



DISSERTATION

Molekular geprägte Materialien für die Sensorik mittels oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie sowie photonischen Kristallen

Verfasser

Mag. rer. nat. Martin Zeilinger

angestrebter akademischer Grad

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl: A 796 605 419

Dissertationsgebiet: Chemie

Betreuer: Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit

Vorwort

Diese Dissertation entstand im Zuge des EU-Projektes FP7-NMP-2010-Lagre-4-263382 „PHOTOSENS“ beginnend im Juli 2011. Neben Aufenthalten in Glasgow, Kuopio, Brüssel und Zürich wurde der überwiegende Teil der geistigen als auch experimentellen Arbeit am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Währingerstraße 38, A-1090 Wien unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit realisiert.

Danksagung

Besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Prof. Peter Lieberzeit, welcher stets darum bemüht war bei Problemen aller Art mit erstaunlich kreativen Ideen zur Seite zu stehen und mir gleichzeitig ein ungewöhnlich hohes Maß an Freiheiten gewährte.

Weiters danke ich der Europäischen Kommission für die finanzielle und organisatorische Verwirklichung des Projekts „PHOTOSENS“.

Darüber hinaus möchte ich Frau Prof. Margit Cichna-Markl für die Hilfe betreffend der Probenvorbereitung, meinem Kollegen Manuel Gintner, BSc für die Zusammenarbeit am SPR-Spektroskop sowie Dr. Stuart Pearce für die TEM Aufnahmen aus Southampton danken. Eine zusätzliche Hilfe waren die interessanten Diskussionen innerhalb der Arbeitsgruppe, allen voran mit Mag. Judith Wackerlig und Mag. Hermann Sussitz. Explizit erwähnen möchte ich Dr. David Eustace samt seinen Kollegen von Renishaw Diagnostics für die ausgesprochen freundliche Aufnahme in Glasgow sowie die daraus resultierende, überaus gewinnbringende Kooperation.

Ein spezieller Dank gebührt meiner Freundin sowie meiner Familie, deren Nerven vor allem in den letzten Jahren auf unterschiedlichste Weise strapaziert wurden.

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	3
DANKSAGUNG	3
INHALTSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	9
1.1 Problematik	9
1.2 Melamin	10
1.3 PHOTSENS – Ein Überblick	11
1.4 Zielsetzung	13
2 METHODENÜBERBLICK	15
2.1 Molekulares Prägen	15
2.2 Bildgebende Verfahren	19
2.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie	20
2.2.2 Rasterkraftmikroskopie	22
2.3 QCM	28
2.4 Photonische Kristalle	31
2.5 SPR	35
2.6 SERS	38
3 SYNTHESE MOLEKULAR GEPRÄGTER MATERIALIEN	41
3.1 Allgemein	41
3.2 Dünne Filme	43
3.2.1 Einleitung	43
3.2.2 Darstellung	45
3.2.3 Beschichtungstechnik	46
3.3 Nanopartikel	50
3.3.1 Einleitung	50
3.3.2 Darstellung der Partikel	51
3.3.3 Beschichtungstechnik	53

3.4 TiO₂-Partikel/MIP Kompositfilme	56
3.4.1 Einleitung	56
3.4.2 Darstellung und Beschichtungstechnik	56
3.4.2.1 Synthese der TiO ₂ Nanopartikel	56
3.4.2.2 Synthese der MIP Kompositfilme mit TiO ₂	57
3.5 Core-Shell Nanopartikel	59
3.5.1 Einleitung	59
3.5.2 Darstellung	60
3.5.2.1 Silanisierung	61
3.5.2.2 Synthese der Polymerhülle	62
3.5.3 Beschichtungstechnik	65
4 MESSUNGEN	67
4.1 Apparative Ausstattung	67
4.1.1 QCM	67
4.1.2 SPR	68
4.1.3 SERS	69
4.1.3.1 Mesophotonics SE1000	70
4.1.3.2 Thermo Nicolet Almega XR	71
4.1.3.3 Ramansignale von Melamin	72
4.2 Dünne Filme	74
4.2.1 QCM	74
4.2.1.1 Dünne Schichten im Vergleich mit früheren Messungen	74
4.2.1.2 Messungen in Realproben	78
4.2.1.3 Melamin-Protein Abhängigkeit	86
4.2.2 SPR	89
4.2.3 SERS	94
4.2.3.1 Dünne Filme mittels SE1000	94
4.2.3.2 Dünne Filme mittels Nicolet Almega XR	102
4.3 MIP Nanopartikel	112
4.3.1 QCM	112
4.3.1.1 Konzentrationsabhängigkeit	112
4.3.1.2 Querselektivität	115
4.3.2 SERS	117
4.4 Dünne Filme mit TiO₂ Anteil	122
4.5 Core – Shell Nanopartikel	126
4.5.1 QCM	126
4.5.1.1 Konzentrationsabhängigkeit	126
4.5.1.2 Querselektivität	129

5 VERGLEICH DER UNTERSCHIEDLICHEN MATERIALIEN	131
5.1 QCM Ergebnisse im Vergleich	131
5.1.1 QCM-Konzentrationsabhängigkeit	131
5.1.2 QCM-Querselektivität	133
5.2 SERS Ergebnisse im Vergleich	137
6 ZUSAMMENFASSUNG	141
6.1 Deutsch	141
6.2 English	142
7 ANHANG	143
7.1 Geräteverzeichnis	143
7.2 Chemikalienverzeichnis	144
7.3 Abkürzungsverzeichnis	145
7.4 Literaturverzeichnis	147
7.5 Lebenslauf	157

1 Einleitung

1.1 Problematik

In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden diverse Entwicklungen der Analytischen Chemie vorangetrieben ohne immer notwendigerweise auf mögliche Vernetzungsmöglichkeiten untereinander zu achten.

Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang molekular geprägte Polymere (MIP)¹, welche außerhalb chromatographischer Trenntechniken und einigen verwandten Anwendungen zur Probenvorbereitung wie der Solid Phase Extraktion kaum genutzt werden. Besonders der Einsatz in Kombination mit spektroskopischen Detektionsmethoden erscheint schwierig, da diese Materialien über keine herausragenden optischen Eigenschaften verfügen und meist in Pulverform hergestellt, verwendet und auch erforscht wurden.

Mit den seit einigen Jahren auf der Basis von Quarzmikrowagen (QCM) entwickelten Sensoren, welche sich ebenso die Eigenschaften von MIP zu Nutze machen, stehen ebenso bekannte und gut charakterisierte Materialien zur Verfügung, welche kombinationsfähiger erscheinen. Der Sensortyp konnte sich im Bereich der Spurenanalytik für Gase begrenzt durchsetzen², blieb aber trotz intensivster Forschung ein Nischenprodukt und wird für Messungen in Flüssigphase erst seit kurzem kommerzialisiert.³ Das anhand der QCM-Forschungen gewonnene Wissen kann dennoch helfen um auf raschem Wege neue Sensoren zu entwickeln: Sowohl die häufig verwendeten dünnen Filme (Polymerschichten im unteren 3-stelligen Nanometerbereich) als auch molekular geprägte Nanopartikel können der Schlüssel zu einer erfolgreichen Kombination mit optischen Detektionsmethoden sein, da sie nicht nur gezielt in geringer Schichtdicke auf diverse Substrate aufgebracht werden können, sondern ebenso über bessere optische Eigenschaften gegenüber den für Chromatographie üblichen Materialien verfügen.

Moderne Analytische Chemie ohne Trenntechnik und Massenspektrometer ist de facto nicht vorstellbar⁴. Die Nachteile dieser Methoden sind jedoch zum einen der hohe Preis und zum anderen die vergleichsweise lange Analysendauer. Des

Weiteren wird vergleichsweise hoch qualifiziertes Personal benötigt um diese komplexen Gerätschaften erfolgreich betreiben zu können sowie, trotz diverser Bemühungen, immer noch große Mengen an teils umweltschädlichen und teuren Lösungsmitteln. All dies führt unter anderem dazu, dass Analysen in gewissen Bereichen entweder gar nicht oder nur sehr eingeschränkt in Form von Stichproben stattfinden können. In vielen Entwicklungsstaaten sind daher, wenn überhaupt, nur sehr eingeschränkte Lebensmittelkontrollen möglich. Dadurch kommt es immer wieder zu Todesfällen durch kontaminierte Lebensmittel, welche in den Staaten der Ersten Welt mittlerweile undenkbar sind.⁵ Hier würde bereits eine günstige Screeningmethode Abhilfe schaffen.

1.2 Melamin

Neben den bekannten Fällen von Lebensmittelvergiftungen durch Melamin⁶ gibt es einige Schattenseiten, welche medial nicht in dem Maße präsent sind, wie beispielsweise die in China vollstreckten Todesurteile gegen angeblich verantwortliche Produktionsleiter oder den hauptsächlich in den USA bekannt gewordenen Melaminskandal betreffend Haustiernahrung. Laut Untersuchungen der Universität für Bodenkultur Wien wurde nach dem Bekanntwerden diverser Fälle in Europa mit Melamin kontaminiertes Milchpulver offensichtlich bewusst aus China in Entwicklungsstaaten Afrikas exportiert. Erhebliche Konzentrationen der Verbindung wurden auch in Babynahrung gefunden, was aufgrund der Anatomie und Ernährung von Babys und Kleinkindern besonders fatale Folgen haben kann. Die Problematik besteht nun vor allem darin, dass weder staatliche noch private Stellen in den betreffenden Ländern über geeignete Analysemethoden verfügen, um auch nur annähernd in der Lage zu sein die Missstände aufzudecken. Die Funde waren reiner Zufall und gehen auf das persönliche Engagement einer Mitarbeiterin der BOKU zurück. Es ist daher völlig unbekannt in welchen Mengen und in welchen weiteren Staaten und Kontinenten mit Melamin verseuchte Lebensmittel exportiert wurden und bis dato werden. Es muss auch angemerkt werden, dass eine flächendeckende Kontrolle mit den vorhandenen analytischen Methoden in Österreich derzeit nur schwierig möglich wäre, falls Bedarf entstehen sollte.

1.3 PHOTOLENS – Ein Überblick

Das EU-Projekt „PHOTOLENS“ hat sich nun zum Ziel gesetzt neuartige, möglichst kosten- und zeiteffektive Analysemethoden zu entwickeln, um Alternativen zu den etablierten, äußerst leistungsfähigen aber aufwendigen und teuren Methoden wie HPLC-MS (high performance liquid chromatography-mass spectrometry) bereitzustellen.⁷

Hierfür wurden drei Beispielanalyte gewählt, welche die möglichen zukünftigen Einsatzbereiche möglichst vollständig abdecken sollen. In dieser Arbeit wird primär Melamin behandelt, welches von diversen Lebensmittelskandalen bekannt ist. Die weiteren Analyte sind Ibuprofen (pharmazeutische Anwendungen) und Formaldehyd (Schadstoffanalytik in der Gasphase). Letzteres soll mittels photonischer Kristalle (PC), Melamin und Ibuprofen mittels SERS detektiert werden.

Neben der Kombination von funktionalisierten Polymeren (Universität Wien, TNO) und z.B. bereits kommerziell erhältlichen SERS-Substraten (Klarite® Substrate von Renishaw Diagnostics) ist auch die Entwicklung eines Sensors auf Basis photonischer Kristalle (University of Southampton) sowie eine spürbare Kostensenkung im Herstellungsprozess durch die Verwendung neuer Materialien und Drucktechniken Ziel des Projekts (VTT, Nanocomp, 3D AG, Momentive). Zusätzlich sollen die zur Auswertung nötigen Spektrometer nach Möglichkeit miniaturisiert werden, wobei die neuartigen Substrate als Lichtleiter Verwendung finden können um ohne aufwendige Optiken einen verlustarmen und gezielten Eintrag der Anregungsstrahlung zu erreichen. Hierfür ist mit Phillips neben Renishaw Diagnostics ein weiterer wichtiger Industriepartner am Projekt beteiligt (ein Überblick findet sich in Abbildung 1).

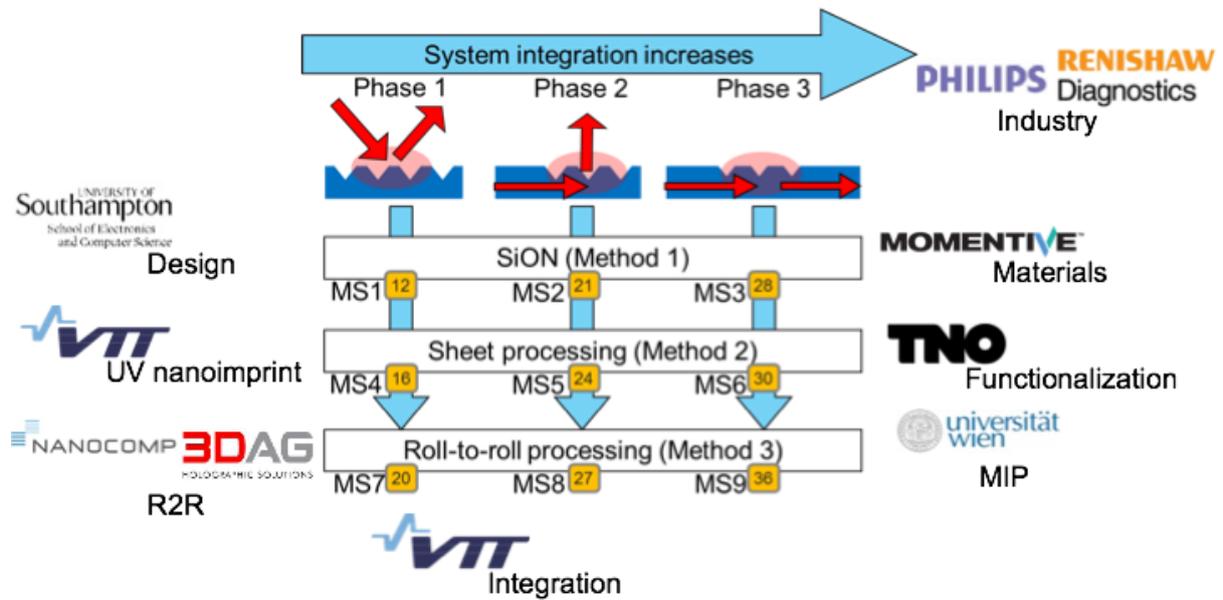


Abbildung 1: Kompetenzen der jeweiligen „PHOTOSENS“ Projektpartner

Natürlich ist es ein ebenso deklariertes Ziel eines EU-Projektes die Zusammenarbeit zwischen den einzelnen Partnern und Ländern zu fördern.⁸ Allein im Rahmen dieser Dissertation kam es zur direkten Zusammenarbeit mit Nanocomp, VTT, TNO, Momentive, der University of Southampton und Renishaw Diagnostics. Ohne diese Kooperationen wäre die entstandene Arbeit nicht realisierbar gewesen.

“Renishaw Diagnostics is expecting new materials and sensors developed in the project to revolutionize photonics sensing applications”

Dr. David Eustace from Renishaw Diagnostics

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten primär die notwendigen sensitiven Materialien für die selektive Erkennung für den Analyten Melamin entwickelt, und diese mit dem im Rahmen des Projekts vorgesehenen Detektionsprinzip der oberflächenverstärkten Raman Streuung kombiniert werden. Hierfür kommen verschiedene funktionalisierte Materialien wie dünne Filme oder funktionalisierte Nanopartikel in Frage. Die entwickelten Polymere sollen mittels QCM weitestmöglich charakterisiert werden um diese Ergebnisse mit jenen der neuartigen SERS Messungen vergleichen zu können bzw. schon zuvor abzuklären, ob eine Kombination überhaupt zum erhofften Messsignal führen kann. Durch den nachträglich entsprechenden Bedarf wurden auch einige Materialien als Prototyp für PC entwickelt und mittels QCM getestet.

Die wissenschaftlich betrachtet interessanteste Neuerung bleibt ohne Zweifel die Erforschung der neuartigen Kombination zwischen MIP und SERS für den Analyten Melamin zur Lebensmittelkontrolle (Abbildung 2).

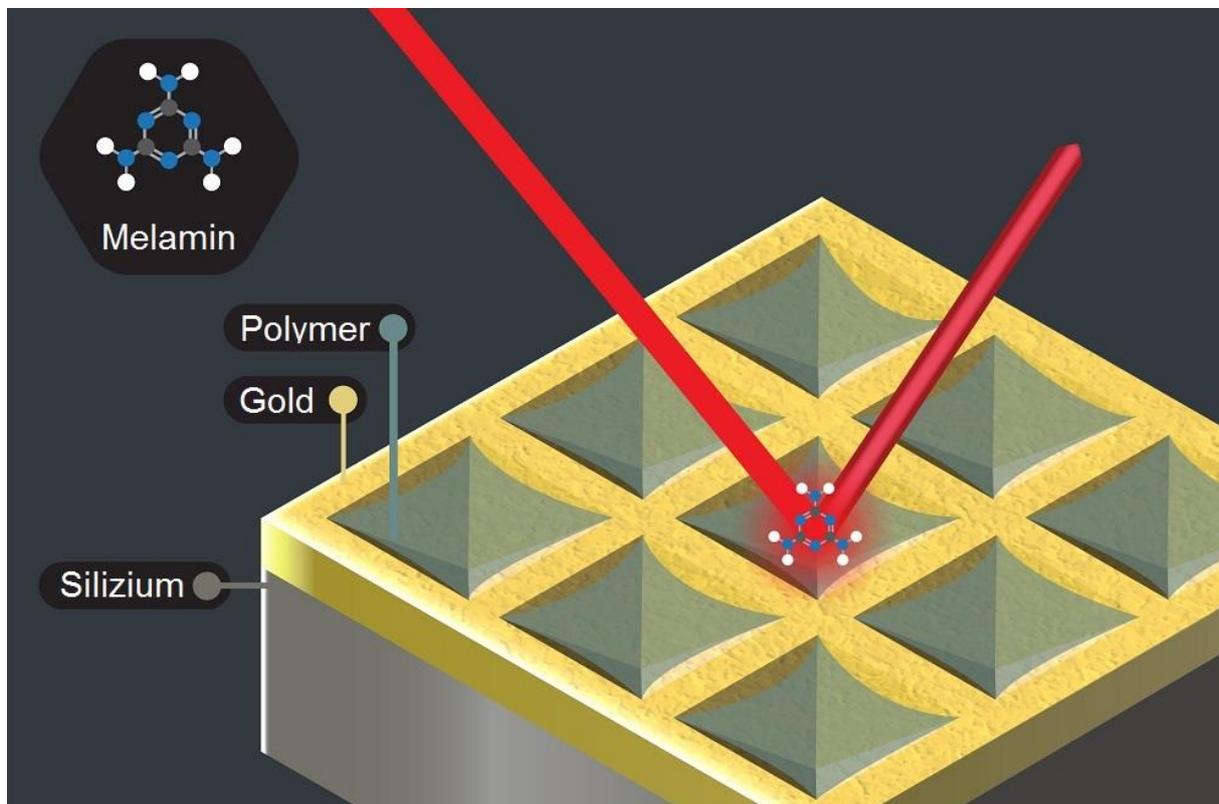


Abbildung 2: Konzept der MIP-SERS Kombination zur Detektion von Melamin.

2 Methodenüberblick

2.1 Molekulares Prägen

Die ersten erfolgreichen Experimente über Molecular Imprinting fanden bereits 1931 unter M. V. Polyakov statt.⁹ Hierbei wurde anhand von Kieselgel festgestellt, dass dieses verstärkt Benzenmoleküle aufnimmt, wenn dieses Lösungsmittel bereits während der Synthese des Gels zugesetzt wurde. Das erste Patent entstand unter der Regie der Firma Merck und beschrieb die Herstellung von molekular geprägtem Silikagel zur Bindung des Nikotins aus Tabakrauch. Diese neuen Zigarettenfilter waren durch die erhöhte Anzahl an künstlich geschaffenen Kavitäten in der Lage um 10,7 % mehr Nikotin aufzunehmen als die konventionell synthetisierte Variante.¹⁰ Seit diesem Patent des Jahres 1965 stieg die Entwicklung verschiedenster molekular geprägter Materialien vor allem im Bereich der wesentlich variableren organischen Polymere stark an.

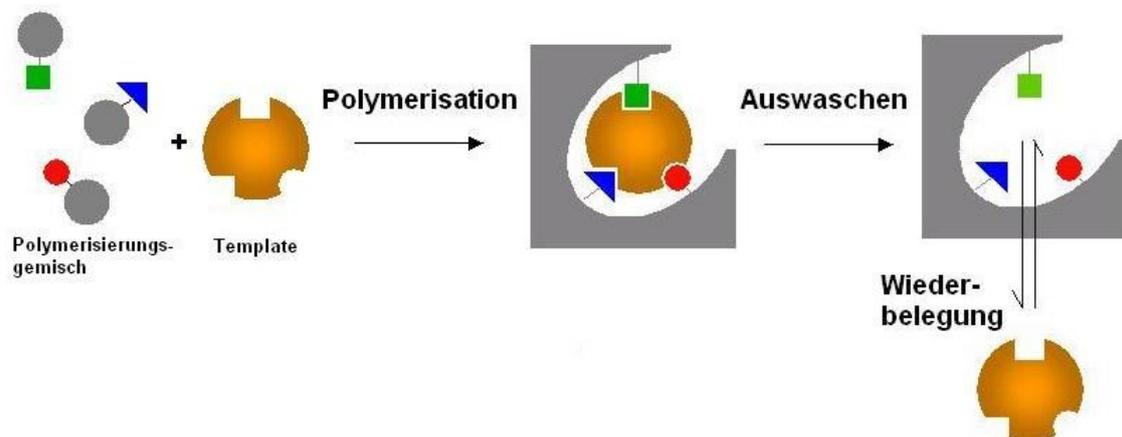


Abbildung 3: Beispiel eines molekular geprägten Polymers mit drei unterschiedlichen funktionellen Monomerbausteinen¹¹

Die Grundlagen für diese Entwicklungen basieren auf in der Natur vorkommenden Phänomenen wie der Bindung von Antikörpern an Antigenen oder der Enzym-Substrat Wechselwirkung. Es handelt sich folglich um ein Schlüssel-Schloss Prinzip, wobei die große Herausforderung der modernen Chemie darin besteht ein künstliches Polymer zu schaffen, welches die Eigenschaft besitzt das Zielmolekül

möglichst sensitiv und selektiv ein- sowie auszulagern. Das Prinzip ist in Abbildung 3 mit drei unterschiedlichen funktionellen Monomeren zu sehen, wobei ebenso Varianten mit nur einem Rezeptortyp üblich sind.

Im Gegensatz zu den von der Natur bekannten Antikörpern geschieht dieser Optimierungsprozess jedoch nicht durch „trial and error“ möglichst vieler unterschiedlicher Varianten sondern durch die intelligente Wahl geeigneter Monomere, welche eine möglichst hohe Affinität gegenüber dem Zielmolekül aufweisen müssen. Versuchsreihen mit teilweise Dutzenden unterschiedlicher Polymertypen gehören der Vergangenheit an und werden anhand bereits in der Literatur verfügbarer Beispiele, moderner Computersimulationsprogramme und vor allem durch das chemische Verständnis des zuständigen Wissenschaftlers ersetzt. Durch die moderne Chemie steht ein scheinbar unbegrenztes Sortiment an funktionellen Monomeren sowie Quervernetzern zur Verfügung, womit für praktisch jedes Molekül eine oder mehrere passende Kombinationen für ein MIP gewählt werden können.

Bei der Wahl der funktionellen Monomereinheiten ist zu beachten, dass die jeweiligen Bindungen nicht zu stark sein dürfen, da beispielsweise ein kovalent gebundenes Templatmolekül nicht aus der Polymermatrix ausgewaschen werden und dadurch mangels leerer Kavitäten kein geeignetes molekular geprägtes Polymer (MIP) entstehen kann. Von Interesse sind Wechselwirkungen im Bereich der Van der Waals Kräfte (bis 10 kJ/mol), π - π -Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen (bis ca. 40 kJ/mol). Die Monomere lagern sich bereits vor der eigentlichen Polymerisation an das Zielmolekül (den Analyten) an. Es kommt folglich zu einer supramolekularen Selbstassemblierung (self-assembly), die ein reversibles System bildet, welches erst durch die Vernetzung während der Polymerisation fixiert wird (siehe Abbildung 3).

Eine weitere, oft vernachlässigte, Bedeutung wird dem Quervernetzer zuteil. Dieser muss grundsätzlich im Lösungsmittel der funktionellen Monomere sowie des Zielmoleküls gelöst werden können, wobei dieses bei vielen Anwendungen speziellen Herausforderungen gerecht werden muss. Zu beachten sind hierbei physikalische Eigenschaften wie Viskosität und Siedepunkt, falls das geprägte

Polymer in Form einer dünnen Schicht aufgetragen werden soll, als auch Toxizität oder Entsorgungsprobleme, sofern eine Produktion größeren Maßstabs angedacht ist. Im Optimalfall besitzt auch der Quervernetzer eine gewisse Affinität zum Zielmolekül.

Zuletzt müssen Polymerisationsdauer sowie Temperatur bedacht werden, da insbesondere bei radikalischen Polymeren sowohl zu schnelle Reaktionen, als auch zu hohe Temperaturen zu unbrauchbaren Kavitäten führen können. Mögliche Variablen sind hier die Menge sowie Art des Startreagens, welches üblicherweise thermisch oder mittels UV-Licht die Polymerisation in Gang setzt. Die Wahl wird wiederum durch die beschränkte Löslichkeit sowie gegebenenfalls eingeschränkte Lager- bzw. Transportmöglichkeiten eingeschränkt, wenn es sich um Produktionen außerhalb des universitären Forschungsbetriebs handelt. Als Beispiel sei Azo-bis-(isobutyronitril) genannt, welches aufgrund von Vorschriften der EU (Lagerung bei 2-8°C, Transport in einem Fahrzeug mit doppeltem Kühlkreislauf) kaum noch verwendet und weitgehend durch Dicumylperoxid ersetzt wird.

Die Lösungsmittel während der Polymerisation, dem Auswaschschritt sowie der eigentlichen Anwendung können, müssen sich aber nicht unterscheiden. Möglich sind MIP, bei welchen der Analyt nur mit einem speziellen Lösungsmittelgemisch ausgewaschen werden kann, wobei die Anreicherung beim Einlagerungsschritt maximiert wird.

Generell können unterschiedliche Probleme bei dem Extraktionsschritt auftreten, welche in Abbildung 4 schematisch aufgezählt sind. Im Idealfall wird lediglich das Templatmolekül entfernt ohne die Struktur der umgebenden Polymermatrix wesentlich zu verändern. Möglich sind jedoch unterschiedliche Problemfälle wie das Zusammenziehen oder eine Ausdehnung der Kavitäten, wodurch eine Wiedereinlagerung von Zielmolekül erschwert wird. Dies ist im Wesentlichen der Grund für den hohen Anteil an Quervernetzer bei molekular geprägten Polymeren, welcher das umgebende Gerüst so weit stabilisiert, dass es zu keinen wesentlichen Veränderungen während des Einsatzes kommt.

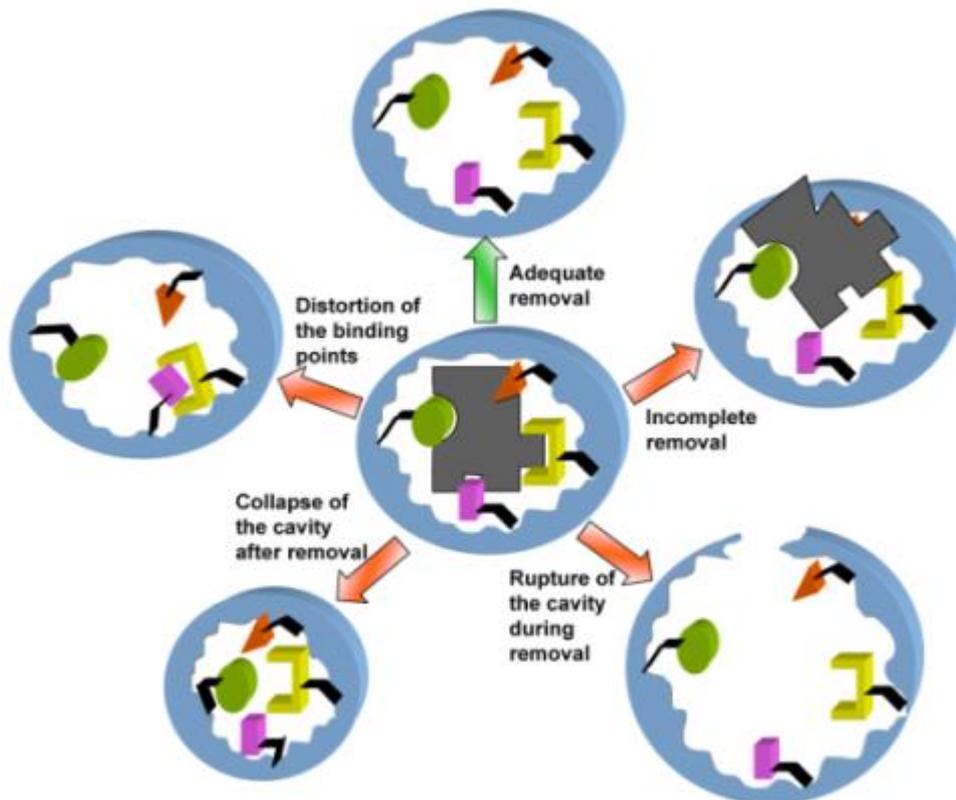


Abbildung 4: Verschiedene Probleme nach dem Auswaschen des Templates, wodurch die Funktion des MIP verloren geht oder zumindest eingeschränkt wird.¹²

Neben dem missglückten Auswaschen des Templates besteht auch noch die Möglichkeit, dass sich unterschiedliche funktionelle Gruppen der Monomere untereinander oder auch mit einem der verwendeten Lösungsmittel (nicht in der Abbildung) vernetzen und dadurch irreversibel unbrauchbar werden. Daher ist besonders auf die Kombination der Monomereinheiten zu achten, wobei diese für gewöhnlich bereits bei der Polymersynthese in Wechselwirkung treten würden und nicht erst beim Entfernen des Template-Moleküls.

Zum Einsatz kommen molekular geprägte Materialien in der Analytischen Chemie primär im Bereich der Trenntechnik (HPLC, UHPLC) sowie der Probenvorbereitung (SPE, SPME). Wichtige präparative Anwendungen sind die Reinigung von Chemikalien sowie die Trennung von Racematen im pharmazeutischen Bereich.¹³

2.2 Bildgebende Verfahren

Das Auflösungsvermögen optischer Lichtmikroskope ist durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts beschränkt (200-300 nm). Deshalb wird ständig versucht Methoden zu entwickeln, um diesen limitierenden Faktor zu umgehen. Das bereits 1931 entwickelte Elektronenmikroskop¹⁴ verwendet einen Elektronenstrahl anstelle der Photonen, wodurch sich die Wellenlänge durch Erhöhung der Energie theoretisch beliebig verkürzen lässt. Praktisch führen zu energiereiche Elektronenstrahlen jedoch zu einer Zerstörung der Probe.¹⁵ Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geometrie eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) wird aufgrund ihrer Bedeutung zur Charakterisierung der in Kapitel 3.5 dargestellten Core-Shell Nanopartikel im Anschluss näher beschrieben.^{16,17} Verglichen mit optischen Mikroskopen handelt es sich um ein Durchlichtmikroskop mit Elektronen anstelle der Photonen, während die Rasterelektronenmikroskopie (SEM) auch massive Proben abbilden kann, indem Sekundär-, Auger-, und rückgestreute Elektronen sowie entstehende Röntgen-, als auch Bremsstrahlung sowie Kathodolumineszenz detektiert werden können.

Der historisch betrachtet nächste bedeutende Schritt war 1981 die Einführung der Rastersondenmikroskopie in Form des Rastertunnelmikroskops (STM).¹⁸ Hierbei wird eine Metallspitze (aus Wolfram, Platinlegierungen oder Gold) als Sonde, welche im Idealfall in einem einzelnen Atom endet, in konstantem Abstand über die Probe geführt ohne diese zu berühren. Zwischen der obligatorisch elektrisch leitenden Oberfläche und der Spitze wird eine Spannung angelegt, wodurch ein Tunnelstrom fließt, welcher direkt vom Abstand zwischen Probe und Spitze abhängig ist. Durch Höhenänderungen der Sonde oder des Probenstückes wird der Stromfluss konstant gehalten und ein entsprechendes Oberflächenprofil wiedergegeben (constant current method, $I = \text{konstant}$). Bei sehr ebenen Materialien besteht zusätzlich die Möglichkeit die Höhe konstant zu halten und den sich verändernden Tunnelstrom aufzuzeichnen (constant height method, $z = \text{konstant}$). Hierbei besteht allerdings die Gefahr, dass die Spitze durch eine Kollision mit der Probe beschädigt wird. In jedem Fall geschieht das Abtasten der Probe zeilenweise, also in Form eines Rasters.

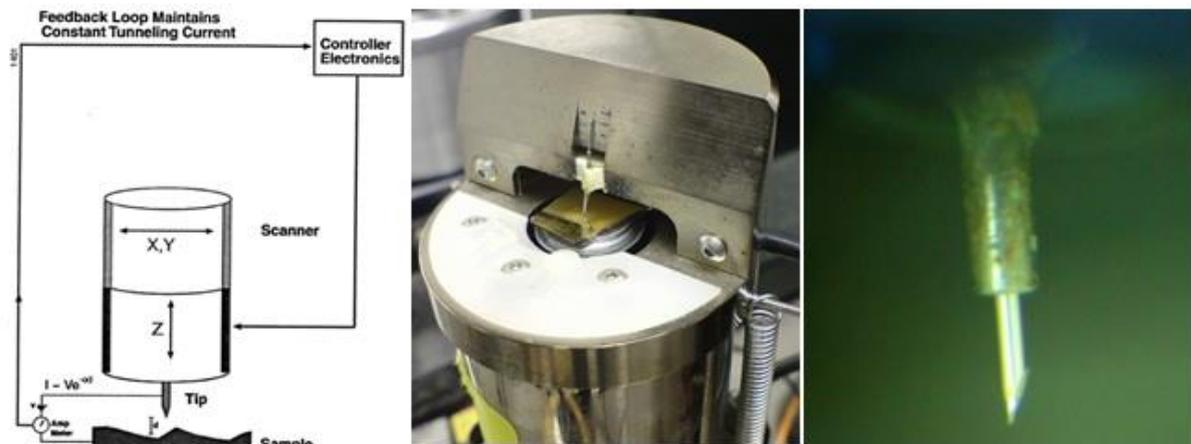


Abbildung 5: STM Prinzip (links), das am Analytischen Institut der Universität Wien vorhandene Gerät mit einer vergoldeten Probe (mitte) und die nasschemisch geätzte zugehörige Wolframspitze im Detail (rechts).

Die größte Herausforderung war die Sicherstellung kleinster Bewegungen in der Größenordnung einzelner Atome oder darunter. Dies wurde durch Piezoelemente ermöglicht.¹⁹ Ein Nachteil der Rastertunnelmikroskopie ist durch die Notwendigkeit gegeben, dass die Probe eine elektrisch leitende Oberfläche besitzen muss. Aufgrund dieses Defizits wurden Techniken etabliert, welche sich andere Wechselwirkungen zwischen Probe und Sonde zu Nutze machen. Neben der im Anschluss näher beschriebenen Rasterkraftmikroskopie (AFM)²⁰ sowie Magnetkraftmikroskopie (MFM)²¹ und der optischen Rasternahfeldmikroskopie (SNOM)²² gibt es noch eine Vielzahl von auf dem Prinzip der Rastersondenmikroskopie basierenden Spezialanwendungen, wie beispielsweise akustische und chemische Kraftmikroskopie sowie Reibungskraftmessungen und Strom-Spannungs-Mikroskopie.

2.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Unter den Elektronenmikroskopen bildet das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) neben dem Rasterelektronenmikroskop den zweiten wesentlichen Grundtyp. Gemessen werden jene Elektronen, die das zu messende Objekt durchstrahlen. Um dies zu ermöglichen muss die Probe im Gegensatz zur SEM sehr dünn sein (je nach Material und verwendetem Gerät zwischen wenigen Nanometern bis hin zu mehreren Mikrometern, typisch 10 bis 100 nm). Die aktuelle Auflösungsgrenze liegt bei 0,05 nm.²³ Der Elektronenstrahl wird mittels einer Spannung von 80-400 kV durch

den evakuierten Strahlengang beschleunigt um nicht von Luftmolekülen abgelenkt zu werden. Aufwendige Kondensor-Linsensysteme bewirken, dass der abzubildende Abschnitt von parallel eintretenden Elektronenstrahlen ausgeleuchtet wird. Bei nicht kristallinen Materialien wie biologischen Proben oder Polymeren werden die Elektronen primär aufgrund der Rutherford- sowie inelastischer Streuung abgelenkt. Die elastisch gestreuten Elektronen werden nun hinter dem Objektiv (siehe Abbildung 6) fokussiert. Eine Blende ermöglicht es nur jene Elektronen passieren zu lassen, welche nicht gestreut wurden.

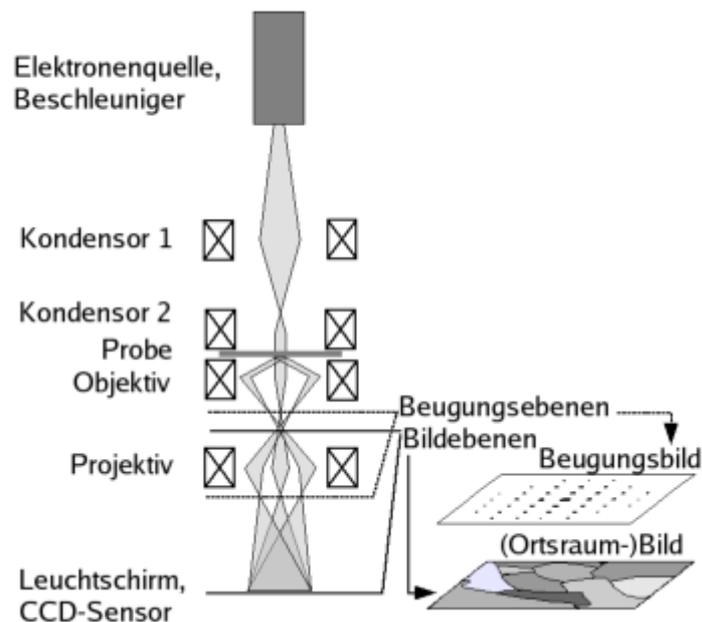


Abbildung 6: Prinzip eines TEM.²⁴

Das Projektiv bewirkt nun eine zusätzliche Vergrößerung des vom Objektiv gelieferten Bildes und gibt dieses an den Detektor weiter. Im einfachsten Fall handelt es sich um einen mit Zinksulfid beschichteten fluoreszierenden Schirm zur direkten Beobachtung. Soll das Bild aufgezeichnet werden müssen die Elektronenstrahlen erst mittels Szintillator in Lichtimpulse umgewandelt und anschließend mit Hilfe von Lichtleiterfaserbündeln zu einem CCD-Chip weitergegeben werden, da direkte Elektronenstrahlung die Fotodioden des Bildsensors zerstören würde.

2.2.2 Rasterkraftmikroskopie

Rasterkraftmikroskopie (AFM) ist eine Unterart der Rastersondenmikroskopie, welche aus der Rastertunnelmikroskopie entwickelt wurde um auch elektrisch nichtleitende Proben untersuchen zu können ohne diese zuvor mit Metall zu beschichten (z.B. mittels Sputtern). Aufgrund des unvermeidbaren Verlustes an Auflösung beim Beschichten von Oberflächen sowie der Tatsache, dass viele Proben durch den Vorgang zerstört werden (insbesondere biologische Proben wie Proteine), wurde diese Entwicklung bereits fünf Jahre nach dem STM im Jahr 1986 realisiert.²⁵ Hierfür wird eine möglichst kleine Spitze, an einer flexiblen Blattfeder, dem sogenannten Cantilever, angebracht und Zeile für Zeile über die Probenoberfläche geführt. Im Idealfall befindet sich am Ende dieser Spitze ein einzelnes Atom (siehe Abbildung 7). Dies lässt sich auch dadurch erreichen, dass ein einzelnes Kohlenmonoxid Molekül an der Spitze immobilisiert wird.²⁶ Mittels einer derart modifizierten Spitze gelang 2012 die Aufnahme einzelner Atombindungen im non contact mode.²⁷ Neben den bildgebenden Techniken besteht die Möglichkeit zu spektroskopischen Verfahren, wobei die Kräfte an bestimmten Punkten einer Probe gemessen werden. Hierbei ist es möglich gezielt Wechselwirkungen unterschiedlicher, an der Spitze gebundener Moleküle mit der Oberfläche zu messen. Untersucht wurden beispielsweise die Kraft-Abstands-Kurven von Proteinen bei der künstlich herbeigeführten Entfaltung.²⁸

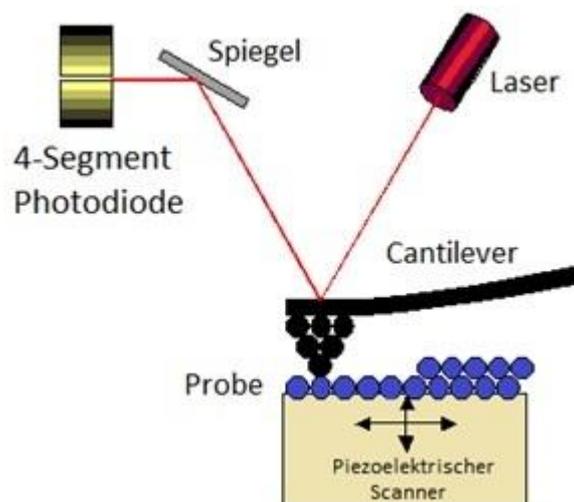


Abbildung 7: Prinzipieller Aufbau eines AFM

Die Bewegungen werden wie gehabt von einem piezoelektrischen Scanner durchgeführt, welcher entweder die Spitze selbst oder den Probenstisch bewegt. Im

Unterschied zum STM wird jedoch kein Tunnelstrom gemessen, sondern die mechanische Auslenkung des Cantilevers mittels eines reflektierten Lasers und einer Multifotodiode (2 oder 4 Segmente). Durch den langen Weg des Lichts vom Cantilever zur Diode bewirkt eine kleine Auslenkung der Spitze eine große Änderung des reflektierten Lichtstrahls an der Fotodiode. Diese Anordnung ermöglicht es kleinste Bewegungen der Spitze im atomaren Maßstab wahrzunehmen, erfordert jedoch eine exakte Positionierung des Lasers auf der Spitze und der Fotodiode exakt zentral auf dem reflektierten Lichtstrahl (siehe Abbildung 8).

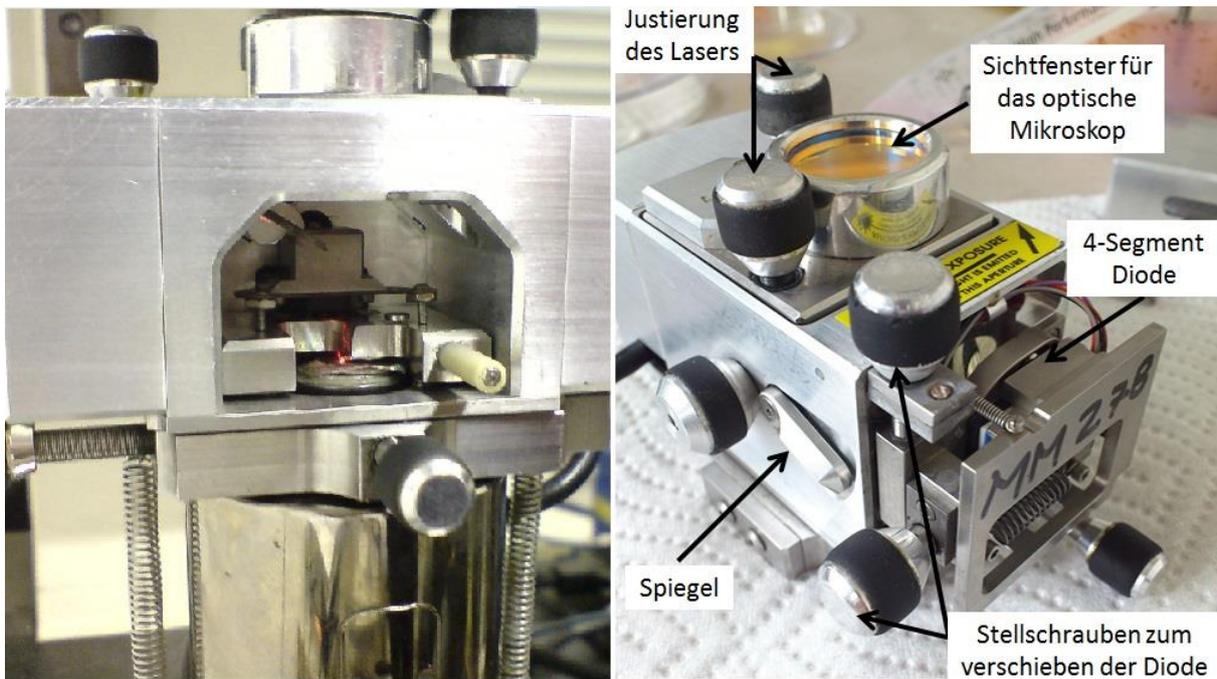


Abbildung 8: Das im Rahmen dieser Dissertation verwendete Nanoscope IV in Aktion (links, der Laserstrahl ist am Cantilever und am Spiegel zu erkennen) und bei einer Wartung mit geöffneter Abdeckung der Stellmechanik für die Justierung der Diode (rechts). Zur groben Annäherung der Spitze an die Probenoberfläche dient in diesem Fall ein Auflichtmikroskop.

Der Zusammenhang zwischen der Auslenkung und der auftretenden Kraft ist durch das Hook'sche Federgesetz gegeben:

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

F = Kraft

Δx = Änderung der Auslenkung

k = Federkonstante

Die Spitze wird durch diverse anziehende (Van-der-Waals- und Kapillarkräfte sowie Dipolwechselwirkungen) und abstoßende Kräfte seitens der Oberfläche beeinflusst (Abstoßungen durch das Pauli Prinzip, die Coulomb Abstoßung der Kernladung). All diese Kräfte können im Lennard Jones Potential zusammengefasst werden (Abbildung 9).

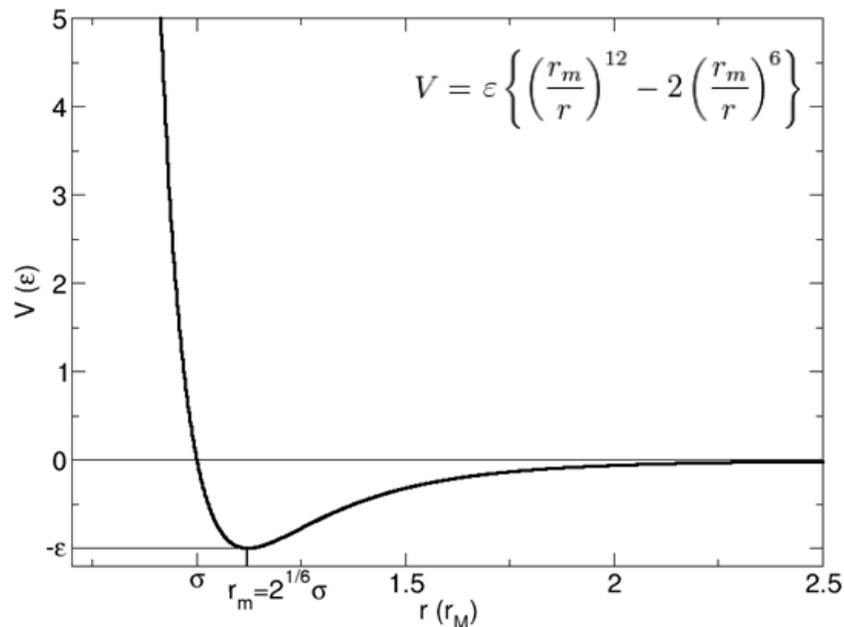


Abbildung 9: Das Lennard-Jones-(12,6)-Potential. Hierbei ist V das Potential, r der Abstand zwischen den Teilchen und r_m der Abstand des Energieminimums zum Ursprung. ϵ entspricht der Tiefe der Potentialmulde. σ entspricht jenem Abstand, an dem das Lennard Jones Potential einen Wert von Null erreicht.

Anhand der genutzten Wechselwirkungen wird unter drei verschiedenen Möglichkeiten ein AFM zu betreiben unterschieden: contact mode, non contact mode und tapping mode. Beim am häufigsten verwendeten contact mode berührt die Spitze permanent die Oberfläche, beim non contact mode ist der Abstand bereits so groß, dass die anziehenden Kräfte überwiegen.

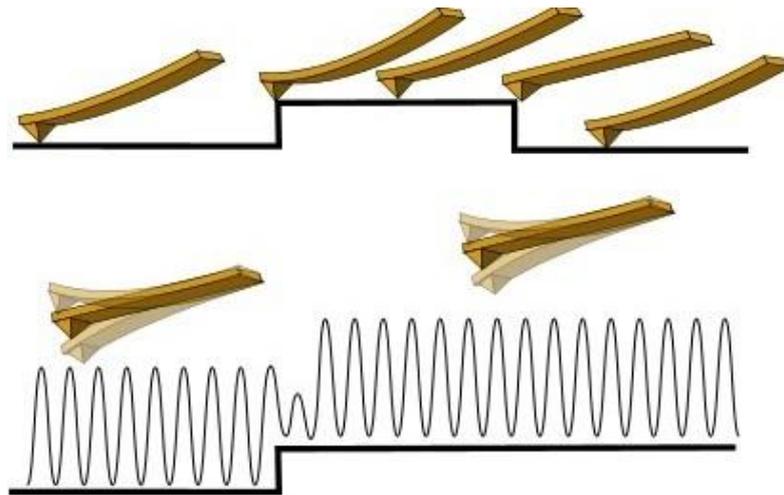


Abbildung 10: Durch die Erhebung verändert sich die Biegung des Cantilevers (oben, contact mode) oder die Resonanzfrequenz (unten, non contact mode). In jedem Fall wird der Abstand zwischen Spitze und Probe mittels Piezoscanner korrigiert, damit der Cantilever wieder seinen ursprünglichen Zustand erreicht.²⁹

Die abstoßenden Wechselwirkungen variieren mit $1/r^{12}$, die Anziehenden lediglich mit $1/r^6$. Theoretisch würde dies bedeuten, dass der contact mode die höchste Auflösung besitzen müsste, was aufgrund diverser Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe praktisch nicht der Fall ist. Bereits beim ersten Kontakt kommt es zu Verunreinigungen und Abnützungen der Spitze, weshalb die Auflösung immer unter jener des non contact sowie tapping mode liegt.

Contact mode

Der contact mode eignet sich besonders für härtere Oberflächen und benötigt keine speziellen Umgebungsbedingungen. Des Weiteren können günstigere Spitzen verwendet und höhere Messgeschwindigkeiten gegenüber dem tapping mode verwendet werden. Grundsätzlich stehen zwei unterschiedliche Varianten zur Verfügung: Der unregelmäßige, dafür schnellere, constant height mode sowie der geregelte constant force mode. Wird die z-Achse konstant gehalten, spricht man vom constant height mode. Dies war die ursprüngliche Variante eines AFM und wird heute nur noch für Untersuchungen von sehr glatten Oberflächen verwendet (z.B. Spaltflächen an Kristallen). Die Höheninformation stammt hierbei lediglich vom Lasersignal des gebogenen Cantilevers.

Wird die Höhenachse wie auch die x/y-Achsen mittels Piezoelement geregelt ist es möglich bei konstanter Kraft, das heißt bei konstanter Auslenkung des Cantilevers,

zu messen (constant force mode). Diese Methode ist zwar langsamer als der constant height mode, verfügt jedoch über die Möglichkeit wesentlich größere Höhenunterschiede sowie weichere Materialien abzubilden und verleiht den verwendeten Spitzen aufgrund der geringeren Kräfte eine wesentlich längere Lebensdauer (eine benutzte Spitze ist in Abbildung 11 dargestellt).

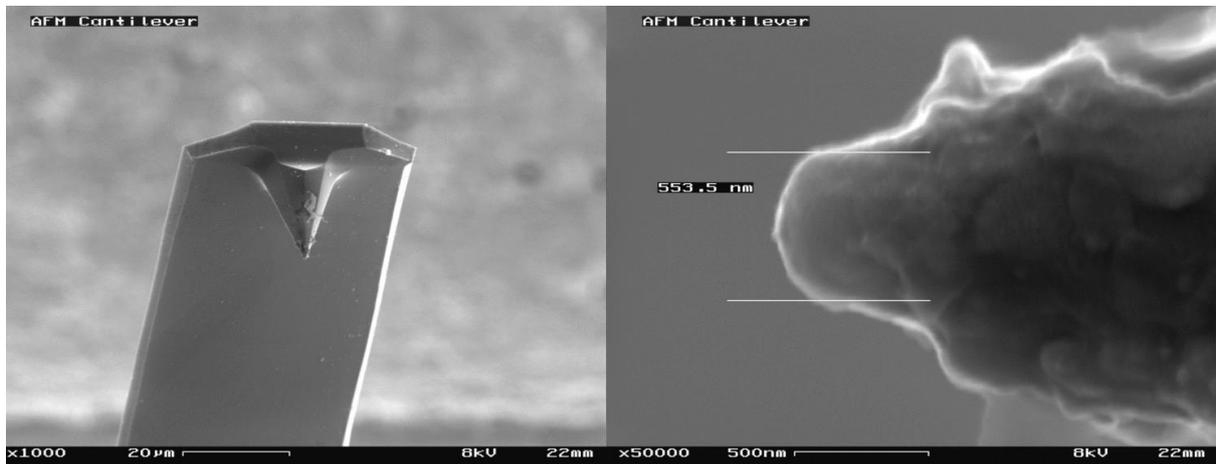


Abbildung 11: SEM Aufnahmen einer im contact mode benutzten AFM Spitze mit erkennbaren Verunreinigungen in 1000 und 50000-facher Vergrößerung.³⁰ Im Laufe der Zeit spielt vor allem der Abrieb der Spitze eine Rolle.

Tapping mode

Der tapping mode (auch intermittent contact mode) nutzt eine oszillierende Spitze, deren Schwingungsamplitude durch Ausgleichsbewegungen des Piezoelements konstant gehalten wird. Dadurch wird die Oberfläche stets nur kurz berührt, weshalb diese Methode äußerst schonend für Spitze und Probe ist und bei der Analyse weicher Oberflächen wie beispielsweise Proteinen Verwendung findet. Der Modus vermindert vor allem die Gefahr des „Durchschneidens“ weicher Proben sowie ein Verschieben kleiner Partikel. Zusätzlich eignet sich der Modus durch die im Vergleich zum contact mode wesentlich geringeren lateralen Kräfte am besten für Messungen unter Flüssigkeiten. Die Abnutzung der Spitzen ist deutlich geringer als bei den Varianten im contact mode.

Non contact mode

Auch non contact mode wird der Cantilever samt Spitze mit Hilfe eines zusätzlichen Piezoelements in eine periodische Schwingung versetzt. Sobald sich die Spitze der Probe soweit nähert, dass sich aufgrund der auftretenden attraktiven Kräfte die

Resonanzfrequenz im geschlossenen Schwingkreis ändert, wird diese Frequenzänderung als Signal zur Regelung des Piezoscanners herangezogen. Alternativ kann eine Frequenz vorgegeben und die sich ergebende Phasenverschiebung zwischen Anregung und Schwingung zur Regelung genutzt werden. Der größte Nachteil ist die komplizierte Handhabung dieser Methode, welche nur im Vakuum, besser im Ultrahochvakuum, verwendet werden kann. Allerdings werden die höchsten Auflösungen im AFM-Bereich erzielt. Es ist neuerdings nicht nur möglich elektrisch nicht leitende Proben wie beispielsweise NaCl atomar aufzulösen, sondern auch einzelne Atombindungen darzustellen und deren Länge zu bestimmen.³¹

Im Rahmen dieser Dissertation wurden primär Messungen im contact mode (constant force) durchgeführt um diverse Oberflächenbeschichtungen zu charakterisieren und Schichtdicken zu überprüfen. In einigen wenigen Fällen mit Nanopartikeln als Probe konnten bessere Ergebnisse mittels tapping mode erzielt werden. Non contact mode war zum einen nicht verfügbar und aufgrund der Proben sowie der notwendigen Auflösung weder nötig noch praktikabel.

2.3 QCM

Quarzkristallmikrowaagen (Quartz Crystal Microbalance) sind Instrumente zur Detektion kleiner Massenänderungen in Gasphase, Vakuum sowie unter Flüssigkeiten.^{32,33,34} Eine nützliche Anwendung liegt darin, die Bildung dünner Filme in situ zu überwachen wie sich dies beispielsweise bei kommerziell erhältlichen Sputteranlagen weitgehend durchsetzen konnte³⁵. Sie basieren auf dem Phänomen der Piezoelektrizität, das bereits 1880 von den Gebrütern Curie entdeckt wurde: Sie stellten das Auftreten elektrischer Ladungen an der Oberfläche natürlicher Turmalinkristalle fest, wenn diese mechanisch belastet und verformt wurden.³⁶ Die Verformung eines solchen Materials durch Anlegen einer Spannung wird als inverser piezoelektrischer Effekt bezeichnet. Als Grundlage für alle QCM dient ein piezoelektrischer Schwingquarz, welcher beim Anlegen einer Spannung im Bereich der aufgetragenen Elektroden seine Form verändert.

Versetzt man nun eine QCM mit Hilfe von Wechselspannung in Schwingung, so ist die Frequenz unter anderem von der Stärke des verwendeten Quarzkristalls abhängig. Dadurch ergibt sich eine Eigenfrequenz, welche umgekehrt proportional zur Dicke des Quarzes ist. Die häufigste Anwendung dieser Eigenschaft findet sich nicht in der Analytik sondern in Form der Quarzuhr. Am häufigsten werden AT-cut-Quarze genutzt, da deren Temperaturkoeffizient zwischen 0 und 50°C praktisch null ist (siehe Abbildung 12). Dies bedeutet, dass sich die Resonanzfrequenz in diesem Bereich nicht mit der Temperatur verändert.³⁷

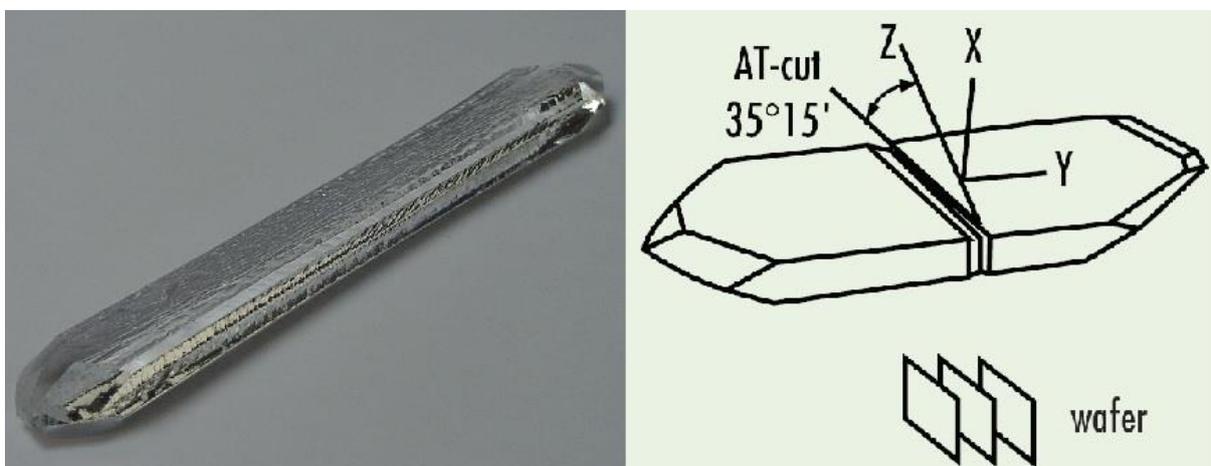


Abbildung 12: Die Quarze werden mittels Hydrothermalsynthese³⁸ künstlich hergestellt (links), entsprechend dem „AT-cut“ geschnitten (Skizze rechts) und gegebenenfalls poliert.

Für spezielle Anwendungen, insbesondere für höhere Temperaturen, stehen beispielsweise Langasit ($\text{La}_3\text{Ga}_5\text{SiO}_{14}$)³⁹ oder Galliumorthophosphat (GaPO_4)⁴⁰ zur Verfügung. Meist werden auch diese Systeme als QCM bezeichnet, obwohl es sich nicht um Quarz handelt. Der Begriff „Quarzmikrowaage“ hat sich auch bei Anwendungen etabliert, bei denen keine klassische Massendetektion stattfindet sondern beispielsweise Viskositätsmessungen, wo letztlich eine Kraft gemessen wird.

Im Bereich der Analytischen Chemie werden Quarzmikrowagen verwendet, indem sie direkt an der Oberfläche funktionalisiert werden. Dies geschieht beispielsweise mittels Antikörpern oder Makrozyklen,⁴¹ welche an der Oberfläche immobilisiert werden, sowie alternativ mittels einer Beschichtung aus molekular geprägten Polymeren (anorganisch oder organisch). Jede dieser Varianten ist dazu in der Lage den Analyten gezielt anzureichern. Die in Folge hervorgerufene zusätzliche Massebelastung kann durch den von Sauerbrey abgeleiteten linearen Zusammenhang anhand der resultierenden Frequenzänderung bestimmt werden:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{A}$$

Hierbei steht die Frequenzänderung Δf in Abhängigkeit der Resonanzfrequenz f_0^2 , Dichte ρ sowie des Schermoduls μ_q des Schwingquarzes. A gibt die Elektrodenoberfläche wieder und Δm die Masseänderung. Unter Zuhilfenahme der Sauerbreykonstanten S_f lässt sich die Gleichung wie folgt umformen:

$$\Delta f = -S_f \cdot \frac{\Delta m}{A}$$

Die Sauerbreykonstante ist hierbei eine materialspezifische Größe und bleibt im Idealfall während einer Messung ebenso unverändert wie die Elektrodenoberfläche. Die Änderung der Frequenz ist somit theoretisch einzig abhängig von der zusätzlichen Massenbelastung durch Analytmoleküle. In der Praxis ist neben der

Anlagerung von unerwünschten Stoffen (Querselektivitäten) vor allem in Flüssigkeiten mit diversen störenden Faktoren zu rechnen. Neben der großen Zahl an Verbindungen in realer Probenmatrix üben sowohl Viskosität, als auch Dichte, sowie Druck- und Temperaturunterschiede wesentlichen Einfluss auf die Messungen aus.^{42,43} Neben dem umgebenden Lösungsmittel muss angemerkt werden, dass auch molekular geprägte Polymerschichten ihre Eigenschaften in Abhängigkeit der Temperatur sowie des umgebenden Lösungsmittels verändern können, wodurch das reale Verhalten entsprechend modifizierter Quarzmikrowaagen von der Sauerbrey-Gleichung abweichen kann.

Die Vorteile des über einen weiten Temperaturbereich konstanten Quarzes müssen folglich teilweise aufgegeben werden, wenn unter Flüssigkeiten und/oder mittels MIP detektiert wird. Um diese Limitierung auszugleichen gibt es seit einigen Jahren Unternehmungen zwei oder mehr Elektroden mit unterschiedlichen Beschichtungen (Mess- und Referenzelektrode) auf demselben Schwingquarz anzubringen.⁴⁴ Eine Anwendung außerhalb der Forschung ist nach derzeitigem Stand noch nicht absehbar.

2.4 Photonische Kristalle

Ein photonischer Kristall ist eine sich periodisch wiederholende Struktur dielektrischer Materialien mit unterschiedlichen Brechungsindices. Möglich ist hierbei die Kombination von beliebig vielen Materialien, wobei meist eines mit sehr hohem Brechungsindex gegenüber Luft verwendet wird. Die Herstellung der Strukturen stellt eine große Herausforderung dar, da die Periodenlänge in etwa der Hälfte der Wellenlänge der zu beeinflussenden elektromagnetischen Strahlung betragen muss (siehe Abbildung 13). Dies bedeutet Abstände von 200 bis etwa 400 nm für den Bereich des sichtbaren Lichts.

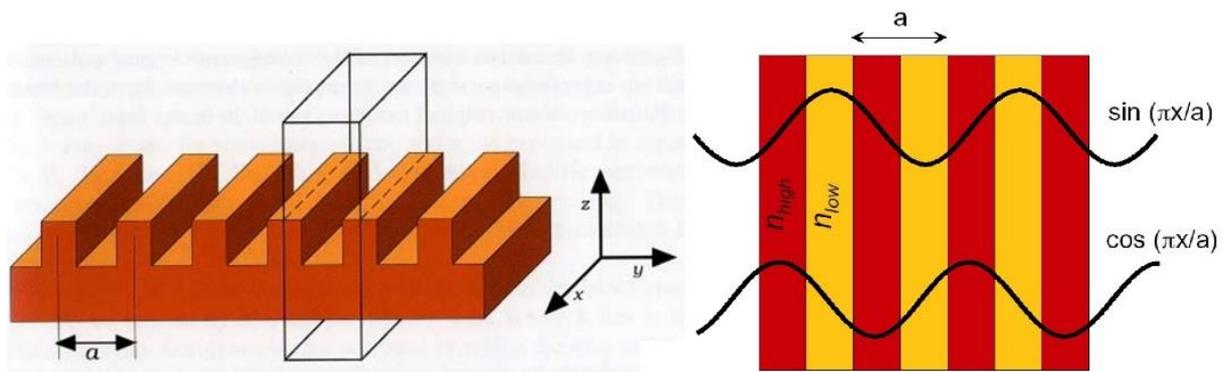


Abbildung 13: Eindimensionaler Photonischer Kristall mit der Periodenlänge a (links). Rechts: Reflexion einer Sinus und einer Cosinus Welle mit der jeweils doppelten Wellenlänge ($\lambda=2a$) an einem Bragg-Spiegel.⁴⁵

Neben der 1D Struktur, wie sie vom Bragg-Spiegel (DBR, distributed Bragg reflector) bekannt ist und für viele Anwendungen mit monochromatischem Licht als Reflektor verwendet wird⁴⁶, gibt es auch 2D und 3D Strukturen (Skizzen in Abbildung 14). Vorteile dieser Elemente sind die wesentlich höhere und selektive Reflektivität im Vergleich zu metallischen Spiegeln. Dies ermöglicht den Bau effizienterer Laser, Wellenleiter mit geringen Kurvenradien und Verlusten sowie optischer Filter mit einem äußerst kleinen Frequenzspektrum.

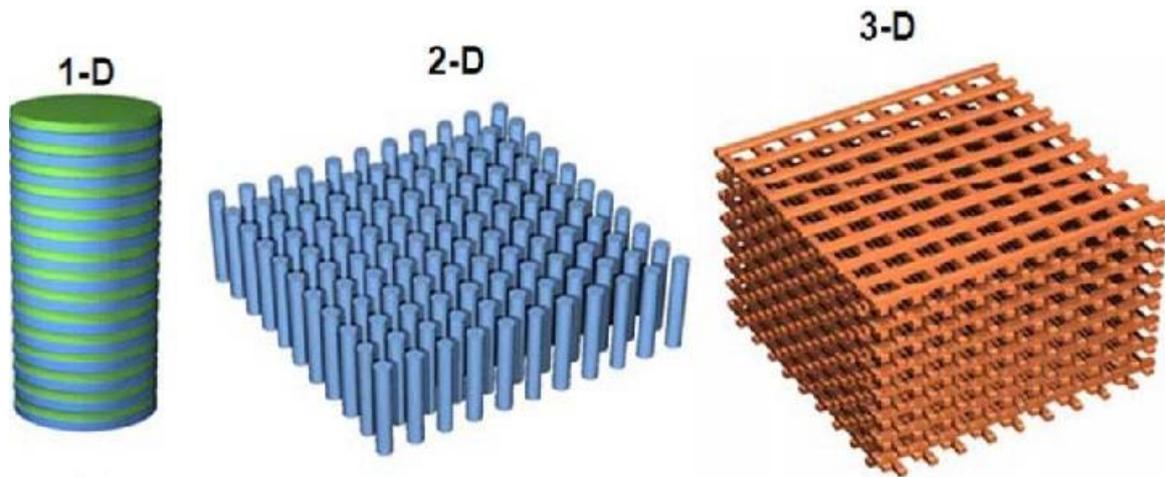


Abbildung 14: 1,2 und 3-dimensionale Strukturen von photonischen Kristallen.⁴⁷

Eine bereits kommerziell erhältliche Anwendung für 2D photonische Kristalle sind Lichtleiter, wobei es hier möglich ist dem Licht einen Richtungswechsel durch gezielt eingebracht Störstellen aufzuzwingen. Dadurch sind wesentlich geringere Kurvenradien möglich als bei konventionellen Glasfaserleitungen, bei welchen das Licht bei zu kleinen Kurvenradien das Kabel verlassen würde. Damit wird es theoretisch möglich auf kleinstem Raum Schaltkreise mit Photonen anstatt der bisher üblichen Elektronen zu realisieren.⁴⁸

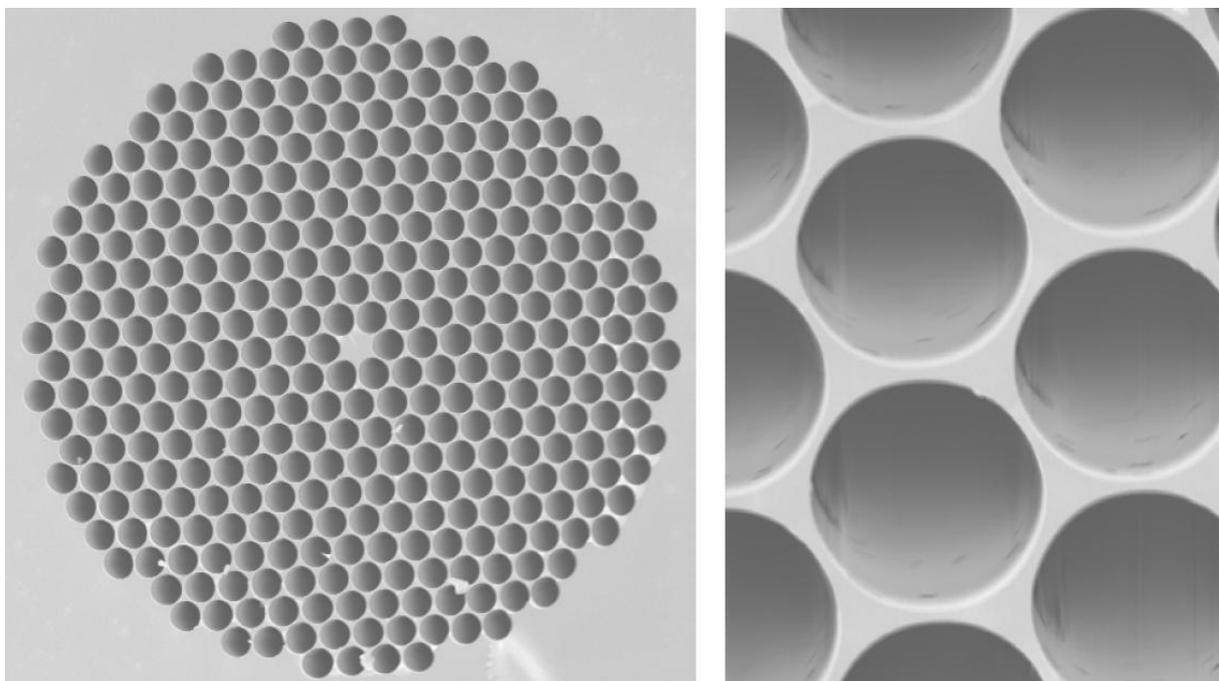


Abbildung 15: SEM Aufnahme eines Lichtleiter bestehend aus einer 2D Struktur photonischer Kristalle.⁴⁹ Der feste Kern in der Mitte (links) hat einen Durchmesser von 5 μm , jener der Hohlräume 4 μm (rechts).

Künstliche 3-dimensionale photonische Kristalle stecken noch in den Kinderschuhen, lassen sich jedoch in kleinem Maßstab gezielt synthetisieren. Ein Beispiel hierfür ist künstlicher Opal aus Polystyrenpartikeln im Nanometermaßstab (Abbildung 16).

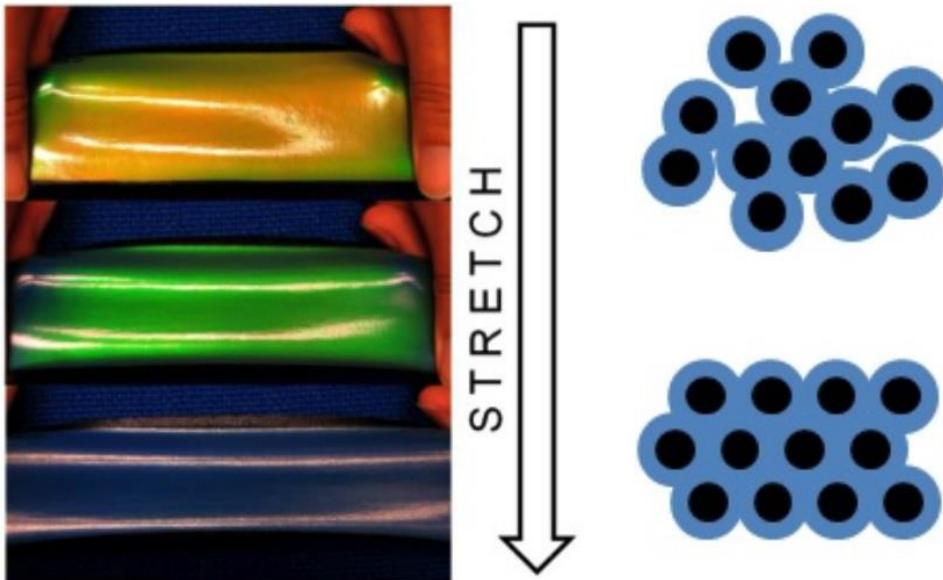


Abbildung 16: Core-Shell Partikel in einer Polymerfolie bilden einen 3-dimensionalen photonischen Kristall und verändern durch Dehnung ihre räumliche Anordnung und damit ihre optischen Eigenschaften.⁵⁰ Unter Zug liegen die einzelnen Partikel näher beisammen und streuen kurzwelligeres Licht (blau) als im entspannten Zustand (gelb).

In der Natur finden sich hingegen außerordentlich viele Beispiele für photonische Kristalle der zweiten und dritten Dimension. Viele Farbenspiele von beispielsweise Federn, Insektenpanzern und Flügeln entstammen den Eigenschaften komplexer Strukturen im Nanometermaßstab (Beispiele in Abbildung 17). Im Gegensatz zu Pigmenten verändert sich die Farbe je nach Betrachtungswinkel.



Abbildung 17: Photonische Kristalle bei einem Schmetterling (2D) und einem Opal (3D).^{51,52} Die Struktur dieser Objekte konnte erst durch neue bildgebende Verfahren wie SEM und TEM erforscht werden. Bei Opal handelt es sich um 3-dimensional angeordnete Kugeln aus Siliziumdioxid, bei Schmetterlingen sind unterschiedliche Strukturen erforscht.⁵³

Bisher gibt es keine ausgereifte Analytisch-Chemische Anwendung mit photonischen Kristallen als Detektionsprinzip. Denkbar ist sowohl die Messung des reflektierten, des durchgehenden als auch des ausgekoppelten Lichts, welche alle drei durch einen Analyten verändert werden können. Ein Prototyp mit einer 2-dimensionalen Struktur auf Polymerbasis ist in Abbildung 18 dargestellt. Die chemische Selektivität kann entweder durch Oberflächenmodifikation oder durch Füllen der Kavitäten mit funktionalisierten Materialien erreicht werden (z.B. molekular geprägtes Polymer).

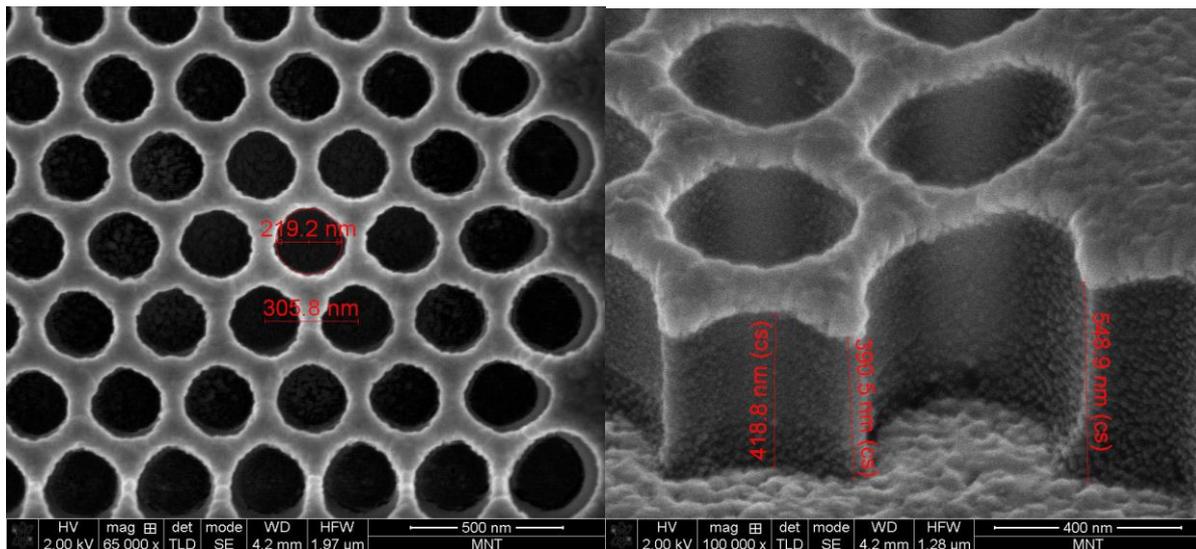


Abbildung 18: Prototyp eines Photonic Crystal Sensors auf Hybridpolymerbasis (Ormocer®). Das verwendete Material sowie die Ausmaße der Kavitäten können sich im Laufe der Entwicklung noch verändern, wobei vor allem tiefere Strukturen von Interesse sind. (SEM Aufnahme einer mittels Obducat Eitre 6 hergestellten Struktur von VTT)

2.5 SPR

Bei der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie werden mittels transversal magnetisch polarisierten Lichts Oberflächenplasmonen angeregt (d.h. die Schwingungsebene der Lichtwellen steht senkrecht zur bestrahlten Oberfläche). Bei Plasmonen handelt es sich um kollektive Plasmaschwingungen der Elektronen eines Metalls gegenüber deren Atomkernen. Das elektrische Feld über der metallischen Oberfläche wird folglich von den mittels Licht zusätzlich angeregten Plasmonen verstärkt. Die Einkopplung erfolgt mittels eines der gängigen Verfahren nach Otto⁵⁴ oder Kretschmann⁵⁵ mit Hilfe eines Prismas (Unterschied und Erklärung siehe Abbildung 19).

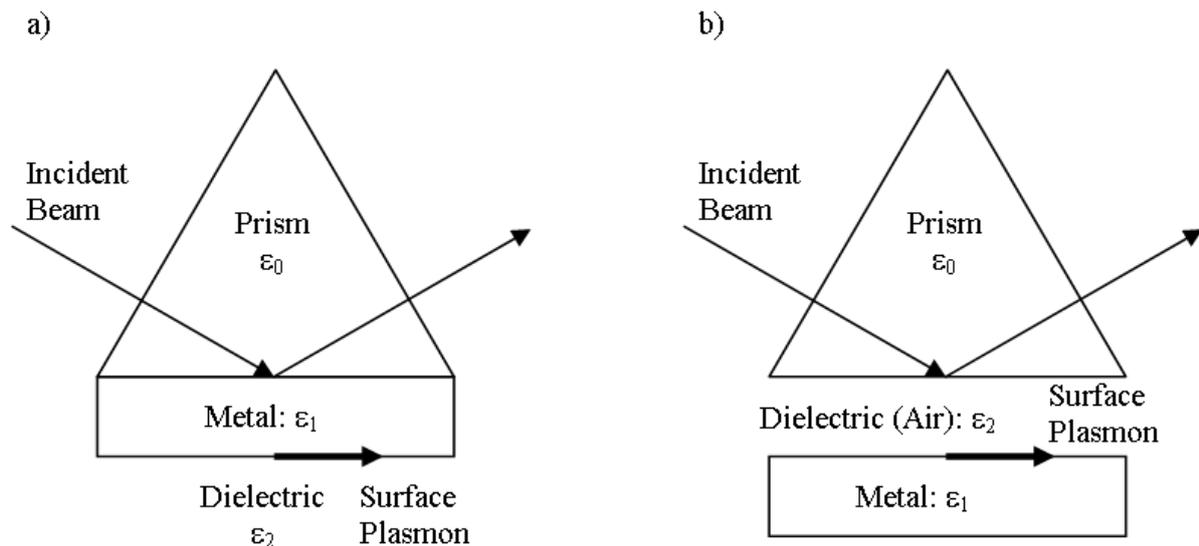


Abbildung 19: Anordnung nach Kretschmann (a) und Otto (b). Bei der Otto Methode befindet sich ein Luftfilm von 4-6 μm zwischen Prisma und Metall, wodurch diese Variante wenig praktische Anwendung findet. Bei der Anordnung nach Kretschmann wird ein sehr dünner Metallfilm von ca. 50 nm direkt auf das Prisma aufgebracht, wodurch die Anregung an der dem Prisma abgewandten Seite entsteht. In beiden Fällen bilden sich die Oberflächenplasmonen zwischen dem Dielektrikum und dem Metall.

Mit geringerer Effizienz sind auch Fehler bzw. Unregelmäßigkeiten einer Metalloberfläche sowie diverse Strukturen dazu in der Lage Licht dazu zu nutzen Oberflächenplasmonen anzuregen oder selbiges wieder auszukoppeln (an Kanten, Spitzen etc.). Diese Effekte finden bei der im Anschluss beschriebenen oberflächenverstärkten Ramanspektroskopie in Form des elektromagnetischen

Effektes praktische Anwendung. Im Fall der SPR sind diese Erscheinungen aufgrund der Eigenschaft Licht auszukoppeln unerwünscht, weshalb besonderer Wert auf eine glatte Goldoberfläche ohne Unregelmäßigkeiten Wert gelegt wird.

Die analytische Anwendung erfolgt meist dadurch, dass der reflektierte Lichtstrahl bei einem bestimmten Winkel (dem Oberflächenplasmonenresonanzwinkel) ein Intensitätsminimum aufweist, welches in Abhängigkeit der Brechungsindizes des umgebenden Mediums steht. Detektiert wird also indirekt die Brechzahl des Analyten. Aufgrund der geringen Abklingzeit der Plasmonen binnen weniger Femtosekunden lassen sich in der Praxis innerhalb eines einzelnen Goldfilms an verschiedenen Stellen unterschiedliche Plasmonen synchron anregen und das jeweils reflektierte Licht mittels Fotodiodenzeile (photodiode array) einzeln detektieren (Beispiel in Abbildung 20).

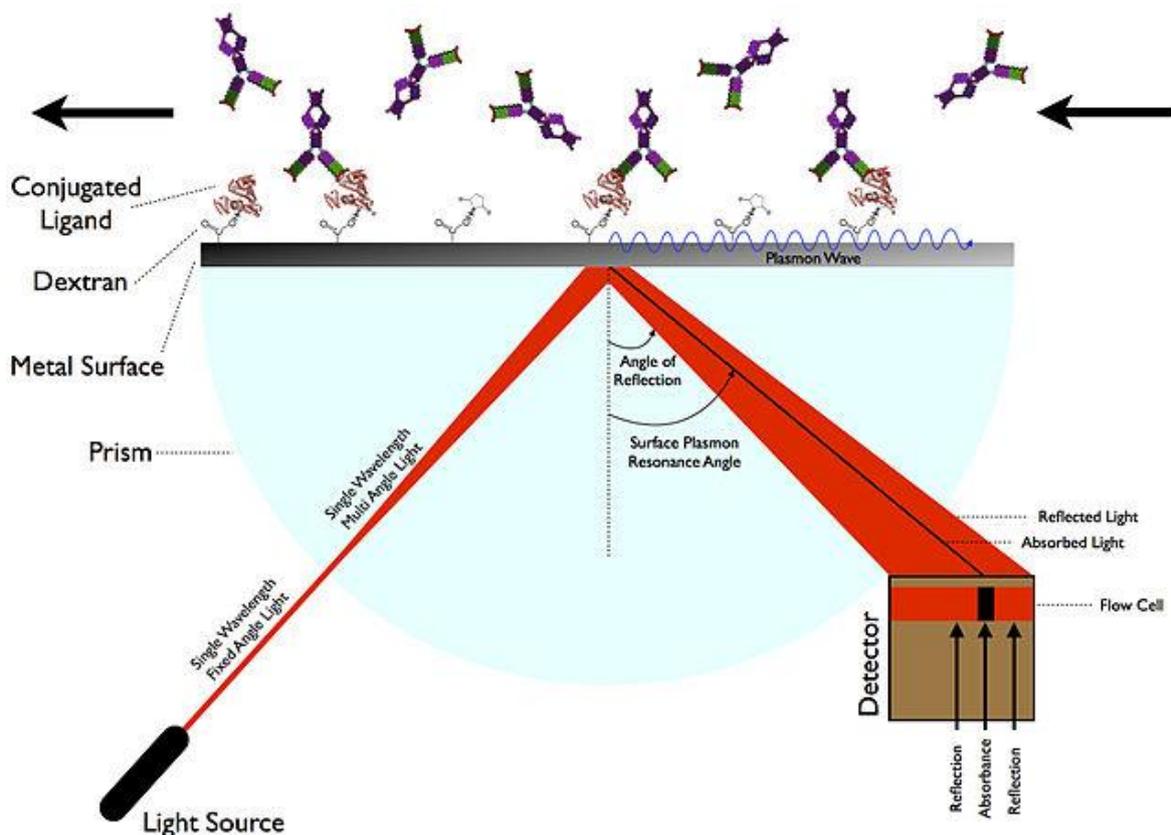


Abbildung 20: Beispiel einer SPR Detektion mit chemisch modifizierter Goldoberfläche.⁵⁶ Der Oberflächenplasmonenresonanzwinkel (Surface Plasmon Resonance Angle) ist Abhängig vom elektrischen Feld, welches sich in das umgebende Medium ausbreitet (~300 nm). Wenn der Wellenvektor des Lasers mit der Wellenlänge der Oberflächenplasmonen übereinstimmt, verstärkt sich die Schwingung der Elektronen durch konstruktive Interferenz.

Zur Bestimmung diverser Analyte hat sich vor allem im pharmazeutischen Bereich die Methode etabliert Oberflächenmodifikationen durch natürliche oder künstliche Antikörper vorzunehmen, wodurch der Analyt gezielt nahe der Metalloberfläche angereichert werden kann. Anwendung findet die SPR Spektroskopie auch bei der Bestimmung von Schichtdicken, wobei es möglich ist die Anlagerung einer Monolage zu verfolgen.⁵⁷

Eine mögliche Alternative zur winkelabhängigen Messung ist die Analyse des reflektierten Strahls einer polychromatischen Lichtquelle mittels Spektrometer, da bei konstantem Winkel nur das zur Anregung der Plasmonen geeignete Licht, d.h. jenes mit geeigneter Wellenlänge, absorbiert wird.⁵⁸

2.6 SERS

Oberflächenverstärkte Raman Streuung wurde erstmals 1973 in Southampton an Pyridin beobachtet, das an einer rauen Silberelektrode adsorbiert war. Der Effekt wurde jedoch nicht weiter beachtet, da die Wissenschaftler davon ausgingen, es handle sich lediglich um eine vermehrte Anlagerung des Analyten an der rauen Oberfläche.⁵⁹ Die eigentliche Entdeckung des SERS Effekts erfolgte 1977 in zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen, die in Folge wiederum zwei unterschiedliche Mechanismen zur Erklärung der Oberflächenverstärkung lieferten. Beide Theorien, nämlich die chemische⁶⁰ sowie die elektromagnetische⁶¹ Verstärkung, erklären in der Realität vorkommende Phänomene und bilden damit die theoretische Grundlage des Effekts, wobei der überwiegende Teil der Verstärkung anhand der elektromagnetischen Theorie erklärt werden kann.

Elektromagnetische Verstärkung

Die elektromagnetische Verstärkung entsteht durch Oberflächenplasmonen, welche insbesondere an spitzen Enden von rauen Oberflächen und Nanopartikeln sehr starke elektrische Felder erzeugen, da die Elektronen an diesen Stellen vergleichsweise schwach an das Metall gebunden sind. Dieser Effekt tritt auf, wenn die Frequenz eines anregenden Lichts mit jener der an der Oberfläche oszillierenden Elektronen übereinstimmt, da sich so Oberflächenplasmonen ausbilden können. Entscheidend ist, dass die Plasmonen sich senkrecht zur Oberfläche ausbreiten, da nur so ein verstärkendes Feld aufgebaut werden kann. Dies ist der eigentliche Grund, weshalb speziell aufgeraute Oberflächen oder Metallnanopartikel verwendet werden.⁶² Die Reichweite dieses Feldes über der Metalloberfläche (im Dielektrikum) hängt nun von den Eigenschaften der Oberfläche sowie der eingesetzten Metalle ab, wobei sich in der Praxis Gold, Silber und bis zu einem gewissen Grad Kupfer bewährt haben. Nun kann die Anwesenheit eines schwingenden Moleküls innerhalb des Dielektrikums dazu führen, dass Plasmonen zusätzlich angeregt werden, wodurch es letztlich zur Verstärkung des Raman-Signals kommt. Der SERS-Effekt ist dabei deshalb so ausgeprägt, da dieser verstärkende Effekt zweimal auftritt. Erst erhöht das elektrische Feld die Intensität des eingestrahlten Lichtes, welches zu

verstärkter Ramanstrahlung des untersuchten Moleküls führt, dann wird das entstehende Signal an der Metalloberfläche anhand desselben Effektes nochmals verstärkt (also analog der ursprünglichen Eingangsstrahlung). Der überwiegende Teil des erhaltenen Spektrums stammt also von der angeregten Metalloberfläche und damit indirekt vom Molekül. Beide Stufen der Verstärkung erhöhen das Signal rein rechnerisch um die zweite Potenz (E^2), wodurch sich eine maximale Verstärkung um E^4 ergibt, welche nur eintritt, wenn die Frequenzen der Anregungsquelle und des Raman-Signals in der Nähe der Oberflächenplasmonenresonanzfrequenz liegen.⁶³

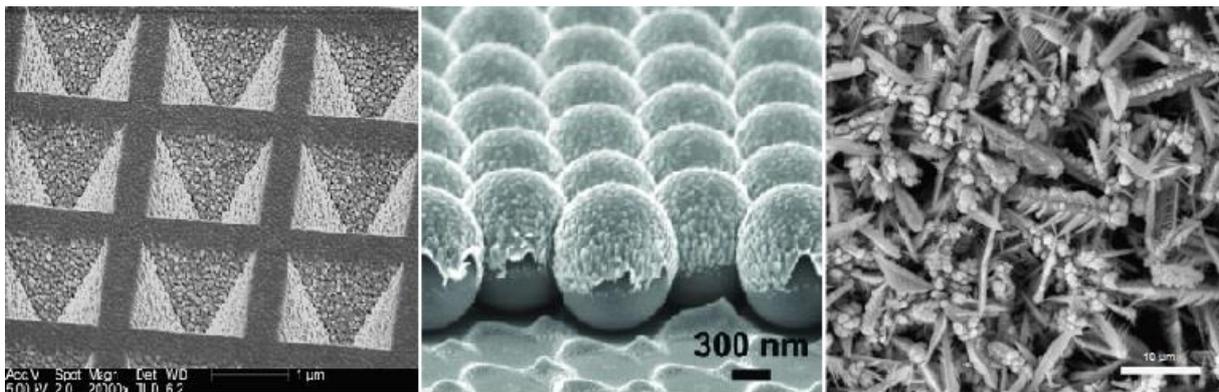


Abbildung 21: Unterschiedliche Metallstrukturen zur Verwendung in Kombination mit SERS: Mit Gold beschichtete Siliziumstruktur (links), Silber auf Polystyrenpartikeln (Mitte) und eine elektrolytisch präparierte raue Kupferoberfläche (rechts). Allen gemein ist eine jeweils besonders raue Oberfläche.

Neben der geeigneten Lichtquelle spielen deshalb auch die Substratmaterialien eine entscheidende Rolle (Abbildung 21). Die Oberflächenplasmonen von Gold und Kupfer sind für Anregungswellenlängen von etwa 550 bis 1250 nm und jene bei Silber von 400 bis 1000 nm geeignet.⁶⁴ Neben Silbernanopartikeln haben sich bei kompakten Substratoberflächen insbesondere Goldoberflächen durchgesetzt, da diese auch nach längerer Zeit an Raumluft weder zu Oxidation noch zur Umwandlung zu anderen Verbindungen neigen (beispielsweise Ag_2S bei Silber) und damit eine gute Lagerfähigkeit bieten.

Chemische Verstärkung

Einige Beobachtungen zeigen ein zusätzlich verstärktes Signal (bis zu 10^2), welches sich nicht allein durch die elektromagnetische Verstärkung erklären lässt. Weiters kommt es bei SERS oft zu einer Peakverschiebung gegenüber normalen Ramanspektren, welche nicht anhand des elektromagnetischen Effektes erklärt

werden kann. Für diese Phänomene kommt die Theorie der chemischen Verstärkung zum Tragen, wobei der größte Unterschied zur elektromagnetischen Verstärkung darin besteht, dass der Analyt hierfür an der oberflächenverstärkenden Metalloberfläche chemisch gebunden sein muss.⁶⁵ Dies ermöglicht einen Ladungsübergang, wobei ein angeregtes Elektron des Metalls vorübergehend auf das Molekül übertragen wird und dieses in einen angeregten Schwingungszustand versetzt. Dieser Vorgang erlaubt spektroskopische Übergänge mittels Licht im sichtbaren oder NIR-Bereich (typische Anregungslaser für Ramanspektroskopie), welche ansonsten erst mit UV-Strahlung möglich wären.⁶⁶

Es muss angemerkt werden, dass die chemische Verstärkung nicht erklären kann, wie Signale von nicht-kovalent an eine Metalloberfläche gebundener Moleküle entstehen. Möglich ist jedoch, dass beide Theorien zutreffen und in Kombination eine zusätzliche Verstärkung ergeben. Die exakten Abläufe sind bis heute unbekannt und werden nach wie vor in der Fachliteratur diskutiert. Die Verstärkung beträgt etwa zehn Größenordnungen⁶⁷, wobei aktuelle Entwicklungen, insbesondere bei neuartigen Oberflächenbeschichtungen, weitere Verbesserungen versprechen.⁶⁸ Mögliche Anwendungen finden sich bisher im Bereich der Biosensoren, zur Detektion von Sprengstoff, der Untersuchung von Kunstgegenständen bis hin zur Detektion einzelner Moleküle.⁶⁹

3 Synthese molekular geprägter Materialien

3.1 Allgemein

Als Ausgangspunkt für die molekular geprägten sensitiven Schichten zur Melaminsensorik dienten molekular geprägte Polymere aus Publikationen bezüglich Solid-Phase-Extraktion (SPE) sowie HPLC Säulenmaterialien, welche dahingehend modifiziert werden mussten, dass sie sich als Film auf Sensoroberflächen wie beispielsweise einer Quarzmikrowaage auftragen lassen. Diese grundsätzlichen Entwicklungen sowie ein Teil der Charakterisierung wurde bereits in der Diplomarbeit „Molekular geprägte Sensorschichten als Instrument zur low-cost-Sensorik von Verfälschungen durch Melamin“ realisiert und sind dort im Detail beschrieben.⁷⁰ Als funktionelles Monomer findet Methacrylsäure Verwendung, welche mit den Aminogruppen des Melamins in Wechselwirkung treten kann. Im Vergleich dazu führten Versuche mit Acrylsäure in einigen Versuchen zu geringeren Imprinting-Effekten aufgrund des zu schnellen Reaktionsverlaufs. Als Lösungsmittel wird stets Wasser verwendet, da Melamin in praktisch allen organischen Lösungsmitteln nahezu unlöslich ist und ein ungiftiges Lösungsmittel Vorteile bei der Handhabung im größeren Maßstab einer späteren Produktion bietet.

Als Quervernetzer wurde N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)bisacrylamid aufgrund seiner ausgezeichneten Wasserlöslichkeit gewählt. Ein zusätzlicher Vorteil sind die funktionellen Gruppen, welche wiederum in der Lage sind schwache Wechselwirkungen mit Melamin einzugehen. Das insbesondere bei der Flüssigchromatographie etablierte Ethylenglykoldimethacrylat kommt nicht in Frage, da sich das hierfür notwendige Lösungsmittelgemisch (z.B. Ethanol-Wasser) durch die ungleichmäßigen Verdunstungseigenschaften negativ auf die Herstellung dünner Filme auswirkt sofern kein azeotropes Gemisch vorliegt.

Eine vereinfachte Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Analyten und funktionellem Monomer in wässriger Lösung ist in Abbildung 22 dargestellt, wobei bei derartig vereinfachten Darstellungen stets beachtet werden muss, dass es sich in der Realität um dreidimensionale Strukturen handelt.

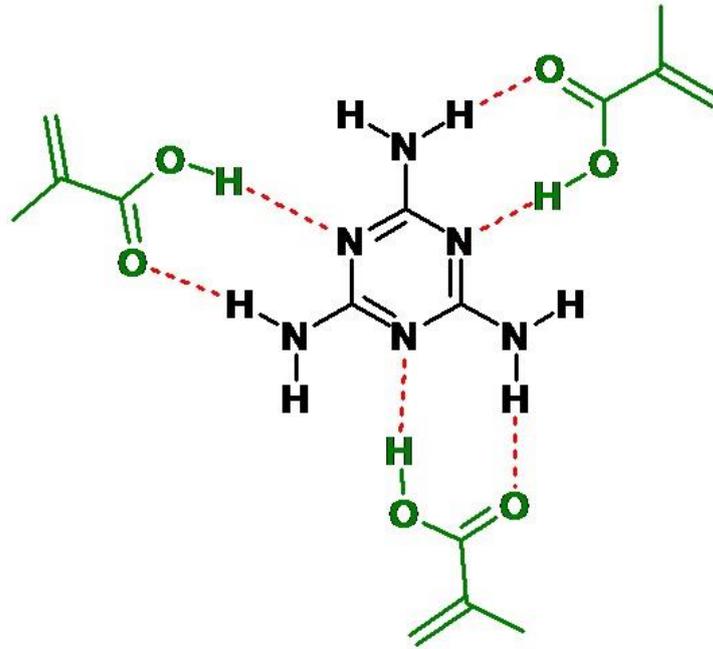


Abbildung 22: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Melamin und Methacrylsäure vor der Polymerisation. Im Idealfall bleibt diese Ordnung bestehen und wird durch die Vernetzung mit weiteren Monomeren fixiert (vor allem durch den Quervernetzer N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)bisacrylamid)).

Nach der Polymerisation kann das Melamin aus den Kavitäten mittels Wasser ausgespült und wieder eingelagert werden (Theorie siehe Kapitel 2.1, insbesondere Abbildung 3 auf Seite 15). In Folge des ersten Waschvorgangs werden zusätzlich nicht vernetzte Monomere und Reste des Radikalstarters entfernt.

In der vorliegenden Dissertation liegt der Fokus auf der Entwicklung dünner Filme, die Darstellung von Nanopartikeln und deren Kombination mit oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie sowie Core-Shell Nanopartikeln und speziell modifizierten dünnen Filmen als Prototyp zur Verwendung in Kombination mit photonischen Kristallen und deren jeweiligen Beschichtungstechniken auf diversen Substratoberflächen.

3.2 Dünne Filme

3.2.1 Einleitung

Von „dünnen Filmen“ spricht man heute, wenn die jeweilige Schicht eine Höhe kleiner als ein Mikrometer, also im Nanometerbereich, aufweist. Häufige künstliche Anwendungen sind unter anderem optische Filter, Verspiegelungen und Dünnschichtsolarzellen.^{71,72} Seitens der Natur sind uns seit langem photonische Kristalle wie beispielsweise bunter Vogelfedern oder einem Insektenflügel⁷³ bekannt, an welchen die nötige Lichtinterferenz anhand einer oder mehrerer dünner Schichten erzeugt wird (Beispiele in Abbildung 23). An einer Seifenblase lässt sich deren Schichtdicke vergleichsweise einfach beobachten, da die reflektierten Wellenlängenbereiche in etwa mit der Schichtdicke der Oberfläche übereinstimmen.

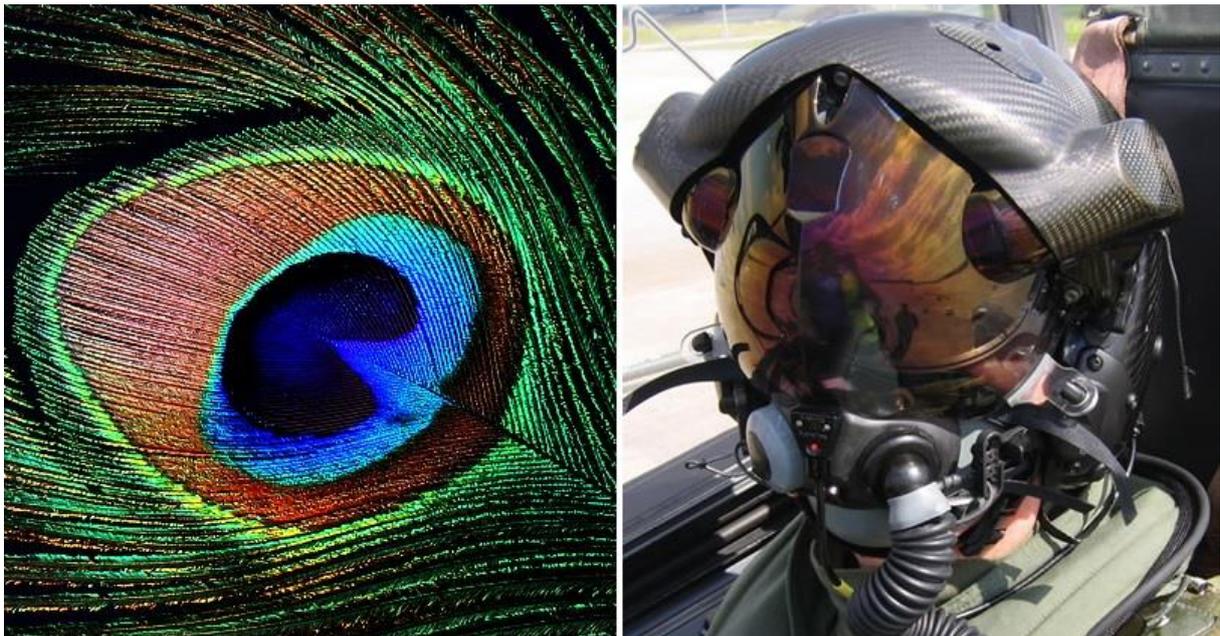


Abbildung 23: Beispiele für dünne Filme in Natur (Pfauenfeder) und Technik (Sonnenschutz am Pilotenhelm einer F-35)⁷⁴

Im Fall von MIP wurden viele dünne Filme für die Verwendung mit QCM Sensoren entwickelt. Ein Analyt kann nur bis zu einer gewissen Tiefe in das Polymer eindringen, wodurch tiefergelegene Teile des Films bestenfalls nutzlos, in der Praxis wegen zunehmender elastischer Eigenschaften des Materials jedoch oft störend

wirken. Im Fall von QCM bewirkt das „überschüssige Material“ eine Signalschwächung oder ein höheres Rauschen aufgrund erhöhter Dämpfung. Diese Phänomene sind gut erforscht und spielen vor allem in Gasphasenmessungen eine Rolle, wo es nötig ist die Dämpfung des Schwingquarzes niedrig zu halten um ausreichende Sensitivität zur Verfügung zu stellen.⁷⁵ Für die Detektionsprinzipien von „PHOTOSENS“ (SERS und Photonic Crystal) sind die optischen Eigenschaften der sensitiven Schichten essentiell, da es bei einer zu dicken, optisch nicht einwandfreien Schicht zu Absorptionen und/oder unerwünschten Lichtbrechungen sowie Streueffekten kommen kann. Dickere molekular geprägte Schichten weisen auf Grund des hohen Anteils an Quervernetzer sowie der Templatmoleküle, welche als zusätzliche Kristallisationskeime wirken, üblicherweise Unregelmäßigkeiten auf und sind dadurch praktisch immer von optisch minderer Qualität. Zusätzlich ist im Falle der Kombination mit SERS darauf zu achten, dass sich der verstärkende elektromagnetische Effekt lediglich wenige hundert Nanometer oberhalb der aktiven Oberfläche ausbreitet; eine zu dicke Schicht könnte demzufolge eine Detektion nicht nur abschwächen sondern diffusionsbedingt auch gänzlich verhindern. Die chemische Verstärkung bei SERS, welche nochmals zwei Zehnerpotenzen über der elektromagnetischen liegt, tritt überhaupt nur auf, wenn ein Analytmolekül direkt mit der Goldoberfläche in Kontakt kommt.⁷⁶ Daher wurden aus der ursprünglich entwickelten, mehr als 1 µm dicken, mit Melamin geprägten Polymerschicht wesentlich dünnere Filme sowie diverse Nanopartikel weiterentwickelt. Ein zusätzlicher, nicht unbedeutender Vorteil liegt darin, dass dünnere Schichten generell schneller äquilibrieren. Ähnlich einer RP18 Trennsäule benötigt es eine gewisse Zeit, bis sich das Trennmaterial an das verwendete Lösungsmittel anpassen kann. Dies fällt insbesondere ins Gewicht, wenn eine sensitive Oberfläche bestehend aus einem molekular geprägten Material, trocken gelagert und direkt in die zu bestimmende Lösung gebracht wird. Je dünner der Film, umso schneller ist das Polymer mit Flüssigkeit getränkt und dadurch bereit zur Analytaufnahme und in direkter Folge zur Messung.

3.2.2 Darstellung

Alle in dieser Arbeit verwendeten selektiven Materialien bestehen grundsätzlich aus N,N'-(1,2-Dihydroxyethylene)bisacrylamid (DHEBA), Methacrylsäure (MAA) und um molekulare Prägung zu erreichen zusätzlich Melamin als Templatmolekül. Für die bei den QCM-Messungen verwendete Referenzelektrode sowie bei einigen Versuchen mit SERS wurde ein ungeprägtes Polymer (non imprinted polymer-NIP) verwendet, welches ohne Zugabe von Melamin hergestellt wurde. Als Radikalstarter dient Natriumperoxodisulfat (PODS). All diese Chemikalien haben den großen Vorteil wasserlöslich zu sein, weshalb auf andere Lösungsmittel verzichtet werden konnte. Dies ist ein entscheidender Aspekt für die Industriepartner im Projektkonsortium, welche ihr Augenmerk auf eine möglichst einfache und kostengünstige Massenproduktion legen.

Das für dünne Filme verwendete Grundrezept findet sich in Tabelle 1 und kann bei Bedarf wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben variiert werden. Die in Kapitel 3.3 und 3.5 beschriebenen Nanopartikel basieren, wenn auch in teils stark modifizierter Form, ebenfalls auf der angeführten Rezeptur.

Tabelle 1: Grundrezept MIP und NIP

	PODS*	DHEBA	MAA	H ₂ O	Melamin
MIP	5	17	8	1000	1,5
NIP	5	17	8	1000	0

(alle Mengenangaben in mg oder µL)

*wird zupipettiert: 17µL einer wässrigen 300 mg/mL Lösung

Die angeführten Monomere (DHEBA und MAA) werden in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß vorgelegt, das Wasser hinzugefügt und die festen Bestandteile mittels Ultraschallbad in Lösung gebracht. Anschließend wird die Mischung auf 55°C temperiert und der Radikalstarter (PODS) in Form einer wässrigen Lösung eingebracht. Unter starkem Rühren wird nun so lange vorpolymerisiert, bis die Flüssigkeit leicht milchig erscheint.

3.2.3 Beschichtungstechnik

Das Präpolymer kann mittels Spin- oder Dropcoating aufgetragen werden und sollte mindestens über Nacht bei Raumtemperatur oder für vier Stunden im Trockenschrank bei 60°C aushärten. Um gezielt dünne Schichten bekannter Stärke herzustellen und mittels Spincoating auf QCM auftragen zu können wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, welche in Tabelle 2 angeführt sind.

Tabelle 2: Beschichtungsvarianten für Spincoating

Nr	min	LM(H ₂ O)	RPM	AFM [nm]	Anmerkung
1	8	400	2000	130-190	
2	8	400	3000	40-70	
3	8	(800)	3000	20-40	+400 µL H ₂ O nach Vorpolym.
4	8	(800)	2000	170-200	+400 µL H ₂ O nach Vorpolym.
5	8	(800)	3000	ca.120	+400 µL H ₂ O nach Vorpolym.
6	25	1000	3000	80-90	
7	25	1000	2000	120-150	

Die Abhängigkeit zwischen der Lösungsmittelmenge sowie der Umdrehungszahl pro Minute (RPM) mit der Schichtdicke konnte mittels AFM bestimmt werden. Hierfür wird eine Rasierklinge durch die auf Glas aufgetragene Polymerschicht geführt und der entstehende gerade Schnitt anschließend unter dem Kraftmikroskop vermessen (Beispiel in Abbildung 25). Für alle Ansätze wurden 5 mg PODS, 17 mg DHEBA und 8 µL MAA verwendet. Falls ein MIP benötigt wurde, mussten 1,5 mg Melamin hinzugefügt werden. Bei den Versuchen 3-5 wurde nach der Vorpolymerisation nochmals mit je 400 µL Wasser auf in Summe 800 µL verdünnt um eine dünnere Schicht zu erzeugen.

Alle Filme sind äußerst glatt und aufgrund der geringen Schichtdicken optisch transparent. Auch ist die Oberfläche im AFM wesentlich glatter als bei früheren Beschichtungen mit ~1 µm Dicke (siehe Abbildung 24). Für die QCM-Messungen wurde die Beschichtungsvariante Nr. 7 gewählt, da eine Schichtdicke von etwa 100 nm erwünscht war und der Spinnvorgang bei 2000 rpm zu regelmäßigeren Oberflächen führt, da seltener Lösungsmitteltropfen vom Quarz weggeschleudert werden ohne sich zuvor gleichmäßig verteilen zu können (je 5 µL vorpolymerisierte Lösung pro Elektrode).

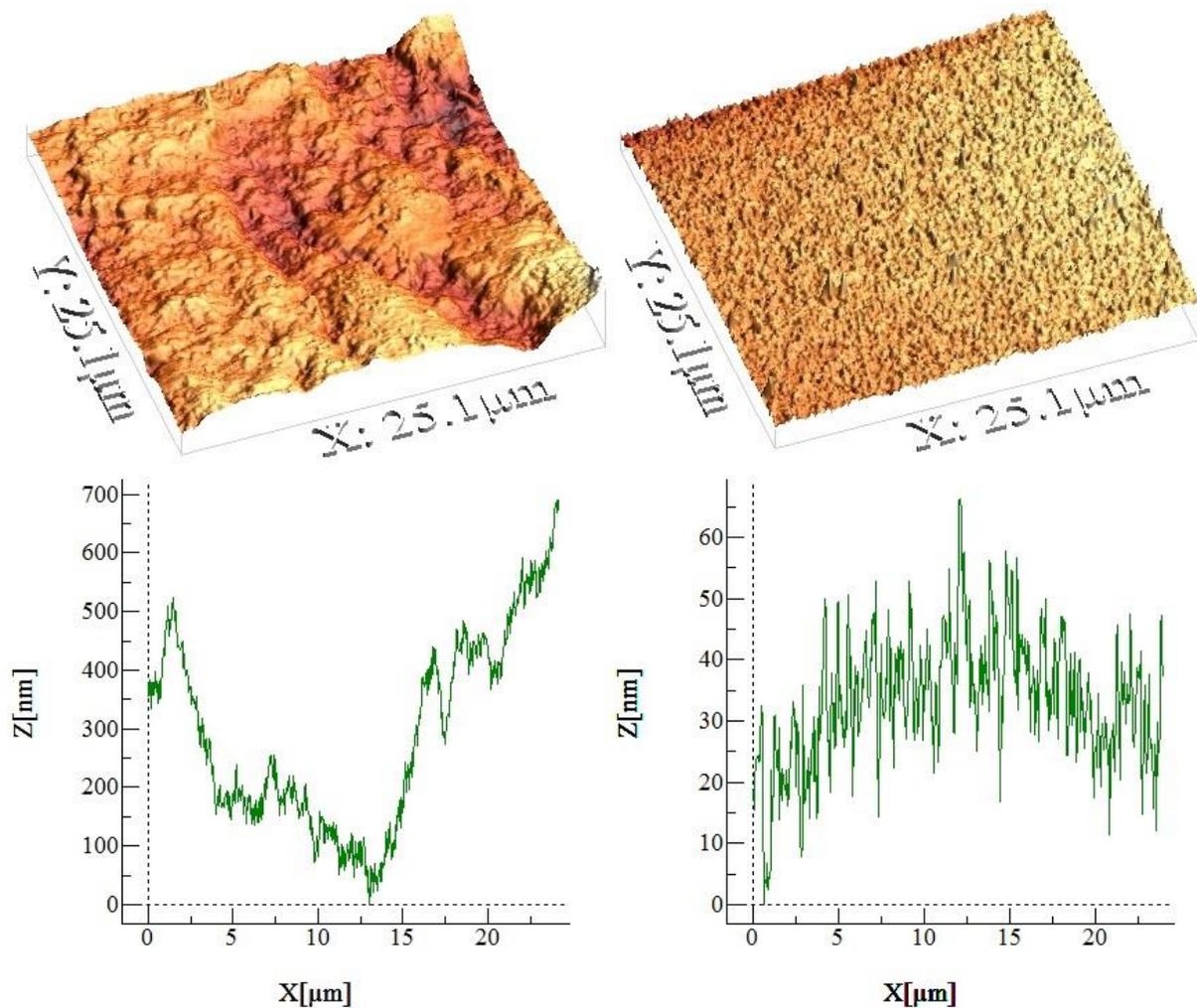


Abbildung 24: 3D AFM Bild einer 1 μm (oben links) und einer 100 nm Schicht (oben rechts) mit identen Achsenskalierungen. Die darunter abgebildeten Profilschnitte veranschaulichen die wesentlich regelmäßigeren Oberflächen der dünneren Schicht (man beachte die unterschiedliche Skalierung der Höhenachse).

Um die Eignung der Filme für eine mögliche Kombination mit photonischen Kristallen testen zu können wurden einige ellipsometrische Untersuchungen an der University of Southampton durchgeführt. Hierfür war es nötig einige kleinere Siliziumsubstrate mit MIP sowie NIP zu beschichten. Dafür wurde Ansatz Nr.6 (siehe Tabelle 2) verwendet. Das Ergebnis sind bläulich schimmernde Oberflächen, ähnlich einer mit Antireflexionslack beschichteten Solarzelle (Abbildung 25).

Aufgrund der gegenüber einer Rasierklinge zu weichen Siliziumoberfläche war es in diesen Fällen nicht möglich die Schichtdicken mittels AFM zu bestimmen. Laut den Projektpartnern aus Southampton lagen diese wie erwünscht bei etwa 200 nm, der Brechungsindex gilt nach derzeitigem Wissen jedoch als zu gering um in einen Photonic Crystal Sensor eingebaut werden zu können.

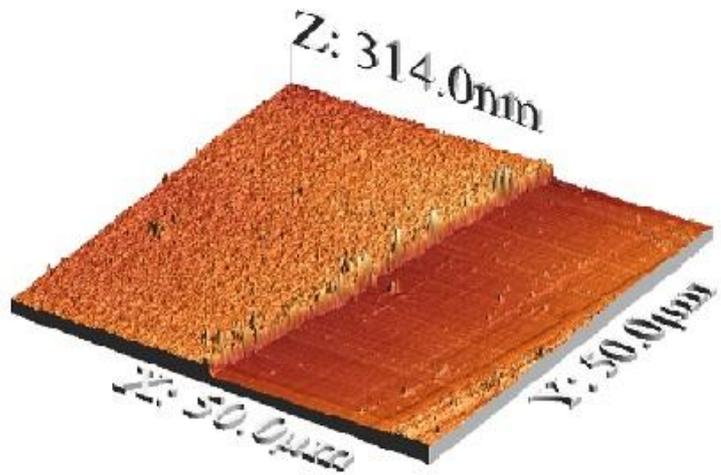
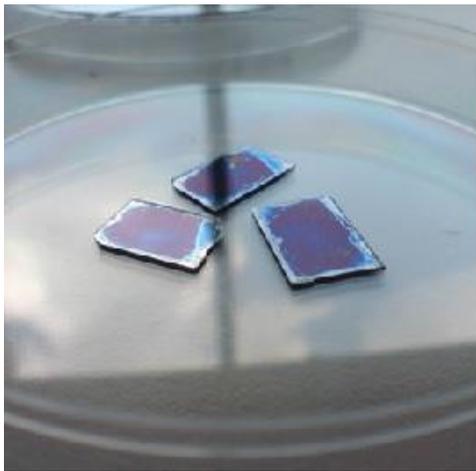


Abbildung 25: Mit MIP beschichtete Siliziumplättchen (links) und eine Schichtdickenbestimmung mittels AFM (rechts). Die Bestimmung mit AFM ist nur möglich, wenn das Polymer auf einem harten Material wie in diesem Beispiel Glas aufgetragen wird.

Beim Beschichten der Klarite® Substrate stellte sich schnell heraus, dass ein effektives Spincoating aufgrund der hohen Oberflächenspannung von Wasser nicht möglich ist, da die vorpolymerisierte Mischung sofort durch die Zentrifugalkraft vom Substrat geschleudert wird. Diverse Versuche zeigten die besten Ergebnisse mittels Dropcoating von 5 μL der in Tabelle 1 angeführten Polymermischungen, welche zuvor nochmals 1:10 mit Wasser verdünnt wurden.

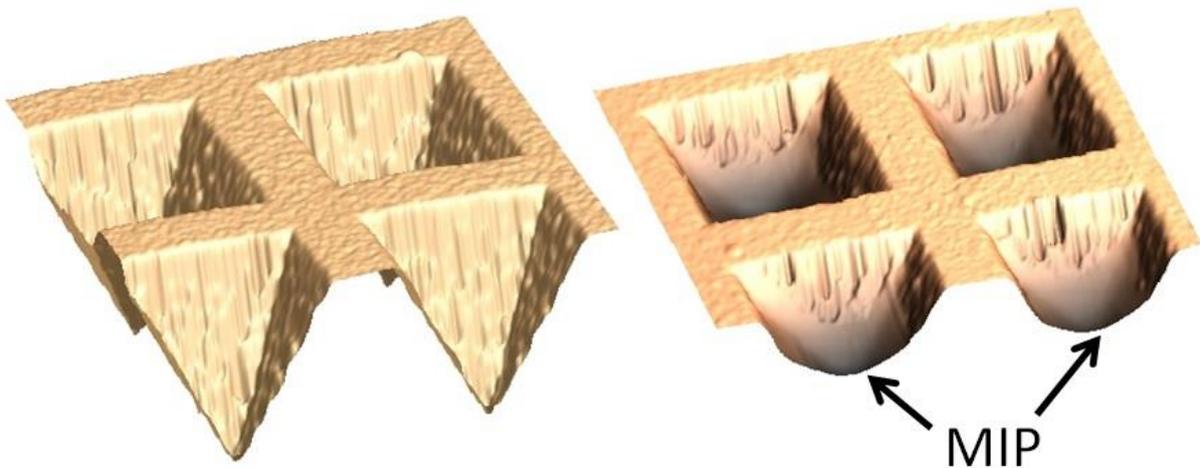


Abbildung 26: Klarite® Substrat ohne (links) und mit molekular geprägtem Polymer (rechts). AFM Aufnahmen im Kontakt-Modus. Der Bereich von 4 Kavitäten entspricht in etwa der Größe, welche mittels Laser angeregt wird (Nicolet Almega XR).^{77,78}

In dieser Form ist weitgehend sichergestellt, dass ausreichend MIP in den Kavitäten verbleibt und gleichzeitig nicht zu dick ist, um keine ausgehende Ramanstrahlung abzuschwächen (siehe Abbildung 26). Ebenso sind jene Teile des Substrates bedeckt, welche laut Renishaw Diagnostics den stärksten SERS Effekt zeigen. Die Menge an eingebrachtem Polymer kann bei Bedarf relativ unkompliziert durch Variation der Monomerkonzentration in der Präpolymerlösung verändert werden.

3.3 Nanopartikel

3.3.1 Einleitung

Unter Nanopartikeln (NP) versteht man im Allgemeinen Teilchen mit einem Durchmesser von bis zu 100 nm. Bei auf Polymeren basierenden Systemen hat sich der Begriff auch für NP etabliert, wenn diese Durchmesser von mehreren hundert Nanometern aufweisen.

Die Analytische Chemie entwickelte für verschiedene Anwendungsgebiete kleinere Partikel, da diese z.B. in der Chromatographie, insbesondere der UHPLC, eine geringere Trennstufenhöhe bei höheren Flussraten erlauben. Dadurch wird eine bessere Trennung der Analyte in kürzerer Zeit mit geringerem Lösungsmiteleinsatz erreicht (siehe Abbildung 27).

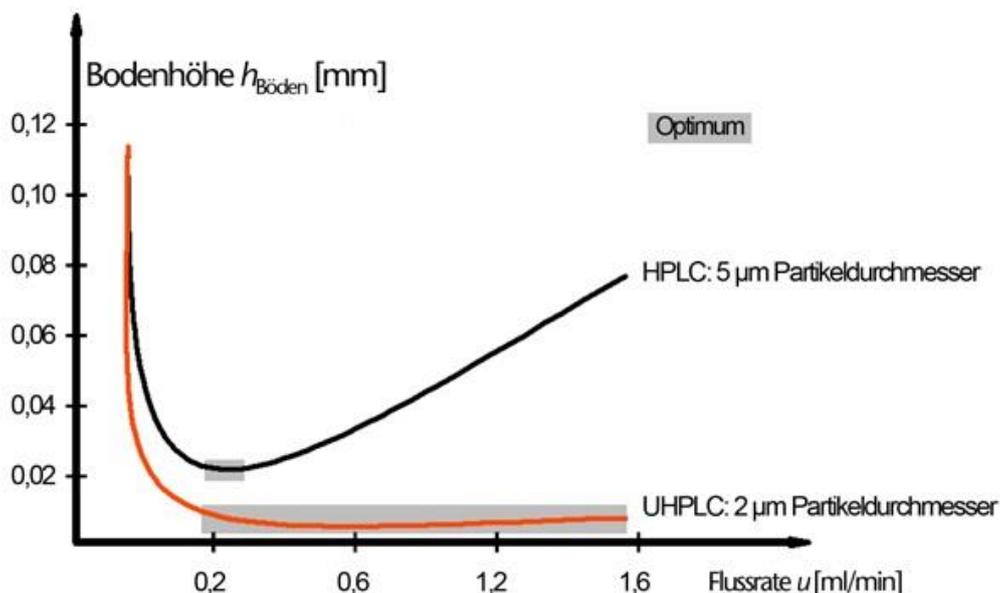


Abbildung 27 : Van-Deemter-Kurven für Flüssigchromatographie in Abhängigkeit der Partikelgröße. Die jeweiligen optimalen Flussraten sind grau hervorgehoben.⁷⁹

Im Bereich der Sensortechnik wird vor allem die große Oberfläche von molekular geprägten Nanopartikeln genutzt um ein verstärktes Signal bei gleichbleibender Sensorgröße zu erreichen. Dies hat sich primär bei Messungen in der Gasphase bewährt, wurde aber auch bei Messungen in Flüssigkeiten ausgiebig erforscht.⁸⁰

Der Vorteil von Nanopartikeln liegt also einerseits in der großen spezifischen Oberfläche, andererseits schlicht darin, dass sie im Gegensatz zu dünnen Filmen in völlig auspolymerisierter Form aufgetragen werden können und daher keine Gefahr besteht, dass Maschinen oder Leitungen beim Beschichtungsprozess verkleben. Des Weiteren ist bei der Verarbeitung keine Eile geboten und es kann eine große Menge an geprägten Partikeln auf Vorrat gehalten werden. Diese Vorteile waren ausschlaggebend für die Entwicklung im Rahmen von „PHOTOSENS“. In der folgenden Abbildung 28 sind neuartige Designkonzepte für zukünftige SERS-Oberflächen abgebildet, welche bereits auf Polymerfolien geprägt wurden. Die Strukturen unterscheiden sich sowohl optisch von den in Silizium geätzten Klarite® Substraten und versprechen zusätzlich verstärkte SERS-Signale. Prototypen erreichten bereits ein um den Faktor acht verstärktes Signal gegenüber Standard Klarite Substraten⁸¹ Die Größe der Kavitäten bestimmt somit direkt den maximalen Durchmesser der molekular geprägten Nanopartikel.

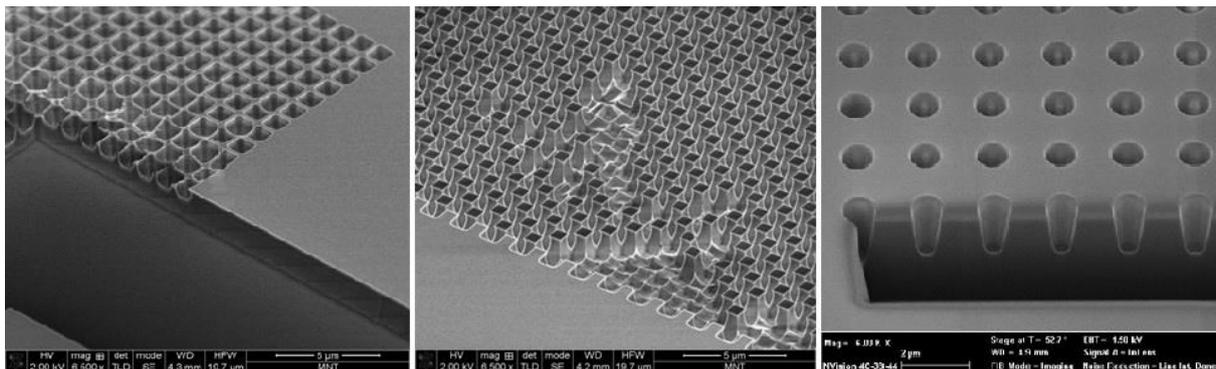


Abbildung 28: Unterschiedliche Konzepte für zukünftige SERS Substrate auf Polymerbasis mit Kavitäten in der Größenordnung zwischen 500 und 1000 nm (SEM Aufnahme und Herstellung mittels Obducat Eitre 6 von VTT)

3.3.2 Darstellung der Partikel

Zur Darstellung wurde die Fällungspolymerisation gewählt. Um eine zufriedenstellende Ausbeute zu erreichen, wurden die Monomerkonzentrationen der Präpolymerlösung gegenüber den dünnen Filmen verdoppelt (Zusammensetzung siehe Tabelle 3). Durch die größere Menge an DHEBA lässt sich dieses nur nach Erwärmen auf 55°C und Behandlung im Ultraschallbad lösen. Das Lösen erfolgt vor der Zugabe des Radikalstarters.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Nanopartikel

	PODS*	DHEBA	MAA	H ₂ O	Melamin
MIP	5	34	16	1000	3
NIP	5	34	16	1000	0

(alle Mengenangaben in mg oder μL)

*wird zupipettiert: 17 μL einer wässrigen 300 mg/mL Lösung

Aufgrund der guten Löslichkeit des Acrylatsystems in Wasser musste Acetonitril (ACN) für die Fällung der Partikel herangezogen werden.

Nach dem Vorpolymerisieren bei 55°C wird die Mischung in 10 mL ACN einpipettiert und mindestens über Nacht bei Raumtemperatur und unter sehr starkem Rühren vollständig auspolymerisiert. Hierbei lässt sich die Größe und Anzahl der entstehenden Teilchen durch Variation der Vorpolymerisationsdauer beeinflussen, da sich mit der Zeit kleinere Partikel zu größeren zusammenschließen. Für die molekular geprägten Nanopartikel (MIP-NP) wurde zur Verbesserung des Imprinting-Effekts mit Melamin gesättigtes ACN verwendet, um ein frühzeitiges Auswaschen von Templatmolekülen zu verhindern (Abbildung 29). Die dadurch verbesserten Messeffekte werden in Kapitel 4.3.1 diskutiert und mit Messungen von Nanopartikeln aus reinem ACN verglichen. Im Anschluss werden die Partikel abzentrifugiert, mit 5 mL ACN gewaschen und letztlich in 0,5 mL ACN aufgenommen. Falls weitere Verdünnungsschritte notwendig waren, musste ebenfalls auf ACN zurückgegriffen werden, da sich zumindest kleinere Acrylatnanopartikel in Wasser wieder lösen.

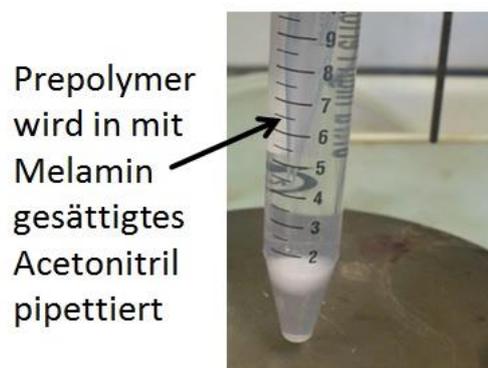


Abbildung 29: Herstellung der MIP-Nanopartikel

3.3.3 Beschichtungstechnik

Zu Beginn sei darauf hingewiesen, dass Polymernanopartikel nach dem Beschichten nicht jene Form behalten, welche sie in Suspension besitzen. Ausschlaggebend hierfür ist die Tatsache, dass besonders Acrylate einen hohen Anteil polarer Lösungsmittel wie Wasser oder ACN an sich binden können. Wird nun ein kugelförmiges Partikel auf eine Oberfläche gebracht, fällt dieses durch das sich verflüchtigende Lösungsmittel bis zu einem gewissen Grad in sich zusammen. Zurück bleibt wie in Abbildung 30 zu sehen eine mehr oder weniger ovale Halbkugel.

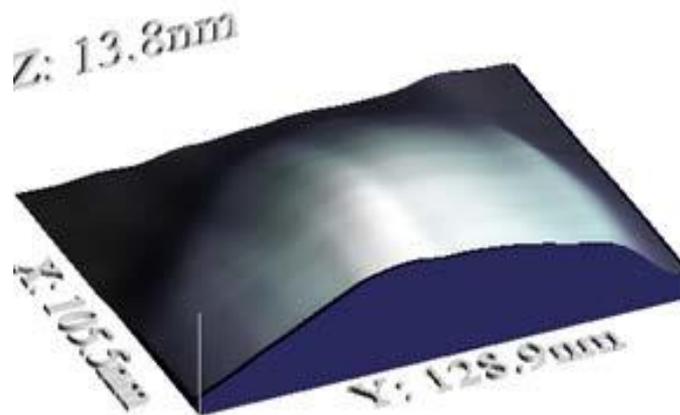


Abbildung 30: 3D – Aufnahme mittels AFM eines auf einer Glasoberfläche getrocknetem MIP – Nanopartikels im Querschnitt bei gleicher Skalierung aller 3 Achsen.

Bei anderen Polymeren ist dieser Effekt teils weniger stark ausgeprägt, wie beispielsweise von Fr. Mag. Judith Wackerlig dargestellte MIP-NP auf Basis von Divinylbenzol zur Detektion von Ibuprofen gezeigt haben. Jedenfalls muss von der simplen Vorstellung einer Schicht aus kugelförmigen, nebeneinander liegenden Nanopartikeln Abstand genommen werden.

Bei größeren Mengen an NP bilden sich poröse Schichten aus, welche bei erneutem Kontakt mit Flüssigkeiten teilweise stark aufquellen, aber durch die Wechselwirkungen untereinander dennoch eine bis zu einem gewissen Grad stabilen Belag bilden, welcher Messungen mit diversen analytischen Methoden ermöglichen.

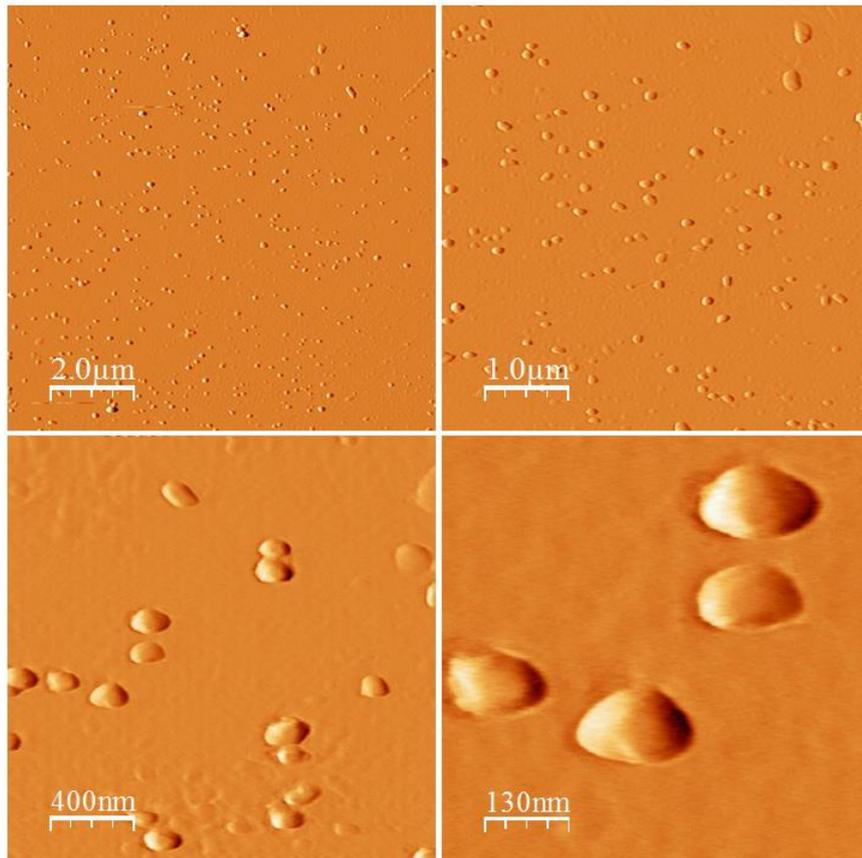


Abbildung 31: AFM-Aufnahmen einiger MIP-Nanopartikel auf einer Glasoberfläche in unterschiedlicher Vergrößerung.

Die in Abbildung 31 gezeigten Nanopartikel wurden durch Verdünnen der ursprünglichen Suspension (siehe Kapitel 3.3.2) auf 1:10 und anschließendem Spincoating auf ein Glasplättchen bei 2000 RPM präpariert. Entscheidend hierbei ist die Behandlung im Ultraschallbad vor dem Auftragen, da sich ansonsten Agglomerate bilden, welche sich unregelmäßig verteilen und keine Größenbestimmung einzelner Partikel erlauben. Das Verhältnis zwischen Höhe und Durchmesser beträgt etwa 1:10, das Volumen ca. $90 \times 10^3 \text{ nm}^3$. Dies entspricht einer hypothetischen Kugel von 55 nm Durchmesser. Hierbei ist zu beachten, dass die Partikel in Suspension durch die Aufnahme von Lösungsmittel zusätzlich an Volumen gewinnen.

Das Beschichten der QCM Sensoren sowie der SERS-Substrate wurde mittels Dropcoating durchgeführt, wobei jeweils $5 \mu\text{L}$ aufgetragen wurden. Für die SERS-Messungen wurde zusätzlich um den Faktor 1:10 sowie 1:100 verdünnt, wobei durch die stärkere Verdünnung eine wesentlich homogenere Beschichtung mit

ausreichender Menge an MIP-NP in den Kavitäten entstand (AFM-Aufnahme in Abbildung 32). Für QCM-Messungen konnte die ursprüngliche NP-Suspension aufgetragen werden, da eine größere Schichtdicke bei den vorgesehenen Messungen keinen wesentlichen Nachteil darstellt und beim ersten Waschschrift ohnehin stets größere Mengen nicht anhaftender Partikel vom Quarz gespült werden.

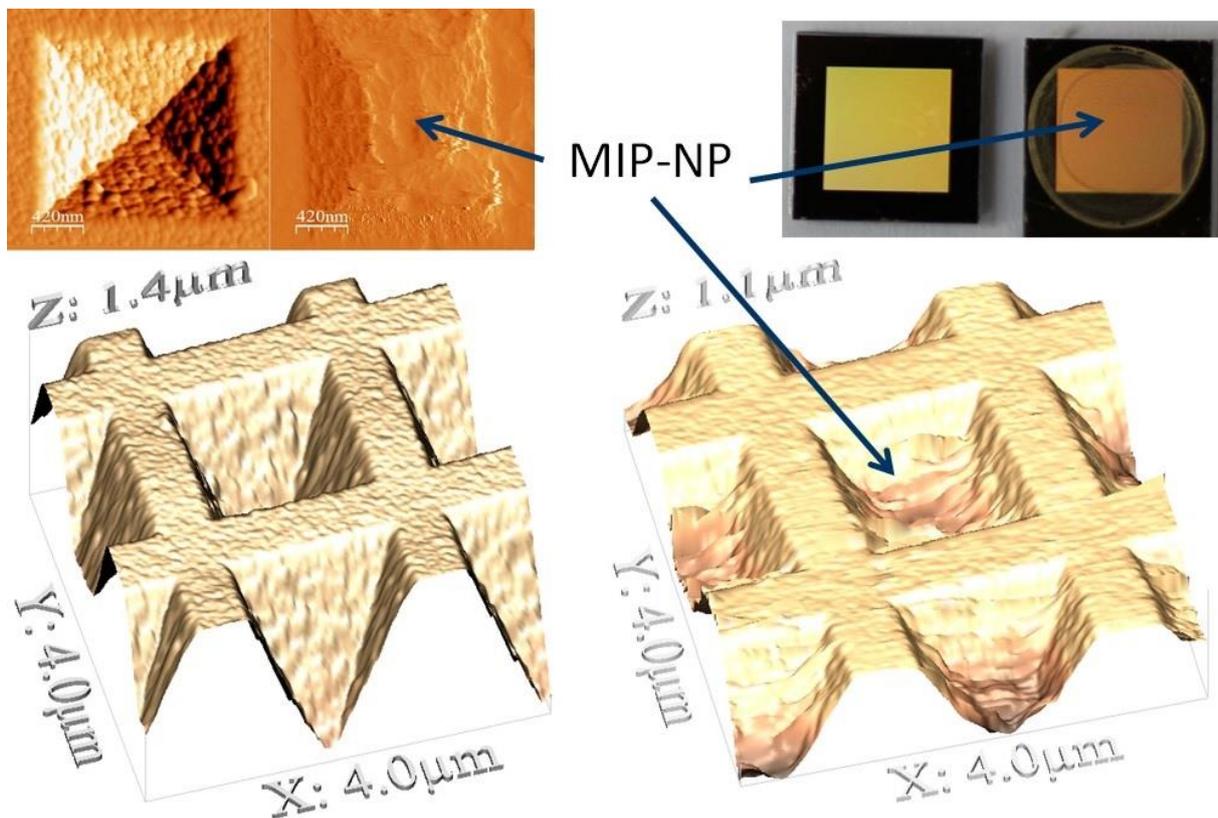


Abbildung 32: AFM Aufnahmen im Contact Mode von unbeschichteten (jeweils das linke Bild) und mit MIP-Nanopartikeln beschichteten Klarite® Substraten (links oben und unten AFM, rechts oben mit bloßem Auge)

Bei einem Vergleich zwischen aufgetragenen NP und den dünnen Filmen auf ein SERS-Substrat fällt die wesentlich homogenere Verteilung der Polymerschicht ins Auge. Die beschriebenen potentiellen Vorteile der Nanopartikel bleiben dennoch erhalten, weshalb auch diese Variante zu weiteren Tests herangezogen wurde. Es sei angemerkt, dass im Falle einer Massenfertigung andere Beschichtungstechniken zum Einsatz kommen können, welche beispielsweise von TNO entwickelt werden (ggf. ähnlich einem Tintenstrahldrucker, jedenfalls vollautomatisierte Verfahren).

3.4 TiO₂-Partikel/MIP Kompositfilme

3.4.1 Einleitung

Wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben reicht der Brechungsindex der unmodifizierten dünnen Filme für eine Anwendung mit photonischen Kristallen aus technischen Gründen nach derzeitigem Stand nicht aus (ca. 1,5). Im Fall von „PHOTOSENS“ war die Notwendigkeit molekular geprägtes Material mit einem möglichst großen Brechungsindex von etwa 1,7 zu erzeugen für die Darstellung der mit TiO₂ versetzten MIP-Filme ausschlaggebend. Die prinzipielle Vorgehensweise ist bereits in der Literatur beschrieben.⁸² Dies gilt auch für das molekular geprägte Polymer zur Detektion von Formaldehyd, welches ebenfalls im Rahmen des Projektes an der Universität Wien von den Mitarbeitern Herrn Dr. Munawar Hussain sowie Frau Mag. Kira Kotova entwickelt wurde. Die Messungen (Kapitel 4) sollen klarstellen, ob die Beimengung von TiO₂ die Messung erschwert oder die Schichten beispielsweise negativ im Bezug der Haftung gegenüber Goldoberflächen beeinflussen.

3.4.2 Darstellung und Beschichtungstechnik

Für die Filme wurden selbst hergestellte TiO₂ Nanopartikel mit einer Größe von etwa 200 nm verwendet. Die Durchführung zur Beschichtung der QCM Elektroden unterscheidet sich nicht von jener der dünnen Filme (siehe Kapitel 3.2.3).

3.4.2.1 Synthese der TiO₂ Nanopartikel

Zur Darstellung der Nanopartikel werden 1040 mg Caprinsäure in 6,5 mL Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Anschließend 178 µL TiCl₄ hinzugefügt und für eine halbe Stunde auf 60°C erwärmt um die Polymerisation zu starten. Nach der Zugabe von 63 µL Wasser unter sehr starkem Rühren präzipitieren die TiO₂ Partikel aus der Lösung. Durch Zentrifugation kann das TiO₂ aus der Suspension gewonnen und bei 110°C getrocknet werden. Die Partikel werden erst grob zerstoßen und im Anschluss in 0,1 M Salzsäure im Ultraschallbad für 5 Minuten behandelt. Nach einem weiteren

Zentrifugationsschritt werden die Partikel mit Wasser und zuletzt mittels Aceton gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet (Ergebnis siehe Abbildung 33).

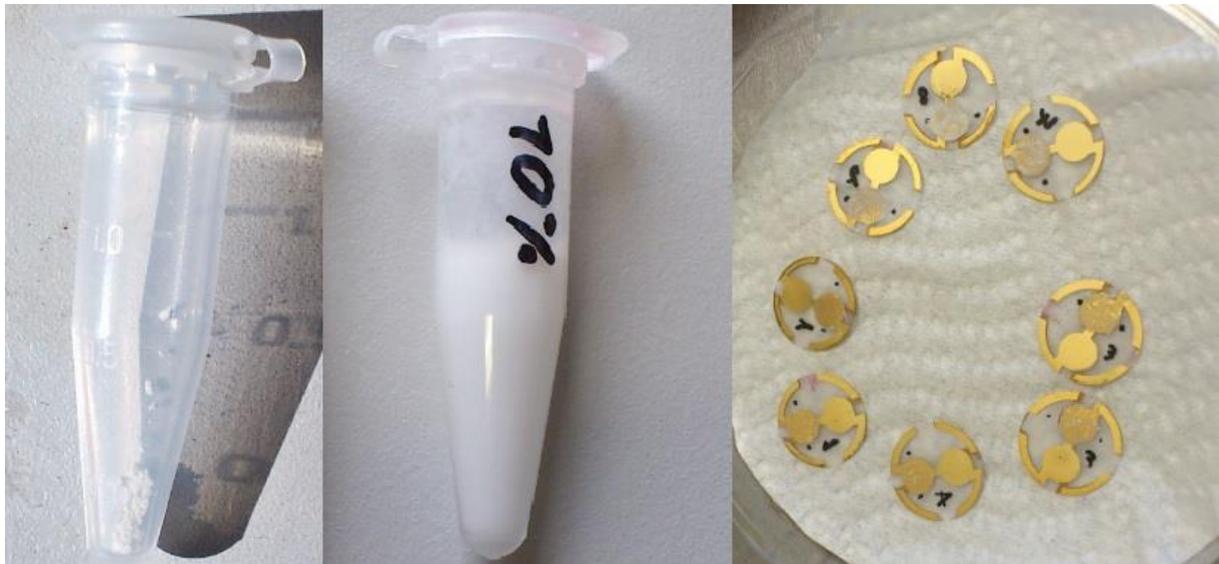


Abbildung 33: Synthetisierte TiO₂-Nanopartikel (links), Vorpolymerisierte MIP Mischung mit 10 % TiO₂-NP (Mitte) und einige auf der Messelektrode beschichtete QCM Sensoren (rechts).

3.4.2.2 Synthese der MIP Kompositfilme mit TiO₂

Um die Wirkung des TiO₂ auf die MIP-Filme zu untersuchen wurden drei Varianten mit unterschiedlichem Titandioxidanteil hergestellt. Hierfür wurde ein molekular geprägtes Polymer in ausreichender Menge vorpolymerisiert und anschließend in drei gleiche Teile geteilt und mit den entsprechenden Mengen an Nanopartikeln versetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der mit TiO₂ versetzten MIP Filme

Nr.	PODS*	DHEBA	MAA	LM(H ₂ O)	Melamin	TiO ₂
1	2,5	8,5	4	200	0,75	1,25 (10%)
2	2,5	8,5	4	200	0,75	3,125 (25%)
3	2,5	8,5	4	200	0,75	6,25 (50%)

(alle Mengenangaben in mg bzw. µL)

*wird zupipettiert: 8,5 µL einer wässrigen 300 mg/mL Lösung

Grundsätzlich war es möglich alle Varianten auf die Goldelektroden der QCM Sensoren aufzutragen wobei die Stabilität als auch die Oberflächenqualität der Schicht mit 50 % TiO_2 Anteil bereits deutlich in Mitleidenschaft gezogen wurde. Sowohl bei Berühren im trockenen Zustand als auch beim erstmaligen Spülen mit Wasser lösen sich große Teile der Beschichtung von der Elektrodenoberfläche Dies gilt auch für die mit NIP beschichtete Referenzelektrode (Zusammensetzung wie in Tabelle 4, jedoch ohne Melamin).

3.5 Core-Shell Nanopartikel

3.5.1 Einleitung

Core-Shell Partikel sind im Wesentlichen Teilchen im μm oder nm-Maßstab, welche aus zwei verschiedenen Materialien im Kern beziehungsweise der äußeren Hülle bestehen. Die Anwendungsmöglichkeiten reichen hierbei von der Chromatographie, welche die verschiedenen Eigenschaften der Hülle und des Kerns nutzt, bis hin zu Core-Shell Leuchtdioden (Core-Shell semiconducting nanocrystal light-emitting diode, CSSNC-LED).^{83,84} Wie bei den mit TiO_2 versetzten dünnen Filmen ist die Motivation zur Entwicklung dieser CS Partikel die Erhöhung der jeweiligen Brechungsindizes, wobei die bereits bei den reinen Polymernanopartikeln erwähnte leichtere Verarbeitung durch die Industrie einen weiteren Vorteil darstellt.

Die synthetisierten Core-Shell Nanopartikel können als Prototyp bzw. Vorarbeit betrachtet werden, da beim Endprodukt keine Detektion von Melamin mit dem Sensorprinzip der Photonic Crystal Sensoren vorgesehen ist. Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, dass Melamin im Gegensatz zu Formaldehyd nicht flüchtig ist und ein dadurch bessere Hantierbarkeit bei den ersten Versuchen verspricht.

Als Kern wurde kommerziell erhältliches TiO_2 gewählt, welches äußerst breite Verwendung findet. Durch den hohen Brechungsindex, welcher letztlich für „PHOTOSENS“ entscheidend war, der chemischen Stabilität sowie die für den Menschen praktisch nicht vorhandene Toxizität kommt der Stoff nicht nur als Farbpigment in Wandfarben und der Ölmalerei sondern auch in nahezu jeder Zahnpasta, in Arzneimitteln sowie Sonnenschutzcremes zur Anwendung. Anzumerken ist, dass die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit verwendeten TiO_2 Nanopartikel einen Durchmesser < 21 nm haben und daher sehr wohl gesundheitlich bedenklich sind.⁸⁵ Die entstandenen Core-Shell Nanopartikel mit anorganischem Kern und Polymerhülle gehören zu den kleinsten jemals synthetisierten. Dies ist notwendig, da die Strukturen der photonischen Kristalle nur wenige hundert Nanometer im Durchmesser haben sollen und dennoch ausreichend Material in diese Kavitäten eingebracht werden muss. In Abbildung 34 ist ein Konzept für einen Sensor abgebildet, welches im Rahmen des Projekts erstellt wurde. Die Kavitäten

der photonischen Kristall Strukturen haben einen Durchmesser von wenigen Hundert Nanometern. Die MIP bzw. NIP Nanopartikel müssen folglich einen kleineren Durchmesser aufweisen.

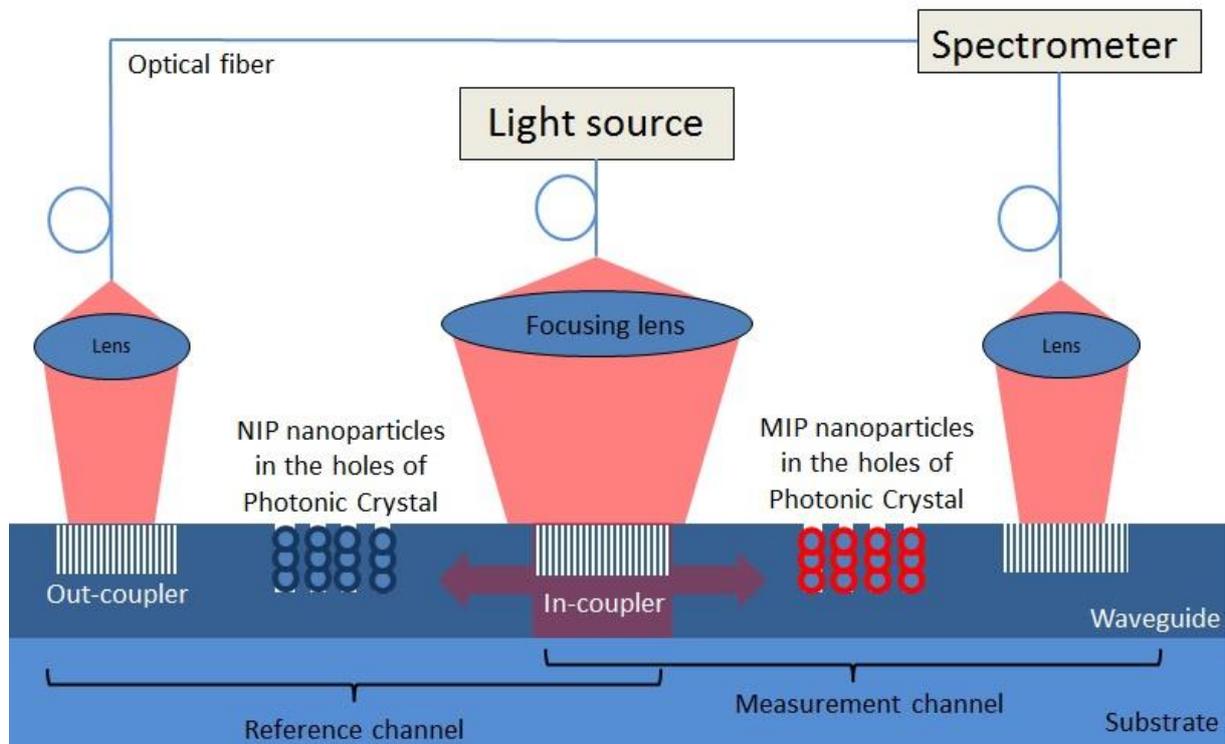


Abbildung 34: Konzept von VTT für einen Photonic Crystal Sensor mit Lichtleitern, optischen Linsen, Ein- und Auskopplung der Strahlen sowie mit NIP und MIP gefüllten Kavitäten des photonischen Kristalls (eine SEM Abbildung der Kavitäten mit Maßen findet sich in Abbildung 18 auf Seite 34).

3.5.2 Darstellung

Die Herstellung ist in zwei wesentliche Schritte unterteilt. Erst müssen die verwendeten TiO_2 Nanopartikel silanisiert werden um einen Ankerpunkt für die anzuknüpfenden Moleküle (MAA und DHEBA) zur Verfügung zu stellen. Die eigentliche Hülle entsteht in einer Suspension der modifizierten Partikel in stark verdünnter wässriger Lösung der Monomere. Die beiden prinzipiellen Reaktionsschritte sind in Abbildung 35 dargestellt und werden anschließend näher beschrieben.

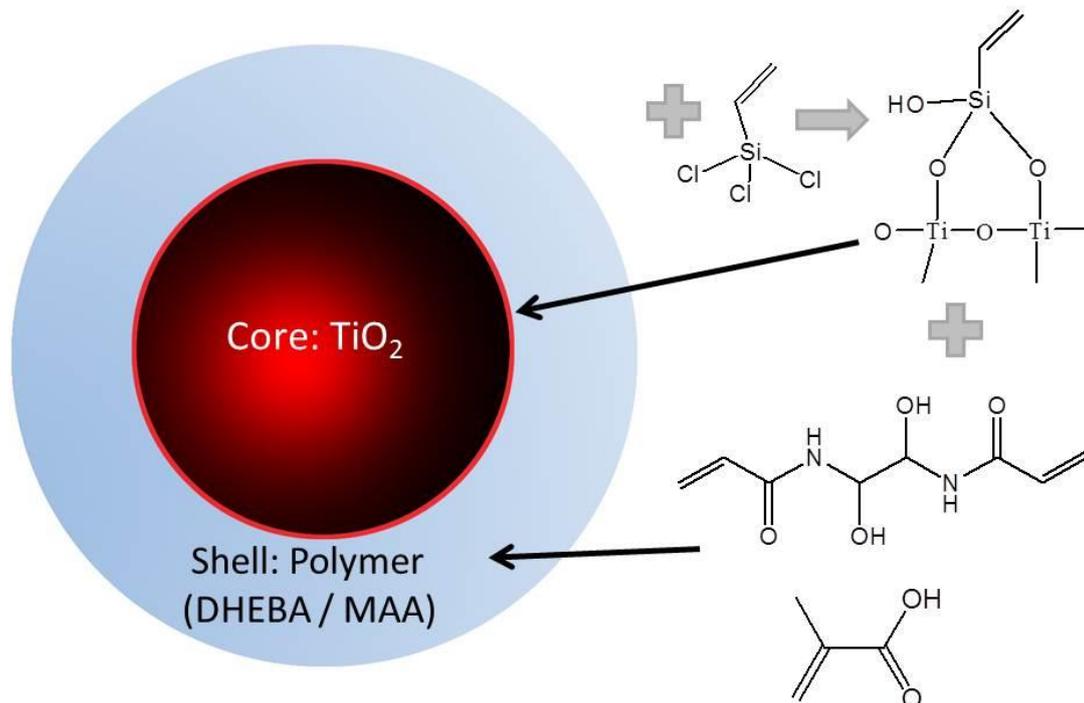


Abbildung 35: Grundsätzlicher Aufbau der Core – Shell Nanopartikel

3.5.2.1 Silanisierung

20 mg der TiO₂ Nanopartikel (<21 nm) werden in einer Lösung von 5 % Vinyltrichlorsilan in wasserfreien Toluol suspendiert und für 30 Sekunden im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wird die Mischung für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion können die Partikel abzentrifugiert und mit Toluol so lange gewaschen werden, bis in der Waschflüssigkeit kein Silan mehr mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen werden kann. Zuletzt werden die Partikel bei höchstens 40°C getrocknet. Die gelungene Silanisierung kann mittels ATR-IR nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36).

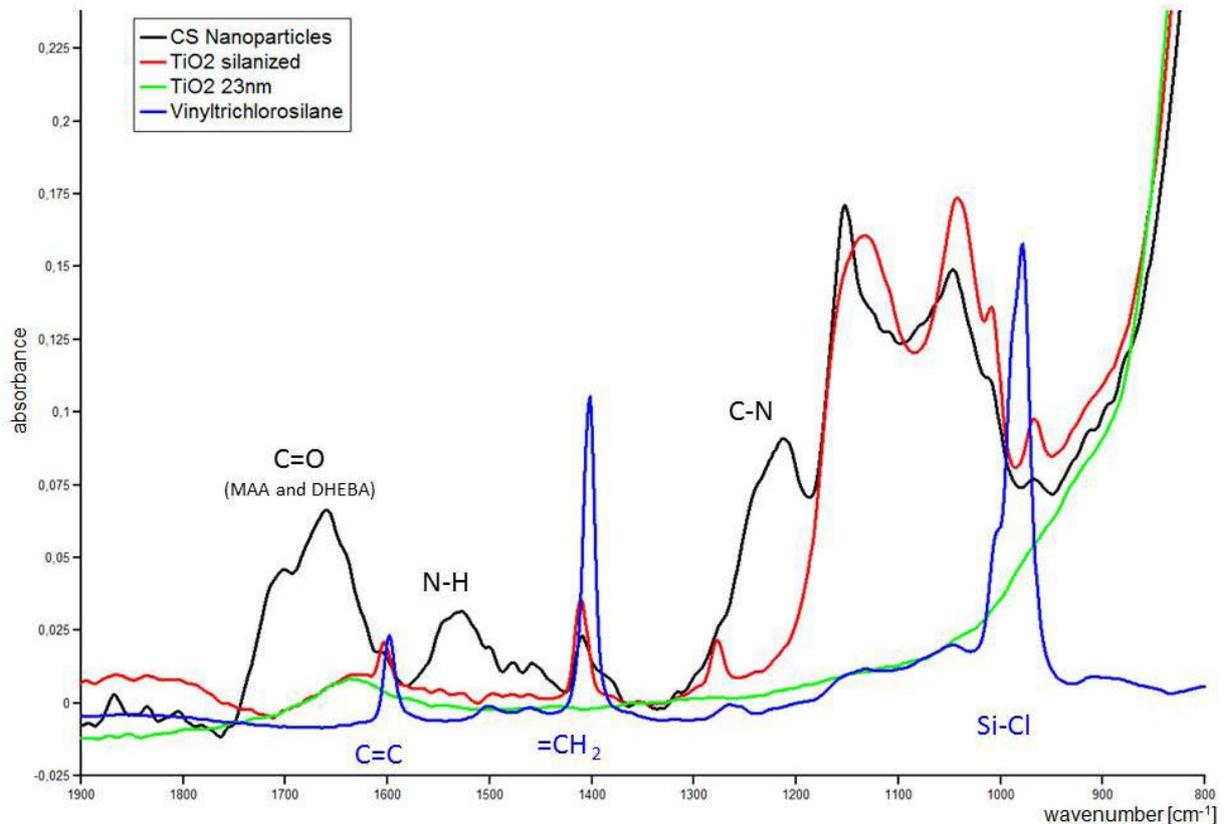


Abbildung 36: ATR-IR Spektren der finalen Core-Shell Partikel sowie aller wichtigen Zwischenprodukte, welche während des Herstellungsprozesses entstehen. Die erfolgte Silanisierung der TiO₂ Nanopartikel (rot) ist vor allem an den =CH₂ und dem C=C Peaks bei 1400 bzw. 1600 Wellenzahlen zu erkennen. Die anschließend aufsynthetisierte Polymerhülle unterscheidet sich anhand diverser breiter Banden (C=O, N-H und C-N), welche durch MAA und DHEBA entstehen (schwarzes Spektrum).

3.5.2.2 Synthese der Polymerhülle

Nach erfolgter Oberflächenmodifikation wiegt man 5 mg der silanisierten TiO₂ Nanopartikel ein und suspendiert sie in einer Lösung aus 2 mL Wasser, 14 mg DHEBA, 6 mg MAA, 1,5 mg Melamin und 5 mg PODS. Das Verhältnis wurde anhand stöchiometrischer Berechnungen gewählt um eine Polymerhülle zu erhalten, deren Dicke in etwa dem Kerndurchmesser von ca. 25 nm entspricht. Die verhältnismäßig große Menge an Wasser verhindert ein Ausfallen von reinen Polymerpartikeln. Das Reaktionsgefäß wird verschlossen und über Nacht unter kräftigem Rühren bei 55°C belassen um ein vollständiges Abreagieren der Monomere zu gewährleisten. Nach einigen Waschschrinen mit Wasser und dem Trocknen im Exsikkator kann wiederum mittels ATR-IR bestätigt werden, dass das Polymer an den Partikeln gebunden

wurde (Abbildung 36). Mittels thermogravimetrischer Untersuchung konnte der Massenanteil an Polymer beziehungsweise TiO_2 näherungsweise bestimmt werden. Die entsprechenden Ein- und Auswaagen finden sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Pyrolytische Zersetzung von CS-Partikeln

	1. Versuch [mg]	2. Versuch [mg]	1. Versuch [%]	2. Versuch [%]	m %	ca. V %*
TiO₂	3,9	3,7	68	62	65	30
Polymer	1,8	2,3	32	38	35	70

*Annahme: $\text{TiO}_2 = 4,26 \text{ g/cm}^3$ Polymer = 1 g/cm^3

Eine Bestimmung der Größe der Partikel ist weder mit spektroskopischen noch gravimetrischen Methoden möglich, weshalb zuerst auf AFM zurückgegriffen wurde.

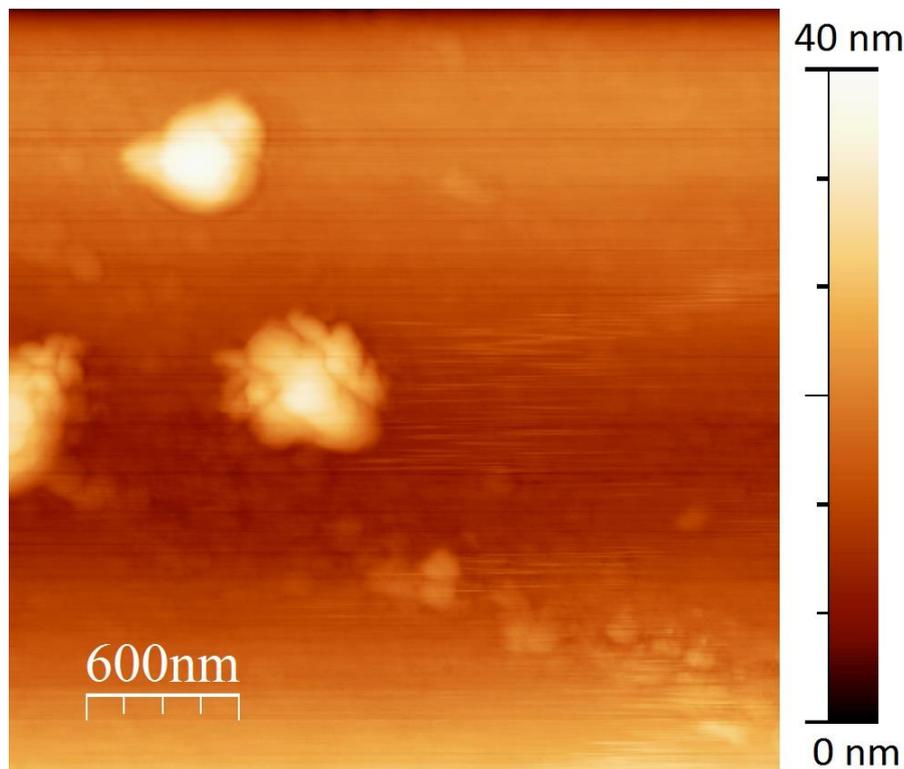


Abbildung 37: Core-Shell Nanopartikel auf einer Glasoberfläche. Neben dem Problem, dass die Partikel zu Agglomerationen neigen, erschwert zusätzlich das starke durch TiO_2 bedingte Rauschen die exakte Größenbestimmung

Die resultierenden Ergebnisse (siehe Abbildung 37) zeigen mangelndes Auflösungsvermögen aufgrund erhöhten Rauschens durch Streuung des AFM-Lasers an den TiO_2 Partikeln. Dies, sowie die Tatsache, dass grundsätzlich nicht

zwischen Polymerhülle und TiO_2 -Kern unterschieden werden kann, führte zu einer Zusammenarbeit mit der University of Southampton, welche ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zur Verfügung stellen konnte. Auf den folgenden Bildern ist sowohl der anorganische Kern als auch die organische Hülle klar zu erkennen (Abbildung 38).

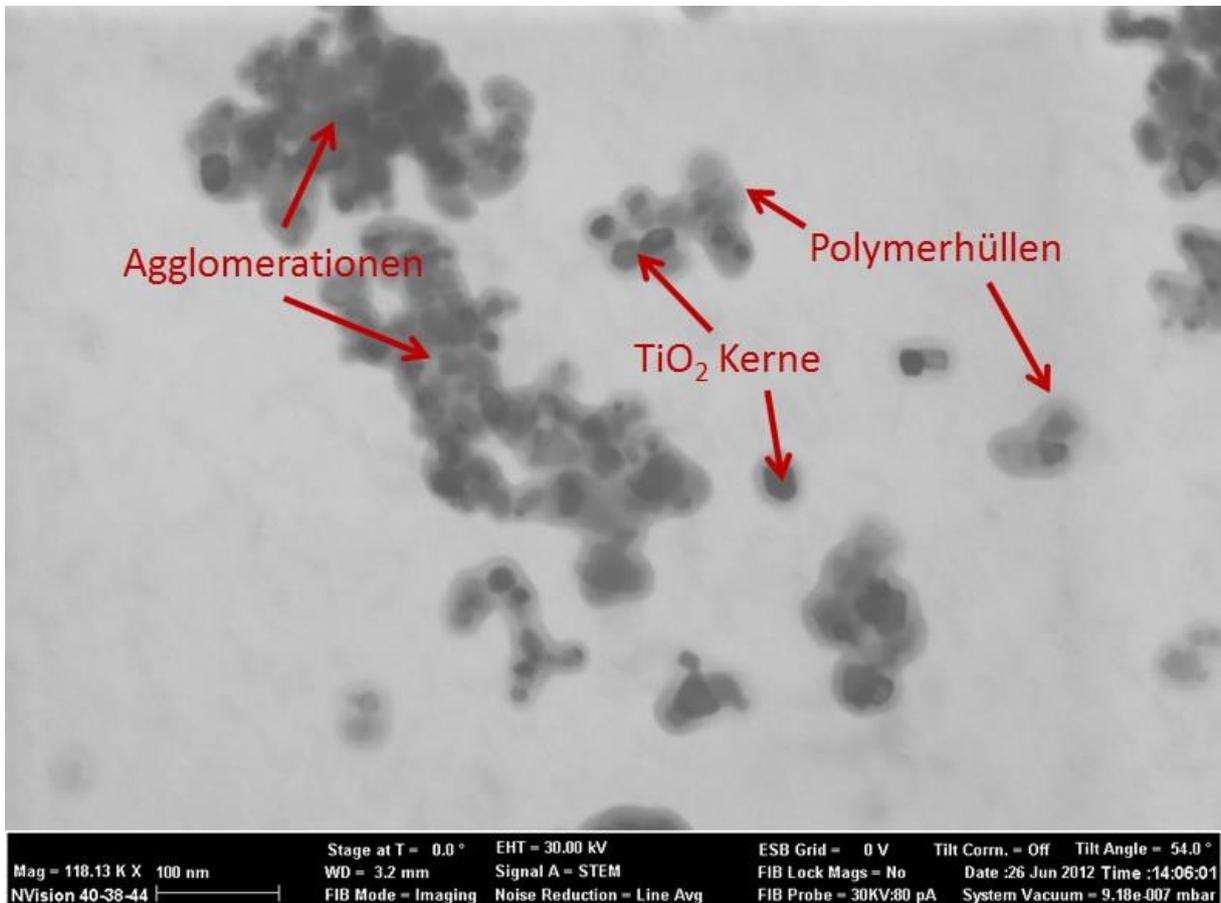


Abbildung 38: TEM – Aufnahme mehrerer Agglomerationen von Core – Shell Partikeln mit klar sichtbarem anorganischem Kern aus TiO_2 und Polymerhülle (aufgenommen an der University of Southampton von Dr. Stuart Pearce)

Der Durchmesser der Kerne beträgt meist 20-23 nm und stimmt somit mit den Herstellerangaben sowie den AFM-Aufnahmen überein. Die Hülle ist bei allen Teilchen mit einer Dicke von 10-15 nm erkennbar, wodurch der Gesamtdurchmesser lediglich 40-50 nm beträgt (siehe auch Abbildung 39). Dies ist nahezu ident mit den Maßen der in Kapitel 3.3 beschriebenen MIP-NP und macht diese CS-Partikel nicht nur zu den kleinsten jemals synthetisierten ihrer Art, sondern prädestiniert sie geradezu zum Einsatz in Nanostrukturen.

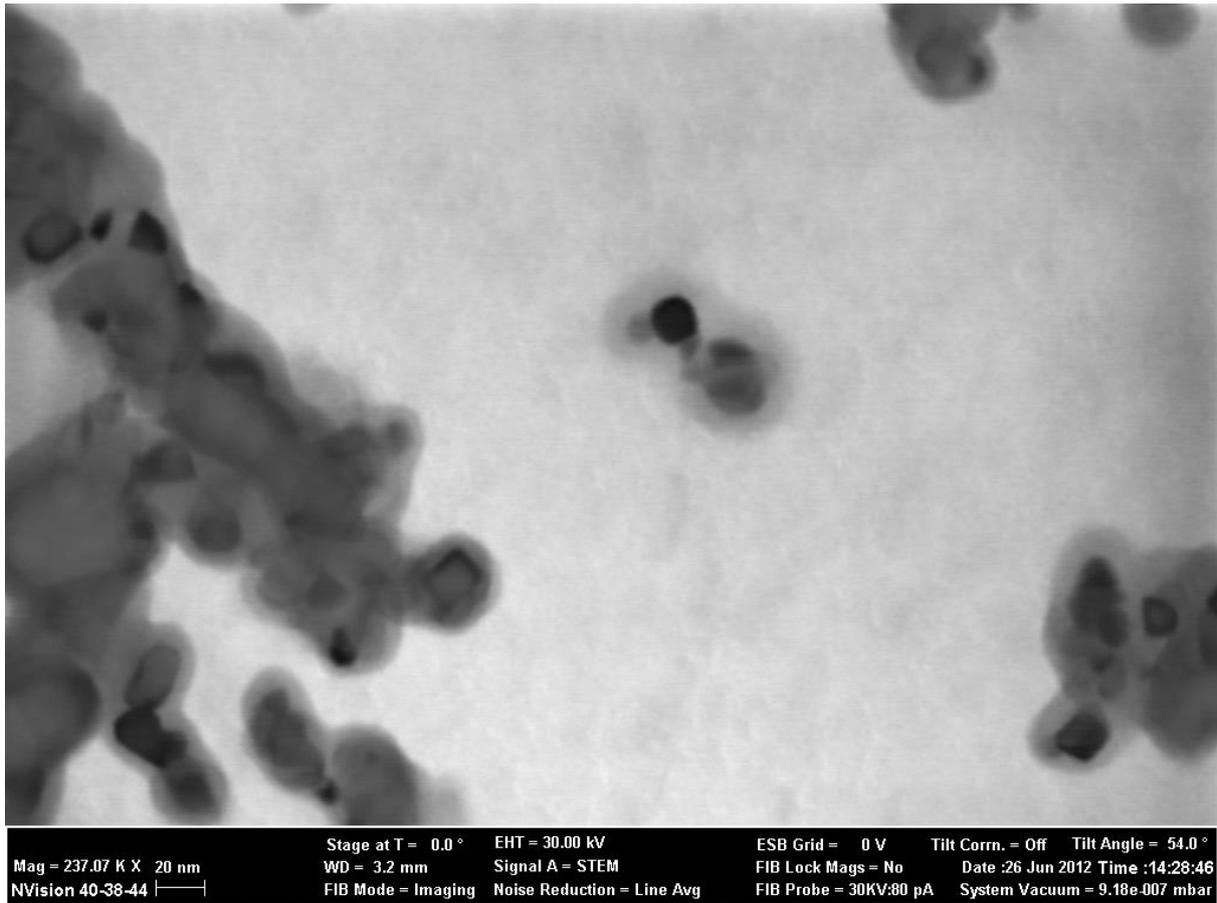


Abbildung 39: Vergrößerte Darstellung einiger Partikel zur Größenbestimmung der Kerne bzw. der Hülle

3.5.3 Beschichtungstechnik

Es wurden sowohl Versuche mit Drop- als auch Spincoating unternommen wobei beide Varianten auf QCM ähnliches Sensorverhalten zeigen. In beiden Fällen wurden 5 μL einer Suspension von 5 mg CS-NP in 500 μL Wasser auf die Elektroden aufgetragen und anschließend für mind. drei Stunden im Trockenschrank bei 65°C belassen.

Mittels Spincoating gelangen einheitlichere Filme, wodurch der Vergleich zwischen MIP und NIP aussagekräftiger ist. Bei Dropcoating verbleibt mehr Material auf den Elektroden, weshalb ein stärkeres Signal ermöglicht wird. Ein Vergleich mittels QCM ist in Kapitel 4.5.1 beschrieben.

4 Messungen

4.1 Apparative Ausstattung

4.1.1 QCM

Alle QCM-Messungen wurden mit der in der Arbeitsgruppe etablierten 2-Elektrodenteknik auf 10 MHz Schwingquarzen mit einem Durchmesser von 13,8 mm und einer Dicke von 168 μm durchgeführt. Jeder Quarz ist mit zwei Goldelektrodenpaaren von 5 bzw. 4 mm (Vorder- und Rückseite) Durchmesser versehen. Die beiden Elektroden auf der Vorderseite wurden entsprechend den Beschreibungen in den Kapiteln 3.2.3, 3.3.3 und 3.5.3 mit den funktionalisierten Materialien beschichtet wobei in der Regel eine als Mess- und die zweite als Referenzelektrode ausgeführt wird. Genaue Beschreibungen über den Aufbau der Flüssigmesszelle (Abbildung 40) sowie der Oszillatorschaltung und den Ablauf des Siebdruckverfahrens zum Aufbringen der Goldelektroden finden sich mittlerweile in unzähligen Arbeiten und können bei Bedarf dort nachgelesen werden.^{86,87}



Abbildung 40: QCM mit zwei beschichteten Elektroden im Detail (links) und mit geschlossenem Deckel(rechts) in der Flüssigmesszelle

4.1.2 SPR

Zur Verwendung kam ein Texas Instruments SPR3 System mit Spreeta® Biosensoren und angeschlossener Durchflusszelle (siehe Abbildung 41). Sowohl das SPR Gerät, als auch die Software sowie die Sensoren sind nicht mehr kommerziell erhältlich.

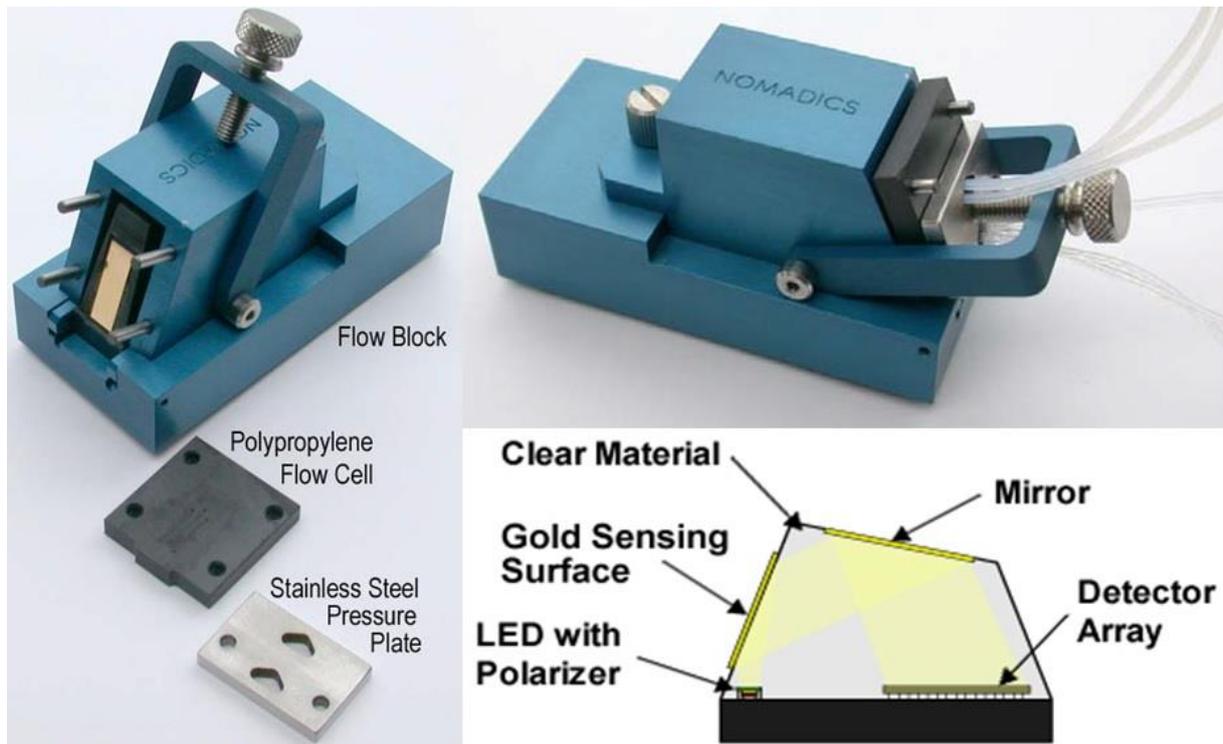


Abbildung 41: Das SPR Spektrometer mit Durchflusszelle (links offen, rechts oben geschlossen) und Sensor (Skizze rechts unten).

Die Untersuchungen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wurden durchgeführt, da das Detektionsprinzip bzw. die entscheidende Stoffeigenschaft jener der Photonic Crystal Sensoren ähnelt. Ziel ist es, ein MIP herzustellen, welches seinen Brechungsindex während der Aufnahme eines Analyten verändert. Diese Änderung sollte sowohl mittels SPR als auch Photonic Crystal Sensoren messbar sein.

4.1.3 SERS

Zur Untersuchung der MIP-SERS Kombination wurden zwei unterschiedliche Ramanspektrometer verwendet. Ein transportables Mesophotonics SE1000 konnte für einige frühe Tests an der Universität Wien eingesetzt werden. Das erheblich leistungsfähigere Nicolet Almega XR der Firma Thermo Electron stand für weitere Untersuchungen in Glasgow, Großbritannien zur Verfügung. Beide Geräte wurden von Renishaw Diagnostics zur Verfügung gestellt. Das Mesophotonics SE1000 ist nicht mehr kommerziell erhältlich, wobei die Rechte der ehemaligen Herstellerfirma von Renishaw übernommen wurden. Rückblickend ergeben sich auch aus dem Vergleich der beiden Messreihen interessante Erkenntnisse.

Bei den verwendeten SERS Substraten (Abbildung 42) handelt es sich um Klarite® Substrate aus der Produktion der Firma Renishaw. Die Basis jedes Chips bildet eine mittels Kalilauge aus Silizium nass-chemisch geätzte, invertierte Pyramidenstruktur. Die Oberflächen werden durch ein spezielles Verfahren mit einer sehr rauen Goldschicht überzogen. Die Struktur der Substrate sowie der Aufbau des Goldes sind entscheidend für den zusätzlich verstärkten Raman Effekt.

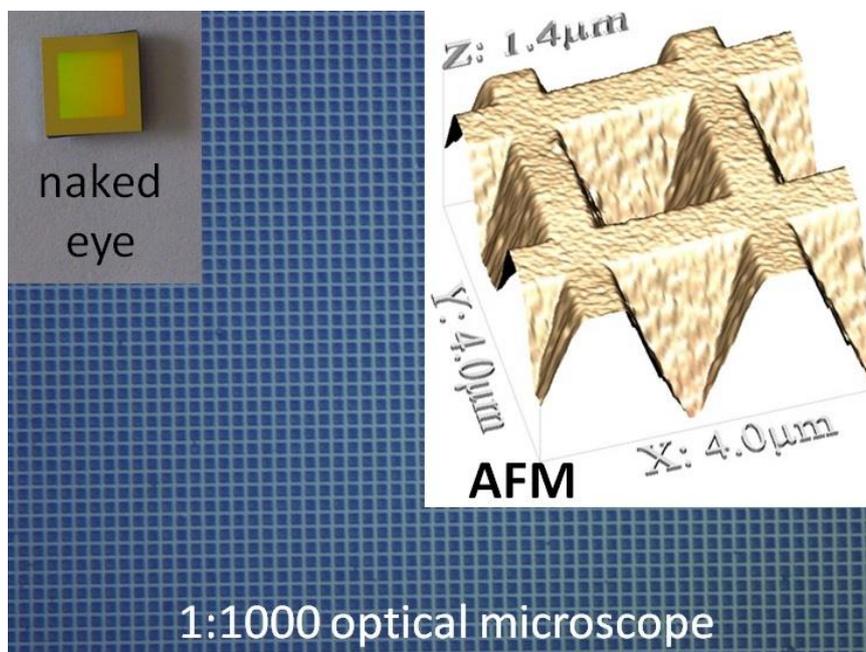


Abbildung 42: Klarite® SERS Substrate in unterschiedlichen Vergrößerungen

Anzumerken ist, dass die Signalverstärkung primär in den Kavitäten und nicht an der vergleichsweise glatten Oberseite entsteht. Anhand von Rasterelektronenmikroskopaufnahmen lässt sich die unterschiedliche Oberflächenstruktur innerhalb der Kavitäten, im Gegensatz zu den AFM Bildern, klar erkennen (Abbildung 43). Als Folge dieser Tatsache ist vor allem die Beschichtung in den Vertiefungen entscheidend. Ein „Überziehen“ der gesamten Substratoberfläche mit molekular geprägten Materialien ist daher nicht von Vorteil sondern verursacht im Gegenteil unter Umständen Diffusionsprobleme.

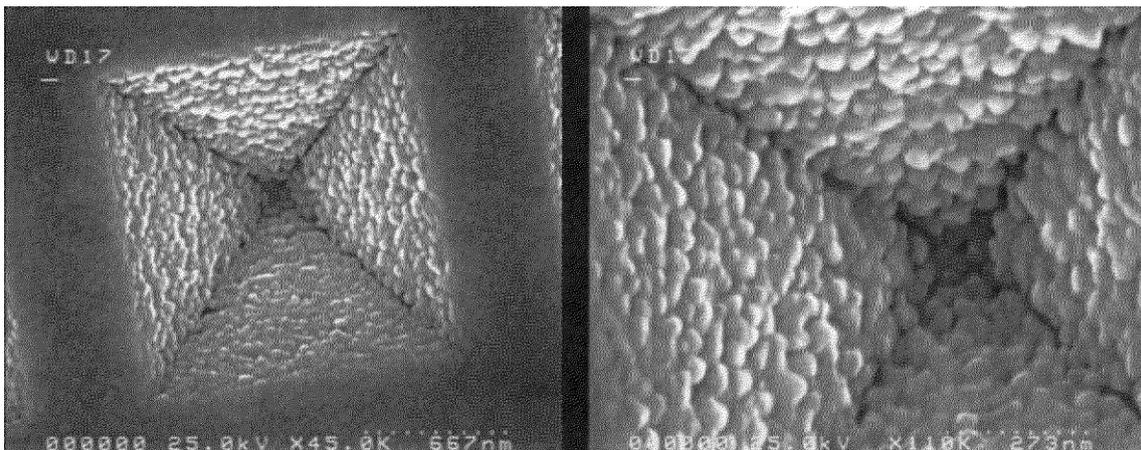


Abbildung 43: Klarite® Substrat unter einem SEM.⁸⁸ Die Oberfläche in den Vertiefungen ist um einiges rauer und liefert den größten Anteil der entscheidenden Oberflächenverstärkung.

4.1.3.1 Mesophotonics SE1000

Das vergleichsweise kleine Raman-Spektrometer ist für die Verwendung in Kombination mit Klarite® Substraten der Firma Renishaw Diagnostics optimiert (Abbildung 44).



Abbildung 44: Portables Mesophotonics SE1000 Ramanspektrometer⁸⁹ optimiert zur Messung von Klarite® Substraten

Es enthält eine Kamera um einen geeigneten Punkt auf dem Substrat zu finden und nutzt Lichtleiter zur Übertragung des Lasers (250 mW). Die Anregungswellenlänge beträgt 785 nm, die typische Messdauer lag je nach gewünschter Qualität zwischen 5 und 20 Sekunden. Sowohl Sensitivität als auch Auflösung liegen im mittleren Bereich und sind mit jenen moderner Handgeräte vergleichbar.

4.1.3.2 Thermo Nicolet Almega XR

Das Almega XR der Firma Thermo Electron ist ein hochauflösendes Ramanspektrometer mit einem extern stabilisierten Diodenlaser (500mW) mit einer Anregungswellenlänge von ebenfalls 785 nm (Abbildung 45). Standardmäßig stehen vier unterschiedliche Objektive zur Verfügung, welche den Laserstrahl auf einen Bereich von 1 bis maximal 4 μm richten (10x, 20x, 50x und 100x).



Abbildung 45: Thermo Nicolet Almega XR mit geschlossenem Probenraum und aufgesetztem Mikroskop (links) sowie Spektroskop und Laser (rechts). Bei einer Messung wird das Laserlicht direkt über die Optik des Mikroskops auf die zuvor fokussierte Stelle gelenkt. Währenddessen wird zur Sicherheit eine Blende hinter dem Okular geschlossen um Augenschäden des Benutzers zu verhindern.⁹⁰

Beim Auflösungsvermögen kann bei Bedarf zwischen 7 cm^{-1} und 2 cm^{-1} gewechselt werden. Es können kompakte Schichten, Pulver als auch Flüssigkeiten untersucht werden, weshalb es sich besonders gut zur Detektion von Signalen in MIP eignet, der durch das Einlegen in die Probenlösungen noch Feuchtigkeit enthalten kann. Durch die fortschrittliche rein softwarekontrollierte Steuerung ist es möglich die Oberfläche voll automatisch an beliebig vielen Punkten zu vermessen wodurch sogar

eine vollständige dreidimensionale Charakterisierung des Materials ermöglicht wird. Für den Großteil der Messungen wurde an jeweils mindestens fünf Punkten mit einer Raman Auflösung von 7 cm^{-1} sowie einer 20-fachen Vergrößerung des optischen Mikroskops jeweils ein Spektrum aufgenommen und das Mittel aus diesen gebildet.

4.1.3.3 Ramansignale von Melamin

Die folgende Tabelle 6 enthält die wichtigsten bekannten ATR/FTIR, FT-Raman und SERS Banden von Melamin.

Tabelle 6: Experimentell ermittelte Signale für Melamin (Wellenzahlen in cm^{-1}).⁹¹

ATR/FTIR	Raman (neutral)	SERS (neutral)	SERS (protoniert)	Schwingungsform
	376		387	δ (CN)
	580	612	575	δ (NCN) + τ (NH ₂)
	675	703	686	Ringatmungsschwingung
810				$\delta_{(\text{OOP})}$
	982	1000	979	δ (CNC) + δ (NCN)
1022	1029	1071	1077	δ (Ring) + ρ (NH ₂)
1170	1189			Ring
1194				δ + ρ (NH ₂)
	1302	1229		δ (NH)
1432	1442	1428		ν (CN) + δ (NH ₂)
1465				
		1526	1497	δ (NCN) + ω (NH ₂)
1526				ν (CN) + δ (NH ₂)
1567				
	1554		1553	δ (NH ₂)
		1617	1603	δ (NH ₂)
1626				
1646				
	1657		1692	δ (NH ₂)
			3220	ν (NH)
3123				
	3130			
3178	3318	3205		
3323	3417	3322		
3417	3468			
3468				

δ = Deformationsschwingung (bending)

τ = Drehschwingung (twisting)

$\delta_{(OOP)}$ = Deformationsschwingung aus der Molekülebene des Ringes (out of plane)

ρ = Schaukelschwingung (rocking)

ν = Streckschwingung (stretching)

ω = Wippschwingung (wagging)

Die SERS Werte der Tabelle wurden mit einem 532 nm Laser und mit Hilfe von Silbernanopartikeln aufgenommen. Für die Detektion im Rahmen dieser Arbeit sind primär die Ringatmungsschwingungen von Bedeutung (703 und 686 cm^{-1}), wobei angemerkt werden muss, dass sich diese durch den veränderten experimentellen Aufbau um einige Wellenzahlen verlagern können (Gold statt Silber, 785 nm anstatt eines 532 nm Lasers).

4.2 Dünne Filme

Die entwickelten molekular geprägten Polymere werden als dünner Film auf die jeweiligen sensitiven Oberflächen (QCM, SPR und SERS) aufgetragen. Diese Variante ist präparativ am einfachsten und liefert in der Regel gut reproduzierbare Daten, da die Schichtdicke sehr gut kontrollierbar ist. Dies sind auch die Gründe weshalb nahezu jedes entwickelte MIP erst in Form einer Schicht auf QCM Sensoren erprobt wird. Die im Vergleich zu den Nanopartikeln homogene und glatte Oberfläche verspricht außerdem bessere Ergebnisse in Bezug auf Querselektivitätsmessungen. Mit dünnen Filmen wurden daher auch Untersuchungen der Wechselwirkungen von Melamin mit diversen Proteinen sowie die ersten Messungen in realer Probenmatrix, wie beispielsweise Milch, durchgeführt.

4.2.1 QCM

Die für Melamin geprägten dünnen Filme waren die ersten für „PHOTOSENS“ synthetisierten molekular geprägten Materialien. QCM-Messungen sind nun einerseits nötig um die prinzipielle Funktion der MIP zu testen bevor diese mit neuen Messprinzipien kombiniert werden, andererseits ist die fehlende Selektivität der Quarzmikrowaage von großem Vorteil um Querselektivitäten des MIP bezüglich diverser Moleküle festzustellen, welche mit den anderen analytischen Methoden grundsätzlich keine Signale liefern.

4.2.1.1 Dünne Schichten im Vergleich mit früheren Messungen

Konzentrationsabhängigkeit

Zu Beginn wurde eine Konzentrationsabhängigkeit von Melamin mit den neuen dünnen Filmen gemessen (Abbildung 46).

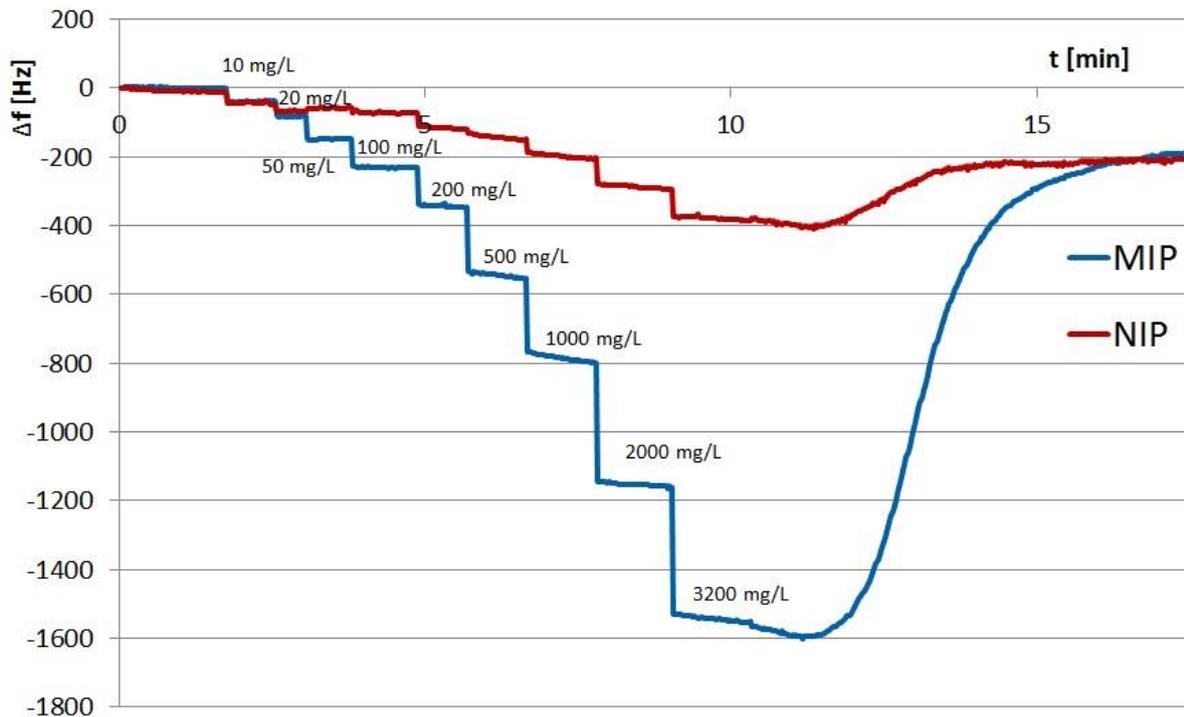


Abbildung 46: Konzentrationsabhängigkeit von Melamin an einem mit je 100 nm MIP bzw. NIP beschichtetem 10 MHz QCM Sensor.

Hierbei ist hauptsächlich der Unterschied zwischen MIP und NIP von Interesse, da die Polymerfilme auf beiden Elektroden je eine Schichtdicke von nur etwa 100 nm aufweisen und damit Anlagerungen an der Oberfläche eine stärkere Rolle spielen als bei den bekannten etwa zehn Mal so dicken Beschichtungen. Dennoch ergibt sich ein Signalverhältnis von 3,9 bei einer Konzentration von 3200 mg/L.

Zum Vergleich ist in Abbildung 47 Das Differenzsignal zwischen MIP und NIP, also Mess- und Referenzelektrode abgebildet. Für QCM Messungen ist dies oft aussagekräftiger als die beiden einzelnen Signalkurven, da tatsächlich nur der Effekt des Imprints abgebildet wird. In vielen Fällen ist es dennoch sinnvoll beide Elektroden bzw. Polymere getrennt zu betrachten. Mit Ausnahme von diesem Beispiel wurde jedoch darauf verzichtet stets beide Varianten abzubilden, da es den Rahmen dieser Dissertation bei einem minimalen zusätzlichen Informationsgewinn sprengen würde.

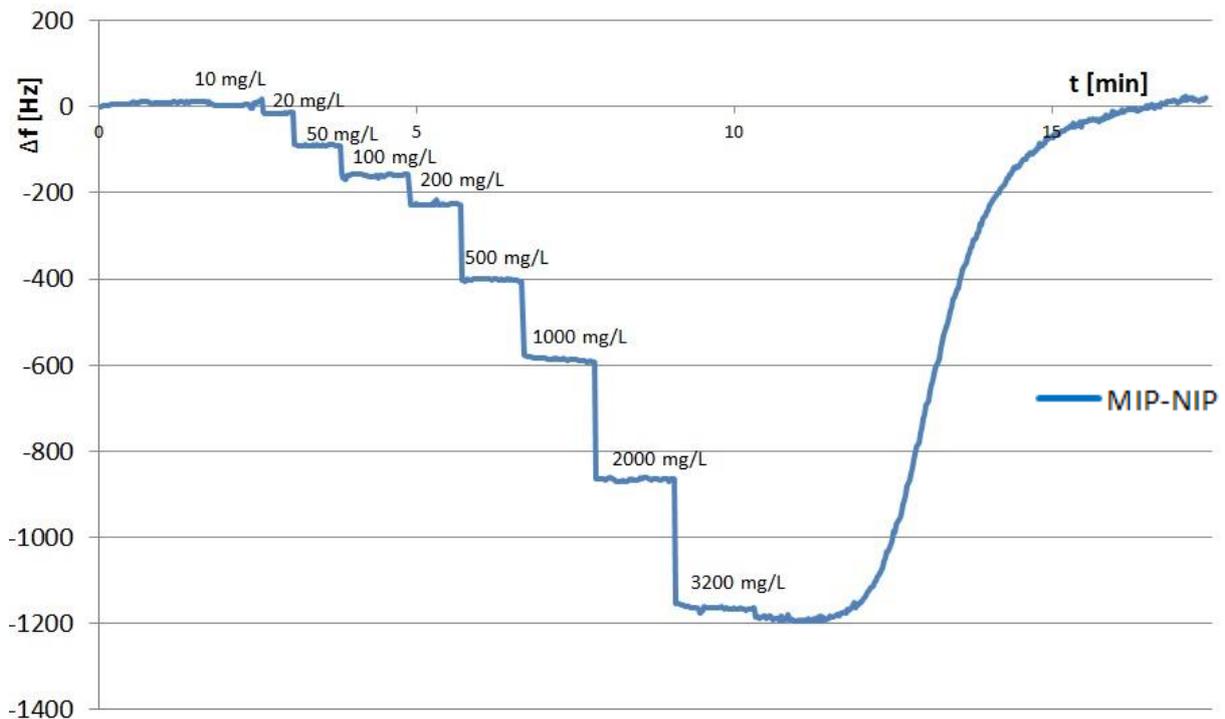


Abbildung 47: Differenzsignal (MIP-NIP) der bereits in Abbildung 46 gezeigten Konzentrationsabhängigkeit.

Ein Vergleich zwischen der 100 nm und einer 1 μm Schicht ist in Abbildung 48 zu sehen. Abgebildet ist jeweils das Differenzsignal zwischen zwei mit MIP bzw. NIP beschichteten Elektroden bei einer bestimmten Melaminkonzentration. Die Unterschiede sind vor allem bei größeren Konzentrationen sehr ausgeprägt, da sich die dünnere Schicht (~ 100 nm) schneller mit Melamin sättigt als eine vergleichsweise dicke (~ 1 μm). Da primär die qualitative Detektion von geringen Mengen an Melamin von Interesse ist, entsteht durch dieses Ansprechverhalten kein wesentlicher Nachteil. Der dynamische Bereich lässt aber auch bei den dünneren Schichten Messungen bis hin zu einer gesättigten Melaminlösung zu.

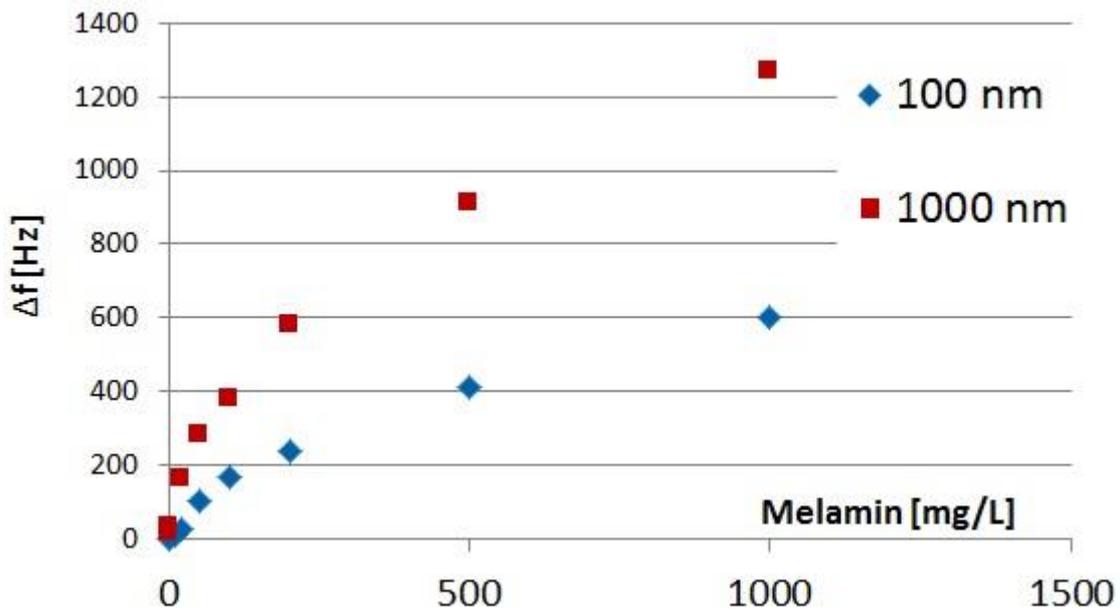


Abbildung 48: Signalstärke (Differenzsignal) in Abhängigkeit der Melaminkonzentration bei unterschiedlichen Polymerschichtdicken.

Querselektivität

Um die Effektivität des MIP näher zu charakterisieren wurden zusätzlich zu einem Protein sowie Zucker, welche in realen Proben vorkommen, einige Verbindungen mit dem Melamin ähnlicher Struktur gewählt und Querselektivitätstests durchgeführt. Die Ergebnisse dienen primär zum Vergleich mit den anschließend entwickelten Nanopartikeln und sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Im Fall von Anilin wurde ein anderer QCM Sensor verwendet, weshalb das Melaminsignal von den anderen Analyten abweicht. Entscheidend ist stets das Verhältnis zwischen Melamin- und Analytsignal, wobei jeweils 100 mg/L Lösungen gemessen wurden. Einzige Ausnahme bildet, aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit, Mesitylen mit 10 mg/L.

Tabelle 7: Querselektivitäten für dünne Filme (jeweils Signale MIP-NIP)

Analyt	Melaminsignal [Hz]	Analysignal [Hz]	Signalverhältnis
Pyridin	300	120	2,50
Phenol	300	0	0,00
BSA	300	100	3,00
Glukose	300	0	0,00
Anilin	800	200	4,00
Mesitylen	140	50	2,80

Die Signale entsprechen dem Wert der Messelektrode abzüglich der Referenz (MIP minus NIP). Phenol und Glukose (D(+)-Glukose) lagern sich lediglich an der Oberfläche an, weshalb das Signal bei MIP und NIP ident und das Differenzsignal Null ist. Eiweißstoffe wie BSA sind innerhalb der Arbeitsgruppe bekannt für Interaktionen mit Acrylatsystemen, weshalb diese seit Längerem gezielt für die Detektion diverser Proteine, aber auch Blutzellen sowie Bakterien, Viren und Hefen genutzt werden⁹². Das höhere Signal am MIP ergibt sich möglicherweise aus der durch die etwas rauere Oberfläche, welche aufgrund der Verwendung des Templates Melamin entsteht. Pyridin, Mesitylen und Anilin dienen praktisch ausschließlich der Überprüfung des Imprints, da sie nicht in Nahrungsmitteln vorkommen sollten. Die Selektivitäten sind mit dem 2,5 bis 4-fachen Signal bei Melamin gegenüber den chemisch sehr ähnlichen Molekülen weitestgehend zufriedenstellend. Offenbar liefert das Anilin (wegen der H-Brücken) das relativ höchste Signal, gefolgt von Mesitylen und Pyridin, die annähernd gleich liegen. Offenbar spielt die primäre Aminogruppe die etwas größere Rolle, als der Ring (Strukturen siehe Abbildung 49).

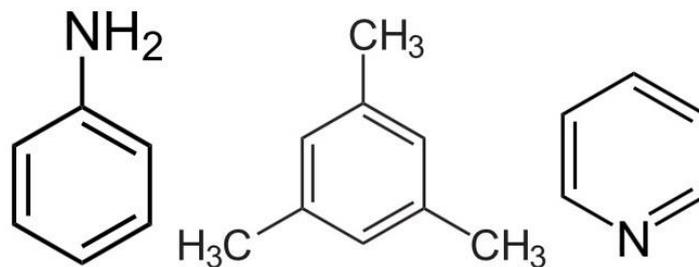


Abbildung 49: Anilin, Mesitylen und Pyridin (v.l.n.r.).

4.2.1.2 Messungen in Realproben

Das Ziel jeder Entwicklung der Analytischen Chemie ist der Einsatz zum Nutzen der Gesellschaft. Im Fall der Schnellanalytik ergeben sich daraus die besonderen Erfordernisse einer Methode mit nach Möglichkeit einfacher oder völlig fehlender Probenvorbereitung. Dies bedeutet, dass das entwickelte Untersuchungsprinzip tunlichst inert gegenüber diversen Einflüssen der umgebenden Medien sein sollte und dennoch eine ausreichende Sensitivität betreffend dem Zielanalyten bereitstellen muss.

Bei Melamin kommen praktisch ausschließlich Proben im Lebensmittelbereich in Frage. Neben diversen bekannten Verunreinigungen in z.B. Backmischungen, Hirschhornsalz, oder Lutschnbonbons sind daher vor allem Milch und Milchprodukte von Interesse.⁹³ Bei der Verwendung der QCM ergeben sich nun mehrere Nachteile aufgrund der Diversität der enthaltenen Substanzen. Eine Messung mit konstantem Fluss der zu untersuchenden Lösung führt beispielsweise bei Milch zu äußerst starkem Rauschen und verhindert dadurch grundsätzlich jegliche Messung. Dieses Problem entsteht durch die Wasser-Fett Emulsion und kann einfach durch Stoppen der Pumpen, das heißt durch Messung in stehender Lösung, umgangen werden (siehe Abbildung 50).

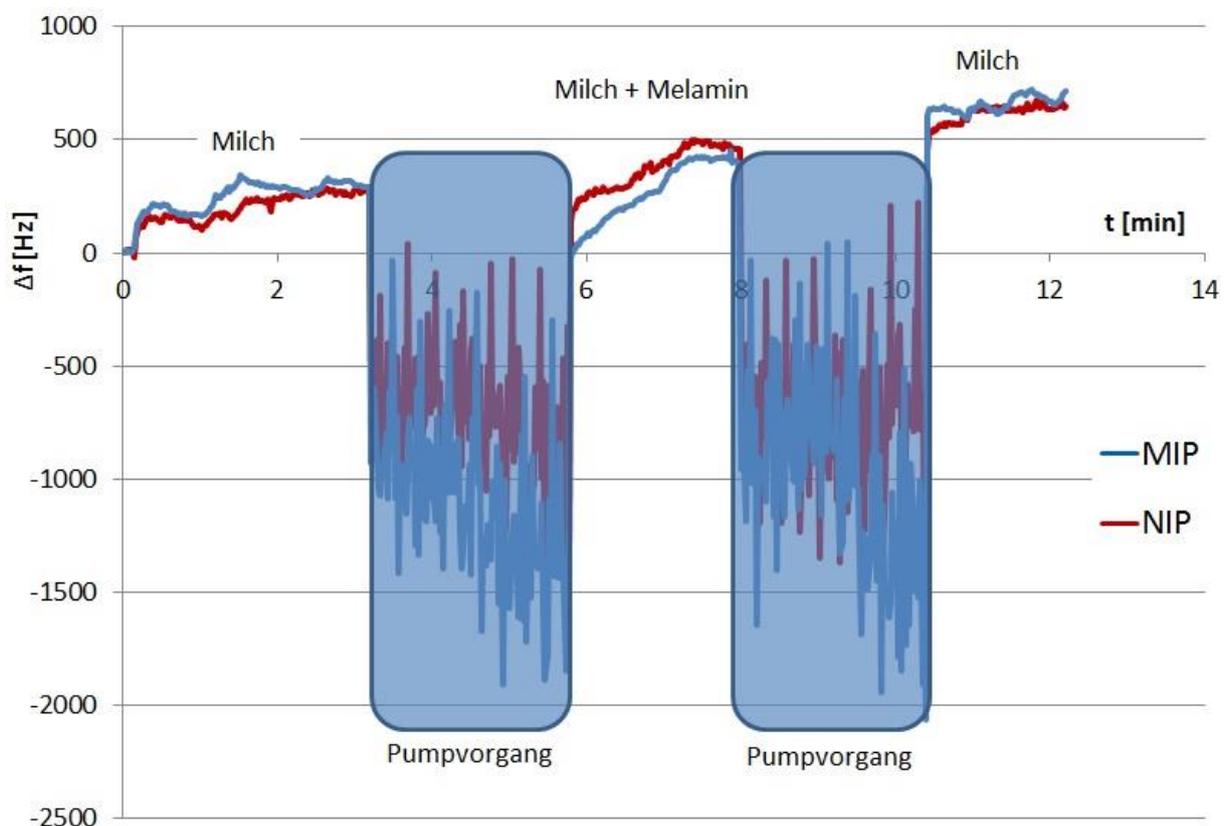


Abbildung 50: QCM Messung von mit Melamin gesättigter Milch (0,5 % Fett). Aufgrund bis dahin unbekannter Matrixeffekte kein Signal von Melamin. Stark erhöhtes Rauschen durch die verwendete Milch bei den Pumpschritten.

Trotz dieses Vorgehens konnte bei der Verwendung von Halbfettmilch keinerlei Frequenzänderung bei Melaminzugabe festgestellt werden. Selbst die Verwendung von mit Melamin gesättigter Milch ergab kein signifikantes Signal. Zum Vergleich ist in Abbildung 51 eine Messung in Wasser mit gesättigter Melaminlösung dargestellt,

welche mit dem selben Sensor im Anschluss an die in Abbildung 50 aufgenommene Messung entstand. Vor dieser Messung wurden die Messzelle etwa drei Stunden mit Wasser gespült um die Oberflächen der Elektroden von Resten der Milch zu säubern. Die Frequenz ändert sich um 2300 Hz an der Mess- und um etwa 400 Hz an der Referenzelektrode. Dies zeigt, dass die Milch den Sensor zwar nicht beschädigen, die Detektion von künstlich zugesetztem Melamin jedoch gänzlich verhindern konnte. Die Ursache hierfür war bislang unbekannt.

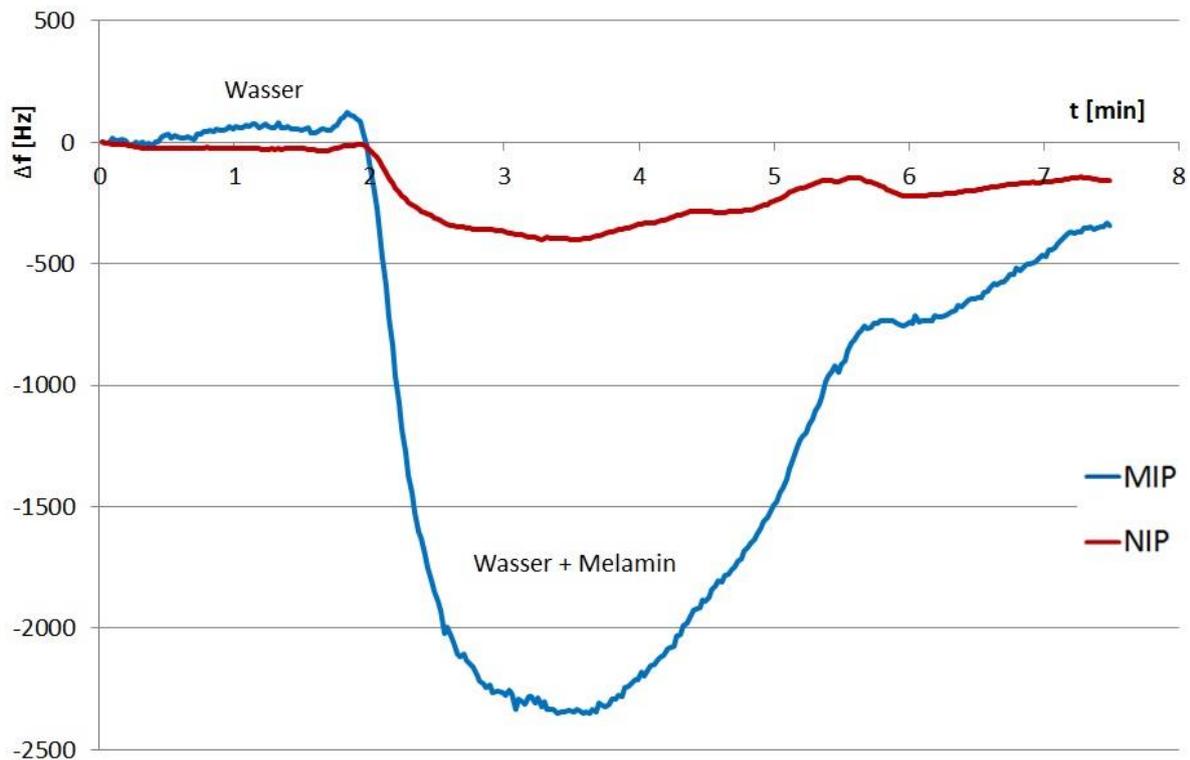


Abbildung 51: Messung einer wässrigen, gesättigten Melaminlösung mit demselben Sensor wie in Abbildung 50. Der Messeffekt ist klar erkennbar. Ebenso kaum verstärktes Rauschen bei den Pumpvorgängen. Aufgrund der zeitlichen Abfolge lässt sich damit sagen, dass der Sensor durch die zuvor verwendete Milch nicht in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Aufgrund der Zusammensetzung der Milch ergeben sich mehrere Möglichkeiten von Interaktionen zwischen dem Sensor, dem Melamin oder auch beiden mit beispielsweise Zuckern, Proteinen oder Fetten.

Um zu erkennen, welche Bestandteile für den Signalverlust verantwortlich sind, wurden mehrere Untersuchungen mit verschiedenen Lebensmitteln durchgeführt. Bereits beim Verdünnen der Half fettmilch mit Wasser auf ein Zehntel ist es möglich ein eindeutiges, aber immer noch sehr schwaches Signal zu erhalten. In Abbildung 52 ist des Weiteren zu erkennen, dass der Unterschied zwischen den mit MIP und

NIP beschichteten Elektroden vergleichsweise gering ist. Dies ist, neben dem geringen Signal, ein Zeichen dafür, dass sich nur wenig Melamin an den sensitiven Schichten angelagert hat. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Melamin innerhalb der Probenmatrix gebunden wird und keine negative Beeinträchtigung des Sensors im eigentlichen Sinn durch das umgebende Medium vorliegt.

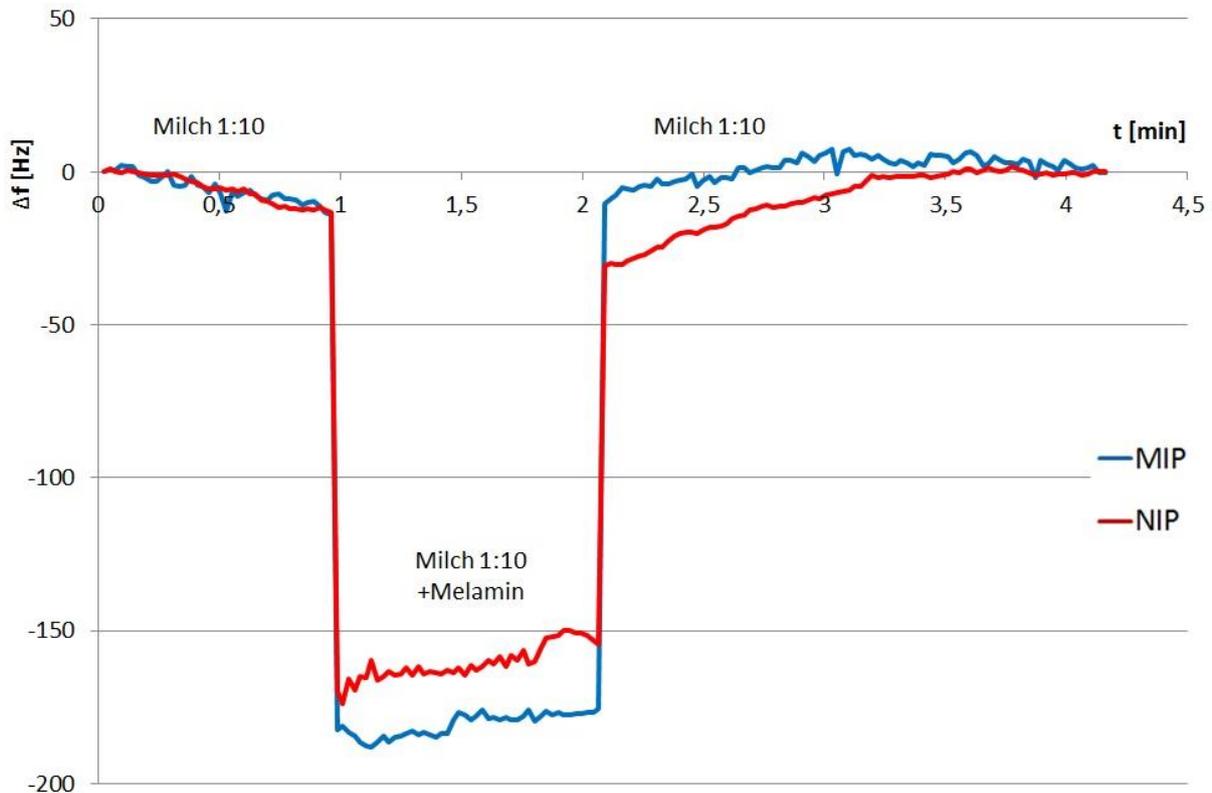


Abbildung 52: Signal einer mit Melamin gesättigten, 1:10 verdünnten Half fettmilch. Der geringe Unterschied zwischen MIP und NIP sowie das in Summe eher geringe Signal sind ein Hinweis darauf, dass Melamin in Lösung gebunden wird.

Betrachtet man die Hauptinhaltsstoffe der Milch und vergleicht diese mit der Struktur von Melamin, geraten zuerst die Proteine in Verdacht. Eine Wechselwirkung zwischen dem Analyten und den Aminosäuregruppen scheint naheliegend und konnte durch die Verwendung von Molke als Medium näher untersucht werden. Diese enthält im Vergleich zur Half fettmilch weniger Fett (0,1 statt 0,5 %) und wesentlich weniger Eiweiß (0,6 statt 3,5 %). Der Gehalt an Zucker unterscheidet sich nicht signifikant (4,1 bzw. 4,9 %). Verglichen mit Milch war nicht nur ein stärkeres Signal bei gesättigter (3200 mg/L) Melaminlösung in Molke erreichbar, sondern zusätzlich ein deutliches Signal bei 320 mg/L (siehe Abbildung 53). Durch den wesentlich geringeren Fettanteil und damit verminderte Dichteschwankungen an den

Elektroden verringern sich zusätzlich das Rauschen während den Pumpvorgängen sowie der Frequenzunterschied bei der Basislinie zu reinem Wasser.

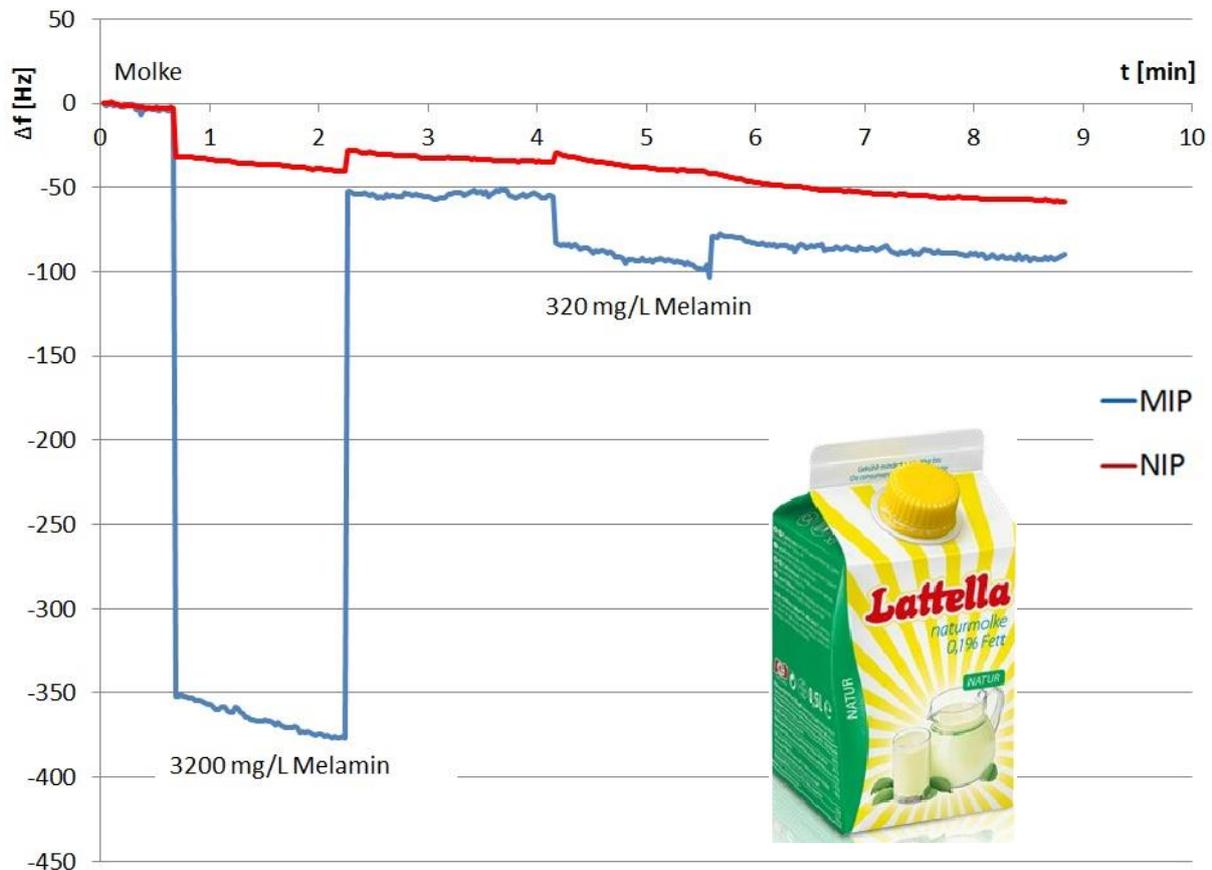


Abbildung 53: QCM-Signale von Melamin in Molke. Die Signale fallen im Vergleich zu Messungen in Milch zwar deutlicher aus, sind aber nicht so stark wie in rein wässriger Lösung. Der Test gibt aufgrund der unterschiedlichen Inhaltsstoffe in Milch und Molke wichtige Hinweise bezüglich der Signalhemmung.

In Folge wurde ebenfalls 1:10 verdünnte Molke mit diversen Konzentrationen von Melamin gespiked. Als Beispiel ist in Abbildung 54 die Messung von 3,2 mg/L Melamin abgebildet. Zu Beginn und am Ende der Messung (bis 4 und ab 12 min) ist die Grundlinie der reinen, verdünnten Molke zu sehen. Die Messung der mit 3,2 mg/L versetzten Molke erfolgte zwischen Minute 7 und 8. Jeweils davor und danach hervorgerufene Frequenzunterschiede sind ein Resultat der Druckschwankungen durch den Pumpvorgang in der inhomogenen flüssiger Phase.

Die Signalstärken unterscheiden sich auch nach längerer Verwendung des Sensors über mehrere Tage hinweg nur noch geringfügig von jenen in Wasser. Dies bedeutet, dass keine starke Beeinträchtigung des MIP durch Inhaltsstoffe des Mediums eintritt.

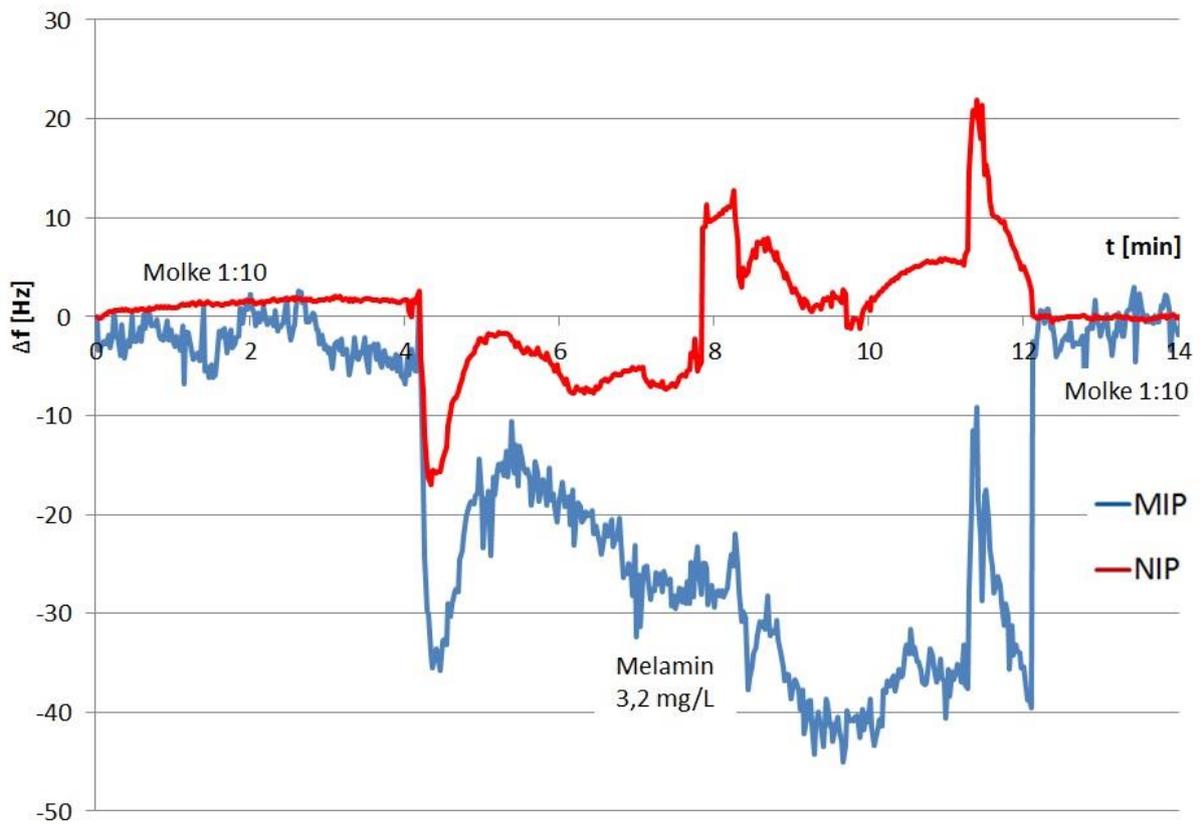


Abbildung 54: Messung von 3,2 mg/L Melamin in 1:10 verdünnter Molke. Relevant ist für Melamin das Signal beim Stillstand der Pumpen bei Minute 7 bis 8.

Alle beschriebenen Messungen im Kapitel 4.2.1.2 wurden mit demselben QCM Sensor aufgenommen und können daher direkt in Tabelle 8 verglichen werden.

Tabelle 8: Signalstärke in Abhängigkeit unterschiedlicher Umgebungsmedien

Matrix	% Fett*	% Protein	% Zucker	Signal*
Wasser	0	0	0	1150
Milch 1:10	0,05	0,35	0,49	30
Milch	0,5	3,5	4,9	-
Molke 1:10	0,01	0,06	0,41	950
Molke	0,1	0,6	4,1	366

* jeweils in mit Melamin gesättigter Lösung

Bei zusätzlichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Menge an gelöstem Zucker keinen Einfluss auf das Melaminsignal hat. Bei Milch sind der vergleichsweise hohe Anteil an Fett und die damit einhergehenden Dichteunterschiede bei

Pumpvorgängen ein Problem, wenn eine Messung mittels QCM erfolgen soll. Mit Ausnahme der verdünnten Milch ist der Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt und der Signalstärke am auffälligsten (Abbildung 55).

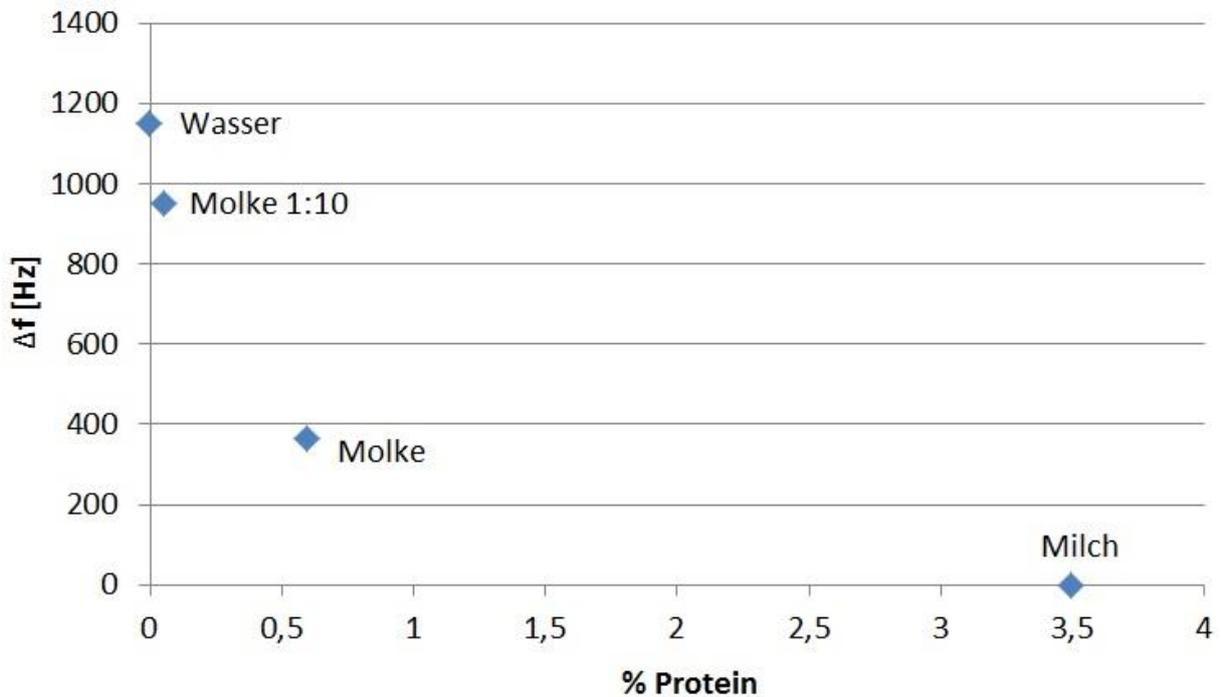


Abbildung 55: Signal in verschiedenen Medien in Abhängigkeit der Proteinkonzentration.

Als Folge dieser Ergebnisse konnte mittels Zentrifugieren aus handelsüblicher, fettarmer Molke das entsprechende Serum gewonnen und für weitere Tests herangezogen werden um die Rolle der Proteine näher zu untersuchen (Abbildung 56). Hierfür wurde eine Eppendorf Mikrozentrifuge vom Typ 5424 bei maximaler Drehzahl eingesetzt (14680 rpm bzw. RZB = 20238 g für 15 Minuten).

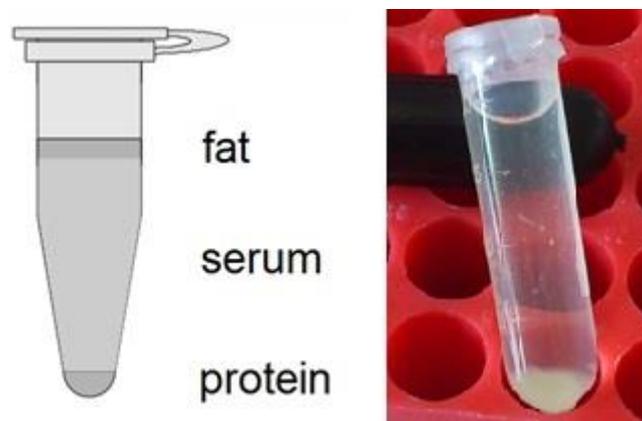


Abbildung 56: Gewinnung von Molkeserum mittels Zentrifugation. Am Boden des Zentrifugentröhrchens ist unlösliches Protein erkennbar.

Um mit Melamin versetztes Molkeserum herstellen zu können werden grundsätzlich zwei unterschiedliche Wege gewählt. Entweder man versetzt die Molke vor dem Zentrifugationsschritt mit Melamin oder danach. Beide Varianten wurden hergestellt und anschließend mit dem MIP-QCM Sensor untersucht (Ergebnis siehe Abbildung 57).

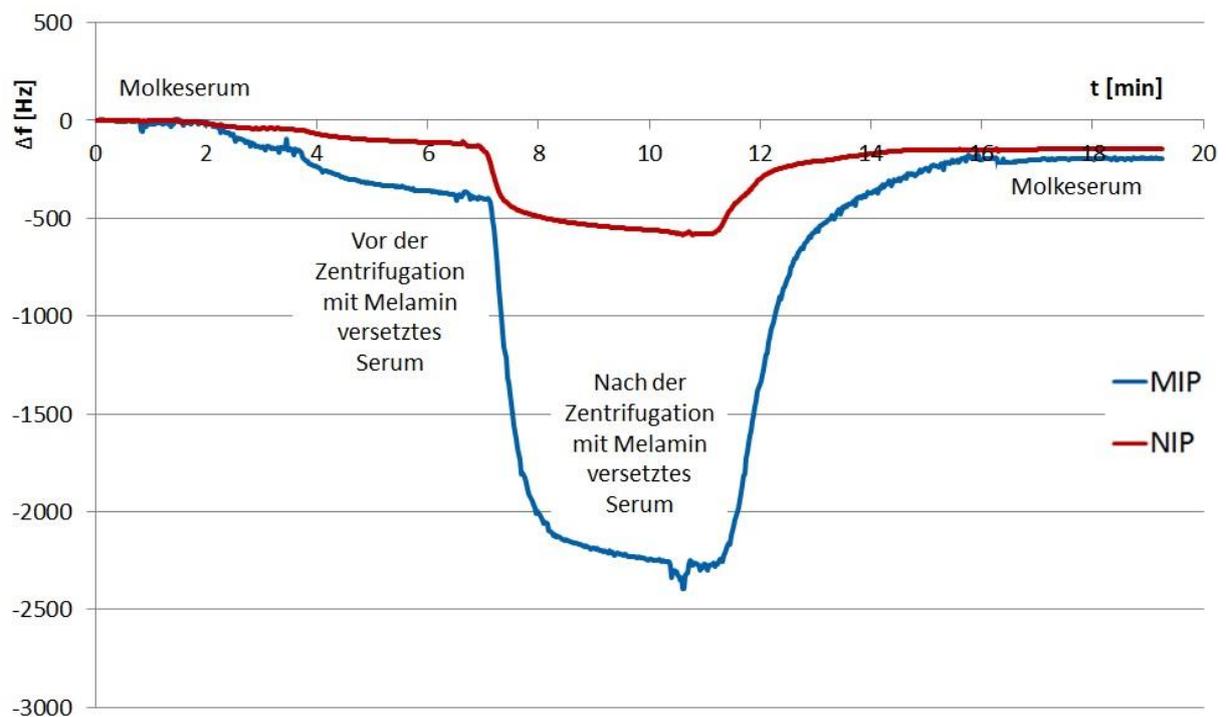


Abbildung 57: Zu unterschiedlichem Zeitpunkt mit Melamin versetzte Proben (je 3200 mg/L) zeigen stark unterschiedliches Signal. Grund hierfür ist an Protein gebundenes Melamin, welches im ersten Fall abzentrifugiert und anschließend verworfen wird.

Der frappierende Unterschied der beiden Signale ist dadurch begründet, dass Melamin zum Teil an unlösliche Proteine (z.B. Kasein) gebunden und durch die Art der Probenvorbereitung abzentrifugiert und verworfen wird. Zentrifugation ist daher ein Schritt der nur in Frage kommt, wenn ausreichend Melamin in Lösung verbleibt um mit der jeweiligen Untersuchungsmethode detektiert zu werden.

Diese Erkenntnis ist vor allem deshalb von Bedeutung, da außergewöhnlich viele analytische Methoden zur Detektion von Melamin auf einen Zentrifugationsschritt bei der Probenvorbereitung zurückgreifen.^{94,95,96} Davon sind auch weit verbreitete und etablierte Methoden wie chromatographische Verfahren und kommerziell erhältliche ELISA-Tests betroffen.⁹⁷ Bedenklich hierbei ist jedenfalls, dass eine quantitative

Aussage praktisch nicht möglich sein kann, da die Menge an Protein bzw. Eiweiß in den Proben variiert und insbesondere bei tatsächlich mit Melamin versetzten Lebensmitteln gänzlich unbekannt ist. Dadurch wird auch bei etwaigen Standardadditionsmethoden immer eine unbekannte Menge Melamin verworfen. Eine qualitative Aussage ist zwar unter Umständen möglich, die bei den jeweiligen Methoden angegebenen Nachweisgrenzen sollten jedoch überdacht werden.⁹⁸

Eine denkbare aber sehr aufwendige Probenvorbereitung wäre beispielsweise ein starkes Erhitzen der Proben. Dies sollte aufgrund der hohen Zersetzungstemperatur von Melamin (350°C) dazu führen, dass Aminosäuren (Zersetzungstemperaturen < 300°C) pyrolytisch zersetzt werden, der Analyt jedoch anschließend wieder in Wasser aufgenommen und „ungestört“ detektiert werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die im Rahmen von „PHOTOSENS“ entwickelte Methode lediglich dem Screening dienen soll, also eine qualitative aber rasche Aussage benötigt wird, wurde diese Art der Probenvorbereitungen nicht untersucht.

Aus den Ergebnissen geht nicht hervor, inwiefern lösliche Proteine wie beispielsweise Serumalbumin mit Melamin wechselwirken. Untersuchungen dazu sind im folgenden Kapitel beschrieben.

4.2.1.3 Melamin-Protein Abhängigkeit

Anhand der in realen Proben gewonnenen Erfahrungen und der Erkenntnis, dass sich Melamin an Proteine bindet, wurde diese Abhängigkeit anhand der Proteine BSA (bovines serum albumin) und Kasein untersucht.

Bovines Serum Albumin hat den Vorteil sehr guter Wasserlöslichkeit. Somit konnten wässrige Lösungen mit bis zu 3,5 % Proteingehalt (entspricht dem Gehalt in Vollmilch) hergestellt, mit Melamin versetzt und vermessen werden. In natürlicher Milch kommt es zu 1,2 % vor und ist Teil der Molkenproteine, welche wiederum 20 % aller in der Milch enthaltenen Eiweißstoffe bilden. Kasein hat im Gegensatz zu BSA eine sehr geringe Wasserlöslichkeit und eignet sich daher ideal zum Vergleich. Verwendet wurde bovines Kasein (Mischung aus α S1-, α S2-, β - und κ -Kasein), welches mit etwa 80 % den größten Teil der in Kuhmilch vorhandenen Proteine stellt.

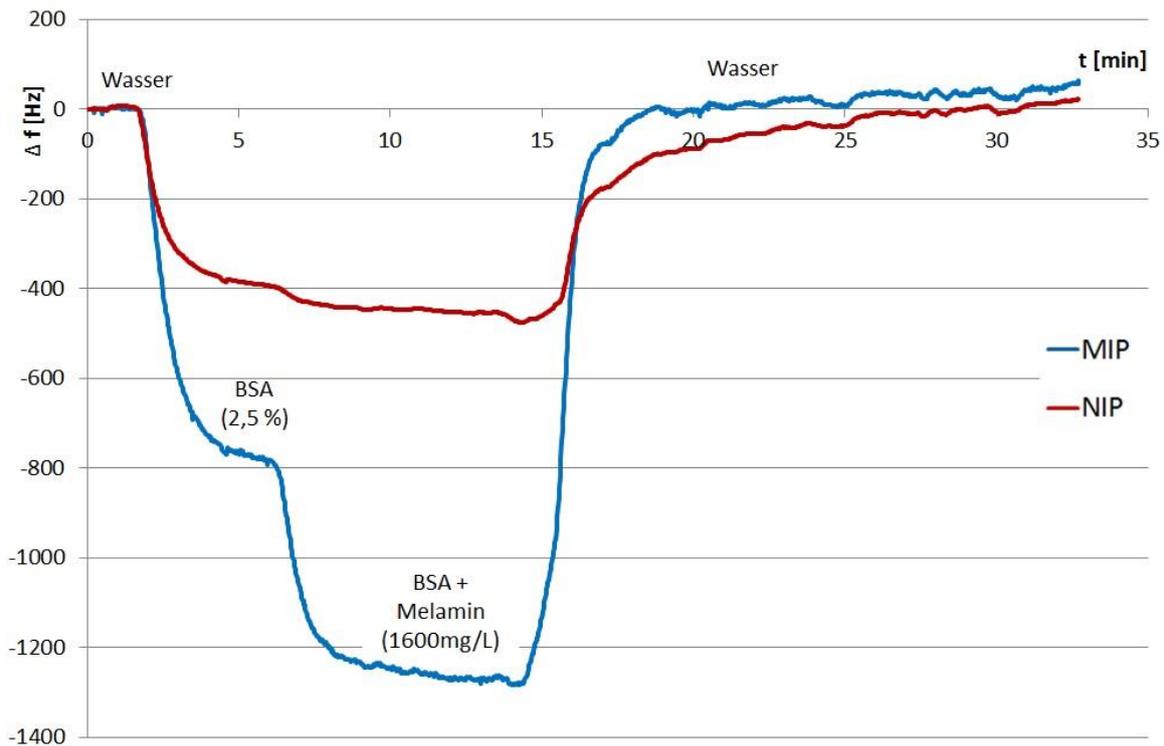


Abbildung 58: QCM-Messung von Melamin in einer mit 2,5 % BSA versetzten Lösung. Sobald der Schwingquarz konstantes Signal liefert wird die BSA-Lösung injiziert (Minute 2). Ist die Frequenz abermals konstant wird auf die mit Melamin versetzte BSA-Lösung gewechselt (Minute 6). Um das tatsächliche Messsignal zu ermitteln wird der Frequenzunterschied zwischen reiner und mit Melamin versetzter BSA-Lösung für beide Elektroden ermittelt und zuletzt das Signal der NIP-Elektrode vom MIP-Signal subtrahiert.

Alle Lösungen wurden mit jeweils 1600 mg/L Melamin versetzt um die Signalabschwächung sowohl zwischen BSA und Kasein als auch zwischen den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen vergleichen zu können. Im Fall von Kasein werden die Lösungen erst abzentrifugiert und der Überstand mittels QCM untersucht. Eine typische Messung ist in Abbildung 58 abgebildet um den Messablauf zu verdeutlichen. Die Ergebnisse aller Messungen, d.h. die Differenz zwischen MIP und NIP, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Signal bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (jeweils 1600 mg/L Melamin)

Konzentration Protein	Signal bei BSA [Hz]	Signal bei Kasein [Hz]
0,00 %	1345	1345
0,50 %	880	754
1,00 %	640	555
1,75 %	430	454
2,50 %	388	407
3,50 %	239	348

Es zeigt sich ein sehr ähnliches Bild bei beiden Proteinen. Die Unterschiede bei den Frequenzänderungen sind nicht signifikant, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sich Melamin in nahezu gleichem Ausmaß an das sich in Lösung befindliche BSA wie auch an das suspendierte Kasein bindet. Die normierten Signale sind nochmals in Abbildung 59 graphisch dargestellt. Dies unterstützt weiterhin die Theorie, wonach Melamin im Falle einer Probenvorbereitung mit Zentrifugationsschritt verworfen wird. Ähnliches geschieht beim Filtrieren oder der Verwendung von SPE Säulen vor der eigentlichen Analyse: Das Melamin wird hier, analog zur Zentrifugation, abgetrennt bevor es zur tatsächlichen Detektion kommt. Zusätzlich muss bedacht werden, dass sich an lösliche Proteine gebundener Analyt ebenfalls schwieriger detektieren lässt als jener, der frei in Lösung vorliegt.

Diese Erkenntnisse sind allgemein gültig und sollten bei praktisch jedem Detektionsprinzip sowie jeder Art von Probenvorbereitung bedacht werden.

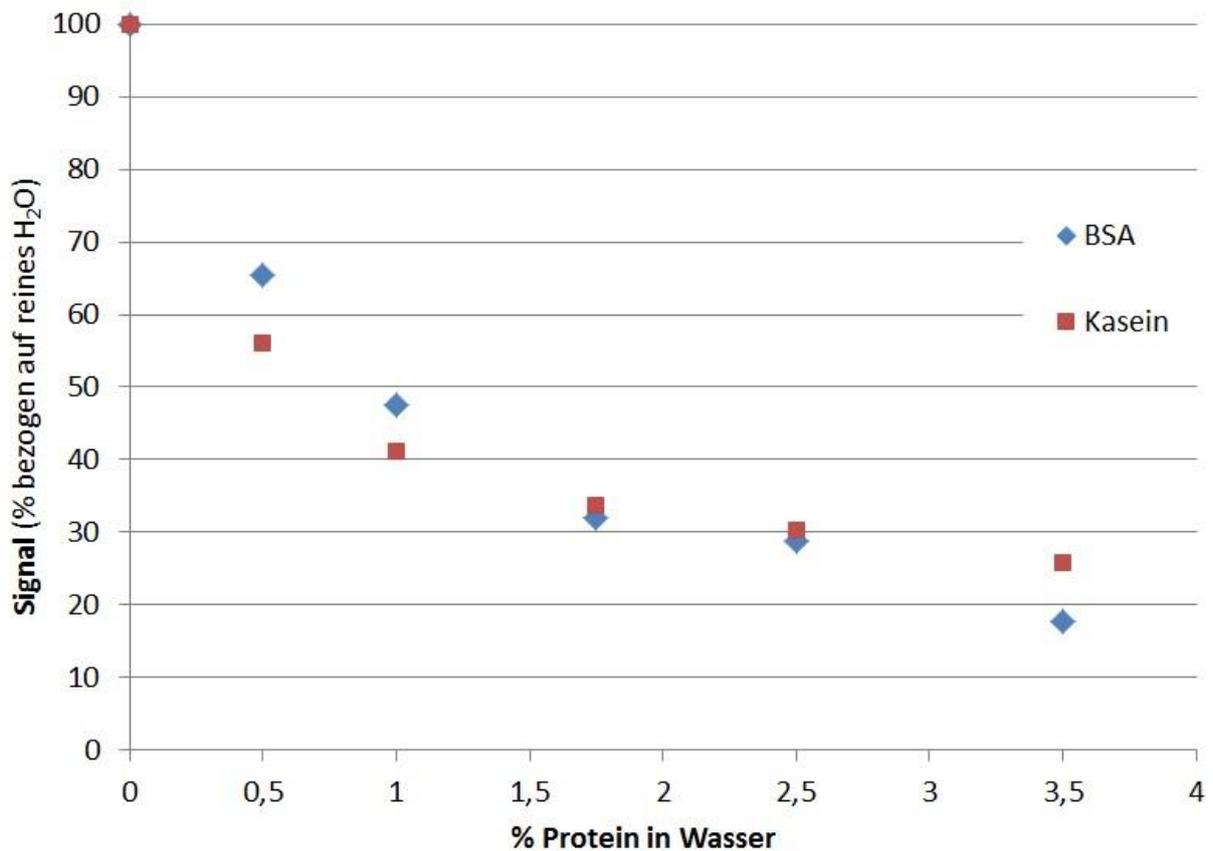


Abbildung 59: Normiertes Messsignal als Funktion der zugesetzten Menge an BSA bzw. Kasein in Wasser. Alle Lösungen enthalten 1600 mg/L Melamin. Der Verlauf ist für beide Proteine nahezu ident und vergleichbar mit den zuvor ermittelten Ergebnissen realer Lebensmittelproben (siehe Abbildung 55).

4.2.2 SPR

Für die Versuche wurde ein MIP-Film auf die Goldoberfläche des SPR Chips mittels Dropcoating aufgetragen und anschließend untersucht. Der schematische Aufbau dieser Messanordnung ist in Abbildung 60 dargestellt.

Die Idee für diese Versuche entstammt früheren Versuchen der Arbeitsgruppe⁹⁹ und konnte durch das bereits vorhandene SPR-Gerät unkompliziert durchgeführt werden. Ähnlich den Experimenten mittels Core-Shell Partikeln handelt es sich um Vorarbeiten für die geplanten Photonic Crystal Sensoren.

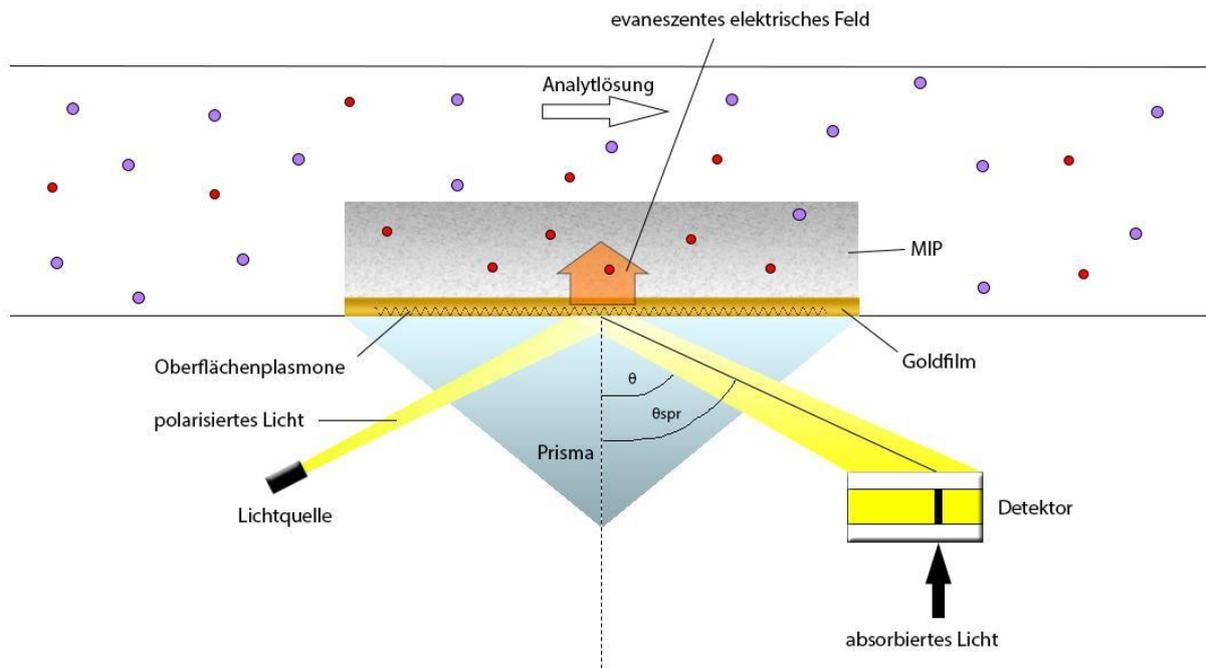


Abbildung 60: Aufbau des mittels MIP modifizierten SPR Sensorchips in der Kretschmann Anordnung. Das MIP dient hierbei als Dielektrikum, dessen Eigenschaften (Brechungsindex) sich durch Ein- bzw. Auslagerung des Analyten verändern und letzten Endes gemessen werden.¹⁰⁰

Zu Beginn muss das Gerät kalibriert werden. Dies geschieht mittels Luft, Wasser und einer weiteren gängigen Substanz (z.B. wässrige Ethanolösung bekannter Konzentration). Da keine exakte Kalibrierung notwendig war um die grundsätzliche Eignung der MIP-SPR Kombination zu überprüfen, wurde lediglich das Intensitätsminimum von Wasser (θ_{spr, H_2O}) festgestellt und die Software auf diesen Wert (1,333) gestellt.

Als Funktionstest wurden unterschiedliche Mischungen aus Ethanol und Wasser hergestellt und gemessen (0, 25, 50, 65, 80, 90, 100 m% Ethanol). Die Werte können mit der aus der Literatur bekannten Refraktometereichkurve¹⁰¹ von Ethanol/Wasser verglichen werden (Abbildung 61). Das Maximum bei 78 m% Ethanol ergibt sich daraus, dass es sich bei Wasser/Ethanol um kein ideales Gemisch handelt. Durch das Auftreten von Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Molekülen kommt es zu zusätzlichen anziehenden Kräften, welche sowohl die Dichte ($\rho = m/V$) als auch die optische Dichte ($n = c_0/c_m$), also den Brechungsindex beeinflussen.

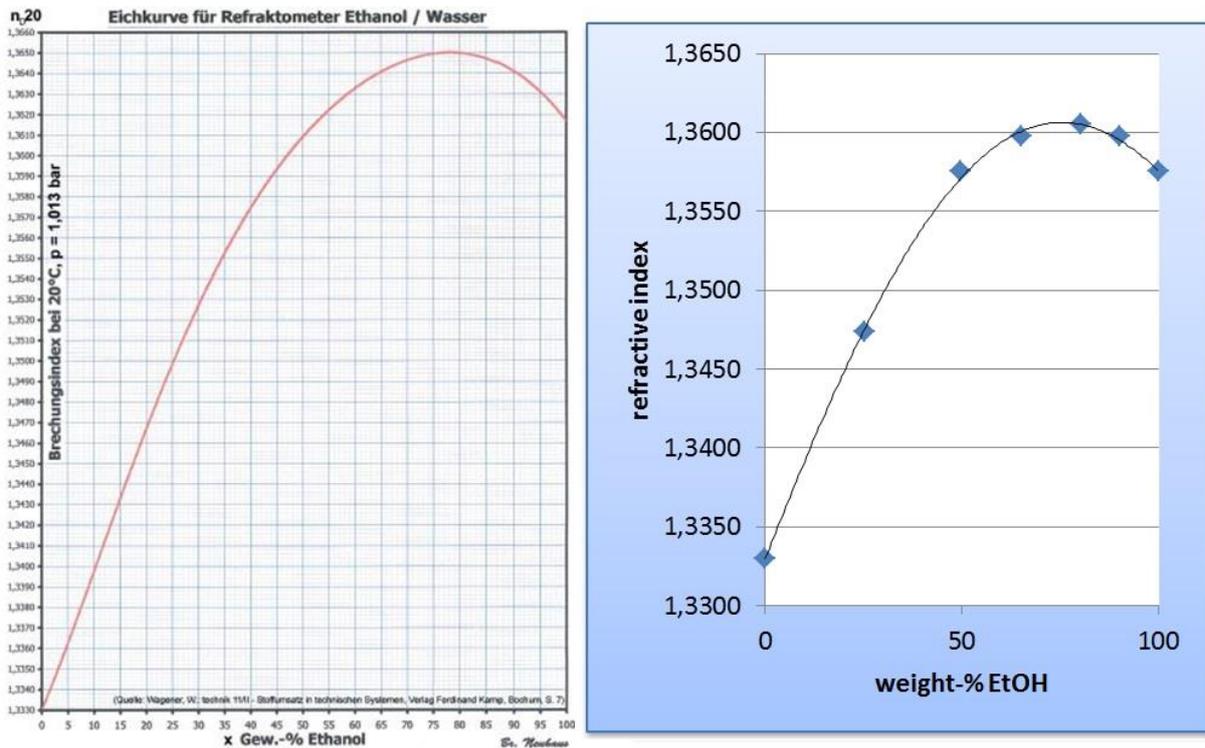


Abbildung 61: Vergleich der Brechungsindizes aus der Literatur (links) und der SPR Messung (rechts). Die Unterschiede ergeben sich aus der unvollständigen Kalibrierung (Maximum laut Literatur: 1,365).

Für die Messung einer Melaminlösung wurde der Brechungsindex über einen längeren Zeitraum aufgenommen und die Probenkammer abwechselnd mit Wasser und gesättigter Melaminlösung durchspült.

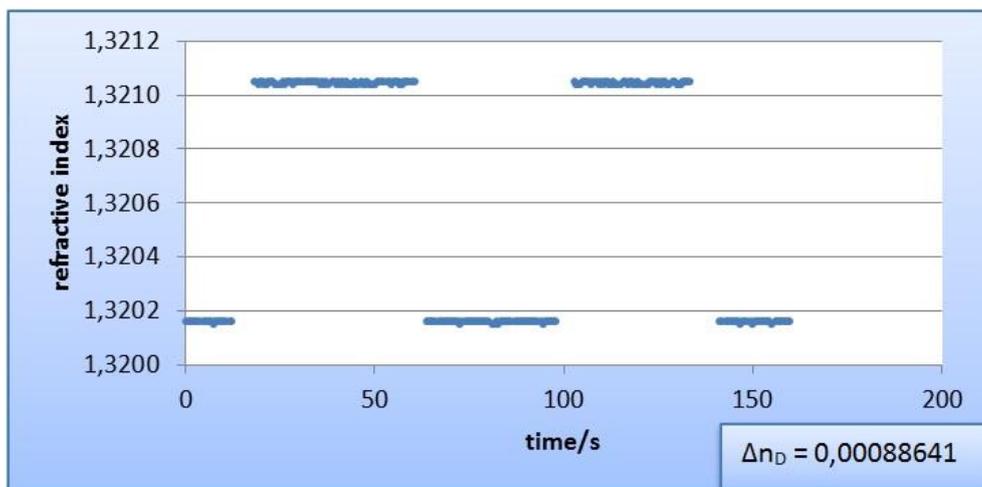


Abbildung 62: SPR Messung von Wasser und gesättigter Melaminlösung.

Durch diese Messung wird ersichtlich, dass sich der Brechungsindex von Wasser durch die Zugabe von Melamin nur marginal verändert (geringere Löslichkeit von Melamin gegenüber z.B. Ethanol). Dennoch kann dieser eindeutig unterschieden werden. Anzumerken ist, dass die Kalibrierung des Sensors bei diesem Beispiel nicht korrekt funktioniert haben dürfte (Wasser sollte einen Brechungsindex von $\sim 1,333$ aufweisen).

In Folge wurden mehrere SPR Sensoren mit MIP beschichtet und ebenfalls mit Wasser und Melaminlösung überspült. Einige dieser Tests zeigten keinerlei Ergebnis (kein Signal, ähnlich Luft) und einige Signale erscheinen auf den ersten Blick vielversprechend (Beispiel in Abbildung 63), können jedoch nicht vom MIP stammen. Zum einen kann der Brechungsindex des Polymers nicht 1,333 betragen, zum anderen ist der Unterschied zwischen Melaminlösung und Wasser nahezu ident mit jenem auf einem unbeschichteten SPR Substrat. Beides ist nahezu ausgeschlossen, weshalb angenommen werden musste, dass die Polymerbeschichtung fehlerhaft war und daher die Lösungen direkt gemessen wurden.

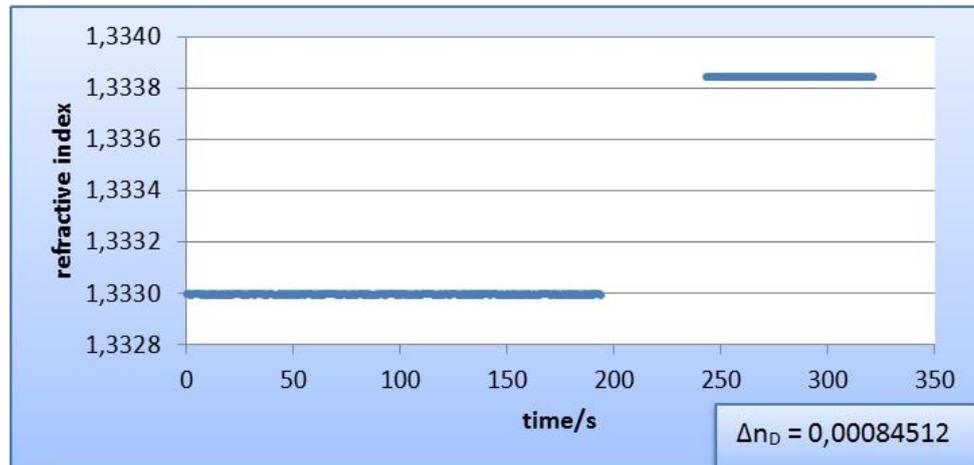


Abbildung 63: Versuch einer Messung der MIP-SPR Kombination. Wie anhand der absoluten Werte als auch an der Differenz zwischen Wasser und Melaminlösung zu erkennen, stammen die Werte nicht vom MIP sondern von unbeschichteten Stellen der Goldoberfläche.

Um sicher zu stellen, dass tatsächlich kein MIP gemessen werden kann, wurde das Hintergrundspektrum von Luft eines SPR Sensors mittels der Software gespeichert und statt des Wassers MIP aufgetragen, gefolgt von Messung im trockenem

Zustand. Es konnte jedoch kein SPR-Signal detektiert werden, was als sicheres Anzeichen dafür gesehen werden kann, dass der Brechungsindex des Polymers außerhalb des Messbereichs des SPR-Systems liegt. Dies wiederum bedeutet, dass das Signal in Abbildung 63 lediglich von der Flüssigkeit stammt, welche den SPR Sensor direkt, also aufgrund der mangelhaften Polymerbeschichtung, berührt.



Abbildung 64: SPR Sensor ohne und mit MIP Beschichtung (links)

Die Brechungsindices der Monomere betragen $n_D^{20} = 1,528$ (DHEBA) bzw. $1,490$ (MAA) und liegen damit außerhalb der Reichweite der verfügbaren SPR-Einheit ($1,3200$ bis $1,3680$). Offensichtlich ändert sich dies auch bei dem mit Wasser versetzten Polymer nicht so stark, dass Messungen ermöglicht worden wären.

Das entwickelte MIP für Melamin könnte dennoch eine gute Option für zukünftige Versuche mit leistungsfähigeren SPR Geräten darstellen, da Melamin mit einem Brechungsindex von $n_D^{20} = 1,872$ stark vom Polymer unterscheidet und damit das Potential besitzen sollte zu einem ausreichenden Signal zu führen. Selbiges gilt für Photonic Crystal Sensoren (Vergleich Formaldehyd: $n_D^{20} = 1,377$).

4.2.3 SERS

Die dünnen Filme waren die ersten in Verbindung mit SERS getesteten molekular geprägten Materialien und wurden bereits sehr früh (Oktober 2011) mit dem portablen Mesophotonics SE1000 vor Ort in Wien auf ihre Eignung hin untersucht. Diese Ergebnisse konnten später mittels des leistungsfähigeren Nicolet Almega XR reproduziert und vervollständigt werden. Hinzu kamen neben den Messungen mit NP-Beschichtungen jene in realem Lebensmittel (Milch).

4.2.3.1 Dünne Filme mittels SE1000

Melaminsignal

Ziel der Messungen war die erstmalige Untersuchung der MIP-SERS Kombination. Als Erstes wurde eine Verdünnungsreihe von reinem Melamin in Wasser erstellt und, wie bei den MIP, 5 μL auf ein Klarite® SERS Substrat aufgetragen, bei 80°C getrocknet und anschließend ein Spektrum aufgenommen.

In Abbildung 65 sind die Ergebnisse der unterschiedlich mit Wasser verdünnten Melaminlösungen zu sehen, wobei das stärkste Signal bei 685 cm^{-1} auftritt. Ein zweiter Peak bei etwa 717 cm^{-1} entsteht vermutlich durch eine Orientierungs- bzw. Ausrichtungsabhängigkeit der Moleküle und ist vor allem bei geringeren Konzentrationen erkennbar.^{102,103,104,105} Aufgetragen wurden je 5 μL Probenlösung, welche anschließend bei 50°C getrocknet wurde. Dadurch befindet sich das gesamte Melamin der jeweils 5 μL direkt auf der Goldoberfläche. Die Nachweisgrenze liegt hierbei zwischen 1 und 0,1 mg pro Liter. Interessant ist die Tatsache, dass das Signal ab einer gewissen Konzentration wieder abfällt (1260 mg/L ist schwächer als 126 mg/L). Dies lässt sich dadurch erklären, dass gestreutes Licht von der bereits zu dicken Melaminschicht wieder absorbiert wird.

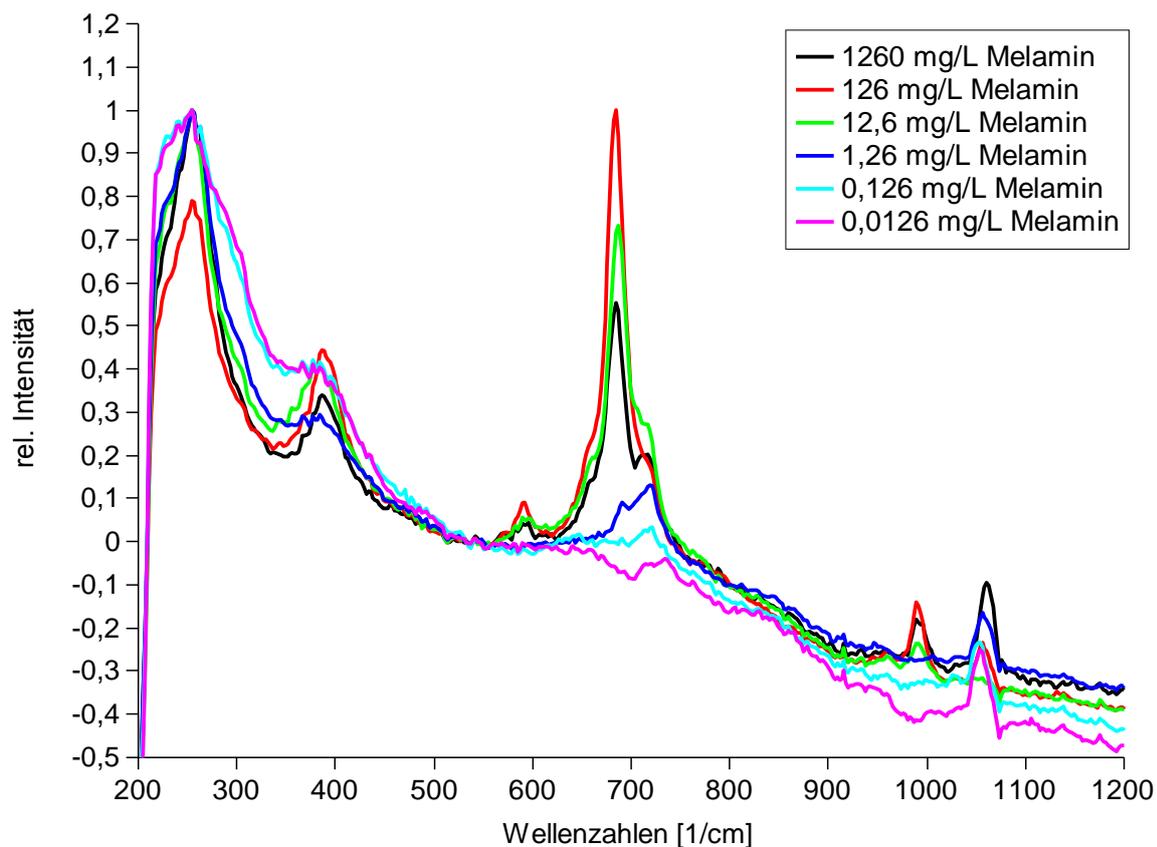


Abbildung 65: SERS Spektren zur Bestimmung der Nachweisgrenze unter Standardbedingungen ohne MIP und zur Veranschaulichung des reinen Melaminsignals. Die Konzentrationen entsprechen Molalitäten von 10^{-2} bis 10^{-7} .

Vergleich MIP und NIP

Beim Vergleich zwischen einem mit MIP und einem mit NIP beschichteten Substrat ist klar erkennbar, dass Melamin in einem molekular geprägten Polymer mittels SERS nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 66). Die vorpolymerisierten Mischungen wurden vor dem Auftragen 1:10 mit Wasser verdünnt, um eine geeignete Schichtdicke zu erhalten. Im Falle des NIP ist kein Signal im Wellenlängenbereich des Melamins zu erkennen.

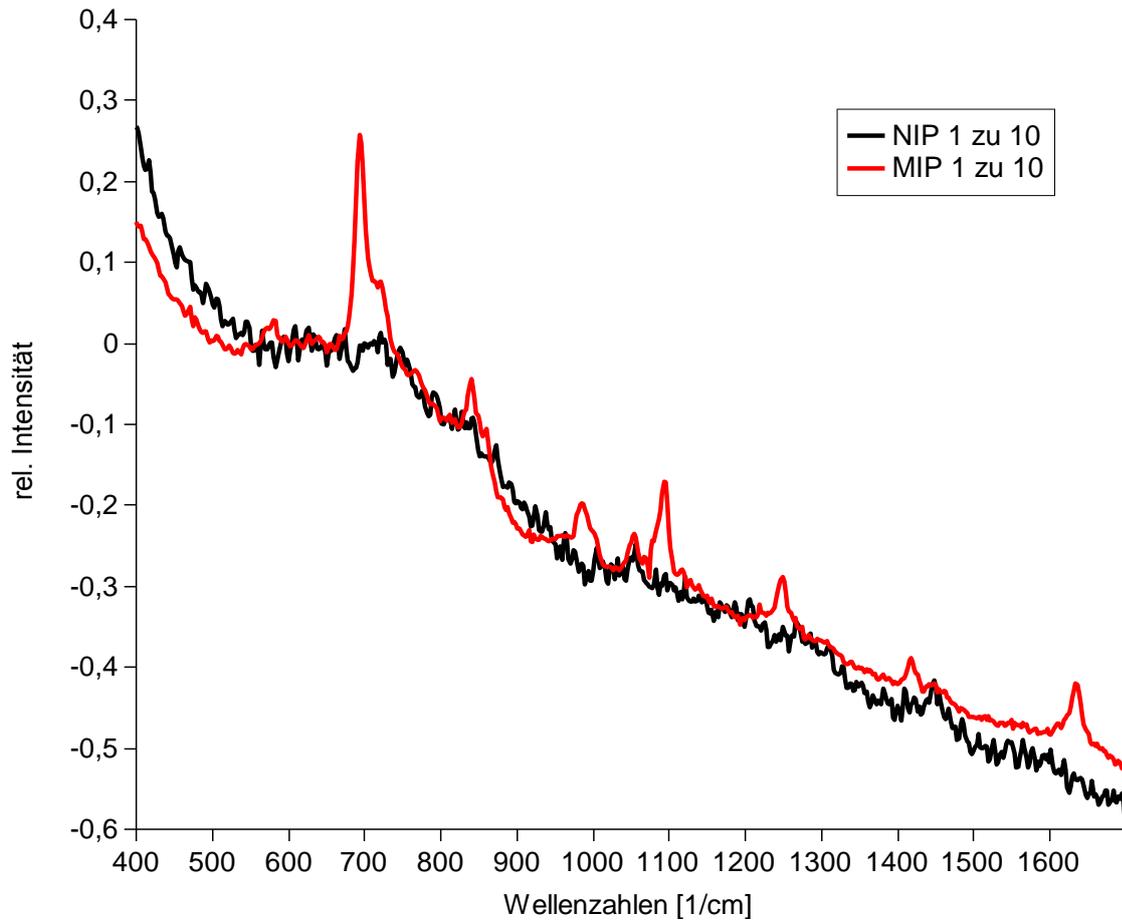


Abbildung 66: MIP und NIP Spektren im direkten Vergleich. Die Anwesenheit von Melamin im MIP Film wird klar durch die Peaks bei 685 cm^{-1} sowie 717 cm^{-1} signalisiert.

Für die Messung in Abbildung 67 wurden die Polymere weiter verdünnt (1 zu 100), wodurch die Polymerpeaks größtenteils verschwinden, während das Melaminsignal vorerst erhalten bleibt bzw. nur geringfügig an Stärke verliert (ähnliches Verhalten wie in Abbildung 65, wo reines Melamin aufgetragen wurde). Dies liegt daran, dass lediglich der Analyt vom oberflächenverstärkenden Raman Effekt profitiert. Im Gegensatz dazu wird das „normale“ Raman Signal des Polymers schwächer, sobald sich weniger Material auf dem Probenträger befindet. Für den SERS Effekt des Melamins kommen lediglich jene Moleküle in Frage, die sich nahe der Oberfläche befinden. Nicht oberflächenverstärkte Signale gewinnen hingegen auch an Intensität, wenn mehr Material, also eine dickere Schicht, vorliegt. Hinzu kommt, dass ein dünnerer Polymerfilm u.U. zu einem besseren SERS Signal führt, da weniger von dem an der aktiven Goldoberfläche gestreuten Licht reabsorbiert wird.

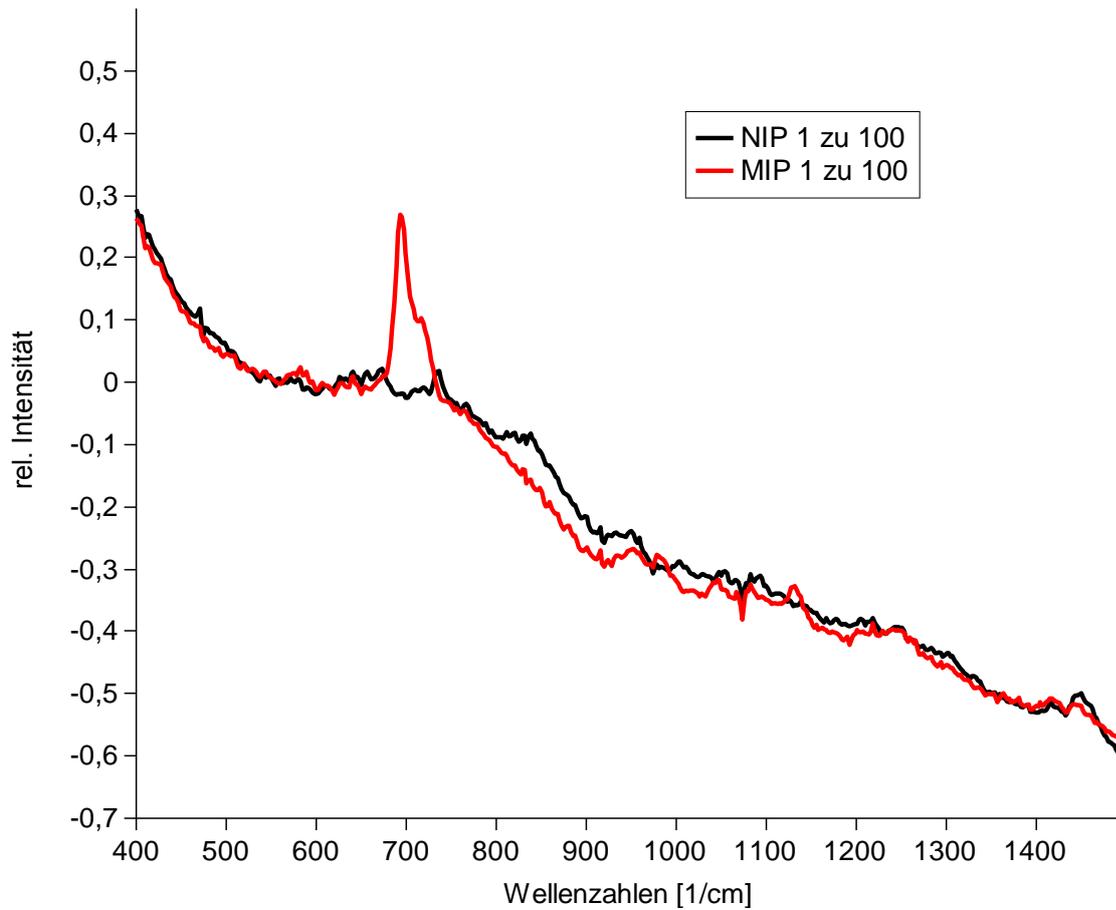


Abbildung 67: Messung wie in Abbildung 34, allerdings mit stärker verdünnten MIP und NIP, wodurch die Grundlinie kaum noch Polymerpeaks enthält. Das Melaminsignal sticht deutlicher hervor, obwohl es an Intensität verloren hat.

Konzentrationsabhängigkeit

Im ersten Versuch wurde ein MIP jeweils mit unterschiedlichen Mengen Wasser verdünnt (1:10 bis 1:1000), wiederum je 5 μL auf ein Klarite Substrat aufgetragen und anschließend getrocknet. Die Spektren sind in Abbildung 68 dargestellt.

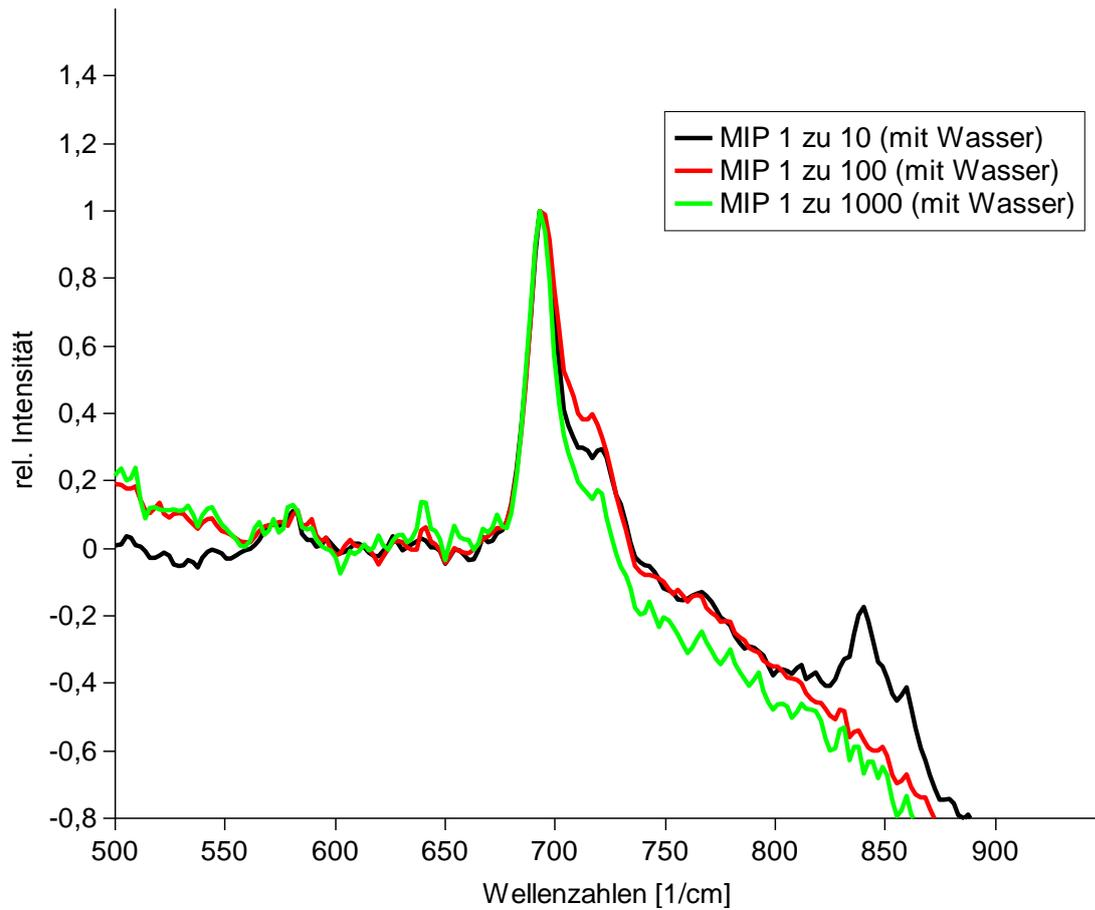


Abbildung 68: MIP mit verschiedenen Mengen Wasser verdünnt. Da lediglich das Melamin an der SERS Oberfläche eine Signalverstärkung erfährt, geben alle drei Verdünnungen ein nahezu identes Signal.

Wie klar zu erkennen ist, unterscheiden sich die primären Melaminpeaks der drei Verdünnungen bei 685 cm^{-1} , wenn überhaupt, nur unwesentlich. Um 850 cm^{-1} sind einige Polymerpeaks der geringsten Verdünnung zu erkennen. Dies bedeutet, dass es sich beim Melaminsignal definitiv um einen SERS-Effekt handelt und größere Schichtdicken keinerlei Vorteile bringen. Das Verdünnen mit Wasser ist daher nicht sinnvoll. Es muss die Konzentration von Melamin im MIP verändert werden und nicht die Menge an MIP.

Um eine Konzentrationsabhängigkeit darstellen zu können wurde daher der prepolymerisierte MIP mit NIP verdünnt. Die entsprechende Grafik ist in Abbildung 69 dargestellt.

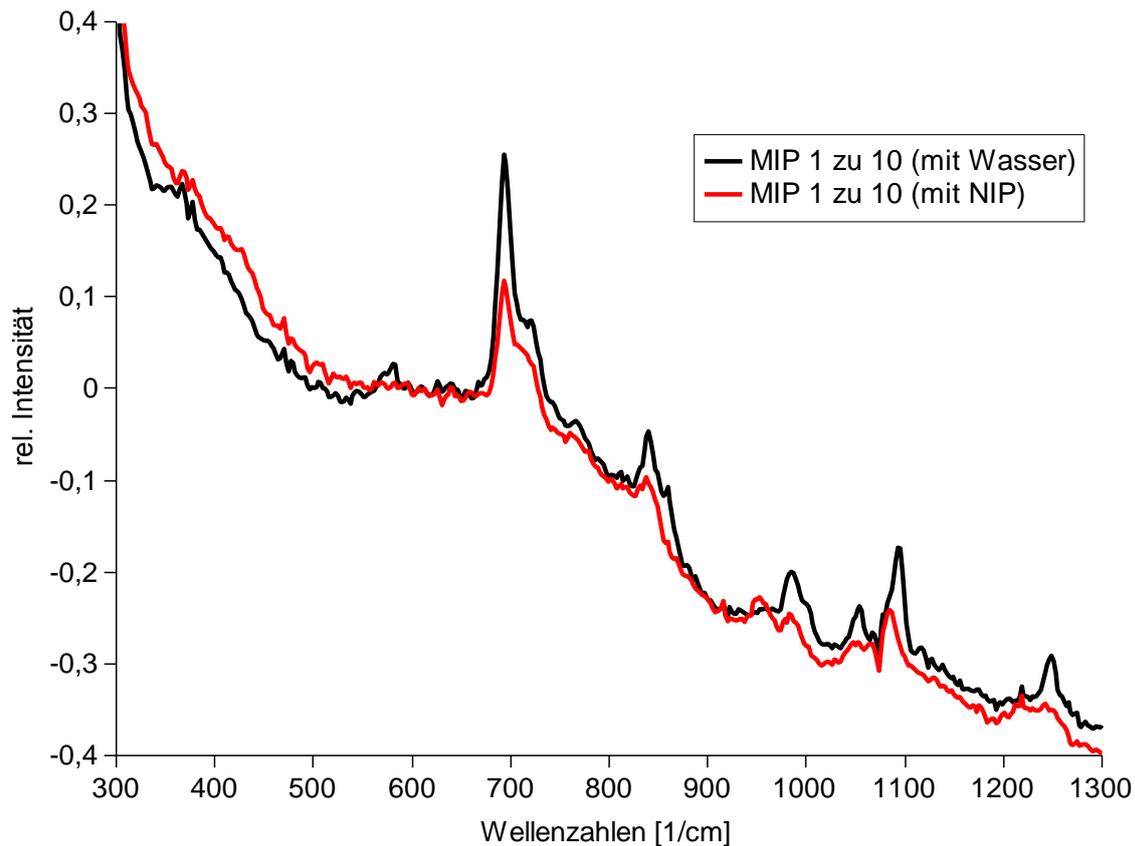


Abbildung 69: MIP verdünnt mit NIP. Das Signal ist klar geschwächt, da in diesem Fall die Konzentration von Melamin an der Goldoberfläche sinkt.

Auswaschen von Melamin

Um die Kombination eines MIP mit SERS tatsächlich einsetzen zu können, ist es notwendig das Templat, also Melamin, aus den Kavitäten auszuwaschen. Daher wird in Abbildung 70 ein MIP Film vor und nach einem Waschschrift gezeigt. Das Prepolymer wurde für diesen Versuch vor dem Auftragen 1:10 mit Wasser verdünnt. Um sicher zu gehen, dass Melamin möglichst vollständig aus dem Polymer ausgespült wird, wurde das SERS Substrat für insgesamt drei Stunden in Wasser gelegt.

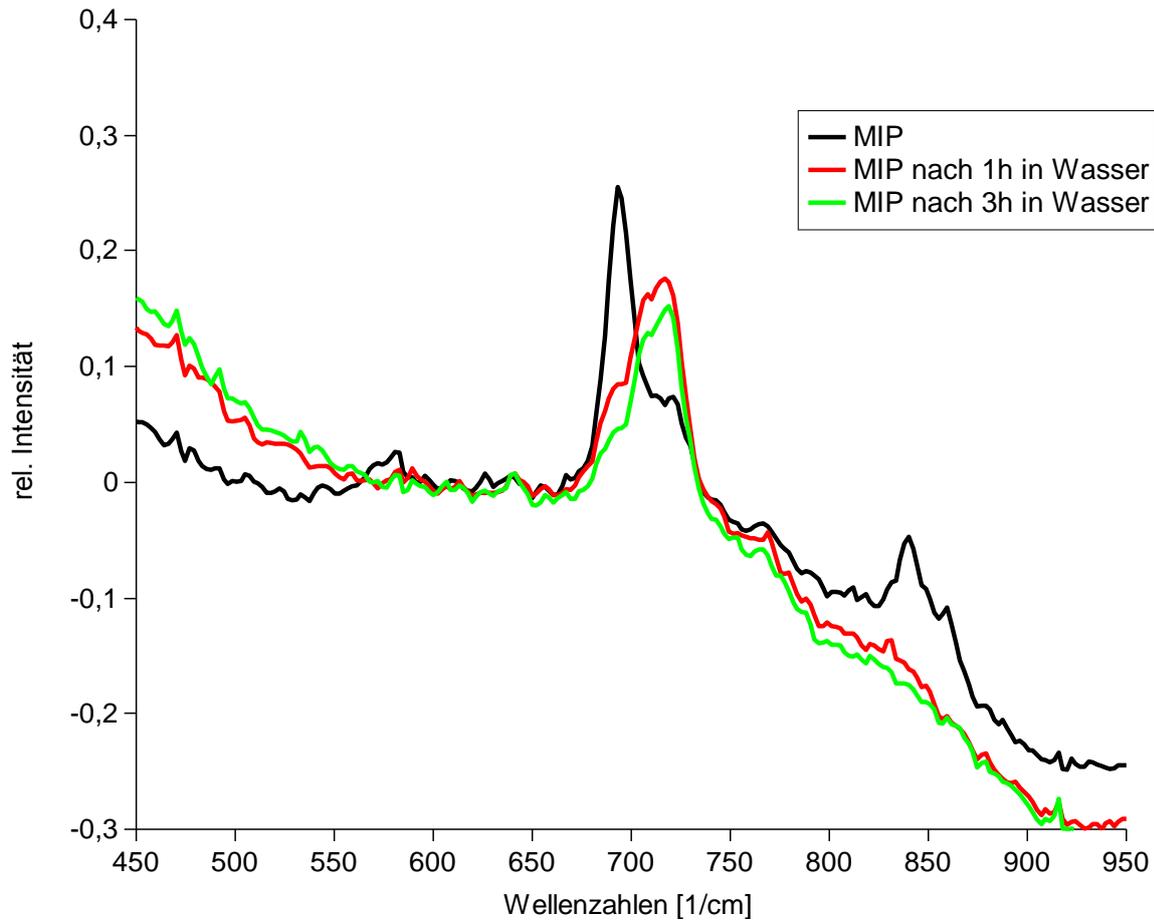


Abbildung 70: MIP nach 1 bzw. 3 Stunden in Wasser (ein und dasselbe Substrat). Das Melamin verschwindet aus den Kavitäten des Polymers und verändert die Orientierung.

Neben der von den Schwingquarzmessungen erwarteten Tatsache, dass Melamin entfernt wird ergeben sich zwei weitere Beobachtungen: Es ändert sich zum Teil die Orientierung von noch im MIP festgehaltenen Polymer, wodurch der Peak bei 685 cm^{-1} schwächer, jener bei 717 cm^{-1} verstärkt wird. Anhand der Unterschiede zwischen den Messungen nach ein und drei Stunden lässt sich zusätzlich erkennen, dass beide Peaks an Intensität verlieren, folglich Melamin aus dem MIP ausgewaschen wird und nicht in einer anderen Orientierung verbleibt. Weiters fehlen bereits nach einer Stunde die meisten der Polymerpeaks wodurch man darauf schließen kann, dass es sich bei diesen Signalen um Reste von ebenfalls nicht kovalent gebundenen Monomeren handelt.

Wiedereinlagerung von Melamin in die sensitive Schicht

Um die Einlagerung von Melamin in die sensitive Schicht zu überprüfen wurde ebenfalls eine 1:10 mit Wasser verdünnte Prepolymerlösung auf ein SERS Substrat aufgetragen und nach dem Aushärten für 3 Stunden in Wasser gelegt um Melamin zu entfernen. Im Anschluss wurde das Substrat für 80 Minuten in gesättigte Melaminlösung getaucht und abermals ein Spektrum aufgenommen (Abbildung 71).

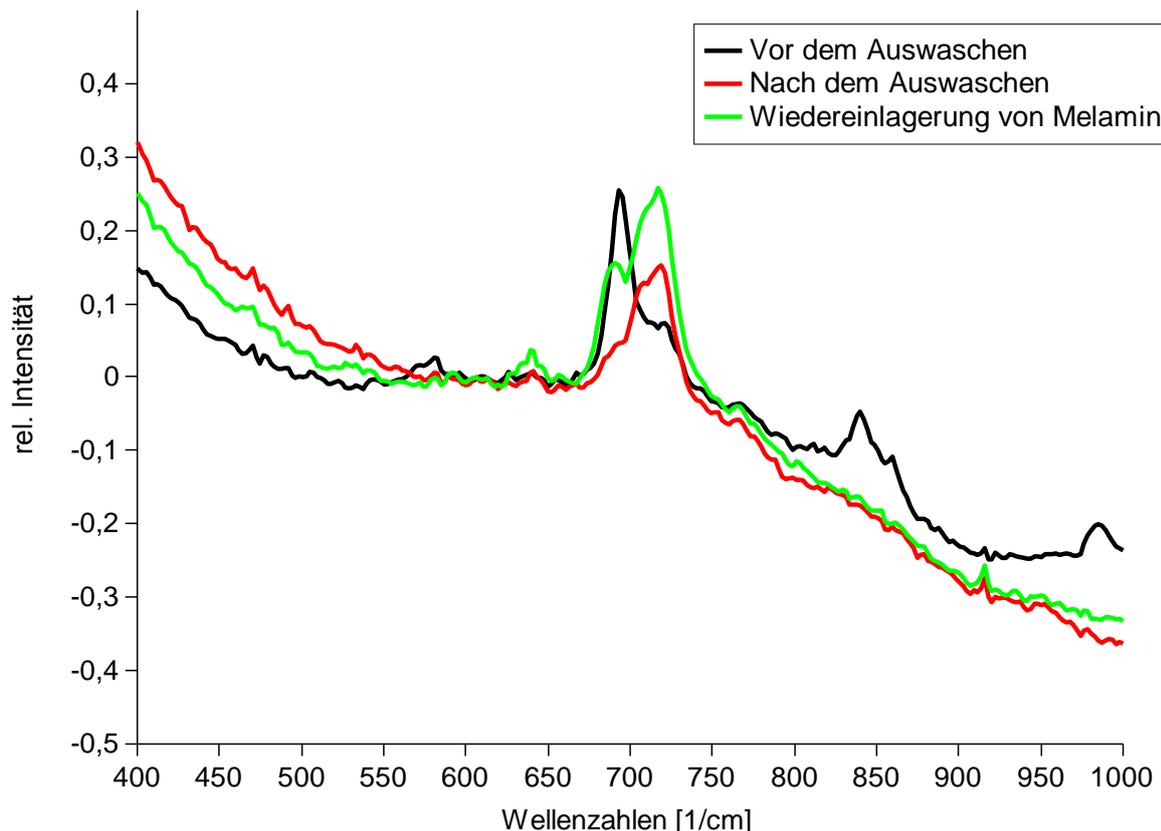


Abbildung 71: Einlagerung von Melamin in den MIP (deutlicher Signalanstieg zwischen rotem und grünem Spektrum bei 717 und 685 cm⁻¹).

Durch das wiederholte Füllen der Kavitäten mittels hoch konzentrierter Melaminlösung steigen beide Peaks wieder an, wobei der ursprünglich intensivere (685 cm⁻¹) nicht seine ursprüngliche Größe erreicht, der vormals nur als Schulter erkennbare bei 717 cm⁻¹ hingegen erheblich an Signalstärke gewinnt. Dies liegt an unterschiedlich gebundenen Formen von Melamin, wobei die der Protonierungsgrad entscheidend ist.¹⁰⁶ Die vorkommenden Schwingungsarten sind im folgenden Kapitel, insbesondere in Abbildung 72, näher erklärt. Dieser Effekt könnte für zukünftige Sensoren durchaus nützlich sein, da bis zu einem gewissen Grad zwischen ursprünglich und neu eingelagertem Analyten unterschieden werden kann.

Das wichtigste Ergebnis ist jedoch der klare Signalanstieg, womit nun erstmals bewiesen ist, dass die Wiedereinlagerung von Melamin in das MIP nicht nur stattfindet, sondern auch mittels SERS nachgewiesen werden kann. Dadurch ist eine quantitative Analyse möglich, wobei das Mengenverhältnis zwischen Melamin und Polymer in der Nähe der Substratoberfläche den entscheidenden Faktor darstellt.

4.2.3.2 Dünne Filme mittels Nicolet Almega XR

Neben den bereits bekannten Ergebnissen mit dünnen Filmen wurden mittels des leistungsfähigeren Nicolet Almega XR Spektrometers die molekular geprägten Nanopartikel untersucht und es konnten einige Versuche mit realitätsgetreuen Proben unternommen werden. Weiters wurden die Versuche des SE1000 größtenteils wiederholt um deren Gültigkeit auch auf einem anderen System zu überprüfen wodurch zusätzlich einige neue Erkenntnisse entstanden.

Signal von MIP vor und nach dem Auswaschen

Durch die Verwendung des in Bezug auf die Laserintensität stärkeren Nicolet Almega XR Spektrometers weicht das Spektrum für eine nicht modifizierte MIP-Schicht von jenem des SE1000 ab. Die jeweiligen Spektren vor und nach dem Auswaschen der Templatmoleküle finden sich in Abbildung 72. Im Gegensatz zu den Messungen mit dem SE1000 Spektrometer (siehe Abbildung 49) fällt der breite Peak bei 560 cm^{-1} ins Auge. Selbiger ist ein Resultat des wesentlich sensitiveren Nicolet Almega XR Spektrometers und dessen stärkerer Laserlichtquelle. In Abbildung 72 sind zusätzlich alle im Rahmen dieser Dissertation relevanten Schwingungsarten beschrieben. Nach dem Auswaschen des Templats mittels Wasser über Nacht wird jedoch so viel Melamin entfernt, dass dieses Raman Signal praktisch vollständig verschwindet. Es handelt sich um ein normales Raman Signal, welches ohne oberflächenverstärkenden Effekt entsteht und auch bei erfolgter Wiedereinlagerung von Melamin in die sensitive Schicht nicht erneut erscheint, da wesentlich mehr Melamin ausgewaschen wird, als wieder eingelagert werden kann.

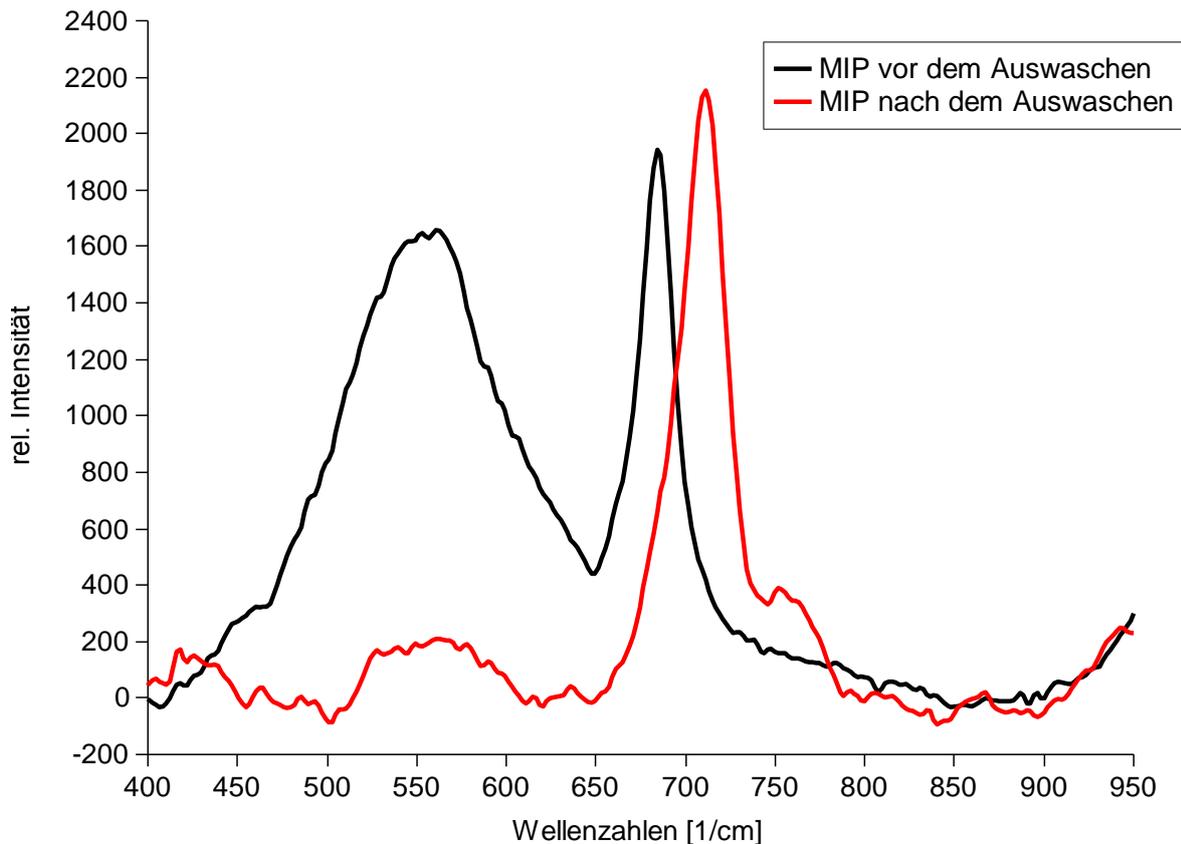


Abbildung 72: Mit MIP beschichtetes SERS Substrat vor und nach dem Auswaschen des Templates mittels Wasser. Die SERS Signale entstammen der Ringatmungsschwingung (ring breathing) des Analyten, wobei der Peak bei 712 cm^{-1} durch neutrales, jener bei 680 cm^{-1} bei protoniertem Melamin entsteht. Es verbleibt also vor allem neutrales Melamin im ausgewaschenen MIP. Das breite Ramansignal bei 570 cm^{-1} gehört zu den Deformationsschwingungen (bending) der NCN sowie Drehschwingungen (twisting) der NH_2 -Gruppen (eine Tabelle mit bekannten Raman/SERS Banden für Melamin findet sich in Kapitel 4.1.3.3).

Dies ist von Vorteil, da durch die großen Mengen Melamin das SERS Signal abgeschwächt wird (erkennbar durch das leicht stärkere rote Spektrum in Abbildung 72 sowie anhand der wesentlich intensiveren Signale im Falle der Wiedereinlagerung von Melamin in den noch folgenden Messungen). Gründe hierfür können sein, dass Melamin die bereits entstandene Raman Strahlung wieder absorbiert sowie dadurch, dass weniger Licht des Lasers zu den Molekülen nahe der verstärkend wirkenden Oberfläche gelangt und somit entsprechend wenig SERS-Effekt genutzt wird.

Konzentrationsabhängigkeit

Hierbei handelt es sich um die faktisch ersten „korrekten“ Konzentrationsmessungen einer MIP-SERS Kombination, da mittels SE1000 lediglich mit NIP-Lösung verdünntes MIP gemessen, und mit dem Signal eines weiteren, mit reinem MIP beschichteten, Substrates verglichen wurde.

Die um etwa fünf Wellenzahlen verschobenen Melaminpeaks aller Messungen (680 bzw. 712 gegenüber 685 bzw. 717 cm^{-1}) lassen sich durch unterschiedlich Geräte erklären, wobei angemerkt werden muss, dass das Nicolet Almega XR vor allen Messungen gegenüber einem Siliziumplättchen kalibriert wurde und damit korrekte Werte liefern müsste. Letztlich ist dieser Unterschied für die Untersuchungen ohne Belang.

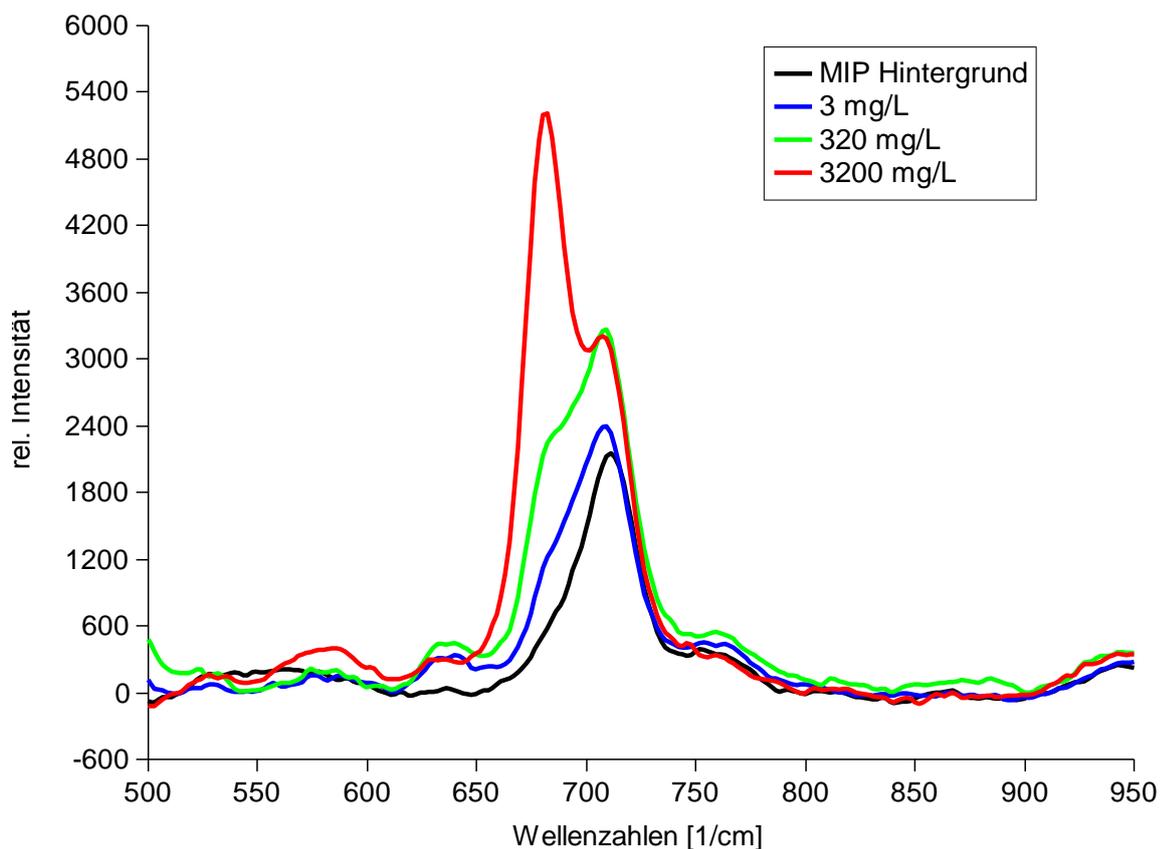


Abbildung 73: SERS Messung eines mit MIP beschichteten Klarite® Substrates nach dem Eintauchen in verschiedenen konzentrierte Melaminlösungen

Für die in Abbildung 73 dargestellte Messung wurde ein Klarite® Substrat mit 1:10 verdünnten MIP beschichtet und das enthaltene Melamin über Nacht mittels Wasser

ausgespült. Das abgebildete Hintergrundspektrum und damit auch das verwendete MIP-SERS Substrat sind ident mit jenem in Abbildung 72. Wie zu erwarten war bleibt stets ein Rest an Templat im MIP gebunden, wodurch es immer nötig ist ein Hintergrundspektrum aufzunehmen. Anschließend wurde das Plättchen für je 10 Minuten in die entsprechend konzentrierten Melaminlösungen getaucht und abermals Spektren aufgenommen. Bereits nach zehn Minuten in einer Lösung von 3 mg/L kann das entstandene Signal klar von jenem des Hintergrundes deutlich unterschieden werden (Vergleich schwarzes und blaues Spektrum). Neben dem Anstieg bei 712 cm^{-1} gewinnt auch der zuvor kaum erkennbare Peak bei 680 cm^{-1} deutlich an Intensität.

Wird die Fläche mittels Integration über beide Peaks ermittelt und gegenüber der Konzentration aufgetragen erhält man eine Langmuir-artiges Bindungsverhalten (Abbildung 74), welche an jene der QCM Messungen erinnert (siehe auch Abbildung 48).

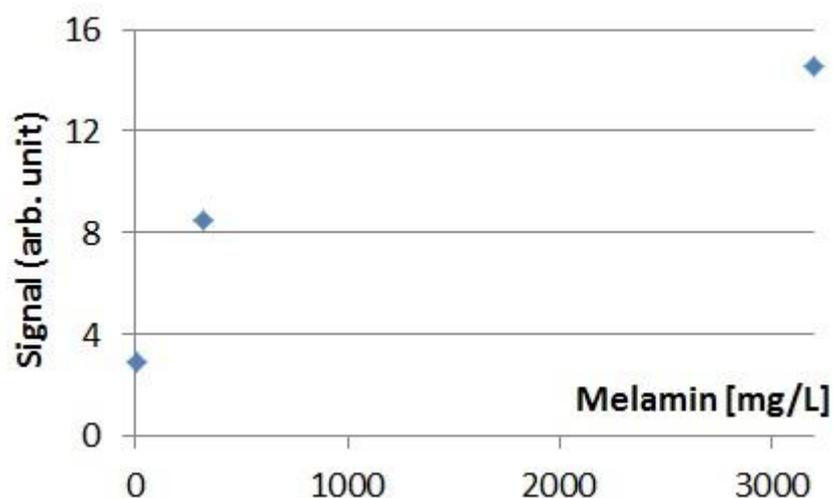


Abbildung 74: Peakflächen des SERS Signals aufgetragen gegenüber der Konzentration an Melamin. Trotz der wenigen Messpunkte zeigt sich ein Verhalten, welches an eine Langmuir-Isotherme erinnert.

Reversibilität des Einlagerungsprozesses

Nach der Messung einer 3200 mg/L Melaminlösung wurde das beschichtete Klarite® Substrat wieder über Nacht in destilliertes Wasser gelegt um wieder eingelagertes Melamin zu entfernen (Messungen in Abbildung 75). Das im Anschluss

aufgenommene Hintergrundspektrum (rot) ist praktisch ident mit jenem zu Beginn der Messreihe (schwarz). Dies bedeutet theoretisch, dass mit der entwickelten molekular geprägten Polymerschicht auch in Kombination mit SERS mehrere Proben mit demselben Substrat gemessen werden können. Praktisch ist es durchaus möglich, dass andere Medien negativen Einfluss auf den MIP nehmen und deshalb, neben der Tatsache der einfacheren Anwendung beim Endbenutzer, am Konzept eines Wegwerfsensors festgehalten werden muss.

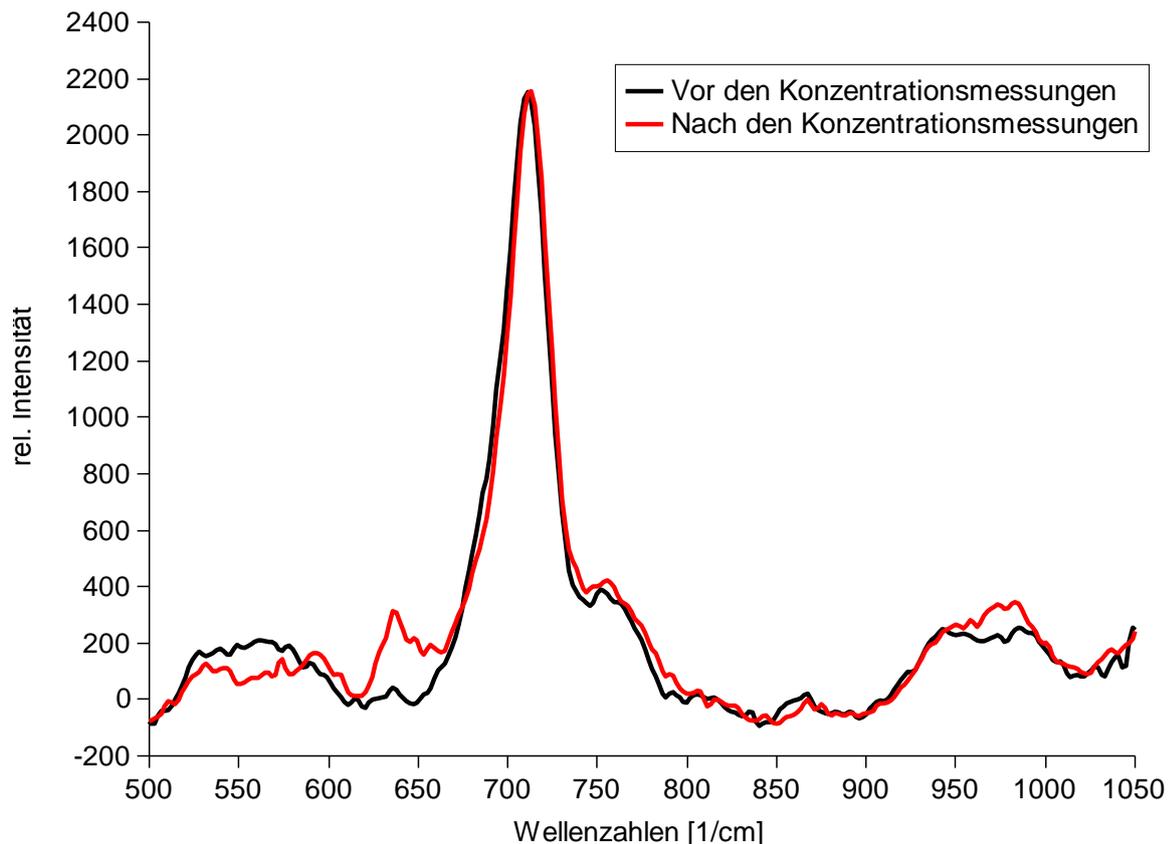


Abbildung 75: Vergleich des Hintergrundsignals vor und nach einer Messreihe (unterschiedliche, wässrige Melaminlösungen) mit anschließendem Auswaschen des Analyten mit Wasser. Der Prozess ist praktisch vollständig reversibel.

Vergleich mit einem unbeschichteten Klarite® Substrat

Melamin zeigt Affinität zu Goldoberflächen, weshalb Melamin mit Hilfe von Klarite® Substraten auch ohne jede weitere Modifikation durch bloßes Eintauchen in eine Melaminlösung bestimmt werden kann. Ein solches Spektrum wird in Abbildung 76 mit dem eines mit MIP modifizierten Substrats verglichen.

Neben der zusätzlichen Selektivität wird durch die Beschichtung mit molekular geprägtem Polymer das Signal wesentlich erhöht. Die Höhe der Melaminsignale beträgt bei 680 cm^{-1} ohne Beschichtung 3650 a.u. und mit MIP 5200 a.u.. Sowohl bei einem unveränderten Klarite Substrat als auch bei einem mit MIP beschichteten, vollständig ausgewaschenen Chip, gibt es bei dieser Wellenzahl praktisch keinen Peak. Das Signal wird folglich durch die MIP Schicht gegenüber einem nicht modifizierten Klarite Substrat um den Faktor 1,4 verstärkt, wodurch der qualitative Nachweis von Melamin in einer Lösung mittels der MIP-SERS Kombination erleichtert wird.

Der zweite Peak bei 710 cm^{-1} erreicht eine Höhe von 3200 a.u., wobei hier das bereits zuvor vorhandene Hintergrundsignal (siehe Abbildung 75) von 2100 a.u. berücksichtigt werden muss. Aufgrund der Möglichkeit einer allgemeinen Signalabschwächung aufgrund komplexer Proben eignet sich vor allem das Signal bei 680 cm^{-1} zur Melaminbestimmung.

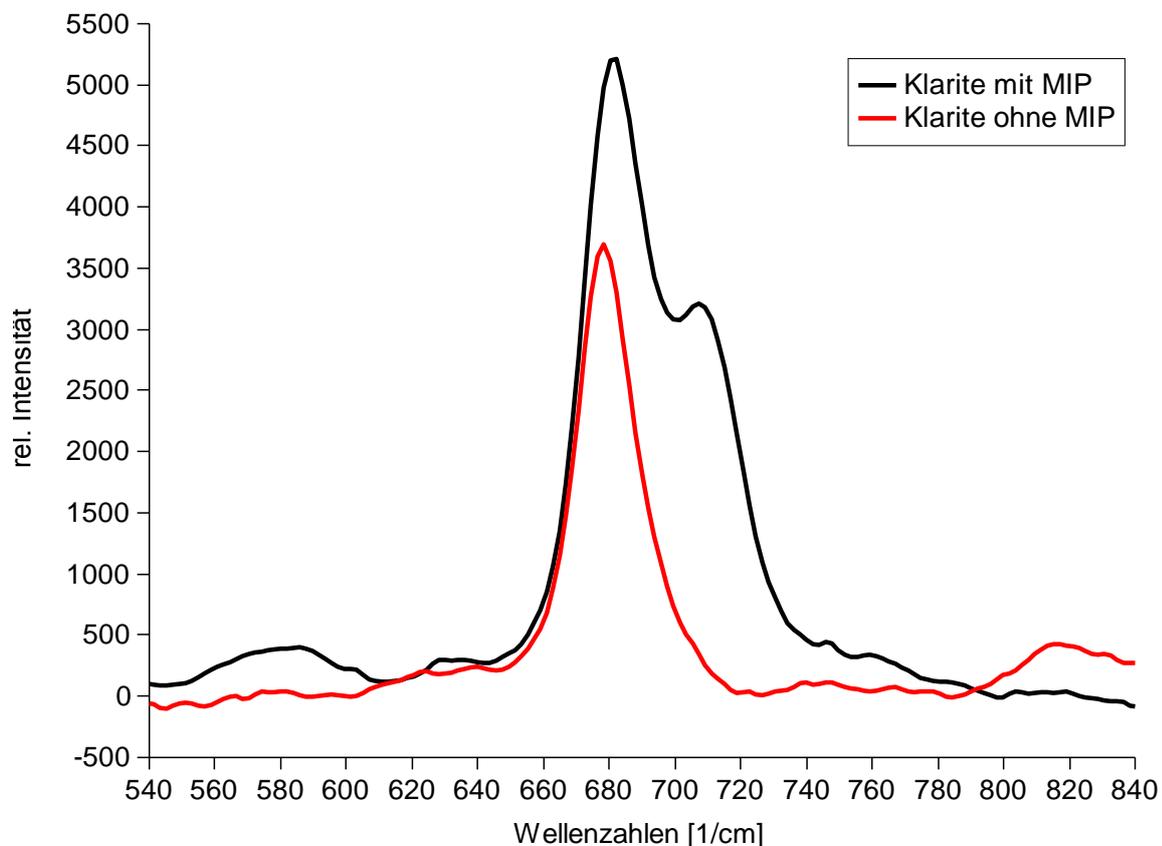


Abbildung 76: Ein mit MIP beschichtetes Substrat und eines ohne Modifikation nach der Einlagerung in 3200 mg/L Melaminlösung für 15 Minuten. Deutlich stärkeres Signal durch das molekular geprägte Polymer.

Vergleich mit NIP

Um festzustellen, ob der MIP Vorteile gegenüber einem ungeprägten Polymerfilm bietet, wurde ein weiteres Substrat mit eben diesem NIP beschichtet und ebenfalls in Wasser gelegt (um Monomerreste zu entfernen). Im Anschluss erfolgte analog zum MIP die Einlagerung von Melamin in einer gesättigten (3200 mg/L) Melaminlösung (siehe Abbildung 77).

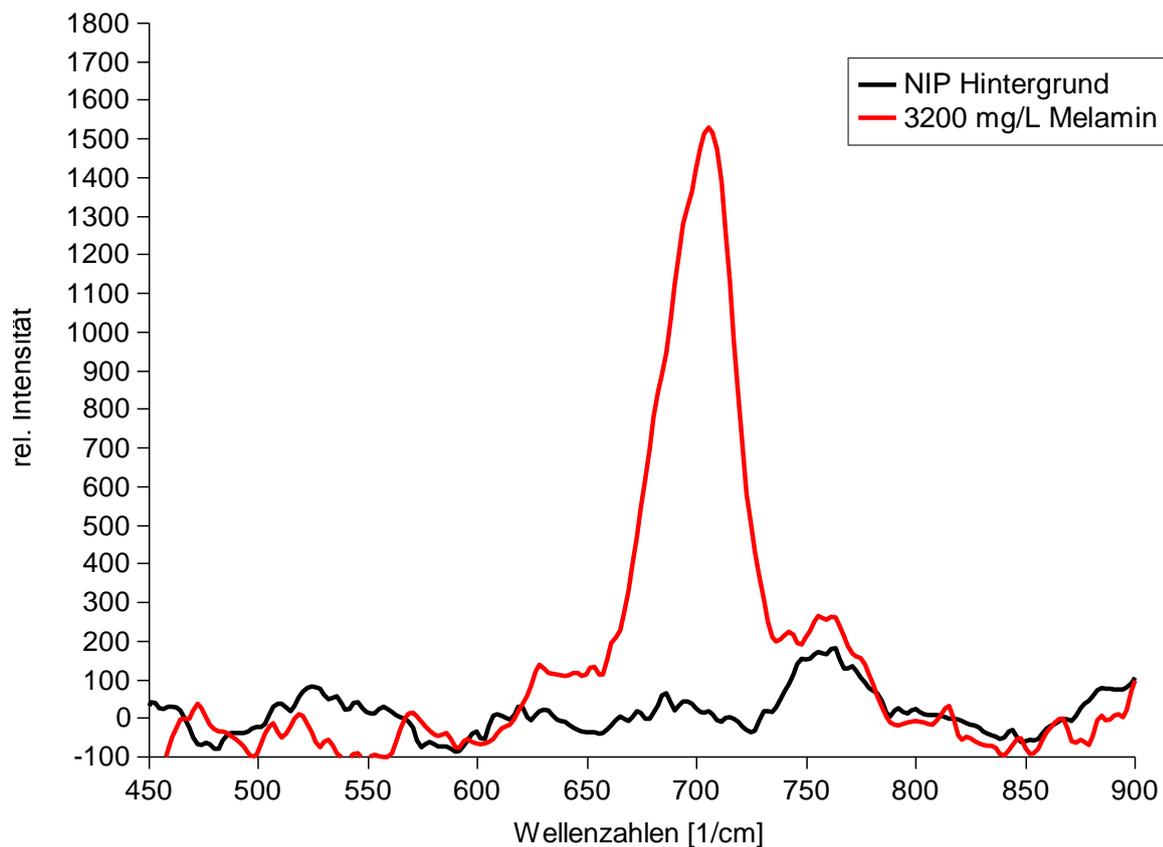


Abbildung 77: Einlagerung von Melamin in ein ungeprägtes Polymer. Verglichen mit dem MIP unterscheidet sich sowohl die Intensität als auch die Peakform.

Das erhaltene Signal ist wesentlich schwächer als jenes der getesteten MIP-SERS Substrate und lässt sich kaum durch Auswaschen entfernen, wodurch weitere Messungen mit demselben Substrat nicht sinnvoll erscheinen. Die Peakfläche beträgt bei einer Konzentration von 3200 mg/L Melamin für das NIP 6,5 und für das MIP 22,9 a.u.. Dies entspricht einem Signalverhältnis von 3,5 und ist damit vergleichbar mit jenem der QCM Messungen mit 3,9.

Es steht somit fest, dass molekular geprägte Polymere eine weit höhere Sensitivität mit sich bringen als ungeprägte Schichten. In den Kavitäten können größere Mengen

an Melamin tiefer in das Polymer eindringen und sich damit in der Nähe der Goldoberfläche anreichern.

Messung von Melamin in Milch

Bei Messungen in Milch konnte das Problem beobachtet werden, dass sich diverse Partikel in Form eines Films auf das Substrat legen und selbiges nach bereits einer Messung nahezu unbrauchbar wird. Diese Verunreinigungen können nicht durch einfaches Spülen oder Einlegen in Wasser beseitigt werden. Komplexere Reinigungsschritte sind zwar denkbar, wurden mit Blick auf die Verwendung im Rahmen des Projektes jedoch unterlassen, da sie kaum außerhalb eines Laboratoriums durchführbar sind. Versuche mit z.B. Molke wurden dennoch übersprungen, da dieses Getränk in Großbritannien, wo diese Messungen durchgeführt wurden, nicht erhältlich ist.

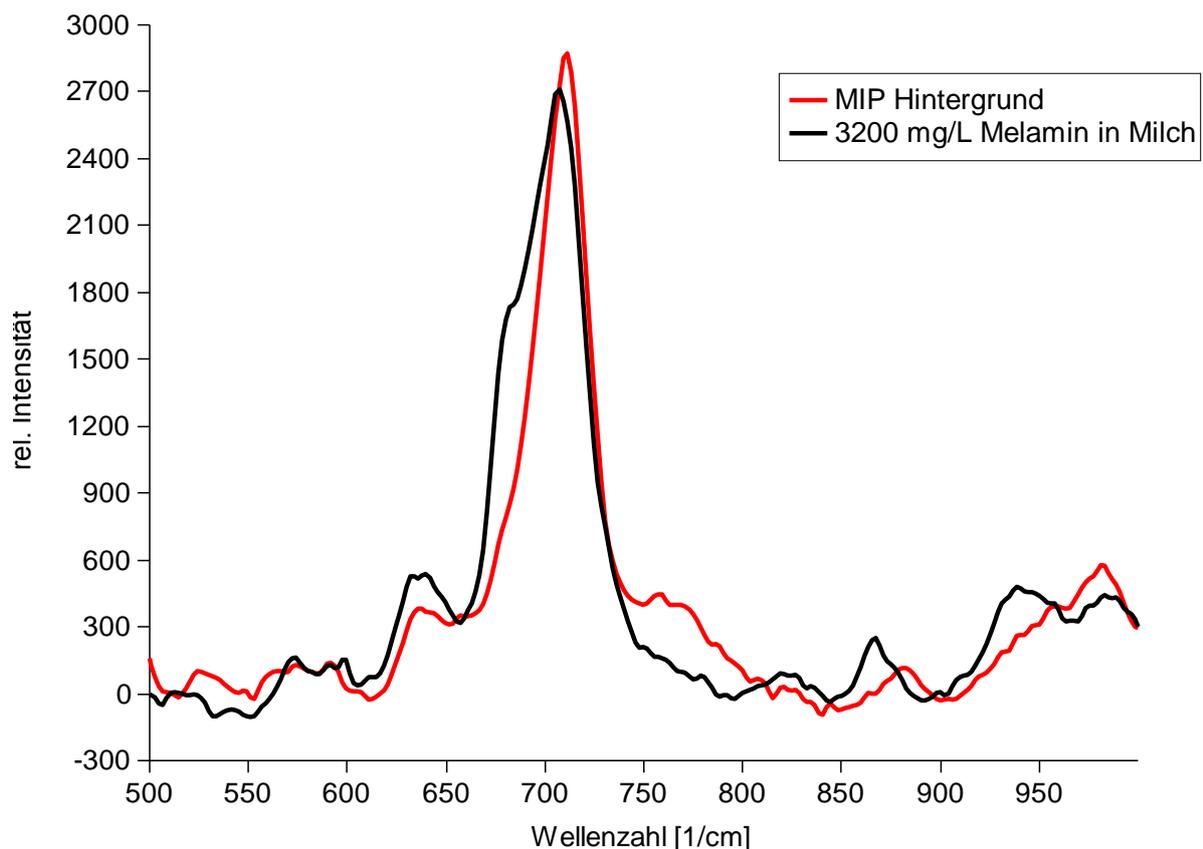


Abbildung 78: Messung von Melamin in Milch. Am abgeschwächten Signal nach der Anreicherung in Milch (rot) entsteht bei 680 cm^{-1} ein neuer Peak, welcher die Anwesenheit von Melamin in der Probenlösung kennzeichnet.

In Abbildung 78 ist in roter Farbe das Spektrum nach 15 Minuten Anreicherung in mit 3200 mg/L Melamin versetzter Milch zu erkennen. Zwar ist das Signal bei 712 cm^{-1} nicht angestiegen und sogar leicht abgeschwächt, doch lässt sich mittels des neuen Peaks bei 680 cm^{-1} qualitativ eindeutig Melamin nachweisen.

Auf einigen weiteren Substraten wurde die Messung von in Milch gelöstem Melamin wiederholt, wobei die Analytkonzentration gesenkt wurde. Praktisch lässt sich jedoch nur eine Messung pro Substrat durchführen, bevor die sensitive Schicht durch die Signalabschwächung nahezu unbrauchbar wird.

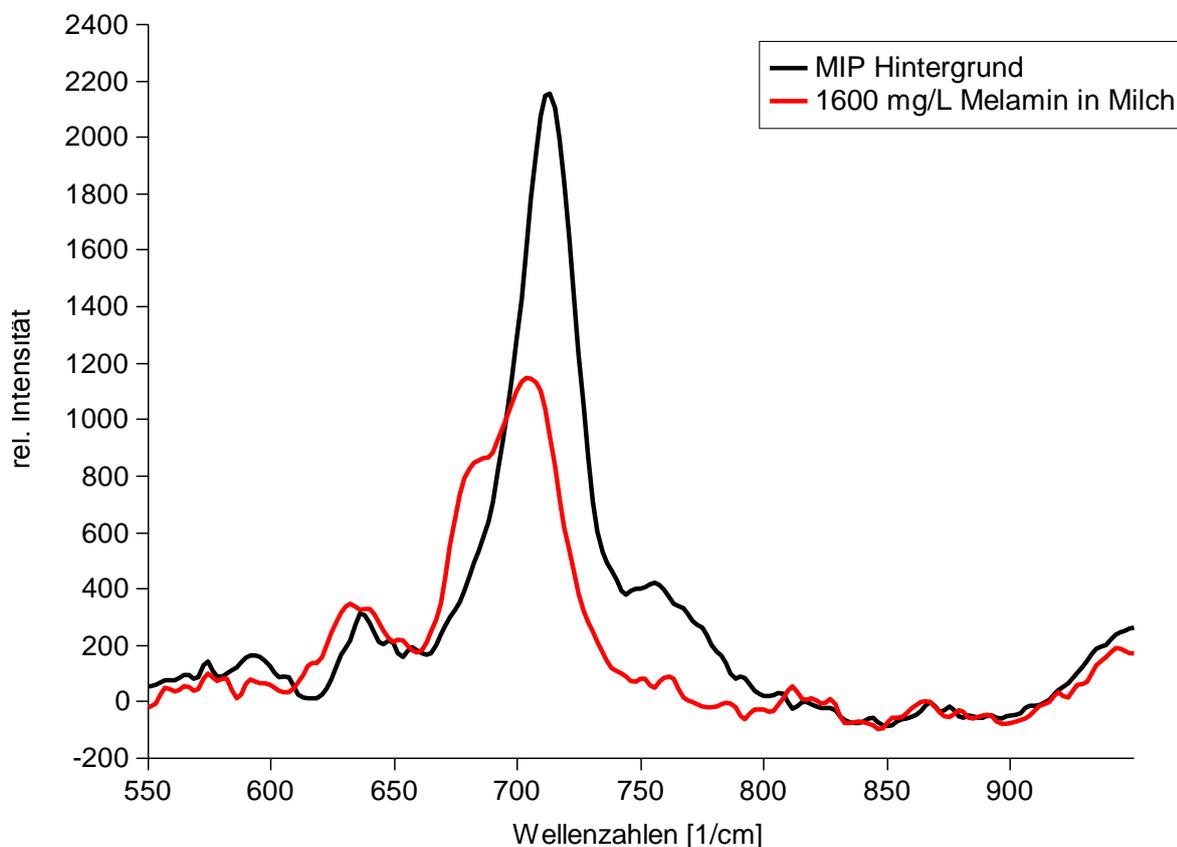


Abbildung 79: Messung von 1600 mg/L Melamin in Milch. Der zweite Peak ist weiterhin deutlich als Schulter bei 680 cm^{-1} erkennbar.

Auch bei 1600 mg/L (Abbildung 79) ist Melamin klar anhand des entstehenden zweiten Peaks bzw. der erkennbaren Schulter bei 680 cm^{-1} zu erkennen, obwohl das Signal bei 712 cm^{-1} bereits weit unter jenem des Blindwerts liegt. Ein derartiger Nachweis in normaler Vollmilch ist mittels QCM als Detektionsprinzip nicht vorstellbar

und auch mit keiner anderen derzeit erhältlichen Analysenmethode ohne langwierige Probenvorbereitung möglich.

Im Rahmen der Untersuchungen mit Milch und der damit verbundenen Signalabschwächung muss bedacht werden, dass der verstärkende Effekt der verwendeten Klarite® Substrate von den bereits als Prototyp existierenden, im Rahmen von „PHOTOSENS“ entwickelten Nachfolgern um ein Vielfaches übertroffen wird (siehe auch Kapitel 3.2.1).¹⁰⁷

4.3 MIP Nanopartikel

Die Entwicklung molekular geprägter Nanopartikel wurde mit dem Ziel vorangetrieben ein Material zur Verfügung zu stellen, welches sich für die Massenproduktion mittels „Roll-to-roll processing“ eignet. Beide für „PHOTOSENS“ vorgesehene Detektionsprinzipien bestehen im Wesentlichen aus Strukturen im Nano- bis Mikrometermaßstab und können daher entweder mit einem sensitiven Polymerfilm oder entsprechend kleinen Partikeln versehen werden. Letztere versprechen einfachere Lagerung und bessere Kompatibilität mit Beschichtungsmaschinen. Die Synthese der Partikel sowie die für die Messungen verwendeten Beschichtungsmethoden sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

4.3.1 QCM

Ähnlich den molekular geprägten dünnen Filmen wurden auch die MIP – Nanopartikel mittels QCM-Messungen auf ihre Funktionalität hin überprüft, bevor die Kombination mit SERS erprobt wurde. Die Charakterisierung beinhaltet Konzentrationsabhängigkeit, Querselektivität sowie die Verbesserung des Imprints durch das Sättigen der Fällungslösung mit Melamin.

4.3.1.1 Konzentrationsabhängigkeit

Bei den Nanopartikeln ist vor allem der Unterschied zwischen MIP und NIP-Partikeln interessant, da aufgrund der großen Oberfläche und Porosität stets ein vergleichsweise starker Sensoreffekt auftritt. Eine Konzentrationsmessung von Melamin mit einem frühen Sensor ist in Abbildung 80 dargestellt.

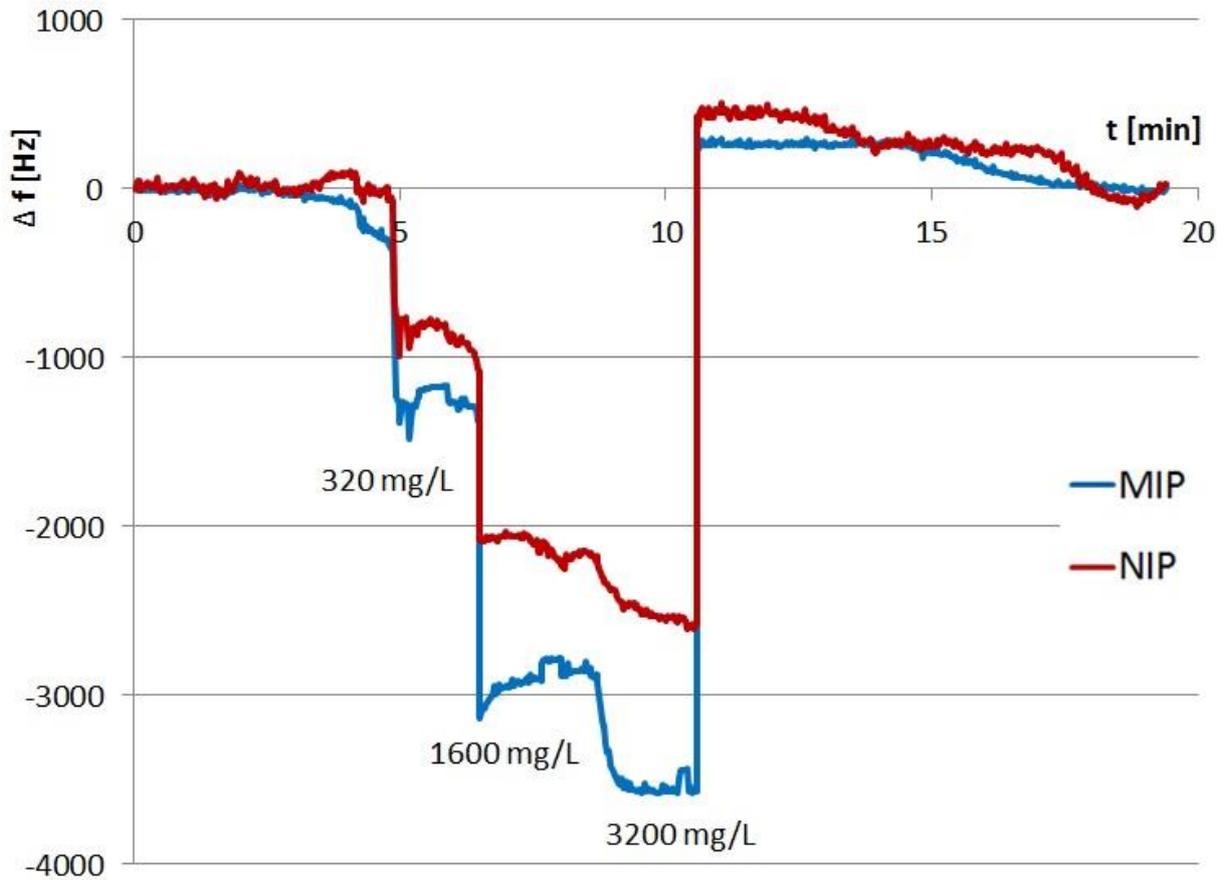


Abbildung 80: QCM-Messung einer Konzentrationsabhängigkeit von Melamin mit MIP – NP, welche in reinem ACN präzipitiert wurden.

Die Signale sind im Vergleich zu dünnen Filmen höher. Dies liegt jedoch an der dickeren Schicht, welche durch Dropcoating entsteht. Beim Präzeffekt, also der Differenz zwischen geprägten (MIP) und ungeprägten (NIP) Nanopartikeln ist ein eindeutig schlechteres Ergebnis zu beobachten. Deshalb wurden die MIP-NP, wie bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben, weiterentwickelt. Am erfolgreichsten war hierbei das Präzipitationsverfahren unter Verwendung von mit Melamin gesättigter Acetonitrillösung.

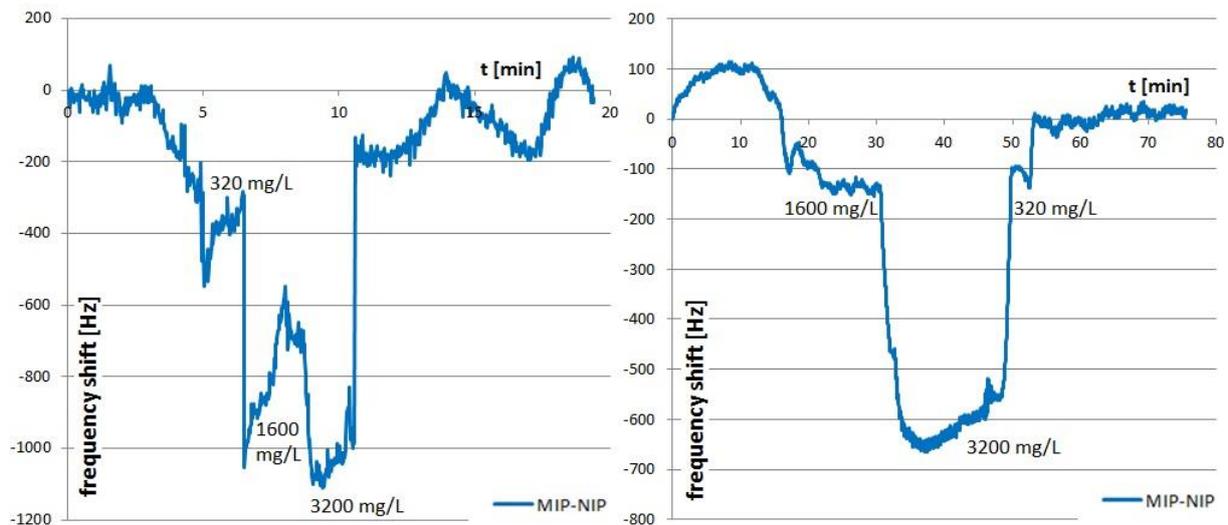


Abbildung 81: Konzentrationsabhängigkeit im Vergleich zwischen den beiden MIP-NP (Differenzsignal). Links die konventionell hergestellten, rechts jene in mit Melamin gesättigter ACN Lösung. Es zeigt sich ein verbesserter Imprinting-Effekt.

Abbildung 81 zeigt die Differenzsignalkurven (MIP minus NIP) der frühen (links) und in gesättigter ACN Lösung hergestellter MIP-NP (rechts). Die erste Messung ist ident mit jener in Abbildung 80. Die Signalverhältnisse sind in Tabelle 10 zu sehen, wobei ein höherer Wert wünschenswert ist. Insbesondere bei hoch konzentrierter Lösung schneiden die neuen Partikel besser ab, da im Polymer eine weitaus größere Anzahl an Kavitäten zur Verfügung steht, welche mit Analyt bestückt werden können.

Tabelle 10: Signalverhältnis MIP:NIP beider NP-Typen bei unterschiedlichen Melaminkonzentrationen

MIP:NIP	320 mg/L	1600 mg/L	3200 mg/L
Konventionelle NP	1,43	1,30	1,41
NP aus gesättigter Lsg.	1,66	1,56	2,11

Es ergibt sich ein wesentlich besseres Signalverhältnis zwischen den beiden Elektroden. Dies bedeutet, dass durch das Hinzufügen von Melamin zur Fällungslösung während der Partikelherstellung weniger Templat aus dem MIP ausgewaschen und damit ein besserer Imprinting-Effekt erreicht wird (Abbildung 82). Dies kann auch bei einer Kombination mit optischer Detektion von Vorteil sein, wobei hierfür zumindest die grundsätzliche Funktion der MIP-NP mittels QCM vorab überprüft werden sollte. Alle weiteren Messungen wurden daher mit den verbesserten Nanopartikeln durchgeführt.

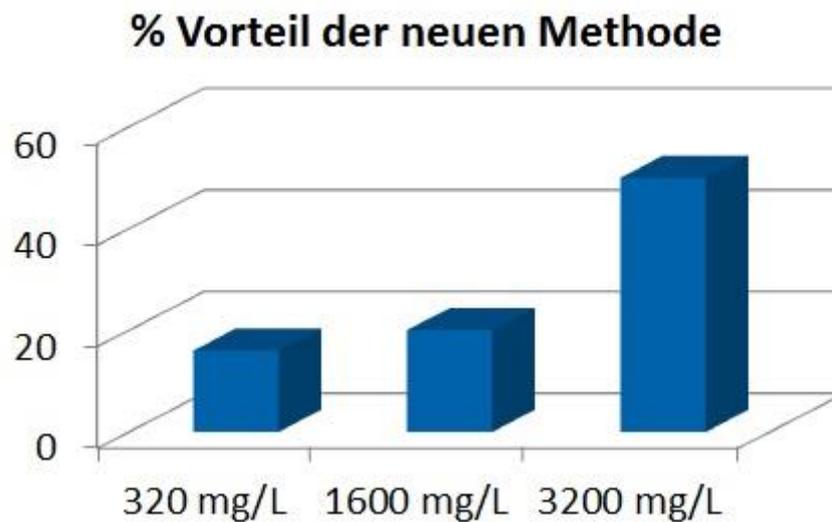


Abbildung 82: Verbesserungseffekt der nach neuer Methode synthetisierter Nanopartikel gegenüber den Früheren bei drei unterschiedlichen Konzentrationen. Bei höher konzentrierten Lösungen ist der Effekt am stärksten.

4.3.1.2 Querselektivität

Um die Querselektivität gegenüber anderen Stoffen festzustellen wurde ein Quarz mit MIP und NIP Nanopartikeln beschichtet und innerhalb einer Messung, also binnen weniger Minuten, mit der zu untersuchenden Verbindung und im Anschluss mit Melamin beschickt, um die Funktionstüchtigkeit beider Elektroden zu überprüfen. Interessant hierbei sind sowohl die einzelnen Signale der Mess- und Referenzelektrode als auch das Differenzsignal.

Als Beispiel ist die Messung von Anilin in Abbildung 83 abgebildet. Um einen Vergleich mit den dünnen Filmen sowie den Core-Shell Nanopartikeln zu ermöglichen wurde neben Anilin auch Glukose und Pyridin untersucht.

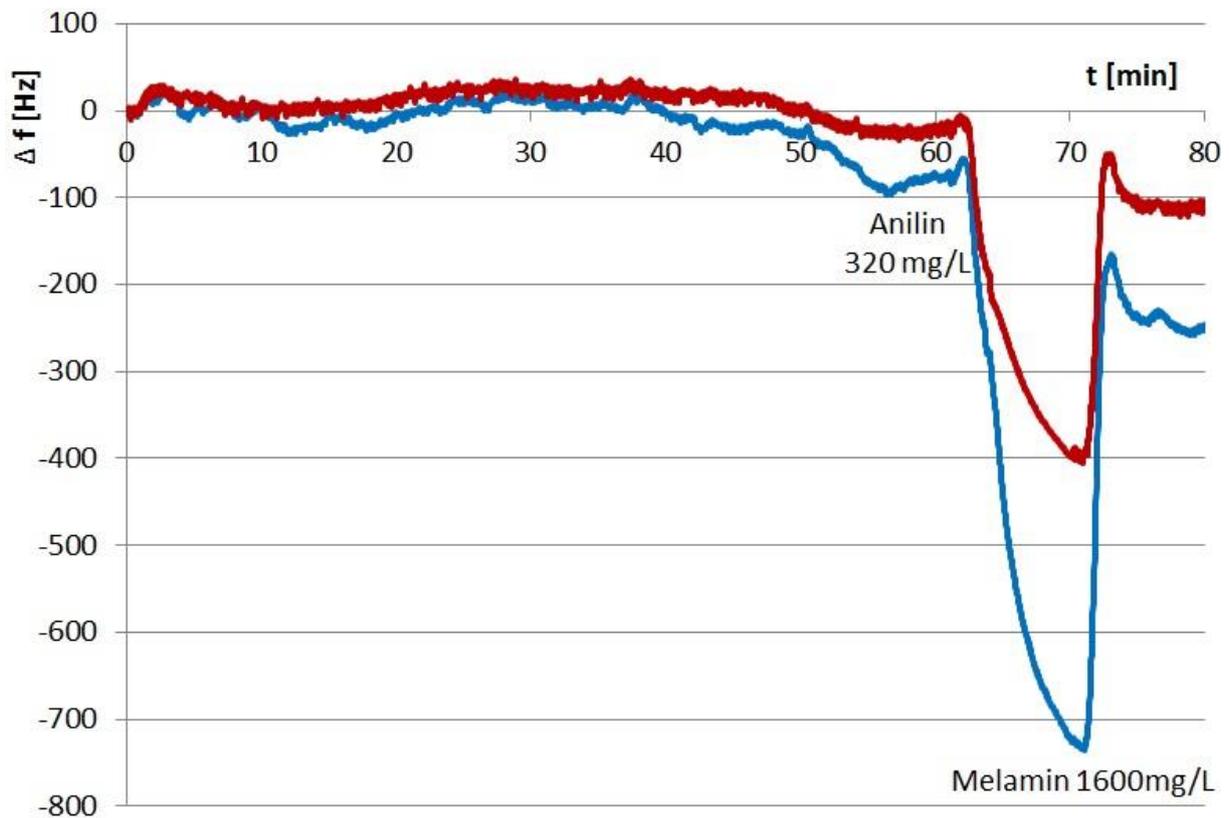


Abbildung 83: Querselektivitätstest auf Anilin (320 mg/L) mit anschließender Funktionskontrolle des QCM Sensors (1600 mg/L Melamin).

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse im folgenden Balkendiagramm zusammengefasst (Abbildung 84). Überraschend ist das starke Signal beider Elektroden gegenüber Pyridin. Die Defizite gegenüber den Querselektivitäten der dünnen Filme lassen sich einerseits durch höhere Porosität als auch durch mangelnden Imprinting-Effekt der MIP-NP erklären. Letzterer entsteht auch in mit Melamin gesättigter Fällungslösung, weshalb auch die Möglichkeit besteht, dass die Struktur des MIP durch die Anwesenheit von Acetonitril negativ beeinflusst wird. Eine Anwendung in Verbindung mit anderen Messmethoden wie oberflächenverstärkter Ramanspektroskopie ist dennoch denkbar, da vor allem größere Moleküle (Zucker, Proteine) nicht in die Schicht eindringen und dadurch auch keine Messung stören können. Anilin und Pyridin werden ohnehin in keinen Lebensmitteln zugesetzt und könnten aufgrund unterschiedlicher Raman-Banden bei Bedarf klar identifiziert werden. Generell führt die zusätzliche Spektralinformation von Methoden wie beispielsweise SERS zu einer zusätzlichen Selektivitätsdimension, wodurch keine Probleme für die Projektfragestellungen zu erwarten sind.

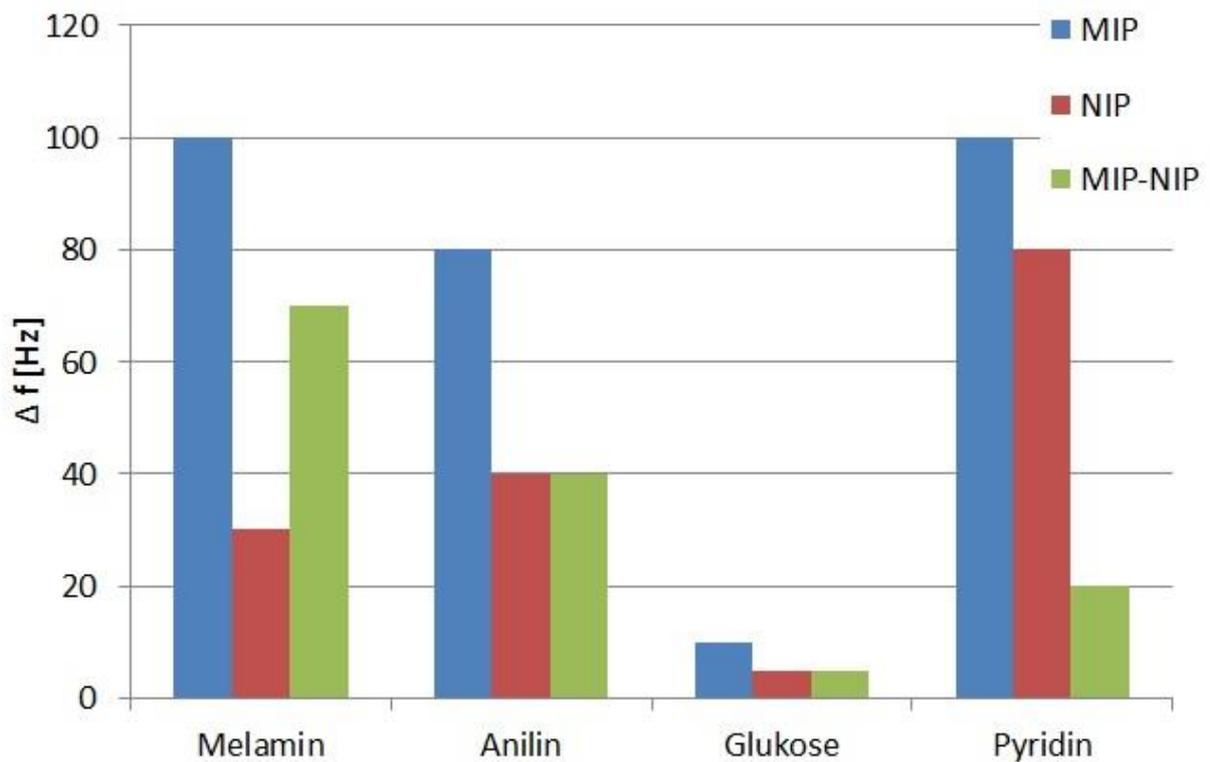


Abbildung 84: Übersicht der Querselektivitätsmessung mittels molekular geprägter Nanopartikel. Mit Ausnahme der Glukose zeigt der Sensor starke Querempfindlichkeiten gegenüber den gewählten Analyten.

Ein Vergleich aller getesteter MIP-Materialien (Film, Nanopartikel und Core-Shell Nanopartikel) findet sich in Kapitel 5.1.

4.3.2 SERS

Für die MIP-NP SERS Messungen wurden ausschließlich die aus Melamin-hältiger Lösung gefällten, verbesserten MIP-Nanopartikel verwendet (siehe Kapitel 3.3.2). Zur Anwendung kam das hochauflösende Nicolet Almega XR Ramanspektrometer.

Getestet wurden zwei unterschiedliche Verdünnungen der ursprünglichen Nanopartikelsuspension (1:10 und 1:100), wobei die SERS Ergebnisse weitgehend vergleichbar waren (siehe Abbildung 85 und Abbildung 86).

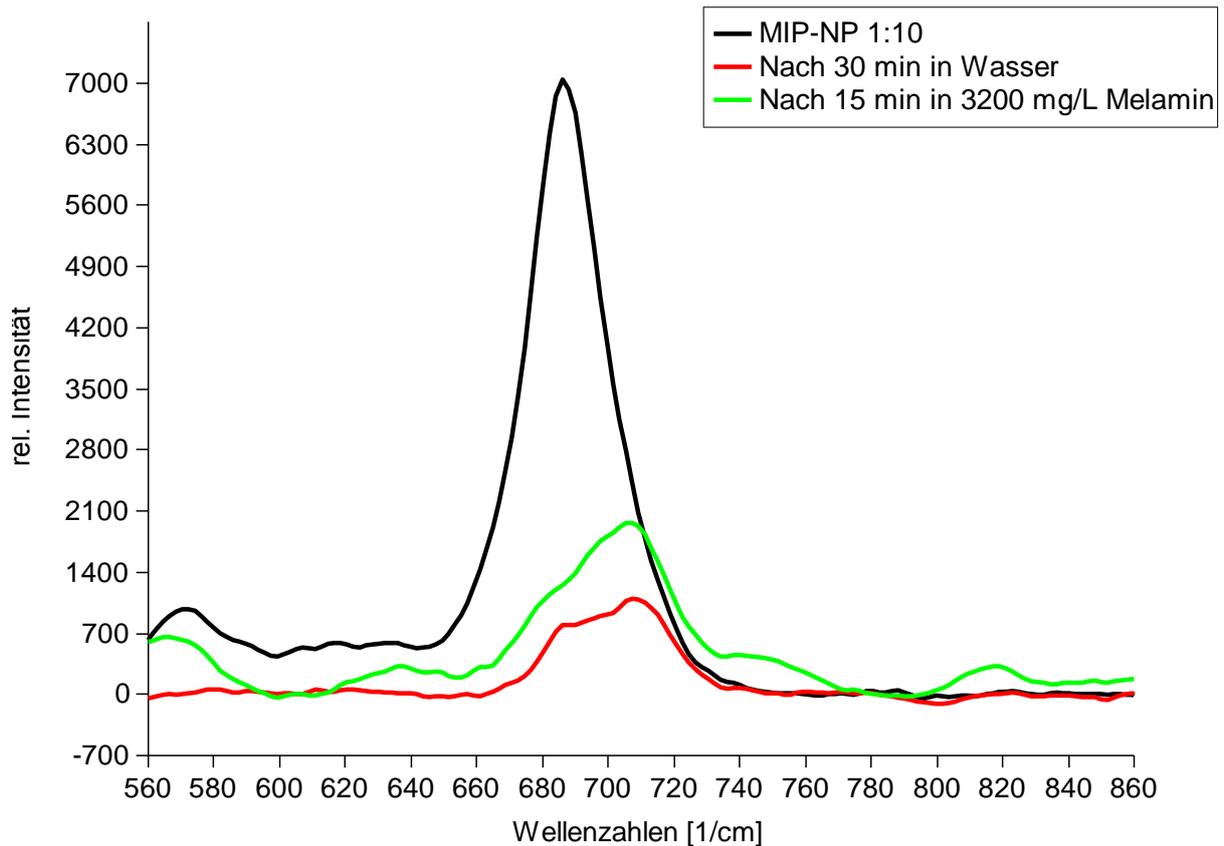


Abbildung 85: Molekular geprägte Nanopartikel (5 μL der 1:10 verdünnten Suspension, schwarz) nach 30 Minuten in Wasser (Auswaschen des Templates, rot) sowie Wiedereinlagerung von Melamin (grün).

Bei der Messung mittels der stärker verdünnten Suspension wurde das Substrat nach dem Melamin-Nachweis nochmals für 45 Minuten in Wasser eingelegt. Das Melaminsignal wurde dadurch abermals wesentlich schwächer als nach den ersten 30 Minuten (Abbildung 86). Dies bedeutet, dass entweder noch reversibel gebundenes Melamin im Polymer vorhanden war oder, dass sich Nanopartikel, bzw. Teile der Schicht von der Oberfläche lösen. Die ähnliche Form der Peaks lässt vermuten, dass sich Material gelöst hat: Sowohl nach 30 als auch nach 45 Minuten sind beide Signale in annähernd gleichem Verhältnis zu erkennen, hätte sich reversibel gebundenes Melamin gelöst, müsste der Peak bei 680 cm^{-1} nach dem zweiten Waschschrift an relativer Intensität verlieren. Aufgrund der schwachen Signale lässt sich diesbezüglich aber keine eindeutige Aussage treffen.

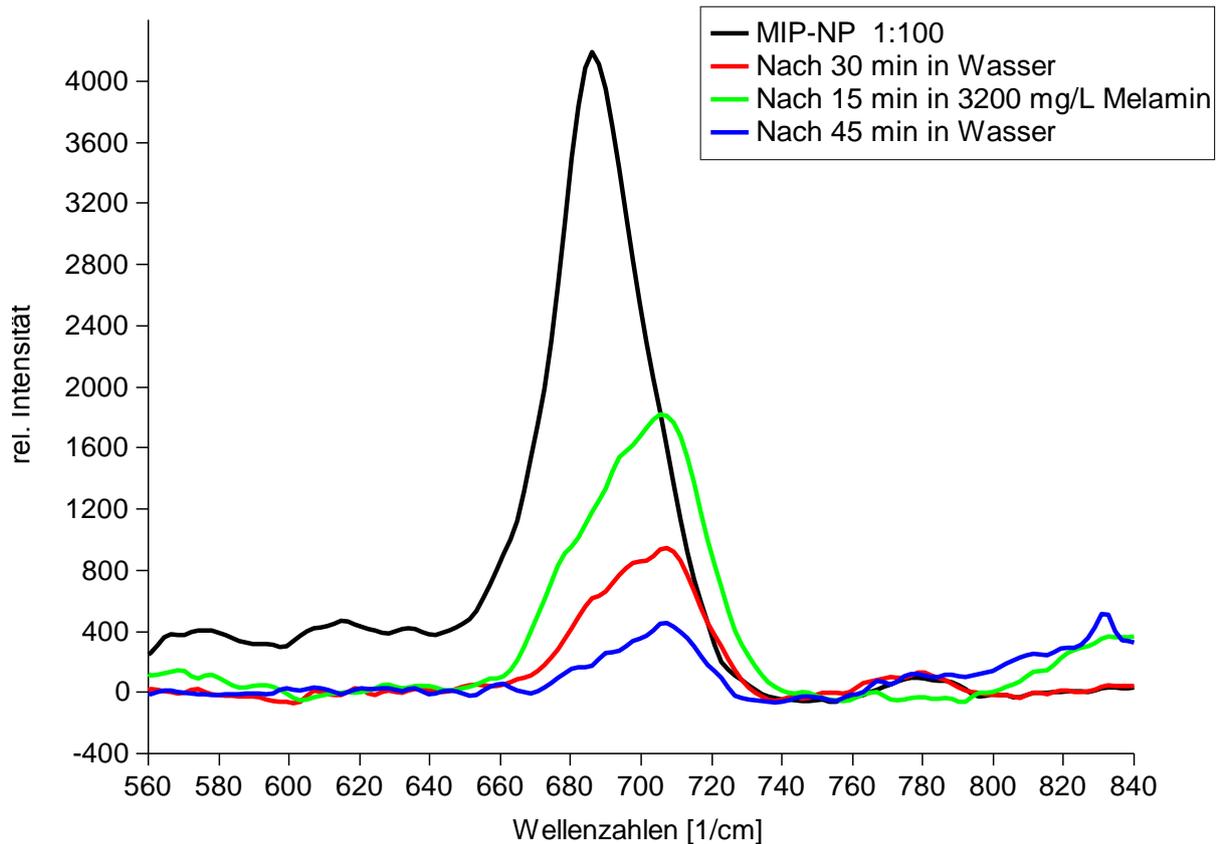


Abbildung 86: Molekular geprägte Nanopartikel (5 μL der 1:100 verdünnten Suspension, (schwarz) nach 30 Minuten in Wasser (Auswaschen des Templates, rot) sowie Wiedereinlagerung von Melamin (grün) und erneutem Entfernen des Analyten mittels Wasser (blau).

Aufgrund der im Mikroskop sowie mittels AFM festgestellten besseren Verteilung der Partikel über die Oberfläche bzw. den Kavitäten des Substrates wurde der geringer konzentrierten Suspension (1 zu 100) bei den weiteren Messungen der Vorzug gegeben. Bei der höheren Konzentration ist die gesamte Klarite Oberfläche mit einer vollständigen, undurchsichtigen Schicht an Partikeln überzogen (1 zu 10 Verdünnung der ursprünglichen Polymerlösung).

Die erhaltenen Signale sind im Vergleich zu den einfachen Polymerfilmen deutlich schwächer und nicht ohne weiteres quantitativ reproduzierbar, was an der vergleichsweise unregelmäßigen Beschichtung liegt. Dennoch konnte anhand der Messungen gezeigt werden, dass ein Nachweis von Melamin mit Hilfe von molekular geprägten Nanopartikeln möglich ist.

Messung von Melamin in Milch

Analog zu den Messungen mit den dünnen MIP Filmen wurde auch mittels MIP-NP in Kombination mit SERS versucht Melamin direkt in Milch nachzuweisen. Ein mit MIP-NP beschichtetes Klarite Substrat wurde erst über Nacht in Wasser von Templat befreit, im Anschluss für 15 Minuten in mit 1600 mg/L Melamin versetzte Milch gelegt und vor der Messung kurz mit Wasser gespült. Die beiden entsprechenden Spektren befinden sich in Abbildung 87.

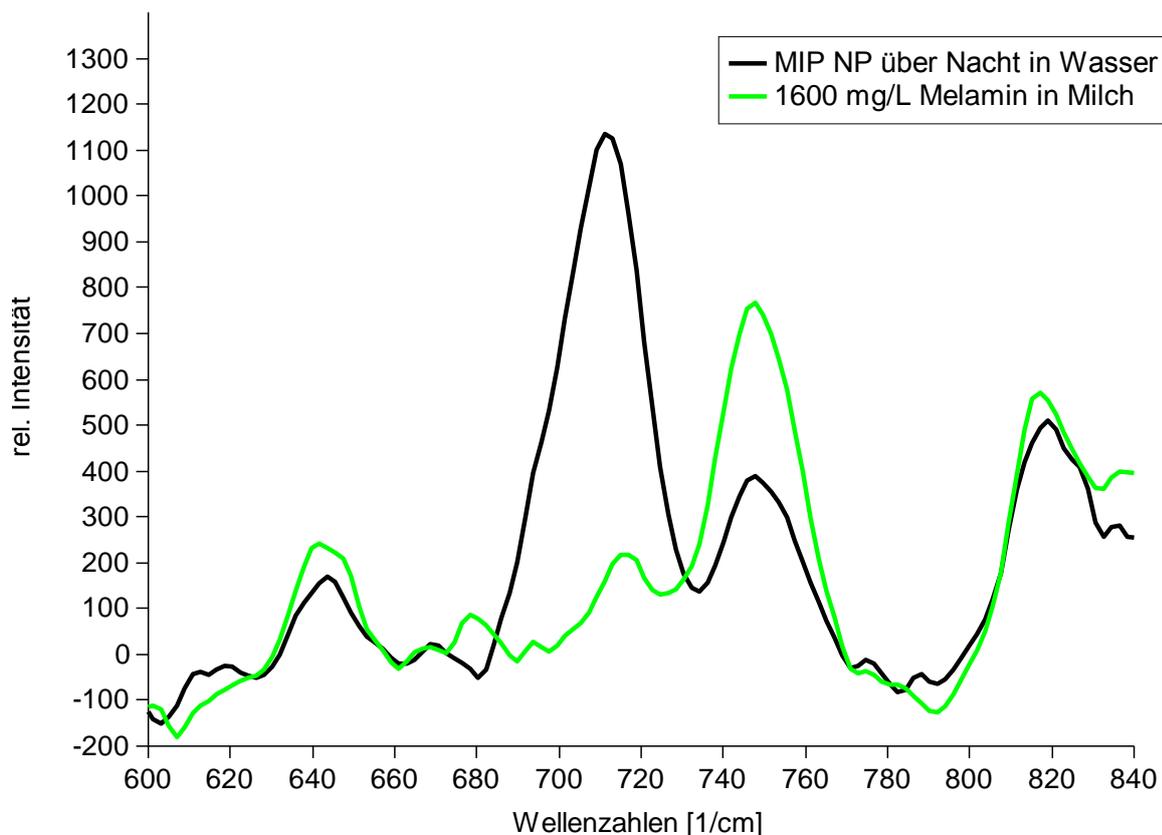


Abbildung 87: Messung von Melamin in Milch mittels einer sensitiven Schicht aus MIP-NP. Nach dem Kontakt mit der Vollmilch konnte keinerlei Melaminsignal detektiert werden.

Die Gründe für das verhältnismäßig schlechtere Abschneiden der Nanopartikel Schicht gegenüber den dünnen Filmen ist nicht vollständig geklärt. Denkbar wäre, dass die rauere Oberfläche zu einer vermehrten Anlagerung von Proteinen und anderen in der Milch enthaltenen Bestandteilen führt und die Signale dadurch abgeschwächt werden. Eine stärkere Verunreinigung gegenüber den dünnen Filmen konnte zumindest subjektiv anhand des Raman-Mikroskops wahrgenommen werden. Dies würde erklären, weshalb auch das bereits vor der Einlagerung in den Partikeln

enthaltene Melamin zuletzt nicht mehr detektiert wird. Theoretisch wäre es auch möglich, dass die NP-Schicht der Behandlung nicht stand-hält und abgespült wurde. Dagegen spricht allerdings, dass eine Schicht mit freiem Auge erkennbar war und die Tatsache, dass auch ein unbeschichtetes SERS Substrat ein zumindest erkennbares SERS Signal liefern sollte (siehe Kapitel 4.2.3.2 auf Seite 107). Nach dem Versuch durchgeführte Messungen erbrachten selbst bei gesättigten Melaminlösungen kein Signal, wodurch eine Verunreinigung der Oberfläche die wahrscheinlichste Variante darstellt.

Durch diese Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass eine Messung von Melamin in Milch mittels der entwickelten MIP-NP Schicht zumindest ohne vorangehende Probenvorbereitung unrealistisch ist.

4.4 Dünne Filme mit TiO₂ Anteil

Wie bereits im Kapitel 3.4.1 erwähnt wurden die dünnen Filme mit TiO₂ Anteil als Prototyp zur Verwendung mit photonischen Kristallen synthetisiert. Aufgrund der, verglichen mit der Projektdauer, langwierigen Entwicklung dieser neuen Messmethode ist es sinnvoll die benötigten sensitiven Materialien herzustellen bevor eine Kombination möglich ist. Um die Funktionalität sicher zu stellen wurden die entsprechenden Partikel mittels QCM charakterisiert.

QCM Messungen

Die Sensoren zeigten aufgrund der teilweise sehr hohen Anteile an Titandioxid verstärktes Rauschen, weshalb zwei verhältnismäßig stark konzentrierte Melaminstandardlösungen untersucht wurden. Eine Messung mit 10 % TiO₂ Anteil ist in Abbildung 88 als Beispiel dargestellt.

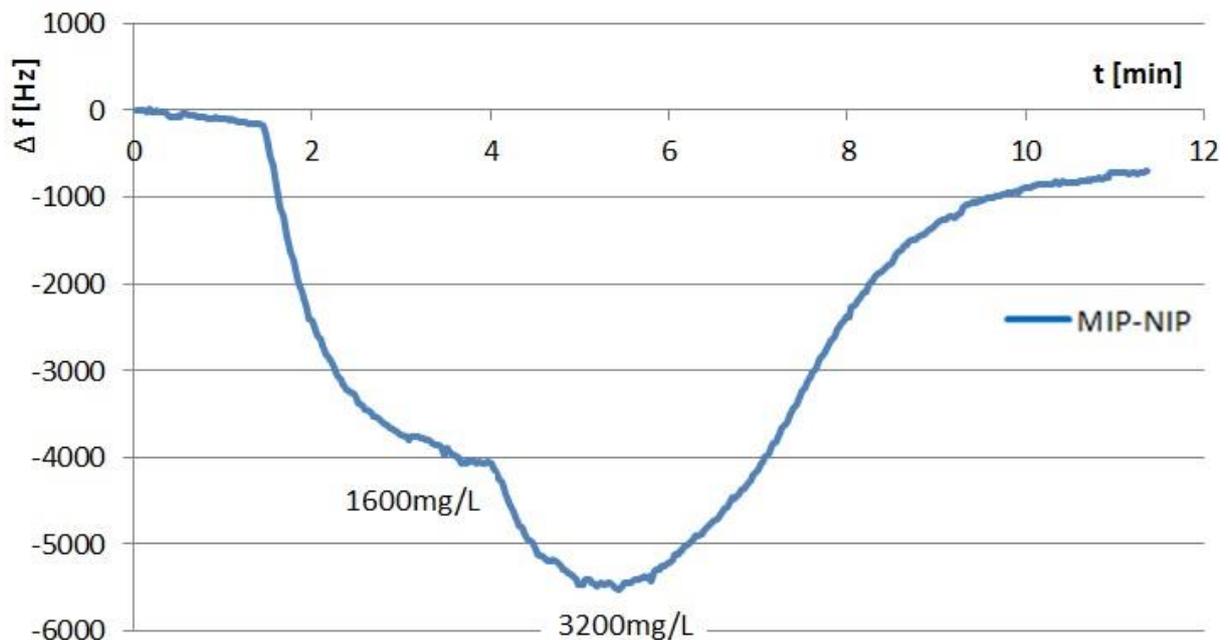


Abbildung 88: Differenzsignal einer Polymerschicht mit 10 % TiO₂ Anteil. Die Melaminsignale fallen im Vergleich zu reinen MIP Filmen stärker aus.

Auffällig ist das höhere Signal gegenüber den dünnen Filmen, welches vermutlich durch die höhere Porosität entsteht. Betrachtet man die Messelektrode, also lediglich

das MIP, erkennt man einen klaren Zusammenhang zwischen dem Anteil an Titandioxid und der Signalstärke (Abbildung 89).

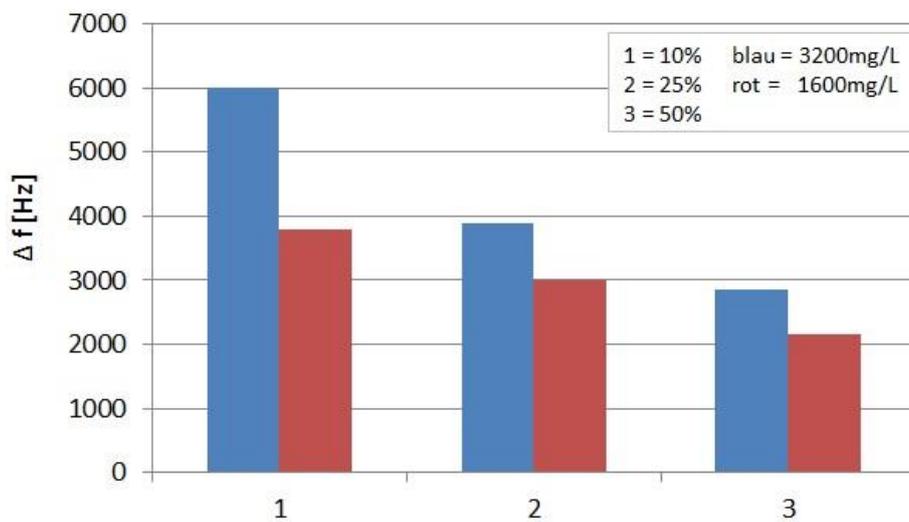


Abbildung 89: Melaminsignal der Messelektrode (MIP) in Abhängigkeit der beigemischten TiO₂ Nanopartikelmenge.

Der Blick auf die Messergebnisse der jeweiligen ungeprägten Polymere (NIP) zeigt, dass auch hier, verglichen mit den dünnen Filmen ohne TiO₂, wesentlich stärkere Signale zustande kommen (Abbildung 90). Diese sind unspezifisch und rühren nicht vom Imprinting-Effekt her.

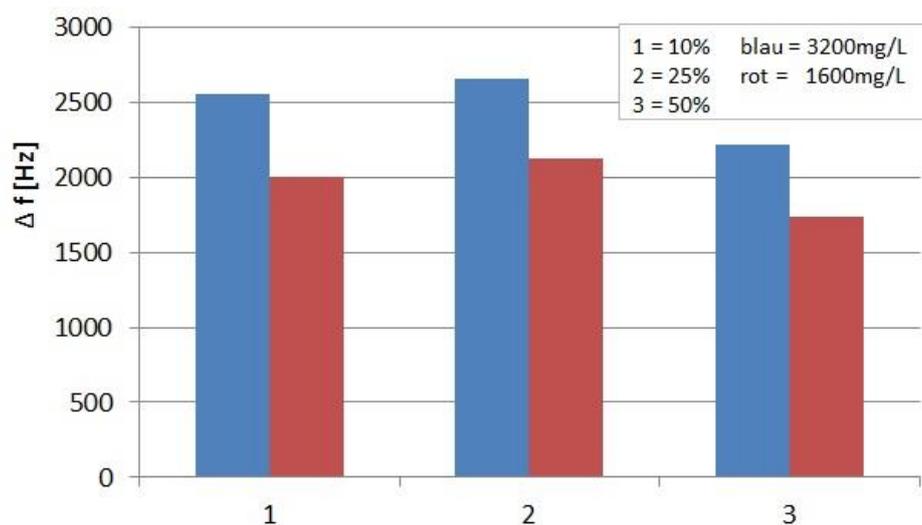


Abbildung 90: Melaminsignal der Referenzelektrode (NIP) in Abhängigkeit der beigemischten TiO₂ Nanopartikelmenge.

Aufgrund dieses Verhaltens kann davon ausgegangen werden, dass sich die jeweiligen Querselektivitäten deutlich verschlechtern sollten. Diese Eigenschaften wurden jedoch nicht explizit untersucht, da die prinzipielle Eignung eines Polymer-Titandioxid Hybridmaterials nachgewiesen werden sollte. Anhand der klar vorhandenen sowie von der Melaminkonzentration abhängigen Signale wurde mit der Entwicklung der Core-Shell Nanopartikel begonnen.

Die Differenzsignale der getesteten Schichten bei den beiden überprüften Melaminkonzentrationen sind in Abbildung 91 zu sehen und zeigen den zu erwartenden Signalverlust in Abhängigkeit der zugesetzten Titandioxid Nanopartikelmenge. Der Imprinting-Effekt sinkt zwar auf den Faktor 2 bis 1,4 (gegenüber 4 bei reinen MIP Filmen), ist jedoch angesichts der großen Mengen an TiO_2 immer noch überraschend hoch.

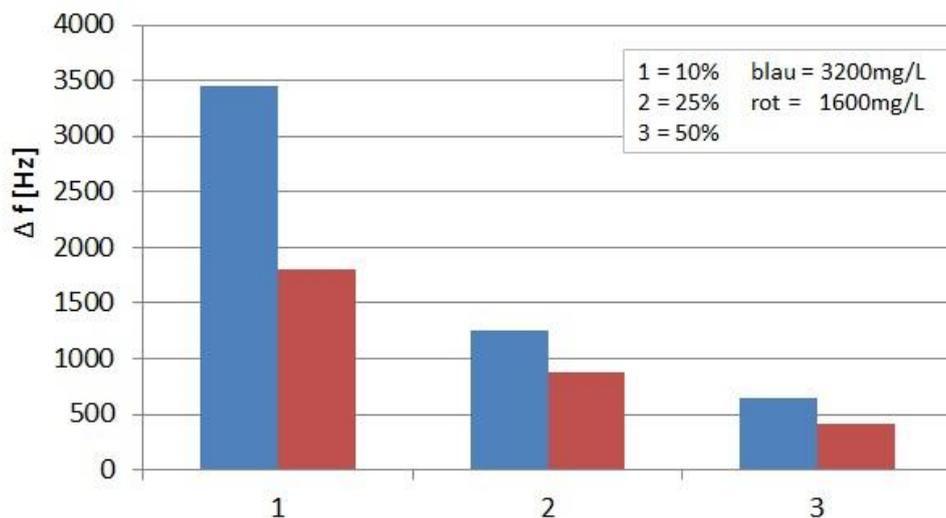


Abbildung 91: Differenzsignal von Melamin (MIP-NIP) in Abhängigkeit der beigemischten TiO_2 Nanopartikelmenge

Durch diese Erkenntnisse ergeben sich viele interessante Möglichkeiten für MIP mit eingeschlossenen Nanopartikeln. Falls der Brechungsindex für optische Messvorrichtungen erhöht werden soll, sollte jedoch ein Umstieg auf kleinere TiO_2 Nanopartikel überdacht werden (wie beispielsweise jene, die für die Core-Shell Nanopartikel verwendet wurden). Eine weitere innovative Möglichkeit welche leider nicht Teil von „PHOTOSENS“ war aber mit Sicherheit bald untersucht wird ist die Kombination mit Silber- oder Goldnanopartikeln in einem MIP zur Steigerung des Raman-Signals analog zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Klarite®

SERS-Substraten. Denkbar wäre dadurch auf eine Detektion der Ramanstrahlung von der Unterseite eines transparenten Substrats, wodurch eine verschmutzte MIP Schicht kein Problem mehr darstellen würde. Ein möglicher Nachteil bei der Verwendung von Silbernanopartikeln ist die geringere Haltbarkeit gegenüber den mit Gold beschichteten Substraten. Ein weiterer wichtiger Punkt ist der noch nicht voll ausgeschöpfte oberflächenverstärkende Raman-Effekt bei Substraten, welcher ebenfalls im Rahmen des Projektes erhöht wurde (University of Southampton¹⁰⁸). Ähnliche Entwicklungen sind bei den metallischen Nanopartikeln vergleichsweise unwahrscheinlich.

4.5 Core – Shell Nanopartikel

Analog zu den dünnen Filmen mit TiO_2 Anteil sind die Core-Shell Nanopartikel ein Material, das für die Kombination mit Photonic Crystal Sensoren zur Verfügung gestellt wurde. Die Versuche an der Universität Wien wurden mittels QCM durchgeführt um festzustellen, ob sich diese Partikel zur Detektion von Melamin eignen. Aufgrund der Vorliebe der zuständigen Projektpartner für Beschichtungen mittels MIP-Nanopartikel wurden die Core-Shell Partikel im Vergleich zu den dünnen Filmen mit TiO_2 eingehender untersucht.

4.5.1 QCM

4.5.1.1 Konzentrationsabhängigkeit

Mittels Dropcoating beschichteter QCM Sensoren konnte die grundsätzliche Eignung der Partikel als molekular geprägtes Material nachgewiesen werden. Hierfür wurden, analog zu den dünnen Filmen, unterschiedlich verdünnte Melaminlösungen durch die Messzelle gepumpt und sobald das Abdriften des Frequenzsignals zu Ende war die Pumpe deaktiviert und der im Wesentlichen konstante Wert noch etwa 2 Minuten beobachtet, bevor der Analyt wiederum mittels Wasser ausgespült wurde. Eine Messkurve der Konzentrationsabhängigkeit ist in Abbildung 92 zu sehen (Differenzkurve zwischen mit MIP und NIP CS-NP beschichteten Elektroden).

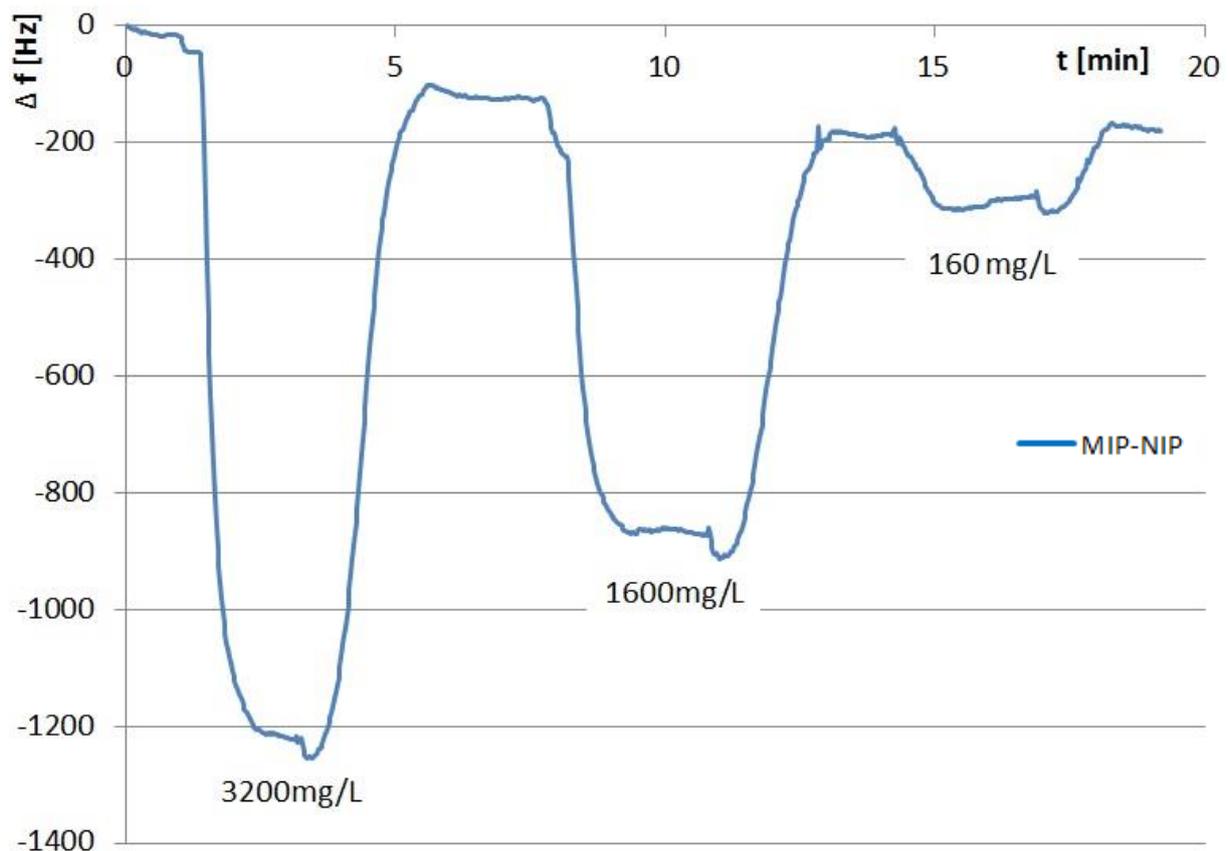


Abbildung 92: QCM Messung von Melamin in 3 unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser mittels MIP und NIP Core – Shell Nanopartikel (aufgetragen mittel Dropcoating).

Die drei getesteten Lösungen mit den Konzentrationen 3200 mg/L, 1600 mg/L und 160 mg/L liefern deutliche Signale. Der Auswaschschritt benötigt ebenso wie die Einlagerung des Analyten nur wenige Minuten und gibt so einen weiteren klaren Hinweis auf die sehr geringe Dicke der MIP-Beschichtung auf den einzelnen Partikeln, die zu sehr schneller Diffusion des Analyten zu den Rezeptorstellen im MIP führt.

Bei der Verwendung von Spincoating wird zwar kein so starkes Signal erreicht (geringere Menge an CS-Partikeln auf der Messelektrode), dafür ergeben sich regelmäßige Schichten, wodurch die Signale der Mess- und Referenzelektrode besser vergleichbar werden. Eine Messung mittels per Spincoating beschichteter Elektroden ist in Abbildung 93 dargestellt, wobei die gleichen Melaminlösungen unter denselben Bedingungen gemessen wurden wie bei dem per Dropcoating beschichteten Sensor.

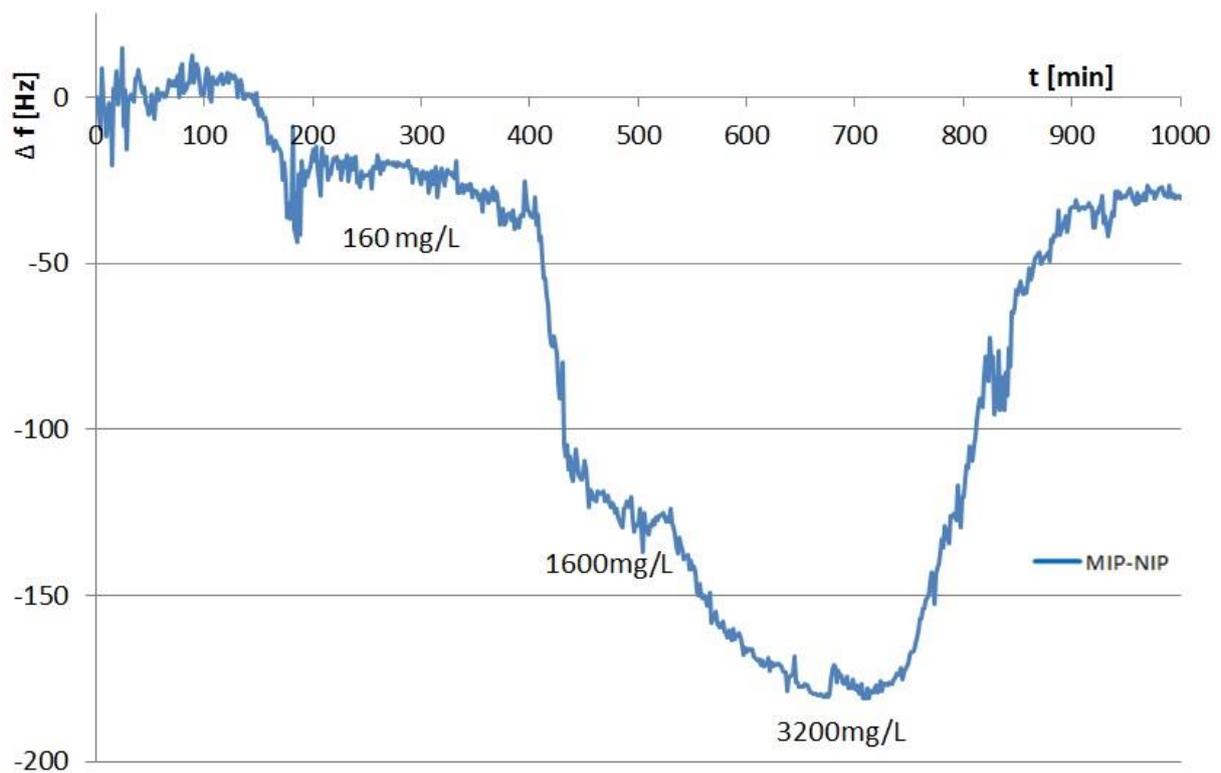


Abbildung 93: QCM Messung von Melamin in 3 unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser mittels MIP und NIP Core – Shell Nanopartikel (aufgetragen mittel Spincoating).

Abbildung 94 zeigt die beiden unterschiedlichen Beschichtungstechniken im direkten Vergleich. Unabhängig der Beschichtung zeigt sich ein Langmuir-Verhalten, wie es bereits von den dünnen Filmen bekannt ist (Kapitel 4.2.1).

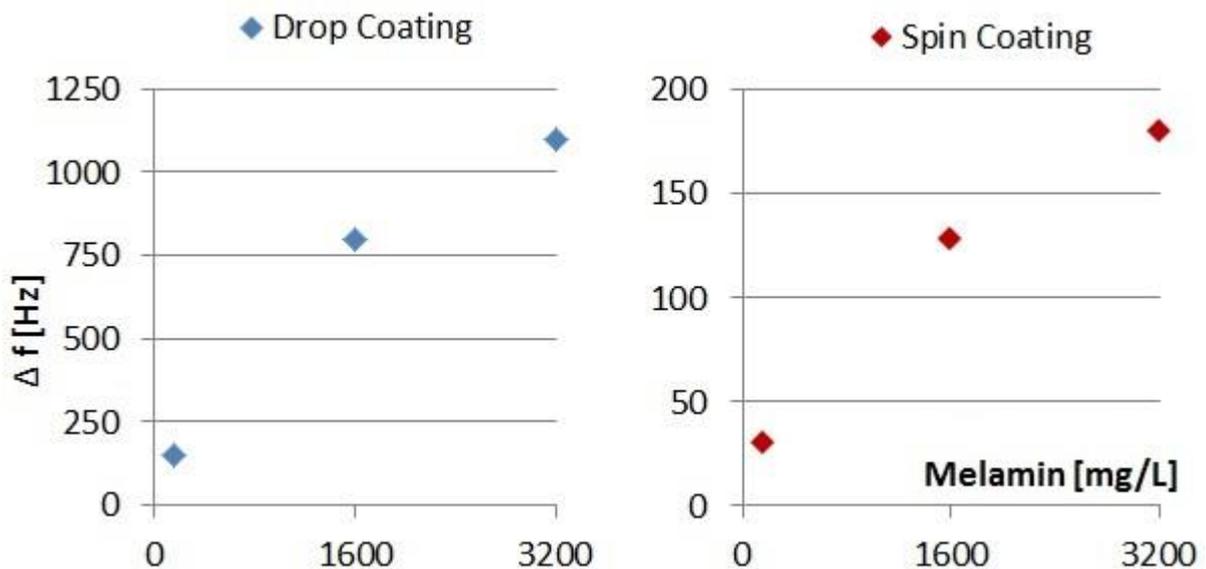


Abbildung 94: QCM-Signale für Melamin bei unterschiedlich mit CS – Nanopartikeln beschichteten Quarzen. Grundsätzlich ähnliches Verhalten, jedoch stärkeres Signal aufgrund der höheren Schichtdicke durch Dropcoating.

4.5.1.2 Querselektivität

Zur Bestimmung der Querselektivitäten wurden Lösungen von Anilin, Glukose und Pyridin in Wasser hergestellt (jeweils 100 mg/L) und mit Melaminlösung (ebenfalls 100 mg/L) verglichen (Abbildung 95). Der eingesetzte QCM Sensor trägt eine Beschichtung, die mittels Dropcoating aufgetragen wurde und fand bereits bei der Konzentrationsmessung im vorhergehenden Kapitel Verwendung.

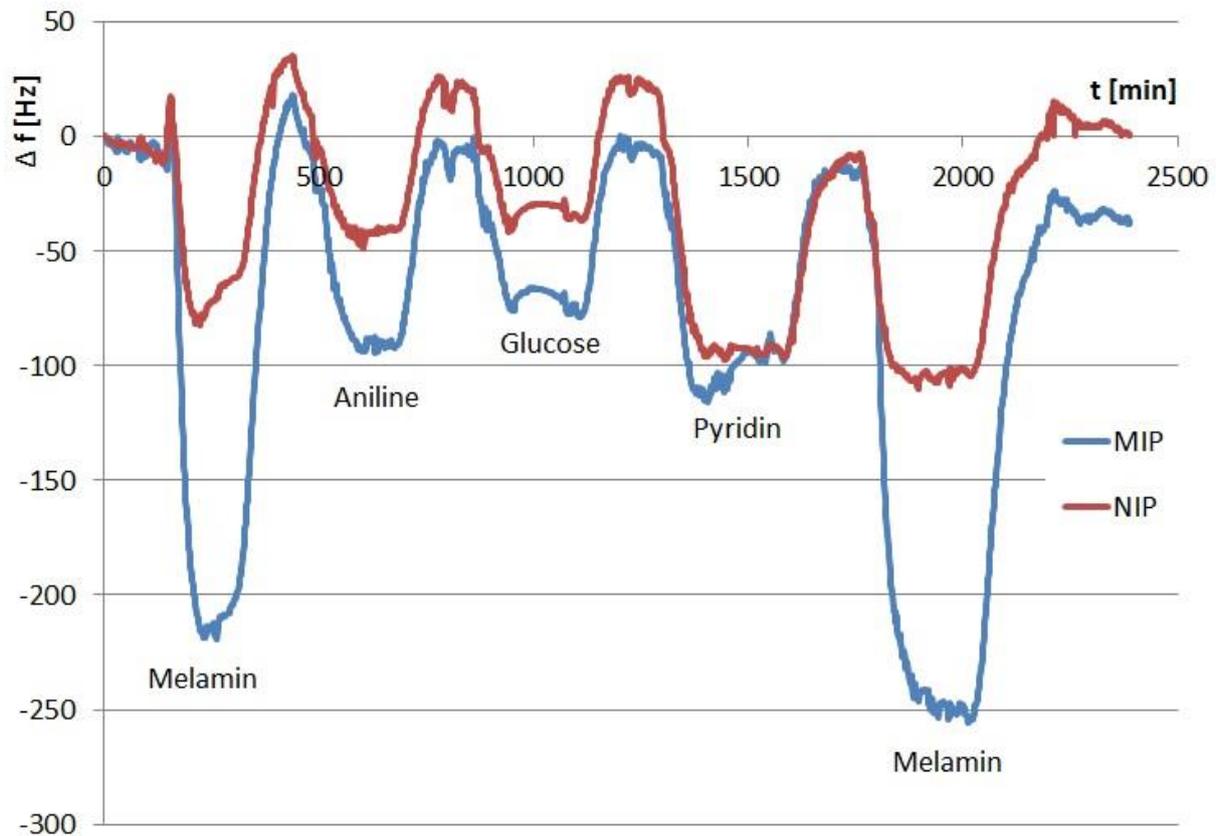


Abbildung 95: QCM Messung verschiedener Verbindungen mittels CS – Nanopartikel zur Analyse der Querselektivität. Jeder Analyt wurde in Form einer wässrigen Lösung mit einer Konzentration von 100 mg/L injiziert.

Zum besseren Überblick der Ergebnisse sei auf das Balkendiagramm in Abbildung 96 verwiesen. Dieses enthält gleichzeitig zu den einzelnen Signalen der Mess- und Referenzelektrode auch die berechneten Differenzsignale (MIP-NIP).

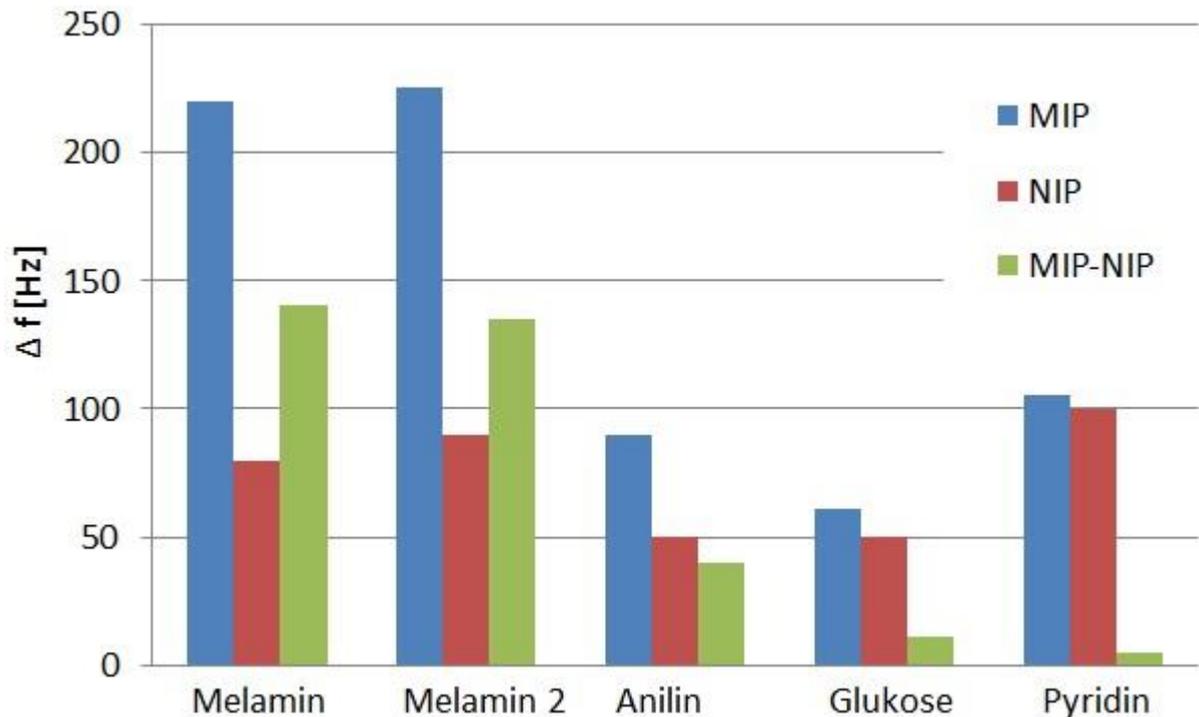


Abbildung 96: Ergebnisse der Querselektivitätsmessung im Vergleich. „Melamin 2“ bezieht sich auf die wiederholte Melamin – Zugabe am Ende der Messung (siehe auch Abbildung 95). Die praktisch unveränderte Signalstärke gegenüber der 1. Zugabe zeigt, dass der Sensor durch die unterschiedlichen Substanzen nicht in Mitleidenschaft gezogen wurde.

Die Core-Shell NP zeigen etwas bessere Querempfindlichkeiten als reine MIP-NP. Dies kann an der grundsätzlich unterschiedlichen Art der Synthese der Polymerhülle sowie an der Bildung einer dichteren und damit weniger porösen Schicht durch die kleineren Core-Shell Partikel liegen. Eine Kombination mit SERS ist aufgrund der optischen Eigenschaften der Kerne nicht sinnvoll, da TiO_2 in den SERS-Kavitäten zu Streuung sowohl des anregenden Lasers, als auch der Ramanstrahlung führen würde.

5 Vergleich der unterschiedlichen Materialien

5.1 QCM Ergebnisse im Vergleich

Zum Vergleich der QCM Messungen von unterschiedlichen Materialien sind die Ergebnisse der jeweiligen Messungen normiert dargestellt. Dies bedeutet, dass das stärkste Signal von Melamin jeweils auf den Wert 1 festgelegt und die geringeren Konzentrationen bzw. die Werte der Querselektivitätsmessungen entsprechend abgeschwächt abgebildet werden. Dadurch ist ein sinnvoller Vergleich verschiedener QCM-Messungen mit unterschiedlichen Beschichtungen möglich.

5.1.1 QCM-Konzentrationsabhängigkeit

Sämtliche Ergebnisse der unterschiedlichen Konzentrationsmessungen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: QCM – Signale verschiedener Melaminlösungen (Angaben in [Hz]).

Dünne Filme					
c [mg/L]	MIP [Hz]	NIP [Hz]	Imprint Faktor	MIP-NIP [Hz]	norm. Signal
0	0	0	0	0	0,00
10	39	32	1,2	7	0,01
20	82	56	1,5	26	0,02
50	148	48	3,1	100	0,09
100	230	62	3,7	169	0,14
200	344	108	3,2	236	0,20
500	550	138	4,0	412	0,35
1000	794	194	4,1	600	0,51
2000	1157	282	4,1	875	0,74
3200	1548	372	4,2	1175	1,00
Nanopartikel					
c [mg/L]	MIP [Hz]	NIP [Hz]	Imprint Faktor	MIP-NIP [Hz]	norm. Signal
0	0	0	0	0	0,00
320	265	160	1,7	105	0,15
1600	670	430	1,6	240	0,34
3200	1330	630	2,1	700	1,00

Core-Shell Nanopartikel					
c [mg/L]	MIP [Hz]	NIP [Hz]	Imprint Faktor	MIP-NIP [Hz]	norm. Signal
0	0	0	0	0	0
160	52	22	2,4	30	0,17
1600	178	50	3,6	128	0,71
3200	258	78	3,3	180	1,00

Anhand der Differenz zwischen MIP und NIP lässt sich nun vergleichsweise einfach darstellen, dass der Imprint bei den dünnen Filmen am effektivsten funktioniert (Imprint Faktor = MIP/NIP). Ein Imprint-Faktor von Unendlich würde bedeuten, dass das jeweilige NIP Material keinerlei Signal liefert. Faktor Zwei würden eine exakt doppelt so starke Einlagerung in das MIP gegenüber jener in den NIP bedeuten, „Eins“ keinerlei Unterschied zwischen den MIP und NIP. Vor allem bei höheren Konzentrationen (ab 50 mg/L) ist der Effekt bei den dünnen Filmen sehr stark. Der Sensoreffekt ist hierbei durch die molekulare Prägung um das drei- bis vierfache gegenüber dem ungeprägten Polymer verstärkt. Der geringe Unterschied bei kleinen Melaminkonzentrationen lässt sich dadurch erklären, dass sich die vergleichsweise geringen Mengen an Melamin bereits unspezifisch an der Oberfläche des jeweiligen Polymers anlagern, welche zwischen MIP und NIP keine wesentlichen Unterschiede aufweisen. Die eigentlichen Kavitäten werden also erst ab einer bestimmten Konzentration mit Analyt gefüllt (mittels QCM spätestens ab 20 mg/L erkennbar). Schichten aus Core-Shell Nanopartikeln schneiden etwas besser ab (Faktor 2,4 bis 3,6), aus reinem Polymer gebildete Nanopartikel fallen hingegen im Vergleich dazu ab (Faktor 1,6 bis 2,1). Zur besseren Veranschaulichung sind die Imprint-Faktoren in für die drei verschiedenen Materialien bei einer Konzentration von jeweils 3200 mg/L Melamin in Wasser dargestellt (Abbildung 97).

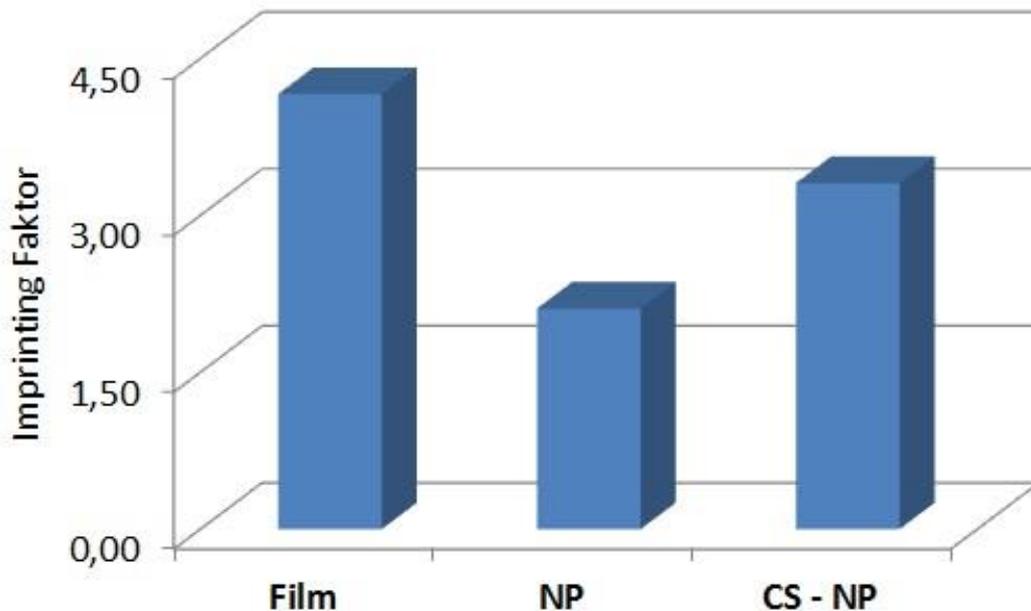


Abbildung 97: Imprinting Faktoren im direkten Vergleich (jeweils bei 3200 mg/L Melamin). Der geringste Effekt ist bei den Nanopartikeln erkennbar, der größte und damit effektivste Imprint lässt sich durch einen durchgehenden Polymerfilm erzielen.

Grundsätzlich muss festgestellt werden, dass sich der dynamische Messbereich aller MIP-Varianten bis hin zur maximal erreichbaren Konzentration von 3200 mg/L Melamin erstreckt. Die Nachweisgrenze liegt bei Polymerfilmen bei ca. 1 mg/L, bei Schichten aus Core-Shell Nanopartikeln konnten problemlos 16 mg/L nachgewiesen werden, wobei jeweils kein Unterschied zwischen MIP und NIP bestand. Diese Nachweisgrenzen sind nur für QCM gültig und sollten, aufgrund nur rudimentärer Optimierung des Sensorsystems, lediglich als grober Richtwert dienen. Eine Detektion mittels QCM von Konzentrationen unter 1 mg/L Melamin in Wasser sollte bei geeigneter Ausstattung (gegebenenfalls QCM mit höherer Frequenz) bei keinem der Materialien ein Problem darstellen.

5.1.2 QCM-Querselektivität

Die Querselektivitätsmessungen liefern ein sehr aussagekräftiges Bild über die Qualität der unterschiedlichen Materialien. Um die einzelnen Messungen vergleichen zu können, werden alle Signale auf den Wert für das Melamin normiert und dieser auf den Wert 1 festgelegt (Tabelle 12). Die Werte der NIP-Materialien beziehen sich ebenfalls auf das Melaminsignal des jeweiligen geprägten Polymers, da auf diese

Weise ein Vergleich zwischen MIP und NIP ermöglicht wird. Details zu den jeweiligen Messvorgängen und verwendeten Konzentrationen finden sich in den Kapiteln 4.2.1.1, 4.3.1.2 und 4.5.1.2.

Tabelle 12: Normierte Signalwerte der Querselektivitätsmessungen ($[Hz]_{Analyt} / [Hz]_{Melamin}$).

	100 nm Film			CS			NP		
	MIP	NIP	MIP-NIP	MIP	NIP	MIP-NIP	MIP	NIP	MIP-NIP
Aniline	0,24	0,02	0,60	0,41	0,23	0,29	0,80	0,40	0,57
Glucose	0,16	0,16	0,00	0,28	0,23	0,08	0,10	0,05	0,07
Pyridine	0,29	0,00	0,30	0,48	0,45	0,04	1,00	0,80	0,29
Melamine	1,00	0,03	1,00	1,00	0,36	1,00	1,00	0,30	1,00

Liefert nun ein weiterer Analyt eine mit Melamin idente Signalstärke, ergibt sich ebenfalls ein Wert von 1. Bei größtmöglicher Selektivität erhält man kein Signal und der Wert geht gegen 0. Das Diagramm in Abbildung 98 zeigt sowohl die Werte der Mess- und Referenzelektrode als auch deren Differenz.

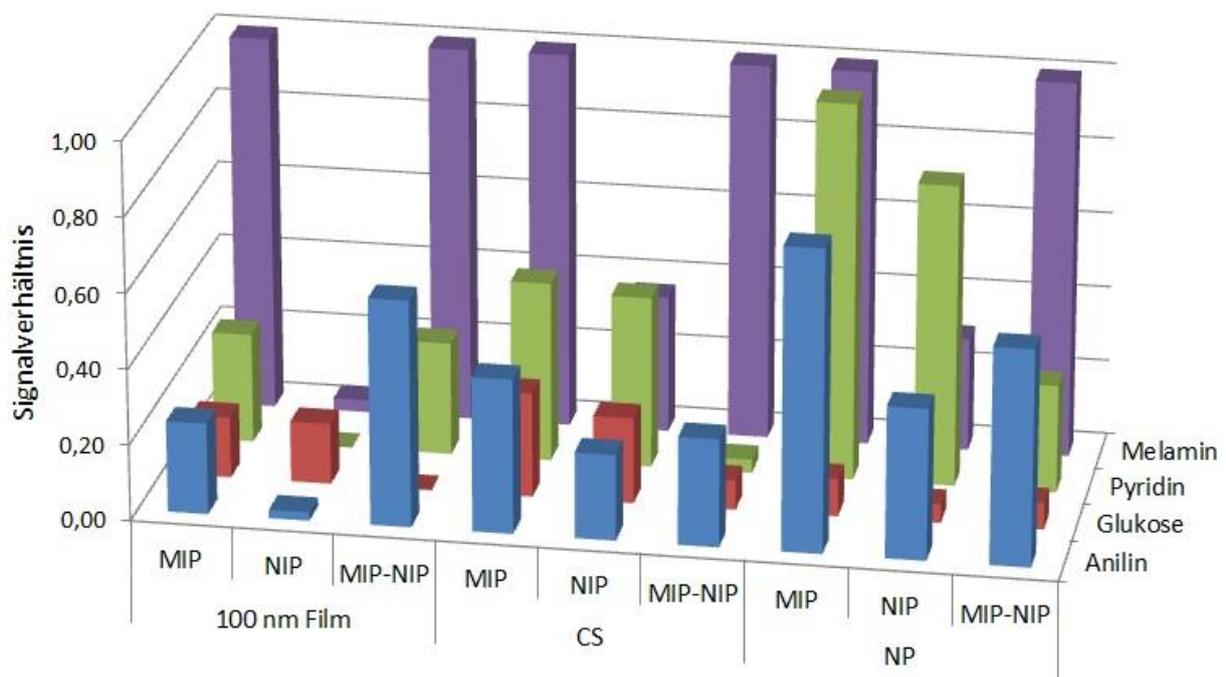


Abbildung 98: Überblick über die QCM – Querselektivitätsmessungen für Pyridin, Glukose und Anilin mit den unterschiedlichen Materialien (dünner Film, Core – Shell Nanopartikel und Nanopartikel).

Grundsätzlich liefern die dünnen Filme die besten Selektivitätswerte. Dieses Ergebnis ist angesichts der Tatsache, dass selbige auch im vorhergehenden Kapitel

die besten Ergebnisse bezüglich des Imprints lieferten (Vergleich MIP/NIP), wenig überraschend. Jeder der drei mit allen Varianten getesteten Analyte gibt nun Information über die unterschiedlichen Beschichtungsmaterialien.

Anilin ist dem Melamin sowohl in Form als auch Größe ähnlich. Alle sensitiven Materialien zeigen ein ähnliches Bild, wenn das MIP mit dem jeweiligen NIP verglichen wird: Das Signal ist bei geprägtem Polymer etwas stärker, bleibt jedoch stets schwächer als bei Melamin. Dies ist ein sicheres Zeichen dafür, dass sich Anilin in die Melamin-Kavitäten einlagert. Aufgrund der geringeren Anzahl an NH_2 -Gruppen und der damit verbundenen schwächeren Wechselwirkungen mit den Säuregruppen des Polymers tut es dies jedoch in geringerem Ausmaß.

Bei Glukose, welche als Beispiel für in Lebensmittel vorkommende Zucker gewählt wurde, zeigt sich ein weitgehend ähnliches Bild bei allen Schichten. Ist der Analyt, wie in diesem Fall, zu groß um in die Kavitäten zu passen, so lagert er sich lediglich an der Oberfläche an. Dies führt theoretisch zu einem gleich großen Signal bei Mess- und Referenzelektrode. Geringe Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass Oberflächen bei geprägten Polymeren in der Regel etwas rauer sein können, als bei ungeprägten und dadurch bessere Anlagerungsmöglichkeiten bieten. Für die Kombination mit optischen Detektionsmethoden ist jedoch vor allem jene Erkenntnis wichtig, dass größere Moleküle nicht, oder nur in sehr geringem Ausmaß in die Kavitäten des Imprints, oder in die Zwischenräume der vergleichsweise porösen Nanopartikelschichten gelangen.

Pyridin besitzt etwas geringere Ausmaße im Vergleich zu Melamin oder Anilin. Durch diese Eigenschaft passt es besser in die Hohlräume der Polymerschichten. Dies fällt insbesondere bei den NP auf, wo die Signalstärke als einzige aller Querselektivitätsversuche jene von Melamin erreicht. Beim NIP wird diese sogar überschritten, weshalb auf vergleichsweise feine Poren und Kanäle in den Polymerschichten geschlossen werden kann. Das vergleichsweise geringe Signal bei den dünnen Filmen ist ein weiteres Indiz dafür, dass Pyridin nicht nur in die Kavitäten der NP-Layer eindringt. Beim NIP-Film fehlt aufgrund nicht vorhandener Kavitäten und äußerst geringer unspezifischer Poren und Kanälen jegliches Signal.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dünne Filme die besten Ergebnisse liefern. Durch die geringe unspezifische Porosität gelangen kaum Analyte in das NIP und verglichen mit den beiden Arten von Nanopartikeln auch weit weniger in den MIP. Die bessere Selektivität der Core-Shell Partikel dürfte darin begründet sein, dass diese eine etwas geringere Größe besitzen und daher eine weniger poröse Schicht bilden als die reinen Polymernanopartikel. Weiters ist es denkbar, dass der TiO_2 Kern zu einer geringeren Schrumpfung bzw. Quellung bei Ab- bzw. Aufnahme von Wasser führt und die Schicht somit weniger gestört wird. Die genaue Größe der Partikel in wässriger Suspension ist jedoch unbekannt, weshalb durchaus andere Ursachen möglich erscheinen. Denkbar wäre hier ein unterschiedlicher Imprinting-Effekt oder Polymeraufbau durch die völlig unterschiedlichen Syntheseschritte. Fest steht, dass für Melamin geprägte sensitive Schichten aus Nanopartikeln in Kombination mit der Quarzmikrowaage signifikante Selektivitätsnachteile gegenüber den dünnen Polymerfilmen aufweisen.

5.2 SERS Ergebnisse im Vergleich

Beim Vergleich der dünnen Filme mit den MIP Nanopartikelschichten ergaben sich wesentliche Unterschiede. Zwar konnte mittels NP Melamin in rein wässriger Lösung festgestellt werden, jedoch nicht in Milch. Die wahrscheinlichste Ursache ist die Verunreinigung der Oberfläche mit Milchbestandteilen, wodurch eine SERS Messung grundsätzlich erschwert wird. Bei den dünnen Filmen, welche über eine wesentlich glattere Oberflächenstruktur verfügen (siehe Abbildung 99), trat dieses Problem nur in geringerem Maße auf: Zwar wurde auch hier das Signal geschwächt, jedoch ist weiterhin zumindest eine qualitative Bestimmung von Melamin möglich. Hinzu kommt die Tatsache, dass die Schichten aus Nanopartikeln nicht so stabil sind wie jene aus einem durchgehenden Polymerfilm. Das bedeutet, dass immer wieder mehr oder weniger große Teile aus der Schicht gerissen werden und der Sensor auf diese Art und Weise an Signalstärke verlieren kann. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Nanopartikelschichten im Gegensatz zu den dünnen Filmen nicht optisch klar erscheinen, also Licht streuen.

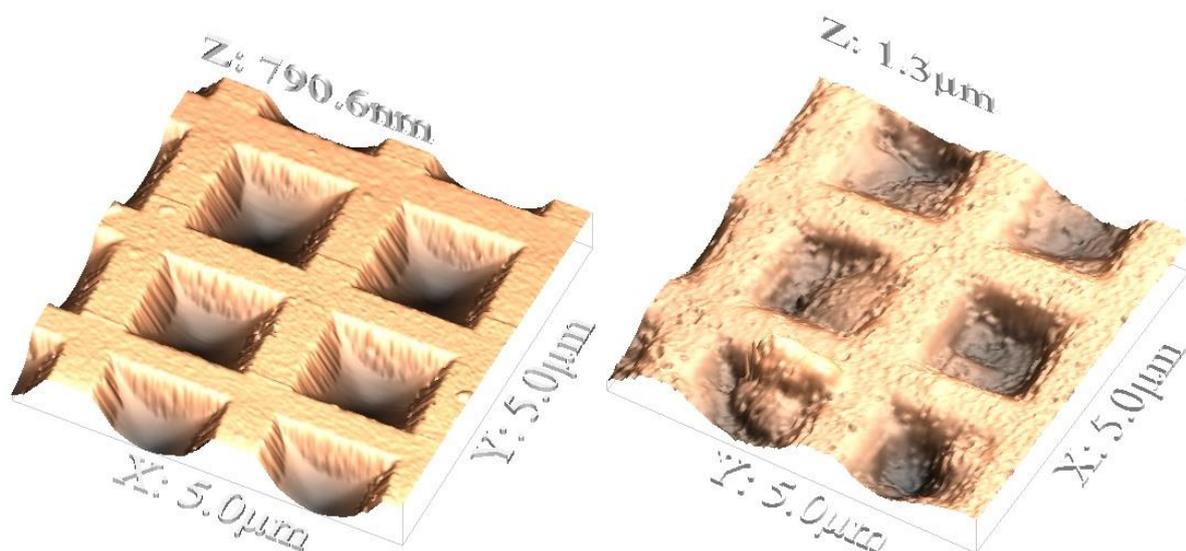


Abbildung 99: Vergleich einer MIP-Schicht und einer Beschichtung mit Nanopartikeln auf Klarite® Substraten. Ungleich regelmäßiger Oberfläche mit dem dünnen Film (Contact Mode Aufnahme links). Agglomerationen, raue Oberfläche und in unterschiedlichem Ausmaß befüllte Kavitäten bei der NP-Beschichtung (Aufnahme im Tapping Mode, rechts).

Interessant ist der Vergleich mit den ebenfalls für „PHOTOSENS“ entwickelten MIP Filmen und Partikeln für die Detektion von Ibuprofen von Frau Mag. Judith Wackerlig. Hier erhält man wesentlich stärkere Analytsignale durch die molekular geprägten Nanopartikel. Dieser Effekt dürfte auf die grundsätzlich unterschiedlichen Polymere zurückzuführen sein. Während das Acrylatsystem zur Detektion von Melamin die Eigenschaft besitzt sehr viel Wasser aufzunehmen und dadurch der Analyt tief in das Polymer eindringen und in Folge dessen die Metalloberfläche des SERS-Substrates erreichen kann, ist dies beim entwickelten Ibuprofen-MIP nicht möglich. Dieses besteht aus den weitgehend wasserunlöslichen Monomeren 4-Vinylpyridin und Divinylbenzol. Die Vermutung liegt nahe, dass die höhere Porosität einer aus Nanopartikeln bestehenden Schicht hier von Vorteil ist, wobei noch unklar ist, ob dies ebenfalls zu Nachteilen in realen Probengemischen führt.

Aus rein analytischer Sicht kann daher für die Detektion von Melamin nur die Verwendung der dünnen Filme empfohlen werden. Dies relativiert sich jedoch möglicherweise dadurch, dass ein Beschichtungsprozess im technischen Maßstab mit vollständig auspolymerisierten Partikeln leichter zu bewerkstelligen ist. In diesem Fall wären jedenfalls weitere Forschungen bezüglich der Verbesserung dieser MIP Nanopartikel vorzunehmen.

Eine Verbesserungsmöglichkeit aller molekular geprägter Beschichtungsvarianten besteht darin, als Templat ein dem Melamin ähnliches Molekül zu verwenden, wodurch die Schichten kein Melaminsignal im SERS aufweisen würden, wenn dieses nicht von außen eindringt (mögliche Templatmoleküle siehe Abbildung 100). Der erwünschte Imprinting-Effekt bliebe weitestgehend erhalten.

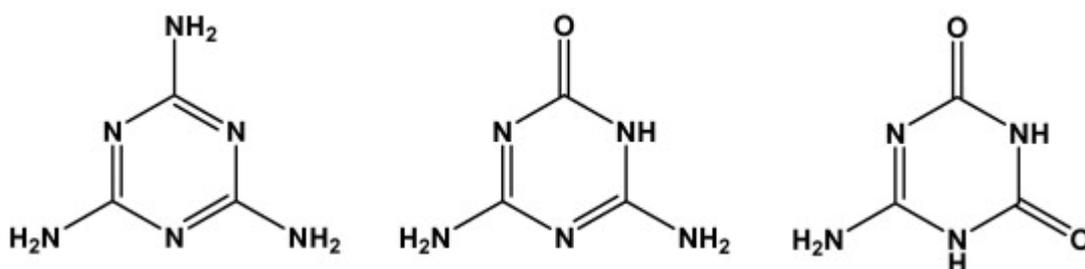


Abbildung 100: Ammelin (mitte) und Ammelid (rechts) als alternative Templatmoleküle zu Melamin (links). Möglich wären auch Triazine, wobei stets überprüft werden muss, ob sich die Schwingungsbanden von jenen des Melamins mittels SERS unterscheiden lassen.

Bei den teilweise hohen Konzentrationen an Melamin in Milch muss zusätzlich bedacht werden, dass zukünftige SERS-Substrate eine wesentlich gesteigerte Sensitivität aufweisen. Eine weitere Alternative stellen SERS aktive Metallnanopartikel aus Gold oder Silber dar, welche direkt im MIP verteilt werden können. Diese Kombination ergibt sehr große Kontaktflächen zwischen Polymer und Metalloberfläche, welche sich positiv auf die Signalverstärkung auswirken müssten. Ein Nachteil ist, dass auch Moleküle an der Oberfläche der MIP-Schicht einen SERS Effekt erhalten und nicht nur jene, welche tiefer in das Polymer eindringen. Allerdings wäre die Herstellung dieser Kombination wäre vermutlich preiswerter als jene mit festen Substraten. Natürlich ist auch eine Verbesserung auf dem Gebiet der Raman-Spektrometrie zu erwarten, wobei angenommen werden muss, dass dies nicht in der Geschwindigkeit geschieht, wie die Entwicklungen bei SERS aktiven Materialien. Das verwendete Mesophotonics SE1000 entspricht laut Renishaw Diagnostics in etwa der Sensitivität moderner transportabler Handgeräte. In Verbindung mit verbesserten Substraten sollte dies die Detektion von Melamin in Milch und ähnlichen flüssigen Proben mit den entwickelten molekular geprägten dünnen Filmen möglich werden lassen.

Jedenfalls ist der Grundstein für diese neue Detektionsmethode anhand der Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation und des Projektes „PHOTOSENS“ gelegt.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsch

Im Zuge der Dissertation konnten molekular geprägte Materialien zum Nachweis von Melamin mittels unterschiedlicher Detektionsmethoden im Rahmen des EU-Projektes „PHOTOSENS“ erfolgreich kombiniert werden. Aufgrund der speziellen Anforderungen durch Strukturen im Submikrometerbereich wurden zusätzlich funktionalisierte Polymernanopartikel sowie neuartige Core-Shell Nanopartikel mit einem Durchmesser von jeweils ca. 50 nm entwickelt, deren Charakterisierung mittels QCM, AFM, TEM und ATR-IR stattfand. Neben einigen Experimenten mittels SPR-Spektroskopie, welche die grundsätzliche Eignung der molekular geprägten Polymere mit dem Sensorprinzip der photonischen Kristalle zeigen sollen, gelang es die funktionalisierten Materialien erfolgreich mit dem Messprinzip der oberflächenverstärkten Ramanspektroskopie zu verbinden. Die Kombination molekular geprägter Nanopartikel mit SERS stellt ebenfalls eine Neuheit dar, doch erreichten Versuche mit dünnen Filmen bei sonst gleichen Bedingungen ein bis zu viermal höheres Signal.

Die Charakterisierung der MIP-SERS Kombination zeigt erhebliche Vorteile gegenüber QCM, wobei beide Methoden in wässrigen Melaminlösungen ohne weitere Optimierung Nachweisgrenzen unter 3 mg/L garantieren. Die praktische Überlegenheit von SERS tritt bei der Untersuchung realer Probenmatrices zu Tage, wobei es erstmals gelang Melamin in Milch ohne jegliche vorhergehende Probenvorbereitung nachzuweisen. Eine derart schnelle, preisgünstige und zugleich unkomplizierte Messung ist selbst mit den leistungsfähigsten Methoden der heutigen Analytik nicht möglich.

Die Detektion von Melamin in Lebensmitteln stellt jedoch nur einen von unzähligen Einsatzbereichen dar, in welchen MIP-SERS Kombinationen eingesetzt werden können. Die vorliegende Arbeit eröffnet daher völlig neue Möglichkeiten für unzählige praktische Anwendungen der Analytischen Chemie.

6.2 English

This work combines molecularly imprinted materials for detecting melamine with different detection principles within the framework of the European Union FP7 project “PHOTOSENS”. The overall project aims at optical sensors with structures at the submicrometer-scale. This results in special requirements making it necessary to also develop functionalized polymer nanoparticles as well as novel core-shell nanoparticles. Those had approximately 50 nm in diameter and were developed and characterized by QCM, AFM, TEM and ATR-IR. In addition to experiments using SPR-spectroscopy, this thesis also shows the ability to combine molecularly imprinted polymers with the sensor principle of photonic crystals. It could be shown that the functionalized materials can be combined with surface-enhanced Raman spectroscopy. Although the combination between MIP-NP and SERS already in itself is highly novel, it can even be said that the signal was up to four times higher when using a thin film coating under equal conditions.

During characterization the MIP-SERS combination showed remarkable advantages over QCM. Despite the fact that a limit of detection of below 3 mg/L is reached with both methods, SERS shows superior results when used in real-life samples. For the first time it is possible to analyze melamine directly in milk without any need for sample preparation. Such fast, uncomplicated and inexpensive detection is not even possible by using the highest performing methods of modern analytics.

The detection of melamine can be considered as proof of concept. The MIP-SERS combination could be used for every Raman active analyte which is accessible by molecular imprinting. The intention of this work is to introduce this new method for a multitude of applications in analytical chemistry.

7 Anhang

7.1 Geräteverzeichnis

Analysenwaage: BP210s ($\pm 0,1$ mg) (Sartorius)

ATR Zelle: Standard Golden Gate Single Reflection Diamond ATR (Specac)

Fluoreszenz-Lichtmikroskop Eclipse LV100 (Nikon)

Frequenzzähler: Universal Counter Agilent 53131A (Agilent Technologies)

FTIR Spektrometer: Spectrum 100 (Perkin Elmer)

Mikrozentrifuge: Centrifuge 5424 (Eppendorf)

Muffelofen: Thermicon P (Heraeus)

Netzwerkanalysator: E5062A ENA Serie Network Analyzer (Agilent Technologies)

Portables Ramanspektrometer: Mesophotonics SE1000

Ramanspektrometer: Thermo Nicolet Almega XR

Rasterkraftmikroskop: Nanoscope IIIa (Digital Instrument; Veeco Metrology Group)

Schlauchpumpe: MCP Process IP-65 (Ismatec)

Surface Plasmon Resonance: Texas Instruments SPR3 (mit Spreeta SPR Biosensor)

Transmissionselektronenmikroskop: Zeiss NVision 40 FIB System

Ultraschallbad: Elmasonic S120 (Elma)

Zentrifuge: Centrifuge 5702 (Eppendorf)

7.2 Chemikalienverzeichnis

Aceton: Merck; zur Analyse; CAS Nummer: 67-64-1

Acetonitril: Merck; zur Analyse; CAS Nummer: 75-05-8

Albumin aus Rinderserum: Sigma Aldrich; $\geq 96\%$; CAS Number 9048-46-8

Anilin: Merck; zur Synthese; CAS Nummer: 62-53-3

Caprinsäure: Merck; zur Synthese; CAS Nummer: 334-48-5

D(+)-Glukose-Monohydrat; Merck, für die Mikrobiologie; CAS Number 14431-43-7

Ethanol 95-97%: VWR; Ph. Eur.; CAS Nummer: 64-17-5

Kasein aus Rindermilch: Alfa Aesar; technisch; CAS Nummer: 9000-71-9

Melamin: Alfa Aesar; 99%; CAS Nummer: 108-78-1

Mesitylen: Merck; zur Synthese; CAS Nummer: 108-67-8

Methacrylsäure: Merck; $\geq 99\%$; CAS Nummer: 79-41-4

N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)bisacrylamid: Alfa Aesar; 97%; CAS Nummer: 868-63-3

Natriumperoxodisulfat: Merck; 98%; CAS Nummer: 7775-27-1

Phenol: Merck, zur Analyse, Ph. Eur.; CAS Nummer: 108-95-2

Pyridin: Sigma Aldrich; 99,8%; CAS Nummer: 110-86-1

Salzsäure 37%: Merck; Ph. Eur.; CAS Nummer: 7647-01-0

Tetrachlorkohlenstoff: Merck; zur Analyse CAS Nummer: 56-23-5

Titandioxid nanopowder (<21nm): Sigma Aldrich; $\geq 99,5\%$; CAS Nummer: 13463-67-7

Toluol: Merck; zur Analyse; CAS Nummer: 108-88-3

Vinyltrichlorsilan: Alfa Aesar; CAS Nummer: 75-94-5

AZOCOL® POLY-PLUS S (violett): Kissel & Wolf (für QCM-Siebdruckschablonen)

Goldglanzpaste 2093: W.C. Heraeus; 12 % Gold (für die QCM-Elektroden)

Sylgard 184 Silicone Elastomer KIT: Dow Corning (Silikon für die QCM-Messzelle)

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AFM:	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
ATR-IR:	Abgeschwächte Totalreflexion Infrarotspektroskopie (attenuated total reflection infrared spectroscopy)
CS-NP:	„Kern-Hülle“ Nanopartikel (Core-Shell Nanoparticles)
DHEBA:	N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)bisacrylamid
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
LM:	Lösungsmittel
MAA:	Methacrylsäure (methacrylic acid)
MIP:	Molekular geprägtes Polymer (molecularly imprinted polymer)
NIP:	Ungeprägtes Polymer (non imprinted polymer)
NIR:	Nahinfrarotstrahlung (near-infrared radiation)
PC:	Photonische Kristalle (Photonic Crystal)
PODS:	Natriumpersulfat (Sodiumperoxodisulfate)
QCM:	Quarzmikrowaage (quartz crystal microbalance)
SEM:	Rasterelektronenmikroskop (scanning electron microscope)
SPE:	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SPME:	Festphasenmikroextraktion (solid phase microextraction)
TEM:	Transmissionselektronenmikroskop (transmission electron microscope)
UHPLC:	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV:	Ultraviolettstrahlung (ultraviolet radiation)

7.4 Literaturverzeichnis

- ¹ McCluskey, A., C. I. Holdsworth, et al. (2007). "Molecularly imprinted polymers (MIPs): sensing, an explosive new opportunity?" Organic & Biomolecular Chemistry **5**(20): 3233-3244.
- ² Sauerbrey, G. (1959). "Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten Und Zur Mikrowagung." Zeitschrift Fur Physik **155**(2): 206-222.
- ³ 3T GmbH & Co. KG: <http://www.3t-analytik.de/de> (21.08.2013).
- ⁴ Issaq, H. J. (2002). A century of separation science. New York, Marcel Dekker.
- ⁵ Schoder, D. (2010). "Melamine Milk Powder and Infant Formula Sold in East Africa." Journal of Food Protection **73**(9): 1709-1714.
- ⁶ Zeilinger, M. (2011). „Molekular geprägte Sensorschichten als Instrument zur low – cost - Sensorik von Verfälschungen durch Melamin“ Diplomarbeit, Universität Wien: 11-14.
- ⁷ VTT. "Large-area Nano-photonic Chemical Sensors": <http://www.photosens.eu> (15.07.2013).
- ⁸ European Commission - Community Research and Development Information Service: http://cordis.europa.eu/fp7/home_en.html (15.07.2013).
- ⁹ Alexander, C., H. S. Andersson, et al. (2006). "Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003." Journal of Molecular Recognition **19**(2): 106-180.
- ¹⁰ Erlenmeyer, H. (1965). "Silica gel filter for removing nicotine from tobacco smoke" Patent DE 1965-M64131.
- ¹¹ Schäfer, M.. "Molecular Imprinting" (11.07.2007).
- ¹² Lorenzo, R. A., A. M. Carro, et al. (2011). "To Remove or Not to Remove? The Challenge of Extracting the Template to Make the Cavities Available in Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)." International Journal of Molecular Sciences **12**(7): 4327-4347.

- ¹³ Komiyama, M., Takeuchi, et al. (2003). "Molecular imprinting : from fundamentals to applications" John Wiley & Sons, Ltd..
- ¹⁴ Borries, B., Ruska, E. (1938). „Das Übermikroskop als Fortsetzung des Lichtmikroskops“ Verhandlungen d. Ges. dt. Naturforscher und Ärzte, 95. Versammlung zu Stuttgart vom 18.-21.9.1938. S. 72–77.
- ¹⁵ Rudenberg, H. G. and P. G. Rudenberg (2010). "Origin and Background of the Invention of the Electron Microscope: Commentary and Expanded Notes on Memoir of Reinhold Rudenberg." Advances in Imaging and Electron Physics, Vol 160 **160**: 207-286.
- ¹⁶ Ruska, E. (1980). The early development of electron lenses and electron microscopy. Stuttgart, Hirzel.
- ¹⁷ Rudenberg, R. (1931). "Configuration for the enlarged imaging of objects by electron beams" Patent DE 906737.
- ¹⁸ Binnig, G. and H. Rohrer (1986). "Scanning Tunneling Microscopy." Ibm Journal of Research and Development **30**(4): 355-369.
- ¹⁹ Tersoff, J. and D. R. Hamann (1985). "Theory of the Scanning Tunneling Microscope." Physical Review B **31**(2): 805-813.
- ²⁰ Binnig, G., C. F. Quate, et al. (1986). "Atomic Force Microscope." Physical Review Letters **56**(9): 930-933.
- ²¹ Hartmann, U. (1988). "Magnetic Force Microscopy - Some Remarks from the Micromagnetic Point of View." Journal of Applied Physics **64**(3): 1561-1564.
- ²² Betzig, E., J. K. Trautman, et al. (1991). "Breaking the Diffraction Barrier - Optical Microscopy on a Nanometric Scale." Science **251**(5000): 1468-1470.
- ²³ Erni, R., M. D. Rossell, et al. (2009). "Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe." Physical Review Letters **102**(9).
- ²⁴ Falk, U. (2006); "Basic TEM ray diagram" OO/The Gimp.
- ²⁵ Binnig, G., C. F. Quate, et al. (1986). "Atomic Force Microscope." Physical Review Letters **56**(9): 930-933.

- ²⁶ Sun, Z. X., M. P. Boneschanscher, et al. (2011). "Quantitative Atomic Force Microscopy with Carbon Monoxide Terminated Tips." Physical Review Letters **106**(4).
- ²⁷ Gross, L., F. Mohn, et al. (2012). "Bond-Order Discrimination by Atomic Force Microscopy." Science **337**(6100): 1326-1329.
- ²⁸ Eibl, R. H. and V. T. Moy (2005). "Atomic force microscopy measurements of protein-ligand interactions on living cells." Methods Mol Biol **305**: 439-450.
- ²⁹ Roduit C. (2010). "AFM figures": www.freesbi.ch (17.07.2013).
- ³⁰ Foto: SecretDisc (2008) "AFM (used) cantilever in Scanning Electron Microscope"
- ³¹ IBM (2012). "IBM Scientists First to Distinguish Individual Molecular Bonds": <http://www-03.ibm.com/press/us/en/pressrelease/38856.wss> (17.07.2013).
- ³² King, W. H. (1964). "Piezoelectric Sorption Detector." Analytical Chemistry **36**(9): 1735-&.
- ³³ Fozza, A. C., J. Roch, et al. (1997). "Oxidation and ablation of polymers by vacuum UV radiation from low pressure plasmas." Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms **131**(1-4): 205-210.
- ³⁴ Lieberzeit, P. A. and F. L. Dickert (2007). "Sensor technology and its application in environmental analysis." Anal Bioanal Chem **387**(1): 237-247.
- ³⁵ Hauptmann, P. (1995) "Sensoren- Stand und Entwicklungstrends" Tagungsband Sensoren-Aktoren-Buskommunikation 23./24.04.1995, 5 - 14.
- ³⁶ Jacobi M. (2006) „Pierre Curie - ein Leben für die Forschung“ Physik in unserer Zeit **37**(3), 116-121.
- ³⁷ Sauerbrey, G. (1959). "Verwendung Von Schwingquarzen Zur Wagung Dunner Schichten Und Zur Mikrowagung." Zeitschrift Fur Physik **155**(2): 206-222.
- ³⁸ Matsuhisa, Y., J. R. Goldsmith, et al. (1978). "Mechanisms of Hydrothermal Crystallization of Quartz at 250-Degrees-C and 15 Kbar." Geochimica Et Cosmochimica Acta **42**(2): 173-&.
- ³⁹ Fritze, H. and H. L. Tuller (2001). "Langasite for high-temperature bulk acoustic wave applications." Applied Physics Letters **78**(7): 976-977.

- ⁴⁰ Elam, J. W. and M. J. Pellin (2005). "GaPO(4) sensors for gravimetric monitoring during atomic layer deposition at high temperatures." Analytical Chemistry **77**(11): 3531-3535.
- ⁴¹ Schirhagl, R., A. Seifner, et al. (2010). "Antibodies and Their Replicae in Microfluidic Sensor Systems-Labelfree Quality Assessment in Food Chemistry and Medicine." Sensor Letters **8**(3): 399-404.
- ⁴² Kanazawa, K. K. and J. G. Gordon (1985). "Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid." Analytical Chemistry **57**(8): 1770-1771.
- ⁴³ Glassford, A. P. M. (1978). "Response of a Quartz Crystal Microbalance to a Liquid Deposit." Journal of Vacuum Science & Technology **15**(6): 1836-1843.
- ⁴⁴ Dickert, F. L. and O. Hayden (2002). "Bioimprinting of polymers and sol-gel phases. Selective detection of yeasts with imprinted polymers." Analytical Chemistry **74**(6): 1302-1306.
- ⁴⁵ Joannopoulos, J. D., Johnson S. G., et al. (2008). "Photonic Crystals-Molding the Flow of Light" Princeton University Press
- ⁴⁶ Hepburn C.. "Vertical Cavity Surface Emitting Lasers (VCSELs)": <http://britneyspears.ac/physics/vcsels/vcsels.htm> (12.07.2013)
- ⁴⁷ Robinson S., Nakkeeran R. (2013). "Photonic Crystal Ring Resonator Based Optical Filters" Advances in Photonic Crystals
- ⁴⁸ Skibina, J. (2009) "Micro- and nanocapillary glass technology for optical biosensing" Biomedical Optics & Medical Imaging
- ⁴⁹ US Naval Research Laboratory. "Improved Photonic-crystal fiber fabrication": http://www.nrl.navy.mil/techtransfer/viewpdf_st.php?id=70 (22.07.2013)
- ⁵⁰ Foto: Cambridge University Enterprise
- ⁵¹ Foto: Didier Descouens, Morpho menelaus didius am 26 June 2011
- ⁵² Foto: CRPeters, An opal doublet from Andamooka South Australia
- ⁵³ Matin, T. R., Menon, P. S. (2009) "Photonic crystal micro- and nanostructures in iridescent butterfly wings" Nanotech Malaysia Conference 2009

- ⁵⁴ Otto, A. (1968). "Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by Method of Frustrated Total Reflection." Zeitschrift Fur Physik **216**(4): 398-&.
- ⁵⁵ Kretschm.E (1971). "Determination of Optical Constants of Metals by Excitation of Surface Plasmons." Zeitschrift Fur Physik **241**(4): 313-&.
- ⁵⁶ Sabban, S., H. T. Ye, et al. (2013). "Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity receptor Fc epsilon RI." Veterinary Immunology and Immunopathology **153**(1-2): 10-16.
- ⁵⁷ Jernström F. (2001). "Self-assembled monolayers of alkanethiols: A study of surface composition" Master's degree project, Uppsala University
- ⁵⁸ Homola, J., J. Dostalek, et al. (2002). "Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk." International Journal of Food Microbiology **75**(1-2): 61-69.
- ⁵⁹ Fleischm.M, P. J. Hendra, et al. (1974). "Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode." Chemical Physics Letters **26**(2): 163-166.
- ⁶⁰ Albrecht, M. G. and J. A. Creighton (1977). "Anomalous Intense Raman-Spectra of Pyridine at a Silver Electrode." Journal of the American Chemical Society **99**(15): 5215-5217.
- ⁶¹ Jeanmaire, D. L. and R. P. Vanduyne (1977). "Surface Raman Spectroelectrochemistry .1. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic-Amines Adsorbed on Anodized Silver Electrode." Journal of Electroanalytical Chemistry **84**(1): 1-20.
- ⁶² Smith, E. and G. Dent (2005). "Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach." Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach: 1-210.
- ⁶³ Moskovits, M. (2006). "Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief perspective." Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications **103**: 1-17.
- ⁶⁴ Sharma, B., R. R. Frontiera, et al. (2012). "SERS: Materials, applications, and the future." Materials Today **15**(1-2): 16-25.
- ⁶⁵ Lombardi, J. R., R. L. Birke, et al. (1986). "Charge-Transfer Theory of Surface Enhanced Raman-Spectroscopy - Herzberg-Teller Contributions." Journal of Chemical Physics **84**(8): 4174-4180.

- ⁶⁶ Campion, A. and P. Kambhampati (1998). "Surface-enhanced Raman scattering." Chem Soc Rev **27**(4): 241-250.
- ⁶⁷ Blackie, E. J., E. C. Le Ru, et al. (2009). "Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Nonresonant Molecules." Journal of the American Chemical Society **131**(40): 14466-14472.
- ⁶⁸ Oo, S. Z., M. D. B. Charlton, et al. (2012). "Optimization of SERS enhancement from nanostructured metallic substrate based on arrays of inverted rectangular pyramids and investigation of effect of lattice non-symmetry." Plasmonics in Biology and Medicine **9**: 8234.
- ⁶⁹ Sharma, B., R. R. Frontiera, et al. (2012). "SERS: Materials, applications, and the future." Materials Today **15**(1-2): 16-25.
- ⁷⁰ Zeilinger, M. (2011). "Molekular gepragte Sensorschichten als Instrument zur low – cost - Sensorik von Verfalschungen durch Melamin" Diplomarbeit, Universitat Wien: 25-67.
- ⁷¹ Elshabini, A. and F. D. Barlow (1998). Thin film technology handbook. New York, McGraw-Hill.
- ⁷² Hanaor, D. A. H., G. Triani, et al. (2011). "Morphology and photocatalytic activity of highly oriented mixed phase titanium dioxide thin films." Surface & Coatings Technology **205**(12): 3658-3664.
- ⁷³ Shevtsova, E., C. Hansson, et al. (2011). "Stable structural color patterns displayed on transparent insect wings." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 668-673.
- ⁷⁴ Kittner M. "F-35 Helmet Mounted Display System": <http://74fdc.wordpress.com/2012/03/16/f-35-helmet-mounted-display-system> (22.07.2013)
- ⁷⁵ Li, S., Y. Ge, et al. (2012). "Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications." Molecularly Imprinted Sensors: Overview and Applications: 1-370.
- ⁷⁶ Lombardi, J. R. and R. L. Birke (2008). "A unified approach to surface-enhanced Raman spectroscopy." Journal of Physical Chemistry C **112**(14): 5605-5617.
- ⁷⁷ Horcas, I., R. Fernandez, et al. (2007). "WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology." Review of Scientific Instruments **78**(1).
- ⁷⁸ Nanotec Electronica webpage: www.nanotec.es (22.07.2013)

- ⁷⁹ Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH. „Wissenschaftlicher Gerätebau“:
<http://www.knauer.net> (19.07.2013)
- ⁸⁰ Schirhagl, R., D. Podlipna, et al. (2010). "Comparing biomimetic and biological receptors for insulin sensing." Chemical Communications **46**(18): 3128-3130.
- ⁸¹ Pearce, S. J., M. D. B. Charlton, et al. (2012). "Integration of nanostructures and waveguide core for Surface Enhanced Raman Spectroscopy: A novel excitation method." Integrated Optics: Devices, Materials, and Technologies XVI **8264**.
- ⁸² Nakayama, N. and T. Hayashi (2007). "Preparation and characterization of TiO₂ and polymer nanocomposite films with high refractive index." Journal of Applied Polymer Science **105**(6): 3662-3672.
- ⁸³ McGinley M., Jarrett D., et al. (2011). "Optimising Core-Shell UHPLC Columns for Improving Protein and Peptide Separations" Chromatography Today November/Dezember 2011: 33-36.
- ⁸⁴ Loukanov, A. R., C. D. Dushkin, et al. (2004). "Photoluminescence depending on the ZnS shell thickness of CdS/ZnS core-shell semiconductor nanoparticles." Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects **245**(1-3): 9-14.
- ⁸⁵ Bundesministerium für Bildung und Forschung. „Gesundheitsrelevante Aspekte synthetischer Nanomaterialien“:
http://www.nanopartikel.info/files/content/dana/Dokumente/NanoCare/Publikationen/NanoCare_Broschuere.pdf
- ⁸⁶ Sussitz, H. (2011). "Mechanistische Studien zur Bakterienadsorption an strukturierten Polymeroberflächen mit AFM und QMB-Sensoren" Diplomarbeit, Universität Wien
- ⁸⁷ Aigner, S. (2011). "Mikrostrukturierte Interdigitalkondensatoren zur Typisierung und Charakterisierung von Erythrozyten mittels kapazitiver und resistiver Messprinzipien und massensensitiver Messungen" Dissertation, Universität Wien: S.67 ff
- ⁸⁸ Tam, F., Piotti, M. E., et al. (2012) "SERS Reporter Molecules and Methods" Patent, US 20120156491 A1
- ⁸⁹ Mesophotonics. "The SE1000 Spectrometer from Mesophotonics - Raman and SERS analysis in a versatile, single platform":
http://208.254.39.65/mntnetwork/e_article000748525.cfm?x=0,b11,w (3.8.2012)

- ⁹⁰ Alliance Analytical Solutions. "Product Listing – Thermo Nicolet Almega XR": <http://www.aaisolutions.com/products-lab-instrument-biotech-scientific-chromatography/product-details.cfm?RID=34940&RIDType=Item> (22.07.2013)
- ⁹¹ Mircescu, N. E., M. Oltean, et al. (2012). "FTIR, FT-Raman, SERS and DFT study on melamine." Vibrational Spectroscopy **62**: 165-171.
- ⁹² Hayden, O., R. Bindeus, et al. (2003). "Mass-sensitive detection of cells, viruses and enzymes with artificial receptors." Sensors and Actuators B-Chemical **91**(1-3): 316-319.
- ⁹³ Holger Knapp (2010). "Melamin in Lebens- und Futtermitteln.", Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
- ⁹⁴ Furusawa, N. and E. Tsumatani (2012). "'Green' HPLC with 100% Water Eluent for Analysing Melamine in Milk." Lc Gc Europe **25**(6): 292-+.
- ⁹⁵ Tian, Y. Q., L. M. Chen, et al. (2012). "Comparison of three methods for detection of melamine in compost and soil." Science of the Total Environment **417**: 255-262.
- ⁹⁶ Tang G., Du L., Su X. (2013). "Detection of melamine based on the fluorescence resonance energy transfer between CdTe QDs and Rhodamine B." Food Chemistry **141**(4): 4060-4065.
- ⁹⁷ Romer Labs (2008). "AgraQuant® Melamine Sensitive Assay. " Anleitung ©2008 Seite 2
- ⁹⁸ Zeilinger, M., Wackerlig, J., et al. (2013). "MIP/QCM sensors for low-cost sensing of melamine in food stuff" ANAKON 2013
- ⁹⁹ Lieberzeit, P. A., C. Schirk, et al. (2004). "From nanopatterning to functionality - surface and bulk imprinting for analytical purposes." Superlattices and Microstructures **36**(1-3): 133-142.
- ¹⁰⁰ Gintner M. (2012). "Protokoll zum Praktikum Oberflächenanalytik"; Universität Wien
- ¹⁰¹ Wagener W. (1981). "Stoffumsatz in technischen Systemen" Verlag Ferdinand KampS S.7.
- ¹⁰² Biswas, N., S. Kapoor, et al. (2007). "Adsorption of CGA on colloidal silver particles: DFT and SERS study." Chemical Physics Letters **444**(4-6): 338-345.

- ¹⁰³ Perry, D. A., H. J. Son, et al. (2010). "Adsorption analysis of nitrophenol isomers on silver nanostructures by surface-enhanced spectroscopy." Journal of Colloid and Interface Science **342**(2): 311-319.
- ¹⁰⁴ Corredor, C., T. Teslova, et al. (2009). "Raman and surface-enhanced Raman spectra of chrysin, apigenin and luteolin." Vibrational Spectroscopy **49**(2): 190-195.
- ¹⁰⁵ Jacob, J. A., S. Naumov, et al. (2011). "Preparation, characterization, surface modification and redox reactions of silver nanoparticles in the presence of tryptophan." Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **87**(2): 498-504.
- ¹⁰⁶ Chen, X., Y. J. Hu, et al. (2013). "Interaction of Melamine Molecules with Silver Nanoparticles Explored by Surface-Enhanced Raman Scattering and Density Functional Theory Calculations." Applied Spectroscopy **67**(5): 491-497.
- ¹⁰⁷ Oo, S. Z., M. D. B. Charlton, et al. (2012). "3D analysis of surface Plasmon dispersion for SERS sensor based on inverted pyramid nanostructures." Photonic and Phononic Properties of Engineered Nanostructures li **8269**.
- ¹⁰⁸ Oo, S. Z., M. D. B. Charlton, et al. (2012). "Optimization of SERS enhancement from nanostructured metallic substrate based on arrays of inverted rectangular pyramids and investigation of effect of lattice non-symmetry." Plasmonics in Biology and Medicine lx **8234**.

Weitere nicht konkret zitierte Angaben stammen aus diversen Lexika sowie Standardwerken der chemischen Literatur wie dem CRC Handbook of Chemistry and Physics. Die verwendeten Abbildungen, sofern keine Zitation vorliegend, sind allesamt „gemeinfrei“ da sie entweder nur Allgemeingut enthalten, die nötige Schöpfungshöhe nicht erreichen oder vom Autor explizit als solches gekennzeichnet wurden. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung aufgetreten sein, bitte ich um Meldung bei mir.

7.5 Lebenslauf

Name: Martin Zeilinger

Geburtsdatum: 22.05.1984

Geburtsort: St. Pölten

Staatsbürgerschaft: Österreich

Bildungsweg:

- 1990-1998 Öffentliche Volks- und Hauptschule, 3200 Ober-Grafendorf
- 1998-2004 HBLVA für chemische Industrie, 1170 Wien
(Diplomarbeit: „Schadstoffanalytik: Chlorphenole in Leder“ bei Herrn Prof. Dipl. Ing. Dr. Manfred Frenzl)
- 2005-2011 Diplomstudium Chemie an der Universität Wien
mit Auszeichnung abgeschlossen
(Diplomarbeitsthema: „Molekular geprägte Sensorschichten als Instrument zur low - cost - Sensorik von Verfälschungen durch Melamin“ bei Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit)
- seit 2011 Doktoratsstudium an der Universität Wien am Institut für Analytische Chemie bei Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Peter Lieberzeit

Beruflicher Werdegang:

- 2000-2008 Ferialpraktika (je 1-2 Monate) in folgenden chemischen Betrieben:
Baxter Bio Science, Constantia Teich, Austria Tabak,
WB Lederfabrik, Rembrandtin, Fernwärme Wien und Shell-Austria
- 2004-2005 Zivildienst beim Roten Kreuz als Einsatzfahrer und Sanitäter
- seit 2009 Lehraufträge der Universität Wien
- seit 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Analytische Chemie im Rahmen des EU-Projekts „PHOTOSENS“