

---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5822

**Untersuchungen zur  
Stabilisierung und Miniaturisierung  
kationensensitiver  
Schichten für die Entwicklung  
von optochemischen  
Mikrosensoren**

**M. Plaschke**

Institut für Instrumentelle Analytik  
Projekt Mikrosystemtechnik

November 1996

---



**Forschungszentrum Karlsruhe**

**Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte**

**FZKA 5822**

**Untersuchungen zur Stabilisierung und Miniaturisierung  
kationensensitiver Schichten für die Entwicklung  
von optochemischen Mikrosensoren**

**Markus Plaschke**

**Institut für Instrumentelle Analytik**

**Projekt Mikrosystemtechnik**

**Von der Fakultät für Chemie der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe**

**1996**

**Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**ISSN 0947-8620**

## Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden optochemische Sensoren (Optroden) zur Detektion der kationischen Spezies Quecksilber(II), Calcium(II) und zur Bestimmung von pH-Werten entwickelt und miniaturisiert.

Der erste thematische Schwerpunkt der Arbeit widmet sich der Verbesserung der *Stabilität* von kationensensitiven Rezeptorschichten. Werden diese durch einfache Einkapselung von Indikatoren hergestellt, so wird die Stabilität der Schicht bedingt durch das Auswaschen des Farbstoffes auf etwa einen Tag begrenzt. Zur Unterdrückung dieses Farbstoffaustrages wurde eine neue Immobilisierungsmethode entwickelt und erprobt, die in der kovalenten Anbindung von Fluoreszenzindikatoren an das wasserlösliche Polysaccharid Dextran (70.000 g/mol) und der anschließenden Einkapselung der makromolekular gebundenen Indikatormoleküle in hydrophilen Matrices besteht. Als Matrices wurden anorganische Silikagele, die nach dem *Sol-Gel-Verfahren* hergestellt wurden, und das organische Hydrogel Polyhydroxyethylmethacrylat (PolyHEMA) eingesetzt. Die vorgestellte Immobilisierungsmethode weist gegenüber der direkten kovalenten Anbindung des Indikators an die Matrix eine deutlich erhöhte *Flexibilität* auf, was beispielhaft an drei Analyt-Rezeptor-Paaren dargestellt wird.

Zur Herstellung von *Quecksilber-sensitiven* Schichten wurden zunächst Porphyrin-Dextrane synthetisiert und mittels spektroskopischer Methoden sowie durch Elektrophorese charakterisiert. Porphyrin-Dextran-dotierte, mesoporöse Silikagel-Schichten zeigten nach 40tägiger Lagerung in Meßpuffer noch 92% der anfänglichen Fluoreszenzintensität.

Auf der Basis von Fluorescein-Dextran wurden *pH-sensitive* Silikagel- und PolyHEMA-Schichten hergestellt. Letztere zeigten einen Meßbereich von pH 5 bis 8 und Ansprechzeiten von 5 Sekunden/pH. Nach 18tägiger Lagerung in Meßpuffer zeigten die Sensoren noch über 95% der ursprünglichen Fluoreszenzintensitäten.

Durch Coimmobilisierung von Calcium Green-Dextran und Texas Red-Dextran wurde ein *Calcium-sensitiver* Sensor mit *interner Referenz* hergestellt. Der Meßbereich des Sensors liegt zwischen  $5 \cdot 10^{-8}$  und  $10^{-5}$  mol/l Ca(II) bei Ansprechzeiten von 5 Sekunden bis zum Erreichen des Sättigungswertes. Der Sensor erwies sich als sehr selektiv gegenüber Interferenzen von Na(I), K(I) und Mg(II). Durch die interne Referenzierung des Meßsignals läßt sich die Reproduzierbarkeit der Sensorsignale entscheidend verbessern.

Als zweiter Schwerpunkt der Arbeit wurde in mehreren Schritten die *Miniaturisierung* der Calciumsensoren mit interner Referenz vorgenommen. Unter Verwendung von optischer Fasertechnik wurden Mikrosensoren mit Durchmessern von 600 bzw. 50  $\mu\text{m}$  entwickelt. Basierend auf verjüngten Faserspitzen (Taper) mit Durchmessern von etwa 300 nm wurden die derzeit kleinsten faseroptischen Calciumsensoren (Nanosensoren) erhalten.

Aufgrund der verbesserten Stabilität und der extremen Miniaturisierung der vorgestellten optischen Sensoren lassen sich in Zukunft neue analytische Aufgabenstellungen (z.B. Messung in biologischen Zellen) mit einer Ortsauflösung im Nanometerbereich bearbeiten.

## Summary

### **Investigations on stabilisation and miniaturization of cation-sensitive films for the development of optochemical microsensors**

Optochemical sensors (optrodes) for the detection of mercury(II), calcium(II) and pH were developed and miniaturized.

Initially, the stability of cation-sensitive films had to be improved. Since the stability of films prepared by simple encapsulation of the dye was limited to one day, a new immobilisation method had to be developed to reduce the wash-out (leaching) of the dye. It consists of the covalent binding of a fluorescence indicator to the water-soluble polysaccharide dextran (70.000 g/mol) followed by the encapsulation of the dye-labeled macromolecule in a hydrophilic polymer matrix. Inorganic silica gel, which was prepared by the sol-gel process, and the organic hydrogel polyhydroxymethylmethacrylat (polyHEMA) were used as matrix. The main advantage of the immobilisation method presented compared with direct covalent binding to the matrix is the variability, as shown in three examples.

Porphyrin-dextrans were synthesized and characterized spectroscopically and by electrophoresis. Sensors prepared by entrapment of porphyrin-dextran in mesoporous silica gel films were mercury-sensitive and still showed 92 % of the initial fluorescence intensity after 40 days storage in buffer.

The immobilisation of fluorescein-dextran in silica gel and polyHEMA films resulted in sensors for pH with a dynamic range from pH 5 to 8 and response times of about 5 seconds per pH. After 18 days storage in buffer, the sensors showed over 95 % of the initial signal.

Calcium Green-dextran and Texas Red-dextran were coimmobilized to make a calcium sensor with reference dye. The dynamic range of the sensor was between  $5 \cdot 10^{-8}$  and  $10^{-5}$  mol/l Ca(II). The sensor showed a response time of 5 seconds and high selectivity with respect to interference from Na(I), K(I) and Mg(II). The reproducibility of the sensor signals was improved markedly by using a reference wavelength.

A second focus of the presented investigation was the step-by-step miniaturization of the calcium sensor with reference dye. Optical fiber technology was used to develop calcium microsensors with diameters of 600 and 50  $\mu\text{m}$ , and a tapered fiber-based nanosensor with a diameter of around 300 nm, the latter being the smallest optochemical calcium sensor yet reported.

In summary, it may be said that improved stability and extreme miniaturization may enable optochemical sensors to perform new analytical tasks (e.g. measurements in biological cells) with a spatial resolution in the nanometer scale.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemische Sensoren</b>	<b>5</b>
3.1.1	Definition und Klassifizierung chemischer Sensoren	5
3.1.2	Optochemische Sensoren	7
3.1.3	Faseroptische Nanosensoren	10
3.1.4	Anwendungsbeispiele für optochemische Sensoren	11
<b>3.2</b>	<b>Die verwendeten Indikatoren</b>	<b>13</b>
3.2.1	Porphyrine	13
3.2.2	Fluorescein	15
3.2.3	Calcium Green-1	18
3.2.4	Sulforhodamin 101 (Texas Red)	20
<b>3.3</b>	<b>Immobilisierung von Indikatoren</b>	<b>22</b>
3.3.1	Immobilisierungsmethoden	22
3.3.2	Der Sol-Gel-Prozeß	25
3.3.3	Organische Hydrogele	28
<b>3.4</b>	<b>Meßtechnische Grundlagen</b>	<b>29</b>
3.4.1	Fluorimetrie	29
3.4.2	Optische Fasern (Lichtwellenleiter)	31
<b>4.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Synthese von Porphyrin-Dextranen</b>	<b>35</b>
4.2.1	Anbindungsmethoden	35
4.2.2	Reinigung der Porphyrin-Dextrane	36

<b>4.3</b>	<b>Herstellung der Sensoren</b>	<b>37</b>
4.3.1	Makrosensoren	37
4.3.1.1	Zusammensetzungen der Eduktmischungen	37
4.3.1.2	Vorbehandlung der Glaträger	39
4.3.1.3	Beschichtung der Glaträger	40
4.3.2	Mikro- und Nanosensoren	41
4.3.3	Physikalische Charakterisierung der Sensoren	42
<b>4.4</b>	<b>Meßanordnungen</b>	<b>42</b>
4.4.1	Makrosensoren	42
4.4.2	Mikro- und Nanosensoren	44
<b>4.5</b>	<b>Kurvenanpassungen</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>47</b>
<b>5.1</b>	<b>Entwicklung einer Immobilisierungsmethode zur Verbesserung der Stabilität optochemischer Sensoren</b>	<b>47</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>47</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Immobilisierung von monomeren Indikatoren in Silikagel-Schichten</b>	<b>48</b>
5.1.2.1	Fluorimetrische Bestimmungsmethode von Quecksilber(II)-Ionen mit meso-Tetrasulfonatophenylporphyrin (TPPS) in wäßriger Lösung	48
5.1.2.2	Herstellung und physikalische Charakterisierung von Silikagel-Schichten	49
5.1.2.3	Stabilität und Ansprechverhalten von Porphyrin-dotierten Silikagel-Schichten	50
5.1.2.4	Interpretation der Ergebnisse	52
<b>5.1.3</b>	<b>Immobilisierung makromolekular gebundener Indikatoren</b>	<b>53</b>
5.1.3.1	Voruntersuchungen mit makromolekular gebundenen Fluorescein-Derivaten	53
5.1.3.2	Darstellung und Reinigung von Porphyrin-Dextranen	56
5.1.3.3	Charakterisierung der Porphyrin-Dextrane	60
5.1.3.4	Immobilisierung von Porphyrin-Dextranen in Silikagel-Schichten	65
<b>5.1.4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>

<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung sensitiver Schichten basierend auf Dextran-gebundenen Indikatoren in hydrophilen Matrices</b>	<b>69</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Herstellung der Rezeptorschichten</b>	<b>69</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Untersuchung des Systems Porphyrin – Quecksilber(II)-Ionen</b>	<b>71</b>
5.2.2.1	Spektrales Verhalten	71
5.2.2.2	Ansprech- und Regenerierungsverhalten	72
5.2.2.3	Kalibration	74
5.2.2.4	Einfluß des pH-Wertes	75
5.2.2.5	Stabilität	76
<b>5.2.3</b>	<b>Untersuchung des Systems Fluorescein – pH</b>	<b>77</b>
5.2.3.1	Spektrales Verhalten	77
5.2.3.2	Ansprechverhalten und Reproduzierbarkeit der Signale	78
5.2.3.3	Titrationenkurven	81
5.2.3.4	Stabilität	82
<b>5.2.4</b>	<b>Untersuchung des Systems Calcium Green – Calcium(II)-Ionen</b>	<b>83</b>
5.2.4.1	Spektrales Verhalten	83
5.2.4.2	Ansprechverhalten und Reproduzierbarkeit der Signale	85
5.2.4.3	Kalibration	88
5.2.4.4	Einfluß des pH-Wertes auf die Sensorsignale	91
5.2.4.5	Querempfindlichkeiten	92
5.2.4.6	Stabilität	94
<b>5.2.5</b>	<b>Coimmobilisierung von Calcium Green- Texas Red-Dextran zur internen Referenzierung der Signale</b>	<b>96</b>
5.2.5.1	Spektrales Verhalten	96
5.2.5.2	Messungen mit interner Referenz	99
5.2.5.3	Einfluß des Farbstoff-Dextran-Gehalts auf die Stabilität der Schichten	102
<b>5.2.6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>

<b>5.3</b>	<b>Miniaturisierung der Sensoren</b>	<b>105</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>105</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Faseroptische Mikrosensoren</b>	<b>106</b>
5.3.2.1	Mikrosensoren mit 600 $\mu\text{m}$ Kerndurchmesser	106
5.3.2.2	Mikrosensoren mit 50 $\mu\text{m}$ Kerndurchmesser	109
<b>5.3.3</b>	<b>Faseroptische Nanosensoren</b>	<b>111</b>
5.3.3.1	Charakterisierung der Nanospitze	111
5.3.3.2	Messung von Calcium mit einer Nanosonde	114
<b>5.3.4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>115</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>117</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>127</b>
<b>8.1</b>	<b>Liste der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>127</b>
<b>8.2</b>	<b>UV-VIS-Spektren der Porphyrin-Dextrane</b>	<b>130</b>
<b>8.3</b>	<b>IR-Spektren der Porphyrin-Dextrane</b>	<b>131</b>

# 1. Einleitung

Bedingt durch den stark anwachsenden Bedarf an chemischen Analysen, die von der klassischen Laboranalytik nur mit hohem Kosten- und Personalaufwand bewältigt werden können, hat sich in den letzten Jahren das Gebiet der chemischen Sensorik entwickelt. Chemische Sensoren sind miniaturisierte Meßwertaufnehmer, die den chemischen Zustand einer Probe reversibel erfassen und in analytisch auswertbare Signale umwandeln können. Aufbau und Funktionsweise eines chemischen Sensors unterscheiden sich prinzipiell von automatisierten klassischen Laboranalyseystemen.

- Chemische Sensoren weisen geringe Dimensionen auf, womit geringe Abmessungen des Sensorkopfes (Mikrosensoren) oder des gesamten Meßsystems (Mikrosystem) gemeint sein können. Durch die Entwicklungen auf dem Gebiet der Mikrosystemtechnik lassen sich auf kleinstem Raum chemische Sensoren und Aktoren (z.B. Mikropumpen) integrieren.
- Chemische Sensoren sind vergleichsweise einfach aufgebaut, was auch eine einfache Bedienbarkeit beinhaltet.
- Durch geringe Dimensionen und Gewicht sind chemische Sensoren transportabel und erlauben somit eine Vor-Ort-Analytik. Damit entfallen Probenahme und Probetransport ins Labor, was zur Zeitersparnis und Fehlerminimierung führt.
- Chemische Sensoren lassen sich als Meßsonden konzipieren, wodurch sie auch an unzugänglichen Stellen eingesetzt werden können.

Aus diesen Merkmalen ergeben sich neue Anwendungsgebiete für chemische Sensoren, die im Bereich der Umweltanalytik, der medizinischen Analytik, der Prozeßkontrolle oder der Arbeitsplatzsicherheit liegen können.

In der Umweltanalytik stellen chemische Sensoren eine sinnvolle Ergänzung zur klassischen Laboranalytik dar. Zwar stehen chemische Sensoren den aufwendigen Laboranalysegeräten derzeit noch deutlich in der Empfindlichkeit und der Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse nach, sie erlauben aber eine schnelle Vor-Ort-Analytik. So kann noch am Ort der Probenahme entschieden werden, welche Probe einer genauen Laboranalyse unterzogen werden muß, und bei welcher aufgrund zu geringer Belastungen auf weitere Untersuchungen verzichtet werden kann. Auf diese Weise kann das Aufkommen an zeit- und kostenintensiven Laboranalysen deutlich reduziert werden.

In der medizinischen Analytik haben sich chemische Sensoren für bestimmte Anwendungen bereits etabliert. So werden zur Bestimmung physiologischer Parameter in Körperflüssigkeiten (z.B. pH-Wert, Glucosespiegel, Elektrolyte) bereits ionenselektive Elektroden und Enzymelektroden routinemäßig eingesetzt, wodurch besonders die Analysezeiten erheblich verkürzt werden können. Der Aspekt der Analysedauer ist auch in der Notfallmedizin von großer Bedeutung.

Auch auf dem Gebiet der Arbeitssicherheit werden chemische Sensoren, etwa zur Personenüberwachung, eingesetzt. Dabei wird die individuelle Belastung einer Person mit toxischen Stoffen (z.B. toxische Gase wie Kohlenmonoxid oder Ammoniak) mit Hilfe von tragbaren Sensoren erfaßt. Dies stellt eine Anwendung dar, die mit klassischen Methoden prinzipiell nicht durchgeführt werden kann.

Wie aus diesen Beispielen hervorgeht, sind Anwendungsgebiete für chemische Sensoren in solchen Bereichen zu suchen, in denen sie gegenüber der klassischen Laboranalytik wesentliche Vorteile aufweisen. Diese liegen besonders in den geringen Dimensionen, in der leichten Handhabung, in kurzen Analysezeiten und in wirtschaftlichen Erwägungen. Unter diesen Aspekten sind chemische Sensoren derzeit als eine sinnvolle Ergänzung zur klassischen Laboranalytik zu verstehen.

## 2. Aufgabenstellung

Optochemische Sensoren nutzen optische Phänomene zur Entstehung eines analytischen Signals aus. Sie bestehen in der Regel aus einer sensitiven Schicht, in der ein Rezeptorfarbstoff immobilisiert ist, welcher bei Kontakt mit dem Analyten seine spektralen Eigenschaften (z.B. Absorption, Fluoreszenz) ändert. Diese Änderung kann als analytisches Signal ausgenutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei aktuelle Schwerpunkte bei der Entwicklung optochemischer Sensoren, nämlich die Verbesserung der *Stabilität* und die *Miniaturisierung* der Sensoren, behandelt werden.

Die Zuverlässigkeit der Sensormessungen wird vor allem durch die physikalische und chemische Stabilität der sensitiven Schichten bestimmt. In zahlreichen Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß das Auswaschen des Indikators aus der Schicht (engl. „leaching“) den wichtigsten begrenzenden Faktor für die Stabilität optochemischer Flüssigkeitssensoren darstellt. Aus diesem Grunde soll im ersten Teil dieser Arbeit versucht werden, den Farbstoffaustrag aus der Schicht durch eine Verankerung der Indikatormoleküle an geeignete Makromoleküle zu reduzieren (Kapitel 5.1).

Eine Immobilisierungsmethode ist dann besonders wertvoll, wenn sie nicht nur auf einen Rezeptor anwendbar ist, sondern auch in möglichst einfacher Weise auf weitere Analyt-Rezeptor-Paare übertragen werden kann. Die Methode sollte bezüglich der Zusammensetzung der sensitiven Schichten möglichst flexibel sein. Deshalb soll im zweiten Teil der Arbeit versucht werden, die Immobilisierung von makromolekular gebundenen Indikatoren auf drei verschiedene Analyt-Rezeptor-Paare anzuwenden. Zudem soll versucht werden, die Zuverlässigkeit der Sensormessungen durch Referenzierung auf einen coimmobilisierten internen Standard zu verbessern (Kapitel 5.2).

Neben der Zuverlässigkeit ist ein weiteres wesentliches Kriterium für die Verwendung eines chemischen Sensors dessen geringe Größe, die durch eine Miniaturisierung der Sensoren erreicht werden kann. Im dritten Teil der Arbeit soll daher gezeigt werden, bis in welche Dimensionen sich optochemische Sensoren miniaturisieren lassen und dabei noch empfindliche analytische Signale liefern können (Kapitel 5.3).

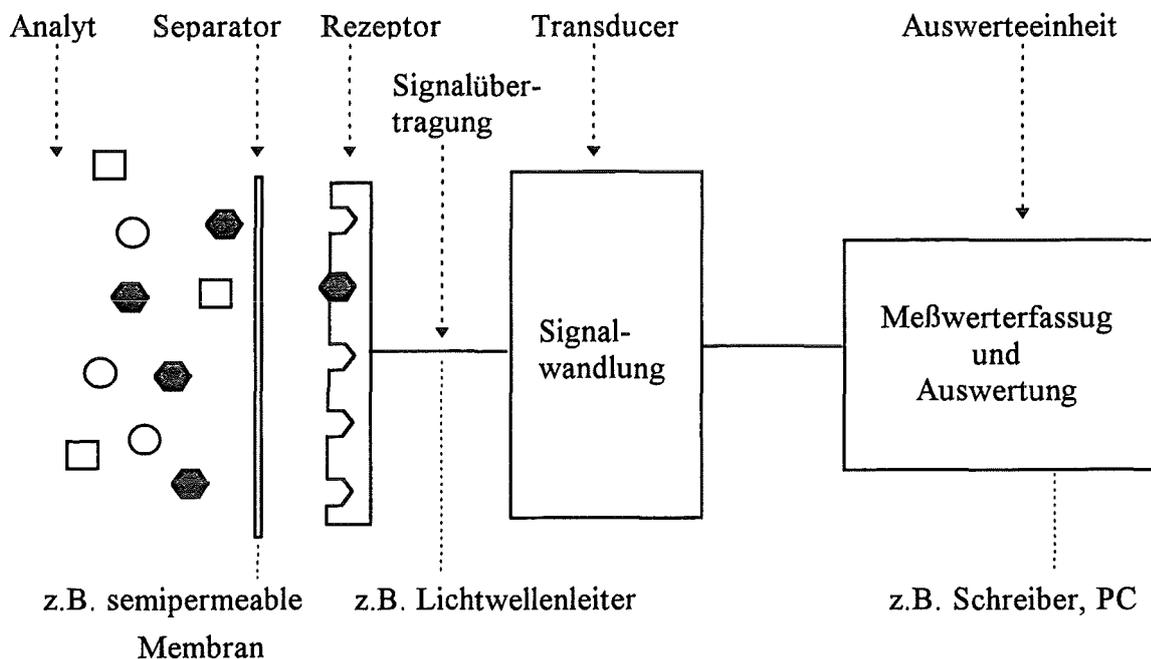
Die Untersuchungen sollen exemplarisch an kationensensitiven Indikatoren vorgenommen werden. Diese sind im einzelnen Porphyrin-Derivate als Quecksilber-sensitive, Calcium Green-1 als Calcium-sensitive und Fluorescein als pH-sensitive Indikatoren. Die Immobilisierung soll in anorganischen und organischen, hydrophilen Gel-Matrices erfolgen. Es wurden anorganische Silikagele, die nach dem Sol-Gel-Prozeß hergestellt werden, und das organische Hydrogel Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat (PolyHEMA) als Matrices für die chemisch-sensitiven Schichten ausgewählt.

### 3. Einführung in die Thematik

#### 3.1 Chemische Sensoren

##### 3.1.1 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 in analytisch auswertbare Signale umwandeln können [1]. Dabei kann entweder die Konzentration einer einzelnen Komponente oder die gesamte Zusammensetzung einer Probe erfaßt werden. Die chemische Information kann von einer chemischen Reaktion des Analyten oder von einer physikalischen Eigenschaft des untersuchten Systems stammen. Chemische Sensoren bestehen mindestens aus zwei funktionellen Einheiten, einem Rezeptorteil und einem Signalwandlungsteil (Transducer). Zur Erhöhung der Selektivität kann zusätzlich eine Trenneinheit (Separator) verwendet werden, die zum Beispiel in einer selektiven Membran bestehen kann. Der schematische Aufbau eines solchen chemischen Sensors ist in Abbildung 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1:** Schematischer Aufbau eines chemischen Sensors

Im Rezeptorteil des Sensors wird die chemische Information in eine Energieform umgewandelt, die vom Transducer erkannt werden kann. Prinzipiell werden Rezeptoren zur Erfassung von physikalischen, chemischen oder biochemischen Informationen unterschieden. Der Transducer, der selber über keine Selektivität verfügt, wandelt die in Form von Energie gespeicherte Information in ein analytisches Signal um. In einer Auswerteeinheit werden die Signale erfaßt und weiterverarbeitet. Eine Klassifizierung chemischer Sensoren kann, wie in Tabelle 3.1 auszugsweise zusammengestellt ist, nach der Art der Signalwandlung (d. h. des Transducers) vorgenommen werden [1].

**Tab. 3.1:** *Klassifizierung chemischer Sensoren*

Transducer	Meßprinzip, -größe
elektrochemisch	Potentiometrie, Amperometrie Voltammetrie, Feldeffekt (ChemFET)
elektrisch	Oberflächenleitfähigkeit, Elektrolytleitfähigkeit
optisch	Fluoreszenz, Absorption, Reflexion, Lichtstreuung, Lumineszenz Brechungsindex
massensensitiv	Oberflächenwellen (Surface Acoustic Wave, SAW), Piezoelektrizität
magnetisch	Paramagnetismus
thermisch	Reaktionswärme

Die weiteste Verbreitung haben die elektrochemischen Sensoren gefunden, zu denen die ionenselektiven Elektroden (ISE) und die pH-Glaselektrode zählen [2]. Unter den Aspekten der Miniaturisierbarkeit und der Multikomponentenanalyse erlangen aber auch optochemische Sensoren zunehmende Bedeutung [3,4,5].

An die Funktionsweise und den Aufbau von chemischen Sensoren werden eine Reihe von Anforderungen gestellt.

- **Sensitivität:** Der Sensor sollte einen möglichst großen Meßbereich abdecken und seine größte Sensitivität im Bereich der üblicherweise vorliegenden Konzentration

des Analyten haben. In den meisten Fällen (v.a. bei toxischen Analyten) sind niedrige Nachweisgrenzen gefordert.

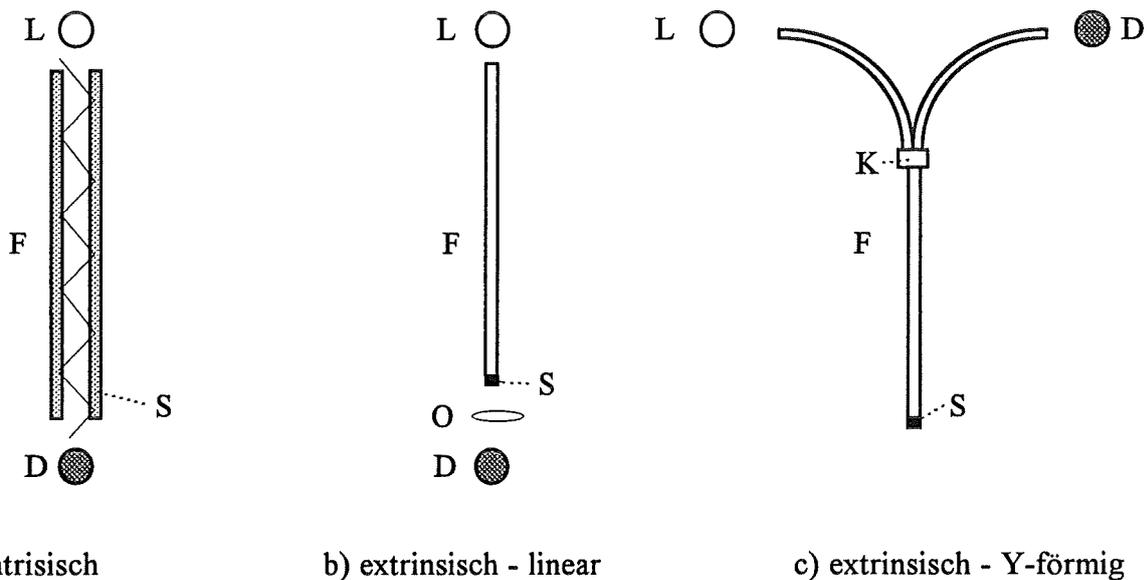
- **Selektivität:** Der Sensor soll den Analyten möglichst ohne Störung durch vorhandene Querempfindlichkeiten bestimmen können.
- **Stabilität:** Mechanische und chemische Stabilität des Sensors sind wichtige Voraussetzungen für zuverlässige Meßergebnisse. Üblicherweise werden Standzeiten von mehreren Monaten gefordert.
- **Ansprechzeit:** In der Regel sind kurze Ansprechzeiten des Sensors auf Änderungen der Analytkonzentration notwendig. Für Sensoren, die im klinischen Bereich eingesetzt werden, sollten die Ansprechzeiten beispielsweise nicht über 120 Sekunden liegen [6]. Die Zeitersparnis ist ein wichtiges Kriterium für den Einsatz eines chemischen Sensors.
- **Reversibilität:** Ein chemischer Sensor soll reversibel auf den Analyten reagieren und nach möglichst kurzen Regenerationszeiten wieder meßbereit sein. Nur dann können kontinuierliche Messungen oder hohe Probendurchsätze realisiert werden.
- **Miniaturisierbarkeit:** Damit können zum einen geringe Abmessungen und Gewicht des gesamten Sensorsystems gemeint sein, wodurch dieses eine hohe Mobilität aufweist und Vor-Ort-Analysen ermöglicht. Zum anderen sind darunter geringe Abmessungen des Sensorkopfes an sich zu verstehen, um entweder auf kleinstem Raum sehr viele Sensorelemente zu integrieren („Sensorarray“), oder um mit einem Sensorelement in sehr kleinen Probenvolumina messen zu können. Durch eine Kombination und Integration von Mikrosensoren, Mikroaktoren (z.B. Mikropumpen, Mikroventile) und Signalauswertung lassen sich Mikrosysteme aufbauen [3,7].

Da chemische Sensoren hochentwickelten Geräten der Laboranalytik bezüglich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse in der Regel unterlegen sind, sind Anwendungen für Sensoren in solchen Bereichen zu suchen, in denen sie gegenüber der klassischen Laboranalytik besondere Vorteile aufweisen. Ein besonders wichtiger Aspekt ist dabei die Miniaturisierung der Sensoren, die zu prinzipiell neuen Anwendungsgebieten führen kann.

### 3.1.2 Optochemische Sensoren

In optochemischen Sensoren (auch Optoden [8] oder Optroden [9,10]) wird die chemische Information durch optische Phänomene hervorgerufen, die aus der Wechselwirkung des Analyten mit dem Rezeptorteil des Sensors resultieren. Der Meßeffect kann in einer Änderung der Fluoreszenz, der Absorption, der Reflexion, des Brechungsindex, der

Lumineszenz oder der Lichtstreuung bestehen. Dementsprechend können die verschiedensten Sensor-Modelle entwickelt werden. Eine bedeutende Rolle spielen die sogenannten Faser-Optischen Chemischen Sensoren (FOCS) [5], bei denen optische Fasern (Lichtwellenleiter) als Teil des Transducers zur Leitung von elektromagnetischer Strahlung von und zu einer sensitiven Schicht eingesetzt werden. Dabei werden extrinsische und intrinsische Sensoranordnungen unterschieden, die wiederum in unterschiedlichen Geometrien aufgebaut sein können (Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2:** *Aufbau von intrinsischen und extrinsischen faseroptischen Sensoren*  
(L: Lichtquelle, F: Faser, S: sensitive Schicht, D: Detektor, O: Objektiv, K: Koppler)

Bei den intrinsischen faseroptischen Sensoren (Abbildung 3.2 a) ist die sensitive Schicht als Mantel um eine Faser aufgebracht. Der Meßstrahl dringt bei jeder Reflexion an der Faserwand etwa eine Wellenlänge tief in die sensitive Schicht ein und kann dort mit dem Analyten in Wechselwirkung treten. Dieses Meßprinzip wird auch „Messung im evaneszenten Feld“ genannt. Es kann beispielsweise zur Erfassung von unpolaren Kohlenwasserstoffen, die sich in Polysiloxan-Schichten anreichern, eingesetzt werden [11].

Befindet sich die sensitive Schicht am Ende eines Lichtleiters, so handelt es sich um extrinsische Sensoren (Abbildung 3.2.b und c). In diesen Anordnungen können Faserbündel oder einzelne Fasern verwendet werden. Die sensitiven Schichten werden üblicherweise mit Indikatoren dotiert, die spezifische Reaktionen mit dem Analyten eingehen und dabei ihre spektralen Eigenschaften (z.B. Fluoreszenz oder Absorption)

ändern. Unter Verwendung von Y-förmigen Lichtwellenleiteranordnungen werden faseroptische Sensoren in der sogenannten Sondengeometrie erhalten (Abbildung 3.2 c). Sie bestehen aus zwei Faserästen, die über einen optischen Koppler zu einem Faserstamm zusammengeführt werden. Das Anregungslicht wird in den einen Ast der Faser eingekoppelt und gelangt zur sensitiven Schicht. Von dort wird das Antwortsignal wieder in die Meßfaser eingekoppelt, gelangt in den optischen Koppler und wird über den zweiten Ast der Faser zum Detektor geführt. Das Antwortsignal hat somit zwei optische Übergänge zu passieren (1. sensitive Schicht → Faser; 2. im Koppler), was immer mit Signalverlusten verbunden ist. Dennoch ist die Sondengeometrie wegen der einfachen Handhabbarkeit (z.B. einfacher Probenwechsel) bei den faseroptischen Sensoren am weitesten verbreitet.

Wenn die Meßeffekte sehr klein werden, sind lineare Aufbauten zu bevorzugen, bei denen das Antwortsignal über optische Linsen aufgesammelt wird (Abbildung 3.2 b). Kleine Meßeffekte liegen beispielsweise dann vor, wenn Fasern mit geringen Durchmessern verwendet werden sollen. Je kleiner die bestrahlte Stirnfläche des Sensors ist, desto höhere Anforderungen werden an den Meßaufbau, insbesondere an die Leistungsfähigkeit der Lichtquelle und die Empfindlichkeit der Detektionseinheit, gestellt [5]. Hierfür stehen einerseits Laser und andererseits photonenzählende Detektionssysteme zur Verfügung.

Gegenüber den etablierten elektrischen und elektrochemischen Sensoren eröffnen optische Sensoren neue Möglichkeiten und Vorteile [12]:

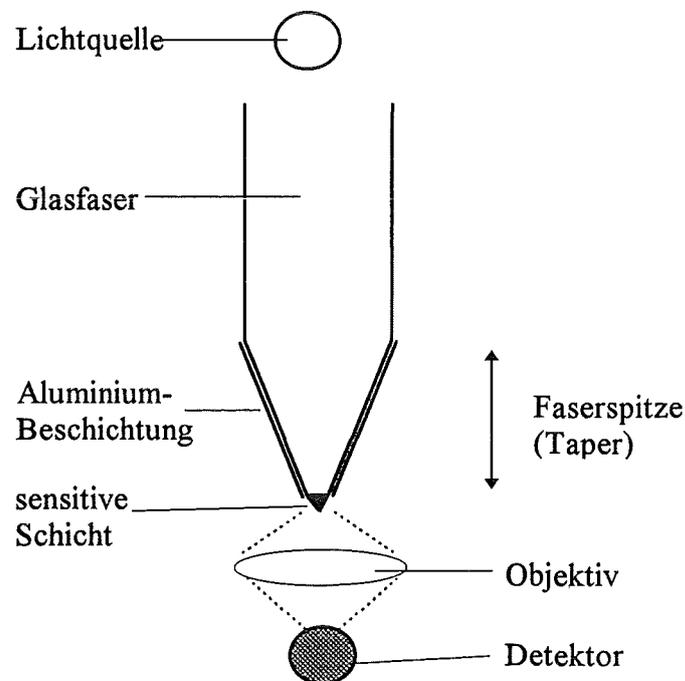
- Optische Sensoren benötigen im Gegensatz zu potentiometrischen oder amperometrischen Sensoren kein Referenzelement, da isosbestische Punkte oder interne Standards als Referenzpunkte verwendet werden können [13].
- Verschiedene Analyte können unterschiedliche Änderungen im optischen Spektrum hervorrufen, wodurch eine Multikomponentenanalyse möglich wird [14].
- Durch den Einsatz von Lichtwellenleitern kann das analytische Signal über längere Distanzen störungsfrei übertragen werden.
- Durch die Kombination von miniaturisierten Sensorkomponenten (Mikropumpen, Mikrospektrometer) lassen sich Mikroanalysensysteme aufbauen [3].
- Durch die Entwicklung von Mikro- oder Nanosensoren können Analysen in kleinsten Volumina durchgeführt werden [15].

Auf die Entwicklung von faseroptischen Nanosensoren wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

### 3.1.3 Faseroptische Nanosensoren

Der Impuls für diese neue Generation von optischen Sensoren stammt von der sogenannten „Near-Field Scanning Optical Microscopy (NSOM)“ [16,17]. Bei dieser Methode der optischen Mikroskopie werden verjüngte Glasfaserspitzen (engl. „taper“) als Lichtquellen verwendet, deren Durchmesser unterhalb der Wellenlänge des verwendeten Anregungslichtes liegen. Mit Hilfe spezieller Techniken können derzeit Glasfaserspitzen bis zu Durchmessern von 10 – 50 nm hergestellt werden [16]. Durch Abtasten von Objekten, die sich im Nahfeldbereich der Faserspitze befinden, können mikroskopische Bilder erzeugt werden, deren räumliche Auflösung nur durch die Dimension der Faserspitze bestimmt wird [16]. Es lassen sich mit diesen Nahfeld-Techniken Auflösungen von 100 nm [18] bis 12 nm [19] erreichen, so daß die optische Mikroskopie bezüglich der Auflösung in Bereiche vordringt, die bislang der Rasterelektronenmikroskopie (REM) vorbehalten waren. Der entscheidende Vorteil der NSOM liegt zudem darin, daß es sich um eine zerstörungsfreie Methode handelt.

Derartige Nanosonden können auch als Lichtquellen für faseroptische Nanosensoren verwendet werden [15,20-25]. Der Aufbau eines Nanosensors ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.3:** Faseroptischer Nanosensor nach [20]

Die sensitive Schicht befindet sich an der Spitze einer verjüngten Glasfaser (Taper), deren Seitenflächen mit Aluminium verspiegelt sind. Dadurch sollen Lichtverluste in der Faserspitze reduziert werden. Das Signal wird vom Objektiv eines Mikroskops gesammelt und gelangt in einen „Optischen Multikanal-Analysator“ (OMA) als Detektionssystem; als leistungsfähige Lichtquelle wird ein Laser verwendet.

In einer speziellen Anwendung wurde durch Photoimmobilisierung eines pH-Fluoreszenzindikators an der Faserspitze ein Nanosensor zur Messung von intrazellulären pH-Werten entwickelt und erfolgreich getestet [26].

Ein weiterer Ansatz zur Entwicklung von Mikro- oder Nanosensoren ist die Verwendung von metallbeschichteten Mikropipetten, die zum Beispiel mit einer indikatordotierten Sol-Gel-Matrix als Rezeptor gefüllt werden können. Mit dieser Technik wurden pH-Mikrosensoren mit Durchmessern von etwa 1 bis 10  $\mu\text{m}$  entwickelt [27].

Die bislang in der Literatur beschriebenen Mikro- und Nanosensoren weisen neben der hohen räumlichen Auflösung, die zum Beispiel Messungen in einzelnen, lebenden Zellen ermöglicht, auch sehr kurze Ansprechzeiten ( $\leq 1$  Sekunde) und hervorragende Nachweisgrenzen auf [23]. Mit Hilfe derartiger Sonden kann die Analytik in räumliche Dimensionen vordringen, die der klassischen Laboranalytik prinzipiell nicht zugänglich sind.

### **3.1.4 Anwendungsbeispiele für optochemische Sensoren**

Unter optochemischen Sensoren werden in der Regel faseroptische Sensoren verstanden, bei denen Indikatorfarbstoffe oder Biorezeptoren in einer Matrix immobilisiert sind. Auf diese Weise lassen sich selektive Sensoren für Ionen [28], Gase [29] oder Bioanalyte [6,30] entwickeln. Letztere werden Biosensoren genannt. Im folgenden wird eine Literaturliste für die Analyte aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit relevant sind.

Eine einfache Möglichkeit zur Herstellung eines optochemischen Sensors besteht in der Immobilisierung eines pH-Indikators in einer Polymermembran. So wurde eine Vielzahl von pH-Optroden durch Immobilisierung von Azofarbstoffen [31], Fluorescein [32-34], HPTS [35] oder Sulfonphthaleinen [36] entwickelt. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich der meist auf eine bis zwei pH-Einheiten begrenzte Meßbereich des Sensors durch Coimmobilisierung mehrerer Indikatoren mit unterschiedlichen  $pK_s$ -Werten erweitern läßt [36].

Für Kationen, deren Bestimmung in physiologischen Medien von Bedeutung ist, wurden beispielsweise Sensoren für  $K^+$ -Ionen [37],  $Na^+$ -Ionen [38],  $Mg^{2+}$ -Ionen [39,40] und  $Ca^{2+}$ -Ionen [41-46] entwickelt. Die Calcium-Sensoren verfügen zum Teil über sehr gute Nachweisgrenzen und Selektivitäten gegenüber  $Mg^{2+}$ -Ionen [43]. Die Ansprechzeiten dieser Sensoren liegen zwischen einer Minute [39,46] und 17 Minuten [43]. Die Stabilitäten der Sensoren liegen zwischen einem Tag (bis zum vollständigen Auswaschen des Indikators) [43] und 14 Tagen (ohne Signalverlust) [41].

Eine weitere wichtige Gruppe von Analyten stellen die Schwermetallionen dar, deren Bestimmung aufgrund ihrer Toxizität umweltrelevante Bedeutung hat. Es wurden beispielsweise Sensoren für Quecksilber-Ionen [47,48], Blei-Ionen [49,50] und Cadmium-Ionen [14,51] entwickelt. Es konnte zudem gezeigt werden, daß mit einem Porphyrin-Derivat als Rezeptorfarbstoff durch spektrale Diskriminierung mehrere Schwermetallionen gleichzeitig bestimmt werden können [52]. Die meisten Schwermetall-Sensoren verfügen zwar über sehr gute Nachweisgrenzen, aber auch über lange Ansprechzeiten bis zu mehreren Stunden [47,49,53].

Ein Hauptproblem bei optochemischen Sensoren, die in wäßrigen Lösungen eingesetzt werden, ist deren begrenzte Stabilität, die vor allem durch Auswaschung (Farbstoffaustrag) oder durch Ausbleichen des Indikators eingeschränkt wird. Viele Sensoren weisen begrenzte Stabilitäten von Stunden [43,54] oder wenigen Tagen auf [39,53]. Mögliche Strategien zur Verringerung des Farbstoffaustrags werden in Abschnitt 3.3.1 diskutiert.

## 3.2 Die verwendeten Indikatoren

### 3.2.1 Porphyrine

Porphyrine sind aromatische Makrozyklen, die als substituierte Porphine bezeichnet werden können. In Abbildung 3.4 ist das Porphin-Grundgerüst dargestellt, das über 18  $\pi$ -Elektronen verfügt und somit einem Aza-Analogen des 18-Annulens entspricht. In Abbildung 3.4 sind zusätzlich die Substituenten der Porphyrin-Derivate enthalten, die in der vorliegenden Arbeit als Indikatoren verwendet wurden.

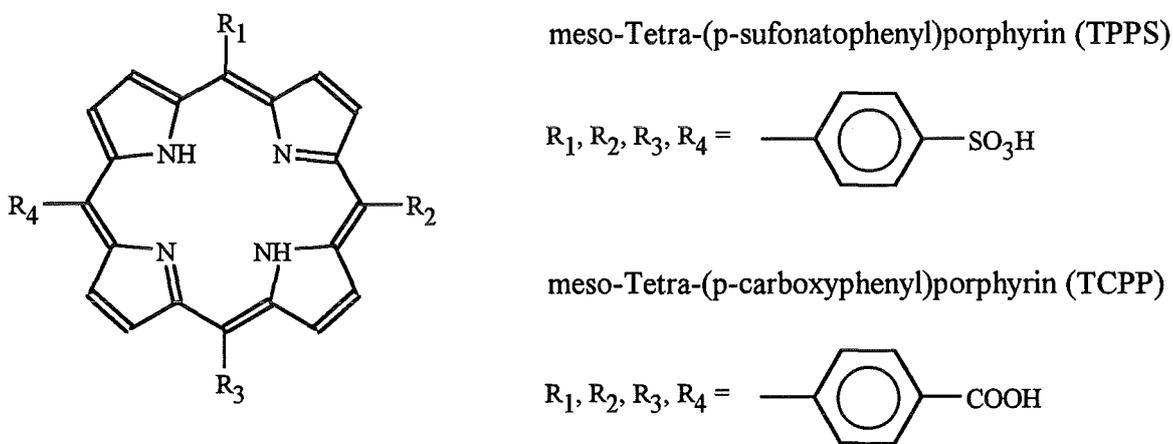
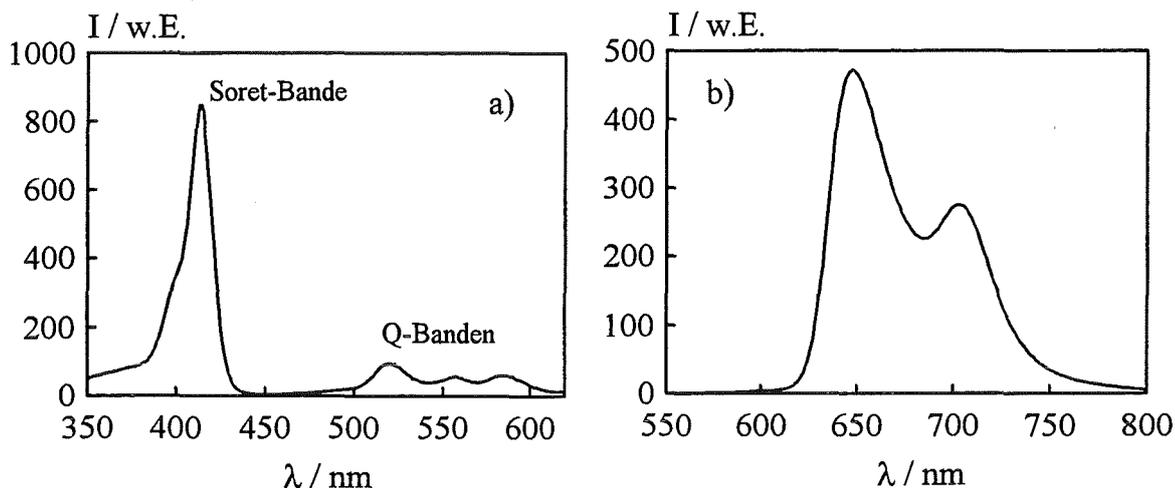


Abb. 3.4: Porphin-Grundgerüst mit 18  $\pi$ -Elektronen und Substituenten

Porphyrine weisen typische Merkmale von aromatischen Verbindungen auf. Sie verfügen über  $(4n + 2)$   $\pi$ -Elektronen und gehorchen damit der Hückel-Regel [55], haben eine planare Struktur und zeigen eine intensive Farbigkeit. Einen eindeutigen Beweis für den aromatischen Charakter liefern die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, in denen die beiden inneren Protonen hochfeld- und die äußeren Protonen tieffeldverschoben sind. [56]. Durch das ausgedehnte delokalisierte  $\pi$ -Elektronensystem absorbieren die Porphyrine Licht im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums.

Weiterhin zeigen Porphyrine eine starke Fluoreszenz, was in der folgenden Abbildung in Form eines Fluoreszenzanregungsspektrums (Abb. 3.5 a), das die gleiche Gestalt wie ein Absorptionsspektrum ausweist, und eines Fluoreszenzemissionsspektrums (Abb. 3.5 b) von meso-Tetra-(p-sulfonatophenyl)porphyrin (TPPS) dargestellt ist.

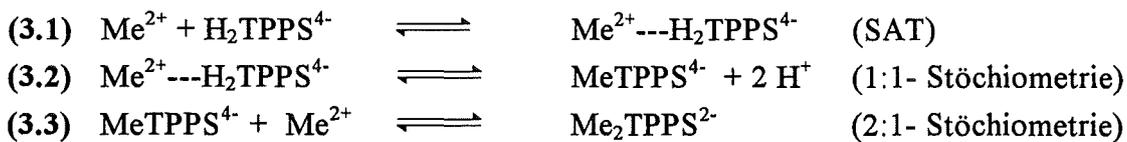


**Abb. 3.5:** Anregungs- (a) und Emissionsspektren (b) von TPPS  
 (Experimentelle Daten:  $c_{\text{TPPS}} = 3,3 \cdot 10^{-6}$  mol/l, Borat-Puffer, pH=8, optische Weglänge  $d = 1$  cm,  
 $T = 22^\circ\text{C}$ , Meßwellenlängen: (a)  $\lambda_{\text{Em}} = 650$  nm, (b)  $\lambda_{\text{Ex}} = 420$  nm)

Im Anregungs- oder Absorptionsspektrum (Abb. 3.5 a) treten bei allen Porphyrinen eine starke Absorptionsbande im Bereich zwischen 380 und 430 nm, die B- oder Soret-Bande genannt wird, sowie mehrere schwächere Banden („Q-Banden“) im Bereich zwischen 500 und 700 nm auf [57]. Diese Absorptionsbanden entstehen durch  $\pi\pi^*$ -Übergänge des konjugierten Ringsystems [58]. Die Soret-Banden weisen außergewöhnlich hohe Extinktionskoeffizienten von  $10^5$  bis  $10^6$   $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  auf [57]. Die Fluoreszenz-emissionsspektren zeigen typischerweise zwei Emissionsbanden im Bereich zwischen 600 und 750 nm mit einer Rotverschiebung von über 200 nm gegenüber der Anregungswellenlänge an der Soret-Bande (Abbildung 3.5 b).

Porphyrine können mit nahezu allen Metallen des Periodensystems Komplexe ausbilden, die auch für lebende Organismen von großer Bedeutung sind. So enthalten beispielsweise der rote Blutfarbstoff Hämoglobin einen Eisen(II)-Porphyrinkomplex und das Blattgrün Chlorophyll einen Magnesium(II)-Porphyrinkomplex. Die Komplexierung der Metallionen findet an den freien Elektronenpaaren der Pyrrol-Stickstoffatome im Zentrum des Rings statt. Die Bildung der Metall-Porphyrin-Komplexe (Metalloporphyrine) kann mit dem folgenden vereinfachten Reaktionsschema am Beispiel von TPPS beschrieben werden [58,59].

Reaktionsschema:

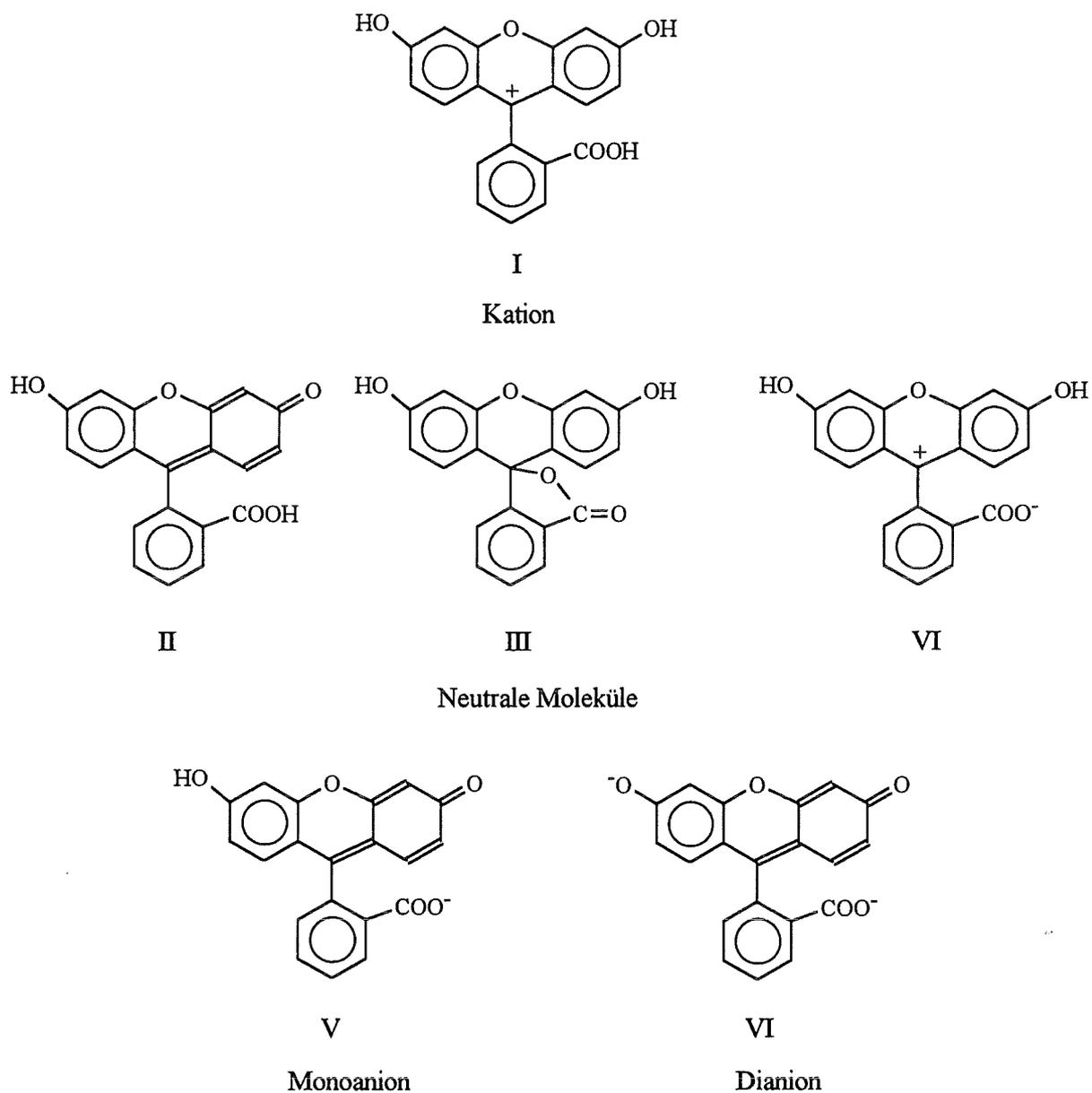


Im ersten Schritt bildet sich ein sogenannter „Sitting at Top“ (SAT)-Komplex aus, bei dem sich das Metallion außerhalb der Ringebene des Porphyrins befindet (Gl. 3.1). Aus diesen SAT-Komplexen werden die Metalloporphyrine gebildet, deren Stöchiometrie von den Ionenradien der Metallionen abhängt. Kleine Kationen wie Zn(II), Cu(II) oder Ni(II) (Ionenradien für die Koordinationszahl vier: 60 pm, 57 pm bzw. 55 pm [60]) werden in der Ringebene mit einer 1:1-Stöchiometrie des Metall-Porphyrin-Komplexes gebunden, der durch die 4fache Koordination des Metallions sehr stabil ist. Große Kationen wie Cd(II) (78 pm) oder Hg(II) (96 pm) können nur außerhalb der Ringebene unter Deformation des Porphyrin-Gerüsts komplexiert werden [59]. Dabei können sich Metall-Porphyrin-Komplexe mit 2:1- und 1:1-Stöchiometrie sowie Sandwich-Strukturen ausbilden [61,62].

Wegen des Komplexierungsverhaltens, verbunden mit den günstigen spektralen Eigenschaften, können Porphyrine auch als Indikatoren für Metallionen verwendet werden. Es wurden fluorimetrische und photometrische Nachweisverfahren für Cu(II) [63], Pb(II) [64], Zn(II) [65] oder Hg(II) [66,54] entwickelt. Weiterhin können Anionen [67] oder toxische Gase wie Ammoniak oder HCN [68,69] mit Hilfe von Porphyrin-Abkömmlingen oder Metalloporphyrinen als Rezeptoren empfindlich nachgewiesen werden.

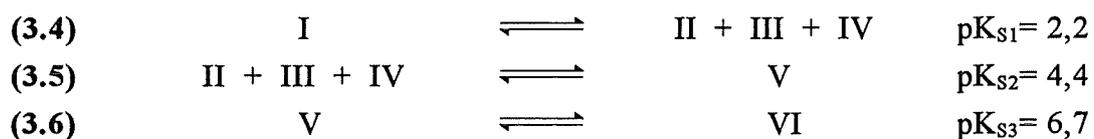
### 3.2.2 Fluorescein

Fluorescein (2-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzoesäure) gehört zu der Klasse der Phthaleine oder Xanthen-Farbstoffe. Es wird wegen der ausgeprägten grünen Fluoreszenz als Markierungssubstanz für biochemische Substrate, als pH-Indikator oder auch zum Färben von Seifen oder Badezusätzen verwendet [70]. Die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffs ist vom pH-Wert der umgebenden Lösung dahingehend abhängig, daß sie von alkalischen zu sauren pH-Werten abnimmt. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten werden auf das Vorhandensein verschiedener protolytischer Formen, in denen der Farbstoff vorliegen kann, zurückgeführt [71]. In der Literatur werden eine kationische, drei neutrale und zwei anionische Modifikationen diskutiert, die in Abbildung 3.6 wiedergegeben sind.



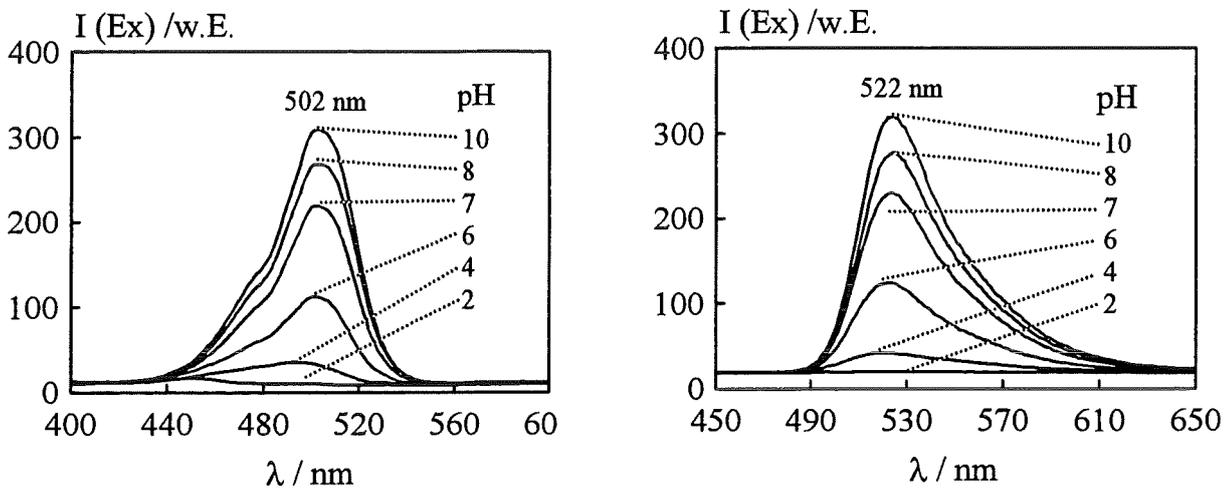
**Abb. 3.6:** Protolytische Formen von Fluorescein [71]

Daraus ergeben sich mehrere Säure-Base-Gleichgewichte mit den dazugehörigen  $pK_S$ -Werten:



Die höchsten Fluoreszenzintensitäten zeigt Fluorescein bei alkalischen pH-Werten ( $pH \geq 12$ ), bei denen die dianionische Form des Moleküls (VI) vorliegt.

Von der lactonischen Form (III) wird angenommen, daß sie aufgrund der fehlenden Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen keine Absorption im sichtbaren Bereich des Spektrums zeigt und somit auch keinen Anteil an den Fluoreszenzemissionen hat. Neutrales Fluorescein (I, II, III) zeigt nur eine geringe Fluoreszenz, wofür hauptsächlich Desaktivierungsprozesse durch innere Umwandlung (engl. „internal conversion“) vom ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  verantwortlich gemacht werden [71]. In Abbildung 3.7 sind die Anregungs- und Emissionsspektren eines Fluorescein-Derivates bei verschiedenen pH-Werten dargestellt. Es handelt sich dabei um ein Fluorescein-Dextran, das in den späteren Untersuchungen als pH-Indikator verwendet wird (siehe Abschnitt 5.2.3).

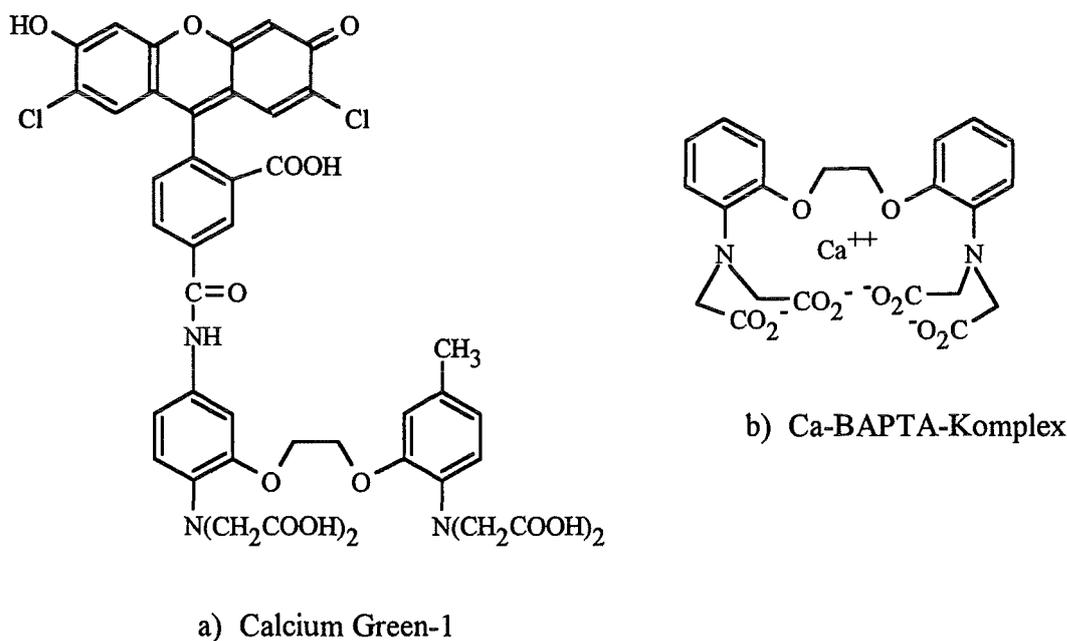


**Abb. 3.7:** Anregungs- (a) und Emissionsspektren (b) von Fluorescein-Dextran  
 (Experimentelle Daten:  $c_{\text{Fluorescein-Dextran}} = 0,036 \text{ g/l}$ , Universalpuffer; Meßwellenlängen: (a)  $\lambda_{\text{Em}} = 522 \text{ nm}$ ,  
 (b)  $\lambda_{\text{Ex}} = 502 \text{ nm}$ ; Zahlenangaben entsprechen eingestellten pH-Werten)

Bedingt durch die verhältnismäßig komplexe pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz des Fluoresceins zeigen auch fluorimetrische Titrationskurven Formen, die nicht mit denen einfacher Säure-Base-Indikatoren übereinstimmen [32]. Da Fluorescein über drei  $pK_S$ -Werte verfügt, erstreckt sich die Titrationskurve über einen weiteren pH-Bereich [32]. Dieses Verhalten zeigen insbesondere auch pH-Optroden mit Fluorescein als Rezeptorfarbstoff [32,33], wodurch sich der Meßbereich des Sensors über einen weiteren pH-Bereich erstreckt als bei pH-Optroden, die Säure-Base-Indikatoren mit nur einem  $pK_S$ -Wert enthalten und somit nur einen Meßbereich von einer bis zwei pH-Einheiten aufweisen.

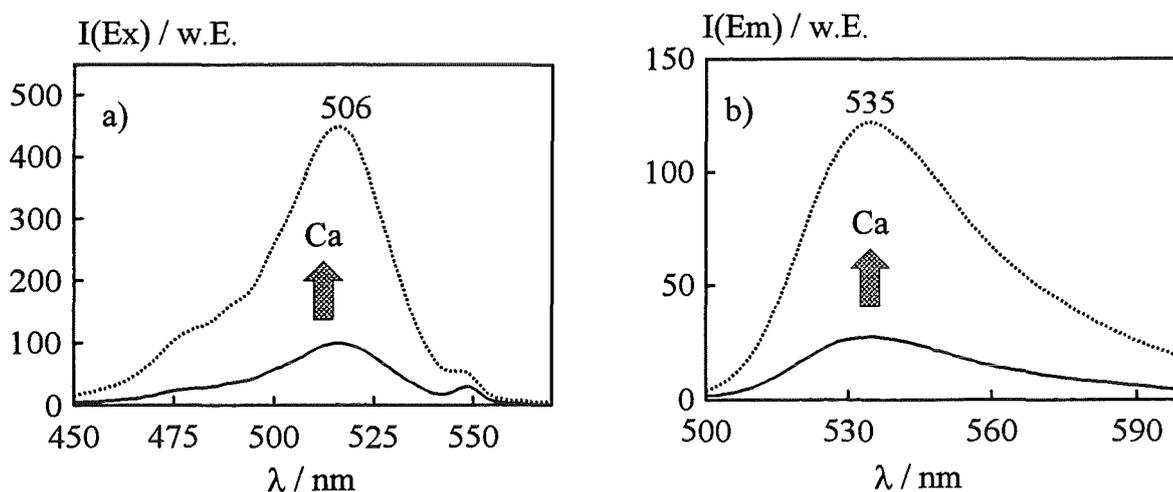
### 3.2.3 Calcium Green-1

Calcium Green-1 (abgekürzt: CG) ist ein calciumselektiver Indikator, der speziell zur Bestimmung von intrazellulären Calcium-Konzentrationen entwickelt wurde [72,73]. Das Indikatormolekül besteht aus zwei funktionellen Einheiten, einem Fluorophor und einem Komplexbildner, die über eine Brücke miteinander verbunden sind (Abbildung 3.8). Als Fluorophor wird ein Dichlorofluorescein-Derivat eingesetzt, das über günstige spektrale Eigenschaften, wie hoher Extinktionskoeffizient, hohe Quantenausbeute und Anregbarkeit im sichtbaren Bereich des optischen Spektrums, verfügt. Der Komplexbildner muß vor allem eine hohe Selektivität über Mg(II)-, Na(I)- und K(I)-Ionen aufweisen. Ferner ist erwünscht, daß die Komplexbildungsreaktion im neutralen pH-Bereich ( $\text{pH} \approx 7$ ) möglichst unempfindlich gegenüber Schwankungen des pH-Werts ist. Diese Voraussetzungen werden vom Komplexbildner 1,2-(bis)-2-Aminophenoxyethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA) erfüllt. In Abbildung 3.8 sind die Strukturformeln von Calcium Green-1 und dem Baustein BAPTA dargestellt.



**Abb. 3.8:** Strukturformeln von Calcium Green-1 (a) und des Calcium-BAPTA-Komplexes (b)

Durch die Kombination von Fluorophor und Komplexbildner ist ein Calcium-Indikator entstanden, der über einen hohen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 8,8 \cdot 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für den Calcium-Komplex von CG), hohe Fluoreszenzquantenausbeuten ( $\Phi_F = 0,75$ ) und über eine Dissoziationskonstante ( $K_D = 1,89 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ ) verfügt, die zur Bestimmung von intrazellulären Calcium-Konzentrationen geeignet ist. Da der monomere Farbstoff lipophile Membranen wie Zellwände innerhalb kurzer Zeit (etwa eine Stunde) durchwandern kann, wird dieser an hydrophile, makromolekulare Trägermoleküle angebunden. Als Träger hervorragend geeignet sind Dextrane, wasserlösliche Polysaccharide, die über eine Biokompatibilität, optische Transparenz und Stabilität gegenüber biologischem Abbau verfügen [73]. Die spektralen Eigenschaften von Calcium Green-1-Dextran (abgekürzt: CGD) sind in Abbildung 3.9 in Form von Anregungs- und Emissionsspektren von CGD und dem entsprechenden Calcium-Komplex wiedergegeben.



**Abb. 3.9:** Anregungsspektren (a) und Emissionsspektren (b) von CGD in wässriger Lösung (durchgezogene Linie  $c(\text{Ca}^{2+})=0$ , gestrichelte Linie  $c(\text{Ca}^{2+})=10^{-5} \text{ mol/l}$ )

(Experimentelle Daten:  $c_{\text{Calcium Green-Dextran}} = 0,01 \text{ g/l}$ , BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ ; Meßwellenlängen: (a)  $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$ , (b)  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ; Angabe  $\uparrow$ : Erhöhung der Fluoreszenz bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen)

Es ist eine Anregungsbande mit einem Maximum bei  $\lambda_{\text{EX}} = 506 \text{ nm}$  (Abbildung 3.9 a) und eine Emissionsbande mit einem Maximum bei  $\lambda_{\text{EM}} = 535 \text{ nm}$  (Abbildung 3.9 b) zu erkennen. Der Calcium-Komplex (gestrichelte Linie) zeigt gegenüber dem calciumfreien Farbstoff (durchgezogene Linie) eine ausgeprägte Fluoreszenzerhöhung um einen Faktor 5 bis 6. Diese wird durch einen sogenannten „Photonen-induzierten Elektronen-Transfer (PET)“ hervorgerufen [72]. Im calciumfreien Indikator befindet sich im Bereich des Komplexbildners (BAPTA) eine hohe Elektronendichte, wodurch die Fluoreszenz des Fluorophoren gelöscht wird. Durch die Komplexierung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird die

Elektronendichte am Komplexbildner (und damit der genannte Löscheffekt) herabgesetzt, was zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt.

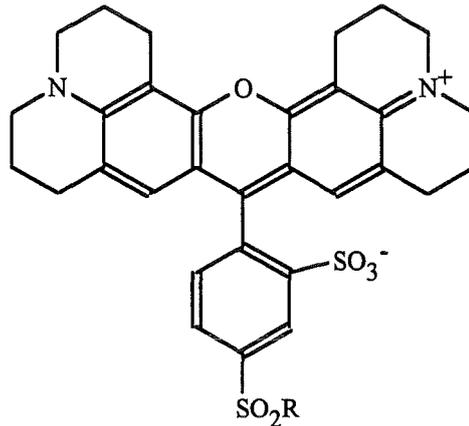
Die Stöchiometrie des Calcium-CG-Komplexes wird in der Literatur mit 1:1 angegeben, wobei bemerkt ist, daß bei hohen Calcium-Konzentrationen eine Abweichung von dieser idealen Stöchiometrie gefunden wird [74]. Eine Erklärung für dieses Verhalten mag die Kristallstruktur von Calcium-BAPTA liefern [75]. In dieser Struktur liegt ein Calcium-Ion in einer achtfachen Koordination mit vier carboxylischen Sauerstoffatomen, den zwei etherischen Sauerstoffatomen und den beiden Stickstoffatomen des BAPTA-Moleküls vor, wie in Abbildung 3.8 b vereinfachend dargestellt ist. Darüber hinaus wird ein zweites Calcium-Ion über einen carboxylischen Sauerstoff des BAPTA-Moleküls koordiniert (nicht gezeigt). Möglicherweise liegen derartige Komplexe bei höheren Calcium-Konzentrationen auch in Lösung vor.

Calcium Green-1 und ähnliche Farbstoffe wurden bereits in mehreren Arbeiten zur Beobachtung von Calcium-Fluktuationen innerhalb von lebenden Zellen verwendet [76-78].

### **3.2.4 Sulforhodamin 101 (Texas Red)**

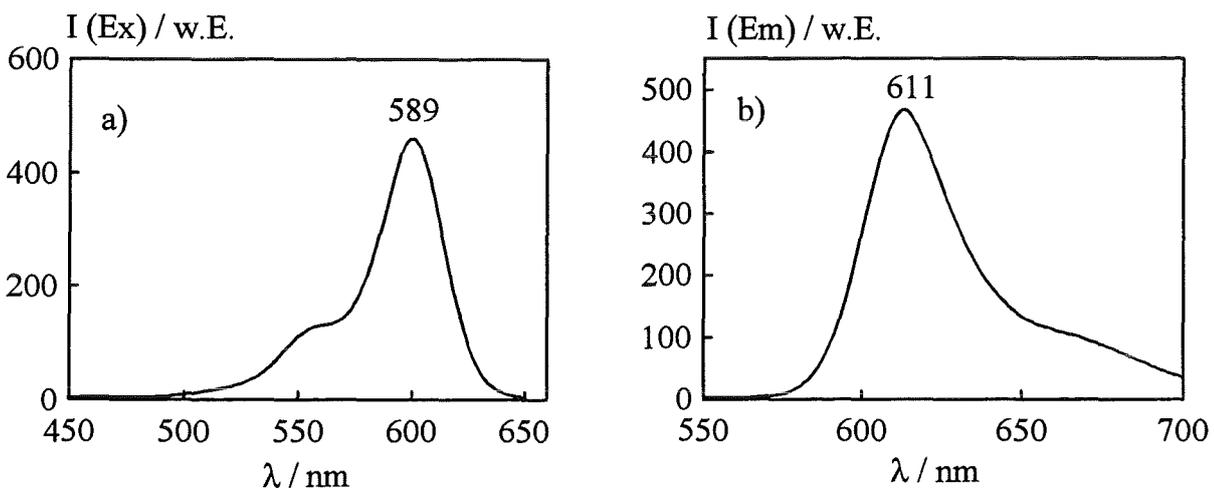
Die Rhodaminfarbstoffe leiten sich vom Diaminoxanthen ab und gehören zur Klasse der Phthaleine. Ausgehend vom eigentlichen Rhodamin können durch Substitution an den Amino-Seitengruppen und an den aromatischen Ringen zahlreiche Derivate hergestellt werden, deren wichtigsten Vertreter das Rhodamin B und das Rhodamin 6G sind. Rhodamine dienen nicht zuletzt wegen ihrer ausgeprägten Fluoreszenz als Farbstoffe für Laser, als Mikroskopie-Farbstoffe, als Leuchtpigmente sowie zur Färbung von Papier und Textilien [70].

Sulforhodamin 101 ist ein häufig verwendeter roter Fluoreszenzstandard, dessen Sulfonylchlorid-Derivate und Dextran-Verbindungen unter dem Namen „Texas Red<sup>®</sup>“ geschützt sind. Die Struktur dieses Farbstoffs ist in Abbildung 3.10 wiedergegeben.



**Abb. 3.10:** Strukturformel von Sulforhodamin 101 (Texas Red)

Die Anregungs- und Emissionsspektren der Dextran-Verbindung von Texas Red (abgekürzt: TRD) sind in Abbildung 3.11 dargestellt.



**Abb. 3.11:** Anregungs- (a) und Emissionsspektren (b) von TRD in wässriger Lösung (Experimentelle Daten:  $c_{\text{Texas Red-Dextran}} = 0,03 \text{ g/l}$ , BTP-Puffer, pH= 7; Meßwellenlängen: (a)  $\lambda_{\text{EM}} = 611 \text{ nm}$ , (b)  $\lambda_{\text{EX}} = 589 \text{ nm}$ ;) )

Die Maxima der Anregungs- und Emissionsbanden liegen bei  $\lambda_{\text{EX}} = 589 \text{ nm}$  (Abb. 3.11 a) und  $\lambda_{\text{EM}} = 611 \text{ nm}$  (Abb. 3.11 b). Wegen der hohen Extinktionskoeffizienten und Fluoreszenzquantenausbeuten kann dieser Farbstoff jedoch beispielsweise auch in Verbindung mit einem Argon-Laser ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) als Anregungslichtquelle verwendet werden [79].

### 3.3 Immobilisierung von Indikatoren

#### 3.3.1 Immobilisierungsmethoden

Für eine zuverlässige Funktionsweise, geringen Wartungsaufwand und lange Standzeiten von chemischen Sensoren werden hohe Anforderungen an die Stabilität der Rezeptorschichten gestellt. Unter diesen Schichten werden farbstoffdotierte Polymermatrixen (oder Membranen) verstanden, deren Stabilität von mehreren Faktoren beeinflusst wird:

- chemische und photochemische Stabilität des Farbstoffs
- chemische, photochemische und mechanische Stabilität der Matrix
- Diffusion des Farbstoffs aus der Matrix (Farbstoffaustrag).

Diese Faktoren erhalten je nach Art des Sensors ein unterschiedliches Gewicht. Bei Gassensoren spielen beispielsweise die chemische und photochemische Stabilität des Indikators die entscheidende Rolle, so daß sich mit stabilen Rezeptorfarbstoffen in der Regel auch stabile Sensoren herstellen lassen [68]. Die Stabilität von Flüssigkeitssensoren, die ständig von – zum Teil aggressiven – wäßrigen Lösungen umspült werden, wird zusätzlich durch die Stabilität der Matrix gegenüber der Probelösung und vor allem durch den Farbstoffaustrag bestimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Konzept entwickelt, das eine Verminderung des Farbstoffaustrags zum Ziel hat, da dies den limitierenden Faktor bezüglich der Stabilität der Sensoren darstellt.

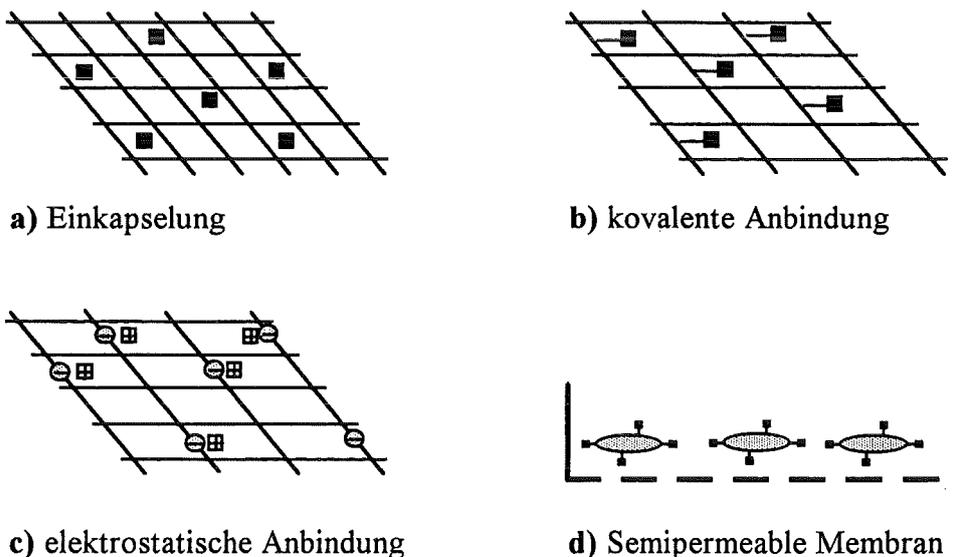


Abb. 3.12: Immobilisierungsmethoden (Erklärungen siehe Text)

Um den Farbstoffaustrag zu unterbinden, können verschiedene Immobilisierungsmethoden verwendet werden, von denen die wichtigsten in Abbildung 3.12 schematisch dargestellt sind und im folgenden erläutert werden.

### **a) Einkapselung**

Eine einfache Immobilisierungsmethode stellt die Einkapselung des Rezeptorfarbstoffs in einer porösen Polymermatrix dar (Abbildung 3.12 a). Auf diese Weise wurden bisher die meisten Optroden etwa zur Bestimmung von pH-Werten, Kationen oder Anionen hergestellt [80,28]. Als Matrices können beispielsweise Silikagele [81,82] oder Hydrogele [83,84] verwendet werden. Die Vorteile dieser Methode liegen in der einfachen, reproduzierbaren Schichtpräparation und vor allem in der Variabilität bei der Zusammensetzung der Schichten, da sich auf diese Weise nahezu alle Indikatoren in frei wählbaren Konzentrationen immobilisieren lassen. Da in der sensitiven Schicht nicht nur der Analyt, sondern auch der Rezeptorfarbstoff diffundieren und damit ausgewaschen werden kann, zeigen viele Sensoren dieses Typs eingeschränkte Stabilitäten, die wiederum von der Dicke der Rezeptorschichten abhängen. So zeigen kationensensitive Silikagel-Schichten mit einer Schichtdicke von 2 mm nach 14tägiger Lagerung in Wasser etwa 60 % Farbstoffverlust [53], wohingegen ähnliche Farbstoffverluste bei 600 nm dicken Schichten bereits nach wenigen Stunden erreicht sein können [54].

### **b) Kovalente Anbindung**

Zur Unterdrückung des Farbstoffaustrags kann der Indikator durch kovalente Anbindung über geeignete funktionelle Gruppen an der Matrix fixiert werden (Abbildung 3.12 b). Auf diese Weise lassen sich sensitive Schichten mit sehr guten Stabilitäten von mehreren Monaten entwickeln [85]. Zur Herstellung dieser Schichten müssen jedoch in der Regel aufwendige Synthesen zur Derivatisierung der Matrix und/oder des Rezeptorfarbstoffs durchgeführt werden, womit ein hoher zeitlicher Entwicklungsaufwand und eine geringe Flexibilität verbunden sind. Für jede neue Zusammensetzung der Matrix müssen in der Regel auch die Synthesen modifiziert werden. Ein Sonderfall der kovalenten Anbindung wäre die Copolymerisation zwischen den Monomeren der Matrix und dem Farbstoffderivat. So können beispielsweise Fluorescein-Derivate mit Acrylamid durch thermische oder Photopolymerisation quervernetzt werden [15,24]. Statt an einer Matrix kann der Indikator auch direkt an einer Festkörperoberfläche (z. B. silanisiertes Glas) angebunden werden [86,87].

### **c) Elektrostatische Anbindung**

Neben der kovalenten Immobilisierung kann unter speziellen Voraussetzungen auch eine elektrostatische Anbindung des Rezeptors an eine Matrix zu stabilen sensitiven Schichten führen (Abbildung 3.12 c). Eine besonders vorteilhafte Matrix zur Herstellung dünner, transparenter Ionenaustauscher-Filme ist der ethanollösliche, perfluorierte Kationenaustauscher Nafion®. Derartige Filme können mit kationischen Rezeptorfarbstoffen imprägniert werden, was die Anwendung dieser Methode jedoch einschränkt. Zudem ist darauf zu achten, daß die Ionenstärken der Probelösungen nicht zu hoch werden, da sonst der Indikator durch Ionenaustausch verdrängt werden kann. Durch elektrostatische Anbindung des Rezeptors wurden beispielsweise stabile Optroden für Schwermetalle [48,50,51] oder pH [88] realisiert.

### **d) Semipermeable Membran**

Ein weiteres Prinzip, das Parallelen zur vorliegenden Arbeit aufweist, besteht darin, die Diffusion des Rezeptormoleküls aus der Membran durch die Verwendung von makromolekularen Rezeptoren zu unterbinden. Diese Methode kann beispielsweise zur Immobilisierung von Enzymen angewendet werden, indem diese durch einen Separator von der Probelösung abgetrennt werden (Abbildung 3.12 d). Als Separatoren können beispielsweise semipermeable Membranen aus PTFE [46] oder Dialysemembranen [43] verwendet werden. Das gleiche Prinzip kann auch zur Immobilisierung niedermolekularer Indikatoren dienen, indem diese an makromolekulare Träger (z. B. Dextrane oder Polypeptide) angebunden werden. So wurden in mehreren Arbeiten Fluorescein-Dextrane und andere polymergebundene Farbstoffe unter Verwendung von Dialysemembranen immobilisiert [89-92].

### **e) Immobilisierung makromolekularer Rezeptoren (siehe Abb. 5.1)**

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, wie sich die Stabilität von kationensensitiven Schichten durch Immobilisierung von makromolekular gebundenen Indikatoren in hydrophilen Matrices verbessern läßt. Als Motivation für diese Themenstellung kann die sehr erfolgreiche Immobilisierung von Enzymen in Silikagelen, die nach dem Sol-Gel-Prozeß hergestellt wurden, gelten [93,94]. Diese bioaktiven Gele zeigen Stabilitäten von mehreren Monaten ohne nennenswerten Aktivitätsverlust.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurden Dextran-gebundene pH-Indikatoren in Polyacrylamid-Gelen zur Entwicklung von miniaturisierten Optroden immobilisiert, bei denen nach 2stündiger Lagerung in Wasser kein Farbstoffaustrag festgestellt wurde [95].

Generell ist zu bemerken, daß in den meisten Arbeiten keine konkreten oder vergleichbaren Angaben zur Stabilität der sensitiven Schichten und deren Bestimmung gemacht werden. Eine universell einsetzbare Immobilisierungstechnik ist zur Zeit noch nicht verfügbar.

### 3.3.2 Der Sol-Gel-Prozeß

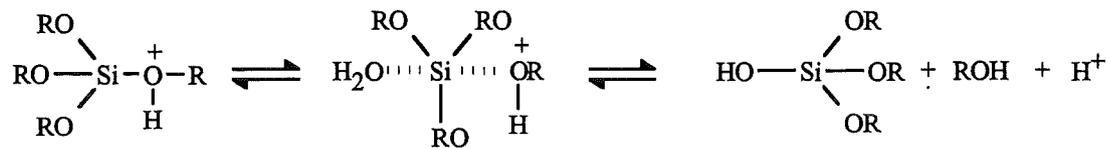
Mit dem Überbegriff „Sol-Gel-Prozeß“ wird eine große Zahl von chemischen Reaktionsabläufen zusammengefaßt, in denen ein *Sol* den Übergang zu einem *Gel* vollzieht [96,97]. Unter einem Sol werden Dispersionen von kolloidal gelösten Partikeln mit Durchmessern von einem bis 100 nm verstanden. Ein Gel besteht aus Polymerketten, die zu einem dreidimensionalen, festen Netzwerk mit Poren im Submikrometer-Bereich verknüpft sind. Ein spezielles Beispiel für einen Sol-Gel-Prozeß stellt das System Tetramethoxysilan (TMOS) / Methanol / Wasser dar, das in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von dünnen Silikagel-Filmen eingesetzt wurde.

Der Übergang vom Sol zum Gel erfolgt durch simultan ablaufende Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen, welche in Form von sauer oder basisch katalysierten, nukleophilen Substitutionsreaktionen ablaufen. In der Literatur werden die folgenden Reaktionsmechanismen diskutiert [96].

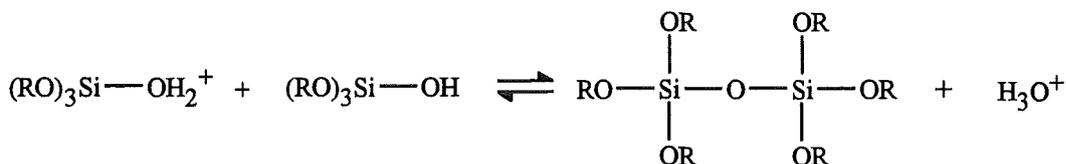
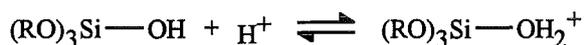
#### Reaktionsmechanismen:

##### a) saure Katalyse

##### Hydrolyse

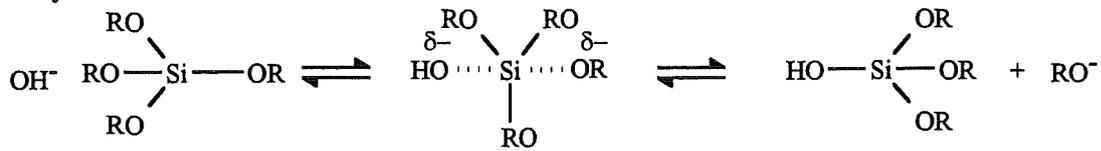


##### Kondensation

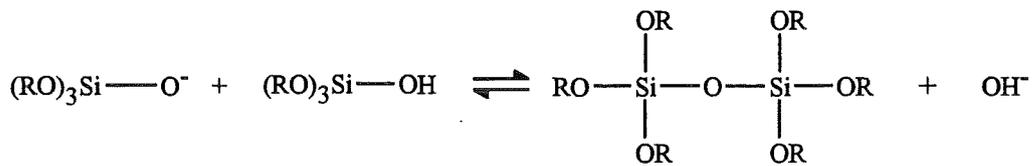
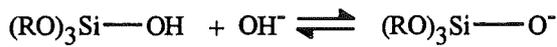


## b) basische Katalyse

### Hydrolyse

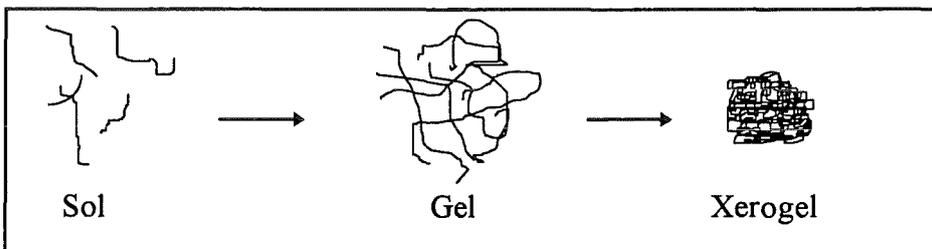


### Kondensation

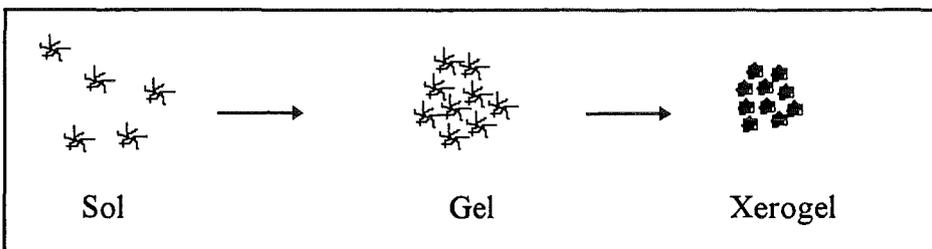


Die Art der Katalyse hat einen entscheidenden Einfluß auf die Struktur der trockenen Gele (Xerogele). Xerogele, die nach basischer Katalyse hergestellt wurden, zeigen eine partikelförmige, vorwiegend mesoporöse Struktur (Porendurchmesser  $d_p \approx 1-50 \text{ nm}$  [97]). Nach saurer Katalyse entstehen dagegen dichte, mikroporöse Gelstrukturen ( $d_p \leq 3 \text{ nm}$ ). Die Vorgänge während der Gelierung sind in Abbildung 3.13 veranschaulicht.

#### a) saure Katalyse



#### b) basische Katalyse



**Abb. 3.13:** Einfluß der Katalyse auf die Struktur der Xerogele

Bei saurer Katalyse liegt eine langsame Hydrolysereaktion vor, die von einer schnellen Kondensationsreaktion gefolgt ist. Unter diesen Bedingungen entstehen wenig verzweigte, lineare Ketten, die im Verlauf der Gelierung miteinander quervernetzt werden (Abbildung 3.13 a). Unter basischer Katalyse verläuft die Hydrolyse schneller als die Kondensation, was im frühen Stadium der Gelierung zur Bildung von Clustern mit hoher Si-O-Si-Quervernetzung führt. Da sich diese Cluster gegenseitig nicht durchdringen können, entstehen daraus diskrete Partikel, die während der Gelierung miteinander verknüpft werden (Abbildung 3.13 b). Als Gelpunkt wird der Zustand oder Zeitpunkt bezeichnet, an dem die kolloidal gelösten Partikel oder Ketten in ein dreidimensionales Netzwerk übergehen, was von einem sprunghaften Anstieg der Viskosität begleitet ist.

Das Primärprodukt des Sol-Gel-Prozesses, ein poröses Si-O-Si-Netzwerk mit Wasser und Alkohol in den Poren, wird *Alkogel* genannt. Durch überkritisches Trocknen des Alkogels im Autoklaven werden die Lösungsmittel ohne Volumenverlust des Gels entfernt; dabei entstehen die sogenannten *Aerogele*, die eine sehr geringe Dichte aufweisen. Bei einfachem Trocknen werden die Alkogege durch zusätzliche Quervernetzungen verdichtet, was mit einer Schrumpfung des Gels verbunden ist; es entstehen die bereits erwähnten *Xerogele*. Während der Trocknung neigen die Gele zu Rißbildungen, die zum Aufbrechen der Struktur führen können [97]. Als Ursache für dieses Verhalten wird die breite Verteilung der Porengrößen in den Alkogelen diskutiert [98], da in Poren unterschiedlicher Größe die Porenwände beim Verdampfen der Lösungsmittel bedingt durch unterschiedliche Kapillardrücke ungleichmäßig belastet werden. Wird dieser Streß während der Trocknung zu groß, brechen die Porenwände auf. Um dies zu verhindern, können dem Sol chemische Additive zugesetzt werden. Die sogenannten „trocknungskontrollierenden Zusatzstoffe“ (engl. „drying control chemical additive“, DCCA) beeinflussen einerseits die mittleren Porengrößen und führen andererseits zu einer schmalen Porengrößenverteilung im Alkogel. Dies führt zu einer gleichmäßigen Belastung der Porenwände während der Trocknung, wodurch Rißbildungen unterbleiben [98]. Weiterhin können oberflächenaktive Substanzen zugesetzt werden, durch die die Oberflächenspannung der Porenflüssigkeit und damit die Kapillardrücke abgesenkt werden. Zusätzlich werden die Benetzungseigenschaften des Sols verbessert, was für die Herstellung von dünnen Filmen von Vorteil ist [99].

Xerogele stellen eine Basis für vielfältige Anwendungsmöglichkeiten und Formgebungen dar. Durch thermische Nachbehandlungsschritte können sie beispielsweise zu optischen Linsen [100], Keramiken [101], Glasfasern [82] oder zu speziellen Beschichtungen weiterverarbeitet werden. Werden sie mit Indikatoren oder Biomolekülen dotiert, so entstehen chemisch-sensitive Rezeptorschichten für optochemische Sensoren [81,82].

### 3.3.3 Organische Hydrogele

Hydrogele sind hydrophile, wasserhaltige, aber wasserunlösliche Polymere, die als dreidimensionales Netzwerk vorliegen [70]. Der Zusammenhalt dieses Netzwerks kann durch kovalente Bindungen, aber auch durch elektrostatische, hydrophobe oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen erfolgen [102]. Die Hydrophilie kann beispielsweise auf dem Vorhandensein von Hydroxyl-, Carboxylat-, Sulfonat- oder Amid-Gruppen beruhen. In Wasser quellen Hydrogele bis zu einem Gleichgewichtsvolumen unter Erhaltung der Form auf. Natürliche Hydrogele kommen beispielsweise in Muskeln, biologischen Membranen oder im Blut vor.

Synthetische Hydrogele basieren u. a. auf Polymethacrylsäuren, Polymethacrylaten, Polyacrylamiden, Polyvinylpyrrolidon oder Polyvinylalkohol. Ihre Eigenschaften werden durch die Hydrophilie der Monomere und durch die Dichte des Polymernetzwerks bestimmt [102]. Durch Copolymerisation kann aus einer begrenzten Anzahl von zur Verfügung stehenden Monomeren eine Vielzahl von Hydrogelen unterschiedlicher Eigenschaften synthetisiert werden. Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (PolyHEMA) ist das am häufigsten verwendete Hydrogel aus der Klasse der Hydroxyalkylmethacrylate oder-acrylate. Ein Ausschnitt aus der Polymerstruktur ist in Abbildung 3.14 wiedergegeben.

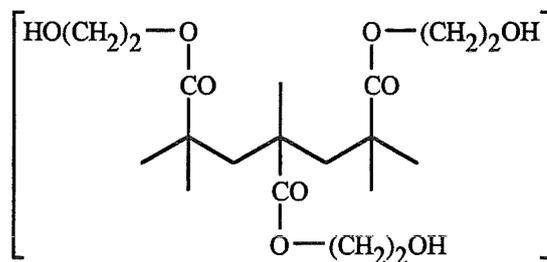


Abb. 3.14: Struktur von PolyHEMA

PolyHEMA ist ein weiches, formbares Gel, das über eine hohe Stabilität gegenüber Hydrolyse verfügt [102] und in Wasser um maximal 40 Volumen% aufquellen kann. Durch Quervernetzung oder Copolymerisation können neue Hydrogele dieses Typs mit veränderter Hydrophilie, Ladung oder mechanischer Festigkeit entwickelt werden [102]. Synthetische Hydrogele werden hauptsächlich zu medizinischen Zwecken verwendet. Wegen ihrer Biokompatibilität können sie beispielsweise in Kathetern, als Dialysemembranen, als Kontaktlinsen oder als Implantate eingesetzt werden [102]. In der analytischen Chemie werden Hydrogele zum Beispiel als Elektrophorese-Gele oder als

Matrices für chemisch-sensitive Membranen von Enzymelektroden oder auch von optochemischen Sensoren verwendet [103].

### 3.4 Meßtechnische Grundlagen

#### 3.4.1 Fluorimetrie

Die Fluoreszenz stellt eine nach dem Fluorit benannte Form der Photolumineszenz dar, bei der Stoffe bei Bestrahlung Energie absorbieren und innerhalb von 0,1 bis 100 Nanosekunden wieder Energie in Form von Strahlung abgeben [104]. Liegt die emittierte Strahlung im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums, so spricht man von optischer Fluoreszenz. In diesem spektralen Bereich werden elektronische Zustände eines Moleküls angeregt, die mit Hilfe eines Termschemas beschrieben werden können. Die vereinfachte Form eines Termschemas (ohne Schwingungs- und Rotationsfeinstruktur) ist in Abbildung 3.15 wiedergegeben.

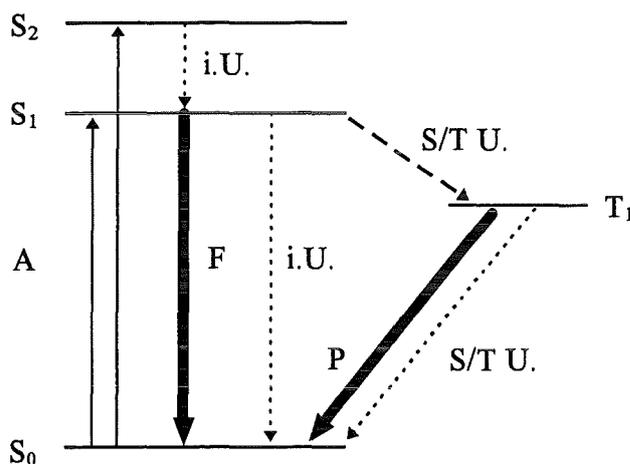


Abb. 3.15: Vereinfachtes Termschema [104] (Erklärungen siehe Text)

Durch Absorption von Licht ( $A$ ) können Moleküle vom elektronischen Grundzustand ( $S_0$ ) in elektronisch angeregte Zustände ( $S_1, S_2, \dots S_n$ ) gelangen. Von dort können sie die absorbierte Energie strahlungslos durch innere Umwandlung ( $i.U.$ , engl. „internal conversion“) abgeben oder spontan in Form von Fluoreszenzstrahlung ( $F$ ) emittieren. Eine weitere Möglichkeit ist der Übergang vom Singulett-Zustand  $S_1$  zum Triplett-Zustand  $T_1$ , was als Singulett-Triplett-Umwandlung ( $S/T U.$ , engl. „intersystem crossing“) bezeichnet wird. Findet der Übergang vom  $T_1$ - zum  $S_0$ -Zustand unter Emission von Strahlung statt, wird diese Phosphoreszenz genannt. Die Abklingzeiten liegen bei Phosphoreszenz-

Erscheinungen bedingt durch die lange Lebensdauer der Triplett-Zustände im Bereich von 0,1 Mikrosekunden bis über 100 Sekunden und sind damit um Größenordnungen länger als bei der Fluoreszenz. Nachdem Elektronenübergänge zur Anregung eines Moleküls mehr Energie benötigen als in Form von Strahlung wieder abgegeben werden kann, sind Fluoreszenzemissionsspektren gegenüber Absorptionsspektren zu längeren Wellenlängen verschoben (Stokes-Verschiebung).

Die Fluorimetrie ist eine Methode der chemischen Analyse, bei der ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität ( $I_F$ ) und der Konzentration ( $c$ ) eines zu bestimmenden Stoffes hergestellt wird. Unter Einbeziehung des Lambert-Beer'schen Gesetzes für die Absorption von elektromagnetischer Strahlung wurde für die Fluoreszenzintensität die folgende Beziehung abgeleitet [105]:

$$(3.7) \quad I_F = \Phi_F I_0 (1 - e^{-\varepsilon c d})$$

$I_F$ : Fluoreszenzintensität  
 $\Phi_F$ : Quantenausbeute  
 $I_0$ : Intensität des eingestrahnten Lichtes  
 $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient  
 $d$ : optische Weglänge

Für geringe Absorptionen ( $\varepsilon \cdot c \cdot d < 0,02$ ) kann Gleichung 3.7 zu 3.8 vereinfacht werden, womit ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Konzentration hergestellt wird [105].

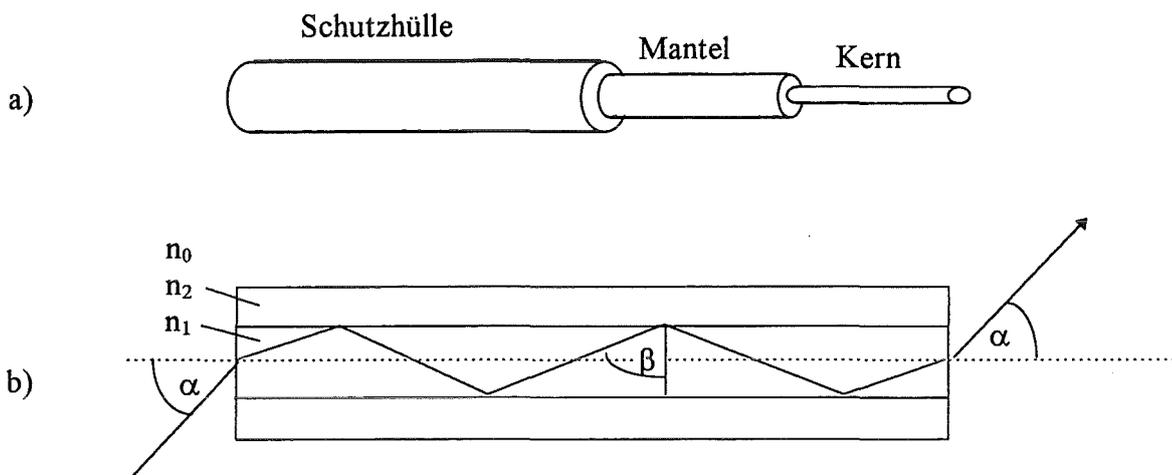
$$(3.8) \quad I_F = 2,3 \Phi_F \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Als Quantenausbeute  $\Phi_F$  wird das Verhältnis der emittierten Lichtquanten zu den absorbierten Lichtquanten definiert. Durchlaufen alle Moleküle den Übergang von  $S_1$  nach  $S_0$  in Form von Fluoreszenzstrahlung, so beträgt die Quantenausbeute eins. In der Regel wird die Quantenausbeute durch sogenannte Fluoreszenzlöschung (engl. „quenching“) vermindert. Das angeregte Molekül kann strahlungslos in den elektronischen Grundzustand übergehen, indem es seine Energie an ein anderes Molekül (Löcher, engl. „quencher“) abgibt. Derartige Löcher können Lösungsmittelmoleküle, paramagnetische Gase (z.B. Triplett-Sauerstoff,  $^3O_2$ ) oder schwere Atome (z.B. Iodid-Ionen) sein. Bei hohen Konzentrationen kann auch das fluoreszierende Molekül selbst als Löcher wirken (Selbstlöschung). Findet die Fluoreszenzminderung durch Reabsorption des emittierten Lichtes statt, so spricht man von einem „inneren Filter Effekt“. Weitere Effekte, die die Fluoreszenz beeinflussen können, sind der pH-Wert, die Temperatur sowie die Polarität und Viskosität des Lösungsmittels [104].

Wie in Gleichung 3.8 ersichtlich ist, wird die Fluoreszenzemission durch die Intensität des eingestrahlteten Lichtes  $I_0$  direkt beeinflusst. Dieser Zusammenhang wird in der Laserfluorimetrie ausgenutzt, indem die Empfindlichkeit der Methode durch den Einsatz von leistungsstarken Lasern als Lichtquellen erheblich gesteigert werden kann [104]. Die Fluorimetrie stellt wegen ihrer hohen Empfindlichkeit eine sehr leistungsfähige Methode der chemischen Spurenanalytik dar.

### 3.4.2 Optische Fasern (Lichtwellenleiter)

Optische Fasern haben dank der Entwicklungen auf dem Gebiet der Telekommunikation eine große Bedeutung zur Übermittlung von Daten erlangt. Der Aufbau einer optischen Faser ist in Abbildung 3.16 a) schematisch dargestellt. Sie bestehen aus einem Kern (engl. „core“), einem Mantel (engl. „cladding“) und einer Schutzhülle. Kommerziell erhältliche Fasern haben Kerndurchmesser von etwa  $5\ \mu\text{m}$  bis  $1\ \text{mm}$ . Als Materialien können Quarz, Glas oder Kunststoffe verwendet werden [106].



**Abb. 3.16:** Aufbau (a) und Lichtleitung (b) in einer optischen Stufenindexfaser ( $n_1, n_2, n_0$ : Brechungsindices von Kern, Mantel und Schutzhülle; Erklärung siehe Text)

Eine elektromagnetische Welle wird dann in einer (Stufenindex-)Faser geführt, wenn

1. der Brechungsindex des Kerns größer ist als der des Mantels ( $n_1 > n_2$ ), und wenn
2. das Licht innerhalb eines Akzeptanzwinkels  $\alpha$  in die Faser eingekoppelt wird.

Die zugehörige Kenngröße ist die numerische Apertur, die folgendermaßen definiert ist:

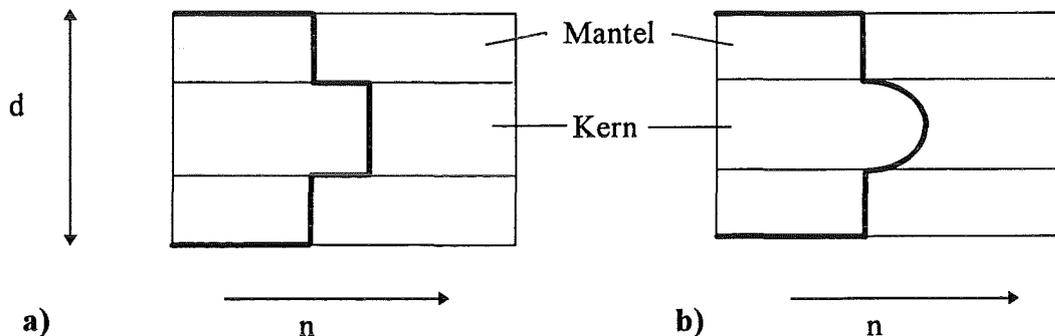
$$(3.9) \quad \sin \alpha = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$

Das Prinzip der Lichtleitung besteht in der mehrfachen Totalreflexion an der Grenzschicht zwischen Kern und Mantel. Hierfür gilt die Reflexionsbedingung:

$$(3.10) \quad \sin \beta \geq n_2/n_1$$

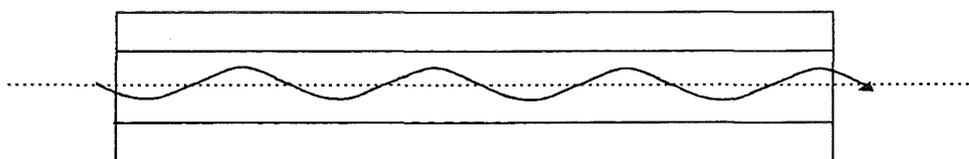
$n_i$ : Brechungsindizes (siehe Abb. 3.16 b)  
 $\beta$ : Winkel der Totalreflexion

Die Brechzahlen des Kerns und des Mantels können in unterschiedlichen Profilen hergestellt werden. Sind die Materialien bezüglich der Brechungsindizes  $n_1$  und  $n_2$  in sich homogen, so erfolgt ein stufenförmiger Übergang des Brechungsindex vom Kern zum Mantel. Diese Fasern werden Stufenindexfasern genannt (Abbildung 3.17 a)



**Abb. 3.17:** Brechzahlprofile einer Stufenindex- (a) und einer Gradientenindexfaser (b)

Liegt ein kontinuierlicher Übergang des Brechungsindex vom Zentrum des Kerns zum Mantel hin vor, so handelt es sich um Gradientenindexfasern (Abbildung 3.17 b). In Gradientenindexfasern wird das Licht näher am Kernmittelpunkt geführt, was in Abbildung 3.18 veranschaulicht ist.



**Abb. 3.18:** Lichtführung in einer Gradientenindexfaser [106]

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Stufenindex- als auch Gradientenindexfasern verwendet.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Merck (Darmstadt), Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm) und Sigma (Deisenhofen) in p.A.-Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

#### **Indikatoren und indikatorgebundene Makromoleküle:**

Als Indikatoren für Quecksilber(II)-Ionen wurden die folgenden Porphyrin-Derivate von der Firma Porphyrin Products (Logan, Utah, USA) bezogen:

- 5,10,15,20-meso-Tetra(p-sulfonatophenyl)porphyrin (TPPS)
- 5,10,15,20-meso-Tetra(p-carboxyphenyl)porphyrin (TCPP)
- 7, 12-Bis-(1-hydroxyethyl)-3,8,13,17-tetramethylporphyrin-2,18-dipropionsäure (Haematoporphyrin)

Die folgenden Indikatoren, Dextrane, Indikator-Dextrane und Indikator-Proteine wurden von der Firma Molecular Probes (Eugene, USA) bezogen. In Klammern sind die Molekulargewichte (MG) und Belegungsgrade (BG) der Makromoleküle mit Indikator oder funktionellen Gruppen angegeben. Nach Firmenangaben können die Belegungen der Makromoleküle mit funktionellen Einheiten produktionsbedingt schwanken.

- Aminodextran (MG: 70.000 g/mol; BG: 30 mol Aminogruppen/mol Dextran)
- Calcium Green-1<sup>®</sup>
- Calcium Green-1-Dextran<sup>®</sup> (MG: 70.000 g/mol; 6,4 mol Calcium Green/ mol Dextran)
- Fluorescein-Dextran (MG: 70.000 g/mol; BG: 13,4 mol Fluorescein/mol Dextran)
- Fluorescein-Lactalbumin (MG: 45.000 g/mol; BG: 2,3 mol Fluorescein/mol Dextran)
- Fluorescein-Ovalbumin (MG: 14.500 g/mol; BG: 3,4 mol Fluorescein/mol Dextran)
- Fluorescein-Rinderserumalbumin (-BSA) (MG: 66.000 g/mol; BG: 5,3 mol Fluorescein/mol Dextran)
- Texas Red-Dextran<sup>®</sup> (MG: 70.000 g/mol; 2,9 mol Texas Red /mol Dextran)

Weiterhin wurden verwendet:

- Agarose
- Dextran (MG: 76.000 g/mol)
- Fluorescein (Na-Salz)
- Phosphorpentoxid
- Sulforhodamin 101 (Texas Red)

### **Metall-Standardlösungen:**

Für die Herstellung der kationenhaltigen Beprobungslösungen wurden Standardlösungen für die Spektroskopie (Merck) verwendet. Verdünnungen dieser Standards mit Pufferlösungen wurden täglich neu angesetzt.

- Calciumstandard (AAS): 1000 mg/ml
- Quecksilberstandard (AAS): 1000 mg/ml

Zur Bestimmung der Querempfindlichkeiten der Calcium-sensitiven Schichten wurden Stammlösungen von Natriumchlorid, Kaliumchlorid und Magnesiumnitrat von Suprapur®-Qualität (Merck) in Konzentrationen von 0,1 mol/l verwendet.

### **Pufferlösungen:**

Alle Pufferlösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt; die pH-Werte wurden durch Zugabe von HCl (4 N) bzw. NaOH (4 N) eingestellt.

#### Meßpuffer zur Bestimmung von Quecksilber(II)-Ionen:

- Borsäure (0,11 mol/l), NaOH (0,056 mol/l), HCl (0,044 mol/l), pH = 8

#### Meßpuffer zur Bestimmung von Calcium(II)-Ionen:

- 1,3-bis[tris(Hydroxymethyl)methylamino]propan (Bis-Tris-Propan; 0,02 mol/l), pH = 7
- Calcium-Kontaminationen des Meßpuffers wurden mit Komplexbildnern entfernt:
- a) durch Zusatz von Ethylendiamintetraacetat (EDTA,  $10^{-3}$  mol/l)
  - b) durch Behandlung mit dem Ionenaustauscher-Harz Chelex-100® (Sigma): zu 100 ml Meßpuffer werden 5 g Chelex-100 gegeben und über Nacht im verschlossenen Gefäß geschüttelt, der überstehende Puffer wird abdekantiert; diese Prozedur wird dreimal wiederholt, wobei zwischen jeder Reinigungsstufe der pH-Wert des Puffers kontrolliert werden muß.

#### Meßpuffer zur Bestimmung von pH-Werten:

- Universalpuffer:

13,72 g	Natriumhydroxid
(auf 1 Liter Wasser)	3,54 g Borsäure
	7,00 g Zitronensäuremonohydrat
	2,25 ml ortho-Phosphorsäure (85 %)

Die Synthese von TCPP-Dextran wurde in 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)-Puffer (0,1 mol/l, pH= 6,5) durchgeführt.

Für die Durchführung der Gel-Elektrophorese wurde der sogenannte Tris-Borsäure-EDTA -Puffer (TBE-Puffer, pH=7) verwendet:

- |                  |        |                                    |
|------------------|--------|------------------------------------|
| • TBE-Puffer:    | 5,4 g  | Tris(hydroxymethyl)aminomethan     |
| (auf 1 l Wasser) | 2,72 g | Borsäure                           |
|                  | 0,72 g | Ethylendiamintetraacetat (Na-Salz) |

#### **Kopplungsreagenzien und Lösungsmittel:**

Zur Synthese der Porphyrin-Dextrane wurden die Reagenzien Cyanurchlorid (99 %), Phosphorpentachlorid (98 %) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDAC) eingesetzt. Weiterhin wurden die Lösungsmittel Ethanol (99 %), Methanol (98 %), Pyridin (99 %+ ) und Toluol (99 %) verwendet. Wasserfreies Toluol wurde durch Zusatz von Molekularsieb (Molekularsieb Union, Carbid-Typ 3 Å, Fluka) hergestellt.

#### **Reagenzien für die Herstellung der sensitiven Schichten(Aldrich):**

- Tetramethoxysilan (TMOS)
- $\gamma$ -Aminopropyltrimethoxysilan (APTMOs)
- Triton X-100 (70 mg/ml Methanol)
- Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat (PolyHEMA; 100 und 200 mg/ml in Methanol)

## **4.2 Synthese von Porphyrin-Dextranen**

### **4.2.1 Anbindungsmethoden**

#### **Cyanurchloridmethode [83,107]:**

0,5 g Dextran (MG: 76.000 g/mol; 0,007 mmol), 0,25 g Cyanurchlorid (1,3 mmol) und 0,05 g Haematoporphyrin (0,07 mmol) werden in 20 ml Tetrahydrofuran (THF) aufgeschlämmt und drei Stunden gerührt. Der farbige Niederschlag wird abfiltriert und 5 mal mit 10 ml THF gewaschen.

#### **Säurechloridmethode [87]:**

150 mg TPPS (0,15 mmol) und 640 mg Phosphorpentachlorid (3,1 mmol) werden innig vermischt und eine Stunde lang in einem Rundkolben über einem Ölbad auf 190 °C erhitzt. Nach Abkühlung wird der klumpigen Masse 5 ml wasserfreies Toluol zugesetzt und eine weitere Stunde unter Rückfluß gekocht. Zu dem gelösten TPPS-Säurechlorid werden

150 mg Aminodextran (0,002 mmol) und 2 ml Pyridin zugesetzt und weitere 2 Stunden unter Rückfluß gerührt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand aufgearbeitet (siehe Abschnitt 4.3.2).

#### **Carbodiimidmethode [108]:**

0,2 g TCPP (0,25 mmol), 0,7 g Aminodextran (0,01 mmol) und 0,17 g EDAC (0,89 mmol) werden in 25 ml MES-Puffer (0,1 mol/l MES) bei einem pH-Wert von 6,5 über Nacht gerührt. Durch Zusatz von 50 ml Ethanol entsteht ein dunkelroter Niederschlag, der abfiltriert und nachfolgend gereinigt wird (s.u.).

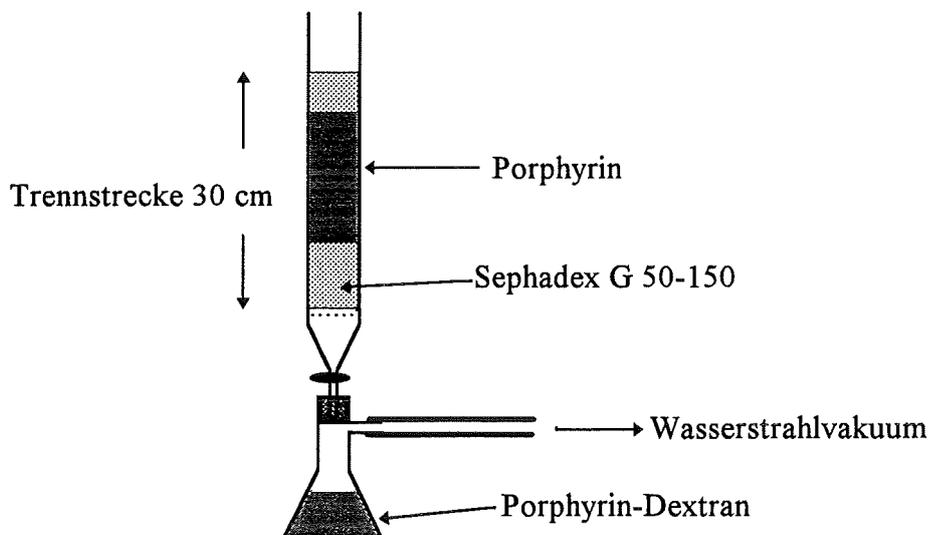
#### **4.2.2 Reinigung der Porphyrin-Dextrane**

##### **Grobreinigung durch Umfällen und Zentrifugation:**

Die Rohprodukte der Porphyrin-Dextran-Synthesen wurden zunächst in 10 ml Wasser gelöst und anschließend mit 100 ml Ethanol versetzt. Es entsteht ein feiner, flockiger Niederschlag, der durch Zentrifugation (Omnifuge-2 ORS, Heraeus Sepatech) abgetrennt wird. Diese Prozedur wird so oft wiederholt (etwa 5 mal), bis die ethanolische Waschlösung farblos wird.

##### **Feinreinigung durch Gel-Filtration:**

25 g Sephadex 50-150<sup>®</sup> werden in 1 Liter Wasser aufgeschlämmt und unter Rühren eine Stunde auf  $T = 90\text{ °C}$  erwärmt. Das gequollene, abgekühlte Gel kann direkt zum Packen der Trennsäule verwendet werden. Die zur Trennung verwendete Säule hat einen Durchmesser von 2 cm und eine Länge von 40 cm. Die Höhe des Gels (Trennstrecke) beträgt etwa 30 cm (siehe Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** *Reinigung von Porphyrin-Dextranen mittels Gel-Filtration*

### **Gel-Elektrophorese:**

0,45 g Agarose werden in 60 ml TBE-Puffer unter Rühren etwa 30 Minuten gekocht, bis eine vollkommen klare Lösung entsteht. Das heiße Gel wird in eine selbst konstruierte Elektrophorese-Kammer eingefüllt (Abmessung des Gel-Betts: Länge 8 cm, Breite 11 cm, Höhe 0,5 cm, Aufbau siehe Abb. 5.8). Während des Erkaltens wird ein spezieller Kamm in das Gel eingetaucht, der im kalten Gel taschenförmige Vertiefungen zurückläßt. Nach dem Erkalten des Gels wird die Kammer mit TBE-Puffer aufgefüllt, so daß das Gel etwa 3 mm mit Puffer überschichtet ist. Anschließend wird die Wasserkühlung, durch die die Elektrophorese-Kammer von unten über einen doppelten Boden gekühlt wird, auf 5 °C eingestellt. Die zu untersuchende Substanz, die auch in TBE-Puffer gelöst sein sollte, wird vorsichtig in eine Vertiefung des Gels pipettiert. Bei Erreichen der Kühltemperatur kann die Elektrophorese durch Einschalten des Netzgerätes (Phero-stab 500, Fa. Biotech-Fischer, Reiskirchen) auf 300 V begonnen werden.

## **4.3 Herstellung der Sensoren**

### **4.3.1 Makrosensoren**

Unter dem Begriff Makrosensoren werden beschichtete, runde Glasträger mit einem Durchmesser von 30 mm und einer Dicke von 1 mm (Fa. Schmid GmbH, Karlsruhe) verstanden. Die Beschichtung erfolgt durch Aufbringen sogenannter Eduktmischungen nach dem Rotationsbeschichtungsverfahren (engl. „spin-coating“, siehe Abschnitt 4.4.1.2)

#### **4.3.1.1 Zusammensetzungen der Eduktmischungen**

In den folgenden Tabellen sind alle verwendeten Eduktmischungen zusammengestellt, wobei die Zusammensetzungen der in Abschnitt 5.2 charakterisierten sensitiven Schichten fett hervorgehoben sind. Alle Indikatoren und Indikator-Dextrane wurden in bidestilliertem Wasser gelöst.

### **Quecksilber-Sensoren:**

Quecksilber-sensitive Schichten wurden durch die Immobilisierung der Porphyrin-Derivate TPPS und TCPP sowie deren eigens synthetisierten Dextran-Verbindungen (siehe Abschnitt 4.2) hergestellt. Die Immobilisierung erfolgte in Silikagel-Matrices, die nach dem Sol-Gel-Prozeß hergestellt wurden.

**Tab. 4.1:** Eduktmischungen zur Herstellung Quecksilber-sensitiver Sol-Gel-Schichten

Indikator: Konzentration:	TPPS 5·10 <sup>-4</sup> mol/l	TPPS-Dextran 7 mg/ml	TCPP 5·10 <sup>-4</sup> mol/l	TCPP-Dextran 2 mg/ml
Indikatorlösung / $\mu$ l	200	<b>300</b>	300	450
TMOS / $\mu$ l	200	<b>300</b>	300	300
Triton -Lösung / $\mu$ l	50	<b>100</b>	100	100
Methanol / $\mu$ l	50	<b>100</b>	100	100
NaOH (0,01 M) / $\mu$ l	100	<b>100</b>	100	100
oder HCl (0,1 M) / $\mu$ l	50	-	-	-
pH des wäßr. Anteils	9,5 bzw. 1,5	<b>8,5</b>	8,5	8,5

#### pH-Sensoren:

pH-sensitive Schichten wurden durch Immobilisierung von Fluorescein und Fluorescein-Dextran in Silikagel-Schichten nach saurer und basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses hergestellt (Tab. 4.2). In analoger Weise wurden auch Protein-Verbindungen von Fluorescein immobilisiert. Weiterhin wurden pH-sensitive PolyHEMA-Filme hergestellt (Tab. 4.3).

**Tab. 4.2:** Eduktmischungen zur Herstellung pH-sensitiver Sol-Gel-Schichten

Indikator: Konzentration:	Fluorescein 10 <sup>-4</sup> M	Fluorescein-Dextran 0,5 mg/ml
Indikatorlösung / $\mu$ l	200	<b>250</b>
TMOS / $\mu$ l	200	<b>300</b>
Triton -Lösung / $\mu$ l	150	<b>150</b>
Methanol / $\mu$ l	300	<b>150</b>
NaOH (0,01 M) / $\mu$ l	100	100
oder HCl (0,1 M) / $\mu$ l	50	<b>50</b>
pH des wäßr. Anteils	9,5 bzw. 2,0	9,5 bzw. <b>2,0</b>

**Tab. 4.3:** Eduktmischung zur Herstellung pH-sensitiver PolyHEMA-Schichten

Indikator Konzentration:	Fluorescein-Dextran 0,5 mg/ml
Indikatorlösung / $\mu$ l	<b>200</b>
PolyHEMA (100 mg/ml) / $\mu$ l	<b>200</b>

### Calcium-Sensoren:

Calcium-sensitive Schichten wurden durch Immobilisierung von Calcium Green-1-Dextran in PolyHEMA-Filmen hergestellt (Tab. 4.4). Die Immobilisierung in Sol-Gel-Filmen wurde in Anlehnung an die Fluorescein-Dextran-dotierten Sol-Gel-Filme durchgeführt. Jedoch zeigten diese Sensoren bei Beprobung mit Ca(II)-Ionen einen sehr geringen Signalhub, so daß auf eine weitere Charakterisierung verzichtet wurde.

**Tab. 4.4:** *Eduktmischung zur Herstellung Calcium-sensitiver PolyHEMA-Schichten*

Indikator: Konzentration:	Calcium Green-1-Dextran 1 mg/ml
Indikatorlösung / $\mu$ l	100
PolyHEMA (100 mg/ml) / $\mu$ l	100
Methanol / $\mu$ l	50

### Calcium-Sensoren mit interner Referenz:

Durch Coimmobilisierung von Calcium Green-1-Dextran und Texas Red-Dextran wurden Calcium-Sensoren mit interner Referenz hergestellt (Tab. 4.5).

**Tab. 4.5:** *Coimmobilisierung von Calcium Green-1- und Texas Red-Dextran*

Indikator (Konzentration): interne Referenz (Konz.):	Calcium Green-1-Dextran (2 mg/ml) Texas Red-Dextran (10 mg/ml)
Indikatorlösung / $\mu$ l	50
interne Referenz-Lsg. / $\mu$ l	50
PolyHEMA (100 mg/ml) / $\mu$ l	50
Methanol / $\mu$ l	50

#### 4.3.1.2 Vorbehandlung der Glasträger

##### a) Reinigung (bei Beschichtung mit Sol-Gel-Filmen):

Die runden Glasträger ( $\varnothing$  30 mm, Dicke 1 mm) werden durch Reinigung mit Aceton, 24stündiges Einlegen in 30%ige HNO<sub>3</sub> und mehrfaches Spülen mit entionisiertem Wasser vorbehandelt.

#### **b) Silanisierung (bei Beschichtung mit PolyHEMA-Filmen):**

Vor der Beschichtung mit PolyHEMA müssen die Glaträger zur Verbesserung der Haftung des Polymers silanisiert werden. Dazu werden Glaträger verwendet, die wie unter a) beschrieben vorbehandelt sind. Die Silanisierung wird in einem rohrförmigen Reaktionsgefäß (Länge 15 cm,  $\varnothing$  4,5 cm) mit seitlichem Hahn und Rückflußkühlung durchgeführt. Für die Glaträger wurde eine spezielle Halterung aus Edelstahl angefertigt, mit der sich 10 Glasscheiben gleichzeitig silanisieren ließen. Die Silanisierung erfolgt in zwei Stufen.

##### 1. Stufe: Silanisierung mit TMOS

Die Glasscheiben werden unter  $N_2$ -Atmosphäre mit 50 ml einer Lösung von 10Vol.% TMOS in wasserfreiem Toluol überschichtet und 2 Stunden unter Rückfluß (Temperatur des Ölbad 120°C) erwärmt. Anschließend werden sie mit etwa 100 ml Toluol gewaschen.

##### 2. Stufe: Silanisierung mit APTMOS

Die Silanisierung wird analog zu 1. Stufe mit einer 10%igen APTMOS-Lösung durchgeführt. Die silanisierten Glasscheiben werden zunächst mit 100 ml Toluol und anschließend mit viel entionisiertem Wasser gewaschen und im Trockenofen bei 110 °C getrocknet.

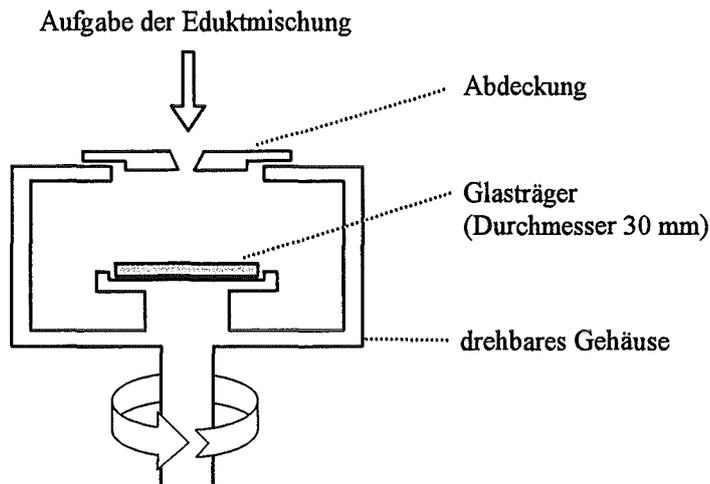
#### **4.3.1.3 Beschichtung der Glaträger**

##### **a) Herstellung von Silikagel-Filmen nach dem Sol-Gel-Prozeß:**

150 bis 200  $\mu$ l der Eduktmischung (Sol) werden nach einer Vorvernetzungszeit von 10 min (bei basischer Katalyse) bzw. 30 min (bei saurer Katalyse) auf die ruhende Sensorscheibe, die sich in einem Adapter einer Zentrifuge befindet, aufgegeben und gleichmäßig verteilt. Die überstehende Lösung wird durch Zentrifugation (Dauer 30 s, Rotationsgeschwindigkeit 2000 U/min) abgeschleudert. Dieses Verfahren wird Rotationsbeschichtungsverfahren (engl. „spin-coating“) genannt und ist in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt. Die Schichten werden eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend zwei Tage im Trockenofen bei 40 °C getrocknet. Vor der Messung werden die sensitiven Schichten einen Tag in Meßpuffer eingelegt (Vorkonditionierung).

##### **b) Herstellung von PolyHEMA-Filmen:**

150-200  $\mu$ l der jeweiligen Eduktmischungen werden wie unter a) beschrieben auf die ruhende, silanisierte Glasscheibe aufgegeben und verteilt. Die überstehende Lösung wird bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 1000 U/min abgeschleudert (Dauer 30 s). Die Schichten werden etwa eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und einen Tag in Meßpuffer eingelegt.



**Abb. 4.2:** *Sensorbeschichtung nach dem Spin-Coating-Verfahren*

#### 4.3.2 Mikro- und Nanosensoren

Bei Mikro- und Nanosensoren werden Stirnflächen optischer Lichtwellenleiter mit indikatorhaltigen Eduktmischungen beschichtet. Es wurden Calcium-sensitive Sensoren mit interner Referenz durch Coimmobilisierung von Calcium Green-1- und Texas Red-Dextran hergestellt. Der Farbstoffgehalt der Eduktmischungen bezogen auf PolyHEMA wurde im Vergleich zu den Makrosensoren (Tab. 4.5) um das 2,5fache erhöht (siehe Tab. 4.6).

##### a) Mikrosensoren:

Es wurden zwei verschiedene optische Fasern aus Quarz verwendet, eine Stufenindexfaser mit einem Kerndurchmesser von 600  $\mu\text{m}$  (Typ: HCP-MO 600T-08; Durchmesser Kern/Mantel/Schutzhülle: 600/630/1040  $\mu\text{m}$ ; Fa. Laser Components, Olching) und 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). Die Beschichtung erfolgte durch dreimaliges Eintauchen und Herausziehen der Faserenden (engl. „dip-coating“) in die Eduktmischung (Tab.4.6), wobei zwischen jedem Eintauchen 10 min gewartet wurde.

##### b) Nanosensoren:

Ein 50 cm langes Stück der Gradientenindexfaser mit 50  $\mu\text{m}$  Kerndurchmesser wird in der Mitte auf einem Stück von etwa 8 cm von der Schutzhülle befreit. Das freigelegte Stück der Faser wird in ein Faserziehgerät mit Filamentheizung (Flame/Brown Micropipette

Puller, Modell P-87; Fa. Sutter Instrument Co., USA) eingespannt und bei maximaler Heizleistung zur Spitze ausgezogen. Die Faserspitze wird wie die Mikrosensoren mit der indikatorhaltigen Polymerlösung (Tab. 4.6) beschichtet.

**Tab. 4.6:** *Eduktmischung für Mikro- und Nanosensoren*

Indikator (Konzentration): interne Referenz (Konz.):	Calcium Green-1-Dextran (10 mg/ml) Texas Red-Dextran (50 mg/ml)
Indikatorlösung / $\mu$ l	50
interne Referenz-Lsg. / $\mu$ l	50
PolyHEMA (100 mg/ml) / $\mu$ l	100

### 4.3.3 Physikalische Charakterisierung der Sensoren

#### **Rasterelektronenmikroskopie:**

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

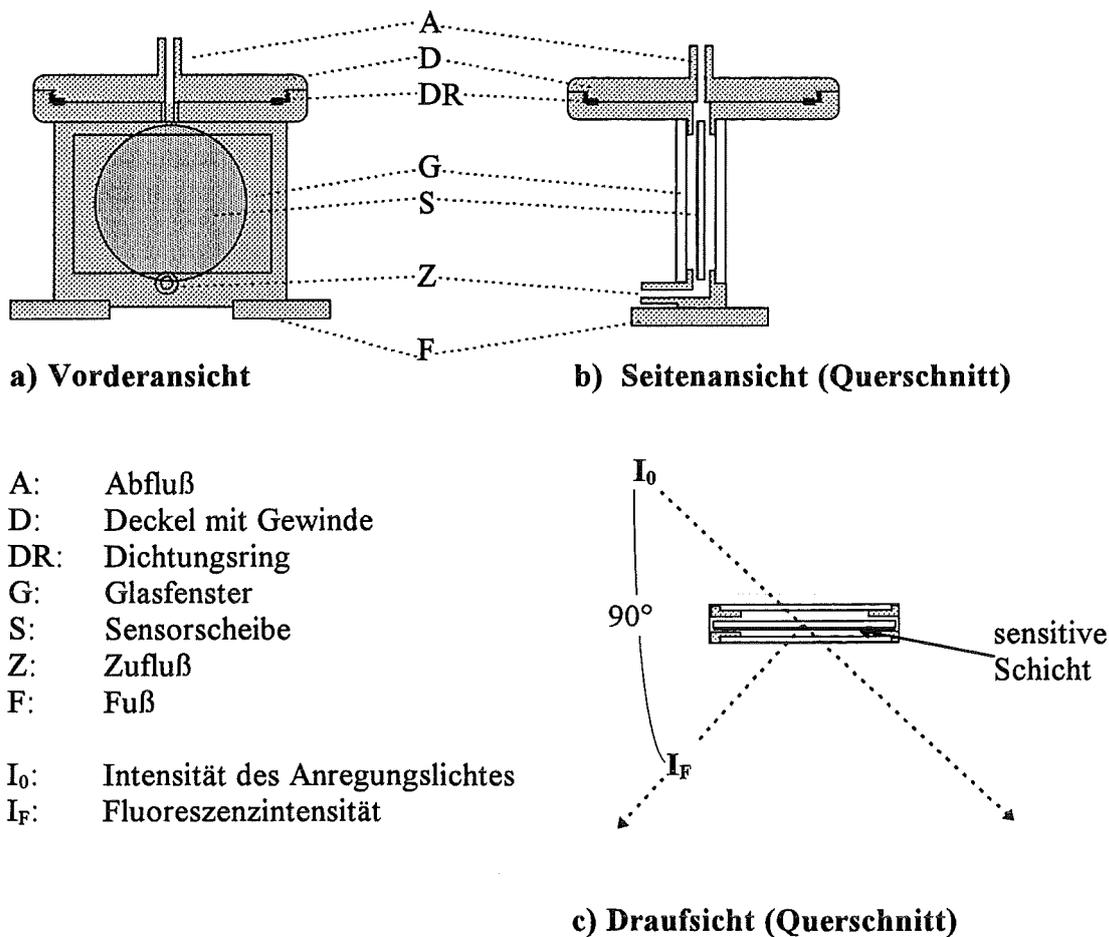
#### **Profilometrie:**

Zur Bestimmung der Oberflächenbeschaffenheiten und Schichtdicken der Beschichtungen stand ein Tastschnittgerät der Firma Tencor Instruments vom Typ P-2 zur Verfügung.

## 4.4 Meßanordnungen

### 4.4.1 Makrosensoren

Die Untersuchungen mit den Makrosensoren wurden in einem Fluorimeter der Firma Shimadzu vom Typ RF 5001 PC durchgeführt. Zur Beprobung der Sensoren wurde eine Durchflußzelle aus Plexiglas konstruiert. Durch einen verschraubbaren Deckel konnten die Sensoren in einfacher Weise von oben gewechselt werden (Abbildung 4.3). Das gesamte Innenvolumen der Durchflußvorrichtung (inklusive Schlauchzu- und abführungen) beträgt 4,5 ml.



**Abb. 4.3:** *Aufbau der Durchflußzelle (a-c) und Geometrie der Meßanordnung (c)*

Zur Reduzierung von Fremdlicht wird die Durchflußzelle so im Meßraum des Fluorimeters positioniert, daß zwischen der Richtung des Anregungslichtes ( $I_0$ ) und dem Detektor, der die Fluoreszenzintensität ( $I_F$ ) mißt, ein Winkel von  $90^\circ$  liegt (Abb. 4.3 c).

Die wichtigsten experimentellen Daten zu den Messungen mit den Sensoren sind bei den jeweiligen Abbildungen aufgeführt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt; Temperaturschwankungen während einer Meßreihe waren  $< 1^\circ\text{C}$ . Während der Messungen wurde mit einer Schlauchpumpe (Modell M 312, Fa. Gilson, Villier le Bel, Frankreich) eine Durchflußrate von 6 ml/min eingestellt. Beim Probenwechsel wurde die Durchflußzelle leergespült und anschließend mit der neuen Probelösung gefüllt, wodurch kurze Austauschzeiten erreicht werden konnten. Bei den Stabilitätsuntersuchungen der Makrosensoren wurde als Korrektur gegen Streuung von den gemessenen Intensitäten jeweils ein Nullwert der Meßanordnung (Spektrum einer Glasscheibe in der Durchflußzelle) abgezogen.

#### 4.4.2 Mikro- und Nanosensoren (Sondengeometrie)

Durch Verwendung von Y-förmigen Lichtleiteranordnungen wurden faseroptische Sensoren in der sogenannten Sondengeometrie aufgebaut (Abbildung 4.4). Die sensitive Schicht (S) ist am Ende einer optischen Faser (Faserstamm, FS) angebracht. Es wurden Fasern mit Kerndurchmessern von 600  $\mu\text{m}$  oder 50  $\mu\text{m}$  (Mikrosensoren) sowie verjüngte Faserspitzen mit einem Durchmesser von etwa 300 nm (Nanosensor) verwendet (siehe Abschnitt 4.3.2). Als Lichtquelle wird ein Nd:YAG-Laser (Modell DTL 166 Q; Fa. Laser 2000, Weßling) mit der Wellenlänge  $\lambda = 473 \text{ nm}$  und einer mittleren Leistung von 7 mW eingesetzt, die nach Bedarf mit Neutralglasfiltern (NG; Neutralglasfilter NG 9 der Fa. Schott, Mainz) abgeschwächt werden kann. Als Detektionseinheit wird ein Optischer Multikanal-Analysator (abgekürzt „OMA“; Modell SI 160; Fa. Spectroscopy Instruments GmbH, Gilching) verwendet. Zur Reduzierung des thermisch bedingten Dunkelstroms der Photodioden wird die Diodenzeile durch eingebaute Peltier-Elemente (auf ca.  $-30^\circ\text{C}$ ) gekühlt. Die entstehende Abwärme wird durch einen Thermostaten ( $T \approx 15^\circ\text{C}$ ; Modell F-20, Fa. Julabo) abgeführt; in das gekühlte Gehäuse wird gleichzeitig trockener Stickstoff eingeblasen (100 ml/min), um die Ausbildung von Kondenswasser zu verhindern.

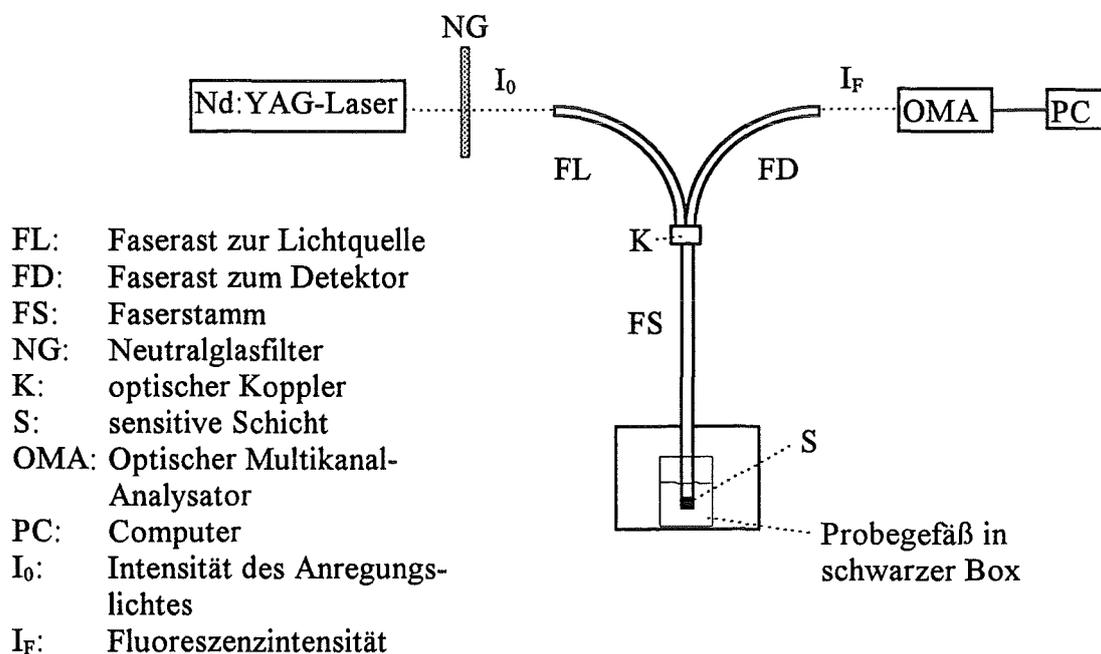
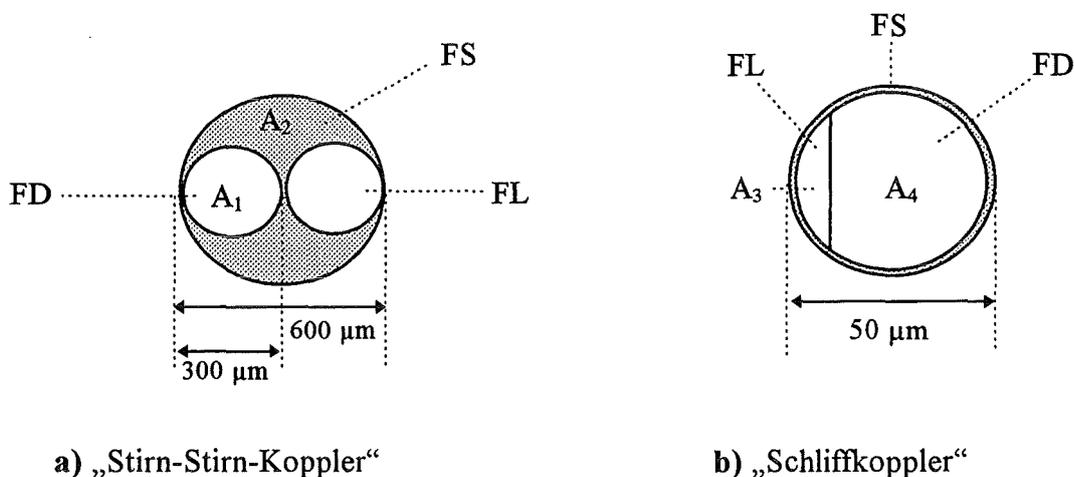


Abb. 4.4: Messanordnung der Mikro- und Nanosensoren (Sondengeometrie)

Die Kopplung der beiden Faseräste (FL und FD in Abb. 4.4) auf den Faserstamm (FS) erfolgt in einem optischen Koppler. Bei der 600  $\mu\text{m}$ -Stufenindexfaser werden die beiden Faseräste, die jeweils über einen Kerndurchmesser von 300  $\mu\text{m}$  verfügen, durch „Stirn-Stirn-Kopplung“ an den 600  $\mu\text{m}$  dicken Faserstamm gekoppelt (BTO Hybridkupplung, Fa. Laser Components, Olching). Durch die Verhältnisse der beiden Flächen  $A_1$  und  $A_2$  in Abbildung 4.5 a ergibt sich in diesem Koppler für das Fluoreszenzlicht, das vom Faserstamm (FS) auf den Faserast zum Detektor (FD) geleitet werden soll, ein Lichtverlust von etwa 75 %.

Bei der 50  $\mu\text{m}$ -Gradientenindexfaser haben Faseräste und Faserstamm die gleichen Durchmesser und sind über einen sogenannten „Schliffkoppler“ (Multimodeschliffkoppler 10/90, Prod. Nr. CA 125.30.12.11, Fa. Laser Components, Olching) mit dem Faserstamm verbunden. Optische Koppler dieses Typs verfügen über geringe Lichtverluste und über ein genaues Koppelverhältnis. Es wurde ein Koppler mit dem Koppelverhältnis 10/90 verwendet und so im optischen Aufbau integriert, daß der Faserast zur Lichtquelle mit 10 % und der zur Detektionseinheit mit 90 % gewichtet wurde (vereinfachter Aufbau siehe Abb. 4.5 b). Durch die geometrischen Verhältnisse in diesem Koppler (Flächenverhältnis  $A_3/A_4 = 10/90$ ) liegen die Verluste für das Fluoreszenzlicht, das vom Faserstamm auf den Faserast zur Detektionseinheit geleitet werden soll, bei etwa 10 %.



**Abb. 4.5:** Vereinfachter Aufbau eines „Stirn-Stirn-Kopplers“ (a) und eines „Schliffkopplers“ (b)

(Erklärung: a) Kopplung zweier 300  $\mu\text{m}$ -Fasern auf eine 600  $\mu\text{m}$ -Faser:  $A_1$ : Querschnittsfläche des 300  $\mu\text{m}$ -Faserastes,  $A_2$ : Querschnittsfläche des 600  $\mu\text{m}$ -Faserstamms; b) Kopplung zweier 50  $\mu\text{m}$ -Fasern auf eine 50  $\mu\text{m}$ -Faser:  $A_3$ : Querschnittsfläche des angeschliffenen 50  $\mu\text{m}$ -Faserastes zur Lichtquelle,  $A_4$ : Querschnittsfläche des angeschliffenen 50  $\mu\text{m}$ -Faserastes zum Detektor; Flächenverhältnis  $A_3/A_4 = 10/90$ ; Abkürzungen: FS = Faserstamm, FD = Faserast zum Detektor, FL = Faserast zur Lichtquelle)

## 4.5 Kurvenanpassungen

Bei den Kalibrationen in Abschnitt 5.2 wurden rechnerische Kurvenanpassungen mit dem Computerprogramm GraFIT<sup>®</sup> Version 3.03 (Erithacus Software Ltd, Stanes, U.K. 1990) durchgeführt. Das Programm verwendet je nach Komplexstöchiometrie (Analyt (A) : Indikator (I)) für die Anpassung die folgenden Gleichungen, deren Herleitungen und Randbedingungen der Literatur über Bindungskonstanten zu entnehmen sind [109].

### Komplexstöchiometrie A : I = 1:1

$$(4.1) \quad S(c_A) = \frac{S_{\max}}{1 + K_D/c_A}$$

Eingaben:

$S(c_A)$  Signal  
 $c_A$  Analytkonzentration

Parameter der Anpassung:

$S_{\max}$  maximales Signal  
 $K_D$  fluorimetrisch bestimmte  
Dissoziationskonstante

### Komplexstöchiometrie A : I = 2:1

$$(4.2) \quad S(c_A) = \frac{S_{\max 1}}{1 + K_{D1}/c_A} + \frac{S_{\max 2}}{1 + K_{D2}/c_A}$$

Eingaben:  $S(c_A)$

$c_A$   
Parameter:  $S_{\max 1}, S_{\max 2}$   
 $K_{D1}, K_{D2}$

### Abweichung von der idealen Stöchiometrie

Zeigt der Kurvenverlauf der Anpassung eine Abweichung von der idealen 1:1-Stöchiometrie, so kann dies durch einen Anpassungsfaktor (s) berücksichtigt werden.

$$(4.3) \quad S(c_A) = \frac{S_{\max}}{1 + (K_D/c_A)^s}$$

Eingaben:  $S(c_A)$

$c_A$   
Parameter:  $S_{\max}$   
 $K_D$   
s

Als Signalwerte  $S(c_A)$  wurden die Intensitätsdifferenzen  $\Delta I$  zwischen dem mit Analytlösung beprobten und dem regenerierten Sensor eingegeben.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Entwicklung einer Immobilisierungsmethode zur Verbesserung der Stabilität optochemischer Sensoren

#### 5.1.1 Zielsetzung

Die Stabilität von ionensensitiven, optochemischen Sensoren wird überwiegend von der Art der Immobilisierung des Rezeptormoleküls bestimmt (vgl. Abschnitt 3.3.1). Erfolgt die Immobilisierung durch einfache Einkapselung des Indikators in einer Polymermembran, so können die Moleküle aus der Matrix durch Diffusion ausgetragen werden, wodurch die Stabilität der sensitiven Schichten begrenzt wird. Das Auswaschen der Indikatormoleküle aus dem Porennetzwerk der Matrix sollte sich durch kovalente Anbindung an geeignete Makromoleküle erheblich einschränken lassen. Dies soll gewissermaßen zu einer Verankerung des Indikators in der Matrix führen, was in Abbildung 5.1 veranschaulicht ist.

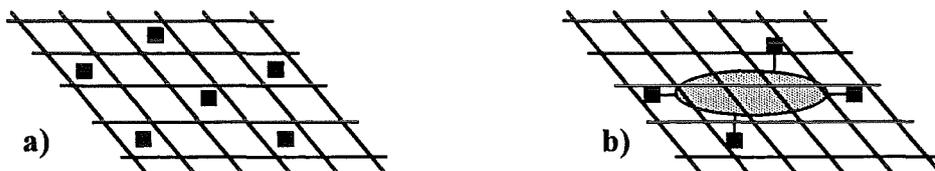


Abb. 5.1: Immobilisierung eines Farbstoffs (■) (a) und von farbstoffgebundenen Makromolekülen (⊕) (b)

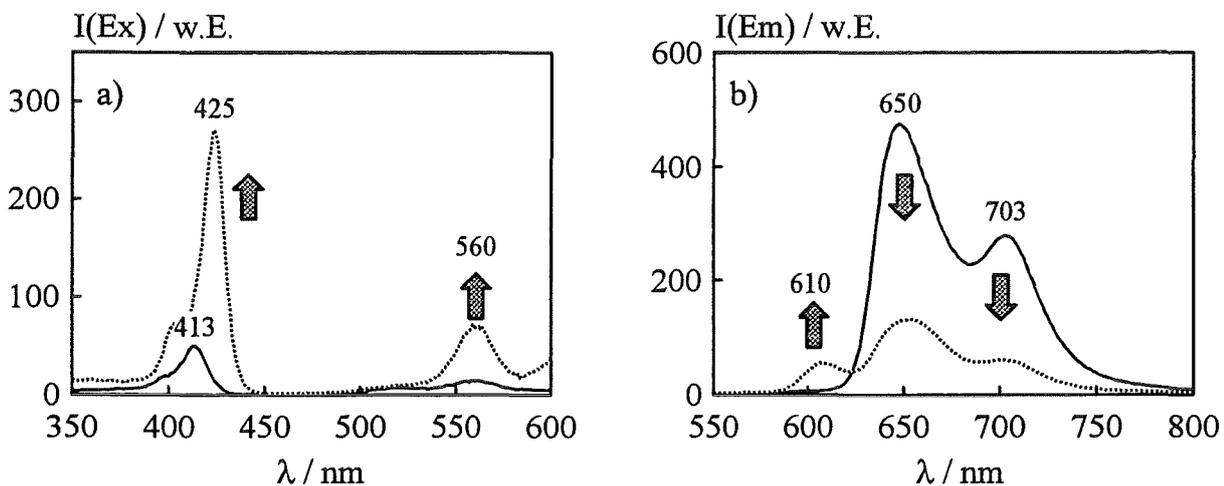
Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Umsetzung dieser Idee zur Verbesserung der Stabilität von chemisch-sensitiven Schichten. Die Untersuchungen werden exemplarisch an kommerziell erhältlichen, makromolekular gebundenen Fluorescein-Derivaten und an eigens synthetisierten Porphyrin-Dextranen durchgeführt. Porphyrine dienen dabei als Indikatoren für zweiwertige Quecksilberionen. Die Immobilisierung erfolgt in Silikagel-Schichten, die nach dem Sol-Gel-Prozeß hergestellt werden.

Ziel der Untersuchungen soll eine Immobilisierungsmethode sein, die es erlaubt, sensitive Schichten mit Stabilitäten von mehreren Wochen herzustellen. Weiterhin soll eine Übertragbarkeit der Methode auf andere Analyt-Rezeptor-Paare gewährleistet sein.

## 5.1.2 Immobilisierung von monomeren Indikatoren in Silikagel-Schichten

### 5.1.2.1 Fluorimetrische Bestimmungsmethode von Quecksilber(II)-Ionen mit meso-Tetrasulfonatophenylporphyrin (TPPS) in wässriger Lösung

Mit dem Porphyrin-Derivat TPPS als Indikator wurde eine empfindliche fluorimetrische Nachweismethode zur Bestimmung von Quecksilber(II)-Ionen in wässrigen Lösungen entwickelt [54]. Die spektralen Änderungen des Indikators bei der Komplexbildung mit Hg(II)-Ionen sind in Abbildung 5.2 in Form von Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenz-emissionsspektren dargestellt. Mit den Meßwellenlängen  $\lambda_{\text{Ex}} = 560 \text{ nm}$  für die Anregung und  $\lambda_{\text{Em}} = 610 \text{ nm}$  für die Emission wurde eine fluorimetrische Bestimmungsmethode für Hg(II)-Ionen in wässrigen Lösungen entwickelt, für die in Tabelle 5.1 die optimierten Meßbedingungen zusammengefaßt sind.



**Abb. 5.2:** Anregungsspektren (a) und Emissionsspektren (b) des Systems Hg(II)-TPPS (Experimentelle Daten: a)  $\lambda_{\text{Em}} = 610 \text{ nm}$ , b)  $\lambda_{\text{Ex}} = 560 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{TPPS}} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ ; durchgezogene Linie  $c_{\text{Hg(II)}} = 0$ , gepunktete Linie  $c_{\text{Hg(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; Borat Puffer, pH=8; Angabe  $\uparrow/\downarrow$ : Erhöhung bzw. Erniedrigung der Fluoreszenz bei der Zugabe von Hg(II)-Ionen)

**Tab. 5.1:** Fluorimetrische Bestimmung von Hg(II)-Ionen mit TPPS [54]

Parameter	Spezifikation
Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}}$	560 nm
Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{Em}}$	610 nm
Puffersystem	Borat (0,1 mol/l)
optimaler pH-Wert	8
Nachweisgrenze <sup>a)</sup>	$7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$
Querempfindlichkeiten	v. a. Cd, Pb, Zn, Cu

a) nach Kaiser [110]

Ausgehend von dieser Bestimmungsmethode soll versucht werden, durch Immobilisierung von TPPS in Sol-Gel-Schichten Quecksilber-sensitive Filme herzustellen.

### **5.1.2.2 Herstellung und physikalische Charakterisierung von Silikagel-Schichten**

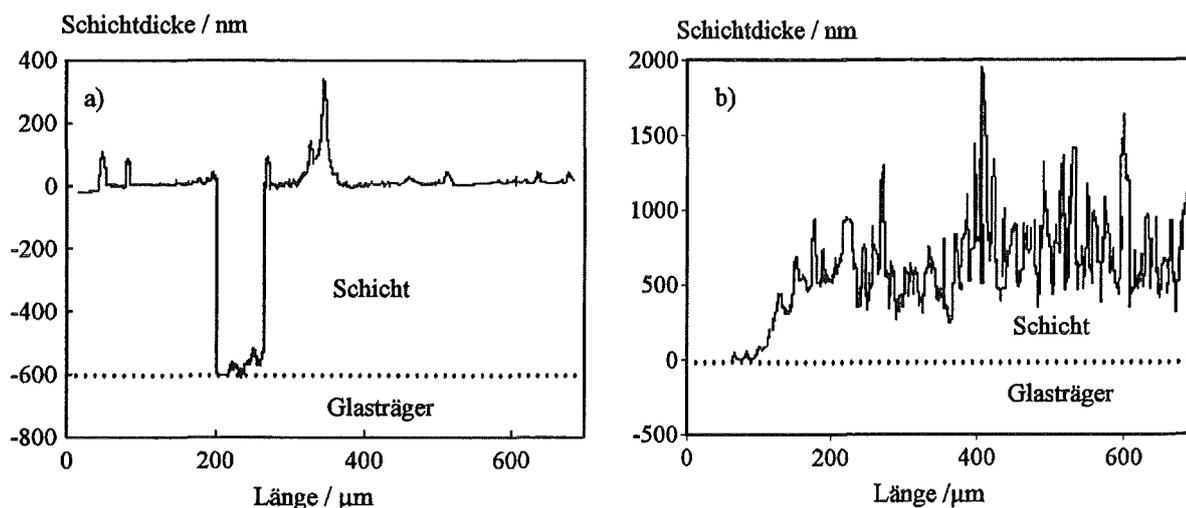
Der Sol-Gel-Prozeß wird durch eine Vielzahl von Parametern wie Zusammensetzung des Sols, Alterungsprozesse des Sols, Trocknungsparameter und thermische Nachbehandlung beeinflusst. Wie in Abschnitt 3.3.2 ausgeführt ist, wird die Struktur der Silikagele besonders durch die Art der Katalyse (sauer oder basisch) sowie die Konzentration des Katalysators bestimmt [97]. Die mechanische Stabilität und die Porosität der Gele kann durch den Zusatz von Hilfsstoffen für die Trocknung (engl. „drying control chemical additive“, DCCA) und für die Herabsetzung der Oberflächenspannung (engl. „surface active agent“, SAA) gesteuert werden [98,99].

In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine Grund-Zusammensetzung des Sols von etwa 1/3 Silan-Anteil, 1/3 wäßriger Farbstofflösung und 1/3 methanolischem Anteil gewählt (genaue Zusammensetzung siehe Abschnitt 4.3.1.1). Zur Verbesserung der Benetzungseigenschaften des Sols wurde als oberflächenaktive Substanz Triton X-100 zugesetzt. Der pH-Wert des wäßrigen Anteils des Sols wurde durch den Zusatz von HCl bzw. NaOH auf pH=1,5 für saure Katalyse und auf pH = 9,5 für basische Katalyse eingestellt. Die Präparation der sensitiven Schichten erfolgt nach dem in Abschnitt 4.3.1.3 beschriebenen Rotationsbeschichtungs-Verfahren („Spin-Coating“, siehe Abb. 4.2).

Die Oberflächenbeschaffenheit der Xerogel-Filme wurde mit einem Tastschnittgerät charakterisiert. Neben der Morphologie der Schichten läßt sich mit dieser Methode auch die Schichtdicke ermitteln, indem ein möglichst scharfer Übergang zwischen Trägermaterial und Schicht abgetastet wird. In Abbildung 5.3 sind die Oberflächenprofile und Schichtdicken von Silikagel-Filmen dargestellt, die nach saurer und basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses hergestellt wurden. Der Übergang zwischen dem Glasträger und der Xerogel-Schicht wurde im vorliegenden Fall durch Einritzen der Schicht mit einem Skalpell (Abb. 5.3 (a)) bzw. durch Abkratzen der Schicht (Abb. 5.3 (b)) erreicht.

Der Einfluß der beiden Katalysearten auf die Beschaffenheit der Schichten wird in Abbildung 5.3 deutlich sichtbar. Bei saurer Katalyse entstehen relativ glatte, geschlossene Schichten mit einer mittleren Schichtdicke von  $600 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ . Dagegen werden bei basischer Katalyse sehr raue Schichten mit einer mittleren Schichtdicke von  $650 \text{ nm} \pm 250 \text{ nm}$  erhalten.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Vorgängen bei der Gelierung des Sols (vgl. Abschnitt 3.3.2). Bei saurer Katalyse entstehen demnach lineare Polymerketten, die beim Trocknen zu einem mikroporösen Netzwerk verdichtet werden. Unter basischer Katalyse entstehen dagegen partikelförmige Systeme, die sich zu mesoporösen Strukturen zusammenlagern [97].



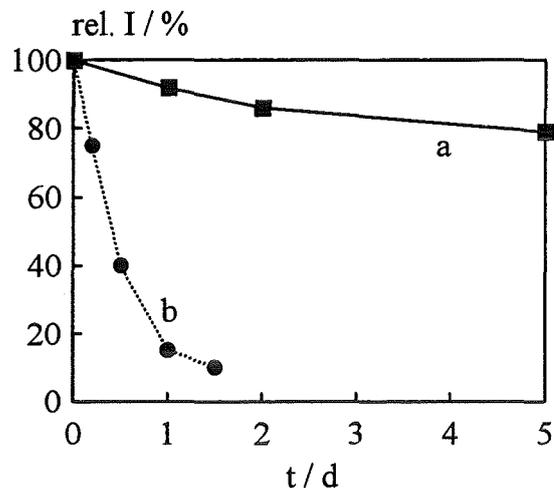
**Abb. 5.3:** Oberflächenprofile und Schichtdicken von Xerogel-Schichten: *a) saure Katalyse, b) basische Katalyse des Sol-Gel-Prozesses*

### 5.1.2.3 Stabilität und Ansprechverhalten von Porphyrin-dotierten Silikagel-Schichten

Zur Bestimmung der Stabilität von optochemischen Sensoren gibt es in der Literatur keine einheitliche Vorschrift, weshalb für die vorliegende Arbeit ein eigenes Stabilitätskriterium festgelegt wurde. Demnach werden die Sensoren in Meßpuffer bei Tageslicht und Raumtemperatur gelagert (sogenannte Lagerstabilität); in regelmäßigen Abständen wird durch Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren der relative Farbstoffgehalt der Schicht als Maß für die Stabilität ermittelt.

Die Stabilität der TPPS-dotierten Filme wurde mit dem Wellenlängenpaar  $\lambda_{EX} = 413 \text{ nm}$  als Anregungswellenlänge und  $\lambda_{EM} = 650 \text{ nm}$  als Emissionswellenlänge bestimmt. Wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist, unterscheiden sich Schichten, die nach saurer oder basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses hergestellt wurden, beträchtlich in ihren Stabilitäten. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Farbstoff in sauer vernetzten Schichten wesentlich stabiler eingebunden ist als in basisch vernetzten Schichten. Nach einem Tag Lagerung in

Pufferlösung (Borat pH=8) weist eine sauer vernetzte Schicht immerhin noch über 90 % ihrer ursprünglichen Fluoreszenzintensität auf, während bei basisch vernetzten Schichten nur noch 15 % der Anfangsintensität vorliegen.

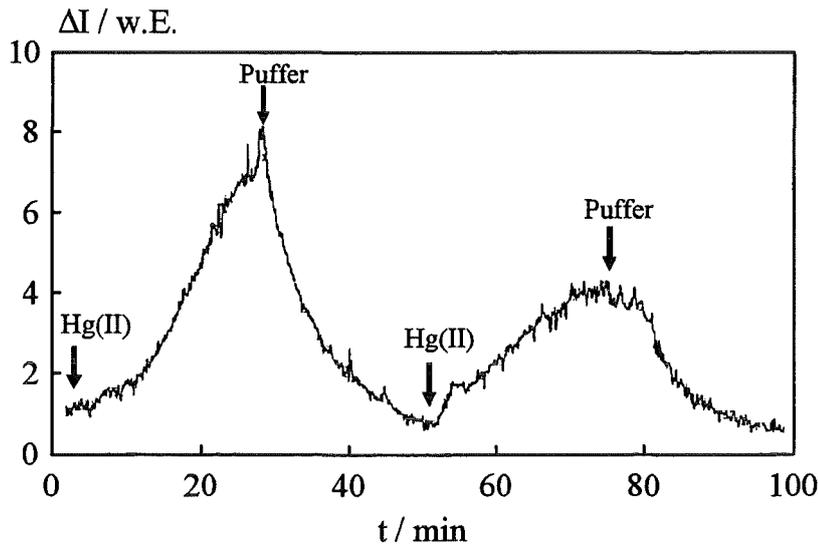


**Abb. 5.4:** *Stabilität von sauer (a) und basisch (b) vernetzten, TPPS-dotierten Silikagel-Filmen* (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{EX}} = 413 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 650 \text{ nm}$ , Borat Puffer, pH = 8)

Die Art der Katalyse beeinflusst nicht nur die Stabilität der Schichten, sondern auch das Ansprechverhalten auf Hg(II)-Ionen in erheblichem Maße. Die stabileren, sauer vernetzten Schichten zeigen auch bei der Beprobung mit hohen Konzentrationen an Hg(II)-Ionen ( $c_{\text{Hg(II)}} = 10^{-4} \text{ mol/l}$ ) keine spektralen Änderungen an den Nachweisbanden für Hg(II)-Ionen ( $\lambda_{\text{EX}} = 425 \text{ nm}$  oder  $560 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{EM}} = 610 \text{ nm}$ ).

Dagegen zeigen Schichten, die nach basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses hergestellt wurden, ein Ansprechverhalten auf Hg(II)-Ionen. In Abbildung 5.5 ist der zeitliche Verlauf der Signale während zweier Beprobungen mit Hg(II)-haltigen Pufferlösungen ( $c_{\text{Hg(II)}} = 10^{-7} \text{ M}$ ) und Regenerierungen mit reinen Pufferlösungen (Borat, pH=8) dargestellt. Zunächst ist festzustellen, daß die Schichten sehr empfindlich und reversibel auf Hg(II)-Ionen reagieren. Es zeigt sich jedoch, daß bei der zweiten Beprobung des Sensors (rechter Teil von Abb. 5.5) nur noch etwa die Hälfte des ersten Signals erreicht wird.

Für diese begrenzte Stabilität der durch basische Katalyse hergestellten Sol-Gel-Filme können Farbstoffaustrag und Auflösungserscheinungen der Schicht verantwortlich sein. Zur Differenzierung zwischen diesen beiden Faktoren wurden die Schichtdicken des Sensors vor und nach 24stündiger Beprobung in der Durchflußzelle mittels Profilometrie bestimmt. Dabei wurde eine Abnahme der Schichtdicke von etwa 100-150 nm festgestellt, was etwa einem 20%igen Schichtabtrag entspricht.



**Abb. 5.5:** Ansprechverhalten von TPPS-dotierten, basisch vernetzten Silikagel-Filmen auf Hg(II)-Ionen (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX} = 425 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{EM} = 610 \text{ nm}$ ,  $c_{Hg(II)} = 10^{-7} \text{ M}$ , Borat-Puffer, pH= 8)

#### 5.1.2.4 Interpretation der Ergebnisse

Bei der Immobilisierung des Quecksilber-sensitiven Indikators TPPS in Silikagel-Filmen, die nach dem Sol-Gel-Prozess hergestellt wurden, wurden erhebliche Unterschiede bezüglich der Stabilität und der Sensitivität der Schichten in Abhängigkeit von der Katalyse bei der Schichtpräparation festgestellt. Dieses Verhalten läßt sich durch unterschiedliche Strukturen der Sol-Gel-Schichten erklären (Abschnitt 3.3.2).

Bei saurer Katalyse entstehen geschlossene Schichten mit mikroporöser Struktur ( $d_p < 2 \text{ nm}$ ) [97,111]. In dieser Umgebung werden die Farbstoffmoleküle so fest eingebunden, daß zwar einerseits der Farbstoffaustrag relativ gering ist, aber andererseits auch keine Komplexbildung mit dem Analyten stattfindet. Schichten, die durch basische Katalyse hergestellt werden, weisen dagegen eine mesoporöse Struktur auf ( $2 \text{ nm} < d_p < 50 \text{ nm}$ ), die sich aus quervernetzten Partikeln zusammensetzt [97]. Durch die mesoporöse Struktur (typische mittlere Porendurchmesser liegen zwischen 5 und 13 nm [36,97]) wird zwar das Ansprechverhalten der Schichten auf Hg(II)-Ionen ermöglicht, aber auch der Farbstoffaustrag beschleunigt.

Es wurde somit gezeigt, daß durch einfache Einkapselung der Porphyrinmoleküle in mesoporösen Silikagel-Schichten keine stabilen und zugleich sensitiven Schichten erhalten werden können.

### 5.1.3 Immobilisierung von makromolekular gebundenen Indikatoren

#### 5.1.3.1 Voruntersuchungen mit makromolekular gebundenen Fluorescein-Derivaten

In den vorangegangenen Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß bei der Immobilisierung von Porphyrin-Molekülen in mesoporösen Silikagel-Filmen zwar sensitive Schichten entstehen, deren Stabilität aber durch Farbstoffaustrag stark begrenzt ist. Mit einem neuen Immobilisierungsansatz wurde daher versucht, die Diffusion des Indikators aus der Matrix durch eine Anbindung an ein Makromolekül zu reduzieren (vgl. Abb. 5.1) [54,112].

Eine wesentliche Voraussetzung für die Auswahl geeigneter Makromoleküle ist deren Löslichkeit in der Eduktmischung (Sol) des Sol-Gel-Prozesses, was auf bestimmte Polysaccharide und Polypeptide zutrifft. Für eine Immobilisierung wurden deshalb kommerziell erhältliche Fluorescein-Dextrane und Fluorescein-Polypeptide ausgewählt, die für die Zellbiologie als Markierungssubstanzen bzw. Indikatoren zur Bestimmung von intrazellulären pH-Werten entwickelt wurden [73]. Die Molekulargewichte (MG) und Farbstoff-Belegungsgrade (BG) dieser Verbindungen sind in Tabelle 5.2 zusammengefaßt.

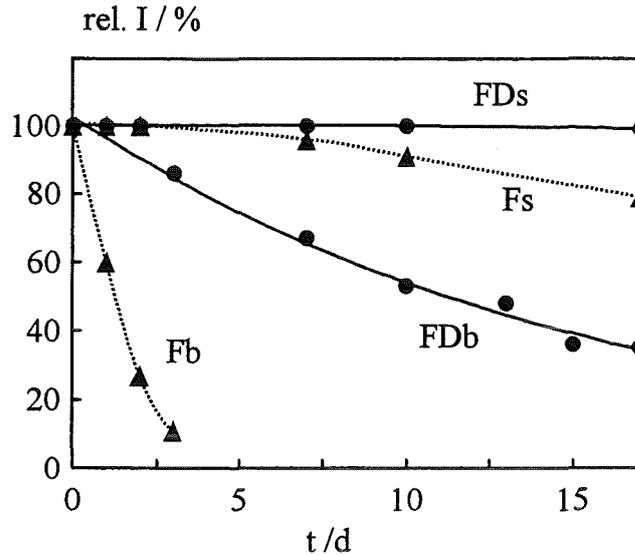
**Tab. 5.2:** *Fluorescein-gebundene Makromoleküle*

	MG / (g/mol)	BG / (mol <sub>Indikator</sub> /mol <sub>Makromolekül</sub> )
Fluorescein-Dextran (FD)	70.000	13,4
Fluorescein-Lactalbumin (FL)	14.500	2,3
Fluorescein-Ovalbumin (FO)	45.000	3,4
Fluorescein-BSA <sup>a)</sup> (FB)	66.000	5,3

a) BSA= Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)

Die Immobilisierung dieser Substanzen wurde analog zu dem in Abschnitt 5.1.2.2 beschriebenen Verfahren nach saurer und basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses durchgeführt. Auch die Lagerung der Sensoren erfolgte unter gleichen Bedingungen.

In Abbildung 5.6 ist das Stabilitätsverhalten von Schichten, die mit Fluorescein-Dextran dotiert wurden, über einen Zeitraum von 17 Tagen dargestellt. Die relativen Fluoreszenzintensitäten nach 14tägiger Lagerung in Pufferlösung sind in Tabelle 5.3 zusammengefaßt.



**Abb. 5.6:** Stabilität von Fluorescein (F)- und Fluorescein-Dextran (FD)-dotierten Silikagel-Schichten nach sauer (s) und basisch (b) katalysierter Herstellung (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX}=490$  nm,  $\lambda_{EM}=522$  nm, Lagerung in Borat-Puffer, pH=8)

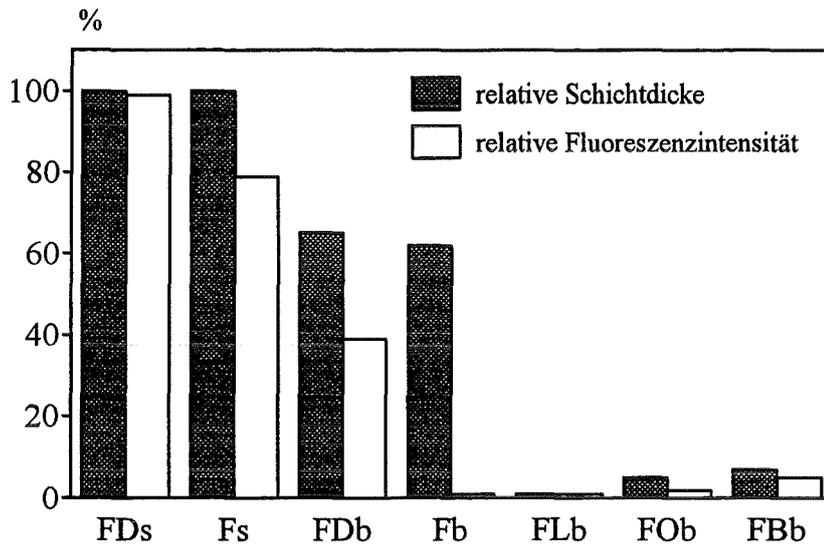
**Tab. 5.3:** Relative Fluoreszenzintensitäten (rel. I) nach 14tägiger Lagerung

	Art der Katalyse	Abkürzung	rel. I / %
Fluorescein-Dextran	sauer	FDs	99
Fluorescein	sauer	Fs	78
Fluorescein-Dextran	basisch	FDb	40
Fluorescein	basisch	Fb	0

Zunächst ist festzustellen, daß nach saurer Katalyse hergestellte Schichten (Fs und FDs) wesentlich stabiler sind als nach basischer Katalyse hergestellte Schichten (Fb und FDb), ein Verhalten, das auch bei den immobilisierten Porphyrinen gefunden wurde (vgl. Abb. 5.4). Die Stabilitäten der Fluorescein- und Fluorescein-Dextran-dotierten Schichten unterscheiden sich deutlich (Tab. 5.3): Die FDs-Schichten zeigen nach 14 Tagen noch 99 % des ursprünglichen Signals, während die Fs-Schichten nur noch 78 % aufweisen. Noch deutlicher wird dies bei den basisch vernetzten Sol-Gel-Filmen, bei denen für die FDb-Schichten noch 40 % des Anfangssignals gefunden werden, während die Fb-Sensoren kein Signal mehr zeigen.

Um eine zusätzliche Information über die Stabilität der Sol-Gel-Matrix zu erhalten, wurden die Schichtdicken der Filme vor und nach der Lagerung in Pufferlösung mit einem Tastschnittgerät ermittelt. Die auf den Ausgangszeitpunkt bezogenen Schichtdicken werden als relative Schichtdicken bezeichnet.

In Abbildung 5.7 ist ein Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten und der relativen Schichtdicken nach 14tägiger Lagerung dargestellt. Zusätzlich wurden analoge Messungen mit den eingangs erwähnten Fluorescein-gebundenen Polypeptiden Ovalbumin (FO), Lactalbumin (FL) und BSA (FB) in basisch vernetzten Sol-Gel-Filmen (Index b) aufgenommen.



**Abb. 5.7:** Relative Schichtdicken und relative Fluoreszenzintensitäten von Fluorescein- und Fluorescein-Polymer-dotierten Silikagel-Filmen nach 14tägiger Lagerung (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX}=490$  nm,  $\lambda_{EM}=522$  nm, Lagerung in Borat-Puffer, pH=8; Abkürzungen: FD (Fluorescein-Dextran), F (Fluorescein), FL (Fluorescein-Lactalbumin), FO (Fluorescein-Ovalbumin), FB (Fluorescein-BSA), s (saure Katalyse der Gelierung), b (basische Katalyse der Gelierung))

Es fällt auf, daß Schichten mit immobilisierten Fluorescein-Polypeptiden durchweg und unabhängig vom Molkulargewicht (siehe Tab. 5.2) geringe Stabilitäten aufweisen, die mit einem drastischen Schichtabtrag verbunden sind. Nach 14 Tagen Lagerung in Pufferlösung werden relative Fluoreszenzintensitäten und relative Schichtdicken von < 10 % bezogen auf den Ausgangszustand gefunden. Aufgrund dieses Ergebnisses wird von weiteren Untersuchungen mit indikatorgebundenen Polypeptiden abgesehen.

Bei den sauer vernetzten Schichten (Fs und FDs) wurde im untersuchten Zeitraum kein Schichtabtrag festgestellt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität wird bei diesen Schichten also vorwiegend durch Farbstoffaustrag verursacht. Dagegen ist der Signlrückgang bei den basisch vernetzten Schichten (Fb und FDb) durch einen deutlichen Schichtabtrag überlagert. Die Schichtdicke geht im Zeitraum von 14 Tagen auf etwa 65 % der ursprünglichen Schichtdicke zurück.

Aus den vergleichenden Voruntersuchungen mit Fluorescein- und Fluorescein-Polymer-dotierten Silikagel-Filmen sollen folgende Aussagen festgehalten werden:

- Die Stabilität von farbstoffdotierten Silikagel-Filmen läßt sich durch eine Anbindung der Farbstoffmoleküle an Makromoleküle deutlich verbessern.
- Das Polysaccharid Dextran zeigt diesbezüglich ein wesentlich günstigeres Verhalten als Polypeptide.
- Bei basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses kann die Stabilität zusätzlich durch Auflösungerscheinungen der Schichten beeinflusst werden.

Diese Erkenntnisse sollen zur Immobilisierung von Porphyrin-Derivaten umgesetzt werden.

### 5.1.3.2 Darstellung und Reinigung von Porphyrin-Dextranen

#### Synthesen:

Zur Synthese von Porphyrin-Dextranen wurden zunächst geeignete funktionelle Gruppen des Porphyrins und des Dextrans in Verbindung mit entsprechenden Kopplungsreaktionen ausgewählt. Es wurden die folgenden Synthesen in Anlehnung an entsprechende Literatursynthesen durchgeführt, in denen das jeweilige Kopplungsreagenz eingesetzt wurde (Tab. 5.4).

**Tab. 5.4:** Funktionelle Gruppen und Reagenzien für die Porphyrin-Dextran-Synthese

Porphyrin	funktionelle Gruppe	Dextran	funktionelle Gruppe	Kopplungsreagenz	Quelle
HAE <sup>a)</sup>	OH	Dextran	OH	Cyanurchlorid	[107]
TCPP <sup>b)</sup>	COOH	Aminodextran	NH <sub>2</sub>	EDAC <sup>d)</sup>	[108,113]
TPPS <sup>c)</sup>	SO <sub>3</sub> H	Aminodextran	NH <sub>2</sub>	PCl <sub>5</sub> <sup>e)</sup>	[87]

a) Haematoporphyrin

b) meso-Tetra-(p-carboxyphenyl)porphyrin

c) meso-Tetra-(p-sulfonatophenyl)porphyrin

d) 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid

e) Phosphorpentachlorid

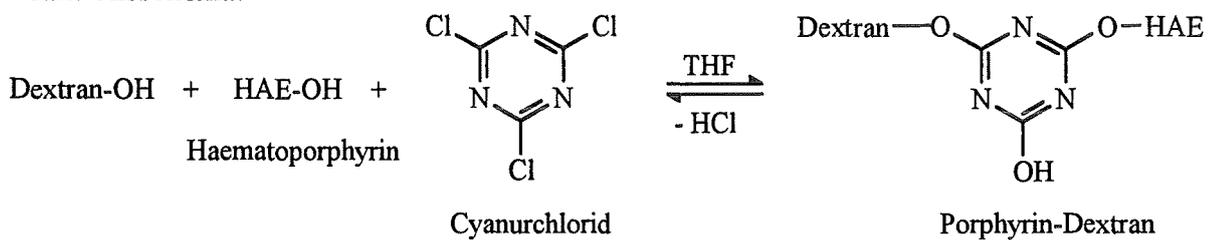
Es wurden zwei verschiedene Dextrane eingesetzt: 1. Dextran (MG= 76.000 g/mol), 2. Aminodextran (MG= 70.000 g/mol; Belegungsgrad: 30 mol NH<sub>2</sub>-Gruppen / mol Dextran).

Zur besseren Übersicht wird die Durchführung der Synthesen in Form von schematisierten Reaktionsgleichungen dargestellt. Die ausführlichen Versuchsvorschriften befinden sich in Abschnitt 4.2.

### Cyanurchlorid-Methode:

Cyanurchlorid kann als Kopplungsreagenz zur Verbindung von OH-Gruppen-haltigen Molekülen eingesetzt werden. Es bleibt als Brückenmolekül zwischen den Edukten erhalten. Mit Hilfe dieser Reaktion wurde versucht, Haematoporphyrin an Dextran anzubinden.

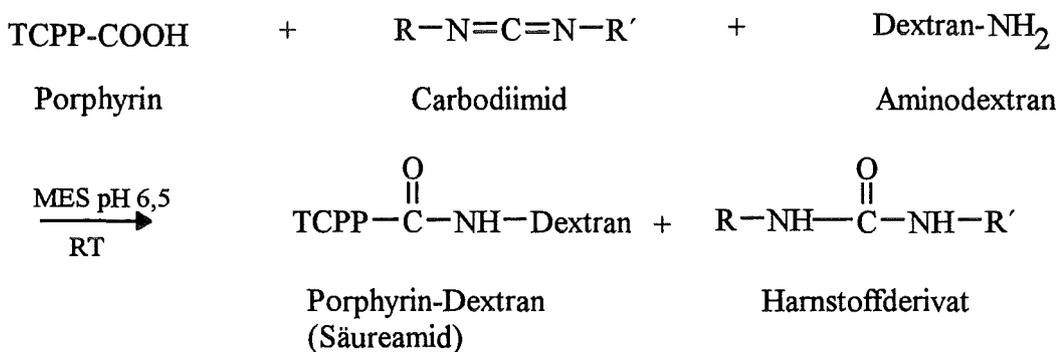
Reaktionsschema:



### Carbodiimid-Methode:

Carbodiimide können als selektive Aktivierungsreagenzien zur Bildung von Säureamiden eingesetzt werden. Sie binden das während der Reaktion freiwerdende Wasser und reagieren zu einem Harnstoff-Derivat ab [114]. Im vorliegenden Fall wurde das Porphyrin TCPP mit Aminodextran umgesetzt. Die Reaktion wurde in wässriger Pufferlösung (MES pH = 6,5) unter Verwendung des wasserlöslichen 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDAC) durchgeführt.

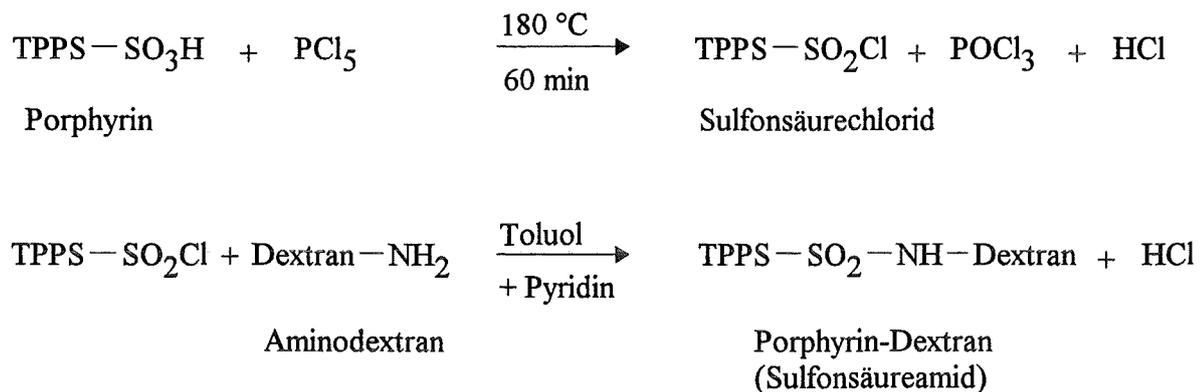
Reaktionsschema:



### Säurechlorid-Methode:

Sulfonsäuren lassen sich in die entsprechenden Säurechloride durch Umsetzung mit Phosphorpentachlorid überführen. Sulfonsäurechloride reagieren wiederum mit Aminen zu Sulfonsäureamiden. Auf diesem Wege wurde das Porphyrin TPPS an Aminodextran angebunden.

Reaktionsschema:



Die Umsetzung des TPPS-Sulfonsäurechlorids mit dem Aminodextran wurde in wasserfreiem Toluol unter Zusatz von Pyridin zum Abfangen der freiwerdenden Salzsäure durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine heterogene Reaktion, da Aminodextran in Toluol praktisch unlöslich ist. Nach der Umsetzung wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt in eine wässrige Lösung überführt.

Von den drei beschriebenen Anbindungsmethoden konnten mit der Cabodiimid- und der Säurechlorid-Methode Porphyrin-Dextrane dargestellt werden. Diese sollen im folgenden kurz TCPP-Dextran und TPPS-Dextran genannt werden. Eine Anbindung von Haematoporphyrin an Dextran mit der Cyanurchlorid-Methode konnte nicht erzielt werden.

Zur Trennung der Porphyrin-Dextrane von nicht umgesetztem Porphyrin und von niedermolekularen Nebenprodukten wurden die Rohprodukte in zwei Schritten gereinigt:

1. Grobreinigung durch Fällen der Porphyrin-Dextrane mit Ethanol
2. Feinreinigung durch Gel-Filtration

Die Reinheit wurde mit Hilfe der Gel-Elektrophorese (Abschnitt 5.1.3.3) kontrolliert.

### **Grobreinigung durch Fällern:**

In einem Vorversuch wurde festgestellt, daß die Porphyrine TPPS und TCPP in Ethanol löslich sind, während Dextrane und Aminodextrane in Ethanol ausfallen. Diese unterschiedlichen Löslichkeiten lassen sich zu einer Grobreinigung der Porphyrin-Dextrane ausnutzen. Wird die wäßrige Reaktionslösung mit einem Überschuß an Ethanol versetzt, so bildet sich ein feiner, flockiger Niederschlag von Porphyrin-Dextranen, der durch Zentrifugation abgetrennt wird. Ein großer Teil der nicht umgesetzten Porphyrin-Moleküle verbleibt in der überstehenden ethanolschen Lösung, die verworfen wird. Dieser Reinigungsvorgang (Lösen in Wasser, Fällern mit Ethanol, Zentrifugation) wird fünfmal wiederholt. Anschließend wird das vorgereinigte Produkt einer Feinreinigung unterzogen. Dies war notwendig, da mittels Gel-Elektrophorese (siehe Abschnitt 5.1.3.3) noch größere Verunreinigungen ( $\approx 30\%$ ) an nicht umgesetztem Porphyrin festgestellt wurden.

### **Feinreinigung durch Gel-Filtration:**

Die Gel-Filtration ist eine Trennmethode, die für die Separation hochmolekularer von niedermolekularen Stoffen in wäßrigen Medien geeignet ist [115]. Bei dieser Methode wird der Effekt ausgenutzt, daß bei der Wanderung von Molekülen durch ein Gel mit einer bestimmten Porenstruktur eine Verteilung nach der Molekülgröße erfolgt. Kleine Moleküle können in die Poren des Gels eindringen und werden somit vom Gel zurückgehalten, während große Moleküle ohne derartige Wechselwirkungen durch das Gel wandern. Je nach Trennaufgabe werden Gele mit unterschiedlicher Porosität und Korngröße verwendet. Die Wahl der geeigneten Porosität wird durch die Trennaufgabe bestimmt, während sich die Korngrößen auf die Elutionszeiten auswirken. Für die vorliegende Trennung wurde als Säulenmaterial (stationäre Phase) Sephadex G 50-150 verwendet. Es handelt sich dabei um ein Material mittlerer Korngröße und Porosität, welches vom Hersteller für Trennungen von Molekulargewichten im Bereich von  $10^2$  bis  $10^4$  g/mol empfohlen wird.

Die Porphyrin-Dextrane eluierten in etwa 30-40 min, das Elutionsvolumen betrug bei der verwendeten Säule (Trennstrecke: 30 cm, Durchmesser: 2 cm; vgl. Abb. 4.1) etwa 200 ml. Zwischen den Porphyrin-Dextranen und den nicht-gebundenen Porphyrinen war eine ungefärbte Zone zu erkennen. Die Elutionszeiten für die Porphyrine lagen bei TPPS im Bereich von mehreren Stunden, TCPP war nicht vollständig eluierbar. Die gereinigten Porphyrin-Dextrane wurden am Rotationsverdampfer ( $T = 70^\circ\text{C}$ ,  $p = 25$  mbar) vom Lösungsmittel befreit und über Phosphorpentoxid 5 Tage lang getrocknet. Nach dieser Reinigungsstufe konnte mittels Gel-Elektrophorese festgestellt werden, daß die Porphyrin-Dextrane von nicht angebundenem Porphyrin nahezu befreit waren.

### 5.1.3.3 Charakterisierung der Porphyrin-Dextrane

Die gereinigten Porphyrin-Dextrane TCPP-Dextran und TPPS-Dextran wurden mit folgenden Methoden charakterisiert: Gel-Elektrophorese, UV-VIS-Spektroskopie und IR-Spektroskopie. Weiterhin wurden der Farbstoff-Belegungsgrad und die Ausbeute bestimmt.

#### Gel-Elektrophorese:

Bei der Gel-Elektrophorese wird das Wanderungsverhalten von geladenen Teilchen unter Einwirkung eines elektrischen Feldes untersucht. Die Trennung erfolgt in einem Gel, welches sich in einem homogenen Puffersystem (konstanter pH-Wert über die gesamte Trennstrecke) befindet. Die in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Wanderungstrecke entspricht der elektrophoretischen Mobilität  $m$ , welche durch Art, Ladung und Größe der Moleküle bestimmt wird. Nachdem zu erwarten war, daß sich die Mobilitäten der Porphyrine und der Porphyrin-Dextrane im elektrischen Feld unterscheiden, wurde diese Methode zur Analyse der Porphyrin-Dextrane eingesetzt. Als Gel wurde Agarose verwendet, die zunächst unter Erwärmen in Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) aufgelöst wurde ( $T = 90^{\circ}\text{C}$ , 40 min). Beim Gießen des heißen Gels in die Elektrophorese-Kammer wurden mit Hilfe eines speziellen Kammes Vertiefungen (Taschen) im Gel ausgespart, in die nach Erkalten des Gels und Füllen der Kammer mit TBE-Puffer das Substrat eingetropft werden konnte. Der Aufbau der verwendeten Elektrophorese-Apparatur ist in Abbildung 5.8 dargestellt.

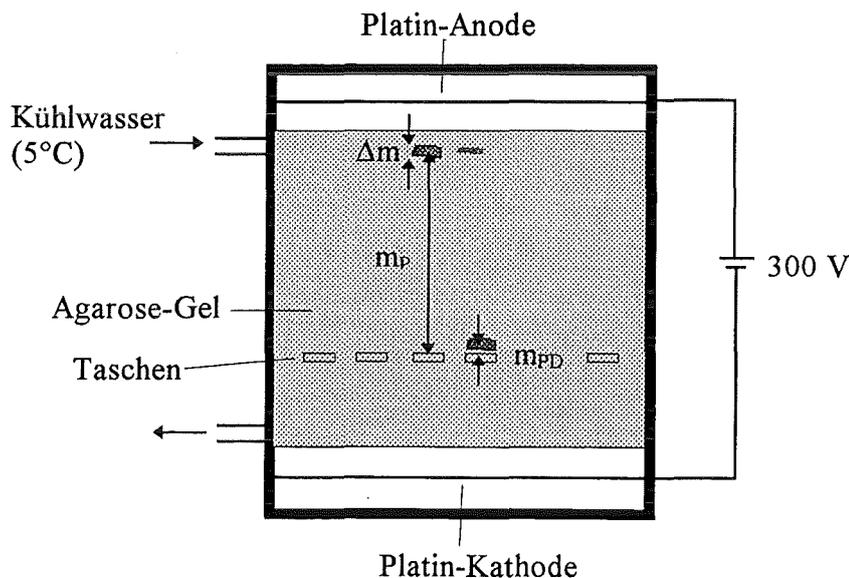


Abb. 5.8: Aufbau der Gel-Elektrophorese-Apparatur (Erklärung siehe Text)

Um die bei der Elektrophorese entstehende Wärme abzuführen, wurde die Kammer von unten (über einen doppelten Boden) mit Hilfe eines Thermostaten ( $T = 5^{\circ}\text{C}$ ) gekühlt. Bei jeder Analyse wurde neben dem Substrat (Porphyrin-Dextran) das entsprechende Porphyrin-Monomer als Bezugssubstanz untersucht. Die Elektrophorese wurde zu dem Zeitpunkt beendet und ausgewertet, an dem die Bezugssubstanz am Ende der Laufstrecke angekommen war. In Anlehnung an die Chromatographie wurde ein Retentionsfaktor (Rf-Wert) ermittelt, indem das Verhältnis der Laufstrecke des Analyten (Porphyrin-Dextran)  $m_{PD}$  zur Laufstrecke der Bezugssubstanz (Porphyrin)  $m_P$  gebildet wurde (Gl. 5.1).

$$(5.1) \quad R_f = \frac{m_{PD}}{m_P}$$

In Abbildung 5.8 ist das typische Bild eines so erhaltenen Elektropherogramms für die Analyse der Porphyrin-Dextrane schematisch dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Porphyrin-Dextrane bedingt durch ihre Größe eine wesentlich kleinere Mobilität im elektrischen Feld aufweisen als die Porphyrine.

Die Laufstrecken  $m$ , Durchmesser der Farbstoff-Flecken  $\Delta m$  und Rf-Werte der synthetisierten Porphyrin-Dextrane mit den zugehörigen Porphyrinen sind in Tabelle 5.5 zusammengefaßt. Zum Vergleich sind die analogen Werte von kommerziell erhältlichem Fluorescein-Dextran und Fluorescein bestimmt worden. Alle untersuchten Dextrane haben das gleiche mittlere Molekulargewicht ( $M_G = 70.000 \text{ g/mol}$ ).

**Tab. 5.5:** *Charakterisierung von Porphyrin-Dextranen mittels Gel-Elektrophorese*

Substanz	$m / \text{cm}$	$\Delta m / \text{cm}$	Rf
TCPP	3,9	0,1	1
TCPP-Dextran	0,4	0,3	0,1
TPPS	3,9	0,1	1
TPPS-Dextran	0,1	0,05	0,02
Fluorescein	3,9	0,1	1
Fluorescein-Dextran	0,4	0,2	0,1

Die farbstoffgebundenen Dextrane zeigen Rf-Werte von 0,02 bis 0,1 und weisen damit erheblich geringere Mobilitäten im elektrischen Feld auf als die ungebundenen Farbstoffmoleküle, deren Rf-Wert definitionsgemäß eins ist. TCPP-Dextran verhält sich bezüglich des Rf-Werts ( $R_f = 0,1$ ) und der Breite der Farbstoff-Banden ( $\Delta m = 0,3 \text{ cm}$ ) wie

Fluorescein-Dextran. TPPS-Dextran zeigt dagegen deutlich kleinere Rf-Werte ( $R_f = 0,02$ ) und Bandbreiten ( $\Delta m = 0,05$  cm). Bei allen drei untersuchten Farbstoff-gebundenen Dextranen (auch beim Fluorescein-Dextran) wurden geringe Spuren von ungebundenem Farbstoff nachgewiesen, dessen Gehalt anhand der Färbung der Banden als  $< 5$  % abgeschätzt werden kann.

Die geringere Mobilität des TPPS-Dextrans im Vergleich zum TCPP-Dextran kann durch die Herstellungsmethode bedingt sein. Nachdem TPPS über vier Sulfonsäuregruppen verfügt, könnten bei der recht drastischen Säurechlorid-Methode vernetzte TPPS-Dextrane mit höherem Molekulargewicht (und damit geringerer Mobilität) entstanden sein. Bei der milderen Carbodiimid-Methode, die zur Synthese des TCPP-Dextrans angewendet wurde, laufen derartige Quervernetzungen vermutlich nur in untergeordnetem Maße ab.

#### UV-VIS-Spektroskopie:

Die Dextran-Verbindungen von TPPS und TCPP wurden mittels UV-VIS-Spektroskopie charakterisiert (Spektren siehe Anhang 8.2). Bei beiden Derivaten konnte ein typisches Porphyrin-Spektrum nachgewiesen werden, wobei die Soret-Banden der Porphyrin-Dextrane gegenüber denen der Porphyrine deutlich verbreitert sind. Die Lagen der Maxima der Soret-Banden sind in Tabelle 5.6 zusammengefaßt.

**Tab. 5.6:** Lage der Soret-Banden von Porphyrinen und Porphyrin-Dextranen (in Borat-Puffer pH=8)

Porphyrin-Derivat	$\lambda_{\text{Soret}} / \text{nm}$
TCPP	414
TCPP-Dextran	416
TPPS	414
TPPS-Dextran	421

Beim TCPP-Dextran ist eine geringe Verschiebung der Soret-Bande von 414 nm (TCPP) auf 416 nm (TCPP-Dextran) festzustellen. Die Soret-Bande von TPPS-Dextran weist gegenüber TPPS eine stärkere Verschiebung von 7 nm auf 421 nm auf.

### Infrarot-Spektroskopie:

Von den Porphyrin-Dextranen wurden Infrarot-Spektren in KBr aufgenommen (Spektren siehe Anhang 8.3). Die Wellenzahlen der gefundenen Schwingungsbanden ( $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) für die Porphyrin-Dextrane sind nachfolgend aufgelistet.

#### TCPP-Dextran ( $\nu / \text{cm}^{-1}$ ):

2925, 2071, 1639, 1546, 1415, 1281, 1208, 1038, 950, 917, 845, 765, 705

#### TPPS-Dextran ( $\nu / \text{cm}^{-1}$ ):

2927, 1641, 1489, 1231, 1165, 1034, 857, 826, 805, 735, 661, 625

### Bestimmung des Farbstoff-Belegungsgrades:

Der Farbstoff-Belegungsgrad der Porphyrin-Dextrane wurde durch Aufnahme von UV-VIS-Spektren ermittelt. Dabei wird die vereinfachende Annahme gemacht, daß die gebundenen und die ungebundenen Porphyrin-Moleküle über die gleichen Extinktionskoeffizienten verfügen. Zunächst wurde von einer Porphyrin-Dextran-Lösung mit bekannter Einwaage (Massenkonzentration  $c_{PD}$  in  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) die Extinktion  $E_{PD}$  bestimmt. Die entsprechende Porphyrin-Konzentration  $c_P$  (in  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) wurde über den Extinktionskoeffizienten der Porphyrine  $\epsilon_P$  nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Aus diesen Werten und den Molmassen des Dextrans ( $M_D$ ) und der Porphyrine ( $M_P$ ) kann der Belegungsgrad ( $n_{\text{Porphyrin}}/n_{\text{Dextran}}$  abgekürzt  $n_P/n_D$ ) nach Gleichung 5.2 ermittelt werden. Die entsprechenden Daten für TCPP-Dextran und TPPS-Dextran sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.

$$(5.2) \quad \text{Belegungsgrad} = \frac{n_P}{n_D} = \frac{c_P \cdot M_D}{(c_{PD} - c_P) \cdot M_P}$$

**Tab. 5.7:** Bestimmung des Farbstoff-Belegungsgrades ( $n_P/n_D$ ) der Porphyrin-Dextrane

	TCPP-Dextran	TPPS-Dextran
$c_{PD} / \text{g l}^{-1}$	0,1	0,1
$\epsilon_P / \text{mol l}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$3,8 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^5$
$E_{PD}$	0,767	0,933
$c_P / \text{g l}^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$
$M_P / \text{g mol}^{-1}$	790,8	934,7
$M_D / \text{g mol}^{-1}$	70.000	70.000
$n_P/n_D / (\text{mol}_P/\text{mol}_D)$	1,4	1,8

Aus diesen Berechnungen ergeben sich die Belegungsgrade der Dextrane mit Porphyrin zu 1,4 beim TCPP-Dextran und zu 1,8 beim TPPS-Dextran. Diese Werte liegen im Bereich von kommerziell erhältlichen Farbstoff-Dextran-Verbindungen.

#### Bestimmung der Ausbeute:

Die Ausbeute wird auf die eingesetzte Menge an Aminodextran bezogen. Einwaagen und Ausbeuten sind in Tabelle 5.8 zusammengefaßt.

**Tab. 5.8:** *Ausbeuten der Porphyrin-Dextrane*

	TCPP-Dextran	TPPS-Dextran
Einwaage Aminodextran / mg	350	150
Ausbeute / mg	197	10
Ausbeute (% der theoret. Ausbeute)	55	6,5

Nach allen Reinigungsschritten konnte bei dem über die Carbodiimid-Methode hergestellten TCPP-Dextran eine Ausbeute von 55 % erreicht werden. Dagegen fällt die Ausbeute beim TPPS-Dextran, das über das TPPS-Sulfonsäurechlorid hergestellt wurde, mit 6,5 % deutlich geringer aus. Dieser Unterschied ist wohl darauf zurückzuführen, daß die TCPP-Dextran-Synthese als homogene Reaktion und die TPPS-Dextran-Synthese als heterogene Reaktion durchgeführt wurde.

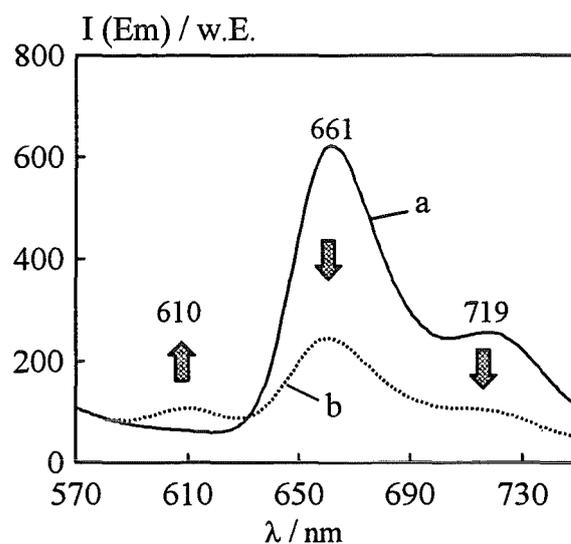
Die wesentlichen Schritte der Porphyrin-Dextran-Synthesen sind in Tabelle 5.9 zusammengefaßt.

**Tab. 5.9:** *Herstellung von Porphyrin-Dextranen*

	TCPP-Dextran	TPPS-Dextran
Darstellungsmethode	Carbodiimid	Säurechlorid
Reinigung	Fällung, Gel-Filtration	
Charakterisierungen	Gel-Elektrophorese, UV/VIS-, IR-Spektroskopie	
Belegungsgrad / (mol <sub>p</sub> /mol <sub>D</sub> )	1,4	1,8
Ausbeute / %	55	6,5

#### 5.1.3.4 Immobilisierung von Porphyrin-Dextranen in Silikagel-Schichten

Die Immobilisierung der Porphyrin-Dextrane erfolgte in Silikagel-Schichten, die durch basische Katalyse des Sol-Gel-Prozesses hergestellt wurden (vgl. Abschnitt 5.1.2.3) [112]. Zur Verbesserung der Stabilität der Schichten wurde auch die Schichtpräparation modifiziert. Bei basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses entstehen, wie in Abschnitt 3.3.2 ausgeführt wurde, partikelförmige Polymerstrukturen, wobei die Partikelgröße von der Hydrolysegeschwindigkeit abhängt [96]. Nachdem die Hydrolysegeschwindigkeit von der Konzentration des Katalysators (Hydroxid-Ionen) bestimmt wird, sollte eine Senkung des pH-Werts in der Eduktmischung des Sol-Gel-Prozesses (Sol) zu kleineren Partikeln führen, die sich zu dichteren und damit stabileren Strukturen verbinden. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert des wäßrigen Anteils des Sols von 9,5 auf 8,5 gesenkt. Das Verhalten der so präparierten Rezeptorschichten bezüglich Sensitivität und Stabilität wird am Beispiel von immobilisiertem TCPP-Dextran erläutert.

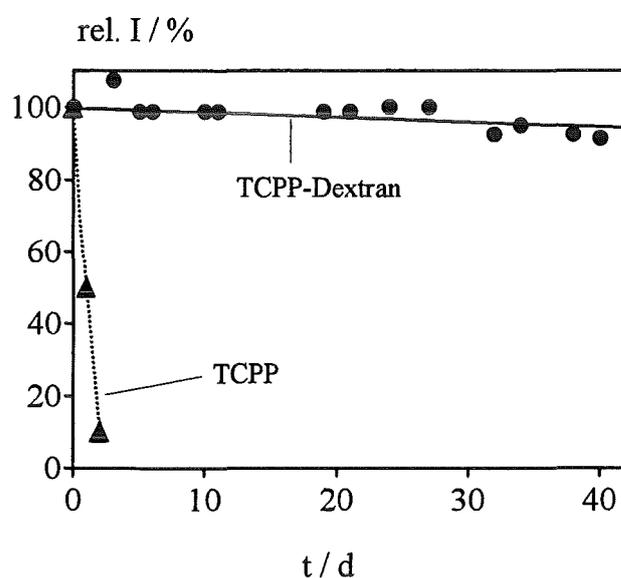


**Abb. 5.9:** Emissionsspektren eines unbeprobten (a) und beprobten (b) TCPP-Dextran-Sensors (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX}=425$  nm; Borat-Puffer, pH=8; a)  $c_{Hg(II)}=0$ ; b)  $c_{Hg(II)}=10^{-5}$  mol/l; Beprobungsdauer 2 h; Angabe  $\uparrow, \downarrow$ : Erhöhung bzw. Erniedrigung der Fluoreszenzintensität bei Beprobung mit  $Hg(II)$ -Ionen)

In Abbildung 5.9 sind die Fluoreszenz-Emissionsspektren von TCPP-Dextran-dotierten Schichten vor und nach der Beprobung mit einer  $10^{-5}$  molaren  $Hg(II)$ -Lösung dargestellt. Es wurde so lange beprobt, bis keine Veränderungen mehr im Spektrum zu beobachten waren, was nach etwa 2 Stunden der Fall war.

Als spezifische Nachweisbande für die Bestimmung von Hg(II)-Ionen wird die Zunahme der Fluoreszenz bei  $\lambda_{EM} = 610$  nm ausgewählt, da Fluoreszenzminderungen, die an den Banden  $\lambda_{EM} = 661$  nm und  $\lambda_{EM} = 719$  nm auftreten, auch durch unspezifische Fluoreszenzlöschung zustande kommen können. Wie in Abbildung 5.9 zu erkennen ist, reagieren die Schichten unter großen spektralen Änderungen auf Hg(II)-Ionen.

Schließlich wurde die Stabilität der mit TCPP-Dextran dotierten Silikagel-Schichten bei Lagerung in Borat-Puffer (pH= 8) über einen Zeitraum von 40 Tagen untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.10 dargestellt.



**Abb. 5.10:** Lagerstabilität der mit TCPP bzw. TCPP-Dextran dotierten Silikagel-Schichten (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX} = 416$  nm,  $\lambda_{EM} = 661$  nm, Lagerung in Borat-Puffer, pH = 8)

Aus Abbildung 5.10 geht hervor, daß Dextran-gebundene Porphyrine in mesoporösen Silikagel-Schichten wesentlich stabiler eingebunden sind als die nicht angebondenen Porphyrine (vgl. Abbildung 5.4). Während TCPP nach 2 Tagen nahezu vollständig aus der Matrix ausgewaschen wurde, zeigte der TCPP-Dextran-Sensor nach 40 Lagerung noch etwa 92 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität. Dieses Ergebnis wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

#### 5.1.4 Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode zur stabilen Immobilisierung von Indikatormolekülen zur Herstellung von sensitiven Schichten (Rezeptorschichten) für optochemische Sensoren erarbeitet werden. Die Untersuchungen wurden exemplarisch an Porphyrin-Derivaten als Indikatoren für zweiwertige Quecksilberionen durchgeführt, die in Sol-Gel-Matrices immobilisiert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß nur bei basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses Rezeptorschichten erhalten werden konnten, die ein Ansprechverhalten auf Hg(II)-Ionen zeigten. Die Stabilität dieser Schichten war jedoch durch Farbstoffaustrag auf einen Tag begrenzt. Nach saurer Katalyse der Schichtpräparation konnten zwar stabilere Schichten erhalten werden, die aber keine Sensitivität auf Quecksilberionen zeigten. Um dieser Gratwanderung zwischen Sensitivität und Stabilität gerecht zu werden, wurden die Farbstoffmoleküle durch kovalente Anbindung an Makromoleküle in der Matrix verankert.

In Voruntersuchungen mit wasserlöslichen Fluorescein-Polymerverbindungen stellten sich die entsprechenden Dextrane als geeignete Makromoleküle heraus. Nach Synthese und Aufarbeitung von Porphyrin-Dextran-Verbindungen (TCPP-Dextran und TPPS-Dextran, vgl. Tabelle 5.9) wurde das Verhalten von TCPP-Dextran in modifizierten, basisch vernetzten Silikagel-Schichten untersucht. Die Porphyrin-Dextran-dotierten Schichten zeigten einerseits ein empfindliches Ansprechverhalten auf Hg(II)-Ionen und andererseits hervorragende Stabilitäten von mehreren Wochen.

Diese drastische Stabilitätsverbesserung durch die Immobilisierung von makromolekular gebundenen Indikatoren läßt sich mit den Porositäten der Silikagele in Verbindung bringen. Der hydrodynamische Radius („Stokes Radius“) der verwendeten Dextrane mit dem Molekulargewicht von 70.000 g/mol wird in der Literatur mit 5,5 nm [116,117] bis 6 nm [118] angegeben. Für die Porenradien von mesoporösen Silikagelen, die bei basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses entstehen, werden Werte von 2,4 nm [36] bis 6,4 nm [97] gefunden. Aus diesem Größenvergleich geht hervor, daß die Porphyrin-Dextrane im Porennetzwerk von mesoporösen Gelen genügend fest eingebunden werden können, während die wesentlich kleineren Porphyrinmoleküle aus den Poren des Gels diffundieren und damit ausgewaschen werden können.

Die Immobilisierung von makromolekular gebundenen Indikatoren weist gegenüber anderen Methoden einige Vorteile auf. Diese ergeben sich aus der Tatsache, daß es sich um eine 2-Schritt-Immobilisierung handelt:

- Erster Schritt: kovalente Anbindung des Indikators an ein Makromolekül
- Zweiter Schritt: Präparation der sensitiven Schicht

Durch die Trennung von kovalenter Anbindung und Schichtpräparation lassen sich beide Teilschritte unabhängig voneinander optimieren. Da die Immobilisierung einfach durch Zugabe der indikatorgebundenen Dextrane in die Eduktmischungen für die Schichtpräparation erfolgt, sind vielfältige Variationen bezüglich der Zusammensetzungen der Schichten möglich:

- Variation der Indikatoren
- Variation des Indikatorgehalts in der sensitiven Schicht
- Coimmobilisierung von mehreren Indikatoren
- Verwendung anderer Matrices.

Diese Flexibilität ist beispielsweise bei der direkten kovalenten Anbindung eines Indikators an eine Matrix nicht gegeben, da für jede Modifizierung der sensitiven Schicht eine neue Synthese durchgeführt werden müßte.

Die Variationsmöglichkeiten dieser neuen Immobilisierungsmethode werden im nächsten Teil der Arbeit anhand von drei Analyt-Rezeptor-Paaren vorgestellt.

## 5.2 Charakterisierung sensitiver Schichten basierend auf Dextran-gebundenen Indikatoren in hydrophilen Matrices

### 5.2.1 Herstellung der Rezeptorschichten

Die Matrix hat einen wesentlichen Einfluß auf die Sensitivität und die Stabilität der Rezeptorschichten. Für die Herstellung von kationensensitiven Schichten werden in der Literatur unterschiedliche Matrices wie Polyvinylchlorid [47], Polyvinylalkohol [83], Silikagele [53,82] oder Hydrogele [84,103] gefunden. Es ist zu erwarten, daß hydrophile Matrices für Messungen in wäßrigen Medien günstigere Eigenschaften bezüglich des Ansprechverhaltens auf Kationen zeigen als hydrophobe Matrices. Für die folgenden Untersuchungen wurden zwei Gele zur Immobilisierung von Indikator-gebundenen Dextranen ausgewählt. Zum einen die bereits vorgestellten anorganische Silikagele, zum anderen das organische Hydrogel Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat (PolyHEMA).

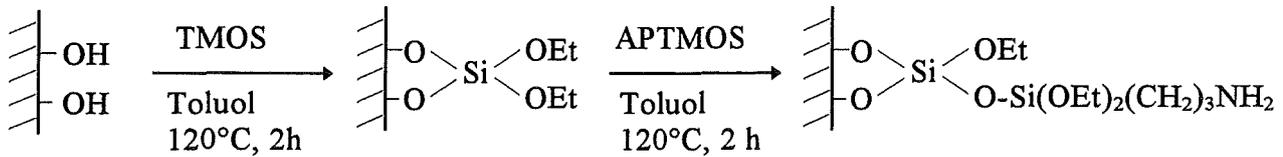
Die Herstellung von sensitiven Silikagel-Schichten nach dem Sol-Gel-Verfahren wurde bereits in Abschnitt 5.1 eingehend diskutiert. Die Eduktmischung für die PolyHEMA-Schichten besteht aus einem wäßrigen Anteil, in dem die Indikator-Dextrane (1 bis 50 mg/ml) gelöst werden, und einem methanolischen Anteil, in dem PolyHEMA (100 mg/ml) gelöst wird. Damit in der Eduktmischung weder PolyHEMA noch die Dextrane ausfallen, wurde ein Mischungsverhältnis von etwa 50 % wäßrigem und 50 % methanolischem Anteil eingestellt. Die genauen Zusammensetzungen der Eduktmischungen sind dem experimentellen Teil (Abschnitt 4.4.1.1) zu entnehmen.

Als Träger für die sensitiven Filme werden runde Glasscheiben ( $\varnothing$  30 mm) verwendet, die durch Spülen mit Aceton,  $\text{HNO}_3$  (30 %) und entionisiertem Wasser gereinigt und vorbehandelt werden. Dabei stellte sich heraus, daß PolyHEMA auf den verwendeten Glasträgern schlecht haftet. Die Hydrogel-Schichten waren nach einem Tag Einlegen in Pufferlösung großflächig abgelöst.

Aus diesem Grunde wurden die Glasträger mit Aminopropyltrimethoxysilan (APT MOS) silanisiert [119,120]. Dazu wurden die Glasträger drei Behandlungsschritten unterzogen:

1. Vorbehandlung mit konzentrierter  $\text{HNO}_3$  (30 %, 24 h)
2. Silanisierung mit Tetramethoxysilan (TMOS) in Toluol (10 Vol. %)
3. Silanisierung mit Aminopropyltrimethoxysilan (APT MOS) in Toluol (10 Vol. %)

Reaktionsschema zur Silanisierung von Glasoberflächen [120]:



Die Silanisierungen wurden durch Erhitzen der Glasscheiben unter Rückfluß (120 °C, 2 h) in einer Lösung aus 10 Vol.% Silan in wasserfreiem Toluol unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Dazu wurde ein Reaktionsgefäß hergestellt, in dem sich in einer speziellen Halterung aus Edelstahl gleichzeitig 10 Glaträger silanisieren ließen.

PolyHEMA-Schichten werden in ähnlicher Weise wie die Sol-Gel-Schichten nach dem Rotationsbeschichtungsverfahren (Spin-Coating) hergestellt (vgl. Abschnitt 4.4.1.3). Es stellte sich heraus, daß die PolyHEMA-Filme auf silanisierten Glaträgern sehr gute Haftungseigenschaften zeigen. Auch nach mehreren Wochen Lagerung in wäßriger Lösung wurde keine Ablösung der Hydrogel-Membran vom Träger festgestellt. Die mittleren Schichtdicken der PolyHEMA-Filme wurde an fünf in gleicher Weise hergestellten Sensoren mittels Profilometrie zu  $502 \text{ nm} \pm 77 \text{ nm}$  ( $= 502 \text{ nm} \pm 15 \%$ ;  $n = 5$ ) bestimmt.

Aus den Untersuchungen in Abschnitt 5.1 ist eine Methode zur Herstellung von stabilen, sensitiven Membranen für optochemische Sensoren hervorgegangen. Es konnte gezeigt werden, daß sich Porphyrine durch die Anbindung an das Polysaccharid Dextran fest in mesoporösen Silikagel-Filmen verankern lassen. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll nun die Anwendung dieser Immobilisierungsmethode auf verschiedene Analyt-Rezeptor-Paare und die Charakterisierung der entsprechenden sensitiven Schichten behandelt werden.

Als Analyt-Rezeptor-Paare wurden ausgewählt:

1. Porphyrin-Dextrane als Quecksilber-sensitive,
2. Fluorescein-Dextran als pH-sensitive und
3. Calcium Green-1-Dextran als Calcium-sensitive Rezeptoren.

Die entsprechenden Dextrane der beiden letztgenannten Indikatoren sind kommerziell erhältlich.

## 5.2.2 Untersuchung des Systems Porphyrin – Quecksilber(II)-Ionen

### 5.2.2.1 Spektrales Verhalten

Zur Herstellung von Quecksilber-sensitiven Filmen wurden die beiden Porphyrin-Dextrane TCPP-Dextran und TPPS-Dextran synthetisiert (Abschnitt 5.1.3.2). Diese wurden sowohl in mesoporösen Sol-Gel-Filmen als auch in PolyHEMA-Filmen immobilisiert. Dabei stellte sich heraus, daß sich in den PolyHEMA-Filmen keine ausreichenden Porphyrin-Dextran-Gehalte einbringen ließen, um deutliche Meßeffekte zu erhalten. Dies war bedingt durch die begrenzte Löslichkeit der Porphyrin-Dextrane in den PolyHEMA-Eduktmischungen, die einen hohen Anteil an Methanol enthalten. Aus diesem Grund wurden die Porphyrin-Dextrane ausschließlich in den bereits bekannten Silikagel-Matrices immobilisiert.

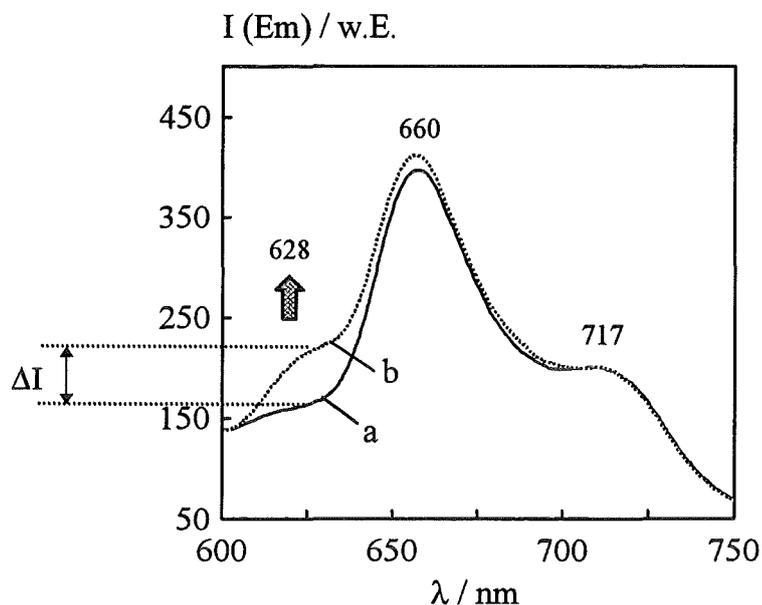
Zunächst wurden die für den Quecksilber-Nachweis spezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen der immobilisierten Porphyrin-Derivate durch Beprobung der sensitiven Schichten mit Hg(II)-haltigen Pufferlösungen ( $c_{\text{Hg(II)}} = 10^{-5}$  mol/l; Borat-Puffer, pH= 8) ermittelt, die in Tabelle 5.10 aufgeführt sind.

**Tab. 5.10:** *Spezifische Anregungs- und Emissionswellenlängen von immobilisierten Porphyrin-Dextranen zum Nachweis von Hg(II)-Ionen*

	TCPP-Dextran	TPPS-Dextran
Anregungswellenlängen		
$\lambda_{\text{Ex1}}$	425 nm	420 nm
$\lambda_{\text{Ex2}}$	565 nm	575 nm
Emissionswellenlänge		
$\lambda_{\text{Em}}$	612 nm	628 nm

Für beide Porphyrin-Dextrane ergeben sich daraus zwei mögliche Anregungswellenlängen  $\lambda_{\text{Ex1}}$  und  $\lambda_{\text{Ex2}}$  und eine Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{Em}}$ . Es stellte sich heraus, daß die mit TCPP-Dextran dotierten Schichten die größten Meßeffekte mit  $\lambda_{\text{Ex1}} = 425$  nm und mit  $\lambda_{\text{Em}} = 612$  nm erreichten, während bei den mit TPPS-Dextran dotierten Schichten die größten Meßeffekte mit dem Wellenlängenpaar  $\lambda_{\text{Ex2}} = 575$  nm und  $\lambda_{\text{Em}} = 628$  nm erhalten wurden. Die Emissionsspektren mit den optimierten Anregungswellenlängen sind in den Abbildungen 5.9 für TCPP-Dextran (spektrales Verhalten siehe Abschnitt 5.1.3.4) und 5.11 für TPPS-Dextran dargestellt.

In Abbildung 5.11 ist ein deutlicher Meßeffect des immobilisierten TPPS-Dextrans bei  $\lambda_{Em}=628\text{ nm}$  zu sehen, während sich die Banden bei  $\lambda_{Em}=660\text{ nm}$  und  $717\text{ nm}$  bei der Beprobung mit Hg(II)-Ionen kaum verändern.



**Abb. 5.11:** Emissionsspektren des unbeprobten (a) und beprobten (b) TPPS-Dextran-Sensors (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX}=575\text{ nm}$ , Borat-Puffer, pH=8; a)  $c_{Hg(II)}=0$ ; b)  $c_{Hg(II)}=10^{-5}\text{ mol/l}$ ; Beprobungsdauer 2 h; Angabe  $\uparrow$ : Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Beprobung mit Hg(II)-Ionen)

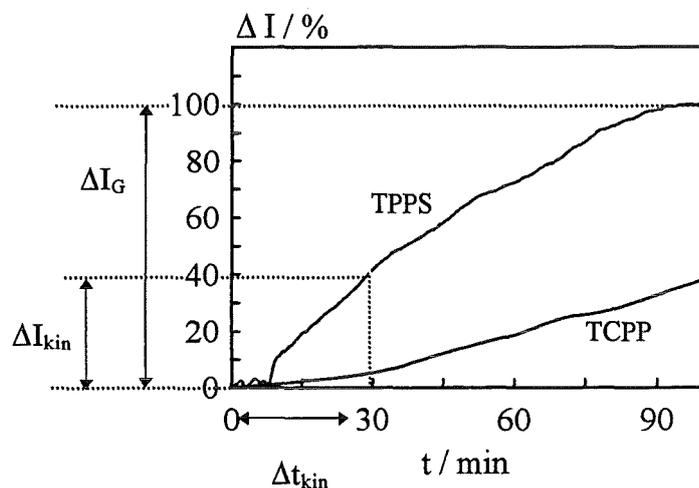
### 5.2.2.2 Ansprech- und Regenerierungsverhalten

In Abbildung 5.12 wird der zeitliche Verlauf des Ansprechverhaltens der TPPS-Dextran-Schichten mit dem der TCPP-Dextran-Schichten bei der Beprobung mit Hg(II)-haltigen Pufferlösungen (Borat Puffer, pH= 8) verglichen. Die Signale wurden auf den jeweiligen Sättigungswert (= 100 %) normiert.

Es ist zu erkennen, daß das Signal des TPPS-Dextran-Sensors nach etwa 90 Minuten kontinuierlicher Beprobung nahezu einen Sättigungswert erreicht hat. Dagegen steigt das Signal des TCPP-Dextran-Sensors nach dieser Zeit noch gleichförmig an und strebt erst nach über 2 Stunden einem Sättigungswert zu.

Beide Sensoren zeigen verhältnismäßig lange Ansprechzeiten von deutlich über einer Stunde bis zur Einstellung des Gleichgewichtswerts  $\Delta I_G$ . Von diesem Verhalten Schwermetallionen-sensitiver Sol-Gel-Sensoren wird auch in der Literatur berichtet: Typische Ansprechzeiten für Schwermetall-Sensoren liegen zwischen 1 h und 24 h [53,121].

Als mögliche Ursachen können Diffusionshemmungen für die hydratisierten Kationen im Porensystem der Matrix oder sterische Hinderungen bei der Ausbildung der Schwermetall-Komplexe in der Matrix diskutiert werden. Für praktische Untersuchungen sind diese Ansprechzeiten jedoch zu lange, so daß es sinnvoll ist, von einer thermodynamischen Auswertung (d. h. Messung im thermodynamischen Gleichgewicht) zu einer kinetischen Auswertung der Signale überzugehen [52]. Darunter ist zu verstehen, daß nach einer definierten Meßzeit  $\Delta t_{\text{kin}}$  das bis dahin erreichte Signal  $\Delta I_{\text{kin}}$  ausgewertet wird. Für die weiteren Untersuchungen wird eine Meßzeit von 30 min festgelegt. Wie in Abbildung 5.12 zu sehen ist, hat der TPPS-Dextran-Sensor nach dieser Zeit etwa 40 % seines Endsignals erreicht, während der TCPP-Dextran-Sensor nur etwa 10 % seines Endwerts erreicht hat. Aus diesem Grund werden die weiteren Untersuchungen mit TPPS-Dextran-dotierten Schichten durchgeführt.

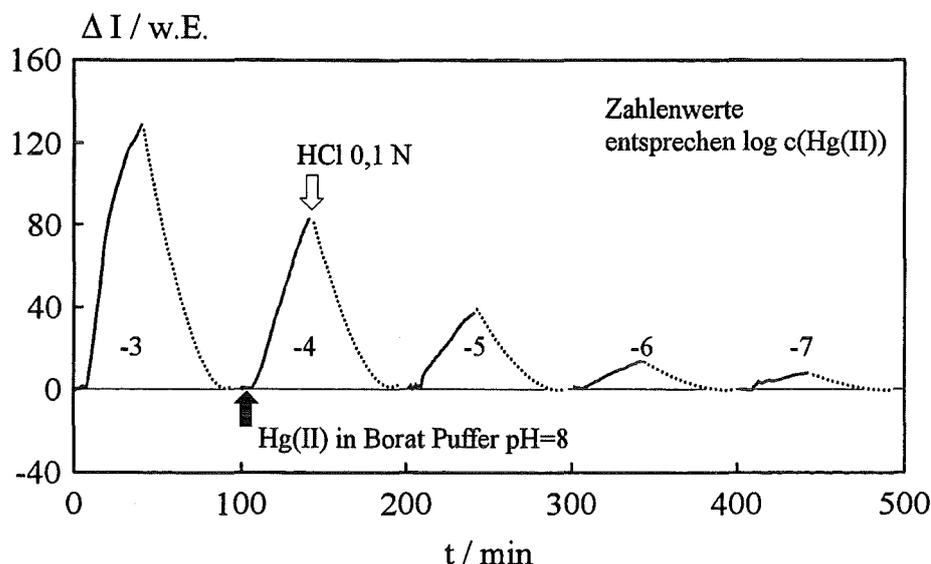


**Abb. 5.12:** Ansprechverhalten eines TPPS- und TCPP-Dextran-Sensors  
(Meßwellenlängen für TPPS ( $\lambda_{\text{EX}} = 575 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 628 \text{ nm}$ ) und TCPP ( $\lambda_{\text{EX}} = 425 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 612 \text{ nm}$ ),  
 $c_{\text{Hg(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ , Borat-Puffer, pH=8; Erklärung siehe Text)

Die Regenerierung der Sensoren ist zwar mit reiner Pufferlösung möglich (Borat-Puffer, pH = 8), aber mit Regenerierungszeiten > 24 h sehr lange. Aus diesem Grunde wurde die Demetallierung der Sensoren durch Spülen mit 0,1 N HCl beschleunigt. Die Regenerierungszeiten liegen dann im Bereich der Beprobungszeiten.

In Abbildung 5.13 sind Beprobungen und Regenerierungen eines TPPS-Dextran-Sensors mit Hg(II)-haltigen Pufferlösungen unterschiedlicher Konzentrationen ( $c_{\text{Hg(II)}} = 10^{-3}$  bis  $10^{-7} \text{ mol/l}$ ) dargestellt. Darin wird das Wesen der kinetischen Auswertung veranschaulicht. Als Sensorsignal wird nicht der Sättigungswert, sondern die Steigung der Ansprechkurve verwendet.

Die Regenerierung der Sensoren mit 0,1 N HCl ist spektral nicht zu beobachten (gestrichelte Linie), da unter diesen Bedingungen die protonierte Form des Porphyrins mit eigenen spektralen Eigenschaften vorliegt.



**Abb. 5.13:** Ansprech- und Regenerierungsverhalten eines TPPS-Dextran-Sensors bei kinetischer Auswertung der Signale (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX}= 575$  nm,  $\lambda_{Em}= 628$  nm, Borat-Puffer, pH=8; Beprobung (durchgezogene Linie), Regenerierung (gestrichelte Linie; spektral nicht zu beobachten); Beprobungs- und Regenerierungsdauer  $\Delta t_{kin}= 30$  min; weitere Erklärungen siehe Text)

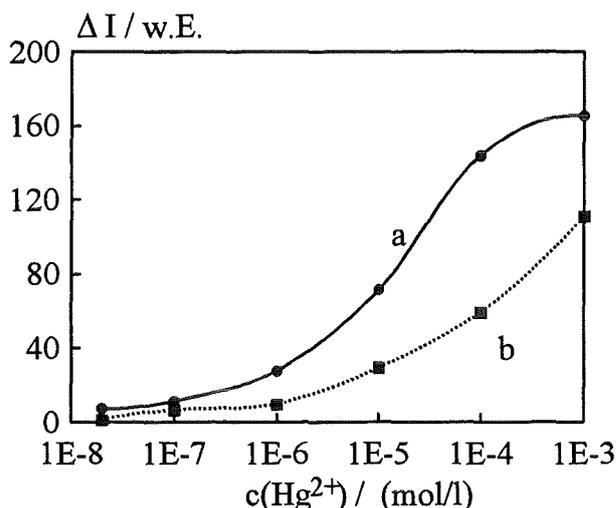
### 5.2.2.3 Kalibration

Die Konzentrationsabhängigkeit der Sensorsignale wurde an einem Sensor untersucht, der mit Hg(II)-haltigen Pufferlösungen mit Konzentrationen von  $2 \cdot 10^{-8}$  bis  $10^{-3}$  mol/ beprobt wurde. In Abbildung 5.14 ist eine Kalibrationskurve nach thermodynamischer Auswertung der Signale (d.h. Messung bis zum Gleichgewichtswert; Kurve a) und eine Kalibrationskurve nach kinetischer Auswertung (d.h. Messung nach 30minütiger Beprobungsdauer; Kurve b) dargestellt.

Die durch kinetische Auswertung erhaltene Kalibrationskurve (Kurve b in Abbildung 5.14) überdeckt bei einer Meßzeit von 30 min einen Meßbereich von  $10^{-7}$  bis  $10^{-3}$  mol l<sup>-1</sup>.

Aus der Kalibrationskurve a) in Abbildung 5.14 (thermodynamische Auswertung) ergibt sich ebenfalls ein Meßbereich von über 4 Konzentrationsdekaden. Für diese Kalibrationskurve wurden rechnerische Kurvenanpassungen mit dem Computerprogramm GraFIT<sup>®</sup> durchgeführt. Die vom Programm verwendeten Gleichungen sind in Abschnitt 4.5

aufgeführt. Es wurde festgestellt, daß sich die Kalibrationskurve a) in Abbildung 5.14 weder mit einem Bindungsmodell der Stöchiometrie Hg:TPPS = 1:1 (Gleichung der Kurvenanpassung Gl. 4.1 in Abschnitt 4.5) noch mit einem Modell der Stöchiometrie 2:1 (Gl. 4.2) anpassen läßt.

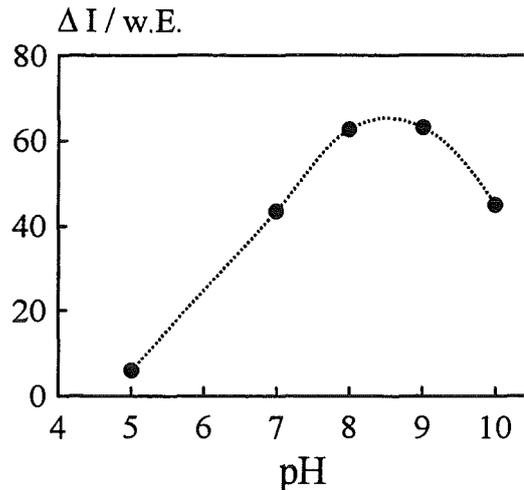


**Abb. 5.14:** Kalibration eines TPPS-Dextran-Sensors nach thermodynamischer (a) und kinetischer (b) Signalauswertung (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{EX}} = 575 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 628 \text{ nm}$ , Borat-Puffer, pH=8; Beprobungsdauer: Kurve a) 2 h, Kurve b) 30 min); weitere Erklärungen siehe Text)

Dieses Verhalten läßt sich dadurch erklären, daß Hg(II)-Ionen mit TPPS Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrien ausbilden [61,62]. In wäßriger Lösung werden Komplexe mit 1:1- und 2:1-Stöchiometrie, sowie Sandwichkomplexe gebildet. Es ist also zu erwarten, daß auch im immobilisierten Zustand eine Mischung dieser möglichen Komplexstrukturen vorliegt. Eine Aussage über die Dissoziationskonstanten des immobilisierten Hg-TPPS-Komplexes kann somit aufgrund der komplexen stöchiometrischen Verhältnisse nicht getroffen werden.

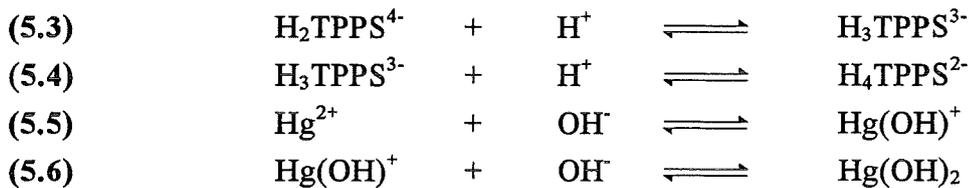
#### 5.2.2.4 Einfluß des pH-Wertes

Zur Ermittlung des pH-Einflusses auf die Sensorsignale wurde ein TPPS-Dextran-Sensor mit Hg-haltigen Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte über einen Zeitraum von 30 min beprobt. Die erhaltenen Sensorsignale  $\Delta I$  sind in Abbildung 5.15 gegen den pH-Wert aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß ein Optimum für die Komplexierung im Sensor bei pH-Werten zwischen 8 und 9 liegt. Sowohl zu größeren als auch zu kleineren pH-Werten hin werden geringere Signale gemessen. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Komplexierungsverhalten von TPPS mit Hg(II)-Ionen in wäßriger Lösung überein [54].



**Abb. 5.15:** *pH-Einfluß auf das Sensorsignal* (Experimentelle Daten:  $\lambda_{EX}= 575 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{EM}= 628 \text{ nm}$ ,  $c_{Hg(II)}= 10^{-4} \text{ mol/l}$  Borat-Puffer; Beprobungs- und Regenerierungsdauer  $\Delta t_{kin}= 30 \text{ min}$ )

Eine Erklärung für dieses Verhalten liegt in den Säure-Base-Gleichgewichten von TPPS (Gleichung 5.3 und 5.4) und Hg(II)-Ionen begründet (Gleichung 5.5 und 5.6):



Im Säuren verschiebt sich das Gleichgewicht von TPPS ( $H_2TPPS^{4-}$  in Gl. 5.3 mit zwei inneren Protonen, vgl. Abb. 3.4) zu seiner protonierten Form  $H_4TPPS^{2-}$ , die keine Komplexbildung mit Hg(II)-Ionen eingeht. Im Alkalischen dagegen kann eine Gleichgewichtsverschiebung der  $Hg^{2+}$ -Ionen zu  $Hg(OH)^+$  und  $Hg(OH)_2$  stattfinden, die wiederum nicht mit TPPS komplexieren.

### 5.2.2.5 Stabilität

Die Lagerstabilität von Porphyrin-Dextran-dotierten Silikagel-Filmen wurde bereits in Abschnitt 5.1.3.4 diskutiert. Bei der Charakterisierung der Sensoren wurden diese ständig mit Analyt- und Regenerierungslösungen umspült, womit ein stärkerer Rückgang des Farbstoffsignals von etwa 9 % pro Woche verbunden war. Eine Ursache hierfür dürfte die mechanische Beanspruchung der Schicht durch die Beprobung sein [54].

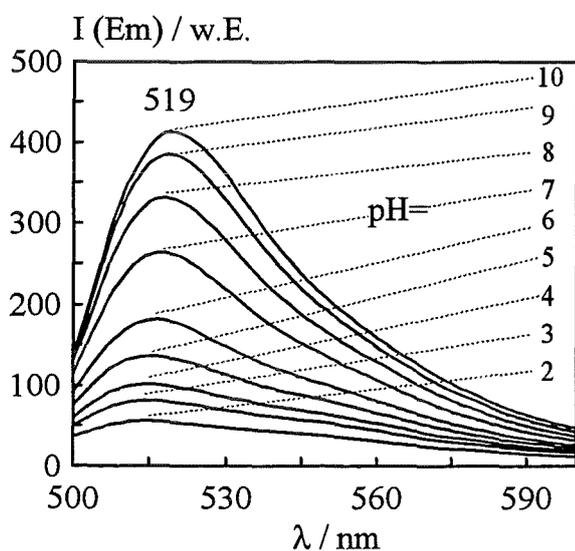
## 5.2.3 Untersuchung des Systems Fluorescein – pH

### 5.2.3.1 Spektrales Verhalten

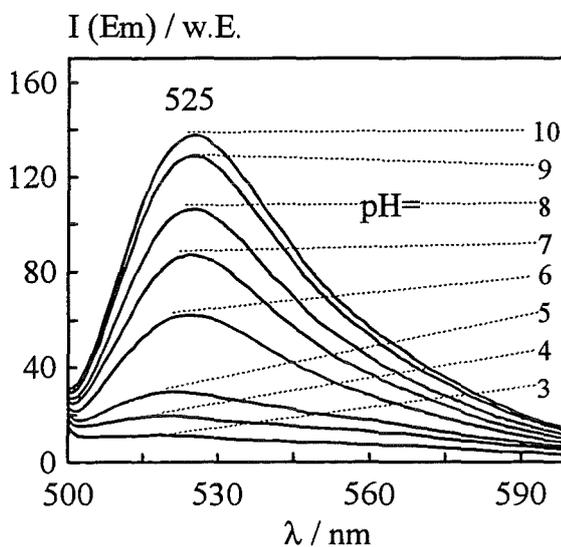
Fluorescein-Dextran wird zur Bestimmung von intrazellulären pH-Werten verwendet, indem es durch Mikroinjektion in eine Zelle eingeführt wird. Da es aufgrund des hohen Molekulargewichts und der Hydrophilie die Zellmembran nicht wieder durchdringen kann, lassen sich pH-Werte in Zellen über längere Zeiträume untersuchen, als dies mit monomeren Indikatoren möglich wäre. Eben dieser Effekt soll zur Herstellung von stabilen, pH-sensitiven Schichten für optochemische Sensoren ausgenutzt werden. In den folgenden Untersuchungen wurde ein Fluorescein-Dextran mit einem Molekulargewicht von 70.000 g/mol und einem Farbstoff-Belegungsgrad von 13,4 Mol Fluorescein pro Mol Dextran verwendet, das in Silikagel- und PolyHEMA-Filmen immobilisiert wurde. Die Silikagel-Filme wurden wegen der besseren Stabilität der Schichten durch saure Katalyse des Sol-Gel-Prozesses hergestellt (vgl. Abbildung 5.6 in Abschnitt 5.1.3.1).

In Abbildung 5.16 ist das spektrale Verhalten von Fluorescein-Dextran in Silikagel- (im folgenden abgekürzt als „FD-SG-Sensor“) und in PolyHEMA-Filmen („FD-PH-Sensor“) dargestellt.

a) FD-SG-Sensor



b) FD-PH-Sensor



**Abb. 5.16:** Emissionsspektren von immobilisiertem Fluorescein-Dextran in Silikagel-Filmen (a) und PolyHEMA-Filmen (b) (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ , Universalpuffer; Zahlenangaben entsprechen den eingestellten pH-Werten)

Die Emissionswellenlängen ( $\lambda_{Em}$ ) des Fluorescein-Dextrans werden durch die Immobilisierung gegenüber den entsprechenden Wellenlängen in Lösung leicht verschoben (siehe Tabelle 5.11).

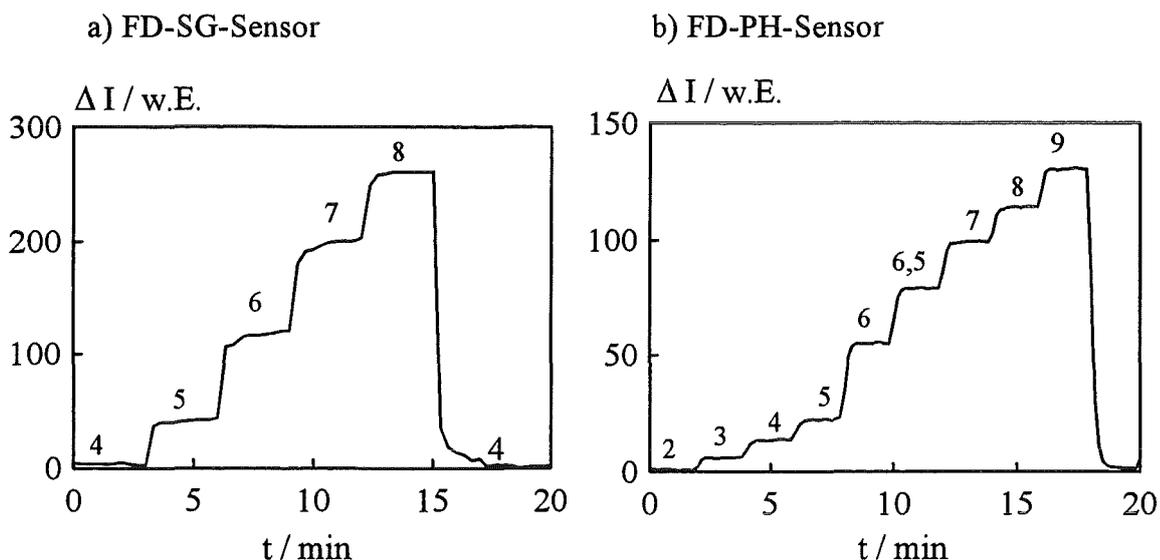
**Tab. 5.11:** Emissionswellenlängen von Fluorescein-Dextran (in Universalpuffer, pH=8)

Fluorescein-Dextran (pH=8)	$\lambda_{Em}$
in Lösung	522 nm
in Silikagel-Filmen	519 nm
in PolyHEMA-Filmen	525 nm

Dieser Matrix-Effekt ist jedoch mit + 3 nm für PolyHEMA- und -3 nm für Silikagel-Schichten verhältnismäßig gering.

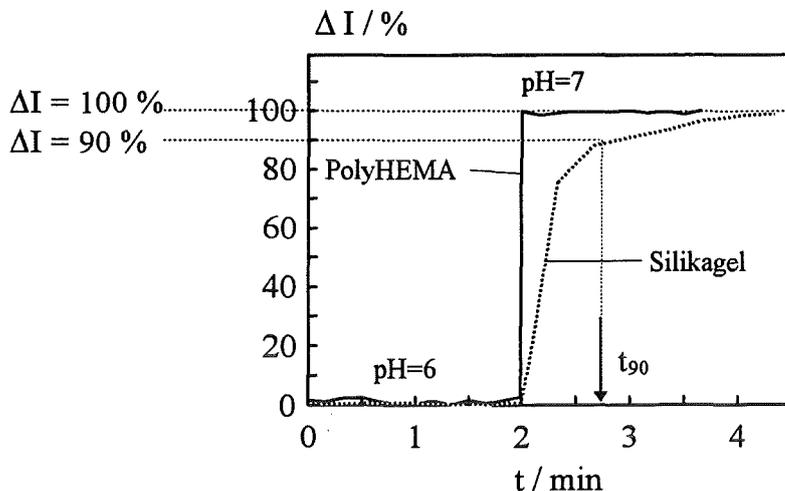
### 5.2.3.2 Ansprechverhalten und Reproduzierbarkeit der Signale

Das Ansprechverhalten der Fluorescein-Dextran-Sensoren wurde durch Beprobung mit Universalpuffer unterschiedlicher pH-Werte untersucht. Die zeitlichen Verläufe der Signale sind in Abbildung 5.17 durch Auftragung des Sensorsignals  $\Delta I$  (= Differenz der Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen pH-Werten) gegen die Beprobungsdauer  $t$  dargestellt.



**Abb. 5.17:** Ansprechverhalten von immobilisiertem Fluorescein-Dextran in Silikagel-Filmen (a) und in PolyHEMA-Filmen (b) (Experimentelle Daten:  $\lambda_{Ex} = 473$  nm,  $\lambda_{Em} = 522$  nm, Universalpuffer; Zahlenangaben entsprechen den eingestellten pH-Werten)

Es ist zu erkennen, daß beide FD-Sensoren empfindlich und reversibel auf pH-Änderungen reagieren. Bezüglich der Ansprechzeiten wurden deutliche Unterschiede bei den beiden Matrices festgestellt. Dies ist in Abbildung 5.18 für einen pH-Sprung von 6 auf 7 aufgezeigt.

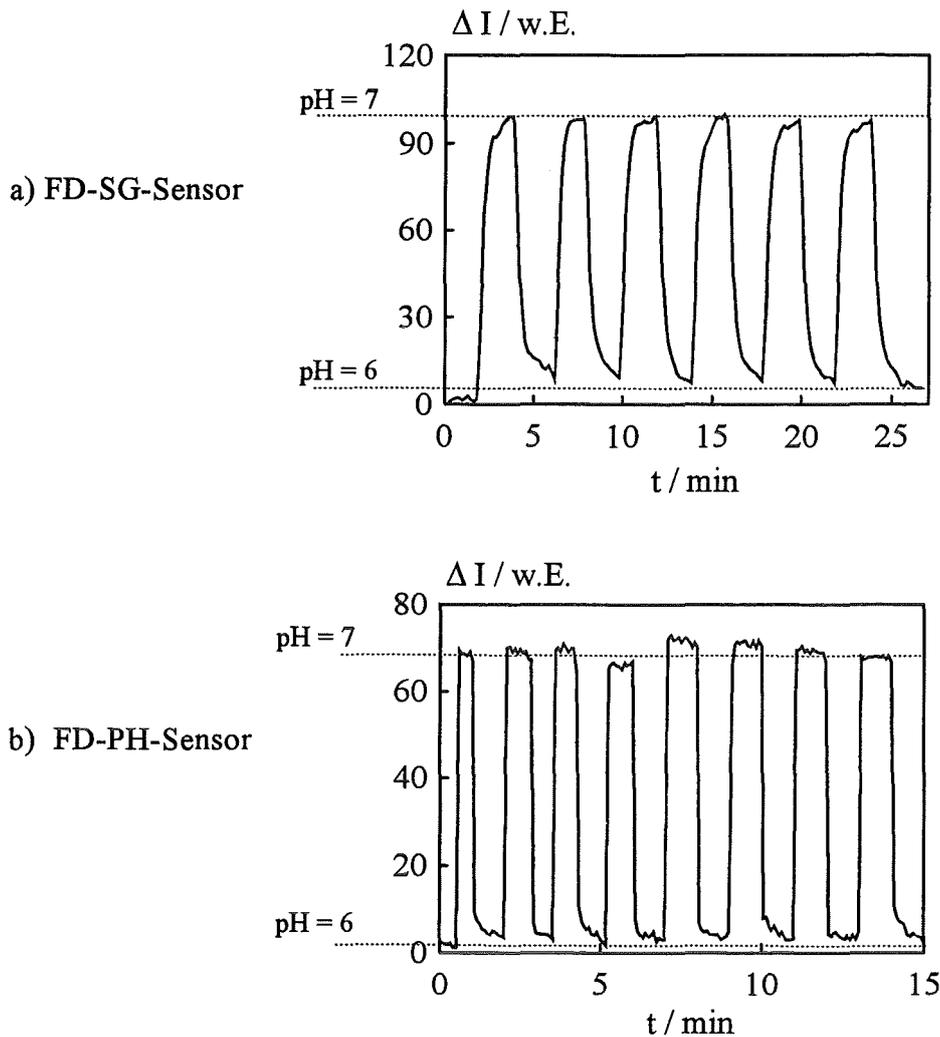


**Abb. 5.18:** Ansprechzeiten von immobilisiertem Fluorescein-Dextran in Silikagel- und PolyHEMA-Filmen (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 522 \text{ nm}$ , Universalpuffer,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ )

Für die PolyHEMA-Filme wurden Ansprechzeiten bis zum Sättigungswert im Bereich von 3-5 Sekunden gemessen, während bei den Silikagel-Filmen der Sättigungswert erst nach etwa 120 Sekunden erreicht war. Die  $t_{90}$ -Zeiten (d.h. die Ansprechzeiten bis zum Erreichen von 90 % des Sättigungswertes,  $\Delta I = 90 \%$  in Abb. 5.18) der FD-SG-Sensoren liegen zwischen 20 und 40 Sekunden. Die PolyHEMA-Schichten reagieren also um über eine Größenordnung schneller als die Silikagel-Schichten.

Die Ansprechzeiten der PolyHEMA-Schichten sind deutlich kürzer als die der meisten anderen pH-sensitiven Optroden, die typischerweise Ansprechzeiten von über 30 Sekunden bis in den Minutenbereich aufweisen [31-33,122]. Interessanterweise sind die Ansprechzeiten auch kürzer als die einer PolyHEMA-Schicht, an die ein pH-Indikator direkt kovalent angebunden wurde (Ansprechzeit etwa 90 s) [103]. Dies deutet darauf hin, daß bei der Immobilisierung des Indikator-Dextrans die Indikatormoleküle über eine freiere Beweglichkeit – und damit über eine größere Reaktivität – verfügen als bei der direkten kovalenten Anbindung an die Matrix.

Die Reproduzierbarkeit der Signale wurde durch abwechselnde Beprobung der Sensoren mit Universalpuffer pH 6 und pH 7 untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.19 für die beiden Matrices wiedergegeben.



**Abb. 5.19:** *Reproduzierbarkeit der Signale beim Wechsel zwischen pH 6 und pH 7*  
 (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 522 \text{ nm}$ , Universalpuffer pH 6 und pH 7, Beprobungs- und Regenerierungsdauer bei den FD-SG-Sensoren: 2 min; Abkürzungen: FD-SG = Fluorescein-Dextran in Silikagel-Filmen, FD-PH = Fluorescein-Dextran in PolyHEMA-Filmen)

Für die Signale beim pH-Wert von 7 ergeben sich daraus die folgenden Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen und relativen Fehlern:

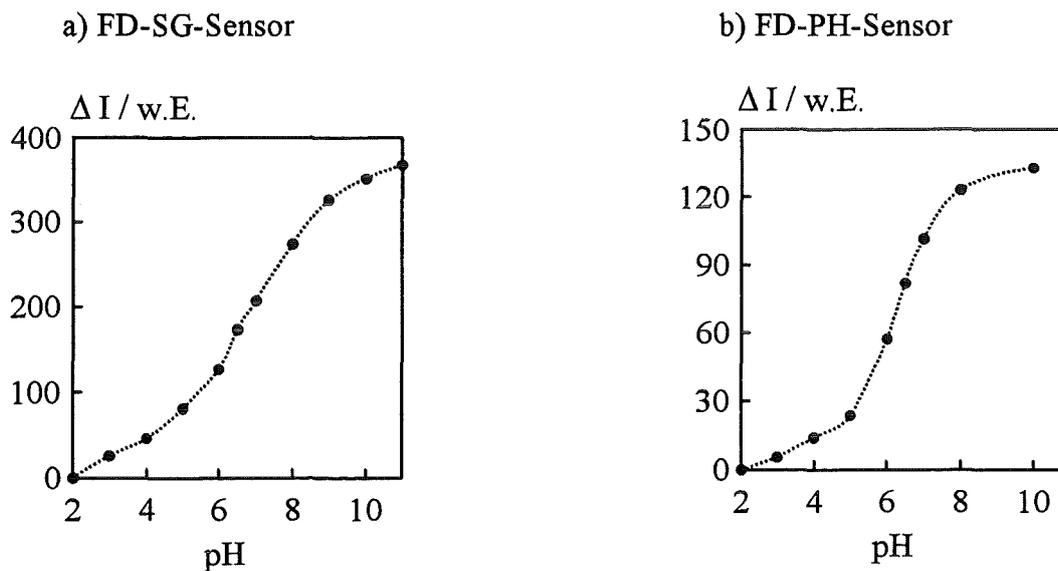
FD-SG-Sensor:	$\Delta I = 95,6 \pm 1,0 = 95,6 \pm 1,0 \%$	(n=6)
FD-PH-Sensor:	$\Delta I = 69,5 \pm 2,1 = 69,5 \pm 3,0 \%$	(n=8)

Definiert man die Auflösungsgrenze für das Meßverfahren nach Kaiser aus dem dreifachen Wert der Standardabweichungen der Signale [110], so läßt sich daraus für die SG-FD-Sensoren im Bereich zwischen pH 6 und pH 7 eine Auflösung von 0,03 pH-Einheiten und für die FD-PH-Sensoren eine entsprechende Auflösung von 0,09 pH-Einheiten ermitteln.

Die Signalauflösung der FD-SG-Sensoren ist also etwa 3mal so gut wie die der FD-PH-Sensoren.

### 5.2.3.3 Titrationskurven

Durch Auftragen der Sensorsignale  $\Delta I$  gegen den pH-Wert werden fluorimetrische Titrationskurven des immobilisierten Fluorescein-Dextrans erhalten, die in Abbildung 5.20 dargestellt sind.



**Abb. 5.20:** Titrationskurven der FD-SG- (a) und FD-PH-Sensoren (b)  
 (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 522 \text{ nm}$ , Universalpuffer, Beprobungsdauer: 5 min/pH;  
 Abkürzungen: FD-SG = Fluorescein-Dextran in Silikagel-Filmen, FD-PH = Fluorescein-Dextran in  
 PolyHEMA-Filmen)

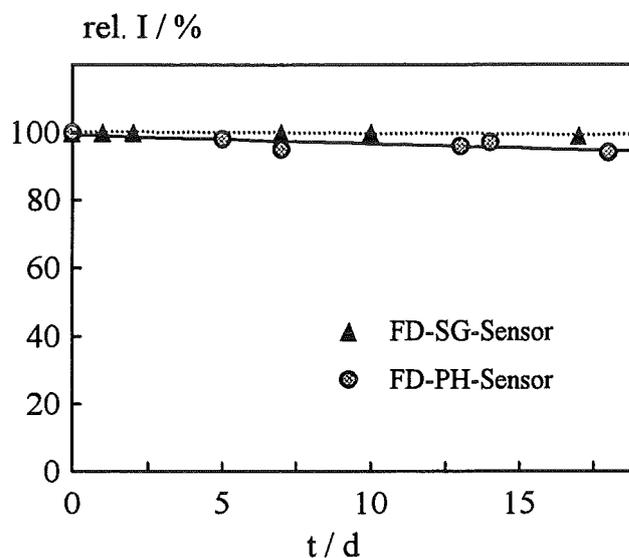
Beide Titrationskurven in Abbildung 5.20 zeigen eine Form, die für pH-Optroden mit Fluorescein als Indikator typisch sind [32,33]. Die Kurvenverläufe sind deutlich flacher als bei pH-Indikatoren, die über einen einzigen  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert verfügen.

Fluorescein kann in sechs verschiedenen protolytischen Formen vorliegen, die in Abbildung 3.6 (Abschnitt 3.2.2) dargestellt sind [71]. Zwischen diesen Formen werden drei Säure-Base-Gleichgewichte mit den  $\text{pK}_\text{S}$ -Werten  $\text{pK}_{\text{S}1} = 2,2$ ,  $\text{pK}_{\text{S}2} = 4,4$  und  $\text{pK}_{\text{S}3} = 6,7$  formuliert. Aus diesem Grunde verlaufen die Titrationskurven des Fluoresceins wesentlich flacher, als dies bei pH-Indikatoren mit nur einem  $\text{pK}_\text{S}$ -Wert der Fall ist. Dieser Effekt kann für einen optochemischen pH-Sensor sogar erwünscht sein, da sich der Meßbereich des Sensors über mehrere pH-Einheiten erstreckt [33].

Bei pH-Indikatoren mit einem  $pK_S$ -Wert kann in der Regel nur über eine bis zwei pH-Einheiten empfindlich gemessen werden [36].

#### 5.2.3.4 Stabilität

Die Stabilität der Sensoren wurde über einen Zeitraum von 18 Tagen bei Lagerung in Universalpuffer (pH = 7) untersucht. In Abbildung 5.21 sind die zeitlichen Verläufe der relativen Fluoreszenzintensitäten der Fluorescein-Dextran-Sensoren wiedergegeben.



**Abb. 5.21:** Lagerstabilitäten der FD-SG- und FD-PH-Sensoren (Experimentelle Daten:  $\lambda_{Ex}$  = 473 nm,  $\lambda_{Em}$  = 522 nm, Lagerung in Universalpuffer, pH = 7; Abkürzungen: FD-SG = Fluorescein-Dextran in Silikagel-Filmen, FD-PH = Fluorescein-Dextran in PolyHEMA-Filmen)

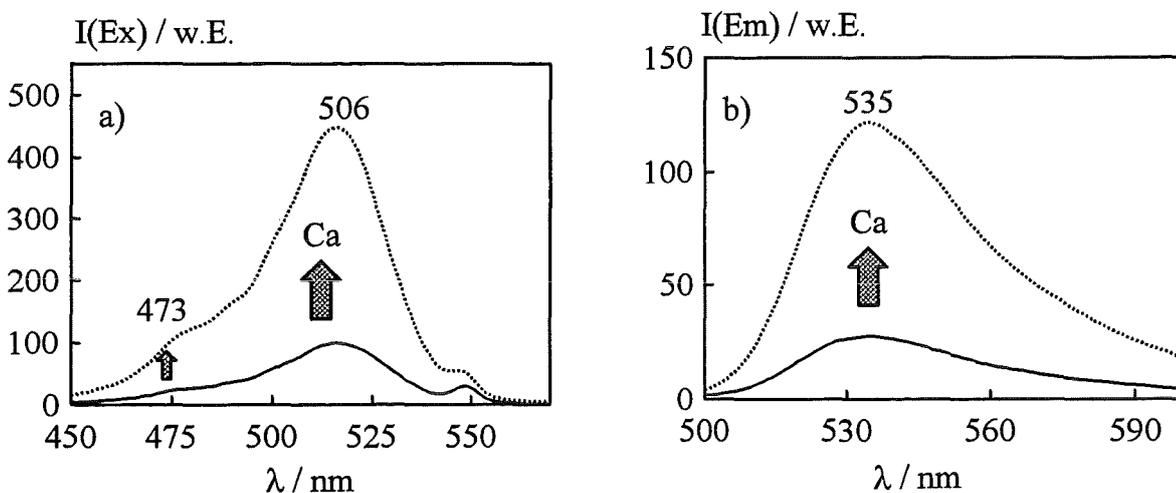
Fluorescein-Dextran ist sowohl in Silikagel-Schichten, die nach saurer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses hergestellt wurden, als auch in PolyHEMA-Schichten stabil eingebunden. Beide Sensoren zeigen nach 18 Tagen Lagerung noch über 95 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität. Dagegen wird Fluorescein, welches nicht an Dextran angebunden ist, innerhalb von 3 Stunden vollständig aus einer PolyHEMA-Matrix ausgewaschen (nicht gezeigt). Das Stabilitätsverhalten von Fluorescein und Fluorescein-Dextran in Silikagel-Schichten ist bereits in Abschnitt 5.1.3.1 ausführlich diskutiert worden.

Es konnte somit gezeigt werden, daß sich durch die Immobilisierung von Dextran-gebundenem Fluorescein in hydrophilen Gel-Matrices stabile, pH-sensitive Schichten für optochemische Sensoren entwickeln lassen.

## 5.2.4 Untersuchung des Systems Calcium Green – Calcium(II)-Ionen

### 5.2.4.1 Spektrales Verhalten

Zweiwertiges Calcium ist wahrscheinlich der wichtigste und zugleich allgegenwärtige Botenstoff in Zellen, der eine bedeutende Rolle bei der Muskelkontraktion, Kommunikation in Nervenzellen, Hormonausschüttung und der Aktivierung von Immunzellen spielt [76]. Für die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen in Zellen wurden spezielle Fluoreszenzindikatoren für Calciumionen entwickelt, zu denen auch Calcium Green-1 zählt (Strukturformel siehe Abb. 3.8). Zur Langzeit-Markierung von Zellen sind die entsprechenden Dextran-Verbindungen mit unterschiedlichen Molekulargewichten kommerziell erhältlich. In Abbildung 5.22 sind die Anregungs- und Emissionsspektren von Calcium Green-1-Dextran (Molekulargewicht = 70.000 g/mol; im folgenden abgekürzt als „CGD“) in wässriger Pufferlösung dargestellt. Als Puffersysteme für die Calcium-Analytik werden üblicherweise sogenannte biologische Puffer bei neutralem pH-Wert verwendet. Wegen des ausgedehnten Pufferbereichs von pH= 6,3 bis 9,5 wurden die folgenden Untersuchungen in Bis-Tris-Propan-Puffer (0,02 mol/l; pH = 7; im folgenden abgekürzt „BTP“) durchgeführt.

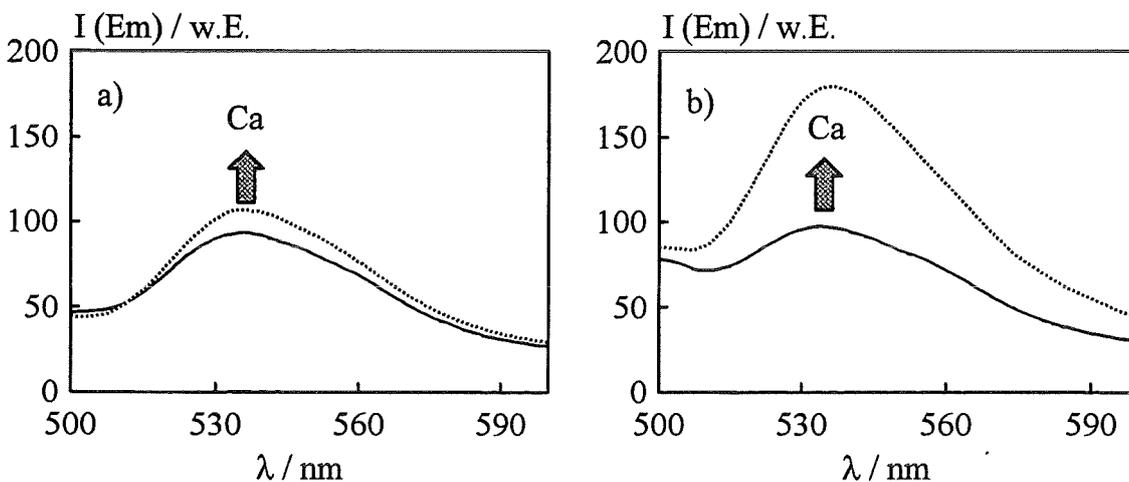


**Abb. 5.22:** Anregungsspektren (a) und Emissionsspektren (b) von CGD in wässriger Lösung (durchgezogene Linie  $c(\text{Ca}^{2+})=0$ , gestrichelte Linie  $c(\text{Ca}^{2+})=10^{-5} \text{ mol/l}$ ) (Experimentelle Daten: (a)  $\lambda_{\text{Em}}=535 \text{ nm}$ , (b)  $\lambda_{\text{Ex}}=473 \text{ nm}$ ; BTP-Puffer, pH= 7; Angabe ↑: Erhöhung der Fluoreszenz bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen)

Der Calciumkomplex des Indikators (gestrichelte Linie in Abb. 5.22) zeigt etwa eine 4fach höhere Fluoreszenzintensität gegenüber der Calcium-freien Form des Komplexbildners (durchgezogene Linie). Zwischen den Maxima der Banden für die Anregung

( $\lambda_{\text{Ex}} = 506 \text{ nm}$ ) und für die Emission ( $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$ ) liegt ein Abstand (Stokes-Verschiebung) von 29 nm. Dieser Abstand ist für Messungen im Sensor aufgrund von erhöhten Anteilen von Streulicht und Reflexionen zu gering, so daß eine Anregungswellenlänge im kürzerwelligen Bereich des Spektrums ausgewählt wurde. Da in den miniaturisierten Meßanordnungen, die im nächsten Kapitel 5.3 vorgestellt werden, als Lichtquelle für die Anregung ein Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 473 nm eingesetzt wurde, wurde diese Wellenlänge auch bei den Makrosensoren als Anregungswellenlänge verwendet.

Die Immobilisierung von CGD erfolgte in den beiden bisher verwendeten Matrices: Silikagel und PolyHEMA. Wie bei den in Abschnitt 5.2.2 behandelten Quecksilbersensitiven Schichten, war bei den CGD-dotierten Silikagel-Filmen nur bei basischer Katalyse des Sol-Gel-Prozesses ein Ansprechverhalten auf Ca(II)-Ionen festzustellen. In Abbildung 5.23 ist das spektrale Verhalten zweier CGD-Sensoren mit etwa dem gleichen Farbstoffgehalt (Silikagel- (Abb. 5.23 a) und PolyHEMA-Matrix (Abbildung 5.23 b)) bei der Beprobung mit Ca(II)-haltiger Pufferlösung ( $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) dargestellt. Die Sensoren wurden so lange in der Durchflußzelle beprobt, bis keine spektralen Änderungen mehr festgestellt wurden.

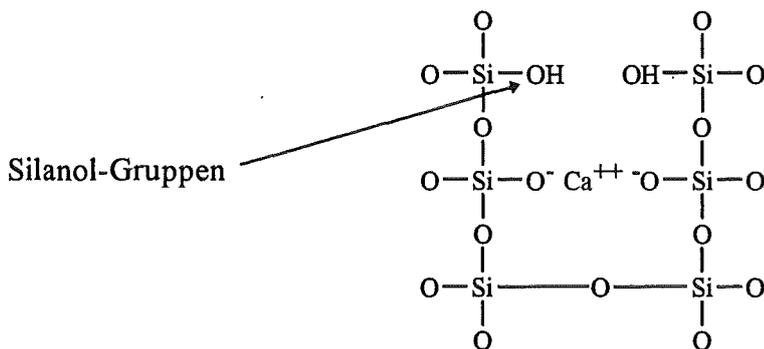


**Abb. 5.23:** Emissionsspektren von immobilisiertem CGD in Silikagel- (a) und PolyHEMA-Schichten (b) (durchgezogene Linie  $c(\text{Ca}^{2+}) = 0$ , gestrichelte Linie  $c(\text{Ca}^{2+}) = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ , BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ ; Angabe  $\uparrow$ : Erhöhung der Fluoreszenz bei Beprobung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen)

Die Emissionswellenlängen des immobilisierten Indikators unterscheiden sich mit  $\lambda_{\text{Em}} = 536 \text{ nm}$  in den Silikagel-Filmen und  $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$  in den PolyHEMA-Filmen nur kaum vom entsprechenden Verhalten in Lösung ( $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$ ). Beim Vergleich von Abbildung

5.23 (a) und (b) ist zu erkennen, daß die Sensitivität der mit CGD dotierten Schichten deutlich von der Art der Matrix abhängt. Die Silikagel-Schicht zeigt unter gleichen experimentellen Bedingungen nur etwa 1/10 des Signals der PolyHEMA-Schicht.

Zur geringen Sensitivität der Sol-Gel-Schichten können verschiedene Faktoren beitragen. Die Hydrophilie der Sol-Gel-Filme wird durch einen gewissen Anteil an Silanol-Gruppen (Si-OH-Gruppen) hervorgerufen, die nicht durch Polykondensationsreaktionen (gemäß Abschnitt 3.3.2) quervernetzt wurden. Durch diese Gruppen kann Silikagel als Ionenaustauscher wirken, wie in Abbildung 5.24 schematisch dargestellt ist [97].



**Abb. 5.24:** Ionenaustausch von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an freien Silanol-Gruppen

Derartige Wechselwirkungen der  $\text{Ca(II)}$ -Ionen mit der Matrix stehen in Konkurrenz zur Komplexbildung mit dem Indikator, wodurch die Signale reduziert werden können. Weiterhin wäre es möglich, daß der Indikator in der Silikagel-Matrix sehr fest eingebunden ist und somit eine Komplexbildung mit Calcium sterisch gehindert ist. Aufgrund der erheblich besseren Sensitivität wurden weitere Charakterisierungen von immobilisiertem CGD in PolyHEMA-Schichten durchgeführt.

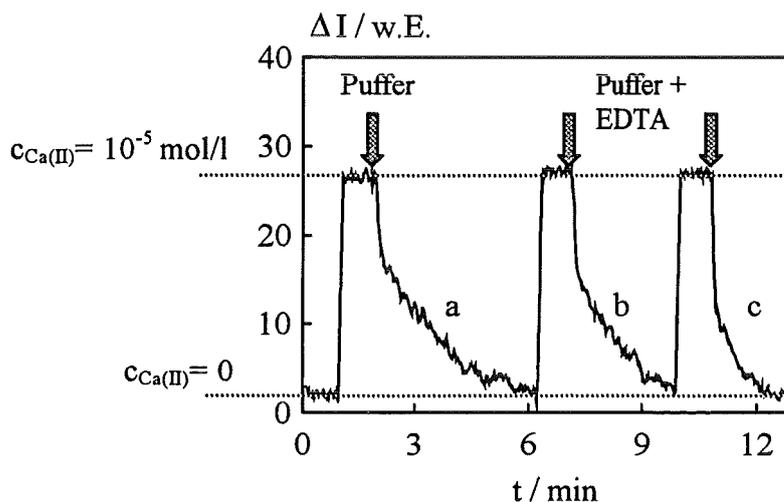
#### 5.2.4.2 Ansprechverhalten und Reproduzierbarkeit der Signale

Beim Beprobieren der Calcium-Sensoren wurde eine erhebliche Kontamination des Meßpuffers (BTP; 0,02 mol/l in bidestilliertem Wasser; pH = 7) mit  $\text{Ca(II)}$ -Ionen festgestellt. Dies ist damit zu erklären, daß Calcium als dritthäufigstes Element der Erdkruste [123] in nahezu allen Stoffen und wäßrigen Medien als Nebenbestandteil vorkommt. Um die sensitiven Schichten charakterisieren zu können, war also zunächst die Herstellung von Calcium-armen Pufferlösungen notwendig. Dazu wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet.

1. Zusatz des Komplexbildners Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
2. Entionisierung mit dem Ionenaustauscher-Harz Chelex-100, das aus Polystyrolperlen mit immobilisierter Iminoessigsäure als Komplexbildner für Kationen besteht. Die Entionisierung des Puffers erfolgte durch Zusatz von 5 g Chelex-100 pro 100 ml Pufferlösung und intensives Schütteln über Nacht. Das Ionenaustauscher-Harz wurde durch Dekantieren von der Pufferlösung abgetrennt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei zwischen jeder Reinigungsstufe der pH-Wert des Puffers kontrolliert und nachreguliert werden mußte.

Die zweite Methode hat den Vorteil, daß der Pufferlösung keine Komplexbildner zugesetzt werden, die durch eine Konkurrenzreaktion mit dem Indikator die Meßdaten beeinflussen können. Wie in Abschnitt 5.2.4.3 genauer diskutiert wird, verbleiben jedoch auch nach mehrfachen Reinigungsstufen Restkontaminationen an Ca(II)-Ionen in den Pufferlösungen. Für die Charakterisierungen der Calcium-Sensoren bedeutet dies, daß immer dann wenn der Sensor vollständig Ca-frei sein sollte mit EDTA-haltigen Pufferlösungen regeneriert wurde. Die Kalibrationen wurden dagegen in EDTA-freien Pufferlösungen durchgeführt.

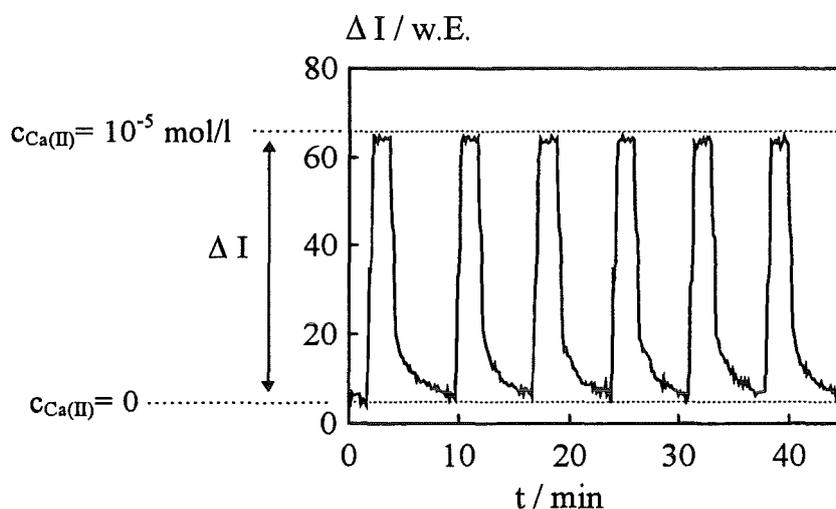
In Abbildung 5.25 ist der zeitliche Verlauf des Ansprech- und Regenerierungsverhaltens eines CGD-Sensors dargestellt. Es sind drei Beprobungen mit Ca(II)-haltigen Pufferlösungen ( $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) und Regenerierungen mit EDTA-haltigen Pufferlösungen unterschiedlicher EDTA-Konzentrationen gezeigt.



**Abb. 5.25:** Ansprech- und Regenerierungsverhalten eines CGD-Sensors (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{EX}} = 473 \text{ nm}$ , BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ ; Angabe: (a) Regenerierung mit Ca-freiem Meßpuffer, (b) mit EDTA in Meßpuffer  $c_{\text{EDTA}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ , (c) dto.  $c_{\text{EDTA}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ )

Der Sensor verfügt über sehr kurze Ansprechzeiten im Bereich von 5 Sekunden. Die Regenerierungszeiten hängen von der Art der Regenerierungslösung ab. Bei Regenerierung mit Ca-freiem Meßpuffer (Index a in Abb. 5.25) beträgt die Zeit bis zum Erreichen des Ausgangssignals etwa 4 Minuten. Durch einen Zusatz von EDTA läßt sich die Regenerierungszeit auf 2 Minuten ( $c_{\text{EDTA}} = 10^{-5}$  mol/l; Index b in Abb. 5.25) bzw. 1,5 Minuten ( $c_{\text{EDTA}} = 2 \cdot 10^{-5}$  mol/l; Index c in Abb. 5.25) verkürzen.

Durch wiederholtes Beprobieren und Regenerieren des Sensors wurde die Reproduzierbarkeit der Signale ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.26 für 6 Calcium-Messungen ( $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5}$  mol/l) dargestellt.



**Abb. 5.26:** Reproduzierbarkeit der Signale eines CGD-Sensors  
(Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 535$  nm, BTP-Puffer, pH= 7)

Für eine Konzentration von  $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5}$  mol/l wurden bei 6 Beprobungen folgende mittlere Signale  $\Delta I$  gemessen:

$$\Delta I = 57,2 \pm 1,2 = 57,2 \pm 2,1 \%$$

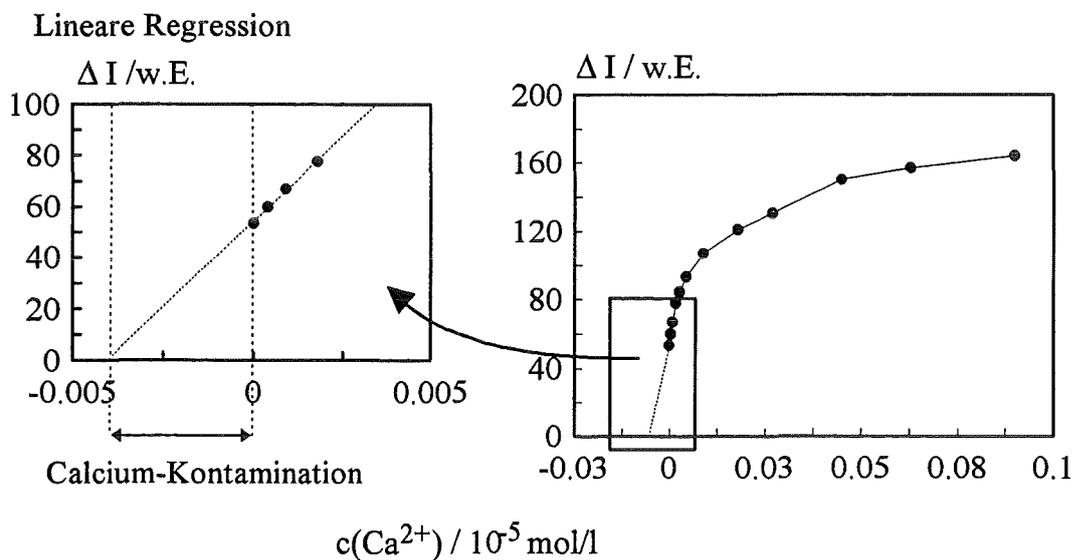
Aus den Standardabweichungen von 6 Messungen wurde ein relativer Fehler von  $\pm 2,1 \%$  ermittelt. Die Calcium-Bestimmungen sind also mit guter Reproduzierbarkeit möglich.

Besonders hervorzuheben sind die kurzen Ansprechzeiten der mit CGD dotierten PolyHEMA-Schichten von etwa 5 Sekunden. Diese sind deutlich kürzer als vergleichbare Werte in der Literatur, die zwischen einer [39] und 15 Minuten [44] liegen.

### 5.2.4.3 Kalibration

Wie bereits erwähnt wurde, mußten die für die Kalibration der Sensoren verwendeten Pufferlösungen zur Entfernung von Calcium-Kontaminationen mit dem Ionenaustauscher-Harz Chelex-100 vorbehandelt werden. Dabei stellte sich heraus, daß auch nach mehreren Reinigungsstufen keine völlig Calcium-freien Pufferlösungen erhalten werden konnten. Dazu tragen auch Kontaminationen aller verwendeten Gefäße (aus Polypropylen) und der Durchflußzelle bei.

Aus diesem Grunde wurde ein Standardadditionsverfahren zur Ermittlung der jeweiligen Calcium-Kontamination eingeführt. Im Bereich der niedrigsten meßbaren Konzentration wurden durch Addition von verdünnter Calcium-Maßlösung mehrere nahe aufeinanderfolgende Kalibrationspunkte aufgenommen, durch die eine mit Hilfe linearer Regression ermittelte Ausgleichsgerade gelegt wurde. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse ergab den Wert der unbekanntes Calcium-Kontamination. Um diesen Wert wurden alle Konzentrationen, die durch Zugabe von Calcium-Maßlösung in den Puffer eingestellt wurden, korrigiert. Das beschriebene Verfahren ist in Abbildung 5.27 anhand einer Kalibration dargestellt.



**Abb. 5.27:** Ermittlung einer unbekanntes Calcium-Kontamination mit Hilfe eines Standardadditionsverfahrens (Erläuterung siehe Text)

Aus der in Abbildung 5.27 gezeigten linearen Regression gehen folgende Parameter für die Geradengleichung (Gl. 5.7) hervor:

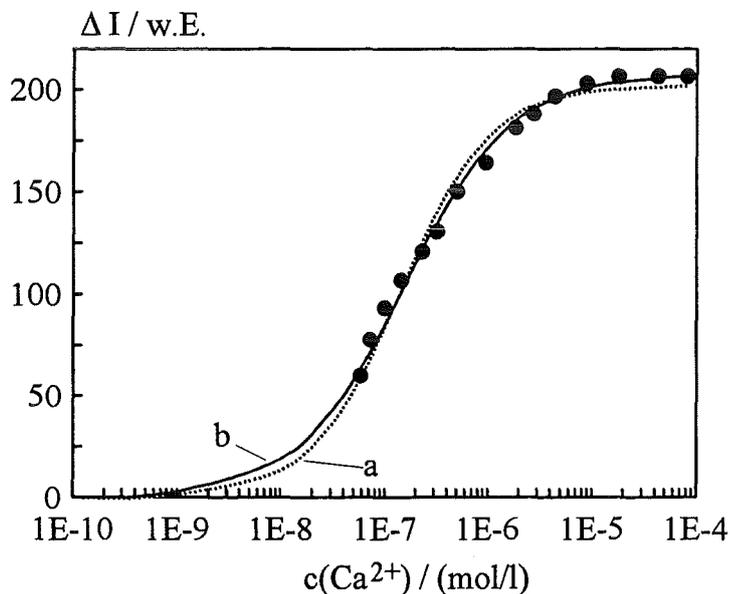
$$(5.7) \quad \Delta I = a \cdot c_{\text{Ca(II)}} + b; \quad a = 13329,2; \quad b = 54,2; \quad c_{\text{Ca(II)}} / (10^{-5} \text{ mol/l})$$

Korrelationskoeffizient  $r = 0,99$ ;

für  $\Delta I = 0$  gilt:  $c_{\text{Ca(II)}} = 4,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$

Mit dem Standardadditionsverfahren wurde eine Kontamination an Ca(II)-Ionen von  $4,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l}$  Ca(II)-Ionen ermittelt. Dieser Wert wurde zu allen eingestellten Calcium-Konzentrationen dieser Kalibration addiert. Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens wurden Kalibrationskurven ermittelt, wobei für jede Kalibration die Calcium-Kontamination in der Meßanordnung separat bestimmt wurde.

In Abbildung 5.28 ist die Kalibration eines CGD-Sensors nach dem beschriebenen Verfahren dargestellt. Es ist zu erkennen, daß – bedingt durch die oben diskutierten Rest-Kontaminationen – die Meßpunkte im unteren Konzentrationsbereich extrapoliert wurden. Der extrapolierte Bereich ist für Sensormessungen prinzipiell zugänglich, wenn es gelingt, entsprechend geringe Calcium-Konzentrationen einzustellen.



**Abb. 5.28:** Kalibration eines CGD-Sensors (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{EX}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 535 \text{ nm}$ , BTP-Puffer, pH= 7; Erklärung siehe Text)

In Abbildung 5.28 sind die Meßpunkte und Kurvenanpassungen für eine ideale 1:1-Stöchiometrie (Kurve a) und für ein abweichendes Verhalten (Kurve b) dargestellt. Die Anpassungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms GraFIT<sup>®</sup> unter Verwendung der Gleichungen 4.1 (Kurve a) und 4.3 (Kurve b) durchgeführt (siehe Abschnitt 4.5). Es ist zu erkennen, daß Kurve b eine gute Anpassung an die Meßpunkte darstellt, wohingegen Kurve a insgesamt etwas steiler verläuft.

Aus den Kalibrationsdaten von drei verschiedenen Sensoren wurden aus den Kurvenanpassungen (vom Typ a und b in Abbildung 5.28) die folgenden Werte für die fluorimetrisch ermittelte Dissoziationskonstante  $K_D$  und den Anpassungsfaktor  $s$  erhalten.

$$\begin{array}{ll} \text{Anpassung (a)} & K_D = 2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} \pm 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}; & s = 1 & (n= 3) \\ \text{Anpassung (b)} & K_D = 3,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} \pm 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}; & s = 0,83 \pm 0,02 & (n= 3) \end{array}$$

Aus den Werten für die Dissoziationskonstante nach Anpassung (a) und (b) wurde ein Mittelwert gebildet (mittlere Dissoziationskonstante):

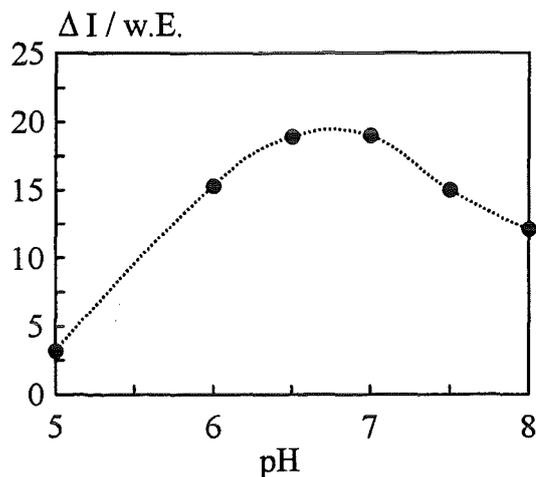
$$K_D = 2,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} \pm 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}; \quad (n= 6)$$

Der gemittelte Wert für die fluorimetrisch ermittelte Dissoziationskonstante des immobilisierten Calcium Green-Dextrans ( $K_D = 2,7 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ ) stimmt gut mit Literaturwerten für Calcium Green-Dextran in Lösung überein, für die Werte von  $K_D = 2,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$  bis  $K_D = 3,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$  gefunden werden [73]. Diese Werte können nach Herstellerangaben produktionsbedingt schwanken und hängen zudem von den jeweiligen experimentellen Bedingungen ab. Daraus kann geschlossen werden, daß das Komplexierungsverhalten des immobilisierten Indikators nur unwesentlich vom Verhalten in Lösung abweicht. Die Schwankungsbreite der Mittelwerte der Dissoziationskonstanten ist auf eine gewisse Unsicherheit bei der Bestimmung der Calcium-Kontaminationen zurückzuführen.

Der CGD-Sensor hat seine größte Empfindlichkeit im Konzentrationsbereich zwischen  $c_{Ca(II)} = 5 \cdot 10^{-8}$  und  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ . In biologischen Zellen, die sich im Ruhezustand befinden, werden typischerweise  $Ca(II)$ -Konzentrationen von  $10^{-7} \text{ mol/l}$  gefunden. Durch Ausschüttung von Calcium-Ionen werden in Zellen Informationen übermittelt. In diesem Zustand steigt der Calcium-Spiegel auf  $10^{-6}$  bis  $10^{-5} \text{ mol/l}$  an [76]. Dieser Aspekt ist für eine Miniaturisierung des Sensors zur Messung in biologischen Zellen von Bedeutung (siehe Abschnitt 5.3).

#### 5.2.4.4 Einfluß des pH-Wertes auf die Sensorsignale

Der Einfluß des pH-Wertes des Mediums auf die Sensorsignale wurde durch Beprobieren des Sensors mit Ca(II)-haltigen Pufferlösungen ( $c_{\text{Ca(II)}} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ ) unterschiedlicher pH-Werte untersucht. Die resultierenden Sensorsignale  $\Delta I$  sind in Abbildung 5.29 gegen den pH-Wert aufgetragen.



**Abb. 5.29:** *Abhängigkeit der Sensorsignale vom pH-Wert*

(Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$ ,  $c_{\text{Ca(II)}} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$ , BTP-Puffer, pH= 7)

Aus Abbildung 5.29 geht hervor, daß der Sensor bei pH 6,5 bis 7 ein Signaloptimum aufweist. Sowohl zu größeren und als auch zu kleineren pH-Werten hin werden geringere Sensorsignale  $\Delta I$  gemessen.

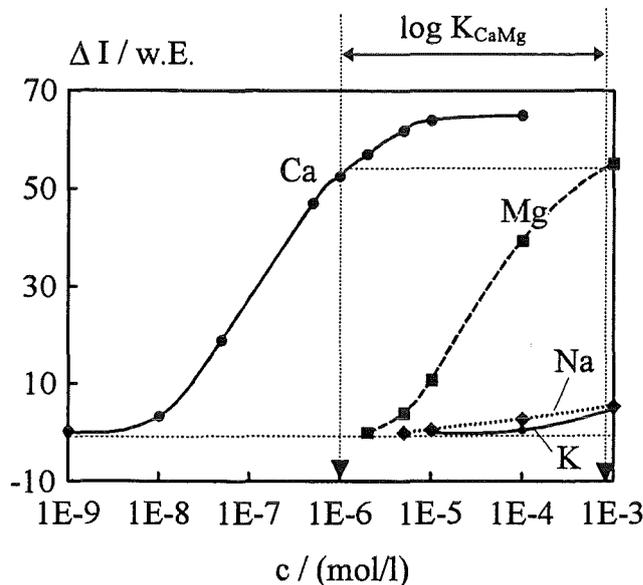
Dieses Verhalten läßt sich durch Säure-Base-Gleichgewichte des Calcium(II)-Ions und des Indikators erklären. Im Basischen findet eine Gleichgewichtsverschiebung des Ca(II)-Ions zum schwerlöslichen Calciumhydroxid gemäß Gleichung 5.8 statt. Dadurch wird die Konzentration an freien Ca(II)-Ionen in Meßlösung reduziert.



Der Signlrückgang zum Sauren hin dürfte durch Protonierungs-Deprotonierungsgleichgewichte des Indikators bedingt sein. In der Literatur wurde zu kleineren pH-Werten hin eine Vergrößerung der Dissoziationskonstanten  $K_D$  und zugleich eine Verringerung der Fluoreszenzintensitäten des Calcium Green-Ca(II)-Komplexes gefunden, wodurch sich die geringeren Sensorsignale bei pH-Werten im sauren Bereich erklären lassen [74].

### 5.2.4.5 Querempfindlichkeiten

Neben  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind die wichtigsten Kationen in physiologischen Medien  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Die Querempfindlichkeit dieser Kationen auf die Bestimmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Sensor wurde nach der sogenannten „Methode der getrennten Lösungen“ (engl. „Separate Solution Method“) ermittelt. Diese Methode wurde zur Bestimmung der Querempfindlichkeiten von ionenselektiven Elektroden eingeführt [124], sie wird aber in abgewandelter Form auch bei optochemischen Sensoren angewendet [40,125]. Dabei werden sowohl für das Meßion (hier  $\text{Ca}^{2+}$ ) als auch für jedes Störion separat Kalibrationskurven erstellt, aus denen graphisch Selektivitätskoeffizienten ermittelt werden können. Dies ist in Abbildung 5.30 für den CGD-Sensor mit den oben genannten Hauptinterferenten dargestellt.



**Abb. 5.30:** Bestimmung der Querempfindlichkeiten des CGD-Sensors  
(Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{EX}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EM}} = 535 \text{ nm}$ , BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ ; Erklärung siehe Text)

Das Verfahren zur graphischen Ermittlung der Selektivitätskoeffizienten ist in Abbildung 5.30 am Beispiel der Querempfindlichkeit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen auf die Bestimmung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wiedergegeben. Es lassen sich zwei verschiedene Selektivitätskoeffizienten ableiten, die mit  $\log K_{\text{CaMg}}$  und  $\Delta I_{\text{CaMg}}$  (allgemein  $\log K_{ij}$  und  $\Delta I_{ij}$ ; i: Meßion, j: Störion) bezeichnet werden. Die Konstante  $\log K_{\text{CaMg}}$  gibt den Abstand der beiden Kalibrationskurven bei einer festgelegten Konzentration des Meßions ( $c_{\text{Ca(II)}}$ ) in Konzentrationsdekaden wieder (Abb. 5.30). Vereinfacht ausgedrückt gibt dieser Selektivitätskoeffizient die Größenordnung an, mit der das Meßion gegenüber dem Störion empfindlicher bestimmt werden kann.

Die zweite Methode zur Angabe von Selektivitäten vergleicht einfach die Signale des Störions (im vorliegenden Falle  $\Delta I_{Mg}$ ) mit denen des Meßions ( $\Delta I_{Ca}$ ) bei einer festgelegten Konzentration [40]. Daraus kann der Selektivitätskoeffizient  $\Delta I_{CaMg} = \Delta I_{Mg} / \Delta I_{Ca}$  ermittelt werden.

Für beide Selektivitätskoeffizienten ist die Angabe der Konzentration des Meßions  $c_i$ , bei der sie bestimmt wurden, notwendig. Die nach der erläuterten Methode erhaltenen Selektivitätskoeffizienten sind in Tabelle 5.12 für die Störionen  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Mg^{2+}$  zusammengestellt.

**Tab. 5.12:** Selektivitätskoeffizienten nach der „Methode der getrennten Lösungen“

Kation	log $K_{ij}$	$\Delta I_{ij}$
	$c_{Ca(II)} = 10^{-6}$ mol/l	$c_i = c_j = 10^{-5}$ mol/l
$Ca^{2+}$	0	1
$Mg^{2+}$	-3	0,17
$Na^+$	< -4	0,04
$K^+$	< -4	0,0

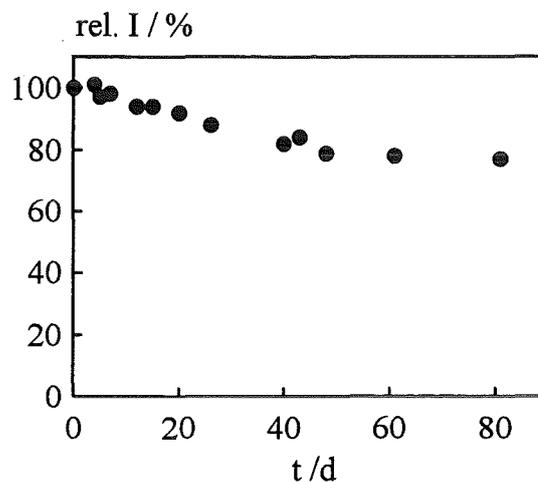
Aus den Werten für den Selektivitätskoeffizienten  $\Delta I_{ij}$  geht hervor, daß bei einer Ionenkonzentration von  $c_i = c_j = 10^{-5}$  mol/l das  $K^+$ -Signal gleich null ist, das  $Mg^{2+}$ -Signal gleich 17 % und das  $Na^+$ -Signal gleich 4 % des entsprechenden  $Ca^{2+}$ -Signals ausmacht. Größere Aussagekraft hat der Selektivitätskoeffizient  $\log K_{ij}$ . Aus den Werten von -3 für  $Mg^{2+}$ -Ionen und < -4 für  $Na^+$ - und  $K^+$ -Ionen läßt sich ableiten, daß der CGD-Sensor 3 bzw. über 4 Größenordnungen empfindlicher auf  $Ca^{2+}$ -Ionen reagiert als auf die entsprechenden Störionen.

Der CGD-Sensor weist also gegenüber den für Untersuchungen in physiologischen Medien wichtigsten Störionen eine hohe Selektivität auf.

#### 5.2.4.6 Stabilität

Die Stabilität der CGD-Sensoren wurde durch Ermittlung der Fluoreszenzintensität des immobilisierten Farbstoffs über einen Zeitraum von 80 Tagen bei Lagerung in Pufferlösung untersucht. Der zeitliche Verlauf ist in Abbildung 5.31 wiedergegeben.

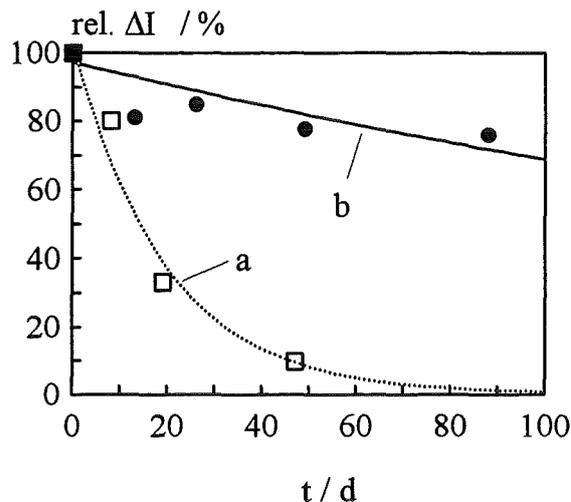
Der CGD-Sensor zeigt innerhalb von 80 Tagen einen leichten Abfall der Fluoreszenzintensität auf knapp 80 % der ursprünglichen Wertes. Dagegen wurde Calcium Green, das nicht an Dextran angebunden war, innerhalb von drei Stunden vollständig aus der PolyHEMA-Matrix ausgewaschen (nicht gezeigt).



**Abb. 5.31:** Lagerstabilität der CGD-Sensoren (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$ , Lagerung in BTP-Puffer, pH= 7)

Für die beobachtete Intensitätsabnahme des Sensors können Farbstoffaustrag und begrenzte chemische Stabilitäten der Matrix und des Indikators verantwortlich sein. Trotz der gefundenen Signalabnahme kann die Stabilitätsverbesserung durch die Immobilisierung des Dextran-gebundenen Indikators anstatt des ungebundenen Indikators von wenigen Stunden auf mehrere Monate als ein deutlicher Fortschritt bezeichnet werden.

Neben dem relativen Farbstoffgehalt (rel. I) wurde auch das Signal des Sensors bei Beprobung mit Ca(II)-Ionen ( $\Delta I$ ) über den gleichen Zeitraum untersucht. Dazu wurde der CGD-Sensor in regelmäßigen Abständen mit Ca(II)-haltigem Meßpuffer ( $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) beprobt. Es stellte sich heraus, daß die Sensitivität der Schichten von der Art der Lagerung der Sensoren abhängt (Abbildung 5.32).



**Abb. 5.32: Signal- Stabilität der CGD-Sensoren** (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 535 \text{ nm}$ ; Kurve a)  $\square$  Calcium-Signal bei Lagerung in BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ ;  $\bullet$  Calcium-Signal bei Lagerung in Calcium-haltigem Puffer  $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-4} \text{ mol/l}$ ; Kurve b) Farbstoffgehalt des Sensors nach Abb.5.31; Erklärungen siehe Text)

In Abbildung 5.32 ist zu erkennen, daß die auf den Ausgangszeitpunkt der Messungen bezogenen Calcium-Signale (rel.  $\Delta I$ ) bei Lagerung in Meßpuffer (BTP,  $\text{pH} = 7$ ) mit der Zeit abnehmen (Kurve a in Abbildung 5.32). Nach 20 Tagen Lagerung wird etwa nur noch 30 % des ursprünglichen Signals gefunden. Bei Lagerung der Sensoren in Ca-haltigen Pufferlösungen (BTP,  $\text{pH} = 7$ ,  $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-4} \text{ mol/l}$ ) ist dagegen eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen Ca-Signalen (ausgefüllte Kreise in Abbildung 5.32) und den Farbstoff-Intensitäten in der Schicht (Kurve b in Abbildung 5.32; aus Abb. 5.31) zu erkennen.

Dieses Ergebnis läßt sich dahingehend interpretieren, daß die Calcium-Bindungsstellen des Indikators bei längerer Lagerung vermutlich besetzt bleiben müssen, damit das Komplexierungsverhalten mit  $\text{Ca(II)}$ -Ionen erhalten bleibt. Ist dies nicht der Fall, so werden die Komplexierungszentren mit der Zeit deaktiviert. Diese Deaktivierung könnte durch Vergiftung des Sensors mit stark komplexierenden Spezies (z.B.  $\text{Zn}^{2+}$ ) im Spurenbereich stattfinden. Weiterhin wäre es möglich, daß die komplexierende Gruppe des Calcium Green-Dextrans im Laufe der Zeit chemisch verändert wird und somit ihre komplexierenden Eigenschaften verliert. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß diese Deaktivierung durch Lagerung in Calcium-haltigen Pufferlösungen verhindert werden kann.

## 5.2.5 Coimmobilisierung von Calcium Green- und Texas Red- Dextran zur internen Referenzierung der Signale

### 5.2.5.1 Spektrales Verhalten

Ein wesentlicher Vorteil optischer Sensoren gegenüber anderen Sensorprinzipien (z.B. elektrochemischen Sensoren) ist die Tatsache, daß sich die gesamte Information des optischen Spektrums zur Ermittlung der Sensorsignale ausnutzen läßt. Bei der Auswertung an einer einzigen Meßwellenlänge ist das Signal des optischen Sensors abhängig vom Farbstoffgehalt in der Schicht, von der Schichtdicke, von der Intensität des eingestrahlten Lichtes sowie von der Empfindlichkeit der Meßapparatur. Schwankungen dieser Faktoren führen zu Meßfehlern, die die Reproduzierbarkeit der Sensorsignale vermindern. Optische Spektren bieten jedoch eine hervorragende Möglichkeit zur Korrektur dieser Fehler, indem die Signale der Meßwellenlänge  $I(\lambda_{\text{Meß}})$  und die einer Referenzwellenlänge  $I(\lambda_{\text{Ref}})$  erfaßt werden. Aus dem Verhältnis dieser beiden Signale errechnet sich ein relatives Sensorsignal  $I_{\text{rel}}$ , welches von den oben genannten Fehlerfaktoren dann unabhängig ist, wenn sich diese auf beide Meßwellenlängen gleichermaßen auswirken (Gl. 5.9).

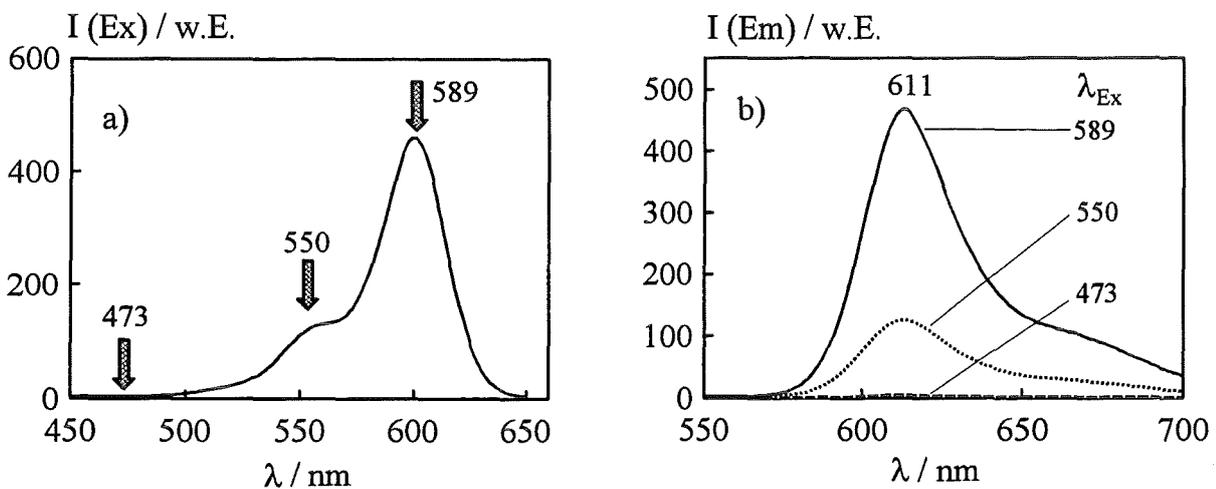
$$(5.9) \quad I_{\text{rel}} = I(\lambda_{\text{Meß}}) / I(\lambda_{\text{Ref}})$$

Als Referenzpunkte eignen sich besonders isosbestische Punkte, deren Lage im Spektrum unabhängig von der Konzentration des Analyten ist. Für Indikatoren, die nicht über isosbestische Punkte verfügen – was bei Calcium Green der Fall ist –, kann ein Referenzpunkt durch Einführung eines internen Standards erhalten werden [13]. Voraussetzung ist, daß das Spektrum des internen Standards neben dem des Indikators separiert werden kann, und daß der interne Standard keine Reaktion mit dem Analyten eingeht. Diese Voraussetzungen treffen auf Sulforhodamin 101 (Texas Red) zu, das als interner Standard beispielsweise für zellbiologische Untersuchungen eingesetzt wird. Für die interne Referenzierung des in Abschnitt 5.2.4 charakterisierten Calcium-Sensors wurde die kommerziell erhältliche Dextran-Verbindung von Texas Red (MG: 70.000 g/mol; Farbstoff-Belegungsgrad:  $2,9 \text{ mol}_{\text{Texas Red}}/\text{mol}_{\text{Dextran}}$ ) verwendet.

In Abbildung 5.33 sind die Anregungs- und Emissionsspektren von Texas Red-Dextran (im folgenden abgekürzt: TRD) in wäßriger Pufferlösung (BTP, pH = 7) dargestellt. Aus dem Anregungsspektrum (Abb. 5.33 a) ist die optimale Wellenlänge für die Anregung von  $\lambda_{\text{Ex}} = 589 \text{ nm}$  zu entnehmen. Wie bereits in Abschnitt 5.2.4.1 erwähnt wurde, wird in den miniaturisierten Meßaufbauten ein Nd:YAG-Laser mit der Wellenlänge  $\lambda = 473 \text{ nm}$  als

Anregungslichtquelle eingesetzt (siehe Kapitel 5.3). Deshalb wurden bereits die Makrosensoren mit dieser Wellenlänge für die Anregung charakterisiert.

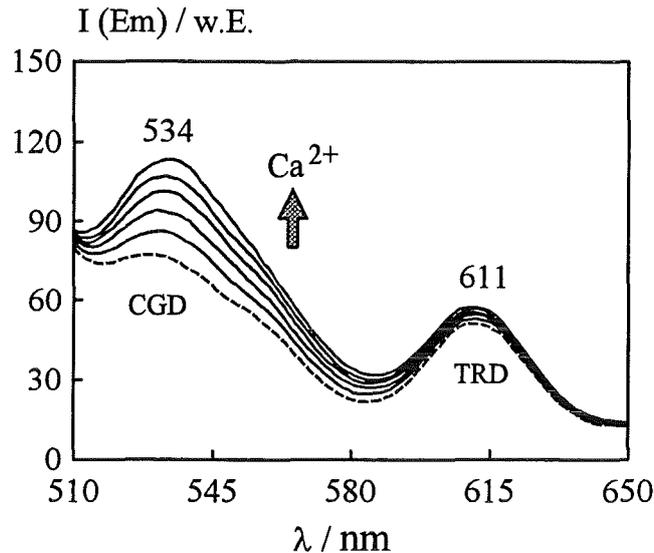
In Abbildung 5.33 b sind die Emissionsspektren mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen  $\lambda_{\text{Ex}1} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Ex}2} = 550 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Ex}3} = 589 \text{ nm}$  wiedergegeben. Daraus wird ersichtlich, daß die Fluoreszenzemissionen entsprechend der Anregungswellenlänge stark ansteigen. Die Fluoreszenzintensität beträgt bei der Anregung mit  $\lambda_{\text{Ex}1} = 473 \text{ nm}$  nur etwa 1 % der Intensität, die mit der optimalen Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Ex}3} = 589 \text{ nm}$  erhalten wird.



**Abb. 5.33:** Anregungs- (a) und Emissionsspektren (b) von TRD in wäßriger Lösung (Experimentelle Daten: (a)  $\lambda_{\text{Em}} = 611 \text{ nm}$ , (b)  $\lambda_{\text{Ex}1} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Ex}2} = 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Ex}3} = 589 \text{ nm}$ ; BTP, pH= 7)

Für die Coimmobilisierung von CGD und TRD bedeutet dies, daß der Gehalt an TRD in der PolyHEMA-Schicht entsprechend hoch eingestellt werden muß, so daß das TRD-Referenzsignal gegenüber dem CGD-Meßsignal eine genügend hohe Intensität aufweist.

In Abbildung 5.34 sind die Emissionsspektren eines durch Coimmobilisierung von CGD und TRD hergestellten Sensors bei Beprobung mit Ca(II)-haltigem Meßpuffer unterschiedlicher Konzentrationen dargestellt. Der Gewichtsanteil der farbstoffgebundenen Dextrane bezogen auf PolyHEMA in der Eduktmischung der Schichtpräparation beträgt 2 Gew.% für CGD und 10 Gew.% für TRD.



**Abb. 5.34:** Emissionsspektren eines Sensors mit coimmobilisiertem CGD und TRD  
 (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{Ca(II)}} = 0, 5 \cdot 10^{-8}, 10^{-7}, 5 \cdot 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; BTP-Puffer, pH= 7;  
 Angabe  $\uparrow$ : Zunahme der Fluoreszenz bei Beprobung mit Ca(II)-Ionen)

In Abbildung 5.34 ist zu erkennen, daß bei dem eingestellten CGD/TRD-Verhältnis (Gewichts-Verhältnis von CGD/TRD in der Eduktmischung = 1/5; vgl. Tab. 4.5) sowohl die CGD-Bande bei  $\lambda_{\text{Em}} = 534 \text{ nm}$ , als auch die TRD-Bande bei  $\lambda_{\text{Em}} = 611 \text{ nm}$  spektral sehr gut auflösbar sind. Trotz der spektralen Verhältnisse, die in Abbildung 5.33 diskutiert wurden, kann bei Texas Red auch mit der Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$  eine hohe Fluoreszenzemission erhalten werden. Die TRD-Bande ( $\lambda_{\text{Em}} = 611 \text{ nm}$ ) wird bei der Beprobung des Sensors mit Ca(II)-Ionen geringfügig erhöht. Dies ist, wie auch aus Abbildung 5.34 hervorgeht, nicht auf eine Reaktion von TRD mit Ca(II)-Ionen zurückzuführen, sondern durch eine partielle Überlagerung der CGD-Bande bedingt. Das Ansprechverhalten der kombinierten CGD/TRD-Sensoren ist vergleichbar mit dem der in Abschnitt 5.2.4 charakterisierten CGD-Sensoren.

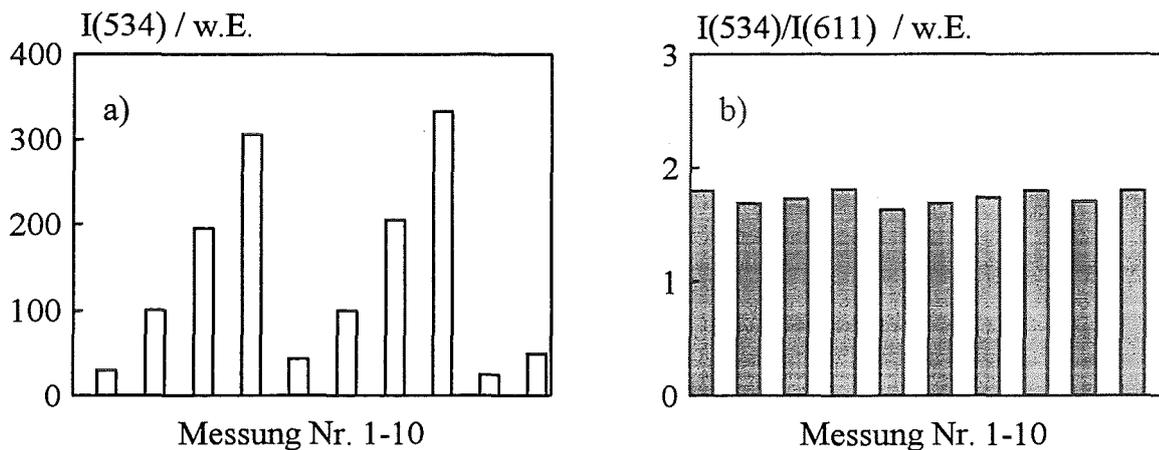
Weiterhin wurde in einem Küvettenversuch die photochemische Stabilität von TRD untersucht. Nach 2 Stunden Dauerbestrahlung einer TRD-Lösung ( $c_{\text{TRD}} = 0,03 \text{ mg/ml}$ ; BTP; pH = 7) mit  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$  wurde keine Abnahme der Fluoreszenzintensität festgestellt.

Es konnte somit gezeigt werden, daß Texas Red-Dextran (TRD) die wesentlichen Kriterien für einen Fluoreszenzstandard – wie spektrale Separierbarkeit, photochemische Stabilität und hohe Fluoreszenzintensitäten – erfüllt.

### 5.2.5.2 Messungen mit interner Referenz

Die folgenden Untersuchungen sollen zeigen, wie sich die interne Referenzierung auf die Reproduzierbarkeit der Sensorsignale auswirkt. Als Meßsignal ohne interne Referenz (absolutes Meßsignal) wird die Intensität bei der Calcium-Nachweisbande ( $I(\lambda_{\text{Meß}} = 534 \text{ nm})$ ) ermittelt. Als relatives Meßsignal  $I_{\text{rel}}$  wird das Verhältnis aus der Intensität an der Calcium-Nachweisbande zu der Intensität an der Emissionsbande des internen Standards ( $I_{\text{rel}} = I(\lambda_{\text{Meß}} = 534 \text{ nm}) / I(\lambda_{\text{Ref}} = 611 \text{ nm})$ ) definiert.

Zunächst wurde der Einfluß von variierenden Intensitäten des Anregungslichtes auf die Sensorsignale  $I(\lambda_{\text{Meß}})$  und  $I_{\text{rel}}$  untersucht. Die Lichtintensitäten wurden durch Einstellungen des Spektrometers und durch Graufilter verändert. Die absoluten Signale  $I(534)$  und relativen Signale  $I(534)/I(611)$  sind in Abbildung 5.35 für 10 verschiedene Anregungslicht-Intensitäten dargestellt.



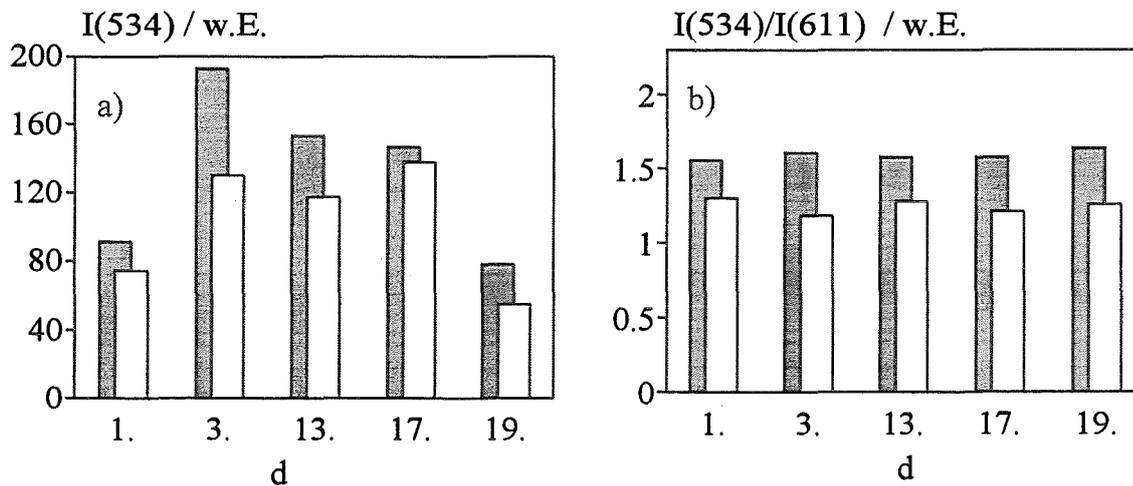
**Abb. 5.35:** Reproduzierbarkeit der absoluten (a) und relativen Signale (b) bei Variation der Lichtintensität (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ )

In Abbildung 5.35 wird veranschaulicht, daß sich die Reproduzierbarkeit der Signale bei stark schwankenden Intensitäten des Anregungslichtes durch die interne Referenzierung entscheidend verbessern läßt. Aus den jeweiligen Sensorsignalen wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und relativen Fehler ermittelt.

absolutes Signal: $I(534)$	$= 118,1 \pm 114,0$	$= 118,1 \pm 96,5 \%$
relatives Signal: $I(534)/I(611)$	$= 1,74 \pm 0,062$	$= 1,74 \pm 3,6 \%$

Durch die interne Referenzierung konnte eine Reduzierung des relativen Fehlers von  $\pm 96,5 \%$  bei der Auswertung der absoluten Signale an einer einzigen Meßwellenlänge I(534) auf  $3,6 \%$  bei der Auswertung der relativen Signale I(534)/I(611) erreicht werden.

In analoger Weise wurden die absoluten und die relativen Signale eines Ca-Sensors an 5 verschiedenen Tagen innerhalb eines Zeitraums von 3 Wochen ermittelt. Es wurden jeweils die Signale des mit Ca(II)-Ionen beprobten ( $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) und des regenerierten Sensors ( $c_{\text{Ca(II)}} = 0$ ) aufgenommen. Die absoluten und relativen Signale für den beprobten und regenerierten Sensor sind in Abbildung 5.36 wiedergegeben. Auch bei dieser Darstellung ist zu erkennen, daß die Reproduzierbarkeit der Signale durch die interne Referenzierung (Abbildung 5.36 b) gegenüber den Signalen bei einer Meßwellenlänge (Abbildung 5.36 a) deutlich verbessert wird.



**Abb. 5.36:** Reproduzierbarkeit der absoluten (a) und relativen Signale (b) eines Sensors an verschiedenen Meßtagen  $d$  (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ; graue Balken:  $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; weiße Balken:  $c_{\text{Ca(II)}} = 0$ ; BTP-Puffer, pH= 7; Abszisse: 1., 3., 13., 17. und 19. Meßtag)

Für die absoluten und relativen Sensorsignale wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Fehler ermittelt.

absolute Signale:

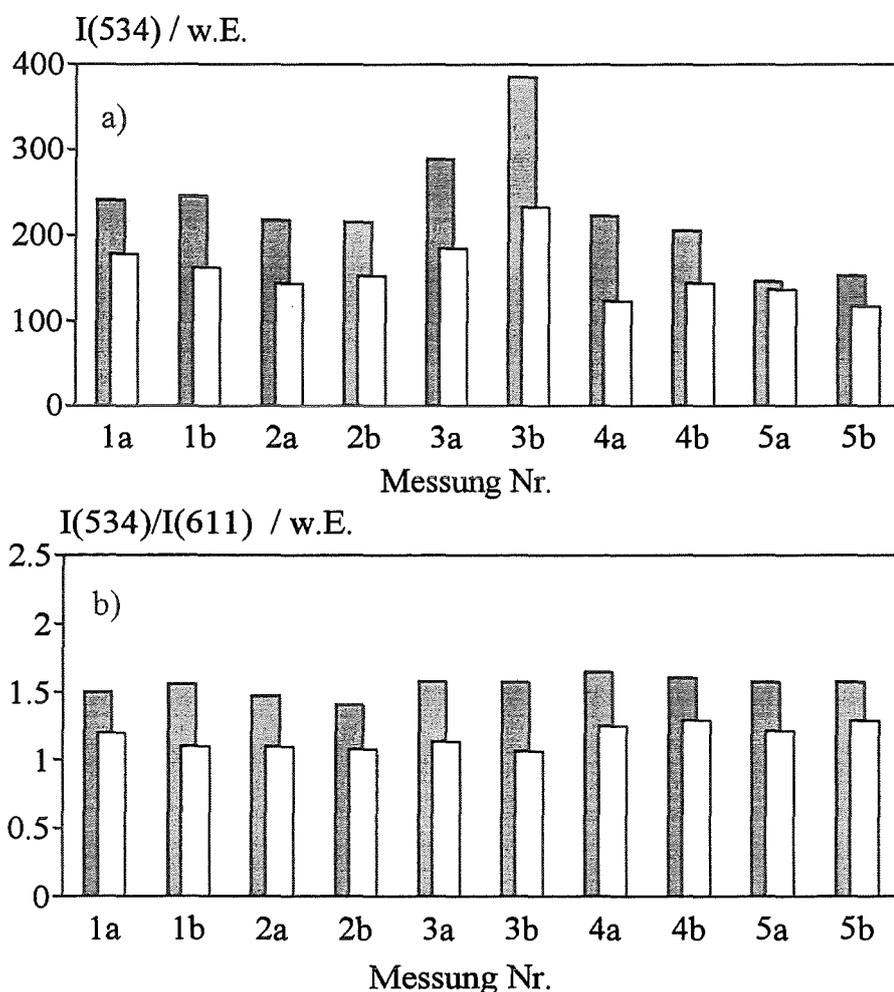
$c_{\text{Ca(II)}} = 0$	I(534)	$= 102,8 \pm 36,6$	$= 102,8 \pm 35,6 \%$
$c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$	I(534)	$= 132,4 \pm 47,5$	$= 132,4 \pm 35,8 \%$

relative Signale:

$c_{\text{Ca(II)}} = 0$	I(534)/I(611)	$= 1,25 \pm 0,050$	$= 1,25 \pm 4,0 \%$
$c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$	I(534)/I(611)	$= 1,59 \pm 0,036$	$= 1,59 \pm 2,3 \%$

Sowohl beim beprobten ( $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ) als auch beim regenerierten Sensor ( $c_{\text{Ca(II)}} = 0$ ) wurde durch die interne Referenzierung eine starke Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Signale erreicht. Während die relativen Fehler bei der Auswertung an einer einzigen Meßwellenlänge (absolute Signale) bei  $\pm 35$  bis  $\pm 36 \%$  liegen, fallen die relativen Fehler der relativen Signale mit Werten von  $\pm 2,3$  bis  $\pm 4 \%$  erheblich geringer aus.

In ähnlicher Weise wurde die Reproduzierbarkeit der Signale von 5 verschiedenen Sensoren untersucht. Jeder Sensor wurde zweimal wie im vorherigen Experiment beprobt und regeneriert. Die absoluten und relativen Signale der Sensoren sind in Abbildung 5.37 dargestellt.



**Abb. 5.37:** Reproduzierbarkeit der absoluten (a) und relativen Signale (b) von 5 verschiedenen Sensoren (Experimentelle Daten:  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ; graue Balken:  $c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; weiße Balken:  $c_{\text{Ca(II)}} = 0$ ; BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ ; Abszisse: „1a“ bedeutet Sensor Nr. 1, Messung a)

Zu den gezeigten Signalen wurde wiederum eine Fehlerbetrachtung durchgeführt.

absolute Signale:

$c_{\text{Ca(II)}} = 0$	$I(534)$	$= 90,1 \pm 34,0$	$= 90,1 \pm 37,7 \%$
$c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$	$I(534)$	$= 165,6 \pm 72,3$	$= 165,6 \pm 43,7 \%$

relative Signale:

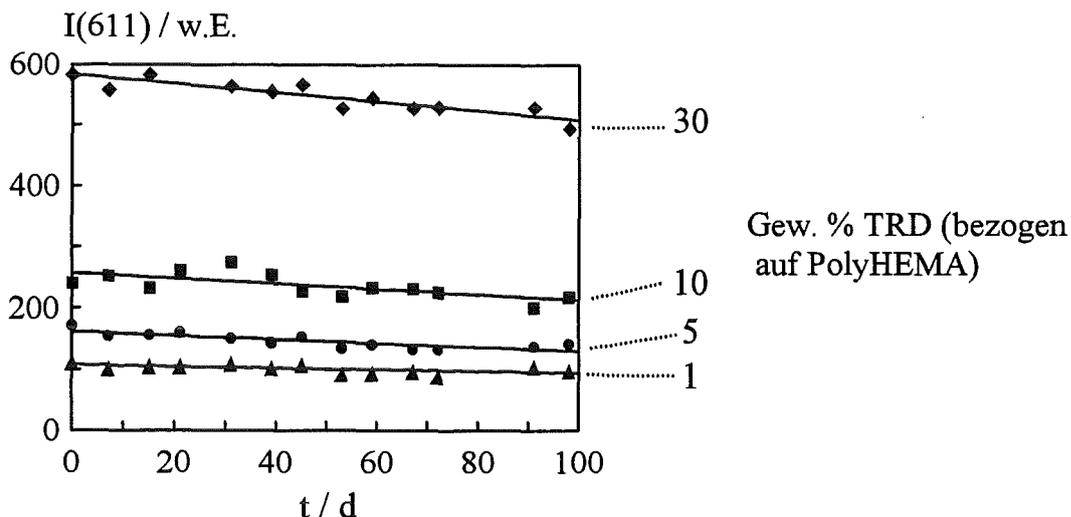
$c_{\text{Ca(II)}} = 0$	$I(534)/I(611)$	$= 1,17 \pm 0,087$	$= 1,17 \pm 7,4 \%$
$c_{\text{Ca(II)}} = 10^{-5} \text{ mol/l}$	$I(534)/I(611)$	$= 1,55 \pm 0,072$	$= 1,55 \pm 4,6 \%$

Bei 5 verschiedenen Sensoren war die Reproduzierbarkeit der absoluten Signale mit relativen Fehlern von  $\pm 37,7 \%$  bzw.  $\pm 43,7 \%$  sehr begrenzt. Durch interne Referenzierung lassen sich diese Fehler auf  $\pm 7,4 \%$  bzw.  $\pm 4,6 \%$  reduzieren. Die verbleibenden relativen Fehler sind auf die begrenzte Reproduzierbarkeit der Sensorherstellung zurückzuführen. Es ist zu erwarten, daß sich diese Fehler durch eine verfahrenstechnische Optimierung der Schichtpräparation weiter verringern lassen.

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Einführung einer internen Referenz durch Coimmobilisierung eines internen Standards zu einer deutlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Sensorsignale führt.

### 5.2.5.3 Einfluß des Farbstoff-Dextran-Gehalts auf die Stabilität der Schichten

Durch die Coimmobilisierung von CGD und TRD wird der gesamte Dextran-Gehalt in der sensitiven Schicht stark erhöht. Als Dextran-Gehalt soll der Anteil des farbstoffgebundenen Dextrans in Gewichtsprozent (Gew.%) bezogen auf das für die Schichtpräparation eingesetzte PolyHEMA in der Eduktmischung verstanden werden. Die durch Coimmobilisierung hergestellten Schichten enthalten 2 Gew.% CGD und 10 Gew.% TRD. Dadurch enthalten sie insgesamt 6 mal soviel Farbstoff-Dextran als die in Abschnitt 5.2.4 charakterisierten CGD-Sensoren, die insgesamt 2 Gew.% CGD enthalten. Es wurde deshalb untersucht, ob die Stabilität der Schichten durch den Dextran-Gehalt in der Schicht beeinflusst wird. Dazu wurden TRD-Sensoren mit Dextran-Gehalten von 1 bis 30 Gew.% TRD (bezogen auf PolyHEMA) hergestellt und deren Stabilitätsverhalten bei Lagerung in Meßpuffer (BTP, pH = 7) über einen Zeitraum von 100 Tagen untersucht.



**Abb. 5.38:** Lagerstabilitäten von TRD-dotierten Schichten mit unterschiedlichen Dextran-Gehalten (Experimentelle Daten:  $\lambda_{Ex}= 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{Em}= 611 \text{ nm}$ ; Lagerung in BTP, pH= 7; Erklärung siehe Text)

Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensitäten im Sensor ist in Abbildung 5.38 dargestellt. Daraus lassen sich die Farbstoffgehalte der TRD-dotierten Schichten für eine Lagerdauer von 30 Tagen ableiten. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 5.13 zusammengestellt.

**Tab. 5.13:** Relative Farbstoffgehalte der TRD-dotierten Schichten nach 30 Tagen Lagerung in Meßpuffer (BTP, pH= 7)

Gew.% TRD	rel. I / % nach 30 Tagen Lagerung
1	96,7
5	94,2
10	94,9
30	96,2

Die untersuchten Schichten weisen nach 30 Tagen Lagerung noch relative Farbstoff-Signale von 94,2 bis 96,7 % des ursprünglichen TRD-Signals auf. Der Farbstoff ist also bei allen Dextran-Gehalten mit vergleichbarer Stabilität in der Matrix immobilisiert. An dieser Stelle soll bemerkt werden, daß Texas Red, welches nicht an Dextran angebunden ist, innerhalb von 5 Stunden komplett aus der Matrix ausgewaschen wird.

Zudem lassen die relativen Intensitäten in Tabelle 5.13 keine systematische Veränderung bei zunehmendem Dextran-Gehalt in der Schicht erkennen. Daraus kann geschlossen werden, daß die Stabilität der mit Indikator-Dextran dotierten Schichten im untersuchten Bereich von 1 bis 30 Gew.% Dextran in der Schicht unabhängig vom Dextran-Gehalt ist.

### 5.2.6 Zusammenfassung

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die zu Beginn entwickelte Immobilisierungsmethode auf drei Analyt-Rezeptor-Paare angewendet. Am Beispiel von Quecksilber-sensitiven, pH-sensitiven und Calcium-sensitiven Schichten wurde dargestellt, daß sich durch die Immobilisierung von indikatorgebundenen Dextranen stabile und sensitive Schichten für optochemische Sensoren entwickeln lassen. Es konnte damit gezeigt werden, daß sich die Immobilisierung makromolekular gebundener Indikatoren in einfacher Weise sowohl auf verschiedene Analyt-Rezeptor-Paare als auch auf neue Matrices anwenden läßt.

Als besonders interessant für weitere Entwicklungen können die Calcium-sensitiven Schichten in Verbindung mit der internen Referenzierung gewertet werden, die durch Coimmobilisierung eines Calcium-Indikators und eines internen Standards hergestellt wurden. Damit wurde gezeigt, daß auch die Coimmobilisierung mehrerer Farbstoffe mit der entwickelten Immobilisierungsmethode realisiert und bezüglich des Farbstoffgehalts in der Schicht variiert werden kann. Mit Hilfe dieser Schichten sind Calcium-Bestimmungen im Konzentrationsbereich von  $< 10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  mol/l mit Ansprechzeiten im Sekundenbereich möglich. Dieser Konzentrationsbereich der größten Sensor-Empfindlichkeit entspricht solchen Calcium(II)-Konzentrationen, die üblicherweise in lebenden Zellen vorgefunden werden.

Mit diesem Hintergrund soll im dritten Teil dieser Arbeit versucht werden, die Calcium-sensitiven Schichten mit interner Referenz an faseroptische Sensorkomponenten anzubringen und schrittweise zu miniaturisieren. Es soll überprüft werden, inwieweit auch mit miniaturisierten Sensoren empfindliche Messungen möglich sind.

## 5.3 Miniaturisierung der Sensoren

### 5.3.1 Zielsetzung

Wie bereits in den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 diskutiert wurde, sind Anwendungen chemischer Sensoren in den Bereichen sinnvoll, in denen sie gegenüber der etablierten Laboranalytik prinzipielle Vorteile aufweisen. Ein wesentlicher Gesichtspunkt ist dabei die Miniaturisierbarkeit chemischer Sensoren, die es erlaubt, sehr kleine Sensorköpfe [5] oder ganze Sensor-Mikrosysteme aufzubauen [7]. Optochemische Sensoren lassen sich durch die Verwendung von optischen Fasern zur Signalübermittlung in hervorragender Weise zu Mikrosensoren miniaturisieren, deren Sensorköpfe Durchmesser im Mikrometerbereich und darunter aufweisen [15]. Eine spezielle Motivation für die Entwicklung miniaturisierter Sensoren besteht darin, Analytik in sehr kleinen Probevolumina ( $< 10 \mu\text{l}$ ) zu betreiben. Dies kann beispielsweise dann erforderlich sein, wenn sehr hochwertige Proben (z.B. Medikamente) bei möglichst geringen Substanzverbrauch untersucht werden sollen. Weitere Einsatzgebiete von Mikrosensoren wären die noninvasive klinische Analytik sowie die minimalinvasive Chirurgie [30].

Ein relativ junges Forschungsgebiet beschäftigt sich mit der Entwicklung von sogenannten optochemischen Nanosensoren, bei denen die Rezeptorschicht an Faserspitzen mit Dimensionen im Submikrometerbereich angebracht ist. Grundlegende Arbeiten zu diesem Thema wurden von Kopelmann et al. am Beispiel von pH-Nanosensoren vorgestellt [15, 20,23-25]. Durch die Verwendung von Nanosensoren eröffnet sich für die chemische Analytik die Möglichkeit, Fluktuationen von physiologisch wichtigen Analyten in einzelnen Zellen zu messen. So ist es bereits gelungen, mit Hilfe von Nanosensoren pH-Werte in einzelnen Blutzellen oder in Froschzellen zu messen [26]. Derartige Untersuchungen werden herkömmlich durch Mikroinjektion von Fluoreszenzindikatoren in lebende Zellen und anschließende Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt [76-78]. Dabei ergibt sich häufig das Problem, daß durch die eingespritzten, zellfremden Indikatoren die physiologischen Gleichgewichte in der Zelle gestört werden, was zu einem frühzeitigen Absterben der Zelle führen kann. Diese Probleme sollten sich beim Einsatz von Nanosensoren, die keine Chemikalien an die Umgebung abgeben, umgehen lassen.

Da Calciumionen eine wichtige Rolle bei der Nachrichtenübermittlung in Zellen spielen, besteht in der Bestimmung von intrazellulären Calciumfluktuationen ein großes Interesse [76,126,127]. Die in Abschnitt 5.2.4 vorgestellten Calcium-sensitiven Schichten sollten wegen ihres Meßbereichs ( $< 10^{-7}$  bis  $10^{-5}$  mol/l), der hohen Selektivität und der kurzen Ansprechzeiten (5 Sekunden) für die Messung von Calciumionen in Zellen besonders gut

geeignet sein. Unter Verwendung dieser Rezeptorschichten sollen zunächst Mikrosensoren und schließlich Nanosensoren entwickelt werden. Die Miniaturisierung der Sensoren erfolgt schrittweise, indem optische Fasern (Lichtwellenleiter) mit unterschiedlichen Kerndurchmessern verwendet werden (Tab. 5.14).

**Tab. 5.14:** *Schrittweise Miniaturisierung optochemischer Sensoren*

0. Stufe: beschichteter Glasträger	→ Makrosensor	(Abschnitt 5.2.4 u. 5.2.5)
1. Stufe: 600 µm-Faser	→ Mikrosensor	(Abschnitt 5.3.2.1)
2. Stufe: 50 µm-Faser	→ Mikrosensor	(Abschnitt 5.3.2.2)
3. Stufe: 300 nm-Faserspitze	→ Nanosensor	(Abschnitt 5.3.3)

Diese Strategie sollte die Problemlösung vereinfachen, indem Erkenntnisse über Handhabungen und Vorgehensweisen einer Entwicklungsstufe auf die jeweils folgende übertragen werden konnten. Mit den folgenden Untersuchungen soll gezeigt werden, in welche Dimensionen optochemische Sensoren miniaturisiert werden können, und inwieweit auch miniaturisierte Sensoren empfindliche Sensorsignale liefern.

## 5.3.2 Faseroptische Mikrosensoren

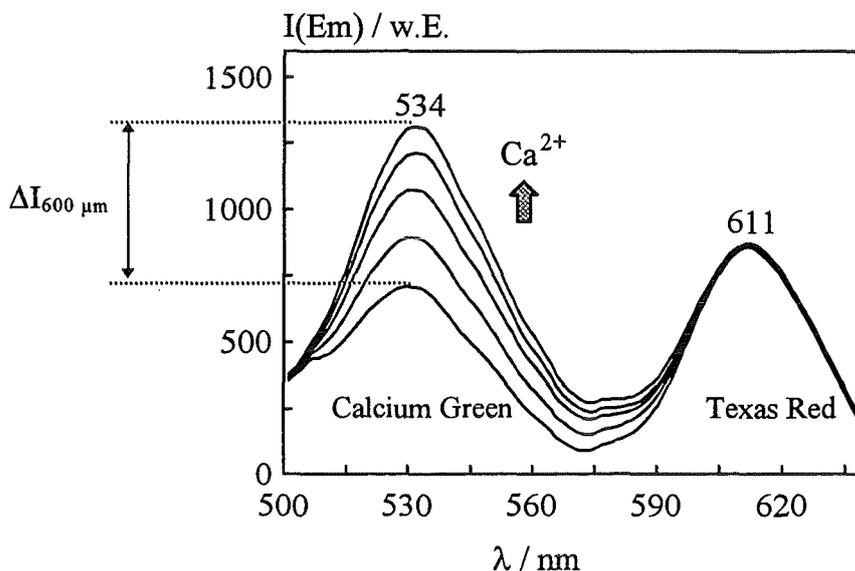
### 5.3.2.1 Mikrosensoren mit 600 µm Kerndurchmesser

Als chemisch-sensitive Rezeptorschichten für die miniaturisierten Sensoren wurden die Calcium-sensitiven Schichten mit interner Referenz verwendet, die durch Coimmobilisierung von Calcium Green-1-Dextran und Texas Red-Dextran in PolyHEMA-Schichten hergestellt wurden (siehe Abschnitt 5.2.5). Die farbstoffdotierten Polymerschichten wurden in einer ersten Miniaturisierungsstufe durch Eintauchen des unteren Faserendes (Faserstamm) einer Stufenindexfaser mit 600 µm Kerndurchmesser in eine Eduktmischung erhalten. Durch Verwendung eines Y-förmigen Lichtleiters wurde eine Meßanordnung in Sondengeometrie aufgebaut (schematischer Aufbau siehe Abbildung 4.4), die die folgenden Merkmale aufweist:

- Der Faserstamm („FS“ in Abb. 4.4) der Y-förmigen Anordnung besteht aus einer Stufenindexfaser mit einem Durchmesser des Faserkerns von 600 µm. Die beiden Äste („FL“ und „FD“ in Abb. 4.4) haben einen Durchmesser von 300 µm und sind durch einfache „Stirn-Stirn-Kopplung“ mit dem Faserstamm verbunden (vgl. Abb. 4.5 a).
- Als Lichtquelle wird ein Nd:YAG-Laser verwendet (mittlere Leistung: 7 mW,  $\lambda = 473 \text{ nm}$ ).

- Die Erfassung der Signale erfolgt durch einen Optischen Multikanal-Analysator (OMA). Diese Detektionseinheit bietet vielfältige Möglichkeiten zur Variation des Meßaufbaus und der Geräteempfindlichkeit. Das thermisch bedingte Untergrundsignal der Diodenzeile kann durch eine eingebaute Peltier-Kühlung ( $T \approx -30^\circ\text{C}$  nach Herstellerangaben) stark reduziert werden. Weiterhin wurden Geräteparameter wie die Breite des Eintrittsspalts in den Monochromator, Belichtungszeiten, Anzahl der Belichtungen sowie die Empfindlichkeit der Diodenzeile variiert und optimiert. Auf eine Diskussion dieser Parameter wird zugunsten einer übersichtlichen Darstellung verzichtet.
- Zur Steigerung der Sensitivität wurden bei der Präparation der Rezeptorschichten der Mikrosensoren die Farbstoffkonzentrationen des Indikators und der internen Referenz in der Eduktmischung im Vergleich zu den Makrosensoren um das 2,5fache erhöht (Eduktmischung siehe Tabelle 4.6). Zuvor wurde sichergestellt, daß mit einer Erhöhung des Farbstoff-Dextran-Gehaltes in der Schicht kein erhöhter Farbstoffaustrag verbunden ist (siehe Abschnitt 5.2.5.3).

In Abbildung 5.39 sind die Emissionsspektren einer 600  $\mu\text{m}$ -Calcium-Mikrosonde mit interner Referenz für unterschiedliche Konzentrationen an Calcium(II)-Ionen dargestellt.



**Abb. 5.39:** Emissionsspektren einer Calcium-Mikrosonde (600  $\mu\text{m}$ -Faser)  
 (Lichtquelle: Nd:YAG-Laser mit Neutralglasfilter (NG 9;  $\tau = 0,025$ ; Erklärung siehe Text);  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ;  
 $c_{\text{Ca(II)}} = 0, 5 \cdot 10^{-8}, 2 \cdot 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; BTP-Puffer,  $\text{pH} = 7$ ; Angabe  $\uparrow$ : Zunahme der Fluoreszenz bei  
 Beprobung mit  $\text{Ca(II)}$ -Ionen)

Zunächst ist in Abbildung 5.39 zu erkennen, daß die Calcium Green- und Texas Red-Banden spektral gut auflösbar sind; die Konzentrationsabhängigkeit der Calcium-Signale entspricht den Verhältnissen in den Makrosensoren. Beim Vergleich von Abb. 5.39 mit Abb. 5.34 fällt auf, daß der Untergrund, der durch Streuung des Anregungslichtes zustande kommt, bei den faseroptischen Mikrosensoren deutlich geringer ausfällt als bei den planaren Makrosensoren. Die Ursachen hierfür dürften einerseits in den unterschiedlichen Geometrien der optischen Aufbauten und andererseits in der Verwendung unterschiedlicher Lichtquellen für die Anregung liegen (Makrosensoren: Xenon-Hochdrucklampe mit Monochromator; Mikrosensoren: Nd:YAG-Laser).

Bei der Belichtung der Rezeptorschichten mit der vollen Laserleistung (mittlere Leistung 7 mW) wurde ein erhebliches Ausbleichen des Calciumindikators festgestellt, während sich die interne Referenz Texas Red als relativ unempfindlich gegenüber dem Anregungslicht erwies. Die gemessenen relativen Signalrückgänge der Schichten nach 15minütiger Dauerbestrahlung mit unterschiedlichen Laserleistungen sind in Tabelle 5.15 enthalten.

**Tab. 5.15:** *Relative Signalrückgänge durch Ausbleichen bei unterschiedlichen Laserleistungen (15 Minuten Dauerbestrahlung)*

Laserleistung / % (100 % = 7 mW)	Signalrückgang / %	
	Calcium Green ( $\lambda_{Em}= 534$ nm)	Texas Red ( $\lambda_{Em}= 611$ nm)
100	35	3
12	16	2
5	6	1
1	$\approx 1$	< 1

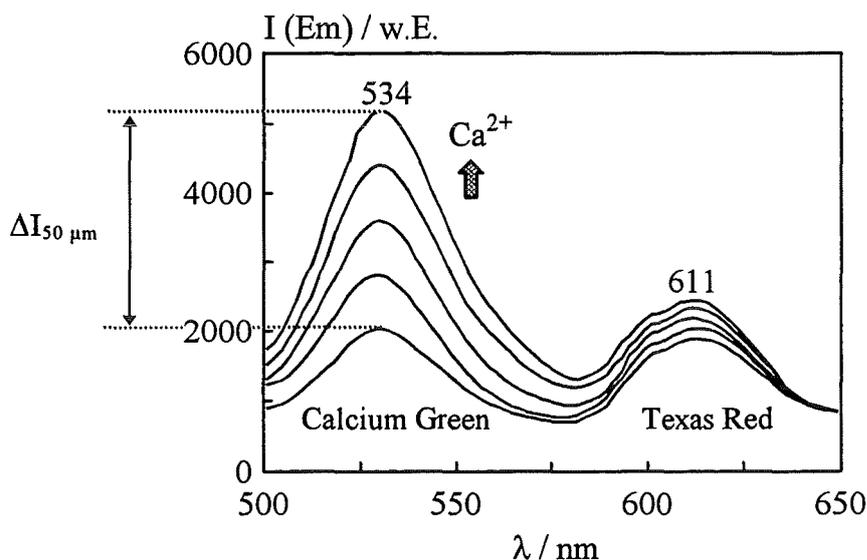
Aus diesem Ergebnis wurde die Konsequenz gezogen, daß für die weiteren Messungen die Laserleistung durch einen Neutralglasfilter (Transmissionskoeffizient  $\tau = 0,025$ ; vgl. Abbildung 4.4) auf etwa 2,5 % der vollen Leistung reduziert wurde. Unter diesen Bedingungen wurden auch die Spektren in Abbildung 5.39 aufgenommen. Auch bei reduzierter Laserleistung wurden Signal-zu-Rausch-Verhältnisse von  $> 90$  erreicht. Als Rauschen wird dabei die Standardabweichung der Intensitäten an der Calcium-Nachweisbande ( $\lambda_{Em}= 534$  nm) bei Aufnahme von 10 Spektren definiert.

### 5.3.2.2 Mikrosensoren mit 50 $\mu\text{m}$ Kerndurchmesser

Aufbauend auf die Ergebnisse der ersten Miniaturisierungsstufe wurde eine Meßanordnung mit einer optischen Faser, deren Faserkern über einen Durchmesser von 50  $\mu\text{m}$  verfügt, realisiert. Dieser Aufbau unterscheidet sich vom vorherigen durch die folgenden Merkmale:

- Die optische Faser ist vom Gradientenindextyp (siehe Abschnitt 3.4.2) mit einem Kerndurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  und einem Kern-plus-Mantel-Durchmesser von 125  $\mu\text{m}$ . Faserstamm und Faseräste haben die gleichen Durchmesser.
- Die Kopplung der beiden Faseräste auf den Faserstamm erfolgt nicht durch einfache „Stirn-Stirn-Kopplung“, sondern durch einen speziellen optischen Koppler („Schliffkoppler“, vgl. Abbildung 4.5 b). In diesem Koppler ist die Verteilung des Lichtes vom Faserstamm auf die Faseräste asymmetrisch: 10 % des Lichtes wird auf den Faserast zur Lichtquelle („FL“ in Abb. 4.5) und 90 % des Lichtes auf den Ast zur Detektionseinheit („FD“ in Abb. 4.5) geleitet. Dadurch wird die Intensität des Anregungslichtes an der Rezeptorschicht um etwa eine Größenordnung reduziert, was aufgrund der genügend hohen Laserleistung kein Problem darstellt. Der Faserast zur Detektionseinheit wird bevorzugt, was zu einer höheren Signalausbeute führt.

Die Spektren einer Mikrosonde mit einem Durchmesser des Faserkerns von 50  $\mu\text{m}$  sind in Abbildung 5.40 gezeigt.



**Abb. 5.40:** Emissionsspektren einer Calcium-Mikrosonde (50  $\mu\text{m}$ -Faser)

(Lichtquelle: Nd:YAG-Laser mit Neutralglasfilter (NG 9;  $\tau=0,025$ ; Erklärung siehe Text);  $\lambda_{\text{Ex}}=473\text{ nm}$ ;  $c_{\text{Ca(II)}}=0, 5 \cdot 10^{-8}, 2 \cdot 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}\text{ mol/l}$ ; BTP-Puffer, pH=7; Angabe  $\uparrow$ : Zunahme der Fluoreszenz bei Beprobung mit Ca(II)-Ionen)

Wird als bestrahlte Sensorfläche in erster Näherung die aus dem Faserkerndurchmesser berechnete Kreisfläche angenommen, so kann ein Flächenverhältnis der 600 µm-Faser zur 50 µm-Faser von 140 zu eins ermittelt werden. Da die Sensorfläche der 600 µm-Faser gegenüber der 50 µm-Faser um über zwei Größenordnungen größer ist, wurde zunächst erwartet, daß auch die Sensorsignale in einer ähnlichen Relation zueinander stehen. Dies wurde nicht bestätigt, was aus den Spektren der beiden Calcium-Mikrosonden mit unterschiedlichen Faserkerndurchmessern hervorgeht.

Beim Vergleich von Abbildung 5.39 und 5.40 fällt auf, daß die Sensorsignale der 50 µm-Sonde ( $\Delta I_{50 \mu\text{m}}$  in Abb. 5.40) bei vergleichbaren Geräteeinstellungen um ein Vielfaches größer sind, als die der 600 µm-Sonde ( $\Delta I_{600 \mu\text{m}}$  in Abb. 5.39). Dieses Ergebnis ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen, die anhand der wesentlichen Unterschiede der beiden Fasersonden qualitativ diskutiert werden sollen (siehe Tabelle 5.16).

**Tab. 5.16:** Vergleich der 600 µm- und 50 µm-Fasersonden (Erklärungen siehe Text)

	600 µm-Fasersonde	50 µm-Fasersonde
Art der Faser	Stufenindex	Gradientenindex
bestrahlte Faserstirnfläche $A / \text{m}^2$ <sup>a)</sup>	$2,8 \cdot 10^{-7}$	$2,0 \cdot 10^{-9}$
Kopplung der Faseräste	„Stirn-Stirn“	„Schliffkoppler“
Verteilung im Koppler auf die Faseräste zur Lichtquelle und zum Detektor / %	50 / 50	10 / 90
bauartbedingte Lichtverluste im Koppler <sup>b)</sup>	$\geq 75 \%$	$\geq 10 \%$
Leistung des Anregungslichtes am Ende des Faserstamms $P / \text{W}$ <sup>c)</sup>	$7,6 \cdot 10^{-5}$	$5,6 \cdot 10^{-6}$
Intensität des Anregungslichtes $I_0 / \text{W m}^{-2}$ <sup>d)</sup>	270	2800
Sensorsignale $\Delta I_{600 \mu\text{m}}$ bzw. $\Delta I_{50 \mu\text{m}} / \text{w.E.}$	600	3145

a) berechnet aus dem Radius des Faserkerns

b) abgeschätzt aus den geometrischen Verhältnissen im Koppler (vgl. Abb. 4.5)

c) gemessen als Photostrom einer Photodiode

d) Abschätzung:  $I_0 = P/A$

Die Leistung des Anregungslichtes, mit dem die sensitiven Schichten belichtet wurden, wurde über den Photostrom einer Photodiode gemessen. Aus dem Verhältnis zwischen der Leistung (P) und der bestrahlten Sensorfläche (A) kann die Intensität des Anregungslichtes ( $I_0$ ) abgeschätzt werden. Die Daten aus Tab. 5.16 können folgendermaßen interpretiert werden:

- Die gemessenen Leistungen des Anregungslichtes an den Faserstirnflächen liegen bei der 600 µm-Faser etwa eine Größenordnung über den Werten der 50 µm-Faser. Diese Größenordnung kommt durch die asymmetrische Verteilung des Lichtes im Koppler der 50 µm-Faser zustande. In dieser Anordnung gelangen nur 10 % des Anregungslichtes von der Lichtquelle zum Sensor, während bei der 600 µm-Faser das volle Anregungslicht zum Sensor geführt wird.
- Die Intensität des Anregungslichtes  $I_0$  (Intensität = Leistung/Fläche;  $I_0 = P/A$ ) liegt bei der 50 µm-Sonde bedingt durch die wesentlich kleinere Sensorfläche etwa eine Größenordnung über dem Wert der 600 µm-Sonde. Dieser Effekt stellt wohl einen wesentlichen Beitrag zu den hohen Sensorsignalen der 50 µm-Sonde dar.
- Die Lichtverluste im Koppler für das Fluoreszenzsignal liegen bei der 600 µm-Faser bedingt durch die geometrischen Verhältnisse bei mindestens 75 %, wohingegen im optischen Koppler der Gradientenindexfaser von etwa 10 % Lichtverlusten ausgegangen werden kann (vgl. Abb. 4.5). Auch dies führt zu einer verbesserten Signalausbeute bei der 50 µm-Faser.

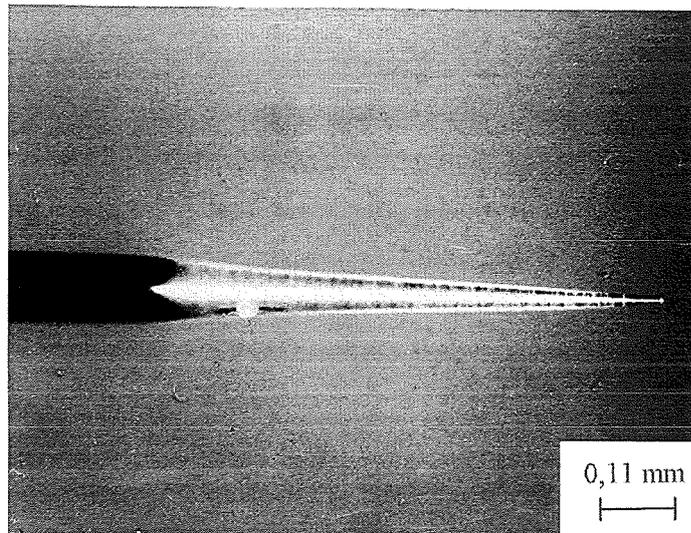
Schon aus diesem qualitativen Vergleich der beiden Fasersonden geht hervor, daß sich die Anordnung mit der 50 µm-Gradientenindexfaser trotz der kleineren Faserstirnfläche als wesentlich leistungsfähiger erweist als die mit der 600 µm-Stufenindexfaser.

### 5.3.3 Faseroptische Nanosensoren

#### 5.3.3.1 Charakterisierung der Nanospitze

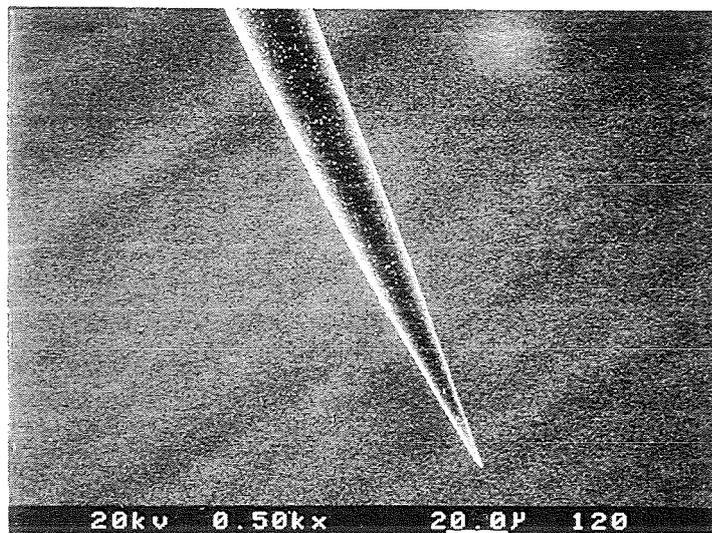
In der dritten Miniaturisierungsstufe wurden aus den Gradientenindexfasern mit 50 µm Kerndurchmesser Faserspitzen mit Durchmessern von  $< 1$  µm hergestellt, mit chemisch-sensitiven Rezeptorschichten versehen und bezüglich der Sensitivität getestet. Die Herstellung der Faserspitzen erfolgte mit einem Faserziehgerät, wie es auch zur Herstellung von Mikropipetten verwendet wird.

In Abbildung 5.41 ist eine lichtmikroskopische Aufnahme einer Faserspitze in 100facher Vergrößerung dargestellt, aus der die Länge und die Form des verjüngten Bereichs der Faser (engl. „taper“) hervorgeht. Die Länge des verjüngten Bereichs (Taper) liegt bei 0,8 bis 1 mm. Der Taper zeigt einen geraden Verlauf und eine Form, die in Anlehnung an die Literatur als nadelförmig bezeichnet werden kann [128].



**Abb. 5.41:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Faserspitze (Vergrößerung 100fach)

Der gleichmäßige, nadelförmige Verlauf der Faserspitze ist in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme (REM-Aufnahme) zu erkennen (Abbildung 5.42).

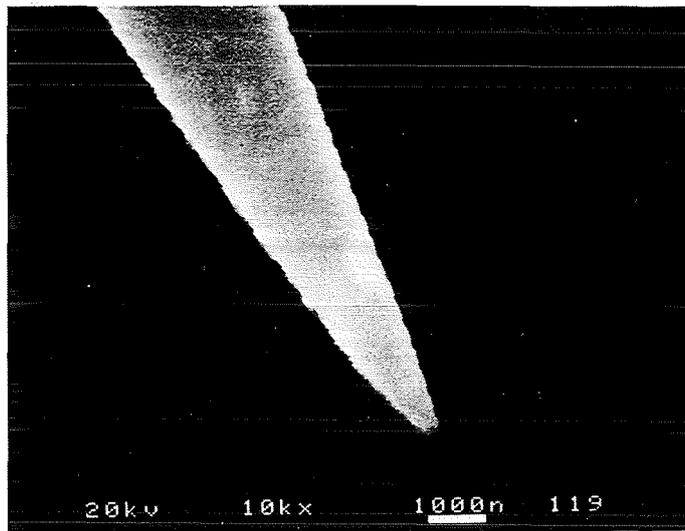


**Abb. 5.42:** REM-Aufnahme einer Faserspitze (Vergrößerung 500fach)

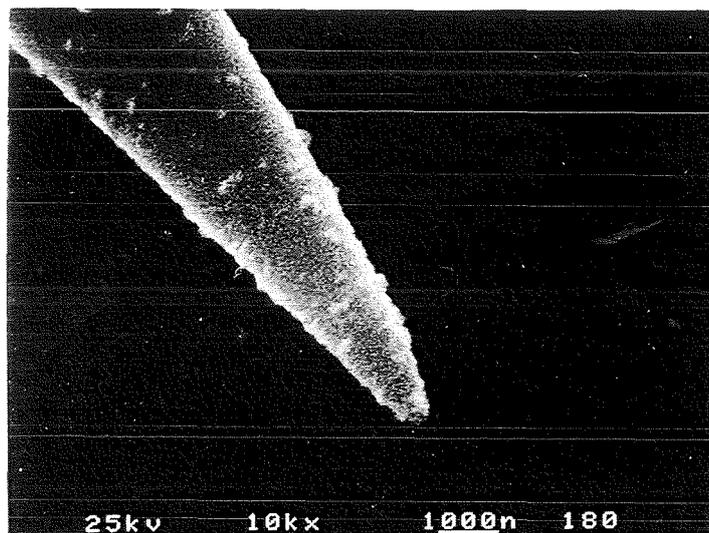
Diese Faserspitzen wurden wie die Mikrosensoren mit der Rezeptorschicht beschichtet (Herstellung siehe Abschnitt 4.4.2, Eduktmischung siehe Tab. 4.6). Zur Abschätzung der Schichtdicke wurden REM-Aufnahmen einer Faserspitze vor und nach der Beschichtung aufgenommen. Die entsprechenden Bilder sind in den Abbildungen 5.43 a) und b) gezeigt. Die unbeschichtete Faserspitze (Abb. 5.43 a) hat an der Stirnfläche einen Durchmesser von etwa 300 nm und kann somit als Nanospitze bezeichnet werden.

Die beschichtete Faser (Abb. 5.43 b) hat im Bereich der Stirnfläche einen Durchmesser von etwa 500-700 nm. Aus dem Vergleich der beiden Aufnahmen kann für die sensitive Schicht eine Dicke von etwa 100-200 nm abgeschätzt werden.

a) unbeschichtete Faserspitze



b) beschichtete Faserspitze



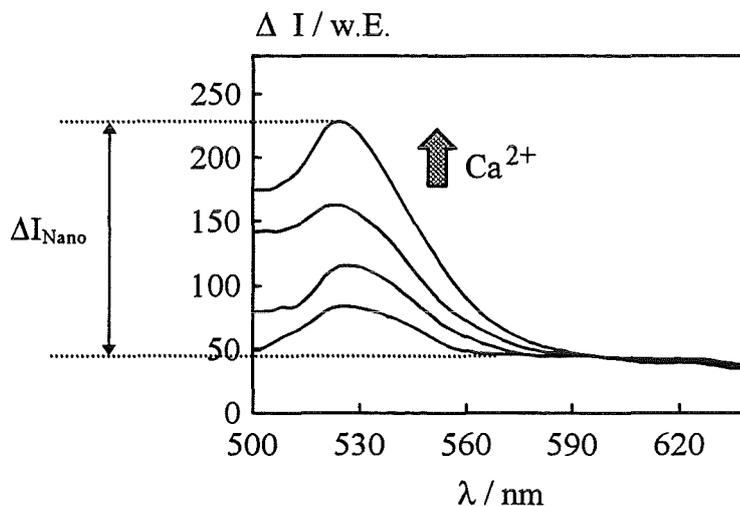
**Abb. 5.43:** REM-Aufnahmen einer unbeschichteten (a) und einer beschichteten Faserspitze (b) (Vergrößerung 10.000fach)

### 5.3.3.2 Messung von Calcium mit einer Nanosonde

Im Vergleich zu den Messungen mit der 50  $\mu\text{m}$ -Mikrosonde wurden bei den Calcium-Messungen mit der Nanosonde folgende Modifikationen vorgenommen:

- Da in der Faserspitze mit größeren Lichtverlusten zu rechnen ist, wurde die volle Laserleistung (mittlere Leistung 7 mW) in die Faser eingekoppelt.
- Die Spektren, die mit der Nanospitze aufgenommen wurden, zeigten einen deutlichen Untergrund durch Streuung. Zur Ermittlung der Sensorsignale wurden deshalb Differenzspektren gebildet, indem von jedem Spektrum des mit Calcium(II)-Ionen beprobten Sensors das Spektrum des unbeprobten Sensors abgezogen wurde. Dadurch verschwindet automatisch die Bande der internen Referenz (Texas Red) bei  $\lambda_{\text{Em}} = 611 \text{ nm}$ , da an dieser Bande keine spektralen Veränderungen bei der Beprobung mit Calciumionen auftreten.

In Abbildung 5.44 sind die erhaltenen Differenzspektren einer Calcium-Nanosonde bei der Beprobung mit Calcium-haltigen Pufferlösungen unterschiedlicher Konzentrationen dargestellt.



**Abb. 5.44:** Differenzspektren einer Calcium-Nanosonde (300 nm-Faserspitze)  
(Lichtquelle: Nd:YAG-Laser,  $\lambda_{\text{Ex}} = 473 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{Ca(II)}}$  = 0,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$ ,  $10^{-5} \text{ mol/l}$ ; BTP-Puffer, pH= 7;  
Angabe  $\uparrow$ : Zunahme der Fluoreszenz bei Beprobung mit Ca(II)-Ionen)

Die in Abbildung 5.44 dargestellten Spektren stellen die ersten Ergebnisse mit einer Calcium-Nanosonde dar. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich verschiedene Calcium-Konzentrationen mit guter Signalqualität unterscheiden lassen.

Die Ansprechzeiten dieser Nanosensoren lagen im Sekundenbereich. Nach Austausch der Probelösung wurde nach 5 Sekunden Meßzeit ein Sensorsignal erhalten, das sich in nachfolgenden Messungen nicht mehr änderte.

Ein Vergleich der Signalamplituden der Nanosonde  $\Delta I_{\text{Nano}}$  mit denen der 50  $\mu\text{m}$ -Mikrosonden wäre dann sinnvoll, wenn entsprechende Daten über die optischen Verhältnisse an der Faserspitze vorlägen. Es ist insbesondere nicht bekannt, welcher Anteil des Anregungslichtes an die Stirnfläche der Faserspitze gelangt, und welcher an den Seitenflächen des Tapers ausgekoppelt wird.

Das seitliche Auskoppeln des Anregungslichtes und Einkoppeln von Fluoreszenzlicht wird üblicherweise durch eine Verspiegelung des Tapers mit einer Aluminiumschicht unterbunden (Nanosensoren von Kopelman et al. [20], vgl. Abb. 3.3). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß in einer jüngeren Arbeit zur Near-Field-Scanning-Optical-Microscopy (NSOM) auch mit Nanosonden ohne Aluminiumverspiegelung hervorragende mikroskopische Auflösungen von 50 nm erzielt wurden [129]. Möglicherweise könnte auch bei faseroptischen Nanosensoren auf eine Aluminiumverspiegelung des Tapers verzichtet werden. Diese Fragestellung war jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht von vorrangigem Interesse.

#### **5.3.4 Zusammenfassung**

Im vorangegangenen Kapitel 5.3 wurden Ergebnisse zur Miniaturisierung Calciumsensitiver Optroden dargestellt. Ausgegangen wurde von planaren Makrosensoren, an denen Calcium-sensitive Schichten mit interner Referenz entwickelt und getestet wurden. Sodann wurden in drei Stufen Mikro- und Nanosensoren durch Anbringung dieser Schichten an die Enden von optischen Fasern hergestellt. In Tabelle 5.17 wird ein Überblick über die Dimensionen der Sensoren bzw. der verwendeten Fasern und den Grad der Miniaturisierung gegeben.

**Tab. 5.17: Miniaturisierung optochemischer Calciumsensoren**

	Sensorfläche / mm <sup>2</sup>	Miniaturisierung <sup>d)</sup>
Makrosensor	30 <sup>a)</sup>	1
Mikrosensor (600 µm)	0,28 <sup>b)</sup>	0,009
Mikrosensor (50 µm)	0,002 <sup>b)</sup>	7 · 10 <sup>-5</sup>
Nanosensor (1 µm)	8 · 10 <sup>-7</sup> <sup>c)</sup>	3 · 10 <sup>-8</sup>

a) bestrahlte Sensorfläche

b) berechnet aus dem Durchmesser des Faserkerns

c) unter der Annahme, daß die bestrahlte Sensorfläche einem Kreis mit dem Durchmesser von 1 µm entspricht

d) bezogen auf die Sensorfläche des Makrosensors

In der rechten Spalte von Tabelle 5.17 wird der Grad der Miniaturisierung angegeben, der bei den Calcium-sensitiven optochemischen Sensoren über einen Bereich von über 8 Größenordnungen verläuft. Es konnte somit gezeigt werden, daß durch den Einsatz hochwertiger optischer Bauelemente, einer empfindlichen Detektionseinheit und einer leistungsstarken, monochromatischen Lichtquelle in allen untersuchten Dimensionen der Sensoren empfindliche Meßsignale erhalten werden konnten. Damit wird deutlich, daß ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung von chemischen Sensoren, nämlich deren Miniaturisierung, bei optochemischen Sensoren erreicht werden kann. Bei Einsatz von entsprechend modifizierten optischen Fasern können Sensoren mit Dimensionen im Nanometerbereich erhalten werden.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist zwei thematische Schwerpunkte auf, die für die Entwicklung von optochemischen Flüssigkeitssensoren von aktueller Bedeutung sind. Zum einen ist dies die Verbesserung der *Stabilität* der sensitiven Schichten, die eine notwendige Voraussetzung für eine zuverlässige Funktion der Sensoren darstellt. Der zweite Schwerpunkt widmet sich der *Miniaturisierung* der Sensoren, mit der sich ein wesentliches Merkmal eines chemischen Sensors – dessen geringe Größe – gegenüber einer klassischen Analysenmethode verbindet. Die Untersuchungen wurden exemplarisch an kationensensitiven Schichten durchgeführt, die durch die Immobilisierung entsprechender Fluoreszenzindikatoren in porösen, hydrophilen Gel-Matrices erhalten wurden. Als Indikatoren wurden Quecksilber-sensitive Porphyrin-Derivate, pH-sensitives Fluorescein und das Calcium-sensitive Calcium Green-1 eingesetzt. Die Matrices dieser Rezeptorschichten bestanden zum einen aus anorganischem Silikagel, das nach dem Sol-Gel-Verfahren hergestellt wurde, und zum anderen aus dem organischen Hydrogel Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat (PolyHEMA). Zur Detektion der optischen Signale wurde die Fluorimetrie als empfindliches Meßverfahren herangezogen.

Da der wichtigste begrenzende Faktor für die Stabilität eines optochemischen Sensors, der in wäßrigen Medien eingesetzt werden soll, durch das Auswaschen des Indikators aus der Rezeptorschicht vorgegeben ist, wurde an planaren Makrosensoren (beschichtete Glasscheiben mit 30 mm  $\varnothing$ ) eine Immobilisierungsmethode zur stabilen Einbindung von Indikatoren in sensitiven Rezeptorschichten entwickelt: Diese besteht in der Anbindung der Indikatoren an makromolekulare Träger und der anschließenden Immobilisierung der indikatorgebundenen Makromoleküle in porösen Rezeptorschichten. Durch diese Molekülvergrößerung können die Indikatoren gewissermaßen in der Matrix verankert werden, was zu einer drastischen Reduzierung des Farbstoffaustrags gegenüber einer Einkapselung der nicht angebondenen Indikatoren führt.

Die grundlegenden Untersuchungen zur Immobilisierung makromolekular gebundener Indikatoren wurden an Quecksilber-sensitiven Schichten durchgeführt, die durch die Immobilisierung von Porphyrin-Derivaten hergestellt wurden. Zuvor wurde sichergestellt, daß eine Komplexierungsreaktion zwischen dem immobilisierten Porphyrin und zweiwertigen Quecksilberionen in mesoporösen, basisch vernetzten Silikagel-Schichten stattfindet. Die Stabilität dieser Schichten war jedoch durch Farbstoffaustrag auf wenige Stunden begrenzt.

Um Quecksilbersensoren mit verbesserter Stabilität zu erhalten, wurden zwei Porphyrin-Dextran-Derivate (meso-Tetra-(p-sulfonatophenyl)porphyrin-Dextran (TPPS-Dextran) und meso-Tetra-(p-carboxyphenyl)porphyrin-Dextran (TCPP-Dextran)) synthetisiert und charakterisiert. Die Immobilisierung dieser Porphyrin-Dextrane in mesoporösen Silikagel-Schichten führte zu sensitiven Rezeptorschichten, die nach einer Lagerung von über 5 Wochen in Pufferlösung noch 92 % des anfänglichen Farbstoffgehalts aufwiesen. Dieses Ergebnis kann als deutlicher Fortschritt gegenüber der Immobilisierung von nicht angebondenen Porphyrin-Molekülen gewertet werden.

Die *Flexibilität* des Immobilisierungskonzepts Dextran-gebundener Indikatoren wurde beispielhaft an drei verschiedenen Analyt-Rezeptor-Paaren dargestellt.

Auf der Basis von Porphyrin-Dextranen wurden Quecksilber-sensitive Silikagel-Schichten hergestellt und bezüglich ihres Ansprechverhaltens auf Hg(II)-Ionen untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Ansprechzeiten der mit Porphyrin-Dextranen dotierten Schichten bis zum Erreichen eines Gleichgewichtswertes bei deutlich über einer Stunde lag. Zur Verkürzung der Analysedauer wurde ein kinetisches Auswerteverfahren (Auswertung der Signale nach 30minütiger Beprobung) eingeführt, mit dem Kalibrationskurven und die pH-Abhängigkeit des Sensorsignals ermittelt wurden. Durch die verhältnismäßig langen Ansprechzeiten der Quecksilber-sensitiven Schichten geht ein klassischer Vorteil eines chemischen Sensors, nämlich die kurze Analysedauer, verloren, so daß diese Sensoren nicht weitergehend charakterisiert wurden.

Durch Immobilisierung von Fluorescein-Dextranen wurden pH-sensitive Schichten hergestellt, wobei neben Silikagel-Schichten auch das Hydrogel PolyHEMA als Matrix eingesetzt wurde. Dabei stellte sich heraus, daß die Ansprechzeiten der PolyHEMA-Sensoren mit 5 Sekunden bis zum Erreichen des Sättigungswertes gegenüber den Silikagel-Schichten, die erst nach etwa 120 Sekunden den Sättigungswert erreichten, um über eine Größenordnung kürzer waren. Neben den Ansprechzeiten und der Reproduzierbarkeit der Signale wurden auch fluorimetrische Titrationskurven ermittelt. Die Stabilität der Fluorescein-Dextran-dotierten Schichten kann als sehr gut bezeichnet werden: Nach etwa 3wöchiger Lagerung lag der Farbstoffgehalt beider Gel-Matrices bei über 95 % des Anfangswertes.

Als weiteres Analyt-Rezeptor-Paar wurden durch die Immobilisierung von Calcium Green-Dextran Calcium-sensitive Schichten hergestellt. Die Calcium-sensitiven Schichten zeigten kurze Ansprechzeiten von etwa 5 Sekunden bis zum Erreichen des Sättigungswertes.

Bei sequentiellen Beprobungs- und Regenerationszyklen wurde eine Reproduzierbarkeit des Signals eines Sensors von  $\pm 2,1\%$  erhalten.

Durch Coimmobilisierung von Calcium Green-Dextran und des Fluoreszenzstandards Texas Red-Dextran wurde gezeigt, daß sich die Reproduzierbarkeit der Sensorsignale verschiedener Sensoren durch eine interne Referenzierung deutlich verbessern läßt: Bei Auswertung der relativen Signale anstatt der absoluten Signale konnten die relativen Fehler der Sensorsignale von 38 - 44 % auf 4 - 7 % entscheidend reduziert werden.

Aus den Kalibrationskurven der Calcium-sensitiven Schichten wurde eine Dissoziationskonstante für den immobilisierten Indikator von  $2,7 \cdot 10^{-7}$  mol/l ermittelt. Der Meßbereich des Sensors liegt somit im Konzentrationsbereich von etwa  $5 \cdot 10^{-8}$  mol/l bis  $10^{-5}$  mol/l, was den Konzentrationsverhältnissen bei Calcium-Fluktuationen in lebenden Zellen entspricht.

Mit diesem Hintergrund wurde der zweite thematische Schwerpunkt der Arbeit, die Miniaturisierung der Calcium-sensitiven Sensoren mit interner Referenz, vorgenommen. Durch die Beschichtung der Stirnflächen von Lichtwellenleitern, deren Faserkerne über Durchmesser von 600  $\mu\text{m}$  bzw. 50  $\mu\text{m}$  verfügten, wurden Sensoren im Mikrometer-Maßstab hergestellt (Mikrosensoren), in faseroptischen Aufbauten als Meßsonden integriert und getestet. Es stellte sich heraus, daß beide Meßsonden zur empfindlichen Detektion von Calciumionen geeignet waren, wobei die 50  $\mu\text{m}$ -Sonde bauartbedingt höhere Fluoreszenzsignale lieferte. Optochemische Nanosonden wurden erhalten, indem in einer weiteren Miniaturisierungsstufe verjüngte Faserspitzen mit Durchmessern von etwa 300 nm mit Calcium-sensitiven Filmen beschichtet wurden. Auch diese Nanosonden, die im Vergleich zu den planaren Makrosensoren um über 8 Größenordnungen verkleinert waren, zeigten bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen eindeutig unterscheidbare Signale. Damit wurde gezeigt, daß die Miniaturisierung der Sensoren, die ein wichtiges Kriterium für weitere Entwicklungen darstellt, im Falle der optochemischen Sensoren in hervorragender Weise erreicht werden kann.

Durch die Immobilisierung Dextran-gebundener Indikatoren konnte die Stabilität von kationensensitiven Rezeptorschichten für optochemische Sensoren von Stunden bis Tagen auf mehrere Wochen verbessert werden. Da sich die Zusammensetzungen der sensitiven Schichten (Art und Menge des Indikators, Coimmobilisierung mehrerer Farbstoffe, Verwendung alternativer Matrices) bei dieser Immobilisierungsmethode in einfacher Weise variieren lassen, ist dieses Konzept auch für andere, neue analytische Aufgabenstellungen interessant. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sich durch die

Kombination von spezieller optischer Fasertechnik, Fluoreszenzdetektion und optimierten chemisch-sensitiven Schichten Sensoren erhalten lassen, die als sehr empfindlich und extrem miniaturisiert zu bezeichnen sind.

Insbesondere durch die geringen Dimensionen der Sensoren werden sich in Zukunft Aufgabenstellungen bearbeiten lassen, die den konventionellen analytischen Methoden nicht zugänglich sind. Dies betrifft beispielsweise die Analytik in kleinsten Volumina (z.B. biologische Zellen oder Domänen) oder die Untersuchung von chemischen Reaktionen auf Oberflächen durch Abtastung mit optochemischen Sensoren mit einer Ortsauflösung im Nanometerbereich.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman; *Pure & Appl. Chem.*, **63(9)** (1991), 1247-1250
- [2] K. Camman; *Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden*, Springer (Heidelberg) 1977
- [3] H.J. Ache; *Interdisciplinary Science Reviews*, **18(3)** (1993), 280-288
- [4] G. Gauglitz; *Labo-Trend* (1995), 19-28
- [5] M.A. Arnold; *Anal. Chem.*, **64(21)** (1992), 1015A-1025A
- [6] P.D. Home, K.G.M.M. Alberti; in A.P.F. Turner, I. Karube, G.S. Wilson (Ed.); *Biosensors—Fundamentals and Applications*, Oxford University Press (Oxford) 1987, 723-736
- [7] W. Bier, B. Büstgens, J. Mohr, C. Müller, W.K. Schomburg, O. Fromheim, T. Kühner, D. Radloff, J. Reichert; *FZK-Nachrichten*, **27(1)** (1995), 11-18
- [8] W. Simon; *Chimia*, **44** (1990), 395
- [9] W.R. Seitz; *Anal. Chem.*, **56** (1984), 16A
- [10] O.S. Wolfbeis; *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **325** (1986), 387
- [11] J. Bürck, J.P. Conzen, B. Beckhaus, H.J. Ache; *Sensors and Actuators B*, **18-19** (1994), 291-295
- [12] O.S. Wolfbeis; *Trends in Analytical Chemistry*, **4(7)** (1985), 184-188
- [13] O.S. Wolfbeis (Ed.); *Fluorescence Spectroscopy—New Methods and Applications*, Springer (Heidelberg) 1993, 221
- [14] R. Czolk; *Untersuchungen an immobilisierten Porphyrinderivaten zur Entwicklung Cadmium-sensitiver Schichten für einen optisch-chemischen Sensor*, Dissertation Universität Karlsruhe (TH), 1990
- [15] W. Tan, Z.-Y. Shi, R. Kopelman; *Anal. Chem.*, **64** (1992), 2985-2990
- [16] E. Betzig, A. Lewis, A. Harootunian, M. Isaacson, E. Kratschmer; *Biophys. J.*, **49** (1986), 269-279
- [17] T.D. Harris, R.D. Grober, T.R. Trautman, E. Betzig; *Applied Spectroscopy*, **48(1)** (1994), 14A-21A
- [18] R. Kopelman, W. Tan, D. Birnbaum; *J. Lumin.*, **58** (1994), 380-387
- [19] E. Betzig, J.K. Trautman, T.D. Harris, J.S. Weiner, R.L. Kostelak; *Science*, **251** (1991), 1468-1470
- [20] R. Kopelman, W. Tan, Z.-Y. Shi; *PCT Int. Appl.*, WO 94/06040, 1994
- [21] R. Dagani; *C&EN*, Dez. (1994), 3-36
- [22] A. Lewis, K. Lieberman; *Anal. Chem.*, **63(11)** (1991), 625A-638A
- [23] R. Kopelman, W. Tan, Z.-Y. Shi; *SPIE Proc.*, **1796** (1992), 157-162

- [24] W. Tan, Z.-Y. Shi, S. Smith, R. Kopelman; *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **253** (1994), 243-257
- [25] W. Tan, Z.-Y. Shi, B.A. Thorsrud, C. Harris, R. Kopelman; *SPIE Proc.*, **2068** (1994), 59-68
- [26] W. Tan, Z.-Y. Shi, S. Smith, D. Birnbaum, R. Kopelman; *Science*, **258** (1992), 778-781
- [27] J. Samuel, A. Strinkovski, S. Shalom, K. Lieberman, M. Ottolenghi, D. Avnir, A. Lewis; *Mater. Letters*, **21** (1994), 431-434
- [28] W.R. Seitz; in O.S. Wolfbeis (Ed.), *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Vol. II, CRC Press (Boca Raton Florida) 1991, 1-16
- [29] S.J. West, S. Ozawa, K. Seiler, S.S.S. Tan, W. Simon; *Anal. Chem.*, **64** (1992), 533-540
- [30] G.G. Guibault, G. Palleschi, G. Lubrano; *Biosensors & Bioelectronics*, **10** (1995), 379-392
- [31] G.J. Mohr, O.S. Wolfbeis; *Anal. Chim. Acta*, **292** (1994), 41-48
- [32] H.E. Posch, M.J.P. Leiner, O.S. Wolfbeis; *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **334** (1989), 162-165
- [33] M.-R. S. Fuh, L.W. Burgess, T Hirschfeld, G.D. Christian, F. Wang; *Analyst*, **112** (1987), 1159-1163
- [34] D.R. Walt, S. Luo, C. Munkholm; *SPIE Proc.*, **906** (1988), 60-64
- [35] H. Offenbacher, O.S. Wolfbeis, E. Furlinger; *Sensors and Actuators*, **9** (1986), 73-84
- [36] S. Kraus; *Xerogelstrukturen als Sensormatrices – Eignungsuntersuchungen durch Immobilisierung pH-sensitiver Indikatoren*, Dissertation Universität Karlsruhe (TH), 1995
- [37] H.He, H. Li, G. Mohr, B. Kovács, T. Werner, O.S. Wolfbeis; *Anal. Chem.*, **65** (1993), 123-127
- [38] J.F. Alder, D.C. Ashworth, R. Narayanaswamy, R.E. Moss, I.O. Sutherland; *Analyst*, **112** (1987), 1191-1192
- [39] T.L. Blair, T. Cynkowski, L.G. Bachas; *Anal. Chem.*, **65** (1993), 945-947
- [40] K. Suzuki, K. Tohda, Y. Tanda, H. Ohzora, S. Nishihama, H. Inoue, T. Shirai; *Anal. Chem.*, **61** (1989), 382-384
- [41] H. Hisamoto, K. Watanabe, E. Nakagawa, D. Siswanta, Y. Shichi, K. Suzuki; *Anal. Chim. Acta*, **299** (1994), 179-187
- [42] Y. Wang, J.M. Baten, S.P. McMaughan, D.R. Bobbitt; *Microchem. J.*, **50** (1994), 385-396
- [43] T. Blair, S.-T. Yang, T. Smith-Palmer, L.G. Bachas; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 300-302

- [44] T. Rosatzin, P. Holy, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon; *Anal. Chem.*, **64** (1992), 2029-2035
- [45] Y. Kawabata, K.-I. Yasunaga, T. Imasaka, N. Ishibashi; *Analytical Sciences*, **7** (1991), 1465-1468
- [46] T. Blair, T. Cynkowski, L. Bachas; *Anal. Chem.*, **65** (1993), 945-947
- [47] M. Lerchi, E. Reitter, W. Simon, E. Pretsch, D.A. Chowdhury, S. Kamata; *Anal. Chem.*, **66** (1994), 1713-1717
- [48] A. Morales-Bahnik, R. Czolk, J. Reichert, H.J. Ache; *Sensors and Actuators B*, **13-14** (1993), 424-426
- [49] M. Lerchi, E. Bakker, B. Rusterholz, W. Simon; *Anal. Chem.*, **64** (1992), 1534-1540
- [50] I. Klimant, M. Otto; *Mikrochim. Acta*, **108** (1992), 11-17
- [51] Z. Zhujun, W.R. Seitz; *Anal. Chim. Acta*, **171** (1985), 251-258
- [52] C. Persner; Untersuchungen an immobilisierten Porphyrinderivaten zur Entwicklung eines optochemischen Sensors für die Bestimmung von Blei-, Cadmium- und Quecksilberionen in wäßrigen Lösungen, Dissertation Universität Karlsruhe (TH), 1995
- [53] B. Iosefzon-Kuyavskaya, I. Gigozin, M. Ottolenghi, D. Avnir, O. Lev; *J. Non-Cryst. Solids*, **147-148** (1992), 808-812
- [54] M. Plaschke, R. Czolk, H.J. Ache; *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995), 107-113
- [55] A. Streitwieser, C.H. Heathcock; *Organische Chemie*, Verlag Chemie (Weinheim) 1980, 1318
- [56] H. Günther; *NMR-Spektroskopie*, 2. Auflage, Thieme-Verlag (Stuttgart) 1983
- [57] D. Dolphin (Ed.), M. Gouterman; *The Porphyrins*, Academic Press (New York) 1978, Vol. 3, 1-165
- [58] A. Harriman; *J.C.S. Faraday I*, **76** (1980), 1978-1985
- [59] M. Tabata, M. Tanaka; *Trends in Anal. Chem.*, **10(4)** (1991), 128
- [60] Fluck, Heumann; *Periodensystem der Elemente*, Verlag Chemie (Weinheim) 1985
- [61] J.W. Buchler; in K.W. Smith (Ed.); *Porphyrins and metalloporphyrins*, Elsevier Scientific Publishing Company (Amsterdam) 1975, 157-231
- [62] M. Tabata, W. Miyata; *Chemistry Letters* (1991), 785-788
- [63] H. Ishi, H. Koh; *Talanta*, **24** (1977), 417
- [64] X. Zhong-Jun, W. Huai-Qui, P. Jiao-Mai; *Acta Chim. Sinica*, **47** (1989), 918
- [65] H. Ishi, H. Koh, K. Satoh; *Analyst*, **107** (1982), 647
- [66] M. Tabata, M. Tanaka; *Analytical Letters*, **13(A6)** (1980), 427-438
- [67] S. Igarashi, K. Uchiyama, T. Yotsuyanagi; *Bunseki Kagaku*, **37** (1988), 331

- [68] G. Heinzmann; Untersuchungen an farbstoffdotierten, porösen Glasfilmen zur Entwicklung von optochemischen Sensoren für die Detektion von toxischen Gasen und die Bestimmung der relativen Luftfeuchtigkeit, Dissertation Universität Karlsruhe (TH), 1996
- [69] J. Sans; Hämoglobin als Rezeptorkomponente in einem Biosensor zur Detektion von Cyanwasserstoff, Diplomarbeit Universität Karlsruhe (TH), 1993
- [70] Römpp; Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag (Stuttgart) 1992
- [71] M.M. Martin, L. Lindqvist; *J. Luminescence*, **10** (1975), 381-390
- [72] M.A. Kuhn; in A.W. Czarnik (Ed.), *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*, ACS Symposium Series 538, American Chemical Society (Washington DC) 1992, 147-161
- [73] *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes* (Eugene, Oregon) 1992-1994
- [74] M. Erhard, P. Erne; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**(1) (1991), 209-215
- [75] J.T. Gerig, P. Sinh, L.A. Levy, R.E. London; *J. Inorg. Biochem.*, **31** (1987), 113-121
- [76] R.Y. Tsien; *C&EN*, Jul. (1994), 34-44
- [77] I. Parker, Y. Yao; *Cell Calcium*, **15** (1994), 276-288
- [78] D.B. Jaffe, S.A. Fisher, T.H. Brown; *J. Neurobiol.*, **25**(3) (1994), 220-233
- [79] K. Mossberg, M. Ericsson; *J. Microscopy*, **158** (1990), 215
- [80] J. Janata; *Anal. Chem.*, **64** (1992), 196R-219R
- [81] R. Zusman, C. Rottman, M. Ottolenghi, D. Avnir; *J. Non-Cryst. Solids.*, **122** (1990), 107-109
- [82] O. Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovich, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov, J. Gun; *Anal. Chem.*, **67**(1) (1995), 22A-30A
- [83] Z. Zhujun, Y. Zhang, M. Wangbai, Z.M. Shakhsher, C.L. Grant, W.R. Seitz, D.C. Sundberg; *Anal. Chem.*, **61** (1989), 202-205
- [84] I. Oehme, B. Prokes, I. Murkovic, T. Werner, I. Klimant, O.S. Wolfbeis; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **350** (1994), 563-567
- [85] A.W. Gentzow, H.-D. Feucht, H. Formanek, G. Wanner; *The 7th Int. Conf. on Solid-State Sensors and Actuators* (1994), 568-570
- [86] C.E. Kibbey, M.E. Meyerhoff; *Anal. Chem.*, **65** (1993), 2189-2196
- [87] H. Offenbacher, O.S. Wolfbeis, E. Furlinger; *Sensors and Actuators*, **9** (1986), 73-84
- [88] Z. Zhujun, W.R. Seitz; *Anal. Chim. Acta*, **160** (1984), 47-55
- [89] D.L. Meadows, J.S. Schultz; *Anal. Chim. Acta*, **280** (1993), 21-30
- [90] J.R. Lakowicz, B. Maliwal; *Anal. Chim. Acta*, **271** (1993), 155-164
- [91] R.B. Thompson, J.R. Lakowicz; *Anal. Chem.*, **65** (1993), 853-856

- [92] L.M. Christian, W.R. Seitz; *Talanta*, **35(2)** (1988), 119-122
- [93] S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi; *Materials Letters*, **10(1,2)** (1990), 1-5
- [94] S. Braun, S. Shtelzer, S. Rappoport, D. Avnir, M. Ottolenghi; *J. Non-Cryst. Solids*, **147&148** (1992), 739-743
- [95] W. Tan, Z.-Y. Shi, R. Kopelman; *Sensors and Actuators B*, **28** (1995), 157-163
- [96] A.M. Buckley, M. Greenblatt; *J. Chem. Education*, **71(7)** (1994), 599-602
- [97] C.J. Brinker, G.W. Scherer; *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel-Processing*, Academic Press (London) 1990
- [98] L.L. Hench, D.R. Ulrich (Ed.); *Science of Ceramic Chemical Processing*, Wiley (New York) 1986, 52-64
- [99] D. Avnir, V.R. Kaufman, R. Reisfeld; *J. Non-Cryst. Solids*, **74** (1985), 395-406
- [100] L.C. Klein; *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **23** (1993), 437-452
- [101] Ph. Colomban; *Ceramics International*, **15** (1989), 23-50
- [102] O. Wichterle, V. Kudela; *Encycl. Polym. Sci. Engng.*, **7**, 783-866
- [103] J.W. Parker, O. Laksin, C. Yu, M.-L. Lau, S. Klima, R. Fisher, I. Scott, B.W. Atwater; *Anal. Chem.*, **65** (1993), 2329-2334
- [104] G. Schwedt; *Fluorimetrische Analyse*, Verlag Chemie (Weinheim) 1981
- [105] S.G. Schulman; *Molecular Luminescence Spectroscopy – Methods and Applications: Part 1*, Wiley (New York) 1985
- [106] Hans Meister; *Elektronik Praxis*, **1** (1996), 72-76
- [107] N.L. Smith, H.M. Lenhoff; *Anal. Biochem.*, **61** (1974), 392-415
- [108] *Versuchsvorschrift der Fa. Molecular Probes*
- [109] K.A. Connors; *Binding Constants – The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley (New York) 1987
- [110] H. Kaiser; *Z. anal. Chemie*, **209** (1965), 1-18
- [111] M.W. Colby, J.D. MacKenzie; *J. Non-Cryst. Solids*, **99** (1988), 129-139
- [112] M. Plaschke, R. Czolk, J. Reichert, H.J. Ache; *Thin Solid Films*, **279** (1996), 233-235
- [113] T.T. Ngo, H.M. Lenhoff; *J. Appl. Biochem.*, **2** (1980), 373-379
- [114] H. Beyer, W. Walter; *Lehrbuch der Organischen Chemie*, Hirzel Verlag (Stuttgart) 1973, 733
- [115] Datenblatt „Sephadex“ (1995), Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- [116] R. Peters; *EMBO J.*, **3(8)** (1984), 1831-1836
- [117] I. Lang, M. Scholz, R. Peters; *J. Cell Biol.*, **102** (1986), 1183-1190
- [118] K.A. Granath, B.E. Kvist; *J. Chromatog.*, **28** (1967), 69-81
- [119] T. J. Kulp, I. Caminas, S.M. Angel, C. Munkholm, D.R. Walt; *Anal. Chem.*, **59** (1987), 2849-2853

- [120] F. Janowski, G. Fischer, W. Urbaniak, Z. Foltynowicz, B. Marciniak; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **51** (1991), 263-272
- [121] O. Lev, B.I. Kuyavskaya, I. Gigozin, M. Ottolenghi, D. Avnir; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **343** (1992), 370-372
- [122] T. Werner, O.S. Wolfbeis; *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **346** (1993), 564-568
- [123] *Der Große Brockhaus-Kompaktausgabe*; 18. Aufl., F.A. Brockhaus (Wiesbaden) 1983, 96
- [124] H.M.N.H. Irving, H. Zettler; *Pure and Appl. Chem.*, **48(2)** (1976), 129-132
- [125] E. Bakker, W. Simon; *Anal. Chem.*, **64** (1992), 1805-1812
- [126] B. O'Rourke, B.M. Ramza, E. Marban; *Science*, **265** (1994), 962-966
- [127] A.L. Escobar, J.R. Monck, J.M. Fernandez, J.L. Vergara; *Nature*, **367** (1994), 739-741
- [128] S. McCulloch, D. Uttamchandani; *Meas. Sci. Technol.*, **6** (1995), 1157-1163
- [129] E. Monson, G. Merrit, S. Smith, J.P. Langmore, R. Kopelman; *Ultramicroscopy*, **57** (1995) 257-262

## 8. Anhang

### 8.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

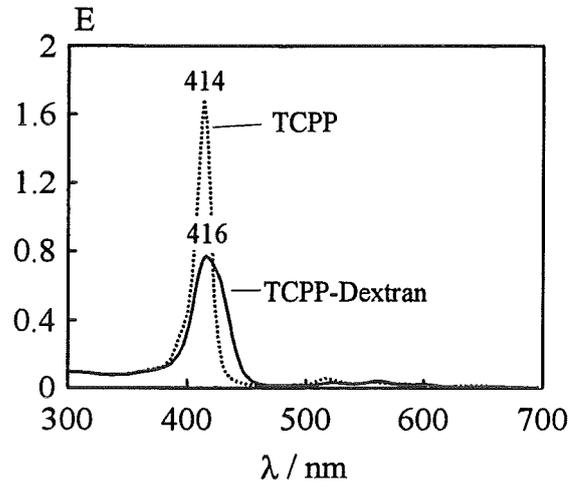
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
APTAMOS	Aminopropyltrimethoxysilan
BG	Belegungsgrad
BSA	bovine serum albumin
BTP	Bis-Tris-Propan-Puffer
$c_i$	Konzentration eines Stoffes i
CG	Calcium Green
CGD	Calcium Green-Dextran
ChemFET	chemischer Feldeffekttransistor
d	Tag
$d_p$	Porendurchmesser
D	Dextran
DCCA	drying control chemical additive
Ø	Durchmesser
E	Extinktion
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Fluorescein
FD	Fluorescein-Dextran
FD-PH	Fluorescein-Dextran in PolyHEMA-Filmen
FD-SG	Fluorescein-Dextran in Silikagel-Filmen
Gew. %	Gewichtsprozent
h	Stunden
$^1\text{H-NMR}$	Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie
HPTS	8-Hydroxy-1,3,6-Pyrentrisulfonat
I, $I_F$	Fluoreszenzintensität
I(Em)	Fluoreszenzintensität im Emissionsspektrum
I(Ex)	Fluoreszenzintensität im Anregungsspektrum
$I_0$	Intensität des eingestrahlten Lichtes
IR	Infrarot
ISE	ionenselektive Elektrode
$K_D$	fluorimetrisch bestimmte Dissoziationskonstante
$\log K_{ij}$	Selektivitätskoeffizient (i:= Meßion, j:= Störion)

m	elektrophoretische Mobilität
Me <sup>n+</sup>	n-fach positiv geladenes Metallion
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
n <sub>i</sub>	Brechungsindex in einem Medium i
Nd:YAG	Neodym-Yttrium-Aluminium-Granat
NG	Neutralglasfilter
NSOM	near-field scanning optical microscopy
OMA	optischer Multikanal-Analysator
P	Porphyrin
PD	Porphyrin-Dextran
PolyHEMA	Poly(2-hydroxyethyl)methacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
Rf	Retentionsfaktor
rel. I	relative Fluoreszenzintensität
REM	Rasterelektronenmikroskopie
S <sub>0</sub>	elektronischer Grundzustand eines Moleküls (Singulett)
S <sub>n</sub>	n-ter elektronisch angeregter Zustand eines Moleküls (Singulett)
SAA	surface active agent
SAT	sitting at top (-Komplex)
SAW	surface acoustic wave
t	Zeit
T	Temperatur
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCPP	meso-Tetra-(p-carboxyphenyl)porphyrin
THF	Tetrahydrofuran
TMOS	Tetramethoxysilan
TPPS	meso-Tetra-(p-sulfonatophenyl)porphyrin
TR	Texas Red
TRD	Texas Red-Dextran
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV/VIS	ultraviolett / sichtbar (engl. „visible“)
w.E.	willkürliche Einheiten

$\alpha, \beta$	Winkelbezeichnungen
$\Delta$	Differenz
$\Delta I$	Intensitätsdifferenz (Signal)
$\Delta I_G$	Gleichgewichts-Signal
$\Delta I_{kin}$	Signal nach einer definierten Meßzeit
$\Delta I_{ij}$	Selektivitätskoeffizient (i:= Meßion, j:= Störion)
$\Delta t$	Ansprechzeit
$\Delta t_{kin}$	kinetische Ansprechzeit
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\Phi_F$	Fluoreszenz-Quantenausbeute
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{Em}$	Wellenlänge für die Emission
$\lambda_{Ex}$	Wellenlänge für die Anregung
$\tau$	Transmissionskoeffizient
$\nu$	Wellenzahl

## 8.2 UV-VIS-Spektren der Porphyrin-Dextrane

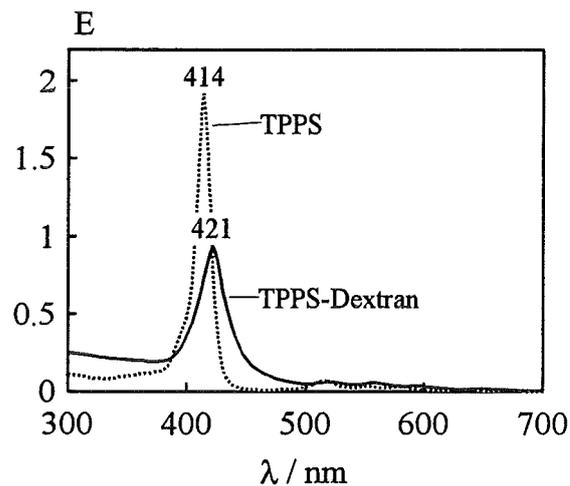
### meso-Tetra-(p-carboxyphenyl)porphyrin-Dextran (TCPP-Dextran)



**Abb 8.1:** UV-VIS-Spektren von TCPP-Dextran und TCPP

(Experimentelle Daten:  $c_{\text{TCPP-Dextran}} = 0,1 \text{ g/l}$ ,  $c_{\text{TCPP}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ , Borat-Puffer,  $\text{pH} = 8$ , optische Weglänge  $d = 1 \text{ cm}$ ,  $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ , Spektrometer: UV-2100, Fa. Shimadzu)

### meso-Tetra-(p-sulfonatophenyl)porphyrin-Dextran (TPPS-Dextran)

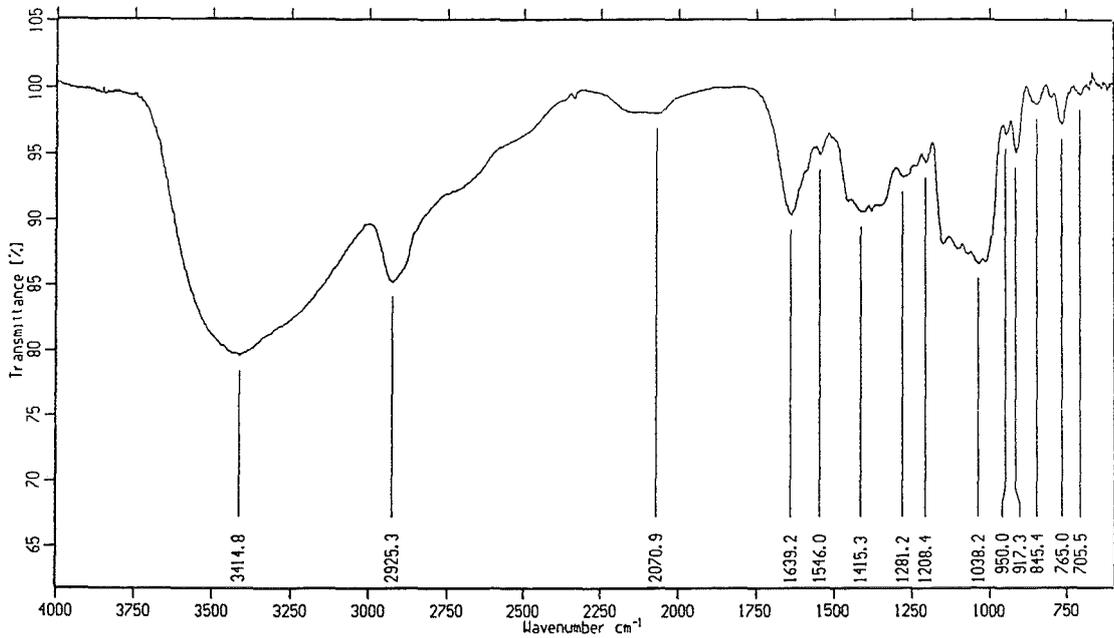


**Abb 8.2:** UV-VIS-Spektren von TPPS-Dextran und TPPS

(Experimentelle Daten:  $c_{\text{TPPS-Dextran}} = 0,1 \text{ g/l}$ ,  $c_{\text{TPPS}} = 4,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$ , Borat-Puffer,  $\text{pH} = 8$ , optische Weglänge  $d = 1 \text{ cm}$ ,  $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ , Spektrometer: UV-2100, Fa. Shimadzu)

### 8.3 IR-Spektren der Porphyrin-Dextrane (in KBr)

#### meso-Tetra-(p-carboxyphenyl)porphyrin-Dextran (TCPP-Dextran)



#### meso-Tetra-(p-sulfonatophenyl)porphyrin-Dextran (TPPS-Dextran)

