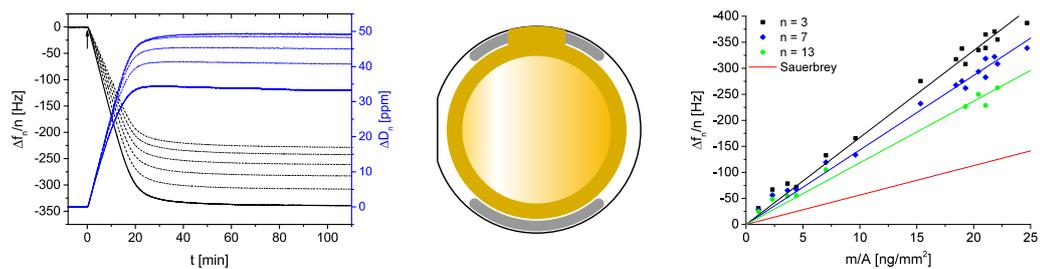


Untersuchung der Adsorption und Anordnung von funktionalisierten Silica-Nanopartikeln auf Oberflächen durch die Kombination von QCM-D und REM



Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Grunewald
aus Berlin

2017

Titelbild:

rechts und links: Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von C. Grunewald, M. Schmutte, C. N. Nouf-
ele, C. Graf, T. Risse, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 10642–10649, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03572. Copyright 2015
American Chemical Society.

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 15.05.2012 bis zum 14.03.2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Risse im Institut für Chemie und Biochemie; Physikalische und Theoretische Chemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Risse
2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Christina Graf

Disputation am: 31.05.2017

Das Ganze
ist mehr als
die Summe seiner Teile.

gekürztes Zitat nach Aristoteles^a

^averkürztes Zitat aus Metaphysik 1041 b 10 (VII. Buch (Z))

Ausführlicher: *„Das, was aus Bestandteilen so zusammengesetzt ist, dass es ein einheitliches Ganzes bildet – nicht nach Art eines Haufens, sondern wie eine Silbe –, das ist offenbar mehr als bloß die Summe seiner Bestandteile. Eine Silbe ist nicht die Summe ihrer Laute: ba ist nicht dasselbe wie b plus a, und Fleisch ist nicht dasselbe wie Feuer plus Erde.“*

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Analyse multivalenter Wechselwirkungen in einem Modellsystem aus geladenen AHAPS-funktionalisierten Silica-Nanopartikeln auf glatten Goldoberflächen mittels QCM-D. Im Vordergrund steht neben der Untersuchung der multivalenten Wechselwirkungen die Analyse der Messbarkeit von Schichten aus diskreten Partikeln mit der QCM-D in Kombination mit dem REM und die statistische Analyse der Partikelstruktur und deren Bildung. Für die Untersuchung multivalenter Wechselwirkungen wurde ein System nicht dicht gepackter Nanopartikel entwickelt. Es wurden Partikel in einer QCM-D-Flusszelle aus Ethanol auf die Goldoberfläche adsorbiert und die Partikelschicht langsam in Ethanol getrocknet. Durch die Wahl einer rauen Partikeloberfläche konnte die multivalente Bindung zur Oberfläche so gesteuert werden, dass die Partikel auch nach dem Trocknen auf der Oberfläche geordnet bleiben. Das kovalente Anbinden der adsorbierten Partikel an einen SAM ist eine alternative Methode, um die Aggregation der Partikel gänzlich zu unterbinden. Für das Modellsystem aus sich abstoßenden, rauen Nanopartikeln auf einer unfunktionalisierten Goldoberfläche wurde das Verhalten der Frequenzdifferenz Δf und der Dissipationsdifferenz ΔD als Funktion der adsorbierten Masse Δm durch eine Kombination von QCM-D und REM analysiert. Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Δf und Δm gefunden, obwohl das System eine merkliche Dissipationsänderung aufweist. Das lineare Quasi-Sauerbrey-Verhalten zwischen Δf und Δm deutet auf einen einfachen Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung und dem Massenzuwachs hin, bei dem jedes Teilchen einen gleichbleibenden Beitrag zur Frequenzänderung liefert. Während die Frequenzänderung nach Trocknung den Erwartungen aufgrund der Sauerbrey-Gleichung auch quantitativ erfüllt, ist die Proportionalitätskonstante in der kondensierten Phase deutlich verschieden. Die Proportionalität zwischen Δf und Δm konnte mit der elektrostatischen Abstoßung und dem damit verbundenen Mindestabstand der Partikel erklärt werden. Ein in der Literatur für Schichten aus diskreten Partikeln verwendetes Extrapolationsschema wurde auf die QCM-D-Messungen des Modellsystems angewendet. Dabei wurde festgestellt, dass das Schema auf der Kompensation von Fehlern beruht und für das hier vermessene wohl-definierte Modellsystem nicht funktioniert. Bei der Analyse der Partikelanlagerung konnte mit Hilfe statistischer Methoden

beobachtet werden, dass sich die Partikelstruktur ab einer bestimmten Bedeckung komprimiert und die einzelnen Partikel ihren Abstand verringern. Aus Partikelanordnungen gering bedeckter Oberflächen konnte das Paarpotential der Partikel näherungsweise ermittelt werden.

Abstract

The present thesis is focused on the analysis of multivalent interactions in a model system of charged, AHAPS functionalized silica nanoparticles on smooth gold surfaces using QCM-D. Main aspects are the investigation of multivalent interactions, the analysis of the measurability of layers of discrete particles with the QCM-D in combination with the SEM and the statistical analysis of the particle structure and its formation. For the investigation of multivalent interactions, a system of non-close packed nanoparticles has been developed. Particles were adsorbed onto the gold surface in a QCM-D flow cell from ethanol and the particle layer was slowly dried in ethanol. The selection of a rough particle surface allowed the multivalent binding to the surface to be controlled so that the particles remain ordered on the surface even after drying. The covalent binding of the adsorbed particles to a SAM is an alternative method to completely prevent the aggregation of the particles. For the model system of repulsive, rough nanoparticles on an unfunctionalized gold surface the behavior of the frequency difference Δf and the dissipation difference ΔD as a function of the adsorbed mass Δm was analyzed by a combination of QCM-D and SEM. A linear relationship between Δf and Δm has been found, although the system has a significant change in dissipation. The linear quasi-Sauerbrey behavior between Δf and Δm indicates a simple relationship between the frequency change and the mass growth, in which each particle provides a constant contribution to the frequency change. While the frequency change after drying satisfies the expectations due to the Sauerbrey equation also quantitatively, the proportionality constant in the condensed phase is clearly different. The proportionality between Δf and Δm could be explained by the electrostatic repulsion and the associated minimum distance of the particles. An extrapolation scheme used in the literature for discrete particle layers was applied to the QCM-D measurements of the model system. It was found that the scheme is based on the compensation of errors and does not work for the well-defined model system measured here. Through the analysis of the particle deposition, it was observed that the particle structure is compressed from a certain coverage and the individual particles reduce their distance. From particle arrangements of low covered surfaces, the approximate pair potential of the particles could be determined.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Multivalenz	5
2.2	Nanopartikel	12
2.3	QCM-D	15
2.4	REM	27
2.5	Statistik	32
2.5.1	Räumliche Statistik	32
2.5.2	Statistische Tests	41
2.5.3	Shapiro-Wilk-Test	44
2.6	Elektrostatische Abstoßung	45
3	Zusammenfassende Einordnung und Diskussion der Veröffentlichungen	49
4	Ausblick	69
5	Publikationen	71
5.1	Ordered Structures of Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces: Correlation of QCM with Structural Characterization	71
5.1.1	Zusammenfassung	71
5.1.2	Eigenanteil	72
5.1.3	Artikel	72
5.2	Structural Characterization of Ordered, Non-Close-Packed Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces	83
5.2.1	Zusammenfassung	83
5.2.2	Eigenanteil	83
5.2.3	Artikel	83
5.3	Controlling the Interaction and Non-Close-Packed Arrangement of Nano- particles on Large Areas	111
5.3.1	Zusammenfassung	111
5.3.2	Eigenanteil	112
5.3.3	Artikel	112
	Abkürzungsverzeichnis	139
	Literaturverzeichnis	141
	Danksagung	147

1 Einleitung

Multivalenz ist in der Biologie und Biochemie ein weit verbreitetes Prinzip um Objekte mit einer Vielzahl schwacher Bindungen reversibel miteinander zu verbinden.^[1,2] Aufgrund der weiten Verbreitung dieses Wirkprinzips, insbesondere bei biologischen Prozessen, kommt dessen Verständnis eine große Bedeutung zu. Die rationale Entwicklung von Anwendungen, die auf diesem Prinzip fußen, erfordert ein detailliertes Verständnis der zugrundeliegenden Effekte auf molekularem Niveau. Ein großes Potential wird in der Entwicklung von Therapeutika gesehen. Beispielsweise ist es bereits gelungen, Leukozyten, die multivalent sind und eine große Rolle bei Entzündungskrankheiten spielen, durch multivalente Polymere zu inhibieren.^[3,4] Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass die Wirkstoffe aufgrund der multivalenten Interaktion bereits bei einer sehr geringen Dosis wirken können. Multivalente Bindungen funktionieren ähnlich wie bei einer Klette, bei der viele schwache Bindungen in Summe eine starke Bindung ergeben.^[4] Diese Bindungen sind größtenteils irreversibel.

Bei einem sehr fein abgestimmten Zusammenspiel von thermischer Energie, der Anzahl an Einzelbindungen und der Bindungsstärke können die schwachen Einzelbindungen gelöst werden. Bei einer hohen Anzahl an Einzelbindungen wird das Lösen der gesamten multivalenten Bindung durch den Effekt der Rückbindung^[4] kinetisch gehemmt oder verhindert, sodass die Wahrscheinlichkeit des Ablösens des multivalent gebundenen Objekts kleiner wird. Erfolgt keine Ablösung aller Einzelbindungen, ist die multivalente Bindung irreversibel. Irreversible Bindungen können auch durch wenige starke Einzelbindungen erzeugt werden. Ein Beispiel einer irreversiblen multivalenten Bindung in der Natur ist das Andocken von Leukozyten an Zellen.^[1] Bei einer Entzündung erscheinen Rezeptoren auf der Zelloberfläche, an die die Leukozyten irreversibel binden. Die laterale Mobilität der Leukozyten bleibt in diesem Fall erhalten, sodass die Leukozyten über die Zelle rollen können.^[1]

Ein Verständnis der Multivalenz auf molekularer Ebene ist ein sehr komplexes Forschungsgebiet, dem sich auf unterschiedliche Weise genähert werden kann. Um die Wirk- und Funktionsweise multivalenter Systeme zu untersuchen, können beispielsweise verschiedene Modellsysteme auf der Basis von molekularen Einheiten,^[5] DNA-Fragmenten^[6,7] oder

auch auf der Basis von Nanopartikeln^[8,9] untersucht werden. Dem gegenüber gibt es die Möglichkeit, große biologische Systeme wie Viren^[1,10] oder Leukozyten^[1,11] zu untersuchen.

Im Gegensatz zu biologischen Systemen, die viele verschiedene Proteine auf ihrer Oberfläche präsentieren, ist es bei einem Modellsystem möglich, durch die gewählte Funktionalisierung die Wechselwirkung mit der Oberfläche zu steuern.^[12] Modellsysteme bieten dabei den Vorteil, dass bestimmte definierte Eigenschaften wie Größe, Form und Festigkeit gezielt gesteuert werden können. Dies ermöglicht es, einzelne Aspekte der multivalenten Wechselwirkungen gezielt und unter klar definierten Bedingungen zu analysieren.

Als Modellsystem für die vorliegende Untersuchung werden Nanopartikel verwendet. Nanopartikel bieten im Gegensatz zu biologischen Systemen wie beispielsweise Viren, die Möglichkeit, eine Reihe von Parametern, wie die Wahl des Lösungsmittels, den pH-Wert oder die Temperatur über einen größeren Bereich zu variieren. In der vorliegenden Arbeit werden sphärische Silica-Nanopartikel verwendet, die mit N-(6-Aminoethyl)-aminopropyltrimethoxysilan (AHAPS) funktionalisiert sind. Aufgrund ihrer runden Form weisen sie eine geringe Kontaktfläche mit einer glatten Unterlage auf und bilden auf diese Weise nur sehr wenige multivalente Einzelbindungen aus. Dies ermöglicht eine schwache Bindung der Partikel an die Oberfläche. Die Moleküle sind über kovalente Bindungen an die Siliziumdioxidoberfläche geknüpft und präsentieren auf der äußeren Oberfläche positiv geladene Aminfunktionen.^[13] Mit einer Goldoberfläche bilden Amingruppen eine schwache Wechselwirkung mit einer Bindungsenergie von etwa 14 kJ/mol in wässriger Lösung^[14] aus. Goldoberflächen sind darüber hinaus sowohl chemisch als auch in der Oberflächenstruktur homogen. Die Wechselwirkung zwischen den auf der Partikeloberfläche befindlichen Amingruppen und der Goldoberfläche besteht aus vielen einzelnen, schwachen Wechselwirkungen und kann daher als gutes Modell für eine multivalente Wechselwirkung dienen. Zusätzlich führt die positive Oberflächenladung der Teilchen zu einer elektrostatischen Abstoßung der Nanopartikel untereinander, die einer Aggregation^[15] sowohl in der Lösung als auch auf der Oberfläche entgegenwirkt.

Bei der Untersuchung solcher Systeme stellt sich die Frage der idealen Analysemethode. In der Literatur lassen sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden finden, mit denen verschiedene Aspekte multivalenter Wechselwirkungen untersucht werden können. Für

das vorliegende Modellsystem gibt es in der Literatur jedoch noch keine idealen Analysemöglichkeiten. Eine Methode, die bereits für die Analyse der Adsorption von Nanopartikeln ähnlicher Systeme verwendet wurde, ist die Schwingquarzmikrowaage mit Dissipationsaufzeichnung (QCM-D).^[16,17] Inwieweit die QCM-D auch für das vorliegende System eine geeignete Analysemethode sein kann, soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. Mit der QCM-D ist es möglich, die Änderung der Resonanzfrequenz eines Quarzplättchens zu messen. Die Resonanzfrequenz verändert sich, wenn sich Masse auf dem Schwingquarz anlagert und wird in Form einer Frequenzdifferenz Δf angegeben. Gleichzeitig wird die Dissipation ΔD , also die bei der Schwingung verlorene Energie, gemessen.^[16] Die Messung einer QCM-D erfolgt in der Regel *in-situ*, also während einer Anlagerung. Auf diese Weise kann beispielsweise die Adsorption der Nanopartikel, die in einer Flusszelle aus einer Suspension in reinem Ethanol an die Goldoberfläche eines Schwingquarzes angelagert werden, als Funktion der Zeit bestimmt werden.^[17] Um die Anlagerung der Nanopartikel quantitativ zu verfolgen, muss die Masse Δm der angelagerten Nanopartikel aus der Frequenzdifferenz Δf bestimmt werden. Der dafür benötigte Zusammenhang zwischen Δf und Δm ist für verschiedene Systeme unterschiedlich komplex. Bei Schichten aus Nanopartikeln ist die Bestimmung von Δm aus Δf nicht trivial.^[16]

Um das Verhalten der QCM-D für die Adsorption diskreter Objekte besser zu verstehen, wurden heuristische Herangehensweisen entwickelt,^[18-21] die das Verhalten von Δf und ΔD bei der Adsorption von diskreten Objekten in Experimenten beschreiben können.^[19,22] Diese Herangehensweisen beruhen auf experimentellen Beobachtungen und sind nicht direkt durch physikalische Theorien gedeckt.^[16,22] Da diese experimentellen Beobachtungen an komplexen Systemen gemacht wurden, ist unklar, ob die daraus abgeleiteten Gesetzmäßigkeiten nur zufällig für die beobachteten Systeme gelten oder auch auf ähnliche Systeme mit beispielsweise sich abstoßenden Partikeln angewendet werden können.

Um den Zusammenhang zwischen Δf und Δm sicher zu bestimmen, muss Δm mit einer alternativen Analysemethode gemessen werden.^[16] Eine geeignete komplementäre Analysemethode für das in dieser Arbeit betrachtete System ist das Rasterelektronenmikroskop (REM).^[23,24] Durch das Zählen der Partikel in den REM-Bildern ist bei bekannter Größe und Dichte der Partikel die Masse der Partikel zugänglich. Die Analyse mit dem REM kann im Gegensatz zur QCM-D nur *ex-situ*, also mit getrockneter Oberfläche, erfolgen. Um den

Zusammenhang zwischen Δf und Δm zu erhalten, müssen Messungen mit verschiedenen Partikelbedeckungen analysiert werden. Nach der Trocknung kann die jeweilige Partikelanordnung mit dem REM analysiert werden und ein Δm bestimmt werden.

Die Anordnung der Partikel kann einen Einfluss auf Δf haben.^[19] Aus diesem Grund ist eine bildgebende Methode wie das REM erforderlich, um den Zusammenhang von Δf und Δm zu analysieren. Für die Analyse der Partikelanordnung ist es wichtig, dass die Partikel beim Trocknen nicht aggregieren und auf den REM-Bildern die gleiche Partikelanordnung analysiert werden kann, die zum Zeitpunkt der QCM-D-Messung auf der Oberfläche war. Die Verknüpfung beider Methoden ermöglicht es, auf diese Weise den Prozess der Partikelanlagerung zu analysieren. Unter der Annahme, dass die Partikel auf der Oberfläche in einem lateralen Gleichgewicht stehen, kann durch die Anordnung der Partikel, die in den REM-Bildern sichtbar ist, mit Hilfe statistischer Methoden das Paarpotential^[25] der Partikel untersucht werden.

Erste QCM-Messungen mit sich abstoßenden Partikeln wurden bereits 1988 von Nordin *et al.*^[26] durchgeführt. Bis heute wurden keine Messungen sich abstoßender Partikel mit verschiedenen Obertönen und Dissipationsaufzeichnung publiziert. Auch der Zusammenhang von Δf und Δm wurde bisher nicht durch Messungen an sich abstoßenden Partikeln untersucht. Untersuchungen der Dissipation ΔD und mehreren Obertönen wurden bisher nur an Partikelsystemen durchgeführt, die sich nicht abstoßen, sondern zufällig anordnen.^[21,22,27] In der vorliegenden Arbeit soll nun das Verhalten der QCM-D mit einem System aus sich abstoßenden Partikeln untersucht werden. Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchung stehen dabei sowohl die multivalente Wechselwirkung der Partikel mit der Oberfläche, als auch die Methodenentwicklung wie das Prüfen der entwickelten Auswerteverfahren der QCM-D-Daten und die Analyse der Bildung der Oberflächenstruktur mit statistischen Mitteln.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Multivalenz

Multivalenz ist ein in der Biologie und Biochemie relevantes Prinzip.^[1,2] Ein einfaches Beispiel dafür ist die Klette, die sich mit einer Vielzahl von einzelnen kleinen Haken an einem anderen Objekt festhalten kann.^[4] Dabei repräsentiert jeder einzelne Haken eine schwache Bindung, die individuell nicht in der Lage wäre, die ganze Klette zu halten. Erst durch die Vielzahl der Haken ist die Bindungsenergie groß genug, um die Klette festzuhalten. Die Multivalenz der Bindung hat aber neben einer Erhöhung der Bindungsenergie auch wichtige Auswirkungen auf die dynamischen Eigenschaften des Systems. So lässt sich die Klette relativ leicht ablösen, wenn die Haken sukzessive getrennt werden. Im Gegensatz dazu erfordert das gleichzeitige Ablösen aller Haken, sprich ein schnelles Ablösen des Objekts, eine große Kraft. In der Natur sind multivalente Wechselwirkungen ein gängiges Prinzip. Hier sei exemplarisch das Andocken von Viren an Zellen genannt.^[1] Der Virus bindet mit mehreren seiner Liganden an eine Reihe von Rezeptoren der Zelle. Dabei ist wieder jede einzelne Bindung schwach, die Summe aller Einzelbindungen jedoch stark genug, dass der Virus fest an die Zelle bindet.^[1]

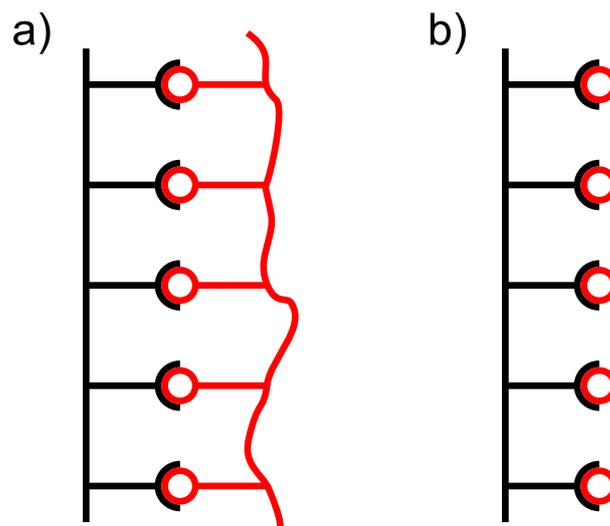


Abbildung 2.1: a) Multivalenter Ligand (rot) und b) monovalente Liganden (rot), gebunden an einen multivalenten Rezeptor (schwarz). In Anlehnung an Fasting *et al.*^[4].

Bei einer multivalenten Bindung sind, wie in Abb. 2.1a) dargestellt, die einzelnen Liganden (rot) durch ein Grundgerüst miteinander verbunden. Abbildung 2.1b) zeigt im Gegensatz dazu eine monovalente Bindung, bei der die einzelnen Liganden (rot) unabhängig voneinander an den multivalenten Rezeptor (schwarz) binden. Sind wie in Abb. 2.1a) Rezeptor und Ligand multivalent, wird auch die Bindung als multivalent bezeichnet. Haben Ligand und Rezeptor die gleiche Anzahl an Bindungsstellen, so spricht man von einer homomultivalenten Bindung. Bei einer unterschiedlichen Anzahl an Bindungsstellen liegt eine heteromultivalente Bindung vor.^[4] Die Bindungen in Abb. 2.1b) der multivalenten Rezeptoren mit monovalenten Liganden sind monovalent.^[1,4]

Mit multivalenten Bindungen sind nicht Bindungen im chemischen Sinne, sondern verschiedene Arten von Wechselwirkungen wie beispielsweise elektrostatische oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen und auch Kombinationen aus diesen gemeint. Diese Wechselwirkungen werden in der Multivalenz als Bindungen bezeichnet. Multivalente Bindungen können aufgrund der hohen Anzahl von nicht unabhängigen Bindungsstellen relativ komplex sein und es gibt mehrere Effekte auf molekularer Ebene, die bei einer multivalenten Bindung berücksichtigt werden müssen. Die Komplexität entsteht dabei auf molekularer Ebene durch die komplexe Dynamik der vielen Bindungspartnern.

Im Allgemeinen unterscheidet man reversible und irreversible Bindungen, wobei die Klassifizierung einer Spezifizierung bezüglich der Zeitskala bedarf, auf der die Bindung wieder gelöst wird bzw. stabil sein soll. Die künstliche Herstellung multivalenter Bindungsarchitekturen, die eine vorgegebene Stabilität aufweisen soll, gestaltet sich als schwierig, da eine Vielzahl voneinander abhängiger Parameter genau justiert werden müssen. Das Lösen multivalenter Bindungen geschieht mit einer relativ langsamen Rate, da viele Einzelbindungen gleichzeitig gebrochen werden müssen, sodass die kumulative Wahrscheinlichkeit für ein solches Ereignis relativ gering ist.^[4] Die Energieverteilung der Partikel gehorcht einer Boltzmannverteilung und ist damit von der thermischen Energie kT abhängig. Mit steigender Temperatur steigt auch die Population energetisch höherer Zustände an, was das Lösen von Bindungen ermöglicht.

Bei Temperatur-programmierten Desorptions (TPD)- Experimenten wird eine Dissoziation in Abhängigkeit von einer steigenden Temperatur untersucht.^[28] Bei einem einfachen aktivierten Prozess dissoziieren die untersuchten Moleküle ab einer bestimmten Tempera-

tur T sehr schnell von der untersuchten Oberfläche, da die Desorptionsrate exponentiell von T abhängt und kleine Änderungen in T somit zu großen Änderungen der Rate führen. Der Temperaturbereich, der zwischen irreversibel gebunden und komplett dissoziiert liegt, kann folglich für kleine Moleküle, die ins Vakuum dissoziieren, sehr schmal sein. Da multivalente biologische Objekte durch die höhere Anzahl an Bindungen^[4] meist eine komplexere Topologie der Energiehyperfläche besitzen, ist der Temperaturbereich etwas breiter. Dennoch ist das Justieren von Residenzzeiten reversibler multivalenter Bindungen sehr schwierig und erfordert eine sehr genaue Abstimmung der Energetik. Auch eine feine Anpassung der entropischen Beiträge, sprich den Konfigurationsraum der zugänglichen Mikrozustände, der durch die Anzahl der Bindungsstellen, deren relative Anordnung aber auch die Dynamik des Systems bestimmt wird, ist notwendig. Während in der Natur solche reversiblen multivalenten Systeme über einen sehr langen Zeitraum entstanden sind, ist das Design im Labor mit sehr viel Aufwand verbunden.

Neben reversibel gebundenen multivalenten Systemen gibt es in der Natur auch viele multivalente Systeme, die bei physiologischen Temperaturen irreversibel binden. Ein Beispiel dafür sind Leukozyten, die im Falle einer vorliegenden Entzündung aus dem Blut an Endothelzellen binden.^[1] Da die multivalente Bindung zwischen Leukozyten und Endothelzellen so stark ist, dass die Leukozyten nicht mehr desorbieren, können die zugehörigen Bindungsmotive auf den Endothelzellen nicht ständig präsentiert werden. Aus diesem Grund gibt es einen Schalter, der die Bindung im Normalfall verhindert, jedoch bei einer Entzündung gezielt ermöglicht. Dieses Prinzip funktioniert so, dass die Bindungsstellen bei einer Entzündung auf die Zelloberfläche gebracht werden. Dadurch binden die Leukozyten an die Bindungsstellen auf den Zellen und können sich in diesem speziellen Fall lateral auf ihnen bewegen.^[1,4]

Als weiteres Beispiel für irreversible Bindungen sind Antikörper zu nennen. Diese haben mehrere identische Bindungsstellen und sollen möglichst fest an ihrem Ziel binden.^[1] Auch der Sonderforschungsbereich (SFB) 765, der sich mit der Erforschung neuer multivalenter Architekturen, Funktionen und Anwendungen befasst und in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit verfasst wurde, ist an der Herstellung von irreversibel an Viren oder Leukozyten bindenden multivalenten Wirkstoffen interessiert.^[4]

Wie bereits erwähnt, müssen bei der Betrachtung multivalenter Wechselwirkungen verschiedene Effekte wie die Rückbindung,^[29,30] der Symmetrieeffekt^[31] sowie die Kooperativität^[32,33] berücksichtigt werden. Der mikroskopische Effekt der Rückbindung beschreibt einen Prozess, bei dem getrennte Einzelbindungen aufgrund ihrer räumlichen Nähe in kurzer Zeit wieder eine Bindung mit der ursprünglichen oder einer anderen in räumlicher Nähe befindlichen Bindungsstelle eingehen. Das Lösen multivalenter Bindungen ist möglich, indem die einzelnen Bindungen in mehreren Schritten gelöst werden. Durch die Rückbindung kann jedoch das Lösen der einzelnen Bindungen in jedem Schritt rückgängig gemacht werden. Dadurch verlangsamt sich der Prozess des Ablösens.^[29,30] Der Einfluss der Rückbindung auf die Geschwindigkeit des Ablösens hängt unter anderem davon ab, wie schnell das gelöste multivalente Objekt in die Lösung diffundieren kann und abtransportiert wird. Da die Geschwindigkeit, mit der die Objekte in die Lösung diffundieren können und nicht ausschließlich die Konzentration der Objekte in Lösung die Anzahl der auf einer Oberfläche gebundenen Objekte bestimmt, handelt es sich bei der Rückbindung um einen Nicht-Gleichgewichts-Effekt. Die Komplexität der Rückbindung steigt mit steigender Komplexität der Bindungspartner, da sich die Bindungsstellen an einem Grundgerüst befinden und es mit einem komplexeren Grundgerüst mehr Freiheitsgrade in der Bewegung gibt.^[4]

Ein weiterer Effekt ist der Symmetrieeffekt, der gleichermaßen für mono- und multivalente Bindungen gilt. Durch diesen Effekt ist die Bindung von mono- oder multivalenten Liganden an multivalente Rezeptoren begünstigt, da die Wahrscheinlichkeit, zufällig auf eine Bindungsstelle zu treffen, mit steigender Anzahl gleicher Bindungsstellen steigt. Möchte man die multivalenten Wechselwirkungen quantifizieren, so muss der Symmetrieeffekt berücksichtigt werden, da er nicht auf die Multivalenz zurückzuführen ist.^[31]

Die Quantifizierung multivalenter Bindungen kann unter anderem an Oberflächen erfolgen. Oberflächen besitzen sehr viele Bindungsplätze. So führt beispielsweise der Kontakt von Proteinlösungen mit Goldoberflächen zum unspezifischen Binden der Proteine an die Oberfläche. Dabei denaturieren die Proteine, was häufig nicht erwünscht ist. Um unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern, können die Oberflächen mit speziellen Polymeren wie Cyclodextran oder dendritischem Polyglycerol beschichtet werden. Das führt dazu, dass die Proteine nur kurz und schwach mit der Oberfläche wechselwirken und nicht de-

naturieren. Durch diese Eigenschaft nennt man diese Art von Beschichtungen proteinresistent. Diese Beschichtungen können oft mit speziell designten Liganden funktionalisiert werden, die Rezeptoren tragen, an die die untersuchten Proteine auf einer beobachtbaren Zeitskala binden. Durch eine chemische Strukturierung der Oberfläche können gezielt bestimmte Bereiche mit Rezeptoren versehen werden. Je nach Größenbereich ist der Abstand der Rezeptoren auf der Oberfläche mit unterschiedlichem Aufwand steuerbar. Kleinere Abstände im nm-Bereich können beispielsweise mit Block-Copolymeren und größere Abstände durch optische Lithographie so gesteuert werden, dass sehr geordnete Oberflächen entstehen.^[4,34,35]

Multivalente Wechselwirkungen können sowohl auf Oberflächen als auch mit Modellsystemen analysiert werden. Als ein mögliches Beispiel für ein Modellsystem seien hier Nanopartikel genannt, die auf ihrer Oberfläche Aminfunktionen besitzen. Diese können auch mit einer unfunctionalisierten Goldoberfläche schwache Wechselwirkungen ausbilden. Die Dynamik des Systems, also das Binden, Ablösen und Bewegen der einzelnen Bindungspartner im mikroskopischen Bereich, lässt sich nur schwer messen. Oft werden daher die Auswirkungen der Dynamik auf makroskopische Größen des Systems gemessen. Typische kinetische Observablen sind die Geschwindigkeitskonstanten für Bindung k_{on} und Dissoziation k_{off} . Thermodynamische Observablen sind beispielsweise die Bindungsenthalpie ΔH und die freie Enthalpie ΔG .^[4]

Ein bereits genannter Effekt, der bei multivalenten Bindungen auftritt und über Unterschiede in ΔG quantifiziert wird, ist die Kooperativität. Kooperativität existiert generell dann, wenn sich ein System mit mehreren Wechselwirkungen von dem Verhalten unterscheidet, das aus den Eigenschaften der isolierten Einzelwechselwirkungen zu erwarten wäre.^[33] In der Praxis wird für die Quantifizierung der Kooperativität zunächst die Stärke der isolierten Einzelwechselwirkung bestimmt. Auf Basis der gewonnenen Daten wird ein Modell für ein nicht kooperatives System mit mehreren Wechselwirkungen erstellt, bei dem beispielsweise auch die Symmetrie der verwendeten Moleküle berücksichtigt wird. Im dritten Schritt wird die tatsächliche Wechselwirkung der multivalenten Objekte gemessen und mit den Erwartungen aus dem Modell verglichen. Ist die freie Bindungsenthalpie der multivalenten Bindung größer als die Summe der freien Bindungsenthalpien der Einzelbindungen, so bezeichnet man die Kooperativität als positiv.^[32] Bei der negativen Ko-

operativität ist die Bindung hingegen schwächer als die Summe der Einzelbindungen. Je nach Größe der negativen Kooperativität ist es möglich, dass die Stärke der Einzelbindungen nur teilweise geschwächt ist und die multivalente Bindung in Summe stärker ist als eine einfache Bindung. So kann es sinnvoll sein, multivalente Wirkstoffe mit negativer Kooperativität einzusetzen, die aufgrund der höheren Anzahl an Bindungsstellen stärker und mit einer höheren Spezifität an den Zielrezeptor binden als monovalente Analoga, sodass wesentlich geringere Dosen des multivalenten Wirkstoffs verabreicht werden können.^[4]

In einem Modell^[1] wird davon ausgegangen, dass sich ein bei einer vorliegenden Kooperativität beobachteter Unterschied in ΔG nicht durch eine Änderung in ΔH ergibt und damit $\Delta H_{\text{mono}} = \Delta H_{\text{multi}}$ gilt. Damit liegt die Änderung von ΔG ausschließlich an einer Entropieänderung ΔS , die beispielsweise durch die Geometrie der Bindungspartner und die Festigkeit des Molekülgerüsts verändert wird. Es gibt inzwischen jedoch auch Studien, die zeigen, dass ΔH durch Wechselwirkungen der Gerüststruktur zwischen zwei multivalenten Objekten oder einer nicht ganz passenden räumlichen Anordnung der Bindungsstellen beeinflusst werden kann.^[4]

Für die Quantifizierung der Kooperativität ist die Kenntnis der genauen Anzahl an Bindungsstellen notwendig. Aus diesem Grund wird die Stärke der Kooperativität oft an speziell dafür designten multivalenten Systemen bestimmt. Eine definierte und geringe Anzahl an Bindungsstellen sowie definierte Abstände zwischen den Bindungsstellen sind beispielsweise bei Molekülen zu finden. Zudem können Moleküle und gezielt einzelne Fragmente der Moleküle speziell designt werden. Da bei einer geringen Anzahl an Bindungsstellen weniger Kombinationsmöglichkeiten der Bindungsstellen existieren, können mit Molekülen im Vergleich zu größeren Objekten die kinetischen und thermodynamischen Größen einfacher bestimmt werden. Da die Zahl der Bindungsstellen in biologischen Systemen oft nicht bekannt ist, ist die Bestimmung der Kooperativität in solchen Fällen nicht möglich.

Die Bindungsenthalpie ΔH lässt sich bei multivalenten Systemen über kalorimetrische Messungen bestimmen. Dabei ist sicherzustellen, dass die gemessene Wärme ΔQ zu dem Gleichgewichtszustand gehört, der untersucht werden sollte. Aus dem ΔQ kann folgend ein ΔH erhalten werden. Bei Wirt-Gast-Systemen mit wenigen Bindungsstellen können unter definierten Bedingungen beispielsweise von Adamantan und Cyclodextran mittels iso-

thermer Titrationskalorimetrie (ITC) die effektive Molarität der Reaktion und neben ΔH weitere Thermodynamische Größen wie die Gleichgewichtskonstante K , die Entropie ΔS und damit auch die freie Enthalpie ΔG bestimmt werden.^[36]

Neben thermodynamischen Größen sind auch kinetische Größen wie Geschwindigkeitskonstanten k für die Beschreibung eines multivalenten Systems von Interesse. Ein Ausdruck für die Temperaturabhängigkeit von Geschwindigkeitskonstanten ist die Arrhenius-Gleichung:^[37]

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} . \quad (2.1)$$

Sie verbindet die Geschwindigkeitskonstante k mit der Aktivierungsenergie E_A und der Temperatur T . Hierbei sind R die Gaskonstante und A ein Frequenzfaktor, der die Stoßrate und die Entropie beinhaltet. Steigt die Größe der betrachteten Moleküle, so sinkt die im Frequenzfaktor enthaltene Frequenz und A wird kleiner. Damit ist im Gegensatz zu kleineren Molekülen bei größeren Objekten bei gleicher Temperatur eine geringere Aktivierungsenergie notwendig, um die gleiche Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten. Ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit von Objekten, die an eine im Ausgangszustand leere Oberfläche binden, hin zu einem Gleichgewichtszustand, ist die Geschwindigkeitskonstante k_{on} . Sie kann beispielsweise durch eine *in-situ* Messung der Bindung multivalenter Objekte an eine Oberfläche gemessen werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Dissoziation k_{off} kann *in-situ* durch die Dissoziation der multivalenten Objekte gemessen werden. Im Spezialfall einer unimolekularen Reaktion kann daraus die Gleichgewichtskonstante K_d bestimmt werden, die eine thermodynamische Größe ist.

Bei der Auswertung der beschriebenen Messungen gilt es so gut wie möglich zwischen Kinetik und Thermodynamik zu unterscheiden. Für die Kinetik ist ausschlaggebend, wie hoch die Barriere zum Brechen der Bindung ist und wie gut die Rückbindung funktioniert. Die Thermodynamik enthält hingegen die Energetik der Bindung und die Entropie, die sich aus statistischen Effekten ergibt und ebenfalls mit der Rückbindung verknüpft ist.^[4]

2.2 Nanopartikel

Nanopartikel werden bereits seit mehreren tausend Jahren verwendet. Schon die Römer setzten nanometergroße Partikel zum Beispiel zum Färben von Gläsern ein. In den letzten Jahrzehnten hat sich die Nanotechnologie nicht zuletzt durch die Entwicklung von Herstellungs- aber vor allem auch von geeigneten Analysemethoden zu einem enorm wichtigen und schnell wachsenden Feld entwickelt. Aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten setzen sich viele unterschiedliche wissenschaftliche Disziplinen mit Nanopartikeln auseinander. Der Durchmesser von Nanopartikeln liegt in der Größenordnung von 1 nm bis 100 nm.

Für die Herstellung von Partikeln dieses Größenbereichs gibt es im Wesentlichen zwei Methoden: die *Top-down*- und die *Bottom-up*-Methode. Bei der *Top-down*-Methode wird das Material mit physischen, mechanochemischen, elektrischen oder thermalen Verfahren in seiner Größe reduziert. Häufig eingesetzte Verfahren sind hierbei das Mahlen, mechanochemische Methoden, Elektroexplosion, Laserablation oder Sputtern.^[38] Bei der *Bottom-up*-Methode werden die Nanopartikel in chemischen Prozessen aus Atomen oder Molekülen erzeugt. Dabei werden Prozesse, wie Kristallisation, Ausfällung und Sol-Gel-Prozesse, die zunächst mit einer homogenen Lösung beginnen, aber auch Prozesse, die nicht in Lösung funktionieren wie beispielsweise CVD (*chemical vapor deposition*) und *Self-assembly*, sowie Kombinationen dieser Techniken eingesetzt.^[38] Nanopartikel besitzen dieselbe chemische Zusammensetzung wie Festkörper, können aber aufgrund ihrer Größe im Vergleich zu makroskopischen Festkörpern verschiedene Eigenschaften aufweisen.^[38] Eine Vorstellung über die Veränderung der Eigenschaften von Nanopartikeln kann am Beispiel eines Kristalls entwickelt werden, der aus wenigen Atomen besteht. Dieser Kristall hat im Vergleich zum Festkörper eine sehr große spezifische Oberfläche. So könnte beispielsweise eine vorhandene Reaktivität stark erhöht sein oder der Schmelzpunkt bei niedrigeren Temperaturen liegen. Der Kristall wird jedoch nicht die Eigenschaften eines einzelnen Atoms besitzen.^[39]

Durch die geringe Größe von Nanopartikeln können mechanische, physikalische, chemische, elektronische, optische und magnetische Eigenschaften verändert sein. Ein markantes Beispiel für veränderte Eigenschaften ist bei Nanopartikeln aus Halbleitermaterialien, den

sogenannten Quantendots, zu finden. Aufgrund der Größe im nm-Bereich treten Quanteneffekte auf, die die elektronischen Eigenschaften verändern. Aus diesem Grund muss bei der Betrachtung der elektronischen Eigenschaften von Nanopartikeln die Quantenmechanik miteinbezogen werden. Dazu wird an einem Beispiel zunächst $\text{Mn}_2\text{P}_2^{2-}$ betrachtet. Bei einzelnen Atomen existieren s-, p- und d-Orbitale mit diskreten Energieniveaus, in denen die Elektronen lokalisiert sind (Abb. 2.2a)). Verbinden sich die Atome zu Molekülen, lässt sich die elektronische Struktur mit Hilfe der Molekülorbitaltheorie beschreiben (Abb. 2.2b)). Der Übergang von einem kleinen Molekül aus einem ausgedehnten Festkörper führt zur Ausdehnung von Bändern, deren energetische Breite vom Überlapp der Wellenfunktionen der Atomorbitale abhängt und die man entsprechend der Anzahl von Knoten der Wellenfunktion klassifizieren kann (Abb. 2.2c)). Für einen unendlich ausgedehnten Festkörper sind die entsprechenden Zustände unendlich dicht. Für einen Nanopartikel mit nur relativ wenigen Atomen bleiben die elektronischen Zustände diskret.

Die elektronischen Eigenschaften von Nanopartikeln liegen daher zwischen denen von Molekülen und Festkörpern. Insbesondere ist der Abstand zwischen den Zuständen kleiner als bei Molekülen aber größer als bei ausgedehnten Festkörpern.^[39] Die Entstehung diskreter Energieniveaus kann auch von der Seite der Materialien wie Metallen oder Halbleitern betrachtet werden, in denen sich die Elektronen wie ein Gas frei bewegen können. Werden die Materialien räumlich im Bereich einiger nm begrenzt, befinden sich die Elektronen in einem sehr kleinen Volumen, das sie nicht verlassen können und somit von einem Potential umgeben sind, das maximal der Austrittsarbeit des Materials entspricht. Ein solches System kann man vereinfachend durch das Modell des Teilchens im Kasten beschreiben, dessen Energieniveaus mit $1/L^2$ von der Länge L des Kastens abhängen. So zeigen CdSe Quantendots mit einem Durchmesser von 2.3 nm eine Emission grünen Lichts, während Partikel mit einem Durchmesser von 4.6 nm rotes Licht emittieren. Nanopartikel der Münzmetalle, insbesondere Silber und Gold, zeichnen sich durch sogenannte Plasmonen – kollektive Anregungen der Leitungsbandelektronen – aus, die im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums liegen und diesen Teilchen ihre charakteristische Farbe verleihen.^[39]

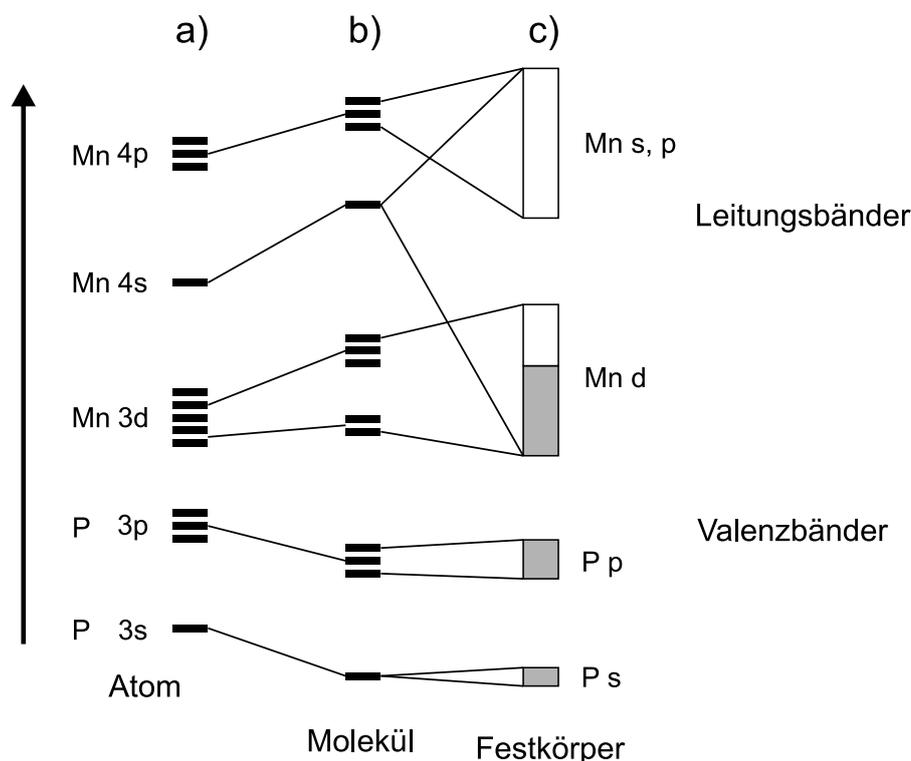


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der c) Bandstruktur von $\text{Mn}_2\text{P}_2^{2-}$, die in einem Modell durch das gedachte Deaktivieren von Bindungen eines Festkörpers aus den Energieniveaus der a) einzelnen Atome und der b) Molekülorbitale hergeleitet wurde. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Hoffmann *et al.*^[40] Copyright 1987 WILEY-VCH.

Nanopartikel können auch dazu genutzt werden, um die Grenzflächen von Festkörpern zu funktionalisieren. So kann beispielsweise die Biokompatibilität von Oberflächen erhöht werden, die Abriebfestigkeit gesteigert oder eine höhere katalytische Aktivität erzielt werden, in dem geeignete Nanopartikel an Festkörperoberflächen adsorbiert werden.^[38] Die zentrale Herausforderung besteht darin, Nanopartikel mit bestimmten Eigenschaften zu erzeugen. Dies erfordert Erkenntnisse über die Abhängigkeit der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Partikel von den Präparationsbedingungen. Zu einem direkten rationalen Design ist man aufgrund der komplexen Abhängigkeiten in vielen Fällen immer noch nicht gelangt. Daneben treten weitergehende Fragestellungen, wie beispielsweise die Konsequenzen dieser Materialien für die Umwelt und der Gesundheit von Menschen zunehmend in den Vordergrund und sind Gegenstand intensiver Forschungstätigkeit.^[41–43]

2.3 QCM-D

Die Schwingquarzwage (QCM) ist eine analytische Technik, bei der die Adsorption eines Stoffes über die Verstimmung eines mechanischen Resonators bestimmt wird. Im Speziellen wird der Massenzuwachs durch Resonanzfrequenzänderung eines piezoelektrischen Quarzkristalls detektiert, der durch geeignete Wechselspannung zum Schwingen angeregt wird. Da die Frequenz, die zur resonanten Anregung des Kristalls benötigt wird, sehr genau gemessen werden kann, lassen sich mit solch einer Anordnung Massenänderungen im ng-Bereich nachweisen.^[16]

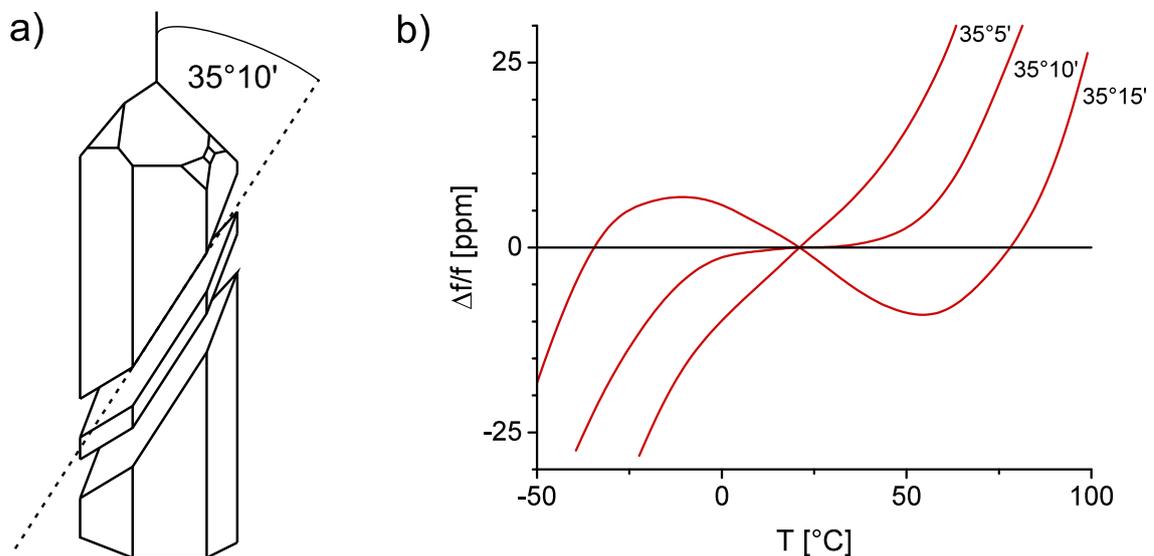


Abbildung 2.3: a) Zeichnung eines Quarzkristalls, aus dem im Winkel von $35^\circ 10'$ zur optischen Achse des Kristalls ein Quarzplättchen herausgeschnitten wird (AT-Schnitt). b) Temperaturveränderung der Resonanzfrequenz eines im AT-Schnitt geschnittenen Schwingquarzes. Die Kurven stellen den idealen Schnittwinkel sowie leichte Abweichungen von $5'$ zu diesem Winkel dar. Nachdruck von a) mit freundlicher Genehmigung von Janshoff *et al.*^[17] Copyright 2000 WILEY-VCH. Abbildung b) in Anlehnung an Sauerbrey *et al.*^[44]

Praktisch werden Quarzplättchen einer bestimmten Orientierung, dem sogenannten AT-Schnitt (Abb. 2.3a)) verwendet, da ein solch geschnittener Kristall eine geringe Temperaturabhängigkeit der Resonanzfrequenz aufweist. In Abb. 2.3b) ist die Veränderung der Resonanzfrequenz $\Delta f/f$ in ppm gegen die Temperatur für drei verschiedene Schnittwinkel aufgetragen. Selbst kleine Abweichungen vom idealen Winkel von $35^\circ 10'$ führen demnach dazu, dass die Breite der Resonanzfrequenzverteilung in einem typischen von $0 - 50^\circ\text{C}$

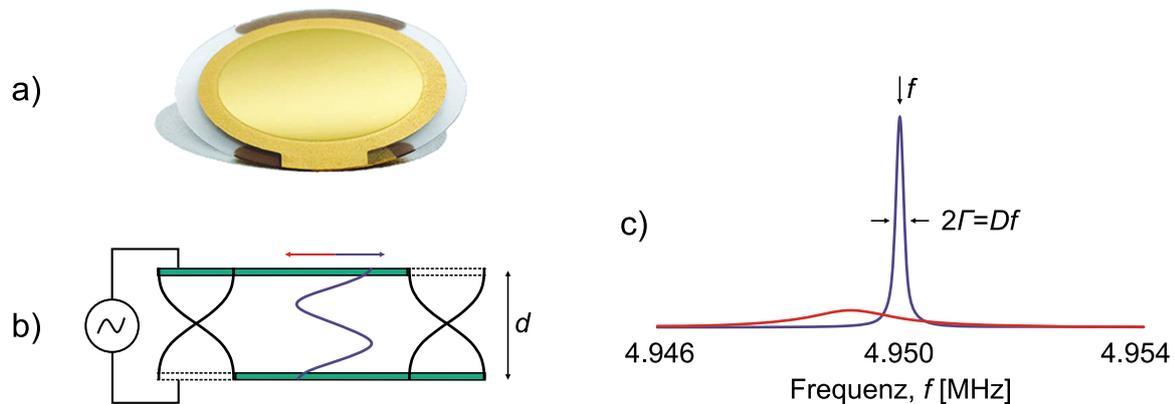


Abbildung 2.4: a) Oberseite eines mit Gold beschichteten Schwingquarzes der Firma Biolin Scientific. b) Schema der Schwingung des Schwingquarzes. Das Plättchen ist an einen Wechselstrom angeschlossen, wodurch es in Schwingungen versetzt wird. Die Schwingungsmoden der Grundschwingung und des 3. Obertons sind in schwarz und in blau eingezeichnet. c) Frequenzspektrum eines Schwingquarzes aus einer Impedanzanalyse in Luft (blau) und mit einer Seite in Wasser (rot). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Reviakine *et al.*^[16] Copyright 2011 American Chemical Society.

deutlich größer als die der ideal zu erhaltenen Breite von 19 Hz (bei einer Resonanzfrequenz von 4.95 MHz) wird.^[17]

Auf das Quarzplättchen sind Goldelektroden auf der Ober- sowie der Unterseite aufgedampft (Abb. 2.6a)). Durch Anlegen einer geeigneten Wechselspannung wird das Quarzplättchen in der Schwingquarzwaage resonant zum Schwingen gebracht (Abb. 2.4b). Die angeregte Schwingung ist eine sogenannte Schermode, bei der sich die beiden Oberflächen des Plättchens parallel zueinander verschieben. Diese Art der Schwingung wird Scherschwingung genannt.^[17] Die Scherschwingung hat den Vorteil, dass diese keine Schallwellen erzeugt und daher keine Energiedissipation durch akustische Kopplung mit der Umgebung stattfindet, was zu einer hohen Güte Q des Resonators beiträgt. Abbildung 2.4c zeigt eine Impedanzanalyse. Auf der y -Achse ist die Amplitude der Stromstärke, die der Kristall beim Schwingen aufnimmt, gegen die Anregungsfrequenz f aufgetragen. Dabei entspricht die Amplitude der Stromstärke der Amplitude der Scherschwingung des Schwingquarzes. Der Ausschlag zeigt die Resonanzfrequenz eines Schwingquarzes in Luft (blau) und mit einer Seite in Wasser (rot).^[16]

Wie aus Abb. 2.4b hervorgeht, hängt die Resonanzfrequenz des Plättchens von dessen Dicke ab. Ändert sich die Dicke des Plättchens durch Aufbringen einer zusätzlichen Masse,

so verändert sich die Resonanzfrequenz, woraus klar wird, warum man einen solchen Aufbau als Waage verwenden kann. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Resonanzfrequenz und der aufgetragenen Masse gilt nach Sauerbrey streng nur dann, wenn man das System aus Quarzkristall und aufgetragtem Material als elastisches Medium im Sinne der klassischen Mechanik betrachten kann.^[44] Ein typisches Beispiel ist eine Metallschicht auf der Quarzoberfläche. Für ein solches System ist die Änderung der Resonanzfrequenz Δf proportional zur Masse Δm der adsorbierten Schicht. Um diese Veränderung der Resonanzfrequenz für das Wiegen dünner Schichten zu quantifizieren, hat Sauerbrey 1959 folgende Gleichung entwickelt^[44]:

$$\Delta m = -C_{\text{QCM}} \frac{\Delta f_n}{n} . \quad (2.2)$$

Hierin bezeichnet Δm die Massenänderung auf der Oberfläche des Sensors, C_{QCM} die spezifische Massensensitivitätskonstante, Δf die gemessene Frequenzdifferenz und n die Ordnung der Schwingung. Die Sauerbrey-Gleichung gilt ausschließlich für elastische Schichten, die sehr wenig Energie dissipieren.^[44] Durch die hohe Sensitivität ist es beispielsweise für die Deposition von Metallen möglich, mit Hilfe der QCM-Bedeckungen deutlich unterhalb einer Monolage nachzuweisen.^[45]

Für ein ideal elastisches Medium führt die Adsorption lediglich zu einer Veränderung der Resonanzfrequenz, aber nicht zu einer Veränderung der Güte des Resonators. Für viele andere Adsorbate, die nicht als ideale elastische Körper angesehen werden können, gilt dies nicht. Dies führt einerseits dazu, dass der einfache Zusammenhang zwischen der adsorbierten Masse und der Veränderung der Resonanzfrequenz, wie ihn die Sauerbrey-Gleichung vorhersagt, nicht mehr gelten muss. Andererseits macht die Veränderung der Güte des Resonators durch die Adsorption Letztere zu einer interessanten zusätzlichen Messgröße. Die Dissipation kann durch mehrere Verfahren gemessen werden. Sie kann aus der Halbwertsbreite des Frequenzsignals der Resonanzfrequenz berechnet werden. Eine andere Methode ist das Auswerten der Amplitude bei einer abklingenden Schwingung, die in Abb. 2.5 dargestellt ist. Bei der sogenannten „ring-down“-Methode^[46] wird der Schwingquarz im Bereich von Mikrosekunden zum Schwingen angeregt. Anschließend klingt die Schwingung einige μs ab. Dabei erzeugt der Schwingquarz durch den piezoelektrischen

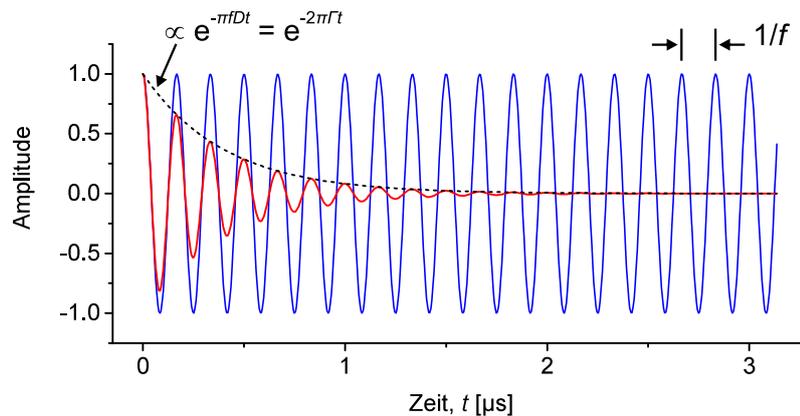


Abbildung 2.5: Abklingkurve eines Schwingquarzes in Luft (blau) und mit einer Seite in Wasser (rot). Nach Reviakine *et al.* [16,46].

Effekt eine Spannung, die gemessen werden kann. Aus der so entstehenden Abklingkurve (Abb. 2.5) werden Frequenz und Dissipation bestimmt. Die QCM mit Dissipationsaufzeichnung nach der „ring-down“-Methode wird auch als QCM-D bezeichnet. Neben der Grundschwingung können mit der QCM-D auch die Obertöne gemessen werden. Da der Schwingquarz elektrisch angeregt wird und dafür gegensätzliche Pole nötig sind, können nur Schwingungen angeregt werden, die eine gegensätzliche Auslenkung der Oberflächen haben. Dies sind die ungeraden Obertöne. In Abb. 2.4b) sind die Grundschwingung ($n=1$) und die Schwingung des 3. Obertons ($n=3$) eingezeichnet. [16]

Es gibt verschiedene Prozesse, durch die Energie dissipiert werden kann. Viskoelastische Eigenschaften eines Adsorbats ist eine Möglichkeit. Ein typisches Beispiel sind Polymerfilme, in denen die Ketten aufgrund der mechanischen Anregung gegeneinander verschoben werden, was in einem irreversiblen Energieverlust resultiert, der die Schwingung des Kristalls dämpft. Energie wird ebenfalls durch hydrodynamische Effekte dissipiert, die beispielsweise auftreten, wenn nanostrukturierte Schichten, wie sie durch die Adsorption von Nanopartikeln auf Oberflächen entstehen, durch den Schwingquarz durch ein Lösungsmittel bewegt werden. Das Lösemittel, das schwächer mit der Oberfläche wechselwirkt als die Partikel, muss in einem solchen Szenario um die Partikel herum fließen, was einer Bewegung in einem viskosen Medium entspricht und daher zu einer Dämpfung des Resonators führt.

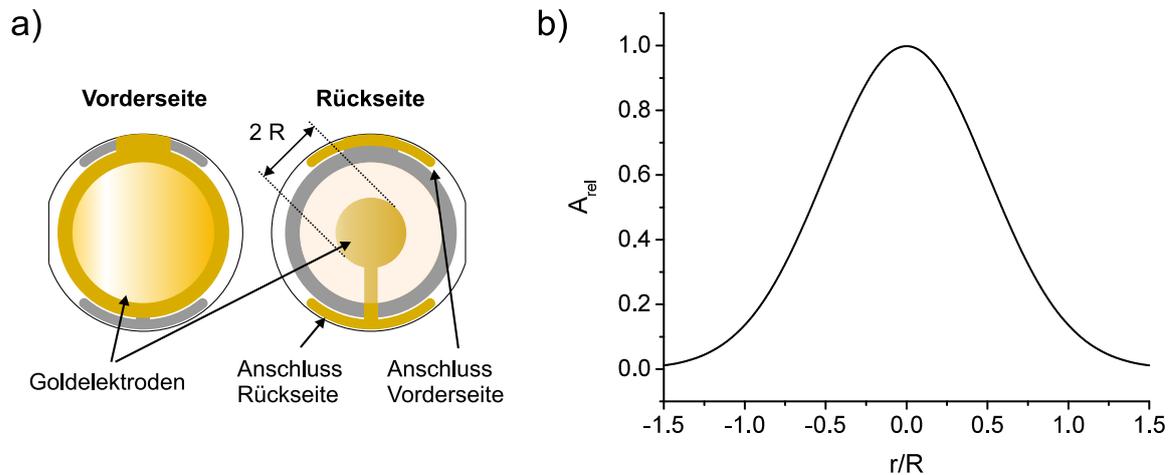


Abbildung 2.6: a) Schwingquarz aus einem durchsichtigen Quarzplättchen mit einem Durchmesser von 14 mm. Auf beiden Seiten sind Goldelektroden aufgedampft. Der spiegelnde Bereich in der Mitte ist glattpoliert, woran sich ein rauher Randbereich anschließt (dunkler dargestellt). Die Elektrode auf der Rückseite hat die Form eines Schlüsselbohrers. Um die Elektrode herum sieht man die Goldschicht der Frontelektrode von der Unterseite. Am Rand sind Goldkontakte aufgedampft. b) Relative Amplitude der Schwingung innerhalb des beidseitig bedampften Bereichs. R ist der Radius der Goldelektrode auf der Rückseite. Ist der Kristall auf einer Seite in Kontakt mit Lösungsmittel wie zum Beispiel Wasser, so kann die radiale Abhängigkeit der Amplitude mit einer Gauß-Funktion beschrieben werden. Für Schwingquarze in Luft findet man dem gegenüber eine Bessel-Funktion. Nachdruck von b) mit freundlicher Genehmigung von Janshoff *et al.*^[17] Copyright 2000 WILEY-VCH.

Ein Schwingquarz, der auf der Ober- und Unterseite mit einer Goldelektrode bedampft ist, kann so verwendet werden, dass sich die Oberseite (Abb. 2.6a)) in einer Lösung befindet. Aufgrund der starken Dämpfung der Schwingung durch die Lösung galt es lange Zeit als unmöglich, die Schwingung in Lösung aufrecht zu erhalten.^[47] In den 1940er Jahren wurden erste Versuche in Lösung durchgeführt^[48] und die QCM damit auch Bio-Applikationen zugänglich gemacht.^[17] Aktuell wird der Schwingquarz für Messungen in Lösung in einer Flusszelle zwischen zwei Gummiringen eingeklemmt. Auf diese Weise ist er als eine Wand der Flusszelle fixiert, so gelagert, dass er nicht brechen kann und so abgedichtet, dass das Lösemittel nicht aus der Flusszelle gelangen kann. Damit die Gummiringe keinen Einfluss auf die Messung nehmen, muss der Schwingquarz im äußeren Bereich unempfindlich gegenüber mechanischen Veränderungen sein. Eine spezielle Form der aufgedampften Elektroden beschränkt die Bewegung des Schwingquarzes auf einen kleinen Bereich in der Mitte, was zur Folge hat, dass eine Adsorption nur in diesem inne-

ren Bereich durch das Experiment erfasst wird. Dabei ist der Durchmesser der Elektrode auf der Rückseite kleiner und hat die Form eines Schlüssellochs (Abb. 2.6a). Diese Methode wird Energieeinfang^[17,49,50] genannt. Sie beruht darauf, dass der Schwingquarz im beidseitig bedampften Bereich etwas dicker ist und damit eine andere Resonanzfrequenz als im einseitig bedampften Bereich besitzt. Wird der Schwingquarz mit der Resonanzfrequenz des beidseitig bedampften Bereichs angeregt, so wird die Scherschwingung am Rand der Rückseitenelektrode fast vollständig reflektiert.^[17] Die relative Schwingungsamplitude ist in Abb. 2.6b) dargestellt. Sie lässt sich bei Sensoren, die sich mit der Vorderseite in Wasser befinden, mit einer Gaußkurve darstellen.^[17] In der Mitte ist die relative Schwingungsamplitude des Sensors maximal. Am Rand des beidseitig bedampften Bereichs ($|r/R| = 1$) ist sie bereits auf 10 % abgesunken.

Durch das Verwenden einer Flusszelle ist es möglich, mit der QCM-D verschiedene Arten von Systemen in Lösung zu untersuchen. Insbesondere ist die QCM-D nicht auf Goldoberflächen beschränkt, wie wohl Gold als primäres Elektrodenmaterial verwendet wird. Durch Aufbringen weiterer Materialien auf diese Elektrodenoberfläche können Messungen an vielen Oberflächenmaterialien vorgenommen werden, wobei verschiedenste Techniken, so auch das Aufkleben dünner Metallfilme, erfolgreich verwendet werden.^[51]

In manchen QCM-Systemen kann durch die Variation der Schwingungsamplitude die Mechanik des Kontakts der adsorbierten Objekte mit der Oberfläche bis hin zum Bindungsbruch bei sehr hohen Amplituden studiert werden.^[52,53] In dem in dieser Arbeit verwendeten QCM-D-System der Firma Biolin Scientific (Q-Sense) ist dies allerdings nicht vorgesehen. Im Hinblick auf eine Analyse der erhaltenen Messgrößen eines QCM-Experiments ist es sinnvoll, verschiedene Arten von dünnen Schichten zu unterscheiden (Abb. 2.7). Die adsorbierten Schichten können rigide sein. Das heißt, dass sie mechanisch gesehen elastisch sind (Abb. 2.7a), b)). Diese Systeme sind durch eine geringe Dissipation (ΔD) charakterisiert. Dem gegenüber gibt es Schichten, die merkliche Mengen Schwingungsenergie zum Beispiel durch viskoelastische Effekte dissipieren (Abb. 2.7c), d)). Neben der gerade angesprochenen Frage der mechanischen Eigenschaften der Schichten, spielt die Morphologie der Schichten für die Analyse der Daten eine große Rolle. So kann man die Systeme im einfachsten Fall als strukturell homogen (Abb. 2.7a), c)) oder inhomogen (Abb. 2.7b), d)) charakterisieren.^[16]

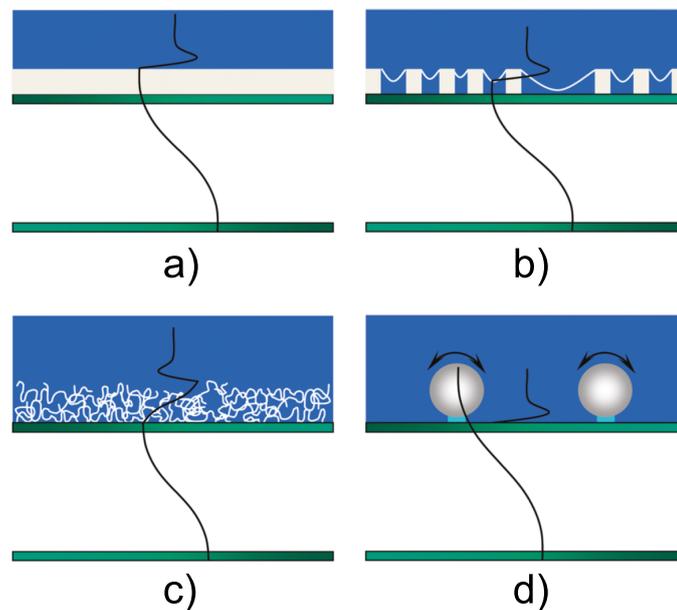


Abbildung 2.7: Verschiedene Schichten (beige) in Wasser (blau) auf einem QCM-Sensor (weiß) mit einer Grundschiwingung (schwarz). Die Goldelektroden sind in grün dargestellt. a) rigide Schicht b) Schicht aus kleinen diskreten Partikeln wie Viren, Detergenzmizellen oder Proteinen c) Polymerfilm d) diskrete Nanopartikel. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Reviakine *et al.*^[16] Copyright 2011 American Chemical Society.

Rigide, das heißt mechanisch gesehen elastische, homogene Schichten (Abb. 2.7a)) sind die einfachste Art, da sie aufgrund ihres Aufbaus nicht komplex sind. Die Dissipation ist bei diesen Systemen sehr gering und Δm kann direkt über die Sauerbrey-Gleichung (Gl. 2.2) bestimmt werden.^[44] Als empirischer Richtwert für die Anwendung der Sauerbrey-Gleichung gilt: $\Delta D_n / (-\Delta f_n / n) \ll 4 * 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$.^[16] Für strukturell inhomogene Schichten wird eingeschlossenes Lösemittel zur gemessenen Resonanzfrequenzänderung Δf beitragen. Wie groß dieser Beitrag ist, lässt sich ohne zusätzliche Bestimmung der adsorbierten Masse nur schwer abschätzen. Wird die Masse der adsorbierten Schicht mit einer alternativen Methode wie beispielsweise der Ellipsometrie, dem SPR (engl. *surface plasmon resonance*), dem AFM (engl. *atomic force microscopy*) oder dem REM bestimmt, kann in Kombination mit der QCM-D die Masse des eingeschlossenen Lösemittels bestimmt oder zumindest abgeschätzt werden.^[20,54] Zwei Eigenschaften der QCM-Methode seien an dieser Stelle noch einmal hervorgehoben. QCM ist eine Methode, die ohne die Einbringung von Markierungen auskommt und auch nicht auf spezielle Eigenschaften der Oberfläche (wie z. B.

die Plansmonenresonanz) angewiesen ist. Demnach erlaubt die Verwendung von Flusszellen die kontinuierliche Analyse der Veränderungen auf der Oberfläche während des Adsorptionsprozesses, sodass die Kinetik von Adsorption und Desorption beobachtet werden kann.^[54] Im Fall rigider Schichten ist die quantitative Auswertung der QCM-D-Messungen sehr simpel. Bei den übrigen Schichtarten erfordert die quantitative Bestimmung von Δm komplexere Herangehensweisen. Gerade für solche Systeme hat sich die Kombination der QCM mit anderen Techniken wie beispielsweise der Ellipsometrie bewährt.^[16,54,55] Bei homogenen Schichten mit einer deutlichen Dissipation ΔD , wie man sie beispielsweise bei Polymerfilmen findet (Abb. 2.7c)), misst die QCM-D die viskoelastischen Eigenschaften der Schicht. Die viskoelastischen Eigenschaften kann man mathematisch durch den komplexen Schubmodul G^* beschreiben.^[16]

Der Speichermodul G' steht für den elastischen Anteil und kann als Federkonstante gesehen werden. Der Verlustmodul $G'' = \omega\eta$ steht für den viskosen Anteil und beschreibt die durch innere Reibung verlorene Energie. Die Viskosität η entspricht dabei einem Reibungskoeffizienten. Weiterhin bezeichnet ω die Winkelgeschwindigkeit und i die imaginäre Zahl. Die Anpassung solcher Systeme ist unterbestimmt, auch wenn mehrere Overtöne dafür verwendet werden. Deshalb ist eine grundlegende Kenntnis der analysierten Schicht für die Einschätzung der aus der Anpassung hervorgegangenen Werte erforderlich.^[16]

Komplizierter ist die Beschreibung von Adsorbatschichten, die aus diskreten Partikeln bestehen, die nicht notwendigerweise dicht gepackt sind (Abb. 2.7b, d)). Beispiele für solche Systeme sind Viren,^[18,21,22] Liposomen^[22,27] oder Nanopartikel,^[56] die an Oberflächen adsorbiert sind. Auch das in dieser Arbeit verwendete System fällt in diese Kategorie. Systeme dieser Art weisen im Vergleich zu homogenen Schichten zusätzliche Effekte auf, die eine Analyse der erhaltenen Daten erschweren. Die Partikel sind mit der Sensoroberfläche verbunden und von Lösungsmittel umgeben. Die Oszillation der Sensoroberfläche versucht nun die Teilchen durch das Lösungsmittel zu bewegen, welches selbst – wenn auch schwächer – an die Sensoroberfläche gekoppelt ist.

Die Kräfte, die auf das Teilchen wirken und durch die Bewegung der Teilchen im Lösungsmittel entstehen, werden versuchen, die Teilchen relativ zur Sensoroberfläche zu bewegen. Diese sogenannten Rutsch- oder auch Rollbewegungen werden auch in der Literatur dis-

kutiert.^[16,20,21,27] Die Frage nach der Bedeutung dieser Dissipationskanäle für die Messgrößen eines QCM-D-Experiments ist direkt mit der Wechselwirkungsenergie, genauer mit der Topologie der Energiehyperfläche, verbunden und hängt daher von den Details des Problems, wie unter anderem der Morphologie der Teilchen, beziehungsweise der Sensoroberfläche, und den chemischen Eigenschaften beider Oberflächen ab. QCM-D-Messungen in Kombination mit anderen Messmethoden haben ergeben, dass für solche Systeme die Frequenzänderung Δf nicht mehr linear mit dem Massezuwachs Δm auf der Oberfläche verknüpft ist.^[20]

Ein grundlegendes Verständnis der zu Grunde liegenden Physik erfordert neben dem oben schon skizzierten Verständnis der Bindung zwischen Partikel und Sensoroberfläche in Gegenwart des Lösungsmittels auch ein detailliertes Verständnis der hydrodynamischen Verhältnisse. Eine Beschreibung der Hydrodynamik ist im allgemeinen Fall schwierig, da die zu Grunde liegende Navier-Stokes-Gleichung keine allgemeine Lösung erlaubt. Ein qualitatives Verständnis der Abhängigkeit von Δf und ΔD für eine mit diskreten Partikeln bedeckte Oberfläche unter Einbeziehung der Hydrodynamik lässt sich durch Simulationen mit Hilfe der Finite-Elemente-Methode (FEM) erreichen, bei der die Navier-Stokes-Gleichung numerisch für das gewählte geometrische Modell gelöst wird.^[21,22,27] Aufgrund der mathematischen Komplexität des Problems gelingt die Lösung mit vertretbarem Aufwand bislang nur für sehr vereinfachte Adsorptionsgeometrien. Das Lösemittel, das die Partikel umgibt, ist zum Teil hydrodynamisch gekoppelt und führt, im Vergleich zu rigiden Schichten gleicher Masse, zur Messung eines größeren Δf .^[21,22,27] Das auf diese Weise mitgemessene Lösemittel wird als eingeschlossenes Lösemittel (engl. *trapped liquid*) bezeichnet.^[16,54]

Betrachtet man ein System adsorbierter Teilchen auf einer Sensoroberfläche in Gegenwart von Lösungsmittel, so wird deutlich, dass im Hinblick auf die Hydrodynamik zwei Effekte unterschieden werden müssen. Zum einen gibt es aufgrund der Bewegung eines Teilchens in einem viskosen Medium hydrodynamische Effekte. Diese Effekte treten für jedes Teilchen auf, im Speziellen auch im Grenzfall unendlicher Verdünnung. Daneben erwartet man, dass es auch eine hydrodynamische Kopplung zwischen den Partikeln geben sollte, wenn sich die Teilchen einander annähern.^[21] Letzterer Effekt hat insbesondere einen starken Einfluss auf die Dissipation, die ab einer bestimmten Bedeckung mit steigender Be-

deckung sogar absinkt, obwohl man im Bild unabhängiger Partikel eine lineare Zunahme sowohl der Frequenzänderung als auch der Dissipation erwarten würde.^[20-22] Aus dem gleichen Grund findet man auch keinen linearen Zusammenhang zwischen Δf und der adsorbierten Masse Δm . Die Veränderung von Δf gegen Δm wird mit steigender Bedeckung immer geringer.

Die FEM-Simulationen haben ergeben, dass die Dissipation der Energie räumlich sehr unterschiedlich verteilt ist. Ein Großteil der dissipierten Energie ist mit Prozessen an der Grenzfläche zwischen Partikel und Flüssigkeit und nur ein kleiner mit solchen zwischen Partikel und Oberfläche verknüpft,^[21] wobei die Festigkeit der Kontaktzone eine große Rolle für das genaue Verhältnis spielt. Eine weichere Kontaktzone führt zu stärkeren Roll- und Rutschbewegungen der Partikel und damit zu einer höheren Energiedissipation.^[21] Die hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln beeinflussen die verschiedenen Obertöne n – also die Frequenz der Bewegung – unterschiedlich stark und führen dazu, dass die Werte von $\Delta f_n/n$ der verschiedenen n mit steigender Bedeckung immer stärker voneinander abweichen.^[20] Dieser Effekt wird Obertondispersion genannt. Ist die Obertondispersion gering, so kann die Sauerbrey-Gleichung zur Berechnung der Masse verwendet werden. Im Normalfall müssen jedoch alternative Auswertungsmethoden verwendet werden.

Ein empirisches Modell versucht die Beziehung zwischen Δf und Δm durch ein einfaches geometrisches Modell zu erfassen und geht davon aus, dass die gemessene Frequenzänderung durch die Masse der adsorbierten Teilchen plus der Masse des durch diese Teilchen bewegten Lösungsmittels gegeben ist. Die Masse des Lösungsmittels wird über Kegel, die jeden Partikel umgeben, berücksichtigt.^[18,19] Die adsorbierte Gesamtmasse aus Partikeln und zugehörigen Lösemittelkegeln wird mit der Sauerbrey-Gleichung berechnet. Bei geringer Bedeckung überlappen die Lösemittelkegel der Partikel nicht und die Frequenzänderung ist linear von der Bedeckung abhängig. Allerdings ist die Frequenzänderung viel größer als aufgrund der adsorbierten Masse der Partikel erwartet werden kann. Adsorbieren weitere Partikel auf der Oberfläche, wie in Abb. 2.8 dargestellt, so überlappen die Lösemittelkegel. Das überlappende Volumen wird jedoch nur einmal detektiert. Das pro Partikel durchschnittlich detektierte Kegelvolumen sinkt demnach mit steigender Bedeckung und führt zu einem nicht linearen Zusammenhang zwischen Δf und Δm . Zusammen mit

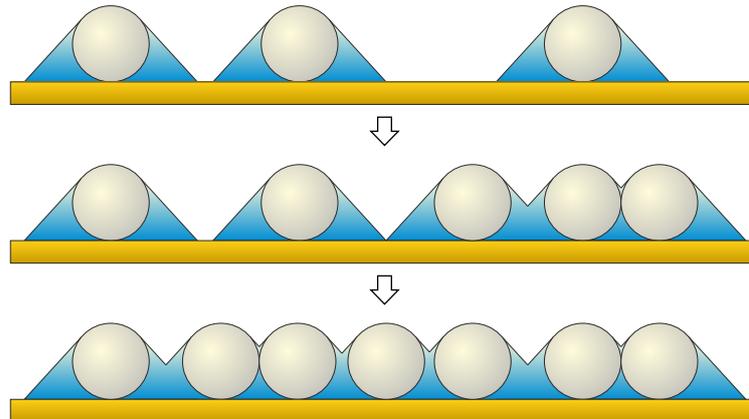


Abbildung 2.8: Lösemittelkegel, die um Partikel herum angeordnet sind, von der Seite gesehen. Mit steigender Bedeckung überlappt sich eine höhere Anzahl von Lösemittelkegeln. In Anlehnung an Reviakine *et al.*^[16]

Monte-Carlo-Simulationen zufällig platzierter Partikel, können mit diesem Modell experimentell ermittelte Zusammenhänge zwischen Δf und Δm aus Schichten von diskreten Partikeln erklärt werden.^[19] Dabei sind die Kegel in dem Modell nicht scharf zum übrigen Lösemittel abgegrenzt, sondern eher als anschauliche Näherung zu verstehen.^[16]

Da das Kegelmodell weder die Obertonabhängigkeit von Δf noch den Verlauf der Dissipation abbilden kann, wurde in der Literatur ein weiteres Modell vorgeschlagen, mit dem der Durchmesser der adsorbierten Partikel aus QCM-D-Messungen erhalten werden kann. Das geschieht, in dem man die experimentell zugängliche dissipative Schicht, die einer teilweisen Bedeckung der Oberfläche entspricht, auf die volle Bedeckung extrapoliert, wobei davon ausgegangen wird, dass eine solche Schicht wieder als elastisches Medium (keine Dissipation) behandelt werden kann.^[21,22,27,57] Man versucht also durch Extrapolation die Frequenzänderung Δf zu ermitteln, bei der die Dissipation verschwindet. Extrapoliert wurde dabei der Quotient aus der Frequenzdifferenz Δf und der Veränderung der Halbwertsbreite des Frequenzpeaks $\Delta\Gamma$ verschiedener Obertöne gebildet und gegen Δf aufgetragen. Die Halbwertsbreite des Frequenzpeaks $\Delta\Gamma$ ist aufgrund des Fourierpaares Frequenz und Zeit direkt mit der Dissipation verknüpft. In dieser Auftragung entspricht die Extrapolation der Kurven auf die Abszisse einer Halbwertsbreite von $\Delta\Gamma = 0$, sodass die entsprechende Frequenzdifferenz entsprechend der obigen Annahmen mittels der Sauerbrey-Gleichung in eine adsorbierte Masse und dadurch in eine Schichtdicke der homogenen

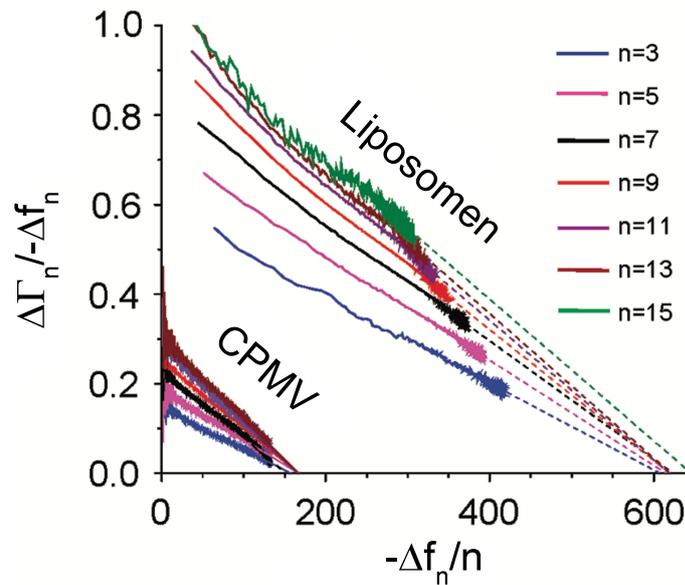


Abbildung 2.9: Der Quotient $-\Delta\Gamma/\Delta f$ für jeden Oberton n ergibt Geraden, die die x-Achse an einem gemeinsamen Punkt schneiden. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Tellechea *et al.* [22] Copyright 2009 American Chemical Society.

Schicht umgerechnet werden kann. Die Schichtdicke entspricht dabei dem Durchmesser der adsorbierten Nanopartikel. Es wird dabei angenommen, dass sich zwischen den Teilchen eingebautes Lösungsmittel ebenfalls wie ein elastisches Medium verhält und in diesem einfachen Schema würde die Dichte des Lösungsmittels gleich der der Partikel gewählt. In Abb. 2.9 sehen wir die Auswertung zweier Messungen von CPMV-Viren ($d = 28$ nm) und Liposomen ($d = 83 \pm 4$ nm). Der Quotient $-\Delta\Gamma/\Delta f$ ist für verschiedene Obertöne gegen $\Delta f/n$ aufgetragen. Die Punkte liegen für jeden Oberton auf einer Geraden, die extrapoliert werden kann. Die Geraden treffen sich auf der Abszisse, an der aus der Frequenzdifferenz Δf die Schichthöhe und damit der Partikeldurchmesser zu $d = 29 \pm 0.8$ nm (CPMV) und 81 ± 6 nm (Liposomen) bestimmt wurde. Hierbei entsprechen die Werte des Extrapolationsschemas den Durchmessern der Partikel. Es ist wichtig, an dieser Stelle zu betonen, dass die Rechtfertigung für dieses Extrapolationsschema rein empirischer Natur ist und es kein theoretisches Fundament gibt, woraus die Gültigkeit dieses Schemas abgeleitet werden kann. [16,22] Es ist also auch denkbar, dass die beobachtete Übereinstimmung zwischen Experiment und Erwartung einer glücklichen Kompensation verschiedener Effekte geschuldet ist und die Methode nicht allgemein anwendbar ist. [22]

2.4 REM

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) wird zur Abbildung von Oberflächen genutzt und ermöglicht Aufnahmen mit einer typischen Auflösung im nm-Bereich. Auch atomare Strukturen können unter besonderen Bedingungen aufgelöst werden.^[58] Um die Probe vergrößert darzustellen, werden beim REM im Gegensatz zum Lichtmikroskop Elektronen zur Abbildung verwendet. Die verbesserte Auflösung des REMs gegenüber Lichtmikroskopen beruht darauf, dass die Wellenlänge der verwendeten Elektronen viel kleiner als die Wellenlänge des sichtbaren Lichtes ist, sodass die sogenannte Abbesche Beugungsgrenze erst bei viel höheren Vergrößerungen erreicht wird. Elektronen, die beispielsweise mit 3 kV beschleunigt wurden, haben eine Wellenlänge von $\lambda = 22$ pm. Zur Abbildung wird ein fein fokussierter Elektronenstrahl über die Probe gerastert, der durch Wolfram-Glühkathoden, LaB₆-Kathoden oder in jüngster Zeit meist mit Hilfe von Feldemissionskathoden erzeugt wird. Wie in Abb. 2.10 gezeigt, werden die primär in der Quelle erzeugten Elektronen durch ein aufwändiges System von elektronenoptischen Elementen zu einem Elektronenstrahl der gewünschten Energie geformt und auf die Probe fokussiert. Eine Ablenkeinheit zur Positionierung des Elektronenstrahls auf der Probe ist in die Elektronenoptik integriert und erlaubt es, den Strahl über die Probe zu rastern. Typische Rasterelektronenmikroskope verfügen über verschiedene Detektoren, deren Signale zusammen mit der Ortsinformation aus der Ablenkeinheit des Elektronenstrahls von einem Computer zu einem zweidimensionalen Bild verarbeitet werden. Damit die Elektronen auf ihrem Weg nicht mit Gasmolekülen wechselwirken können, sondern sichergestellt werden kann, dass die gemessenen Signale ausschließlich von der Interaktion der Elektronen mit der Probe stammen, muss sich der gesamte Elektronenstrahl inklusive der Probe im Hochvakuum befinden.^[59]

Die Notwendigkeit verschiedener Detektoren wird deutlich, wenn man sich die Wechselwirkung von Elektronen mit Materie vergegenwärtigt. Bei der Interaktion der Primärelektronen (PE) des Elektronenstrahls mit der Probe werden die Elektronen elastisch und inelastisch an den Elektronenhüllen der Probenatome gestreut. Beim elastischen Stoßen verlieren die Elektronen keine Energie und verändern ihre Richtung um durchschnittlich 2-5°, wobei sich ihre Richtung in seltenen Fällen um bis zu 180° ändern kann. Durch die Rich-

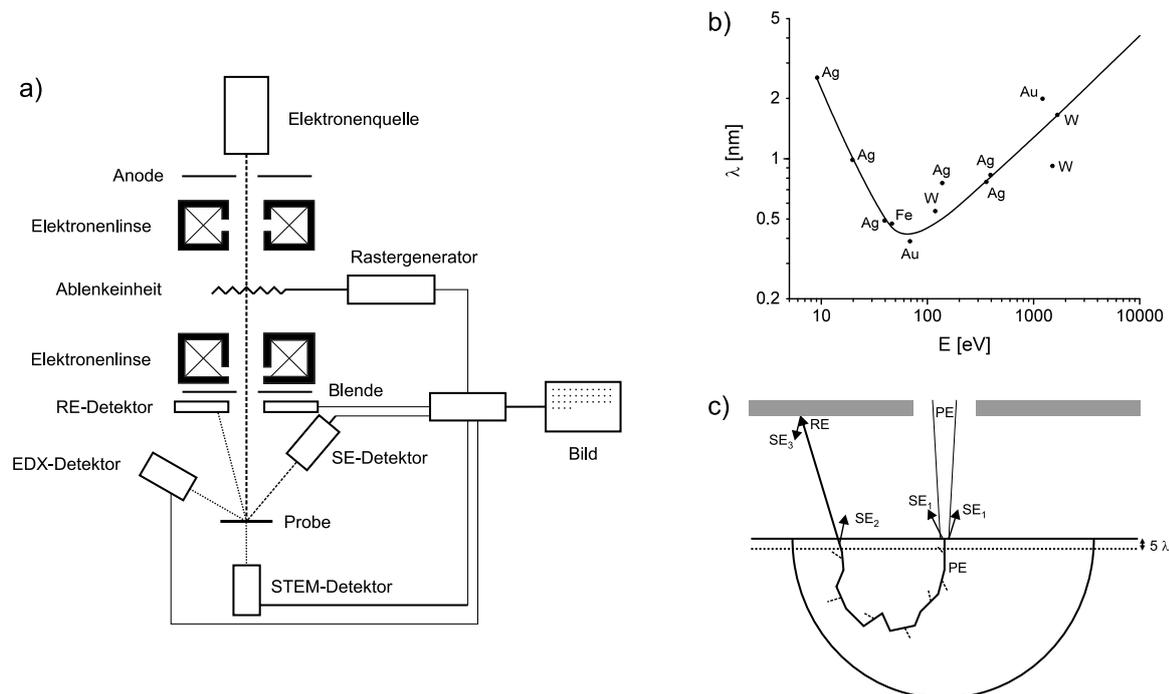


Abbildung 2.10: a) Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops nach Wells^[60] und Goldstein^[59] b) Mittlere freie Weglänge eines Elektrons in einem Festkörper in Abhängigkeit von der Elektronenenergie. Kurve mit Messwerten nach Henzler^[61]. c) Schema der Elektronenbildung in einer Probe nach Goldstein^[59] und Reimer^[62]. Die Primärelektronen (PE) des Elektronenstrahls treffen auf die Oberfläche und bilden Sekundärelektronen (SE). Teilweise verlassen die PE die Probe nach einigen Stößen als Rückstreuelektronen (RE). Der Bereich, in den die Elektronen eindringen, hat je nach Elektronenenergie näherungsweise die Form eines Halbkreises oder einer Birne und ist meist etwas tiefer als breit. Die Schicht, aus der die SE die Oberfläche verlassen können, ist ungefähr 5λ dick.

tungsänderung der Elektronen führen elastische Stöße zu einer räumlichen Ausbreitung der Elektronen in der Probe. Im Gegensatz dazu verlieren die Elektronen bei inelastischen Stößen einen Teil ihrer Energie und erfahren nahezu keine Veränderung ihrer Richtung. Der Energieverlust entspricht sehr häufig nur einem Bruchteil ihrer Energie. Dadurch können sie viele Stöße ausführen und eine gewisse Distanz in der Probe zurücklegen. Die Tiefe, in die die Elektronen in die Probe vordringen, verringert sich mit steigender Ordnungszahl der Elemente. Dies ist hauptsächlich mit einer größeren Anzahl an Zuständen der Atome zu erklären, die mit steigender Ordnungszahl von den Primärelektronen angeregt werden können. Neben den durch inelastische Stöße verkürzten Trajektorien der Elektronen kommt hinzu, dass die Wahrscheinlichkeit für elastische Stöße, bei denen die Elektronen

in einem etwas größeren Winkel abgelenkt werden, mit steigender Ordnungszahl ebenfalls zunimmt. Die daraus resultierende stärkere Ablenkung der Elektronen führt ebenfalls zu einer geringeren Tiefe, in die die Elektronen in die Probe vordringen. Nach einer ausreichend großen Anzahl von elastischen Stößen ist die Richtungsänderung der Elektronen groß genug, dass ein gewisser Anteil der Primärelektronen die Probe als sogenannte Rückstreuelektronen (RE) wieder verlassen kann. Ein möglicher Weg eines Elektrons ist in Abb. 2.10c) dargestellt. Der Halbkreis deutet an, wie weit die Primärelektronen sowohl in die Tiefe als auch lateral in das Probenmaterial vordringen. Die mittlere freie Weglänge der Elektronen bis zu einem inelastischen Stoß ist in Abb. 2.10b) gegen die Elektronenenergie aufgetragen. Die Tiefe, in die die Elektronen vordringen, kann durch eine größere Elektronenenergie vergrößert werden, wodurch sich der Radius der Elektronen im Material in Abb. 2.10c) und damit ebenfalls die laterale Ausbreitung der Rückstreuelektronen vergrößert. Bei den inelastischen Stößen der Elektronen auf ihrem Weg durch die Probe entstehen Sekundärelektronen (SE) und elektromagnetische Strahlung wie Röntgenstrahlung.

Die Energieverteilung der Elektronen, die die Probe wieder verlassen, ist in Abb. 2.11a) als Funktion der relativen Elektronenenergie in Bezug auf den Primärstrahl, dargestellt. Nach einem Maximum bei niedrigen Energien steigt die Anzahl der emittierten Elektronen an und hat ihr zweites, wesentlich breiteres Maximum bei 70 bis 80 % der Primärelektronenenergie. Das erste Maximum liegt bei einer Elektronenenergie von ungefähr 3 eV, kann

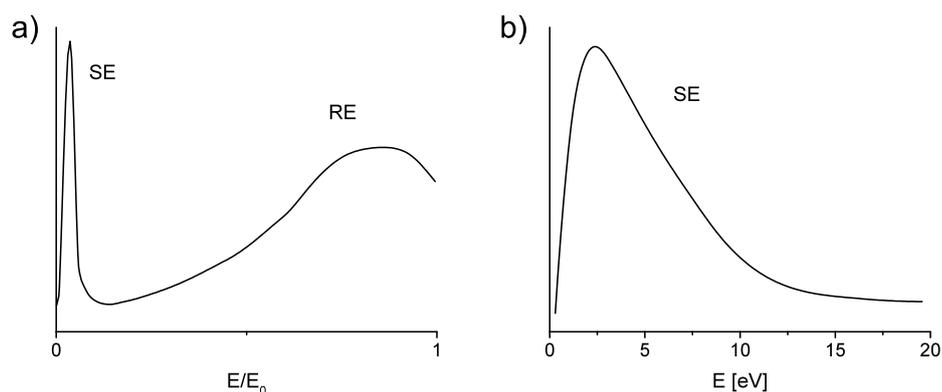


Abbildung 2.11: a) Schematische Darstellung der Energieverteilung von Elektronen, die die Probe verlassen. Auf der x-Achse ist die relative Energie bezogen auf die Energie der Primärelektronen E_0 dargestellt. b) Verteilung der Sekundärelektronen (SE), die die Probe im energetisch niedrigen Bereich bis 20 eV verlassen. In Anlehnung an Goldstein^[59].

den Sekundärelektronen zugeordnet werden und ist in Abb. 2.11b) vergrößert dargestellt. Aus der Verteilung in Abb. 2.11a) geht hervor, dass Rückstreuelektronen, die die Probe wieder verlassen, eine relativ hohe Energie besitzen. Bei üblichen Energien der Primärelektronen von 1 bis 30 kV liegt ihre Energie 3 bis 4 Größenordnungen über der Energie der Sekundärelektronen. Der Anteil an Rückstreuelektronen, im Verhältnis zu den eingestrahnten Primärelektronen, wird durch den Rückstreukoeffizienten $\eta = \frac{n_{RE}}{n_{PS}}$ angegeben. n_{RE} ist dabei die Anzahl rückgestreuter Elektronen und n_{PS} die Anzahl der Elektronen des Primärstrahls. Der Rückstreukoeffizient η hängt nur schwach von der Energie des Primärstrahls, jedoch stark von der Ordnungszahl der Elemente bis zu einer Größe von $Z = 50$ ab.^[59] Der Austrittswinkel der RE ist cosinusverteilt. Damit treten die meisten RE im Winkel von 0° bis 45° bezogen auf die Oberflächennormale aus der Oberfläche aus. Ein Kippen der Oberfläche kann die Winkelverteilung stark verändern. Die gezielte Detektion der RE ermöglicht durch die Abhängigkeit von Z einen guten Materialkontrast, der Aufschluss über die Elemente in einer Oberflächenschicht bis zu einer Tiefe von einigen μm geben kann.^[59]

Neben den Rückstreuelektronen treten im REM auch Sekundärelektronen (SE) auf. Sie werden auf verschiedene Weisen generiert und tragen damit verschiedene Informationen. SE haben, wie bereits anhand von Abb. 2.11b) gesehen werden konnte, eine Energie von 2-5 eV und unterscheiden sich in dieser Eigenschaft stark von den RE. Dem Graphen in Abb. 2.10b) kann entnommen werden, dass Elektronen in diesem Energiebereich nur kurze Distanzen im Material zurücklegen, bis sie durch einen inelastischen Stoß Energie verlieren. Nach nur wenigen Stößen haben die SE so viel Energie verloren, dass sie die Austrittsarbeit nicht mehr überwinden können und in der Probe bleiben. Aus diesem Grund stammen die detektierbaren SE aus einer wenige Monolagen dicken Schicht der Oberfläche, die ungefähr dem fünffachen der mittleren freien Weglänge λ entspricht (Abb. 2.10c). SE, die tiefer im Material gebildet werden, können es nicht verlassen. Die SE, die vom Primärstrahl gebildet werden, stammen damit direkt von der Stelle, an dem der fokussierte Primärstrahl in das Material eindringt. Sie haben folglich eine sehr gute Ortsauflösung. Allerdings erzeugen die Primärelektronen auf ihrem Weg durch die Probe fortwährend SE. SE, die von RE kurz vor dem Verlassen der Probe erzeugt werden, können die Probe ebenfalls verlassen und werden SE_2 genannt. SE_2 haben damit die laterale Auflösung

der RE und können im Normalfall nicht von den SE_1 separiert werden, da die SE_2 in einem kontinuierlichen, kreisförmigen Bereich um die SE_1 herum gebildet werden. Damit ist die Ortsauflösung von SE und RE gleich. Sekundärelektronen entstehen weiterhin, wenn RE gegen die Wände der Probenkammer stoßen und dort SE (SE_3) erzeugen. SE_3 behalten demnach die Intensitätsinformation der RE, werden aber als SE detektiert. Da die Entstehung der SE_3 räumlich von der Entstehung der SE_1 und SE_2 getrennt ist, können sie voneinander separiert werden.

Das Verhältnis von Primärelektronen und detektierbaren Sekundärelektronen wird durch den sogenannten Sekundärelektronenkoeffizienten $\sigma = \frac{n_{SE}}{n_{PS}} = \frac{n_{SE,1} + n_{SE,2}}{n_{PS}}$ angegeben. Dabei ist n_{SE} die Anzahl der Sekundärelektronen, die von einer Probe emittiert wird, die mit n_{PS} Elektronen des Primärstrahls beschossen wurde. Im Gegensatz zu η der RE ist σ stark von der Elektronenenergie abhängig. Je geringer die Primärenergie, desto höher σ . Im Beispiel von Gold ist bei $E_0 = 5 \text{ keV}$, $\sigma = 0.7$ und bei $E_0 = 50 \text{ keV}$, $\sigma = 0.1$. Dafür ist σ fast nicht von der Ordnungszahl abhängig. Ausnahmen davon sind Gold, bei der σ in Bezug auf das σ aller übrigen Elemente in etwa verdoppelt und Kohlenstoff, bei dem σ ungefähr halbiert ist. Der Austrittswinkel der SE ist wie bei den RE cosinusverteilt. Damit treten die meisten SE im Winkel von 0° bis 45° aus der Probenoberfläche aus. Im Gegensatz zu den RE kann diese Winkelverteilung nicht durch Kippen der Oberfläche verändert werden. Für die Abbildungseigenschaften des REM ist der sogenannte Quanteneffekt von Bedeutung. Dieser beruht auf der Tatsache, dass die Emission der SE aus oberflächennahen Bereichen stammt. In der Nähe von Kanten eines Objekts ist die von SE erreichbare Oberfläche größer als für glatte Oberflächen, sodass die Kanten der betrachteten Objekte etwas heller erscheinen. Durch die geringe Tiefe, aus der die SE stammen, können durch die Detektion der SE Informationen über die Topographie der Probenoberfläche erhalten werden. SE haben allerdings keinen starken Materialkontrast. Letzterer beruht bei der Detektion von SE auf Unterschieden in der Austrittsarbeit verschiedener Bereiche. Soll die oberste Schicht der Oberfläche gezielt mit hoher Auflösung untersucht werden, so muss eine geringe Beschleunigungsspannung gewählt werden, die eine geringe laterale Verteilung der RE und damit auch der SE_2 ermöglicht.^[59]

Bei sehr dünnen Proben in der Größenordnung von 100 nm, können zusätzlich die Primärelektronen in Transmission gemessen werden. Dafür werden die Elektronen, die auf der

Rückseite der Probe austreten, unterhalb der Probe detektiert. Es ist auch möglich, Proben wie Nanopartikel auf sogenannten TEM-Grids aufzubringen, die typischerweise aus einem Netz dünner Drähte (meist Kupfer) bestehen, welche mit Kohlenstoff beschichtet sind, das eine große mittlere freie Weglänge und damit einen geringen Kontrast im TEM aufweist. Auf diese Weise befinden sich ein Teil der deponierten Nanopartikel in Bereichen, in denen der einfallende Elektronenstrahl lediglich eine dünne Kohlenstoffschicht durchdringen muss. Diese Partikel können dann mit dem TEM detailliert studiert werden.^[59]

Die PE schlagen durch inelastische Stöße auch Elektronen aus inneren Schalen heraus. Die angeregten Atome emittieren daraufhin elementspezifische Röntgenstrahlung und erlauben auf diese Weise eine Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung. Je nach untersuchtem Element schlägt jedes 1000 bis 10 000ste eingestrahlte Elektron ein Innerchalenelektron aus einer Atomhülle. Die Wahrscheinlichkeit, dass dabei ein Röntgenquant entsteht, steigt mit steigender Ordnungszahl.^[59] Zur Detektion der Röntgenstrahlung wird die sogenannte EDX (*energy dispersive X-ray spectroscopy*)-Methode verwandt, bei der die Röntgenstrahlung mit einem energiedispersiven Röntgendetektor detektiert wird. In Kombination mit den Positionen des rasternden Elektronenstrahls kann somit eine zweidimensionale Abbildung der Elementverteilung erzeugt werden.^[59]

2.5 Statistik

2.5.1 Räumliche Statistik

Die Statistik stellt eine Vielzahl von Werkzeugen zur Verfügung, mit der die räumliche Anordnung von Partikeln untersucht werden kann.^[63] Die Basis dieser Analysen stellt die Bestimmung der Partikelkoordinaten dar, die aus mikroskopischen Aufnahmen, z. B. REM-Bildern, erhalten werden kann. Die Anordnung der Partikel kann auf diese Weise durch die Koordinaten des Schwerpunkts beschrieben werden und in Form eines zweidimensionalen Punktmusters dargestellt werden. Man unterscheidet drei Arten von Interaktionen^[64] (Abb. 2.12), bei denen sich die Partikel entweder a) abstoßen, b) nicht interagieren und zufällig verteilt sind, oder c) sich anziehen.

Damit Partikelanordnungen einerseits miteinander verglichen werden können und andererseits auch die Abstoßung und die Anziehung der Partikel quantifiziert werden kön-

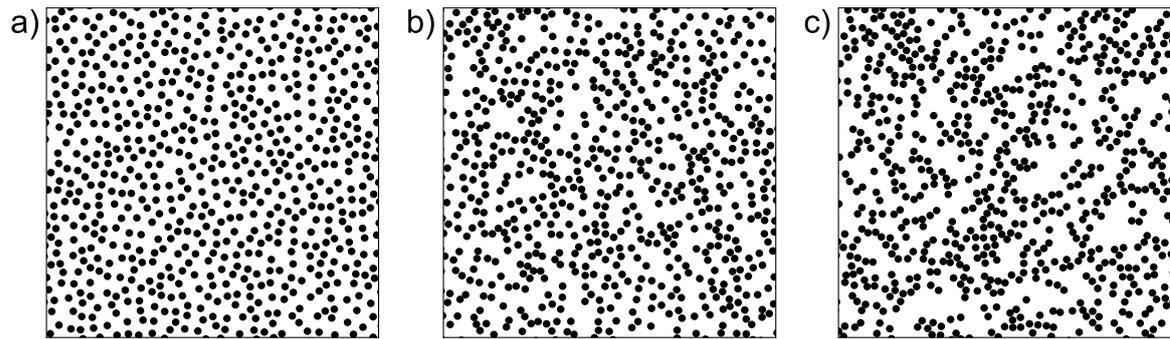


Abbildung 2.12: Simulationen von a) sich abstoßenden Partikeln, b) zufällig angeordneten Partikeln und c) aggregierten Partikeln. Die Oberflächenbedeckung ist bei allen drei Bildern gleich. In Anlehnung an Baddeley^[64].

nen, müssen weitere Größen ermittelt werden. Die Oberflächenbedeckung θ ist der Anteil der betrachteten Oberfläche $A_{\text{Oberfläche}}$, der von Partikeln mit der Fläche A_{Partikel} verdeckt ist:^[65,66]

$$\theta = \frac{A_{\text{Partikel}}}{A_{\text{Oberfläche}}} . \quad (2.3)$$

Bei bekannter Partikelfläche ist θ durch Zählen der Partikel zu bestimmen. Im Falle kugelförmiger Partikel können über die Abstände der Partikelzentren weitere Informationen über die Partikelanordnung gewonnen werden. Informationen über die lokale Struktur um jedes Partikel kann erfasst werden, indem der Abstand zum jeweils nächsten Nachbarpartikel für alle Partikel bestimmt wird.^[63] Abbildung 2.13a) illustriert die Vorgehensweise anschaulich: Der betrachtete Partikel ist rot eingefärbt. Der nächste Nachbar ist grün eingefärbt und liegt auf dem rot gestrichelten Kreis, dessen Radius der Abstand zum grünen Partikel ist (blau). Die beiden anderen schwarzen Partikel, die auf dem Kreis liegen, haben einen Abstand, der nur geringfügig größer ist. Da nur der nächste Nachbar betrachtet wird, gehen ihre Abstände nicht in die Nächste-Nachbar-Abstandsverteilung (NN-Verteilung) ein, sodass die NN-Verteilung keine Informationen über die Anzahl von Nachbarn mit einem Abstand in der Nähe des kleinsten Abstands beinhaltet.

Die resultierende NN-Verteilung ist in Abb. 2.13b) als schwarze Linie für die in Abb. 2.13a) gezeigte Anordnung von Teilchen dargestellt. Neben der NN-Verteilung wurden in Abb. 2.13b) zum Vergleich als grüne Linie die NN-Verteilung einer zufälligen Anord-

nung von Partikeln ($d = 137$ nm) und als rote Linie die NN-Verteilung einer komplett zufälligen Anordnung von Punkten ($d = 0$) dargestellt. Der Anstieg der zufälligen Verteilung (grün) beginnt bei kürzeren Abständen, die dem minimalen Abstand aufgrund der Größe der gewählten Teilchen (137 nm) entspricht, während die komplett zufällige Verteilung der Punkte ab $r = 0$ ansteigt. Für die gegebene Bedeckung zeigt die NN-Verteilung der statistisch angeordneten Teilchen ein Maximum bei etwa 160 nm und der komplett zufälligen Punkte bei etwa 130 nm. Dem gegenüber zeigt die NN-Verteilung der in a) gezeigten Anordnung nur sehr wenige NN-Abstände unterhalb von 200 nm. Das Maximum findet sich bei etwa 300 nm und fällt dann bis etwa 400 nm auf 0 ab. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass neben der Position des Maximums und des Anfangs der Verteilungsfunktion auch die Form der Verteilung deutlich unterschiedlich ist. Während die beiden statistischen Verteilungen eine deutliche Asymmetrie zu größeren Abständen aufweisen, ist die NN-Abstandsverteilung aus a) deutlich symmetrischer. Daneben fällt auf, dass das Verhalten der drei Verteilungsfunktionen bei großen Abständen ähnlich ist. Qualitativ kann man aus den Unterschieden der NN-Verteilungen direkt schließen, dass es sich bei der Verteilung in Abbildung stat2a) nicht um eine zufällig verteilte Anordnung von Partikeln handelt. Aufgrund des Fehlens kleiner Abstände in der Verteilung aus a) kann man folgern, dass kleine Partikelabstände in diesem System energetisch ungünstig sind, was auf eine repulsive Wechselwirkung der Partikel schließen lässt.

Wie bereits angesprochen, liefert die NN-Verteilung keine Information über die Anzahl von Teilchen mit einem Abstand ähnlich dem des Abstands zum nächsten Nachbarn. Für den roten Partikel in Abb. 2.13a) finden sich beispielsweise drei Nachbarn mit ähnlichem Abstand. Um die Anzahl der Nachbarn zu erfassen, wäre eine Funktion sinnvoll, die die Nachbarn innerhalb eines bestimmten Radius zählt. Diese Funktion ist als die sogenannte K-Funktion^[63] bekannt.

Um die K-Funktion zu berechnen, wird, wie in Abb. 2.13c) dargestellt, ein Kreis um einen betrachteten Partikel gelegt. Der Radius des Kreises wird verändert und die Anzahl der Partikelzentren, die sich in dem Kreis befinden, wird aufgezeichnet.^[63] Nachdem dieses Vorgehen für alle Partikel der Oberfläche wiederholt wurde, wird die Anzahl an Partikeln für jeden Radius r gemittelt.^[63] Daraus resultiert eine Funktion, die die durchschnittliche Anzahl an Partikeln, die sich in einem Kreis des Radius r befinden, beschreibt. Die resul-

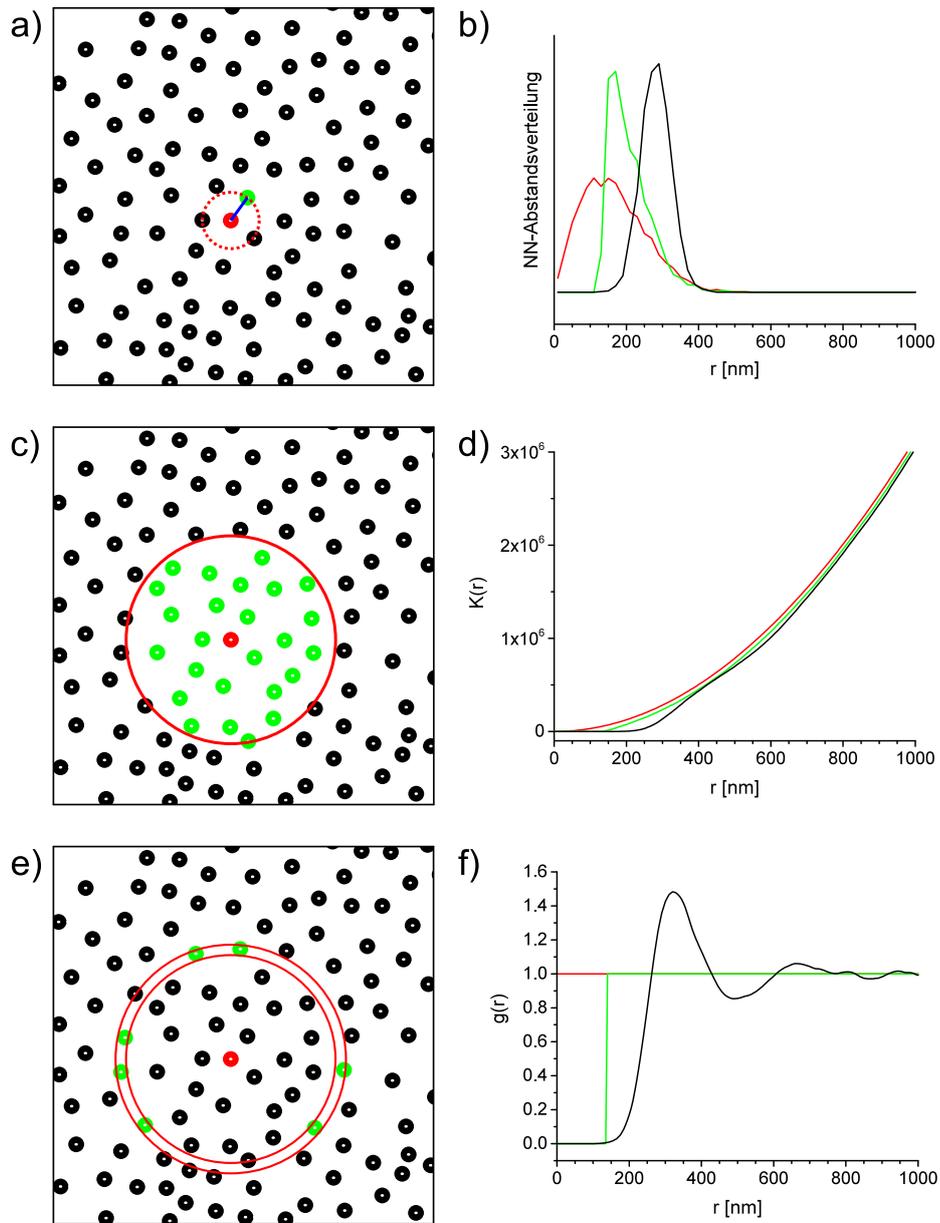


Abbildung 2.13: a), c), e) Ausschnitt aus einer Simulation von sich abstoßenden Nanopartikeln mit einem Durchmesser von $d = 137$ nm. Die Partikelzentren sind mit einem weißen Punkt markiert. b) Nächste-Nachbar-Abstandsverteilung: Die Abstände zum jeweils nächsten Nachbarn eines Partikels werden für alle Partikel ermittelt und in einer Verteilung dargestellt. c) $K(r)$ -Funktion: Für jeden Radius eines Kreises (in c)) wird die mittlere Anzahl an enthaltenen Partikeln bestimmt. d) $g(r)$ -Funktion: Für jeden Radius eines Ringes in e) wird die mittlere Anzahl an Partikeln ermittelt, die auf dem Ring liegen. e) Die Graphen in b), d) und f) sind gegen den Abstand r zwischen den Partikelzentren aufgetragen. Die Graphen in d) und f) sind so normiert, dass sie mit einer zufälligen Verteilung verglichen werden können. b), d), f) Die roten Linien entsprechen einer komplett zufälligen Verteilung (kein Partikeldurchmesser) und die grünen Linien entsprechen einer zufälligen Verteilung von Partikeln mit einem Durchmesser von 137 nm.

tierende Funktion wird so normiert, dass eine komplett zufällig verteilte Anordnung den Verlauf von πr^2 hat und durch den Ursprung geht.^[63] Auf diese Weise wird die Vergleichbarkeit verschiedener Oberflächen erhöht. Die K-Funktion der in Abb. 2.13c) gezeigten Partikelanordnung ist in Abb. 2.13d) als schwarze Linie dargestellt. Die grüne Linie ist eine Simulation von zufällig angeordneten Partikeln gleicher Größe und gleicher Oberflächenbedeckung. Die Simulation ist erforderlich, weil die Partikel eine Ausdehnung haben und eine komplett zufällige Anordnung^[63] von Massepunkten (rote Linie) nicht erreicht werden kann. Liegt die K-Funktion der Verteilung unterhalb der grünen Linie (statistische Verteilung), so spricht das für eine Abstoßung der Partikel, während im Bereich oberhalb der grünen Linie, eine Überhöhung der entsprechenden Abstände andeuten und bei kleinen Abständen mit einer attraktiven Wechselwirkung der Teilchen assoziiert werden können.^[63,64] Die K-Funktion hat den Nachteil, dass kumulative Effekte auftreten.^[63] Das bedeutet, dass starke Aggregation oder Abstoßung bei kleinen Distanzen den kompletten Graphen in x-Richtung verschieben.^[63] Dies erschwert die Analyse der Partikelstruktur bei größeren Abständen, da leicht eine starke Abstoßung bei kleinen Distanzen das Verhalten des Graphen bei größeren Abständen verändert. Dies ist beispielsweise daran zu erkennen, dass die K-Funktion der zufällig verteilten Partikel (grüne Linie in Abb. 2.13d)) nicht wie der Graph der komplett zufälligen Anordnung (rote Linie) durch den Ursprung geht, sondern um den Partikeldurchmesser von 137 nm zu größeren Abständen verschoben ist. Eine Funktion, die ebenfalls alle Partikelabstände mit einbezieht, jedoch keine kumulativen Effekte aufweist, ist die sogenannte Paarkorrelationsfunktion $g(r)$. Statt der Anzahl der Partikelzentren in einem Kreis (Abb. 2.13c)) wird bei dieser Funktion die Anzahl der Partikelzentren auf einem schmalen Ring (Abb. 2.13e)) gezählt. Es wird also nicht die Anzahl bis zu einem bestimmten Radius, sondern in einem kleinen Bereich von Radien um einen bestimmten Radius ermittelt. Die Normierung erfolgt so, dass eine komplett zufällige Verteilung den Wert $g(r) = 1$ hat (rote Linie in Abb. 2.13f)). Die $g(r)$ -Funktion beantwortet also die Frage, wie viele Partikel bei welchem Abstand im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung anzutreffen sind. Sind die Partikelabstände an einem betrachteten r im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung häufiger, ist $g(r) > 1$, sind sie weniger häufig, ist $g(r) < 1$. Sind in einem bestimmten Bereich keine Nachbarn zu finden, so ist $g(r) = 0$ (grüne Linie in Abb. 2.13f)). Dies ist beispielsweise bei sehr kleinen Abständen von Nanopartikeln der

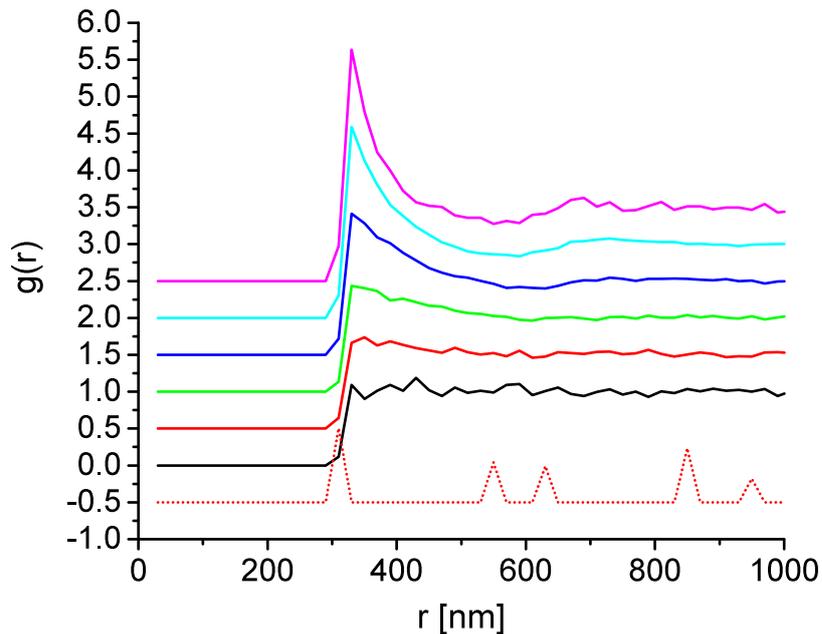


Abbildung 2.14: $g(r)$ -Funktionen von Simulationen zufällig angeordneter Partikel (durchgezogene Linien) mit einem Partikeldurchmesser von 318 nm bei den Bedeckungen: 3 %, 14 %, 27 %, 41 %, 49 % und 54 % der Gesamtoberfläche. Zur Übersichtlichkeit wurden die einzelnen $g(r)$ -Funktionen um 0.5 versetzt. Die rosa Kurve entspricht der nahezu gesättigten Bedeckung und die schwarze Kurve einer geringen Bedeckung. Die rot gepunktete Kurve wurde aus einem zweidimensionalen hexagonal dicht gepackten Gitter der gleichen Partikel berechnet. Zur besseren Übersicht wurde die gepunktete $g(r)$ -Funktion auf ein Maximum von 1 normiert.

Fall, da diese nicht näher zusammenliegen können, als ihr eigener Durchmesser groß ist. Im Gegensatz dazu liegen bei sehr großen Abständen r sehr viele Partikel auf dem Ring der $g(r)$ -Funktion. Dadurch hängt die Partikelanzahl nur noch von der Bedeckung ab und es gilt $g(r) = 1$ für unendlich große r .^[63]

Das erste große Maximum der in Abb. 2.13f) gezeigten $g(r)$ -Funktion ist der mittlere Partikelabstand^[67,68] und liegt bei ca. 325 nm. Ein weiterer Parameter, der der $g(r)$ -Funktion entnommen werden kann, ist die Ordnung der Partikelstruktur.^[69–71] Eine ausgeprägte Strukturierung der $g(r)$ -Funktion mit Minima und Maxima über große Partikelabstände spricht für eine hohe Ordnung. Der Extremfall perfekter periodischer Ordnung ist eine Gitterstruktur.

Die $g(r)$ -Funktion einer hexagonal dichten Anordnung von Partikeln mit einem Durchmesser von 318 nm ist in Abb. 2.14 als gepunktete Linie dargestellt. Hier sind eindeutige Peaks bei den zu erwartenden Abständen im Gitter zu sehen. Für alle übrigen Abstände

ist $g(r) = 0$. Die durchgezogenen Linien in Abb. 2.14 sind $g(r)$ -Funktionen simulierter Partikelanordnungen von zufällig angeordneten Nanopartikeln mit einem Durchmesser von 318 nm. Mit dieser Grafik soll illustriert werden, dass auch eine zufällig angeordnete Oberfläche von nicht interagierenden Partikeln ein Maximum erzeugen kann. Die Grafik zeigt Oberflächen verschiedener Bedeckungen von sehr gering (schwarz) bis zum näherungsweise Erreichen des sogenannten *jamming limits*^[66,72] (rosa). Zur besseren Übersicht wurden die Funktionen versetzt dargestellt. Das *jamming limit* ist die maximale Bedeckung, die mit zufällig angeordneten Partikeln erreicht werden kann und liegt bei einer Bedeckung von $\theta = 0.547$ relativ zur Gesamtoberfläche.^[66,72] Die Entstehung des Peaks kann mit der Entstehung einer zufällig verteilten Oberfläche nach dem RSA-Modell (RSA - engl. *random sequential adsorption*) erklärt werden.^[70]

Zu Beginn der Simulation ist die Oberfläche leer und die Partikel werden an zufällige Orte platziert. Wenn sich die Oberfläche füllt, werden Zufallskordinaten generiert, an denen kein Partikel mehr platziert werden kann, weil er dann mit einem bereits platzierten Partikel überlappen würde. Tritt ein solcher Fall auf, wird der Partikel verworfen und es werden neue Koordinaten generiert. Nähert sich die Oberflächenbedeckung dem *jamming limit*, gibt es nur noch wenige Lücken, wo Partikel platziert werden können. Die dort platzierten Partikel haben Abstände zu den Nachbarpartikeln, die nur etwas größer als ihr eigener Durchmesser sind. Damit werden aus dem Ensemble statistisch generierter Koordinaten solche selektiert, die zu kleinen Abständen zwischen den Partikeln führen und so in Werten der $g(r)$ -Funktion oberhalb der statistischen Erwartung im Bereich kleiner Abstände resultiert.^[73] Bei einer komplett zufälligen Verteilung aus Punkten, die sich nicht überlappen können, gibt es keine Selektion und die $g(r)$ -Funktion entspricht der theoretischen Erwartung.^[73]

Jeder der in Abb. 2.14 gezeigten $g(r)$ -Funktionen wurde aus einem Datensatz von 25 000 Partikeln berechnet. Am Rauschen der Kurven ist sichtbar, dass für eine gute statistische Abbildung kleinerer Bedeckungen sehr viele Partikel und damit sehr viele Abstände in die Berechnung der $g(r)$ -Funktion eingehen müssen. Das liegt daran, dass die Partikelabstände im Vergleich zu größeren Bedeckungen bei gering bedeckten Oberflächen zu größeren Werten verschoben sind, während das in Abb. 2.14 betrachtete Fenster gleich bleibt. Damit sinkt die Anzahl der Abstände, die in den betrachteten Bereich eingehen. Bei der Aufnah-

me von REM-Bildern kommt der hier nicht dargestellte Effekt hinzu, dass auf Bildern gleicher Größe bei niedrigen Bedeckungen weniger Partikel liegen. In der Folge müssen für Oberflächen niedriger Bedeckung mehr REM-Bilder zur Berechnung von $g(r)$ -Funktionen verwendet werden.

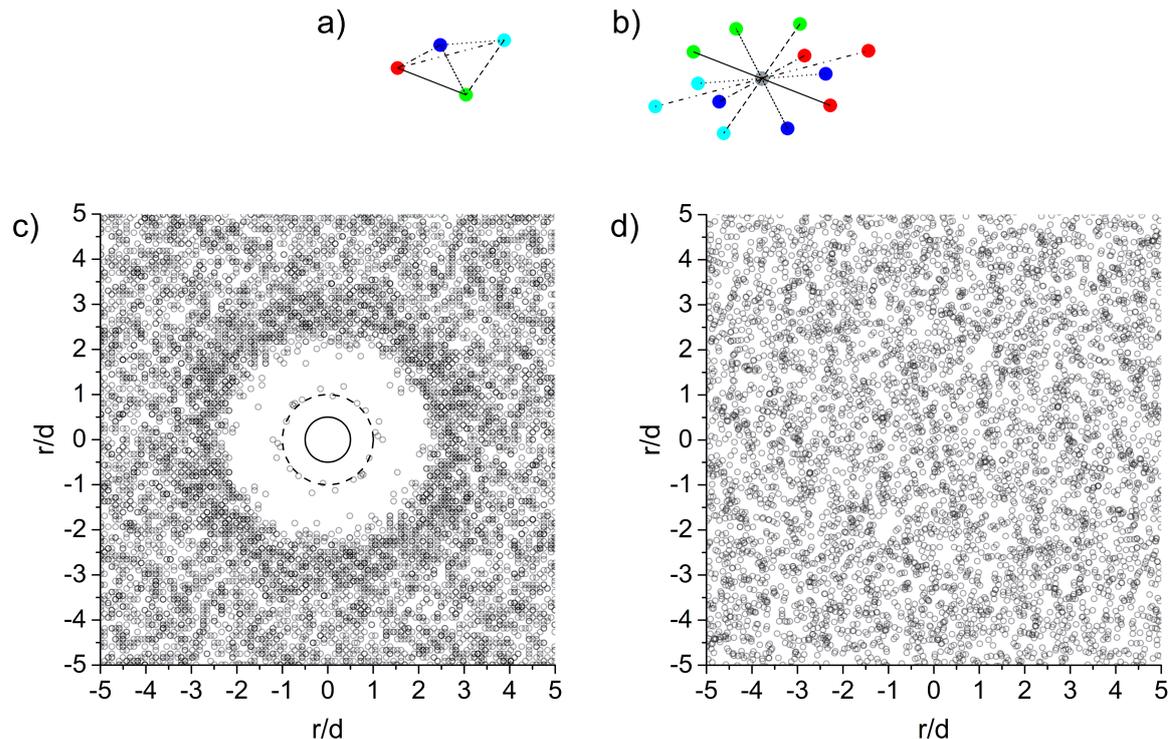


Abbildung 2.15: a,b) Schema der Entstehung eines Fry-Plots. Jeder der vier Punkte in a) wird ins Zentrum von b) gelegt und a) Fry-Plot aus einer Oberfläche mit sich abstoßenden Partikeln und wenigen Clustern. b) Fry-Plot einer Simulation von vollständig zufällig verteilten Punkten zum Vergleich.

Die $g(r)$ -Funktion ist eine winkelintegrierte Betrachtung der Verteilung. Daher ist es wichtig zu wissen, ob die Partikelanordnung azimuthal homogen verteilt ist, oder ob es Winkelabhängigkeiten gibt, die eine einfache Interpretation der $g(r)$ -Funktion verhindern würden. Fry-Plots^[74] (oder Patterson-Plots) sind eine Möglichkeit, dies zu testen (Abb. 2.15). Hierbei werden Kopien der Partikelanordnung erstellt und so übereinandergelegt, dass jeder Partikel einmal im Zentrum des Bildes platziert wird. In Abb. 2.15a) und b) wird dieser Prozess veranschaulicht. Jeder der vier Punkte aus Abb. 2.15a) wird einmal ins Zentrum von Abb. 2.15b) gelegt und verleiht dabei den übrigen drei Punkten seine Farbe, sodass insgesamt $3 \cdot 4 = 12$ farbige Punkte entstehen. Der überlagerte mittlere 13. Punkt wird

normalerweise nicht gezeichnet und ist hier grau dargestellt. Jede der 6 in Abb. 2.15a) gezeichneten Linien kommt zweifach in Abb. 2.15b) vor, denn der Abstand vom roten zum grünen Punkt ist umgekehrt auch der Abstand vom grünen zum roten Punkt und so weiter. Dadurch erhält der Plot ein Inversionszentrum.^[74] In dem entstandenen Muster lassen sich vorhandene Winkelabhängigkeiten durch Abweichungen von einer kreisförmig isotropen Anordnung erkennen. Des Weiteren lassen sich auch hier abstoßende sowie anziehende Effekte ablesen.^[74] In Abb. 2.15c) ist ein Fry-Plot von sich abstoßenden Partikeln gezeigt. Innerhalb des gestrichelten Kreises, der einem Partikelabstand von dem Partikeldurchmesser d entspricht, kann kein Partikel gefunden werden. Einzelne Punkte werden in der Nähe des gestrichelten Rings gefunden und können aggregierten Partikelpaaren zugeordnet werden, die den Partikeldurchmesser d als Abstand haben. Durch die Abstoßung der Partikel setzt sich die weiße Fläche fort, da sich die nicht aggregierten Partikel abstoßen und erst oberhalb eines Mindestabstands benachbarte Partikel gefunden werden. Bei diesem Mindestabstand, der im gezeigten Beispiel etwa $2d$ entspricht, endet der weiße Kreis. Nach dem Beginn der grauen Fläche, die aus den überlagerten Koordinaten besteht, gibt es bei ca. $2.8d$ einen dunkleren Ring, der den mittleren Partikelabstand repräsentiert und mit

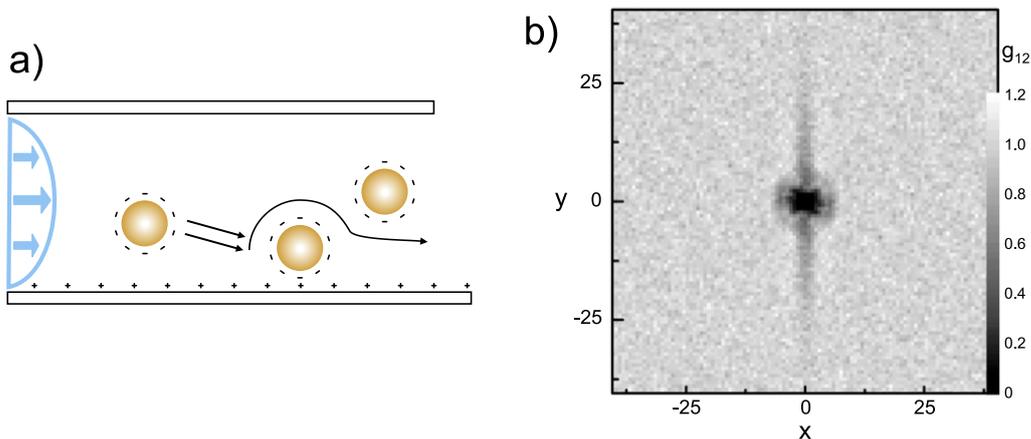


Abbildung 2.16: a) Adsorption geladener Nanopartikel direkt hinter bereits adsorbierten Nanopartikeln bei hoher Flussrate. b) Paarkorrelationskarte von unter hoher Flussrate adsorbierten Nanopartikeln. Die Werte der $g(r)$ -Funktionen, die ihren Ursprung in der Mitte der Grafik haben und radial nach außen verlaufen, sind rechts dargestellt. Schwarz bedeutet, dass keine Partikel adsorbiert sind. Wie der Fry-Plot ist auch die Paarkorrelationskarte punktsymmetrisch. Nachdruck von van Loenhout *et al.*^[75] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

dem Maximum der $g(r)$ -Funktion zusammenfällt. Mit größerem Abstand vom Zentrum des Fry-Plots entsprechen die Koordinaten immer stärker einer zufälligen Verteilung. Zum Vergleich ist in Abb. 2.15d) ein Fry-Plot einer komplett zufällig verteilten Oberfläche dargestellt, auf der die Partikel überlappen dürfen.

Für die hier untersuchten Systeme ist ein solcher Test essentiell, da die Verwendung einer Flusszelle zu Winkelabhängigkeiten in der Anordnung der Teilchen führen kann. Bei höheren Flussraten könnte die Adsorption von Partikeln direkt hinter bereits adsorbierten Partikeln behindert werden, da sie beim Absinken weitergespült werden (Abb. 2.16a)).^[75] Dieser Effekt lässt sich in Abb. 2.16b) in einer dem Fry-Plot sehr ähnlichen Paarkorrelationskarte erkennen.^[75] Hier ist neben dem schwarzen Kreis in der Mitte, der einen Mindestabstand der sich abstoßenden Partikel anzeigt, ein länglicher Schatten zu sehen. Dieser vertikale Schatten zeigt, wie der starke Fluss die Adsorption beeinflusst hat. Der Vergleich von der Paarkorrelationskarte in Abb. 2.16b) mit dem Fry-Plot in Abb. 2.15c) zeigt, dass in Abb. 2.15c) keine Winkelabhängigkeit vorliegt, da die in Abb. 2.15c) gefundenen Strukturen im Rahmen der Statistik alle kreisförmig sind.

2.5.2 Statistische Tests

Um die Aussagekraft ausgewerteter Messdaten zu überprüfen, werden häufig statistische Tests angewendet. Bei medizinischen Tests werden beispielsweise die Daten mit und ohne Behandlung verglichen, um auf diese Weise Aussagen über die Wirkung der Behandlung treffen zu können. Das Ziel dieser Tests besteht darin, eine Wahrscheinlichkeit anzugeben, mit der der betrachtete Satz von Daten, der durch den Test gemachten Hypothese entspricht.^[76]

In dem vorliegenden Fall soll ein statistischer Test angewendet werden, um die Gaußverteilung verschiedener Messwerte zu überprüfen. Aus diesem Grund werden im Folgenden die wesentlichen Grundlagen statistischer Tests dargestellt.

Statistische Tests basieren auf der Formulierung einer Hypothese und unterscheiden dann zwischen zwei Fällen (Abb. 2.17): a) die Hypothese ist erfüllt oder b) die Hypothese wird nicht erfüllt. Man formuliert die Hypothese so, dass man die Aussage: „Das gesuchte Phänomen wird nicht beobachtet. Es gibt keinen Unterschied.“ als sogenannte Nullhypothese

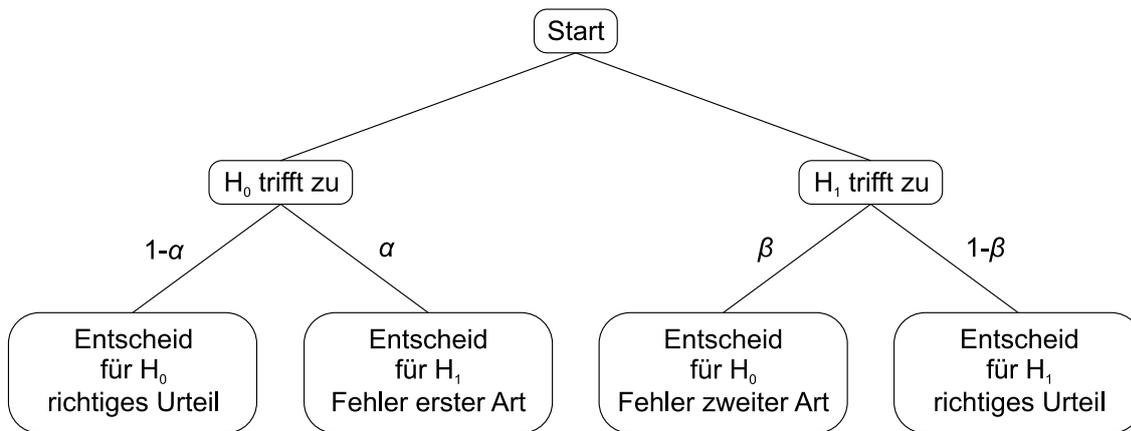


Abbildung 2.17: Schema für den Entscheid und die Fehler bei statistischen Tests. Nach^[77].

(H₀) bezeichnet, während man den anderen Fall als Alternativhypothese (H₁) bezeichnet. Die Nullhypothese ist beispielsweise erfüllt, wenn die Änderung eines experimentellen Parameters keine Auswirkung auf die untersuchten Größen hat.^[76,78] Ein statistischer Test geht nun zunächst davon aus, dass die Nullhypothese korrekt ist. Folglich geht der Test davon aus, dass alle Messwerte, die z. B. vor und nach einer Veränderung eines Parameters, dessen Auswirkung getestet werden soll, erhalten wurden, derselben Verteilung genügen. Für das gewählte Beispiel hat man zwei Datensätze. Der Erste, der vor der Veränderung des Parameters erhalten wurde, genügt einer Verteilung, die man auch die Grundverteilung nennt. Von dem zweiten Datensatz, der nach der Veränderung der Parameter erhalten wurde, erwartet der Test, dass dieser eine Verteilung aufweist, die der Grundverteilung entspricht. Die Wahrscheinlichkeit, die getestete Verteilung oder eine noch extremere Verteilung zufällig aus der Grundverteilung zu ziehen, wird durch den sogenannten p-Wert angegeben. Ein hoher p-Wert drückt aus, dass die Wahrscheinlichkeit sehr groß ist, dass die gemessene Verteilung nach der Änderung des Parameters aus der Grundverteilung stammt. Ein niedriger p-Wert drückt hingegen aus, dass die gemessene Verteilung nach Änderung des Parameters nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit aus der Grundverteilung stammt.

Bei einem statistischen Test wird der p-Wert dazu genutzt, entweder die Nullhypothese beizubehalten und sich dadurch gegen die Alternativhypothese zu entscheiden oder die Nullhypothese zu widerlegen. Das Widerlegen der Nullhypothese ist damit ein Ent-

scheid für die Alternativhypothese. Dies gelingt nur, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass die nach der Veränderung der Parameter gemessene Verteilung nicht aus der Grundverteilung stammt, eine zuvor gesetzte Grenze überschreitet. Das heißt, dass der p-Wert relativ klein sein muss, um die Nullhypothese abzulehnen. Um eine Grenze für die Entscheidung zu setzen, wird ein Signifikanzniveau festgelegt, das der p-Wert für das Ablehnen der Nullhypothese unterschreiten muss.

In einem gedachten Beispiel gehen wir zunächst davon aus, dass die Nullhypothese korrekt ist. Unter dieser Voraussetzung ist der p-Wert gleichzeitig ein Maß für die Häufigkeit fälschlicherweise anzunehmen, dass die Alternativhypothese richtig sei. Setzt man ein Signifikanzniveau α von 5 %, wird die Nullhypothese bei einem Ergebnis mit einem p-Wert unter 0.05 als widerlegt angesehen. Dadurch würde man statistisch gesehen die Nullhypothese in 95 von 100 Fällen korrekterweise als richtig einstufen. In 5 von 100 Fällen könnte die Nullhypothese verworfen und die Richtigkeit der Alternativhypothese angenommen werden. In diesen 5 Fällen hätte man einen sogenannten Fehler erster Art begangen, der in Abb. 2.17 dargestellt ist. Da man bei einer realen Untersuchung nicht 100 Studien durchführt, sondern nur eine einzige, weiß man nicht, ob man nur zufällig einen niedrigen p-Wert unter 0.05 erhält und die Nullhypothese trotzdem korrekt ist oder die Nullhypothese tatsächlich widerlegt werden kann.

Je nachdem, wie groß die Auswirkungen eines solchen Fehlers erster Art wären, gibt es verschiedene Signifikanzniveaus, die vor dem statistischen Test festgelegt werden. Ein Signifikanzniveau von 5 % (p-Wert unter 0.05) gilt als statistisch signifikant. Ein Signifikanzniveau von 0.1 % (p-Wert von unter 0.001) gilt als hoch signifikant. Wird sich bei einem hoch signifikanten Test für die Alternativhypothese entschieden, weil der p-Wert kleiner als 0.001 ist, ist es sehr unwahrscheinlich, dass dabei ein Fehler erster Art begangen wurde. Wenn wir eine Studie betrachten, bei der hingegen die Alternativhypothese H_1 korrekt ist, dann würde ein Fehler begangen werden, wenn H_0 nicht widerlegt werden kann und H_1 als falsch angesehen wird. Diesen Fehler nennt man Fehler zweiter Art und die Wahrscheinlichkeit, diesen Fehler zu begehen, erhält den Buchstaben β . Da β von der Größe des erwarteten Effektes abhängt und diese unbekannt ist, ist auch β unbekannt. Daher muss β vor dem Test geschätzt werden. In der Regel wird für diese Abschätzung der Begriff der Teststärke verwendet. Sie ist die Wahrscheinlichkeit, sich bei einer wahren Alternativhypo-

these korrekt für die Alternativhypothese zu entscheiden und ist $1 - \beta$. Die Teststärke hängt von mehreren Faktoren ab. Ein Faktor, der sich nicht beeinflussen lässt, ist der Unterschied, der zwischen den möglichen Werteverteilungen der Nullhypothese und der Alternativhypothese liegt. Ist der Unterschied klein, so wird der p-Wert relativ groß sein, da keine für die Nullhypothese untypischen Werte gemessen werden. Dies führt zu einer großen Wahrscheinlichkeit, einen Fehler zweiter Art zu begehen. Der Test hat damit ein großes β und eine kleine Teststärke. Ein sehr großer Unterschied zwischen den Werteverteilungen von Null- und Alternativhypothese wird sich hingegen in einem sehr geringen p-Wert auswirken, was die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler zweiter Art zu begehen reduziert. Die Teststärke ist in diesem Fall hoch. Der nächste Faktor, der die Teststärke beeinflusst, ist die Anzahl der Messwerte. Eine hohe Anzahl der Messwerte führt zu einer schärferen Trennung zwischen den möglichen Werteverteilungen der Null- und Alternativhypothese. Die Wahl des jeweiligen Tests hat ebenfalls einen Einfluss auf die Teststärke. So sinkt die Teststärke beispielsweise in Richtung einer geringer werdenden Anzahl von Messwerten für verschiedene Tests unterschiedlich schnell. Gezielt beeinflussen lässt sich die Teststärke neben der Anzahl der Messungen mit der Wahl des Signifikanzniveaus. Ein höherer Wert des Signifikanzniveaus bedeutet, dass sich bei größeren p-Werten für die Alternativhypothese entschieden wird. Dies erhöht die Teststärke, vergrößert aber gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit einen Fehler erster Art zu begehen. Mit der Wahl des Signifikanzniveaus ist also immer eine Abwägung zwischen dem möglichen Begehen eines Fehler erster und zweiter Art verbunden.

2.5.3 Shapiro-Wilk-Test

Bei vielen Messungen sind die Messwerte normalverteilt, wenn keine systematischen Fehler die Messungen beeinflussen. Gilt diese Voraussetzung bei einer bestimmten Messung, bietet es sich an, die Verteilung der Messwerte auf eine Normalverteilung zu testen. Ob eine Menge von Werten aus einer Normalverteilung stammt, kann mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet werden. Die Nullhypothese dieses Tests ist die Annahme, die analysierten Daten seien normalverteilt. Die Alternativhypothese ist demnach, dass die Daten nicht normalverteilt sind. Der Test wurde so gestaltet, dass er auch bei einer geringen Anzahl an

Datenpunkten eine hohe Teststärke besitzt. Das Testresultat ist ein p-Wert. Ist der p-Wert größer als das zuvor festgelegte Signifikanzniveau, werden die Messwerte als gaußverteilt angenommen. Der Test liefert in diesem Fall die Begründung, warum eine Normalverteilung nicht ausgeschlossen werden sollte.

2.6 Elektrostatische Abstoßung

Oben wurde beschrieben, dass die $g(r)$ -Funktion für einen beliebigen Abstand r die Abweichung der Partikelanordnung von der statistisch zu erwartenden Verteilung widerspiegelt. Es wurde ebenfalls deutlich, dass attraktive beziehungsweise repulsive Wechselwirkungen zwischen den Teilchen zu solchen Abweichungen führen. Im Grenzfall kleiner Oberflächenbedeckungen ist die $g(r)$ -Funktion für kleine Abstände ausschließlich von Partikel-paaren bestimmt, da bei sehr geringen Bedeckungen die Wahrscheinlichkeit, ein drittes Teilchen mit ähnlichem Abstand in der Nachbarschaft zu finden, sehr klein ist. Befinden sich die auf einer Oberfläche adsorbierten Teilchen im thermodynamischen Gleichgewicht, so kann das Potential $u(r)$ zwischen den Teilchen, das die Anordnung der Partikel auf der Oberfläche bestimmt, durch simples Invertieren der $g(r)$ -Funktion nach Gleichung (2.4) ermittelt werden^[25,79–83].

$$g(r) = \exp\left(-\frac{u(r)}{k_B T}\right) \quad (2.4)$$

Hierbei ist k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur. Im Grenzfall geringer Bedeckungen entspricht dieses Potential gerade dem Paarpotential zwischen den Teilchen.

Damit nachvollzogen werden kann, welche Näherungen gemacht wurden und von welchen Größen das Paarpotential abhängt, wird im Folgenden eine kurze Übersicht über die Herleitung des Paarpotentials gegeben.

Bei dem in dieser Arbeit betrachteten System geschieht die erste Näherung dadurch, dass die Spiegelladungen der Partikel nicht mit einbezogen werden. Würde man die Ladungen der Partikel und die Spiegelladungen^[84] in einem simplen Bild als vier Punktladungen betrachten, die sich in einem isotropen Raum befinden, so würden Dipol-Wechselwirkungen

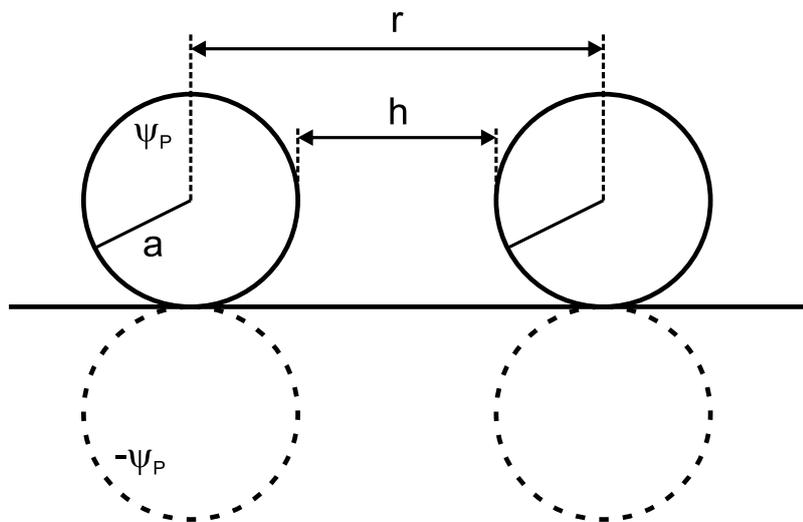


Abbildung 2.18: Zwei Nanopartikel mit dem Radius a auf einer metallischen Oberfläche, die im Abstand r voneinander liegen. Die Lücke zwischen den Partikeln h kann auch als dimensionslose Größe in Partikelradien $H = h/a$ angegeben werden. In der Goldoberfläche ist die sogenannte Spiegelladung eingezeichnet, die durch die geladenen Partikel auf der Oberfläche induziert wird.

zwischen den Ladungen wirken, die mit $1/r^3$ ^[84] abfallen. Da die Partikel jedoch eine Ausdehnung haben, das umgebende Medium nicht isotrop ist und die Spiegelladungen ihrerseits im Metall durch Friedel-Oszillationen mit $1/r^3$ abklingen,^[85] würde die zu Grunde liegende Gleichung für das Paarpotential sehr komplex werden. Um das Paarpotential auf einfache Weise näherungsweise durch eine Funktion anzupassen und dadurch das Oberflächenpotential der Partikel zu erhalten, wird das System als in einem isotropen Medium angenommen und die Ausdehnung der Partikel berücksichtigt.

Die Gleichung für die Potentialkurve stammt aus einer analytischen Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung, die linear angenähert wurde.^[70,86] Diese Linearisierung funktioniert gut im Bereich von $z_i e \psi_P / k_B T < 1$, was einem Oberflächenpotential der Nanopartikel von $\psi_P < 25$ mV entspricht. Daher wird diese Näherung auch „*low potential approximation*“ genannt. Es hat sich aber gezeigt, dass diese Näherung bei Raumtemperatur auch einem Oberflächenpotential von bis zu 100 mV noch einsetzbar ist.^[82,87,88] Die Linearisierung der Poisson-Boltzmann-Gleichung geht zunächst von sich gegenüberstehenden flachen Platten aus. Die Erweiterung auf kugelförmige Partikel erfordert zusätzliche mathematische Tricks. Derjaguin behandelt die Kugeloberfläche als eine Kaskade von vielen flachen Rin-

gen. Mit dieser Annahme ergibt sich für das elektrostatische Paarpotential die folgende Gleichung:^[70,86,88,89]

$$\frac{u}{k_B T} = \frac{1}{2} \frac{\epsilon_0 \epsilon_r a \psi_P^2}{k_B T} \ln(1 \pm \exp(-\kappa a H)) \quad (2.5)$$

Dabei ist u das elektrostatische Potential, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante, ϵ_r die relative Permittivität, a der Partikelradius, ψ_P das Oberflächenpotential des Partikels, $H = h/a$ die Länge h der Lücke zwischen den Partikeln in Partikelradien a (siehe Abb. 2.18) und L ist die Debye-Länge:

$$\kappa^{-1} = L = \sqrt{\frac{\epsilon k_B T}{8\pi e^2 I}} \quad (2.6)$$

Die Derjaguin-Gleichung funktioniert gut für Doppelschichten, die im Vergleich zum Partikelradius dünn sind. Das bedeutet, dass $\kappa a > 5$ sein sollte. Da die Derjaguin-Näherung das elektrostatische Potential bei größeren Abständen um rund 10 % überschätzt, kann alternativ die sogenannte lineare Superpositionsnäherung genutzt werden.^[86] Diese gilt für Abstände, die größer als die Dicke der Doppelschicht sind^[70]:

$$\frac{u}{k_B T} = \left(\frac{1}{2} \frac{\epsilon k_B T a}{e^2} \right) Y^2 \frac{2}{2+H} \exp(-\kappa a H), \quad (2.7)$$

$$\text{mit } Y = 4 \tanh\left(\frac{\psi_P e}{4k_B T}\right) \text{ erhält man :} \quad (2.8)$$

$$\frac{u}{k_B T} = \left(\frac{1}{2} \frac{\epsilon k_B T a}{e^2} \right) \left(4 \tanh\left(\frac{\psi_P e}{4k_B T}\right) \right)^2 \frac{2}{2+H} \exp(-\kappa a H). \quad (2.9)$$

Da das in dieser Arbeit untersuchte System die Anforderungen für Gleichung (2.9) erfüllt, wurde diese zur Anpassung des Paarpotentials verwendet.

3 Zusammenfassende Einordnung und Diskussion der Veröffentlichungen

Im Folgenden möchte ich in einer Zusammenfassung diskutieren, welche Resultate im Rahmen dieser Dissertation entstanden sind. In dem durchgeführten Projekt geht es darum, die multivalente Wechselwirkung von sich elektrostatisch abstoßenden, monodispersen Silica-Nanopartikeln auf unfunktionalisierten Goldoberflächen zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit entstanden als Kooperationsprojekt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Risse mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christina Graf im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 765. In der wissenschaftlichen Zusammenfassung habe ich zugunsten der Darstellung darauf verzichtet, die Eigenanteile stets konkret zu benennen, da diese direkt vor den Artikeln im Detail ausgeführt sind. Neben den dargestellten Ergebnissen wurde in anderen Projektteilen unter anderem der Einfluss verschiedener Topologien auf das laterale Gleichgewicht der Partikel und der Partikelabstand bei unterschiedlichen Lösemitteln und Salzkonzentrationen untersucht.

In dem vorliegenden Projektteil wurden Silica-Nanopartikel auf glatten Goldoberflächen in Ethanol analysiert. Die verwendeten Silica-Nanopartikel sind durch eine Funktionalisierung mit positiv geladenen N-(6-Aminoethyl)-aminopropyltrimethoxysilan (AHAPS)-Liganden multivalent, das heißt sie bilden mehrere gleiche Bindungen zur Goldoberfläche aus. Die multivalente Wechselwirkung dieses Modellsystems wurde mittels Schwingquarzwage mit Dissipationsaufzeichnung (QCM-D) und Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert. Dabei ermöglichte die QCM-D eine *in-situ*-Analyse der Partikeladsorption, indem die Frequenzdifferenz Δf und die Dissipationsdifferenz ΔD als Funktion der Zeit gemessen wurden. Auf diese Weise konnten Aussagen über die Adsorptionskinetik und die Reversibilität der Bindung der Nanopartikel an die Goldoberfläche aus dem zeitlichen Verlauf von Δf getroffen werden. Die Rasterelektronenmikroskopie, als komplementäre Methode, erlaubte es durch die gleichzeitige *ex-situ*-Bestimmung der aufgebrauchten Masse Δm und der Partikelanordnung den Zusammenhang von Δf , ΔD und Δm zu analysieren. Darüber hinaus konnte die Partikelanordnung durch die Analyse der REM-Bilder untersucht werden.

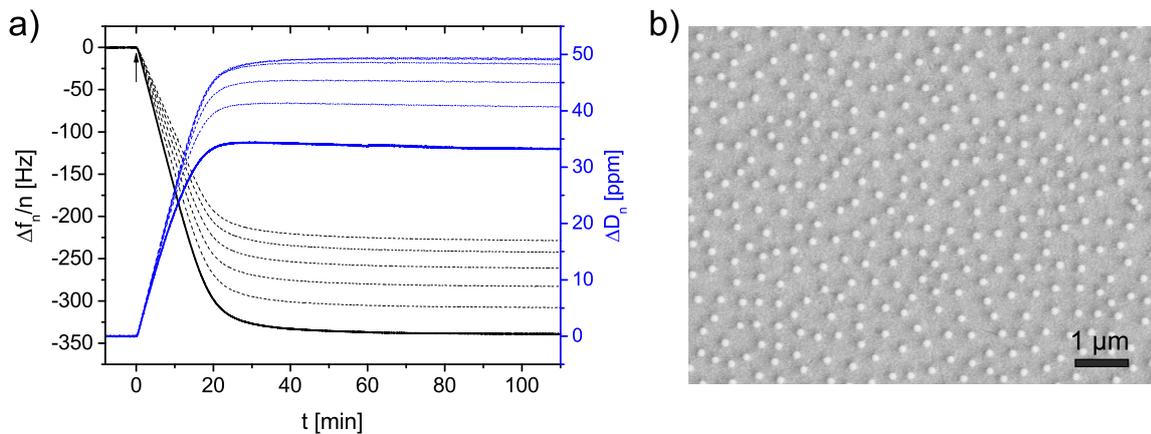


Abbildung 3.1: a) QCM-D-Messung einer Anlagerung der betrachteten Nanopartikel an eine Goldoberfläche. Die dicken Linien repräsentieren den 3. Oberton von Δf (schwarz) und ΔD (blau). Die gepunkteten Linien stellen die höheren Obertöne dar. b) REM-Bild einer mit den betrachteten Nanopartikeln gesättigten Oberfläche. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Grunewald *et al.*^[90] Copyright 2015 American Chemical Society.

Die Messergebnisse einer Anlagerung von Nanopartikeln sind in Abb. 3.1 dargestellt. Dabei zeigt Abb. 3.1a) die Frequenzdifferenz Δf und die Dissipationsdifferenz ΔD verschiedener Obertöne einer QCM-D-Messung als Funktionen der Zeit und Abb. 3.1b) die Partikelanordnung nach der QCM-D-Messung durch ein REM-Bild. Der Beginn der Partikelanlagerung ist in Abb. 3.1a) bei $t = 0$ min durch einen Pfeil markiert. Der 3. Oberton ist durch eine dicke und der 7., 9., 11. und 13. Oberton durch dünne Linien eingezeichnet. Das Aufhängen der verschiedenen Obertöne wird als Obertondispersion bezeichnet.^[16] Nach ca. 20 min flachen ΔD und Δf ab. Nach ca. 40 min kann zusätzlich zum leichten Absinken von Δf (schwarz) ein gleichzeitiges Absinken von ΔD (blau) beobachtet werden. Die Dissipation ΔD ist für dieses System sehr groß, wie es auch in der Literatur für Messungen an ähnlichen Systemen wie Viren oder Liposomen beobachtet wurde.^[22,27]

Für Systeme aus diskreten Partikeln mit signifikantem ΔD kann, wie bei Messungen in der Literatur dargestellt wird, die Gültigkeit der Sauerbrey-Gleichung nicht angenommen werden.^[16] Im Gegensatz dazu ist die adsorbierte Masse Δm bei rigiden Schichten und Schichten mit sehr geringer Energiedissipation linear zu Δf und kann mit Hilfe der Sauerbrey-Gleichung ermittelt werden.^[44] Da der Zusammenhang zwischen Δf und der adsorbierten Masse Δm für das analysierte System nicht trivial und noch unbekannt war, sollte

er durch die Kombination der vom REM ermittelten Masse Δm bestimmt werden. Für die *ex-situ*-Analyse im REM musste die Oberfläche getrocknet werden. Damit die Oberfläche nach der Messung ohne die Sedimentation von Nanopartikeln getrocknet werden konnte, wurde die Flusszelle mit Lösemittel gespült. Das Spülen mit Ethanol führte zu keiner Änderung von Δf und ΔD . Aus diesem Grund konnte davon ausgegangen werden, dass durch das Spülen keine Desorption der Partikel stattfand. Die Anzahl der nach dem Spülen und der Trocknung im REM sichtbaren Partikel (Abb. 3.1b)) entsprach demnach der Anzahl der Partikel, die sich zum Ende der Anlagerung in der QCM-D auf der Oberfläche befanden. Durch Zählen der Partikel auf den REM-Bildern konnte die adsorbierte Masse Δm bestimmt werden. Um mehrere unterschiedliche Δm zu erhalten, mussten mehrere Messungen durchgeführt werden, bei denen die Anlagerung bei unterschiedlichen Δf durch Spülen mit Lösemittel abgebrochen wurden. Das Δf , das nach dem Spülen der Oberfläche gemessen wurde, ist mit mehreren Obertönen gegen das zugehörige Δm aufgetragen (Abb. 3.2a)). Die zugehörigen Dissipationsdifferenzen sind in Abb. 3.2b) in ppm gegen die adsorbierte Partikelmasse pro Fläche in ng/mm^2 aufgetragen.

Die Graphen der Frequenzdifferenzen sind linear und ihre Steigung nimmt mit zunehmendem Oberton ab. Die Steigungen sind dabei deutlich größer als die Steigung, die aus der Sauerbrey-Gleichung für eine rigide Schicht resultieren würde. In einem einfachen Bild würde das bedeuten, dass die Masse der adsorbierten Nanopartikel von der QCM-D über-

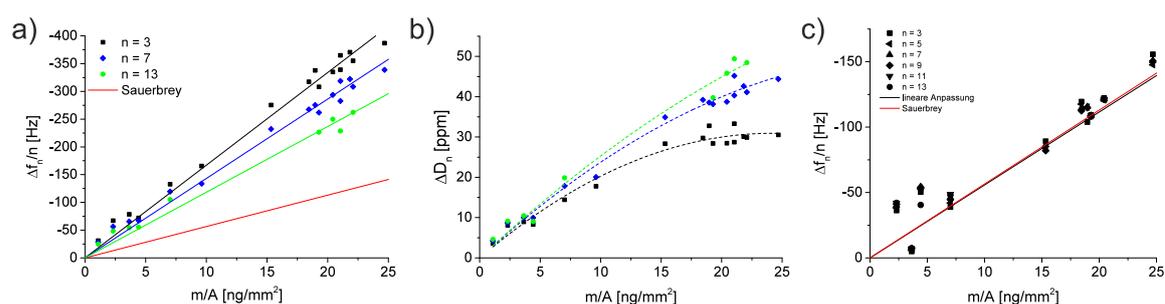


Abbildung 3.2: Auftragung der a) Frequenzdifferenz Δf und b) Dissipationsdifferenz ΔD gegen die Massebelastung m/A zwischen einer unbeschichteten Oberfläche in Ethanol und der zugehörigen mit Partikeln beschichteten Oberfläche in Ethanol. Die rote Gerade in a) wurde mit der Sauerbrey-Gleichung berechnet. c) Auftragung der Frequenzdifferenz Δf und gegen die Massebelastung m/A zwischen einer trockenen unbeschichteten Oberfläche und der zugehörigen getrockneten mit Partikeln beschichteten Oberfläche. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Grunewald *et al.*^[90] Copyright 2015 American Chemical Society.

schätzt wird. Die Überschätzung der Masse ist beim 3. Oberton am größten. Die Graphen von ΔD sind im Gegensatz zum Verlauf von Δf nicht linear, haben jedoch ebenfalls eine Obertonabhängigkeit, denn sie sind mit niedrigerem Oberton stärker gekrümmt. Der Zusammenhang von Δf und Δm wird in der Literatur für ähnliche Systeme durch eine Kurve beschrieben,^[22,27] was im Gegensatz zu den mit diesem System erhaltenen Ergebnissen steht.

Durch eine genaue Analyse sollte herausgefunden werden, warum das verwendete System eine Abweichung von dem Verhalten ähnlicher Systeme zeigt. Ein großer Einfluss auf Δf und ΔD geht von dem Lösemittel aus, das die Partikel umgibt und von der QCM-D mitgemessen wird. So könnte die größere Steigung der Frequenzdifferenzen in Abb. 3.2a) im Vergleich zu der mit der Sauerbrey-Gleichung berechneten Geraden durch das mitgemessene Lösemittel erklärt werden. Auch die Obertonabhängigkeit der Steigung der Geraden in Abb. 3.2a) kann durch Lösemittelleffekte, wie das Eindringen der Scherschwingung in das Lösemittel, erklärt werden. Bei niedrigeren Obertönen ist die Eindringtiefe der Scherschwingung in die Lösung größer,^[45] sodass die Scherschwingung des 3. Obertons die Partikel am weitesten einschließt, die größte Menge an Lösemittel mitgemessen wird und die stärkste Abweichung der Steigung der Δf -Graphen von der Sauerbrey-Geraden verursacht.

Ohne den Einfluss des Lösemittels würde wenig oder keine Energie dissipiert werden und der Zusammenhang zwischen der Frequenzdifferenz Δf und der Massebeladung Δm müsste der Sauerbrey-Gleichung entsprechen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Δf und ΔD der trockenen Oberfläche vor dem Anlagerungsexperiment gemessen und über den Zeitraum des gesamten Anlagerungsexperiments aufgezeichnet. Das Experiment umfasste das Füllen der Flusszelle mit Lösemittel, die Anlagerung der Partikel, das Spülen mit Lösemittel und die 16 h dauernde Trocknung der Oberfläche. Die vor dem Füllen der Flusszelle gemessenen Werte wurden von den nach dem Trocknen der Partikelstruktur gemessenen Werten subtrahiert. Der auf diese Weise gemessene Zusammenhang von Δf und Δm ist in Abb. 3.2c) dargestellt, wobei die Ordinate gegenüber Abb. 3.2a) zweifach vergrößert ist. Die Ausgleichsgerade, die durch die Messpunkte gelegt wurde, liegt auf der Sauerbrey-Geraden. Das bedeutet, dass der Zusammenhang zwischen Δf und Δm ohne Solvens wie erwartet der Sauerbrey-Gleichung entspricht. Dies ist eine Bestätigung dafür,

dass die Abweichung von der Sauerbrey-Gleichung in Δf und die hohe Energiedissipation von Wechselwirkungen mit dem Lösemittel stammen.

Um das abweichende Verhalten des analysierten Systems im Lösemittel im Vergleich zu ähnlichen Systemen näher zu analysieren, wurden die Unterschiede zwischen den Systemen betrachtet. Auf dem REM-Bild in Abb. 3.1b) ist zu sehen, dass sich die Partikel abstoßen und einen Mindestabstand zueinander einhalten. Dieser Mindestabstand unterscheidet die Partikelanordnung von den in der Literatur gemessenen Systemen, die sich nicht abstoßen und zufällig angeordnet^[18,19,21,91] sind. Inwiefern die andere Anordnung und insbesondere das Auftreten geringerer Partikelabstände einen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen Δf und Δm haben kann, wird ersichtlich, wenn man die im Lösemittel bestehenden Effekte genauer betrachtet.

Das Verhalten von Δf und ΔD ist bei Systemen aus diskreten Partikeln signifikant durch hydrodynamische Wechselwirkungen bestimmt.^[20] Dabei muss zwischen den hydrodynamischen Wechselwirkungen der Partikel mit dem Solvens an sich und den hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Partikeln differenziert werden. Die Wirkung der hydrodynamischen Wechselwirkungen lässt sich erklären, indem wir uns zunächst eine leere Schwingquarzoberfläche im Lösemittel vorstellen. Nach dem Platzieren eines Partikels auf der leeren Oberfläche wird für den ersten Partikel ein Δf gemessen, das größer ist, als nach der Sauerbrey-Gleichung erwartet wird. Die Partikel werden durch die schwingende Oberfläche zum Schwingen angeregt und leicht durch die umgebenden Lösemittelmoleküle gezogen, die ebenfalls schwingen. Dabei findet je nach Festigkeit des Partikelkontakts mit der Oberfläche eine Rutsch- oder Kippbewegung statt, wodurch an den Rändern zum Lösemittel Energie dissipiert wird.^[20,21] Auf diese Weise hat der Partikel einen größeren Einfluss auf die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes und es wird ein größeres Δf pro adsorbiertem Partikel gemessen als ohne umgebendes Lösemittel gemessen werden würde.

Beim Platzieren eines zweiten Partikels in unendlicher Entfernung würde er nicht mit dem ersten Partikel wechselwirken und somit das gleiche Δf bewirken, wie der erste Partikel. Dabei stellt sich die Frage, ab welchem Partikelabstand hydrodynamische Wechselwirkungen zwischen den Partikeln messbar sind. Kommt es bei geringeren Partikelabständen zu einer gleichzeitigen Wechselwirkung zwischen den Partikeln, so wird die Energiedissipati-

on der einzelnen Partikel verringert und das Δf ist weniger groß als bei einzelnen Partikeln. Im Grenzfall dicht gepackter Oberflächen sind alle Partikel chemisch miteinander verbunden und haben nur sehr geringe hydrodynamische Wechselwirkungen mit dem Lösemittel. Dies führt dazu, dass die Partikel keine Rutsch- oder Kippbewegungen ausführen und keine Energie dissipieren.^[21] Δf entspricht hierbei der Sauerbrey-Gleichung, wobei unter dem dichten Partikelfilm eingeschlossenes Lösemittel mitgemessen wird.^[20] Damit sind die hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln mit kleinerem Abstand größer und verringern ΔD und das Überschätzen von Δf . Große Partikelabstände verursachen demnach einen größeren Ausschlag und kleinere Partikelabstände einen kleineren Ausschlag von Δf und ΔD .

Bei dem gemessenen System ist der Abstand der elektrostatisch geladenen Partikel so groß, dass die hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln zu klein sind, um die Größe von Δf zu reduzieren. Im Gegensatz dazu kann die Krümmung der ΔD -Kurven als Einfluss hydrodynamischer Wechselwirkungen zwischen den Partikeln interpretiert werden. Diese tritt ab einer Bedeckung von 15 ng/mm^2 beim 3. Oberton deutlich auf und ist beim 13. Oberton kaum zu sehen. Da der 3. Oberton eine größere Eindringtiefe hat und eine stärkere Krümmung verursacht als der 13. Oberton, ist auch bei ΔD eine Abhängigkeit von der Eindringtiefe der Scherwelle zu beobachten. Die Partikelabstände scheinen in dem Bereich über einer Bedeckung von 15 ng/mm^2 gerade so groß zu sein, dass der hydrodynamische Einfluss zwischen den Partikeln zunächst in ΔD , jedoch noch nicht in Δf messbar wurde.

Auf diese Weise konnte bei dem betrachteten System festgestellt werden, dass sich die hydrodynamischen Wechselwirkungen bereits bei geringeren Partikelabständen, die ab einer Bedeckung von 15 ng/mm^2 auftreten, auf ΔD auswirken. Die damit verknüpfte Reduzierung von ΔD für geringere Partikelabstände hat eine Krümmung der ΔD -Kurven der Obertöne mit größerer Eindringtiefe zur Folge.

Der Partikelabstand konnte durch die Analyse der REM-Bilder quantifiziert werden. Aus der Abstandsanalyse der REM-Bilder geht hervor, dass die Nanopartikel einen mittleren Abstand von 340 nm und einen Mindestabstand von $290 \pm 20 \text{ nm}$ einhalten. Mit diesem Mindestabstand kann nach den vorliegenden Untersuchungen eine untere Grenze angegeben werden, bei der sich die hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den Par-

tikeln noch nicht auf Δf auswirken. Da bei Δf durch die Linearität keine Einflüsse der hydrodynamischen Wechselwirkungen zu sehen sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkungen noch nicht stark genug sind und bei einem kleineren Abstand sichtbar werden würden.

Durch die zufällige Anordnung der Objekte bei Messungen in der Literatur^[18,19,21,91] gibt es im Vergleich zu dem in dieser Arbeit analysierten Modellsystem eine größere Anzahl kleiner Abstände. Durch die hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln wird dem Effekt der hydrodynamischen Wechselwirkungen isoliert liegender Partikel entgegengewirkt und mit steigender Bedeckung die Abweichung vom Sauerbrey-Verhalten reduziert. Damit einher geht die bereits beschriebene Reduktion der dissipierten Energie, wenn die diskreten Partikel kleinere Abstände einnehmen.

Das Auftreten kleiner Abstände kann mit Nächste-Nachbar-Abstandsverteilungen^[92] (NN-Verteilungen) veranschaulicht werden, wie in Abb. 3.3 gezeigt ist. In diese Verteilung geht für jeden Partikel der Abstand zum jeweils nächsten Nachbarn ein, was die Verteilung sehr empfindlich für kleine Partikelabstände macht. Die in schwarz dargestellte Verteilung stammt von einer Messung des in dieser Arbeit untersuchten Systems aus sich abstoßenden Partikeln. Die in rot dargestellte Verteilung wurde simuliert und repräsentiert die zufällig verteilten Partikel aus den Messungen in der Literatur. Der Partikeldurchmesser und die Bedeckung sind für die Partikelanordnungen beider Verteilungen gleich. Die

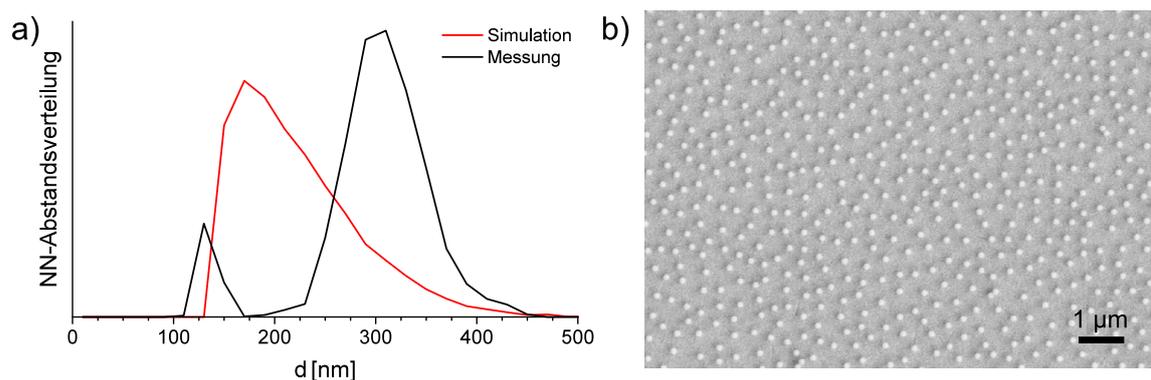


Abbildung 3.3: a) Nächste-Nachbar-Abstandsverteilung von Messungen mit gering bedeckten Oberflächen (schwarz) und einer Simulation nicht wechselwirkender, zufällig angeordneter Partikel des gleichen Partikeldurchmessers und der gleichen Bedeckung (rot). b) REM-Aufnahme von adsorbierten AHAPS-funktionalisierten Silica-Nanopartikeln auf einer Goldoberfläche eines QCM-D-Sensors.

Verteilungen sind gegen den Abstand d der Partikelmittelpunkte in nm aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind beide Graphen flächennormiert. Bei den zufällig angeordneten Partikeln liegt der Hauptteil der NN-Abstände im Bereich vom Partikeldurchmesser (137 nm) bis zu einem Abstand von 240 nm. Bei den sich abstoßenden Partikeln gibt es eine kleine Anzahl aggregierter Partikel bei ca. 137 nm, die auf Trocknungseffekte zurückzuführen sind und während der QCM-D-Messung in Lösung wahrscheinlich nicht aggregiert waren. Bis zu einem Abstand von 240 nm sind fast keine NN-Abstände zu finden. Im Gegensatz dazu liegt der Hauptteil an NN-Abständen von zufällig angeordneten Partikeln (Abb. 3.3a), rot) bei geringen Abständen. Dadurch gibt es einen großen Einfluss hydrodynamischer Wechselwirkungen zwischen den Partikeln, die die Dissipation und die Abweichung von der Sauerbrey-Geraden verringern. Durch die Abstoßung der Partikel ist die NN-Verteilung zu größeren Abständen verschoben. Dadurch ist der Einfluss der hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den sich abstoßenden Partikeln sehr klein und beim Zusammenhang zwischen Δf und Δm nicht sichtbar. Abbildung 3.3b) zeigt das REM-Bild zu der in Abb. 3.3a) gezeigten schwarzen NN-Verteilung. Die Partikel halten einen Mindestabstand ein, wobei am Rand des REM-Bildes wenige kleine Aggregate zu sehen sind.

Die Auswirkungen der hydrodynamischen Wechselwirkungen auf die QCM-D-Messungen wurden von Johannsmann *et al.*^[20,21] mit Finite-Elemente-Methode-(FEM)-Simulationen für äquidistante Zylinder analysiert. Die Zylinder reduzieren ihren Abstand mit steigender Bedeckung und berühren sich bei einer Bedeckung von 100 %. Verglichen mit dem in dieser Arbeit betrachteten System, haben die Zylinder einen kleineren Durchmesser von $d = 28 \text{ nm}$ ^[21] und sind damit gegenüber der Eindringtiefe der Schärwelle (187 nm beim 3. Oberton in Ethanol) deutlich kleiner. Darüber hinaus wurde die Simulation an einer zweidimensionalen Schnittfläche durchgeführt, die in Abb. 3.4a) dargestellt ist. Durch die beschriebenen Näherungen sind die Ergebnisse der FEM-Simulationen ausschließlich qualitativ^[21] mit den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen vergleichbar. Der simulierte Verlauf von Δf und ΔD in Abhängigkeit von der Bedeckung ist in Abb. 3.4b) dargestellt. Hierbei sinkt Δf zunächst linear und flacht ab einer Bedeckung von ca. 25 % ab. Eine Abhängigkeit vom Oberton ist nicht erkennbar. Die Graphen von ΔD steigen bis zu einer Bedeckung von rund 30 % an und sinken danach wieder ab. Dabei ist die Krümmung

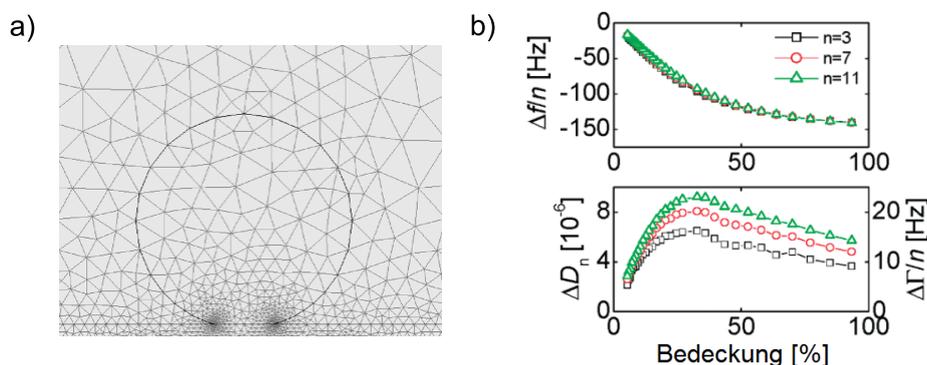


Abbildung 3.4: a) FEM-Netz zur Simulation der Auswirkungen des Lösemittels auf Δf und ΔD bei QCM-D-Messungen. b) Verlauf von ΔD und Δf in Abhängigkeit von der Bedeckung. 100 % Bedeckung entspricht einer Reihe von direkt aneinander liegenden Partikeln. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Johannsmann *et al.* [21] Copyright 2009 American Chemical Society.

des 3. Obertons am stärksten. Es ist möglich, dass die in dieser Arbeit betrachteten Bedeckungen noch im linearen Bereich der simulierten Daten liegen. Hierzu würde auch das Abknicken des 3. Obertons von ΔD im Vergleich zum 13. Oberton passen. Ein Unterschied zu den Simulationen besteht hingegen in der fehlenden Obertonabhängigkeit von Δf , was mit den gemachten Näherungen erklärt werden könnte.

Um zu überprüfen, ob vorhandene Methoden zur Ermittlung von Δm oder dem Partikeldurchmesser für nicht repulsive Systeme aus QCM-D-Messungen auch für Systeme mit sich abstoßenden Partikeln funktionieren, wurden die Methoden auf das getestete System angewendet. Eine empirische Methode, die zur Auswertung adsorbierter Schichten aus diskreten Objekten verwendet wird, ist ein Extrapolationsschema. [20] Dieses Schema beruht auf der Annahme, dass eine Partikelanlagerung, die bis zu einer Teilbedeckung der Oberfläche durchgeführt wurde, bis zu einer Vollbedeckung extrapoliert werden kann und der extrapolierte Film wie eine rigide Schicht behandelt werden kann. [20] Das bedeutet, dass ΔD gegen 0 geht und die Sauerbrey-Gleichung angewendet werden kann. Da Schichten aus Nanopartikeln nicht zu rigiden Schichten werden können, werden die gemessenen Werte einer Adsorption auf den Punkt extrapoliert, an dem das Verhältnis zwischen Δf und ΔD 0 ergibt. Ein Maß für die Menge der adsorbierten Schicht ist das Δf . Wird der Quotient aus ΔD und $-\Delta f$ gegen Δf aufgetragen, so bietet das den Vorteil, dass an dem Punkt, an dem $\Delta D / -\Delta f$ zu 0 bestimmt wird, ein Δf abgelesen werden kann. Da Δf bei rigiden

Schichten mittels Sauerbrey-Gleichung in ein Δm umgerechnet wird, kann auf diese Weise die adsorbierte Masse einer dichten Schicht der adsorbierten Partikel erhalten werden. Bei den in der Literatur^[22,27] analysierten Systemen entstehen bei dieser Art der Auftragung von $\Delta D / -\Delta f$ für verschiedene Obertöne jeweils Geraden, wie in Abb. 2.9 auf S. 26 gezeigt wurde. Extrapoliert man diese Geraden der verschiedenen Obertöne zu größeren Δf , so treffen sie sich in einem gemeinsamen Schnittpunkt mit der x-Achse, an dem $\Delta D / -\Delta f = 0$ ist. Das Δf an diesem Schnittpunkt entspricht dem Δf einer rigiden Schicht der adsorbierten Objekte^[22] und kann zur Berechnung des Partikeldurchmessers verwendet werden.

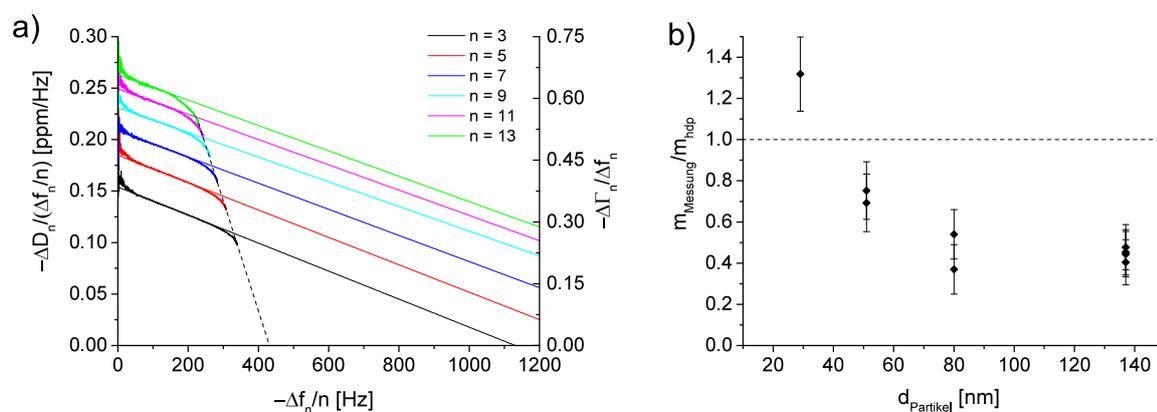


Abbildung 3.5: Auftragung von $-\Delta \Gamma / \Delta f$ gegen Δf für verschiedene Obertöne der in Abb. 3.1a) dargestellten QCM-D Messung. b) Mit Hilfe des Extrapolationsschemas ermittelte Massebelastungen, relativ zu einer hexagonal dichtesten Packung der Nanopartikel in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser d . Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Grunewald *et al.*^[90] Copyright 2015 American Chemical Society.

Das beschriebene Extrapolationsschema wurde mit dem in dieser Arbeit untersuchten System durchgeführt. Dabei entstanden Graphen, die einen geraden Bereich besitzen und bei höheren Werten von $-\Delta f / n$ abknicken. Diese Graphen sind in Abb. 3.5a) dargestellt. Beim Extrapolieren der linearen Bereiche erhält man mehrere parallele Geraden, die die x-Achse an verschiedenen Stellen schneiden. Ein einzelner Wert für $-\Delta f / n$ ist damit, im Gegensatz zu den in der Literatur gezeigten Messungen, nicht ermittelbar. Um einen Wert ablesen zu können, wurden die Enden der abgeknickten Kurven verbunden und die entstehende Gerade extrapoliert. In mehreren Messungen mit Partikeln unterschiedlicher Größe wurden aus dem Δf qualitativ ähnlicher Grafiken verschiedene relative Massebelastungen, bezogen auf m_{hdp} , bestimmt und in Abb. 3.5b) gegen den Partikeldurchmesser d aufgetragen. Auf diese Weise konnte ein Vergleich zwischen den Ergebnissen des Extrapolationssche-

mas angestellt und die Daten auf eine Abhängigkeit von d untersucht werden. Dies ist insbesondere in Bezug auf die Eindringtiefe der Scherwelle in Ethanol interessant, die sich von 181 nm beim 3. Oberton bis auf 87 nm beim 13. Oberton verringert und damit im Größenbereich der verwendeten Partikel liegt. Die extrapolierte Massebeladung der Partikel steigt mit kleinerem Partikeldurchmesser an. Welche Rolle die Eindringtiefe der Schermoden dabei spielt, ist jedoch unklar. Das prinzipielle Verhalten der $\Delta D / - \Delta f$ -Kurven hängt jedenfalls nicht vom Partikeldurchmesser ab.

Darüber hinaus treffen sich die extrapolierten Geraden nicht in einem Punkt und das ermittelte Δf entspricht weder der Masse einer hexagonal dichtesten Packung, noch einer soliden Schicht mit der Höhe der Partikeldurchmesser. Dadurch, dass das verwendete Verfahren empirisch ist,^[22] kann es sein, dass bei zufällig angeordneten Partikeln ein Unterschätzen des Partikeldurchmessers kompensiert wird und dadurch beispielsweise der Partikeldurchmesser mit einer Genauigkeit von 10 %^[22] ermittelt werden kann. Bei sich abstoßenden Partikeln ist der Verlauf von Δf und ΔD durch die weniger starken hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln weniger stark gekrümmt. Wie bereits in Abb. 3.2 auf Seite 51 gezeigt, kommt bei dem in dieser Arbeit untersuchten System hinzu, dass Δf linear ist, während der Graph von ΔD bereits durch den Einfluss der hydrodynamischen Wechselwirkungen gekrümmt ist. Dies führt zu einem nichtlinearen Verhalten von $\Delta D / - (\Delta f/n)$ gegenüber $\Delta f/n$ (Abb. 3.5).

Die Beobachtung, dass ΔD bei wachsender Bedeckung die Steigung verringert, konnte auch *in-situ* während der Anlagerungen beobachtet werden. Dazu wird im Folgenden noch einmal Abb. 3.1 auf Seite 50 betrachtet. Bei dieser Messung konnte nach dem Abflachen von Δf und ΔD nach ca. 40 min ein leichtes Absinken von Δf (schwarz) mit gleichzeitigem Absinken von ΔD (blau) beobachtet werden. Da Δf und Δm bei dem analysierten System proportional sind, ist das Absinken von Δf auch ein Steigen der adsorbierten Masse Δm . Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich weitere Partikel in einem langsamen Prozess auf der Oberfläche anlagerten. Die weitere Partikelanlagerung könnte so erklärt werden, dass sich die adsorbierten Partikel thermisch bewegten und somit immer wieder Lücken entstanden, in die neue Partikel adsorbierten. Mit der Adsorption von Partikeln fand eine Kompression, also ein Umorganisieren der Partikelstruktur, statt. Da Δf in den Messungen langsam immer weiter abgesunken ist, ist davon auszugehen, dass es sich um

einen sehr langsamen Prozess handelte. Dafür spricht, dass der Partikeltransport durch das Lösemittel auf die Oberfläche diffusionslimitiert ist. Die Beobachtung, dass neben Δf auch gleichzeitig ΔD gesunken ist, spricht ebenfalls dafür, dass der Partikelabstand leicht reduziert wurde. Das Sinken von ΔD mit sich annähernden Partikeln konnte ebenfalls bei FEM-Simulationen^[21] beobachtet werden.

Ein weiterer Hinweis auf das Umorganisieren der Partikelstruktur konnte aus der Analyse der durchschnittlichen Anzahl benachbarter Partikel in einem bestimmten Radius auf der Oberfläche erhalten werden. Hierzu wurde ein Radius festgelegt, die Anzahl der Nachbarpartikel innerhalb des Radius auf einem REM-Bild gezählt und über alle Partikel des REM-Bildes gemittelt. Da der Partikelabstand zwischen den Koordinaten der Partikel bestimmt wurde, wurden nur Partikel gezählt, deren Zentren in dem festgelegten Radius lagen. In Abb. 3.6) ist die durchschnittliche Anzahl an Partikeln in den Radien 500 nm (ausgefüllte Kreise, linke y-Achse) und 340 nm (leere Diamanten, rechte y-Achse) gegen die Bedeckung des jeweiligen REM-Bildes in Partikeln/ μm^2 aufgetragen. Die durchschnittliche Anzahl von Nachbarn innerhalb von 500 nm nimmt mit steigender Bedeckung linear zu. Der Radius von 500 nm ist groß genug, dass das Resultat lediglich die mittlere Dichte an Partikeln widerspiegelt. Ein System aus zufällig angeordneten Partikeln würde dementsprechend dieselbe Gerade erzeugen. Der Radius von 340 nm wurde so gewählt, dass er in der Nähe der mittleren Partikelabstände der analysierten Oberflächen liegt. Hier sollen lokale Effekte sichtbar werden. Der Radius ist so klein, dass bei einer gesättigten Oberfläche von etwa 9 Partikeln/ μm^2 etwa 2 Partikel innerhalb eines solchen Kreises liegen. Die Anzahl an benachbarten Partikeln, deren Zentren im Radius von 340 nm liegen, steigt bei der Messreihe des analysierten Systems mit steigender Bedeckung unterschiedlich schnell. Im Bereich unter 6 Partikeln/ μm^2 steigt die Anzahl der Partikel im Radius von 340 nm durch die Adsorption von Partikeln in der Nachbarschaft langsam an. Dabei liegen auch einige Partikel knapp außerhalb der 340 nm. Im Bereich über 6 Partikel/ μm^2 steigt die Anzahl der Partikel im Radius von 340 nm stärker an. Das lässt sich damit erklären, dass die Partikel, die knapp außerhalb der 340 nm liegen, den Abstand verringern und nach und nach innerhalb der 340 nm zu finden sind.

Dieser Prozess kann mit den in Abb. 3.6b) dargestellten $g(r)$ -Funktionen veranschaulicht werden. In Abb. 3.6b) sind die $g(r)$ -Funktionen zu den in Abb. 3.6a) gezeigten Oberflächen

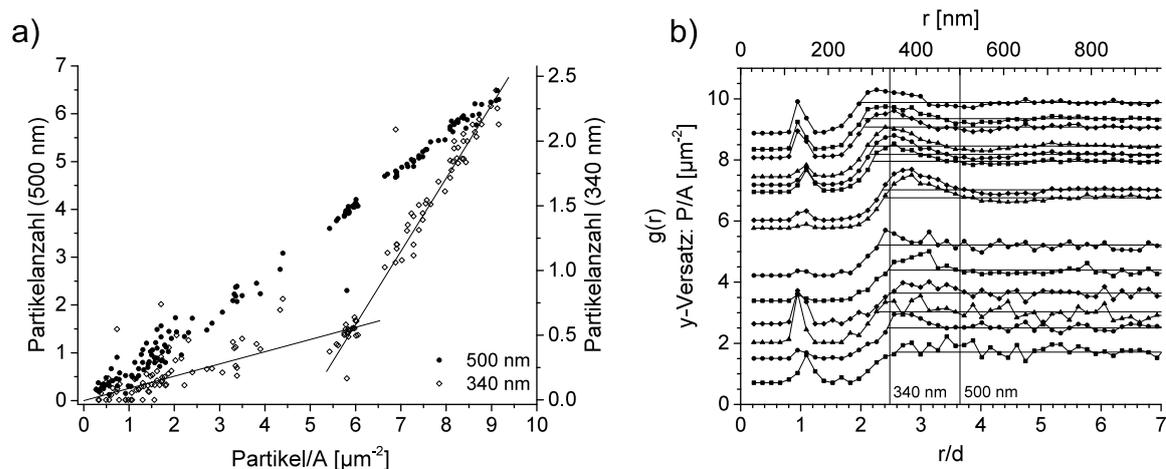


Abbildung 3.6: a) Durchschnittliche Anzahl an benachbarten Partikeln in einem Radius von 500 nm (ausgefüllte Punkte, linke y-Achse) und in einem Radius von 340 nm (offene Punkte, rechte y-Achse) gegen die Bedeckung in Partikeln/ μm^2 . b) Mittlere $g(r)$ -Funktionen der Partikelanordnungen. Auf der unteren x-Achse ist der Abstand der Partikelmittelpunkte in Durchmessern d und auf der oberen x-Achse in nm aufgetragen. Der vertikale Versatz ist die mittlere Bedeckung in Partikeln/ μm^2 . $g(r) = 1$ ist zur Orientierung als Linie eingezeichnet. Die Abstände von 340 nm und 500 nm sind als vertikale Linien eingezeichnet. Nachdruck von a) mit freundlicher Genehmigung von Grunewald *et al.*^[90] Copyright 2015 American Chemical Society.

dargestellt. Auf der unteren x-Achse ist der Partikelabstand in Einheiten des Partikeldurchmessers d und auf der oberen x-Achse in nm dargestellt. Der Versatz der $g(r)$ -Funktionen ist die in Abb. 3.6a) auf der x-Achse dargestellte Bedeckung. Zur Orientierung ist $g(r) = 1$ für jede $g(r)$ -Funktion mit einer Linie markiert. Damit die relative Häufigkeit der Nanopartikel bezogen auf eine zufällige Verteilung, die von den $g(r)$ -Funktionen dargestellt wird, mit den Kreisen aus Abb. 3.6a) korreliert werden kann, sind die Kreisradien von 340 nm und 500 nm als vertikale Linien dargestellt. Im Verlauf der $g(r)$ -Funktionen gering bedeckter Oberflächen hin zu größeren Bedeckungen ist sichtbar, wie das Maximum der $g(r)$ -Funktionen immer weiter in den Radius von 340 nm geschoben wird. Dies hat das Ansteigen der Geraden in Abb. 3.6a) zur Folge. Der Radius von 500 nm befindet sich hingegen in einem Bereich, der nur geringfügig von $g(r) = 1$ abweicht und eine zufällige Anordnung widerspiegelt. Die Analyse der Partikelanordnungen zeigt, dass sich die Partikelabstände verringerten. Die Veränderung der Anzahl benachbarter Partikel in bestimmten Radien ist demnach in Einklang mit den Hinweisen auf ein Komprimieren der Partikelstruktur während der Partikelanlagerung.

Neben diesen Erkenntnissen lassen sich noch weitere Fragestellungen zu den strukturellen Eigenschaften der Partikelanordnung mit Hilfe der räumlichen Statistik beantworten. Beispielsweise kann das elektrostatische Paarpotential durch eine simple Inversion der $g(r)$ -Funktion ermittelt werden, wenn es sich bei der untersuchten Partikelstruktur um eine laterale Gleichgewichtsstruktur handelt.^[25,79,80] Dabei wird die Paarkorrelationsfunktion ($g(r)$ -Funktion) der räumlichen Statistik genutzt. Im Limit niedriger Bedeckungen entspricht die Inversion der $g(r)$ -Funktion dem Paarpotential der Partikel.^[25,79,80] Die Herausforderung, die bei niedrig bedeckten Oberflächen entsteht, ist, dass im Vergleich zu höher bedeckten Oberflächen mehr Partikel für eine rauscharme $g(r)$ -Funktion benötigt werden. Gleichzeitig gibt es auf den REM-Bildern durch die geringe Bedeckung weniger Partikel. Dadurch wird es bei dem untersuchten System notwendig, REM-Bilder mehrerer Messungen gleicher Bedeckung für eine gemittelte $g(r)$ -Funktion zu verwenden. Dafür ist es wichtig zu wissen, ob die REM-Bilder der verschiedenen Messungen kombiniert werden dürfen, was mit statistischen Mitteln überprüft werden kann. Eine Möglichkeit ist zu testen, ob die Messpunkte, die in eine gemittelte Funktion eingehen, gaußverteilt sind. Dies kann bei der Berechnung der mittleren $g(r)$ -Funktion geschehen.

Zur Berechnung der mittleren $g(r)$ -Funktionen wurden die Werte der einzelnen $g(r)$ -Funktionen an jedem Partikelabstand r der Funktionen gemittelt. Wenn beispielsweise alle 20 nm ein Datenpunkt existiert und 10 $g(r)$ -Funktionen gemittelt werden, ergibt sich alle 20 nm eine Verteilung von Funktionswerten, die in die mittlere Funktion einfließen. Mit dem Shapiro-Wilk-Test konnte überprüft werden, ob die Werte dieser Verteilungen einer Gaußverteilung entsprechen.^[93] Der Shapiro-Wilk-Test ist auch bei einer geringen Anzahl von Werten anwendbar und besitzt eine hohe Teststärke.^[94] Für die $g(r)$ -Funktionen der betrachteten Partikelanordnungen wurde ein Konfidenzintervall von 95 % angenommen und die Verteilung der einzelnen Werte der $g(r)$ -Funktionen alle 20 nm getestet. Dabei wurde festgestellt, dass die Werte der $g(r)$ -Funktionen als gaußverteilt angenommen werden können. Dies bestätigt, dass die REM-Bilder aus verschiedenen Messungen gemittelt werden können und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ein laterales Gleichgewicht der adsorbierten Nanopartikel vorliegt.

Zusätzlich zur Gaußverteilung der Daten wurde als Absicherung überprüft, ob das Fehlerintervall der gemittelten Funktionen den Erwartungen entspricht. Bei $g(r)$ -Funktionen, bei

denen aufgrund der geringen Datenmenge kein Fehlerintervall gebildet werden konnte, wurde stattdessen die Größe des Rauschens simuliert. Die Abschätzung dieser Werte erfolgte durch die Simulation einer Partikeladsorption an eine große Oberfläche. Eine simple Möglichkeit stellt dabei das RSA-Model^[73] (engl. *random sequential adsorption*) dar. Dabei werden die Partikel nacheinander an zufälligen freien Positionen auf der Oberfläche platziert.^[73] Die Größe und die Anzahl der simulierten Oberflächen entsprach dabei der Größe und der Anzahl der REM-Bilder. Die Partikelgröße und die Oberflächenbedeckung wurden so gewählt, dass sie den Experimenten entsprechen. Die elektrostatische Abstoßung und die thermische Bewegung konnten durch eine Gaußverteilung der Partikelabstände in der Simulation berücksichtigt werden, sodass die $g(r)$ -Funktionen der Simulationen und der Messungen im Bereich des Fehlers übereinander liegen. Die Simulation wurde für verschiedene Bedeckungen durchgeführt und zeigt, dass das Rauschen und die Standardabweichung der Messungen den durch die Simulation entstandenen Erwartungen entsprechen. Die Abschätzung des Rauschens und der Standardabweichung ist also konsistent mit der Annahme, dass die in dieser Arbeit betrachteten Partikel unterschiedlicher Messungen auf REM-Bildern der gleichen Bedeckung die gleiche $g(r)$ -Funktion erzeugen. Damit konnte mit zwei unterschiedlichen Methoden gezeigt werden, dass die $g(r)$ -Funktionen aus verschiedenen Messungen gemittelt werden können.

Eine weitere Information, die aus den $g(r)$ -Funktionen ermittelt werden kann, ist unter anderem der mittlere Partikelabstand. Dieser lässt sich aus den $g(r)$ -Funktionen in Abb. 3.6b ablesen und ist die Stelle des ersten Maximums nach den Aggregaten. Bei dem analysierten System liegt der mittlere Partikelabstand bis zu einer Bedeckung von $6 \text{ Partikeln}/\mu\text{m}^2$ bei 2.8 Partikeldurchmessern d . Bei höheren Bedeckungen verringerte sich der mittlere Partikelabstand stetig. Damit wurde ein weiterer Anhaltspunkt für die Komprimierung der Partikelanordnung ab einer bestimmten Bedeckung erhalten.

Wie bereits erwähnt, kann das Paarpotential aus der Inversion der $g(r)$ -Funktion berechnet werden.^[25,79,80] Im Limit geringer Bedeckung gehen ausschließlich Abstände von Zwei-Partikel-Interaktionen in den invertierten Bereich der $g(r)$ -Funktion ein. Es ist auch möglich, Oberflächen mit höherer Bedeckung zu verwenden, in der auch Drei-Partikel-Interaktionen eine Rolle spielen. Da das Paarpotential in diesem Fall nicht mehr mit einer einfachen Inversion berechnet werden kann, wurden in dieser Arbeit niedrig bedeckte Oberflächen analysiert. Abbildung 3.7a) zeigt zwei $g(r)$ -Funktionen, die gegen den Parti-

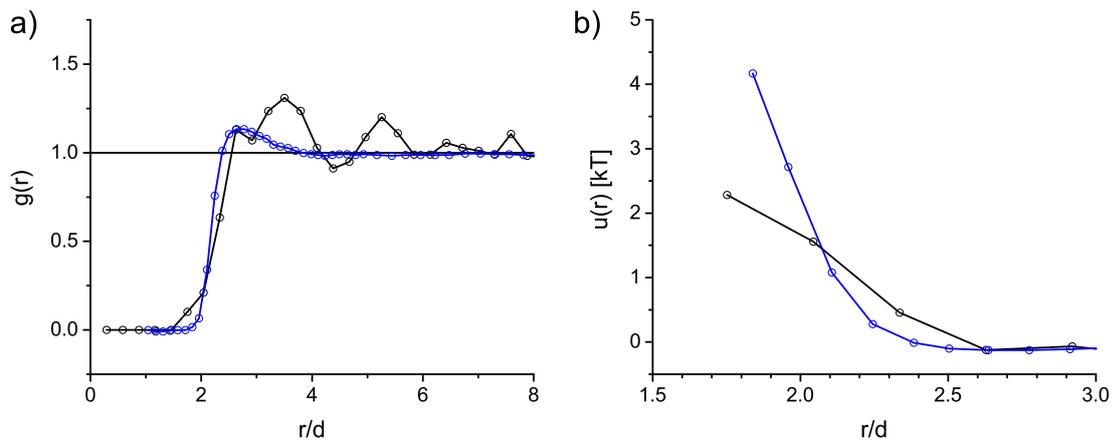


Abbildung 3.7: a) $g(r)$ -Funktion der niedrigsten Bedeckungen (schwarz) im Vergleich mit einer Messung von Brunner *et al.* [95] (blau) einer vergleichbar niedrigen relativen Bedeckung und b) daraus berechnete Paarpotentiale des analysierten Systems (schwarz) und der Literatur (blau) in $k_B T$ gegen den Partikelabstand r in Partikelradien d .

kelabstand r in Partikeldurchmessern d aufgetragen sind. In Abb. 3.7b) sind zwei durch Inversion aus den beiden $g(r)$ -Funktionen berechnete Paarpotentiale gegen r in d dargestellt. Die schwarzen Graphen wurden aus dem analysierten System bestimmt, während die blauen Graphen von Brunner *et al.* [95] zum Vergleich eingezeichnet sind. Die beiden Kurven liegen in Abb. 3.7a) übereinander, jedoch ist der Anstieg der blauen Kurve bei $r/d = 2$ steiler und das statistische Rauschen ist wesentlich kleiner. Das blau eingezeichnete Paarpotential steigt durch den steileren Anstieg der $g(r)$ -Funktion ebenfalls stärker an. Das Rauschen wurde von Brunner *et al.* durch die Aufnahme einer Vielzahl von Bildern der $3 \mu\text{m}$ großen Partikel mit einem Lichtmikroskop minimiert. [95] Während sich das Paarpotential des gemessenen Systems (schwarz) nur mit größeren Abweichungen mit einem Paarpotential aus der DLVO-Theorie anpassen lässt, stimmen die Daten von Brunner *et al.* gut mit der Theorie überein. Das liegt daran, dass Brunner *et al.* negativ geladene sulfat-terminierte Polystyrol-Nanopartikel verwenden, die in Wasser über einer ebenfalls negativ geladenen Siliziumdioxid-Oberfläche schweben. Dadurch befinden sich die Partikel in einem nahezu isotropen Medium, was gut durch ein Paarpotential beschrieben werden kann. Bei dem analysierten Modellsystem spielen zusätzlich die schwache Anbindung der Partikel an die Metalloberfläche und Bildladungen eine Rolle, die von der DLVO-Theorie nicht wiedergegeben werden.

Wie bereits beschrieben, ist eine Voraussetzung für die Analyse der Oberflächenstruktur, dass die Partikelanordnung möglichst frei von Trocknungseffekten wie aggregierten Partikeln ist. Auf diese Weise kann ein fixiertes Abbild der Partikelstruktur untersucht werden, das bereits vor dem Trocknen auf der Oberfläche existierte. Das Design einer Oberflächenstruktur, die ihre Ordnung beim Trocknen behält, ist nicht trivial und bedarf einer Auseinandersetzung mit den bei der Trocknung wirkenden Kräften. Die Herausforderung besteht darin, die Partikel am Aggregieren zu hindern. Um auszuschließen, dass die Partikel bereits vor der Anlagerung aggregiert waren, wurde der hydrodynamische Radius der suspendierten Partikel und das ζ -Potential mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) in der Suspension bestimmt. Mit der Messung des ζ -Potentials wurde die Integrität der Ligandenhülle und damit die Stabilität der Partikel gegenüber Aggregation in Suspension bestimmt. Wenn das ζ -Potential unter -30 mV liegt, ist die elektrostatische Abstoßung erfahrungsgemäß groß genug, um die Partikel in reinem Ethanol zu stabilisieren, sodass ausgeschlossen werden kann, dass die Partikel bereits vor der Anlagerung aggregieren.

Eine Aggregation der Partikel nach der Anlagerung kann durch Kapillarkräfte erfolgen. Nach der Anlagerung der Partikel wird die Oberfläche mit Lösemittel gespült und an Luft getrocknet. Beim Trocknen sinkt der Lösemittelspiegel so weit ab, dass sich zwischen den Partikeln Menisken ausbilden und dadurch Kapillarkräfte^[96,97] zwischen den Nanopartikeln wirken, sofern diese nahe genug zusammenliegen. Um diese Kapillarkräfte zu reduzieren, wurde Ethanol als Lösemittel verwendet, da die Kapillarkräfte nur etwa ein Drittel des Wertes von Wasser haben^[98]. Die Trocknungsgeschwindigkeit hat ebenfalls einen Einfluss auf den Erhalt der Partikelstruktur. Bei einem kontrollierten Fluss von 0.2 ml Luft/min wurde die Oberfläche über 16 h getrocknet. Die elektrostatische Abstoßung der geladenen Partikel wirkt den Kapillarkräften entgegen. Auch hier eignet sich Ethanol als Lösemittel, da es eine im Vergleich zu Wasser dreifach geringere Dielektrizitätskonstante^[99] hat und damit die elektrostatische Ladung weniger stark abschirmt.

Glatte Silica-Nanopartikel (Abb. 3.8a)), die nach Stöber^[100] synthetisiert wurden und auf diese Weise angelagert wurden, aggregierten beim Trocknen jedoch trotz dieser Maßnahmen zu großen Teilen auf der Oberfläche. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die Anzahl multivalenter Bindungen der Partikel zur Goldoberfläche so gering war, dass die Kapillarkräfte die Partikel beim Trocknen verschieben konnten. Folgt

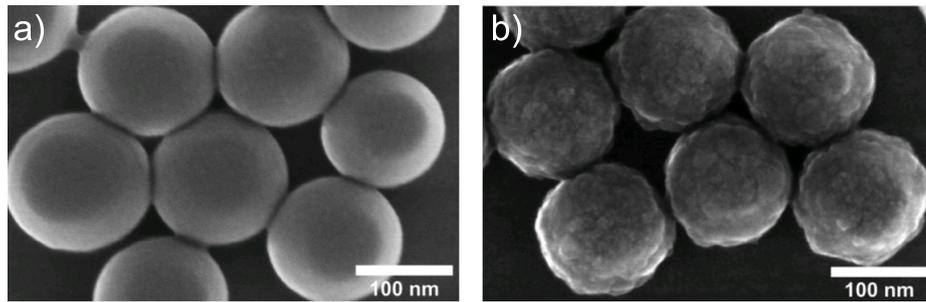


Abbildung 3.8: a) Glatte Silica-Nanopartikel, hergestellt nach der Synthese nach Stöber^[100] b) Raue Silica-Nanopartikel, hergestellt nach der Synthese nach Hartlen^[101] Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Schmudde *et al.*^[102] Copyright 2016 American Chemical Society.

man dieser Hypothese, hätte die Bindungsstärke zwischen Partikel und Oberfläche einen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Partikel.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Silica-Partikel gleicher Größe und Funktionalisierung mit einer größeren Rauheit verwendet, die nach der sogenannten Hartlen-Methode^[101] synthetisiert wurden. Raue Partikel haben durch die Unebenheiten auf ihrer Partikeloberfläche mehrere Kontaktpunkte mit der Unterlage und dadurch im Gegensatz zu glatten Partikeln eine größere Kontaktfläche zur Oberfläche. Die größere Kontaktfläche führt zu einer größeren Anzahl multivalenter Bindungen und damit zu einer Verstärkung der multivalenten Bindung zur Oberfläche. Durch die Verwendung von raueren Nanopartikeln (Abb. 3.8b) konnte somit ein Aggregieren der Partikel beim Trocknen stark reduziert werden. Ein gänzliches Unterbinden der Trocknungseffekte konnte durch das kovalente Binden der Nanopartikel an eine NHS/EDC-aktivierte, auf der Goldoberfläche selbstassemblierte Monolage (SAM) aus 11-Mercaptoundecanolmolekülen, erreicht werden. Es entstand eine über den kompletten Sensor geordnete Oberfläche. Auf diese Weise konnte demonstriert werden, dass eine höhere Bindungsstärke zwischen Partikel und Oberfläche die Bildung von Aggregaten wirksam reduziert.

Betrachtet man die laterale Verteilung, so ist sowohl die Partikelstruktur der aggregierten, glatten Partikel, als auch der wohl geordneten, kovalent gebundenen Partikel über die komplette Sensoroberfläche homogen. Im Gegensatz dazu weisen REM-Bilder rauher Partikel Unterschiede der Anzahl an Aggregaten zwischen dem zentralen Bereich und der übrigen Sensoroberfläche auf. Während die Partikelanordnung fast ausschließlich aus einzelnen Partikeln besteht (Abb. 3.1b)), findet in einem kleinen, mittigen Bereich von ca.

10 % der Oberfläche eine verstärkte Bildung von Aggregaten statt. Aufgrund der konvexen Oberfläche des Flusszellendeckels trocknet der Flüssigkeitsfilm zuletzt zwischen der Mitte des Sensors und der gegenüberliegenden Seite der Flusszelle. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die Form des Meniskus aufgrund der Flusszellegeometrie in der Mitte anders ist und dies die bei der Trocknung wirkenden Kräfte beeinflusst. Es konnte festgestellt werden, dass neben der Rauheit auch die Größe der Partikel einen Einfluss auf die Aggregation beim Trocknen hat. Dabei konnten bei rauen Partikeln mit einem Durchmesser unter 100 nm stärkere Trocknungseffekte als bei rauen Partikeln über 100 nm beobachtet werden. Um für die Untersuchung des Modellsystems möglichst geringe Trocknungseffekte zu erhalten, wurden für die gemachten Untersuchungen aufgrund der bisher genannten Ergebnisse raue Nanopartikel mit einem Durchmesser von 137 ± 4 nm verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adsorption von diskreten Partikeln im Hinblick auf die Abhängigkeit von Δf und ΔD von den adsorbierten Partikeln bei Messungen mit der QCM-D analysiert. Durch die Kombination von QCM-D und REM konnte die adsorbierte Masse Δm erhalten und die Struktur der Partikelanordnung untersucht werden. Es wurden mehrere Methoden zur Bestimmung der adsorbierten Masse aus Δf und ΔD angewendet. Dabei stellte sich heraus, dass das Extrapolationsschema auf der Kompensation von Fehlern beruht und bei einer Anordnung von repulsiven Partikeln nicht funktioniert. Entgegen den Erwartungen für Schichten aus diskreten Objekten, gibt es einen linearen Quasi-Sauerbrey-Zusammenhang zwischen Δf und Δm , der eine einmalige externe Messung der adsorbierten Masse und die Anpassung der Sauerbrey-Konstanten voraussetzt. Dieses lineare Verhalten entsteht durch den geringen Einfluss der hydrodynamischen Wechselwirkungen zwischen den sich abstoßenden Partikeln. Beim Ermitteln von Δf und ΔD zwischen der trockenen, leeren Goldoberfläche und der nach der Adsorption getrockneten Goldoberfläche wurden die hydrodynamischen Wechselwirkungen ausgeschlossen. Bei dieser Analyse entspricht das Δf des in dieser Arbeit untersuchten Systems den Erwartungen aufgrund der Sauerbrey-Gleichung und ΔD ist 0, wie man es für eine rigide Schicht erwarten würde. Die Partikel sind durch ihre multivalente Bindung zur Goldoberfläche irreversibel an die Goldoberfläche gebunden, können sich aber lateral auf ihr bewegen.

Durch die Anwendung der räumlichen Statistik konnte ein Komprimieren der Oberflächenstruktur ab einer bestimmten Bedeckung festgestellt werden. Durch die Inversion der $g(r)$ -Funktion bei niedrig bedeckten Oberflächen konnte das Paarpotential zwischen den Partikeln ermittelt werden.

4 Ausblick

In weiterführenden Untersuchungen könnte der Frage nachgegangen werden, ob das Partikelsystem so verändert werden kann, dass ein Gleichgewicht zwischen der Oberfläche und der Lösung entsteht. Dies wiederum birgt die Herausforderung, dass im REM keine gesättigte Oberfläche analysiert werden kann, da die Partikel beim Spülen zumindest teilweise von der Oberfläche desorbieren. Durch die Wahl größerer Partikel, die mit einem Lichtmikroskop sichtbar wären, könnte die Anordnung durch eine QCM-D Flusszelle mit Fenster analysiert werden. Um die auf der Goldoberfläche adsorbierte Schicht zu sehen, müsste die Oberfläche während des Spülens mit Lösemittel betrachtet werden.

Ein weiterer Weg wäre die gleichzeitige *in-situ*-Analyse der Oberfläche mit einem Ellipsometer. Dies ist durch eine Ellipsometriezelle der QCM-D in Verbindung mit einem Laser-Ellipsometer möglich.

Darüber hinaus könnte eine kovalent an einen SAM gebundene Partikelanordnung aus nicht-dicht-gepackten Partikeln mit einer proteinresistenten Beschichtung versehen werden, um als strukturierte Oberfläche für Proteinwechselwirkungen zu dienen. In weiteren Projektbereichen wurden bereits erste Untersuchungen zu den Proteinwechselwirkungen beispielsweise von Viren mit einer strukturierten Oberfläche mittels QCM-D durchgeführt. Darauf aufbauend könnte die multivalente Wechselwirkung in weiterführenden Untersuchungen durch die Anlagerung von Viren an eine topologisch veränderte Oberfläche wie beispielsweise Halbschalen analysiert werden.

5 Publikationen

5.1 Ordered Structures of Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces: Correlation of Quartz Crystal Microbalance with Structural Characterization

Christian Grunewald, Madlen Schmudde, Christelle Njiki Noufele, Christina Graf,* und Thomas Risse*

5.1.1 Zusammenfassung

Die Schwingquarzwaage mit Dissipationsaufzeichnung (QCM-D) wird häufig zur *in-situ* Messung der Adsorption von diskreten Partikeln wie beispielsweise Viren, Proteinen, Mizellen und anorganischen Nanopartikeln an Oberflächen eingesetzt. Während die adsorbierte Masse Δm von rigiden Schichten linear zur Frequenzänderung Δf ist und mit der Sauerbrey-Gleichung berechnet werden kann, ist die Interpretation von Δf bei Schichten aus diskreten Partikeln, insbesondere mit hoher Änderung der Dissipation ΔD , eine Herausforderung. Es wurden positiv geladene, aminfunktionalisierte Silica-Nanopartikel ($d = 137$ nm) aus einer ethanolischen Dispersion an einer Goldoberfläche adsorbiert. Die Dichte der adsorbierten Teilchen wurde *ex-situ* mittels REM ermittelt, woraus die entsprechende Masse berechnet und anschließend mit den gemessenen Δf und ΔD aus den QCM-D-Messungen korreliert wurde. Durch die REM-Bilder konnte zudem die Anordnung der Partikel untersucht werden. Die Partikel stoßen sich elektrostatisch ab und bilden einen Film aus nicht dicht gepackten Nanopartikeln, die über weite Bereiche geordnet sind und einen Mindestabstand einhalten. Die Sättigungsbedeckung beträgt durch die elektrostatische Abstoßung 15 % der hexagonal dichtesten Packung auf der Oberfläche. Obwohl die adsorbierte Schicht ein großes ΔD besitzt, was üblicherweise mit viskoelastischem Verhalten des System erklärt wird, ist die Frequenzänderung Δf proportional zur beobachteten Masse der adsorbierten Teilchen. Der Wert der Proportionalitätskonstanten hängt allerdings vom Oberton, das heißt von der Resonanzfrequenz des Quarzkristalls, ab und entspricht nicht der Sauerbrey-Konstanten. Dies zeigt, dass die adsorbierte Masse nicht allein aus einer *in-situ* QCM-D-Messung bestimmt werden kann und eine zweite

Methode hinzugezogen werden muss. Die Korrelation von ΔD und Δf mit der Struktur der Partikelanordnung zeigt, dass mit abnehmendem Partikelabstand zunächst geringe Abweichungen vom linearen Verhalten in ΔD beobachtet werden, während die Frequenzänderung Δf noch proportional zur adsorbierten Masse ist. Damit kann eine untere Grenze von rund zwei Partikeldurchmessern (290 ± 20 nm) angegeben werden, bis zu der ΔD nur wenig und Δf als lokaleres Phänomen gar nicht von einem linearen Verhalten abweichen.

5.1.2 Eigenanteil

Die Durchführung der QCM-D-Messungen, die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der REM- und QCM-D-Messungen, die Berechnung der Verteilungsfunktionen, die Berechnung und Auswertung der $-\Delta D/\Delta f$ über Δf -Diagramme sowie die Konzeption und das Schreiben des Manuskripts wurden von mir umgesetzt.

5.1.3 Artikel

Reprinted with permission from C. Grunewald, M. Schmudde, C. N. Noufele, C. Graf, T. Risse, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 10642–10649. Copyright 2015 American Chemical Society.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03572>.

Ordered Structures of Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces: Correlation of Quartz Crystal Microbalance with Structural Characterization

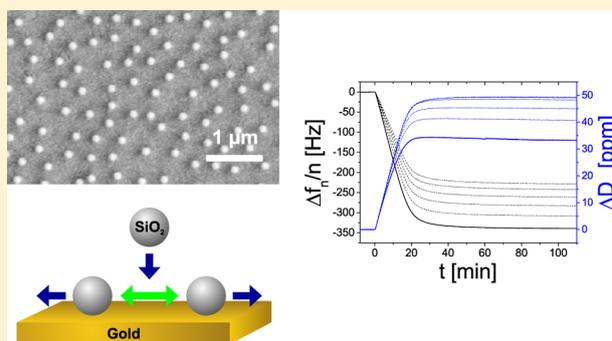
Christian Grunewald, Madlen Schmutde, Christelle Njiki Noufele, Christina Graf,* and Thomas Risse*

Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Takustrasse 3, 14195 Berlin, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Quartz crystal microbalance (QCM) is frequently used to investigate adsorption of nanometer-sized objects such as proteins, viruses, or organic as well as inorganic nanoparticles from solution. The interpretation of the data obtained for heterogeneous adsorbate layers is not straightforward in particular if the systems exhibit sizable amounts of dissipation. In this study we investigate the deposition of monodisperse, amine functionalized silica nanoparticles on gold surfaces using QCM with dissipation (QCM-D) to obtain frequency and dissipation changes during adsorption from the liquid phase. These investigations are combined with ex situ scanning electron microscopy (SEM) measurements to study both coverage as well as lateral arrangement of the particles.

An ordered layer of particles is found at saturation coverage due to the charged particle surface resulting in a repulsive interaction between the particles. The repulsion ensures a minimal distance between the particles, which leads to a saturation coverage of 15% for particles of 137 nm diameter. The frequency shift is shown to be a linear function of coverage which is a behavior expected for an elastic medium according to the Sauerbrey equation. However, the system shows a strong dependence of the normalized frequency shift on the overtones as well as a large dissipation, which is a clear indication for a system with viscoelastic properties. The analysis of the data show that a reliable determination of the adsorbed mass solely on the basis of QCM-D results is not possible, but additional information as determined by SEM in the present case is required to determine the coverage. From a correlation of the QCM-D results with the structural characterization it is possible to infer that the dissipation is a long ranged phenomenon. A lower boundary of the interaction length could be derived being twice the particle diameter for the particles studied here. In contrast to that the frequency response behaves like local phenomenon.



Quartz crystal microbalance with dissipation detection (QCM-D) has become a versatile tool to study interactions at the liquid–solid interface.^{1–5} It is a label free method used not only to determine information about the adsorbed mass but also to extract other properties such as the morphology of adsorbates or phase transformations.^{1,2,4} The information needs to be extracted from the observed frequency change (Δf) and the corresponding change in dissipation (ΔD) of the quartz sensor in modern commercial instruments being measured at various harmonics of the primary resonance frequency. The analysis is straightforward for elastic media forming a continuous film on the sensor surface. Under these conditions the change of dissipation or equivalently the change of the quality factor of the quartz crystal resonator is very small, and the change of frequency is directly proportional to the adsorbed mass (m) known as the Sauerbrey relation⁶

$$\Delta m = -C \frac{\Delta f_n}{n} \quad (1)$$

where C is the mass sensitivity constant being $17.7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ for the QCM crystals used in this study, and n is the

overtone number. The situation is more complex for adsorption of nanosized adsorbates such as proteins, viruses, or nanoparticles, which form heterogeneous layers on the surfaces. There is a considerable amount of literature addressing the problem associated with the heterogeneity of the system (e.g., refs 7–12). Heterogeneous adsorbate systems are typically categorized into systems exhibiting considerable dissipation and those showing only small dissipation.⁴ The latter type of systems was quite successfully treated with a modified Sauerbrey approach using e.g. a liquid cone model to account for the contributions of the surrounding liquid.^{4,7,9,13} The former systems such as e.g. lipid vesicles on titania surfaces, which exhibit frequency dependent dissipation as well as frequency dependent frequency shifts, are more difficult to describe and need more sophisticated approaches.^{10,14} To this end simulations, which solve the hydrodynamic problem numerically, were used in trying to deduce information on

Received: September 19, 2015

Accepted: September 23, 2015

Published: September 23, 2015

the underlying physics of the problem.^{4,8,11,12,15} These simulations rely on the so-called small load approximation, which links observables of the QCM experiments namely changes in frequency and dissipation with the real and imaginary part of the complex ratio between stress and velocity at the surface of the sensor. Because of the linear correlation between frequency shift and stress it was concluded that the stress can be treated in a laterally averaged manner, which provides the basis for treating heterogeneous systems within this model.^{4,8,16} These calculations show that the dissipation typically found to be dependent on the overtone number is associated with the properties of the interface layer between adsorbate and crystal surface as well as with the solvent rather than the viscoelastic properties of the adsorbate itself.^{8,15} The theoretical modeling suggests that the rocking and sliding motion of the particles adsorbed on the surface and the corresponding frictional flow of solvent molecules are particularly important for the observed changes in dissipation and frequency.^{4,8,15} The viscoelastic properties of the particles were proposed to play a bigger role if not only the dissipation but also the frequency shift becomes a function of the oscillator frequency.⁴ A particular example of the latter class of systems are lipid vesicles tethered to solid surfaces.^{11,12} A quantitative description of such a system using numerical solutions of the hydrodynamic problem has not been done. Up until now hydrodynamic modeling is limited to simplified model calculations i.e. the adsorbate system was typically modeled by a pseudo-two-dimensional system.^{8,11,12,15} While these calculations show at least semiquantitative results for systems with low dissipation, the published results obtained for systems with large dependence of dissipation and frequency change on coverage such as adsorbed liposomes remain qualitative.^{11,12} A variety of heuristic approaches have been suggested to treat these more complex systems. A rather successful one is to use the ratio between dissipation and frequency shift as a function of the frequency shift and extrapolate the data linearly toward a frequency shift corresponding to negligible dissipation.^{11,12,15,17} The extrapolation scheme was prompted by the observation that the plots often obey a linear correlation between the dissipation/frequency ratio and the frequency shift; however, a clear physical picture that is underlying this extrapolation is missing, yet.^{11,12,15,17} For a variety of systems the extrapolated frequency shifts, which can be thought of as the hypothetical shift observed for a continuous elastic film of this material, are in good agreement with the expectations based on the structural properties of the system at hand.^{12,15,17} It was also shown that this idea may allow to deduce more complex information such as the shape of lipid vesicles adsorbed on surfaces.¹¹

In this contribution model systems of monodisperse silica nanoparticles functionalized through silanol chemistry with organic shells containing terminal amine functionalities were used to investigate the adsorption of these systems on gold surfaces by means of QCM-D. The QCM-D experiments were combined with scanning electron microscopy (SEM) to correlate the observed QCM traces to adsorbed masses and characterize the morphology of the adsorbed layer. The systems exhibit not only strong dissipation but also a strong dependence of both the dissipation as well as the frequency shift on the measurement frequency (overtones). However, in contrast to most systems where nanometer-sized adsorbates are investigated, the observed frequency shift versus adsorbed mass is perfectly linear as expected based on elastic medium theory. We

will discuss this observation in light on the structural properties of the system.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Tetraethyl orthosilicate (TEOS, Fluka, 99%), L-arginine (Fluka, 99.5%), cyclohexane (Carl Roth, 99.5%), ethanol (EtOH, Berkel AHK, 100%), ethanol (EtOH, Fisher Scientific, 96%), ammonia solution (Carl Roth, 25–27%), N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS, ABCR, 92%), and sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck, 85%) were used as received.

Synthesis of Monodisperse SiO₂ Particles. All silica nanoparticles used in this study were synthesized according to the method of Hartlen et al.¹⁸ in a multistep growth process.

In brief, an aqueous solution of L-arginine (0.05 mmol in 6.9 mL of H₂O) was prepared, and a layer of cyclohexane (0.55 mL) was added. The solution was heated to 60 °C, and TEOS (3 mmol) was added swiftly to the cyclohexane layer. Particles with a diameter of 20 ± 2 nm were obtained after stirring for 20 h at 60 °C at 300 rpm. These particles were used as seeds for subsequent growth steps (e.g., particles of 137 nm diameter were obtained after five growth steps). In each growth step, the seed dispersion was diluted without cleaning with water to a final concentration of 5 g/L. Two mM L-arginine were used in each step, and the amounts of TEOS and cyclohexane follow the method of Hartlen.¹⁸ Separation and subsequent purification were achieved by cycles of centrifugation at 240 g and redispersion in ethanol. The particles were stored in ethanol for further applications.

Functionalization of SiO₂ Particles with AHAPS. Silica nanoparticles diluted in ethanol and ammonia were functionalized with N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS) by stirring the reaction mixture at RT overnight and subsequent refluxing for 2 h at 80 °C in an argon atmosphere. The particles were purified by three centrifugation (960 g) and redispersion steps in ethanol. The AHAPS functionalization on the particle surface leads to positively charged particles being characterized by positive zeta potentials, which is responsible for the stability of the colloids. Subsequently, the functionalized particles were stored in ethanol under argon at 8 °C. Details of the procedure can be found in the literature.¹⁹

Scanning Electron Microscopy (SEM). SEM images of the dried QCM sensors were acquired on a Hitachi SU8030 EM with an acceleration voltage of either 30 kV or 3 kV in the secondary electron (SE) mode.

For calculating the areal mass densities, the diameter of the particles was determined from the SEM images. From this the particle volume was calculated. Silica nanoparticles were found to have a matrix density of 2.1 g/cm³²⁰ and a porosity of 10–15%,²¹ which yields an average density of (1.93 ± 0.03) g/cm³ assuming the pores to be filled with ethanol.

The area density of particles was determined using 10 to 50 SEM images taken at various positions of the quartz chip, and mean values together with the standard deviation were determined. Together with the average mass density the areal particle densities were recalculated into areal mass densities.

Substrates. QCM-D sensors with a fundamental frequency of 4.95 ± 0.02 MHz, coated with gold, were purchased from Q-Sense (Västra Frölunda, Sweden). They were cleaned by 10 min UV/ozone (Bioforce, Ames, IA) treatment and 30 min immersion in 2% SDS solution. After rinsing with ultrapure water and drying with nitrogen the surfaces were stored at

ambient conditions. They were treated for 10 min with UV/ozone directly before use.

Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. QCM-D experiments were done with a Q-Sense E1 system (Q-Sense) using the standard flow cell. First the flow cell was rinsed with ethanol for about 20 min at 25 °C until the baseline was stable. The particle dispersion in ethanol was kept under an argon atmosphere at all times and was injected at a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ until a steady state was reached. Subsequently, the chamber was rinsed with pure ethanol before the surface was allowed to dry in the chamber at an airflow of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ overnight. All QCM traces show frequency changes normalized to the corresponding overtone $\Delta f_n/n$. The change in quality factor of the resonator is given as the so-called dissipation in units of ppm and is also normalized on the corresponding overtone.

RESULTS AND DISCUSSION

QCM-D Results for AHAPS Functionalized Silica Nanoparticles in the Liquid State. A typical QCM-D measurement of AHAPS functionalized silica nanoparticles with a diameter of 137 ± 4 nm adsorbed on the gold surface of a QCM chip is shown in Figure 1. The normalized frequency

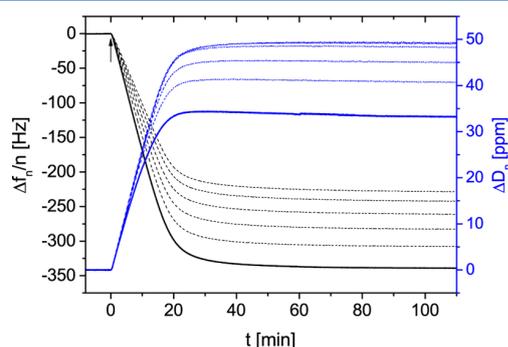


Figure 1. QCM-D measurement of AHAPS functionalized silica particles with a diameter of 137 ± 4 nm adsorbed on gold. Black traces: normalized frequency changes; blue traces: corresponding changes of dissipation for different overtones (3rd–13th). The bold solid traces belong to the 3rd overtone.

change $\Delta f_n/n$ and the corresponding dissipation change ΔD_n are plotted for the third up to the 13th overtone against time. The admission of the particle dispersion into the QCM cell

leads to a reduction of the resonance frequency and a concomitant increase of dissipation. The frequency change drops almost linear with time until about 20 min and afterward flattens off and reaches an almost constant frequency at longer times. The maximal observed frequency change decreases monotonously with the overtone number being reduced by about 30% when comparing the third with the 13th overtone. The dissipation increases until about 20 min almost linearly. For the smaller overtones (3rd, 5th, and 7th) it goes through a shallow maximum and drops slightly by a few ppm, while the higher overtones simply leveling off for longer times. The dissipation increases with measurement frequency; however, for the higher overtones the differences between adjacent overtones become significantly smaller showing very similar behavior for the 11th and the 13th overtone. The strong dependence of both frequency shift as well as dissipation on the measurement frequency is typically found for weakly bound systems such as liposomes on titania,^{11,12} gold,²² and silicon dioxide²² surfaces, ferritin on gold,^{8,23} or silica particles on silica surfaces.²⁴ The ratio of ΔD to $-\Delta f$ is often used to characterize the deviation from the ideal Sauerbrey-like behavior. For the current system this ratio is about $1 \times 10^{-7} \text{ Hz}^{-1}$, which is e.g. very comparable to ratios observed for the adsorption of intact liposomes in aqueous buffer solution on different substrates.^{22,11,12} The similarity between lipid vesicles and silica nanoparticles in terms of their QCM response are in line with the view put forward in a series of articles that the observed dissipation is not probing the viscoelastic properties of the adsorbate itself rather than those of its interface with the sensor surface and the solvent.^{8,12,15,23,25} Along this line it can be understood that silica nanoparticles, which can be considered as rigid spheres,²⁶ share the same behavior in a QCM experiment as lipid vesicles as long as the interaction with the sensor surface and the solvent are comparable.

For systems exhibiting large dissipation, the application of the Sauerbrey equation predicting a linear correlation between the frequency change and the adsorbed mass is problematic.⁴ Therefore, a simple analysis of the data using the Sauerbrey equation to determine the mass of the adsorbed nanoparticles from the observed frequency shift is not possible. To get an independent measure of the deposited amounts, the QCM sensors were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) after adsorption of the particles in the QCM cell. Figure 2a shows the correlation between the frequency change for the 3rd, the 7th, and the 13th overtone observed by QCM and the

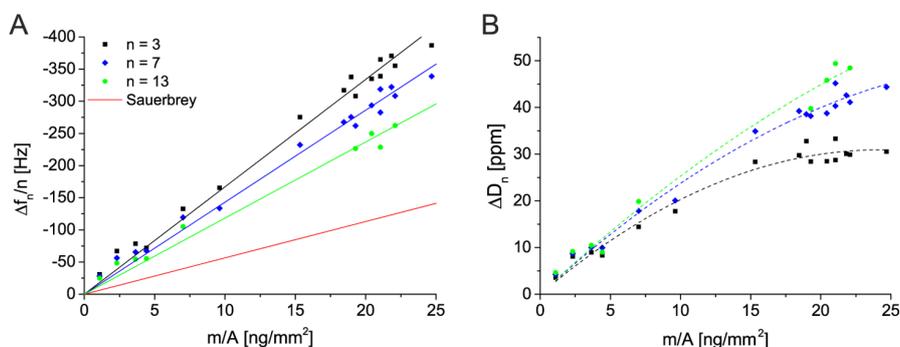


Figure 2. A) Plot of the normalized frequency change as a function of the areal mass density as determined from the SEM images for three overtones. Red line is the expectation based on the Sauerbrey equation using a constant of $17.7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. B) Plot of the normalized change of dissipation for the same overtones as a function of the areal mass density. Dashed lines in the plot are guides to the eye.

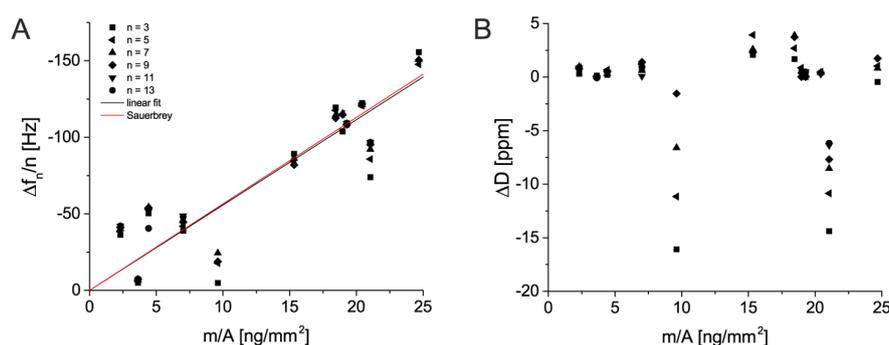


Figure 3. (A) Frequency shift of different measurements as a function of the areal mass density measured by SEM. Symbols denote the results from different overtones. (B) Corresponding changes of the dissipation for the measurements of (A).

corresponding areal mass density determined from the SEM images for a series of independent measurements with different particle loadings. The maximal coverage of 24.7 ng/mm² observed here corresponds to a particle density of 9.5 particles/μm² and surface coverage of 15.4% with respect to a hexagonal closed packed arrangement of spheres on a surface (a more detailed account on the particle arrangement can be found in Figure 4 and will be discussed below). The data points with areal mass densities between 18.4 and 24.7 ng/mm² correspond to saturation coverage of individual measurements and to corresponding area densities of 7.1 to 9.5 particles/μm². We could not correlate the observed variations in saturation coverage to changes of the experimental conditions such as the zeta potential of the particles. Interrupting the adsorption process by flushing the QCM cell with ethanol at a given frequency change was used to prepare samples with smaller loadings. Figure 2a reveals a linear correlation between the frequency change and areal mass density for all overtones; however, the slope of the curves drops monotonically with overtone order as expected based on the results discussed above. It is important to note that the observed slopes are considerably steeper than expected based on the Sauerbrey equation (shown as the red trace in Figure 2a). This observation is in line with results described in the literature for adsorption of nanometer-sized adsorbates and is oftentimes associated with the excitation of solvent, which hence gets “weighted” by the balance.^{4,7,13} However, investigations for various nanometer sized adsorbates ranging from proteins to viruses or nanoparticles typically show significant deviation from a simple linear relation between frequency and coverage already for small surface coverage.^{4,7,8,12,13,15}

Figure 2B shows the corresponding change of dissipation as a function of areal mass density for the three overtones presented in Figure 2A. The change of dissipation deviates significantly from a linear correlation for higher coverage. In particular the third overtone flattens at higher coverage and is basically horizontal for frequency changes beyond −2.50 Hz corresponding to a coverage of 12% of the closed packed arrangement. For higher harmonics the deviation from a linear correlation is less prominent. The latter point is in line with observations in the literature.^{12,15} It was shown that the dissipation may go through a maximum as a function of coverage, and this maximum shifts to higher coverage with increasing overtone order.

QCM-D Results for AHAPS Functionalized Silica Nanoparticles in the Dried State. As pointed out above the deviation between the measured frequency response and the expectation based on the Sauerbrey equation in the liquid

state is often explained by the excitation of solvent being weighted. Hence, it is useful to compare the results in the liquid state with the frequency shifts that are observed after drying the sample. Figure 3a shows the frequency shifts of the dried sample as a function of the areal mass density determined by SEM. It is seen that except for two measurements the normalized frequency shift depends only slightly on the overtone. In addition to that a linear regression of the data reveals a line, which is very close to the expectation based on the Sauerbrey equation (red and blue line in Figure 3a). However, for small loadings below 5 ng/mm² the observed frequency shifts deviate from the ideal linear correlation. One has to keep in mind that each of the measurements took more than 18 h, which renders the stability of the entire system a crucial factor. A typical measurement showing the entire measurement sequence can be found in the Supporting Information. The corresponding changes of the dissipation as a function of coverage are shown in Figure 3b. Except for the two measurements, which also deviate strongly in the frequency response, all measurements show a small dissipation of a few ppm in the dried state. From these measurements it can be concluded that QCM is able to determine the adsorbed mass of this nanostructured adsorbate system in the dried state with reasonable precision.

Structural Characterization of the AHAPS Functionalized Silica Particles on a Flat Gold Surface. Figure 4 shows SEM images for particle densities of 5.9 (A) and 2.2 particles/μm² (B). From a visual inspection of both images it is readily seen that the particles do not exhibit a distance distribution expected for a statistical arrangement of particles. Most strikingly small interparticle distances are absent. This behavior points to a repulsive interaction between the particles, which originates from the Coulomb repulsion between the

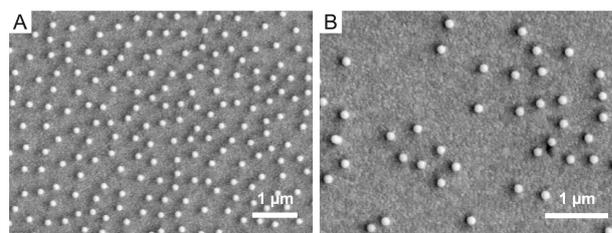


Figure 4. SEM images of positively charged AHAPS functionalized silica particles with a diameter of 137 ± 4 nm on a gold surface of a QCM sensor. The surface particle densities are (A) 5.9 and (B) 2.2 particles/μm².

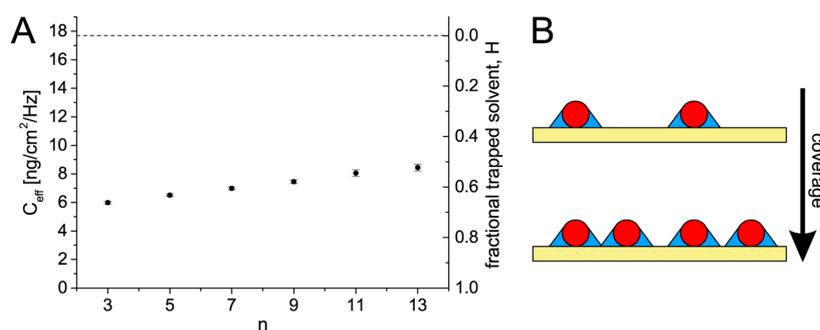


Figure 5. A) Effective Sauerbrey constants (C_{eff}) (left ordinate) and corresponding fractional mass of trapped solvent (right ordinate) as deduced from the slope of the curves presented in Figure 2a) in comparison to the expectation based on an ideal Sauerbrey behavior (expected Sauerbrey constant is shown as dashed horizontal line). B) Sketch of nanoparticles with associated solvent, which is excited together with the particles.

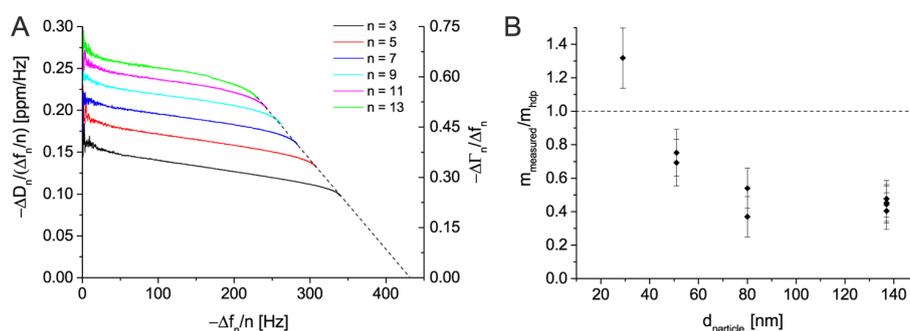


Figure 6. a) Plot of the negative ratio of change of dissipation and normalized frequency change against the frequency shift. b) Ratio between the mass of the monolayer determined from the extrapolated frequency shift at vanishing dissipation (see text) and the mass of a hexagonal closed packed layer of particles for different particle sizes.

charged nanoparticles. The particles are positively charged as characterized by a zeta potential of 59 ± 5 mV in ethanol, due to the protonated amino moieties of the AHAPS functionalized particle surface. The formation of an array of well-separated particles over the entire coverage range is in sharp contrast to typically observed statistical growth of nanoparticles, which shows short interparticle distances already at low coverage. For the present case the repulsion between the particles suppresses the formation of particles with distances below about twice the particle diameter ($r_{\text{dist}} < 290$ nm). In turn, interparticle distances of about 300 nm are found much more frequently than expected based on a statistical distribution, which is nicely seen in Figure 4b as well as in Figure 7 below.

Analysis of the Data in Ethanol within an Effective Sauerbrey Model. As stated above the frequency change of the QCM in the liquid state corresponds to a significantly larger adsorbed mass than expected from the mass of the adsorbed silica particles. Due to the linear dependence of the frequency shift on coverage the data may be analyzed based on an effective Sauerbrey model. Figure 5 provides a plot of effective Sauerbrey constants (C_{eff}) as a function of the overtone number as calculated from eq 1 using the adsorbed masses determined by SEM. It is seen that the constants rise from about $6.0 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ for the third to $8.5 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ for the 13th overtone. The deviation from the Sauerbrey constant of the quartz crystal used here, indicated by the horizontal line in the plot, may be interpreted as an excitation of solvent by the QCM and one translates the apparent Sauerbrey constants into a fractional solvent mass as suggested in the literature (see for example refs 7 and 13). The fractional solvent mass is given on the axis on the right-hand side and ranges from 66% for the

third to 52% for the 13th overtone, which is directly comparable to values found for proteins, viruses, lipid vesicles, and other particles in the coverage range observed here. Due to the linear correlation between frequency and adsorbed mass the fraction of solvent contributing to the change of frequency remains constant over the coverage range investigated here, which is in contrast to the reports in the literature^{7,13} showing a decrease of the fractional solvent content with coverage. In a simplified model sketched in Figure 5b this would imply that one has to have a constant overlap between the solvent volumes that are excited together with different particles (symbolized as a cone in Figure 5b). In case the number of neighbors within a given distance is changing with coverage, which it does in the case of these particles (see Figure 7 for a more detailed discussion) the overlap has to be small. This analysis relies on the assumption that the mass change is encoded solely in the observed frequency change. However, this assumption is problematic for systems with a significant amount of dissipation.^{4,7,8,12,13,15}

Analysis of the QCM Data Using an Extrapolation Scheme on the $\Delta D/\Delta f$ Ratio. A heuristic approach being used for systems showing a large dependence of dissipation and frequency change on the overtone utilizes the ratio between these two quantities and plots it as a function of the frequency change.^{15,17,11,12} The idea is to extrapolate the ratio linearly to vanishing dissipation and extract a frequency shift at zero dissipation change, which can be thought of as the frequency change obtained by a continuous film of this material behaving like an elastic system. Figure 6a shows the corresponding plot of the data from Figure 1. First, it is seen that the ratio is highest for the 13th and lowest for the third harmonics. In

comparison with liposomes the observed values of ΔD are about 30% smaller,¹² which according to the literature reflect the different stiffness of the particles under consideration. Apart from the absolute values the shape of the curves for different harmonics is very similar. After the expected numerical instabilities of the ratio at small frequency changes a linear decrease is observed notably with similar slope for all overtones; however, at higher frequency change the curves consistently bend downward. This occurs at different frequency changes, however, at the same coverage for the different harmonics, and it corresponds to the point at which the curve of the frequency change deviates from the linear decrease and starts to flatten off in Figure 1. The linear decrease with frequency change is in line with reports in the literature on nanometer-sized adsorbates; however, for the systems reported in the literature the curves are linear over the entire coverage range and are steeper for higher harmonics, which gives rise to a common intersection of the lines at zero dissipation (intersection with the x -axis).^{12,15} The zero crossing should correspond to the case where the viscous contribution of the system disappears, i.e. a system that has the properties of a closed packed 2D layer of the adsorbates, which behaves as an elastic medium. Extrapolating the almost parallel curves for the different overtones in the linear regime shown in Figure 6a will lead to a large spread of frequency change for vanishing dissipation change. The roots found for the extrapolation of the different overtones differ by more than 600 Hz for the present case, which renders such an extrapolation inappropriate to determine the mass of the layer. More importantly the extrapolated frequencies are significantly higher for all overtones as compared to the expectation for a closed packed layer of silica particles. In other words, the slopes of the curves at low coverage are too small. As seen from Figure 6a the curves become steeper at high coverage, and it is interesting to test if an extrapolation of the asymptotic slopes at saturation coverage is a more reliable scheme to determine the mass of the system. The asymptotic extrapolation of all overtones coincide (there is a small offset for the curve of $n = 9$) and yield an intersection with the frequency change axis at about -430 Hz. Figure 6b shows the ratio of the mass density calculated from the extrapolated frequency shifts according to the Sauerbrey equation and the mass density of a closed packed layer of nanoparticles. It is seen that for particles discussed above ($d = 137$ nm) the mass deduced from the QCM results accounts for less than 50% of the mass of a dense monolayer of particles, which is consistently found for a variety of independent measurements. This is in line with observations in the literature on weakly bound nanoparticles.^{7,8,13} What is the reason for the failure of the extrapolation scheme? One concern is the size of the particles with respect to the penetration depth of the shear wave. For ethanol the depth of the shear wave drops from 181 to 87 nm when going from 15 MHz (3rd overtone) to 65 MHz (13th overtone). Hence, the size of the particles cannot be considered small as compared to the penetration depth of the shear wave. To this end we have also done the analysis of data obtained for smaller particle sizes namely particles with diameters of 80 ± 3 nm, 45 ± 3 nm, and 29 ± 3 nm, respectively, which exhibit the same qualitative behavior of the QCM data as discussed above. The particles with a diameter of 80 nm show a similar behavior as the ones with a diameter of 137 nm. Upon further reduction of the diameter to 45 nm the description becomes better and the mass is only underestimated by about 25%. Going to 29 nm particles inverts the

outcome, and the particle mass is overestimated by about 30%. The plot indicates that a reliable determination of the adsorbed mass using this extrapolation scheme is not possible. For small particles the error of the extrapolation scheme is smaller but still significant. For particles above 80 nm, the adsorbed mass is underestimated by more than a factor of 2 showing a very similar ratio for both sizes (80 and 137 nm). While the decrease of the extrapolated mass with increasing particle diameter may point to the importance of the penetration depth of the shear wave, it is not readily clear why this effect should already level off for particle sizes, which are within the characteristic penetration depth of the shear wave for all measurement frequencies used. The hydrodynamics of such systems is, however, complex, and a definitive statement on this subject would need a quantitative description of the hydrodynamics, which is beyond the scope of the current contribution.

Correlation between the Coverage Dependent QCM Response and the Growth Properties of the System. An interesting question that remains is the reason for the change of the slope observed at higher coverage in the dissipation/frequency ratio plot (Figure 6a). For a discussion of possible effects it is important to recall that the frequency change is directly proportional to the coverage while the dissipation is not (Figure 2). This already indicates that the particles cannot be considered independent with respect to dissipation, while the frequency response is perfectly in line with a model of independent particles. The decrease of the dissipation/frequency ratio with frequency change observed in Figure 6a is a direct consequence of the coupling, as a horizontal line would be expected for independent particles. The interesting question is if the change in slope being observed at about 75% of saturation coverage (Figure 6a) can be correlated with the structural properties of the system. As indicated in Figure 4 already, the low and high coverage situations both show the same minimal nearest neighbor distance; however, the number of neighbors with distances close to the nearest neighbor distance is increasing with increasing coverage. To quantify this behavior Figure 7 shows a plot of the number of neighbors for two shells of different diameter. The diameter of the shells has been chosen based on the nearest neighbor distance distribution. A shell with a diameter of 500 nm is large as compared to the maximum of the nearest neighbor distribution for the entire coverage range, while the shell diameter of 340 nm corresponds to the maximum of the nearest neighbor distribution for an intermediate coverage.

The linear increase observed for the shell of the large diameter is readily understood: in case the shell is sufficiently large, it averages over the details of the distance distribution, hence, the number of neighbors simply scales with surface coverage, and in turn the number of particles scales linearly with coverage. The situation is different if the radius of the circle is chosen to be in the range of the maximum of the nearest neighbor distribution, hence in a range where it is sensitive to the deviations from a statistical distribution. The plot for a diameter of 340 nm shows a well-defined change of the slope of the trend lines describing the number of neighbors within the shell. The crossing point is found at about 70% of the maximal coverage. This behavior can be apprehended by the SEM images shown at the top of Figure 7. At low coverage large open spaces can be seen. In addition, the particles have a well-defined minimal distance, which is of the order of twice the particle diameter. With increasing coverage the open space is filled with particles, while the minimal distance as well as the

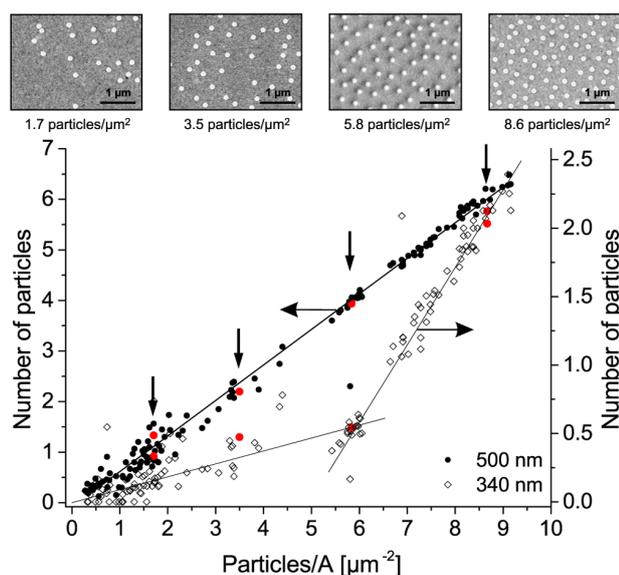


Figure 7. top: SEM images for four different areal densities indicated by arrows and red dots in diagram below. For better contrast the particles were overlaid with white circles. bottom: number of particles in a circle of diameter 500 nm (filled symbols, left scale) and a circle of diameter 340 nm (open symbols, right scale).

maximum of the nearest neighbor distance distribution remains unchanged. Beyond about 70% of the maximal coverage the empty spaces are filled, and the increase of coverage is only possible by a compression of the layer. This results in a shift of the maximum of the nearest neighbor distribution to smaller values and increases the number of neighbors as shown in Figure 7. The reduced adsorption rate is a direct consequence of this behavior, because empty adsorption sites on the surface become scarce. New adsorption sites have to be created by a rearrangement of the particles, which is a slow process. The ability of the particle layer to rearrange is a direct consequence of the multivalent character of the bonding of the particle on the surface, which is characterized by several weak interactions between ammonia groups and the gold surface.

The structural characterization of the layer also offers the possibility to revisit the QCM results of Figure 6a. As discussed above the decreasing values for the $\Delta D/\Delta f$ -ratios observed (Figure 6a) is a direct consequence of a hydrodynamic coupling between the particles. Such a coupling requires spatial proximity. The structural analysis showed that the particles keep a minimal distance of about 290 nm for the entire coverage range. In turn it is possible to give a lower boundary for the range of the hydrodynamic coupling being around 290 nm. The structural analysis also revealed that the number of neighbors in a shell of 340 nm rises strongly for coverage above 70%, which is the coverage range where the curves of the $\Delta D/\Delta f$ -ratios show a significant change of the slope. In a picture of coupled particles this implies that beyond coverage of 70% the number of interaction partners increases strongly, which allows for rationalizing the observed change in the slope.

There is an additional important conclusion that can be drawn from the QCM results, which concerns the origin of the interaction. It was shown that the frequency change was found to be a linear function for the entire coverage range investigated here. This points to the fact that each particle added to the layer contributes the same increment of frequency change. This is

different to typical QCM results showing significant deviations from linearity. Structural information on these systems is often not available, but in cases the structure has been investigated a statistical growth mode is found (see e.g. ref 15). As the number of neighbors is changing with coverage except for distances below 290 nm where it is zero, this observation suggests that the frequency change is a more local property than the dissipation. The latter interpretation is consistent with theoretical investigations treating the hydrodynamics of the system explicitly for an array of equally spaced rods, which show a linear decrease of the frequency change at large distance, which deviates from linearity for coverage beyond about 20% for a variety of systems.^{8,12,15} As these calculations treat the system as a 2-dimensional arrangement of rods, hence a coverage of 20% corresponds to a much larger distance than about twice the diameter found for the present experiments. However, a direct comparison of absolute distances is difficult between a 2-dimensional arrangement of particles and a 1-dimensional order of infinitely long rods. In turn, the coupling, which is clearly present in the system, has to be associated with the change in dissipation. This interpretation is consistent with the picture put forward in the recent literature, that a large fraction of the energy dissipation is taking place in the solvent surrounding the nanoparticle.^{4,11,12,15} Hence, from a hydrodynamic point of view the flow of solvent around the rocking or sliding particles will depend on the presence of particles in the surroundings, which have their own flow-fields being coupled as soon as the distance between the particles become sufficiently small. As discussed in the literature the coupling of the flow-fields reduces the amount of dissipation per particle and leads to a flattening of the dissipation curves and even a decrease of dissipation at high coverage.^{11,12,15,17}

CONCLUSIONS

We used a model system of monodisperse, positively charged silica nanoparticles on a gold surface and connected frequency and dissipation differences as measured by QCM-D with surface coverage and information on the structural arrangement of the particles deduced by SEM. The plot of Δf vs coverage yields a linear relationship for all overtones; however, the slope of the curves decreases with increasing overtone order. As the silica particles are stiff hard spheres, this observation is a consequence of the weak interaction between the organic ligand and the gold surface rendering the particle/gold interface soft with respect to their mechanical properties. The slope of the curves is significantly steeper than expected for an elastic medium (Sauerbrey equation), which can be interpreted as the excitation of solvent associated with the particles being "weighted" by the QCM. In contrast to the frequency change, ΔD deviates from a linear behavior with coverage indicating that there is hydrodynamic coupling between the particles. Extrapolations within so-called Df-plots (plot of $\Delta D/\Delta f$ vs Δf), which have been used successfully in the literature to extrapolate to a rigidified particle layer, fail to predict the particle size over a wide range of particle sizes despite the fact that the curves can be extrapolated reasonably well close to saturation coverage. We analyzed the morphology of the particle layer and find a repulsion of the particles resulting in a minimal distance between the particles and an ordered structure close to saturation coverage, which correspond to about 15% of the coverage of a hexagonal closed packed structure. The analysis of the structure as a function of coverage reveals that void space, capable of accommodating new particles

with the boundary condition that interparticle distance never drops below a minimal value, vanishes at about 70% of saturation coverage. At this point a change in the adsorption kinetics is observed being connected to the compressive growth mode. Concomitant with the onset of the compressive growth mode the slope of the curves in the $\Delta D/\Delta f$ vs Δf plot changes. From this correlation between QCM results and structural properties we can estimate a lower bound for the distance at which interparticle interactions influence the dissipation response of the QCM, while the frequency response behaves as a more local quantity.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b03572.

Figure S-1 (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Phone: 49 30 838 55313. Fax: 49 30 838 4 55313. E-mail: risse@chemie.fu-berlin.de (T.R.).

*Phone: 49 30 838 55304. Fax: 49 30 838 455304. E-mail: cmgraf@zedat.fu-berlin.de (C.G.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The work has been supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through the SFB 765 (TP A4 and Z2).

■ REFERENCES

- (1) Becker, B.; Cooper, M. A. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 754–787.
- (2) Cooper, M. A.; Singleton, V. T. *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 154–184.
- (3) Janshoff, A.; Galla, H.-J.; Steinem, C. *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4164–4195.
- (4) Reviakine, I.; Johannsmann, D.; Richter, R. P. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8838–8848.
- (5) Steinem, C.; Janshoff, A., Eds. *Piezoelectric Sensors*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007.
- (6) Sauerbrey, G. *Eur. Phys. J. A* **1959**, *155*, 206–222.
- (7) Bingen, P.; Wang, G.; Steinmetz, N. F.; Rodahl, M.; Richter, R. P. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8880–8890.
- (8) Johannsmann, D.; Reviakine, I.; Rojas, E.; Gallego, M. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8891–8899.
- (9) Macakova, L.; Blomberg, E.; Claesson, P. M. *Langmuir* **2007**, *23*, 12436–12444.
- (10) Reimhult, E.; Larsson, C.; Kasemo, B.; Höök, F. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7211–7220.
- (11) Reviakine, I.; Gallego, M.; Johannsmann, D.; Tellechea, E. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 084702.
- (12) Tellechea, E.; Johannsmann, D.; Steinmetz, N. F.; Richter, R. P.; Reviakine, I. *Langmuir* **2009**, *25*, 5177–5184.
- (13) Carton, L.; Brisson, A. R.; Richter, R. P. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9275–9281.
- (14) Reviakine, I.; Rossetti, F. F.; Morozov, A. N.; Textor, M. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 204711.
- (15) Johannsmann, D.; Reviakine, I.; Richter, R. P. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8167–8176.
- (16) Borovikov, A. P. *Instrum. Exp. Technol.* **1976**, *19*, 223–224.
- (17) Olsson, A. L. J.; Quevedo, I. R.; He, D.; Basnet, M.; Tufenkji, N. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7833–7843.

(18) Hartlen, K. D.; Athanasopoulos, A. P. T.; Kitaev, V. *Langmuir* **2008**, *24*, 1714–1720.

(19) Graf, C.; Gao, Q.; Schütz, I.; Noufele, C. N.; Ruan, W.; Posselt, U.; Korotianskiy, E.; Nordmeyer, D.; Rancan, F.; Hadam, S.; Vogt, A.; Lademann, J.; Haucke, V.; Rühl, E. *Langmuir* **2012**, *28*, 7598–7613.

(20) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.

(21) Bogush, G. H.; Tracy, M. A.; Zukoski, C. F. *J. Non-Cryst. Solids* **1988**, *104*, 95–106.

(22) Cho, N.-J.; Frank, C. W.; Kasemo, B.; Höök, F. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1096–1106.

(23) Rojas, E.; Gallego, M.; Reviakine, I. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8982–8990.

(24) Torun, B.; Kunze, C.; Zhang, C.; Kühne, T. D.; Grundmeier, G. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 7377.

(25) Du, B.; König, A. M.; Johannsmann, D. *New J. Phys.* **2008**, *10*, 053014.

(26) Qiu, D.; Cosgrove, T.; Howe, A. M.; Dreiss, C. A. *Langmuir* **2006**, *22*, 546–552.

Supporting Information

Ordered structures of functionalized silica nanoparticles on gold surfaces: a quartz crystal microbalance perspective

Christian Grunewald, Madlen Schmudde, Christelle Njiki Noufele,

Christina Graf, Thomas Risse**

Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, Takustr. 3, 14195 Berlin, Germany

corresponding authors: risse@chemie.fu-berlin.de

Tel: ++49 30 838 55313

Fax: ++49 30 838 4 55313

cmgraf@zedat.fu-berlin.de

Tel: ++ 49 - 30 - 838 55304

Fax: ++ 49 - 30 - 838 455304

Full QCM Measurement from dry state to dried state

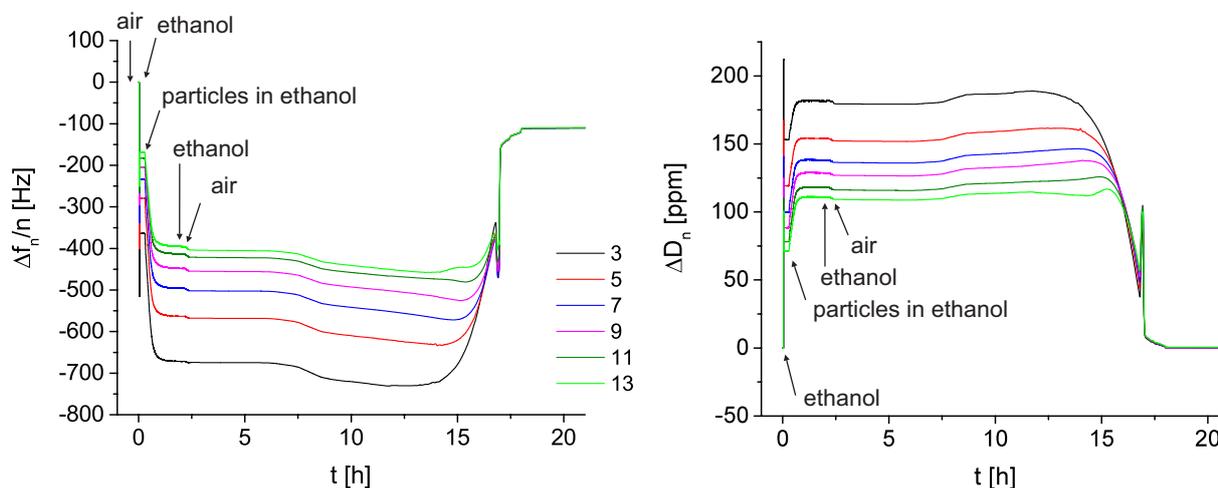


Figure S-1: QCM Measurement of 137 nm AHAPS functionalized silica particles. Δf and ΔD are recorded from the moment where the sensor is mounted in the flow cell under ambient conditions until the coated chip is dried in air. About 5 minutes after the recording is started the flow cell is filled with ethanol. After additional 10 minutes the particle dispersion is allowed to run through the flow cell. After the deposition is finished the cell is flushed with ethanol to remove undeposited particles and subsequently dried. The surface dries under an air flow of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ which takes about 15 h.

5.2 Structural Characterization of Ordered, Non-Close-Packed Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces

Christian Grunewald, Madlen Schmutde, Christina Graf,* and Thomas Risse*

5.2.1 Zusammenfassung

Nanostrukturierte Oberflächen spielen eine wichtige Rolle in der modernen Wissenschaft und Technologie. Dazu zählen geordnete Schichten aus nicht dicht gepackten Nanopartikeln, die sehr vielseitig einsetzbar sind. In diesem Artikel wird eine detaillierte Charakterisierung der Oberflächenstruktur einer einfach herzustellenden Schicht aus nicht-dicht gepackten, sich elektrostatisch abstoßenden, geladenen Silica-Nanopartikel dargestellt. Durch die Adsorption von positiv geladenen, monodispersen, AHAPS-funktionalisierten Silica-Nanopartikeln ($d = 137 \pm 4$ nm) kann eine über große Bereiche geordnete Oberflächenstruktur erhalten werden, die in diesem Artikel durch die Kombination von QCM-D und REM genauer untersucht wird. Dabei wird die Oberflächenstruktur in Abhängigkeit der Bedeckung mit mehreren statistischen Methoden untersucht. Aus den REM-Bildern mit den niedrigsten Bedeckungen kann die Paarkorrelationsfunktion ermittelt werden, die die Bestimmung des Paarpotentials erlaubt.

5.2.2 Eigenanteil

Die Durchführung der QCM-D-Messungen, die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der REM-Messungen, die Berechnung und Interpretation der Funktionen der räumlichen Statistik, die Berechnung des Paarpotentials sowie die Konzeption und das Schreiben des Manuskripts wurden von mir umgesetzt.

5.2.3 Artikel

This document is a preceding manuscript version of a published work that appeared in final form in *Langmuir*, Copyright 2017 American Chemical Society after peer review and technical editing by the publisher. To access the final edited and published work see <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01804>.

Structural Characterization of Ordered, Non-Close-Packed Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces

*Christian Grunewald, Madlen Schmutde, Christina Graf**, Thomas Risse**

Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie, Takustr. 3, 14195 Berlin,
Germany

**present address: Hochschule Darmstadt, University of Applied Sciences, Fachbereich
Chemie- und Biotechnologie, Hochschulstr. 2, 64289 Darmstadt

corresponding authors: risse@chemie.fu-berlin.de
Tel: +49 30 838 55313
Fax: +49 30 838 4 55313

christina.graf@h-da.de
Tel: +49 6151 16 38216

ABSTRACT

Nanostructured surfaces play an important role in modern science and technology. In particular, ordered arrangements of non-close-packed nanoparticles created by self-assembly offer a versatile route to prepare systems, which can be used in various applications such as sensing or plasmonic devices. Herein, a detailed characterization of the surface structure of an easy to make non-close-packed monolayer of electrostatically repelling charged nanoparticles will be presented. The layer is prepared by adsorption and self-assembly of positively charged, monodisperse silica nanospheres ($d = 137 \pm 4$ nm) on bare gold surfaces. The adsorption process was analyzed in-situ using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) and ex-situ by scanning electron microscopy (SEM). The analysis of SEM images allows to determine not only the coverage of the particles but also their lateral arrangement. The structure was analyzed as a function of coverage using different statistical methods. To this end, it could be shown that for smallest coverage analyzed within this study only particle pairs contribute to the observed pair correlation function, which allows to determine the electrostatic pair potential of the functionalized silica particles on the gold surface.

KEYWORDS

nanoparticles, non-close-packed monolayer, pair correlation function, pair potential, nearest neighbor distribution, random sequential adsorption, Fry-plot, QCM-D, SEM, spatial statistics

Introduction

The interaction between nanometer-sized adsorbates and surfaces play an important role for a variety of applications. A microscopic characterization of the interactions governing the adsorption process is challenging due to the intricate interplay between the constituents even if well-defined model systems are considered. Different methods have been employed to determine e.g. the interparticle interaction. Optical tweezers¹⁻² were used to hold pairs of particles and investigate the trapping of single particles in between them. Alternatively, single particles were trapped in an electric field while their Brownian motion was recorded³. Also, extended systems may be used in case well-defined model systems are employed. Ordered, non-close-packed two-dimensional structures of nanoparticles created by self-assembly from isotropic solution are such model systems, which are also highly desirable systems for applications such as antireflection coatings,⁴⁻⁵ tunable superhydrophobic surfaces,⁶ or plasmonic devices⁷. The formation of such structures by self-assembly requires on the one hand a repulsive interaction between the particles. On the other hand, the interaction of the particles with the surface has to be strong enough to warrant stable adsorption, while the barrier for lateral diffusion should be low enough to allow for mobility of the particles required to establish lateral order. The latter allows for establishing a two-dimensional equilibrium, which renders such systems suitable for further analysis with respect to the interaction potential between the particles. This has been demonstrated for particles adsorbed on flat surfaces⁸⁻¹¹ as well as ones confined between two flat surfaces^{1, 12-14}.

Here, we present results for large scale, non-close-packed arrangements of nanoparticles from an isotropic dispersion using silica nanospheres exhibiting a positively charged ligand shell introduced by functionalization with N-(6-aminoethyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS) deposited on bare gold surfaces. The adsorption process was analyzed in-situ using quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and ex-situ by scanning electron

microscopy (SEM). The microscopy allows not only to determine the amount of adsorbed particles but also to characterize the 2-dimensional arrangement of the particles on the gold surface. Characterization using SEM requires a drying process, which should not perturb the particle arrangement on the surface. We have shown previously that properly chosen particles as well as drying conditions allows to ensure this condition on these gold substrates.¹⁵⁻¹⁶ Herein, we would like to discuss the structural properties of the non-close-packed arrangement of particles.

Experimental Section

Materials:

Tetraethyl orthosilicate (TEOS, Fluka, 99%), L-arginine (Fluka, 99.5%), cyclohexane (Carl Roth, 99.5%), ethanol (EtOH, Berkel AHK, 100%), ethanol (EtOH, Fisher Scientific, 96%), ammonia solution (Carl Roth, 25–27%), N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS, ABCR, 92%), and sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck, 85%) were used as received.

Synthesis of Monodisperse SiO₂ Particles:

Silica nanoparticles used in this study were synthesized according to the method of Hartlen et al. in a multistep growth process.¹⁷ Briefly, a layer of cyclohexane (0.55 mL) was added to an aqueous solution of L-arginine (0.05 mmol in 6.9 mL of H₂O) and the solution was heated to 60 °C. TEOS (3 mmol) was added swiftly to the cyclohexane layer. Seed particles with a diameter of 20 ± 2 nm were obtained after stirring for 20 h at 60 °C (300 rpm) and were used for subsequent growth steps (particles of 137 nm diameter were obtained after five growth steps). In each growth step, the seed dispersion was diluted without cleaning with water to a

final concentration of 5 g/L. 2 mM L-arginine was used in each step, and the amounts of TEOS and cyclohexane were chosen according to the method of Hartlen.¹⁷ Separation and subsequent purification were achieved by cycles of centrifugation at 240 g and redispersion in ethanol. The particles were stored in ethanol.

Functionalization of SiO₂ Particles with AHAPS:

Silica nanoparticles diluted in ethanol and ammonia were functionalized with N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS) by stirring the reaction mixture at RT overnight and subsequent refluxing for 2 h at 80 °C in an argon atmosphere. The particles were purified by three cycles of centrifugation (960 g) and subsequent redispersion ethanol. The AHAPS functionalization on the particle surface leads to positively charged particles being characterized by positive zeta potentials, which is responsible for the stability of the colloids. Subsequently, the functionalized particles were stored in ethanol under argon at 8 °C. Details of the procedure can be found in the literature.^{16, 18}

Scanning Electron Microscopy (SEM):

SEM images of the dried QCM sensors were acquired on a Hitachi SU8030 EM with an acceleration voltage of either 30 kV or 3 kV in secondary electron (SE) mode. The area density of particles was determined using 10 to 50 SEM images taken at various positions of the quartz chip.

Substrates:

QCM-D sensors with a fundamental frequency of 4.95 ± 0.02 MHz, coated with gold, were purchased from QSense (Västra Frölunda, Sweden). They were cleaned by 10 min UV/ozone (Bioforce, Ames, IA) treatment and 30 min immersion in 2% SDS solution. After rinsing with

ultrapure water and drying with nitrogen the surfaces were stored at ambient conditions. They were treated for 10 min with UV/ozone directly before use.

Preparation of the adsorbed nanoparticles:

Adsorption of the nanoparticles on the gold surfaces were done in Q-Sense E1 system (QSense) using the standard flow cell. First the flow cell was rinsed with ethanol for about 20 min at 25 °C. The particle dispersion in ethanol was kept under an argon atmosphere at all times and was injected at a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Subsequently, the chamber was rinsed with pure ethanol before the surface was allowed to dry in the chamber at an airflow of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ overnight. The adsorption process was monitored in-situ using QCM-D.

Results and Discussion

AHAPS functionalized silica nanoparticles were shown to adsorb irreversibly on bare gold surfaces from a dispersion of the particles in ethanol.¹⁵ For particles with a diameter of 137 ± 4 nm discussed in the following the density of the particles on the gold surface never exceeds 9.5 particles/ μm^2 .¹⁵ This corresponds to about 15 % of the maximal coverage expected for a hexagonal closed packed arrangement of these particles. It was shown that the frequency change observed in QCM-D experiments is linearly dependent on coverage despite the fact that the system shows a sizeable change of dissipation. Even though the frequency change cannot be converted into a mass density using the Sauerbrey equation, because of the more complex hydrodynamic properties of the adsorbed nanoparticles in ethanol,^{15, 19-23} the linear relationship allows to use the frequency shift of the QCM-D experiment as a measure of the coverage during adsorption experiments.¹⁵ A typical QCM-D trace of an adsorption experiment is shown in Figure 1. For completeness, we have not only shown the frequency change, but also the changes in dissipation. The frequency decreases almost linearly during the first 15 minutes. The slope of the curve becomes much flatter for longer times. However,

it is important to note that even for very long times exceeding the 130 minutes shown here the frequency drops steadily. The frequency becomes stable as soon as the colloidal solution above the surface is exchanged to pure solvent. This implies that the surface adsorbs particles over a very long period of time, however, with a small rate. It is important to note that this behavior is contrast to the expectation based on a hit and stick adsorption process,²⁴⁻²⁵ which would result in a saturation behavior of the adsorption for long adsorption times.

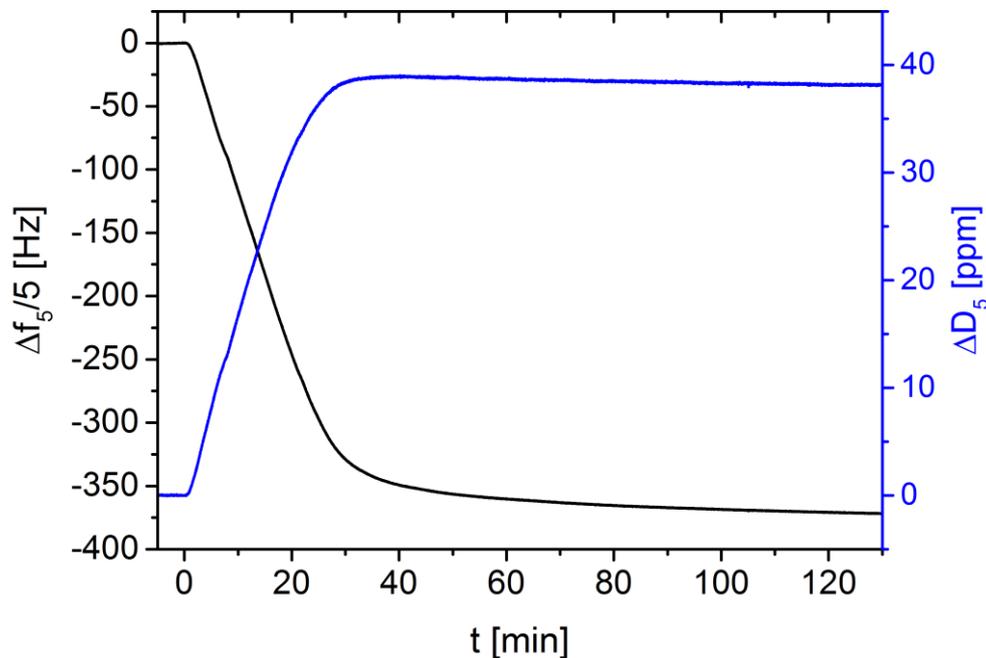


Figure 1: QCM-D measurement of AHAPS functionalized silica particles with a diameter of 137 ± 4 nm adsorbed on gold. Black trace: normalized frequency changes; blue trace: corresponding changes of dissipation exemplarily shown for the 5th overtone.

This behavior can be understood if the structural properties of the adsorbed layer are taken into account. Figure 2 shows two SEM images corresponding to different surface coverage. It is readily seen that the particles are not arranged as expected for a statistical hit and stick adsorption process. Instead, the images clearly reveal that the distance distribution lacks small distances, which are expected to occur even for small coverage. From these results, it is

readily concluded that the particles repel each other, which is expected because of their positive surface charge. Therefore, it is straightforward to understand that the maximal coverage observed in these experiments is well-below the theoretically expected maximal coverage, which correspond to a covered area of 54.6 % for the so-called jamming limit being the maximal coverage expected for a purely statistical hit and stick adsorption process.^{24, 26} Adsorbed particles with static adsorption sites would result in adsorption kinetics which should show a saturation behavior at prolonged adsorption times because the number of available adsorption sites decreases with increasing coverage. This is at variance to the experimental observation showing a continuous adsorption, however, at slow rates. This behavior can be rationalized by a lateral mobility of the adsorbed particles on the surface in ethanol. The thermally induced lateral displacement of the particles allows for a dynamic rearrangement of the particles, which allows to adopt additional particles on the surface and a subsequent relaxation of the structure to optimize the total energy of the system. A single amine bond to gold is known to be weak with binding energies ranging between 14 and 38 kJ/mol.²⁷ The irreversible binding of the particles on the surface, however, indicates that the particles are tethered with several of these groups to the gold surface. Even though the binding energy of the individual bonds is rather small, the multivalent nature of the bonding will impose barriers for the lateral mobility of the particles, which determines the corresponding dynamics. The rate of the adsorption is determined by the lateral dynamics of the particles as well as their impingement rate onto the surface, which is found to be slow for the conditions chosen here. Due to the irreversible adsorption of the particles, the lateral dynamics allows to establish a quasi-equilibrium of the particles on the gold surface in case no particles are present in the solution. Correspondingly, the SEM images taken from the adsorbed particles on the gold surface are interpreted as frozen snapshots of a quasi-equilibrium arrangement.

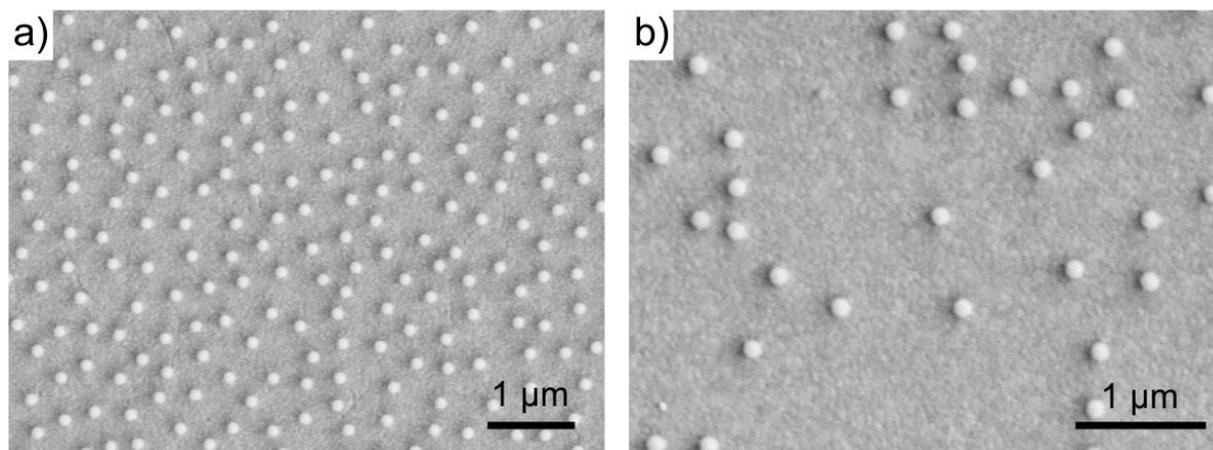


Figure 2: *AHAPS functionalized silica particles with a diameter of 137 ± 4 nm adsorbed on gold. a) SEM image corresponding to a particle density of 5.8 particles/ μm^2 ; b) SEM image corresponding to a particle density of 3.8 particles/ μm^2 .*

The flow cell of the QCM-D apparatus was used to establish a constant concentration of nanoparticles above the gold surface. However, the directed flow of the particles in the QCM-D cell may introduce deviations from the expected azimuthally isotropic distribution of the particles in the plane due to shadowing effects induced by adsorbed particles.²⁸⁻²⁹ Deviations from an azimuthally isotropic distribution can be analyzed using a so-called Fry-plot,²⁸⁻³⁰ which is shown in Figure 3 exemplarily for a sample with a particle density of 5.9 particles/ μm^2 . For the Fry-plot an SEM image of a particle distribution is represented by a map of small circles positioned at the center of gravity of each particle. This map is superimposed with itself such, that every particle within the image is positioned once at the center of the Fry-plot. In practice, one has to restrict the particles being centered within the image being used to avoid edge effects. The grey level in such plot is directly related to the particle density. The Fry-plot in Figure 3 shows a circular white area with a radius of about twice the particle diameter around the center, which contains very few particles only. The circular shape of the white area as well as the azimuthally isotropic grey ring at larger distance proves that the particle distribution lacks azimuthal anisotropies as expected for a

system resembling an equilibrium distribution. It should be noted that few particles are found at a smaller distance, which matches the particle diameter (indicated by the dashed line with $r/d = 1$) and can be associated with a small amount of aggregates, mainly dimers, found in the particular SEM image used to prepare the Fry-plot.

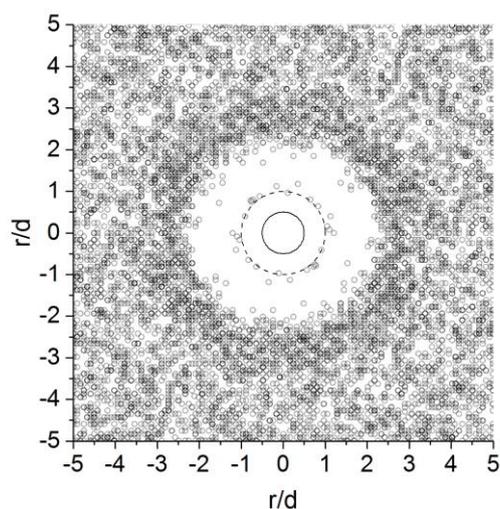


Figure 3: Fry-plot of an SEM image with a particle density of $5.9 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$. The particle positions are indicated by small circles centered at the center of gravity of the particles. The solid black circle in the center indicates the size of the particles, while the dotted line resembles a distance of a particle diameter.

The results of the Fry-plot justify to use radial distribution functions to further characterize the structure of the adsorbed layer. Figure 4 shows area normalized nearest neighbor distance distributions given as a function of the distance in units of the particle diameter (d) as solid lines. For a reasonable signal to noise value of the distance distribution, the observed nearest neighbor distances of the images were cumulated using 20 nm wide bins. The distributions shown in Figure 4 correspond to a particle density of 9.1 (a), 3.7 (b), and 1.7 (c) particles/ μm^2 , which correspond to a covered surface area of 13.4 %, 5.5 % and 2.5 %, respectively. The highest coverage observed in all experiments presented here is 9.5 particles/ μm^2 and has thus be defined as 100 % coverage. In turn, the three distributions

shown in Figure 4 correspond to 96 %, 39 % and 18 % on this relative coverage scale. For every coverage nearest neighbor distributions for two independent measurements are superimposed, which allows to estimate the expected scattering of the distributions for nominally identical experiments. The observed distributions are nicely reproduced, however, some fluctuations are observed with respect to the number of dimers, which are found at a distance corresponding to the diameter of the particles ($r/d = 1$). The slight deviation of the maximum from the expected value ($r/d = 1$) is due to the binning of the distances (20 nm) giving an artificial maximum for the bin centered at 130 nm. From the available experimental data, we cannot rule out that the small fraction of dimers is a consequence of the drying procedure. Since the hydrodynamic diameter of the particle determined by dynamic light scattering is within the error bar identical to the one observed by SEM (140 ± 3 nm vs. 137 ± 4 nm) and given a zeta-potential of 59 ± 5 mV, which is in the stable range for such colloids, the number of aggregates in the solution is very low. After the peak indicative of aggregated particles, the nearest neighbor distribution drops to zero, which is in line with the white area in the Fry-plot discussed above. For low and intermediate coverage, the onset of the nearest neighbor distribution remains constant at about 1.8 times the particle diameter. At the higher coverages, the onset shifts slightly towards smaller distances as indicated in Figure 4. In contrast to that, the maximum of the distributions as well as their overall width change considerably with coverage. With increasing coverage, the maximum is found to shift from $r/d = 2.75$ over $r/d = 2.55$ continuously to $r/d = 2.2$ if the coverage is increased from 1.7 to 9.1 particles/ μm^2 . Concomitantly, the overall width of nearest neighbor distribution drops considerably with increasing coverage extending to almost 6 times the particle diameter for 1.7 particles/ μm^2 while dropping to zero already at 3.2 times the particles diameter for 9.1 particles/ μm^2 . The shift of the maximum as well as the reduction of the overall width is well in line with the expectations for increasing coverage, which reduces the probability to find large nearest neighbor distances and in turn renders smaller nearest neighbor distances more

likely. In addition to the experimental distribution, the dashed curves in Figure 4 correspond to theoretically calculated distributions of a so-called RSA simulations using hard spheres of 137 nm diameter and the experimentally determined coverage. It is clearly seen that even for the smallest coverage a significant number of particles are expected to have neighbors with distances smaller than the onset of the experimental nearest neighbor distribution at r/d of about 1.8 if a statistical adsorption process is considered. For the smallest coverages in Figure 4 c) the simulation and the experimental trace superimpose for distances larger than $r/d \approx 3.3$.

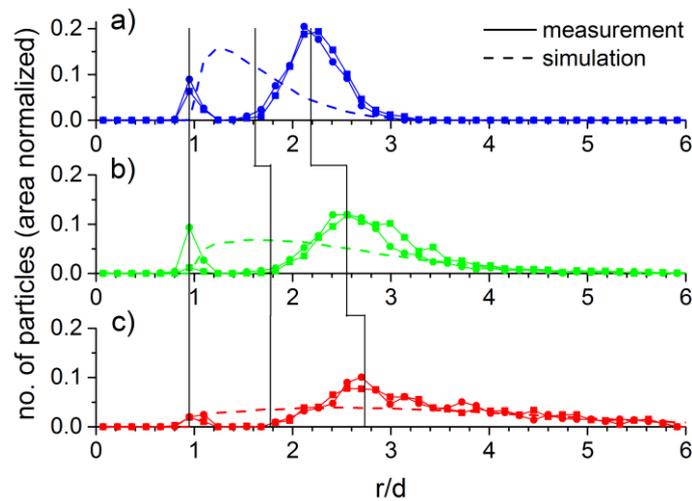


Figure 4: Nearest neighbor distance distributions at different coverages: a) 9.1 particles/ μm^2 , b) 3.7 particles/ μm^2 and c) 1.7 particles/ μm^2 . The center to center distance of the nanoparticles are given in multiples of the particle diameter d . Two experimental distributions (solid lines) and one simulated distribution (dashed line) using a random sequential adsorption model of hard spheres are shown for each coverage. The area is normalized to 1 for each distribution. For the experimental nearest neighbor distributions, the position of the maxima and the onset of the distribution (excluding aggregated particles found around $r/d = 1$) are marked with a vertical line.

For a coverage of 3.7 particles/ μm^2 (Figure 4 b) the superposition of statistical and experimental nearest neighbor distribution starts at almost the same distance, however, the overlapping range is reduced because of the reduced overall width of the nearest neighbor distribution with increasing coverage. At the highest coverage, the overlapping region vanishes as the nearest neighbor distribution drops to zero slightly above $r/d = 3$. With increasing coverage, the fraction of smaller distances found in the simulated traces which are not observed in experiment increases, because of the reduced overall width of the distributions and the almost constant onset of the experimental traces. In turn, the maxima found in the experimental nearest neighbor distributions become more pronounced at higher coverage.

While the nearest neighbor distribution is focusing on the direct vicinity of each particle, it does not allow to characterize the properties of the particle distribution at larger distances. In particular, the nearest neighbor distribution contains no information about the number of neighbors with distances higher than the nearest neighbor distance nor does it allow to quantify the deviation of the distribution from the expectation based on a statistical ensemble. For azimuthally isotropic distributions the latter information can be gathered by the pair correlation function (or radial distribution function) $g(r)$. Figure 5a shows a $g(r)$ function obtained from a set of SEM images corresponding to a particle density of 8.9 particles/ μm^2 as solid black line. The $g(r)$ function is normalized such that a value of 1 corresponds to the expectation for a statistical arrangement of particles. The $g(r)$ function shown in Figure 5a exhibits a first peak at a distance corresponding to a particle diameter. This peak is associated with aggregated particles as already discussed above. At higher distances the pair correlation function drops to zero indicating the lack of inter-particle distances between 1 and about 1.8 times the particle diameter due to the repulsive interaction between the particles. The particles being expelled from the small distances lead to the formation of the maximum with a value well above 1 found at a distance about 2.5 times the particle diameter for the coverage shown

here. The value of the maximum clearly indicates that these distances are considerably more likely than expected for a statistical distribution. This is in line with the discussion of the nearest neighbor distance distribution discussed above. For a well-ordered structure, the $g(r)$ function oscillates around the statistically expected value of 1. Brunner et al. have shown that several oscillations can be observed for repulsive nanoparticles confined to a predefined area defined by appropriate laser fields in case a sufficient number of images can be accumulated to reduce the statistical noise.⁹ For the current data set, the oscillations are damped after the first minimum found at $r/d \approx 3.5$ for the given signal to noise ratio of the pair correlation function. The minimum with a value of the $g(r)$ function below one indicates that these particle distances are found with a smaller probability than expected for a statistical distribution. Please note that this information cannot be extracted from the nearest neighbor distance distribution discussed above because of its focus on the nearest neighbor only. The noise of the $g(r)$ function is determined by the number of particles being analyzed. For the SEM pictures analyzed here, the number of particles in the individual images is too small to determine $g(r)$ functions with a reasonable signal to noise ratio. Obviously, the problem becomes increasingly important with decreasing coverage as the number of particles observed per image drops significantly. Meaningful $g(r)$ functions require a proper average of a set of images.⁹ Hence, the $g(r)$ function (Figure 5a, black line) was created by averaging 9 images corresponding to the same particle density. The averaging process assumes that the underlying distance distribution is the same if the coverage is kept constant. Consequently, the $g(r)$ functions processed from the individual images contain statistical noise, which obscure the determination of the $g(r)$ function in case the number of particles is too small. The grey shaded area around the black trace corresponds to the standard deviation of the mean $g(r)$ function (black trace) as determined from a statistical analysis of the set of individual $g(r)$ functions determined for every image used to create the mean $g(r)$ function. At this point, it is important to test if the assumption of a normally distributed noise underlying the statistical

analysis is valid. To this end, we have used a Shapiro-Wilk test shown in Figure 5 b, which is known to have a rather high power for a given significance. The red line shown in Figure 5b corresponds to a confidence level of 95 %. Except for very few points, the result of the Shapiro-Wilk test is found above the red line indicating that the null-hypothesis of the test namely that the data is normally distributed is likely to be correct for basically all distances tested here.

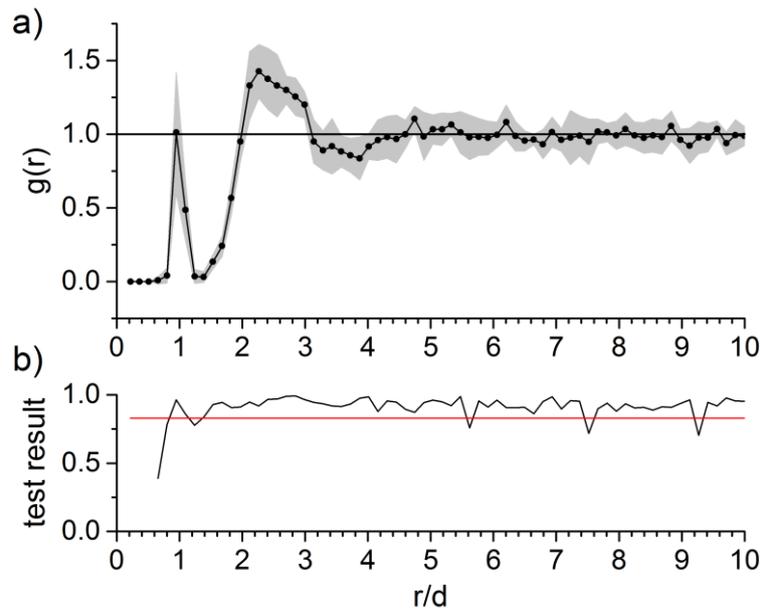


Figure 5: a) Averaged pair correlation function $g(r)$ of a set of measured SEM images with a particle density of $8.9 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$ (black line). The grey shaded area indicates the standard deviation determined from the statistical analysis of the individual $g(r)$ functions. b) Result of a Shapiro-Wilk test of the data shown in a). Red line indicates the 95 % confidence level.

In the following, we would like to discuss the evolution of the $g(r)$ function with coverage, which is shown for appropriately averaged sets of images in Figure 6. The particle density of each group is encoded by the vertical offset of each $g(r)$ function as their value is always 0 at small distance. Horizontal lines positioned at $g(r) = 1$ are added for each distribution to better judge for the deviations from the expectation for a random adsorption. All functions show a peak of variable height at the particle diameter indicative for the presence of aggregated

particles. After the initial peak, the $g(r)$ functions go back to zero and show an onset which shifts from 1.9 times the particle diameter at the lowest coverage to a distance of 1.6 times the particle diameter for the higher covered surfaces. For coverages above about 5 particles/ μm^2 the $g(r)$ function exhibits a maximum at higher distances, while the curves at lower coverages show only slight indications for the expected maximum based on the results from the nearest neighbor distance distribution. It is important to note that the signal to noise ratio drops significantly for smaller coverage because of the decrease in the number of particles available for analysis, which renders an identification of the expected maximum based on the nearest neighbor distribution more challenging. The decrease of the signal to noise ratio observed for the higher coverage is again due to a reduced number of available data sets at these coverages.¹⁵ In line with the expectations based on the analysis of the nearest neighbor distribution, the maxima shift to lower distances with increasing coverage. Concomitantly, the minima at higher distances observed for coverages above 5 particles/ μm^2 shift to smaller distances, too. Further oscillations cannot be clearly identified due to the limited signal to noise ratio of the curves. For the curves with the highest signal to noise ratio (7.5 particles/ μm^2) the $g(r)$ function may indicate a second maximum, but traces with significantly improved signal to noise would be required to substantiate this. In addition, the rise of the $g(r)$ functions from the onsets just below 2 times the particle distance becomes steeper with increasing coverage.

In comparison to results obtained by Brunner et al.⁹ who used a laser system to trap high charged sulphate-terminated polystyrene particles of 3 μm diameter above a negatively charged silica surface and observed the position of the particles as a function of time with an optical microscope, the shift of the first maximum for comparable normalized distances is larger in the case discussed here where it shrinks from about $r/d = 3$ to $r/d = 2.3$ while a range between 2.6 to 2.3 was observed in literature. Given the different nature of the system, in particular, the significantly reduced diameter of the particles as well as the multivalent

bonding of the particles to the gold surface here as compared to particles expected to float above the surface in case of the experiments reported by Brunner, both systems behave rather similar. The more rigid tethering of the particles on the surface will reduce the lateral mobility of the particles significantly. Based on theoretical expectations this should result in a broadening of the extrema found in the $g(r)$ function,³¹ which is well in line with the comparison of the experimental results by Brunner et al. and the results presented here.

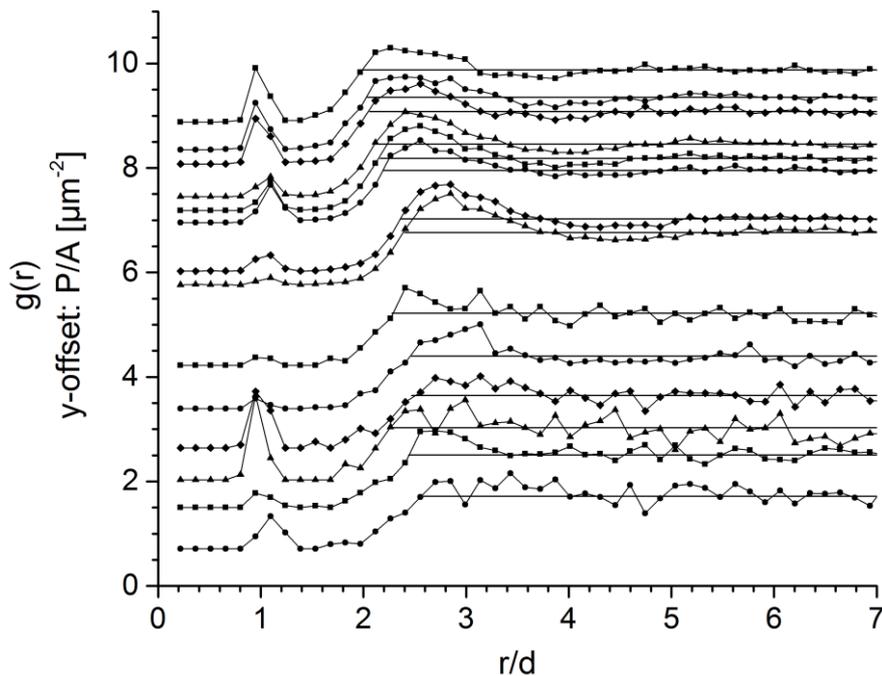


Figure 6: Mean $g(r)$ functions of the groups of SEM images at different surface coverages. The offset of the $g(r)$ functions is the surface coverage of the corresponding SEM images P/A in particles/ μm^2 , which is plotted on the y-axis. On the x-axis, the center to center distance r is plotted in particle diameters d . The thin horizontal lines mark $g(r) = 1$ for the different coverage. For clarity, the $g(r)$ functions in the coverage series are plotted with alternating symbols.

At this point, it is interesting to compare the results of the $g(r)$ function more closely to those of the nearest neighbor distributions discussed above as a function of coverage. Figure 7a) shows the position of the maxima observed in the nearest neighbor distributions as well as the

$g(r)$ functions as a function of coverage. For the nearest neighbor distributions, we have shown the values determined from the analysis of individual images (open circles) and the ones obtained analyzing the same set of images used to determine the $g(r)$ functions (red crosses). It is readily seen that the maxima of the $g(r)$ functions (blue crosses) are found at higher distances as compared to the nearest neighbor distribution. This is readily understood by the fact that additional neighbors with slightly higher distances contribute to the $g(r)$ function, which shifts the maximum to larger values. It is also interesting to observe that in the coverage range where we observe a clear maximum in the $g(r)$ functions the maxima found for both distributions drop almost parallel and follow the expected trend for an ideal lattice (red dashed line in Figure 7a). The latter is shifted to larger distances as expected for imperfectly ordered systems.

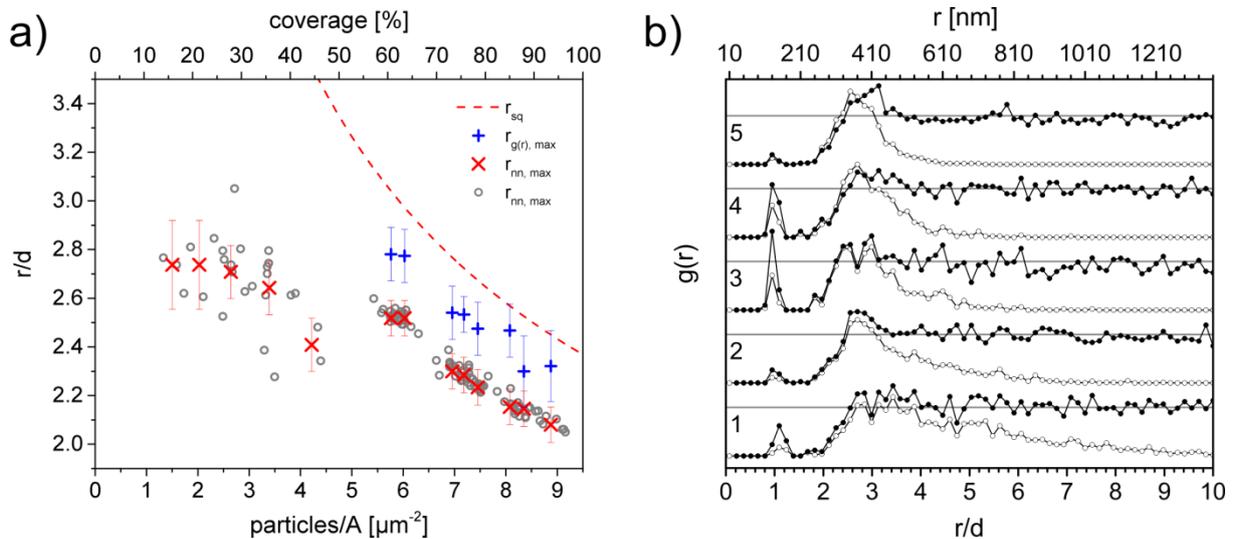


Figure 7: a) Positions of the maxima determined from the nearest neighbor distance distribution of individual images (open circles) and averaged image set (x) as well as the averaged $g(r)$ function (+) (the same set of images are used) as a function of surface coverage in particles/ μm^2 . The relative surface coverage of the experiment is given on the upper x-axis where the highest observed coverage of 9.1 particles/ μm^2 is set to 100%. The dashed curve represents the expected interparticle distance of an ideal square arrangement at

the corresponding surface coverage. b) Averaged pair correlation functions $g(r)$ as filled circles and scaled nearest neighbor distributions (using the same set of images) as open circles plotted against the distance r in units of the particle diameter d . The x-axis at the top shows the distance r in nm. The plots from 1 to 5 correspond to particle densities of 0.6, 1.5, 2, 2.6 and 3.4 particles/ μm^2 , respectively.

For coverages below 5 particles/ μm^2 the $g(r)$ functions lack clear evidence for a maximum, which is most likely due to the insufficient signal to noise ratio of the data as the nearest neighbor distributions still exhibit a maximum. The position of the maxima extracted from the nearest neighbor distributions with coverages below 5 particles/ μm^2 deviates strongly from the expectations based on an ideal crystalline arrangement. In fact, the position of the maximum is shifting only slightly from about 2.5 times the particle distance at 6 particles/ μm^2 to about 2.75 times the particle distance at 1.7 particles/ μm^2 . At the lowest coverage (0.6 particles/ μm^2) a determination of the position is associated with significant errors, hence it is not added to this graph. The behavior is well in line with the expectation based on a repulsive interaction, which tends to create an ordered structure to minimize the total energy. This ordering effect is counteracted by thermal energy, which tends to obliterate the order. The distance dependence of the repulsive potential will determine the position of the maximum of the nearest neighbor distribution. In the limit of very low coverage this potential will be the pair potential, because the likelihood of having a third particle in comparable distance to contribute significantly to the potential becomes very small. A comparison of the $g(r)$ functions (filled circles) with nearest neighbor distributions (open circles) shown for the lowest coverage in Figure 7b) allows to elucidate the question at which surface coverage three body interactions start to contribute. Again a horizontal line indicating $g(r) = 1$ is added to each $g(r)$ function to indicate the statistical expectation. The nearest neighbor distributions are scaled to facilitate a direct comparison with the $g(r)$ functions. For the lowest coverage, the

$g(r)$ function and the nearest neighbor function share the same noise pattern up to distances of about 6 times the particle diameter, while this is no longer true for the two highest coverages corresponding to 2 and 2.6 particles/ μm^2 , respectively, for which differences are already visible in the raising edge of the functions close to $r/d = 2$. For the two intermediate coverage intimate similarity of both curves is restricted to a smaller distance range, however, the similarity extends up to about 3 - 3.5 times the particle distance. From the similarity of the fine structure of both distributions at the lowest coverage, it is possible to conclude that the $g(r)$ function is solely determined by particle pairs up to large distances. Therefore, the $g(r)$ function obtained from the lowest coverage preparations should represent the ordering effect of the pair potential between two particles. A more quantitative measure of the pair potential can be obtained by using a relation known from statistical mechanics, which relates the radial distribution function $g(r)$ with the corresponding potential $u(r)$ according to:^{11, 32-33}

$$g(r) = \exp\left(-\frac{u(r)}{kT}\right) \quad (1)$$

In the limit of low coverage, the potential $u(r)$ is the pair potential between two particles,^{11, 32-33} which was shown to be the case for the lowest coverage investigated here.

Figure 8a) shows a $g(r)$ function (black) derived from a set of images with a particle density of 0.6 particles/ μm^2 as a function of the distance r in units of the particle diameter d . The blue graph in a) shows data from Brunner et al.⁹ for the system discussed above. It is important to note that the data from Brunner et al. corresponds to a covered area of 2.9 % while the data presented here correspond to a covered surface area of about 1%. To improve the signal to noise ratio, the bin size has been doubled (40 nm) compared to the plot shown in Figure 7. As discussed above the peak observed at around $r/d = 1$ in Figure 7, is related to particle aggregates. These aggregates have been removed from the data set because spurious contributions of these aggregates have been found to corrupt the analysis in terms of the pair

potential. Therefore, the $g(r)$ function shown in Figure 8 lacks the peak around $r/d = 1$. The $g(r)$ function is zero up to $r/d = 1.5$. Correspondingly, the potential would have to be infinity, which is physically incorrect but a consequence of the limited statistics of the data set. The $g(r)$ function raises above $r/d = 1.5$ and scatters around $g(r) = 1$ for values larger than 2.2. For the given signal to noise ratio of the data it remains an open question if the maximum around 3 – 3.5 times the particle diameter, which is in line with the expectations based on the nearest neighbor distribution, is real.

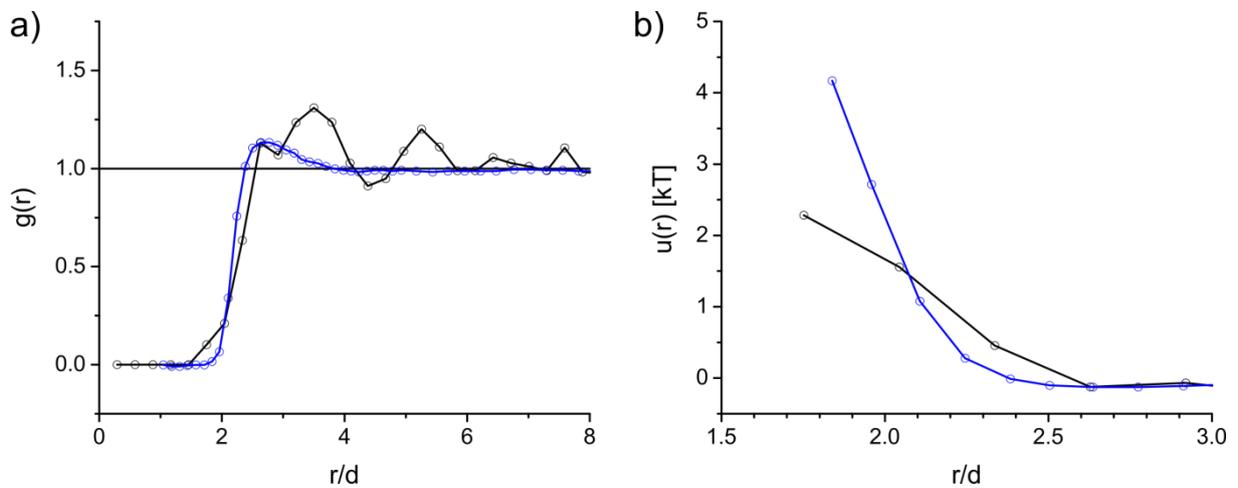


Figure 8: a) The black graph represents the averaged $g(r)$ function for the lowest coverage of 0.6 particles/ μm^2 , corresponding to a coverage of 1.0 % of the surface area; the horizontal line marks $g(r) = 1$; the blue graph is the $g(r)$ function adapted from Brunner et al.⁹ with a surface coverage of 2.9 %, which was the lowest coverage investigated. b) potentials $u(r)$ derived from the $g(r)$ function plotted in a) by means of equation (1) against the particle distance in units of its diameter d .

The $g(r)$ function adapted from the data published by Brunner et al.⁹ exhibits a very good signal to noise ratio, hence no significant impact of the statistics is expected for the calculated potential $u(r)$. In comparison with the data presented here, the onset of the $g(r)$ function for the larger (3 μm diameter), floating sulphate-terminated polystyrene particles of Brunner et al. is shifted to larger distances starting to deviate from zero for distances close to

twice the particle diameter. The blue curve rises steeper than the data presented here and exhibits a clear maximum before it settles around $g(r) = 1$ for distances above 4 times the particle diameter. Simulations (data not shown) can be used to see that the size of the maximum is dependent on coverage. As the coverage is about three times the one of the data presented here a direct comparison is difficult. More importantly, we have seen above that at this coverage already three body interactions play a role, which will increase the repulsive potential with respect to the two-particle case. In case the pair potential would be the same for both systems one would still expect a more repulsive potential for the data obtained by Brunner. The calculated potential curves $u(r)$ using equation (1) are plotted on the same distance axis in Figure 8b). The pair potential derived from the black $g(r)$ function drops from 3.5 kT at a distance of about 1.75 times the particle distance to values around zero at $r/d \approx 2.5$. The potential derived from the blue trace in Figure 8 a) shows a much steeper increase with decreasing distance compared to the black graph. Both potentials show a slight minimum due to the maximum in the $g(r)$ functions. The limited signal to noise ratio of the data presented here, in particular the rather small number of occurrences determining the first two points of the $g(r)$ function deviating from zero just below $r/d = 2$ leads to a significant error estimated to be about 0.5 kT in the absolute value of the pair potential at low distance. Nonetheless, the potential created from the data published by Brunner et al. is significantly steeper than the one extracted from the data presented here. As discussed above this effect is partially due to the contributions of three body interactions influencing the potential for the coverage corresponding to the blue trace. Brunner et al. determined the effective charge of their particles within the DLVO theory to be around $Z_{\text{eff}} \approx 2 \cdot 10^8$ and a salt concentration of 0.3 μMol . If one would assume the same charge density for our particles with a 500-fold smaller surface of the particles it is impossible to fit the measured data. For an ion concentration in pure ethanol expected to range in the lower μmol range³⁴ the effective charge has to be about one order of magnitude larger than found for the polystyrene particles investigated by

Brunner et al., which correspond to a charge density impossible to accomplish on the surface of the silica particles by binding of amino ligands. It has, however, to be emphasized that the simple DLVO theory describes the repulsion between two charged particles in an isotropic solution, while the silica nanoparticles are tethered to a metal being subject among others to image charge effects, which complicates a theoretical description of the situation considerably.

In summary, a combination of in-situ monitoring by QCM-D and subsequent structural elucidation of non-close-packed layers of monodisperse, positively charged, AHAPS functionalized silica nanoparticles allowed to gain new insights into the adsorption process, the dynamics on the surface and the electrostatic pair potential of the particles. From the detailed correlation of QCM-D and SEM results, it was possible to show that the silica nanoparticles multivalently tethered on the gold surface remain laterally mobile on the surface. Different statistical methods used to analyze the arrangement of the particles on the surface show that the particles repel each other as expected based on the positive surface charge introduced by the AHAPS ligands, which leads to the formation of non-close-packed layers. With increasing coverage, the surface structure compresses which influences the characteristic maxima of the radial distribution functions namely the nearest neighbor distributions as well as the pair correlation functions. The behavior of the maxima with coverage allows to clearly discriminate between regime in which open adsorption sites are easily found and one where the layer compresses upon increasing coverage, which is directly reflected in the adsorption kinetics. A detailed analysis of the pair correlation function allows to conclude that the repulsion between the particles observed for the lowest coverage is governed by two-particle pair potential. The latter could be obtained from the pair correlation function and was compared to results from literature and expectation based on simple DLVO theory, which was successfully used to describe the pair potentials. It turned out that DLVO

theory is not capable to describe the present system at least qualitatively, which is thought to be due to the metallic surface used to bind the particles complicating the description of the system significantly.

References

1. Crocker, J. C.; Grier, D. G., *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77* (9), 1897–1900.
2. Aveyard, R.; Binks, B. P.; Clint, J. H.; Fletcher, P. D. I.; Horozov, T. S.; Neumann, B.; Paunov, V. N.; Annesley, J.; Botchway, S. W.; Nees, D.; Parker, A. W.; Ward, A. D.; Burgess, A. N., *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88* (24), 246102.
3. Mojarad, N.; Krishnan, M., *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (7), 448–452.
4. Sun, C.-H.; Min, W.-L.; Linn, N. C.; Jiang, P.; Jiang, B., *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91* (23), 231105.
5. Linn, N. C.; Sun, C.-H.; Jiang, P.; Jiang, B., *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91* (10), 101108.
6. Chen, Y.-C.; Huang, Z.-S.; Yang, H., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (45), 25495–25505.
7. Jiang, P.; McFarland, M. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (11), 3710–3711.
8. Behrens, S. H.; Grier, D. G., *Phys. Rev. E* **2001**, *64* (5 Pt 1), 050401.
9. Brunner, M.; Bechinger, C.; Strepp, W.; Lobaskin, V.; Grünberg, H. H. v., *Europhys. Lett.* **2002**, *58* (6), 926–965.
10. Hsu, M. F.; Dufresne, E. R.; Weitz, D. A., *Langmuir* **2005**, *21* (11), 4881–4887.
11. Vondermassen, K.; Bongers, J.; Mueller, A.; Versmold, H., *Langmuir* **1994**, *10* (5), 1351–1353.
12. Han, Y.; Grier, D. G., *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91* (3), 038302.
13. Kepler; Fraden, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *73* (2), 356–359.
14. Carbajal-Tinoco, M. D.; Castro-Román, F.; Arauz-Lara, J. L., *Phys. Rev. E* **1996**, *53* (4), 3745–3749.
15. Grunewald, C.; Schmutde, M.; Noufele, C. N.; Graf, C.; Risse, T., *Anal. Chem.* **2015**, *87* (20), 10642–10649.
16. Schmutde, M.; Grunewald, C.; Goroncy, C.; Noufele, C. N.; Stein, B.; Risse, T.; Graf, C., *ACS Nano* **2016**, *10* (3), 3525–3535.
17. Hartlen, K. D.; Athanasopoulos, A. P. T.; Kitaev, V., *Langmuir* **2008**, *24* (5), 1714–1720.
18. Graf, C.; Gao, Q.; Schütz, I.; Noufele, C. N.; Ruan, W.; Posselt, U.; Korotianskiy, E.; Nordmeyer, D.; Rancan, F.; Hadam, S.; Vogt, A.; Lademann, J.; Haucke, V.; Rühl, E., *Langmuir* **2012**, *28* (20), 7598–7613.
19. Johannsmann, D.; Reviakine, I.; Rojas, E.; Gallego, M., *Anal. Chem.* **2008**, *80* (23), 8891–8899.
20. Johannsmann, D.; Reviakine, I.; Richter, R. P., *Anal. Chem.* **2009**, *81* (19), 8167–8176.
21. Tellechea, E.; Johannsmann, D.; Steinmetz, N. F.; Richter, R. P.; Reviakine, I., *Langmuir* **2009**, *25* (9), 5177–5184.
22. Reviakine, I.; Johannsmann, D.; Richter, R. P., *Anal. Chem.* **2011**, *83* (23), 8838–8848.

23. Reviakine, I.; Gallego, M.; Johannsmann, D.; Tellechea, E., *J. Chem. Phys.* **2012**, *136* (8), 84702.
24. Feder, J., *Journal of Theoretical Biology* **1980**, *87* (2), 237–254.
25. Talbot, J.; Tarjus, G.; van Tassel, P. R.; Viot, P., *Colloids Surf., A* **2000**, *165* (1-3), 287–324.
26. Adamczyk, Z.; Siwek, B.; Zembala, M.; Belouschek, P., *Adv. Colloid Interface Sci.* **1994**, *48*, 151–280.
27. Pong, B.-K.; Lee, J.-Y.; Trout, B. L., *Langmuir* **2005**, *21* (25), 11599–11603.
28. Kooij, E. S.; Brouwer, E. A. M.; Wormeester, H.; Poelsema, B., *Langmuir* **2002**, *18* (20), 7677–7682.
29. van Loenhout, M. T. J.; Stefan Kooij, E.; Wormeester, H.; Poelsema, B., *Colloids Surf., A* **2009**, *342* (1-3), 46–52.
30. Fry, N., *Tectonophysics* **1979**, *60* (1-2), 89–105.
31. Brewer, D. D.; Tsapatsis, M.; Kumar, S., *J. Chem. Phys.* **2010**, *133* (3), 034709.
32. Tsong, T. T., *Phys. Rev. Lett.* **1973**, *31* (19), 1207–1210.
33. Hill, T. L., *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. 2. print ed.; Addison-Wesley Publ. Comp: Reading, Mass., 1962; p XIV, 508 S.
34. Zwol, P. J. v.; Palasantzas, G.; DeHosson, J. T. M., *Phys. Rev. E* **2009**, *79* (4).

5.3 Controlling the Interaction and Non-Close-Packed Arrangement of Nanoparticles on Large Areas

Madlen Schmudde, Christian Grunewald, Christian Goroncy, Christelle N. Noufele, Benjamin Stein, Thomas Risse,* und Christina Graf*

5.3.1 Zusammenfassung

Unter dem Aspekt aktueller Relevanz geordneter und nanostrukturierter Oberflächen in der Industrie und Wissenschaft ist insbesondere die Weiterentwicklung und Optimierung der Herstellungsverfahren ein aktuelles Forschungsthema. In diesem Artikel wird eine einfache Methode vorgestellt, mit der sich großflächige, geordnete Strukturen aus positiv geladenen, monodispersen Nanopartikeln ($\text{\O} 118\text{--}162\text{ nm}$) herstellen lassen. Die Partikel bestehen aus Silica und sind durch eine AHAPS-Funktionalisierung mit Aminogruppen versehen und damit positiv geladen. Die von den Partikeln gebildete Monolage ist nicht dicht gepackt und ist über Zentimeter große Bereiche geordnet. Die Ordnung entsteht im Wesentlichen durch die elektrostatische Abstoßung der Partikel, verbunden mit der Wechselwirkung zwischen Partikel und Oberfläche. Das Trocknen der Oberfläche ist dabei entscheidend für die Ordnung der Partikelstruktur. Zur Vermeidung von Aggregaten werden die Kapillarkräfte durch einen sehr langsamen, kontrollierten Trocknungsprozess aus Ethanol minimiert. Durch die Variation der Wechselwirkung der Partikel zur Oberfläche kann gezeigt werden, dass über Amidbindungen kovalent an einen SAM gebundene Partikel unempfindlich gegenüber der Trocknung sind. Die so präparierten Oberflächen können schnell in Wasser getrocknet werden. Die geordneten Strukturen nicht dicht gepackter Partikel können als einfach herzustellendes Templat für weitere Anwendungen genutzt werden, was mit der Anlagerung größerer Polystyrolpartikel ($\text{\O} 368 \pm 14\text{ nm}$) demonstriert wurde.

5.3.2 Eigenanteil

Die QCM-D-Messungen, die Funktionalisierung der Goldoberfläche, die Bestimmung der Rauheit der Goldoberfläche sowie die Berechnung der Verteilungsfunktionen wurden von mir durchgeführt. Die Auswertung der REM- und QCM-D-Messungen sowie Diskussionen und Beiträge zum Entwurf des Papers erfolgten gemeinsam mit Madlen Schmutde.

5.3.3 Artikel

Reprinted with permission from M. Schmutde, C. Grunewald, C. Goroncy, C. N. Noufele, B. Stein, T. Risse, C. Graf, *ACS Nano* **2016**, *10*, 3525–3535. Copyright 2016 American Chemical Society.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acsnano.5b07782>.

Controlling the Interaction and Non-Close-Packed Arrangement of Nanoparticles on Large Areas

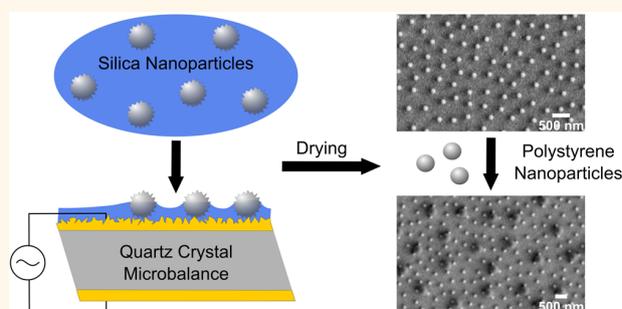
Madlen Schumde, Christian Grunewald, Christian Goroncy, Christelle N. Noufele, Benjamin Stein, Thomas Risse,* and Christina Graf*

Institut für Chemie und Biochemie, Physikalische und Theoretische Chemie, Freie Universität Berlin, Takustraße 3, D-14195 Berlin, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: In light of the importance of nanostructured surfaces for a variety of technological applications, the quest for simple and reliable preparation methods of ordered, nanometer ranged structures is ongoing. Herein, a versatile method to prepare ordered, non-close-packed arrangements of nanoparticles on centimeter sized surfaces by self-assembly is described using monodisperse (118–162 nm \varnothing), amino-functionalized silica nanoparticles as an exploratory example. It is shown that the arrangement of the particles is governed by the interplay between the electrostatic repulsion between the particles and the interaction between particles and surfaces. The latter is tuned by the properties of the particles such as their surface roughness as well as the chemistry of the linkage. Weak dispersive interactions between amino groups and gold surfaces are compared to a covalent amide linkage of the amino groups with carboxylic acid functionalized self-assembled monolayers. It was shown that the order of the former systems may suffer from capillary forces between particles during the drying process, while the covalently bonded systems do not. In turn, covalently bonded systems can be dried quickly, while the van der Waals bonded systems require a slow drying process to minimize aggregation. These highly ordered structures can be used as templates for the formation of a second, ordered, non-close-packed layer of nanoparticles exemplified for larger polystyrene particles ($\varnothing 368 \pm 14$ nm), which highlights the prospect of this approach as a simple preparation method for ordered arrays of nanoparticles with tunable properties.

KEYWORDS: non-close-packed monolayer, self-assembly, nanoparticles, silica, QCM-D, electrostatic interaction



Ordered, but non-close-packed two-dimensional nanostructures are highly desired systems in many fields of application. They can be used for sensing substrates which require non-close-packed arrangements in order to prevent cross talk between the features.¹ Other applications are found in such different scientific fields as antireflection coatings,^{1,2} tunable superhydrophobic surfaces,³ surface plasmonic devices,⁴ or as model systems for interaction studies.⁵ Especially, such ordered, non-close-packed structures are highly versatile templates for the preparation of complex two-dimensional nanostructures such as mesoscopic gold and silver rings⁶ or silicon rings by colloidal lithography⁷ as well as for the generation of patchy or hybrid particles⁸ and heterogeneous microshells⁹ or for the preparation of porous membranes.¹⁰ Moreover, they can serve as templates for the preparation of non-close-packed colloidal crystals. Such structures are highly attractive because they possess a wider photonic band gap than

close-packed crystals, making them important materials for photonic devices such as all-optical chips,¹¹ optical switches,¹² and light-emitting diodes.¹³

In the past, numerous procedures were developed to obtain two-dimensional, highly ordered, but close-packed crystals of nanoparticles like convective self-assembling,¹⁴ floating-transferring technique,¹⁵ spin coating,¹⁶ or the Langmuir–Blodgett technique.¹⁷ In contrast, despite the diverse and important applications of non-close-packed arrangements of nanoparticles highlighted above, the current possibilities for the fabrication of such structures are rather limited (see Table 1). Non-close-packed structures were obtained by plasma etching^{8,18} or reactive ion etching¹⁹ of close-packed monolayers, which is

Received: December 10, 2015

Accepted: February 24, 2016

Published: February 26, 2016

Table 1. Methods for Preparing Non-Close-Packed Structures

method	advantages	disadvantages	references
Etching of close-packed structures	Adjustment of the lattice spacing and the final nanoparticle size	Reduction in particle size Change of particle morphology and surface Requires a plasma chamber or other etching apparatus Restricted to certain types of particles	8, 18, 19
Deformation of elastomeric substrates	Adjustment of the lattice spacing	Transfer of close-packed nanoparticle layer to a stretchable substrate needed Transfer from elastomer to a surface needed	20, 21
Spin coating	Direct assembly on the substrate	Interparticle distances not adjustable Subsequent polymerization necessary to preserve the non-close-packed structure	22
Assembly at liquid–air interfaces	Adjustment of lattice spacing Preparation of structured surfaces possible	Subsequent transfer to solid substrate with appropriate adhesive layer required	23
Assembly at liquid–liquid interfaces	Adjustment of lattice spacing	Restricted to appropriate particles Requires subsequent transfer to a solid substrate	24
Template-directed assembly	Preparation of complex structures possible	Template is needed	25, 26
Assembly by using optical tweezers	Adjustment of lattice spacing Preparation of uncommon structures possible	Restricted to small areas Requires optical tweezers	27, 28
Convective self-assembly	Adjustment of lattice spacing Direct assembly on the substrate	Requires specific polyelectrolyte-functionalized particles Fairly ordered structures only within a few micrometers, no long-range ordered structures possible	29

based on a reduction of the individual particle size. Starting from a close-packed layer, a separation of the particles can be alternatively achieved by mechanical elongation if an elastomeric substrate is used as a support for the close-packed layer.^{20,21} In addition, spin coating of colloidal particles with polymeric additives being removed afterward,²² the assembly of particles at the liquid–air²³ or liquid–liquid interface²⁴ with subsequent transfer of the ordered layer to a solid substrate, template-directed assembly of nanoparticles on surfaces^{25,26} or the use of optical tweezers^{27,28} have been used to produce such system.

However, there are significant limitations to the currently available methods (see Table 1). All of these methods are either multistep processes where further modifications after the self-assembling process are needed or they require the use of complex instrumentation such as optical tweezers rendering them labor and in many cases cost-intensive and making their reproduction often challenging.^{1–13,18–28} Post treatments such as etching techniques are potentially difficult to apply if particles with well-defined properties such as magnetism, optical properties or surface chemistry are to be used and also restricted to several materials like polystyrene which is also often used.^{4,18,19} Moreover, several of the above-mentioned techniques are restricted to the preparation of small areas only.^{27,28}

Compared to these complex approaches, the simplest way would be the direct self-assembly of nanoparticles from dispersion on a surface as it is standard for the preparation of close-packed colloidal crystals. The self-assembly of an ordered, non-close-packed arrangement of particles requires repulsive forces between the particles, which is readily introduced by a surface charge of the particles. While the formation of an ordered, non-close-packed arrangement of the particles in solution is rather straightforward if the Coulomb repulsion is sufficiently large as compared to the thermal energy, the stability of such a structure outside of the solution depends strongly on the ratio between the interaction of the particles with the surface on the one hand and the capillary forces acting between particles during drying on the other hand. As the latter can be rather strong, the systems tend to form close-packed

aggregates during drying.³⁰ Morisada *et al.* recently succeeded in overcoming these attractive capillary forces during drying in a convective self-assembly process of silica nanoparticles by coating their nanoparticles with cationic polyelectrolytes which provide strong interparticle repulsive forces. However, structures of moderate order were limited to a few micrometers. Ordered structures on longer scales could not be achieved.²⁹

A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D) is a widely used technique for studying processes at interfaces based on the piezoelectric properties of a quartz sensor. By applying an alternating electric field to an appropriately oriented quartz crystal (*e.g.*, an AT-cut sample) a mechanical oscillation of the crystal with a characteristic resonance frequency is induced. The resonance frequency changes when mass is adsorbed on the surface of the crystal.^{31,32} In a QCM-D experiment, the energy dissipation parameter (*D*) is determined additionally, which is defined as the loss of energy per oscillation period divided by the total energy stored in the system. *D* provides information on the viscoelastic properties of adsorbed layers.

Here, we present a new approach for the preparation of non-close-packed arrangements of nanoparticles using positively charged silica nanospheres deposited on gold and functionalized gold surfaces. The surfaces were prepared on a QCM-D chip, which enables an *in situ* monitoring of the adsorption process. The self-assembled nanoparticles deposited on the different surfaces were dried subsequently and analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The capillary forces present during the drying process tend to aggregate the particles. The efficiency of the aggregation strongly depends on the interaction strength between particle and surface. It is shown that the latter can be controlled by the surface morphology of the particles. The impact of a change in the interaction between the particles and the surface was also elucidated by comparing weakly interacting amine functionalized silica particles on gold surfaces with silica particles bound covalently to functionalized gold surfaces using amide linkages between the amine and a carboxylic acid functionality of a self-assembled monolayer. Furthermore, the arrays of non-close-packed silica particles can be used as templates for the

Table 2. Summarized Data Obtained for the QCM-D Measurements of Rough and Smooth Amino-Functionalized Silica Colloids on a Gold Surface

NP	d_{SEM} [nm]	R_q^a [nm]	d_{DLS} [nm]	zeta-potential [mV]	Δf [Hz]	ΔD [ppm]	NN-distance ^b [nm]	ρ_A [particles per μm^2]
rSiNP	137 ± 4	2.0 ± 0.5	140 ± 3	59 ± 5	-330 ± 5	28 ± 1	313 ± 34	7.2 ± 0.2
sSiNP	136 ± 4	0.9 ± 0.3	147 ± 5	52 ± 6	-409 ± 5	36 ± 1	300 ± 29	8.2 ± 0.3

^aRoot-mean-square roughness. ^bNearest neighbor distance between the particles.

subsequent self-assembly of a second type of nanoparticles exemplified using polystyrene nanoparticles. Due to the versatility regarding the possible types of particle and substrates and the simple and fast assembly of the particles directly on the substrate without postprocess treatments, this procedure offers many advantages over already existing methods.

RESULTS AND DISCUSSION

Arrangement of Particles from Ethanol on a Gold Surface. Monodisperse silica nanoparticles of 137 ± 4 nm diameter were prepared in a stepwise process in water by the Hartlen method.³⁵ Using small cores (20 ± 2 nm diameter) synthesized by the procedure according to Hartlen *et al.*³³ in a seeded growth process in ethanol based on a modified Stöber method³⁴ yielded silica nanoparticles of 136 ± 4 nm diameter. The surface of both types of particles is functionalized with *N*-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS) turning the initially negative zeta potentials of the particles into highly positive ones (see Table 2). In contrast to the smooth surface of the particles obtained by the Stöber-like growth process, the surface of the particles grown by the Hartlen method is visibly rough (see Figure 1). For the rough particles, a root-mean-square (RMS) roughness (R_q) of around 2 nm was obtained, whereas the smooth particles exhibit a RMS roughness of around 1 nm (see Table 2). According to a cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) study of Carcouët *et al.*, the formation of monodisperse silica nanoparticles prepared by a modified Hartlen procedure (lysine was

used instead of arginine) occurs through an association process of small seed particles. In contrast, a molecular growth mechanism leading to the formation of a silica shell on the silica seed particles is suggested for the Stöber-like growth process.^{35–37} The difference in the surface morphology between particles synthesized by the Hartlen process in water and by the Stöber-like growth process in alcohol can be explained by different silica condensation reactions: In water, irreversible Si–O–Si bonds are formed due to condensation and particles with relatively rough surfaces result, whereas in alcoholic solution, alcoholate (SiOR) and hydroxyl (SiOH) groups can exchange resulting in a smooth surface due to a relaxation mechanism.³⁸

Both types of particles were self-assembled from ethanol on the gold surface of QCM sensor chips whose R_q was determined by STM to be 0.7 ± 0.2 nm.³⁹ During the QCM-D experiments, the changes in frequency (Δf) and dissipation (ΔD) were measured as a function of time for different overtones, which allows to monitor the adsorption process of the particles on the surface of the sensor. For the discussion within this report, the third overtone is presented. Higher overtones show the same qualitative behavior; however, the active area probed by the shear mode of the quartz crystal decreases with increasing overtone.^{40,41} The ethanolic nanoparticle dispersion was injected in the QCM-D flow chamber until Δf stabilizes, which corresponds to saturation coverage.⁴² Subsequently, nonbound colloidal particles were removed by flushing the cell with pure ethanol. No change in frequency is observed during this process indicating irreversible binding of colloids on the gold surface (see typical QCM-D measurements in Figure 2). Although the bond of amines to gold is known to

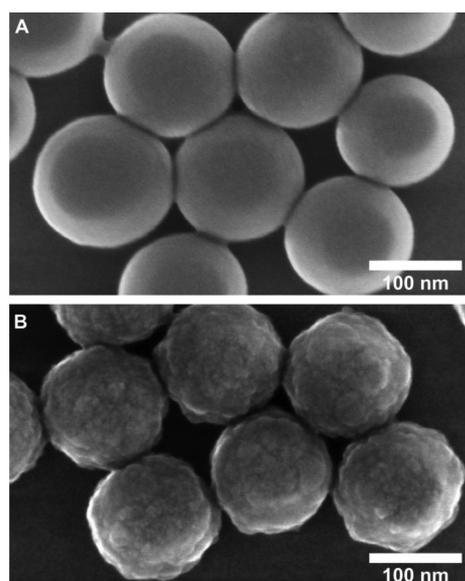


Figure 1. SEM images of the surface morphology of silica nanoparticles with (A) a shell grown in a Stöber-like growth process³⁴ and (B) synthesized according to the Hartlen method.³³

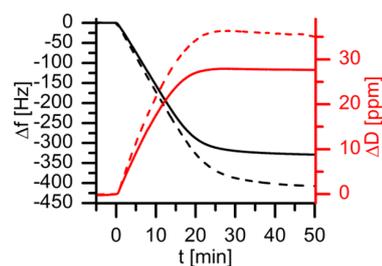


Figure 2. QCM-D measurements of the binding process of amino-functionalized silica nanoparticles with rough (solid curve, $\text{Ø} = 137 \pm 4$ nm) and smooth (dashed curve, $\text{Ø} = 136 \pm 4$ nm) surface morphology on a gold surface.

be weak with a binding energy between 14.2 and 38.5 kJ/mol in aqueous solution,⁴³ the simultaneous formation of multiple amine–gold bonds between each nanoparticle and the gold surface makes the overall binding strength per particle high enough to create an adsorbate layer, which remains unchanged during the washing process. This observation also shows that a

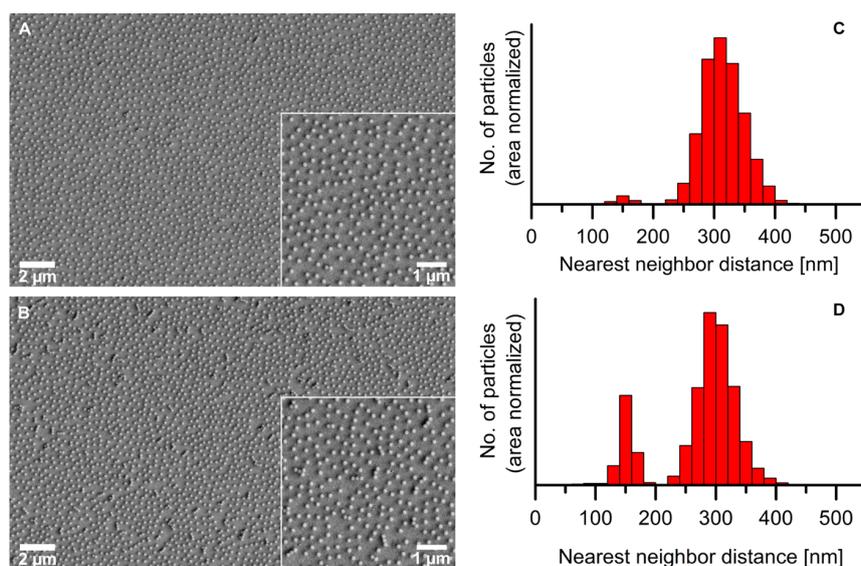


Figure 3. SEM images of the two-dimensional arrangement of (A) rough ($\text{\AA} = 137 \pm 4$ nm) and (B) smooth ($\text{\AA} = 136 \pm 4$ nm) amino-functionalized silica nanoparticles on a gold surface. These images are typical for 90% or 50% of the surface of the QCM chip, respectively (see main text for further explanation). The corresponding histograms show the distribution of nearest neighbor distances of (C) rough and (D) smooth particles in these regions.

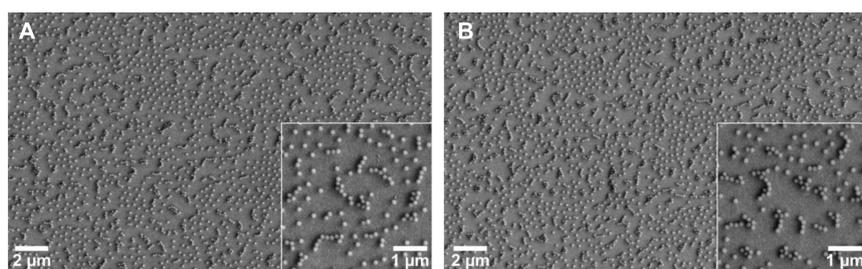


Figure 4. SEM images of aggregates of amino-functionalized silica nanoparticles with (A) rough ($\text{\AA} = 137 \pm 4$ nm) and (B) smooth ($\text{\AA} = 136 \pm 4$ nm) surface morphology on a gold surface visible in the center of the QCM-D chip. These images are representative for the situation in 10% or 50% of the total surface area of the chip, respectively. The insets are enlarged views of the images.

possible desorption reaction would be very slow; hence, there is no adsorption/desorption equilibrium at saturation coverage.

In Figure 2, typical examples of QCM-D measurements of the adsorption of rough (solid curves) and smooth (dashed curves) amino-functionalized silica nanoparticles are shown. The data obtained from the measurements are summarized in Table 2. The colloids with the rough surface (rSiNP) show a total change in Δf of -330 ± 5 Hz after 30 min. The total change in Δf of the particles with the smooth surface (sSiNP) after the same time is significantly higher (-409 ± 5 Hz). A large difference is also found for the change in dissipation ΔD : For the rough nanoparticles, the total change in ΔD is 28 ± 1 ppm, whereas for the colloids with the smooth surface, a total value for ΔD of 36 ± 1 ppm is obtained. SEM images of the sensor chips are analyzed in the following section to explain these differences.

SEM images of the dried QCM chips show an ordered, non-close-packed arrangement of the particles (see Figure 3A,B). The formation of such a structure occurs due to several factors: Initially, the nanoparticles in dispersion are separated through electrostatic repulsion because of their highly positive zeta potential (see Table 2). This repulsion between the particles leads to a non-close-packed arrangement of the particles on the

surface. During the subsequent evaporation of the solvent, these interparticle distances are preserved because of the multivalent amino–gold interactions. As earlier work suggests that the process of drying is a key factor for obtaining non-close-packed arrangements of colloids from solution^{44,45} and due to the observation of an augmented amount of aggregates after drying, a slow drying process was chosen to prevent the particles from aggregation. Since a QCM-D was used for observing the adsorption of the nanoparticles on the surface, it is also reasonable to use this device for a slow and controlled drying process by passing air through the flow chamber with a flow rate of $200 \mu\text{L}/\text{min}$. Under these conditions, the drying process takes several hours, whereas removal of the QCM chip from the flow chamber and simply drying it on air takes only about a minute. The oscillation of the quartz crystal does not influence the arrangement of the colloids on the surface as verified by several control experiments. Comparing the SEM images (in Figure 3) reveals a significant difference between the two-dimensional structures formed by particles with rough and smooth surface morphology, respectively. Particles with a rough surface show a regular arrangement over a very large fraction of the sensor area (*ca.* 90% of the gold surface which is equal to 0.7 cm^2 , see Figure 3A, for the discussion of the region with

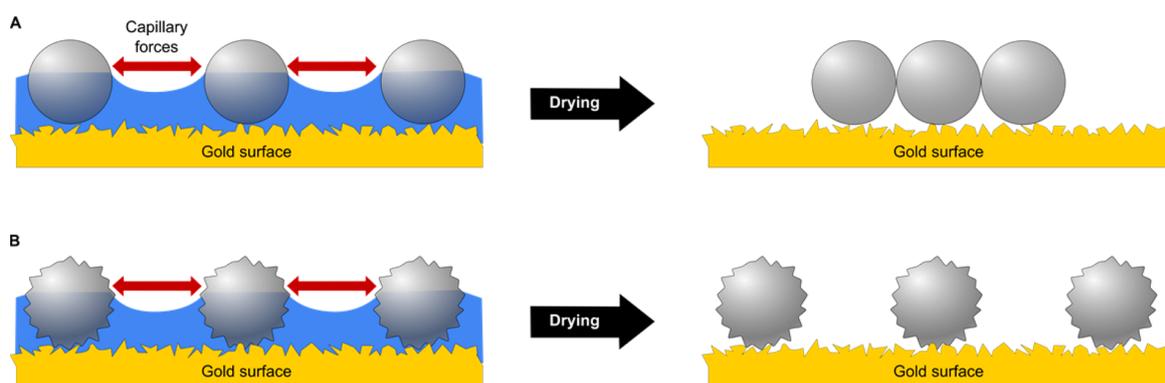


Figure 5. (A) Normal drying process of smooth colloidal particles resulting in (partial) aggregation and (B) friction-supported controlled drying successfully preventing aggregation.

aggregates: see below and Figure 4A). In this region, only a few (around 2%) two-dimensional aggregates consisting of 2–4 colloids are found. The colloids have a nearest neighbor (center-to-center) distance of 310 ± 30 nm. The distribution of the nearest neighbor distances of around 6700 particles determined from 26 different SEM images of the same QCM-D chip sampled over the entire surface is shown in Figure 3C, which is a typical result found for several experiments. The small peak at around 140 nm matching the average diameter of the nanoparticles corresponds to the low number of small aggregates. In contrast, the QCM-D chip covered with particles with a smooth surface shows significantly more aggregates (around 18%), although the zeta potential of both systems is comparable (see Table 2). Only about 50% of the QCM-D sensor surface is covered with a regular arrangement of the smooth colloids, which is equal to 0.4 cm^2 (see Figure 3B, discussion of the region with aggregates: see below and Figure 4B). The nearest neighbor (center-to-center) distance of the particles in those well-ordered areas was determined to 300 ± 29 nm. The latter value, as well as the corresponding nearest neighbor distance distribution (see Figure 3D), was obtained by analyzing 17 different SEM images of ordered areas on the same QCM-D chip (in total around 5100 particles). The smooth particles exhibit a particle density per area of $8.2 \pm 0.3 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$, whereas for the rough particles, a value of $7.2 \pm 0.2 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$ is calculated (see Table 2), which is about 12% lower. The corresponding frequency change Δf of the rough particles is 19% lower as compared to the smooth ones. This discrepancy is due to the different adsorption properties of the two systems as the frequency change of a QCM experiment in solution is weighting not only the mass of the particles, but also solvent molecules coupled to the nanoparticles. The corresponding effects have been investigated in detail for the current systems in a preceding publication.⁴⁶

Additional investigations using smooth silica nanoparticles of smaller (118 ± 3 nm) and larger (162 ± 4 nm) diameter show an increasing nearest neighbor distance with increasing particle diameter (see Supporting Information). In this way, an adjustment of the interparticle distances is possible since the particle interaction energy decreases with decreasing particle size as shown by arranging latex particles at the water/octane interface.⁴⁷ The scaling of the interparticle distance with the particle diameter is also assumed in theoretical work using Brownian dynamic simulations.⁴⁸

For all experiments using rough particles, one small, continuous area is found on the sensor chip (about 10% of the total area), which has a significantly higher number of aggregates (Figure 4A). In case of the smooth particles, this less ordered, continuous zone occupies around 50% of the gold surface (Figure 4B). The SEM images of areas with an increased amount of aggregates show significant open space around the particles; however, the average particle density is identical to that found on the ordered parts of the sample (Figure 4). This area is typically located in the center of the QCM sensor chip coinciding with the thinnest region of the QCM flow chamber. As a consequence of the increased solvent layer thickness toward the edge of the QCM chip, ethanol evaporates from the rim toward the center of the crystal where the lateral capillary forces between the particles are maximal. This observation suggests that the observed formation of aggregates is an effect of the drying process, where the capillary forces cause the formation of oligomers of particles on the surface, which then become stable against further movement by the capillary forces, as seen by the fact that there is no mesoscopic mass transfer observed on the surface.

The aggregation of nanoparticles on a surface during a drying process has already been described in detail elsewhere.⁴⁹ Attractive lateral capillary forces are exerted onto the particles, if the thickness of the liquid layer is reduced. If the interparticle distances are small enough so that a liquid film persists between the particles, these forces become maximal just before the drying process is completed and, hence, pull the particles together, so that aggregation results. In addition, the distance between neighboring particles, as well as the interfacial tension at the liquid/solid interface, influences the capillary forces being more efficient for small nearest neighbor distances.⁴⁹ In the present experiments, ethanol was used as liquid phase. Comparison experiments with the rough colloids dispersed in water showed similar results as obtained in ethanol regarding the change in Δf . However, many aggregates are found after the drying process in water, and a regular arrangement was observed only for small areas as compared to experiments using ethanol. This exemplifies the importance of the surface tension which is proportional to the magnitude of the capillary forces and, therefore, causes a reduction of the capillary forces from water to ethanol by about a factor of 3.⁴⁴

The aggregation upon drying was found to be more distinct for the colloids with a smooth surface than for those with a rough surface, although both systems have the same size and very similar degrees of surface functionalization and, hence,

surface charges as judged by the zeta potential (see Table 2). Thereby, an effect of L-arginine on the surface of the rough particles due to the preparation procedure can be excluded since L-arginine is removed before the functionalization with AHAPS by copious purification of the particles (see Supporting Information), which was confirmed by measuring a negative zeta potential of -40 ± 3 mV, typical for nonfunctionalized silica particles, before the coating with AHAPS. From these considerations, it is concluded that the surface roughness is the key factor, which determines aggregation during drying. In turn, it can be concluded that rough particles are bound more strongly to the surface due to additional friction forces, which hinder the lateral mobility on the surface (see Figure 5). From a simulation of the dynamics observed during a pushing experiment, Korayem *et al.* inferred that smooth particles with a diameter below 500 nm will slide and not roll on a rough surface.⁵⁰ By using a nanoindenter setup, Fuchs *et al.* observed for 10 μm borosilicate microspheres an increase of the sliding friction coefficient and a decrease of the rolling friction coefficient with increasing surface roughness for RMS roughnesses between 0.3 and 2.7 nm.⁵¹ These results are perfectly in line with the observation presented here suggesting that the lateral mobility of the particles is due to a sliding motion.

This discussion indicates that for the present system the stability of the layer against lateral capillary forces can be tuned to some extent by the roughness of the particles. Despite the increased binding to the surface for the rough particles and the efforts being made to reduce the speed of the drying process, the interaction with the surface is still insufficient to withstand the largest capillary forces exerted in the center of the chip indicating the limited range of this additional interaction.

Arrangement of Particles from Water on an 11-Mercaptoundecanoic Acid Functionalized Gold Surface.

To determine the influence of the binding strength on the self-assembly of the colloids as well as their stability against capillary forces during drying, the particles are bound *via* a strong covalent amide bond (around $397.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ for *N*-methylacetamide⁵²) to the surface. A self-assembled monolayer (SAM) of 11-mercaptoundecanoic acid was prepared on the gold surface of the QCM sensor chip, which is bonded strongly to the gold surface ($167\text{--}209 \text{ kJ mol}^{-1}$)⁵³ and is thus about 1 order of magnitude stronger than typical amino–gold bonds (see above). The amino functionalized particles were coupled to the activated carboxylic acid head groups of the SAM from aqueous dispersion.

The deposition of the rough particles was monitored by QCM-D along the lines described above (see Figure 6). The

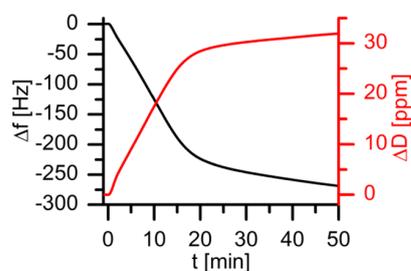


Figure 6. QCM-D measurement of the binding process of amino-functionalized silica nanoparticles with rough (solid curve, $\Phi = 137 \pm 4$ nm) surface morphology on an 11-mercaptoundecanoic acid functionalized gold surface.

frequency change shows a steep almost linear decrease directly after the introduction of the dispersion. The curve shows a reduction of the slope after 15–20 min to later decrease with a constant, but much reduced slope. The frequency change of the rough particles on the SAM increases from -330 ± 5 Hz found on the nonfunctionalized surfaces to a value of -268 ± 5 Hz observed in this experiment. The dissipation curve also shows a linear behavior at low coverage. After about 15–20 min, the slope of the curve decreases. In the latter period, the dissipation increases slightly from 29 ± 1 to 32 ± 1 ppm. Prior to a discussion of these results, it is interesting to elucidate the morphology of the particle layer.

Analyzing the layers of rough particles on the functionalized surface by SEM (Figure 7) reveals almost no aggregates (0.7%, around 7300 particles were analyzed) throughout the entire QCM-D crystal indicating that the covalently bound particles are more strongly bound to the surface and can withstand even the largest capillary forces during drying, which is also consistent with the reduction of the fraction of the aggregates as compared to the amine bound particles (2% aggregates see Figure 3C). In contrast to the slow drying process, which was necessary for the nonfunctionalized gold surfaces (see discussion above), the present systems were dried within 1 min under a nitrogen stream corroborating the statement concerning the stability of the system against lateral displacement of the particles. In Figure 7, panels A and B show a SEM image and the corresponding nearest neighbor distance distribution, respectively. A monomodal distribution with a maximum at 370 ± 40 nm is found which is shifted by 60 nm to larger values compared to the nonfunctionalized gold surface.

From the frequency shifts observed by QCM-D (Figure 6) for the two types of gold surfaces (functionalized and nonfunctionalized), a reduced coverage with particles is expected for the functionalized one. This expectation is supported by the SEM analysis of the corresponding particle-covered gold surfaces, which yields a particle density of $7.2 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$ for the nonfunctionalized and $5.4 \pm 0.1 \text{ particles}/\mu\text{m}^2$ for the functionalized surface. Hence, a reduction of 25% of the saturation coverage is found on the functionalized Au surface. It may be noted in passing that the observed frequency changes scale very nicely with the particle density despite the fact that the measurements are done in ethanol (non-functionalized surface) and water (functionalized surface). This correlation is not trivial, because both systems exhibit a considerable amount of change in dissipation. For such systems, viscoelastic effects at the interface between particles and solvent were shown to be important for the measured Δf and ΔD values in QCM-D experiments.^{32,54} In turn, it can be concluded that the differences between these effects in water and ethanol have to be small.

The initial temporal evolution of the frequency change observed by QCM-D is in line with the one observed at the nonfunctionalized surfaces (see Figure 2), suggesting that at the early stages of the adsorption process there is sufficient open space on the surface that additional particles can adsorb without limitations imposed by particles present at the surface, which gives rise to a constant increase of the frequency change with time for the given experimental conditions. At a certain coverage, the void space on the surface becomes a limiting factor and the adsorption rate drops significantly. In contrast to the situation on the pure gold (see Figure 2), the QCM-D traces found for the functionalized surface do not level off, but show a much reduced but linear slope for the remaining time of

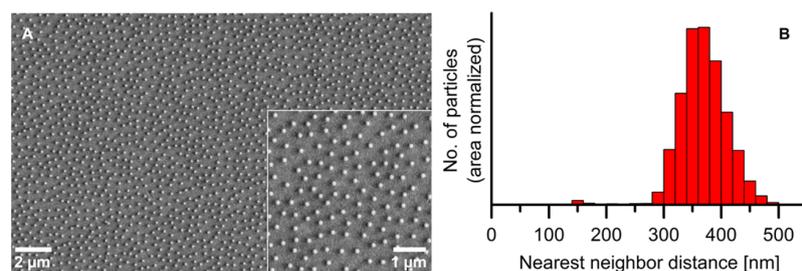


Figure 7. (A) SEM image of the two-dimensional arrangement of rough ($\text{O} = 137 \pm 4$ nm) amino-functionalized silica nanoparticles on an 11-mercaptopundecanoic acid functionalized gold surface, which is typical for the arrangement on the whole surface. The corresponding histogram (B) shows the distribution of nearest neighbor distances.

the experiment (up to 50 min, see Figure 6). When flushing the QCM-D chip with water to stop the adsorption process, the frequency remains unchanged. These observations indicate that there is a slow but constant rate of adsorbed nanoparticles, which is in contrast to a simple model of a laterally rigid particle layer. In case of the nanoparticles adsorbed on the pure gold surface, we have already shown that the adsorption of the particles is characterized by two different regimes.⁴⁶ In the first regime, the particles adsorb on void space on the surface, while in the second phase, when open area providing adsorption sites compliant with the Coulomb repulsion is almost removed, the layer gets compressed, which results in a decrease of the nearest neighbor distance and an increase of the lateral order within the layer. The latter process requires lateral mobility of the particles on the surface, which is conceivable due to the weak multivalent interaction between the nanoparticles and the nonfunctionalized gold surface.

The linear decrease of the frequency change at later times in case of the functionalized gold surfaces suggests that the silica nanoparticles adsorbed there are laterally mobile, too. This allows to accommodate more particles than anticipated for a simple hit and stick process. However, the particles are covalently attached *via* amide bonds to the self-assembled monolayer, which renders this tether stable. The movement of the particles on the surface would hence require a lateral diffusion of the particles together with the attached molecules of the SAM. The lateral diffusion of molecules in a SAM under a driving potential is well conceivable. SAMs are dynamic entities as, for example, shown by the ability to exchange molecules with a solution.⁵⁵ However, the dynamic of such a process is significantly slower than the lateral diffusion of the silica particles weakly bound to the pure gold surface *via* an amine functionalization, which gives rise to the slow decrease of the frequency change of significant periods of time.

In addition to the change in Δf , the change in ΔD behaves somewhat different for the particles adsorbed onto the functionalized surface compared to those on the nonfunctionalized one: as in case of the nonfunctionalized surface, ΔD is first increasing, but then it does not reach saturation but further increases linearly with significantly lower slope than in the beginning (see Figure 6). For both, Δf and ΔD of the functionalized surface, the slope of the curves changes at the same time supporting the suggested adsorption process of the particles in the second stage. The final value for ΔD is 32 ± 1 ppm, which is higher compared to the one observed for the nonfunctionalized surface. The increased value for the change in energy dissipation is attributed to additional flexibility of the tether provided by the alkyl chain of 11-mercaptopundecanoic acid, which is in line with the observations in literature for the

deposition of silicon nanocrystals with organic acids of varying alkyl-chain lengths on silica surfaces.⁵⁶

So far, only the rough silica nanoparticles were discussed in detail. The particles with a smooth surface also show on the functionalized surfaces the absence of a limited area with an accumulated amount of aggregates confirming their stability against aggregation driven by capillary forces during the drying process. However, no reduction of the number of aggregates could be observed compared to the nonfunctionalized surfaces. In this regard, one has to keep in mind that in these experiments a transfer of the particles in water is necessary. The stability of amino-functionalized particles is in water, in contrast to ethanol, very sensitive to environmental changes like the rate of functionalization and is also time-dependent.⁵⁷ This decrease in stability can lead to aggregation of particles in dispersion, which is in line with an increase of the hydrodynamic diameter (see Supporting Information) which probably results in the high amount of aggregates on the surface. Regarding the interparticle distances, no change compared to the nonfunctionalized surfaces is observed, and therefore, also the dependence on the particle size is retained.

Preparation of Mixed Non-Close-Packed Monolayers Composed of Silica and Polystyrene Nanoparticles.

The layers of rough silica colloids on an 11-mercaptopundecanoic acid functionalized gold surface can be further used as templates for the preparation of mixed non-close-packed monolayers. To this end, an aqueous dispersion of polystyrene nanospheres with a diameter of 368 ± 14 nm and characterized by a negative surface charge (zeta potential: -21 ± 1 mV) was flushed over the layer of rough silica particles covalently bound to the functionalized QCM chip. The deposition of the polystyrene colloids results in a further decrease of the frequency change observed by QCM from -237 ± 5 Hz after the silica nanoparticles adsorption to -283 ± 5 Hz after adsorption of the polystyrene particles (see Figure 8), which correspond to a rather small amount of polystyrene compared to the amount of silica particles. The frequency change of this system is stable after flushing with water indicating an irreversible binding of the polystyrene nanoparticles to the surface. The change in Δf is accompanied by a change in ΔD from 29 ± 1 ppm after deposition of silica colloids to 66 ± 2 ppm after deposition of polystyrene particles. The ratio of $\Delta D/\Delta f$ associated with the adsorption of polystyrene particles is about a factor of 7 higher than that found for the adsorption of the silica nanoparticles, highlighting the importance of viscoelastic contributions to the binding of the polystyrene particles. What is the reason for the increased importance of the dissipation? QCM-D measurements on functionalized Au surfaces lacking adsorbed silica nanoparticles show that the

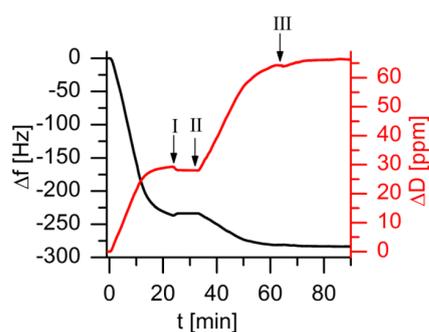


Figure 8. QCM-D measurement of the binding process of amino-functionalized silica nanoparticles ($\text{\AA} = 137 \pm 4$ nm) on an 11-mercaptopundecanoic acid functionalized gold surface with rough surface morphology and following deposition of polystyrene nanoparticles ($\text{\AA} = 368 \pm 14$ nm) with negative surface charge. The arrows indicate (I) end of the adsorption of silica particles/flushing with water, (II) beginning of the adsorption of polystyrene particles, and (III) end of the adsorption of polystyrene particles/flushing with water.

polystyrene particles bind neither reversibly nor irreversibly to this surface. This is in line with the simple picture that the interaction between two negatively charged systems should be repulsive (note that a negative surface charge is expected for the SAM, too, as the EDC/NHS activation of carboxylate functionalities is not complete^{58,59}).

However, the polystyrene nanospheres adhere to the positively charged silica nanoparticles adsorbed to the functionalized surface as visualized by SEM (Figure 9A). The polystyrene particles, which repel each other due to electrostatic interactions between the negatively charged particles, form a two-dimensional non-close-packed array on the surface. The maximum of the nearest neighbor distribution is at a distance of 1030 ± 180 nm (center-to-center) with a minimal distance between the particle of about 600 nm and a very small number of aggregates as shown in Figure 9B. The standard deviation of the distribution is considerably wider (17%) as found for the underlying silica particles (around 10%). A closer inspection of the SEM images reveals two different adsorption geometries. The first are polystyrene particles bound to two silica nanoparticles with the polystyrene particle bridging the two silica nanoparticles. In a second class, the polystyrene particles are bound in the center of three silica particles forming an almost equilateral triangle (bended adsorption complexes, see Figure S5C). From simple geometric considerations using a hard sphere model (see Supporting Information for details), it can be deduced that the polystyrene particle can interact with

the functionalized gold surface in case the silica nanoparticles have a minimal distance of about 450 nm for the interaction with two silica particles (see Figure S6A,B). For the linear adsorption complexes observed here, an average distance of 480 ± 40 nm between the silica nanoparticles is found. In turn, most polystyrene particles bound to two silica nanoparticles are also in contact with the SAM. As seen in the inset of Figure 9A, bended adsorption complexes are also observed in case the distance of the silica nanoparticles is smaller than 450 nm indicating that an interaction with the SAM is also energetically preferred if the distance of the silica particles would allow for an interaction with the silica particles only. Within the same model, the leg length of the equilateral triangles formed by the silica particles should be at least 390 nm to accommodate the polystyrene particles such that they can interact with the SAM surface. For this class of adsorption complexes, an average nearest neighbor distance of 400 ± 32 nm is found, which again shows that most of the adsorbed triangular complexes the polystyrene particles will also be in contact with the SAM surface. These observations are at odds with the simple picture of two negatively charged surfaces mentioned above, which gives rise to a repulsive potential due to Coulomb interaction. First, the system always contains counterions, which will screen the Coulomb repulsion, and in addition, attractive dispersion interactions between the polystyrene particles on the one hand and the SAM on the other contribute to a stabilization of the particles in contact with the SAM surface, which is, however, too small to adhere the particles to the functionalized Au surface in case the strong attractive interaction to the silica nanoparticles is absent.

CONCLUSION

In this work, the regular, non-close-packed self-assembly of amino-functionalized silica nanoparticles with smooth and rough surface morphology on a gold surface due to electrostatic repulsion between the positively charged particles was achieved in a QCM-D device. The formation of aggregates during the drying process, which up to now has prevented the formation of non-close-packed ordered structures in similar processes, could be successfully limited by (1) applying a slow drying process inside the flow chamber of the QCM-D and (2) exploiting the multivalent interaction between amino groups and the gold surface and especially frictional forces between the particles and gold surfaces caused by the surface roughness of both systems. The latter allows to overcome capillary forces, which normally cause aggregation in drying processes and, hence, to obtain extended ordered non-close-packed structures by this friction-supported controlled drying process.

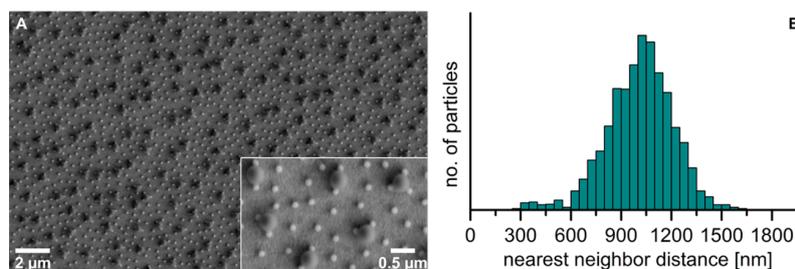


Figure 9. (A) SEM image of the arrangement of polystyrene nanoparticles ($\text{\AA} = 368 \pm 14$ nm) on an ordered structure of self-assembled rough, amino-functionalized silica nanoparticles ($\text{\AA} = 137 \pm 4$ nm) on an 11-mercaptopundecanoic acid functionalized gold surface. (B) The histogram shows the distribution of nearest neighbor distances between polystyrene nanoparticles (center-to-center distance).

Further, it could be shown that increasing the interaction strength of the particles with the surface employing covalent amide bonds decreases the formation of aggregates and allows for accelerating the preparation process due to the possibility to dry the surfaces rapidly. This approach provides a facile procedure to prepare non-close-packed colloidal monolayers. In addition to the fabrication of non-close-packed nanoparticle arrays, the combination of QCM-D and SEM can be applied for monitoring and imaging the extent of interparticle and particle–surface interactions.

While this concept is shown here for silica nanoparticles as an exploratory example, the strategy of adjusting Coulombic repulsion and the interaction strength of the particles to the surface is readily transferable to many other particle systems, which can exhibit a wide variety of properties or functionalities. To this end, the ability to form mixed layers using two different types of particles additionally highlights the versatility of the approach to design well-ordered, non-close-packed layers of particles with tailored chemical or physical properties.

EXPERIMENTAL DETAILS

Synthesis of Monodisperse SiO₂ Particles with a Rough Surface. Silica nanoparticles of 137 ± 4 nm diameter with a rough surface were synthesized according to a procedure described by Hartlen *et al.*³³ in a multistep growth process (for details see Supporting Information).

Synthesis of Monodisperse SiO₂ Particles with a Smooth Surface. With the use of 20 nm seed particles obtained by the method of Hartlen in a modified synthesis of Reculosa *et al.*,³⁴ smooth particles of 136 ± 4 nm diameter were synthesized in a one-step procedure (see Supporting Information). The stepwise growth of three silica shells in a modified Stöber process^{60,35,36} on silica seed particles of 53 ± 3 nm diameter which were prepared according to the Hartlen method (see above) yielded particles with a final diameter of 118 ± 4 nm and a smooth surface (see Supporting Information). For obtaining particles with a diameter of 162 ± 4 nm, a fourth shell was grown on these particles.

Functionalization of SiO₂ Particles with AHAPS. Silica nanoparticles diluted in ethanol and ammonia were functionalized with *N*-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS) under argon atmosphere according to a procedure by Graf *et al.*⁵⁷ (see Supporting Information).

Synthesis of Polystyrene Nanoparticles. Polystyrene nanoparticles of 368 ± 14 nm diameter were synthesized by emulsion polymerization as described by Zhang *et al.*⁶¹ (see Supporting Information).

Functionalization of QCM Sensor Chips with 11-Mercaptoundecanoic Acid. The gold surface of QCM sensor chips ($\nu_{\text{res}} = 4.95 \pm 0.02$ MHz, Q-Sense, Västra Frölunda, Sweden) was functionalized with 11-mercaptoundecanoic acid (4.7 mM) in 80% ethanolic solution for 12 h. After a rinse with ultrapure water, the sensor was inserted into the flow chamber of the QCM-D (see below) and the carboxylic acid groups were transformed into *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester groups by passing an aqueous mixture of 0.05 M NHS and 0.20 M *N*-(3-(dimethylamino)propyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) for 7 min over the surface with a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Subsequently, the sensor was rinsed with water and used for the self-assembly studies with nanoparticles.⁶²

Preparation of Non-Close-Packed Monolayers of SiO₂ Particles Using QCM-D. QCM-D measurements were carried out with a Q-Sense E1 (Q-Sense) system using a standard flow cell. Ethanol was flushed through the flow cell for about 20 min at 25 °C with 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ prior to adsorption of nanoparticles until a stable baseline was obtained. Subsequently, the ethanolic nanoparticle dispersion (0.1 g/L) was injected at a flow rate of 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ and flushed over the gold surface until the change in frequency (Δf) reached a steady state. The QCM sensor chips were subsequently flushed with ethanol at the same flow rate for another 10 min to

remove reversibly bound particles. For drying, the sensor chip was left inside the flow chamber and air was passed through the chamber with a flow rate of 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ until the sensor chip was dry as monitored by the QCM-D response. Several overtones of the frequency change (Δf) and the dissipation (ΔD) were recorded as a function of time to quantify the changes in mass and energy dissipation of the deposited nanoparticles.

For 11-mercaptoundecanoic acid functionalized surfaces, the procedure was the same except ultrapure water was used instead of ethanol in all steps of the process. Sensor chips treated by this process were flushed for 10 min with water inside the flow cell after the deposition of the particles, taken out of the device, rinsed again manually with water, and quickly dried in a nitrogen flow.

Preparation of Mixed Non-Close-Packed Monolayers of SiO₂ Particles and Polystyrene Particles Using QCM-D. Mixed non-close-packed monolayers were prepared on 11-mercaptoundecanoic acid functionalized gold surfaces. Rough silica nanoparticles were deposited as described in the previous section. After Δf became constant, ultrapure water was flushed for 10 min through the flow chamber with 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Polystyrene nanoparticles dispersed in ultrapure water were injected at the same flow rate until the change in Δf stabilized. The sample was flushed again with ultrapure water for 10 min. The sensor chip was taken out of the flow cell, rinsed with ultrapure water, and dried in a nitrogen flow.

Scanning Electron Microscopy (SEM). SEM and STEM images were acquired on a Hitachi SU8030 EM. SEM and STEM images were taken with an acceleration voltage of either 30 or 3 kV, respectively, in the secondary electron (SE) or transmission electron (TE) mode. Standard STEM images (not shown here) were used for the size analysis of the silica particles.

Transmission Electron Microscopy (TEM) and Determination of the Surface Roughness of the Nanoparticles. Samples for TEM were prepared by dipping carbon-coated copper 400-mesh grids (Quantifoil) in an ethanolic particle dispersion. TEM images for roughness analysis were recorded using a Zeiss EM 10 CR microscope at 80 kV. To minimize radiation damage of the nanoporous silica structures, all images are recorded in less than 10 s. The root-mean-square (RMS) roughness of the particles was determined from the TEM images with the program FIJI.⁶³

Dynamic Light Scattering and Zeta Potential Measurements. The hydrodynamic diameter of the particles ($c = 0.1$ g/L in ethanol, unfiltered) and their zeta potential were determined using a Zetasizer Nano ZS from Malvern Instruments Ltd. The hydrodynamic diameters are averaged values of a large number of particles, which are obtained using a cumulant fit of the dynamic light scattering data.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsnano.5b07782.

Experimental section (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: th.risse@fu-berlin.de.

*E-mail: cmgraf@zedat.fu-berlin.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within the Sonderforschungsbereich (SFB) 765, subprojects A4 and Z2 and the Freie Universität Berlin. We thank Dr. H. Renz and Prof. Dr. R. J. Radlanski (Department of Craniofacial Developmental Biology, Charité - Universitätsmedizin Berlin) for the use of their electron

microscope and the group of Prof. Dr. R. Haag for access to the Dynamic Light Scattering setup.

REFERENCES

- (1) Sun, C.-H.; Min, W.-L.; Linn, N. C.; Jiang, P.; Jiang, B. Templated Fabrication of Large Area Subwavelength Antireflection Gratings on Silicon. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 231105.
- (2) Linn, N. C.; Sun, C.-H.; Jiang, P.; Jiang, B. Self-Assembled Biomimetic Antireflection Coatings. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 101108.
- (3) Chen, Y.-C.; Huang, Z.-S.; Yang, H. Cicada-Wing-Inspired Self-Cleaning Antireflection Coatings on Polymer Substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 25495–25505.
- (4) Jiang, P.; McFarland, M. J. Wafer-Scale Periodic Nanohole Arrays Templated from Two-Dimensional Nonclose-Packed Colloidal Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3710–3711.
- (5) Denis, F. A.; Hanarp, P.; Sutherland, D. S.; Gold, J.; Mustin, C.; Rouxhet, P. G.; Dufrene, Y. F. Protein Adsorption on Model Surfaces with Controlled Nanotopography and Chemistry. *Langmuir* **2002**, *18*, 819–828.
- (6) McLellan, J. M.; Geissler, M.; Xia, Y. Edge Spreading Lithography and Its Application to the Fabrication of Mesoscopic Gold and Silver Rings. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10830–10831.
- (7) Liu, X.; Gozubenli, N.; Choi, B.; Jiang, P.; Meagher, T.; Jiang, B. Templated Fabrication of Periodic Arrays of Metallic and Silicon Nanorings with Complex Nanostructures. *Nanotechnology* **2015**, *26*, 55603.
- (8) Yu, Y.; Ai, B.; Mohwald, H.; Zhou, Z.; Zhang, G.; Yang, B. Fabrication of Binary and Ternary Hybrid Particles Based on Colloidal Lithography. *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 4549–4555.
- (9) Yu, Y.; Gan, L.; Zhang, G.; Yang, B. Asymmetric Microparticles and Heterogeneous Microshells via Angled Colloidal Lithography. *Colloids Surf., A* **2012**, *405*, 51–58.
- (10) Li, F.; Wilker, M. B.; Stein, A. Simulation-Aided Design and Synthesis of Hierarchically Porous Membranes. *Langmuir* **2012**, *28*, 7484–7491.
- (11) Lin, S. Experimental Demonstration of Guiding and Bending of Electromagnetic Waves in a Photonic Crystal. *Science* **1998**, *282*, 274–276.
- (12) Weissman, J. M.; Sunkara, H. B.; Tse, A. S.; Asher, S. A. Thermally Switchable Periodicities and Diffraction from Mesoscopically Ordered Materials. *Science* **1996**, *274*, 959–960.
- (13) Yablonovitch, E. Photonic Band-Gap Structures. *J. Opt. Soc. Am. B* **1993**, *10*, 283.
- (14) Dimitrov, A. S.; Nagayama, K. Continuous Convective Assembling of Fine Particles into Two-Dimensional Arrays on Solid Surfaces. *Langmuir* **1996**, *12*, 1303–1311.
- (15) Retsch, M.; Zhou, Z.; Rivera, S.; Kappl, M.; Zhao, X. S.; Jonas, U.; Li, Q. Fabrication of Large-Area, Transferable Colloidal Monolayers Utilizing Self-Assembly at the Air/Water Interface. *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 230–241.
- (16) Colson, P.; Cloots, R.; Henrist, C. Experimental Design Applied to Spin Coating of 2D Colloidal Crystal Masks: A Relevant Method? *Langmuir* **2011**, *27*, 12800–12806.
- (17) van Duffel, B.; Ras, R. H. A.; De Schryver, F. C.; Schoonheydt, R. A. Langmuir–Blodgett Deposition and Optical Diffraction of Two-Dimensional Opal. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 3333–3336.
- (18) Vogel, N.; Goerres, S.; Landfester, K.; Weiss, C. K. A Convenient Method to Produce Close- and Non-Close-Packed Monolayers using Direct Assembly at the Air-Water Interface and Subsequent Plasma-Induced Size Reduction. *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 1719–1734.
- (19) Choi, D.-G.; Yu, H. K.; Jang, S. G.; Yang, S.-M. Colloidal Lithographic Nanopatterning via Reactive Ion Etching. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7019–7025.
- (20) Yan, X.; Yao, J.; Lu, G.; Li, X.; Zhang, J.; Han, K.; Yang, B. Fabrication of Non-Close-Packed Arrays of Colloidal Spheres by Soft Lithography. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7688–7689.
- (21) Li, X.; Wang, T.; Zhang, J.; Yan, X.; Zhang, X.; Zhu, D.; Li, W.; Zhang, X.; Yang, B. Modulating Two-Dimensional Non-Close-Packed Colloidal Crystal Arrays by Deformable Soft lithography. *Langmuir* **2010**, *26*, 2930–2936.
- (22) Jiang, P.; Prasad, T.; McFarland, M. J.; Colvin, V. L. Two-Dimensional Nonclose-Packed Colloidal Crystals Formed by Spincoating. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 011908.
- (23) Bhawalkar, S. P.; Qian, J.; Heiber, M. C.; Jia, L. Development of a Colloidal Lithography Method for Patterning Nonplanar Surfaces. *Langmuir* **2010**, *26*, 16662–16666.
- (24) Isa, L.; Kumar, K.; Müller, M.; Grolig, J.; Textor, M.; Reimhult, E. Particle Lithography from Colloidal Self-Assembly at Liquid-Liquid Interfaces. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5665–5670.
- (25) Yin, Y.; Lu, Y.; Gates, B.; Xia, Y. Template-Assisted Self-Assembly: A Practical Route to Complex Aggregates of Monodispersed Colloids with Well-Defined Sizes, Shapes, and Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8718–8729.
- (26) Hoogenboom, J. P.; Rétif, C.; de Bres, E.; van de Boer, M.; van Langen-Suurling, A. K.; Romijn, J.; van Blaaderen, A. Template-Induced Growth of Close-Packed and Non-Close-Packed Colloidal Crystals during Solvent Evaporation. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 205–208.
- (27) Hoogenboom, J. P.; Vossen, D. L. J.; Favre-Moskalenko, C.; Dogterom, M.; van Blaaderen, A. Patterning Surfaces with Colloidal Particles Using Optical Tweezers. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80*, 4828.
- (28) Grier, D. G. A Revolution in Optical Manipulation. *Nature* **2003**, *424*, 810–816.
- (29) Morisada, S.; Kojima, S.; Sumi, T.; Kawakita, H.; Ohto, K. Fabrication of Non-Close-Packed Colloidal Monolayers by Convective Self-Assembly Using Cationic Polyelectrolyte-Grafted Silica Particles. *Colloid Polym. Sci.* **2015**, *293*, 2985–2993.
- (30) Kralchevsky, P.; Paunov, V.; Ivanov, I.; Nagayama, K. Capillary Meniscus Interaction between Colloidal Particles Attached to a Liquid–Fluid Interface. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *151*, 79–94.
- (31) Dixon, M. C. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *J. Biomol. Technol.* **2008**, *19*, 151–158.
- (32) Reviakine, I.; Johannsmann, D.; Richter, R. P. Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear: Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8838–8848.
- (33) Hartlen, K. D.; Athanasopoulos, Aristidis, P. T.; Kitaev, V. Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to > 200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays. *Langmuir* **2008**, *24*, 1714–1720.
- (34) Reculusa, S.; Poncet-Legrand, C.; Ravaine, S.; Mingotaud, C.; Duguet, E.; Bourgeat-Lami, E. Syntheses of Raspberry-like Silica/Polystyrene Materials. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2354–2359.
- (35) Bogush, G.; Zukoski, C. Uniform Silica Particle Precipitation: An Aggregative Growth Model. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 19–34.
- (36) Philipse, A. P. Quantitative Aspects of the Growth of (Charged) Silica Spheres. *Colloid Polym. Sci.* **1988**, *266*, 1174–1180.
- (37) van Blaaderen, A.; van Geest, J.; Vrij, A. Monodisperse Colloidal Silica Spheres from Tetraalkoxysilanes: Particle Formation and Growth Mechanism. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *154*, 481–501.
- (38) Carcouët, C. C. M. C.; van de Put, M. W. P.; Mezari, B.; Magusin, P. C. M. M.; Laven, J.; Bomans, P. H. H.; Friedrich, H.; Esteves, A. C. C.; Sommerdijk, N. A. J. M.; van Benthem, R. A. T. M.; With, G. de. Nucleation and Growth of Monodisperse Silica Nanoparticles. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 1433–1438.
- (39) Grunewald C. Untersuchung Multivalenter Wechselwirkungen auf Funktionalisierten Goldoberflächen mittels QCM. Master Thesis, Berlin, 2012.
- (40) Johannsmann, D. Viscoelastic, Mechanical, and Dielectric Measurements on Complex Samples with the Quartz Crystal Microbalance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 4516–4534.
- (41) Biolin Scientific Home Page. <http://www.biolinscientific.com/q-sense/services/?card=QS9>.
- (42) Senkara-Barwijuk, E.; Kobiela, T.; Lebed, K.; Lekka, M. Reaction Pathway and Free Energy Profile Determined for Specific

Recognition of Oligosaccharide Moiety of Carboxypeptidase Y. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *36*, 103–109.

(43) Pong, B.-K.; Lee, J.-Y.; Trout, B. L. First Principles Computational Study for Understanding the Interactions between ssDNA and Gold Nanoparticles: Adsorption of Methylamine on Gold Nanoparticulate Surfaces. *Langmuir* **2005**, *21*, 11599–11603.

(44) Qian, J.; Bhawalkar, S. P.; Xu, Y.; Jia, L. Novel Use of Polymer Brushes in Colloidal Lithography to Overcome Lateral Capillary Force. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 3111–3118.

(45) Degand, S.; Lamblin, G.; Dupont-Gillain, C. C. Colloidal Lithography using Silica Particles: Improved Particle Distribution and Tunable Wetting Properties. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *392*, 219–225.

(46) Grunewald, C.; Schudde, M.; Noufele, C. N.; Graf, C.; Risse, T. Ordered Structures of Functionalized Silica Nanoparticles on Gold Surfaces: Correlation of Quartz Crystal Microbalance with Structural Characterization. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 10642–10649.

(47) Aveyard, R.; Clint, J. H.; Nees, D.; Paunov, V. N. Compression and Structure of Monolayers of Charged Latex Particles at Air/Water and Octane/Water Interfaces. *Langmuir* **2000**, *16*, 1969–1979.

(48) Gray, J. J.; Bonnecaze, R. T. Adsorption of Colloidal Particles by Brownian Dynamics Simulation: Kinetics and surface structures. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 1366.

(49) Thill, A.; Spalla, O. Aggregation Due to Capillary Forces During Drying of Particle Submonolayers. *Colloids Surf., A* **2003**, *217*, 143–151.

(50) Korayem, M. H.; Zakeri, M. Dynamic Modeling of Manipulation of Micro/Nanoparticles on Rough Surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 6503–6513.

(51) Fuchs, R.; Weinhart, T.; Meyer, J.; Zhuang, H.; Staedler, T.; Jiang, X.; Luding, S. Rolling, Sliding and Torsion of Micron-Sized Silica Particles: Experimental, Numerical and Theoretical Analysis. *Granular Matter* **2014**, *16*, 281–297.

(52) Marochkin, I. I.; Dorofeeva, O. V. Amide Bond Dissociation Enthalpies: Effect of Substitution on N-C Bond Strength. *Comput. Theor. Chem.* **2012**, *991*, 182–191.

(53) Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C. The Chemistry of the Sulfur-Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1183–1192.

(54) Johannsmann, D.; Reviakine, I.; Richter, R. P. Dissipation in Films of Adsorbed Nanospheres Studied by Quartz Crystal Microbalance (QCM). *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8167–8176.

(55) Schlenoff, J. B.; Li, M.; Ly, H. Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12528–12536.

(56) Quevedo, I. R.; Olsson, A. L.; Clark, R. J.; Veinot, J. G.; Tufenkji, N. Interpreting Deposition Behavior of Polydisperse Surface-Modified Nanoparticles Using QCM-D and Sand-Packed Columns. *Environ. Eng. Sci.* **2014**, *31*, 326–337.

(57) Graf, C.; Gao, Q.; Schütz, I.; Noufele, C. N.; Ruan, W.; Posselt, U.; Korotianskiy, E.; Nordmeyer, D.; Rancan, F.; Hadam, S.; Vogt, A.; Lademann, J.; Haucke, V.; Rühl, E. Surface Functionalization of Silica Nanoparticles Supports Colloidal Stability in Physiological Media and Facilitates Internalization in Cells. *Langmuir* **2012**, *28*, 7598–7613.

(58) Frey, B. L.; Corn, R. M. Covalent Attachment and Derivatization of Poly(L-lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization - Modulation FT-IR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3187–3193.

(59) Patel, N.; Martyn, C. D.; Mark, H.; Richard, J. H. Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **1997**, *13*, 6485–6490.

(60) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.

(61) Zhang, J.; Chen, Z.; Wang, Z.; Zhang, W.; Ming, N. Preparation of Monodisperse Polystyrene Spheres in Aqueous Alcohol System. *Mater. Lett.* **2003**, *57*, 4466–4470.

(62) Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G. M. A Strategy for the Generation of Surfaces Presenting Ligands for Studies of Binding Based on an Active Ester as a Common Reactive Intermediate: A Surface Plasmon Resonance Study. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777–790.

(63) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682.

Supporting Information for

Controlling the Interaction and Non-Close-Packed Arrangement of Nanoparticles on Large Areas

*Madlen Schmudde, Christian Grunewald, Christian Goroncy, Christelle N. Noufele,
Benjamin Stein, Thomas Risse,* Christina Graf**

Institut für Chemie und Biochemie, Physikalische und Theoretische Chemie, Freie Universität
Berlin, Takustraße 3, D-14195 Berlin, Germany, e-mail: th.risse@fu-berlin.de,
cmgraf@zedat.fu-berlin.de

1. Synthesis of the Nanoparticles

Materials.

Tetraethyl orthosilicate (TEOS, Fluka, 99%), L-arginine (Fluka, 99.5%), cyclohexane (Carl Roth, 99.5%), ethanol (EtOH, Berkel AHK, 100%), ethanol (EtOH, Fisher Scientific, 96%), ammonia solution (Carl Roth, 25-27%), N-(6-aminoethyl)-aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS, ABCR, 92%), sodium dodecyl sulfate (SDS, Merck, 85%), sodium dodecyl sulfate (SDS, Fisher Scientific, electrophoretic grade), 11-mercaptoundecanoic acid (Aldrich, 95%), *N*-

(3-(dimethylamino)propyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, Fluka, 98%) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS, Aldrich, 98%), potassium persulfate (Aldrich, 99%), styrene containing 4-*tert*-butylcatechol as stabilizer (Aldrich, 99%) were used as received.

QCM-D sensor chips coated with a gold layer (4.95 ± 0.02 MHz, Q-Sense, Västra Frölunda, Sweden) were used as substrates during the self-assembling experiments. Prior to the experiments the sensor chips were cleaned by 10 min of UV/ozone treatment (Bioforce, Ames, IA) and immersion in a 2 % aqueous SDS solution for 30 min. Subsequently, they were rinsed with ultrapure water ($18.2 \text{ M}\Omega$, 25°C) and dried under nitrogen before storage. Right before usage the sensor chips were treated again for 10 min with UV/ozone.

The reaction vessels utilized in all reaction steps with silica nanoparticles were cleaned before use with hydrofluoric acid (8 vol %) to remove insoluble deposits on the glass surface. After that they were copiously rinsed with water.

All redispersion steps of the nanoparticles were carried out in an ultrasonic bath (Bandelin Sonorex RK512H (215 W, 35 kHz)).

Synthesis of Monodisperse SiO₂ Particles with a Rough Surface (rSiNP).¹

In a 25 mL flask L-arginine (0.05 mmol) was diluted in water (6.9 mL) and a layer of cyclohexane (0.55 mL) was added. The solution was heated to 60°C and TEOS (3 mmol) was dropped quickly to the cyclohexane layer. After stirring for 20 h at 60°C at 300 rpm particles of 20 ± 2 nm diameter were formed. The particles were used as seeds and were grown in five steps to a final diameter of 130 ± 4 nm. In each growth step, the seed dispersion was used without purification and was diluted with water to a final concentration of 5 g/L. 2 mM L-arginine were used in each step. The volumes of TEOS and cyclohexane used in each growth step are given in

Table S1. The particles were separated by centrifugation at 240 g and were redispersed in ethanol. The nanoparticles were purified by two further centrifugation (240 g) and redispersion steps. The particles were stored in ethanol for further applications.

Table S1. Amounts of chemicals used for the seeded growth steps of rough SiO₂ nanoparticles

Growth step	Diameter seed particles [nm]	Volume of dispersion from the step before [mL]	TEOS [mmol]	Cyclohexane [mL]
1	20±2	7	20.3	5.0
2	34±2	30	67.7	17.0
3	45±2	80 ^a	56.9	5.0
4	67±3	67 ^b	44.2	5.0
5	88±4	193 ^c	37.5	5.0

^a Volume contains 54.1 mmol of non-reacted TEOS and 17 mL cyclohexane.

^b Volume contains 74.9 mmol of non-reacted TEOS and 22 mL cyclohexane.

^c Volume contains 96.5 mmol of non-reacted TEOS and 27 mL cyclohexane.

Synthesis of Monodisperse SiO₂ Particles with a Smooth Surface (sSiNP) by a Modified

Synthesis according to Reculosa.²

Seed particles were synthesized according to the method of Hartlen *et al.*¹ described above and further used without cleaning. 1 mL of this dispersion was diluted with 10 mL of ethanol and 2.2 mL of ammonia were added. A solution of 4.5 mmol of TEOS diluted with 4 mL of ethanol was added *via* a peristaltic pump with a pump rate of 1.8 mL/h. The particles were separated by centrifugation at 240 g and were redispersed in ethanol. The nanoparticles were purified by two

further centrifugation (240 g) and redispersion steps. The particles were stored in ethanol for further applications.

Synthesis of Monodisperse SiO₂ Particles with a Smooth Surface (sSiNP2, sSiNP3) by Growing Stöber Shells on Hartlen Seed Particles.^{3,4}

The seed particles were used from the Hartlen synthesis without cleaning. The dispersion was diluted to a concentration of 0.2 g/L with ethanol and ammonia was added to result in a final concentration of 2 mM. TEOS was diluted with ethanol in a ratio of 1:4 and was added to the reaction mixture in 0.5 mL steps every 10 min (see Table S2). For further growth steps the obtained dispersions were also used without cleaning and the particle and ammonia concentrations were adjusted as described above. The amount of TEOS, which was added in each growth step, was calculated so that in each case the volume of the nanoparticles was doubled. The amounts of the chemicals used for the synthesis are given in Table S2 and S3. The particles were separated from the reaction mixture by centrifugation at 240 g and redispersed in ethanol. The nanoparticles were purified by two further centrifugation (240 g) and redispersion steps. The particles were stored in ethanol for further applications.

TEM images of smooth silica particles with 118 ± 3 nm and 162 ± 4 nm diameter are shown in Figure S1.

Table S2. Amounts of chemicals used for the seeded growth steps of smooth SiO₂ nanoparticles with a final diameter of 118±4 nm

Growth step	Diameter seed particle [nm]	Volume of seed dispersion [mL]	Concentration of the seed solution [g/L]	Ethanol [mL]	Ammonia [mL]	TEOS^b [mmol]
1	53±3	10.0	9.52	466.0	22.4	1.5
2	61±3	500	0.39	-	0.1	3.0
3	94±3	240	0.77	250	11.75	3.0

^a Volume of TEOS was diluted 1:4 with ethanol

Table S3. Amounts of chemicals used for the seeded growth steps of smooth SiO₂ nanoparticles with a final diameter of 162±4 nm

Growth step	Diameter seed particle [nm]	Volume of seed dispersion [mL]	Concentration of the seed solution [g/L]	Ethanol [mL]	Ammonia [mL]	TEOS^b [mmol]
1	94±3 ^a	200	0.77	570	27	2.5
2	105±3	799	0.46	-	1.5	5.3

^a Same particles as used in the third growth step in Table S2

^b Volume of ethanol in [ml]

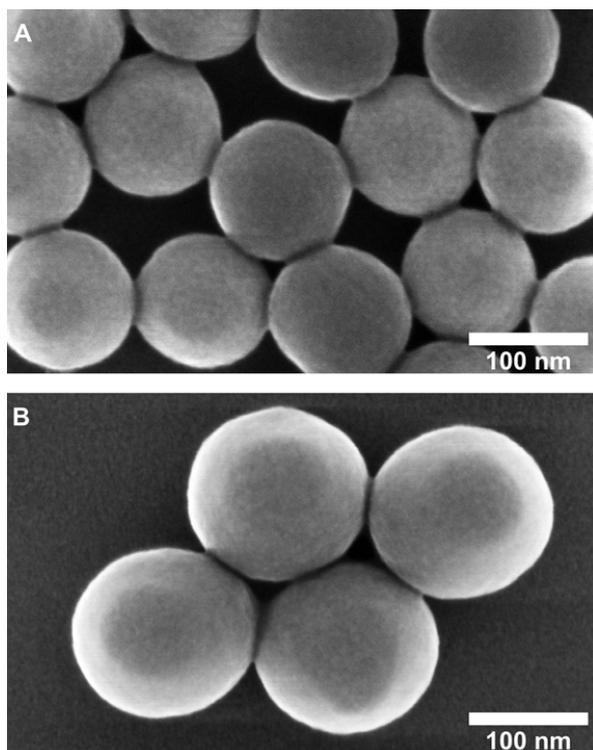


Figure S1: SEM images of the surface morphology of smooth silica nanoparticles of (A) 118 ± 3 nm and (B) 162 ± 4 nm diameter.

Functionalization of SiO₂ Particles with AHAPS.

In an argon atmosphere, a dispersion of silica nanoparticles was diluted with ethanol to a final concentration of 1 g/L, mixed with ammonia and N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilane (AHAPS) (see Table S4) and stirred at 500 rpm for 9 h. The reaction mixture was refluxed for 2 h at 80 °C. The particles were purified by three centrifugation (960 g) and redispersion steps in ethanol. Subsequently, the functionalized particles were stored in ethanol under argon atmosphere at 8 °C.

Table S4. Amounts of chemicals used for the functionalization of SiO₂ nanoparticles

NP	Volume of the Dispersion in EtOH [mL]	Mass Concentration of NP [mg/ml]	Volume of Ammonia [mL]	AHAPS [mmol]
rSiNP	208	0.99	9.1	0.13
sSiNP	240	0.27	10.5	0.08
sSiNP2	173	1.00	7.5	0.12
sSiNP3	240	0.31	10.5	0.08

Transfer of AHAPS Functionalized Silica Nanoparticles to Water

For binding the nanoparticles on an 11-mercaptopundecanoic acid functionalized gold surface a transfer to water is necessary. Therefore, the ethanolic nanoparticle dispersion was diluted with ultrapure water to 0.1 g/l in an argon atmosphere. The percentage of ethanol in the solution was between 0.6% and 2.1%. The particle dispersion was ultrasonicated for 5 – 20 min and directly used.

Synthesis of Polystyrene Nanoparticles⁵

The emulsion polymerization for preparing polystyrene nanoparticles was performed according to the method of Zhang *et al.*⁵ In a 250 mL three neck round bottom flask 8.2 μ mol potassium persulfate and 8.5 μ mol sodium dodecyl sulfate were dissolved in 50 mL ethanol and 20 mL ultrapure water. After the reaction was placed under an argon atmosphere, 8.7 mmol styrene were added and the reaction mixture was heated to 70 °C und stirred for 9 h at this temperature. The polystyrene nanoparticles were purified by three centrifugation (941 g) and redispersion steps in ultrapure water.

2. QCM-D and SEM Measurements on a Non-Functionalized Gold Surface

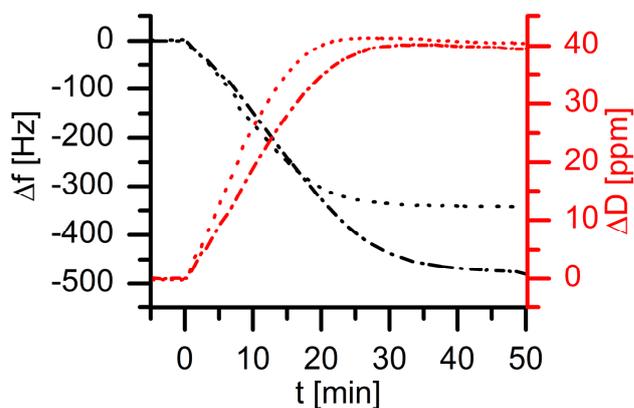


Figure S2: QCM-D measurements of the binding process of amino-functionalized silica nanoparticles with 118 ± 3 nm (dotted curve) and 162 ± 4 nm (dashed-dotted curve) diameter on a gold surface.

Table S5. Summarized data obtained for the QCM-D measurements of smooth amino-functionalized silica colloids on a gold surface

NP	Diameter (SEM) [nm]	R_q [nm]	Diameter (DLS) [nm]	Zeta-potential [mV]	Δf [Hz]	ΔD [ppm]	NN-distance ^a [nm]	ρ_A [particles per μm^2]
sSiNP2	118 ± 3	1.2 ± 0.3	141 ± 2	50 ± 4	-345 ± 5	41 ± 1	268 ± 29	10.2 ± 0.4
sSiNP3	162 ± 4	1.3 ± 0.4	169 ± 3	53 ± 2	-473 ± 5	40 ± 1	340 ± 32	6.2 ± 0.8

^aNearest neighbor distance between the particles.

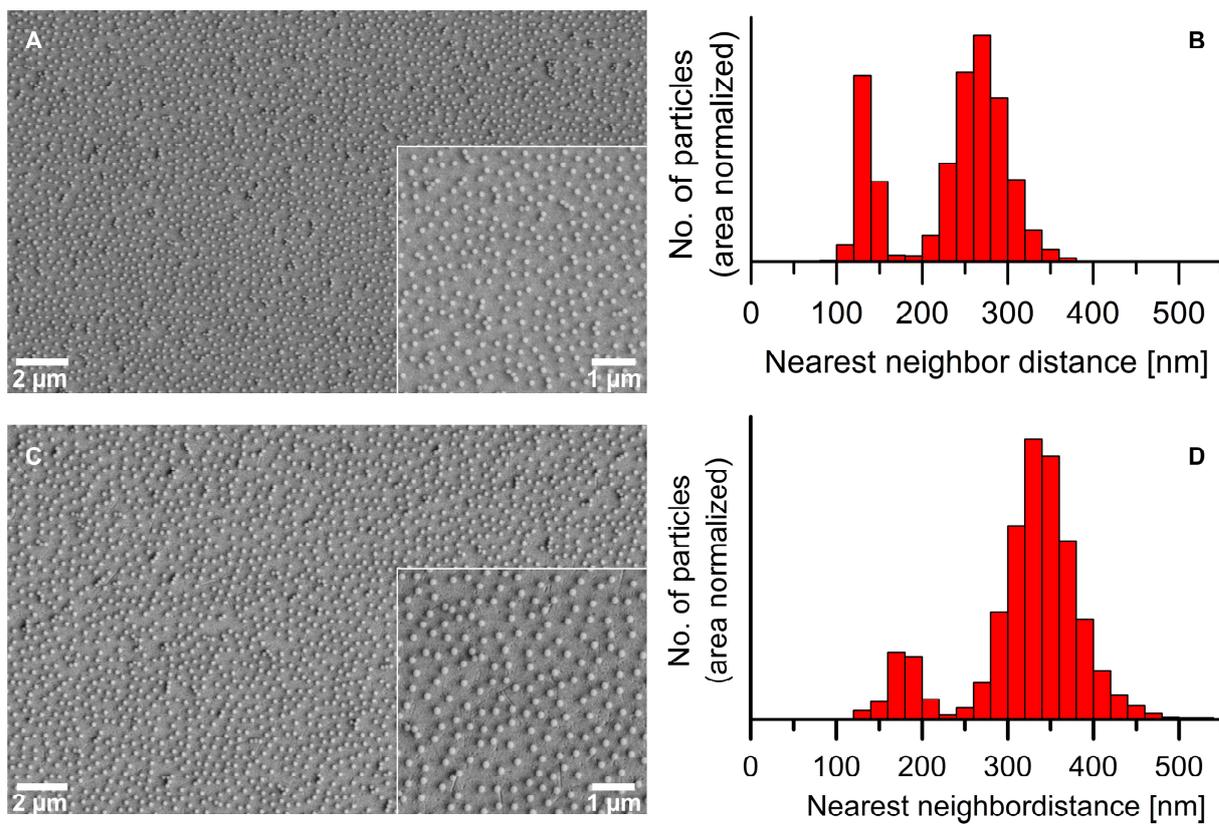


Figure S3: SEM images of the two-dimensional arrangement of (A) 118 ± 3 nm and (C) 162 ± 4 nm diameter amino-functionalized silica nanoparticles on a gold surface typical for 50% of the whole surface. The corresponding histograms show the distribution of nearest neighbor distances of (B) 118 ± 3 nm and (D) 162 ± 4 nm particles.

3. SEM Measurements on an 11-Mercaptoundecanoic Acid Functionalized Gold Surface

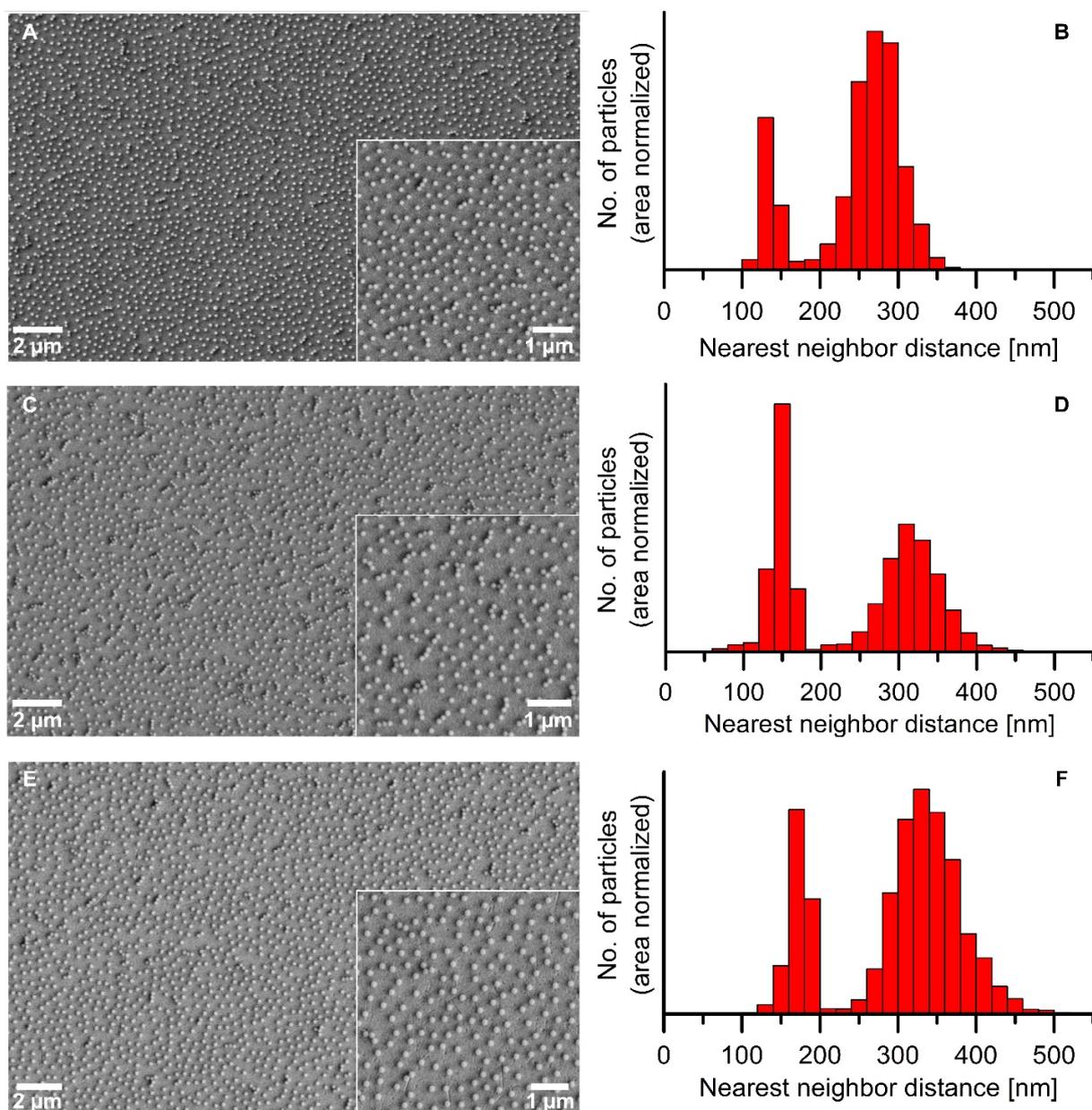


Figure S4: SEM images and corresponding histograms of the two-dimensional arrangement of (A, B) 118 ± 3 nm, (C, D) 136 ± 4 nm, and (E, F) 162 ± 4 nm amino-functionalized silica nanoparticles on an 11-mercaptoundecanoic acid functionalized gold surface.

Table S6. Summarized data obtained for the arrangement of smooth amino-functionalized silica colloids on an 11-mercaptoundecanoic acid functionalized gold surface

NP	Diameter [nm]	Diameter (DLS) [nm]	Zeta-potential [mV]	NN-distance ^a [nm]
rSiNP1	137±4	163±7	41±2	368±38
sSiNP1	136±4	187±5	38±15	317±35
sSiNP2	118±3	165±7	26±3	274±27
sSiNP3	162±4	201±13	24±2	335±40

^aNearest neighbor distance between the particles

4. Geometric Considerations Regarding the Position of Polystyrene Nanospheres between Silica Nanoparticles

In Figure S6A (top view) the limiting case 1 for the position of a polystyrene nanoparticle in the silica array is shown, where the particle is placed on the center connecting axis of two silica nanoparticles. The parameters needed for the calculation of half of the minimal center-to-center distance between two silica nanoparticles d_{PS-Si} where a polystyrene nanoparticle placed in-between them touches the gold surface are shown in Figure S6B (side view). d_{PS-Si} is calculated according to Eq. S1:

$$d_{PS-Si} = \sqrt{(r_{Si} + r_{PS})^2 - (r_{PS} - r_{Si})^2} \quad (S1)$$

In Figure S6C (top view) limiting case 2 is shown, where the polystyrene nanoparticle is located in the center of an equilateral triangle formed by three silica nanoparticles. By using the

d_{PS-Si} the center-to-center distance between the silica nanoparticles is calculated applying the height in an equilateral triangle (see Eq. S2 – S4):

$$h = \frac{1}{2}\sqrt{3} d_{Si-Si} \quad (S2)$$

$$h = \frac{3}{2}d_{PS-Si} \quad (S3)$$

By converting Eq. S2 to d_{Si-Si} and using Eq. S3 for h one obtains Eq. S4:

$$d_{Si-Si} = \frac{3}{\sqrt{3}} d_{PS-Si} \quad (S4)$$

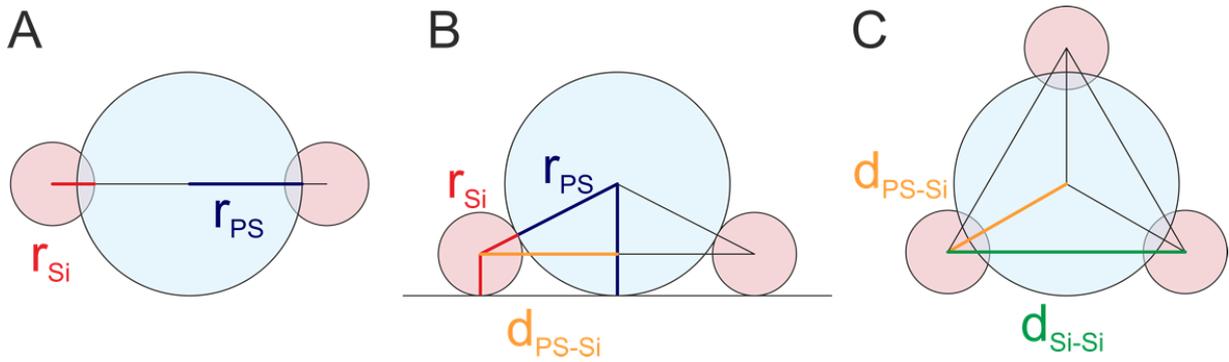


Figure S5: Geometric considerations regarding the packing of polystyrene spheres (blue spheres) on top of an ordered array of ordered silica spheres (red spheres): (A) top view of a polystyrene particle in the middle of the center connecting axis between two silica spheres, (B) side view of the same situation, and (C) top view of a polystyrene particle which is located in the center of an equilateral triangle formed by three silica nanoparticles

REFERENCES

- (1) Hartlen, K. D., Athanasopoulos, Aristidis P. T., Kitaev, V. Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to >200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays. *Langmuir* **2008**, *24*, 1714–1720.
- (2) Reculosa, S., Poncet-Legrand, C., Ravaine, S., Mingotaud, C., Duguet, E., Bourgeat-Lami, E. Syntheses of Raspberry-like Silica/Polystyrene Materials. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2354–2359.
- (3) Bogush, G., Zukoski, C. Uniform Silica Particle Precipitation: An Aggregative Growth Model. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 19–34.
- (4) Philipse, A. P. Quantitative Aspects of the Growth of (Charged) Silica Spheres. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *266*, 1174–1180.
- (5) Zhang, J., Chen, Z., Wang, Z., Zhang, W., Ming, N. Preparation of Monodisperse Polystyrene Spheres in Aqueous Alcohol System. *Mater. Lett.* **2003**, *57*, 4466–4470.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFM	<i>atomic force microscope</i> Rasterkraftmikroskop
AG	Arbeitsgruppe
AHAPS	N-(6-Aminoethyl)aminopropyltrimethoxysilan
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CPMV	<i>Cowpea mosaic virus</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DLVO	Theorie, benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek
Dr.	Doktor
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<i>et al.</i>	lateinisch für ‚und andere‘
FEM	Finite-Elemente-Methode
Gl.	Gleichung
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Kap.	Kapitel
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NN	Nächste-Nachbar
PE	Primärelektronen
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
QCM-D	<i>quartz crystal microbalance with dissipation monitoring</i> Schwingquarzwaage mit Dissipationsaufzeichnung
RE	Rückstreuelektronen
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAM	<i>self assembled monolayer</i> Selbstorganisierte Monolage
SE	Sekundärelektronen
SEM	<i>scanning electron microscope</i> Rasterelektronenmikroskop
SFB	Sonderforschungsbereich
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> Oberflächenplasmonenresonanz
Tab.	Tabelle
TPD	Temperatur-programmierte Desorption
z. B.	zum Beispiel

Literatur

- [1] M. Mammen; S.-K. Choi; G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [2] M. F. Perutz, *Q. Rev. Biophys.* **1989**, *22*, 139.
- [3] J. Darnedde; A. Rausch; M. Weinhart; S. Enders; R. Tauber; K. Licha; M. Schirner; U. Zugel; A. von Bonin; R. Haag, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 19679–19684.
- [4] C. Fasting; C. A. Schalley; M. Weber; O. Seitz; S. Hecht; B. Kokschi; J. Darnedde; C. Graf; E.-W. Knapp; R. Haag, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10622–10650.
- [5] B. Baytekin; S. S. Zhu; B. Brusilowskij; J. Illigen; J. Ranta; J. Huuskonen; L. Russo; K. Rissanen; L. Kaufmann; C. A. Schalley, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 10012–10028.
- [6] K. Matsuura; M. Hibino; Y. Yamada; K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 357–358.
- [7] C. Scheibe; A. Bujotzek; J. Darnedde; M. Weber; O. Seitz, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 770.
- [8] V. Gubala; X. Le Guevel; R. Nooney; D. E. Williams; B. MacCraith, *Talanta* **2010**, *81*, 1833–1839.
- [9] J. Vonnemann; C. Sieben; C. Wolff; K. Ludwig; C. Bottcher; A. Herrmann; R. Haag, *Nanoscale* **2014**, *6*, 2353–2360.
- [10] G. B. Sigal; M. Mammen; G. Dahmann; G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789–3800.
- [11] K. Elsnér; M. M. K. Boysen; T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1715–1725.
- [12] J. Huskens, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 537–543.
- [13] N. Herzer; S. Hoepfener; U. S. Schubert, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5634–5652.
- [14] B.-K. Pong; J.-Y. Lee; B. L. Trout, *Langmuir* **2005**, *21*, 11599–11603.
- [15] J. C. Crocker; D. G. Grier, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *73*, 352–355.
- [16] I. Reviakine; D. Johannsmann; R. P. Richter, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8838–8848.
- [17] A. Janshoff; H.-J. Galla; C. Steinem, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4164–4195.
- [18] P. Bingen; G. Wang; N. F. Steinmetz; M. Rodahl; R. P. Richter, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8880–8890.
- [19] I. Carton; A. R. Brisson; R. P. Richter, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9275–9281.
- [20] D. Johannsmann; I. Reviakine; E. Rojas; M. Gallego, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8891–8899.
- [21] D. Johannsmann; I. Reviakine; R. P. Richter, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8167–8176.
- [22] E. Tellechea; D. Johannsmann; N. F. Steinmetz; R. P. Richter; I. Reviakine, *Langmuir* **2009**, *25*, 5177–5184.

- [23] J. I. Goldstein, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: A text for biologists, materials scientists, and geologists*, Plenum Press, New York [u.a.], 2. Auflage, **1994**.
- [24] T. Serizawa; H. Takeshita; M. Akashi, *Langmuir* **1998**, *14*, 4088–4094.
- [25] K. Vondermassen; J. Bongers; A. Mueller; H. Versmold, *Langmuir* **1994**, *10*, 1351–1353.
- [26] S. A. Nordin; B. Kasemo, in V. Degiorgio, Herausgeber, *Trends in Colloid and Interface Science II*, Band 76 von *Progress in Colloid & Polymer Science*, 51–53, Steinkopff, Darmstadt, **1988**.
- [27] I. Reviakine; M. Gallego; D. Johannsmann; E. Tellechea, *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 84702.
- [28] P. Malet, in J. L. G. Fierro, Herausgeber, *Spectroscopic characterization of heterogeneous catalysts*, Band 57 von *Studies in Surface Science and Catalysis*, B333–B382, Elsevier, Amsterdam and New York, **1990**.
- [29] A. Mulder; J. Huskens; D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3409.
- [30] R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013.
- [31] G. Ercolani; C. Piguet; M. Borkovec; J. Hamacek, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 12195–12203.
- [32] C. A. Hunter; H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488–7499.
- [33] G. Ercolani; L. Schiaffino, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1800–1807.
- [34] H. M. Saavedra; T. J. Mullen; P. Zhang; D. C. Dewey; S. A. Claridge; P. S. Weiss, *Rep. Prog. Phys.* **2010**, *73*, 036501.
- [35] N. Vogel; M. Retsch; C.-A. Fustin; A. Del Campo; U. Jonas, *Chem. Rev.* **2015**.
- [36] F. P. Schmidtchen, in C. A. Schalley, Herausgeber, *Analytical methods in supramolecular chemistry*, 55–78, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [37] P. W. Atkins; A. Höpfner; A. Schleitzer, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 3. Auflage, **2001**.
- [38] P. Casey, in R. H. J. Hannink; A. J. Hill, Herausgeber, *Nanostructure Control of Materials*, Woodhead publishing in materials, 1–31, Woodhead, Cambridge, **2006**.
- [39] G. Schmid, *Nanoparticles: From Theory to Application*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [40] R. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, *26*, 846–878.
- [41] M. Auffan; J. Rose; J.-Y. Bottero; G. V. Lowry; J.-P. Jolivet; M. R. Wiesner, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 634–641.
- [42] A. López-Serrano; R. M. Olivas; J. S. Landaluze; C. Cámara, *Anal. Methods* **2014**, *6*, 38–56.

- [43] V. K. Sharma; J. Filip; R. Zboril; R. S. Varma, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8410–8423.
- [44] G. Sauerbrey, *Z. Physik* **1959**, *155*, 206–222.
- [45] C. Steinem; A. Janshoff, Herausgeber, *Piezoelectric Sensors*, Band 5, Springer Berlin Heidelberg, **2007**.
- [46] M. Rodahl; F. Höök; A. Krozer; P. Brzezinski; B. Kasemo, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 3924–3930.
- [47] K. K. Kanazawa; J. G. Gordon, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1770–1771.
- [48] W. Mason, *J. Colloid Sci.* **1948**, *3*, 147–162.
- [49] D. Johannsmann, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 501–516.
- [50] I. Reviakine, *J. Appl. Phys.* **2004**, *95*, 7712.
- [51] R. P. Richter; A. R. Brisson, *Langmuir* **2004**, *20*, 4609–4613.
- [52] M. Edvardsson; M. Rodahl; B. Kasemo; F. Höök, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4918–4926.
- [53] E. R. Hirst; Y. J. Yuan; W. L. Xu; J. E. Bronlund, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1759–1768.
- [54] M. A. Cooper; V. T. Singleton, *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 154–184.
- [55] F. Höök; B. Kasemo; T. Nylander; C. Fant; K. Sott; H. Elwing, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5796–5804.
- [56] T. Serizawa; S. Kamimura; M. Akashi, *Colloids Surf., A* **2000**, *164*, 237–245.
- [57] A. L. J. Olsson; I. R. Quevedo; D. He; M. Basnet; N. Tufenkji, *ACS Nano* **2013**, *7*, 7833–7843.
- [58] Y. Orai; T. Sunaoshi; S. Okada; T. Ogashiwa; H. Ito; M. Konno, *J. Phys.: Conf. Ser.* **2014**, *522*, 012020.
- [59] J. I. Goldstein; D. E. Newbury; A. D. Romig; C. Fiori; E. Lifshin, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer US, Boston, **1992**.
- [60] O. C. Wells, *Scanning electron microscopy*, McGraw-Hill, New York, **1974**.
- [61] M. Henzler; W. Göpel, *Oberflächenphysik des Festkörpers*, Teubner Studienbücher, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **1994**.
- [62] L. Reimer, *Scanning electron microscopy: Physics of image formation and microanalysis*, Band 45 von *Springer series in optical sciences*, Springer, Berlin and New York, 2. Auflage, **1998**.
- [63] G. L. W. Perry; B. P. Miller; N. J. Enright, *Plant Ecol.* **2006**, *187*, 59–82.
- [64] A. J. Baddeley; E. Rubak; R. Turner, *Spatial point patterns: Methodology and applications with R*, Chapman and Hall/CRC interdisciplinary statistics series, CRC Press, Boca Raton, **2015**.

- [65] P. Hanarp; D. S. Sutherland; J. Gold; B. Kasemo, *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *241*, 26–31.
- [66] Z. Adamczyk, *Particles at interfaces: Interactions, deposition, structure*, Band 9 von *Interface Science and Technology*, Elsevier, Amsterdam, 1. Auflage, **2006**.
- [67] P. Hanarp; D. Sutherland; J. Gold; B. Kasemo, *Nanostruct. Mater.* **1999**, *12*, 429–432.
- [68] P. Hanarp; M. Käll; D. S. Sutherland, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 5768–5772.
- [69] J. J. Gray; R. T. Bonnecaze, *Langmuir* **2001**, *17*, 7935–7947.
- [70] Z. Adamczyk; M. Zembala; B. Siwek; P. Warszyński, *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *140*, 123–137.
- [71] A. O. Lundgren; F. Björefors; L. G. M. Olofsson; H. Elwing, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3989–3992.
- [72] J. Talbot; G. Tarjus; P. R. van Tassel; P. Viot, *Colloids Surf., A* **2000**, *165*, 287–324.
- [73] E. L. Hinrichsen; J. Feder; T. Jøssang, *J. Stat. Phys.* **1986**, *44*, 793–827.
- [74] N. Fry, *Tectonophysics* **1979**, *60*, 89–105.
- [75] M. T. van Loenhout; E. Stefan Kooij; H. Wormeester; B. Poelsema, *Colloids Surf., A* **2009**, *342*, 46–52.
- [76] W. E. Martin; K. D. Bridgmon, *Quantitative and statistical research methods: From hypothesis to results*, Band 42 von *Research methods for the social sciences*, Jossey-Bass, San Francisco, 1. Auflage, **2012**.
- [77] H. Walser, *Statistik für Naturwissenschaftler*, Band 3541, UTB, Stuttgart, 1. Auflage, **2011**.
- [78] R. S. Nickerson, *Psychol. Methods* **2000**, *5*, 241–301.
- [79] T. L. Hill, *An Introduction to Statistical Thermodynamics*, Addison-Wesley series in chemistry, Addison-Wesley Publ. Comp, Reading, Mass., 2. Auflage, **1962**.
- [80] T. T. Tsong, *Phys. Rev. Lett.* **1973**, *31*, 1207–1210.
- [81] M. Quesada-Pérez; J. Callejas-Fernández; R. Hidalgo-Álvarez, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, *95*, 295–315.
- [82] F. Fogolari; A. Brigo; H. Molinari, *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 377–392.
- [83] A. D. Law; D. M. A. Buzza, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 094704.
- [84] T. Fließbach, *Elektrodynamik: Lehrbuch zur Theoretischen Physik II*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 6. Auflage, **2012**.
- [85] W. A. Harrison, *Solid state theory*, Dover Publications, New York, **1979**.

- [86] G. M. Bell; S. Levine; L. N. McCartney, *J. Colloid Interface Sci.* **1970**, *33*, 335–359.
- [87] F. Fogolari; P. Zuccato; G. Esposito; P. Viglino, *Biophys. J.* **1999**, *76*, 1–16.
- [88] R. Hogg; T. W. Healy; D. W. Fuerstenau, *Trans. Faraday Soc.* **1966**, *62*, 1638.
- [89] B. Derjaguin, *Acta Phys. Chim., U.R.S.S.* **1939**, *10*, 333–346.
- [90] C. Grunewald; M. Schmudde; C. N. Noufele; C. Graf; T. Risse, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 10642–10649.
- [91] D. Johannsmann; G. Brenner, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7476–7484.
- [92] B. Bhattacharjee, *Phys. Rev. E* **2003**, *67*, 041208.
- [93] S. S. Shapiro; M. B. Wilk, *Biometrika* **1965**, *52*, 591.
- [94] N. M. Razali; Y. B. Wah, *J. Stat. Modeling Anal.* **2011**, *2*, 21–33.
- [95] M. Brunner; C. Bechinger; W. Strepp; V. Lobaskin; H. H. v. Grünberg, *Europhys. Lett.* **2002**, *58*, 926–965.
- [96] P. A. Kralchevsky; K. Nagayama, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2000**, *85*, 145–192.
- [97] A. Thill; O. Spalla, *Colloids Surf., A* **2003**, *217*, 143–151.
- [98] J. Qian; S. P. Bhawalkar; Y. Xu; L. Jia, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 3111–3118.
- [99] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC, Boca Raton, 83. Auflage, **2002**.
- [100] W. Stöber; A. Fink; E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62–69.
- [101] K. D. Hartlen; A. P. T. Athanasopoulos; V. Kitaev, *Langmuir* **2008**, *24*, 1714–1720.
- [102] M. Schmudde; C. Grunewald; C. Goroncy; C. N. Noufele; B. Stein; T. Risse; C. Graf, *ACS Nano* **2016**, *10*, 3525–3535.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Thomas Risse danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und für die Unterstützung und umfangreiche Betreuung mit vielen wissenschaftlichen Diskussionen. Auch Frau Professor Dr. Christina Graf danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Übernahme des Zweitgutachtens. Mich mit beiden über die Forschungsprojekte, die Methoden, Ziele und Ergebnisse austauschen zu können, war von unschätzbarem Wert.

Besonders herzlich möchte ich mich für die erfolgreiche Kooperation in unterschiedlichen Projekten und die damit verbundenen wissenschaftlichen Diskussionen in einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein Dank gilt vor allem den Beteiligten am Nanopartikel-Projekt aus der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Christina Graf. Madlen Schmudde danke ich für Synthese und Charakterisierung der Nanopartikel, die Aufnahme der REM-Bilder und die Synthese der Goldhalbschalen, Christian Goroncy für die Aufnahme der TEM-Bilder und die Bestimmung der Rauheit, Benjamin Stein und Jasmin Grabowski für die Titan- und Goldhalbschalen.

Bei Katharina Achazi und Christian Kühne aus der AG Dervedde bedanke ich mich für die Unterstützung bei Messungen mit dem SPR.

Weiterer Dank gilt im Rahmen der Kooperation im Viren-Projekt Sumati Bhatia für die Synthese eines Liganden, Luis Cuellar für die Zusammenarbeit bei QCM-D und SPR-Messungen und Daniel Lauster für das Bereitstellen der Viren.

Tobias Becherer danke ich für die gemeinsamen Messungen an dPG und aBeta mit der QCM-D und dem SPR, Andrea Schulz und Anke Schindler für die Aufnahme von REM und AFM-Bildern und Igor Derr aus der AG Roth für die Unterstützung beim elektrochemischen Wachsen von Halbschalen.

Bei Frau J.Prof. Dr. Bettina Keller, Axel Schild und Susanne Liese möchte ich mich für die Unterstützung bei der Beantwortung theoretischer Fragen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch den Arbeitsgruppenmitgliedern der AG Risse, insbesondere Karin Schubert, Rudolf Cames, Nina Richter, Philipp Consentius, Aaron Hahn, Hendrik Ronneburg, Raphael Moreira, Dr. Peter Clawin, Dr. Wiebke Riedel und Dr. Eric Meyer, die mich durch eine überaus nette Arbeitsatmosphäre in dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei dem Sonderforschungsbereich 765 möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung, das wissenschaftliche Programm und die Möglichkeit zu zahlreichen Fortbildungen bedanken. Für die großartige Unterstützung in beruflicher und privater Hinsicht möchte ich mich ganz herzlich bei Helia Grunewald, dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, und bei meiner Familie bedanken.

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Christian Grunewald, 14. März 2017