



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Molekular geprägte Sensorschichten als Instrument zur low – cost - Sensorik von Verfälschungen durch Melamin

Verfasser

Martin Zeilinger

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Chemie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit

Vorwort

Die vorliegende Diplomarbeit entstand im Rahmen des EU-Projektes FP7-NMP-2010-Large-4-263382 „PHOTOSENS“ in der Zeit von Februar bis Juli 2011 in der Arbeitsgruppe Chemosensorik und optische Molekülspektroskopie, Währingerstraße 38, A-1090 Wien der Universität Wien
Leiter: O. Univ.-Prof. Dr. Franz Dickert.

Danksagung

Ich möchte meinem Betreuer Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit für die spontane Aufnahme, die rasche und unkomplizierte Vorgehensweise, sowie für die Vergabe eines außergewöhnlich aktuellen und interessanten Themas danken.

Weiters möchte ich meinen Dank der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme, sowie für die überaus kompetente Unterstützung bei diversen Fragestellungen aussprechen. Explizit erwähnen möchte ich Herrn Mag. Hermann Sussitz für die Einschulung auf diversen Geräten sowie für die diversen äußerst gewinnbringenden Diskussionen, Herrn Ing. Mag. Dr. Stephan Aigner für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bei EDV-Fragen und Frau Ing. Marietta Maurer für die Unterstützung bei diversen administrativen Tätigkeiten.

Ein besonderer Dank gebührt meinen Eltern sowie meiner Großmutter, ohne welche es mir nicht möglich gewesen wäre dieses Studium zu finanzieren.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort und Danksagung	3
1 Einleitung	7
1.1 Problematik	7
1.2 Zielsetzung	8
1.3 Melamin	9
1.4 Toxizität und Grenzwerte	11
2 Theorie	15
2.1 Chemosensoren	15
2.2 Molekulares Prägen	16
2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	19
2.4 Quarzmikrowaage (QCM)	22
3 Experimenteller Teil	25
3.1 Herstellung dünner Schichten	25
3.2 Silanisierung	28
3.3 Entwicklung eines MIP für Melamin	30
3.4 Charakterisierung der Oberfläche	41
3.5 QCM – Allgemeines	44
3.6 QCM – Messungen	47
3.7 QCM – Querselektivitäten	51
3.8 QCM – Temperaturabhängigkeit des MIP	62
4 Zusammenfassung	67
4.1 Deutsch	67
4.2 English	68
5 Chemikalien und Gerätschaften	69
6 Literaturverzeichnis	71
7 Lebenslauf	75

1 Einleitung

1.1 Problematik

In letzter Zeit treten vermehrt Lebensmittelskandale aufgrund diverser Verunreinigungen mit für den Menschen gesundheitsschädlichen Stoffen auf. Zum Teil werden von Produzenten bewusst Gesundheitsrisiken beim Verbraucher in Kauf genommen nur um die Kosten bei der Herstellung zu minimieren.

Einer dieser Skandale betrifft Melamin, welches gezielt Lebensmitteln zugesetzt wurde um einen höheren Proteinanteil und damit ein wertvolleres Produkt vorzutäuschen. Dies wird durch den hohen Stickstoffanteil im Melamin ermöglicht, da der Eiweißgehalt in der Regel indirekt mittels unspezifischer TKN - Methode (Total Kjeldahl Nitrogen) bestimmt und somit nicht näher differenziert wird, woher der gemessene Stickstoff bzw. Ammoniak stammt. Im Jahr 2007 wurde in China produziertes Tierfutter mit Melamin versetzt, in die USA exportiert und führte dort zum Tod vieler Haustiere durch Nierenversagen. 2008 verursachten verseuchte Milchprodukte in China den Tod von 6 Säuglingen worauf hohe Haftstrafen verhängt und am 24. November 2009 zwei Todesurteile vollstreckt wurden.

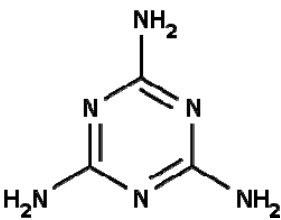
Mit den modernen Methoden der analytischen Chemie ist es grundsätzlich kein Problem Melamin in Nahrungsmitteln nachzuweisen. Hierfür werden in der Regel HPLC (high performance liquid chromatography) – Systeme mit Kopplung zu einem Triple – Quadrupol - MS (Massenspektrometer) verwendet, wie sie derzeit in vielen Analytisch-Chemischen Laboratorien Anwendung finden. Zuvor muss meist zusätzlich eine Probenvorbereitung mittels SPE – Säule erfolgen (Solid Phase Extraction). Der Nachteil dieser Methoden ist zum einen der hohe Preis und zum anderen der relativ geringe Probendurchsatz (etwa 10 min pro Messung). Deswegen wurde eine Screeningmethode basierend auf ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) entwickelt, welche die Untersuchung einer größeren Zahl an Proben bei geringeren Kosten erlaubt, da nur ein geringer Teil mittels HPLC – MS nachuntersucht werden muss.¹

1.2 Zielsetzung

Aufgrund der ausgesprochen hohen Probenzahl ist es nun die Aufgabe der Analytischen Chemie die etablierten, aber kostenintensiven Methoden wie HPLC – MS, im Bereich der low - cost Sensorik zu ergänzen, um eine möglichst hohe Sicherheit der Lebensmittel für den Konsumenten bei überschaubaren Kosten gewährleisten zu können.

Hier beginnt das EU-Projekt „PHOTOSENS“ welches unter Anderem die Entwicklung eines low - cost Sensors mit optischer Detektion für Melamin anstrebt. Die Überlegungen gehen in Richtung SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) sowie PC (Photonic Crystal). Jedenfalls soll die Methode preislich unter jener mittels ELISA liegen und mindestens gleich gute Ergebnisse in kürzerer Zeit liefern. Aufgrund dieser Anforderungen ist eine Massenproduktion der Sensoren auf Kunststoffolie oder sogar auf einer Papieroberfläche angedacht. Die insgesamt neun Projektpartner verteilen sich auf sechs EU – Länder und sind in der Lage sowohl die Entwicklung, Serienproduktion bis hin zum Verkauf an die Endverbraucher durchzuführen. Dieses Netzwerk garantiert, dass die Ergebnisse des Projekts einen Wissens und Technologievorsprung gegenüber dem Weltmarkt und damit eine nachhaltige Verbesserung am Arbeitsmarkt in Europa, vor allem im Bereich der boomenden High Tech Industrie, bewirken. Die Aufgabe der Universität Wien als Partner in diesem Projekt liegt in der Entwicklung eines geeigneten molekular geprägten Polymers (MIP – molecular imprinted polymer) für einen derartigen Sensor. Dies ist somit auch das zentrale Ziel dieser Diplomarbeit.

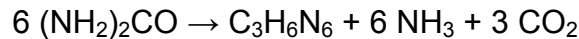
1.3 Melamin

$C_3H_6N_6$	
Weitere Bezeichnungen:	Cyanursäuretriamid, 2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin
CAS – Nummer:	108-78-1
Beschreibung:	farb- und geruchlose monokline Prismen
Molmasse	126,12 g/mol
Dichte	1,57 g/cm ³
Schmelzpunkt	350 °C (Zersetzung)
Löslichkeit	3,2 g/L bei 20°C in Wasser

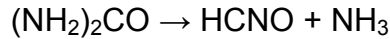
Der Name Melamin setzt sich aus den zwei deutschen Wörtern Melam und Amin zusammen. Melam (ein Kondensationsprodukt von Melamin) wurde erstmals 1834 von Justus von Liebig durch Erhitzen von Kaliumthiocyanat und Ammoniumchlorid dargestellt. Kommerziell genutzt wird es seit 1930, wodurch der Bedarf und die hergestellte Menge sprunghaft anstiegen.²

Heute wird Melamin aus Harnstoff mittels Hoch- oder Niederdruckverfahren (>8MPa bzw. 1MPa) hergestellt. Meist liegen die Anlagen zur Herstellung von Melamin direkt neben jenen für die Harnstoffsynthese. Wichtige Produzenten sind BASF (Deutschland), Orascom Construction Industries (Ägypten), Borealis Agrolinz Melamine mit Sitz in Linz und Zakłady Azotowe Pulawy in Polen. Zunehmende Bedeutung erlangen in Europa auch Importe aus dem asiatischen Raum, vor allem aus der Volksrepublik China.³

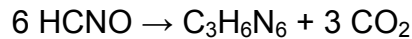
Reaktionsgleichung der Herstellung:



Die Reaktion kann in folgende zwei Schritte unterteilt werden:



(Aufspaltung von Harnstoff in Cyansäure und Ammoniak)



(Polymerisation der Cyansäure zu Melamin unter CO_2 -Abspaltung)

Melamin dient mit seinen drei reaktiven Amin - Gruppen als wichtiger Grundstoff für diverse Polymere, Harze und Klebstoffe vor allem in der Holzverarbeitenden und Kunststoffindustrie (siehe Abbildung 1). Ein Großteil wird mit Formaldehyd zu sogenannten Aminoplast - Kunstharzen polymerisiert wobei über das Verhältnis zwischen Formaldehyd und Melamin das Gleichgewicht von Mono bis Hexamethylolmelamin eingestellt werden kann.



Abbildung 1: Trimethylolmelamin als Beispiel für ein MF-Harz

Umgangssprachlich findet sich meist die Bezeichnung „Melaminharz“ oder einfach nur „Melamin“. Bekannte Handelsnamen sind unter Anderem Resopal, Meladur und Iporka. Dieses Produkt zeigt aufgrund seiner hohen Quervernetzung weit bessere Materialeigenschaften als reine Harnstoffharze welche für diverse Standardprodukte herangezogen werden (z.B. Faser und Spanplatten im Möbelbau).

Anwendung findet Melamin - Formaldehydharz (MF - Harz) oft zur Herstellung von hochstrapazierfähigen Oberflächenbeschichtungen. Hierfür wird bedrucktes Papier (z.B. ein Holz furnierimitat) mit dem Harz getränkt und bei hoher Temperatur mit dem Träger (meist Holz faserprodukte) fest verbunden. Die so erhaltene Oberfläche zeichnet sich durch hohe mechanische und thermische Stabilität aus.

Ebenso wichtig ist die Verwendung als Leim für Holzwerkstoffe (Spanplatten etc.) mit erhöhten Anforderungen wie z.B. Möbelstücke für Feuchträume. Hier finden oft Mischharze wie MHF (Melamin - Harnstoff - Formaldehyd) Verwendung.

Vermischt mit Cyanursäure (1:1 - Mischung) erhält man Melamincyanurat welches als Brandschutzmittel bis etwa 320 °C dient. Melaminpolyphosphat kann bis 350 °C eingesetzt werden.

Als Nischenprodukte sind vor allem Melaminharzschäume als nichtbrennbare Sitz- und Polsterbezüge im Flugzeugbau sowie Kinos und ähnlichen Bereichen zu nennen. Ebenso gibt es Anwendungsgebiete zur Schallisolierung in Gaststätten, Diskotheken sowie Tonstudios. Weiters werden sogenannte Schmutzradierer aus offenporigem Melaminharzschäum hergestellt, welche aufgrund der beim Reiben entstehenden Harzpartikel eine materialabtragende Wirkung und einen damit einhergehenden Reinigungseffekt aufweisen.⁴

1.4 Toxizität und Grenzwerte

Die Aufnahme über Haut, Atmung sowie Nahrung gilt als gesundheitsschädlich. Chronischer Kontakt kann möglicherweise zu Krebserkrankungen führen sowie fruchtschädigende Wirkung zeigen. Die akute Toxizität ist vergleichsweise gering, so liegt der LD₅₀ bei 3248 mg/kg (Ratte)⁵. Zum Vergleich: Der LD₅₀ Wert von Kochsalz liegt bei 3000 mg/kg. Eine länger andauernde Einnahme kann jedoch zum Tod durch Nierenversagen führen, da sich diverse schwerlösliche Melaminsalze bilden (z.B. mit Glykolsäure) und in den Harnwegen auskristallisieren⁶. So wurde in Studien festgestellt, dass das Risiko einer Nierenerkrankung bei Kindern durch die tägliche Einnahme von nur 0,2 mg/kg

Körpergewicht bereits um den Faktor 1,7 ansteigt⁷. Dies ist insofern bedenklich, da die TDI (tolerable daily intake – Tageshöchstdosis) von der EU auf eben diese 0,2 mg/kg festgelegt wurde. In den USA gelten derzeit 0,063 mg/kg.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Grenzwerten von der Politik eingeführt, wobei eine klare Tendenz nach unten zu erkennen ist um den Verbraucher zu beruhigen.

Der aktuelle Grenzwert (Juli 2010) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde mit 2,5 mg/kg für Lebensmittel und Tierfutter sowie auf 1 mg/kg für Kindernahrung festgelegt⁸. Lebensmittel, welche diesen Grenzwert nicht erfüllen sind laut der Europäischen Kommission unverzüglich zu vernichten.

Zusätzlich wurde ein Grenzwert von 30 mg/kg für Verpackungsmaterialien festgelegt, um einer möglichen Kontamination der Lebensmittel durch Migration von Melamin vorzubeugen.

Falls eine mutmaßliche Verunreinigung vorliegt, ist grundsätzlich mit weit höherem Gehalt an Melamin zu rechnen, da sonst kein effektiv erhöhter Eiweißgehalt vorgetäuscht werden kann. So weisen viele der beanstandeten Proben einen Gehalt im drei- bis vierstelligen mg/kg - Bereich auf. Im ersten in Deutschland positiv getesteten Lebensmittel wurden 152 mg/kg Melamin nachgewiesen⁹. In diversen Backmischungen fanden sich Werte von 200 bis 470 mg/kg– ebenfalls in Deutschland. Taiwanesische Behörden fanden in aus China importiertem Hirschhornsalz bis zu 2470 mg/kg Melamin¹⁰.

Infolge der Verfütterung von verseuchtem Tierfutter können auch Produkte wie Eier sowie diverse Folgeprodukte wie Nudeln, Kuchen aber auch Pharmazeutika betroffen sein. Beispielsweise wurde in ebenfalls aus China stammenden Zinkkapseln 1,5 mg/kg Melamin gefunden, was letztlich auf in den Kapseln enthaltenes Eipulver zurückzuführen sein dürfte¹¹.

Einer Studie der UdSSR von 1980 zufolge ist die Mischung von Melamin mit Cyanursäure (1:1 Mischung - Verwendung als Brandschutzmittel) gefährlicher als die einzelnen Stoffe. Festgestellt wurde, dass der LD₅₀ Wert der Mischung unter

jenen der Einzelsubstanzen liegt¹². Das sogenannte Melamincyanurat ist streng genommen kein Salz, wie man vom Namen her annehmen könnte, sondern ein zweidimensionaler Komplex, welcher von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird – ähnlich der DNA – Basenpaarung (siehe Abbildung 2). Durch diese Eigenschaft ist es in Wasser praktisch unlöslich.

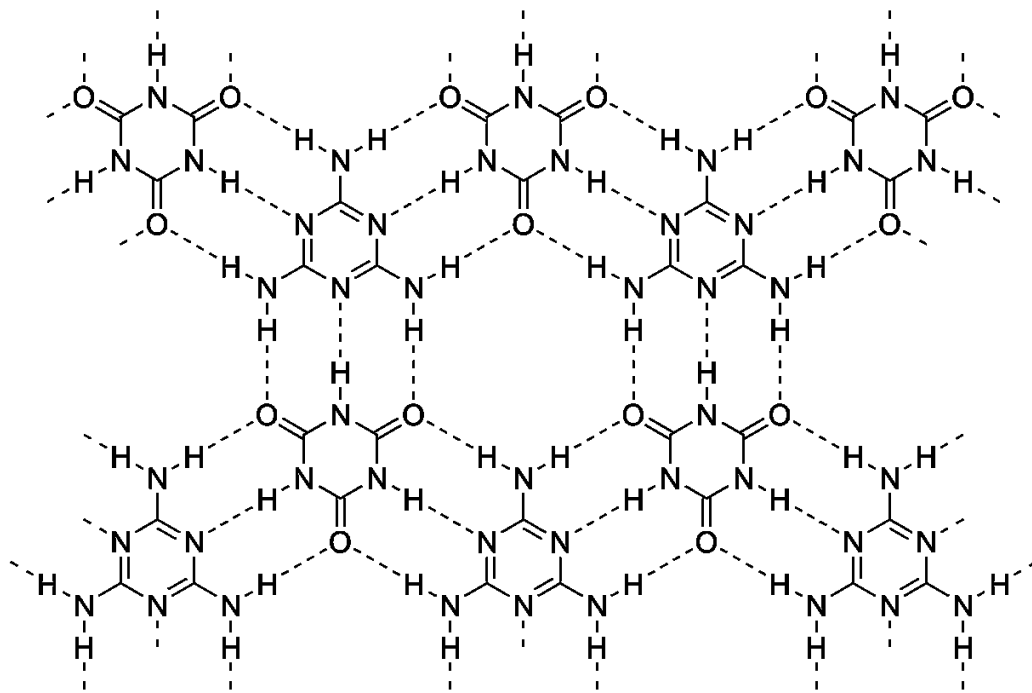


Abbildung 2: Melamin - Cyanursäurekomplex

Bei den meisten Verunreinigungen der letzten Zeit wie dem Tierfutterskandal 2007 sowie dem Tod der sechs Säuglinge 2008 steht ebenfalls Melamincyanurat in Verdacht.¹³ Ebenso sind in Melamin herstellungsbedingt stets Spuren von Ammelin und Ammelid enthalten, welche mit Melamin, Cyanursäure als auch mit sich selbst ähnliche Komplexe bilden können (siehe auch Abbildung 3).

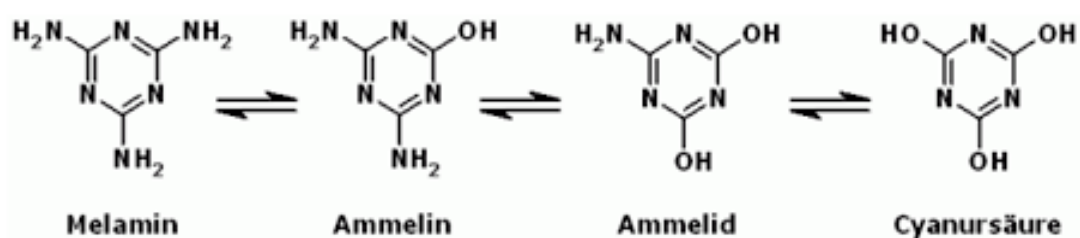


Abbildung 3: Melamin und einige seiner wichtigen Derivate

2 Theorie

2.1 Chemosensoren

Sensoren dienen der Messung diverser physikalischer oder chemischer Eigenschaften wie Temperatur, Dichte, Druck, Strahlung sowie der Konzentration oder Aktivität diverser Stoffe wie z.B. Wasser (Luftfeuchte), H^+ - Ionen (pH - Elektrode) oder Sauerstoff (Lambdasonde im Kraftfahrzeug). Die entweder qualitativ oder quantitativ erfolgte Messung beruht auf der Umwandlung der chemischen oder physikalischen Phänomene (z.B. Frequenz, Widerstand, Spannung, optische Absorption, Fluoreszenz oder Streuung) in elektrische Signale, welche im Anschluss als ablesbarer Wert dargestellt werden und gegebenenfalls auch über längere Zeiträume mittels EDV – Systemen aufgezeichnet werden können. Ein Sensor kann, muss aber nicht zwingend in miniaturisierter Form vorliegen. So kommen beispielsweise pH - Glaselektroden von wenigen cm Länge und nur 3 mm Durchmesser bis hin zu Einstabmessketten mit 1 m Länge in Abwasseraufbereitungsanlagen zum Einsatz¹⁴, wo schlicht eine besonders robuste Ausführung mit längerer Lebensdauer erforderlich ist. Meist ist man jedoch bemüht miniaturisierte Formen zu schaffen um sie platzsparender einsetzen und vor allem auch günstiger herstellen zu können. In der Regel sinkt die Messgenauigkeit bei miniaturisierten Varianten nicht oder unwesentlich.

Ein Chemosensor, der gezielt einen Analyten nachweisen soll, benötigt normalerweise eine Sensorschicht, welche den Zielanalyten möglichst sensitiv und selektiv anlagern soll. In der Arbeitsgruppe finden dafür vor allem molekular geprägte Polymere Verwendung¹⁵ – es gibt aber auch eine Reihe anorganischer Materialien, welche in Frage kommen wie beispielsweise Yttrium – dotiertes Zirkoniumdioxid bei der Lambdasonde oder die Glasmembran einer pH - Elektrode.

Weiters gibt es diverse supramolekulare Nachweisstrategien um Moleküle direkt an einer Sensoroberfläche zu immobilisieren und so zu detektieren. Besonders erwähnenswert sind die Stoffklassen der Calixarene, Cucurbiturile, Paracyclophane und Cyclodextrine.¹⁶

2.2 Molekulares Prägen

Durch molekulares Prägen von Polymeren werden künstliche Hohlräume im Polymer geschaffen, in welchen sich nach dem Schlüssel – Schloß Prinzip die gewünschten Analytmoleküle ein- und auch wieder auslagern können (siehe auch Abbildung 4). Dies geschieht vorwiegend durch geeignete Wahl der Monomere, welche eine Affinität zum Analytmolekül aufweisen müssen um sich während bzw. bereits vor der Polymerisation durch Selbstorganisation an diese anzulagern und schließlich auszuhärten.^{15,17}

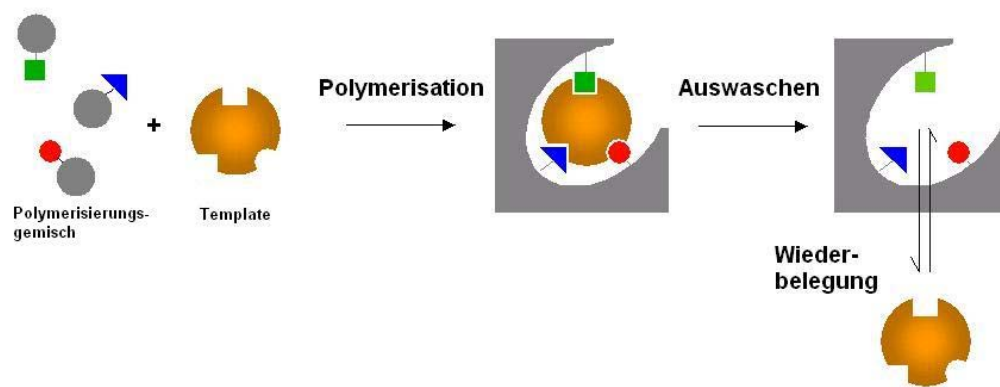


Abbildung 4: Beispiel eines MIP mit 3 verschiedenen Rezeptoren¹⁸

Die Funktionsweise unterscheidet sich vom Prinzip her nicht von jenem der in der Natur vorkommenden Affinitätsrezeptoren. Aufgrund dessen wird oft von künstlichen Antikörpern gesprochen, welche ihre Anwendung in der Sensorik, Trenntechnik aber auch als Katalysatoren finden.

Die Polymerschichten können wiederum grob in zwei Arten unterteilt werden: Zum einen gibt es ausschließlich an der Oberfläche geprägte Polymere wie sie für die Detektion von großen Analyten verwendet werden (für Bakterien, Hefen, Viren etc.). Diese ähneln den natürlichen Antikörpern am ehesten. Auf der anderen Seite gibt es die „klassischen“ Molecular Imprints (MIP), welche eine durch die gesamte Dicke des Materials reichende Prägung aufweisen. Die in dieser Arbeit entwickelten MIP - Schichten sind ausschließlich von letzterem Typ.

Wichtig ist auch die Reversibilität der Reaktion, da die für den Imprint verwendeten Moleküle auch wieder ausgewaschen werden müssen. Als Folge dieser

Herausforderungen werden Van der Waals Kräfte (bis 10 kJ/mol), Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen und Ionen- als auch Komplexbindungen (bis 40 kJ/mol) ausgenutzt. Kovalente Bindungen sind aufgrund ihrer Irreversibilität unerwünscht. Theoretisch sollte nur der entsprechende Analyt in die entstehenden Kavitäten passen - was praktisch nie der Fall ist.

Als Modell für die Adsorption wird meist die Langmuir Isotherme herangezogen (Abbildung 5). Diese geht von drei Vereinfachungen aus: 1. Wenn die sensitive Schicht vollständig bedeckt ist, findet keine weitere Adsorption statt. 2. Alle Adsorptionsstellen sind gleichwertig. 3. Die Stellen sind voneinander vollkommen unabhängig.

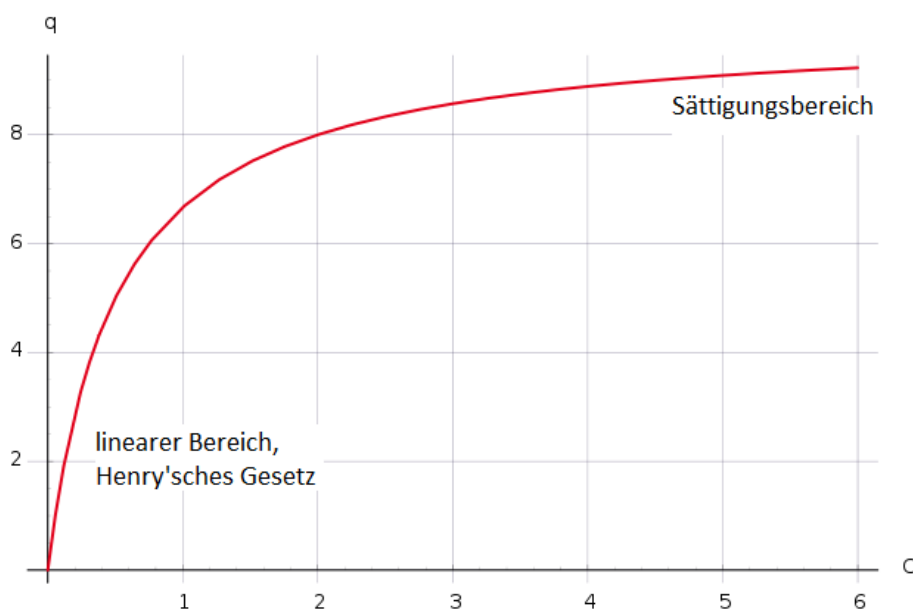


Abbildung 5: Langmuir Isotherme

Im Gegensatz dazu ist es beim BET (Brunauer – Emmet – Teller, Abbildung 6) Modell möglich eine Belegung zu erreichen, welche über der Zahl an Kavitäten liegt. Grundlage hierfür ist die Anlagerung des Analyten in Form mehrerer molekularer Schichten auf der Oberfläche des MIPs. Dies tritt erst bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen auf und wird auch Kapillarkondensation genannt.

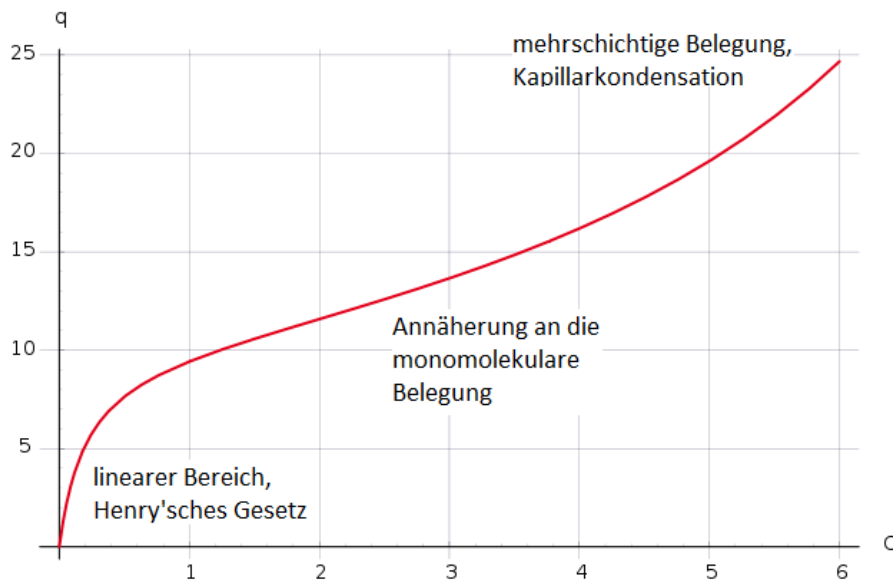


Abbildung 6: BET - Isotherme

Durch die mittlerweile riesige Auswahl an Monomeren, Quervernetzern sowie geeigneten Lösungsmitteln ist es jedoch möglich für nahezu jede Fragestellung ein geeignetes MIP zu designen.¹⁹ Hierfür kann zum Einen eine Änderung der Zusammensetzung der Mischung als auch diverse weitere Parameter zum Erfolg führen. Wichtig ist vor allem auch eine geeignete Polymerisationsdauer, welche sich sowohl über die Temperatur, als auch über die Menge an Starterreagens ergibt. Aufgrund dieser Vielzahl an Möglichkeiten ist das chemische Geschick eines Entwicklers gefragt um sinnvolle Ergebnisse zu erzielen.

Möglich ist auch die Verwendung von alternativen Templaten (wie z.B. Mesitylen als Ersatz für Melamin). Dies ist vor allem dann von Vorteil, wenn zum Beispiel das Analytmolekül während des Polymerisationsvorgangs aufgrund thermischer Instabilität zerfällt oder im bei der Reaktion verwendeten Lösungsmittel nicht löslich ist. Grundsätzlich ist bei einem derartigen Vorgehen jedoch mit schlechteren Ergebnissen zu rechnen.

Weiters können Sensorarrays eingesetzt werden, wobei mehrere verschiedene Sensoren (bzw. Sensoren gleichen Typs mit verschiedenen Imprints) synchron verwendet werden und mittels statistischer Auswerteverfahren wie Hauptkomponentenanalyse (PCA) oder über Neuronale Netze zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden.

2.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Bei der Rasterkraftmikroskopie (AFM – atomic force microscopy) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Tunnelmikroskopie (STM – scanning tunneling microscope), welche ebenfalls ein bildgebendes Verfahren zur Abtastung sehr kleiner Strukturen ist. Das Prinzip ist in Abbildung 7 dargestellt. Im Unterschied zum STM wird jedoch kein Tunnelstrom gemessen bzw. konstant gehalten, sondern die Auslenkung eines Cantilevers („Federausleger“) mit einer im Idealfall in einem einzelnen Atom endenden Spitze. Die Breite der Spitze gibt direkt die maximale Auflösung des Geräts wieder. Um die konstante Lage der Spitze zu gewährleisten wird ein Laser auf den Ausleger gerichtet, von diesem reflektiert und mittels einer Multiphotodiode (2 oder 4 Segmente) jede Änderung detektiert. Die Spitze wird nun in 2 Achsen (X und Y) über die Probe geführt - sobald ein Höhenunterschied auftritt verändert sich die Höhenlage der Spitze (Z - Achse) sowie des Cantilevers, wodurch auch der Laser die Photodioden in veränderter Intensität trifft. In unserem Fall wird in Folge der Piezoscanner, auf welchem die Probe liegt, in der Höhe verstellt (Z - Achse), bis die 4 Dioden wieder das Grundsignal liefern. Es sind am Markt auch Geräte mit beweglichem Cantilever und fixem Tisch verfügbar. In jedem Fall werden die Bewegungen des Piezoscanners aufgezeichnet und entsprechen schließlich dem gewünschten Bild der Oberfläche. Das Hook'sche Federgesetz gibt den Zusammenhang zwischen der auf den Cantilever wirkenden Kraft und dessen Auslenkung wieder:

$$F = - k \cdot \Delta x$$

F = Kraft

Δx = Änderung der Auslenkung

k = Federkonstante

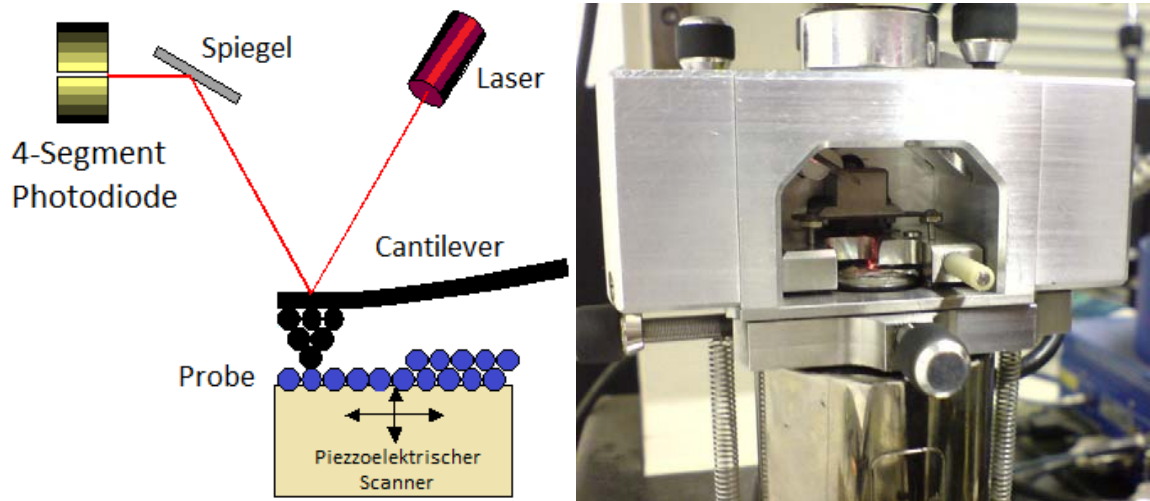


Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau und Foto des verwendeten Geräts

Ein AFM kann nun in 3 verschiedenen Modi betrieben werden: contact mode, non contact mode und tapping mode. Beim contact mode, welcher am häufigsten Verwendung findet, berührt die Spitze ständig die Oberfläche wodurch die repulsiven (abstoßenden) Wechselwirkungen überwiegen. Beim non contact mode ist der Abstand größer, wodurch die attraktiven (anziehenden) Kräfte überwiegen. Theoretisch ergibt sich eine bessere Empfindlichkeit beim contact mode, welche sich durch das Lennard Jones Potential erklären lässt: Die abstoßenden Wechselwirkungen verändern sich mit $1/r^{12}$, die Anziehenden nur mit $1/r^6$ (siehe auch Abbildung 8).

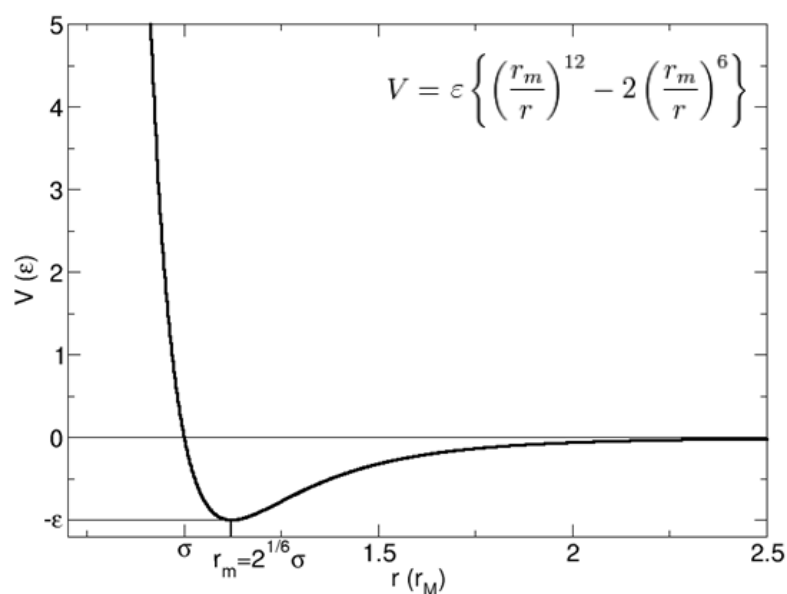


Abbildung 8: Das Lennard-Jones-(12,6)-Potential²⁰

Praktisch wird die Auflösung durch die beim direkten Kontakt zwischen Probe und Spitze einhergehenden Wechselwirkungen herabgesetzt. Eine benutzte Spitze mit anhaftenden Probenresten ist in Abbildung 9 abgebildet. Dadurch sind in der Realität die höchsten Auflösungen im non contact Mode erreichbar: Im Gegensatz zum STM können hierbei sogar nicht leitende Proben wie z.B. NaCl atomar aufgelöst werden. Der Nachteil ist die aufwendige Handhabung, da meist unter Vakuum bzw. Hochvakuum gemessen wird, was die Messung vieler Proben prinzipiell unmöglich macht.

Beim tapping mode gleitet eine oszillierende Spitze über die Probe wobei über eine Feedback - Schlaufe die Oszillatoramplitude konstant gehalten wird. Dadurch wird die Oberfläche nur leicht berührt, was wiederum eine sehr schonende Methode für weichere Oberflächen wie z.B. Proteine darstellt. Der Modus kann sowohl unter Umgebungsbedingungen als auch in Flüssigkeiten eingesetzt werden, weshalb er weit verbreitet ist.

Im Laufe der Diplomarbeit wurden nur Messungen im contact mode durchgeführt wobei neben Oberflächencharakterisierung vor allem Schichtdickenbestimmungen durchgeführt wurden.

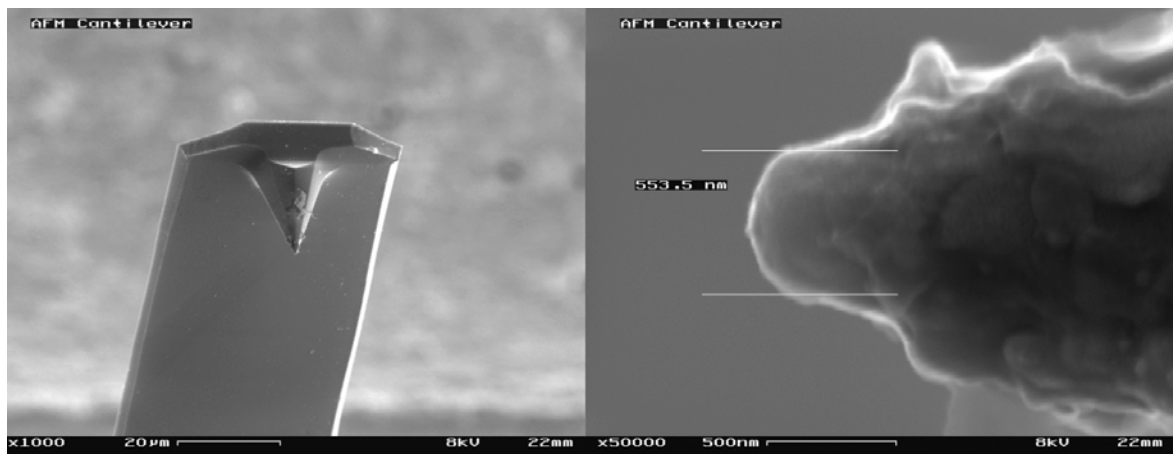


Abbildung 9: Benutzte AFM – Spitze mit erkennbaren Probenresten in 1000 und 50000-facher Vergrößerung²¹

2.4 Quarzmikrowaage (QCM)

Als Basis einer Quarzmikrowaage (QCM - quartz crystal microbalance) dient ein Schwingquarz, welcher mit zwei Elektroden (Vorder- und Rückseite) beschichtet und durch Anlegen eines Wechselfeldes einer Oszillatorschaltung zum Schwingen angeregt wird. Die Frequenz dieses Feldes wird durch Rückkopplung mit der Eigenfrequenz des Quarzes synchronisiert. Der Quarz schwingt nun mit einer für ihn typischen Frequenz, welche sich jedoch ändert, sobald eine Massezunahme an der Elektrode auftritt. Dies wird durch Analytaufnahme in eine direkt auf die Elektrode aufgetragene sensitive Schicht erreicht, wie sie ausführlich in den vorigen Kapiteln erläutert wurde.

Die Quarzmikrowaage hat den Vorteil der Möglichkeit zur Miniaturisierung sowie günstige Herstellungskosten. Sie finden ihre Anwendung vor allem in der Gasphase, da hier die Lebensdauer der sensitiven Schichten begünstigt und die äußerst hohe Empfindlichkeit zum Tragen kommt. Für gewöhnlich wird nur eine Elektrode auf den Quarz aufgetragen um eine große sensitive Oberfläche zu erhalten und um Interferenzen mehrerer Elektroden untereinander auszuschließen. Kommerzielle Sensorarrays mit mehreren QCM – Sensoren sind deshalb meist aus ebenso vielen einzelnen Quarzen zusammengesetzt. Für diese Diplomarbeit wurden jedoch Messungen im flüssigen Medium mit zwei – Elektroden Technik durchgeführt um gleichzeitig Daten mit einer Mess- und Referenzelektrode von ein und demselben Quarz aufzeichnen und somit andere Einflüsse ausschließen zu können.

Der benötigte Quarz besteht aus sogenanntem α – Quarz, welche als einzige Modifikation piezoelektrische Eigenschaft zeigt. Er kommt in der Natur als Bergkristall vor, wird jedoch für die vielen Anwendungsmöglichkeiten (Uhren, Computer, Fernsehgeräte, Steuerungen, etc) synthetisch aus Quarzsand mittels Hydrothermalsynthese hergestellt. Chemisch betrachtet handelt es sich um einen Einkristall aus reinem SiO_2 . Die gewünschte α – Modifikation entsteht nur bei Temperaturen unterhalb 573 °C. Bei höheren Temperaturen entsteht die β - Modifikation welche keine piezoelektrischen Eigenschaften zeigt.

Bei der Hydrothermalsynthese werden in einem Druckbehälter (3), gefüllt mit H_2O und wenig NaOH (4), bei hoher Temperatur ($< 573\text{ }^\circ\text{C}$) sowie Druck überkritische Bedingungen erzielt. Superkritisches Wasser entsteht bei Bedingungen über 22 MPa und $324\text{ }^\circ\text{C}$ – praktisch werden etwa 100 MPa und $350 - 400\text{ }^\circ\text{C}$ angewandt). In der heißeren Zone (5) befindet sich SiO_2 (z.B. reiner Quarzsand) und in der Kälteren ein Impfkristall (2). Das SiO_2 löst sich nun im Wasser und wandert von der heißeren zur kälteren Zone, was zu Wachstum am Impfkristall führt (Schema in Abbildung 10).

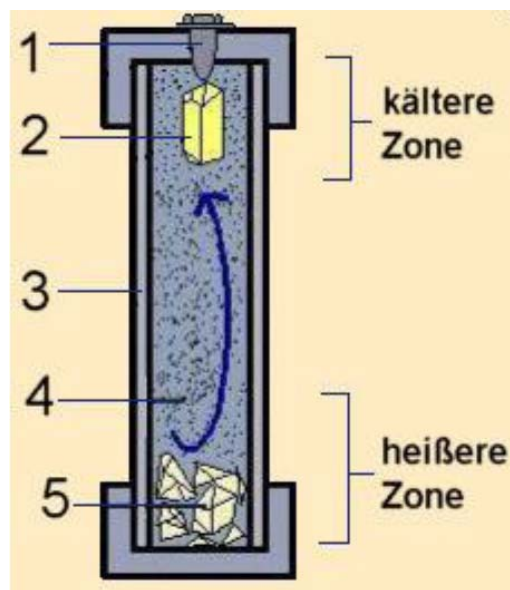


Abbildung 10: Hydrothermalsynthese²²

3 Experimenteller Teil

Die Versuche unter 3.1 und 3.2 sind als Vorversuche zu verstehen. Ab 3.3 beginnt die eigentliche Herangehensweise an die Aufgabenstellung der Entwicklung einer sensitiven Schicht für Melamin. Zur Verwendung kamen neben AFM und der Messapparatur für die QCM auch IR – ATR, UV – VIS und Fluoreszenzspektroskopie, ein Fluoreszenzmikroskop sowie diverse handelsübliche Laborgeräte (Heizrührer, Ultraschallbad etc.). Ergebnisse sowie die Diskussionen der einzelnen Versuche sind direkt im Anschluss an die Beschreibungen zu finden. Die genauen Bezeichnungen der Geräte sowie der verwendeten Chemikalien befinden sich am Ende der Arbeit unter „5. Chemikalien und Gerätschaften“.

3.1 Herstellen dünner Schichten

Einleitung

Dünne sensitive Schichten bringen einige Vorteile für Sensormessungen. So kann oft nur der obere Teil einer dickeren geprägten Schicht mit Analyt angereichert werden. Als Folge schwächt das „überschüssige Material“ das Signal bei der Quarzmikrowaage ab oder bewirkt höheres Rauschen. Bei vielen optischen Detektionsmethoden ist ebenso mit einer Schwächung des Signals bei zu dicken Schichten zu rechnen. Insbesondere bei Gasphasenmessungen mit kleinen Molekülen ist es wesentlich die Dämpfungseigenschaften eines Schwingquarzes gering zu halten um die Sensitivität zu erhöhen.

Es wurde eine Reihe von etwa 40 Versuchen mit einem Styrol - Divinylbenzol Copolymer durchgeführt, wobei das Ziel war eine durchgehende, optisch klare Schicht mit einer Dicke von weniger als 100 nm herzustellen war. Systeme aus Styrol/Divinylbenzol haben sich innerhalb der Arbeitsgruppe als zuverlässiges, einfach handzuhabendes Polymer erwiesen, welche primär für Schichten zur Detektion vorwiegend unpolarer und aromatischer Analyte verwendet werden. Durch Variation der Monomereinheiten können jedoch auch polare Einheiten mit vernetzt werden.

Versuchsdurchführung

Die Monomermischung wurde in den in der Tabelle angegebenen Zusammensetzungen in ein 1,5 mL Eppendorf – Reaktionsgefäß gefüllt, mit 5 mg AIBN (Azo-bis-(isobutyronitril)) als Radikalstarter versetzt und unter UV Licht bestrahlt um die Polymerisation zu starten. Die Lösungsmittelzugabe erfolgte entweder vor oder nach der Vorpolymerisation unter dem UV – Licht. Bei der LM Zugabe vor dem Vorpolymerisieren entstehen jedoch feste Partikel und keine einheitliche Polymerschicht, weshalb diese Versuche nicht weiter verfolgt wurden. Als Lösungsmittel wurde ausschließlich Tetrahydrofuran (THF) und als Quervernetzer Divinylbenzol (DVB) verwendet. Als optimale Vorpolymerisationszeit erwiesen sich 30 Minuten. Bei kürzeren Intervallen befand sich keine Polymerschicht auf den Trägern.

Anschließend konnten 5 μ L der Mischung auf ein Glasplättchen (etwa 5 mal 5 mm) aufgetragen und 15 Sekunden mit 3000 Umdrehungen pro Minute abgespinnt werden. Die ausgehärtete Schicht wurde mittels Rasierklinge rautenförmig eingeschnitten um die anschließende Vermessung eines Schnittes mittels AFM – Gerät zu erleichtern und die genaue Dicke zu bestimmen. Abbildung 11 zeigt auf der linken Seite das AFM – Bild der Oberfläche wobei der dunkel dargestellte Schnitt leicht zu erkennen ist. Unten rechts ist eine Rauigkeitsverteilung dargestellt, rechts oben das Höhenprofil mit den beiden Messpunkten (strichlierte blaue Linien bzw. blaue Kreuze auf der linken Seite). Der Höhenunterschied zwischen den beiden Punkten beträgt 73 nm und ist in der unteren Tabelle angeführt.

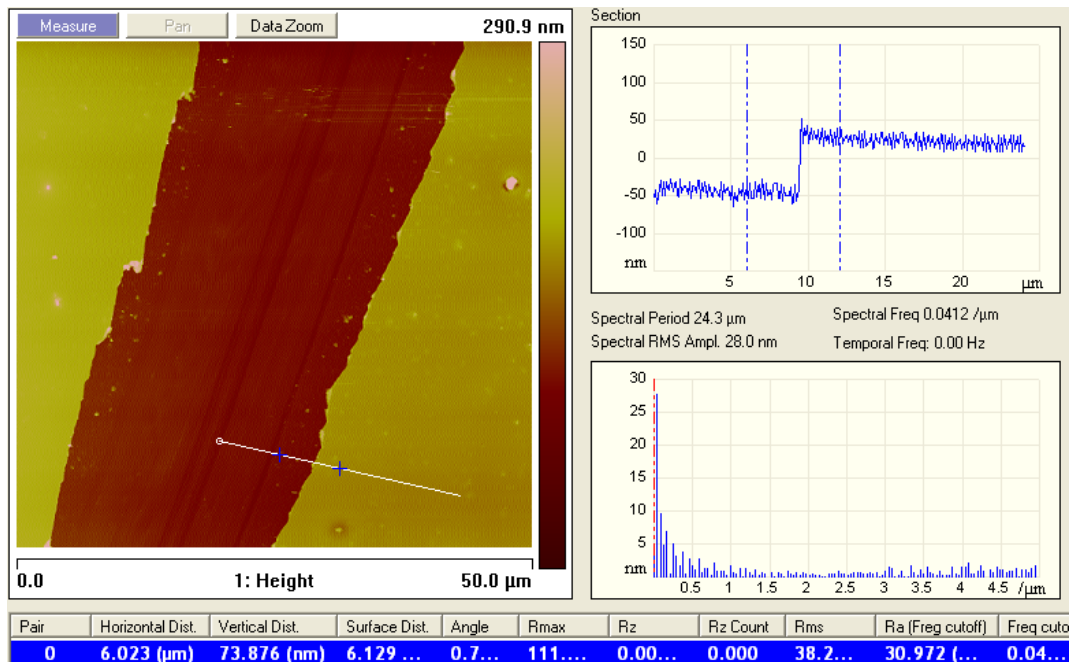


Abbildung 11: Schichtdickenbestimmung (rechts oben ist die Höhe zu erkennen)

Ergebnis

Versuch	Styrol	DVB	LM(THF)	Dicke [nm]
1	200 μL	200 μL	400 μL	100-120
2	200 μL	200 μL	1100 μL	70-80
3	200 μL	300 μL	100 μL	60-100
4	200 μL	300 μL	200 μL	60-100
5	200 μL	300 μL	400 μL	60-80
6	100 μL	100 μL	1200 μL	20-30
7	100 μL	100 μL	1000 μL	60-80
8	200 μL	300 μL	800 μL	40
9	200 μL	300 μL	1000 μL	30-60

Schichtdickenbestimmung mittels AFM

Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit des Gemisches wurde eine Adaption des Systems mit Methacrylsäure (MAA) statt Styrol vorgenommen um eine funktionelle Gruppe für Melamin mit ein zu polymerisieren. Da Melamin keine Löslichkeit in den Verwendeten Chemikalien zeigt, wurde als alternatives Templat 5 % Mesitylen zugefügt. Zwar besitzt Mesitylen über keine Aminogruppen, jedoch ist die räumliche Anordnung des Moleküls jenem von Melamin sehr ähnlich. Die optimale Vorpolymerisationsdauer liegt wieder bei 30 min (bei kürzerer Dauer bildet sich keine durchgehende Schicht). In Abbildung 12 ist eine 3-dimensionale

AFM – Aufnahme einer derartigen Schicht zu sehen. Die hohen Zacken entstehen aufgrund diverser Partikel, welche sich bevorzugt am Rand des Schnittes bilden.

Versuch	MAA	DVB	LM(THF)	Dicke [nm]
1	30 µL	15 µL	400 µL	70-90

Zusammensetzung der MAA – DVB Schicht

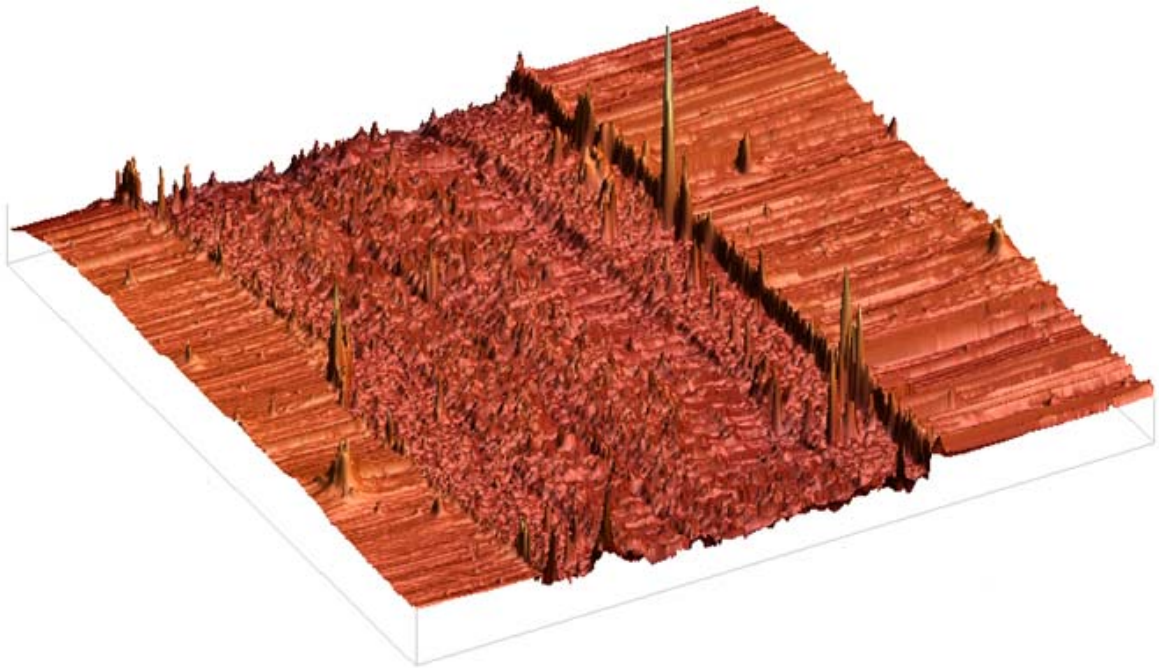


Abbildung 12: 3D – Bild der Messung (50 mal 50 µm, Schichthöhe 70 nm)²³

3.2 Silanisierung

Einleitung

Um einen besseren Halt von Polymerfilmen auf Glas bzw. Quarzoberflächen zu gewährleisten können Silanisierungen durchgeführt werden. Durch diese Oberflächenbehandlung werden funktionelle Gruppen an die Oberfläche immobilisiert bzw. generiert, welche eine bessere Haftung der Schichten garantieren. Dies kann entweder durch diverse schwache Wechselwirkungen wie auch durch chemische Bindungen geschehen. Reagenzien können auch gemischt werden falls zum Beispiel eine vollständige Silanisierung mit Octenyldimethyl – Gruppen zu dicht ist um eine Polymerisation mit der Polymerschicht zu

gewährleisten. In diesem Fall müsste Trimethylchlorsilan (oder z.B. Methyltrichlorsilan) zugegeben werden. Weiters muss die chemische Natur der Polymerschicht beachtet werden. Im Fall von Acrylaten ergibt eine Silanisierung nur Sinn, wenn direkt aufpolymerisiert wird. Mögliche Abhilfe schafft hier unter Umständen eine Aktivierung der Glasoberfläche mit z.B. LiOH.

Analog können an diversen Metallen (z.B. Goldelektroden) Thiolisierungen durchgeführt werden. Ob eine derartige Vorbehandlung notwendig ist oder nicht, lässt sich nicht eindeutig vorhersagen. Die langjährige Erfahrung innerhalb der Arbeitsgruppe zeigt jedoch, dass Polymere auf Goldoberflächen wesentlich länger stabil bleiben als auf Glas, auf dem eine Silanisierung oft unumgänglich ist.

Durchführung

Die Glas bzw. Quarzplättchen wurden mit 2%iger LiOH – Lösung bei 70 °C 10 Minuten vorbehandelt um die Oberfläche zu aktivieren und einem Waschschrift unterzogen. Anschließend wurde eine Silanisierung in Octenyldimethylchlorosilan (1 M in Toluol) durchgeführt (3 Stunden). Nach einem weiteren Waschschrift mit destilliertem Wasser und dem Trocknen im Trockenschrank kann das Polymer aufgetragen werden.

Die erhaltenen Oberflächen wurden mit AFM und ATR-IR Spektroskopie untersucht, wobei es mittels AFM nicht möglich war einen eindeutigen Nachweis der Silanisierung abzubilden. Dies kann an der zu geringen Auflösung der verwendeten Spitzen sowie an der möglicherweise vollständigen Silanisierung mit stets gleich langen Ketten, welche wiederum eine glatte Oberfläche ergeben, liegen. Ebenfalls möglich ist, dass einzelne Ketten der Spitze ausweichen und daher keinen erkennbaren Höhenunterschied liefern.

Anhand der ATR – Aufnahmen konnte die Silanisierung jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13). Die monomolekulare Schicht zeigt zwar auch im ATR ein sehr schwaches Signal/Rausch – Verhältnis, dennoch sind die Banden vor allem der CH₂ Gruppen knapp unter 3000 cm⁻¹ klar zu erkennen. Für die Aufnahmen wurde ein Reflexionskristall aus Diamant verwendet.

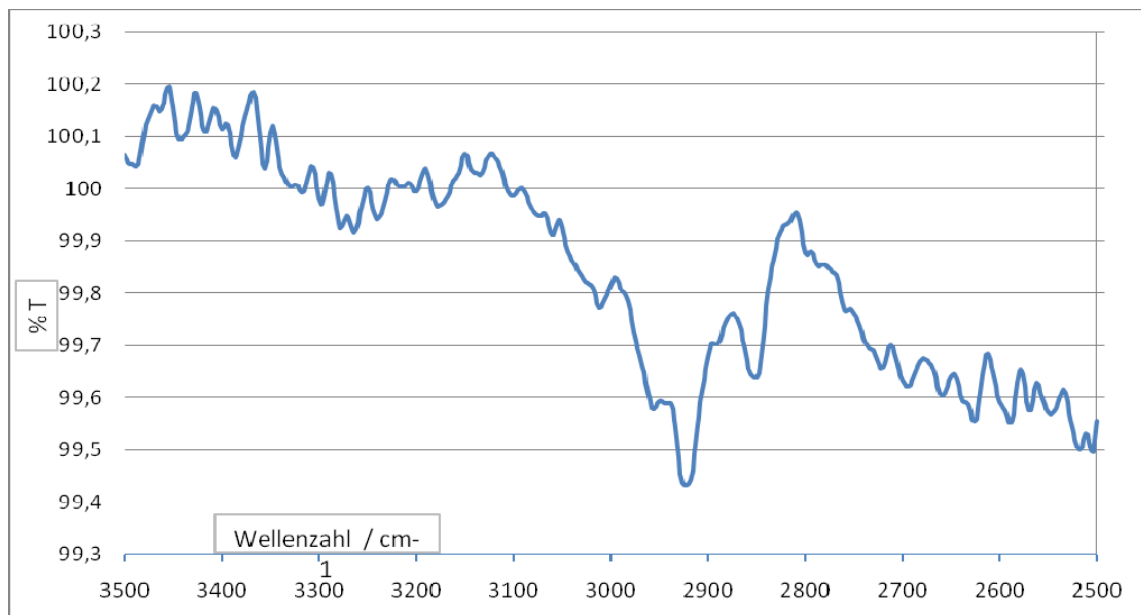


Abbildung 13: ATR – Spektrum einer silanisierten Glasoberfläche

3.3 Entwicklung eines MIP für Melamin

Um Anhaltspunkte für die Entwicklung einer neuen sensitiven Schicht für den Analyten Melamin zu erhalten wurde zu Beginn eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. Diverse Publikationen beziehen sich auf Solid – Phase – Extraktion Säulen (SPE) mittels eines Copolymers aus Methacrylsäure (MAA) als funktionellen Monomer und Ethylendimethacrylat (EDMA) als Quervernetzer.²⁴

Hierfür wird im Wesentlichen ein fester Block („bulk polymerization“) aus den genannten Monomeren mit AIBN (Azo-bis-(isobutyronitril)) und Chloroform oder Wasser / Ethanol als Lösungsmittel sowie Melamin als Templat vollständig auspolymerisiert. Anschließend wird zerkleinert, gesiebt, das Material vom Templat befreit und in SPE – Säulen gefüllt. Im Wesentlichen sind diese SPE – Säulen die derzeit übliche Probenvorbereitung für die Analyse mittels HPLC – MS.

Theoretisch möglich wären auch supramolekulare Nachweisstrategien, wobei vor allem Cucurbiturile eine ausgeprägte Affinität zeigen dürften. Es gibt auch eine

geringere Zahl an Veröffentlichungen, welche wesentlich komplexere Polymermischungen anführen. Teilweise sind beispielsweise Kronenether in einer Polymerschicht fixiert.²⁵ Konkrete Vorteile für unsere Zwecke lassen sich daraus jedoch nicht ableiten, weshalb die MAA/EDMA – Variante zur Weiterentwicklung herangezogen wurde, welche vor allem für eine günstige Massenproduktion wesentlich besser geeignet sein sollte. Nun sind diverse Änderungen des Polymers notwendig um eine geeignete sensitive Schicht für Sensoren bereitzustellen. Diese und die dazu notwendigen Experimente werden nun näher erläutert.

„Die Genialität einer Konstruktion liegt in ihrer Einfachheit.

Kompliziert bauen kann jeder.“

Sergej P. Koroljow

Löslichkeitsversuche

Für eine geeignete Schicht werden erfahrungsgemäß etwa 5-10 % Templat benötigt. Um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel sich für die Monomere sowie das Melamin eignet, wurden einige Löslichkeitsversuche durchgeführt.

Je 5 mg Melamin wurden mit 800 µL der angeführten Lösungsmittel geschüttelt und im Ultraschallbad behandelt und gegebenenfalls auch noch erwärmt. Getestet wurde mit: Acetonitril (ACN), Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Tetrahydrofuran (THF) sowie Wasser und Chloroform.

In Wasser löst sich das Melamin bereits nach kurzem Erwärmen oder nach Ultraschallbehandlung und bleibt auch gelöst. Die Wasserlöslichkeit steigt sowohl bei Erhöhen der Temperatur sowie bei Senkung des pH – Wertes stark an. In den anderen Lösungsmitteln war die angeführte Menge Melamin nicht löslich.

Infolge dessen ergibt sich das Problem, dass das Monomer Ethylendimethacrylat (EDMA) nicht bzw. nur sehr gering in Wasser löslich ist. Als Konsequenz wurden

die nötigen Zugabemengen an Ethanol durch die folgende Versuchsreihe bestimmt (alle Mengenangaben in mg oder μL):

Nr.	AIBN	EDMA	MAA	H ₂ O	EtOH	Beschr.	+5 mg Melamin	Abkühlen
1	2	50	50	200	800	gelöst	unvollst. Gelöst	Melamin↓
2	2	50	50	400	600	gelöst	nach ΔT gelöst	bleibt in Lsg.
3	2	50	50	600	400	nach ΔT	nach ΔT gelöst	2 Phasen
4	2	50	50	800	200	2 Phasen	-	-
5	2	50	50	900	100	2 Phasen	-	-

Zusammensetzung der Mischungen für die Löslichkeitsversuche

Folglich wäre nur eine Mischung 40:60 (H₂O:EtOH) denkbar.

Probleme:

Um eine einheitliche Polymerisation auf einer Sensoroberfläche zu erreichen ist es nachteilig zwei verschiedene Lösungsmittel zu verwenden. Vor allem bei dem 40 : 60 – Wasser : Ethanol Gemisch ergeben sich beim Trocknen ungünstige Verhältnisse, da die Zusammensetzung weit abseits des azeotropen Punktes liegt. Zusätzlich zu beachten ist die Tatsache, dass für eine Massenproduktion von der Industrie ungiftige und vor allem umweltverträgliche Lösungsmittel bevorzugt werden. Aus diesen Gründen wurde ein geeigneter wasserlöslicher Quervernetzer gesucht und mit Dihydroxyethylen-bisacrylamid (DHEBA) gefunden.²⁶

Zur künftigen Selektivitätssteigerung wurde zusätzlich auf ein Gemisch mit einem höheren Quervernetzeranteil gewechselt. Um die Löslichkeit zu überprüfen wurde eine Mischung aus 30 μL MAA, 70 mg DHEBA und 5 mg Melamin in 400 μL Wasser hergestellt und erfolgreich mit Ultraschall gelöst.

Mit Radikalstarter versetzt startet die Polymerisation bei erhöhter Temperatur oder unter UV – Licht, wobei sich der ideale Zeitpunkt zum Auftragen der Mischung anhand einer Trübung der Lösung erkennen lässt (das Polymer ist im Gegensatz zu den Monomeren nicht in Wasser löslich). Vor dem Auftragen kann die Polymerlösung zusätzlich mit Wasser versetzt werden um dünnere Schichten erzeugen zu können.

Bei diversen Polymerisationsversuchen zeigte sich, dass die Vorpolymerisationsdauer nicht reproduzierbar war (Abweichungen um ein Vielfaches). Das AIBN wurde aus Ethanol umkristallisiert (40 °C im Wasserbad). Dies, sowie das Austreiben von bei der Reaktion störendem Sauerstoff aus der Reaktionslösung mittels Stickstoff, brachten keinerlei erkennbare Verbesserung mit sich. Da der Radikalstarter AIBN (Azo-bis-(isobutyronitril)) nur eine geringe Wasserlöslichkeit besitzt, erfolgte ein Umstieg auf (Natrium) Peroxodisulfat (PODS) (Löslichkeit von 545 g/L in Wasser). Grundsätzlich ist die Dauer stark temperaturabhängig.

Versuche zur Reaktionsgeschwindigkeit mit Acrylsäure und Methacrylsäure

PODS wurde stets in gelöster Form zugegeben (300 mg/mL - je 17 µL Zugabe). Die ersten vier Versuche wurden bei einer Temperatur von 70°C durchgeführt:

Nr.	PODS	DHEBA	Mono	LM (H ₂ O)	Melamin	Bemerkungen:
1-1	5 mg	35 mg	15 mg MAA	600 µL	0 mg	Polymerisieren alle
1-2	5 mg	35 mg	15 mg MAA	600 µL	0 mg	nach ca. 5 Minuten
2-1	5 mg	35 mg	15 mg AA	600 µL	0 mg	vollständig aus.
2-2	5 mg	35 mg	15 mg AA	600 µL	0 mg	(AA etwas schneller)

Reaktionsgeschwindigkeit: Versuche bei 70°C

Aufgrund der zu kurzen Reaktionszeiten wurde die Temperatur auf 60 °C gesenkt:

Nr.	PODS	DHEBA	Mono	LM (H ₂ O)	Melamin	Bemerkungen:
1-1	5 mg	35 mg	15 mg MAA	900 µL	0 mg	~35 min bis Gelpunkt
1-2	5 mg	35 mg	15 mg MAA	900 µL	0 mg	~40 min bis Gelpunkt
2-1	5 mg	35 mg	15 mg AA	900 µL	0 mg	7 min spontan fest
2-2	5 mg	35 mg	15 mg AA	900 µL	0 mg	7 min spontan fest

Reaktionsgeschwindigkeit: Versuche bei 70°C

Die Versuche zeigen, dass Acrylsäure wesentlich schneller zum Aushärten führt sowie die bereits erwähnte starke Temperaturabhängigkeit des Polymerisationsfortschritts. Für die folgenden Arbeiten wurden nur noch

DHEBA - MAA Mischungen verwendet, da diese sowohl eine kontrollierbarere Reaktion, als auch eine größere Verbreitung in der Literatur finden und daher erfolgsversprechender – d.h. sterisch günstiger sein dürften (siehe Einleitung 3.3).

Versuche um das Ausfallen des Polymers aus der Lösung zu verhindern

Es wurde getestet, ob die Zugabe diverser Lösungsmittel wie Ethanol, Methanol, Aceton usw. ein Ausfallen des Polymers verhindern können. Leider erwiesen sich alle Versuche in diese Richtung als Fehlschläge (auch bei relativ großen Zugabemengen von 600 µL auf 50 mg Monomere). Infolge dessen wurde eine pH - Wert - Regulierung mittels Ammoniak unternommen. Beim Auspolymerisieren der neutralisierten oder basisch gestellten Mischungen erhält man ein erfolgsversprechendes, durchsichtiges Polymer, welches sich problemlos als Schicht auf Glasplättchen auftragen lässt. Leider zeigte sich, dass diese Schichten sich schlagartig bei Kontakt mit Wasser lösen und stark aufquellen. Weiters auffällig war, dass größere Mengen Radikalstarter verwendet werden mussten.

Ein Kollege stellte zeitgleich praktisch dasselbe Problem fest, bei einer Polymermischung, welche er mit KOH neutralisieren wollte (30% DHEBA, 50% MAA und 20% Vinylpyrrolidon zur Detektion von Proteinen). Interessant hierbei ist, dass geringe Mengen an KOH auch als Polymerisationsinhibitor für Vinylpyrrolidon zugesetzt werden. Der Beweggrund sowie das genaue Polymerrezept finden sich in.²⁴

Die Erklärung für das Phänomen ist die Instabilität des Quervernetzers, welcher unter Einfluss von Basen hydrolysiert:

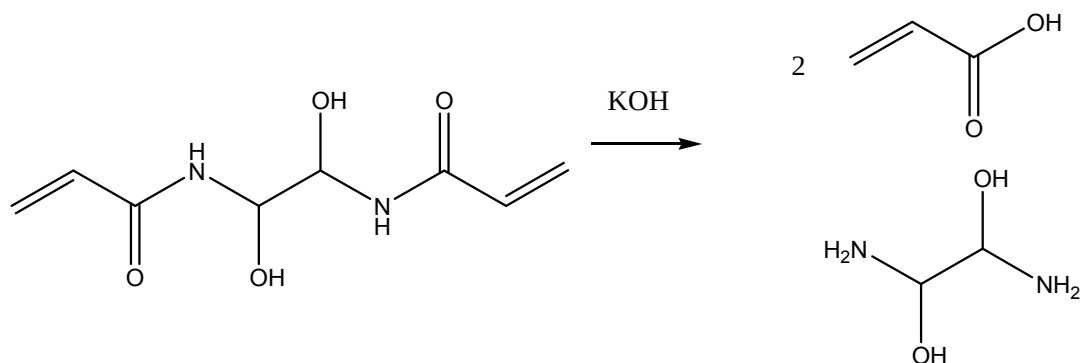


Abbildung 14: Hydrolyse von 1,2 - Dihydroxyethylen-bisacrylamid

Als Folge der in Abbildung 14 dargestellten Reaktion wurden die Versuche mit NH₃ abgebrochen.

ATR – IR – Nachweis von Melamin in einer Schicht

Es wurden folgende Polymermischungen (eine mit und eine ohne Imprint) hergestellt, bei 70 °C vorpolymerisiert und mit 3000 Umdrehungen pro Minute auf silanisierte Glasplättchen aufgespinnt:

	PODS	DHEBA	MAA	LM (H ₂ O)	Melamin
NIP	1.5 mg	70 mg	30 mg	800 µL	0 mg
MIP	1.5 mg	70 mg	30 mg	800 µL	14 mg

Zusammensetzung der mittels ATR getesteten Schichten

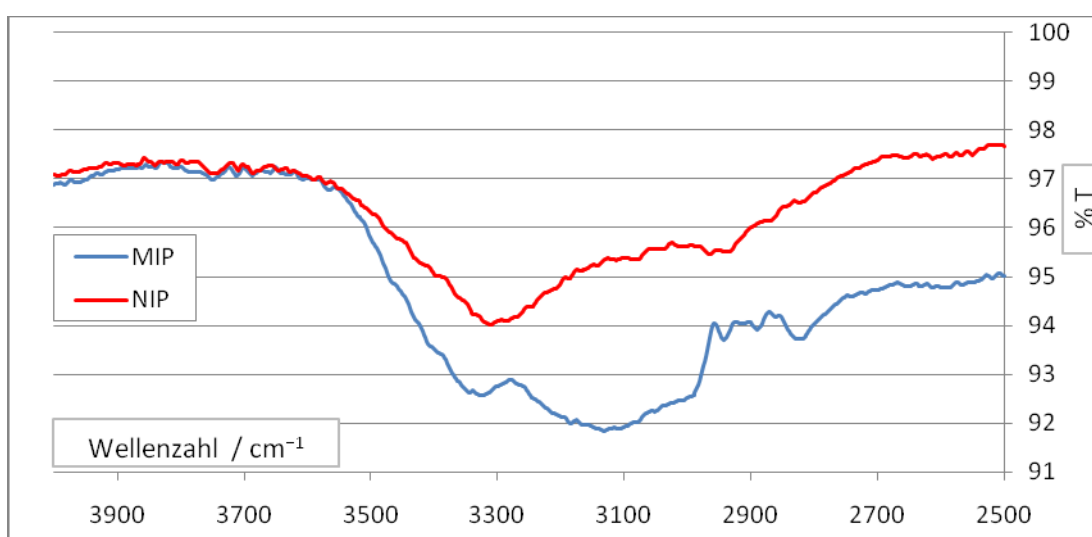


Abbildung 15: ATR – Transmissionsspektren

links NH bzw. NH₂ Bande (~3300 cm⁻¹) und darunter C-N Gruppen

Die Anwesenheit von Melamin im Imprint konnte zwar auf diese Weise nachgewiesen werden (Abbildung 15), jedoch war es nicht möglich das Auswaschen zu überprüfen. Grund hierfür ist die unterschiedliche Intensität der Banden, je nachdem wo das Plättchen auf den ATR – Multireflexionskristall (Diamant) gesetzt wird.

Deshalb wurden Versuche gestartet das Melamin mittels Fluoreszenz sowohl in Lösung als auch in einer Polymerschicht zu detektieren.

Fluoreszenzmessungen:

Um die Fluoreszenzeigenschaften von Melamin in wässriger Lösung zu untersuchen wurde etwas Melamin in Wasser durch Erwärmen gelöst (etwa 20 mg in 8 mL) und in einem Fluoreszenzspektrometer LS50B der Firma Perkin Elmer ein 3D-Scan durchgeführt.

Ergebnis: Die optimale Anregungswellenlänge liegt bei 260 nm wobei die stärkste Emission bei 365 nm auftritt (Abbildung 16). Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode unter 1 mg/L.

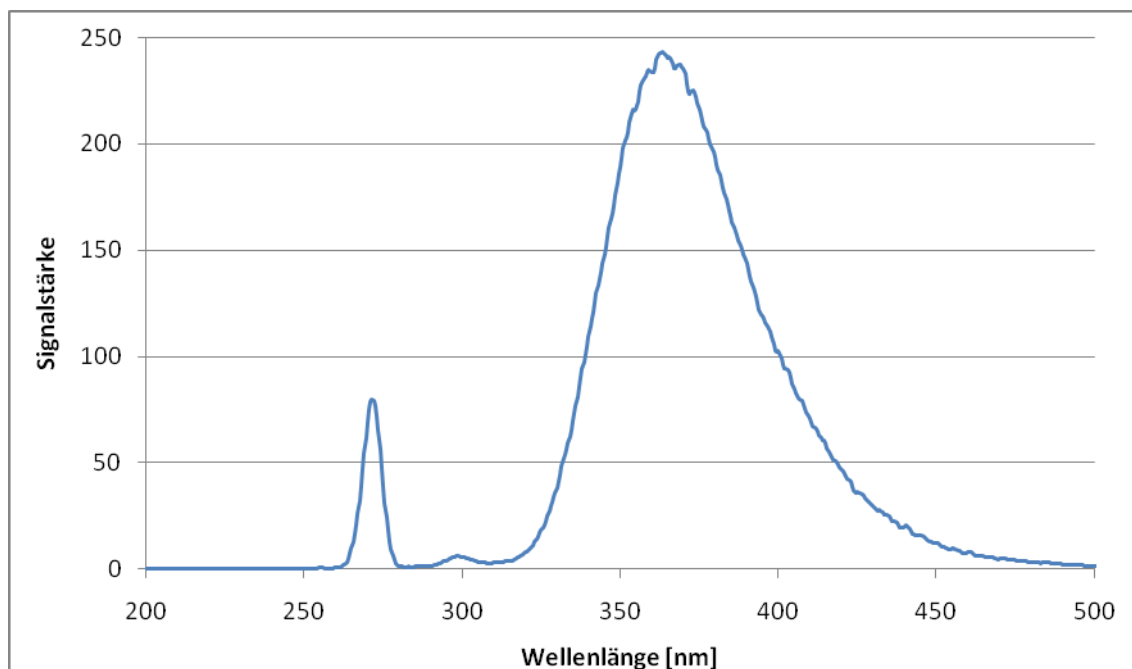


Abbildung 16: Emissionsspektrum von Melamin bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$

Anschließend wurde eine Objektträgerhalterung präpariert um direkt eine sensitive Schicht vermessen zu können. Hierfür wird ein handelsüblicher Objektträger mit einer sensitiven Schicht versehen, in die Halterung eingesetzt und analog einer Flüssigküvette gemessen. Dieses Verfahren wurde in der Arbeitsgruppe erfolgreich für Messungen diverser PAK - Verbindungen (Polyaromatischer Kohlenwasserstoffe) wie beispielsweise Pyren herangezogen.

Die größte Herausforderung besteht in der bestmöglichen Ausrichtung der in Abbildung 17 dargestellten Halterung, da bereits geringe Winkelunterschiede sehr starke Signaldifferenzen ergeben (eine Drehung um etwa 5° führt z.B. zum Verschwinden des Signals). Zur Justierung wurde ein Objektträger dünn mit Melamin beschichtet und in die Ebene gebracht, welche ein Maximum an Fluoreszenz liefert. Damit ließ sich die Zelle optimal justieren. Die zum maximalen Signal führenden Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden erneut überprüft, verändern sich gegenüber der Messung im wässrigen Medium jedoch nicht.

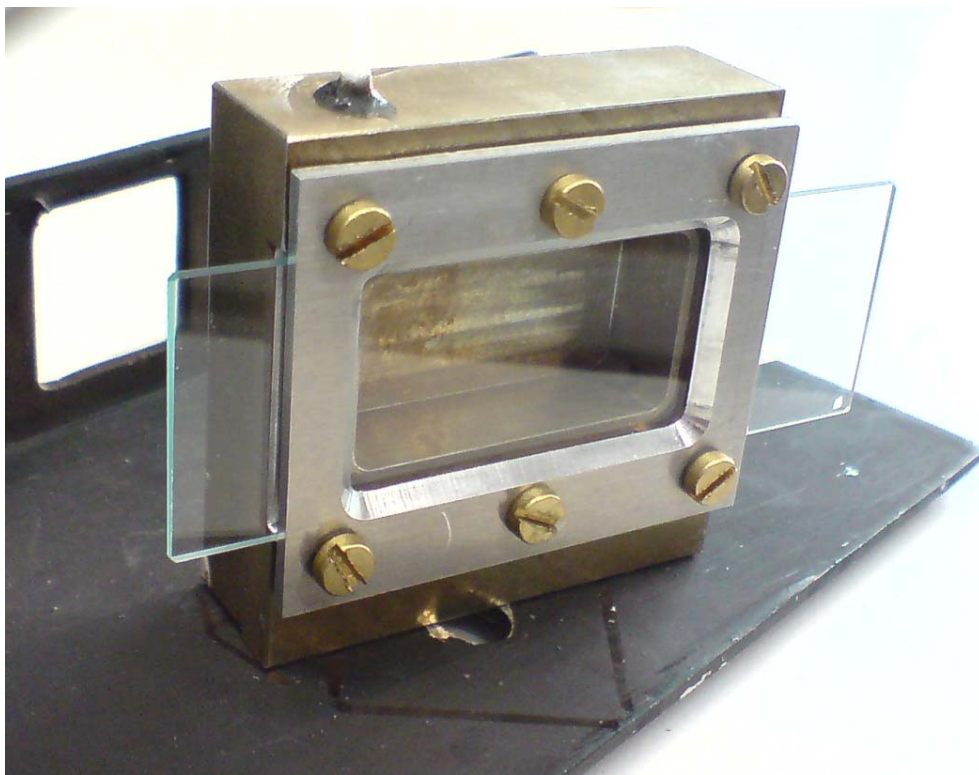


Abbildung 17: Objektglashalterung für Fluorimetrie

Bei der Messung einer MIP – Schicht stellte sich heraus, dass das Signal von Melamin gequenchet wird. Es bleibt jedoch die Möglichkeit der Messung in wässriger Lösung. Versuche zeigen jedoch, dass auch in Lösung mit Methacrylsäure (oder auch anderen Säuren) Fluoreszenzlöschung auftritt. Um dennoch mittels Fluoreszenzmessung die Funktionalität der molekular geprägten Schicht untersuchen zu können wurde eine Schicht folgender Zusammensetzung auf Glasplättchen und in eine Petrischale (größere Menge) aufgetragen.

PODS	DHEBA	MAA	LM(H ₂ O)	Melamin
5 mg	17 mg	8 mg	400 µL	1,5 mg

Mischung für die Fluoreszenzversuche

Dabei lösen sich allerdings die Schichten sowohl von den Glasplättchen als auch von der Petrischale in wenigen Minuten ab wodurch keine aussagekräftigen Messungen mittels Fluoreszenz durchgeführt werden konnten. Grund hierfür dürfte das Material der Petrischalen sein. Sie bestehen aus Polystyrol, an welchem sich das verwendete Polymer kaum hält. Logische Konsequenz war die Verwendung eines anderen Trägermaterials.

Erfolgsversprechend schien die Verwendung von handelsüblichen Kunststoffküvetten aus PMMA (Polymethylmethacrylat). Für den Versuch wurden 200 µL der bei 60°C vorpolymerisierten Lösung in den unteren Teil einer Küvette pipettiert und über Nacht auspolymerisiert. Erst wurde gemessen, ob sich das Melamin (vom Imprint) wieder aus dem Polymer entfernen lässt. Hierfür die Küvette mit Wasser gefüllt und nach verschiedenen Zeitabständen die Fluoreszenz gemessen. Es konnte ein klarer Anstieg des Signals und damit der Melaminkonzentration festgestellt werden. Die abgebildeten Kurven zeigen das gemessene Signal in der überstehenden Lösung 5 bzw. 30 Minuten nach Zugabe des Wassers (Abbildung 18). Das verhältnismäßig niedrige Signal ist durch Quenching von ebenfalls ausgewaschenen, nicht polymerisiertem Monomeren (MAA) zu erklären.

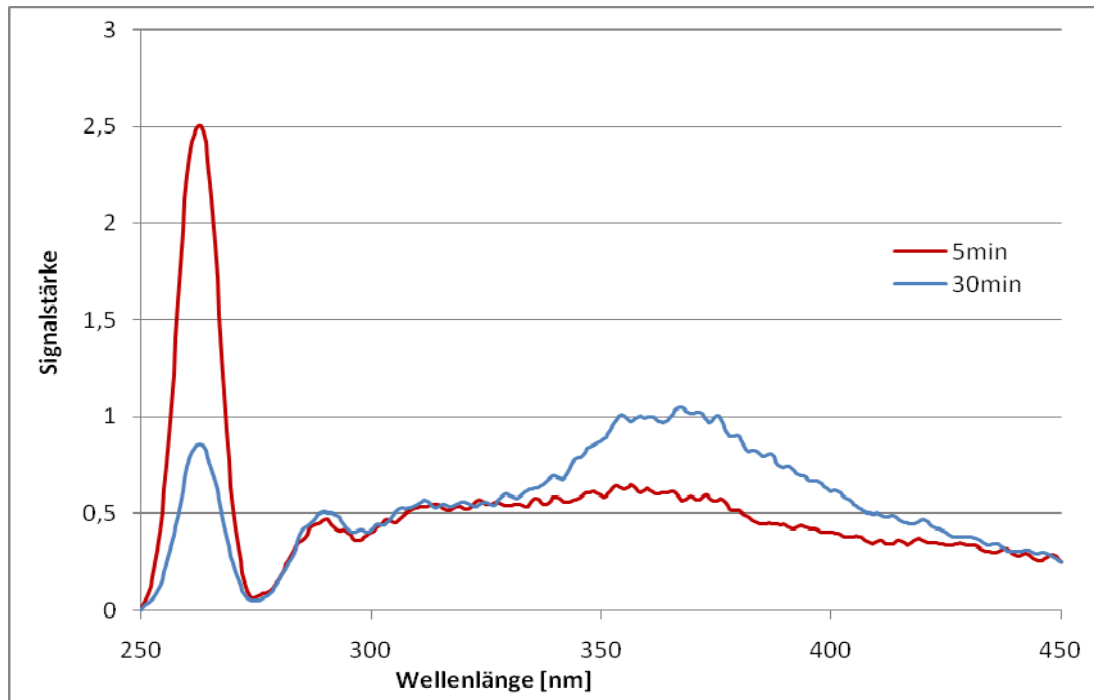


Abbildung 18: Auswaschen von Melamin aus der Schicht

Nach mehrmaligem Auswaschen wurde eine hoch konzentrierte Melaminlösung (100 mg/L) in die Küvette gefüllt und nach 0, 5, 10, 60 und 90 Minuten die Fluoreszenz gemessen (Abbildung 19). Die unterste Kurve (violett) entspricht dem Signal der letzten Waschlösung (praktisch kein Melamin in Lösung). Das stärkste Signal (gelb) wurde direkt nach dem Einfüllen der Lösung aufgenommen und zeigt somit nahezu die Emission einer 100 mg/L Melaminlösung. Dazwischen ist die zeitlich verzögerte Abnahme der Melaminkonzentration in der überstehenden Lösung zu erkennen (bei 5, 10 und 60 Minuten).

Nach 60 Minuten trat keine weitere Veränderung des Signals auf (Signal bei 60 und 90 Minuten ist praktisch ident), weshalb man darauf schließen kann, dass kein weiteres Melamin in die Schicht eindiffundieren konnte. Man beachte auch das wesentlich höhere Signal im Verhältnis zu den Auswaschkurven, da keine Fluoreszenzlöschung mehr auftritt (Vergleich Abbildung 18 und 19).

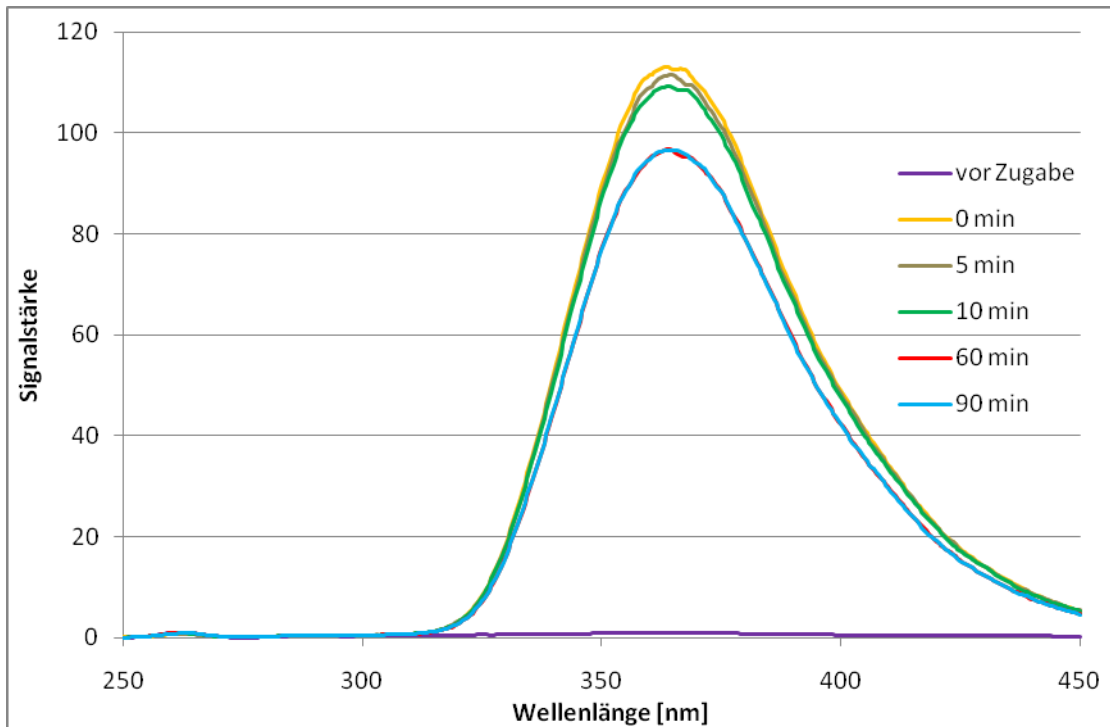


Abbildung 19: Aufnahme von Melamin in die Schicht

Nachdem aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die grundsätzliche Eignung des entwickelten molekular geprägten Polymers für die Sensorik nachgewiesen war, konnte in direkter Folge mit der Präparation von Schwingquarzen zur weiteren Charakterisierung begonnen werden. In Abbildung 20 ist die Anlagerung von Methacrylsäure um ein Melaminmolekül in Lösung dargestellt.

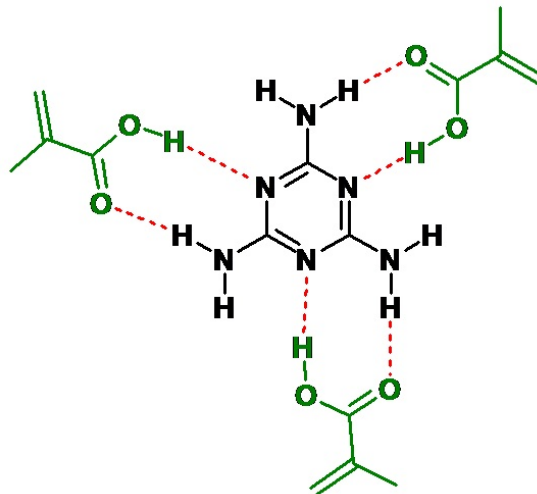


Abbildung 20: Wasserstoffbrückenbildung zwischen Melamin und Methacrylsäure

3.4 Charakterisierung der Oberfläche

Die für die zuletzt angeführten Fluoreszenzversuche genutzte sensitive Schicht ist das Ergebnis nach langwierigen Polymeroptimierungen. Eine große Herausforderung stellte hierbei wie erwähnt die erst stark unterschiedliche Polymerisationsdauer (siehe 3.3), die teilweise rauhen Oberflächen sowie die Haltbarkeit auf der Sensoroberfläche dar. Das verwendete Acrylat erreicht dennoch nicht die glatte Oberfläche wie sie mit z.B. Polystyrolschichten problemlos hergestellt werden kann. Dieses Kapitel soll einen Vergleich der neuen MIP – Schicht mit einer weitgehend glatten Divinylbenzol – Methacrylsäure Copolymerschicht ermöglichen.

Die Schichten enthalten die in folgenden Tabellen angeführte Zusammensetzung und wurden auf Glasplättchen aufgetragen.

PODS	DHEBA	MAA	H ₂ O	Melamin
5 mg	17 mg	8 mg	400 µL	1,5 mg

AIBN	DVB	MAA	THF	Mesitylen
5 mg	30 mg	15 mg	400 µL	2,5 µL

Zusammensetzung der DHEBA-MAA bzw DVB-MAA Schicht

Das DVB – MAA Gemisch wurde 30 min unter UV-Licht vorpolymerisiert und anschließend je 5 µL pro Plättchen aufgetragen und mit 3000 rpm abgespinn.

Die dargestellte DHEBA – MAA Schicht wurde im Wasserbad bei 55 °C vorpolymerisiert und nach etwa 8 Minuten bei 2000 rpm abgespinn. Im Wesentlichen handelt es sich somit um dieselbe Schicht, welche für die in Kapitel 3.5 folgenden Schwingquarzmessungen verwendet wurde.

Für die beiden Bilder des Lichtmikroskops wurden die Schichten mittels Rasierklinge eingeritzt um einen Größenvergleich zu ermöglichen (Abbildung 21). Mittels Durchlichtmikroskop konnten bei 1000 facher Vergrößerung folgende Aufnahmen erstellt werden:

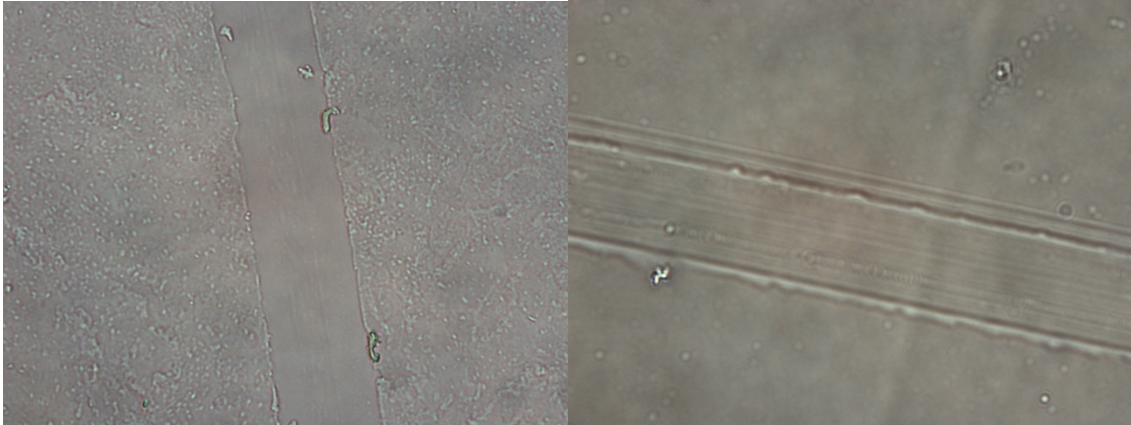


Abbildung 21: links DHEBA – MAA und rechts die glattere DVB – MAA Schicht

Die Dicke der DVB - Schicht beträgt ca. 100 nm und die der DHEBA – Schicht im Durchschnitt 1 μm . Trotz dieser relativ dicken und sehr unebenen Schicht konnten sehr gute Ergebnisse mittels QCM erzielt werden. Die Unebenheiten beim DHEBA – MAA System (Abbildung 21) können mehrere hundert nm erreichen. Im Gegensatz dazu zeigt die DVB - MAA Schicht lediglich Unregelmäßigkeiten von unter 10nm. Die in Abbildung 23 erkennbaren Zacken stellen kleinere Partikel (z.B. Staub) dar.

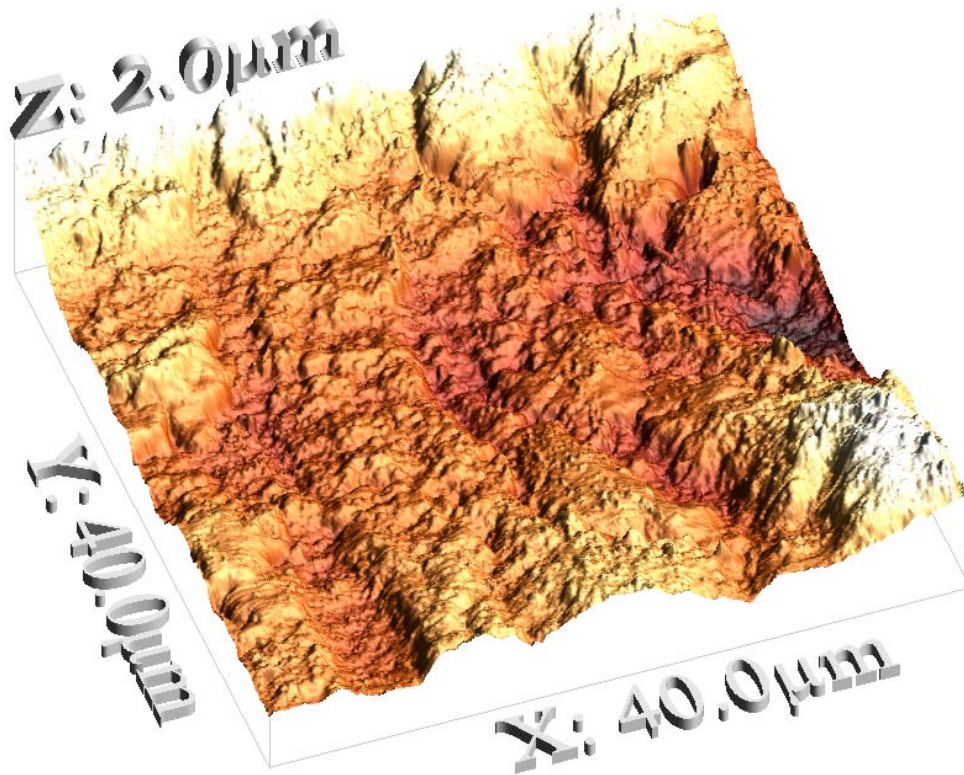


Abbildung 22: AFM Aufnahme einer DHEBA – MAA Schicht

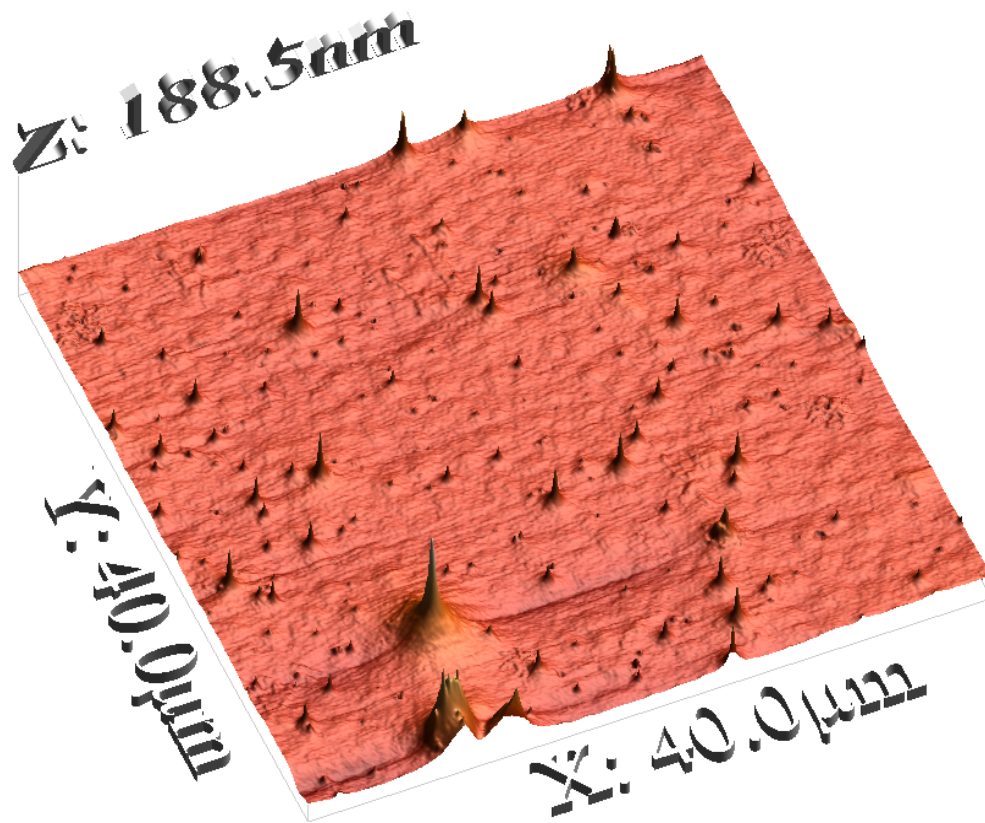


Abbildung 23: AFM Aufnahme einer DVB - MAA Schicht

3.5 QCM - Allgemeines

Für die Quartz Crystal Microbalance (QCM) - Messungen wurden 10 MHz Quarzplättchen von 13,8 mm Durchmesser und 168 μm Dicke mit per Siebdruck aufgetragenen Elektroden von 5 bzw. 4 mm Größe (Vorder- / Rückseite) genutzt. Alle Messungen wurden mittels 2 – Elektrodentechnik durchgeführt, wobei sich sowohl Mess- als auch Referenzelektrode auf demselben Quarzplättchen befinden (siehe auch 2.4 und Abbildung 24). Der Aufbau der Messzelle und Oszillatorschaltung sowie das Aufbringen der Goldelektroden mittels Siebdruckverfahren bzw. deren spezielles Design ist in diversen Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits ausführlich beschrieben und kann dort nachgelesen werden.²⁷

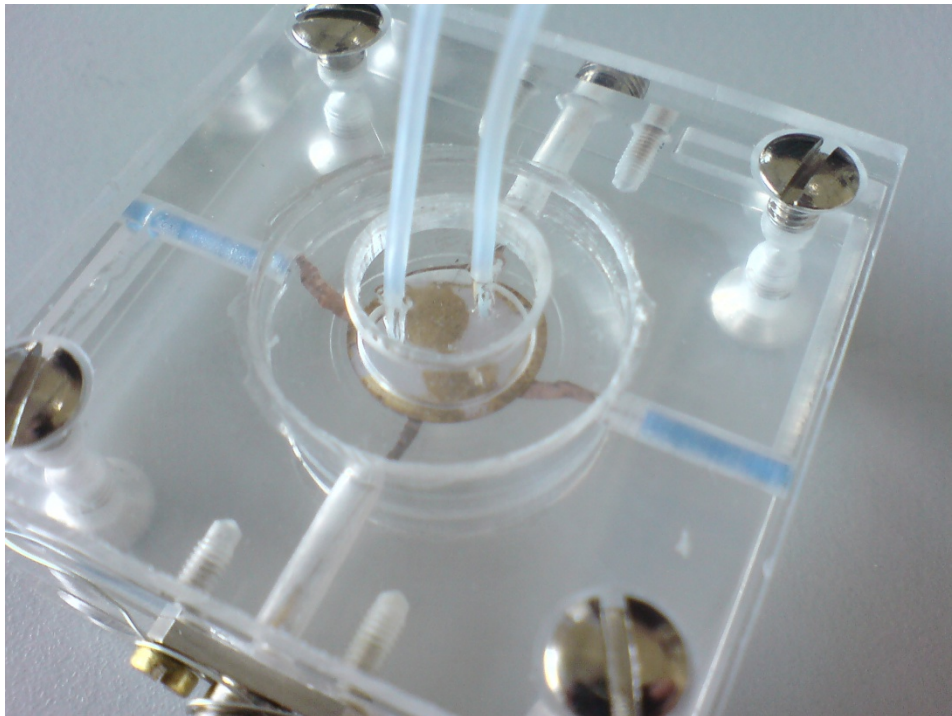


Abbildung 24: Die verwendete Messzelle mit funktionstüchtigem Schwingquarz

Auswaschkurven

Bei einem neu beschichteten Sensor muss zunächst das zur Prägung notwendige Melamin sowie allfällige noch vorhandene Monomerreste aus der Schicht ausgewaschen werden. Die Schichtdicken wurden über die Frequenzänderung des Quarzes bestimmt und betragen 1225 nm für die Referenz und 1495 nm für die Messelektrode. Dieser geringe Unterschied kann nicht für die unterschiedlichen Frequenzänderungen verantwortlich gemacht werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass Melamin aus der Messelektrode ausgewaschen wird und dadurch einen stärkeren Frequenzanstieg verursacht (Vergleich der beiden Kurven in Abbildung 25).

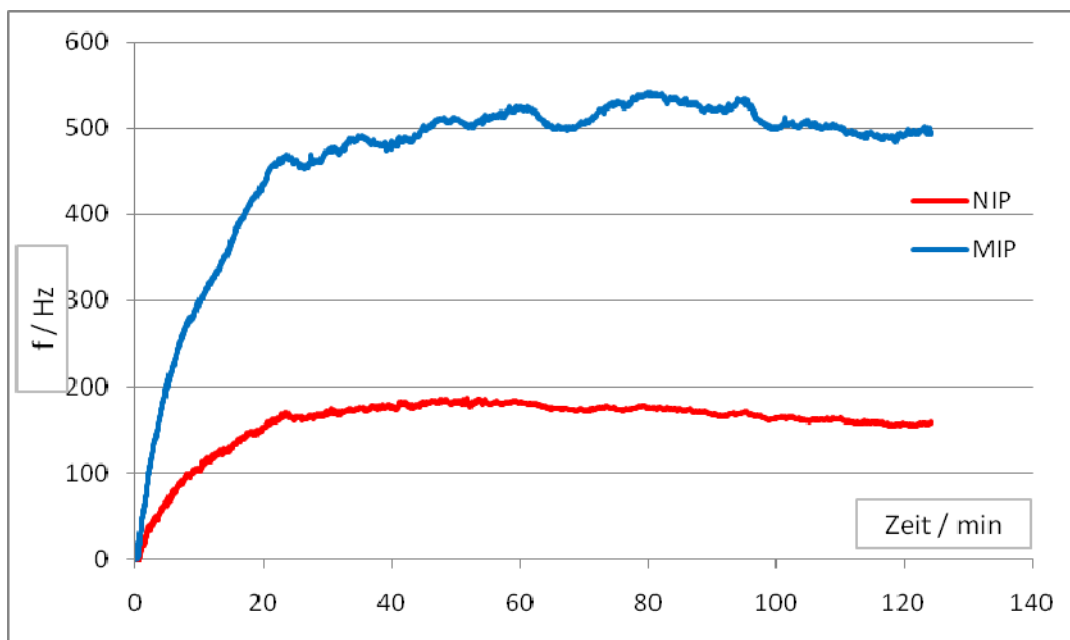


Abbildung 25: Höherer Masseverlust und somit Frequenzanstieg an der Messelektrode (MIP) aufgrund des ausgewaschenen Melamins.

Einschwingkurve:

Falls ein Quarz bereits von Melamin befreit ist zeigt sich während des Einschwingvorgangs eine Frequenzabnahme, die mit der Aufnahme von Wasser in die sensitive Schicht zu begründen ist. Die folgende Abbildung 26 zeigt einen solchen Schwingquarz (Messelektrode) im wässrigen Medium bei der Einlagerung

von Wasser in die Poren. Durch die steigende Masse sinkt die Frequenz, wobei dies zu Beginn rascher von statten geht als gegen Ende des Vorgangs.

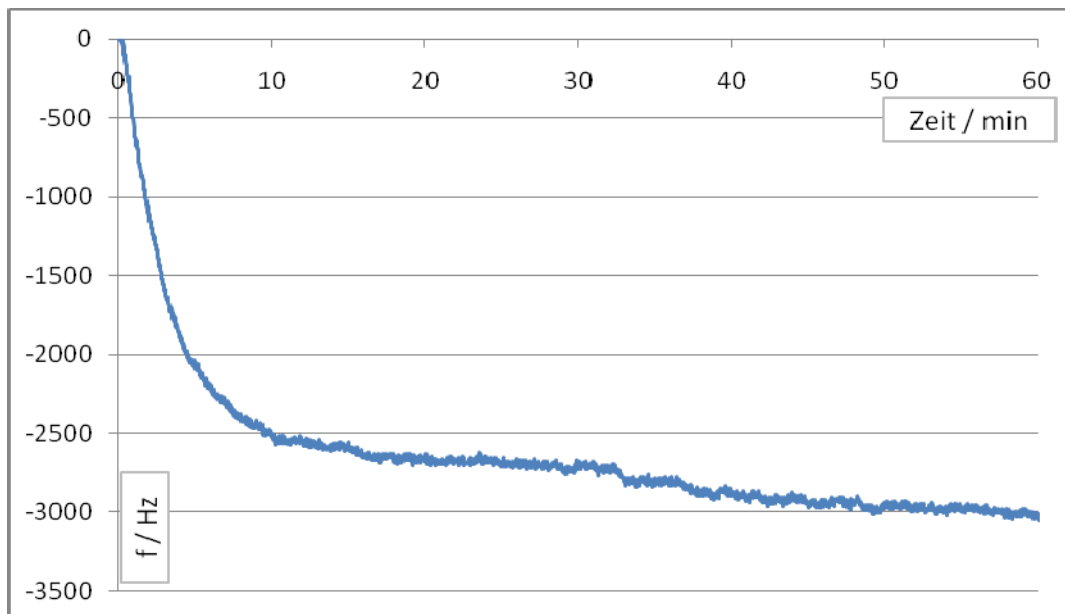


Abbildung 26: Typische Einschwingkurve einer QCM

Schichtdickenbestimmung:

Mittels Netzwerkanalysator können die Schichtdicken näherungsweise bestimmt werden. Hierfür muss die Resonanzfrequenz vor und nach dem Auftragen des Polymers gemessen werden. Aufgrund von Vergleichen mit AFM - Schichtdickenbestimmungen ist bekannt, dass 1000 Hz Frequenzänderung in etwa 40 nm Schichtdicke entsprechen(siehe auch 3.1).

	Differenz [Hz]	Schichtdicke [nm]
Referenz	30625	1225
Messelektrode	37388	1495

Typische Schichtdicke eines verwendeten Sensors

Im Falle des Acrylatsystems sind diese Werte jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da keine homogene Schicht erzeugt werden kann und erhebliche Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche entstehen (siehe 3.4). Die für die weiteren Messungen verwendeten Sensorschichten haben alle eine Dicke von etwa 1-1,5 μm .

3.6 QCM – Messungen

Für die erste Messung wurde eine sehr hoch konzentrierte Lösung von 2000 mg/L verwendet um festzustellen, ob überhaupt eine Frequenzänderung festgestellt werden kann. Die erste erfolgreiche Messung ist in Abbildung 27 dargestellt. Der Analyt wurde bei etwa 3 Minuten 20 Sekunden zugegeben wobei der Messvorgang während des Pumpens pausiert wurde. Nach etwa 4 Minuten 20 Sekunden wurde wieder mit Wasser gespült wobei das Signal die ursprüngliche Basislinie auch nach einem erneuten Spülvorgang bei etwa 5 Minuten nicht vollständig erreichen konnte.

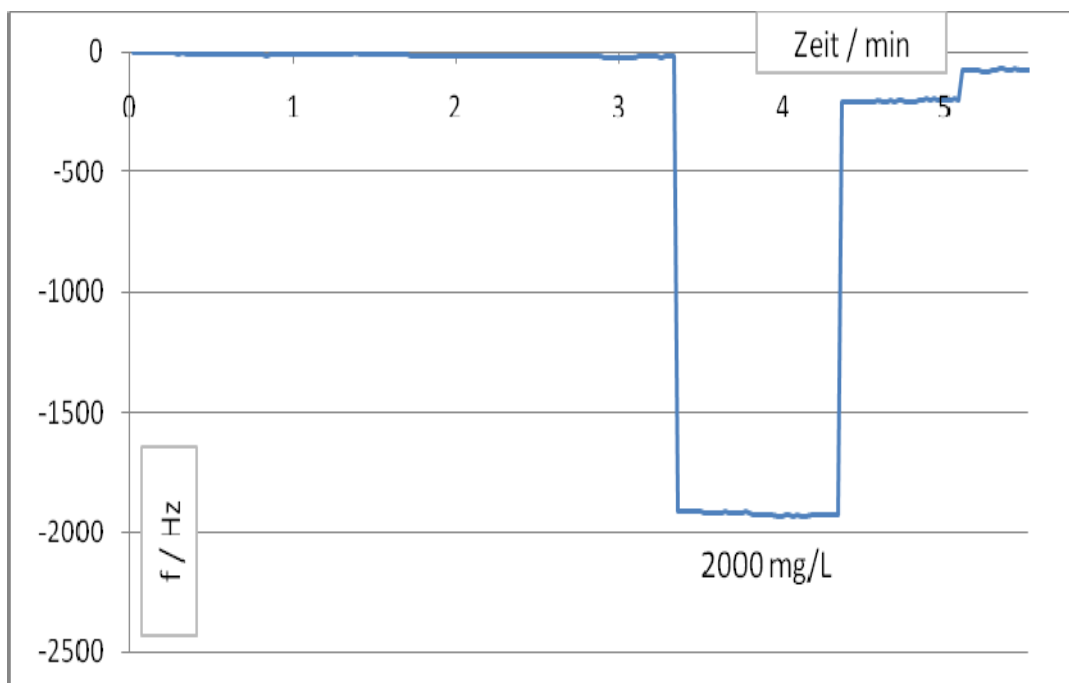


Abbildung 27: Erstes Messsignal

Reproduzierbarkeit

Eine Lösung der Konzentration 200 mg/L wurde gemessen, der Analyt ausgespült und abermals injiziert (Abbildung 28). Die Frequenzänderungen unterscheiden sich nur um 1,7%, was für eine gute Reproduzierbarkeit spricht. Auch die später gemessene Konzentrationsabhängigkeit zeigt ein identes Signal.

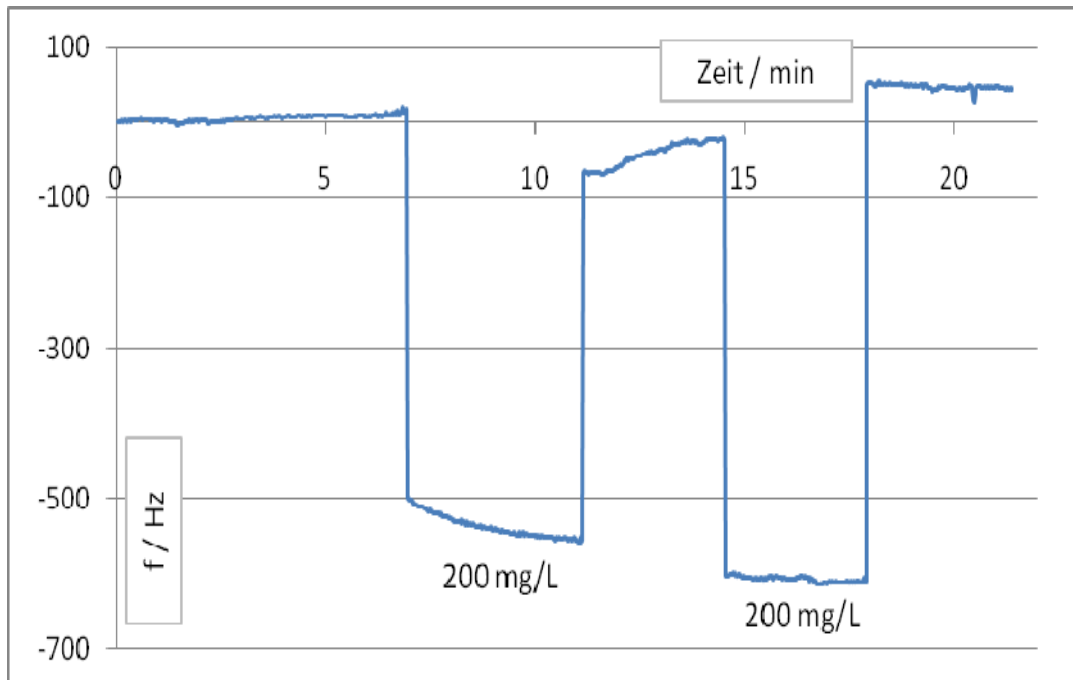


Abbildung 28: Messung der Reproduzierbarkeit

Konzentrationsabhängigkeit:

Die Messung der Konzentrationsabhängigkeit wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 1000 mg/L Melamin durchgeführt wobei ein sehr schnelles Ansprechen des Sensors festgestellt werden konnte. Selbst bei den höher konzentrierten Lösungen war das Signal nach 2-3 Minuten konstant. Das Auswaschen mit Wasser benötigt etwa 10 Minuten. In Abbildung 29 sind die einzelnen Signale der Mess- und Referenzelektrode dargestellt, während Abbildung 30 das Differenzsignal zeigt. Die Nachweisgrenze liegt bei dem getesteten Sensor unter 1 mg/L. Der Basisliniendrift an beiden Elektroden erklärt sich durch einen geringen Verlust an Polymeranteilen.

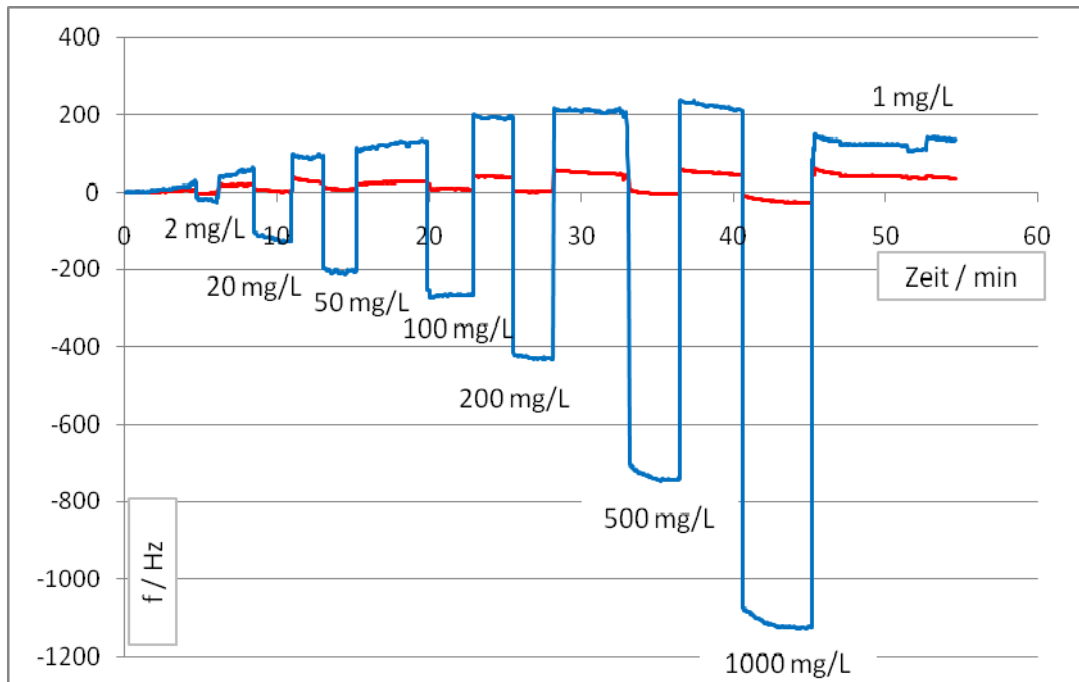


Abbildung 29: Unterschied zwischen Mess- (blau) und Referenzelektrode (rot)

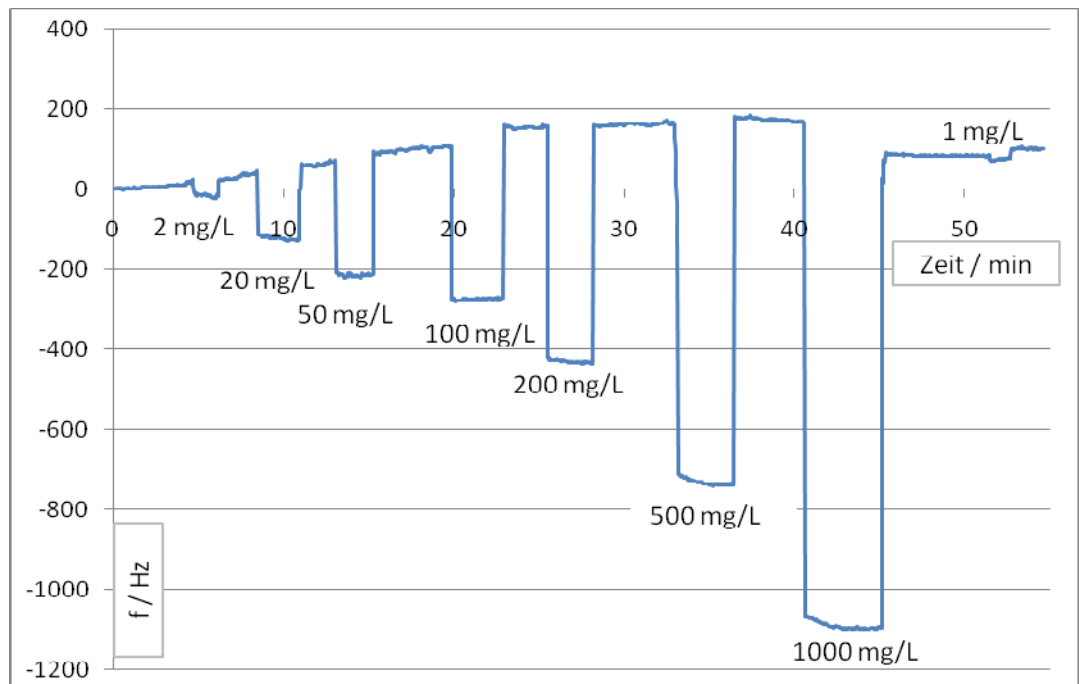


Abbildung 30: Differenzsignal

Konzentration vs. Frequenzänderung:

c [mg/L]	F [Hz]
1	ca. 15
2	33
20	161
50	281
100	377
200	579
500	910
1000	1271

Frequenz in Abhängigkeit der Konzentration

Das in Abbildung 31 graphisch dargestellte Konzentration – Signal Verhältnis ähnelt stark der Langmuir Isotherme: Bei geringen Konzentrationen ist eine wesentlich stärkere Affinität zur sensitiven Schicht erkennbar als bei Höheren (siehe auch 2.2).

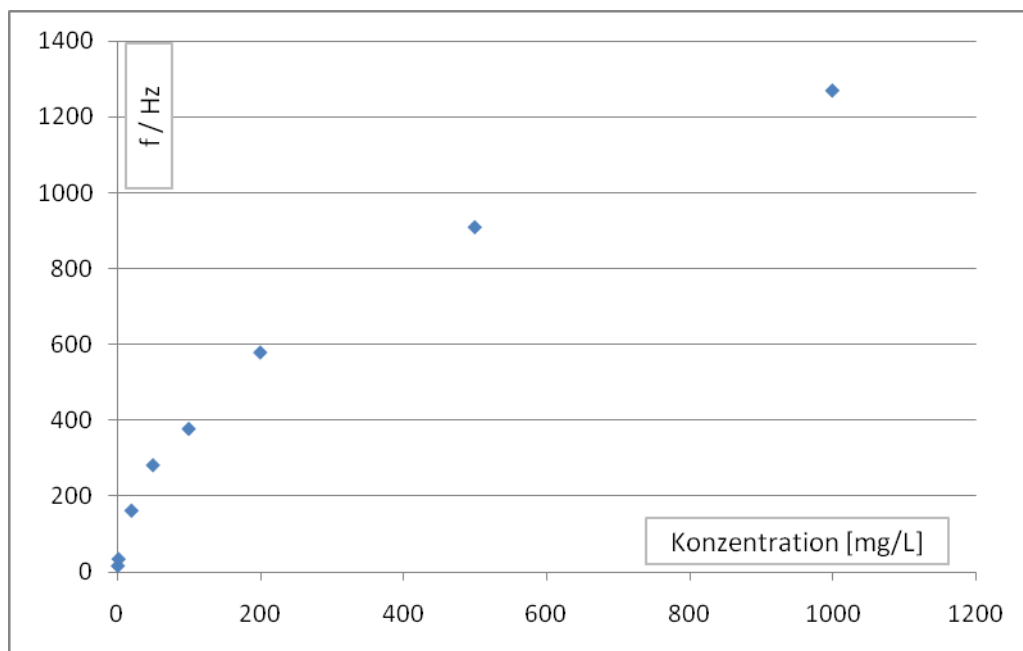


Abbildung 31: Diagramm der Konzentrationsabhängigkeit des Differenzsignals

3.7 QCM – Querselektivitäten

Neben der Sensitivität spielt auch die Selektivität eine wesentliche Rolle für die Qualität eines Sensors. In weiterer Folge sind die Messergebnisse sowohl der einzelnen Mess- und Referenzelektroden als auch deren Differenz angegeben. Folgende Analyte wurden getestet: Pyridin, Phenol, Anilin, Mesitylen, Cyanursäure und Piperidin als Strukturanaloga bzw. chemisch nahe verwandte Verbindungen, sowie Bovines Serumalbumin und Glukose, da dies für die technische Anwendung von Bedeutung ist. Die Schichtdicken der Elektroden betrugen jeweils zwischen 1,2 und 1,5 μm .

Piperidin

Bei Piperidin ist hier nur exemplarisch das Signal der Messelektrode abgebildet:

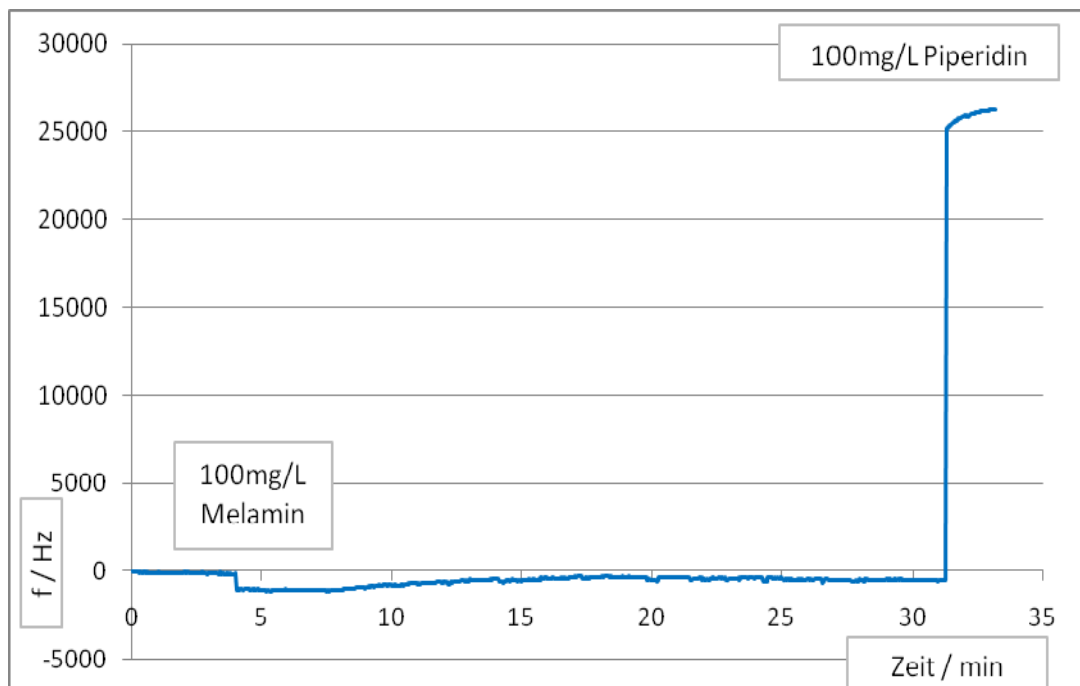


Abbildung 32: Zerfall der sensitiven Schicht durch Zugabe von Piperidin

Wie man in Abbildung 32 sieht, steigt nach Zugabe von Piperidin das Signal sehr schnell und stark an, wobei dies ein irreversibler Prozess ist, welcher durch das Auflösen der Schicht zustande kommt. Es zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie es bei den Polymerisationsversuchen mit Ammoniak zu beobachten war

(siehe 3.3). Beachtenswert ist, dass bereits eine so schwach basische Verbindung ($pK_s = 11,12$) bei geringer Konzentration den Quervernetzer binnen weniger Minuten praktisch vollständig hydrolysiert. In der Literatur finden sich ebenfalls Erfahrungen mit der Zersetzung bei leicht basischen und sogar gekühlten Proben.²⁸

Pyridin

Pyridin dient zur Charakterisierung des Imprint und wurde aufgrund seiner geringen Größe und des Heteroatoms gewählt.

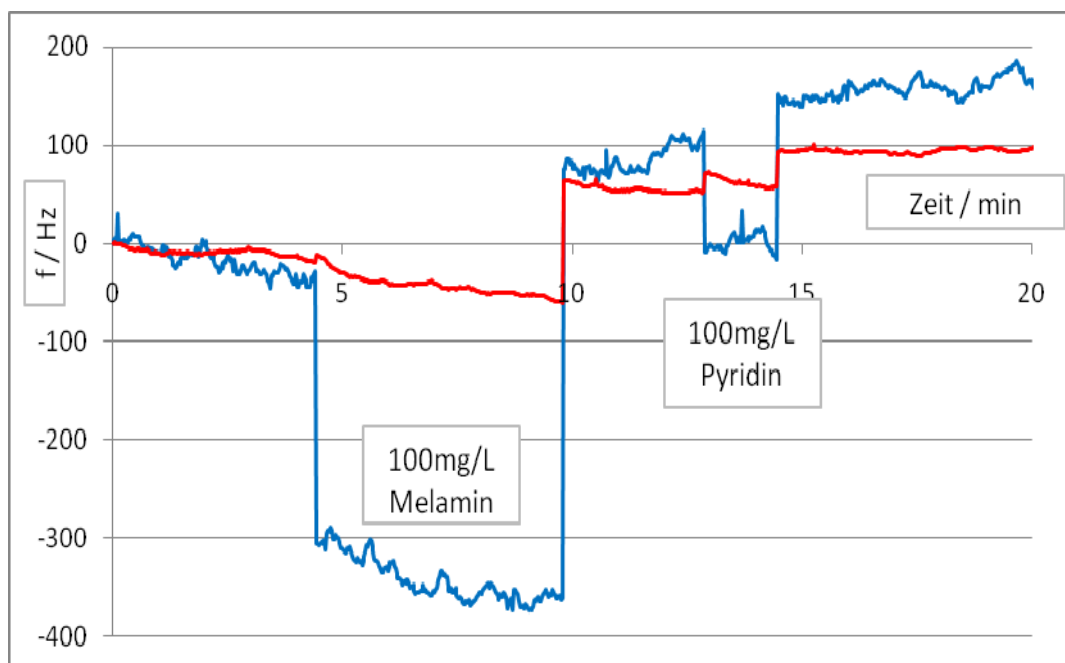


Abbildung 33: Mess- (blau) und Referenzsignal (rot) für Pyridin

Die Referenzelektrode zeigt keinen optisch erkennbaren Effekt (Abbildung 33), da der Drift nach oben diesen ausgleicht (bzw. knapp übersteigt). Die Differenzkurve (Abbildung 34) ist jedenfalls eindeutig:

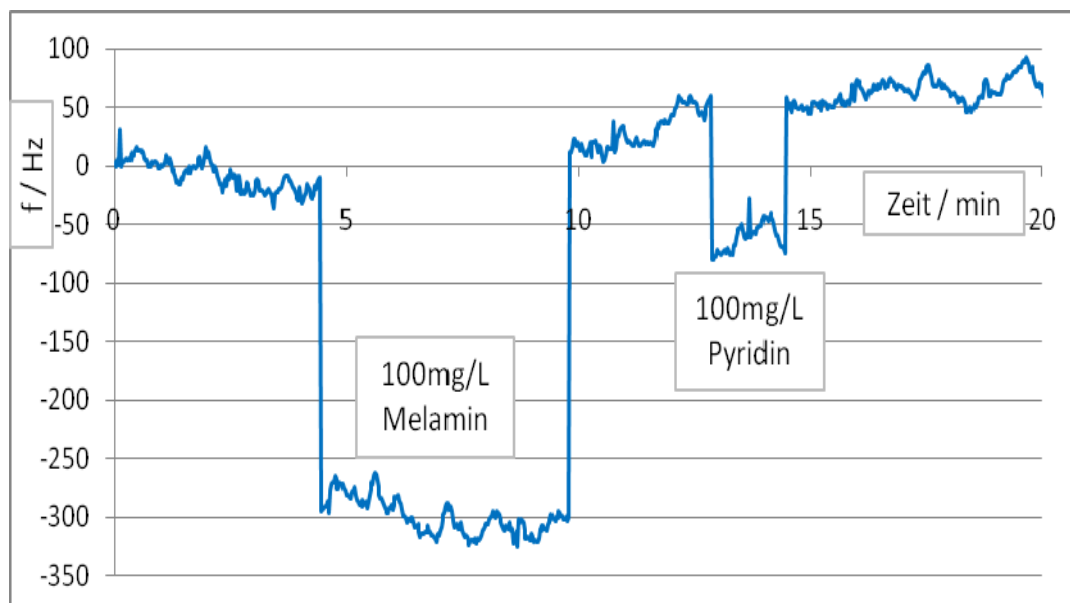


Abbildung 34: Differenzsignal für Pyridin

Bei Pyridin ist eine Querselektivität gegeben, welche bei gleicher Konzentration ein wesentlich geringeres Signal liefert. Der Selektivitätsfaktor liegt bei 2,5. Durch die verschiedenen Signale der beiden Elektroden kann zusätzlich davon ausgegangen werden, dass Pyridin in das MIP eindringt, also nicht nur an der Oberfläche anlagert. Dennoch ist dies ein sehr positives Ergebnis, da Melamin und Pyridin strukturell sehr ähnlich sind (Heteroatome, Aromatizität).

Phenol

Phenol ist Melamin zwar strukturell ähnlich, besitzt jedoch keine basischen funktionellen Gruppen, weshalb es sich für einen Querselektivitätstest anbietet um die Rolle der Säure – Basengruppen Wechselwirkungen näher zu untersuchen (siehe auch Kapitel 3.3).

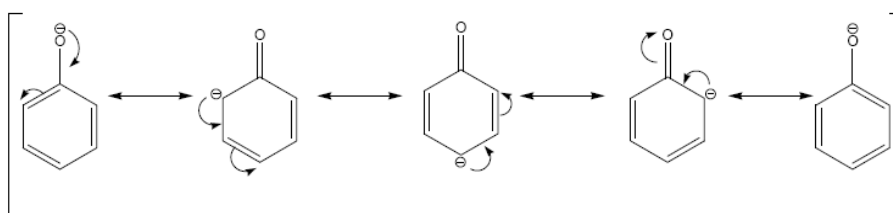


Abbildung 35: Mesomeriestabilisierung des Phenolat-Anions

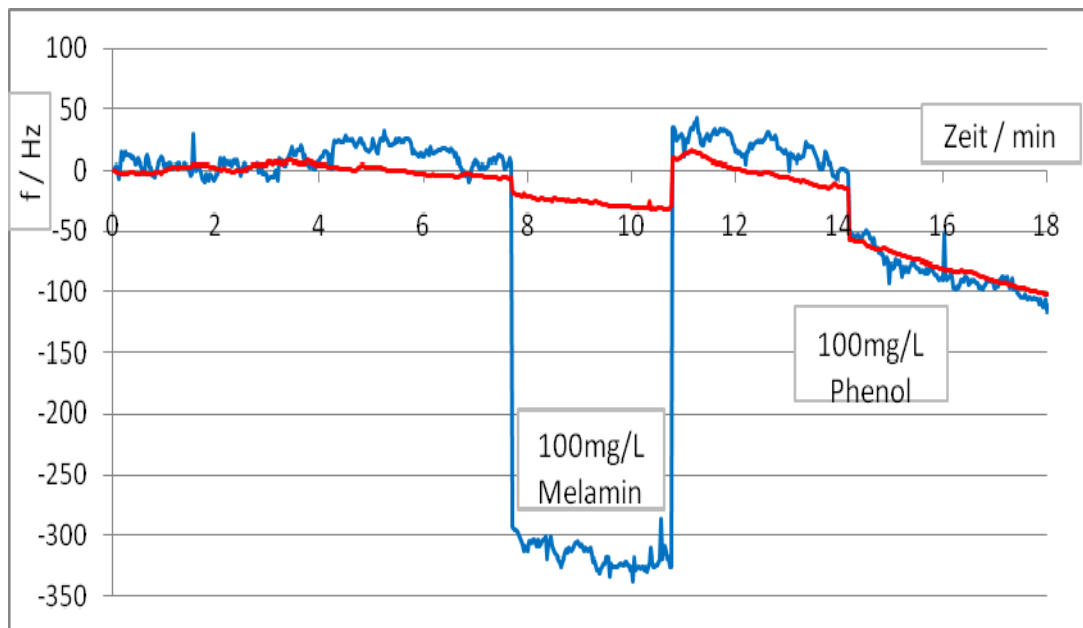


Abbildung 36: Mess- (blau) und Referenzsignal (rot) für Phenol

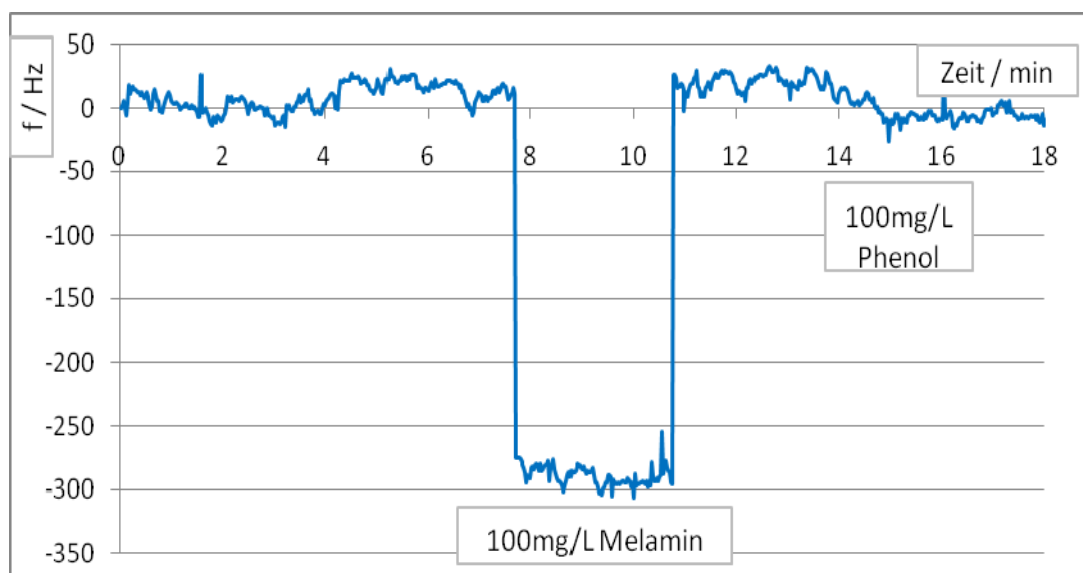


Abbildung 37: Differenzsignal für Phenol

Die in den Abbildungen 36 und 37 dargestellte nicht vorhandene Querselektivität auf Phenol lässt sich durch die Chemie des Phenols erklären, welches im Vergleich zu aliphatischen Alkoholen eine relativ sauer reagierende Hydroxygruppe besitzt (Erklärung siehe Abbildung 35). Phenol ist also eine schwache Säure, welche sich nicht in das grundsätzlich saure (durch den funktionellen Monomer Methacrylsäure) Polymer ein- bzw. anlagert.

Bovines Serum Albumin (BSA)

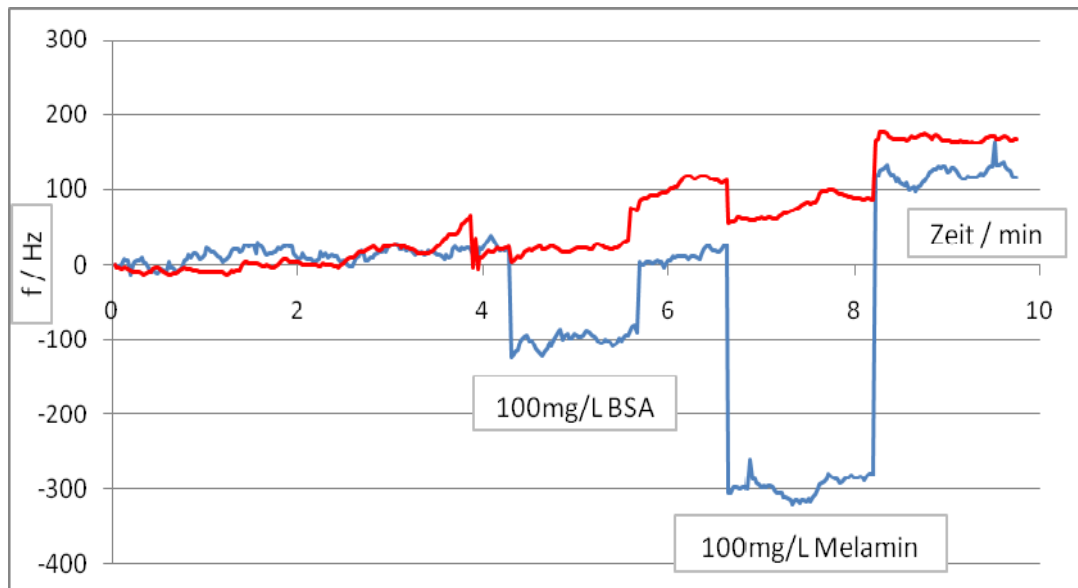


Abbildung 38: Mess- (blau) und Referenzsignal (rot) für BSA

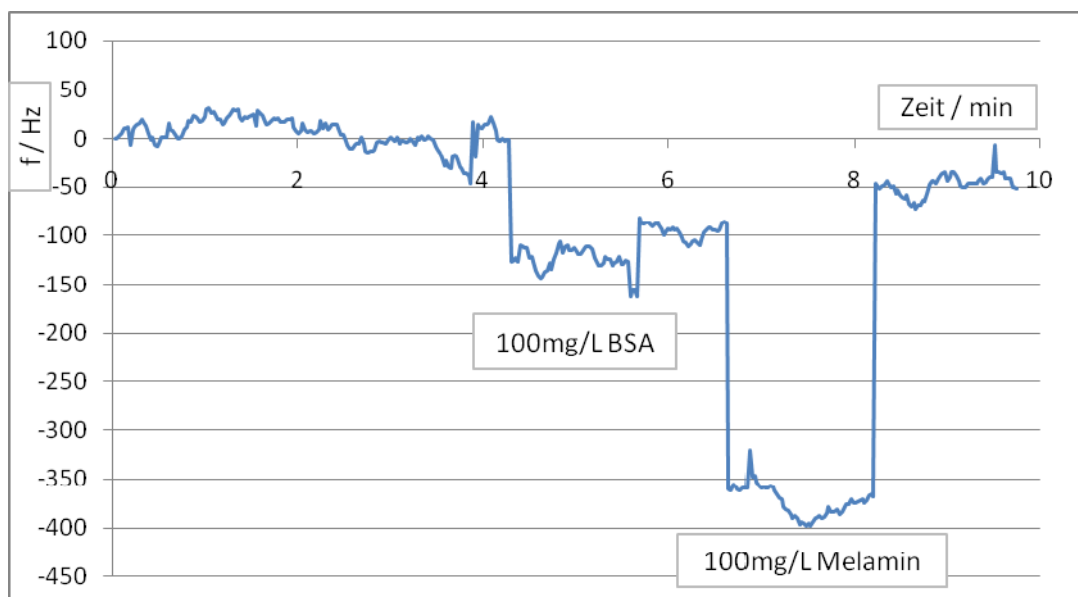


Abbildung 39: Differenzsignal für BSA

Albumine gehören zur Gruppe der globulären Proteine und ermöglichen das Lösen von sonst wasserunlöslichen Substanzen indem diese an das Protein gebunden werden. Bovines Serumalbumin kommt naturgemäß in Milch und entsprechenden Produkten vor. Es wurden Signale an beiden Elektroden festgestellt, was aufgrund der verwendeten Schichten wenig überraschend ist. Ähnliche Polymere werden innerhalb der Arbeitsgruppe zur Sensorik diverser

Proteine (u. A. auch BSA) herangezogen und finden auch in der Bioanalytik breite Verwendung (z.B. Polyacrylamidgelelektrophorese). Das in Abbildung 38 erkennbar höhere Signal des MIP an der Messelektrode im Vergleich zum NIP der Referenzelektrode ergibt sich aus der raueren Oberfläche, welches offensichtlich besser mit dem globulären Protein interagieren kann. Generell gibt es, ähnlich dem Melamin, Wechselwirkungen zwischen den NH_2 -Gruppen des Analyten und dem Polymer. Ebenso sind schwache Wechselwirkungen zwischen dem Quervernetzer und dem Protein wahrscheinlich. Bei dem Versuch wurde ein Selektivitätsfaktor von etwa 3 erreicht. Dieses Ergebnis erklärt sich aufgrund des fehlenden Imprints mit dem Protein sowie dessen Ausmaße, welche verhindern, dass es in die Melamin – Imprints eindiffundieren könnte (siehe Abbildung 39). Die dennoch relativ hohen Masseneffekte lassen sich durch den großen Unterschied der Molmassen erklären (BSA ca. 66000 g/mol, Melamin 126 g/mol). Die Anzahl der adsorbierten Proteinmoleküle ist also auf jeden Fall sehr gering.

Glukose

Eine Querselektivität auf Zucker wäre für einen Lebensmittelsensor fatal. Daher wurde Glukose näher untersucht.

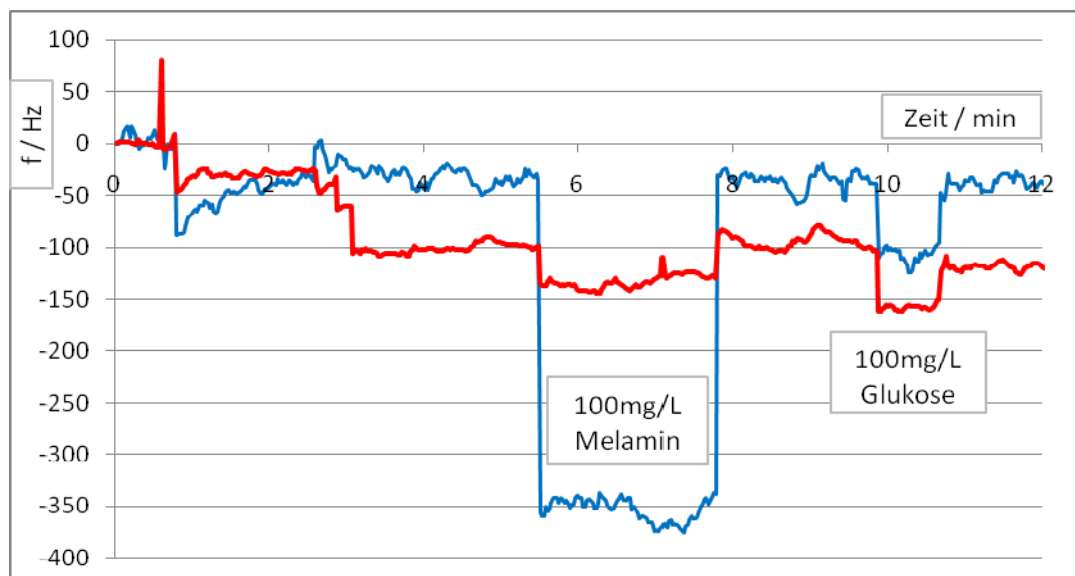


Abbildung 40: Mess- (blau) und Referenzsignal (rot) für Glukose

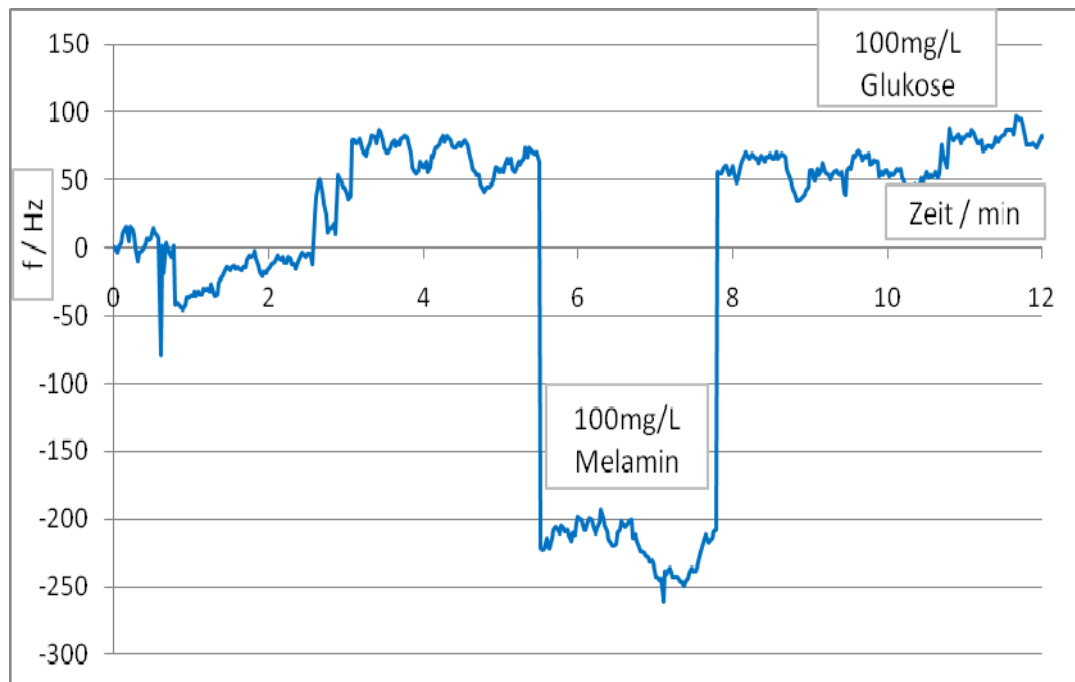


Abbildung 41: Differenzsignal für Glukose

Glukose ist ein Monosaccharid und gehört dadurch zu den Kohlehydraten. Er ist ebenso ein Baustein diverser Zweifachzucker wie Laktose (Disaccharid aus D-Galaktose und D-Glukose). In dieser Form kommt er natürlich in Milch vor, wird aber auch in diversen Produkten für Süßungszwecke zugesetzt.

Referenz- und Messelektrode zeigen einen identen Effekt im Bezug auf den Analyten Glukose (Abbildung 40), weshalb beim Differenzsignal (Abbildung 41) keine Änderung erkennbar ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die größeren Glukosemoleküle nicht in der Lage sind in die Poren des MIP der Messelektrode einzudringen. Die Oberfläche ist bei beiden Elektroden annähernd gleich groß, wodurch beide dasselbe Signal liefern und folglich kein Effekt beim Differenzdiagramm aufscheint. Die Messung ist dadurch ein sehr gutes Beispiel für die Funktion eines Imprints.

Anilin

Ein Querselektivitätstest mit Anilin dient primär zur Überprüfung der Qualität des Imprints. Die NH_2 -Gruppe sowie der aromatische Charakter sind auch wesentliche Bestandteile von Melamin. Die Signalkurven sind in Abbildung 42 und 43 dargestellt.

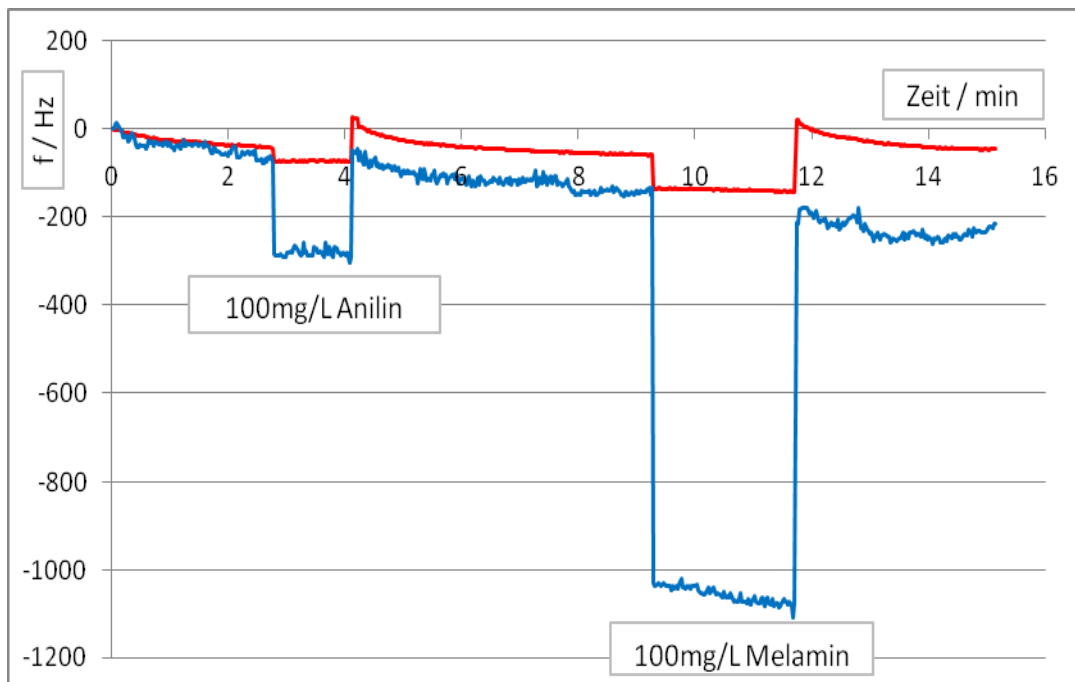


Abbildung 42: Mess- (blau) und Referenzsignal (rot) für Anilin

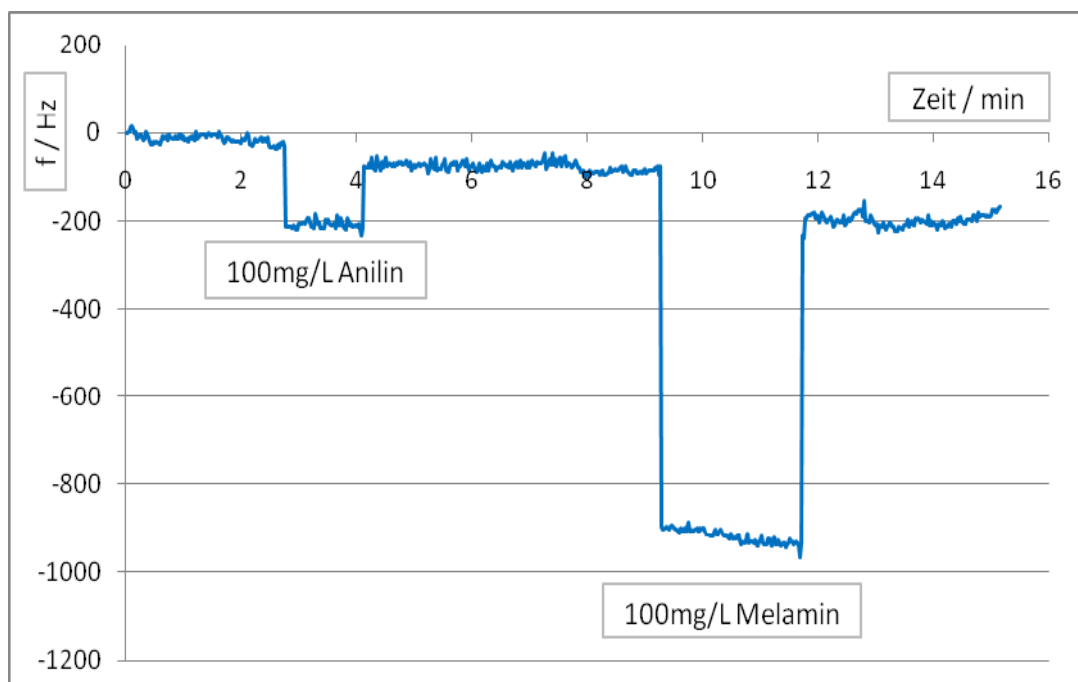


Abbildung 43: Differenzsignal für Anilin

Anilin zeigt trotz seiner NH_2 -Gruppe eine etwas schwächere Querselektivität als Pyridin. Bei dem Test wird ein Selektivitätsfaktor von 4 erreicht. Dies lässt darauf schließen, dass Heteroatome im Ring entscheidend zu den Wechselwirkungen zwischen Analyt und der sensitiven Schicht beitragen. Der Größenunterschied zwischen Pyridin und Anilin sollte keine wesentliche Rolle spielen, da Melamin

ohnehin wesentlich größer ist und entsprechend die Hohlräume für alle genannten Moleküle ausreichend Platz bieten müssen. Das generell höhere Signal bei Melamin im Vergleich zu den vorhergehenden Querversuchen dürfte an einer geringfügig höheren Polymerisationstemperatur liegen und ist im folgenden Kapitel näher untersucht.

Mesitylen

Mesitylen ist die von der räumlichen Ausdehnung dem Melamin ähnlichste der getesteten Substanzen und eignet sich deshalb sowie aufgrund ihrer apolaren Natur sehr gut für Querselektivitätsversuche.

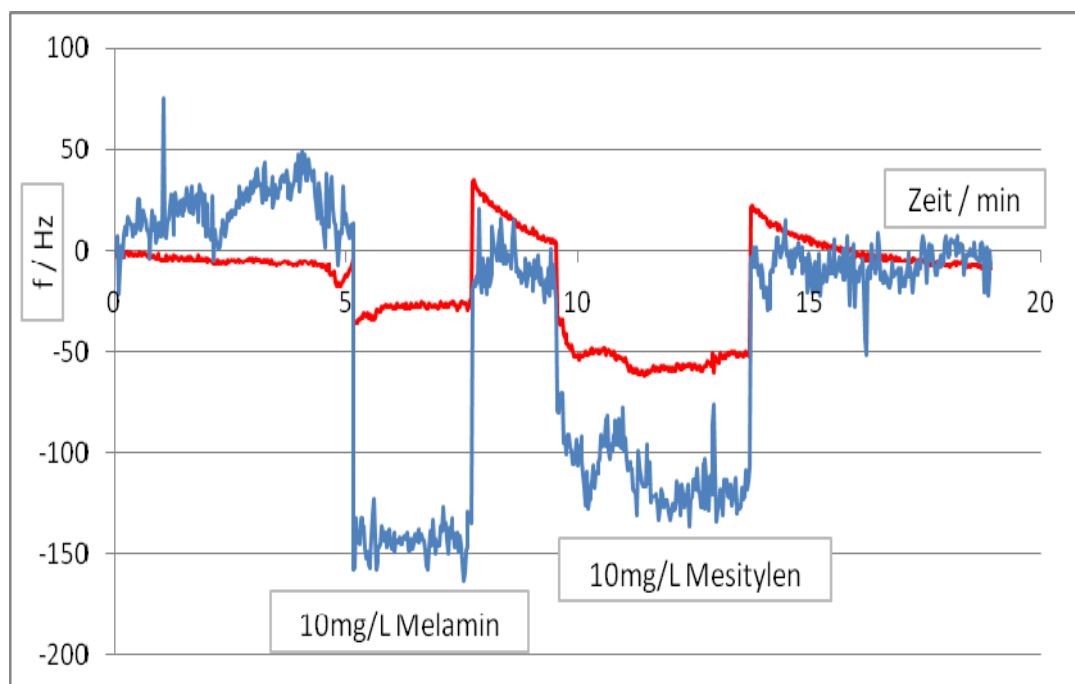


Abbildung 44: Mess- (blau) und Referenzsignal (rot) für Mesitylen

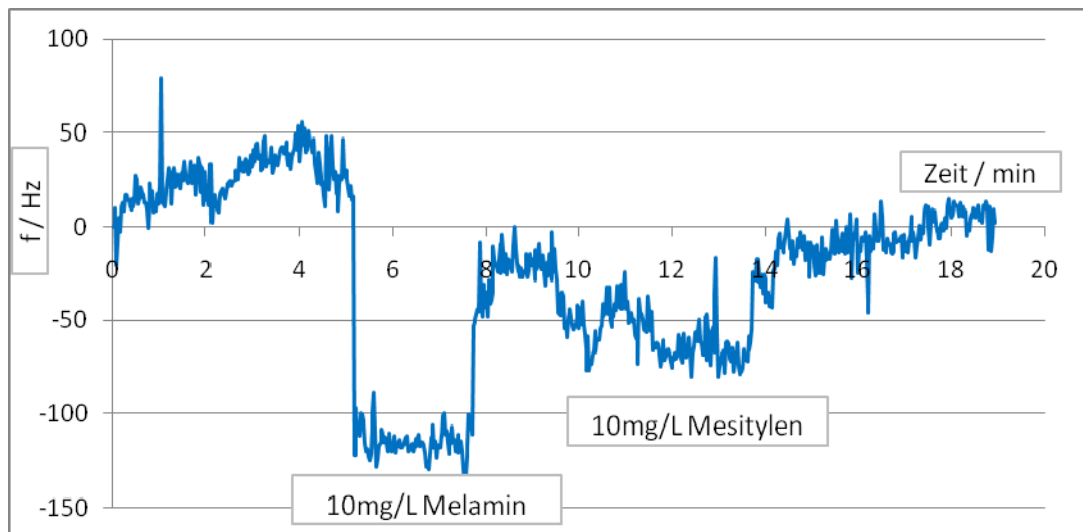


Abbildung 45: Differenzsignal für Mesitylen

Mesitylen besitzt eine sehr geringe Wasserlöslichkeit (maximal 20 mg/L), wodurch sich aufgrund der geringen Konzentrationen ein ungünstiges Signal - Rauschverhältnis ergibt (siehe Abbildungen 45). Die Versuche sind dennoch interessant, da Mesitylen eine ähnliche Größe wie Melamin, jedoch keine Aminogruppen und Heteroatome im Ring besitzt. Mesitylen lagert sich auch an die NIP - Schicht der Referenzelektrode an (Abbildung 44), jedoch nicht so stark wie in die MIP-Schicht, wodurch sich ein Selektivitätsfaktor von etwa 3 ergibt. Dies ist wiederum ein Beweis dafür, dass es in die Melamin – Imprints eindringt obwohl es nicht von der Säure – Base Wechselwirkung profitiert.

Cyanursäure

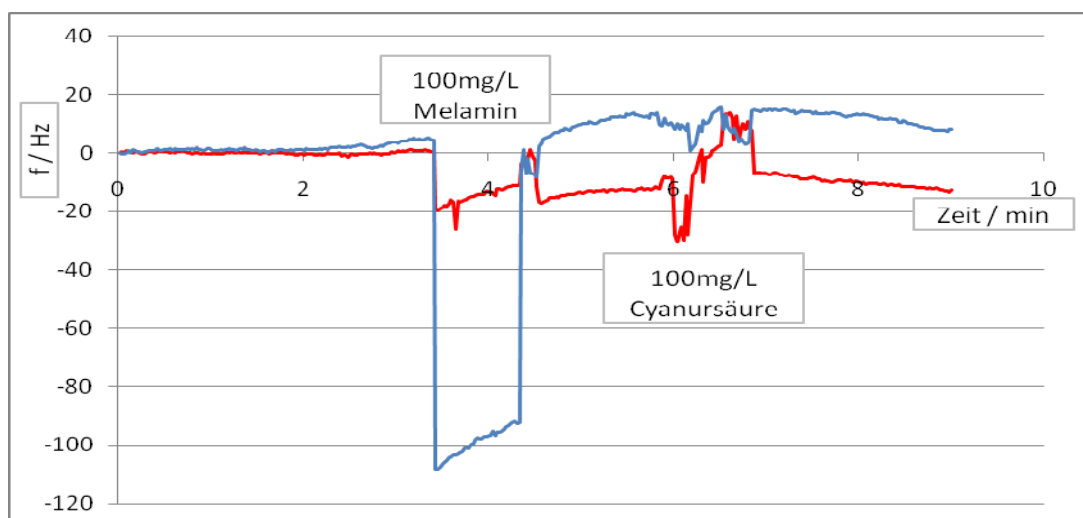


Abbildung 46: Mess- (blau) und Referenzsignal (rot) für Cyanursäure

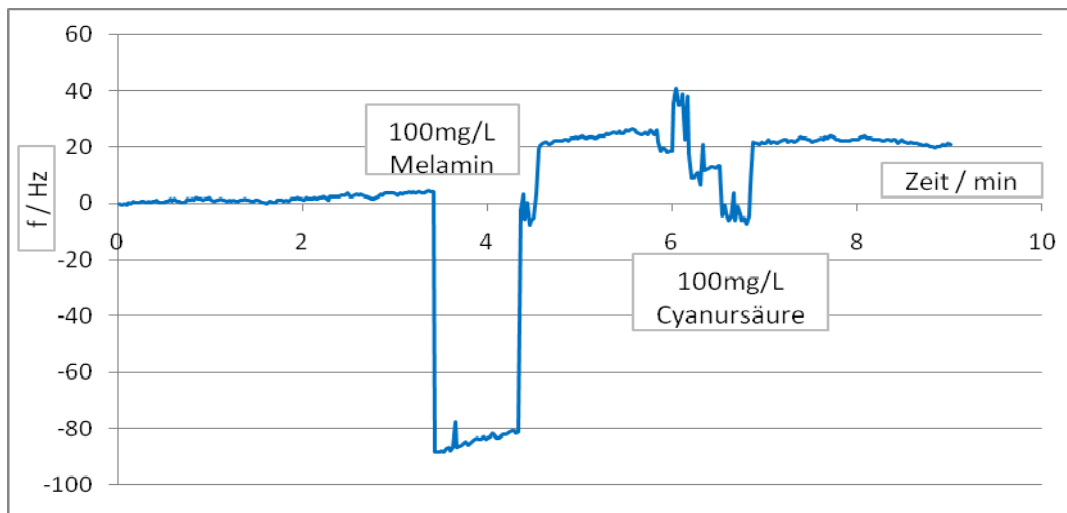


Abbildung 47: Differenzsignal für Cyanursäure

Cyanursäure zeigt wie erwartet keine bzw. nur eine sehr geringe Querselektivität (siehe Abbildungen 46 und 47). Bei manchen Messungen war sogar ein negativer Effekt zu beobachten, bei welchen vermutlich noch eingelagertes Melamin aus dem Polymer ausgewaschen wurde. Dieser Effekt entsteht dadurch, dass Melamin, sobald es aus der Kavität diffundiert, von Cyanursäure ausgefällt und so aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Dieser Verdacht liegt nahe, da bei diversen in der Literatur gefundenen MIPs für SPE das Melamin ebenfalls mittels Säure eluiert wird und Cyanursäure eine sehr starke Affinität zu Melamin aufweist (siehe Melamincyanurat unter 1.4).

Schlussfolgerungen Querselektivität:

Die Effizienz der molekularen Prägung zeigt sich besonders anhand der Versuche mit Pyridin und Anilin. Pyridin kann sich aufgrund seines Heteroatoms leichter in die Melamin-Poren einlagern als Anilin. Größeren Molekülen (wie etwa Zucker oder Proteinen) ist dies gänzlich unmöglich und zeigen dadurch meist ein sehr ähnliches bis identes Signal an Mess- und Referenzelektrode. Die Basizität des jeweiligen Analyten trägt einen mindestens ebenso starken Beitrag zu Sensitivität und Selektivität bei. So zeigt das entwickelte Polymer keinerlei Querselektivität auf Phenol. Grund hierfür ist die Mesomeriestabilisierung des Phenols wodurch die negative Ladung, welche bei Abgabe eines Protons entsteht, über den gesamten Ring verteilt wird und damit ein stabilisiertes Phenolatanion bildet. Eine

Querselektivität auf andere sauer reagierende Moleküle ist folglich nahezu ausgeschlossen. Dies gilt bereits bei neutralen Molekülen wie beispielsweise der getesteten Modellschubstanz Mesitylen nicht mehr. Zur besseren Übersicht zeigt Abbildung 48 die Signalverhältnisse der getesteten Querselektivitäten im Überblick. Durch andere Messverfahren (z.B. optische Detektionsmethoden) kann die für eine praktische Anwendung wesentliche Selektivität im Vergleich zur unspezifischen QCM natürlich noch weiter gesteigert werden.

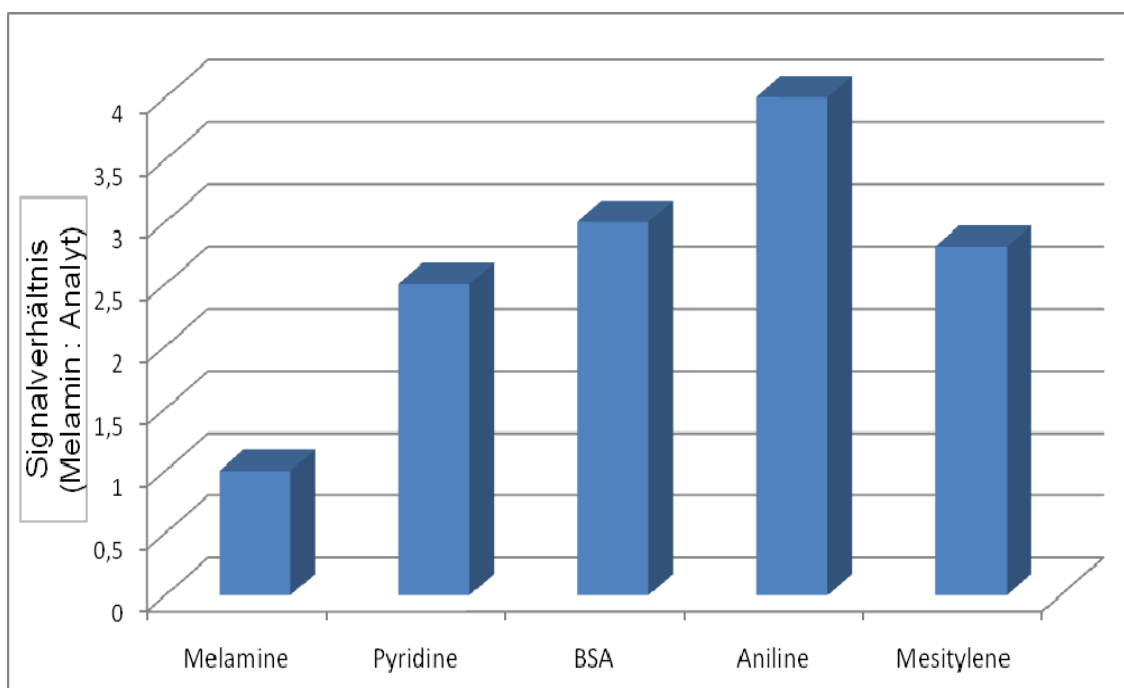


Abbildung 48: Signalverhältnis der getesteten Verbindungen

3.8 QCM – Temperaturabhängigkeit des MIP

Im Laufe der Experimente zu den Querselektivitäten konnte festgestellt werden, dass manche Chargen an Imprint ein bis zu dreimal höheres Signal zeigten. Da die Zusammensetzungen und Schichtdicken stets ident waren und bereits eine starke Abhängigkeit der Polymerisationsdauer von der Temperatur festgestellt wurde, sollte nun eine Mögliche Abhängigkeit der MIP – Struktur von der Reaktionstemperatur untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden mehrere QCM mit MIP gleicher Zusammensetzung aber unterschiedlicher Reaktionstemperatur beschichtet:

Nr.	PODS	DHEBA	MAA	LM (H ₂ O)	Melamin	Temperatur
1	5 mg	17 mg	8 µL	400 µL	1,5 mg	66 °C
2	5 mg	17 mg	8 µL	400 µL	1,5 mg	63 °C
3	5 mg	17 mg	8 µL	400 µL	1,5 mg	60 °C
4	5 mg	17 mg	8 µL	400 µL	1,5 mg	57 °C
5	5 mg	17 mg	8 µL	400 µL	1,5 mg	54 °C

Polymerzusammensetzung bei verschiedenen Temperaturen

Von allen Mischungen wurden je 5 µL auf QCM aufgetragen und bei 2000 rpm abgespinn, anschließend für eine Stunde bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet und bei Raumtemperatur mindestens über Nacht ausgehärtet. Gemessen wurden schließlich einige Konzentrationsabhängigkeiten auf Melamin sowie die Querselektivität auf Pyridin bei zwei verschiedenen Konzentrationen. Die Wahl fiel auf Pyridin, da es die stärkste aller getesteten Querselektivitäten zeigt (siehe 3.7).

Ergebnis der Konzentrationsabhängigkeit auf Melamin:

c [mg/L]	66 °C	63 °C	60 °C	57 °C	54 °C
20	650 Hz	40 Hz	160 Hz	140 Hz	115 Hz
50	1500 Hz	75 Hz	280 Hz	250 Hz	220 Hz
100	1700 Hz	150 Hz	310 Hz	500 Hz	300 Hz
200	2250 Hz	250v	580 Hz	650 Hz	460 Hz
500	-	290 Hz	910 Hz	1000 Hz	780 Hz

Temperatur – Signalabhängigkeit für Melamin

Bei den Werten in der Tabelle handelt es sich um die Frequenzänderung in Hertz nach Zugabe der jeweiligen Melaminkonzentration. Es zeigt sich, dass bei höheren Temperaturen wesentlich stärkere Signale zu erwarten sind. Die Versuche bei 63 °C passen nicht in dieses Bild, da die vorpolymerisierte Mischung zu früh aufgetragen wurde und deshalb zu wenige geeignete Imprints entstanden. Auf eine Wiederholung wurde aufgrund der anderen Ergebnisse und ihrer eindeutigen Tendenz verzichtet.

Graphisch dargestellt:

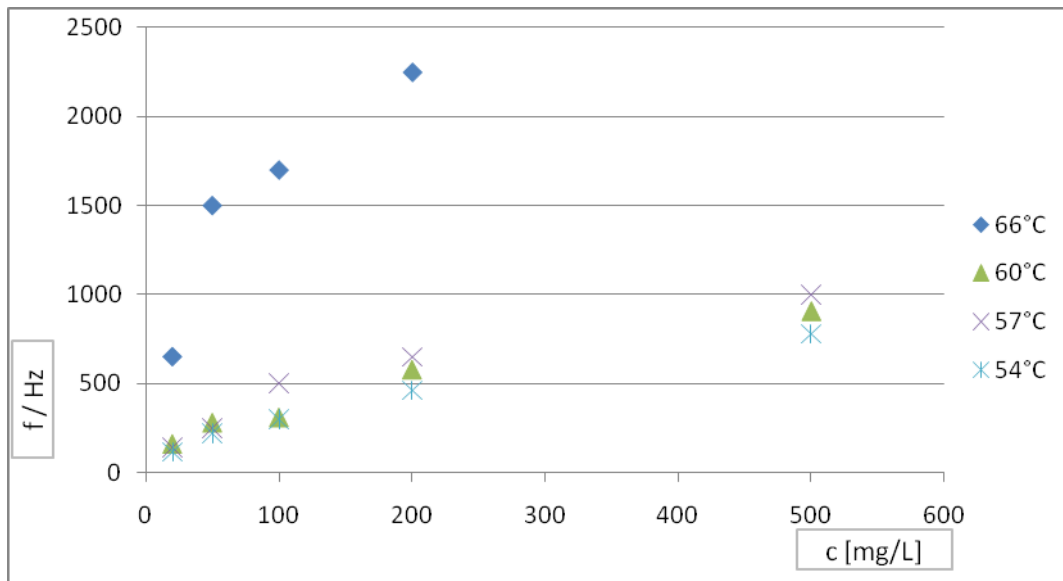


Abbildung 49: Temperatur – Signalabhängigkeit für Melamin

Es zeigt sich ein, in Abbildung 49 gut erkennbar, stärkeres Signal beim bei 66 °C polymerisierten MIP. Allerdings zeigt der Sensor auch ein wesentlich stärkeres Rauschen und rasche Sättigung. Die anderen Versuche zeigen weitgehend ähnliche Ergebnisse (die Schwankungen sind nicht unbedingt temperaturabhängig). Alle zeigen ein Langmuir – ähnliches Verhalten (siehe 2.2).

Ergebnisse für die Querselektivität auf Pyridin:

c [mg/L]	66 °C	60 °C	57 °C	54 °C
50	1600	85	80	110
100	2300	100	230	135

Temperatur – Signalabhängigkeit für Pyridin

Wie erwartet ist auch hier das Signal beim am höchsten temperierten MIP am größten. Aussagekräftiger ist jedoch das Verhältnis eines Sensors zwischen dem Signal von Melamin und jenem von Pyridin:

Signalverhältnis	66 °C	60 °C	57 °C	54 °C
mel50/pyr50	0,9	3,3	3,1	2,0
mel100/pyr100	0,7	3,1	2,2	2,2

Temperatur – Signalverhältnisse (Melamin : Pyridin bei 50 bzw. 100mg/L)

Je größer das Verhältnis zwischen Melamin- und Pyridinsignal, umso höher ist die Selektivität. Zum besseren Überblick sind die Signalverhältnisse in Abbildung 50 als Balkendiagramm dargestellt.

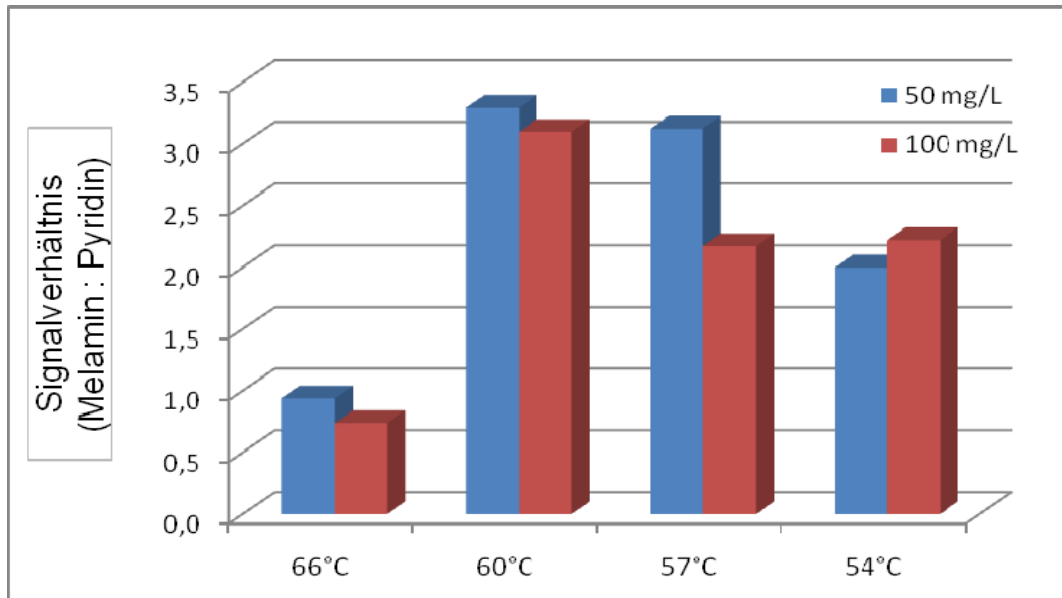


Abbildung 50: Signalverhältnisse bei 2 verschiedenen Konzentrationen (jeweils blau und rot) in Abhängigkeit der Polymerisationstemperatur

Auf dem Diagramm ist die mangelhafte Selektivität des MIP bei 66 °C klar zu erkennen. Grund hierfür ist die vermutlich zu schnelle Reaktion der Monomere, welche so keine Zeit finden sich ausreichend an den Analyten anzuformen. Das „poröse Gebilde“ härtet schließlich aus und zeigt zwar ein schnelles Ansprechverhalten im Bezug auf Melamin, da dieses aufgrund der höheren Porosität und damit verbundenen größeren inneren Oberfläche schnell und tief in die Schicht eindringen kann, jedoch zeigt sich das Verhalten auch bei anderen Molekülen wie beispielsweise beim getesteten Pyridin. In der Praxis erhält man für Pyridin bei gleicher Konzentration sogar ein stärkeres Signal als mit Melamin (siehe Abbildung 50: Verhältnis unter 1). Weiters zeigt es ein ungewöhnlich starkes Rauschen gegenüber allen bei niedriger Temperatur hergestellten Polymeren, was auf wesentlich geringere Quervernetzung und damit auch eingeschränkte Haltbarkeit schließen lässt.

4 Zusammenfassung

4.1 Deutsch

Melamin steht in letzter Zeit immer häufiger im Zusammenhang mit diversen Todesfällen bei Tier und Menschen durch Nierenversagen. Grund ist die absichtliche Beisetzung in diversen Lebensmitteln um einen erhöhten Eiweißgehalt und damit wertvollere Produkte vorzutäuschen.

Die derzeit übliche Analytik ist sehr aufwendig und teuer, weshalb das EU - Projekt „PHOTOSENS“ ins Leben gerufen wurde um unter Anderem einen günstigen Sensor für Melamin zu entwickeln. Die Detektion soll letzten Endes mittels optischer Methoden wie PC (Photonic Crystal) oder SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) erfolgen. Das Herzstück des Sensors ist eine molekular geprägte Polymerschicht, in welcher sich der Analyt erst anreichert um schließlich in ausreichender Konzentration für eine Messung vorzuliegen. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde eine solche Schicht in Form eines Copolymers aus Methacrylsäure und Dihydroxyethylenbisacrylamid entwickelt und mittels diverser Methoden wie Rasterkraftmikroskopie und Quarzmikrowaagen näher charakterisiert.

Alle getesteten Schichten zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit ähnlich einer Langmuir – Isotherme. Die Nachweisgrenze mittels Quarzmikrowaage liegt bei 1 mg/L. Jedoch hängt das Ansprechverhalten der molekular geprägten Schichten stark von der Polymerisationstemperatur ab. Zwischen 55°C und 65°C steigt die Signalstärke bei erhöhtem Rauschen auf das Vierfache an, aber Schichten zeigen praktisch keine Selektivität mehr.

Bei diversen Querselektivitätsmessungen konnten gute Ergebnisse erzielt werden, wobei saure oder zu große Moleküle wie Phenol bzw. Glukose kein Signal gaben und auch kleinere Moleküle mit basischen Gruppen (z.B. Anilin oder Pyridin) ein geringeres Signal als Melamin geben. Typische Selektivitätsfaktoren liegen hier zwischen 2,5 bei Pyridin und 4 bei Anilin.

4.2 English

Melamine has caused several fatalities among both humans and animals in the last years causing kidney malfunction. The reason for this is that it is intentionally added to food to simulate higher protein amounts and thus higher quality.

Current instrumental analytical methods for its detection are usually complex and expensive. Therefore the EU – project „PHOTOSENS“ was initiated to develop a low-cost sensor for melamine among other analytes with optical detection methods like Photonic Crystal (PC) and Surface Enhanced Raman Scattering (SERS).

Selectivity of those devices will be guaranteed by molecularly imprinted polymers that enrich the analyte to achieve high enough concentration for the measurement. In the course of this diploma thesis such a sensitive layer was realized in as a copolymer containing methacrylic acid and dihydroxyethylenebisacrylamide. It was characterized with several methods including atomic force microscopy and quartz crystal microbalance (QCM).

All tested layers showed Langmuir-type concentration dependence. The limit of detection while using a Quartz Crystal Microbalance was 1 mg/L. However, the sensitivity and selectivity of the molecularly imprinted polymers strongly depends on polymerization temperature: when changing from 55 °C to 65 °C, sensitivity increases by a factor of four, but selectivity is lost.

Cross selectivity tests showed very satisfying results where acid and large molecules like glucose and phenol give no signal. Even small analytes including alkaline groups (e.g. aniline and pyridine) showed substantially lower signal in comparison with melamine. Typical selectivity factors were about 2,5 for pyridine and 4 for aniline.

5 Chemikalien und Gerätschaften

Chemikalien:

Styrol pA (>99,5%): Fluka
Divenylbenzol zur Synthese: Merck
Lithiumhydroxide monohydrate, 98%: Alfa Aesar
Toluol, for analysis: EMSURE
7-Octenyldimethylchlorosilan: Lorenz Chemie Karlsruhe
MAA: Methacrylsäure 99%: Aldrich
AA: Acrylsäure 99%: Aldrich
EDMA: Ethylene glycol dimethacrylate 98%: Aldrich
DHEBA: Dihydroxyethylen-bisacrylamid p.A.: Alfa Aesar
MBA: N,N'-Methylenbisacrylamid p.A.: BDH Chemicals LM Poole England
AIBN: Azo-bis-(isobutyronitril) pA: Merck
PODS Natriumperoxodisulfat 98%: Fa.Merck
Melamin 99%: Alfa Aesar
Ammoniak 25%: AnalaR Normapur
184 Silicone Elastomer KIT: Sylgard (Silikonmischung für die Messzelle)
Azocol Poly-Plus S: KIWO (Diazo-UV-Polymer-Kopierschicht)
Glanzgoldpaste GGP 2093-12%: Heraeus
BSA: Albumin, from bovine serum: Sigma Aldrich
D(+)-Glukose-Monohydrat f.biochem.Zwecke: Fa.Merck
Phenol p.a.: Merck
Pyridin 99,8%: Aldrich
Mesitylen zur Synthese: Merck
Anilin zur Synthese: Merck
Piperidin zur Synthese: Merck
Cyanursäure >98%: Merck

Geräte:

AFM Multimode Veeco Probe Cp 1	AFM
Nikon Eclipse LW 100	Fluoreszenzmikroskop
Perkin Elmer Spektrum 100	FT-IR Spektrometer (mit ATR – Einheit)
Agilent 53131A Universal Counter	Frequenzzähler
Agilent E5062A (300 kHz – 3 GHz)	Netzwerkanalysator
Perkin Elmer LS50B	Fluoreszenzspektrometer

6 Literaturverzeichnis

- ¹Romer Labs Diagnostic GmbH: <http://www.romerlabs.com/en/analytes/other-analytes.html>
- ²Thieme Chemistry (Hrsg.): RÖMPP Online - Version 3.5. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2009.
- ³Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 72, Pg. 292, 1984
- ⁴Stiftung Warentest: „Melamin in Milchprodukten : Keine Panik“, Meldung vom 1. Oktober 2008
- ⁵David Bradley, „Melamine in milk“, Sciencebase 17 September 2008
- ⁶Weise Elizabeth „Poison pet food woes seem to hit cats harder“, USA Today. 5 August 2007
- ⁷Gang et al. „The risk of melamine-induced nephrolithiasis in young children starts at a lower intake level than recommended by the WHO“, Pediatric Nephrology Volume (2009)
- ⁸WHO: „International experts limit melamine levels in food“, Mitteilung vom 6. Juli 2010
- ⁹Ministerium für den ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden Württemberg: „Verbraucherministerium warnt vor chinesischen Bonbons 'White Rabbit'“, Pressemitteilung 222/2008
- ¹⁰Holger Knapp „Melamin in Lebens- und Futtermitteln“, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (2010)
- ¹¹Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde: Rundschreiben Nr. 435 vom 4.11.2008
- ¹²A.A. Babayan, A.V.Aleksandryan, „Toxicological characteristics of melamine cyanurate, melamine and cyanuric acid“, Zhurnal Eksperimental'noi i Klinicheskoi Meditsiny, Vol.25, 345-9 (1985)

- ¹³Lili He, Yang Liu, Mengshi Lin, Joseph Awika, David R. Ledoux, Hao Li, Azlin Mustapha,. „A new approach to measure melamine, cyanuric acid, and melamine cyanurate using surface enhanced Raman spectroscopy coupled with gold nanosubstrates“. Sensing & Instrumentation for Food Quality 2: 66–71 (2008)
- ¹⁴Ludwig Kratz: Die Glaselektrode und ihre Anwendungen, Frankfurt 1950
- ¹⁵R. Arshady and K. Mosbach „Synthesis of Substrate-Selective Polymers by Host-Guest Polymerization“ Makromol. Chem. 182, 687-692 (1981)..
- ¹⁶F.L. Dickert, R. Sikorski „Supramolecular strategiers in chemical sensing“ Materials Science and Engineering C 10 39-46 (1999)
- ¹⁷W.J. Whelan, G.A. Petsko, F. Ahmad, H. Bialy, S. Black, K. Brew, R. Fenna, S. Hassler and J. Hodgson, eds „Molecular Imprinting: Molecularly Imprinted Polymers - Their Use in Enantiomeric Resolution, as Antibody Binding Mimics and as Catalysts“ Protein Engineering, vol. 8, Oxford University Press, p. 54. K. Mosbach (1995)
- ¹⁸Mario Schäfer „Molecular Imprinting“, 11.07.2007
- ¹⁹Piletsky, S.A., Piletska, O.V., Turner, A.P.F., Dubey, I., Dubey, L. „Polymeric binding materials“ Polymeric binding materials US20090082480 (2009)
- ²⁰Olaf Lenz „Das Lennard-Jones-(12,6)-Potential“ created with xmgrace, 22.03.2007
- ²¹SecretDisc „AFM (used) cantilever in Scanning Electron Microscope“ 4.1.2008
- ²²Hans Flandorfer „Synthesemethoden der Festkörperchemie“ Vorlesungsunterlagen (2011)
- ²³I. Horcas¹, R. Fernández¹, J. M. Gómez-Rodríguez², J. Colchero³, J. Gómez-Herrero², and A. M. Baro⁴
„WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology“ Review of Scientific Instruments 78, 013705; doi:10.1063/1.2432410 (2007)

- ²⁴Curcio, M.; Puoci, F.; Cirillo, G.; Iemma, F.; Spizzirri, U. G.; Picci, N., „Selective Determination of Melamine in Aqueous Medium by Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction.“ *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (22), 11883-11887. (2010)
- ²⁵Pietrzyk, A., Kutner, W., Chitta, R., Zandler, M., D’Souza, F., Sannicolo, F., Mussini, P., „Melamine Acoustic Chemsensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Film“ *Analytical Chemistry*, Vol. 81, No.24, 10061 (2009)
- ²⁶Schirhagl, R., Podlipna, D., Lieberzeit, P., Dichert F., „Comparing biomimetic and biological receptors for insulin sensing“ *The Royal Society of Chemistry*, 46, 3128-3130 (2010)
- ²⁷Sussitz, H. „Mechanistische Studien zur Bakterienadsorption an strukturierten Polymeroberflächen mit AFM und QMB-Sensoren“ Diplomarbeit an der Universität Wien (2011)
- ²⁸Neumann, U., Khalaf, H., Rimpler, M., „Quantitation of proteins separated in N,N'-1,2-dihydroxyethylenebisacrylamide-crosslinkedpolyacrylamide gels“ *Analytical Biochemistry* Volume 206, Issue 1, (1992)

Weitere nicht konkret zitierte Angaben sowie einige der Abbildungen wurden aus Wikipedia übernommen. Die verwendeten Abbildungen, sofern keine Zitation vorliegend, sind allesamt „gemeinfrei“ da sie entweder nur Allgemeingut enthalten, die nötige Schöpfungshöhe nicht erreichen und/oder vom Autor explizit als solches gekennzeichnet wurden. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung aufgetreten sein, bitte ich um Meldung bei mir.

7 Lebenslauf

Name: Martin Zeilinger
Geburtsdatum und Ort: 22.05.1984 in Sankt Pölten
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

1990-1998 Öffentliche Volks- und Hauptschule, 3200 Obergrafendorf
1998-2004 HBLVA für chemische Industrie, 1170 Wien
(inkl. Diplomarbeit: „Schadstoffanalytik: Chlorphenole in Leder“)
2004-2005 Zivildienst beim Roten Kreuz als Einsatzfahrer und Sanitäter
seit 2005 Diplomstudium Chemie an der Universität Wien
01.02.2011 Beginn der Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie der
Universität Wien bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit

Berufserfahrung:

1. Qualitätssicherungslabor der Firma Teich AG in 3200 Weinburg
2. Produktion der WB Lederfabrik GmbH, 3150 Wilhelmsburg
3. Qualitätssicherung der Firma Austria Tabak in 1160 Wien
4. Blutplasma - Aufbereitung der Firma Baxter BioScience, Standort Wien
5. Technisches Labor der Fa. Rembrandtin, 1210 Wien
6. Qualitätssicherung der Fa. Shell - Austria, 1220 Wien
7. Prozesskontrolle der Fernwärme Wien (MVA Flötzersteig), 1160 Wien

Bei den angegebenen Firmen wurden jeweils 1-2 Monate Praktikum absolviert, wodurch vor allem Erfahrungen im Bereich der Analytik sowie Verfahrenstechnik gewonnen werden konnten.