

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Nikolaus Meyerbröker

aus Hannover

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2012

**Präparation und Charakterisierung
ultradünner, biokompatibler
Filme und Membranen
auf Basis von Polyethylenglykolen**

Gutachter:

apl. Prof. Dr. Michael Zharnikov

apl. Prof. Dr. Hans-Robert Volpp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen.....	15
2.1	Der Begriff der Oberfläche	15
2.2	Selbstaggregierende Monolagen (self-assembled monolayers, SAMs)	16
2.2.1	Geordnete Monolagen	16
2.2.2	Selbstaggregierende Monolagen	16
2.2.3	Selbstaggregierende Monolagen organischer Thiole auf Gold	18
2.2.4	Selbstaggregierende Monolagen mit aromatischem Gerüst	19
2.3	Verhalten von SAMs als Reaktion auf ionisierende Strahlung.....	20
2.4	Proteinresistente Oberflächen	23
2.4.1	Wechselwirkungen von Proteinen mit Oberflächen.....	23
2.4.2	Eigenschaften von Polyethylenglykolen (PEGs)	24
2.4.3	Verhalten von Polyethylenglykolen in wässriger Umgebung	24
2.4.4	Proteinabweisende Eigenschaften von Polyethylenglykolen	25
2.4.5	Proteinadsorption auf Polyethylenglykolen.....	26
3	Charakterisierungsmethoden	27
3.1	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS).....	27
3.1.1	Grundlagen.....	27
3.1.2	Apparativer Aufbau	29
3.1.3	XPS-Signale	30
3.1.4	Schichtdickenbestimmung dünner Filme.....	31
3.1.5	Bestimmung der stöchiometrischen Zusammensetzung.....	33
3.2	Nahkanten-Röntgenfeinstruktur-Absorptionsspektroskopie (NEXAFS)	34
3.3	Infrarot-Reflexion-Absorption Spektroskopie (IRRAS)	36
3.4	Ellipsometrie	37
3.5	Elektronenmikroskopie (REM, TEM).....	40
3.6	Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	41
3.7	Fluoreszenzmikroskopie (FM)	43
3.8	Bulge-Test Methode.....	44
4	Experimenteller Teil.....	47
4.1	Synthesen.....	47
4.1.1	4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) und 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT).....	47
4.1.2	Epoxid-terminierte Polyethylenglykole (PEGx-EPX)	48
4.2	Selbstaggregierende Monolagen (SAMs)	49
4.2.1	Präparation selbstaggregierender Monolagen	49
4.2.2	Elektronenbestrahlung zur homogenen und strukturierten Bestrahlung	49
4.2.3	Präparation PEGylierter selbstaggregierender Monolagen	51
4.2.4	Präparation freistehender Membranen aus PEGylierten SAMs	52

4.2.5	ATRP-Polymerisation von P-NIPAM auf Amino-terminierten SAMs	54
4.2.6	Goldätzexperimente.....	54
4.2.7	Protein-Adsorptionsexperimente.....	54
4.3	Dünne Hydrogel-Filme aus quervernetzten Polyethylenglykolen	55
4.3.1	Präparation dünner, quervernetzter PEG-Filme	55
4.3.2	Herstellung und Immobilisierung von Gold-Nanopartikeln (AuNPs)	55
4.3.3	Ellipsometrische Untersuchung der Quelleigenschaften unbestrahlter PEG-Filme	56
4.3.4	AFM-Untersuchung der Quelleigenschaften bestrahlter PEG-Filme	57
4.3.5	Bestimmung der mechanischen Eigenschaften freistehender Membranen	57
4.4	Spektroskopische Messungen.....	59
4.4.1	XPS.....	59
4.4.2	UV-VIS-Messungen.....	60
5	Ergebnisse und Diskussion	61
5.1	Elektronenstrahlinduzierte Effekte Amino-terminierter, aromatischer SAMs ...	61
5.1.1	CBPT-SAMs als Templat für die chemische Elektronstrahlolithographie.....	62
5.1.2	Einfluss der Elektronenenergie auf die Effizienz der chemischen Lithographie	64
5.1.3	Einfluss der Elektronenenergie auf den Grad der Quervernetzung.....	68
5.1.4	Charakterisierung von 4'-Aminobiphenyl-4-thiol (ABPT) Monolagen	70
5.1.5	Reaktivität oberflächengebundener Aminogruppen nach Elektronenbestrahlung.....	75
5.2	Biokompatible Nanomembranen auf Basis quervernetzter SAMs	81
5.2.1	PEGylierung selbstaggregierender Monolagen.....	82
5.2.2	Nass-chemische Kopplung von PEG-Epoxiden an iNBPT-Filme.....	84
5.2.3	Kopplung von PEG-Epoxiden mittels Spincoating-Technik	85
5.2.4	Präparation und Charakterisierung freistehender, PEGylierter Nanomembranen	89
5.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse PEGylierter Nanomembranen auf SAM-Basis	94
5.3	Dünne Filme aus quervernetzten Polyethylenglykolen.....	95
5.3.1	Präparation quervernetzter, dünner PEG-Filme	95
5.3.2	Charakterisierung der PEG-Filme mittels Ellipsometrie und XPS.....	97
5.3.3	<i>In-situ</i> Charakterisierung der PEG-Filme mittels IRRAS Spektroskopie.....	100
5.3.4	Temperaturabhängiges Quellverhalten quervernetzter PEG-Filme	101
5.3.5	Proteinabweisende Eigenschaften der PEG-Filme	104
5.4	Verhalten quervernetzter PEG-Filme bei Elektronenbestrahlung im UHV.....	107
5.4.1	<i>In-situ</i> XPS-Messungen und Elektronenbestrahlung.....	107
5.4.2	NEXAFS und HRXPS Messungen nach Elektronenbestrahlung	113
5.4.3	<i>Ex-situ</i> IRRAS Messung nach Elektronenbestrahlung.....	115
5.4.4	Benetzbarkeit der PEG-Filme vor und nach Elektronenbestrahlung	115
5.4.5	Veränderungen der Topographie von PEG-Filmen durch Bestrahlung.....	117
5.4.6	Quelleigenschaften bestrahlter PEG-Filme	119
5.4.7	Proteinabweisende Eigenschaften der PEG-Filme nach Elektronenbestrahlung	124
5.4.8	Adsorption von Farbstoffmolekülen aus wässriger Phase	127

5.5	Verbundfilme aus Polyethylenglykolen mit Gold-Nanopartikeln (AuNPs)	129
5.5.1	Adsorption von AuNPs und filmdickenabhängige UV-VIS Spektren	129
5.5.2	Temperaturabhängige UV-VIS Untersuchungen der AuNP-PEG-Filme.....	130
5.5.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung der AuNP-PEG-Filme	132
5.5.4	Adsorption von AuNPs in lithographisch strukturierte PEG-Filme I.....	134
5.5.5	Adsorption von AuNPs in lithographisch strukturierte PEG-Filme II.....	135
5.6	PEG-Hydrogel Nanomembranen	137
5.6.1	Präparation.....	137
5.6.2	Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung.....	137
5.6.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.....	139
5.6.4	Makromechanische Eigenschaften der PEG-Membranen	140
6	Zusammenfassung.....	143
7	Referenzen	145
8	Anhang.....	155
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	155
8.2	Liste der Publikationen	156
8.3	Danksagung.....	157

Kurzfassung

Motivation dieser Arbeit ist die Präparation ultradünner Nanomembranen (< 10 nm), die außerdem biokompatibel bzw. proteinresistent sind, um als Trägerfilm biologischer Proben für die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM) Verwendung finden zu können.

Als Basis werden selbstaggregierende Monolagen (SAMs) aus 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) auf einem Au(111)-Substrat eingesetzt, die durch Bestrahlung mit niederenergetischen Elektronen lateral quervernetzt und deren terminale Nitrogruppen zu oberflächengebundenen Aminogruppen reduziert werden (iNBPT). An diese lassen sich Epoxid-terminierte Polyethylenglykole (PEG) derart koppeln, dass die resultierende PEG-iNBPT Doppelschicht bei einer Gesamtdicke von nur 5 nm biokompatibel wird und der Adsorption von Fibrinogen als Testprotein widersteht. Ferner wird ellipsometrisch und röntgenspektroskopisch (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) untersucht, welchen Einfluss Schichtdicke und Packungsdichte des PEG-Films auf die proteinabweisenden Eigenschaften des PEG-iNBPT-Films ausüben und die Resultate mit denen eines etablierten, biokompatiblen SAMs aus Oligoethylenglykol-terminiertem Undecanthiol verglichen. Zuletzt muss der PEG-iNBPT Film vom Substrat abgelöst und als Membran über ein TEM-Grid mit freistehenden Bereichen von mindestens $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ gespannt werden können, ohne dass die Folie dabei ihre Biokompatibilität verliert. Ihre Eignung als HRTEM-Trägerfilm wird anhand von Gold-Nanopartikeln und dem Eisenspeicherprotein Ferritin demonstriert.

Wegen der vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten von NBPT-SAMs wäre es interessant, ein alternatives SAM-bildendes System mit ähnlichen Merkmalen zu besitzen. In einer früheren Arbeit wurde bereits aufgeführt, dass 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT) Monolagen ebenfalls durch Elektronenbestrahlung quervernetzt und die terminale Nitrilgruppe zu einer Aminogruppe reduziert wird. Darauf aufbauend wird in dieser Arbeit gezeigt, dass sich CBPT-SAMs als negatives Resist-Material in Elektronenstrahlolithographie, sowie als Templat in der chemischen Elektronenstrahlolithographie (EBCL) eignen. In diesem Zusammenhang wird der Einfluss der Elektronenenergie im Bereich von 0.5-10 keV auf den Grad der Quervernetzung aromatischer SAMs sowie auf die Effektivität der Reduktion terminaler Gruppen beleuchtet, um so Aufschlüsse über zugrundeliegende Prozesse bei der Elektronenbestrahlung selbstaggregierender Monolagen zu gewinnen. Außerdem wird der Frage nachgegangen, ob alle durch elektronenstrahlinduzierte Reduktion entstandenen, oberflächengebundenen Aminogruppen gleichermaßen in der Lage sind, als Anker zur Kopplung weiterer Moleküle zu dienen.

Die SAM-basierenden, PEGylierten Nanomembranen sind mit 5 nm zwar außerordentlich dünn, aber nur einseitig biokompatibel. Es wird in dieser Arbeit eine zweite Präparationsmethode vorgestellt, die es ermöglicht, direkt und ohne den Umweg über quervernetzte SAMs, doppelseitig biokompatible Nanomembranen variabler Dicke herzustellen, die ab 20 nm ausreichend mechanische Stabilität aufweisen, um freistehend existieren können. Als Vorstufe dient ein aus Epoxid- und Amino-terminierten, multifunktionellen Polyethylenglykolen bestehender Zweikomponentenfilm, der per Rotationsbeschichtung auf ein flaches Substrat aufgebracht und thermisch quervernetzt wird. Die 6-300 nm dicken PEG-Filme werden ellipsometrisch sowie XPS- und infrarotspektroskopisch charakterisiert und auf ihre filmdickenabhängige Proteinresistenz untersucht. Durch die Quervernetzung zeigt das polymere Netzwerk ein Hydrogel-typisches, reversibles Quellverhalten beim Kontakt mit Wasser, welches eingehend ellipsometrisch analysiert wird. Zudem können Gold-Nanopartikel (AuNPs) irreversibel und in hohen Dichten in der Matrix des PEG-Films immobilisiert werden und so das Quellverhalten in eine optische Antwort des Systems umwandeln.

Ein zweiter Aspekt bezüglich der PEG-Filme betrifft ihre Reaktion auf die Bestrahlung mit Elektronen. Das Verhalten von Polyethylenglykolen wird diesbezüglich erstmals systematisch mit Hilfe der PEG-Filme XPS- und infrarotspektroskopisch sowie mit Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS) untersucht. Ferner wird rasterkraftmikroskopisch (AFM) und fluoreszenzmikroskopisch ermittelt, wie sich die dosisabhängige Elektronenbestrahlung auf die PEG-Filme in Bezug auf Quellverhalten, Topographie, Benetzbarkeit und Biokompatibilität auswirken.

Zuletzt werden die PEG-Filme von ihrem Substrat abgehoben, freistehend über eine Gitterstruktur gespannt und die mechanischen Eigenschaften wie Elastizitätsmodul und Eigenspannung der Membranen bestimmt. Auch in diese können Gold-Nanopartikel eingebettet werden und somit eine Verbundmembran mit erweiterten optischen Eigenschaften hergestellt werden. Sie zeigt zudem ebenfalls ein ausgeprägtes Quellverhalten, welches zu veränderten Eigenschaften in Abhängigkeit von äußern Parametern wie Temperatur oder Luftfeuchtigkeit führt.

Abstract

The motivation behind this work is the preparation of ultrathin nanomembranes (<10 nm), which should be additionally biocompatible or protein-repelling to be used as supporting film for high-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) studies of biological samples. It may improve essentially the resolution and structural reliability of such experiments in their specific application to sensitive biological targets.

As a basis for preparation, self-assembled monolayers (SAMs) of 4'-nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) on Au(111) substrates are used. In the first step, NBPT SAMs are cross-linked by low-energy electron exposure resulting in a mechanically stable film. Simultaneously, the terminal nitro groups are reduced to reactive amine moieties to which epoxy-functionalized poly(ethylene glycols) (PEGs) are coupled. The resulting PEG-iNBPT bilayer with a total thickness of only 5 nm resists the adsorption of fibrinogen as a test protein. Further, layer thickness and package density of the PEG-moiety is monitored by ellipsometry and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to investigate the influence on protein-repellent properties of the PEG-iNBPT film. The results are compared with those of established biocompatible SAMs of oligo(ethylene glycol)-terminated undecanethiol. Finally, the PEG-iNBPT film is separated from its substrate and transferred to a TEM grid with freestanding areas of at least $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ without losing biocompatibility. The suitability as HRTEM supporting film is demonstrated using gold nanoparticles and the iron storage protein ferritin.

Due to the versatile applications of NBPT SAMs, it would be valuable to have a second SAM-building system with similar characteristics. In a previous work it was already shown that SAMs of 4'-cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT) are cross-linked by electron exposure and the terminal nitrile group is converted into an amino moiety. On this basis, in this work it is demonstrated that CBPT SAMs are suitable as a negative resist material in electron beam lithography, as well as a template in the electron beam chemical lithography (EBCL). In this context, the influence of the electron energy in the range of 0.5-10 keV is investigated concerning the degree of crosslinking of aromatic SAMs as well as the efficiency of the reduction of the terminal groups. Through this, one receives information about the underlying processes involved in the electron irradiation of self-assembled monolayers. In addition, the question is investigated whether all surface-bound amino groups formed by electron beam induced reduction are equally capable of acting as an anchor group for other molecules.

PEGylated nanomembranes on a basis of cross-linked SAMs are extremely thin but they only offer a single-side biocompatibility. In this work a second preparation technique is presented which allows double-sided biocompatible nanomembranes in arbitrary thickness directly and without having to use cross-linked SAMs. Above 20 nm, they have sufficient mechanical stability to be free-standing. As precursors, epoxy- and amino-terminated, multi-functional poly(ethylene glycols) (PEGs) are applied as a two-component film by spin coating on a flat substrate and are thermally cross-linked subsequently. PEG films between 6-300 nm thicknesses are prepared and characterized by ellipsometry, XPS and infrared spectroscopy as well as their thickness dependent protein-repellence is evaluated. By the cross-linking procedure, the polymeric network exhibits a hydrogel-like, reversible swelling behavior upon contact with water, which is analyzed in detail by ellipsometry. Additionally, gold nanoparticles (AuNPs) are irreversibly immobilized and in high densities in the PEG matrix of the films to transfer the swelling behavior into an optical response of the film.

For the first time, the behavior of poly(ethylene glycols) in respect to their reaction toward irradiation with electrons is systematically investigated using XPS, infrared spectroscopy and near edge

X-ray-absorption spectroscopy (NEXAFS). Furthermore, atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy are used to determine the dose-dependent effect of electron exposure on the PEG films in terms of swelling behavior, topography, wettability and biocompatibility.

Finally, the PEG-films are detached of their substrate and tightened over a grating structure to determine the mechanical properties of the membranes with the bulge test. Also gold nanoparticles can be embedded in the membrane producing a composite membrane which offers enhanced optical properties. The membrane shows a distinct swelling, which expresses altered properties as a function of parameters such as temperature or humidity.

1 Einleitung

ROBERT N. NOYCE von der Firma *Fairchild Semiconductors* (USA) ließ 1961 den Prototypen eines integrierten Schaltkreises unter der schlichten Bezeichnung „Semiconductor Device and Lead Structure“ zum Patent anmelden.¹ Neben der Idee, aktive und passive elektronische Bauelemente auf einem Siliziumchip zu vereinen, war es insbesondere der Herstellungsprozess, der sich als besonders zukunftsweisend erwies. Eine Folge von Maskenbestrahlungen, Ätzschritten und Metallabscheidungen ergab hochkomplexe Strukturen aus einer zunächst chemisch und topographisch homogenen Oberfläche. Schon der erste kommerzielle Mikroprozessor von 1972 vereinte 3500 Transistoren bei Strukturgrößen von 10 μm auf einem Siliziumchip. Heute ist es möglich, mehr als 2 Milliarden Transistoren bei einer Strukturgröße von 32 nm auf einem Chip zu integrieren.

Voraussetzung für diesen Erfolg war vor allem die Entwicklung lithographischer Techniken zur Mikro- und Nanostrukturierung. Auf einem glatten Substrat wird ein Resist-Material aufgebracht, das bezüglich seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Entwicklerlösung durch eine externe Aktivierung entweder stabilisiert (negativ Resist) oder destabilisiert (positiv Resist) wird. Lithographische Strukturierungen erfolgen am einfachsten mittels Belichtung durch eine Photomaske. Da aber die Herstellung der Lochmasken mit zunehmender Miniaturisierung sehr aufwändig und teuer ist, bietet sich als Alternative die maskenlose Lithographie an, bei der der Resist zeilenweise beispielsweise durch einen fokussierten Elektronenstrahl belichtet wird. Trotz der im Vergleich zur Maskenbestrahlung deutlich langsameren Ausführungsgeschwindigkeit, hat sich dieses Verfahren etabliert, da ein Elektronenstrahl relativ einfach bis auf wenige Nanometer fokussiert und positioniert werden kann und das Gebiet der Nanolithographie (Strukturgrößen unter 100 nm) ohne großen apparativen Aufwand zugänglich ist.

Nun wird aber das Resist-Material zum begrenzenden Faktor was die strukturelle Auflösung angeht, da sie nicht mehr durch die Ausdehnung des Elektronenstrahls sondern durch die Filmdicke des Resists bestimmt wird. Der so genannte *Proximity-Effekt* führt dazu, dass durch Überblendung der effektiv bestrahlte Bereich immer größer ist als der Durchmesser des Elektronenstrahls. Die durch Rückstreuungselektronen (back scattered electrons, BSE) hervorgerufene Unschärfe wird umso größer, je höher die Energie des Elektronenstrahls ist. Andererseits kann dessen Energie nicht beliebig gesenkt werden, da dann zum einen seine Fokussierbarkeit abnimmt und zum anderen die Eindringtiefe in das Resist-Material sinkt und es nicht mehr vollständig belichtet wird. Die minimale Filmdicke für einen per Spincoating aufgetragenen PMMA Standard-Resist liegt bei ~ 50 nm, was eine Elektronenenergie von mindestens 5 keV erfordert und wegen des Proximity-Effekts zu einer Begrenzung der effektiven Auflösung von etwa 100 nm führt.² Um kleinere Strukturen auf elektronenstrahlolithographischem Weg herzustellen, muss ein vollkommen anderes Resist-Material verwendet werden.

Selbstaggregierende Monolagen (SAMs) organischer Thiole auf Gold (**Abb. 1**) sind seit Anfang 1990 im Mittelpunkt intensiver Forschung, da sie ein präparativ einfaches und vielseitiges System zur Oberflächenfunktionalisierung bilden.³⁻⁵

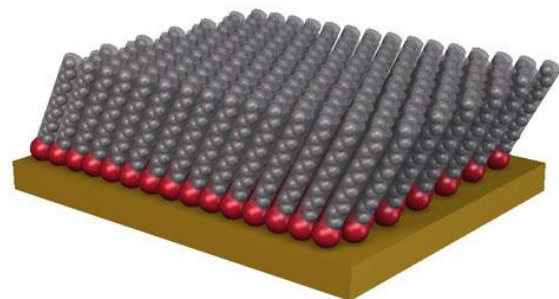


Abb. 1. Selbstaggregierende Monolage auf einem Goldsubstrat (gelb) am Beispiel von Dodecanthiol mit einer Thiolat Kopfgruppe (rot), einer Spacer-Gruppe (grau) und einer optionalen Endgruppe.

Der monomolekulare Film ist dabei so dicht gepackt, dass er trotz seiner extrem geringen Dicke von nur ~ 1 nm das darunterliegende Substrat wirksam beispielsweise vor Ätzchemikalien schützen kann.⁶ Es ist daher naheliegend, ein derartiges System als monomolekularen Resist zur nanolithographischen Strukturierung zu verwenden.⁷ Bereits bei einer Elektronenbestrahlung ab 10 eV können die (C-H)- und (C-C)-Bindungen gespalten werden,⁸ was bei aliphatischen SAMs zur Desorption der Molekülfragmente führt, während es bei Monolagen mit aromatischem Gerüst zu einer intermolekularen Quervernetzung kommt.

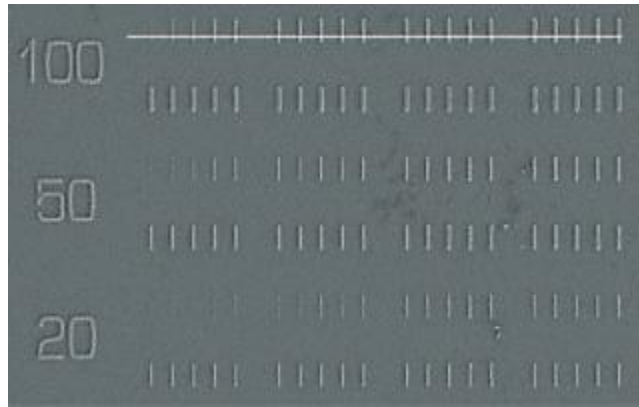


Abb. 2. Nanolithographische Strukturierung gemäß „Top-Down“-Methode: Ein aromatischer Biphenylthiol-SAM als negatives Resist-Material auf einem Siliziumsubstrat erlaubt strukturelle Auflösungen bis zu 20 nm. [10]

Die bestrahlten Areale aliphatischer SAMs können das Substrat bei einem anschließenden nasschemischen Ätzprozess nicht mehr schützen, die SAMs reagieren als Positiv-Resist.⁹ Auf der anderen Seite gewinnen aromatische SAMs durch Quervernetzung an diesbezüglicher Widerstandsfähigkeit und lassen sich als Negativ-Resist verwenden.¹⁰⁻¹² In **Abb. 2** ist ein Beispiel für die Leistungsfähigkeit von SAMs als Resist-Material in der Nanolithographie gezeigt. Aufgrund der geringen Dicken kann mit entsprechend niedrigen Elektronenenergien gearbeitet und Strukturen bis 20 nm realisiert werden. Weder mit klassischen Resist-Materialien noch maskenlithographisch lassen sich derart hohe Auflösungen erzielen.

Die Verwendung selbstaggregierender Monolagen beschränkt sich aber bei weitem nicht nur auf die Verwendung als Resist-Material zur „Top-down“-Nanostrukturierung. **Abb. 3** gibt einen Überblick der wichtigsten Anwendungsgebiete. Insbesondere bei Verwendung aliphatischer- und aromatischer Thiole, die eine funktionelle Endgruppe tragen, ergibt sich eine Vervielfältigung der Möglichkeiten. Durch eine geeignete Wahl der Endgruppen von SAMs können sie so die Charakteristika von Oberflächen beispielsweise bezüglich Benetzbarkeit,¹³ elektrischer Leitfähigkeit¹⁴⁻¹⁵ oder Widerstandsfähigkeit gegenüber unspezifischer Proteinadsorption und Zelladhäsion gesteuert werden.¹⁶⁻¹⁷

Gerade die Anwendung selbstaggregierender Monolagen im biologischen Kontext ist von großem Interesse und erstreckt sich auf Forschungsgebiete wie der

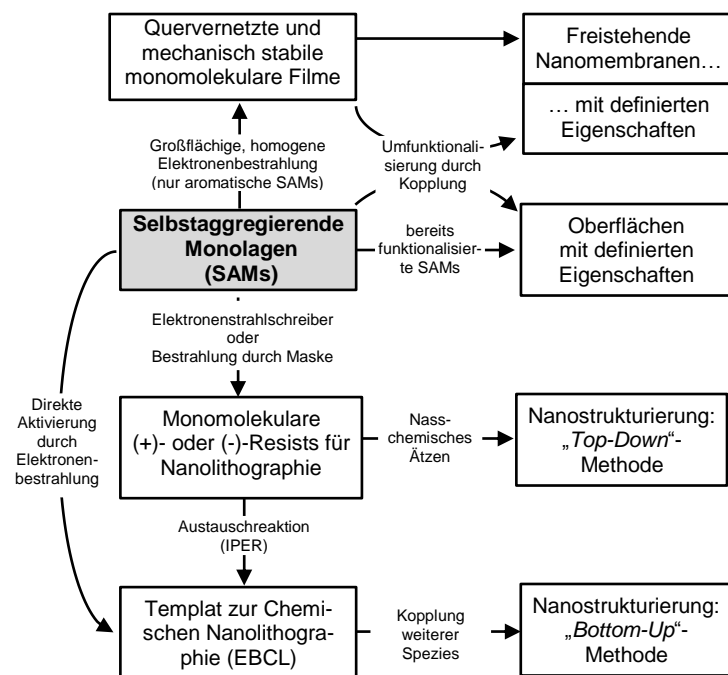


Abb. 3. Schema der wichtigsten Anwendungsbereiche selbstaggregierender Monolagen (SAMs) organischer Thiole auf Gold.

Bildung von Biofilmen auf Oberflächen, Biosensoren und medizinischen Anwendungen. Dabei stellen die Monolagen aufgrund ihrer geringen Rauigkeit und chemischen Uniformität eine nahezu ideales Modellsystem dar, um die Wechselwirkung von Biomolekülen mit Oberflächen zu untersuchen.¹⁸ Es reicht bereits der nur ~ 2 nm dünne Film eines Hexaethylglykol-terminierten Undecanthiol-SAMs – $\text{HS-C}_{11}\text{H}_{22}\text{-(OCH}_2\text{CH}_2)_6\text{-OH}$ – aus, um eine vollständig biokompatible Oberfläche zu schaffen, die der Adsorption selbst stark adsorbierender Proteine wie Fibrinogen widersteht.

Oberflächen können aber auch dadurch modifiziert werden, dass die Endgruppen der SAMs als Anker zur Kopplung weiterer Spezies verwendet werden. Dafür eignen sich insbesondere Amino-terminierte Filme, da die NH_2 -Gruppe als potentes Nukleophil mit einer Vielzahl chemischer Gruppen wie Säurechloriden, Anhydriden, Isocyanaten und Epoxiden unter milden Bedingungen reagiert. In diesem Zusammenhang hat sich ein eigenständiges Forschungsgebiet entwickelt, welches SAMs als Basis für oberflächeninitiierte Polymerisationen (surface-initiated polymerization, SIP) einsetzt.¹⁹⁻²⁰ Besonders interessant ist diese Polymerisationsmethode in Kombination mit der Elektronenstrahlolithographie zur so genannten „Bottom-Up“-Nanostrukturierung. Ein vielseitig einsetzbares Verfahren zur Erzeugung von Strukturen chemischer Reaktivitäten führt über eine strahlungsinduzierte Austauschreaktion (irradiation-promoted exchange-reaction, IPER). Dabei werden belichtete Bereiche eines aliphatischen SAMs *ohne* Endgruppe durch Alkanthiole *mit* reaktiver Endgruppe ausgetauscht, die als Ausgangspunkt für eine oberflächeninitiierte Polymerisation dient.²¹

Ein zweiter Weg zur nanolithographischen „Bottom-Up“-Strukturierung nutzt die Tatsache aus, dass sich die Endgruppen einiger SAMs mit einem Elektronenstrahl auch direkt aktivieren lassen und der Schritt der Austauschreaktion deshalb nicht mehr benötigt wird. So zeigen aliphatische Monolagen aus 11-Aminoundecanthiol (AUDT) erst nach einer Elektronenbestrahlung von ~ 1 mC/cm² (bei 10 eV) ihre volle Reaktivität gegenüber elektrophilen Reagenzien. Besonders interessant ist die Tatsache, dass die chemische Reaktivität der oberflächengebundenen Aminogruppen dosisabhängig ist. Man kann einen chemischen Reaktivitätsgradienten erzeugen, der es ermöglicht, mittels SIP dreidimensionale Strukturen variabler Höhe zu erzeugen (**Abb. 4**).²²

Ein alternatives Templat zur direkten Aktivierung und chemischen Nanostrukturierung sind Monolagen mit einem aromatischen Gerüst. Dabei wird ausgenutzt, dass diese SAMs bei Elektronenbestrahlung aufgrund von Quervernetzung nicht nur stabilisiert werden, sondern dass der freiwerdende Wasserstoff zudem in der Lage ist, geeignete Endgruppen zu reduzieren. Das bis heute einzig etablierte System zur direkten Oberflächenaktivierung aromatischer SAMs besteht aus 4'-Nitro-biphenyl-4-thiol (NBPT), deren terminale Nitrogruppen chemisch nahezu inert sind, während der Elektronenbestrahlung aber zu oberflächengebundenen Aminogruppen reduziert werden.²³ Ferner lässt sich die Reaktivität der Oberfläche ebenfalls über die Bestrahlungsdosis steuern,²⁴ um beispielsweise dreidimensionale, polymere Nanostrukturen auf einer Oberfläche zu erschaffen (**Abb. 5**).²⁵⁻²⁹ Aufgrund der einzigartigen Möglichkeiten von NBPT-SAMs wäre es natürlich wünschenswert, ein alternatives System mit ähnlichen Eigenschaften zu besitzen. In einer früheren Arbeit konnte bereits dargelegt werden, dass SAMs aus 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT) bei Elektronenbestrahlung ebenfalls oberflächengebundene Aminogruppen bilden, an die sich weitere Moleküle koppeln lassen.³⁰ In die-

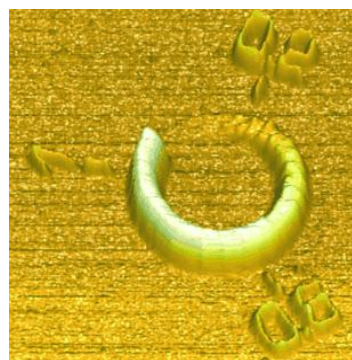


Abb. 4. „Bottom-Up“-Nanostrukturierung: AUDT-SAM mit Polymerbürsten, deren Höhen (0-100 nm) dosisabhängig sind (0-1.0 mC/cm² bei 3 keV). [22]

ser Arbeit wird gezeigt, dass sich CBPT-SAMs nicht nur als negatives Resist-Material sondern auch als SIP-Templat für die chemische Nanolithographie eignen (Abschnitt 5.1.1). In diesem Zusammenhang wird erstmals systematisch der Einfluss der Elektronenenergie auf die Ausbeute der Reduktion (Abschnitt 5.1.2) und den Grad der Quervernetzung untersucht (Abschnitt 5.1.3). Ferner wird zum ersten Mal detailliert überprüft, inwieweit die durch elektronenstrahlinduzierte Reduktion entstandenen, oberflächengebundenen Aminogruppen aromatischer Monolagen für die Kopplung weiterer Moleküle überhaupt zugänglich sind (Abschnitt 5.1.5). Hinsichtlich dieses Aspekts sind die Angaben in der Literatur teilweise widersprüchlich. So fanden Eck et al. bei der Kopplung von Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) an bestrahlte NBPT-SAMs nur eine maximale Ausbeute von <70 % bezüglich der vorhandenen NH_2 -Gruppen,²³ während andererseits berichtet wurde, dass sich TFAA an chemisch reduzierte NBPT-SAMs wie auch an OH-terminierte Alkanthiol-Monolagen nahezu quantitativ koppeln ließ.³¹⁻³²

Aromatische Monolagen sind auch deshalb von besonderem Interesse, da sie einen präparativ bequemen Weg zur Herstellung *ultradünner Nanomembranen* (<10 nm) bieten. Die elektronenstrahlinduzierte Quervernetzung von Bi- oder Terphenylthiol-SAMs führt zu einem ungeordneten, aber äußerst stabilen Kohlenstofffilm,³³ der trotz seiner geringen Dicke von kaum mehr als einem Nanometer, Temperaturen von über 1000°C standhält.³⁴⁻³⁵ Er kann von seinem Substrat abgehoben werden und als Nanomembran (carbon nanomembrane, CNM) freistehend über Flächen von mindestens $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ existieren (Abb. 6a).³⁶ CNM haben sich bei der Untersuchung von Nanopartikeln bereits als vielversprechende Trägermembran (Support) in der hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM) bewährt (Abb. 6b).³⁷

Auch die zuvor besprochenen NBPT-SAMs sind zur Membranherstellung geeignet, wobei sich allerdings aufgrund einer geringeren Packungsdichte nur freistehende Flächen von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ realisieren lassen. Dennoch konnten aus NBPT-SAMs freistehende Membranen hergestellt werden, auf denen vor dem Abheben ein bis zu 300 nm dicker Polymerfilm mittels SIP erzeugt wurde.³⁸⁻³⁹ Zu-

gleich waren diese Polymer-Teppiche (polymer carpets) der erste erfolgreiche Versuch, zumindest eine Seite einer Nanomembran maßgeschneidert zu funktionalisieren und auf diese Weise die Limitierung auf die wenigen, existierenden Endgruppen aromatischer SAMs zu umgehen. Weitere Versuche, freistehende SAM-basierte Nanomembranen zu funktionalisieren, beschränkten sich auf die Strukturierung der Monolagen bereits vor Bestrahlung,³⁹⁻⁴⁰ bzw. auf Kopplung an die Aminogruppen der freistehenden NBPT-Membran.⁴¹

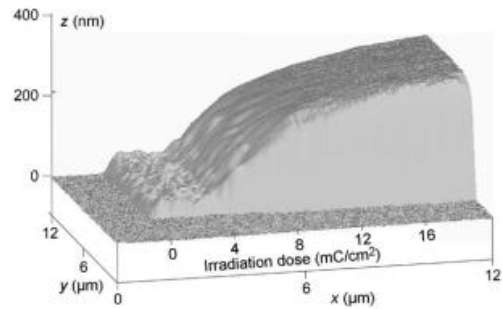


Abb. 5. AFM-Bild von lithographisch strukturierten, dreidimensionalen Polymerbürsten auf einem NBPT-SAM. [25]

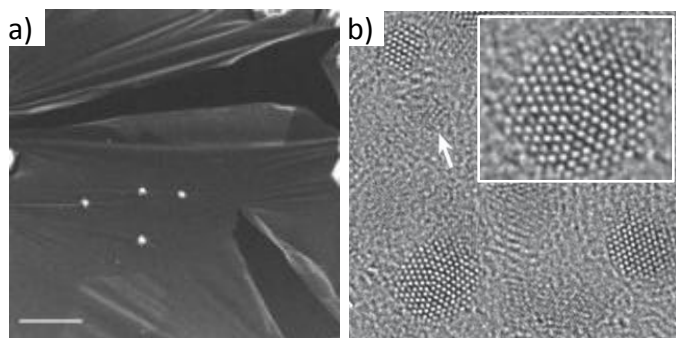


Abb. 6. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer freistehenden Membran, die durch Quervernetzung und Abheben eines aromatischen Biphenylthiol-SAMs erhalten wurde [36]; (b) Bei Verwendung der Membran als TEM Trägerfilm lassen sich die individuellen Goldatome eines Gold-Nanopartikels als helle Punkte sichtbar machen. [37]

Es stellt sich daher die Frage, inwieweit sich die Fähigkeit aromatischer SAMs aus ihnen ultradünne Nanomembranen herzustellen, mit der Biokompatibilität von Polyethylenglykolen kombinieren lässt, um biokompatible Trägermembranen zur TEM-Untersuchung biologischer Proben zu erhalten. Gerade bei der Untersuchung von Oberflächen-immobilisierten Proteinen ist wichtig, die Wechselwirkung des Biomoleküls mit der Oberfläche zu minimieren. Andernfalls kommt es zur Entfaltung und Denaturierung des zu untersuchten Proteins, was seine Struktur und Wirkungsweise verändert.⁴²

Als TEM-Support im unteren Nanometer-Bereich für biologische Proben werden in der Literatur neben den auf quervernetzten Biphenylthiol-SAMs basierenden CNM,⁴³⁻⁴⁴ nur noch Nanomembranen aus Graphen bzw. Graphenoxid (GO)⁴⁵ erwähnt (**Abb. 7**). Beide Membranen haben keine chemisch einheitlich definierten Oberflächen. Nur bei den CNM konnte nach ihrem Ausglühen im Ultrahochvakuum (annealing) indirekt eine begrenzte Biokompatibilität zumindest für das Protein *Bacteriorhodopsin* nachgewiesen werden, einem Bestandteil der Purpurmembran des Halobakteriums *Halobacterium salinarum*.⁴³ Eine weitergehende Überprüfung der Biokompatibilität durch Proteinadsorptionsexperimente wurde weder bei den CNM noch bei den GO-Membranen durchgeführt. Insofern wäre es interessant, eine ultradünne Membran herzustellen, die bei TEM-Experimenten ähnliche Abbildungsqualitäten liefert und bei der sich die Biokompatibilität in Form einer Proteinresistenz gegenüber stark adsorbierenden Proteinen wie Fibrinogen direkt zeigen lässt.

Als Basis für die Herstellung biokompatibler Nanomembranen werden in Abschnitt 5.2 die bereits diskutierten 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) Monolagen verwendet. Nach deren Bestrahlung wird Epoxid-terminiertes Polyethylenglykol (PEG) derart an die oberflächengebundenen Aminogruppen gekoppelt, dass der PEGylierte Film bei einer Gesamtdicke von nur 5 nm biokompatibel ist, was durch Adsorptionsexperimente mit Fibrinogen als Testprotein demonstriert wird. Nach dem Abheben der PEGylierten NBPT-Filme, lassen sie sich als freistehende Nanomembranen auf eine Gitterstruktur übertragen ohne dabei ihre Biokompatibilität zu verlieren, was durch ein weiteres Adsorptionsexperiment mit Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen verifiziert wird. Zuletzt wird die Eignung als Support in HRTEM-Experimenten durch Untersuchungen von Gold-Nanopartikeln und dem Eisenspeicherprotein Ferritin gezeigt.

Die hier vorgestellten Membranen auf Basis PEG-lyierter, aromatischer SAMs sind mit 5 nm zwar außerordentlich dünn, besitzen aber nur auf der PEG-Seite proteinabweisende Eigenschaften, d.h. die Membranen sind nur einseitig biokompatibel. Werden sie beispielsweise in eine Proteinlösung getaucht, führt das zu unspezifischer Adsorption auf der SAM-Seite. Daher wäre es wünschenswert, eine Nanomembran herzustellen, die beidseitig biokompatibel ist. Als Ansatz für die Präparation muss man

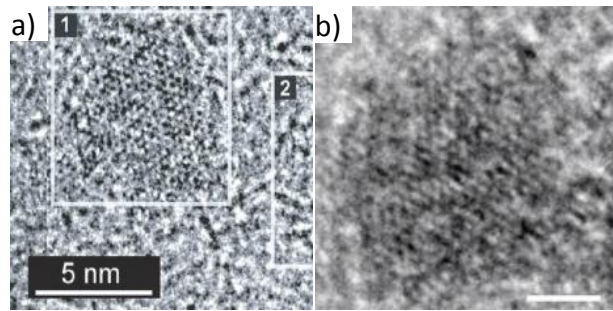


Abb. 7. 300 kV HRTEM-Bilder von Ferritin auf einer Trägermembran aus (a) einer Monolage von Graphenoxid (GO) [45] und auf (b) einer Membran basierend auf einem Biphenylthiol-SAM (CNM) [44].

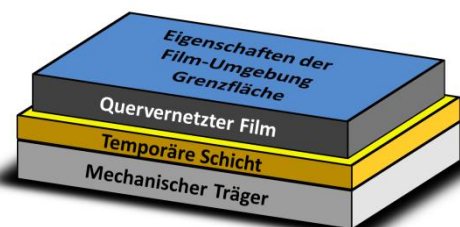


Abb. 8. Generelles Prinzip zur Herstellung ultradünner Membranen: Als Vorläufer zur Membranherstellung dient ein quervernetzter Film. Zwischen diesem und dem Substrat befindet sich eine leicht zu entfernende, temporäre Schicht (sacrificial layer), nach deren Auflösen der Film zur Membran wird.

sich das Grundprinzip der Membranherstellung noch einmal vor Augen führen, welches auch den SAM-basierenden Membranen zugrunde liegt (**Abb. 8**). Als Vorläufer der Membran dient ein dünner, quervernetzter Film, welcher sich auf einem flachen und möglichst glatten Träger befindet. Zwischen beiden liegt eine weitere temporäre Schicht (sacrificial

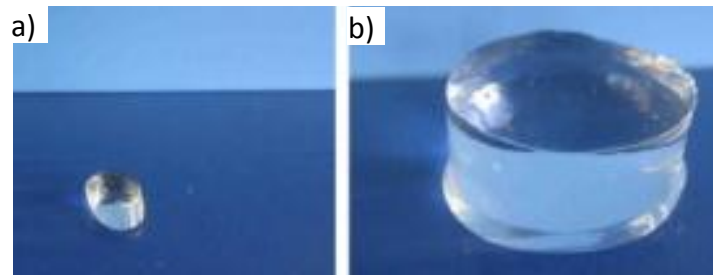


Abb. 9. Schwellverhalten von Hydrogelen durch Wassereinlagerung am Beispiel eines Cellulose-basierenden Polymers (a) mit einem riesigen Schwellverhältnis von > 500 (b). [46]

layer), nach deren Auflösung sich der quervernetzte Film von dem mechanischen Träger ablöst und damit zur Membran wird. Bei Übertragung auf eine Gitterstruktur spricht man von freistehenden Membranen. Damit sind die Bedingungen für eine erfolgreiche Präparation beidseitig biokompatibler Nanomembranen gegeben und es stellt sich die Frage nach der Realisierung des geeigneten Vorläuferfilms. Biokompatibilität lässt sich am einfachsten mit den bereits erwähnten Polyethylenglykolen erreichen, die als dünner Film auf ein geeignetes Substrat aufgebracht und durch einen externen Prozess quervernetzt werden müssen. Derartige PEGs werden auch als PEG-Hydrogele bezeichnet und sind nur ein Beispiel für eine ganzen Klasse hydrophiler, durch Wasser quellbarer und quervernetzter Polymere, die nach der Einlagerung von Wasser allgemein als Hydrogele bezeichnet werden (**Abb. 9**).⁴⁶⁻⁴⁷ Für PEG-Hydrogele gilt, dass sie weiterhin biokompatibel sind. Sie können biologisch aktive Substanzen in ihrer Matrix immobilisieren und in einer bestimmten Rate wieder freigeben, weshalb sie in der kontrollierten Abgabe medizinischer Wirkstoffe Verwendung finden (drug release).⁴⁸⁻⁴⁹

Für die Herstellung von PEG-Hydrogelen werden häufig Acrylat-terminierte Polyethylenglykole verwendet und unter UV-Licht polymerisiert.⁵⁰⁻⁵¹ Bei Bestrahlung durch eine Photomaske lassen sich zudem strukturierte PEG-Filme erzeugen.⁵²⁻⁵³ Andererseits kann die Quervernetzung auch durch eine chemische Reaktion funktionalisierter Polyethylenglykole realisiert werden.

GROLL et al. verwendeten beispielsweise Isocyanat-terminierte *STAR-PEGs*, um dünne und quervernetzte PEG-Filme mit Dicken zwischen 3 - 500 nm auf einer glatten Oberfläche herzustellen.⁵⁴⁻⁵⁶ *STAR-PEGs* sind multifunktionelle Polyethylenglykole und tragen zwischen 4 und 8 funktionelle Gruppen pro Oligomer. Allerdings wurden die Filme nur auf ihre Proteinresistenz hin untersucht und zur Kopplung weiterer Moleküle an noch verbleibende Isocyanatgruppen verwendet. Zudem ist der Einsatz multifunktionaler Isocyanate wie auch Acrylate als Einkomponentensystem dahingehend problematisch, dass es zusätzlich zu einer *intramolekularen* Reaktion der einzelnen Arme kommt und damit zu einer Verringerung des Quervernetzungsgrads. Für eine erfolgreiche Membranpräparation ist aber gerade ein hoher Quervernetzungsgrad unverzichtbar. Eine Lösung bieten die Arbeiten von WATANABE et al., die freistehende Nanomembranen ab einer Dicke von 25 nm auf Basis der chemischen Quervernetzung eines Zweikomponentensystems multifunktionaler Oligomere hergestellt haben, deren Bestandteile ein aromatisches Macromonomer mit fünf Epoxidgruppen und verzweigtes Polyethylenimin (PEI) waren.⁵⁷⁻⁵⁸

In dieser Arbeit wird das Konzept des Zweikomponentensystems von WATANABE mit dem multifunktionaler *STAR-PEGs* von GROLL zusammengeführt, um hochgradig quervernetzte PEG-Schichten zu präparieren, die im Folgeschritt als freistehende PEG-Hydrogele mit Dicken im Nanometerbereich existieren können. Entsprechend wird die Präparation der PEG-Filme mit Epoxid- und Amino-terminierten, 4-armigen *STAR-PEGs* der Molmasse von 2000 kDa realisiert. Nach deren Rotati-

onsbeschichtung (spin coating) auf ein Substrat und der chemischen Quervernetzung bewegt sich die Dicke der Filme zwischen 6-300 nm, obwohl in Abhängigkeit der Parameter des Präparationsprozesses prinzipiell auch höhere Filmdicken erreichbar sind.

Vor dem Abheben der PEG-Filme vom ihrem Substrat werden sie in Bezug auf Biokompatibilität, Quelleigenschaften, Verhalten gegenüber Elektronenbestrahlung und der Fähigkeit, in Wasser gelöste Gold-Nanopartikel zu deponieren, eingehend charakterisiert. Dabei zeigt sich, dass die dünnen PEG-Hydrogel Filme (hydrogel thin films) für sich genommen schon äußerst ungewöhnliche Merkmale aufweisen, die sie für Vielzahl von Applikationen potentiell interessant machen.

Das Quellverhalten dünner, polymerer Hydrogelfilme als Reaktion auf einen äußeren Reiz stellt ein vielversprechendes Anwendungsgebiet zur Herstellung intelligenter Oberflächen dar („smart responsive surfaces“).⁵⁹ Diese reagieren auf äußere Parameter wie beispielweise Temperatur, Luftfeuchtigkeit oder pH-Wert mit Veränderung in ihren optischen, elektrischen oder geometrischen Eigenschaften. Als Membran können diese Polymere zudem als selbstauslösendes Ventil für Ionen oder Molekülen verwendet werden. Reversibles Quellverhalten polymerer Materialien bei Kontakt mit einem „guten“ Lösungsmittel lässt sich zunächst thermodynamisch aufgrund einer Minimierung der freien Enthalpie der Mischung erklären. Ist das Polymer quervernetzt, können die Molekülketten nicht in Lösung gehen, sondern werden durch den osmotischen Druck des Lösungsmittels entgegen ihrer normalen Gaußschen Konformation gestreckt. Das Gleichgewicht dieser beiden Kräfte bestimmt das Volumen des polymeren Netzwerks und das Quellverhältnis, womit sich auch die allgemeine Beobachtung erklärt, dass dieses mit zunehmendem Quervernetzungsgrad abnimmt. Für isotrope, neutrale Polymere (wie PEG-Hydrogele) lässt sich das Quellverhalten durch einen Ansatz von FLORY und REHNER beschreiben⁶⁰⁻⁶² und der Quervernetzungsgrad (genauer die mittlere Molmasse zwischen zwei Verzweigungspunkten) aus dem Quellverhältnis berechnen. Da die Kinetik der Wassereinlagerung unter Diffusionskontrolle abläuft, ist die hohe Geschwindigkeit des Quellvorgangs ein wichtiges Merkmal *dünnere* Hydrogel-Filme. Liegt die Reaktionszeit makroskopischer Hydrogele (Abb. 9) im Minuten- und Stundenbereich, beträgt sie bei 10 µm Filmen schon weniger als 1 s.⁶³ Zudem ist das Quellverhalten dünner Filme hochgradig anisotrop, sodass die Richtung der Volumenvergrößerung in erster Linie senkrecht zur Substratebene verläuft.⁶⁴

Für thermosensitives Verhalten dünner Hydrogel-Filme sind zwei Grundprinzipien zu unterscheiden. Zum einen können polymere Netzwerke, sobald sie in eine Flüssigkeit getaucht sind, bei einer bestimmten Temperatur einen spontanen Phasenübergang zeigen. Prominentestes Beispiel ist Poly-*N*-Isopropylacrylamid (P-NIPAM), das unterhalb einer kritischen Löslichkeitstemperatur (lower critical solution temperature, LCST) von 32 °C wasserlöslich ist, während es oberhalb als milchige Suspension auftritt und sich nicht mehr in Wasser löst (Abb. 10).⁶⁵ Liegt P-NIPAM als oberflächengebundener, dünner Film oder in Form von Polymerbürsten vor, ist das Material unterhalb der LCST hydrophil und durch Wassereinlagerung gequollen, während es oberhalb als hydro-

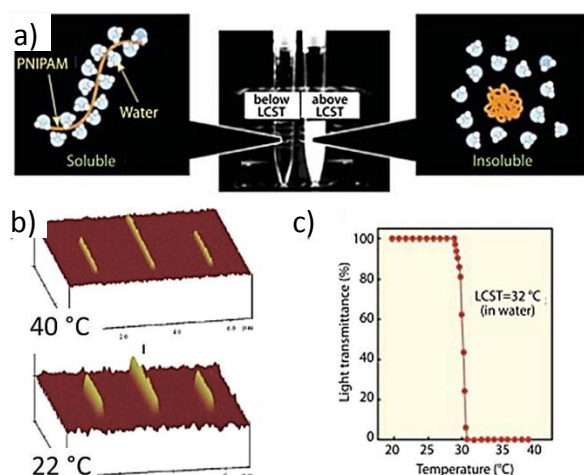


Abb. 10. Thermosensitives Verhalten von P-NIPAM mit einer unteren, kritischen Löslichkeitstemperatur (LCST) in wässriger Lösung (a), als oberflächengebundene Polymerbürsten (b) und das entsprechende Phasendiagramm in Wasser (c) [27, 65].

phobes Polymer mit geringer Filmdicke auftritt.²⁷ Der Wechsel der Hydrophilie geht auch mit einer Veränderung der Biokompatibilität bzw. der Fähigkeit, Zelladhäsion widerstehen zu können, einher.⁶⁶

Ursache für die Existenz eines solchen Phasenübergangs ist in den thermodynamischen Eigenschaften des Polymer-Lösungsmittels-Systems zu suchen. Mischungsenthalpie ΔH_M und Mischungsentropie ΔS_M haben das *gleiche* Vorzeichen, weshalb die Temperaturabhängigkeit der freien Mischungsenthalpie $\Delta G_M = \Delta H_M - T \cdot \Delta S_M$ eine Nullstelle und damit einen Phasenübergang spontaner Mischung bzw. Entmischung besitzt. So mischen sich P-NIPAM und Wasser mit $\Delta H_M \approx +50 \text{ J/g}$ endotherm, während sie entropisch begünstigt ist ($\Delta S_M > 0$).⁶⁷ Auf der anderen Seite sind Polyethylenglykole deutlich hydrophiler und lösen sich in Wasser exotherm ($\Delta H_M \approx -50 \text{ J/g}$ für ein die Mischung von PEG400).⁶⁸ Weil auch bei diesem System die Mischungsentropie ΔS_M ein positives Vorzeichen hat, wird ΔG_M immer negativ, und die Löslichkeit ist bei allen Temperaturen freiwillig. Das gilt zumindest bei dieser vereinfachten thermodynamischen Betrachtungsweise. Es bedeutet ferner, dass PEG-Hydrogele unter Wasser stets aufquellen, sobald der osmotische Druck des Lösungsmittels die konformative Fixierung der Molekülketten übersteigt.

Ein weiterer Aspekt von Hydrogelen im Zusammenhang mit den Quelleigenschaften ist ihre Fähigkeit, andere Substanzen einlagern und durch einen externen Stimulus (z.B. Temperatur, pH-Wert) wieder freizugeben. Es lassen sich nicht nur organische Moleküle einbetten, sondern auch anorganische Metall-Nanopartikel, wobei diese sich meist irreversibel festsetzen und so einen Hybrid-Film mit zusätzlichen Merkmalen erzeugen. Dazu zählen in erster Linie erweiterte optische Eigenschaften, die mit der Tatsache zusammenhängen, dass in Metall-Nanopartikeln leicht Oberflächenplasmonenresonanzen (surface plasmon resonances, SPR) angeregt werden können. Zu diesem Zweck verwendet man fast immer Gold-Nanopartikel (AuNPs), da diese ohne Schutzgas stabil sowie präparativ einfach zugänglich sind. Zudem sind sie in verschiedensten Größen, Formen und Oberflächenfunktionalitäten verfügbar und haben eine intensive SPR-Absorptionsbande im sichtbaren Bereich (in wässriger Lösung z.B. $\sim 520 \text{ nm}$ bei einem Partikeldurchmesser von 10 nm).

Bei Metallfilmen makroskopischer wie mikroskopischer Dimension ist zur resonanten Anregung dieser kollektiven Oszillation der Valenzelektronen ein spezieller optischer Aufbau notwendig (*Kretschmann-* oder *Otto-Konfiguration*). In sphärischen Gold-Clustern, deren Durchmesser $2R$ deutlich kleiner ist als die Wellenlänge der Plasmonenresonanz λ ist ($2R \ll \lambda$), können die Oberflächenplasmonen jedoch auch direkt von der einem einfallenden Lichtstrahl angeregt werden (**Abb. 11**). Dieses als *lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz* (localized surface plasmon resonance, LSPR) genannte Phänomen tritt sowohl bei immobilisierten als auch kolloidalen AuNPs auf. Selbst in extrem verdünnter Lösung oder als Monolagen haben sie noch eine gut zu detektierende Absorptionsbande. Von Interesse ist in erster Linie die Position des Maximums, weil dieses einerseits empfindlich von der Struktur der Nanopartikel selber (Größe, Form, Größenverteilung und räumlicher Anordnung) und andererseits von den dielektrischen Eigenschaften ϵ_M des ungebundenen Mediums abhängt.⁶⁹⁻⁷⁰

Sind solche Nanopartikel in ein polymeres Hydrogel eingebettet, kann dessen durch einen externen Reiz hervorgerufenen Veränderungen direkt in ein

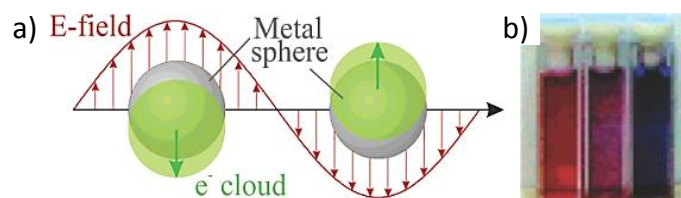


Abb. 11. (a) Schema der Anregung lokalisierter Oberflächenplasmonenresonanzen (LSPR) in Nanopartikeln [68]; (b) Abhängigkeit der LSPR-Absorptionswellenlänge von der Partikelgröße (5-35 nm) [70].

optisches Signal umgewandelt werden. Entsprechend haben MITSUSHI et al. die thermosensitiven Eigenschaften von P-NIPAM in ein LSPR-Signal übersetzt, indem sie Goldnanopartikel auf ein Glassubstrat fixiert und die Polymerbürsten in den Zwischenräumen haben wachsen lassen (Abb. 12).⁷¹ Der in Abb. 10 gezeigte Phasenübergang bei der kritischen Temperatur (LCST) führt zu einer Änderung der dielektrischen Natur des die AuNP umgebenden Polymers und damit zu einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums des LSPR-Signals. Allerdings ist die Empfindlichkeit dieser Sensorvariante, bei dem die Nanopartikel auf der Oberfläche fixiert sind, mit einer Resonanzverschiebung von nur 6 nm gering, da sie ausschließlich durch die Veränderung der Permittivität des Mediums verursacht wird.

Andererseits ist die LSPR-Bedingung bezüglich des Abstandes zwischen den AuNPs wesentlich sensitiver, sobald deren Entfernung innerhalb des Bereichs kollektiver Wechselwirkung der Partikel liegt, das heißt der Interpartikelabstand d kleiner als der fünffache Partikelradius R ist ($d < 5R$). Je nach Abstand d kommt es zu einer Rotverschiebung des Absorption um bis zu 300 nm ($d \approx 0.5 \text{ nm}$).⁷⁰

Diesem Ansatz folgend haben TOKAREV et al. den Sensortyp verbessert, indem sie neben den auf dem Substrat fixierten AuNPs eine zweite Schicht von Nanopartikeln auf dem Polymerfilm deponierten (Abb. 13).⁷²⁻⁷³ Im nicht-gequollenen Zustand liegt das Maximum der Resonanz aufgrund der Nähe zwischen beiden Goldschichten nun bei 625 nm. Schwillt der Polymerfilm an, ändert sich nicht nur dessen Dielektrizitätskonstante, sondern es nimmt vor allem der Abstand zwischen den fixierten und mobilen AuNPs zu. Damit sinkt die Stärke der Interpartikelkopplung, was wieder zu einem Maximum der Absorption im Bereich individueller AuNPs bei 574 nm führt und damit einer Blauverschiebung von 50 nm.

Es kann bis hierher festhalten werden, dass Gold-Nanopartikel, die in einen polymeren Netzwerk einbetten sind, ein vielversprechendes Vehikel darstellen, um das durch einen externen Stimulus hervorgerufene Anschwellen des Films direkt in eine Änderung der optischen Absorptionseigenschaft übersetzten zu können. Besonders hohe Sensitivitäten lassen sich erzielen, wenn die AuNPs so dicht gepackt sind, dass neben den individuellen auch die kollektiven Eigenschaften der Partikel hervortreten. Da diese Interpartikelkopplung stärker als die Kopplung mit dem umgebenden Mediums ist, führt die Veränderung des Interpartikelabstands zu einer deutlicheren Änderung des UV-VIS-Spektrums (6 nm vs. 50 nm). Es gibt aber eine Einschränkung: Um die hohe Empfindlichkeit zu gewährleisten, müssen die Abstände zwischen den Nanopartikeln im nicht-geschwollenen Zustand des Hydrogels im Bereich weniger Nanometer liegen, da es sonst zu keiner kollektiven Anregung kommt. Diese Be-

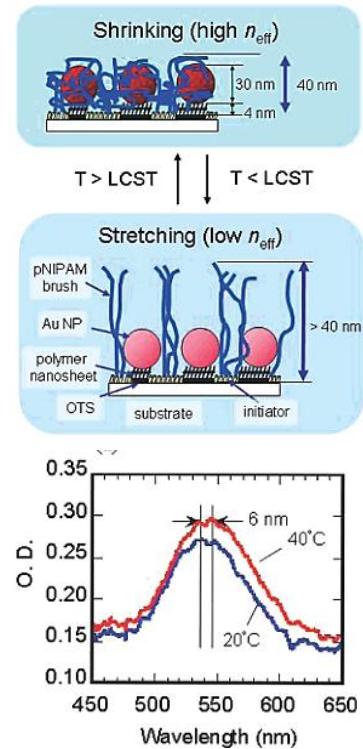


Abb. 12. Prinzip eines Sensors zur Detektion der Änderung der Filmdicke von oberflächengebundenem P-NIPAM als optisches Signal. [71]

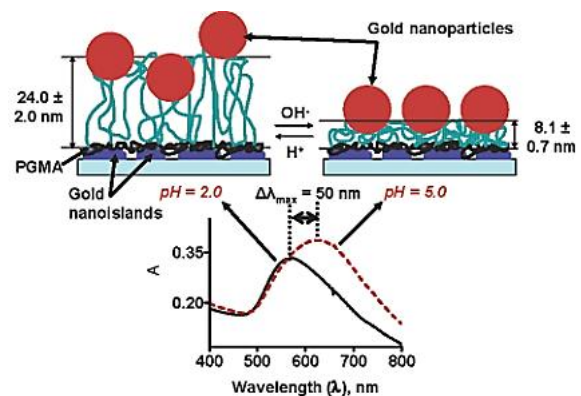


Abb. 13. Verbesserter LSPR-Sensortyp, der die hohe Empfindlichkeit des Absorptionsmaximums vom Interpartikelanstand der AuNPs ausnutzt. [72]

dingung lässt sich beispielsweise durch die Doppelschicht in Abb. 13 erfüllen. Bei diesem Aufbau ist allerdings die Filmdicke im nicht-geschwollenen Zustand auf wenige Nanometer begrenzt und damit auch die Intensität der LSPR-Absorption wegen der geringen Zahl an AuNPs im Lichtweg.

Bei den von TOKAREV verwendeten Hydrogelen handelte es sich um quervernetztes Polyvinylpyridin (PVP), einem Polyelektrolyt-Hydrogel, dessen Filmdicke in erster Linie auf Veränderungen des pH-Wertes reagiert.⁷²⁻⁷⁴ Dabei wurden die Nanopartikel *in-situ* in dem Hydrogel durch Reduktion von HAuCl_4 erzeugt. Die in dieser Arbeit vorgestellten, dünnen Filme aus PEG-Hydrogel weisen ebenfalls ein ausgeprägtes Quellverhalten auf. Im Gegensatz zu den PVP-Hydrogelen reagieren die in Abschnitt 5.3 präsentierten, neutralen PEG-Hydrogele direkt auf die sie umgebende relative Luftfeuchtigkeit oder indirekt auf eine lokale Temperaturniedrigung (genauer der Temperaturdifferenz zwischen PEG-Film und Umgebung). Um zur Erhöhung der Absorption des LSPR-Signals auch dickere Filme von 50 nm und mehr als optischen Umwandler (optical transducer) verwenden zu können, müssen sie in der Lage sein, die Nanopartikel so dicht zu deponieren, dass der Interpartikelabstand d unterhalb des fünffachen Partikelradius R sinkt ($d \leq 5R$). Genau diese Eigenschaften besitzen die hier gezeigten PEG-Filme (Abschnitt 5.5). Vor allem Citrat-stabilisierte AuNPs werden mit einer so hohen Dichte in die PEG-Filme eingelagert, dass es im nicht-geschwollenen Zustand zu einer kollektiven Plasmonenanregung im Bereich von 620 nm kommt und damit zu einer Rotverschiebung um 70 nm gegenüber dem geschwollenen Zustand. Ferner ist die Absorption durch die AuNPs bei einem 50 nm dicken PEG-Film schon mit dem bloßen Auge deutlich sichtbar, indem sich der zuvor farblose Film intensiv violett verfärbt. Trägt man einen Tropfen Wasser auf dem Film auf, wird er an der Grenzfläche sofort wieder transparent (**Abb. 14**). Nach dem Entfernen des Tropfens verfärbt sich der Bereich erneut violett.

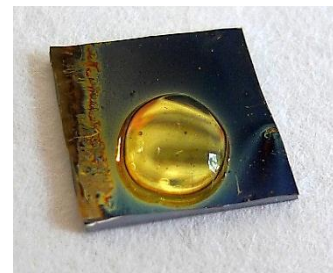


Abb. 14. Wassertropfen auf einem 50 nm PEG-Hydrogel Film, in den AuNPs eingebettet sind.

Gegenüber dem System von TOKAREV müssen die AuNPs nicht *in-situ* in dem Film erzeugt werden, weshalb man die volle Kontrolle über Größe und Form der Partikel behält und auch anderweitig funktionalisierte AuNPs verwenden kann. Es lassen sich beispielsweise, wenn auch weniger dicht, Biotin-stabilisierte Gold-Nanopartikel einlagern. Die in einer biokompatiblen PEG-Matrix eingebetteten, biotinylierten Partikel können als Sensor für Biomoleküle (z.B. Avidin) verwendet werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der PEG-Hydrogelfilme ergibt sich aus der Tatsache, dass es mit einfachen lithographischen Mitteln möglich ist, die Nanopartikel auch strukturiert im Miko- und Nanometermaßstab sowohl als Positiv als auch Negativ deponieren zu können. Für ein *positives* Abbildungsmuster wird der PEG-Film mit Polymethylmethacrylat (PMMA) als Resistmaterial rotationsbeschichtet und anschließend mit einem Elektronenstrahlschreiber strukturiert (Abschnitt 5.5.5). Nach Entwicklung des PMMA-Resists ist an den *bestrahlten* Stellen der PEG-Film für in wässriger Phase gelöste Substanzen wieder zugänglich. Das in dieser Arbeit gezeigte Verfahren stellt eine interessante Alternative zu der etablierten Methode der mizellaren Blockcopolymer-Lithographie (block copolymer micelle lithography, BCML) dar, die häufig zur Mikrostrukturierung von Gold-Nanopartikeln im Zusammenhang mit einer polymeren Matrix verwendet wird (**Abb. 15**).⁷⁵ Diese Methode verläuft über in

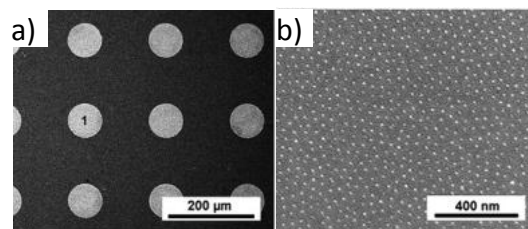


Abb. 15. (a) Mikrostrukturierung von Oberflächen durch mizellare Blockcopolymer Lithographie (BCML); (b) Struktur der AuNPs auf der Oberfläche nach der Reduktion. [75].

Mizellen eingekapselte Au(III)-Ionen, die, nach Absorption auf einem Substrat, durch Reduktion in Gold-Nanopartikel umgewandelt werden, während die organischen Mizellen durch Plasmabehandlung entfernt werden.⁷⁶⁻⁷⁹ Zuletzt kann ein Polymer aufgetragen werden, das die AuNPs umschließt. Allerdings ist bei dieser Methode zum einen die Dichte der AuNPs durch die Größe der Mizellen beschränkt, zum anderen befinden sich die Partikel hauptsächlich an der Oberfläche des Films. Ferner sind Größe, Form und Funktionalisierung der AuNPs im Gegensatz zu der hier präsentierten Methode beschränkt.

Zur Erzeugung eines negativen Adsorptionsmusters wird der PEG-Film direkt mit einem Elektronenstrahl lithographiert, was dazu führt, dass die AuNPs beinahe ausschließlich in den nicht-bestrahlten Regionen des PEG-Films eingebettet sind (Abschnitt 5.5.4). Um diesen Sachverhalt verstehen zu können, muss man sich die Wirkung der Elektronenbestrahlung auf Polyethylenglykole vor Augen führen.

Es ist allgemein bekannt, dass PEG-terminierte SAMs schon bei geringen Dosen von unter 1 mC/cm^2 (bei 50 eV) ihre proteinabweisenden Eigenschaften verlieren.⁸⁰ Andererseits berichteten KRSCO et al., dass dünne Filme aus reinem Polyethylenglykol ($\bar{M}_N = 7 \text{ kDa}$) nach der Bestrahlung mit einem Elektronenstrahlschreiber (bei 10 keV) ab Dosen von $\sim 0.1 \text{ mC/cm}^2$ so stark quervernetzt waren, dass sich die belichteten Bereiche nicht mehr mit Wasser abwaschen ließen und Hydrogel-typisches Quellverhalten zeigten (**Abb. 16**).⁸¹⁻⁸² Dennoch hatten diese als „PEG Microgels“ bezeichneten Strukturen kaum mehr die charakteristischen PEG-Merkmale. Nur die mit extrem niedrigen Dosen von $< 0.1 \text{ mC/cm}^2$ bestrahlten Bereiche des PEG-Films wiesen eine verminderte Neigung zur Fibrinogenadsorption gegenüber dem umgebenden Siliziumsubstrat auf, während nach Bestrahlung mit mehr als 0.5 mC/cm^2 die Proteinresistenz nicht mehr vorhanden war. Ein umgekehrter Trend der Dosisabhängigkeit war beim Quellverhältnis erkennbar. Der Quotient der Filmdicke nach und vor einer Wassereinlagerung sank von einem Wert um die 16 bei mit 0.1 mC/cm^2 bestrahlten Regionen auf genau 1 bei Dosen über 1 mC/cm^2 , was gleichbedeutend mit einem Verlust der Quelleigenschaften ist. Biokompatibilität und Quellverhalten sind aber typische Merkmale von PEG-Hydrogelen, sodass deren Fehlen darauf hindeutet, dass sich die verbleibende Struktur in chemischer Hinsicht signifikant von der eines Polyethylenglykols unterscheiden muss. Diesen Aspekt hat KRSCO in seinen Veröffentlichungen jedoch nicht untersucht und eine strahleninduzierte Reorganisation des PEG-Films nicht näher charakterisiert.

In dieser Arbeit wird erstmals Wirkung der Elektronenbestrahlung auf die Eigenschaften und die chemische Zusammensetzung von PEG-Filmen detailliert analysiert (Abschnitt 5.4). Chemisch quervernetzte wie nicht-quervernetzte PEG-Filme mit unterschiedlichen Filmdicken werden großflächig durch eine Elektronenkanone (flood gun) mit 50 eV bestrahlt und dosisabhängige Veränderungen in der Filmdicke sowie der chemischen Zusammensetzung röntgenspektroskopisch mit XPS und NEXAFS sowie infrarotspektroskopisch untersucht. Es zeigt sich, dass die PEG-Filme unabhängig von ihrer Ausgangsfilmdicke und ihrem anfänglichen Quervernetzungsgrad durch Elektronenbestrahlung chemisch in einen von (C-C)- σ -Bindungen dominierten Film umwandelt werden, der gegenüber weiterer Bestrahlung eine verstärkte Widerstandsfähigkeit aufweist. Daher ist auch der relative Filmdickenverlust zu Beginn am größten und nimmt mit zunehmender Dosis ab. Besonders deutlich kristallisieren sich die strukturellen Veränderungen in den XPS-Spektren heraus. Bei unbe-

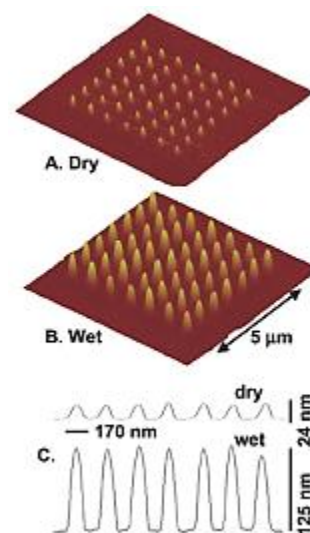


Abb. 16. Elektronenstrahl-induzierte Quervernetzung eines PEG-Films und ein daraus resultierendes, Hydrogel-typisches Quellverhalten beim Kontakt mit Wasser. [81]

strahlten Filmen wird das für Polyether charakteristische, stöchiometrische Verhältnis von zwei sauerstoffgebundenen Kohlenstoffatomen pro Sauerstoffatom gefunden. Ferner enthalten die Spektren – wie für Polyethylenglykole zu erwarten – kaum Kohlenstoff, an dem kein Sauerstoff gebunden ist. Während der Bestrahlung wird dieser aliphatische Kohlenstoff auf Kosten der sauerstoffgebundenen Kohlenstoffspezies zum dominierenden Signal, bis schließlich pro Sauerstoffatom nur noch ein daran gebundenes Kohlenstoffatom kommt. Der PEG-Film wird also durch Elektronenbestrahlung nicht nur dünner, sondern wandelt sich in einen „carbenen“ Film um, was natürlich auch mit makroskopischen Veränderungen bei Quellverhalten, Biokompatibilität und Benetzbarkeit einhergehen muss.

Ähnlich wie KRKOS „Microgels“ verlieren auch die in dieser Arbeit präsentierten PEG-Filme nach einer Bestrahlungsdosis von etwa 1 mC/cm^2 ihre Quelleigenschaften (entsprechend einem Quellverhältnis von eins). Allerdings ist der Film bereits vor der lithographischen Strukturierung quervernetzt, sodass die bestrahlten Areale in diesem Fall von nicht-bestrahlten Bereichen umgeben sind, die weiterhin alle typischen Eigenschaften von PEG-Hydrogelen aufweisen. So kann die direkte lithographische Strukturierung dazu verwendet werden, Strukturen in dem PEG-Film zu erzeugen, an denen Proteine in Form eines positiven Adsorptionsmusters irreversible adsorbieren (Abschnitt 5.4.7) oder an denen Gold-Nanopartikel (Abschnitt 5.5.4) wie auch Farbstoffmoleküle (Abschnitt 5.4.7) als negatives Muster von einer Adsorption ausgeschlossen werden.

Ein letzter interessanter Aspekt in Bezug auf die hier präsentierten PEG-Filme ergibt sich aus der eingangs erwähnten Motivation zur Herstellung doppelseitig biokompatibler Nanomembranen. Diese haben neben einer Dimension im molekularen Bereich zwei makroskopische Dimensionen und werden daher auch als „quasi-zweidimensionales Material“ bezeichnet. Das gleichzeitige Vorhandensein makroskopischer und molekularer Eigenschaften machen Nanomembranen zu einem außergewöhnlichen Material.⁸³

Für die Charakterisierung von Nanomembranen lässt sich beispielsweise ihr makromechanisches Verhalten in Form des Elastizitätsmoduls (Youngsches Modul) definieren. Dazu wird die Membran über eine mechanisch steife Lochmatrix gespannt und die Auslenkung in Abhängigkeit von einer Kraft gemessen (**Abb. 17**). Das geschieht experimentell entweder mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM), bei dem die AFM-Spitze die Membran eindrückt und gleichzeitig deren Auslenkung misst (Nanoindentation).⁸⁴ Oder die Membran wird durch eine Druckdifferenz gewölbt und die Auslenkung optisch bestimmt (Bulge-Test).⁸⁵ Auf molekularer Ebene lassen sich Nanomembranen beispielsweise durch ihre Permeabilität für Ionen oder neutrale Moleküle charakterisieren. Bei polymeren Hydrogel-Nanomembranen kann zudem die Permeabilität oder optische Eigenschaft über den pH-Wert oder die Temperatur beeinflusst werden, um so eine Art chemisches Ventil zu erhalten (**Abb. 18**).⁸⁶⁻⁸⁷

Für die Herstellung von Nanomembranen gibt es mehrere Ansätze. Polyelektrolytfilme (PE-Filme) können durch abwechselndes Auftragen von positiven und negativen PE-Polymeren aufgrund der elektrostatischen Anziehung der Schichten so stabil werden, dass sie als freistehende Membranen existieren. JIANG et al. gelang es sogar, einen solchen PE-Film zwischen 20 und 70 nm um Gold-Nanopartikel herum zu präparieren, der stabil genug war, um als freiste-

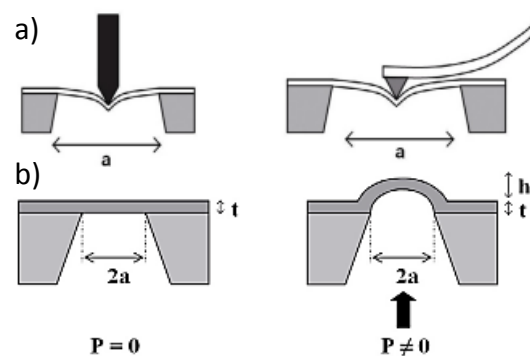


Abb. 17. Experimentelle Verfahren zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften (E-Modul) von Membranen durch Nanoindentation (a) oder Bulge-Test (b). [86]

hende Verbundmembran vom Typ *d* (Abb. 18) bestehen zu können.⁸⁸

Alternativ gibt es die Präparationsmethode mittels eines dünnen Vorläufer-Films in Kombination mit dessen Quervernetzung und einer temporären Schicht (Abb. 8). Analog wurden bereits die auf SAMs-basierenden, PEGylierten Nanomembranen hergestellt. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass es der hohe Vernetzungsgrad der hier diskutierten PEG-Hydrogelfilme zulässt, diese von ihrem Substrat abzuheben und ab einer Dicke von ~ 20 nm als freistehende Membran vom Typ *a* (Abb. 18) auf eine Gitterstruktur übertragen zu können (Abschnitt 5.6). Bei 100 nm dicken Membranen ließen sich Öffnungen im Millimeter-Bereich überdecken. Besonders interessant sind diese *PEG-Hydrogel Nanomembranen* in Bezug auf Biokompatibilität, Quellverhalten, optischen Eigenschaften im Zusammenhang mit der Adsorptionsfähigkeit von Nanopartikeln und der Strukturierbarkeit. So sind auch die Membranen vom Typ *c* und *d* (Abb. 18) zugänglich.

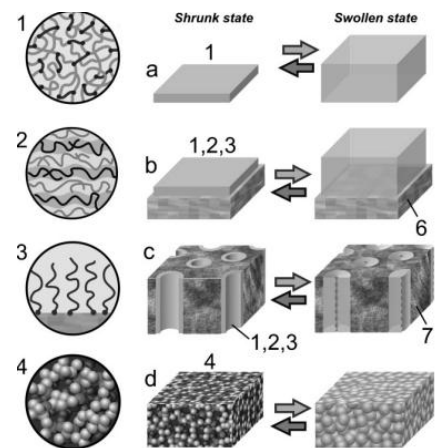


Abb. 18. Übersicht von auf Hydrogel-Polymeren basierender Nanomembranen: (a) freistehend, (b) von porösem Substrat-unterstützt, (c) freistehend, porös und (d) freistehend mit eingebetteten NP. [87]

2 Grundlagen

2.1 Der Begriff der Oberfläche

Modifikation und Charakterisierung von Oberflächen sind ein wichtiger Teil aktueller wissenschaftlichen Betrachtungen. Dabei werden interdisziplinär Bereiche wie Chemie, Physik, Biologie und Materialwissenschaften mit einbezogen. Eine Oberfläche ist definiert als die Phasengrenzfläche, die einen festen Körper von einer flüssigen oder festen Umgebung abgrenzt, während eine *Grenzfläche* allgemein die Phasengrenze zweier nicht mischbarer Körper ist.

Allerdings muss man sich stets vor Augen halten, dass eine Oberfläche keinen scharf definierten Bereich darstellt. Das wird schon deutlich, wenn man versucht, den Flächeninhalt einer Oberfläche zu quantifizieren. Der Wert hängt entscheidend von der Größenskala ab, auf der man sich bewegt. Eine mit 100 nm Gold bedampfte, glatte Siliziumoberfläche kann makroskopisch (Strukturen > 1 mm) und mikroskopisch (Strukturen > 1 μm) als glatt angesehen werden, was sich z.B. in einem hohen optischen Reflexionsgrad bei geringer Streuung des Lichts auswirkt (**Abb. 19a**). Damit ist klar, dass eventuelle Strukturen kleiner als die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes sind (< 500 nm).

Betrachtet man den entsprechenden Goldfilm unter dem Elektronenmikroskop, weist er deutliche topografische Strukturen im Nanometerbereich auf, und die eigentlich glatte Oberfläche zeigt eine ausgeprägte Nanostruktur (**Abb. 19b**).

Neben der topographischen Abgrenzung einer Oberfläche von seiner Umgebung ist ihre chemische Grenze ein weiterer zentraler Aspekt. Auch hier unterscheiden sich makroskopische und mikroskopische Betrachtungsweise deutlich. Als Beispiel dient die Oberfläche eines Kupferfilms, dessen Zusammensetzung davon abhängt, wie „tief“ man in das Material schaut. Bei einer Informationstiefe der Analyse von 1 μm besteht die Oberfläche fast ausschließlich aus metallischem Kupfer. Eine oberflächensensitive, chemische Analyse mit einer Informationstiefe von nur 5 nm zeigt ein vollkommen anders Bild. Die Oberfläche besteht dann vor allem aus diversen Cu(I)- und Cu(II)-Oxiden und nur einem geringen Anteil an metallischem Kupfer (**Abb. 20**).

Obwohl sich bei „normalen“ Körpern nur ein winziger Bruchteil der Atome an der Oberfläche befinden, sind es genau diese Atome, die der Umgebung ausgesetzt sind und mit ihr chemisch und physikalisch wechselwirken. Man benötigt demnach Analysemethoden, die oberflächensensitiv sind, d.h. deren Informationstiefen möglichst gering sind. Das Analysewerkzeug der Wahl für die chemische Untersuchung einer Oberfläche ist die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS; detaillierte Beschreibung im Abschnitt „Charakterisierungsmethoden“). Die XPS Analyse einer Goldoberfläche der genannten Reinheit zeigt deutliche Anteile von Kohlenstoff und Sauerstoff auf der Oberfläche. Diese lassen auch durch intensives mechanisches Reinigen nicht entfernen.

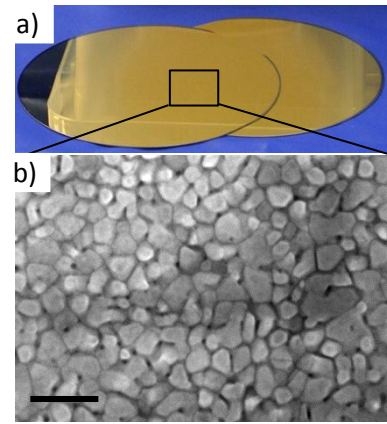


Abb. 19. Polykristalliner 100 nm Goldfilm auf einem Siliziumwafer. Makroskopisch scheint der Film extrem glatt zu sein (a); bei 100-facher Vergrößerung (Markierung: 100 nm) erkennt man auf der Oberfläche deutlich eine Nanostruktur (b).



Abb. 20. Tiefenprofil der chemischen Zusammensetzung einer Kupferoberfläche.

2.2 Selbstaggrierende Monolagen (self-assembled monolayers, SAMs)

2.2.1 Geordnete Monolagen

Im Jahre 1776 machte BENJAMIN FRANKLIN sein berühmtes Experiment am Clapham Pond nahe London. Bei starkem Wind goss er einen Teelöffel Olivenöl vom Ufer aus in den See. Sofort begann sich der Ölfilm auf dem See auszubreiten und die Wasserwellen wurden stark gedämpft. Später schrieb Franklin: „Das Öl, obwohl nicht mehr als ein Teelöffel voll, bewirkte sofortige Stille. [...] Es breitete sich sehr schnell aus und machte bald ein Viertel des Gewässers aus. Vielleicht einen halben Acre, so glatt wie ein Spiegel“. Obwohl dieser Effekt lange bekannt war, war Franklin der erste, der sich des Phänomens unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten annahm. Er vermutete, dass sich die Moleküle im Öl beim Kontakt mit Wasser abstoßen und daher einen möglichst dünnen Film bilden. Etwa 100 Jahre später berechnete JOHN WILLIAM STRUTT aus den Beobachtungen Franklins, dass der Ölfilm auf der Wasseroberfläche mit etwa 2 nm nur eine Moleküllage dick gewesen sein konnte, was zugleich auch die erste zuverlässige Schätzung einer Molekülgröße war.

Bis man herausfand, wie und warum es zu dieser Anordnung der Ölmoleküle kommt, dauerte es noch weitere 30 Jahre. Pionier auf diesem Gebiet war LANGMUIR. Er veröffentlichte 1917 zwei Artikel, in denen er erste theoretische Konzepte entwickelte.⁸⁹ Triebkraft der Bildung von Monolagen an Grenzflächen ist demnach das Bestreben einer Oberfläche, ihre Oberflächenenergie zu senken. Die Filme werden gebildet, wenn sich oberflächenaktive Moleküle (Tenside) ab einer bestimmten Packungsdichte auf einer Flüssig-Luft-Grenzfläche befinden (**Abb. 21a**). Tenside sind amphiphile Moleküle und bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe, die sich an einer langkettigen, hydrophoben Gruppe befindet.

1937 gelang es KATHERINE BLODGETT, eine solche Monolage auf ein festes Substrat zu übertragen, indem sie einen Glaträger in die Flüssigkeit, an deren Grenzfläche sich eine Monolage gebildet hatte, eintauchte und wieder herauszog (**Abb. 21b**).⁹⁰ Durch wiederholtes Eintauchen und Herausziehen kann man bei geeigneten Systemen Multilagen definierter Filmdicke herstellen (Langmuir-Blodgett-Filme).

2.2.2 Selbstaggrierende Monolagen

1946 bemerkte WILLIAM A. ZISMAN beim Arbeiten mit einer stark verdünnten Lösung von Eicosanol ($C_{20}H_{43}OH$) in Hexadecan, dass diese die Wände eines Erlenmeyerkolbens nicht benetzte.⁹¹ Durch umfangreiche Messreihen konnte Zisman zeigen, dass dieser Effekt nicht auf eine Verunreinigung zurückzuführen war, sondern dass sich auf der Glasoberfläche eine dicht gepackte, monomolekulare Schicht gebildet haben musste, bei der die polare Hydroxylgruppe an der Oberfläche des

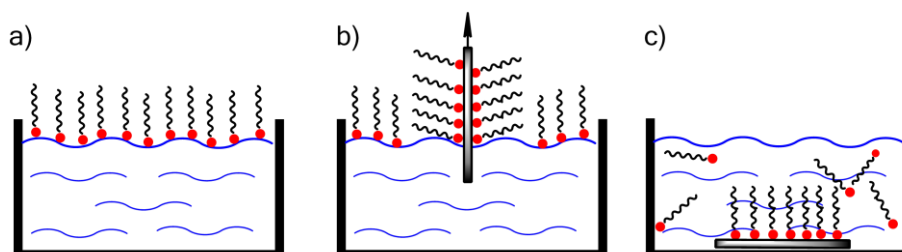


Abb. 21. Entstehung geordneter Monolagen: (a) amphiphile Moleküle (Tenside) bilden Langmuir-Filme an der Grenzfläche einer flüssigen und gasförmigen Phase; (b) durch Übertragung auf einen festen Träger können sie als Langmuir-Blodgett-Filme existieren; (c) selbstaggrierende Monolagen entstehen dagegen direkt durch Adsorption von in flüssiger Phase gelösten Molekülen auf einer festen Oberfläche.

Substrates koordiniert sind, während die unpolaren Alkylketten nahezu senkrecht zum Substrat stehen. Wichtiger noch war die Erkenntnis von Zisman, dass die beschriebenen Monolagen nicht vom Langmuir-Blodgett-Typ sein konnten, sondern dass es sich um einen neuartigen Schichttyp handeln musste, der direkt auf dem Substrat entsteht, wenn sich dieses in der Lösung befindet (**Abb. 21c**). Derartige Monolagen sind also untrennbar mit der Existenz eines Substrats verbunden. Während Zisman für seine Schichten den Begriff „oleophob“ verwendete, wurden sie später selbst-aggregierende Monolagen (self-assembled monolayers, SAMs) genannt. Trotzdem fanden Zismans Schichten zunächst nur wenig Beachtung, da sie zwar thermodynamisch stabil waren, aber an ihrer Grenze zur Luft keine funktionalisierbaren Gruppen aufwiesen und sich durch polare organische Lösungsmittel leicht wieder entfernen ließen.⁴ Auch gab es bis auf die Messung des Kontaktwinkels noch keine analytischen Methoden, derartige Oberflächen genauer zu charakterisieren. Dennoch war ein Ansatz gefunden, amphiphile Moleküle dicht-gepackt und kontrolliert auf einer Oberfläche abzuscheiden.

Ende der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts wurden selbstaggregierende Schichten wieder aufgegriffen. JACOB SAGIV entdeckte, dass Octadecyltrichlorsilan (allgemein Organotrichlorsilane, OTS) auf Glas als Substrat sehr stabile Monolagen bildete.⁹² Triebkraft der Monolagenbildung war die Entstehung der sehr stabilen Silizium-Sauerstoff Bindung. Spuren von Wasser im organischen Lösungsmittel hydrolysieren die Trichlorsilylgruppe unter Bildung von (Si-O)-Bindungen zum Substrat und zu benachbarten OTS-Molekülen.⁹³ Die maximale Anzahl an (Si-O)-Bindungen ergibt sich bei Bildung einer dicht-gepackten Monolage, bei der die Alkylketten möglichst aufrecht zur Oberfläche stehen. OTS eignet sich nicht nur zur Beschichtung von Glas, sondern für eine Reihe weiterer hydroxylierter Substrate wie Siliziumdioxid, Aluminiumoxid und Glimmer. Zudem waren mit ω -substituierten OTS erstmals funktionalisierbare Monolagen verfügbar. Allerdings hängt die Qualität der OTS-Filme sehr empfindlich von den Reaktionsbedingungen ab.

Von 1983 an wurden neben den Alkylsilanen weitere SAM-bildende Systeme entdeckt, wobei das Grundprinzip aller Adsorbatmoleküle gleich ist. Es handelt sich um lineare α - bzw. α,ω -funktionalisierte organische Moleküle bestehend aus einer Kopfgruppe, einem Spacer (z.B. Methylen- oder Phenyleinheiten) und einer Endgruppe (**Abb. 22**). Der Erfolg von SAMs liegt unter anderem darin begründet, dass sie eine Reihe von Eigenschaften, wie monomolekulare Schichtdicke bei hoher Packungsdichte, chemische Uniformität sowie definierter Ordnung bezüglich Konformation und Überstruktur auf dem Substrat, aufweisen. Zudem erlaubte die rasante Entwicklung oberflächensensitiver Analysemethoden wie Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie (XPS), Infrarot-

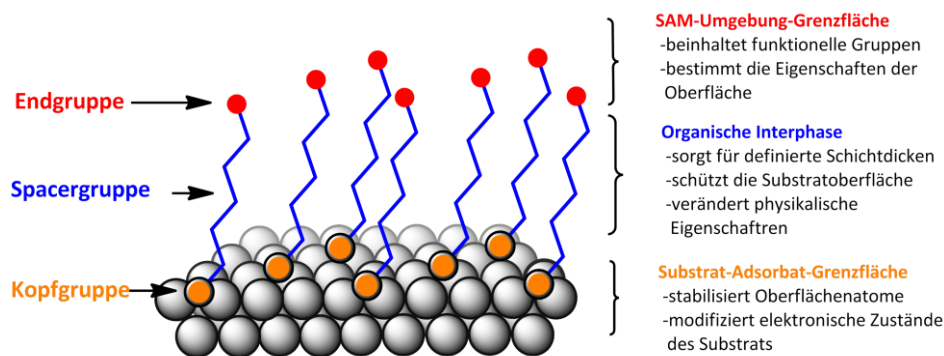


Abb. 22. Selbstaggregierender Monolagen (SAMs) auf einem Substrat am Beispiel eines endgruppenfunktionalisierten Alkanthiols auf einer Au(111)-Oberfläche. Durch geeignete Wahl der Komponenten des SAMs lassen sich vor allem die Eigenschaften der Grenzfläche des SAMs mit der Umgebung beeinflussen.

Reflexionsadsorptions-Spektroskopie (IRRAS), optische Ellipsometrie, Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS) und rastermikroskopischer Verfahren wie Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) eine detaillierte Charakterisierung der Eigenschaften und des Bildungsprozesses von SAMs.

2.2.3 Selbstaggrierende Monolagen organischer Thiole auf Gold

Organische Thiole auf einer Au(111)-Oberfläche sind das wichtigste und am besten untersuchte, SAM-bildende Substrat-Adsorbat-System. Gold eignet sich besonders gut als Substrat, da es leicht mittels Vakuumbedampfung als dünne Substratschichten hergestellt werden kann und es an Luft keine Oxidschicht bildet. Die Oberfläche kann durch einfaches Bestrahlen mit ozonbildendem UV-Licht von chemisch und physikalisch gebundenen organischen Verunreinigungen gesäubert werden. Zum anderen sind Thiole als Adsorbate hinreichend stabil und binden als „weiche“ Nuklophile mit einer Bindungsenergie von etwa 300 kJ/mol an Goldoberflächen,⁹⁴ während „harte“ funktionelle Gruppen wie Amino, Hydroxy- und Carboxy-Gruppen nur schwach adsorbieren können (HSAB-Konzept).⁹⁵ Diese hohe Affinität führt dazu, dass Thiole fast alle auf der Goldoberfläche adsorbierten Moleküle verdrängen können (Selbstreinigung). Auch Silber und Kupfer bilden mit Alkanthiolen entsprechende selbstorganisierende Monolagen,⁹⁶ wobei man allerdings unter Schutzgas arbeiten muss, da sich diese Metalle an Luft mit einer Oxidschicht überziehen.

Kinetische Studien haben gezeigt, dass die Bildung der Monolagen in drei Schritten erfolgt (**Abb. 23**).⁹⁷⁻⁹⁸ Zunächst bildet sich gemäß der Kinetik einer langmuirschen Adsorptionsisotherme eine ungeordnete Lage ($k_1 = 2500-3000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Im zweiten, etwa 3-4 mal langsameren Schritt, wandern die zunächst ungeordnet auf der Oberfläche liegenden Alkanthiole auf ihre endgültigen Gitterplätze und beginnen sich aufzurichten. Der letzte, noch einmal deutlich langsamere Schritt beinhaltet schließlich die korrekte Ausrichtung der Ketten in all-trans-Konformation (Abb. 23). Der genaue Mechanismus der Chemisorption von Alkanthiolen auf Gold ist im Detail nicht bekannt, doch es konnte röntgenspektroskopisch gezeigt werden, dass es sich bei der adsorbierten Schwefelspezies um ein Thiolat handelt.⁹⁹ Damit kann der erste Schritt formal als eine oxidative Addition von Au(0) in eine Thiol Bindung mit anschließender reduktiver Eliminierung von Wasserstoff angesehen werden:

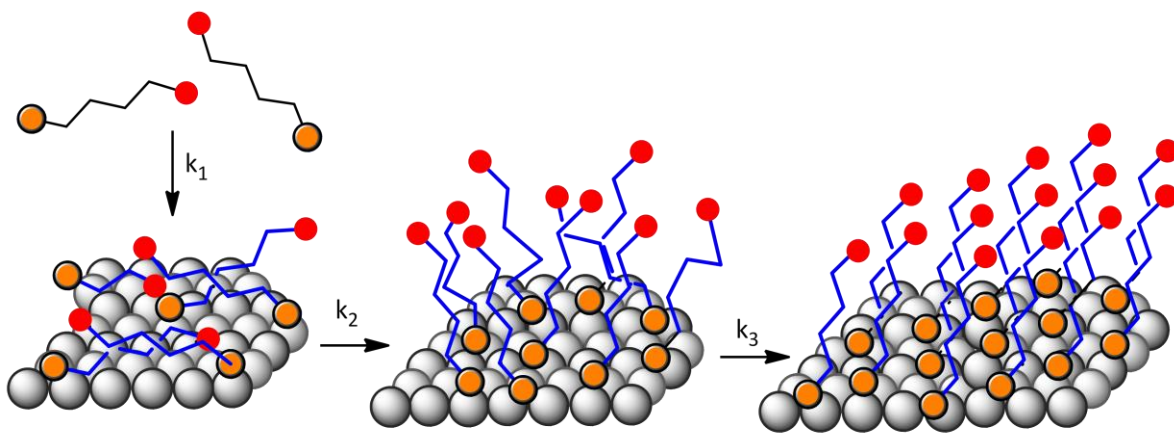
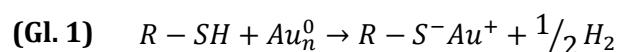


Abb. 23. Die drei Schritte zur Bildung von Alkanthiol-SAMs. 1.Schritt: Ungeordnete Adsorption; 2. Schritt: Aufrichten und Bildung einer geordneten Überstruktur; 3. Schritt: Alkylketten in all-trans-Konformation.

Die an der SAM-Bildung beteiligten Wechselwirkungsenergien lassen sich folgendermaßen beschreiben:¹⁰⁰ während der erste Schritt überwiegend eine Reaktion des Substrats mit der Kopfgruppe des Adsorbats ist, wird der zweite Schritt von van-der-Waals-Wechselwirkungen der Seitenkette und der Mobilität des Adsorbats auf der Oberfläche bestimmt. Am Ende des Prozesses sind die Alkanthiol-Ketten hochsymmetrisch als eine $(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$ -Überstruktur wahrscheinlich in den Lücken (Hollow-Position) einer Au(111)-Oberfläche angeordnet (**Abb. 24**).¹⁰¹⁻¹⁰² Daraus ergibt sich auch eine weitere Eigenschaft von Alkanthiolen auf Au(111)-Oberflächen. Die Ketten sind unter einem Tiltwinkel von $\sim 30^\circ$ bezüglich der Flächennormalen geneigt. Der optimale Abstand zweier Methylen-Einheiten beträgt 4.6 Å. Beispielsweise ordnen sich auf einer Ag(100)-Oberfläche die Schwefelatome im Abstand von 4.54 Å an, was annähernd dem idealen Abstand für die Methylgruppen entspricht. Daher zeigen Alkanthiole auf einer Ag(100)-Oberfläche auch so gut wie keinen Tiltwinkel¹⁰³. Auf einer Au(111)-Oberfläche haben die Schwefelatome dagegen einen Abstand von 4.97 Å und der Abstand für aufrecht stehende Alkylketten wäre nicht optimal. Daher sind sie soweit gekippt, bis der Abstand zwischen den Alkylketten wieder dem thermodynamisch günstigsten Wert entspricht.

Für die $(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$ Überstruktur von Alkanthiol-SAMs (blaue Kugeln in Abb. 24) ergibt sich bei dem Netzebenenabstand einer Au(111)-Oberfläche (gelbe Kugeln in Abb. 24) von 0.24 nm eine maximale Packungsdichte von 24.1 Å² pro Alkanthiol-Molekül oder $1.67\cdot 10^{16}$ Molekülen pro cm².

2.2.4 Selbstaggrierende Monolagen mit aromatischem Gerüst

Die Ketten aliphatischer SAMs mit unpolaren Endgruppen sind trotz der vielen konformellen Freiheitsgrade der Methylengruppen weitestgehend einheitlich ausgerichtet. Tragen die SAMs dagegen polare Endgruppen (OH, COOH, CN), ist eine einheitliche Ausrichtung nicht immer dauerhaft gegeben. Die anfänglich hohe Ordnung des SAMs kann mit der Zeit durch Reorganisation verloren gehen.¹⁰⁴ Ein System mit geringerer konformationeller Freiheit könnte hier höhere Ordnung erlauben. Flüssigkristalle (wie beispielsweise das Pentylcyanobiphenyl, 5CB) sind wie SAMs hoch geordnete, 2-dimensionale Schichten. Daher liegt die Verwendung von Biphenylthiolen zum Aufbau von selbstorganisierenden Monolagen nicht fern.¹⁰⁵ Ein weiterer interessanter Aspekt von aromatischen Thiolen mit einer Endgruppe in 4'-Position ist, dass diese mit der Kopfgruppe elektronisch über den Spacer verbunden ist (Konjugation) und man durch geeignete Wahl der Endgrup-

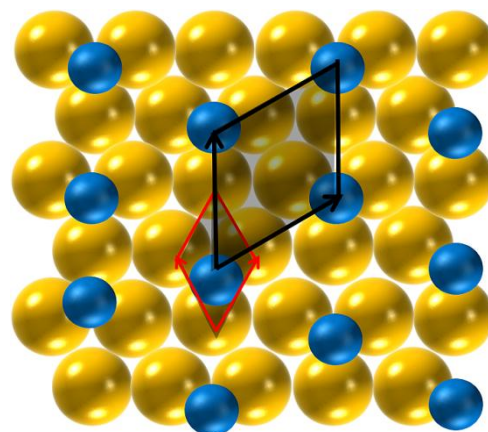


Abb. 24. Thiolat-Überstruktur (blau) auf einer Au(111)-Oberfläche (gelb). Je nach Wahl der Basisvektoren ergeben sich verschiedene Darstellungen. Am gebräuchlichsten ist die Woodsche Notation $(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$, die die Gittervektoren der Überstruktur (schwarz) anhand der Basisvektoren des Substrats (rot) beschreibt.

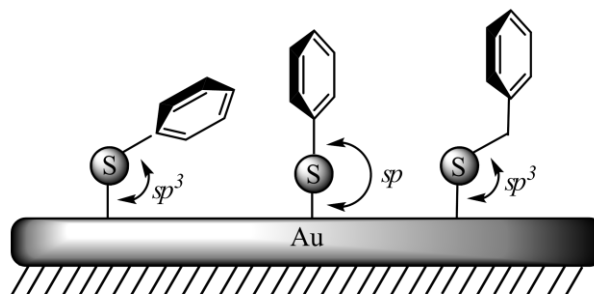


Abb. 25. Modell zu Erklärung der verschiedenen Packungsdichte aromatischer Thiole und Benzylthiole. In der Realität sind auch Benzylthiol-Monolagen mit einer CH₂-Gruppe als Spacer auf der Oberfläche gekippt.

pe die Thiolatbildung stabilisieren oder destabilisieren kann, bzw. die Thiolgruppe weicher oder härter machen kann.

1993 wurden erstmals thioaromatische Monolayer auf Gold systematisch untersucht und mit denen von Alkanthiolen verglichen.¹⁰⁶ Es konnte gezeigt werden, dass einfache Phenylthiole nur schlecht definierte Monolagen bilden. Erst mit längeren aromatischen Thiolen wie Biphenylthiol und Terphenylthiol war es möglich, Monolagen herzustellen, deren Oberflächenbedeckung und Überstruktur annähernd denen langkettiger Alkanthiole entsprachen. Man kann sich diese Eigenschaften aromatischer SAMs modellhaft anhand des Winkels der Au-S-C-Bindung und der daraus resultierenden Hybridisierung des Schwefels erklären (Abb. 25). Maximale Wechselwirkung der π -Orbitale der Phenylringe ist bei einem Winkel von 180° gegeben. Daraus resultiert aber eine für den Schwefel ungünstige sp -Hybridisierung. Eine favorisierte sp^3 -Hybridisierung hingegen würde zu einer geringeren Wechselwirkung der Phenylringe führen. Daher erreicht man mit Thiolen in Benzylstellung die am dichtesten gepackten aromatischen SAMs,¹⁰⁷ da dann sowohl der Au-S-C-Winkel wie auch die relative Lage der Phenylringe günstig sind.

2.3 Verhalten von SAMs als Reaktion auf ionisierende Strahlung

Ein wesentlicher Grund für die weite Verbreitung von SAMs in der Forschung ist, dass es mit verschiedenen Methoden einerseits möglich ist, diese strukturiert auf ein Substrat aufzubringen oder andererseits die auf einem Substrat befindliche Monolage selektiv an bestimmten Stellen zu modifizieren. In beiden Fällen spricht man von Lithographie, da dieser Begriff allgemein ein Verfahren beschreibt, eine Oberfläche in kontrollierter räumlicher Auflösung zu verändern. Im ersten Fall wird die Oberfläche eines Substrats durch Aufbringen einer Monolage an bestimmten Stellen strukturiert; im zweiten Fall wird die Monolage selbst mittels elektromagnetischer Strahlung, Elektronen oder Ionen an bestimmten Stellen chemisch modifiziert und somit strukturiert.

Microcontact Printing (μ CP) ist die bekannteste Methode, um auf einem Substrat an definierten Stellen eine selbstaggregierende Monolage aufzubringen. Dabei wird das Adsorbat mit Hilfe eines Stempels aus Polydimethylsiloxan (PDMS) direkt auf das Substrat aufgebracht. Ein Vorteil des Verfahrens besteht in der schnellen (wenige Sekunden bis einige Minuten) und großflächigen Strukturierung von Metall-, Metalloxid- oder Halbleiteroberflächen ($0.1-100 \text{ cm}^2$). Ein Nachteil ist die begrenzte räumliche Auflösung von maximal 100 nm .¹⁰⁸

Um auf einem Substrat kleinere Strukturen zu erzeugen, ist Röntgen- oder Elektronenstrahlung besser geeignet, da die theoretische Auflösungsgrenze im Bereich der Größe von Molekülen und damit bei $\sim 1 \text{ nm}$ liegt. In der Praxis führt eine Vielzahl von Effekten dazu, dass diese maximale Auflösung kaum erreicht wird. Beim Verwenden von Masken, deren Struktur auf das Substrat übertragen werden soll, führen Beugungseffekte am Maskengitter zu einer Verringe-

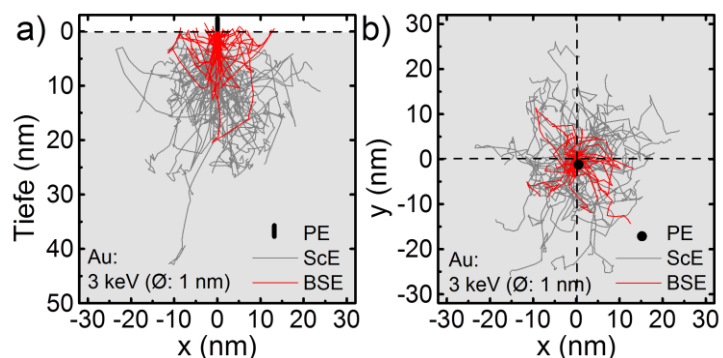


Abb. 26. Monte-Carlo Simulation der Trajektorien von Primärelektronen (3 keV, Durchmesser 1 nm) beim Eintritt in einen Festkörper (Au) als Tiefenprofil (a) und Flächenprofil (b). Nur PE auf den rot gezeichneten Trajektorien verlassen die Oberfläche wieder und stehen z.B. für die Elektronenmikroskopie zur Verfügung (back scattered electrons, BSE).

rung der Auflösung. Mit dem Elektronenstrahl eines Rasterelektronenmikroskops ist dagegen ein maskenfreies, serielles Belichten möglich. In beiden Techniken wird das Substrat zunächst mit einem photosensitiven Resist-Material beschichtet, das an den belichteten Stellen beschädigt wird und sich dann durch Abspülen entfernen lässt (positiver Resist). Das Substrat kommt zum Vorschein und kann mittels einer Ätzchemikalie entfernt werden, während es an den unbestrahlten Stellen vom Resist geschützt wird. Die Elektronenstrahlolithographie stellt hohe Anforderungen an den Resist, da Elektronen beim Eindringen in Materie in alle Richtungen gestreut werden (**Abb. 26a**). Um die laterale Verbreiterung (**Abb. 26b**) gering zu halten, muss mit Primärelektronen möglichst kleiner Energie gearbeitet werden. Diese haben dann aber nur eine geringe Eindringtiefe in Oberflächen (**Abb. 27**).¹⁰⁹ Daher sollte das Resistmaterial nicht dicker als das 2-3-fache der Streulänge sein. Diese Anforderungen treffen auf SAMs zu. Sie sind sehr dünn (< 2 nm) und die Fläche einer molekularen Einheit liegt im Bereich von 0.25 nm².

Es ist demnach nicht verwunderlich, dass die Eignung von SAMs als Resist in der Elektronenstrahlolithographie intensiv untersucht worden ist, zumal sich mit der geringen Dicke des Resists ein weiteres Feld für die Elektronenstrahlolithographie eröffnet. Die gewöhnlich benutzten Resist-Materialien (PMMA) haben eine Dicke von >50 nm und eignen sich daher nur für Elektronen ab einer Energie von 5 keV. Niederenergetische Elektronen bis zwischen 10 und 500 eV dringen aufgrund ihrer geringen inelastischen Streulänge nur bis zu 10 nm in die Oberfläche ein, weshalb man bei diesen Elektronenenergien auf einen sehr dünnen Resist angewiesen ist.

Niederenergetische Elektronen rufen in Thiolat-SAMs chemische Veränderungen wie das Brechen von Bindungen (C-C, C-H, C-S), die Bildung von C=C Bindungen, aber auch Quervernetzung benachbarter Moleküle hervor.⁸ SAMs, die aus Alkanthiolen bestehen, werden durch die Bestrahlung fragmentiert und damit anfälliger für Desorption. Die Goldschicht unter den

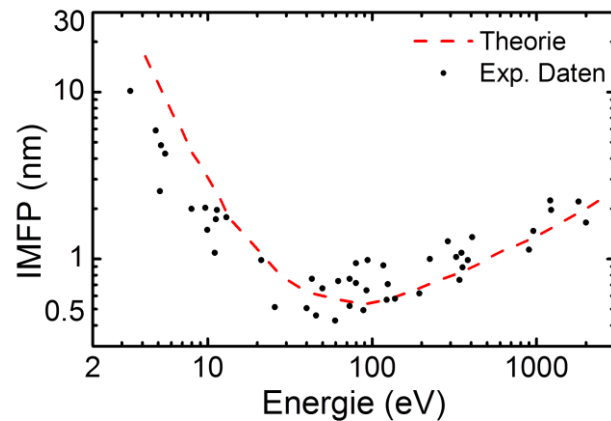


Abb. 27. Universalkurve der mittleren inelastischen Weglänge (IMFP) von Elektronen in Materie; die rote Linie ist nach SEAH und DENCH theoretisch berechnet, die schwarzen Punkte sind experimentell bestimmte Daten verschiedener fester Materialien.

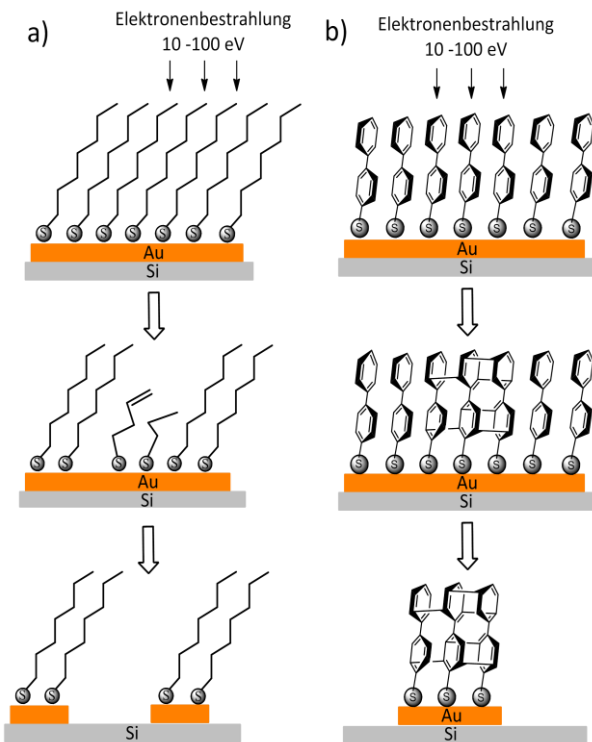


Abb. 28. Thiol-basierte SAMs als Elektronenstrahlresist in der Nanolithographie. (a) Aliphatischen SAMs als Positiv-Resist und (b) aromatische SAMs als Negativ-Resist.

bestrahlten Bereichen wird nicht mehr vor der Diffusion von Ätzchemikalien geschützt (**Abb. 28a**). Im Gegensatz zu aliphatischen Monolagen kommt es nach der Bestrahlung mit Elektronen bei SAMs mit aromatischem Gerüst zu einer lateralen Quervernetzung, die der Schicht an den belichteten Stellen eine höhere mechanische und chemische Widerstandsfähigkeit verleiht. Der SAM ist an den unbestrahlten Arealen leichter zu entfernen als an den bestrahlten Bereichen, weshalb aromatische SAMs als Negativ-Resist verwendet werden können (**Abb. 28b**). Biphenyl-4-thiol (BPT) ist das einfachste System einer dicht gepackten, aromatischen Monolage auf Gold. Die Elektronenbestrahlung von BPT-SAMs ist intensiv untersucht worden, und die Eignung als Negativ-Resist konnte durch Bestrahlung der Monolage mit Elektronen der Energie 50 eV bei einer Dosis von 40 mC/cm² gezeigt werden.¹² Die Bestrahlung mit Elektronen führt wie auch bei den aliphatischen SAMs zu einer Spaltung von (C-H)- und (C-C)-Bindungen. Während die freigesetzten Wasserstoffradikale durch das umgebende Vakuum entfernt werden, rekombinieren die Kohlenstoffradikale mit benachbarten Einheiten und vernetzen so die Schicht lateral. Bei aliphatischen SAMs führt die Spaltung der (C-C)-Bindung zu einer Dissoziation des entsprechenden Fragments ins Vakuum.

Neuere Untersuchungen haben allerdings ergeben, dass weniger die Aromatizität sondern die Ringstruktur ursächlich für die Quervernetzung ist. Es konnte gezeigt werden, dass aliphatische, aber ringförmige Bicyclohexylthiol-SAMs bei Elektronenbestrahlung lateral quervernetzen und sich wie ein Negativ-Resist verhalten.¹¹⁰

Bei der Elektronenbestrahlung von SAMs aus 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol (NBPT) entdeckte man erstaunlicherweise, dass die aromatischen Ringe nicht nur quervernetzen, sondern dass an den bestrahlten Stellen die Nitrogruppen durch bei der Spaltung der C-H Bindungen frei gewordene Wasserstoffatome zur Aminogruppen reduziert worden waren.²³ Dieser Effekt ist insbesondere deshalb interessant, weil die entstandene Aminogruppe chemisch reaktiv ist und dort elektrophile Substanzen angekoppelt werden können (**Abb. 29**). Damit wird es möglich, zwei-dimensionale chemische Strukturen mit einer lateralen Auflösung im Nanometerbereich herzustellen.

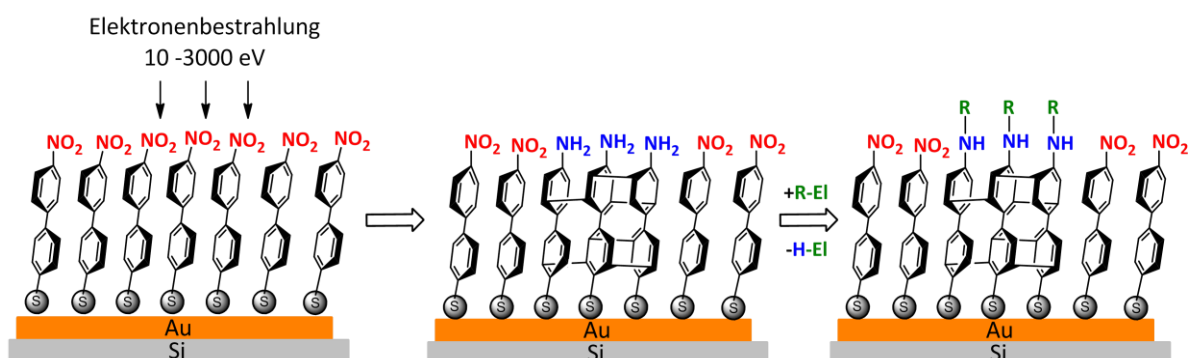


Abb. 29. 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol-SAMs als Templat für die chemische Nanolithographie. Durch Elektronenbestrahlung werden die Nitrogruppen zu reaktiven Aminogruppen reduziert, an die weitere, elektrophile Moleküle (R-EI) gekoppelt werden können.

2.4 Proteinresistente Oberflächen

Ein wichtiger Aspekt biomaterialwissenschaftlicher Forschungen beschäftigt mit der Adsorption von Proteinen auf Oberflächen. Da es sich bei diesen Biomolekülen um große und amphiphile Makromoleküle handelt, sind sie intrinsisch oberflächenaktiv und die Fragestellung liegt weniger darin, wie man sie auf Oberflächen adsorbieren kann, sondern wie sich ein kontrolliertes Adsorptionsverhalten erreichen lässt. Dazu ist es zunächst unerlässlich, Oberflächen zu besitzen, die unspezifischer Adsorption von Proteinen widerstehen. In einer solchen Matrix können dann Bereiche erzeugt werden, in denen sich Biomoleküle spezifisch adsorbieren lassen (Biosensoren, Biochips).¹¹¹

Auf der anderen Seite sind proteinabweisende Materialien und Oberflächenbeschichtungen auch in medizinischen und technischen Anwendungen von großer Wichtigkeit, um Werkstoffe vor einer unkontrollierten Adhäsion biologischer Moleküle und Organismen zu schützen. So stellt die Adsorption von Proteinen bei künstlichen Implantaten ein ernstes Problem dar.¹¹² Dieser Vorgang tritt bereits unmittelbar nach der Implantation auf und führt zu einer unkontrollierten Adsorption von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und des Blutplasmas. Das wiederum kann zu einer körpereigenen Immunreaktion auf die adsorbierten Proteine in Form einer Entzündungsreaktion, gefolgt von der Einkapselung und Abstoßung des Implantats führen.¹¹³

Aber auch bei vielen technischen Systemen, die in Kontakt mit Wasser stehen wie Wassertanks, Rohrsysteme und die Außenhülle von Schiffen, führt die primäre Adsorption von Proteinen zu einer Adhäsion von Mikroorganismen und damit zu einer Beeinträchtigung von Funktion und Effizienz der Geräte (**Abb. 30**).¹¹⁴

Da es nur wenige Materialien gibt, die eine intrinsische Biokompatibilität aufweisen, ist die Entwicklung proteinresistenter bzw. biokompatibler Oberflächenbeschichtungen von großem praktischem und finanziellem Interesse.

2.4.1 Wechselwirkungen von Proteinen mit Oberflächen

Für die Entwicklung proteinresistenter Oberflächen ist es erforderlich, den Mechanismus der Wechselwirkung von Proteinen mit Oberflächen zumindest in Ansätzen zu verstehen.

Proteinadsorptionen werden im Allgemeinen durch die drei in dem System vorhandenen Komponenten bestimmt. Dazu zählt in erster Linie das Protein selber. Dessen Adsorption auf einer Oberfläche führt zu strukturellen Veränderungen seiner Sekundär- und Tertiärstruktur bis hin zur Denaturierung. Die strukturelle Stabilität eines Proteins ist daher ein wichtiger Parameter bei der Einschätzung der Adsorptionsstärke.¹¹⁵ Thermodynamisch betrachtet ist die Faltung von Proteinen entropisch ungünstig und wird daher ausschließlich durch den negativen Enthalpiebeitrag aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Dementsprechend sind große Proteine mit einem hohen Anteil geordneter Sekundärstrukturelemente wie α -Helix- oder β -Faltblattstrukturen (z.B. Fibrinogen) meist weniger stabil als kleine und kompakte Proteine mit einer überwiegend ungeordneten Sekundärstruktur (Lysozym, Insulin).⁴²

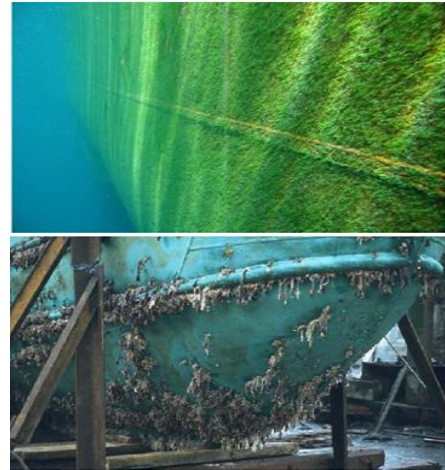


Abb. 30. Adhäsion von Algen auf der Außenhülle von Schiffen als Beispiel für Bildung von Biofilmen. [114]

Eine Entfaltung oder Denaturierung von Proteinen kann sowohl durch äußere Faktoren des umgebenden Mediums (z.B. pH-Wert, Temperatur) als auch durch Adsorption auf Oberflächen hervorgerufen werden. Deshalb ist es wichtig zu wissen, wie Proteine auf Oberflächen adsorbieren und wie der Adsorptionsvorgang durch die Beschaffenheit der Oberfläche beeinflusst wird.

Eine bedeutsame Erkenntnis ist, dass hydrophobe Oberflächen oft höhere Proteinadsorptionsraten aufweisen als hydrophile.¹¹⁶ Wie bei anderen amphiphilen Molekülen (z.B. Mizellen) sind in wässriger Lösung die polaren Regionen eines aktiven Proteins vornehmlich nach außen orientiert, während die unpolaren entsprechend nach innen gerichtet sind. Wechselwirkt das Protein mit einer wasserabweisenden Oberfläche, werden die zuvor innen liegenden, hydrophoben Bereiche des Proteins nach außen geführt (hydrophobe Wechselwirkung). Dieser Vorgang kann mit einer Strukturänderung, Denaturierung und dem Verlust der biologischen Aktivität des Proteins einhergehen.

Bei geladenen Polyelektrolyt-Oberflächen (PE-Oberflächen) beeinflusst zudem der isoelektrische Punkt des Proteins und der pH-Wert des umgebenden Mediums die Interaktion zwischen dem Biomolekül und der Oberfläche (elektrostatische Wechselwirkungen). Auch die Ionenstärke ist im Fall des Auftretens elektrostatischer Wechselwirkungen eines geladenen Proteins mit der geladenen Oberfläche von Bedeutung. Daher sind diese Oberflächen in einem wesentlich enger gefassten Bereich proteinabweisend als neutrale.

2.4.2 Eigenschaften von Polyethylenglykolen (PEGs)

Damit lassen sich bereits zwei wichtige Kriterien für proteinfreundliche Oberflächen bzw. Oberflächenbeschichtungen definieren: Diese müssen *hydrophil* und elektrostatisch *neutral* sein. Verwendet werden in dieser Hinsicht vor allem Polymere wie beispielsweise Polyethylenglykole und Polysaccharide (Dextrane oder Zellulosederivate).¹¹⁷ Der Grad an Proteinresistenz der Polymerfilme wird dabei vor allem durch deren Packungsdichte und Schichtdicke bestimmt.

Von den erwähnten Materialien stellen Filme auf Basis von Polyethylenglykolen (PEGs) das mit Abstand am häufigsten verwendete System dar, um Oberflächen vor unspezifischer Adsorption zu schützen.¹¹⁸ Zusammen mit der fehlenden Giftigkeit und der geringen Immunogenität finden PEGs ein breites Anwendungsgebiet besonders auf dem Gebiet der Biomedizin.

Polyethylenglykol (PEG) - auch Polyethylenoxid (PEO) genannt - ist ein ungeladener und hydrophiler Polyether, der linear oder verzweigt in einem Molmassenbereich bis mehreren Millionen g/mol verfügbar ist. Trotz seiner einfachen und unscheinbaren molekulare Struktur zeigt PEG einige höchst ungewöhnliche Eigenschaften. Zum einen ist in Wasser wie auch in einer Vielzahl organischer Lösungsmittel gut bis sehr gut löslich. Offensichtlich ist gerade das Verhältnis von zwei Methylengruppen gefolgt von einem Sauerstoffatom für dieses vielfältige Löslichkeitsmuster verantwortlich, denn die homologen Nachbarn von PEG - Polymethylenoxid und Polypropylenoxid - sind beide nicht in wasserlöslich. Zudem wird die Löslichkeit in Wasser auch durch eine besonders hohe konformelle Flexibilität der EG-Einheiten innerhalb einer PEG-Kette unterstützt. Auf der andern Seite ist PEG in unpolaren Lösungsmitteln und interessanterweise auch in Diethylether und Glykol nicht löslich.¹¹⁹

2.4.3 Verhalten von Polyethylenglykolen in wässriger Umgebung

Ein wichtiger Punkt zum Verständnis der Biokompatibilität von Polyethylenglykolen ist ihre Fähigkeit, eine ausgeprägte Hydrathülle zu bilden. Zusammen mit der konformellen Flexibilität der PEG-Ketten in Wasser führt der so genannte sterische Ausschlusseffekt zwischen den EG-Ketten dazu,

dass die PEG-Ketten bei einer ausreichenden Packungsdichte in einer gestreckten Anordnung als Polymerbürsten vorkommen. Aufgrund der hohen Löslichkeit in Wasser sind die PEG-Ketten stark hydratisiert und stoßen sich infolge des sterischen Ausschlussvolumens gegenseitig ab. Mit einer Zunahme der Anzahl an EG-Einheiten nimmt auch die Hydrathülle zu. So steigt die Anzahl von Wassermolekülen pro EG-Einheit von einem Wert um zwei bei Tetraethylenglykol auf etwa 3-5 für Polyethylenglykole mit einer Molmasse von 2000 g/mol bzw. 45 EG-Einheiten an.¹²⁰

2.4.4 Proteinabweisende Eigenschaften von Polyethylenglykolen

JEON et al. versuchten zum ersten Mal, eine theoretische Erklärung für das proteinabweisenden Verhalten von PEG-Filmen zu geben. Ihre Arbeiten widmeten sich dem Einfluss von Packungsdichte und Schichtdicke¹²¹ sowie der Größe der Proteine¹²² auf die Proteinresistenz der PEG-Filme. Sie ist das Resultat eines Zusammenspiels von sterischer Abstoßung sowie attraktiver Van-der-Waals- und hydrophober Wechselwirkung zwischen der PEG-Oberfläche und dem Protein. Bei Annäherung des Proteins an einen dichten-gepackten PEG-Film wird dieser zusammengedrückt, was zu einer Verkleinerung seines Volumens führt und er einen Teil seines hydratisierten Wassers abgeben muss. Thermodynamisch führt die Kompression also zu einer *Abnahme der Entropie*, da die PEG-Ketten weniger Konformationen einnehmen können und zu einer *Zunahme der Enthalpie* durch den Verlust von Hydratwasser. Da beide Effekte von der Kettenlänge abhängen, ist die Proteinresistenz umso ausgeprägter, je *länger* die PEG-Ketten sind und je *dichter* sie auf der Oberfläche gepackt vorliegen. Gleiches gilt für die anziehenden Kräfte von Protein und PEG: sie sind umso schwächer, je höher Dicke und Dichte des PEG-Films sind.

Allerdings versagt das Modell von JEON bei kurzen Kettenlängen ($M_N < 1$ kDa). Diese sollten der Theorie nach zunehmend nicht mehr der Proteinadsorption widerstehen können, was jedoch nicht beobachtet wird. Ein alternatives von SLEIFZER et al. vorgeschlagenes Modell betrachtet vor allem die *Dichte* des PEG-Films und sich daraus ergebenden *Konformation* der EG-Einheiten.¹²³⁻¹²⁴

Obwohl der Theorie von JEON entsprechend experimentell bestätigt wurde, dass bei PEG-Filmen vor allem Kettenlänge und Bedeckungsgrad für die Proteinresistenz von Bedeutung sind, wird bei selbstaggregierenden Monolagen aus Oligoethylenglykol-terminierten Alkanthiolen schon bei fünf EG-Einheiten eine vollständige Proteinresistenz beobachtet.^{16, 125} Das Modell der sterischen Repulsion kann zur Erklärung für diese proteinresistenten SAMs nicht herangezogen werden. Sie bilden sehr dicht-gepackte und wohlgeordnete Monolagen, in die nur sehr wenig Wasser eindringen kann. Der Hydratationsgrad ist gering und der Effekt einer durch Proteinadsorption hervorgerufenen Dehydratisierung ist zu vernachlässigen. Zudem ist die geordnete Struktur der SAMs bereits mit einer geringen Entropie verbunden, weshalb die mit einer Kompression verbundene Entropieabnahme ebenfalls vernachlässigt werden kann. Obwohl der Mechanismen der Proteinresistenz EG-terminierter SAMs bislang noch nicht eindeutig geklärt ist, sind die Ausbildung eines stabilen und hoch-geordneten Wasserfilms zwischen der Grenzfläche des EG-SAMs und dem umgebenden Mediums sowie das Auftreten elektrostatischer Abstoßungskräfte zwischen Oberfläche und Protein die entscheidenden Gründe für die Biokompatibilität.¹²⁶⁻¹²⁷ Experimentell konnte die Ausbildung der Wasser-Interphase nachgewiesen werden. Sie resultiert aus starken Wasserstoffbrückenbindungen der EG-Schicht und erreicht eine Ordnung der Wassermoleküle bis zu 5 nm weit in das Medium hinein. Durch die Ausbildung dieser viskosen Zwischenschicht wird die Proteinadsorption gehemmt und sie können die Oberfläche nicht mehr erreichen.

2.4.5 Proteinadsorption auf Polyethylenglykolen

Bezüglich der Proteinadsorption sind je nach Ausmaß der PEG-Bedeckung und der Art des adsorbierenden Proteins drei verschiedene Adsorptionsmechanismen möglich.¹²⁸

Bei geringer Packungsdichte des PEG-Films können kleine Proteine durch die PEG-Schicht hindurch auf die Substratoberfläche gelangen. Bei größeren Proteinen kann es zu einer Adsorption kommen, bei der der PEG-Film zwar nicht komprimiert wird, aber die Biomoleküle durch attraktive Van-der-Waals- oder elektrostatische Wechselwirkungskräfte an der Oberfläche des PEG-Films festgehalten werden. Große Proteine hingegen können unter Kompression an dem PEG-Film adsorbieren. Daher ist vollständige Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption nur bei Abwesenheit aller drei Adsorptionsvarianten gegeben, was eine hohe Packungsdichte und die Minimierung attraktiver Wechselwirkungskräfte erfordert. Daher kann eine Proteinadsorption zum einen durch die Einführung repulsiver Kräfte zwischen Protein und Oberfläche, als auch durch die Vermeidung attraktiver Kräfte kontrolliert werden.

Bei den PEG-Filmen wird das Ausmaß der Hydrathülle zwar weitestgehend durch die Kettenlänge und den Bedeckungsgrad bestimmt, es kommt aber möglicherweise wie bei den EG-SAMS zusätzlich zu einer geordneten, viskosen Wasser-Interphase.¹²⁹ Besitzen die PEG-Ketten in Wasser geladene, funktionelle Gruppen, üben diese einen Einfluss auf die Struktur der sich ausbildenden Wasserschicht aus. Durch saure- oder basische Gruppen können auf diese Weise Oberflächenladungen entstehen, die die Bildung des stabilen Wasserfilms unterstützen.

3 Charakterisierungsmethoden

Während sich Zisman 1947 bei der Charakterisierung selbstorganisierender Monolagen noch weitestgehend auf Kontaktwinkelmessungen zur Oberflächenanalyse verlassen musste, sind heute eine Vielzahl von Verfahren verfügbar. Die meisten Geräte arbeiten im Ultrahochvakuum, dessen routinemäßige Anwendung erst seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts gegeben ist. Grob lassen sich die Analysemethoden in zwei große Gruppen einteilen: Oberflächen lassen sich elektronenmikroskopisch untersuchen, wobei die Probe mit einem Elektronenstrahl abgetastet wird und entweder die Streuung der Primärelektronen (Transmissionselektronenmikroskop, TEM) oder die Emission von Sekundärelektronen (Rasterelektronenmikroskop, REM) als bildgebendes Signal verwendet wird. Alternativ können Oberflächen mit einer feinen Spitze abgetastet und deren Profil über den Tunnelstrom (Rastertunnelmikroskop, STM) oder aufgrund der Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze (Rasterkraftmikroskop, AFM) ermitteln werden. Mikroskopische Techniken dienen in erster Linie zur topografischen Charakterisierung von Oberflächenprofilen, während zur chemischen Analyse vor allem spektroskopische Verfahren eingesetzt werden. Das ist zum einen die Photoelektronenspektroskopie, zu deren wichtigsten Methoden die Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie (XPS) und die Augerelektronen-Spektroskopie (AES) zählen. Einfallende elektromagnetische Strahlung erzeugt auf in dem Substrat Photo- und Augerelektronen mit elementspezifischer Energie. Ferner lassen sich Oberflächen mittels Absorption elektromagnetischer Wellen untersuchen. Die Infrarot-Absorptions-Reflexions-Spektroskopie (IRRAS) findet in erster Linie zur Identifizierung funktioneller Gruppen von auf einer Oberfläche befindlichen Molekülen Verwendung.

3.1 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

3.1.1 Grundlagen

Die wichtigste Methode zur spektroskopischen Charakterisierung von Oberflächen wird unter dem Oberbegriff der Photoelektronenspektroskopie (PES) zusammenfasst. Darunter fallen eine ganze Reihe von Techniken, die auf dem äußeren photoelektrischen Effekt beruhen. Elektromagnetische Strahlung geeigneter Wellenlänge ist in der Lage, Photoelektronen aus dem von ihr durchdrungenen Material herauszulösen. Je nach Energie der einfallenden elektromagnetischen Strahlung unterscheidet man zwischen Ultraviolettphotoelektronenspektroskopie (UPS) und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS). Aufgrund der unterschiedlichen Energiebereiche von UPS und XPS ergeben sich verschiedene Informationen. Bei UPS haben die Photonen eine Energie zwischen 10 und 100 eV (200-20 nm Wellenlänge) und können damit Elektronen aus dem Valenzband des zu untersuchenden Materials anregen. Die Photoelektronen geben dann Aufschluss über die elektronische Struktur des Valenzbandes und über deren Zustandsdichte (density of states, DOS).

Werden weiche Röntgenstrahlen im Bereich weniger Kiloelektronenvolt (keV) verwendet, reicht deren Energie aus, um auch mit kernnahen Elektronen zu wechselwirken. Obwohl die Photonen auch zur Anregung der Valenzelektronen in der Lage sind, ist deren Wirkungsquerschnitt mit Röntgenstrahlung der Energie > 1 keV so gering, dass die Photoelektronen fast ausschließlich aus kernnahen Orbitalen stammen. Deren kinetische Energie ist charakteristisch für das chemische Element von dem es emittiert wurde. Sind mehrere Atomorbitale zur Photoionisation verfügbar, lässt sich die Energie einem bestimmten Orbital des betreffenden Elements zuordnen. Was die Röntgenphotoelektronenspektroskopie besonders interessant macht, ist die Tatsache, dass die Energie der

Photoelektronen zusätzlich noch von der chemischen Umgebung abhängt. Das führt zu einer *chemischen Verschiebung* je nach Oxidationsstufe, Hybridisierung oder induktiv wirkenden Substituenten am betrachteten Atom. Daher wird die XPS-Spektroskopie auch als ESCA (electron spectroscopy for chemical analysis) bezeichnet.

Um aus der kinetischen Energie der Photoelektronen die Bindungsenergie des Orbitals zu berechnen, von dem es ausgesandt worden ist, kann man in erster Näherung die einfache Einstein-Relation verwenden:

$$(Gl. 2) \quad E_B = h\nu - E_{KIN} - \Phi.$$

Die Bindungsenergie des Orbitals E_B lässt sich aus der Differenz der Energie der Röntgenstrahlung $h\nu$ und der kinetischen Energie des Photoelektrons

E_{KIN} abzüglich einer Arbeitsfunktion Φ bestimmen.

Allerdings gibt es *zwei* Arbeitsfunktionen (die von Probe und Spektrometer), deren Werte in der Regel verschieden sind (**Abb. 31**).

Zunächst ist die Bindungsenergie definiert als die Energiedifferenz zwischen der Orbitalenergie und dem Fermi-niveau E_F .

Bis zur Ionisationsgrenze oder dem Vakuumniveau E_{VAC} verliert das Photoelektron dann noch die Energie der Austrittsarbeit Φ genauer die der Probe Φ_{PROBE} .

Damit hat das die Probe verlassene Photoelektron die kinetische Energie E'_{KIN} bezüglich des Vakuumniveaus der Probe.

Allerdings ist diese Energie nicht die Energie E_{KIN} , die am Detektor des Spektrometers gemessen wird.

Sind Probe und Detektor leitend mit einander verbunden, liegen zwar ihre Fermi-niveaus auf gleichem Potential, nicht aber die Vakuumniveaus.

Sie unterscheiden sich um die Differenz der Austrittsarbeiten von Probe und Spektrometer ($\Phi_{SPEKTRO} - \Phi_{PROBE}$).

Allerdings benötigt man die Arbeitsfunktion der Probe Φ_{PROBE} nicht.

Ebenso müssen die Unterschiede zwischen den beiden kinetischen Energien E_{KIN} und E'_{KIN} nicht berücksichtigt werden, wenn die Arbeitsfunktion des Spektrometers $\Phi_{SPEKTRO}$ bekannt ist.

Denn die gesuchte kinetische Energie der Probe E'_{KIN} ergibt sich dann direkt aus der gemessenen kinetischen Energie E_{KIN} :

$$(Gl. 3) \quad E'_{KIN} + \Phi_{Probe} = E_{KIN} + \Phi_{SPEKTRO}$$

und damit die Bindungsenergie:

$$(Gl. 4) \quad E_B = h \cdot \nu - E_{KIN} - \Phi_{SPEKTRO}.$$

Die Austrittsarbeit des Spektrometers braucht nur einmal bestimmt zu werden und wird über eine externe Spannung an den Analysator angelegt, um die gemessene kinetische Energie E_{KIN} über die Energie der Röntgenstrahlung $h\nu$ direkt als Bindungsenergie E_B auszugeben.

Wie in **Abb. 32** zu sehen, erzeugt das primäre Röntgenphoton ein Photoelektron. Zurück bleibt ein Loch, also eine inverse Elektronenkonfiguration. Diese hat nur eine kurze Lebensdauer und das entstandene, angeregte Ion relaxiert entweder durch Aussendung von elektromagnetischer Strahlung als Röntgenfluoreszenz (**Abb. 32b**) oder es emittiert ein Augerelektron (**Abb. 32c**).

Diese Augerelektronen sind nicht einfach nur ein „Nebenprodukt“ der PES, sondern begründen eine eigene

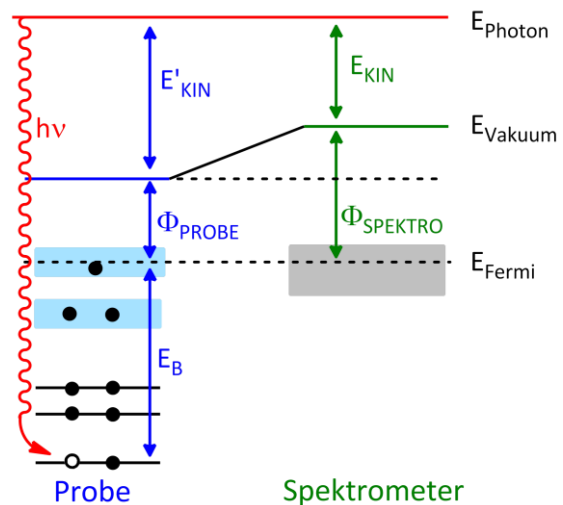


Abb. 31. Schema der relevanten Energieniveaus für die Messungen der Bindungsenergie mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS).

Die Austrittsarbeit des Spektrometers braucht nur einmal bestimmt zu werden und wird über eine externe Spannung an den Analysator angelegt, um die gemessene kinetische Energie E_{KIN} über die Energie der Röntgenstrahlung $h\nu$ direkt als Bindungsenergie E_B auszugeben.

Wie in **Abb. 32** zu sehen, erzeugt das primäre Röntgenphoton ein Photoelektron. Zurück bleibt ein Loch, also eine inverse Elektronenkonfiguration. Diese hat nur eine kurze Lebensdauer und das entstandene, angeregte Ion relaxiert entweder durch Aussendung von elektromagnetischer Strahlung als Röntgenfluoreszenz (**Abb. 32b**) oder es emittiert ein Augerelektron (**Abb. 32c**).

Diese Augerelektronen sind nicht einfach nur ein „Nebenprodukt“ der PES, sondern begründen eine eigene

Spektroskopie, die Augerelektronenspektroskopie (AES). Die Energie der Augerelektronen liegt mit 50-2000 keV im Bereich der der Photoelektronen. Allerdings ist deren kinetische Energie unabhängig von der Energie der einfallenden Röntgenstrahlung, während die der Photoelektronen gemäß Gleichung 2 mit steigender Photonenanregungsenergie zunimmt.

Das ist insofern interessant, da die Oberflächensensitivität XPS-spektroskopischer Messungen von der Energie der Photoelektronen und damit von der der Röntgenstrahlung $h\nu$ abhängt. Je geringer die Energie der Photonen, desto geringer die

Energie E_{KIN} der Photoelektronen und damit deren mittlere freie Weglänge oder Informationstiefe. Das ist der Grund, dass bei XPS-Spektrometern zur Erzeugung der Röntgenstrahlen ausschließlich Magnesium oder Aluminium als Anodenmaterial verwendet wird. Diese beiden Metalle sind diejenigen mit der geringsten Ordnungszahl bei gleichzeitig ausreichend thermischer Stabilität, um als Anodenmaterial im Ultrahochvakuum verwendet werden zu können.

3.1.2 Apparativer Aufbau

Grundsätzlich besteht ein XPS-Spektrometer aus drei Elementen: der Röntgenquelle, dem Energieanalysator und dem Detektor.

Im letzten Abschnitt wurde besprochen, dass die kinetische Energie der Photoelektronen von der Wellenlänge der Röntgenstrahlen abhängt, weshalb es wichtig ist, Röntgenstrahlung möglichst definierter Energie und geringer Linienbreite zu verwenden. Bei Magnesium als Anodenmaterial benutzt man die $K\alpha$ -Linie bei 1253.6 eV mit einer Halbwertsbreite 0.7 eV bzw. bei Aluminium die $K\alpha$ -Linie bei 1486.6 eV bei einer Halbwertsbreite von 0.85 eV. Mit Hilfe eines Monochromators lässt sich die Halbwertsbreite auf <0.3 eV senken, was aber zu erhöhtem apparativen Aufwand und einer verminderten Intensität der Röntgenstrahlung führt. Deshalb wird in gängigen Spektrometern meistens auf den Monochromator verzichtet. Das wichtigste Bauteil in der PES ist der Energieanalysator, der die kinetische Energie der von der Probe emittierten Photoelektronen bestimmt (**Abb. 33**). Dafür wird fast ausschließlich ein hemisphärischer Energieanalysator verwendet, der aus zwei konzentrischen, metallischen Halbkugeln mit dem Innen- und Außenradius r_1 und r_2

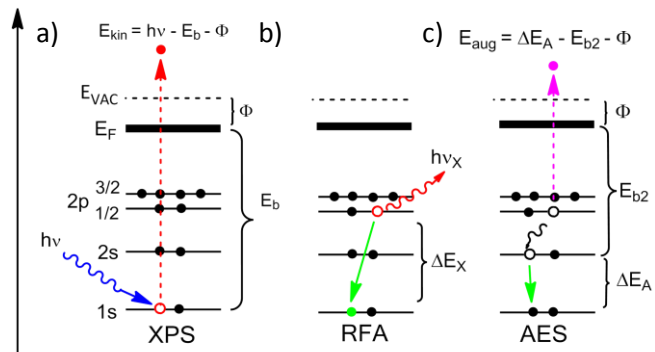


Abb. 32. Energieniveaudiagramm der Photoelektronenspektroskopie: (a) Anregung eines Photoelektrons durch ein Röntgenphoton; (b) Relaxation durch Fluoreszenz; (c) Relaxation durch Emission eines Auger-Elektrons; E_F Fermi-Energie; E_{VAC} Vakuumenergie; $h\nu_x$, ΔE_x Energie des Photoelektrons bzw. des Fluoreszenzphotons.

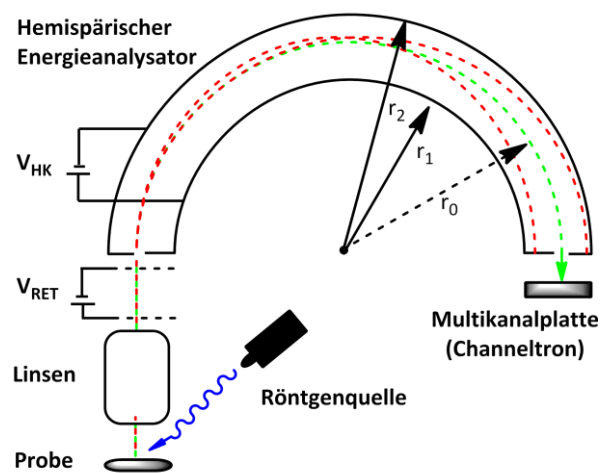


Abb. 33. Schematischer Aufbau eines XPS-Spektrometers: die Röntgenstrahlung erzeugt in der Probe Photoelektronen, die fokussiert werden und das Feld einer variablen Gegenspannung V_{RET} durchlaufen. Den hemisphärischen Analysator können nur Elektronen mit einer bestimmten Energie passieren, deren Anzahl mit einer Multikanalplatte (Channeltron) gemessen wird.

besteht, an deren Ein- und Ausgang jeweils ein dünner Schlitz angebracht ist. Wird an den beiden Halbkugeln die elektrische Spannung V_{HK} angelegt, werden die durch den Eingangsschlitz eintretenden Elektronen in dem Raum zwischen den Halbkugeln entsprechend ihrer kinetischen Energie auf verschieden stark gekrümmte Bahnen gelenkt. Nur bei einer definierten kinetischen Energie E_{PASS} können die Elektronen auf einer Bahn mit dem Radius r_0 durch den Ausgangsschlitz zum Detektor gelangen. Kontinuierliches Verändern der Spannung V_{HK} selektiert die Elektronen nach ihrer Energie und deren Anzahl (Intensität). Aus der anliegenden Spannung V_{HK} und den geometrischen Dimensionen (r_1, r_2) kann man direkt die kinetische Energie E_{PASS} der detektierten Elektronen bestimmen:

$$(Gl. 5) \quad V_{HK} = \frac{E_{PASS}}{e} \cdot \left(\frac{r_2}{r_1} - \frac{r_1}{r_2} \right).$$

In der Praxis wird allerdings die Spannung V_{HK} konstant bei einem festen Wert gehalten, sodass nur Elektronen detektiert werden können, deren Energie E_{PASS} beträgt. Der Vorteil des CAE-Modus (constant analyser energy) liegt darin, dass eine energieabhängige Empfindlichkeit des Analysators und vor allem des Detektors nichtberücksichtigt werden braucht, da ja immer nur Elektronen derselben Energie auf diesen treffen. Stattdessen wird vor dem Eingangsschlitz ein variables Bremspotential V_{RET} angelegt, sodass nur diejenigen Photoelektronen den Detektor erreichen können, deren kinetische Energie der folgenden Gleichung genügt:

$$(Gl. 6) \quad E_{KIN} = E_{PASS} + e \cdot V_{RET}.$$

Der *Detektor* hat die Aufgabe, die Anzahl der ihn erreichenden Elektronen pro Zeiteinheit zu bestimmen. Er besteht aus zwei Elementen, einem Elektronenvervielfacher zur Verstärkung des Signals und dem eigentlichen Detektorelement, das das verstärkte Signal in ein elektrisches Nutzsignal umwandelt.

Zur Verstärkung der ankommenden Elektronen wird meist eine Multikanalplatte verwendet. Dabei handelt es sich um einer Ansammlung von Kanalelektronenvervielfachern (**Abb. 34**), die nach dem Prinzip eines Sekundärelektronenvervielfachers arbeiten. Das so verstärkte Signal wird noch einmal nachbeschleunigt und über eine Kollektorelektrode eingefangen und gezählt. Prinzipiell wäre es mit Multikanalplatten möglich, nicht nur die Anzahl der ankommenden Elektronen bestimmen, sondern auch deren Energie. Allerdings hat der Elektronenvervielfacher zum einen eine deutlich geringere Energieauflösung als ein hemisphärischer Energieanalysator, zum anderen zeigt er ein nichtlineare Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Energie der Primärelektronen auf, weshalb es schwierig ist, deren Energie und Intensität gleichzeitig zu messen.¹³⁰

Daher wird der Elektronenvervielfacher nur zum Zählen der Elektronen verwendet und deshalb im Sättigungsbereich betrieben. Jedes ankommende Primärelektron erzeugt unabhängig von seiner Energie die maximale Anzahl an Sekundärelektronen.

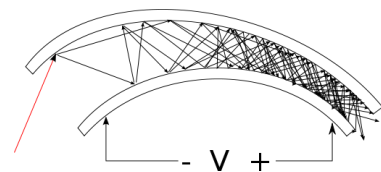


Abb. 34. Prinzip eines Kanalelektronenvervielfachers zur Bestimmung des Elektronenflusses.

3.1.3 XPS-Signale

Wie aus Abb. 32 ersichtlich, können prinzipiell alle Energieniveaus angeregt werden, deren Bindungsenergie kleiner als die Energie des einfallenden Photons ist (z.B. 1254 eV bei Verwendung einer Mg-Röntgenquelle). Werden Oberflächen untersucht, die aus mehreren Elementen bestehen, würden die Spektren aufgrund der Vielzahl der Signale schnell unübersichtlich werden. Es gibt jedoch bei jedem Element für jedes Energieniveau einen Wirkungsquerschnitt σ , der die Stärke der

Kopplung eines Röntgenphotons mit den Elektronen des betrachteten Orbitals kennzeichnet. Dieser Wirkungsquerschnitt unterscheidet sich oft erheblich bei verschiedenen Energieniveaus innerhalb eines Elements. So gibt es schon beim Kohlenstoff drei erreichbare Zustände, aus denen das Mg-K_α Röntgenphoton mit seiner Energie von 1254 eV ein Photoelektron erzeugen kann: aus den kernnahen Niveaus C 1s und C 2s, sowie aus dem C 2p Valenzniveau. Allerdings beträgt der relative Wirkungsquerschnitt für das C 2s-Niveau nur etwa 5 % bezüglich des C 1s-Orbitals und für das C 2p liegt der entsprechende Wert sogar nur bei ~0.1%.¹³¹ Gleiches gilt für alle Elemente der ersten Hauptgruppe, sodass die Untersuchung organischer Oberflächen meist zu einfachen Spektren führt. Die Abhängigkeit des Wirkungsquerschnitts σ von der Energie der Niveaus innerhalb eines Elements zeigt ein generelles Prinzip: σ ist umso größer, je geringer die Energiedifferenz zwischen Röntgenphoton und Orbital ist.

Ein weiterer Effekt bei XPS-Spektren resultiert aus der Spin-Bahn-Kopplung eines emittierten Elektrons. Bei allen Energieniveaus, deren Bahndrehimpulsquantenzahl L größer Null ist (also allen p -, d - und f -Orbitalen), führt die Spin-Bahn-Kopplung zu einem Gesamtdrehimpuls $J=L\pm S$. Da die Spinquantenzahl S immer den Wert $\frac{1}{2}$ hat, spaltet jeder p , d und f -Term in ein Duplett auf. Die beiden Energieniveaus sind bei neutralen Atomen mit Elektronen besetzt und damit energetisch entartet. Nach der Photoionisation sind die Niveaus aber nur noch einfach besetzt, und die Entartung ist aufgehoben. Damit ergeben sich zwei energetisch verschiedene Signale im Spektrum, deren Intensitätsverhältnis sich aus den Multiplizitäten der beiden J -Werte zu $(L+1)/L$ ergibt.

Beim Kohlenstoff C 1s-Signal kommt es in Molekülen mit ausgeprägtem π -System häufig zu weiteren Peaks bei höherer Bindungsenergie. Diese um bis zu 10 eV verschobenen „Shake-up“-Signale treten auf, wenn das Photoelektron während seiner Emission einen (π - π^*)-Übergang induziert und dabei einen Teil seiner Energie verliert. Die Verschiebung entspricht quantitativ einem optischen HOMO-LUMO-Übergang.

3.1.4 Schichtdickenbestimmung dünner Filme

Bei der Photoelektronenspektroskopie handelt es sich um eine oberflächensensitive Methode. In dem für die XPS-Spektroskopie relevanten Energiebereich beträgt die mittlere freie Weglänge (inelastic mean free path, IMFP) von Elektronen in Festkörpern etwa 10 bis 30 Å. In ähnlicher Größenordnung liegen auch die Abschwächungslängen λ der Elektronen. Diese experimentell ermittelte Größe beinhaltet zusätzlich noch elastische Streueffekte und gibt die Entfernung an, nach der sich die Intensität der Photoelektronen beim Durchqueren durch ein Material auf $\frac{1}{e}$ verringert hat. Daraus ergibt sich eine XPS-Informationstiefe von $3\cdot\lambda$ oder 5 - 10 nm.

Ein wichtiger Aspekt der XPS-Spektroskopie ist die Möglichkeit, Oberflächen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ zu charakterisieren, sowie Schichtdicken und Tiefenprofile entlang der Oberflächennormalen einer Probe zu bestimmen. Für eine quantitative Betrachtung ist es wichtig zu wissen, von welchen Größen die Intensität des Signals abhängt. Ansatz dafür ist die folgende Gleichung:¹³²

$$(Gl. 7) \quad dI = \Phi \cdot \sigma \cdot N_p \cdot K \cdot \exp\left(-\frac{x}{\lambda \cdot \cos\vartheta}\right) dx.$$

Φ ist die Intensität der Röntgenstrahlung, σ der Wirkungsquerschnitt, N_p die Teilchenzahldichte, K ist eine Apparatekonstante, λ die Abschwächungslänge und ϑ der Winkel zwischen Analysatorachse und Flächennormale der Probe. Für Gleichung 7 gibt es zwei Fälle zu unterscheiden. Ist Element A in einer Schicht der Dicke d homogen verteilt, ergibt sich die folgende Intensität I_A :

$$(Gl. 8) \quad I_A = I_A^\infty \cdot \left[1 - \exp\left(-\frac{d_A}{\lambda_A \cdot \cos \vartheta}\right) \right],$$

wobei I_A^∞ die maximale Intensität für den Fall $d_A \gg \lambda_A$ ist. Dieses Phänomen der begrenzten Signalintensität wird Selbstabschwächung genannt. Die maximale Intensität I_X^∞ ergibt sich aus Gleichung 7 und beinhaltet auch die Geräteparameter:

$$(Gl. 9) \quad I_X^\infty = \Phi \cdot K \cdot \sigma_X \cdot N_{\rho, X} \cdot \cos \vartheta \cdot \lambda_X$$

Oftmals werden bei XPS-Messungen dünne Filme mit einer Dicke d_A von wenigen Nanometern gemessen, die sich auf einem deutlich dickeren Substrat befinden. Das Signal des Substrats B wird dann von der dünnen, aufliegenden Schicht A gemäß Gleichung 7 durch Integration von 0 bis d_A beschrieben:

$$(Gl. 10) \quad I_B = I_B^0 \cdot \exp\left(-\frac{d_A}{\lambda_A \cdot \cos \vartheta}\right)$$

Diese Gleichung wird verwendet, um die Schichtdicke d_A des Filmes A anhand der Abschwächung des Substratsignals I_B zu bestimmen. Die unbekannte Größe I_B^0 ist durch die Messung der Intensität einer gesputterten Substratoberfläche zugänglich.

Die Abschwächungslänge λ ist in erster Näherung nur von der kinetischen Energie der Photoelektronen abhängig. In der Praxis allerdings hängt λ nicht unwesentlich von der Dichte des Materials ab, durch das sich die Photoelektronen bewegen. Das wird alleine schon durch die Analogie von Gleichung 10 mit dem Lambert-Beerschen-Gesetz deutlich: $I(d) = I_0 \cdot \exp(-\varepsilon \cdot c \cdot d)$. Es beschreibt die Abschwächung von sichtbarem Licht beim Durchschreiten einer farbigen Flüssigkeit durch eine Küvette der Dicke d . Die Abschwächungslänge entspricht hier dem Produkt aus dem Extinktionskoeffizient ε und der Konzentration des Farbstoffs c . Daher ist zu erwarten, dass auch die Abschwächungslänge λ einen materialspezifischen Anteil beinhaltet.

Eine Quelle der Ungenauigkeiten bei XPS-Messungen zur Bestimmung von Größen wie Schichtdicke ist die Verwendung absoluter Signalintensitäten. Bei der Schichtdickenbestimmung mittels Abschwächung des Substratsignals werden die Intensitäten zweier separater Messungen verglichen (Referenz und Probe). Das Ergebnis ist aber nur insoweit verlässlich, wenn externe Faktoren wie beispielsweise der Röntgenfluss Φ in beiden Messungen identisch sind. Derartige Schwankungen brauchen nicht berücksichtigt zu werden, wenn man zwei Signale einer Messung miteinander vergleicht.

Die Bestimmung der Schichtdicke eines Filmes, welcher auf einem Substrat liegt (beispielsweise der eines SAMs auf einem Goldsubstrat), ist durch den Vergleich der Intensitäten des Kohlenstoff C 1s-Signals des SAMs mit dem Au 4f-Signal des Substrats möglich. Als Referenz dient ein SAM mit bekannter Schichtdicke, z.B. ein Dodecanthiol-SAM auf einer Au(111)-Oberfläche mit der bekannten Schichtdicke von 14.5 Å.

Das Prinzip der Schichtdickenbestimmung zeigt **Abb. 35**. Bei senkrechter Position des Analysator bezüglich der Probe ($\cos(\theta) = 1$) wird das Au 4f-Signal des Substrats von dem darüberliegenden SAM entsprechend Gleichung 10 abgeschwächt, während das C 1s-Signal des SAM gemäß Gleichung 8 selbst abgeschwächt wird:

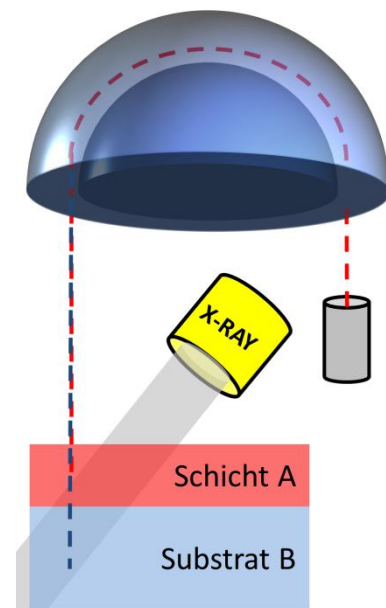


Abb. 35. Abhängigkeit der XPS-Signalintensitäten von der Tiefe und der Struktur einer Probe.

$$(Gl. 11) \quad \frac{I_C}{I_{Au}} = \frac{I_C^\infty}{I_{Au}^\infty} \cdot \frac{1 - \exp\left(-\frac{d}{\lambda_C}\right)}{\exp\left(\frac{d}{\lambda_{Au}}\right)}$$

In Gleichung 11 sind alle Größen bis auf das Verhältnis der maximalen Intensität I_C^∞/I_{Au}^∞ bekannt. Dieser Quotient wird anhand einer Referenz mit bekannter Schichtdicke d_{REF} einmal bestimmt und kann dann als Parameter K auf beliebige Systeme übertragen werden:

$$(Gl. 12) \quad K = \frac{I_C^\infty}{I_{Au}^\infty} = \frac{I_C}{I_{Au}} \cdot \frac{\exp\left(\frac{d_{REF}}{\lambda_{Au}}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{d_{REF}}{\lambda_C}\right)}$$

Damit lässt sich die Schichtdicke d_{PROBE} für einen unbekanntem Film aus Gleichung 11 durch Messen des C 1s/Au 4f-Verhältnisses der Probe bestimmen:

$$(Gl. 13) \quad \left[1 - \exp\left(\frac{d_{PROBE}}{\lambda_C}\right)\right] - \Omega \cdot \exp\left(-\frac{d_{PROBE}}{\lambda_{Au}}\right) = 0$$

mit

$$(Gl. 14) \quad \Omega = \frac{1}{K} \cdot \frac{I_C}{I_{Au}}$$

Das heißt, man erhält die Filmdicke d_{PROBE} einer entsprechend Abb. 35 aufgebauten Probe auch durch Messen der C 1s Intensität der Probe und der Au 4f des Substrats. Sofern sich Probe und Referenz strukturell nicht zu sehr unterscheiden, sind K und die Abschwächungslängen von der Probe unabhängige Parameter. Durch numerisches Auflösen von Gleichung 13 nach d_{PROBE} erhält man die gesuchte Schichtdicke. Analytisch kann man die Gleichung nur dann nach d_{PROBE} auflösen, wenn man die Abschwächungslängen λ_C und λ_{Au} durch eine mittlere Abschwächungslänge $\lambda' = \frac{1}{2}(\lambda_C + \lambda_{Au})$ ersetzt. Dann erhält man für die Schichtdicke:

$$(Gl. 15) \quad d_{PROBE} = \lambda' \cdot \ln(\Omega + 1).$$

3.1.5 Bestimmung der stöchiometrischen Zusammensetzung

Neben der Schichtdickenbestimmung ist die XPS-Spektroskopie auch zur quantitativen Analyse der auf einer Oberfläche befindlichen Elemente geeignet. Wie auch bei der Schichtdickenbestimmung gibt es mehrere Ansätze und Modelle, die stöchiometrische Zusammensetzung einer Oberfläche anhand der Intensität der XPS-Signale zu berechnen. Am einfachsten liegt der Fall, wenn die Elemente auf der zu untersuchenden Oberfläche statistisch verteilt sind. Dann ergibt sich das stöchiometrische Verhältnis N_A und N_B der Elemente A und B einfache durch aus den Intensitäten der XPS-Signale I , den Abschwächungslängen λ und den Wirkungsquerschnitten σ :

$$(Gl. 16) \quad \frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{\lambda_B}{\lambda_A}$$

Sind die Elemente nicht statistisch sondern in Schichten angeordnet (SAMs), muss neben der Selbstabschwächung auch die Abschwächung darüberliegender Schichten berücksichtigt werden. Daher ergibt das stöchiometrische Verhältnis einer Schicht O , die das Element O beinhaltet, über einer Schicht U mit dem Element U :

$$(Gl. 17) \quad \frac{N_O}{N_U} = \frac{I_O}{I_U} \cdot \frac{\sigma_U}{\sigma_O} \cdot \frac{\lambda_U}{\lambda_O} \cdot \frac{\exp(-d_U/\lambda_U) \cdot [1 - \exp(-d_O/\lambda_U)]}{1 - \exp(-d_O/\lambda_O)}$$

Diese Gleichung ließe sich noch vereinfachen, sofern die Dicke einer Schicht deutlich kleiner als die entsprechende Abschwächungslänge in dem Exponentialterm ist, da dieser dann nach einem Polynom entwickelt werden kann.

3.2 Nahkanten-Röntgenfeinstruktur-Absorptionsspektroskopie (NEXAFS)

NEXAFS (near edge X-ray absorption fine structure) Spektroskopie ist eine wichtige röntgenspektroskopische Methode zur Untersuchung dünner Schichten, mit der neben der elektronischen Struktur auch die geometrische Ordnung einer Schicht bestimmt werden kann. Die Röntgenabsorptionskante ist der Bereich, bei dem die Energie der Röntgenphotonen gerade ausreicht, um in der Probe Elektronen aus einem bestimmten Atomorbital (meistens einem Rumpforbital wie der K-Schale) anzuregen. Ist die Röntgenenergie geringer, können nur noch Elektronen aus einem weniger kernnahen Niveau angeregt werden, für das aber der Wirkungsquerschnitt deutlich geringer ist (es gilt weiterhin, dass der Wirkungsquerschnitt bei resonanter Wechselwirkung am größten ist). Daher ist die Absorption der Röntgenstrahlung an der Absorptionskante eines Elektronenniveaus un stetig (**Abb. 36a**).

Zur Ausmessung der Struktur der Röntgenkante benötigt man Röntgenstrahlung variabler Wellenlänge. Eine solche Quelle bietet heute nur ein Synchrotron, was NEXAFS-Messungen teuer und aufwändig machten. Dennoch wird die NEXAFS-Spektroskopie bei geordneten Monolagen häufig verwendet, da sie ihre Informationen anderweitig nur schwierig oder ungenau zu erhalten sind.

Nähert man sich mit der Photonenenergie von der niederenergetischen Seite beispielsweise der K-Kante des Kohlenstoffs an, nimmt die Intensität des reflektierten Röntgenstrahls beim Erreichen der Kante sprunghaft ab, da die Photonen nun genügend Energie haben, um Elektronen aus dem C 1s-Atomorbital (AO) in ein leeres, antibindendes Molekülorbital (MO) anzuregen. Das ist ein weiterer wichtiger Unterschied zur XPS, bei der die Elektronen grundsätzlich weit über das Vakuumniveau gehoben werden. Ebenso unterscheidet sich NEXAFS von XPS in der Detektion der Übergänge. XPS misst die Intensität der Photoelektronen, während bei NEXAFS theoretisch die Abschwächung der Intensität des einfallenden Röntgenstrahls (Absorption) gemessen wird. Um aber eine hohe Oberflächensensitivität der NEXAFS-Messung zu erhalten, wird in der Praxis die Röntgenabsorption indirekt über das Auffüllen der freigewordenen kernnahen Orbitale gemessen. Dabei entstehenden Auger- und Sekundärelektronen, die mit einer Sekundärelektronenvervielfacher gemessen werden (siehe Abschnitt 3.1.2).

Die Intensität des reflektierten Röntgenstrahls nimmt also durch Absorption aufgrund der resonanten Anregung eines Elektrons aus dem C 1s-Niveau in das energetisch niedrigste nicht-besetzte Molekülorbital (LUMO) ab. Besteht der Kohlenstoff des Oberflächenfilms nur aus sp^3 -hybridisiertem Kohlenstoff, führt die Anregung in ein σ^* -LUMO. Da diese σ^* -MOs aufgrund ihrer hohen Energie (oberhalb der Ionisierungsgrenze) in einem quasikontinuierlichen Bereich liegen, ist die C 1s $\rightarrow \sigma^*$ Resonanz meist breit und weniger aussagekräftig. Hat der Kohlenstofffilm dagegen π -Bindungen, weisen diese oftmals scharf definierte Energieniveaus auf und das Spektrum der

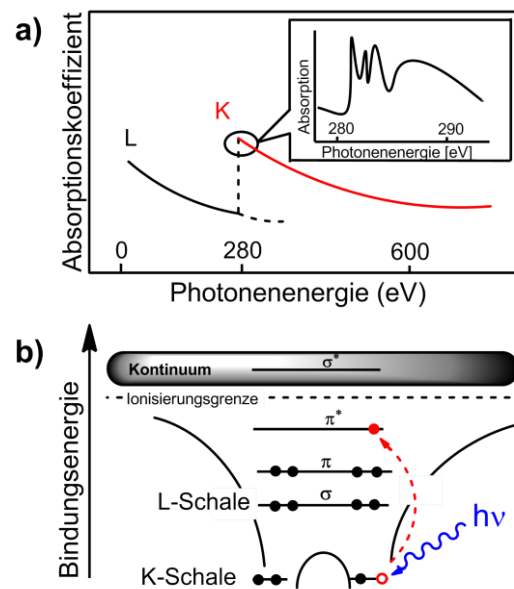


Abb. 36. (a) Röntgenkante und Feinstruktur von Kohlenstoff. K bezeichnet das 1s und L das 2s Orbital; (b) an der Röntgenkante wird ein Photoelektron zunächst in unbesetzte Molekülorbitale angeregt. Erst wenn die Röntgenenergie groß genug ist, erfolgt die Anregung ins Vakuum.

C K-Kante zeigt eine oder mehrere schmale $C\ 1s \rightarrow \pi^*$ Resonanzen. Daher ist NEXAFS besonders zur elektronischen Analyse von π^* -MOs geeignet.¹³³

Die zweite wichtige Eigenschaft von NEXAFS-Spektren ist, dass die Wechselwirkung der Röntgenstrahlung mit den MOs der Probe eine räumliche Anisotropie aufweist, das heißt der Wirkungsquerschnitt ist abhängig vom Winkel und der Richtung des Übergangsdipolmoment der Anregung (genauer von der Symmetrie der unbesetzten MOs und der Ausrichtung des SAMs bezüglich der Oberflächennormalen). In Gasphasen

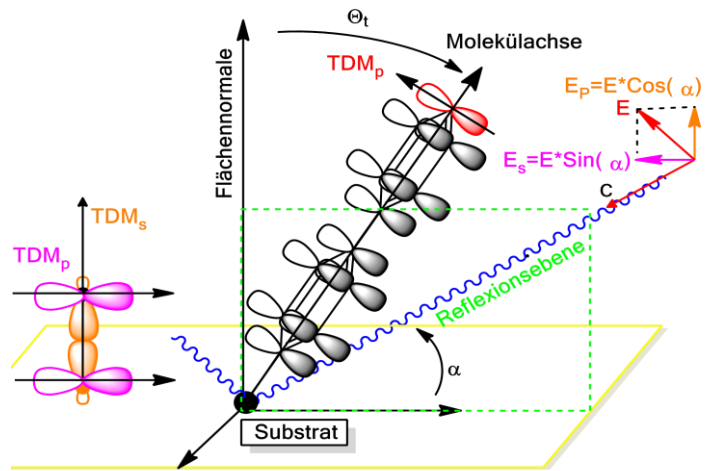


Abb. 37. Zusammenhang zwischen Tiltwinkel θ_t , Einfallswinkel der Röntgenstrahlung α und Intensität der Wechselwirkung. TDM sind die Übergangsdipolmomente bezüglich eines Molekülorbitals, E ist die elektrische Komponente der linear polarisierten Röntgenstrahlung mit der Ausbreitungsrichtung c .

oder bei ungeordneter Bedeckung sind die Intensitäten der Feinstruktur bei Verwendung von linear polarisierter Röntgenstrahlung von Einfallswinkel unabhängig, da die beteiligten Orbitale in allen Raumrichtungen gleichverteilt sind. Bei SAMs sind anisotrope Orbitale jedoch in einer Vorzugsrichtung orientiert. Das führt zu einer winkelabhängigen Intensitätsverteilung der Feinstruktur und zur Möglichkeit einer Orientierungsbestimmung des Moleküls relativ zur Oberfläche. Den Zusammenhang zwischen der räumlichen Lage eines aromatischen π^* -Systems und der Ausrichtung der einfallenden Röntgenstrahlung zeigt **Abb. 37**. Man kann das System als eine Kombination von drei Koordinatensystemen betrachten: Das Substrat bildet das Hauptkoordinatensystem. Bezüglich dessen z-Achse wird einerseits das Koordinatensystem des Moleküls, bestehend aus der Molekülachse und den Übergangsdipolmomenten (TDMs), sowie andererseits die y-Achse des Koordinatensystems der einfallenden Röntgenstrahlung (bestehend aus der Ausbreitungsrichtung c und den Feldvektoren E und B) definiert. Bei Monolagen stehen π^* -Orbitale (und damit ihre TDMs) parallel und σ^* -MOs senkrecht zur Substratebene, bzw. haben eine Neigung entsprechend des Tiltwinkels. Mathematisch wird der Zusammenhang unter Berücksichtigung, dass die Molekülachse nur bezüglich des Winkels θ_t definiert ist und in der x-y-Ebene jede Position mit gleicher Wahrscheinlichkeit einnehmen kann, für π -Systeme durch Gleichung 18 dargestellt:

$$(Gl. 18) \quad I(\alpha, \theta_t) \propto P \cdot [1 - \cos^2 \theta_t \cdot \cos^2 \alpha - 0.5 \cdot (\sin^2 \theta_t \cdot \sin^2 \alpha)] + (0.5 - P/2) \cdot (1 + \cos^2 \alpha)$$

Der Polarisationsgrad P ($0 \leq P \leq 1$) gibt die Güte der Polarisation der Röntgenstrahlung an und lag bei den durchgeführten Experimenten bei 0.85. Führt man die Messungen wie in **Abb. 37** gezeigt bei verschiedenen Einfallswinkeln (meistens 90° und 20°) durch, kann man durch Vergleich der Intensitäten mittels Gleichung 18 direkt den Tiltwinkel bestimmen (unter der Annahme, dass das herangezogene TDM senkrecht zur Molekülachse steht). **Abb. 38** zeigt grafisch den Zusammenhang der verschiedenen Winkel von Gleichung 18 und macht gleichzeitig den Zusammenhang zwischen Tiltwinkel und Differenz- bzw. Relativspektrum deutlich. Man erkennt, dass eine Messung bei einem Einstrahlwinkel von 55° (magischer Winkel) dazu führt, dass die Intensität nicht mehr von der räumlichen Lage der Moleküle abhängt. Das NEXAFS-Spektrum beinhaltet dann nur noch Informationen über die elektronische Struktur eines Oberflächenfilms. Bei allen anderen Winkeln

kommt es zu einer Anisotropie der Intensität, die umso größer ist, je weiter man sich vom magischen Winkel entfernt. Daher ist es zur Bestimmung des Tiltwinkels sinnvoll, unter einem möglichst großen und kleinen Winkel zu messen. Aus der Differenz bzw. dem Quotient der gemessenen Intensitäten lässt sich dann direkt der Tiltwinkel berechnen.

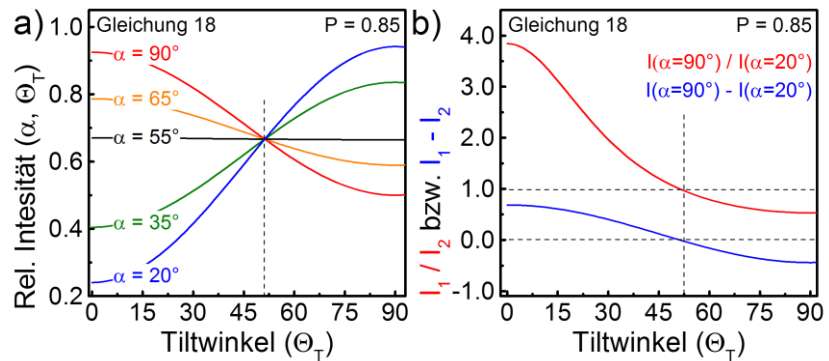


Abb. 38. Berechnete Intensitätsverhältnisse nach Gleichung 18: (a) die Intensität (pro Proportionalitätsfaktor) ist gegen den Tiltwinkel einer Monolage bei verschiedenen Einfallswinkeln aufgetragen; (b) werden Messungen bei zwei verschiedenen Winkeln α durchgeführt, kann man aus der Differenz oder dem Quotienten der Intensitäten Rückschlüsse über Ordnungsgrad und Tiltwinkel ziehen.

3.3 Infrarot-Reflexion-Absorption Spektroskopie (IRRAS)

Bei der Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie (IRRAS) wird polarisiertes Licht unter einem flachen Winkel von $> 70^\circ$ bezüglich der Flächennormalen an einem Metallsubstrat reflektiert und zu einem Detektor geleitet. Auf der Oberfläche befindliche Moleküle können das einfallende Licht in charakteristischer Weise absorbieren, was zu entsprechenden Banden im Spektrum führt. IRRAS ist eine schnelle und einfache Möglichkeit, SAMs unter atmosphärischen Bedingungen zu untersuchen. Im einfachsten Fall benutzt man IRRAS, um funktionelle Gruppen zu identifizieren oder den Ausgang von chemischen Reaktionen an SAMs zu überprüfen. Des Weiteren ist es in einigen Fällen möglich, mittels IRRAS den Tiltwinkel¹³⁴ von SAMs zu bestimmen. Da Monolagen sehr dünn sind, liegen die Absorptionen bei ca. $5 \cdot 10^{-3}$ AU (absorbance units), und man muss für Messungen in mittleren Infrarotbereich (MIR, $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten MCT-Detektor (Mercury-Cadmium-Telluride) verwenden. Außerdem muss es sich bei dem Spektrometer um ein Gerät mit Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR-Spektrometer) handeln, da man so innerhalb von kurzer Zeit eine Vielzahl von Messungen durchführen und das Signal-Rausch-Verhältnis senken kann. Weiterhin kann man bauartbedingt (Laser-Vermessung der Position des Michelson-Interferometers) den Absolutwert

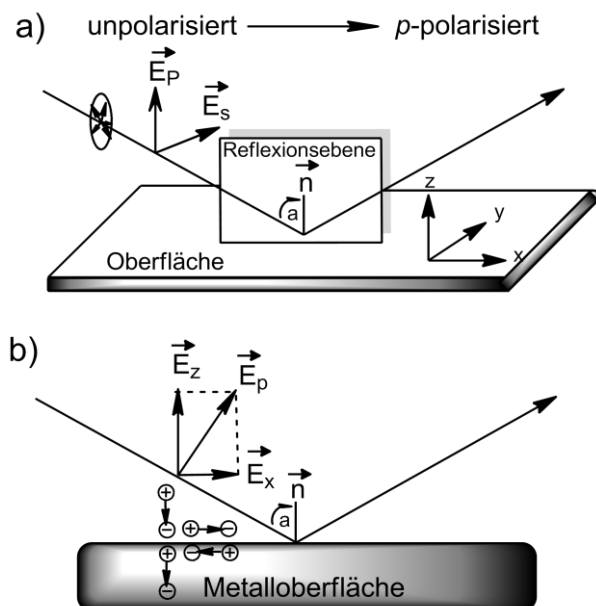


Abb. 39. (a) Reflexion von unpolarisiertem Licht an einer Oberfläche ergibt p-polarisiertes Licht. Die Orientierung bezieht sich auf die Reflexionsebene. (b) Reflexion von p-polarisiertem Licht an einer Metalloberfläche. Man erkennt, dass parallel zur Metalloberfläche polarisiertes Licht (E_x) durch die Polarisationsladungen ausgelöscht wird, während senkrecht polarisiertes Licht (E_z) verstärkt wird.

der Absorptionswellenzahl sehr genau bestimmen. Man verwendet bei der IRRAS p -polarisiertes Infrarotlicht, bei dem der Vektor des elektrischen Feldes E_p *parallel* zur Reflexionsebene steht (**Abb. 39a**). Bei einem Einfallswinkel von weniger als 90° bezüglich n teilt sich E_p in zwei Komponenten E_z und E_x auf (**Abb. 39b**). E_x liegt parallel zur Metalloberfläche und wird durch Verschiebungspolarisation der Metallelektronen ausgelöscht. E_z liegt senkrecht zur Metalloberfläche und wird entsprechend verstärkt. Da nur Licht in E_z -Richtung transmittiert wird, erfolgt maximale Wechselwirkung des einfallenden Lichts bevorzugt mit funktionellen Gruppen, deren Übergangsdipolmoment eine Komponente in z -Richtung, also senkrecht zur Metalloberfläche steht.

3.4 Ellipsometrie

Ellipsometrie ist ein standartmäßiges Routineverfahren zur optischen Schichtdickenbestimmung dünner Filme, die auf einem glatten und reflektierenden Träger aufgebracht sind. Damit ergibt sich eine wichtige Einschränkung, dass Filme auf transparenten Substraten (Glass) oder Filme, die sichtbares Licht diffus streuen, schlecht oder gar nicht ellipsometrisch gemessen werden können. Dennoch macht der verhältnismäßig einfache apparative Aufwand (Messung unter Raumbedingungen) bei gleichzeitig hoher Geschwindigkeit und Genauigkeit der Messungen die Ellipsometrie bei geeigneten Proben zu einer wichtigen Methode. Ferner ist es möglich, Proben nicht nur an Luft, sondern in Flüssigkeiten zu messen, um so beispielsweise Quellverhalten oder die Kinetik von Adsorptionen zu untersuchen.

Das Messprinzip der Ellipsometrie beruht darauf, dass Licht beim Durchgang durch Materie seine Polarisation ändert. Diese hängt von den optischen Eigenschaften des Materials und von der Weglänge ab, den das Licht durch das Material nimmt und ist damit direkt mit der Schichtdicke verknüpft. So einfach das Prinzip zunächst klingt, so komplex ist die hinter der Ellipsometrie stehende Theorie.

Die Bezeichnung Ellipsometrie stammt von einer Möglichkeit, wie elektromagnetische Wellen polarisiert sein können. Licht lässt sich als elektromagnetische Welle beschreiben, bei der sich der Vektor des elektrischen Feldes periodisch in den Vektor des magnetischen Feldes umwandelt. Beide sind orthogonal, um 180° phasenverschoben und stehen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Zur Charakterisierung von Licht reicht daher die Beschreibung eines der beiden Vektoren aus. Meistens wird der elektrische Feldvektor (\vec{E} -Vektor) verwendet.

Betrachtet man *zwei* Lichtwellen, die sich in derselben Richtung ausbreiten, können die beiden \vec{E} -Vektoren bezüglich Winkel, Phase und Amplitude beliebig zu einander stehen. Derartiges Licht ist unpolarisiert. Stehen die Vektoren dagegen *orthogonal* zu einander, sind die Wellenzüge polarisiert, genauer *elliptisch* polarisiert (**Abb. 40**). Verlaufen beide Wellen zusätzlich noch in Phase, werden sie als *linear* polarisiert bezeichnet. Oder sie sind bei identischer Amplitude genau um 90° phasenverschoben und damit *zirkular* polarisiert.

Als nächstes stellt sich die Frage, was mit polarisiertem Licht passiert, wenn es sich durch Materie bewegt. Dazu definiert man eine

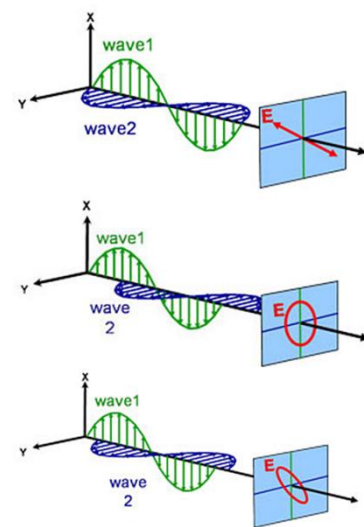


Abb. 40. Polarisationen zweier orthogonaler Wellen: (a) linear polarisiert (phasengleich, beliebige Amplitude), (b) zirkular polarisiert (90° phasenverschoben, gleiche Amplitude) und (c) elliptisch polarisiert (Phase und Amplitude beliebig). [Bild: www.jawoollam.com/tutorial]

Reflexionsebene und beschreibt die Wellen diesbezüglich mit s (senkrecht) und p (parallel). Ist der einfallende Lichtstrahl beispielsweise linear polarisiert, besitzt er bei einer Phasendifferenz von 0° einen Amplitudenanteil E_s (senkrecht) und E_p (parallel) bezüglich der Reflexionsebene (**Abb. 41a**). Nach Reflexion und Durchgang durch die Probe hat sich das Licht bezüglich Amplitude und Phase verändert und ist nun elliptisch polarisiert. Für die Ellipsometrie ist wichtig, wie sich die s - und p Komponenten von Phase und Amplitude vor und nach der Reflexion jeweils verändert haben:

$$(Gl. 19) \quad \rho = \tan(\Psi) \cdot e^{i\Delta}$$

Diese als Fundamentalgleichung der Ellipsometrie bezeichnete Beziehung beschreibt die Veränderungen von Phase und Amplitude durch zwei separate Größen. Δ bezeichnet dabei die *Differenz der Phasen* zwischen einfallendem und reflektiertem Licht und kann alle Werte zwischen 0 - 360° annehmen, während $\tan(\psi) = |R_p|/|R_s|$ das *Verhältnis der Amplituden* vor und nach der Reflexion separiert nach parallelem und senkrechtem Anteil beschreibt. R_p und R_s werden auch totale Reflexionskoeffizienten genannt und ergeben sich aus den Fresnelschen Reflexionskoeffizienten.

Das einfachste Modell einer Reflexion ist das an einer einzigen Grenzfläche (**Abb. 41b**). Jedes Material hat eine gewisse Transparenz, weshalb einfallendes Licht nur teilweise reflektiert wird und in das Medium mit dem Brechungsindex n_2 eindringt. Bezüglich der Reflexion gilt, dass die Amplituden E_p und E_s je nach Einfallswinkel Φ_1 unterschiedlich stark reflektiert werden. Mathematisch wird das durch die Fresnelschen Reflexionskoeffizienten r^p und r^s beschrieben, die das Verhältnis der Amplituden vom reflektiertem zu einfallendem Licht beschreiben:

$$(Gl. 20) \quad r^p = \frac{n_2 \cdot \cos(\Phi_1) - n_1 \cdot \cos(\Phi_2)}{n_2 \cdot \cos(\Phi_1) + n_1 \cdot \cos(\Phi_2)}, \quad r^s = \frac{n_1 \cdot \cos(\Phi_1) - n_2 \cdot \cos(\Phi_2)}{n_1 \cdot \cos(\Phi_1) + n_2 \cdot \cos(\Phi_2)}$$

In **Abb. 41c** und **d** sind die Verläufe der beiden Koeffizienten sowie deren Betragsquadrate exemplarisch für eine Reflexion von Licht an der Grenzfläche Luft ($n_1 \approx 1$) und einem transparenten Medium mit dem Brechungsindex $n_2 = 2$ abgebildet. Der Brechungswinkel Φ_2 berechnet sich gemäß dem Snellschen Gesetz ($n_1 \sin \Phi_1 = n_2 \sin \Phi_2$) aus dem Einfallswinkel und den Brechungsindizes der beiden Medien.

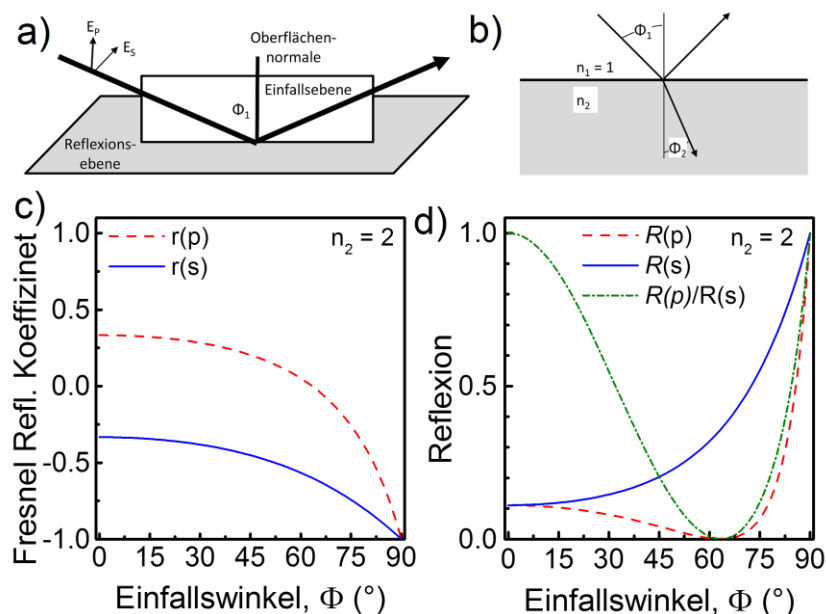


Abb. 41. (a) Modell der Reflexion von Licht an einer ideal reflektierenden Grenzfläche. (b) Reflexion und Transmission an einer realen Grenzfläche. (c) Verhältnis der Amplituden von reflektiertem und einfallendem Licht und (d) die entsprechenden Intensitäten als Betragsquadrat der Amplitude.

Die Ellipsometrie beschreibt die Reflexion an einer Grenzfläche, welche zusätzlich noch einen darüberliegenden Film trägt (**Abb. 42**). Damit wird die Reflexion durch die totalen Reflexionskoeffizienten beschrieben, die die der Summe der einzelnen Fresnelschen Koeffizienten sind:

$$(Gl. 21) \quad R^p = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \cdot \exp(-2i\beta)}{1 + r_{12}^p + r_{23}^p \cdot \exp(-2i\beta)}, \quad R^s = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \cdot \exp(-2i\beta)}{1 + r_{12}^s + r_{23}^s \cdot \exp(-2i\beta)}$$

mit

$$(Gl. 22) \quad \beta = 2\pi \cdot \frac{d}{\lambda} n_2 \cdot \cos(\Phi_2).$$

In der sogenannten Filmphasendicke β steckt die gesuchte Schichtdicke des Films d .

Damit gibt sich für spektroskopische Ellipsometrie das folgende Vorgehen: Die ellipsometrischen Koeffizienten Ψ und Δ werden bei verschiedenen Wellenlängen experimentell bestimmt (meistens im Bereich zwischen 200–1000 nm). Die Schichtdicke des Films erhält man, indem man die Parameter der Totalen Reflexionskoeffizienten aus Gleichung 21 mathematisch solange anpasst, bis sie mit dem experimentellen Verlauf bestmöglich übereinstimmen. Dafür ist es allerdings notwendig, den wellenlängenabhängigen Verlauf des Brechungsindex des Films zu kennen. Für transparente organische Medien ist dieser Verlauf gut mit dem Cauchy-Modell beschreibbar:

$$(Gl. 23) \quad n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4}$$

Der apparative Aufbau eines Ellipsometers mit rotierendem Analysator ist in **Abb. 43** dargestellt. Eine Lichtquelle erzeugt zunächst unpolarisiertes, polychromatisches Licht im Wellenlängenbereich von 200-1000 nm. Es wird durch einen Polarisator gelenkt, um linear polarisiertes Licht zu erzeugen. Optional kann daraus mit einem $\lambda/4$ -Plättchen elliptisch polarisiertes Licht erzeugt werden. Meist schickt man das linear polarisierte Licht aber direkt auf die Probe. Dort wird es reflektiert, wobei es seine Polarisation ändert und mit einem Analysator und Detektor ausgewertet wird. Bei dem Analysator handelt es sich um einen rotierenden Polarisationsfilter. Der Detektor besteht aus einem Gitter, der das Licht abhängig von der Wellenlänge aufspaltet und auf einem Array von Photodioden lenkt (44 bei dem verwendeten Ellipsometer), das die Intensität der Lichtes in Abhängigkeit von der Position des Analysator für alle Wellenlängen gleichzeitig auswerten kann. Anhand der Positionen von Polarisator und Analysator kann die wellenlängenabhängige Änderung des Polarisationsgrads ermittelt werden, die Basis zur Bestimmung der Dicke des Filmes ist, den das Licht durchquert.¹³⁵

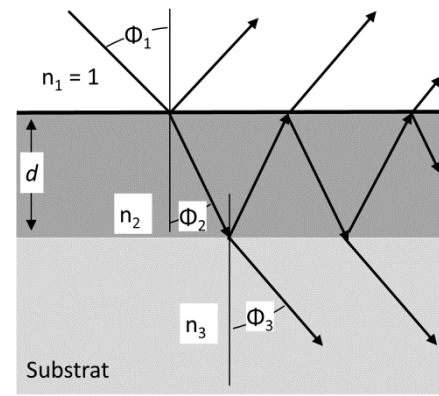


Abb. 42. Modell von Reflexion und Transmission eines Filmes, der auf einem Substrat liegt.

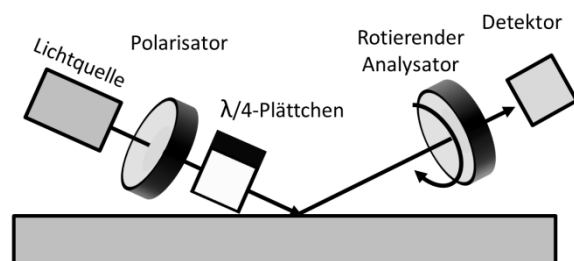


Abb. 43. Apparativer Aufbau eines Ellipsometers mit rotierendem Analysator. Das $\lambda/4$ -Plättchen (Retarder) kann optional in den Strahlengang geschoben werden.

3.5 Elektronenmikroskopie (REM, TEM)

Elektronenmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren bei dem die zu untersuchende Probe mit Elektronen untersucht wird. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen einem Transmissions-elektronenmikroskop (TEM) und einem Rasterelektronenmikroskop (REM). Auch wenn der apparative Aufbau beider Mikroskoptypen ähnlich ist, unterscheiden sie sich in Bezug auf Anwendungsbereiche und erhaltene Bildinformationen deutlich voneinander.

Der Aufbau eines TEM ähnelt dem eines Durchlichtmikroskops (**Abb. 44**): Elektronen werden als möglichst homogener und paralleler Strahl auf die Probe gelenkt. Beim Durchgang werden die Elektronen an den Atomkernen des Probenmaterials abgelenkt, sodass ein Abbild der von dem Elektronenstrahl durchleuchteten Probe entsteht. Damit wird auch klar, dass die Proben möglichst dünn und auf einer geeigneten, ebenfalls möglichst dünnen Trägermembran aufgebracht sein müssen. Da der Kontrast beim TEM vornehmlich von der Massenzahl der in der Probe enthaltenen Elemente abhängt, sind Metallpartikel besonders gut zu untersuchen. So ist es bei Beschleunigungsspannungen von bis zu 400 kV möglich, Auflösungen im sub-Å-Bereich zu erhalten. Damit ist das TEM das bildgebende Verfahren, mit der höchsten Auflösung. Es eignet sich zudem auch zur Untersuchung biologischer Proben. Allerdings bedarf es dazu einiger Vorarbeiten wie der Fixierung, Dehydratisierung oder Kontrasterhöhung durch selektive Einlagerung von Schwermetallen.

Im Gegensatz dazu wird beim REM die Probe mit einem möglichst fokussierten Elektronenstrahl zeilenweise abgetastet und die Intensität der von der Probe emittierten Sekundärelektronen mit einem Detektor bestimmt (daher wird das REM auch als Sekundärelektronenmikroskop bezeichnet). Da sich Detektor und Elektronenquelle in selben Halbraum bezüglich der Probe befinden, kann diese eine beliebige Dicke aufweisen. Weil aber ein Primärelektron, welchen in die Probe eindringt, mehrere Sekundärelektronen erzeugen kann, müssen die Proben leitfähig sein. Nichtleitende Proben kann man durch bedampfen mit Gold oder Graphit zugänglich machen.

Rasterelektronenmikroskope arbeiten mit Elektronenenergien bis ~ 20 keV, was deutlich geringer ist als beim TEM. Routinemäßig wird oft mit Energien von wenigen keV gearbeitet, was bedeutet, dass die Sekundärelektronen aus einer Tiefe von maximal $10 \mu\text{m}$ kommen. Bei Verwendung von Primärenergien von < 1 keV kann die Informationstiefe auf wenige Nanometer reduziert werden. Daher zeigt das REM vor allem die Struktur der Oberfläche des Körpers. Der hohe Oberflächenkontrast bei niedrigen Primärenergien, macht das REM zu einem wichtigen Werkzeug in der Oberflächenanalytik. Das liegt auch daran, dass beim REM meist mehrerer Detektoren gleichzeitig verwendet werden können. Je nach Position der Detektoren sehen die Bilder der gleichen Probe oft ganz verschieden aus, da die Bildinformation aus unter-

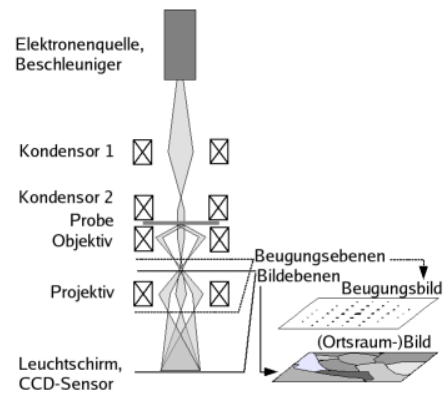


Abb. 44. Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops.

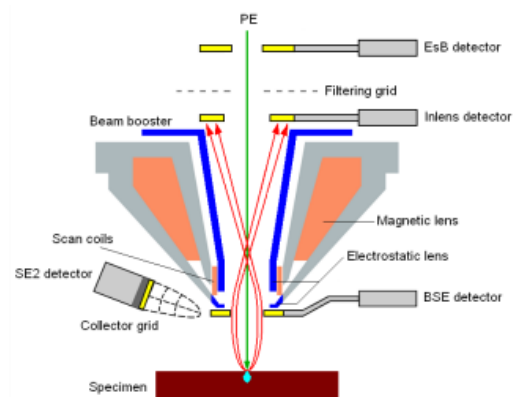


Abb. 45. Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops (REM) mit den verschiedenen Detektortypen.

schiedlichen Tiefen der Probe stammt. So befindet sich der InLens-Detektor senkrecht oberhalb der Probe. Die diesen Detektor erreichenden Sekundärelektronen (Typ SE1) stammen überwiegend aus der obersten Schicht der Probe. Dagegen ist der SE2-Detektor im 45°-Winkel zur Probe angebracht. Er detektiert vor allen Sekundärelektronen vom Typ SE2, die aus tieferen Schichten der Probe stammen. Zusätzlich ist der SE2-Detektor von einem Gitter umgeben, an das eine (negative) Spannung angelegt werden kann und arbeitet so als ein Energiefilter. Je negativer die Spannung, desto energiereicher müssen die SE2 sein, um das Bremspotential überwinden zu können und aus desto tieferen Schichten der Probe stammen sie folglich.

Trotz des einfachen und kompakten Aufbaus gerade im Gegensatz zum TEM, lassen sich beim REM Auflösungen im Nanometer-Bereich erzielen. Ferner weist das REM im Gegensatz zum TEM eine deutlich größere Tiefenschärfe auf und die Proben müssen meist nicht aufwändig vorbereitet werden.

3.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy, AFM) gehört zu Klasse der Rastersondenmikroskopie. Neben dem AFM gehört hierzu auch das Rastertunnelmikroskop (scanning tunneling microscope, STM). Bei Rastersondenmikroskopen wird die Oberfläche nicht mittels elektromagnetischer Wellen, sondern mit einem zeilenweisen Probenkopf untersucht. Beim STM wird als Sonde ein extrem dünner, metallischer Draht verwendet und dabei der Tunnelstrom zwischen Probe und Spitze gemessen. Damit ist auch schon eine wichtige Einschränkung für STM-Messungen gegeben: Die Proben müssen leitfähig sein. Dennoch ist STM eine wichtige Methode, neben der Topographie auch die elektronischen Eigenschaften zu bestimmen.

Um auch nichtleitende Proben wie Polymere oder Keramiken messen zu können, wurde das Rasterkraftmikroskop (AFM) entwickelt. Dabei wird die Probe mit einer winzigen Spitze aus Silizium oder SiN, die auf einer biegsamen Latte, der Messnadel oder Cantilever, angebracht ist, abgetastet. Dabei erfolgt eine Auslenkung des Cantilevers entsprechend der Topographie der Oberfläche.

Der apparative Aufbau eines AFM ist prinzipiell einfach (**Abb. 46**). Die Probe wird auf einem Probenhalter montiert und durch Piezoelemente in x- und y-Richtung bewegt. Dabei lassen sich Scanweiten von 100 µm und theoretischen Auflösungen von unter einem Nanometer erreichen. Die Messnadel mit der Spitze ist an einem dritten Piezoelement montiert, das sich nur in z-Richtung, also senkrecht zu Probenebene, bewegen lässt. Die Auslenkung wird mit einem Laser verfolgt, indem dieser auf die Messnadel gerichtet ist und von ihrer Oberfläche reflektiert wird. Die Position des Lasers wird dabei mit einer Quadrantenphotodiode gemessen.

Der häufigste Einsatz von AFMs ist die Untersuchung der Topographie einer Oberfläche. Um zu beschreiben, wie sich die Spitze bei Annäherung an die Oberfläche der Probe verhält, eignet sich eine Kraft-Abstandskurve (force distance curve). Ursächlich für die Auslenkung der Messnadel sind die Van-der-Waals-Kräfte zwischen Probe und Spitze. Ist der Abstand größer als deren Reichweite, wirkt auf die Spitze keine Kraft und das Cantilever ist nicht ausgelenkt.

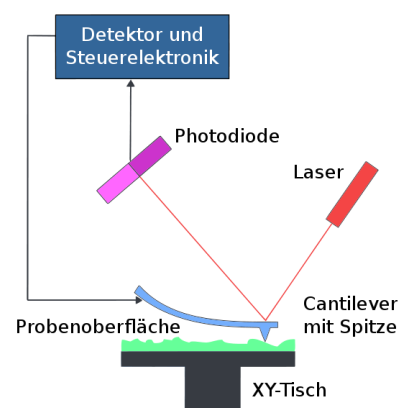


Abb. 46. Apparativer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops (AFM). Eine feine Spitze wird über die Oberfläche gefahren und die Auslenkung mit einem Laser und Photodioden bestimmt.

Nähert sich die Spitze der Probe an, beginnen ab einer gewissen Entfernung die anziehenden Kräfte zu wirken, die dazu führt, dass das Cantilever in Richtung der Probe ausgelenkt wird. Bei weiterer Annäherung, kommen zusätzlich abstoßende Kräfte dazu, die die Messnadel entsprechend von der Probe abstößt (**Abb. 47**).

Für die Messung gibt es verschiedene Verfahren. Das einfachste und älteste ist der Kontaktmodus (contact mode). Dabei befindet sich die Spitze während der Messung im Bereich abstoßender Kräfte und wird von der Probe abgelenkt.

Dabei wird entweder die Position des z-Piezos (constant height) oder die Auslenkung der Spitze konstant gehalten, indem die Position des z-Piezos entsprechend nachgeregelt wird (constant deflection). Der Constant-Height-Modus wird heute kaum noch verwendet, da sowohl Spitze als auch Probe sehr leicht beschädigt werden.

Dennoch ist auch der Kontaktmodus bei konstanter Auslenkung bei vielen Proben problematisch. Vor allem bei weichen, polymeren Strukturen führt er leicht zu einer Beschädigungen der Probe. Daher wurde ein „sanfterer“ Kontaktmodus entwickelt, auch Intermittant-Contact oder Tapping-Mode genannt, bei dem die Spitze im Abstand attraktiver Wechselwirkung gehalten wird. Um trotzdem in Kontakt mit der Probe zu kommen, wird das Cantilever mit einem weiteren Piezoelement nahe seiner Eigenfrequenz zum Schwingen angeregt und so nahe an die Oberfläche geführt, dass die freie Amplitude der Schwingung durch die repulsive Wechselwirkung von Spitze und Probe leicht gedämpft wird. Daher wird die Probe von der Spitze nur an einem Umkehrpunkt der Schwingung leicht berührt.

Praktisch wird der Tapping-Mode folgendermaßen ausgeführt. An den Erreger-Piezo wird eine Wechselspannung nahe der Eigenfrequenz des Cantilevers (100 - 1000 kHz, je nach Material) angelegt. Der Betrag der Spannung bestimmt die Amplitude des Cantilevers (1 - 1000 nm). Dann wird die Spitze so weit der Probe genähert, bis sich die Amplitude auf einen vorher festgelegten Wert verringert hat. Je kleiner dieser Amplituden-Setpoint ist, desto stärker ist der Kontakt zwischen Spitze und Probe. Diese wird nun in x- und y-Richtung gescannt, während durch permanentes Nachregeln des z-Piezos die Amplitude konstant gehalten und die Spannung als topographische Höheninformation ausgegeben wird.

Ein interessantes Nebenprodukt des Tapping-Modes ist die Phaseninformation zwischen Erreger-Piezo und dem oszillierenden Cantilever. Die Phase wie auch die Amplitude des Cantilevers sind über das Signal der Photodioden zugänglich. Schwingt das Cantilever frei, liegt zwischen Schwinger und Erreger die für den Resonanzfall typische Phasenverschiebung von $\pi/2$ vor. Diese ändert sich, wenn sich die Spitze der Probe genähert. Weiterhin kommt es aber auch zu einer Änderung der Phasenverschiebung, wenn es zu einer materialabhängigen Veränderung der Wechselwirkung von Probe und Spitze kommt. Beispielsweise unterschiedliche Viskoelastizitäten innerhalb einer Probe können mit dem Phasenbild erhalten werden. Da es gleichzeitig mit Höhen- und Amplitudenbild in einem Scanvorgang zugänglich ist, wird es routinemäßig mit gemessen (obwohl die Amplitude idealerweise konstant gehalten werden soll, kommt es bei plötzlichen Stufen zu einer stärkeren Berührung und zu einem Abfall der Amplitude, da die Elektronik nicht schnell genug reagiert).

Der Non-Contact-Mode ähnelt dem Tapping-Mode. Allerdings wird die Probe von der Spitze während der Schwingung nicht berührt. Stattdessen üben die attraktiven Kräfte der Probe eine sehr

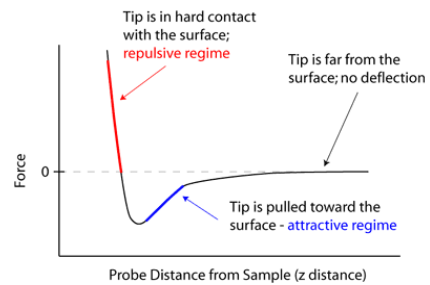


Abb. 47. Kraft-Abstand-Kurve von AFM-Spitze und Probe.

schwache Kraft (~ 1 pN) auf die Spitze aus, was zu einer Verschiebung der Eigenfrequenz und damit Amplitude führt.

Daneben gibt es weitere Methoden wie Lateral-Force-Microscopy, Magnetic Force Microscopy oder Chemical Force Microscopy.

Es kann festgehalten werden, dass die Rasterkraftmikroskopie oft die einzige Möglichkeit darstellt, Topographie und Struktur nichtleitender Proben zu untersuchen und die Dicke von Polymer-schichten zu bestimmen und bietet eine wichtige Alternative, um ellipsometrisch oder röntgen-spektroskopisch bestimmte Filmdicken zu verifizieren.

Ein Nachteil der Rastersondenmikroskopie ist die lange Messzeit, da die Proben zeilenweise untersucht werden. Typische AFM-Bilder werden mit 256-512 Zeilen abgetastet, was bei einer Geschwindigkeit von 1 Hz Messzeiten von mindestens 4 Minuten pro Bild bedeutet.

3.7 Fluoreszenzmikroskopie (FM)

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Auflichtmikroskopie zur Untersuchung fluoreszierender Stoffe. Vor allen bei der Untersuchung biologischer Proben wird diese Technik sehr häufig verwendet. So sind fluoreszenzmarkierte Proteine eine bequeme Möglichkeit, das Adsorptionsverhalten der Biomoleküle auf strukturierten Oberflächen zu untersuchen.

Aufgrund der Stokes-Verschiebung ist die Wellenlänge des Intensitätsmaximums der Emission eines Fluorophors in der Regel größer als die des Absorptionsmaximums (**Abb. 48**). Sie ist die Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie. Das Licht einer polychromatischen Quelle wird durch einen optischen Kantenfilter (Anregungsfilter) gelenkt, der alle Wellenlängen, die größer als ein bestimmter Wert sind, herausfiltert (Hochpassfilter). Die Kante ist dabei so gewählt, dass das den Filter verlassende Licht einen möglichst großen Bereich des Absorptionsspektrums des Fluorophors abdeckt, ohne dabei das Licht des Emissionsspektrums zu beinhalten (**Abb. 49**). Damit ist klar, dass das Filtersystem des Mikroskops auf den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff abgestimmt sein muss.

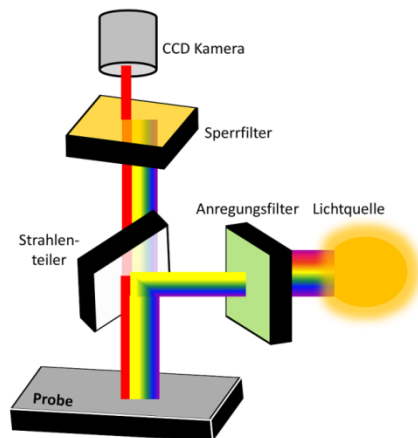


Abb. 49. Schematischer Aufbau einer Fluoreszenzmikroskopie bestehend aus einem optischen Auflichtmikroskop, in dessen Strahlengang zwei Filter und ein Strahlenteiler eingebracht sind. Diese Elemente trennen das Absorptionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffs von seinem Emissionsspektrum.

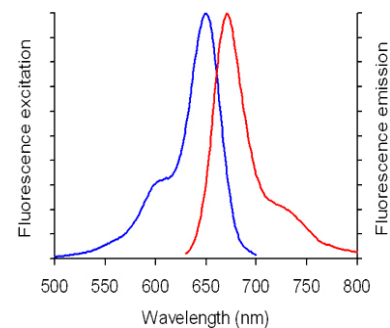


Abb. 48. Absorptionsspektrum (blau) und Emissionsspektrum eines Fluoreszenzfarbstoffs (AlexaFluor648®). Aufgrund der Stokesverschiebung ist das Emissionsspektrum zu größeren Wellenlängen verschoben.

(Hochpassfilter). Die Kante ist dabei so gewählt, dass das den Filter verlassende Licht einen möglichst großen Bereich des Absorptionsspektrums des Fluorophors abdeckt, ohne dabei das Licht des Emissionsspektrums zu beinhalten (**Abb. 49**). Damit ist klar, dass das Filtersystem des Mikroskops auf den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff abgestimmt sein muss.

Anschließend durchläuft das Licht einen halbdurchlässigen Spiegel als Strahlenteiler, der es auf die Probe lenkt. Das von dieser reflektierte Licht beinhaltet nun zusätzlich das Fluoreszenzlicht. Da dieses im dem Wellenlängenbereich liegt, der zuvor von dem Anregungsfilter entfernt wurde, kann es nur von der Fluoreszenz herrühren.

Der Lichtstrahl durchläuft nun wieder den Strahlenteiler und der transmittierte Anteil trifft auf den Sperrfilter. Dieser ist das Gegenstück zum Anregungsfilter und ist ein Kantenfilter, der alle Wellenlängen herausfiltert, die kleiner als ein bestimmter

Wert sind (Tiefpassfilter). Die Kante ist so gewählt, dass sämtliche Wellenlängen herausgefiltert werden, die der Anregungsfilter durchgelassen hat, ohne aber Emission des Farbstoffs ebenfalls zu sperren. Daher stammt das Licht, das den Detektor erreicht, nur von dem Fluoreszenzfarbstoff und nicht aus der Lichtquelle. Auch nicht-fluoreszierende Farbstoffe erscheinen schwarz.

Viele Fluoreszenzmikroskope haben mehrere Filter eingebaut, um verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig nachweisen zu können. So ist es beispielsweise möglich, rot fluoreszierendes Protein A neben grün fluoreszierendem Protein B gleichzeitig und dennoch unabhängig voneinander nachweisen zu können.

3.8 Bulge-Test Methode

Der Bulge-Test ist die wichtigste Methode zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften freistehender Membranen. Dabei wird die Membran der Dicke t über eine Lochblende mit runder oder quadratischer Öffnung der Dimension a gespannt und ein Überdruck p angelegt (Abb. 50). Dadurch wird die Membran um den Betrag h in Richtung der Niederdruckseite ausgelenkt, bis sich Dehnung (strain) ε und mechanische Spannung (stress) σ ausgeglichen haben.

Die für Membranen charakteristischen mechanischen Größen sind in erster Linie das Elastizitätsmodul E und die Eigenspannung (residual stress) σ_0 . Das E-Modul ist dabei keine Membran-eigene Größe, sondern eine Materialkonstante, die sich am einfachsten über eine Spannungs-Dehnungs-Kurve ergibt (Abb. 51). Während diese bei eindimensionalen Objekten für kleine Ausdehnungen eine Gerade mit dem E-Modul als Steigung beschreibt ($\sigma = E \cdot \varepsilon$), ist die Funktion für zweidimensionale Membranen komplizierter, da sie noch einen zweiten Beitrag, die Eigenspannung, enthält. Damit lautet die mechanische Grundgleichung für Membranen wie folgt:

$$(Gl. 24) \quad \sigma = \frac{E}{1-\nu} \varepsilon + \sigma_0 .$$

Die mechanische Spannung σ wird über den angelegten Druck $p = F/A$ und die geometrischen Abmessungen erhalten. Für eine dünne Membran ($t \ll a$), die über einer Öffnung mit sphärischer Symmetrie gespannt ist, lässt sich die Beziehung von Druck und Spannung durch eine Gleichung beschreiben, die die Auswirkung des Innendruckes p auf die Wände eines sphärischen, dünnwandigen Gefäß beschreibt: $\sigma = p \cdot R / 2t$. Für den experimentellen Aufbau gemäß Abb. 50 und der Annahme kleiner Auslenkungen ($h \ll a$) kann der Radius R der virtuellen Kugel durch den Lochdurchmesser a und die Auslenkung h ausgedrückt werden und die Spannung ergibt sich wie folgt: $\sigma = p \cdot a^2 / 4t \cdot h$. Die Dehnung der Membran $\varepsilon = \Delta l / L$ lässt sich ebenfalls aus den Abmessungen der Auslenkung ausdrücken: $\varepsilon = 2h^2 / 3a^2$. Damit kann Gleichung 24 in Form einer quadratischen Druck-Auslenkung-Beziehung für Membranen über einer sphärischen Öffnung geschrieben werden:

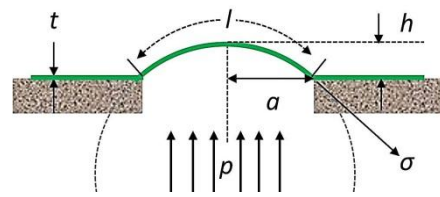


Abb. 50. Experimenteller Aufbau des „Bulge-Tests“ zu Bestimmung der mechanischen Eigenschaften freistehender Membranen.

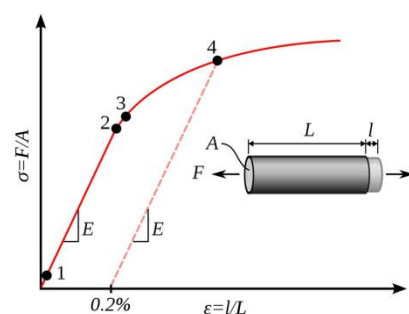


Abb. 51. Idealisierte Spannungs-Dehnungs-Kurve. Für kleine Werte (im Bereich 1-2) ist der Verlauf linear, es gilt das Hookesche Gesetz und aus der Steigung kann das E-Modul erhalten werden.

$$(Gl. 25) \quad p/h = 4 \cdot \frac{t}{a^2} \cdot \sigma_0 + \frac{8}{3} \cdot \frac{t}{a^4} \cdot \frac{E}{1-\nu} \cdot h^2.$$

ν ist die Poissonzahl, ein materialabhängiger Parameter, der das Verhältnis von Quer- zu Längenkontraktion beschreibt (**Abb. 52**). Sie kann als ein Maß angesehen werden, wie sich das Volumen bei einer Längenkontraktion ändert. Für $\nu=0.5$ bleibt dieses konstant. Da diese Zahl vom Material der Membran abhängt, kann sie nur geschätzt werden, was zugleich auch eine Schwierigkeit der Bulge-Methode ist.

Der Bulge-Test kann nicht nur für sphärische Membranen verwendet werden, sondern auch für solche, die über quadratische oder rechteckige Löcher gespannt sind (z. B. SiN-Fenster Membranen). Dazu führt man in Gleichung 25 zwei Parameter C_1 und C_2 ein, die die geometrischen Dimensionen der Membran beschreiben:

$$(Gl. 26) \quad p/h = C_1 \cdot \frac{t}{a^2} \cdot \sigma_0 + C_2 \cdot \frac{t}{a^4} \cdot \frac{E}{1-\nu} \cdot h^2.$$

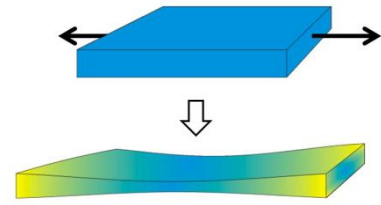


Abb. 52. Auswirkung der Längsausdehnung auf die Querausdehnung eines Körpers mit positiver Poissonzahl ν .

4 Experimenteller Teil

4.1 Synthesen

4.1.1 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) und 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT)

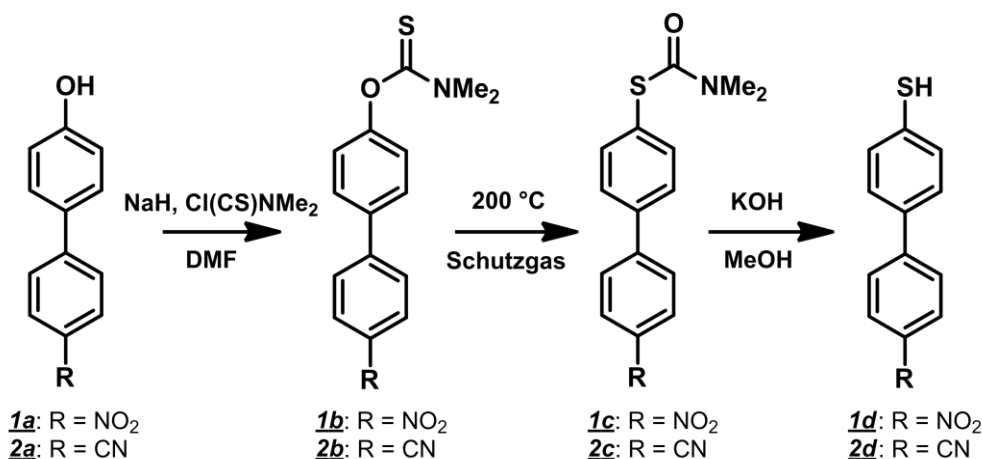


Abb. 53. Synthese der für die Bildung selbstaggregierender Monolagen verwendeten Adsorbat-Moleküle 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) und 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT).

Die Synthesen der beiden Adsorbat-Moleküle unterscheiden sich nur geringfügig, weshalb sie gemeinsam beschrieben werden. Eine ausführliche Diskussion mit den detaillierten spektroskopischen Daten auch der jeweiligen Intermediate **1b**, **2b**, **1c** und **2c** findet sich hier.³⁰

Ein Äquivalent (eq) des jeweiligen Ausgangsstoffs (**1a** und **2a**, beide TCI-Europe) wurde in trockenem *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst und im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 1.5 eq NaH und gleicher Stoffmenge *N,N*-Dimethylthiocarbamoylchlorid, wurde für 4 h bei 60 °C gerührt und nach dem Abkühlen auf RT tropfenweise Wasser zugegeben, um überschüssiges NaH zu zerstören. Die Lösung wurde dreimal mit Dichlormethan (DCM) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser und konz. NaCl-Lösung gewaschen sowie über MgSO₄ getrocknet. Das DCM wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus einer 1:1-Mischung von Ethylacetat/Ethanol umkristallisiert.

Die Umlagerung des Thiocarbamat **1b** und **2b** zum Thiolcarbamat **1c** und **2c** erfolgte durch Erhitzen unter Schutzgas auf 200 °C für 8 Stunden. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert. Im letzten Schritt wurde das Thiolcarbamat **1c** und **2c** in einer 10-prozentigen Lösung von KOH in entgastem Methanol für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde tropfenweise konz. HCl zugegeben, wobei das Thiol **1d** oder **2d** ausfiel. Nach dem Filtrieren wurde das Rohprodukt durch Vakuumsublimation ($p < 0.1$ mbar) bei 80-100 °C gereinigt und man erhielt **1d** als leuchtend-gelben und **2d** als weißen kristallinen Feststoff.

Analysedaten:

NBPT: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 3.56 (bs, 1H, SH), 7.38 (d 2H), 7.50 (d, 2H), 7.70 (d, 2H), 8.30 (d, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 124.23, 127.58, 127.85, 128.07, 137.73, 137.90, 146.45, 146.72. MS (EI+): m/z (%) = 231.0(100), 197.1(5), 185.0(5). EA: berechnet: C, 62.32 %; H, 3.92 %; N, 6.06 %; S, 13.86 %; gefunden: C, 62.33 %; H, 3.99 %; N, 6.01 %, S, 13.59 %.

CBPT: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 3.54$ (s, 1H), 7.37 (d, 2H), 7.47 (d, 2H), 7.64 (d, 2H), 7.72 (d, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 110.93, 118.87, 127.35, 127.79, 129.70, 132.27, 132.66, 136.42, 144.77$. MS (EI+): $m/z(\%) = 211.0(100), 210.0(61), 177.0(11), 140.1(9)$. EA: *berechnet*: C, 73.90 %; H, 4.29 %; N, 6.63 %; S, 15.18 %; *gefunden*: C, 73.73 %; H, 4.35 %; N, 6.61 %, S, 14.82 %. Schmelzpunkt: 112 - 113 °C.

4.1.2 Epoxid-terminierte Polyethylenglykole (PEG_x-EPX)

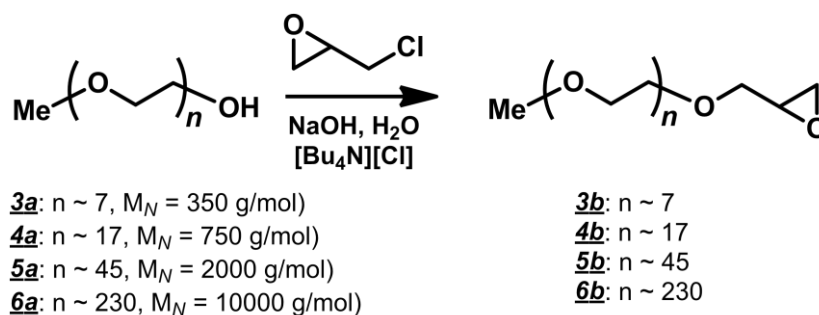


Abb. 54. Synthese Epoxid-terminierter Polyethylenglykole (PEG_x-EPX) mittels Phasentransferkatalyse zur Kopplung an oberflächengebundene Aminogruppen.

Epoxid-terminierte Polyethylenglykole wurden unter phasentransferkatalytischen Bedingungen aus dem entsprechenden Monomethoxy-Polyethylenglykolen und Epichlorhydrin synthetisiert.¹³⁶ Ein Äquivalent (eq) polydisperses Monomethoxy-Polyethylenglykol (mPEG_x-OH) **3a-6a** mit den mittleren Molmassen $\bar{M}_N = 350, 750, 2000$ oder 10000 g/mol (alle Sigma-Aldrich) wurde in einer wässrigen, 50 %ige NaOH-Lösung bestehend aus 3 eq NaOH, 1.1 eq Epichlorhydrin und 2/100 eq Tetrabutylammoniumchlorid (Bu_4NCl) gegeben und für 1 h bei 60 °C kräftig gerührt. Anschließend wurde Dichlormethan (DCM) zugegeben und die festen Bestandteile abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeeengt, um DCM, Wasser und überschüssiges Epichlorhydrin zu entfernen. Die Aufarbeitung der Rohprodukte PEG350-EPX **3b** und PEG750-EPX **4b** erfolgte per Vakuumdestillation, die von PEG2000-EPX **5b** und PEG10000-EPX **6b** säulenchromatographisch (Aluminiumoxid, Laufmittel: 2:1-Mischung Methanol und DCM). Für PEG350-Epoxid **3b** wurde ein blass-gelbes Öl, für PEG750-Epoxid **4b** ein weißes Wachs und PEG2000-Epoxid **5b** und PEG10000-Epoxid **6b** ein weißer Feststoff erhalten.

Analysedaten exemplarisch für PEG350-Epoxid **3b**:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 2.56$ (dd, 1H), 2.73 (dd, 1H), 3.06-3.12 (m, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.40 (dd, 1H), 3.54 (m, 2H), 3.61-3.69 (m, 26H), 3.71 (dd, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm}) = 44.36, 50.99, 59.26, 70.22, 70.41-70.44, 70.55, 71.86$.

4.2 Selbstaggrierende Monolagen (SAMs)

4.2.1 Präparation selbstaggrierender Monolagen

Das Standardsubstrat zur SAM-Herstellung bestand aus einem polierten Si(100)-Wafer, auf dem durch Metallbedampfung (physical vapor deposition, PVD) ein 100 nm Goldfilm aufgebracht war. Polierte Siliziumoberflächen eignen sich hervorragend als Substrat für Metallabscheidungen, da sie eine extrem niedrige Rauigkeit von unter 1 Å haben. Da Gold nur schlecht auf Siliziumdioxid haftet (Silizium ist unter Raumbedingungen von einer 3-5 nm nativen Oxidschicht bedeckt), wurde zwischen Siliziumwafer und Goldfilm eine 5 nm dicke Schicht aus Titan oder Chrom aufgebracht.

Die Goldsubstrate wurden von „Georg Albert PVD“ bezogen und zur Reinigung für 20 Minuten unter einer Ozon produzierenden Niederdruck-Quecksilberdampfampe (NIQ 40/18, Heraeus Noblelight) gelegt. Nach Abspülen mit DMF und Ethanol wurden die Wafer mit Stickstoff getrocknet und umgehend verwendet. Alle benötigten Glasgeräte wurden für eine Stunde mit Caroscher Säure (drei Teile konz. Schwefelsäure in einem Teil 30 % Wasserstoffperoxid) gereinigt, mit Millipore® Wasser abgespült und im Trockenschrank gelagert. Weiterhin wurde streng darauf geachtet, dass die Glasschliffe nicht gefettet, sondern mit Teflonhülsen abgedichtet wurden. Andernfalls konnte es zu Verunreinigungen der SAMs durch Schliff fett kommen, was sich im XPS-Spektrum als Siliziumsignal widerspiegelte.

Die Präparation der aromatischen Monolagen (4'-Nitrobiphenyl-4-thiol, 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol und 4'-Aminobiphenyl-4-thiol) erfolgte bei Raumtemperatur durch 72-stündiges Einlegen des Substrats in eine 2 mM Lösung des jeweiligen Thiols in entgastem DMF. Während der SAM-Bildung wurde das Reaktionsgefäß mit Aluminiumfolie abgedunkelt und unter Schutzgas gehalten.

Das DMF hatten den Reinheitsgrad p.A. und wurden vor Gebrauch mindestens einen Tag über Molekularsieb (4 Å, entwässert im Vakuum bei ca. 200 °C) getrocknet. Das Entgasen des Lösungsmittels erfolgte durch 30 minütiges Einleiten von Argon.

4.2.2 Elektronenbestrahlung zur homogenen und strukturierten Bestrahlung

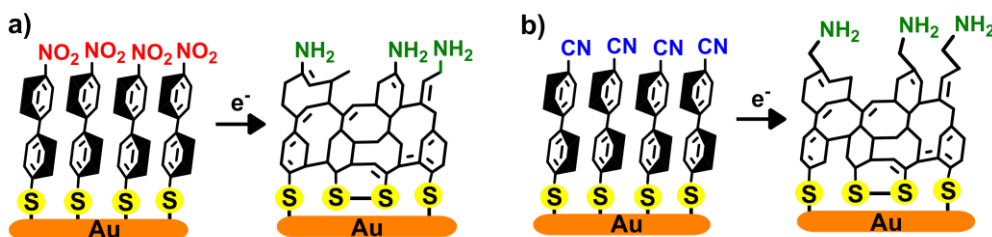


Abb. 55. Homogene Elektronenbestrahlung aromatischer NBPT (a)- und CBPT-SAMs (b): Die Biphenyl-einheiten werden dabei lateral quervernetzt und die Endgruppen zu Aminogruppen reduziert.

Die Bestrahlung der Monolagen mit Elektronen wurde unter drei Gesichtspunkten durchgeführt. Zunächst war es nötig, die aromatischen SAMs über eine Fläche von mindestens (1.5 x 1.5) cm² mit möglichst homogener Dosis zu bestrahlen. Für diesen Zweck wurde eine Elektronenkanone verwendet (Typ FG20, Specs), die eine stufenlose Einstellung der Elektronenenergie von 1 bis 500 eV erlaubte. Gemäß Spezifikation sollte die Elektronenkanone eine homogene und gleichzeitig hohe Stromdichte über eine Fläche von mindestens 4 cm² erlauben. Eine hohe Intensität war wünschenswert, um die Belichtungszeiten zu verkürzen. Die elektronenstrahlinduzierte Quervernetzung und Reduktion aromatischer SAMs erfordert hohe Dosen in der Größenordnung von bis zu

50 000 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$, was deutlich über den $\sim 100 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ eines Standard-Elektronenstrahlresist wie PMMA mit liegt.

Zur Kalibrierung der Dosis und Überprüfung der räumlichen Homogenität des Elektronenstrahls wurde der Probenhalter mit 5 Faraday-Cups versehen und deren Strom in Abhängigkeit von der Elektronenenergie, dem Filamentstrom sowie dem Abstand von Elektronenkanone und Probe gemessen. Die beste Homogenität über die gesamte Fläche des Messfeldes wurde bei einer Elektronenenergie von 50 eV, einem Filamentstrom von 6 mA und einem Abstand von 7.1 cm zwischen der Ausgangsblende der Elektronenkanone und der Probe erhalten (**Abb. 56**). Die Dosis D konnte aus dem Strom I durch einen Faraday Cup mit einer Fläche der Lochblende A und der Zeit der Bestrahlung t folgendermaßen berechnet werden:

$$(Gl. 27) \quad D[\mu\text{C}/(\text{cm}^2)] = I [\mu\text{A}]/A[\text{cm}^2] \cdot t[\text{s}].$$

Die SAMs wurden daher im Abstand von 7.1 cm zur Elektronenkanone auf dem Probenhalter montiert und bei einem Druck von $p < 10^{-8}$ mbar bestrahlt. Gemäß Gleichung 27 und den Werten aus **Abb. 56** ergibt für eine Dosis von 40 mC/cm^2 eine Bestrahlungsdauer von 26 Minuten.

Die Elektronenkanone FG20 lässt sich aber nicht nur zur homogenen Bestrahlung, sondern auch zur Mikrostrukturierung verwenden (**Abb. 57**). Bei der als „Proximity Printing“ bezeichneten Technik wird die Probe mit einem homogenen Elektronenstrahl durch eine Maske bestrahlt. Der Vorteil dieser Methode liegt in kurzen Bestrahlungszeiten. Allerdings ist die Auflösung durch die Maske begrenzt. Außerdem kann die Probe nur mit einer einheitlichen Dosis bestrahlt werden. Dennoch ist das Proximity-Printing eine schnelle und einfach durchzuführende Methode, um großflächig (mehrere Millimeter) Mikrostrukturen zu erzeugen. Wichtig ist bei der experimentellen Durchführung, die Maske elektrisch leitend mit der Masse zu verbinden und sie so flach wie möglich auf der Probe zu montieren. In dieser Arbeit wurden TEM-Grids vom Typ Quantifoil® verwendet, da diese sich aufgrund eines steifen Kohlelochfilms sehr flach auf den Proben montieren ließen und in verschiedensten Mustern mit Lochgrößen bis zu 1 μm erhältlich waren. Um die Masken elektrisch mit dem Probenhalter zu verbinden, wurden sie auf der Probe mit elektrischem Klebeband befestigt.

Der Elektronenstrahl-schreiber (e-beam writer) war die dritte Möglichkeit, SAMs mit Elektronen zu bestrahlen (**Abb. 58**). Dabei wurde die Probe zeilenweise mit einem fokussierten Elektronenstrahl abgefahren, was sich in einer zeit-

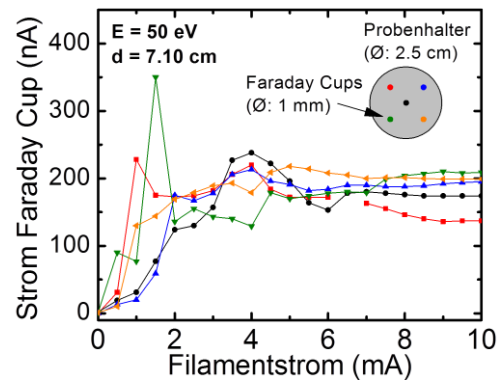


Abb. 56. Kalibrierung und Bestimmung der Homogenität des Elektronenstrahls der Elektronenkanone FG20 durch 5 auf dem Probenhalter angeordnete Faraday Cups bei einer Energie von 50 eV und einem Abstand von 7.1 cm zur Probe.

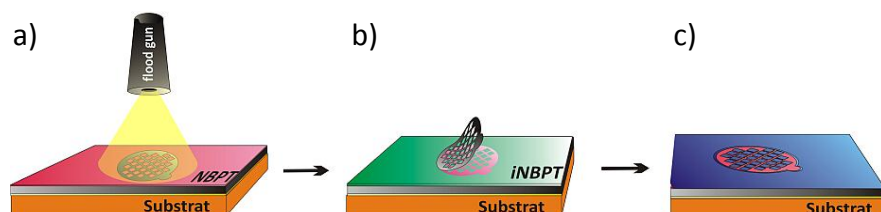


Abb. 57. Mikrostrukturierung durch Proximity-Printing: (a) Bestrahlung eines NBPT-SAMs (rot) mit einem homogenen Elektronenstrahl durch eine Lochmaske (TEM-Grid); (b) die Form der Maske spiegelt sich in der Struktur entstandener, oberflächengebundener Aminogruppen (grün) und (c) daran gekoppelter weiterer Moleküle (blau) wie Polymerbürsten oder PEG wider.

lich deutlich längeren Bestrahlung äußerte. So dauerte die vollständige Belichtung einer Fläche von $(100 \times 100) \mu\text{m}^2$ bei einer Dosis von 40 mC/cm^2 mehr als 15 Stunden.

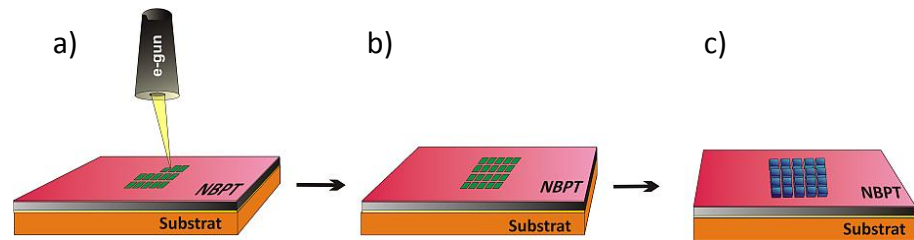


Abb. 58. Nanostrukturierung durch Elektronenstrahlolithographie: (a) Bestrahlung eines NBPT-SAMs (rot) mit einem Elektronenstrahlschreiber (e-beam writer) erzeugt in (b) das gewünschte Muster oberflächengebundener Aminogruppen (grün); Kopplung einer weiteren Moleküle (blau) an die Aminogruppen (c).

Dafür wurde keine Maske benötigt und die Strukturgrößen konnten im Nanometer-Bereich liegen. Zudem bot die Elektronenstrahlolithographie die Möglichkeit, Strukturen mit einem Dosisgradienten herzustellen, um dosisabhängige Effekte mit einer einzigen Probe untersuchen zu können.

In dieser Arbeit wurde das Rasterelektronenmikroskop (REM) LEO 1530 Gemini (Zeiss) als Elektronenstrahlschreiber zur lithographischen Strukturierung verwendet. Mit einem externen Controller (Elphi Quantum, Raith GmbH) konnte der Elektronenstrahl des Mikroskops gesteuert und vorher programmierte Strukturen bis auf wenige Nanometer genau positioniert werden. Durch diese Kombination der beiden Geräte war es möglich, alle Bereich der Elektronenenergien des REMs (0.5–20 keV) auch für die Lithographie zugänglich zu machen, um Effekte der Energie der Primärelektronen detailliert zu untersuchen. Die Kalibrierung der Dosis erfolgte mit einem Faraday Cup. Bei Strukturen mit einem Dosisgradienten war eine Eigenheit des lithographischen Systems zu beachten. Bei der automatischen Einstellung der Bestrahlungsparameter kam es bei kleinen Dosen zu Überbelichtungen. Betrug der Umfang zwischen kleinster und größter Dosis mehr als eine Größenordnung, wurden die Bestrahlungsparameter manuell eingestellt.

4.2.3 Präparation PEGylierter selbstaggregierender Monolagen

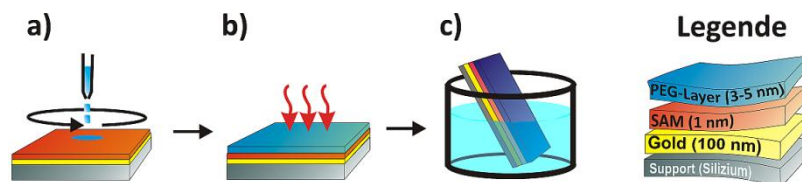


Abb. 59. PEGylierung Amino-terminierter, selbstaggregierender Monolagen: (a) Auftragen des PEG-Epoxids (PEGx-EPX) per Spincoating, (b) thermische Kopplung des PEG-Epoxids an oberflächengebundene Aminogruppen des bestrahlten NBPT-Films und (c) Entfernung von überschüssigem, nicht reagiertem PEG-Epoxid durch mehrstündiges Einlegen in Chloroform oder 30-sekündige Ultraschallbehandlung.

Die Kopplung Epoxid-terminierter Polyethylenglykole an oberflächengebundene Aminogruppen erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde eine 1-prozentige Lösung der jeweiligen PEG-Epoxide (PEG350, PEG750, PEG2k und PEG10k) in Chloroform hergestellt. Mittels Spincoating-Technik wurden die PEG-Epoxide auf einen bestrahlten NBPT-SAM gegeben (**Abb. 59**). Dazu wurde der Wafer auf den Probenhalter des Rotationsbeschichters (Spin-Coaters) befestigt und 20–100 μl der PEG-Lösung so auf die Probe gegeben, dass sie gerade vollständig von der Lösung bedeckt war. Dann wurde der Spincoating-Prozess gestartet, indem die Probe innerhalb von 5 Sekunden auf eine Geschwindigkeit von 4000 Umdrehungen pro Minute beschleunigt und für 45 s bei dieser Geschwindigkeit gehalten wurde. Überschüssige PEG-Epoxid-Lösung wurde dabei von der Probe ge-

schleudert und es blieb ein homogener, ca. 50 nm dicker Film des PEG-Epoxids auf der Oberfläche haften.

Der Kopplungsprozess des PEG-Epoxids an die oberflächengebundenen Aminogruppen des bestrahlten NBPT-SAMs erfolgte durch 8-stündiges Erhitzen der Proben auf 80 °C (Abb. 59b). Da PEG bei erhöhter Temperatur luftempfindlich ist, wurde die Kopplung unter Schutzgas durchgeführt (**Abb. 60**). Im letzten Schritt wurde überschüssiges PEG-Epoxid durch 30-sekündige Ultraschallbehandlung entfernt. Bei den Substraten für die Membranherstellung, die keinen Haftvermittler zwischen dem Goldfilm und dem Siliziumwafer hatten, führte die Ultraschallbehandlung zu einer sofortigen Zerstörung des Goldfilms. Daher wurden diese Proben zur Entfernung des überschüssigen PEG-Epoxids für mehrere Stunden in Chloroform gelegt und anschließend mit Ethanol abgespült. Die Bestimmung der PEG-Filmdicke auf den NBPT-SAMs zeigte, dass beide Methoden gleichermaßen erfolgreich waren.

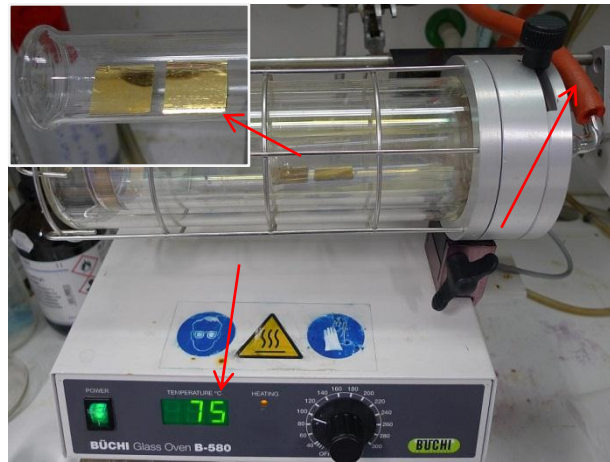


Abb. 60. Thermische, unter Schutzgas durchgeführte Kopplung des PEG-Epoxids an die oberflächengebundenen Aminogruppen eines bestrahlten NBPT-SAMs.

4.2.4 Präparation freistehender Membranen aus PEGylierten SAMs

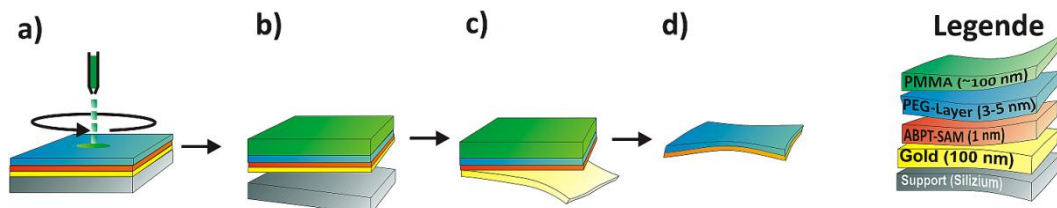


Abb. 61. Membranpräparation quervernetzter, aromatischer Monolagen: (a) Auftragen eines polymeren Schutzfilms aus PMMA, (b) Abtrennen des mechanischen Trägers (Supports) von der Goldschicht, (c) Auflösen des Goldfilms und (d) transferieren des verbleibenden SAM-PMMA Systems auf einen neuen Support oder eine Gitterstruktur und Auflösen des PMMA-Films mit Aceton.

Schlüsselschritt für die Membranherstellung war die Abtrennung des SAM-tragenden Goldfilms von dem mechanischen Träger. Standardsubstrate für die SAM-Herstellung ließen sich dafür nicht verwenden, da der Goldfilm aufgrund des Haftvermittler-Films aus Titan nicht mehr ohne Zerstörung des SAMs vom Siliziumsupport zu trennen war. In der Literatur wurde ein Verfahren beschrieben, bei dem als alternatives Substrat ein 300 nm dicker, epitaxial auf Glimmer als Support aufgetragener Goldfilm für die Membranherstellung quervernetzter, aromatischer SAMs verwendet wurde.⁴¹

Die SAMs wurden auf diesem Substrat in gleicher Weise präpariert und bestrahlt. Die Trennung des Goldfilms vom Glimmer erfolgte allerdings unter drastischen Bedingungen. Auf das System wurde für 30 Minuten konzentrierter Flußsäure einwirken gelassen (**Abb. 62a**), wobei die Gold-Glimmer-Bindung an den Rändern geschwächt wurde und sich der Goldfilm durch schräges Eintauchen in Wasser vom Glimmer abziehen ließ (Abb. 62b).

Zur Membranherstellung säureempfindlicher, PEGylierter SAMs musste daher ein alternatives Verfahren entwickelt werden. Wie schon mehrfach erwähnt, wurde bei goldbedampften Silizium-

wafern ein dünner Film aus Titan verwendet, um die Haftung des Goldes auf dem Siliziumwafer zu verstärken. Ohne den Haftvermittler waren die Goldfilme zwar ebenfalls als Substrat für die SAM-Herstellung zu verwenden, besaßen aber nur geringe mechanische Stabilität, was sich insbesondere durch eine deutlich verminderte Kratzfestigkeit äußerte. Entscheidend aber war, dass sich der Goldfilm auch ohne Ätzen durch bloßes Eintauchen in eine Flüssigkeit mit hoher Oberflächenspannung (Wasser) vom Siliziumsupport abziehen ließ (**Abb. 63**). Beim Eintauchen in organische Lösungsmittel wie Ethanol oder DMF war der Goldfilm dagegen stabil.

Damit ergab sich für die Membranpräparation der folgende Herstellungsprozess. Auf die bestrahlten und PEGylierten NBPT-SAMs wurde zunächst per Spincoating (4000 rpm, 45 s) ein PMMA Schutzfilm (PMMA950k als 1-prozentige Lösung in Chlorbenzol, Allresist GmbH) aufgetragen, der den Goldfilm nach dem Abtrennen vom dem Siliziumträger stabilisieren sollte (Abb. 61a). Durch Eintauchen in Wasser wurde der Gold-SAM-PMMA Film vom Silizium abgezogen (Abb. 61b, Abb. 63) und auf der Oberfläche einer wässrigen Goldätzlösung schwimmen gelassen, bis sich der Goldfilm vollständig aufgelöst hatte und nur der durchsichtige SAM-PMMA-Film zurück blieb (Abb. 61c). Milde Oxidationsmittel für Gold waren eine basische KCN-Lösung oder eine basische Thiosulfat-Lösung mit einem Fe(II)/Fe(III)-Redox-System. Alternativ wurde auch eine Lugoldsche Lösung verwendet, die zwar die höchste Ätzgeschwindigkeit aufwies, aber aufgrund von elementarem Iod auch das größere Oxidationspotential für andere Materialien.

Die verbleibende SAM-PMMA-Membran wurde dann auf einen alternativen Support oder einen Gitterstruktur (TEM-Grid) übertragen und das PMMA durch Eintauchen in Aceton entfernt (Abb. 61d).

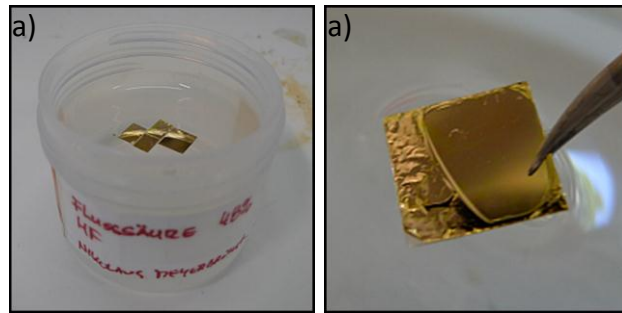


Abb. 62. Trennung des Goldfilms (bedeckt mit dem SAM und der PMMA-Schicht) vom Träger (Glimmer) durch Ätzen mit Flusssäure (a) und abziehen des Goldfilms (b) gemäß [40].

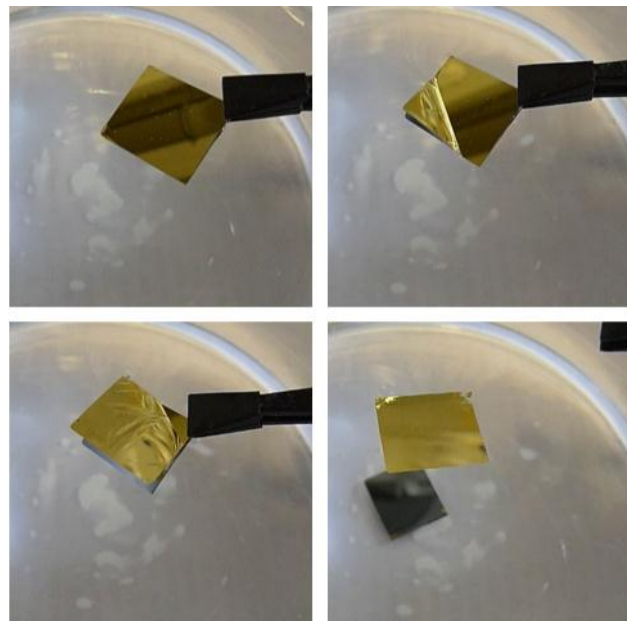


Abb. 63. Abtrennung eines SAM-tragenden Goldsubstrats vom Siliziumsupport. Wird die Goldschicht ohne Haftvermittler auf einen polierten Siliziumwafer aufgedampft, lassen sich beide Materialien durch schräges Eintauchen in Wasser wieder trennen.

4.2.5 ATRP-Polymerisation von P-NIPAM auf Amino-terminierten SAMs

Die Herstellung von Polymerbürsten mittels oberflächeninitiiert Polymerisation (SIP) von Typ einer Atom-Transfer-Radikal-Polymerisation (ATRP) auf Amino-terminierten Oberflächen ist in der Literatur bereits ausführlich beschrieben, weshalb das Prozedere hier nur kurz besprochen wird.¹³⁷ Zunächst wurde α -Bromisobuttersäurebromid (BIBB) als Initiators an bestrahlte aromatische NBPT- oder CBPT-SAMs gekoppelt. Für eine erfolgreiche Reaktion war es notwendig, dass alle Komponenten wasserfrei waren, weshalb das verwendete Dichlormethan (DCM) und das Triethylamin (Et_3N) über Kalziumhydrid getrocknet und direkt vor Verwendung in das Reaktionsgefäß destilliert wurden. Andernfalls konnten Spuren von Wasser in Verbindung mit dem Säurebromid zu einer Zersetzung der SAMs und des Goldsubstrats führen.

In einen ausgeheizten, unter Schutzgas stehenden Schlenk Kolben wurden die bestrahlten SAMs in wasserfreies DCM mit 2 % Et_3N gegeben und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde BIBB tropfenweise und unter Rühren zugegeben, bis eine 10-prozentige Lösung des Initiator erhalten wurde. Die Reaktion erfolgte über Nacht und bei Raumtemperatur.

Für die Polymerisation wurde der BIBB-aktivierte SAM unter Schutzgas in eine 4:1-Mischung aus entgastem Wasser und Methanol gegeben, in der als 25-prozentige Lösung das Inhibitor-freie Monomer *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) gelöst war. Als Katalysator wurde 1 Mol% (bezogen auf die Stoffmenge des verwendeten NIPAMs) eines Cu(I)-Amin Komplexes bestehend aus Cu(I)Br und *N,N,N',N',N''*-Pentamethyldiethylentriamin (PMDETA) im Stoffmengenverhältnis 1:3 verwendet.

Die Polymerbürsten wurden über Nacht wachsen gelassen und die Proben im Ultraschallbad gereinigt.

4.2.6 Goldätzexperimente

Um die Eignung aromatischer SAMs als negatives Resist-Material in der Elektronenstrahlolithographie zu zeigen, wurden sie lithographisch strukturiert und in eine Entwicklerlösung getaucht. Dabei handelt es sich um eine Goldätzlösung. Die besten Ergebnisse in Hinblick auf den Kontrast zwischen bestrahlten und nicht-bestrahlten Arealen wurden mit einer alkalischen Thiosulfat-Lösung erzielt, die aus einer 1 M KOH Lösung mit 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 10 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ und 1 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ bestand.¹³⁸ Die Geschwindigkeit des Ätzprozesses für die Goldfilme betrug bei Raumtemperatur etwa 2-3 nm pro Minute.

4.2.7 Protein-Adsorptionsexperimente

Die Biokompatibilität PEGylierter SAMs und von PEG-Hydrogel Filmen wurde mittels Adsorptionsexperimenten von Fibrinogen (aus Rinderplasma; Sigma-Aldrich) als Testprotein durchgeführt.¹²⁵ Dazu wurden die Proben für 30 min in eine filtrierte (Spritzenfilter mit 0.45 μm Porengröße), PBS-gepufferte Lösung getaucht. Anschließend wurde das gleiche Volumen einer PBS-gepufferten Fibrinogenlösung der Proteinkonzentration 2 mg/ml zugegeben. Nach weiteren 30 min wurden die Proben für ca. 5 min mit destilliertem Wasser übergossen, mit Millipore®-Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Adsorptionsexperimente mit Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen (AlexaFluor®647-Fibrinogen-conjugat, Invitrogen, Deutschland) erfolgten analog, außer dass eine Proteinkonzentration von nur 0.25 mg/ml verwendet wurde.

4.3 Dünne Hydrogel-Filme aus quervernetzten Polyethylenglykolen

4.3.1 Präparation dünner, quervernetzter PEG-Filme

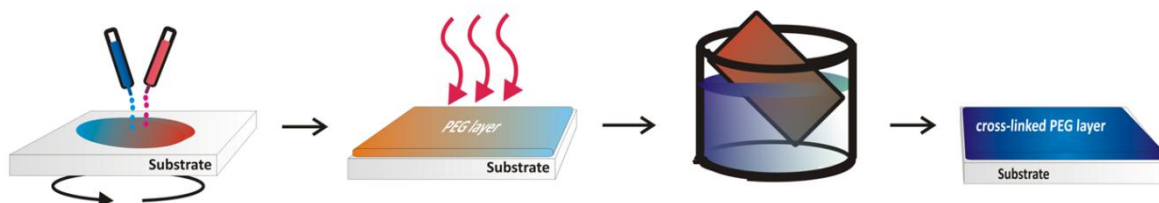


Abb 64. Schema der Präparation dünner, quervernetzter Polyethylenglykol-Filme: (a) Epoxid- und Amino-terminiertes STAR-PEG wird mittels Spincoating als dünner Film auf ein flaches Substrat aufgebracht, (b) die thermische Quervernetzung der PEG-Komponenten erfolgt durch Erhitzen auf 80°C und (c) nicht reagiertes PEG wird durch Ultraschallbehandlung entfernt.

Die Präparation der Polyethylenglykol-Filme erfolgte durch thermische Kopplung eines Zweikomponentensystems bestehend aus einer Epoxid- und einer Amino-terminierten PEG-Komponente. Bei beiden Polyethylenglykolen handelte es sich um 4-armiges STAR-PEG mit einer mittleren Molmasse von $\bar{M}_N = 2000 \text{ g/mol}$ (abgekürzt mit *NH₂-STAR2k* und *EPX-STAR2k*). Die Substanzen wurden von der Firma *Creative PEGWorks* (Winston Salem, USA) bezogen und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Um die Dicke des PEG-Films zu regulieren, wurden von den beiden PEG-Komponenten jeweils Lösungen in Chloroform mit den Konzentrationen 0.75–30 mg/ml erstellt.

Identische Volumina der beiden Komponenten gleicher Konzentration wurden direkt vor der Verwendung gemischt und per Spincoating auf ein mit 100 nm Gold bedampftes Siliziumwaferstück gegeben (**Abb 64**). Zu bessern Homogenität der Filme wurden die Goldwafer vorher unter einer UV-Lampe gereinigt (siehe Abschnitt 4.2.1), mit Ethanol abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Die PEG-Lösungen konnten auch auf andere Substrate wie Glas oder Silizium aufgetragen werden. Dafür waren die STAR-PEGs allerdings in Ethanol oder THF zu lösen, um homogene Filme zu erhalten. Nach dem Auftragen der PEG-Filme per Spincoating wurden die beiden Komponenten bei 80 °C unter Schutzgas für 8 h quervernetzt (Abb. 60). Im letzten Schritt wurden die PEG-Filme unter Wasser für 30 s im Ultraschallbad behandelt, um nicht umgesetztes PEG zu entfernen.

PEG-Filme, die für Herstellung von Membranen vorgesehen waren, wurden auf einem mit Gold bedampften Siliziumwafer präpariert, der ohne Haftvermittler zwischen Gold und Silizium hergestellt war (Georg Albert PVD). Wegen der mechanischen Empfindlichkeit derartiger Goldfilme, wurden die PEG-Filme statt der Ultraschallreinigung über Nacht in *entgastes* Wasser oder Chloroform gelegt.

4.3.2 Herstellung und Immobilisierung von Gold-Nanopartikeln (AuNPs)

Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 9 nm wurden nach etablierten Protokollen durch Reduktion einer Au(III)-Lösung hergestellt.¹³⁹ In einem Becherglas wurden 50 mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in 150 ml Wasser gelöst und zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden 150 mg Natriumcitrat im 15 ml Wasser gelöst und unter kräftigem Rühren zu der siedenden Lösung gegeben, die sich danach dunkelrot verfärbte.

Die Parameter der Lösung konnten unter Annahme einer quantitativen Umsetzung, einer spezifischen Dichte der Nanopartikel von 19.3 g/cm^3 und einem mittleren Partikeldurchmesser von 9 nm berechnet werden. Man erhielt $\sim 30\,000$ Goldatome pro AuNP, was einer Konzentration von $\sim 2 \cdot 10^{13}$

AuNPs pro ml Lösung, bzw. einem Volumenanteil von $\sim 10^{-5}$ entsprach. Daraus ergab sich ein mittlerer Abstand der AuNPs von ~ 350 nm zu einander.

4.3.3 Ellipsometrische Untersuchung der Quelleigenschaften unbestrahlter PEG-Filme

Zur Bestimmung der Quelleigenschaften der PEG-Filme wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, das Anschwellen des Films kontinuierlich mit einem Ellipsometer zu verfolgen. Kernstück des experimentellen Aufbaus war ein 4×4 cm² großes Peltier-Element (TEC1-12706, 127 Einzelelemente, $Q_{\text{MAX}} = 65$ W, Conrad Electronics SE) auf dem Temperatursensoren (Pt100) mit Wärmeleitklebstoff befestigt waren (**Abb. 65**). Das Peltier-Element ermöglichte es ohne großen experimentellen Aufwand, die PEG-Filme einem Temperaturbereich von 80 °C bis -10 °C auszusetzen. Um eine optimale Wirkung zu erzielen, musste das Peltier-Element auf einem Kühlkörper montiert werden. Durch Anlegen einer Gleichspannung konnte die Oberseite je nach Polung kühlen oder heizen, während die Temperatur des Peltiers mit den Pt100-Widerständen bestimmt wurde.

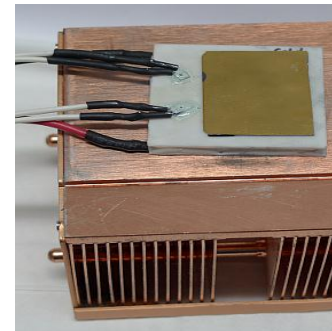


Abb. 65. Abbildung des verwendeten Peltier-Elements (weiß) mit Probe, das sich auf einen Kühlkörper befindet.

Für die temperaturabhängigen Messungen der ellipsometrischen Filmdicke wurde das Peltier mit dem Kühlkörper auf dem Probehalter eines spektralen Ellipsometers (Woollam M44, J.A. Woollam Co. Inc.) montiert (**Abb. 66**). Die Software des Ellipsometers (WVASE) ermöglichte eine kontinuierliche, zeitaufgelöste Messung der ellipsometrischen Parameter mit bis zu 2 Messzyklen pro Sekunde. Auf der anderen Seite wurde der Temperatursensor mit ein Multimeter (Keithley 2000/E) verbunden, welches die Widerstandswerte ebenfalls zeitaufgelöst mit einer Rate von einer Messung pro Sekunde aufzeichnen und per USB-Schnittstelle an einen PC übertragen konnte. So war es über die Verknüpfung der Zeitachse beider Messungen möglich, das temperaturabhängige Verhalten der ellipsometrischen Parameter zu untersuchen. Nachdem die ellipsometrischen Parameter unter Annahme eines Cauchy-Modells in Filmdicken des PEG-Films umgerechnet wurden, erhielt man die gesuchte Temperaturabhängigkeit der Schichtdicke der PEG-Filme.

Während eines Experimentes wurde die Temperatur geändert, indem bei Raumtemperatur beginnend die Spannung am Peltier-Element manuell so erhöht wurde, dass diese einer Temperaturänderung von ~ 2 °C/min entsprach. Die Temperaturerniedrigung wurde fortgesetzt, bis sich auf der Oberfläche des PEG-Film ein *sichtbarer* Wasserfilm abzusetzen begann. Dieser Punkt war auch in den ellipsometrischen Messwerten deutlich dadurch erkennbar dass der Wasserfilm zu sehr großen Fehlern bei der Schichtdickenbestimmung führte. Dennoch konnte die Temperatur je nach Umgebungsbedingungen (die Raumtemperatur lag bei allen Experimenten zwischen 19-21 °C und die relative Luftfeuchtigkeit zwischen 21-24 %) auf bis zu 0.5-1.0°C gesenkt werden.

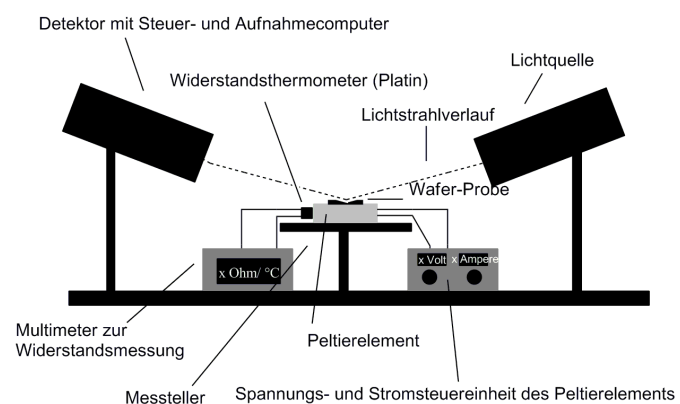


Abb. 66. Experimenteller Aufbau zur temperaturabhängigen Messung der ellipsometrischen Schichtdicken der PEG-Filme.

4.3.4 AFM-Untersuchung der Quelleigenschaften bestrahlter PEG-Filme

Um die Eigenschaften der PEG-Filme nach der Elektronenbestrahlung zu untersuchen, wurden sie wie in Abschnitt 4.2.2 besprochen lithographisch mit einem Elektronenstrahlschreiber bei einer Elektronenenergie von 3 keV und mit Dosen zwischen $0.05\text{--}40\text{ mC/cm}^2$ strukturiert (**Abb. 67**).

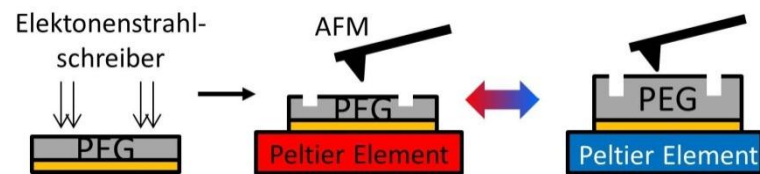


Abb. 67. Schema der rasterkraftmikroskopischen Bestimmung der Quelleigenschaften bestrahlter PEG-Filme: nach deren lithographischer Strukturierung wird die Topographie der Oberfläche temperaturabhängig mit einem AFM untersucht.

Zur Analyse der Quelleigenschaften bestrahlter PEG-Filme wurde die Topographie der lithographisch hergestellten Strukturen in Abhängigkeit von deren Temperatur mit einem Rasterkraftmikroskop (Dimension 3100 AFM mit einem Nanoscope IIIa Controller) im Tapping-Mode unter atmosphärischen Bedingungen gemessen. Das AFM ermöglichte es bauartbedingt (lateraler xy-Scanner ist am Cantilever montiert, d.h. Probe wird nicht bewegt), dass das zur Kühlung verwendete Peltier-Element direkt auf dem Probenhalter aus Metall angebracht werden konnte, der damit die Aufgabe des Kühlkörpers übernahm. Zur elektrischen Abschirmung der Proben von dem Peltier wurde eine dünne, geerdete Aluminiumfolie verwendet. Andernfalls führte die Restwelligkeit der Spannungsquelle des Peltiers zu deutlichen 50 Hz-Überlagerungen in den AFM-Bildern.

Die AFM-Messung erfolgte, nachdem die gewünschte Temperatur eingestellt worden war. Diese ließ sich während einer Messung manuell ohne Schwierigkeiten bei $\pm 0.1^\circ\text{C}$ konstant halten. Die thermische Kontraktion des Systems bei Abkühlung von Raumtemperatur auf 0°C lag bei weniger als $6\text{ }\mu\text{m}$ und damit innerhalb der Reichweite des z-Scanners des AFMs.

4.3.5 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften freistehender Membranen

Die mechanischen Eigenschaften der PEG-Membranen wurden mit der Bulge-Test Methode bestimmt. Dazu wurden die Membranen auf eine runde Lochblende aus Kupfer gespannt (Single Hole TEM-Grid, Plano GmbH), die einen Durchmesser von 3.05 mm , eine Dicke von $30\text{ }\mu\text{m}$ und einem Lochdurchmesser von $300\text{ }\mu\text{m}$ hatte (**Abb. 68b**). Die mit dem PEG-Film bedeckte Lochblende wurde dann mit einem sehr dünnen, doppelseitigen Klebeband (Tesa 4973, Beiersdorf AG) auf einen metallischen Hohlzylinder fixiert und in senkrechter Position in den Lichtweg eines optischen Mikroskops positioniert. Die gegenüberliegende Seite des Zylinders war über einen Kunststoffschlauch mit einem Druckkolben verbunden, der aus zwei parallel geschalteten Kunststoffspritzen mit Gummistempeln bestand (**Abb. 68**). Eine 1 ml Spritze diente zur sukzessiven Erhöhung des Druckes durch Volumenverringern und wurde für den eigentlichen Messvorgang verwendet, während eine 20 ml Spritze zur dazu diente, die Größe des Druckraums und damit die Sensitivität der Druckänderung auf die Volumenänderung der 1 ml Spritze zu justieren. So konnte ein variabler Überdruck angelegt werden, der mit einem Differenzdrucksensor (MPX2010, Motorola) gemessen wurde. Dieser war für Differenzdrücke bis zu 15 kPa ausgelegt und gab bei einer Betriebsspannung von 5.00 V als Ausgangssignal eine ratiometrische, lineare Gleichspannung von 2.5 mV/kPa aus. Die Auslenkung der Membran im Mikrometer-Bereich konnte mit dem Okularmaßstab eines Lichtmikroskops bestimmt werden.

Für eine Messreihe wurde die PEG-Membran entsprechend montiert und das Volumen des Druckraums sukzessive in 0.5 ml -Schritten erniedrigt, während die Auslenkung der Membran und

die Spannung am Drucksensors notiert wurde. Vor einer Messreihe wurde das System auf Dichtigkeit überprüft, indem ein entsprechend großer Überdruck angelegt wurde, sodass das Verhältnis vom Durchmesser der Lochblende zur Auslenkung der Membran etwa $\frac{1}{2}$ betrug. Lag der am Drucksensor gemessene Spannungsabfall nach 30 Minuten bei weniger als 10% des Wertes zum Zeitpunkt Null, wurde das System als dicht sowie die Membran als fehlerfrei betrachtet und die eigentliche Messung konnte durchgeführt werden.

Die Wertepaare von Druck und Auslenkung wurden grafisch gegeneinander aufgetragen. Durch Anpassung an Gleichung 25 konnten Elastizitätsmodul und Eigenspannung bestimmt werden. Als Dicke der Membran wurden die vor dem Abheben gemessenen ellipsometrischen Filmdicken und als Poissonzahl wurde ein Wert von 0.25 verwendet.

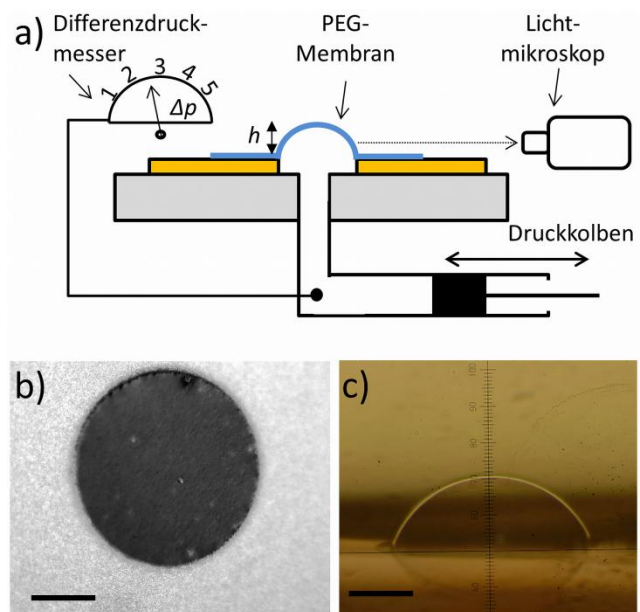


Abb. 68. (a) Schematischer Aufbau der Apparatur zu Bestimmung der mechanischen Eigenschaften freistehender Membranen nach der Bulge-Test Methode; (b) Lichtmikroskopie-Bild der PEG-Membran auf einer $300\ \mu\text{m}$ Lochblende und (c) Wölbung der Membran durch einen angelegten Überdruck (Balken = $100\ \mu\text{m}$).

4.4 Spektroskopische Messungen

4.4.1 XPS

Die XPS-Messungen wurden mit einem MAX200 Spektrometer (Leybold-Heraeus) unter UHV-Bedingungen bei einem Druck unter 10^{-8} mbar durchgeführt. Das Material der Röntgenanode bestand aus Magnesium, dessen charakteristische $K\alpha$ -Linie bei einer Energie von 1253.6 eV und einer Halbwertbreite von 0.7 eV ohne Monochromator verwendet wurde. Die Nominalleistung der Anode betrug 220 W (13 kV Beschleunigungsspannung bei 15 mA Emissionsstrom). Die Spektren wurden bei konstanter Durchgangsenergie (E_{PASS}) des hemisphärischen Energieanalysators im CAE-Modus gemessen. Die Durchgangsenergie lag bei den Detailspektren bei 48 eV, die Schrittweite 0.2 eV. Die Anzahl der Scans pro Spektrum sowie die Messzeit pro Energieintervall (dwell time) wurde der Intensität des zu messenden Signals angepasst. Die aufgenommenen Spektren wurden durch eine spektrometerspezifische Transmissionsfunktion dividiert, um die energieabhängige Empfindlichkeit des Linsensystems, des Analysators und des Detektors auszugleichen. Bei Proben, die auf einem Goldsubstrat präpariert waren, wurde die Energieskala auf 84.0 eV normiert.¹⁴⁰

Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit dem Programm *XPS Peak 4.1*.¹⁴¹ Zur Bestimmung der Signale wurde eine Untergrundkorrektur nach SHIRLEY vorgenommen (Shirley Background)¹⁴²⁻¹⁴³ und die Signale des Spektrums selbstkonsistent an eine symmetrische Voigt-Funktion mit einer variablen Gauß-Lorentz-Produktfunktion angepasst. Für das Au 4f-Signale wurde eine Dupletttaufspaltung von 3.65 eV und für das S 2p Signal eine Aufspaltung von 1.2 eV verwendet.¹⁴⁴

Die Bestimmung der zur Berechnung der Schichtdicken benötigten Abschwächungslängen erfolgte anhand der Messung der Goldsignale (Au 4f, Au 4d und Au 4p) von Alkanthiol-SAMs verschiedener Kettenlänge (C12, C14, C16 und C18). Für die Schichtdicken der SAMs wurden 1.1 Å für jede CH_2/CH_3 -Einheit und 1.3 Å für die Au-S-Bindung angenommen. Die Intensitäten der vier Alkanthiole pro Goldsignal wurden aufgetragen und aus der Steigung der Geraden konnte gemäß Gleichung 28 die Abschwächungslänge für die kinetische Energie der jeweiligen Emission bestimmt werden. Die drei erhaltene Abschwächungslängen für die Energie der Au 4f, Au 4d und Au 4p-Emissionen ließen sich die folgende Potenzfunktion anpassen:

$$(Gl. 28) \quad \lambda(E_{kin})[\text{Å}] = 0.017 \cdot E_{kin}[\text{eV}]^{1.0378}$$

Die nach Gleichung 28 berechneten Abschwächungslängen ausgewählter Emissionen sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Orbital	Au 4f	C 1s	N 1s	O 1s	S 2p	F 1s
BE (eV)	84	284	400	532	162	685
λ (Å)	26.1	21.4	18.7	15.9	24.2	12.3

Tabelle 1. Abschwächungslängen ausgewählter Emissionen bei Verwendung einer Magnesiumanode gemäß Gleichung 28.

4.4.2 UV-VIS-Messungen

Die UV-VIS-Messungen der mit Gold-Nanopartikeln besetzten PEG-Filme wurden mit einem selbst gebauten Spektrometer unter einem Winkel von 0° bezüglich der Oberflächennormalen durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine Deuterium-Wolfram- Halogenlampe, die Messungen in einem spektralen Bereich von 190-2000 nm erlaubte (DH-2000-BAL, Micropack GmbH). Das Licht wurde durch ein Glasfaserkabel auf die Probe geleitet und das reflektierte Licht durch einen weiteren Lichtleiter in ein Gitterspektrometer (HR2000, Ocean Optics GmbH) geführt.

Von allen Spektren wurde das Dunkelspektrum abgezogen. Als Referenzspektren dienten die entsprechenden PEG-Filme ohne AuNPs. Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Spektren wurden die AuNP-PEG-Filme jeweils mit und ohne Kühlung durch einem Peltier-Element gemessen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Das Ergebnis dieser Arbeit lässt sich in drei Bereiche unterteilen. Abschnitt 5.1 untersucht im Detail das Verhalten Amino-terminierter Biphenylthiol Monolagen bei mit Bestrahlung niederenergetischer Elektronen und zeigt am Beispiel von 4-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT) SAMs, wie sich eine Änderung der für die Bestrahlung verwendeten Elektronenenergie auf die Effektivität der Quervernetzung und die Bildung von Aminogruppen auswirkt. Ferner wird diskutiert, in wie weit oberflächengebundene Aminogruppen bestrahlter 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) Monolagen für die Kopplung weiterer Moleküle überhaupt verfügbar sind. Als Referenzsystem wird ein 4'-Aminobiphenyl-4-thiol (ABPT) SAM verwendet, der erstmals sauer hergestellt werden konnte und schon im unbestrahlten Zustand eine große Anzahl oberflächengebundener Aminogruppen besitzt.

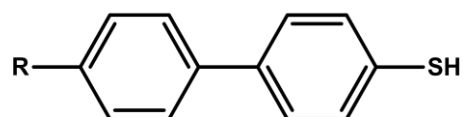
Abschnitt 5.2 widmet sich der Präparation und eingehenden Charakterisierung freistehender, biokompatibler Nanomembranen basierend auf Amino-terminierten und quervernetzten Biphenylthiol-SAMs. Es wird gezeigt, dass es möglich ist, entsprechend funktionalisierte Polyethylenglykole (PEGs) so an die Aminogruppen bestrahlter NBPT-Monolagen zu koppeln, dass die Filme bei einer Gesamtdicke von weniger als 5 nm proteinabweisende Eigenschaften aufweisen. Zudem konnten die Filme von ihrem Träger abgehoben und freistehend auf eine Gitterstruktur übertragen werden, ohne dabei ihre proteinabweisende Eigenschaft zu verlieren. Solche biokompatiblen Membranen stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Herstellung eines Trägerfilms zur Untersuchungen biologischer Objekte (z.B. Proteine) in der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) dar.

Die letzten Abschnitte 5.3-5.6 behandeln schließlich eine neuartige Methode, mechanisch stabile Nanomembranen herzustellen, die ausschließlich aus Polyethylenglykol bestehen. Diese sind im Gegensatz zu SAM-basierenden PEG-Membranen beidseitig biokompatibel und lassen sich in beliebiger Dicke ab etwa 20 nm freistehend herstellen. Die Präparation der Membranen verläuft über einen quervernetzten, 5-200 nm dicken Film aus Polyethylenglykol, der für sich schon bemerkenswerte Eigenschaften aufweist. Er ist beispielsweise in der Lage, Nanopartikel aus wässriger Lösung nahezu irreversibel zu immobilisieren. Mit Hilfe lithographischer Techniken lässt sich die Deposition lokal steuern und so Muster von Nanopartikeln erzeugen, die in einer biokompatiblen PEG-Matrix eingebettet sind. Zudem wird gezeigt, wie die PEG-Filme auf Elektronenbestrahlung im Ultrahochvakuum (UHV) reagieren und sich dabei strukturell so umwandelt, dass sie beispielsweise keine Quelleigenschaften mehr zeigen.

5.1 Elektronenstrahlinduzierte Effekte Amino-terminierter, aromatischer SAMs

Aromatische Bi- und Terphenylthiol-Monolagen haben die wichtige Eigenschaft, dass sie bei Bestrahlung mit Elektronen im Ultrahochvakuum (UHV) lateral quervernetzen und dann eine so hohe mechanische und thermische Stabilität aufweisen, dass sie auch ohne Substrat existieren³⁶ oder Temperaturen von über 1000 °C standhalten können.³⁴

Tragen die Biphenylthiol-SAMs zusätzlich eine terminale Nitro- oder Nitrilgruppe (d.h. eine oxidierte Form der Aminogruppe), konnte gezeigt werden, dass der bei der Bestrahlung freiwerdende Wasserstoff diese beiden Gruppen zu einer Aminogruppen reduziert, an die dann



R=NO₂ : 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT)

R=CN : 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT)

R=NH₂ : 4'-Aminobiphenyl-4-thiol (ABPT)

Abb. 69. Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Adsorbat-Moleküle zur Präparation aromatischer SAMs.

in einem Folgeschritt weitere Moleküle gebunden werden können.^{23, 30} Für hohe Kopplungsdichten sind detaillierte Kenntnisse über den Zusammenhang von Oberflächendichte der entstehenden Aminogruppen und Bestrahlungsdosis notwendig. In Abschnitt 5.1.2 wird daher beschrieben, welche Rolle die Energie der Primärelektronen auf die Entstehung der Aminogruppen spielt. Ein entsprechender Energieeffekt bezüglich des Grades der Quervernetzung, wird in Abschnitt 5.1.3 untersucht.

Im Abschnitt 5.1.4 werden erstmalig 4'-Aminobiphenyl-4-thiol-Monolagen und ihre Reaktion auf Elektronenbestrahlung untersucht, während im Abschnitt 5.1.5 schließlich der Frage nachgegangen wird, ob sämtliche durch Elektronenbestrahlung von NBPT- und CBPT-SAMs gebildeten, oberflächengebundenen Aminogruppen gleichermaßen für die Kopplung weitere Moleküle erreichbar sind. Als Referenzsystem wird dabei das Verhalten von ABPT-SAMs bei Elektronenbestrahlung in Bezug auf Kopplung reaktiver Anhydride untersucht, da diese SAMs schon im unbestrahlten Zustand Aminogruppen ihrer der Oberfläche tragen.

5.1.1 CBPT-SAMs als Templat für die chemische Elektronenstrahlolithographie

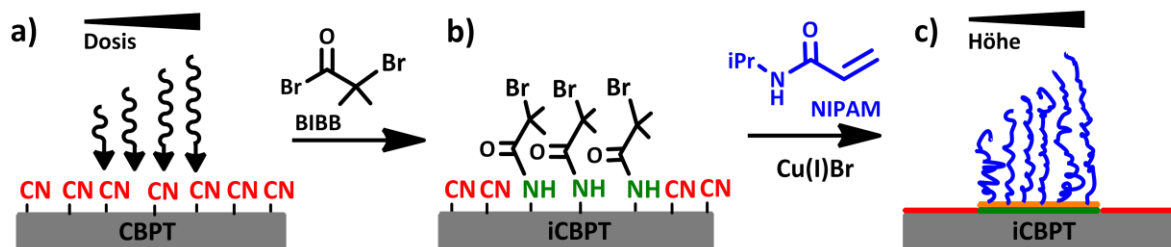


Abb. 70. 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT) SAMs als Templat in der chemische Nanolithographie: (a) Direkte Aktivierung und Strukturierung der Oberfläche durch Elektronenbestrahlung; (b) Kopplung eines Polymerisationsinitiators (Bromisobuttersäurebromid, BIBB) und (c) Präparation von Polymerbürsten aus Poly-N-Isopropylacrylamid (P-NIPAM) durch oberflächeninitiierte Polymerisation (SIP). Die Schichtdicke des Polymers in (c) ist dann ein Maß für die Dichte oberflächengebundener Aminogruppen in (a).

Als Templat für die chemische Elektronenstrahlolithographie (EBCL) eignen sich bisher nur wenige SAM-Systeme. Diese müssen dahingehend strukturierbar sein, dass sie gegenüber einer zu kopplenden Spezies definierte Bereiche hoher Reaktivität aufweisen, die von einer Matrix ohne diesbezügliche Reaktivität umgeben sind. Solche Strukturen abgestufter Reaktivität können auf SAMs beispielsweise lithographisch durch elektronenstrahlinduzierte Austauschreaktion erzeugen werden (irradiation-promoted exchange reaction, IPER).²¹ Andererseits lassen sich solche Muster auch durch direkte Elektronenbestrahlung erzeugen. So konnte gezeigt werden, dass sich die Reaktivität (Nukleophilie) oberflächengebundener Aminogruppen von aliphatischen 11-Aminoundecanthiol-SAMs (HS-C₁₁H₂₂-NH₂, AUDT-SAMs) nach Elektronenbestrahlung mit einer Dosis von etwa 1 mC/cm² deutlich steigern ließ.²²

Weitaus wichtiger als Templat für eine direkte elektronenstrahlinduzierte Aktivierung sind Nitrobiphenylthiol-SAMs (NBPT-SAMs), da die Nitrogruppen des unbestrahlten SAMs keinerlei Reaktivität gegenüber potentiellen elektrophilen Reagenzien aufweisen. Erst unter dem Einfluss der Elektronenbestrahlung wird die Oberfläche durch Reduktion chemisch aktiviert und für die Kopplung elektrophiler Komponenten zugänglich gemacht. Zudem kann die Dichte der Aminogruppen und damit die Aktivität der Oberfläche als Funktion der die Bestrahlungsdosis gesteuert werden und so Strukturen mit einem chemischen Gradienten erzeugt werden (**Abb. 70a**).

Im Rahmen einer früheren Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass auch 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol-SAMs (CBPT-SAMs) bei Bestrahlung mit Elektronen der Energie 50 eV quervernetzen und die Nitrilgruppe dabei zu einer Aminogruppe reduziert wird.³⁰ Es wäre in diesem Zusammenhang interessant, CBPT-SAMs auch bezüglich ihrer Eignung als Templat für die chemische Elektronenstrahl-lithographie zu untersuchen und mit den entsprechenden Ergebnissen für das etablierte NBPT-System zu vergleichen.

Die Dichte oberflächengebundener Aminogruppen kann experimentell über die Bildung von Polymerbürsten mittels oberflächeninitiiert Polymerisation (surface initiated polymerization, SIP) bestimmt werden. Dazu wird zunächst ein für die verwendete Polymerisationsmethode spezifischer Aktivator an die Aminogruppen der zu untersuchenden Oberfläche gekoppelt (**Abb. 70b**). Dessen Oberflächendichte ist von der Dichte oberflächengebundener Aminogruppen abhängig und wirkt sich direkt auf Höhe der Polymerbürsten aus (**Abb. 70c**).

Die hier untersuchten Polymerisationen werden mittels Atom-Transfer-Radikal-Polymerisation (ATRP) durchgeführt. Standardaktivator für diesen Polymerisationstyp ist ein Derivat der Isobuttersäure, das ein Bromatom am α -Kohlenstoff trägt. Er lässt sich am einfachsten über das entsprechende Säurebromid als Bromisobuttersäurebromid (BIBB) an die Aminogruppen binden. Als Monomer wird *N*-Isopropylacrylamid (NIPAM) verwendet, da sich Polymerbürsten aus Poly-NIPAM nach Zugabe eines Cu(I)-Katalysators kontrolliert und mit geringer Polydispersität herstellen lassen. Deren Höhe ist rasterkraftmikroskopisch zu bestimmen und stellt ein direktes Maß für die Dichte oberflächengebundener Aminogruppen dar. Abhängigkeiten der Höhe der Polymerbürsten von der Bestrahlungsdosis sind bisher nur für NBPT-SAMs untersucht worden.²⁵⁻²⁹

In **Abb. 71** sind die entsprechenden AFM-Bilder von NIPAM-Polymerbürsten auf CBPT-SAMs und – zum direkten Vergleich – auf NBPT-SAMs mit den zugehörigen Höhenprofilen bei einer Elektronenenergie von 3 keV und logarithmisch ansteigender Dosis zwischen 0-100 mC/cm² dargestellt. Auf den ersten Blick verhalten sich beide Systeme sehr ähnlich. Ab einer Minstdosis von 5 mC/cm² ist die Dichte der oberflächengebundenen Aminogruppen hoch genug und die Polymerbürsten beginnen zu wachsen. Sie erreichen schließlich bei einer Dosis von 30-40 mC/cm² ihre maximale Höhe von 50-60 nm. Wird die Dosis weiter erhöht, sinkt die Höhe wieder, da jetzt mehr NH₂-Gruppen durch strahlungsinduzierte Schäden verloren gehen als durch Reduktion neu hinzukommen. Unterschiede zwischen NBPT und CBPT-SAMs ergeben sich zum einen aus einer geringeren maximalen Höhe der Polymerbürsten bei CBPT-SAMs. Während diese für NBPT-SAMs bei 65 nm liegt, lassen sich für CBPT-SAMs nur Höhen bis 53 nm erzielen. Das steht im Einklang mit XPS-spektroskopischen Untersuchungen von CBPT- und NBPT-SAMs. Für CBPT-SAMs ergibt sich nach der Bestrahlung mit 40 mC/cm² eine um etwa 20 % niedrigere Intensität des N 1s-Signals der Aminogruppe als bei NBPT-SAMs, die mit derselben Dosis bestrahlt wurden (**Abb. 72**). Die höhere Empfindlichkeit der NH₂-Gruppen von CBPT-SAMs für strahlungsinduzierte Schäden spiegelt das unterschiedliche Resultat der Reduktion beider Gruppe wieder. Das Produkt der Reduktion eines Nitrils ist eine CH₂NH₂-Gruppe, während eine Nitrogruppe nur zu einer NH₂-Gruppe reduziert wird. Die zusätzliche (C-C)- σ -Bindung

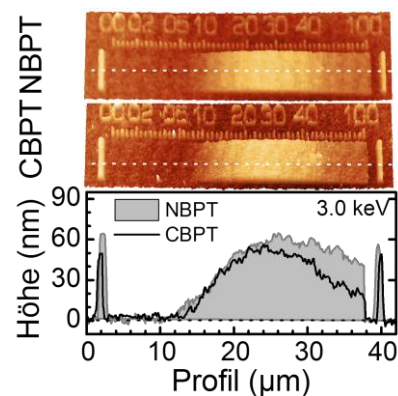


Abb. 71. Rasterkraftmikroskopie (AFM) Bilder mit den entsprechenden Höhenprofilen von P-NIPAM-Polymerbürsten auf NBPT- und CBPT-SAMs, die bei einer Elektronenenergie von 3 keV mit logarithmisch ansteigender Dosis zwischen 0-100 C/cm² (Zahlenwerte in den AFM-Bildern) bestrahlt wurden.

führt wie bei der Bestrahlung von Alkyl-SAMs zu der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines strahlungsinduzierten Verlusts der aliphatischen Endgruppe bei CBPT-SAMs.

Andererseits scheint der annähernd gleichlaufende Höhenanstieg der Polymerbürsten beider SAMs im Bereich zwischen 5-20 mC/cm² den N 1s XPS-Ergebnissen in Abb. 72 zunächst zu widersprechen, da auch in diesem Dosisbereich die relative XPS-Intensität des NH₂-Signals von CBPT unter der von NBPT liegt. Der Widerspruch löst sich allerdings auf, wenn

man annimmt, dass die CH₂NH₂-Gruppen von CBPT-SAMs sterisch leichter zugänglich bzw. reaktiver sind als die NH₂-Gruppen der NBPT-Monolagen und daher die geringere Dichte der Aminogruppen kompensieren.

Auch wenn die maximal erreichbare Oberflächendichte bei CBPT-SAMs unter von NBPT-SAMs liegt, konnte gezeigt werden, dass sich CBPT-SAMs als Templat für EBCL eignen. Die Dichte oberflächengebundener Aminogruppen durch Elektronenbestrahlung ist hoch genug, um weitere Spezies in signifikanten Mengen koppeln zu können, ohne dass diese sich an nicht-bestrahlten Arealen binden konnten. Ferner bieten auch CBPT-SAMs durch kontinuierliche Veränderung der Bestrahlungsdosis die Möglichkeit, einen Gradienten bezüglich der chemischen Reaktivität auf ihrer Oberfläche zu erzeugen. Dieses ist insofern wichtig, da CBPT-SAMs somit die einzige Alternative für die bisher ausschließlich zu diesem Zweck verwendeten NBPT-SAMs bieten.

5.1.2 Einfluss der Elektronenenergie auf die Effizienz der chemischen Lithographie

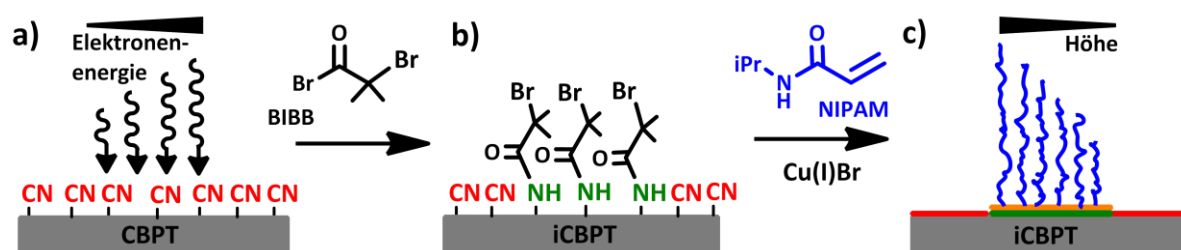


Abb. 73. Einfluss der Energie des primären Elektronenstrahls auf die Dichte der durch Reduktion gebildeten, oberflächengebundenen Aminogruppen: (a) Aktivierung der Oberfläche durch Elektronenbestrahlung, (b) Kopplung eines geeigneten Aktivators und (c) Polymerisation, um die Dichte der Aminogruppen in (a) und damit die Effizienz der Reduktion anhand der Höhe der Polymerbürsten in (c) zu bestimmen.

CBPT-SAMs eignen sich wie im letzten Abschnitt gezeigt als Templat für die chemische Elektronenstrahlolithographie (EBCL). Bei Verwendung eines Elektronenstrahlschreibers dient als Elektronenquelle ein bis auf wenige Nanometer gebündelter Elektronenstrahl. Da dessen Fokussierbarkeit mit abnehmender Energie geringer wird, arbeiten Elektronenstrahlschreiber mindestens bei Energien im unteren keV-Bereich. Elektronenkanonen zur großflächigen Bestrahlung (flood gun) verwenden dagegen deutlich geringere Elektronenenergien von 10-500 eV, da es hier nicht auf Fokus-

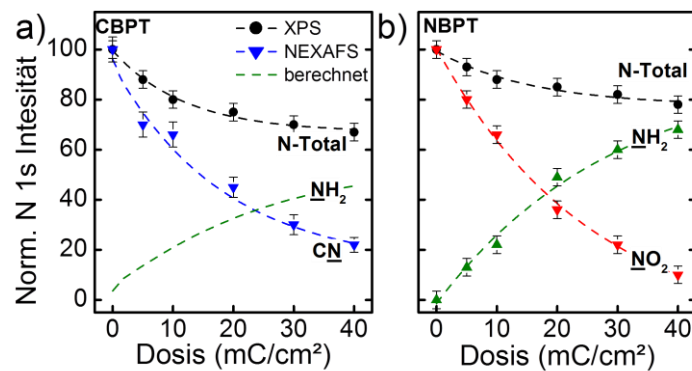


Abb. 72. Dosisabhängigkeit der XPS N 1s-Signalintensitäten von (a) CBPT- und (b) NBPT-SAMs während der Bestrahlung mit 50 eV Elektronen unter UHV-Bedingungen (bei CBPT wurden die CN-Intensitäten per NEXAFS und der Gesamtstickstoffgehalt per XPS bestimmt, während der NH₂-Verlauf aus der Differenz beider Werte berechnet wurde).

sierbarkeit, sondern auf eine möglichst großflächige (im cm-Bereich) und räumliche homogene Elektronenverteilung ankommt. Die Verwendung höherer Energien bei Elektronenstrahl-schreibern ist aber noch aus einem weiteren Grund von Bedeutung. Die Elektronenstrahlolithographie wird häufig zur Strukturierung von Photo-lacken (so genannten e-beam resists) verwendet. Das sind organische Polymere, die per Spincoating auf das Substrat aufgetragen werden und Schichtdicken zwischen 50-1000 nm haben. Je nach Struktur des Polymers kann die Löslichkeit des Resist nach

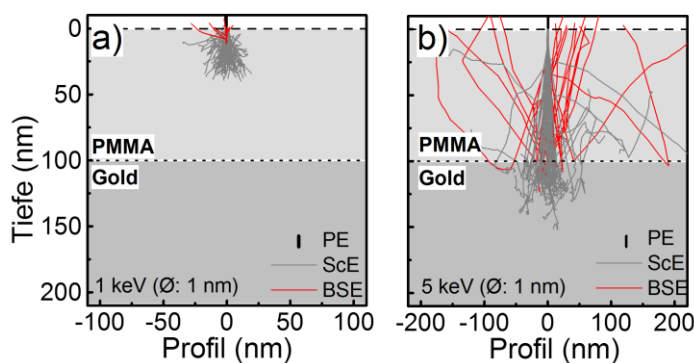


Abb. 74. Monte-Carlo Simulation der Trajektorien eines 1 nm Elektronenstrahls, der mit einer Energie von 1 keV (a) bzw. 5 keV (b) in einen 100 nm dicken, auf einem Goldsubstrat befindlichen PMMA-Film eindringt. Erst ab einer Energie von 5 keV durchdringt der Strahl das Material vollständig. Die Elektronen auf den roten Trajektorien (BSE, backscattered electron) verlassen die Probe wieder, während die ScE (scattered electron) im Material verbleiben.

Elektronenbestrahlung entweder zunehmen (Positivlack) oder abnehmen (Negativlack). Damit der Elektronenstrahl tief genug in eine z.B. 100 nm dicke Polymerschicht eindringen kann, muss seine Energie mindestens im Bereich einiger keV liegen (**Abb. 74**). Elektronenstrahlen mit einer Energie $E < 1$ keV sind daher bei normalen, polymeren Resistmaterialien nicht zu verwenden, da sie nicht tief genug eindringen können, um das Material vollständig zu belichten. SAMs haben mit ~ 1 nm eine deutlich geringere Dicke und sollten sich daher als potentieller Resist für sehr oberflächensensitive Elektronen im Bereich von 10-100 eV eignen. Daher wäre es interessant, den Einfluss der Energie des Primärstrahls sowohl auf die Eignung von CBPT-SAMs als Resist-Material als auch auf die Effizienz der Reduktion der Nitrilgruppe zu untersuchen.

MÜLLER et al. analysierten erstmals den Einfluss der Elektronenenergie auf strahleninduzierte Schäden von Hexadecan-thiol-SAMs zwischen 10-100 eV.⁸ Sie beobachteten bei Verwendung konstanter Dosen eine deutliche Erhöhung der Strahlenschäden bei steigender Elektronenenergie. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen STEENACKERS et. al. bei Analyse der N 1s XPS Spektren von NBPT-SAMs bei Verwendung von Elektronen mit 10 eV.²⁹ Zur vollständige Reduktion der Nitrogruppe wurde eine Dosis von 120 mC/cm² benötigt und damit dreimal mehr als bei der Verwendung von Elektronen mit 50 eV.²³ Sie erklärten diese Zunahme mit der Annahme, dass neben Primärelektronen (PE) vor allem die in der Goldschicht entstehende Sekundärelektronen (SE) für die Reduktion verantwortlich sein und dass deren Anzahl mit zunehmender PE zunehme.

Experimentell zeigte sich also, dass im Bereich geringer Elektronenenergien (10-50 eV) die Effektivität der Reduktion mit steigender Energie der Primärelektronen zunimmt. Auf der „hochenergetischen“ Seite der Energieskala, d.h. im unteren Kiloelektronenvolt-Bereich, der bei Verwendung eines Elektronenstrahl-schreibers wichtig ist, wurde ein diesbezüglicher Energieeffekt auf die Effektivität einer Reduktion der Endgruppen von NBPT-SAMs dagegen noch nicht systematisch untersucht. In der Literatur ist nur die benötigte Dosis von etwa 40 mC/cm² für eine Elektronenenergie von 3 keV beschrieben, die wie, im letzten Abschnitt diskutiert, durch oberflächeninitiierte Polymerisation und Bestimmung der Höhe der Polymerbürsten erhalten wurde.²⁷

An einem solchen Modellsystem wird im Folgenden untersucht, wie effektiv Elektronen im Bereich von 0.5-20 keV in der Lage sind, die Nitrilgruppe eines CBPT-SAM zu reduzieren. Als Maß für die Effektivität dient die Höhe von Polymerbürsten in Abhängigkeit von Bestrahlungsdosis und

Elektronenenergie. Auf das CBPT-Templat werden mit einem Elektronenstrahlschreiber bei einer bestimmten Energie zwölf Quadrate mit Dosen zwischen 1.0-150 mC/cm² geschrieben und anschließend die P-NIPAM Polymerbürsten generiert. **Abb. 75a** zeigt exemplarisch das AFM-Bild für eine Elektronenenergie von 0.5 keV. Die Zahlenwerte unter den Quadraten geben die Dosis an, mit der das darüberliegende Quadrat bestrahlt worden ist. Analog werden CBPT-SAMs mit Elektronenenergien von 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 und 20.0 keV strukturiert, Polymerbürsten hergestellt und deren Höhen mit dem AFM vermessen, die dann die Dichte der oberflächengebundenen Aminogruppen repräsentieren.

Bei 0.5 keV beginnen die Polymer-

bürsten ab ca. 5 mC/cm² zu wachsen und erreichen ihre maximale Höhe von ~50 nm bereits bei 10-15 mC/cm². Eine weitere Erhöhung der Dosis führt aufgrund strahlungsinduzierter Schäden wieder zu einem allmählichen Absinken der Bürstenhöhe.

Wird die Energie der Elektronen sukzessive erhöht, wandert das Maximum der Höhe hin zu größeren Bestrahlungsdosen, ohne dass sich der Wert von ~50 nm wesentlich ändert. Entsprechend verschieben sich auch die Mindestdosis sowie der Bereich, bei dem Strahlungsschäden die Neubildung von Aminogruppen überwiegt, zu höheren Dosen. Das Verhalten ist noch einmal in **Abb. 75b** zusammengefasst, wo deutlich zu beobachten ist, wie die Höhenprofilkurven bei steigender Energie zu höheren Dosen wandern, während die maximale Höhe der Polymerbürsten und auch die Form der Kurven annähernd konstant bleibt.

In **Abb. 75c** sind die Ergebnisse noch einmal anders dargestellt und das Höhenprofil der Polymerbürsten gegen die Elektronenenergie für eine bestimmte Bestrahlungsdosis aufgetragen. So lässt sich beispielsweise für eine Zieldosis die optimale Elektronenenergie bestimmen. Für 40 mC/cm² (blaue Kurve) wird die maximale Höhe und damit die größte Effektivität bei 3-5 keV erreicht. Die Kurve weist zudem ihr vollständiges Profil auf: Sie erreicht ein Maximum, das von einem linken und rechten Zweig flankiert wird. Bei 40 mC/cm² stellt der linke, ansteigende Zweig denjenigen Bereich dar, bei dem die maximale Höhe aufgrund von Strahlungsschäden nicht mehr erreicht wird, während der fallende Ast rechts vom Maximum den Bereich kennzeichnet, bei dem die maximale Höhe aufgrund unvollständiger Reduktion noch nicht erreicht wird. Die entsprechende Kurve für niedrige Dosen (grün) zeigt im betrachteten Energiebereich nur noch den fallenden Ast, da die effektivste Energie außerhalb des betrachteten Energieintervalls liegt. Auf der anderen Seite ist für hohe Dosen (rot Kurve) nur der steigende Ast zu erkennen ist und man befindet sich im Bereich strahlungs-

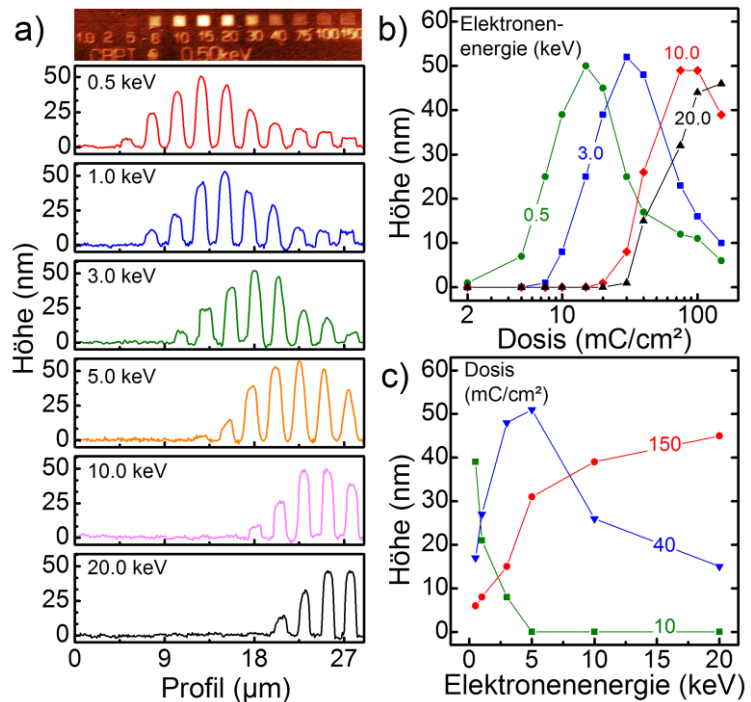


Abb. 75 (a) AFM Bilder und Höhenprofile von P-NIPAM Polymerbürsten erzeugt auf quadratischen Flächen, die mit verschiedenen Elektronenenergien bestrahlt sind. (b) Die Höhe der Polymerbürsten als Funktion der Bestrahlungsdosis bei konstanter Energie bzw. (c) als Funktion der Energie bei konstanter Dosis.

bedingter Verluste. Erst ab einer Energie >20 keV sind die PE ineffektiv genug, um auch bei 150 mC/cm² zu einer maximalen Dichte der Aminogruppen zu gelangen.

Die Ergebnisse in Abb. 75 zeigen, dass es einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Energie der PE und der Effektivität der Reduktion gibt. Sie bestätigen ebenso die Hypothese, dass für die Reduktion im betrachteten Energieintervall von 0.5 - 20 keV vor allem Sekundärelektronen verantwortlich sein müssen. Für die Reduktion der Nitrilgruppe werden Wasserstoffradikale benötigt, die nur durch elektroneninduzierte Spaltung einer (C-H)-Bindung im Biphenylgerüst entstanden sein können. Läuft dieser Prozess nach dem Prinzip der dissoziativen Elektronenanlagerung (DEA) ab, ist der Wirkungsquerschnitt für die Spaltung der (C-H)-Bindung durch ein externes Elektron im resonanten Fall am größten und nimmt bei steigender Energie des Elektrons rasch ab.¹⁴⁵ Die Bindungsenergie der (C-H)-Bindung liegt bei 350 kJ/mol und damit bei ~ 5 eV. Die Wahrscheinlichkeit also, dass ein Elektron im keV-Bereich eine (C-H)-Bindung gemäß dem DEA-Mechanismus spalten kann, ist gering.

Abb. 76a zeigt, was beim Eintritt eines Primärstrahls in das SAM-tragende Substrat geschieht. Aufgrund der viel geringeren Dichte, Massenzahl und Dicke des SAM im Vergleich zum Goldsubstrat, braucht der SAM bei diesen Streuprozessen nicht berücksichtigt zu werden. Die Primärelektronen (PE) dringen in das Substrat ein und erzeugen direkt um ihre Eintrittsstelle herum innerhalb der Fluchttiefe λ Sekundärelektronen vom Typ SE1. Auf dem Weg durch das Substrat werden die PE vielfach gestreut und dabei abgelenkt (Abb. 74). Ein Teil verlässt das Substrat wieder als Rückstreuungselektronen (back-scattered electrons, BSE). Dessen Anteil η_{BSE} beträgt für Gold beispielsweise zwischen 0.4 - 0.5 und ist in erster Näherung unabhängig von der Energie der PE. Das heißt, fast die Hälfte der eintretenden Elektronen verlässt die Probe als BSE wieder. Auch die gestreuten Elektronen können bei ihrem Weg durch das Substrat innerhalb der Fluchttiefe λ Sekundärelektronen erzeugen, die als SE2 bezeichnet werden. Sekundärelektronen vom Typ SE3 werden hier nicht berücksichtigt, da ihr Einfluss schwer vorherzusagen ist. Sie entstehen durch BSE, die beispielsweise in die Wände der Vakuumkammer einschlagen und dort Sekundärelektronen erzeugen.¹⁴⁶

In **Abb. 76b** ist das Energiespektrum *austretender* Elektronen gezeigt, das von einem Primärstrahl der Energie $e \cdot U$ erzeugt werden.¹⁴⁷⁻¹⁴⁸ Es wird von einem scharfen Bereich zwischen 0 - 50 eV dominiert, der von Sekundärelektronen des Typs SE1 und SE2 stammt und ein Maximum bei 2 - 5 eV aufweist, also genau in dem Bereich einer chemischen Bindungsenergie. Anschließend folgt der Bereich inelastisch reflektierter Elektronen (BSE) mit einer Energie 50 eV $< E < e \cdot U$. Als letztes ist noch ein kleiner Buckel elastisch reflektierter Elektronen mit der Energie $E = e \cdot U$ zu erkennen.

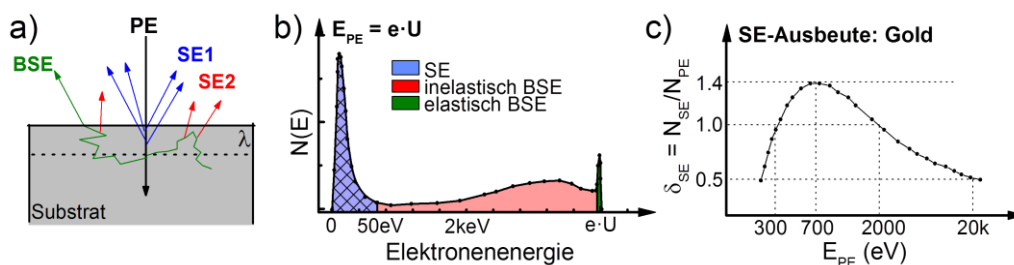


Abb. 76 (a) Ein Strahl primärer Elektronen (PE) dringt in das Substrat ein und erzeugt direkt an der Eintrittsstelle Sekundärelektronen (SE) vom Typ 1 (SE1). Nach mehreren Streuprozessen können die PE das Substrat als Rückstreuungselektronen (BSE) wieder verlassen und auf ihrem Weg weitere SE vom Type SE2 erzeugen. Nur SE, die innerhalb der Fluchttiefe λ erzeugt werden, können das Substrat verlassen. (b) Das von einem PE der Energie $e \cdot U$ erzeugte Spektrum an SE, BSE und elastisch reflektierten Elektronen. (c) Experimentell bestimmte Ausbeute an SE, die pro PE der Energie E_{PE} in einem Goldsubstrat entstehen.

Wie schon mehrfach erwähnt sind die SE wahrscheinlich fast ausschließlich für elektronenstrahl-induzierte Prozesse innerhalb eines SAMs verantwortlich. Um den Einfluss der Energie der PE auf diese zu verstehen und damit das Verhalten aus Abb. 75 zu erklären, ist es notwendig, die Ausbeute der SE in Abhängigkeit von der Energie des Primärstrahl zu kennen. Diese Ausbeute δ_{SE} , definiert als die Anzahl an Sekundärelektronen, die ein Primärelektron der Energie E_{PE} erzeugt, ist in **Abb. 76c** für ein Goldsubstrat dargestellt. Prinzipiell sehen Kurven für andere Materialien ähnlich aus und können anhand von drei charakteristischen Energiewerten an das jeweilige Material angepasst werden. Für Gold liegt das Maximum der Ausbeute mit $\delta_{SE} \approx 1.4$ bei 700 eV, d.h. jedes PE erzeugt 1.4 SE. Die beiden Punkte, für die $\delta = 1$ ist, liegen bei 300 und 2000 eV.¹⁴⁶

Damit lässt sich Abnahme der der Effizienz der Reduktion mit steigender Energie anhand des Verlaufs der Ausbeute an Sekundärelektronen erklären. Allerdings stimmen die absoluten Werte nicht überein. Während sich die SE-Ausbeute bei einem Anstieg der Energie von 700 auf 20000 eV nur um den Faktor ~ 3 verringert, liegt der entsprechende Unterschied in der Dosis für die maximale Höhe der Polymerbürsten bei einem Faktor 5-6. Die Diskrepanz ergibt sich höchstwahrscheinlich in der vereinfachten Betrachtung der SE-Ausbeute δ_{SE} , in der alle das Substrat verlassende Elektronen von 0-50 eV gleichermaßen behandelt werden. Für eine detailliertere Betrachtung müsste der Verlauf der Ausbeute speziell des niederenergetischen Bereichs der SE zwischen 1-20 eV genauer betrachtet werden. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die BSE teilweise für die gezeigten Prozesse mitverantwortlich sind.

5.1.3 Einfluss der Elektronenenergie auf den Grad der Quervernetzung

Die zweite wichtige Reaktion thioaromatischer SAMs als Antwort auf Bestrahlung mit Elektronen ist eine intermolekulare Quervernetzung. Die Monolagen wandeln sich dabei in einen ultradünnen, mechanisch, thermisch und chemisch stabilen Kohlenstofffilm um. Wird auf dem SAM während der homogenen Elektronenbestrahlung eine Gittermaske montiert, bildet sich das Muster des Gitters zunächst als ein latentes Bild auf dem SAM ab. Bestrahlte und nicht-bestrahlte Bereiche unterscheiden sich dabei weniger in topographischer Hinsicht, sondern vor allem chemisch-strukturell in Form einer lateralen Quervernetzung. Solche chemischen Strukturen lassen sich mit den gewöhnlichen Analysemethoden wie Rasterkraft- oder Elektronenmikroskop nur schwer untersuchen, da der Topographie- und Materialkontrast zwischen bestrahlten und unbestrahlten Bereichen gering ist (**Abb. 77**). Im Gegensatz zu dem im letzten Abschnitt besprochenen chemischen Kontrast aufgrund unterschiedlicher Oberflächenfunktionalitäten (Nitro/Nitril-gruppe und Aminogruppen), kann ein Kontrast in Form strukturierter Quervernetzung auch auf nicht-substituiertem Biphenylthiol Monolagen erzeugt werden.

Im folgenden Experiment wird ein TEM-Grid als Maske auf einen CBPT-SAM montiert, mit 40 mC/cm^2 bei 50 eV bestrahlt und das latente Bild in einer Goldätzlösung entwickelt. Dabei greift die Lösung das Gold nur an nicht-bestrahlten Bereichen an, während unterliegendes Gold in den bestrahlten Arealen durch den quervernetzten SAM geschützt wird. Allerdings ist der Kontrast zwischen bestrahlten und nicht-bestrahlten Bereichen bezüglich der

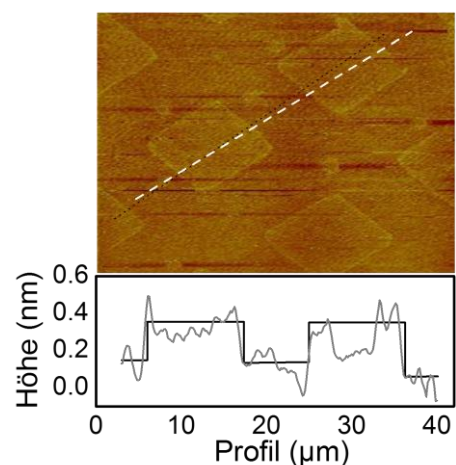


Abb. 77. AFM-Bild und Höhenprofil entlang der weißen Linie eines CBPT-SAMs nach Bestrahlung durch eine Maske (TEM-Grid) mit 40 mC/cm^2 zeigen einen sehr geringen topographischen Kontrast.

Schutzwirkung vor der Goldätzlösung bei CBPT-SAMs geringer als bei Monolagen aliphatischer Thiole wie beispielsweise Dodecanthiol. Das zeigt sich darin, dass nur relativ milde Oxidationsmittel verwendet werden können und Bedingungen wie Konzentration, Temperatur und Dauer des Ätzvorgangs sorgfältig auf einander abgestimmt werden müssen, um ein Überätzen zu vermeiden.

Betrachtet man das entsprechende rasterkraftmikroskopische Höhenprofil nach erfolgreicher Maskenbestrahlung und Ätzen eines

CBPT-SAMs, reflektiert die Höhendifferenz von 100 nm exakt die erwartete Schichtdicke des Goldsubstrats wieder (**Abb. 78a**). CBPT-SAMs eignen sich also als negativer Elektronenstrahlresist, und es lässt sich bei der verwendeten Dosis-Energie Kombination (40 mC/cm^2 bei 50 eV) ein nahezu 100-prozentiger Kontrast in der Ätzwirkung erzielen. Der Detailausschnitt in **Abb. 78b** zeigt zudem, dass auch der räumliche Kontrast hoch ist. Der Anstieg zwischen geätzten und nicht-geätzten Bereichen liegt bei unter 200 nm , was zum andern auch zeigt, dass sich die verwendete Maske (Quantifoil® TEM-Grids) sehr flach auf eine Probe montieren lässt und der CBPT-Resist eine laterale Auflösung von mindestens 200 nm erlaubt.

Um die Frage zu klären, welchen Einfluss die Elektronenenergie auf die zur Quervernetzung aromatischer SAMs benötigte Bestrahlungsdosis hat, wurde mit dem Elektronenstrahlschreiber ein Feld von Quadraten unterschiedlicher Dosis erzeugt. Dabei steigt die Bestrahlungsdosis in horizontaler und die Elektronenenergie in vertikaler Richtung. Das auf einem CBPT-SAM erzeugte Bestrahlungsmuster wurde in eine Ätzlösung getaucht und anschließend im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (**Abb. 79**).

Deutlich erkennbar ist der Kontrast zwischen den Bereichen, an denen der Goldfilm aufgelöst wurde und die Oberfläche des Silizium-Supports hervortritt, von den Flächen, an denen der Goldfilm stehen geblieben ist und die aufgrund der deutlich höheren Massenzahl von Gold heller erscheinen. Die Farbe der Rahmen in **Abb. 79** zeigt die Resistenz des jeweiligen Energie-Dosis Wertepaars gegenüber der Ätzlösung und ist damit ein Maß für den Grad der Quervernetzung. Der höchste Quervernetzungsgrad wird durch eine grüne Umrahmung

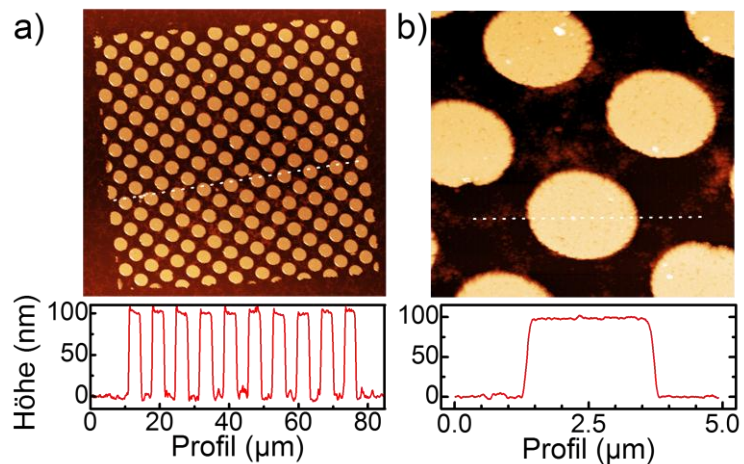


Abb. 78. CBPT-SAMs als negativer Resist für Elektronenstrahlithographie: (a) AFM-Bild mit Höhenprofil nach homogener Elektronenbestrahlung (50 eV) durch ein TEM-Grid und anschließendem Eintauchen in eine Goldätzlösung; (b) Detailausschnitt von (a).

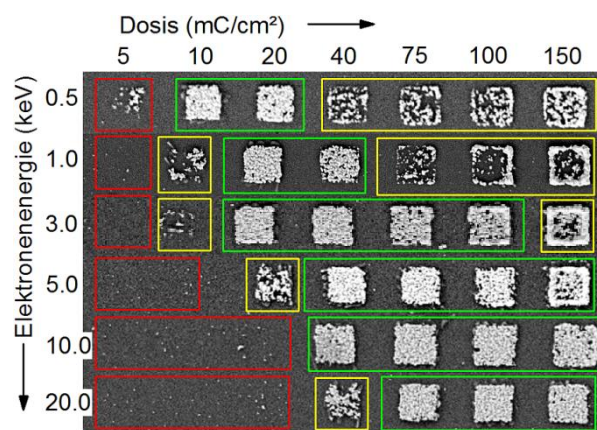


Abb. 79. REM-Abbildung nach dem Ätzen eines Feldes von Quadraten, das mit einem Elektronenstrahlschreiber in einen CBPT-SAM geschrieben wurde; die verwendeten Dosen steigen von links nach rechts an, während die verwendeten Elektronenenergien von oben nach unten zunehmen. Bereiche mit hoher Resistenz gegenüber der Ätzlösung sind grün markiert, Bereiche mit geringer und ohne sind entsprechend gelb bzw. rot umrandet.

angezeigt und liegt bei niedrigen Elektronenenergien zwischen 10-30 mC/cm². Er wandert bei Vergrößerung der Elektronenenergie zu höheren Dosen und liegt bei 20 keV schon im Bereich von mindestens 75 mC/cm². Auch beim Quervernetzungsgrad gibt es Bereiche mit unvollständiger bzw. so niedriger Quervernetzung, dass die Bereiche teilweise von der Ätzlösung angegriffen werden können (Abb. 79, gelb und rot markiert). Interessanterweise führt die Verwendung sehr hoher Dosen wieder zu einer Verringerung der Resistenz gegenüber der Ätzlösung. Dieser Effekt ist allerdings nur bei niedrigen Elektronenenergien sichtbar und resultiert aus der sukzessiven Zerstörung des quervernetzten Films durch fortwährende Bestrahlung. Dennoch ist die Wahl der richtigen Dosis in Bezug auf Quervernetzung relativ unkritisch, da die Bereiche mit ausreichender Resistenz wesentlich breiter sind als die der maximalen Dichte oberflächengebundener Aminogruppen (Abb. 75).

Zudem ist eine deutliche Korrelation in der Energieabhängigkeit von Quervernetzung und Effektivität der Reduktion zu beobachten, da beide Prozesse denselben Ursprung haben: Die Spaltung von σ -Bindungen im aromatischen Gerüst durch die in der Goldschicht erzeugten Sekundärelektronen. Die Wasserstoffradikale können die Nitrilgruppe reduzieren, während die verbleibenden Kohlenstoffradikale intermolekular quervernetzen.

5.1.4 Charakterisierung von 4'-Aminobiphenyl-4-thiol (ABPT) Monolagen

Monolagen aus 4'-Aminobiphenyl-4-thiol (ABPT-SAMs) sind vor allem dahingehend interessant, dass sie schon im unbestrahlten Zustand eine hohe Dichte oberflächengebundener Aminogruppen aufweisen. Sie stellen damit ein wichtiges Referenzsystem für elektronenstrahlithographische Experimente dar. Als Monolagen mit einem aromatischen Gerüst führt die Bestrahlung mit Elektronen ebenfalls zu einer Quervernetzung, wobei der

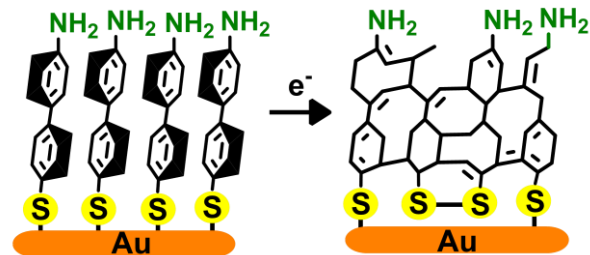


Abb. 80. 4'-Aminobiphenyl-4-thiol (ABPT) SAMs und ihre Reaktion auf Elektronenbestrahlung.

bestrahlte Film aber weiterhin eine hohe Anzahl von NH₂-Gruppen tragen sollte (**Abb. 80**). Die Präparation von ABPT-SAMs war lange schwierig, da das Aminobiphenylthiol Monomer nicht sauber synthetisiert werden konnte und ABPT-SAMs zu Bildung von Doppellagen (Bilayer) neigen. Dennoch konnte 4'-Aminobiphenyl-4-thiol (ABPT) als Substrat durch chemische Reduktion von 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol (NBPT) erstmals sauber hergestellt werden. In trockenem DMF als Lösungsmittel ließen sich dann ABPT-SAMs auf einem Au(111)-Substrat präparieren.

Abb. 81 zeigt die Synchrotron-basierten *ex-situ* HRXPS-Spektren unbestrahlter (untere Reihe) und bestrahlter ABPT-SAMs (obere Reihe). *Ex-situ* bedeutet in diesem Zusammenhang, dass Elektronenbestrahlung und Messung nicht in derselben UHV-Kammer durchgeführt wurden, sondern dass die Proben zwischenzeitlich unter Raumbedingungen gelagert wurden. Zur Überprüfung der Qualität von ABPT-SAMs wird das S 2p-Spektrum des Schwefels verwendet. Bei unbestrahlten SAMs darf es nur aus einem einzigen Duplett mit der Aufspaltung von 1.2 eV und der für SAMs charakteristischen Bindungsenergie von 162.1(±0.1) eV für die S 2p_{3/2}-Emission bestehen (**Abb. 81a**). Die Bindungsenergie ist charakteristisch für die Schwefel-Gold-Bindung von Thiol-SAMs und kann leicht von oxidiertem Schwefel bzw. von Thiolen unterschieden werden, die nicht an Gold gebunden sind. Eine zusätzliche S 2p_{3/2}-Emission bei ~163.5 eV deutet auf freies Thiol hin, das nicht (mehr) an Gold gebunden ist¹⁴⁹ und zu einer schlechteren Qualität der Monolagen führt. Das Schwefelspektrum

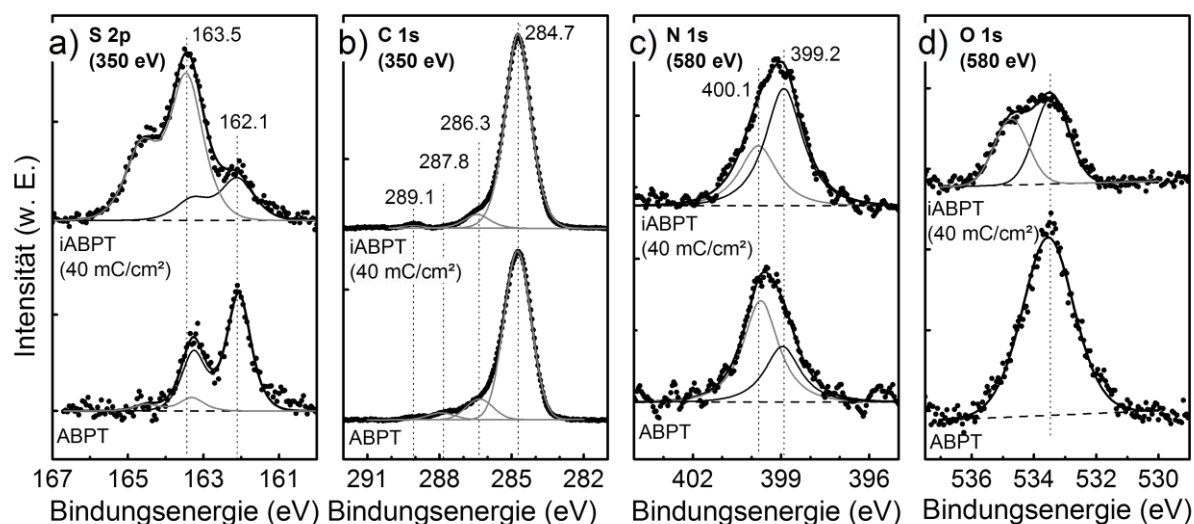


Abb. 81. *Ex-situ* gemessene HRXPS-Spektren von ABPT-SAMs vor (untere Reihe) und nach (obere Reihe) der Bestrahlung mit Elektronen (Energie $E = 50$ eV und Dosis $D = 40$ mC/cm²): Die Schwefel S 2p (a) und Kohlenstoff C 1s (b) Spektren wurden bei einer Photonenenergie von 350 eV, die Stickstoff N 1s (c) und Sauerstoff O 1s (d) Spektren bei einer Photonenenergie von 580 eV aufgenommen.

einer ABPT-Monolage wird genau vom dem für SAMs typischen Duplett bei von 162.1 eV für die S 2p_{3/2}-Emission dominiert. Der geringe Anteil an freiem, ungebundenem Thiol bei 163.3 eV liegt unter 5 % und stammt wahrscheinlich von ABPT-Molekülen, die auf der Oberfläche des Monolayers liegen. Da deren Schwefel nicht abgeschwächt wird, ist ihr Anteil noch geringer.

Das C 1s-Spektrum des Kohlenstoffs in **Abb. 81b** ist geprägt von einer Hauptemission bei 284.7 eV, die sich den 10 aromatischen Kohlenstoffatomen pro ABPT-Molekül zuordnen lässt, die nicht an ein elektronegatives Heteroatom gebunden sind. Die Schulter auf der höherenergetischen Seite besteht zum einem aus dem Signal bei 286.3 eV, das von den beiden Kohlenstoffatomen der Biphenylrings stammt, die die Amino- bzw. Thiolgruppe tragen. Die weiteren schwachen Signale bei 287.8 eV und 289.1 eV können von adsorbiertem CO₂ resultieren oder es handelt sich um so genannte shake-up Signale, die oftmals im C 1s-Spektrum aromatischer Monolagen auftreten.¹⁵⁰

Das N 1s-Spektrum des Stickstoffs zeigt ein breites Signal, dem sich zwei individuelle Stickstoffspezies zuordnen lassen (**Abb. 81c**). Das niederenergetische Signal bei 399.2 eV ist auf eine freie NH₂-Gruppe zurückzuführen, während das Signal bei 400.1 eV von dem Stickstoff einer Aminogruppe herrührt, an die wahrscheinlich Wasser oder Kohlendioxid aus der Umgebung koordiniert ist. Solche Doppelpicks mit einem willkürlichen Intensitätsverhältnis der beiden Stickstoffspezies treten bei Amin-terminierten SAMs häufig auf.¹⁵¹⁻¹⁵²

Obwohl ABPT-SAMs im O 1s Sauerstoffbereich eigentlich kein Signal beinhalten sollte, lassen sich dennoch nicht unbedeutende Mengen auf der Monolage nachweisen (**Abb. 81d**). Derartige Sauerstoffverunreinigungen sind für Amino-terminierte SAMs nicht ungewöhnlich und treten beispielsweise bei Monolagen aliphatischer 11-Aminoundecanthiole (AUDT) oder bestrahlter NBPT-SAMs auf, die atmosphärischen Bedingungen ausgesetzt waren. Ursache für den Sauerstoff sind Adsorbate aus der Luft (Wasser oder Kohlendioxid), die sich in unbestimmten Mengen auf der Oberfläche Amino-terminierter Monolagen anlagern.

Nach der Bestrahlung des ABPT-SAMs mit 40 mC/cm² bei 50 eV, zeigt vor allem das S 2p-Signal die typischen, strahlungsbedingten Veränderungen (Abb. 81a) wie sie auch bei der Elektronenbestrahlung anderer Thiol-basierender SAMs beobachtet werden.¹⁵³ Der beträchtliche Anstieg der Schwefelspezies bei 163.5 eV lässt den Schluss zu, dass der größte Teil des Schwefels nach der Bestrah-

lung nicht mehr an das Gold gebunden ist, sondern sich entweder als Disulfid oder freies Thiol in der Kohlenstoffmatrix befindet. Bemerkenswert ist allerdings der hohe Anteil dieser Schwefelspezies nach der Bestrahlung mit 40 mC/cm^2 . Er beträgt $\sim 70\%$ und damit wesentlich mehr als für andere Thiol-aromatische SAMs nach Bestrahlung mit gleicher Dosis gefunden wurde. So wurden beispielsweise für Biphenylthiol Monolagen oder für 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol-SAMs nur Werte um 40% erhalten.¹⁵⁴⁻¹⁵⁵

Die Veränderungen des Kohlenstoff C 1s und des Stickstoff N 1s-Signal sind nur marginal. Beim Sauerstoff nimmt die Intensität dagegen nach der Bestrahlung ab, während es bei den Schwefel-, Kohlenstoff- und Stickstoffsignalen zu einer Zunahme kommt, was sich mit Hilfe der Adsorbate auf der ABPT-Monolage erklären lässt. Diese desorbieren zwar während der Bestrahlung im UHV, da die Proben vor der HRXPS-Messung der Umgebung ausgesetzt waren, ist es zu einer erneuten Adoption von Bestandteilen der Luft gekommen. Dennoch scheinen bestrahlte iABPT-Filme eine geringere Neigung aufzuweisen, wieder Adsorbate aus der Umgebung aufzunehmen, was dann zu den beobachteten Intensitätsanstiegen der Signale des bestrahlten Films bei gleichzeitig gesunkener O 1s Intensität führt. Zudem zeigt das N 1s-Spektrum von iABPT (Abb. 81c) einen höheren Anteil an freiem NH_2 -Stickstoff. Das korreliert auch mit dem Verhalten von aliphatischen, Amino-terminierten SAMs, die durch Bestrahlung bezüglich ihrer Nukleophilie aktiviert werden können.²²

In **Abb. 82** sind die XPS Resultate einer *in-situ* Messung gezeigt. Das heißt, Bestrahlung und XPS-Messungen wurden unmittelbar nacheinander in derselben UHV-Kammer durchgeführt. Die dosisabhängige Schichtdicke (Abb. 82a) des ABPT-Films wurde anhand der Abschwächung des Au 4f Signals im Vergleich zu der bei Alkanthiolen mit bekannter Filmdicke bestimmt. Die liegen vor allem bei den unbestrahlten ABPT-SAMs mit 18.7 \AA deutlich über denen vergleichbarer NBPT oder CBPT-SAMs, bei denen entsprechenden Filmdicken von nur $14\text{-}15 \text{ \AA}$ beobachtet werden.¹⁵⁵

Die zusätzliche Schicht von $\sim 4 \text{ \AA}$ bei ABPT-SAMs stammt von den auf der Oberfläche adsorbierten Molekülen, deren strahlungsinduzierte Desorption auch zu der Abnahme der Schichtdicke von 3 \AA bei einer Dosis von 40 mC/cm^2 führt. Gleichzeitig nehmen die Intensitäten der Kohlenstoff- und Stickstoffsignale zu, während die des Sauerstoffs abnimmt (Abb. 82 b-d). Damit ist die strahlungsbedingten Verminderung der Schichtdicke bei ABPT-SAM fast ausschließlich auf die Desorption der Adsorbate zurückzuführen.

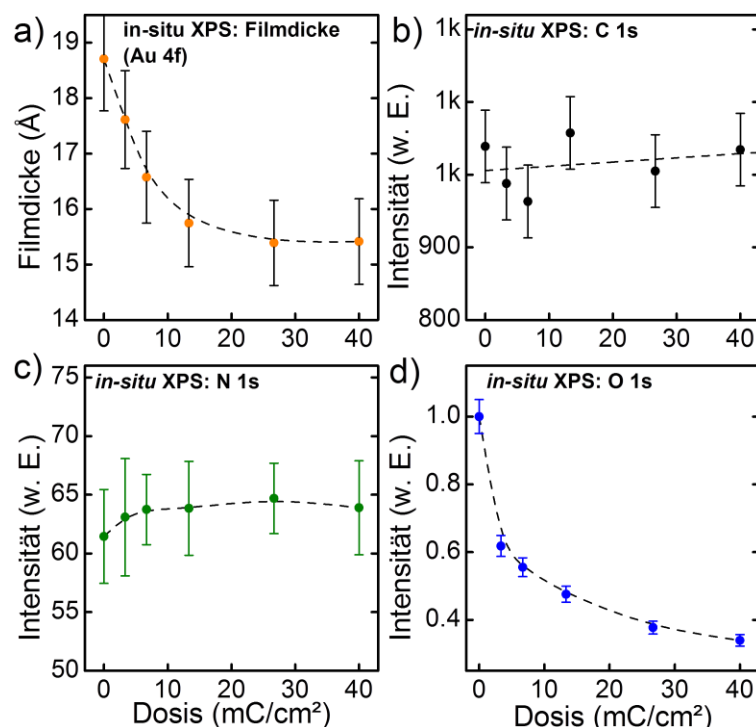


Abb. 82. Dosisabhängige *in-situ* XPS Intensitäten von ABPT-SAMs bei Elektronenbestrahlung mit 50 eV ; (a) Schichtdicke anhand der Abschwächung von Au 4f; (b) C 1s bei 284.7 eV ; (c) N 1s bei 399.0 eV ; (d) O 1s bei 536.7 eV .

In **Abb. 83** sind die Veränderungen der Signalintensitäten für *in-situ* XPS und *ex-situ* HRXPS Messungen von ABPT-SAMs nach der Bestrahlung mit 40 mC/cm^2 noch einmal zusammengefasst. Die quantitativen und qualitativen Veränderungen der Signale sind ähnlich bzw. gleich. Nur für das Sauerstoffsignal ergibt sich eine signifikant größere Abnahme bei der *in-situ* XPS-Messung, da es nach Bestrahlung zu keiner erneuten Adsorption kommen kann. Die quantitativ größeren Veränderungen bei den HRXPS-Messungen zwischen den bestrahlten und nicht-bestrahlten Probe resultieren zudem aus der niedrigeren Photonenenergie bei einer HRXPS-Messungen (hier 580 eV gegenüber 1256 eV für XPS-Messungen) und damit einer deutlich höheren Oberflächensensitivität der emittierten Photoelektronen.

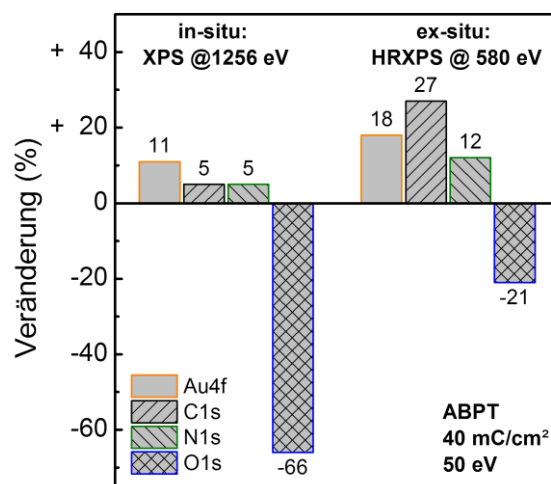


Abb. 83. Vergleich strahlungsbedingter Veränderungen von *in-situ* gemessenen XPS-Intensitäten bei einer Photonenenergie von 1256 eV (links) und *ex-situ* gemessenen HRXPS-Intensitäten (rechts) bei einer Photonenenergie von 580 eV.

Die Röntgen-Nahkanten-Absorption-Spektroskopie (NEXAFS) ist eine der wichtigsten spektroskopische Methoden, um nicht nur die elektronische Struktur von SAMs, sondern auch deren strukturelle Uniformität zu untersuchen, die sich beispielsweise in einem einheitlichen Tiltwinkel der Moleküle äußert. **Abb. 84a** zeigt die NEXAFS-Spektren eines ABPT-SAMs an der Kohlenstoff K-Kante (C K-edge) bei unterschiedlichen Einfallswinkeln des Photonenstrahls. Es lassen sich drei Übergänge identifizieren. Die stärkste Resonanz $C 1s \rightarrow \pi_1^*(C-C)$ bei 285. eV (A) stammt von dem Übergang eines Elektrons aus der K-Schale in das erste leere, antibindende Molekülorbital (LUMO) des Biphenylrings. Der Übergang bei 288.5 eV (B) resultiert aus dem entsprechenden Übergang in das zweite, antibindende MO des Rings. Das breite Signal bei ~ 293 eV (C) ist typisch für den $C 1s \rightarrow \sigma^*(C-C)$ Übergang in antibindende σ^* -MO. Der Grad der Ordnung, den die Moleküle eines SAMs bezüglich der Oberfläche einnehmen, zeigt sich in einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Dichroismus, der sich aus den Differenzspektren bei senkrechtem (90°) und streifendem (20°) Einfallswinkel bestimmen lässt (**Abb. 84a**, unten). π^* -MOs, deren Übergangsdipolmoment (TDM) senkrecht zur Oberflächennormalen stehen, zeigen einen positiven Dichroismus, während σ^* -MOs, deren TDM parallel zur Oberflächennormalen stehen, einen negativen Dichroismus zeigen.

Anhand der Winkelabhängigkeit der Spektren lässt sich zudem der Tiltwinkel bestimmen, den die Moleküle einer Monolage bezüglich der Oberflächennormalen einnehmen. Dazu trägt man das Verhältnis der Intensitäten eines Übergangs (am besten diejenigen mit der höchsten Intensität) gemessen bei verschiedenen Einfallswinkeln α relativ zur Intensität des Übergangs bei senkrechtem Einfallswinkel gegen den Wert des Einfallswinkels α auf (**Abb. 85**). Die Punkte werden an Gleichung 18 gefittet und man erhält als freien Parameter den Tiltwinkel. Für ABPT-SAMs wurde dieser mit $37.1^\circ (\pm 0.7^\circ)$ bestimmt. Der Wert liegt in der Größenordnung anderer aromatischer Thiol-SAMs auf Gold, für die Tiltwinkel zwischen $32^\circ - 40^\circ$ ermittelt wurden.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷

Nach der Bestrahlung (iABPT) ändert sich das NEXAFS-Spektrum der Kohlenstoffkante im Vergleich zu unbestrahltem ABPT vor allem darin, dass die Feinstruktur weniger ausgeprägt und die Intensitäten der π^* -Resonanzen schwächer geworden sind (**Abb. 84b**). Am auffälligsten ist aber das Fehlen eines Dichroismus. Das Differenzspektrum weist nur noch wenige Details auf. Nach der

Bestrahlung ist die hohe, SAM-typische Ordnung fast vollständig verloren gegangen, weshalb man daher nach der Bestrahlung besser von ABPT-Filmen spricht.

Betrachtet man das unter 55° (magischer Winkel) aufgenommene Spektrum der Stickstoff K-Kante, erkennt man bei dem bestrahlen wie bei dem unbestrahlten ABPT-SAM/Film zwei Resonanzen: Bei 410 eV einen σ^* -Übergang und interessanterweise bei 399.5 eV einen π^* -Übergang. Da diese Resonanz bei SAMs aliphatischer Aminoalkanthiole nicht oder nur schwach auftritt,¹⁵⁶ ist sie damit zu erklären, dass das freie Elektronenpaar des Stickstoffs teilweise als π -Bindung mit dem aromatischen Biphenylgerüst verbunden ist. Diese Verknüpfung ist nach der Bestrahlung sogar noch ausgeprägter.

Es lässt sich festhalten, dass mittels HRXPS und NEXAFS gezeigt werden konnte, dass sich ABPT-SAMs in hoher Qualität herstellen lassen. Die Monolagen zeigten keine Tendenz zur Multilagenbildung und es waren nur Spuren von ABPT-Molekülen nachweisbar, die nicht als SAM auf der Oberfläche gebunden waren. Die hohe Qualität zeigte sich auch in dem Dichroismus der NEXAFS-Spektren und einer einheitlichen Ausrichtung der Moleküle von 37° bezüglich der Oberflächennormalen.

Bestrahlung mit niederenergetischen Elektronen führte zu einem für aromatische SAMs charakteristischen Verhalten wie dem Erscheinen einer zweiten Schwefelspezies, ein nur sehr geringer Materialverlust aufgrund von Quervernetzung einhergehend mit dem beinahe völligen Verschwinden jeglicher Ordnung innerhalb des Film.

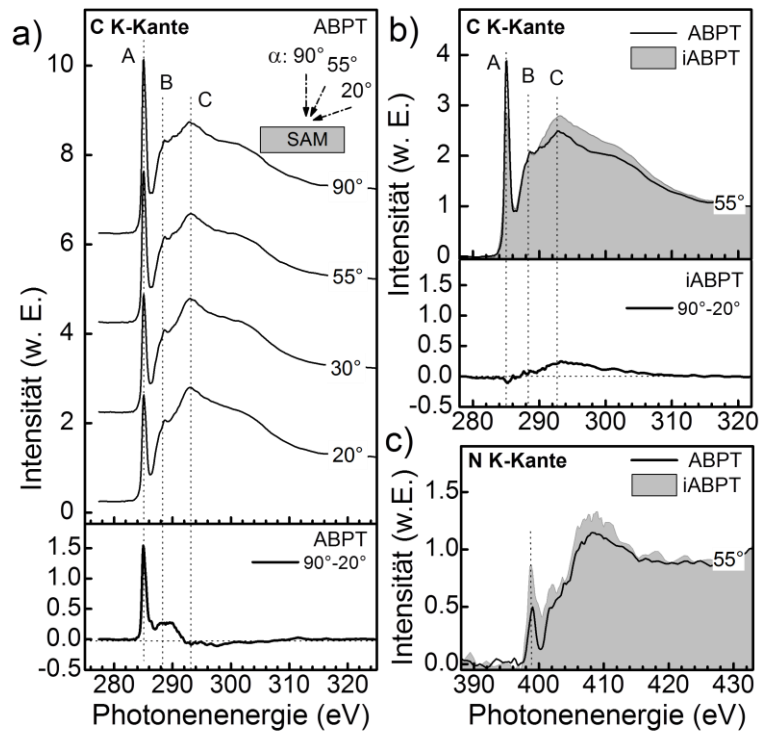


Abb. 84. Ex-situ NEXAFS-Spektren von unbestrahlten und bestrahlten (40 mC/cm^2) ABPT-SAMs; (a) Spektren an der C K-Kante von ABPT unter verschiedenen Einfallswinkeln des Röntgenstrahls (oben) sowie das Differenzspektrum von senkrechtem und streifendem Einfall (unten); (b) Spektren an der C K-Kante vor (schwarze Linie) und nach (grau schraffierte Fläche) der Bestrahlung (oben) und das entsprechende Differenzspektrum eines bestrahlten ABPT-Films; (c) Spektren der N K-Kante vor (schwarze Linie) und nach der Bestrahlung (grau schraffierte Fläche).

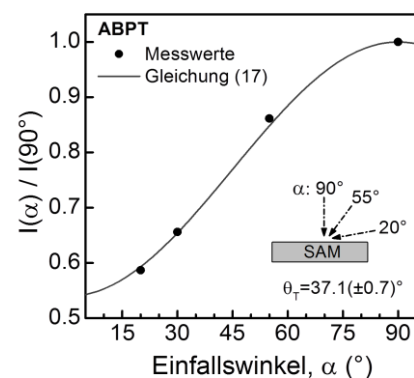


Abb. 85. Bestimmung des Tiltwinkels von ABPT-SAMs aufgrund des Dichroismus von NEXAFS Differenzspektren an der C K-Kante.

5.1.5 Reaktivität oberflächengebundener Aminogruppen nach Elektronenbestrahlung

Funktionalisierte Oberflächen mit oberflächengebundenen Aminogruppen werden häufig als Substrat eingesetzt, um verschiedenste chemische Spezies, aber auch Biomoleküle wie Proteine immobilisieren zu können. In Abschnitt 5.1.1 wurde bereits gezeigt, dass sich Amino-terminierte SAMs als Substrat für die chemische Nanolithographie (EBCL) eignen. Zudem wird in Abschnitt 5.2 gezeigt, dass sie sich auch als mechanisch stabiler und dennoch ultradünner Trägerfilm zur Herstellung funktionalisierter Nanomembranen eignen. Dabei ist eine hohe Kopplungsdichte der an die Oberfläche anzubindenden Moleküle erstrebenswert, was mit einer möglichst hohen Dichte oberflächengebundener Aminogruppen zur Voraussetzung hat. Werden aromatische Nitro- oder Cyanobiphenylthiol-SAMs (NBPT und CBPT) als oberflächenaktives Material verwendet, entstehen die Aminogruppen erst nach einer externen Aktivierung durch Bestrahlung beispielsweise mit Elektronen. Weil durch Überbelichtung die Aminogruppen wieder zerstört werden, müssen Bestrahlungsdosis und Energie genau auf einander abgestimmt werden.

Amine sind sehr potente Nucleophile und reagieren nass-chemisch schon unter milden Bedingungen quantitativ mit Elektrophilen wie Säurechloriden, Anhydriden, Isocyanaten und Aldehyden. Bei leichtem Erwärmen reagieren sie ferner auch mit Epoxiden und Estern in guten Ausbeuten. Es ist daher zu erwarten, dass die Aminogruppen bestrahlter NBPT-SAMs mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) quantitativ reagieren. Neben der hohen Reaktivität gegenüber Aminen hat TFAA den Vorteil, dass sich dessen Kopplung an die Oberfläche aufgrund der Anwesenheit seiner Fluoratome bequem XPS-spektroskopisch anhand des Fluor-Stickstoff-Verhältnisses quantifizieren lässt. Der Gehalt an NH_2 -Stickstoff kann bei NBPT-SAMs einfach ermittelt werden, da das N 1s-Signal der Aminogruppe eine Bindungsenergie von ~ 399 eV hat, während die N 1s-Emission der Nitrogruppen eine Bindungsenergie von ~ 406 eV besitzt. Die entsprechenden XPS N 1s Spektren sind in **Abb. 86** für verschiedene Dosen einer Bestrahlung von NBPT gezeigt. Der unbestrahlte SAM enthält anfangs nur eine Stickstoffspezies, die sich aufgrund der hohen Bindungsenergie einer Nitrogruppe zuordnen lässt. Mit zunehmender Bestrahlung nimmt das NO_2 -Signal ab, während gleichzeitig ein zweiter Peak bei 399 eV auftritt, der von den entstehenden NH_2 -Gruppen herrührt. Bei einer Dosis von ~ 40 mC/cm^2 ist das Signal der Nitrogruppe fast vollständig verschwunden und das Spektrum weist nur den Peak der NH_2 -Gruppe auf. Der dosisabhängige Verlauf der Stickstoffspezies ist noch einmal in **Abb. 87** zusammengefasst. Mit Hilfe dieser Daten kann nun anhand des Fluor-Stickstoff-Verhältnisses die Ausbeute der Kopplung von TFAA an einen NBPT-SAM in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis bestimmt werden.

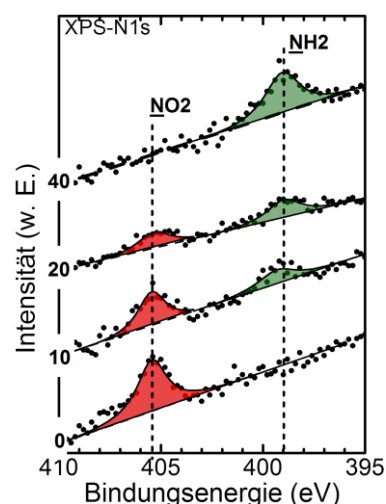


Abb. 86. XPS N 1s Spektren eines NBPT-SAM während der Elektronenbestrahlung (50 eV) mit 0, 10, 20 und 40 mC/cm^2 . Die Umwandlung terminaler Nitro- in Aminogruppen ist deutlich zu erkennen.

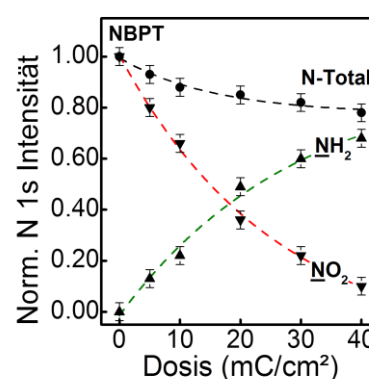


Abb. 87. Die normalisierten XPS-N 1s Intensitäten von NBPT während der Bestrahlung zeigen den die Umwandlung der Nitro- in eine Aminogruppe, aber auch den strahlungsinduzierten Verlust an Gesamtstickstoff.

Als Eck et al. TFAA an bestrahlte NBPT-SAMs koppelten und die Ausbeute per XPS bestimmten, erhielten die Werte von nur 50-70 % bezüglich der vorhandenen NH_2 -Gruppen.²³ Das ist insofern interessant, da HUTT und PAN übereinstimmend eine nahezu quantitative Kopplung von TFAA an OH-terminierter Alkanthiol-SAMs beobachteten.³¹⁻³² Zudem fanden KANKATE et al., dass Nitrogruppen von NBPT-SAMs, die mittels Vakuumabscheidung aus der Gasphase hergestellt waren, durch den bei der SAM-Bildung entstehenden Wasserstoffabspaltung der Thiolgruppe partiell reduziert waren.¹⁵⁸ Eine Derivatisierung der so präpartierten NBPT-SAMs mit TFAA lieferte ebenfalls quantitativen Umsatz. Das lässt zunächst den Schluss zu, dass der unvollständige Umsatz von elektronenstrahlreduzierten NBPT-SAMs nicht wie Eck vermutete alleine aufgrund der sterischer Hinderung der TFAA Moleküle begründet werden kann, da ja die OH-terminierten Alkanthiol-SAMs vollständig reagieren.

Um die Frage zu klären, ob der Prozess der Elektronenbestrahlung selber für die unvollständige Kopplung von TFAA an die bestrahlten NBPT-SAMs ursächlich ist, werden die Kopplungsexperimente zunächst an einem geeigneten Referenz-SAM durchgeführt. Dafür eignen sich besonders die im vorigen Abschnitt besprochenen Aminobiphenylthiol-Monolayer (ABPT-SAMs), da sie auch ohne Elektronenbestrahlung eine hohe Dichte oberflächengebundener NH_2 -Gruppen besitzen. Um zu untersuchen in wie weit sich eine Bestrahlung mit Elektronen auf die Reaktivität der Aminogruppen auswirkt, wurden ABPT-SAMs im unbestrahlten Zustand sowie nach der Bestrahlung mit 20 bzw. 40 mC/cm^2 in Trifluoressigsäureanhydrid gegeben. Um einen zusätzlichen sterischen Effekt durch das Anhydrid zu untersuchen, werden entsprechende Experimente zusätzlich mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) und Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) durchgeführt (Abb. 88b). Ferner wird die gleiche Derivatisierung an bestrahlten und unbestrahlten NBPT-SAMs durchgeführt und die Ausbeute der Kopplung XPS-spektroskopisch anhand des Fluor-Stickstoff-Verhältnisses bestimmt.

In Abb. 89a sind die F 1s-Intensitäten nach der Kopplung von TFAA, PFPA und HPBA an unbestrahlte- sowie bestrahlte ABPT-SAM gezeigt. Wie erwartet, nehmen die Fluorintensitäten mit

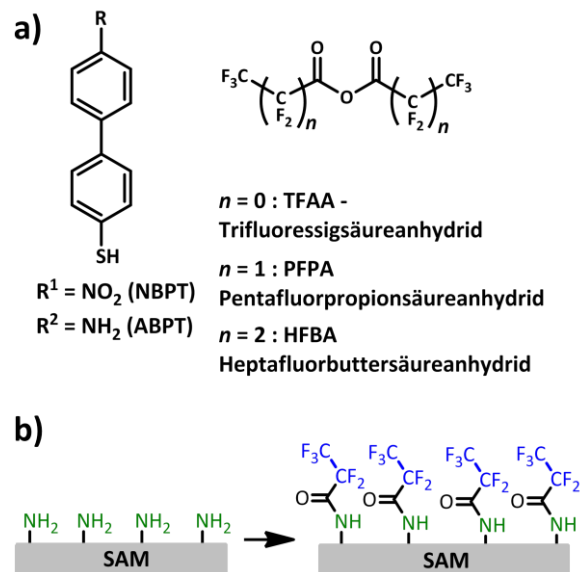


Abb. 88. (a) Für die Derivatisierung verwendeten amino-terminierten SAMs (ABPT, NBPT und CBPT), sowie die perfluorierten Anhydride TFAA, PFPA und HFBA. (b) Schema der Derivatisierung einer Amino-terminierten Oberfläche mit TFAA.

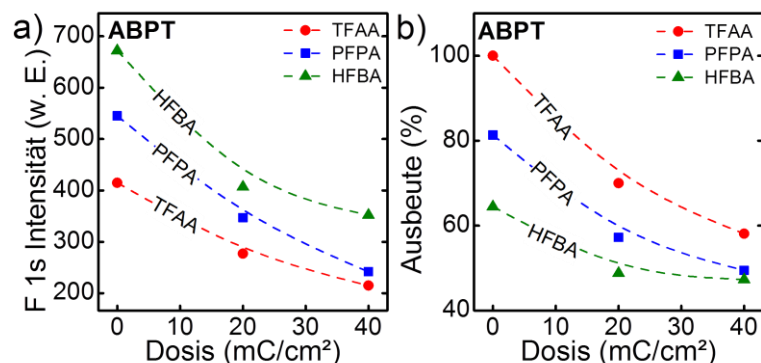


Abb. 89. Dosisabhängigkeit der Derivatisierung von ABPT-SAMs mit TFAA, PFBA und HFBA: (a) zeigt die XPS F 1s-Intensitäten nach der Kopplung und (b) die daraus berechneten, dosisabhängigen Kopplungsausbeuten der drei Anhydride.

steigender Dosis ab, da es zu einem strahlungsbedingten Verlust von Aminogruppen kommt. Deutlich ist für alle drei Derivatisierungssubstanzen ein gleichförmiges Absinken der Fluorintensitäten um ca. 40-50 % erkennbar, wenn man das Reagenz anstatt an einen unbestrahlten ABPT-SAM an einen mit 40 mC/cm² bestrahlten ABPT-Film koppelt. Ferner ist die F 1s-Intensität umso größer, je mehr

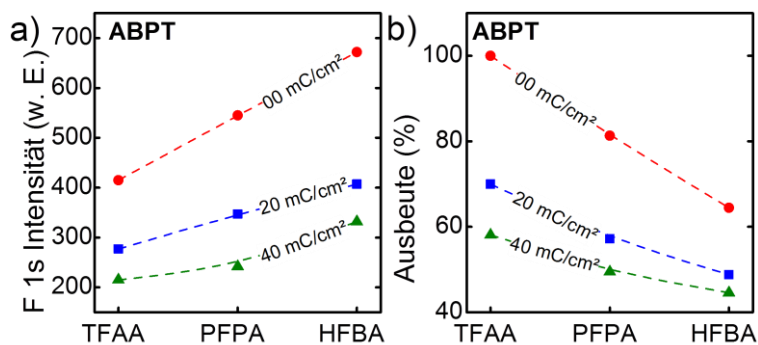


Abb. 90. Sterischer Effekt der Derivatisierung von ABPT-SAMs mit TFAA, PFPA und HFBA: (a) zeigt die XPS F 1s-Intensitäten nach der Kopplung und (b) die daraus berechneten Kopplungsausbeuten der verschiedenen großen Anhydride mit steigender Dosis.

Fluor das Derivatisierungsreagenz beinhaltet, was zeigt, dass der sterische Einfluss des Anhydrids begrenzt zu sein scheint. Um die gemessenen Fluorintensitäten mit der Anzahl oberflächengebundener Aminogruppen des ABPT-SAMs korrelieren und so die Ausbeute der Kopplung bestimmen zu können, muss die Intensität des F 1s Signals *nach* der Kopplung zu der der N 1s-Emission *vor* der Kopplung in Beziehung gesetzt werden. Damit wird vermieden, dass die Abschwächung des N 1s Signals durch das darüberliegende Perfluoramid in Betracht gezogen werden muss. Um das stöchiometrische Fluor-Stickstoff-Verhältnis und damit die Ausbeute der Kopplung zu bestimmen, müssen die F 1s- und N 1s-Intensitäten jeweils mit ihrem Wirkungsquerschnitt korrigiert werden. Dieser wird dann durch das stöchiometrische Fluor-Stickstoff-Verhältnis dividiert (3 für TFAA, 5 für PFPA und 7 für HFBA). Die dosisabhängigen Ausbeuten für die Kopplung an ABPT sind in **Abb. 89b** dargestellt.

Für die Kopplung von TFAA an den unbestrahlten ABPT-SAM ergibt sich eine quantitative Kopplung von 100 %. Es ist zusätzlich erkennbar, dass die Größe des Anhydrides doch einen Einfluss auf die Ausbeute hat. Diese sinkt auf bei 83 % bei PFPA und auf 68 % bei HFBA. Was sich in der vorigen Abbildung als Trend schon andeutet, wird jetzt deutlich: Ein Absinken der Ausbeute bei steigender Dosis. Für TFAA sind bei 40 mC/cm² nur noch 58 % der NH₂-Gruppen erreichbar. Etwas schwächer ist der Trend ausgeprägt für die größeren Anhydride mit 47 % Umsatz für PFPA und 41 % für HFBA bei Verwendung derselben Dosis.

Da im Fall der unbestrahlten ABPT-SAMs stets die höchsten Ausbeuten erzielt werden, kann der geringe Kopplungsgrad bestrahlter ABPT-Filme nicht mit dem sterischen Anspruch der Anhydride begründet werden. Trägt man die entsprechenden Kopplungsausbeuten bei konstanter Dosis gegen die Größe der Anhydride auf (**Abb. 90**), so erkennt man, dass im Gegenteil der sterische Effekt mit zunehmender Dosis sogar kleiner wird (erkennbar an der geringeren Steigung bei en höheren Dosen), da die verbleibenden, aktiven NH₂-Gruppen weniger dicht gepackt sind und der sterische Einfluss der Kopplungsreagenzien nivelliert wird (**Abb. 90**).

Entsprechende Derivatisierungsexperimente wurden auch mit NBPT-SAMs durchgeführt. Diese besitzen im unbestrahlten Zustand keine oberflächengebundenen Aminogruppen und sollten daher bei ihrer Derivatisierung kein Fluor im Spektrum zeigen. Dennoch sieht man in **Abb. 91a**, dass es auch bei unbestrahlten NBPT-SAMs zu einer gewissen Kopplung von TFAA, PFPA und HFBA gekommen ist. Das ist ein klares Indiz dafür, dass die Nitrogruppen von NBPT-SAMs auch bei nasschemischer SAM-Präparation zu einem kleinen Anteil reduziert werden. Mit einsetzender Bestrahlung steigen die F 1s-Intensitäten nach den Kopplungsexperimenten zunächst steil an und erreichen

bei 20-30 mC/cm² ihre Maxima, um bei weiter steigender Dosis allmählich wieder abzunehmen. Es fällt zunächst auf, dass die Verläufe der Fluorintensitäten in Abb. 91 deutliche Ähnlichkeiten zu den Höhenprofilen der Polymerbürsten von Abb. 71 aufweisen, was zu erwarten ist, da in beiden Fällen eine elektrophile Komponente an durch Bestrahlung erzeugte, oberflächengebundene Aminogruppen eines NBPT-SAMs gekoppelt wurde.

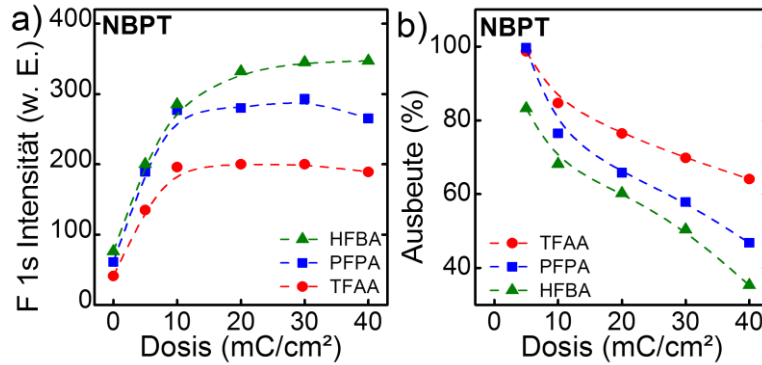


Abb. 91. Dosisabhängigkeit der Derivatisierung von NBPT-SAMs mit TFAA, PFBA und HFBA: (a) zeigt die XPS F 1s-Intensitäten nach der Derivatisierung und (b) die daraus berechneten Kopplungsausbeuten der drei Anhydride mit steigender Dosis.

Während in Abschnitt 5.1.1 das Interesse aber nur auf die Dichte (chemisch aktiver) Aminogruppen gerichtet war, soll hier zusätzlich die Kopplungsausbeute bestimmt werden. Und da ergibt sich in **Abb. 91b** ein eindeutiges Resultat. Wie bei den ABPT-SAMs nimmt auch bei NBPT die Ausbeute der Kopplung der Anhydride mit steigender Dosis ab. Für TFAA beispielsweise ist die Kopplung bei 5 mC/cm² annähernd quantitativ und erreicht bei maximaler Bestrahlung schließlich einen Wert von nur noch ~70 %, was gut mit den Wertes übereinstimmt, die Eck et al. erhalten haben.²³

Die dosisabhängigen Ausbeuten der Derivatisierungsexperimente von ABPT- und NBPT-SAMs führt zu der interessanten Erkenntnis, dass NH₂-Gruppen bei Elektronenbestrahlung nicht nur durch strahlungsinduzierte Bindungsspaltung verloren gehen können, sondern zusätzlich eine strahleninduzierte Deaktivierung stattfindet. Der XPS-spektroskopisch detektierte Stickstoff bei 399-400 eV besteht also aus Aminogruppen, die für elektrophile Kopplungsreagenzien zugänglich sind (aktive Aminogruppen) und einer Stickstoffspezies, die nicht reagieren kann (inaktive Aminogruppen). Ob diese nur aus sterischen Gründen nicht zugänglich sind, oder ob es sich um eine chemisch unreaktive Stickstoffspezies (z.B. tertiäre Amine) handelt, kann anhand der durchgeführten Experimente nicht ermittelt werden.

Mit Hilfe der Hypothese der inaktiven Aminogruppen erklärt sich auch das größere Absinken der Ausbeute von bestrahlten ABPT-SAMs (100 % Ausbeute bei 0 mC/cm² und 58 % bei 40 mC/cm²) im Vergleich zu den NBPT-SAM (100 % und 70 % bei gleichen Dosen). Im Fall von NBPT-SAMs werden während der Bestrahlung fortwährend neue, aktive Aminogruppen gebildet, während bei den ABPT-SAMs deren Anzahl festgelegt ist. Daher liegen die *Kopplungsausbeuten* bei bestrahlten ABPT-SAMs stets unter denen von NBPT-SAMs, während die *Kopplungsdichten* bei ABPT wegen der größeren Anzahl aktiver Aminogruppen höher sind.

Es kann festgehalten werden, dass oberflächengebundene Aminogruppen durch Elektronenbestrahlung teilweise inaktiviert werden. Das äußert sich bei ABPT-SAMs in einer kontinuierlich abnehmenden Reaktivität der vorhandenen Aminogruppen. Das zeigt sich beispielsweise, indem man P-NIPAM Polymerbürsten auf einem ABPT-SAM wachsen lässt, den homogen durch ein TEM-Grid bestrahlt wurde (**Abb. 92a**). Es ergibt sich ein zu NBPT-SAMs inverses Höhenprofil.

Zuletzt in **Abb. 92b** dargelegt, dass sich auch ABPT-Monolagen wie für aromatische SAMs erwartet als negatives Resist-Material für der Elektronenstrahlolithographie eignen. Nach Bestrahlung durch eine Maske mit 2 µm Lochgröße kann der Film mit einer Goldätzlösung entwickelt werden und das Goldsubstrat bleibt nur an den bestrahlten Regionen stehen.

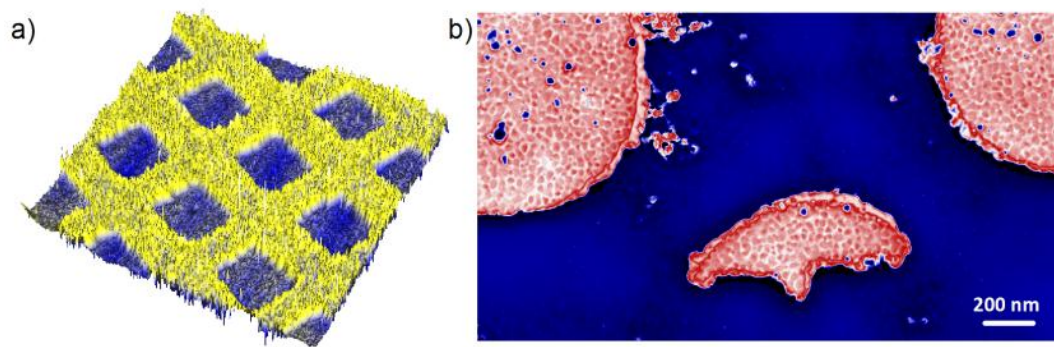


Abb. 92. (a) AFM Bild von P-NIPAM-Polymerbürsten auf einem ABPT-SAM, der durch TEM-Grid mit quadratischen Öffnungen ($10\mu\text{m}$) bei 50 eV mit 40 mC/cm^2 bestrahlt wurde; (b) REM Bild von ABPT-SAMs als negatives Resist Material nach Bestrahlung durch eine TEM-Grid mit $2\mu\text{m}$ großem Löchern (Quantifoil® R2/2) mit Elektronen der Energie 50 eV als Nachweis einer elektronenstrahlinduzierten Quervernetzung.

5.2 Biokompatible Nanomembranen auf Basis quervernetzter SAMs

Eine besondere Herausforderung im Grenzgebiet von Oberflächenchemie und Biologie ist die Herstellung biokompatibler Materialien, die inert gegenüber unspezifischer Proteinadsorption und Zelladhäsion sind. Insbesondere bei der Untersuchung der Struktur von Proteinen, die mittels eines spezifischen Rezeptors oder Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert sind, ist es wichtig, die Wechselwirkung des Proteins mit dem Substrat zu minimieren. Andernfalls werden die Ergebnisse nicht die tatsächliche Wirkungsweise des Biomoleküls widerspiegeln, sondern Artefakte aufgrund von Denaturierung und Entfaltung des Proteins.

Eine wichtige Methode zur Untersuchung biologischer Proben wie Proteine, Zellen oder Viren ist die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ Diese mikroskopische Methode erlaubt Auflösungen bis in den Sub-Nanometerbereich. Bei einem TEM-Experiment wird die Probe auf einem Träger fixiert und von einem homogenen, hochenergetischen Elektronenstrahl (50–200 keV) durchleuchtet, der dabei entsprechend der Dichte der Probe abgeschwächt und von einem unterhalb der Probe angebrachten Detektor aufgenommen wird

(**Abb. 93**). Da bei dieser „Durchlicht“-Geometrie das Gesamtbild aus Probe und Träger zusammengesetzt ist, muss der Trägerfilm möglichst dünn und hochtransparent für Elektronen sein, um die Information der Probe nicht zu überdecken. Daher bestehen kommerziell erhältliche, befilmte TEM-Grids meist aus einem ~10 nm dünnen Kohlenstofffilm. Dieser ist allerdings nicht biokompatibel. Daher ist es in Hinblick auf die Untersuchung von Proteinen wünschenswert, einen biokompatiblen TEM-Support zu entwickeln, der die folgenden Eigenschaften aufweist:

- *ultradünn und aus einem Material mit geringer Massenzahl („low-Z“-material)*
- *freistehend über Flächen von mindestens $5 \mu\text{m}^2$, um die Membran auf kommerziell erhältliche Gitterstrukturen (TEM-Grids) spannen zu können*
- *homogenen und amorphen Charakter, um Bildverzerrungen durch geordnete, kristalline Strukturen zu vermeiden*
- *mindestens eine biokompatible Seite, um die Denaturierung deponierter Proteine zu verhindern.*

Als Ansatz zur Herstellung ultradünner Membranen werden aromatische SAMs verwendet, da sich diese leicht funktionalisieren und freistehend als Membran präparieren lassen. Folglich besteht das hier gezeigte Verfahren zur Herstellung biokompatibler Nanomembranen aus zwei Stufen: Präparation eines quervernetzten, proteinresistenten Films, der dann im nächsten Schritt von seinem Substrat abgehoben und auf ein TEM-Grid übertragen wird.

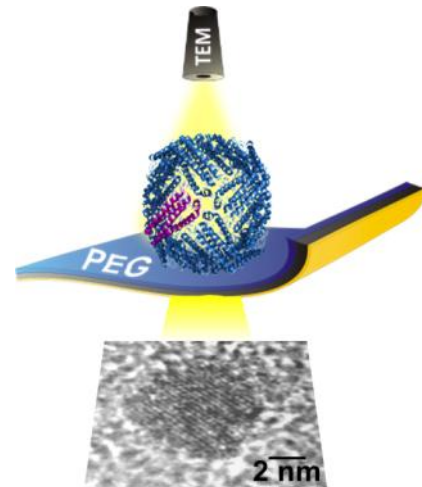


Abb. 93. Aufbau eines TEM-Experiments: Ein Elektronenstrahl durchleuchtet die auf einem Träger platzierte Probe und ein darunter befindlicher Detektor wandelt diesen in ein Bild des Objekts um.

5.2.1 PEGylierung selbstaggregierender Monolagen

Biokompatible oder proteinabweisende SAMs sind lange bekannt und bestehen meist aus Oligoethylenglykol-terminierten Alkanthiolen.^{17, 119, 121} Dabei sind die Alkylketten für die Stabilität des SAMs verantwortlich, während die Ethylenglykol-Einheiten (EG-Einheiten) der Grenzfläche des SAMs proteinabweisende Eigenschaften verleihen. Ein System mit Undecanthiol ($\text{HS-C}_{11}\text{H}_{22}\text{-R}$) als aliphatischer Gruppe wurde erstmals von PRIME et al. systematisch auf seine proteinabweisenden Eigenschaften untersucht. Es wurde gezeigt, dass bereits fünf EG-Einheiten ausreichen, den SAM bei einer Gesamtdicke von nur 2 nm gegenüber der Adsorption von Fibrinogen resistent zu machen.¹⁷ Es ist daher konsequent, Polyethylenglykole mit ihren biokompatiblen Eigenschaften an Amino-terminierte und quervernetzte aromatische SAMs, wie sie im letzten Abschnitt besprochen wurden, zu koppeln. Wegen ihrer hohen mechanischen Stabilität sollten die PEGylierten Filme auch ohne Substrat existieren können und sich für die Herstellung biokompatibler Membranen eignen.

Dieser Methodologie folgend, besteht die erste Herausforderung darin, ein Verfahren zu entwickeln, Polyethylenglykole (PEGs) derart an z.B. bestrahlte NBPT-SAMs zu koppeln, dass der gesamte Film proteinresistent wird. Zur Herstellung PEGylierter SAMs, also Monolagen mit einer PEG-Endgruppe, gibt es grundsätzlich drei Verfahren. Am einfachsten ist die *direkte Kopplung* eines SAM-bildenden Monomers, welches als Endgruppe bereits eine PEG-Gruppe trägt (**Abb. 94a**). Solche PEGylierten SAMs sind bekannt und kommerziell erhältlich. Sie haben einen Undecanthiol-Spacer (elf Methyleneinheiten) und tragen als Endgruppe 1-8 EG-Einheiten. Diese SAMs sind in der Literatur vielfach beschrieben und stellen eine sehr bequeme Möglichkeit zur Präparation biokompatibler Oberflächen dar.¹²⁵ Allerdings lässt sich solches System weder quervernetzen noch von seinem Substrat abheben und ist daher zur Membranherstellung ungeeignet.

Es muss daher ein Verfahren entwickelt werden, einen NBPT-SAM nach der Bestrahlung mit einer PEG-Schicht zu versehen. Dazu kann man die Polymerisation direkt auf der mit einem geeigneten Initiator aktivierten Oberfläche des bestrahlten NBPT-SAMs ausführen („*Grafting-From*“-Technik, **Abb. 94b**). Der Vorteil dieses Verfahrens, das genau dem in Abschnitt 5.1.2 durchgeführten entspricht, liegt in der hohen Dichte der Polymerketten. Von Nachteil ist, dass es für Schichten unter 20 nm schlecht zu kontrollieren und somit für die geforderten 5-10 nm dicken PEG-Schichten nicht geeignet ist.

Als drittes bietet sich an, Polymere mittels „*Grafting-To*“-Methode an die Oberfläche zu binden (**Abb. 94c**). Dabei wird das entsprechend funktionalisierte Polymer als Ganzes an die Oberfläche gekoppelt und man behält so die vollständige Kontrolle über die Eigenschaften des Polymers (Molmasse, Dispersität). Es lassen sich aber mit zunehmender Größe des Polymers immer geringere Kopplungsdichten erreichen, da bereits gebundene Polymere die Kopplung weiterer verhindern. Dennoch stellt die „*Grafting-To*“-

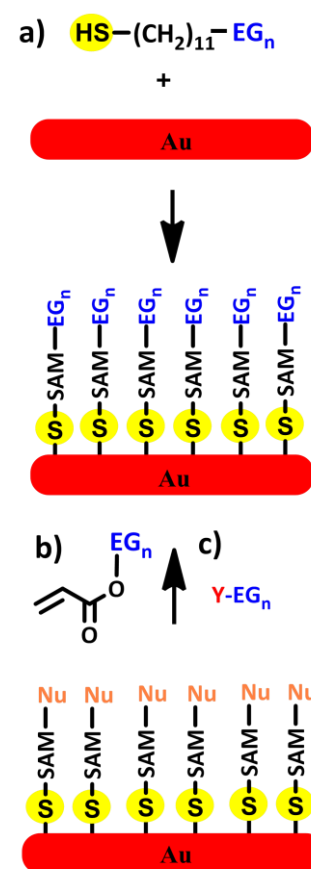


Abb. 94. Drei Methoden zur Herstellung PEGylierter SAMs: (a) direkte Kopplung, bei der das SAM-bildende Monomer bereits eine PEG-Endgruppe enthält; (b) „*Grafting-From*“-Methode, bei der die Polymerisation der EG-Monomere von der Oberfläche (SAM) aus startet und (c) die „*Grafting-To*“-Methode, bei der Polyethylenglykol direkt an eine Oberfläche gekoppelt wird.

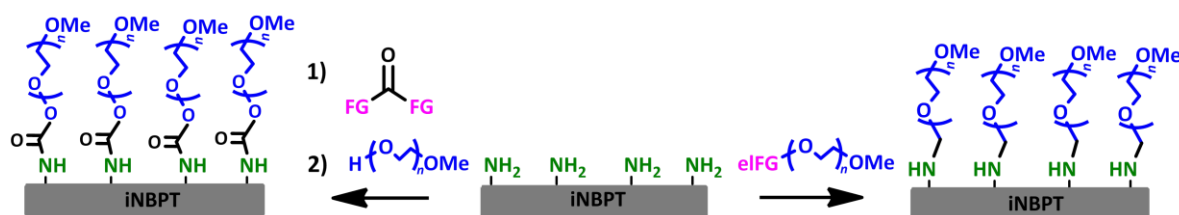


Abb. 95. „Grafting-To“-Kopplung von Polyethylenglykolen an Amino-terminierte Oberflächen (hier iNBPT) entweder durch Umpolung der Aminogruppen und anschließende Addition von PEG (links) oder durch Kopplung entsprechend funktionalisierter (umgepolter) PEGs an die NH_2 -Gruppen (rechts).

Methode den einzig gangbaren Weg dar, Polyethylenglykole in kontrollierter Weise und in einer nur wenige Nanometer dünnen Schicht an bestrahlte NBPT-SAMs zu koppeln.

Polyethylenglykole sind mit ihren endständigen Hydroxyl-Gruppen mäßige Nucleophile. Genauso wie die Oberfläche bestrahlter NBPT-SAMs, die aufgrund ihrer Aminogruppen ebenfalls nucleophil reagiert. Um beide Komponenten mit einander zu verbinden, muss daher entweder die Oberfläche oder das PEG umgepolt werden. Da die Kopplung an eine Oberfläche der ausbeutebestimmende Schritt ist, sind höhere Kopplungsdichten zu erwarten, wenn elektrophil funktionalisierte Polyethylenglykole an die Amino-terminierte Oberfläche gebunden werden (**Abb. 95, rechts**). Der alternative Weg, eine Oberfläche beispielsweise mit 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI) umzupolen und dann das PEG direkt anzukoppeln, ist mit zwei Oberflächenreaktionen verbunden. Erst muss das Umpolreagenz mit der Oberfläche reagieren und im zweiten Schritt das PEG mit der nun elektrophilen Oberfläche (**Abb. 95, links**).

Daher wird das Verfahren der direkten Kopplung verwendet. Nun muss entschieden werden, welche funktionelle Gruppe (FG) das PEG tragen muss, um möglichst effektiv mit den Aminogruppen eines bestrahlten NBPT-SAMs reagieren zu können. Zum einen gibt es hochreaktive Elektrophile wie Isocyanate oder Säurechloride. Während letztere über die entsprechenden PEG-Säuren relativ einfach in einer zweistufigen Reaktion erhältlich sind, ist die Darstellung von der PEG-Isocyanate schwieriger. Ferner sind beide Gruppen aufgrund ihrer hohen Reaktivität feuchtigkeitsempfindlich und damit schlecht zu handhaben. Daher wurden Epoxid-terminierte PEGs verwendet, die in einer einstufigen Synthese aus Monomethoxy-Polyethylenglykol und Epichlorhydrin unter phasenkatalytischen Bedingungen zugänglich sind (**Abb. 96**). Sie sind nicht feuchtigkeitsempfindlich und weisen bei leicht erhöhter Temperatur eine ausreichende Reaktivität gegenüber Aminen auf.

Es muss noch diskutiert, welche Molmassen die verwendeten Polyethylenglykole haben müssen. Die bekannten aliphatischen, PEG-terminierten SAMs (**Abb. 94a**) haben die Eigenschaft, dass sie proteinabweisend sind, wenn die PEG-Schicht aus fünf und mehr EG-Einheiten besteht, was einer Molmasse von 264 g/mol (6×44 g/mol) entspricht. Entsprechend wurde zunächst kommerziell erhältliches, polydisperses Monomethoxy-PEG mit einer mittleren Molmasse von 350 g/mol (PEG350) verwendet.

Der gesamte Prozess der PEGylierung von bestrahlten NBPT-SAMs ist schematisch noch einmal in **Abb. 97** zusammengefasst: NBPT-SAMs werden durch niederenergetische Elektronen von 50 eV bei einer Dosis von 40 mC/cm^2 quervernetzt, wobei gleichzeitig die Nitro- zu einer Aminogruppen reduziert wird, an die dann Epoxid-terminiertes Polyethylenglykol gekoppelt wird, um den iNBPT-PEG-Film biokompatibel zu machen.

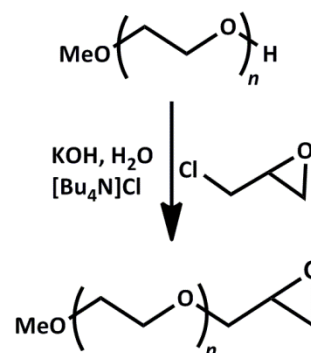


Abb. 96. Darstellung Epoxid-terminierter Polyethylenglykole in einer einstufigen Reaktion aus Epichlorhydrin.

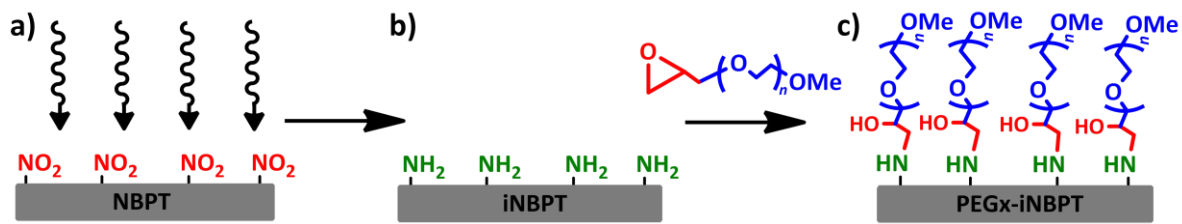


Abb. 97. Präparation biokompatibler und ultradünner Filme basierend auf der Kopplung epoxidiertes Polyethylenglykole an bestrahlte NBPT-SAMs: (a) homogene Elektronenbestrahlung von NBPT-SAMs führt zur Quervernetzung und der Bildung oberflächengebundener Aminogruppen (b), an die dann epoxidiertes Polyethylenglykol mittels „Grafting-To“-Technik gebunden wird (c).

5.2.2 Nass-chemische Kopplung von PEG-Epoxiden an iNBPT-Filme

Der Schritt der elektronenstrahlinduzierten Quervernetzung und Reduktion von NBPT-SAMs ist bereits vielfach untersucht worden, weshalb hier nicht näher darauf eingegangen wird. Zudem unterscheidet sich der Prozesse nur unwesentlich von dem in Abschnitt 5.1 diskutierten für CBPT-Monolagen. Die NBPT-SAMs wurden in allen Experimenten mit einer Dosis von 40 mC/cm^2 bei einer Elektronenenergie von 50 eV bestrahlt.

In einem ersten Ansatz wurde versucht, dass PEG-Epoxid nass-chemisch an bestrahlte NBPT-Filme zu koppeln. Der Erfolg der Reaktion wurde über die Zunahme der ellipsometrischen Schichtdicke quantifiziert und XPS-spektroskopisch verifiziert. Zur Überprüfung der Proteinresistenz wurden die nass-chemisch PEGylierten SAMs in einer Pufferlösung mit Fibrinogen als Testprotein inkubiert. Fibrinogen zeigt eine hohe Neigung, sich auf Oberflächen anzulagern, sodass eine Oberfläche als proteinabweisend angesehen werden kann, wenn sie der Adsorption dieses Proteins widersteht.

Der iNBPT-Film wurde zunächst über Nacht bei 40°C in eine 20-prozentige Lösung des PEG-Epoxids (200 mg/ml) mit $\bar{M}_N = 350 \text{ g/mol}$ (PEG350-EPX) in Chloroform gegeben, wobei sich allerdings mit $\sim 4 \text{ \AA}$ nur ein geringfügiger Zuwachs der ellipsometrischen PEG-Filmdicke ergab (**Abb. 98a**). Auch die Resistenz gegenüber der Adsorption von Fibrinogen war mit einer ellipsometrischen Proteinfilmdicke von 41 \AA nur unwesentlich geringer als die eines nicht-PEGylierten iNBPT-Films (**Abb. 98b**). Deshalb wurde die Konzentration des PEG350-EPXs in Chloroform auf 400 sowie auf 800 mg/ml erhöht und die iNBPT-Filme wieder über Nacht bei 40°C reagieren gelassen. Dadurch ließ sich die Dicke der PEG-Schicht auf $\sim 8 \text{ \AA}$ verdoppeln, was auch mit einer Verminderung der Fibrinogenadsorption einherging. Dennoch waren die PEG-Filme einem Proteinfilm von über 30 \AA noch weit von der geforderten Proteinresistenz entfernt. Daraufhin wurde die Kopplung des PEG350-EPX mit den Konzentrationen 200 , 400 und 800 mg/ml

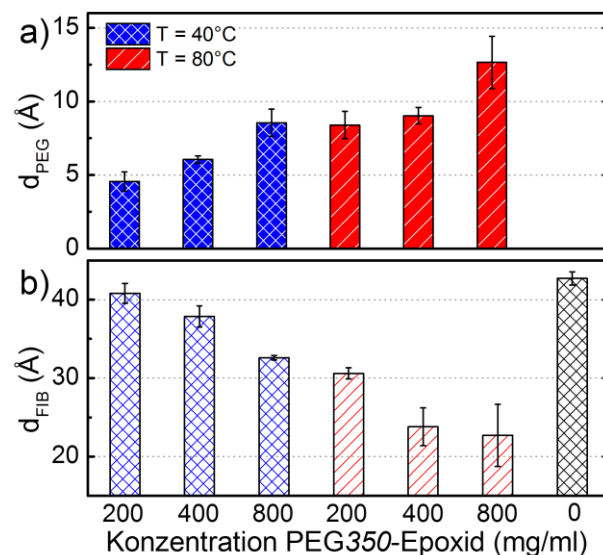


Abb. 98. Ergebnis der nass-chemische Kopplung von PEG350-Epoxid an bestrahlte NBPT-Filme: (a) Dicke des PEG-Films nach der Kopplung bei Variation von Reaktionstemperatur und PEG-Konzentration; (b) Dicke der Fibrinogen Schicht nach dem Proteinabsorptionsexperiment als Maß für die Biokompatibilität des jeweiligen PEG350-iNBPT-Films.

in DMF bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C durchgeführt, was erwartungsgemäß zu höheren Kopplungsdichten des PEG-Epoxids führte. So konnte bei Verwendung einer PEG-Lösung mit 800 mg/ml die Schichtdicke auf bis zu 13 Å gebracht werden. Gleichzeitig war ein Rückgang der Fibrinogenadsorption auf nur noch 22 Å zu beobachten. Dennoch ließ sich trotz Erhöhung der Temperatur auf 80 °C ein biokompatibler iNBPT-Film mit PEG350-Epoxiden nicht erhalten, weshalb als nächstes epoxidiertes PEG mit einer mittleren Molmasse von 750 g/mol (PEG750-EPX) verwendet wurde. Die Reaktion bei 80 °C in DMF zeigte, dass es zu einem signifikanten Anstieg der Schichtdicken auf 14 Å

kam. Bei einer Konzentration von 400 mg/ml wurden 17 Å, während es bei einer Erhöhung auf 800 mg/ml zu keiner weiteren Zunahme der PEG-Schichtdicke mehr kam. Offensichtlich führte die Viskosität der hochkonzentrierten PEG750-EPX Lösung dazu, dass die Steigerung der Konzentration kompensiert wurde.

Das bedeutete aber zugleich, dass mit dem nass-chemischen Verfahren eine weitere Erhöhung der Molmasse des PEGs nicht mehr zu der benötigten Steigerung der PEG-Schichten führen würde. Die Lösungen würden immer viskoser, sodass mit entsprechend niedrigerer Konzentration gearbeitet werden müsste. Daher konnte auch bei Verwendung einer PEG2000-EPX-Lösung die PEG-Schicht auf einem iNBPT-Film nicht über 20 Å gebracht werden ($c=200$ mg/ml, $T=80$ °C, DMF).

Zur Verifikation, dass es sich bei der Zunahme der Schichtdicke chemisch auch wirklich um eine PEG-Schicht handelte, wurden XPS-Spektren von den PEGylierten NBPT-Filmen aufgenommen. Sie zeigen die für Polyethylenglykole typische C 1s-Emission bei ~ 286.4 eV, dessen Intensitäten mit den ellipsometrisch ermittelten PEG-Filmdicken korrelierten (**Abb. 99a**). Ferner ist eine Zunahme der Intensität der O 1s-Emission durch den PEG-Film zu erkennen (**Abb. 99b**).

5.2.3 Kopplung von PEG-Epoxiden mittels Spincoating-Technik

Die nass-chemischen Kopplungsversuche haben gezeigt, dass eine Erhöhung der PEG-Konzentration prinzipiell zu einer Erhöhung der PEG-Kopplungsdichten auf den iNBPT-Filmen führt. Folglich sollte eine 100 prozentige Lösung, also das reine PEG-Epoxid, zu einer maximalen Dichte führen. Da die nass-chemische Präparation zu Problemen bei hohen Konzentrationen und gleichzeitig hohen molaren Massen des PEG-Epoxids führte, musste ein alternatives Verfahren gefunden werden, welches es erlaubt, die iNBPT-Oberfläche mit dem reinen PEG-Epoxid unabhängig von seiner molaren Masse in Kontakt zu bringen. Dazu werden die NBPT-SAMs wie beschrieben hergestellt und mit 40 mC/cm² bestrahlt. Anschließend wird das PEG-Epoxid als 1-prozentige Lösung in Chloroform (10 mg/ml) per Spincoating (4000 rpm) auf den bestrahlten NBPT-SAM gegeben, der so mit einem ~ 30 Å dünnen Film aus PEG-Epoxid bedeckt ist (**Abb. 100a**). Die Aminogruppen des

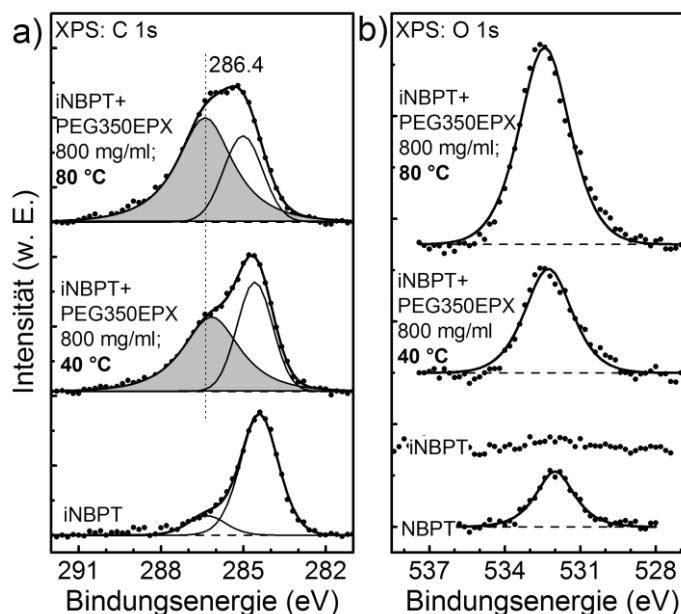


Abb. 99. (a) XPS C 1s-Spektrum eines iNBPT-Films vor und nach der nass-chemischen der Kopplung mit einer 80% PEG350-EPX Lösung bei 40 °C und 80 °C Reaktionstemperatur; (b) das entsprechenden O 1s-Spektrum.

iNBPT-Films sind nun in direktem Kontakt mit dem reinen PEG-Epoxid. Unter Schutzgas wird der PEG-Film bei 80 °C an den bestrahlten NBPT-SAM gebunden (**Abb. 100b**). Überschüssiges, nicht reagiertes PEG-Epoxid kann durch Einlegen des SAMs in Chloroform oder durch Behandlung im Ultraschallbad wieder entfernt werden (**Abb. 100c**).

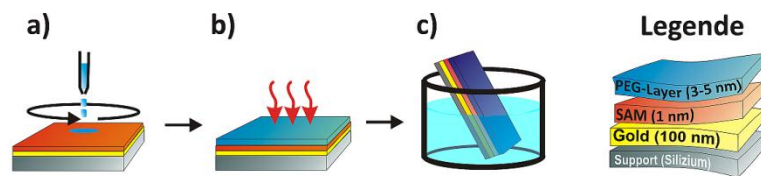


Abb. 100. Kopplung epoxid-terminierter PEGs an iNBPT-Filme mittels Spincoating-Technik: (a) Spincoating einer Lösung des PEG-Epoxids, (b) thermische Kopplung des Epoxides an die oberflächengebundenen Aminogruppen des iNBPT-Films und (c) Entfernung überschüssigen PEGs-Epoxids durch Waschen oder Ultraschallbehandlung.

Nach dieser Methode wurden neben den Epoxid-terminierten Polyethylenglykolen mit den Molmassen $M_N = 350$ und 750 g/mol auch PEG-Epoxide mit 2000 und 10000 g/mol (abgekürzt mit PEGx) an bestrahlte NBPT-SAMs gekoppelt. Die jeweiligen ellipsometrisch gemessenen PEG-Filmdicken nach der Kopplung der Epoxide PEG350-PEG10k sind im Diagramm in **Abb. 101a** dargestellt. Deutlich ist ein Anstieg der Dicke der PEG-Schicht mit zunehmender Molmasse des PEG-Epoxids erkennbar. Für PEG350-iNBPT liegt die Stärke der PEG-Schicht bei 16 \AA , und damit vergleichbar mit einer PEG-Schicht, die bei nass-chemischer Präparation maximal erhalten werden konnte (vergleiche Abb. 98). Aber schon bei PEG750-iNBPT ist mit 21 \AA eine Zunahme der PEG-Schichtdicke gegenüber der nass-chemischen Präparation erkennbar. Besonders deutlich wird der Erfolg der Spincoating-Methode bei Kopplung von PEG2k- und PEG10k-EPX, bei der PEG Filmdicken von bis 40 \AA erreicht werden konnten.

Abb. 101c zeigt die Proteinschichtdicken auf den PEGx-iNBPT Filmen nach Adsorptionsexperimenten mit Fibrinogen. Je dicker der PEG-Film, desto weniger ist Fibrinogen in der Lage, auf der Oberfläche zu adsorbieren. Wichtiger noch ist die Tatsache, dass bei der Verwendung von PEG2k die Dicke der Fibrinogenschicht nur noch wenige \AA beträgt und bei PEG10k keine Adsorption mehr nachweisbar ist. Damit konnte gezeigt werden, dass eine PEG-Schicht von $>30 \text{ \AA}$ ausreicht, die Oberfläche eines bestrahlten NBPT-SAMs biokompatibel zu machen.

Um die Oberflächendichte des PEG-Films und die proteinabweisenden Eigenschaften näher zu untersuchen, wurde entsprechendes Referenzsystem herangezogen. Als solches eignen sich die schon mehrfach angesprochenen EG-terminierten Undecanthiole vom Typ EGnUDT, die bis zu $n=6$ Ethylenglykol-

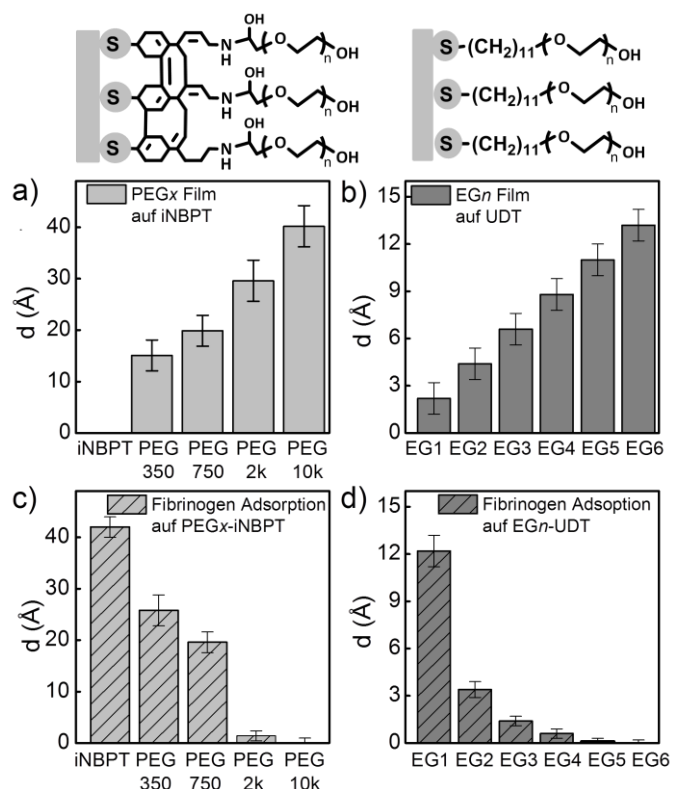


Abb. 101. Ellipsometrische Schichtdicken des PEGx/EGn Teils von (a) PEGx-iNBPT-Filmen und (b) Referenz EGn-UDT-SAMs; Fibrinogen Schichtdicke auf (a) PEGx-iNBPT-Filmen und (d) EGn-UDT-SAMs nach Adsorptionsexperiment.

Einheiten tragen können (Abb. 94 und Abb. 101). Die Packungsdichten dieser Monolagen werden fast ausschließlich von dem aliphatischen Undecanthiol-Spacer bestimmt und sind daher in gewissem Rahmen unabhängig von Anzahl und Länge der EG-Einheiten, was sich in einem annähernd linearer Zuwachs der PEG-Schicht mit wachsender Anzahl der EG-Einheiten widerspiegelt (**Abb. 101b**).

Interessant ist zudem die Tatsache, dass die EGN-UDT SAMs schon bei einer Dicke der PEG Schicht von nur 13 Å vollständig proteinresistent sind (**Abb. 101d**), während für die mittels Grafting-To-Methode hergestellten PEGx-iNBPT Filme eine PEG-Schicht von mindestens 30 Å notwendig ist. Dieser Zusammenhang wird noch einmal in **Abb. 102** verdeutlicht, in der die ellipsometrischen PEG-Schichtdicken von EGN-UDT SAMs und PEGx-iNBPT Filmen sowie ihre Biokompatibilität in einem Diagramm zusammengefasst sind. Obwohl sich beide Systeme strukturell deutlich unterscheiden, besteht ein gewisser Zusammenhang zwischen der Molmasse des PEG-Fragments und der resultierenden ellipsometrischen PEG-Schichtdicke, der sich darin zeigt, dass für beide Systeme die Punkte auf einer Linie liegen (Abb. 102), auch wenn die Filmdicken der PEG-Schicht bei gleicher Molmasse für die EGN-UDT SAMs tendenziell etwas höher liegen. Im Gegensatz dazu zeigt sich systemübergreifend kein Zusammenhang zwischen der Molmasse, der PEG-Schichtdicke und den proteinabweisenden Eigenschaften (grüne und rote Punkte in Abb. 102). Für das PEGx-iNBPT System ist zum Erreichen der Proteinresistenz ein beträchtlich dickerer PEG-Film erforderlich.

Es zeigt sich also, dass die ellipsometrische PEG-Filmdicke alleine kein geeignetes Kriterium ist, um die Biokompatibilität der PEGx-iNBPT Filme im Vergleich zu den EGN-UDT SAMs abschätzen zu können. Eine alternative Betrachtungsmöglichkeit bietet das C 1s XPS-Spektrum, welches exemplarisch für EG6-UDT in **Abb. 103a** gezeigt ist. Das Signal bei 284.6 eV stammt von dem aliphatischen Undecanthiol-Spacer, während das Signal bei höherer Bindungsenergie von dem Kohlenstoff des PEG-Films herrührt. Entsprechendes gilt für die PEGx-iNBPT Filme. Das Intensitätsverhältnis der beiden Signale kann als Maß für die Oberflächendichte des PEG-Films angesehen werden. Je höher diese ist, desto intensiver ist das C 1s-Signal bei ~286 eV und desto stärker wird das C 1s-Signal des darunterliegenden Kohlenstofffilms bei ~284 eV abgeschwächt. Das Verhältnis beider Signale ist also umso größer, je größer die Oberflächendichte des PEG-Films ist, zumal sich für beide Systeme die Intensitäten des reinen Kohlenstofffilms (UDT und iNBPT) nicht

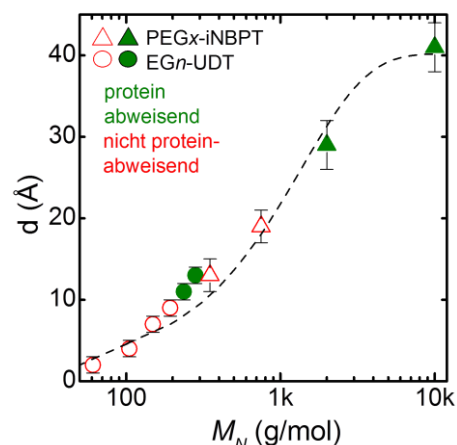


Abb. 102. Ellipsometrische PEG Schichtdicken von EGN-UDT SAMs und PEGx-iNBPT Filmen in Abhängigkeit der PEG Molmasse M_N zusammengefasst in einem Diagramm; proteinabweisende Systeme sind grün markiert.

Es zeigt sich also, dass die ellipsometrische PEG-Filmdicke alleine kein geeignetes Kriterium ist, um die Biokompatibilität der PEGx-iNBPT Filme im Vergleich zu den EGN-UDT SAMs abschätzen zu können. Eine alternative Betrachtungsmöglichkeit bietet das C 1s XPS-Spektrum, welches exemplarisch für EG6-UDT in **Abb. 103a** gezeigt ist. Das Signal bei 284.6 eV stammt von dem aliphatischen Undecanthiol-Spacer, während das Signal bei höherer Bindungsenergie von dem Kohlenstoff des PEG-Films herrührt. Entsprechendes gilt für die PEGx-iNBPT Filme. Das Intensitätsverhältnis der beiden Signale kann als Maß für die Oberflächendichte des PEG-Films angesehen werden. Je höher diese ist, desto intensiver ist das C 1s-Signal bei ~286 eV und desto stärker wird das C 1s-Signal des darunterliegenden Kohlenstofffilms bei ~284 eV abgeschwächt. Das Verhältnis beider Signale ist also umso größer, je größer die Oberflächendichte des PEG-Films ist, zumal sich für beide Systeme die Intensitäten des reinen Kohlenstofffilms (UDT und iNBPT) nicht

Es zeigt sich also, dass die ellipsometrische PEG-Filmdicke alleine kein geeignetes Kriterium ist, um die Biokompatibilität der PEGx-iNBPT Filme im Vergleich zu den EGN-UDT SAMs abschätzen zu können. Eine alternative Betrachtungsmöglichkeit bietet das C 1s XPS-Spektrum, welches exemplarisch für EG6-UDT in **Abb. 103a** gezeigt ist. Das Signal bei 284.6 eV stammt von dem aliphatischen Undecanthiol-Spacer, während das Signal bei höherer Bindungsenergie von dem Kohlenstoff des PEG-Films herrührt. Entsprechendes gilt für die PEGx-iNBPT Filme. Das Intensitätsverhältnis der beiden Signale kann als Maß für die Oberflächendichte des PEG-Films angesehen werden. Je höher diese ist, desto intensiver ist das C 1s-Signal bei ~286 eV und desto stärker wird das C 1s-Signal des darunterliegenden Kohlenstofffilms bei ~284 eV abgeschwächt. Das Verhältnis beider Signale ist also umso größer, je größer die Oberflächendichte des PEG-Films ist, zumal sich für beide Systeme die Intensitäten des reinen Kohlenstofffilms (UDT und iNBPT) nicht

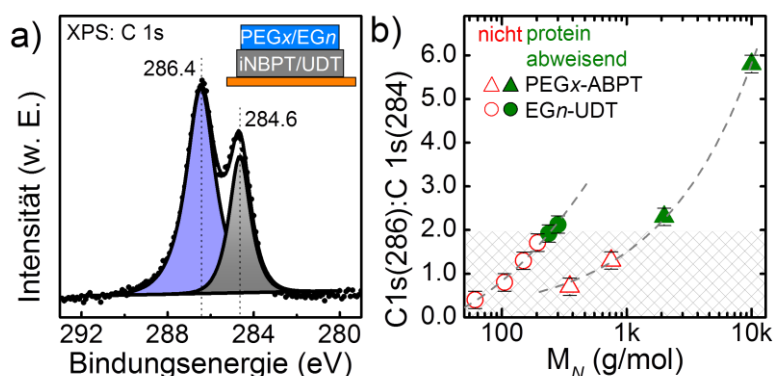


Abb. 103. (a) Die XPS C 1s Spektren von EGN-UDT/PEGx-iNBPT zeigen zwei charakteristische Emissionen: der Peak bei 286.5 eV stammt von der PEG-Schicht, der Peak bei 284.5 eV von der UDT/iNBPT-Schicht; (b) die Intensitätsverhältnisse der beiden Kohlenstoffemissionen von (a) in Abhängigkeit von der Molmasse des PEG-Films/SAMs.

wesentlich unterscheiden sollte, da beide eine ähnliche Kohlenstoffdichte aufweisen.

In **Abb. 103b** sind die Intensitätsverhältnisse der beiden Kohlenstoff C 1s-Spezies gegen die Molmasse für beide Systeme aufgetragen. Im Gegensatz zu der entsprechenden Auftragung der ellipsometrischen Filmdicken **Abb. 102** liegen beide Systeme auf getrennten Geraden. Das Referenzsystem (runde Punkte) zeigt bei gleicher PEG-Molmasse eine deutlich höhere Oberflächendichte der PEG-Schicht als die PEGx-iNBPT Filme (dreieckigen Punkte). Auf der anderen Seite zeigen beide Systeme übereinstimmend ab einem Verhältnis der beiden C 1s-Signale von $2.1(\pm 0.1)$ proteinabweisendes Verhalten (grüne Punkte).

Dieses Ergebnis zusammen mit den ellipsometrischen Resultaten von **Abb. 102** lässt den Schluss zu, dass sich beide System vor allem dahingehend unterscheiden, dass bei den per „Grafting-To“-Methode hergestellten PEGx-iNBPT Filmen die PEG Kopplungsdichte geringer ist als bei den Referenz SAMs. Damit die PEGx-iNBPT-Filme ähnliche Proteinresistenz erlangen können, muss die geringere PEG-Kopplungsdichte durch eine entsprechend höhere Schichtdicke kompensiert werden, was durch die Verwendung höhermolekularer (längerer) PEGs erreicht wurde.

Um zu zeigen, dass sich das PEG-Epoxid selektiv an den bestrahlten Stellen ablagert und es zu keiner Multilagenbildung kommt, wurde während des Elektronenbestrahlung eine Maske auf dem NBPT-SAM montiert und so ein strukturiertes Muster von Aminogruppen erzeugt, die durch Bereiche von Nitrogruppen begrenzt sind. Werden die strukturierten SAMs gemäß der gerade beschriebenen Spincoating-Technik PEGyliert, darf sich das PEG-Epoxid nur an den bestrahlten Bereichen anlagern und die Struktur des TEM-Grids muss sich deutlich als topographisches Profil widerspiegeln. In **Abb. 104a** ist das Rasterkraftmikroskop (AFM) Bild eines NBPT-SAMs gezeigt, der durch ein TEM-Grid (1000 Maschen pro Zoll) bestrahlt und an den PEG10k-EPX gekoppelt wurde. Deutlich sind die Löcher von den Stegen des Gitters zu unterscheiden. Die Dicke des PEG10k-Films ergibt sich aus dem Höhenprofil und liegt mit 4-5 nm in guter Übereinstimmung zu der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicke.

Für derart strukturiert PEGylierte iNBPT-Filme bietet die Fluoreszenzmikroskopie (FM) eine alternative Methode zur qualitativen Abschätzung der proteinabweisenden Eigenschaften. Wird die PEG-Struktur in eine Pufferlösung mit fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen (flFib) gegeben, setzt sich das Fibrinogen ausschließlich auf den nicht PEGylierten Bereichen ab. Das zeigt sich deutlich in dem rot-fluoreszierenden Bereichen des FM-Bilds in **Abb. 104b**, bei der der NBPT-SAM durch eine Lochmaske mit $2\ \mu\text{m}$ großen Löchern (Quantifoil® R2/2 TEM-Grid) bestrahlt und anschließend PEGyliert wurde. Die Intensität der Fluoreszenz ist allerdings durch die Nähe der Fluorophore zum Goldsubstrat sehr schwach (Quenching). Daher lassen solche Fluoreszenzbilder nur durch den direkten Intensitätsvergleich strukturierter Oberflächen sichtbar machen.

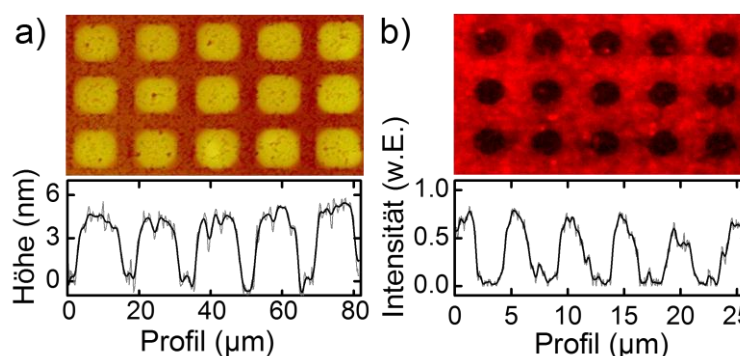


Abb. 104. (a) AFM-Bild und Höhenprofil (entlang der weißen Linie) nach der PEGylierung eines strukturiert bestrahlten NBPT-SAMs mit PEG10k-EPX; (b) FM-Bild einer eines strukturiert bestrahlten und PEGylierten iNBPT-SAMs nach Inkubation in einer Pufferlösung mit fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen (flFib).

5.2.4 Präparation und Charakterisierung freistehender, PEGylierter Nanomembranen

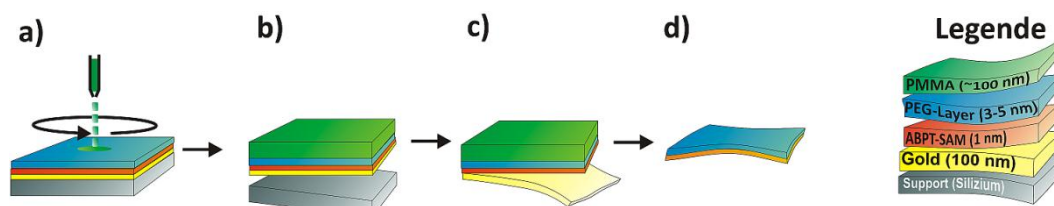


Abb. 105. Präparation freistehender Nanomembranen basierend auf quervernetzten SAMs durch Ablösung von ihrem Substrat: (a) Mittels Spincoating wird PMMA als mechanische Stabilisierungsschicht aufgetragen; (b) durch Eintauchen in Wasser lässt sich der Silizium-Support von der Goldschicht trennen; (c) nass-chemisches Auflösen des Goldfilms; (d) zuletzt wird die verbleibende Membran auf eine Gitterstruktur übertragen und die PMMA-Schicht durch Eintauchen in Aceton entfernt.

Die Separation des SAM-tragenden Goldsubstrats von seinem mechanischen Support ist der Schlüsselschritt bei der Präparation von Nanomembranen auf Basis quervernetzter, aromatischer Biphenylthiole (Abb. 105). In der Literatur ist ein Verfahren beschrieben, bei dem das Gold auf Glimmer als mechanischen Support aufgetragen ist und die Trennung des Goldfilms vom Glimmer mittels konzentrierter Flusssäure erfolgt (siehe Abb. 62 auf Seite 53). Starke Mineralsäuren sind aber mit Polyethylenglykolen nicht kompatibel, da sie zu einer chemischen Zersetzung des Polyethers führen. Auch wenn die PEG-Schicht durch einen Film aus Polymethylmethacrylat (PMMA) vor dem direkten Kontakt der Flusssäure geschützt ist, besteht kein vollständiger Schutz, da auch PMMA als Polyester keine ausreichende Stabilität vor starken Säuren bietet (**Abb. 105a**).

Es muss daher ein alternatives Verfahren gefunden werden, um PEGx-iNBPT-Filme von ihrem Substrat abzuheben. Dazu werden 100 nm Gold auf einem Siliziumwafer ohne den sonst verwendeten Haftvermittler aufgedampft (PVD) und die SAMs wie gewohnt präpariert, bestrahlt und PEGyliert. Entscheidend ist, dass sich die SAM-tragende Goldschicht durch schräges Eintauchen in Wasser von dem Silizium-Support wieder abziehen lässt (**Abb. 105b**) und auf der Wasseroberfläche schwimmt, während der Siliziumwafer weiter eintaucht (siehe Abb. 63 auf Seite 53). Anschließend kann die Goldschicht leicht auf eine wässrige Goldätzlösung übertragen werden (**Abb. 105c**). Als solche eignet sich eine Lösung aus KI/I_2 (Lugoldsche Lösung), ebenso mildere Reagenzien wie basisches KCN oder ein Thiosulfat-Ferricyanid-System.^{138, 160} Nach Auflösen der Goldschicht wird im letzten Schritt die verbleibende PMMA-geschützte PEGx-iNBPT Membran auf eine Gitterstruktur übertragen und das PMMA durch Eintauchen in Aceton restlos entfernt (**Abb. 105d**).

Im Folgenden werden die Eigenschaften der Membran als Support biologischer Proben in TEM Experimenten gemäß der am Anfang dieses Kapitels gestellten Kriterien untersucht. Dazu wird zuerst der Frage nachgegangen, ob sich die Schichtdicke des entsprechenden PEGx-iNBPT Vorläuferfilms in der Dicke der Membran wiederfindet. Um diese zu bestimmen, wird die Membran auf einen polierten Siliziumwafer übertragen und die Höhe der Membrankante mit einem Rasterkraftmikroskop bestimmt. Das AFM-Bild in **Abb. 106a** zeigt einen $40 \times 40 \mu\text{m}$ großen Ausschnitt der Kante einer PEG10k-iNBPT Membran, die auf einem Siliziumwafer liegt. Die Membran weist eine homogene Topographie auf und zeigt keinerlei Unregelmäßigkeiten. Das Höhenprofil an der Kante ergibt eine Dicke der Membran von $5 (\pm 1) \text{ nm}$, was sehr gut mit der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicke des PEG10k-iNBPT Films aus Abb. 101a übereinstimmt. Die proteinabweisenden Eigenschaften der Membran lassen sich mit dieser Anordnung ebenfalls bestimmen. Dazu wird ein partiell mit der PEG10k-iNBPT Membran bedecktes Siliziumsubstrat in eine PBS-gepufferte Lösung

mit fluoreszenz-markiertem Fibrinogen (fFib) getaucht und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (FM) ist die Membran deutlich als dunkler Bereich erkennbar, während die unbedeckte Siliziumoberfläche aufgrund des adsorbierten Fibrinogens rot erscheint (**Abb. 106b**). Die PEG10k-iNBPT Membran ist also nicht nur proteinabweisend, sie besitzt zudem die Fähigkeit, von ihrer bedeckten Oberfläche vor unspezifischer Proteinadsorption zu schützen.

Aufgrund der extrem geringen Dicke der Membran, ist sie unter dem Lichtmikroskop nur an den Rändern schemenhaft zu erkennen (**Abb. 106c**). Um den Kontrast zu verstärken, ist das Bild im DIC-Modus (Differentialinterferenzkontrast) aufgenommen, bei dem unterschiedliche Weglängen des Lichtes durch ein Material als Helligkeitskontrast wahrgenommen werden. Deshalb ist die Kante der Membran schwach sichtbar, da es dort bei der Präparation zu Faltungen kommen kann.

Nachdem Dicke und Biokompatibilität der PEG10k-iNBPT Membran überprüft worden sind, wird als nächstes ihre Eignung als freistehende Membran untersucht. Erst damit würde sich eine Verwendung als Support für TEM-Experimente eröffnen. Um eine freistehende Membran zu erhalten, wird der Film nach dem Abheben nicht auf ein anderes Substrat sondern auf Gitterstrukturen wie beispielsweise TEM-Grids übertragen (**Abb. 107a**). Dabei handelt es sich um runde Metallgitter mit einem Standarddurchmesser von 3.05 mm und einer Dicke zwischen 10 - 50 μm . Sie sind mit verschiedensten Lochgrößen und -formen erhältlich. Im Rasterelektronenmikroskop (REM) lässt sich die freistehende Membran dann bequem untersuchen. **Abb. 107b** zeigt eine PEG10k-iNBPT Membran, die über ein TEM-Grid mit quadratischer Lochstruktur der Kantenlänge $\sim 11 \mu\text{m}$ (1500 Maschen pro Zoll) gespannt ist. Deutlich zu erkennen sind die von der Membran bedeckten Bereiche, während Areale, in denen die Membran zerstört ist, schwarz erscheinen. Um die Membran im REM überhaupt sichtbar machen zu können, ist es notwendig, die Energie des Primärstrahls so niedrig wie möglich zu halten. Nur so erhält man einen ausreichenden Oberflächenkontrast, um die Membran so deutlich sichtbar zu machen. Wie in Abschnitt 5.1.2 dargelegt, sinkt die Eindringtiefe der Elektronen bei kleiner werdender Energie und damit auch die Informationstiefe der für die Detektion verantwortlichen Sekundärelektronen. Aus diesem Grund ist das REM Bild in **Abb. 107b** bei einer Primärenergie von

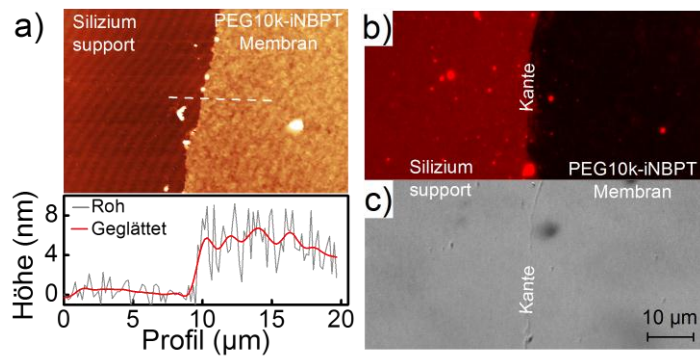


Abb. 106. (a) AFM Bild einer teilweise auf einen Siliziumsubstrat liegenden PEG10k-iNBPT Membran mit dem zugehörigen Höhenprofil entlang der Kante (gestrichelten Linie); (b) das entsprechende FM Bild nach Inkubation in einer Lösung mit fluoreszenz-markiertem Fibrinogen; das Silizium erscheint aufgrund von Fibrinogenadsorption rot, während die von der Membran bedeckten Bereiche schwarz sind; (c) das Lichtmikroskopie Bild zeigt nur die Kante schwach sichtbar.

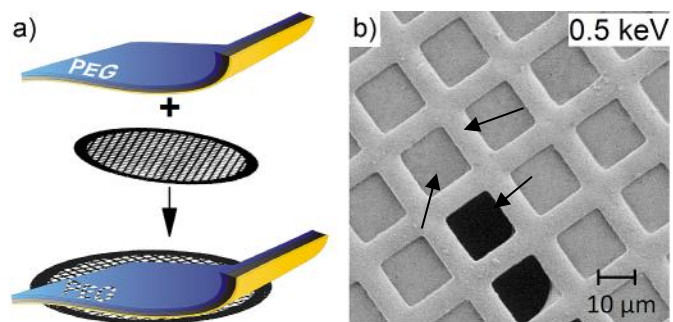


Abb. 107. (a) Schema des Transferierens einer PEGylierten Membran auf ein TEM-Grid; (b) Rasterelektronenmikroskopie (REM) Aufnahme einer PEG10k-iNBPT Membran, die freistehend über ein TEM-Grid mit 1500 Maschen pro Zoll gespannt ist (Energie des Primärstrahls 500 eV).

nur 500 eV aufgenommen ist. Das erklärt auch, dass die von der Membran bedeckten Metallstangen des Gitters nur unwesentlich heller sind als die freistehenden Bereiche. Allerdings muss man bedenken, dass die Fokussierung des Elektronenstrahls bei geringer werdender Elektronenenergie immer schwieriger wird, was für die in diesem Fall hier im Mikrometer-Bereich gezeigten Abbildungen unkritisch ist.

Die variable Oberflächensensitivität eines Rasterelektronenmikroskops durch Einstellung der Energie seines Primärstrahls kann auch ausgenutzt werden, die Transparenz der PEG10k-iNBPT Membran zu untersuchen und mit den von kommerziell erhältlichen, Kohlenstoffbefilmtem TEM-Grids zu vergleichen. Diese Trägermembranen sind mit ca. 10 nm etwa doppelt so dick wie eine PEG10k-iNBPT Membran, was sich in der

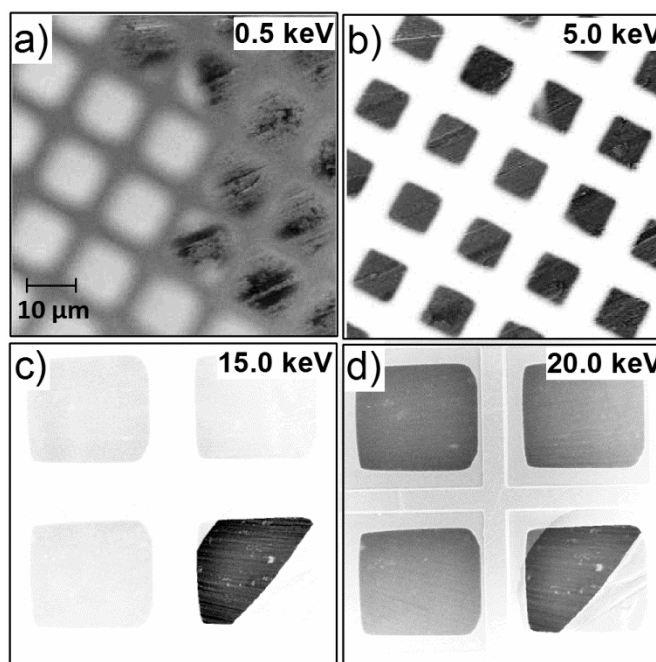


Abb. 108. REM Bilder einer PEG10k-iNBPT Membran, die teilweise über die Löcher eines ein TEM-Grids gespannt ist, aufgenommen bei einer Energie des Primärstrahls von (a) 0,5 keV und (b) 5 keV; die analoge Aufnahme eines teilweise beschädigten, kommerziell erhältlichen TEM-Grids mit einem 10 µm Kohlenstofffilm bei (c) 15 keV und (d) 20 keV.

Transparenz für Elektronen widerspiegeln muss. Da sich ein REM vom „Lichtweg“ her wie ein Auflichtmikroskop verhält (Elektronenquelle und Detektor befinden sich im selben Halbraum bezüglich der Ebene der Probe), kann die Transparenz einer Probe nur indirekt bestimmt werden. Dazu wird die Membran auf ein TEM-Grid gespannt, das dann direkt auf dem Probenhalter montiert wird. Anschließend wird ein Bereich auf dem Gitter gesucht, über dem die Membran teilweise zerstört ist (rechte Hälfte in **Abb. 108a**). Durch die Löcher kann der Elektronenstrahl jetzt auf die Oberfläche des Probenhalters fokussiert werden, der dann wie ein Spiegel wirkt und die vom Primärstrahl erzeugten Elektronen (SE und BSE) zurückwirft. Wird die Energie des Primärstrahls auf 0,50 keV eingestellt und auf den Probenhalter fokussiert, sind seine Details nur in den Bereichen sichtbar, die nicht von der Membran bedeckt sind. Sie selber ist für Elektronen dieser Energie intransparent und der Bereich erscheint diffus (linke Hälfte in **Abb. 108a**). Wird die Energie des Elektronenstrahls erhöht, steigt die Eindringtiefe der Elektronen und die Membran wird allmählich transparent. Ab einer Energie von ~ 5 keV ist die Struktur des Probenhalters deutlich durch die Membran hindurch zu erkennen (**Abb. 108b**). Wird das Experiment mit einem kommerziell erhältlichen, 10 nm kohlebefilmtem TEM-Grid durchgeführt, zeigt sich eine beginnende Transparenz für Elektronen ab einer Energie von 15 keV (**Abb. 108c**), und erst bei 20 keV ist die Oberfläche des Probenhalters auch durch den Kohlefilm zu sehen (**Abb. 108d**). Es zeigt sich also, dass PEG10k-iNBPT Membranen eine bedeutend bessere Durchlässigkeit für Elektronen besitzt als standartmäßig verwendete Kohlefilm-Grids.

Eine wichtige Eigenschaft der PEG10k-iNBPT Membranen ist, dass sie eine Oberfläche mit definierten chemischen und biologischen Eigenschaften besitzt. Die Membran ist nur auf der PEG-Seite proteinabweisend, während sie auf der SAM-Seite diese Eigenschaft sicherlich nicht aufweist. In Bezug auf ihre biologischen Eigenschaften verhält sich die PEG10k-iNBPT Membran wie eine so

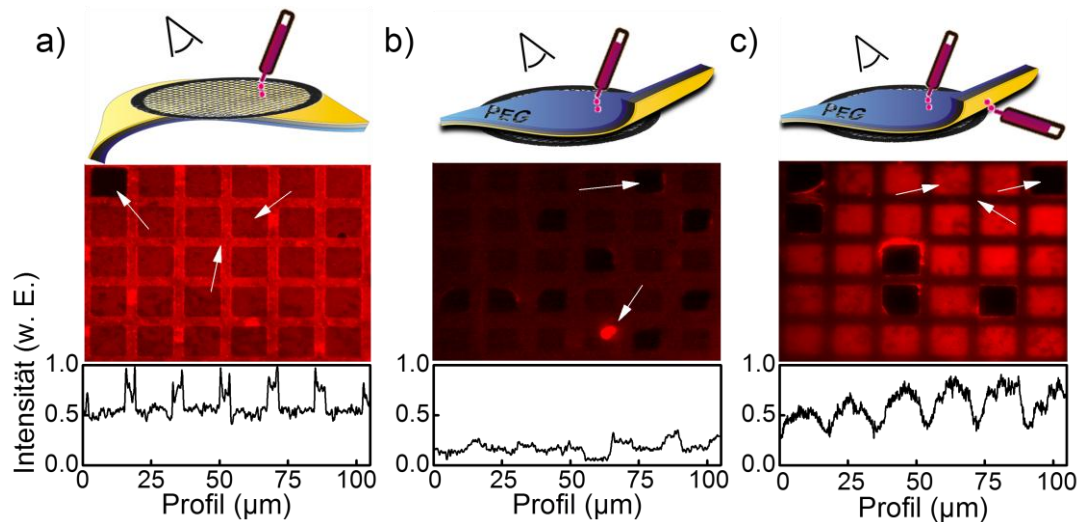


Abb. 109. Adsorption von Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen (flFib) auf PEG10k-iNBPT Membranen, die über TEM-Grids gespannt sind und deren Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop (FM): (a) flFib wurde auf der SAM-Seite aufgetragen und das FM-Bild von SAM-Seite aufgenommen; (b) flFib wurde auf die PEG-Seite gegeben und das FM-Bild wurde von der PEG-Seite aufgenommen; (c) das TEM-Grid wurde als Ganzes in flFib getaucht und das FM-Bild von der PEG-Seite aufgenommen.

genannte Janus-Membran, das heißt, sie zeigt unterschiedliche Eigenschaften auf beiden Seiten. Dieses Verhalten spiegelt sich auch in entsprechenden Proteinadsorptionsexperimenten wieder.

Zum Nachweis der Biokompatibilität freistehender PEG10k-iNBPT Membranen, wurden etwa 0.5 µl einer PBS-gepufferten Lösung mit fluoreszenz-markiertem Fibrinogen (flFib) auf die *SAM-Seite* einer über ein TEM-Grid gespannten PEG10k-iNBPT Membran gegeben (**Abb. 109a**). Nach 30 min wurde das System vorsichtig für etwa eine Stunde in destilliertes Wasser getaucht und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (FM) von der *SAM-Seite* beobachtet. Deutlich ist die Membran aufgrund der roten Fluoreszenz des adsorbierten Fibrinogens sichtbar. Interessanterweise sind die Metallstege des Gitters heller als die Membran selber. Normalerweise wird Fluoreszenz unterdrückt (gequencht), wenn sich ein Fluorophor in unmittelbarer Nähe einer Metalloberfläche befinden. Diese Schwächung der Fluoreszenz durch die Kupferstege wird anscheinend durch eine stärkere Proteinadsorption auf das Metall kompensiert. Oben links ist ein schwarzer Bereich zu erkennen, an dem die Membran zerstört ist. Es ist wichtig, dass dieser Bereich wirklich vollständig dunkel ist, da die schwache Fluoreszenz des dünnen Fibrinogenfilms zu langen Belichtungszeiten von 20-60 s führt und die Abwesenheit des Lichtsignals anzeigt, dass die Fluoreszenzen ausschließlich vom Fibrinogen ausgeht und keine Anteile an eventuell vorhandenem Umgebungslicht enthält.

Wird das flFib auf der *PEGylierten Seite* der PEG10k-iNBPT Membran aufgebracht und im FM auch von *dieser Seite* beobachtet, ergibt sich ein komplett anderes Bild (**Abb. 109b**). Es ist nur eine sehr schwache Fluoreszenz wahrnehmbar. Das wird besonders durch den hell leuchtenden Fleck deutlich, der von einer Verunreinigung stammt und die potentiell mögliche Intensität der Fluoreszenz anzeigt. Der Janus-artige Charakter der Membrane bezüglich der Biokompatibilität zeigt sich ferner, wenn die Membrane in die flFib-Lösung getaucht wird und von der *PEGylierten Seite* untersucht wird (**Abb. 109c**). Es lassen sich drei Regionen unterscheiden. Die PEG-Seite erscheint jetzt aufgrund des Fibrinogens, welches sich auf der Rückseite (auf der SAM-Seite) angelagert hat und durch die Membran hindurch leuchtet, hell. Die Metallstege sind wesentlich dunkler, da die Membrane sie vor Proteinadsorption schützt. Zuletzt sind die Bereiche, in denen die Membran beschädigt ist, wieder schwarz.

Zuletzt muss noch untersucht werden, ob sich die PEG10k-iNBPT Membranen als Trägerfilme für die Transmissionselektronenmikroskopie im Allgemeinen sowie zur TEM-Untersuchung biologischer Proben im Speziellen eignen. Aufgrund der hohen Stromdichte des Elektronenstrahls eines HRTEM Mikroskops ($\sim 10^5$ A/cm²) sind an Trägerfilme hohe Anforderungen bezüglich der Stabilität gestellt. Es muss also immer auch untersucht werden, wie weit diese während der Messung stabil bleiben. Um einen ersten Eindruck von der Leistungsfähigkeit der PEG10k-iNBPT Membran zu erhalten, wurden Gold-Nanopartikel (AuNP) auf ihr deponiert und im HRTEM untersucht.

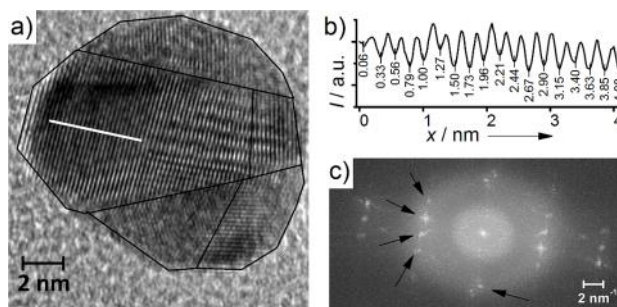


Abb. 110. (a) HRTEM-Bild (200 keV) eines ~ 12 nm großen Gold-Nanopartikels (AuNP), der sich auf einer freistehenden PEG10k-iNBPT Membran befindet; der AuNP besteht aus mehreren Kristalliten (schwarz umrandet); (b) das Intensitätsprofil entlang der weißen Linie in (a) zeigt eine Periodenlänge von 0.24 nm; (c) das entsprechende FFT Frequenzbild zeigt die (111)-Ebenen als helle Punkte im Abstand von ~ 4 nm⁻¹.

Aufgrund der hohen Massenzahl von Gold, lassen sich AuNPs gut elektronenmikroskopisch untersuchen. Sie heben sich deutlich von dem Trägerfilm ab, der meist aus einem Material mit niedriger Massenzahl (Kohlenstoff) hergestellt ist.

In **Abb. 110a** ist das HRTEM-Bild eines ca. 12 nm großen AuNP dargestellt, der sich auf einer freistehenden PEG10k-iNBPT Trägermembran befindet. Deutlich ist in Form periodischer Intensitätsschwankungen die innere Struktur erkennbar, welche sich klar von dem diffusen Hintergrund der Membran abhebt. Ferner zeigt sich, dass der betrachtete Nanopartikel aus mehreren Kristalliten besteht. Gold-Nanopartikel ab einer Größe von ~ 4 nm sind oftmals polykristallin und weisen keine sphärische Symmetrie mehr auf. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „Twinning“ bezeichnet.¹⁶¹ Der in **Abb. 110a** abgebildete Gold-Nanopartikel besteht aus mindestens fünf dieser Kristallite, welche vornehmlich entlang einer Kristallebene orientiert sind. Das Intensitätsprofil zeigt eine periodische Schwankung mit einem konstanten Abstand von 0.24 nm entlang der Minima bzw. Maxima (**Abb. 110b**). Dieser Wert stimmt ausgezeichnet mit dem Gitterabstand der Au(111)-Ebene von 0.236 nm überein. Die Dominanz dieser Ebene ergibt sich auch, wenn das Bild mittels Fourier-Transformation (Fast Fourier Transformation, FFT) in den Frequenzraum überführt wird (**Abb. 110c**). Die weißen Punkte stellen die Reflexe der (111)-Ebenen in diesem Raum dar (markiert mit schwarzen Pfeilen) und befinden sich im Abstand von ~ 4 nm⁻¹ zum Reflex nullter Ordnung, der in der Mitte des Bildes angeordnet ist. Der Kehrwert dieses Abstandes ergibt wieder den Abstand der Au(111)-Ebene im Ortsraum.

Als weiteres Beispiel für die Leistungsfähigkeit der PEG10k-iNBPT Membran in TEM-Experimenten, sind in **Abb. 111** die HRTEM-Bilder von Ferritin zu sehen. Ferritin ist ein Eisenspeicherprotein und besteht aus einem Kern mit bis zu 4500 Eisenatomen, der von einer Proteinschale umgeben ist.¹⁶² Obwohl Eisen im Vergleich zu Gold aufgrund seiner kleineren Massenzahl einen viel geringeren

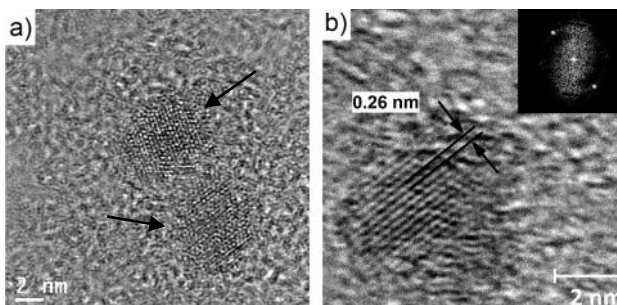


Abb. 111. (a) HRTEM Bild (200 keV) von zwei Ferritin Proteinen (Pfeile) auf einer PEG10k-iNBPT Membran; (b) in dem vergrößerten Ausschnitt ist die innere Struktur des Eisenkerns und der Abstand zweier Gitterebenen erkennbar (oben rechts das zugehörige FFT-Bild).

Kontrast bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen hat, ist die kristalline Struktur des Ferritin-Kerns dennoch deutlich sichtbar (**Abb. 111b**). Der Abstand zweier Ebenen ergibt sich zu 0.26 nm und passt damit zu einer (011)-Ebene des Ferrihydrit Kerns.¹⁶³ Das Bild weist zudem eine deutliche Ähnlichkeit mit der theoretischen Simulation eines HRTEM-Bildes von Ferritin auf.⁴⁵ Die Qualität des hier abgebildeten Ferritins ist nicht schlechter als in der Literatur beschriebene Bilder, die beispielsweise auf deutlich dünneren Graphen Membranen⁴⁵ oder carbonoden Nanomembranen⁴⁴ aufgenommen wurden, wobei die letztgenannten – im Gegensatz zu den PEG10k-iNBPT Membranen – nur bedingt proteinabweisend sind.

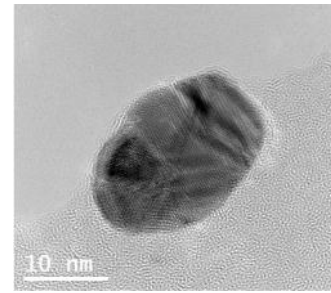


Abb. 112. Strahlungsbedingte Beschädigung der Membrane im der oberen Hälfte des Bildes.

Die Stabilität des Supports in HRTEM-Experimenten ist ein wichtiger Punkt. Die starke Fokussierung des Elektronenstrahls führt zu Dosen von mehr als 10^5 As/cm². Aufgrund der hohen Energie des Primärstrahls von 200 keV und mehr ist der Wirkungsquerschnitt der Elektronen entsprechend gering und die Wirkung der Dosis relativiert sich. Dennoch sind HRTEM-Aufnahmen auf 15-60 Sekunden beschränkt, da es nach längeren Belichtungszeiten zunehmend zur Zerstörung der Membran kommt (**Abb. 112**). Ferner zeigt Abb. 112 den geringen Einfluss, den die Membran auf das Gesamtbild ausübt. Die Absorption der Membran ist nur geringfügig über der des Vakuums (zerstörter Bereich).

5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse PEGylierter Nanomembranen auf SAM-Basis

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass es möglich ist, Epoxid-terminierte Polyethylenglykole mittels „Grafting-To“-Methode derart an oberflächengebundene Aminogruppen eines bestrahlten Nitrobiphenylthiol-SAMs zu koppeln, dass der Film bei einer Gesamtdicke von nur ~ 5 nm der unspezifischen Adsorption von Fibrinogen widersteht. Zudem konnten die PEGylierte Strukturen auf lithographisch präparierten NBPT-SAMs hergestellt werden, um so beliebige PEG-Muster im Mikro- und Nanometer-Maßstab zu erzeugen.

Die wichtigste Erkenntnis dieses Abschnittes aber ist, dass möglich war, die PEGylierten Filme von ihrem Substrat abzuheben und als freistehende Nanomembran auf ein Gitter zu übertragen, ohne dass diese ihre Biokompatibilität einbüßten. Damit war es gelungen, erstmals Nanomembranen mit definierten biologischen Eigenschaften zu präparieren. Die Leistungsfähigkeit und Eignung der Membran als Support in Transmissionselektronenmikroskopie Experimenten wurde anhand von Gold-Nanopartikeln und dem Eisenspeicherprotein Ferritin gezeigt.

5.3 Dünne Filme aus quervernetzten Polyethylenglykolen

Die im letzten Abschnitt diskutierten, biokompatiblen Nanomembranen eignen sich wie gezeigt als vielversprechender Support in biologischen TEM-Experimenten. Sie bestehen aus einer Doppelschicht, deren PEG-Hälfte der Membran ihre Proteinresistenz verleiht, während die SAM-Hälfte der Membran mechanische Stabilität gibt (**Abb. 113a**). Solche Membranen sind zwar mit 5 nm außerordentlich dünn, aber nur einseitig proteinresistent. Es liegt daher nahe, eine Membran herzustellen, die beide Eigenschaften – Biokompatibilität und Proteinresistenz – in einer Schicht vereint. Als Vorläufer dient wieder ein entsprechender, dünner Film, der von einem Träger abgehoben werden kann. Ziel dieses Abschnitts ist es, einen möglichst dünnen und stabilen Film aus Polyethylenglykol herzustellen, die hochgradig quervernetzt und trotzdem biokompatibel ist. Lässt sich der PEG-Film von seinem Träger wieder abheben, sollten die daraus hergestellten Membranen doppelseitig biokompatibel sein (**Abb. 113b**).



Abb. 113. Schema biokompatibler, PEG-Nanomembranen basierend auf (a) quervernetzten, PEGylierten SAMs, deren PEG-Seite (blau) proteinabweisend ist, während die SAM-Seite (gelb) diese Eigenschaft nicht besitzt; (b) eine Membran, die nur aus PEG besteht wäre dagegen beidseitig biokompatibel.

5.3.1 Präparation quervernetzter, dünner PEG-Filme

Bei den Stichworten PEG und Quervernetzung gelangt man zunächst zur photoinduzierten Polymerisation von Polyethylenglykol-Acrylaten, die häufig zur Präparation von PEG-Hydrogelen eingesetzt werden. Allerdings weisen PEG-Polymere, deren Monomere nur aus Monoacrylaten bestehen, keine Quervernetzung auf und die mechanische- und Lösungsmittelstabilität ihre Polymerketten rührt ausschließlich von der Verzahnung der Polymerketten her (**Abb. 114**). Daher werden solche PEG-Acrylate meist zur Herstellung von Hydrogel-Materialien makroskopischer Dimension verwendet.

Möchte man aus PEG-Hydrogelen dagegen dünne Filme oder Schichten herstellen, reicht die einfache Stabilisierung durch Verzahnung der Polymerketten nicht mehr aus. Es ist dann notwendig, die einzelnen Ketten chemisch miteinander zu verbinden, also eine Quervernetzung zwischen den einzelnen Molekülketten zu schaffen. Dazu kann man als Quervernetzer ein di- oder multifunktionelles PEG-Acrylat zugeben, welches bei der Polymerisation zu einer chemischen Kopplung der Polymerketten und somit zu einer deutlichen Steigerung der Stabilität führt (**Abb. 115**). Damit nimmt auch die Löslichkeit des Polymers ab. Den Grad der Quervernetzung kann man durch den Massenanteil des Quervernetzers steuern. Maximale Vernetzung wird erreicht, wenn nur multifunktionelle Macromere (polymerisierbare Mono- oder Oligomere) verwendet werden. Das entsprechende Polymer besteht dann idealerweise nur noch aus einem einzigen, stark verzweigten Molekül. Allerdings wird der Vernetzungsgrad bei einem System,

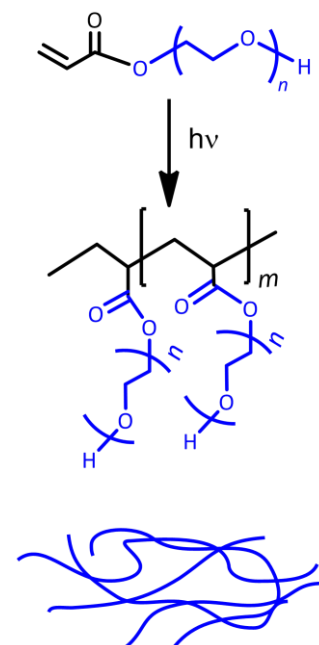


Abb. 114. Schema der Polymerisation von PEG-Acrylaten zu langen Polymerketten ohne intermolekulare Quervernetzung.

welches nur homofunktionelle Gruppen trägt – also nur eine Sorte funktioneller Gruppen – durch eine Art *intramolekularen* Kurzschluss begrenzt (**Abb. 116**). Um dem vorzubeugen, geht man am einfachsten zu einem Zweikomponentensystem über. Dabei besitzt die eine Komponente beispielsweise nukleophile funktionelle Gruppen, während die andere Komponente elektrophile Funktionalitäten aufweist. So lassen sich bei Verwendung multifunktionaler Substrate hohe Vernetzungsgrade erzielen, da die Macromere nur noch *intermolekular* und nicht mehr *intramolekular* reagieren können. Übertragen auf die Herstellung hochgradig vernetzter PEG-Filme, müssen die elektrophilen und nukleophilen Polyethylenglykole mindestens zwei funktionellen Gruppen pro Molekül tragen. Noch besser sind polyfunktionelle Polyethylenglykole, die eine große Anzahl identischer, funktioneller Gruppen pro Molekül enthalten. Sie werden unter dem Begriff „*STAR-branched PEG*“ oder „*Multiarm-PEG*“ geführt und sind mit 4-8 funktionellen Gruppen pro Oligomer ab einer Molmasse von 2000 g/mol kommerziell erhältlich.

Für die folgenden Experimente werden 4-armige STAR-PEGs mit einer Molmasse von 2000 g/mol (2 kDa) verwendet, da sie auf der einen Seite eine hohen Anzahl funktioneller Gruppen pro Molekül bieten, ohne jedoch ihren PEG-Charakter zu verlieren (Biokompatibilität). Die eingesetzten STAR-PEGs bestehen aus der Ketopentose Ribulose, an deren vier OH-Gruppen jeweils eine PEG-Kette mit etwa 10 EG-Einheiten gebunden und mit einer funktionellen Gruppe terminiert ist. Als nukleophile Komponente kommen Hydroxy- oder Amino-terminierte STAR-PEGs in Frage. Aufgrund der deutlich höheren Reaktivität wurden ausschließlich die letztere verwendet (STAR2k-NH₂). Als elektrophile Komponente wurden Epoxid-terminierte STAR-PEGs verwendet (STAR2k-EPX). Die Vorteile Epoxid-terminierter Polyethylenglykole wurden bereits im letzten Abschnitt bei der Kopplung an oberflächengebundene Aminogruppen ausführlich diskutiert (Abschnitt 5.2.1). Damit besteht das Zweikomponentensystem aus Amino- oder Epoxid-terminierten, 4-armigen STAR-PEGs mit einer Molmasse von 2 kDa (**Abb. 117**).

Um die beiden Komponenten als dünne Schicht auf einen geeigneten flachen Träger aufzubringen, wird wieder das Spincoating-Verfahren verwendet. Dazu werden beide Komponenten in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, dessen Wahl dabei auf den Träger angepasst werden muss. Dabei ist von Vorteil, dass sich Polyethylenglykole mit Ausnahme unpolarer Lösungsmitteln wie Kohlenwasserstoffen in nahezu allen organischen Flüssigkeiten wie auch in Wasser lösen. Als Substrat können eine Vielzahl flacher Träger verwendet werden. Gute Resultate hinsichtlich der Homogenität des PEG-Films nach dem Spincoating ergaben sich bei Verwendung goldbedampfter Siliziumwafer in Verbindung mit Chloroform als Lösungsmittel für die STAR-PEGs. Im Gegensatz zu den SAMs der letzten Kapitel, hat das Goldsubstrat hier einzig die Aufgabe, eine glatte und leicht zu säubernde Oberfläche bereit zu stellen. Alternativ können in Ethanol gelöste STAR-PEGs auch auf

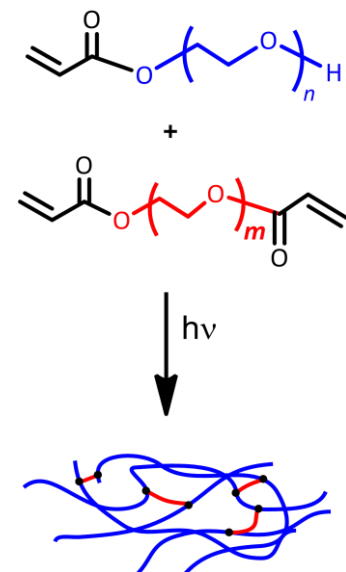


Abb. 115. Schema einer Polymerisation mit Quervernetzer; die einzelnen Polymerketten sind chemisch mit einander verbunden.

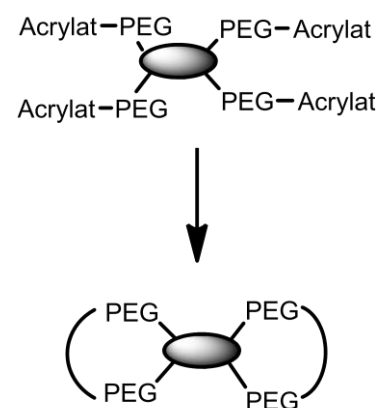


Abb. 116. Intramolekularer „Kurzschluss“ bei Verwendung homofunktionaler STAR-PEGs am Beispiel eines Multi-Acrylats

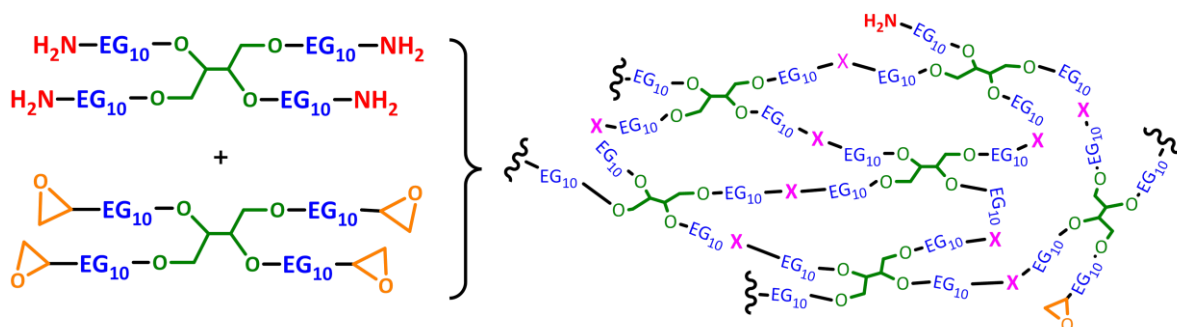


Abb. 117. Kopplung Amino- und Epoxid-terminierter, 4-armiger STAR-PEGs (STAR2k-NH₂ und STAR2k-EPX) zu einem hochgradig quervernetzten, dreidimensionalen Polyethylenglykol-Netzwerk.

Glas- oder Siliziumsubstrate aufgebracht werden. Allerdings sind PEG-Filme auf Goldsubstraten wegen der hohen Reflektivität des Metalls am zuverlässigsten ellipsometrisch und IRRAS-spektroskopisch zu charakterisieren. Ferner führt die Leitfähigkeit zu einer Vermeidung von Aufladungseffekten bei röntgenspektroskopischer- und elektronenmikroskopischer Untersuchung (XPS und REM). Vor allem aber gibt es bei Verwendung des Goldsubstrats eine erfolgreiche Präparationsmethode, den quervernetzten PEG-Film von dem Substrat wieder abzuheben. Daher wurde – sofern nicht anders erwähnt – goldbedampfte Siliziumsubstrate verwendet.

Damit ähnelt die Präparation dem in Abschnitt 5.2.3 beschriebenen Verfahren zur Kopplung der epoxid-terminierten, linear PEGs an die Amino-terminierten iNBPT-Filme. Die beiden PEG-Komponenten werden separat in Chloroform gelöst, kurz vor Verwendung im Verhältnis 1:1 gemischt und per Spincoating auf das Goldsubstrat aufgetragen (**Abb. 118a**). Zur besseren Haftung werden die Goldwafer vor ihrer Verwendung für 15 Minuten mit einer ozonbildenden UV-Lampe gereinigt und mit Ethanol abgespült. Vorhandene organische Verunreinigungen lassen sich so von der Oberfläche entfernen, was zu einer Erhöhung der Reproduzierbarkeit und Homogenität der PEG-Filme nach dem Spincoating-Prozess führt. Die thermische Quervernetzung wird genauso wie die PEG-Kopplung an den iNBPT-Film bei 80 °C für 6 Stunden unter Schutzgas durchgeführt (**Abb. 118b**). Zur Entfernung von überschüssigem PEG werden die Proben schließlich für 30 Sekunden im Ultraschallbad gereinigt, während Proben für die Membranpräparation alternativ für mehrere Stunden in Chloroform gelegt werden (**Abb. 118c**).

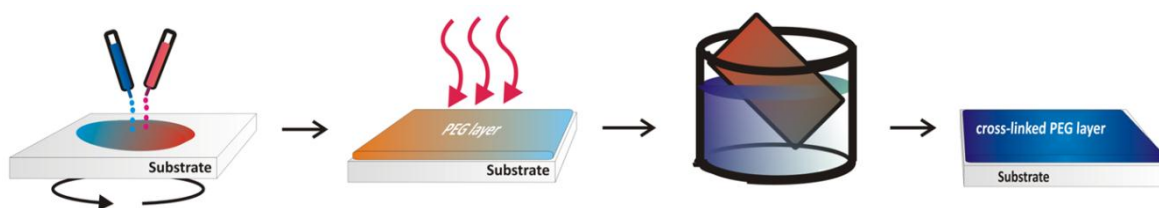


Abb. 118. Präparation dünner, quervernetzter Polyethylenglykol-Filme: (a) Epoxid- und Amino-terminiertes STAR-PEG wird mittels Spincoating als dünner Film auf ein Substrat aufgebracht und (b) die beiden Komponenten thermisch bei 80 °C quervernetzt. (c) Nicht reagiertes PEG wird im Ultraschallbad entfernt.

5.3.2 Charakterisierung der PEG-Filme mittels Ellipsometrie und XPS

Die auf Goldsubstraten präparierten PEG-Filme werden als erstes ellipsometrisch bezüglich ihrer Schichtdicken charakterisiert. Dazu werden ihre Filmdicken direkt nach dem Spincoating-Prozess und dann noch einmal nach der Ultraschallbehandlung bestimmt. Es zeigt sich ein klarer Zusammenhang zwischen den Filmdicken und der verwendeten Konzentration der PEG-Lösung in Chloroform. In **Abb. 119a** sind die entsprechenden Werte bei einer Spincoating-Geschwindigkeit von

4000 Umdrehungen pro Minute gegen die Konzentration der PEG-Lösung aufgetragen. Im Bereich von 0.75–30 mg/ml (Massenkonzentration, d.h. Masse an PEG pro Volumen Lösung) erhält man PEG-Filmdicken zwischen 6 und 200 nm. Nach Quervernetzung und Ultraschallbehandlung ergibt sich erneut ein linearer Zusammenhang zwischen den logarithmischen Werten der Filmdicke und der Konzentration. Die Abweichung in Form eines Materialverlusts ist bei kleinen Konzentrationen am offenkundigsten ausgeprägt. Trägt man den absoluten Materialverlust gegen die Konzentration auf, wird ersichtlich, dass die Verringerung der Filmdicken unabhängig von der Konzentration bei 2–3 nm liegt (**Abb. 119b**). Der auf die Filmdicke nach dem Spincoating-Prozess bezogene, relative Materialverlust zeigt daher eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit (**Abb. 119c**). Trotzdem ist der geringe Schichtdickenverlust nach der Ultraschallbehandlung ein klares Anzeichen für die Vernetzung innerhalb der PEG-Schicht. Ohne das Erhitzen wird der Film schon durch bloßes Abspülen nahezu komplett wieder entfernt. Gleiches gilt, wenn nur eine Komponente aufgetragen und für 8 Stunden bei 80 °C erhitzt wird.

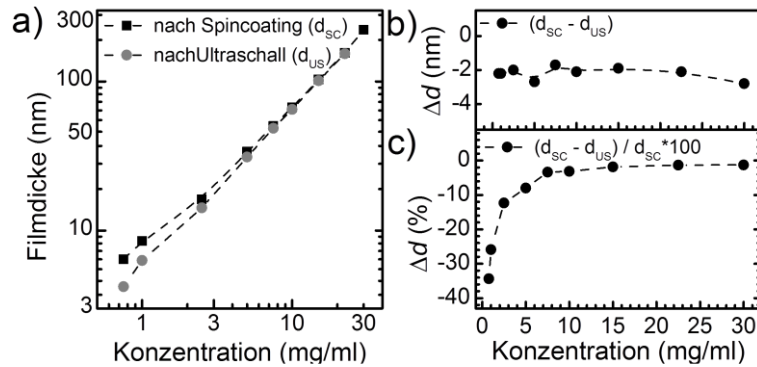


Abb. 119. (a) Abhängigkeit der PEG-Filmdicken von der Konzentration der verwendeten PEG-Lösung nach dem Auftragen auf einen Goldsubstrat mittels Spincoating-Technik (d_{sc}) und nach Quervernetzung und Ultraschallbehandlung (d_{us}). Materialverlust während der PEG-Film Präparation als Differenz der Filmdicken d_{sc} und d_{us} in Nanometern (b) bzw. in Prozent (c).

Die einfache Kontrolle der Filmdicke durch Wahl der Konzentration der PEG-Lösung erlaubt es, filmdickenabhängige Entwicklungen der in einem XPS-Spektrum vorkommenden PEG-Signale zu untersuchen. **Abb. 120a** zeigt exemplarisch das XPS-Spektrum für einen 20 nm PEG-Film, welches von den Emissionen des Kohlenstoffs (C 1s) und des Sauerstoffs (O 1s) als den einzigen Bestandteilen von Polyethylenglykolen dominiert wird. Bei dünnen PEG-Filmen findet sich zusätzlich noch das Au 4f Signal des Goldsubstrates. Die N 1s Emission der Aminogruppen ist so schwach, dass sie nur in den Detailspektren zu identifizieren ist.

Trägt man die XPS-Intensitäten von Kohlenstoff, Sauerstoff, Gold und Stickstoff gegen die ellipsometrisch gemessene PEG-Filmdicke auf, erhält einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Intensität der Emission und der Filmdicke. Der filmdickenabhängige Verlauf der Au 4f-Intensität in **Abb. 120b** deutet auf eine exponentielle Abschwächung des Au 4f Signals mit steigender Filmdicke wie es für das XPS-Signal eines Substrats zu erwarten ist, das gemäß Gleichung 10 von einer darüberliegenden (PEG)-Schicht abgeschwächt wird. Eine Anpassung der Intensitätswerte an eine Exponentialfunktion vom Typ $I \propto \exp(-d/\lambda)$ ergibt die Abschwächungslänge $\lambda_{Au\ 4f}$ für Photoelektronen mit einer kinetischen Energie von ~ 1170 eV beim Durchgang durch den PEG-Film.

Der Wert der Abschwächungslänge λ gibt die Dicke des Films an, nach der die Intensität der Photoelektronen bezogen auf einen beliebigen Startwert auf $\sim 37\%$ ($1/e$) gesunken ist. Die Abschwächungslänge ist von der kinetischen Energie der Photoelektronen abhängig und für $\lambda_{Au\ 4f}$ wurde der Wert $5.0 (\pm 0.3)$ nm ermittelt.

In ähnlicher Weise sind in **Abb. 120c** und **d** die C 1s und O 1s Intensitäten der PEG-Filme gegen ihre ellipsometrischen Schichtdicken aufgetragen. Im Gegensatz zum Substratsignal nimmt hier die Intensität mit steigender Filmdicke d gemäß Gleichung 8 zu, da diese Photoelektronen in dem Film

selber erzeugt werden. Allerdings nähert sich die Intensität I aufgrund der Selbstabschwächung asymptotisch einem Maximum an. Mathematisch wird das durch eine Exponentialfunktion vom Typ:

$$(Gl. 29) \quad I \propto [1 - \exp(-d/\lambda)]$$

ausgedrückt. Werden die Intensitätswerte der C 1s- und O 1s-Emission gegen die ellipsometrische Dicke des PEG-Films aufgetragen und an diese Gleichung angepasst, erhält man analog die Abschwächungslängen für Photoelektronen mit der kinetischen Energie der beiden Emission. Für das C 1s-Signal mit einer Energie von ~ 970 eV ergibt sich dann eine Abschwächungslänge λ_{C1s} von $3.9(\pm 0.3)$ nm und für das O 1s-Signal mit der Energie von ~ 725 eV entsprechend eine Abschwächungslänge λ_{O1s} von $3.3(\pm 0.6)$ nm. Für das N 1s Signal des Stickstoffs sollte eine analoge Beziehung zwischen Signalintensität und Filmdicke gelten. **Abb. 120e** zeigt allerdings, dass die N 1s Intensitäten offenbar unabhängig von der Filmdicke sind und zudem stark

schwanken. Der stöchiometrische Anteil des Stickstoffs und damit die Intensität des N 1s Signals ist im Vergleich zum Sauerstoff und Kohlenstoff gering. Zudem wird ein vorhandener Trend durch messtechnische Ungenauigkeiten und Schwankungen innerhalb des Films überlagert.

Trägt man die für Au 4f, C 1s und O 1s erhaltenen Abschwächungslängen $\lambda_{Au\ 4f}$, $\lambda_{C\ 1s}$ und $\lambda_{O\ 1s}$ gegen die kinetische Energie des jeweiligen Emissionen auf, erkennt man, dass die drei Werte näherungsweise auf einer Geraden liegen (**Abb. 121**). Wie erwartet nimmt die Abschwächungslänge mit steigender kinetischer Energie der Elektronen zu und die Informationstiefe entsprechend ab. Interessant ist ein Vergleich der Abschwächungslängen für die PEG-Filme mit denen, die man für SAMs erhält (**Abb. 121**).¹⁶⁴ Die Werte sind für die PEG-Filme fast doppelt so groß wie diejenigen, die für eine Reihe von Alkanthiol-SAMs erhalten werden. Der Unterschied resultiert aus einer geringeren spezifischen Dichte der PEG-Filme. SEAH und DENCH haben einen empirischen Zusammenhang zwischen der Dichte eines organischen Films ρ (in g/cm^3) und der von der kinetischen Energie E (in eV) abhängigen Abschwächungslänge λ (in nm) beschreiben:¹⁰⁹

$$(Gl. 30) \quad \lambda(E) = \gamma \rho \cdot [49/E^2 + 0.11 \cdot \sqrt{E}].$$

Mit Hilfe dieser Gleichung und den entsprechenden Abschwächungslängen erhält man für die PEG-Filme eine spezifische Dichte von $0.84(\pm 0.1) g/cm^3$. Der Wert liegt deutlich unter dem von fes-

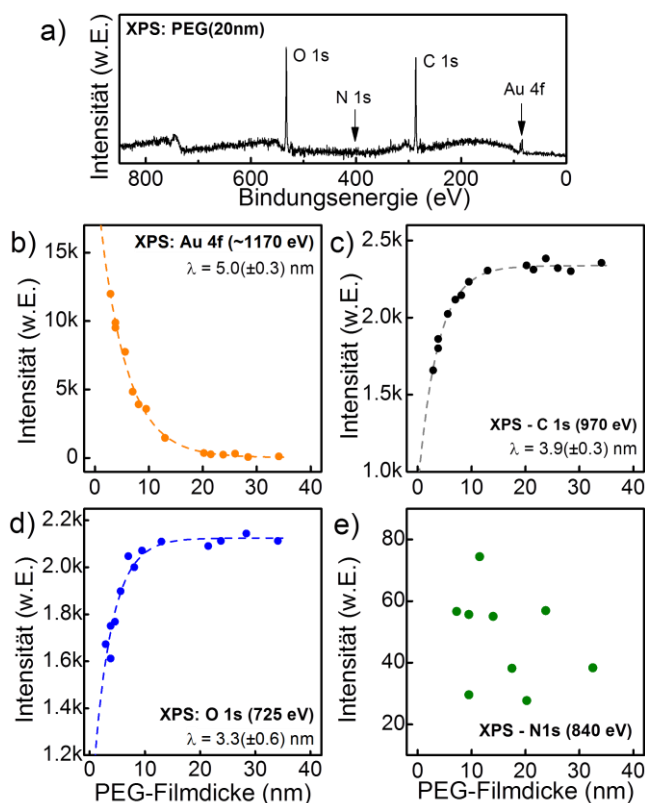


Abb. 120. (a) XPS-Übersichtsspektrum eines 20 nm PEG-Films; (b-e) die Au 4f, C 1s, O 1s und N 1s Intensitäten der PEG-Filme aufgetragen gegen die ellipsometrisch bestimmte Filmdicke zur Bestimmung der Abschwächungslängen.

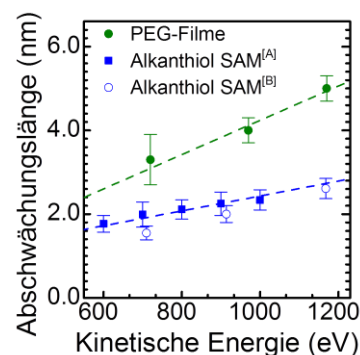


Abb. 121. Abhängigkeit der Abschwächungslängen von der kinetischen Energie der Photoelektronen. [A] aus Referenz [106] und [B] experimentell ermittelt (4.4.1).

tem Polyethylenglykol, das eine Dichte von $\sim 1.1 \text{ g/cm}^3$ hat.

Entsprechende Experimente wurden auch mit PMMA-Filmen durchgeführt. ROBERTS et al. haben PMMA per Spincoating auf Siliziumoberflächen präpariert, die Schichtdicke der Filme ellipsometrisch bestimmt und die Intensität der XPS-Signale in Abhängigkeit der Filmdicke aufgetragen.¹⁶⁵ Sie erhielten Abschwächungslängen, die mit der Dichte von festem PMMA (1.2 g/cm^3) konform war. Eine Erklärung für die hohen Abschwächungslängen und den daraus resultierenden, scheinbar geringen Dichten der hier verwendeten PEG-Filme, ist in dem Präparationsprozess zu finden. Insbesondere bei den dünnen PEG-Filmen kommt es zu einem erheblichen, relativen Materialverlust, was sich in einer filmdickenabhängigen Dichte der PEG-Filme widerspiegelt. Dünnere Filme haben eine geringere Dichte, dickere eine höhere. Da bei der Bestimmung der Abschwächungslängen aber vor allem die dünnen PEG-Filme bis 40 nm vertreten sind, geben die erhaltenen Abschwächungslängen auch nur die Parameter der dünneren Filme wieder. Bei den PMMA ist eine derartige Abhängigkeit der Dichte von der Filmdicke nicht gegeben, weshalb hier Abschwächungslängen erhalten wurden, die mit der Dichte des festen PMMA übereinstimmen.

5.3.3 In-situ Charakterisierung der PEG-Filme mittels IRRAS Spektroskopie

Die Quervernetzung kann auch direkt, in-situ mittels Infrarot-Spektroskopie verfolgt werden. Dazu wird die Probe auf ein temperaturgesteuertes Heizelement montiert. Dabei handelt es sich um ein Peltier-Element, an dem zur Temperaturkontrolle zwei Kaltleiter-Widerstände (Pt100) befestigt sind (**Abb. 122d**). Die Quervernetzung wird dann unter Vakuumbedingungen ($p < 1 \text{ mbar}$) in der Messkammer des Vakuum IR-Spektrometers durchgeführt. Damit können während der thermischen Quervernetzung fortwährend IR-Spektren aufgenommen werden, um die Reaktion der beiden PEG-Komponenten auf dem Substrat zu verfolgen.

Die IR-Spektren von STAR2k-EPX und STAR2k-NH₂ werden zunächst separat gemessen und sind auf den ersten Blick fast identisch (**Abb. 122a**). Sie zeigen nahezu exakt das für amorphe Polyethylenglykole typische Bandenmuster, dessen Zuordnung in **Tabelle 2** zusammengefasst ist.^{127, 166-167}

Dass sich die beiden Spektren nur marginal unterscheiden, ist nicht verwunderlich, da der überwiegende Teil der Moleküle identisch ist. Dennoch lässt sich bei 913 cm^{-1} die symmetrische (C-O)-Steckschwingung der Epoxidgruppe identifizieren. Der

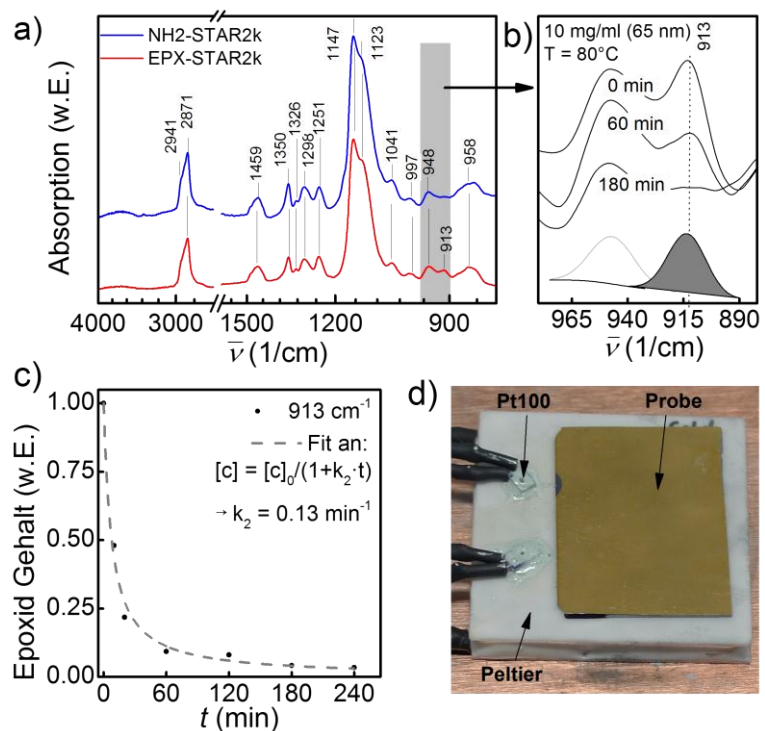


Abb. 122. (a) IRRAS Spektren von Amino- und Epoxid-terminierten STAR-PEGs; (b) detaillierter Ausschnitt des Bereichs der Epoxidbande einer Mischung aus STAR2k-NH₂ und -EXP, deren zeitliche Änderung bei 80°C und exemplarisch die Quantifizierung der Epoxidbande; (c) zeitabhängiger Verlauf der Intensität der Epoxidbande während des Vernetzungsprozesses; (d) Foto des zum Erhitzen der Proben verwendeten Peltier Element.

Wellenzahl ($\frac{1}{\text{cm}}$)	Zuordnung	Wellenzahl ($\frac{1}{\text{cm}}$)	Zuordnung
2941 sh	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ sym. stretch.	1147 s	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ asym. stretch.
2871 s	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ asym. stretch.	1123 sh	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ (")
1459 m	$\delta(\text{CH}_2)$ scissoring	1041 w	$\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ (")
1350 m	$\omega(\text{CH}_2)$ wagging, gauche	948 m	$\rho(\text{CH}_2)$ rocking
1326 w	$\omega(\text{CH}_2)$ wagging, trans	913 w	$\nu_{\text{s}}(\text{COC})_{\text{EXP}}$ sym. stretch.
298 m	$\tau(\text{CH}_2)$ twisting	858 m	$\nu_{\text{s}}(\text{COC})$ sym. stretch.
1251 m	$\tau(\text{CH}_2)$ twisting		

Tabelle 2. Infrarot-Bandenordnung für STAR2k-EPX und STAR2k-NH₂. Es lassen sich nahezu alle Valenz- und Deformationsschwingungen nachweisen (stretch = Streck.; scissoring = Scher.; wagging = Wipp.; twisting = Dreh.; rocking = Schaukel; w,m,s = schwache, mittlere und starke Intensität; sh = Schulter).

entsprechende Bereich ist in **Abb. 122b** noch einmal detailliert dargestellt. Vor dem Erhitzen der beiden PEG-Komponenten, ist die Bande deutlich zu erkennen. Wird die Probe auf 80°C erwärmt, beginnen die Aminogruppen mit den Epoxidgruppen unter Ringöffnung zu reagieren und die charakteristische Epoxidbande verschwindet. Schon nach 60 Minuten hat sie merklich an Intensität verloren nach 180 Minuten ist die Bande kaum noch nachweisbar. Trotz der relativ geringen Intensität kann die Epoxidbande quantifiziert werden, indem sie an eine Lorentzfunktion angepasst wird. Die so erhaltenen Flächeninhalte sind ein relatives Maß für den Gehalt an Epoxidgruppen innerhalb des PEG-Films. Trägt man die Werte gegen die Reaktionszeit auf, erhält man einen Zusammenhang zwischen Konzentration und Zeit, mit dessen Hilfe sich die Kinetik der Quervernetzung anhand des Abbaus der Epoxidgruppen beschreiben lässt (**Abb. 122c**). Um die Reaktionsordnung und Geschwindigkeitskonstante zu bestimmen, werden die Punkte an die entsprechenden Funktionen für eine Reaktion erster oder zweiter Ordnung angepasst. **Abb. 122c** zeigt, dass sich die Punkte gut an eine Funktion 2. Ordnung vom Typ $c = c_0 / (1 + k_2 \cdot t)$ anpassen lassen. Der Geschwindigkeitskoeffizient zweiter Ordnung k_2 beträgt dann 0.13 min^{-1} bei 80 °C Reaktionstemperatur. Er ist temperaturabhängig, variiert aber nur wenig mit Filmdicke der PEG-Schicht. Die Reaktion zweiter Ordnung zeigt zudem, dass der Abbau der Epoxidgruppe intermolekular verläuft und die Epoxidgruppe nicht thermisch abgebaut wird, was einer Reaktion erster Ordnung entspräche.

5.3.4 Temperaturabhängiges Quellverhalten quervernetzter PEG-Filme

Quervernetzte und hydrophile Polymere sind zwar wasserunlöslich, trotzdem können sie zum Teil beträchtliche Mengen an Wasser aufnehmen. Da sie oftmals eine gelartige Konsistenz aufweisen, werden sie auch als Hydrogele bezeichnet. Die Wasseraufnahme ist reversibel und Hydrogele zeigen durch das eingelagerte Wasser ein charakteristisches Quellverhalten. Voraussetzung dafür, dass hydrophile Polymere dieses Verhalten zeigen, ist dass ihre Molekülstruktur quervernetzt sein muss. Genau das erfüllen die eben besprochenen PEG-Filme (**Abb. 117**). Sie bilden ein dreidimensional verknüpftes, polymeres Netzwerk und es ist daher zu erwarten, dass auch sie Wasser einlagern und so ihr Volumen vergrößern können. Eine Volu-

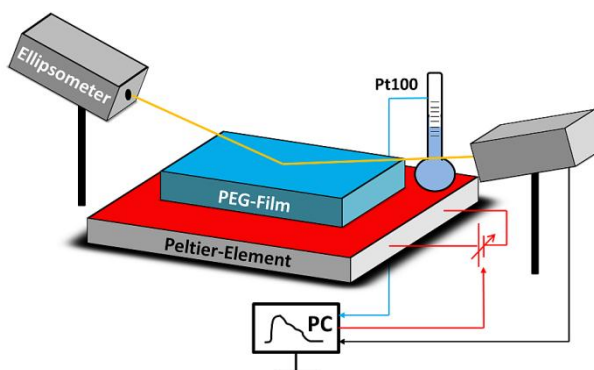


Abb. 123. Ellipsometrische Messung des temperaturabhängigen Quellverhaltens von PEG-Filmen.

menzunahme zeigt sich bei dünnen Filmen in Form einer Schichtdickenzunahme, die am einfachsten mittels Ellipsometrie gemessen werden kann. Eine Möglichkeit, den Zuwachs zu bestimmen ist, die Filme einmal an Luft und einmal unter Wasser zu messen. Allerdings erhält man dann nur die beiden Extremwerte.

Daher wurde eine Methode entwickelt, die die Zunahme der PEG-Filmstärke kontinuierlich bei sukzessiver Wassereinlagerung misst. Die Probe wurde dazu auf einem Peltier-Element montiert, um so die Dicke des PEG-Film ellipsometrisch bei unterschiedlichen Temperaturen T bestimmen zu können (**Abb. 123**).

Unter Normalbedingungen ($T_A=22^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchte $rh=21\%$) hat beispielsweise der in **Abb. 124** gezeigte PEG-Film eine Dicke von 101 nm und selbst bei einer Erhöhung der Temperatur auf über 80°C ändert sich diese nur unwesentlich. Gleiches gilt auch für PEG-Filme mit anderen Dicken. Das bedeutet, dass die Filme unter den genannten Normalbedingungen keine oder nur unwesentliche Mengen an Wasser gespeichert haben. Wird die Temperatur des Peltier-Elements dagegen gesenkt, zeigt der Film ab 15°C einen leichten Anstieg der Schichtdicke auf 110 nm (**Abb. 124b**). Bei weiterer Absenkung der Temperatur auf $\sim 3^\circ\text{C}$ erreicht der Film schließlich seine maximale Dicke von 198 nm. Ferner ist in **Abb. 124b** zu erkennen, dass das Quellverhalten vollständig reversibel ist und der Film auf Temperaturänderung im Rahmen der gezeigten Zeitskala instantan reagiert.

Die Zunahme der Schichtdicke bei sinkender Temperatur resultiert aus einer Adsorption von Luftfeuchtigkeit in den PEG-Film. Durch die Temperaturerniedrigung steigt direkt über der Probe die relative Luftfeuchtigkeit an, bis sie einen Wert erreicht, bei dem sich der Wasserdampf in dem PEG-Film abzuscheiden beginnt. Bei 15°C auf der Probe entspricht das unter den oben genannten Normalbedingungen (22°C Umgebungstemperatur) einer relativen Luftfeuchte von $\sim 40\%$ (**Abb. 125**). Sinkt die Temperatur weiter, steigt die relative Luftfeuchtigkeit entsprechend an, was sich ellipsometrisch in einem Anstieg der Filmstärke zeigt. Die maximale Filmstärke ist durch die Sättigung des PEG-Films gegeben und mit einer unteren kritischen Temperatur (T_c) verknüpft, die von experimentellen Parametern wie Umgebungstemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit abhängt. Unterhalb dieser Temperatur bilden sich auf der Oberfläche des PEG-Films zudem kleine Wassertropfen, da der gesättigte PEG-Film kein weiteres Wasser mehr aufzunehmen vermag. Für den 100 nm PEG-Film entspricht T_c einer relativen Luftfeuchte von $>85\%$ direkt über dem PEG-Film. Adsorption und Verdunstung stehen nicht mehr im Gleichgewicht und es kommt zur Abschei-

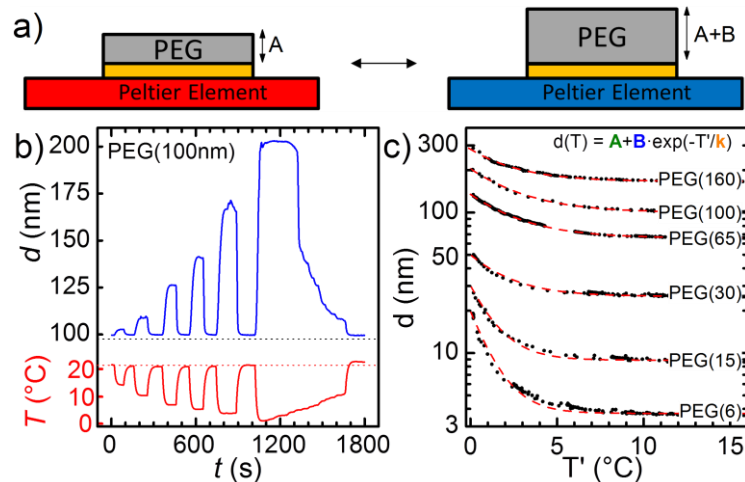


Abb. 124. (a) Schema der Bestimmung der Schwelleigenschaften von PEG-Filmen mittels Peltier Element; (b) definierte Temperaturpulse des Peltiers und die entsprechende Antwort eines PEG-Films durch Änderung seiner Schichtdicke; (c) Ergebnisse kontinuierlicher, temperaturabhängiger Schichtdickenmessungen von PEG-Filmen zwischen 6 - 160 nm.

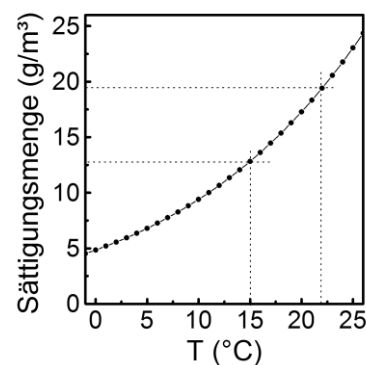


Abb. 125. Sättigungsmenge von Wasserdampf in Luft bei 1013 hPa.

dung von flüssigem Wasser.

Trägt man die Schichtdicke gegen die Temperatur des PEG-Films auf und setzt die maximale Filmdicke, die bei T_c erreicht wird, auf $0\text{ }^\circ\text{C}$, erhält man für die verschiedenen PEG-Filme den in **Abb. 124c** gezeigten Verlauf. Die Verschiebung der Temperaturskala kann vorgenommen, da es vornehmlich auf den temperaturabhängigen Verlauf der Filmdicke ankommt und nicht die absoluten Wertepaare von Temperatur und Filmdicke. Dadurch lässt sich die Filmdicke d unabhängig von den Umgebungsbedingungen in Abhängigkeit von der normierten Temperatur T' darstellen:

$$(Gl. 31) \quad d(T') = A + B \cdot \exp(-T'/k)$$

Die Parameter A , B und k beschreiben die Quelleigenschaften des PEG-Films, wobei die Frage zu klären ist, in wie weit die einzelnen Parameter von der Filmdicke abhängen. Der Parameter A gibt die Filmdicke im wasserfreien Zustand, also bei hohen Temperaturen an, während B die maximal *zusätzliche* Filmdicke aufgrund des Anschwellens entspricht (**Abb. 124a**). Damit ist $A+B$ der Wert für eine maximal *erreichbare* Filmdicke und das Verhältnis von B zu A kann als Quellverhältnis definiert werden. Der Parameter k ist der Kehrwert eines Sensitivitätsfaktor, der beschreibt, wie empfindlich der PEG-Film auf Temperaturänderungen reagiert.

Die Schichtdickenabhängigkeit der Parameter A , B und k ist in **Abb. 126** aufgetragen. Parameter A weniger interessant, da er die Filmdicke bei hohen Temperaturen wiedergibt und deshalb einfach auf sich selber abgebildet wird (grüne Gerade mit der Steigung eins). Der Parameter B verläuft ab einer Filmdicke von 30 nm nahezu analog zu A , was bedeutet, dass sich die Filmdicken durch Wassereinlagerung ziemlich genau verdoppeln.

Aussagekräftiger als der Verlauf von A und B selber, ist der des Verhältnisses B/A der beiden Parameter (**Abb. 126b**). Es kann als ein Quellverhältnis interpretiert werden, das den maximalen Zuwachs bezogen auf die Standardfilmdicke bei Raumtemperatur beschreibt. Für den dünnsten PEG-Film mit ~ 4 nm liegt das Verhältnis bei rund 2.5 und sinkt dann kontinuierlich, bis es für PEG-Filme ab 30 nm einen Wert von ~ 1.0 annimmt und dann für alle dickeren Filme konstant bleibt. Es ist allgemein bekannt, dass das Quellverhältnis von Hydrogelen von deren Vernetzungsgrad abhängt. Je niedriger dieser ist, desto größer das Quellverhältnis. Übertragen auf die hier betrachteten PEG-Filme bedeutet das, dass die Quervernetzung bei den dünnsten Filmen am geringsten ist dann kontinuierlich ansteigt und ab ca. 30 nm dicken Filmen einen Höchstwertwert erreicht.

Interessant ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich des Quellverhältnisses mit Verlauf des relativen Materialverlusts bei der

Präparation der Filme wie er in **Abb. 119c** auf Seite 98 gezeigt war. Dessen filmdickenabhängiger Trend ist annähernd reziprok zum B/A Verhältnis und damit gleichlaufend mit der Quervernetzung. Die dünnen Filme verlieren nach dem Präparationsprozesses aufgrund unvollständiger Quervernetzung am meisten Material, haben daher den niedrigsten Quervernetzungsgrad und zeigen dementsprechend das größte

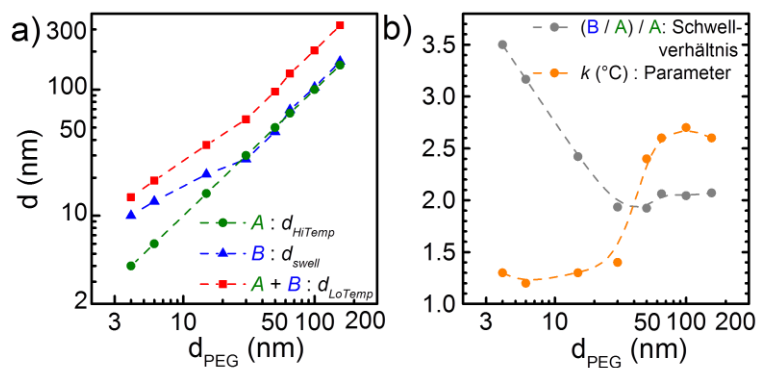


Abb. 126. Abhängigkeit des Schwellverhaltens von PEG-Filmen unterschiedlicher Dicke ausgedrückt durch die Parameter der Gleichung 31; (a) Parameter A und B , sowie $A+B$; (b) Parameter k und das Verhältnis der Parameter B und A .

Quellverhältnis. Ab 30 nm liegt der Materialverlust bei unter 5 %, was ziemlich genau der Filmdicke entspricht, ab der das Quellverhältnis konstant bleibt.

5.3.5 Proteinabweisende Eigenschaften der PEG-Filme

Zu der wichtigsten Eigenschaft von Polyethylenglykolen zählt die Biokompatibilität, also die Verhinderung unspezifischer Proteinadsorption auf ihrer Oberfläche. Daher ist es unumgänglich, die hier beschriebenen PEG-Filme unter diesem Aspekt zu charakterisieren. Ein Standardverfahren zur Ermittlung der Proteinresistenz ist die Untersuchung einer Oberfläche mit Hilfe von Proteinen, die eine starke Tendenz zu unspezifischer Adsorption zeigen. Die Probe wird in eine gepufferte Lösung des entsprechenden Proteins getaucht und anschließend mit destilliertem Wasser abzuspülen. Durch die Scherkräfte des Abspülens werden alle Proteine abgewaschen, die nicht oder nur sehr locker an der Oberfläche haften. Auf ihr verbleibende Proteinmengen lassen sich z.B. ellipsometrisch anhand einer Schichtdickenzunahme durch den Proteinfilm bestimmen. So wurden in Abschnitt 5.2.3 beispielsweise die PEGylierte SAMs auf ihre Proteinresistenz untersucht. Allerdings ist dieses Verfahren alleine nicht eindeutig und es muss durch weitere Messungen verifiziert werden, dass die zusätzliche ellipsometrische Filmdicke tatsächlich aus einem adsorbierten Proteinfilm besteht. Ferner sind solche Proteinschichten nur wenige Nanometer dick, was die ellipsometrische Bestimmung bei nativen Filmdicken von bis zu 100 nm wenig zuverlässig macht.

Daher wurden eine anders Verfahren angewendet, um die Menge des auf einem PEG-Film adsorbierten Proteins nachzuweisen. XPS-spektroskopisch können Proteine auf Oberflächen anhand des N 1s Stickstoffsignals quantifiziert und durch C 1s Kohlenstoffspektren verifiziert werden. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die PEG-Filme aufgrund der verwendeten Amino-terminierten PEGs schon eine intrinsische Stickstoffmenge beinhalten. Allerdings ist diese relativ gering und lässt sich deshalb leicht herausrechnen.

Als Testproteine zur Bestimmung der Biokompatibilität wurde zum einen Fibrinogen verwendet. Dieses Protein mit einer Größe von 340 kDa wird für diesen Zweck häufig eingesetzt, da es eine starke Tendenz aufweist, auf nahezu allen Materialien zu adsorbieren. Oberflächen, die der Adsorption von Fibrinogen widerstehen, können als proteinresistent oder biokompatibel angesehen werden. Zum anderen wurde Avidin eingesetzt. Dieses mit einer Größe von 68 kDa deutlich kleinere Protein besitzt eine geringe Tendenz der Oberflächenadsorption, was sich natürlich in entsprechenden Adsorptionsexperimenten widerspiegeln sollte.

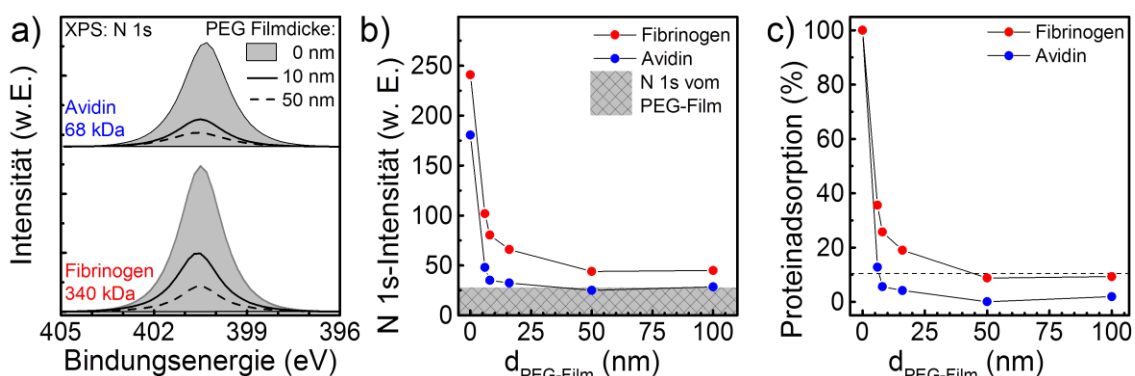


Abb. 127. Adsorption von Avidin und Fibrinogen auf PEG-Filmen unterschiedlicher Schichtdicke: (a) XPS N 1s Spektren nach der Proteinadsorption auf Goldsubstraten ohne und mit PEG-Filmen der Dicke 10 und 50 nm; (b) die XPS N 1s Intensitäten aufgetragen gegen die PEG-Filmdicke; (c) der daraus berechnete Gehalt der Proteinadsorption als Maß für die Biokompatibilität der PEG-Filme (gestichelten Linie stellt die Grenze zwischen vorhandener und fehlender Proteinresistenz dar).

In **Abb. 127a** sind die N 1s XPS-Spektren der Adsorptionsexperimente von Fibrinogen und Avidin auf PEG-Filme mit Schichtdicken zwischen 10 und 50 nm gezeigt. Als Referenz für eine hypothetische Filmdicke von null wurde eine gereinigte Goldoberfläche ohne PEG-Film eingesetzt, dessen Oberfläche wie erwartet bei der Adsorption sowohl von Avidin als auch von Fibrinogen die größten Stickstoffintensitäten zeigt. Deutlich wird zudem, dass mit zunehmender PEG-Filmdicke die Intensität des Stickstoffs abnimmt. In **Abbildung 127b** ist das noch einmal verdeutlicht, indem die Intensität des N 1s Signals nach Adsorptionsexperimenten auf sechs verschiedene PEG-Filme aufgetragen ist. Aufgrund des inhärenten Stickstoffgehalts der PEG-Film, gehen

die Intensitäten auch bei vollständiger Proteinresistenz nicht gegen Null, sondern verbleiben oberhalb des schraffierten Bereichs. Wird die Stickstoffintensität um diesen Offset korrigiert und auf den Wert der maximalen Adsorption bei reinen Goldoberflächen normalisiert, erhält man ein Maß für den Proteinadsorption auf dem PEG-Film und damit seiner Biokompatibilität (**Abb. 127c**). Klar zu erkennen ist die stärkere Tendenz von Fibrinogen, sich auf Oberflächen abzusetzen. Die PEG-Filme ab einer Dicke von 10 nm sind resistent gegenüber der Adsorption von Avidin (weniger als 10 % Proteinadsorption bezüglich einer nicht-PEGylierten Oberfläche), während bei Fibrinogen für die gleiche Proteinresistenz mindestens eine Filmdicke von 50 nm notwendig ist.

Um zu zeigen, dass das zusätzliche N 1s-Signal tatsächlich von der Adsorption der Proteine herührt, wurden zusätzlich die C 1s Kohlenstoffspektren herangezogen (**Abb. 128**). Als Referenz dient wieder eine reine Goldoberfläche. Die Form dieser C 1s Signale ist charakteristisch für Proteine. Im Fall der Fibrinogenadsorption sieht man nur bei dem PEG-Film mit 10 nm noch adsorbiertes Fibrinogen, während sich bei dickeren Filmen die Signale von Fibrinogen nicht mehr von Hintergrund der C 1s Signale des PEGs unterscheiden lassen. Gleiches gilt für Avidin. Aufgrund der geringeren Größe und Adsorptionsneigung ist schon bei PEG(10nm)-Filmen das Avidin-Signal kaum noch zu erkennen.

Aus den C 1s-Spektren leitet sich ferner ab, dass mit zunehmender Filmdicke das Maximum des C 1s-Signals des PEG-Kohlenstoffs zu höheren Bindungsenergien wandert. Die durch die Röntgenstrahlen in Goldsubstrat erzeugten Elektronen (Photoelektronen, BSE und SE) können bei steigender Filmdicke den Bereich der XPS-Informationstiefe nicht mehr erreichen, um den Verlust an Photoelektronen in dieser Schicht auszugleichen. Die oberste Schicht lädt sich daher immer stärker auf, je weiter sie vom Substrat entfernt ist.

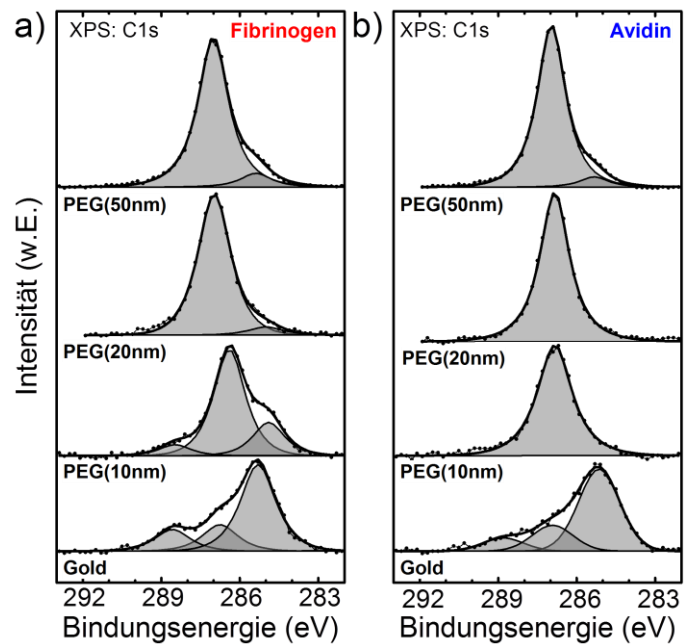


Abb. 128. XPS C 1s Spektren nach der Adsorption von Fibrinogen (links) und Avidin (rechts) auf Goldsubstraten ohne und mit PEG-Filmen der Dicke 10, 20 und 50 nm.

5.4 Verhalten quervernetzter PEG-Filme bei Elektronenbestrahlung im UHV

Eine wichtige Eigenschaft von Polyethylenglykol-Filmen ist ihre Reaktion auf Bestrahlung niederenergetischer Elektronen (< 20 keV). Ein derartiges Verhalten ist bis jetzt in erster Linie an PEG-terminierten, aliphatischen SAMs (vom Type Abb. 94a) in Bezug auf strahlungsinduzierte Veränderung der Proteinresistenz untersucht worden. So konnte festgestellt werden, dass ~2 nm dicke Ethylenglykol-terminierte SAMs bereits nach der Elektronenbestrahlung mit einer Dosis von nur 0.5 mC/cm² bei 50 eV ihre Proteinresistenz gegenüber Fibrinogen und Avidin verlieren.⁸⁰ Dieses Verhalten wurde vor allem mit dem Verlust von Ethylenglykol begründet. Bei den kurzen EG-Ketten der verwendeten SAMs reicht schon der Bruch einer (C-C)- bzw. (C-O)-Bindung aus, um das entsprechende Fragment von der Oberfläche zu lösen und dass der verbleibende Teil des SAMs nicht mehr proteinresistent ist. Die hier präsentierten PEG-Filme sind aber wesentlich dicker (10-100 nm), sodass eine Elektronenbestrahlung die Filmdicken zwar verringert, es sollte aber genügend PEG-Material vorhanden ein, damit der Film trotz Elektronenbestrahlung weiterhin proteinresistent bleibt.

In diesem Abschnitt werden zunächst die Auswirkungen der Bestrahlung auf Schichtdicke und chemische Zusammensetzung mittels der Standardmethoden zur Oberflächenanalyse wie XPS, NEXAFS und IRRAS untersucht. Anschließend werden die Auswirkungen der Bestrahlung auf die im letzten Kapitel besprochenen Eigenschaften der PEG-Filme wie den Quelleigenschaften und der Proteinresistenz diskutiert. Ferner wird ein Einfluss der Elektronenbestrahlung die Benetzbarkeit der PEG-Filme gezeigt.

5.4.1 *In-situ* XPS-Messungen und Elektronenbestrahlung.

XPS ist die einfachste spektroskopische Methode, um Informationen über die Auswirkungen einer Elektronenbestrahlung auf die chemische Zusammensetzung einer Oberfläche zu gewinnen. Die PEG-Filme werden dazu mit einer Elektronenkanone unter UHV-Bedingungen bestrahlt und anschließend in derselben Vakuumkammer XPS-spektroskopisch untersucht. Die Spektren der unbestrahlten PEG-Filme sehen ab einer Dicke von etwa 20 nm aufgrund der Selbstabschwächung der XPS-Signale nahezu identisch aus. In **Abb. 129** ist exemplarisch das XPS-Spektrum eines 40 nm dicken PEG Films dargestellt. Das Spektrum wird von dem O 1s Sauerstoffsignal bei ~534 eV und dem des C 1s Kohlenstoffs bei ~286 eV dominiert. Bei PEG-Filmen mit weniger als 20 nm kommt zusätzlich bei 84.0 eV noch das Au 4f-Signal des Goldsubstrats zum Vorschein. Ferner zeigen sich zwei weitere, schwache Signale bei 100 und 160 eV (Si 2s und Si 2p), die von einer Verunreinigung im STAR2k-Epoxid stammen und höchstwahrscheinlich von Überresten einer säulenchromatographischen Reinigung bei der Herstellung des PEG-Epoxids herrühren. Da der Anteil des Siliziums bezogen auf Kohlenstoff und Sauerstoff im Promillebereich liegt, wurde die Verunreinigung bei der weiteren Betrachtung vernachlässigt und auch nicht versucht, diese zu entfernen.

Im C 1s-Detailspektrum des unbestrahlten PEG-Filmes sieht man, dass es aus zwei Signalen besteht, die von zwei Kohlenstoffspezies stammen (**Abb. 130**, unten). Ein stärkeres Signal bei 286.4 eV (blau), welches typisch für den Kohlenstoff einer Ethergruppe ist, sowie ein deutlich schwächeres

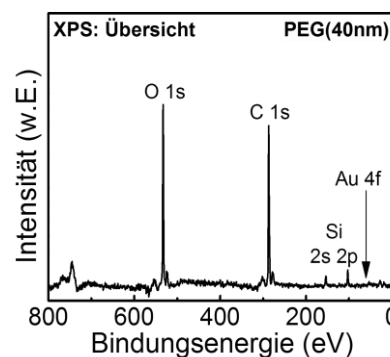


Abb. 129. XPS-Übersichtsspektrum eines 40 nm dicken PEG-Films auf einem Goldsubstrat.

bei 284.4 eV (grau), das von einer aliphatischen Kohlenstoffspezies stammt, an die kein Heteroatome gebunden ist. Mit einer Intensität von < 10 % bezüglich der Gesamtkohlenstoffintensitäten lässt es sich dem Kohlenstoffgerüst, an dessen Armen die vier PEG-Ketten hängen, zuordnen (Abb. 117).

Wird der PEG-Film mit Elektronen von 50 eV bestrahlt, erfährt das C 1s-Spektrum offenkundige Veränderungen. Schon bei einer relativ geringen Dosis von nur 2 mC/cm² hat das PEG-Kohlenstoffsignal bei 286.4 eV zugunsten des aliphatischen Kohlenstoffsignals bei 284.4 eV abgenommen (Abb. 130, Mitte). Bei noch höheren Bestrahlungsdosen sinkt das Signal der PEG-Kohlenstoff weiter, während die Intensität des aliphatischen Kohlenstoffs entsprechend zunimmt (Abb. 130, oben). Betrachtet man das O 1s Sauerstoffspektrum, nimmt auch die Sauerstoffintensität während der Bestrahlung ab (Abb. 131a). Für die Au 4f-Spektren des Goldsubstrats ergibt sich dagegen ein umgekehrtes Bild (Abb. 131b). Während sich für den unbestrahlten 40 nm PEG-Film noch kein Au 4f-Signal nachweisen lässt, sind nach der Bestrahlung mit 20 mC/cm² bzw. 40 mC/cm² schwache, aber dennoch deutlich erkennbare Goldsignale nachweisen. Die Intensität nach der Bestrahlung mit 40 mC/cm² entspricht ungefähr der Schichtdicke eines unbestrahlten Films mit 28 nm, d.h. der PEG-Film hat durch die Bestrahlung circa 30 % an Material bzw. Schichtdicke verloren.

Klarer wird dieses Verhalten, wenn man die Signalparameter der XPS-Emissionen (Flächeninhalt, Peak-Position und Halbwertsbreite) gegen die Bestrahlungsdosis aufträgt. Betrachtet man zunächst die Au 4f Signale des Goldsubstrats wird sofort einen Trend sichtbar. Aufgrund der geringen Informationstiefe des Goldsignals, ist es bei einem 40 nm PEG-Film im unbestrahlten Zustand noch nicht identifizierbar. Erst ab einer Dosis von 10 mC/cm² ist die Filmdicke soweit gesunken, dass ein quantifizierbares Au 4f-Signal erhalten wird. Um einen klaren Trend bei steigender Dosis zu erhalten, wurde der Schichtdickenverlauf zunächst an einem 20 nm PEG-Film bestimmt, da dieser Film schon im unbestrahlten Zustand ein ausreichend intensives Goldsignal hat. In Abb. 132a ist der aus der Abschwächung des Goldsignals berechnete Verlauf Filmdicke für einen 20 nm und 40 nm PEG-Film in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis gezeigt. Die für die Berechnung benötigten Abschwächungslängen wurden aus Abb. 120 entnommen. Schon bei kleinen Dosen kommt es zu einer starken Abnahme der Filmdicke, sodass nach einer Bestrahlung von 10 mC/cm² etwa 1/3 des PEG-Films verloren gegangen ist. Bei fort-dauernder Bestrahlung nimmt die Dicke annähernd linear ab, bis sich bei einer Dosis von 55 mC/cm² die ursprüngliche Filmdicke halbiert hat.

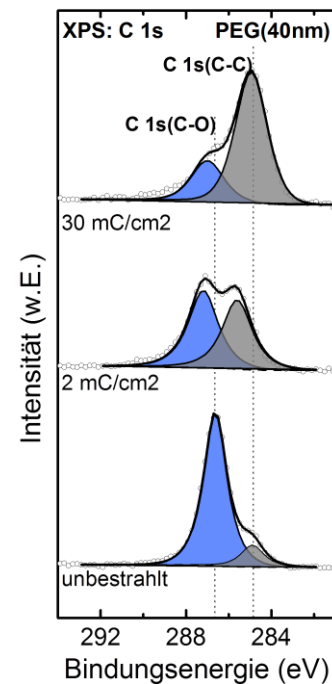


Abb. 130. XPS C 1s Detailspektren eines 40 nm PEG-Films vor der Bestrahlung (unten) und nach einer Elektronenbestrahlung mit 2 mC/cm² (Mitte) und 30 mC/cm² (oben).

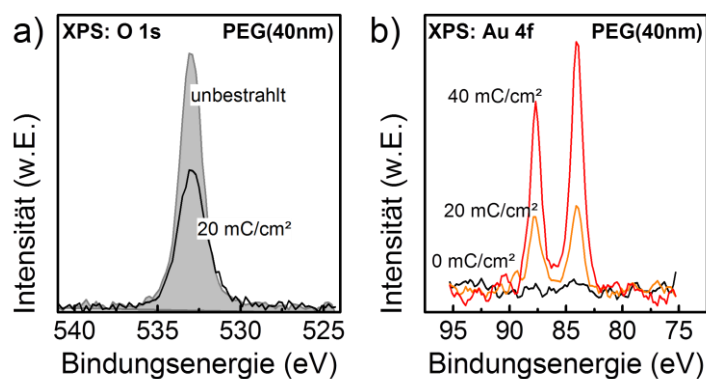


Abb. 131. (a) O 1s Sauerstoff- und (b) Au 4f Goldspektren eines 40 nm PEG-Films vor und nach der Bestrahlung mit Elektronen.

Ein Sättigungsbereich ist im betrachteten Dosisintervall nicht erkennbar. Zudem wird aus Abbildung **Abb. 132a** klar, dass sich die Verläufe der Schichtdicken beider Filme qualitativ kaum unterscheiden. Das kann auch so erwartet werden, da die verwendeten Elektronen mit einer Energie von 50 eV nur wenige Nanometer tief in den PEG-Film eindringen können (**Abb. 76c**) und daher dessen vollständige Dicke irrelevant ist (sofern die Struktur beider Filme identisch ist). Inwieweit die Empfindlichkeit der PEG-Filme bei Bestrahlung von Elektronen im Vergleich zu anderen Polymerfilmen einzuschätzen ist, muss noch untersucht werden.

Wichtiger als die Betrachtung der Filmdicke durch die Elektronenbestrahlung ist eine detaillierte Untersuchung, wie sich die Oberfläche chemisch und strukturell verändert.

Naiv könnte man zunächst annehmen, dass der Elektronenstrahl unselektiv Bindungen spaltet, die Oberfläche sukzessive abträgt und nach Beendigung der Bestrahlung der PEG-Film einfach nur dünner geworden ist. Aber schon ein Blick auf das XPS C 1s Spektrum (**Abb. 130b**) zeigt, dass sich auch die chemische Struktur der Oberfläche durch die Bestrahlung erkennbar verändert hat. Der prozentuale Anteil an PEG-Kohlenstoff bei 286.4 eV nimmt bei einsetzender Bestrahlung zunächst signifikant ab. Beträgt der Anteil dieser Kohlenstoffspezies bei unbestrahlten PEG-Filmen noch 88 % des Gesamtkohlenstoffgehalts, so sinkt er bereits nach einer Dosis von 10 mC/cm² auf ~40 % und bei weiterer Bestrahlung auf Werte unter 22 % (**Abb. 132b**). Im Gegenzug steigt der Anteil an aliphatischem Kohlenstoff bei 284.4 eV von anfangs 12 % auf fast 80 % bei maximaler Bestrahlungsdosis. Interessanterweise nimmt die Gesamtkohlenstoffintensität, also die Summe beider Signale, sogar leicht zu. Das kann durch die strahlungsbedingte Abnahme des Sauerstoffgehalts auf etwa 65 % der Ursprungsintensität (**Abb. 132c**) erklärt werden, da im Gegenzug die Selbstabschwächung des Kohlenstoffs durch den Verlust an Sauerstoff verringert wird.

Das stöchiometrische Verhältnis der Kohlenstoffspezies bei 286.4 eV zum Sauerstoff bei 534 eV hat bei unbestrahlten PEG-Filmen den Wert 2.05 : 1 und entspricht somit annähernd dem Idealverhältnis 2:1 für Polyethylenglykole (**Abb. 132d**). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das C1s-Signal bei 286.4 eV und das O1s-Signal in der Tat eindeutig dem PEG zuzuordnen sind. Durch die Bestrahlung nehmen nicht nur beide Signale ab, auch ihr Verhältnis verschiebt sich zu einem Wert von ungefähr eins. Es findet sich in den XPS-Spektren also für jedes Sauerstoffatom nur noch ein Kohlenstoffatom mit einer Bindungsenergie von 286.4 eV. Das wirft die Frage auf, in welcher chemischen Form der verbleibende Sauerstoff vorliegt, da es bei einer (C-O-C)-Ether-Bindung für

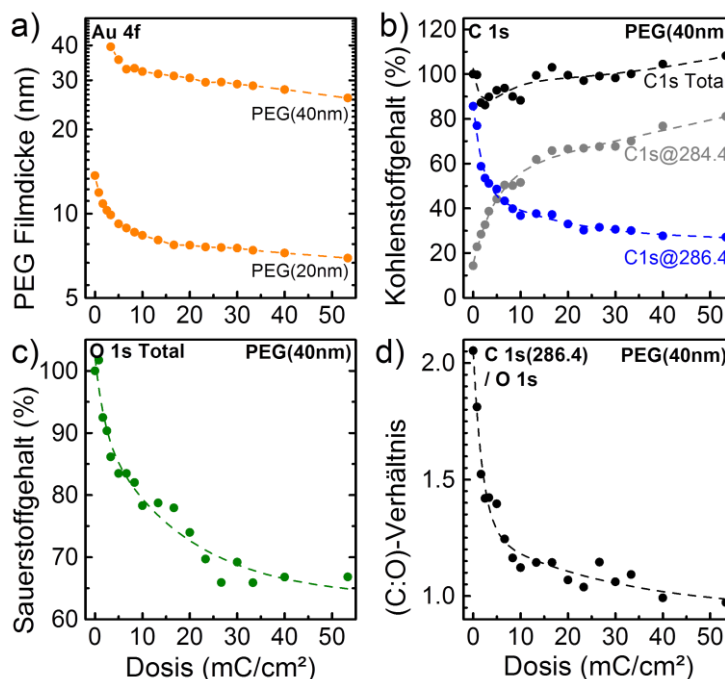


Abb. 132. Veränderungen in der Oberflächenzusammensetzung eines 40 nm PEG-Films bei Elektronenbestrahlung mit (50 eV): (a) Abnahme der Schichtdicke ermittelt anhand der Abschwächung des Au 4f Signals des Substrats; (b-c) normierter Intensitätsverlauf beider im XPS Spektrum vorkommenden C 1s Kohlenstoffspezies und des O 1s Sauerstoffsignals; (d) Verlauf der aus C 1s- und O 1s-Intensitäten berechneten Kohlenstoff-zu-Sauerstoff-Verhältnisse.

jedes Sauerstoffatom genau zwei Kohlenstoffatome im Bereich 286.4 eV geben muss. Das beobachtete stöchiometrische Verhältnis von ~ 1.0 passt demnach nicht zu einem Polyether. Der Sauerstoff dürfte daher in Form von Hydroxyl- oder Carboxylgruppen bzw. als Ester, Keton oder Aldehyd vorliegen. Das lässt sich beispielsweise mittels Infrarotspektroskopie klären (siehe nächster Abschnitt). Allerdings deutet die Abwesenheit eines C 1s Signals um 288 eV bei der *in-situ* Messung darauf hin, dass bei der Bestrahlung nur sehr wenig Carboxyl- oder Estergruppen entstanden sein können.

Zusammenfassend kann bis hier festgehalten werden, dass die PEG-Filme bei der Elektronenbestrahlung nicht einfach gleichmäßig abgetragen werden, sondern dass zusätzlich die PEG-typischen C 1s- und O 1s Signale – wenn auch in unterschiedlicher Stärke – abnehmen und gleichzeitig nicht-heteroatomgebundener, aliphatischer Kohlenstoff entsteht.

Zunächst ist bekannt, dass ein Heteroatom bei Elektronenbestrahlung die Bindungsspaltung eines zu ihm α -ständigen C-Atom fördert.¹⁶⁸ Da in Polyethylenglykolen alle Kohlenstoffatome α -ständig zu einem Heteroatom (Sauerstoff) stehen, erklärt sich die hohe Empfindlichkeit der PEG-Filme auf Elektronenbestrahlung. Der Elektronenstrahl bricht die chemischen Bindungen innerhalb des PEG-Films, dessen Fragmente teilweise ins Vakuum diffundieren können und so zu der beobachteten Verringerung der Schichtdicke führen. Die verbleibenden Fragmente ordnen sich umgehend so neu an, dass die entstehende Struktur einen deutlich höheren Anteil an (C-C)-Bindungen aufweist, was den Anstieg der aliphatischen Kohlenstoffspezies bei 285.4 eV erklärt. Diese Struktur ist zudem stabiler gegenüber Elektronenbestrahlung, da sie weniger Kohlenstoffatome mit α -ständigen Heteroatomen besitzt. Daher reichert sich diese chemische Struktur mit zunehmender Bestrahlung an, was zudem die gesteigerte Stabilität des Films ab einer Bestrahlungsdosis von ~ 10 mC/cm² erklärt (Abb. 132a). Der verbliebene Sauerstoff sollte vornehmlich in Form von Hydroxyl-Gruppen angeordnet sein, was zumindest der beobachteten C:O Stöchiometrie von 1:1 (neben dem aliphatischen

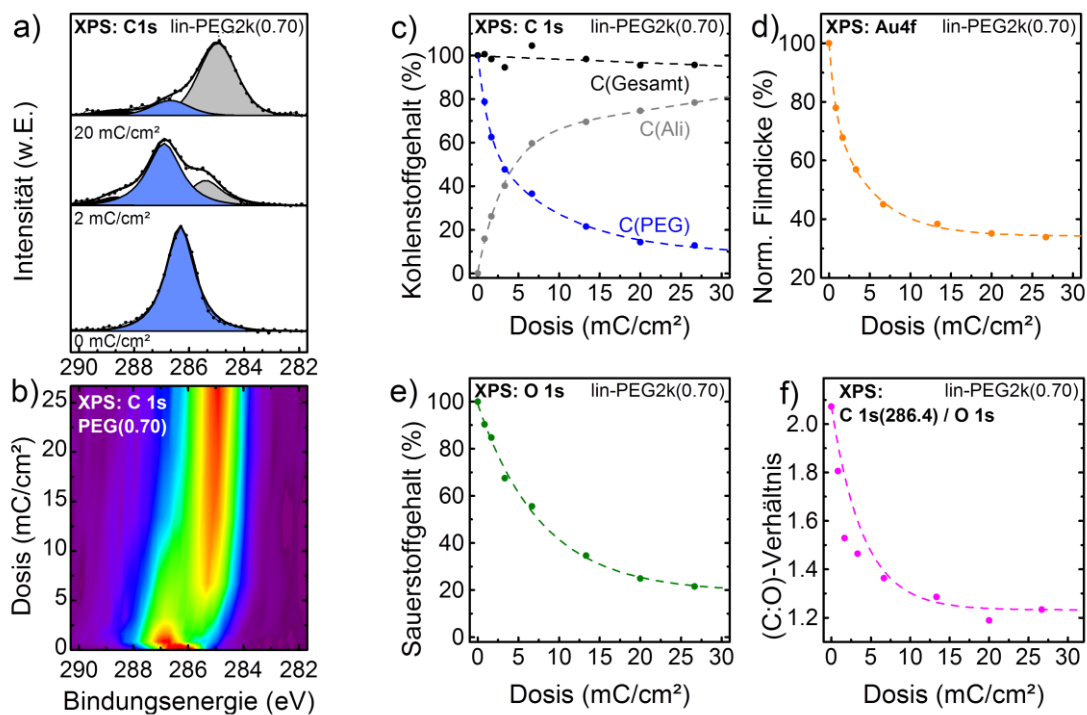


Abb. 133. Auswirkung der Elektronenbestrahlung auf einen Film bestehend aus linearem PEG der Molmasse 2000 g/mol: (a) C 1s-Spektren des PEG-Films vor und nach der Bestrahlung mit 2 bzw. 20 mC/cm²; (b) Konturdiagramm der Dosisabhängigkeit der C 1s-Spektren; (c-e) Dosisabhängigkeit der beiden C 1s Signale, sowie der O 1s- und Au 4f-Signales; (f) dosisabhängiger Verlauf des Verhältnisses von C 1s(286.4) zu O 1s.

Signal nur noch eines für Ether oder Alkohole) und dem O 1s Spektrum (nur eine Sauerstoffspezies für Ether oder Alkohole) entspricht.¹⁶⁹ Ferner geben die XPS-Spektren kein Anzeichen für die Anwesenheit von Carbonylbindungen.

Um die Hypothese zu bestätigen, dass die strahlungsinduzierten Veränderungen in der strukturellen Natur der Polyethylenglykole zu suchen sind, wurde ein Kontrollexperiment mit einem PEG-Film durchgeführt, der aus linearem, nicht quervernetztem PEG der Molmasse 2000 g/mol (lin-PEG2k) besteht. Der Film wurde wie beschrieben per Spincoating präpariert. Im Gegensatz zu den bisher betrachteten STAR-PEG-Filmen ist dieser Film aus linearem PEG natürlich gegenüber Lösungsmitteln unbeständig, er weist aber kein aliphatisches Gerüst auf, was sich deutlich in seinem C 1s XPS Spektrum in **Abb. 133a** zeigt. Im Gegensatz zu dem STAR-PEGs in **Abb. 130**, hat das lineare PEG nur ein einziges Kohlenstoffsignal bei 286.1 eV auf, der aliphatische Buckel bei ~ 285 eV fehlt komplett.

Werden diese Filme bestrahlt, entsteht wie bei den quervernetzten PEG-Filmen eine zweite Kohlenstoffspezies bei 284.4 eV, während der PEG-Kohlenstoff bei 286.1 eV entsprechend abnimmt. Trägt man die übrigen Parameter wie Kohlestoff- und Sauerstoffgehalt (**Abb. 133b** und **c**), sowie die Abnahme der Filmdicke (**Abb. 133e**) und des C 1s(PEG):O 1s Verhältnis (**Abb. 133f**) auf, sind die Unterschiede zwischen den Filmen aus thermisch quervernetztem STAR-PEG und denen aus nicht quervernetztem, linearem PEG marginal. Damit ist offensichtlich, dass die Veränderungen der PEG-Filme nur durch die chemische Struktur der PEG-Ketten selber bestimmt sind und der Quervernetzungsprozess keine Rolle spielt. Daher ergeben sich auch die nur geringfügigen Unterschiede der Bestrahlungsmuster bei Filmen unterschiedlicher Schichtdicke.

Es verändern aber während der Bestrahlung nicht nur die Intensitäten der C 1s- und O 1s-Signale, sondern auch die Halbwertsbreiten (full width at half maximum, FWHM) und die Positionen der Signalmaxima. In **Abb. 134a** und **b** ist der dosisabhängige Verlauf der Halbwertsbreite der C 1s- und O 1s-Emission zu erkennen, der erstaunlicherweise für beide Elemente annähernd identisch verläuft. Die Zunahme um ~ 0.5 eV (die beiden Kohlenstoff-Signale sind mit derselben Halbwertsbreite angepasst) kann mit einer gestiegenen Unordnung innerhalb des Films erklärt werden. Je uniformer eine Schicht in Bezug auf Konformation und chemische Homogenität ist, desto geringer ist die Halbwertsbreite des Signals. Deren strahlungsbedingte Verbreiterungen sind ein deutliches Anzeichen dafür, dass die Filme während der Bestrahlung chemisch inhomogener werden, wodurch es zu einer Vielzahl von Kohlenstoff- und Sauerstoffspezies kommt, die sich in ihrer chemischen Verschiebung geringfügig unterscheiden. Eine Erhöhung der konformellen Unordnung führt ebenfalls dazu, dass sich die Signale einer chemischen Spezies geringfügig unterscheiden und so zu einer Vergrößerung der Halbwertsbreite beitragen.

Da auch Aufladungseffekte zu einer Verbreiterung der Halbwertsbreiten von Signalen führen können, ist es notwendig, zusätzlich die Dosisabhängigkeit der Peak-Positionen zu untersuchen. Die PEG-Filme sind auf einem leitenden Goldsubstrat aufgebracht und sollten sich während der XPS-Messung nicht aufladen. Umso interessanter ist das dosisabhängige Verhalten

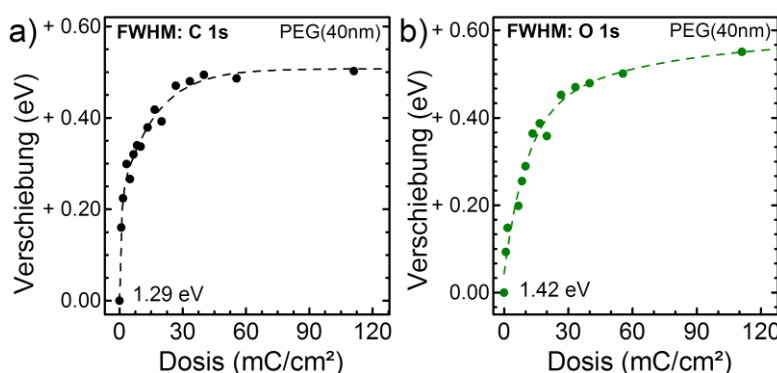


Abb. 134. Dosisabhängiger Verlauf der Halbwertsbreiten der (a) C 1s- und (b) O 1s-Emission als Reaktion auf die Elektronenbestrahlung.

der PEG-Filme bezüglich der Positionen der C 1s- und O 1s-Signale (**Abb. 135a** und **b**). Das Kohlenstoffsignal des unbestrahlten 40 nm PEG-Films liegt bei 284.6 eV. Nach kurzer Bestrahlung (8 mC/cm²) kommt es zu einer deutlichen Verschiebung der Signalpositionen um 0.5-0.8 eV hin zu höheren Bindungsenergien. Bei weiterer Bestrahlung wandern die Maxima der Signale wieder zu niedrigeren Bindungsenergien. Bei 100 mC/cm² liegt das Maximum ungefähr wieder bei seinem Ausgangswert. Ausnahme bildet der PEG-Kohlenstoff, der weiterhin um 0.4 eV in Richtung höherer Bindungsenergie verschoben ist. Der Effekt der Verschiebung der Maxima ist nahezu unabhängig von der Filmdicke. In **Abb. 136** sind die Positionen der Maxima der beiden Kohlenstoffspezies und des Sauerstoffs für drei Filme zwischen 30-60 nm PEG-Filme gezeigt. Der nahezu identische, filmdickenunabhängige Verlauf bedeutet, dass der Effekt der Signalverschiebung nicht in der Schichtdicke, sondern ausschließlich in der Struktur des PEG-Films begründet liegt.

Es stellt sich die Frage, wie es zu der Verschiebung kommt. Da sich die C 1s- und O 1s-Signale um etwa dieselbe Energie verschieben, kann es sich nicht um eine Änderung aufgrund der chemischen Verschiebung handeln. Wahrscheinlich ist, dass es sich um einen Aufladungseffekt handelt. Durch die Bestrahlung sinkt die Leitfähigkeit innerhalb des PEG-Films, es kommt zu einer positiven Aufladung der obersten Schicht während der Messung, die zu der Verschiebung in Richtung höherer Bindungsenergie führt. Mit fortschreitender Bestrahlung steigt die Leitfähigkeit wieder, die Aufladung nimmt ab und die Maxima der beiden Signale wandern wieder zu Werten niedrigerer Bindungsenergie. Die Form der Kurve lässt auf zwei gegenläufige Prozesse schießen. Der eine führt zu einem Anstieg der Leitfähigkeit mit steigender Dosis, der andere zu einem absinken. Welche Prozesse das im Einzelnen sind, muss noch geklärt werden. Fest steht aber, dass sich die Form der Kurven in **Abb. 135** und **Abb. 136** an eine Funktion aus dem Produkt zweier Exponentialfunktionen anpassen lässt, die wie folgt aussieht:

$$y = A \cdot \exp(-k_1 \cdot x) \cdot [1 - \exp(-k_2 \cdot x)].$$

der PEG-Filme bezüglich der Positionen der C 1s- und O 1s-Signale (**Abb. 135a** und **b**). Das Kohlenstoffsignal des unbestrahlten 40 nm PEG-Films liegt bei 284.6 eV. Nach kurzer Bestrahlung (8 mC/cm²) kommt es zu einer deutlichen Verschiebung der Signalpositionen um 0.5-0.8 eV hin zu höheren Bindungsenergien. Bei weiterer Bestrahlung wandern die Maxima der Signale wieder zu niedrigeren Bindungsenergien. Bei 100 mC/cm² liegt das Maximum ungefähr wieder bei seinem Ausgangswert. Ausnahme bildet der PEG-Kohlenstoff, der weiterhin um 0.4 eV in Richtung höherer Bindungsenergie verschoben ist. Der Effekt der Verschiebung der Maxima ist nahezu unabhängig von der Filmdicke. In **Abb. 136** sind die Positionen der Maxima der beiden Kohlenstoffspezies und des Sauerstoffs für drei Filme zwischen 30-60 nm PEG-Filme gezeigt. Der nahezu identische, filmdickenunabhängige Verlauf bedeutet, dass der Effekt der Signalverschiebung nicht in der Schichtdicke, sondern ausschließlich in der Struktur des PEG-Films begründet liegt.

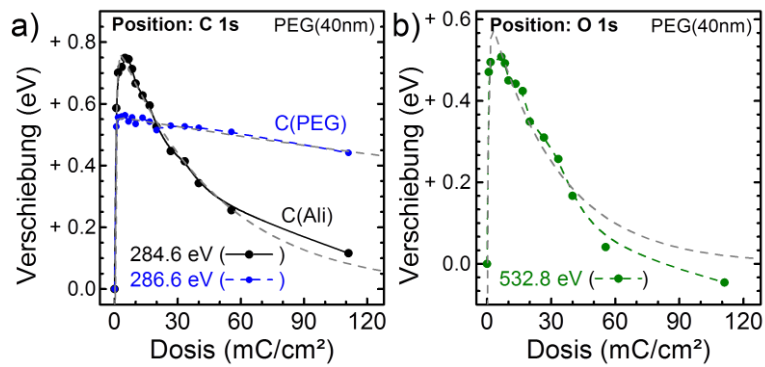


Abb. 135. Dosisabhängige Veränderung der XPS Signalmaxima der (a) C 1s- und (b) O 1s-Emission als Reaktion auf die Elektronenbestrahlung eines 40 nm PEG-Films.

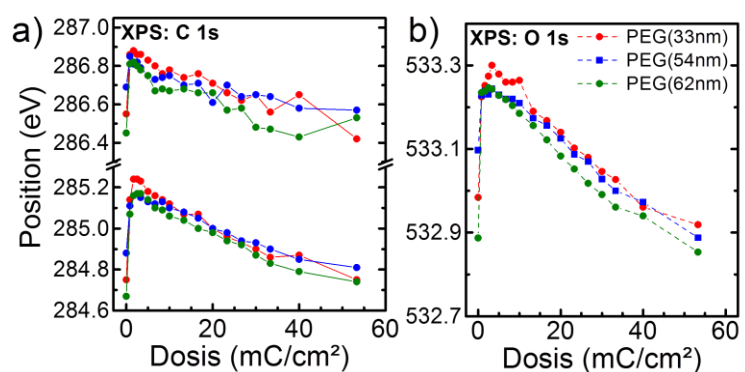


Abb. 136. Position der XPS (a) C 1s- und (b) O 1s-Signalmaxima von PEG Filmen der Dicke 33, 54 und 62 nm in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.

5.4.2 NEXAFS und HRXPS Messungen nach Elektronenbestrahlung

Als nächstes gilt es, detaillierter zu klären, was chemisch auf der Oberfläche passiert und wie dieses mit den beobachteten XPS-Ergebnissen in Einklang zu bringen ist. Dazu wurden bestrahlte und unbestrahlte PEG-Filme mittels Röntgennahkantenspektroskopie (NEXAFS) charakterisiert, um Informationen über die elektronische Struktur der Oberfläche zu erhalten. Besonders empfindlich sind NEXAFS-Spektren bei der Untersuchung von Systemen, die nicht besetzte π^* -MOs besitzen. Sollten sich in den PEG-Filmen durch die Elektronenbestrahlung π -Bindungen (C=C oder C=O) gebildet haben, müssten sie somit zu identifizieren sein.

In **Abb. 137a** sind die NEXAFS-Spektren an der K-Kante des Kohlenstoffs eines 10 nm PEG-Films vor und nach der Elektronenbestrahlung abgebildet. Für den unbestrahlten Film lassen sich zwei Resonanzen identifizieren. Das schmale Signal (A) bei 288.9 eV wird von einem $C\ 1s \rightarrow \sigma^*(C-H)$ Übergang mit Rydberg Charakter erzeugt, während das breitere Signal (B) bei 292.4 eV von einer $C\ 1s \rightarrow \sigma^*(C-C/O)$ Resonanz herrührt.¹⁷⁰ Weiteren Resonanzen treten nicht auf, wie es für einen PEG-Film zu erwarten ist, der nur aus (C-C/H/O) σ -Bindungen besteht. Zusätzlich ist in Abb. 137a noch das Referenzspektrum eines EG3-terminierten Undecanthiol-SAMs gezeigt, dass die gleichen Resonanzen enthalten, wenn auch in unterschiedlichen Intensitätsverhältnissen. Zusätzlich ist noch eine Schulter bei 287.2 eV (D) zu erkennen, die von einem $C\ 1s \rightarrow \sigma^*(C-H)$ -Übergang des Undecanthiols stammt. Ferner ist ein schwaches Signal bei 285.1 eV (D) vorhanden, das einer $C\ 1s \rightarrow \pi^*(C=C/O)$ Resonanz zugeordnet werden kann und von Verunreinigungen oder Beschädigungen des Referenz-SAM während der NEXAFS-Messung herrührt.¹⁷¹ Dieses Signal fehlt bei dem unbestrahlten PEG-Film, was nicht nur dessen Reinheit sondern vor allen auch die Integrität der verwendeten Präparationsmethode bestätigt.

Nach einer Bestrahlung mit 40 mC/cm^2 fallen sofort deutliche Veränderungen des NEXAFS-Spektrums an der Kohlenstoffkante ins Auge. Die Intensität der scharfen (C-H)-Resonanz (A) bei 288.8 eV hat sich bezogen auf den (C-C/O)-Übergang (B) bei 292.5 eV signifikant verringert. Zudem weist das Spektrum des bestrahlten PEG-Films nun auch eine Schulter (D) bei 287.3 eV auf, die auf die Anwesenheit von aliphatischen (C-H)-Bindungen hindeutet, was in guter Übereinstimmung zu den XPS-Ergebnissen steht.

Am auffälligsten aber ist das Erscheinen einer vierten Resonanz bei 285.0 eV (D), die für einen $C\ 1s \rightarrow \pi^*(C=C/O)$ Übergang typisch ist. Dazu passt auch eine breite Resonanz bei $\sim 301\text{ eV}$ (E), die von der entsprechenden $C\ 1s \rightarrow \sigma^*(C=C/O)$ -Übergang stammt.¹⁷²

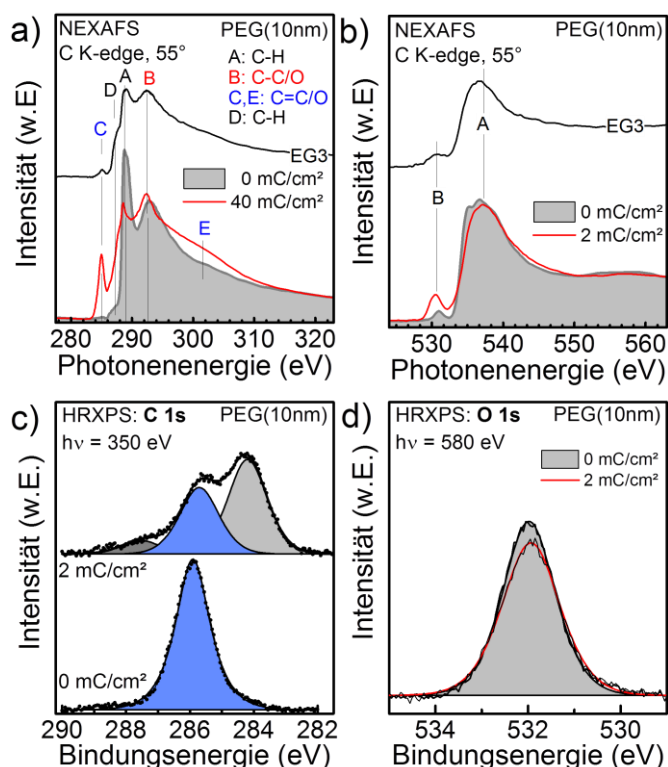


Abb. 137. NEXAFS Spektren eines bestrahlten und unbestrahlten PEG-Films (20 nm) an der Kohlenstoff- (a) und an der Sauerstoffkante (c); zusätzlich ist das Spektrum eines Undecanthiol-SAMs mit einer EG3 Endgruppe gezeigt. Die entsprechenden C 1s (c) und O 1s (d) HRXPS Spektren.

Vergleicht man die entsprechenden NEXAFS Spektren an der Sauerstoff K-Kante (**Abb. 137b**) von PEG- Filmen vor und nach der Bestrahlung, zeigen sich ebenfalls Unterschiede in den beiden Spektren, auch wenn diese weit weniger auffällig sind als bei den Spektren an der C-Kante. Der dominierende Peak (A) $O 1s \rightarrow \sigma^*(C-O)$ bei 537.9 eV verändert sich nach der Bestrahlung kaum, während das schwache Signal bei 530.6 eV der $O 1s \rightarrow \pi^*(C=O)$ -Resonanz zunimmt. Analog ist ein breites, schwaches Signal des entsprechenden $O 1s \rightarrow \sigma^*(C=O)$ -Übergangs bei ~ 545 eV zu erkennen. Diese π^* -Resonanzen bedeuten, dass die entsprechenden Resonanzen im Kohlenstoffspektrum des bestrahlten Films zumindest teilweise auf die Anwesenheit von Carbonylgruppen hinweisen.

Bevor die NEXAFS-Ergebnisse mit den hochaufgelöster XPS-Spektren in **Abb. 137** und verglichen werden, muss noch einmal betont werden, dass die NEXAFS- und HRXPS Messungen *ex-situ* erfolgte, das heißt, die Proben waren nach der UHV-Bestrahlung der Umgebung ausgesetzt. Das kann dazu führen, dass sich die chemische Zusammensetzung einer im Vakuum stabilen Oberfläche beim Kontakt mit Luft verändert. Daher sind die XPS-Spektren einer *in-situ* und *ex-situ* Messung auch nur bedingt miteinander vergleichbar.

Unter diesem Gesichtspunkt ist das C 1s Spektrum des mit 2 mC/cm^2 bestrahlten PEG(10nm) Filmes zu verstehen (**Abb. 137c**). Im Gegensatz zu den Kohlenstoffspektren der *in-situ* XPS-Messung (**Abb. 130** und **Abb. 133**) ist der Peak bei 287.7 eV wesentlich stärker ausgeprägt. Er lässt sich der Kohlenstoffspezies einer Carbonylgruppe zuordnen und passt damit zu den NEXAFS-Messungen an der Sauerstoff K-Kante, die eine Sauerstoffspezies mit einer π -Bindung vorhergesagt hat. Das Sauerstoffspektrum zeigt eine Verminderung des Signals um $\sim 5\%$. Dieser Wert ist geringer als die 15% , die bei der *in-situ* Messung mittels XPS bestimmt wurden. Allerdings muss beachtet werden, dass die HRXPS Spektren bei einer Photonenenergie von nur 580 eV, während XPS Spektren bei einer Photonenenergie von 1254 eV aufgenommen wurden. Der Vergleich der Abnahme der Sauerstoffsignale ist daher nicht ohne weiteres möglich.

Es lässt sich festhalten, dass die NEXAFS Daten eine gute Ergänzung zu den *in-situ* XPS-Ergebnissen darstellen. Während im Spektrum des unbestrahlten Films nur die PEG-typischen σ^* -Resonanzen auftreten, ist nach der Bestrahlung ein zusätzlicher σ^* -Übergang von aliphatischem Kohlenstoff zu erkennen, der in Übereinstimmung zu dem Auftreten des aliphatischen C 1s-Signals der XPS-Spektren steht. Die neu entstandene π^* -Resonanz bei 285.1 eV findet sich dagegen eher in den HRXPS-Spektren wieder und stammt zumindest teilweise von einem Carbonyl-Kohlenstoff, der beim Luftkontakt auf dem bestrahlte PEG-Film entstanden ist. Das kann allerdings nur durch eine Bestrahlung mit anschließender *in-situ* HRXPS- und NEXAFS-Messung bestätigt werden.

5.4.3 Ex-situ IRRAS Messung nach Elektronenbestrahlung

Neben der röntgenspektroskopischen Untersuchung stellt die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) eine weitere Methode dar, die chemische Struktur von Oberflächen zu untersuchen. Daher werden die PEG-Filme vor und nach der Bestrahlung infrarotspektroskopisch untersucht, um durch Bestrahlung entstandene funktionelle Gruppen identifizieren zu können. Es muss allerdings betont werden, dass die IRRAS dünner Filme weit weniger oberflächensensitiv ist als die in den letzten Kapiteln besprochenen Methoden, da der Infrarotstrahl den Film komplett durchdringt und die Information des gesamten Films trägt. Dennoch sollten insbesondere die in den letzten beiden Abschnitten postulierten Carbonylgruppen zu finden sein, da das IR Spektrum von Polyethylenglykolen im Bereich der Carbonyl-Schwingungen zwischen $1500\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ keine eigenen Banden enthält (**Abb. 138a**). Nach einer Bestrahlung von 10 mC/cm^2 hat sich das IR Spektrum nur wenig verändert. Zunächst sind die Banden aufgrund einer geringeren gewordenen Filmdicke weniger intensiv. Dennoch gibt es im IR-Spektrum der bestrahlten Probe zwei neue Banden bei 1718 und 1670 cm^{-1} (**Abb. 138b**), welche sich Carbonyl-Gruppen zuordnen lassen. Allerdings ist deren Intensität gering, sodass die Oberflächendichte der Gruppen nicht sehr hoch ist. Um welche Carbonyl-Spezies es sich genau handelt, ist mit den vorhandenen Daten nicht zu ermitteln. Der Doppelpeak deutet auf die Carboxy-Gruppe einer Carbonsäure hin. Allerdings müsste dann die Dichte und Beweglichkeit der COOH-Gruppen so hoch sein, dass sich Dimere bilden, denn nur dann entsteht im IR-Spektrum ein Doppelpeak. Ansonsten sind Aldehyde, Ketone oder Ester möglich.

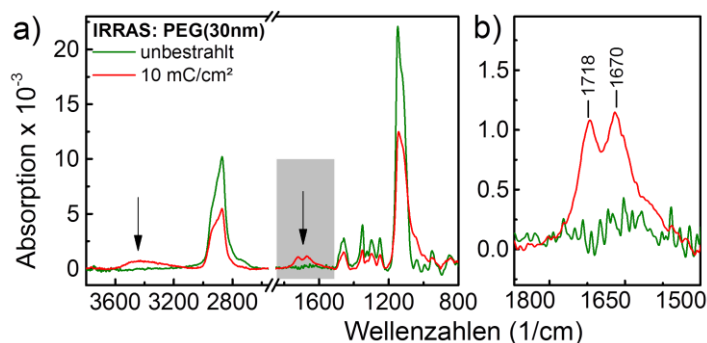


Abb. 138. Infrarotspektren eines PEG-Films mit einer Schichtdicke von 30 nm vor und nach der Elektronenbestrahlung: (a) Übersichtsspektrum und (b) Detailausschnitt des Bereichs der Carbonyl-Schwingungen.

Die Benetzbarkeit ist eine weitere Eigenschaft, mit deren Hilfe sich die chemisch-strukturelle Veränderungen einer Oberfläche sichtbar machen lassen. Standardverfahren zur Untersuchung auf Benetzbarkeit ist die Bestimmung des Kontaktwinkels, also des Winkels, den ein Wassertropfen mit der Oberfläche einnimmt. Entsprechend werden die Kontaktwinkel der Proben vor und nach der Bestrahlung bestimmt, um so Rückschlüsse auf strukturelle Veränderungen zu ziehen. In **Abb. 139** sind die Werte der statische Kontaktwinkel in Abhängigkeit der PEG-Filmdicke aufgetragen. Zunächst sinkt der Kontaktwinkel unbestrahlter PEG-Filme von 34° bei einem 10 nm PEG-Film auf Werte unter 20° bei einer Filmdicke von $>60\text{ nm}$. Dieses filmdickenabhängige Verhalten zeigt erneut, dass die dünnen PEG-Filme unter 20 nm noch deutlich von dem Substrat gekennzeichnet sind. Erst mit zunehmender Dicke wird der Einfluss geringer. Ferner bedeutet dieser filmdickenabhängige Trend, dass für Oberflächeneigenschaften der

5.4.4 Benetzbarkeit der PEG-Filme vor und nach Elektronenbestrahlung

Die Benetzbarkeit ist eine weitere Eigenschaft, mit deren Hilfe sich die chemisch-strukturelle Veränderungen einer Oberfläche sichtbar machen lassen. Standardverfahren zur Untersuchung auf Benetzbarkeit ist die Bestimmung des Kontaktwinkels, also des Winkels, den ein Wassertropfen mit der Oberfläche einnimmt. Entsprechend werden die Kontaktwinkel der Proben vor und nach der Bestrahlung bestimmt, um so Rückschlüsse auf strukturelle Veränderungen zu ziehen. In **Abb. 139** sind die Werte der statische Kontaktwinkel in Abhängigkeit der PEG-Filmdicke aufgetragen. Zunächst sinkt der Kontaktwinkel unbestrahlter PEG-Filme von 34° bei einem 10 nm PEG-Film auf Werte unter 20° bei einer Filmdicke von $>60\text{ nm}$. Dieses filmdickenabhängige Verhalten zeigt erneut, dass die dünnen PEG-Filme unter 20 nm noch deutlich von dem Substrat gekennzeichnet sind. Erst mit zunehmender Dicke wird der Einfluss geringer. Ferner bedeutet dieser filmdickenabhängige Trend, dass für Oberflächeneigenschaften der

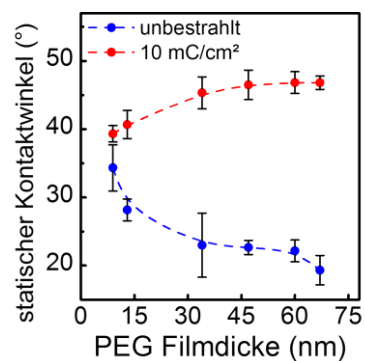


Abb. 139. Filmdickenabhängiger, statischer Kontaktwinkel vor und nach einer Bestrahlung mit 10 mC/cm^2 .

PEG-Filme auch der Volumenkörper betrachtet werden muss. Allerdings sind die Kontaktwinkelmessungen an den unbestrahlten PEG-Filmen mit der verwendeten Flüssigtropfenmethode relativ unzuverlässig. Wie in Abschnitt 5.3.4 besprochen zeigen die PEG-Filme ein ausgeprägtes Quellverhalten bei Wasserkontakt, was dazu führt, dass der statische Kontaktwinkel zeitlich nicht konstant bleibt, sondern im Verlaufe von einer Minute um bis zu 10° abnehmen kann. Einigermaßen zuverlässige Werte werden erreicht, wenn die Kontaktwinkel jeweils nach genau 10 Sekunden bestimmt werden.

Nach Bestrahlung der PEG-Filme mit 10 mC/cm^2 werden die Kontaktwinkel erneut gemessen (Abb. 139). Eine erste wichtige Beobachtung ist, dass sich der Kontaktwinkel zeitlich kaum noch ändert. Zudem liegen die Werte mit 47° deutlich über denen unbestrahlter Filme mit 22° . Das Verhalten steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorigen Kapitel. Durch die Bestrahlung haben die Filme die typischen Eigenschaften eines PEG-Hydrogels verloren. Der mit aliphatischem Kohlenstoff angereicherter Film ist wesentlich hydrophober und scheint auch keine Quelleigenschaften mehr zu besitzen.

Der Effekt der strahlungsinduzierten Manipulation der Benetzbarkeit lässt sich auch verwenden, um mit elektronenstrahlolithographischen Methoden hydrophobe bzw. weniger benetzbare Muster in eine hydrophile PEG-Matrix zu schreiben. **Abb. 140a** zeigt den Effekt der verminderten Benetzbarkeit bestrahlter Bereiche. Auf einem PEG-Film wird ein Gitter mit quadratischen Löchern von 5 mm montiert und mit einer Elektronenkanone bestrahlt. Wird die Probe auf ein Peltier-Element gelegt und die Temperatur auf 0.5°C gesenkt, kondensiert die Luftfeuchtigkeit zunächst überwiegend auf nicht-bestrahlten Bereichen. Der Ausschnitt in **Abb. 140b** macht deutlich, dass flüssiges Wasser sich hauptsächlich im Bereich der Stege der Gittermaske abgesetzt hat.

Wird eine Gitterstruktur mit mikroskopisch kleinen Löchern auf dem PEG-Film montiert (TEM-Gitter, Quantifoil® R2/2) und bestrahlt, zeigt sich ein gegensätzliches Muster der Kondensation. Wasserdampf scheidet sich in ca. $1 \mu\text{m}$ kleinen Tröpfchen ausschließlich an den bestrahlten Stellen ab (**Abb. 140c**). In diesem Fall ist die Kondensation durch eine Minimierung der Oberflächenspannung begünstigt und eine erhöhte chemische und topographische Rauigkeit (Kondensationskeime) an den bestrahlten Bereichen fördert die Kondensation von Wasserdampf.

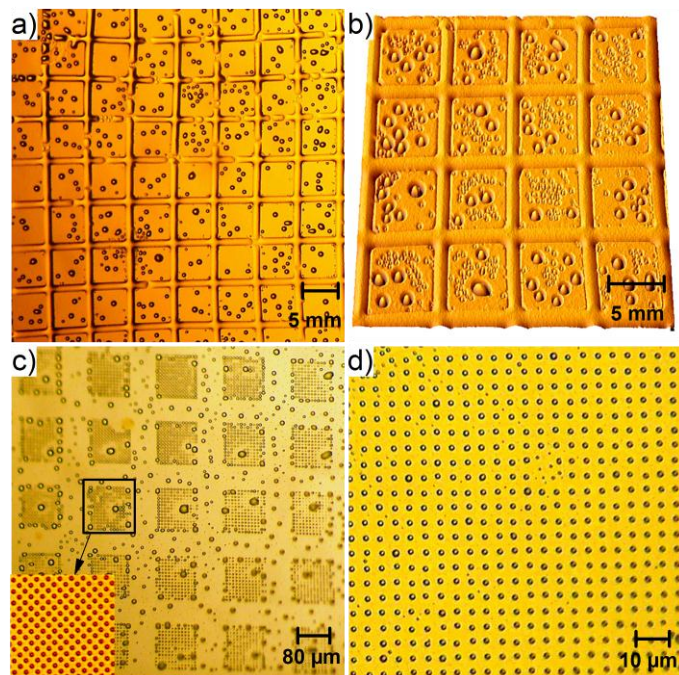


Abb. 140. Strukturierung der Benetzbarkeit von PEG-Filmen durch Elektronenbestrahlung: Bestrahlung durch eine Lochmaske makroskopischer (a+b) sowie mikroskopischer Dimension (c+d).

5.4.5 Veränderungen der Topographie von PEG-Filmen durch Bestrahlung

In den letzten Kapiteln wurden bereits einige Auswirkungen der Bestrahlung niederenergetischer Elektronen auf PEG-Filme diskutiert. So wurde gezeigt, dass es zu einem signifikanten Materialverlust kommt, der sich in einer Verminderung der Filmdicke ausdrückt. Strukturell wandeln sich die PEG-Filme durch die Bestrahlung in eine hydrophobe, carbenoide Struktur um. In diesem Kapitel wird der strahlungsbedingte Materialverlust detailliert untersucht. Dazu werden die PEG-Filme nicht großflächig mit einer Elektronenkanone bestrahlt, sondern mit einem Elektronenstrahlschreiber Strukturen in der Größenordnung von einigen 100 nm bis zu wenigen Mikrometern geschrieben. Zur topographischen Charakterisierung eignet sich insbesondere die Rasterkraftmikroskopie (AFM), sodass Elektronenstrahlolithographie und AFM eine interessante Kombination zur Beschreibung von elektronenstrahlinduzierten Effekten auf die Topographie der Oberfläche bilden. Ein weiterer Vorteil des Elektronenstrahlschreibers besteht darin, dass in einem Schreibvorgang Strukturen unterschiedlicher Dosis erzeugt werden können und er so eine bequeme Möglichkeit bietet, zusätzlich dosisabhängige Effekte zu charakterisieren.

Um zu untersuchen wie sich der Elektronenstrahl auf die Topographie der Oberfläche von PEG-Filmen auswirkt und wie fein sich Strukturen in dem PEG-Film auflösen lassen, wird mit einem Elektronenstrahlschreiber (Energie 3 keV) eine Serie von Rechtecken der Dimension $(4 \times 0.75) \mu\text{m}$ in variablen Abständen zwischen 2 und $0.1 \mu\text{m}$ in einen 65 nm PEG-Film geschrieben. Die eingesetzte Dosis liegt bei 10 mC/cm^2 und die bestrahlten Bereiche werden anschließend bezüglich ihrer Topographie mit dem AFM vermessen. In dem in **Abb. 141a** gezeigten AFM-Bild erkennt man deutlich die vom Elektronenstrahl erzeugten Rechtecke mit einer Breite von 750 nm und einer Länge von $4 \mu\text{m}$. Die Zahlenwerte links neben einer Reihe geben den Abstand zwischen den Rechtecken in Mikrometern an. Schon im dem AFM-Bild erkennt man, dass sich Strukturen von bis zu 250 nm sauber in dem PEG-Film auflösen lassen. Die dreidimensionale Projektion des AFM-Bild (**Abb. 141b**) zeigt, wie der Elektronenstrahl die rechteckigen Vertiefungen in dem PEG erzeugt hat. Ein detail-

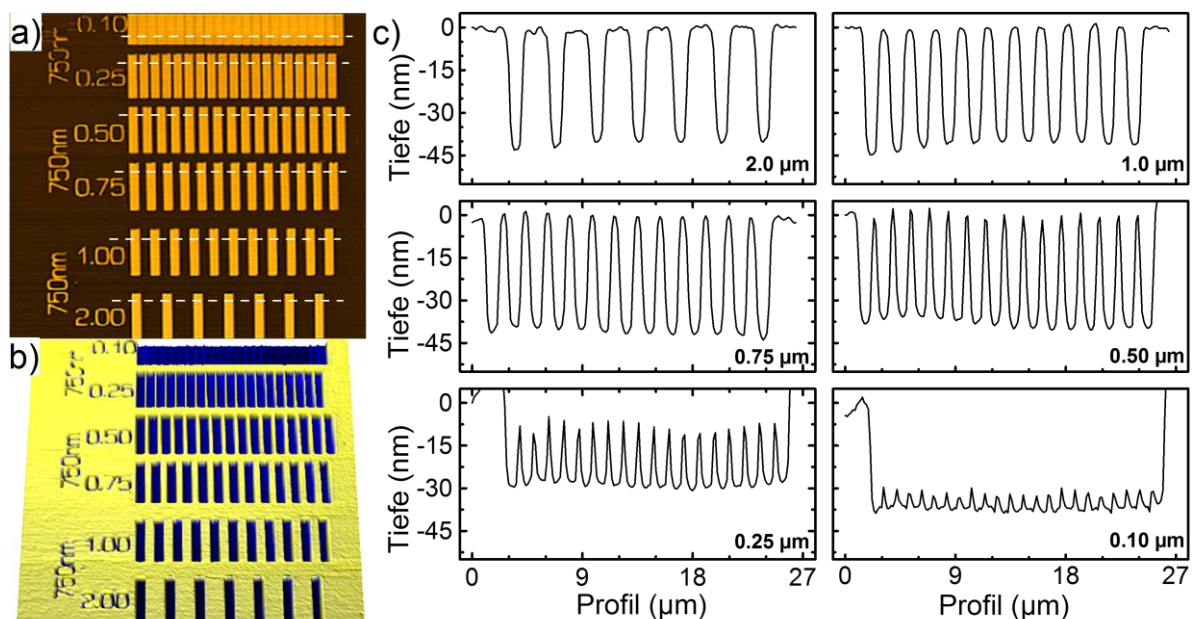


Abb. 141. Lithographische Strukturen eines Elektronenstrahlschreibers (3 keV) in einem 65 nm PEG-Film bei konstanter Dosis von 10 mC/cm^2 : (a) AFM-Bild der 750 nm breiten Rechtecke, deren Abstand (in μm) durch den Wert neben den Rechtecken gegeben ist; (b) das entsprechende Bild in dreidimensionaler Perspektive; (c) Höhenprofile entlang der weißen Linien in (a).

liertes Bild der lateralen Auflösung gewinnt man, indem man die Tiefenprofile entlang der Rechtecke betrachtet (**Abb. 141c**). Bei einer Dosis von 10 mC/cm^2 beträgt die Tiefe der Rechtecke 44 nm . Diese Tiefe ist bis zu einem Abstand von 500 nm zwischen den Rechtecken konstant, auch wenn die genaue Form des Tiefenprofils nicht exakt einer Rechteckfunktion entspricht. Der Grund liegt in der begrenzten Geschwindigkeit des AFM-Controllers. Dieser ist nicht schnell genug, um bei der eingestellten Scangeschwindigkeit ($0.5 - 1.0 \text{ Hz}$ bei $(40 \times 40) \mu\text{m}$ Scanbereich) den Flanken der Struktur genau zu folgen. Beträgt der Abstand zwischen den Strukturen 250 nm , lassen diese sich zwar weiterhin gut auflösen, allerdings beträgt die gemessene Tiefe nur noch 30 nm . Sinkt der Abstand auf einen Bereich von 100 nm , können die einzelnen Rechtecke nicht mehr getrennt werden.

Neben der räumlichen Auflösung wird als nächstes die Dosisabhängigkeit der Tiefe der Strukturen untersucht. Dazu wird eine Serie von $1 \mu\text{m}$ großen Kreisen jeweils im Abstand von $1 \mu\text{m}$ mit Dosen zwischen $0.07 - 10 \text{ mC/cm}^2$ bestrahlt. Aufgrund des hohen Umfangs zwischen minimaler und maximaler Dosis, ist es wichtig, die Besonderheit des verwendeten Elektronenstrahlschreibers zu berücksichtigen (siehe „Experimenteller Teil“). Das zweidimensionale AFM-Bild in **Abb. 142a**, bei dem die Höheninformation farbcodiert vorliegt, zeigt zunächst wenig Interessantes. Erst die dreidimensionale Projektion macht den Zusammenhang zwischen Dosis und Tiefe der Struktur sichtbar (**Abb. 142b**). Um den dosisabhängigen Einfluss hervorzuheben, ist das Bild *invers* abgebildet, d.h. die Höhen der Zylinder zeigen deren Tiefe an. Aber erst das Tiefenprofil macht den Einfluss der Dosis auf die Tiefe der Löcher in der PEG-Schicht auch quantitativ deutlich. So liegt die Lochtiefe bei der maximal verwendeten Dosis von 10 mC/cm^2 bei 45 nm (**Abb. 142c**). Dieser Wert ist nahezu identisch mit dem in **Abb. 141** erhaltenen Tiefe. Auch wenn beide Filme mit 65 nm die gleiche Dicke aufwiesen, zeigt das Ergebnis, dass die Tiefen unabhängig von der Form der Struktur sind und bei verschiedenen Proben reproduzierbare Ergebnisse liefern. Bei sinkender Dosis wird erwartungsgemäß auch die Lochtiefe geringer. Der Zusammenhang zwischen Dosis und Lochtiefe ist noch einmal in **Abb. 142d** zusammengefasst. Man erkennt, dass die Filmdicke zunächst stark abnimmt. Bereits bei einer Bestrahlung von nur 2 mC/cm^2 beträgt die Lochtiefe über 30 nm , das heißt, die ursprüngliche Filmdicke von 65 nm hat sich fast halbiert. Eine weitere Erhöhung der Dosis führt dann zu einer deutlich geringeren Abnahme der Filmdicke und bei 10 mC/cm^2 hat sich die Filmdicke um 45 nm und damit auf $\sim 30 \%$ verringert.

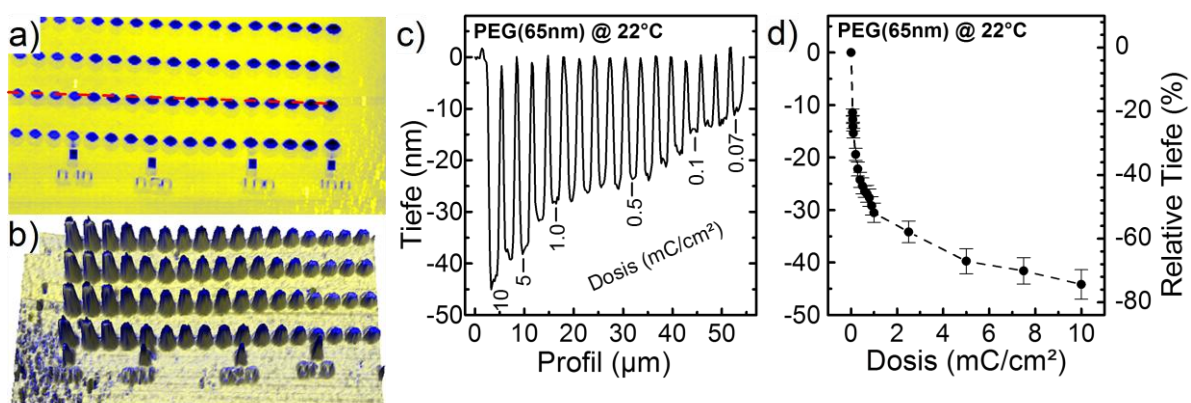


Abb. 142. Lithographische Strukturen eines Elektronenstrahlschreibers (3 keV) in einem 65 nm PEG-Film bei variabler Dosis zwischen $0.07 - 10 \text{ mC/cm}^2$: (a) AFM Bild einer Serie von Kreisen, deren Bestrahlungsdosis durch den Wert unterhalb der Struktur gegeben ist; (b) höheninverses, dreidimensionales AFM-Bild zeigt den Zusammenhang zwischen Strukturtiefe und Dosis; (c) Höhenprofil entlang der roten Linie von (a) und (d) Zusammenhang zwischen Dosis und Tiefe der erzeugten Strukturen.

Aufgrund der signifikanten Abhängigkeit der Profiltiefe von der Dosis ist es möglich, dreidimensionale Strukturen in der PEG-Matrix zu erzeugen. **Abb. 143a** zeigt das AFM-Bild einer umgedrehten, quadratischen Stufenpyramide, die durch wiederholtes, dosisäquivalentes Bestrahlen (1 mC/cm^2 bei 3 keV) quadratischer Strukturelemente mit von außen nach innen abnehmender Größe hergestellt werden kann. Dabei ist die Höheninformation als Farbcode in dem Konturdiagramm enthalten und die einzelnen, kleiner werdenden Quadrate sind gut zu erkennen. Ein Tiefenprofildiagramm entlang der weißen Linie macht die Auswirkung der Bestrahlung der einzelnen Quadrate sichtbar (**Abb. 143b**). Wie

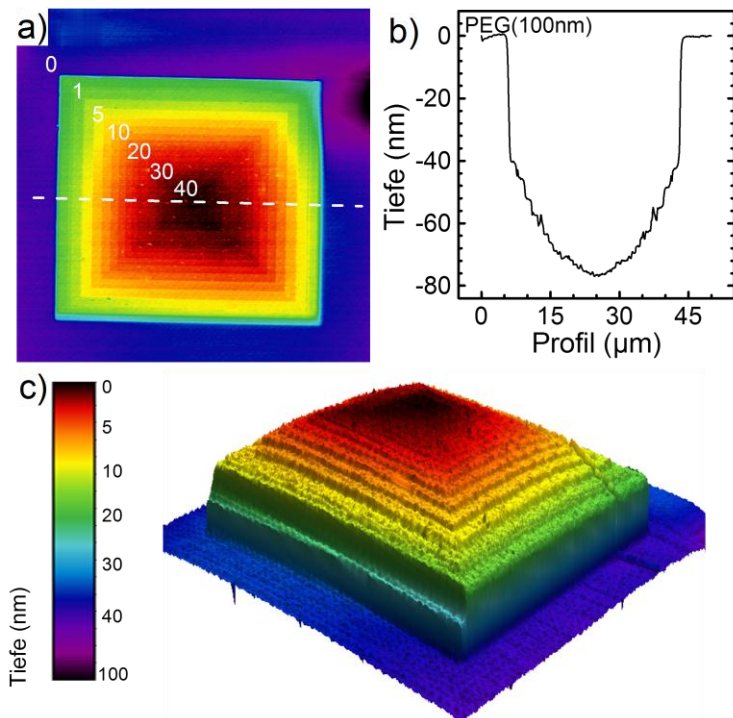


Abb. 143. (a) AFM Konturdiagramm einer umgedrehten Pyramide, die in einen PEG(90nm) Film geschrieben worden ist; (b) Tiefenprofil entlang der weißen Linie; (c) Zusammenfassung der beiden Diagramme in einem dreidimensionalen, höheninversen Profilbild.

zuvor schon gesehen, führt bereits eine geringe Bestrahlung zu einer deutlichen Verringerung der Filmdicke. Nach 2 mC/cm^2 hat die zweite Ebene des 100 nm PEG-Films eine Tiefe von 40 nm und die Erhöhung der Dosis auf 40 mC/cm^2 führt nur noch zu einer zusätzlichen Vertiefung von 40 nm , womit sich eine Gesamttiefe von dann 80 nm ergibt. Die höheninverse, dreidimensionale Abbildung verdeutlicht die Veränderung der Strukturtiefe bei keinen Dosen noch einmal optisch (**Abb. 143c**).

5.4.6 Quelleigenschaften bestrahlter PEG-Filme

Bei der Untersuchung des Kontaktwinkels der PEG-Filme fiel bereits auf, dass nach einer Bestrahlung nicht nur die Benetzbarkeit der Filme abgenommen hatte, sondern dass die Werte der Kontaktwinkel über längerer Zeit konstant blieben. Das war bei den unbestrahlten Filmen nicht der Fall, was mit einer Adsorption von Wasser in den Film und einer damit einhergehenden Veränderung der Benetzbarkeit erklärt wurde. Im Umkehrschluss sollte dann der PEG-Film nach der Bestrahlung weniger in der Lage sein, Wasser aufzunehmen und damit eine der typischen Eigenschaft von Hydrogelen verlieren. Der Einfluss der Elektronenbestrahlung auf die Quelleigenschaften von PEG-Filme wird in diesem Kapitel detailliert untersucht, wobei sich derselben Technik wie im letzten Kapitel bedient wird. Mit einem Elektronenstrahlschreiber werden kreisförmige Strukturen unterschiedlicher Dosis in den PEG-Film geschrieben, die wie im Abschnitt 5.3.4 mit einem Peltier-Element schrittweise abgekühlt werden können. Mit dem AFM lässt dann eine Dosisabhängigkeit der Quelleigenschaften untersuchen (**Abb. 144**).

Die AFM Bilder eines 100 nm PEG-Film mit den zugehörigen Höhenprofilen sind in **Abb. 144** exemplarisch bei Raumtemperatur ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) und bei $2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ gezeigt. Zur besseren Verdeutlichung sind die Veränderungen separat einmal im Bereich niedriger Bestrahlungsdosen zwischen 0.1 und

1.0 mC/cm² und einmal im Bereich hoher Bestrahlungsdosen von 1.0 bis 40 mC/cm² gezeigt. Gut zu erkennen ist, dass sich bei Raumtemperatur die Tiefe der Töpfe (im folgenden *Töpfchentiefe* genannt) wie erwartet bei steigender Dosis erhöht. Dieses thermosensitive Verhalten wird im Zusammenhang mit der Frage diskutiert, in wieweit bestrahlte Bereiche noch in der Lage sind, bei Temperaturerniedrigung unter Wassereinlagerung zu quellen.

In **Abb. 145** sind die Höhenprofile für weitere Temperaturen gezeigt. Deutlich erkennt man, dass mit steigender Dosis nicht nur generell die Tiefe der Töpfchen ansteigt, sondern auch deren Thermosensitivität in Form einer Änderung der Töpfchentiefe pro Temperaturänderung.

So steigt bei einer Dosis von 0.1 mC/cm² die Tiefe von 20 nm bei Raumtemperatur auf ~55 nm bei 0.5 °C, was einer Zunahme der Tiefe um 35 nm entspricht. Bei 40 mC/cm² liegt die Töpfchentiefe zunächst bei 70 nm und steigt dann auf einen Wert von 170 nm an, was einer Zunahme der Tiefe von 100 nm bedeutet.

Anstatt die Werte einzeln zu diskutieren, wird im Folgenden gezeigt, dass sich die Töpfchentiefe in Abhängigkeit von Dosis und Temperatur mathematisch beschreiben lässt. Ein erster Hinweis auf das systematische Verhalten der drei beteiligten Parameter Bestrahlungsdosis, Temperatur und Tiefe der Töpfchen zeigt sich in **Abb. 146**. Das dreidimensionale Streifendiagramm in **Abb. 146a** betont die Dosisabhängigkeit der Töpfchentiefe bei einer bestimmten Temperatur. Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass sich die Tiefe bei allen betrachteten Temperaturen mit steigender Dosis asymptotisch einen Maximalwert nähert. Trägt man andererseits die Töpfchentiefe wie in **Abb. 146b** bei konstanter Bestrahlungsdosis gegen die Temperatur auf, folgt auch hier die Struktur einem einheitlichen Trend. Beginnend bei der jeweils maximalen Tiefe bei 0 °C fällt sie offensichtlich exponentiell ab und erreicht bei Werten über 15 °C ihren minimalen Wert. Eine dritte Möglichkeit, die Zahlentripel aus Tiefe, Temperatur und Dosis grafisch darzustellen, zeigt das Konturdiagramm in **Abb. 146c**. Diese Darstellung verdeutlicht die Zonen der Töpfchentiefe und mit welcher Kombination aus Temperatur und Dosis eine bestimmte Tiefe erreicht werden kann.

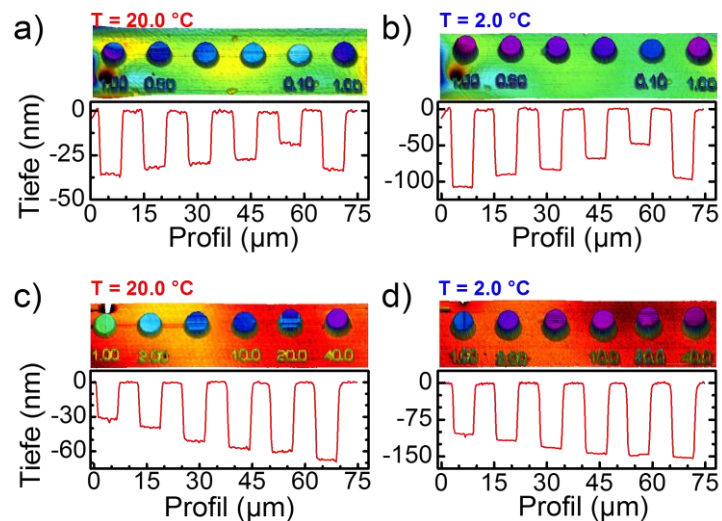


Abb. 144. Höheninverse AFM-Bilder mit Höhenprofilen von kreisförmigen Strukturen (Töpfchen) in einem 100 nm PEG-Film, erstellt mit einem 3 keV Elektronenstrahl im Dosisbereich 0.1 – 1.0 mC/cm² bei (a) 20 °C und (b) 2.0 °C, sowie bei Dosen von 1.0 – 40 mC/cm² bei (c) 20 °C und (d) 2.0 °C (die Zahlenwerte in den AFM-Bildern geben die jeweilige Dosis in mC/cm² an).

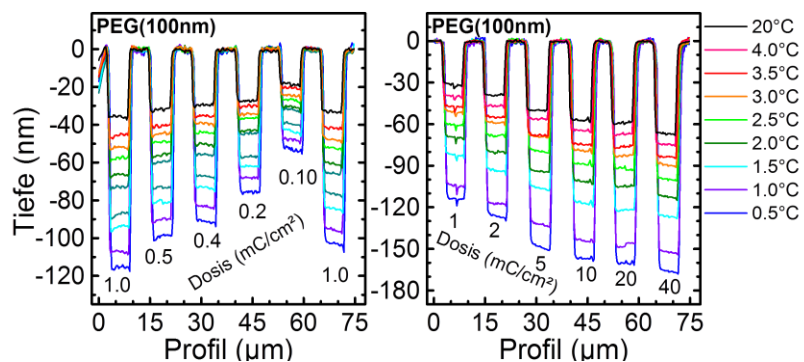


Abb. 145. Zusammenfassung der AFM-Höhenprofile eines 100 nm PEG-Films, bestrahlt mit Dosen zwischen (a) 0.10–1.0 und (b) 1.0–40 mC/cm² im Temperaturbereich zwischen 0.5–20 °C.

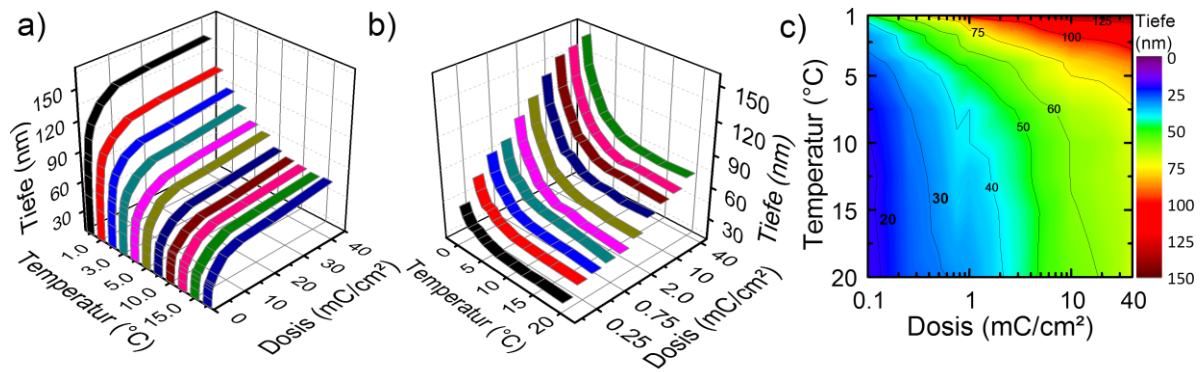


Abb. 146. Darstellungen des Einflusses von Bestrahlungsdosis und Temperatur auf die Tiefe der Töpfchen eines 100 nm PEG-Films : (a) Dosisabhängigkeit der Tiefe bei verschiedenen Temperaturen; (b) Temperaturabhängigkeit der Tiefe bei verschiedenen Dosen; (c) Konturdiagramm der Tiefe als Farbcode in Abhängigkeit von Dosis und Temperatur.

Wie schon aus Abbildung Abb. 146b zu vermuten, folgt die temperaturabhängige Töpfchentiefe einer exponentiellen Charakteristik. Die entsprechenden Kurven sind in **Abb. 147** noch einmal exemplarisch für Dosen von 0.1, 1.0, 10 und 40 mC/cm² dargestellt. Die Abbildungen für die anderen Dosen verlaufen analog. Die Punkte lassen sich sehr gut an die folgende Exponentialfunktion anpassen:

$$(Gl. 32) \quad d(T) = A + B \cdot \exp(-T / k)$$

mit $d(T)$ der temperaturabhängigen Töpfchentiefe in nm, T der Temperatur in °C und drei Parametern A , B und k . Die Parameter lassen sich einem realen physikalischen Hintergrund zuordnen (**Abb. 149**). So gibt A die Töpfchentiefe unter Normalbedingungen an, also bei Raumtemperatur, wenn der PEG-Film keine nennenswerten Wassermengen gespeichert hat. Parameter B charakterisiert die maximale, zusätzliche Töpfchentiefe bei niedriger Temperatur. Damit ist die Summe $A+B$ die maximal erreichbare Gesamttiefe. Die Bedeutung der beiden Parameter ist am Beispiel der mit 0.1 mC/cm² bestrahlten Bereiche in **Abb. 147a** verdeutlicht. Der Kehrwert des Parameters k lässt sich als ein Sensitivitätskoeffizient interpretieren, der anzeigt, wie empfindlich das System auf Temperaturveränderungen reagiert.

Um die Reaktion der PEG-Filme auf Elektronenbestrahlung vollständig zu beschreiben (hier exemplarisch für einen 100 nm PEG-Film gezeigt), werden die temperaturabhängigen Parameter A , B und k aus Gleichung 32 ihrerseits auf eine eventuell vorhandene Dosisabhängigkeit untersucht. Dazu sind A , B und k noch einmal in **Tabelle 3** zusammengefasst. Werden die Fit-Parameter nun ihrerseits gegen die Dosis aufgetragen, zeigt sich, dass

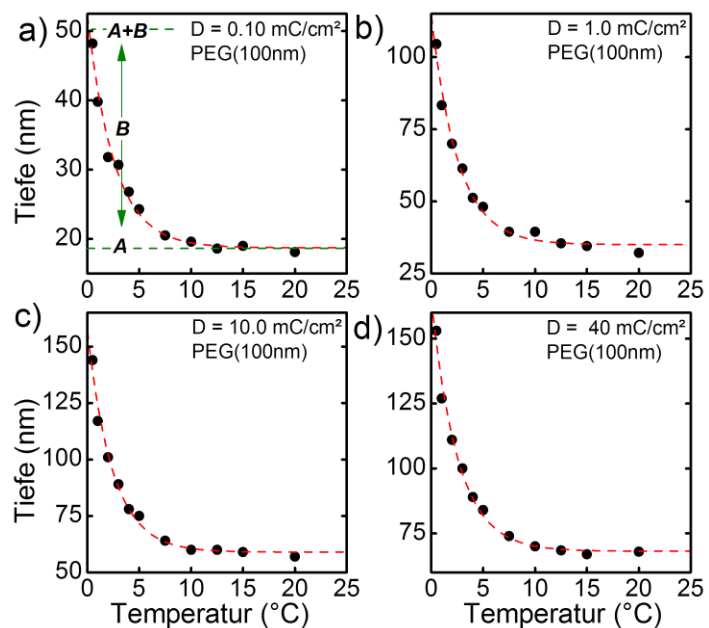


Abb. 147. Töpfchentiefe in Abhängigkeit von der Temperatur eines 100 nm PEG-Films nach der Bestrahlung mit (a) 0.10, (b) 1.0, (c) 10.0 und (d) 40.0 mC/cm².

A und B nicht unabhängig von der Dosis sind (**Abb. 148a** und **b**). Auf der anderen Seite ist k mit einem Mittelwert von $2.50(\pm 0.1)$ °C nahezu unabhängig von der Dosis (**Abb. 148d**). Interessanterweise hat dieser anhand von AFM-Messungen bestrahlter PEG-Filme bestimmte Parameter nahezu den gleichen Wert wie der Parameter k , der in Abschnitt 5.3.4 bei den Quellversuchen unbestrahlten PEG-Filmen ab einer Dicke von 50 nm ellipsometrisch mit einem Wert von $\sim 2.6(\pm 0.2)$ °C ermittelt wurde. Diese hohe Korrelation lässt darauf schließen, dass die bestrahlten Töpfchen bei Temperaturerniedrigung nicht quellen können, sondern nur die sie umgebende PEG-Matrix ihre Filmdicke ändert.

Die Dosisabhängigkeit der beiden Parameter A und B lässt sich nicht optimal durch eine Exponentialfunktion beschreiben (roten Kurven in **Abb. 148**). Besser eignet sich die Hill-Funktion (blaue Kurven in **Abb. 148**), eine Wachstumsfunktion der folgenden Form:

$$(Gl. 33) \quad P(D) = V \cdot \frac{D^n}{t^n + D^n}$$

mit $P(D)$ den dosisabhängigen, exponentiellen Parameter $A(D)$ und $B(D)$, die durch die Parameter der Hill-Funktion V , t und n beschrieben werden.

Trägt man die Werte des Parameters A , der die Töpfchentiefe bei Raumtemperatur beschreibt, gegen die Dosis auf und passt die Punkte an die Hill-Funktion an (**Abb. 148a**), ergibt sich für den Hill-Parameter V ein Wert von 98 nm (**Tabelle 4**). Auch V hat einen realen, physikalischen Hintergrund. Es gibt den Wert der Töpfchentiefe im Grenzfall unendlicher Dosen an. Mit einem Wert von 98 nm entspricht er ziemlich genau der Dicke des PEG(100nm)-Films bei Raumtemperatur, was zu erwarten ist, wenn der Elektronenstrahl den PEG-Film mit einer unendlich hohen Dosis bestrahlt und dadurch vollständig entfernt. Ferner bedeutet das, dass es möglich ist, durch die Messung der Dosis- und Temperaturabhängigkeit der Töpfchentiefe auch ohne Ellipsometrie die Schichtdicke des unbestrahlten PEG-Films zu bestimmen. Da beide Werte sehr gut korrelieren und vollkommen unabhängig voneinander bestimmt worden sind, werden die ellipsometrisch erhaltenen Filmdicken eindeutig bestätigt.

Dosis (mC/cm ²)	A (nm)	B (nm)	$A+B$ (nm)	k (°C)
0.10	18.7	33.5	52.2	2.59
0.25	27.6	47.3	74.9	2.34
0.50	31.4	59.5	90.9	2.41
0.75	31.1	70.1	101.2	2.64
1.00	35.0	79.3	114.3	2.56
2.00	40.9	87.5	128.4	2.53
5.00	51.7	91.9	143.6	2.49
10.0	59.0	97.9	156.9	2.44
20.0	61.7	99.9	161.6	2.45
40.0	68.1	96.8	164.9	2.56

Tabelle 3. Exponentielle Parameter A , B und k der Abhängigkeit der Töpfchentiefe von der Temperatur nach der Gleichung 32.

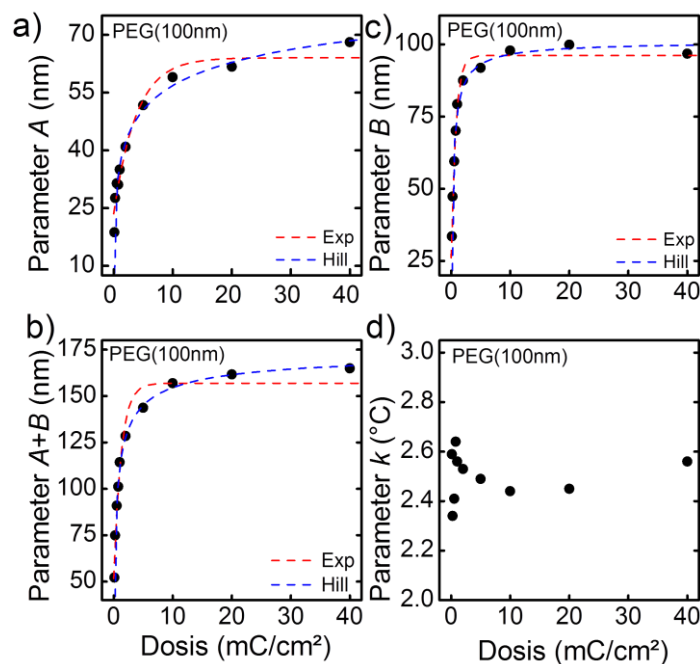


Abb. 148. Auftragung der Parameter A , B , $A+B$ und k aus Gleichung 32 und Tabelle 3 in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.

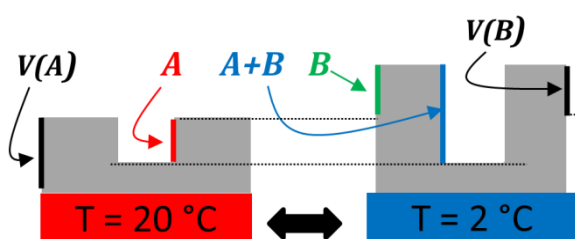


Abb. 149. Bedeutung der Parameter A und B aus Gleichung 32 und der Parameter $V(A)$ und $V(B)$ aus Gleichung 33.

Exponentieller Parameter	V (nm)	t ()	n ()	t^n
A	98 (±1)	4.1 (±0.2)	0.38 (±0.01)	1.71
B	101 (±2)	0.27 (±0.03)	0.84 (±0.03)	0.33
A+B	178 (±3)	0.41 (±0.02)	0.62 (±0.03)	0.58

Tabelle 4. Beschreibung der exponentiellen Parameter A und B in Abhängigkeit von der Dosis durch eine Hill-Funktion mit den Parametern V , t und n .

Betrachtet man in gleicher Weise den Hill-Parameter V der die Dosisabhängigkeit des exponentiellen Parameters B beschreibt (Abb. 148b), beträgt der Wert 101 nm (**Tabelle 4**). Bedenkt man, dass der exponentielle Parameter B den maximalen Zuwachs an Töpfchentiefe durch das Aufquellen angibt, ist auch dieser Parameter in sehr guter Übereinstimmung mit den ellipsometrisch erhaltenen Werten in Abschnitt 5.3.4, wo gezeigt wurde, dass PEG-Filme im Bereich von 100 nm ein Quellverhältnis von zwei aufweisen, also auf das doppelte ihrer ursprünglichen Filmdicke anwachsen. Damit erhält man mit dem AFM neben der Filmdicke auch das Quellverhältnis. Das zeigt noch einmal eindeutig, dass die bestrahlten Bereiche des PEG-Films nicht anschwellen. d.h. der PEG-Film verliert durch die Bestrahlung komplett die Fähigkeit, Wasser aufzunehmen.

Andererseits ist es möglich, die Dosis- und Temperaturabhängigkeit der Strukturtiefe vollständig analytisch zu beschreiben (hier am Beispiel des 100 nm PEG-Film). Gleichung 32 lässt sich zunächst mit den dosisangängigen Parametern aus Gleichung 33 erweitern:

$$(Gl. 34) \quad d(D, T) = A(D) + B(D) \cdot \exp\left(-\frac{T}{k}\right)$$

Die Parameter $A(D)$ und $B(D)$ werden dann durch die dosisabhängigen Parameter der Hill-Funktionen V , t und n aus Tabelle 4 ersetzt, und man erhält die folgende Gleichung:

$$(Gl. 35) \quad d(D, T) = 98 \text{ nm} \cdot \frac{D^{0.38}}{1.71 + D^{0.38}} + 101 \text{ nm} \cdot \frac{D^{0.84}}{0.33 + D^{0.84}} \cdot \exp\left(-\frac{T}{2.50 \text{ °C}}\right)$$

Sie beschreibt die Töpfchentiefe des PEG(100)-Films vollständig. Wie gut die Übereinstimmung der gemäß Gleichung 33 berechneten Töpfchentiefen mit den gemessenen Werten ist, zeigt die Fehleranalyse in **Abb. 150**. Für mehr als $\frac{2}{3}$ der Werte liegt der Fehler unter 5 Prozent und nur ein Messwert hat mit 12.5 % einen Fehler von mehr als 10 %. Die Verteilung des Fehlers im Temperatur-Dosis-Raum ist in dem Konturdiagramm ersichtlich (**Abb. 150b**). Ferner sieht man, dass die betragsmäßige Größe des Fehlers zufällig in der Dosis-Temperatur-Ebene verteilt ist.

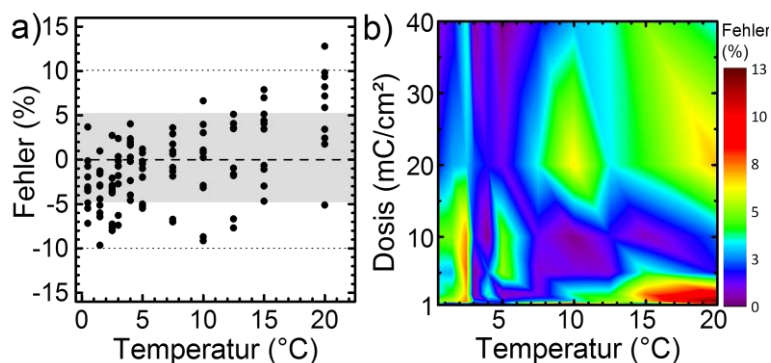


Abb. 150. Grafische Darstellung des Fehlers zwischen den gemessenen Werten der dosis- und temperaturabhängigen Töpfchentiefe und den gemäß Gleichung 35 errechneten Werten.

Wirft man noch einmal einen Blick auf die den dosisabhängigen Verlauf des exponentiellen Parameter B (Abb. 148b), fällt auf, dass B zunächst sehr steil ansteigt, um schon bei relativ geringen Dosen von $\sim 2 \text{ mC/cm}^2$ den Maximalwert von 100 nm erreicht. Physikalisch bedeutet das, dass schon ab kleinen Bestrahlungsdosen (für Dosen mit $D > t^n$, also $D > 0.33 \text{ mC/cm}^2$) der PEG-Film seine Quellfähigkeit nahezu komplett verloren hat. Mathematisch führt das dazu, dass sich Gleichung 35 weiter vereinfachen lässt, indem man annimmt, dass Parameter B näherungsweise unabhängig von der Dosis ist. Diese Tatsache ergibt sich auch aus der Hill-Funktion selber und den entsprechenden Parametern, die $B(D)$ beschreiben (Tabelle 4). t^n hat einen Wert von 0.33, sodass der Term $t^n \ll D^n$ und damit Bruch der Hill-Funktion gegen eins tendiert. Daher kann Gleichung 30 wie folgt vereinfacht werden:

$$(Gl. 36) \quad d(D, T) \approx 100 \text{ nm} \cdot \left[\frac{D^{0.38}}{1.71 + D^{0.38}} + \exp\left(-\frac{T}{2.50}\right) \right]$$

Die Beschreibung des Systems ist in einen dosis- und einen temperaturabhängigen Term separierbar. Natürlich wird der Fehler zwischen den Messwerten und den gemäß Gleichung 36 berechneten Werten gerade bei niedrigen Dosen und Temperaturen relativ groß sein, dennoch zeigt sich, dass große Fehler von über 20 % überwiegend in einem kleinen Bereich zu finden ist, bei denen Temperatur und Dosis gleichzeitig niedrig sind ($T < 5 \text{ }^\circ\text{C}$ und $D < 1 \text{ mC/cm}^2$) (Abb. 151). Im überwiegenden Wertebereich bleibt der Fehler sogar unter 10 %.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PEG-Filme durch Elektronenbestrahlung schon bei relativ geringen Dosen von 1 mC/cm^2 ihre PEG-typischen Eigenschaften verlieren, wie die wichtige Fähigkeit, Wasser aufnehmen zu können. Daher zeigen die PEG-Filme an den bestrahlten Stellen auch keine Quelleigenschaften mehr. Die mittels XPS und NEXAFS gezeigten chemischen Veränderungen der Oberfläche der PEG-Filme durch Elektronenbestrahlung, werden in der Veränderung makroskopischer Eigenschaften wie dem Quellverhalten und der Benutzbarkeit fortgeführt. Die strahleninduzierte Umwandlung der PEG-Struktur in eine mehr aliphatische, kohlenstoffartige Struktur passt zu den Beobachtungen des Quellverlustes.

5.4.7 Proteinabweisende Eigenschaften der PEG-Filme nach Elektronenbestrahlung

In Abschnitt 5.3.5 wurde bereits gezeigt, dass PEG-Filme die Eigenschaft besitzen, mehr oder weniger stark unspezifischer Proteinabsorption von zu widerstehen. Ferner ist bekannt, dass bei Ethylenglykol-terminierten SAMs vom Typ gemäß Abb. 94 ihre Biokompatibilität verlieren, wenn sie

mit 50 eV Elektronen bestrahlt werden.⁸⁰ Bei diesen SAMs ist eine nur 1.3 nm dicke PEG-Schicht für die Proteinresistenz des SAMs verantwortlichen (Abb. 101b) und so führt schon eine geringe Dosis von $< 1 \text{ mC/cm}^2$ dazu, dass die für eine Biokompatibilität notwendige Filmdicke unterschritten wird. Es stellt sich natürlich die Frage, in wie weit die Proteinresistenz der hier präsentierten, mit bis zu

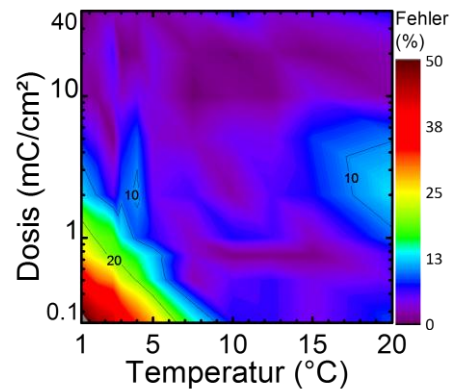


Abb. 151. Fehlerkonturdiagramm zwischen Messwerten und der nach Gleichung 36 berechneten Töpfchentiefe.

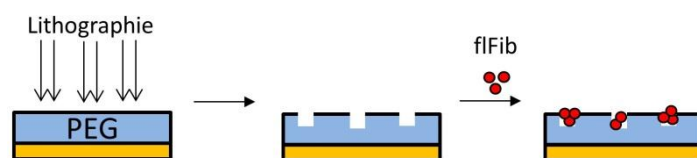


Abb. 152. Untersuchung proteinabweisender Eigenschaften von bestrahlten PEG-Filmen mittels lithographischer Strukturierung, Adsorption von Fluoreszenz-markierten Proteinen (flFib) und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung.

100 nm deutlich dickeren PEG-Filme durch Elektronenbestrahlung beeinflusst werden. Diese Filme verlieren zwar durch Bestrahlung mit Elektronen ebenfalls an Schichtdicke, dennoch sollte die noch verbleibende Filmdicke ausreichen, um weiterhin einer Proteinadsorption widerstehen zu können. Auf der anderen Seite ist die Biokompatibilität auch eine Eigenschaft der Oberfläche und in den letzten Abschnitten wurde gezeigt, dass sich die Oberfläche der PEG-Filme schon bei Elektronenbestrahlung mit kleinen Dosen deutlich verändert. Insofern kann erwartet werden, dass die auch Proteinresistenz durch Bestrahlung beeinflusst wird.

Ein einfach durchzuführendes Experiment ist wieder das lithographische Erstellen von Bestrahlungsmustern, im Zusammenhang mit der Adsorption von Fluoreszenz-markierten Proteinen und einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (**Abb. 152**). Sofern sich bestrahlte Bereiche von unbestrahlten hinsichtlich des Adsorptionsvermögens von Proteinen unterscheiden, werden die lithographischen Strukturen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar und lassen eine qualitative Analyse der Proteinresistenz aufgrund des Hell-Dunkel-Kontrasts zu.

In den PEG-Filmen von **Abb. 153** werden quadratische Strukturen mit einer Dosis von 5 mC/cm^2 erzeugt und nach der Inkubation in einer Lösung mit Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen (Alexa-Fluor®648 conjugated fibrinogen) unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei dem verwendeten Filtersystem des Mikroskops (optimiert für den Farbstoff TexasRed®) leuchtet das Fibrinogen und damit die Bereiche, auf denen es adsorbiert ist, rot auf. Wie erwartet erscheinen die bestrahlten Bereiche rot, was bedeutet, dass sich Fibrinogen ausschließlich an diesen Arealen abgesetzt hat. Selbst bei dem nur mäßig Fibrinogen-resistenten 15 nm PEG-Filmen (siehe filmdickenabhängige Proteinresistenz in **Abb. 127**) ein ist noch deutlicher Kontrast zu erkennen. Zudem ist ein schwacher Trend wahrnehmbar, dass sich auf den unbestrahlten Bereichen umso mehr Fibrinogen ablagert, je dünner der jeweilige PEG-Film ist. Auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit den in Abschnitt 5.3.5 bestimmten Proteinadsorptionen mittels XPS.

Führt man das gleiche Bestrahlungs- und Fibrinogen-Adsorptionsexperiment mit den in Abschnitt 5.2 besprochenen, PEGylierten PEG10k-iNBPT Filmen durch, ergibt sich ein ganz ähnliches Bild (**Abb. 154b**). Auch diese Filme verlieren durch Elektronenbestrahlung ihre Biokompatibilität. Da aber die PEG+iNBPT Filme mit $\sim 5 \text{ nm}$ viel dünner als die in diesem Kapitel besprochenen PEG-Filme sind, ist die räumliche Distanz des Fluoreszenz-markierten Fibrinogens zum Goldsubstrats geringer. Das führt zu einer beträchtlichen Verringerung der Fluoreszenzintensität („quenching“) und zu entsprechend längeren Belichtungsdauern. Die in **Abb. 154** gezeigten FM-Bilder wurden im Fall des 70 nm PEG-Films für 8 Sekunden belichtet, wäh-

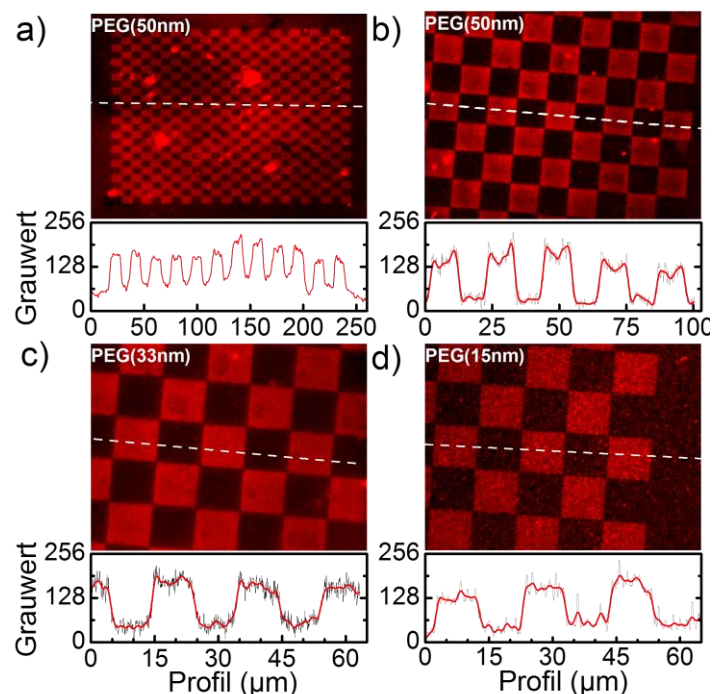


Abb. 153. Fluoreszenzmikroskopie Bilder von PEG-Filmen nach lithographischer Strukturierung (5 mC/cm^2 ; 3 keV) und Adsorption von Fluoreszenz-markiertem Fibrinogen; Filmdicken: (a) und (b) 50 nm, (c) 33 nm und (d) 15 nm.

rend für das FM-Bild des PEK10k-iNBPT Films 30 Sekunden nötig waren, um eine ähnliche Helligkeit des Bildes zu erhalten. Neben den verschiedenen Belichtungszeiten unterscheiden sich beide PEG-Filme auch bei der Betrachtung unter dem optischen Lichtmikroskop. Bei dem 70 nm PEG-Film ist das Lithographiemuster deutlich sichtbar (**Abb. 154c**), während bei dem wesentlich dünneren PEG10k-iNBPT Film das Muster nicht zu erkennen ist (**Abb. 154d**). Die hohe Empfindlichkeit der PEG-Filme bezüglich des Verlusts an Schichtdicke nach Elektronenbestrahlung wird also auch optisch direkt sichtbar. Die Bestrahlung mit einer Dosis von 5 mC/cm^2 führt bei dem 70 nm PEG-Film zu einer Vertiefung von $\sim 20 \text{ nm}$, diese sind im Lichtmikroskop sichtbar. Die Bilder wurden im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) Modus aufgenommen, bei dem sich Weglängenunterschiede des Lichtes in Helligkeitsunterschieden ausdrücken. Das führt bei den untersuchten Strukturen zu einer deutlichen Kontrastverbesserung.

Die DIC-Mikroskopie führt noch zu einem weiteren interessanten Phänomen. Im letzten Abschnitt wurde das Quellverhalten lithographisch strukturierter PEG-Filme untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Tiefe der Strukturen dosis- und vor allem auch temperaturabhängig war. Diese Abhängigkeiten der Strukturtiefe finden sich auch in DIC-Mikroskop Aufnahmen wieder, indem kreisförmige Muster mit steigender Dosis zwischen 0.01 und 10 mC/cm^2 in einen 40 nm PEG-Film geschrieben werden (**Abb. 155**). Bei der Aufnahme unter Raumtemperatur sind die Strukturen ab einer Dosis von 0.5 mC/cm^2 zu erkennen. Wird der Film aber auf 2°C abgekühlt, schwillt der Film an den unbestrahlten Bereichen an, was zur Vertiefung der Löcher und damit zu einer Erhöhung des optischen Kontrasts auch kleiner Dosen führt.

Es bleibt noch die Frage zu klären, ob einen Zusammenhang zwischen der Bestrahlungsdosis und der Menge an adsorbiertem Fibrinogen besteht. Dazu werden drei Strukturen mit einem Dosisgradienten lithographisch in einen 70 nm PEG-Film geschrieben, anschließend in eine Lösung mit fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen gegeben und unter dem DIC- und dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (**Abb. 156**). Die Zahlenwerte in an den jeweiligen Strukturen bezeichnen die Dosis, mit der der unter- bzw. obenliegende Bereich bestrahlt ist. Die Werte sind besonders gut in der DIC-Mikroskopie-Bildern zu erkennen. Die Adsorption von Fibrinogen zeigt eine deutliche Reaktion auf die verwen-

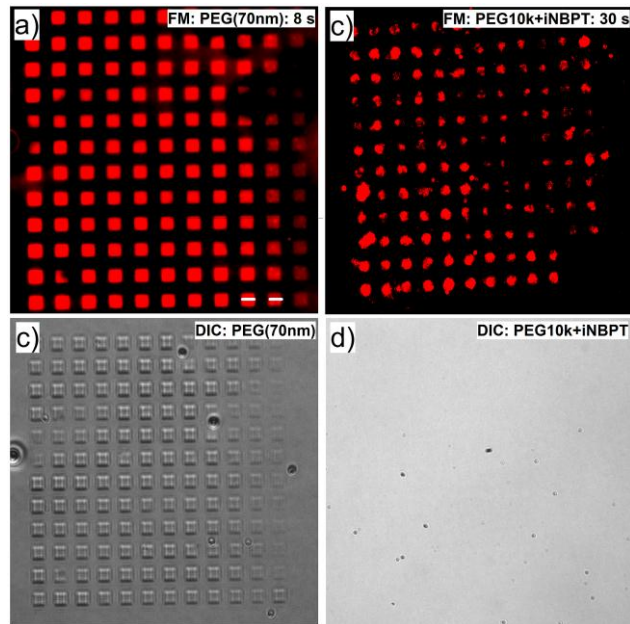


Abb. 154. FM Bilder zusammen mit den entsprechenden Lichtmikroskop Bildern (DIC) eines PEG(70nm)-Films (a, c) und eines $\sim 5 \text{ nm}$ PEK10k-iNBPT-Films (b, d) nach Bestrahlung mit 5 mC/cm^2 und Eintauchen in eine Lösung mit fluoreszenzmarkiertem Fibrinogen.

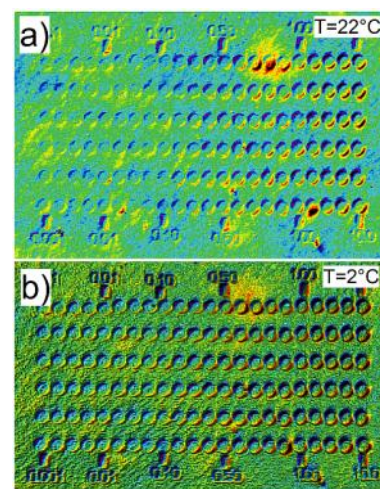


Abb. 155. DIC Mikroskop Falschfarbenbilder der mit einem Elektronenstrahl hergestellten Strukturen bei (a) 22°C und (b) 2°C .

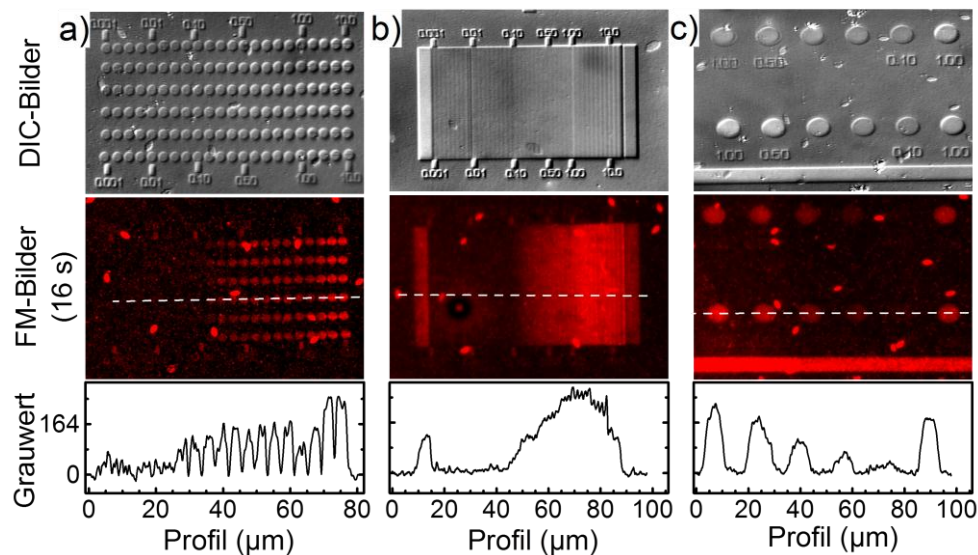


Abb. 156. Mikroskopische Untersuchung (oben DIC, Mitte FM, unten Intensitätsprofil) der Fibrinogenadsorption auf 70 nm PEG-Filme, in die ein Bestrahlungsgradient geschrieben worden ist.

dete Bestrahlungsdosis. Generell gilt, je größer die Dosis, desto heller die Bereiche und desto stärker die Proteinadsorption. Ab einer Dosis von $\sim 0.1 \text{ mC/cm}^2$ beginnt sich das Fibrinogen auf den bestrahlten Bereichen unabhängig von der Form des Musters abzusetzen. Die Intensität des adsorbierten Fibrinogens nimmt mit steigender Dosis zu und erreicht bei einer Dosis von $\sim 5 \text{ mC/cm}^2$ ihr Maximum. Das heißt, bei den hier vorgestellten PEG-Filmen ist es nicht nur möglich, innerhalb einer proteinabweisenden Matrix Bereiche beliebiger Form und Größe zu erzeugen, an denen Proteine adsorbieren können. Es besteht sogar die Möglichkeit, in gewissem Rahmen die Menge an Protein zu beeinflussen, die an das PEG adsorbiert werden kann.

Es stellt sich zuletzt noch die Frage, was der Grund für den Verlust der Biokompatibilität elektronenbestrahlter PEG-Filme sein könnte. Die Elektronenbestrahlung führt zu einer Verringerung der Filmdicke. Das kann aber nicht der Grund sein, da die verbleibende Schichtdicke ausreichend sein sollte, der Proteinadsorption zu widerstehen. Weit wichtiger ist die chemische Umwandlung der Oberfläche von einer typischen PEG- in eine carbenoide Struktur (siehe sie XPS-Ergebnisse der Bestrahlung in Abschnitt 5.4.1). Der daraus resultierende Verlust an Quellvermögen bzw. der Fähigkeit, Wasser einzulagern, dürfte der eigentliche Grund für den Verlust an Proteinresistenz sein. Polyethylenglykole sind gerade wegen ihrer Fähigkeit, Wassermoleküle zu binden, biokompatibel. Fehlt diese Eigenschaft, können Proteine leicht auf diesen „trockenen“ Oberflächen adsorbieren (hydrophiler Effekt).

5.4.8 Adsorption von Farbstoffmolekülen aus wässriger Phase

Der Verlust der Quellfähigkeit lässt sich noch auf eine andere Weise sichtbar machen als mit den in Abschnitt 5.3.4 und 5.4.6 besprochenen Methoden der Adsorption von Feuchtigkeit aus der Umgebung bei Abkühlung des Filme. Sollten die Filme ihre Quelleigenschaften verlieren, dürfte auch ein in Wasser gelöster Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr in die bestrahlten Stellen eindringen dürfen und somit im Fluoreszenzmikroskop dunkel erscheinen. Die PEG-Filme werden wieder elektronenlithographisch mit einem Muster steigender Dosis strukturiert, in eine wässrige Lösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Fluoreszin* gegeben und anschließend gründlich mit Wasser und Ethanol abgespült. Die FM-Bilder sind in **Abb. 157** abgebildet und mit einem Fluoreszenzfilter für grün

fluoreszierende Proteine (green fluorescence proteins, GFP) aufgenommen. Zunächst fällt auf, dass die Bilder sehr scharf sind. Der Kontrast der Elektronenbestrahlung spiegelt sich nahezu vollständig in dem Adsorptionsmuster des Farbstoffs wider. Er haftet fast ausschließlich an unbestrahltem PEG, während die bestrahlten Bereiche nahezu frei von Fluoreszin bleiben. Es ist kein Verwaschen der Strukturen erkennbar, was besonders in der dreidimensionalen Intensitätsprojektion in **Abb. 157d** sichtbar wird. Der Farbstoff wandert nicht in die bestrahlten Stellen ein. Da das Fluoreszin als wässrige Lösung vorgelegt hat, ist das Wasser der entscheidende Faktor. Es transportiert den Farbstoff in den PEG-Film. Die bestrahlten Bereiche lagern kein Wasser ein und damit auch kein Fluoreszin. Damit können diese Areale auch nicht mehr anschwellen. Das Fluoreszin-Experiment bestätigt die bisherigen Erkenntnisse und erklärt damit auch den Verlust an Biokompatibilität. Die hydrophoben, bestrahlten Bereiche sind nun für eine unspezifische Proteinadsorption zugänglich.

Ferner wirkt sich auch bei der Einlagerung von Fluorescein der Bestrahlungsgradient auf die Menge des eingelagerten Farbstoffs aus.

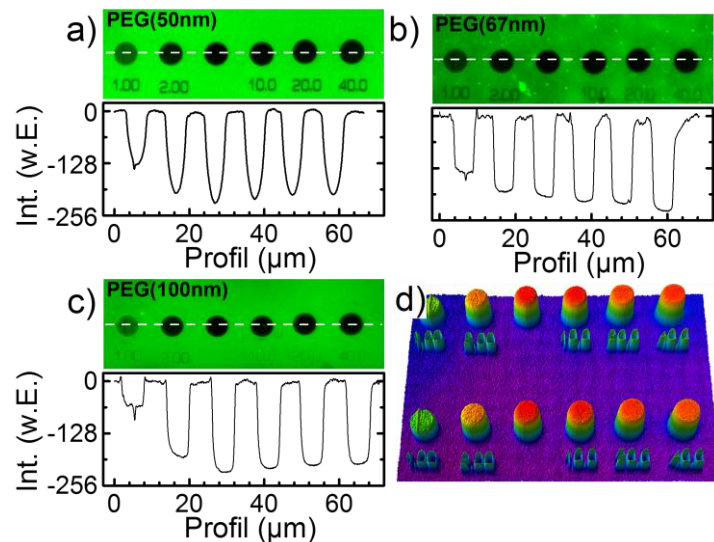


Abb. 157. (a-c) Fluoreszenzmikroskopie-Bilder (GFP-Filter) von PEG-Filmen verschiedener Filmdicke nach Bestrahlung (Zahlenwerte entsprechen der Dosis im mC/cm^2) und Einlegen in eine wässrige Fluoreszin Lösung zeigen den dosisabhängigen Einfluss auf den Verlust der Quellfähigkeit; (d) höheninverses, dreidimensionales Profilbild von (c).

5.5 Verbundfilme aus Polyethylenglykolen mit Gold-Nanopartikeln (AuNPs)

5.5.1 Adsorption von AuNPs und filmdickenabhängige UV-VIS Spektren

Aufgrund der Quelleigenschaften der PEG-Filme beim Kontakt mit Wasser ist es interessant zu untersuchen, was mit den darin gelösten Stoffen geschieht. Bei Proteinen und für Farbstoffe wurde der Effekt bereits im letzten Abschnitt diskutiert. Während Proteine wie Fibrinogen und Avidin sich größtenteils wieder herauswaschen ließen, verblieb beispielsweise der Farbstoff Fluoreszin überwiegend in den PEG-Filmen. Eine zweite Klasse von in Wasser gelösten Materialien stellen kolloidal gelöste Stoffe dar. Kolloide sind Substanzen mit einer Größe von unter einem Mikrometer, die in einem Dispersionsmedium (z.B. Wasser) fein verteilt sind.

Um zu untersuchen wie sich kolloidales Gold (meist als Gold-Nanopartikel oder AuNPs bezeichnet) im Zusammenhang mit den quellbaren PEG-Hydrogel Filmen verhält, werden sie für ungefähr eine Stunde in eine wässrige Lösung der Nanopartikel getaucht ($\varnothing=9$ nm; $c\approx 10^{13}$ AuNPs/ml). Nach dem Herausnehmen ist schon mit dem bloßen Auge eine deutliche Veränderung der Filme wahrnehmbar. Je nach deren Schichtdicke erscheinen die anfangs farblosen und durchsichtigen PEG-Filme grün, violett oder weiterhin transparent (**Abb. 158**). So führt die Einlagerung der Gold-Nanopartikel bei einem 70 nm PEG-Film zu einem grünlichen Farbeindruck (**Abb. 158c**), während die Schicht bei einer Filmdicke von 40 nm rot-violett erscheint (**Abb. 158b**). Bei unter 20 nm sind die Filme transparent (**Abb. 158a**), wobei allerdings ein möglicher Farbeindruck durch die starke Eigenfarbe des Goldsubstrats überlagert sein kann. Die schichtdickenabhängige Farbe macht zudem Inhomogenitäten des Films direkt sichtbar. Die grünen Bereiche in **Abb. 158d** deuten beispielsweise auf Gebiete höherer Schichtdicke innerhalb des 55 nm PEG-Films hin.

Ursächlich für das Auftreten des Farbeindrucks nach Einlagerung der AuNPs kann ein Interferenzeffekt sein. Dafür wären zwei definierte optische Grenzflächen notwendig, an denen das Licht reflektiert wird. Die eine kann der Goldfilm des Substrats sein, während die andere die Grenzfläche des AuNPs-PEG-Films mit der Umgebung darstellen kann. Gegen Interferenz spricht allerdings die geringe Empfindlichkeit des Farbeindrucks von der Filmdicke.

Wahrscheinlicher ist demnach eine Erklärung mit Hilfe der Theorie der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) von AuNPs. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssen die PEG-Filme UV-VIS-spektroskopisch charakterisiert werden, um filmdickenabhängige Absorptionsmaxima ohne den Einfluss des Goldsubstrats untersuchen zu können.

Bei der Betrachtung der UV-VIS-Spektren in Abhängigkeit von Filmdicke und Farbeindruck (**Abb. 159**) können zunächst zwei Beobachtungen festgehalten werden. Je nach Filmdicke kommt es zu einer Verände-

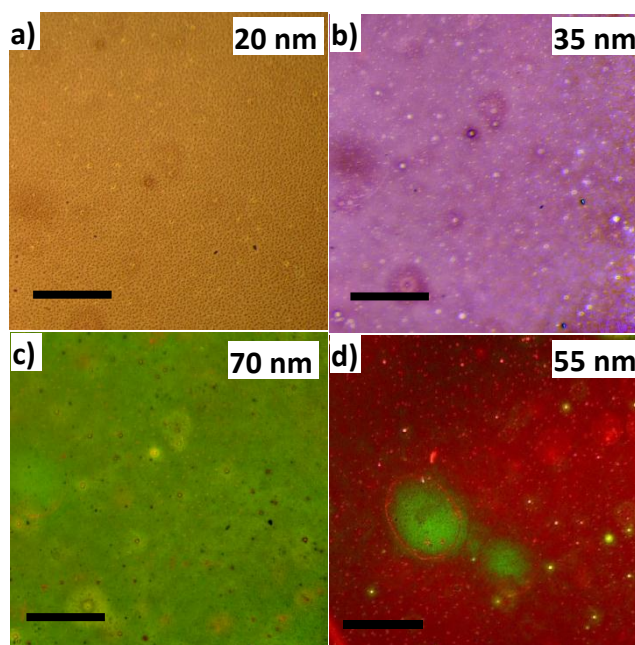


Abb. 158. Abhängigkeit des Farbeindrucks nach Adsorption von Gold-Nanopartikeln in PEG-Filme der Dicke 20 nm (a), 35 nm (b) und 70 nm (c); (d) Inhomogenitäten der Filmdicke treten deutlich als unterschiedliche Farben hervor (die Balken entsprechen 1 mm).

nung von *Position* und der *Intensität* der Absorptionsmaxima. So zeigt das UV-VIS Spektrum transparenter AuNP-PEG-Filme mit einer Schichtdicke um die 20 nm insgesamt eine nur gering ausgeprägte Absorption. Dennoch ist ein schwaches Maximum bei 550 nm identifizierbar, welches einer lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) der im PEG-Film eingebetteten Gold-Nanopartikel zugeordnet werden kann (**Abb. 160**). Position und Intensität der Bande lassen auf eine niedrige AuNP-Dichte schließen und der Film erscheint wegen der starken Eigenfarbe des Goldsubstrats und der geringen Schichtdicke farblos.

Mit steigender Filmdicke nehmen die Zahl der Nanopartikel und die Intensität der Lichtabsorption zu, sodass die PEG-Filme ab 40 nm allmählich violett erscheinen. Bei noch höheren Filmdicken beginnt sich das Absorptionsspektrum zu verändern. Bei einem 70 nm PEG-Film treten zwei Maxima auf. Die Bande bei 610 nm lässt sich der um 60 nm rotverschobenen Absorption zuordnen, die auch bei den Filmen mit geringerer Schichtdicke beobachtet wird. Zusätzlich führt eine Bande im nahen UV-Bereich bei 357 nm zu einer Absorption der Blauanteile des Lichtes, was insgesamt zu dem grünen Farbeindruck des Filmes führt. Dieses zusätzliche Signal stammt möglicherweise von einer Multipol-Anregung der AuNPs, die durch das Goldsubstrat hervorgerufen wird.¹⁷³

Die Rotverschiebung der Bande im sichtbaren Bereich kann mit der LSPR-Theorie von AuNPs erklärt werden. Steigt die *Dichte* der Nanopartikel innerhalb des Films in einen Bereich, bei dem der Abstand untereinander weniger als dem fünffachen des Partikelradius entspricht, können die AuNPs *kollektiv* mit dem Licht reagieren, was zu der beobachteten Rotverschiebung der LSPR-Bande führt. Das bedeutet aber gleichzeitig, dass sich die Partikel in dickeren Filmen leichter und vor allem in höheren Dichten einlagern können

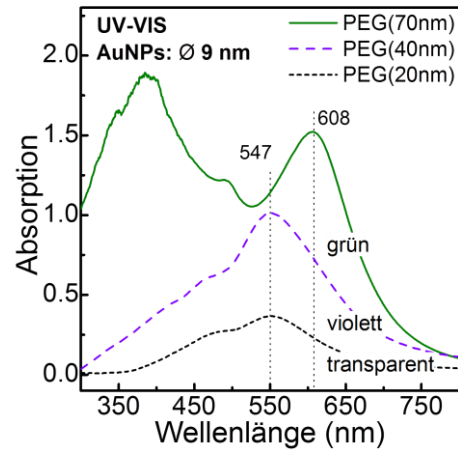


Abb. 159. Abhängigkeit der UV-VIS Spektren von der Schichtdicke der AuNP-PEG-Verbundfilme.

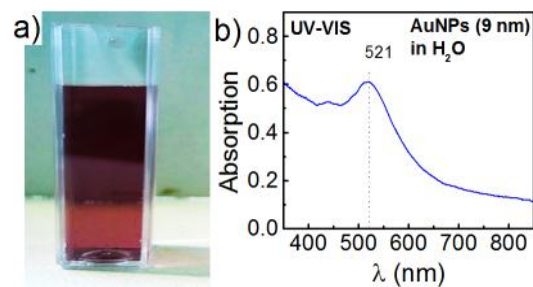


Abb. 160. (a) Rötliche Farbe einer kolloidalen, Citrat-stabilisierten Goldlösung mit einer mittleren Partikelgröße von 9 nm; (b) das UV-VIS Spektrum zeigt das typische Absorptionsmaximum bei 521 nm durch Plasmonenanregung der Valenzelektronen von Gold.

5.5.2 Temperaturabhängige UV-VIS Untersuchungen der AuNP-PEG-Filme

Einen weiteren Hinweis auf die Ursache der starken Adsorption durch die in den PEG-Filmen eingebetteten Gold-Nanopartikel erhält man, wenn das in Abschnitt 5.3.4 diskutierte thermosensitive Quellverhalten auf die AuNP-PEG-Verbundfilme angewendet wird. In diesem Fall führt ein Anschwellen des Films bei homogener Verteilung der AuNPs zu einer sukzessiven Verringerung der Dichte.

Am Beispiel des 70 nm AuNP-PEG-Films ist deutlich erkennbar, wie der bei Raumtemperatur grüne Film mit fallender Temperatur und damit steigender Schichtdicke seine Farbe in rot-violett ändert und schließlich farblos wird (**Abb. 161**). Das Anschwellen bzw. die Temperatur des PEG-Films wird also direkt in eine Änderung der optischen Absorption übersetzt. Der filmdickenabhängige Farbverlauf ist qualitativ genau entgegengesetzt dem in Abb. 158 gezeigten Verlauf der Filmdicke.

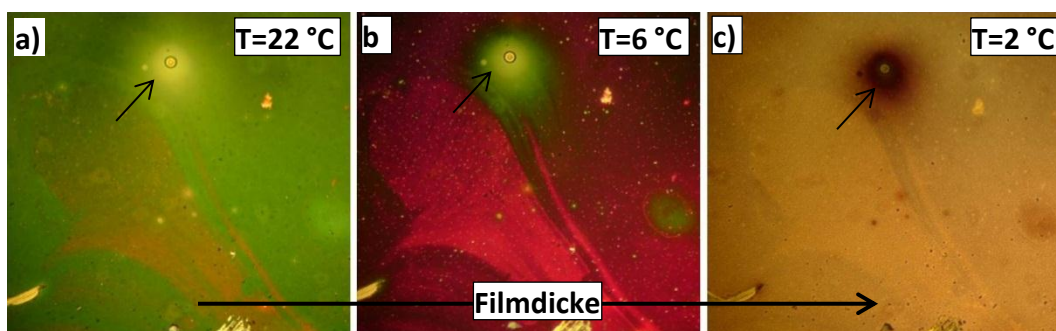


Abb. 161. Temperaturabhängiger Farbeindruck eines PEG(70nm) nach der Adsorption von Gold-Nanopartikeln als Konsequenz des Quellens bei 22°C (a), 6°C (b) und 2°C (c).

Das stützt die These, dass vor allem die *Dichte* der AuNPs für den Farbeindruck verantwortlich ist, zumal sich die Filme wie bereits gezeigt auf das Doppelte ihrer ursprünglichen Filmdicke ausdehnen können.

Das zeigt sich auch bei Bereichen des Filmes, an denen dieser weniger anschwellen kann (schwarzen Pfeile in Abb. 161). Die Farbe dieser Regionen ist bei 22 °C kaum von der des umgebenden Films zu unterscheiden. Bei fallender Temperatur schwillt dieser Bereich weniger an und erscheint weiterhin grün, während die Umgebung sich violett verfärbt hat. Bei 2 °C schließlich ist diese Region violett, während die Umgebung bereits keine Färbung mehr aufweist.

Um einen tiefergehenden Eindruck von den eigentlichen Absorptionsprozessen zu gewinnen, werden von den AuNP-PEG Verbundfilmen temperaturabhängige UV-VIS-Spektren aufgenommen. Als Referenz dienen PEG-Filme ohne eingebettete AuNPs, um den Einfluss von Substrat und PEG-Film zu eliminieren. In **Abb. 162a** ist das UV-VIS-Spektrum eines grünen, 70 nm AuNP-PEGs Films gezeigt. Bei Raumtemperatur ist eine starke Absorptionsbande bei 608 nm zu erkennen, die nach der Abkühlung der Probe auf 2 °C zu einer Wellenlänge von 541 nm verschoben ist. Außerdem nimmt die Intensität der Absorption signifikant ab, was die scheinbare Transparenz des Films im gequollenen Zustand erklärt. Wichtiger aber ist die Betrachtung der Position der Absorptionsmaxima. Im Fall des geschwollenen Film liegt dieses im Bereich *individueller*, lokalisierter Oberflächenplasmonen von Gold-Nanopartikel. Im Gegensatz dazu ist das Maximum bei Raumtemperatur um fast 70 nm rotverschoben, was darauf hindeutet, dass es zu einer kollektiven Anregung der Oberflächenplasmonen der AuNPs kommt. Das bedeutet aber gleichzeitig, dass der Interpartikelabstand unterhalb des fünffachen Partikelradius gefallen ist, also bei unter 25 nm liegt.

Wird das UV-VIS Spektrum von einem anfänglich violett gefärbten, 40 nm AuNP-PEG Film aufgenommen, erkennt man, dass sich nur die Intensität des Absorptionsmaximums verändert hat (**Abb. 162b**). Die Position bleibt weitestgehend konstant. Damit ist die Dichte der AuNPs in dem Film auch für die Intensität der Absorption verantwortlich.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der

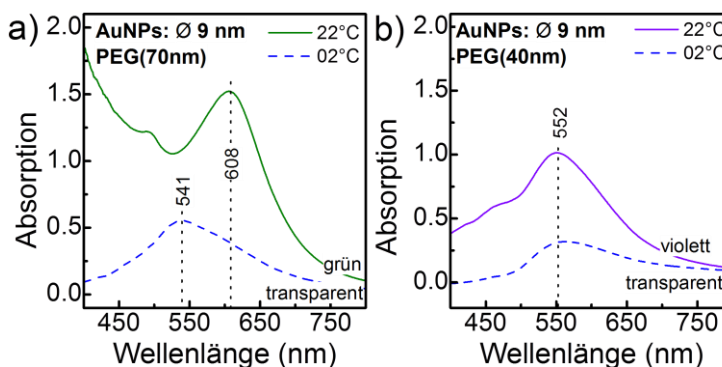


Abb. 162. Temperaturabhängige UV-VIS-Spektren eines (a) 70 nm und (b) 40 nm AuNP-PEG Verbundfilms bei 22 °C (durchgezogene Linien) und 2 °C (gestrichelte Linien).

Verfärbung der AuNP-PEG Verbundfilme nicht um einen Interferenzeffekt, sondern um das Zusammenspiel der Anregung kollektiver und individueller lokalisierter Oberflächenplasmonenresonanzen der eingebetteten AuNPs handelt. Sie sind in den PEG-Filmen gerade so dicht gepackt, dass die Verdopplung der Filmdicke ausreicht, dass System vom Regime kollektiver in das individueller LSPR zu überführen. Das ist vor allem auch in der Hinsicht interessant, dass die Dichte der Nanopartikel in den PEG-Filmen deutlich höher ist als in der wässrigen Lösung, aus der sie in die PEG-Filme inseriert sind. Der Interpartikelabstand in der kolloidalen Goldlösung liegt in der Größenordnung von 300 nm.

5.5.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung der AuNP-PEG-Filme

Zur Untersuchung von Verteilung und Dichte der Nanopartikel im den PEG-Filmen bietet sich das Rasterelektronenmikroskop an. Wegen der hohen Massenzahl und der hohen spezifischen Dichte von Gold, lassen sich AuNPs sehr gut elektronenmikroskopisch untersuchen. In **Abb. 163** sind REM-Aufnahmen von PEG-Filmen verschiedener Dicke nach dem Einlegen in eine Goldlösung mit einer mittleren Partikelgröße von 9 nm gezeigt. Auf einem Goldsubstrat, auf dem sich *kein* PEG-Film befindet, scheiden sich auch keine Nanopartikel ab (**Abb. 163a**). Die Struktur der Oberfläche ist typisch für eines 100 nm Goldfilm auf einem Siliziumsubstrat, der durch Bildung von Kristalliten eine deutlich höhere Rauigkeit als das unterliegende, polierte Siliziumsubstrat aufweist.

In **Abb. 163b** ist das REM-Bild eines 20 nm PEG-Films auf Gold zu sehen, der für 60 Minuten in eine wässrige Lösung Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel ($\approx 10^{13}$ AuNPs pro ml) getaucht war. Deutlich ist die Adsorption von Nanopartikeln zu sehen. Sie sind homogen verteilt, weisen nur geringe Agglomerationen auf und bedecken die Oberfläche zu ca. 15 % (der Bedeckungsgrad wurde anhand des hell-dunkel Verhältnisses bestimmt). Es ist interessant, dass sich die Goldpartikel im Elektronenmikroskop so deutlich von dem Substrat abheben. Auch wenn der Bildkontrast auf die Nanopartikel eingestellt ist, zeigen sie eine deutlich höhere Emission von bildgebenden Elektronen als das ebenfalls aus Gold bestehende Substrat.

Die Verwendung dickerer PEG-Filme bei gleicher Eintauchdauer in die Goldlösung führt zu einer steigenden Dichte der Nanopartikel. So erreichen 50 nm PEG-Filme eine Oberflächenbedeckung von rund 43 % (**Abb. 163c**) und 100 nm dicke Filme schließlich 77 % (**Abb. 163d**). Auch bei dieser hohen Packungsdichte kommt es zu keiner nennenswerten Agglomeration der AuNPs.

Betrachtet man die entsprechenden Proben im AFM, erhält man ein topographisches Abbild der Oberfläche (**Abb. 164**). Das AFM-Bild des reinen Goldsubstrats unterscheidet sich nur unwesentlich von dem entsprechenden REM-

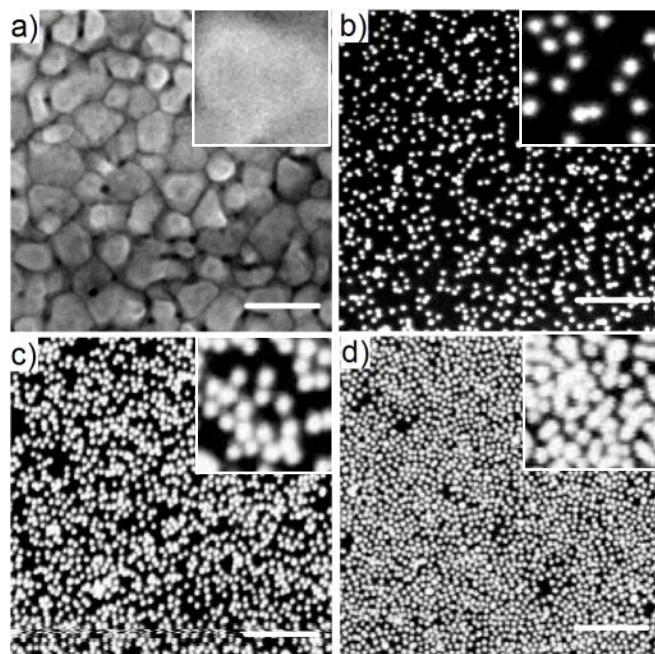


Abb. 163. REM-Bilder von 100 nm Goldsubstraten ohne (a) und mit PEG-Filmen der Dicke 20 nm (b), 50 nm (c) und 100 nm (d) nach 60 minütigem Eintauchen in eine wässrige Lösung mit Gold-Nanopartikeln. Die Balken entsprechen 100 nm Länge (100k-facher Vergrößerung), die kleinen Fenster einer entsprechen 250k-facher Vergrößerung.

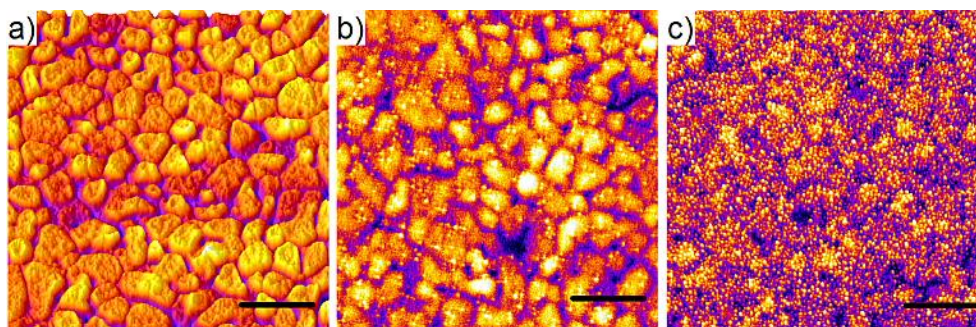


Abb. 164. AFM-Bilder von 100 nm Goldsubstraten ohne (a) und mit PEG-Filmen der Dicke 20 nm (b) und 50 nm (b) nach 60 minütigem Eintauchen in eine wässrige Lösung mit Gold-Nanopartikeln. Die Balken entsprechen einer Länge von 100 nm. Der Höhenkontrast liegt bei 40 nm.

Bild in Abb. 163a. Bei 20 nm PEG-Filmen dagegen ist im AFM die Struktur des Goldsubstrats noch deutlich erkennbar und auch bei 50 nm Filmdicke lässt sich der Golduntergrund noch gut erkennen. Die Unebenheiten der PEG Schicht sind geringer als die des Goldsubstrats. Zudem sind die Nanopartikel im Gegensatz zu den REM-Bildern schwieriger sichtbar zu machen, was dafür spricht, dass sie sich in Hohlräumen innerhalb der PEG-Matrix befinden und nicht nur auf der Oberfläche haften.

Eine weitere Möglichkeit, die Tiefenverteilung der Goldpartikel zu untersuchen, ist wieder die Rasterelektronenmikroskopie. Dieses Mal wird die Probe allerdings im Profil untersucht, das heißt, sie wird in der Mitte durchgebrochen und senkrecht auf dem Probehalter montiert untersucht. Das Übersichtsbild in **Abb. 165a** zeigt in der linken Hälfte den Siliziumsupport als grauen Bereich (B) gefolgt von einem dünnen, hellen Streifen, der von dem Goldsubstrat herrührt. Die rechte schwarze Bildhälfte (A) resultiert vom Bereich des Vakuums. Untersucht man den mittleren, hellen Streifen genauer, erkennt man, dass dieser eine Feinstruktur aufweist (**Abb. 165b**, Falschfarbenbild zur Kontrastverbesserung). Er besteht seinerseits aus zwei hellen, ungefähr 100 nm breiten Streifen, die durch einen schmalen dunkleren Bereich getrennt sind. Der Linke der beiden Streifen (C) ist dem auf dem Silizium aufgedampften Goldsubstrat zuzuordnen, während der rechte, etwas dunklere Streifen (D) von den im dem PEG-Film eingelagerten Gold-Nanopartikeln stammt, die den PEG-Film überhaupt erst für das REM sichtbar machen. Der Unterschied beider Schichten wird besonders bei fortlaufendem Abtasten des Elektronenstrahls deutlich. Die PEG-Schicht zeigt mit zunehmender Beobachtungszeit und damit Bestrahlungsdosis signifikante Degenerationserscheinungen (**Abb. 165c**). Schon nach 4 Scans (Bild Mitte, links) über die gleiche Stelle, beginnt die PEG-Schicht aufzuquellen. Nach sechs Scans (Mitte, rechts) hebt sich die Schicht von dem Goldsubstrat ab und hat sich nach 9 Scans nahezu aufgelöst. Ursache ist zu einem Materialabtragung durch den Elektronenstrahl (sputtern), zum andern heizen sich vom dem Elektronenstrahl getroffene Bereiche auf und die schlechte Wärmeleitfähigkeit der PEG-Schicht führt zu einem Verdampfen.

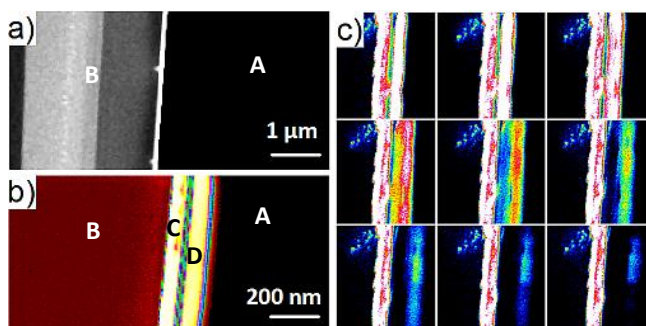


Abb. 165. REM Profilbilder eines 102 nm PEG-Films mit AuNPs D auf einem 100 nm Goldsubstrat C; (a) das Übersichtsbild zeigt diesen als hellen Streifen neben dem Siliziumsupport B in der linken Bildhälfte; (b) in einem vergrößerten Ausschnitt erkennt man eine Feinstruktur; (c) strahlungsbedingte Schäden führen zu einer Zerstörung des mit AuNPs gesättigten Films (jedes Bild entspricht einem Scan des Elektronenstrahls).

5.5.4 Adsorption von AuNPs in lithographisch strukturierte PEG-Filme I

In Abschnitt 5.4.7 wurde bereits gezeigt, dass es möglich ist, das Eindringen eines in Wasser gelösten Farbstoffs in den PEG-Film zu unterdrücken, indem der Film mit Elektronen bestrahlt wird. So konnten bei Verwendung eines Elektronenstrahlschreibers Strukturen erzeugt werden, in die kein in Wasser gelöster Farbstoff mehr gelangte. Es sollte daher möglich sein, mit der gleichen Methode auch kolloidal in Wasser gelöste Stoffe wie Gold Nanopartikel oder Quantenpunkte (Quantendots) selektiv von der Adsorption in Bereichen auszuschließen, die von einem Elektronenstrahl „geschützt“ wurden. Experimentell entspricht dieses Verfahren der schon mehrfach besprochenen lithographischen Strukturierung in Kombination mit einem nachfolgenden Eintauchen in eine wässrige Lösung der Nanopartikel (**Abb. 166**).

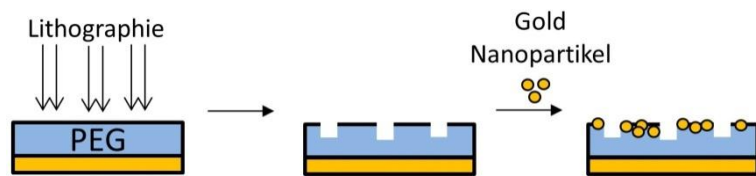


Abb. 166. Schema der strukturierten Adsorption von Goldnanopartikeln in einen PEG-Film mittels direkter Elektronenstrahlolithographie zu Herstellung *negativer* Adsorptionsmuster.

Die PEG-Filme werden anschließend mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. In den Übersichtsbildern ist klar zu erkennen, dass sich die Nanopartikel ($\varnothing=9$ nm) fast ausschließlich an den nicht bestrahlten Bereichen des PEG-Film anlagern. Diese sind im REM als helle Bereiche identifizierbar, während die bestrahlten Areale frei von den AuNPs bleiben und demnach dunkel erscheinen (**Abb. 167a1** und **b1**). Wird der Ausschnitt vergrößert, ist es sogar möglich, die einzelnen Goldpartikel in erstaunlicher Bildqualität aufzulösen (**Abb. 167b2**). Um diese optisch noch deutlicher sichtbar zu machen, sind die Detailaufnahmen teilweise mit einem inversen Bildkontrast gezeigt. Damit sind die Goldpartikel als dunkle Punkte auf einem hellen PEG-Hintergrund zu erken-

nen. Die PEG-Filme werden anschließend mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. In den Übersichtsbildern ist klar zu erkennen, dass sich die Nanopartikel ($\varnothing=9$ nm) fast ausschließlich an den nicht bestrahlten Bereichen des PEG-Film anlagern. Diese sind im REM als helle Bereiche identifizierbar, während die bestrahlten Areale frei von den AuNPs bleiben und demnach dunkel erscheinen (**Abb. 167a1** und **b1**). Wird der Ausschnitt vergrößert, ist es sogar möglich, die einzelnen Goldpartikel in erstaunlicher Bildqualität aufzulösen (**Abb. 167b2**). Um diese optisch noch deutlicher sichtbar zu machen, sind die Detailaufnahmen teilweise mit einem inversen Bildkontrast gezeigt. Damit sind die Goldpartikel als dunkle Punkte auf einem hellen PEG-Hintergrund zu erken-

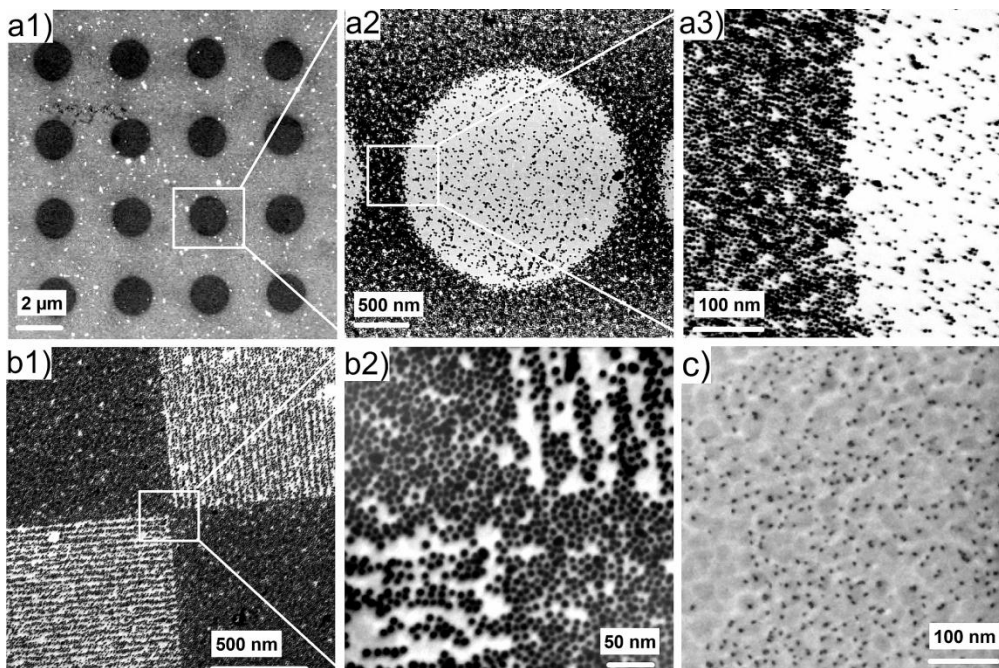


Abb. 167. Rasterelektronenmikroskopie Bilder nach der Adsorption von Gold-Nanopartikeln (9 nm) auf mit Dosen von 10 mC/cm^2 elektronenstrahlolithographisch strukturierten PEG-Filmen der Dicke 50 nm: (a1-a3) kreisförmige Strukturen mit $2 \mu\text{m}$ Durchmesser bei verschiedenen Vergrößerungen; (b1+b2) quadratisches Schachbrettmuster mit $2 \mu\text{m}$ Kantenlänge bei zwei Vergrößerungen, (b2) mit *inversem* Farbkontrast; (c) Alternative zu AuNPs: CdSe Quantendots auf einem unstrukturierten PEG-Film.

nen. Es muss noch einmal betont werden, dass die Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) aufgenommen wurden und die Bildqualität fast an die eines einfachen Transmissionselektronenmikroskops (TEM) heranreicht. Es sind keine Verzerrungen durch Aufladungseffekte des Elektronenstrahls erkennbar, was erstaunlich ist, da die AuNPs sich in einer elektrisch nicht leitenden organischen Matrix befinden.

Die Qualität des lithographischen Adsorptionskontrasts kann in Form der Partikeldichte definiert werden. Für die in Abb. 167a gezeigte Struktur beträgt an den unbestrahlten Bereichen die Partikeldichte $\sim 70\%$, während nach einer Bestrahlung mit 10 mC/cm^2 die Dichte nur $\sim 6\%$ beträgt.

Zum Teil erhält man wie in Abb. 167b ein zunächst unerwartetes Adsorptionsmuster. Die bestrahlten Strukturen weisen ein Streifenmuster aus Gold-Nanopartikeln auf. Erklärung findet das Muster unter der Annahme, dass der Elektronenstrahl des Schreibers diese Strukturen verursacht. Das Muster wird durch zeilenweises abfahren der Oberfläche erzeugt. Kommt es zwischen zwei Zeilen zu einem Versatz, besteht das Muster aus abwechselnd bestrahlten und nicht bestrahlten Bereichen. Deren Breite kann anhand der Größe der Nanopartikel auf ca. 10 nm abgeschätzt werden. Interessanter ist jedoch wie hoch die laterale Auflösung ist. Die Adsorption der Nanopartikel folgt genau dem Elektronenstrahl.

5.5.5 Adsorption von AuNPs in lithographisch strukturierte PEG-Filme II

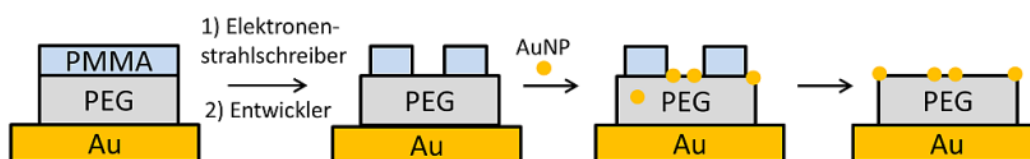


Abb. 168. Schema der Strukturierung von PEG-Filmen mittels Elektronenstrahlresist-Technik zur Herstellung positiver Adsorptionsmuster.

Das Muster der im letzten Kapitel besprochenen strukturierten Adsorption entsprach dem eines negativen Abbilds der von dem Elektronenstrahl belichteten Bereiche. Interessanter wäre es, wenn man ein *positives* Abbild der Bestrahlungsmuster in der Adsorption erhalten würde. Dann hätte man eine proteinabweisende PEG-Matrix, in die an definierten Stellen kolloidal oder physikalisch gelöste Substanzen deponiert werden könnten. Das würde die Möglichkeit eröffnen, Gold-Nanopartikel, die beispielsweise mit einem Antikörper versehen sind, in lokal begrenzten Strukturen auf dem biokompatiblen PEG-Film einzulagern.

Um dieses zu erreichen, wird der PEG-Film mit einem Elektronenstrahlresist (PMMA) rotationsbeschichtet und lithographisch strukturiert (**Abb. 168**). Die Kombination aus Resist und Lithographie ist sehr flexibel und kann leicht auch auf einen Photoresist in Zusammenhang mit der Bestrahlung durch UV- oder sichtbares Licht erweitert werden.

Zur elektronenstrahlolithographischen Strukturierung wird das PMMA per Rotationsbeschichtung auf den PEG-Film gegeben und die gewünschte Struktur in den Resist geschrieben. Laut Spezifikation beträgt die Dicke des verwendeten PMMA-Resists bei 4000 U/min ungefähr 90 nm . Um eine ausreichende Eindringtiefe des Elektronenstrahls zu gewährleisten, wird die Energie des Elektronenstrahlenschreibers auf 20 keV eingestellt. Bei der Wahl der Dosis muss allerdings darauf geachtet werden, dass der Elektronenstrahl nicht mit dem darunterliegenden PEG-Film in Kontakt kommt, da er sonst beschädigt wird und seine Quelleigenschaften einbüßen kann. Auf der anderen Seite muss die Dosis ausreichend sein, damit sich der PMMA-Film bei der Entwicklung an den bestrahl-

ten Stellen vollständig auflöst. Gute Resultate werden mit einer Dosis von 120 - 160 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ erhalten. Das AFM Profil nach dem Entwicklungsschritt zeigt eine nahezu einheitliche Tiefe des Resist von 150 nm (**Abb. 169**). Das ist zwar mehr als die laut Spezifikation angebenen 90 nm für 4000 U/min, allerdings sind diese 90 nm nur ein Richtwert. Mit der Zeit steigt die Konzentration des PMMAs, welches in flüchtigem Chlorbenzol gelöst ist, durch Verdunsten des Lösungsmittels an. Dennoch zeigten die AFM-Bilder mit den entsprechenden Höhenprofilen, dass sich der PMMA-Resist an den mit 160 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (bei 20 keV) bestrahlten Stellen nach dem Eintauchen in eine Entwicklerflüssigkeit (3:1 Mischung von Isopropanol, IPA und Methyloisobuthylketon, MIBK) höchstwahrscheinlich vollständig entfernen lässt.

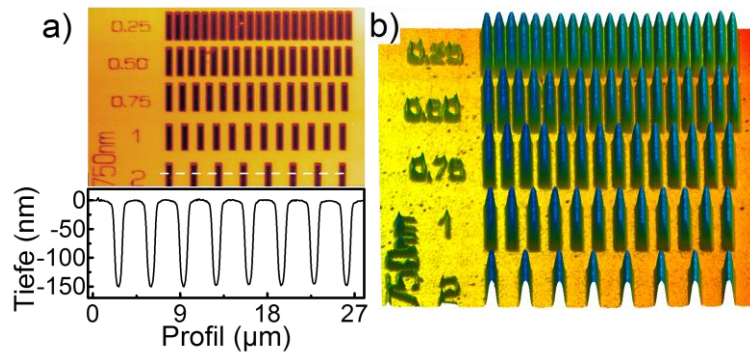


Abb. 169. (a) AFM Bild mit Tiefenprofil sowie (b) höheninverses 3D-Profilbild des PMMA Resists auf einem PEG-Film nach der Strukturierung mit 160 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ bei 20 keV und nasschemischer Entwicklung des Resists mit einer 3:1 Mischung von IPA und MIBK. Der vertikale Zahlenwert gibt die Breite der Rechtecke an, die horizontalen Werte den Abstand der Rechtecke in Mikrometern).

Damit ist der wichtigste Schritt zu Erzeugung von Positivmustern mit AuNPs gegeben. Sollten die Partikel entsprechend dicht gepackt sein, wäre das ein wichtiger Hinweis, dass die unterliegende PEG-Schicht von dem Elektronenstrahl nicht beeinflusst wird. In **Abb. 170** wurde ein 70 nm PEG-Film wie beschrieben mit einem PMMA Elektronenstrahlresist versehen und ein Muster von Quadraten geschrieben. Nach der Entwicklung wurde der Film für eine Stunde in eine Lösung citratstabilisierter AuNPs gegeben und elektronenmikroskopisch untersucht (**Abb. 170**). Deutlich sind die Bereiche als helle Areale zu erkennen, in denen sich die Goldnanopartikel befinden. Bei starker Vergrößerung werden die einzelnen Partikel wieder deutlich sichtbar (inverse Helligkeit). Sie sind ähnlich dicht gepackt wie in den unbestrahlten Bereichen in Abb. 167. Außerdem ist der Kontrast zwischen bestrahlten und unbestrahlten Bereichen noch besser, auf den von PMMA bedeckten Bereichen sind nahezu keine AuNPs adsorbiert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich zumindest Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel in hoher Dichte und mit großem Kontrast als negatives und positives Abbild eines Elektronenstrahls strukturiert in die PEG-Filme einbetten lassen.

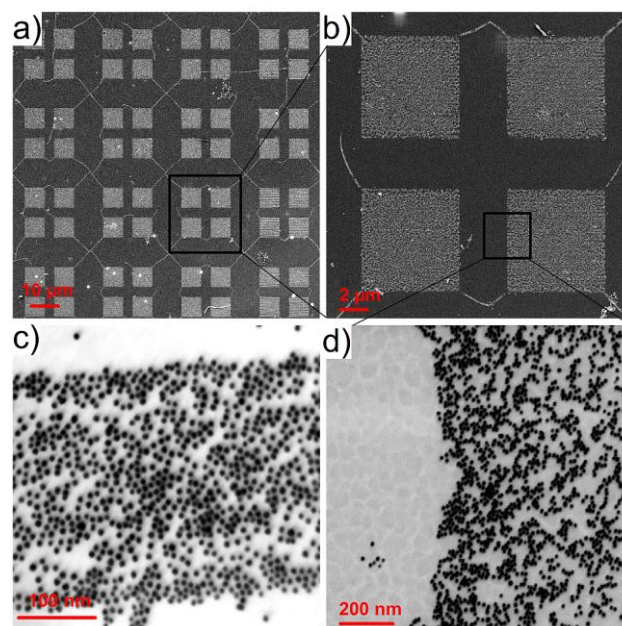


Abb. 170. REM-Bilder nach der Adsorption von Gold-Nanopartikeln als positives Muster der lithographischen Strukturierung (Bilder (c) und (d) sind mit *inversem* Bildkontrast dargestellt).

5.6 PEG-Hydrogel Nanomembranen

5.6.1 Präparation

Eine interessante Anwendung hochgradig quervernetzter, polymerer Filme ist deren Fähigkeit, als freistehende Membranen auch ohne Substrat existieren zu können. Dieses wurde bereits am Beispiel der PEG10k-iNBPT-Filme demonstriert und damit ein generelles Prinzip zur Herstellung dünner Membranen aus quervernetzten Vorläuferfilmen aufge-

zeigt. Unlöslichkeit und Quellverhalten der in den letzten Kapiteln besprochenen PEG-Filme sind deutliche Hinweise, dass diese ebenfalls hochgradig quervernetzt sind und so die Voraussetzung zur Membranherstellung erfüllen. Bei der verwendeten Präparationsmethode muss sich nicht nur die Filmdicke in der Dicke der Membranen widerspiegeln, sondern es sollten sich auch variable Membrandicken von wenigen bis zu einigen hundert Nanometern realisieren lassen.

Die Herstellung der Membranen auf Grundlage quervernetzter PEG-Filme unterscheidet sich dabei nur unwesentlich von der, die bei der Präparation der Nanomembranen aus quervernetzten, PEGylierten SAMs verwendet wurde. Der PEG-Film befindet sich zwischen einer temporären Schicht auf der einen Seite (dem „sacrificial layer“) und einer polymeren Schutzschicht auf der anderen Seite, während sich das ganze System auf einem mechanisch stabilen Träger (Support) befindet (**Abb. 171**). Der polymere Schutzfilm besteht aus einer ca. 50 nm dicken PMMA-Schicht und als temporäre Schicht wird ein 100 nm Goldfilm auf einem Siliziumträger verwendet.

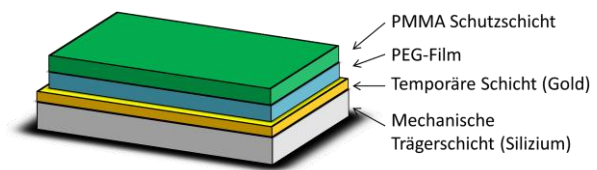


Abb. 171. Schematischer Aufbau zur Präparation freistehender Membranen aus dünnen Filmen.

5.6.2 Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung

Die PEG-Membranen können rasterkraftmikroskopisch (AFM) bezüglich ihrer Dicke charakterisiert werden, indem die PEG-Filme von ihrem Substrat angehoben und auf ein Waferstück aus poliertem Silizium transferiert werden. Anschließend lassen sich die Membrandicken mit dem AFM bestimmen, indem die Höhe der Membrankante vermessen wird (**Abb. 172**). Die Resultate werden dann mit den ellipsometrischen Werten des entsprechenden Vorläuferfilms verglichen.

Die AFM-Bilder zusammen mit den Höhenprofilen sind in **Abb. 173** gezeigt. Zunächst erkennt man, dass die Membranen selber kaum eigene Strukturen aufweisen, was bedeutet, dass sie im untersuchten Größenbereich topographisch weitgehend homogen sind. Zudem zeigen sie eine deutlich ausgeprägte Kante von nur wenigen Mikrometern Ausdehnung. Das ist wichtig, da nur so eine genaue Bestimmung der Membrandicke mit dem AFM gewährleistet ist. Derart scharf definierte Schnittkanten lassen sich erreichen, indem die mit PMMA geschützten PEG-Filme zusammen mit dem Siliziumwafer zerteilt werden. Die (100)-Ausrichtung der Siliziumoberfläche führt beim Brechen des Wafers zu sehr geraden Bruchstellen und gleichzeitig zu einem gradlinigen und wenig ausgefranzten Zerreißen der anhaftenden Gold-PEG-PMMA Dreifachschicht.

Bei Betrachtung der AFM-Aufnahmen der Membrankanten in **Abb. 173** fällt auf, dass ihre Höhen erwartungsgemäß mit steigender Konzentration der verwendeten PEG-Lösung zunehmen. Die

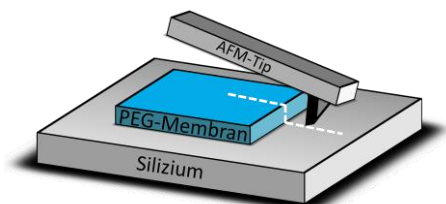


Abb. 172. Schema zur Bestimmung der Dicke einer PEG-Membran (blau) mittels Rasterkraftmikroskop (AFM).

Membrandicken lassen sich durch Anpassen der Rohdaten der AFM-Höhenprofile (rote, durchgehende Linien) entlang der weißen Linie in den AFM-Bildern an eine Stufenfunktion (schwarze, gestrichelte Linien) bestimmen.

Werden diese Membrandicken gegen die Konzentration der jeweiligen PEG-Lösung des Vorläuferfilms aufgetragen, erhält man einen annähernd linearen Zusammenhang zwischen den logarithmierten Größen der Konzentration und der Film- bzw. Membrandicke (**Abb. 174**). Die Punkte lassen sich an eine lineare Funktion vom Typ

$$(Gl. 37) \quad \ln(d) = \ln(a) + b \cdot \ln(c)$$

anpassen. d ist die Film- bzw. Membrandicke in Nanometern, c ist die Konzentration in mg/ml, während a und b Parameter der zugrundeliegenden Potenzfunktion

$$(Gl. 38) \quad d = a \cdot c^b$$

sind. Analog werden auch die ellipsometrisch ermittelten PEG-Filmdicken gegen die Konzentration aufgetragen (Abb. 174, rote Quadrate) und gemäß Gleichung 37 angepasst. Die beiden Koeffizienten a und b sind für die Filme und die Membranen in Tabelle 5 zusammengefasst. Der Parameter a hat die Einheit $\text{nm}/(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})$, während b keine Einheit besitzt.

Es kann festgehalten werden, dass sich im untersuchten Konzentrationsintervall die rasterkraftmikroskopische Dicke der Membranen nicht wesentlich von den ellipsometrisch gemessenen Werten der entsprechenden Vorläuferfilme unterscheidet. Beide sollten im Idealfall identisch sein. Dennoch beruhen die zwei Messverfahren auf vollkommen verschiedenen Prinzipien und die gute Analogie der Resultate bestätigt die Zuverlässigkeit der beiden verwendeten Charakterisierungsmethoden.

Werden die beiden Parameter genauer analysiert, fällt auf, dass b (die Steigung der Geraden in Abb. 174) sowohl bei den PEG-Filmen als auch bei den Membranen ziemlich genau den Wert von eins aufweist. Das bedeutet, dass die Dicke der PEG-Filme und der Membranen im verwendeten Wertebereich linear mit der Konzentration ansteigt. Allerdings liegen die absoluten Werte bei den

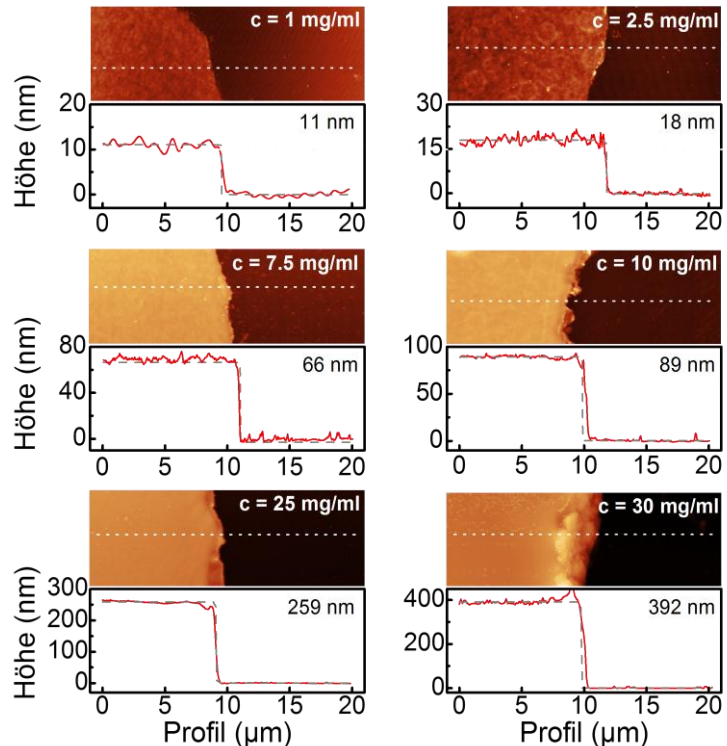


Abb. 173. AFM Höhenprofilmessungen von PEG-Membranen auf einer Siliziumoberfläche zur Bestimmung der Dicke der Membranen. Die Angabe der Konzentrationen bezieht sich auf die PEG-Lösung bei zugrundeliegender PEG-Film-Herstellung.

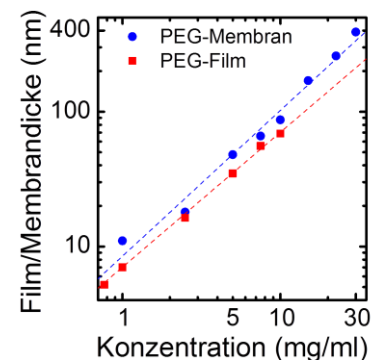


Abb. 174. Gegenüberstellung der rasterkraftmikroskopisch bestimmten PEG-Membrandicken mit den ellipsometrisch erhaltenen PEG-Filmdicken.

	$\ln(a)$	b
PEG-Filme	7.1 (±0.2)	1.00 (±0.05)
PEG-Membranen	10.2 (±1.2)	1.08 (±0.13)

Tabelle 5. Fit-Parameter der Messwerte aus Abb. 174 für die Gleichungen 37 und 38.

Membranen um etwa 20-30 % über denen der PEG-Filme, was sich in einem Unterschied des Parameters b bzw. y -Achsenabschnitt der Geraden in Abb. 174 bemerkbar macht. Der Offset kann entweder messtechnische Ursachen haben (Ellipsometrie vs. Rasterkraftmikroskop) oder einen realen Hintergrund haben, indem die Membranen durch ein Anschwellen während des Separationsprozesses oder danach um 20-30 % dicker sind als ihre Vorläuferfilme.

5.6.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Im nächsten Schritt werden die PEG-Membranen auf ihre Eignung als Trägerfilm in elektronenmikroskopischen Experimenten untersucht. Um zusätzlich zu überprüfen, ob die Membranen ebenfalls das Hydrogel-typische Quellverhalten aufweisen, werden sie über Nacht auf der Oberfläche einer wässrigen Lösung mit Gold-Nanopartikel platziert und erst dann auf eine Lochmaske transferiert. Entsprechend wird eine 50 nm AuNP-PEG-Verbundmembran auf ein TEM-Grid mit 10 μm großen Löchern gespannt und im

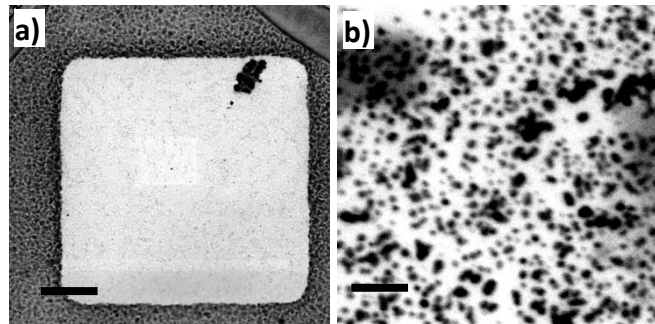


Abb. 175. Rasterelektronenmikroskopie Bilder einer 50 nm PEG-Membran, die über ein TEM-Grid mit 10 μm Lochgröße gespannt ist (dargestellt mit *inversem* Helligkeitskontrast) und in der AuNP ($\bar{\sigma} = 9 \text{ nm}$) eingebettet sind. (a) Maßstab 1 μm PE = 3 keV; (b) Maßstab 20 nm, PE = 20 keV.

Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Das Übersichtsbild bei 3000-facher Vergrößerung macht deutlich, dass die Membran homogen über die Öffnung des Gittes gespannt werden kann (**Abb. 175a**). Um einen besseren visuellen Eindruck der Bilder zu erhalten, sind sie mit einem inversen Helligkeitskontrast dargestellt, d.h. Elemente mit hoher Massenzahl wie AuNPs erscheinen dunkel, während organische Materialien (Elemente niedrige Massenzahl) hell sind.

Das Detailbild in **Abb. 175b** zeigt die Membran bei 250 000-facher Vergrößerung. Um den Oberflächenkontrast und damit den Einfluss Membran auf die Bildinformation zu minimieren, ist die Abbildung bei einer Energie der Primärelektronen (PE) des REMs von 20 keV aufgenommen. Man erkennt deutlich die in der Membran eingebetteten Gold-Nanopartikel mit ihrem mittleren Durchmesser von 9 nm. Die Abbildung demonstriert zum einen, dass auch die Membranen in der Lage sind, Nanopartikel in ihrer Matrix zu einzubinden. Nicht weniger wichtig ist aber die Tatsache, dass es überhaupt möglich ist, dieses Bild in so hoher Vergrößerung mit einem Rasterelektronenmikroskop aufnehmen zu können, ohne dass die Membran durch den Primärstrahl zerstört wird. REM-Untersuchungen an PEG-Membranen, in denen keine AuNPs eingelagert sind, weisen eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber REM-Untersuchungen auf. Es scheint, dass die Einbettung der AuNPs zu einer Stabilisierung der PEG-Membranen bei elektronenmikroskopischen Experimenten führt, indem die von dem Primärstrahl des Mikroskops in der Membran deponierte Ladung und Wärmeenergie über die Metallpartikel abgeführt werden kann.

5.6.4 Makromechanische Eigenschaften der PEG-Membranen

Der charakteristische Parameter zur Beschreibung makroskopischer Eigenschaften freistehender Membranen ist das Elastizitätsmodul (E-Modul). Aufgrund der hohen Stabilität der Membranen kann das E-Modul mit Hilfe der Bulge-Test Methode ermittelt werden, die sich durch ihren relativ einfachen experimentellen Aufbau auszeichnet. Zudem erhält man gleichzeitig einen zweiten Parameter freistehender Membranen, die Eigenspannung σ_0 . Sie beschreibt eine intrinsische Spannung, die auch vorhanden ist, wenn auf die Membran keine externe Kraft wirkt. Grundlage für den Bulge-Test ist die in Abschnitt 3.8 hergeleitete Gleichung 25:

$$(Gl. 25) \quad p/h = 4 \cdot \frac{t}{a^2} \sigma_0 + \frac{8}{3} \cdot \frac{t}{a^4} \cdot \frac{1}{1-\nu} E \cdot h^2,$$

bzw. in Form eines Polynoms dritten Grades von h dargestellt:

$$(Gl. 25') \quad p = 4 \cdot \frac{t}{a^2} \sigma_0 \cdot h + \frac{8}{3} \cdot \frac{t}{a^4} \cdot \frac{1}{1-\nu} E \cdot h^3.$$

Sie beschreibt den Zusammenhang zwischen den Parametern der Membran (E und σ_0), den geometrischen Ausdehnungen (a , t) und ihrer Reaktion (h) auf eine äußere Kraft (p) (**Abb. 176a**). Voraussetzung für den Bulge-Test ist, dass die PEG-Membranen eine hohe mechanische Stabilität aufweisen. Im Zusammenhang mit der Bestimmung der Membranauslenkung h durch den Okularmaßstab eines Lichtmikroskops, muss h im Bereich von mindestens $100 \mu\text{m}$ liegen, um eine ausreichende Genauigkeit der Auslenkung zu gewährleisten. Da die Gleichung 25 streng genommen nur für den Fall gültig ist, dass die Auslenkung klein im Verhältnis zum Durchmesser der Lochgröße ist, also dass $h \ll a$ ist, sollten die Membranen freistehend über einer Lochmaske von mindestens $200 \mu\text{m}$ Ausdehnung existieren können ($2 \cdot a > 100 \mu\text{m}$). Eine derartige Anforderung ist für *Nano*-membranen mit einer Dicke von $t \approx 50 \text{ nm}$ nicht trivial. Zumal die Membranen bei Auslenkungen im Bereich von $h \approx 100 \mu\text{m}$ eigentlich im Zentimeter-Bereich freistehend sein müssten.

Wird die Membranen wie dieser Arbeit auf eine Lochmaske mit einem Durchmesser von nur $300 \mu\text{m}$ ($a = 150 \mu\text{m}$) gespannt, muss ihre maximale Auslenkung deutlich kleiner sein ($h \ll 150 \mu\text{m}$), was dann aber zu einer ungenauen Bestimmung der Auslenkung durch den Okularmaßstab führt. Oder man dehnt die Auslenkung auf einen Bereich $h \approx a$ aus, bei der Gleichung 25 zunehmend ihre Gültigkeit verliert.

In **Abb. 176b** und **c** sind die Bilder einer 50 nm dünnen PEG-Membran gezeigt, die freistehend auf einer $300 \mu\text{m}$ Lochmaske mit runder Öffnung bzw. mit quadratischen Öffnungen gespannt ist. Die hohe mechanische Stabilität zeigt sich schon qualitativ dahingehend, dass sie über einer $300 \mu\text{m}$

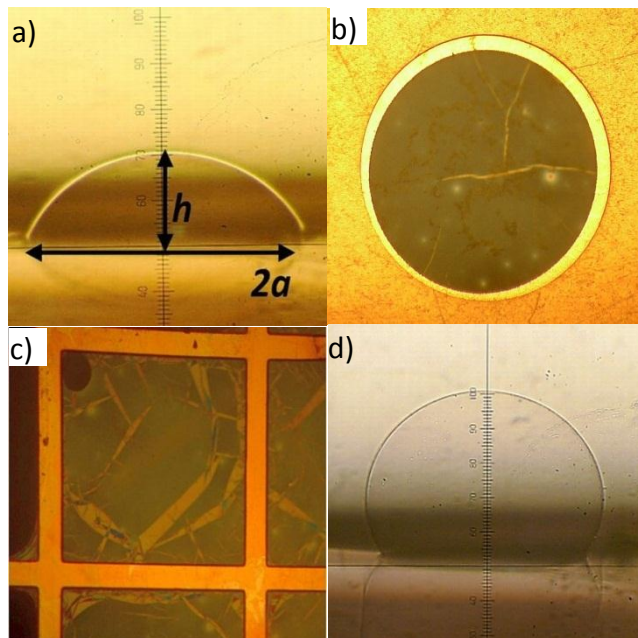


Abb. 176. Lichtmikroskopische Bilder einer 50 nm PEG-Membran. (a) Definition der geometrischen Parameter von Auslenkung und Durchmesser; (b) die Membran freistehend über einer $300 \mu\text{m}$ Lochblende und (c) einem TEM-Grid mit 75 Maschen/Zoll, was einer Kantenlänge von $\sim 300 \mu\text{m}$ entspricht; (d) die Membran kurz vor dem Zerreißen bei $h > 2a$ (ultimate tensile stress).

Lochblende auf mehr als $h=300\ \mu\text{m}$ ausgedehnt werden kann, was mit einer Verdoppelung der Fläche der Membran einhergeht (**Abb. 176d**). Damit erfüllen die Membranen die Voraussetzung, um als Templat für die Bulge-Test Methode verwendet werden zu können.

Die Durchführung eines Bulge-Tests wird in der Bilderserie einer 50 nm PEG-Membran, die über eine $300\ \mu\text{m}$ Lochblende ($a=150\ \mu\text{m}$) gespannt ist, in

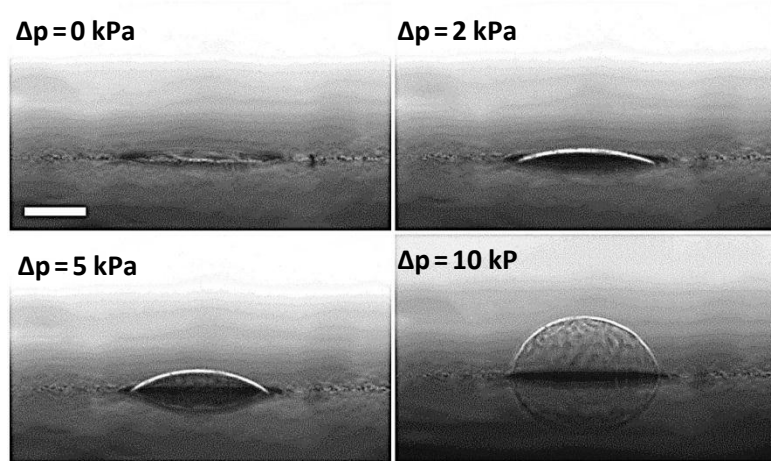


Abb. 177. Bilderserie der druckabhängigen Auslenkung einer PEG-Membran, die über eine Lochmaske gespannt ist (Maßstab= $100\ \mu\text{m}$).

Abb. 177 demonstriert. Klar ist zu erkennen, wie sich die Membran bei steigender Druckdifferenz zu wölben beginnt. Die Auftragung der Messwerte der Auslenkung bei gegebenem Druck zeigt **Abb. 178a**. Werden direkt als Funktion der Auslenkung von der Druckdifferenz aufgetragen (h gegen Δp), hat die Spannungs-Dehnungs-Kurve gemäß Gleichung 25' die Form eines Polynoms dritten Grades. In **Abb. 178a** ist diese Auftragung für den ersten und den neunten Expansionszyklus abgebildet. Es scheint, dass die Membranen durch die periodischen Expansionen und Kontraktionen weicher werden. So benötigt beispielsweise eine Auslenkung von $150\ \mu\text{m}$ im ersten Expansionszyklus eine Druckdifferenz von $4.5\ \text{kPa}$, nach dem 9. Zyklus dagegen nur noch rund $3\ \text{kPa}$. Zur Bestimmung der mechanischen Parameter der Membran wird der neunte Zyklus verwendet und die Messpunkte zunächst an Gleichung 25' für Auslenkungen 0 bis $150\ \mu\text{m}$ angepasst (die rote Kurve in **Abb. 178a**). Unter der Annahme einer Membrandicke von $50\ \text{nm}$ und einer Poissonzahl ν von 0.25 ergibt sich für die Eigenspannung σ_0 ein Wert von $2\ \text{MPa}$ und für das E-Modul ein Wert von knapp unter $100\ \text{MPa}$. Diese Resultate sind im Vergleich zu anderen polymeren Membranen deutlich zu niedrig. Beispielsweise wurden für das Elastizitätsmodul von Membranen quervernetzter aromatischer SAMs Werte von $10\ \text{GPa}$ bei einer Eigenspannung von $40\ \text{MPa}$ gefunden und WATANABE et al. erhielten für die von ihnen hergestellten organischen Nanomembranen Werte um die $1\ \text{GPa}$ für das E-Modul.⁵⁷⁻⁵⁸ In dieser Größenordnung sollten auch die Werte für die PEG-Membranen liegen.

Eine Erklärung für die großen Abweichungen zwischen den gemessenen und erwarteten Werten für das E-Modul findet sich in der Herleitung von Gleichung 25 (Abschnitt 3.8). Sie gilt wie schon angemerkt nur unter der Annahme kleiner Auslenkungen bezüglich des Radius der Lochmaske. Bei der hier durchgeführten Messung ist diese Bedingung nicht mehr gegeben,

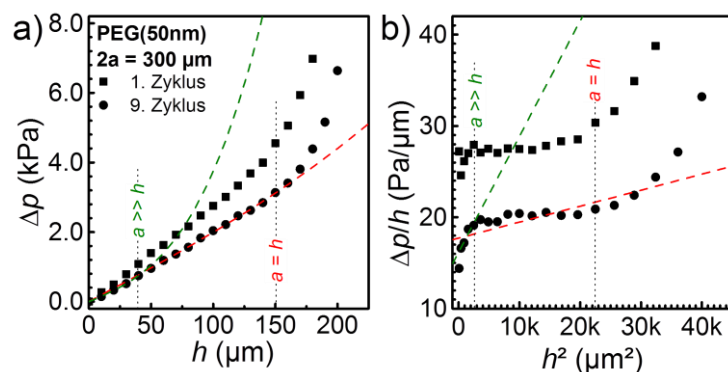


Abb. 178. Experimentelle Spannungs-Dehnungs-Kurve einer $50\ \text{nm}$ PEG-Membran über einer $300\ \mu\text{m}$ Lochblende: (a) Eine Auftragung der Auslenkung gegen den Druck ergibt einen kubischen Zusammenhang; (b) die Auftragung des Quadrats der Auslenkung gegen den Druck pro Auslenkung führt zu einem linearen Zusammenhang.

denn h liegt mit bis zu $150\ \mu\text{m}$ in derselben Größenordnung wie a . Deshalb werden in einem zweiten Versuch zur Anpassung an Gleichung 25' nur die Messwerte bis zu einer Auslenkung von $h=30\ \mu\text{m}$ herangezogen (grüne Kurve in Abb. 178), was zu einem E-Modul von $0.8\ \text{GPa}$ bei einer Eigenspannung von $3\ \text{MPa}$ führt. Diese Werte stimmen bei Weitem besser mit den erwarteten Werten überein. Dennoch muss angemerkt werden, dass es bei kleinen Auslenkungen zu größeren Ungenauigkeit bei der Messung von h mit dem Okularmaßstab kommt. Offensichtlich wirkt sich dieser Fehler aber nicht so entscheidend aus wie Abweichung beim Verlassen des Gültigkeitsbereichs von Gleichung 25 bzw. 25'.

Alternativ können die Messwerte der Druck-Auslenkungs-Kurve auch wie in **Abb. 178b** gezeigt gemäß Gleichung 25 aufgetragen werden. Zu erwarten wäre in diesem Fall ein linearer Verlauf, wenn $\Delta p/h$ gegen h^2 aufgetragen wird. Allerdings weichen die Messwerte auch in dieser Darstellung deutlich davon ab, was noch einmal bestätigt, dass der gewählte experimentelle Aufbau nur im Bereich kleiner Auslenkungen mit der Theorie hinter Gleichung 25 übereinstimmt. Was bei dieser Form der Auftragung deutlich wird, ist die Veränderung der Eigenspannung mit fortschreitenden Messzyklen. σ_0 ergibt sich direkt aus der Interpolation der Messwerte mit dem Schnittpunkt der y-Achse. Während dieser beim ersten Zyklus bei $28\ \text{Pa}/\mu\text{m}$ (respektive $\sigma_0=3.6\ \text{MPa}$) liegt, beträgt er nach dem neunten Zyklus nur noch $15\ \text{Pa}/\mu\text{m}$ ($\sigma_0=1.7\ \text{MPa}$).

Es kann festgehalten werden, dass die PEG-Membranen sich als außerordentlich stabil erweisen, um freistehend über Flächen von mehreren einhundert Mikrometern existieren zu können. Damit können ihre makromechanischen Eigenschaften prinzipiell mit der Bulge-Test Methode bestimmt werden. Allerdings muss dafür experimentell gegeben sein, dass die Auslenkung der Membran klein ist gegenüber dem Durchmesser der Lochmaske auf dem sie montiert wird. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Bestimmung der Auslenkung mittels eines Okularmaßstabs ist zwar experimentell sehr einfach durchzuführen, führt aber zu den erwähnten Problemen. Als Lösung kann die Größe der Lochmaske vergrößert werden, sofern die mechanische Stabilität der Membran das zulässt.

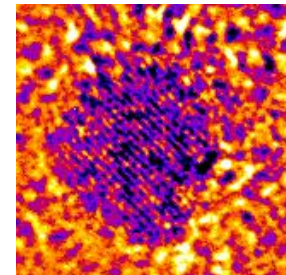
Oder die Auslenkungen müssen indirekt bestimmt werden. Um die Einschränkungen mit dem Okularmaßstab zu umgehen, wird in der Literatur ein alternatives Verfahren verwendet, das die Messung kleiner Auslenkungen im Mikrometerbereich erlaubt. Wird die Membran mit einem Laserstrahl im geometrischen Aufbau eines Interferometers beleuchtet, entsteht auf ihr ein ringförmiges Interferenzmuster (Newtonsche Ringe), mit dessen Hilfe sich die Dehnung der Membran auch für eine kleine Auslenkung berechnen lässt. Allerdings ist dieser Aufbau deutlich aufwändiger, weshalb in dieser Arbeit auf eine solche Durchführung zunächst verzichtet wurde.

6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in drei Abschnitte unterteilen. Zunächst wurden elektronenstrahlinduzierte Effekte von aromatischen selbstaggregierenden Monolagen (SAMs) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich SAMs aus 4'-Cyanobiphenyl-4-thiol (CBPT) als alternatives Templat in der chemischen Elektronenstrahlolithographie eignen und dass sich auf diesen Monolagen Polymerbürsten aus P-NIPAM herstellen ließen. In dem Zusammenhang wurde dargelegt, dass bei elektronenstrahl-induzierten Prozessen die Effektivität der Elektronen mit steigender Energie abnimmt, was den Schluss darlegt, dass elektronenstrahlinduzierte Effekte vor allem durch Sekundärelektronen bis 10 eV hervorgerufen werden. Ferner wurde untersucht, ob die Bestrahlung mit Elektronen einen Einfluss auf die Reaktivität von oberflächengebundenen Aminogruppen hat. Es konnte eine diesbezügliche Wirkung gefunden werden, dass oberflächengebundene Aminogruppen durch Elektronenbestrahlung teilweise deaktiviert werden bzw. an Reaktivität einbüßen.

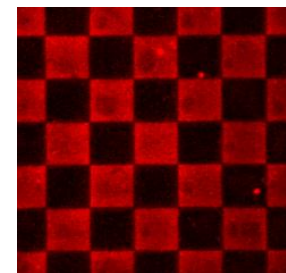


Der zweite Abschnitt beschäftigte sich mit der in der Einleitung gestellten Frage, ob es möglich ist, ultradünne, biokompatible Nanomembranen herzustellen, die sich als Trägerfilm biologischer Proben für die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM) eignen. Als Basismaterial wurden durch Elektronenbestrahlung quervernetzte Filme aus 4'-Nitrobiphenyl-4-thiol-SAMs (NBPT-SAMs) verwendet und Epoxid-terminiertes Polyethylenglykol (PEG) mit einem neu entwickelten Verfahren aus Rotationsbeschichtung und thermischer Kopplung an den SAM gebunden. Bei Verwendung von PEG mit einer Molmasse ab 10 000 g/mol waren die PEGylierten NBPT-Filme bei einer Gesamtdicke von nur 5 nm biokompatibel, d.h. sie waren in der Lage, der Adsorption von Fibrinogen vollständig zu widerstehen. Ferner war es mit lithographischen Methoden möglich, auch strukturierte PEG-Muster zur räumlich-strukturierten Proteinadsorption herzustellen.

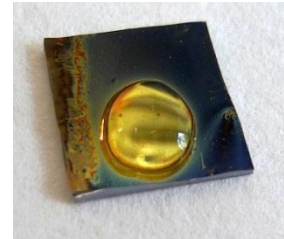


Der zweite Teil dieses Abschnitts widmete sich der Präparation und Charakterisierung freistehender Membranen aus den PEG-NBPT Filmen. Dazu wurde eine bestehende Methode dahingegen optimiert, quervernetzte SAMs auch ohne Verwendung konzentrierter Flusssäure (HF) von ihrem Substrat abzuheben zu können. So was es möglich, PEGylierte NBPT-Filme als freistehende, ultradünne Nanomembran zu präpariert, ohne dass sie ihre Proteinresistenz verlieren. Die Eignung der Membranen als elektronenmikroskopischer Support biologischer Proben wurde anhand hochauflösender TEM-Aufnahmen von Gold-Nanopartikeln und dem Eisenspeicherprotein Ferritin gezeigt.

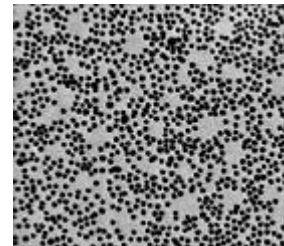
Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob es möglich sei, doppelseitig biokompatible Nanomembranen aus PEG als Basismaterial herzustellen. Grundlagen waren wieder quervernetzte dünne Filme, die allerdings dieses Mal ausschließlich aus Polyethylenglykolen bestanden. Die Quervernetzung selber wurde mittels einer chemischen Reaktion durchgeführt. Um einen hohen Quervernetzungsgrad zu gewährleisten, erwies sich ein Zweikomponentensystem multifunktionaler, verzweigter Polyethylenglykole (STAR-PEGs) als zielführend. Praktisch wurden Epoxid- und Amino-terminierte, 4-armige STAR-PEGs der Molmasse 2 000 g/mol eingesetzt, die in Chlorform gelöst per Rotationsbeschichtung ab Filmdicken von 6 nm auf vergoldeten Siliziumsubstraten aufgetragen werden konnten. Die chemische Reaktion der Epoxid- und Aminogruppen erfolgte durch Erwärmen



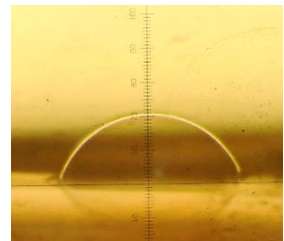
unter Schutzgas. Danach waren die PEG-Film so stabil, dass sie sich weder mit einem Lösungsmittel noch durch Ultraschallbehandlung wieder entfernen ließen. Die ultradünnen PEG-Hydrogel Filme wurden auf ihr Quellverhalten, ihre Proteinresistenz und ihre Einlagefähigkeit von Gold-Nanopartikeln untersucht. Ein kontinuierliches Quellverhalten konnte mit Hilfe eines Peltier-Elements durchgeführt werden, wobei sich ein reproduzierbares Verhalten zeigte. Ab Filmdicken von 30 nm wiesen sie ein Schwellverhältnis von zwei auf, was im Einklang mit dem hohen Vernetzungsgrad steht. Bezüglich der Biokompatibilität wurde gezeigt, dass Fibrinogen nur bedingt in der Lage war, irreversibel in den Filmen zu adsorbieren. Im Gegensatz dazu konnten Citrat-stabilisierte Gold-Nanopartikel in so hoher Dichte in den PEG-Filmen eingebettet werden, dass ihr Einfluss auf die optischen Eigenschaften schon mit bloßem Auge sichtbar war. Zudem ließ sich eine deutliche filmdickenabhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) der eingebetteten Goldnanopartikel um bis zu 70 nm nachweisen. So führte das Absinken der Temperatur zu einer Filmdickenzunahme, die sich als optisches Signal detektieren ließ.



Der zweite Aspekt der PEG-Filme betraf ihr Verhalten bezüglich der Bestrahlung mit niederenergetischen Elektronen. Zur eingehenden Untersuchung wurden die PEG-Filme im Ultrahochvakuum sukzessive bestrahlt und die Veränderungen in-situ röntgenphotoelektronenspektroskopisch (XPS) gemessen. Dabei zeigte sich, dass sich die PEG-Filme vor allem dahingehend chemisch-strukturell veränderten, dass sie sich von einer PEG-charakteristischen Stöchiometrie in eine carbonoide, kohlenstoffangereicherte Matrix umwandelten, die wesentlich hydrophober und nicht mehr proteinresistent war. Sie zeigt aber vor allem auch nicht mehr das für PEG-Hydrogele typische Quellverhalten durch Wassereinlagerung. Mit Hilfe lithographischer Strukturierung konnten so Bereiche innerhalb einer PEG-Matrix erzeugt werden, an denen sich selektiv Biomoleküle anlagern konnten oder die von der Adsorption weiterer Komponenten wie Gold-Nanopartikeln ausgeschlossen waren.



Zuletzt wurden die PEG-Filme von ihrem Substrat abgehoben und ab einer Dicke von 20 nm als freistehende *PEG-Hydrogel Nanomembranen* auf Lochmasken übertragen. Der Hydrogel-Charakter wurde nachgewiesen, da die Membranen weiterhin in der Lage waren, Gold-Nanopartikel in ihrer Matrix einzubetten und so eine AuNP-PEG-Verbundmembran zu bilden. Ferner machte die hohe mechanische Stabilität es möglich, makromechanische Eigenschaften wie Elastizitätsmodul und Eigenspannung der Membranen mit einer einfachen experimentellen Methode des Bulge-Tests zu bestimmen. Der erhaltene Wert für das E-Modul liegt mit einem Wert um die 1 GPa im Bereich anderer organischer Nanomembranen.



7 Referenzen

- (1) NOYCE, R. N., Fairchild Semiconductor Corporation, Mountain View, CA, *Semiconductor Device and Lead Structure*, U.S. Pat. 2,981,877 (1961).
- (2) ALLRESIST GMBH (2012). *Parametersammlung und Übersicht für Photoresists und E-Beam Resists*. [online], verfügbar unter: http://www.allresist.de/wDeutsch/FAQ/FAQE_BeamResists/0080aufloesung.php [Zugriff am: 18. Juli 2012].
- (3) SCHREIBER, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **65**, 151-256 (2000).
- (4) ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* **96**, 1533-1554 (1996).
- (5) LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103-1169 (2005).
- (6) KUMAR, A.; BIEBUYCK, H. A.; ABBOTT, N. L.; WHITESIDES, G. M. The Use of Self-Assembled Monolayers and a Selective Etch to Generate Patterned Gold Features. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9188-9189 (1992).
- (7) BALLAV, N.; CHEN, C. H.; ZHARNIKOV, M. Electron beam and soft X-ray lithography with a monomolecular resist. *J. Photopolym. Sci. Technol.* **21**, 511-517 (2008).
- (8) MÜLLER, H. U.; ZHARNIKOV, M.; VÖLKELE, B.; SCHERTEL, A.; HARDER, P.; GRUNZE, M. Low-energy electron-induced damage in hexadecanethiolate monolayers. *J. Phys. Chem. B* **102**, 7949-7959 (1998).
- (9) DAVID, C.; MÜLLER, H. U.; VÖLKELE, B.; GRUNZE, M. Low energy electron proximity printing using a self-assembled monolayer resist. *Microelectron. Eng.* **30**, 57-60 (1996).
- (10) KÜLLER, A.; EL-DESAWY, M. A.; STADLER, V.; GEYER, W.; ECK, W.; GÖLZHÄUSER, A. Electron-beam lithography with aromatic self-assembled monolayers on silicon surfaces. *J. Vac. Sci. Technol. B* **22**, 1114-1117 (2004).
- (11) GÖLZHÄUSER, A.; GEYER, W.; STADLER, V.; ECK, W.; GRUNZE, M.; EDINGER, K.; WEIMANN, T.; HINZE, P. Nanoscale patterning of self-assembled monolayers with electrons. *J. Vac. Sci. Technol. B* **18**, 3414-3418 (2000).
- (12) GEYER, W.; STADLER, V.; ECK, W.; ZHARNIKOV, M.; GÖLZHÄUSER, A.; GRUNZE, M. Electron-induced crosslinking of aromatic self-assembled monolayers: Negative resists for nanolithography. *Appl. Phys. Lett.* **75**, 2401-2403 (1999).
- (13) SIGAL, G. B.; MRKSICH, M.; WHITESIDES, G. M. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3464-3473 (1998).
- (14) REED, M. A.; ZHOU, C.; MULLER, C. J.; BURGIN, T. P.; TOUR, J. M. Conductance of a molecular junction. *Science* **278**, 252-254 (1997).
- (15) FAN, F. R. F.; YANG, J. P.; DIRK, S. M.; PRICE, D. W.; KOSYKIN, D.; TOUR, J. M.; BARD, A. J. Determination of the molecular electrical properties of self-assembled monolayers of compounds of interest in molecular electronics. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2454-2455 (2001).
- (16) PRIME, K. L.; WHITESIDES, G. M. Self-Assembled Organic Monolayers - Model Systems for Studying Adsorption of Proteins at Surfaces. *Science* **252**, 1164-1167 (1991).
- (17) PRIME, K. L.; WHITESIDES, G. M. Adsorption of Proteins onto Surfaces Containing End-Attached Oligo(Ethylene Oxide) - a Model System Using Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10714-10721 (1993).
- (18) RATNER, B. D. *Correlation, surfaces and biomaterials science*. in B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons (Eds.) *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 2 ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 765-771 (2004).
- (19) JORDAN, R. in *Surface-Initiated Polymerization II*. 2 ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (2006).

- (20) MA, H. W.; HYUN, J. H.; STILLER, P.; CHILKOTI, A. "Non-fouling" oligo(ethylene glycol)-functionalized polymer brushes synthesized by surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Adv. Mater.* **16**, 338-341 (2004).
- (21) BALLAV, N.; SCHILP, S.; ZHARNIKOV, M. Electron-beam chemical lithography with aliphatic self-assembled monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 1421-1424 (2008).
- (22) SCHILP, S.; BALLAV, N.; ZHARNIKOV, M. Fabrication of a full-coverage polymer nano-brush on an electron-beam-activated template. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 6786-6789 (2008).
- (23) ECK, W.; STADLER, V.; GEYER, W.; ZHARNIKOV, M.; GÖLZHÄUSER, A.; GRUNZE, M. Generation of surface amino groups on aromatic self-assembled monolayers by low energy electron beams - A first step towards chemical lithography. *Adv. Mater.* **12**, 805-808 (2000).
- (24) GÖLZHÄUSER, A.; ECK, W.; GEYER, W.; STADLER, V.; WEIMANN, T.; HINZE, P.; GRUNZE, M. Chemical nanolithography with electron beams. *Adv. Mater.* **13**, 803-806 (2001).
- (25) HE, Q.; KÜLLER, A.; SCHILP, S.; LEISTEN, F.; KOLB, H. A.; GRUNZE, M.; LI, J. B. Fabrication of controlled thermosensitive polymer nanopatterns with one-pot polymerization through chemical lithography. *Small* **3**, 1860-1865 (2007).
- (26) SCHMELMER, U.; JORDAN, R.; GEYER, W.; ECK, W.; GÖLZHÄUSER, A.; GRUNZE, M.; ULMAN, A. Surface-initiated polymerization on self-assembled monolayers: Amplification of patterns on the micrometer and nanometer scale. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 559-563 (2003).
- (27) HE, Q.; KÜLLER, A.; GRUNZE, M.; LI, J. B. Fabrication of thermosensitive polymer nanopatterns through chemical lithography and atom transfer radical polymerization. *Langmuir* **23**, 3981-3987 (2007).
- (28) SCHMELMER, U.; PAUL, A.; KÜLLER, A.; STEENACKERS, M.; ULMAN, A.; GRUNZE, M.; GÖLZHÄUSER, A.; JORDAN, R. Nanostructured polymer brushes. *Small* **3**, 459-465 (2007).
- (29) STEENACKERS, M.; KÜLLER, A.; BALLAV, N.; ZHARNIKOV, M.; GRUNZE, M.; JORDAN, R. Morphology control of structured polymer brushes. *Small* **3**, 1764-1773 (2007).
- (30) MEYERBRÖKER, N. Elektronenstrahlinduzierte Vernetzung und chemische Modifizierung selbstaggregierender Monoschichten von 4'-Cyano-1,1'-biphenyl-4-thiol auf Gold(111)-Oberflächen. *Diplomarbeit, Universität Heidelberg* (2009).
- (31) HUTT, D. A.; LEGGETT, G. J. Functionalization of hydroxyl and carboxylic acid terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* **13**, 2740-2748 (1997).
- (32) PAN, S.; CASTNER, D. G.; RATNER, B. D. Multitechnique surface characterization of derivatization efficiencies for hydroxyl-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir* **14**, 3545-3550 (1998).
- (33) CABRERA-SANFELIX, P.; ARNAU, A.; SANCHEZ-PORTAL, D. First-principles investigation of electron-induced cross-linking of aromatic self-assembled monolayers on Au(111). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 1578-1584 (2010).
- (34) TURCHANIN, A.; BEYER, A.; NOTTBOHM, C. T.; ZHANG, X. H.; STOSCH, R.; SOLOGUBENKO, A.; MAYER, J.; HINZE, P.; WEIMANN, T.; GÖLZHÄUSER, A. One Nanometer Thin Carbon Nanosheets with Tunable Conductivity and Stiffness. *Adv. Mater.* **21**, 1233-1237 (2009).
- (35) NOTTBOHM, C. T.; TURCHANIN, A.; BEYER, A.; STOSCH, R.; GÖLZHÄUSER, A. Mechanically Stacked 1-nm-Thick Carbon Nanosheets: Ultrathin Layered Materials with Tunable Optical, Chemical, and Electrical Properties. *Small* **7**, 874-883 (2011).
- (36) ECK, W.; KÜLLER, A.; GRUNZE, M.; VÖLKELE, B.; GÖLZHÄUSER, A. Freestanding nanosheets from crosslinked biphenyl self-assembled monolayers. *Adv. Mater.* **17**, 2583-2587 (2005).
- (37) NOTTBOHM, C. T.; BEYER, A.; SOLOGUBENKO, A. S.; ENNEN, I.; HUTTEN, A.; ROSNER, H.; ECK, W.; MAYER, J.; GÖLZHÄUSER, A. Novel carbon nanosheets as support for ultrahigh-resolution structural analysis of nanoparticles. *Ultramicroscopy* **108**, 885-892 (2008).
- (38) AMIN, I.; STEENACKERS, M.; ZHANG, N.; BEYER, A.; ZHANG, X. H.; PIRZER, T.; HUGEL, T.; JORDAN, R.; GÖLZHÄUSER, A. Polymer Carpets. *Small* **6**, 1623-1630 (2010).

- (39) AMIN, I.; STEENACKERS, M.; ZHANG, N.; SCHUBEL, R.; BEYER, A.; GÖLZHÄUSER, A.; JORDAN, R. Patterned Polymer Carpets. *Small* **7**, 683-687 (2011).
- (40) NOTTBOHM, C. T.; WIEGMANN, S.; BEYER, A.; GÖLZHÄUSER, A. Holey nanosheets by patterning with UV/ozone. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4324-4328 (2010).
- (41) ZHENG, Z.; NOTTBOHM, C. T.; TURCHANIN, A.; MUZIK, H.; BEYER, A.; HEILEMANN, M.; SAUER, M.; GÖLZHÄUSER, A. Janus Nanomembranes: A Generic Platform for Chemistry in Two Dimensions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 8493-8497 (2010).
- (42) NAKANISHI, K.; SAKIYAMA, T.; IMAMURA, K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 233-244 (2001).
- (43) RHINOW, D.; VONCK, J.; SCHRANZ, M.; BEYER, A.; GÖLZHÄUSER, A.; HAMPP, N. Ultrathin conductive carbon nanomembranes as support films for structural analysis of biological specimens. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4345-4350 (2010).
- (44) RHINOW, D.; BÜNFELD, M.; WEBER, N. E.; BEYER, A.; GÖLZHÄUSER, A.; KUHLBRANDT, W.; HAMPP, N.; TURCHANIN, A. Energy-filtered transmission electron microscopy of biological samples on highly transparent carbon nanomembranes. *Ultramicroscopy* **111**, 342-349 (2011).
- (45) WILSON, N. R.; PANDEY, P. A.; BEANLAND, R.; YOUNG, R. J.; KINLOCH, I. A.; GONG, L.; LIU, Z.; SUENAGA, K.; ROURKE, J. P.; YORK, S. J.; ET AL. Graphene Oxide: Structural Analysis and Application as a Highly Transparent Support for Electron Microscopy. *ACS Nano* **3**, 2547-2556 (2009).
- (46) PEPPAS, N. A. *Hydrogels*. in B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons (Eds.) *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, 2 ed., Elsevier Academic Press Amsterdam, pp. 100-107 (2004).
- (47) CHANG, C. Y.; DUAN, B.; CAI, J.; ZHANG, L. N. Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. *Eur. Polym. J.* **46**, 92-100 (2010).
- (48) LIN, C. C.; ANSETH, K. S. PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. *Pharm. Res.* **26**, 631-643 (2009).
- (49) PEPPAS, N. A.; HILT, J. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345-1360 (2006).
- (50) ANDREOPOULOS, F. M.; BECKMAN, E. J.; RUSSELL, A. J. Light-induced tailoring of PEG-hydrogel properties. *Biomaterials* **19**, 1343-1352 (1998).
- (51) ANDREOPOULOS, F. M.; DEIBLE, C. R.; STAUFFER, M. T.; WEBER, S. G.; WAGNER, W. R.; BECKMAN, E. J.; RUSSELL, A. J. Photocrosslinkable hydrogel synthesis via rapid photopolymerization of novel PEG-based polymers in the absence of photoinitiators. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6235-6240 (1996).
- (52) EKBLAD, T.; LIEDBERG, B. Protein adsorption and surface patterning. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **15**, 499-509 (2010).
- (53) LARSSON, A.; DU, C. X.; LIEDBERG, B. UV-patterned poly(ethylene glycol) matrix for microarray applications. *Biomacromolecules* **8**, 3511-3518 (2007).
- (54) GROLL, J.; AMIRGOULOVA, E. V.; AMERINGER, T.; HEYES, C. D.; ROCKER, C.; NIENHAUS, G. U.; MÖLLER, M. Biofunctionalized, ultrathin coatings of cross-linked star-shaped poly(ethylene oxide) allow reversible folding of immobilized proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 4234-4239 (2004).
- (55) GROLL, J.; AMERINGER, T.; SPATZ, J. P.; MÖLLER, M. Ultrathin coatings from isocyanate-terminated star PEG prepolymers: Layer formation and characterization. *Langmuir* **21**, 1991-1999 (2005).
- (56) GROLL, J.; HAUBENSAK, W.; AMERINGER, T.; MÖLLER, M. Ultrathin coatings from isocyanate terminated star PEG prepolymers: Patterning of proteins on the layers. *Langmuir* **21**, 3076-3083 (2005).
- (57) WATANABE, H.; KUNITAKE, T. A large, freestanding, 20 nm thick nanomembrane based on an epoxy resin. *Adv. Mater.* **19**, 909-912 (2007).
- (58) WATANABE, H.; MUTO, E.; OHZONO, T.; NAKAO, A.; KUNITAKE, T. Giant nanomembrane of covalently-hybridized epoxy resin and silica. *J. Mater. Chem.* **19**, 2425-2431 (2009).

- (59) STUART, M. A. C.; HUCK, W. T. S.; GENZER, J.; MÜLLER, M.; OBER, C.; STAMM, M.; SUKHORUKOV, G. B.; SZLEIFER, I.; TSUKRUK, V. V.; URBAN, M.; ET AL. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nat. Mater.* **9**, 101-113 (2010).
- (60) FLORY, P. J. Statistical Mechanics of Swelling of Network Structures. *J. Chem. Phys.* **18**, 108-111 (1950).
- (61) FLORY, P. J.; REHNER, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks - II. Swelling. *J. Chem. Phys.* **11**, 521-526 (1943).
- (62) FLORY, P. J.; REHNER, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks - I. Rubber-like Elasticity. *J. Chem. Phys.* **11**, 512-520 (1943).
- (63) TANAKA, T.; FOLLMORE, D. J. Kinetics of swelling of gels. *J. Chem. Phys.* **70**, 1214-1218 (1979).
- (64) TOOMEY, R.; FREIDANK, D.; RUHE, J. Swelling behavior of thin, surface-attached polymer networks. *Macromolecules* **37**, 882-887 (2004).
- (65) NAKAYAMA, M.; OKANO, T.; WINNIK, F. M. Poly(N-isopropylacrylamide)-based Smart Surfaces for Cell Sheet Tissue Engineering. *Material Matters* **5**, 56-58 (2010).
- (66) ALARCON, C. D. H.; FARHAN, T.; OSBORNE, V. L.; HUCK, W. T. S.; ALEXANDER, C. Bioadhesion at micro-patterned stimuli-responsive polymer brushes. *J. Mater. Chem.* **15**, 2089-2094 (2005).
- (67) SCHILD, H. G.; TIRRELL, D. A. Microcalorimetric Detection of Lower Critical Solution Temperatures in Aqueous Polymer-Solutions. *J. Phys. Chem.* **94**, 4352-4356 (1990).
- (68) CUNNINGHAME, R. G.; MALCOM, G. N. The Heats of Mixing of Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol 400 and 300. *J. Chem. Phys.* **65**, 1454-1456 (1961).
- (69) KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L.; SCHATZ, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668-677 (2003).
- (70) GHOSH, S. K.; PAL, T. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles: From theory to applications. *Chem. Rev.* **107**, 4797-4862 (2007).
- (71) MITSUSHI, M.; KOISHIKAWA, Y.; TANAKA, H.; SATO, E.; MIKAYAMA, T.; MATSUI, J.; MIYASHITA, T. Nanoscale actuation of thermoreversible polymer brushes coupled with localized surface plasmon resonance of gold nanoparticles. *Langmuir* **23**, 7472-7474 (2007).
- (72) TOKAREVA, I.; MINKO, S.; FENDLER, J. H.; HUTTER, E. Nanosensors based on responsive polymer brushes and gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15950-15951 (2004).
- (73) TOKAREVA, I.; TOKAREV, I.; MINKO, S.; HUTTER, E.; FENDLER, J. H. Ultrathin molecularly imprinted polymer sensors employing enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. *Chem. Commun.*, 3343-3345 (2006).
- (74) TOKAREV, I.; MINKO, S. Stimuli-responsive hydrogel thin films. *Soft Matter* **5**, 511-524 (2009).
- (75) GLASS, R.; MÖLLER, M.; SPATZ, J. P. Block copolymer micelle nanolithography. *Nanotechnology* **14**, 1153-1160 (2003).
- (76) LIU, P.; SUN, J. G.; HUANG, J. H.; PENG, R.; TANG, J.; DING, J. D. Fabrication of micropatterns of nanoarrays on a polymeric gel surface. *Nanoscale* **2**, 122-127 (2010).
- (77) AYDIN, D.; LOUBAN, I.; PERSCHMANN, N.; BLÜMMEL, J.; LOHMÜLLER, T.; CAVALCANTI-ADAM, E. A.; HAAS, T. L.; WALCZAK, H.; KESSLER, H.; FIAMMENGIO, R.; ET AL. Polymeric Substrates with Tunable Elasticity and Nanoscopically Controlled Biomolecule Presentation. *Langmuir* **26**, 15472-15480 (2010).
- (78) GRÄTER, S. V.; HUANG, J. H.; PERSCHMANN, N.; LOPEZ-GARCIA, M.; KESSLER, H.; DING, J. D.; SPATZ, J. P. Mimicking cellular environments by nanostructured soft interfaces. *Nano Lett.* **7**, 1413-1418 (2007).
- (79) ZHU, M.; BAFFOU, G.; MEYERBRÖKER, N.; POLLEUX, J. Micropatterning Thermoplasmonic Gold Nanoarrays To Manipulate Cell Adhesion. *ACS Nano*, DOI: 10.1021/nn302329c (2012).
- (80) BALLAV, N.; THOMAS, H.; WINKLER, T.; TERFORT, A.; ZHARNIKOV, M. Making Protein Patterns by Writing in a Protein-Repelling Matrix. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 5833-5836 (2009).

- (81) HONG, Y.; KRASKO, P.; LIBERA, M. Protein surface patterning using nanoscale PEG hydrogels. *Langmuir* **20**, 11123-11126 (2004).
- (82) KRASKO, P.; SUKHISHVILI, S.; MANSFIELD, M.; CLANCY, R.; LIBERA, M. Electron-beam surface-patterned poly(ethylene glycol) microhydrogels. *Langmuir* **19**, 5618-5625 (2003).
- (83) ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. *Polymer* **47**, 2217-2262 (2006).
- (84) LEE, C.; WEI, X. D.; KYSAR, J. W.; HONE, J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* **321**, 385-388 (2008).
- (85) MARTINS, P.; DELOBELLE, P.; MALHAIRE, C.; BRIDA, S.; BARBIER, D. Bulge test and AFM point deflection method, two technics for the mechanical characterisation of very low stiffness freestanding films. *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **45** (2009).
- (86) TOKAREV, I.; MINKO, S. Multiresponsive, Hierarchically Structured Membranes: New, Challenging, Biomimetic Materials for Biosensors, Controlled Release, Biochemical Gates, and Nanoreactors. *Adv. Mater.* **21**, 241-247 (2009).
- (87) TOKAREV, I.; ORLOV, M.; MINKO, S. Responsive polyelectrolyte gel membranes. *Adv. Mater.* **18**, 2458-2460 (2006).
- (88) JIANG, C. Y.; MARKUTSYA, S.; PIKUS, Y.; TSUKRUK, V. V. Freely suspended nanocomposite membranes as highly sensitive sensors. *Nat. Mater.* **3**, 721-728 (2004).
- (89) LANGMUIR, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **39**, 1848-1906 (1917).
- (90) BLODGETT, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1007-1022 (1935).
- (91) BIGELOW, W. C.; PICKETT, D. L.; ZISMAN, W. A. Oleophobic Monolayers. 1. Films Adsorbed from Solution in Non-Polar Liquids. *J. Colloid Sci.* **1**, 513-538 (1946).
- (92) SAGIV, J. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 92-98 (1980).
- (93) MCGOVERN, M. E.; KALLURY, K. M. R.; THOMPSON, M. Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane. *Langmuir* **10**, 3607-3614 (1994).
- (94) SELLERS, H.; ULMAN, A.; SHNIDMAN, Y.; EILERS, J. E. Structure and Binding of Alkanethiolates on Gold and Silver Surfaces - Implications for Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 9389-9401 (1993).
- (95) NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4481-4483 (1983).
- (96) LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G. M.; ALLARA, D. L.; TAO, Y. T.; PARIKH, A. N.; NUZZO, R. G. Comparison of the Structures and Wetting Properties of Self-Assembled Monolayers of Normal-Alkanethiols on the Coinage Metal-Surfaces, Cu, Ag, Au. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7152-7167 (1991).
- (97) HIMMELHAUS, M.; EISERT, F.; BUCK, M.; GRUNZE, M. Self-assembly of n-alkanethiol monolayers. A study by IR-visible sum frequency spectroscopy (SFG). *J. Phys. Chem. B* **104**, 576-584 (2000).
- (98) SCHWARTZ, D. K. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 107-137 (2001).
- (99) HÄHNER, G.; WÖLL, C.; BUCK, M.; GRUNZE, M. Investigation of Intermediate Steps in the Self-Assembly of N-Alkanethiols on Gold Surfaces by Soft-X-Ray Spectroscopy. *Langmuir* **9**, 1955-1958 (1993).
- (100) SCHLENOFF, J. B.; LI, M.; LY, H. Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 12528-12536 (1995).
- (101) STRONG, L.; WHITESIDES, G. M. Structures of Self-Assembled Monolayer Films of Organosulfur Compounds Adsorbed on Gold Single-Crystals - Electron-Diffraction Studies. *Langmuir* **4**, 546-558 (1988).
- (102) NUZZO, R. G.; KORENIC, E. M.; DUBOIS, L. H. Studies of the Temperature-Dependent Phase-Behavior of Long-Chain Normal-Alkyl Thiol Monolayers on Gold. *J. Chem. Phys.* **93**, 767-773 (1990).

- (103) EHLER, T. T.; MALMBERG, N.; NOE, L. J. Characterization of self-assembled monolayers on silver and gold using surface plasmon resonance spectroscopy - Reply. *J. Phys. Chem. B* **101**, 8043-8043 (1997).
- (104) EVANS, S. D.; SHARMA, R.; ULMAN, A. Contact-Angle Stability - Reorganization of Monolayer Surfaces. *Langmuir* **7**, 156-161 (1991).
- (105) ULMAN, A. Self-assembled monolayers of 4-mercaptobiphenyls. *Acc. Chem. Res.* **34**, 855-863 (2001).
- (106) SABATANI, E.; COHENBOULAKIA, J.; BRUENING, M.; RUBINSTEIN, I. Thioaromatic Monolayers on Gold - A New Family of Self-Assembling Monolayers. *Langmuir* **9**, 2974-2981 (1993).
- (107) TAO, Y. T.; WU, C. C.; EU, J. Y.; LIN, W. L.; WU, K. C.; CHEN, C. H. Structure evolution of aromatic-derivatized thiol monolayers on evaporated gold. *Langmuir* **13**, 4018-4023 (1997).
- (108) XIA, Y. N.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 551-575 (1998).
- (109) SEAH, M. P.; DENCH, W. A. Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standard data base for electron inelastic mean free paths in solids. *Surf. Interface Anal.* **1**, 2-11 (1979).
- (110) WASKE, P. A.; MEYERBRÖCKER, N.; ZHARNIKOV, M. Self-Assembled Monolayers of Cyclic Aliphatic Thiols and Their Reactions toward Electron Irradiation. *J. Phys. Chem. C* **116**, 13559-13568 (2012).
- (111) ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 273-282 (2000).
- (112) ANDRADE, J. D.; HLADY, V. Plasma-Protein Adsorption - the Big 12. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **516**, 158-172 (1987).
- (113) SLACK, S. M.; HORBETT, T. A. Physicochemical and Biochemical Aspects of Fibrinogen Adsorption from Plasma and Binary Protein Solutions onto Polyethylene and Glass. *J. Colloid Interface Sci.* **124**, 535-551 (1988).
- (114) ROSENHAHN, A.; EDERTH, T.; PETTITT, M. E. Advanced nanostructures for the control of biofouling: The FP6 EU Integrated Project AMBIO. *Biointerphases* **3**, Ir1-Ir5 (2008).
- (115) MAKHATADZE, G. I.; PRIVALOV, P. L. Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **47**, 307-425 (1995).
- (116) GRINNELL, F.; FELD, M. K. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J. Biol. Chem.* **257**, 4888-4891 (1982).
- (117) BRINK, C.; OSTERBERG, E.; HOLMBERG, K.; TIBERG, F. Using Poly(Ethylene Imine) to Graft Poly(Ethylene Glycol) or Polysaccharide to Polystyrene. *Colloid. Surface.* **66**, 149-156 (1992).
- (118) KINGSHOTT, P.; GRIESSER, H. J. Surfaces that resist bioadhesion. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **4**, 403-412 (1999).
- (119) HARRIS, J. M. *Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol)*. in J. M. Harris (Eds.) *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, 2 ed., Plenum Press, New York, pp. 1-12 (1992).
- (120) ANTONSEN, K. P.; HOFFMAN, A. S. *Water Structure of PEG Solutions by Differential Scanning Calorimetry Measurements*. in J. M. Harris (Eds.) *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, 2 ed., Plenum Press, New York, London, pp. 15-27 (1992).
- (121) JEON, S. I.; LEE, J. H.; ANDRADE, J. D.; DEGENNES, P. G. Protein Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide .1. Simplified Theory. *J. Colloid Interface Sci.* **142**, 149-158 (1991).
- (122) JEON, S. I.; ANDRADE, J. D. Protein Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide .2. Effect of Protein Size. *J. Colloid Interface Sci.* **142**, 159-166 (1991).
- (123) SZLEIFER, I. Protein adsorption on tethered polymer layers: effect of polymer chain architecture and composition. *Physica A* **244**, 370-388 (1997).

- (124) SZLEIFER, I. Protein adsorption on surfaces with grafted polymers: A theoretical approach. *Biophys. J.* **72**, 595-612 (1997).
- (125) CHRISTOPHIS, C.; GRUNZE, M.; ROSENHAHN, A. Quantification of the adhesion strength of fibroblast cells on ethylene glycol terminated self-assembled monolayers by a microfluidic shear force assay. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 4498-4504 (2010).
- (126) FELDMAN, K.; HAHNER, G.; SPENCER, N. D.; HARDER, P.; GRUNZE, M. Probing resistance to protein adsorption of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers by scanning force microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10134-10141 (1999).
- (127) HARDER, P.; GRUNZE, M.; DAHINT, R.; WHITESIDES, G. M.; LAIBINIS, P. E. Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption. *J. Phys. Chem. B* **102**, 426-436 (1998).
- (128) CURRIE, E. P. K.; NORDE, W.; STUART, M. A. C. Tethered polymer chains: surface chemistry and their impact on colloidal and surface properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* **100**, 205-265 (2003).
- (129) ISRAELACHVILI, J. N.; PASHLEY, R. M. Molecular layering of water at surfaces and origin of repulsive hydration forces. *Nature* **306**, 249-250 (1983).
- (130) WOLF, M. Multi-Cannel-Plates. *Phys. unserer Zeit* **12**, 90-95 (1981).
- (131) SCOFIELD, J. H. Hartree-Slater subshell photoionization cross-sections at 1254 and 1487 eV. *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* **8**, 129-137 (1976).
- (132) FULGHUM, J. E.; LINTON, R. W. Quantitation of Coverages on Rough Surfaces by Xps - An Overview. *Surf. Interface Anal.* **13**, 186-192 (1988).
- (133) HAASE, J. Sexafs (Surface Extended X-Ray Absorption Fine-Structure) and Nexafs (near-Edge-X-Ray Absorption Fine-Structure) - X-Ray Absorption-Spectroscopy on Adsorbate-Coated Surfaces. *Chem. unserer Zeit* **26**, 219-231 (1992).
- (134) ARNOLD, R.; TERFORT, A.; WÖLL, C. Determination of molecular orientation in self-assembled monolayers using IR absorption intensities: The importance of grinding effects. *Langmuir* **17**, 4980-4989 (2001).
- (135) TOMPKINS, H. G. in *A User's Guide to Ellipsometry*. 1 ed., Dover Publications, Mineola, NY, (1993).
- (136) KIDA, T.; YOKOTA, M.; MASUYAMA, A.; NAKATSUJI, Y.; OKAHARA, M. A Facile Synthesis of Polyglycidyl Ethers from Polyols and Epichlorohydrin. *Synthesis-Stuttgart*, 487-489 (1993).
- (137) AHN, S. J.; KAHOLEK, M.; LEE, W. K.; LAMATTINA, B.; LABEAN, T. H.; ZAUSCHER, S. Surface-initiated polymerization on nanopatterns fabricated by electron-beam lithography. *Adv. Mater.* **16**, 2141-2145 (2004).
- (138) BURDINSKI, D.; BLEES, M. H. Thiosulfate- and thiosulfonate-based etchants for the patterning of gold using microcontact printing. *Chem. Mater.* **19**, 3933-3944 (2007).
- (139) ECK, W.; CRAIG, G.; SIGDEL, A.; RITTER, G.; OLD, L. J.; TANG, L.; BRENNAN, M. F.; ALLEN, P. J.; MASON, M. D. PEGylated Gold Nanoparticles Conjugated to Monoclonal F19 Antibodies as Targeted Labeling Agents for Human Pancreatic Carcinoma Tissue. *ACS Nano* **2**, 2263-2272 (2008).
- (140) MOULDER, J. F.; STICKLE, W. E.; P.E., S.; BOMBEN, K. D. in *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Perkin-Elmer Corp, Eden Prairie, MN, (1992).
- (141) KWOK, R. W. M., 4.1 ed., Department of Chemistry, The Chinese University of Hong Kong
- (142) KOWALCZYK, S. P.; F.R. MCFEELY; LEY, L.; GRITSYNA, V. T.; SHIRLEY, D. A. The electronic structure of SrTiO₃ and some simple related oxides (MgO, Al₂O₃, SrO, TiO₂). *Solid State Commun.* **23**, 161-169 (1977).
- (143) TOUGAARD, S. Background removal in x-ray photoelectron spectroscopy: Relative importance of intrinsic and extrinsic processes. *Phys. Rev. B: Condens. Matter* **34**, 6779-6783 (1986).

- (144) ZHARNIKOV, M. High-resolution X-ray photoelectron spectroscopy in studies of self-assembled organic monolayers. *J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom.* **178**, 380-393 (2010).
- (145) DUGAL, P. C.; ABDOL-CARIME, H.; SANCHE, L. Mechanisms for low-energy (0.5-30 eV) electron-induced pyrimidine ring fragmentation within thymine- and halogen-substituted single strands of DNA. *J. Phys. Chem. B* **104**, 5610-5617 (2000).
- (146) SEILER, H. Secondary Electron emission in the Scanning Microscope. *J. Appl. Phys.* **54**, 1-17 (1983).
- (147) REIMER, L. in *Scanning electron microscopy*. 2 ed., Springer, Berlin; Heidelberg, (1998).
- (148) VAN DORP, W. F.; HAGEN, C. W. A critical literature review of focused electron beam induced deposition. *J. Appl. Phys.* **104** (2008).
- (149) CASTNER, D. G.; HINDS, K.; GRAINGER, D. W. X-ray photoelectron spectroscopy sulfur 2p study of organic thiol and disulfide binding interactions with gold surfaces. *Langmuir* **12**, 5083-5086 (1996).
- (150) HEISTER, K.; RONG, H. T.; BUCK, M.; ZHARNIKOV, M.; GRUNZE, M.; JOHANSSON, L. S. O. Odd-even effects at the S-metal interface and in the aromatic matrix of biphenyl-substituted alkanethiol self-assembled monolayers. *J. Phys. Chem. B* **105**, 6888-6894 (2001).
- (151) BIERBAUM, K.; KINZLER, M.; WÖLL, C.; GRUNZE, M.; HAHNER, G.; HEID, S.; EFFENBERGER, F. A near-Edge X-Ray-Absorption Fine Structure Spectroscopy and X-Ray Photoelectron-Spectroscopy Study of the Film Properties of Self-Assembled Monolayers of Organosilanes on Oxidized Si(100). *Langmuir* **11**, 512-518 (1995).
- (152) GÖLZHÄUSER, A.; PANOV, S.; MAST, M.; SCHERTEL, A.; GRUNZE, M.; WÖLL, C. Growth of Pyromellitic Dianhydride on an Amino-Terminated Surface. *Surf. Sci.* **334**, 235-247 (1995).
- (153) HEISTER, K.; ZHARNIKOV, M.; GRUNZE, M.; JOHANSSON, L. S. O.; ULMAN, A. Characterization of X-ray induced damage in alkanethiolate monolayers by high-resolution photoelectron spectroscopy. *Langmuir* **17**, 8-11 (2001).
- (154) TURCHANIN, A.; KAUFER, D.; EL-DESAWY, M.; WÖLL, C.; WITTE, G.; GÖLZHÄUSER, A. Molecular Mechanisms of Electron-Induced Cross-Linking in Aromatic SAMs. *Langmuir* **25**, 7342-7352 (2009).
- (155) MEYERBRÖKER, N.; ZHARNIKOV, M. Modification of Nitrile-Terminated Biphenylthiol Self-Assembled Monolayers by Electron Irradiation and Related Applications. *Langmuir* **28**, 9583-9592 (2012).
- (156) GRAF, N.; YEGEN, E.; GROSS, T.; LIPPITZ, A.; WEIGEL, W.; KRAKERT, S.; TERFORT, A.; UNGER, W. E. S. XPS and NEXAFS studies of aliphatic and aromatic amine species on functionalized surfaces. *Surf. Sci.* **603**, 2849-2860 (2009).
- (157) BALLAV, N.; SCHUPBACH, B.; DETHLOFF, O.; FEULNER, P.; TERFORT, A.; ZHAMIKOV, M. Direct probing molecular twist and tilt in aromatic self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15416-15417 (2007).
- (158) KANKATE, L.; TURCHANIN, A.; GÖLZHÄUSER, A. On the Release of Hydrogen from the S-H groups in the Formation of Self-Assembled Monolayers of Thiols. *Langmuir* **25**, 10435-10438 (2009).
- (159) ALLEN, T. D. in *Introduction to Electron Microscopy for Biologists*. 1 ed., Academic Press, San Diego, (2008).
- (160) XIA, Y. N.; ZHAO, X. M.; KIM, E.; WHITESIDES, G. M. A selective etching solution for use with patterned self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Chem. Mater.* **7**, 2332-2337 (1995).
- (161) WANG, Y. Q.; LIANG, W. S.; GENG, C. Y. Coalescence Behavior of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **4**, 684-688 (2009).
- (162) ANDREWS, S. C.; AROSIO, P.; BOTTKE, W.; BRIAT, J. F.; VONDARL, M.; HARRISON, P. M.; LAULHERE, J. P.; LEVI, S.; LOBREAUX, S.; YEW DALL, S. J. Structure, Function, and Evolution of Ferritins. *J. Inorg. Biochem.* **47**, 161-174 (1992).
- (163) KIM, S. W.; SEO, H. Y.; LEE, Y. B.; PARK, Y. S.; KIM, K. S. Crystal Structure of Ferrihydrite Nanoparticles Synthesized in Ferritin. *Bull. Korean Chem. Soc.* **29**, 1969-1972 (2008).

- (164) LAMONT, C. L. A.; WILKES, J. Attenuation length of electrons in self-assembled monolayers of n-alkanethiols on gold. *Langmuir* **15**, 2037-2042 (1999).
- (165) ROBERTS, R. F.; ALLARA, D. L.; PRYDE, C. A.; BUCHANAN, D. N. E.; HIOBBIS, N. D. Meath Free Path for Inelastic Scattering of 1.2 keV Electrons in Thin Poly(methylmethacrylate) Films. *Surf. Interface Anal.* **2**, 5-10 (1980).
- (166) MATSUURA, M.; MIYAZAWA, T. Vibrational Analysis of Molten Poly(ethylene glycol). *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **7**, 1735-1744 (1969).
- (167) TOKUMITSU, S.; LIEBICH, A.; HERRWERTH, S.; ECK, W.; HIMMELHAUS, M.; GRUNZE, M. Grafting of alkanethiol-terminated poly(ethylene glycol) on gold. *Langmuir* **18**, 8862-8870 (2002).
- (168) HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. in *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 7 ed., Thieme, Stuttgart, (2005).
- (169) RATTNER, D. B.; CASTER, D. G. *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*. in J. Vickerman, I. Gilmore (Eds.) *Surface Analysis: The Principal Techniques*, 2 ed., Wiley, Chichester, UK, pp. 47-112 (2009).
- (170) ZWAHLEN, M.; HERRWERTH, S.; ECK, W.; GRUNZE, M.; HAHNER, G. Conformational order in oligo(ethylene glycol)-terminated self assembled monolayers on gold determined by soft X-ray absorption. *Langmuir* **19**, 9305-9310 (2003).
- (171) DANNENBERGER, O.; WEISS, K.; HIMMEL, H. J.; JAGER, B.; BUCK, M.; WOLL, C. An orientation analysis of differently endgroup-functionalised alkanethiols adsorbed on Au substrates. *Thin Solid Films* **307**, 183-191 (1997).
- (172) STÖHR, J. in *NEXAFS Spectroscopy*. 2 ed., Spinger, Berlin, Heidelberg, (1992).
- (173) OKAMOTO, T.; YAMAGUCHI, I. Optical absorption study of the surface plasmon resonance in gold nanoparticles immobilized onto a gold substrate by self-assembly technique. *J. Phys. Chem. B* **107**, 10321-10324 (2003).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ABPT	4'-Aminobiphenyl-4-thiol	LCST	Lower Critical Solution Temperature
AFM	Atomic Force Microscopy; Rasterkraftmikroskopie	LSPR	Localized SPR; Lokalisierte SPR
AO	Atomorbital	LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization	MO	Molekülorbital
AUDT	11-Amino-Undecanthiol	NBPT	4'-Nitrobiphenyl-4-thiol
BCML	Block Copolymer Micelle Polymerization; Mizellare Coblock Polymerisation	NEXAFS	Near Edge X-Ray Absorption Fine Structure; Nahkanten-Röntgenabsorptions-Feinstruktur
BIBB	α -Bromisobuttersäurebromid	NIPAM	<i>N</i> -Isopropylacrylamide
BPT	Biphenyl-4-thiol	Nu	Nucleophil(ie)
BSE	Back Scattered Electron, Rückstreuelektron	PE	Polyelektrolyt
CBPT	4'-Cyanobiphenyl-4-thiol	PE	Primärelektron
CNM	Carbon Nanomembrane	PEI	Polyethylenimin
DCM	Dichlormethan	PFPA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
DIC	Differenzieller Interferenzkontrast	PMMA	Polymethylmethacrylat
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	P-NIPAM	Poly- <i>N</i> -Isopropylacrylamid
EBCL	Electron Beam Chemical Lithography; Chemische Elektronenstrahl-lithographie	REM	Rasterelektronenmikroskop
EG	Ethylenglykol	rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
EI	Elektrophil(ie)	SAM	Self-assembled Monolayer, Selbstaggregierende Monolage
E-Modul	Elastizitätsmodul	SE	Sekundärelektron
EPX	Epoxid	SIP	Surface Initiated Polymerization Oberflächeninitiierte Polymerisation
FFT	Fast Fourier Transformation	SP	Surface Plasmon; Oberflächenplasmon
FG	Funktionelle Gruppe	SPR	Surface Plasmon Resonance, Oberflächenplasmonenresonanz
flFIB	Fluorescently-labeled Fibrinogen, Fluoreszenz-markiertes Fibrinogen	TDM	Transition Dipol Moment, Übergangsdipolmoment
FM	Fluoreszenzmikroskopie	TEM	Transmissionselektronmikroskopie
GO	Graphenoxid	TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid	THF	Tetrahydrofuran
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital	UDT	Undecanthiol
HRXPS	High Resolution XPS	UHV	Ultrahochvakuum
HTREM	High Resolution TEM	UV-VIS	Ultraviolet-visible Spectroscopy
IPER	Irradiation Promoted Exchange Reaction	XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy; Röntgenphotoelektronenspektroskopie
IR	Infrarot		
IRRAS	Infrarot Reflexions Absorptionsspektroskopie		

8.2 Liste der Publikationen

Zeitschriften:

MEYERBRÖKER N. UND ZHARNIKOV M. Modification of Nitrile-Terminated Biphenylthiol Self-Assembled Monolayers by Electron Irradiation and Related Applications. *Langmuir* **28**, 9583-9592 (2012).

MEYERBRÖKER N., LI, Z.-A., ECK W., UND ZHARNIKOV M. Biocompatible Nanomembranes Based on PEGylation of Cross-Linked Self-Assembled Monolayers. *Chem. Mater.* **24**, 2965-2975, (2012).

WASKE A.P., MEYERBRÖKER N., ECK W. UND ZHARNIKOV M. Self-Assembled Monolayers of Cyclic Aliphatic Thiols and Their Reaction toward Electron Irradiation. *J. Phys. Chem. C* **116**, 13559–13568, (2012).

ZHU M., BAFFOU G., MEYERBRÖKER N. UND POLLEUX J. Micropatterning Thermoplasmonic Gold Nanoarrays To Manipulate Cell Adhesion. *ASC Nano*, DOI: 10.1021/nn302329c (2012).

TRUMM C., STANG S., EBERLE B., KAIFER E., WAGNER N., BECK J., BREDOW T., MEYERBRÖKER N., ZHARNIKOV M., HÜBNER O. UND HIMMEL H.-J. Highly Oxidized Semiconducting Coordination Polymers – Coupled Oxidation and Coordination of Guanidine Electron Donors. *Eur. J. Inorg. Chem.* **19**, 3156-3167, (2012).

Konferenzbeiträge:

MEYERBRÖKER N., ECK, W. UND ZHARNIKOV, M. Biocompatible Nanomembranes Based on PEGylation of Cross-Linked Self-Assembled Monolayers. *TechConnect World 2011*, 13.-16. Juni 2011, Boston, USA.

MEYERBRÖKER N., LI Z.-A., ECK, W. UND ZHARNIKOV, M. Biocompatible Nanomembranes Based on PEGylation of Cross-Linked Self-Assembled Monolayers. *76. Jahrestagung der DPG*, 25.-30. März 2012, Berlin, Deutschland.

MEYERBRÖKER N. UND ZHARNIKOV, M. A Novel Approach to Prepare Ultrathin films of Poly(ethylene glycol) for Structured Deposition of Nanoparticles. *ECCL 2012*, 18.-22. Mai 2012, Stykkisholmur, Island.

MEYERBRÖKER N., ECK, W. UND ZHARNIKOV, M. Biocompatible Nanomembranes Based on PEGylation of Cross-Linked Self-Assembled Monolayers. *ICN+T 2012*, 23.-26. Juli 2012, Paris, Frankreich.

8.3 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Betreuer apl. Prof. Dr. Michael Zharnikov nicht nur für die ausgezeichnete und lehrreiche Unterstützung bedanken, sondern auch für die vielen Möglichkeiten, meine Arbeit im Rahmen von Konferenzen präsentieren zu können und für die wissenschaftlichen Freiheiten, die mir beim Verfassen dieser Arbeit gewährt wurden.

Apl. Prof. Dr. Hans-Robert Volpp danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Bei Dr. Wolfgang Eck möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung beim Erstellen meiner Diplomarbeit und für die wertvollen Ideen und Anregungen bedanken, die Grundlagen dieser Arbeit waren.

Herrn Prof. Dr. Michael Grunze danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis der Angewandten Physikalischen Chemie und die guten Arbeitsbedingungen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen sind das:

Die Rosenhähne und vor allem Rosenhänninnen für die amüsanten Grill-Feiern und Mittwochs-Sporties-Tage.

Dabei sei ganz explizit Stella Bauer erwähnt. Nicht nur, dass ich sie mit dem Korrekturlesen dieser Arbeit gequält habe, auch das von mir gepflegte hohe Lied der „Extrem-Unordnung-am-Laborplatz“ war für sie ein nie versiegender Quell für Mahnungen zur Ordnung am selbigen und Aufforderungen, diesen aufzuräumen. Das wird mir unvergessen bleiben. Und ich danke den beiden Marias: Alles und Piluca, die in einer nicht genau zu definierenden Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Natürlich danke ich Thomas Kriesche und Leo Pöttinger bzw. Leo Pöttinger und Thomas Kriesche, kurz den Bürgies, für unendliche Diskussionen, Kaffee am Morgen, am Mittag und am Nachmittag, denn – kein Bier vor vier – sowie das eine oder andere Herrengedeck ab vier – bis vier. War wirklich eine super Zeit mit Euch!

Ein großer Dank gilt meinem Bürogenossen Dr. Florian Staier für stets anregenden Diskussionen und nicht minder anregende Heidegeist-Abende.

Günther Meinusch danke ich für die immer prompte und kompetente Reparatur der MAX sowie der Beratung bei vielen Fragen rund um Elektronik. Peter Jeschka danke ich für die Lösung bei Computerproblemen.

Vielen Dank an Georg Albert für die Realisierung der Sonderwünsche bezüglich der Herstellung der Gold(111)-Wafer einmal mal mit und einmal mal ohne Haftvermittler, einmal mit 30 nm Gold und einmal mit 100 nm, einmal auf Silizium, dann wieder Glimmer.

Bei Reinhold Jehle bedanke ich mich für die Unterstützungen bei der MAX sowie für die technischen Erstellung und Realisierung zahlreicher Sonderwünsche.

Einen herzlichen Dank geht an Zi-An Li und Dr. Marina Spasova von der AG Fahrle der Universität Duisburg-Essen sowie Dr. Ingrid Haußer vom Bioquant Heidelberg für die Unterstützung bei den TEM-Aufnahmen.

Meinen Praktikanten, Bachelorstudenten und Hilfwissenschaftlern Christian Patze, Michel Kettner und Ingo Appel danke ich für ihre wertvolle und selbständige Unterstützung.

Besonderen Dank gilt auch meiner Lebensgefährtin Patricia, die während des gesamten Studiums und besonders aber während der letzten Jahre, geduldig meine Launen ertragen und mir den Rücken freigehalten hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern bedanken, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung des Studiums diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, im August 2012 Nikolaus Meyerbröker