



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Selektivitätsuntersuchungen an Mohnproteinen mit  
geprägten Quarzsensoren**

Verfasser

**Christoph Langsam**

angestrebter akademischer Grad

**Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer nat.)**

Wien, 2009

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt: Chemie

Betreuerin / Betreuer: O. Univ. Prof. Dr. F. Dickert



## **Danksagung**

Diese Arbeit entstand von Juni bis Oktober 2009 unter der Leitung von o. Univ. Prof. Dr. Franz L. Dickert am Institut der analytischen Chemie der Universität Wien.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dickert für die Aufgabenstellung, seine Unterstützung, sowie insbesondere seine stets positive Motivation, die mir als Ansporn für die Arbeit diente.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. Romana Schirhagl meinen Dank aussprechen, die mich in meine Tätigkeit eingeführt, mich betreut hat und mir hilfreich zur Seite gestanden ist. Zusätzlich danke ich Herrn Mag. Biedermann und Herrn Mag. Grillberger für ihre Hilfe bei Problemen mit der Datenverarbeitung und Hilfestellungen auf dem Gebiet der Elektronik.

Meinen Eltern, die mich seit Jahren in meinem naturwissenschaftlichen Interesse, vor allem in der Chemie gefördert haben, gebührt der größte Dank.



Danksagung	3
1. Allgemeiner Teil	7
1.1. Aspekte und Anforderungen der modernen Analytik	7
1.1.1. Apparatur	7
1.1.2. Methode	7
1.1.3. Analyt	8
1.1.4. Sensorik	8
1.2. Chemosensoren	8
1.2.1. Aufbau	8
1.2.2. Anwendungen	9
1.3. Aufgabenstellung	9
2. Theoretischer Teil	10
2.1. Schwingquarze	10
2.2. Piezo- Effekt	11
2.3. Kristallographische Achsen von Quarz	12
2.4. Resonanz	13
2.5. Schwingungszustände	14
2.6. AT- Cut	15
2.7. Dämpfung	16
2.8. Sauerbrey- Gleichung	17
2.9. QCM	19
2.10. AFM	20
2.11. Prägetechnik	22
2.11.1. Oberflächenprägung	22
2.11.2. Polymer	23
2.11.3. Selbstorganisation	23
2.11.4. Spin- coating	23
2.11.5. Stempeltechnik	23
2.12. Relevante Wechselwirkungen	24
2.12.1. Adsorptionsisothermen	25
2.12.2. Wirt- Gast- Chemie	27
2.12.3. Diffusionsgesetze	28
2.13. Proteine	28

2.13.1	Methoden der Proteinbestimmung	29
2.13.1.1.	Kjeldahl	29
2.13.1.2.	Warburg- Christian	30
2.13.1.3	Bradford	30
2.13.1.4.	Lowry	30
3.	Praktischer Teil	31
3.1.	Messgeräte	31
3.1.1.	Messzelle	31
3.1.2.	Oszillatorschaltkreis	32
3.1.3.	Oszilloskop und Frequenzzähler	33
3.1.4.	Netzwerkanalysator	33
3.2.	Design der Quarze	34
3.2.1.	Elektroden	35
3.2.2.	Siebdrucktechnik	36
3.3.	Beschichtung	36
3.4.	Polymer	36
3.5.	Messung	37
3.6.	Proteine als Analyt	37
3.6.1	Isolierung	37
4.	Ergebnisse und Diskussionen	38
5.	Anhang	58
5.1.	Zusammenfassung Deutsch	58
5.2.	Summary English	59
Literatur		60

# 1. Allgemeiner Teil

## 1.1. Aspekte und Anforderungen der modernen Analytik

Gegen Ende des 20. Jahrhunderts gelang es der analytischen Chemie durch vielschichtige Forschung und der Nutzung, Verbesserung, sowie der Kombination bereits gut etablierter Analysestrategien, Bestimmungsgrenzen verschiedener umwelt- und technikkrelevanter Stoffe drastisch herabzusetzen. In Zeiten des immer höher werdenden Lebensstandard, ist vor allem die Erfassung von gesundheitsgefährdenden Substanzen, umweltschädlicher Gase, sowie Schwermetallen und organischen Verbindungen im täglichen Gebrauch von großer Relevanz.

### 1.1.1. Apparatur:

Das Streben der Analytik nach größtmöglicher Sensitivität, Selektivität und Spezifität, sowie nach minimaler Bestimmungsgrenze verschiedenster Analyte wird durch die Entwicklung und Optimierung immer komplexerer Analysemethoden realisiert. Dies bedingt komplexe Analyseapparaturen, zu deren Bedienung und Wartung eine besondere Ausbildung und sorgfältige Unterweisung notwendig ist. Daraus resultieren hohe Personalkosten und ein bisweilen beträchtlicher Zeitaufwand. Ein weiteres Hindernis stellt die, aufgrund der Komplexität resultierende räumliche Größe solcher Apparaturen dar. Bei Feldmessungen ist ein Einsatz vor Ort nur erschwert möglich, was zum Teil aufwändige Transportprozeduren, einen großen Zeitaufwand und damit Kosten mit sich bringt.

### 1.1.2. Methode:

Bei den Prinzipien, die auf der Änderung physikalisch- chemischer Eigenschaften der Analyte oder deren Umgebung beruhen spielt der Faktor Zeit eine herausragende Rolle. Hier ist die Probenvorbereitung, die meist den größten Zeitaufwand darstellt, auf ein Minimum zu reduzieren. Die Methoden sind in Anbetracht des Zeitfaktors geeignet zu wählen. Speziell in Grenzsituationen, bei denen spontane Entscheidungen gefragt sind, sind rasche einfache Messungen, mit geringerer Genauigkeit meist sinnvoller angebracht, als genaue aufwändige Laboranalysen.

### **1.1.3. Analyte:**

Neben dem medial wieder stärker ins Rampenlicht getretenen Bewusstsein für Umwelt und Klima zählt die Vorbeugung von Zivilisationskrankheiten (Allergien, Krebs, Alzheimer ...) zu einem besonderen Schwerpunkt in der bioanalytischen Chemie. Forschungen zur Detektion von Zellen, Oberflächenproteinen, Viren und Antikörpern haben sich im ersten Jahrzehnt des 21. Jahrhunderts etabliert und stellen ein großes Potenzial für die zukünftige analytische Chemie dar.

### **1.1.4. Sensorik:**

Geeignete Lösungsstrategien um den obig angeführten Anforderungen gerecht zu werden, konnten bereits seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts durch die resistive potentiometrische und kapazitive Chemosensorik realisiert werden. Handliche, billige, leicht zu bedienende Sensoren, die im automatischen „on-line-monitoring“ selektiv nach kurzer Ansprechzeit Analyte bestimmen können sind der Stand der Technik und werden in naher Zukunft von großer Bedeutung in der analytischen Chemie sein [1].

## **1.2. Chemosensoren**

### **1.2.1. Aufbau [2]**

Im engeren Sinne besteht jeder Chemosensor aus 4 wichtigen Bauteilen: Der sensitiven Schicht, einem Transducer, dem Signalwandler und einem EDV- Teil. Die sensitive Schicht ist der Kern des Sensors. Sie kann eine, speziell für den Messanalyten aufgebrauchte Oberfläche, zum Beispiel ein Polymer, oder eine Membran sein. Die Messung erfolgt durch selektive Adsorption des Analyten an der sensitive Schicht. Wünschenswert ist bei Adsorptionsphänomenen eine nahezu vollständige Reversibilität der Adsorption. Die Größe des Messsignals wird dabei durch das chemische Gleichgewicht von ad- und desorbierenden Analyten sehr stark beeinflusst. Der Transducer ist der eigentliche Sensorbauteil, da sich dessen chemisch- physikalische Eigenschaften proportional der Adsorption des Analyten an die sensitive Schicht verändern. In vielen Chemosensoren erzeugt der Transducer aufgrund der Eigenschaftsänderung ein elektrisches Feld und wandelt ein Adsorptionssignal in ein elektrisches Signal um.

Der Signalwandler transformiert die vom Transducer erhaltenen elektrischen Signale in digitale Signale, welche vom EDV- Teil gelesen und verarbeitet werden können. Dadurch können die Daten auf einem Display visualisiert werden. Der EDV- Teil ist meist ein Computer, der die erhaltenen Signale speichert, verarbeitet und z. B.: grafisch darstellen kann. Durch Berechnungen aus den erhaltenen Daten wie z. B.: statistische Auswertungen, kann dadurch leicht die maximale Information aus den Rohsignalen gewonnen werden.

### **1.2.2. Anwendungen**

Einer der wichtigsten und bekanntesten Vertreter der potentiometrischen Chemosensoren ist die Lamdasonde, die seit 1970 weltweit millionenfach in Autos vorhanden, den  $O_2$ - Gehalt im Kraftstoff detektiert [3]. Auch der Figaro- Taguchi-Sensor, ein resistiver, auf  $SnO_2$  basierender Sensor, der reduzierende umweltrelevante Gase ( $CH_4$ ,  $CO$ ,  $H_2$ ) aber auch Alkohole nachweisen kann, ist seit langem kommerziell erhältlich.  $NO_2$  kann mit sehr guter Empfindlichkeit mit einem „surface akustik wave“ (SAW)- Oszillator- Sensoren beschichtet mit einem 15 nm Film von Blei- Phtalocyaninen nachgewiesen werden. Technische Größen, wie zum Beispiel Temperatur in der Umgebung oder der Druck im Reifen, sind ebenfalls mit der SAW-Technologie detektierbar [4]. In der Medizin bietet die Sensorik ebenfalls eine große Vielfalt an Anwendungen: Hohe Personalkosten durch medizinische Betreuung und Pflege älterer Personen werden durch automatische Messsysteme für körperrelevante Parameter auf ein Minimum reduziert. Die Daten sind per „on- line- monitoring“ permanent überwachbar und es kann im Notfall spontan Hilfe angefordert werden. Beispiele hierfür sind der Doppelkatheter mit einer Chem- FET- Bestimmung von Ionen im Blut, sowie amperometrische Blutzuckersensoren auf der Basis von Enzymen mittels Glucoseoxidase [5].

### **1.3. Aufgabenstellung**

Es sollen Untersuchungen von Mohnproteinen auf Mohnsensoren und die Querempfindlichkeit gegenüber anderen Proteinen angestellt werden. Allgemein stellen diese Arten von Untersuchungen einen großen Bedarf sowohl im medizinischen als auch im lebensmitteltechnischen Bereich dar. In Hinblick auf durch einzelne Proteine hervorgerufene Allergien, ist die Forschung zur spezifischen Detektion einer gewissen Proteingruppe, beziehungsweise von Proteinen, die in einem gewissen Lebensmittel vorhanden sind, ein sehr wichtiger Aspekt zur Behandlung und Prävention von allergischen Reaktionen und Krankheiten. Ähnliche Versuche wurden zuvor bereits mit Pollen erfolgreich abgeschlossen [6].

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1. Schwingquarze

Durch die Anwendung des inversen Piezo- Effektes wird ein speziell geschnittenes Einkristallplättchen aus Quarz in Schwingung versetzt, dessen Resonanzfrequenz sich bei Masseanlagerungen ändert. Für diese charakteristische Eigenschaft wird der Schwingquarz als massensensitiver Bauteil chemosensorischer Messungen herangezogen. Neben analytisch- chemischen Anwendungen wird der Schwingquarz bereits seit Jahrzehnten für chronometrische und informationstechnische Zwecke benutzt, welche in der heutigen Zeit nicht mehr wegzudenken sind [7], [8]. In Analogie zur Zeitmessung, bei der seit 6 Jahrhunderten das Pendel dem mechanischen Getriebe den periodischen Takt vorgibt, übernimmt in Quarzuhren diese Funktion der Schwingquarz. Ist es in Pendeluhr die ständig manuell aufgezugene Feder, welche einem dämpfungsbedingten Ausklingen des Pendels entgegensteuert, so sorgt in der Quarzuhr das Anlegen einer elektrischen Spannung für eine kontinuierliche Oszillation. Die gesamte Informationstechnologie wäre ohne die Entwicklung von Schwingquarzen nicht möglich gewesen, da sämtliche Bauteile in dieser Sparte auf Taktgeber angewiesen sind. Es kommen dabei je nach Bedingung Schwingquarze unterschiedlicher Resonanzfrequenzen zur Anwendung. Damit diese Quarze in den unterschiedlichsten Größen und Geometrien dennoch einen großen Bereich an Resonanzfrequenzen hervorbringen können, werden auch sämtliche Schwingungsmoden der Quarze eingesetzt. So werden Schwingquarze einer Echtzeituhr mit 32768 Herz betrieben, da die Division durch  $2^{15}$  dem Sekundentakt entspricht. Aus geometrischen Gründen haben sich Stimmgabelschwinger für deren Einsatz als geeignet erwiesen. Neben anderen elektrotechnischen Bauteilen, z. B.: LCD- Displays in Taschenrechnern, die nahezu stromlos durch das Anlegen einer äußeren Spannung betrieben werden können, besitzen auch die auf Schwingquarzen basierenden Bauteile einen äußerst geringen Stromverbrauch. Das ist der Grund, weshalb eine Armbanduhr mit einer kleinen Knopfzelle als Spannungsquelle mehrere Jahre betrieben werden kann.

Aufgrund der Temperaturanfälligkeit von Schwingquarzen wäre eine ständige Korrektur nicht thermostatisierter Quarzuhren, zum Beispiel Armbanduhr, von Nöten. Auch ist die Temperatur von Prozessoren ständig konstant zu halten.

## 2.2. Piezo- Effekt:

Dieses Phänomen wurde 1880 von den Brüdern Pierre und Jaques Curie am Turmalinkristall entdeckt und dient in der Wissenschaft als Basis sämtlicher elektrischer Bewegungsmodule [9]. Materialien, die piezoelektrische Eigenschaften besitzen, haben meist kristalline Modifikationen und elektrisch isolierende Eigenschaften.

Die  $\alpha$ - Modifikation des Quarzes ist das bekannteste Material, das den Piezo- Effekt besitzt. Dessen mechanische Robustheit und äußerst schwach gedämpfte Resonanzfrequenzen, machen den Quarz zu einem sehr brauchbaren chemischen Sensor. Etliche Piezokeramiken, wie Bariumtitanat, Lithiumniobat, Lithiumtitanat oder die technisch wichtigste Piezo- Keramik BZT (Blei- Zirkon- Titanat) zeigen zwar einen besseren Effekt, sind aber in Relation zum natürlich vorkommenden Quarz erheblich teurer [10], [11]. Davon abgesehen, ist der Effekt des Quarzes für viele sensitive Messungen durchaus ausreichend. Wird ein piezoelektrisches Material durch eine mechanische Kraft deformiert, tritt im Kristallgitter eine Polarisierung auf, das heißt, der positive und der negative Ladungsschwerpunkt, welche im Normalzustand übereinander liegen, überdecken sich nicht mehr, sondern verschieben sich voneinander. Aus dieser Trennung resultiert ein Dipolmoment und die Ausbildung einer Feldstärke, analog der Feldstärke zwischen zwei echten getrennten Ladungen z. B.: in einem Kondensator. Physikalisch gesehen ist die Spannung über den Weg direkt proportional zur Feldstärke. Die Deformation des Quarzes, die laterale Ladungstrennung und die daraus resultierende Spannung sind somit direkt proportional, wie in Gleichung 1 beschrieben.

$$U = E \cdot \Delta x$$

Gl. 1

U...Spannung,

E...Feldstärke,

$\Delta x$ ...Verschiebung

Durch periodische Deformationsbewegungen lassen sich auf diese Weise Wechselspannungen mit Phase, Amplitude und Frequenz der Deformationsfrequenz erzeugen.

Wird nun in inverser Strategie eine Wechselspannung an den Quarz über Elektroden angelegt, wird der Quarz durch die periodische Deformationsbewegung in Schwingung versetzt. Dieser sogenannte inverse Piezo- Effekt wurde bereits 1 Jahr nach Entdeckung des Piezo- Effektes von Gabriel Lippmann theoretisch vorausgesagt und ebenfalls von den Gebrüdern Curie nachgewiesen.

### 2.3. Kristallografische Achsen von Quarz

Der Quarzkristall besitzt ein trigonales Kristallsystem mit einer hexagonalen Struktur. Die dreizählige Drehachse wird auch Z-Achse, oder optische Achse genannt, da das Phänomen der Doppelbrechung entlang dieser Achse auftritt. Die Z-Achse bildet die Hauptachse. Die X- Achse erstreckt sich normal dazu vom Zentrum an der Z- Achse bis zu einer der 6 Ecken des Kristallprismas. Diese Achse wird auch elektrische Achse genannt, da durch Deformation der Piezo- Effekt entlang dieser Achse messbar wird. Normal zu beiden Achsen steht die Y- Achse, welche mechanische Achse genannt wird. Wird längs der X- Achse eine elektrische Spannung angelegt, resultiert daraus eine Elongation entlang der Y- Achse. Dieses Verhalten der Y- Achse kommt dem inversen Piezo- Effekt gleich. Das

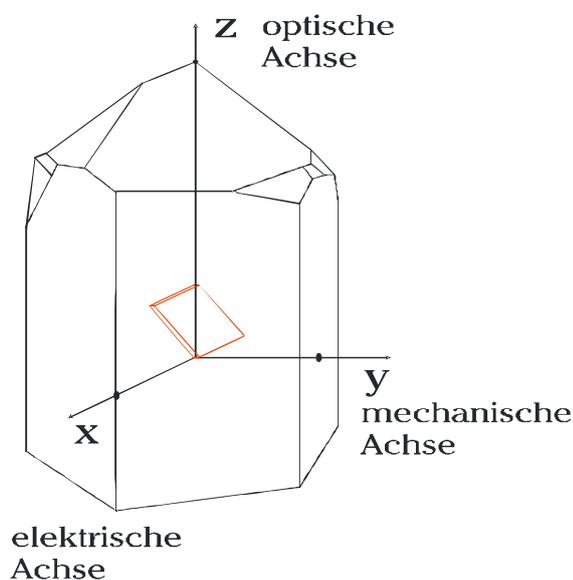


Abb. 1: Kristallografische Achsen eines Kristalls mit AT-

e-Zentrum. Über der Temperatur von  $573^{\circ}\text{C}$ , welche als Limit chemischer Quarzsensoren angesehen wird, wandelt sich die unter dieser Temperatur stabile  $\alpha$ -Quarzkristall- Modifikation in den über dieser Temperatur stabileren  $\beta$ - Quarz um. Durch diese polymorphistische Umwandlung verliert der Kristall seine polaren Achsen und damit seine Anwendung als chemischer Sensor. Der Quarz mit seinen Achsen ist in Abbildung 1 dargestellt.

Vorhandensein von polaren Kristallachsen ist für den Piezo- Effekt eine wichtige Voraussetzung. Polare Achsen in einem Kristall zeichnen sich dadurch aus, dass der Kristall, ähnlich einem Dipol, nach einer  $180^{\circ}$ -Rotation um eine solche polare Achse nicht zur Deckung gebracht werden kann. Dementsprechend besitzt ein Kristall mit polaren Achsen kein Symmetri-

## 2.4. Resonanz

Mit den Auswirkungen von Resonanzeffekten und erzwungenen bzw. parametrischen Schwingungen sind bereits kleine schaukelnde Kinder vertraut. Wird der Quarz unter Ausnutzung des inversen Piezo- Effektes durch Anlegen einer Wechselspannung in Schwingung versetzt, tritt bei Erreichen seiner Eigenfrequenz eine Resonanz auf, die ihn nahezu ungedämpft weiter schwingen lässt. Die ständig existierende Dämpfung verhindert eine Resonanzkatastrophe. Gemäß der Thomson- Formel besitzt jeder elektrische Schwingkreis mit Spule und Kondensator sowohl eine serielle, als auch eine parallele Resonanzfrequenz. Auch der Schwingquarz kann daher in einem elektronischen Ersatzschaltbild als Schwingkreis dargestellt werden. Die serielle Resonanzfrequenz beschreibt jene Frequenz, bei der eine nahezu ungedämpfte Schwingung auftritt, wobei hingegen an der etwas höher liegenden parallelen Resonanzfrequenz die Dämpfung maximal wird. Mathematisch betrachtet, werden die komplexen Impedanzen der seriellen und der parallelen Schaltung gleichgesetzt [12]. Der erhaltene Ausdruck für die Gesamtimpedanz beschreibt einen Zählerterm und einen Nennerterm. Durch Null- setzen von jeweils einen der beiden Terme erhält

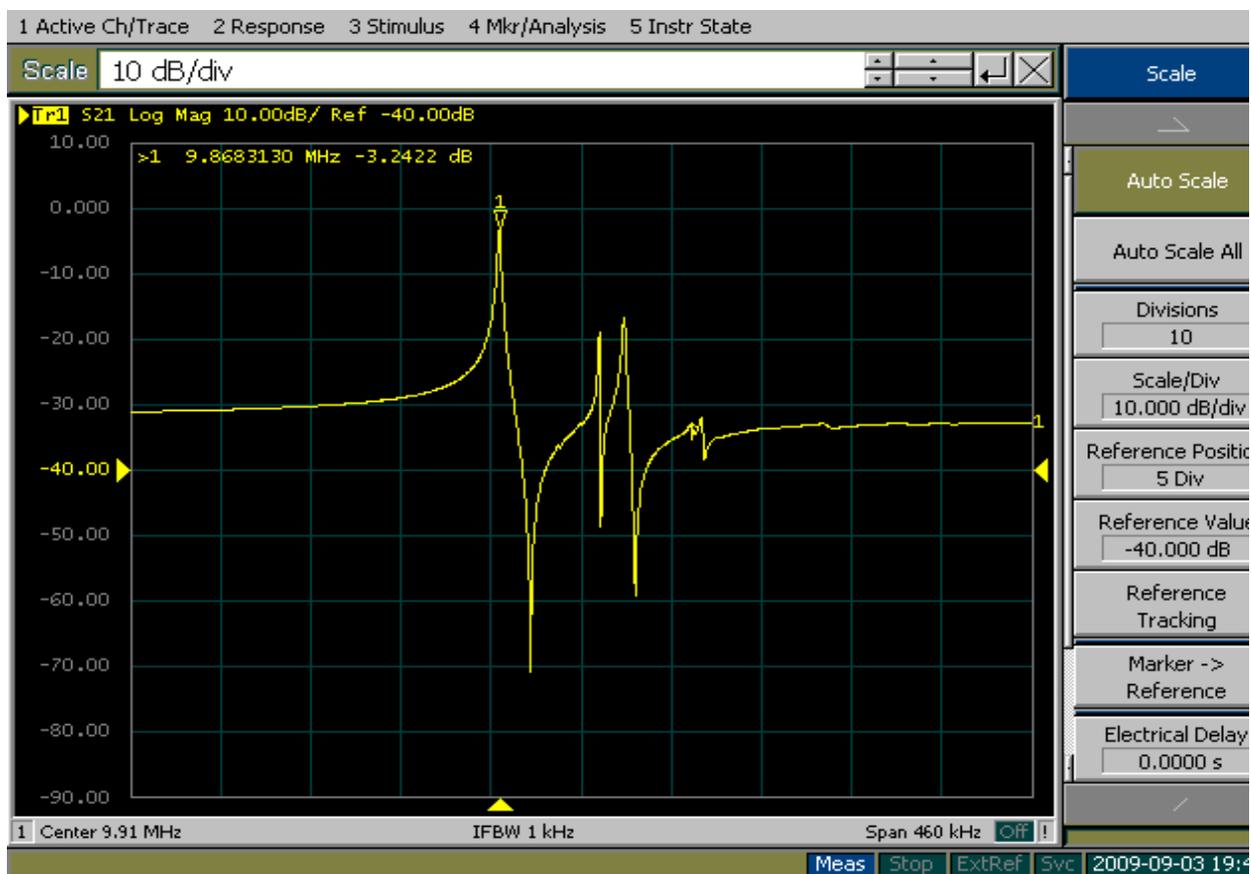


Abb. 2: Dämpfungsspektrum verschiedener Schwingungsmoden

man 2 unterschiedliche Frequenzen. Die Resonanzfrequenz für  $Z=0$  wird serielle Resonanzfrequenz bezeichnet, während die parallele Frequenz den Umstand für maximale Impedanz beschreibt. Abbildung 2 zeigt ein Dämpfungsspektrum, bei dem neben der Dickenschwingung weitere Schwingungsmoden zu sehen sind. Diese Nebenresonanzen besitzen ebenfalls serielle und parallele Resonanzfrequenzen.

## 2.5. Schwingungszustände

In Analogie eines mechanischen elastischen Stabes kann auch ein Quarzkristall in verschiedene Richtungen deformiert werden und verschiedene Schwingungsmoden

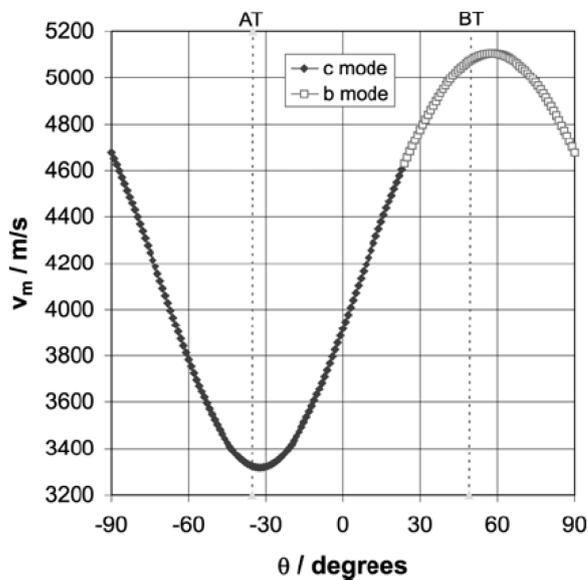


Abb.3: Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit

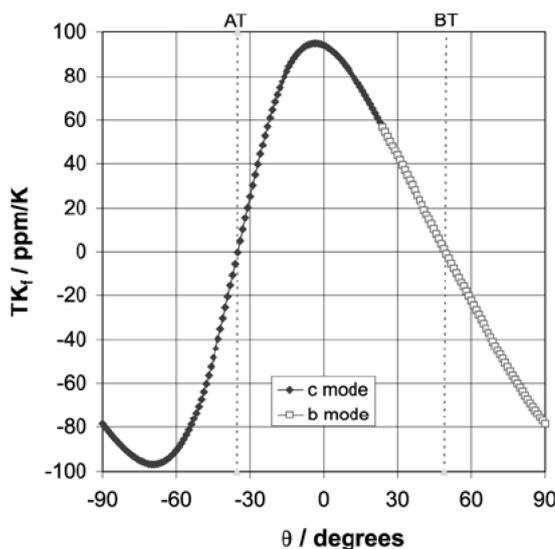


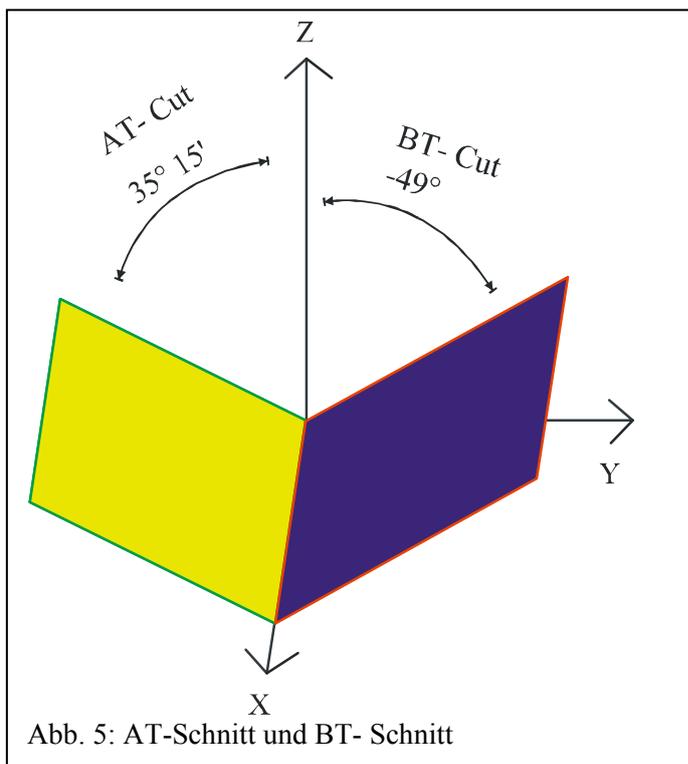
Abb. 4: Temperaturabhängigkeit bei 360°- Messung um die X- Achse. In AT und BT- Schnitten sind die Temperatur- koeffizienten Null

einnehmen. Die Eigenfrequenzen werden durch Materialkonstanten des Quarzes determiniert. Die Bevorzugung einer bestimmten Schwingungsmoden hängt sehr stark vom kristallografischen Schnitt des Quarzplättchens aus dem jeweiligen Einkristall ab. Mögliche Schwingungsmoden für diese Schwingquarze sind in dem Fall Deformations- Scheer-Torsionsschwingungen und Dickenschwingungen. In allen dieser Schnitte aus dem Einkristall treten sämtliche dieser Schwingungen in unterschiedlichen Relativintensitäten, Frequenzen und Kopplungsverhältnissen auf. Die Schallgeschwindigkeit der einzelnen Quarzschnitte trägt entscheidend zur Qualität bei. Bei der Suche temperaturunabhängiger Quarzschnitte reduziert sich aufgrund der Beseitigung longitudinaler Schwingungen die Auswahl auf Quarzschnitte längs der X-

Achse. Bei  $360^\circ$ - Messungen um die X- Achse, entdeckte man die 2 temperaturunabhängigen Kristallschnitte „AT“ und „BT“. Die Vorzüge des AT- Cuts liegen im ersten relevanten Koeffizienten der Temperaturabhängigkeit. Der zur 3. Potenz mit der Temperatur ansteigende Koeffizient ist viel niedriger, als der quadratisch ansteigende Wert des BT- Schnitts. In Abb. 3 ist die Schallgeschwindigkeit eines Quarzes bei unterschiedlichen Schnittwinkel dargestellt. Sie beträgt nahezu ein Minimum im AT- Schnitt, während sie für den BT- Schnitt fast im Maximum liegt. In Abb. 4 ist die Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Schnittwinkel zu sehen. Sie verschwindet im AT- und im BT- Schnitt [13].

## 2.6. AT- Cut:

Jede der Schwingungsmoden besitzt unterschiedliche Eigenschaften, die je nach Aufgabenstellung genutzt werden können. Für die Anwendungen eines



massensensitiven Chemosensors ist eine weitgehende Temperatur- und Druckunabhängigkeit erwünscht. Die Dickenschwingung wird diesen Anforderungen am besten gerecht. Um die Resonanz der Dickenschwingung zu maximieren wird das Quarzplättchen im AT- Schnitt aus dem Einkristall des Quarzes erzeugt. Der AT- Schnitt bezeichnet den Schnitt entlang der X- Achse im Winkel von  $35^\circ 15'$  von der Z- Achse in negativer Richtung zur Y- Achse. Darüber hinaus beträgt der lineare

Temperaturkoeffizient in dessen Abhängigkeitsgleichung einen Wert nahe bei Null. Der Grund dafür ist, dass sich zwei ähnliche Temperaturkoeffizienten der elastischen Nachgiebigkeit in ihren Werten aufheben, weshalb der Korrektoreffekt bei geringen Temperaturänderungen vernachlässigt werden kann. Abbildung 5 verdeutlicht die bevorzugten Kristallschnitte hinsichtlich Lage und Winkel zu den kristallografischen Achsen [14].

## 2.7. Dämpfung

Die Dämpfung [15] ist ein Maß für den Spannungs- oder Leistungsverlust in elektronischen, mechanischen oder akustischen Schwingkreisen. In der Elektronik beschreibt sie den Verlustfaktor zwischen Eingangs- und Ausgangsspannung und wird in Dezibel angegeben (siehe Gleichung 2). Mit Hilfe eines Netzwerkanalysators können Resonanzfrequenzen und Dämpfungen von elektrischen Schwingkreisen gemessen werden. Im Einsatz von massensensitiven Schwingquarzen stellt die Dämpfung bei der seriellen Resonanzfrequenz ein Maß für die Qualität des Schwingquarzes dar.

$$a = 20 \cdot \lg \left( \frac{U_1}{U_2} \right) \text{ dB}$$

a... Dämpfung

Gl. 2

$U_1$ ...Eingangsspannung

$U_2$ ...Ausgangsspannung

Sorgfältige Elektrodenbeschichtung und Behandlung der Quarzplättchen lassen den Quarz an trockener Luft eine Dämpfung von  $-1,5$  dB erreichen. Im Allgemeinen können bei diesen Bedingungen mit Quarzplättchen bis zu einer Dämpfung von  $-3$  dB gute Ergebnisse erzielt werden.

Die ungestörte Dämpfung beruht auf den verlustfreien Bildungs- und Induktionsvorgängen der elektrischen und magnetischen Felder. Aufgrund der hohen Dielektrizitätskonstante von Wasser treten die elektrischen Feldlinien verlustreich in die Wasserphasen hinaus. Dieser Effekt wird durch das Vorhandensein von Elektrolyten in der wässrigen Phase zusätzlich verstärkt. Die Folgen davon sind Zunahmen der Resonanzdämpfungen um 5 dB- Einheiten und eine Verstärkung des weißen Rauschens um einen Faktor 10 bis 20.

Viskoelastische Effekte sind in wässrigen Phasen einflussreiche Faktoren in Bezug auf auftretende Frequenzfluktuationen des Schwingquarzes, auf Grund derer die Messung erheblich erschwert wird.

## 2.8. Sauerbrey- Gleichung

G. Sauerbrey formulierte diese Gleichung 1959 um die Korrelation zwischen Frequenz- und Masseänderung unter Berücksichtigung von mechanischen Stoffparametern und Konstanten zu beschreiben. Relevant für chemosensorische Messungen mit Schwingquarzen ist die Gleichung hinsichtlich der direkten Proportion von Masse und Frequenz, sowie der quadratischen Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Ausgangsfrequenz [16].

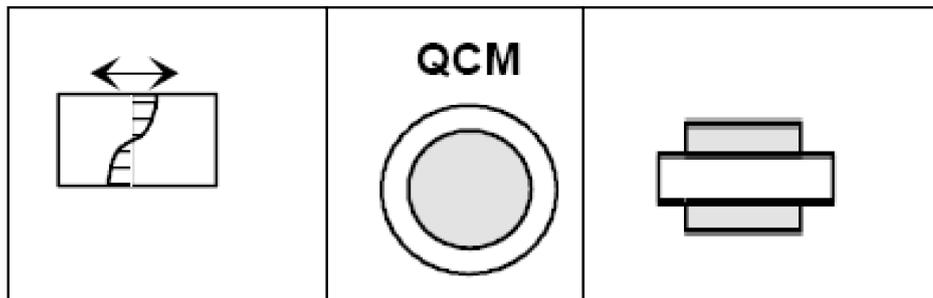


Abb. 6: Seitenansicht eines Schwingquarzes. Bei der Dickenschwingung wird eine stehende akustische Welle durch den Bulk des Quarzes generiert ( links). Auf und Seitenansicht einer QMB. grau= Elektroden (mitte und rechts).

Die Herleitung dieser Formel erfolgt aus der Überlegung, dass, wie in Abbildung 6 gezeigt, im Resonanzfall eine stehende Welle mit halber Wellenlänge ausgebildet wird. Diese Frequenz stellt die Grundfrequenz dar. Diese Überlegung zeigt die indirekte Proportionalität der Quarzdicke zu der Grundfrequenz, wie in den Gleichungen 3 und 4 verdeutlicht.

$$f_0 = \frac{v}{2d}$$

Gl. 3

$$d = \frac{v}{2f_0}$$

Gl. 4

v...Schallgeschwindigkeit im Quarz

d...Schichtdicke des Plättchens

f<sub>0</sub>...Grundfrequenz

Wird in die von Sauerbrey ermittelte Gleichung 5,

$$\frac{\Delta f_0}{f_0} = \frac{\Delta d}{d} = \frac{\Delta m}{\rho A d}$$

Gl. 5

der Term der Dicke (Gleichung 4) eingesetzt, erhält man die Sauerbrey- Gleichung (Gleichung 6), mit der direkten Proportionalität der Frequenzänderung in Relation zu der Masseänderung des Quarzes durch den Analyten, der an der Polymerschicht adsorbiert ist. Des Weiteren ist die quadratische Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Grundfrequenz ersichtlich.

$$\Delta f = -2f_0^2 \frac{\Delta m}{\rho v A}$$

Gl. 6

$\rho$ ...Dichte des Quarzplättchens

$v$ ...Schallgeschwindigkeit im Quarz (3300 m/s)

$A$ ...Fläche der Goldelektrode

$m$ ...Masse des Analyten

$f_0$ ...Resonanzfrequenz des Schwingquarzes

## 2.9. QCM

Der Name QCM steht für „quartz crystal microbalance“ und bezeichnet eine 35°25‘ AT- Cut geschnittene sphärische Quarzplatte, welche 168 µm dick ist und 15,5 mm im Durchmesser misst (siehe Abb. 7). Die Resonanzfrequenz der hauptsächlich auftretenden Dickenschwingung liegt bei 10 MHz. Durch Auftragen von Elektroden leitfähig gemacht, gilt diese Quarzmikrowaage als eine der wichtigen Chemosensoren.

Die erforderliche Schichtdicke einer QCM kann auf einfache Weise nach Gleichung 4 berechnet werden. Die Grundresonanz tritt dann auf, wenn eine stehende Welle mit halber Wellenlänge zwischen den Elektroden durch die Quarzschicht ausgebildet werden kann. Ist die gewünschte Grundfrequenz zum Beispiel 10 MHz, muss die Dicke des Quarzes somit ein 20 Millionstel der Strecke sein, die eine akustische Welle im Quarz in einer Sekunde zurücklegt. Messungen haben ergeben, dass die Schallgeschwindigkeit in einem AT- geschnittenen Quarzplättchen etwa 3300 m/s beträgt (siehe Abb. 3). Diese Strecke, 3300 m, durch 20 Millionen dividiert, ergibt die gewünschte Schichtdicke von etwa 168 µm.

Gemäß der Sauerbrey- Gleichung verstärkt sich der Messeffekt mit der Grundfrequenz zum Quadrat. Da das Rauschen nur in direkter Proportion zu der Frequenz ansteigt, resultiert daraus eine allgemein verbesserte Messqualität und Sensitivität. Das Limit stellt die mechanische Belastbarkeit des Quarzes dar. Wird eine höhere Grundfrequenz erwünscht, so muss für die stehende Welle die Dicke der Quarzschicht um die Hälfte verringert werden. Das Risiko, die QCM durch unsachgemäße Handhabung mechanisch zu beschädigen, ist bei 20 MHz- QCM bereits sehr groß. Im Allgemeinen stellen 10 MHz- Mikrowaagen einen Kompromiss zwischen Sensitivität und mechanischer Bruchresistenz dar.

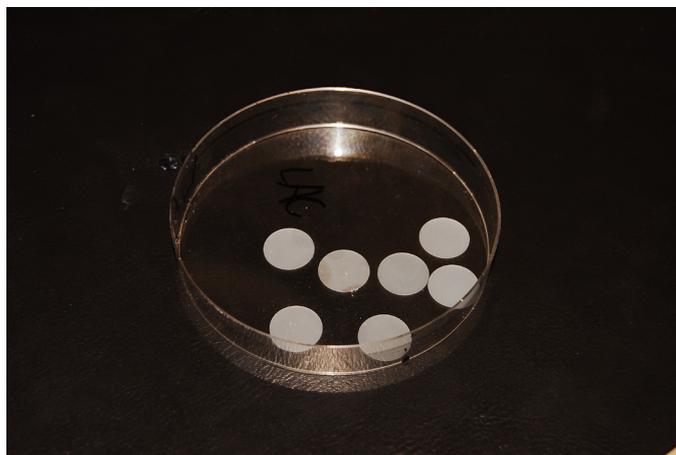


Abb. 7: Mehrere QCM- Quarze in einer Petrischale

## 2.10. AFM

AFM ist die Abkürzung für „atomic force microscopy“, die auf Deutsch Rasterkraftfeldmikroskopie genannt wird. In Abbildung 8 ist ein AFM- Gerät zu sehen und in Abbildung 9 dessen Aufbau.

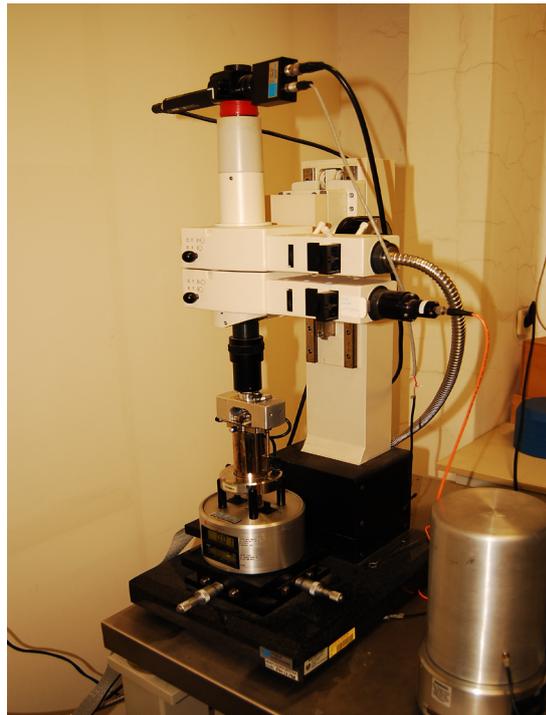


Abb. 8: AFM- Gerät im Labor des Institut für analytische Chemie an der Universität Wien

Das triviale physikalische Prinzip der Deformation durch Einwirken einer Kraft wird zur Untersuchung von Oberflächen ausgenutzt und kann vertikale Unebenheiten von wenigen Nanometern auflösen. Das AFM- Mikroskop besteht aus einem Lichtmikroskop, an dessen Objektiv über dem Objektträger ein Cantilever mit einer dünnen Spitze angebracht ist, wie in Abbildung 9 gezeigt. Abbildung 10 zeigt die Form des Cantilevers [17].

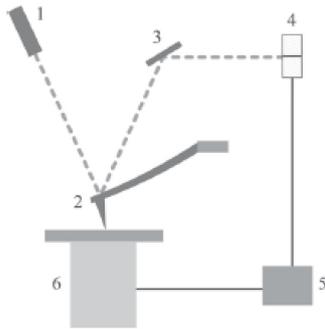


Abb. 9: Prinzip der AFM- Messung

1...Laser, 2...Cantilever mit Goldschicht zur Reflexion, 3... Spiegel, 4... CCD- Kamera, 5...Elektronik, 6...Rechner

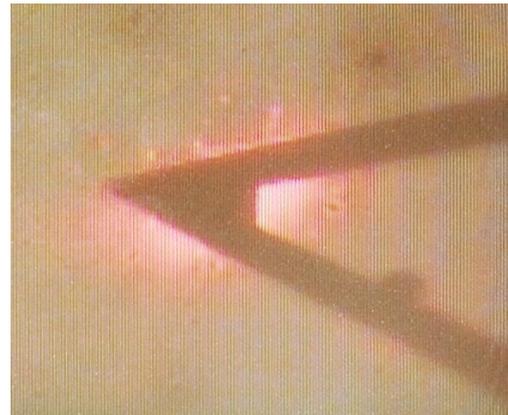


Abb 10: Sicht von oben auf die Goldschicht des Cantilevers, auf die der Laserstrahl gerichtet ist.

Der in Dreiecksform gestaltete Cantilever ist an der Oberseite mit einer reflektierenden Goldschicht überzogen und besitzt die physikalischen Materialeigenschaften einer Deformationsfeder. Im Kontaktmodus, welcher für die AFM- Messungen herangezogen wird, rastert die Spitze die Oberfläche mit physikalischem Kontakt.

Vertikale Veränderungen der Oberfläche resultieren in identischer vertikaler Verschiebung der Spitze, was eine Deformation des fest verankerten Cantilevers zur Folge hat. Ein Detektionslaser, der an der Goldschicht des Cantilevers reflektiert, auf eine CCD- Kamera trifft, wird bei vertikalen Veränderungen durch die sich deformierende Goldfläche an eine andere Stelle auf die CCD- Kamera projiziert. Durch geeignete Software, kann aus der veränderten Stelle direkt die vertikale Änderung der Oberfläche berechnet werden. Alle feinmotorischen Bewegungen des Cantilevers werden über Piezo- Elemente realisiert.

Erhebliche Vorteile der AFM- Mikroskopie gegenüber deren Vorgängermethode, der Rastertunnelmikroskopie, liegen in der Natur der Probe. Diese benötigt keinerlei Vorbereitungen und muss weder leitfähig sein, noch muss der Probenraum evakuiert werden.

Neben dem Kontaktmodus- Verfahren wird häufig der Tapping- Modus angewandt, bei dem der Cantilever aufgrund seiner Federeigenschaften in seiner Resonanzfrequenz angeregt wird, die sich bei vertikaler Oberflächenänderung proportional der Höhe ändert.

## 2.11. Prägetechnik

Je nach Art, Größe und Chemismus des Analyten, sind unterschiedliche Prägestrategien und -techniken notwendig, um brauchbare Ergebnisse erzielen zu können. Die Verbesserung bewährter, und die Verfolgung neuer Prägemethoden stellt hierbei einen wesentlicher Punkt der chemosensorischen Forschung dar. Allgemein werden je nach Größe der Analyte 2 wesentliche Prägetechniken, das Volumen-Prägen für Mikro- und Mesomoleküle, sowie das Oberflächenprägen von Makromolekülen unterschieden.

### 2.11.1 Oberflächenprägung [18]

Für die Untersuchung von Proteinen wird die Strategie des Volumenprägens angewandt. Speziell zur Detektion dieser großen Moleküle

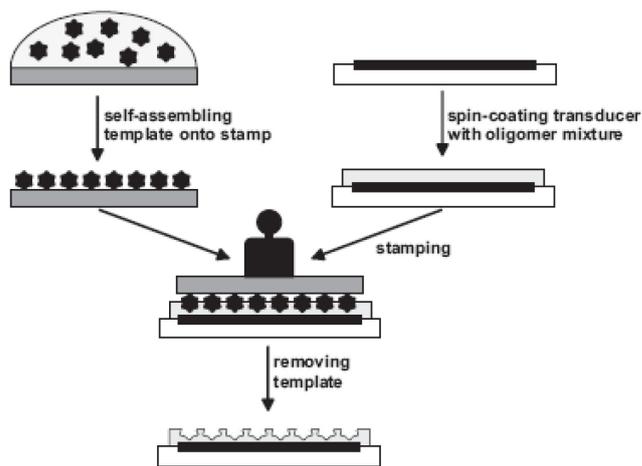


Abb. 11: Oberflächenprägung

Quarzscheibe (weiß), Elektrode (Schwarz), Glasoberfläche (grau)

wurde bereits 1995 von Mosbach [19] diese innovative Prägestrategie entwickelt. Auf eine reine Glasoberfläche werden die Proteine aufgebracht, danach zur Selbstorganisation angeregt und in präpolymerisiertes, auf

die Elektrode aufgebracht Polymer gepresst. Abbildung 11 zeigt die Einzelschritte der Oberflächenprägung. Nach Entfernung der hart gewordenen Polymerschicht wird diese Elektrode mit den zurückbleibenden Polymerabdrücken als sensitive Schicht verwendet. Im Gegensatz zum Volumenprägen, das nicht nur an der Oberfläche, sondern auch in den inneren Bulk- Schichten Hohlräume für eine spezifische Erkennung erzeugt, befinden sich die Kavitäten hier ausschließlich in Form einer Monoschicht an der Oberfläche, was eine entsprechende Limitierung der Detektionsstellen und der Sensitivität zur Folge hat. Die zweite Elektrode des

Quarzes wird nur mit dem Polymer beschichtet um als Referenz Temperatur- und Basislinienveränderungen zu kompensieren.

### **2.11.2. Polymer**

Die sensitive Schicht am Quarz besteht aus einer Polymerschicht, die je nach chemischer Eigenschaften des Analyten, hinsichtlich hydrophiler Gruppen und Polarität, speziell synthetisiert wird. Die verwendeten Monomere werden mit Quervernetzern ähnlicher chemischer Eigenschaften versetzt, um bei der Polymerisation langkettige Polymerstränge zu vermeiden und stattdessen netzartige Strukturen zu formen. Unter Einsatz von Radikalstartern werden die Monomere vopolymerisiert.

### **2.11.3. Selbstorganisation**

Um im Fall der Oberflächenprägetechnik schlussendlich eine gut strukturierte Oberflächenschicht zu erhalten, ist es notwendig, dass der Analyt als Templat zur Selbstorganisation fungiert, um danach geordnet in das Präpolymer gedrückt zu werden. Um das zu erreichen, wird eine konzentrierte, meist wässrige Lösung der Analyte auf ein Glasplättchen getropft, und man lässt die fluiden Anteile verdunsten. Der Organisationsprozess wird durch die physikalisch- chemischen Wechselwirkungen zwischen den Oberflächengruppen der Proteine und der Glasoberfläche bestimmt.

### **2.11.4. Spin- coating**

Die Spin- Technik bewährt sich, um mit wenig Aufwand einen homogenen Flüssigkeitsfilm auf ein Substrat aufzutragen. Ein Tropfen der Flüssigkeit wird durch Rotation des Substrates gleichmäßig darauf verteilt. Die Rotationsgeschwindigkeit des Substrats erreicht bei 3000-4000 rpm optimale Ergebnisse.

### **2.11.5 Stempeltechnik**

Die selbstorganisierten Analyte auf der Glasplatte werden mit Druck in den noch weichen, vopolymerisierten Flüssigkeitsfilm der Polymerlösung gedrückt, in welchem nach dem Aushärten des Polymers und dem Auswaschen der Analyte Abdrücke zurückbleiben. Um den Druck über längere Zeit konstant zu halten, wird die Glasplatte auf dem Polymerfilm mit einer Klammer befestigt.

## 2.12. Relevante Wechselwirkungen

Ein Großteil der chemosensorischen Detektionsprinzipien beruht auf Adsorptionsphänomenen. Für deren Auftreten sind verschiedene Arten physikalischer und chemischer Interaktionen entscheidend, die sich prinzipiell in ihrer Bindungsenergie unterscheiden. Diese Energie beeinflusst im weitesten Sinne das chemische Gleichgewicht der Adsorption an der sensitiven Schicht bzw. Membran. Zur Vermeidung von Vergiftung oder Zerstörung der sensitiven Schicht, ist die Reversibilität des Adsorptionsprozesses ein wichtiges Kriterium für die wissenschaftlich hochwertigen Einsätze der Chemosensoren.

In Anbetracht der Bindungsenergien sind zwei Phänomene der Adsorption unterscheidbar [20].

Die Physisorption beschreibt Adsorptionsphänomene aufgrund von schwachen, meist auf der Grundlage von Dipolen basierenden Interaktionen zwischen neutralen Teilchen. Typische Beispiele physikalischer Wechselwirkungen sind diverse Dipol- und induzierte Dipol- Wechselwirkungen, Van- der- Waals- und London- Kräfte. Aufgrund der niedrigen Bindungsenergie von 0- 10 kJ pro Mol und der dadurch gegebenen Reversibilität, stellt die Physisorption vor allem in Hinblick auf sterische Adsorption ein wichtiges Prinzip in der Chemosensorik dar. Zu dieser Kategorie von Wechselwirkungen gehört auch die repulsive Kraft, der oben erwähnten AFM-Cantileverspitze, die, bedingt von dieser abstoßenden Kraft, eine ausgleichende Deformationsbewegung ausführt. Im Falle der Chemosensoren wird allerdings die attraktive Komponente dieser Wechselwirkungen ausgenutzt.

Die Chemosorption beschreibt im Gegensatz zur Physisorption, stärkere kovalente, koordinative und ionische Bindungen zwischen Analyt und Substratmolekülen, zu denen auch die Wasserstoffbrücken und lipophile Wechselwirkungen zählen, die als Nebenformen koordinativer Interaktionen angesehen werden können. Während Komplexbindungen und Ionenbindungen mit Bindungsstärken von 10- 40 kJ pro Mol und guter Reversibilität ebenfalls für die Sensorik sehr brauchbar sind, entsteht bei der Bildung kovalenter Verbindungen eine Bindungsstärke von etwa 300 kJ pro Mol, in welche Analytmoleküle in die Substratschicht irreversibel eingelagert werden. Aufgrund der großen Bindungsstärke der kovalenten Wechselwirkungen ist die Irreversibilität dieser Bindungen ersichtlich. Das System müsste eine ähnlich große Energie aufbringen, um die Bindungen wieder zu trennen.

### 2.12.1. Adsorptionsisothermen:

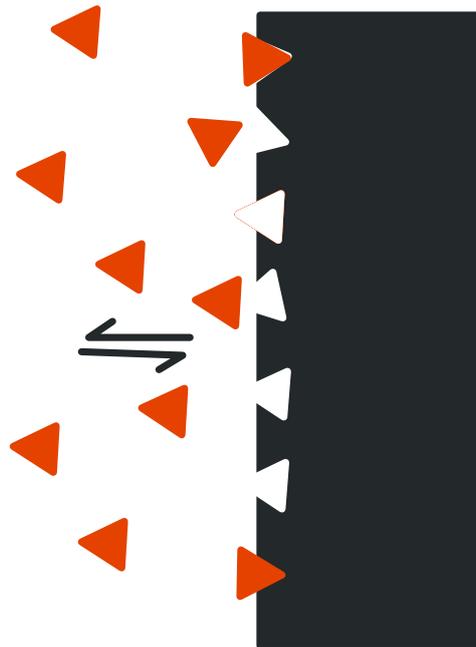


Abb. 12: Adsorption an einer Schicht

Eine Adsorptionsisotherme beschreibt den in Abbildung 12 verdeutlichten Adsorptionseffekt bei einer bestimmten, konstant gehaltenen Temperatur. Den theoretischen Hintergrund der Adsorptionseffekte kann man sehr gut durch physikalisch-chemische Gesetzmäßigkeiten beschreiben. Aufgrund thermodynamischer und kinetischer Überlegungen können mathematische Modelle entwickelt und graphisch dargestellt werden. Diese graphischen Funktionen zeigen die Gestalt von Isothermen, die durch verschiedene Parameter determiniert werden. Diese variablen Parameter sind meistens von folgenden Faktoren abhängig:

1. Die Anzahl der Analyte oder die Konzentration beziehungsweise der Gasdruck.
2. Der Adsorptions- und der Desorptionskoeffizient, die von dem chemischen Adsorptionsgleichgewicht abhängig sind.
3. Die Anzahl der besetzten und freien Stellen. Mathematisch relevant sind deren relative Werte.

Die bekannteste Isotherme für Adsorptionsphänomene wurde von Irving Langmuir entwickelt. Er formulierte diese mit Hilfe einer Adsorptionsformel, die auf 3 Annahmen basierte.

- Wenn die adsorbierende Schicht vollständig beschichtet, somit alle Adsorptionsstellen belegt sind, tritt keine Adsorption mehr auf.
- Alle Adsorptionsstellen sind gleichwertig, und keine wird in Bezug auf andere bevorzugt belegt.
- Die Adsorptionsstellen üben keinen Adsorptionseinfluss auf ihre Nachbarstellen aus.

Zur Berechnung dieser Isotherme, stellte er folgende Überlegungen an. Die relative Beschichtung einer Oberfläche ist der Konzentration, dem Adsorptionsfaktor (chemisches Gleichgewicht) und der relativen Anzahl freier Stellen direkt proportional. Die relative Beschichtung und die relative Anzahl der freien Stellen ergeben zusammen den Gesamtanteil der Adsorptionsstellen an, also den relativen Wert 1.

Die zweite Überlegung in Bezug auf dieses vollständig reversible System ist die Desorption, deren Geschwindigkeit direkt von der Desorptionskonstante und von der relativen Anzahl der besetzten Stellen abhängt.

Die mathematische Kombination dieser beiden Überlegungen führt zur Gleichung 7, deren graphische Darstellung die, in Abbildung 13 gezeigte Langmuir'sche Isotherme beschreibt. Für kleine Konzentrationswerte ergibt der Nenner annähernd 1 und die Gleichung beschreibt eine Gerade (linearer Bereich, rot). Hingegen stellt für große Werte der mathematische Term eine Konstante dar (Sättigung, schwarz). Dazwischen liegt der nicht-lineare Bereich (gelb).

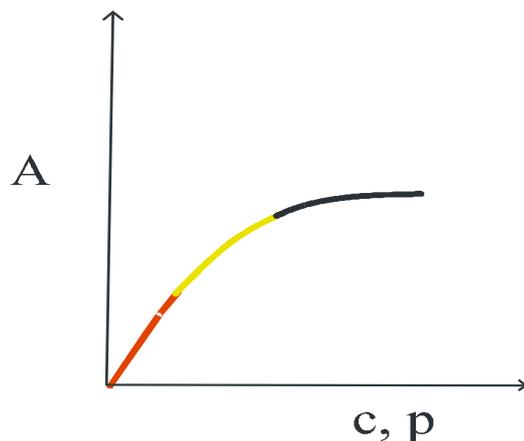


Abb 13: Langmuir- Isotherme

A...Adsorptionssignal,

c...Analytonzentration

p...Gasdruck

$$S = \frac{a c}{1 + b c}$$

Gl. 7

S...Signal

c...Analytkonzentration,

a, b...Koeffizienten

Das Adsorptionsverhalten vieler Gase und Flüssigkeiten erfüllt nur selten alle 3 der oben genannten Annahmen, sodass die Langmuir- Isotherme nur bedingt verwendbar ist. Hinsichtlich unterschiedlicher Präferenzen an Adsorptionsstellen, wurde die Tempkin- und die Freundlich- Isotherme entwickelt. Die zusätzlichen Faktoren in diesen Isothermen- Gleichungen beinhalten thermodynamische Informationen einzelner Bindungsstellen.

Eine häufig Anwendung findende Isotherme stellt die Brunauer- Emmet- Teller- Isotherme dar. Sie geht grundsätzlich davon aus, dass der Adsorptionseffekt nicht bei Belegung aller Stellen zum Stillstand kommt. Stattdessen adsorbieren in verminderter Stärke Analyte in zusätzlichen Schichten darüber.

Generell ist das Adsorptionsgleichgewicht von den thermodynamischen Größen Enthalpie und Entropie abhängig

## 2.12.2 Wirt- Gast- Chemie [21]

Neben den Adsorptionseffekten sind die Phänomene der Wirt- Gast- Chemie für chemosensorische Proteinmessungen von ähnlich großer Bedeutung. Diese supramolekulare Chemiesparte beschreibt die Anwendung sphären- oder käfigartiger organischer Moleküle, die neben chemischer Wechselwirkung auch unter Ausnutzung sterischer Effekte, Moleküle sehr selektiv mit großen Bindungskonstanten einbetten können. Anorganische Anwendungen haben die gürtelähnlichen Kroneether, die von dem amerikanischen Chemiker Charles Pedersen entdeckt wurden, mit denen größenselektiv Alkaliionen komplexiert werden können.

In Analogie darauf, auf organische Moleküle übertragen, sind besonders mono- und bicyclische tetraaza- [n,n]- methyl- Paracyclophane zu erwähnen, die sich für die Einbettung von Benzol, Toluol und deren Derivate als besonders geeignet erwiesen haben. Die sterischen Maße dieser Cyclophane sind durch die Variation der Methylketten justierbar. Durch die Arbeiten von Stetter und Roos an diesen Molekülen werden sie auch Stetter- Cyclophane genannt.

Die im täglichen Gebrauch größte Anwendung finden  $\alpha$ -,  $\beta$ -, oder  $\gamma$ - Cyclodextrine. Sie bestehen aus 6 ( $\alpha$ ), 7 ( $\beta$ ) oder 8 ( $\gamma$ ) cyclisch gebundenen beta- Glucoseeinheiten, und werden in der bioanalytischen Chromatographie als stationäre Phase, sowie zur Luftreinigung (Febreeze<sup>®</sup>) in Haushalten verwendet [22].

### 2.12.3 Diffusionsgesetze [23]

Um Adsorption zu ermöglichen, ist die Diffusion zu der sensitiven Schicht notwendig. Speziell in flüssiger Phase sind diffusionskontrollierte Effekte für die Messdauer entscheidend. Berechnet werden können diese durch die Fick'schen Diffusionsgesetze. Die beiden Gesetze werden in den Gleichungen 8 und 9 beschrieben.

Das chemische Gleichgewicht strebt ständig ein Minimum des chemischen Potentials an. Das 1. Fick'sche Gesetz in Gleichung 8 beschreibt die direkte Proportion zwischen dem Diffusionsstrom und dem chemischen Potenzial beziehungsweise dem Konzentrationsunterschied.

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

Gl. 8

Dieses Gesetz stellt die Anfangs- und Randbedingungen der Diffusion dar. Bei Fortdauer der Diffusion verringert sich das chemische Gleichgewicht und der Diffusionsstrom nimmt mit der Zeit immer weiter ab. Um diesen zeitlichen Verlauf des Stromes zu berechnen entwickelte Fick sein 2. Gesetz, in Gleichung 9 gezeigt, indem er die Kontinuitätsgleichung für die Masseerhaltung in sein 1. Gesetz mit einbezog

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$$

Gl. 9

D...Diffusionskoeffizient

c...Konzentration

t...Zeit, x...Ort

### 2.13. Proteine [24]

Proteine bestehen aus Aminosäuren, welche die Grundbausteine für das Entstehen von lebenden Organismen darstellen. Jede dieser Aminosäuren besitzt sowohl eine Carboxylgruppe als auch eine Aminogruppe, welche analog der Hydroxygruppe bei Alkoholen durch Kondensationsreaktionen mit der Carboxylgruppe esterähnliche Amide verschiedener Aminosäuren unterschiedlicher Länge und Aminosäure-Sequenzen bildet. Von großer biochemischer Bedeutung sind die Proteine deswegen, da sie aufgrund von chemischer- physikalischer- dipolarer Wechselwirkungen der

unterschiedlichen Seitenketten der Aminosäuren, unterschiedliche räumliche Strukturen in verschiedenen chemischen Medien ausbilden können. In geeigneten Gemischumgebungen können Proteine ihre Struktur mehrmals dynamisch wechseln. Diese Dynamik hinter solchen sterischen Veränderungen ist schlussendlich der Grundbaustein für die Ausbildung periodischer chemischer Reaktionskaskaden und Zyklen, ohne die die Entstehung von Leben unmöglich gewesen wäre. Die chemischen Eigenschaften und deren Klassifizierung wurde bereits vor mehr als 250 Jahren beschrieben und von dem US-amerikanischen Proteinchemiker T. B. Osborne um 1900 formuliert [25]. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Proteine konnten bestimmte Anteile aus verschiedenen chemischen Medien extrahiert werden. Der gesamte Proteinpool wurde in 4 Arten, sogenannten Osborne-Fractionen klassifiziert, bestimmend, in welchem Medium sie extrahiert werden konnten. Wasserlösliche Proteine werden als Albumine definiert, Globuline können aus salzhaltigen Lösungen extrahiert werden, Prolamine werden aus Ethanol/Wasser-Mischungen extrahiert und die Glutenine sind in protischen Lösungen gut extrahierbar.

Im 20. Jahrhundert gelang es Wissenschaftlern, mit verbesserten Chromatographiemethoden sämtliche Proteine zu sequenzieren. Die heutzutage angewendete 2D-SDS-PAGE liefert ausgezeichnete Ergebnisse im Bereich der Proteinerkennung. Deren zeitaufwendige Probenvorbereitung stellt allerdings ein großes Hindernis für die flächendeckende Anwendung in der Proteinanalytik da.

### **2.13.1. Methoden der Proteinbestimmung**

Aufgrund der großen Menge an Aminosäuren in einem Protein sind die reaktiven Seitenketten von unterschiedlichen chemischen Eigenschaften geprägt. Es haben sich in Folge unterschiedliche Strategien zur Bestimmung der Proteine unter Nutzung der verschiedenen Wechselwirkungen herausgebildet. Diese werden je nach Aufgabenstellung, Genauigkeit, Kosten, oder Aufwand eingesetzt.

#### **2.13.1.1. Kjeldahl**

Diese älteste nasschemische Methode wird wegen ihrer Einfachheit in der lebensmittelchemischen Analyse eingesetzt. Die Prinzipien der Bestimmung sind die chemischen Stickstoff-Aufschlüsse der Proteine zu Ammoniak, der in Säure

aufgenommen und diese mit Lauge rücktitriert wird [26]. Verfälschung der Lebensmittel durch Beimengung stickstoffhaltiger, chemischer Substanzen zeigen aber gleichzeitig die Schwächen dieser Methode auf.

#### **2.13.1.2. Warburg und Christian**

Durch die Existenz sämtlicher aromatischer Tyrosin- und Thryptophanreste ist eine Proteinbestimmung mittels UV- Absorption möglich, die sich für Reinsubstanzen zum Beispiel Rinderserumalbumin bei 280 nm bewährt hat. Warburg und Christian haben in einer Bestimmung bei 2 Wellenlängen eine mathematische Abschätzung entwickelt, um auch Proteingemische, zum Beispiel Proteine im Beisein von Nucleotiden oder Nucleinsäuren zu berechnen. Vorteile dieser Methode sind die spontane Messung ohne Zusätze, die zerstörungsfreie Analyse und die geringe benötigte Menge an Proteinanalyt. Die Berechnung basiert auf der Annahme des durchschnittlichen Verhältnisses zwischen aromatischer und aliphatischer Gruppen. Für Proteine mit stark abweichendem Verhältnis und trüben Proteinlösungen ist diese Methode nicht anwendbar [27].

#### **2.13.1.3. Methode nach Bradford [28 ]**

Der Bradford- Assay beschreibt die komplexometrische Farbreaktion des Reagens Coomassie Brilliant Blue mit hydrophoben, kationischen Seitenketten der Proteine. Durch die Bildung dieses Komplexes verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Reagens von 470 nm nach 595 nm. Die Absorption bei dieser Wellenlänge kann als Information für die Proteinkonzentration herangezogen werden. Diese Methode ist, ähnlich der Bestimmung nach Warburg und Christian, nur semiquantitativ, da die Kalibration mit einem Eichprotein, meist Rinderserumalbumin durchgeführt werden muss. Die großen Vorteile sind die schnelle und sehr einfache Durchführung und die hohe Sensitivität dieser Methode.

#### **2.13.1.4. Bestimmung nach Lowry**

Diese Detektionsmethode ist ähnlich der Biuret- Methode und beruht auf der koordinativen Bindung der Kupferionen an stickstoffhaltige Verbindungen [29].  $\text{Cu}^{2+}$  wird durch das Folin- Ciocalteu- Phenol- Reagenz zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, welches dann mit den stickstoffhaltigen Peptidbindungen koordinative Wechselwirkungen eingeht. Der entstehende tiefrote Komplex besitzt sein Absorptionsmaximum bei 750 nm. Die Absorption bei dieser Wellenlänge ist proportional zur Proteinkonzentration. Wie aus der Prozedur ersichtlich, stören sowohl Ammoniumsalze, als auch oxidierende bzw. reduzierende Substanzen.

## 3. Praktischer Teil

### Proteinbestimmung mit dem Schwingquarz

#### 3.1. Messgeräte

Abbildung 14 zeigt einen Arbeitsplatz, an dem Proteinuntersuchungen durchgeführt werden, mit den für die Messungen benötigten Geräten.

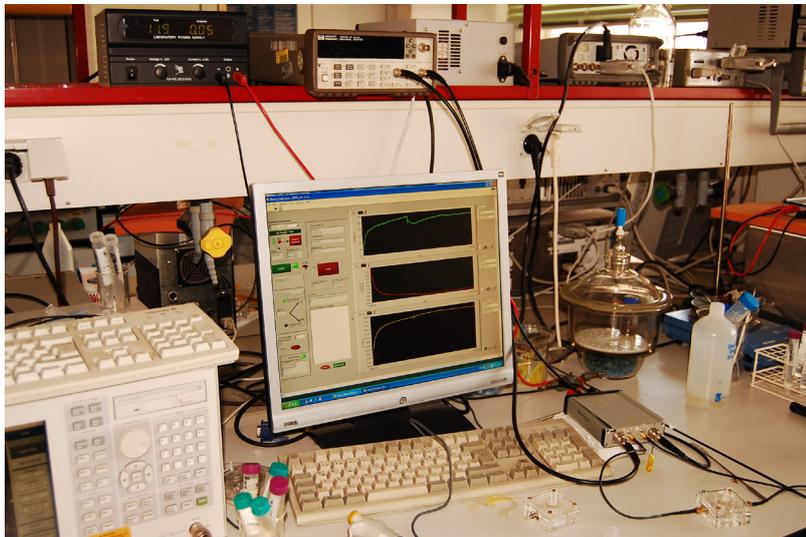


Abb. 14: QCM- Analysengeräte im Labor der Arbeitsgruppe

#### 3.1.1. Messzelle

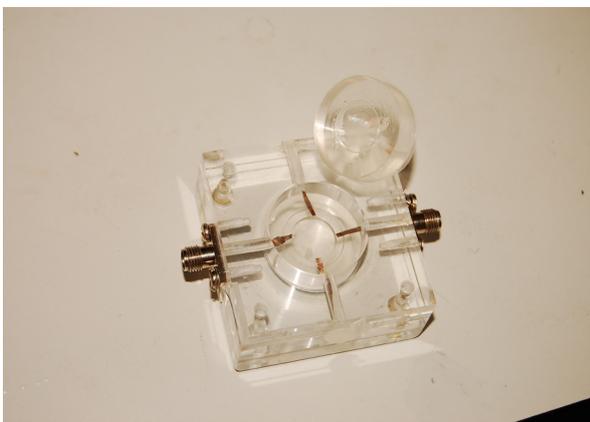


Abb. 15: Messzelle mit Elektroden und Messraum

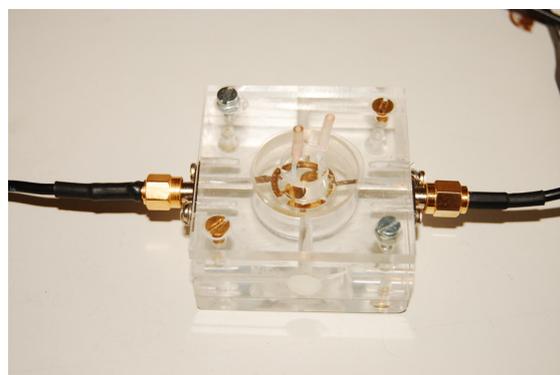


Abb. 16: Angeschlossene Messzelle mit QCM-Quarz im Messbetrieb

In die Messzelle, wie in Abbildung 15 und 16 gezeigt, wird die QCM für die experimentellen Untersuchungen eingebaut. Die Zelle besteht im Wesentlichen aus 4 Teilen, dem Gehäuse, den Anschlüssen, den Elektroden und dem Messraum, in dem sich die QCM befindet.

Das Plexiglas- Gehäuse dient zum wasserdichten Verschrauben und besitzt die Anschlüsse der Messkanäle.

An den Anschlüssen sind jeweils 2 Elektroden im rechten Winkel kontaktiert, die Schwingungsinformation an die 2 Kanäle weiterleiten.

Verzinnnte Kupferelektroden werden an die Anschlussseiten angelötet. Sie verbinden die Anschlüsse mit dem Messraum und werden an den Kontaktstellen mit dem Quarz kupferblank geschliffen. Der Messraum besteht aus erhärtetem Silikon- Elastomer, welches speziell für die Schwingquarze in einer Gussform präpariert wurde. Durch feine Kanäle können wässrige Analytlösungen hinzugefügt und entfernt werden.

### 3.1.2. Oszillatorschaltkreis

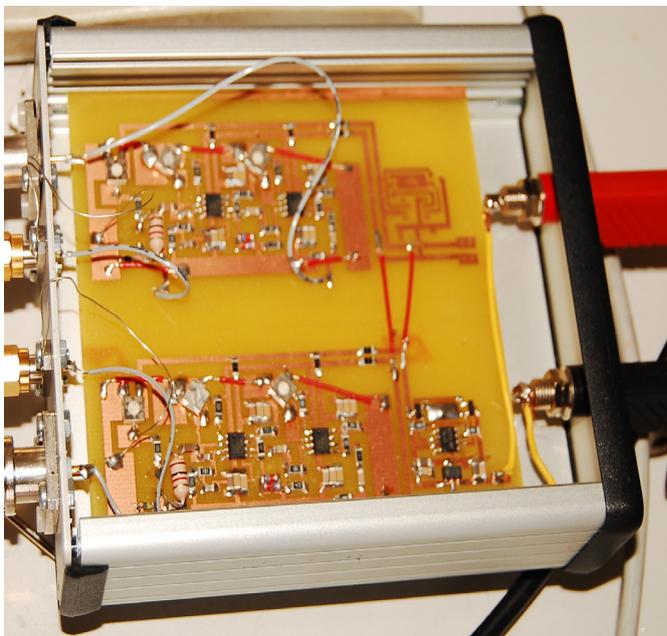


Abb. 17: Oszillatorschaltung für 2 Kanäle

Abbildung 17 zeigt eine verwendete Oszillatorschaltung. Diese Schaltung ist das elektronische Herzstück der Apparatur. Sie hat als analog-digital -Wandler die Aufgabe, die Sensorfrequenzen in elektronisch digitale Daten umzuwandeln welche der Computer danach aufzeichnen kann. Integrierte Regelkreise ermöglichen eine Justierung der Phase, Frequenz und Verstärkung beider Kanäle. Die Einstellung erfolgt unter Drehung der Stellschrauben mit einem Schraubenzieher.

### 3.1.3. Oszillator und Frequenzzähler

Ein Quarz kann nur durch externes Anlegen einer Wechselspannung zur Oszillation gebracht werden. Diese wird vom Oszillator generiert, wobei die Spannung jeweils den Anforderungen und Stabilität des Schwingquarzes angepasst werden muss. Bei falscher (zu hoher) Spannung kann es zu mechanischen Beschädigungen der Oszillatorschaltung kommen. Für die durchgeführten Messungen wurden Schaltungen verwendet, die auf eine Oszillatorwechselspannung von 12 Volt ausgelegt waren.

Der Frequenzzähler detektiert die vom Oszillator erzeugte und an der Oszillatorschaltung eingestellte Frequenz, um diese für jeden der Kanäle mit der jeweiligen Resonanzfrequenz in Übereinkunft zu bringen. Es werden dabei 2 oder mehrere Kanäle nacheinander eingestellt. Abbildung 18 zeigt einen Oszillator und einen Frequenzzähler.



Abb. 18: Oszillator (links) und 3- Kanal- Frequenzzähler (rechts)

### 3.1.4. Netzwerkanalysator

Die Bestimmung der Resonanzfrequenz und der Dämpfung dieser Resonanzschwingung stellen eine wichtige Information bezüglich der Qualität des Sensors dar. Mit Hilfe des Netzwerkoszillators (Abbildung 19), der Frequenz gegen die Dämpfung aufträgt, können diese Informationen auf einfache Weise bestimmt werden. Außer den Frequenzänderungen durch Beschichtung bzw. Entfernung von sensitiven Schichten sind neben den Parallel- und Seriellresonanzfrequenzen der dominierenden Dickenschwingung auch Nebenresonanzen anderer Schwingungsmoden, der Deformations-, der Torsions- und der Scher-Schwingung erkennbar.

Gegebenenfalls sind in ganzzahligen ungeraden Vielfachen der Grundresonanz

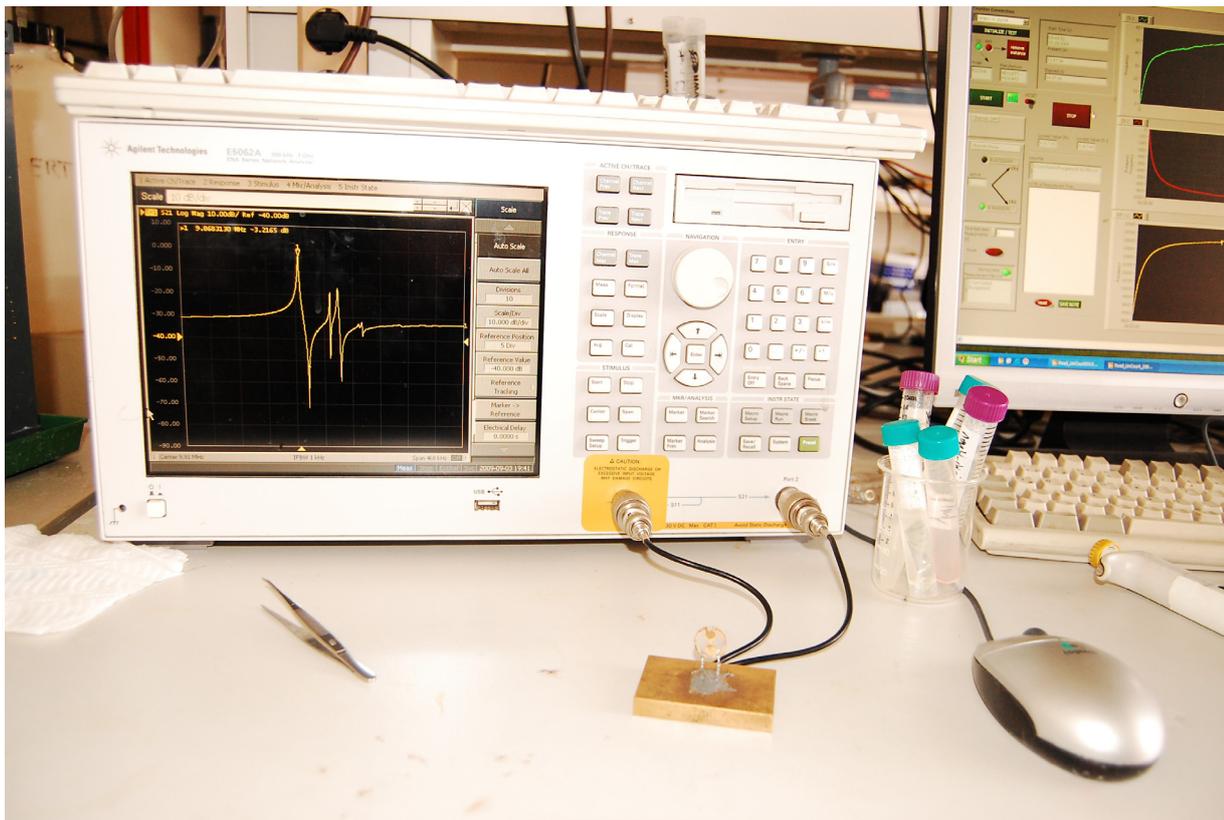


Abb. 19: Der Netzwerkanalysator zeigt das Dämpfungsspektrum von einem angeschlossenen QCM- Quarz. Die Hauptresonanzfrequenz, Dämpfungen, sowie Nebenresonanzen sind zu erkennen

Oberschwingungen der verschiedenen Moden justierbar.

### 3.2. Design der Quarze

Zur Erzeugung eines Schwingkreises ist es unerlässlich, den blanken QCM- Quarz mit Elektroden aus leitenden Materialien zu beschichten. Die Beschichtung von Elektroden auf den Schwingquarz wird mittels Siebdrucktechnik bewerkstelligt, welche im Vergleich zu der chemischen Aufdampftechnik wesentlich weniger Zeit- und Arbeitsaufwand mit sich bringt. Davon abgesehen erweist sich der Qualitätsverlust dieser Schichten gegenüber der Aufdampftechnik als belanglos. Das duale Elektrodendesign erlaubt mit der simultanen Referenzmessung eine Kompensation von Temperatur und Driftphänomenen. Für chemosensorische Messungen werden je nach Problemstellung verschiedene Elektrodendesigns herangezogen, wobei vor allem der Elektrodendurchmesser und die Position der Kontaktstellen modifiziert und optimiert werden können.

### 3.2.1. Elektroden



Abb. 20: Elektroden der flüssigen Phase an der Oberseite



Abb. 21: Elektroden der Referenz (Luft)- phase an der Unterseite

In Abbildung 20 und 21 sind beide Elektrodenseiten gezeigt. Aufgrund der inerten und leitenden Eigenschaften werden Goldelektroden verwendet. Eine organische Suspension aus Gold in Lösungsmittel wird durch die Siebmaske auf die QCM geschmiert und im Ofen bei 400 °C für 3 Stunden nachbehandelt [30]. Durch diese grobe Hitzebehandlung verflüchtigen respektive pyrolysieren die organischen Substanzen und das Gold verteilt sich homogen auf der Quarzoberfläche. Je nach Problemstellung werden andere Siebformen herangezogen. Speziell für die Verwendung in flüssiger Phase ist es notwendig, die Elektroden unterschiedlich groß zu gestalten, um ein zu starkes Austreten der Feldlinien in die äußere Wasserphase zu unterbinden. Der Durchmesser der Elektroden in der Gasphase beträgt 3 mm und 5 mm in der flüssigen Phase.

### 3.2.2. Siebdrucktechnik

Diese Technik wird für einfaches Aufbringen von dünnen Schichten auf eine Oberfläche verwendet. Die Technik wird in Abbildung 22 verdeutlicht. Die Herstellung der Maske ( siehe Abbildung 23 ) erfolgt durch ein auf einem Rahmen aufgeklebtes Siebtuch (20  $\mu\text{m}$ ), dass mit einer Formvorlage photolithographisch UV-belichtet wird. Der vorher aufgebrachte Photolack härtet unter UV aus und verstopft das Sieb. Der nicht belichtete Photolack unter der Formvorlage bleibt viskos und wird mit warmen Wasser ausgewaschen. Die Goldpaste wird durch das fixierte Sieb auf die ebenfalls befestigte QCM geschmiert.

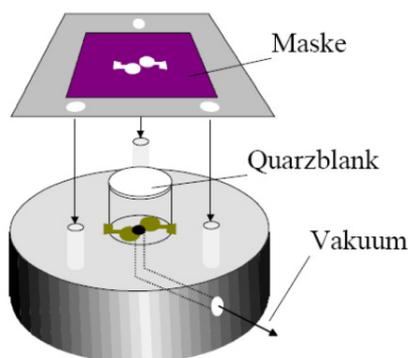


Abb. 22: Siebdrucktechnik

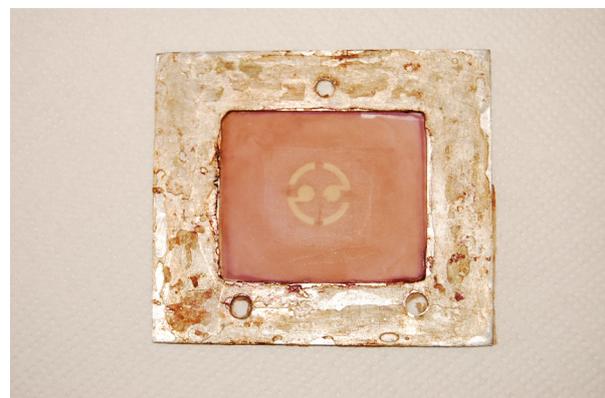


Abb. 23: Sieb der Arbeitsgruppe

### 3.3. Beschichtung

5  $\mu\text{l}$  einer 1 zu 10 verdünnten Lösung von Mohnproteinextrakt (1,8 g/l) werden auf ein etwa 50  $\text{mm}^2$  großes quadratisches Glasplättchen aufgebracht und 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur offen stehen gelassen. Dadurch verdunstet die Flüssigkeit und die Proteine ordnen sich selbständig auf der Glasoberfläche. Nach Beschichtung der beiden Quarzelektroden mit je 5  $\mu\text{l}$  des Polymers wird durch die Spin-coating-Technik ein homogener Polymerfilm erzeugt und die Glasplatte mit den Proteinen mit einer Klammer auf eine der beiden Polymerschichten gepresst. Durch Lagerung über Nacht tritt die vollständige Polymerisierung ein. Am Tag danach wird die Klammer entfernt und die Proteine der Quarzoberfläche mit destilliertem Wasser heraus gespült.

### 3.4. Polymer [31]

Die Proteine besitzen mit ihren polaren Oberflächengruppen hydrophile Eigenschaften. Dementsprechend wird das polare Polymer Polyacrylat für die Beschichtung verwendet. Dieses Polymer setzt sich aus folgenden Quervernetzern und Zusatzstoffen zusammen: Methacrylsäure, Azobisisobutyronitril (AIBN),

Dihydroethylenbisacrylamid (DHEBA), und Vinylpyrrolidon. Die Synthese und Vorpolymerisation erfolgt durch die Addition von 30 mg DHEBA und 20 mg Vinylpyrrolidon zu 50 mg Methacrylsäure. Nach Solvatation in 800 µl destilliertem Wasser bei 70 °C erfolgt die Zugabe von 1,5 mg AIBN als Radikalstarter und Vorpolymerisation bei 70 °C, bis eine Trübung des Polymers eintritt. Zur Verwendung als sensitive Prägeschicht muss das Polymer mit destilliertem Wasser auf die Hälfte der Konzentration verdünnt werden.

### **3.5. Messung**

Zur experimentellen Messung muss der Quarz exakt mit den größeren Elektroden nach oben diagonal in den Messraum eingebaut werden, sodass ein wasserdichter Analysenraum von ca. 200 µl entsteht und die 4 Elektroden mit der unteren Schicht kontaktiert werden. Nach Justierung der Resonanzfrequenzen für beide Kanäle in destillierter wässriger Phase, kann mit dem 2-3 stündigen Einschwingen des Quarzes begonnen werden. In dieser Phase lagert sich Wasser in die Polymerschichten bis zu deren Sättigung ein. Das Einleiten und Entfernen der Analytlösung erfolgt im Gegensatz zu Durchfluss- Messzellen, manuell mit einer Eppendorf- Pipette. Es ist bei allen Messungen auf eine Vermeidung von Luftblasen zu achten.

### **3.6. Proteine als Analyt**

#### **3.6.1. Isolierung**

Proteine aus Mohn, Sesam, Mandel oder Haselnuss können ohne großen Aufwand aus den Samen oder Kernen der Pflanzen isoliert werden. Mittels 16- stündiger Soxhlet- Extraktion über n- Hexan werden die lipophilen Anteile und Fette aus der mechanisch zerkleinerten Probe entfernt. Nach Trocknung des Rückstandes in der Extraktionshülse über Nacht wird dieser in 0,05 M „phosphate buffered Saline“ (PBS) gerührt, um die wasserlöslichen Proteine zu extrahieren. Durch 30 minütiger Zentrifugation bei 4400 rpm können die festen Anteile von der proteinhaltigen wässrigen Lösung getrennt und verworfen werden. Die wässrigen Proteinextrakte werden gesammelt und bei -4°C aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit der Bradfordmethode.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Bevor die eigentliche Messung gestartet werden kann, benötigt der Quarz eine gewisse Einschwingzeit, um dem Quarz das Equilibrieren zu ermöglichen. Nach Injektion mit Wasser wird, wie in Abbildung 24 sichtbar, eine stetige Abnahme der Frequenz sichtbar, die in eine Sättigung mit anschließendem konstanten Frequenzverhalten mündet. Die Frequenzverringerung ist auf eine Einlagerung von Wasser in das polare Polymer zurückzuführen, welche bis zur Sättigung andauert. Diese Sättigungsphase mit Wasser hält etwa 2 Stunden an, weshalb jeder der Proteinmessungen eine Einschwingzeit von 3 Stunden vorausgegangen ist.

Als Analyt dienen Proteinlösungen, die durch Verdünnung der bei  $-4^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagerten Proteinextrakte mit destilliertem Wasser erstellt werden.

Für alle Messungen wird das selbe Polymer nach der in Abschnitt 3.4. beschriebenen Rezeptur verwendet. Es beinhaltet die folgende Monomere: 50 mg Methacrylsäure, 20 mg Vinylpyrrolidon und 30 mg DHEBA. Im Folgenden wird das Polymer als Gemisch der 3 Monomeren „MVD“ bezeichnet

### Frequenzerniedrigung eines Mohnsensors durch Wasseraufnahme

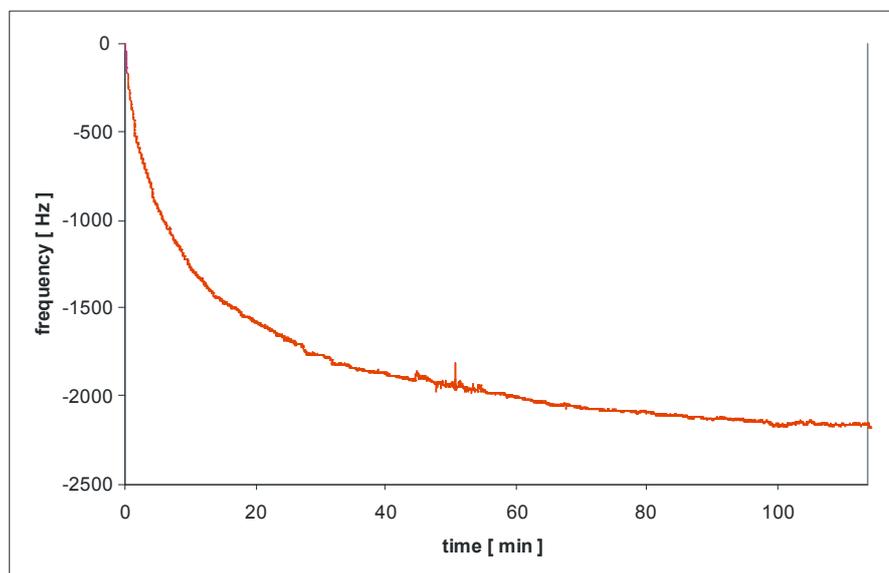


Abb. 24: Frequenzerniedrigung durch Wasseraufnahme des Polymers MVD, Schicht: 480 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in  $\text{H}_2\text{O}$ , Frequenz: 9,809 MHz

Die folgenden Abbildungen 25-39 zeigen Messkurven mit Quarzsensoren, die mit MVD beschichtet und mit einer 1,8 g/l wässrigen Mohnlösung geprägt wurden.

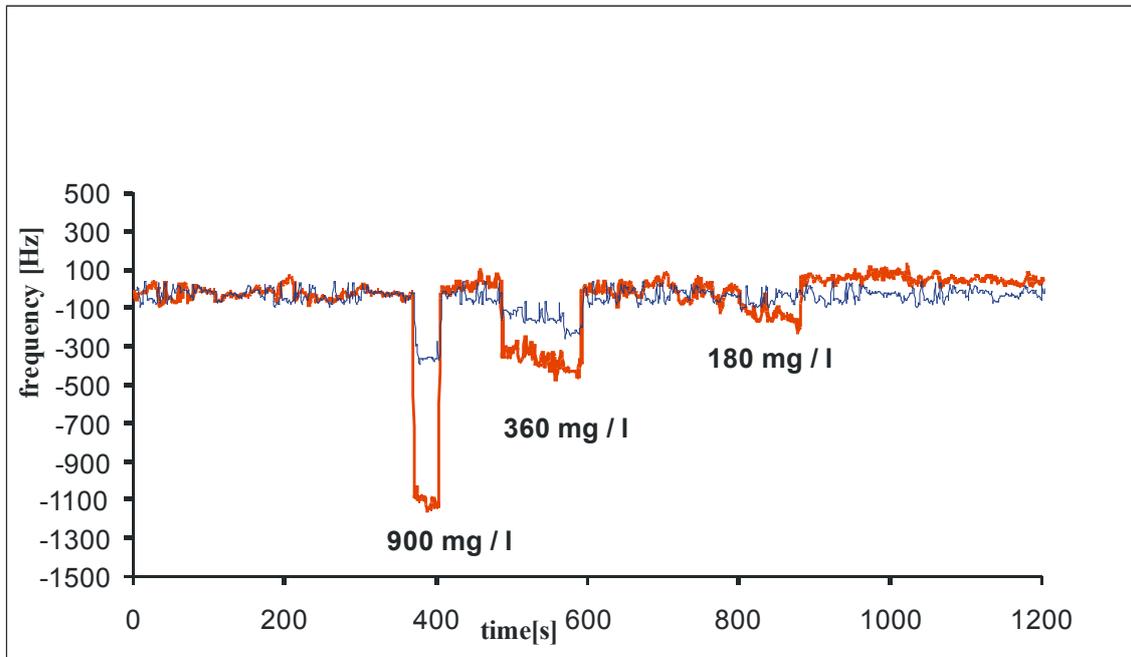


Abb. 25: Sensorantwort auf eine Mohnproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 240 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,882 MHz, Referenz: NIP: MVD, 280 nm, Frequenz: 9,896 MHz

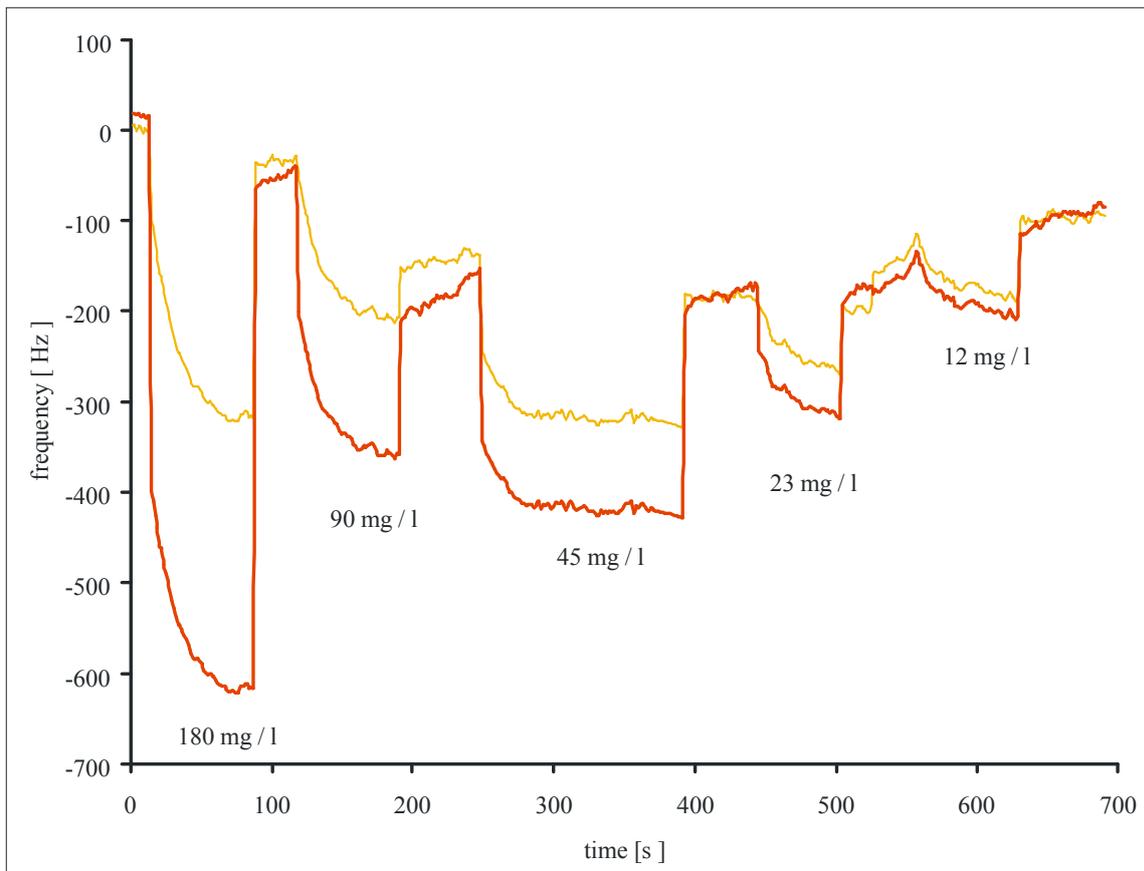


Abb. 26: Sensorantwort auf eine Mohnproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 560 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,853 MHz, Referenz: NIP: MVD, 480 nm, Frequenz: 9,867 MHz

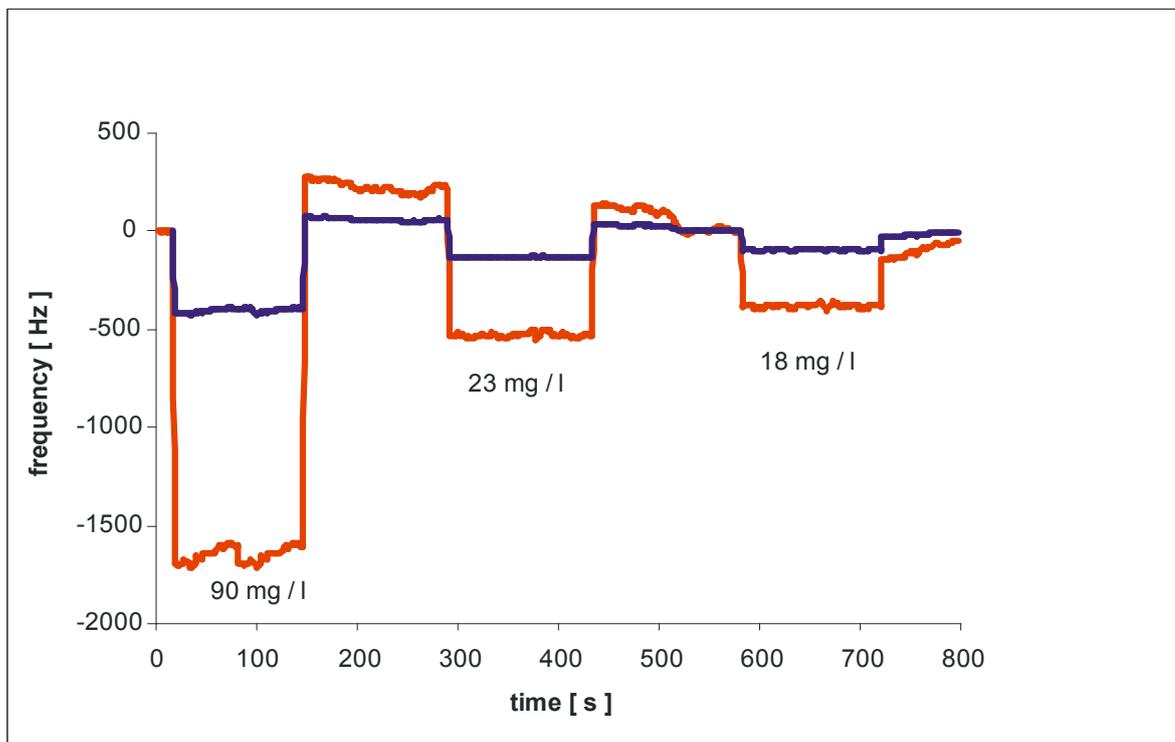


Abb. 27: Sensorantwort auf eine Mohnproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 920nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,857 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz: 9,874 MHz

#### Diskussion der Mohnproteinergebnisse:

In den Abbildungen 25, 26 und 27 sind Messkurven von Sensorantworten auf Mohnproteinlösungen bei variabler Polymerschichtdicke der mit MIP geprägten Messelektrode dargestellt. Sehr deutlich zu erkennen ist die zunehmende Sensitivität bei zunehmender Schichtdicke. Das deutet auf die Existenz von zusätzlichen Kavitäten bei größeren Schichtdicken hin, was eine Erhöhung der adsorbierenden Proteine zur Folge hat.

Ein weiteres Augenmerk, das diese Theorie untermauert, ist die Referenz, die mit dem NIP- Polymer geprägt ist. Auch die Sensorantwort dieser Elektrode nimmt bei steigender Schichtdicke zu. Speziell bei kleinen Analytkonzentrationen und niedrigen Polymerschichtdicken beobachtet man, dass die Frequenzerniedrigungen der beiden Elektroden sehr ähnlich werden. Durch die weit größeren Sensorantworten bei höheren Schichtdicken, wird das Signal / Rauschverhältnis besser.

Im Besonderen fällt in Abbildung 26 bei einer Schichtdicke von 560 nm auf, dass im Vergleich zu den meisten anderen Messkurven kein sprunghaftes Absinken der Frequenz nach Injektion mit dem Analyten erfolgt, sondern eine verlangsamte

Abnahme der Resonanzfrequenz beobachtet wird, die nach 1-2 Minuten einen konstanten Wert erreicht. Dieses Verhalten deutet auf eine herabgesetzte Diffusion der Proteinmoleküle in die Kavitäten hin. Der Grund dafür ist im Prägeverfahren zu suchen. Aufgrund des seltenen Auftretens dieses Phänomens ist eine lückenlose Erklärung dafür aus den gemessenen Daten nicht eindeutig und benötigt dafür nähere Untersuchungen.

In Abbildung 28 ist die Proportionalität zwischen der Sensorantwort und der Polymerschichtdicke für Injektionen mit Mohnlösungen gleicher Konzentrationen dargestellt. In dieser Grafik sind neben den 3 oben gezeigten Mohnmessungen auch später angeführte Querempfindlichkeitsmessungen mit einbezogen, in denen Mohnproteine involviert waren. Es ist hier ein Zusammenhang erkennbar.

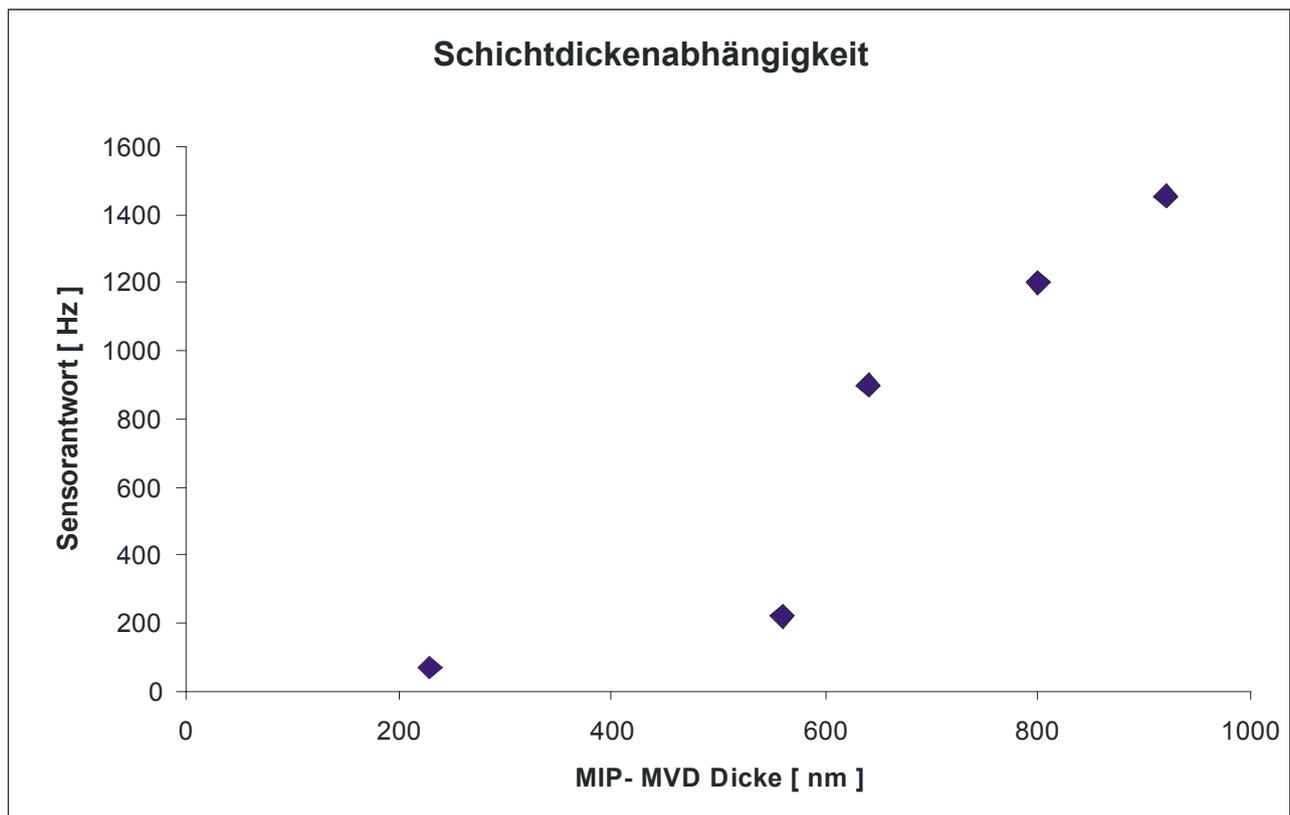


Abb. 28: Abhängigkeit der Empfindlichkeit von der Schichtdicke, MIP- MVD, Analyt: Mohnlösungen

Der eine abweichende Messpunkt in der graphischen Darstellung bezieht sich auf die Messungen in Abbildung 26 bei 540 nm. Bei eben dieser Messserie tritt das vorher erwähnte Verhalten der erschwerten Diffusion in die Kavitäten auf. Eine These, die dieses Verhalten erklären könnte, sieht den Grund in stark sterisch gehinderten

Kavitäten an der Polymeroberfläche. Während ein Bruchteil der Analyte mit größerer Hinderung in weniger abgeschirmte Hohlräume eindringen, und damit zur Sensorantwort einen Beitrag leisten kann, bleibt der andere Anteil der Kavitäten für die Proteine verborgen. Die Richtigkeit dieser Annahme kann allerdings nur durch weitere Experimente bestätigt oder falsifiziert werden.

Die Tatsache, dass die Polymerschichtdicken im Vergleich zu der Größe eines Proteins sehr groß sind, lässt auch vermuten, dass aufgrund der dicken Schicht während des Pressvorganges mit dem Stempel sehr viele kleine Hohlräume aufgrund der Rauheit der Polymeroberfläche entstanden sind, in denen sich die Proteine unspezifisch einlagern können. Diese Überlegung würde sich in den Messergebnissen dadurch teilweise bestätigen, dass die mohngeprägten Sensoren nicht nur für die Mohnproteine, sondern auch für Sesam und Mandel eine erhöhte Sensitivität zeigen. Die relativen Sensorverhältnisse bleiben in nahezu allen Sensormessungen in einem konstanten Bereich.

Im Gegensatz zu einer Durchfluss- Messzelle, nimmt in der verwendeten Injektions-Messzelle die Frequenz nicht kontinuierlich ab, sondern sprunghaft. Der Grund dafür liegt in der Injektionstechnik, da erst 3-5 Sekunden nach der Injektion die unterbrochene Messung wieder aktiviert wird. Bei den kleinen, schnell in die Kavitäten diffundierenden Proteinen wird innerhalb weniger Sekunden bereits die maximale Frequenzerniedrigung erreicht.

In Zusammenhang zwischen sprunghaftem und weichem Absinken der Frequenz nach Injektion mit dem Analyt ist die Vermutung anzustellen, dass es sich bei den Sprung-Antworten um einen Wechsel der Resonanzfrequenz handelt, ein Phänomen, dass bei stark dämpfenden Sensoren und zu hoher Frequenzverschiebungen auftreten kann. In diesem Falle beinhaltet die grafische Auswertung einen Sprung der Frequenz nach Injektion des Analyten und ein Zurückspringen bei nachfolgender Wasser-Spülung. Die Überlegung ist aufgrund der Ähnlichkeit mit den oben gezeigten Messauswertungen durchaus berechtigt, kann aber durch die Tatsache widerlegt werden, dass auch in dieser Diplomarbeit erhaltene Erfahrungswerte bestätigen, dass sich alle Phänomene des Wechsels der Resonanzfrequenz in einem Sprungbereich zwischen 2 kHz und weit darüber befinden und ein, bis zu einem Faktor 10, stärkeres weißes Rauschen mit sich bringt. Es ist in den Messergebnissen kein Anzeichen auf dieses Frequenzphänomen sichtbar.

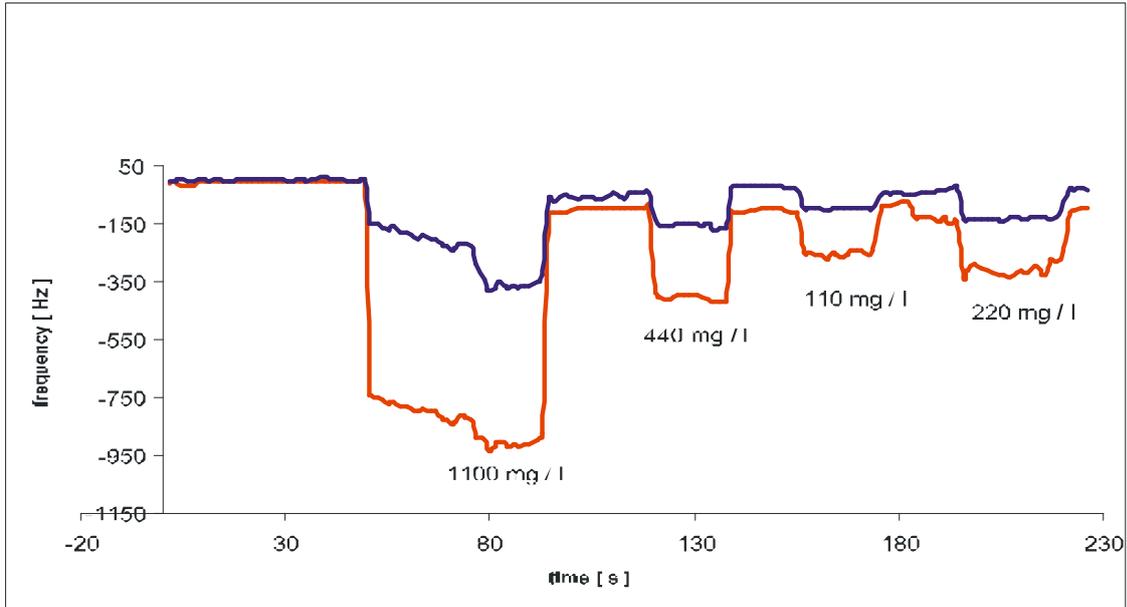


Abb. 29: Sensorantwort auf eine Sesamproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 240 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,883 MHz, Referenz: NIP: MVD, 280 nm, Frequenz : 9,896 MHz

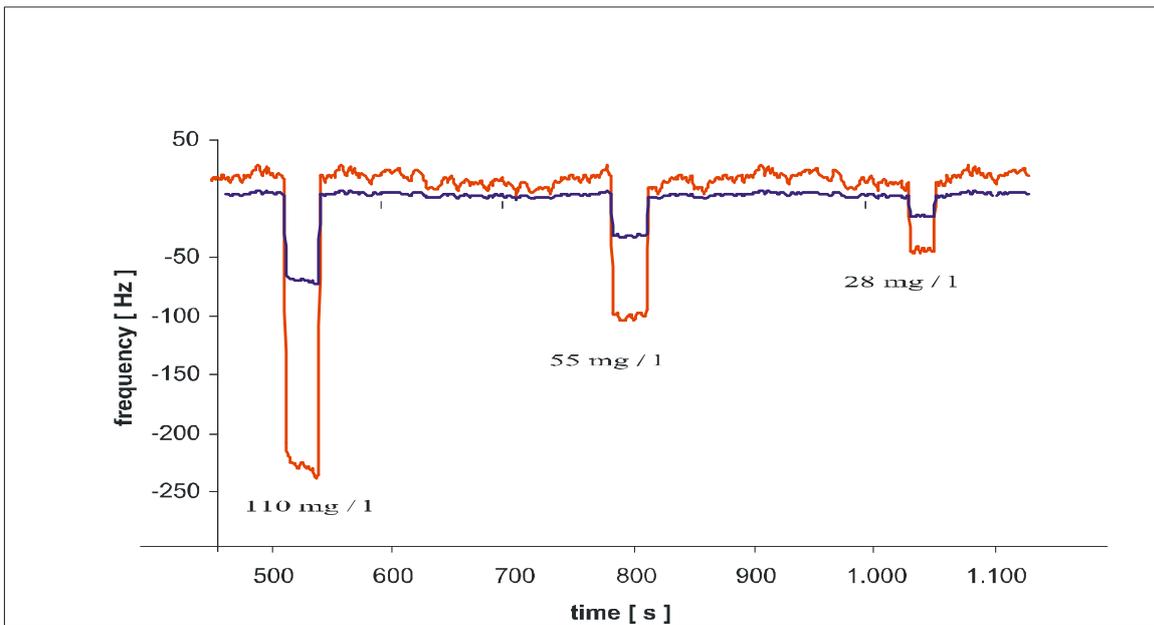


Abb. 30: Sensorantwort auf eine Sesamproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 560 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,852 MHz, Referenz: NIP: MVD, 480 nm, Frequenz: 9,870 MHz

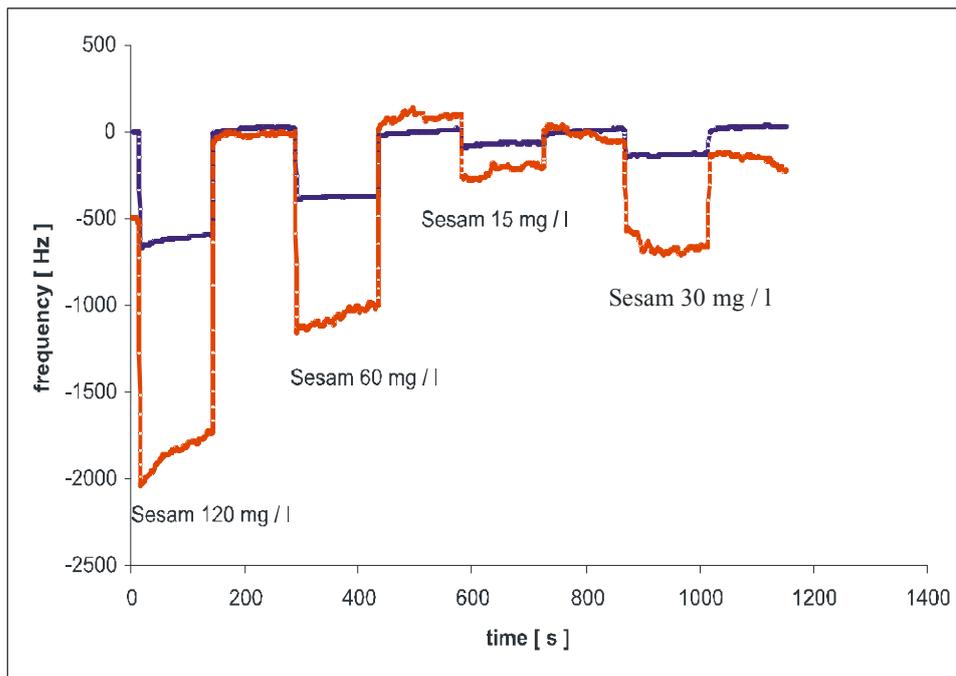


Abb. 31: Sensorantwort auf eine Sesamproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 920nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,857 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz: 9,874 MHz

#### Diskussion zu den Sesamergebnissen:

Analog zu den Sensitivitätsverbesserungen mit zunehmender Schichtdicke beim Mohn, ist dieses Phänomen auch bei den Sesamproteinen zu beobachten, sodass die relative Sensorantwort bezüglich der Mohnproteine in ähnlichen Bereichen bleibt.

In der Abbildung 29 bei 240 nm MIP- MVD ist ein Einfluss der Referenzelektrode auf die Messelektrode zu sehen. Dieses Phänomen des Übersprechens tritt vor allem bei Elektroden auf, deren Resonanzfrequenzen eng beinander liegen, wobei die Grenze unter der Übersprechung stattfindet, etwa 15 kHz beträgt. Weist eine Elektrode im Vergleich zur Gegenelektrode eine ungleich größere Dämpfung auf, so ist ebenfalls das Risiko einer Übersprechung gegeben. Ein Sensor mit starken Tendenzen zum Übersprechen, ist für Messungen nicht geeignet. Die Ausnahme besteht dann, wenn die Übersprechung in der Größenordnung des Rauschens, also nahezu vernachlässigbar, ist.

Das Messergebnis der Grafik 31 bei 920 nm zeigt die Auswirkung eines nicht ganz stabilen Polymers. Das ist dadurch zu erkennen, dass nach der Injektion des Analyten eine Frequenzerniedrigung mit einer darauffolgenden leichten Erhöhung zu sehen ist. Korrekterweise ist es notwendig, bis zum Erreichen eines konstanten Frequenzwertes

zu warten, oder im Notfall den Sensor zu wechseln. Springt aber nach dem Auswaschen mit H<sub>2</sub>O die Frequenz auf einen Wert zurück, der um demselben Maße verschoben ist, wie die Verschiebung in der Messphase bewirkt, so gleicht die verschobene Frequenz diesen Effekt aus.

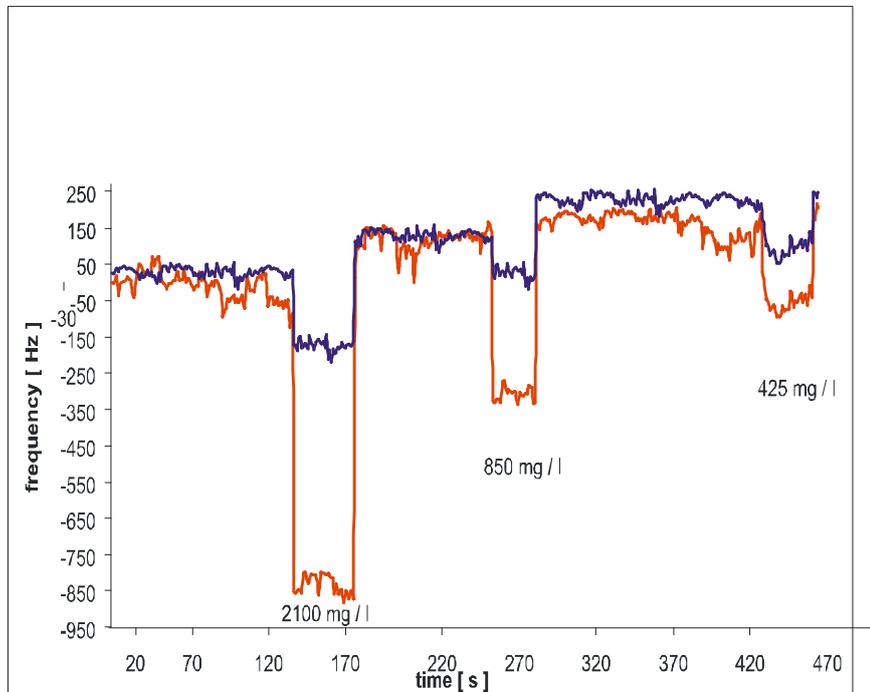


Abb. 32: Sensorantwort auf eine Mandelproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 240 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,882 MHz, Referenz: NIP: MVD, 280 nm, Frequenz: 9,896 MHz

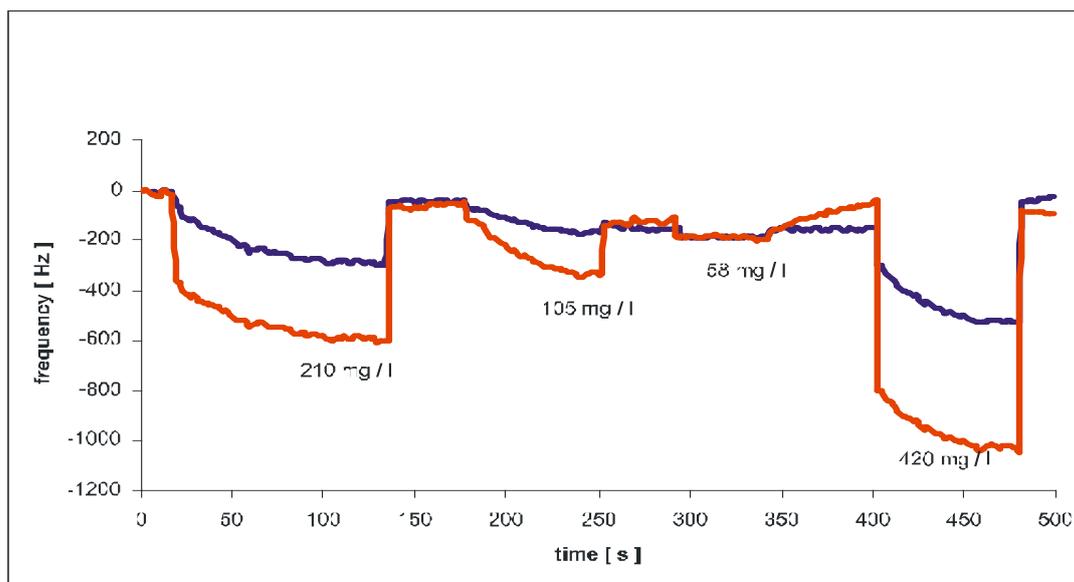


Abb. 33: Sensorantwort auf eine Mandelproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 560 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,850 MHz, Referenz: NIP: MVD, 480 nm, Frequenz: 9,867 MHz

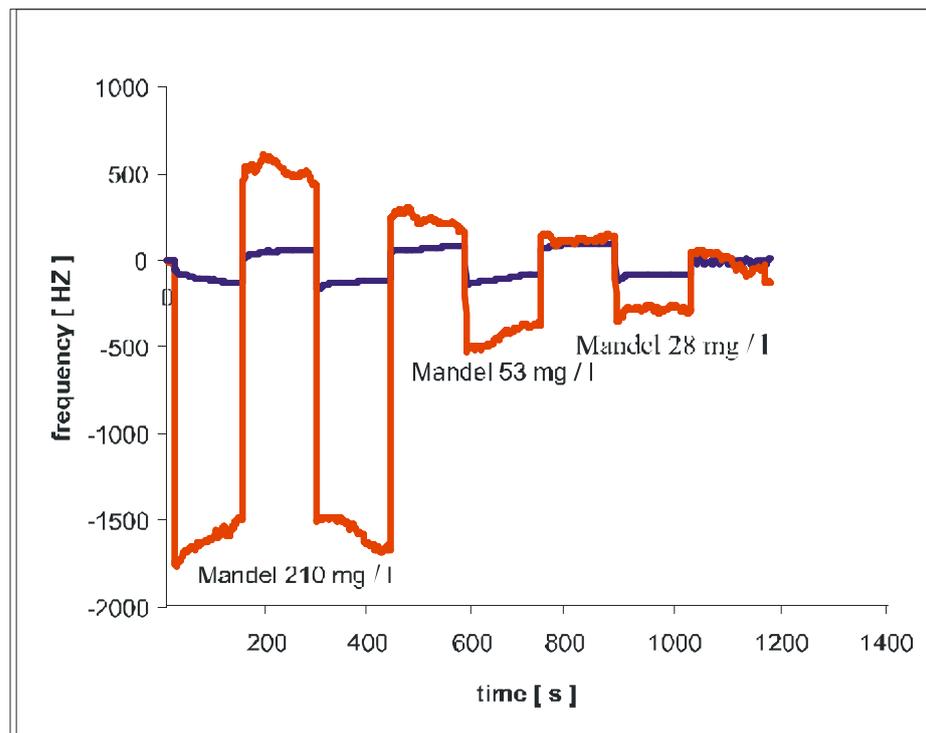


Abb. 34: Sensorantwort auf eine Mandelproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 920nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,857 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz: 9,874 MHz

#### Diskussion der Mandelergbnisse:

Der Vergleich der 3 Messungen in Abbildung 32, 33 und 34 für Mandelproteine zeigt bezüglich der Sensivität das gleiche Verhalten, wie es auch bei Mohn- und Sesamproteinen der Fall ist. Deutlich ist auch der Anstieg des Signal- / Rauschverhältnisses mit zunehmender Schichtdicke zu erkennen. Vor allem bei der Messung der Abbildung 33 mit 560 nm Schichtdicke ist die herabgesetzte Diffusion in die Kavitäten zu erkennen.

In der Abbildung 34 bei 920 nm ist ein Ansteigen der Frequenz nach dem Auswaschen des Analyten mit Wasser zu sehen. Dieser Anstieg in den positiven Bereich hat in diesem Fall nichts mit einem Anti- Sauerbrey- Verhalten, oder mit einem Wechsel der Resonanzfrequenz zu tun, sondern ist schlicht und einfach ein Phänomen der Wasserlöslichkeit des Polymers in der wässrigen Phase. Während der 3 stündigen Equilibraionszeit des Polymers in Wasser, geht ein kleiner Teil des Polymers mit in Lösung. Wird die Frequenz dieser wässrigen Phase nun mit der Basislinie versehen, und nach der Messung mit einem Protein diesmal mit frischem destilliertem Wasser ausgewaschen, verschiebt sich die Basislinie in den positiven Bereich.

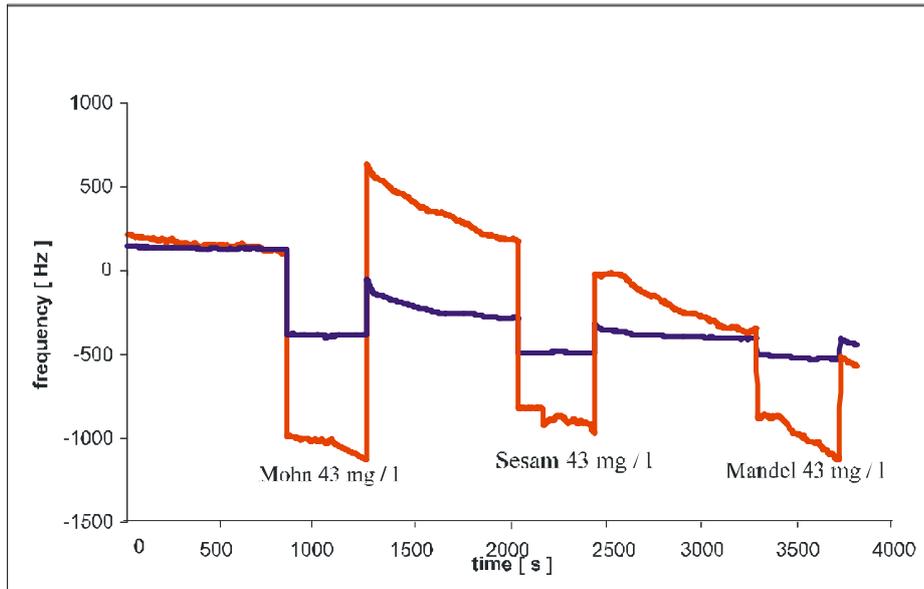


Abb. 35: Vergleich verschiedener Proteinlösungen gleicher Konzentration, MIP: MVD, Schicht: 800 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,857 MHz, Referenz: MIP: MVD, 640 nm, Frequenz: 9,874 MHz

In der Abbildung 35 wird eindrucksvoll gezeigt, welche Auswirkung eine Messung mit einem nicht fertigen equilibrierten Polymer hat. Der Basisliniendrift, der eigentlich die Frequenzverschiebung durch die noch vorhandene Equilibration darstellt, ist in dieser Messauswertung deutlich zu sehen. In solchen Fällen ist eine einfache Basislinienkorrektur sinnvoll.

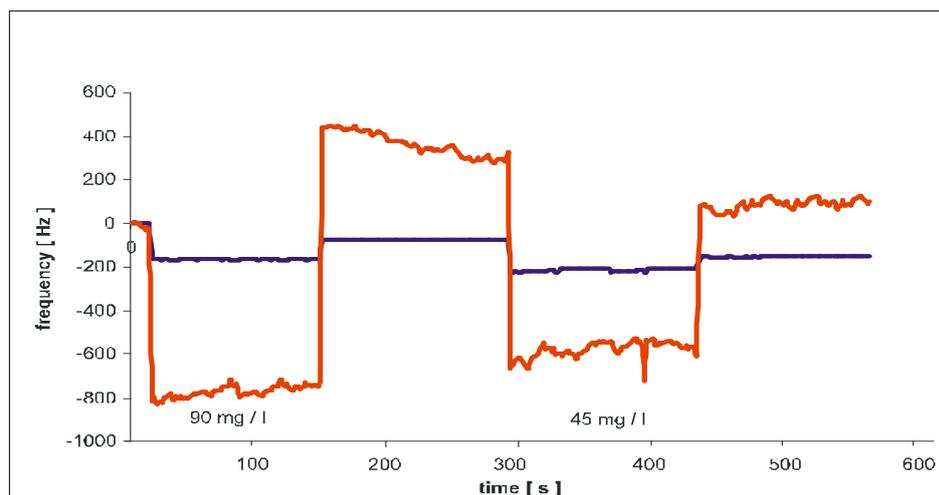


Abb. 36: Sensorantwort auf eine Mohnlösung, MIP: MVD, Schicht: 920nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,857 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz: 9,874 MHz

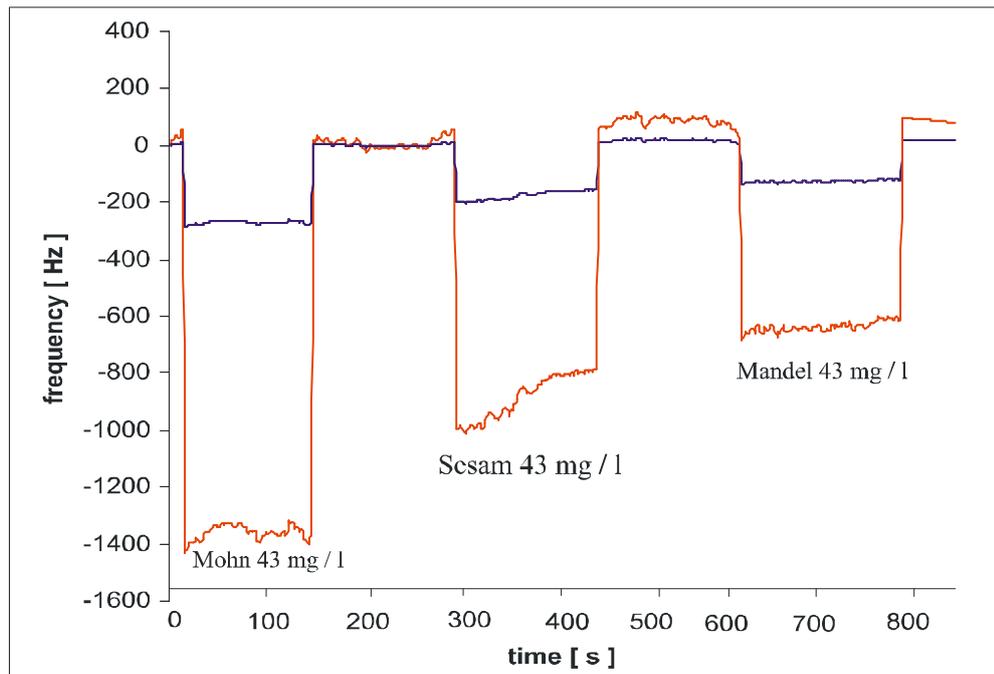


Abb. 37: Vergleich verschiedener Proteinlösungen gleicher Konzentration, MIP: MVD, Schicht: 920nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,857 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz: 9,874 MHz

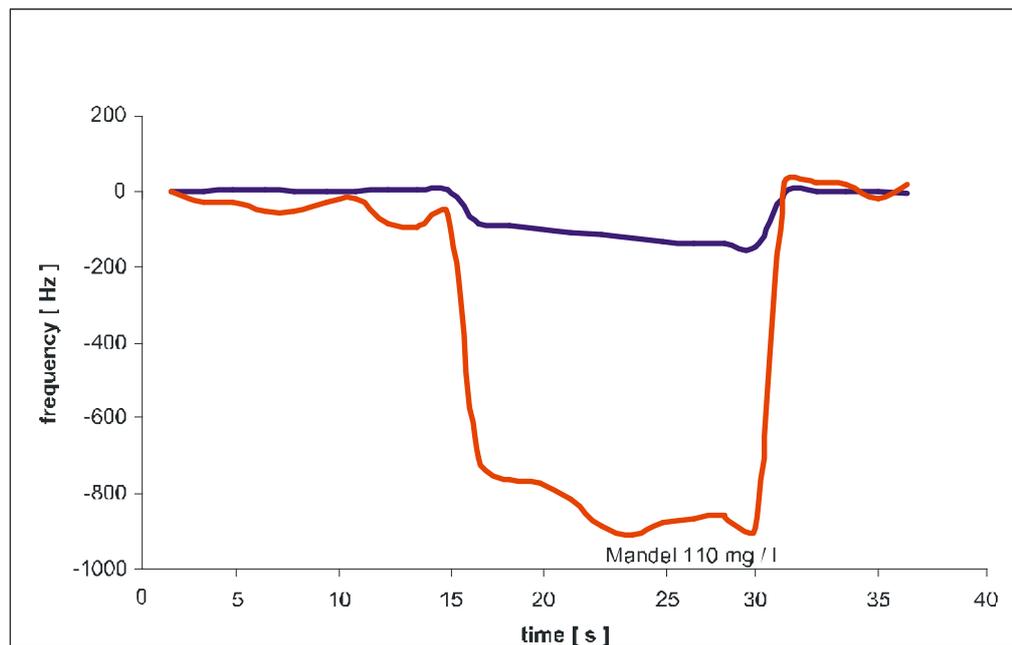


Abb. 38: Sensorantwort auf eine Mandelproteinlösung, MIP: MVD, Schicht: 920nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,857 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz: 9,874 MHz

Werden Verdünnungsreihen der Proteinlösungen von den verschiedenen Pflanzen erstellt und diese mit einem Mohn- geprägten Sensor untersucht, zeigen sich für verschiedene Mohnsensoren folgende Ergebnisse, die in den Abbildungen 39-43 gezeigt werden.

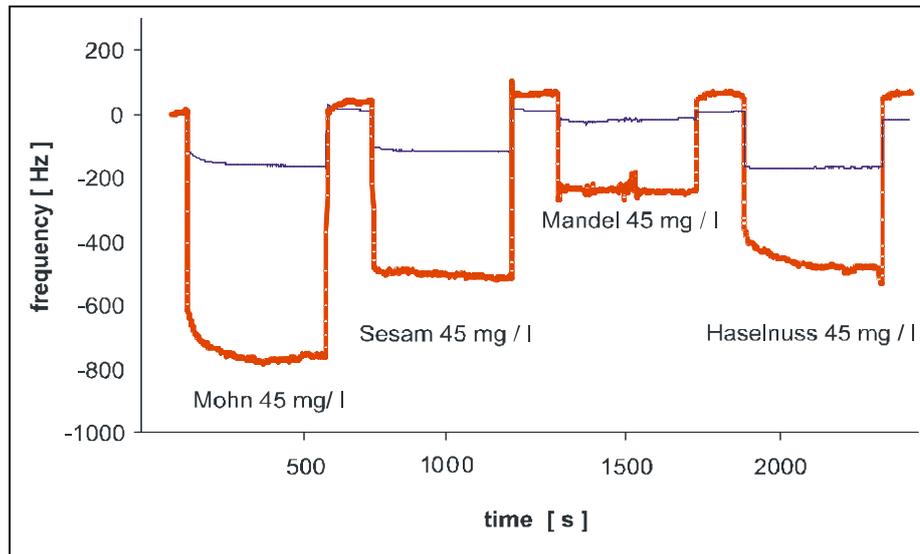


Abb. 39: Querempfindlichkeiten, MIP: MVD, Schicht: 640 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,809 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz: 9,817 MHz

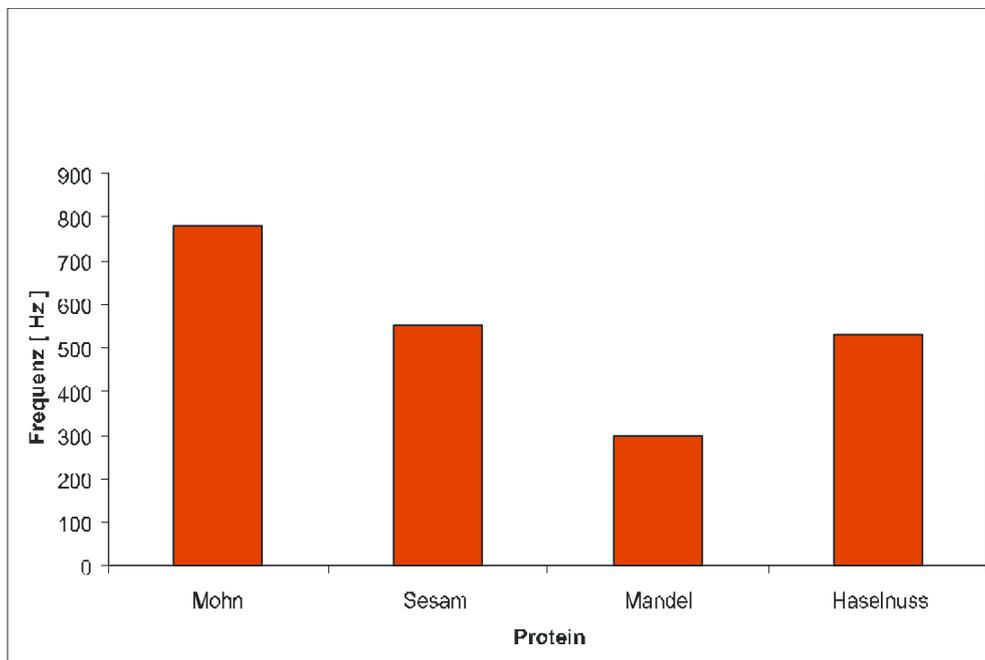


Abb. 40: Querempfindlichkeiten MIP: MVD, Schicht:640 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,809 MHz, Referenz: NIP: MVD, 320 nm, Frequenz : 9,817 MHz

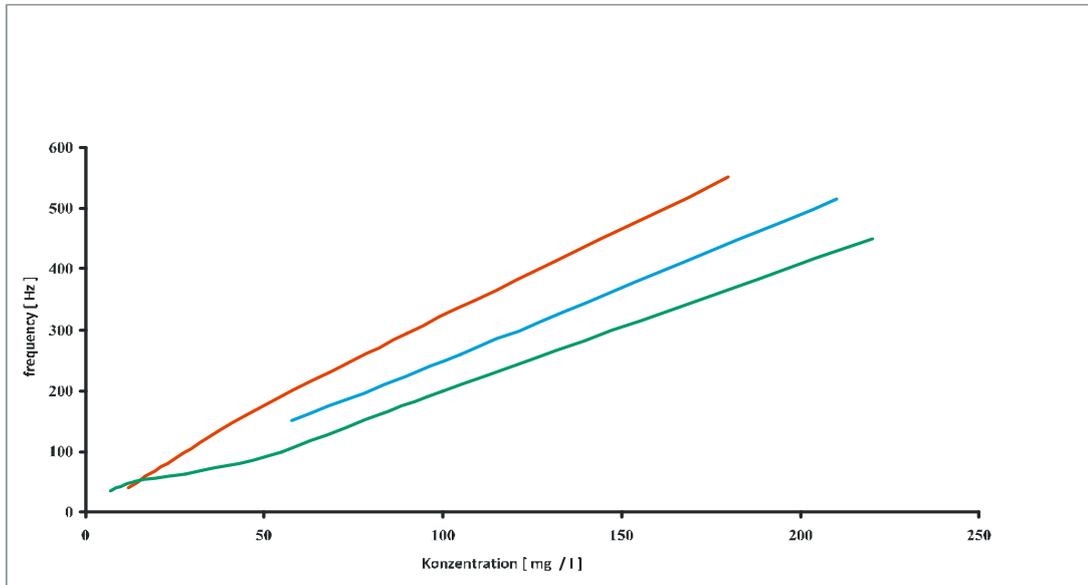


Abb. 41: Querempfindlichkeiten, MIP: MVD, Schicht: 560 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,850 MHz, Referenz: NIP: MVD, 480 nm, Frequenz: 9,867 MHz, Mohn (rot), Sesam (blau) und Mandel (grün)

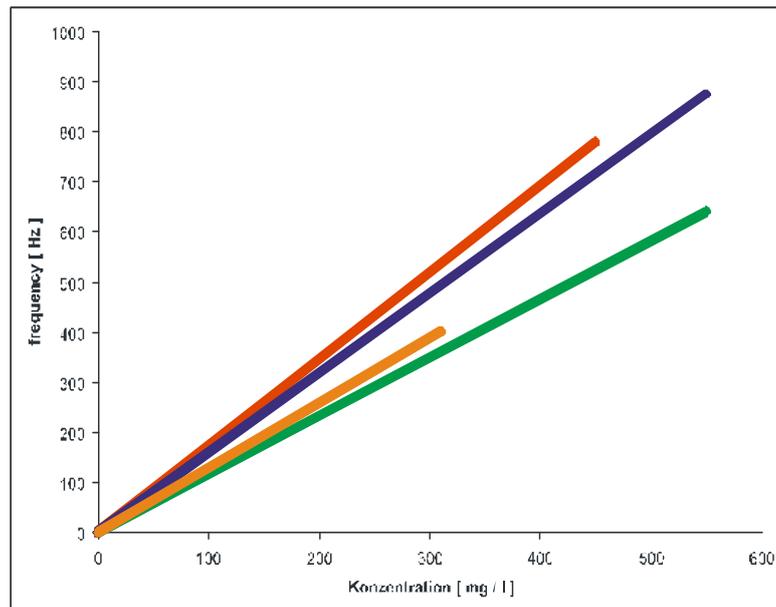


Abb. 42: Querempfindlichkeiten, MIP: MVD Schicht: 560 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,852 MHz, Referenz: NIP: MVD, 480 nm, Frequenz: 9,870 MHz, Mohn (rot), Sesam (blau), Haselnuss (orange) und Mandel (grün)

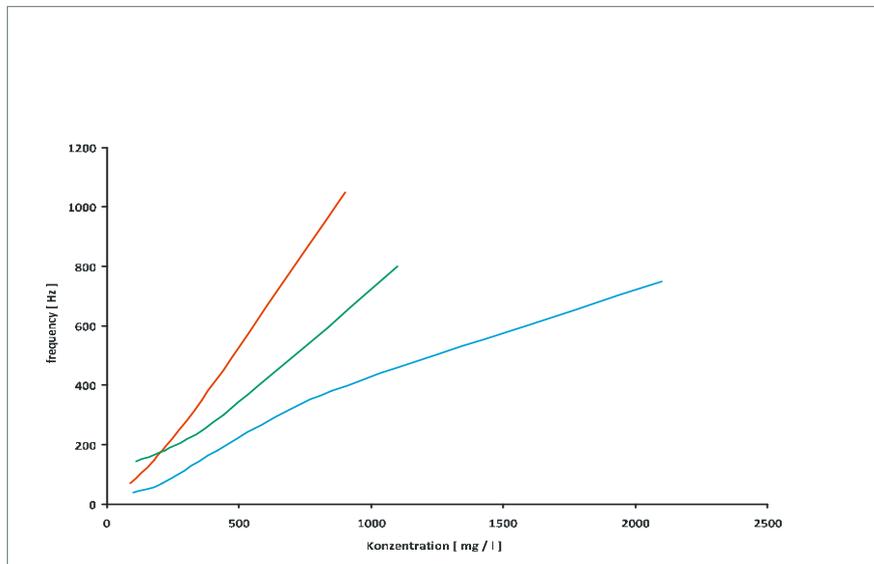


Abb. 43: Querempfindlichkeiten MIP: MVD, Schicht: 240 nm, Templat: Mohnproteine 1,8 g/l H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,882 MHz, Referenz: NIP: MVD, 280 nm, Frequenz: 9,896 MHz, Mohn (rot), Sesam (grün) und Mandel (blau)

### Diskussion der Querempfindlichkeiten:

Wie in den Abbildungen 40, 41, 42 und 43 verdeutlicht, dass auch bei unterschiedlichsten Empfindlichkeiten das Verhältnis von Mohn- Sesam- und Mandelprotein in einem ähnlichen Bereich geblieben ist, lässt Zweifel an der guten Selektivität des Sensors aufkommen. Wie auch die oben erwähnte unspezifische Einlagerung der Proteine aufgrund der Rauheit der dicken Polymerschicht, steht unter anderem die Frage im Raum, ob die Unterschiede nicht vollkommen unspezifisch von den Konzentrationsverhältnissen der Proteinlösungen kommen, die alle jeweils ständig durch Verdünnung der Proteinextrakte hergestellt wurden. Bedauerlicherweise ist es auch in keiner der Messungen zu sterisch hindernden Phänomenen der Sesam- und der Mandelproteine, wie zum Beispiel, Anti-Sauerbrey- Verhalten gekommen.

Es sei zu diesem Aspekt darauf hingewiesen, dass es im Falle der Prägung des Sensors mit dem größten Protein zu keinen Anti- Sauerbrey- Verhalten kommt, da alle Analyte in die Hohlräume hineinpassen, und somit einen frequenzsenkenden Sensoreffekt liefern. Des weiteren ist es bei diesen Experimenten nicht zutreffend, dass die Selektivitätsverhältnisse einfach nur die Konzentrationsverhältnisse widerspiegeln.

Zur Validierung der Selektivitäten der Quarze, werden die Kreuzselektivitäten der Proteine untereinander untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse am Beispiel der Kreuzreaktivität zwischen Mohn- und Mandelproteinen zueinander geben einen Einblick in die vorhandene Selektivität.

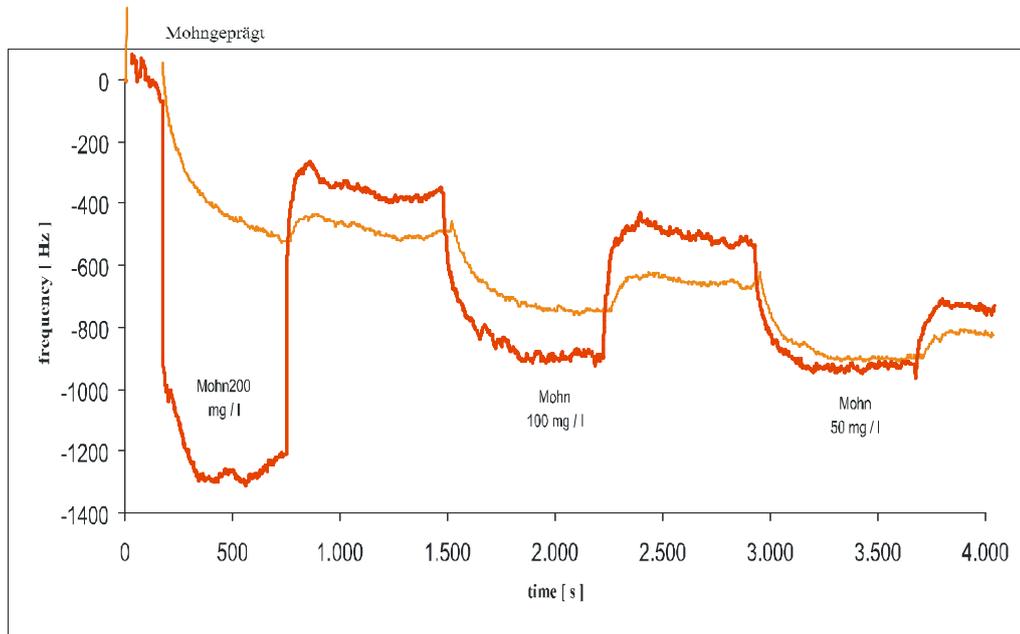


Abb. 44: Sensorergebnisse auf Mohnproteine der Konzentration: 200 mg/l, 100 mg/l und 50 mg/l, MIP: MVD, Schicht: 240 nm, Templat: Mohnproteine 1,0 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,859 MHz, Referenz: NIP: MVD, 240 nm, Frequenz: 9,875 MHz

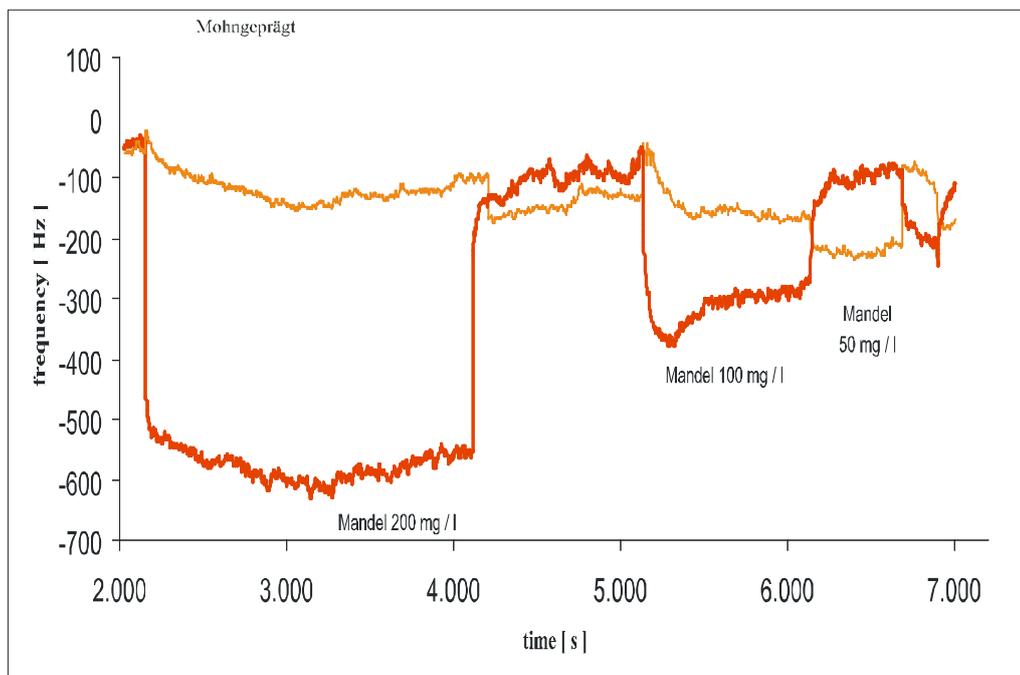


Abb. 45: Sensorergebnisse auf Mandelproteine der Konzentration: 200 mg/l, 100 mg/l und 50 mg/l, MIP: MVD, Schicht: 240 nm, Templat: Mohnproteine 1,0 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,859 MHz, Referenz: NIP: MVD, 240 nm, Frequenz: 9,874 MHz

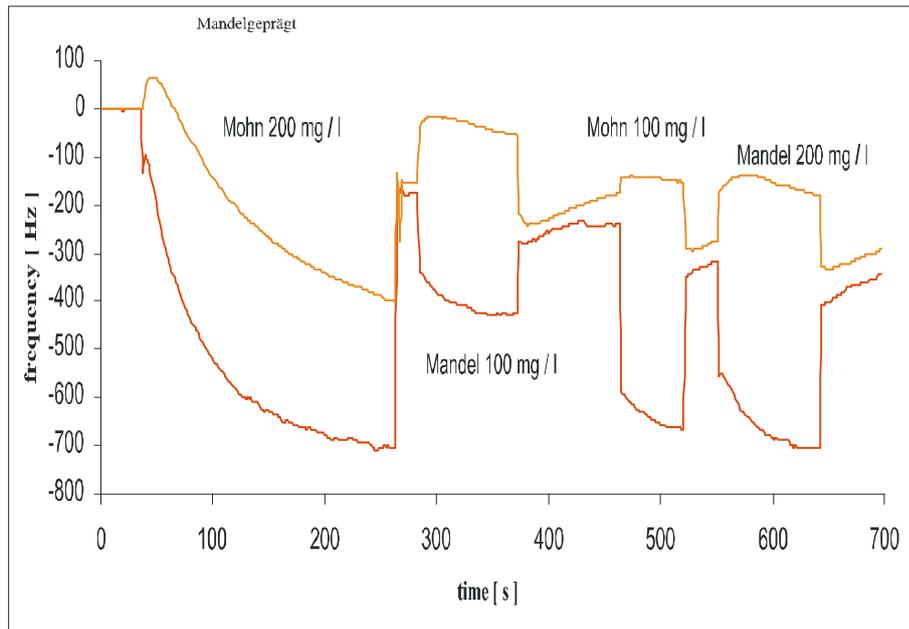


Abb. 46: Querempfindlichkeiten aus Mohn und Mandelproteine bei 200 mg/l und 100 mg/l, MIP: MVD, Schicht: 160 nm, Templat: Mandelproteine 1,0 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,864 MHz, Referenz: NIP: MVD, 160 nm, Frequenz: 9,844 MHz

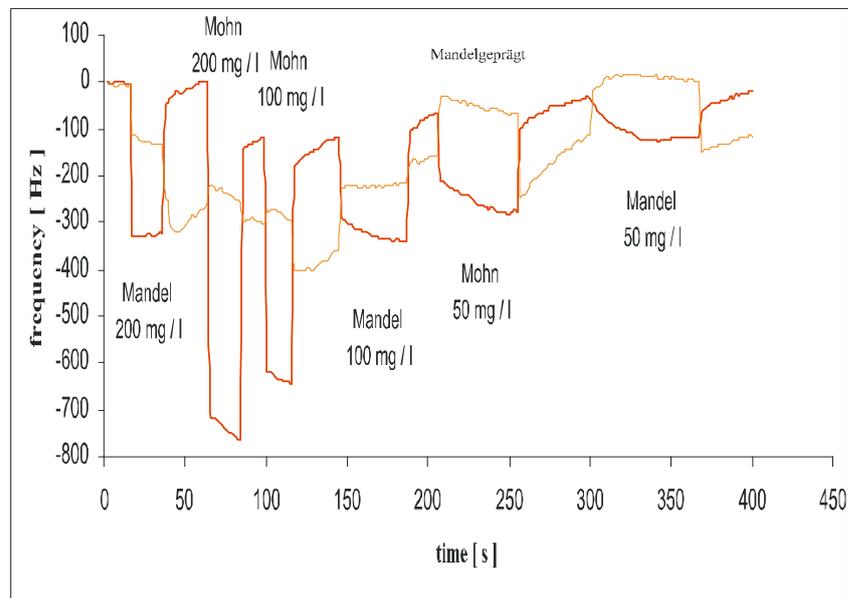


Abb. 47: Querempfindlichkeiten aus Mohn und Mandelproteine bei 200 mg/l, 100 mg/l und 50 mg/l, MIP: MVD, Schicht: 160 nm, Templat: Mandelproteine 1,0 g/l in H<sub>2</sub>O, Frequenz: 9,864 MHz, Referenz: NIP: MVD, 160 nm, Frequenz: 9,844 MHz

Die erhaltenen Kreuzselektivitäten für Mohn- und Mandelproteine sind in den folgenden Abbildungen 48, 49 und 50 dargestellt.

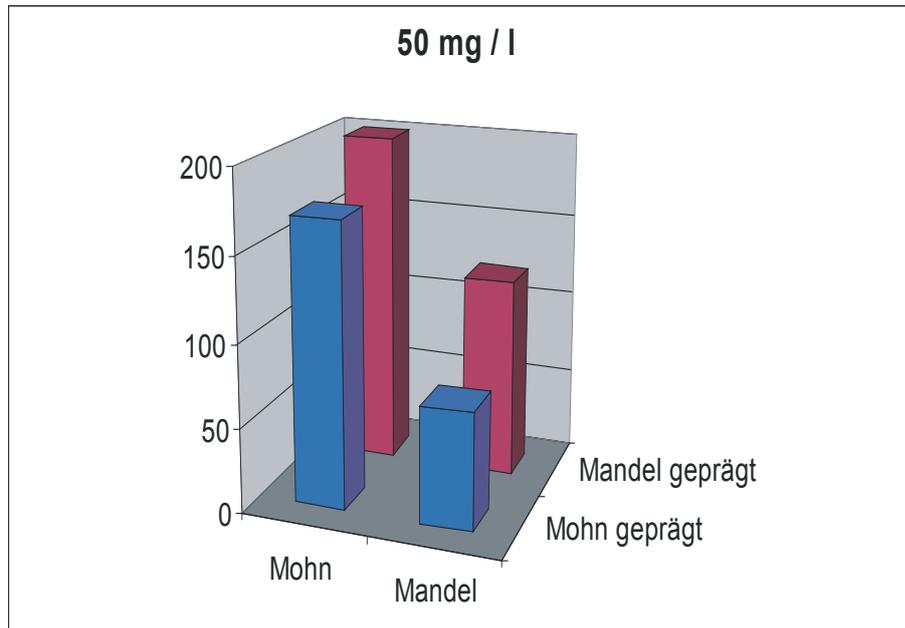


Abb. 48: Kreuzselektivität für Mohn und Mandelproteine bei einer Proteinkonzentration von 50 mg/l, erhalten aus den in Abb. 45,46, und 47 gezeigten Messergebnissen

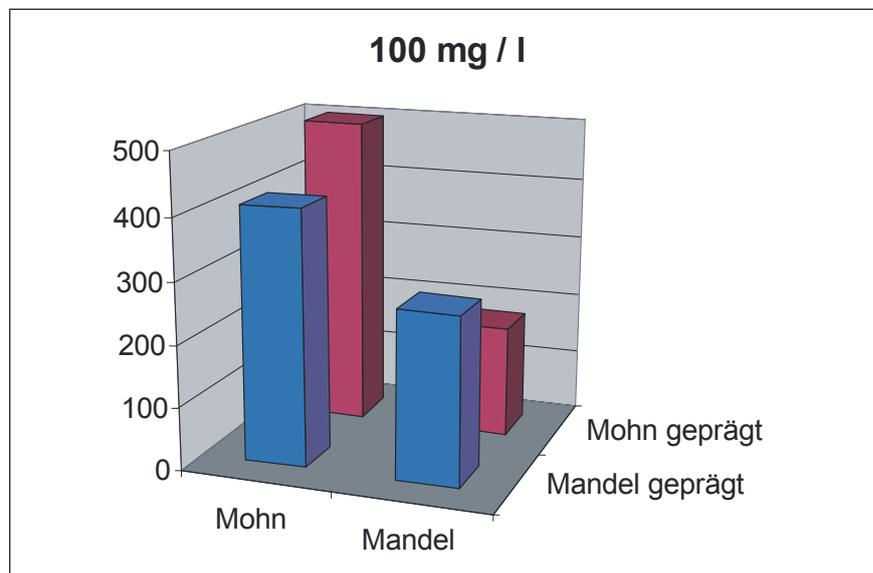


Abb. 49: Kreuzselektivität für Mohn und Mandelproteine bei einer Proteinkonzentration von 100 mg/l, erhalten aus den in Abb. 45,46, und 47 gezeigten Messergebnissen

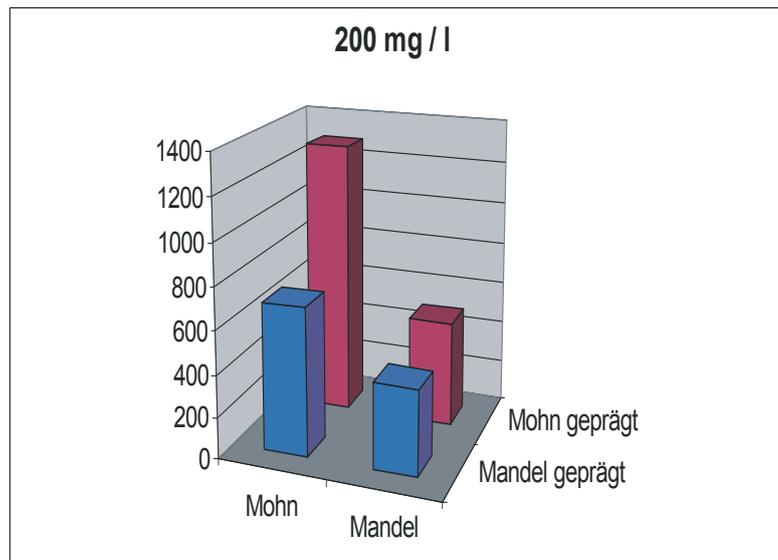


Abb. 50: Kreuzselektivität für Mohn und Mandelproteine bei einer Proteinkonzentration von 200 mg/l, erhalten aus den in Abb. 45,46, und 47 gezeigten Messergebnissen

#### Diskussion der Kreuzselektivitäten:

Alle 3 Abbildungen 48, 49 und 50 zeigen bezüglich der Sensorantworten der Quarze ähnliches Verhalten. Für mit Mohn geprägte Sensoren wird gemäß der Erwartungen bei der Bedeckung mit Mohnproteinlösungen die größte Antwort erhalten, während die Proteinlösungen von Mandelkernen geringere Sensorsignale zeigen. Obwohl die Erwartungen, das größten Sensorsignals für Mandelproteinlösungen auf mandelgeprägten Sensoren zu erhalten nicht erfüllt werden, sind die großen Änderungen hinsichtlich der Verhältnisse beider Proteinlösungen zueinander ein deutlicher Hinweis auf die vorhandene Selektivität der Quarzsensoren. Für Sensoren geprägt mit Mohnproteinen ist die Antwort für Mohnproteinlösungen um einen Faktor 3 höher als die für Mandelproteinlösungen. Während die Antwort auf Mohnproteinlösungen bei mandelgeprägten Sensoren stark abnimmt, ist nur eine geringfügige Abnahme der Mandelproteinlösungen erkennbar, die den Unterschied zwischen den beiden Proteinen im mandelgeprägten Fall auf einen Faktor knapp unter 2 abfallen lässt. Im Vergleich zu den Mohnergebnissen ist die erwartete Veränderung in der Kreuzselektivität eingetreten, die ein Hinweis auf die Selektivität der Quarzsensoren darstellt.

Bei AFM- Bildern auf einer Glasplatte (Abb. 51, 52 und 53), ist die Selbstorganisation der Proteine sichtbar.

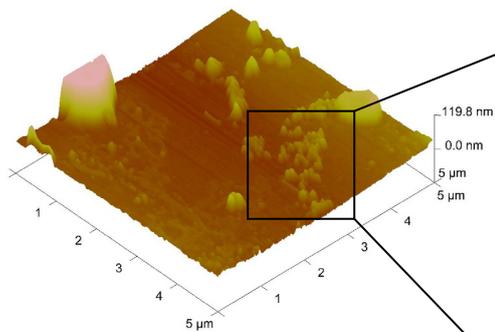


Abb.51: Mohnproteine 1,8 g/l in Wasser organisiert auf einer Glasplatte unter dem AFM

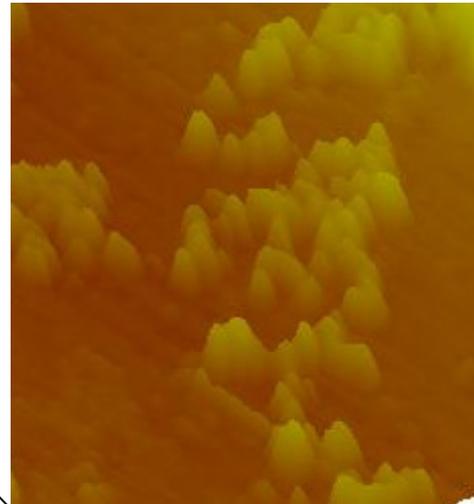


Abb. 52: Vergrößerung

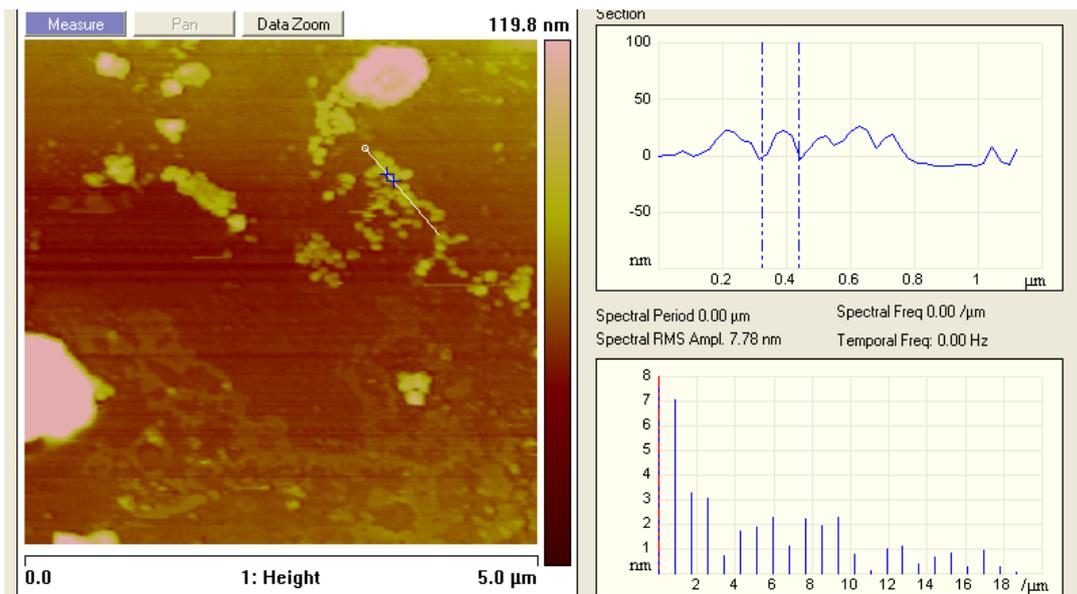


Abb. 53: Profil der organisierten Proteine auf der Glasplatte

Bei zu hoher Konzentration werden Cluster von Agglomeraten der Proteinen (Abbildung 54) beobachtet. Werden Quarze mit agglomerierten Proteinen geprägt, entstehen große Hohlräume, in denen unselektiv mehrere Arten von Proteine adsorbiert werden können.

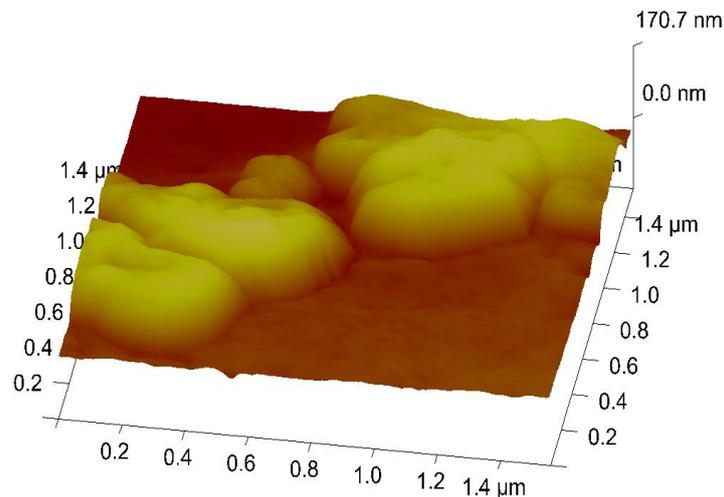


Abb. 54: Agglomeration der Mohnproteine, 18 g/l in Wasser

Die Unselektivität bei Agglomeration der selbstorganisierenden Proteine auf der Glasplatte wirft die Frage nach der Selektivität der Messergebnisse auf. Würden bereits im Stempelvorgang die Proteine aufgrund der zu hohen Konzentration der Mohnlösung von 1,8 g/l in Wasser eine Agglomeration eingehen, wäre auch hiermit die eigentliche Quelle der Selektivität, die Abdrücke der Proteine, nicht existierend. In solchen Fällen wäre der Sensor nutzlos. Frühere Experimente und Messungen, sowie meine Untersuchungen mit dem AFM- Gerät haben ergeben, dass die Konzentration von 1,8 g/l wässriger Mohnlösung noch nicht zu groß ist um eine Selbstorganisation durch Agglomeration zu verhindern.

## 5. Anhang

### Zusammenfassung

#### 5.1. Deutsch

Chemische Proteinsensoren besitzen großes Potential und werden zunehmend eine herausragende Rolle im Bereich der bioanalytischen Chemie, Medizin und Lebensmitteltechnologie einnehmen. Die rasche Ansprechzeit, benutzerfreundliche Handhabung mit wenig Probenvorbereitung, sowie geringe Anschaffungskosten machen diese Sensoren zu wirtschaftlich relevanten Messmethoden. Aufgrund der physikalischen Gesetze, auf denen diese Sensoren basieren, in diesem Fall der Massendetektion, sind neben der bioanalytischen Anwendungen auch rein chemische oder umweltanalytische Fragestellungen von Bedeutung.

Der hier herangezogene Transducer ist der QCM, die Quarzmikrowaage. Durch Anlegen eines externen Wechselfeldes wird dieser in Resonanz versetzt und deren Eigenschwingungen gemessen. Durch Anlagerung von Analyten verringert sich direkt proportional zur Massenlagerung (abhängig von der Konzentration der Analytlösung) die Resonanzfrequenz. Kalibrierungen erlauben dann absolute Massenbestimmungen. Temperatur- Druck- und Viskositätseffekte können durch Differenzmessungen eliminiert werden.

Es konnte in der vorliegenden Diplomarbeit gezeigt werden, dass mit der hier durchgeführten Strategie des Prägens von Polymeren und somit der Erzeugung von synthetischen Antikörpern z.B. Mohnproteine bis hinab zu 100 µg/l nachgewiesen werden können. Auch Querempfindlichkeit zu verschiedenen anderen Proteinen, z.B. Mandel und Sesam, wurden optimiert. Eine Variation der Polymerschichtdicke bis etwa zu 1 µm vergrößert die Sensorempfindlichkeiten um einen Faktor 10. Es geht also trotz der relativ großen Analytmoleküle die Oberflächenrauigkeit bzw. das „bulk“ ein. Bei allen Messungen mit „Mohnsensoren“ besitzen Mohnproteinlösungen die größte Sensorantwort. Generell gilt für die Kreuzselektivitäten, dass für das Templat als Analyt der größte Effekt erzielt wird, während die Kreuzempfindlichkeiten nur ca 50 % betragen.

## Summary

### 5.2. English

Chemical sensors show a high potential, to play an important role in bioanalytical chemistry, medicine and food-technology. The rapid response time, user- friendly handling and low costs as compared to relevant analytical methods to assess analytes, make chemical sensors a innovative and attractive field of analytical chemistry. Due to the physical laws, on which these mass-sensors used are based, a nearly unlimited progress concerning bioanalytical, chemical and environmental research can be achieved.

The sensor itself is the QCM, the quartz crystal microbalance. An alternating current is applied to create resonance of the quartz, that can be measured as “eigen” vibration. The decrease in frequency is directly related to the ab/adsorption of analyte. The frequency shift is directly proportional to the mass, giving the direct information for gauging the concentration of analytes in the sample. Although temperature, pressure and viscosity of the solution affect the frequency shift, they can be compensated for by differential measurements.

The diploma thesis presented shows that the strategy chosen, molecular imprinting of polymers via the generation of synthetic antibodies, allows the detection of poppy proteins down to 100  $\mu\text{g/l}$ . The cross sensitivity to other proteins, e.g. sesame and almond, were optimized. An increase of polymer coating up to 1  $\mu\text{m}$  leads to an amplification of sensitivity by a factor of 10. In spite of the relative large protein molecules surface roughness and “bulk” phenomena are important. In all measurements the “poppy sensor” will give the most pronounced response to the poppy protein. Generally, concerning cross-sensitivities the highest effect is observed if the analyte is identical to the template, whereas cross-sensitivities are only 50% of these responses.

## Verwendete Literatur

- [1] F. Dickert, P. Lieberzeit, *Chemosensors in Environmental Monitoring*, Anal Bio. Chem., ( 2009 ), 393, 467- 472
- [2] F. Dickert, P. Lieberzeit, Imprinted Polymers in Chemical Recognition for Mass- Sensitive Devices, Springer Ser Chem. Sens. Biosens.,(2007), 5 p. 175
- [3] Chemosensoren für Gase und Lösungsmitteldämpfe - Ein Beitrag zur Umweltanalytik F.L. Dickert Chemie in unserer Zeit **26**, 138 (1992 [4])
- [4] Peter Gründler, *Chemische Sensoren*, Springer, ISBN 3- 540-20984-0
- [5] F. L. Dickert, *Chemische Sensoren – Anwendung in Technik und Medizin*, VO- Skriptum, WS 2007 / 2008
- [6] Pollen-imprinted polyurethanes for QCM allergen sensors M. Jenik, A. Seifner, P. A. Lieberzeit, F. L. Dickert Analytical and Bioanalytical Chemistry **394**, 523-528 (2009).
- [7] A. Marrison, *The Evolution of Quarz Crystal Clocks*,The Bell System Technical Journal, Vol. XXVII, pp. 510-588, 1948.
- [8] M. E. Frerking, Fifty Years of Progress in Quartz Crystal Frequency Standards, 1996 IEEE International Frequency Control Symposium, pp. 33-46
- [9] T. Ikeda, Fundamentals of Piezoelectricity, -oxford University Press, 1990
- [10] B. Jaffe, W. Cook, H. Jaffe, Piezoelectric Ceramics, 1989
- [11] K. Ruschmeyer, Piezokeramik, Expert Verlag, 1995
- [12] F. Dickert, P. Lieberzeit, *Imprinted Polymers in Chemical Recognition for Mass- Sensitive Devices*, Springer Ser Chem. Sens. Biosens.,(2007), 5 p. 180
- [13] Schmidt RF, Allen JW Veletino JF, Parks J, Zhang C (2001 ) Sensors Actuators B 76;95

- [14] C.Lu, A. W. Czanderna, Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, (1984)
- [15] Tipler, Mosca, Physik für Wissenschaftler und Ingenieure, 2. Auflage, ISBN:3-8274-1164-5
- [16] Dr. rer. Nat. Ralf Lucklum, Resonante Sensoren, Habilitationsschrift
- [17] Pier Carlo Braga, Davide Ricci, Atomic Force Microscopy, Methods in Molecular Biology, Volume 242
- [18] Artificial Antibodies for Bioanalyte Detection - Sensing Viruses and Proteins O. Hayden, P. A. Lieberzeit, D. Blaas, and F.L. Dickert Adv. Funct. Mater. **16**, 1269 (2006).
- [19] M. Kempe, K. Mosbach, J. Chromatogr. B 2004 804, 61
- [20] Peter Atkins, Julio de Paula, Physical Chemistry, ISBN: 878-0-19870072-2
- [21] Piezoelektrische Chemosensoren - von der Adsorption zur molekularen Erkennung mit Host-Guest Chemie F.L. Dickert und O. Schuster Chemie in unserer Zeit **28**, 147 (1994).
- [22] Sensor Materials for Solvent Vapour Detection - Donor-Acceptor and Host-Guest Interactions F.L. Dickert, A. Haunschild Adv. Mater. **5**, 887 (1993).
- [23] Tipler, Mosca, Physik für Wissenschaftler und Ingenieure, 2. Auflage, ISBN:3-8274-1164-5
- [24] E. Buddecke, Grundrisse der Biochemie, de Gruyter Verlag, 5. Auflage, Berlin, New York, 1977
- [25] A. S. Tatham and P. R. Shewry, Allergens in wheat and related cereas, Cardiff School of Health Science, University of Wales, Institute Cardiff, Journal Compilation 2008
- [26] Latscha, Klein, Analytische Chemie, ISBN: 3540-58456-0
- [27] Morcol, T. und A. Subramanian ( 1999) A red dot- blot protein assay technique in the low nanogram range, Anal. Biochem. 270: 7-82

- [28] Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- [29] Lowry, O. H., N. J. Roseborough, A. L. Farr, und R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**: 265- 275
- [30] Surface Imprinting Strategies for the Detection of Trypsin O. Hayden, C. Haderspöck, S. Crossing, X. Chen and F.L. Dickert *Analyst*, **133**, 1044 (2006).
- [31] Modifying Polymers by Selforganisation for the Mass-Sensitive Detection of Environmental and Biogenous Analytes F.L. Dickert, P. Lieberzeit, S. Gazda-Miarecka, K. Halikias, K.-J. Mann *Sensors and Actuators B* **100**, 112 (2004).

## **Lebenslauf:**

### **Christoph Langsam**

- 21. Juni 1986:** geboren in St.Pölten
- 1993- 1997:** Besuch der Volksschule Inzersdorf- Getzersdorf
- 1997- 2005:** Besuch des Bundesrealgymnasiums Krems
- 2005- 2009:** Chemiestudium an der Universität Wien
- Juni 2009:** Beginn der Diplomarbeit an der Fakultät für analytische Chemie mit Schwerpunkt auf chemosensorische Proteinmessungen