



ulm university

universität

uulm

Institut für Elektrochemie

Untersuchungen zu
funktionalisierten Elektroden
in der elektrochemischen
Doppelschicht

Dissertation von

Sebastian Horvat

2017

Untersuchungen zu
funktionalisierten Elektroden
in der elektrochemischen
Doppelschicht

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

angefertigt am

Institut für Elektrochemie

von

Sebastian Horvat

aus Süßen

Ulm 2017

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2012 bis April 2016 am Institut für Elektrochemie der Universität Ulm angefertigt.

Wissenschaftlicher Betreuer: Prof. Dr. Timo Jacob

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Peter Dürre

1. Gutachter: Prof. Dr. Timo Jacob
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Ziener

Tag der Promotion: 20.06.2017

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und sämtliche Textstellen, die wortwörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen erbrachten Leistungen als solche gekennzeichnet.

Ulm, den 20.04.2017

Sebastian Horvat

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Aufbau eines Biosensors.....	3
2.1.1 Glucose-Sensoren.....	4
2.1.2 DNA-basierte Sensoren	8
2.2 Raman-Spektroskopie.....	10
2.2.1 Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS).....	13
2.3 Self-assembled monolayers (SAMs)	15
2.4 Die elektrochemische Doppelschicht.....	19
2.4.1 Das Helmholtz-Modell.....	20
2.4.2 Das Gouy-Chapman-Modell	21
2.4.3 Das Stern-Modell und weitere Doppelschichtmodelle.....	22
3 Materialien und Methoden	25
3.1 Zyklische Voltammetrie	25
3.2 Rastersondenmikroskopie.....	26
3.3 Präparierung der Glucose-Sensoren	29
3.4 Herstellung nanostrukturierter Au(SSV)-Substrate	31
3.5 Präparierung der DNA-basierten Sensoren	34
3.6 Eingesetzte Chemikalien.....	38

Ergebnisse und Diskussion	41
4 Glucose-Sensoren: Aufbau und Charakterisierung.....	41
4.1 Elektrochemische Betrachtung der Au(111)-Elektrode	41
4.2 Ausbildung der 4-PyS-SAM auf Au(111)	42
4.3 Metallisierung der mit 4-PyS bedeckten Au(111)-Elektrode.....	43
4.4 Glucose-Sensor mit Enzym-Linker Polyallylamin.....	48
4.5 Glucose-Sensor mit Enzym-Linker 2-Thiobarbitursäure.....	52
4.6 Übersicht der amperometrischen Glucose-Sensoren.....	56
5 DNA-basierte Sensoren: Aufbau und Charakterisierung	60
5.1 Elektrochemische Betrachtung der Au(SSV)-Elektrode.....	60
5.2 Ausbildung der Mercaptohexanol-SAM	61
5.3 Immobilisierung des DNA-Probenstrangs B8881	63
5.4 Immobilisierung des DNA-Targetstrangs B8882.....	66
5.5 Hybridisierung zwischen DNA-Probenstrang B8881 und DNA-Targetstrang B8882 in Anwesenheit der Mercaptohexanol-SAM	70
6 Untersuchungen zum lokalen elektrischen Feld in der elektrochemischen Doppelschicht.....	73
6.1 Bestimmung der STR von Texas Red	73
6.1.1 Schwingungs-Stark-Effekt eines punktförmigen Dipols.....	75
6.1.2 Simulierung des elektrischen Felds mit dem GC-Modell.....	78
6.1.3 Das Lorentz'sche Modell	79
6.1.4 Schwingungs-Stark-Effekt ausgewählter Sondenmoleküle	81

6.2 Einfluss der Salzkonzentration auf die Auslenkung der TR-Wellenzahl in unterschiedlichen Sonden-Positionen.....	83
6.3 Das lokale elektrische Feld	87
7 Zusammenfassung und Ausblick	91
Literaturverzeichnis.....	95

1 Einleitung

In der heutigen Zeit ist die Diagnose, an Diabetes mellitus erkrankt zu sein, weltweit und durch sämtliche Gesellschaftsschichten verbreitet. Das charakteristische Merkmal dieses Krankheitsbilds umfasst eine chronische Störung des Stoffwechsels, wodurch erhöhte Blutzuckerkonzentrationen auftreten [1]. Die Entwicklung von handlichen Blutzuckermessgeräten, beginnend in den frühen 1970er Jahren, hat zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität Millionen betroffener Diabetes-Patienten geführt. Mit diesen Geräten kann der Blutzuckergehalt unter alltäglichen Situationen und zu jeder Zeit zuverlässig bestimmt werden. Dementsprechend können Maßnahmen zur Regulierung der Blutzuckerkonzentration eingeleitet werden, wodurch langfristig zum einen die Lebenserwartung von Diabetes-Patienten gesteigert und andererseits Ersparnisse im Gesundheitssektor erzielt werden können [2].

Solche Messgeräte sind empfindliche Glucose-Sensoren mit dem Konzept einer Verflechtung von bioenzymatischen und elektrochemischen Prozessen. In amperometrischen Sensoren findet eine Erkennungsreaktion zwischen Analyt, in diesem Fall Glucose, und einer enzymatisch-funktionalisierten Elektrode statt, deren elektrochemische Charakterisierung im ersten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht wird.

Elektrochemische Detektionsmethoden sind, im Vergleich zu anderen analytischen Methoden [3], für den Bau tragbarer, miniaturisierten Geräte besonders geeignet. Die Messelektrode ist in gleichem Maße sowohl Ursache von Elementarprozessen, welche durch das Anlegen geeigneter Elektrodenpotentiale herbeigeführt wird, als auch Detektor des Messsignals (Strom), resultierend aus der enzymatischen Umsatzreaktion. Diese Doppelfunktion der Messelektrode bewirkt, dass elektrochemische Sensoren, apparativ gesehen, konstruktiv weniger anspruchsvoll als alternative (optische oder chemische) Detektionsprinzipien [4, 5] sind.

Die genaue Kontrolle des Elektrodenpotentials ist die grundlegende Komponente im Betrieb von elektrochemischen Sensoren oder Messgeräten allgemein, die zudem die Beschaffenheit der elektrodennahen flüssigen Region (Elektrolyt) bestimmt, wodurch es zur Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht kommt. Das elektrische Feld in dieser Grenzflächenregion beeinflusst maßgeblich bioelektrochemische und elektrokatalytische Reaktionen [6-8].

Trotz grundlegenden Vorstellungen über den Aufbau der elektrochemischen Doppelschicht, die teilweise ein Jahrhundert zurückliegen [9-13], ist die genaue Struktur auf molekularer Ebene erst im letzten Jahrzehnt theoretisch eingehender untersucht worden [14-16]. Die Aktualisierung der vorherrschenden Vorstellungen über den Aufbau der Doppelschicht ist deswegen geboten, kann aber nicht ohne eine hinreichende experimentelle Untersuchung vollzogen werden. Mit der Einführung von biofunktionalisierten und strukturierten Elektroden, im Kontext der Sensorik, ergeben sich an dieser Stelle neue Zugangsmöglichkeiten für die experimentelle Untersuchung der Doppelschichtstruktur.

Dafür müsste eine Sonde von molekularer Abmessung gezielt in der Nähe der Elektrodenoberfläche positioniert werden. Diese molekulare Sonde stellt einen empfindlichen Fühler dar, welcher die lokalen Verhältnisse in der elektrochemischen Doppelschicht abbilden kann. Farbstoffmoleküle sind für diese Art der Untersuchungen geeignet, da der Zustand dieser Sonde mit Hilfe der Raman-Spektroskopie unter elektrochemischen *in-situ* Bedingungen [17-19] ausgelesen werden kann. Solche Farbstoffmoleküle stellen potentielle Sonden für die Ermittlung des lokalen elektrischen Felds dar, das aufgrund der Verschiebung einer charakteristischen Schwingungsfrequenz der Sonde ermittelt werden kann. Der molekulare Stark-Effekt [20] liefert die theoretische Grundlage für das Verständnis der beobachteten Frequenzverschiebungen.

Der Vergleich von experimentellen Ergebnissen mit modernen theoretischen Simulationen auf molekularer Ebene wird durch diese Art von Untersuchungen möglich. Der Wunsch dieser Arbeit ist es, mit funktionalisierten Elektroden einen experimentellen Beitrag zur Aufklärung der Doppelschichtstruktur zu leisten. Ähnliche Versuche sind bereits unternommen worden [21-23], jedoch bestätigten diese lediglich die grundlegende Gültigkeit der klassischen Doppelschichtmodelle. Präzisere theoretische Modelle deuten hingegen auf Abweichungen des Feldverlaufs, bezüglich des klassischen Gouy-Chapman-Modells, in der elektrochemischen Doppelschicht hin. Die experimentelle Bestätigung solcher Abweichungen war das Ziel im zweiten Teil dieser Arbeit.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Aufbau eines Biosensors

Sensoren sind Geräte, welche physikalische, chemische oder biologische Veränderungen wahrnehmen können und in der Lage sind, die erhaltenen Informationen in ein messbares Signal umzuwandeln [24]. Die Aufgabe eines elektrochemischen Sensors, wie schematisch in Abbildung 1 dargestellt, besteht darin, aus einer Probenmatrix selektiv mit einem bestimmten Analyten in Wechselwirkung zu treten. Realisiert wird diese Anforderung durch den Aufbau des Sensors, welcher aus zwei Hauptkomponenten besteht: Dem Rezeptor, einem chemisch molekularen Erkennungselement, welcher selektiv mit dem Analyten wechselwirken sollte, um seine Anwesenheit in der analysierten komplexen Probe anzuzeigen. In unmittelbarer Umgebung zum Rezeptor ist ein Signalwandler integriert. Dieser leitet das detektierte Signal zu einem extern angeschlossenen Signalprozessor weiter, welcher dieses verstärkt und abbildet [25].

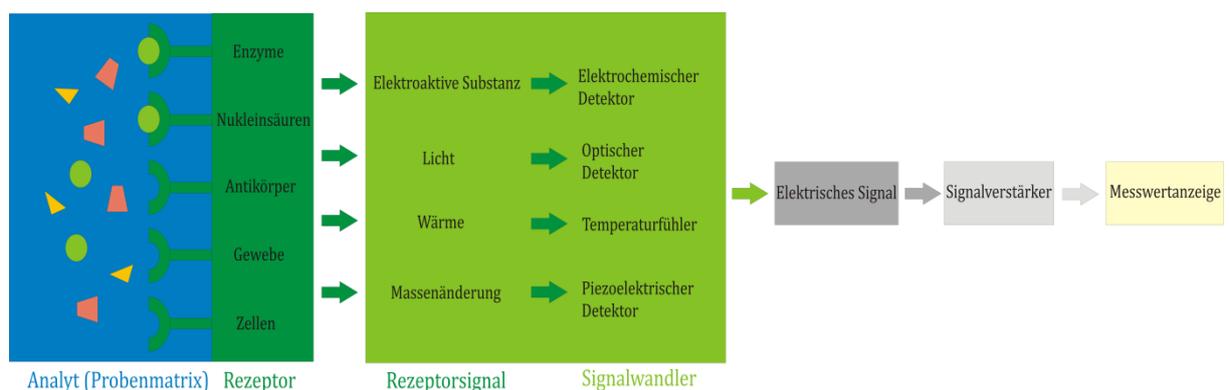


Abbildung 1: Funktionsweise eines Biosensors, nach [24-26].

Elektrochemische Sensoren, in welchen ein biologischer Rezeptor integriert ist, werden als elektrochemische Biosensoren bezeichnet. Die eingesetzten biologischen Rezeptoren variieren dabei von verwendeten Zellen, Geweben, Antikörpern, Proteinen, Enzymen bis hin zu Nukleinsäuren wie DNA und RNA [26]. Aufgrund der Natur des biologischen Erkennungsprozesses zwischen Rezeptor und Analyt sowie des Modus der Signalumwandlung, gibt es verschiedene Kategorien von Biosensoren. In dieser Arbeit werden einerseits amperometrische Glucose-Sensoren, welche als biokatalytische Sensoren bezeichnet werden, und andererseits DNA-basierte Sensoren, sogenannte Bioaffinitäts-Sensoren, vorgestellt.

2.1.1 Glucose-Sensoren

Kennzeichen eines biokatalytischen Sensors ist die starke Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Analyt, wobei Reaktionen selektiv am makromolekularen biologischen Erkennungselement katalysiert und als Folge dessen elektroaktive Spezies gebildet werden [26]. Die Reaktionsprodukte werden am Detektor ein elektrisches Signal hervorrufen, wodurch Rückschlüsse auf die Interaktion zwischen Rezeptor und Analyt möglich sind. Als integrierte Rezeptoren in biokatalytischen Sensoren sind Zellen, pflanzliche und tierische Gewebestücke sowie Enzyme weit verbreitet. Enzymbasierte Glucose-Sensoren finden Anwendung in Blutzuckermessgeräten, wodurch sich ein großer Absatzmarkt für diese Art von Produkten entwickelt hat. Für die Glucose-Nachweisreaktion



gelang Clark und Lyons im Jahre 1962 [27] die Realisierung einer Sauerstoffelektrode, in welcher die Einbettung des Enzyms Glucose-Oxidase (GOx) zwischen zwei halbdurchlässigen Membranen erfolgte und der Sauerstoffverbrauch der enzymkatalysierten Oxidation von Glucose gemessen werden konnte. Im Zentrum des Enzyms Glucose-Oxidase befindet sich die Redox-Komponente Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD).

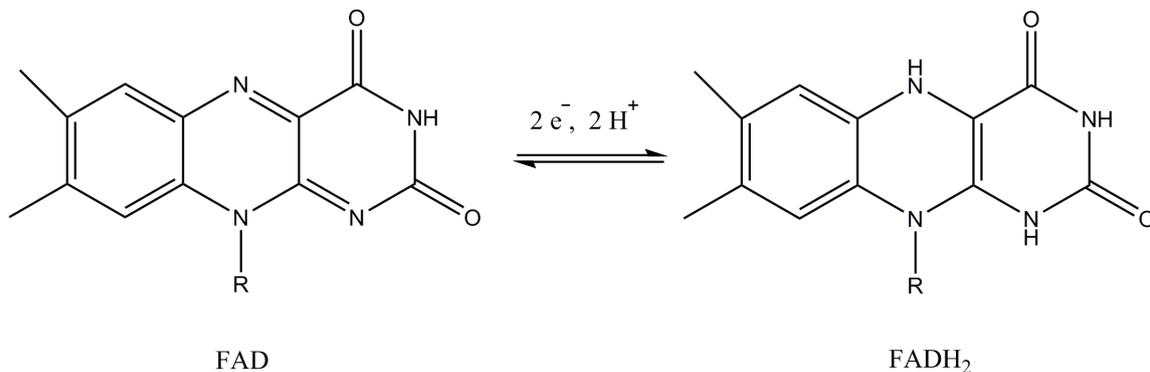
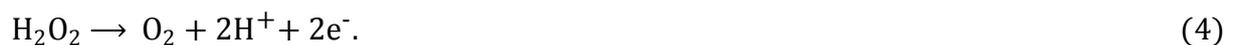


Abbildung 2: Redox-Reaktion des FAD-Moleküls, nach [28].

Als Elektronenüberträger kommt dieses sogenannte Coenzym in Stoffwechselprozessen der prokaryotischen und eukaryotischen Zellen vor. Dazu zählen unter anderem die oxidative Phosphorylierung, die β -Oxidation von Fettsäuren, aber eben auch die Oxidation von Glucose [29]. Der Reaktionsmechanismus von Glucose-Sensoren der ersten Generation wird durch die Gleichungen (2-5) beschrieben [30].

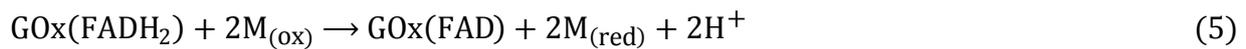


Erreicht Glucose das aktive Zentrum des Enzyms, erfolgt unmittelbar die spezifische Oxidation von Glucose zu Gluconolacton, welches im Anschluss zu Gluconsäure hydrolysiert wird. Die FAD-Komponente von Glucose-Oxidase wird unter Aufnahme zweier Elektronen sowie zweier Protonen zu FADH₂ reduziert und mittels molekularem Sauerstoff erneut zur ursprünglichen FAD-Spezies oxidiert. Das entstandene Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid kann amperometrisch detektiert werden. Diese Art der Detektion etablierte sich 1973 mit den Arbeiten von Guilbault und Lubrano [31], in deren amperometrischer Enzymelektrode das Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid an einer Platinelektrode oxidiert wurde



Im Blut ist ein zehnfacher Überschuss von Glucose im Vergleich zu Sauerstoff enthalten, was die praktische Verwendung der oben beschriebenen Glucose-Sensoren der ersten Generation deutlich erschwert [32]. Dieser Sauerstoffmangel kann durch Kohlepaste-Enzymelektroden deutlich minimiert werden, wobei der Effekt der erhöhten Sauerstofflöslichkeit in organischen Lösungsmitteln, bestehend aus Kel-F Ölen und Perfluornonanen, ausgenutzt wird [33]. Ein weiterer Nachteil von Glucose-Sensoren der ersten Generation sind mögliche koexistierende oxidierbare Substanzen, welche einen Beitrag zum Gesamtstrom leisten und damit für eine Abweichung des tatsächlichen Glucose-Gehalts sorgen. Abhilfe diesbezüglich liefert die Immobilisierung von Enzymen auf elektropolymerisierten Filmen wie Polypyrrol [34], Polyanilin [35] und Polythiophen [36]. Koexistierende elektroaktive Spezies können durch alternierende Schichten von Nafion (Acetaminophen) und Cellulose-Acetat (Ascorbinsäure) blockiert werden, während Wasserstoffperoxid hin zur Elektrode diffundieren kann [37]. Ein weiterer Ansatz zur Blockierung von koexistierenden Spezies ist die Senkung des Oxidationspotentials der elektroaktiven Spezies. Dazu eignet sich im Besonderen die Kombination aus modifizierten Kohlenstoff-Nanoröhren (CNTs) mit Platin-Nanopartikeln [38] oder Gold-Nanopartikeln [39].

Eine Variante zum effektiven Elektronentransfer stellt die Verwendung eines Redox-Mediators [26, 30], einer elektronentransferierenden Spezies in Lösung, dar. Anstelle von molekularem Sauerstoff (wie in Gleichung 3) reagiert der als Elektronenakzeptor wirksame Mediator mit der FADH₂-Komponente des Enzyms unter Aufnahme zweier Elektronen. Die reduktive Spezies des Mediators wird an der Elektrode unmittelbar durch die Abgabe von Elektronen in die ursprüngliche oxidative Spezies umgewandelt und steht einer weiteren katalytischen Umsetzung mit Glucose zur Verfügung:

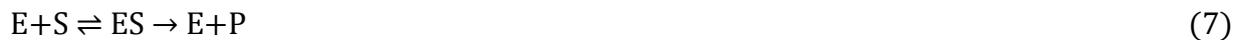


Dieser Mechanismus wird als Glucose-Sensor der zweiten Generation bezeichnet. Der verwendete Redox-Mediator sollte gegen äußere Einflüsse stabil sein, nicht mit molekularem Sauerstoff reagieren und nicht von pH-Einflüssen verändert werden. Die eingesetzten Mediatoren reichen dabei von leitfähigen organischen Salzen wie Tetra-thiofulvalene [40], über Osmium- [41] und Ruthenium-Pyridine [42], Quinone-Verbindungen [43] bis hin zu Ferrocene-Derivaten [44] und Preußisch Blau [45]. Für *in-vivo* Anwendungen sind solche in Lösung befindlichen, jedoch nicht immobilisierten Mediatoren aufgrund ihrer geringen Haltbarkeit wenig geeignet.

Glucose-Sensoren der dritten Generation stellen diesbezüglich eine Alternative dar. Deren Merkmal ist die Immobilisierung der Enzyme in unmittelbarer Nähe zur Elektrode, wodurch ein höchst effizienter und im Idealfall direkter Elektronentransfer realisiert werden soll [8]. Sich selbst anordnende Monolagen (engl. *self-assembled monolayers*, SAMs), denen ein separates Kapitel gewidmet ist, bieten die Möglichkeit, auf elegante Weise Enzyme in unmittelbarer Nähe zur Elektrode zu immobilisieren [46]. In dieser Arbeit werden die Eigenschaften der SAMs ausgenutzt, um einen nano-strukturierten amperometrischen Glucose-Sensor zu entwickeln.

Während in vielen Glucose-Sensoren das dimere Flavoenzym Glucose-Oxidase verwendet wird, besitzen die hier vorgestellten Glucose-Sensoren das Enzym Pyranose-2-Oxidase. Statt zwei FAD-Zentren enthält Pyranose-2-Oxidase [47, 48] insgesamt vier FAD-Zentren, weshalb die Ausbeute des Elektronentransfers gesteigert werden könnte.

Um einen Glucose-Sensor analysieren zu können ist die Michaelis-Menten-Gleichung von grundlegender Bedeutung:



Diese Gleichung beschreibt den monotonen Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Substratkonzentration, wobei sich ein spezifischer Enzym-Substrat-Komplex ausbildet [28]. Aus kinetischen Betrachtungen der enzymkatalysierten Reaktion ergibt sich für einen amperometrischen Glucose-Sensor gemäß einer modifizierten Lineweaver-Burk-Gleichung folgender Zusammenhang

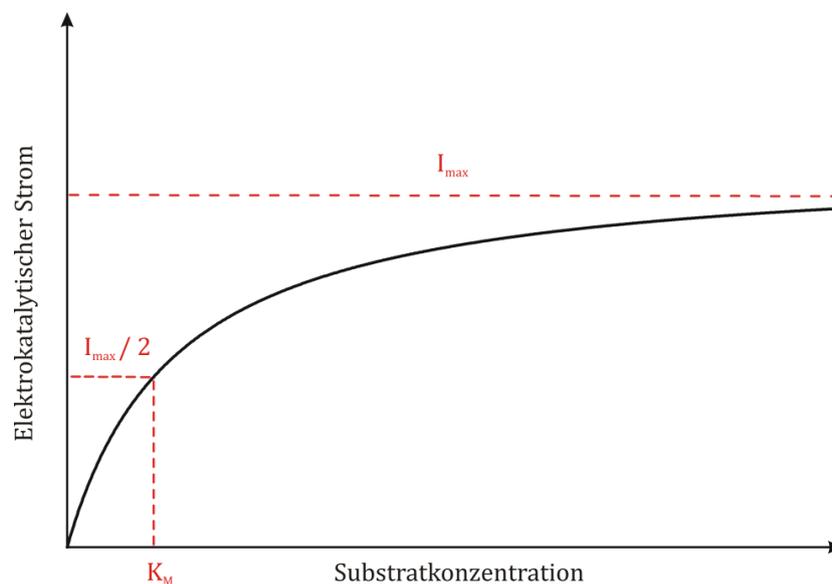


Abbildung 3: Charakterisierung eines amperometrischen Glucose-Sensors, nach [49-52].

Die Charakterisierung der Enzym-Eigenschaften erfolgt durch die Bestimmung der Michaelis-Konstante K_M und der Ermittlung des Maximalstroms I_{\max}

$$I = \frac{I_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Die Michaelis-Konstante K_M korreliert mit der Hälfte des Maximalstroms bezüglich der Reaktion zwischen Glucose und Enzym und beschreibt die spezifische Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat. Dabei gilt: Je kleiner K_M ist, desto stärker ist die Wechselwirkung [53]. In einem amperometrischen Glucose-Sensor wird ein weit ausgeprägter linearer Antwortbereich angestrebt, der sich bis zu einer mit K_M proportionalen Glucose-Konzentration erstreckt. Das Verhältnis (I_{\max}/K_M) gibt Auskunft über die Sensitivität und damit über die Effizienz dieser Art von Sensoren.

2.1.2 DNA-basierte Sensoren

DNA-basierte Sensoren ziehen große Aufmerksamkeit auf sich, da ihr aktiver Bestandteil, die Desoxyribonukleinsäure, in allen Lebewesen vorkommt und wichtige Informationen über das Erbgut enthält. Mutationen im Erbgut sorgen für Störungen innerhalb der Zellen, wodurch diese letztlich absterben. Von jeher bestand damit großes Interesse daran, die Ursachen der Mutationen ausfindig zu machen.

Im Unterschied zu den bisher besprochenen Redox-Sensoren nutzen Bioaffinitäts-Sensoren die selektive Interaktion zwischen der mit einem biologischen Rezeptor (DNA-Probenstrang) funktionalisierten Elektrode und dem in der Probenmatrix (Lösung) enthaltenen Analyten (DNA-Targetstrang). Bei der Andockung des Analyten an den bioaffinen Rezeptor wird durch Wasserstoff-Brückenbindungen ein thermodynamisch stabiler Komplex gebildet (Hybridisierungsprozess). Nachfolgend werden die Wasserstoff-Brückenbindungen in einem sogenannten elektrochemischen Schmelzverfahren (engl. *electrochemical melting experiment* [17]) durch die Einstellung des Elektrodenpotentials gekappt (dehybridisiert). Zur Detektion dieses Vorgangs wird das Raman-Signal eines an den Analyten (DNA-Targetstrang) angebrachten Markers monitoriert. Das Elektrodenpotential, bei dem die Bindung zwischen Rezeptor und Analyt aufgelöst wird, ersichtlich durch das Verschwinden des Raman-Signals des Markers, ist die erwünschte Detektionsgröße, welche Auskunft über eventuelle Mutationen innerhalb des DNA-Strangs des Analyten gibt.

Watson und Crick haben als Erste die DNA-Struktur entschlüsselt [54]. Die DNA-Doppelhelix besteht aus zwei zueinander komplementären Strängen, wobei in jedem DNA-Strang die Purin-Basen Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidin-Basen Cytosin (C) und Thymin (T) enthalten sein können. Die DNA-Basen sind dabei kovalent an den Desoxyribose-Zuckerbaustein gebunden, welcher seinerseits über Phosphordiester-Verknüpfungen stabilisiert wird. Das Gesamtkonstrukt der DNA-Struktur ist folglich eine Polynukleotidsequenz, wie in Abbildung 4 visualisiert.

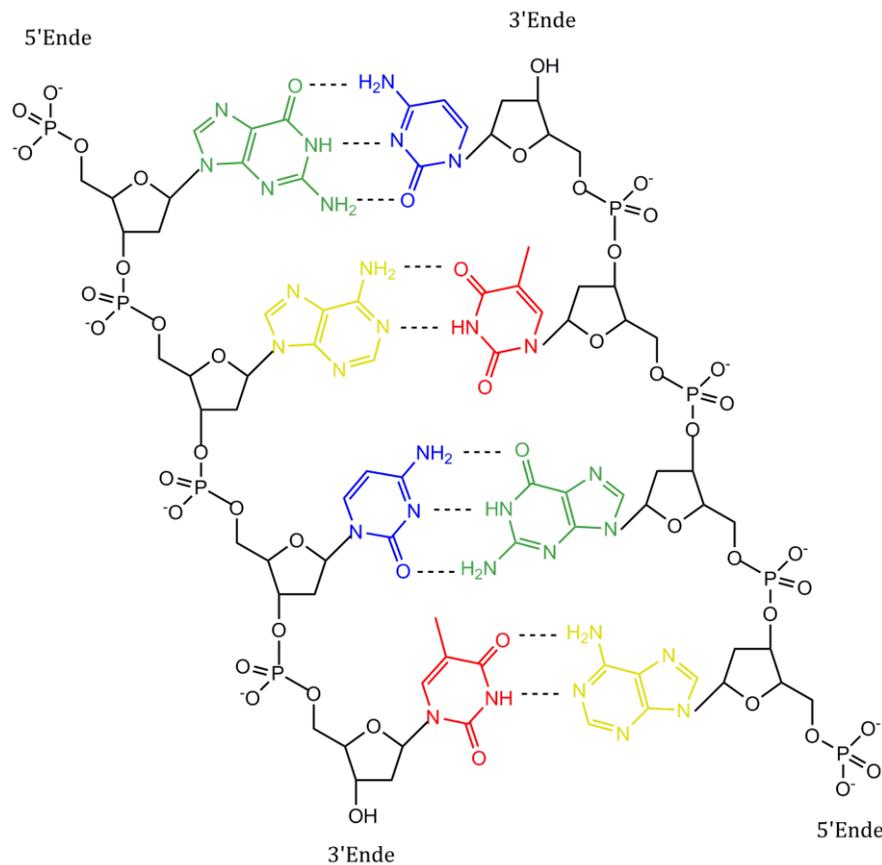


Abbildung 4: Ausschnitt einer *double-stranded* (ds-)DNA mit den DNA-Basen Adenin (gelb), Guanin (grün), Cytosin (blau) und Thymin (rot). Die Paare Cytosin-Guanin und Adenin-Thymin sind durch jeweils drei bzw. zwei Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft, nach [53].

Befindet sich eine hybridisierte DNA-Sequenz im Elektrolyt, können unterschiedlichste Arten von Wechselwirkungen mit den gelösten Molekülen oder Ionen auftreten. So können elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA und den im Elektrolyt enthaltenen Natrium-, Kalium-, Magnesium- sowie Calcium-Ionen zur Ausbildung von stabilisierten Metall-DNA-Komplexen führen. Spuren von Schwermetall-Ionen wie Chrom, Nickel und Blei können hingegen eine Beschädigung der DNA-Struktur hervorrufen [33].

Organische Farbstoffe wie Porphyrine, welche im menschlichen Stoffwechsel als Häm-Komplex in der Lage sind, Blutsauerstoff zu binden und zu transportieren, wechselwirken ebenso mit der helixförmigen Struktur der DNA [55]. Je nach Art des im Porphyrinkomplex enthaltenen Metalls, erfolgt die Bindung an den Kanten mehrerer DNA-Basenpaare oder aber mittels Interkalation, wobei das möglichst planare, aromatische System des andockenden Farbstoffs zwischen den Basenpaaren eingebaut

wird. Die Interkalation organischer Farbstoffe wie Methylenblau ermöglicht es, auftretende Mutationen innerhalb der DNA-Sequenzen ausfindig zu machen [17].

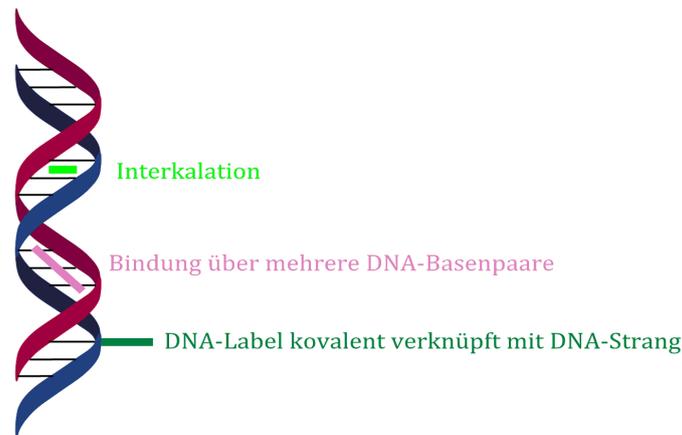


Abbildung 5: Mögliche Arten einer Sondenfixierung an der ds-DNA, nach [17-19].

Kovalente Wechselwirkungen ermöglichen es, einen Farbstoff an ausgewählten Stellen auf dem DNA-Targetstrang anzubinden. In dieser Arbeit wird der organische Farbstoff Texas Red (TR) kovalent an den DNA-Targetstrang immobilisiert, wo er als Raman-Sonde für ortsspezifische Untersuchungen dienen kann. Hierbei wird die Methode der Raman-Spektroskopie einen wirksamen Zugang zur TR-Sonde bieten.

2.2 Raman-Spektroskopie

Die Entdeckung des Raman-Effekts durch C. V. Raman beruht auf der Inspiration des tiefblauen Meeres während einer Schifffahrt von London nach Bombay im Jahre 1928. Im gleichen Jahr gelang es ihm, sekundäre Linien im Spektrum von Flüssigkeiten, die aus einer inelastischen Streuung des Lichtes hervorgehen, im Laboratorium nachzuweisen [56, 57]. Die Bedeutung des neu entdeckten Effekts wurde unmittelbar erkannt: Ende 1928 gab es bereits 80 Publikationen, die sich mit dem Raman-Effekt befasst haben [58].

Die vollständige Behandlung des Raman-Effekts wurde schon früh auf die Grundlage der damals neu erfundenen Quantenmechanik gestellt, allerdings kann auch eine semiklassische Beschreibung die Grundzüge des Phänomens hinreichend erklären. In der semiklassischen Beschreibung, die im Folgenden verwendet wird, werden Schwingungen in den Molekülen angeregt, die mit dem elektrischen Feldvektor E_0 des Lichts in Wechselwirkung treten [59].

Das elektrische Feld des Lichts ist eine ebene Welle, die an der Stelle des streuenden Moleküls durch eine harmonische Anregung der Frequenz ω_L dargestellt wird

$$E(t) = E_0 \cos(\omega_L t) \quad (9)$$

Im Fall der Raman-Spektroskopie verursacht die elektrische Feldkomponente E eine Umverteilung der Elektronen innerhalb der Elektronenhülle und sorgt damit für eine Verzerrung der Konfiguration des Moleküls. Durch die Ladungsumverteilung entsteht ein induziertes elektrisches Dipolmoment P [60]. Dieser Vorgang wird als induzierte Polarisierung bezeichnet und anhand des Polarisierbarkeitstensors α dargestellt:

$$P = \alpha E \quad (10)$$

Aufgrund der Verzerrung des Moleküls, welche allgemein durch eine Auslenkung q vom Gleichgewichtszustand beschrieben ist, wird die Polarisierbarkeit $\alpha(q)$ des Moleküls, im Vergleich zur Polarisierbarkeit α_0 im Gleichgewichtszustand, verändert:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \alpha}{\partial q^2}\right)_0 q^2 + \dots \quad (11)$$

Die erste Ableitung ist maßgeblich entscheidend für den Erhalt der aktiven Raman Moden im Raman Spektrum, wodurch die zweite Ableitung vernachlässigt wird. Durch die periodische feldinduzierte Verzerrung des Moleküls wird die Auslenkung q eine harmonische Schwingung mit einer der Eigenfrequenzen ω_A des Moleküls durchführen:

$$q_A(t) = q_A^0 \cos(\omega_A t) \quad (12)$$

Diese harmonische Änderung der Auslenkung q führt zu einer harmonischen Modulation der Polarisierbarkeit mit der Frequenz ω_A der Eigenschwingung:

$$\alpha(t) = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q_A^0 \cos(\omega_A t) \quad (13)$$

Nach einer trigonometrischen Umformung der induzierten Polarisierbarkeit, werden sowohl die elastisch gestreute Komponente, mit der Frequenz ω_L des einfallenden Lichts sowie zwei Modulationsterme, mit den Kombinationsfrequenzen $(\omega_L \pm \omega_A)$ erkennbar:

$$P(t) = \alpha_0 E_0 \cos(\omega t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 q_A^0 E_0 (\cos[(\omega_L - \omega_A)t] + \cos[(\omega_L + \omega_A)t]) \quad (14)$$

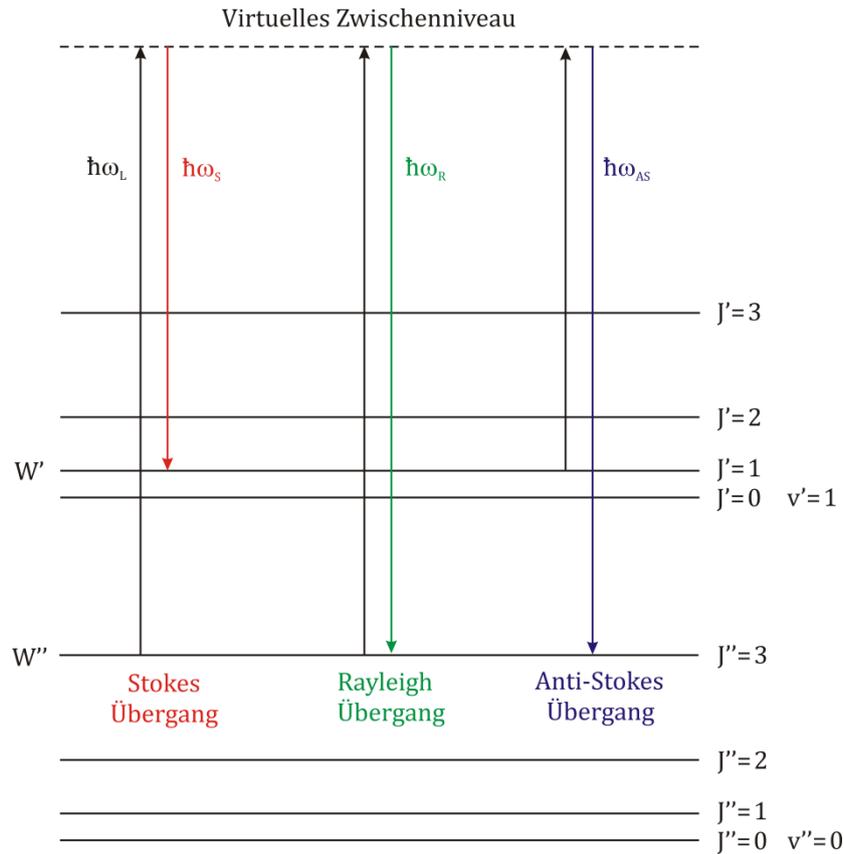


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rayleigh-, Stokes- und Anti-Stokes Übergänge eines rotierenden und schwingenden zweiatomigen Moleküls im Elektronengrundzustand, nach [59].

Das harmonisch sich ändernde Dipolmoment wird elektromagnetische Strahlung gemäß der Larmor-Formel ausstrahlen, in diesem Fall eine Spektrallinie mit der Frequenz ω_L des einfallenden Lichts (die sogenannte Rayleigh-Streuung) sowie zwei Sekundärlinien mit den Frequenzen $(\omega_L - \omega_A)$ und $(\omega_L + \omega_A)$, welche als Stokes- und Anti-Stokes-Linien bezeichnet werden [59]. Die Intensität des inelastisch gestreuten Lichts ist proportional zum Quadrat des induzierten Dipolmoments und zur vierten Potenz der emittierten Lichtfrequenz, was die Schwäche der Raman-Streuung teilweise erklären kann.

Mit einer Ausbeute von 1 zu 10^7 gestreuten Photonen ist der Raman-Effekt sehr schwach. Die aufkommende Entwicklung der Lasertechnik ab den 1960er Jahren und die geringfügige Raman-Streuung in Wasser haben nichtsdestotrotz für ein anhaltendes Interesse an der Raman-Spektroskopie gesorgt, das mit der Beobachtung der oberflächenverstärkten Raman-Streuung im Jahre 1973 erneuert wurde.

2.2.1 Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)

Im Jahre 1973 an der Universität Southampton, bei der Untersuchung von adsorbiertem Pyridin auf einer elektrochemisch aufgerauten Silberoberfläche, haben Fleischmann, Hendra und McQuillan eine unerwartet hohe Intensität der erhaltenen Raman Spektren beobachtet [61]. Sie haben ursprünglich das erhöhte Raman-Signal der vergrößerten aktiven Oberfläche ihres elektrochemisch aufgerauten Silbersubstrats zugeschrieben [62]. Vier Jahre später publizierten die Forschungsgruppen um Albrecht und Creighton [63], sowie Jeanmarie und Van Duyne [64] unabhängig voneinander die Ursache im Bestehen von nanostrukturierten Metalloberflächen, wobei sich starke lokale elektromagnetische Felder ausbilden. Mit dem Elektromagnetischen (EM)- sowie dem Ladungstransfer (CT)-Mechanismus sind zwei anerkannte Theorien etabliert worden, welche die beobachtete Signalverstärkung erklären können. Verglichen mit der ursprünglichen Raman-Spektroskopie kann der Verstärkungseffekt dabei bis zu 10^{10} mal stärker ausfallen [65].

Der EM-Mechanismus nutzt die Eigenschaft der freien Beweglichkeit von Elektronen im Metallgitter aus. Auf der Metalloberfläche finden Elektronenoszillations-Vorgänge statt, die als Oberflächenplasmonen bezeichnet werden. Die Plasmonen-Oszillationen sind vor allem bei Gold, Silber und Kupfer (sog. Münzmetalle) besonders ausgeprägt, wobei ihre Frequenz von der Dielektrizitätskonstante des jeweiligen Metalls abhängig ist. Die EM-Signalverstärkung, welche um den Faktor 10^6 höher ist, findet ihren Ursprung in der Wechselwirkung des eingestrahnten Lichts mit den Oberflächenplasmonen im Metall [66]. Besonders raue Metalloberflächen sorgen für die Verstärkung des Raman-Signals durch den EM-Mechanismus.

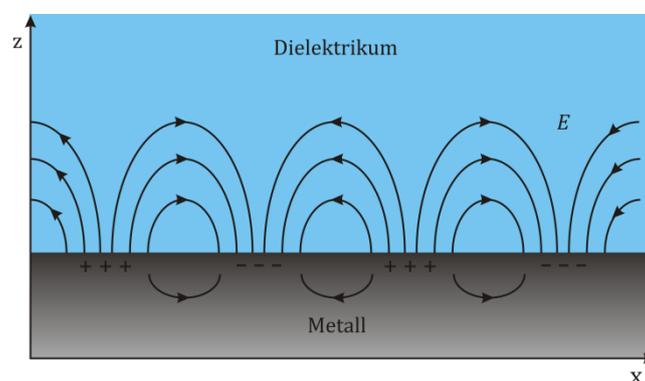


Abbildung 7: Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche zwischen Metall und Dielektrikum besitzen elektromagnetischen Wellen- sowie Oberflächenladungscharakter. Dabei entsteht ein elektrisches Feld in z-Richtung bezüglich der Metalloberfläche, nach [67].

Wird ein Molekül auf einer Metalloberfläche chemisorbiert, besitzen seine Grenzorbitale annähernd die gleiche Energie wie das Fermi-Niveau des Metalls. Das Fermi-Niveau bezeichnet das energetisch höchste Orbital im Metall, welches noch mit Elektronen besetzt ist und durch das angelegte Elektrodenpotential gezielt eingestellt werden kann. Entspricht die Frequenz der einwirkenden elektromagnetischen Strahlung ungefähr dem Energieunterschied zwischen dem Fermi-Niveau des Metalls und dem energetisch niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO), besteht die Möglichkeit eines Elektronentransfers vom Fermi-Niveau ins LUMO. Laut dem CT-Mechanismus bleibt im Metall ein Loch zurück, wobei nach einer gewissen Zeit eine Rekombination im Metall durch das Zurücktunneln von Elektronen hin zum Loch stattfindet [68]. Die durch Licht gesteuerte, periodische Besetzung des LUMOs führt zu einer alternierenden Stärkung und Schwächung der Bindung im adsorbierten Molekül und letztendlich zu einer verstärkten Vibrationsanregung, die sich in einer erhöhten Intensität der Raman-Emission bemerkbar macht. Dieser gesteuerte Ladungstransfer kann eine Verstärkung des Raman-Signals um den Faktor 100 verursachen, wobei im Resonanzfall eine Verstärkung von bis zu 10^4 möglich ist [69].

Die Verwendung elektrochemisch aufgerauter Substrate für SERS, deren Präparation nicht gezielt kontrollierbar ist, bringt den Nachteil von nicht gleichmäßig wiederholbaren Messungen mit sich. Die Arbeitsgruppe um Prof. Bartlett (Universität Southampton) entwickelte daher eine Prozedur zur Herstellung von sogenannten nanostrukturierten SSV (engl. *sphere segment void*, Abbildung 8) Substraten. Die hexagonal angeordnete Löcher-Struktur des Au(SSV)-Substrats, siehe Kapitel 3.4, eignet sich aufgrund ihrer plasmonischen Eigenschaften für die Verstärkung des Raman-Signals nach dem Prinzip des EM-Mechanismus [70].

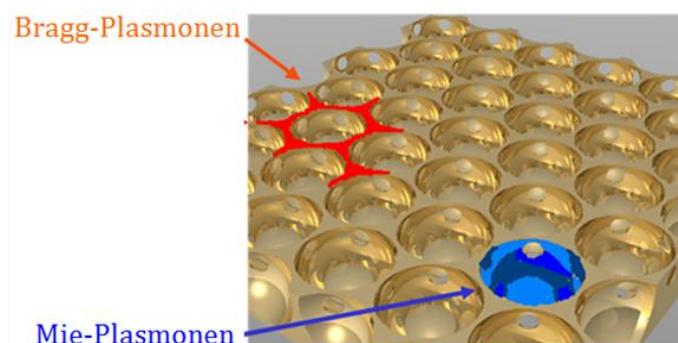


Abbildung 8: Wirksame Oberflächenplasmonen auf dem Au(SSV)-Substrat, nach [65, 71].

Das strukturierte Au(SSV)-Substrat besitzt zwei voneinander unterscheidbare Arten von Oberflächenplasmonen [72]. Bragg-Plasmonen sind delokalisierte Schwingungen der Elektronendichte in der metallischen Struktur, die in den Löchern nur eine sehr geringe Intensität aufweisen. Betrachtet man den sphärischen Kugeldurchmesser D , so gibt es Bragg-Plasmonen für eine Hohlraumtiefe H unterhalb $0.35 D$ und oberhalb $0.75 D$. Von Bragg-Plasmonen zu unterscheiden sind Mie-Plasmonen, welche für $H > 0.35 D$ in den Löchern lokalisiert vorkommen. In dieser Arbeit werden Au(SSV)-Substrate mit einer Hohlraumtiefe von $0.80 D$ verwendet, die sowohl Mie-Plasmonen als auch Bragg-Plasmonen aufweisen. Diese verschiedenen Arten von Schwingungen der Elektronendichte im strukturierten Metallsubstrat tragen zur Ausbildung von lokalen Feldern an der Goldoberfläche bei, welche letztlich, gemäß den Vorstellungen des EM-Mechanismus, für den Verstärkungseffekt des Raman-Signals sorgen.

2.3 Self-assembled monolayers (SAMs)

Nuzzo und Allara revolutionierten im Jahre 1980 die Präparierung von organischen Monolagen durch die Verwendung von sich selbst anordnenden (*self-assembly*) Monolagen [73]. Der Selbstordnungsprozess erfolgt dabei spontan durch die Adsorption aus der Gasphase oder in der Lösung, wobei geordnete, dichte und stabile Strukturen (SAMs) geformt werden [74]. SAMs besitzen eine Größe von ein bis drei Nanometern und haben aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften ein breites Anwendungsspektrum. Die Moleküle, die zur Ausbildung von SAMs verwendet werden, enthalten drei charakteristische Teile [75]. Häufig besitzen SAMs eine Schwefel-Ankergruppe, die sogenannte Kopfgruppe, wodurch starke chemische Bindungen mit Goldoberflächen ausgebildet werden [76]. Für die Einstellung der Schichtdicke und der Packung der SAM ist die Kohlenwasserstoff-Kette verantwortlich, welche aliphatisch oder aromatisch sein kann. Aromatische SAMs zeichnen sich durch eine hohe elektrische Leitfähigkeit aus [77]. Die Eigenschaften der SAMs werden zudem durch die terminale, sogenannte Endgruppe, bestimmt. Zu diesem Aspekt gehört der hydrophile oder hydrophobe Benetzungsgrad von SAM-modifizierten Systemen. Eine weitere Eigenschaft von SAMs ist deren Passivierungsverhalten, wodurch der Zugang von Molekülen in der Lösung zum Goldsubstrat verhindert wird. Im Fall des hier vorgestellten DNA-basierten Sensors verhindert die Schicht der aliphatischen Mercaptohexanol-SAM spezifische Wechselwirkungen zwischen den biologischen Komponenten der DNA und der Metalloberfläche.

In dieser Arbeit wird zudem die terminale Endgruppe der aromatischen 4-PyS-SAM ausgenutzt, um einen nanostrukturierten Enzym-Sensor zu entwickeln. Somit entstehen organisch funktionalisierte Metalloberflächen, welche als Templat für die Entwicklung weiterer aktiver Elektrodensysteme und somit für spezifische Anwendungen dienen können.

Ein wesentlicher Schritt in der Entwicklung der in dieser Arbeit untersuchten Glucose-Sensoren ist die Metallisierung einer SAM-funktionalisierten Metallelektrode. Wird eine Metallelektrode in eine aus diesem Metall bestehende Salzlösung eingetaucht, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen der festen und der ionisierten Metallspezies aus



Im elektrochemischen Gleichgewicht verknüpft die Nernst-Gleichung [78] die Metallionenaktivität in Lösung mit dem Galvanipotential $\Delta_S^M \varphi$ an der Metall/Elektrolyt-Grenzfläche:

$$\Delta_S^M \varphi = \varphi^M - \varphi^S = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{Me}^{z+}}}{a_{\text{Me}}} \quad (16)$$

Der Zustand jeder Phase α ist durch das elektrostatische Potential innerhalb der Phase φ^α charakterisiert. Dieses verknüpft das außerhalb der Phase vorkommende Volta-Potential ψ^α mit dem Oberflächenpotential χ^α , welches aufgrund einer inhomogenen Ladungsverteilung auf der Oberfläche entsteht [79]:

$$\varphi^\alpha = \psi^\alpha + \chi^\alpha \quad (17)$$

Durch das Anlegen eines Elektrodenpotentials, welches sich negativ bezüglich des Nernstpotentials befindet, kann eine elektrolytische Metallabscheidung (Volumenabscheidung) auf einem Fremdmetallsubstrat stattfinden. Dieser Vorgang wird als Überpotentialabscheidung (engl. *bulk deposition* bzw. *overpotential deposition*, OPD) bezeichnet und ist von der Unterpotentialabscheidung (engl. *underpotential deposition*, UPD) zu unterscheiden [80].

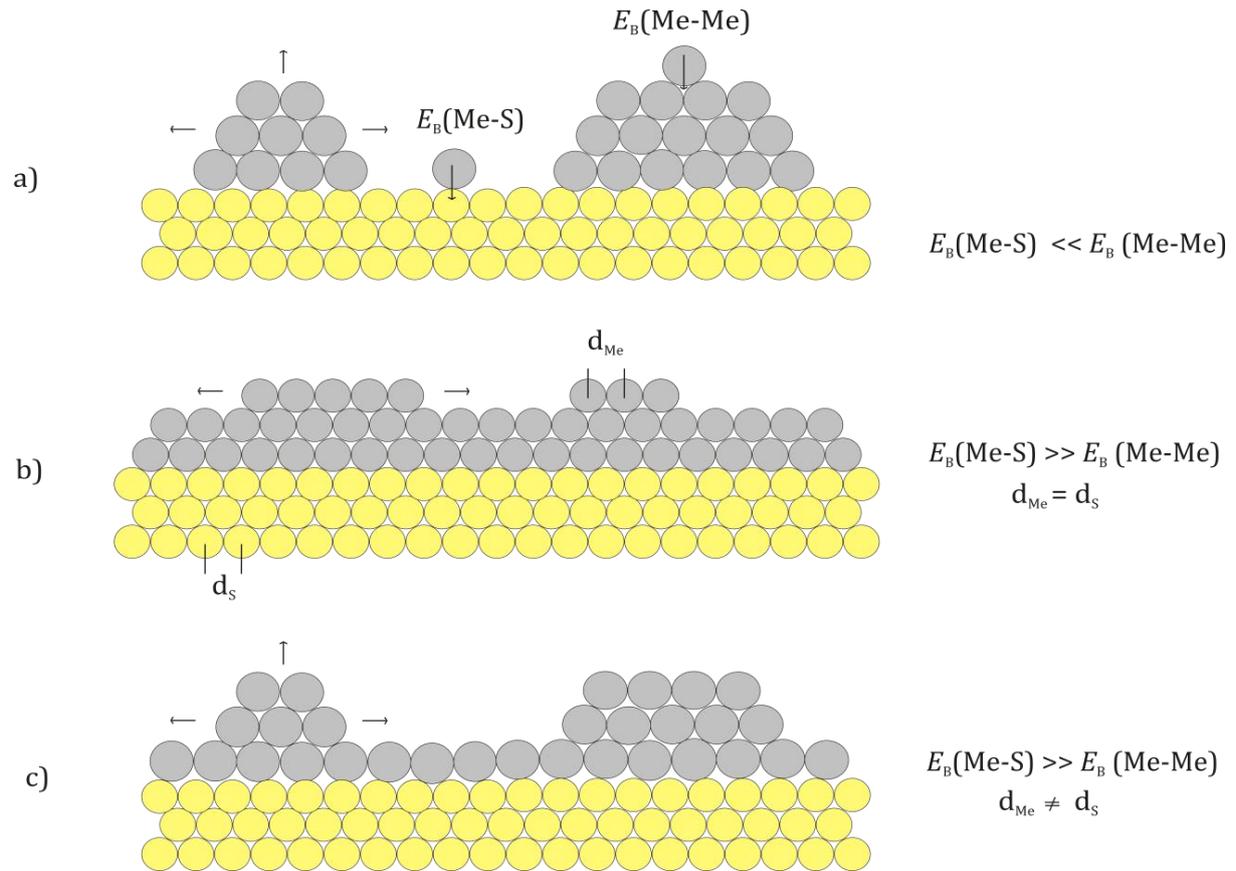


Abbildung 9: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Wachstumsarten bei der elektrolytischen Metallabscheidung auf einem Metall: a) „Volmer-Weber“-Wachstum (3D-Inselwachstum) b) „Frank van der Merwe“-Wachstum (Lagenwachstum) c) „Stranski-Krastanov“-Wachstum (3D-Inselwachstum auf bereits abgeschiedenem Lagenwachstum), nach [81].

Bei der Metallabscheidung können je nach Bindungsenergien sowie den Gitterkonstanten der involvierten Metalle drei unterschiedliche Wachstumsarten beobachtet werden [81], siehe Abbildung 9. Bei der Überpotentialabscheidung („Volmer-Weber“-Wachstum) sind die Wechselwirkungsenergien zwischen Substrat und Metallatomen ($E_B(\text{Me-S})$) schwächer ausgeprägt als zwischen den Metallatomen ($E_B(\text{Me-Me})$). Die OPD-Abscheidung vollzieht sich solange, bis die Metallionenkonzentration dem neuen Gleichgewichtspotential gemäß der Nernst-Gleichung folgt. Kinetische Effekte wie die Kristallisationsüberspannung können das 3D-Inselwachstum verzögern und diesen elektrochemischen Prozess zu negativeren Potentialen bezüglich des Nernstpotentials verschieben [80].

Die Unterpotentialabscheidung auf einem artfremden Metall findet hingegen bei Potentialen positiv des Nernstpotentials statt. Dabei sind die Wechselwirkungsenergien zwischen Substrat und Metall (E_B (Me-S)) stärker als zwischen den Metallatomen (E_B (Me-Me)). Da sich die Gitterkonstanten der beteiligten Spezies unterscheiden können, wird zuerst Monolagenwachstum beobachtet („Frank van der Merwe“-Wachstum), welches in ein 3D-Inselwachstum („Stranski-Krastanov“-Wachstum) übergeht. Kolb *et al.* konnten dabei zeigen, dass Oberflächendefekte, wie monoatomar hohe Stufen, Einfluss auf die UPD-Abscheidung von Kupfer auf Au(111) nehmen [82]. Des Weiteren untersuchten Kolb *et al.* die Metallabscheidung sowohl von Silber als auch von Kupfer auf einer mit Alkanthiol-SAM modifizierten Au(111)-Elektrode [83-85].

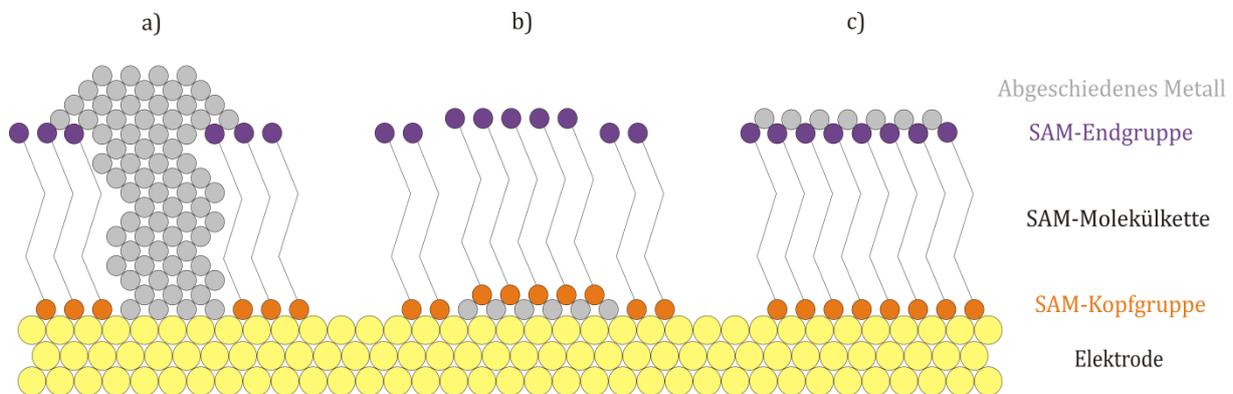


Abbildung 10: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Metallabscheidung auf einer mit SAM-bedeckten Elektrode: a) Metallabscheidung auf der Elektrode b) Metallabscheidung zwischen SAM und Elektrode (engl. *buried monolayer*) c) Metallabscheidung auf der SAM (engl. *on-top*), nach [86].

Dabei konnte im Fall der Silberabscheidung gezeigt werden, dass der Prozess kinetisch gehindert ist und die unterschiedliche Länge der SAM-Molekülkette Einfluss auf die Ordnung der SAM nimmt, wobei sich an Defektstellen der SAM/Au(111)-Grenzfläche zuerst zwei Monolagen Silber ausbilden, bevor das 3D-Wachstum um die SAM einsetzt [83]. Im Fall der Kupferabscheidung gibt es zudem keine Anzeichen dafür, dass während der Bulk-Abscheidung die Ethanthiol-SAM desorbiert, woraus gefolgert wird, dass die gebildete *buried monolayer* die SAM stabilisiert [85].

In dieser Arbeit wird diesbezüglich keine aliphatische SAM, sondern die sehr geordnete, aromatische SAM (4,4'-Dithiodipyridin) verwendet. Baunach *et al.* entwickelten eine Methode aus stromlosen und potential-kontrollierten (elektrochemischen) Verfahren, wobei die Metallabscheidung *on-top* auf dieser SAM realisiert werden kann [87].

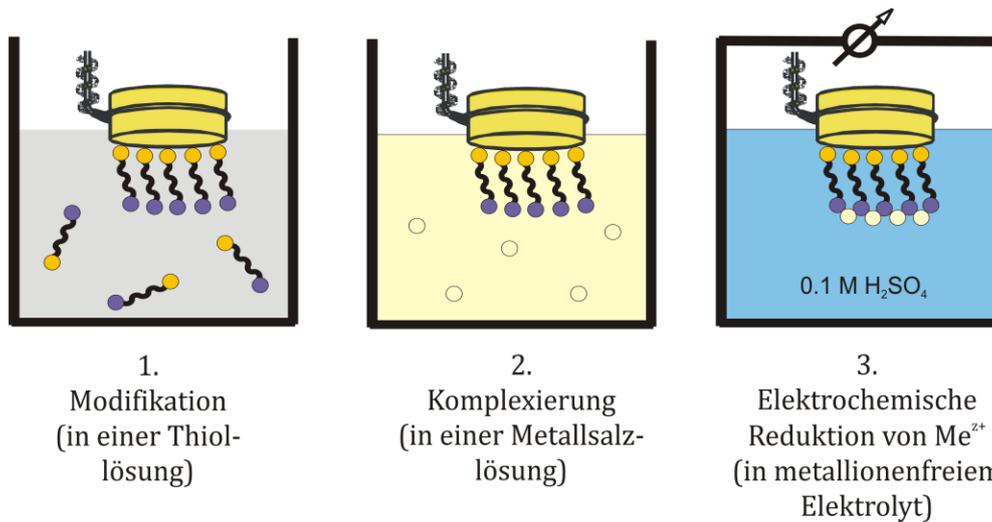


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Metallabscheidung *on-top* auf einer ω -funktionalisierten, aromatischen SAM, nach [86].

Die ω -funktionalisierte SAM wird zunächst über ihre SAM-Kopfgruppe auf der Elektrode adsorbiert. Es folgt eine Komplexierung zwischen Metallionen in Lösung sowie der SAM-Endgruppe, wobei in diesem stromlosen Verfahren ein Komplex gebildet wird. Durch die Verwendung der aromatischen SAM können im nächsten Schritt unter Potentialkontrolle und ohne Anwesenheit von Metallionen in Lösung Elektronen durch die SAM tunneln, wodurch sich monoatomar hohe Metallinseln (Pd, Rh, Pt) ausbilden [88-90]. Im Aufbau von Glucose-Sensoren besitzen die Platininseln *on-top* auf der 4-PyS-SAM eine zentrale Rolle, wie Kapitel 4 zeigen wird.

2.4 Die elektrochemische Doppelschicht

Der Verlauf des Galvanipotentials φ zwischen Elektrode und Elektrolyt wird durch die Ladungstrennung an der Grenzfläche Metall/Elektrolyt bestimmt. Als elektrochemische Doppelschicht bezeichnet man die Grenzflächenregion, worin sich das elektrische (Galvani-)Potential stark bis hin zu seinem Wert im Elektrolyt ändert. Klassische Modelle der Doppelschicht beschreiben die Anordnung der gelösten Ionen und Lösungsmittelmoleküle, welche zusammen die Doppelschicht aufbauen. In den folgenden Abschnitten werden diese theoretisch bestimmten Modelle näher erläutert.

2.4.1 Das Helmholtz-Modell

Das erste Modell zur Ausbildung der elektrochemischen Doppelschicht basiert auf den Arbeiten von Hermann von Helmholtz aus dem Jahre 1879 [9]. Seine Überlegungen gehen von der Idee aus, dass sich auf beiden Seiten der Grenzfläche entweder positive oder negativ geladene Teilchen anordnen. Entscheidend ist hierbei seine Annahme der starren Anordnung von geladenen Teilchen auf Seiten des Elektrolyts.

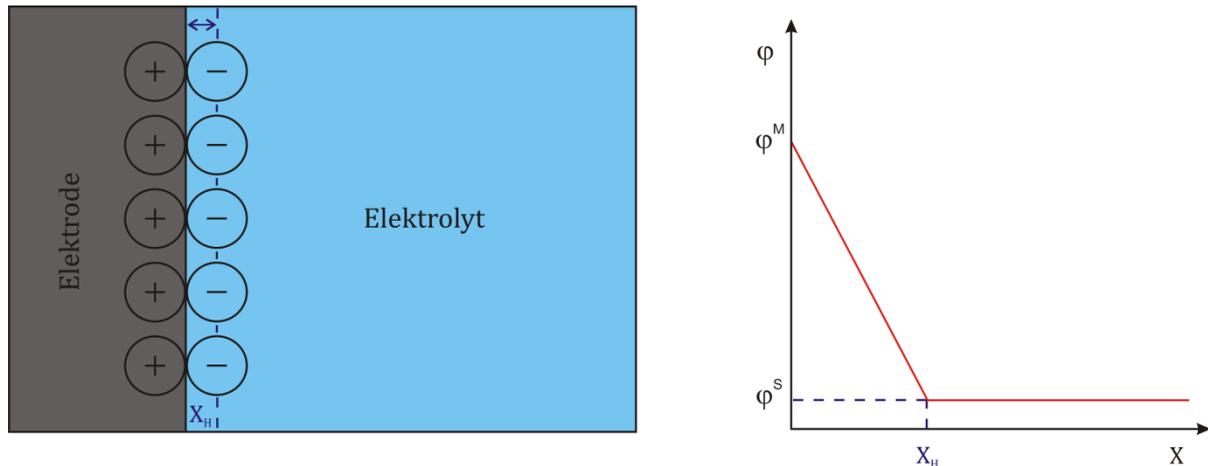


Abbildung 12: Schematische Darstellung der starren Doppelschichtstruktur und des entsprechenden Potentialverlaufs im Helmholtz-Modell, nach [9].

Dieses Modell kann wie ein klassischer paralleler Plattenkondensator aufgefasst werden, wobei eine Platte die Elektrode darstellt und die andere durch die Ladungsschwerpunkt-Ebene der gegensätzlich geladenen Ionen im Elektrolyt charakterisiert wird. Ionen werden im Helmholtz-Modell als Punktladungen betrachtet. Zudem wird der geringste Abstand zur Elektrode als X_H bezeichnet. Abbildung 12 visualisiert den linearen Potentialabfall zwischen Elektrode und dieser Helmholtz-Ebene, der dem Potentialverlauf in einem Plattenkondensator entspricht. Die flächenbezogene (differentielle) Kapazität des Kondensators ist:

$$C_{d,H} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{X_H} \quad (18)$$

Dabei bezeichnet ϵ_r die relative Dielektrizitätskonstante des Elektrolyts und ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums. Im Helmholtz-Modell verändert sich die Kapazität $C_{d,H}$ durch die Veränderung des Elektrodenpotentials nicht. Letztlich gibt es auch Mängel im Helmholtz-Modell: Das Modell gibt die experimentell beobachtete Änderung von $C_{d,H}$ mit dem Potential und mit der Elektrolytkonzentration nicht wieder.

2.4.2 Das Gouy-Chapman-Modell

Mit dem von L. G. Gouy [10] und D. L. Chapman [11] entwickelten Modell aus den Jahren 1910-1913 konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Doppelschichtkapazität sehr wohl durch das Anlegen des Elektrodenpotentials beeinflusst wird.

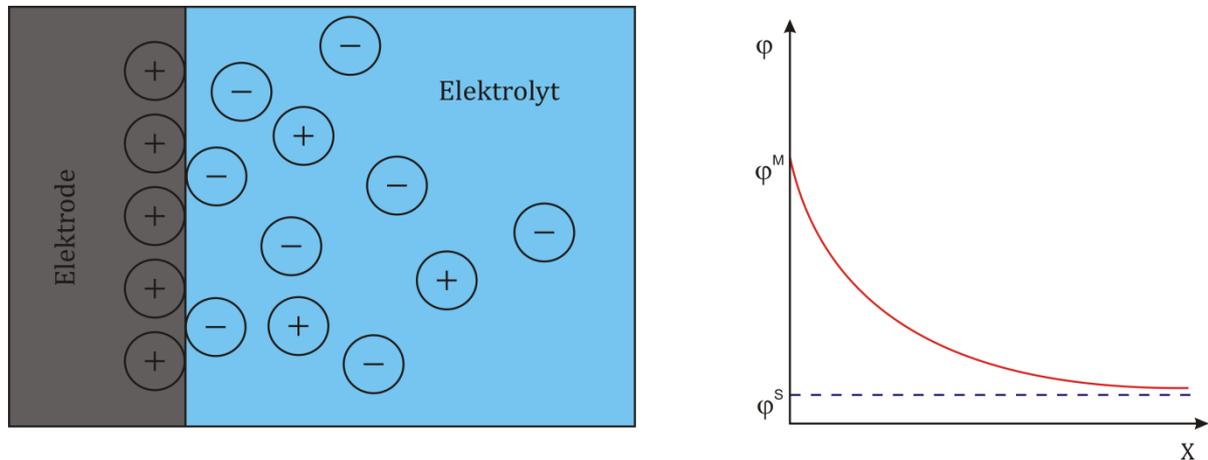


Abbildung 13: Schematische Darstellung der diffusen Doppelschichtstruktur und des Potentialverlaufs im Gouy-Chapman-Modell, nach [10, 11].

Im Unterschied zum Helmholtz'schen Modell befinden sich die Ionen nicht mehr auf einer starren Ebene, sondern besitzen die Möglichkeit, sich frei im Elektrolyt zu bewegen. Dadurch treten Ionen-Wechselwirkungen auf, weshalb die Ausdehnung x_{DL} der elektrochemischen Doppelschicht mit der vorliegenden Elektrolyt-Konzentration gekoppelt ist (siehe Gleichung 19). Der Verlauf des Potentials φ^{Δ} im GC-Modell ist durch die Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung mit Randbedingungen gegeben, die den Wert des Potentials an der Elektrode und im Elektrolyt vorschreibt [91, 92].

$$x_{DL} = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2n_i^0 z^2 e^2}} \quad (19)$$

n_i^0 (mol L ⁻¹)	x_{DL} (Å)
1	3.0
0.1	9.6
0.01	30.4
0.001	96.2

Tabelle 1: Zusammenhang zwischen der Debye-Länge (x_{DL}) und der im Elektrolyt vorliegenden Salzkonzentration in der elektrochemischen Doppelschicht.

Das Gouy-Chapman-Modell liefert außerdem Informationen über die Ladungsdichte unmittelbar an der Elektrodenoberfläche

$$\sigma_M = \epsilon_r \epsilon_0 \left(\frac{\partial \varphi^{\Delta}}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (20)$$

Durch Ableitung von σ_M nach dem Potential $\varphi^{\Delta,0}$ an der Elektrode wird die differentielle Kapazität der diffusen Doppelschicht erhalten

$$C_{d,GC} = \frac{\partial \sigma_M}{\partial \varphi^{\Delta,0}} = \sqrt{\left(\frac{2z^2 e^2 \epsilon_r \epsilon_0 n_i^0}{k_B T}\right)} \cosh\left(\frac{-ze \varphi^{\Delta,0}}{2k_B T}\right) \quad (21)$$

Ein Vorteil des GC-Modells gegenüber dem Helmholtz-Modell ist die Vorhersage der Abhängigkeit der Kapazität vom Elektrodenpotential, welche mit dem Experiment in Einklang steht. Über das Minimum der differentiellen Kapazität kann das Nullladungspotential (engl. *potential of zero charge*, PZC) erhalten werden, wobei die Elektrode ladungsfrei ist [79]. Im GC-Modell ist das PZC stets bei 0 V. Abweichende experimentelle Werte werden durch Vorgänge bestimmt, die im GC-Modell nicht berücksichtigt sind, wie beispielsweise die spezifische Adsorption von Ionen auf der Elektrodenoberfläche. Die Arbeitsfunktion der Elektrode φ^M hängt mit dem PZC zusammen, wobei mehrere Vorschläge in der Literatur gegeben sind [93].

2.4.3 Das Stern-Modell und weitere Doppelschichtmodelle

Das von Otto Stern im Jahre 1924 vorgestellte Modell [12] bezüglich der Ladungsverteilung im Elektrolyt ist eine Vereinigung der Modelle von Helmholtz und Gouy-Chapman. Nahe der Elektrode bildet sich eine kompakte, starre Schicht von hydratisierten Ionen aus. Die Ebene durch den Ladungsschwerpunkt der hydratisierten Ionen wird als äußere Helmholtz-Ebene X_H bezeichnet.

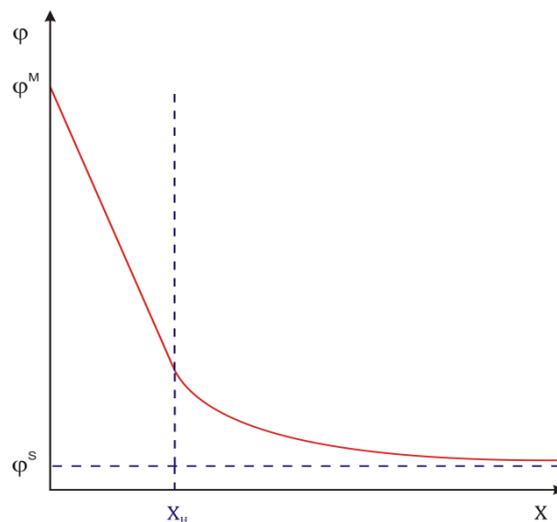


Abbildung 14: Das Stern-Modell vereinigt das Helmholtz- sowie das Gouy-Chapman-Modell, nach [12].

Angrenzend an diese starre Schicht beginnt die diffuse Doppelschicht. Die Kapazität im Stern-Modell ergibt sich durch zwei in Reihe geschaltete Kondensatoren

$$\frac{1}{C_d} = \frac{1}{C_{d,H}} + \frac{1}{C_{d,GC}} \quad (22)$$

Im Jahre 1947 etablierte D. C. Grahame das nach ihm benannte Grahame-Modell, welches als Erweiterung zum Stern-Modell angesehen werden kann [94]. Solvatisierte Ionen können, je nach Art der Ionen-Spezies, befähigt sein, ihre Solvathülle abzustreifen und auf der Elektrodenoberfläche zu adsorbieren.

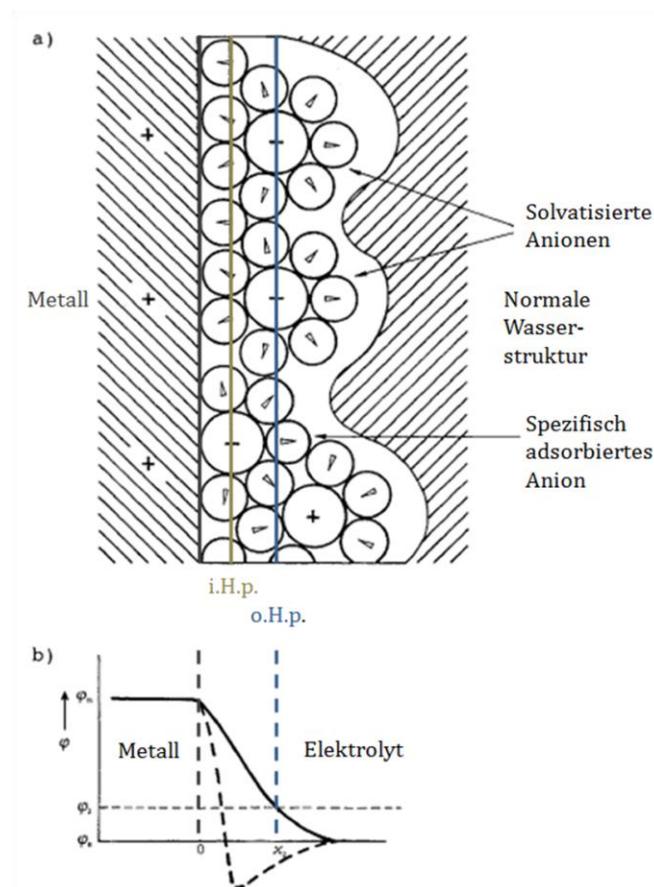


Abbildung 15: Modell der Metall/Elektrolyt-Grenzfläche und des Potentialverlaufs entlang der elektrochemischen Grenzfläche unter Berücksichtigung der inneren Helmholtzschicht (engl. *inner Helmholtz plane*, i.H.p) und der äußeren Helmholtzschicht (engl. *outer Helmholtz plane*, o.H.p), nach [95].

Beim Vergleich der Ladungsschwerpunkt-Ebenen zwischen adsorbierten Ionen und vollständig hydratisierten Ionen, unmittelbar an der Elektrode, ergibt sich für den Fall der spezifischen Adsorption ein geringerer Abstand der Ladungsträger bezüglich der Elektrodenoberfläche. Das Grahame-Modell verfeinert letztlich den Begriff der

Helmholtz-Ebene und führt eine neue, sogenannte innere Helmholtz-Ebene durch spezifische Adsorptionsvorgänge ein. Das elektrostatische Potential verändert sich innerhalb der Helmholtz-Ebenen linear und geht außerhalb der äußeren Helmholtz-Ebene in einen exponentiellen Verlauf über.

Im Jahre 1963 erweiterten Bockris, Devanathan und Müller die bestehenden Doppelschichtmodelle um den Beitrag der Wechselwirkungen von Dipolmomenten der Lösungsmittelmoleküle in der Grenzflächenregion [13]. Im Fall von Wasser bestehen bedeutende Wechselwirkungen zwischen den Dipolen und ihrer Orientierung unmittelbar an der Elektrode. Im Bockris-Devanathan-Müller-Modell wurde die Bezeichnung der inneren Helmholtz-Ebene verfeinert, welche fortan die Ladungsschwerpunkt-Ebene der ersten Dipolschicht sowie spezifisch adsorbierte Ionen involviert.

Während in den bisher vorgestellten Modellen zur elektrochemischen Doppelschicht die Ladungsverteilung im Elektrolyt thematisiert wurde, muss ebenso die Metallelektrode betrachtet werden. Das sogenannte Jellium-Modell [96, 97] besitzt zwei wesentliche Komponenten. Die Metallelektrode besteht einerseits aus positiv geladenen Metallionentrümpfen und andererseits aus frei beweglichen, negativ geladenen Elektronen. Die Metallionentrümpfe formen dabei einen kontinuierlich verlaufenden Hintergrund, welcher an der sogenannten Jellium-Kante, angrenzend zum Elektrolyt, abrupt verschwindet. Im Jellium-Modell werden Elektronen als quantenmechanisches Plasma betrachtet, welche sich aufgrund ihrer freien Beweglichkeit im Metall inhomogen über die Metalloberfläche verteilen. Dabei unterliegen Elektronen Wechselwirkungen mit Ladungen im Metallionentrumpf. Das elektrische Feld in der elektrochemischen Doppelschicht beeinflusst diese elektronische Verteilung. Als Konsequenz dessen wird das Oberflächenpotential χ^M verändert. Eine negative Oberflächenladung erzeugt beispielsweise einen Überschuss an Elektronen an der Oberfläche. Aufgrund ihrer geringen Masse besitzen Elektronen die Fähigkeit, an der Jellium-Kante in den Elektrolyt zu tunneln. Dieser Effekt wird als *electron-spillover* bezeichnet. Die Elektronen an der Metalloberfläche erzeugen ein in hohem Maße polarisierbares Medium, wodurch die Doppelschichtkapazität beeinflusst wird. Das Jellium-Modell besagt, dass Überschussladungen in unmittelbarer Nähe zur Metallelektrode auftreten können [98].

3 Materialien und Methoden

3.1 Zyklische Voltammetrie

Die Voltammetrie und insbesondere die zyklische Voltammetrie (engl. *cyclic voltammetry*, CV) ist für die Untersuchung von kinetischen und thermodynamischen Prozessen an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt eine der am häufigsten verwendeten Methoden [99]. Die mit dem Elektrolyt benetzte Oberfläche der untersuchten Arbeitselektrode (engl. *working electrode*, WE) wird durch einen extern angeschlossenen Potentiostat auf einem konstanten Potential gehalten, welches gegen eine Referenzelektrode (engl. *reference electrode*, RE) gemessen wird. Als Referenzelektrode wird in dieser Arbeit eine gesättigte Kalomelektrode (SCE) verwendet, welche als stromloses Element wirkt und für ein stabiles Elektrodenpotential sorgt ($E_{SCE} = 0.24 \text{ V}$ bzgl. der Normal-Wasserstoffelektrode). Die voreingestellte Potentialdifferenz zwischen der WE und der RE wird durch einen Operationsverstärker aktiv geregelt. Hierfür injiziert der Operationsverstärker durch eine Gegenelektrode (engl. *counter electrode*, CE) einen stabilisierenden Regelstrom in die Messzelle.

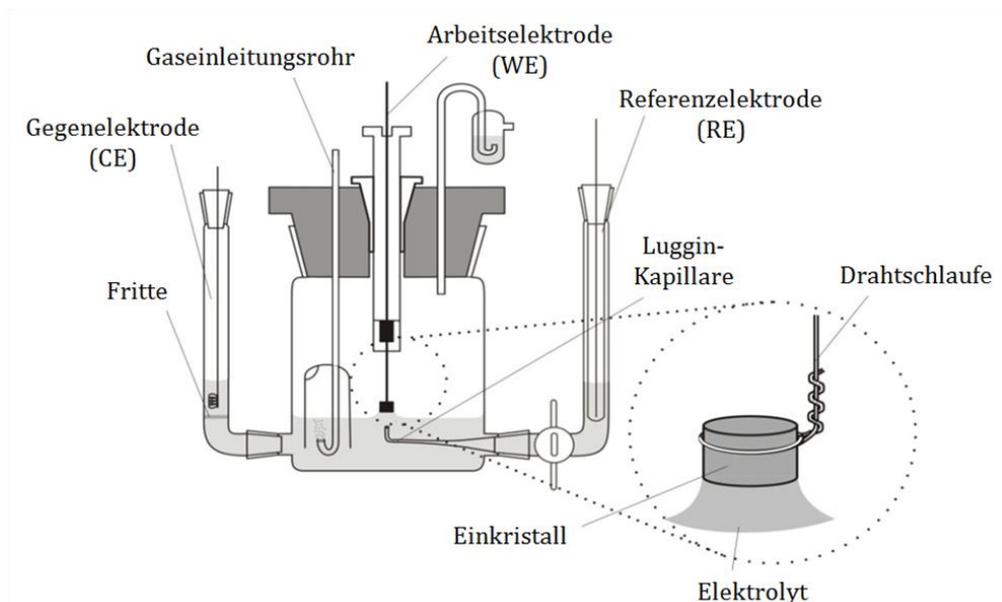


Abbildung 16: Aufbau einer elektrochemischen Zelle für Einkristall-Messungen, nach [86].

In der zyklischen Voltammetrie wird das eingestellte Elektrodenpotential zwischen zwei festgelegten Umkehrpunkten E_1 und E_2 mit einer gegebenen Vorschubgeschwindigkeit linear verändert. Üblicherweise werden CV-Experimente wie oben beschrieben in einer Dreielektroden-Anordnung durchgeführt. Meistens wird als CE ein Platindraht oder ein großflächiges Platinnetz verwendet, um den stabilisierenden Regelstrom in die Messzelle zu leiten. Beim linearen Abtasten (engl. *linear sweep*) des Potentialbereichs werden an der WE zwei verschiedene Arten von Strömen, kapazitive und faraday'sche Ströme, auftreten. Kapazitive Ströme bilden sich aufgrund der Umladung der elektrischen Doppelschicht aus. Faraday'sche Ströme resultieren aus einem Ladungstransfer zwischen Elektrode und Elektrolyt. Um ohm'sche Widerstände im Elektrolyt niedrig zu halten, wird diesem ein Leitsalz beigefügt. Zusätzlich können ohm'sche Widerstände in der elektrochemischen Zelle, durch die Anbringung der CE in unmittelbarer Nähe zur WE, minimiert werden. Die RE befindet sich zwischen den beiden Elektroden.

3.2 Rastersondenmikroskopie

Gerd Binnig und Heinrich Rohrer gelang mit der Erfindung des Rastertunnelmikroskops (engl. *scanning tunneling microscope*, STM) erstmalig die Abbildung von Graphit mit atomarer Auflösung [100]. In den vergangenen drei Jahrzehnten ist ihre ursprüngliche Idee zu einem äußerst vielseitigen Forschungsgebiet, der sogenannten Rastersondenmikroskopie (engl. *scanning-probe microscopy*, SPM), avanciert [3]. Eine ebenfalls weit verbreitete Methode aus dieser Kategorie ist die Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM). Die Ortsauflösung beider Methoden beruht auf dem gleichen Prinzip: Mit Hilfe einer piezoelektrischen Positioniereinheit wird eine feine, mesoskopisch dimensionierte Sonde in unmittelbarem Abstand über die Probe gerastert. Während des gesamten Vorgangs wird die Wechselwirkung zwischen Sonde und Probe gemessen, wobei sich die Art der Wechselwirkung signifikant unterscheidet [3, 101].

STM-Messungen setzen eine metallisch-leitfähige Probe voraus. Das Anlegen einer Spannung zwischen der feinen, möglichst atomar zugespitzten Metallspitze sowie der Probe verursacht im Abstand von wenigen Nanometern das Auftreten des quantenmechanischen Tunneleffekts [80]. Dabei können Elektronen-Wellenfunktionen von Spitze und Probe überlappen, wobei der auftretende Tunnelstrom exponentiell vom Abstand der beiden Komponenten abhängt.

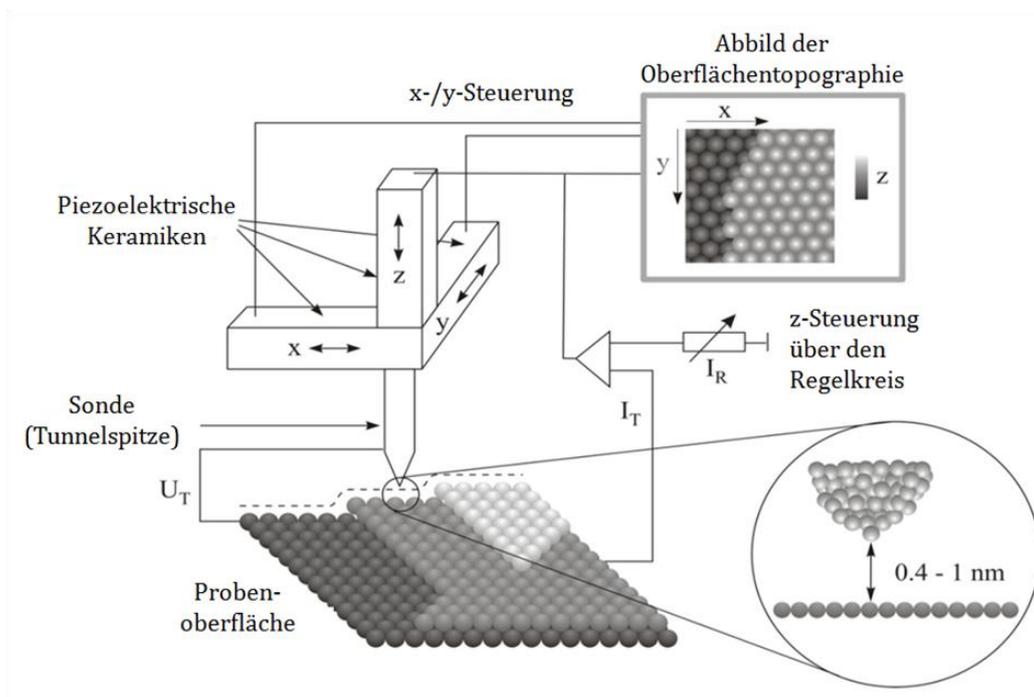


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Rastersondenmikroskopie, welche hier im Fall von STM-Untersuchungen visualisiert wird, nach [86].

Die STM-Spitze kann dabei in zwei unterschiedlichen Messmodi über die Probenoberfläche bewegt werden. Die Rasterung der Probenoberfläche erfolgt im ersten Modus unter konstanter Höhe der Probenspitze (engl. *constant-height mode*), wodurch der Tunnelstrom farbenkodiert dargestellt wird. Ein Vorteil hierbei ist die Verwendung von schnellen Rastergeschwindigkeiten, während die Abrasterung von rauen Oberflächen nachteilig sein kann. Dabei ist ein direkter Kontakt zwischen Probe und Spitze möglich, aus dessen Folge die Spitze zerstört werden kann. Der zweite Messmodus basiert auf der Erhaltung eines konstanten Tunnelstroms (engl. *constant-current mode*), wobei die Höhenauslenkung der STM-Spitze, bei Unebenheiten der Oberfläche, farbenkodiert als topographische Karte dargestellt wird.

AFM-Messungen bieten, im Vergleich zum STM, den Vorteil sowohl metallische als auch nicht-metallische Probenoberflächen untersuchen zu können. Ein wesentlicher Unterschied ist hierbei, dass in AFM-Messungen kurzreichweitige Kräfte [102] zwischen einer Sonde (einem sogenannten Cantilever) und der Probenoberfläche detektiert werden können.

Ein Laser-Detektions-System misst dabei die Krafteinwirkung auf den Cantilever. Der Laserstrahl trifft auf die Oberseite des Cantilevers und wird zu einem Positionsdetektor reflektiert, woraus Rückschlüsse auf die Verbiegung des Cantilevers möglich sind. Um die Oberflächentopographie bestimmen zu können wird der Cantilever in XY-Richtung über die zu untersuchende Oberfläche bewegt, wobei je nach Oberflächenbeschaffenheit unterschiedliche Kräfte wirken können. Mittels einer sogenannten Rückkopplungsschleife wird der Abstand zwischen Sonde und Probe in Z-Richtung nachregelt, falls das gemessene Sensorsignal bezüglich eines zuvor festgelegten Sensor-*Setpoints* (Sollwert) abweichen sollte.

Im sogenannten *tapping mode* (TM) wird die Schwingungsamplitude des Cantilevers über diese Rückkopplungsschleife konstant gehalten. Erhebungen der Oberfläche sorgen dafür, dass der Cantilever in seiner Oszillation eingeschränkt ist und die Schwingungsamplitude abnimmt. Im Gegensatz dazu bewirken Absenkungen der Oberfläche einen Anstieg der Schwingungsamplitude. Der Detektor misst eben jene Auslenkungen der Schwingungsamplitude des Cantilevers. Mit Hilfe dieses AFM-Modus können Enzym-Topographien der Glucose-Sensoren vermessen werden, wobei ein Silizium-Cantilever (Typ RTESP) eingesetzt wurde. Als SPM-Gerät wurde das *Mutimode 8* der Firma Veeco verwendet.

3.3 Präparierung der Glucose-Sensoren

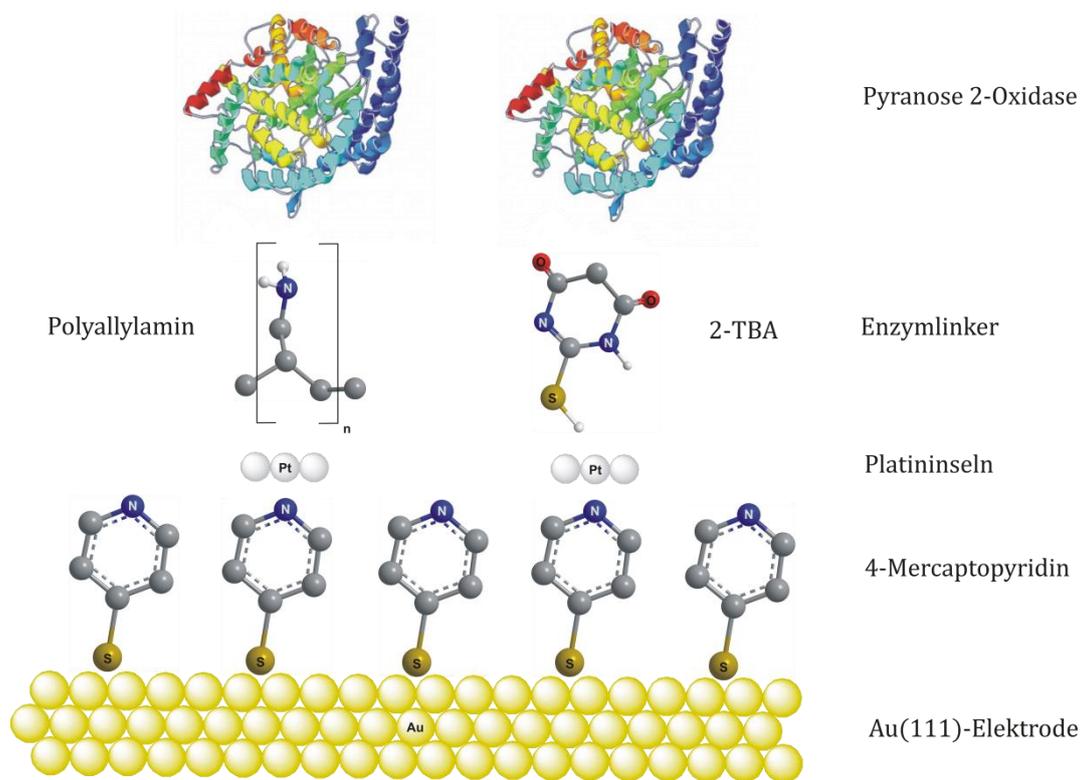


Abbildung 18: Schematischer Aufbau einer funktionalisierten Goldelektrode für Glucose-Sensoren.

Die Probenpräparation beginnt mit dem Tempern der Au(111)-Elektrode. Ziel des Temperns ist die Entfernung von Verunreinigungen auf der Au(111)-Oberfläche sowie die Herbeiführung der thermisch induzierten Rekonstruktion in die *heringbone*-Struktur [103]. Dazu wird der Au(111)-Einkristall (Durchmesser: 4 mm, Höhe: 5 mm) fünf Minuten lang gleichmäßig in der oxidierenden Flamme eines Bunsenbrenners erwärmt. Der getemperte Au(111)-Einkristall wird daraufhin unter Stickstoffkühlung über die Oberfläche eines mit Milli-Q-Wasser gefüllten Behälters gehalten und letztlich mit Milli-Q-Wasser benetzt, um die Oberfläche beim Transport vor Verunreinigung durch die Luft zu schützen. Für STM- und AFM-Messungen wird ein Au(111)-Einkristall (Durchmesser: 12 mm, Höhe: 2,5 mm) verwendet. Der Prozess des Temperns wird hierbei in einer Wasserstoffflamme mit abschließender Kühlung durchgeführt.

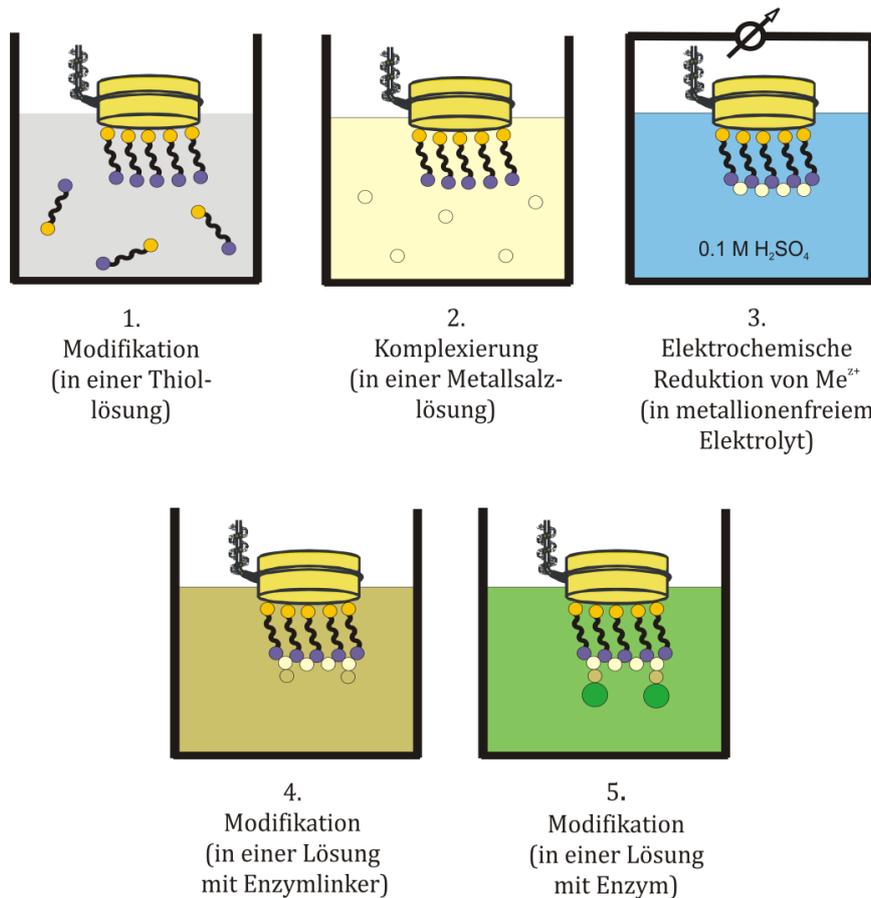


Abbildung 19: Visualisierung der Modifikationsschritte zum Aufbau der Glucose-Sensoren, nach [86].

Zuerst wird der frisch getemperte Au(111)-Einkristall in eine aus 4,4'-Dithiodipyridin ($20 \mu\text{M}$) bestehende Lösung eingetaucht. Um einer oxidativen Schädigung der SAM vorzubeugen, wird die SAM-Modifikationslösung zunächst für 30 Minuten einer Argonatmosphäre ausgesetzt, wobei die Modifikationsdauer zehn Minuten beträgt. Im Anschluss wird die mit 4-PyS-SAM modifizierte Au(111)-Einkristalloberfläche, ohne Potentialkontrolle, in eine aus K_2PtCl_4 (0.1 mM) bestehende Lösung für zwei Minuten gegeben. Danach wird die Elektrode mit Milli-Q-Wasser gespült. Die komplexierten Platin-Ionen werden in einer elektrochemischen Zelle, unter Potentialkontrolle und unter Ausschluss von Platinsalz in Lösung, im Elektrolyt H_2SO_4 (0.1 M) reduziert. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Enzym-Linker getestet, um das Enzym P2OxB1H zu immobilisieren. Für die Aufbringung einer geladenen Polymerschicht wird die modifizierte Elektrode fünf Minuten lang in eine Phosphatpufferlösung eingetaucht, welche Polyallylamin ($500 \mu\text{M}$) enthält. Gegebenenfalls können zur Kopplung von P2OxB1H (8 U/mL) an Polyallylamin die Hilfsreagenzien EDC (15 mM) und NHS (30 mM) in Phosphatpufferlösung ($\text{pH} = 7$) zugegeben werden, wobei die Enzym-Modifikationsdauer 60 Minuten beträgt.

Als Enzymaktivität (U/mL) wird die Enzymmenge bezeichnet, die 1 μmol Substrat pro Minute umsetzt [104]. Bevor 2-TBA als Enzym-Linker verwendet werden kann, muss die 2-TBA-Modifikationslösung (20 μM) für 30 Minuten mit Argon behandelt werden. Es folgt das Eintauchen des mit Platininseln modifizierten Einkristalls, für 30 Minuten, in diese 2-TBA-Lösung. Letztlich wird P2OxB1H (8 U/mL bzw. 4 U/mL) aus der Phosphatpufferlösung (pH = 7) immobilisiert. Das hier verwendete Enzym Pyranose 2-Oxidase ist ein D_2 -symmetrisches Homotetramer [48]. Jede der vier Untereinheiten enthält eine aus 623 Aminosäuren bestehende Aminosäure-Sequenz. Durch die geometrische Anordnung von Pyranose 2-Oxidase besitzt jede Untereinheit eine kovalent gebundene Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Komponente [47]. Die Umsetzung mit Glucose erfolgt dabei gemäß dem in Abbildung 20 dargestellten Mechanismus.

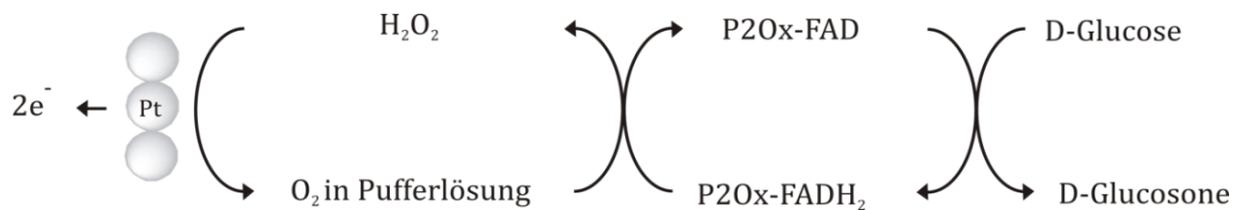


Abbildung 20: Mechanismus der Umsetzung von Glucose am aktiven Zentrum des Enzyms Pyranose 2-Oxidase, nach [47, 48].

3.4 Herstellung nanostrukturierter Au(SSV)-Substrate

Polykristalline SSV-Substrate [18] werden durch das Verfahren einer elektrochemischen Metallabscheidung auf ein nanostrukturiertes Templat angefertigt. In Abbildung 21 sind die wesentlichen Schritte bezüglich der Anfertigung von Au(SSV)-Substraten gezeigt.

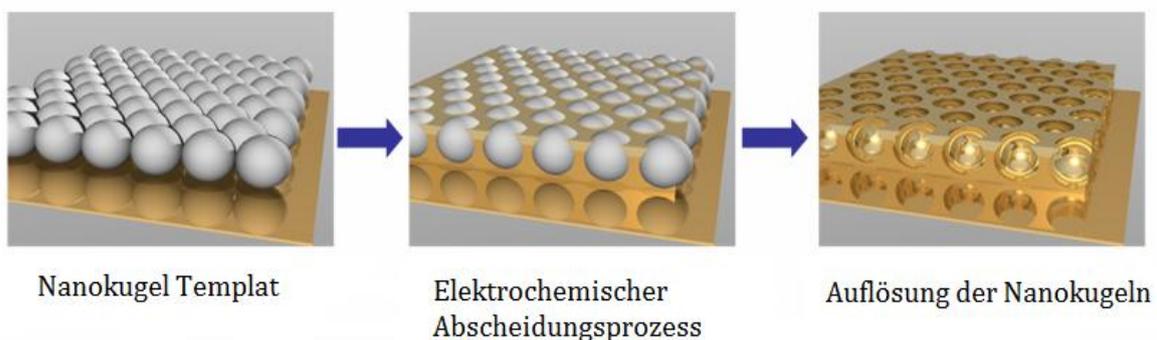


Abbildung 21: Schematische Übersicht der Au(SSV)-Substratherstellung, nach [18, 70].

Zunächst wird unter Verwendung eines Templates eine dicht gepackte Schicht aus 600 nm großen Polystyren-Kugeln aufgebaut. Es folgt eine elektrochemische Goldabscheidung durch das Templat, wodurch die Schichtdicke durch das Faraday'sche Gesetz präzise eingestellt werden kann. Die Polystyren-Kugeln werden anschließend mit DMF herausgelöst, wodurch eine (nano-)strukturierte Oberfläche erhalten wird. Im Folgenden werden die Schritte näher erläutert (vgl. Abbildung 22).

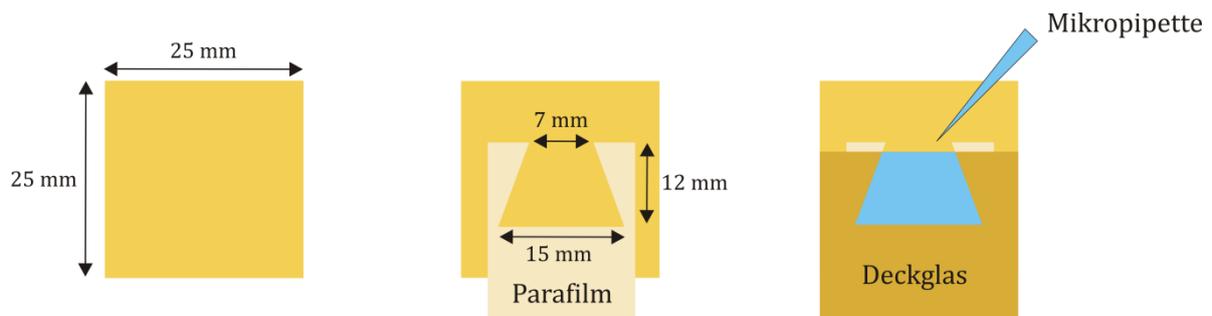


Abbildung 22: Anfertigung des Nanokugel-Templats.

Mikroskop-Objektträger aus Glas (25×75 mm) werden in einem Aufdampfungsprozess zuerst mit 10 nm Titan und anschließend mit 200 nm Gold beschichtet. Titan wirkt dabei als Haftungsschicht und ist wichtig für spätere elektrochemische Messungen im Elektrolyt, da ohne die Titanschicht Gold vom Glasträger abgelöst werden könnte. Das aufgedampfte Goldsubstrat (25×75 mm) wird mit einem Diamantschneider in drei gleiche Stücke (25×25 mm) geschnitten. Anschließend wird ein trapezförmiges Templat aus Parafilm, mit den Maßen gemäß Abbildung 22, angefertigt. Auf die Parafilmschicht wird ein Deckglas gelegt. Bevor die kolloidale Polystyren-Lösung zugegeben werden kann, muss das Substrat, bestehend aus Goldoberfläche, Parafilm und Deckglas, jedoch auf eine Heizplatte (65°C) gelegt werden. Dieser Vorgang ist notwendig, da die Parafilmschicht fortan als Haftungsschicht zwischen Gold und Deckglas fungiert. Mit einer Mikropipette werden $9.4 \mu\text{L}$ der kolloidalen Polystyren-Lösung mit einem Durchmesser von 600 nm in die Trapezform überführt. Für die Ausbildung einer homogenen Packung werden die Substrate für zwei Tage bei 15° Neigungswinkel und einer Temperatur von 14°C im Kühlschrank gelagert. Dabei verdunstet das in der kolloidalen Polystyren-Lösung enthaltene Wasser kontrolliert ab. Die zusätzlich wirkenden Kapillarkräfte sind maßgeblich für die Entstehung einer regelmäßig-hexagonal angeordneten Polystyren-Kugelpackung verantwortlich. Bevor

die elektrochemische Goldabscheidung stattfinden kann, werden auf der Heizplatte bei 65°C sowohl das Deckglas als auch das Parafilm-Templat entfernt. Mit einem handelsüblichen Nagellack werden daraufhin die Stellen auf dem Substrat markiert, auf denen keine Goldabscheidung stattfinden soll. Eine elektrochemische Zelle wird mit 45 mL einer kommerziell erhältlichen Goldlösung ECF 60 sowie 225 µL des Aufhellers E3 gefüllt, welcher für den späteren Glanz des Au(SSV)-Substrats sorgen soll. Das Substrat ist die Arbeitselektrode, ein Platinnetz ist die Gegenelektrode und als Referenzelektrode wird eine Kalomel-Elektrode verwendet. Über die Faraday'schen Gesetze [105, 106] gibt es einen Zusammenhang zwischen der Abscheidungsmenge Q und der Hohlraumtiefe H

$$Q = \frac{A \rho F}{M} H \quad (23)$$

Möglich wird dies durch das Anlegen eines konstanten Potentials (-0.72 V), wobei über eine bestimmte Zeitspanne die geflossene Ladung Q gemessen wird.

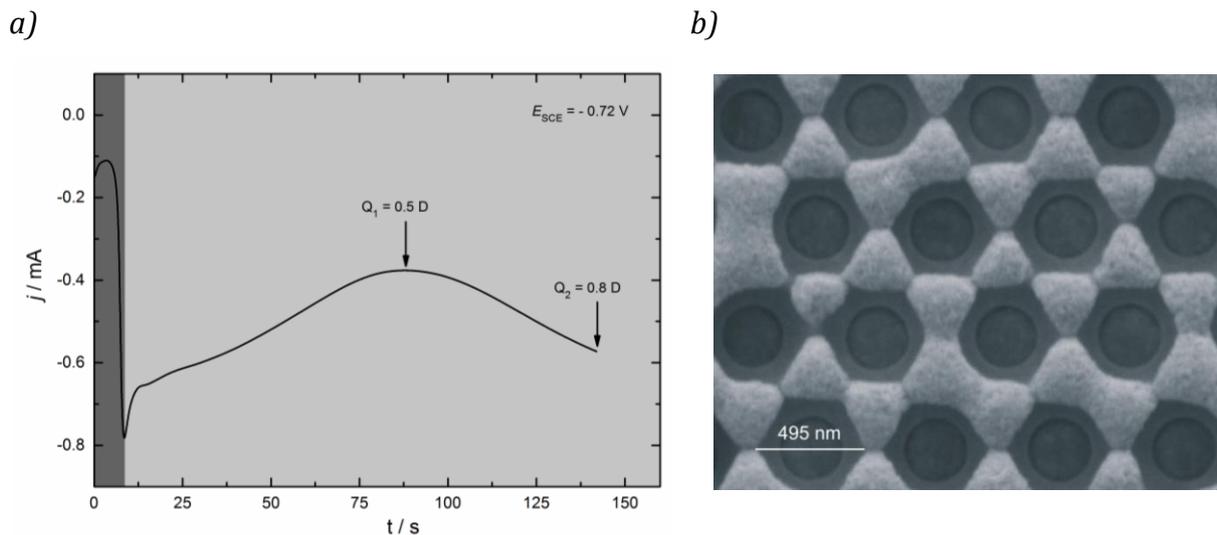


Abbildung 23: a) Strom-Zeit-Transient der elektrochemischen Goldabscheidung zum Erhalt der Au(SSV)-Substrate, b) die sphärischen Hohlräume mit Durchmessern von 600 nm werden durch die Abscheidung einer theoretisch 480 nm dicken Goldschicht erhalten, nach [70].

Die elektrochemische Goldabscheidung kann in zwei Bereiche aufgeteilt werden. Der dunkelgraue Bereich in Abbildung 23 zeigt dabei das Wachstum der Goldschicht um die 600 nm großen Nanokugeln bis sich die ersten Monolagen Gold gebildet haben. Am Maximum der Kurve bei ($t \sim 10$ s) nimmt die Form der Nanokugeln Einfluss auf das Wachstumsverhalten der abgeschiedenen Goldschicht. Die Bulk-Abscheidung zeigt im

Transienten ein proportionales Verhalten zwischen der sich aktiv verändernden Goldoberfläche und dem gemessenen Strom. Bis zu einer Hohlraumtiefe H von $0.50 D$ nimmt die Goldoberfläche ab und es wird ein Minimum des Stroms erhalten. Durch die Kenntnis der Ladung Q_1 an dieser Stelle ist es möglich, die Hohlraumtiefe H von $0.80 D$, aufgrund der Proportionalität zwischen abgeschiedener Ladung und Abscheidungshöhe, zu bestimmen. Da die Goldoberfläche bei der Abscheidung zwischen der Hohlraumtiefe $0.50 D$ und $0.80 D$ zunimmt, steigt in Abbildung 23 der Transient erneut an. Im Anschluss werden die Goldsubstrate in DMF eingelegt und mit Milli-Q-Wasser gereinigt. Die Durchmesser der sphärischen Hohlräume, siehe Abbildung 23, betragen durchschnittlich 495 nm was in guter Übereinstimmung mit den theoretisch zu erwartenden 480 nm steht.

3.5 Präparierung der DNA-basierten Sensoren

Um eine erfolgreiche Chemisorption von hybridisierten DNA-Molekülen [17-19] auf Goldoberflächen zu gewährleisten, ist ein stabiler organischer Linker notwendig. Im ersten Schritt des DNA-Modifikationsvorgangs interagieren die am 3'-Ende des DNA-Probenstrangs enthaltenen sechs Thiolgruppen mit der Goldoberfläche.

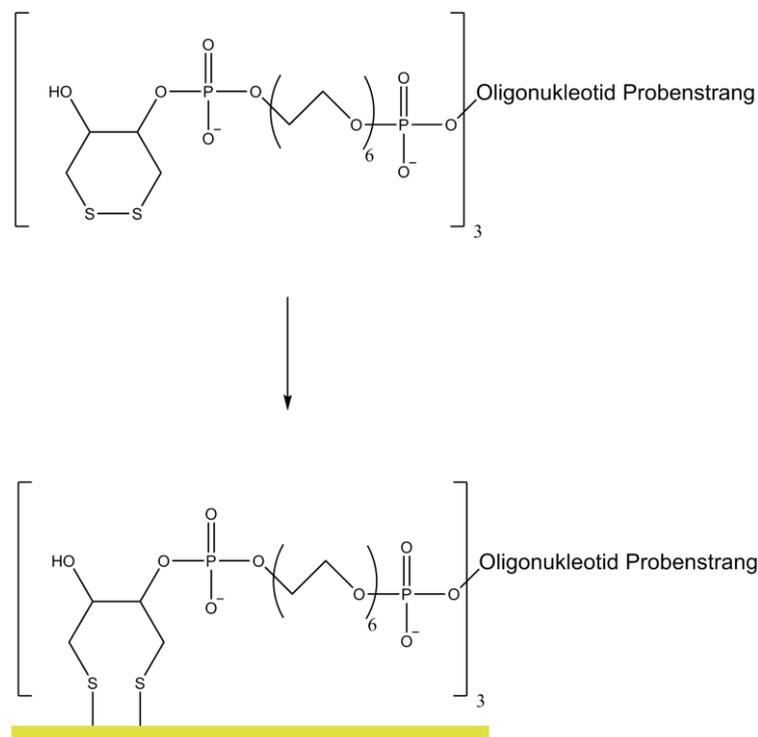


Abbildung 24: Visualisierung des Linker-Aufbaus für die Immobilisierung von DNA-Probenstrang auf dem Goldsubstrat, bestehend aus alternierenden Einheiten von Disulfiden (X) und Hexaethylenglycol (H).

Die Au(SSV)-Substrate werden dabei in einen Tris-Puffer (10 mM, pH = 7.2) eingetaucht, welcher den DNA-Probenstrang (1 μ M) enthält. Die Modifikationsdauer beträgt 24 Stunden. Anschließend wird das Substrat mit Tris-Puffer gespült. In Schritt zwei wird das modifizierte Substrat mit einer Mercaptohexanollösung (1 mM) im Tris-Puffer für 30 Minuten benetzt.

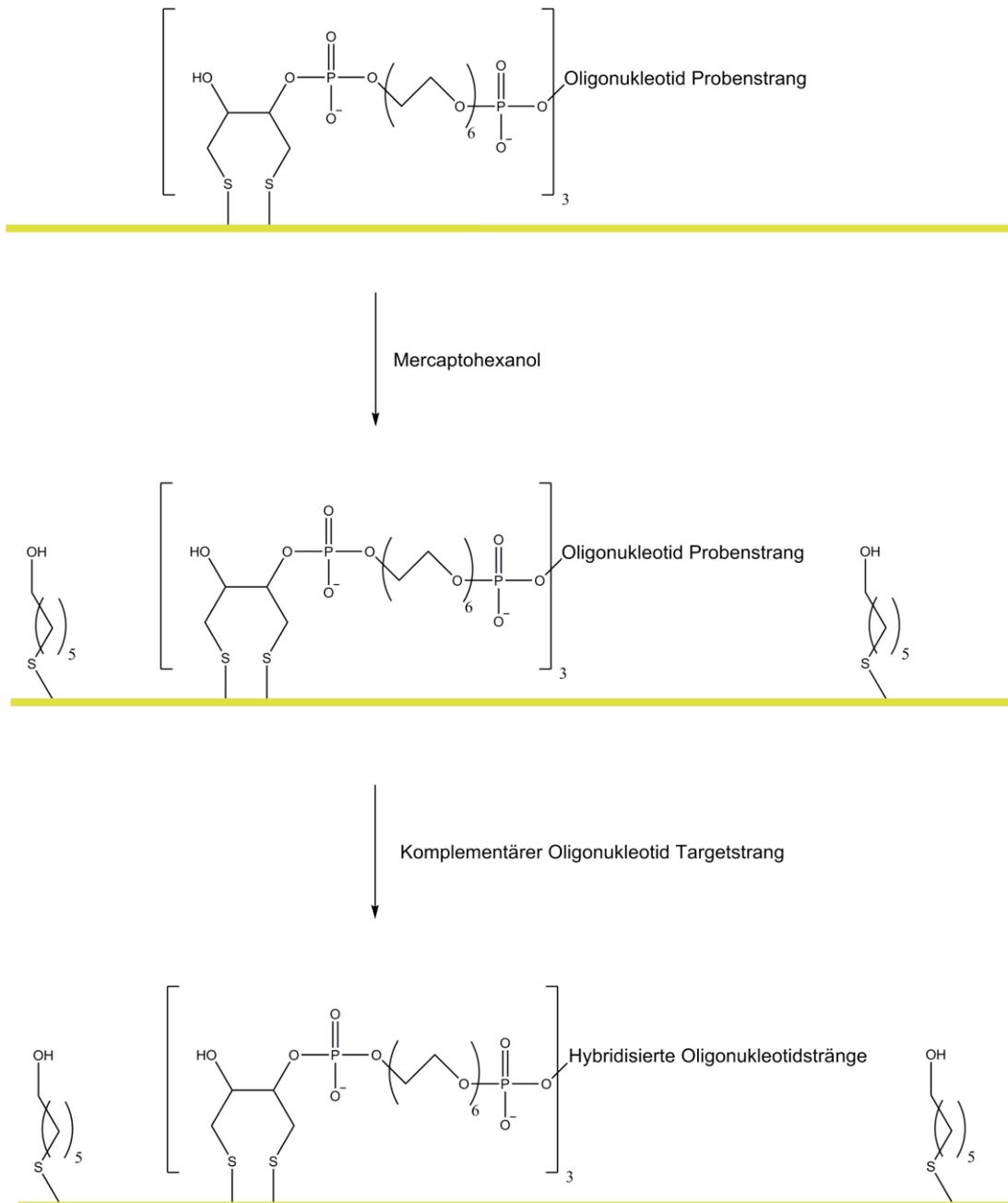


Abbildung 25: Schematische Darstellung des DNA-Hybridisierungsprozesses.

Dieser Schritt ist notwendig für die Passivierung der Goldoberfläche durch Mercaptohexanol. Damit ist die Voraussetzung für die in Schritt drei durchgeführte effektive Hybridisierung zwischen DNA-Probenstrang und DNA-Targetstrang gegeben. Ein zusätzlicher Effekt ist die Aufrichtung des DNA-Probenstrangs. Um die Hybridisierung zu vollziehen wird das modifizierte System mit einer Tris-Lösung benetzt, welche den DNA-Targetstrang (1 μM) enthält. Abschließend wird das Substrat erneut mit Tris-Puffer und darin enthaltenem NaCl gespült. Die folgende Tabelle listet die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen auf. Die Abkürzung „T“ steht hierbei für die Stellen, an denen die Anbringung der Raman-Sonde Texas Red (TR) über einen aminoC6-Linker an die Thymin-Base stattfindet. Für die Darstellung der DNA-Struktur sei auf Abbildung 4 verwiesen.

Code	Oligonukleotid-Sequenz
B8881 (Probenstrang)	XHXHXH 5' AGGAAACACCAAAGATGATATT 3'
B8882 (Targetstrang)	3' (T)CCTTTGTGGTTTCTACTATAA 5'
B8883 (Targetstrang)	3' TCC(T)TTGTGGTTTCTACTATAA 5'
B8884 (Targetstrang)	3' TCCTTTGTGGT(T)TCTACTATAA 5'
B8885 (Targetstrang)	3' TCCTTTGTGGTTTCTACTA(T)AA 5'

Tabelle 2: Übersicht der Oligonukleotid-Sequenzen. Stellen, an denen der Farbstoffmarker (Texas Red) angebracht ist, sind mit „T“ gekennzeichnet.

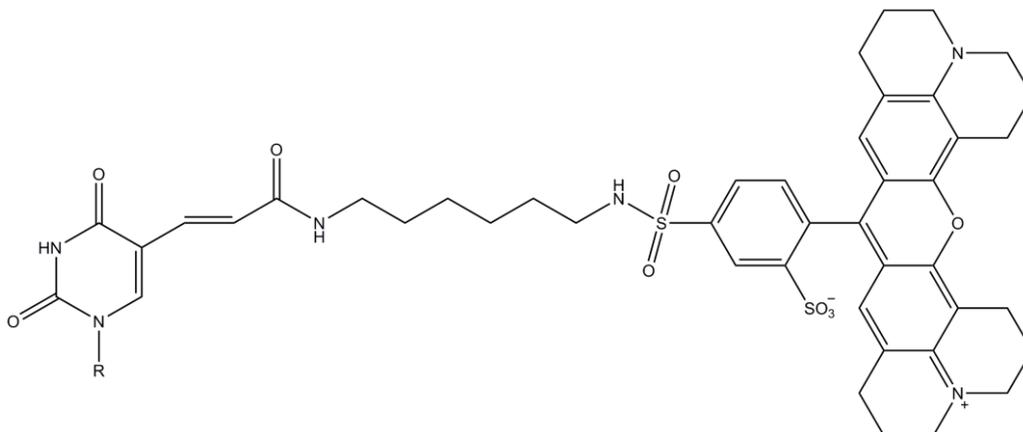


Abbildung 26: Darstellung der Struktur von Texas Red. Zudem ist die Anbindung der TR-Sonde an die DNA-Base Thymin visualisiert.

Elektronische Anregungen des Farbstoff-Moleküls Texas Red können durch die Methode der UV-VIS-Spektroskopie untersucht werden. Wie Abbildung 27 zeigt, befindet sich das Absorptionsmaxima λ_{\max} bei 594 nm. Diese Eigenschaft macht den Farbstoff auch für Raman Untersuchungen mit einer Laserwellenlänge ($\lambda = 633$ nm) interessant. Die in dieser Arbeit verwendete rote Laserwellenlänge wurde zudem explizit an die hexagonal angeordneten plasmonischen Hohlraum-Resonatoren des Goldsubstrats angepasst, wodurch eine effektive Plasmonenanregung gewährleistet ist.

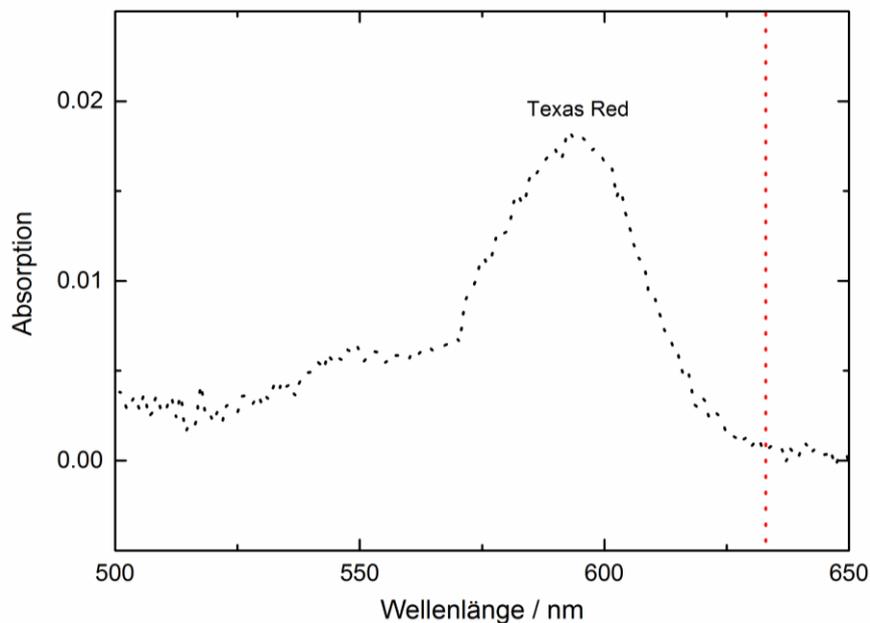


Abbildung 27: UV-VIS Spektrum der TR-Sonde, aufgezeichnet mit einem SPECORD S 600 (Analytik Jena). Das Absorptionsmaxima λ_{\max} von Texas Red liegt bei 594 nm. Die rot gestrichelte Linie stellt schematisch die Wellenlänge des hier verwendeten roten Lasers ($\lambda = 633$ nm) dar.

Für die experimentelle Aufnahme von SERS-Spektren ist eine Kompatibilität zwischen einer elektrochemischen Raman-Messzelle sowie des hier verwendeten in Via Raman-Mikroskops (Firma Renishaw) erforderlich. Da sich die Raman-Messzelle aktuell in einem Patentierungsverfahren (Deutsche Patentanmeldung 10 2016 222 613.4) befindet, dürfen an dieser Stelle keine Informationen darüber bekannt gegeben werden.

Das in Via Raman-Mikroskop bündelt die Laserwellenlänge ($\lambda = 633 \text{ nm}$) an einer Objektivlinse (50X-long distance objective, Firma Leica). Der senkrechte Arbeitsabstand dieser Linse, bezüglich der mit Elektrolyt bedeckten Substratoberfläche, beträgt 8 mm. Zudem sei angemerkt, dass es zu keiner Zeit zu einem direkten Kontakt zwischen Elektrolyt und Linse kommt. Die Laserleistung war stets 1,7 mW und die Einwirkungsdauer des Lasers 40 Sekunden.

3.6 Eingesetzte Chemikalien

Name Strukturformel	Hersteller	Reinheit
<i>Schwefelsäure</i> H_2SO_4	Merck	Suprapur (96%)
<i>Salzsäure</i> HCl	Merck	30 %
<i>Natronlauge</i> NaOH	Merck	99 %
<i>Wasserstoffperoxid</i> H_2O_2	Merck	35 %
<i>Pottasiumtetrachloroplatinate (II)</i> K_2PtCl_4	Aldrich	99.99 %
<i>Natriumchlorid</i> NaCl	Aldrich	$\geq 99.5 \%$
<i>Kaliumchlorid</i> KCl	Aldrich	$\geq 99 \%$
<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i> KH_2PO_4	Fluka	$\geq 99.5 \%$
<i>Dikaliumhydrogenphosphat</i> K_2HPO_4	Aldrich	$\geq 99 \%$
<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i> $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	Aldrich	$\geq 99.8 \%$
<i>4,4'-Dithiodipyridin</i> $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2$	Aldrich	98 %

<i>6-Mercapto-1-hexanol</i> $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$	Aldrich	99 %
<i>2-Thiobarbitursäure</i> 2-TBA	Aldrich	98 %
<i>Poly(allylamine hydrochlorid)</i> PAA HCl	Aldrich	MW 58.000
<i>N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-</i> <i>carbodiimide hydrochlorid</i> EDC	Fluka	$\geq 98 \%$
<i>N-hydroxysuccinimide</i> NHS	Aldrich	98 %
<i>N,N-Dimethylformamid</i> $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$	Aldrich	99 %
Goldabscheidungslösung ECF 60	Metalor	
Aufheller E3	Metalor	
Polystyren-Lösung	Thermo Scientific	
DNA-Sequenzen B8881 – B8885	Atdbio	HPLC
Pyranose 2-Oxidase P2OxB1H		8 U/mL
Argon Ar	MTI	99.999%
Stickstoff N_2	MTI	99.999 %

Ergebnisse und Diskussion

4 Glucose-Sensoren: Aufbau und Charakterisierung

4.1 Elektrochemische Betrachtung der Au(111)-Elektrode

Um eventuell vorhandene Verunreinigungen in der elektrochemischen Zelle ausschließen zu können, wird vor jeder Enzym-Messung die getemperte Au(111)-Elektrode in einen schwefelsäurehaltigen Elektrolyten eingetaucht. Abbildung 28 zeigt exemplarisch die charakteristisch auftretenden Merkmale der Adsorptions- und Desorptionsprozesse auf einer sauberen Au(111)-Oberfläche.

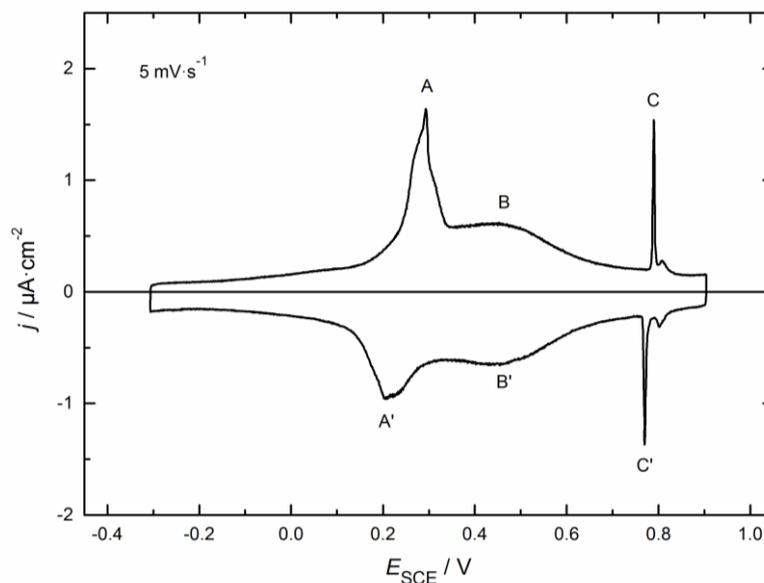


Abbildung 28: Strom-Spannungskurve einer sauberen Au(111)-Elektrode in 0.1 M H₂SO₄.

Das Eintauchen der getemperten Goldeinkristalloberfläche erfolgt bei -0.2 V wo, analog zu den Arbeiten von Kolb, die Au(111)-Oberfläche eine rekonstruierte ($\sqrt{3} \times 22$)-*heringbone*-Struktur annimmt [103]. Mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 5 mV/s tritt bei 0.3 V eine potentialinduzierte Aufhebung der Rekonstruktion auf (Peak A). Zusätzlich können die im Elektrolyt enthaltenen Anionen Sulfat bzw. Hydrogensulfat als ungeordnetes Oberflächengas auf der neu ausgebildeten (1x1) Struktur adsorbieren (Schulterpeak B). Diese mobilen Anionen bilden bei 0.78 V eine ($\sqrt{3} \times \sqrt{7}$) R19.1°-Überstruktur aus (Peak C). Die dazu komplementär verlaufenden Desorptionsprozesse (Peak C' sowie Peak B') sind nahezu reversibel. Peak A' visualisiert die potentialinduzierte Rekonstruktion in die *heringbone*-Struktur.

4.2 Ausbildung der 4-PyS-SAM auf Au(111)

Im Fall des hier verwendeten 4,4'-Dithiodipyridin wird das in Lösung befindliche Disulfid an der Elektrodenoberfläche dissoziativ aufgespalten. Bedingt durch die starke Chemisorption des Schwefels mit der Goldoberfläche adsorbieren die zwei gebildeten Thiole und zwar so, dass die Schwefelatome in der Mitte zwischen drei Goldatomen, der sogenannte *three-fold hollow site*, ansässig sind [107]. Die dabei gebildete Struktur an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt hängt jedoch sehr stark vom verwendeten Elektrolyten, dem Elektrodenpotential sowie dem pH-Wert ab [108, 109].

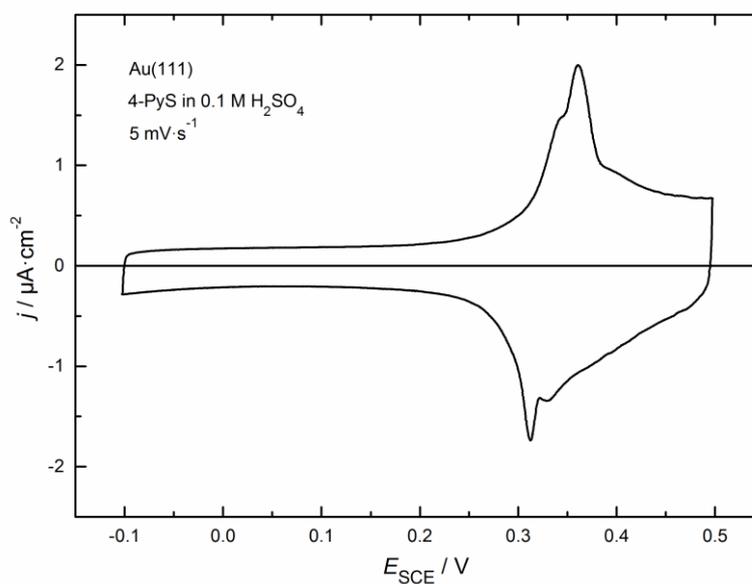


Abbildung 29: Strom-Spannungskurve einer mit 4-PyS modifizierten Au(111)-Elektrode in 0.1 M H₂SO₄.

Abbildung 29 zeigt charakteristische Merkmale der SAM in H₂SO₄ (0.1 M) mit einem Potentialfenster, welches sich über den Stabilitätsbereich der SAM erstreckt. Nicht gezeigt ist der Beginn der reduktiven Desorption der SAM ab einem Elektrodenpotential kleiner als -0.2 V sowie der Beginn der oxidativen Desorption der SAM ab einem Elektrodenpotential positiver als 0.7 V. Das Eintauchpotential ist -0.1 V, wobei die SAM eine $(7 \times \sqrt{3})$ -Überstruktur ausbildet und der Pyridin-Stickstoff in einem protonierten Zustand vorliegt [110]. Eine geometrische Umstrukturierung der SAM erfolgt bei 0.35 V, was mit den Ergebnissen von Kolb *et al.* übereinstimmt [110]. Verursacht wird dieser Vorgang durch die zusätzliche Adsorption von Sulfat bzw. Hydrogensulfat auf der Goldoberfläche. Die Strom-Spannungskurve deutet auf einen quasi-reversiblen Phasenübergang hin. Interessanterweise wird dieser Phasenübergang in anderen Elektrolyten, wie beispielsweise HClO₄ (0.1 M) aber auch mit der in dieser Arbeit

verwendeten Phosphatpufferlösung ($\text{pH} = 7$), nicht beobachtet. Das ist ein Indiz dafür, dass die Adsorption der Schwefelatome im Sulfation oder Hydrogensulfation auf einer Au(111)-Oberfläche deutlich stärker ausgeprägt sein muss und folglich an freien, nicht mit 4-PyS bedeckten Plätzen der Au(111)-Oberfläche bevorzugt ablaufen kann. Um zu überprüfen, ob die SAM-Modifikationslösung nach einer gewissen Zeit noch intakt ist oder ob bereits oxidative Prozesse an der SAM stattgefunden haben, eignet sich die Aufnahme eines Zyklovoltammogramms, wie in Abbildung 29 dargestellt.

4.3 Metallisierung der mit 4-PyS bedeckten Au(111)-Elektrode

Mithilfe einer Kombination aus stromlosen und elektrochemischen Präparationschritten können monoatomar hohe Metallinseln auf der mit 4-Mercaptopyridin bedeckten Au(111)-Elektrode erhalten werden. Im Fokus dieser Arbeit stehen jedoch nicht Palladium-, Rhodium-, oder Iridiuminseln, sondern Platininseln. Dieses Modellsystem eignet sich unter anderem hervorragend dafür, katalytische Prozesse wie die CO-Oxidation und damit Vorgänge in der Brennstoffzellen-Technologie zu analysieren. In dieser Arbeit soll jedoch ein Glucose-Biosensor aufgebaut werden, in dessen Reaktionsmechanismus die Integration von katalytisch aktiven Platininseln erforderlich ist.

Es stellt sich die Frage, weshalb die Enzyme nicht direkt auf einer Platinelektrode immobilisiert werden und stattdessen dieser Aufbau gewählt wird. Um diese Frage beantworten zu können, ist ein Blick auf die Struktur unabdinglich. Dafür muss zuerst der elektrochemische Herstellungsprozess der Platininseln näher betrachtet werden. Das im 4-Mercaptopyridin enthaltene N-Atom in para-Position ist eine wichtige Anforderung für den Metallisierungsschritt der SAM *on-top*, siehe Abschnitt 2.3. Zuerst wird die adsorbierte 4-PyS-SAM ohne Potentialkontrolle für zwei Minuten mit K_2PtCl_4 (0.1 mM) komplexiert. Damit die komplexierten Platinionen zu Metallinseln reduziert werden können, ist eine elektrochemische Behandlung unter Potentialkontrolle in einem metallsalzfreien Elektrolyten nötig. In kathodischer Vorschubrichtung wird genau dieser Vorgang im ersten Zyklus bei ca. 0.15 V festgestellt. Im zweiten Zyklus sind bereits alle Platinionen zu Pt^0 reduziert und dementsprechend wird kein erneuter Reduktionspeak beobachtet. Die geflossene Ladungsmenge beziffert sich auf rund $35 \mu\text{C cm}^{-2}$, was einer Bedeckung von 7-10% bezüglich einer kompletten Platinmonolage auf Au(111) entspricht.

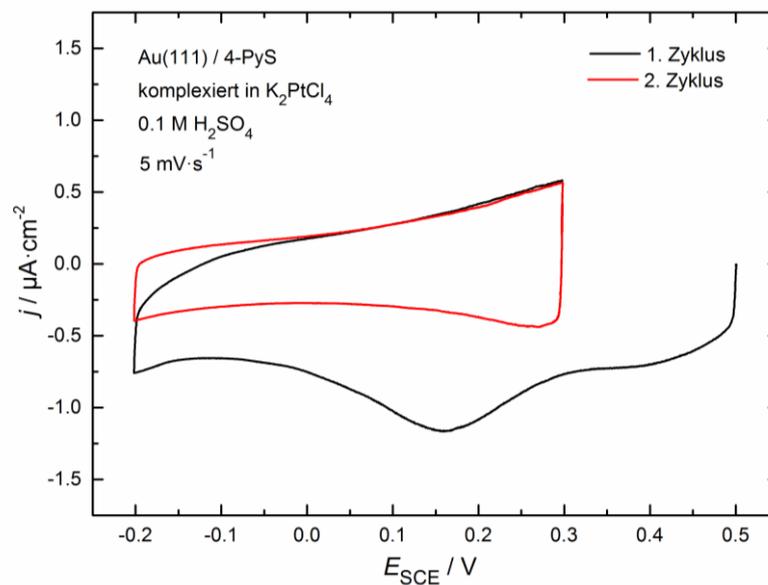


Abbildung 30: Strom-Spannungskurve der elektrochemischen Platinabscheidung auf einer mit 4-PyS modifizierten Au(111)-Elektrode in 0.1 M H_2SO_4 . Die Reduzierung der komplexierten Platinionen vollzieht sich vollständig im ersten Zyklus (schwarze Kurve).

Die mittels STM erhaltenen Topographie der Platininseln, siehe Abbildung 39, ermöglicht den Rückschluss auf eine annähernd homogene Verteilung der Platininseln mit einem Durchmesser von durchschnittlich rund 10 nm, was ungefähr der Größe eines Enzyms entspricht. Idealerweise wird ein Enzym auf eine Platininsel immobilisiert, was mit einer reinen Platinelektrode so nicht steuerbar gewesen wäre. Die Maße des hier verwendeten Enzyms Pyranose 2-Oxidase ($9 \text{ nm} \times 9 \text{ nm} \times 13 \text{ nm}$) korrelieren sehr gut mit der Größe der Platininseln, weshalb diese Idee sehr vielversprechend ist.

Es stellt sich zudem die Frage, ob die Platinbedeckung erhöht werden könnte. Da die 4-Mercaptopyridin-SAM in der *three-fold hollow site* auf Au(111) adsorbiert, stehen pro Komplexierungsvorgang $1/3$ ML Stickstoffatome für die Komplexierung mit Platinionen bereit. Manolova *et al.* untersuchten bereits den Einfluss der erhöhten Komplexierungszeit (15 bzw. 120 Minuten) im Modifikationsschritt mit K_2PtCl_4 (0.1 mM), was in einer Bedeckung von 18 bzw. 25 % mündete [111]. Eine erhöhte Bedeckung kann ebenfalls über eine mehrmalige Komplexierung mit K_2PtCl_4 (0.1 mM) erhalten werden, wobei sich stets der Platinreduktionspeak (wie in Abbildung 30) ausbildet.

Festzuhalten ist jedoch der Aspekt, dass eine erhöhte Bedeckung an Platininseln, der Forderung nach einer wohldefinierten Verteilung der Enzyme widersprechen würde. Die Beeinflussung der immobilisierten Enzyme untereinander, aufgrund eines zu geringen Abstands zueinander, sollte folglich vermieden werden, um eine optimale Umsetzung von Glucose am Enzym-Zentrum zu gewährleisten.

Mittels winkelaufgelöster Photoelektronenspektroskopie (engl. *angle-resolved XPS*, AR-XPS) konnte gezeigt werden, dass die Metallinseln tatsächlich auf der SAM *on-top* angesiedelt sein müssen [111] und sich nicht zwischen der Au(111)-Elektrode und der SAM-Schicht, als sogenannte *buried-monolayer* [83-85], befinden. Diese oberflächen-sensitive Methode bestätigt, dass emittierte Photoelektronen des Bulk-Golds durch adsorbierte SAM-Moleküle inelastisch gestreut werden, wobei ein exponentieller Zusammenhang zwischen der SAM-Schichtdicke und der Intensitätsabnahme der Photoelektronen besteht [112]. Eine Vergrößerung des Photoelektronen-Detektionswinkels, bezüglich der Oberflächennormalen, resultiert in einer Intensitätszunahme der Photoelektronen aus der Metallschicht *on-top*, stets in Relation zur Photoelektronen-Intensität des Substrat-Bulks [113, 114].

Boyen *et al.* zeigten zudem, dass es zu starken chemischen Wechselwirkungen zwischen den monoatomar hohen Metallinseln und der 4-PyS-SAM kommt. Sowohl die Dichtefunktionaltheorie (engl. *density functional theory*, DFT) als auch UPS-Untersuchungen (engl. *ultraviolet-photoelectron spectroscopy*, UPS) konnten eine Abnahme der Zustandsdichte (engl. *density of states*, DOS) der Palladiuminseln (0.7 ML) auf der 4-PyS-SAM am Fermi-niveau E_F feststellen [107]. Während Bulk-Palladium metallischen Charakter besitzt, zeigen Palladiuminseln, in der Größenordnung von 9 nm, nicht metallische Eigenschaften [107].

Diese Art von Untersuchungen bezüglich Platininseln *on-top* auf der 4-PyS-SAM wurden nach aktuellstem Stand noch nicht publiziert. Allerdings wären Erkenntnisse hierzu für die hier vorgestellten Glucose-Sensoren sehr bedeutsam, da, wie bereits in Abschnitt 2.1.1 thematisiert wurde, im Laufe der Reaktion zwischen Glucose und der redoxaktiven FAD/FADH₂-Spezies, die im Enzym kovalent angebunden ist, Wasserstoffperoxid als Reaktionsprodukt gebildet sowie elektrochemisch umgesetzt wird. Einerseits könnte die elektrochemische Oxidation von H₂O₂ an der Au(111)-Oberfläche ablaufen und andererseits an den katalytisch aktiven Platininseln.

Murthy *et al.* untersuchten bereits die Oxidation von H_2O_2 auf einer nur mit 4-PyS bedeckten Goldoberfläche im Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7.1$) [115]. Diese Untersuchungen zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Strom-Spannungskurve aus Abbildung 31, jedoch mit dem wesentlichen Unterschied, dass in deren System Wasserstoffperoxid bei einem Elektrodenpotential von 0.75 V oxidiert wird. Dieser Befund deckt sich mit elektrochemischen Messungen von Brett *et al.*, welche die Oxidation von Wasserstoffperoxid an einer reinen metallischen Goldoberfläche untersuchten. In Abwesenheit der 4-PyS-SAM erfolgt die elektrochemische Oxidation von H_2O_2 auf Goldsubstraten ebenfalls bei 0.75 V [116].

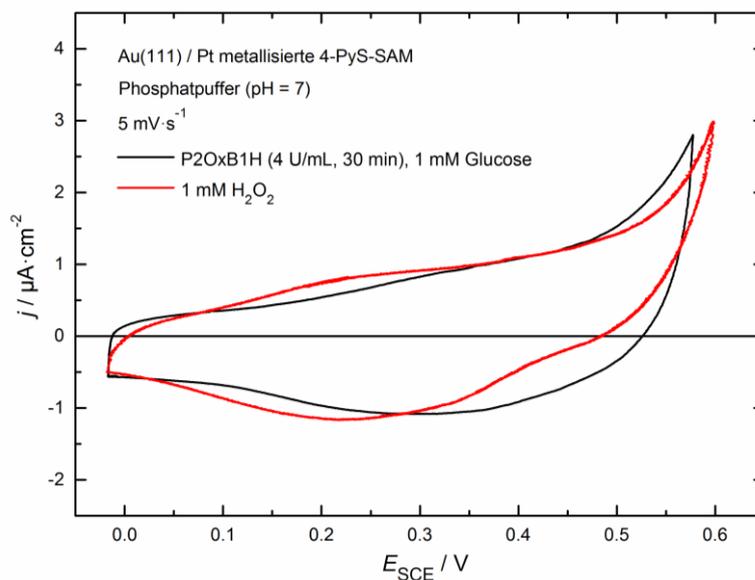


Abbildung 31: Oxidation von Wasserstoffperoxid am Basissystem Au(111)/4-PyS/Pt.

Die Frage, ob Platininseln auf der SAM einen Einfluss auf die Oxidation von H_2O_2 haben, muss gemäß Abbildung 31 verifiziert werden. Das Oxidationspotential von in Lösung befindlichem Wasserstoffperoxid ist deutlich moderater, sobald Platininseln auf der SAM vorhanden sind. Bereits bei 0.5 V erfolgt die H_2O_2 -Oxidation an den katalytisch aktiven Platininseln. Den Trend, dass Platinoberflächen für die Oxidation von H_2O_2 deutlich besser geeignet sind als Goldoberflächen, belegen auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Hall *et al.* [117]. Ihre Publikation zeigt den Beginn der Oxidation von H_2O_2 ($\text{pH} = 7.3$) auf einer reinen Platinelektrode ab einem Elektrodenpotential von 0.3 V.

Abbildung 32 zeigt den Stabilitätsbereich des Platin-metallisierten SAM-Systems auf der Au(111)-Oberfläche im Phosphatpuffer (pH = 7). Die Strom-Spannungskurve resultiert hauptsächlich aus kapazitiven Strömen basierend auf der Ladungsumverteilung in der elektrochemischen Doppelschicht. Es wird ersichtlich, dass dieses System bis zu Elektrodenpotentialen von 0.6 V stabil ist.

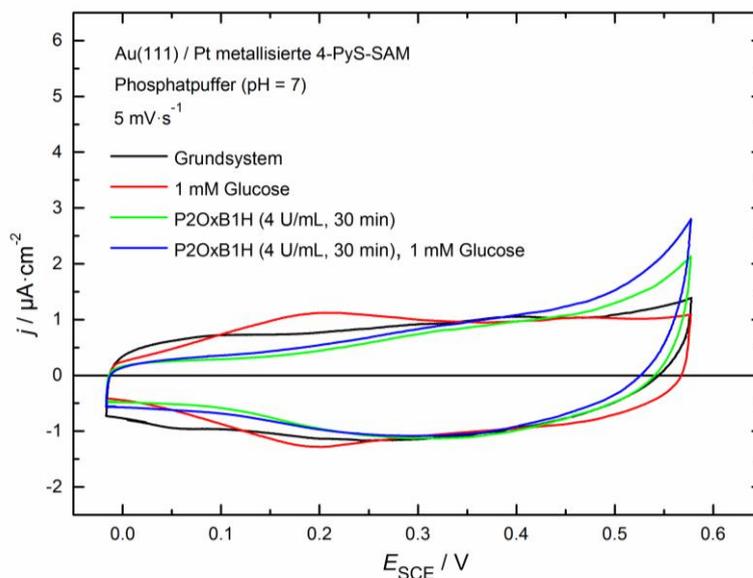


Abbildung 32: Immobilisierung von P2OxB1H auf Platininseln im System Au(111)/4-PyS/Pt.

Das erhaltene Potentialfenster erlaubt nun die Aussage, dass folglich Enzym-Messungen bei Elektrodenpotentialen über 0.6 V nicht geeignet sind, da bei hohen anodischen Potentialen die SAM desorbieren und die Goldoberfläche Goldoxidschichten ausbilden würde. Maskovos *et al.* zeigten, dass diese Goldoxidschichten in hohem Maße befähigt sind, als katalytisch wirksame Spezies die Glucose-Oxidation zu fördern [118]. Um zu verhindern, dass Glucose mit der Goldoberfläche überhaupt reagieren kann, enthält der hier verwendete Phosphat-Puffer stets Chlorid-Ionen. Somit passivieren sowohl die SAM als auch Chlorid-Ionen die Goldoberfläche, wodurch explizit im Stabilitätsbereich eine Glucose-Oxidation auszuschließen ist.

Es stellt sich die Frage, ob D-Glucose mit den Platininseln reagiert und daran umgesetzt wird. Aufschluss darüber gibt ebenfalls Abbildung 32. Bei 0.15 V besteht die Möglichkeit, dass Glucose-Moleküle auf den Platininseln reversibel adsorbieren bzw. desorbieren (rote Kurve). Park *et al.* untersuchten bereits die Oxidation von Glucose auf Platinelektroden und stellten fest, dass Glucose-Moleküle durchaus im neutralen Medium auf Platinelektroden adsorbieren können [119]. In Abbildung 32 ist dieser

Effekt jedoch nicht stark ausgeprägt. Ein Grund hierfür könnte die niedrige Bedeckung der Platininseln (7-10 % vgl. mit Au(111)) sein. Eventuell besteht die Möglichkeit, dass der Prozess bei höheren Glucose-Konzentrationen stärker ausgeprägt ist, was jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit steht. Die Abwesenheit der Stromanstiege in anodischer Vorschubrichtung, ab Elektrodenpotentialen positiver als 0.3 V, deutet auf die Inaktivität der Glucose-Oxidation hin. Abbildung 32 thematisiert zudem die Situation rund um die Enzymimmobilisierung von P2OxB1H, *ohne* Enzym-Linker. Auffallend hierbei ist der Beginn eines Stromanstiegs ab 0.45 V (grüne Kurve). Da P2OxB1H insgesamt über vier kovalent angebundene FAD-Komponenten verfügt, werden diese möglicherweise oxidiert, was auf einen direkten Elektronentransfer hindeuten könnte. Werden dem System zusätzlich Glucose-Moleküle beigefügt, treten bereits ab 0.4 V erhöhte Ströme auf (blaue Kurve). Der Grund hierfür ist die einsetzende Reaktion zwischen Glucose und einer der vier FAD-Komponenten, wobei H_2O_2 erzeugt wird, welches an den Platininseln oxidiert wird. Die Ergebnisse deuten somit drauf hin, dass die Platininseln auf der 4-PyS-SAM durchaus befähigt sind, katalytische Umsätze, wie hier die Oxidation von H_2O_2 , zu fördern.

4.4 Glucose-Sensor mit Enzym-Linker Polyallylamin

Die Wahl des Enzym-Linkers fiel auf das Polymer Polyallylamin. Als Grund hierfür sei angemerkt, dass Polyallylamin als funktionelle Gruppe eine Aminogruppe besitzt. Daher besteht die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen einer Carbonsäuregruppe von P2OxB1H und einer Aminogruppe des Polyallylamins, wodurch eine kovalente Amidbindung [8] entsteht, siehe Abbildung 33. Alternativ könnte die Carbonsäuregruppe von P2OxB1H mittels den Kupplungsreagenzien EDC/NHS in einen aktivierten NHS-Ester umgewandelt werden, welcher für die Umsetzung mit Polyallylamin zur Verfügung steht.

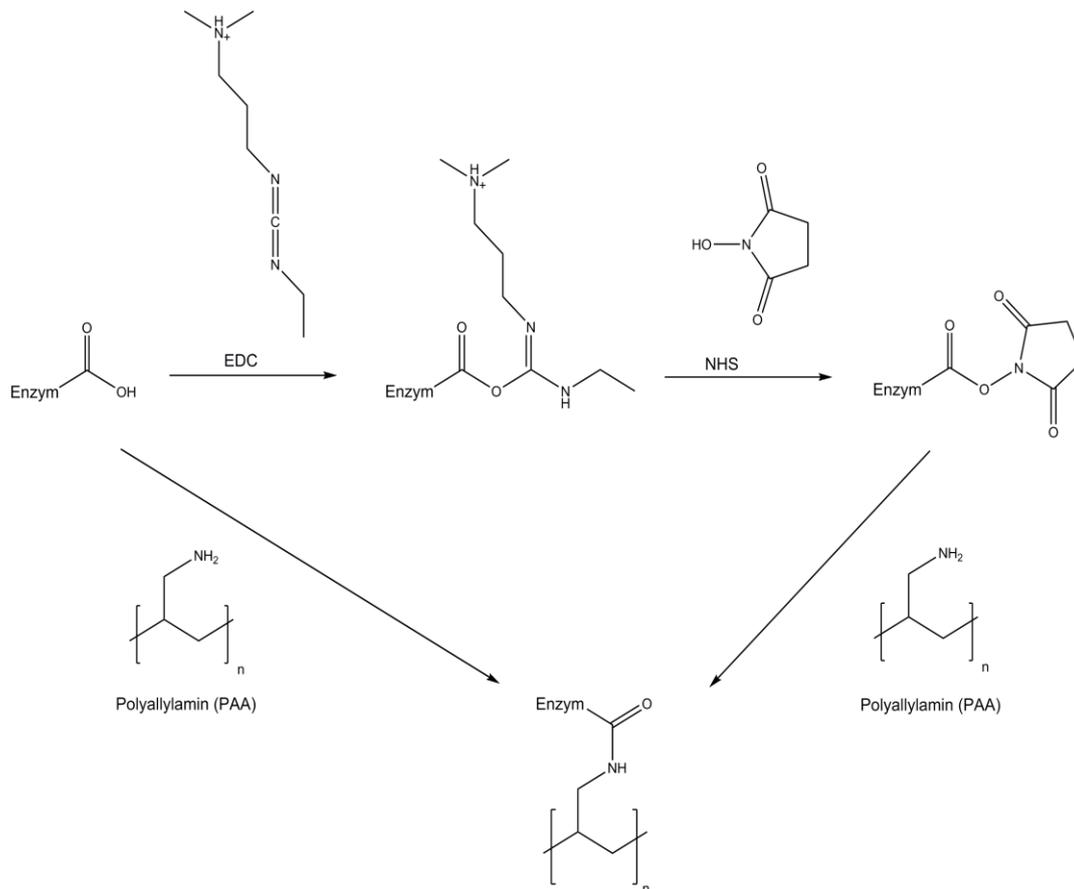
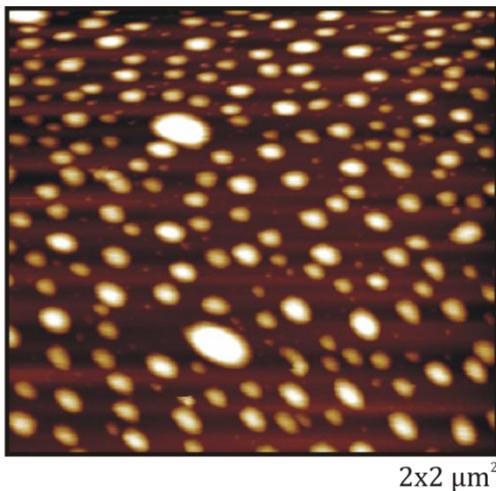


Abbildung 33: Übersicht zur Anbindung von P2OxB1H an den Linker Polyallylamin.

Nachdem das Polymer auf der mit Platininseln bedeckten 4-PyS-SAM aufgebracht wurde, stellt sich die Frage, wie die Oberflächentopographie ermittelt werden kann. *In-situ* AFM-Experimente eignen sich als Methode, um Enzym-Topographien zu bestimmen.

a)



b)

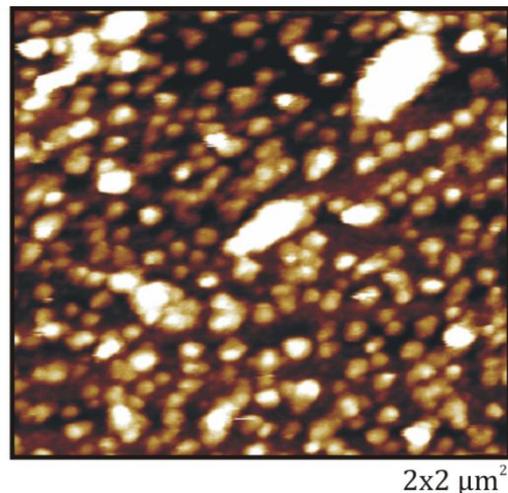


Abbildung 34: *In-situ* AFM-Abbildung der Oberflächentopographie der mit Platin modifizierten 4-PyS-SAM auf Au(111), nach Modifizierung mit: a) Polyallylamin, b) P2OxB1H kovalent gebunden an Polyallylamin.

Deutlich erkennbar sind nun PAA-Polymeragglomerate, die sich homogen über die Oberfläche verteilen. Der gemittelte Agglomeratdurchmesser beträgt 200 nm und die Systemhöhe weist 50 nm auf (Abbildung 34 a). Die gebundenen Enzyme innerhalb der PAA-Schicht verursachen eine deutlich verzweigtere Agglomerat-Struktur. Dabei variieren die Durchmesser zwischen 100-450 nm und es wird eine Systemhöhe von 100 nm festgestellt (Abbildung 34 b). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die P2OxB1H-Enzyme in die Polymermatrix eingebettet werden. Das erhaltene AFM-Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die mechanische Beschaffenheit der komplexen SAM-Struktur für STM-Experimente nicht geeignet ist.

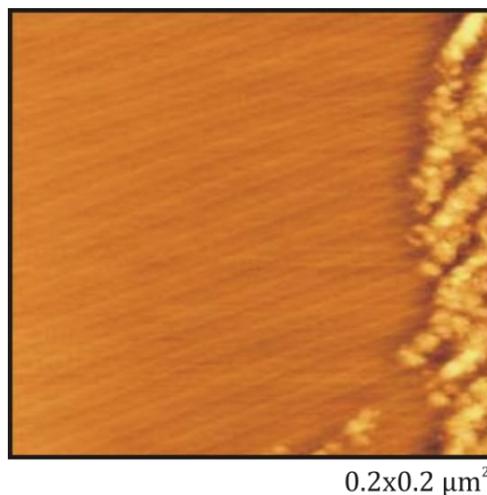


Abbildung 35: Versuch zur Abbildung der Polyallylamin-Topographie auf der mit Platin modifizierten 4-PyS-SAM auf Au(111) mittels *in-situ* STM, nach [120].

In der Tat verursacht die STM-Spitze eine Bewegung des modifizierten Polymer-Systems auf der metallisierten 4-PyS-SAM. Die STM-Spitze sorgt für einen Bindungsbruch zwischen der Au(111)-Oberfläche und dem Schwefel-Atom der modifizierten SAM. Das komplette System wird durch die Spitze von der Au(111)-Oberfläche gerissen und an den Rand geschoben.

Eine Zerstörung des PAA-Films im Stabilitätsbereich der SAM kann aufgrund der aufgenommenen Strom-Spannungskurven, siehe Abbildung 36, ausgeschlossen werden. Ebenfalls gibt es keine ersichtlichen Veränderungen mit und ohne Anwesenheit von Glucose in Lösung (rote bzw. schwarze Kurve).

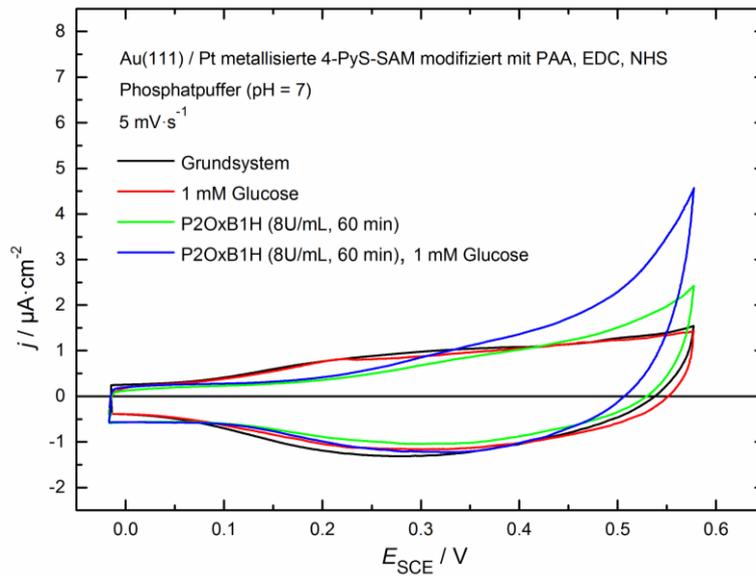


Abbildung 36: Immobilisierung von P2OxB1H mittels PAA-Linker im System Au(111)/4-PyS/Pt/PAA.

Als Rückschluss kommt damit in Betracht, dass an der Polymerschicht *ohne* immobilisiertes Enzym keine Glucose-Umsetzung stattfinden sollte. Bezüglich der enzymatischen Reaktion mit Glucose ist das Reaktionsprodukt H_2O_2 bei 0.32 V detektierbar (blaue Kurve). Weniger stark ausgeprägt hingegen ist ein möglicher direkter Elektronentransfer am aktiven Enzym-Zentrum in Abwesenheit von Glucose in Lösung (grüne Kurve).

Mit Hilfe von amperometrischen Messungen sollte im Folgenden der in Abbildung 36 untersuchte Glucose-Sensor charakterisiert werden. Gajdzik *et al.* versuchten bereits durch Glucose-Zuspritzexperimente den Sättigungsstrom dieses Glucose-Sensors zu bestimmen [121], welcher bei 0.56 V in der Größenordnung von wenigen mA/cm^2 lag. Gooding *et al.* untersuchten eine ähnliche enzymatische Reaktion zwischen Glucose und Glucose-Oxidase (GOx), welches mit Hilfe der SAM 3-Mercaptopropionsäure, auf einer Platin-nanostrukturierten Goldelektrode immobilisiert wurde. In pH neutralem Elektrolyt wurden bei 0.65 V allerdings Sättigungsströme in der Größenordnung von wenigen $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ detektiert [122]. Warum das homotetramere Enzym P2OxB1H im Vergleich zum dimeren Enzym GOx in einem ähnlichen System um einen Faktor von 1000 aktiver sein sollte, war nicht verständlich und kann mithilfe von Abbildung 37 als unwahrscheinlich erachtet werden. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich um einen Messbereichfehler [121] handeln könnte.

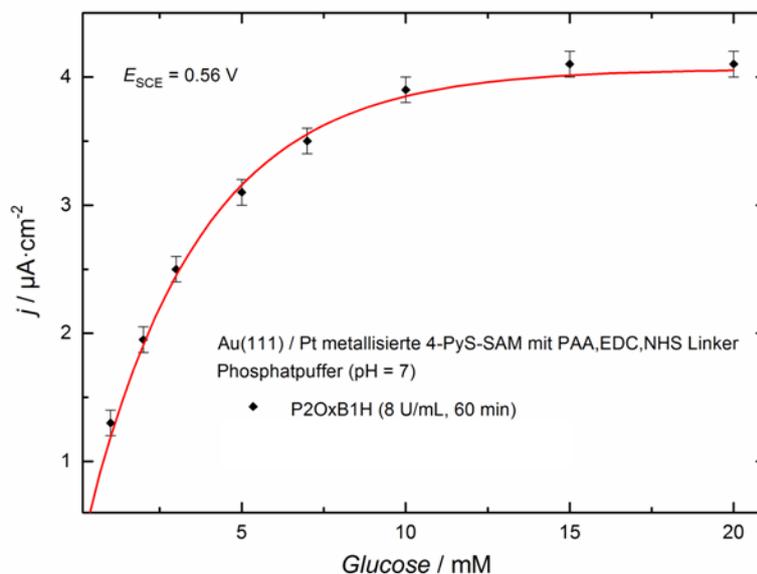


Abbildung 37: Darstellung des amperometrischen Glucose-Sensors, in welchem PAA, EDC und NHS als P2OxB1H-Linker eingesetzt wird. Die Glucose-Konzentration in Lösung wurde jeweils vorgelegt.

Die kovalente Bindung des Enzyms P2OxB1H an die PAA-Polymerschicht, auf einer mit Platininseln modifizierten 4-PyS-SAM, ergibt bei 0.56 V einen Sättigungsstrom von 4 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Wie kann der Sättigungsstrom und folglich die Enzym-Aktivität erhöht werden? Eine Möglichkeit stellt die Erhöhung der Enzym-Bedeckung dar. Hier wurde jedoch einer anderen Fragestellung nachgegangen und zwar sollte mit Hilfe eines geeigneteren Enzym-Linkers versucht werden, die Ausbeute des gebundenen Enzyms zu steigern.

4.5 Glucose-Sensor mit Enzym-Linker 2-Thiobarbitursäure

Nachdem sich im vorherigen Kapitel das Polymer PAA flächendeckend als Agglomerate über die modifizierte Oberfläche erstreckte, wurde der Fokus auf einen Enzym-Linker gelegt, welcher ein möglichst kleines, mehrfachfunktionelles organisches Molekül darstellt. Verheißungsvoll könnte, beim Blick auf dessen mesomere Grenzstrukturen, die Verwendung von 2-Thiobarbitursäure (2-TBA) sein.

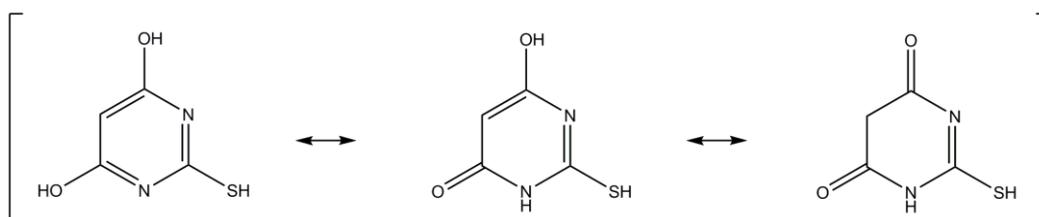


Abbildung 38: Mesomere Grenzstrukturen von 2-TBA.

Abbildung 38 visualisiert diese mesomeren Grenzstrukturen, wobei deutlich wird, dass 2-TBA über Hydroxylgruppen, eine Thiolgruppe sowie freie Elektronenpaare an N-Atomen verfügt. STM-Untersuchungen bestätigen die flache Adsorption von 2-TBA, helle Spots, auf den Platininseln [120].

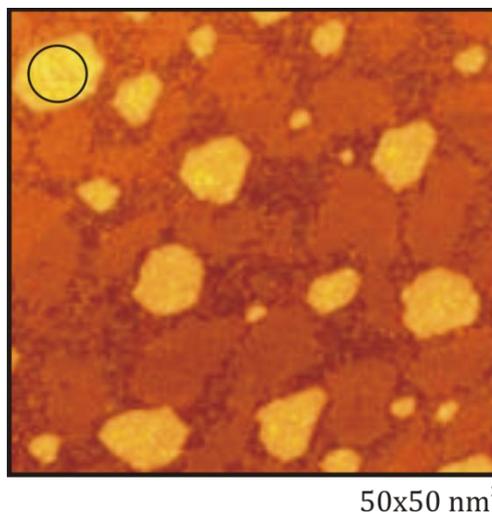


Abbildung 39: *In-situ* STM-Aufnahme von 2-TBA auf den Platininseln der 4-PyS-SAM, nach [120].

Um als Enzym-Linker zu fungieren, sollte 2-TBA in der Lage sein mit P2OxB1H eine kovalente Bindung auszubilden. Abbildung 40 zeigt eine mesomere Grenzstruktur in welcher 2-TBA als ungesättigte β -Hydroxy-Carbonylverbindung vorliegt. Aus dieser Form könnte ein nukleophiler Angriff auf das Carbonyl-C-Atom einer im P2OxB1H ansässigen Carbonsäure-Gruppe stattfinden, wodurch unter Wasserabspaltung eine 1,3-Dicarbonylverbindung gebildet wird.

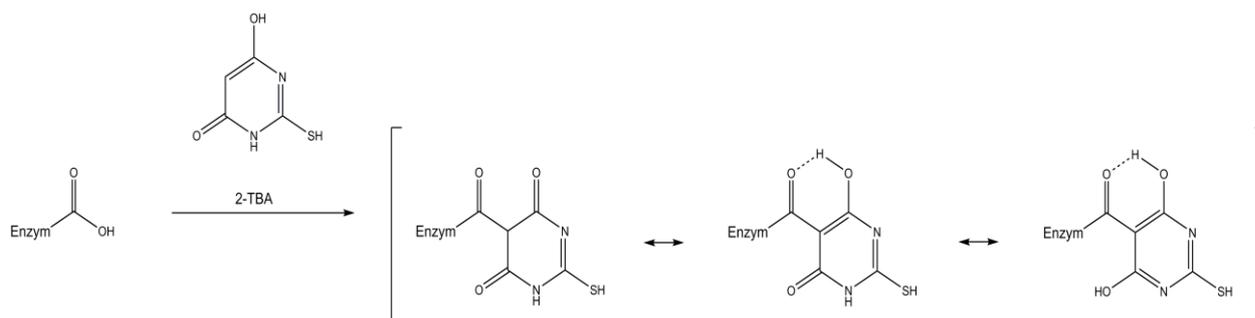


Abbildung 40: Übersicht zur Anbindung von P2OxB1H an 2-TBA.

Diese 1,3-Dicarbonylverbindung unterliegt nun einer Enolisierungstendenz aufgrund des Bestrebens, ein konjugiertes π -System ausbilden zu können. Der resultierende Energiegewinn stellt die Triebkraft der Reaktion dar.

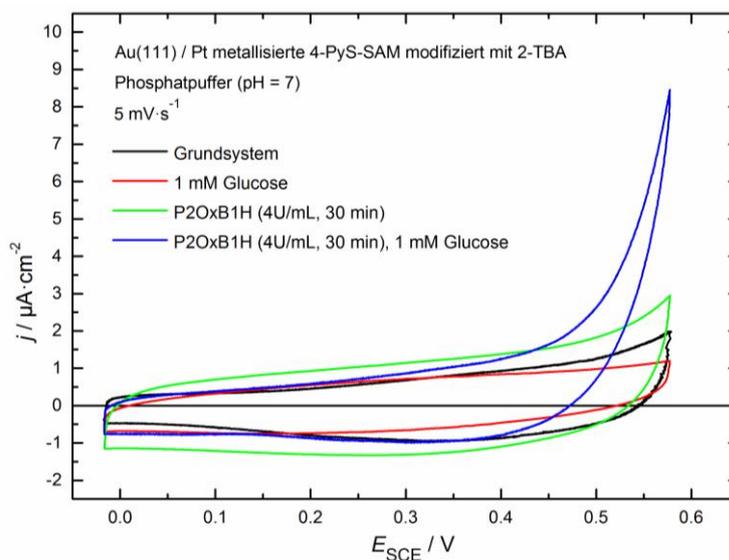
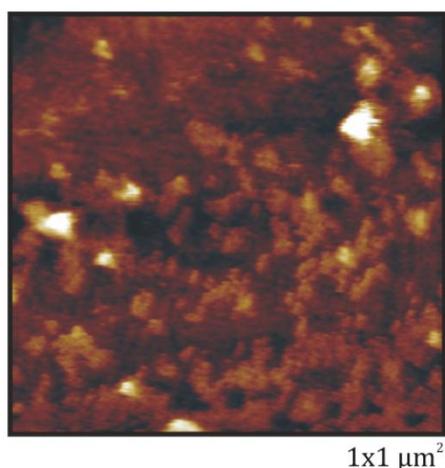


Abbildung 41: Immobilisierung von P2OxB1H mittels 2-TBA Linker im System Au(111)/4-PyS/Pt/2-TBA.

Es scheint eine stabilisierende Wechselwirkung zwischen 2-TBA und Glucose (rote Kurve) zu geben, welche im Zykelvoltammogramm ohne Glucose (schwarze Kurve) nicht auftritt, siehe Abbildung 41. Die Detektion des Reaktionsprodukts H₂O₂ ist sehr stark ausgeprägt und erfolgt bereits bei moderaten Bedingungen von 0.25 V (blaue Kurve).

Im Folgenden werden *in-situ* AFM-Messungen einen Einblick in die Oberflächentopographie der funktionalisierten Elektrode geben. Dabei wird sowohl der Einfluss der Enzym-Modifikationszeit als auch die Variation der P2OxB1H-Konzentration untersucht.

a)



b)

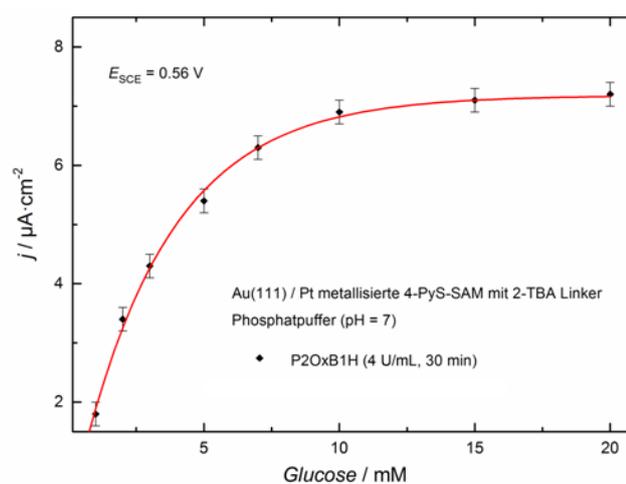


Abbildung 42: Immobilisierung von P2OxB1H (4 U/mL, 30 min) mit 2-TBA-Linker: a) *in-situ* AFM-Topographie, b) Antwort des amperometrischen Glucose-Sensors.

In-situ AFM visualisiert, nach der Immobilisierung von P2OxB1H (4 U/mL, 30 min) durch den 2-TBA-Linker, das Enzym P2OxB1H mit den Maßen (4 nm x 6 nm x 13 nm). Die Enzym-Topographie ändert sich daher signifikant durch die Wahl des Enzym-Linkers. Es werden Enzyme in runder Form detektiert (helle Spots). Wie wirkt sich nun diese Veränderung der P2OxB1H-Oberflächentopographie auf die Reaktivität bezüglich Glucose aus? Der kleine, organische 2-TBA-Linker ermöglicht es dem kovalent gebundenem Enzym in eine geeignetere geometrische Anordnung, mit einer näheren räumlichen Anbringung des aktiven Zentrums an die Platininseln, überführt zu werden. Bei 0.56 V wird ein Sättigungsstrom von 7.2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ erhalten. Der detektierte Sättigungsstrom, verglichen mit dem PAA-Linker, ist bereits höher und das, obwohl nur die Hälfte an Enzymkonzentration eingesetzt wurde.

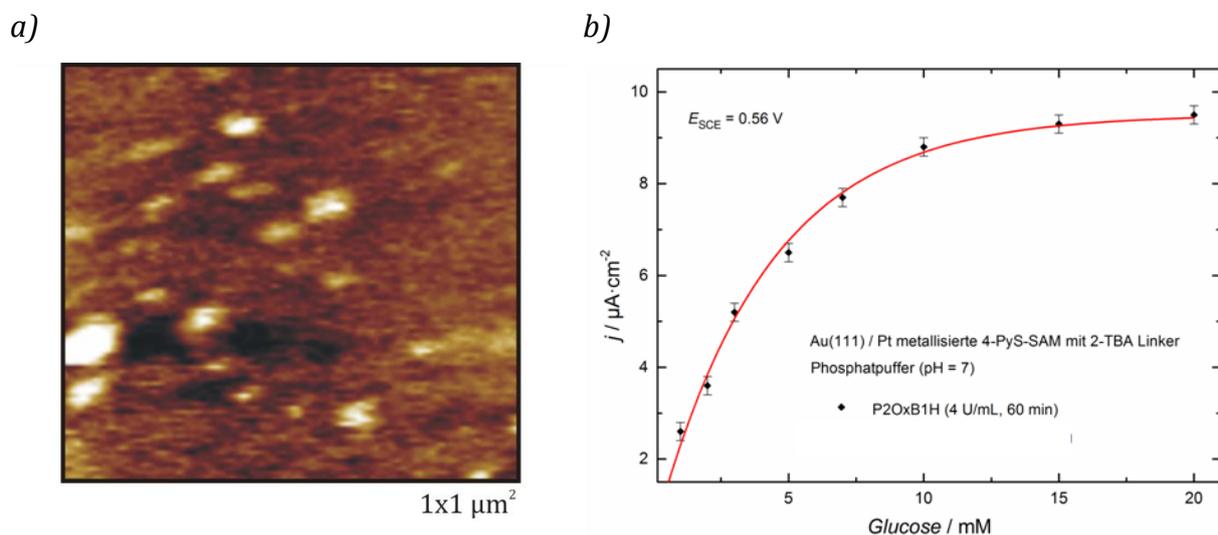


Abbildung 43: Immobilisierung von P2OxB1H (4 U/mL, 60 min) mit 2-TBA-Linker: a) *in-situ* AFM-Topographie, b) Antwort des amperometrischen Glucose-Sensors.

Eine Erhöhung der Enzym-Modifikationszeit von 30 auf 60 Minuten führt zu einer erhöhten Bedeckung, wobei die Enzymgröße (6 nm x 10 nm x 15 nm) darauf schließen lässt, dass ein Enzym auf einer Platininsel immobilisiert wurde. Amperometrische Messungen zeigen, dass diese Enzym-Anordnung bei 0.56 V zu einer erneuten Steigerung des Sättigungsstroms auf 9.5 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ führt.

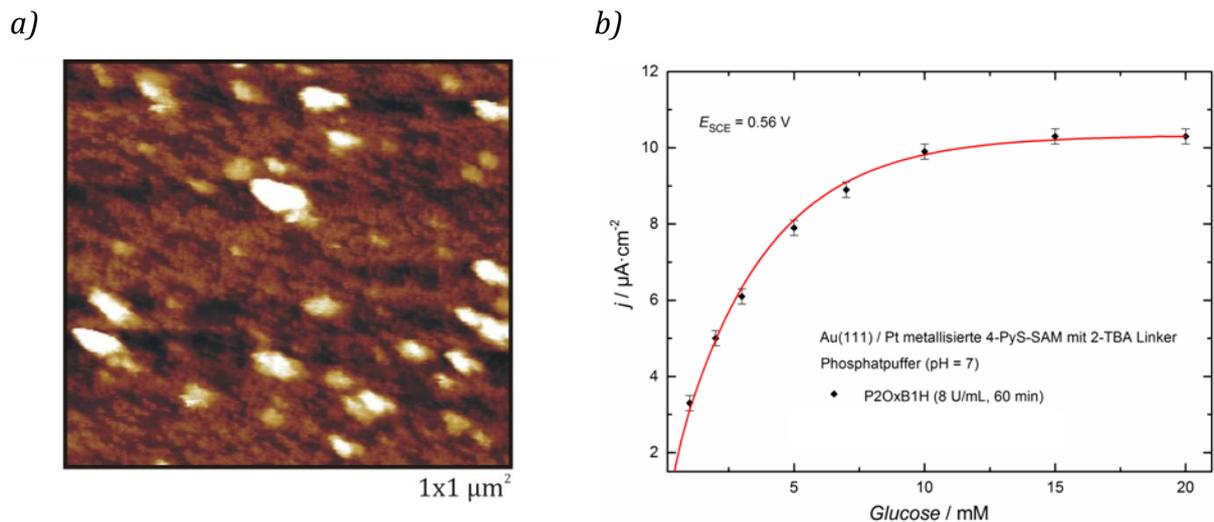


Abbildung 44: Immobilisierung von P2OxB1H (8 U/mL, 60 min) mit 2-TBA-Linker: a) *in-situ* AFM-Topographie, b) Antwort des amperometrischen Glucose-Sensors.

Durch die Erhöhung der Enzymkonzentration auf 8 U/mL bei gleichbleibender Enzym-Modifikationszeit (60 Minuten) wird erneut eine zunehmende Bedeckung festgestellt. Die Größe der Enzyme hat sich nicht verändert, allerdings beträgt die Systemhöhe 30 nm. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass ein geringer Anteil der Enzyme nicht an 2-TBA kovalent gebunden ist, da kein Platz mehr zur Verfügung stand. Dementsprechend könnten Enzym-Enzym-Wechselwirkungen zur Ausbildung von Enzym-Clustern in mehreren Lagen geführt haben. Da nahezu alle Platininseln mit Enzymen belegt sind, sollten zwangsläufig nur minimal höhere Sättigungsströme bei 0,56 V erhalten werden, was bei einem Sättigungsstrom von $10,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ tatsächlich der Fall ist.

4.6 Übersicht der amperometrischen Glucose-Sensoren

Die Wahl der Enzym-Linker hat einen großen Einfluss auf die Glucose-Umsetzung in diesem Modellsystem. Ohne Enzym-Linker sind die Enzyme völlig zufällig orientiert und zeigen, wie in Abbildung 45 erkennbar, einen geringen Umsatz von Glucose. Der Polymer-Linker mit und ohne EDC und NHS, bewirkt eine günstigere Anordnung der Enzyme in der Polymerschicht. In beiden Fällen werden identische Strom-Spannungskurven bezüglich der Umsetzung mit Glucose erhalten. Eine Optimierung des Systems gelingt durch die kovalente Anbindung der Enzyme durch den 2-TBA-Linker.

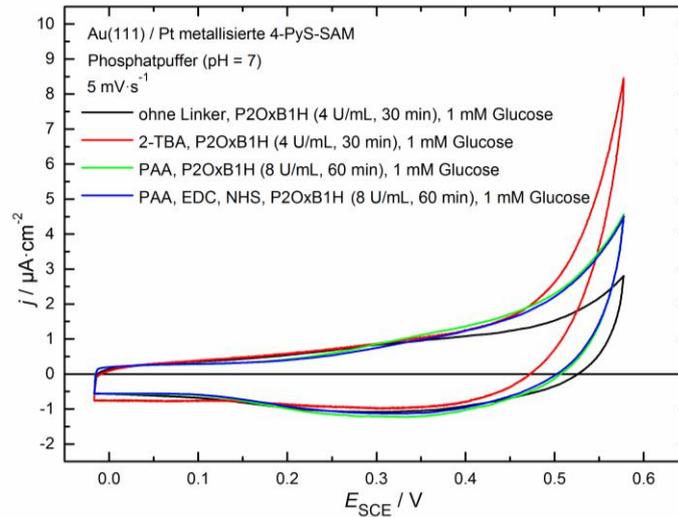


Abbildung 45: Übersicht der Strom-Spannungskurven bei der Umsetzung von Glucose (1 mM) im Phosphatpuffer (pH = 7), unter Verwendung unterschiedlicher Enzym-Linker für die Immobilisierung von P2OxB1H.

Um die maximale Stromdichte (I_{\max}) der vorgestellten amperometrischen Glucose-Sensoren vergleichen zu können, sei auf Abbildung 46 verwiesen, wobei ohne Enzym-Immobilisierung keine Glucose-Umsetzung stattfindet.

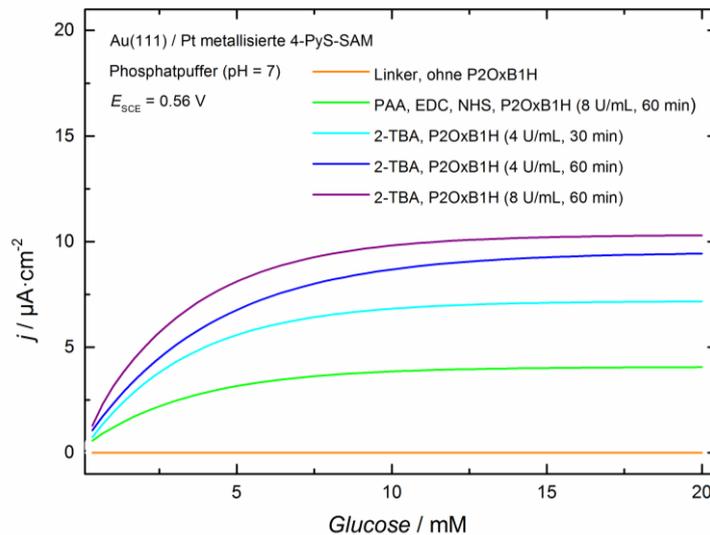


Abbildung 46: Charakterisierung der amperometrischen Glucose-Sensoren.

Die Charakterisierung der Glucose-Sensoren erfolgt gemäß einer modifizierten Lineweaver-Burk-Auftragung

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{K_M}{I_{\max}} \frac{1}{[\text{Glucose}]} + \frac{1}{I_{\max}} \quad (24)$$

aus welcher die Auftragung I^{-1} gegen die reziproken Glucose-Konzentration $[\text{Glucose}]^{-1}$ vorgenommen wird und über den Schnittpunkt mit der Abszisse letztlich K_M bestimmt werden kann [50]. Die Michaelis-Konstante K_M ist dabei die Substratkonzentration, bei der genau die Hälfte aller Enzymzentren mit Glucose besetzt ist.

Enzym-Linker / Enzym-Modifikationsparameter	K_M (mM)	I_{\max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	Sensitivität ($\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$)
PAA, EDC, NHS/ P2OxB1H (8 U/mL, 60 min)	1.85	4.0	2.16
2-TBA / P2OxB1H (4 U/mL, 30 min)	2.72	7.2	2.65
2-TBA / P2OxB1H (4 U/mL, 60 min)	2.68	9.5	3.54
2-TBA / P2OxB1H (8 U/mL, 60 min)	1.72	10.5	6.10

Tabelle 3: Vergleich der in dieser Arbeit elektrochemisch bestimmten Parameter der amperometrischen Glucose-Sensoren. Aufgelistet sind die Michaelis-Menten-Konstante (K_M), der maximal mögliche Sättigungsstrom (I_{\max}) und die Sensitivität (K_M/I_{\max}).

Mit Hilfe von Tabelle 3 ist ein Vergleich der hier vorgestellten amperometrischen Glucose-Sensoren möglich. Als erster Aspekt wird festgestellt, dass die Michaelis-Konstanten im Bereich zwischen 1.7-2.7 mM L⁻¹ liegen. Da Blutzucker-Sensoren sehr fein dosiert im Bereich <6.1 mM L⁻¹ (nüchterner Blutzucker-Gehalt) sowie >7 mM L⁻¹ (Diabetes-Erkrankung) messen müssen und sich der lineare Bereich der hier vorgestellten Glucose-Sensoren nicht so weit erstreckt, sind diese Glucose-Sensoren für kommerzielle Anwendungen nicht geeignet [123].

Der K_M -Wert ist eine enzyspezifische Größe und variiert in geringem Maße aufgrund nanostrukturierter, konfigurativer Unterschiede im Aufbau der Glucose-Sensoren, wobei insbesondere die Zugänglichkeit von Glucose an das aktive Enzymzentrum unterschiedlich beeinflusst wird. Auffallend ist, dass die eingesetzte Enzymmenge (8 U/mL) zu einem K_M -Wert von ~ 2.7 mM L⁻¹ führt, während die Enzymmenge (4 U/mL) lediglich ~ 1.7 mM L⁻¹ aufweist.

Ein zweiter Aspekt ist die Sensitivität (K_M / I_{\max}) der Glucose-Sensoren. Dabei wird deutlich wie stark die aus *in-situ* AFM-Messungen erhaltene Enzym-Topographie Einfluss auf die Umsetzung der Glucose (I_{\max}) nimmt. Die Enzym-Immobilisierung durch den Polymer-Linker PAA unter der Modifikationsbedingung (8 U/mL, 60 min) führte zu einer Sensitivität von $2.16 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Gemäß Tabelle 3 scheint die Enzym-Einbettung in diese Agglomeratstruktur weniger geeignet zu sein als eine gleichmäßige Enzym-Verteilung wie im Fall der Enzym-Immobilisierung durch den 2-TBA-Linker. Selbst die Hälfte an eingesetzter Enzymmenge (4 U/mL, 30 min) zeigt bereits eine Sensitivitätssteigerung auf $2.65 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Durch die Optimierung der Modifikationsbedingungen (4 U/mL, 60 min bzw. 8 U/mL, 60 min) konnte die Sensitivität auf $3.54 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bzw. $6.1 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ gesteigert werden. Unter den gleichen Modifikationsbedingungen konnte im Fall der Enzym-Immobilisierung durch den 2-TBA-Linker, verglichen mit der Enzym-Anbindung durch den Polymer-Linker PAA, damit eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 2.8 festgestellt werden.

Luhana *et al.* zeigen eine Übersicht von Glucose-Sensoren in denen ebenfalls Platin-Nanopartikel eine zentrale Rolle einnehmen [52]. Dabei wird jedoch das Reaktionsprodukt H_2O_2 aus der Reaktion zwischen immobilisierten Glucose-Oxidase-Enzymen (GOx) und Glucose gebildet. Ausgeprägte lineare Bereiche bis $\sim 10 \text{ mM L}^{-1}$ werden dabei insbesondere in Sensoren mit fein verteilten Platin-Nanopartikeln auf Kohlenstoffnanoröhren (engl. *multiwall carbon nanotubes*, MWCNT) bzw. Kohlenstoff-Kapseln (engl. *hollow carbon spheres*, HCS) realisiert.

Die hier vorgestellten amperometrischen Glucose-Sensoren weisen diesbezüglich einen deutlich kleineren linearen Bereich auf, jedoch ist deren Sensitivität in der gleichen Größenordnung. Folglich muss für die Optimierung von Glucose-Sensoren ein Zusammenspiel von vier Faktoren vorhanden sein: Eine homogene Verteilung von Platin-Nanopartikeln, im System integrierte Enzym-Linker, ein möglichst moderates Elektrodenpotential und Elektrolytbedingungen im neutralen Bereich. Wünschenswert ist ebenfalls eine Biokompatibilität der beteiligten Komponenten für *in-vivo* Anwendungen.

5 DNA-basierte Sensoren: Aufbau und Charakterisierung

5.1 Elektrochemische Betrachtung der Au(SSV)-Elektrode

Grundvoraussetzung für Messungen mit DNA-Oligonukleotiden ist die Auswahl eines geeigneten Elektrolyten, in welchem sich die DNA-Struktur nicht irreversibel zersetzt. Diese Anforderung erfüllt Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Puffer), welcher in zahlreichen biologischen Systemen verwendet wird. Als Leitsalz wird NaCl beigefügt, wobei die eingesetzte NaCl-Konzentration für die Ausbreitung der elektrochemischen Doppelschicht verantwortlich ist.

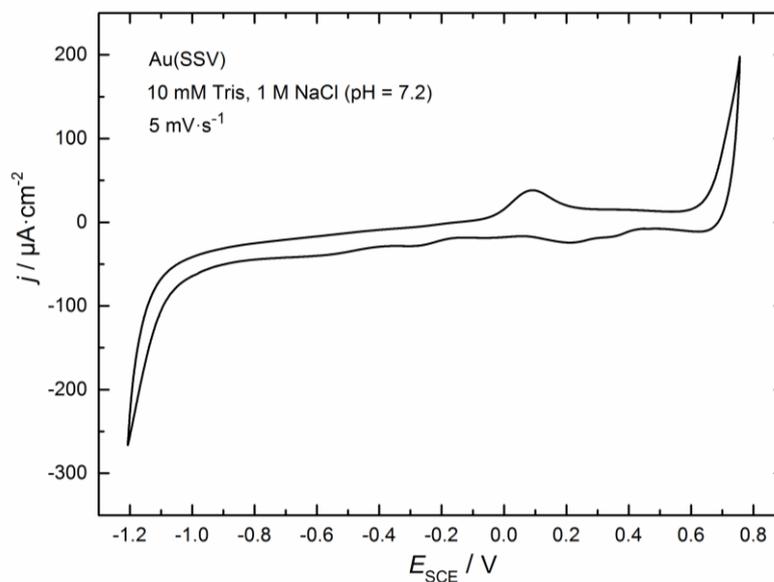


Abbildung 47: Strom-Spannungskurve des Au(SSV)-Substrats unter dem Einfluss von NaCl (1 M) im Tris-Puffer (pH = 7.2).

Auffallend ist hierbei, dass bei Elektrodenpotentialen negativer als -1.05 V zunehmend eine Wasserstoffentwicklung auf der Substratoberfläche einsetzt. Dieser Potentialbereich sollte für DNA-Messungen folglich gemieden werden. Oxidative Prozesse wie die Sauerstoffentwicklung treten in diesem Medium bei Elektrodenpotentialen positiver als 0.6 V auf. Beim Eintauchen bei 0.4 V sind bereits Chlorid-Ionen auf der Oberfläche adsorbiert, welche bei -0.2 V desorbieren und in kathodischer Scanrichtung bei 0.05 V erneut adsorbieren können.

Im SERS-Spektrum des Tris-Puffers (Abbildung 48) ist lediglich eine Raman-Linie, wenn auch nicht stark ausgeprägt, bei ungefähr 1000 cm^{-1} (einfache C-C Bindung) erkennbar.

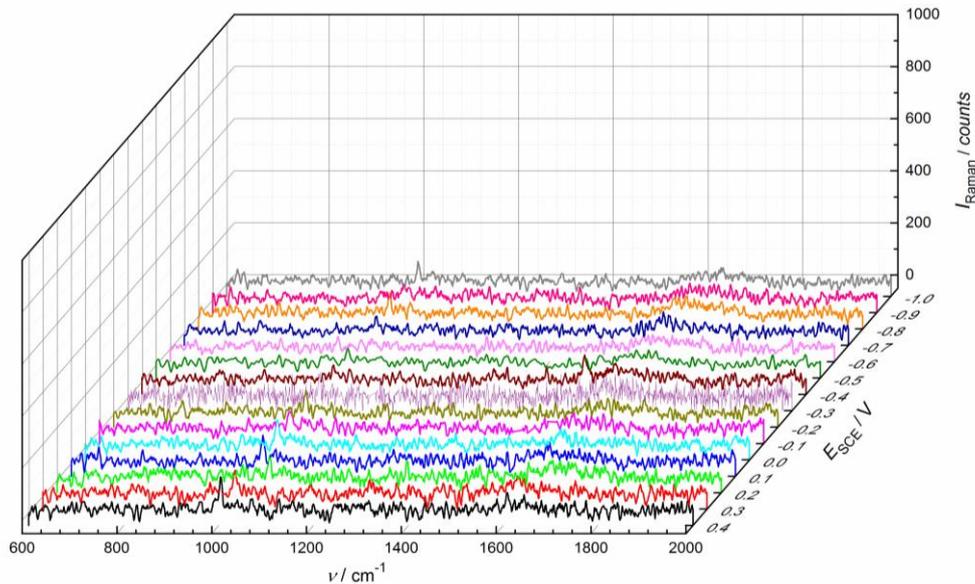


Abbildung 48: SERS-Spektrum des Au(SSV)-Substrats unter NaCl (1 M) im Tris-Puffer (pH = 7.2).

ν (cm ⁻¹)	Aktive Schwingung
1005	C-C <i>Stretching</i>
1600	NH ₂ <i>Scissor</i>

Tabelle 4: Zuordnung der Tris-Schwingungen im SERS-Spektrum [124].

5.2 Ausbildung der Mercaptohexanol-SAM

Im Aufbau der DNA-basierten Sensoren ist die aliphatische Mercaptohexanol-SAM ein unverzichtbarer Baustein. Ohne die Bedeckung der Au(SSV)-Oberfläche durch die SAM wird keine effektive Hybridisierung zwischen DNA-Probenstrang und DNA-Targetstrang gewährleistet. In diesem Fall würde sich der DNA-Targetstrang zufällig auf der Goldoberfläche ablegen. Da SAMs sowohl oxidativ als auch reduktiv desorbiert werden können, gibt das Zyklovoltammogramm in Abbildung 49 Auskunft über den Stabilitätsbereich der adsorbierten Mercaptohexanol-SAM. Deutlich zu sehen ist die reduktive Desorption der Mercaptohexanol-SAM in Form eines Desorptionspeaks, wobei der Desorptionsprozess bei einem Elektrodenpotential zwischen -0.6 V und -0.75 V vollzogen wird.

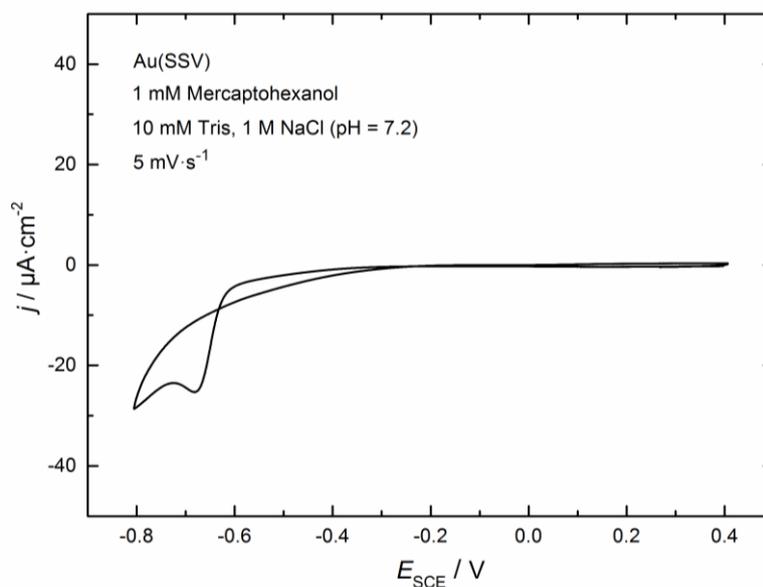


Abbildung 49: Strom-Spannungskurve der adsorbierten Mercaptohexanol-SAM (1 mM) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Das SERS-Spektrum in Abbildung 50 enthält einerseits Raman-Schwingungen des Tris-Puffers und andererseits Raman-Schwingungen der Mercaptohexanol-SAM. Auffallend sind die aliphatischen C-H Schwingungen (1338 cm^{-1}), siehe Tabelle 5, welche bei Elektrodenpotentialen negativer als -0.7 V nicht mehr zu sehen sind. Dies deutet ebenfalls auf die Desorption der SAM hin.

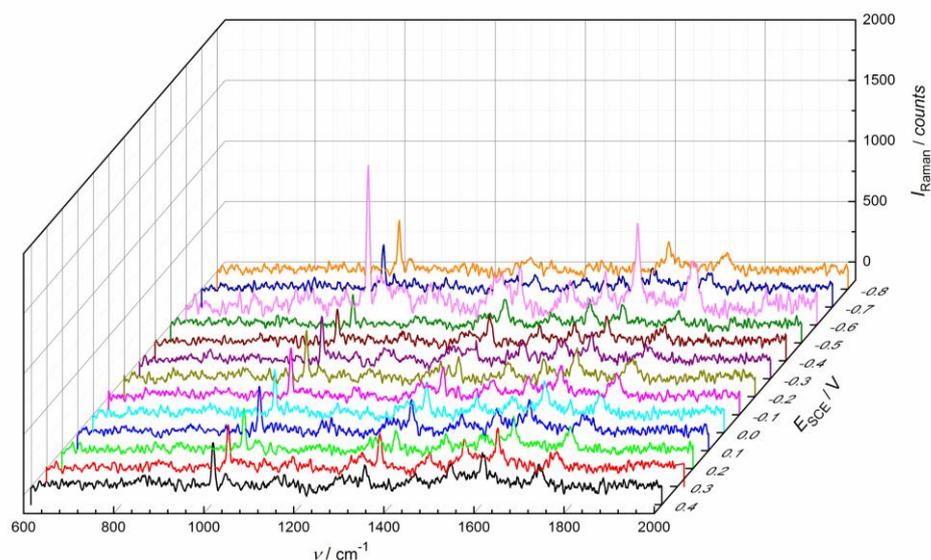


Abbildung 50: SERS-Spektren der adsorbierten Mercaptohexanol-SAM (1 mM) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

ν / cm^{-1}	Aktive Schwingung
1005	C-C <i>Stretching</i>
1338	CH ₂ <i>Wagging</i>
1440	CH <i>Deformation</i>
1530	CNH <i>Scissor</i>
1600	NH ₂ <i>Scissor</i>
1723	Mercaptohexanol-Tris-Schwingung

Tabelle 5: Zuordnung der Mercaptohexanol-Schwingungen im SERS-Spektrum [124, 125].

5.3 Immobilisierung des DNA-Probenstrangs B8881

Der erste Schritt im Aufbau der DNA-basierten Sensoren ist die Chemisorption des DNA-Probenstrangs. In dessen Struktur gibt es drei Dithiol-Linker, wodurch insgesamt sechs Thiole auf dem Goldsubstrat adsorbieren. Die Stabilität des DNA-Probenstrangs sollte folglich stärker ausgeprägt sein als die der Mercaptohexanol-SAM, welche nur eine Thiolbindung pro Molekül für die Adsorption zur Verfügung stellen kann. Mahajan *et al.* bestimmten bereits für den mit drei Dithiol-Linkern ausgestatteten DNA-Probenstrang eine Bedeckung von 1.6×10^{12} Molekülen pro cm^2 , wobei der Abstand zwischen den einzelnen DNA-Strängen rund 8 nm beträgt [18]. Damit steht genügend Platz für die Adsorption von Mercaptohexanol zur Verfügung.

Die Aufnahme der Strom-Spannungskurve aus Abbildung 51 zeigt nun, dass es keinen Reduktionspeak des DNA-Probenstrangs gibt. Bis zu welchem Elektrodenpotential der DNA-Probenstrang tatsächlich auf der Oberfläche adsorbiert ist, lässt sich aus dem Zyklovoltammogramm jedenfalls nicht bestimmen, da sich der gezeigte Bereich nahe am Wasserstoffentwicklungsbereich befindet. Der Strom-Spannungskurve kann zudem die Information entnommen werden, dass Chlorid-Ionen bei -0.2 V desorbieren, was darauf schließen lässt, dass das PZC im Bereich von -0.2 V liegt. In anodischer Scanrichtung adsorbieren Chlorid-Ionen jedoch erst bei 0.15 V, was auf eine kinetische Hemmung in Form von noch adsorbiertem DNA-Probenstrang deutet.

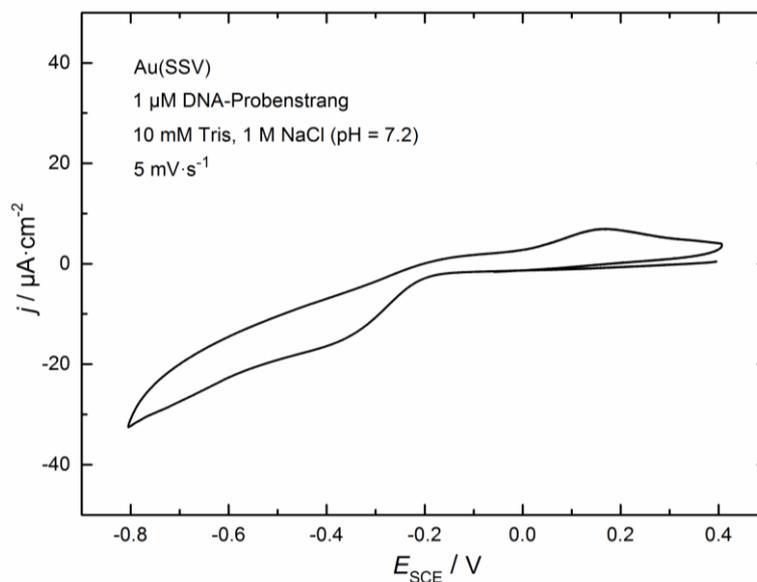


Abbildung 51: Strom-Spannungskurve des DNA-Probenstrangs ($1 \mu\text{M}$) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Das SERS-Spektrum, siehe Abbildung 52, bietet einen Zugang zur Detektion der DNA-Basen des Probenstrangs, da Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin aromatische Ringstrukturen besitzen, deren Schwingungen eine ausgeprägte Raman-Aktivität besitzen. Allen voran die Schwingungsmoden mit einer Änderung der Polarisierbarkeit α in die oberflächennormale Z-Richtung sind besonders aktiv, was durch die Ausbildung der Kneulform der ss-DNA (engl. *single stranded DNA*) begünstigt wird.

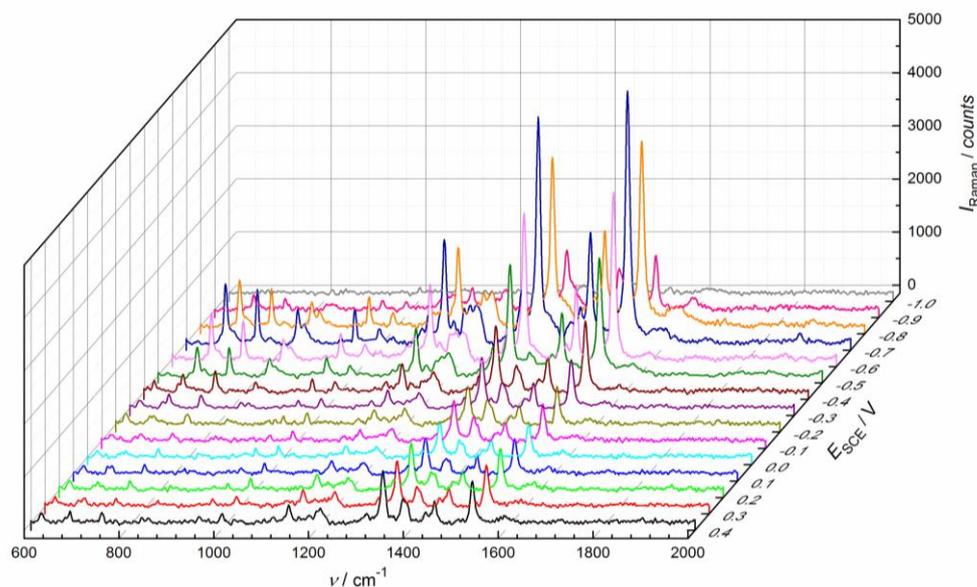


Abbildung 52: SERS-Spektren des DNA-Probenstrangs ($1 \mu\text{M}$) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

ν / cm^{-1}	DNA Base	Aktive Schwingung
692	G	<i>Ring breathing</i>
747	A	<i>Ring breathing</i>
850	C, G	<i>N-C-N Stretching</i>
953	C, G	<i>NH₂ Rocking</i>
1005		<i>C-C Stretching</i>
1143		<i>Deoxyribose phosphate backbone</i>
1212	C, T	<i>Ring-CH₃ Stretching</i>
1342	A, G, T	<i>C-N Stretching</i>
1450	A, C, G, T	<i>C=N Stretching</i>
1531	C, G, T	<i>Ring Stretching</i>
1596	A	<i>NH₂ Deformation</i>

Tabelle 6: Zuordnung der Schwingungsmodi des DNA-Probenstrangs im SERS-Spektrum [126, 127].

Die Strom-Spannungskurve in Abbildung 53, gemessen nach der Modifizierung des DNA-Probenstrangs mit Mercaptohexanol, untermauert die Eigenschaft von SAMs, ein passivierendes Verhalten zu zeigen. Im gesamten Stabilitätsbereich der Mercaptohexanol-SAM werden in kathodischer Scanrichtung keine signifikanten Ströme detektiert.

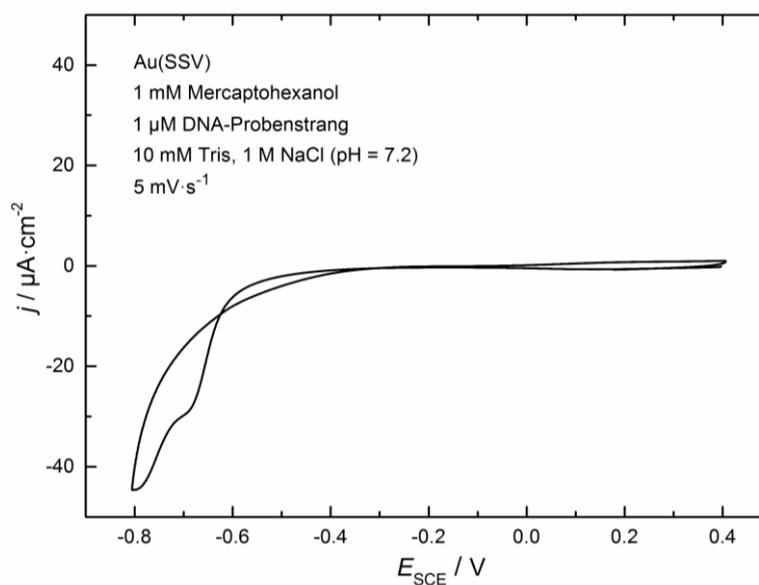


Abbildung 53: Strom-Spannungskurve nach Immobilisierung des DNA-Probenstrangs (1 μM) und Mercaptohexanol (1 mM) auf das Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Über den kompletten angelegten Elektrodenpotentialbereich von 0.4 V bis -1 V werden keinerlei Schwingungsmoden des DNA-Probenstrangs detektiert, siehe Abbildung 54. Die Ursache könnte durch den SAM bedingten, vergrößerten Abstand der DNA-Bestandteile zur Substratoberfläche und damit einer schwächeren Ankopplung an die Substratplasmonen erklärt werden. Einzig C-C-Schwingungsmoden können detektiert werden.

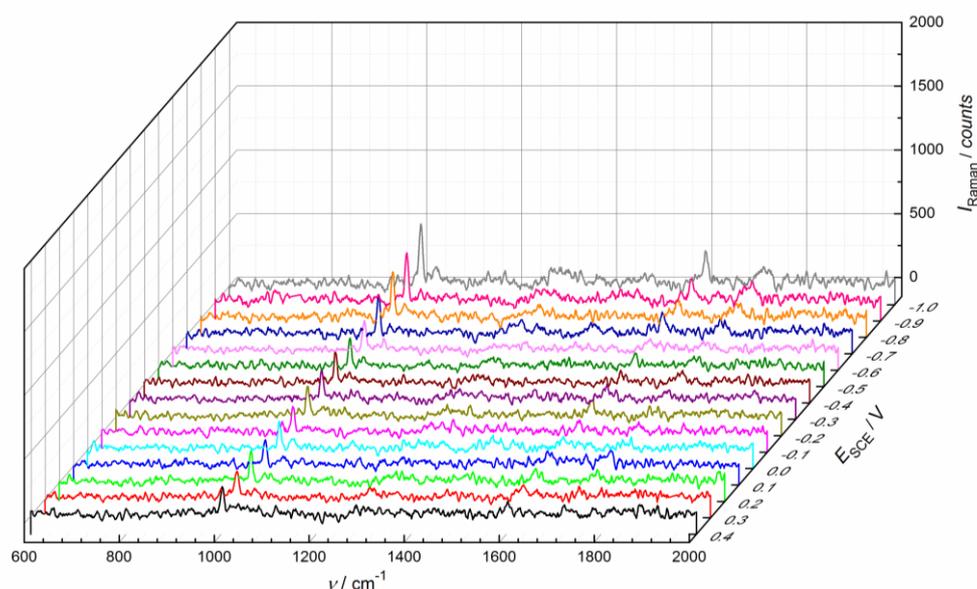


Abbildung 54: SERS-Spektrum nach Immobilisierung des DNA-Probenstrangs (1 μM) und Mercaptohexanol (1 mM) auf das Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

ν / cm^{-1}	Aktive Schwingung
1005	C-C <i>Stretching</i>
1600	NH ₂ <i>Scissor</i>
1723	Mercaptohexanol-Tris-Schwingung

Tabelle 7: Zuordnung der Schwingungen im SERS-Spektrum [124].

5.4 Immobilisierung des DNA-Targetstrangs B8882

Ohne Dithiol-Linker ausgestattet, besitzt der DNA-Targetstrang keine Möglichkeit, auf der Goldoberfläche über eine Gold-Schwefel-Bindung zu chemisorbieren. Aus diesem Grund enthält Abbildung 55 auch keinen Desorptionspeak des DNA-Targetstrangs. Erneut findet die Chlorid-Desorption bei -0.2 V statt. Aufgrund der uneingeschränkten Diffusion des DNA-Targetstrangs gibt es genügend freie Adsorptionsplätze für die Readsorption von Chlorid-Ionen im Rückscan, welche bei 0.05 V und nicht bei 0.15 V, wie im Fall des adsorbierten DNA-Probenstrangs, erfolgt.

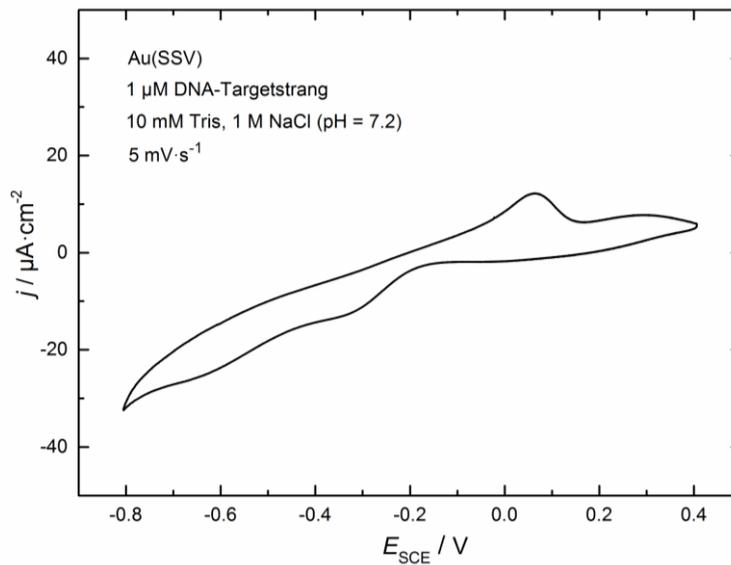


Abbildung 55: Strom-Spannungskurve des DNA-Targetstrangs ($1 \mu\text{M}$) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Der DNA-Targetstrang besitzt jedoch eine kovalent angebrachte TR-Sonde. Aufgrund der konjugierten Ringstruktur des organischen Farbstoffmoleküls ist dieses in besonderem Maße befähigt, Raman-Aktivität zu zeigen.

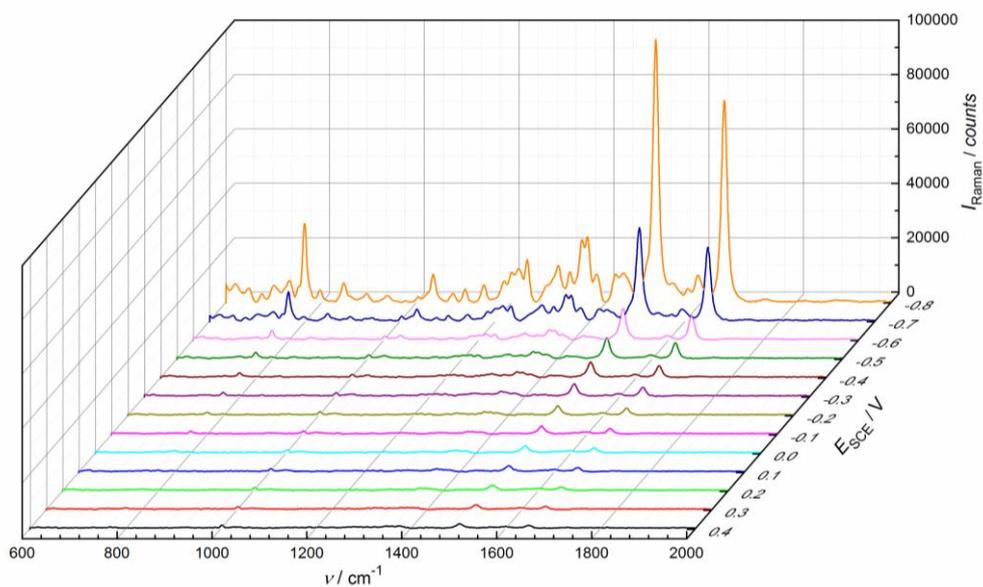


Abbildung 56: SERS-Spektrum des DNA-Targetstrangs ($1 \mu\text{M}$) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Bereits bei 0.4 V werden TR-Schwingungsmoden im SERS-Spektrum detektiert. Aus Abbildung 56 wird deutlich, dass die TR-Sonde äußerst effektiv mit den Oberflächenplasmonen des Goldsubstrats in Wechselwirkung steht. Bei -0.8 V kann

sogar von einem resonanten CT-Mechanismus ausgegangen werden. Die Feinstruktur der DNA-Targetstrang-Schwingungsmoden wird erst nahe dem CT-Elektrodenpotential erhalten. Diese Feinstruktur deckt sich mit der des DNA-Probenstrangs, wobei hier zusätzlich zwei resonante Schwingungsmoden der TR-Sonde erhalten werden. Aus diesem Grund wird die TR-Sonde für den Einsatz zur Vermessung der elektrochemischen Doppelschicht als geeignet empfunden.

ν / cm^{-1}	DNA Base	Aktive Schwingung
699	G	<i>Ring breathing</i>
735	A	<i>Ring breathing</i>
762	T	<i>Labelled TR-Streching</i>
802	C, T	<i>Ring breathing</i>
848	C, G	<i>N-C-N Streching</i>
900	A	<i>NH₂ Rocking</i>
936	C, G	<i>NH₂ Rocking</i>
1005		<i>Tris / C-C Streching</i>
1035	A, G, C, T	<i>N-Sugar Streching</i>
1078	G	<i>C-C Streching</i>
1143		<i>Deoxyribose phosphate backbone</i>
1212	C, T	<i>Ring-CH₃ Streching</i>
1296	C	<i>C-N Streching</i>
1327	G	<i>C-N Streching</i>
1356	T	<i>C-N Streching</i>
1384	A	<i>C-N Streching</i>
1419	C	<i>C-C Streching</i>
1440	A, C, G, T	<i>C=N Streching</i>
1505		<i>TR-Sonde / Streching</i>
1542	C, G, T	<i>Ring Streching</i>
1571	A	<i>Ring Streching</i>
1594	A	<i>NH₂ Deformation</i>
1650		<i>TR-Sonde / Deformation</i>

Tabelle 8: Zuordnung der Schwingungsmodi des DNA-Targetstrangs im SERS-Spektrum [18, 124, 126, 127].

Der Einfluss von Mercaptohexanol auf den DNA-Targetstrang wird in der Strom-Spannungskurve, siehe Abbildung 57, visualisiert. Es zeigt sich ebenfalls ein passivierendes Verhalten durch die SAM.

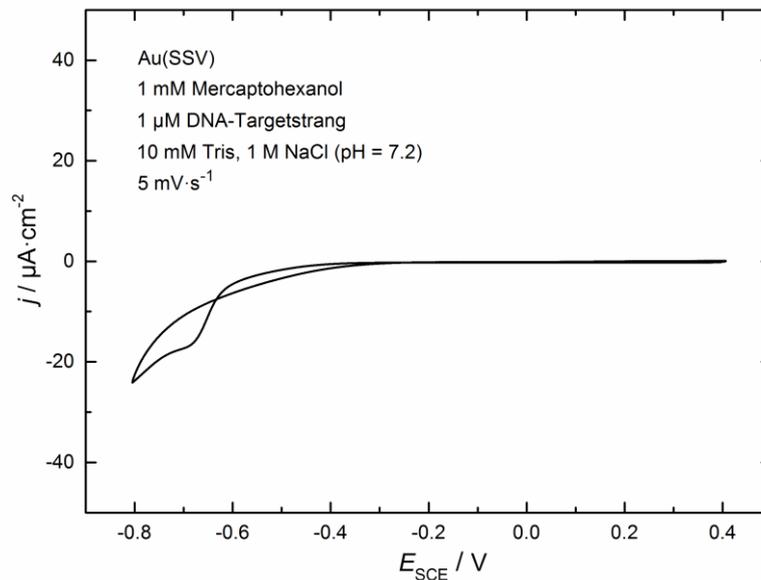


Abbildung 57: Strom-Spannungskurve nach Immobilisierung des DNA-Targetstrangs (1 μM) und Mercaptohexanol (1 mM) auf das Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Wichtig zu erwähnen ist hierbei, dass die TR-Sonde dennoch eine starke Polarisierung erfährt. Während zunächst die Mercaptohexanol-SAM die Oberfläche bedeckt, ist der frei bewegliche DNA-Targetstrang im Bulk-Elektrolyt verteilt.

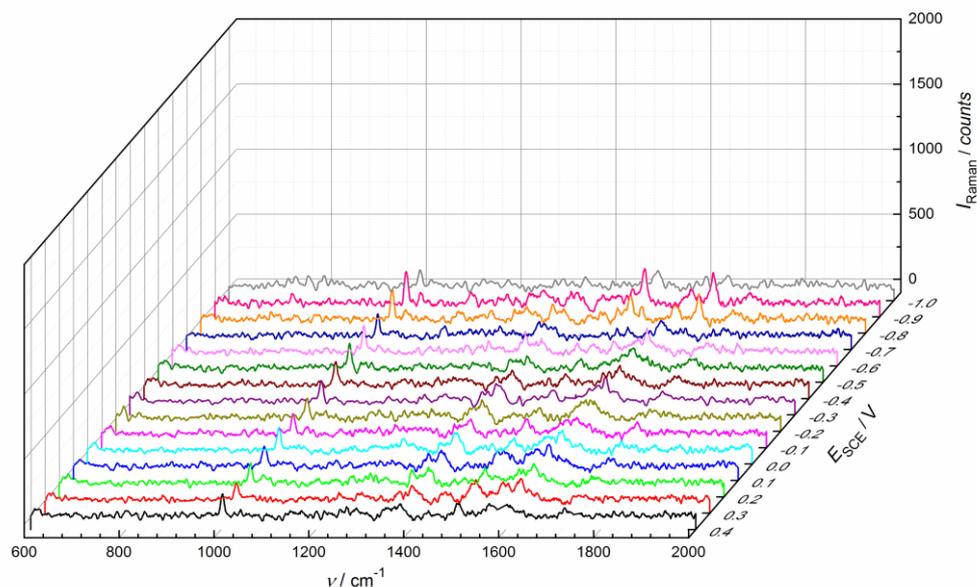


Abbildung 58: SERS-Spektrum nach Immobilisierung des DNA-Targetstrangs (1 μM) sowie Mercaptohexanol (1 mM) auf das Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Erst ab einem Elektrodenpotential von -0.7 V und der Desorption der Mercaptohexanol-SAM besteht die Möglichkeit zur Ausbildung eines CT-Ladungstransferkomplexes. Tatsächlich werden die Schwingungsmoden von Texas Red detektiert. Aufgrund der in Lösung vorliegenden Mercaptohexanol-Moleküle kann jedoch der Resonanzfall nicht eintreten und es werden niedrige Intensitäten der beiden Schwingungsmoden erhalten, siehe Abbildung 58.

5.5 Hybridisierung zwischen DNA-Probenstrang B8881 und DNA-Targetstrang B8882 in Anwesenheit der Mercaptohexanol-SAM

In diesem Abschnitt wird das Basismodell der DNA-basierten Sensoren erläutert. Um die elektrochemische Doppelschicht zu vermessen, wird die TR-Sonde an verschiedenen Positionen der nun hybridisierten Doppelhelix angebracht.

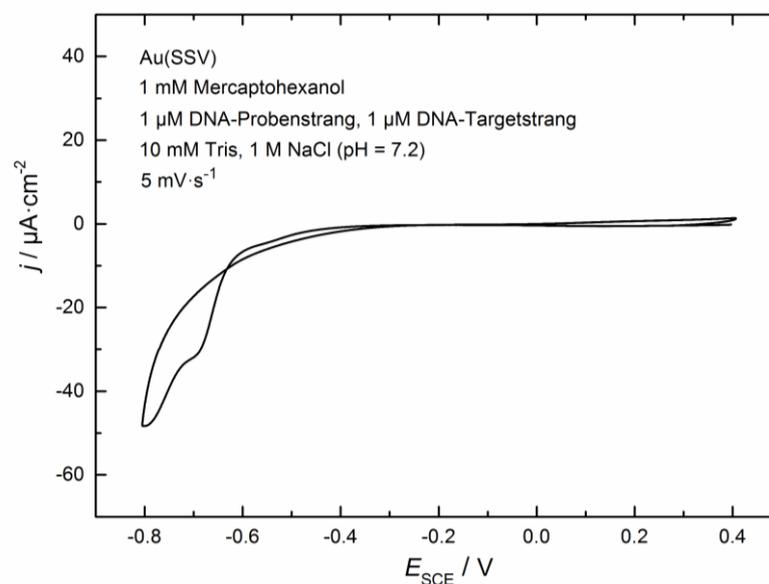


Abbildung 59: Strom-Spannungskurve des hybridisierten DNA-Systems mit DNA-Probenstrang (1 μM), DNA-Targetstrang (1 μM) und Mercaptohexanol (1 mM) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

Hier ist der Marker an der ersten DNA-Base Thymin kovalent angebunden. Die Strom-Spannungskurve in Abbildung 59 stellt dabei einen Stabilitätsbereich des hybridisierten DNA-Systems in kathodischer Vorschubrichtung von 0.4 V bis -0.6 V dar.

Abbildung 60 zeigt, dass durch die Anregungswellenlänge des Lasers explizit Änderungen der Polarisierbarkeit in der TR-Sonde hervorgerufen werden, wodurch von 0.4 V bis -0.6 V die TR-Schwingungsmoden detektiert werden können. Die Schwingungsmoden der TR-Sonde werden im kompletten Stabilitätsbereich des hybridisierten DNA-Systems detektiert. Ab einem Elektrodenpotential von -0.8 V wird zudem die Feinstruktur der DNA-Schwingungsmoden sichtbar.

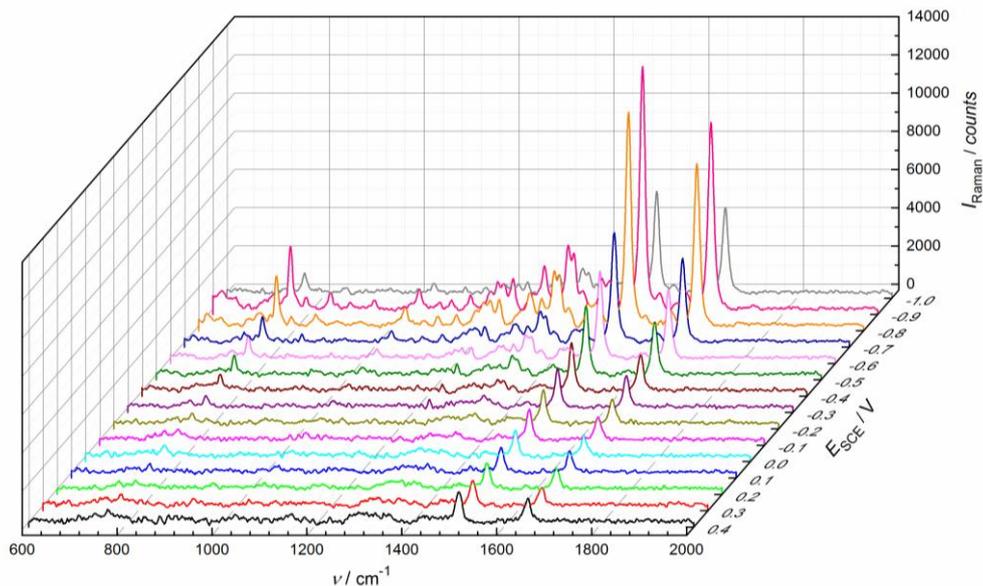


Abbildung 60: SERS-Spektren des hybridisierten DNA-Systems mit DNA-Probenstrang (1 μM), DNA-Targetstrang (1 μM) und Mercaptohexanol (1 mM) auf dem Au(SSV)-Substrat, aufgezeichnet im Tris-Puffer (10 mM) mit NaCl (1 M).

ν / cm^{-1}	DNA Base	Aktive Schwingung
762	T	Labelled with TR-Sonde
1505		TR-Sonde / <i>Stretching</i>
1650		TR-Sonde / <i>Deformation</i>

Tabelle 9: Zuordnung der TR-Schwingungen im SERS-Spektrum [18, 124, 126, 127].

Das hybridisierte DNA-System kann als DNA-basierter Sensor verwendet werden. Die Funktionsweise eines DNA-basierten Sensors besteht darin, den sogenannten Schmelzbereich der hybridisierten DNA-Stränge zu bestimmen. Abbildung 61 zeigt, wie das *melting*-Potential elektrochemisch bestimmt werden kann. Elektrodenpotentiale negativer als -0.9 V verursachen die Auslenkung der Dipolmomentvektoren des DNA-Probenstrangs und des DNA-Targetstrangs in unterschiedliche Richtungen.

Das wirksame elektrische Feld bewirkt letztlich eine Lockerung und schließlich den Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen. Aufgrund dessen wird der Targetstrang vom Probenstrang gelöst und diffundiert in den Elektrolyten. Das Experiment liefert die Möglichkeit, den am Targetstrang kovalent angebindenen TR-Marker und dessen Intensität zu verfolgen. Über die Auftragung eines sigmoidalen Fits wird bei der Hälfte der Maximalintensität das *melting*-Potential bestimmt.

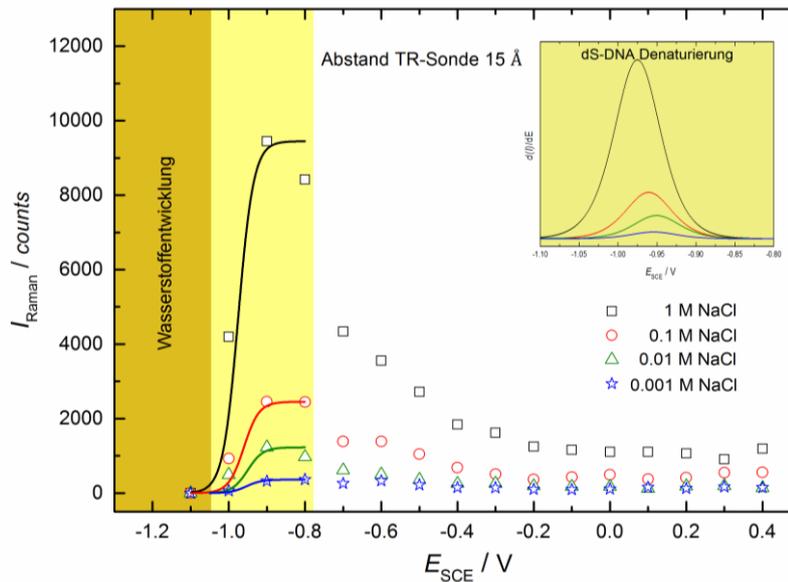


Abbildung 61: DNA-Biosensor in Form eines *melting*-Experiments.

Der Einfluss von verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen in Lösung führt zu einer minimalen Erniedrigung des *melting*-Potentials, bei der Verdünnung von NaCl (1M) auf NaCl (0.001M), von -0.97 V auf -0.95 V. Bei verdünnten Salzlösungen ist die Brown'sche Molekularbewegung und damit der Einfluss der Entropie erhöht, wodurch die Dehybridisierung bei mildereren Elektrodenpotentialen einsetzt. Dieser Befund geht einher mit dem Trend, dass bei höheren Temperaturen ein schnellerer Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen auftreten sollte.

6 Untersuchungen zum lokalen elektrischen Feld in der elektrochemischen Doppelschicht

6.1 Bestimmung der STR von Texas Red

Der in Kapitel 5 vorgestellte hybridisierte DNA-Aufbau bietet die Möglichkeit, die TR-Sonde in verschiedenen Abständen relativ zur Elektrodenoberfläche anzubringen und damit das lokale elektrische Feld in der elektrochemischen Doppelschicht zu vermessen. Im Stark-Effekt wird die Verschiebung der Schwingungsfrequenz der Sonde, aufgrund des lokalen elektrischen Felds, thematisiert.

$$\nu(E) = \nu_0 + \mu_{\text{STR}} E \quad ; \quad \mu_{\text{STR}} = \left(\frac{\Delta \nu}{\Delta |E|} \right) \quad (25)$$

Die Proportionalitätskonstante ist die sogenannte *Stark-Tuning-Rate* (STR). Da die TR-Sonde vereinfacht als zweiatomiger, punktförmiger Dipol angesehen werden kann, sei auf Kapitel 6.1.1 verwiesen, worin die Grundlagen des molekularen Stark-Effekts sowie die STR für eine exemplarische Modellsonde (CO-Molekül) im Vakuum bestimmt wurden. Eine experimentelle Ermittlung der gemessenen Stark-Verschiebung, als Funktion des Elektrodenpotentials φ , liefert lediglich die Größe $(\Delta \nu / \Delta \varphi)_{\text{exp}}$. Für die Berechnung der STR ist jedoch noch der Faktor $(\Delta |E| / \Delta \varphi)$ erforderlich:

$$\mu_{\text{STR}} = \left(\frac{\Delta \nu}{\Delta |E|} \right)_{\text{exp}} = \left(\frac{\Delta \nu}{\Delta \varphi} \right)_{\text{exp}} / \left(\frac{\Delta |E|}{\Delta \varphi} \right)_{\text{GC}} \quad (26)$$

Die Größe $(\Delta |E| / \Delta \varphi)$ beschreibt die Änderung der elektrischen Feldstärke mit dem Elektrodenpotential φ und kann nicht direkt aus dem Experiment erhalten werden, weshalb sie aus Theorien oder Computermodellen der Doppelschichtstruktur, hier aus der GC-Theorie, abgeschätzt werden muss. Das GC-Modell wird in Kapitel 6.1.2 thematisiert und liefert bei $\varphi_0 = 0$ V an der Elektrodenoberfläche

$$\left(\frac{\partial |E|}{\partial \varphi} \right)_{\text{GC}} = 0.0024 \text{ \AA}^{-1}$$

Die experimentelle mittlere Verschiebung der TR-Raman-Linie bei 1650 cm^{-1} über dem Potentialbereich $(-0.6 - 0.4 \text{ V})$ ergibt sich aus Abbildung 62 zu

$$\left(\frac{\Delta \nu}{\Delta \varphi} \right)_{\text{exp}} = -1.2 \text{ cm}^{-1} / \text{V}$$

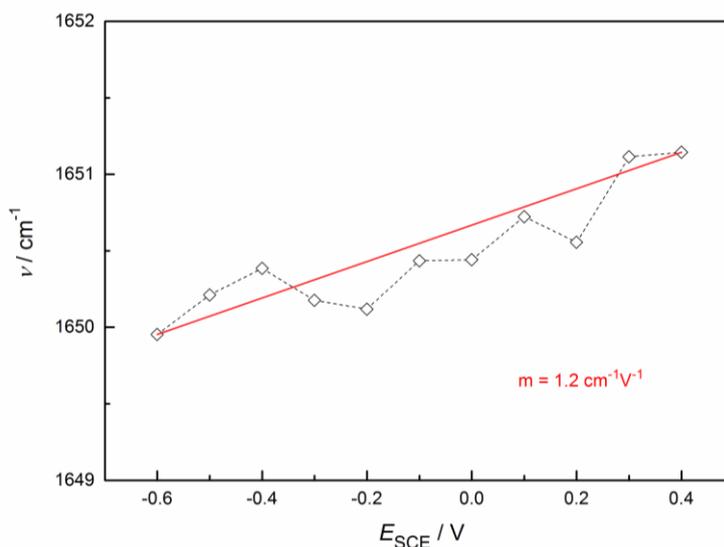


Abbildung 62: Gemessene Verschiebung der Frequenz der TR-Raman-Linie (1650 cm^{-1}) als Funktion des angelegten Elektrodenpotentials in 1M NaCl-Lösung.

Die STR der TR-Sonde lautet damit

$$|\mu_{STR}| = 500 \text{ cm}^{-1}/(\text{V}/\text{\AA}) = 5 \text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$$

Im Vergleich zur STR der modellhaften CO-Sonde [128]

$$|\mu_{STR}^{(CO)}| = 0.67 \text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm}) \text{ im Vakuum,}$$

ist der hier bestimmte Wert für TR, im Vergleich zu typischen Werten, um den Faktor 10-30 zu hoch. Aus diesem Grund muss der Einfluss des Elektrolyten berücksichtigt werden. Die Einbettung des TR-Sondenmoleküls in Mitten des Elektrolyten, das einem Dielektrikum mit der relativen Permittivitätskonstante von reinem Wassers ($\epsilon_r = 78$) gleichgestellt wird, ist im Lorentz'schen Modell in Kapitel 6.1.3 beschrieben. Darin wird auf das von der Umgebung rund um die TR-Sonde wirkende lokale elektrische Feld Bezug genommen. Dies führt zu einer revidierten und präziseren Definition der STR

$$\mu_{STR} = \left(\frac{3}{\epsilon_r + 2} \right) \left(\frac{\Delta\nu}{\Delta\varphi} \right)_{\text{exp}} / \left(\frac{\partial|E|}{\partial\varphi} \right)_{GC} \quad (27)$$

Nach erfolgter Korrektur um das Lorentz'sche Lokalfeld, welches einen Faktor $1/27$ beiträgt, wird für die STR der TR-Sonde im Vakuum

$$|\mu_{STR}| = 19 \text{ cm}^{-1}/(\text{V}/\text{\AA}) = 0.19 \text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$$

erhalten, was mit experimentell bestimmten STR-Werten ähnlicher Moleküle korreliert [20] und in Kapitel 6.1.4 näher betrachtet wird.

6.1.1 Schwingungs-Stark-Effekt eines punktförmigen Dipols

Um einen Zugang für die experimentelle Bestimmung des elektrischen Feldverlaufs durch die Verwendung der TR-Sonde in der elektrochemischen Doppelschicht zu erhalten, muss zunächst ein möglichst einfaches Modell entwickelt werden. Darin wird angenommen, dass sich die Sonde wie ein einfacher, punktförmiger Dipol verhält, welcher in einer scharf definierten Höhe über der Elektrode platziert ist. Außerdem wird vorausgesetzt, dass sich der Dipol parallel zu den lokalen Feldlinien orientiert hat. Die Richtung ist dabei in Z-Richtung zur Elektrodenoberfläche orientiert. Zusätzlich streckt sich der Dipol mit wachsender Feldstärke, sodass das fiktive Äquivalentdipolmoment größer und damit die interne Bindung länger wird [129]. Der Komplexität wegen wird die TR-Sonde als zweiatomiger, punktförmiger Dipol angesehen. Im Modellsystem kann daher der Einfluss des elektrischen Felds im einfachsten Fall auf das zweiatomige CO-Molekül angewendet werden, welches auf einer Elektrodenoberfläche adsorbiert ist. Die Valenzschwingung des CO-Moleküls unterliegt einem anharmonischen Kraftfeld $U(r)$. Dieses Kraftfeld ist für den hier beobachteten Stark-Effekt [20] verantwortlich, welcher im Folgenden erklärt wird. Das Kraftfeld wird passend durch das Morse-Potential wiedergegeben [130]

$$U(r) = D_0 [\exp(-2\beta(r - r_0)) - 2 \exp(-\beta(r - r_0))] \quad (28)$$

$$k_0 = U''(r)|_{r=r_0} = 2 D_0 \beta^2 \quad (29)$$

wobei r_0 den Gleichgewichtsabstand der C=O Bindung im Vakuum angibt. Für das Beispiel des CO-Moleküls als Sonde betragen die Modellparameter $D_0 = 9.8$ eV und $1/\beta = 0.40$ Å, wodurch Gleichung 29 die Kraftkonstante k_0 und den richtigen Wert 2143 cm⁻¹ für die C=O Valenzschwingung im Vakuum liefert. Im Folgenden wird sich als zutreffend erweisen, die sogenannte Bindungsordnung (BO, *bond order*, nach Pauling) der C=O Valenzbindung als dynamische Koordinate zu wählen. Hier wird eine Definition verwendet, die durch Shustorovich popularisiert wurde [131], wodurch nun die Größe der Bindungsordnung Z als Funktion der C=O Bindungslänge r eingeführt wird:

$$Z(r) = \exp(-\beta (r - r_0)) \quad (30)$$

Die Verwendung dieser Bindungsordnung ergibt für das Morse-Potential die einfache parabelförmige Gestalt

$$U(r) \equiv u(Z) = D_0 (Z^2 - 2Z) \quad (31)$$

Als nächstes soll die Kraftkonstante bestimmt werden, worüber die zweite Ableitung des Morse-Potentials Auskunft gibt. Die erste Ableitung des Potentials ist selbst eine Funktion der Bindungsordnung:

$$U'(r) = u'(Z) (\partial Z / \partial r) = -(2\beta D_0) Z (Z - 1) \quad (32)$$

Dabei entspricht die C=O Bindungslänge am stabilen Gleichgewichtspunkt (bei $Z = 1$) dem Wert im Vakuum ohne Feld. Die zweite Ableitung, die als effektive Kraftkonstante $k(Z)$ für das gestörte (gestreckte) CO-Molekül dienen wird, kann anhand der ungestörten Vakuum-Kraftkonstante k_0 und der gestörten Bindungsordnung Z ausgedrückt werden

$$k(Z) \equiv U''(r) = (2\beta^2 D_0) Z (2Z - 1) = k_0 Z (2Z - 1) \quad (33)$$

was richtigerweise den Vakuumwert k_0 für den ungestörten Fall $Z = 1$ wiedergibt. Die modifizierte Bindungsordnung $Z(E)$ wird als Funktion der angelegten Feldstärke E in Korrelation gesetzt. Die potentielle Energie des CO-Moleküls mit molekularem Dipolmoment $P(r)$ im äußeren Feld und die entsprechende Gleichgewichtsbedingung lauten

$$U_{\text{Feld}}(r) = U(r) - E P(r) \quad (34)$$

$$\partial U_{\text{Feld}} / \partial r = (2\beta D_0) Z (1 - Z) - E Q(Z) = 0 \quad (35)$$

wobei die effektive elektrische Dipolladung $Q(Z)$ als Ableitung des CO-Dipolmoments nach der internen Streckungsordinate r definiert ist:

$$Q(Z) = \partial P(r) / \partial r \quad (36)$$

Es wird weiterhin angenommen, dass die effektive Ladung ebenfalls eine Funktion $Q(Z)$ der Bindungsordnung ist. Die Lösung von Gleichung 35 ist nur für Felder möglich, welche nicht stärker sind als

$$E_{\text{crit}} = \frac{\beta D_0}{2 Q_0} \quad (37)$$

wobei die entsprechende Bindungsordnung $Z = 0.5$ wäre, was einer stark gestreckten C=O Bindung nahe der Dissoziation entsprechen würde. Die Konstante Q_0 ist die Dipolladung (bei $Z = 0.5$) und damit nahe dem Dissoziationszustand. Für die C=O

Bindung ergibt sich eine kritische Feldstärke von rund 12 V/\AA , wobei für Q_0 die elementare Ladung eingesetzt wird. Aus Gleichung 35 ergibt sich durch die Bedingung ($Z = 1$) der folgender Ausdruck

$$Z(E) = \frac{1}{2} \left(1 + \sqrt{1 - \frac{E}{E_{crit}}} \right) = \frac{1}{2} \left(1 + \sqrt{1 - \frac{2Q_0 E}{\beta D_0}} \right) \quad (38)$$

Somit sollte eine Änderung der C=O Bindungsordnung Z als Funktion der angelegten Feldstärke E zu beobachten sein. Dabei werden Änderungen von Größen gemessen, die von Z abhängig sind, wie hier die Frequenz $\nu(E)$ der C=O Valenzschwingung

$$\nu(E) = \sqrt{k(Z)/\mu_{CO}} = \nu_0^{vac} \sqrt{Z(2Z - 1)} \quad (39)$$

wobei die effektive Kraftkonstante $k(Z)$ aus Gleichung 33 bekannt ist. μ_{CO} ist die reduzierte Masse des CO-Moleküls (6.86 amu), ν_0^{vac} ist die Frequenz der C=O Valenzschwingung im Vakuum (2143 cm^{-1}) und $Z(E)$ ist durch Gleichung 38 vorgegeben. Die Schwingungsfrequenz wird damit als Funktion der Feldstärke (E/E_{crit}) dargestellt und ist in Abbildung 63 visualisiert.

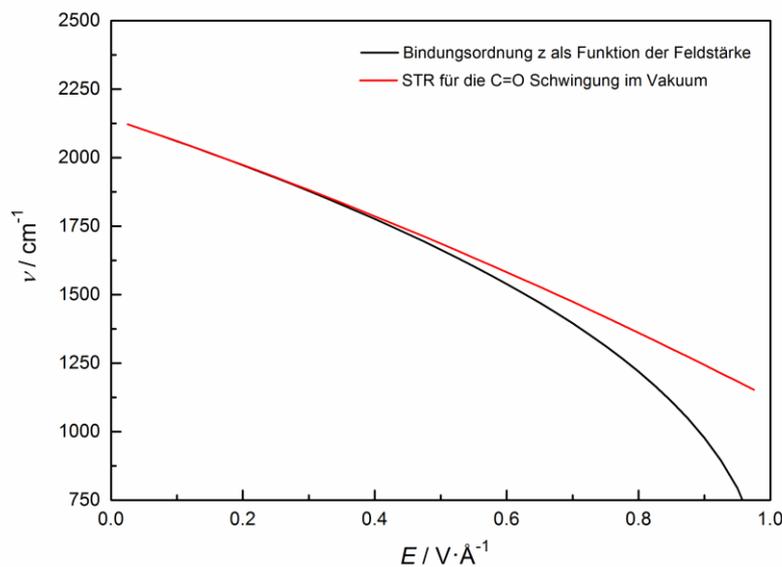


Abbildung 63: Der berechnete Verlauf der Frequenz der C=O Streckschwingung als Funktion des angelegten elektrischen Felds (E/E_{crit}) im Vakuum.

$$\nu(E) = \left(\nu_0^{vac} / \sqrt{2} \right) \sqrt{1 - \frac{E}{E_{crit}} + \sqrt{1 - \frac{E}{E_{crit}}}} \quad (40)$$

Eine Reihenentwicklung nach (E/E_{crit}) ergibt:

$$v(E) = v_0^{vac} - \frac{3}{8} v_0^{vac} \frac{E}{E_{crit}} - \frac{13}{128} v_0^{vac} \left(\frac{E}{E_{crit}} \right)^2 - \dots \quad (41)$$

woraus sich eine lineare STR im Vakuum ergibt:

$$\mu_{STR} = \left(\frac{\partial v}{\partial E} \right)_{E=0} = -\frac{3}{8} \left(\frac{v_0^{vac}}{E_{crit}} \right) \quad (42)$$

Für die CO-Sonde wird $|\mu_{STR}| = 67 \text{ cm}^{-1}/(\text{V}/\text{\AA}) = 0.67 \text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$ bestimmt. Der Vergleich mit der Literatur zeigt, dass dieser STR-Wert für CO in der richtigen Größenordnung anderer Moleküle liegt [128].

6.1.2 Simulierung des elektrischen Felds mit dem GC-Modell

Um ein Gefühl für den Verlauf des elektrischen Felds zu bekommen, eignet sich eine Abschätzung anhand des GC-Modells. Die verwendeten Formeln des Modells wurden hier mit Hilfe des Programms *Mathematica* implementiert. Das elektrische Potential $\varphi^\Delta(\mathbf{x})$ wird unter Berücksichtigung von Randbedingungen erhalten:

$$\left(\frac{\partial \varphi^\Delta}{\partial x} \right)^2 = \left(\frac{4 k_b T n_i^0}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \right) \left[\cosh \left(\frac{ze}{k_b T} \varphi^\Delta(\mathbf{x}) \right) - 1 \right] \quad (43)$$

Die Lösung dieser Gleichung, durch eine Quadratur, liefert den Verlauf des Potentials:

$$\varphi^\Delta(\mathbf{x}) = \left(\frac{4 k_b T}{ze} \right) \operatorname{arctanh} \left[\exp \left(-x \sqrt{\frac{2 n_i^0 z^2 e^2}{\varepsilon_r \varepsilon_0 k_b T}} \right) \tanh \left(\frac{ze \varphi_0^\Delta}{4 k_b T} \right) \right] \quad (44)$$

wobei x den Abstand zur Elektrode und φ_0^Δ den Wert des Galvani-Potentials an der Elektrode, gemessen gegenüber einem entfernten Referenzpunkt im Volumen des Elektrolyten, angibt.

Über den Gradienten des elektrischen Potentials wird der Verlauf der elektrischen Feldstärke $E(\mathbf{x})$ bestimmt:

$$E(\mathbf{x}) = - \left(\frac{\partial \varphi^\Delta}{\partial x} \right) = \sqrt{\left(\frac{8 k_b T n_i^0}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \right)} \sinh \left(\frac{ze \varphi_0^\Delta}{2 k_b T} \right) \quad (45)$$

Abbildung 64 visualisiert diese abstandsabhängige Potentialabnahme, wobei der Wert der elektrischen Feldstärke aus dem Diagramm entnommen werden kann.

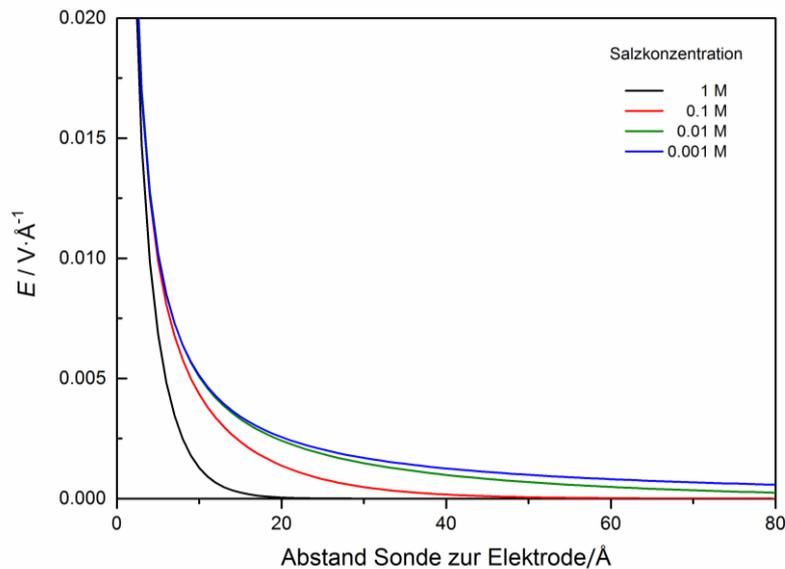


Abbildung 64: Darstellung des Feldverlaufs nahe der Elektrodenoberfläche im GC-Modell unter dem Einfluss unterschiedlicher Salzkonzentrationen.

Das elektrische Feld erfährt, gemäß dem GC-Modell, einen exponentiellen Abfall. Die Debye-Länge, welche als Maß für die Ausdehnung der Doppelschicht dienen kann, wurde bereits in Kapitel 2 eingeführt. Wie aus Abbildung 64 ersichtlich wird, gilt folgender Zusammenhang: Je niedriger die Salzkonzentration im Elektrolyten ist, desto ausgedehnter ist die diffuse Doppelschicht und umso bedeutender ist das darin wirkende elektrische Feld.

6.1.3 Das Lorentz'sche Modell

Befindet sich das Dipol-Molekül nicht im Vakuum, sondern im Elektrolyten [132], so verhält sich der Elektrolyt in erster Näherung rund um diese Sonde als ein dielektrisches Kontinuum mit einer Dielektrizitätskonstante, welche näherungsweise derer des Wassers ($\epsilon_r = 78$) entspricht. Die Sonde selbst verdrängt ein gewisses Volumen des Elektrolyten. Leicht vorstellbar ist, dass diese Sonde in einem im Elektrolyten praktizierten Loch platziert ist. Das Lorentz'sche Modell setzt ein sphärisches Loch voraus. Das Feld, welches durch die aus diesem Loch verdrängten Wasserdipole erzeugt wird, sollte gleich Null sein. Im Gegenzug erzeugen die Wasserdipole außerhalb des Lochs ein bedeutendes elektrisches Feld. Das elektrische Feld wirkt jedoch auch auf die Mitte des Lochs, in welcher der punktförmige Sondendipol platziert ist. Dem-

entsprechend liefert dieses lokale Feld E_{loc} in der Mitte des Lochs die Antwort der Sonde und nicht das äußere elektrische Feld E_{ext} , so wie es im GC-Modell angegeben wird. Im Lorentz'schen Modell besteht eine Proportionalität zwischen dem lokalen Feld und dem äußeren Feld im Dielektrikum außerhalb des Lochs:

$$E_{\text{loc}} = \left(1 + \frac{\varepsilon_r - 1}{3}\right) E_{\text{ext}} \quad (46)$$

Für Wasser wird durch die induzierte Polarisationsladung am Rande des Lochs ein deutlich erhöhtes lokales elektrisches Feld in der Mitte des sphärischen Lochs erzeugt

$$E_{\text{loc}} \cong 27 E_{\text{ext}}$$

wobei die mittlere Größenordnung von E_{ext} näherungsweise dem Feld in der GC-Theorie, oder einer ähnlichen Alternativtheorie, entsprechen sollte. Die Notwendigkeit, auf das lokale elektrische Feld Bezug zu nehmen, führt zu einer revidierten und präziseren Definition der STR

$$\mu_{\text{STR}} = \left(\frac{\Delta\nu}{\Delta|E_{\text{loc}}|}\right)_{\text{exp}} = \left(\frac{\Delta\nu}{\Delta\varphi}\right)_{\text{exp}} \left(\frac{\Delta\varphi}{\Delta|E_{\text{loc}}|}\right)_{\text{exp}} \quad (47)$$

Mit der vereinfachten Notation $E_{\text{ext}} \equiv E$ und mit Hilfe von Gleichung 59 ergibt sich die STR zu folgendem Ausdruck

$$\mu_{\text{STR}} = \left(\frac{3}{\varepsilon_r + 2}\right) \left(\frac{\Delta\nu}{\Delta\varphi}\right)_{\text{exp}} / \left(\frac{\partial|E|}{\partial\varphi}\right)_{\text{GC}} \quad (48)$$

Die STR der TR-Sonde beträgt somit

$$|\mu_{\text{STR}}| = 19 \text{ cm}^{-1}/(\text{V}/\text{\AA}) = 0.19 \text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$$

Die STR der hier bestimmten TR-Sonde ist in der gleichen Größenordnung wie publizierte STR-Werte anderer Moleküle, welche in Kapitel 6.1.4 näher betrachtet werden. Dieses Ergebnis untermauert zudem die Tatsache, dass die Schwingungsfrequenz der TR-Sonde dem lokalen elektrischen Feld ausgesetzt ist.

Unter Berücksichtigung des GC-Modells und des Lorentz'schen Modells kann in Tabelle 10 das lokale elektrische Feld abgeschätzt werden.

Abstand (Å)	Feldstärke (Vm ⁻¹)			
	1 M	0.1M	0.01 M	0.001 M
15	5x10 ⁷	5x10 ⁸	8x10 ⁸	8x10 ⁸
24	3x10 ⁶	2x10 ⁸	5x10 ⁸	5x10 ⁸
48	2x10 ³	2x10 ⁷	2x10 ⁸	3x10 ⁸
72	5x10 ⁻¹	2x10 ⁶	8x10 ⁷	2x10 ⁸

Tabelle 10: Übersicht der lokalen elektrischen Feldstärken (Vm⁻¹), welche auf die TR-Sonde in der elektrochemischen Doppelschicht bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (10⁻³ M bis 1 M) einwirken.

Effekte der Feldstärke nimmt die TR-Sonde einerseits bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und andererseits bei unterschiedlichen Abständen relativ zur Elektrodenoberfläche innerhalb der elektrochemischen Doppelschicht wahr.

6.1.4 Schwingungs-Stark-Effekt ausgewählter Sondenmoleküle

Boxer *et al.* entwickelten eine Methode, mit welcher die STR von Sondenmolekülen untersucht werden kann. Die Sonde wird in einem Lösungsmittel, gewöhnlich 2-Methyltetrahydrofuran, gelöst und unter dem Einfluss von flüssigem Stickstoff bei 74 K in eine Glasmatrix überführt. Ein transparenter Kondensator umgibt diese Glasmatrix, wobei Spannungen im Bereich von 1-2 kV angelegt werden [129]. Mittels elektromagnetischer Strahlung werden Schwingungsfrequenzen der Sonde, unter dem Einfluss des elektrischen Felds, beeinflusst.

Wie Tabelle 11 zeigt, ist die Nitrilgruppe für solche Untersuchungen sehr geeignet [133]. Die aliphatische Acetonitril-Sonde besitzt eine STR von 0.44 cm⁻¹/(MV/cm). Durch die Verwendung von aromatischen Nitrilen kann der Wert der STR erhöht werden. Im Fall von 4-Methylbenzonnitril wird eine STR von 0.71 cm⁻¹/(MV/cm) erhalten. Mit Donor-Substituenten, wie beispielsweise 5-Cyanoindol, gelingt die Erhöhung der STR auf 0.86 cm⁻¹/(MV/cm). Eine weitere Steigerung der STR kann mit Hilfe von Donor-Akzeptor-Polyenen wie Dicyanomethylenpolyene realisiert werden. Hierbei beziffert sich die STR zu 2.9 cm⁻¹/(MV/cm).

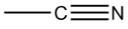
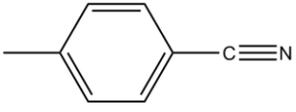
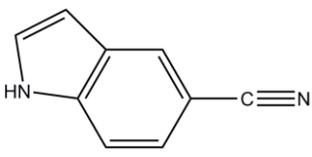
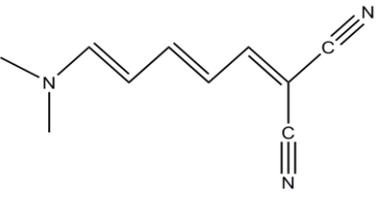
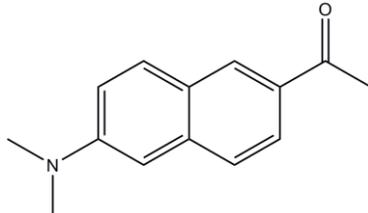
Sonde	$ \mu_{\text{STR}} $ ($\text{cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$)
	0.44
	0.71
	0.86
	2.9
	0.86

Tabelle 11: Überblick von STR-Werten ausgewählter Sondenmoleküle [133].

In dieser Arbeit wird der kommerziell erhältliche Farbstoff Texas Red als Sonde vermessen. Es bietet sich ein Vergleich mit Acedan, 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalen, an. Dessen verbrückte Amidstruktur mit konjugiertem π -System ist zudem die Kernstruktur der Fluoreszenzfarbstoffe Badan und Prodan. Dabei wird eine STR von $0.86 \text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$ bestimmt. Die TR-Sonde besitzt hingegen ein ausgeprägteres π -System. Der Vergleich mit Acedan zeigt, dass die hier bestimmte STR von Texas Red mit $0.19 \text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$ etwas niedriger ist. Eine zunehmende Anzahl von konjugierten π -Bindungen bewirkt daher eine Abnahme des STR-Werts. Diesen Trend bestätigen ebenfalls Untersuchungen bezüglich der STR von konjugierten Dicyanomethylenpolyenen [133].

6.2 Einfluss der Salzkonzentration auf die Auslenkung der TR-Wellenzahl in unterschiedlichen Sonden-Positionen

Die Differenz zwischen maximaler und minimaler Auslenkung der TR-Wellenzahl, welche proportional zur mittleren quadratischen Abweichung der Wellenzahl ist (engl. *root-mean-square*, RMS), eignet sich als Modellgröße um Rückschlüsse auf die Stärke des lokalen elektrischen Felds ziehen zu können.

Wie Abbildung 65 entnommen werden kann, besitzt die elektrochemische Doppelschicht aufgrund der eingesetzten Salzkonzentration (NaCl, 1 M) eine Debye-Länge von 3 Å. Eine unmittelbare Konsequenz, aus Sicht des klassischen Gouy-Chapman-Modells, ist hierbei der Effekt, dass sich die TR-Sonde in allen vier Positionen außerhalb der Debye-Länge befindet. Demzufolge sollte das lokale elektrische Feld bereits vor der am nächsten zur Elektrodenoberfläche angebrachten TR-Sonde abgeklungen sein. Zudem wird erwartet, dass die betrachtete TR-Schwingungsmode an den unterschiedlichen Positionen nicht beeinflusst werden sollte.

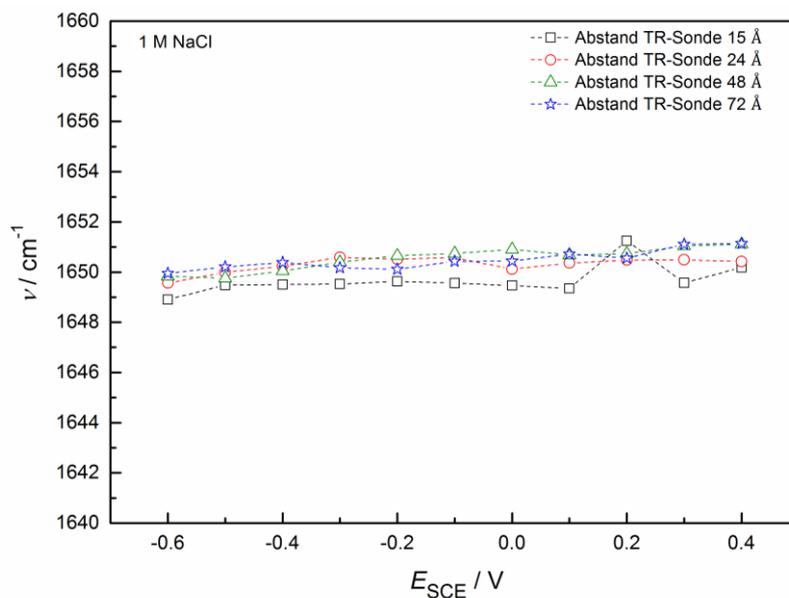


Abbildung 65: Auswirkung des elektrischen Felds auf die Frequenz der 1650 cm^{-1} Linie im TR-Molekül, aufgezeichnet im Tris-Puffer (pH = 7.2) mit NaCl (1 M).

Dennoch sind minimale Effekte des lokalen elektrischen Felds beobachtbar. Es werden geringfügige Auslenkung der Schwingungsfrequenz zu 2.4 cm^{-1} (Abstand 15 Å), 1.0 cm^{-1} (Abstand 24 Å), 1.4 cm^{-1} (Abstand 48 Å) und 1.2 cm^{-1} (Abstand 72 Å) bestimmt.

Die am nächsten zur Elektrode befindliche Position der TR-Sonde sollte die größten Auswirkungen des lokalen elektrischen Felds wahrnehmen, was durchaus zu beobachten ist.

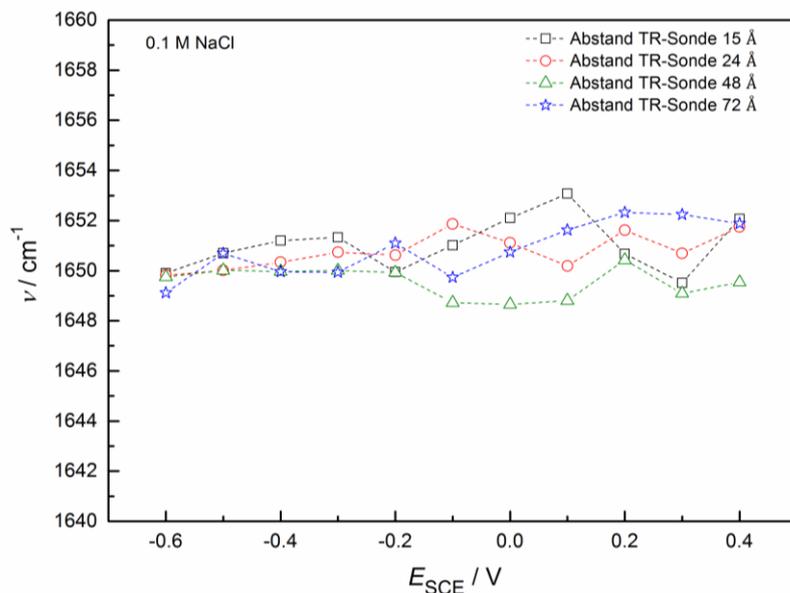


Abbildung 66: Auswirkung des elektrischen Felds auf die Frequenz der 1650 cm^{-1} Linie im TR-Molekül, aufgezeichnet im Tris-Puffer (pH = 7.2) mit NaCl (0.1 M).

Durch die Verdünnung der NaCl-Konzentration um eine Zehnerpotenz auf 0.01 M dehnt sich die elektrochemische Doppelschicht auf eine Debye-Länge von 10 \AA aus. Obwohl die Positionen der TR-Sonde erneut, wenn auch in geringerem Maße als im vorherigen Fall, außerhalb der elektrochemischen Doppelschicht sind, wird aus Abbildung 66 entnommen, dass stärkere Auslenkungen der TR-Wellenzahl auftreten. Beobachtet werden Abweichungen von 3.6 cm^{-1} (Abstand 15 \AA), 1.9 cm^{-1} (Abstand 24 \AA), 1.8 cm^{-1} (Abstand 48 \AA) und 3.2 cm^{-1} (Abstand 72 \AA).

Die Auslenkungen der TR-Wellenzahl werden dabei im Elektrodenpotentialbereich zwischen 0.4 V und -0.2 V beobachtet. Hingegen scheinen Elektrodenpotentiale zwischen -0.2 V und -0.6 V zu einer Stabilisierung der Wellenzahl in den jeweiligen Systemen beizutragen. Diese Vorgänge korrelieren mit dem Potentialbereich um das PZC, wobei hier auf das PZC des unmodifizierten Au(SSV)-Substrats verwiesen wird, welches sich je nach eingesetzter NaCl-Konzentration zwischen -0.3 V und -0.1 V befindet und in Abbildung 67 dargestellt ist.

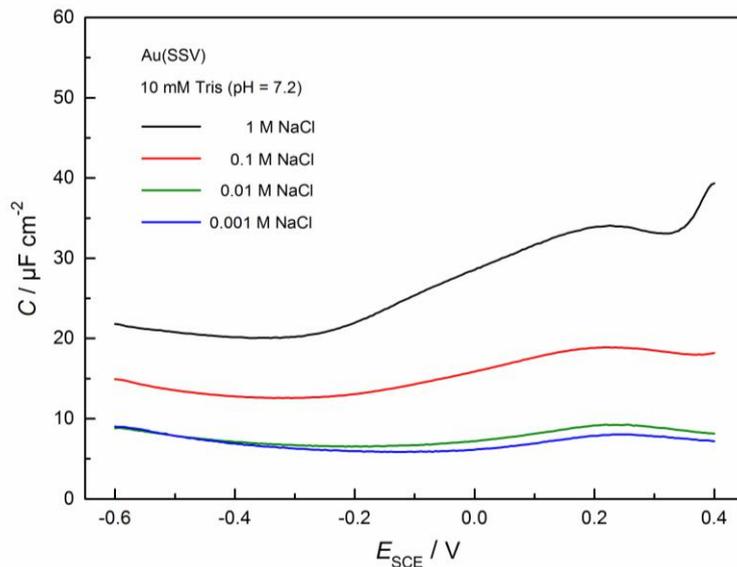


Abbildung 67: Bestimmung des PZC auf dem Au(SSV)-Substrat im Tris-Puffer (pH = 7.2).

Eine mögliche Erklärung stellt der lineare Zusammenhang zwischen der elektrischen Feldstärke an der Elektrode und des Elektrodenpotentials im Bereich des PZC dar, wobei es tatsächlich zu einer fast linearen Änderung der Wellenzahl bei Elektrodenpotentialen zwischen -0.6 und -0.2 V kommt, wie in Abbildung 66 ersichtlich. Nichtsdestotrotz ändert sich diese qualitative Erklärung bei geringeren NaCl-Konzentrationen, was im Folgenden gezeigt wird.

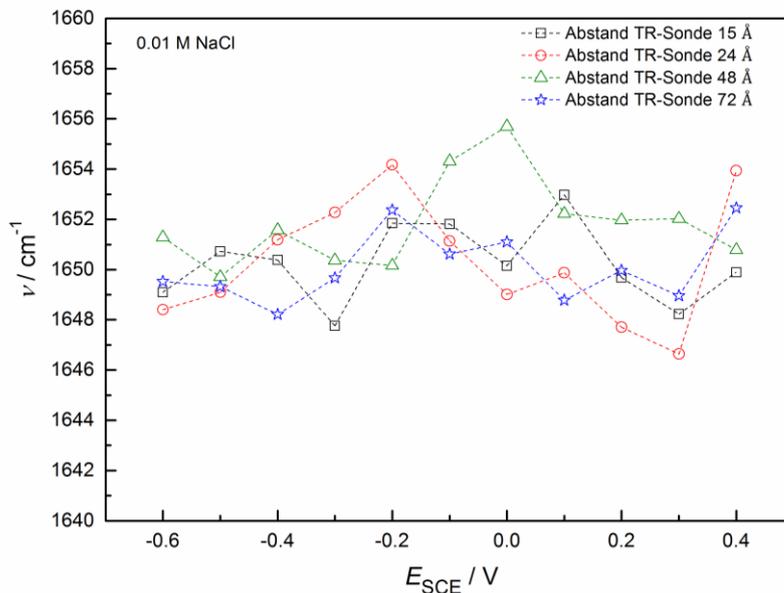


Abbildung 68: Auswirkung des elektrischen Felds auf die Frequenz der 1650 cm^{-1} Linie im TR-Molekül, aufgezeichnet im Tris-Puffer (pH = 7.2) mit NaCl (0.01 M).

Eine Verminderung der NaCl-Konzentration auf 0.01 M resultiert in einer Debye-Länge von 30 Å, weshalb sich die ersten beiden Positionen der TR-Sonde innerhalb der elektrochemischen Doppelschicht befinden. Wie aus Abbildung 68 entnommen werden kann, werden nun deutlich größere RMS-Abweichungen der Wellenzahlen mit 5.2 cm^{-1} (Abstand 15 Å), 7.5 cm^{-1} (Abstand 24 Å), 6.0 cm^{-1} (Abstand 48 Å) und 4.2 cm^{-1} (Abstand 72 Å) beobachtet.

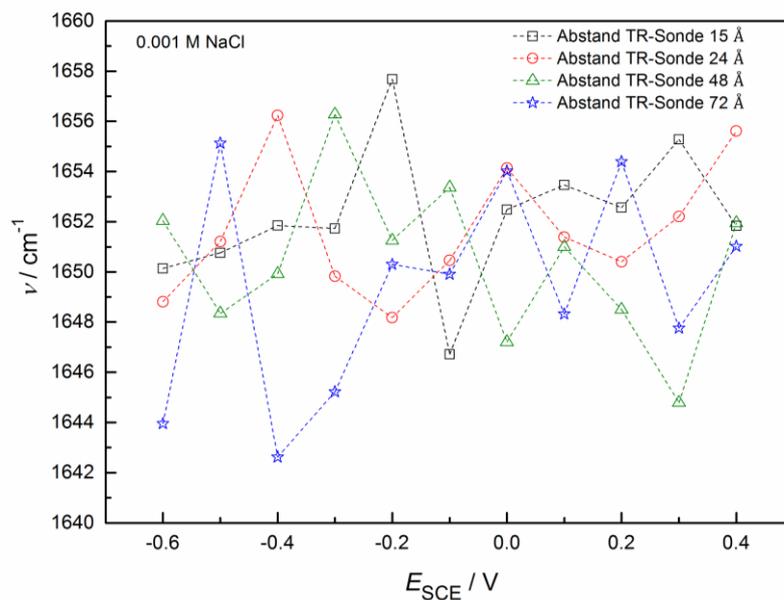


Abbildung 69: Auswirkung des elektrischen Felds auf die Frequenz der 1650 cm^{-1} Linie im TR-Molekül, aufgezeichnet im Tris-Puffer (pH = 7.2) mit NaCl (0.001 M).

Dieser Trend wird durch die weitere Verringerung der NaCl-Salzkonzentration auf 0.001 M bestätigt. Bis auf 96 Å ist die elektrochemische Doppelschicht, gemäß dem GC-Modell, ausgedehnt, wodurch alle vier Positionen der TR-Sonde innerhalb der Debye-Länge sind. Die RMS-Abweichungen der Wellenzahlen mit 11.0 cm^{-1} (Abstand 15 Å), 7.5 cm^{-1} (Abstand 24 Å), 11.5 cm^{-1} (Abstand 48 Å) und 12.5 cm^{-1} (Abstand 72 Å) sind spektroskopisch gesehen allesamt bedeutend, wie Abbildung 69 zeigt.

6.3 Das lokale elektrische Feld

Gemäß dem molekularen Stark-Effekt ist die Schwingungsfrequenz der TR-Sonde proportional zum lokalen elektrischen Feld, wodurch die Möglichkeit gegeben ist, die Ortsabhängigkeit des Feldverlaufs in der elektrochemischen Doppelschicht durch Positionierung der Sonde in unterschiedlichen Abständen zu untersuchen. Dies gelingt mit vier Stellungen der TR-Sonde, indem einerseits ein konstantes Elektrodenpotential angelegt und andererseits eine konstante Salzkonzentration gewählt wird.

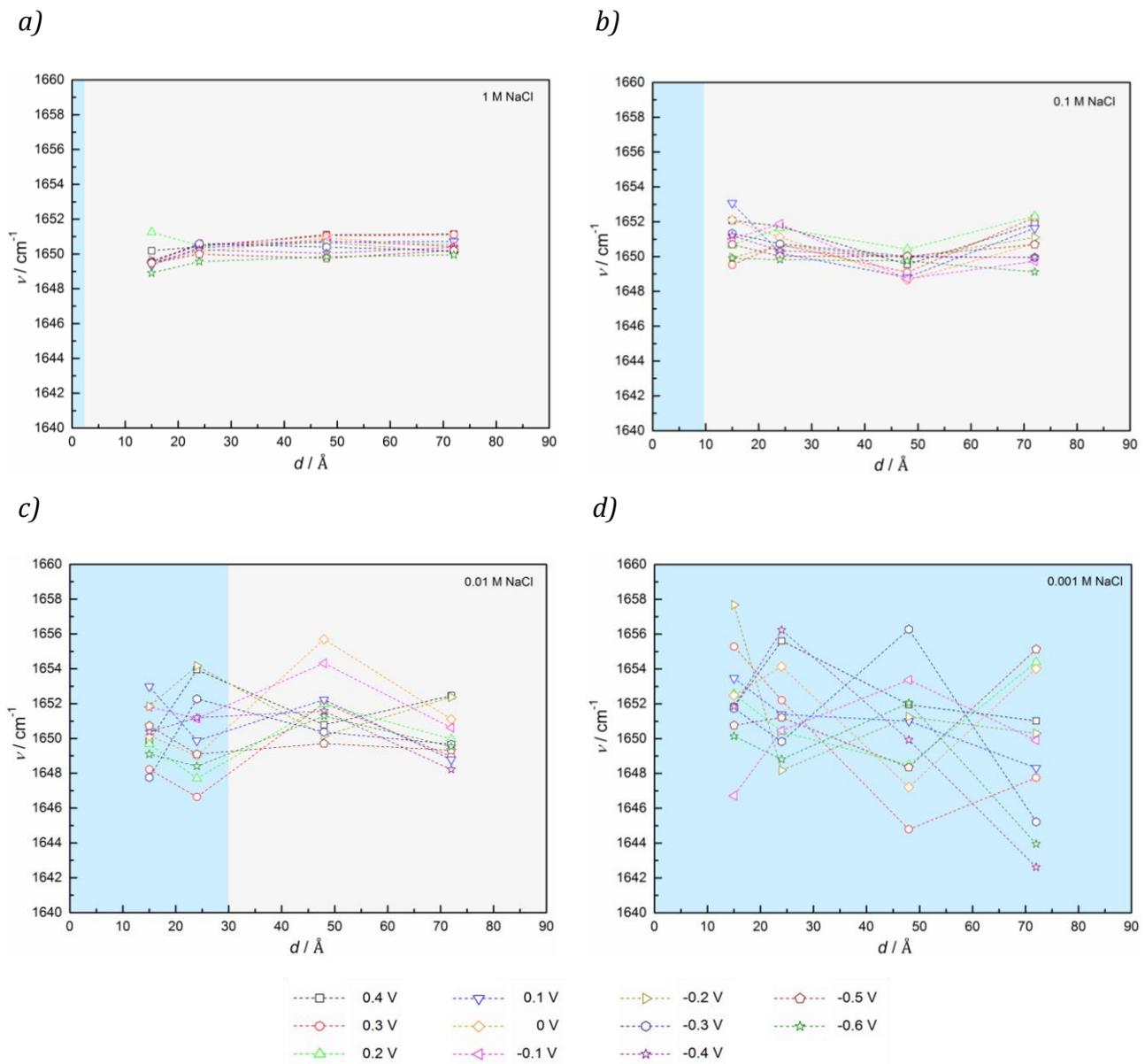


Abbildung 70: Übersicht der Frequenzverschiebung der 1650 cm^{-1} Linie der TR-Sonde als Funktion des Abstands zur Elektrode, unter gegebenem Elektrodenpotential bei unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen: a) 1 M, b) 0.1 M, c) 0.01 M und d) 0.001 M im Tris-Puffer (pH = 7.2). Durch den molekularen Stark-Effekt ist der lokale elektrische Feldverlauf annähernd proportional zu den gemessenen Frequenzverschiebungen.

Im Fall von sehr hohen Salzkonzentrationen (1 M NaCl) wird ein gering ausgeprägter und nahezu linearer Feldverlauf erhalten, siehe Abbildung 70 a. Deutliche Abweichungen der Sondenfrequenz sind bei verdünnteren Salzlösungen eindeutig zu beobachten. Je niedriger die Salzkonzentration ist, desto weiter erstreckt sich, gemäß der Gouy-Chapman-Theorie, die Doppelschicht (farbig dargestellt in Abbildung 70). Die TR-Sonde spürt, durch den molekularen Stark-Effekt, das darin enthaltene lokale elektrische Feld.

Allerdings werden bei der genaueren Betrachtung abstandsabhängige Fluktuationen beobachtet. Die oben dargestellten experimentellen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die gesamte elektrochemische Doppelschicht in zwei Zonen einzuteilen ist. In der unmittelbaren Nähe der Elektrode befindet sich eine sogenannte Nahzone, deren Breite in der Größenordnung der Debye-Länge sein dürfte, worin das Elektrodenpotential bis zum Wert im Bulkelektrolyten abgeschirmt wird. Hier ändert sich das lokale elektrische Feld, dem die Sonde ausgesetzt ist, sehr stark mit dem Elektrodenpotential. Diese Tatsache ist durch die große Streuung der Frequenzwerte der Sonde mit dem Elektrodenpotential, wie beispielhaft in Abbildung 70 (c und d) für die Region unterhalb x_{DL} zu beobachten ist. Die Frequenzkurven, die bei unterschiedlichen Elektrodenpotentialen gemessen wurden, kreuzen sich sehr oft bei Sondenabständen unterhalb der Debye-Länge in der Nahzone.

Im Unterschied zu dieser Nahzone verlaufen die Frequenzkurven bei Sondenabständen $x > x_{DL}$ fast immer parallel, was auf eine qualitativ ähnliche Verteilung des elektrischen Feldes in dieser sogenannten Fernzone deutet. Der qualitative Verlauf der Frequenzkurven (d.h. des lokalen elektrischen Feldes) ist, verglichen mit der Nahzone, nur relativ gering von Änderungen des Elektrodenpotentials betroffen.

Nach der klassischen Theorie von Gouy-Chapman besitzt der Bereich, der hier Fernzone genannt wurde, keine besondere Bedeutung, da er in der GC-Näherung dem ungestörten Bulkelektrolyt entspricht. Die in Abbildung 70 dargestellten experimentellen Ergebnisse zeigen aber, dass durchaus gewisse Auswirkungen des lokalen Feldes auf das Sondenmolekül in der Fernzone einwirken. So können, gemäß Abbildung 70 c, systematische Frequenzverschiebungen der Sonde in der Größenordnung von $4-6 \text{ cm}^{-1}$ sogar im Abstand von $50-70 \text{ \AA}$ auftreten.

Die Vermutung, dass sich das lokale elektrische Feld als eine Potential- und Ladungswelle in dieser Fernzone ausbreitet, könnte diese Ergebnisse erklären. Die qualitative Einteilung der Doppelschicht in eine Nah- und Fernzone ist skizzenhaft in Abbildung 71 dargestellt.

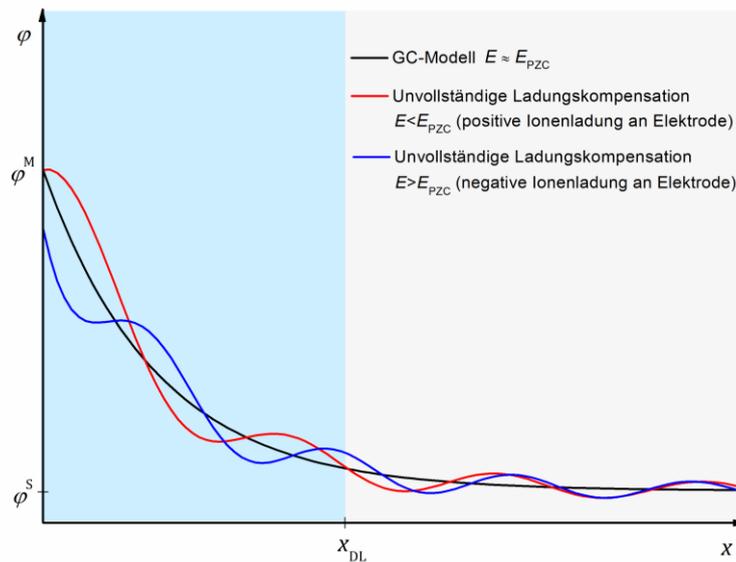


Abbildung 71: Modell zum unstetigen Feldverlauf in der elektrochemischen Doppelschicht, unter Berücksichtigung unvollständiger Ionenladungs-Kompensation im Elektrolyt. Während im klassischen Gouy-Chapman-Modell von einem exponentiell abklingenden Potentialverlauf ausgegangen wird (schwarze Kurve), lassen sich die vorgestellten Messergebnisse unter der Annahme deuten, dass der GC-Potentialverlauf von wellenförmigen Abweichungen überlagert ist (rote und blaue Kurve). Diese Abweichungen erstrecken sich über die Längenskala x_{DL} hinaus. Ein möglicher Grund für diese langreichweitigen Effekte ist die alternierende Ladungsüber- bzw. Ladungsunterkompensation von Ionen zwischen Elektrode und dem gewählten Beobachtungspunkt x .

Die Ursache langreichweitiger Feldeffekte ist in einer Verteilung der Ionendichte im Elektrolyten zu suchen, wodurch eine nur unvollständige Kompensation der Ionenladungen in aufeinanderfolgenden Elektrolytschichten nahe der polarisierten Elektrodenoberfläche auftritt. Dabei wird die gesamte Ionenladung zwischen der Elektrode und der Sonde entweder über- oder unterkompensiert, ein Effekt dessen Reichweite leicht die Debye-Länge des GC-Modells überschreiten kann. Die resultierende wellenförmige Verteilung des Ladungsüberschusses führt zu einer Ausdehnung des elektrischen Feldes über die Grenzen der GC-Doppelschicht hinaus.

Die experimentell bestimmten Daten bezüglich des lokalen elektrischen Feldverlaufs in der elektrochemischen Doppelschicht geben folglich Anlass dazu, dass die klassischen Theorien von Helmholtz [9], Gouy-Chapman [10, 11] sowie Stern [12], welche in Kapitel 2 thematisiert wurden, modernisiert werden sollten. Die Struktur der Lösungsmittelmoleküle, Molekül-Metall bzw. Ionen-Metall-Wechselwirkungen, spezifisch adsorbierte Ionen auf der Elektrodenoberfläche sowie langreichweitige Effekte durch alternierende Ladungsüber- bzw. Ladungsunterkompensation von Ionen haben allesamt einen bedeutenden Einfluss auf den fluktuierenden lokalen elektrischen Feldverlauf.

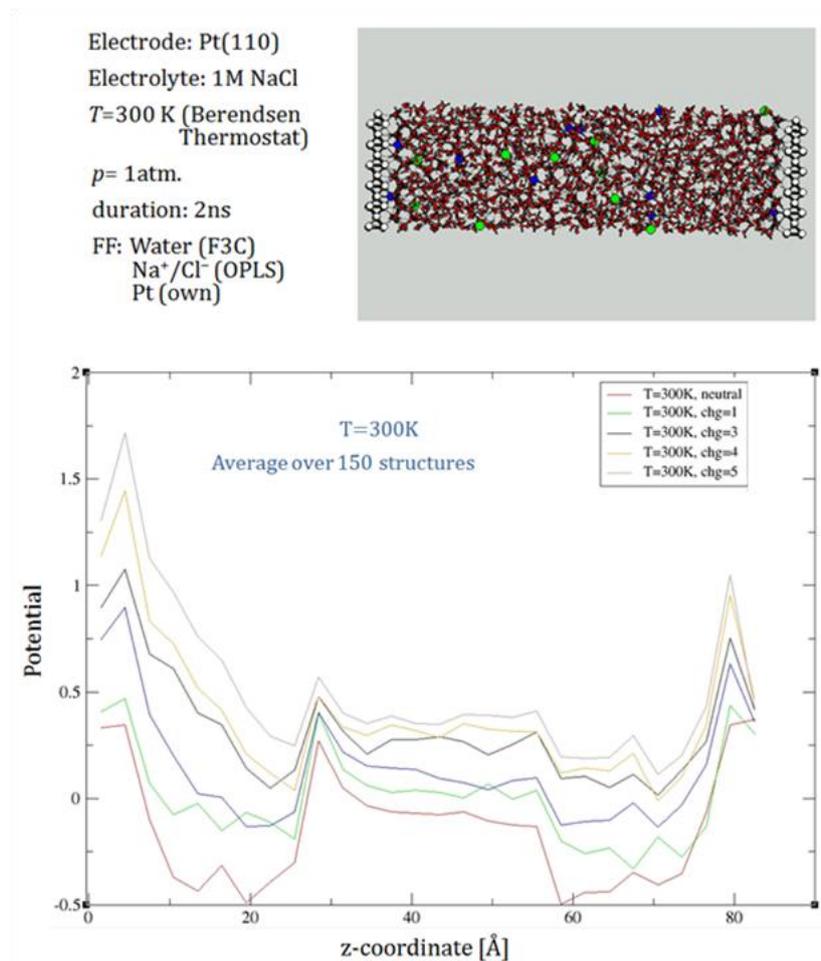


Abbildung 72: QM/MM-Simulation bezüglich des lokalen elektrischen Felds in der elektrochemischen Doppelschicht, nach [134].

Theoretische Molekulardynamik-Simulationen [14-16] sowie die QM/MM-Simulation, unter den in Abbildung 72 angegebenen Bedingungen, weisen ebenfalls auf Fluktuationen des lokalen elektrischen Felds hin, wodurch es zu einem Einklang von Theorie und Experiment kommt.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu funktionalisierten Elektroden in der elektrochemischen Doppelschicht durchgeführt. Dabei ist es gelungen, nanostrukturierte Glucose-Sensoren zu entwickeln und zu charakterisieren. Dazu mussten folgende Eigenschaften erfüllt sein: Die Glucose-Sensoren besitzen einen Aufbau, in dem ein Enzym-Linker in unmittelbarer Nähe zur Elektrode verankert ist, wodurch die immobilisierten Enzyme in einer geometrisch günstigen Position fixiert sind und ihre enzymatische Aktivität effizient zur Geltung kommt. Zusätzlich muss im Glucose-Sensor eine gleichmäßige Verteilung von Platin-Nanopartikeln gewährleistet sein, damit das Reaktionsprodukt H_2O_2 , welches in der Reaktion zwischen immobilisiertem Enzym und Glucose entsteht, detektiert werden kann. Damit die Enzym-Funktionalität aufrechterhalten bleibt, sollte der Sensor einerseits in neutralem Medium und andererseits bei einem möglichst moderat ausgewählten Elektrodenpotential betrieben werden.

Diese Bedingungen erfüllen die hier vorgestellten Glucose-Sensoren. Auf einem Au(111)-Einkristall konnte mit Hilfe einer adsorbierten 4-PyS-SAM und anschließender Pt-Metallisierung dieser SAM eine homogene Verteilung von Platininseln mit einem Durchmesser von ~ 10 nm erhalten werden. In dieser Arbeit wurde das Enzym Pyranose 2-Oxidase (P2OxB1H), ein Homotetramer welches pro Untereinheit eine kovalent gebundene und katalytisch aktive Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Komponente im aktiven Zentrum besitzt, einerseits über den Enzym-Linker Polyallylamin (PAA) und andererseits über den Enzym-Linker Thiobarbitursäure (2-TBA) immobilisiert.

In-situ AFM-Messungen zeigen, dass die Enzym-Topographien dieser beiden funktionalisierten Elektroden deutliche Unterschiede aufweisen. Während die Enzym-Immobilisierung von P2OxB1H durch den PAA-Linker zu einer Agglomeratstruktur mit darin völlig unterschiedlich orientierten, eingebetteten Enzymen führte, konnte mit dem 2-TBA-Linker eine gleichmäßig geordnete Enzym-Topographie erhalten werden.

Die elektrochemische Charakterisierung der amperometrischen Glucose-Sensoren erfolgte im Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7$) sowie bei einem Elektrodenpotential von 0.56 V, wobei in einer Variante der Lineweaver-Burk-Auftragung festgestellt wurde, dass die Michaelis-Konstante K_M je nach eingesetzter Enzymmenge (8 U/mL bzw. 4 U/mL)

leichte Unterschiede ($1.7\text{-}2.7\text{ mM L}^{-1}$) aufweist. Dieser geringe lineare Bereich macht deutlich, dass die hier vorgestellten Glucose-Sensoren für kommerzielle Anwendungen jedoch nicht geeignet sind, da die Bereiche $<6.1\text{ mM L}^{-1}$ (nüchterner Blutzucker-Gehalt) sowie $>7\text{ mM L}^{-1}$ (Diabetes-Erkrankung) nicht präzise genug ausgelesen werden.

Die unterschiedliche Enzym-Topographie nimmt starken Einfluss auf die Umsetzung der Glucose und bestimmt maßgeblich den Sättigungsstrom (I_{\max}) der Glucose-Sensoren sowie deren Sensitivität (I_{\max}/K_M). Die Enzym-Immobilisierung durch den Polymer-Linker PAA, unter der Modifikationsbedingung (8 U/mL , 60 min), ergab eine Sensitivität von $2.16\text{ }\mu\text{A mM}^{-1}\text{ cm}^{-2}$. Hingegen zeigte die gleichmäßigere Enzym-Verteilung, wie im Fall der Enzym-Immobilisierung durch den 2-TBA-Linker, selbst bei der Hälfte an eingesetzter Enzymmenge (4 U/mL , 30 min) bereits eine Sensitivitätssteigerung auf $2.65\text{ }\mu\text{A mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Die Optimierung der Modifikationsbedingungen (4 U/mL , 60 min bzw. 8 U/mL , 60 min) resultieren in einer erneuten Steigerung der Sensitivität von $3.54\text{ }\mu\text{A mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ auf $6.1\text{ }\mu\text{A mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Unter gleichen Modifikationsbedingungen führte die Enzym-Immobilisierung durch den 2-TBA-Linker, verglichen mit der Enzym-Anbindung durch den Polymer-Linker PAA, zu einer beachtlichen Sensitivitätssteigerung um den Faktor 2.8 und damit zu einer besseren Effizienz dieses Glucose-Sensors.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das lokale elektrische Feld in der elektrochemischen Doppelschicht experimentell untersucht. Als geeignetes System wurde eine hybridisierte DNA angesehen, wobei die Hybridisierung zwischen DNA-Targetstrang (mit der kovalent angebondenen Farbstoff-Sonde Texas Red) und dem dazu komplementären DNA-Probenstrang (über Dithiol-Linker auf einer plasmonenwirksamen, nanostrukturierten Goldoberfläche immobilisiert) erfolgte. Der hybridisierte DNA-Aufbau ermöglicht dabei die gezielte Anbringung der TR-Sonde in verschiedenen Abständen relativ zur Elektrodenoberfläche. Elektrochemische CV- und SERS-Experimente geben ein Potentialfenster zwischen 0.4 V und -0.6 V ($\text{pH} = 7.2$) vor, in welchem die 1650 cm^{-1} Linie im TR-Molekül analysiert werden sollte.

Es wurde gezeigt, dass Texas Red den Gesetzmäßigkeiten des molekularen Stark-Effekts unterliegt, worin dessen Schwingungsfrequenz proportional zum lokalen elektrischen Feld ist. Diese Proportionalitätskonstante wird als *Stark-Tuning-Rate* (STR) bezeichnet und konnte zu $|\mu_{\text{STR}}| = 0.19\text{ cm}^{-1}/(\text{MV}/\text{cm})$ bestimmt werden.

Die Ortsabhängigkeit des Feldverlaufs in der elektrochemischen Doppelschicht zu untersuchen gelang, indem einerseits ein konstantes Elektrodenpotential angelegt und andererseits eine konstante Salzkonzentration im Elektrolyten gewählt wurde. Im Fall von sehr hohen Salzkonzentrationen (1 M NaCl) wird die Schwingungsfrequenz der 1650 cm^{-1} Linie im TR-Molekül wenig beeinflusst, was auf einen nahezu linearen Feldverlauf hindeutet. Deutliche Abweichungen der Sondenfrequenz konnten bei verdünnteren Salzlösungen eindeutig beobachtet werden. Erklärt werden kann dieses Verhalten über die Gouy-Chapman-Theorie welche besagt: Je niedriger die Salzkonzentration ist, desto weiter erstreckt sich die elektrochemische Doppelschicht.

Dennoch wurden bei der genaueren Betrachtung abstandsabhängige Fluktuationen beobachtet, weshalb es sinnvoll ist, die gesamte elektrochemische Doppelschicht in zwei Zonen einzuteilen. In unmittelbarer Nähe der Elektrode befindet sich eine sogenannte Nahzone, deren Breite in der Größenordnung der Debye-Länge x_{DL} liegen sollte, worin das Elektrodenpotential bis zum Wert im Bulk Elektrolyt abgeschirmt wird. In der Nahzone ändert sich das lokale elektrische Feld, dem die Sonde ausgesetzt ist, sehr stark mit dem Elektrodenpotential. Dabei wird eine große Streuung der Frequenzwerte der Sonde mit dem Elektrodenpotential festgestellt.

In der sogenannten Fernzone ($x > x_{DL}$) verlaufen die Frequenzkurven der Sonde fast immer parallel und werden relativ wenig von Änderungen des Elektrodenpotentials beeinflusst. Nach der klassischen Theorie von Gouy-Chapman besitzt diese Fernzone keine besondere Bedeutung. Die dargestellten experimentellen Ergebnisse zeigen jedoch, dass durchaus gewisse Auswirkungen des lokalen Feldes auf das Sondenmolekül in der Fernzone einwirken, wobei systematische Frequenzverschiebungen der Sonde in der Größenordnung von $4\text{-}6\text{ cm}^{-1}$ im Abstand von $50\text{-}70\text{ \AA}$ auftreten. Das lokale elektrische Feld breitet sich als eine (Potential- und Ladungs-)Welle in dieser Fernzone aus.

Die Ursache solcher langreichweitigen Feldeffekte liegt in der Verteilung der Ionendichte im Elektrolyten, wobei eine nur unvollständige Kompensation der Ionenladungen in aufeinanderfolgenden Elektrolytschichten nahe der polarisierten Elektrodenoberfläche auftritt. Die gesamte Ionenladung zwischen der Elektrode und der Sonde wird entweder über- oder unterkompensiert.

Die resultierende wellenförmige Verteilung des Ladungsüberschusses führt zu einer Ausdehnung des elektrischen Feldes über die Grenzen der GC-Doppelschicht hinaus. Die experimentellen Ergebnisse bestätigen damit Molekulardynamik-Simulationen über die elektrochemische Doppelschicht, in denen Abweichungen des Feldverlaufs, bezüglich klassischer Doppelschichtmodelle wie das GC-Modell, bestimmt wurden.

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse haben damit bedeutende Auswirkungen auf elektrochemische Prozesse in der elektrochemischen Doppelschicht. Vorgänge, welche auf Theorien der klassischen Doppelschichtmodelle beruhen, sollten daher assimiliert werden. Fluktuationen des elektrischen Felds könnten beispielsweise Übergangszustände sowie Aktivierungsenergien elektrodennaher elektrochemischer und elektrokatalytischer Reaktionen beeinflussen und so zu neuartigen Erkenntnissen führen.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Heidemann, Y. Du, L. Schubert, W. Rathmann, C. Scheidt-Nave, Bundesgesundheitsbl, 56 (2013) 668.
- [2] A.P.F. Turner, Chem. Soc. Rev., 42 (2013) 3184.
- [3] D.A. Bonnell, D.N. Basov, M. Bode, U. Diebold, S.V. Kalinin, V. Madhavan, L. Nowotny, M. Salmeron, U.D. Schwarz, P.S. Weiss, Rev. Mod. Phys., 84 (2012) 1343.
- [4] G.W.Chantry, H.M. Evans, J. Chamberlain, H.A. Gebbie, Infrared Physics, 9 (1969) 85.
- [5] R.F.K. Herzog, F.P. Viehböck, Phys. Rev., 76 (1949) 855.
- [6] E.M. Stuve, Chemical Physics Letters, 519 (2012) 1.
- [7] L.D. Chen, M. Urushihara, K. Chan, J.K. Norskov, ACS Catal., 6 (2016) 7133.
- [8] I. Willner, E. Katz, Angew. Chem. Int. Ed., 39 (2000) 1180.
- [9] H. Helmholtz, Ann. Physik, 7 (1879) 337.
- [10] M. Gouy, J. Phys. Theor. Appl., 9 (1910) 457.
- [11] D.L. Chapman, Phil. Mag., 25 (1913) 475.
- [12] O. Stern-Hamburg, Zeitschrift für Elektrochemie, 30 (1924) 508.
- [13] J.O'M.Bockris, M.A. Devanathan, K. Müller, Proc. R. Soc., A274 (1963) 55.
- [14] E. Spohr, Electrochimica Acta, 44 (1999) 1697.
- [15] B. Eck, E. Spohr, Electrochimica Acta, 42 (1997) 2779.
- [16] M. Predota, A.V. Bandura, P.T. Cummings, J.D. Kubicki, D.J. Wesolowski, A.A. Chialvo, M.L. Machesky, J. Phys. Chem. B, 108 (2004) 12049.
- [17] R.P. Johnson, J.A. Richardson, T. Brown, P.N. Bartlett, J. Am. Chem. Soc., 134 (2012) 14099.
- [18] S. Mahajan, J. Richardson, T. Brown, P.N. Bartlett, J. Am. Chem. Soc., 130 (2008) 15589.

- [19] E. Papadopoulou, N. Gale, J.F. Thompson, T.A. Fleming, T. Brown, P.N. Bartlett, *Chem. Sci*, 7 (2016) 386.
- [20] S.H. Brewer, S. Franzen, *J. Chem. Phys.*, 119 (2003) 851.
- [21] V. Oklejas, C. Sjostrom, J.M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 2408.
- [22] V. Oklejas, C. Sjostrom, J.M. Harris, *J. Phys. Chem. B*, 107 (2003) 7788.
- [23] G. Schkolnik, J. Salewski, D. Millo, I. Zebger, S. Franzen, P. Hildebrandt, *Int. J. Mol. Sci.*, 13 (2012) 7466.
- [24] B.R. Egdins, *Chemical Sensors and Biosensors*, Wiley (2002).
- [25] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Biosensors & Bioelectronics*, 16 (2001) 121.
- [26] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 1747.
- [27] L.C. Clark Jr., C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102 (1962) 29.
- [28] P.N. Bartlett, *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- [29] P.N. Bartlett, *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Techniques and Applications* (ed. P.N. Bartlett), Wiley, (2008) 1.
- [30] J. Wang, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 814.
- [31] G.G. Guilbault, G.J. Lubrano, *Anal. Chim. Acta*, 64 (1973) 439.
- [32] C. Chen, Q. Xie, D. Yang, H. Xiao, Y. Fu, Y. Tan, S. Yao, *RSC Advances*, 3 (2013) 4473.
- [33] J. Wang, *Electroanalysis*, 13 (2001) 983.
- [34] M. Gao, L. Dai, G.G. Wallace, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1089.
- [35] X. Pan, J. Kan, L. Yuan, *Sensors and Actuators B*, 102 (2004) 325.
- [36] R. Singhal, A. Chaubey, K. Kaneto, W. Takashima, B.D. Malhotra, *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (2004) 277.

- [37] Y. Zhang, Y. Hu, G.S. Wilson, D. Moatti-Sirat, V. Poltout, G. Reach, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1183.
- [38] J. Wu, L. Yin, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 3 (2011) 4354.
- [39] P. Si, P. Kannan, L. Guo, H. Son, D.-H. Kim, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 3845.
- [40] P.N. Bartlett, S. Booth, D.J. Caruana, J.D. Kilburn, C. Santamaría, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 734.
- [41] J. Sun, Y. Sun, Z. Wang, C. Sun, Y. Wang, X. Zhang, J. Shen, *Macromol. Chem. Phys.*, 202 (2001) 111.
- [42] E. Kosela, H. Elzanowska, W. Kutner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 724.
- [43] K.T. Lau, S.A.L. de Fortescu, L.J. Murphy, J.M. Slater, *Electroanalysis*, 15 (2003) 975.
- [44] J. Losada, M.P. García Armada, I. Cuadrado, B. Alonso, B. González, C.M. Casado, J. Zhang, *J. Organomet. Chem.*, 689 (2004) 2799.
- [45] A. A. Karyakin, *Electroanalysis*, 13 (2001) 813.
- [46] W. Schuhmann, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 82 (2002) 425.
- [47] M. Bannwarth, D. Hackmann-Pohl, S. Bastian, F. Giffhorn, G. E. Schulz, *Biochemistry*, 45 (2006) 6587.
- [48] M. Bannwarth, S. Bastians, D. Heckmann-Pohl, F. Giffhorn, G. E. Schulz, *Biochemistry*, 43 (2004) 11683.
- [49] H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- [50] N.C. Foulds, C.R. Lowe, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 82 (1986) 1259.
- [51] H. Zhang, Z. Meng, Q. Wang, J. Zheng, *Sensors and Actuators B*, 158 (2011) 23.
- [52] C. Luhana, X.J. Bo, J. Ju, L.P. Guo, *J. Nanopart. Res.*, 14 (2012) 1158.
- [53] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie (7. Auflage.)*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, (2013).

- [54] J.D. Watson, F.H.C. Crick, *Nature*, 171 (1953) 737.
- [55] F. Qu, N.-Q. Li, *Electroanalysis*, 9 (1997) 1348.
- [56] C.V. Raman, *Nature*, 108 (1921) 367.
- [57] C.V. Raman, *Indian J. Phys.*, 2 (1928) 387.
- [58] N. Sheppard, *The Historical Development of Experimental Techniques in Vibrational Spectroscopy*, in: J. M. Chalmers, P. Griffiths (Eds.) *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Wiley VCH, 2001.
- [59] K.H. Hellwege, *Einführung in die Physik der Molekeln*, Springer-Verlag, 2., korrigierte Aufl., Berlin; Heidelberg; NewYork; 1989.
- [60] R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy* (Wiley, Chichester, 2006).
- [61] E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, *Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy: and related plasmonic effects* (Amsterdam, Elsevier, 2009).
- [62] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.*, 26 (1974) 163.
- [63] M.G. Albrecht, J.A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 5215.
- [64] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, 84 (1977) 1.
- [65] S. Cintra, M.E. Abdelsalam, P.N. Bartlett, J.J. Baumberg, T.A Kelf, Y. Sugawara, A.E. Russel, *Faraday Discuss.*, 132 (2006) 191.
- [66] P.L. Stiles, J.A. Dieringer, N.C. Shah, R.P. Van Duyne, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 1 (2008) 601.
- [67] W.L. Barnes, A. Dereux, T.W. Ebbesen, *Nature*, 424 (2003) 824.
- [68] S. Mahajan, R.M. Cole, J.D. Speed, S.H. Pelfrey, A.E. Russell, P.N. Bartlett, S.M. Barnett, J.J. Baumberg, *J. Phys. Chem. C*, 114 (2010) 7242.
- [69] L. Jensen, C.M. Aikens, G.C. Schatz, *Chem. Soc. Rev.*, 37 (2008) 1061.
- [70] N.G. Tognalli, A. Fainstein, E.J. Calvo, M. Abdelsalam, P.N. Bartlett, *J. Phys. Chem. C*, 116 (2012) 3414.

- [71] T.A. Kelf, Y. Sugawara, R.M. Cole, J.J. Baumberg, *Physical Review B*, 74 (2006) 245415.
- [72] R.M. Cole, J.J. Baumberg, F.J. Garcia de Abajo, S. Mahajan, M. Abdelsalam, P.N. Bartlett, *Nano Lett.*, 7 (2007) 2094.
- [73] R.G. Nuzzo, D.L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 4483.
- [74] F. Schreiber, *Surf. Sci.*, 65 (2000) 151.
- [75] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G.M. Whiteside, *Chem. Rev.*, 105 (2005) 1103.
- [76] A. Ulman, *Chem. Rev.*, 96 (1996) 1533.
- [77] S.M. Lindsay, M.A. Ratner, *Adv. Mater*, 19 (2007) 23.
- [78] C.H. Hamann, W. Vielstich, *Elektrochemie* (Wiley, Weinheim, 2005).
- [79] W. Schmickler, *Chem. Rev.*, 96 (1996) 3177.
- [80] M.A. Schneeweiss, D.M. Kolb, *Chemie in unserer Zeit*, 34 (2000) 72.
- [81] W.J. Lorenz, G. Staikov, *Surf. Sci.*, 335 (1995) 32.
- [82] M.H. Hölzle, V. Zwing, D.M. Kolb, *Electrochimica Acta*, 40 (1995) 1237.
- [83] H. Hagenström, M.J. Esplandiú, D.M. Kolb, *Langmuir*, 17 (2001) 839.
- [84] H. Hagenström, M.A. Schneeweiss, D.M. Kolb, *Electrochimica Acta*, 45 (1999) 1141.
- [85] H. Hagenström, M.A. Schneeweiss, D.M. Kolb, *Langmuir*, 15 (1999) 7802.
- [86] T. Baunach, *Dissertation Universität Ulm* (2004).
- [87] T. Baunach, V. Ivanova, D.M. Kolb, H.G. Boyen, P. Ziemann, M. Büttner, P. Oelhafen, *Adv. Mater*, 16 (2004) 2014.
- [88] V. Ivanova, T. Baunach, D.M. Kolb, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 4283.
- [89] M. Manolova, M. Kayser, D.M. Kolb, H.G. Boyen, P. Ziemann, D. Mayer, A. Wirth, *Electrochimica Acta*, 52 (2007) 2740.

- [90] V. Ivanova, M. Manolova, D.M. Kolb, *Solid State Phenomena*, 121-123 (2007) 363.
- [91] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, 1993.
- [92] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, 1994.
- [93] S. Trasatti, *J. Electroanal. Chem.*, 33 (1971) 351.
- [94] D.C. Grahame, *Chem. Rev.*, 41 (1947) 441.
- [95] D.M. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 1162.
- [96] N.D. Lang, W. Kohn, *Phys. Rev.*, B 3 (1971) 1215.
- [97] W. Schmickler, *J. Electroanal. Chem.*, 150 (1983) 19.
- [98] J.P. Badiali, M.L. Rosinberg, *J. Electroanal. Chem.*, 158 (1983) 253.
- [99] J. Heinze, *Angew. Chem.*, 96 (1984) 823.
- [100] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, 56 (1986) 930.
- [101] D. Rugar, P. Hansma, *Physics today*, 43 (1990) 23.
- [102] E. Meyer, *Progress in Surface Science*, 41 (1992) 3.
- [103] D.M. Kolb, *Progress in Surface Science*, 51 (1996) 109.
- [104] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie*, Springer, 2005.
- [105] M. Faraday, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 124 (1834) 77.
- [106] W.B. Jensen, *J. Chem. Educ.*, 89 (2012) 1208.
- [107] H.G. Boyen, P. Ziemann, U. Wiedwald, V. Ivanova, D.M. Kolb, S. Sakong, A. Gross, A. Romanyuk, M. Büttner, P. Oelhafen, *nature materials*, 5 (2006) 394.
- [108] T. Baunach, V. Ivanova, D.A. Scherson, D.M. Kolb, *Langmuir*, 20 (2004) 2797.
- [109] T. Sawaguchi, F. Mizutani, S. Yoshimoto, I. Taniguchi, *Electrochimica Acta*, 45 (2000) 2861.

- [110] W. Zhou, T. Baunach, V. Ivanova, D.M. Kolb, *Langmuir*, 20 (2004) 4590.
- [111] M. Manolova, V. Ivanova, D.M. Kolb, H.G. Boyen, P. Ziemann, M. Büttner, A. Romanyuk, P. Oelhafen, *Surf. Sci.*, 590 (2005) 146.
- [112] P.E. Laibinis, C.D. Bain, G.M. Whitesides, *J. Phys. Chem.*, 95 (1991) 7017.
- [113] M. Manolova, H.G. Boyen, J. Kucera, A. Groß, A. Romanyuk, P. Oelhafen, V. Ivanova, D.M. Kolb, *Adv. Mater.*, 21 (2009) 320.
- [114] F. Eberle, M. Saitner, H.G. Boyen, J. Kucera, A. Groß, A. Romanyuk, P. Oelhafen, M. D'Olieslaeger, M. Manolova, D.M. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 341.
- [115] A.S.N. Murthy, J. Sharma, *Anal. Chim. Acta*, 363 (1998) 215.
- [116] A.M. Oliveira-Brett, F.M. Matysik, M.T. Vieira, *Electroanalysis*, 9 (1997) 209.
- [117] S.B. Hall, E.A. Khudaish, A.L. Hart, *Electrochimica Acta*, 43 (1998) 579.
- [118] E.B. Makovos, C.C. Liu, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 15 (1986) 157.
- [119] S. Park, H. Boo, T.D. Chung, *Anal. Chim. Acta*, 556 (2006) 46.
- [120] M. Manolova, private communication.
- [121] J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, R. Hempelmann, G.W. Kohring, F. Giffhorn, M. Manolova, D.M. Kolb, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (2010) 12604.
- [122] J.J. Gooding, V.G. Praig, E.A.H. Hall, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2396.
- [123] K.G.M.M. Alberti, P.Z. Zimmet, *Diabet. Med.*, 15 (1998) 539.
- [124] R.E. Khoma, V.O. Gel'mbol'dt, O.V. Shishkin, V.N. Baumer, A.A. Ennan, *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 59 (2014) 1.
- [125] F. Bansebaa, Y. Zhou, A.G. Brolo, D.E. Irish, Y. Deslandes, E. Kruus, T.H. Ellis, *Spectrochimica Acta Part A*, 55 (1999) 1229.
- [126] N. Han Jang, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23 (2002) 1790.
- [127] R. Liu, D. Zhang, C. Cai, Y. Xiong, S. Li, Y. Su, M. Si, *Vibrational Spectroscopy*, 67 (2013) 71.

- [128] D.K. Lambert, *Electrochimica Acta*, 41 (1996) 623.
- [129] S.D. Friend, S.G. Boxer, *Acc. Chem. Res.*, 48 (2015) 998.
- [130] P.M. Morse, *Physical Review*, 34 (1929) 57.
- [131] E. Shustorovich, *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 1 (2007) 307.
- [132] J.W. McPherson, *J. Appl. Phys.*, 118 (2015) 204106.
- [133] I.T. Suydam, S.G. Boxer, *Biochemistry*, 42 (2003) 12050.
- [134] T. Jacob, private communication.

Liste der Veröffentlichungen

- [1] S. Horvat, L. Daccache, T. Jacob, A. Farkas: „Messzelle für die Raman-Spektroskopie an einer Fest-Flüssig-Grenzfläche und Verwendungen hiervon“
Deutsche Patentanmeldung 10 2016 222 613.4
- [2] M. Mohr, S. Horvat, L. Daccache, K. Brühne, T. Jacob, H.-J. Fecht: *Influence of grain boundaries on elasticity and thermal conductivity of nanocrystalline diamond films*, Acta Materialia 2017, 122, 92.

Geplante weitere Veröffentlichungen (nach dem Einreichen der Dissertation)

- [3] *Electrochemical study about the influence of two different enzyme linkers for the immobilization of Pyranose 2-Oxidase on functionalized electrode surface.*
- [4] *Experimental investigations about the local electric field in the electrochemical double layer.*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Timo Jacob für seine Bereitschaft mich nach der Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Elektrochemie als Doktorand aufzunehmen und als Doktorvater am Gelingen dieser Dissertation mitzuwirken. Er ermöglichte mir einen Aufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Phil Bartlett, an der *School of Chemistry* in Southampton, um die Grundlagen der Methode *Surface-Enhanced Raman-Spectroscopy* zu erlernen. Es machte mir eine große Freude, am Aufbau sowie der Etablierung dieser Methode am Institut für Elektrochemie mitzuwirken, die ihren Höhepunkt in der Entwicklung eines Patents bezüglich einer elektrochemischen Raman-Messzelle fand. Des Weiteren möchte ich mich für die Teilnahme an den Konferenzen wie das Symposium zu 40 Jahre SERS (2013) in Southampton und der ICORS (2014) in Jena sowie der Bereitstellung der gezeigten QM/MM-Simulation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Ziener gilt mein Dank für die Bereitschaft das Zweitgutachten anzufertigen.

Hervorheben möchte ich zudem die hervorragenden wissenschaftlichen Diskussionen über das lokale elektrische Feld mit Dr. Attila Farkas, welche meinen Horizont erweiterten und mir stets in Erinnerung bleiben werden.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Mila Manolova, deren Arbeiten ich zum Thema Enzym-Immobilisierung weiterführen durfte.

Ein besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe für Bauelemente für die Aufdampfung der SERS-Substrate. Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe für Mikro- und Nanomaterialien, in welcher die SEM-Aufnahmen aufgezeichnet wurden.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen für die gemeinsam erlebte Zeit, wie unter anderem die Konferenzen in Riezlern, bedanken. Sehr geschätzt habe ich hierbei die Zusammenarbeit mit Dr. Martin Metzler und Layal Daccache.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Freundin, meinen Eltern sowie meinen Freunden bedanken, die alle mein Leben bereichern und mich auf diesem Lebensabschnitt begleitet haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Horvat
Vorname: Sebastian
Geburtstag: 10. März 1986
Geburtsort: Göppingen

Schulische Ausbildung:

09/92 – 07/96 J.-G.-Fischer-Grundschule Süßen
09/96 – 07/05 Rechberg-Gymnasium Donzdorf
07/05 Abitur

Zivildienst:

08/05 – 05/06 Lebenshilfe für Menschen mit Behinderung,
Göppingen-Voralb

Studium:

09/06 – 02/12 Diplom-Chemie-Studium an der Universität Ulm
04/09 Vordiplom
05/11 Diplomarbeit am Institut für Elektrochemie der
Universität Ulm
12/11 Akademischer Grad des Diplom-Chemikers (Dipl.-Chem.)
02/12 – 06/17 Promotion am Institut für Elektrochemie der
Universität Ulm
06/17 Akademischer Grad der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)