

Chemische Sensorik mit neuen Beschichtungen für die Flüssigphase

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

MICHAEL KASPAR

Tag der mündlichen Prüfung:

22. November 2000

Dekan:

Professor Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Oberhammer

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| KAPITEL 1: EINLEITUNG UND MOTIVATION..... | 1 |
| 1.1. KLASSISCHE ANALYTIK - MODERNE SENSORIK..... | 1 |
| 1.2. CHEMISCHE SENSOREN | 3 |
| KAPITEL 2: THEORETISCHER TEIL..... | 5 |
| 2.1. MASSENSENSITIVE TRANSDUCER..... | 5 |
| 2.2. DICKENSCHWINGER (BAW-TSM)..... | 9 |
| 2.3. QCM ALS MASSENSENSITIVER SENSOR IN FLÜSSIGER PHASE | 10 |
| 2.4. DIE THEORETISCHEN MODELLE IM ÜBERBLICK..... | 14 |
| 2.5. POLYMERE (UNSPECIFISCH) | 19 |
| 2.5.1. Polyketone..... | 19 |
| 2.5.2. Sol-Gel Schichten..... | 21 |
| 2.6. CYCLOHEXAPEPTIDE (QUASISPEZIFISCH)..... | 24 |
| 2.7. ANTIGEN - ANTIKÖRPER – IMMUNOLOGIE (SPEZIFISCH) | 26 |
| 2.8. MUSTERERKENNUNG UND MULTIKOMPONENTENANALYSE | 28 |
| KAPITEL 3: LITERATURÜBERSICHT ÜBER ARBEITEN ANDERER AUTOREN..... | 33 |
| 3.1. BIOSENSORIK MIT SCHWINGQUARZEN..... | 33 |
| 3.2. CHEMOSENSORIK MIT SCHWINGQUARZEN IN FLÜSSIGER PHASE..... | 35 |
| KAPITEL 4: EXPERIMENTELLER TEIL..... | 37 |
| 4.1. MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN | 37 |
| 4.2. METHODEN UND EINFLÜSSE | 40 |
| 4.2.1. Quarz..... | 40 |
| 4.2.2. Quarzhalter..... | 41 |
| 4.2.3. Sensorkontaktierung..... | 44 |
| 4.2.4. Meßanlage | 45 |
| 4.2.5. Meßprogramm..... | 48 |
| 4.2.6. Sensorherstellung | 48 |
| 4.2.7. Datenauswertung..... | 62 |
| KAPITEL 5: ERGEBNISSE UND DISKUSSION..... | 63 |
| 5.1. POLYKETONE..... | 63 |
| 5.1.1. Schichtdicke..... | 63 |
| 5.1.2. Stabilität der Polymerschichten..... | 66 |
| 5.1.3. Mustererkennung und Multikomponentenanalyse..... | 68 |

| | |
|---|------------|
| 5.2. SOL-GEL-POLYMERE..... | 74 |
| 5.3. CYCLOPEPTIDE..... | 80 |
| 5.3.1. <i>Cyclopeptide in gepufferten wässriger Phase</i> | 80 |
| 5.3.2. <i>Einfluß der untersuchten Puffer</i> | 81 |
| 5.3.3. <i>Einfluß von Variationen in der Analytstruktur</i> | 86 |
| 5.3.4. <i>Abhängigkeit von der Analytkonzentration</i> | 88 |
| 5.3.5. <i>Einfluß der Goldoberfläche</i> | 90 |
| 5.3.6. <i>Cyclopeptide in ungepufferten Lösung</i> | 91 |
| 5.4. BLUTGRUPPENBESTIMMUNG..... | 98 |
| KAPITEL 6: ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 101 |
| 6.1. SENSORSYSTEM | 101 |
| 6.2. SCHWINGQUARZE MIT POLYKETONBESCHICHTUNG..... | 101 |
| 6.3. SCHWINGQUARZE MIT POLYSILOXANBESCHICHTUNG..... | 102 |
| 6.4. SCHWINGQUARZE MIT CYCLOPEPTIDBESCHICHTUNG | 103 |
| 6.5. SCHWINGQUARZE MIT ANTIKÖRPERBESCHICHTUNG..... | 103 |
| 6.6. AUSBLICK | 104 |
| KAPITEL 7: LITERATURVERZEICHNIS..... | 107 |
| KAPITEL 8: ANHANG..... | 115 |
| 8.1. TECHNISCHER ANHANG..... | 115 |
| 8.1.1. <i>Technische Zeichnung des Sensorchips</i> | 115 |
| 8.1.2. <i>Oszillatorschaltung</i> | 116 |
| 8.2. PUBLIKATIONEN | 117 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| AFM | <u>A</u> tom <u>F</u> orce <u>M</u> icroscopy (Atom-Kraft-Mikroskopie) |
| AT-Schnitt | bezeichnet eine bestimmte Schnittrichtung im Quarzeinkristall (0° zur elektrischen und 35°15' zur optischen Achse) |
| BAW | <u>B</u> ulk <u>A</u> coustic <u>W</u> ave (akustische Volumenwelle) |
| BSA | <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin (Rinderserum-Albumin) |
| CO | <u>C</u> arbon <u>M</u> onoxide (Kohlenmonoxid) |
| DC/AC | <u>D</u> irect <u>C</u> urrent (Gleichstrom) / <u>A</u> lternating <u>C</u> urrent (Wechselstrom) |
| DCM | <u>D</u> ichlormethan |
| DiesterCO | 2-Carboxyethylheptensäureethylester-CO-Copolymer |
| GC | <u>G</u> aschromatographie |
| HEPES | N-[2- <u>H</u> ydroxyethyl]piperazin-N'-(2-ethylsulfonsäure) |
| HCO | <u>H</u> exen- <u>C</u> O-Copolymer |
| HolCO | <u>H</u> exenol- <u>C</u> O-Copolymer |
| HPLC | <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography (Hochdruck-Flüssigchromatographie) |
| HP-VEE | <u>H</u> ewlett- <u>P</u> ackard- <u>V</u> isual <u>E</u> ngineering <u>E</u> nvironment |
| IgG | <u>I</u> mmunoglobulin Fraktion <u>G</u> |
| IR | <u>I</u> nfrarot |
| LC | Flüssig- (<u>L</u> iquid) <u>C</u> hromatographie |
| MLR | <u>M</u> ultivariate <u>L</u> ineare <u>R</u> egression |
| NMR | <u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonanz (Kernresonanz) |
| PCA | <u>P</u> rincipal <u>C</u> omponent <u>A</u> nalysis (Hauptkomponenten-Analyse) |
| PCO | <u>P</u> ropen- <u>C</u> O-Copolymer |
| PCR | <u>P</u> rincipal <u>C</u> omponent <u>R</u> egression (Hauptkomponenten-Regression) |
| PBS | <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung) |
| PLS | <u>P</u> artial <u>L</u> east <u>S</u> quare Regression |
| PsCO | <u>P</u> entensäure- <u>C</u> O-Copolymer |
| PyCO | 4-(1-Pyrenyl)buten-CO-Copolymer |
| QCM | <u>Q</u> uartz <u>C</u> rystal <u>M</u> icrobalance (Quarzmikrowaage) |
| REM | <u>R</u> asterelektronenmikroskopie |
| SAM | <u>S</u> elbstanordnende <u>M</u> onolagen |
| SG1/SG2 | <u>S</u> ol- <u>G</u> el-Polymer <u>1</u> (Monomer: Bis(trimethoxysilyl)hexan) und <u>S</u> ol- <u>G</u> el-Polymer <u>2</u> (Monomer: Phenyltrimethoxysilan) |

| | |
|--------|---|
| SH | <u>S</u> hear <u>H</u> orizontal (horizontal schierend) |
| STM | <u>S</u> canning <u>T</u> unneling <u>M</u> icroscopy (Rastertunnel-Mikroskopie) |
| SV | <u>S</u> hear <u>V</u> ertical (vertikal schierend) |
| TBTU | 2-(1H- <u>B</u> enzotriazol-1-yl)-1,1,3,3, <u>T</u> etramethyluroniumtetrafluorborat |
| TCO | <u>T</u> etradecen- <u>C</u> O-Copolymer |
| THF | <u>T</u> etrahydrofuran |
| TRIS | <u>T</u> ris[hydroxymethyl]aminomethan |
| TSM | <u>T</u> ransverse <u>S</u> hear <u>M</u> ode (transversaler Schermodus) |
| UHV | <u>U</u> ltrahochvakuum |
| UoICO | <u>U</u> ndecenol- <u>C</u> O-Copolymer |
| UsCO | <u>U</u> ndecensäure- <u>C</u> O-Copolymer |
| UV/VIS | <u>U</u> ltraviolett, <u>V</u> isible (sichtbares Licht) |
| XPS | <u>X</u> - <u>R</u> ay <u>P</u> hotoelectron <u>S</u> pektroskopie (Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie) |

| | |
|--------------------------|--|
| <i>A</i> | Elektrodenfläche |
| c_{66} | elastische Quarzkonstante |
| c_Q | Wellenausbreitungsgeschwindigkeit |
| d | Dicke des Quarzes |
| Df | Frequenzänderung |
| f_0 | Frequenz der Grundschiwingung |
| $f_{p,s}$ | Parallel- bzw. Serienresonanzfrequenz |
| Dm | Massenänderung |
| μ_Q | Schermodulus des Quarzes |
| N | N -te Oberschiwingung |
| Q | Quality-factor |
| r, h | Dichte bzw. Viskosität (Indizes: Q: Quarz, L: Flüssigkeit, S: Schicht) |

Kapitel 1: Einleitung und Motivation

1.1. Klassische Analytik - moderne Sensorik

In den letzten Jahrzehnten hat sich die sensorgestützte Analytik und -meßtechnik zu einem zukunftssträchtigen Zweig der allgemeinen Analytik entwickelt. Vor allem in der Bioanalytik und im pharmazeutischen Wirkstoffscreening werden immer größere Anstrengungen unternommen, um neue Techniken zu entwickeln. Wirkstoffe werden beispielsweise nicht mehr anhand von Tierversuchen getestet, sondern mit einzelnen Zellsensoren.

Sollen schnelle Messungen vor Ort bei widrigen Umgebungsbedingungen durchgeführt werden, können große statische Analytikmethoden meist nicht eingesetzt werden. Für diese Methoden sind auch häufig zeitaufwendige Schritte wie Probennahme oder Probenvorbereitung (Trennung, Reinigung, Anreicherung) notwendig. Die Probe muß zur Analytik gebracht werden.

Immer häufiger werden daher speziell angepaßte Analysengeräte entwickelt, die ohne großen technischen und apparativen Aufwand direkt für Vor-Ort-Messungen eingesetzt werden können. Hier kommt die Analytik zur Probe.

Da die Messung relevanter Parameter allein in den meisten Fällen nicht ausreicht, sind Analytik und Meßtechnik auf diesem Sektor in der Regel eng miteinander verknüpft. Ohne spezielle Analytik ist eine Erfassung und Umsetzung einer zu messenden Größe meist genauso wenig effektiv wie eine hervorragende Analytik ohne die Möglichkeit, diese Größe auch empfindlich zu detektieren.

Die verschiedenen Medien, in denen Parameter mit Hilfe der sensorischen Analytik und Meßtechnik erfaßt werden, lassen sich wie folgt gliedern:

- Wasser
- Boden/Feststoffe
- Luft
- Nahrungs- und Genußmittel
- Organismen

Die Anzahl an Parametern, die in der Analytik bestimmt werden können wächst laufend.

Solche Parameter sind beispielsweise anorganische und organische Schadstoffe, Insektizide oder mikrobiologische Parameter. Aber auch physikalische Größen wie Temperatur, Schall,

Licht, Feuchtigkeit, Druck, elektromagnetische Felder oder Radioaktivität werden zur Analyse genutzt. Zur Bestimmung dieser Parameter lassen sich eine Vielzahl von instrumentellen Methoden und Verfahren einsetzen. Sie gliedern sich in:

- chromatographische Verfahren (GC, LC, HPLC)
- elektrische Verfahren (Polarographie, Amperometrie, Voltammetrie)
- spektroskopische Verfahren (IR, UV/VIS, NMR, MS)
- Sensoren (physikalisch, chemisch, biologisch)

Aus diesen Verfahren wird für spezielle Analytikaufgaben die effektivste Methode ausgewählt und angewandt. Dabei spielen vor allem zeitliche und wirtschaftliche Faktoren eine große Rolle. Ein Meßverfahren muß in vielen Anwendungsgebieten schnell Informationen liefern. So können zeitkritische Prozesse wie z.B. Produktionsschritte effektiv überwacht werden; auf sich ändernde Bedingungen kann somit schnell reagiert werden.

Manche Meßmethoden sind für einfache Überwachungsaufgaben in rauen Umgebungen zu empfindlich oder störanfällig. Erhöhte Anforderungen bezüglich des Einsatzgebietes sind ein Grund für die Entwicklung von kostengünstigen physikalischen, chemischen oder biologischen Sensoren. Diese können in miniaturisierter Form als Massenprodukt und oft auch als Einwegsensor hergestellt werden. Der Einsatz in automatischen Meßsystemen reduziert den Zeitaufwand und dadurch die Kosten einer Analyse. Kombinationen mehrerer Sensorprinzipien können in Online-Messungen kontinuierlich Prozeßabläufe auf Unregelmäßigkeiten prüfen und bei geeigneter Steuerung im Bedarfsfall selbstständig Änderungen im Prozeß vornehmen.

Solche Sensoren sind in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich weiterentwickelt worden und werden insbesondere in der Gasphase bei einer Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten verwendet, so zum Beispiel zur Kontrolle der Abgase in Kraftwerken oder als Alarmsensoren für die Überschreitung von Kohlenmonoxid in geschlossenen Räumen. In einem neueren Anwendungsgebiet werden chemische Sensoren zur Erkennung von Gerüchen eingesetzt. Auf diesem weiten Gebiet können sie die Alterung von Lebensmitteln erkennen oder auch in der Medizindiagnostik Anzeichen von Krankheiten „erschnüffeln“ (Elektronische Nase).

Ein klassisches Beispiel ist auch die Lambdasonde, die im heißen Autoabgas kontinuierlich den Sauerstoffgehalt des Abgases bestimmt und damit den Verbrennungsprozesses steuert.

Die Optimierung dieser Sensoren beinhaltet eine Vielzahl von Parametern, die im folgenden Kapitel kurz beschrieben werden.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Sensorsystem, das mit unterschiedlichen Schichten versehen werden kann, ist die Basis für solche Spezialisierungen und Optimierungen. Je nach Einsatzgebiet werden an die Beschichtungen besonders hohe Anforderungen gestellt. Sie müssen stabil gegen Temperatureinflüsse, Alterung oder Chemikalien sein, sollen einfach herzustellen sein und gleichzeitig größtmögliche Sensitivität und Selektivität aufweisen. Ebenso muß das gesamte System einfach zu bedienen und zu warten sein und darf nur wenig Platz benötigen.

Im Rahmen dieser Dissertation werden Wege zur Herstellung, Präparation und Verwendung von neuen sensitiven Beschichtungen für Sensoren in flüssiger Phase vorgestellt. Die Implementierung zerbrechlicher Sensoren in mechanisch robuste Sensorchips sowie der Weg für ein kommerzielles Meßsystem werden hier aufgezeigt.

1.2. Chemische Sensoren

Chemische Sensoren sind (kleine) Meßwertaufnehmer, die Konzentrationen chemischer Komponenten in Flüssigkeiten oder Gasen kontinuierlich erfassen. Sie bestehen aus einem stofferkennenden Teil und einem Transducer, einem Meßwertumformer, der die Information im zu analysierenden Medium in ein Signal umwandelt, das mit der gängigen Technik der Elektronik oder Optik weiter verarbeitet werden kann [1].

Die Analytik komplexer Systeme mit Hilfe von mehreren solchen Sensoren ist den Grundsätzen der menschlichen Sinneswahrnehmung nachempfunden. In Abbildung 1 ist schematisch die Abfolge einer solchen Erkennung aufgezeigt. Bei der Entwicklung von Sensorsystemen muß jeder dieser einzelnen Schritte optimal in das Gesamtsystem eingepaßt werden.

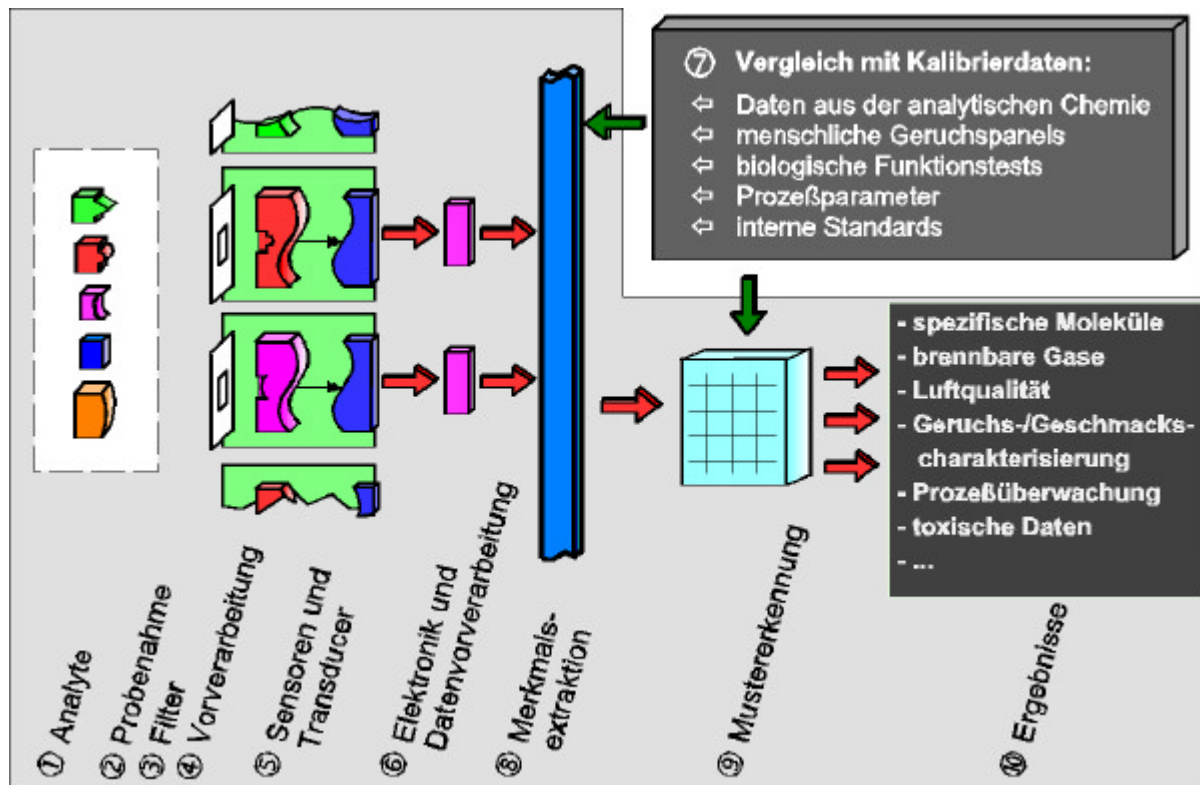


Abbildung 1: Chemisches Sensorsystem zur Erkennung von Stoffen in der Gas und Flüssigphase. Die Einteilung in zehn Teilprozesse entspricht dem Geruchsprozeß der menschlichen Nase [2].

Die Funktionsweise eines chemischen Sensorsystems beinhaltet die in Gas-, Flüssig- oder Festphase vorliegenden Analyten (①), die einer Probenahme (②) unterzogen werden. Durch entsprechende Filter werden Verunreinigungen abgetrennt (③), die die weitere Analyse stören können. Eine Vorverarbeitung (④) beinhaltet Verdünnungsschritte, Aufkonzentrationen, chemische Umsetzungen (z.B. Markierungen, Derivatisierungen) oder Trocknungen. Die eigentliche Erkennung und Signalerzeugung erfolgt mit Hilfe des Sensors (⑤), der mit einer den Anforderungen entsprechenden sensitiven Schicht versehen ist. Mit Hilfe des Transducers können beispielsweise Änderungen von Leitfähigkeiten, Massen, Schichtdicken oder einer Wärmetönung innerhalb der Schicht erfaßt werden. Diese Änderungen werden über eine Elektronik (⑥) erfaßt. Die dadurch gewonnenen Daten werden mit Hilfe spezieller computergestützter Programme verarbeitet. Diese Verarbeitung beinhaltet eine Merkmalsextraktion (⑧), gefolgt von einer Mustererkennung (⑨), bei der nach spezifischen Datenmustern gesucht wird. Der Vergleich der so erhaltenen Werte mit Kalibrierdaten (⑦) führt letztendlich zum Ergebnis (⑩).

Kapitel 2: Theoretischer Teil

2.1. Massensensitive Transducer

Sensoren, die aufgrund der Änderung von physikalischen Parametern die auf der Oberfläche abgeschiedene Masse erkennen können, heißen massensensitive Transducer. Ein verbreitetes System zur sogenannten Mikrowägung ist der Schwingquarz, der seit etwa 40 Jahren zur Bestimmung von abzuscheidenden Stoffen aus der Gasphase und seit etwa 15 Jahren zu diesem Zweck auch in der Flüssigphase eingesetzt wird.

Solche massensensitiven Sensoren bestehen aus einem piezoelektrischen Material, das sich bei elektrischer Stimulation zur Ausbildung stehender akustischer Wellen anregen läßt. Dieser piezoelektrische Effekt (griech.: $\pi\tau\zeta\epsilon\iota\nu$ = drücken) wurde 1880 von Pierre und Jacques Curie entdeckt [3]. Er beruht darauf, daß es bei Ausübung einer Kraft F auf ein piezoelektrisches Material zu einer Ladungsverschiebung und damit zur Ausbildung einer Polarisation kommt (Abbildung 2). Es entsteht ein Dipolmoment in Richtung der polaren Achse (x-Achse), welches proportional der durch die Kraft F erzeugten Deformation (entlang der y-Achse) ist. Der umgekehrte piezoelektrische Effekt tritt auf, wenn eine Spannung über zwei Elektroden (entlang der x-Achse) an dieses Material angelegt wird. Der Kristall deformiert sich in Richtung der y-Achse. Dieser umgekehrte piezoelektrische Effekt wird zur Anregung einer Materiewelle im Quarzkristall ausgenutzt.

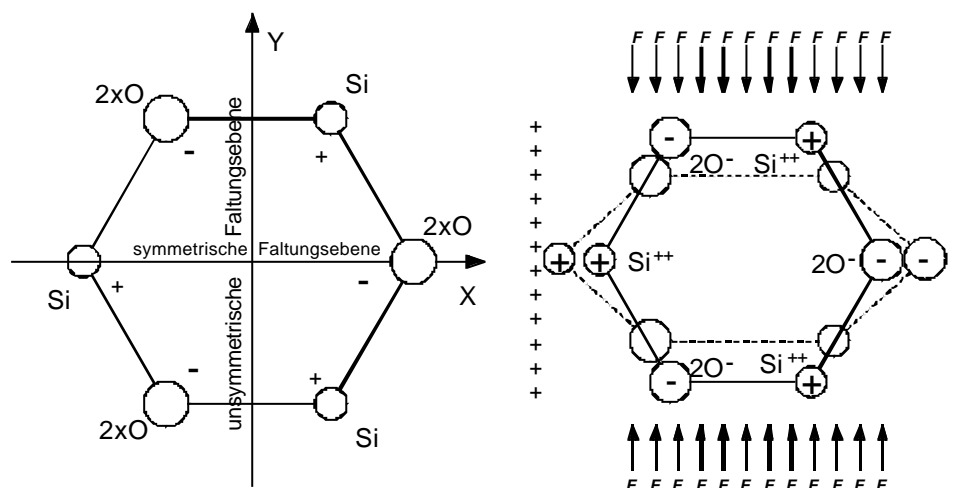


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Quarzeinkristalls und Zustandekommen des direkten piezoelektrischen Effektes durch Einwirkung einer Kraft F .

Um diesen Effekt zur Herstellung für piezoelektrische Sensoren zu verwenden, werden auf der Oberfläche dieser Materialien - im allgemeinen Kristalle mit polaren Achsen wie Quarz,

Lithiumniobate oder Lithiumtantalate - Metallelektroden aufgebracht, die meist aus dünnen Goldfilmen oder in einfacheren und billigeren Varianten aus Aluminium- oder auch Titanschichten bestehen. Achsen im Kristall nennt man polar, wenn bei einer Drehung um diese Achsen die Strukturzelle nicht deckungsgleich ist (siehe Abbildung 2: y-Achse).

Werden piezoelektrische Materialien als Sensoren verwendet, so lassen sie sich anhand der Charakteristika der jeweils erzeugten akustischen Wellen unterscheiden [4]:

- Teilchenauslenkung relativ zur Wellenausbreitungsrichtung (longitudinal oder transversal)
- Teilchenauslenkung relativ zur Sensoroberfläche (horizontal oder vertikal)
- Wellenleitungsmechanismus (Volumen oder Oberfläche)

In Abbildung 3 sind die verschiedenen Typen von akustischen Wellen und deren Ausbreitungsgeschwindigkeiten in Quarz gezeigt:

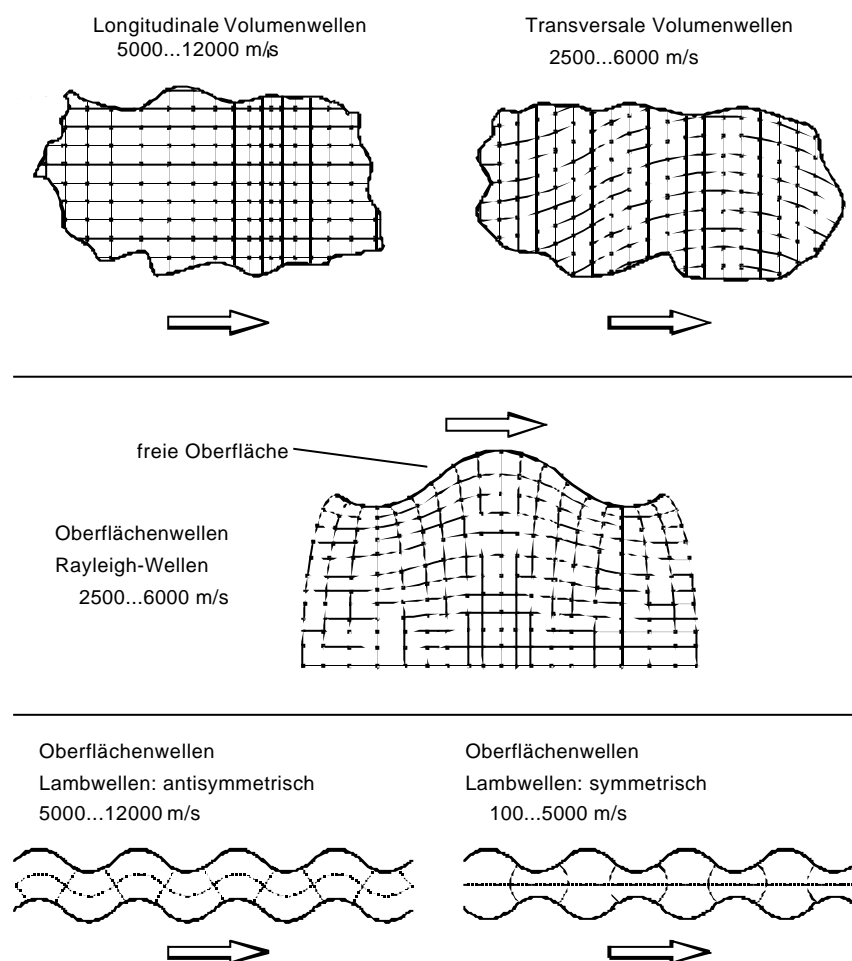


Abbildung 3: Akustische Wellen und deren Ausbreitungsgeschwindigkeit in Quarz. Die Pfeile bezeichnen die Ausbreitungsrichtung [5].

Die Teilchenauslenkung von Transversalwellen erfolgt senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Transversalwellen werden auch als Scherwellen (TSM, Transverse Shear Mode) bezeichnet, da sich senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle die Atome der Kristallebenen gegeneinander verschieben. Bei Longitudinalwellen sind Ausbreitungsrichtung und Teilchenauslenkung parallel.

Nimmt man die Sensoroberfläche als Bezugsebene, so lassen sich Wellen mit Teilchenauslenkungen senkrecht zur Wellenausbreitungsrichtung und parallel zur Sensoroberfläche als *horizontale Scherwellen* (SH, Shear Horizontal) bezeichnen.

Entsprechend sind Wellen mit Teilchenauslenkungen, die transversal zur Wellenausbreitungsrichtung und senkrecht zur Sensoroberfläche erfolgen, *vertikale Scherwellen* (SV, Shear Vertical) [4, 6].

Betrachtet man den Mechanismus, der für die Wellenleitung verantwortlich ist, so erkennt man grundsätzliche Unterschiede: Volumenwellen breiten sich ungerichtet im Festkörpervolumen aus, Oberflächenwellen aber nur entlang der Bauteiloberfläche.

Welche akustische Welle erzeugt wird, hängt von der Wahl des Materials, dessen Kristallorientierung, der Schichtdicke und der Geometrie der Elektroden ab.

Das Prinzip der Quarz-Mikrowaage wurde erstmals von Sauerbrey im Jahre 1959 beschrieben [7] und für TSM-Resonatoren hergeleitet. Erzeugt man demnach durch Rückkopplung mit einem elektrischen Schaltkreis eine stehende Welle, so ist deren Resonanzfrequenz von der gesamten schwingenden Masse abhängig. Da Frequenzen sehr genau gemessen werden können, stellt dieses System einen hochempfindlichen Massensensor dar. Sauerbrey beschrieb in seinem grundlegenden Artikel die Änderung der Resonanzfrequenz eines Resonators bei Aufbringen eines Filmes auf dessen Oberfläche.

Da bei einer Dickenscherschwingung eine Fremdmassenbelegung formal zu einer größeren Dicke des Resonators führt, sonst aber die mechanischen Eigenschaften des Resonators nicht beeinflusst werden, ergibt sich folgende Frequenzänderung Δf infolge der sich ändernden Masse Δm :

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta m}{d} = -\frac{1}{r_Q d} \frac{\Delta m}{A} \quad (1)$$

(f_0 : Grundfrequenz des unbeschichteten Bauteils, d : Dicke des Quarzplättchens, A : Elektrodenfläche, $r_Q = 2651 \text{ kg/m}^3$: Dichte von Quarz)

Berücksichtigt man zusätzlich noch die Bedingung für die Resonanzfrequenz der Grundschiwingung $f_0 = c_Q/2d$ (c_Q ist die Wellenausbreitungsgeschwindigkeit der elastischen Transversalwelle im Quarz von ca. 3330 m/s), so erhält man:

$$\mathbf{Df} = -\frac{2}{c_Q \mathbf{r}_Q A} f_0^2 \mathbf{Dm} = -C f_0^2 \frac{\mathbf{Dm}}{A} \quad (2)$$

Nach dieser Gleichung ändert sich die Schwingungsfrequenz eines Quarzes in erster Näherung proportional zu Masse, die auf den Quarz aufgebracht oder von dessen Oberfläche entfernt wird (Sauerbrey-Gleichung) [7].

Da die akustische Welle sich auch über einen gewissen Bereich in das umgebende Medium fortsetzt (Kap. 2.3) und diese Ausbreitung von Dichte und Viskosität abhängt, können diese Sensoren nicht nur zur Bestimmung von Massen eingesetzt werden, sondern auch zur Ermittlung von Dichte und Viskosität des umgebenden Mediums sowie von auf der Oberfläche aufgetragenen Polymeren. Durch die Empfindlichkeit der Frequenzbestimmung lassen sich kleinste Änderungen dieser Eigenschaften detektieren.

Die theoretische Sensitivität S eines Schwingquarzes nach Sauerbrey [8] ergibt sich mit

$$\Delta f = -\frac{2}{c_Q \mathbf{r}_Q A} f_0^2 \Delta m = -\frac{2}{\sqrt{\mathbf{m}_Q} \mathbf{r}_Q A} f_0^2 \Delta m = -C f_0^2 \frac{\Delta m}{A} \quad (2a)$$

zu

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta m} = -\frac{2 f_0^2}{A \sqrt{\mathbf{m}_Q} \mathbf{r}_Q} \quad (3)$$

Die theoretische Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Schwingquarze berechnet sich somit mit $A = 19,6 \text{ mm}^2$, $\mathbf{r}_Q = 2,648 \text{ g/cm}^3$, $\mu_Q = 2,947 \cdot 10^6 \text{ N/cm}^2$ und $f_0 = 10 \text{ MHz}$ zu

$$S = 1,15 \text{ Hz/ng}$$

Die auf die Fläche der Elektroden bezogene Sensitivität S_A ergibt sich zu

$$S_A = 22,54 \text{ Hz/(ng mm}^2\text{)}$$

2.2. Dickenschwinger (BAW-TSM)

Hierbei handelt es sich meist um runde Quarzplättchen (QCM, quartz crystal microbalance) mit kreisförmigen Elektroden, die einen Durchmesser im Bereich von 5 bis 25 mm besitzen. Legt man an die Elektroden ein elektrisches Wechselfeld an, so werden Volumenwellen erzeugt, die sich senkrecht zur Sensoroberfläche ausbreiten. Hierbei ergibt sich aus der Dicke d des Quarzplättchens die Bedingung für die Wellenlänge der Grund- und Oberschwingung: $\lambda = 2d/n$ ($n = 1, 3, 5\dots$).

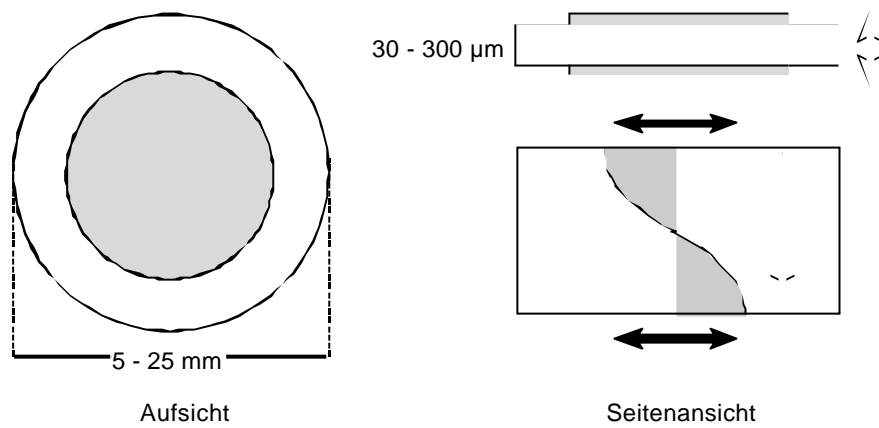


Abbildung 4: Schema eines Dickenschwingers (weiße Pfeile: Wellenausbreitungsrichtung, schwarze Pfeile: Teilchenauslenkung) [4].

Da die Oberschwingungen meist nicht genügend frequenzstabil sind, wird in der Sensorik im allgemeinen nur die Grundfrequenz verwendet.

Die elektrischen Eigenschaften eines Schwingquarzes können durch sein Ersatzschaltbild erläutert werden:

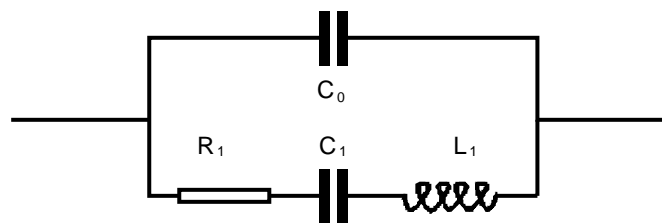


Abbildung 5: Ersatzschaltbild eines Schwingquarzes in Luft (Butterworth-Van Dyke) [9, 10].

R_1 , L_1 und C_1 stellen eine ideale gedämpfte Serienresonanz dar und werden dem blanken Quarzkristall zugeordnet. R hängt mit dem durch Reibung hervorgerufenen Energieverlust des mechanischen Schwingungssystems zusammen, L korrespondiert mit der Massenbelegung und C mit der mechanischen Elastizität des Materials. C_0 repräsentiert die geometrische Kapazität der aufgedampften Goldelektroden [11].

2.3. QCM als massensensitiver Sensor in flüssiger Phase

Bringt man nun einen Schwingquarz in Kontakt mit einer Flüssigkeit, so ändern sich seine Resonanzeigenschaften stark [12, 13]. Hierbei kommt es zu einer scheinbaren Massenerhöhung und zu einer Verstärkung der Dämpfung durch Energieübertragung auf die umgebenden Flüssigkeitsschichten. Die Reichweite \mathbf{d} der dadurch in die Flüssigkeit übertragenen transversalen Scherwelle beträgt [14, 15]:

$$\mathbf{d} = \sqrt{\frac{\mathbf{h}_L}{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}_L \cdot f_R}} \quad (4)$$

\mathbf{h}_L bezeichnet hier die Viskosität und \mathbf{r}_L die Dichte der Flüssigkeit, f_R ist die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes. Typische Werte von \mathbf{d} liegen im Bereich von 1 μm .

Die Dämpfung wird auch in einer Veränderung des "quality-factors" Q des Quarzes deutlich. Dieser Q -Faktor beschreibt das Verhältnis der im Oszillator gespeicherten Energie E_{sp} gegenüber der innerhalb einer Schwingungsperiode abgegebenen Energie E_{ab} [16].

Der Q -Faktor ändert sich beispielsweise, wenn ein Quarz aus dem Vakuum in Kontakt mit einer Flüssigkeit gerät, um den Betrag [17]:

$$\Delta Q = 2\mathbf{p} \cdot \frac{\Delta E_{sp}}{\Delta E_{ab}} = \frac{\sqrt{\mathbf{p} f_0 d \mathbf{r}_Q}}{\sqrt{\mathbf{r}_L \mathbf{h}_L}} \quad (5)$$

Der Q -Faktor kann anschaulich auch als Verhältnis der Resonanzfrequenz zur Halbwertsbreite der Resonanzkurve (Realteil der Admittanz) bezeichnet werden:

$$Q = \frac{f_0}{\Delta f_h} \quad (6)$$

Wird der Quarz einseitig in Kontakt mit einer idealen Newtonschen Flüssigkeit gebracht, so erniedrigt sich seine Resonanzfrequenz nach Kanazawa et al. um den Betrag [18, 19]:

$$\Delta f_L = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\mathbf{r}_L \cdot \mathbf{h}_L}{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}_Q \cdot \mathbf{m}_b}} \quad (7)$$

\mathbf{m}_b bezeichnet den elastischen Schermodulus, der ein Maß für die piezoelektrische und mechanische Steifigkeit des Quarzes darstellt, \mathbf{r}_Q die Dichte und f_0 die Resonanzfrequenz der Grundschwingung des Quarzes. Die Dichte und Viskosität der Flüssigkeit werden durch \mathbf{r}_L und \mathbf{h}_L bezeichnet. Es muß beachtet werden, daß $\mathbf{D}f_L$ und $\mathbf{D}Q$ von der Wurzel des Viskosität-

Dichte-Produktes abhängen, das durch Gl. (4) gegeben ist und für z.B. dickere Materialien wie Polymere oder Makromoleküle sehr unterschiedlich ist. Die Masse der Flüssigkeit hat keinen Einfluß auf den Q -Faktor.

Bringt man beispielsweise einen 10 MHz-Quarz in einseitigen Kontakt mit Wasser, so ändert sich seine Resonanzfrequenz um etwa 1,7 kHz. Ändert sich die Viskosität des umgebenden Wassers um 1 % - dies entspricht einer Temperaturänderung von 0,3 °C - so ergibt sich eine Frequenzänderung von 4,3 Hz.

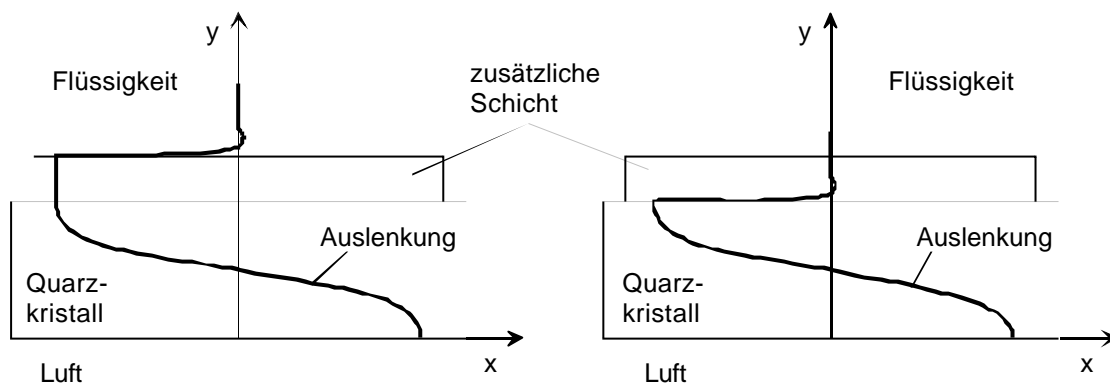


Abbildung 6: Grenzfälle des Resonanzverhaltens eines Schwingquarzes mit zusätzlich aufgebrachtener Schicht (links: starre Schicht, rechts: viskoelastische Schicht) und einseitigem Kontakt zu einer Flüssigkeit [20].

Belegt man den Quarz zusätzlich mit einer Schicht, so ergeben sich die in Abbildung 6 dargestellten Grenzfälle für das Resonanzverhalten. Bei völlig starrer Schicht ergeben sich keine Energieverluste; die Amplitudenfunktion setzt sich unverändert in die zusätzliche Schicht fort und koppelt somit optimal an den schwingenden Quarz an. Verhält sich die zusätzliche Schicht aber viskoelastisch, so klingt die Wellenfunktion bereits innerhalb der Schicht ab. Die Resonanzfrequenzänderung ist hier abhängig von Dichte und Viskosität der aufgebrachtener Schicht. Da die Amplitude der Welle mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche exponentiell abfällt, ist die Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Dicke der Schicht auch exponentiell; zusätzlich können Resonanzphänomene auftreten.

Für einen solchen Quarz, der in Kontakt mit einer Flüssigkeit steht und gleichzeitig eine abgeschiedene Masse auf der Oberfläche besitzt wird ein modifiziertes Ersatzschaltbild (Abbildung 7) angenommen [20]:

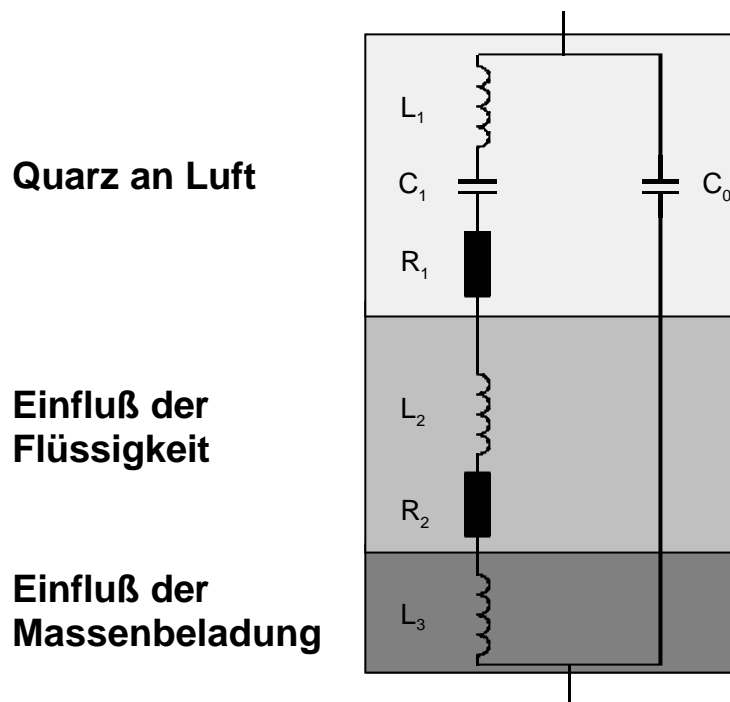


Abbildung 7: Ersatzschaltbild für einen Quarz bei Kontakt mit einer Flüssigkeit und gleichzeitiger Massenbeladung [20].

Der Einfluß von Massenzunahme erhöht die in diesem Modell beschriebene zusätzliche Induktivität L_3 , die Benetzung von Flüssigkeiten beeinflusst L_2 und R_2 . Werden Oberschwingungen zur Messung verwendet, so variiert R_1 mit dem Quadrat der Frequenz, L_2 und R_2 nur mit der Wurzel der Frequenz. Dies bedeutet, daß die Sensitivität auf Massenänderungen bei höheren Frequenzen stärker zunimmt, als der Einfluß von Flüssigkeitseigenschaften.

Für kleine Beladungen stellen die Gleichungen (2) und (7) Grenzfälle dieses allgemeineren Modells dar.

Komplexere Theorien berücksichtigen zusätzliche elektrische Parameter, Viskoelastizitäten (Reed et al., Behling et al. [21, 22, 23]), Mehrfachsichten (Granstaff et al. [24]), Oberflächenrauigkeiten (Daikhin et al. [25, 26]), den Einfluß von Kompressionswellen (Lucklum et al. [27]) und Streufelder innerhalb leitfähiger Lösungen (Rodahl et al, Shana et al. [16, 28]).

Neuere Arbeiten, die sich insbesondere mit dickeren viskoelastischen Schichten auf der Oberfläche eines Quarzes befassen, behandeln das Ensemble aus Quarz und dieser Schicht wie ein gekoppeltes schwingendes System [29, 30, 31]. Das zu diesem Modell gehörende Ersatzschaltbild (Abbildung 8) beschreibt die viskoelastische Schicht als eigenes schwingfähiges System, das sich durch einen parallelen Widerstand R_2 , eine parallele

Kapazität C_2 und eine parallele Induktivität L_2 auszeichnet. Diese Elemente beschreiben die mechanischen Eigenschaften der Schicht: R_2 beschreibt die viskose Dämpfung im Film, C_2 die Speicherung elastischer Energie, L_2 die Speicherung kinetischer Energie.

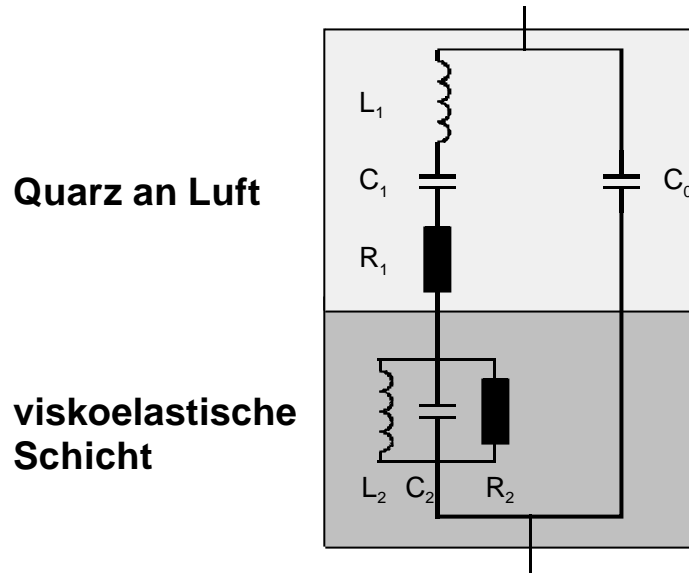


Abbildung 8: *Ersatzschaltbild eines polymerbeschichteten Schwingquarzes (gekoppeltes Resonatorsystem) [29]. Der Einfluß durch eine kontaktierende Flüssigkeit und zusätzliche Massenbeladung ist nicht berücksichtigt.*

Solche Modelle lassen sich auch für andere Beschichtungen und Flüssigkeiten herleiten, die sich mit dem Quarz in Kontakt befinden [15].

2.4. Die theoretischen Modelle im Überblick

In der Literatur finden sich seit der ersten Veröffentlichung zur Verwendung von Schwingquarzen als Mikrowaage [7] bis in die heutige Zeit eine Vielzahl von Theorien. In immer komplexeren Betrachtungsweisen werden immer mehr Parameter berücksichtigt, die auf das Schwingverhalten des Quarzes und seine elektrischen und mechanischen Parameter einen Einfluß ausüben. Solche Theorien führen zu mathematischen Modellen, mit denen sich diese Parameter bei bestimmten Anwendungen des Quarzes als Sensor berechnen lassen.

Im Folgenden ist eine kurze Übersicht über die Entwicklung dieser Theorien gegeben.

Tabelle 1 (Seite 18) stellt die wichtigsten mathematischen Formeln sowie die dabei benutzten Näherungen der ausgesuchten Autoren gegenüber.

Der von **Sauerbrey** [7] im Jahre 1959 erstmals beschriebene Einsatz von Schwingquarzen zur Mikrowägung ging im Gegensatz zu heutigen Betrachtungen von Quarzplatten mit unendlicher Ausdehnung aus. Diese Vereinfachung vermeidet die Berücksichtigung von Randbedingungen, die aufgrund des endlichen schwingenden Materials auftreten würden. Die Versuchsbedingungen zur Herleitung des Zusammenhangs der Frequenzänderung proportional zur Massenänderung stellten damals im Vakuum auf den Quarz aufgebrachte, starr angekoppelte dünne Schichten dar. Schwingquarze mit zusätzlicher Massenbelegung verhielten sich so wie Schwingquarze, die um gerade diese Masse dicker waren.

$$\Delta f = -Cf_0^2 \frac{\Delta m}{A} \quad (8)$$

Dieses Verhalten führte zur Verwendung von Schwingquarzen als Schichtdickenmonitore.

Kanazawa et al. [18, 19] erweiterten dieses Modell für den Einsatz des Schwingquarzes in flüssigen Medien. Der einseitige Kontakt von Flüssigkeiten mit einem Dickenschwinger führt nach Kanazawa et al. zu einer Kopplung der Scherwelle im Quarz mit einer gedämpften Scherwelle in der benetzenden Flüssigkeit.

Die resultierende Schwingung wird durch Viskosität und Dichte dieser Flüssigkeit beeinflusst. Dieser Zusammenhang konnte durch verschieden konzentrierte Ethanol- bzw. Glukose-Lösungen experimentell gezeigt werden. Der Zusammenhang zwischen

Frequenzverstimmung und Änderung der Eigenschaften des kontaktierenden Mediums wird durch Gleichung (9) beschrieben.

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\mathbf{r}_L \cdot \mathbf{h}_L}{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}_Q \cdot \mathbf{m}_Q}} \quad (9)$$

Die Beladung mit einer zusätzlichen adsorbierten Masse wurde hier nicht berücksichtigt.

Martin et al. [20] ergänzten das Modell des Kontaktes einer Newtonschen Flüssigkeit mit einem Scherschwinger mit der Berechnung einer simultanen Beladung mit einer starr angebundenen Masse.

Als Ergebnis ihrer Untersuchungen wurde ein Modell aufgestellt, das die elektrischen Parameter des reinen Schwingquarzes mit zusätzlichen Parametern verknüpft, die die aufgebrauchte Masse und die im Kontakt befindliche Flüssigkeit repräsentieren (Abbildung 7).

Durch Anpassen der durch Admittanz-Messungen bestimmten Parameter an den Kurvenverlauf konnte dieses Modell recht gut verifiziert werden.

Zur Aufstellung dieses Modells wurde die aufgebrauchte, starr angebundene Schicht als dünn im Vergleich zur akustischen Wellenlänge angenommen.

$$\Delta f \approx \frac{2f_s^2}{N\sqrt{c_{66}}\mathbf{r}_q} \left[\mathbf{r}_s + \left(\frac{\mathbf{r}_L \mathbf{h}_L}{4\mathbf{p}_s} \right)^{1/2} \right] \quad (10)$$

Auch dieses Modell geht von idealisierten Bedingungen aus, wie inkompressible isotrope Newtonsche Flüssigkeiten, infinitesimal dicke Elektroden und dünne starr angebundene Beschichtungen; für reale Flüssigkeiten und Schichten stellt es nur eine Näherung dar. Durch solche Admittanz-Messungen konnten die unterschiedlichen Einflüsse auf den Quarz durch Änderungen der Dichte, Viskosität und Masse separiert werden.

Nachdem die grundlegenden Modelle aufgestellt waren, wurden sie durch Variationen verschiedenster experimenteller Parameter optimiert und den realen Systemen immer mehr angepaßt.

So wurde durch **Shana et al.** [28] gezeigt, daß auch die Geometrie der Elektroden einen Einfluß auf die Frequenzänderung eines Schwingquarzes hat. Die Bestimmung der seriellen und parallelen Resonanzfrequenz zeigte, daß die serielle Frequenz durch mechanische Eigenschaftsänderungen des angrenzenden Mediums und die parallele durch mechanische und

elektrische Eigenschaftsänderungen beeinflusst wird [32]. Durch Modifizierung der Geometrie der in Flüssigkeit befindlichen Elektrode konnte nachgewiesen werden, daß das elektrische Feld, das neben der Elektrode auftritt, mit der angrenzenden leitfähigen Flüssigkeit und auch mit dünnen Schichten wechselwirkt; dadurch entstehen diese starken Änderungen der parallelen Resonanzfrequenz. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden entsprechende Ersatzschaltbilder des Quarzes aufgestellt.

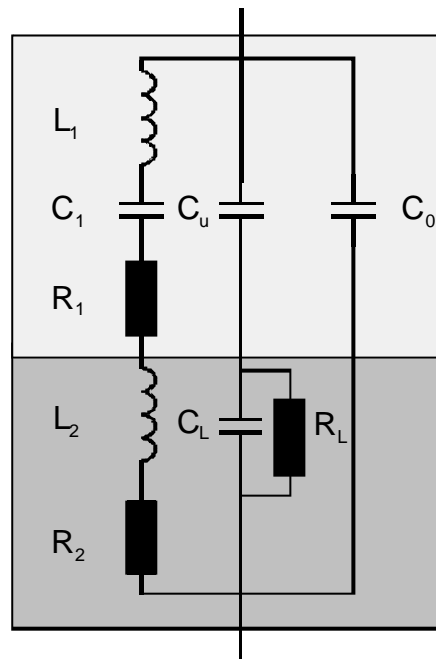


Abbildung 9: Elektrisches Ersatzschaltbild für einen Schwingquarz mit modifizierter Elektrodengeometrie in einseitigem Kontakt mit einer Flüssigkeit [28].

Die Modifikation des Ersatzschaltbildes beinhaltet die seriellen Kapazitäten C_U und C_L , parallel zur Kapazität C_0 . Diese Kapazitäten kommen durch die modifizierte Elektrodengeometrie (z.B. Ringelektrode) zustande. Die zusätzliche Induktivität L_2 und der Widerstand R_2 sind mit der mechanischen Beladung der Elektrode durch die Flüssigkeit verknüpft. R_L ist von der Leitfähigkeit der Flüssigkeit und der Eindringtiefe des elektrischen Feldes in die Flüssigkeit abhängig.

Die theoretische Berechnung von Systemen, die den Quarz einschließlich angekoppelter viskoelastischer Schicht und Flüssigkeit behandelt, wurde erst kürzlich vorgestellt.

Bandey et al. [15, 29] entwickelten eine theoretische Beschreibung des Systems Quarz/Beschichtung/Flüssigkeit in Abhängigkeit von verschiedenen Oberflächenbeladungen (ideale Masse, semi-infinite Newtonsche Flüssigkeit, semi-infinite Maxwell'sche Flüssigkeit, semi-infinite viskoelastische Schicht, finite viskoelastische Schicht und Schichtsysteme).

Mit Hilfe dieses Modells lassen sich Änderungen der Materialeigenschaften von Viskosität, Dichte, Beschichtungsdicke und Quarzschermodulus auf mechanische und elektrische Impedanzänderungen des Quarzes zurückführen und bestimmen.

Viskoelastische Schichten mit Dicken im Bereich der Abklinglänge (finite Schichten) reflektieren demnach die vom Quarz ausgehende akustische Welle - es entsteht Interferenz. Für Ölschichten ergibt sich beispielsweise ein ideales Verhalten des Blindwiderstandes (= Imaginärteil der Impedanz) nach Sauerbrey unterhalb einer Schichtdicke von 5 μm .

Dickere viskoelastische Schichten bzw. Schichten, bei denen die Abklinglänge wesentlich kleiner ist als die Schichtdicke selbst, verhalten sich semi-infinit. Die Welle pflanzt sich nur in einer Richtung fort und wird innerhalb der Schicht auf null gedämpft. Änderungen außerhalb dieses Bereiches werden nicht wahrgenommen. Die mechanische Impedanz setzt sich aus der Summe der Impedanzen durch die Belegung einer Oberfläche mit einer Schicht und durch den zusätzliche Kontakt mit einer Flüssigkeit zusammen.

Für eine nicht starr angebundene Schicht in Kontakt mit einer Newtonschen Flüssigkeit ergibt sich eine totale Impedanz, die sich nicht aus den Einzelsummen zusammensetzt (nichtlinear).

Das vorgestellte theoretische Modell stimmt für viele Anforderungen mit den praktischen Meßwerten überein.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen in der Literatur beschriebenen theoretischen Modelle des Schwingquarzes und dessen Verhalten auf Änderungen an der Oberfläche.

| Modell | Df | Transducer | Medium |
|-------------------|---|---|--|
| Sauerbrey [7] | $\Delta f = -Cf_0^2 \frac{\Delta m}{A}$ | Unendlicher Quarz, starre Schichten | Vakuum |
| Kanazawa [18, 19] | $\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\mathbf{r}_L \cdot \mathbf{h}_L}{\mathbf{p} \cdot \mathbf{r}_Q \cdot \mathbf{m}_Q}}$ | Kopplung der Scherwelle im Quarz mit Scherwelle in Flüssigkeit, Dichte und Viskositätseinfluß der Flüssigkeit | Flüssigkeit |
| Martin [20] | $\Delta f \approx \frac{2f_s^2}{N\sqrt{c_{66}}\mathbf{r}_q} \left[\mathbf{r}_s + \left(\frac{\mathbf{r}_L \mathbf{h}_L}{4\mathbf{p}f_s} \right)^{1/2} \right]$ | Starr angebundene Massenschicht in Kontakt mit Flüssigkeit | Newtonsche Flüssigkeit |
| Shana [28] | $\Delta f_p = f_{p0} \left(\sqrt{\frac{f_{p0} \mathbf{r}_L \mathbf{h}_L}{\mathbf{p} \mathbf{r}_Q c_{66}}} + \frac{AH}{2A_1} \right)$ A, A ₁ : Fläche der verschiedenen Elektroden, H: beinhaltet elektrische und mechanische Parameter | Mechanische und elektrische Änderungen im Umfeld des Quarzes, Änderungen in der Elektrodengeometrie | Flüssigkeit |
| Bandey [15, 29] | Impedanzanalyse und -rechnung | Dünne, dicke, starre und viskoelastische Schichten | Newtonsche und Maxwellsche Flüssigkeiten |

2.5. Polymere (unspezifisch)

2.5.1. Polyketone

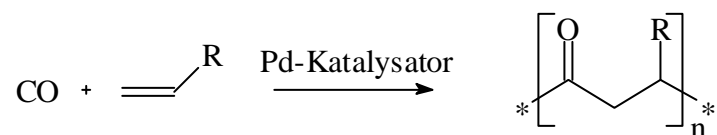
Sensoren mit Polymerbeschichtung sind ein geeignetes System zur Analyse von organischen Verunreinigungen in gasförmiger und wässriger Umgebung [33, 34, 35, 36, 37, 38]. Solch eine Analyse erfolgt durch Anreicherung des Analyten im Polymer und Detektion geeigneter Parameter über einen Transducer. Da Polymere allerdings mangels spezifischer Erkennungszentren eher unspezifische Wechselwirkungen eingehen, müssen Arrays aus mehreren polymerbeschichteten Sensoren zu einer Mustererkennung herangezogen werden. Verschiedene polymerbeschichtete Sensoren ergeben im Idealfall bei unterschiedlichen Analyten charakteristische Muster, die über eine spezielle Datenverarbeitung zur qualitativen und auch quantitativen Bestimmung von einzelnen Analyten auch in Gemischen verwendet werden können.

In der vorliegenden Arbeit werden Copolymere aus Olefinen und Kohlenmonoxid [39, 40, 41], die durch homogene und heterogene Katalyse hergestellt wurden, als hochsensitive Beschichtung von Schwingquarzen verwendet. Anstelle von Kohlenmonoxid können auch weitere polare, ungesättigte Monomere wie z.B. SO_2 , Isonitrile, Isocyanate, Imine und Stickstoff-Sauerstoffverbindungen eingesetzt werden. Beispiele für weitere prinzipiell geeignete Transducer mit solchen Polymerbeschichtungen sind in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt:

Tabelle 2: Übersicht über Meßverfahren mit polymerbeschichteten Transducern.

| Transduktion | einsetzbarer Transducer | Beispiele für meßbare bzw. abgeleitete Parameter |
|----------------------|---|---|
| massensensitiv | <ul style="list-style-type: none"> • Schwingquarz (BAW) • Oberflächenbauelement (SAW) • mikromechanische Zungen | Anreicherungskoeffizienten, viskoelastische Parameter |
| kalorimetrisch | <ul style="list-style-type: none"> • Thermopiles • mikromechanisch integrierter Kalorimeter • mikromechanische Zungen | Sorptions-, Kondensations-, Verdampfungsenthalpien und -entropien |
| kapazitiv | <ul style="list-style-type: none"> • Interdigitalkondensator • mikromechanisch integrierter Interdigitalkondensator | Dielektrizitätskonstanten |
| Leitfähigkeit DC, AC | <ul style="list-style-type: none"> • Vierpunktstrukturen • Interdigitalstrukturen | spezifische Leitfähigkeit, Einzelbeiträge spezifischer Ladungsträger bei AC-Betrieb |
| optisch | <ul style="list-style-type: none"> • Reflektrometrischer Aufbau • kolorimetrischer Aufbau • Integriert optische Aufbauten • Fluoreszenz | Brechungsindex, Quelleffekte, Volumenänderungen |

Die palladiumkatalysierte, alternierende Copolymerisation von Alkenen mit Kohlenmonoxid liefert Polyketone, die sehr interessante Materialien für die Beschichtung von Transducern sind (vgl. Tabelle 2). Sie lassen sich in organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan oder Tetrahydrofuran auflösen und durch Aufsprühen auf viele Materialien wie Glas, Metall, Papier und Kunststoff aufbringen. Man erhält fest haftende Polymerfilme mit definierter Schichtdicke.



Während kurzkettenige Olefin-Copolymerisate wie Ethen/CO-Copolymere nur in exotischen Lösungsmitteln wie Hexafluorisopropanol löslich sind und in Kohlenwasserstoffen praktisch nicht quellen, nimmt die Löslichkeit der homologen Polyketone mit länger werdender Alkylkette R immer mehr zu. Zum Beispiel löst sich ein Tetradezen/CO-Copolymer in

n-Hexan. Der Schmelzpunkt dieses Polymers liegt allerdings schon bei 40 °C, so daß es für Beschichtungen weniger geeignet ist. Die mechanische Stabilität ist somit nicht ausreichend.

Geeignet erscheinen Polyketone mit nicht zu langer Seitenkette, die in Dichlormethan löslich sind, jedoch in anderen organischen Lösungsmitteln nur quellen, einen hohen Schmelzpunkt und eine niedrige Glas temperatur besitzen. Eine niedrige Glas temperatur ist für schnelle Transportvorgänge im Polymer wünschenswert. Verschiedene funktionelle Gruppen im Polymer erhöhen die Selektivität und geben die Möglichkeit, nachträglich Erkennungszentren einzubauen oder Vernetzungsreaktionen durchzuführen. Solche Vernetzungsreaktionen beeinflussen die innere Struktur des Polymers und tragen zur Stabilität auf der Transduceroberfläche bei.

Da die verwendeten Palladiumkatalysatoren unempfindlich gegenüber einer Vielzahl von funktionalisierten Monomeren sind, lassen sich auch durch das Alken-Monomer auf einfache Weise interessante Funktionen in das Polyketon einführen. Dabei ist auch an den Einbau von Wirtsverbindungen aller Art (z.B. Cyclodextrine, Calixarene, Kronenether, Kryptanden, Cyclophane, Cyclopeptide, DNA-Sequenzen, biologische Erkennungs-Strukturen, etc.) für die molekulare Erkennung zu denken .

Um Polymere mit den oben beschriebenen Eigenschaften zu erhalten, muß teilweise der Katalysator verändert werden. Für die Herstellung von Styrol/CO-Copolymeren haben sich beispielsweise zweizählige Stickstoffliganden als besonders aktiv erwiesen.

Die Materialeigenschaften des Polymers können durch die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Druck, Lösungsmittel oder Reaktionszeit) kontrolliert und optimiert werden. Zum Beispiel bewirkt die Erhöhung der Polymerisationstemperatur von 25° auf 60°C eine Abnahme in der Glas temperatur des Propen/CO-Copolymers von -1° auf -10°C.

Die erhaltenen Polyketone zeigen außerdem Unterschiede in der Mikrostruktur. Je nach Katalysator erhält man ein regioirreguläres Polymer (66 % Kopf-Schwanz-Verknüpfung), oder ein regioregulares Polymer (100 % Kopf-Schwanz-Verknüpfung). Solche Merkmale können bei der Optimierung der sensitiven Schicht eines Transducers hilfreich sein.

2.5.2. Sol-Gel Schichten

Nachdem im vorhergehenden Kapitel Polymere beschrieben wurden, die erst synthetisiert und gereinigt wurden und dann auf einen Sensor aufgesprüht wurden, sollen im Folgenden Polymere behandelt werden, die direkt auf der Sensoroberfläche „aufwachsen“. Der große

Vorteil dieser Polymere gegenüber den bereits beschriebenen Polyketonen ist, daß keine aufwendige Synthese bei extremen Bedingungen notwendig ist.

Solche Polymerfilme werden durch einen Sol-Gel Prozeß hergestellt [42, 43].

Bei diesem Prozeß werden Silanmonomere durch einen geeigneten Katalysator mit einer funktionalisierten Oberfläche quervernetzt. Der Sol-Gel-Präkursor - in diesem Fall das Silan-Monomer – kann mit vielen möglichen funktionellen Gruppen und Kettenlängen verwendet werden. Diese reiche Auswahl an Monomeren führt zu einer ebenso reichen Variation an Polymereigenschaften (starr, viskoelastisch, hydrophil oder hydrophob).

In Abbildung 10 ist schematisch ein idealisierter Sol-Gel-Prozeß dargestellt.

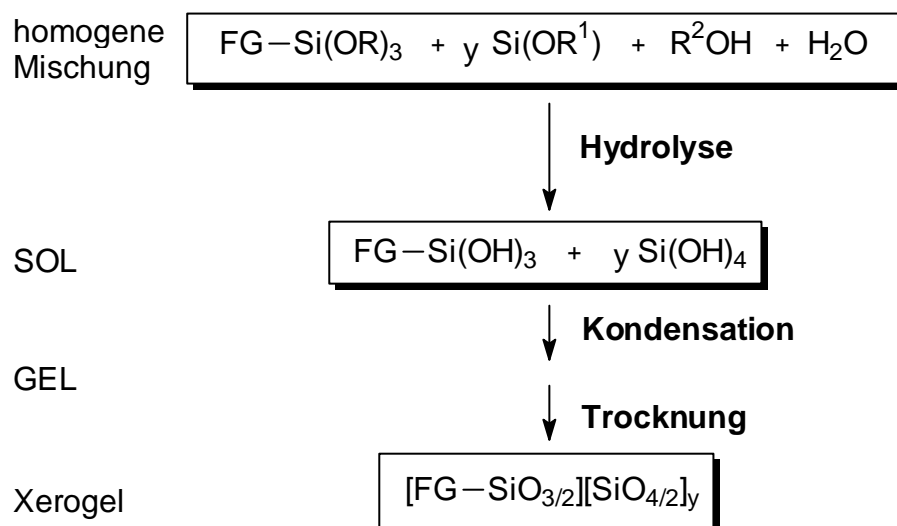


Abbildung 10: *Idealisiertes Schema des Sol-Gel Prozesses. Cokondensation eines funktionalisierten Trialkoxysilanes mit einem Tetraalkoxysilan (FG: funktionelle Gruppe) [42].*

Der Sol-Gel Prozeß wird durch Mischen der entsprechenden Alkoxysilane mit Wasser und einem Alkohol gestartet. Bei zu kleiner Reaktionsgeschwindigkeit wird dem homogenen Gemisch etwas Katalysator zugegeben [43]. Die so entstandenen Silanole (Sol) kondensieren und ergeben Polysiloxane. Wird diese Reaktion in Gegenwart einer mit Silangruppen funktionalisierten Oberfläche durchgeführt, so entsteht eine kovalent mit dieser Oberfläche vernetzte Polymerschicht.

Mit fortschreitender Quervernetzung entsteht ein Netzwerk aus Polymer, in welches das Lösungsmittel eingelagert ist (Gel). Eine nachfolgende Trocknung bewirkt anschließend ein Schrumpfen der Polymerschicht durch den Verlust an Lösungsmittel sowie Vernetzung nicht abreagierter Silanolgruppen (Xerogel).

Solche Polymere werden in Katalyseprozessen (z.B. Hydrierungen, Hydroformylierungen oder -aminierungen) zum Anbinden des Katalysators benutzt [44, 45]. Für diesen Prozeß ist es wichtig, wie gut das verwendete Lösungsmittel in die Matrix des Polymers eindiffundiert. Diese Wechselwirkung kann sich entscheidend auf die Ausbeute der Produkte auswirken. Auch die Entfernung des Lösemittels und der Reaktionsprodukte aus dem Polymer und somit die Rückgewinnung des an den Träger gebundenen Katalysators wird durch diese Wechselwirkung beeinflusst. Um Aussagen über solche Prozesse machen zu können, wurden verschiedene Polymere auf Sensoren aufgebracht und ihr Verhalten gegenüber unterschiedlichen Lösungsmitteln untersucht.

2.6. Cyclohexapeptide (quasispezifisch)

Cyclische Peptide kommen in der Natur in verschiedenen Formen und biologischen Aktivitäten vor. Sie treten als *homodete* ringförmige Peptide auf (z.B. Lactame), die nur Peptidbindungen enthalten, oder sind *heterodet* und weisen zusätzlich noch Disulfidbrücken, Sulfid-, Ester-, oder Thioesterbindungen auf. Nachweislich erhöht die cyclische Struktur die metabolische Stabilität, Rezeptorselektivitäten, die Bioverfügbarkeit und Wirkungsprofile [46].

Vertreter natürlich vorkommender cyclischer Peptide sind beispielsweise das Antibiotikum Gramacidin S, das Octapeptid Amatoxin, das im Knollenblätterpilz vorkommt und die Synthese der m-RNA hemmt, sowie das Dodecadepsipeptid Valinomycin, das selektiv Kaliumionen durch biologische oder künstliche Membranen transportieren kann; weitere sind in [47, 48] zu finden.

Sensoren, die mit supramolekularen Erkennungsstrukturen beschichtet sind, können als schnelle und einfache Testsysteme verwendet werden, um Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Gastmolekülen zu detektieren. Solche Informationen sind für die pharmazeutische Industrie zur Entwicklung, Erkennung und Selektion von neuen Wirkstoffen von größter Bedeutung. Werden für dieses Screening nicht Einzelsubstanzen verwendet, sondern ein Gemisch von vielen potentiellen Wirkstoffen, sogenannte Bibliotheken, die nach den Prinzipien der kombinatorische Chemie hergestellt werden können, so lassen sich die gewünschten Rezeptoren mit erheblich weniger zeitlichem und apparativen Aufwand synthetisieren und selektieren [49].

Für molekulare Erkennung mit supramolekularen Strukturen sind im wesentlichen mehrfache intermolekulare Bindungsstellen verantwortlich. Soll ein Molekül spezifisch von solch einer Struktur erkannt werden, dürfen diese Wechselwirkungen nicht oder nur in geringem Maße durch Bindungen unerwünschter Stoffe gestört oder blockiert werden.

Der Analyt soll eine spezifische Wechselwirkung mit der auf der Oberfläche befindlichen Rezeptorstruktur eingehen (Abbildung 11). Ein eventuell unspezifisch gebundenes Lösungsmittel- oder Puffermolekül darf diesen Vorgang nicht wesentlich behindern bzw. soll ihn sogar fördern. Eine Hinderung kann z.B. dadurch entstehen, daß Bindungsstellen irreversibel blockiert werden oder daß aus Analyt- und Puffer-Molekülen ein Komplex

gebildet wird, der nicht mehr in der Lage ist, mit der Rezeptorstruktur auf der Oberfläche spezifisch wechselzuwirken.

Im Falle eines ionischen Mediums, eines ionischen Analyten und einer ionischen Oberflächenstruktur ist zu erwarten, daß die „Erkennung“ des Analyten in hohem Maße von der Art des ionischen Mediums, also dessen Struktur, dessen pH-Wert und dessen Konzentration abhängt.

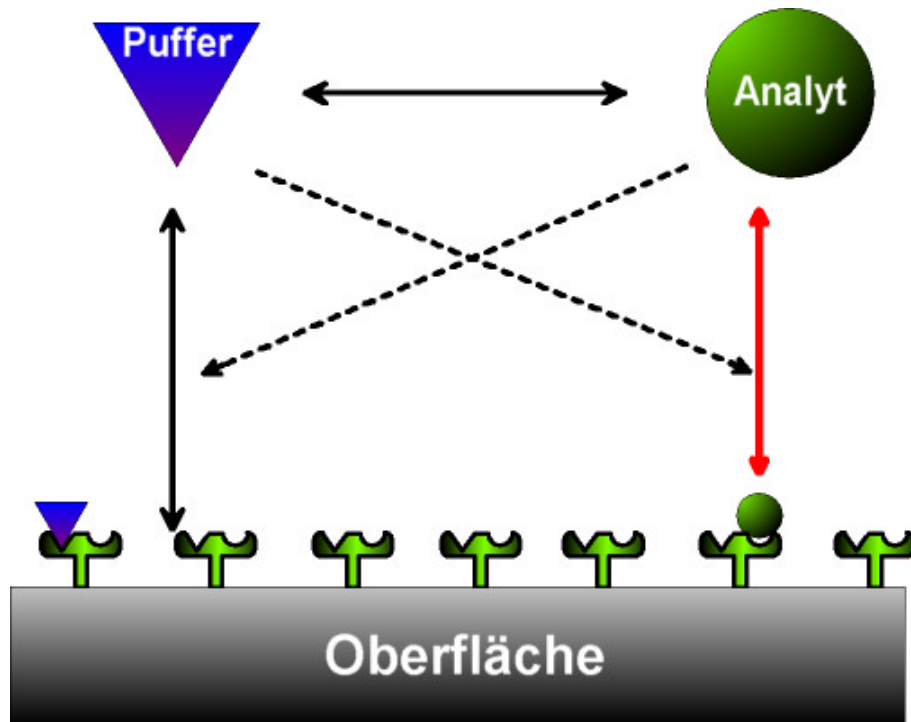


Abbildung 11: Schematischer Wechselwirkungsprozeß der Analytmoleküle mit Puffer-Ionen und der Sensoroberfläche in ionischem Medium.

Andererseits führt der Einsatz eines elektrischen Transducers in flüssiger, leitfähiger Phase aufgrund von Änderungen in der elektrischen Umgebung zu Störungen, die sich mit Signalen durch Analytwechselwirkung mit der Oberfläche überlagern können [14, 16, 28].

Solche Wechselwirkungen lassen sich auch theoretisch durch Kraftfeld- und Molekulardynamikrechnungen nachprüfen bzw. vorhersagen (siehe Abschnitt 4.2.6.4).

2.7. Antigen - Antikörper – Immunologie (spezifisch)

Die durch Krankheitserreger ausgelösten Reaktionen des körpereigenen Abwehrsystems (Immunsystem) sind für das Überleben von zentraler Bedeutung. Diese Abwehrmechanismen verhindern den Eintritt von Mikroorganismen oder schränken deren Vermehrung im Körper ein. Im Körper eingedrungene körperfremde Stoffe (Antigene) werden durch Antikörper markiert, die eine hohe Affinität zu diesem Antigen besitzen. Sie sind somit für die weitere Immunreaktion gekennzeichnet. Ein Teil dieses Immunsystems bilden die Immunglobuline (Ig). Sie befinden sich in der Globulinfraktion des Blutserums und werden von sogenannten B-Lymphozyten produziert, die im Knochenmark gebildet werden.

Die Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Proteinketten, die kovalent über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 12). Die Bindung des Antigens kommt über den variablen Teil des Antikörpers, das F_{ab} -Fragment, durch nichtkovalente Wechselwirkungen zustande. Das F_c -Fragment enthält den jeweils nicht variablen, carboxyterminalen Teil der schweren Ketten.

Im menschlichen Blutserum kommen fünf Immunglobulin-Isotypen vor, die sich in der Zusammensetzung der schweren Kette unterscheiden: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Der Anteil an IgG beträgt hier ca. 85 % am Gesamt-Immunglobulin. IgG, IgD und IgE kommen in Form von Monomeren vor, IgM liegt als Pentamer und IgA als Mono-, Di- oder Trimer vor.

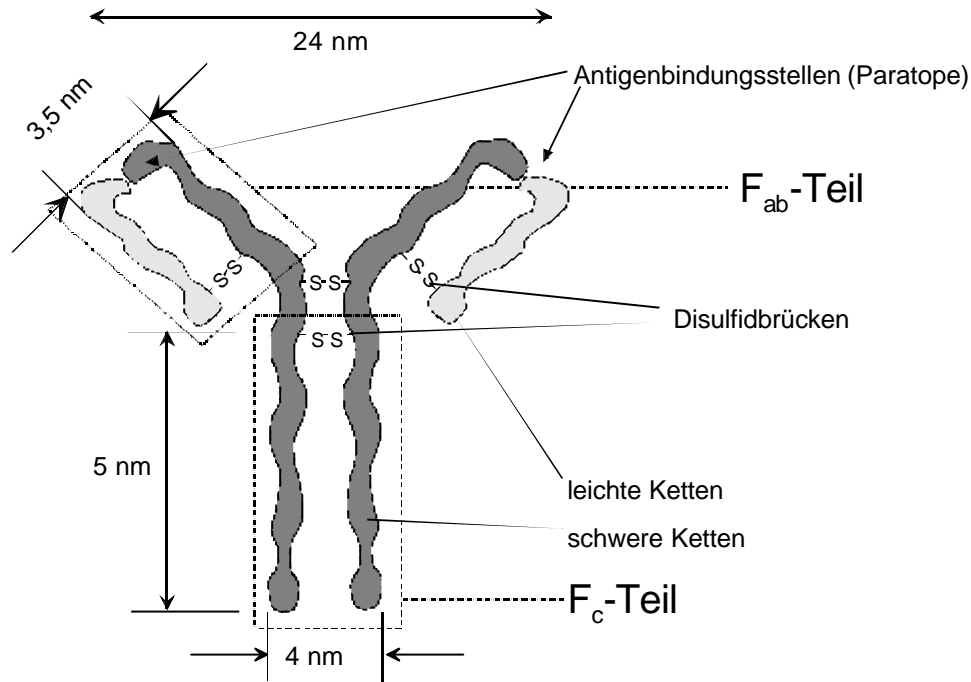


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Antikörpers vom Immunoglobulin-Typ (Ig).

Die variablen Fab-Regionen unterscheiden sich von Antikörper zu Antikörper in ihrer Aminosäuresequenz und folglich in ihrer dreidimensionalen Struktur. Ein bestimmter Antikörper kann so ein komplementär gebautes Antigen an dessen Bindungsstelle – der Antigen determinante bzw. dem Epitop – spezifisch binden. In der Regel sind Antikörper aufgrund ihrer beiden Fab-Regionen divalent. Die eigentlichen Bindungsstellen des Antikörpers befinden sich an den äußeren Enden der Fab-Regionen. Es sind drei Teile der Schlingen in den Polypeptidketten, die sich eng aneinanderlagern und so aufgrund der Verteilung der verschiedenen Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften (z.B. Ladungen) die Antigenstruktur bestimmen, die sich dazu komplementär verhält.

Zur Blutgruppenbestimmung wird normalerweise mit Hilfe der verschiedenen Antikörper Anti-A und Anti-B bei einer unbekanntes Blutprobe eine Verklumpung (Hämagglutination) herbeigeführt. Diese rührt von einer Vernetzung der roten Blutkörperchen her, die durch gleichzeitiges Binden der Antikörper an identische Antigene auf der Erythrozytenoberfläche (A- bzw. B-Substanz) zustandekommt. Die Bestimmung erfolgt meist visuell.

Für eine vollständige Analyse der Blutgruppen mit Untergruppen und Antikörpern werden im Regelfall einige Milliliter Blut benötigt. Nach Trennung der festen und flüssigen Bestandteile werden dazu eine Vielzahl an Tests meist zeitaufwendig von Hand durchgeführt. Für jeden Test werden teure Bestimmungsreagenzien verbraucht.

Diese Problematik ist ein Ansatzpunkt für eine automatisierte Blutbestimmung durch mit entsprechenden sensitiven Schichten belegte Sensoren [50, 51].

Um einen Blutgruppentest mit Hilfe von massensensitiven Sensoren durchzuführen, muß der Antikörper auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden, da das Antigen, also der Erythrozyt, in diesem Fall eine wesentlich größere Massenänderung erwarten läßt, wenn es über den Sensor geleitet wird. Die Abnahme der Resonanzfrequenz infolge der Bindung von Erythrozyten läßt auf die jeweilige Blutgruppe schließen. Die Parallelschaltung mehrerer entsprechend beschichteter Sensoren erlaubt so die schnelle automatische Erkennung verschiedener Blutparameter wie Hauptblutgruppe, Unterblutgruppe oder Antikörper.

2.8. Mustererkennung und Multikomponentenanalyse

Der Einsatz von mehreren Sensoren mit unterschiedlichen Beschichtungen, die hauptsächlich unspezifische Wechselwirkungen mit Analyten eingehen, erfordert die Anwendung einer multivariaten Datenanalyse. Da ein unspezifischer Sensor auf alle zu untersuchenden Analyten reagieren kann, sind zur qualitativen Unterscheidung und zur Quantifizierung einerseits mehrere Sensoren nötig und andererseits eine entsprechende Datenauswertung der durch Überlagerung zustandekommenden Sensorsignale.

Solche Verfahren lassen sich in verschiedene Kategorien (modellbasiert, modellfrei, überwacht und unüberwacht) einteilen und stellen einen Zusammenhang zwischen den Meßwerten der Sensoren und den Konzentrationen der Analyten her.

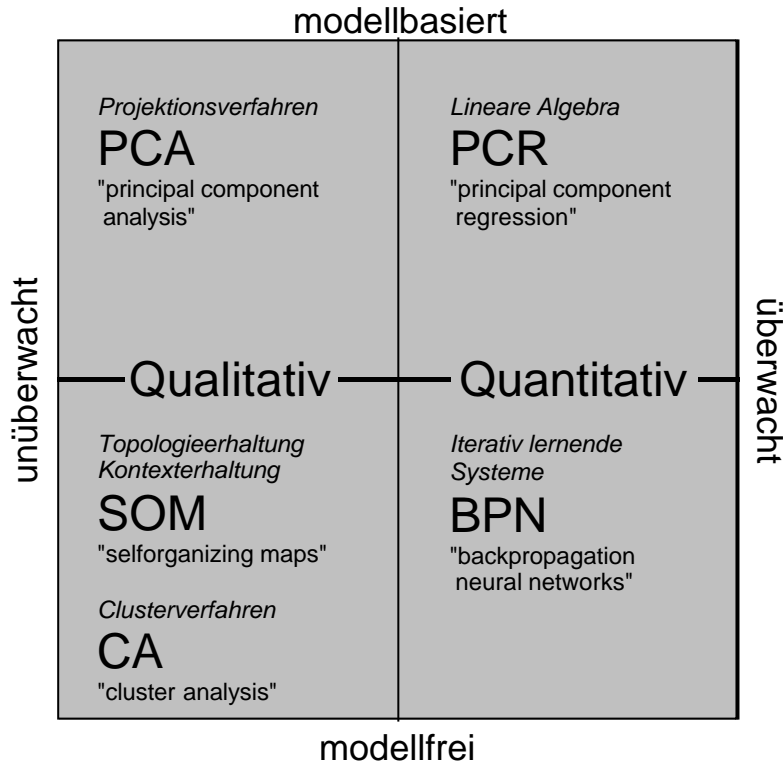


Abbildung 13: Einteilung der verschiedenen Methoden zur Klassifizierung und Korrelation von Sensordaten [nach 52].

Modellbasierte Verfahren beispielsweise begründen diesen Zusammenhang mittels Kalibrierfunktionen, die durch einen exakt definierten Satz von Parametern beschrieben werden. Solch ein Parameter kann beispielsweise die partielle Empfindlichkeit als Steigung der Kalibriergeraden sein.

Mit Hilfe der Analysenfunktion, die aus der expliziten Bestimmung der Umkehrfunktion der Kalibrierfunktion hervorgeht, lassen sich so Konzentrationen unbekannter Proben ermitteln.

Modellfreie Verfahren stellen den gesuchten Zusammenhang ohne Definition von physikalisch bedeutsamen Parametern dar.

Die Einteilung in überwachte und unüberwachte Methoden basiert auf der Art und Weise, mit der der Zusammenhang mit Kalibrierdaten hergestellt wird.

Überwachte Verfahren verwenden zur Kalibrierung sowohl die Sensorsignale als auch die Konzentrationen eines Kalibrierdatensatzes (Referenzdaten). Die Informationen, die zur Kalibrierfunktion führen, werden durch Vergleich der Sensorsignale und Konzentrationen berechnet. Durch diese Kalibrierfunktion läßt sich auf Eigenschaften unbekannter Daten (Testdaten) schließen.

Unüberwachte Verfahren benötigen zur Kalibrierung nur die Sensorsignale, die nach Merkmalen geordnet werden, die eine Klassifizierung dieser Signale zulassen. Diese Methode arbeitet qualitativ, sowie semiquantitativ.

Tabelle 3: Übersicht über Verfahren zur Mustererkennung und Multikomponentenanalyse.

| Verfahren | Überwachung | Information | Beispiel |
|------------------|--------------------|--------------------|--|
| modellbasiert | unüberwacht | qualitativ | PCA |
| modellbasiert | überwacht | quantitativ | PCR, MLR, PLS |
| modellfrei | unüberwacht | qualitativ | Clusteranalyse, selbstorganisierende Karten |
| modellfrei | überwacht | quantitativ | feed-forward-Netze |

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur qualitativen Analyse eine Hauptkomponenten-Analyse (PCA, principal component analysis) und zur quantitativen Analyse eine Hauptkomponenten-Regression (PCR, principal component regression) durchgeführt. Es handelt sich einerseits um ein modellbasiertes unüberwachtes und andererseits um ein modellbasiertes überwachtes Verfahren.

Eine ausführliche Übersicht zu diesen multivariaten Auswertemethoden ist z.B. in [52, 53, 54] zu finden.

Im Folgenden sollen die eingesetzten Methoden und Begriffe näher erläutert werden:

Hauptkomponentenanalyse, PCA:

Die Verwendung der qualitativen Hauptkomponentenanalyse basiert auf der Notwendigkeit, Ähnlichkeiten innerhalb eines Datensatzes zu erkennen und Merkmale zu extrahieren. Da der Datensatz im allgemeinen aus einer großen Menge an Merkmalsvektoren besteht (Merkmalsvektoren repräsentieren jeweils eine gemessene Probe; Merkmale sind z.B. die Signalhöhen eines Sensors), ist es kaum möglich, solche Zusammenhänge ohne rechnergestützte Hilfsmittel zu erfassen. Enthalten Merkmalsvektoren beispielsweise n Komponenten, so spannen sie einen n -dimensionalen Raum auf. Da möglichst viele Eigenschaften der untersuchten Proben erfaßt werden, sind die Merkmalsvektoren meist hochdimensional. Eine anschauliche graphische Darstellung wird somit unmöglich. Da diese nur in drei Dimensionen möglich ist, muß also eine Datenreduktion erfolgen.

Die Hauptkomponentenanalyse ermöglicht in solchen Fällen die Projektion eines n -dimensionalen Raumes auf einen r -dimensionalen Raum ($n \geq r$).

Hauptkomponenten sind optimale Linearkombinationen, d.h. gewichtete Summen der ursprünglichen Komponenten. Sie sind orthogonal. Bei der Hauptkomponentenanalyse wird durch die Hauptkomponenten ein neues Koordinatensystem aufgespannt; das alte Koordinatensystem wird also transformiert (Orthogonalprojektion).

Dieses Prinzip soll am folgenden Bild veranschaulicht werden.

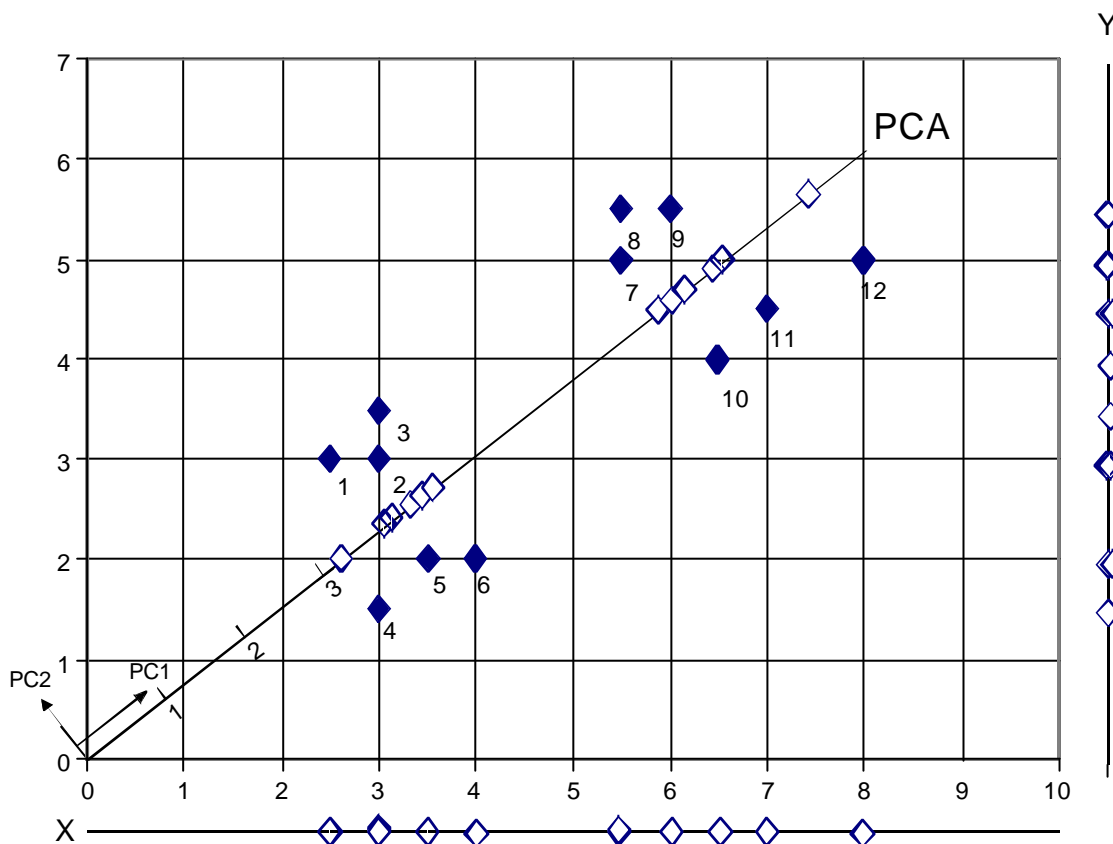


Abbildung 14: Veranschaulichung der Hauptkomponentenanalyse [54].

Abbildung 14 zeigt ein zweidimensionales x - y -Diagramm. Versucht man, diese Daten in einem eindimensionalen Raum zu betrachten, so müssen sie auf eine Gerade projiziert werden. Dies kann nur durch Weglassen einer der beiden Variablen erfolgen. Das Resultat ist am unteren und rechten Rand zu sehen. Die paarweisen Abstände der Datenpunkte werden nicht gut erhalten. Die Hauptkomponentenanalyse versucht nun, eine neue Koordinate zu finden, die diese Abstände am Besten wiedergibt. Diese Koordinate ist im Diagramm mit PC1 bezeichnet. In ihr tritt die größte Varianz bzw. Streuung auf. Die restliche Varianz wird über eine zweite orthogonale Hauptkomponente erfaßt (PC2).

Die Transformation eines höherdimensionalen Datensatzes führt zur Berechnung von Eigenvektoren und Eigenwerten.

Das Ergebnis einer Hauptkomponentenanalyse wird hauptsächlich mit Hilfe zweier Diagrammen dargestellt: Das Scores- und das Loadings-Diagramm.

Scores:

Die Scores beschreiben die Lage eines Objektes entlang der Hauptkomponenten. Sie sind ein Maß für die Klassifizierung unterschiedlicher Objekte. Werden Objekte innerhalb des durch die Hauptkomponenten aufgespannten Raumes diskriminiert, so lassen sich auch die diesen Daten zugrundeliegenden Proben diskriminieren.

Loadings:

Die Loadings beschreiben die Gewichtung der Ausgangsvariablen. Mit ihrer Hilfe lassen sich die Bedeutung eines Sensors für die Kalibrierung und Diskriminierung der Proben abschätzen.

Die Hauptkomponentenanalyse bietet als graphisch orientierte Methode die Möglichkeit, hochdimensionale Daten in einer verminderten Dimensionalität (zwei- oder dreidimensional) darzustellen, wobei die räumlichen Abstände der Daten möglichst erhalten bleiben.

Hauptkomponentenregression, PCR:

Bei der Hauptkomponentenregression wird eine multivariate lineare Regression (MLR) auf den Hauptkomponenten einer PCA durchgeführt. Diese Regression stellt einen linearen Zusammenhang zwischen mehreren unabhängigen Variablen (Eingangsvariablen) und mehreren abhängigen Variablen (Ausgangsvariablen) her. Dies erfolgt über eine Regressionsrechnung, bei der versucht wird, die Reststandardabweichung zu minimieren, welche durch die Abweichung der tatsächlichen Werte von den vorhergesagten zustandekommt. Bei dieser Regression werden lediglich die signifikanten Hauptkomponenten zur quantitativen Vorhersage verwendet, die aus einer Hauptkomponentenanalyse erhalten werden.

Die Hauptkomponenten-Regression führt zur Darstellung eines Vorhersage-Diagramms. Durch die Eingabe eines unabhängigen Datensatzes können Vorhersagen über die Quantität der Daten gemacht werden. Beispielsweise können nach erfolgter Kalibrierung mit bekannten Analytmischungen unbekannte Mischungen klassifiziert und quantifiziert werden.

Ausführlichere Informationen zur Multivariaten Datenanalyse findet sich in [55].

Kapitel 3: Literaturübersicht über Arbeiten anderer Autoren

In den letzten Jahren wurden Schwingquarze zunehmend als Transducer für die Sensorik in der wäßrigen Phase eingesetzt. Dabei können verschiedene Arbeitsgebiete unterschieden werden.

Auf der einen Seite ist dies die Charakterisierung von biologischen Schichten und von Molekülen bzw. deren Wechselwirkungen untereinander (die sogenannte Biosensorik) und auf der anderen Seite die Qualifizierung und Quantifizierung und somit Erkennung von organischen Stoffen mittels mit Erkennungsstrukturen beschichteten Sensorarrays (z.B. Supramoleküle, Polymere...). Dieser Bereich wird meist als Chemosensorik bezeichnet.

3.1. Biosensorik mit Schwingquarzen

Okahata et al. beschrieben thermodynamische und kinetische Parameter der Wechselwirkung von DNA-Strängen mit Komplementär-Strängen und Proteinen unter Benutzung von 9 MHz bzw. 27 MHz Schwingquarzen, die über eine Oszillatorschaltung betrieben wurden. Der Einfluß von Immobilisierungs-Strategie, Kettenlänge, Ionenstärke, Temperatur und Fehlsequenzen auf die Hybridisation [56] von DNA-Strängen und elektrostatischen Effekten auf die Bindung von Proteinen [57, 58] bzw. Oligopeptiden [59] an solche DNA-Stränge konnte quantifiziert werden.

Die Arbeitsgruppe um Thompson untersuchte RNA-Protein-[60], DNA-DNA-[61, 62] und RNA-RNA-Wechselwirkungen [63, 64] mittels eines Netzwerkanalysators, der kontinuierlich die elektrischen Ersatzschaltbild-Parameter des Quarzes bestimmte. Hierdurch konnten verschiedene Effekte wie z.B. strukturelle Umlagerungen der Stränge und damit einhergehende Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften und die Massenänderung bei Anlagerung unterschieden werden [60, 61, 62].

Die Adsorption von Protein Mono- und Multischichten auf Gold- und Platinoberflächen von Schwingquarzen wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie Oberflächenrauigkeit, Oberflächenenergie, Elektrodenpotential und Schicht-Eigenschaften untersucht [65, 66, 67]. Matsumoto et al. beschrieb die Adsorption von Rinderserumalbumin (bovine serum albumine, BSA) auf TiO₂-Oberflächen und die Effekte der Variation von Ionenstärke und pH-Wert. Er fand ein Adsorptionsmaximum bei einem pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins bei sehr niedriger Ionenstärke. Die Adsorption konnte durch Hydrophobisierung der Oberfläche erhöht werden [68].

Rodahl et al. untersuchten die Proteinadsorption mit Hilfe der simultanen Messung der Frequenz und des Energieverlustes. Die so erhaltene Modelstudie wurde mit der Adsorption weiterer biologischer Schichten wie Lipidvesikeln oder Zellen verglichen. Der Energieverlust pro Massenänderung stieg mit abnehmender Rigidität der Schicht an. Der Wassereinschluß in biologischen Schichten hatte den größten Einfluß auf diesen Effekt. [69].

Im Folgenden werden einige ausgewählte immunologische Anwendungen der Schwingquarz-Sensorik zusammengefaßt:

Schwingquarze wurden verwendet, um das Bakterium *chlamydia trachomatis* nachzuweisen. Dazu wurde der entsprechende Bakterien-Antikörper auf einen Schwingquarz immobilisiert und die Bakterienkonzentration in Urinproben bestimmt [70].

Der Nachweis eines Proteins des Afrikanischen Schweinefiebers über einen immobilisierten spezifischen Antikörper gelang Uttenthaler et al. [71]. Der Sensor konnte über einen Zyklus von 20 Regenerationen und 30 Tagen verwendet werden. Auch durch physisorptive Anbindung des Virusproteins und den Nachweis des entsprechenden Antikörpers konnten infizierte und virusfreie Proben unterschieden werden [72, 73].

Elektrische und viskoelastische Eigenschaften von epithelialen und endothelialen Zell-Monolagen konnten durch die Kombination von Impedanz-Analyse und Schwingquarzen von Steinem et al. bestimmt werden [74]. Hierbei wurde die frequenzabhängige Impedanz von Goldelektroden untersucht, die mit Lipiddoppelschichten funktionalisiert waren. Mit Hilfe von angepaßten Ersatzschaltbildern wurden die elektrischen Eigenschaften und mit Hilfe von Schwingquarzmessungen die viskoelastischen Eigenschaften bei der Bindung verschiedener Toxine an die Membran bestimmt.

Tessier et al. untersuchten die Bindung von menschlichen Erythrozyten bzw. IgG auf mit Antikörpern funktionalisierten Schwingquarzoberflächen. Die Reaktion des Quarzes auf die Bindung von Zellen beruhte hauptsächlich auf viskoelastischen Effekten, während sie bei Bindung von IgG Masseneffekten zugeschrieben wurde [50].

Gerade bei Zellen, die mit Hilfe des Schwingquarzes analysiert werden sollen, treten die Schwierigkeiten auf, daß das Signal des Sensors nicht nur mit der Änderung der Masse auf der Oberfläche korreliert werden darf, sondern insbesondere mit der Änderung der viskoelastischen Eigenschaften im Bereich der Oberfläche [69, 75, 76].

3.2. Chemosensorik mit Schwingquarzen in flüssiger Phase

Die Chemosensorik mit Schwingquarzen hat einen deutlich geringeren Anteil an forschenden Gruppen zu verzeichnen, als vergleichsweise die Biosensorik. Hier liegt die Erkennung von Stoffen mittels organischer Käfigstrukturen und Polymeren im Vordergrund.

Haupt et al. [77] berichteten über einen mit einem enantioselektiven „imprinted-polymer“-beschichteten 5-MHz-Schwingquarz, der in der Lage war, die Enantiomere des β -Blockers Propanolol zu unterscheiden. Die dafür verwendete sensitive Polymerschicht wurde aus Monomeren der Form Methacrylsäure bzw. Methacrylat im Beisein des nachzuweisenden enantiomerenreinen Analyten S-Propanolol hergestellt. Nach UV-Quervernetzung wurde das Templat herausgewaschen.

Der Selektivitätskoeffizient für die beiden Enantiomere, der sich aus dem Verhältnis der Selektivitäten des Templatmoleküls zu der des Enantiomeren ergibt, betrug $S_S/S_R = 5$. Der Sensor arbeitete reversibel; die Detektionsgrenze lag bei $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

Chance et al. [78] zeigten, daß sich durch die Verwendung von Polymeren, die gute Quelleigenschaften aufweisen, eine enorme Sensitivitätssteigerung erreichen läßt. Durch solche Polymere lassen sich Frequenzänderungen bei Analytzugabe im Bereich von einigen kHz detektieren. Als Beschichtung verwendeten sie Cholestyramin, ein Styren-Divinylbenzen-Copolymer, der Analyt stellte das Antibiotikum Cefoperazon dar. Die Analyse erfolgte diskontinuierlich in einer Zelle mit ruhendem Probenvolumen innerhalb etwa einer Stunde. Die Wiederverwendbarkeit des Sensors wurde durch mehrere Waschprozeduren gewährleistet.

Hauptmann et al. [79, 80] untersuchten organische Verunreinigungen in Trink- und Meerwasser. Als Beschichtungen verwendeten sie unpolare Polymere wie Polybutadien oder modifizierte Polysiloxane (Polydimethylsiloxan mit 25% Cyanopropyl- und 25% Phenylgruppen), sowie zum Vergleich verschiedene Calixarene. Das Vorhandensein von Salzen im Meerwasser hatte auf die Sensoren keinen großen Einfluß.

Die Detektionsgrenzen für chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe und Aromaten lagen im oberen ppb- bis unteren ppm-Bereich.

Meist werden Schwingquarze mit Polymerbeschichtungen aber zur Untersuchung der Eigenschaften des jeweiligen Polymers verwendet [22]. Daraus ergeben sich neue Ansätze für

die Entwicklung immer komplexerer Ersatzschaltbilder des schwingenden Systems aus sensitiver Schicht und Transducer [15, 29].

Kapitel 4: Experimenteller Teil

4.1. Materialien und Chemikalien

Sensoren

Die Quarzeinkristallrohlinge wurden von der Firma RSG Electronic Components, Offenbach bezogen. Sie waren hochpoliert, flach, hatten einen Durchmesser von 8,5 mm, eine Resonanzfrequenz von 10 MHz, und waren AT-geschnitten.

Das zum Aufdampfen der Elektroden verwendete Gold wurde freundlicherweise von der Firma Degussa AG als Spende zur Verfügung gestellt. Titan als Haftvermittler stammte von der Firma Goodfellow, Bad Nauheim.

Kontaktfederstifte

Zum Kontaktieren der Quarzelektroden wurde Kontaktfederstifte der Firma Feinmetall GmbH, Herrenberg (Abmessungen: Länge: 11 mm, Dicke: 0,6 mm, Kopfform: rund) verwendet.

Frequenzzähler

Die Resonanzfrequenzen der Sensoren wurden mittels eines Frequenzzählers der Firma Hewlett-Packard (HP 53132A) bestimmt. Impedanzkurven wurden mit einem Impedanzanalysator der Firma Hewlett-Packard (4192) aufgenommen.

Die verwendeten Oszillatorschaltungen (siehe Kap. 8.1.2) sind Weiterentwicklungen der Schaltungen von Dr. G. Nötzel (Arbeitskreis Prof. Göpel, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Tübingen).

FIA

Für den Aufbau der Meßanlage wurden zwei HPLC-Ventile der Firma Valco Instruments, Schenck (CH) verwendet; von dort wurden auch die verschiedenen Fittings und Ferrules und Flußteiler bezogen. Das 3-Wege-Injektionsventil (Modell C2-2006EH, chemiinert) war auf schnelles Umschalten optimiert, das 8-Wege-Ventil (Modell C5-2008EMT, chemiinert) wurde als automatisches Probengeberventil verwendet.

Die Durchflußpumpen, die den Fluß durch die Anlage und das Aufziehen der Probenlösungen gewährleisten, sowie die Pumpschläuche (Tygon R3603) stammen von der Firma Ismatec, Wertheim-Mondfeld.

Der Thermostat (Modell HD-4), der die gesamte Meßapparatur auf $\pm 0,01$ K temperierte, wurde von der Firma Julabo, Seelbach hergestellt.

Druckgas

Der Vordruck von 1,5 bar wurde durch Argon 4.8 der Firma Messer-Griesheim, Krefeld eingestellt. Weiterhin wurde Argon 4.8 zur Reinigung und Trocknung der Sensoren verwendet.

Piranha

Mischung aus 3-4 Teilen konzentrierter Schwefelsäure und einem Teil 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung.

Polymere

Die verwendeten Polyketone wurden im Arbeitskreis Prof. Lindner, Institut für Anorganische Chemie, Universität Tübingen, hergestellt.

Cyclopeptide

Die verwendeten Cyclopeptide wurden im Arbeitskreis Prof. Jung, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen, synthetisiert.

Pufferlösungen

Alle Pufferlösungen wurden aus den entsprechenden Grundchemikalien der höchsten Reinheit mit destilliertem Wasser hergestellt: TRIS (Paesel-Lorei-GmbH, Frankfurt); HEPES (Sigma-Aldrich, Steinheim); Natriumhydrogenphosphate (Fluka, Neu-Ulm).

Antikörper

Antikörper (BS 66, Maus-IgG3) für die Blutgruppentest wurden freundlicherweise von der Firma Biotest-AG, Dreieich zur Verfügung gestellt.

Erythrozytenlösung

Zur Bestimmung der Blutgruppen wurden gereinigte Erythrozytenlösungen in PBS verwendet, die freundlicherweise von Prof. Northoff, Transfusionsmedizin der Uniklinik Tübingen, zur Verfügung gestellt wurden.

Protein A und BSA

Protein A und BSA wurden von der Firma ICN, Eschwege bezogen.

Lösungsmittel

Alle Lösungsmittel und organische Analysesubstanzen wurden aus der Produktreihe Uvasol der Firma Merck bezogen.

REM

Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen wurden mit einem DSM 926 der Firma Zeiss, Oberkochen angefertigt.

AFM

Die AFM-Bilder wurden mit einem Nanoscope III A von Digital Instruments, Darmstadt aufgenommen

Mikroskop

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem BX 60 der Firma Olympus, Hamburg angefertigt.

Kontaktwinkel

Die Kontaktwinkel-Messungen erfolgten an einem CAM200 der Firma KSV Instruments, Helsinki.

4.2. Methoden und Einflüsse

4.2.1. Quarz

Die in dieser Arbeit verwendeten Quarzresonatoren werden industriell aus Quarzeinkristallen hergestellt. Durch verschiedene Schnittwinkel (Abbildung 15) erhält man aufgrund der Kristallstruktur Quarzplättchen mit unterschiedlichen Eigenschaften (Abbildung 16). So zeichnet sich z.B. der AT-Schnitt durch seine Temperaturstabilität aus, die einen solchen Quarz zum Einsatz als Frequenznormale prädestiniert. Schnitte, bei denen das Schwingverhalten des Quarzplättchens stark von der Temperatur abhängt (z.B. XT-Schnitt), befähigen den Schwingquarz zum Einsatz als Temperatursensor.

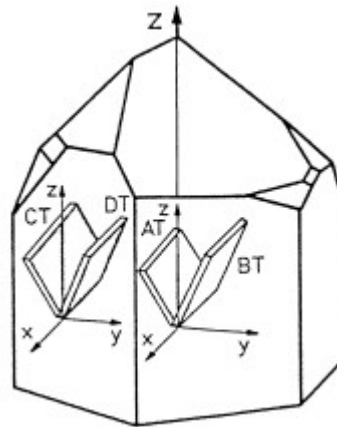


Abbildung 15: Ausschnitt aus einem Quarzeinkristall mit Lage einiger Quarzschnitte (AT: 1-250 MHz, BT: 1-30 MHz, CT: 300-1000 kHz, DT: 180-400 kHz).

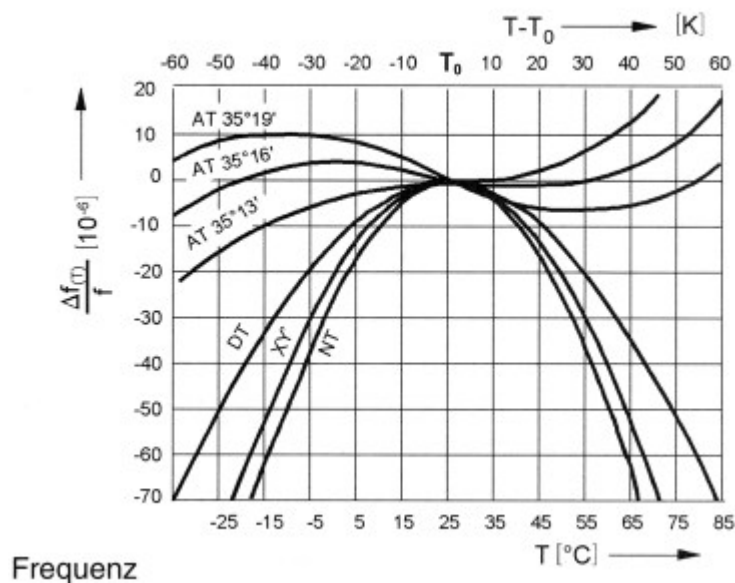


Abbildung 16: Temperaturgang der Frequenz für verschiedene Quarzschnitte.

4.2.2. Quarzhalter

Das Prinzip der Quarzmikrowaage auf Basis des Dickenschwingers stellt eine horizontale Scherwelle auf der Fläche der auf dem Quarz befindlichen Goldelektroden dar. Da diese Scherwelle sich aber auch über die Elektrodenfläche fortsetzt, ist es erforderlich, den Quarz in einem sogenannten Sensorchip so weit außen wie möglich zu befestigen. Dadurch wird eine übermäßige Dämpfung der Wellenbewegung am besten verhindert. In Abbildung 17 ist schematisch die Verteilung der Schwingungsamplitude der Scherschwingung bei verschiedenen Schwingquarzformen gezeigt [8, 81].

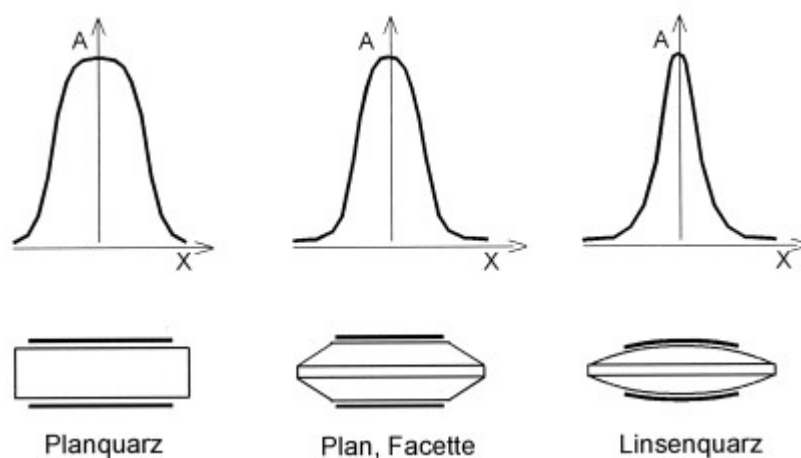


Abbildung 17: Verteilung der Schwingungsamplitude unterschiedlicher Schwingquarzformen.

Der Sensorchip spielt für den späteren Gebrauch des Sensors eine wichtige Rolle: Er soll einfach herzustellen sein, muß robust und unkompliziert verwendbar sein und es sollen möglichst keine chemisch instabilen Komponenten verwendet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Formen und Größen von Sensorhalterungen untersucht und optimiert.

Der letztendlich eingesetzte optimierte Quarzhalter ist in Abbildung 18 (unten rechts) und Abbildung 19b dargestellt. Er besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen: Dem Quarzhalter aus Edelstahl, auf dem der eigentliche Sensor mit einem O-Ring aus Fluorkautschuk fixiert wird, und einem Einsatz aus Plexiglas, der die zur Kontaktierung der beiden Elektroden nötigen vergoldeten Federkontakt-Stifte voneinander isoliert und den Quarz gegen den O-Ring drückt. Die frei schwingende Fläche des Sensors hatte einen Durchmesser von 7,5 mm. Dies bedeutet, daß 1,25 mm Platz zwischen der Elektrode und der Fixierung besteht. Dies bewirkt kleinstmögliche Dämpfung der exponentiell abfallenden akustischen Scherwelle.

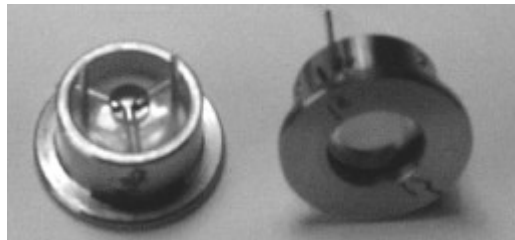
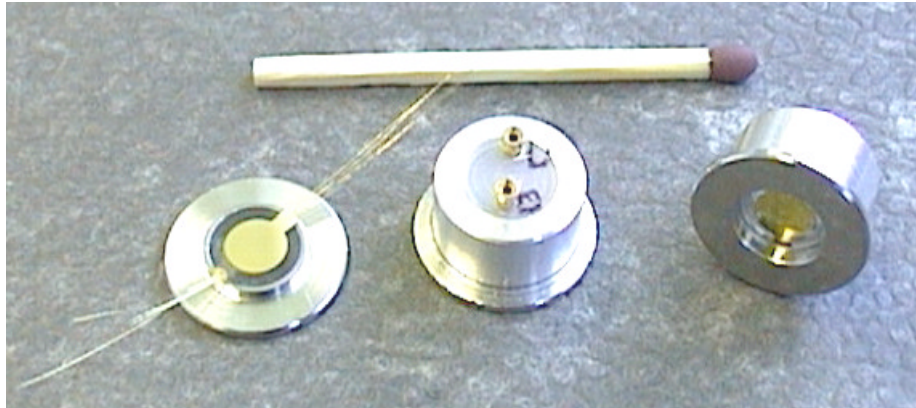


Abbildung 18: *Quarzchip; links oben: frisch bedampfter Quarz mit Goldkontaktbändchen; Mitte: gekapselter Quarz mit Kontaktstiften; rechts: Meßvolumen auf der Unterseite des Chips; unten: optimierter Chip mit Federkontaktstiften und O-Ring-Klemmung.*

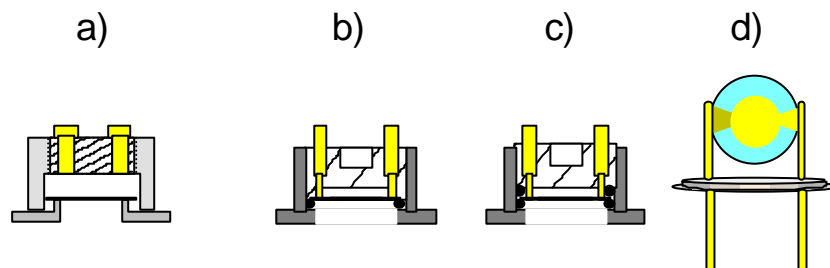


Abbildung 19: *Verschiedene Versionen von Schwingquarzhaltern: a) abgekapselter Chip mit aufgeklebtem Quarz, b) abgekapselter Chip mit einfacher O-Ring-Pressung, c) abgekapselter Chip mit doppelter O-Ring-Pressung, d) Quarzhalter für die Gasphase.*

Diese Optimierung läßt sich am Admittanzspektrum zeigen (Abbildung 20):

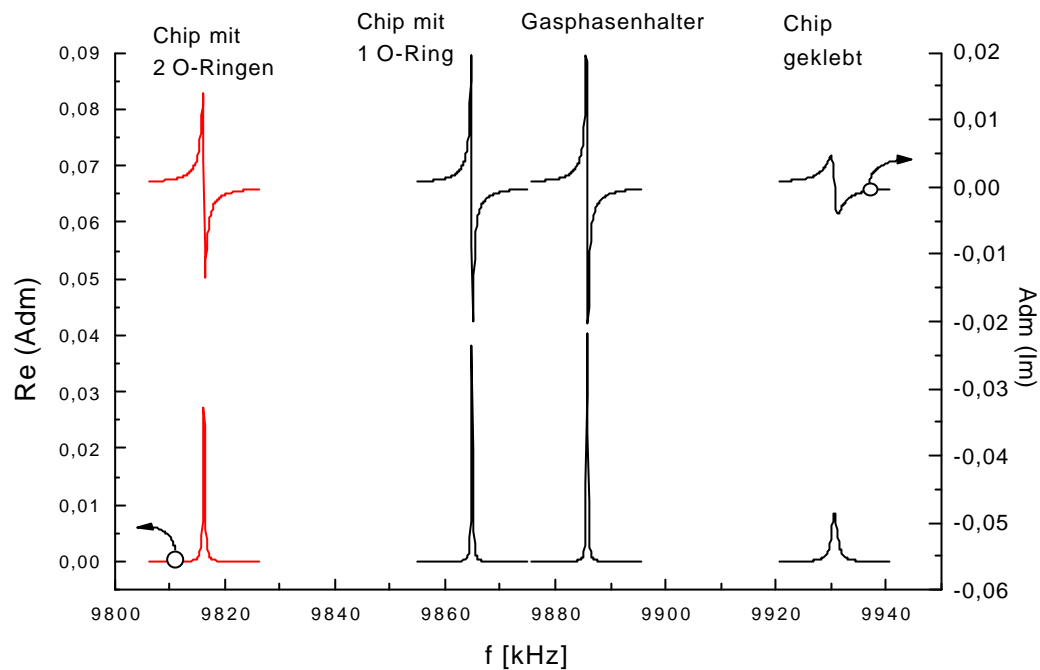


Abbildung 20: Real- und Imaginärteil der Admittanz für verschiedene Sensorchips.

In Abbildung 20 ist der Realteil der Admittanz für Quarze, die in unterschiedlichen Sensorhaltungen befestigt sind, an Luft gezeigt. Es zeigt sich deutlich, daß der Sensorchip, in dem der Quarz mittels Epoxid-Kleber fixiert wurde, eine verbreiterte Kurve und ein niedrigeres Maximum hat. Der Quarz ist hier relativ starr über den Kleber fixiert. Die beiden Kurven, bei denen der Quarz über O-Ringe fixiert wurde, unterscheiden sich nur noch wenig von der Kurve, bei der der Quarz in einem Gasphasenhalter für Schwingquarze hängt (siehe Abbildung 19).

Betrachtet man zusätzlich die Q-Faktoren dieser Quarze, die ein Maß für die Güte des Quarzes darstellen, so ist auch hier ersichtlich, daß ein geklebter, starr fixierter Quarz deutlich schlechter ist, als die durch O-Ringe flexibel gelagerten Sensoren (Tabelle 4). Durch die starre Fixierung ist auch der Ersatzschaltbildparameter R , der ein Maß für die Dämpfung des Quarzes bzw. der Scherwelle im Quarz darstellt, im Vergleich zu den elastisch fixierten Quarzplättchen stark erhöht.

Tabelle 4: Q-Faktoren und Ersatzschaltbildparameter R für verschiedene untersuchte Quarzhalter.

| Halter-Version | Q-Faktor | R (Maß für Dämpfung) |
|-----------------------|-----------------|-----------------------------|
| 2-O-Ring-Halter | 25677 | 36,2 |
| 1-O-Ring-Halter | 38832 | 24,8 |
| Gasphasenhalter | 38030 | 24,4 |
| geklebter Chip | 8129 | 115,2 |

Die Meßwerte wurden über Impedanzmessungen erhalten. Durch eine Fit-Routine, die die Impedanzkurve an die einzelnen Meßwerte anpaßte, wurden die Ersatzschaltbildparameter R , C , L , C_0 sowie der Q-Faktor berechnet. Da die erhaltenen Parameter allerdings von Quarz zu Quarz etwas unterschiedlich waren, sind diese Werte nur Richtgrößen. Wird ein Quarz in einer dieser Halterungen in Kontakt mit Wasser gebracht, so sinkt der Q-Faktor durch die Dämpfung auf einen Wert von etwa 1900 (geklebter Quarz) bzw. 2500 (O-Ring Quarz).

4.2.3. Sensorkontaktierung

Bei der Entwicklung der Sensorchips mußte notwendigerweise auch das Problem der Kontaktierung der beidseitigen Elektroden des Quarzplättchens gelöst werden. Im Hinblick auf eine spätere industrielle Verwendung solcher Chips war es erforderlich, Kontaktierungsmethoden zu verwenden, die sich später maschinell ausführen lassen.

Anfänglich wurden Kontaktbänder aus Gold mit Hilfe von leitfähigen Epoxidklebern aufgeklebt. Diese hatten allerdings den Nachteil, daß sie einerseits nicht genügend haltbar waren und andererseits eine zu große Fläche des Quarzes verklebten. Auch war es schwierig, die untere Elektrode zu kontaktieren, ohne daß der metallene Quarzhalter elektrisch mit der Elektrode in Kontakt kam. Die weitere Entwicklung führte zur Kontaktierung mit durch Ultraschall-Bonden aufgebrachte Golddrähten bzw. Goldbändern. Durch diese Methode wurde eine direkte Goldverbindung hergestellt, die die Elektroden spannungsfrei mit Kontaktfahnen versah. Allerdings war diese Methode größeren mechanischen Zugbelastungen nicht gewachsen.

Als beste und einfachste Methode wurde schließlich die Kontaktierung durch vergoldete Federkontaktstifte verwendet. Diese Stifte wurden von einer Seite durch den Chipmantel auf

die Kontaktflächen der oberen und unteren Elektrode gedrückt, wobei durch die Federung eine zu starke mechanische Belastung verhindert wurde.

Der elektrische Kontakt der unteren Elektrode zur Kontaktfläche auf der oberen Quarzseite wurde über eine kleine Leitsilberschicht um die Quarzkante herum gewährleistet. Dieser Schritt kann durch einen zusätzlichen Schritt während der Goldbedampfung ersetzt werden, indem der Quarz seitlich nochmals mit Gold bedampft wird.

4.2.4. Meßanlage

Um das für eine Mustererkennung nötige Sensor-Array zu realisieren, wurden vier gleiche Meßzellen konstruiert, die in einen Thermostatisier-Mantel aus Messing eingebettet waren (Abbildung 21 und Abbildung 22). Durch diesen Mantel floß Wasser als Temperierflüssigkeit. Innerhalb des Mantels befanden sich außer der Meßzelle noch die Oszillatorschaltung zur Schwingungsanregung der Quarze und ein Temperaturregler für den Thermostaten.

Das thermostatisierte Volumen wurde so minimiert; Schwankungen der Umgebungstemperatur können schneller ausgeglichen werden.

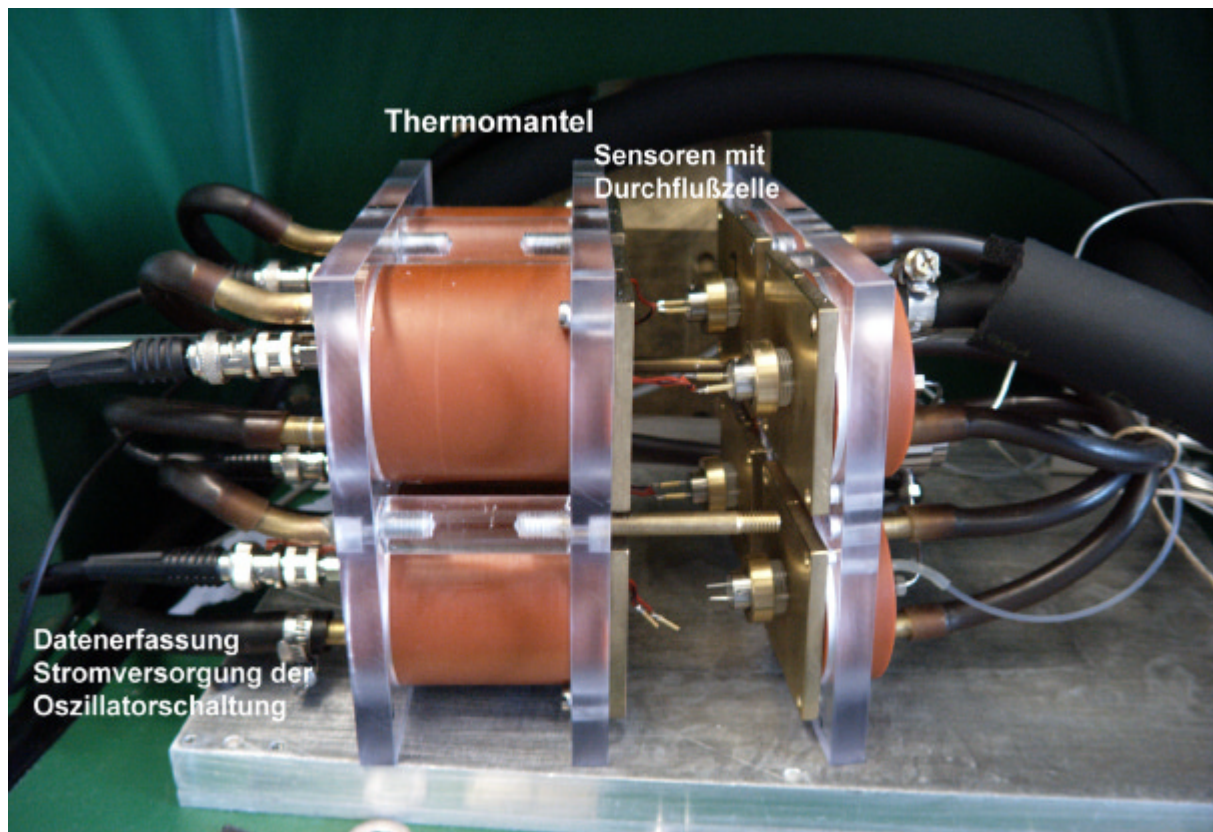


Abbildung 21: Photographie des verwendeten thermostatisierten Meßaufbaus. Er besteht aus zwei Hälften, die nach Einbau der vier Sensoren zusammengeschoben werden.

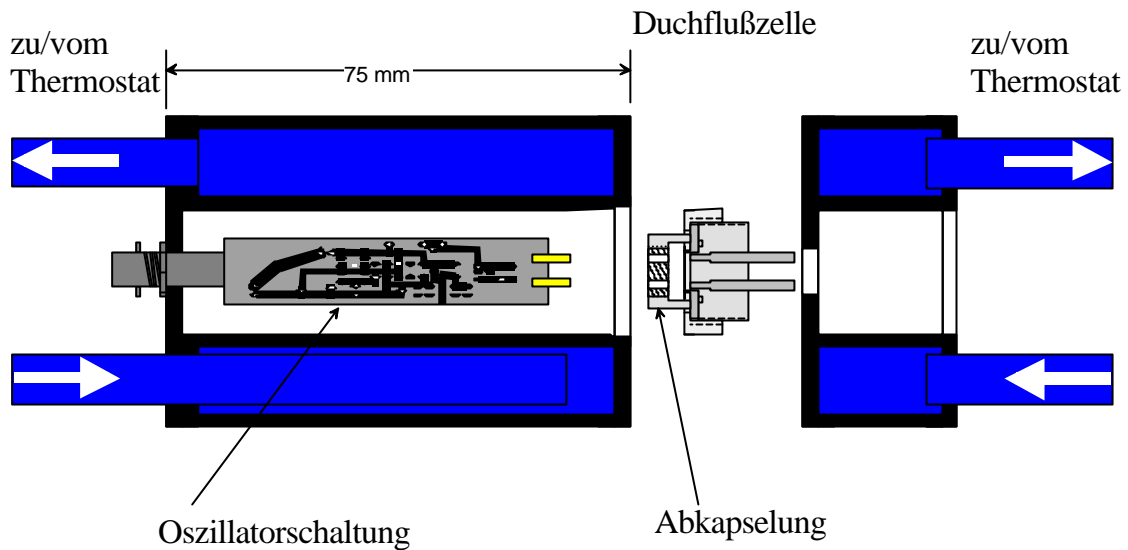


Abbildung 22: Schematische Ansicht einer thermostatisierten Meßzelle. Vier solcher Zellen wurden zu einem Array zusammengefaßt.

Die gesamte Meßanlage ist schematisch in Abbildung 23 dargestellt. Die Ansteuerung und Datenerfassung erfolgte über einen Computer mit Hilfe eines eigens für diesen Aufbau geschriebenen Meßprogramms unter HP-VEE. Hiermit ließen sich automatisch die Ventile und Pumpen zu jeder beliebigen Zeit schalten. Die Datenerfassung über den Abtaster, der die vier Transducer ansteuert, erfolgte in Zeitabständen von etwa sechs Sekunden. Die Daten und das Meßprotokoll wurden als ASCII-Datei gespeichert.

Die in der linken Flasche befindliche Vorratsflüssigkeit wurde unter einen Argon-Überdruck von etwa 0,5 bar gesetzt. Dieses sollte die Bildung von Luftblasen in den Kapillaren verhindern und stellte den für den Durchfluß nötigen Flüssigkeitsstrom zur Verfügung. Dieser Strom wurde durch die hinter der Meßzelle liegende peristaltische Pumpe in der Geschwindigkeit reguliert. Durch die Anordnung der Pumpe nach der Meßzelle wurden Verschleppungen vermieden, die durch Anreicherungen von Analyten in den flexiblen Schläuchen auftreten können.

Über ein Acht-Wege-Ventil konnten acht verschiedene Analyt-Mischungen mittels einer Probenschleife variablen Volumens über die Sensoren gegeben werden.

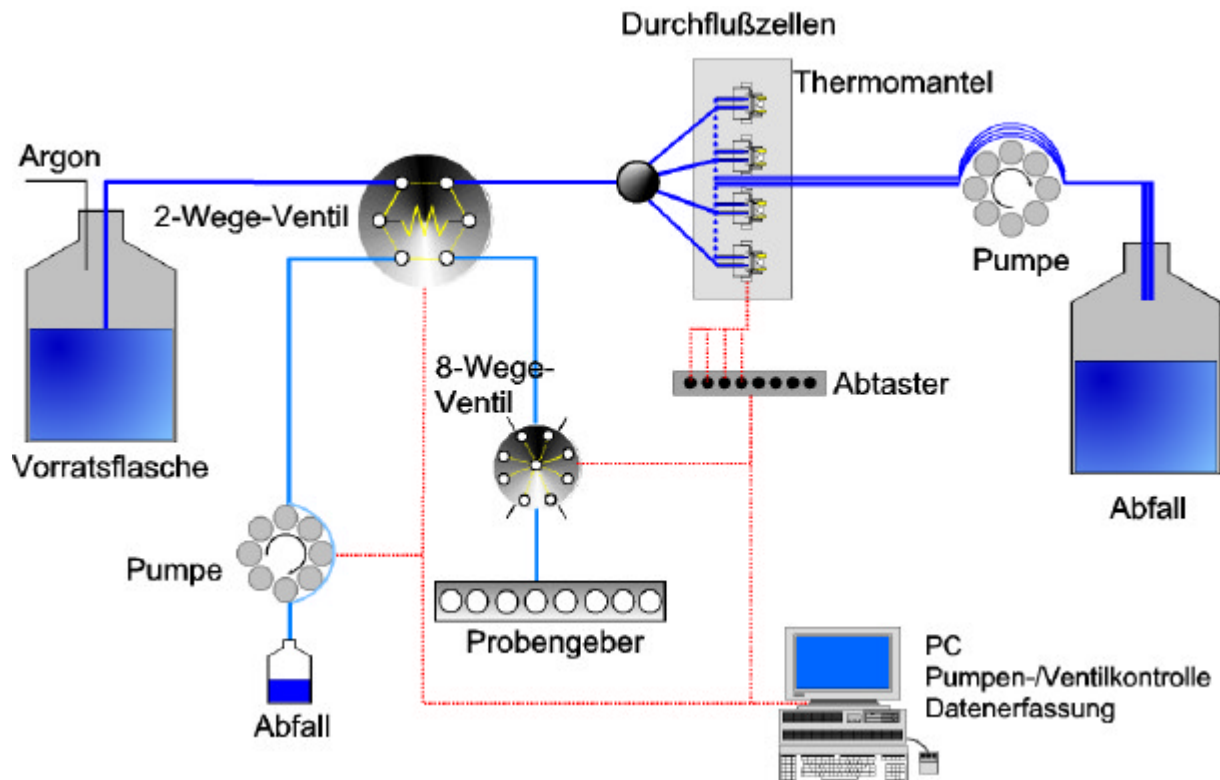


Abbildung 23: Schematische Ansicht der gesamten FIA-Meßanlage. Die Ansteuerung und Datenerfassung erfolgt über einen Computer mit Hilfe eines eigens für diesen Aufbau geschriebenen Meßprogramms unter HP-VEE.

Der Durchmesser der zur Flußregulierung verwendeten Pumpschläuche hat einen Einfluß auf die kurzfristigen Schwankungen der Frequenz der Schwingquarze. In Abbildung 24 ist dieses Rauschen für drei verschiedene Pumpschläuche gezeigt. Das kleinste Rauschen trat hier bei Schlauchdurchmessern von 250 μm auf. Die Durchflußraten betragen etwa 45-50 μl pro Minute.

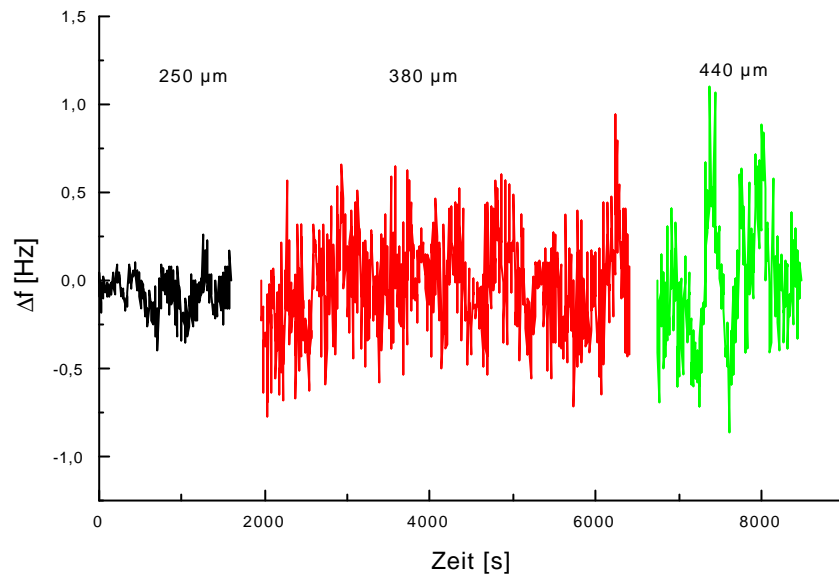


Abbildung 24: *Frequenzrauschen bei verschiedenen Pumpschlauchdurchmessern (250 μm , 380 μm und 440 μm , Durchflußrate: 45 $\mu\text{l}/\text{min}$, 46 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 50 $\mu\text{l}/\text{min}$)*

4.2.5. Meßprogramm

Da die Frequenzerfassung von vier Meßzellen über den verwendeten Frequenzzähler (HP 53132A) nicht möglich war (es standen nur 2 Eingänge zur Verfügung), wurde ein Scanner eingesetzt, der vier Kanäle durchschalten kann. Zur Ansteuerung dieses Scanners samt Meßanlagensteuerung und Datenerfassung wurde ein entsprechendes Meßprogramm in HP-VEE programmiert. So wurde erreicht, daß alle vier Kanäle innerhalb 6 Sekunden ausgelesen werden können. Dies ist wichtig, wenn schnelle Reaktionskinetiken oder Einlagerungsreaktionen untersucht werden sollen.

Die einfache Steuerung des Programms und der Meßanlage macht es so möglich, daß auch unerfahrene Benutzer Messungen durchführen können.

4.2.6. Sensorherstellung

Für den Einsatz als Sensor in der Flüssig-Phase müssen Schwingquarze mit sensitiven Beschichtungen belegt werden, die einerseits leicht aufzubringen sind und andererseits wasserstabil sind und nicht abgewaschen werden. Als Grundlage für diese Beschichtungen diente jeweils eine Goldschicht, die über einen Haftvermittler (Titan) in einer Ultrahochvakuum-Apparatur direkt auf die polierten Schwingquarzrohlinge aufgedampft wurde.

4.2.6.1. Sensorbeschichtung

Der Quarz-Rohling wurde mindestens 4 Stunden in Piranha-Lösung eingelegt. Danach wurden je drei Quarze mindestens dreimal im Ultraschallbad mit Reinstwasser gespült und im Argonstrom getrocknet. Die drei Quarze wurden in eine spezielle Aufdampfhalterung (Abbildung 25) geschraubt und in die UHV-Kammer eingeschleust.

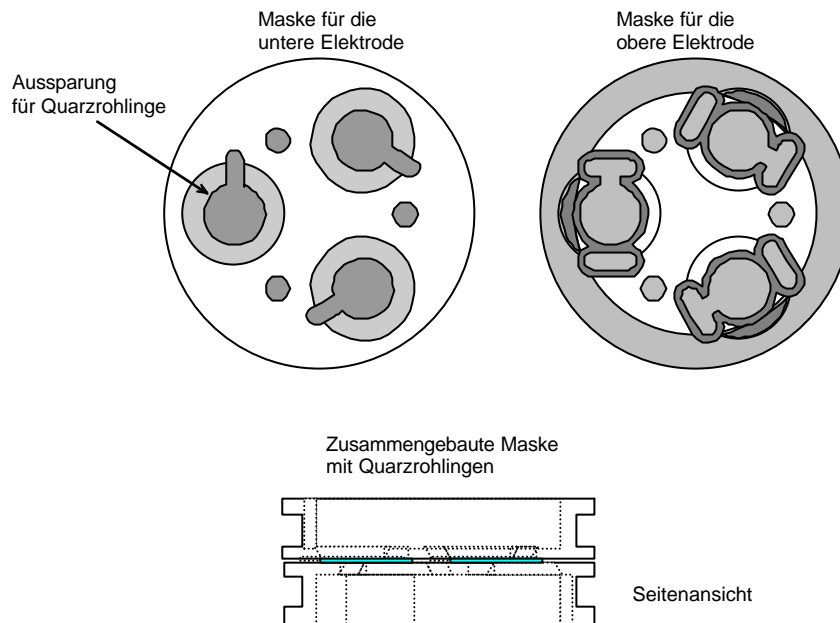


Abbildung 25: Maske zum Aufdampfen der Goldelektroden der verwendeten Schwingquarze.

Nach 12 stündigem Erhitzen auf etwa 450°C, wobei eventuell flüchtige Adsorbate entfernt werden sollten, wurde eine ca. 5 nm dicke Schicht aus Titan aufgedampft, das als Haftvermittler für das Gold diente. Nach Aufdampfen einer ca. 100-120 nm dicken Goldschicht wurde der Probenhalter umgedreht und die Prozedur wiederholt. Danach wurden die frisch bedampften Schwingquarze ausgeschleust und im Bedarfsfall mit Kontaktdrähten aus Gold (Dicke: 50 µm) versehen.

Die Goldschichten wurden mit Atom-Kraft-Mikroskopie charakterisiert. In Abbildung 26 ist diese Oberfläche abgebildet.

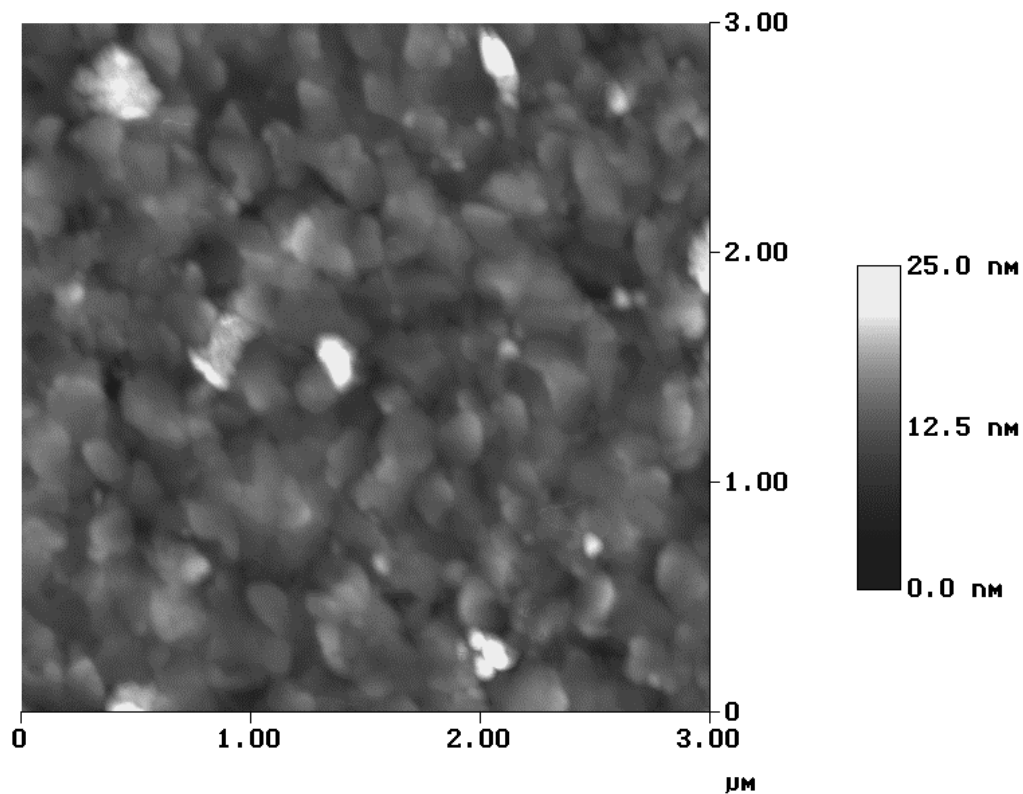


Abbildung 26: *AFM-Bild der auf einen Schwingquarz aufgedampften Goldelektrode. Die Aufnahme wurde im Tapping-Modus mit einer Scan-Rate von 0,8 Hz mit 512 x 512 Pixeln aufgenommen.*

Dargestellt ist ein 3x3 μm großer Ausschnitt der Goldelektrode. Durch eine Rauigkeitsanalyse wurde eine mittlere Rauigkeit der aufgedampften Goldschichten von 2,4 nm ermittelt. Die Rauigkeit errechnete sich aus der Standardabweichung vom Mittelwert der Oberfläche.

Je höher die Rauigkeit der Elektrode auf der Oberfläche, desto mehr wird der Quarz durch eingelagertes Wasser in diesen Mikrokavitäten gedämpft. Dies verschlechtert die Qualität der Oszillation [13, 17, 25, 26].

In Abbildung 27 ist die Kante der Goldelektrode gezeigt. Mittels AFM wurde hier die Dicke der Goldelektrode mit 96 nm ermittelt.

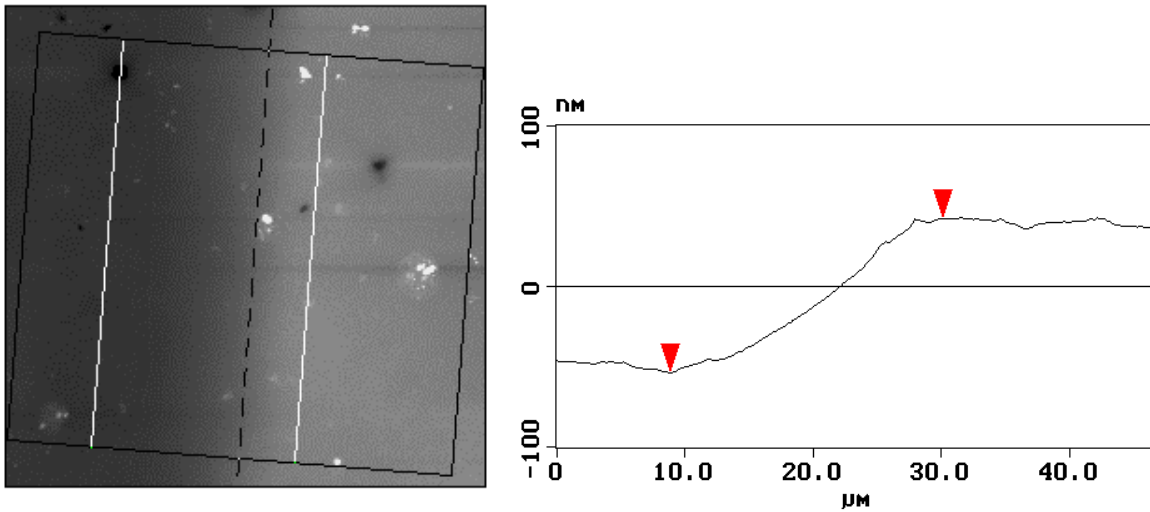


Abbildung 27: AFM-Bild der aufgedampften Gold-Elektroden; links: Übergang Quarz-Gold, rechts: Höhenprofil.

Die Oberflächenbeschaffenheit der Goldschicht ist wichtig für das Schwingverhalten des späteren Sensors [25, 26]. In Abbildung 28 ist der Vergleich eines industriell hergestellten Schwingquarzes (Firma KVG) mit einem nach dem im Abschnitt 4.2.6.1 beschriebenen Verfahren hergestellten Sensors gezeigt. Man erkennt deutlich das höhere Grundrauschen des industriell hergestellten Quarzes.

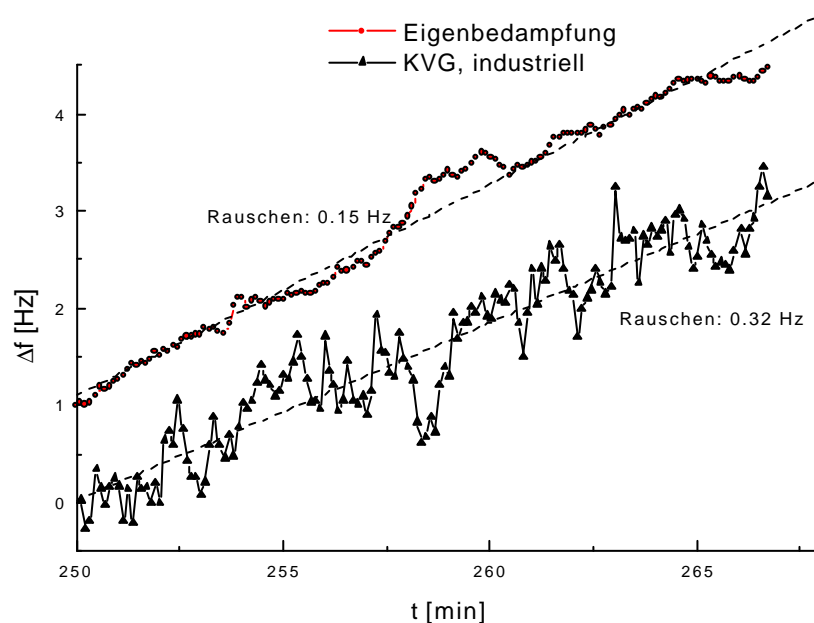


Abbildung 28: Vergleich des Grundrauschens eines industriell hergestellten Quarzes (dreieckig: Firma KVG) mit einem selbst bedampften Quarz (gepunktet, Rohling: Firma RSG).

4.2.6.2. Polymere - Polyketone¹

Die verwendeten Polymere wurden im Arbeitskreis Lindner typischerweise nach folgender Vorgehensweise synthetisiert:

20,0 mg ($2,58 \cdot 10^{-5}$ mol) des Katalysators 1 wurden in 100 ml Dichlormethan und 2 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde in einen 250 ml Stahlautoklaven mit mechanischem Rührer eingebracht und in 20 min mit Propen gesättigt. Danach wurde Kohlenmonoxid auf 60 bar aufgepreßt. Die Polymerisationszeit betrug 24 h bei 25 °C. Durch Verdampfen des Lösungsmittels wurde 2,96 g Propen/CO-Copolymer erhalten.

Die Aktivität des Katalysators betrug 45 g Polymer/(g_{Pd}) h). Die Reinigung des Polymers erfolgte durch Auflösen in 50 ml Dichlormethan, Filtration über eine kurze Kieselgelsäule und anschließender Ausfällung in 300 ml Methanol. Nach Abdekantieren des Methanols wurde das Polymer am Vakuum getrocknet.

Von den erhaltenen Polymeren wurden zur Reinheitskontrolle NMR-Spektren aufgenommen und die Glas temperatur bestimmt. Im Falle des Propen-CO-Copolymers lag beispielsweise die Glas temperatur bei 5°C.

In Abbildung 29 sind zwei Katalysatoren gezeigt, die zur Polymerisation von Kohlenmonoxid mit Olefinen verwendet wurden.

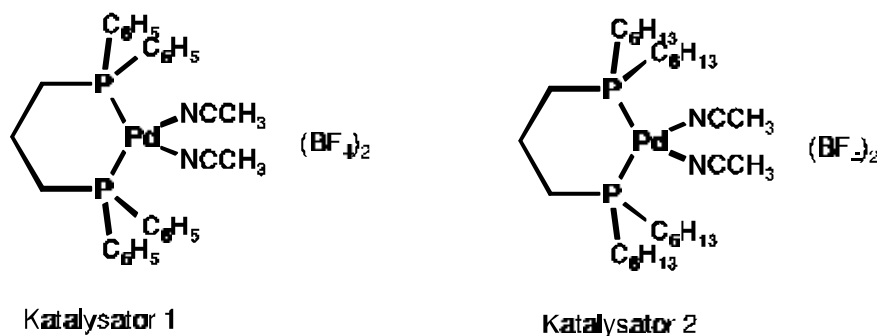


Abbildung 29: Struktur der bei der Synthese verwendeten Palladiumkatalysatoren.

Die Präparation der Polymerschichten auf den Sensoren wurde wie folgt durchgeführt:

Die unterschiedlichen Polymere wurden in Dichlormethan (im Falle der hydrophileren Polymere wurde Ethanol verwendet) gelöst und mit Hilfe einer Airbrush-Pistole und Stickstoff auf die Oberfläche des Quarzes gesprüht. Während dieses Prozesses wurde die

¹ Die verwendeten Polymere wurden im Arbeitskreis Prof. Lindner von Dipl. Chem. Dr. Markus Schmid und Dipl. Chem. Dr. Joachim Wald synthetisiert.

Frequenzabnahme des Schwingquarzes verfolgt, um die Dicke der Beschichtungen zu kontrollieren. Beispielsweise ergab eine Frequenzverstimmung von 10 kHz beim Auftragen von PCO (Propen-CO-Copolymer) eine Schichtdicke von etwa 1 μm (Abbildung 30).

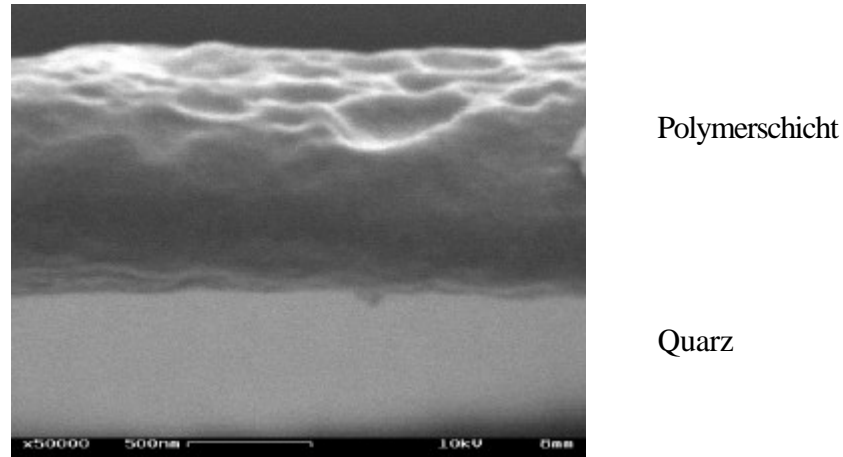


Abbildung 30: Ansicht des Querschnitts anhand einer Bruchkante eines mit Propen-CO-Copolymer beschichteten Schwingquarzes.

Im Folgenden werden die verwendeten Polymere mit den in Abbildung 31 beschriebenen Abkürzungen bezeichnet. Einzige Ausnahme der Copolymere ist PyCO; dieses Polymer wurde aus drei Monomeren (Terpolymer) polymerisiert. Zusätzlich zum Pyrenderivat wurde Propen mit CO terpolymerisiert.

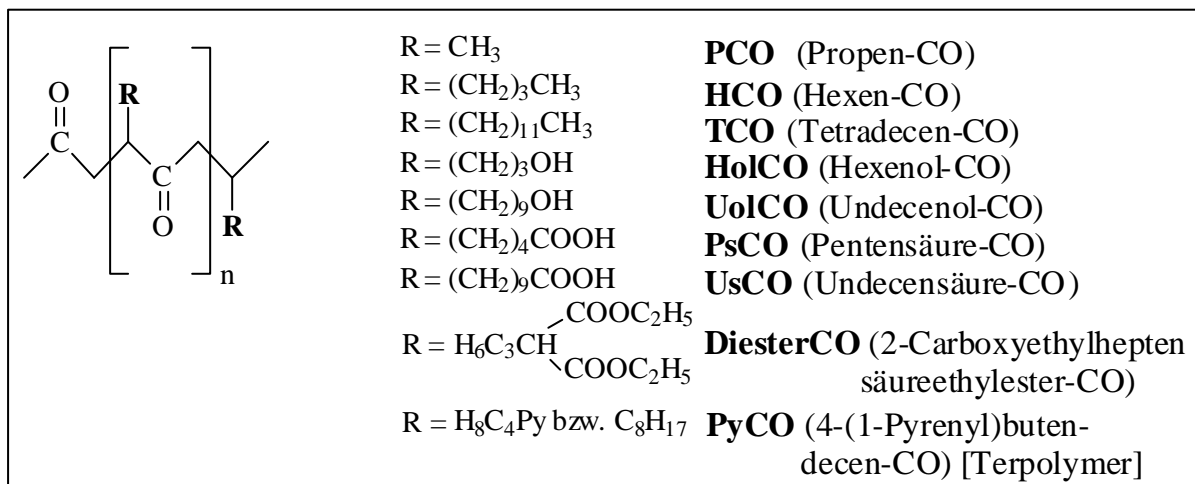


Abbildung 31: Kurzbezeichnung der untersuchten Polymere vom Polyketon-Typ.

Eigenschaften

Die Oberflächenspannung ist ein wichtiger Parameter bei Benetzungsvorgängen, Adhäsion und Adsorption. Sie wird durch die chemische Zusammensetzung der Oberfläche bestimmt, wobei sich diese von der Zusammensetzung im Inneren des Feststoffs deutlich unterscheiden kann. Die Festkörper-Oberflächenspannung lässt sich durch Kontakt- oder

Randwinkelmessungen bestimmen. Für Kunststoffoberflächen läßt sich die Oberflächenspannung in unpolare und polare Anteile aufteilen, wenn man Randwinkelmessungen mit verschiedenen Flüssigkeiten durchführt.

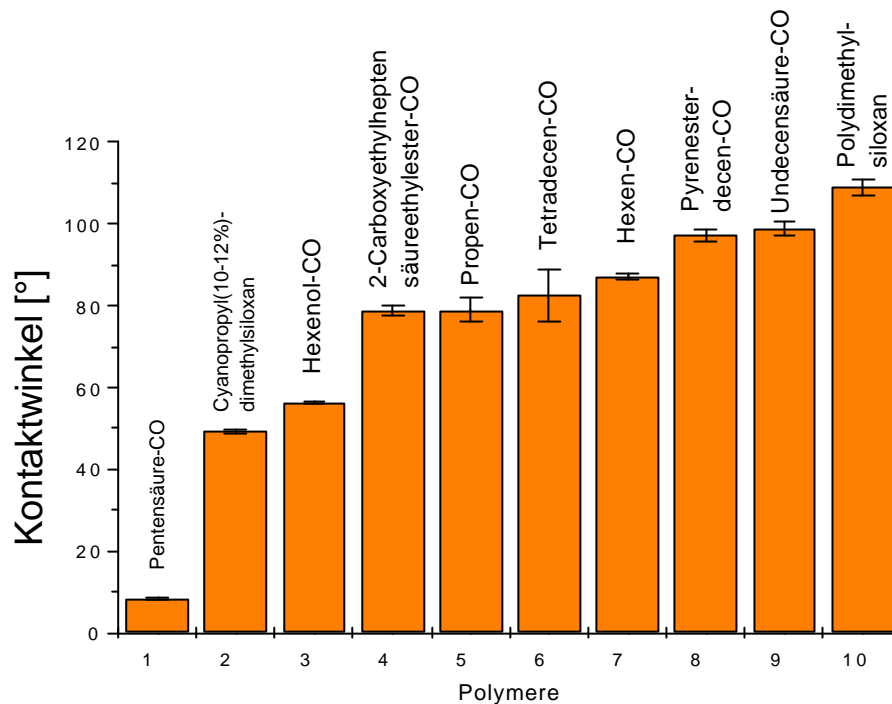


Abbildung 32: Kontaktwinkel bei Benetzung der verwendeten Polymere mit einem Wassertropfen.

Zur Klassifizierung der Polymere hinsichtlich ihrer Hydrophilie wurden Kontaktwinkelmessungen an einem Wassertropfen durchgeführt. Hierbei wird der Winkel des Wassertropfens mit der Oberfläche bestimmt, der auf der zu untersuchenden Oberfläche liegt. Je nach Größe des Winkels unterscheidet man zwischen hydrophiler (Kontaktwinkel im Bereich $\ll 50$) und hydrophober (Kontaktwinkel $\gg 50$) Oberfläche. In Abbildung 32 ist dieser Kontaktwinkel für die untersuchten Polymere sowie für zwei Vergleichspolymere (Polydimethylsiloxan und Polycyanopropyl(10-12%)-dimethylsiloxan) aufgetragen. Wie zu erwarten ist, liegen die Kontaktwinkel für die Polymere mit kurzen Ketten und funktionellen Gruppen (Pentensäure-, Hexenol-CO-Copolymer und Cyanopropylsiloxan) im unteren hydrophilen Bereich. Die Kontaktwinkel für Polymere mit mittleren Kettenlängen und hydrophoben Seitenketten (Propen-, Hexen-, Tetradecen- und 2-Carboxyethylheptensäureethyl-ester-CO-Copolymere) bewegen sich im Bereich um 80° , was auf eine mäßig hydrophile Oberfläche schließen läßt [82]. Für die Polymere mit langen hydrophoben Seitenketten ergeben sich erwartungsgemäß hohe Kontaktwinkel. Dies entspricht einer hydrophoben Oberfläche.

Zur Charakterisierung der Aufnahmefähigkeit von Wasser wurden zeitaufgelöste Kontaktwinkelaufnahmen angefertigt (Abbildung 33). Je besser sich ein Polymer mit Wasser vollsaugen kann, desto schneller nimmt es Wasser aus dem Tropfen auf. Der Kontaktwinkel verschiebt sich dabei zu kleineren Winkeln, da das Tropfenvolumen sinkt.

Es zeigte sich, daß die hydrophilen und mittel-hydrophilen Polymere (Hexenol-CO, Propen-CO, Hexen-CO, Tetradecen-CO) ein rasches Quellverhalten besitzen; innerhalb von 6-12 Sekunden sättigte sich der Polymerfilm mit Wasser. Die lineare Abnahme des Kontaktwinkels nach dieser Quellphase ist hauptsächlich auf eine gleichmäßige Verdunstung zurückzuführen. Die hydrophoben Polymere zeigen ein langsames Quellverhalten. Es stellte sich erst nach mehr als einer Minute eine Sättigung ein (Abbildung 34).

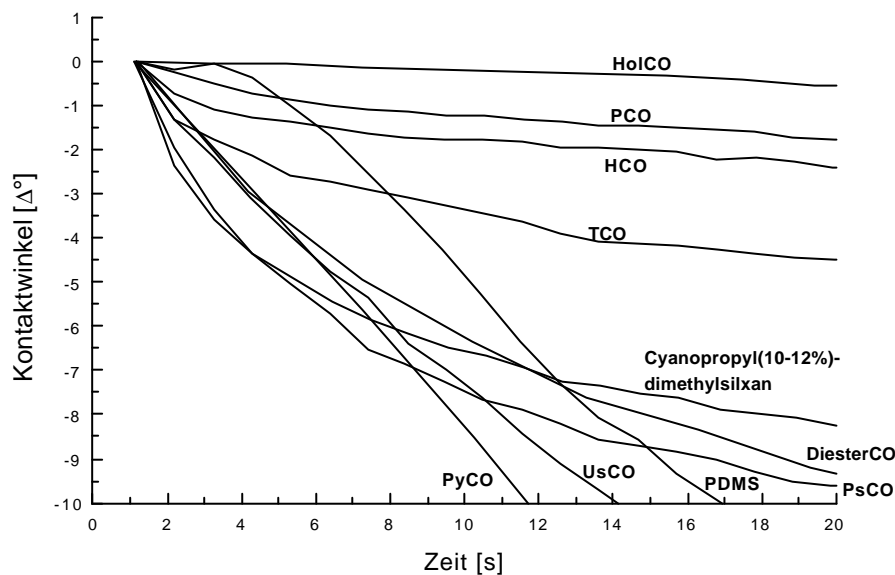


Abbildung 33: Zeitaufgelöste Kontaktwinkelmessungen der verwendeten Polymere.

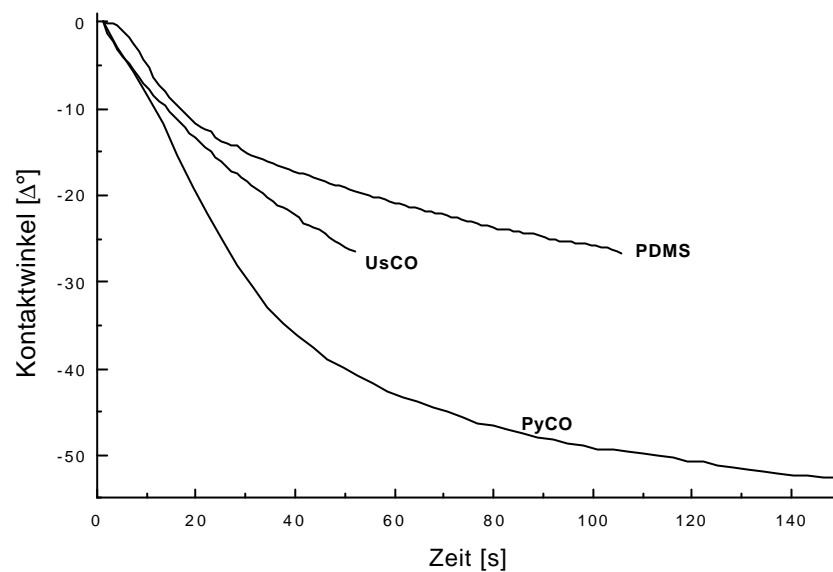


Abbildung 34: Langzeitmessung der Abnahme des Kontaktwinkels bei den hydrophoben Polymeren.

4.2.6.3. Sol-Gel Schichten

Diese Polymerschichten wurden auf dem Sensor nach dem Sol-Gel-Verfahren hergestellt. Um eine Polymerisation der eingesetzten Monomere auf der Goldelektrode des Sensors zu ermöglichen, ist eine mit entsprechenden funktionellen Gruppen modifizierte Oberfläche nötig. Als reaktive Gruppe wird für den Sol-Gel Prozeß eine aktivierte Silangruppe benötigt.

Die Präparation² lief nach folgendem Schema ab:

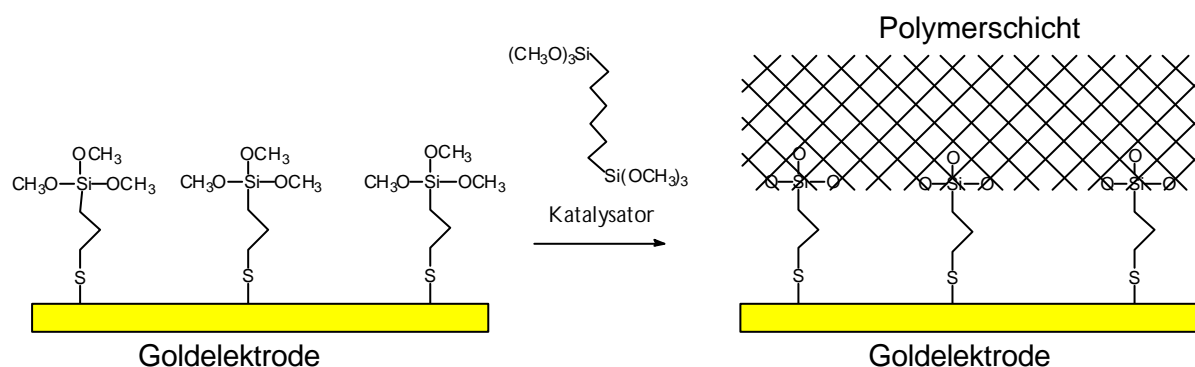


Abbildung 35: Schema des Sol-Gel Prozesses an der Sensoroberfläche.

Die Präparation verlief direkt auf den in ihre Halterung eingebauten Sensoren.

Zuerst wurde eine Monolage Mercaptopropyltrimethoxysilan in absolutierter ethanolischer Lösung (etwa 5 mM) ca. 24 Stunden lang immobilisiert. Dadurch wurde die kovalente

² Die Präparation der Schichten erfolgte in Kooperation mit Dipl.Chem. Elisabeth Holder im Arbeitskreis Prof. Lindner

Anbindung der später aufpolymerisierten Schicht an die Goldelektrode erreicht. Diese Monolage stellt den Ausgangspunkt für den weiteren Sol-Gel Prozeß dar.

Nach mehrmaliger Reinigung der Goldelektrode wurde der Sensor in die Sol-Gel Prozeßlösung getaucht. Aus einer Stammlösung von 4 ml Ethanol, ca. 30 mg Silanmonomer und 10 µl Katalysator ($n\text{-Butyl}_2\text{Sn}(\text{OAc})_2$) wurden 50 µl Prozeßlösung entnommen. Diese Lösung wurde auf die zu beschichtende Fläche gegeben. Zum Starten der Reaktion wurde eine Spur Wasser hinzugegeben. Der Prozeß wurde nach etwa 16 Stunden abgebrochen und die Oberfläche mit Ethanol mehrmals gereinigt. Um eine vollständige Quervernetzung innerhalb der Schicht zu erreichen, wurde der Sensor für 20 Stunden bei ca. 40-50°C getempert.

Im Falle der auf Silizium synthetisierten Polymere wurde die Oberfläche mehrere Stunden in frischer Piranha-Lösung aktiviert und dann direkt der Sol-Gel-Prozeß durchgeführt. Eine Funktionalisierung der Oberfläche war hier nicht notwendig.

4.2.6.4. Cyclopeptide³

Die Synthese der entsprechenden Cyclohexapeptide wurde nach dem in Abbildung 36 aufgeführten Schema durchgeführt. Nach der automatischen Synthese der entsprechenden seitenkettengeschützten linearen Peptidsequenz auf dem Tritylchlorid-Harz wird dieses durch Hexafluorisopropanol vom Harz abgespalten und mittels dem Kupplungsreagenz TBTU cyclisiert. Nach Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mittels Trifluoressigsäure liegt das cyclische Peptid in Lösung vor, wird mit Diethylether gefällt und mit Standardmethoden aufgearbeitet [83].

³ Die Synthesen der Cyclopeptide wurden im Arbeitskreis Prof. Jung von Dipl.Chem. Dr. Dietmar Leipert durchgeführt.

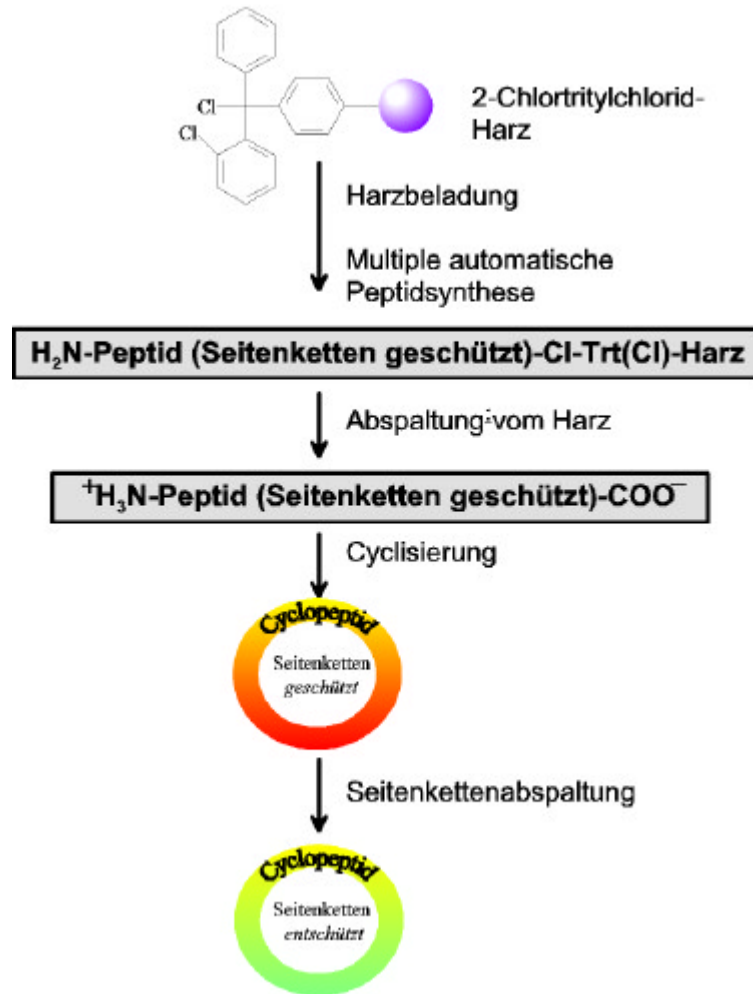


Abbildung 36: Schema der Synthese der verwendeten cyclischen Peptide.

Die in dieser Arbeit untersuchten cyclischen Peptide wurden nach dieser klassischen Methode hergestellt. Sie wurden mittels Massenspektrometrie, XPS-Messungen, STM-Messungen und Kontaktwinkelmessungen charakterisiert [83, 84].

In Abbildung 37 sind die chemischen Strukturen der untersuchten Cyclohexapeptide aufgeführt.

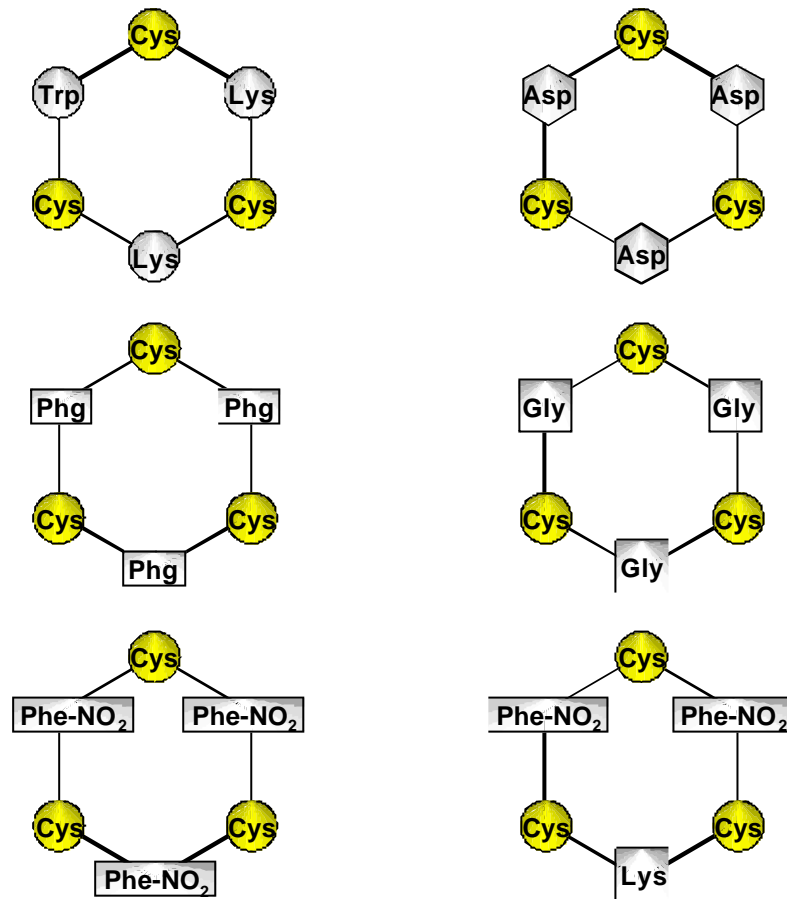


Abbildung 37: Chemische Strukturen der untersuchten Cyclopeptide. Die verwendeten Abkürzungen entsprechen der internationalen 3-Buchstaben-Konvention.

Zur Präparation der sensitiven Schichten wurden die Cyclopeptide in einer Mischung aus Reinstwasser und Acetonitril in Lösung gebracht. Danach wurde das Cyclopeptid gerade so zum Ausfallen gebracht, um das thermodynamische Gleichgewicht in der Richtung Adsorption auf die Goldoberfläche zu verschieben. Die frisch aufgedampften Sensoren wurden für zwei Stunden bei 50°C aufrecht in diese Lösung gestellt. Die aufrechte Lage soll verhindern, daß ungelöste Bestandteile sich nicht auf den Elektroden ablagern. Danach wurde mehrmals mit Dichlormethan und Acetonitril gespült und mit Argon getrocknet.

Mit diesen Cyclopeptiden wurden Kraftfeld- und Molekulardynamikrechnungen durchgeführt⁴. Um den Mechanismus der Einlagerung der mit Schwingquarzen untersuchten Analyten besser zu verstehen, wurde deren Wechselwirkungsenergie mit den auf der Oberfläche befindlichen Cyclopeptiden mit den Programmen *Cerius2* und *Discover* berechnet. Die Cyclopeptide waren in diesen Rechnungen zunächst auf Graphitoberflächen

⁴ Die Kraftfeld- und Molekulardynamikrechnungen wurden von Frau Dipl.Chem. Dr. Christiane Stingel durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

gebunden. Dafür wurde das implementierte Kraftfeld *CFF91* verwendet, das speziell für Peptide entwickelt wurde. Die Strukturen der Cyclopeptide wurden durch Variation der Anbindungsabstände am Graphit bestimmt. Mit dem Programmteil *Discover* wurde die Cyclohexapeptide mittels Molekulardynamik auf 293 K erwärmt und danach die Struktur im Energieminimum (0 K) neu berechnet. Blieb die Energie nach mehreren Dynamik- und Minimierungsrechnungen konstant, wurde diese Struktur zur Bestimmung der Bindungsenergien mit den entsprechenden Analyten verwendet.

Kritisch angemerkt werden muß allerdings, daß bei solchen Rechnungen verschiedene Parameter nicht mit der Realität übereinstimmen:

- Die wäßrige Umgebung wurde nur über die Struktur und Ladung der berechneten Moleküle berücksichtigt; Wasser selbst wurde nicht in die Rechnungen einbezogen.
- Die Oberfläche war Graphit, im Gegensatz zur Goldoberfläche der Messungen.
- Die Rechnungen wurden bei 0 K durchgeführt.

Für eine grobe Abschätzung der Wechselwirkungen können diese Fehler aber in Kauf genommen werden.

In Abbildung 38 ist die Struktur eines mit solchen Methoden berechneten Cyclopeptids auf Graphit gezeigt. Man erkennt, daß in dieser energetisch minimierten Form die Phenylringe der Phenylalanine senkrecht zum Peptidring stehen und sich annähernd senkrecht zu den übrigen Phenylringen stellen.

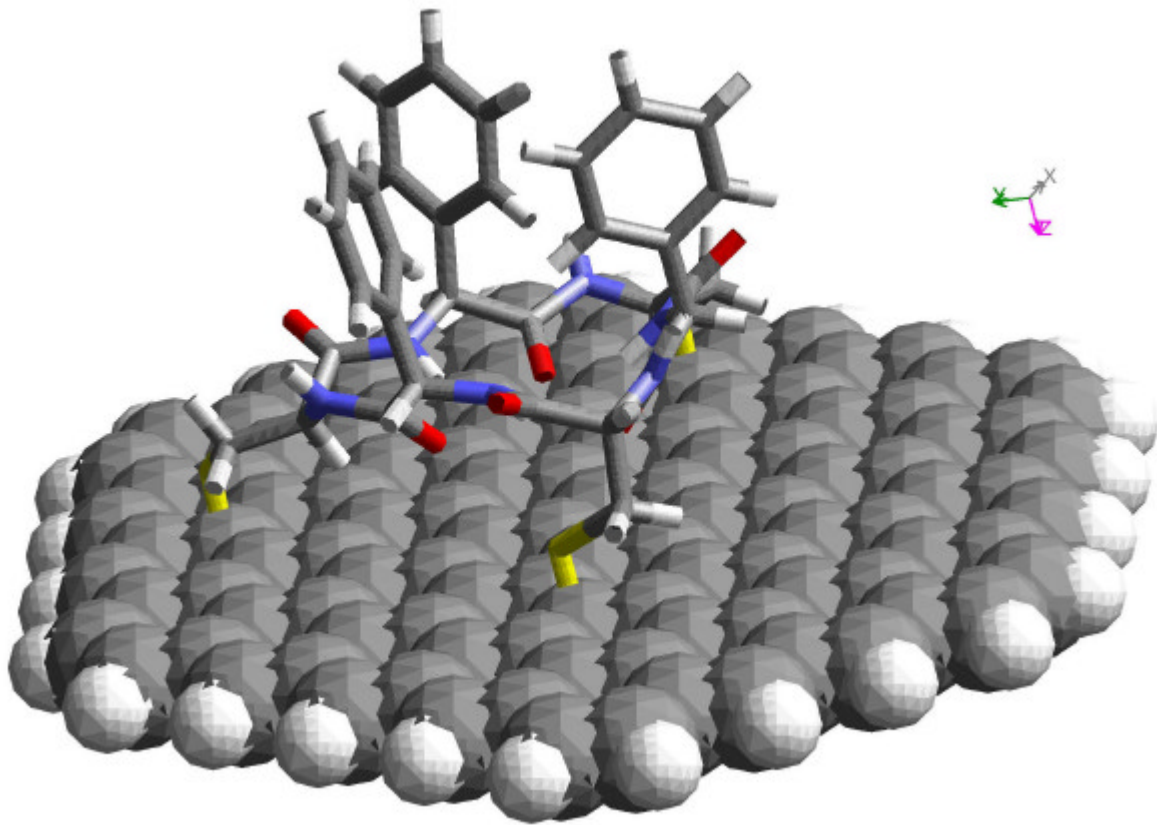


Abbildung 38: Darstellung des Cyclohexapeptid $c[\text{Cys-Phe}]_3$ auf Graphit (aus Kraftfeldrechnungen).

4.2.6.5. Antikörper⁵

Zur Blutgruppenbestimmung wurden Schwingquarze mit Antikörperbeschichtungen hergestellt. Hierbei wurde auf der frisch aufgedampften Goldelektrode eine Schicht aus Protein A physisorbiert. Protein A hat die Eigenschaft, spezifisch Immunglobuline binden zu können: 50 μl einer Lösung von Protein A in PBS (2 mg/ml) wurden auf die Quarzoberfläche gegeben. Nach 2 Stunden wurde die Oberfläche mit Reinstwasser gewaschen und 50 μl der Antikörperlösung auf den Quarz gegeben. Nach mindestens 30 Minuten wurde der Quarz mit Reinstwasser gespült.

Die Belegung mit Antikörper kann entweder direkt durch Aufgeben von Anti-A-Lösung auf die Sensoroberfläche oder durch Belegung in einer FIA-Anlage erfolgen, wobei die Belegung als Änderung der Schwingungsfrequenz des Sensors direkt mitverfolgt werden kann.

⁵ Die Messungen mit Antikörpern wurde in Kooperation mit Dipl.Chem. Reiner Krapf durchgeführt.

4.2.7. Datenauswertung

Die Auswertung der jeweiligen Sensorsignale wurde in den überwiegenden Fällen manuell vorgenommen, da so Störeinflüsse durch z.B. Signalschwankungen aufgrund von Druckschwankungen, elektrischen Impulsen oder mechanischen Erschütterungen am besten ausgeglichen werden konnten. Das Vorgehen soll hier kurz beschrieben werden:

Mit Hilfe einer Basislinien-Korrektur wurde der Sensordrift vom Sensorrohsignal subtrahiert (Abbildung 39a+b). Gleichzeitig wurden so Sprünge in der Basislinie beseitigt. Die Sensorsignale wurden dann als Differenz des Minimums des Signals zur Basislinie erhalten (Abbildung 39c).

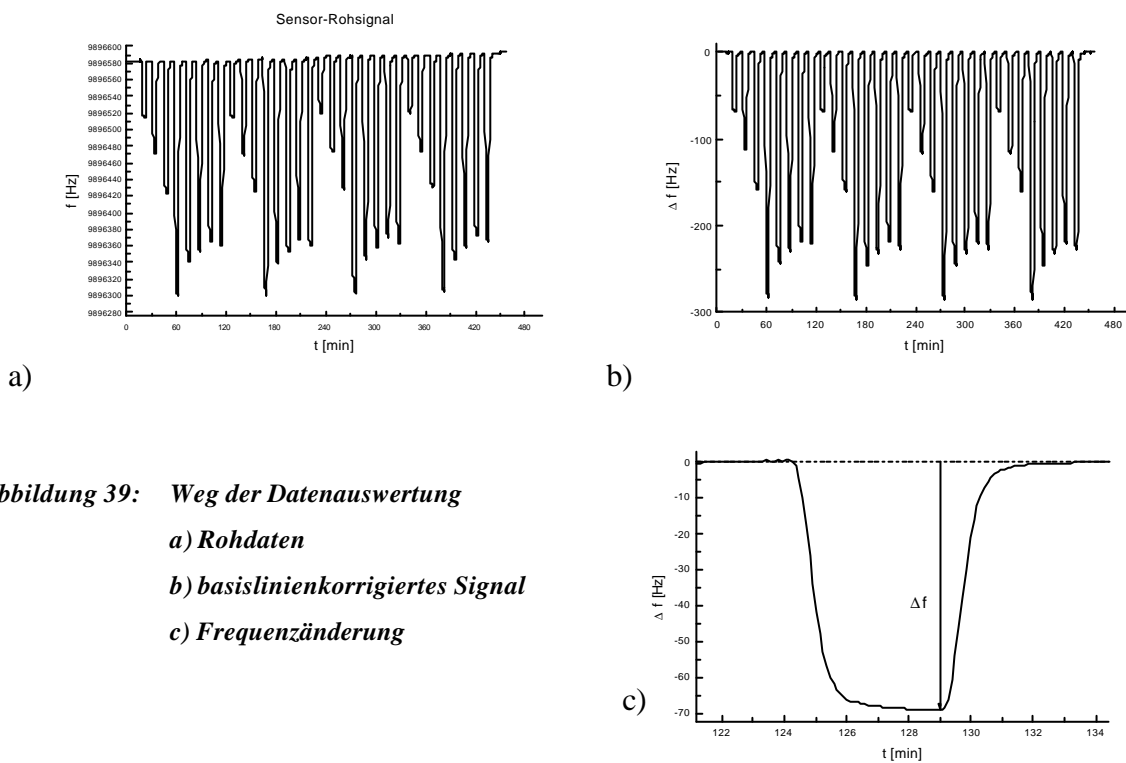


Abbildung 39: Weg der Datenauswertung

a) Rohdaten

b) basislinienkorrigiertes Signal

c) Frequenzänderung

Kapitel 5: Ergebnisse und Diskussion

5.1. Polyketone

5.1.1. Schichtdicke

Die Dicke der sensitiven Schicht auf der Transduceroberfläche beeinflusst in großem Maße die Leistungsfähigkeit einer Stoffbestimmung mit einer Schwingquarzmessung. Je dicker die Schicht ist, um so mehr Analyt kann in ihr aufgenommen werden und um so sensitiver wird der beschichtete Sensor. Mit zunehmender Schichtdicke verlängern sich allerdings auch die Analysenzeiten, da der Analyt längere Zeit benötigt, um in die Schicht hinein- und wieder herausdiffundieren zu können. Auch wird die Resonanzschwingung des Schwingquarzes durch höhere Massenbeladung stärker gedämpft. Bei starren dicken Schichten kann es zum Verlust der Scherschwingung kommen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Schichtdicke der Polymerschichten auf die Größe und Form des Sensorsignals bei Zugabe eines in Wasser gelösten Analyten (hier Toluol) wurden Sensoren mit PCO (Propen-CO-Copolymer) beschichtet. Die Beschichtungsdicke wurde über die Änderung der Resonanzfrequenz während des Beschichtens mit 7 kHz und 13 kHz eingestellt. Dies entspricht etwa einer Dicke von 0,7 μm und 1,3 μm .

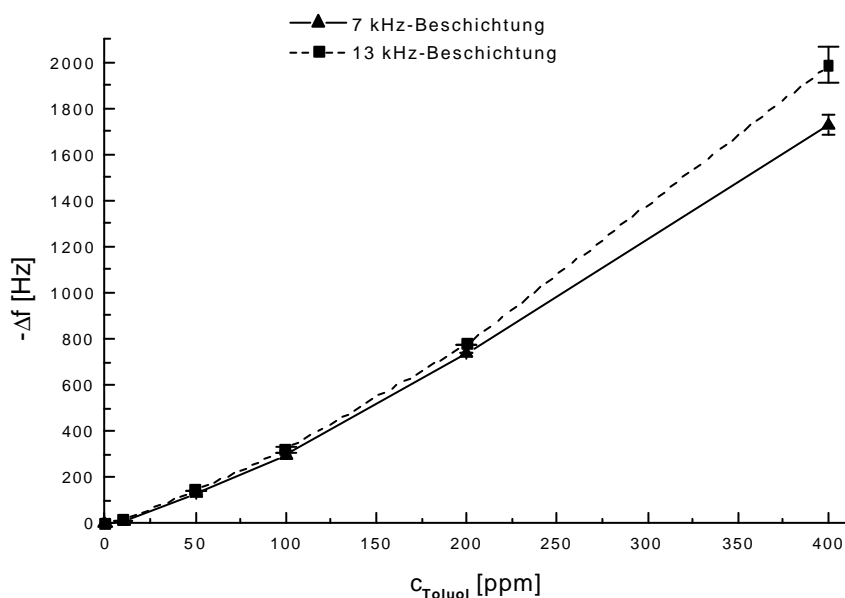


Abbildung 40: Kalibrierkurven zweier mit PCO beschichteten Sensoren bei Zugabe von geringen Mengen an Toluol in Wasser (Die Frequenzänderung von 7 kHz beim Beschichten entspricht etwa einer Schichtdicke von 700 nm).

Mit einer solchen Kalibriermessung läßt sich die Sensitivität des Sensors als Steigung der Ausgleichsgeraden ermitteln.

Aus der Kalibrierkurve geht deutlich hervor, daß trotz größerer Schichtdicke keine wesentliche Erhöhung der Sensitivität erhalten wurde. Bei hohen Toluolkonzentrationen ist eine überproportionale Zunahme des Sensorsignals zu erkennen. Diese Zunahme ist auf Änderungen der Sorptionseigenschaften des Polymers durch den Analyten zurückzuführen. Die Struktur des Polymers quillt und kann so mehr Analyt und Wasser aufnehmen.

In Abbildung 41 ist der Signalverlauf von Sensoren mit unterschiedlicher Beschichtungsdicke gezeigt. Die Signalförmung läßt erkennen, daß durch die dickere Polymerschicht (12 kHz, ca. 1,2 µm) die Analysenzeit nicht ausreicht, um ein Sättigungssignal zu erreichen. Die Diffusion in das Polymerinnere verläuft dazu nicht schnell genug. Bei geringerer Schichtdicke wird das maximale Sensorsignal nach relativ kurzer Zeit erreicht; es herrscht ein Gleichgewicht zwischen ein- und ausdiffundierendem Toluol.

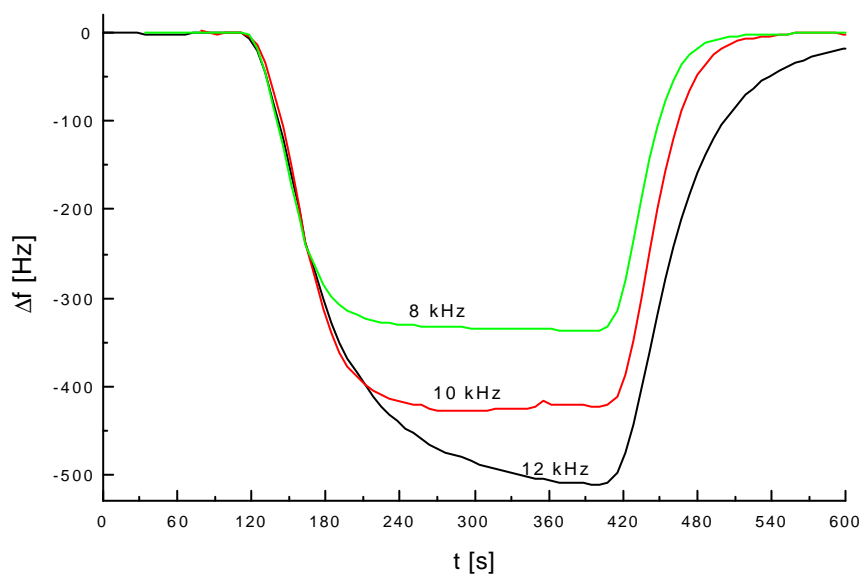


Abbildung 41: Vergleich der Signalförmung von Sensoren mit unterschiedlich dicker Beschichtung bei Exposition von 200 ppm Toluol (8 kHz Frequenzverstärkung bei der Beschichtung entspricht einer Schichtdicke von ca. 800 nm).

Ein weiterer Nachteil großer Schichtdicken zeigt sich im Kurvenverlauf während des Ausspülens des Analyten: Die Auslagerung von Toluol verläuft deutlich schlechter, je größer die Beschichtungsdicke ist.

Um eine optimale Dicke der sensitiven Polymerschicht zu bestimmen, wurden mehrere Sensoren mit unterschiedlich dicken Polymerschichten hinsichtlich Signalgröße auf den Analyten Toluol (D_f) und den zeitlichen Verlauf des Signals (k) untersucht.

Durch Anpassen der Analytkurve mit der Näherungsfunktion $f(x) = -100 \frac{x^n}{k^n + x^n}$, die den Verlauf einer solchen Kurve recht gut wiedergibt, erhält man den Zeitfaktor k sowie den Exponenten n . Diese Faktoren stellen ein Maß für die Schnelligkeit dar, mit der der Analyt in das Polymer eindiffundiert (Abbildung 42). Der Exponent n ändert sich bei unterschiedlichen Schichtdicken kaum. Seine Größe hängt von der Diffusion in die Meßzelle und zur sensitiven Schicht ab. Der Faktor k bestimmt die Diffusion in die Polymerschicht. Kleines k und großes n bedeuten, daß der Analyt sich schnell in der Sensorbeschichtung zur Gleichgewichtskonzentration sättigt; großes k und kleines n , daß im Polymer in der Analysenzeit keine Gleichgewichtskonzentration erreicht wurde.

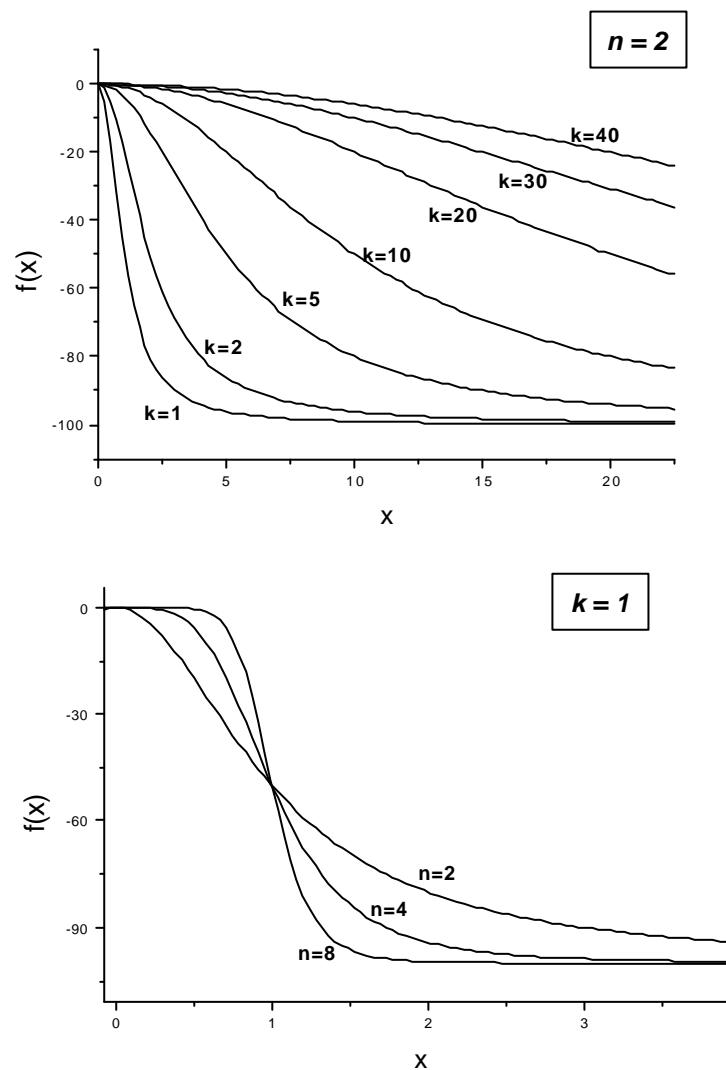


Abbildung 42: Verlauf der Näherungsfunktion $f(x) = -100 \frac{x^n}{k^n + x^n}$ für verschiedene Werte von k und n .

In Abbildung 43 ist dieser Signalverlauf bei Zugabe von jeweils 200 ppm Toluol in Wasser gezeigt. Die Signalhöhe nimmt bis zu einer Beschichtungsdicke von 8 kHz linear mit einer Steigung von ca. -53 Hz pro kHz Beschichtungsdicke zu. Die Ausgleichsgerade wurde aufgrund des Anstiegs des Zeitfaktors k ab 10 kHz Beschichtungsdicke nur bis zu diesem Wert angepaßt. Man erkennt, daß k ab der Beschichtungsdicke 10 kHz deutlich zunimmt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß sich der Analyt in der vorgegebenen Meßzeit nicht vollständig in der gesamten Polymerschicht sättigen kann und somit das Analytsignal auch kein Sättigungssignal darstellt. Für n wurden jeweils nahezu konstante Werte zwischen 2,8 und 3,5 erhalten. Dieser Faktor ist von der Polymerdicke nahezu unabhängig.

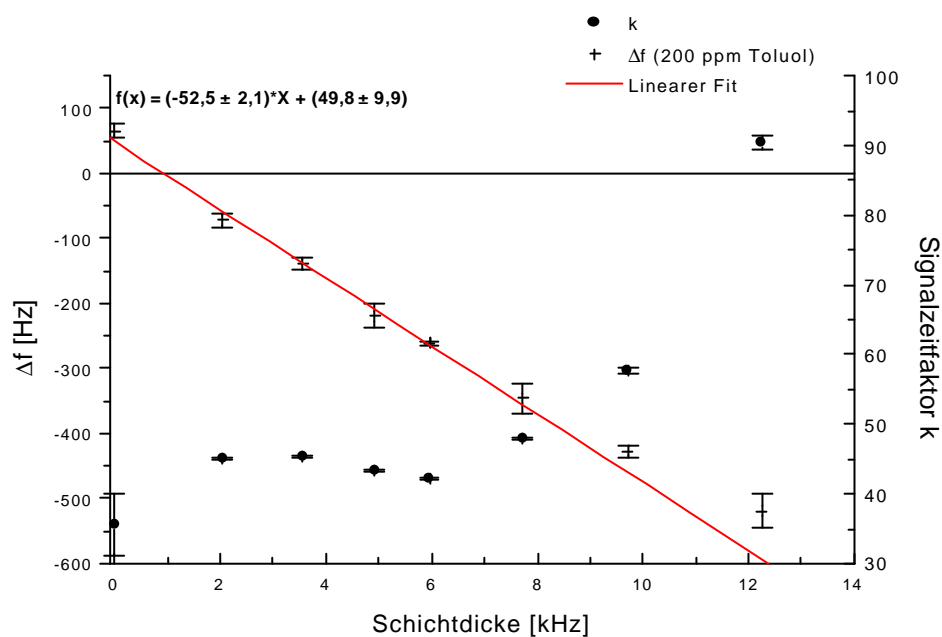


Abbildung 43: Zusammenhang zwischen Schichtdicke, Signalzeitfaktor k und Signalhöhe bei Exposition von 200 ppm Toluol; Sensorbeschichtung: PCO.

5.1.2. Stabilität der Polymerschichten

Die Stabilität der Polymerschichten auf dem Transducer ist der wichtigste Gesichtspunkt für eine langfristige Nutzung des Sensors in wässriger Phase. Hierbei spielt einerseits die Haftung bzw. Anbindung auf der Oberfläche und andererseits die Änderung der Volumenstruktur des Polymerfilms eine wichtige Rolle. Werden Teile der Beschichtung im Verlauf einer Messung oder mehrerer Meßzyklen abgelöst, können Signalgrößen so verfälscht werden, daß aufeinanderfolgende Messungen untereinander nicht vergleichbar sind.

Zur Bestimmung der Langzeitverwendbarkeit der untersuchten Polyketone wurden einerseits Langzeitmessungen im Abstand von einigen Wochen durchgeführt, andererseits wurden von den Polymerschichten lichtmikroskopischen Aufnahmen angefertigt. Diese geben Aufschluß über die Veränderung der Schicht im Verlauf von mehreren Messungen.

Beispiele von lichtmikroskopischen Aufnahmen dieser Schichten sind in Abbildung 44 gezeigt:

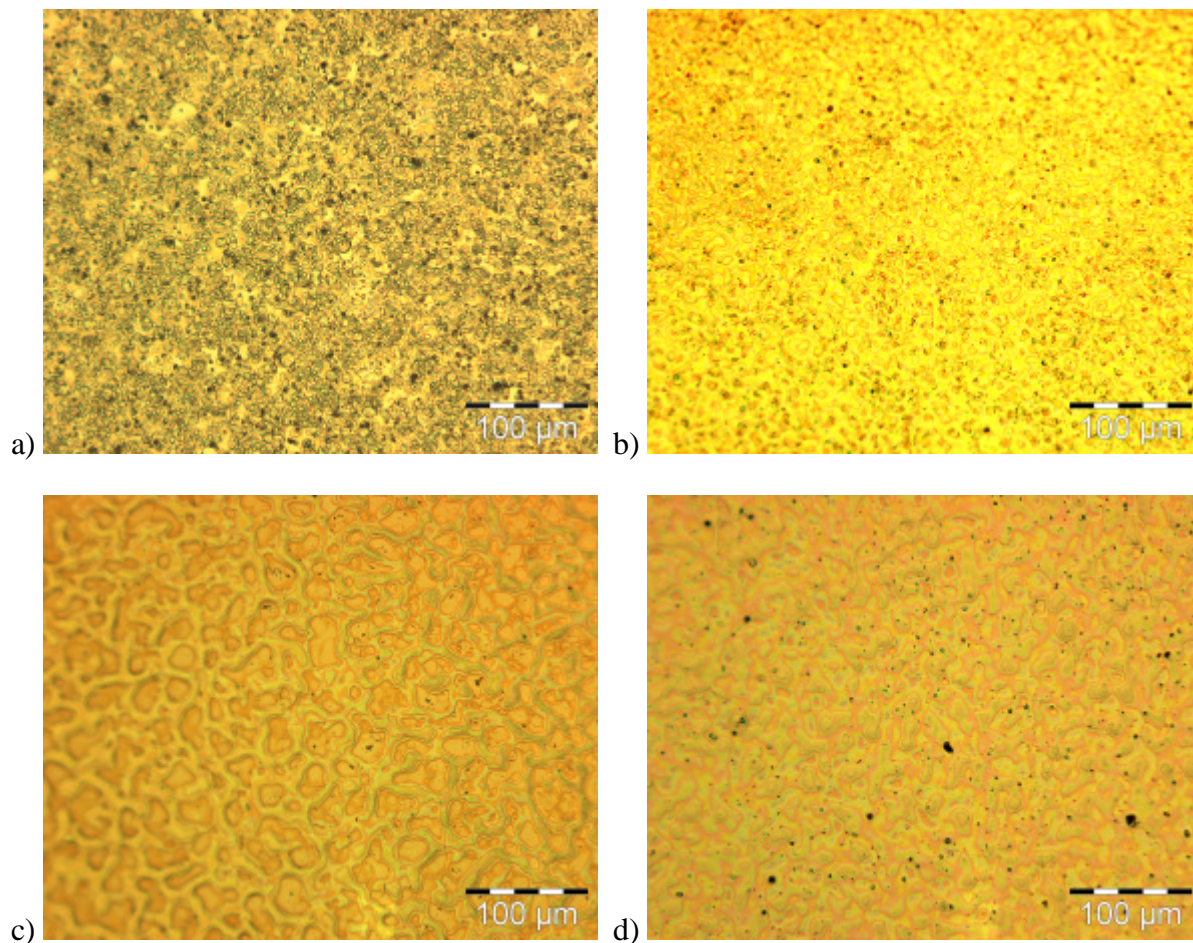


Abbildung 44: *Lichtmikroskopische Aufnahme von Polyketon-Schichten: a) frisch beschichteter Sensor (PCO) b) PCO-Schicht nach 6 Wochen unter Meßbedingungen c) HolCO-Beschichtung nach 9 Wochen d) PyCO-Beschichtung nach 12 Wochen Meßbetrieb.*

Abbildung 44a zeigt einen frisch mit PCO beschichteten Sensor. Man erkennt die kleinen Polymertröpfchen, die sich beim Aufsprühen auf die Oberfläche aufeinanderlagern. Die Struktur ist kontrastreich, die Tröpfchen sind klar zu erkennen. Vergleicht man diese Oberfläche mit einer PCO-Schicht, die 6 Wochen lang als sensitive Schicht im Einsatz war (Abbildung 44b), so sind die Polymertröpfchen nicht mehr so deutlich abgegrenzt. Es treten größere Polymerbereiche auf, die sich aus kleineren Tröpfchen zusammengeschlossen haben.

Ein ähnliches Bild zeigen die Beschichtungen mit HolCO (Abbildung 44c) und PyCO (Abbildung 44d) nach 9 bzw. 12 Wochen unter Wasserfluß und Analytzugabe.

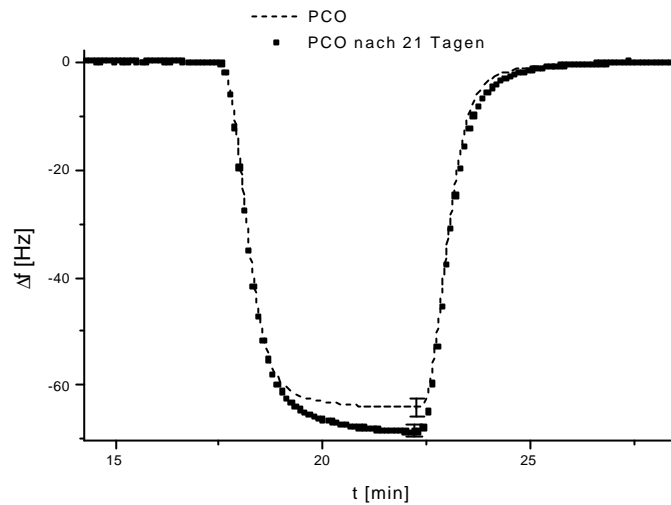


Abbildung 45: *Frequenzverschiebung eines mit PCO beschichteten Quarzes nach Zugabe von 50 ppm Toluol in Wasser. Die Messungen wurden im Abstand von 21 Tagen durchgeführt. Der Sensor befand sich im Dauerbetrieb. Für das Signalminimum ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung für drei Messungen hinzugefügt.*

In Abbildung 45 ist zum Vergleich das Sensorsignal eines mit PCO beschichteten Sensors nach Zugabe von Toluol in Wasser (50 ppm) gezeigt. Nach einer kontinuierlichen Meßzeit von etwa 3 Wochen veränderte sich das Signal wenig. Die Signalhöhe nahm sogar etwas zu. Dies kann auf die strukturelle Veränderungen im Polymer zurückzuführen sein; eine Aufweitung des Polymernetzwerkes und Veränderung der Viskosität im Meßzeitraum führt zu einer veränderten Ankopplung der viskoelastischen Schicht an den Transducer und somit zu unterschiedlichen Signalen. Zusätzlich kann dadurch die Einlagerung von Analytmolekülen verändert werden. Eine Auftrennung dieser Effekte ist mit einer Frequenzbestimmung alleine nicht möglich [85].

5.1.3. Mustererkennung und Multikomponentenanalyse

Um die Eignung dieser Polymere zur gezielten Bestimmung der Menge von organischen Stoffen neben anderen Verunreinigungen bzw. anderen Analyten zu untersuchen, wurden vier unterschiedliche Polymere (PCO, HolCO, DiesterCO, PyCO) einer Mustererkennung unterzogen.

Als Analyten wurden Toluol und 4-Cl-3-Methylphenol in unterschiedlichen Konzentrationen zur Kalibrierung verwendet. Weitere Messungen mit unabhängigen Datensätzen

(„unbekannten“ Konzentrationen) wurden zur Validierung dieser Kalibrierung durchgeführt. Die Auswertung dieser Messungen wurde mit dem Programm „The Unscrambler 7.0“ durchgeführt.

In Abbildung 46 ist der PCA-Plot einer Kalibrierung für verschiedene Mischungen von Toluol mit 4-Cl-3-Methylphenol gezeigt. Die Mischungen mit hoher Toluol-Konzentration zeigen eine deutlich höhere Streuung, als Mischungen, bei denen Toluol nur in geringen Mengen zugemischt war. Dies liegt vor allem an dem Verlust von Toluol durch Ausgasen im Verlauf der Messungen. Die geringe Streuung des Mischungsverhältnisses 0/50 resultiert aus der internen Standardisierung auf diesen Wert.

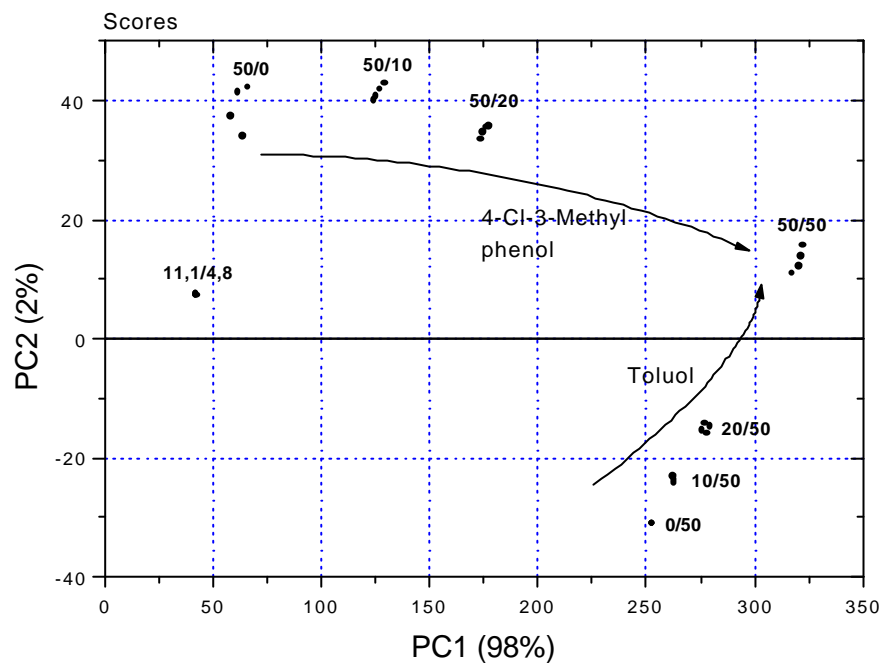


Abbildung 46: PCA-Plot der Kalibrierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Toluol und 4-Cl-3-Methylphenol. Konzentrationsangabe: ppm (Toluol) / ppm (Phenol).

Um Sensordrifts und -alterungen zu berücksichtigen, wurde das Signal für 50 ppm 4-Cl-3-Methylphenol als interner Standard gewählt. Da Phenol einen geringen Dampfdruck besitzt und sich daher auch kaum im Verlauf der Messung verflüchtigt, kann davon ausgegangen werden, daß dessen Konzentration in der Analytlösung annähernd konstant bleibt. Die Signale der jeweiligen Sensoren wurden durch das Signal dieses Wertes geteilt. Dadurch wird die Signalveränderung durch Alterung der Polymerschichten ausgeglichen. Dieser Effekt tritt vor allem bei Langzeitmessungen im Bereich von Wochen auf; die sensitive Schicht verändert sich und kann so weniger Analyt adsorbieren.

In Abbildung 47 ist ein Vergleich zweier PCA-Plots mit und ohne die interne Standardisierung gezeigt. Ohne interne Standardisierung läßt sich keine eindeutige Clustering der Meßwerte erkennen. Der Verlauf der Werte mit zunehmender Konzentration der Analyten bleibt allerdings erhalten.

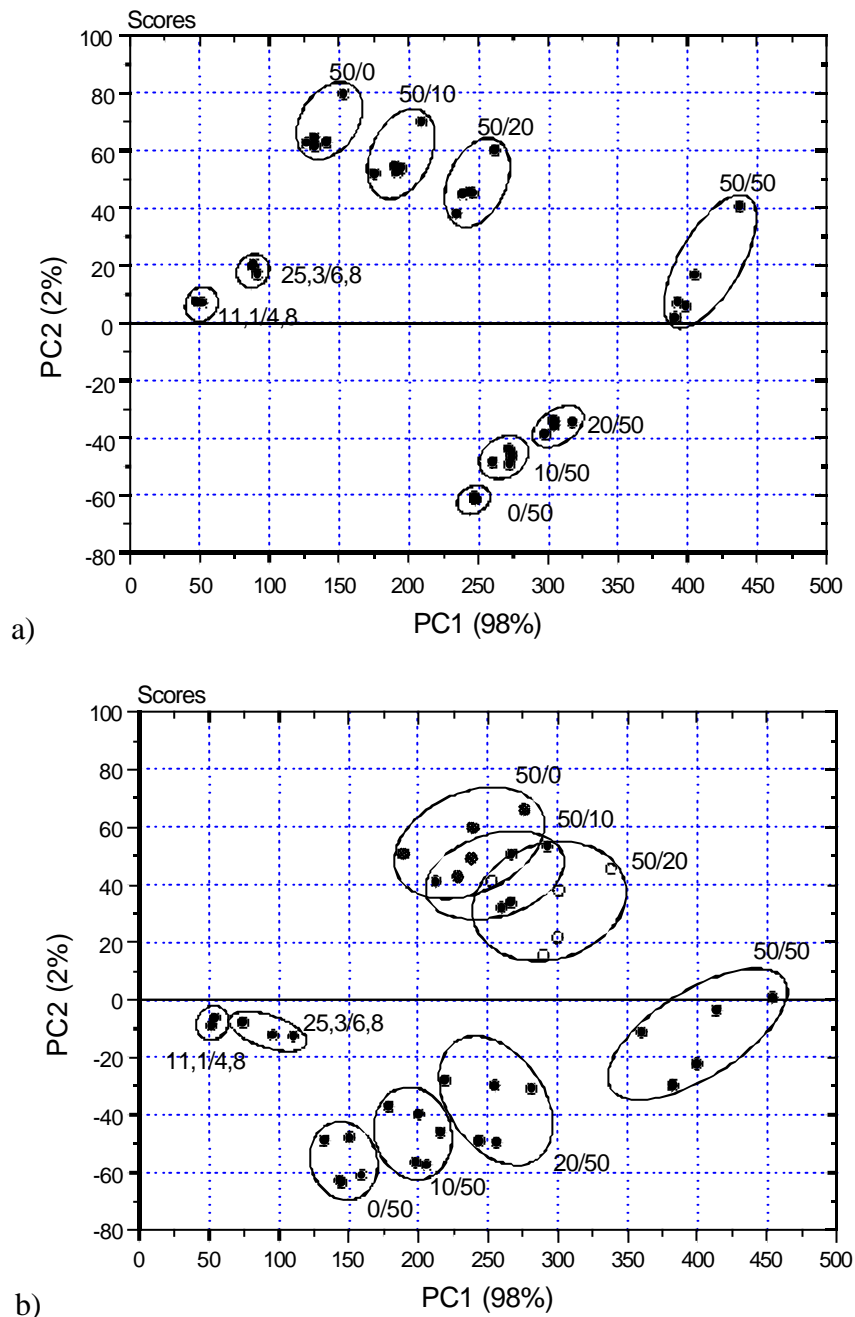


Abbildung 47: Vergleich zweier PCA-Plots; a) mit und b) ohne interne Standardisierung auf 50 ppm 4-Cl-3-Methylphenol. Die Messungen erfolgten im Abstand von 4 Wochen.

Die „Stabilität“ der Polymerschichten im Wasser zeigt sich deutlich bei Vergleichsmessungen, die im Abstand von 4 Wochen mit mehreren Analytmischungen durchgeführt wurden (Abbildung 47 a). Der qualitative PCA-Plot zeigt die unterschiedlichen

Mischungsverhältnisse eindeutig getrennt voneinander. Man erkennt, daß bei den hohen Toluol-Konzentrationen immer ein Ausreißer auftaucht. Dieser Datenpunkt kommt jedesmal durch die jeweils dritte Wiederholungsmessung der gleichen Analyten zustande, die im Abstand von etwa 2,5 h zur ersten Messung erfolgte. Er ist darauf zurückzuführen, daß trotz eisgekühlter Lösungen die Toluolkonzentration durch Abdampfen abnahm und somit nicht mehr dem eingestellten Wert entsprach. Nach vier Wochen wurde frisch eingestellte Analytmischungen mit denselben Sensoren vermessen; diese Werte lagen im selben Bereich, wie die Lösungen, die vier Wochen zuvor gemessen wurden.

Dies zeigt, daß die benutzten Sensorbeschichtungen über diese vier Wochen, während der sie im Kontakt mit Wasser waren, nicht an Selektivität verloren. Neue Proben wurden richtig eingeordnet. Ein Verlust an Sensitivität wurde durch die Standardisierung kompensiert.

Betrachtet man zusätzlich zur qualitativen PCA die quantitative PCR, die nach Kalibration über eine multilineare Regression in der Lage ist, unbekannte Mischungen zu quantifizieren, so werden die „unbekannten“ Proben relativ gut den richtigen Konzentrationen zugeordnet.

In Abbildung 48 sind die mit Hilfe einer PCR vorhergesagten Konzentrationen des Analyten Toluol gegen die eingestellten Mengen aufgetragen.

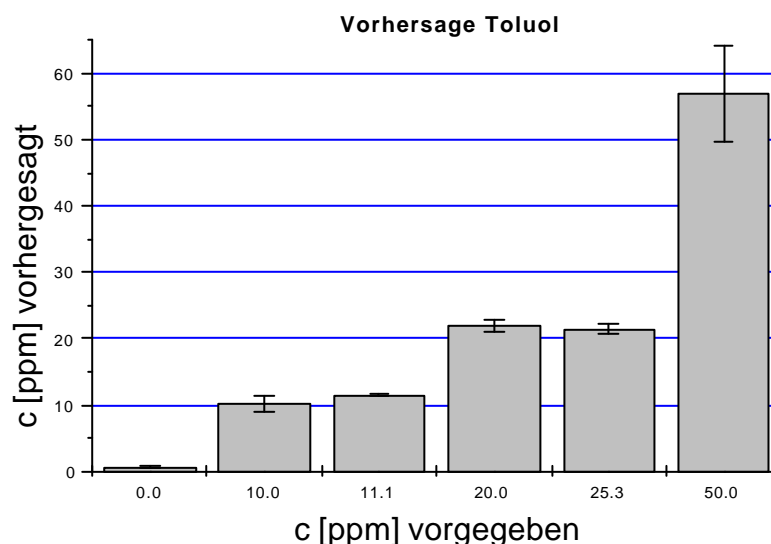


Abbildung 48: *Vorhersage der Toluol-Konzentrationen gegenüber den vorgegebenen Werten einer Mischung aus Toluol und 4-Cl-3-Methylphenol. Die Werte wurden mit Hilfe einer PCR berechnet.*

Das Regressionsmodell für die PCR wurde durch eine Kalibrierungsmessung berechnet. Nachfolgende Messungen wurden dem Auswerteprogramm als unbekannte Mischungen vorgegeben. Durch das berechnete Modell konnten die entsprechenden Toluol-Konzentrationen innerhalb der Mischung mit 4-Cl-3-Methylphenol quantifiziert werden. Auch hier wird das Abdampfverhalten von Toluol anhand der größeren Standardabweichungen (maximaler Fehler bei 50 ppm: 7,3 ppm) und etwas schlechter vorhergesagten Konzentrationen deutlich.

Die Vorhersage für den Analyten 4-Cl-3-Methylphenol im Beisein von Toluol (Abbildung 49) zeigt, daß hier durch fehlende Verflüchtigung dessen Konzentrationen weitaus genauer und vor allem reproduzierbar bestimmt werden kann. Die Standardabweichungen für alle unbekannt Konzentrationen sind sehr gering (maximaler Fehler bei 0 ppm: 1,1 ppm).

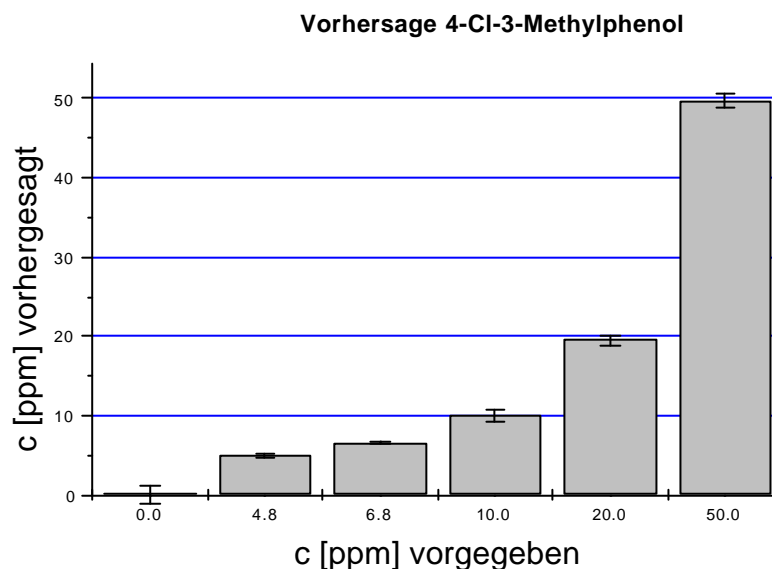


Abbildung 49: Vorhersage der Konzentrationen an 4-Cl-Methyl-Phenol in einer Mischung mit Toluol. Die Werte wurden mit Hilfe einer PCR berechnet.

Die Gewichtung der vier verschieden beschichteten Schwingquarze läßt sich anhand des Loadings-Plots zeigen (Abbildung 50). Im Loadings-Plot wird der Einfluß der unterschiedlichen Sensoren auf die Hauptkomponenten-Analyse dargestellt. Die Werte entlang der Hauptkomponenten PC1 und PC2 ergeben den Anteil der Sensoren an dieser Hauptkomponente.

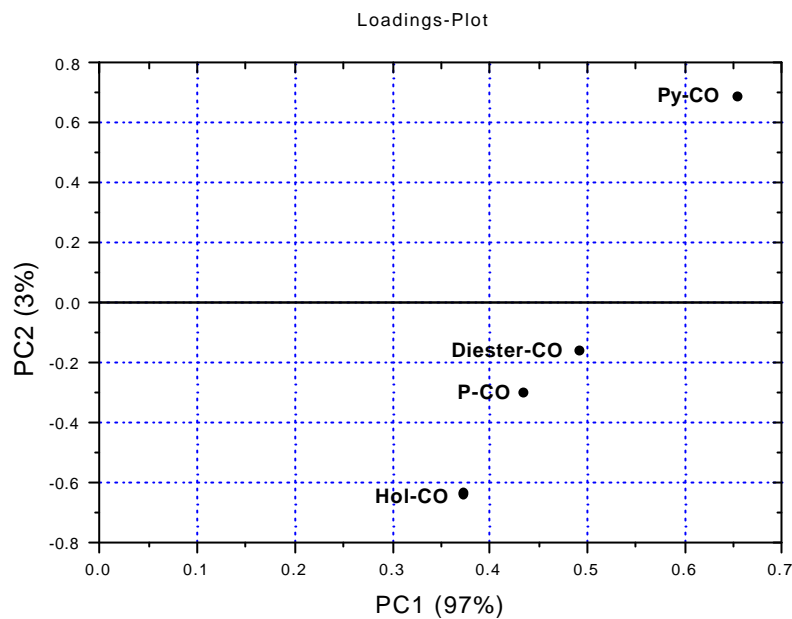


Abbildung 50: *Loadings-Plot der PCR mit Mischungen an Toluol und 4-Cl-3-Methylphenol.*

Der Sensor mit der PyCO-Beschichtung liegt beispielsweise bei hohen PC1- und PC2-Werten, was bedeutet, dass seine Signale mit einem hohen Prozentsatz zur Multikomponentenanalyse beitragen. Die HolCO-Beschichtung trägt weniger zur 1. Hauptkomponente, dafür aber mehr zur 2. Hauptkomponente bei. Haben Sensoren mit unterschiedlichen Beschichtungen ähnliche Loadings oder sehr kleine Werte auf einer Hauptkomponente, so trägt ihr Signal wenig zur Unterscheidung bei; sie sind für ein gutes Regressionsmodell nicht unbedingt erforderlich.

5.2. Sol-Gel-Polymere

Die nach der in Kapitel 4.2.6.3 beschriebenen Prozedur auf Silizium-Oberflächen aufgetragenen Polymere wurden mittels Lichtmikroskopie charakterisiert. Diese Aufnahmen sind in Abbildung 51 und Abbildung 53 gezeigt.

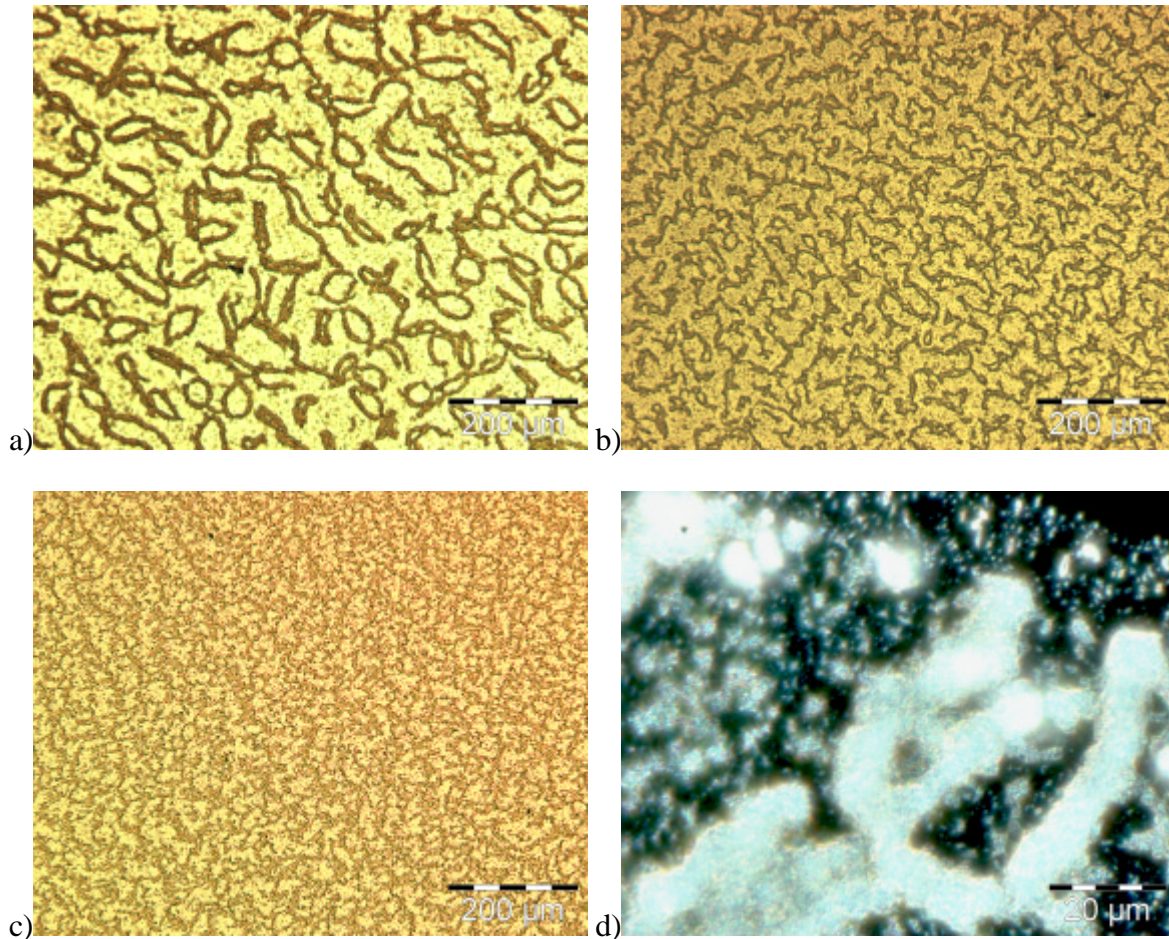


Abbildung 51: Lichtmikroskopische Aufnahmen des SG1-Polymers auf einer Si-Wafer-Oberfläche; Monomer: Bis(trimethoxysilyl)hexan. Die Polymerisation wurde nach a) 13h b) 14h c) 16h unterbrochen. Vergrößerung: 100fach, Hellfeldaufnahmen; d) Dunkelfeldaufnahme nach 13 h, 1000fach vergrößert.

Der Einfluß der Quervernetzungszeit auf die Struktur des SG1-Polymers ist in der Bildfolge (Abbildung 51a-c) dargestellt. Die dunklen Bereiche stellen dicke Polymerstränge dar, in den hellen Bereichen liegt eine geringere Polymerdichte vor. Dies wird durch Streulichtaufnahmen weitaus deutlicher (Abbildung 51d). In dieser Aufnahme stellen die hellen, stark streuenden Bereiche Polymersubstanz dar.

Mit zunehmender Dauer der Reaktion an der Oberfläche verfeinert sich die Struktur des Polymers. Die anfangs vorhandenen dunklen fadenartigen Polymergebilde verschwinden im Verlauf der Zeit. Dunkle und helle Bereiche sind gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt (Abbildung 51c). Wird die Reaktion vor einer Einwirkzeit von 10 Stunden abgebrochen, so werden keine stabil haftenden Schichten erhalten; sie werden beim nachfolgendem Spülen mit Ethanol abgewaschen.

Die unterschiedliche Oberflächenstruktur wurde mit Hilfe von Raster-Elektronen-Mikroskopie Aufnahmen genauer untersucht. Solche Aufnahmen sind in Abbildung 52 gezeigt.

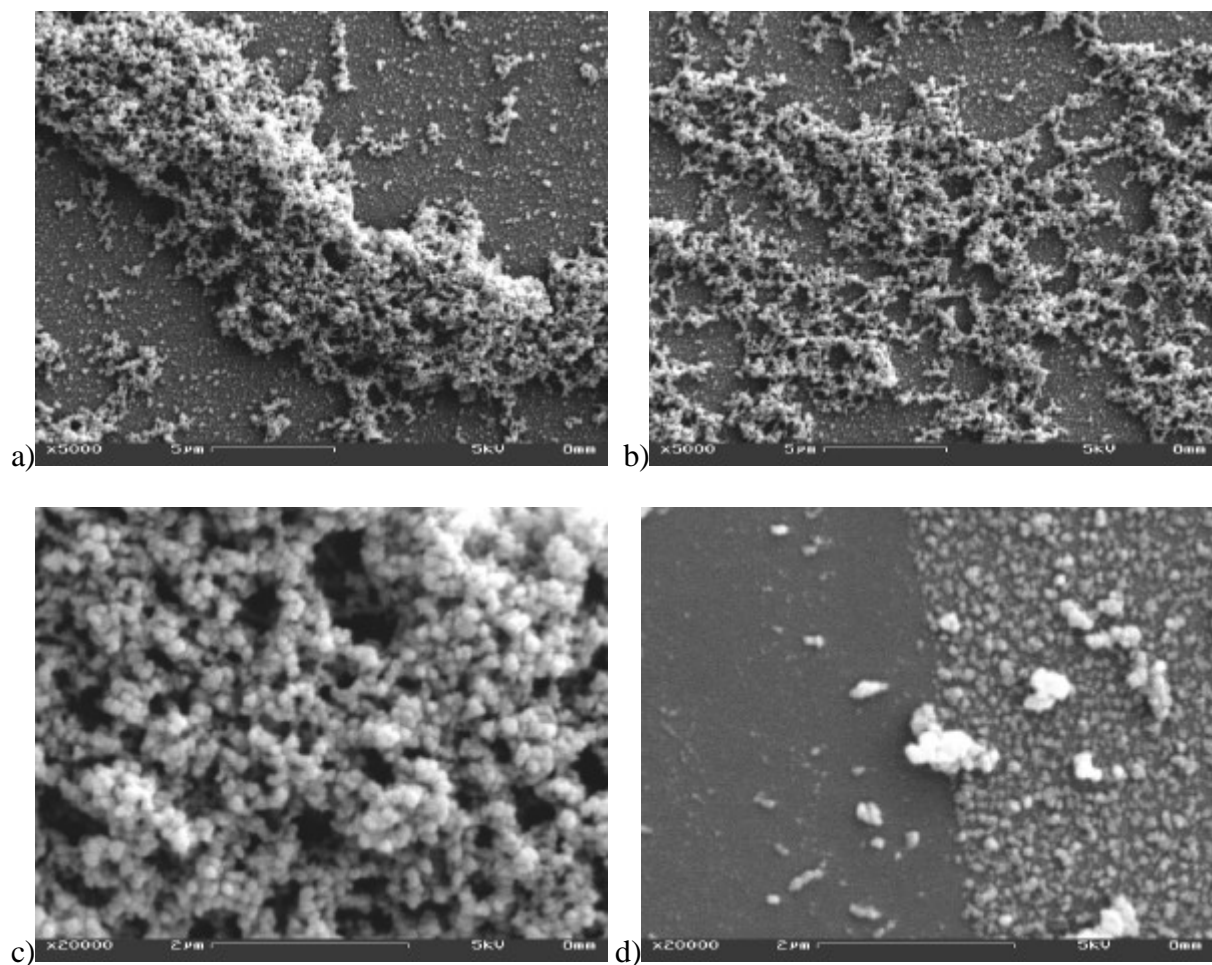


Abbildung 52: REM-Aufnahmen der SGI-Schichten: a), c), d) 13 h , b) 16 h Reaktionszeit. In Bild d) wurde die Oberfläche mit einer Metallspitze abgetragen.

In diesen Aufnahmen wird der Unterschied der Struktur nach 13 bzw. 16 Stunden Reaktionszeit deutlicher. Die schon mit Lichtmikroskopie beobachteten Polymerstränge bestehen aus Zusammenlagerungen vieler kleiner Polymerkügelchen. Die räumliche Separation dieser Zusammenlagerungen nach 13 Stunden (Abbildung 52a) geht nach 16

Stunden in ein verzweigtes Netzwerk über (Abbildung 52b). In Teilbild c) ist eine Vergrößerung eines Polymerhaufens gezeigt. Man erkennt deutlich die vielen kleinen Polymerkügelchen sowie die hohe Porosität der aufgewachsenen Schicht. Teilbild d) stellt die Oberfläche zwischen diesen Polymeransammlungen dar. In der linken Bildhälfte ist ein Kratzer zu sehen, der bis auf die Silizium-Oberfläche reicht. Man erkennt, daß die scheinbar freie Oberfläche zwischen den Ansammlungen mit einer gleichmäßigen dünnen Schicht aus Polymerkügelchen belegt ist. Die Polymeranhäufungen können auf verschiedene Arten entstehen: Einerseits sedimentieren größere in Lösung gebildete Polymerstränge auf der Oberfläche und vernetzen mit der dort bereits vorhandenen Polymerschicht, andererseits kann auch an einzelnen Stellen bevorzugt ein Polymerwachstum erfolgen.

In Abbildung 53 sind lichtmikroskopische Aufnahmen des SG2-Polymers dargestellt. Die Polymerisationszeit betrug 16 Stunden.

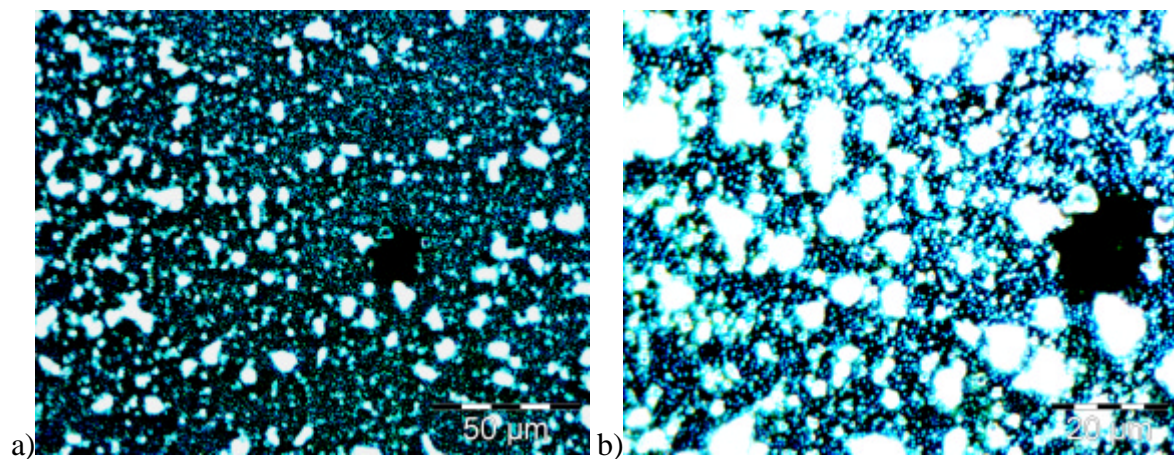


Abbildung 53: Lichtmikroskopische Aufnahme des SG2-Polymers auf einer Si-Wafer-Oberfläche: a) 500fache Vergrößerung b) 1000fache Vergrößerung; Monomer: Phenyltrimethoxysilan, Dunkelfeld.

Im Gegensatz zum SG1-Polymer beobachtet man bei dem SG2-Polymer viele gleichmäßig verteilte Polymercluster in unterschiedlichen Größenordnungen. Zwischen großen Clustern befinden sich viele kleine Polymeransammlungen. Im rechten Bildausschnitt ist die unbelegte Si-Oberfläche des Substrates zu erkennen. Möglicherweise hat an dieser Stelle ein Staubpartikel die Polymerisation verhindert.

Auch hier werden die Oberflächenstrukturen durch REM-Aufnahmen deutlicher (Abbildung 54). Die Polymerkügelchen sind etwa fünfmal größer als beim SG1-Polymer. Es bildet sich keine geschlossene Schicht. Die regelmäßig verteilten Polymerhaufen entstehen durch Verklumpung von wenigen Polymerkügelchen.

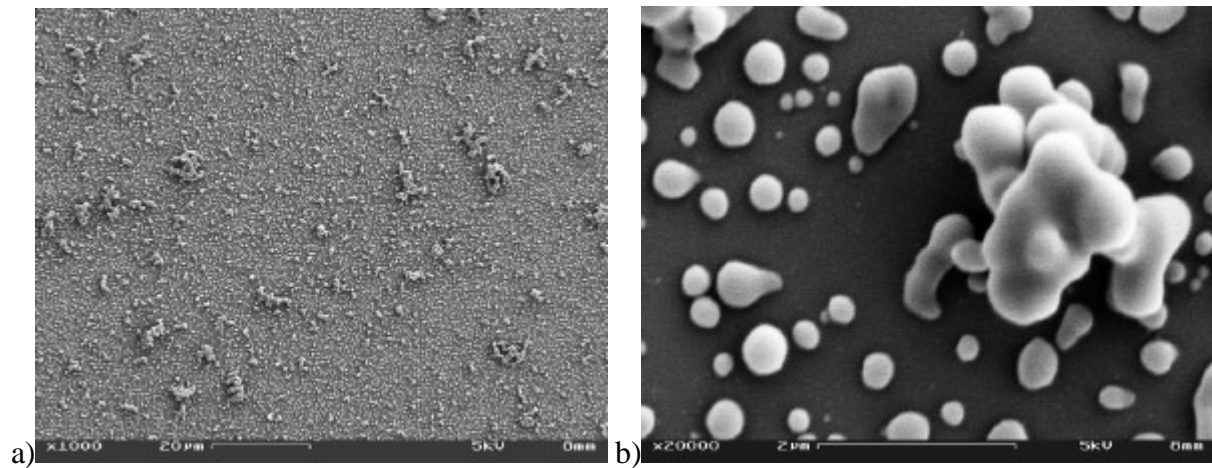


Abbildung 54: REM-Aufnahmen der SG2-Oberfläche.

Beide Polymere bilden über einer Belegungszeit von 10 Stunden fest haftende Schichten. Das Polymerwachstum erfolgt nicht gleichmäßig, sondern beginnt inselartig. Mit zunehmender Polymerisationszeit wachsen diese Inseln mehr und mehr zusammen.

In Abbildung 55 ist das Oberflächenprofil einer solchen SG1-Schicht nach etwa 20 Stunden Reaktionszeit gezeigt.

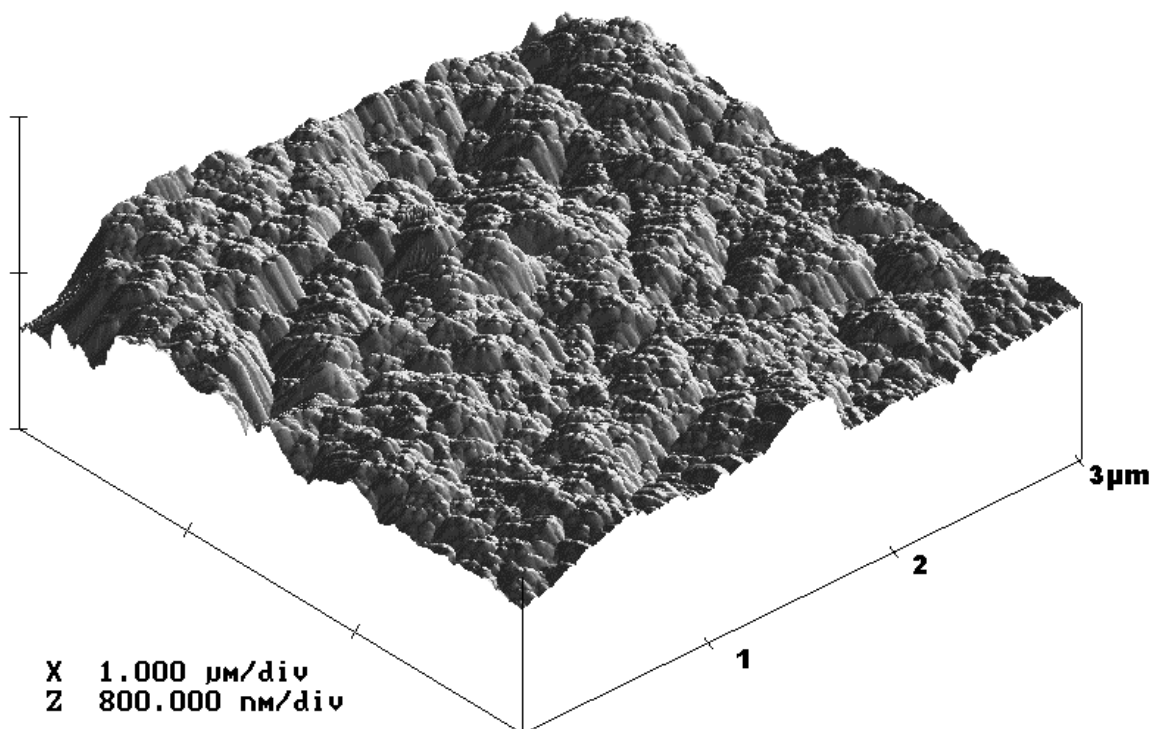


Abbildung 55: AFM-Bild einer 2,5 µm dicken Sol-Gel-Schicht (Tapping-Mode).

Die Oberfläche zeigt eine relativ hohe Rauigkeit von etwa 60 nm (rms). Man erkennt auch hier einzelne Bereiche, die deutlich höher sind.

Mit Hilfe der Sensorik lassen sich diese Polymere nach ihrem Verhalten gegenüber gewissen Lösungsmittel einteilen. Dieser Klassifizierungsschritt hilft bei der Optimierung des Herstellungsprozesses und der Suche nach Einsatzgebieten der Polymere.

Die beiden Sol-Gel-Polymere SG1 und SG2 wurden nach der in Kap 4.2.6.3 beschriebenen Prozedur auf die Goldelektrode von Schwingquarzen aufgebracht und verschiedenen Lösungsmitteln in Wasser ausgesetzt. Es ergab sich die in Abbildung 56 dargestellte Lösungsmittelabhängigkeit.

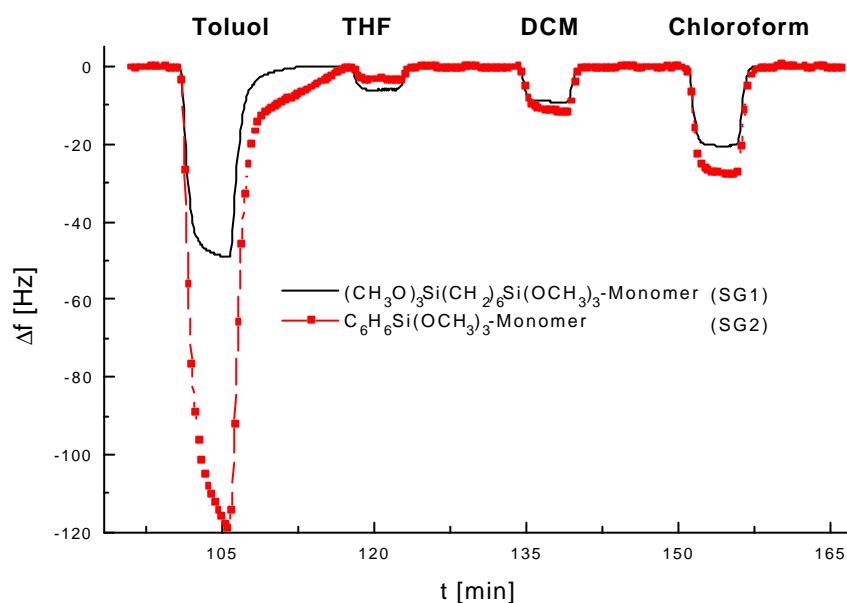


Abbildung 56: *Frequenzverschiebung zweier Sol-Gel-beschichteter Sensoren bei Zugabe von jeweils 50 ppm unterschiedlicher Lösungsmittel in Wasser.*

Einerseits wurde ein Polymer untersucht, dessen Monomer aus einer Hexylkette mit zwei abschließenden Trimethoxysilangruppen bestand (SG1). Als Vergleich dazu kam ein polymerisiertes Phenyltrimethoxysilan-Monomer zum Einsatz (SG2). Beide Polymere wurden nach dem in Abschnitt 4.2.6.3 beschriebenen Verfahren auf die Oberfläche zweier Schwingquarze aufgebracht. Die Frequenzverschiebung der Quarze vor und nach Beschichten betrug 8,0 kHz (SG1) und 11,6 kHz (SG2). Die SG2-Schicht war also etwas dicker.

Statische Kontaktwinkelmessungen mit einem Wassertropfen ergaben einen Benetzungswinkel von $158,2^\circ \pm 7,5^\circ$ für das SG1-Polymer und $115,9^\circ \pm 1,1^\circ$ für das SG2-Polymer. Das SG1-Polymer mit Hexylgruppen ist also deutlich hydrophober, als das SG2-Polymer, das an sich schon hydrophob ist.

Trotz des Beschichtungsunterschiedes erkennt man, daß der SG2-beschichtete Sensor auf Toluol ein deutlich höheres Signal zeigt. Durch größere Wechselwirkung mit dem Polymer ergibt sich eine langsame Adsorptions- und Desorptionskinetik. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Wechselwirkungen der Phenylgruppen untereinander zurückzuführen. Der SG1 beschichtete Sensor zeigt ein nur halb so großes Signal mit schneller Kinetik.

Beim Übergang zum Analyten THF ändert sich die Größe der Wechselwirkung. Hier erhält man ein höheres Signal für das SG1-Polymer.

Da THF polarer ist als Toluol, hat es eine geringere Neigung, aus der wäßrigen Phase in das Polymer hineinzudiffundieren. Daher ergibt sich insgesamt ein kleineres Signal. Die beiden halogenierten Methane DCM und Chloroform ergeben im Rahmen der Beschichtungsdickengenauigkeit ähnliches Verhalten. Für Chloroform als unpolares Lösungsmittel wird dem entsprechend ein größeres Signal erhalten als DCM.

5.3. Cyclopeptide

Die in den vorigen Abschnitten beschriebenen Schichten aus cyclischen Hexapeptiden wurden hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit unterschiedlichen Analyten in flüssiger Phase unter Verwendung von verschiedenen gepufferten und ungepufferten Lösungen untersucht. Die Messungen in ungepuffertem Lösung beinhalteten die Analyten Toluol, Methylcyclohexan, Butyraldehyd und n-Butanol; in gepuffertem Lösung wurden zusätzlich verschiedene L-Aminosäuren untersucht.

Um die Mechanismen der Wechselwirkungen der beteiligten Moleküle besser verstehen zu können, wurden Kraftfeld- und Molekulardynamikrechnungen durchgeführt.

5.3.1. Cyclopeptide in gepuffertem wässriger Phase

Die Wechselwirkung der verwendeten Pufferlösungen mit der Cyclopeptidoberfläche und dem Analyten kann zu Störungen der Wechselwirkung der Analyten mit der Erkennungsstruktur führen. Um diesen Einfluß zu untersuchen, wurden drei verschiedene Puffersysteme ausgewählt. Diese Systeme bestanden aus Phosphatpuffer ($pK_a = 7,1$), der durch die hochgeladenen Hydrogenphosphationen hohe ionische Wechselwirkungen erwarten läßt, HEPES-Puffer ($pK_a = 7,5$) und TRIS-Puffer ($pK_a = 8,1$), die geringere ionische Wechselwirkungen zeigen sollen.

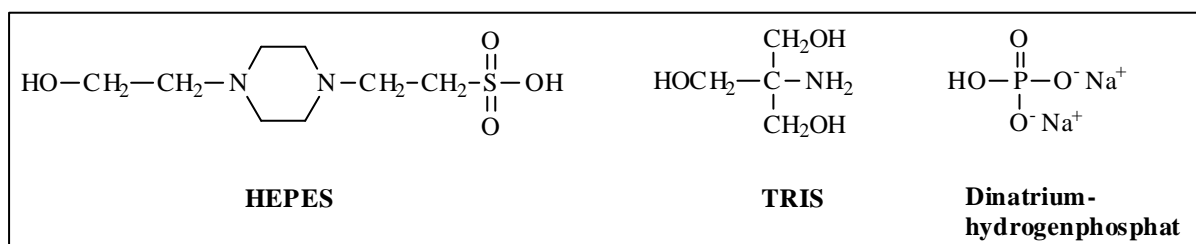


Abbildung 57: Struktur der untersuchten Pufferionen.

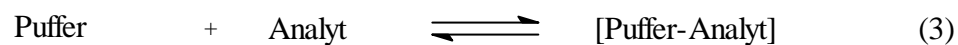
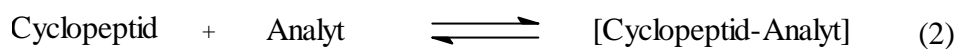
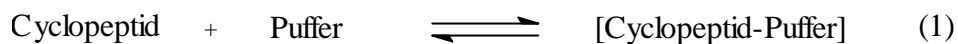
Das HEPES-Puffermolekül liegt in wässriger Umgebung unterhalb seines pK -Wertes überwiegend in Form seiner Sulfonsäure vor, trägt also keine Partialladung; oberhalb des pK -Wertes liegt es als negativ geladenes Sulfonsäure-Anion vor. In diesem Bereich sind höhere ionische Wechselwirkungen mit einer geladenen Oberfläche sowie den Analyten zu erwarten.

Bei TRIS liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt. TRIS liegt unterhalb des pK -Wertes in positiver ionischer Form vor und oberhalb als neutrales Teilchen.

Der Phosphatpuffer, der sich aus Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat zusammensetzt, liegt von sich aus bei den gemessenen pH-Werten schon in stark ionischen Formen vor. Hier sind hohe Wechselwirkungen zu erwarten.

5.3.2. Einfluß der untersuchten Puffer

Für das Zustandekommen einer Wechselwirkung der Analyten mit dem Cyclopeptid auf der Sensoroberfläche sind verschiedene Gleichgewichte der verwendeten Pufferionen mit der sensitiven Schicht und den Analyten von Bedeutung:



Ist die Wechselwirkung der Pufferionen mit der Beschichtung und den Analytionen groß gegenüber der gewünschten Wechselwirkung der Analyten mit der Erkennungsstruktur (Gleichung (1) und (3) weit auf der rechten Seite), so ist ein geringes bzw. gar kein Signal bei Zugabe dieser Analyten zu erwarten. Dies ist beim verwendeten Phosphatpuffer zu beobachten (Abbildung 58).

In Abbildung 58 ist die Reaktion eines mit $c[\text{Cys-Asp}]_3$ beschichteten Schwingquarzes auf Zugabe von unterschiedlichen Aminosäurelösungen der Konzentrationen 1 mM dargestellt. Als Puffer wurde Phosphatpuffer mit Konzentrationen von 10 mM und 100 mM verwendet.

Deutlich ist die Abnahme des Sensorsignals bei Steigerung der Phosphationenkonzentration zu sehen; dies ist darauf zurückzuführen, daß hier das Wechselwirkungsgleichgewicht mit der Oberfläche stark auf die Seite der Pufferionen verschoben wird (vgl. Abbildung 11).

Interessanterweise ergeben sich für die beiden sauren Aminosäuren positive Frequenzänderungen. Messungen des pH-Wertes ergaben, daß für die beiden sauren Aminosäuren und für Arginin die pH-Werte beim 10 mM Phosphatpuffer nicht genau eingehalten wurden. Die Pufferkapazität war nicht ausreichend. Bei Arginin wurde ein zu hoher und bei Asparagin- und Glutaminsäure ein zu niedriger Wert erhalten. Somit unterschied sich die Pufferionenkonzentration der zugegebenen Analytlösung von der des durchlaufenden Flußpuffers, welches der Sensor detektierte. Bei Erhöhung der Pufferkapazität wurden wieder normale Frequenzerniedrigungen erhalten. Durch die Anlagerung der Aminosäuren erfolgte eine Massenzunahme an der Oberfläche und damit eine Frequenzerniedrigung des Schwingquarzes.

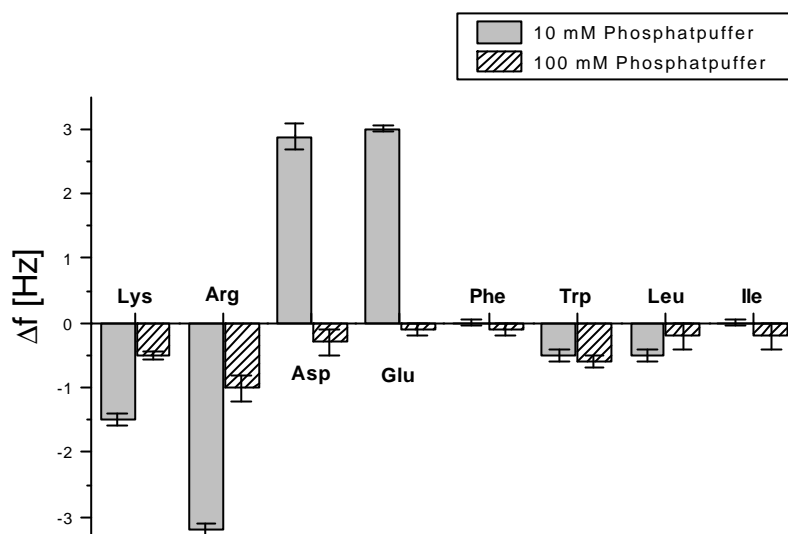


Abbildung 58: Sensorsignale eines mit $c[\text{Cys-Asp}]_3$ beschichteten Quarzes bei Zugabe von Aminosäure-Lösungen in 10 mM und 100 mM Phosphatpuffer.

Da die Aminosäuren mit hydrophoben und aromatischen Seitenketten nur sehr geringe Signale zeigten, werden sie in der folgenden Diskussion nicht weiter berücksichtigt.

Bei Verwendung des HEPES-Puffers konnte die Abnahme der Sensorsignale bei Erhöhung der Pufferkonzentration ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 59). Der Wechsel der Pufferkonzentration von 10-fachem Überschuss gegenüber dem Analyten (10 mM) auf 25-fachen Überschuss führte zu einer Verringerung des Sensorsignals auf den Faktor 1/3, was größtenteils auf einen Konzentrationseffekt des Puffers zurückzuführen ist. Betrachtet man die Wechselwirkungsgleichgewichte, so verschiebt sich bei zunehmender Pufferkonzentration Gleichung (2) zuungunsten der Cyclopeptid-Analytwechselwirkung.

Weiterhin fällt eine starke Erhöhung der Sensorsignale auf. Gegenüber dem Phosphatpuffer wurden bei den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin um das zehnfache höhere Sensorsignale erhalten, wenn HEPES-Puffer verwendet wurde. Die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure ergaben nur geringe Signale.

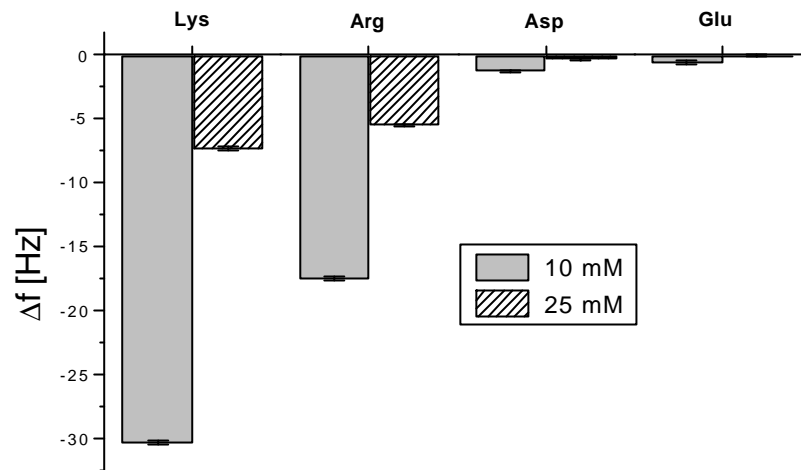


Abbildung 59: Abnahme der Sensorsignale mit steigender Pufferkonzentration beim HEPES-Puffer (Beschichtung: $c[\text{Cys-Asp}]_3$).

Im vorangegangenen Abschnitt wurde postuliert, daß der HEPES-Puffer (pKa 7,35) geringere ionische Wechselwirkungen eingeht, als der Phosphatpuffer, da er unterhalb des pK-Wertes neutral vorliegt. Um diese These zu bestätigen, wurden Meßreihen mit verschiedenem pH-Wert durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 60 dargestellt. Mit zunehmendem pH-Wert nahmen die Signale der Aminosäuren stark ab. Im gleichen Maße nahm die Wechselwirkung des HEPES-Puffers mit den Analyten und der Oberfläche zu, da er überwiegend in seiner ionischen Form (negativ geladene Sulfoxygruppe) vorkommt.

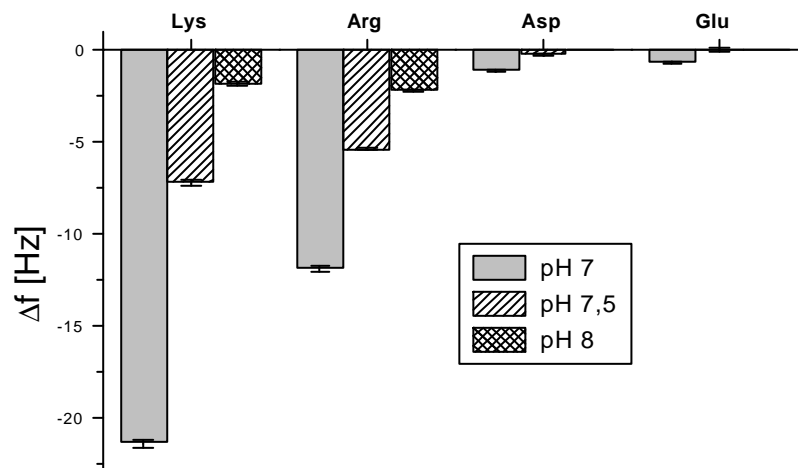


Abbildung 60: Einfluß der pH-Wert Änderung auf die Sensorsignale bei Zugabe von vier verschiedenen Aminosäuren (1 mM, Puffer: HEPES 25 mM, Beschichtung: $c[\text{Cys-Asp}]_3$).

Untersucht man die gleiche Abhängigkeit der Signale vom pH-Wert des TRIS-Puffers (pKa 8,1), so zeigt sich, daß bei sauren bis neutralen Werten kaum Frequenzänderungen

meßbar sind. Liegt der pH-Wert allerdings über dem pK-Wert des Puffers, so wurden auch hier größere Signale detektiert (Abbildung 61). Dies läßt sich ebenfalls durch die Änderung der Ionizität mit steigendem pH-Wert erklären. TRIS besitzt eine Amino-Gruppe, die bei niedrigem pH-Wert protoniert vorliegt und somit positiv geladen ist; es erfolgt eine starke Wechselwirkung mit dem Analyten und der Oberfläche. Mit zunehmendem pH-Wert sinkt die Protonierung des Pufferions und somit die unerwünschte Wechselwirkung – der Analyt kann wieder stärker mit der Oberfläche wechselwirken. Bei höherem pH-Wert zeigte sich eine erhöhte Selektivität zwischen den beiden basischen Analyten Lysin und Arginin.

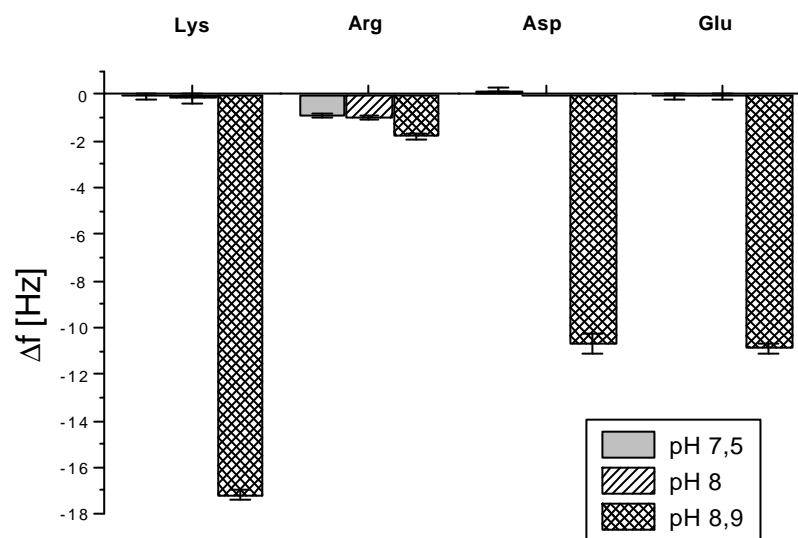


Abbildung 61: Einfluß der pH-Wert Änderung auf die Sensorsignale von vier verschiedenen Aminosäuren (1 mM, Puffer: TRIS 25 mM, Beschichtung: $c[\text{Cys-Asp}]_3$).

Die mit Schwingquarzen untersuchten Wechselwirkungen der Aminosäuren in verschiedenen Puffern hängen stark vom verwendeten Puffer ab. Dies läßt sich durch Kraftfeld- und Molekulardynamikrechnungen bestätigen. In Abbildung 62 sind die so berechneten Wechselwirkungsenergien der untersuchten Puffer und Analyten mit dem Cyclopeptid $c[\text{Cys-Asp}]_3$ dargestellt. Das Peptid wurde in seiner ionischen Form (dreifach negativ geladen) für diese Rechnungen verwendet. Die untersuchten Analyten und Puffermoleküle wurden in saurer Umgebung (je nach pK-Wert) protoniert und in basischer deprotoniert gerechnet.

Lysin zeigte die höchsten Wechselwirkungsenergien, gefolgt von Arginin. Die beiden sauren Aminosäuren zeigten aufgrund der Abstoßung der negativen Carboxy-Gruppen keine Wechselwirkung. Der Verlauf der Energien der Analyten ähnelt den bereits durch Sensormessungen erhaltenen Signalen.

Betrachtet man die Puffer, so geht der Phosphatpuffer aufgrund seiner Abstoßung ebenfalls keine Wechselwirkung mit der Oberfläche ein. Für HEPES wurden sowohl in saurer, als auch in basischer Umgebung sehr geringe Wechselwirkungsenergien erhalten. TRIS zeigte in saurer Umgebung (als protoniertes Molekül gerechnet) deutlich höhere Energien, als in basischer (deprotoniert). Dieses Verhalten stimmt mit den durch Schwingquarzmessungen erhaltenen Ergebnissen überein.

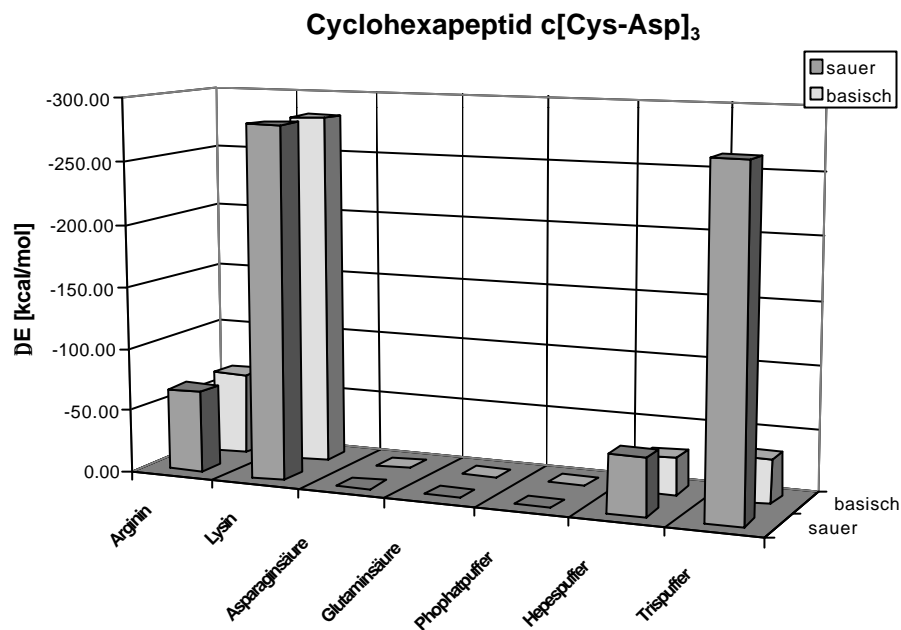


Abbildung 62: Mit Kraftfeldrechnungen berechnete Wechselwirkungsenergien der untersuchten Puffermoleküle und Analyten mit einem auf einer Oberfläche angebindenem Cyclopeptid c[Cys-Asp]₃.

Da die sauren Aminosäuren und der Phosphatpuffer keine Wechselwirkung mit dem Cyclopeptid eingehen, wurde zusätzlich das Verhalten der Analyt- und Puffermoleküle untereinander berechnet (Abbildung 63).

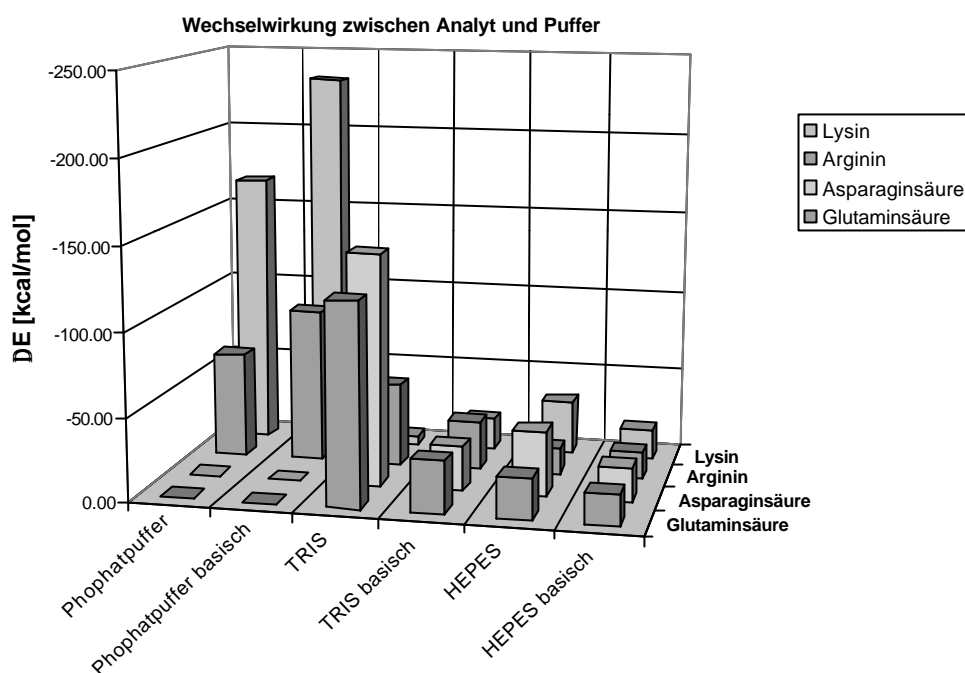


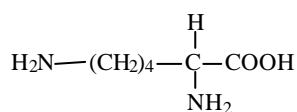
Abbildung 63: Wechselwirkungsenergien der untersuchten Analyten mit den verwendeten Puffern (berechnet mit Kraftfeldrechnungen).

Der Phosphatpuffer zeigte analog den Meßergebnissen hohe Wechselwirkungen mit den Analyten Lysin und Arginin und wie bereits mit der negativ geladenen Cyclopeptid-Oberfläche keine Wechselwirkung mit den negativ geladenen sauren Aminosäuren. Dies kann ein Grund für die geringen Signale bei Verwendung dieses Puffers sein (Abbildung 58).

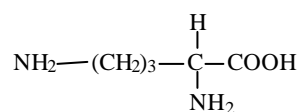
TRIS und HEPES zeigten beide geringere Wechselwirkungen, wobei TRIS in seiner deprotonierten Form (basisch) sehr viel geringere Energien aufwies, als in seiner protonierten Form. Auch dieses Verhalten wurde anhand von Sensormessungen gefunden (Abbildung 61).

5.3.3. Einfluß von Variationen in der Analytstruktur

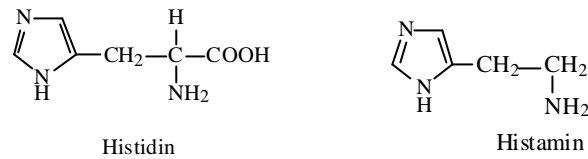
Um Aufschluß über die Art der Wechselwirkung zu erlangen, wurde zum Vergleich zu den üblicherweise verwendeten Aminosäuren Lysin und Arginin die um eine CH_2 -Gruppe kürzere Aminosäure Ornithin zugegeben. Der Vergleich von Histidin mit Histamin soll den Einfluß der Carboxygruppe am α -Kohlenstoff-Atom zeigen.



Lysin



Ornithin



In Abbildung 64 sind die Reaktionen des Sensors bei Zugabe dieser Stoffe gezeigt. Das Sensorsignal bei Ornithin entsprach demjenigen von Lysin. Eine zusätzliche Methylengruppe wirkt sich also wenig oder überhaupt nicht aus.

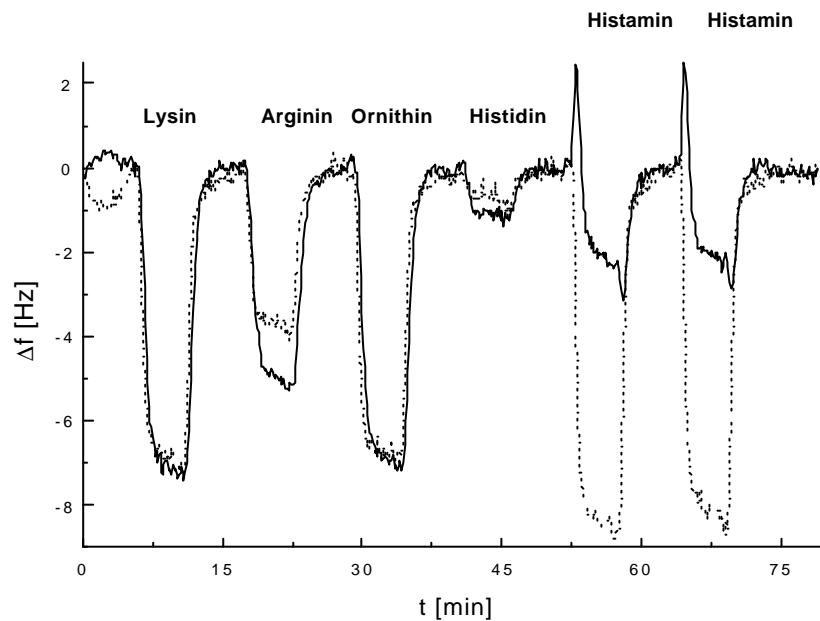


Abbildung 64: Sensorsignale bei Zugabe von 1 mM Lysin, Arginin, Ornithin, Histidin und zweimal Histamin. Puffer: HEPES pH 7,5 25 mM (durchgezogen: $c[\text{Cys-Asp}]_3$; gepunktet: $c[\text{Cys-Phg}]_3$).

Im Gegensatz dazu ergab der Ersatz einer Carboxyl-Gruppe am α -Kohlenstoff durch ein H-Atom bei den unterschiedlichen Beschichtungen ein völlig andersartiges Signal. Die Überlagerung einer schnellen Frequenzzunahme mit einem langsameren Abnehmen läßt darauf schließen, daß durch die fehlende Carboxygruppe und somit durch das neutrale Molekül eine schnelle Verdrängung stattfindet, gefolgt von einer langsameren Adsorption. Beim Ausspülen des Analyten ergab sich genau der umgekehrte Effekt.

Dieser Effekt ist ausschließlich auf den $c[\text{Cys-Asp}]_3$ -Sensor beschränkt. Der parallel betriebene Sensor mit $c[\text{Cys-Phg}]_3$ -Beschichtung zeigte statt dessen ein relativ großes normales Signal.

Den Einfluß der Analytstruktur wird auch deutlich, wenn man die Sensorantworten auf Zugabe zweier Enantiomere betrachtet. Mit dem Cyclopeptid c[Cys-Lys-Cys-Lys-Cys-Trp] gelang insbesondere die Unterscheidung der Enantiomere von Arginin. Da sich das Sensorsignal der beiden Enantiomere nur wenig voneinander unterschied, wurde diese Messung zehnmal wiederholt, um Meßartefakte auszuschließen. Ein Fehler in der Einwaage der Aminosäure, der zu einem unterschiedlichen Signal führen könnte, wurde mittels UV-Spektroskopie und Circular dichroismus ausgeschlossen. Es ergab sich eine Abweichung der Analytkonzentrationen von 2 %.

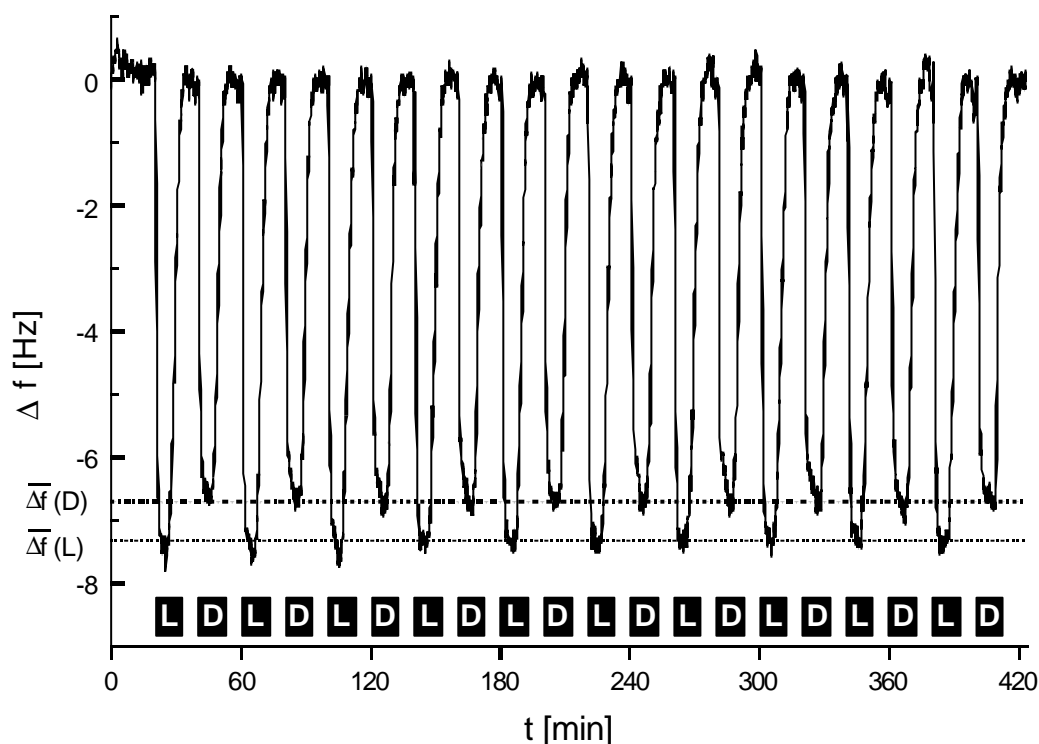


Abbildung 65: Frequenzänderung des mit Cyclopeptid c[Cys-Lys-Cys-Lys-Cys-Trp] beschichteten Schwingquarzes bei Zugabe der Enantiomere des Arginins (1 mM Arginin in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4) [siehe auch 83, 84].

In Abbildung 65 ist diese Reaktion eines mit diesem Cyclopeptid beschichteten Sensors gezeigt. Man erkennt, daß die Wechselwirkung des L-Enantiomeren größer ist, als die des D-Enantiomeren. Eine statistische Auswertung ergibt einen mittleren chiralen Trennfaktor von $\alpha = 1,12$ mit einer Standardabweichung von $s = 0,02$.

5.3.4. Abhängigkeit von der Analytkonzentration

Um eine Aussage über die eventuell vorhandenen Adsorptionsplätze auf der cyclopeptidbeschichteten Oberfläche machen zu können, wurden konzentrationsabhängige Messungen mit Lysin durchgeführt. Da mit dem HEPES-Puffer die höchsten

Frequenzverschiebungen erhalten wurden, wurde dieser als Medium verwendet. In Abbildung 66 und Abbildung 67 ist die konzentrationsabhängige Messung in 10 mM HEPES-Puffer mit Lysin dargestellt. Die Messung wurde sechs Mal wiederholt. Man erkennt, daß die Meßwerte sich sehr gut reproduzieren lassen.

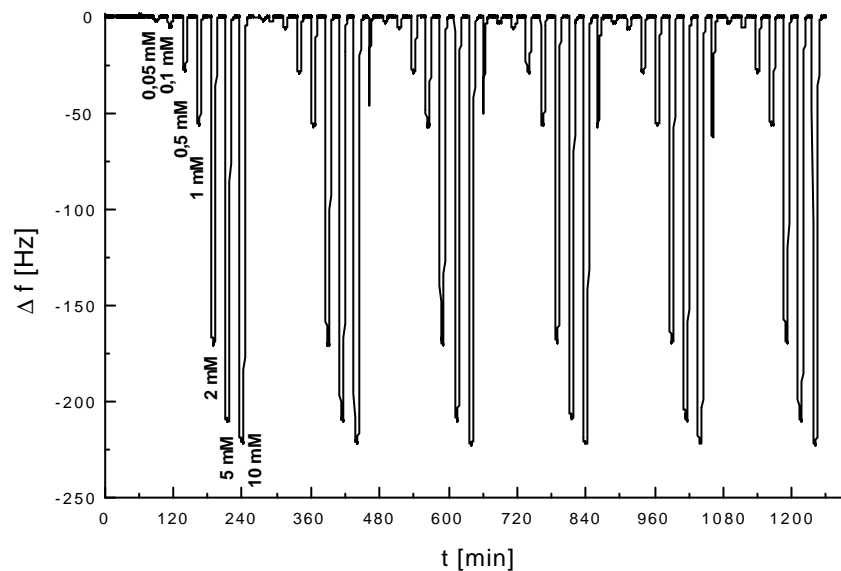


Abbildung 66: Meßkurve eines mit $c[\text{Cys-Lys-Cys-Lys-Cys-Trp}]$ beschichteten Schwingquarzes. Es wurden sechs Durchläufe mit den Konzentrationen 0,01 bis 10 mM Lysin in HEPES 10 mM (pH 7,4) durchgeführt.

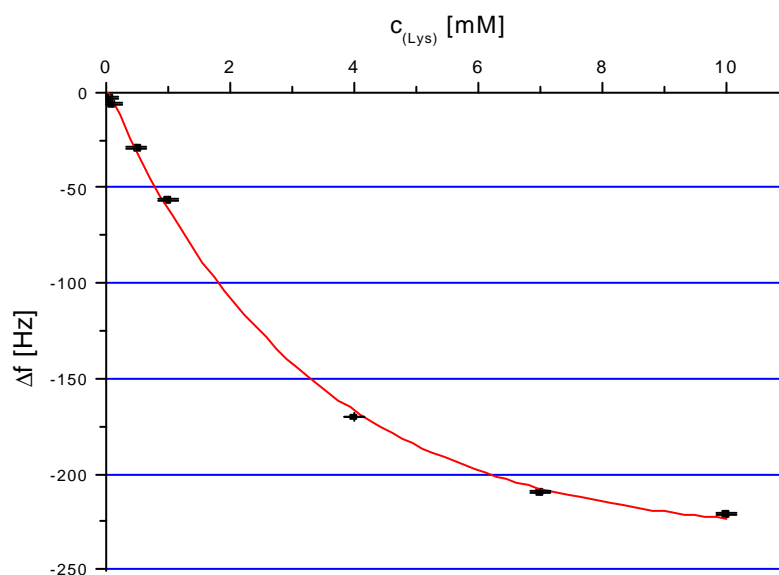


Abbildung 67: Abhängigkeit des Sensorsignals eines mit Cyclopeptid $c[\text{Cys-Lys-Cys-Lys-Cys-Trp}]$ beschichteten Schwingquarzes bei Zugabe verschiedener Konzentrationen an Lysin in HEPES-Puffer (10 mM, pH 7,4).

Nach einem linearen Ansprechverhalten im unteren Konzentrationsbereich des Analyten ergibt sich für höhere Lysinkonzentrationen eine Sättigung. Dies läßt sich mit einer Absättigung der Adsorptionsplätzen auf der Cyclopeptidschicht erklären. Als untere Detektionsgrenze ergibt sich eine Lysinkonzentration von 50 μM .

5.3.5. Einfluß der Goldoberfläche

Der Einsatz eines elektrischen Transducers in wäßriger Phase kann zur Vermutung führen, daß die Signale der Analyten bzw. die Reaktion des Sensors auf pH-Wertänderungen unabhängig von der Oberflächenbeschichtung auch durch die blanke Goldoberfläche zustandekommen können. Um den Effekt des Puffers bzw. der Transduceroberfläche ausschließen zu können, wurden Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten über einen Sensor mit $c[\text{Asp-Cys}]_3$ -Beschichtung und parallel dazu über einen Schwingquarz ohne Beschichtung (blanke Goldelektrode) geleitet (Flußpufferlösung pH 8,1; Abbildung 68).

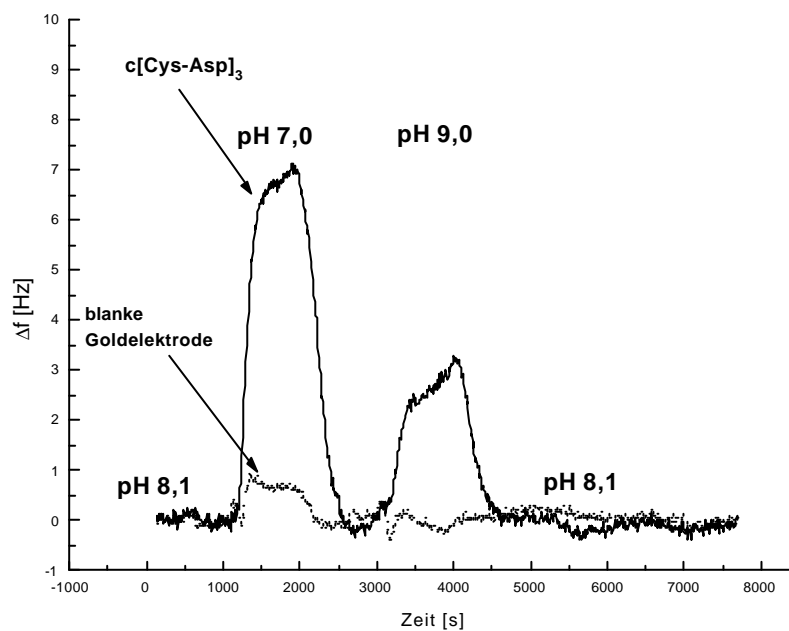


Abbildung 68: Reaktion zweier Sensoren auf Zugabe von Pufferlösungen (TRIS, 25 mM) mit unterschiedlichen pH-Wert zu einer Flußpufferlösung mit pH 8,1 (durchgezogen: Sensor mit Cyclopeptidbeschichtung; gepunktet: blanke Goldelektrode).

Man erkennt deutlich, daß ein Signal fast ausschließlich auf die Beschichtung zurückzuführen ist. Während der Sensor ohne Beschichtung kaum auf die pH-Wert-Änderung reagierte, ergab sich bei der Cyclopeptidbeschichtung ein um das zehnfache höheres Signal.

5.3.6. Cyclopeptide in ungepufferter Lösung

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, wirkt sich der Einsatz von Puffermolekülen stark auf die Wechselwirkungen der beteiligten Moleküle aus. Für nichtionische Analytmoleküle ist die Verwendung von Puffern nicht notwendig. Dadurch kann der Effekt dieser Analyten auf die cyclopeptidbeschichtete Oberfläche genauer untersucht werden.

Analyte waren Toluol, Methylcyclohexan, Butanol und Butyraldehyd. Die untersuchten Peptide waren einerseits das reine cyclische Grundgerüst ohne Seitengruppen ($c[\text{Cys-Gly}]_3$) und andererseits ein Cyclopeptid mit Nitrophenyl-Seitengruppen ($c[\text{Cys-Phe}(\text{NO}_2)]_3$) bzw. eines, bei dem eine Nitrophenylseitengruppe durch Lysin ersetzt war ($c[\text{Cys-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Cys-Phe}(\text{NO}_2)\text{-Cys-Lys}]$).

In Abbildung 69 ist die Reaktion von mit den Cyclopeptiden $c[\text{Cys-Gly}]_3$ und $c[(\text{Cys-Phe}(\text{NO}_2))_2\text{-Cys-Lys}]$ beschichteten Sensoren im Vergleich mit einem unbeschichteten Schwingquarz auf Zugabe von wässrigen Toluol- und Methylcyclohexanlösungen gezeigt.

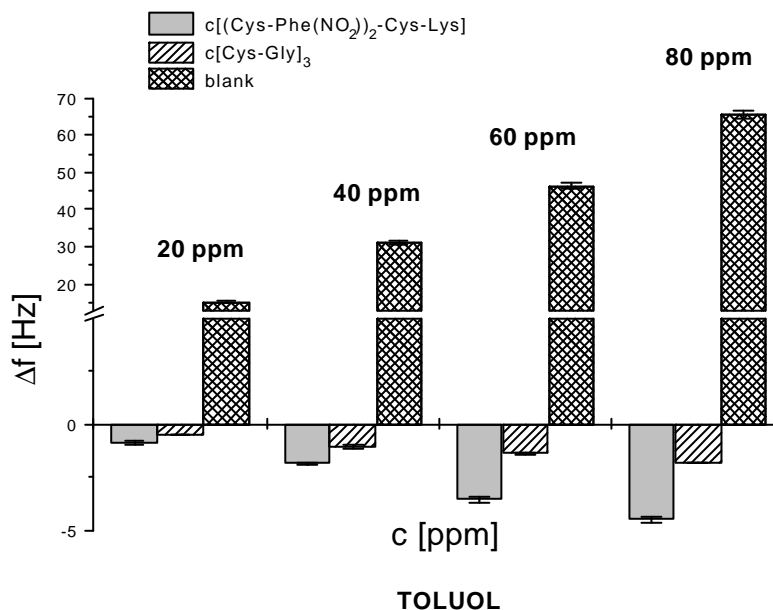


Abbildung 69: Vergleich der Sensorsignale zweier cyclopeptidbeschichteter Schwingquarze mit einem unbeschichteten Quarz bei Exposition verschiedener Konzentrationen an Toluol in Wasser. Aufgrund der hohen Signale des unbeschichteten Sensors ist die Ordinate geteilt.

Man erkennt, daß ein Sensor ohne jegliche Beschichtung ein völlig anderes Signal zeigte als ein beschichteter Sensor. Durch Änderungen an der Elektrodengrenzfläche bei Zugabe der Analytlösungen ergibt sich eine positive Frequenzänderung. Die beiden Sensoren mit Cyclopeptidbeschichtung ergaben eine negative Frequenzänderung. Dies läßt auf eine

Wechselwirkung der Analyten mit den Cyclopeptiden schließen. Toluol zeigte mit dem Cyclopeptid $c[(\text{Cys-Phe}(\text{NO}_2)_2\text{-Cys-Lys})_2\text{-Cys-Lys}]$ mehr als doppelt so große Signale als der Sensor ohne Seitengruppen. Dies ist vermutlich auf erhöhte Wechselwirkungen des aromatischen Systems zurückzuführen. Im Vergleich dazu reagierte der Analyt Methylcyclohexan weitaus stärker mit dem Sensor, der mit dem Cyclopeptid $c[\text{Cys-Gly}]_3$ beschichtet war (Abbildung 70).

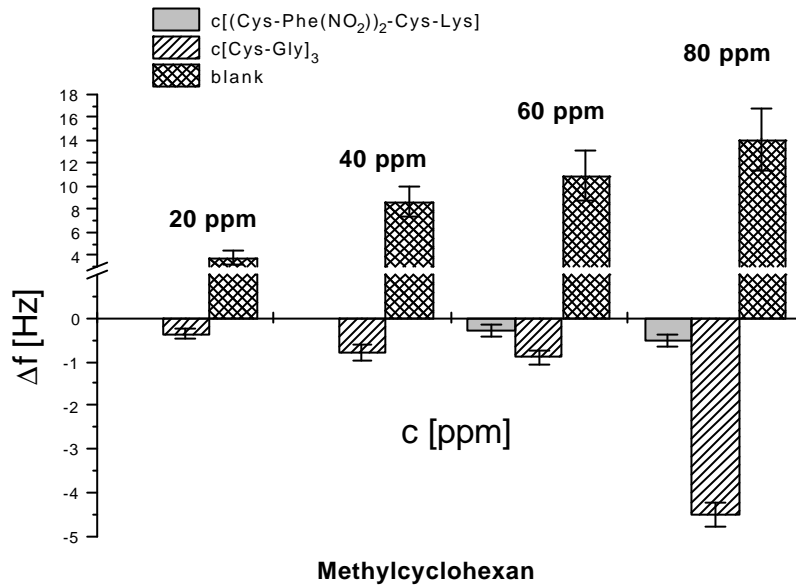


Abbildung 70: Vergleich der Sensorsignale zweier cyclopeptidbeschichteter Schwingquarze mit einem unbeschichteten Quarz bei Exposition verschiedener Konzentrationen an Methylcyclohexan in Wasser. Aufgrund der hohen Signale des unbeschichteten Sensors ist die Ordinate geteilt.

Die positive Frequenzänderung des unbeschichteten Quarzes bei Zugabe von Methylcyclohexan fiel bei diesem Analyten deutlich geringer aus.

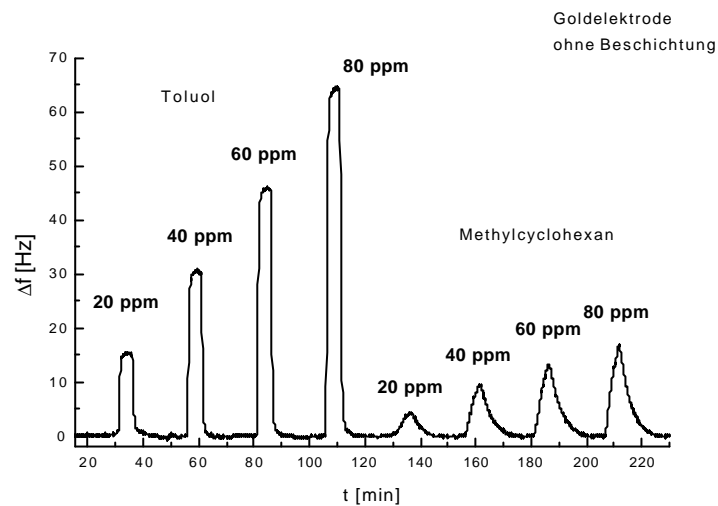


Abbildung 71: *Frequenzänderung eines unbeschichteten Quarzes bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Toluol und Methylcyclohexan.*

Da bei den unbeschichteten Sensoren eine Frequenzerhöhung auftrat, muß darauf geschlossen werden, daß sich die viskoelastischen Eigenschaften der Flüssigkeit und deren Ankopplung an die Goldschicht bei Analytzugabe verändert haben.

Die Signalform zeigt zusätzlich eine deutliche Unterscheidung zwischen Toluol und Methylcyclohexan (Abbildung 71). Während bei Toluol der Gleichgewichtszustand zwischen Oberfläche und wäßriger Analytlösung schnell und reversibel erreicht wurde, zeigte Methylcyclohexan eine langsame Wechselwirkungskinetik. Das Signal erreichte nur langsam ein Maximum ohne Sättigungsbereich. Nach einer Analytaufgabezeit von 5 Minuten wurde mit Wasser gespült; das Signal fiel nur langsam auf die Basislinie zurück.

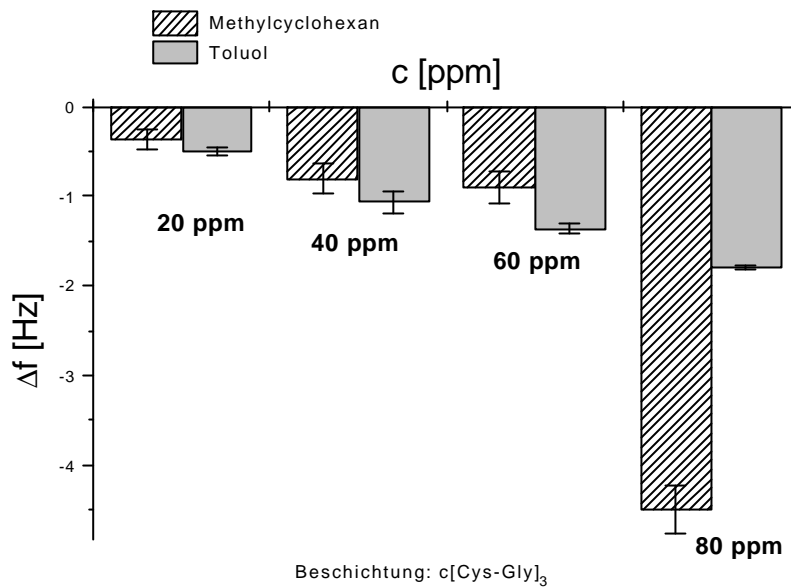


Abbildung 72: Sensorantwort eines mit c[Cys-Gly]₃ beschichteten Sensors auf Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von Toluol und Methylcyclohexan.

Vergleicht man die Signale der beiden Sensoren miteinander, so erkennt man, daß beim Übergang von einem reinem Cyclopeptidring (Abbildung 72) zu einem mit Phenyl- und Aminobutylgruppen substituierten Ring (Abbildung 73) die Signalintensität und –selektivität zunahm. Durch die zusätzlichen Gruppen wurde zwischen dem Aromaten Toluol und dem cyclischen Kohlenwasserstoff Methylcyclohexan unterschieden. Die Signalerhöhung gegenüber dem reinen Peptidring ist nach Kraftfeldrechnungen auf die Wechselwirkung des aromatischen Toluol-Systems mit der Lysin-Seitengruppe zurückzuführen.

Der enorme Signalzuwachs von Methylcyclohexan bei 80 ppm ist vermutlich auf Löslichkeitseffekte zurückzuführen. Methylcyclohexan ist nur bis zu einer Konzentration von ca. 100 ppm in Wasser löslich.

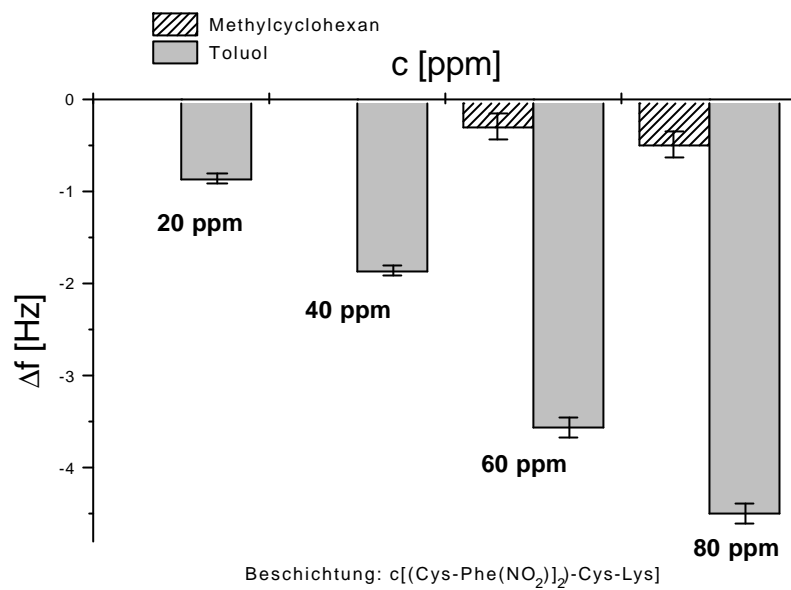


Abbildung 73: Sensorantwort eines mit c[(Cys-Phe(NO₂))-Cys-Phe(NO₂)-Cys-Lys] beschichteten Sensors auf Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von Toluol und Methylcyclohexan.

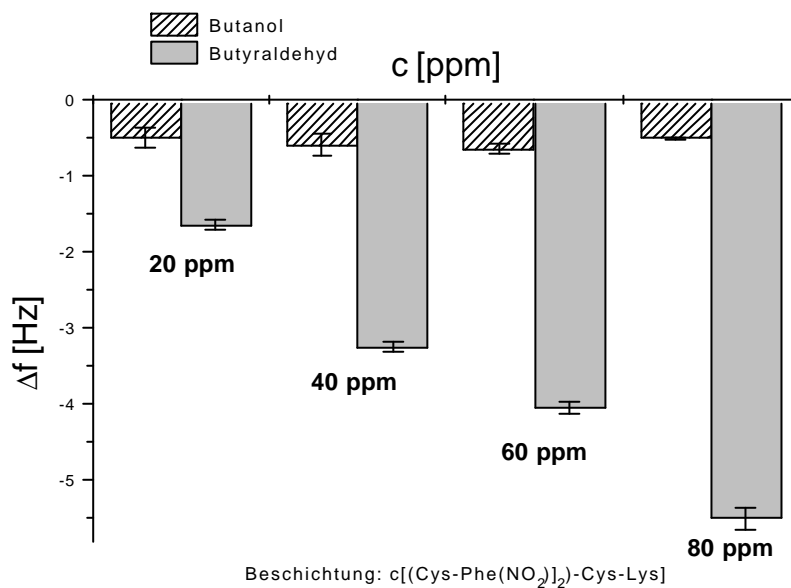


Abbildung 74: Sensorantwort eines mit c[(Cys-Phe(NO₂))₂-Cys-Lys] beschichteten Sensors auf Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von Butanol und Butyraldehyd in Wasser.

Die beiden polaren Analyten Butanol und Butyraldehyd zeigten mit dem Cyclopeptid c[(Cys-Phe(NO₂))₂-Cys-Lys] ebenfalls eine unterschiedliche Wechselwirkung (Abbildung 74). Während Butanol über alle Konzentrationen ein geringes Signal ergab, zeigte der Aldehyd sogar noch größere Wechselwirkung mit der Beschichtung als Toluol.

In Abbildung 75 sind die Meßergebnisse für alle Cyclopeptide und eine ausgewählte Konzentration der untersuchten Analyten gegenübergestellt.

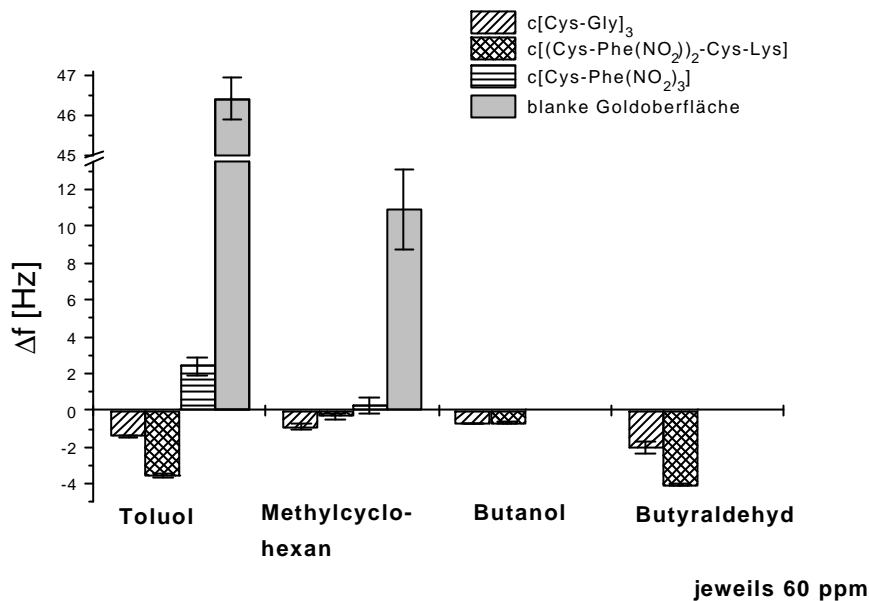


Abbildung 75: Gegenüberstellung der verschiedenen Cyclopeptide und einer unbeschichteten Sensoroberfläche: Sensorsignal bei Zugabe von jeweils 60 ppm Analyt.

Die positiven Frequenzänderungen des mit $c[\text{Cys-Phe}(\text{NO}_2)]_3$ beschichteten Schwingquarzes lassen - verglichen mit einem unbeschichteten Quarz - auf eine unvollständige Beschichtung schließen. Sowohl Toluol als auch Butyraldehyd ergaben mit dem Aminobutyl-substituierten Cyclopeptid die besten Wechselwirkungen, da dieses Cyclopeptid als einzigstes ionische Wechselwirkungen eingehen kann. Durch Kraftfeldrechnungen lassen sich π -Kation-Wechselwirkungen des Toluols mit der positiv geladenen NH_3^+ -Gruppe der Lysinseitenkette zeigen. Auch Butyraldehyd geht mit dieser Gruppe Wechselwirkungen ein. Es bilden sich H-Brücken zwischen der NH_3^+ -Gruppe der Lysinseitenkette und der Aldehydgruppe.

Die geringen Wechselwirkungen von Butanol begründen sich darin, daß Alkohole in Wasser sehr gut löslich sind und eine Anlagerung an Oberflächen energetisch und entropisch ungünstig ist. So zeigen Alkohole allgemein in Wasser sehr geringe Signale.

Die berechneten Wechselwirkungsenergien der Analyte mit den Cyclopeptiden sind in Abbildung 76 zusammengefaßt. Auch hier ergaben sich für das Cyclopeptid $c[(\text{Cys-Phe}(\text{NO}_2))_2\text{-Cys-Lys}]$ die höchsten Wechselwirkungen.

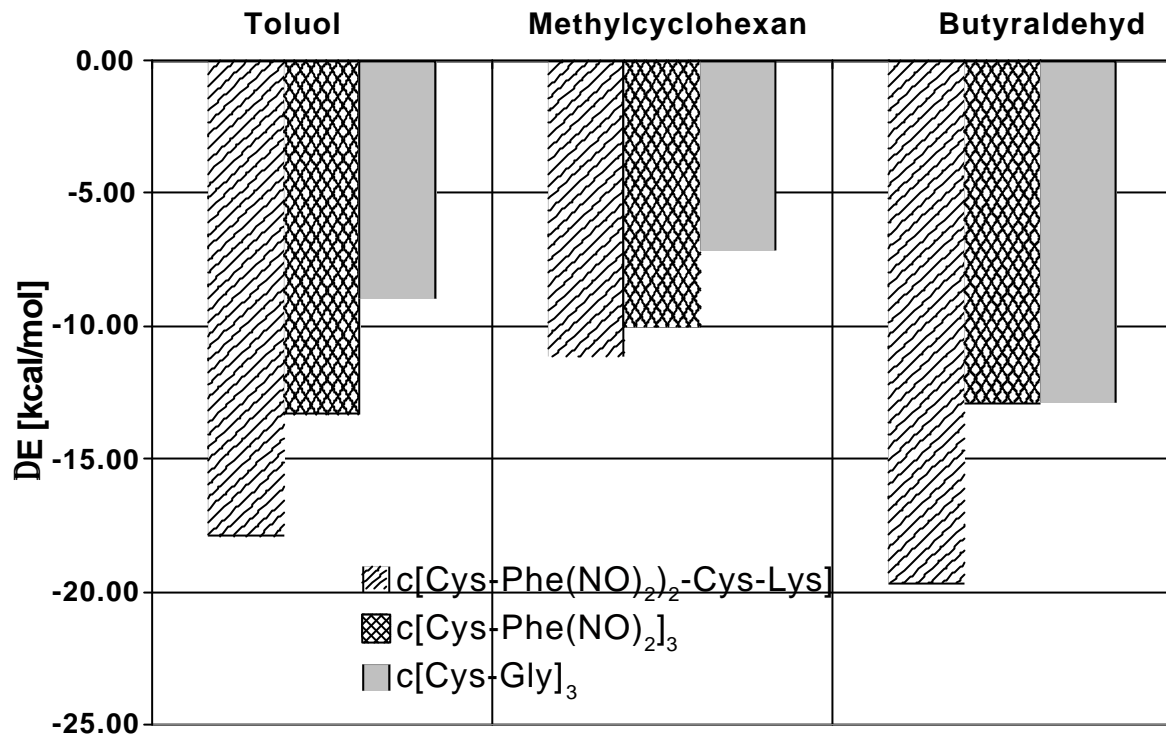


Abbildung 76: Mit Kraftfeldrechnungen ermittelte Wechselwirkungsenergien der Analyte mit drei verschiedenen Cyclopeptiden.

5.4. Blutgruppenbestimmung⁶

Um die für die Blutgruppenbestimmung wichtige Verklumpung (Agglutination) von Antikörpern und Erythrozyten mit einem Schwingquarz zu verfolgen, wurde Protein A direkt auf dessen Goldoberfläche immobilisiert. Der Quarz wurde dann in die FIA eingebaut und äquilibriert. Nach Erreichen einer stabilen Basislinie wurde der Antikörper Anti-A injiziert. Dieser sollte nun irreversibel an Protein A binden. Dies kann deutlich verfolgt werden, da die Frequenz bei Zugabe des Antikörpers irreversibel abnimmt, was einer Massenzunahme an der Oberfläche entspricht. Nach einer Spülphase mit PBS kann man erkennen, daß nur locker angelagerter Antikörper in geringem Maße ausgespült wird.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche zu blockieren, wurde nun BSA zugegeben. Der Frequenzverlauf zu höheren Frequenzen während der Zugabe läßt auf eine Reaktion des Quarzes auf die unterschiedliche Dichte der BSA-Lösung schließen. Da nach einer kurzen Spülzeit die ursprüngliche Basislinie wieder erreicht wurde, kann davon ausgegangen werden, daß kaum BSA gebunden hat, also wenig unspezifische Bindungsstellen vorhanden waren.

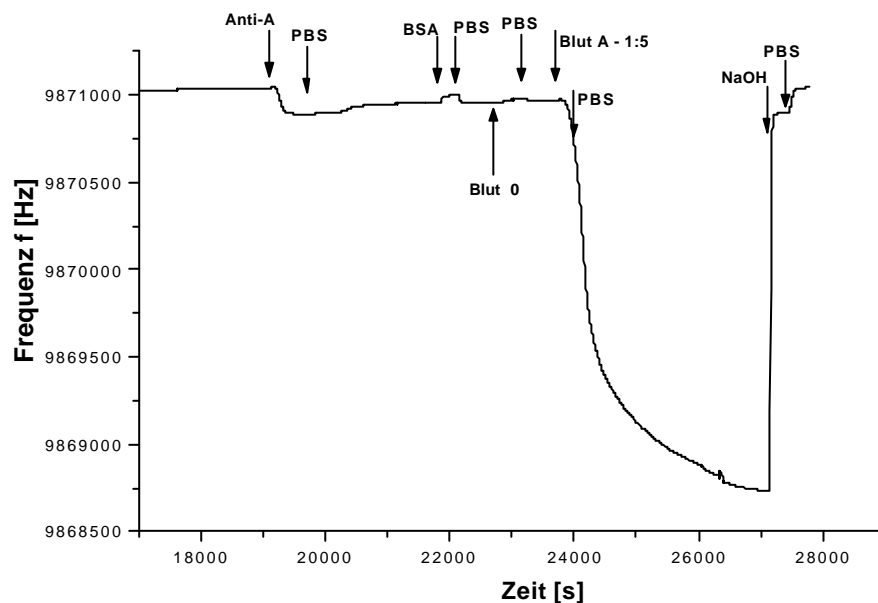


Abbildung 77: Blutgruppenbestimmung mit einem mit Protein A beschichteten Schwingquarz.

⁶ Die Blutgruppenbestimmungen wurden in Kooperation mit Dipl.Chem. Reiner Krapf durchgeführt.

Um sicher zu gehen, daß der gebundene Antikörper Anti-A nur auf Erythrozyten der Blutgruppe A reagiert, wurde eine Negativprobe mit Erythrozyten der Blutgruppe 0 injiziert (ca. 200000 Zellen/ μ l).

Der Sensor zeigte hier wie erwartet kaum eine Reaktion. Nach Ausspülen des Analyten und einer kurzen Wartezeit wurde die Positiv-Probe (Erythrozyten der Blutgruppe A, ca. 200000 Zellen/ μ l) zugegeben.

Der Sensor zeigte hier eine deutliche Reaktion. Die abnehmende Frequenz weist auf zunehmende Masse an der Oberfläche des Quarzes hin und somit auf die Agglutination der Erythrozyten mit den auf der Oberfläche angebondenen Anti-A Antikörpern.

Diese Reaktion läuft auch nach Umschalten auf PBS-Puffer noch weiter, solange sich noch Erythrozyten im Meßvolumen befinden. Nach Erreichen einer annähernden Sättigung wurde die Oberfläche mit Hilfe von 10 mM NaOH-Lösung regeneriert, um den Sensor erneut verwenden zu können. Hierbei wurde der Antikörper samt gebundenem Erythrozyten vom Protein A heruntergelöst. Man erkennt, daß diese Prozedur erfolgreich funktioniert hat, da die Schwingungsfrequenz nach der Regeneration in etwa der Frequenz entspricht, bevor Antikörper zugegeben wurde. Eine Blutgruppenbestimmung mit Hilfe von beschichteten Schwingquarzen kann somit auch mehrfach erfolgen.

Weitere Messungen werden zur Zeit im Rahmen einer weiterführenden Dissertation durchgeführt [86].

Kapitel 6: Zusammenfassung und Ausblick

6.1. Sensorsystem

Für die kommerzielle Nutzung von Sensorsystemen ist ein einfacher und robuster Aufbau der integrierten Sensoren und des Meßsystems von großer Wichtigkeit. Die eigentlichen Sensoren müssen kostengünstig herzustellen und von einem ungeübten Benutzer einfach auszuwechseln sein. Dabei dürfen sie bei etwaigen mechanischen Belastungen nicht funktionsuntüchtig werden.

Durch den Einbau der mechanisch labilen Schwingquarze in feste Sensorchips mit belastungsarmer Kontaktierung wurde der technologische Weg zur Massenfertigung geebnet. Das Sensorsystem selbst wurde thermisch und elektromagnetisch von der Umgebung entkoppelt. Durch den Aufbau können bis zu vier Sensoren gleichzeitig verwendet werden. Durch eine Software-Steuerung und Datenerfassung kann das gesamte System automatisch und kontinuierlich Meßwerte erfassen.

Ein potentieller Nutzer eines auf Schwingquarzen basierenden Sensorsystems muß lediglich die fertig zusammengebauten und mit entsprechenden Beschichtungen versehenen Sensorchips austauschen.

6.2. Schwingquarze mit Polyketonbeschichtung

Sensoren mit Polymerbeschichtung werden in der Gasphase zur Mustererkennung und Multikomponentenanalyse in verschiedensten Einsatzgebieten verwendet. So können beispielsweise verdorbene Lebensmittel erkannt oder die Alterung von Ölen verfolgt werden. Sollen solche Sensoren in der Flüssigphase eingesetzt werden, so müssen an die Beschichtungen erhöhte Ansprüche gestellt werden. Mit der Klasse der Polyketone wurden Polymere untersucht, die diesen Ansprüchen genügen. Sie haften fest auf der Oberfläche und verändern auch nach mehrwöchiger Meßzeit in Wasser ihre Struktur und Eigenschaften kaum. Dies ermöglicht reproduzierbare Messungen über lange Zeiträume.

Durch ihre Synthese lassen sie sich in verschiedensten chemischen Strukturen herstellen. Der Einbau von funktionellen Gruppen und charakteristischen Molekülen wie beispielsweise Fluorophore oder Erkennungsstrukturen bietet die Möglichkeit, gezielt Polymere mit bestimmten Eigenschaften zu synthetisieren.

Durch statische Kontaktwinkelmessungen konnten die verschiedenen Polyketone hinsichtlich ihres Verhaltens in Wasser klassifiziert werden. Mit Hilfe mikroskopischer Messungen konnte der Erhalt der Oberflächenmorphologie der Polymerschichten auch noch nach mehr als 2 Monaten Nutzung nachgewiesen werden.

Am Beispiel einer Mengenbestimmung von Stoffen in einem Stoffgemisch wurde die Funktion eines Sensorarrays auf Basis von polyketonbeschichteten Schwingquarzen gezeigt. Um eventuell auftretende Änderungen der Beschichtungen im Verlauf von Langzeitmessungen wirkungsvoll zu eliminieren, wurde die interne Standardisierung auf eine Referenzsubstanz durchgeführt. Diese Methode verbessert die Genauigkeit der Mengenbestimmung deutlich besonders, wenn es sich bei den zu analysierenden Substanzen um flüchtige Verbindungen handelt und Mehrfachmessungen durchgeführt werden.

6.3. Schwingquarze mit Polysiloxanbeschichtung

Kommerziell erhältliche Polysiloxane sind für Beschichtungsanwendungen auf Schwingquarzen wenig geeignet. Für eine feste Ankopplung an die Sensoroberfläche sind funktionelle Gruppen nötig. Mit Hilfe von Thiolgruppen lassen sie sich zwar kovalent an Goldoberflächen anbinden, allerdings sind solche angekoppelten Polymerfilme meist wenig wasserstabil, da ohne nachfolgende Quervernetzung ein fester Zusammenhalt der Polymerstränge nicht möglich ist. Solche Filme werden im Laufe der Zeit abgelöst und eignen sich nicht für reproduzierbare Messungen.

Ein Ausweg sind Polymerschichten, die über einen Sol-Gel-Prozeß direkt auf der Sensoroberfläche synthetisiert werden. Solche Schichten können wiederum durch den Einsatz einer Vielzahl von funktionalisierten Silanmonomeren mit sehr geringem Synthesaufwand hergestellt werden.

Am Beispiel zweier Silanmonomere wurde dieser Beschichtungsweg untersucht. Solche Schichten sind über eine direkte Quervernetzung von monomeren Silanen mit silanfunktionalisierten Goldoberflächen möglich. Die dadurch erhaltenen Polysiloxanschichten zeigen eine hohe Stabilität und sind im Gegensatz zu den viskosen käuflichen Siloxanen deutlich höher vernetzt.

Mit Hilfe solcher beschichteter Sensoren lassen sich die einzelnen Polymere charakterisieren. Dies ist für die Weiterentwicklung des Sol-Gel-Prozesses hinsichtlich der herrschenden Reaktionsbedingungen von großer Wichtigkeit.

6.4. Schwingquarze mit Cyclopeptidbeschichtung

Das in dieser Arbeit entwickelte und optimierte Sensorarray wurde für die Eignung von Cyclopeptiden als molekulare Erkennungsstrukturen auf Schwingquarzoberflächen in wässriger Phase eingesetzt. Aufgrund der Eigenschaft des elektrischen Transducers selbst und seiner Sensitivität auf Änderungen der elektrischen Eigenschaften der umgebenden Lösung ist diese Meßmethode weniger gut geeignet, um in elektrisch leitenden Lösungen zu messen. Monolagen aus Cyclopeptiden wurden hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit unterschiedlichen Analyten in wässriger gepufferter Lösung und ungepufferter Lösung untersucht. Es konnte ein starker Einfluß der unterschiedlichen verwendeten Puffer sowie deren Konzentration auf die Wechselwirkung der Analyte mit der Oberfläche ermittelt werden. Mit Hilfe von Kraftfeldrechnungen wurde dies bestätigt. Weiterhin wurde der Einfluß der Analytstruktur, der molekularen Erkennungsstruktur, des umgebenden Mediums und der Analytkonzentration untersucht. Die Struktur des Analyten und der auf der Sensoroberfläche befindlichen Erkennungsstruktur ermöglicht eine Klassifizierung und Unterscheidung sogar von Enantiomeren.

Da die erwünschte Wechselwirkung des Analyten mit der Erkennungsstruktur allerdings von so vielen Parametern meist negativ beeinflusst wird, sind die Grenzen einer sinnvollen Erkennung mit Hilfe von Cyclopeptidmonolagen in wässriger Phase auf Schwingquarzen erreicht.

6.5. Schwingquarze mit Antikörperbeschichtung

Die spezifische Wechselwirkung von Antigenen mit Antikörpern stellt ein System zur Erkennung und Identifizierung mittels Sensoren dar. Werden Sensoren mit den entsprechenden Antikörpern beschichtet, so kann die spezifische Reaktion des Antigens zum Antikörper-Antigen-Komplex detektiert werden.

Das im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Sensorsystem wurde zur Erkennung von Blutzellen mit Hilfe von antikörperbeschichteten Schwingquarzen eingesetzt. Eine Unterscheidung der Blutgruppen A und 0 war so möglich. Mit Antikörpern der Erythrozyten A beschichtete Sensoren erkannten die Blutgruppe A, während die Blutgruppe 0 kein Signal ergab.

Das verwendete Beschichtungsverfahren mit Protein A erlaubt die Regeneration der sensitiven Schichten und somit die Mehrfachverwendung der Sensoren. Die

Antikörperbeschichtung wird nach erfolgter Reaktion mit angebundener Antigenschicht vom mit Protein-A beschichteten Sensor abgelöst; dieser steht damit für eine erneute Beschichtung mit Antikörper zur Verfügung.

6.6. Ausblick

Eine weitere Vergrößerung des Sensorarrays auf acht Sensoren ist mit geringem elektronischem und materiellem Aufwand ohne Probleme möglich. Dadurch wird die Möglichkeit einer genaueren, schnelleren und umfassenderen Analyse von Stoffen in wäßriger Phase möglich. So können beispielsweise Gemische mit einer Vielzahl von Komponenten qualitativ und quantitativ unterschieden werden.

Für einen kommerziellen Aufbau muß das gesamte System zusammengefaßt und beispielsweise in ein tragbares Gehäuse eingebaut werden. Eine entsprechende Kalibrierung, Datenerfassung und Datenvorverarbeitung muß bereits im Gerät erfolgen.

Ein solches Gerät kann als Detektor gekoppelt mit verschiedensten Analysemethoden wie beispielsweise HPLC, LC, elektrochemischen oder optischen Transducer eingesetzt werden.

Die weitere Entwicklung könnte in Anlehnung an die in der Bioanalytik verwendeten Standards in Richtung Sensor-bestückte Platten für den Einsatz in Pipettierrobotern im Massenscreening erfolgen [87]. Auch Handgeräte in Form von Eintauchsensoren, die in die zu analysierende Lösung eingetaucht werden, sind für solche Sensoren denkbar.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymere eignen sich sehr gut, um speziell angepaßte Beschichtungen für zukünftige Anwendungen herzustellen, die den jeweiligen Anforderungen genügen. So lassen sich leicht Seitengruppen einfügen, Erkennungszentren einbauen oder Vernetzungsgrade einstellen. Im Falle der direkt aufpolymerisierten Sol-Gel-Polymere wird es erforderlich sein, genaue Bedingungen für reproduzierbare Schichtdicken zu ermitteln. Eine Methode der direkten Schichtdickenkontrolle über die Frequenzverschiebung des Quarzes wäre an dieser Stelle ein Ansatz.

Der Einsatz von antikörperbeschichteten Schwingquarzen in der Blutanalytik eröffnet die Möglichkeit, verschiedenste Blutparameter online in einem Schritt zu bestimmen. Eine Komplettbestimmung der Haupt- und Unterblutgruppen mit Rhesusfaktoren sowie eine Antikörperbestimmung kann mit einem entsprechen beschichteten Sensorarray erfolgen. Die weitere Entwicklung in Richtung eines miniaturisierten Handgerätes ist denkbar.

Mit Monolagen aus Erkennungsstrukturen sind für Schwingquarze in wässriger Phase nur geringe Signale zu erwarten. Die Massenänderung an der Oberfläche ist bei kleinen Molekülen sehr gering. Um die Signalintensitäten zu erhöhen, kann einerseits die entsprechende Erkennungsstruktur an dickere Schichten angebunden werden. Dies erhöht die Zahl der möglichen Bindungsstellen. Andererseits kann die Sensitivität des Sensors selbst erhöht werden. Wird die Schwingungsfrequenz des Quarzes erhöht, so können immer kleinere Massenänderungen detektiert werden. Die Erhöhung der Frequenz kann einerseits durch Anregung von Oberschwingungen erfolgen. Dies läßt sich elektronisch bewerkstelligen. Andererseits können Quarze mit höherer Resonanzfrequenz verwendet werden. Diese sind allerdings dünner und damit mechanisch instabiler. Erhöht man beispielsweise die Frequenz des Sensors von 10 MHz auf 30 MHz, so sinkt seine Dicke von 167 μm auf ca. 56 μm . Die theoretische Sensitivität würde sich um das neunfache erhöhen.

In der Literatur sind schon Schwingquarze mit bis zu 75 MHz Resonanzfrequenz beschrieben [88]. Zusätzlich zur mechanischen Instabilität ergibt sich durch die Frequenzerhöhung ein erhöhtes Rauschen, niedrige Frequenzstabilität und einen schlechteren Q-Faktor.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- [1] M. Otto: "Analytische Chemie", 2. Auflage Aufl.; Wiley-VCH, Weinheim, (2000), ISBN-Nr. 3-527-29840-1.
- [2] J. Mitrovics, H. Ulmer, U. Weimar und W. Göpel: "Modular sensor system for gas sensing and odor monitoring: The MOSES concept", *Acc. Chem. Res.*, **31** (1998) 307-316.
- [3] P. Curie und J. Curie: "Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées", *C. R. Acad. Sci.*, **91** (1880) 294-297.
- [4] J.W. Grate, S.J. Martin und R.M. White: "Acoustiv wave microsensors. Part I", *Anal. Chem.*, **65** (1993) 940A-948A.
- [5] D.S. Ballantine, R.M. White, S.J. Martin, A.J. Ricco, E.T. Zellers und G.C.,W.H. Frye: "Acoustic Wave Sensors: Theory, Design and Physico-Chemical Applications"; Academic Press, San Diego, (1997).
- [6] J.W. Grate, S.J. Martin und R.M. White: "Acoustiv wave microsensors. Part II", *Anal. Chem.*, **65** (1993) 987A-996A.
- [7] G. Sauerbrey: "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung", *Z. Phys.*, **155** (1959) 206-222.
- [8] M.D. Ward und E.J. Delawski: "Radial mass sensitivity of the quartz crystal microbalance in liquid media", *Anal. Chem.*, **63** (1991) 886-890.
- [9] D.M. Soares, W. Kautek, C. Fruböse und K. Doblhofer: "The electrochemical quartz-microbalance in media of changing viscoelastic properties, and the design and characterization of a suitable driver electronics", *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **98** (1994) 219-228.
- [10] M.A.M. Noel und P.A. Topart: "High-frequency impedance analysis of quartz crystal microbalances. 1. general considerations", *Anal. Chem.*, **66** (1994) 484-491.
- [11] J. Auge, P. Hauptmann, J. Hartmann, S. Rösler und R. Lucklum: "New design for QCM sensors in liquids", *Sensors and Actuators B Chemical*, **24-25** (1995) 43-48.
- [12] W.C. Duncan-Hewitt und M. Thompson: "Four-layer theory for the acoustic shear wave sensor in liquids incorporating interfacial slip and liquid structure", *Anal. Chem.*, **64** (1992) 94-105.
- [13] L. Tessier, F. Patat, N. Schmitt, G. Feuillard und M. Thompson: "Effect of the generation of compressional waves on the response of the thickness-shear mode acoustic wave sensor in liquids", *Anal. Chem.*, **66** (1994) 3569-3574.
- [14] Z.A. Shana, H. Zong, F. Josse und D.C. Jeutter: "Analysis of electrical equivalent circuit of quartz crystal resonator loaded with viscous conductive liquids", *J. Electroanal. Chem.*, **379** (1994) 21-33.

-
- [15] H. Bandey, S. Martin, R. Cernosek und A. Hillman: "Modeling the responses of thickness-shear mode resonators under various loading conditions", *Anal. Chem.*, **71** (1999) 2205-2214.
- [16] M. Rodahl, F. Hook und B. Kasemo: "QCM operation in liquids: An explanation of measured variations in frequency and Q factor with liquid conductivity", *Anal. Chem.*, **68** (1996) 2219-2227.
- [17] M. Rodahl und B. Kasemo: "Frequency and dissipation-factor responses to localized liquid deposits on a QCM electrode", *Sensors and Actuators B Chemical*, **37 (1-2)** (1996) 111-116.
- [18] K.K. Kanazawa und J.G. Gordon II: "The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with a liquid", *Anal. Chim. Acta*, **175** (1985) 99-105.
- [19] K.K. Kanazawa und J.G. Gordon II: "Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid", *Anal. Chem.*, **57** (1985) 1170-1171.
- [20] S.J. Martin, V.E. Granstaff und G.C. Frye: "Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading", *Anal. Chem.*, **63** (1991) 2272-2281.
- [21] C.E. Reed, K.K. Kanazawa und J.H. Kaufman: "Physical description of a viscoelastically loaded AT-cut quartz resonator", *J. Appl. Phys.*, **68** (1990) 1993-2001.
- [22] C. Behling, R. Lucklum und P. Hauptmann: "Possibilities and limitations in quantitative determination of polymer shear parameters by TSM resonators", *Sensors and Actuators A Physical*, **61** (1997) 260-266.
- [23] C. Behling, R. Lucklum und P. Hauptmann: "Response of quartz-crystal resonators to gas and liquid analyte exposure", *Sensors and Actuators A Physical*, **68** (1998) 388-398.
- [24] V.E. Granstaff und S.J. Martin: "Characterization of a thickness-shear mode quartz resonator with multiple nonpiezoelectric layers", *J. Appl. Phys.*, **75** (1994) 1319-1329.
- [25] L. Daikhin und M. Urbakh: "Influence of surface roughness on the quartz crystal microbalance response in a solution - New configuration for QCM studies", *Faraday Discuss.*, **107** (1997) 27-38.
- [26] M. Urbakh und L. Daikhin: "Influence of the surface morphology on the quartz crystal microbalance response in a fluid", *Langmuir*, **10** (1994) 2836-2841.
- [27] R. Lucklum, S. Schranz, C. Behling, F. Eichelbaum und P. Hauptmann: "Analysis of compressional-wave influence on thickness-shear-mode resonators in liquids", *Sensors and Actuators A Physical*, **60 (1-3)** (1997) 40-48 .
- [28] Z.A. Shana und F. Josse: "Quartz crystal resonators as sensors in liquids using the acoustoelectric effect", *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1955-1964.

-
- [29] S. Martin, H. Bandey, R. Cernosek, A. Hillman und M. Brown: "Equivalent-circuit model for the thickness-shear mode resonator with a viscoelastic film near film resonance", *Anal. Chem.*, **72** (2000) 141-149.
- [30] E. Benes: "Improved quartz crystal microbalance technique", *J. Appl. Phys.*, **56** (1984) 608-626.
- [31] V.M. Mecea: "Loaded vibrating quartz sensors", *Sensors and Actuators A Physical*, **40** (1994) 1-27.
- [32] T. Zhou, L. Nie und S. Yao: "On equivalent circuits of piezoelectric quartz crystals in a liquid and liquid properties. Part I. Theoretical derivation of the equivalent circuit and effects of density and viscosity of liquids", *J. Electroanal. Chem.*, **293** (1990) 1-18.
- [33] H. Sun, Z. Chen, W. Wlodarski und M. McCormick: "Silica and polyimide coated quartz crystal resonators for analysis of liquids ", *Sensors and Actuators B Chemical*, **35** (1996) 146-153.
- [34] H.M. Yan, G. Kraus und G. Gauglitz: "Detection of mixtures of organic pollutants in water by polymer film receptors in fibre-optical sensors based on reflectometric interference spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, **312** (1995) 1-8.
- [35] K. Bodenhöfer, A. Hierlemann, G. Noetzel, U. Weimar und W. Göpel: "Performances Of Mass Sensitive Devices For Gas Sensing: Thickness Shear Mode And Surface Acoustic Wave Transducers ", *Analytical Chemistry*, **68** (1996) 2210-2218.
- [36] R. Zhou, M. Haimbodi, D. Everhart und F. Josse: "Polymer Coated QCR Sensors For The Detection Of Organic Solvents In Water ", *Sensors and Actuators B Chemical*, **35** (1996) 176-182.
- [37] R. Zhou: "Synthese und Untersuchung der metallkomplexierenden und chemisch-sensitiven Eigenschaften von funktionellen polymeren Materialien", *Dissertation, Universität Tübingen*, (1994).
- [38] A. Hierlemann: "Massensensitive Detektion flüchtiger organischer Substanzen mit modifizierten Polysiloxanen", *Dissertation, Universität Tübingen*, (1996).
- [39] E. Drent und P. Budzelaar: "Palladium-catalyzed alternating copolymerization of alkenes and carbon monoxide", *Chemical Reviews*, **96** (1996) 663-681.
- [40] E. Lindner, M. Schmid, J. Wald, J. Queisser, M. Geprägs, P. Wegner und C. Nachtigall: "Catalytic activity of cationic diphosphaladium(II) complexes in the alkene-CO-copolymerisation in organic solvents and water in dependance on the length of the alkyl chain at the phosphene ligands", *J. Organomet. Chem.*, (2000) in press.

- [41] M. Schmid: "Synthesis and characterization of sterically optimized cationic diphospalladium(II) complexes and their application in the alternating copolymerization of olefins with carbon monoxide", *Dissertation, Universität Tübingen*, (1999).
- [42] E. Lindner, T. Schneller, F. Auer und H.A. Mayer: "Chemistry in interphases - A new approach to organometallic syntheses and catalysis", *Angewandte Chemie - International Edition*, **38** (1999) 2155-2174.
- [43] J. Livage, C. Sanchez und F. Babonneau: "Chemistry of Advanced Materials: An Overview" (Hrsg: L.V. Interrante und M.J. Hampden-Smith); VCH, New-York, (1998).
- [44] E. Lindner, T. Schneller, F. Auer und H.A. Mayer: "Chemistry in interphases - A new approach to organometallic syntheses and catalysis", *Angew. Chem., intern. ed.*, **38** (1999) 155-2174.
- [45] E. Lindner, T. Schneller, F. Auer, P. Wegner und H.A. Mayer: "Stoichiometric and catalytic reactions of the polysiloxane-bound (ether-phosphine)rhodium(I) complex [CIRh(PO)(P similar to O)] in interphases", *Chemistry A European Journal*, **3** (1997) 1833-1845.
- [46] H.-D. Jakubke: "Peptide: Chemie und Biologie", *Spektrum, Heidelberg*, (1996).
- [47] J. DiMaio, T.M.-D. Nguyen, C. Lemieux und P.W. Schiller: "Synthesis and pharmacological characterization in vitro of cyclic enkephalin analogues: effect of conformational constraints on opiate receptor selectivity", *J. Med. Chem.*, **25** (1982) 1432-1438.
- [48] B. Dietrich, P. Viout und J.-M. Lehn: "Macrocyclic chemistry: Aspects of organic and inorganic supramolecular chemistry", *VCH-Verlag, Weinheim*, 1. Auflage (1996).
- [49] A.F. Spatola und P. Romanovskis: "Cyclic peptide libraries: recent developments - in: combinatorial peptide and nonpeptide libraries" (Hrsg: G. Jung); VCH, Weinheim, (1996), 11, ISBN-Nr. 3-527-29380-9.
- [50] L. Tessier, N. Schmitt, H. Watier, V. Brumas und F. Patat: "Potential of the thickness shear mode acoustic immunosensors for biological analysis", *Anal. Chim. Acta*, **347** (1997) 207-217.
- [51] J.G. Quinn, R. O'Kennedy, M. Smyth, J. Moulds und T. Frame: "Detection of blood group antigens utilising immobilised antibodies and surface plasmon resonance", *Journal of Immunological Methods*, **206** (1997) 87-96.
- [52] G. Kraus, U. Weimar, G. Gauglitz und W. Göpel: "Mustererkennung und Multikomponentenanalyse bei chemischen Sensoren", *Technisches Messen*, **62** (1995) 229-236.

-
- [53] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte und L. Kaufman: "Chemometrics: A Textbook"; Elsevier, Amsterdam, (1988), ISBN-Nr. 0-444-42660-4 .
- [54] T. Hermle: "Bewertung und Optimierung rechnerbasierter Auswertemethoden für chemische Gassensoren", *Diplomarbeit, Universität Tübingen*, (1998).
- [55] R. Henrion und G. Henrion: "Multivariate Datenanalyse"; Springer, (1994).
- [56] Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa und Y. Ebara: "Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance", *Anal. Chem.*, **70** (1998) 1288-1296.
- [57] Y. Okahata, K. Niikura, Y. Sugiura, M. Sawada und T. Morii: "Kinetic Studies of Sequence-Specific Binding of GCN4-bZIP Peptides to DNA Strands Immobilized on a 27-MHz Quartz-Crystal Microbalance", *Biochemistry*, **37** (1998) 5666-5672.
- [58] K. Niikura, K. Nagata und Y. Okahata: "Quantitative detection of protein binding onto DNA by using a quartz-crystal microbalance", *Chem. Lett.*, **10** (1996) 863-864.
- [59] K. Niikura, H. Matsuno und Y. Okahata: "Binding behavior of lysine-containing helical peptides to DNA duplexes immobilized on a 27 MHz quartz-crystal microbalance", *Chem. Eur. J.*, **5** (1999) 1609-1616.
- [60] L.M. Furtado, H. Su, M. Thompson, D.P. Mack und G.L. Hayward: "Interactions of HIV-1 TAR RNA with Tat-derived peptides discriminated by on-line acoustic wave detector ", *Anal. Chem.*, **71** (1999) 1167-1175 .
- [61] L.M. Furtado und M. Thompson: "Hybridization of complementary strand and single-base mutated oligonucleotides detected with an online acoustic wave sensor", *Analyst*, **123** (1998) 1937-1945.
- [62] H. Su und M. Thompson: "Kinetics of interfacial nucleic acid hybridization studied by acoustic network analysis", *Biosens. Bioelectron.*, **10** (1995) 329-340.
- [63] H. Su, S. Chong und M. Thompson: "Kinetics of hybridization of interfacial RNA homopolymer studied by thickness-shear mode acoustic wave sensor", *Biosens. Bioelectron.*, **12** (1997) 161-173.
- [64] H. Su, S. Chong und M. Thompson: "Interfacial hybridization of RNA homopolymers studied by liquid phase acoustic network analysis", *Langmuir*, **12** (1996) 2247-2255.
- [65] B. Guo, J. Anzai und T. Osa: "Adsorption behavior of serum albumin on electrode surfaces and the effects of electrode potential", *Chem. Pharm. Bull.*, **44** (1996) 800-803 .
- [66] S. Ghafouri und M. Thompson: "Interfacial properties of biotin conjugate-avidin complexes studied by acoustic wave sensor ", *Langmuir*, **15** (1999) 564-572.

- [67] J. Anzai, Y. Kobayashi, Y. Suzuki, H. Takeshita, Q. Chen, T. Osa, T. Hoshi und X. Du: "Enzyme sensors prepared by layer-by-layer deposition of enzymes on a platinum electrode through avidin-biotin interaction ", *Sensors and Actuators B Chemical*, **52** (1998) 3-9.
- [68] Y. Matsumoto, Y. Okada, M. Sudoh und Y. Suzuki: "Evaluation of adsorption properties of bovine serum albumin on TiO₂ membrane by quartz crystal microbalance", *Membrane*, **23** (1998) 87-94.
- [69] M. Rodahl, F. Höök, C. Fredriksson, C.A. Keller, A. Krozer, P. Brzezinski, M. Voinova und B. Kasemo: "Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion", *Faraday Discuss.*, **107** (1997) 229-246.
- [70] I. Ben-Dov, I. Willner und E. Zisman: "Piezoelectric Immunosensors for Urine Specimens of Chlamydia trachomatis Employing Quartz Crystal Microbalance Microgravimetric Analyses", *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3506-3512.
- [71] E. Uttenthaler, C. Kößlinger und S. Drost: "Characterization of immobilization methods for African swine fever virus protein and antibodies with a piezoelectric immunosensor.", *Biosens. Bioelectron.*, **13** (1998) 1279-1286.
- [72] E. Uttenthaler, C. Kößlinger und S. Drost: "Quartz crystal biosensor for detection of the African Swine Fever disease", *Anal. Chim. Acta*, **362** (1998) 91-100.
- [73] J.M. Abad, F. Pariente, L. Hernandez und E. Lorenzo: "A quartz crystal microbalance assay for detection of antibodies against the recombinant African swine fever virus attachment protein p12 in swine serum", *Anal. Chim. Acta*, **368** (1998) 183-189.
- [74] C. Steinem, A. Janshoff, J. Wegener, W.P. Ulrich, W. Willenbrink, M. Sieber und H.J. Galla: "Impedance and shear wave resonance analysis of ligand-receptor interactions at functionalized surfaces and of cell monolayers", *Biosens. Bioelectron.*, **12** (1997) 787-808.
- [75] A. Janshoff, J. Wegener, M. Sieber und H.J. Galla: "Double-mode impedance analysis of epithelial cell monolayers cultured on shear wave resonators", *Eur. Biophys. J.*, **25** (1996) 93-103.
- [76] C. Fredriksson, S. Kihlman, M. Rodahl und B. Kasemo: "The Piezoelectric Quartz Crystal Mass and Dissipation Sensor: A Means of Studying Cell Adhesion", *Langmuir*, **14** (1998) 248-251.
- [77] K. Haupt, K. Noworyta und W. Kutner: "Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance", *Analytical Communications*, **36** (1999) 391-393.
- [78] J. Chance und W. Purdy: "Signal enhancement using a swellable polymer TSM acoustic wave sensor coating", *Analytical Letters*, **32** (1999) 1751-1760.

-
- [79] R. Lucklum, S. Rösler, J. Hartmann und P. Hauptmann: "On-line detection of organic pollutants in water by thickness shear mode resonators", *Sensors and Actuators B Chemical*, **35** (1996) 103-111.
- [80] S. Rösler, R. Lucklum, R. Borngräber, J. Hartmann und P. Hauptmann: "Sensor system for the detection of organic pollutants in water by thickness shear mode resonators", *Sensors and Actuators B Chemical*, **48** (1998) 415-424.
- [81] B. Neubig und W. Briese: "Das große Quarzkochbuch"; Franzis-Verlag, Feldkirchen, (1997), ISBN-Nr. 3-7723-5853-5.
- [82] A. Abu-Surrah und B. Rieger: "High molecular weight 1-olefin/carbon monoxide copolymers: a new class of versatile polymers", *Topics in Catalysis*, **7** (1999) 165-177.
- [83] D. Leipert: "Mikrostrukturierte Peptidfunktionalisierung von Oberflächen und molekulare Rezeptoren auf der Basis von Cyclopeptiden", *Dissertation, Universität Tübingen*, (1998).
- [84] T. Weiß: "Organische Monoschichten zur molekularen Erkennung", *Dissertation, Universität Tübingen*, (1998).
- [85] M. Kaspar, H. Stadler, T. Weiß und C. Ziegler: "Thickness shear mode resonators ("mass-sensitive devices") in bioanalysis", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366** (2000) 602-610.
- [86] R. Krapf: "Blutgruppenbestimmung und Blutserumuntersuchungen mit Schwingquarzen", *Dissertation, Universität Kaiserslautern*, (2001).
- [87] J. Rickert: "Massensensitive Biosensoren zur spezifischen Detektion von Affinitätsreaktionen", *Dissertation, Universität Tübingen*, (1997).
- [88] B. Zimmermann und P. Hauptmann: "Design, manufacturing and characterisation of high-frequency thickness-shear-mode resonators for chemical analysis in liquids", *Proc. 8th IMCS, Basel*, (2000) 102.
- [89] G. Noetzel: "persönliche Mitteilung", *www.motech.de*, (1998).

Kapitel 8: Anhang

8.1. Technischer Anhang

8.1.1. Technische Zeichnung des Sensorchips

In den folgenden Abbildungen sind technische Zeichnungen der verwendeten Sensor-Halterungen gezeigt. Diese bestanden aus einer Edelstahlabkapselung, die dem Chip Stabilität verleiht und gleichzeitig als Abschirmung gegen elektromagnetische Störungen fungiert. In diese Kapselung wurde ein O-Ring (1,5 x 1 mm) eingelegt.

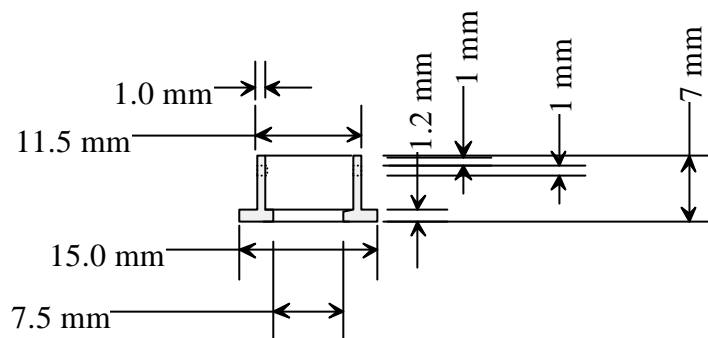


Abbildung 78: Seitenansicht der Sensorabkapselung aus Edelstahl.

Der Sensor wurde auf den Einsatz gelegt und gegen den in der Abkapselung liegenden O-Ring gepreßt. Der Einsatz wurde mit drei Stahlstiften in seiner Position gehalten. Die beiden Elektroden des Quarzes wurden mit Federkontaktstiften durch den Plexiglas-Einsatz hindurch kontaktiert.

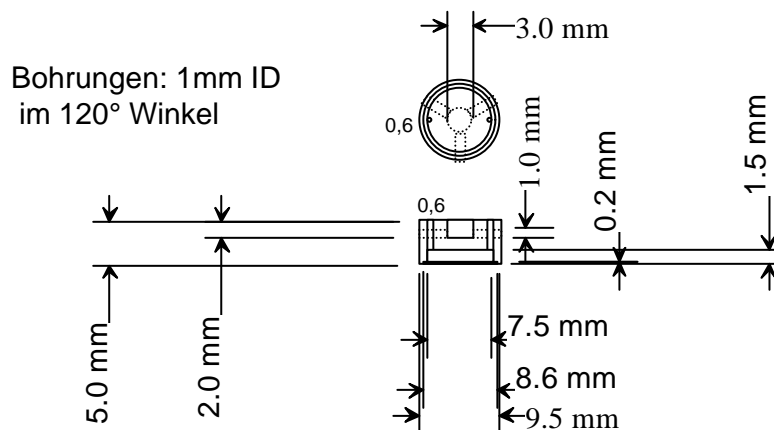


Abbildung 79: Aufsicht und Seitenansicht des Einsatzes. Das Quarzplättchen wird mit diesem Einsatz gegen einen O-Ring gepreßt, der in der Abkapselung liegt. Material: Plexiglas.

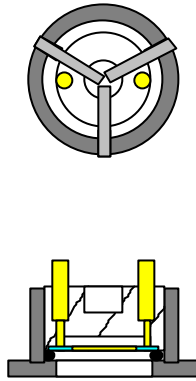


Abbildung 80: Aufsicht und Seitenansicht des komplett zusammengebauten Sensorchips mit Federkontaktstiften.

8.1.2. Oszillatorschaltung

In den folgenden Abbildungen ist die verwendete Miniatur-Oszillatorschaltung gezeigt. Mit Hilfe dieser Schaltung wurden die Schwingquarze mit einer Resonanzfrequenz von 10 MHz zum Schwingen angeregt.

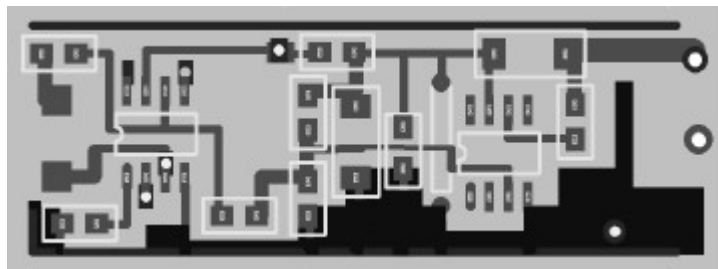


Abbildung 81: Oberseite der verwendeten Mini-Oszillatorschaltung (Abmessung: 15 x 45 mm).

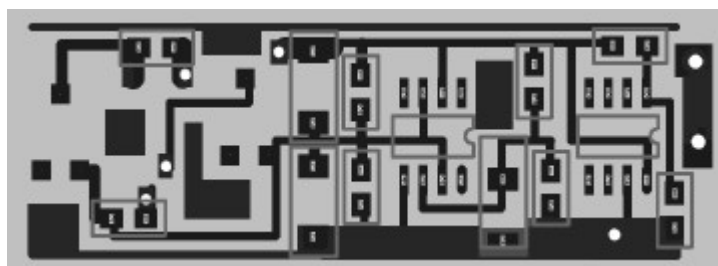


Abbildung 82: Unterseite der verwendeten Mini-Oszillatorschaltung (Abmessung: 15 x 45 mm).

Die genauen Spezifikationen der einzelnen Bauteile sind im Bedarfsfall bei der Firma Motech, Reutlingen erhältlich [89].

8.2. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. vorgestellt:

T. Weiß, D. Leipert, M. Kaspar, G. Jung und W. Göpel: "Monolayers of Cyclopeptides: A new Concept for Molecular Recognition and Enantiomeric Discrimination" *Adv. Mater.*, **11** (1999) 331-335.

D. Leipert, T. Weiß, M. Kaspar, J. Mack, W. Göpel, G. Jung: „Cyclopeptide derivatives and their use as molecular receptors“, *Biosensors '98*, Berlin, (5/1998).

M. Kaspar, H. Stadler, T. Weiß und Ch. Ziegler: „Thickness shear mode resonators ("mass-sensitive devices") in bioanalysis“, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366** (2000) 602-610.

Vortrag:

Michael Kaspar: „Cyclopeptidderivate – Käfigstrukturen als molekulare Rezeptoren“, *Biosensors 1999*, München.

Danksagung

Herrn Prof. Wolfgang Göpel[†] möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und ganz besonders für die großzügige Bereitstellung der ausgezeichneten Arbeitsbedingungen danken.

Herrn Prof. Günter Gauglitz danke ich für die unproblematische Übernahme der Betreuung dieser Arbeit und seine spontane Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Heinz Oberhammer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Frau Prof. Christiane Ziegler danke ich für ihre Mühe bei der Weiterführung der Forschungen innerhalb des Arbeitskreises nach dem plötzlichen und tragischen Tod von Prof. Göpel.

Herrn Dr. Tilo Weiß gilt mein Dank für sein stetes Engagement in technischer und wissenschaftlicher Hinsicht und seine Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders danken möchte ich auch Frau Elke Nadler für viele lustige AFM- und REM-Sitzungen und die Anfertigung dieser Bilder.

Frau Dr. Christiane Stingel danke ich für ihre Mühe bei den Kraftfeld-Rechnungen und die Überlassung der relevanten Ergebnisse.

Dr. Gert Nötzel gilt mein besonderer Dank für die Überlassung der Schwingquarzelektronik und seine Anregungen in allen die Elektronik betreffenden Themen.

Für seine Synthesen diverser Cyclopeptide und sein reges Interesse an den zugehörigen Messungen möchte ich mich bei Herrn Dr. Dietmar Leipter ganz herzlich bedanken.

Herrn Dr. Hans-Joachim Egelhaaf gilt mein Dank für seine Diskussionsbereitschaft in Sachen Cyclopeptide und sein Engagement innerhalb der Cyclopeptidgruppe.

Für ihre Synthesen verschiedenster Polymere bedanke ich mich besonders bei Herrn Dr. Markus Schmid, Herrn Dr. Joachim Wald, Frau Dipl. Chem. Elisabeth Holder aus dem Arbeitskreis von Prof. Lindner.

Herrn Wolfgang Neu, sowie der gesamten Werkstatt mit den Herren Klaus Schaupp, Thomas Jäger und Johannes Seidl danke ich für ihre großen Mühen bei der Fertigung unzähliger Sensorchips und Meßzellen.

Den Herren Dipl. Chem. Hartmut Stadler und Dipl. Ing. Aleksandar Vidic danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft in Sachen Impedanzmessungen und Elektronik und die Bereitstellung des Impedanzmeßprogramms.

Allen Kollegen im Kaffeeraum (Götz Reinhard, Ralf Mayer, Martin Rösch, Olaf Wurzinger, Elke Nadler, Egon Merz, Simone Hahn und Reiner Krapf) danke ich für die regenerativen Mittagspausen mit ihren informativen Diskussionen.

Meinen Kollegen Dipl. Chem. Reiner Krapf, Dr. Christian Bauer und Dr. Ralph Burckardt danke ich für die lustige und anregende Atmosphäre und Zusammenarbeit im Labor und Büro 8N23.

Allen bisher nicht genannten Kollegen und Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ohne die man sich immer schwer tut.

Meiner Freundin Simone Hahn gilt mein ganz besonderer Dank für ihre langjährige Unterstützung während dieser Arbeit.

Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, P. Grathwohl, G. Häfeling, H.P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, B. Koppenhöfer, K.-A. Kovar, D. Krug, H. Liebich, E. Lindner, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, V. Schurig, F.F. Seelig, H.-U. Siehl, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, H.-D. Wiemhöfer, K.-P. Zeller, C. Ziegler

Lebenslauf

Michael Kaspar
geboren am
13. Mai 1971
in
Frankfurt/Main

Schulbildung:

| | |
|-------------|----------------------------------|
| 1977 - 1981 | Grundschule Frechen / Waldenbuch |
| 1981 - 1990 | Uhland-Gymnasium Tübingen |
| 1990 | Allgemeine Hochschulreife |

Wehrdienst:

| | |
|-------------|--|
| 1990 – 1991 | 1. Raketenartillerie-Bataillon 250 in Großengstingen |
|-------------|--|

Studium:

| | |
|----------------|--|
| WS 1991/92 | Immatrikulation an der Eberhard-Karls Universität in Tübingen im Fach Chemie-Diplom |
| 3/1994 | Abschluß der Diplomvorprüfungen |
| 7/1995-8/1995 | Hilfsassistenten-Tätigkeit im Arbeitskreis Prof. Lindner am Thema „ <i>Metallorganische homogene Katalyse mit unterkoordinierten Rhodiumkomplexen</i> “ |
| 5/1997 | Diplomhauptprüfungen |
| 6/1997-12/1997 | Diplomarbeit mit Thema „ <i>Detektion von flüchtigen organischen Stoffen mit massensensitiven Sensoren in wäßriger Phase</i> “ unter Anleitung von Prof. Göpel |
| 1/1998-11/2000 | Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Tübingen DFG-Graduiertenkolleg „ <i>Quantitative Analyse und Charakterisierung pharmazeutisch und biochemisch relevanter Substanzen</i> “ Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: „ <i>Analyse von organischen Stoffen in flüssiger Phase mit der Quarzmikrowaage</i> “ unter Anleitung von Prof. Göpel und Prof. Gauglitz |