterschiedliche Ionenpaare beeinflusst werden könne. Es wurden Mikro-Sensoren hergestellt, die beide Farbstoffe entweder einzeln als wasserunlösliche Ionenpaare oder als gemeinsames Ionenpaar enthielten. Mit den entsprechenden Sensoren wurden Lebensdauer-Messungen bei pH-Werten von pH = 5...11 wie in Kapitel 5.1.2.1 beschrieben durchgeführt, aus denen die Änderung des Phasensignals $\Delta\Phi$ und der Wendepunkt der Kalibrationskurve bestimmt wurde.

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 5-2 dargestellt. Sie zeigen, dass sowohl die Signaländerung als auch der pH-Messbereich stark von der Zusammensetzung des Sensors abhängen. Sensor SL 3, der die beiden Farbstoffe einzeln als Ionenpaare enthielt, zeigte die größte Phasenverschiebung, das pH-Optimum lag jedoch im Alkalischen. Sensor SL 2, der die beiden Farbstoffe als gemeinsames Ionenpaar enthielt, besaß einen gut geeigneten pH-Messbereich (Wendepunkt bei pH = 7,3), weshalb diese Zusammensetzung für die weiteren Messungen verwendet wurde.

Tabelle 5-2 *Zusammensetzung und Eigenschaften der Sensoren.*

Sensor	Enthaltene Ionenpaare	$\Delta\Phi$ (pH=5→pH=11)	Wdp bei pH
SL 1	Ru(phen) ₃ Cl ₂ und BTB·TDMA	8,2°	ca. 10
SL 2	Ru(phen) ₃ ·BTB ₂	13,6°	7,3
SL 3	Ru(phen) ₃ ·(TFPB) ₂ und BTB·TDMA	33,8°	8,7

In der Literatur wurde diskutiert, dass ein RET nicht zwischen den Partnern eines Donor-Akzeptor-Ionenpaares stattfindet, sondern lediglich zwischen Donoren und Akzeptoren verschiedener Ionenpaare. Als mögliche Ursache wurde eine falsche Orientierung der Dipolmomente der Partner im Ionenpaar genannt [26]. Daher erfüllen die Ionenpaare lediglich die Funktion einer lipophilen, d.h. verankernden Einheit. Ihre Konzentrationen in den Beschichtungslösungen müssen demnach so gewählt sein, dass in der fertigen Rezeptorschicht der mittlere Abstand der Ionenpaare voneinander im Bereich der kritischen RET-Distanz von 4,4 nm liegt.

Um dies für die experimentell gefundene Zusammensetzung bei Sensor SL 2 abzuschätzen, wurde zunächst die Volumenabnahme bei Eintrocknung der Beschichtungslösung bestimmt. Dafür wurden je 500 μ l Beschichtungslösung in ein PE-Reaktionsgefäß pipettiert und trocknen lassen. Das Volumen des entstandenen Polymers wurde durch

Volumenverdrängung von Wasser bestimmt. Nach dem Trocknen betrug das Volumen noch ca. 25 μl , woraus sich ein Faktor von etwa 20 ergibt. Dieser Faktor wurde bei der Berechnung des mittleren Ionenpaarabstands in der Polymermatrix zugrunde gelegt. Weiterhin wurde berücksichtigt, dass PolyHEMA in Wasser sein Volumen durch Quellung um bis zu 40% vergrößert. Unter Annahme punktförmiger Ionenpaare berechnet sich dann der Abstand zwischen zwei Ionenpaaren in der trockenen Polymermatrix zu 3,2 nm, in der gequollenen Schicht zu 3,6 nm. In dem pH-Sensor SL 2 liegt der Ionenpaar-Abstand demnach unter der Förster-Distanz von 4,4 nm, wodurch eine hohe Transfer-Effizienz gewährleistet ist.

5.1.1.3 Untersuchungen an Makrosensoren

Im Folgenden wurde anhand des Absorptions- bzw. Lumineszenzverhaltens der beiden Farbstoffe in PolyHEMA untersucht, inwieweit ein Resonanz-Energietransfer (RET) stattfindet.

Absorptions-Spektren von BTB

Zunächst wurden sensitive Schichten hergestellt, die nur BTB enthielten, damit die Absorption des Ruthenium-Komplexes die des BTB nicht stört. Da das reine BTB wasserlöslich ist, enthielt die Rezeptorschicht anstelle des $\text{Ru}(\text{phen})_3\text{BTB}_2$ -Ionenpaars die gleiche BTB-Stoffmenge als BTB-TDMA-Ionenpaar.

Von diesen Schichten wurden Absorptionsspektren bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen, die Spektren sind in Abbildung 5-2 dargestellt. Am Maximum der protonierten Form bei 429 nm sinkt die Extinktion mit steigendem pH-Wert, am Maximum der deprotonierten Form bei 629 nm steigt sie. Der isosbestische Punkt liegt bei 529 nm. Zur Kalibration wurden die Extinktionswerte bei 629 nm ausgewertet, der Wendepunkt der Kurve lag bei $\text{pH} = 8,5$.

Lumineszenz-Spektren von $\text{Ru}(\text{phen})_3\text{BTB}_2$

Für die Lumineszenz-Messungen wurden Rezeptorschichten mit dem $\text{Ru}(\text{phen})_3\text{BTB}_2$ -Ionenpaar hergestellt und mit unterschiedlichen pH-Puffern beprobt. Die Lumineszenz-Emissionsspektren sind in Abbildung 5-3 dargestellt. Bei $\text{pH} = 5$ ist die Extinktion des BTB und somit die Effizienz des Resonanz-Energietransfers (RET) gering, sodass das Spektrum etwa dem des ungelöschten Ruthenium-Komplexes entspricht. Bei steigenden pH-Werten sinkt die Lumineszenz-Intensität durch steigenden RET. Dass es sich um einen solchen handelt und nicht um eine Absorption von emittiertem Licht wird dadurch nahegelegt, dass die Wellenlänge des Maximums und die Spektralform erhalten bleibt. Würde BTB mit seinem Maximum bei 629 nm das Lumineszenzlicht (Maximum bei 598 nm) absorbieren, so

sollte sich mit zunehmender Absorption die Lage des Maximums und somit die Spektralform ändern.

Zur Kalibration wurden die Lumineszenz-Intensitäten am Maximum herangezogen. Der Wendepunkt der Kalibrationskurve lag bei $\text{pH} = 7,3$.

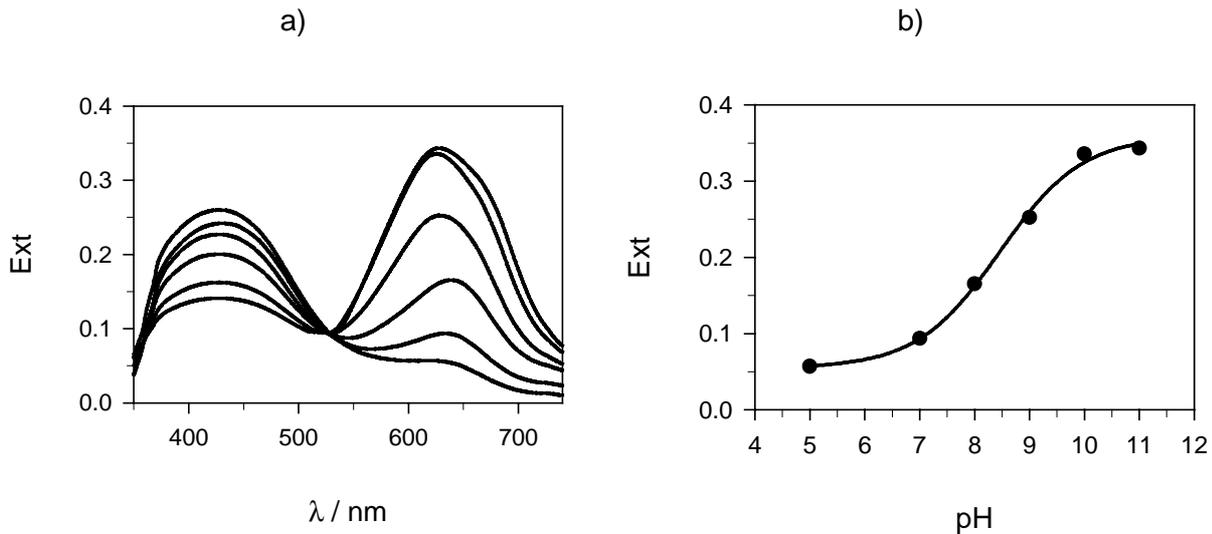


Abbildung 5-2 a) Absorptionsspektren von BTB-TDMA in PolyHEMA. b) Kalibration. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, $\text{pH} = 5; 7; 8; 9; 10; 11$ bei $\lambda = 429$ nm von oben nach unten bzw. bei $\lambda = 629$ nm von unten nach oben. Kalibration der Werte bei $\lambda = 629$ nm].

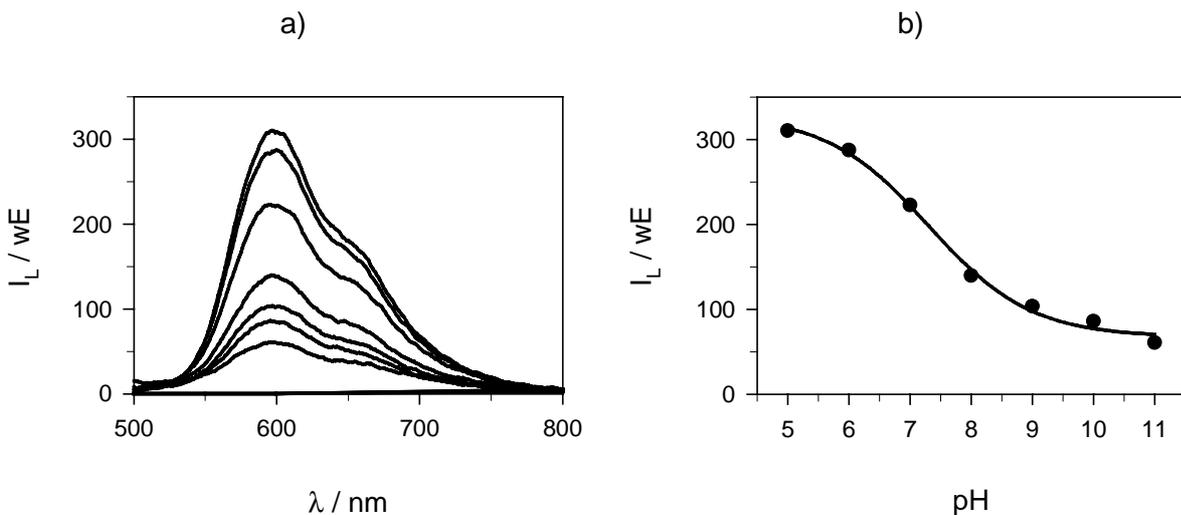


Abbildung 5-3 a) Lumineszenz-Emissionsspektren von $\text{Ru}(\text{phen})_3(\text{BTB})_2$ in PolyHEMA. b) Kalibration. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, $\text{pH} = 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11$ von oben nach unten. $\lambda_{\text{ex}} = 464$ nm].

Lebensdauer-Messung

Eine ausführliche Beschreibung der Messapparatur ist im Experimentellen Teil gegeben. Mit Hilfe einer optischen Faser, die das modulierte Anregungslicht der LED führte, wurde die Rezeptorschicht bestrahlt. Das emittierte Lumineszenzlicht wurde mit einem Photomultiplier erfasst, wobei das Anregungslicht durch ein Kantenfilter unterdrückt wurde, sodass die gesamte Emission bei Wellenlängen größer als 550 nm erfasst wurde. Die Auswertung des modulierten Lumineszenzsignals erfolgte mit einem Lock-In Verstärker. Ein solcher gibt zwei Signale als Messwerte aus: Zum einen den Phasenwinkel Φ in $[\circ]$, der die Phasenverschiebung zwischen Referenzsignal und Messsignal angibt und bei diesem Versuchsaufbau ein Maß für die Lebensdauer der Lumineszenz ist, zum anderen die vom Gerätehersteller als „Magnitude“ bezeichnete Größe in [mV], die zur Amplitude des modulierten Messsignals und somit zur Lumineszenz-Intensität proportional ist. Sie wird im Folgenden immer dann mit aufgeführt, wenn Aussagen über die Intensität der Lumineszenz von Interesse sind, wie z.B. beim Vergleich zwischen Intensitäts- und Lebensdauer-Messungen im nächsten Abschnitt oder bei den Experimenten zum Photobleichen. Dabei wird als Achsenbeschriftung „Mag/mV“ gewählt, im Text jedoch von „Amplitude“ gesprochen.

Die Ergebnisse solcher Messungen sind im nächsten Abschnitt in Abbildung 5-4 gezeigt. Mit steigendem pH-Wert sank sowohl die Phasenverschiebung als auch das Amplitudensignal. Dies deutet auf einen mit steigendem pH-Wert zunehmenden RET hin, was sich mit den Ergebnissen der Absorptions- und spektral aufgelösten Lumineszenz-Messungen deckt.

5.1.1.4 Vergleich zwischen Lebensdauer- und Intensitäts-Messungen

Um den Einfluss von Schichtdickeschwankungen auf die Sensorsignale zu untersuchen, wurden 10 Makro-Sensoren für Lebensdauer-Messungen hergestellt, die durch Aufpipettieren der Lösung auf runde Deckgläser beschichtet wurden. Dabei wurden unterschiedliche Volumina pipettiert, woraus unterschiedliche Schichtdicken resultierten. Mit jedem Sensor wurde eine pH-Kalibration durchgeführt.

In Abbildung 5-4 sind die erhaltenen Ergebnisse gegenübergestellt. Bei Auswertung der Phasenwinkel Φ lagen die Wendepunkte der Kalibrationskurven bei $\text{pH} = 8,0 \pm 0,2$, die Änderung des Phasensignals zwischen $\text{pH} = 5$ und $\text{pH} = 10$ betrug $\Delta\Phi = 11,2^\circ \pm 2,2^\circ$ ($\pm 20\%$). Bei der Auswertung des Amplitudensignals lag der Wendepunkt bei $\text{pH} = 7,8 \pm 0,3$, die Änderung der Amplitude betrug $23 \text{ mV} \pm 17 \text{ mV}$ ($\pm 74\%$).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bei unterschiedlichen Schichtdicken der Sensoren die Lebensdauerwerte von Sensor zu Sensor gut reproduzierbar, die Amplitudenwerte hingegen mit großen Exemplarstreuungen behaftet sind. Die Lebensdauer als Messgröße zu verwenden bietet den Vorteil, dass sie eine intensive Größe und somit weitgehend

unabhängig von der Schichtdicke und – wie in Kapitel 5.1.3.2 noch gezeigt werden wird – von der Anregungsintensität ist.

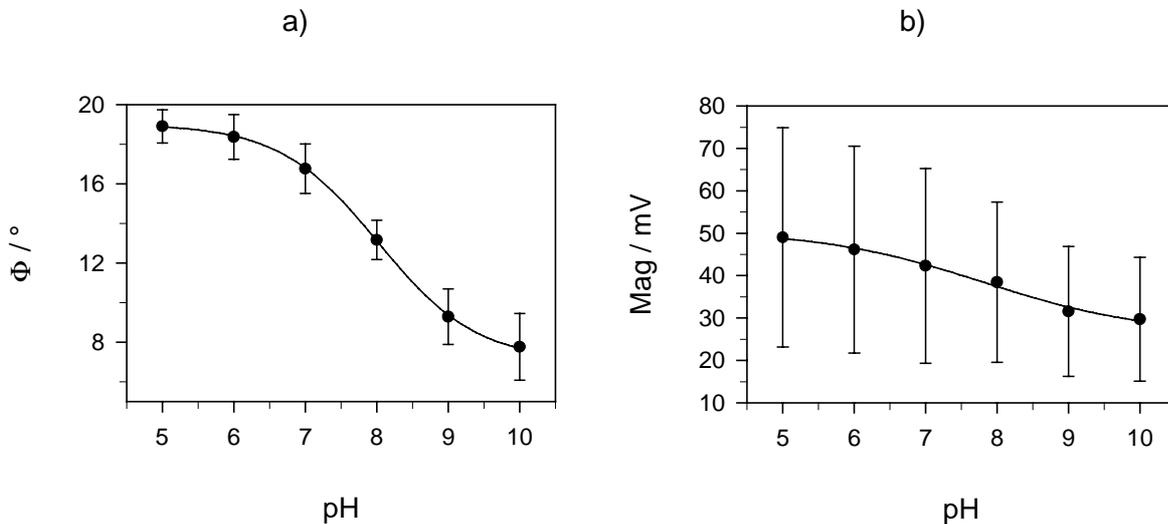


Abbildung 5-4 Lebensdauer-Messungen. a) Phasenwerte. b) Amplitudenwerte. [Experimentelle Daten: Universalpuffer. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus). Die Fehlerbalken geben die Exemplarstreuung von 10 Sensoren an].

Vergleicht man die Ergebnisse der Kalibration der Phasenwerte bei Makro- und miniaturisierten Sensoren (vgl. Voruntersuchung in Kapitel 5.1.1.2 sowie Kapitel 5.1.2.1 bis 5.1.2.4), so fällt auch bei diesem pH-Sensor auf, dass sich die Wendepunkte unterscheiden. Bei den Makrosensoren lag der Wendepunkt bei $\text{pH} = 8,0$, bei den Mikro- bis Nano-Sensoren bei $\text{pH} = 7,3$. Eine solche Messbereichsverschiebung bei der Übertragung von Rezeptorschichten gleicher Zusammensetzung von Makrosensoren auf faseroptische Sensoren wurde bereits bei dem spektral referenzierten Kalium-Sensor beobachtet. Als Ursache hierfür wird das unterschiedliche Trägermaterial der Rezeptorschicht bzw. unterschiedliche Beschichtungsverfahren angesehen. Weiterführende Untersuchungen hierzu wurden nicht vorgenommen.

5.1.1.5 Wahl der Modulationsfrequenz

Der Zusammenhang zwischen der Lebensdauer τ , dem gemessenen Phasenwinkel Φ und der Modulationsfrequenz ν ist durch Gleichung 5-2 gegeben.

Gleichung 5-2
$$\tau = \frac{\tan(\Phi)}{2\pi\nu}$$

Bei einer gegebenen Lebensdauer der Lumineszenz kann man folglich den erzielten Phasenwinkel durch die Wahl der Modulationsfrequenz beeinflussen.

Den Zusammenhang zwischen dem Phasenwinkel Φ und dessen Tangens (der wiederum proportional zur Lebensdauer τ und Modulationsfrequenz ν ist) ist in Abbildung 5-5 dargestellt. Die gepunkteten Linien deuten dieselbe Lebensdaueränderung $\Delta\tau$ bei den Frequenzen ν_1 und $\nu_2 = 10 \cdot \nu_1$ an. Bei der Frequenz ν_1 wird diese als größere Phasenwinkeländerung $\Delta\Phi$ als bei der Frequenz ν_2 wiedergegeben. Dies verdeutlicht, dass die Messfrequenz nicht zu hoch gewählt werden sollte, da sonst die beobachtete Änderung des Phasenwinkels gering wird.

Als optimale Modulationsfrequenz wird in der Literatur üblicherweise diejenige angesehen, bei der sich ein Phasenwinkel von 45° ergibt, da dann die beste Genauigkeit der Lebensdauer-Messung gegeben ist [51]. Aus dem im vorigen Abschnitt bestimmten maximalen Phasenwinkel von $\Phi = 19^\circ$ des Sensors errechnet sich mit der für die Messung verwendeten Modulationsfrequenz von $\nu = 90$ kHz eine Lebensdauer von $0,61 \mu\text{s}$. Demnach läge die optimale Modulationsfrequenz bei 260 kHz. Für solch hohe Frequenzen waren jedoch weder der verwendete Vorverstärker noch der Lock-In Verstärker ausgelegt. Der Lock-In Verstärker konnte nur bis 120 kHz verwendet werden, der Vorverstärker zeigte oberhalb von 90 kHz eine zunehmende Dämpfung des Signals sowie eine gerätebedingte Phasenverschiebung. Daher wurden als Messfrequenz 90 kHz gewählt, woraus sich Phasenwinkel zwischen $5 \dots 20^\circ$ ergaben.

Die Messung bei niedrigen Frequenzen bietet weiterhin den Vorteil, dass man sich in einem Bereich bewegt, in dem der Tangens nahezu linear ist, d.h. dass die Änderungen des Messwerts Φ proportional zu denen der eigentlichen Messgröße τ sind (vgl. Abbildung 5-5 b).

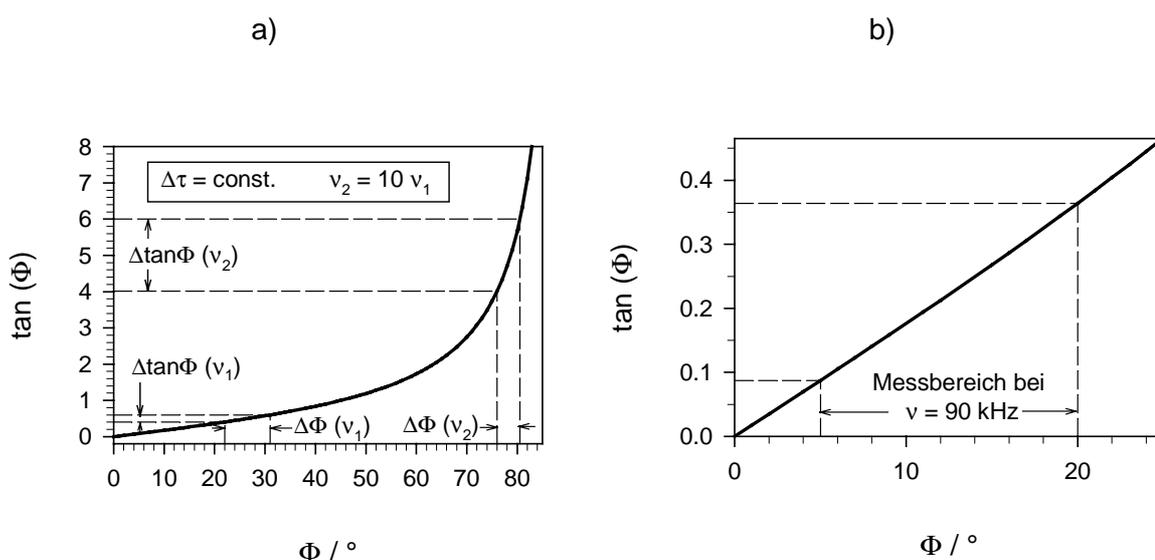


Abbildung 5-5

Zusammenhang zwischen Phasenwinkel Φ und $\tan \Phi$ (Erläuterungen siehe Text).

5.1.2 Miniaturisierung

5.1.2.1 pH-Messungen mit Mikro-Sensoren

Zur Herstellung von Mikro-Sensoren wurden plane Faserenden mit einem Kerndurchmesser von 200 μm verwendet. Diese wurden zur Beschichtung mehrmals in die Messlösung eingetaucht, wobei auf eine genaue Einhaltung der Zeiten geachtet wurde, um eine gute Reproduzierbarkeit der Beschichtung zu erzielen. Als Anregungslichtquelle wurde eine blaue LED verwendet, da deren Licht mit genügender Effizienz in die Faser eingekoppelt werden konnte.

Die Ergebnisse der pH-Messungen mit zehn verschiedenen Mikro-Sensoren sind in Abbildung 5-6 dargestellt. Die Wendepunkte der einzelnen Kalibrationskurven lagen bei $\text{pH} = 7,3 \pm 0,1$, die Signaländerungen bei $\Delta\Phi = 14,0^\circ \pm 0,4^\circ$. Die Reproduzierbarkeit der Sensoreigenschaften war sehr gut, der relative Fehler lag bei 1,4% bezogen auf den Wendepunkt und bei 2,9% bezogen auf die Phasenänderung $\Delta\Phi$. Die bessere Reproduzierbarkeit gegenüber den Makro-Sensoren dürfte auf die gleichmäßigere Schichtdicke zurückzuführen sein.

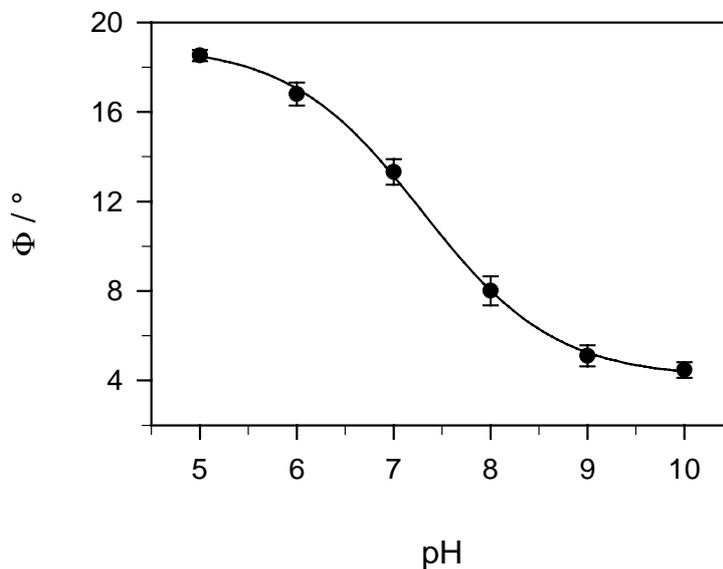


Abbildung 5-6

pH-Abhängigkeit der Mikro-Sensoren. [Experimentelle Daten: Universal-puffer. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus). Kerndurchmesser $d = 200 \mu\text{m}$. Beleuchtungsstärke $E = 0,68 \text{ W/m}^2$. Die Fehlerbalken geben die Exemplarstreuung von 10 Sensoren an].

5.1.2.2 Vergleich der Anregungslichtquellen: LED – Laser

Da bei der weiteren Miniaturisierung der Sensoren die Intensität der LED zur Anregung nicht ausreichte, musste für die folgenden Miniaturisierungsschritte auf einen Laser zurückgegriffen werden. Dazu wurde ein kontinuierlich emittierender Laser verwendet, dessen Licht mit Hilfe eines elektrooptischen Modulators rechteckig moduliert wurde.

Da die Ableitungen des Zusammenhangs zwischen Lebensdauer und Phasenwinkel auf der Annahme einer sinusförmigen Anregung beruhen, wurde getestet, ob die unterschiedliche Modulationsart bzw. die Anregungsquelle einen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Hierfür wurden Vergleichsmessungen mit einem Mikro-Sensor durchgeführt, indem die beschichtete Faser mit einem y-Faserkoppler verbunden wurde, sodass auf dieselbe Rezeptorschicht wahlweise das Licht der LED bzw. des Lasers geleitet werden konnte. Mit diesem Aufbau wurden je zwei Messungen mit einer sinusförmig, dann rechteckig modulierten LED bzw. dem rechteckig modulierten Laser durchgeführt. Bei allen Messungen waren die Phasenwerte vergleichbar. Der rechteckig modulierte Laser war demnach für Lebensdauer-Messungen ebenso geeignet wie die sinusförmig modulierte LED und konnte daher für die weiteren Miniaturisierungsschritte verwendet werden.

Dies ist erklärbar, wenn man ein Rechtecksignal als Summe aus harmonischen Sinusschwingungen (Fourier-Reihe) ansieht, wobei die Grundschiwingung (erste Harmonische) dieselbe Frequenz besitzt wie das Rechteck-Signal. Für eine Rechteckfunktion mit der Frequenz ν und der Amplitude y lautet die Fourier-Reihe [117]:

Gleichung 5-3
$$y_R(t) = \frac{4 \cdot y}{\pi} \sum_i \frac{1}{2i-1} \cdot \sin [(2i-1) \cdot 2\pi\nu \cdot t]$$

Durch den Lock-In Verstärker wird aus dem gesamten Lumineszenzsignal nur die erste Harmonische herausgefiltert, die dieselbe Frequenz besitzt wie das Anregungslicht, aber entsprechend phasenverschoben ist. Wie stark die höheren harmonischen Anteile unterdrückt werden, gibt die dynamische Reserve an. Bei dem verwendeten Gerät betrug sie 60 dB pro Oktave, was einer Unterdrückung der zweiten harmonischen Sinusschwingung um den Faktor 1000 entspricht. Das vom Lock-In Verstärker herausgefilterte Signal ist demnach nur der Sinusanteil des Lumineszenzlichts. Gratton und Limkeman untersuchten Abweichungen von der idealen sinusförmigen Anregung genauer und kamen zu dem Schluss, dass bereits bei einem Filterfaktor von 200 pro Oktave Messungen mit gepulsten Lichtquellen, die einen hohen harmonischen Anteil besitzen, möglich sind [118].

5.1.2.3 pH-Messungen mit Submikro-Sensoren

Basierend auf gezogenen Faserspitzen mit einem Spitzendurchmesser von 300 nm wurden Submikro-Sensoren hergestellt. Die Ergebnisse der pH-Messungen mit drei Sensoren sind in Abbildung 5-7 dargestellt. Der Wendepunkt lag bei $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$, die Änderung des Phasensignals über den untersuchten pH-Bereich bei $\Delta\Phi = 13,1^\circ \pm 1,0^\circ$. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der Mikro-Sensoren.

Die kleinsten bisher in der Literatur beschriebenen faseroptischen Sensoren für Lebensdauer-Messungen basierend auf einem protolyseabhängigen Energietransfer liegen bei etwa 10 μm Spitzendurchmesser [38,113]. Die in diesem Kapitel beschriebenen Sensoren sind somit die ersten derartigen Sensoren, deren Dimension im Submikrometerbereich liegt.

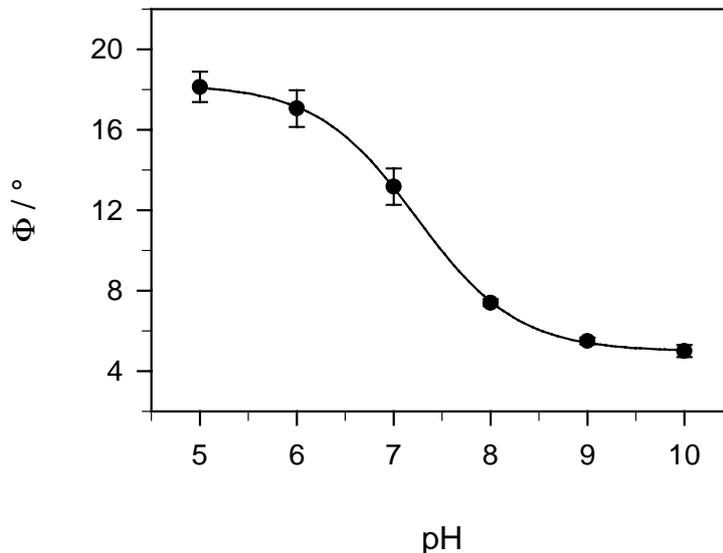


Abbildung 5-7 *pH-Abhängigkeit der Submikro-Sensoren.* [Experimentelle Daten: Universalpuffer. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck). Spitzendurchmesser $d = 300 \text{ nm}$. Beleuchtungsstärke $E = 1,6 \cdot 10^5 \text{ W/m}^2$. Die Fehlerbalken geben die Exemplarstreuung von 3 Sensoren an].

5.1.2.4 pH-Messungen mit Nano-Sensoren

Nano-Sensoren mit einer Apertur von 50 nm wurden durch Eintauchen von SNOM-Spitzen in die farbstoffhaltige Polymerlösung erhalten.

Abbildung 5-8 zeigt die Ergebnisse von pH-Messungen mit drei Nano-Sensoren. Auch diese zeigten bezüglich des pH-Messbereichs die gleichen Eigenschaften wie die Mikro- und

Submikro-Sensoren. Der Wendepunkt lag bei $\text{pH} = 7,2 \pm 0,1$, die Änderung des Phasensignals über den untersuchten pH-Bereich betrug $\Delta\Phi = 12,2^\circ \pm 1,1^\circ$.

Mit diesen Sensoren ist folglich eine weitere Miniaturisierung unter Erhaltung eines genauen und reproduzierbaren Messsignals gelungen. Die hier erstmals vorgestellten Nano-Sensoren sind gegenüber den in der Literatur beschriebenen Sensoren (siehe voriges Kapitel) bezüglich der Fläche auf weniger als ein Zehntausendstel miniaturisiert.

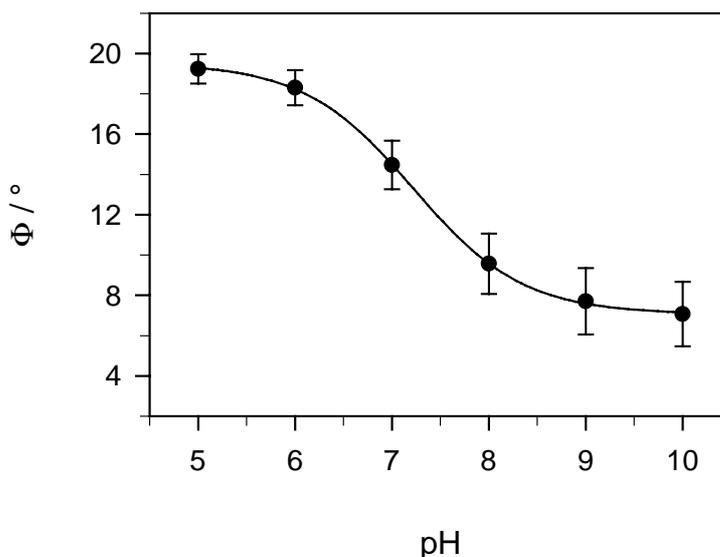


Abbildung 5-8 *pH-Abhängigkeit der Nano-Sensoren.* [Experimentelle Daten: Univer-salpuffer. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck). Apertur $d = 50 \text{ nm}$. Beleuchtungsstärke $E = 2,5 \cdot 10^8 \text{ W/m}^2$. Die Fehlerbalken geben die Exemplarstreuung von 3 Sensoren an].

Die von den Mikro- zu den Nano-Sensoren abnehmende Änderung des Phasensignals ist vermutlich auf einen zunehmenden Streu- und Fremdlichtanteil zurückzuführen. Zwar filtert der Lock-In Verstärker die Messfrequenz aus und verstärkt nur Signale mit dieser Frequenz, kritisch ist jedoch, wenn der Anteil von Fremd-Lumineszenzlicht, das vom Laser z.B. in der Faser oder im Kantenfilter angeregt wird, steigt.

Dies war in Blindmessungen, die ohne Rezeptorschicht durchgeführt wurden, deutlich zu erkennen. Man erhielt einen von den Mikro- zu den Nano-Sensoren steigenden modulierten Untergrund. Rechnerische Untergrundkorrekturen sind insofern kritisch, als bei einer Korrektur nicht nur das Phasensignal, sondern auch die Intensität mit einbezogen wird (vgl. Kapitel 5.1.3.3). Durch den Lösungswechsel ändert sich wegen der Flexibilität der Faser die exakte räumliche Lage der Spitze gegenüber dem Fenster des Photomultipliers immer ein wenig, und somit auch die Intensität des erfassten Lichtes. Diese Intensitätsänderungen würden zu Fehlern in der Untergrund-Korrektur führen. Aus diesem Grunde wurde auf eine

Korrektur verzichtet, zumal die gewünschte Messgenauigkeit von 0,1 pH-Einheiten mit diesen Sensoren erreicht werden konnte (siehe Kapitel 5.1.2.6).

5.1.2.5 Ansprechverhalten

Das Ansprechverhalten des pH-Sensors wurde anhand eines Mikro-Sensors bei dem Wechsel zwischen pH = 6 und pH = 8 getestet. Der zeitliche Verlauf der Phasen- sowie der Amplituden-Werte ist in Abbildung 5-9 dargestellt. Für den Wechsel von pH = 6 nach pH = 8 wurde die t_{90} -Zeit zu 18 s, beim Wechsel von pH = 8 nach pH = 6 zu 35 s bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Sensor schnell und reversibel auf Änderungen des pH-Wertes anspricht.

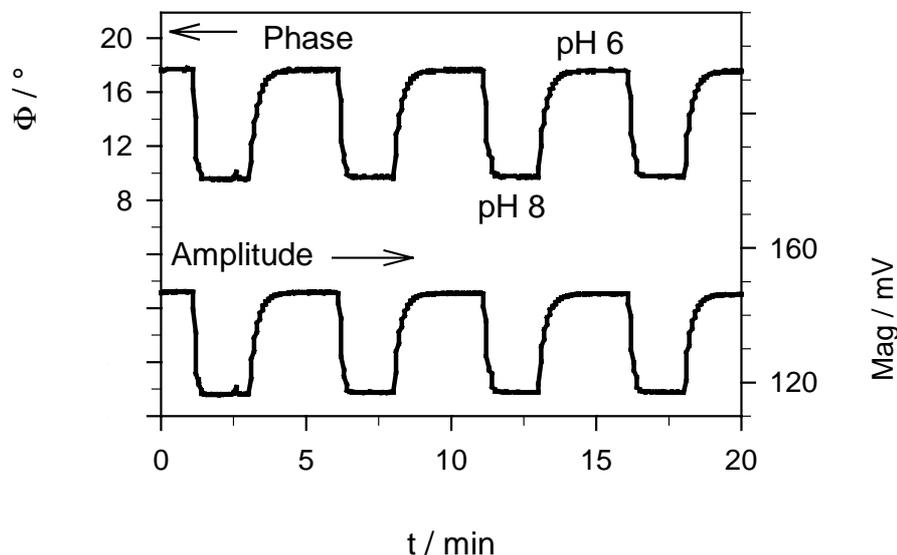


Abbildung 5-9 *Ansprechverhalten des Sensors. Linke Achse: Phasenwerte. Rechte Achse: Amplitude. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, pH = 6; 8. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus)].*

5.1.2.6 Dynamischer pH-Messbereich bei Submikro- und Nano-Sensoren

Die Betrachtungen zur Messgenauigkeit wurden wie bei dem Kalium-Sensor mit spektraler Referenzierung durchgeführt. Zur Ermittlung des 6σ -Rauschens wurde hier jedoch das Sensorsignal eines Submikro- und eines Nano-Sensors zehn Minuten lang in 5 s-Abständen aufgenommen, und aus diesen Werten wurde die Standardabweichung bestimmt (siehe Abbildung 5-10). Die Werte für 6σ betragen $0,18^\circ$ beim Submikro-Sensor bzw. $0,48^\circ$ beim Nano-Sensor. Sie wurden bei pH = 7 ermittelt, bei anderen pH-Werten war das Rauschen vergleichbar.

Aus den entsprechenden Kalibrationen der Kapitel 5.1.2.3 und 5.1.2.4 wurden die Ableitungswerte berechnet, welche die Signaländerung pro 0,1 pH-Einheiten angeben. Der

Vergleich dieser Kurven mit den 6σ -Werten ergab, dass bei Submikro-Sensoren im pH-Bereich von 6,0...8,6 und mit Nano-Sensoren im pH-Bereich von 6,8...7,7 auf 0,1 pH-Einheiten genau gemessen werden kann (siehe Abbildung 5-11). Diese pH-Sensoren sind demnach bis zur Nano-Version geeignet, um auf 0,1 pH-Einheiten genaue Messungen im physiologischen Bereich durchzuführen.

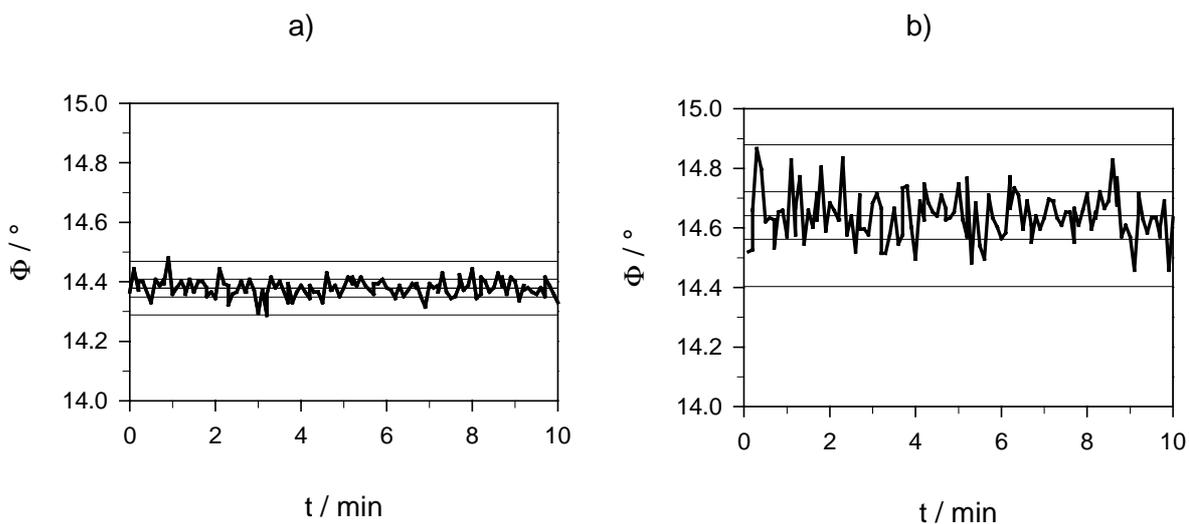


Abbildung 5-10 *Rauschen des Sensorsignals bei pH = 7. a) Submikro-Sensor. b) Nano-Sensor.* Die Linien kennzeichnen jeweils $\bar{X}+3\sigma$; $\bar{X}+\sigma$; \bar{X} ; $\bar{X}-\sigma$; $\bar{X}-3\sigma$. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, pH = 7. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

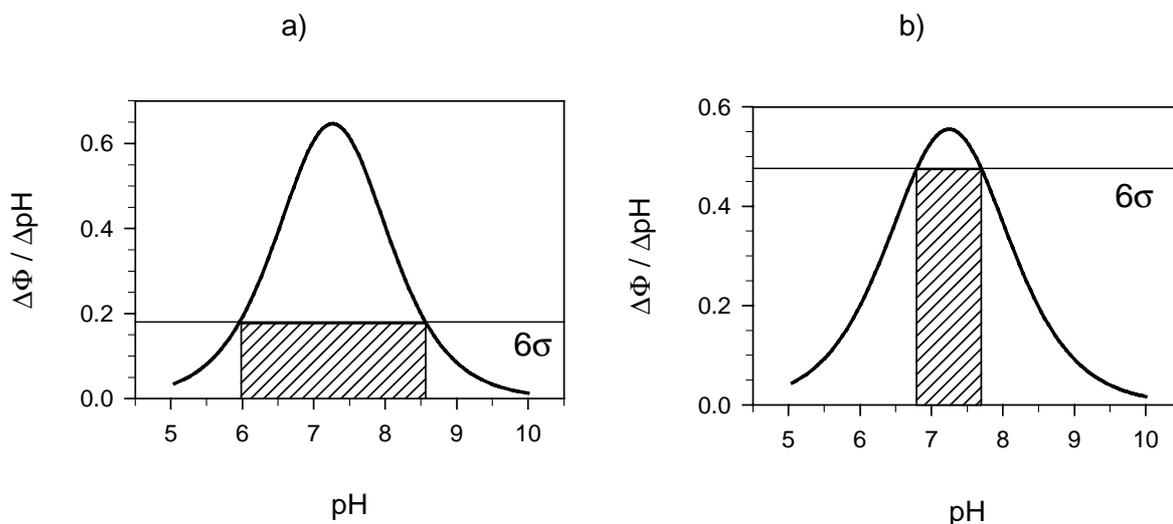


Abbildung 5-11 *Dynamischer pH-Messbereich. a) Submikro-Sensor. b) Nano-Sensor.* [Kurven: Signaländerung pro Inkrement von 0,1 pH-Einheiten. Waagrechte Linien: Werte der sechsfachen Standardabweichung (Rauschen). Schraffierte Bereiche: Messbereiche für 0,1 pH-Einheiten genaue Messungen].

5.1.3 Signalstabilität

5.1.3.1 Einführung

Die Einflussgrößen auf die Signal- und Farbstoffstabilität entsprechen denen der Sensoren mit spektraler Referenzierung, sie wurden daher in analoger Weise getestet.

5.1.3.2 Variation der Anregungsintensität

Der Einfluss unterschiedlicher Schichtdicken auf das Sensorsignal bei gleichbleibender Anregungsintensität wurde anhand von Makro-Sensoren bereits getestet (vgl. Kapitel 5.1.1.4). Während die Amplitudenwerte der Sensoren deutlich schwankten, waren die Phasenwerte nahezu gleichbleibend.

In diesem Abschnitt wird nun untersucht, wie sich eine veränderte Anregungsintensität auf das Sensorsignal bei gleicher Schichtdicke auswirkt. Dafür wurde ein Submikro-Sensor hergestellt und dessen Signalwerte (Phase und Amplitude) bei $\text{pH} = 5$ aufgenommen. Zunächst wurde die Laserleistung stufenweise auf das fünffache gesteigert. Der Phasenwert blieb konstant bei $\Phi = 19,5^\circ \pm 0,1^\circ$, während sich die Amplitude von 13 mV auf 80 mV steigerte. Als nächstes wurde die Laserleistung mit Neutralfiltern stufenweise auf 10% abgeschwächt, wobei der Phasenwert wiederum konstant blieb, die Amplitude hingegen entsprechend abnahm.

Als nächstes wurde die Eintauchtiefe der Faserspitze in die Küvette variiert. Dadurch ändert sich der Raumwinkel (und somit die Intensität) des noch auf das Photomultiplier-Fenster fallenden Lichtes. Insgesamt wurde die Eintauchtiefe um 3 mm variiert. Wiederum blieb der Phasenwert konstant.

Mit diesen Versuchen wurde gezeigt, dass das Phasensignal des Sensors in weitem Rahmen unabhängig von Änderungen der Anregungsintensität bis zu einem Faktor 50 ist.

5.1.3.3 Photostabilität

Photostabilität des Lumineszenzfarbstoffs

Zunächst wurde anhand von Submikro-Sensoren die Photostabilität des reinen Lumineszenzfarbstoffs an Raumluft getestet. Dafür wurden Sensoren hergestellt, die nur die entsprechende Stoffmenge des Ruthenium-Komplexes als $\text{Ru}(\text{phen})_3\text{Cl}_2$ enthielten. Es wurden drei solche Sensoren hergestellt und mit verschiedenen Beleuchtungsstärken durchgehend zwanzig Minuten lang bestrahlt. Für den ersten Versuch wurde die volle Laserleistung in die Faser eingekoppelt, und bei weiteren Versuchen die Laserleistung mit

Neutralfiltern (NG) auf 10^{-1} bzw. 10^{-5} abgeschwächt, wobei letzterer Wert den bei Kalibrationen üblichen Beleuchtungsstärken entspricht.

Bei hohen Anregungslichtintensitäten gelangt immer ein wenig Anregungs- und Fremd-Lumineszenzlicht durch den Kantenfilter in den Detektor. Unter den üblichen Messbedingungen ist dieser Anteil zu vernachlässigen, bei Versuchen mit hoher Anregungsintensität, wie sie hier angewandt wurde, jedoch nicht. Je stärker der Messfarbstoff zerstört wird, desto geringer wird das eigentliche Messsignal und desto höher somit der Anteil des Störsignals. Bei den Amplitudenwerten, die sich additiv aus Mess- und Störsignal zusammensetzen, kommt es zu einem Offset. Um einerseits den Offset zu eliminieren und andererseits den unterschiedlichen Anfangsintensitäten durch die leicht variierende Schichtdicke Rechnung zu tragen, wurden die Amplitudenwerte der Sensoren aus Gründen der Vergleichbarkeit der Darstellung normiert. Bei den Phasenwerten kommt es ebenfalls zu einer Verfälschung durch Störlicht, die um so größer ist, als das eigentliche Messsignal durch Photobleichen schwächer wird. Bei der Belichtung mit der vollen bzw. auf ein Zehntel abgeschwächten Laserintensität wurde daher eine Nullwert-Korrektur mit dem Messwert der unbeschichteten Spitze durchgeführt. Da dieser Sensor nicht beprobt wurde, also die räumliche Lage der Spitze im Gegensatz zu Kapitel 5.1.2.4 nicht verändert wurde, war die Korrektur des Phasenwertes hier möglich und wurde nach Gleichung 5-4 durchgeführt. Die Korrekturformel leitet sich aus der Addition von Mess- und Störsignal (dargestellt als Vektoren mit dem Betrag der Amplitude und Phasenwinkel Φ gegen die Ursprungsgerade) ab [117].

Gleichung 5-4
$$\Phi_{\text{korrr}} = \arctan\left(\frac{I_1 \cdot \sin \Phi_1 - I_0 \cdot \sin \Phi_0}{I_1 \cdot \cos \Phi_1 - I_0 \cdot \cos \Phi_0}\right)$$

$I_1; \Phi_1$ Amplitude bzw. Phasenwinkel des unkorrigierten Messsignals

$I_0; \Phi_0$ Amplitude bzw. Phasenwinkel des Nullwerts (Spitze ohne Beschichtung)

In Abbildung 5-12 sind die Phasen- und Amplitudenwerte der Messungen zum Photobleichen im zeitlichen Verlauf dargestellt. Aus dem Verlauf der Amplitudenwerte in Abbildung 5-12 b kann man ersehen, dass der Farbstoff – wenn man ihn der vollen Laserleistung aussetzt - bereits nach 20 Minuten nahezu vollständig zerstört ist. Unter den bei den Messungen üblicherweise angewandten Intensitäten ist der Farbstoff jedoch stabil. Die Lebensdauer der Lumineszenz und somit der gemessene Phasenwert sollten unabhängig von der Menge des noch vorhandenen, unzerstörten Farbstoffs sein. Aus Abbildung 5-12 a kann man jedoch ersehen, dass sich der Phasenwert mit der Zeit ändert. Hierbei muss man berücksichtigen, dass durch die hohe Beleuchtungsstärke noch andere Reaktionen als die Zerstörung des Messfarbstoffs ablaufen, wie z.B. Erwärmung des Polymers (bei steigender Temperatur sinkt die Lebensdauer, da die Wahrscheinlichkeit für die „internal conversion“ zunimmt), oder dass bei der Zerstörung des Farbstoffs möglicherweise fluoreszierende Zwischen- und

Folgeprodukte mit einer anderen Lebensdauer entstehen. So entsteht nach Literaturangaben zum Beispiel bei der Zerstörung von Ruthenium-Komplexen eine bei der Emission des Rutheniums absorbierende Spezies, die einen RET bewirken und somit die Lebensdauer der Lumineszenz verkürzen kann [119].

Unter Messbedingungen waren sowohl das Amplituden- als auch das Phasensignal des Ruthenium-Farbstoffs stabil.

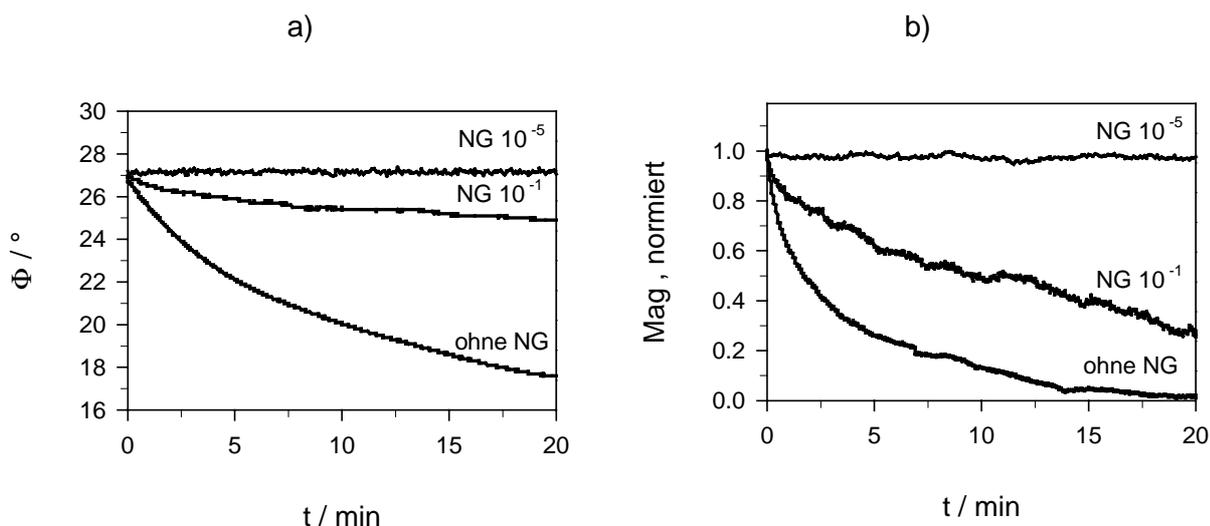


Abbildung 5-12 Photobleichen eines Submikro-Sensors mit $\text{Ru}(\text{phen})_3\text{Cl}_2$ an Raumluft. a) Phasensignal. b) Amplitude. [Experimentelle Daten: Beleuchtungsstärke ohne Filter $E = 1,6 \cdot 10^{10} \text{ W/m}^2$. Neutralfilter mit Transmission $T = 10^{-1}$ bzw. 10^{-5} (letzteres entspricht den üblichen Messbedingungen). Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

Photostabilität des Absorptionsfarbstoffs

Als nächstes wurde die Stabilität des Absorptionsfarbstoffs unter Messbedingungen untersucht. Nach Literaturangaben ist besonders die deprotonierte Form des BTB empfindlich auf Photobleichen unter Einwirkung von Sauerstoff [26,34]. Daher wurde ein pH-Sensor mit dem $\text{Ru}(\text{phen})_3(\text{BTB})_2$ -Komplex hergestellt, dessen Phasen- und Amplitudenwerte während einer einstündigen Belichtung mit den bei Messungen üblichen Beleuchtungsstärken bei verschiedenen pH-Werten registriert wurden. Da der Lumineszenzfarbstoff nach den obengenannten Ergebnissen stabil ist, wäre bei einer selektiven Zerstörung des Absorptionsfarbstoffes folgendes zu erwarten: Durch den RET verringert der Absorptionsfarbstoff sowohl die Lebensdauer (gemessen als Phasenwinkel) als auch die Intensität (gemessen als Amplitudensignal) der Lumineszenz. Eine Zerstörung des Absorptionsfarbstoffs würde zu einer geringeren RET-Effizienz führen, und somit zu einem Anstieg des Phasensignals sowie der Amplitude.

Abbildung 5-13 zeigt den Verlauf der Phasen- und Amplitudensignale eines *Submikro-Sensors* bei verschiedenen pH-Werten. Beide Signale waren jeweils eine Stunde lang unter den bei Messungen üblichen Beleuchtungsstärken stabil. Berücksichtigt man, dass man für eine Messung lediglich 2 s benötigt, so lassen sich mit jedem Sensor mindestens 1800 Messwerte aufnehmen.

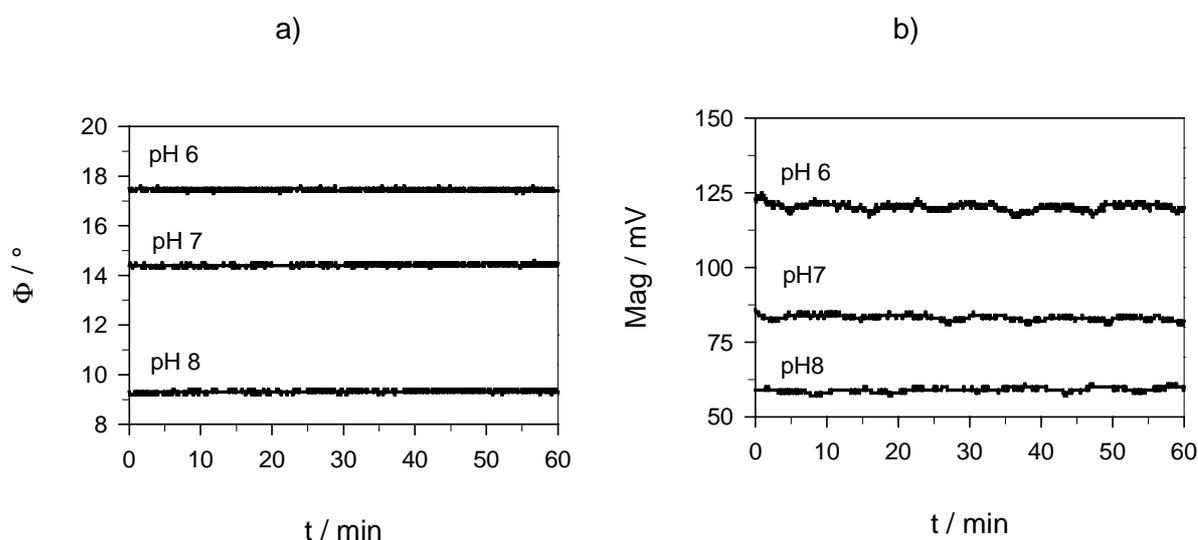


Abbildung 5-13 Photostabilität des Submikro-pH-Sensors unter Messbedingungen. a) Phasensignal. b) Amplitude. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, pH = 6; 7; 8. Beleuchtungsstärke $E = 1,6 \cdot 10^5 \text{ W/m}^2$. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

Weiterhin kann man aus den Daten folgern, dass unter den gegebenen Bedingungen (ruhende Flüssigkeiten bei den entsprechenden pH-Werten) kein Farbstoffaustrag stattfindet.

Als nächstes wurde die Stabilität des Absorptionsfarbstoffs anhand eines *Nano-Sensors* untersucht. Wie bei den Submikro-Sensoren wurde der Sensor eine Stunde lang mit der Intensität, die auch bei den Kalibrationen angewandt wurde, bestrahlt. Verglichen mit den Messbedingungen für Submikro-Sensoren war die Beleuchtungsstärke an der Spitze bei den Nano-Sensoren um den Faktor 10 höher. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 5-14 dargestellt. Bei pH = 6 waren sowohl das Phasen- als auch das Amplitudensignal während einer Stunde stabil, woraus man auf eine Stabilität der beiden Farbstoffe über den beobachteten Zeitraum schließen kann. Bei pH = 8 zeigte sich ein langsamer Anstieg sowohl beim Phasen- als auch beim Amplitudensignal, was wie oben erläutert auf ein Photobleichen des Absorptionsfarbstoffs hinweist. Bei pH = 9 war dieser Effekt noch ausgeprägter. Das Phasensignal stieg auf $\Phi = 17,8^\circ$ an, der vollständig protonierte Sensor hat einen Phasenwert von etwa $\Phi = 19,5^\circ$ (vgl. Abbildung 5-8). Daraus kann man folgern, dass das BTB während der einstündigen Belichtung fast vollständig

zerstört wurde. Auch der Amplituden-Wert stieg bei $\text{pH} = 9$ stark an und ging nach einer Stunde etwa der Sättigung entgegen. Dass das Amplitudensignal den Wert bei $\text{pH} = 6$ im Gegensatz zum Phasensignal nicht erreicht, ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den gezeigten Messungen jeweils um unterschiedliche Sensoren handelte. Wie bereits erwähnt sind die in gewissem Rahmen schwankenden Schichtdicken dafür verantwortlich, dass sich die Amplitudenwerte (im Gegensatz zu den Phasenwerten) von Sensor zu Sensor unterscheiden. Am Kurvenverlauf kann man jedoch erkennen, dass das Amplitudensignal wie das Phasensignal einem konstanten Endwert entgegengeht, was auf eine fast vollständige Zerstörung des BTB hindeutet.

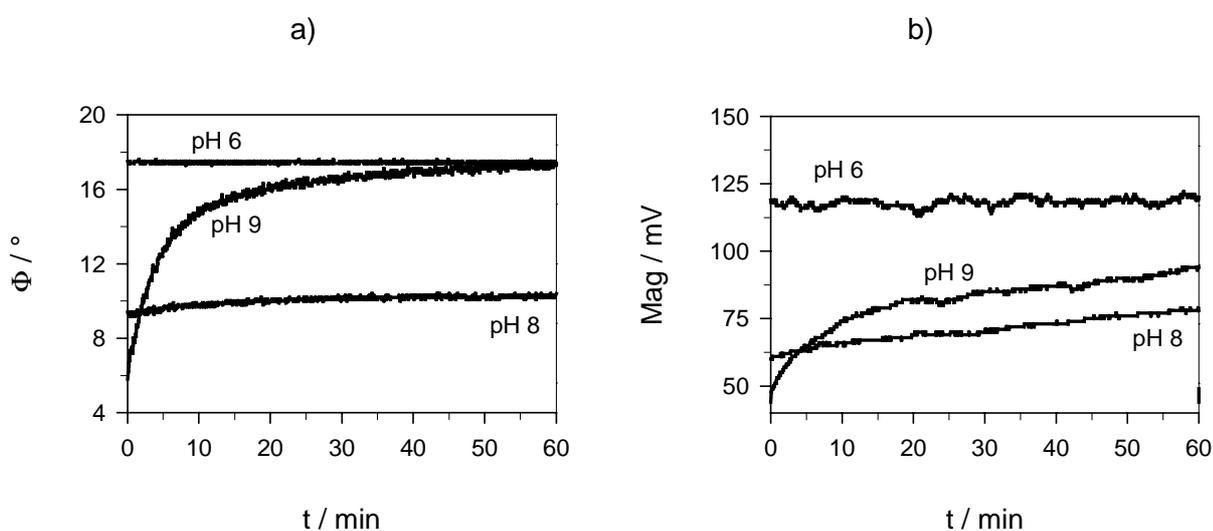


Abbildung 5-14 Photostabilität des Nano-pH-Sensors unter Messbedingungen. a) Phasensignal. b) Amplitude. [Experimentelle Daten: Universalpuffer, $\text{pH} = 6; 8; 9$. Beleuchtungsstärke $E = 2,5 \cdot 10^6 \text{ W/m}^2$. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

Aus den beobachteten Kurven wurde eine Abschätzung der Auswirkung der Photodekomposition auf das Phasensignal getroffen. Dazu wurden die jeweiligen Phasenwerte bei $\text{pH} = 8$ bzw. $\text{pH} = 9$ von dem Phasenwert bei $\text{pH} = 5$ ($\Phi = 19,5^\circ$) subtrahiert. Die resultierenden abfallenden Kurven geben die Zerstörung des BTB wieder. Sie wurden jeweils an einen exponentiellen Zerfall angepasst, die Gleichungen sind in Anhang 8.4.2 aufgeführt.

Bei $\text{pH} = 8$ errechnet sich die Änderung des Phasensignals durch Photobleichen des BTB während einer Messung (Dauer: 2 s) zu $\Delta\Phi = 0,002^\circ$, bei $\text{pH} = 9$ zu $\Delta\Phi = 0,08^\circ$. Eine einmalige Kalibration sollte durchaus noch durchführbar sein, bei wiederholten Messungen bei pH -Werten größer als 8 ist jedoch mit deutlichen Fehlern durch Farbstoffbleichen zu rechnen.

5.1.3.4 Farbstoffaustrag

Die beiden verwendeten Farbstoffe sind in ihrer ursprünglichen Form ($\text{Ru}(\text{phen})_3\text{Cl}_2$ bzw. BTB-Natriumsalz) jeweils wasserlöslich. Um ihren Austrag aus der Polymerschicht in die wässrige Messlösung zu verhindern, wurde das wasserunlösliche $\text{Ru}(\text{phen})_3(\text{BTB})_2$ -Ionenpaar hergestellt. Bei hohen pH-Werten, bei denen das BTB zweifach negativ geladen vorliegt, ist nach Literaturangaben jedoch mit einem Auswaschen von BTB in die wässrige Phase zu rechnen [26].

Der Farbstoffaustrag wurde anhand eines Submikro-Sensors getestet. Dazu wurde ein Sensor in Puffer bei $\text{pH} = 6$ vorkonditioniert und nach einer Stunde die Phasenwerte bei $\text{pH} = 6; 7; 8$ aufgenommen. Anschließend wurde der Sensor im Dunkeln für 19 Stunden mit einer Pufferlösung bei $\text{pH} = 6$ im Durchfluss beprobt (Durchflussrate: 0,5 ml/min), danach wurde wieder eine Kalibration mit Puffern mit $\text{pH} = 6; 7; 8$ durchgeführt. Anschließend wurde der Sensor noch zweimal bei $\text{pH} = 8$ im Durchfluss beprobt und danach jeweils eine Kalibration durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 5-3 wiedergegeben. Dort sind jeweils die Anfangs-Phasenwerte Φ_0 und die Änderungen $\Delta\Phi$ beim Wechsel von $\text{pH} = 6$ nach $\text{pH} = 8$ wiedergegeben. Weiterhin ist noch die prozentuale Phasenänderung beim Wechsel von $\text{pH} = 6$ nach $\text{pH} = 7$ bzw. von $\text{pH} = 7$ nach $\text{pH} = 8$ angegeben.

Tabelle 5-3 *Änderung des Sensorsignals durch Farbstoffaustrag.*

Beprobung im Durchfluss	0 h	19 h (pH=6)	2,5 h (pH=8)	21 h (pH=8)
Φ_0 (pH = 6)	18,6°	18,5°	18,6°	18,3°
$\Delta\Phi_{\text{ges}}$ (pH = 6 → pH = 8)	10,6°	10,7°	10,1°	8,0°
$\Delta\Phi$ (pH = 6 → pH = 7) / $\Delta\Phi_{\text{ges}}$	39 %	39 %	38 %	29 %
$\Delta\Phi$ (pH = 7 → pH = 8) / $\Delta\Phi_{\text{ges}}$	61 %	61 %	62 %	71%

Nach 19-stündiger Beprobung im Durchfluss mit $\text{pH} = 6$ waren keinerlei Änderungen im Sensorverhalten zu beobachten. Nach zweieinhalb Stunden Beprobung mit $\text{pH} = 8$ war die Phasenänderung bereits von $\Delta\Phi = 10,6^\circ$ auf $\Delta\Phi = 10,1^\circ$ gesunken. Nach weiteren 18,5 Stunden betrug die Phasenänderung nur noch $\Delta\Phi = 8,0^\circ$, die prozentualen Anteile bei den pH-Schritten von $\text{pH} = 6$ nach $\text{pH} = 7$ bzw. von $\text{pH} = 7$ nach $\text{pH} = 8$ hatten sich gegenüber den anfänglichen Verhältnissen verschoben. Der abnehmende Wert der Phasenänderung deutet auf einen Austrag von BTB hin, denn je weniger BTB sich in der Membran befindet, desto weniger ausgeprägt ist der RET, und desto schwächer ist die Verringerung der Lebensdauer. Der Anfangs-Phasenwert Φ_0 bleibt hingegen bei $\text{pH} = 6$ nahezu konstant, da bei diesem pH-Wert noch kaum RET auftritt.

Aus den Beobachtungen kann man ableiten, dass bei $\text{pH} = 6$ kein bzw. nur ein geringer Farbstoffaustrag in die wässrige Lösung stattfindet, bei $\text{pH} = 8$ hingegen damit gerechnet werden muss. Ein Nano-Sensor sollte daher nur möglichst kurz zur Kalibration mit höheren pH -Werten beprobt und ansonsten in Lösungen mit $\text{pH} \leq 6$ aufbewahrt werden.

5.1.3.5 Sauerstoff-Querempfindlichkeit

Sauerstoff als Quencher kann in Konkurrenz zur Lumineszenzlöschung durch den RET treten. In den meisten Polymermatrices wird die Lumineszenz der Ruthenium-Komplexe durch Sauerstoff gut gequencht. Auf diesem Prinzip basieren viele Sauerstoff-Sensoren [50,51]. Die Sauerstoff-Empfindlichkeit hängt jedoch stark vom Liganden des Rutheniums und von der Polymermatrix ab, was bereits in den anfänglichen Untersuchungen zur Auswahl des Ruthenium-Komplexes und der Polymermatrix berücksichtigt worden war (vgl. Kapitel 5.1.1.1).

Nachdem dort jedoch nur die Sauerstoffempfindlichkeit des Ruthenium-Komplexes in der Gasphase getestet worden war, wurde nun die Sauerstoff-Querempfindlichkeit des pH -Sensors ($\text{Ru}(\text{phen})_3(\text{BTB})_2$ -Komplex in PolyHEMA) in Lösung untersucht. Dies geschah anhand von Mikro-Sensoren. Diese wurden zunächst in der Gasphase mit Raumluft, Stickstoff und Sauerstoff beprobt. Das Sensorsignal änderte sich dabei nicht. Anschließend wurde der Sensor mit Lösung bei $\text{pH} = 7$ beprobt. Der Messpuffer war zunächst raumluftgesättigt, dann wurde Sauerstoff und schließlich Stickstoff eingeblasen. Auch hierbei änderte sich das Sensorsignal nicht.

Daraus ist zu folgern, dass der verwendete Ruthenium-phenanthrolin-Komplex in PolyHEMA keine messbare Querempfindlichkeit auf Sauerstoff besitzt, weder in der Gasphase noch in Lösung. Diese Beobachtung deckt sich mit den Voruntersuchungen der Sauerstoff-Querempfindlichkeit aus Kapitel 5.1.1.1.

5.1.4 Zusammenfassung – pH -Sensor

In diesem Kapitel wurde ein pH -Sensor vorgestellt, dessen Messprinzip auf der sich ändernden Lebensdauer der Lumineszenz eines Ruthenium-phenanthrolin-Komplexes beruht. Die Lebensdaueränderung wird durch einen Resonanz-Energietransfer auf den pH -Absorptionsindikator Bromthymolblau hervorgerufen und durch eine phasensensitive Detektion verfolgt.

Es wurde gezeigt, dass die Phasensignale verschiedener Sensoren deutlich reproduzierbarer als deren Intensitätswerte sind, zudem ist das Phasensignal weitgehend unabhängig von Schwankungen der Anregungsintensität.

Erstmals wurde in dieser Arbeit eine Miniaturisierung derartiger Sensoren in den Submikrometerbereich bis zu einer Nano-Variante mit 50 nm Apertur durchgeführt.

Bei sämtlichen faseroptischen Varianten (also Mikro- bis Nano-Sensoren) lag der dynamische Messbereich geeignet für Messungen bei physiologischen Konzentrationen mit einer Genauigkeit von 0,1 pH-Einheiten.

Die Signalstabilität unter Messbedingungen war bei physiologischen pH-Werten sehr gut. Bei $\text{pH} \geq 8$ jedoch wurde bei allen Sensoren ein Farbstoffaustrag und bei Nano-Sensoren ein Photobleichen von BTB beobachtet. Diese Effekte können während einer Kalibration als vernachlässigbar angesehen werden, sie sind jedoch bei wiederholten Messungen bei $\text{pH} \geq 8$ zu beachten. Eine Sauerstoffquerempfindlichkeit des Sensors wurde weder in der Gasphase noch in wässriger Lösung beobachtet.

5.2 Kalium-Sensoren

5.2.1 Einführung

In der Literatur ist bereits ein Kalium-Sensor beschrieben, der ein Ruthenium-BTB-Ionenpaar in einer PVC-Matrix mit dem Kalium-Komplexbildner Valinomycin kombiniert, wodurch diese Membran kaliumsensitiv wird [35]. Abweichend von dem pH-Sensor wurde hier der Ruthenium-tris(diphenyl-dipyridyl)-Komplex verwendet. Dieser Sensor ist jedoch nur für die Messung bei alkalischen pH-Werten geeignet, was der Zielvorgabe physiologischer Messungen dieser Arbeit widerspricht.

Bei den Voruntersuchungen für den spektral referenzierten Kalium-Sensor (siehe Kapitel 4.1.3.2) war festgestellt worden, dass der Weichmacher einen entscheidenden Einfluss auf den pH-Arbeitsbereich des Sensors hatte, wobei der Weichmacher NPOE eine Verschiebung zu niedrigeren pH-Werten bewirkte. Daher wurde untersucht, ob auch bei dem in der Literatur beschriebenen Sensor durch Austausch des dort verwendeten Weichmachers CPDDE gegen NPOE ein niedrigerer pH-Arbeitsbereich erzielt werden könne.

5.2.2 Farbstoffspektren

Die Voraussetzung für eine hohe RET-Effizienz ist eine gute Überlappung der Farbstoffspektren. Zur Untersuchung, ob dies in der gewählten Matrix gewährleistet ist, wurden Makrosensoren auf Plexiglasträgern hergestellt, die beide Farbstoffe in einer PVC-NPOE-Matrix enthielten.

In Abbildung 5-15 sind die Absorptionsspektren der protonierten und deprotonierten Form von Bromthymolblau sowie das Lumineszenz-Anregungs- und Emissionsspektrum des Ruthenium-Komplexes dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht, dass nur das Absorptionsspektrum der deprotonierten Form des Bromthymolblau gut mit dem Emissionsspektrum des Ruthenium-Komplexes überlappt, der entsprechende Bereich ist schraffiert dargestellt. Durch die Kombination der beiden Farbstoffe in einer Membran können folglich Sensoren hergestellt werden, bei denen eine steigende Protolyse des BTB zu einer steigenden RET-Effizienz und somit zu einer Verringerung der Lebensdauer der Lumineszenz des Ruthenium-Komplexes führt.

Enthält eine solche Membran zusätzlich noch einen Kalium-Komplexbildner wie Valinomycin, so führt wegen des Ionenaustauschprinzips eine steigende Kaliumionenkonzentration zu einer steigenden Protolyse des BTB, was als Verringerung des Phasenwertes verfolgt werden kann.

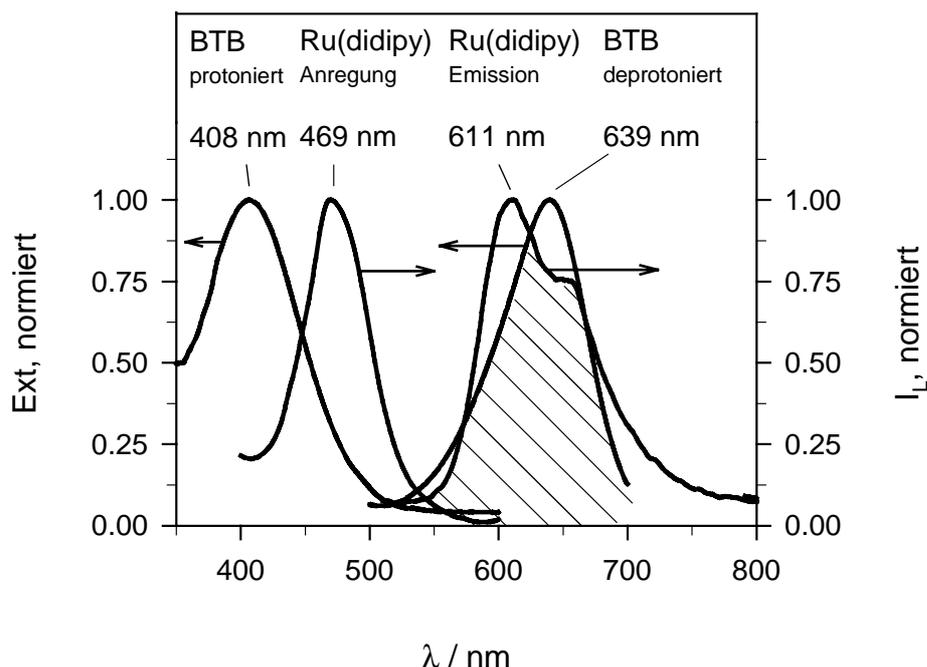


Abbildung 5-15 Absorptionsspektren von BTB und Lumineszenzspektren von Ru(didipy). [Linke Achse: Absorptionsspektren von BTB-CTA. Rechte Achse: Lumineszenz-Anregungs- ($\lambda_{em} = 630$ nm) und Emissionsspektrum ($\lambda_{ex} = 470$ nm) von Ru(didipy)₃Cl₂. Farbstoffe jeweils in PVC / NPOE / Valinomycin-Schichten. Überlappungsbereich schraffiert].

5.2.3 Untersuchung des pH-Arbeitsbereichs

Wie auch bei dem spektralen Kalium-Sensor wurde zunächst der pH-Arbeitsbereich dieses Kalium-Sensors untersucht. Hierfür wurde ein Mikro-Sensor hergestellt, mit dem pH-Reihen ohne und mit 100 mmol Kalium, was der Sättigungskonzentration des Sensors entspricht, aufgenommen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-16 dargestellt. Aus der Differenz der beiden Reihen lässt sich die Kaliumsignaländerung bei dem jeweiligen pH-Wert vorhersagen. Das beste Kaliumsignal wäre bei pH = 11 zu erwarten. Der für den spektral referenzierten Sensor beschriebene Einfluss von NPOE auf den pH-Arbeitsbereich lässt sich offensichtlich nicht auf den hier angesetzten RET-Sensortyp übertragen.

Eine weitere Optimierung dieses Sensors wurde insbesondere unter Berücksichtigung der mangelnden Stabilität des Bromthymolblau bezüglich Photobleichen und Farbstoffaustrag bei pH-Werten größer als 8 nicht vorgenommen.

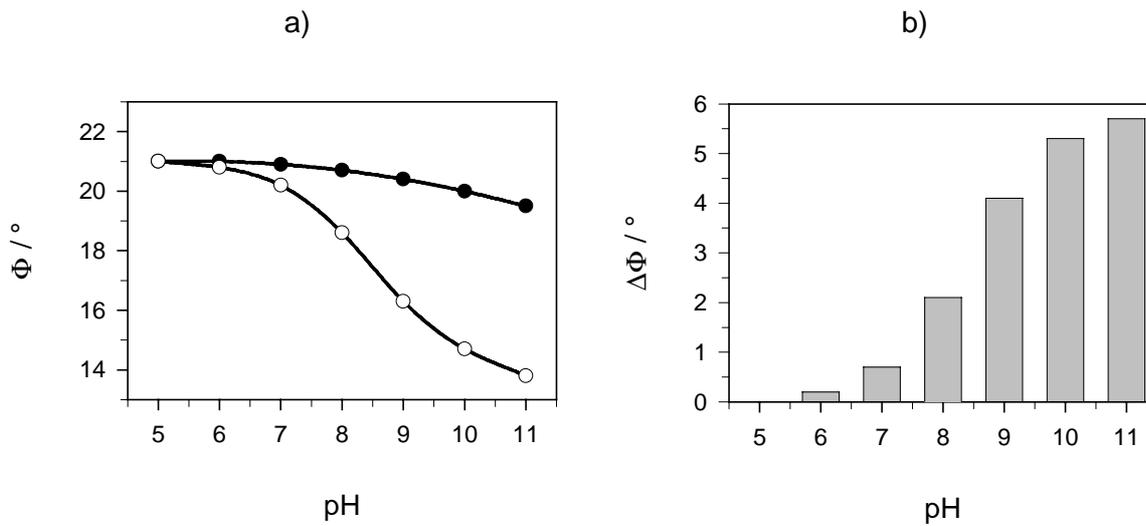


Abbildung 5-16 a) pH-Abhängigkeit des Kalium-Sensors in kaliumfreien (●) und kaliumhaltigen Puffern (○). b) Signalhub für Kalium-Messungen bei den einzelnen pH-Werten. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer ohne bzw. mit 100 mmol/l KCl. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus)].

5.3 Chlorid-Sensoren

5.3.1 Voruntersuchungen

5.3.1.1 Einfluss des Weichmachers auf die Sensoreigenschaften

Zunächst wurde ein Chlorid-Sensor nach Literaturangaben hergestellt [34]. Die ursprüngliche Rezeptur verwendete als Weichmacher 2-Cyanophenyl-dodecylether (CPDDE). Um den Einfluss des Weichmachers auf Sensoreigenschaften wie Ansprechzeit, Signalhub und dynamischen Messbereich zu testen, wurden Makro-Sensoren mit unterschiedlichen Weichmachern hergestellt: CPDDE, Dioctylsebacat (DOS) und 2-Nitrophenyl-octylether (NPOE). Das Verhalten dieser Sensoren bei Änderungen der Chloridionenkonzentration bei $\text{pH} = 7,0$ wurde untersucht um festzustellen, inwieweit sie für physiologische Messungen geeignet sind. Intrazelluläre Chloridionenkonzentrationen liegen im Bereich um 1 mmol/l , extrazelluläre um 100 mmol/l [106].

Da die Ionenstärke der Puffer die Gleichgewichte in der Membran und somit das Sensorsignal beeinflusst, musste sie bei allen verwendeten Puffern konstant gehalten werden. Dies wurde bei chloridfreien Puffern bzw. Puffern niedriger Chloridionenkonzentration durch Zugabe entsprechender Mengen von Natriumfluorid bewirkt (vgl. Kapitel 3.1.5.2).

CPDDE

In Abbildung 5-17 ist das Ansprechverhalten des Sensors auf sprunghafte Änderungen der Chloridionenkonzentration bei $\text{pH} = 7,0$ sowie die Kalibration des Phasensignals dargestellt. Der Chlorid-Sensor basiert auf dem Koextraktionsprinzip (siehe Kapitel 2.4.3). Das heißt, dass bei steigender Chloridionenkonzentration mehr Protonen in die Membran aufgenommen werden, was das Protolysegleichgewicht des BTB zugunsten der protonierten Form verschiebt. Dadurch sinkt die Effizienz des RET und folglich erhöht sich mit steigender Chloridionenkonzentration sowohl der Phasenwinkel Φ als auch der Amplitudenwert.

Die Ansprechzeit (t_{90}) auf eine Erhöhung der Chloridkonzentration betrug im Schnitt 150 s , die Regenerationszeit (t_{90}) des chloridgesättigten Sensors 250 s . Die Änderung des Phasensignals von chloridfreier zu 500 millimolarer Chlorid-Lösung betrug $\Delta\Phi = 7,0^\circ$. Der Wendepunkt der Kalibrationskurve lag bei $\text{pCl} = 0,99$ (entsprechend 102 mmol/l), was den Sensor geeignet für extrazelluläre Messungen macht. Aus dem Verlauf der Kalibrationskurve kann man ersehen, dass sich der Sensor noch nicht in der Sättigung befindet. Dennoch wurde nur bis zu einer Chloridionenkonzentration von 500 mmol/l kalibriert, da einerseits für physiologische Messungen keine höheren Konzentrationen gefordert sind, und andererseits bei höheren Konzentrationen die Ionenstärke der Kalibrationspuffer zu groß wird. Wenn

deren Ionenstärke zu stark von der physiologischen abweicht, lassen sich die kalibrierten Werte nicht mehr mit denen physiologischer Proben vergleichen.

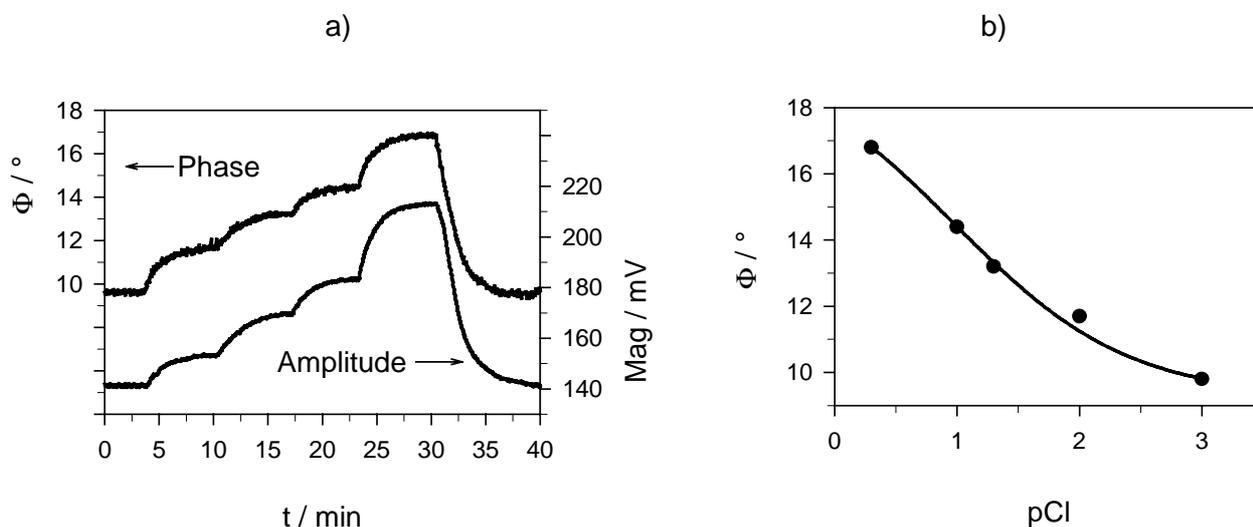


Abbildung 5-17 Chlorid-Sensor mit CDPPE. a) Ansprechverhalten [linke Achse: Phasen-signal, rechte Achse: Amplitude]. b) Kalibration der Phasenwerte. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, pH = 7, $c(\text{NaCl}) = 1; 10; 50; 100; 500; 1$ mmol/l von links nach rechts. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458$ nm, $\nu = 90$ kHz (Sinus)].

DOS

Das Ansprechverhalten sowie die Kalibrationskurve des mit dem Weichmacher DOS hergestellten Sensors sind in Abbildung 5-18 dargestellt. Sowohl die Ansprechzeit ($t_{90} = 200$ s) als auch die Regenerationszeit ($t_{90} = 500$ s) dieses Sensors waren gegenüber demjenigen mit CPDDE verlängert. Der Wendepunkt der Kalibrationskurve war zu niedrigeren Chloridkonzentrationen hin verschoben, er lag bei $pCl = 1,36$ (entsprechend 43 mmol/l). Dadurch befand sich der Sensor bei der höchsten zur Kalibration verwendeten Chloridkonzentration bereits fast in der Sättigung, wodurch die beobachtete Phasenänderung mit $\Delta\Phi = 8,4^\circ$ stärker ausgeprägt war.

NPOE

Der mit dem polarsten Weichmacher NPOE hergestellte Sensor zeigte wie erwartet das schnellste Ansprechverhalten mit einer Ansprechzeit (t_{90}) von 60 s und einer Regenerationszeit (t_{90}) von 100 s (vgl. Abbildung 5-19). Der Wendepunkt der Kalibration lag ähnlich wie mit CPDDE bei $pCl = 0,95$ (entsprechend 112 mmol/l), die über den gesamten Messbereich erzielte Phasenänderung betrug jedoch nur $\Delta\Phi = 4,1^\circ$.

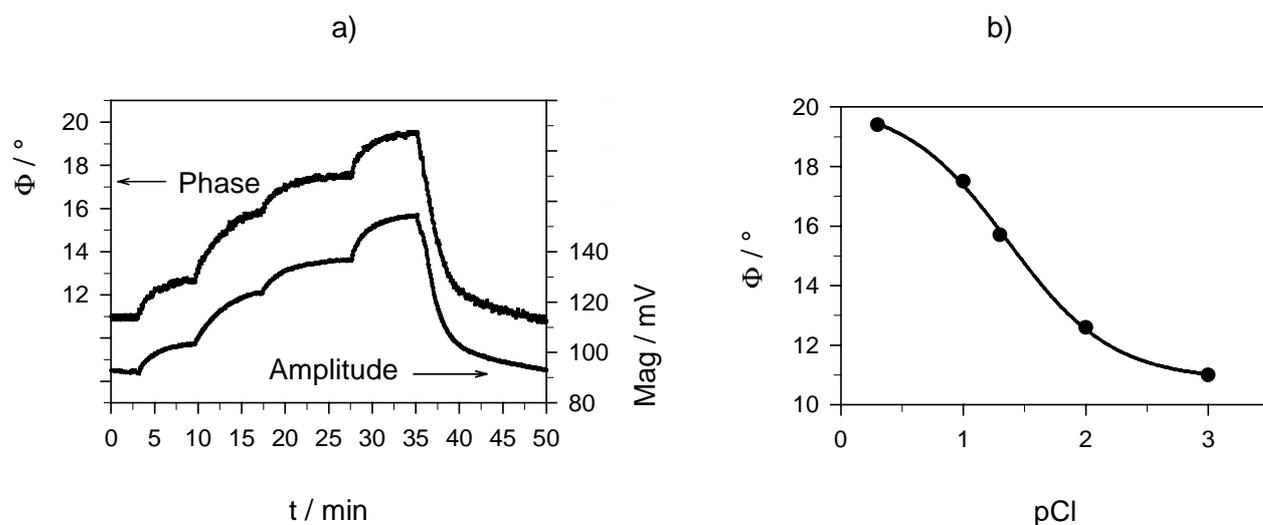


Abbildung 5-18 Chlorid-Sensor mit DOS. a) Ansprechverhalten [linke Achse: Phasen-signal, rechte Achse: Amplitude]. b) Kalibration der Phasenwerte. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, $\text{pH} = 7$, $c(\text{NaCl}) = 1; 10; 50; 100; 500; 1 \text{ mmol/l}$ von links nach rechts. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus)].

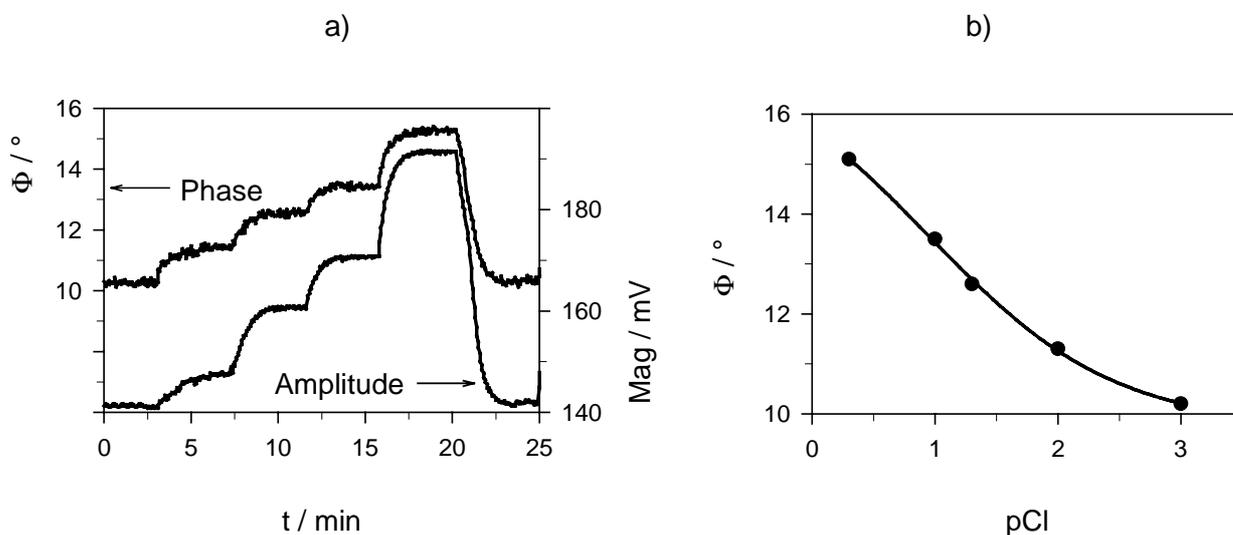


Abbildung 5-19 Chlorid-Sensor mit NPOE. a) Ansprechverhalten [linke Achse: Phasen-signal, rechte Achse: Amplitude]. b) Kalibration der Phasenwerte. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, $\text{pH} = 7$, $c(\text{NaCl}) = 1; 10; 50; 100; 500; 1 \text{ mmol/l}$ von links nach rechts. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus)].

Zusammenfassung

Bemerkenswert war, dass alle Sensoren unabhängig vom Weichmacher bei pH = 7,0 einsetzbar waren. Der Einfluss des Weichmachers auf den pH-Arbeitsbereich ist offensichtlich bei Sensoren mit Ruthenium-BTB-Komplexen nicht so ausgeprägt wie bei denen mit der spektralen Referenzierung. Dennoch gab es Unterschiede in den weiteren Sensoreigenschaften, die nochmals in Tabelle 5-4 zusammengestellt sind.

Wegen seiner großen Signaländerung $\Delta\Phi$ im getesteten Konzentrationsbereich wurde für die weiteren Untersuchungen der mit DOS hergestellte Sensor verwendet.

Tabelle 5-4 *Übersicht über die Sensoreigenschaften in Abhängigkeit vom verwendeten Weichmacher.*

Weichmacher	CPDDE	DOS	NPOE
Phasensignal $\Delta\Phi$	7,0°	8,4°	4,1°
Wendepunkt	0,99 (102 mmol/l)	1,36 (43 mmol/l)	0,94 (115 mmol/l)
Ansprechzeit t_{90}	150 s	200 s	60 s
Regenerationszeit t_{90}	250 s	500 s	100 s

5.3.1.2 Verwendete Farbstoffe

Anhand von Makro-Sensoren wurde die Überlappung der Farbstoff-Spektren getestet. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 5-20 dargestellt. Es wurden dieselben Farbstoffe wie für den Kalium-Sensor verwendet, lediglich die Polymermatrix war unterschiedlich. Auch in dieser Matrix überlappte das Absorptionsspektrum der deprotonierten Form des BTB sehr gut mit dem Emissionsspektrum des Rutheniumkomplexes, was die Voraussetzung für einen RET ist. Die unterschiedliche Lage der Maxima im Vergleich zum Kalium-Sensor ist auf die unterschiedliche Matrix, und hierbei insbesondere auf den Weichmacher zurückzuführen.

5.3.1.3 pH-Arbeitsbereich

Der pH-Arbeitsbereich des Chlorid-Sensors wurde anhand eines Mikro-Sensors bestimmt. Die pH-Kalibrationen des Sensors ohne und mit 500 mmol/l Chlorid sind in Abbildung 5-21 dargestellt. Der Vergleich der beiden Kurven verdeutlicht, dass die größte Signaländerung bei Chlorid-Messungen bei einem pH-Wert von 7 zu erwarten ist. Der Sensor hat folglich sein Optimum bei physiologischen pH-Werten.

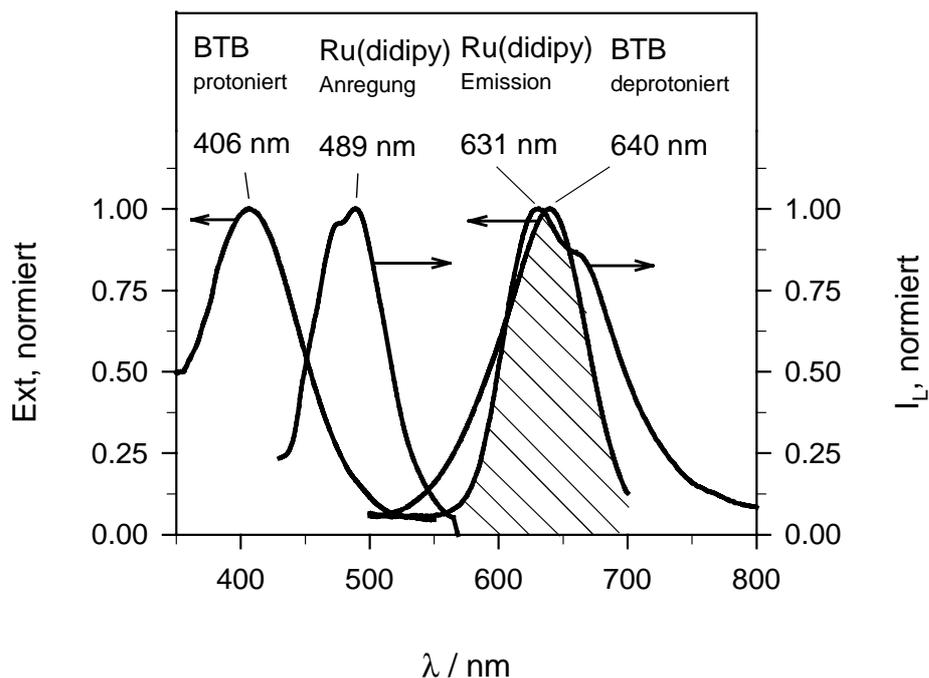


Abbildung 5-20 Absorptionsspektren von BTB und Lumineszenzspektren von Ru(didipy). [Linke Achse: Absorptionsspektren von BTB-CTA. Rechte Achse: Lumineszenz-Anregungs- ($\lambda_{em} = 630 \text{ nm}$) und Emissionsspektrum ($\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$) von Ru(didipy) $_3$ Cl $_2$. Farbstoffe jeweils in PVC / DOS / TDMACI-Schichten. Überlappungsbereich schraffiert].

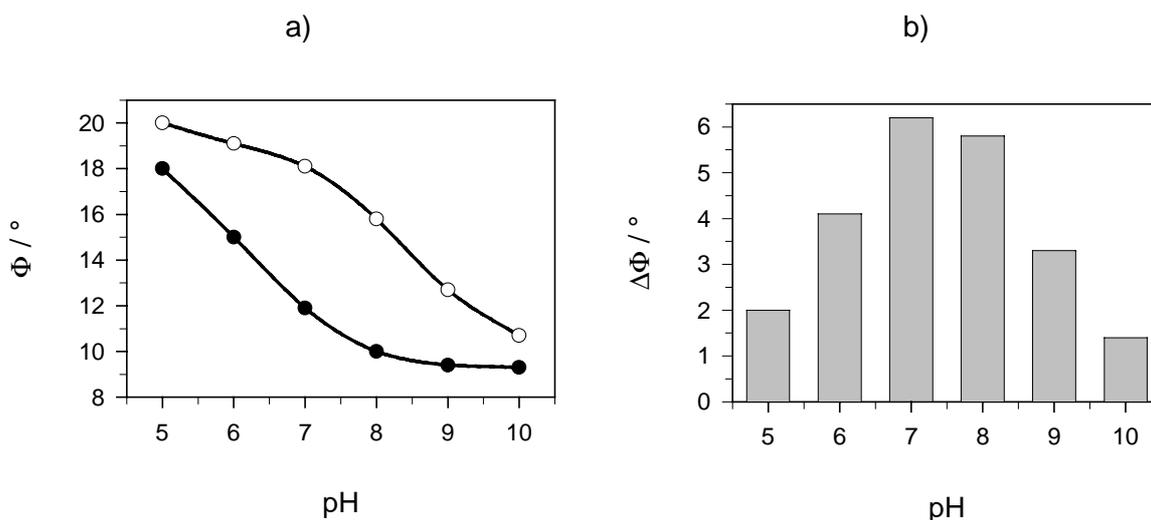


Abbildung 5-21 a) pH-Abhängigkeit des Chlorid-Sensors in chloridfreien (●) und chloridhaltigen Puffern (○). b) Signalhub für Chlorid-Messungen bei den einzelnen pH-Werten. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer ohne bzw. mit 500 mmol/l NaCl. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{ex} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus)].

5.3.1.4 Wahl der Modulationsfrequenz

Mit dem Chlorid-Sensor aus Abbildung 5-21 wurde bei $\text{pH} = 7,0$ ein maximaler Phasenwinkel von $\Phi = 18,1^\circ$ gemessen, was einer Lebensdauer von $0,58 \mu\text{s}$ entspricht. Diese ähnelt der Lebensdauer der Lumineszenz des beim pH-Sensor verwendeten Ruthenium-Farbstoffs. Daher können die Betrachtungen aus Kapitel 5.1.1.5 auf diesen Sensor übertragen werden. Als Modulationsfrequenz wurden wiederum 90 kHz gewählt.

5.3.2 Miniaturisierung

5.3.2.1 Chlorid-Messungen mit Mikro-Sensoren

Aus Quarzfasern mit einem $200 \mu\text{m}$ -Kern wurden Mikro-Sensoren hergestellt. Die Ergebnisse der Chlorid-Messungen mit drei Sensoren sind in Abbildung 5-22 dargestellt. Die Änderung des Phasenwinkels über den getesteten Konzentrationsbereich betrug $\Delta\Phi = 6,1^\circ \pm 0,3^\circ$, die Wendepunkte lagen bei $\text{pCl} = 1,43 \pm 0,03$ (entsprechend 37 mmol/l , bzw. $35 \dots 40 \text{ mmol/l}$). Der Wendepunkt lag somit sehr ähnlich wie bei der Kalibration mit dem Makro-Sensor aus Kapitel 5.3.1.1, die Phasenänderung lag jedoch um 2° niedriger. Die Reproduzierbarkeit des Phasensignals von Sensor zu Sensor war sehr gut.

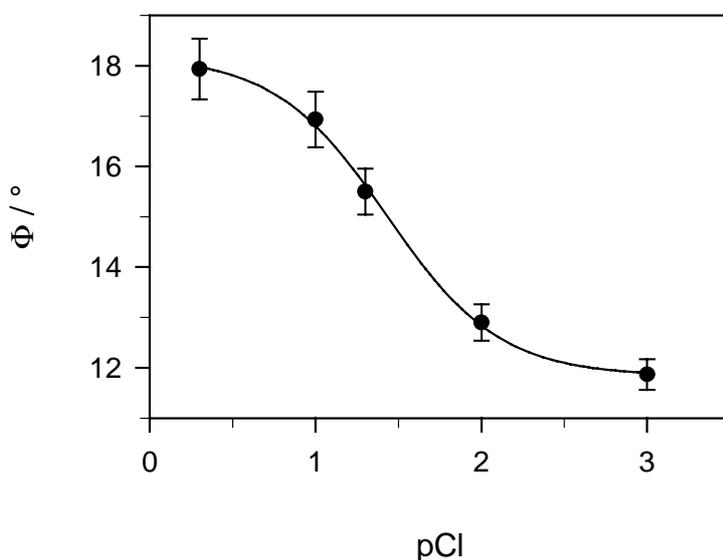


Abbildung 5-22

Chlorid-Abhängigkeit der Mikro-Sensoren. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, $\text{pH} = 7$. Anregungsquelle: LED, $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Sinus). Kerndurchmesser $d = 200 \mu\text{m}$. Die Fehlerbalken geben die Exemplarstreuung von 3 Sensoren an].

5.3.2.2 Chlorid-Messungen mit Submikro-Sensoren

Der nächste Miniaturisierungsschritt bestand in der Beschichtung von ausgezogenen Faserspitzen mit Spitzendurchmessern von etwa 300 nm. Die so hergestellten Submikro-Sensoren wurden mit Messpuffern unterschiedlicher Chloridionenkonzentration beprobt. Die Phasenänderung über den getesteten Konzentrationsbereich betrug $\Delta\Phi = 6,6^\circ \pm 0,2^\circ$, die Wendepunkte der Kalibrationen lagen bei $\text{pCl} = 1,18 \pm 0,04$ (entsprechend 66 mmol/l bzw. 60...72 mmol/l, vgl. Abbildung 5-23).

Auch bei den Chlorid-Sensoren für phasensensitive Lumineszenz-Detektion war hiermit erstmals eine Miniaturisierung in den Submikrometer-Bereich durchgeführt worden.

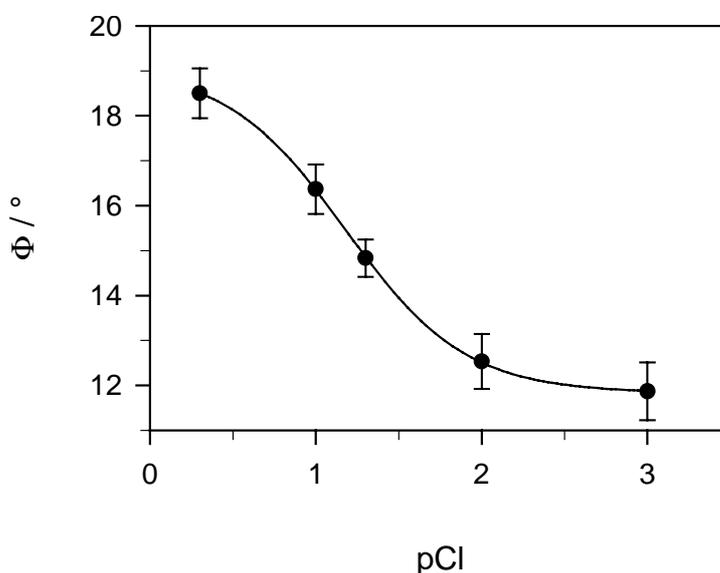


Abbildung 5-23 Chlorid-Abhängigkeit der Submikro-Sensoren. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, $\text{pH} = 7$. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck). Spitzendurchmesser $d = 300 \text{ nm}$. Beleuchtungsstärke $E = 6,3 \cdot 10^4 \text{ W/m}^2$. Die Fehlerbalken geben die Exemplarstreuung von 3 Sensoren an].

5.3.2.3 Chlorid-Messungen mit Nano-Sensoren

Abschließend wurden noch Chlorid-Nano-Sensoren durch Beschichtung von SNOM-Spitzen hergestellt. Die Ergebnisse der Chlorid-Messungen mit diesen Sensoren sind in Abbildung 5-24 gegeben. Die Phasenänderung über den getesteten Konzentrationsbereich betrug $\Delta\Phi = 6,8^\circ \pm 0,3^\circ$, die Wendepunkte der Kalibrationen lagen bei $\text{pCl} = 1,26 \pm 0,02$ (entsprechend 55 mmol/l bzw. 52...58 mmol/l).

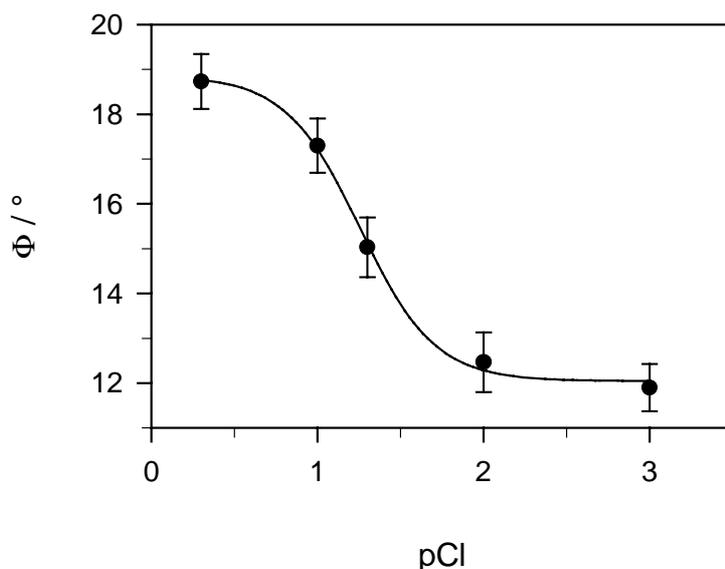


Abbildung 5-24 Chlorid-Abhängigkeit der Nano-Sensoren. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, pH=7. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck). Apertur $d = 50 \text{ nm}$. Beleuchtungsstärke $E = 1,5 \cdot 10^6 \text{ W/m}^2$. Die Fehlerbalken geben die Exemplarstreuung von 3 Sensoren an].

5.3.2.4 Vergleich der miniaturisierten Sensoren

Die Charakteristiken der Chlorid-Kalibrationen mit den miniaturisierten Sensoren sind nochmals in Tabelle 5-5 gegenübergestellt. Im Gegensatz zu dem spektralen Kalium-Sensor und dem pH-Sensor war kein deutlicher Unterschied der Sensorcharakteristik im Vergleich zu dem Makro-Sensor aus Kapitel 5.3.1.1 zu beobachten.

Die Wendepunkte der miniaturisierten Sensoren schwankten zwar im Bereich von 35...72 mmol/l, doch sind mit allen hergestellten Sensoren Messungen unter physiologischen Bedingungen prinzipiell möglich. Auffällig war, dass die Messbereichsschwankungen zwischen den verschiedenen Sensorvarianten größer waren als zwischen den Individuen einer Variante. Da für alle diese Sensoren *dieselbe* Beschichtungslösung verwendet wurde, kommen Herstellungsschwankungen der Membranlösung als Erklärung nicht in Frage. Es ist anzunehmen, dass die unterschiedliche Schichtdicke und Geometrie einen Einfluss auf die Eigenschaften hat.

Tabelle 5-5 Chlorid-Messung mit miniaturisierten Sensoren.

	Mikro-Sensor	Submikro-Sensor	Nano-Sensor
$\Delta\Phi$	$6,1^\circ \pm 0,3^\circ$	$6,6^\circ \pm 0,2^\circ$	$6,8^\circ \pm 0,3^\circ$
Wdp	pCl = $1,43 \pm 0,03$	pCl = $1,18 \pm 0,04$	pCl = $1,26 \pm 0,02$

5.3.2.5 Dynamischer Chlorid-Messbereich bei Submikro- und Nano-Sensoren

Die Betrachtungen zur Messgenauigkeit wurden wie bei den pH-Sensoren durchgeführt (siehe Kapitel 5.1.2.6). Aus dem Verlauf des Sensorsignals in einem Messpuffer mit 500 mmol/l Chlorid und $\text{pH} = 7,0$ wurde das 6σ -Rauschen ermittelt. Die Werte betragen $0,21^\circ$ beim Submikro-Sensor und $0,59^\circ$ beim Nano-Sensor (siehe Abbildung 5-25).

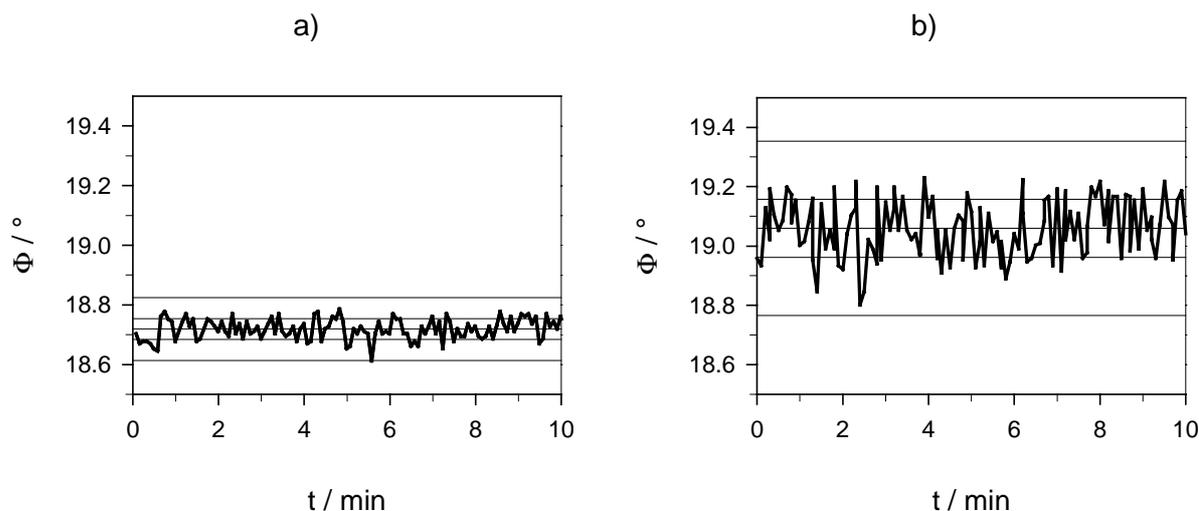


Abbildung 5-25 Rauschen des Sensorsignals bei $\text{pH} = 7$ und $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol/l}$. a) Submikro-Sensor. b) Nano-Sensor. Die Linien kennzeichnen jeweils $\bar{X} + 3\sigma$; $\bar{X} + \sigma$; \bar{X} ; $\bar{X} - \sigma$; $\bar{X} - 3\sigma$. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, $\text{pH} = 7$, $c(\text{NaCl}) = 500 \text{ mmol/l}$. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

Aus den entsprechenden Kalibrationen für Submikro- bzw. Nano-Sensoren wurden die Werte der Ableitung berechnet, welche die Signaländerung pro $0,1 \text{ pCl}$ -Einheiten wiedergeben. In Abbildung 5-26 sind diese Kurven mit den zugehörigen 6σ -Werten verglichen. Mit dem Submikro-Sensor kann man bei pCl -Werten von $0,5 \dots 1,9$ auf $0,1 \text{ pCl}$ -Einheiten genaue Messungen durchführen. Dies entspricht Chloridkonzentrationen von $13 \dots 316 \text{ mmol/l}$. Beim Nano-Sensor war der Messbereich der $0,1 \text{ pCl}$ -Einheiten genauen Messungen kleiner, er reichte von $\text{pCl} = 1,1 \dots 1,5$, entsprechend $32 \dots 79 \text{ mmol/l}$. Für auf $0,2 \text{ pCl}$ -Einheiten genaue Messungen war der Sensor von $\text{pCl} = 0,8 \dots 1,7$ geeignet, dies entspricht $20 \dots 158 \text{ mmol/l}$. Mit beiden Sensoren ist die Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulären Konzentrationsbereichen möglich, mit dem Submikro-Sensor wären auch genaue Messungen im Bereich extrazellulärer Chloridkonzentrationen durchführbar.

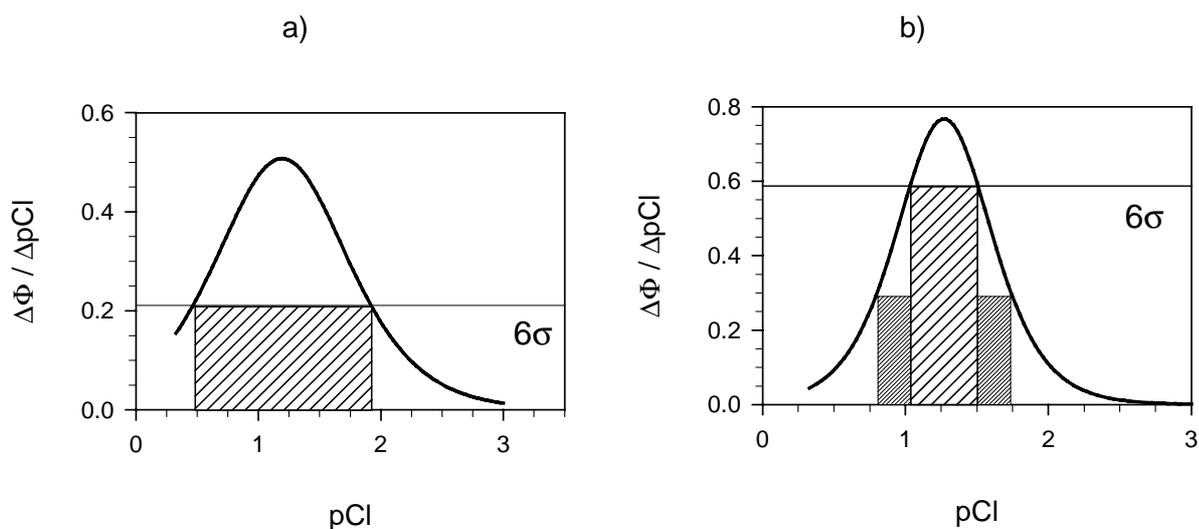


Abbildung 5-26 *Dynamischer Chlorid-Messbereich bei pH = 7. a) Submikro-Sensor. b) Nano-Sensor.* [Kurven: Signaländerung pro Inkrement von 0,1 pCl-Einheiten. Waagrechte Linien: Werte der sechsfachen Standardabweichung (Rauschen). Grobschraffierte Bereiche: Messbereiche für 0,1 pCl-Einheiten genaue Messungen. Feinschraffierter Bereich in (b): Messbereich für 0,2 pCl-Einheiten genaue Messungen].

5.3.3 Signalstabilität

5.3.3.1 Variation des Anregungslichtes

Der Einfluss einer veränderten Anregungsintensität auf das Phasensignal eines Submikro-Sensors wurde durch Steigerung der Laserleistung auf das fünffache bzw. Abschwächung des Laserlichts auf 10% mit Neutralfiltern untersucht. Wie bereits beim pH-Sensor war das Phasensignal auf $\pm 0,1^\circ$ stabil, was den statistischen Schwankungen bei den Messungen entspricht (vgl. Kapitel 5.1.3.2). Auch eine Änderung des Abstands zwischen Faserspitze und Photomultiplier hatte keinerlei Auswirkungen auf das Phasensignal. Das Sensorsignal war somit unabhängig von der Anregungsintensität bei Variation um den Faktor 50.

5.3.3.2 Photostabilität

Photostabilität des Lumineszenzfarbstoffs

Zunächst wurde anhand von Submikro-Sensoren die Photostabilität des reinen Lumineszenzfarbstoffs an Raumluft getestet. Dafür wurden Sensoren hergestellt, die nur die entsprechende Stoffmenge des Ruthenium-Komplexes als $\text{Ru}(\text{didipy})_3\text{Cl}_2$ enthielten. Es wurden drei solche Sensoren hergestellt und während zwanzig Minuten mit verschiedenen Beleuchtungsstärken bestrahlt. Für den ersten Versuch wurde die volle Laserleistung in die

Faser eingekoppelt, bei weiteren Versuchen wurde sie mit Neutralfiltern (NG) auf 10^{-1} bzw. 10^{-5} (letzteres entspricht den Messbedingungen) abgeschwächt. Die Korrektur der Phasen- und Amplitudenwerte wurde wie in Kapitel 5.1.3.3 beschrieben durchgeführt.

In Abbildung 5-27 sind die Phasen- und Amplituden-Werte dieser Messung im zeitlichen Verlauf dargestellt. Aus deren Verlauf kann man ersehen, dass der Farbstoff – wenn man ihn der vollen Laserleistung aussetzt - bereits nach 20 Minuten nahezu vollständig zerstört ist. Auch das Phasensignal nahm bei hohen Beleuchtungsstärken ab (vgl. Kapitel 5.1.3.3). Bei den unter normalen Messbedingungen angewandten Beleuchtungsstärken (NG 10^{-5}) hingegen war sowohl das Phasen- als auch das Amplitudensignal stabil.

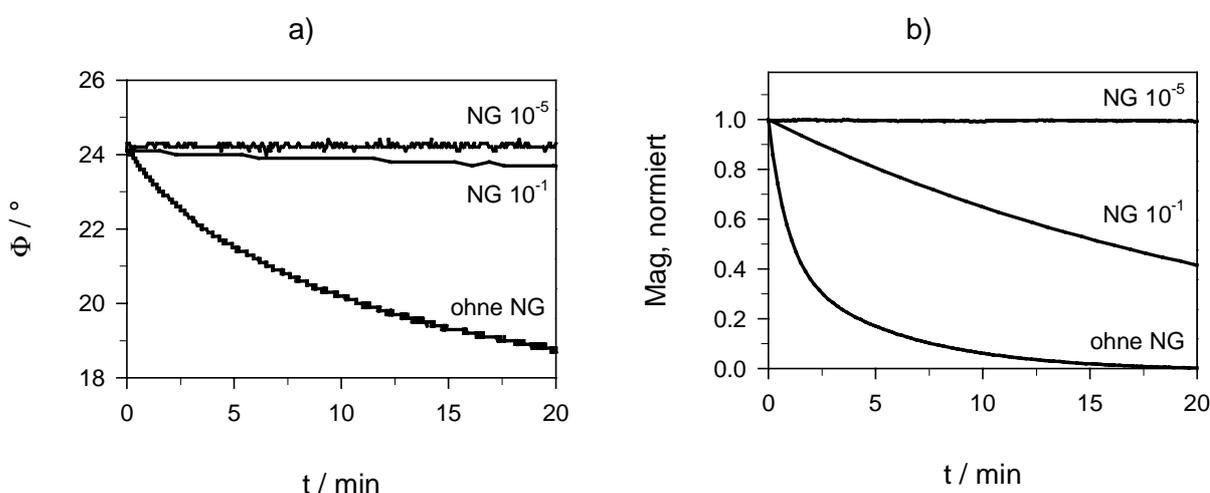


Abbildung 5-27 Photobleichen eines Submikro-Sensors mit $\text{Ru}(\text{didipy})_3\text{Cl}_2$ an Raumluft. a) Phasensignal. b) Amplitude. [Experimentelle Daten: Beleuchtungsstärke ohne Filter $E = 6,3 \cdot 10^9 \text{ W/m}^2$. Neutralfilter mit Transmission $T = 10^{-1}$ bzw. 10^{-5} (letzteres entspricht den üblichen Messbedingungen). Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

Photostabilität des Absorptionsfarbstoffs

Als nächstes wurde die Stabilität des Absorptionsfarbstoffs in Submikro- und Nano-Sensoren unter Messbedingungen untersucht. Dafür wurden Chlorid-Sensoren mit dem $\text{Ru}(\text{didipy})_3(\text{BTB})_2$ -Komplex hergestellt, deren Phasen- und Amplitudenwerte während einer einstündigen Belichtung mit den bei Messungen üblichen Beleuchtungsstärken in chloridfreiem bzw. chloridhaltigem ($c = 500 \text{ mmol/l}$) Messpuffer aufgenommen wurden. Da der Lumineszenzfarbstoff nach den oben geschilderten Ergebnissen stabil ist, wäre eine Signaländerung auf das Photobleichen des Absorptionsfarbstoffs zurückzuführen.

Abbildung 5-28 zeigt den Verlauf der Phasen- und Amplitudenwerte eines *Submikro-Sensors* in chloridfreiem und chloridhaltigem Messpuffer. Beide Signale waren eine Stunde lang unter den bei Messungen üblichen Beleuchtungsstärken konstant, woraus man auf eine

Photostabilität beider Farbstoffe schließen kann. Für eine Einzelmessung benötigt man etwa 2 s, daher lassen sich mit einem solchen Sensor mindestens 1800 Messwerte aufnehmen.

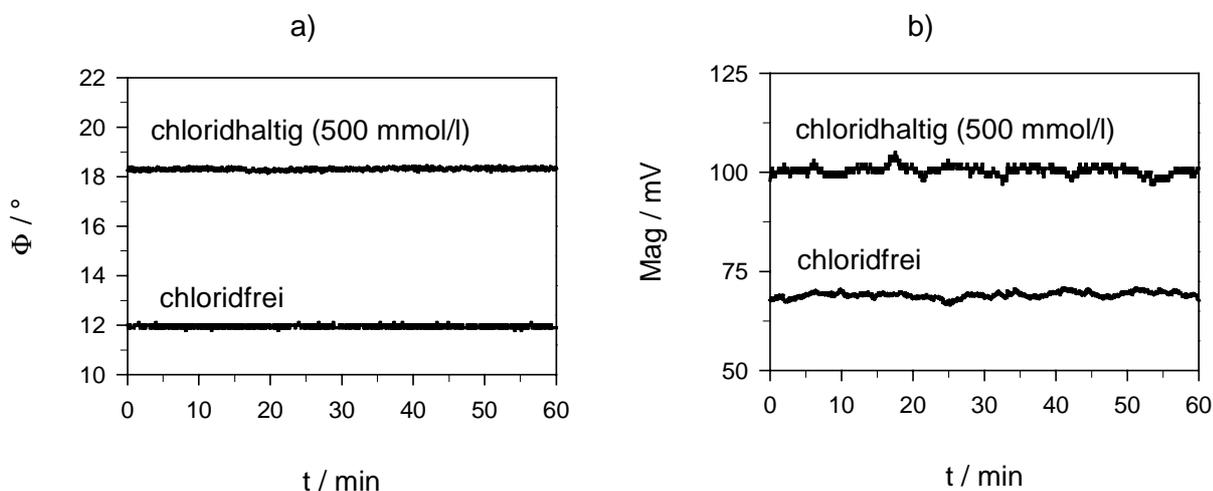


Abbildung 5-28 Photostabilität des Submikro-Sensors unter Messbedingungen. a) Phasensignal. b) Amplitude. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, pH = 7, ohne bzw. mit 500 mmol/l NaCl. Beleuchtungsstärke $E = 6,3 \cdot 10^4 \text{ W/m}^2$. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

Abbildung 5-29 zeigt den Verlauf der Phasen- und Amplitudenwerte eines *Nano-Sensors* in chloridfreiem und chloridhaltigem Messpuffer. Auch bei diesem Sensor waren die Signale eine Stunde lang unter den bei Messungen üblichen Beleuchtungsstärken stabil, folglich kann man auch mit einem Nano-Sensor mindestens 1800 Messwerte aufnehmen.

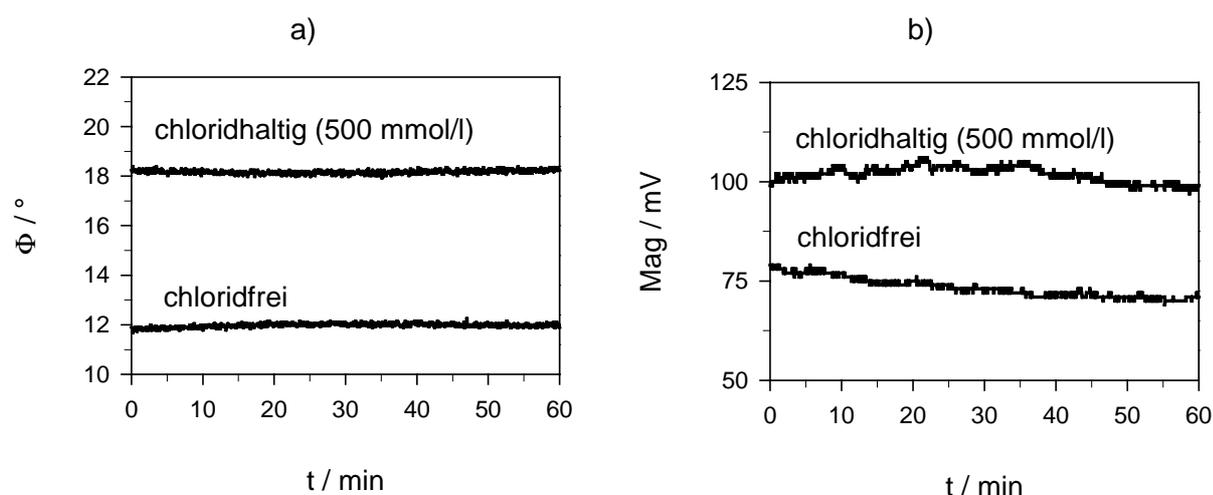


Abbildung 5-29 Photostabilität des Nano-Sensors unter Messbedingungen. a) Phasensignal. b) Amplitude. [Experimentelle Daten: Phosphatpuffer, pH = 7, ohne bzw. mit 500 mmol/l NaCl. Beleuchtungsstärke $E = 1,5 \cdot 10^6 \text{ W/m}^2$. Anregungsquelle: Laser, $\lambda_{\text{ex}} = 476,5 \text{ nm}$, $\nu = 90 \text{ kHz}$ (Rechteck)].

5.3.3.3 Farbstoffaustrag

Der Farbstoffaustrag wurde anhand eines Submikro-Sensors getestet. Dazu wurde ein Sensor in chloridfreiem Puffer ruhend vorkonditioniert, nach einer Stunde wurde eine Kalibration durchgeführt. Anschließend wurde der Sensor für 18,5 Stunden mit chloridhaltigem Puffer (500 mmol/l) im Durchfluss beprobt (Durchflussrate: 0,5 ml/min), anschließend wurde wieder eine Kalibration durchgeführt. Es folgten zwei weitere Beprobungen im Durchfluss mit chloridfreien Puffern für vier und nochmals drei Stunden, nach denen jeweils wieder Kalibrationen durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 5-6 wiedergegeben. Es sind jeweils die Anfangs-Phasenwerte Φ_0 , die Signaländerungen zwischen chloridfreiem und chloridgesättigtem Sensor $\Delta\Phi$ und die Wendepunkte der Kalibrationen aufgeführt.

Tabelle 5-6 *Änderung des Sensorsignals durch Farbstoffaustrag.*

Beprobung im Durchfluss	0 h	18,5 h (Cl ⁻)	4 h (FI ⁻)	7 h (FI ⁻)
Φ_0 (chloridfrei)	12,2°	12,4°	13,1°	13,8°
$\Delta\Phi$	7,0°	6,9°	4,7°	3,0°
Wdp	1,14	1,10	nicht bestimmbar	0,13

Die Durchflussbeprobung mit chloridhaltigen Puffern, die dazu führt, dass das BTB maximal protoniert ist, bewirkte keine signifikanten Änderungen der Sensoreigenschaften. Ein Farbstoffaustrag fand offensichtlich nicht statt.

In chloridfreien Puffern hingegen ist das BTB maximal deprotoniert, und wie bereits in Kapitel 5.1.3.4 beschrieben, ist diese Protolysestufe anfällig für einen Austrag in die wässrige Messlösung. Tatsächlich wurde ein Anstieg des Anfangsphasenwertes sowie eine Abnahme der Phasenwinkeländerung während der Kalibration beobachtet. Auch der Wendepunkt verschob sich deutlich. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit der Annahme eines BTB-Austrags, da ein solcher zu einer verringerten Effizienz des RET und somit zu steigenden Phasenwerten führt.

Der Sensor sollte daher nur kurzfristig zur Kalibration mit chloridfreier Lösung in Berührung kommen und bevorzugt in chloridhaltigen Puffern aufbewahrt werden.

5.3.3.4 Sauerstoff-Querempfindlichkeit

Bereits in den Voruntersuchungen in Kapitel 5.1.1.1 war die Sauerstoffempfindlichkeit des Ruthenium-phenanthrolin-Komplexes in einer mit DOS weichgemachten Polymermatrix getestet worden. Der dort beschriebene Sensor sprach in der Gasphase auf Sauerstoff an. Daher ist anzunehmen, dass der vorliegende Chlorid-Sensor mit dem Ruthenium-diphenyl-dipyridyl-Komplex ebenfalls eine Querempfindlichkeit auf Sauerstoff aufweist. Eine solche wäre kritisch, da sie die Messergebnisse verfälschen kann.

Um die Sauerstoffempfindlichkeit der Sensoren in Lösung zu testen, wurde ein Mikro-Sensor mit chloridfreiem Messpuffer (pH = 7,0) beprobt. Der Messpuffer war zunächst raumluftgesättigt wie auch bei den Kalibrationen, dann wurde Sauerstoff und anschließend Stickstoff für je 30 Minuten durch den Puffer geleitet. Gleichermaßen wurde mit einem chloridhaltigen Messpuffer ($c(\text{Cl}^-) = 500 \text{ mmol/l}$, pH = 7,0) verfahren. Die jeweiligen Phasenwerte sind in Tabelle 5-7 gegenübergestellt.

Tabelle 5-7 *Sauerstoffempfindlichkeit des Phasensignals bei pH = 7.*

Messpuffer	chloridfrei	chloridhaltig ($c = 500 \text{ mmol/l}$)
sauerstoffgesättigt	11,8°	18,1°
raumluftgesättigt	11,9°	18,3°
stickstoffgesättigt	13,2°	20,1°

Der Phasenwert in raumluftgesättigter Lösung entsprach bei beiden Chloridkonzentrationen etwa dem in sauerstoffgesättigter Lösung. In stickstoffgesättigter Lösung war der Phasenwert jedoch deutlich höher, da Stickstoff keine Lumineszenzlöschung bewirken kann. In chloridfreier Lösung betrug die Differenz zur sauerstoffgesättigten Lösung $\Delta\Phi = 1,4^\circ$, in chloridhaltiger Lösung $\Delta\Phi = 2,0^\circ$.

Der Chlorid-Sensor weist eine deutliche Sauerstoffquerempfindlichkeit auf. Man hat daher darauf zu achten, bei der Kalibration sowie bei den Messungen den Sauerstoffgehalt in der Messlösung konstant zu halten.

5.3.4 Zusammenfassung – Chlorid-Sensor

In diesem Teil der Arbeit wurden Untersuchungen an Chlorid-Sensoren durchgeführt, deren Chlorid-Sensitivität von einer Koextraktion von Chloridionen und Protonen herrührt. Letztere verschieben das Protolysegleichgewicht des Absorptionsfarbstoffs Bromthymolblau. Dieses wiederum beeinflusst über Resonanz-Energietransfer die Lebensdauer der Lumineszenz

eines Ruthenium-diphenyl-dipyridyl-Komplexes, die phasensensitiv bestimmt wird. Durch die Wahl der Messgröße ist der Sensor unabhängig von Änderungen in der Intensität des Anregungslichts.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Miniaturisierung derartiger Sensoren in den Submikrometerbereich bis zu einer Nano-Variante mit 50 nm Apertur durchgeführt, wobei alle Varianten einen vergleichbaren dynamischen Messbereich aufweisen. Alle Sensor-Varianten waren prinzipiell geeignet für Messungen bei physiologischen pH-Werten und konnten zwischen intra- und extrazellulären Chloridionenkonzentrationen unterscheiden. Bis zu den Nano-Sensoren hin kann eine Genauigkeit von 0,1 pCl-Einheiten erreicht werden, wobei der zugehörige Messbereich mit zunehmender Miniaturisierung abnimmt.

Anhand von Makrosensoren wurde gezeigt, dass allein durch die Wahl des Weichmachers der dynamische Messbereich in gewissen Grenzen verschoben werden kann.

Die Photostabilität der verwendeten Farbstoffe ist als sehr gut zu bezeichnen, da selbst mit der Nano-Variante mehr als 1800 Messungen mit einem Sensor durchführbar sind.

Zu beachten ist hingegen der Farbstoffaustrag in die wässrige Messlösung. Nach einer vierstündigen Beprobung im Durchfluss mit chloridfreien Puffern ist ein deutlicher Austrag von BTB in die Messlösung zu beobachten. In chloridhaltiger Lösung hingegen verbleibt das Farbstoff-Ionenpaar in der Rezeptorschicht.

Der Einfluss von gelöstem Sauerstoff sollte ebenfalls beachtet werden, da eine Querempfindlichkeit des Sensors beobachtet wurde. Es wird daher zweckmäßig für Messungen in realen Proben sein, den Sauerstoffgehalt der Probe zu bestimmen, in den Kalibrationslösungen anzugleichen und konstant zu halten.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Diese Arbeit befasste sich mit der Miniaturisierung optochemischer Sensoren bei gleichzeitiger Gewährleistung eines zuverlässigen Messsignals. Hierzu wurden zwei verschiedene Wege beschritten: Im ersten Ansatz wurde die Lumineszenz spektral ausgewertet, wobei das Messsignal auf das Signal eines Referenzfarbstoffs bezogen wurde (interne Referenzierung). Der zweite Ansatz bestand in Lebensdauer-Messungen mit phasensensitiver Detektion, wobei dieser Messparameter von sich aus unabhängig von der Anregungsintensität ist und daher keiner weiteren Referenzierung bedarf. Für beide Messmethoden wurden Sensoren entwickelt, die über mehrere Stufen zu Mikro-, Submikro- und Nano-Sensoren miniaturisiert wurden, wobei erstmalig Sensordimensionen von 50 nm erreicht wurden. Es wurde gezeigt, dass bei allen Miniaturisierungsvarianten durch die ausgeführte Signalstabilisierung genaue Messungen möglich waren.

Die Vorteile der *spektralen Referenzierung* wurden anhand eines Kalium-Sensors demonstriert, der in verschiedenen Miniaturisierungsvarianten bis zur Nano-Version untersucht wurde. Die dazu notwendigen Arbeitsschritte waren die Einführung eines Referenzfarbstoffs zur Verbesserung der Signalstabilität, die Optimierung der Zusammensetzung der Rezeptorschicht, sodass Messungen bei physiologischen pH-Werten möglich waren, die anschließende Miniaturisierung und Charakterisierung der Sensoreigenschaften der einzelnen Miniaturisierungsstufen sowie die Untersuchung der Farbstoff- und Signalstabilität.

Die sensitive Schicht des Kalium-Sensors bestand aus einer weichgemachten PVC-Membran, die zur selektiven Erkennung von Kalium den natürlichen Komplexbildner Valinomycin und zur optischen Signalübertragung ein Fluorescein-Derivat enthielt. Als Referenzfarbstoff wurde Nilrot aus einer Reihe getesteter Farbstoffe ausgewählt. Es wurde gezeigt, dass sich durch Anregungsschwankungen hervorgerufene Schwankungen des absoluten Signals durch die interne Referenzierung deutlich reduzieren lassen. Eine derartige Referenzierung bei ionensensitiven PVC-Schichten wurde erstmals durchgeführt.

Die Optimierung der Membranzusammensetzung führte zu Sensoren, deren pH-Arbeitsbereich im physiologischen Bereich lag. Der dynamische Kalium-Messbereich deckte extrazelluläre Kaliumionenkonzentrationen ab, und eine Unterscheidung von extra- und intrazellulären Konzentrationen war bis hin zur Nano-Version möglich. Die maximale Genauigkeit, die mit Submikro- und Nano-Sensoren erzielt werden konnte, lag bei 0,2 pK-Einheiten.

Für die Miniaturisierung waren zwei wesentliche Schritte erforderlich: Zum einen musste die Haftung der sensitiven Schicht auf den optischen Fasern durch Silanisierung mit Trichlorvinylsilan verbessert werden, weiterhin musste die Membranzusammensetzung beim Übergang von Makro- zu miniaturisierten Sensoren angepasst werden.

Die Photostabilität sowohl des Mess- als auch des Referenzfarbstoffs war sehr gut, das referenzierte Messsignal war wegen des sehr ähnlichen Bleichverhaltens der beiden Farbstoffe nochmals um den Faktor 100 stabiler als das absolute Signal. Selbst mit dem Nano-Sensor, der wegen seiner geringen Dimension die höchste Beleuchtungsstärke erfuhr, lassen sich gemäß einer Extrapolation der Bleichkurven etwa 23000 Messungen bis zum Auftreten eines 1%igen Messfehlers durch Photobleichen durchführen. Der Farbstoffaustrag war ebenfalls gering, ein 1%iger Fehler ist erst nach 17 Stunden kontinuierlicher Beprobung im Durchfluss aufgetreten. Eine Sauerstoffquerempfindlichkeit der Sensoren konnte nicht festgestellt werden.

Als alternativer Ansatz wurden *Lebensdauer-Messungen* durchgeführt, bei denen das Messsignal mittels phasenaufgelöster Detektion erhalten wurde. Die Messungen basierten auf Änderungen der Lumineszenz-Lebensdauer durch Resonanz-Energietransfer von angeregten Ruthenium-Komplexen auf Moleküle des Absorptionsindikators Bromthymolblau. Bei Änderungen dessen Protolysegrads ändert sich die Rate des Energietransfers und somit die Lebensdauer der Lumineszenz des Rutheniums. So konnte mit diesen beiden Farbstoffen ein pH-Sensor hergestellt werden. Durch eine Kombination der Farbstoffe mit verschiedenen Ionophoren in einer weichgemachten PVC-Matrix wurden weiterhin Kalium- und Chlorid-Sensoren hergestellt.

Sowohl der pH- als auch der Chlorid-Sensor waren geeignet für Messungen im physiologischen Bereich. Sie wurden in mehreren Schritten miniaturisiert. Mit der hier erstmals vorgestellten Nano-Variante beider Sensoren konnten auf 0,1 pH- bzw. 0,1 pCl-Einheiten genaue Messungen durchgeführt werden.

Bei Untersuchungen zur Photostabilität wie zum Farbstoffaustrag erwies sich die deprotonierte Form des Bromthymolblau als limitierender Parameter. Dennoch können mit beiden Nano-Sensoren unter physiologischen Bedingungen etwa 1800 Messungen ohne Änderung des Sensorsignals durch Photobleichen durchgeführt werden. Beim Chlorid-Sensor war eine Sauerstoffquerempfindlichkeit gegeben, beim pH-Sensor konnte sie durch eine geeignete Wahl des Polymers eliminiert werden.

In Tabelle 6-1 ist eine Zusammenstellung und Bewertung der Eigenschaften der hergestellten miniaturisierten Sensoren gegeben.

Tabelle 6-1 *Eigenschaften der hergestellten Sensoren.*

Messgröße	Lumineszenz-Intensität	Lumineszenz-Lebensdauer	
		Analyt	K ⁺
Unabhängigkeit von der Anregungsintensität	gut (bis Faktor 10 getestet)	sehr gut (bis Faktor 50 kein Einfluss)	
erzielte Messgenauigkeit	0,2 pK	0,1 pH	0,1 pCl
Photostabilität	Bei Mess- und Referenzfarbstoff sehr gut	Bei Ruthenium-Komplexen sehr gut; Bei BTB in deprotonierter Form eingeschränkt	
Farbstoffaustrag	Gering, referenziertes Signal stabil	Ruthenium-Austrag nicht beobachtet; BTB in deprotonierter Form wird ausgetragen	
Sauerstoffempfindlichkeit	keine	keine	vorhanden
Ansprechzeit	Ansprechzeit < 1 min Regenerationszeit 15 min	< 1 min	Ansprechzeit ca. 3 min Regenerationszeit ca. 8 min
Einsatz im physiologischen Konzentrationsbereich	pH-Optimum bei pH = 6 extrazelluläre Kaliumkonzentrationen	sehr gut geeignet, Optimum bei pH = 7,3	pH-Optimum bei pH = 7 extrazelluläre Chloridkonzentrationen
Apparativer Aufwand bei Messung mit miniaturisierten Sensoren	hoch (da spektrale Aufspaltung und empfindliche Detektion erforderlich)	geringer (da gesamtes Lumineszenzlicht erfasst wird)	

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Miniaturisierung und Signalstabilisierung für beide Sensortypen gelungen ist, wobei der spektral referenzierte Kalium-Sensor von der Stabilität bezüglich Photobleichen und Farbstoffaustrag den Sensoren für phasensensitive Lebensdauer-Messungen überlegen war, mit letzteren jedoch eine höhere Messgenauigkeit von 0,1 pH bzw. 0,1 pCl-Einheiten erzielt wurde.

Durch die geringen Dimensionen dieser Sensoren sind Messungen in kleinsten Volumina (z.B. biologischen Zellen oder Domänen) oder mit hoher Ortsauflösung (z.B. Abrastern von Oberflächen) denkbar. Für solche Anwendungen sind jedoch noch weitere Adaptionen sowohl des apparativen Aufbaus als auch der Kalibration nötig: Die Faserspitzen müssen mit Mikromanipulatoren in die Proben eingebracht werden, wozu eine mikroskopische Kontrolle erforderlich ist, und die Matrix der Kalibrationspuffer muss an die der Probe angepasst werden, um eventuell vorhandene Querempfindlichkeiten auszugleichen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Hulanicki A., Glab S. und Ingman F. (1991). Chemical Sensors - Definition and Classification. *Pure & Applied Chemistry* 63(9), 1247-50.
- [2] Gauglitz G. (1997). Elektronenspektroskopie. *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. 3. Auflage, H. Naumer und W. Heller, 248-49. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [3] Camman K. (1977). Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden. Heidelberg: Springer Verlag.
- [4] Bailey P. L. (1976). Analysis with Ion-Selective Electrodes. London: Heyden & Son Ltd.
- [5] Ache H. J. (1993). Chemical Microsensors and Microanalysers. *Interdisciplinary Science Reviews* 18, 280-288.
- [6] Gauglitz G. (1995). Trends bei optischen Sensoren. *Labo-Trend*, 19-28.
- [7] Otto M. (1995). Analytische Chemie. Weinheim: VCH.
- [8] Czolk R. (1990). Untersuchungen an immobilisierten Porphyrinderivaten zur Entwicklung Cadmium-sensitiver Schichten für einen optisch-chemischen Sensor. Dissertation Universität Karlsruhe (TH).
- [9] Tan W., Shi Z.-Y. und Kopelman R. (1992). Development of Submicron Chemical Fiber Optic Sensors. *Analytical Chemistry* 64, 2985-90.
- [10] Meister H. (1996). Lichteffect - Lichtwellenleiter-Lösungen für industrielle Einsätze. *Elektronik Praxis* 1, 72-76.
- [11] Betzig E., Lewis A., Harootunian A., Isaacson M. und Kratschmer E. (1989). Near-Field Scanning Optical Microscopy (NSOM). *Biophysical Journal* 49, 269-79.
- [12] Harris T. D., Grober R. D., Trautman T. R. und Betzig E. (1994). Super-Resolution Imaging Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 48, 14A-21A.
- [13] Trautmann J. und Ambrose W. P. (1997). Near-field Optical Imaging and Spectroscopy of Single Molecules. *Single-Molecule Optical Detection, Imaging and Spectroscopy*. T. Basché, W. E. Moerner, M. Orrit und U. P. Wild, 191-222. Weinheim: VCH.
- [14] Barenz J., Hollricher O. und Marti O. (1996). An easy-to-use non-optical shear-force distance control for near-field optical microscopes. *Reviews of Scientific Instrumentation* 67, 1912-16.
- [15] Kopelman R., Tan W. und Shi Z.-Y. (1992). Nanometer Optical Fiber pH Sensor. *SPIE Proceedings* 1796, 157-62.
- [16] Tan W., Shi Z.-Y., Thorsrud B. A., Harris C. und Kopelman R. (1994). Near-field Fiberoptic Chemical Sensors and Biological applications. *SPIE Proceedings* 2068, 59-67.
- [17] Tan W., Shi Z.-Y., Smith S., Birnbaum D. und Kopelman R. (1992). Submicrometer Intracellular Chemical Optical Fiber Sensors. *Science* 258, 778-81.
- [18] Monson E., Merritt G., Smith S., Langmore J. P. und Kopelman R. (1995). Implementation of an NSOM system for fluorescence microscopy. *Ultramicroscopy* 57, 257-62.
- [19] Plaschke M., Geyer M., Reichert J. und Ache H. J. (1997). Submicron Fiber-Optic Sensors for Calcium-Ions and pH with Internal Calibration. *SPIE Proceedings* 3105, 31-36.
- [20] Kopelman R. und Dourado S. (1996). Is smaller better? - Scaling of characteristics with size of fiber-optic chemical and biochemical sensors. *SPIE Proceedings* 2836, 2-11.

- [21] Munkholm Ch. und Walt D. R. (1986). Polymer Modification of Fiber Optic Chemical Sensors as a Method of Enhancing Fluorescence Signal for pH Measurement. *Analytical Chemistry* 58, 1427-30.
- [22] Samuel J., Strinkovski A., Shalom S., Lieberman K., Ottolenghi M., Avnir D. und Lewis A. (1994). Miniaturization of organically doped sol-gel materials: a microns-size fluorescent pH sensor. *Materials Letters* 21, 431-434.
- [23] Tan W., Shi Z.-Y. und Kopelman R. (1995). Miniaturized fiber-optic chemical sensors with fluorescent dye-doped polymers. *Sensors and Actuators B* 28, 157-63.
- [24] Lakowicz J. R., Szmecinski H. und Karakelle M. (1993). Optical sensing of pH and pCO₂ using phase-modulation fluorimetry and resonance energy transfer. *Analytica Chimica Acta* 272, 179-86.
- [25] Kosch U. (1998). Energy transfer as a new method to design luminescence decay time optical sensors. Dissertation Universität Regensburg.
- [26] Kosch U., Klimant I., Werner T. und Wolfbeis O. S. (1998). Strategies to Design pH Optodes with Luminescence Decay Times in the Microsecond Time Regime. *Analytical Chemistry* 70, 3892-97.
- [27] Plaschke M. (1996). Untersuchungen zur Stabilisierung und Miniaturisierung kationensensitiver Schichten für die Entwicklung von optochemischen Mikrosensoren. Dissertation Universität Karlsruhe.
- [28] Valeur B., Bourson J. und Pouget J. (1993). Ion Recognition Detected by Changes in Photoinduced Charge or Energy Transfer. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*. Anthony W. Czarnik, 25-44. Washington: ACS.
- [29] Bell Th. W., Beckles D. L., Cragg P. J., Liu J., Maioriello J., Papoulis A. T. und Santora V. J. (1993). Intrinsic Chromophores and Fluorophores in Synthetic Molecular Receptors. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*. Anthony W. Czarnik, 85-103. Washington: ACS.
- [30] Spichiger U. E., Freiner D., Bakker E., Rosatzin T. und Simon W. (1993). Optodes in clinical chemistry: potential and limitations. *Sensors and Actuators B* 11, 263-71.
- [31] Polster J., Prestel G. und Wollenweber M. (1995). Contributions to Potassium and Ammonium Ion-Selective Optodes Based on Valinomycin, Nonactin and 1,1-Dimethylsila-20-Crown-7. *SPIE Proceedings* 2508, 341-50.
- [32] He H. und Wolfbeis O. S. (1990). Fluorescence Based Optrodes for Alkali Ions Based on the Use of Ion Carriers and Lipophilic Acid/Base Indicators. *SPIE Proceedings* 1368, 165-74.
- [33] Shortreed M. R., Dourado S. und Kopelman R. (1997). Development of a fluorescent optical potassium-selective ion sensor with ratiometric response for intracellular applications. *Sensors and Actuators B* 38-39, 8-12.
- [34] Huber Ch., Werner T., Krause Ch., Klimant I. und Wolfbeis O. S. (1998). Energy transfer-based lifetime sensing of chloride using a luminescent transition metal complex. *Analytica Chimica Acta* 364, 143-51.
- [35] Krause Ch., Werner T., Huber Ch., Klimant I. und Wolfbeis O. S. (1998). Luminescence Decay Time-Based Determination of Potassium Ions. *Analytical Chemistry* 70, 3983-85.
- [36] Wolfbeis O. S. (1991). Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors., Vol. I+II. Boca Raton: CRC Press.
- [37] Peterson J. L., Goldstein S. R. und Fitzgerald R. V. (1980). Fiber optic pH probe for physiological use. *Analytical Chemistry* 52, 864-69.
- [38] Werner T., Klimant I., Huber Ch., Krause Ch. und Wolfbeis O. S. (1999). Luminescence Lifetime based Fiber-Optic Ion-Microsensors. *Mikrochimica Acta* 131, 25-28.

- [39] Barrow G. M. (1984). *Physikalische Chemie*. 6 Auflage. Wien: Bohmann.
- [40] Czarnik A. W. (1993). *Supramolecular Chemistry, Fluorescence, and Sensing. Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*. Anthony W. Czarnik, 1-9. Washington: ACS.
- [41] Schmidt W. (1994). *Optische Spektroskopie*. Weinheim: VCH.
- [42] Wedler G. (1997). *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.
- [43] Schwedt G. (1981). *Fluorimetrische Analyse*. Weinheim: VCH.
- [44] Owen C. S. (1992). Comparison of Spectrum-Shifting Intracellular pH Probes 5'(and 6')-Carboxy-10-dimethylamino-3-hydroxyspiro[7H-benzo[c]xanthene-7,1'(3'H)-isobenzofuran]-3'-one and 2',7'-Biscarboxyethyl-5(and 6)-carboxyfluorescein. *Analytical Biochemistry* 204, 65-71.
- [45] Wolfbeis O. S., Rodriguez N. V. und Werner T. (1992). LED-Compatible Fluorosensor for Measurement of Near-Neutral pH Values. *Mikrochimica Acta* 108, 133-41.
- [46] Parker J. W., Laksin O., Yu C., Lau M.-L., Klima S., Fisher R., Scott I. und Atwater B. W. (1993). Fiber-Optic Sensors for pH and Carbon Dioxide Using a Self-Referencing Dye. *Analytical Chemistry* 65, 2329-34.
- [47] Song A., Parus S. und Kopelman R. (1997). High-Performance Fiber-Optic pH-Microsensors for Practical Physiological Measurements Using a Dual-Emission Dye. *Analytical Chemistry* 69, 863-67.
- [48] Szmecinski H. und Lakowicz J. R. (1993). Lifetime-Based Sensing Using Phase-Modulation Fluorometry. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*. Anthony W. Czarnik, 196-226. Washington: ACS.
- [49] Lakowicz J. R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press.
- [50] Holst G., Kühl M. und Klimant I. (1995). A Novel Measuring System for Oxygen Microoptodes based on a Phase Modulation Technique. *SPIE Proceedings* 2508, 387-98.
- [51] Berndt K. W. und Lakowicz J. R. (1992). Electroluminescent Lamp-Based Phase Fluorometer and Oxygen Sensor. *Analytical Biochemistry* 201, 319-25.
- [52] Andrews D. L. und Demidov A. A. (1999). *Resonance Energy Transfer*. New York: John Wiley & Sons.
- [53] Atkins P. W. (1987). *Physikalische Chemie*. Weinheim: VCH.
- [54] IUPAC (1983). Definition of pH-Scales, Standard Reference Values, Measurement of pH and related Terminology. *Pure & Applied Chemistry* 55, 1467-76.
- [55] Galster H. (1990). *pH-Messung - Grundlagen, Methoden, Anwendungen, Geräte*. Weinheim: VCH.
- [56] Kunze U. R. (1986). *Grundlagen der quantitativen Analyse*. 2 Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- [57] Seiler K. (1993). *Ion-Selective Optode Membranes*. Buchs: Fluka Chemie AG.
- [58] Bakker E. und Simon W. (1992). Selectivity of Ion-Sensitive Bulk Optodes. *Analytical Chemistry* 64, 1805-12.
- [59] Morf W. E., Seiler K., Sørensen P. R. und Simon W. (1989). New Sensors Based on Carrier Membrane Systems: Theory and Practice. *Ion-Selective Electrodes*, 5. E. Pungor, 141-52. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- [60] Morf W. E., Seiler K., Lehmann B., Behringer Ch., Tan S., Hartman K., Sørensen P. R. und Simon W. (1989). Mechanisms, Possibilities and Limitations of Carrier-Based Ion-Sensors. *Ion-Selective Electrodes*, 5. E. Pungor, 115-31. Budapest: Akadémiai Kiadó.

- [61] Seiler K. und Simon W. (1992). Theoretical aspects of bulk optode membranes. *Analytica Chimica Acta* 266, 73-87.
- [62] Tan S. S. S., Hauser P. C., Chaniotakis N. A., Suter G. und Simon W. (1989). Anion-Selective Optical Sensors Based on a Coextraction of Anion-Proton Pairs into a Solvent-Polymeric Membrane. *Chimia* 43, 257-61.
- [63] Hauser P. C., Périsset Ph. M. J., Tan S. S. S. und Simon W. (1990). Optode for Bulk-Response Membranes. *Analytical Chemistry* 62, 1919-23.
- [64] Ozawa S., Hauser P. C., Seiler K., Tan S. S. S., Morf W. E. und Simon W. (1991). Ammonia-Gas-Selective Optical Sensors Based on Neutral Ionophores. *Analytical Chemistry* 63, 640-644.
- [65] Tan S. S. S., Hauser P. C., Wang K., Fluri K., Seiler K., Rusterholz B., Suter G., Krüttli M., Spichiger U. E. und Simon W. (1991). Reversible optical sensing membrane for the determination of chloride in serum. *Analytica Chimica Acta* 255, 35-44.
- [66] Rosatzin Th., Holý P., Seiler K., Rusterholz B. und Simon W. (1992). Immobilization of Components in Polymer Membrane-Based Calcium-Selective Bulk Optodes. *Analytical Chemistry* 64, 2029-35.
- [67] Chan W. H., Lee A. W. M., Lee C. M., Yau K. W. und Wang K. (1995). Design and Characterization of Sodium-selective Optode Membranes Based on the Lipophilic Tetraester of Calix[4]arene. *Analyst* 120, 1963-67.
- [68] Siswanta D., Hisamoto H., Sato S., Matsumoto Y., Koike Y., Yamamori S. und Suzuki K. (1997). Magnesium Ion-Selective Optodes Based on a Neutral Ionophore and a Lipophilic Cationic Dye. *Analytical Sciences* 13, 429-35.
- [69] He H., Li H., Uray G. und Wolfbeis O. S. (1993). Non-Enzymatic Optical Sensor for Penicillins. *Talanta* 40, 453-57.
- [70] Shortreed M., Bakker E. und Kopelman R. (1996). Miniature Sodium-Selective Ion-Exchange Optode with Fluorescent pH Chromoionophores and Tunable Dynamic Range. *Analytical Chemistry* 68, 2656-62.
- [71] Shortreed M. R., Barker S. L. R. und Kopelman R. (1996). Anion-selective liquid-polymer optodes with fluorescent pH chromoionophores, tunable dynamic range and diffusion enhanced lifetimes. *Sensors and Actuators B* 35-36, 217-21.
- [72] Barker S. L. R., Shortreed M. R. und Kopelman R. (1997). Utilization of Lipophilic Ionic Additives in Liquid Polymer Film Optodes for Selective Anion Activity Measurements. *Analytical Chemistry* 69, 990-995.
- [73] Falbe J. und Regitz M. (1995). *Römpf Chemie-Lexikon* (CD). Stuttgart: Thieme-Verlag.
- [74] Cowie J. M. G. (1997). *Chemie und Physik der Polymeren*. Braunschweig: Vieweg & Sohn.
- [75] Seivick S. (1967). *Journal of Polymer Science* C16, 821.
- [76] Salamone J. C. (1996). *Polymeric Materials Encyclopedia*., Vol. 5. Boca Raton (USA): CRC Press.
- [77] Wehry E. L. und Rogers L. B. (1966). *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*. D. M. Hercules. New York: John Wiley & Sons.
- [78] Ohnesorge W. E. (1966). *Fluorescence of Metal Chelate Compounds*. *Fluorescence and Phosphorescence Analysis*. D. M. Hercules. New York: John Wiley & Sons.
- [79] Elvers B., Hawkins S., Ravenscroft M. und Schulz G. (1989). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5 Auflage. Weinheim: VCH.
- [80] Martin M. M. und Lindqvist L. (1975). The pH-dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence* 10, 381-90.
- [81] Fowler S. D. und Greenspan P. (1985). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33, 833.

- [82] Fowler S. D., Brown W. J. und Greenspan P. (1986). *Federation Proceedings* 45, 1996.
- [83] Green F. J. The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators. Milwaukee: Aldrich Chemical Company.
- [84] Smith K. E. und Buchler J. W. (1975). Porphyrins and Metalloporphyrins. New York: Elsevier Scientific Publishing Company.
- [85] Treibs A. (1969). Metallkomplexe von Porphyrinen. *Liebigs Annalen Der Chemie* 728, 115-48.
- [86] Klassen D. M. und Crosby G. A. (1968). Spectroscopic Studies of Ruthenium(II) Complexes. Assignment of the Luminescence. *The Journal of Chemical Physics* 48, 1853-58.
- [87] Meyer R. J. (1970). Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie. 8. Auflage. E. H. Pietsch, A. Kotowski, M. Becke-Goehring, and K.-Ch. Buschbeck. Weinheim: VCH.
- [88] Lytle F. E. und Hercules D. M. (1969). The Luminescence of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) Dichloride. *Journal of the American Chemical Society* 91, 253-57.
- [89] Masilamani D. und Lucas M. E. (1993). Fluorescent Chemosensors for Monitoring Potassium in Blood and across Biological Membranes. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*. Anthony W. Czarnik, 162-82. Washington: ACS.
- [90] Bradshaw J. S., Krakowiak K. E., Tarbet B. J., Bruening R. L., Biernat J. F., Bochenska N., Izatt R. M. und Christensen J. J. (1989). Silica gel-bound aza-crowns for the selective removal and concentration of metal ions. *Pure & Applied Chemistry* 61, 1619-24.
- [91] Gutsche C. D. (1998). Calixarenes Revisited. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- [92] Christen H. R. und Vögtle F. Organische Chemie. Frankfurt am Main: Otto Salle Verlag.
- [93] Stryer L. (1990). Biochemie. Heidelberg: Spektrum-der-Wissenschaft Verlagsgesellschaft.
- [94] Voet D. und Voet J. G. (1992). Biochemie. Weinheim: VCH.
- [95] Wegmann D., Weiss H., Ammann D., Morf W. E., Pretsch E., Sugahara K. und Simon W. (1984). Anion-Selective Liquid-Membrane Electrodes Based on Lipophilic Quaternary Ammonium Compounds. *Mikrochimica Acta* III, 1-16.
- [96] Hartman K., Luterotti S., Osswald H. F., Oehme M., Meier P. C., Ammann D. und Simon W. (1978). Chloride-Selective Liquid-Membrane Electrodes Based on Lipophilic Methyl-Tri-N-Alkyl-Ammonium Compounds and Their Applicability to Blood Serum Measurements. *Mikrochimica Acta* II, 235-46.
- [97] Tan S. S. S., Hauser P. C., Wang K., Fluri K., Seiler K., Rusterholz B., Suter G., Krüttli M., Spichiger U. E. und Simon W. (1991). Reversible optical sensing membrane for the determination of chloride in serum. *Analytica Chimica Acta* 255, 35-44.
- [98] Teorell T. und Stenhagen E. (1936). Ein Universalpuffer für den pH-Bereich 2,0 bis 12,0. *Biochemische Zeitung* 299, 416-19.
- [99] Mosbach K. (1976). Immobilization Techniques. *Methods in Enzymology*. S. P. Colowick und N. O. Kaplan. New York: Academic Press Inc.
- [100] Plueddemann E. P. (1980). Chemistry of Silane Coupling Agents. *Silylated Surfaces*. D. E. Leyden und W. T. Collins, 31-53. New York: Gordon and Breach Science Publishers.
- [101] Rosen M. R. (1987). From Treating Solution To Filler Surface And Beyond. *Journal of Coatings Technology* 50, 70-83.
- [102] Meier, Hans (1963). Die Photochemie der organischen Farbstoffe. Berlin: Springer Verlag.

- [103] Eggeling C., Widengren J., Rigler R. und Seidel C. A. M. (1999). Photostability of Fluorescent Dyes for Single-Molecule Spectroscopy. *Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine*. W. Rettig, B. Strehmel, S. Schrader und H. Seifert. Berlin: Springer Verlag.
- [104] Oehme F. (1991). Chemische Sensoren. Braunschweig: Vieweg & Sohn.
- [105] Plaschke M., Czolk R., Reichert J. und Ache H. J. (1996). Stability improvement of optochemical sol-gel film sensors by immobilisation of dye-labeled dextrans. *Thin Solid Films* 279, 233-35.
- [106] Darnell J., Lodish H. und Baltimore D. (1986). Molecular Cell Biology. New York: Scientific American Books.
- [107] McCulloch S. und Uttamchandani D. (1995). A simple reproducible technique for producing sub-micrometre fibre-optic probes for near-field optical microscopy and chemical sensors. *Measurement Science and Technology* 6, 1157-63.
- [108] Kaiser H. (1965). Zum Problem der Nachweisgrenze. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie* 209, 1-18.
- [109] Kaiser H. (1947). *Spectrochimica Acta* 3, 40.
- [110] Heinzmann G., Czolk R. und Ache H. J. (1994). Investigation of the stability of an optochemical nitrate sensor. *Sensors and Actuators B* 18-19, 47-50.
- [111] Morf W. E. (1981). The Principles of Ion-Selective Electrodes and of Membrane Transport, Studies in Analytical Chemistry., Vol. 2. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- [112] Williams J. L. R., Doty J. C., Grisdale P. J., Searle R., Regan T. H., Happ G. P. und Maier D. P. (1967). Boron photochemistry. I. Irradiation of sodium tetraarylborates in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* 89, 5153.
- [113] Kosch U., Klimant I. und Wolfbeis O. S. (1999). Long-Lifetime Based pH Micro-Optodes without Oxygen Interference. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 364, 48-53.
- [114] Juris A., Balzani V., Barigelletti F., Campagna S., Belser P. und von Zelewsky A. (1988). Ru(II) Polypyridine Complexes: Photophysics, Photochemistry, Electrochemistry, and Chemiluminescence. *Coordination Chemistry Reviews* 84, 85-277.
- [115] Mohr G. J., Werner T., Oehme I., Preininger C., Klimant I., Kovacs B. und Wolfbeis O. S. (1997). Novel Optical Sensor Materials Based on Solubilization of Polar Dyes in Apolar Polymers. *Advanced Materials* 9, 1108-13.
- [116] Klimant I. und Wolfbeis O. S. (1995). Oxygen-Sensitive Luminescent Materials Based on Silicone-Soluble Ruthenium Diimine Complexes. *Analytical Chemistry* 67, 3160.
- [117] Hering E., Martin R. und Stohrer M. (1989). Physik für Ingenieure. Düsseldorf: VDI-Verlag GmbH.
- [118] Gratton E. und Limkeman M. (1983). A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution. *Biophysical Journal* 44, 315-24.
- [119] Hartmann P., Leiner M. J. P. und Kohlbacher P. (1998). Photobleaching of a ruthenium complex in polymers used for oxygen optodes and its inhibition by singlet oxygen quenchers. *Sensors and Actuators B* 51, 196-202.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen

BTB	Bromthymolblau
Chr VI	Chromoionophor VI
CPDDE	2-Cyanophenyl-dodecylether
CTA	Cetyltrimethylammonium
didipy	4,4'-Diphenyl-2,2'-dipyridyl
DOS	Sebacinsäure-bis-2-ethylhexylester (Dioctylsebacat)
E	Beleuchtungsstärke
Ext	Extinktion
f	Brennweite
FG	Funktionsgenerator
FPNPE	2-Fluorophenyl-2-nitrophenylether
I_f / I_L	Fluoreszenz-Intensität / Lumineszenz-Intensität
I_f norm	Normierte Fluoreszenz-Intensität
I_f rel	relative Fluoreszenz-Intensität
I/U	Strom-Spannungswandler
LWL	Lichtwellenleiter
Mag	Magnitude (Amplitudenwert bei Lebensdauer-Messungen)
NG	Neutralfilter (Glas)
NPOE	2-Nitrophenyl-octylether
OMA	optischer Multikanal-Analysator
pCl	negativer dekadischer Logarithmus der Chloridionenkonzentration
phen	1,10-Phenanthrolin
pK	negativer dekadischer Logarithmus der Kaliumionenkonzentration
PMMA	Polymethacrylsäuremethylester
PMT	Photomultiplier Tube
PolyHEMA	Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat
PVC	Polyvinylchlorid
PVC-OH	Copolymer aus 91% Vinylchlorid, 3% Vinylacetat und 6% Vinylalkohol
RBOE	Rhodamin B-octadecylester
REM	Rasterelektronenmikroskop
RET	Resonanz-Energietransfer
SL x	Bezeichnung der Sensoren für Lebensdauer-Messungen
SNOM	Scanning Near-Field Optical Microscopy

SR x	Bezeichnung der Sensoren mit spektraler Referenzierung
T	Transmission
tCIPB	tetrakis(4-chlorophenyl)Borat
TDMA	Tridodecylmethylammonium
tFPB	tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]Borat
THF	Tetrahydrofuran
TRDA	Texas Red-dodecylamin
Wdp	Wendepunkt der Kalibrationskurve
wE	willkürliche Einheiten
λ_{em}	Lumineszenz- Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Lumineszenz- Anregungswellenlänge
λ_{max}	Wellenlänge am Maximum
Φ	Phasenwinkel; Quantenausbeute

8.2 Synthese der Ionenpaare und Ruthenium-Komplexe

8.2.1 Ru(*didipy*)₃Cl₂

Ru(II)-tris-(4,4'-Diphenyl-2,2'-dipyridyl)-bis-Chlorid

500 mg 4,4'-Diphenyl-2,2'-dipyridyl (*didipy*) wurden in 30 ml Ethylenglycol gelöst, mit 3 ml bidestilliertem Wasser versetzt und unter Rückfluss auf 120°C erhitzt. 107,8 mg RuCl₃ wurden in 1,5 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde zu der heißen *didipy*-Lösung zugetropft und weitere drei Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 50 ml Salzsäure (0,1 mol/l) zugegeben, woraufhin sich ein orangefarbener Niederschlag bildete. Dieser wurde abgenutscht, fünfmal mit wenig Salzsäure gewaschen, zunächst zwei Stunden im Luftstrom und dann im Exsiccator über NaOH getrocknet.

8.2.2 Ru(*phen*)₃(*tFPB*)₂

Ru(II)-tris-(1,10-phenanthrolin)-bis-tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borat

29,6 mg Natrium-tetrakis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]Borat wurden in 10 ml Chloroform gelöst. 30 mg Ru(*phen*)₃Cl₂ wurden in 80 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die Chloroformphase wurde viermal mit je 20 ml der wässrigen Lösung geschüttelt; bei den ersten drei Malen entfärbte sich die wässrige Phase, beim vierten Mal nicht mehr. Die Chloroformphase wurde dreimal mit je 20 ml bidestilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, dann wurde das Lösemittel in einem Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde im Exsiccator über Natriumhydroxidplättchen getrocknet.

8.2.3 Ru(didipy)₃BTB₂·6H₂O

Ru(II)-tris-(4,4'-Diphenyl-2,2'-dipyridyl)-bis-Bromthymolblau-Hexahydrat

104 mg BTB-Natriumsalz wurden in 3 ml Natriumhydroxidlösung (0,1 mol/l) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 3 ml Salzsäure (0,1 mol/l) gegeben. Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 40 ml verdünnt.

93 mg Ru(didipy)₃Cl₂ wurden in 40 ml Aceton gelöst und mit 500 ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Zu dieser Lösung wurde die BTB-Lösung zugegeben, woraufhin sich ein voluminöser, orangeroter Niederschlag bildete. Das Aceton wurde durch Erwärmen verdampft, der Niederschlag abgenutscht, fünfmal mit wenig bidestilliertem Wasser gewaschen und im Exsiccator über NaOH getrocknet.

8.2.4 Ru(phen)₃BTB₂·6H₂O

Ru(II)-tris-(1,10-phenanthrolin)-bis-Bromthymolblau-Hexahydrat

129,2 mg BTB-Natriumsalz wurden in 3 ml Natriumhydroxidlösung (0,1 mol/l) gelöst und mit 20 ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 4 ml Salzsäure (0,1 mol/l) gegeben. Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 50 ml verdünnt.

82,1 mg Ru(phen)₃Cl₂ wurden in 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst und zu der BTB-Lösung gegeben. Es bildete sich ein voluminöser orangefarbener Niederschlag, der abgenutscht, fünfmal mit wenig bidestilliertem Wasser gewaschen und im Exsiccator über NaOH getrocknet wurde.

8.2.5 BTB·TDMA

Bromthymolblau-Tridodecylmethylammonium-Salz

215,4 mg BTB-Natriumsalz wurden in 5 ml Natriumhydroxidlösung (0,1 mol/l) gelöst und mit bidestilliertem Wasser auf 30 ml verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 8 ml Salzsäure (0,1 mol/l) gegeben. Die Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml verdünnt und der Ansatz geteilt (die zweite Hälfte wurde zur Herstellung von BTB·CTA verwendet).

100 mg TDMACl wurden in 10 ml Aceton gelöst und mit 20 ml bidestilliertem Wasser versetzt. Diese Lösung wurde zu 50 ml BTB-Lösung gegeben und über Nacht gerührt. Dabei bildeten sich rote Tröpfchen des Ionenpaars. Diese Emulsion wurde viermal mit je 15 ml Dichlormethan ausgeschüttelt, die dabei auftretende Emulsion an der Phasengrenzfläche wurde mit kaltgesättigter Natriumchloridlösung gebrochen. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, dann wurde das Lösemittel in

einem Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wurde im Exsiccator über Natriumhydroxidplättchen getrocknet.

8.2.6 BTB·CTA

Bromthymolblau-Cetyltrimethylammonium-Salz

53,3 mg CTACl wurden in 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung wurde zu 50 ml BTB-Lösung aus dem vorigen Abschnitt gegeben. Die gelbe Lösung wurde dreimal mit je 15 ml Dichlormethan ausgeschüttelt, die dabei auftretende Emulsion wurde mit kaltgesättigter Natriumchloridlösung gebrochen. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, dann wurde das Lösemittel abrotiert. Der Rückstand wurde im Exsiccator über Natriumhydroxidplättchen getrocknet.

8.3 Silanisierungsvorschriften

8.3.1 Silanisierung nach Mosbach

Diese Silanisierungsmethode wurde für 3-Aminopropyl-triethoxysilan angewandt.

Zunächst wurden die Glasträger vorsichtig mit einem ethanolgetränkten Tuch gereinigt.

Eine Mischung aus 9 ml bidestilliertem Wasser und 1 ml 3-Aminopropyl-triethoxysilan (pH 12) wurde mit Salzsäure (5 mol/l) auf pH 3...4 eingestellt (Kontrolle mit Indikatorpapier). In diese Lösung wurden die Glasträger eingetaucht und zwei Stunden lang im Wasserbad auf 75°C erhitzt, verdunstetes Wasser wurde von Zeit zu Zeit nachgefüllt. Danach wurden die Glasträger mit bidestilliertem Wasser gespült und vier Stunden lang im Trockenschrank bei 115°C getrocknet.

8.3.2 Silanisierung nach Plueddemann

Diese Methode wurde zur Silanisierung mit Trichlorvinylsilan angewandt.

Reinigung

Zunächst wurden die Glasträger vorsichtig mit einem ethanolgetränkten Tuch gereinigt.

Dann wurden sie eine Stunde lang in eine 50°C warme Lösung aus 20 ml bidestilliertem Wasser, 3 ml 25%iger Ammoniaklösung und 3 ml 30%igem Wasserstoffperoxid getaucht. Die Glasträger wurden mit Wasser abgespült und 30 Minuten lang im Trockenschrank bei 90°C getrocknet.

Silanisieren

In einem Teflonbecher wurden 30 ml Ethanol vorgelegt. Unter Rühren wurden langsam 2 ml Trichlorvinylsilan zugetropft. Bei Raumtemperatur wurde eine Stunde lang gerührt. Dann wurden die Glasträger für 1...2 Minuten eingetaucht und 20 Minuten bei 90°C getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden sie vorsichtig mit einem ethanolgetränkten Tuch gereinigt.

8.4 Kurvenanpassungen**8.4.1 Kalium-Sensor (Spektrale Referenzierung)****Photobleichen****Messgröße:****Funktion:**

$$I_f / \text{wE (Chromoionophor VI)} \quad y = 727 + 619 \cdot \exp(-0,2531 \cdot t) + 1272 \cdot \exp(-0,0089 \cdot t)$$

$$I_f / \text{wE (Nilrot)} \quad y = 508 + 370 \cdot \exp(-0,2458 \cdot t) + 645 \cdot \exp(-0,0094 \cdot t)$$

$$I_{f,\text{rel}} \quad y = 0,8619 + 0,8646 \cdot \exp(-0,0009 \cdot t)$$

Zeit t in [min]

In die Berechnungen wurde der Offset nicht mit einbezogen, da er von einer konstanten Untergrundfluoreszenz herrührt. Es wurde nur mit den exponentiellen Termen gerechnet.

Farbstoffaustrag**Messgröße:****Funktion:**

$$I_{f,\text{rel}} \quad y = 2,7033 \cdot \exp(-0,0006 \cdot t)$$

Zeit t in [h]

8.4.2 pH-Sensor (Lebensdauer-Messung)**Photobleichen von BTB****Messgröße:****Funktion:**

$$\Phi / ^\circ \text{ (bei pH = 8)} \quad y = 0,97634 \cdot \exp(-0,068 \cdot t)$$

$$\Phi / ^\circ \text{ (bei pH = 9)} \quad y = 6,968 \cdot \exp(-0,321 \cdot t) + 4,354 \cdot \exp(-0,071 \cdot t)$$

Zeit t in [min]

