

**Resonante Quarzsensoren -  
Analytik biopharmazeutisch relevanter Adhäsions- und  
Abbauprozesse**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Herrn Apotheker Andreas Hünerbein**  
geboren am 06. März 1979 in Naumburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h.c. Reinhard H. H. Neubert
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. Peter Hauptmann
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerd Bendas

Naumburg (Saale) im August 2010

Tag der Verteidigung: 31. Januar 2011

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>ii</b>
<b>Symbolverzeichnis .....</b>	<b>iii</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>4</b>
2.1 Physikalische Grundlagen der Quarzmikrobalance .....	4
2.2 Einflussfaktoren auf das Schwingungsverhalten des Sensors .....	9
2.3 Theoretische Modelle und Ersatzschaltbilder .....	12
2.4 Anwendungsmöglichkeiten der Quarzmikrobalance.....	14
2.4.1 Kolloidale Systeme.....	14
2.4.2 Untersuchungen an Biomolekülen.....	16
2.4.3 QCM-Biosensoren für Zellen und Viren .....	19
2.4.4 Polymere.....	20
2.4.5 Bestimmung von kinetischen Parametern .....	21
2.4.6 Elektrochemische Quarzmikrobalance .....	22
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
3.1 Das Experimentalsystem LiquiLab 21 .....	24
3.2 Funktionalisierung der Sensoroberfläche .....	29
3.2.1 Methoden der Funktionalisierung.....	29
3.2.2 Reinigung der Sensoroberfläche.....	31
3.3 Methoden zur Überprüfung der Sensorbeschichtung.....	32
3.3.1 Rasterkraftmikroskopie .....	32
3.3.2 Kontaktwinkelmessung .....	33
3.3.3 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie .....	34
3.3.4 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie.....	35
<b>4 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>37</b>
4.1 Einfluss des Tensidgehaltes von Liposomen auf das Adsorptionsverhalten an modifizierten Sensoroberflächen .....	37
4.1.1 Herstellung der Liposomen und Sensorbeschichtung.....	38
4.1.2 Adsorptionsuntersuchungen mittels QCM .....	39
4.1.3 Zusammenfassung .....	43

---

<b>4.2</b>	<b>Adsorption von Nanopartikeln an Heparinlayer.....</b>	<b>44</b>
4.2.1	Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel .....	45
4.2.2	Sensorbereitung und QCM-Experimente .....	47
4.2.3	Zusammenfassung .....	49
<b>4.3</b>	<b>Polyelektrolyt-Wechselschichten von Heparin und Chitosan .....</b>	<b>50</b>
4.3.1	Versuchsaufbau .....	50
4.3.2	Ergebnisse der QCM-Messungen .....	51
4.3.3	Zusammenfassung .....	54
<b>4.4</b>	<b>Nachweis der Wechselwirkung zwischen Concanavalin A und zuckergebundenen Liposomen durch QCM und MALDI-ToF-Imaging.....</b>	<b>55</b>
4.4.1	Vorbereitung und Durchführung der QCM-Experimente .....	56
4.4.2	Analyse auf dem Schwingquarz mit MALDI-ToF-Imaging .....	57
4.4.3	Zusammenfassung .....	61
<b>4.5</b>	<b>Enzymatischer Abbau von Polymerfilmen .....</b>	<b>62</b>
4.5.1	Bildung und Analyse des PLGA-Films auf dem Quarzsensor .....	63
4.5.2	Messung des Abbaus von PLGA-Filmen durch QCM .....	63
4.5.3	Zusammenfassung .....	65
<b>4.6</b>	<b>Peptischer und tryptischer Verdau von immobilisiertem <math>\beta</math>-Casein.....</b>	<b>66</b>
4.6.1	Immobilisierung des $\beta$ -Caseins .....	67
4.6.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Caseinschicht .....	68
4.6.3	Verdau von bovinem $\beta$ -Casein .....	70
4.6.4	Bestätigung des Verdaus durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie .....	73
4.6.5	Zusammenfassung .....	75
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Eigene Publikationen.....</b>	<b>89</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>93</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>95</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analysenmethode der Quarzmikrobalance (QCM) und ihrer Anwendung für Fragestellungen, die von biopharmazeutischem Interesse sind. Nach einer einleitenden Darstellung der wichtigsten theoretischen Grundlagen und einer Übersicht zu biowissenschaftlichen Anwendungen der QCM-Sensoren werden neben dem verwendeten Messsystem und einigen daran durchgeführten Modifikationen auch von der Quarzmikrobalance unabhängige Analyseverfahren vorgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Untersucht wurden zum einen Adhäsionsvorgänge von kolloidalen Strukturen wie Liposomen und Nanopartikeln an modifizierte Sensoroberflächen und der Schichtaufbau aus Polyelektrolyten. Zum anderen diente die Methode dazu, Abbauprozesse, wie den enzymatischen Abbau von Polymeren und Proteinen zu untersuchen. Die QCM erweist sich gerade in Kombination mit anderen Analyseverfahren als wertvolle Methode in der pharmazeutischen Analytik, um Adhäsions- und Abbauprozesse detailliert in Echtzeit untersuchen zu können.

## ABSTRACT

This thesis deals with the analytical method called quartz crystal microbalance (QCM) and its application within the scope of biopharmaceutical research. After an initiatory description of the theoretical fundamentals of QCM and an overview of its application in life sciences, the experimental setup and its modifications are illustrated. Analytical methods which are independent from QCM and which were applied are explained. Experiments were performed to analyse adhesion of colloidal structures like liposomes and nanoparticles on modified sensor surfaces and to monitor the multilayer assembling of polyelectrolytes. In contrast to adhesion processes enzymatic degradation of polymers and proteins were investigated. QCM is proved to be a valuable tool for real-time monitoring of adhesion and degradation procedures in pharmaceutical analytics.

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. <i>atomic force microscopy</i> )
BAW	akustische Volumenwelle (engl. <i>bulk acoustic wave</i> )
$\beta$ -CN	$\beta$ -Casein
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymzimtsäure (engl. <i><math>\alpha</math>-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> )
ConA	Concanavalin A
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EQCM	elektrochemische Quarzmikrobalance (engl. <i>electrochemical QCM</i> )
FIA	Fließinjektionsanalyse (engl. <i>flow injection analysis</i> )
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i> )
MHD	Mercaptohexadecan
MHDA	Mercaptohexadecansäure (engl. <i>mercaptohexadecanoic acid</i> )
MS	Massenspektrometrie
N-glut-PE	N-glutaryl-phosphatidylethanolamin
PBS	Phosphatpuffer (engl. <i>phosphat buffered saline</i> )
PCS	dynamische Lichtstreuung, Photonenkorrelationsspektroskopie (engl. <i>photon correlation spectroscopy</i> )
PLGA	Poly(D,L-Laktid-co-Glykolid)
PEI	Polyethylenimin
POPC	Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin
QCM	Quarzmikrobalance (engl. <i>quartz crystal microbalance</i> )
SAM	selbst angeordnete Monoschicht (engl. <i>self assembled monolayer</i> )
SAW	akustische Oberflächenwelle (engl. <i>surface acoustic wave</i> )
SPC	Sojaphosphatidylcholin
TFA	Trifluoressigsäure (engl. <i>trifluoroacetic acid</i> )
ToF	Flugzeit (engl. <i>time of flight</i> )
TSM	Dickenscherswingmodus (engl. <i>thickness shear mode</i> )

---

## SYMBOLVERZEICHNIS

$A$	Fläche (Elektrodenfläche)
$B$	Bandbreite einer Schwingung
$c$	Konzentration
$C$	Schichtwägempefindlichkeit
$d_q$	Schichtdicke des Quarzes
$e$	Piezomodul
$f$	Frequenz
$f_0$	Grundfrequenz
$f_{\text{damp}}$	dämpfungsproportionale Frequenz beim LiquiLab 21
$\Delta f$	Frequenzänderung
$\Delta f_{\text{damp}}$	Änderung der dämpfungsproportionalen Frequenz beim LiquiLab 21
$k_{\text{ass}}$	Assoziationskonstante
$k_{\text{diss}}$	Dissoziationskonstante
$K_D$	Gleichgewichtskonstante
$\lambda$	Wellenlänge
$L$	Induktivität
$m_M$	molekulare Masse
$m_q$	Masse des Quarzes
$\Delta m_q$	Masseänderung bei Sauerbrey
$m/z$	Verhältnis aus Masse und Ladung
$\varphi$	Massenbelegung (Änderung der Masse pro Fläche)
$P$	Polarisation
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
$R$	Widerstand
$\tau$	Abklingkonstante
$T$	mechanische Spannung
$t$	Zeit
$u_q$	Schallgeschwindigkeit in Quarz
$Z$	akustische Impedanz

# 1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die pharmazeutische Analytik beschränkt sich nicht mehr nur auf klassische Routineverfahren. Für die Beantwortung analytischer Fragestellungen in der Pharmazie wird zunehmend auch auf Methoden zurückgegriffen, die vor einigen Jahren nur von speziellen Forschungsrichtungen genutzt wurden. Das liegt zum einen an der Entwicklung der Forschungsinhalte, deren Bearbeitung immer leistungsfähigere Analytik erfordert, zum anderen auch an der Entwicklung der Analysenmethoden selbst. Viele Methoden sind heute so bequem anwendbar, dass keine besondere Spezialisierung für ihre Anwendung notwendig ist. Die viel größere Herausforderung ist die richtige Interpretation der gewonnenen Analyseergebnisse. Zur Bewältigung einer leicht zu generierenden und schwer überschaubaren Menge einzelner Messergebnisse können moderne Computersysteme und Methoden der Bioinformatik dienen. Die grundlegende Bewertung der Eignung einer Methode und die kritische Auswertung erhaltener Ergebnisse erfordern aber zunehmend Kenntnisse, die weit über klassisch pharmazeutische Themen hinausgehen. Hier hilft nur das Einarbeiten in die fundamentalen Grundlagen einer Analysentechnik und die konstruktive Zusammenarbeit mit Fachleuten aus Physik, Messtechnik und Informatik.

Zunehmend Bedeutung für die pharmazeutische Analytik gewinnen Analyseverfahren, die das zu untersuchende Objekt – z.B. ein Molekül, Vehikelsystem oder Mikroorganismus – in seinem natürlichen Umfeld bzw. in dem Umfeld seiner Verwendung analytisch beobachten lassen. Ziel dabei ist es, den Einfluss der Methode auf die Untersuchung so gering wie möglich zu halten. Da die genannten Untersuchungsobjekte somit nicht isoliert sind, sondern ständig mit ihrer Umgebung wechselwirken, ist die Untersuchung dieser Wechselwirkung eine hochinteressante und für das Verständnis komplexer Vorgänge unerlässliche Aufgabe.

Einen wichtigen Beitrag dazu können Sensoren leisten, deren grundlegende Eigenschaft es ist, analoge Signale einer Messgröße in ein elektrisches Ausgangssignal zu wandeln, das

sich anschließend zum Beispiel digital verarbeiten lässt. Bei Sensoren für den Einsatz in biologischen Systemen (sog. Biosensoren) bedarf es für diese Umwandlung geeigneter Erkennungsstrukturen, die eng mit einem Signalwandler (Transducer) gekoppelt sind, der ein physikochemisches Signal in leicht auswertbare elektrische Messwerte umwandelt. Sensoren spielen in den verschiedensten Forschungsrichtungen eine zunehmende Rolle. Die biologische, chemische und physikalische Forschung, aber auch Materialwissenschaften und bestimmte Herstellungstechnologien nutzen Sensoren für die Analyse und Prozesskontrolle. Mit der daraus resultierenden Vielfalt an Eingangssignalen wird deutlich, dass es Sensoren in einer ähnlich großen Zahl geben muss. Die Änderungen von Temperatur, Stoffkonzentrationen, optischen oder mechanischen Eigenschaften sind Beispiele für Eingangsgrößen, die mit Sensoren untersucht werden können. Materialien, prinzipieller Aufbau und Einsatzbedingungen von Sensoren sind also höchst unterschiedlich. Ein bedeutender Vorteil vieler Sensoren ist die Tatsache, den gemessenen Vorgang sofort mitverfolgen zu können. Diese Echtzeit-, online- oder auch *in-situ*-Messungen erlauben die direkte Betrachtung des Verlaufs eines Prozesses und ergeben dadurch mehr Informationen als die ausschließliche Betrachtung der Ergebnisse.

Eine mittels Transducern relativ leicht zu wandelnde Eingangsgröße ist die Eigenfrequenz eines schwingenden Systems. Sensoren, mit denen sich Änderungen dieser Eigenfrequenz erfassen lassen, heißen resonante Sensoren. Die zu messende Größe wird dabei durch eine Verschiebung der Resonanzfrequenz des schwingenden Elements dargestellt, wie sie zum Beispiel bei der Anlagerung einer Masse auftritt. Bei akustischen Sensoren nutzt man dieses Prinzip. Als Sensormaterialien kommen Stoffe, wie Siliziumdioxid (Quarz) zum Einsatz, die elektrische Ladung in mechanische Deformationen umwandeln können. Die erzeugte akustische Welle kann sich dabei auf verschiedene Weise im Material ausbreiten. Zum einen gibt es Oberflächenwellen (*surface acoustic waves*, SAW), die sich entlang der Oberfläche des Sensormaterials oder durch Reflexion an den Grenzflächen ausbreiten. Bei der zweiten Variante breitet sich die akustische Welle innerhalb des Materials aus, sog. Volumenwellen (*bulk acoustic waves*, BAW) bzw. Dickenscherschwingungen (*thickness shear mode*, TSM). Diese Art der Wellenausbreitung wird bei der Quarzmikrobalance (*quartz crystal microbalance*, QCM) genutzt, die Gegenstand dieser Arbeit ist.

In der pharmazeutischen Analytik spielt die QCM bisher kaum eine Rolle. Nur wenige Fragestellungen aus rein pharmazeutischer Sicht wurden mittels QCM bearbeitet. Trotzdem gibt es tausende von Veröffentlichungen zur QCM bzw. zur Nutzung der QCM



als Analysenmethode für biophysikalische, molekularbiologische und materialwissenschaftliche Untersuchungen. Die darin enthaltenen Erkenntnisse, Methoden und Erfahrungen erleichtern es, die QCM auch für pharmazeutische Aufgaben anzuwenden.

In dieser Arbeit lassen sich die Untersuchungen mittels QCM in zwei Gruppen einteilen. Zum einen werden Adhäsionsprozesse von Vehikelsystemen wie Liposomen und Nanopartikel untersucht, zum anderen Abbauvorgänge von Schichten aus Proteinen oder Polymeren. Außerdem wurde der Schichtaufbau unter Nutzung von Polyelektrolyten verfolgt. Neben den apparativen und methodischen Aufgabenstellungen zur QCM selbst, werden ergänzende analytische Methoden genutzt, um sensorunabhängig Analysen und Vorgänge bewerten zu können. Ziel ist die Einbindung der QCM in das Methodenspektrum der pharmazeutischen Analytik mit den Schwerpunkten Biopharmazie und pharmazeutische Technologie.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Der dem Messprinzip der QCM zugrunde liegende piezoelektrische Effekt wurde schon 1880 von Pierre und Jaques Curie bei Versuchen mit Turmalinkristallen entdeckt. 1959 wurde von Sauerbrey zwischen Massebeladung und Änderung der Resonanzfrequenz eine lineare Beziehung gefunden (Sauerbrey, 1959), die den Ausgangspunkt des Einsatzes von Schwingquarzen für die Quantifizierung von dünnen Metallschichten bildete. Erst die Entwicklung moderner Elektronik ermöglichte den Betrieb der QCM in Flüssigkeiten. Zunächst durch Nomura und Okuhara in organischen Flüssigkeiten betrieben (Nomura und Okuhara, 1982), erfolgte die Charakterisierung des Einflusses von umgebenden flüssigen Medien auf das Sensorverhalten durch Kanazawa und Gordon (Kanazawa und Gordon, 1985a; Kanazawa und Gordon, 1985b). Durch diese Arbeiten wurde die QCM erstmals auch für die Biowissenschaften interessant. Damit verbundene zusätzliche Messgrößen, wie zum Beispiel die Dämpfung, gestalten die Signalauswertung zwar deutlich komplexer, erlauben aber andererseits eine zusätzliche Informationsgewinnung, die zunehmend an Bedeutung gewinnt. Dadurch wird aber auch deutlich, dass der gebräuchlichste Begriff für die Methode QCM (*quartz crystal microbalance*, deutsch Quarzmikrowaage) zu eng gefasst ist. Die reine Analyse der Massebeladung des Sensors ist nur ein Grenzfall der Sensorantwort. Trotzdem haben sich richtigere Bezeichnungen der Methode wie *quartz crystal resonator* (QCR oder QXR) bis heute nicht durchgesetzt.

### 2.1 Physikalische Grundlagen der Quarzmikrobalance

Durch den piezoelektrischen Effekt führt mechanische Deformation bei geeigneten Materialien zur Verschiebung von Ladungsschwerpunkten und damit zur Polarisation. Der Zusammenhang zwischen Polarisation  $P$  und mechanischer Spannung  $T$  lässt sich durch

$$P = eT \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

darstellen, wobei das Piezomodul  $e$  eine charakteristische Stoffkenngröße ist. Umgekehrt kann man durch Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes mechanische Schwingungen in Form einer stehenden Volumenwelle hervorrufen. Dieser reziproke oder inverse piezoelektrische Effekt ist die Grundlage zum Bau von Quarzresonatoren. Im Resonanzfall erreicht die Amplitude der erzeugten Schwingung ein Maximum. Piezoelektrische Materialien sind nichtleitend und nicht zentrosymmetrisch, weshalb sie folglich kein Inversionszentrum besitzen. Neben dem für QCM-Sensoren meist verwendeten  $\alpha$ -Quarz ( $\text{SiO}_2$ ) eignen sich zum Beispiel auch Lithiumtantalat ( $\text{LiTaO}_3$ ), Lithiumniobat ( $\text{LiNbO}_3$ ) oder Galliumorthophosphat ( $\text{GaPO}_4$ ) (Krempl *et al.*, 1997). Der messtechnische Einsatz des Quarzes hängt von der Lage seiner Schnittebene in einem künstlich gezogenen Einkristall ab, da das Piezomodul in unterschiedlichen kristallographischen Richtungen verschieden ist. So ist der AT-Schnitt, der um  $-35,15^\circ$  um die x-Achse aus der xz-Ebene herausgedreht ist, ein sehr masseempfindlicher Dickenscherschwinger mit einer geringen Temperaturempfindlichkeit bei  $25^\circ\text{C}$  ( $\Delta f/\theta$  ca. 1 Hz/K) (Lu und Czanderna, 1984). Quarze aus anderen Schnittebenen eignen sich für andere Anwendungen. So können HT-geschnittene Quarze als empfindliche Temperatursensoren eingesetzt werden (Spasov, 1992). Die Regelmäßigkeit und hohe Genauigkeit der Quarzoszillatoren begründet ihren Einsatz als Taktgeber in Uhren und elektronischen Schaltungen. Zur Beschreibung der Güte einer Schwingung wird der sog. Q-Faktor herangezogen. Er ist der Quotient aus Grundfrequenz  $f_0$  und der Bandbreite  $B$  der Schwingung bzw. auch der  $2\pi$ fache Quotient aus der Gesamtenergie der Schwingung und dem Energieverlust (Rodahl *et al.*, 1995). Bei Schwingungen, die wenig gedämpft sind, spricht man also von Systemen mit hoher Güte. Zum Vergleich: der Q-Faktor für Schwingquarze beträgt ca.  $3 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$ , der von Pendeluhren etwa  $10^4$  und der einer Cäsium-Atomuhr etwa  $10^{13}$ .

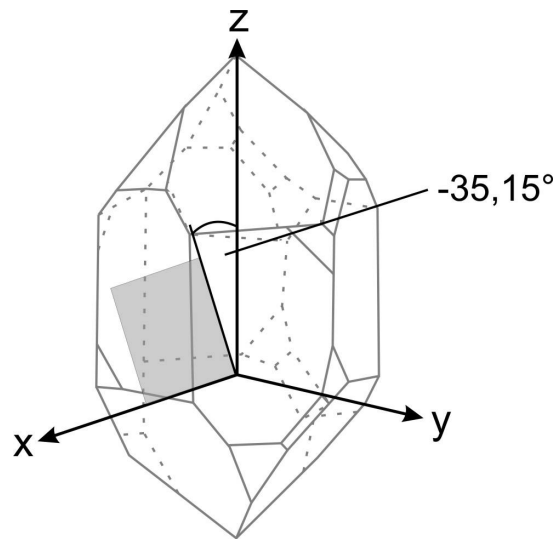


Abb. 2.1.1: Lage des AT-Schnitts im Einkristall.

Das elektrische Wechselfeld wird mittels aufgedampfter Metallelektroden angelegt. Oft nutzt man Gold als Elektrodenmaterial, wobei Chrom als Zwischenschicht zur besseren Haftung dienen kann. Neben einer Reihe anderer Elektrodenmetalle sind heute auch Sensoren mit Beschichtungen aus verschiedenen Oxiden, Nitraten, Cellulosen, Biotin und anderen Materialien und Stoffen kommerziell erhältlich (Q-Sense, 2010). Meist ist die dem Analyten zugewandte, geerdete Elektrode auf der Sensoroberseite zur elektrischen Kontaktierung auf die Rückseite geführt. Sie ist größer als die Elektrode auf der Rückseite, damit die Amplitude der Schwingung zum Elektrodenrand hin nahezu null wird. Mit diesem als *energy trapping* bezeichneten Verfahren sollen Einflüsse durch eine seitliche Halterung des Sensors vermieden werden und das elektrische Wechselfeld wird auf die Region zwischen den Elektroden begrenzt (Kanazawa, 2005). Es kann durch eine dickere Elektrode auf der Unterseite noch verstärkt werden. Martin und Hager bestimmten die Amplitudenverteilung als Besselfunktion. Näherungsweise kann auch eine Gaußfunktion angenommen werden (Martin und Hager, 1989).

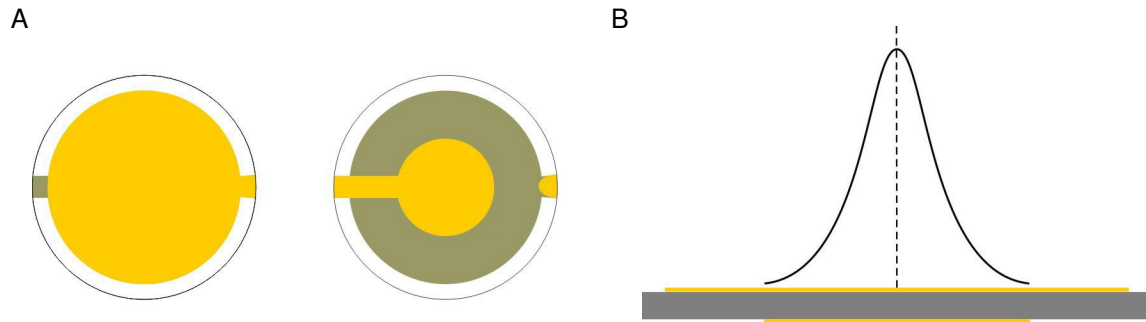


Abb. 2.1.2: A: Elektrodendesign der Oberseite (links) und Unterseite (rechts). B: Verteilung der Amplitude der Scherschwingung.

Für Untersuchungen, die sich unter dem Begriff Biowissenschaften zusammenfassen lassen, werden am häufigsten Sensoren mit einer Frequenz zwischen 5 MHz und 10 MHz genutzt. Nach der Resonanzbedingung ist die Schichtdicke des Quarzes  $d_q$  gleich der halben Wellenlänge  $\lambda$ .

$$d_q = \frac{\lambda}{2} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

Daraus folgt, dass höherfrequente Quarzsensoren dünner sind, wobei immer die kombinierte Dicke aus Quarz und Elektrode zu betrachten ist. Ein 10 MHz Quarzsensor hat eine Dicke von 166,7  $\mu\text{m}$ . Die Limitierung in Richtung immer höherer Frequenzen liegt zum einen in einer deutlich verschlechterten Handhabbarkeit zu dünner Sensorquarze begründet. Zum anderen steigt bei höheren Frequenzen neben der Sensitivität für die Masseänderung auch die Sensitivität gegenüber Störeinflüssen.

Die Tatsache, dass Sensoren mit höheren Schwingungsfrequenzen sensitiver sind, erklärt Mecea (Mecea *et al.*, 1996; Mecea, 2006) durch das von der Schwingungsbewegung des angeregten Sensors erzeugte Feld im angrenzenden Medium und die damit hohe Beschleunigung, die auf die Materie in Sensornähe wirkt. Er definiert das Produkt aus kleinster nachweisbarer Masse und der Stärke des erzeugten Feldes als Konstante, sowohl für QCM-Resonatoren als auch für klassische Balkenwaagen. Bemerkenswert dabei ist, dass die Stärke dieses Feldes im Zentrum des Schwingquarzes eine millionenfach höhere Intensität als das Gravitationsfeld der Erde besitzt und innerhalb weniger Millimeter auf null absinkt.

Je höher die Schwingungsfrequenz des Sensors, desto geringer ist die Eindringtiefe der akustischen Welle in das angrenzende Medium. Sie liegt für 10 MHz-Sensoren bei ca.

180 nm in Wasser und damit im Bereich der Größe von Biomolekülen. Die in einigen Messsystemen genutzten Obertöne – Schwingungen mit einem ganzzahligen Vielfachen der Grundfrequenz – haben also immer eine geringere Eindringtiefe als der Grundton. Nur ungerade Obertöne können bei der QCM genutzt werden, denn nur durch sie kommt es zu gegensätzlichen Ladungen an Ober- und Unterseite des Sensors.

Die angesprochene Analyse der Dämpfung der akustischen Welle kann technisch auf verschiedene Weise erreicht werden. Sie ist für die Anwendung der QCM im Vakuum oder in Gasen weniger von Bedeutung, da hier die akustische Welle kaum gedämpft wird (geringe akustische Impedanz).

Ein als „dissipative QCM“ (*quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*, QCM-D) bekanntes Verfahren nutzt das Abklingverhalten der akustischen Schwingung, um Aussagen zum Energieverlust des Systems machen zu können (Rodahl *et al.*, 1997). Dazu wird der schwingende Sensorquarz kurzzeitig von der Spannungsquelle getrennt und die Abklingkonstante  $\tau$  ermittelt. Bei starren Schichten klingt die Schwingung langsam ab, viskose Schichten hingegen führen zu einem schellen Abklingen der Schwingung. Der ermittelte Dissipationsfaktor ist ein Maß für die Dämpfung des Systems. Er ist der Kehrwert des Q-Faktors. Dieses Prinzip wird in den kommerziell erhältlichen Geräten der Firma q-sense (Göteborg, Schweden) genutzt, die durch ihre weite Verbreitung sehr zum Einsatz der QCM in den Biowissenschaften beigetragen haben.

Ein weiteres Verfahren ist die Impedanzanalyse. Sie lässt auch bei stärkerer Dämpfung die Bestimmung der Änderung der Resonanzfrequenz  $\Delta f$  und die Änderung des Widerstandes  $\Delta R$  (siehe Abschnitt 2.3) zu (Kipling und Thompson, 1990). Mit hoher Genauigkeit werden so mehr Informationen gewonnen als bei anderen Techniken. Von Vorteil ist die Tatsache, dass der Sensor hier passiv betrieben wird, d.h. er ist nicht Teil der Messelektronik. Für die Durchführung der Impedanzanalyse werden überwiegend Netzwerkanalysatoren genutzt.

Eine weitere Variante stellt die Dämpfungsanalyse mittels Oszillatorschaltung des in dieser Arbeit verwendeten Messsystems dar. Sie wird deshalb bei dessen Vorstellung in Abschnitt 3.1 behandelt.

## 2.2 Einflussfaktoren auf das Schwingungsverhalten des Sensors

Die Schwingung eines Quarzsensors kann durch viele Faktoren beeinflusst werden. Ihre Kenntnis kann für die Interpretation von Messergebnissen äußerst wichtig sein. Gerade bei der Anwendung in flüssigen Medien kommt eine Reihe von Einflüssen hinzu, die zunächst für die Auswertung der reinen Massebeladung (gravimetrischer Sensor) als störend angesehen werden. Diese nichtgravimetrische Sensorantwort bietet aber die Chance, zusätzliche Informationen zu den Vorgängen an der Sensoroberfläche zu gewinnen, wie zum Beispiel zu den viskoelastischen Eigenschaften des angrenzenden Mediums. Abbildung 2.2.1 zeigt eine Reihe von möglichen Einflussfaktoren, von denen die wichtigsten besprochen werden sollen.

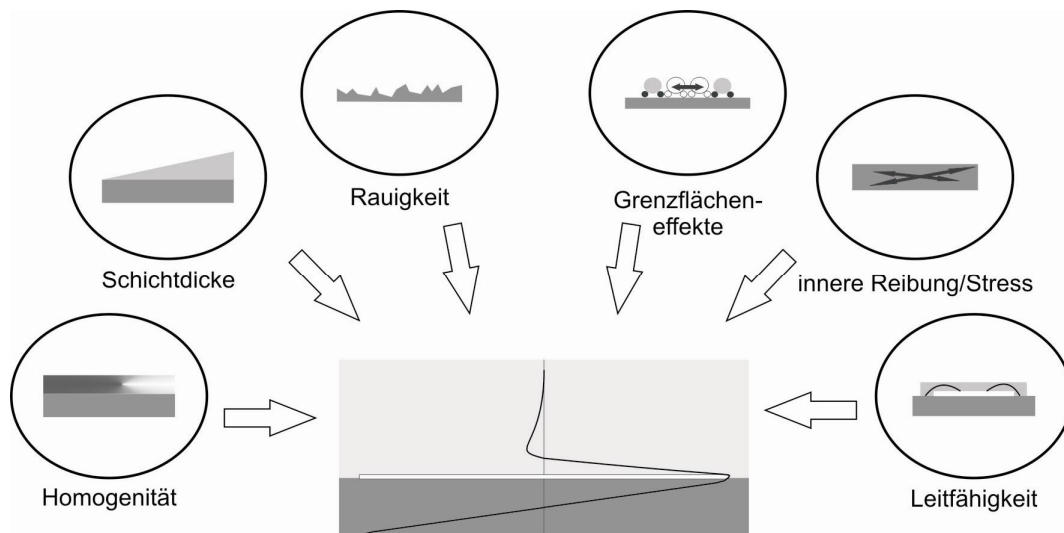


Abb. 2.2.1: Faktoren, die das Schwingungsverhalten eines Quarzsensors beeinflussen können [modifiziert nach (Lucklum und Hauptmann, 2003)].

Die weitaus häufigste Verwendung der QCM erfolgte bisher zur Analyse einer Massebeladung. Wie oben erwähnt hat Sauerbrey dazu die Grundlagen erarbeitet (Sauerbrey, 1959). Dabei werden aufgelagerte Schichten als adäquate Quarzsichten behandelt. Da die Ausbreitungsgeschwindigkeit der akustischen Welle im Quarz ( $u_q = 3340 \text{ m s}^{-1}$ ) konstant ist, ergibt sich mit

$$u_q = \lambda f_q \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

eine Änderung von Resonanzfrequenz und aufgelagerter Masse  $m$  bzw. Änderung der Schichtdicke  $d$  im gleichen Verhältnis.

$$-\frac{\Delta f_q}{f_q} = \frac{\Delta m_q}{m_q} = \frac{\Delta d_q}{d_q} \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

Da sich die Masse als Produkt aus Fläche  $A$ , Dicke  $d$  und Dichte  $\rho$  ( $\rho_q=2,648 \cdot 10^3 \text{ kg m}^{-3}$ ) ausdrücken lässt, ergibt sich mit Gleichung 2.2 und 2.3 die Sauerbrey-Gleichung.

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{u_q \rho_q A} \Delta m \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

Sauerbrey führte das Verhältnis aus Änderung der Masse ( $\Delta m$ ) und Fläche ( $A$ ) als Massenbelegung  $\varphi$  ein

$$\varphi = \frac{\Delta m}{A} \quad (\text{Gleichung 2.6})$$

und fasste in der Schichtwägempefindlichkeit  $C$  alle Konstanten des Quarzes zusammen, womit sich die Sauerbrey-Gleichung vereinfacht als

$$\Delta f = -C\varphi \quad (\text{Gleichung 2.7})$$

darstellen lässt. Die Schichtwägempefindlichkeit erklärt die in Abschnitt 2.1 erwähnte erhöhte Sensitivität höherfrequenter Sensoren, da die Frequenzänderung proportional zum Quadrat der Grundfrequenz ist. Durch die Beladung einer Elektrodenfläche von  $1 \text{ cm}^2$  mit  $4,4 \text{ ng}$  würde bei einem  $10 \text{ MHz}$  Sensor eine Frequenzänderung von  $1 \text{ Hz}$  hervorgerufen. Bezieht man auch die Fläche in die Konstante mit ein, erhält man die theoretische Sensitivität  $S$  (Ward und Delawski, 1991).

Die Sauerbrey-Gleichung hat nur Gültigkeit, wenn die Fremdschichten dünn, gleichmäßig verteilt und starr sind. Unter diesen Bedingungen erfährt die Schwingung keinen Energieverlust; die starre Schicht ist optimal an den Quarz gekoppelt. Für den Einsatz in flüssigen Medien wurden Arbeiten veröffentlicht, die die Sauerbrey-Gleichung entsprechend erweitern (Kankare, 2002).

Neben der reinen Massebeladung nach Sauerbrey stellt die einseitige Bedeckung des Schwingquarzes mit einer Newtonschen Flüssigkeit einen weiteren Grenzfall der Sensorantwort dar. Für diese rein viskosen Medien und für eine semi-infinite Schicht stellten Kanazawa und Gordon die folgende mathematische Beziehung her (Kanazawa und Gordon, 1985a; Kanazawa und Gordon, 1985b).



$$\Delta f = -f_0^{\frac{3}{2}} \left( \frac{\rho_{fl} \eta_{fl}}{\pi \rho_q \mu_q} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Gleichung 2.8})$$

Dabei sind  $\rho_{fl}$  und  $\eta_{fl}$  die Dichte bzw. Viskosität der Flüssigkeit und  $\mu_q$  das Schermodul des Quarzes ( $\mu_q = 2,947 \cdot 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$ ). Die Frequenzänderung ist damit vom Viskositäts-Dichte-Produkt der angrenzenden Flüssigkeit abhängig. Die Scherwelle wird in der Flüssigkeit stark gedämpft. Die Amplitude der Schwingung verringert sich deutlich, womit die geringe Eindringtiefe in flüssige Medien zu erklären ist. Für die praktische Anwendung ist vor allem die Berücksichtigung der Viskosität von Bedeutung. Eingangs wurde erwähnt, dass AT-geschnittene Quarze eine geringe Temperaturempfindlichkeit besitzen. Für QCM-Experimente in Flüssigkeiten ist aber zu beachten, dass die Temperatur stark die Viskosität beeinflusst und diese nach Kanazawa und Gordon direkt auf die Frequenzänderung wirkt. Daher ist eine gute Temperaturstabilisierung für solche Untersuchungen eine wichtige Voraussetzung.

Der Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die Sensorantwort wurde von Urbakh und Daikhin näher untersucht (Urbakh und Daikhin, 1994; Daikhin und Urbakh, 1997). Sie spielt vor allem für raue Elektrodenoberflächen, poröse angelagerte Schichten und aufgelagerte Polymere eine Rolle. Beim Einsatz der QCM in flüssigen Medien können sich Flüssigkeitsmoleküle in Vertiefungen und Hohlräume einlagern und werden als Fremdmasse mit der eigentlich untersuchten Schicht bei der Scherbewegung mitbewegt (*trapped liquid*). Mathematische Modelle können diesen Einfluss auf die Sensorantwort in Abhängigkeit von der Stärke der Rauigkeit vorhersagen (Daikhin *et al.*, 2002).

Der Dämpfungseffekt viskoser Flüssigkeiten verdoppelt sich, wenn der Quarz vollständig in sie eingetaucht ist. Außerdem würden elektrisch leitende Medien die Elektroden kurzschließen. Deshalb können Schwingquarze nur in niedrigviskosen Flüssigkeiten mit sehr kleinen Leitwerten, wie zum Beispiel Hexan oder Heptan (Auge *et al.*, 1994) voll eingetaucht betrieben werden. Bei der größeren Zahl der Anwendungen, insbesondere bei Biosensoren, ist der Quarz nur einseitig mit Flüssigkeit bedeckt. Das führt zu einem einseitigen hydrostatischen Druck auf den Sensorquarz. Daher ist zum einen auf eine möglichst spannungsfreie Einfassung des Quarzes in der Messanordnung zu achten, zum anderen müssen Schwankungen im hydrostatischen Druck, gerade bei Durchflussmesszellen, vermieden werden.

Unter dem Begriff Slip werden verschiedene Grenzflächeneffekte zusammengefasst. Dazu können Partikelverschiebungen an der Grenzfläche Sensor/Flüssigkeit, Diskontinuitäten in

der Scherspannung oder in Folge von Rauigkeit eingeschlossene Gase zählen (Lucklum, 2002). Diese Effekte bedingen eine Abweichung theoretischer Vorhersagen von experimentellen Ergebnissen. Daher wird auch für diese Phänomene versucht, modellhafte Beschreibungen zu finden, zum Beispiel bei Lu *et al.* (Lu *et al.*, 2003) und Du *et al.* (Du *et al.*, 2004).

Dass auch die Leitfähigkeit und die Dielektrizitätskonstante des Mediums an der Sensoroberfläche Einfluss auf die Resonanzfrequenz haben kann, zeigten Rodahl *et al.* (Rodahl *et al.*, 1996). Grund hierfür ist eine mögliche Wechselwirkung von Ladungsträgern im Medium mit Oberflächenladungen, die durch die akustische Schwingung bedingt sind. Rodahl *et al.* zeigten auch, dass dieser Effekt keinen Einfluss auf die Resonanzfrequenz hat, wenn das Elektrodendesign so gewählt wird, dass die obere Elektrode die Seite des Quarzes zum flüssigen Medium hin vollständig bedeckt.

Bei QCM-Experimenten ist grundsätzlich zu beachten, dass der Sensor immer eine Antwort auf die Summe der ihn beeinflussenden Veränderungen und nicht auf eine einzelne Messgröße gibt.

## 2.3 Theoretische Modelle und Ersatzschaltbilder

Ziel mess- und sensortechnisch orientierter Arbeiten ist die möglichst genaue und vollständige Beschreibung des Sensorverhaltens. Damit soll auch eine Vorhersage der Sensorantwort unter bestimmten experimentellen Voraussetzungen erreicht werden. Unter Zuhilfenahme elektrischer Ersatzschaltbilder wurden verschiedene Modelle publiziert, die wiederum bestimmte Randbedingungen voraussetzen, um vor allem auch die nicht gravimetrischen Einflüsse auf die Sensorantwort beschreiben zu können. Einige relevante Modelle sollen hier kurz Erwähnung finden.

Im *Transmission-Line-Modell* wird ein Schichtaufbau des Sensors angenommen. Er wird als eine piezoelektrische Schicht – der eigentliche Schwingquarz – mit einer aufgelagerten Anzahl nicht piezoelektrischer Schichten dargestellt, die von der akustischen Welle durchdrungen werden (Martin *et al.*, 1991; Lucklum, 2005). Damit können die jeweiligen Einflüsse von Masse, Dichte und Viskosität separat betrachtet werden. Jeder Schicht wird dazu eine akustische Impedanz  $Z$  zugeordnet, die die Faktoren zusammenfasst, die der Schallausbreitung entgegenwirken.

Durch das *Acoustic-Load-Konzept* wird die akustische Last durch eine Matrix beschrieben. Sie lässt sich mit der Änderung der Resonanzfrequenz  $\Delta f$  und der Änderung des dynamischen Widerstandes  $\Delta R$  in Beziehung setzen. Gerade viskoelastische Materialeigenschaften lassen sich so besser charakterisieren. Die akustische Last wird in einen Realteil und einen Imaginärteil zerlegt. Der Realteil führt zur Erhöhung des äquivalenten Widerstandes, der Imaginärteil zur Verschiebung der Resonanzfrequenz (Behling *et al.*, 1998). Für die Sonderfälle der dünnen, starren Schichten bzw. der rein viskosen Flüssigkeiten ergeben sich wieder die bekannten Gleichungen von Sauerbrey und Kanazawa. Das *Acoustic-Load-Konzept* liefert für viele praktisch relevante Fälle genaue Ergebnisse. Beide Modelle stimmen in ihren Aussagen für einen Großteil der möglichen betrachteten Fälle gut überein (Lucklum, 2002).

Aus dem *Transmission-Line-Modell* lässt sich ein vereinfachtes Ersatzschaltbild, das *Butterworth-van-Dyke-Modell* ableiten. Mit ihm kann das Verhalten des Quarzes anhand elektrischer Größen beschrieben werden (Abbildung 2.3.1A).

$C_p$  repräsentiert dabei die Parallelkapazität, die durch den Quarzsensor mit seinen aufgedampften Elektroden gegeben ist. Sie lässt sich mit Kenntnis der Dielektrizitätskonstanten  $\varepsilon$ , der Quarzdicke  $d_q$  und der Elektrodenfläche  $A_{el}$  nach

$$C_p = \frac{A_{el}\varepsilon}{d_q} \quad (\text{Gleichung 2.9})$$

bestimmen. Die Kapazität  $C$  korrespondiert mit der mechanischen Elastizität, die Induktivität  $L$  mit der schwingenden Masse des Quarzes und der Widerstand  $R$  mit dem durch Reibung hervorgerufenen Energieverlust (Auge *et al.*, 1994). Soll der Quarz in einer Flüssigkeit mit einer aufgelagerten Masse beschrieben werden, wird das Ersatzschaltbild für den Einfluss der Flüssigkeit um eine weitere Induktivität  $L_L$ , einen weiteren Widerstand  $R_L$ , einen Parallelwiderstand  $G_L$  und eine Parallelkapazität  $C_L$  erweitert. Die komplexe Größe der Impedanz  $Z$  spiegelt den Einfluss der aufgelagerten Masse wider (Abbildung 2.3.1B).

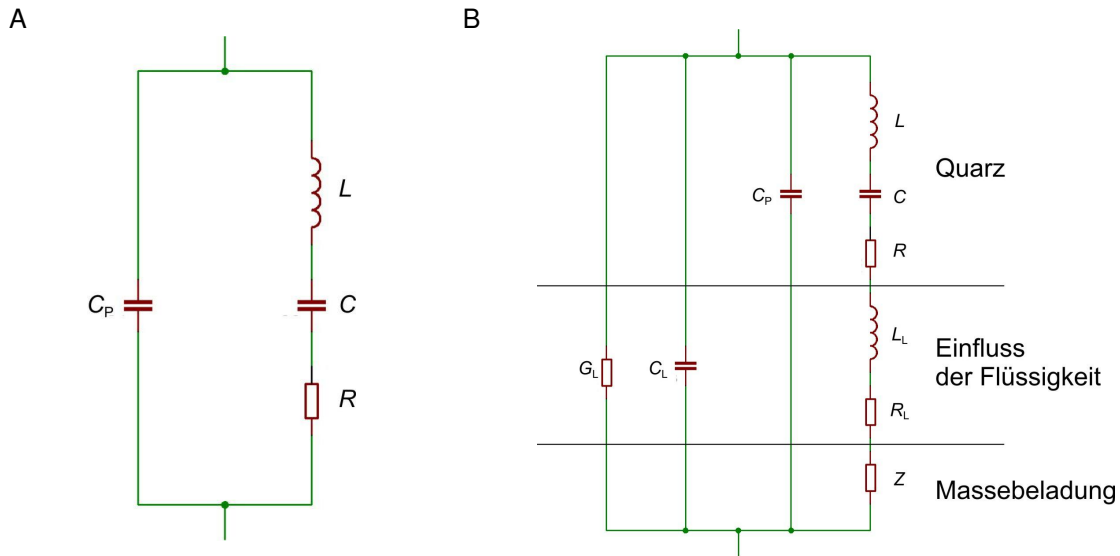


Abb. 2.3.1: A: Butterworth-van-Dyke (BvD)-Ersatzschaltbild für einen unbeladenen Quarz. B: erweitertes Ersatzschaltbild für einen Quarz mit Flüssigkeits- und Massebelastung.

## 2.4 Anwendungsmöglichkeiten der Quarzmikrobalance

Anhand des dargestellten Messprinzips der QCM wird deutlich, dass es eine unüberschaubare Anzahl von Anwendungen gibt. Die Analyse von Wechselwirkungen mit dem Sensorquarz oder einer aufgetragenen Funktionsschicht lässt sich für ausschließlich technische Fragestellungen genauso nutzen, wie für die Prozesskontrolle oder für biowissenschaftliche Untersuchungen. Die im Folgenden vorgestellten Arbeiten wurden gewählt, weil sie zumindest theoretisch einen Bezug zu pharmazeutischen Fragestellungen haben und für ihren Bereich charakteristisch sind. Bewusst wurde auf Anwendungen der QCM in der Gasphase, zum Beispiel zur Bestimmung von Metallfilmdicken, und auf rein technisch-industrielle Anwendungen verzichtet.

### 2.4.1 Kolloidale Systeme

Mit der Möglichkeit des Einsatzes der QCM in Flüssigkeiten wuchs auch das Interesse am Verhalten von kolloidalen Vesikeln auf dem Sensor. Daher entstand eine Reihe von Arbeiten zur Adhäsion von Vesikeln an verschiedene Oberflächen, zur Bildung von Membranmodellen durch Spreitung von Liposomen und auch zur spezifischen Wechselwirkung von Liposomen mit verschiedenen Erkennungsstrukturen, wobei hier die Vesikel teilweise als „Massevergrößerung“ dienen, um den eigentlich zu beobachtenden

Effekt der spezifischen Wechselwirkung deutlicher erkennen zu können. Das Spreiten von Vesikeln auf Oberflächen und die damit einhergehende Bildung von Modellmembranen (*supported phospholipid/planar bilayer*, SPB) sind hauptsächlich für die Herstellung von Biosensoren interessant.

Bei der Betrachtung der Adhäsion kolloidaler Systeme spielt neben dem rein gravimetrischen Effekt der Anlagerung einer bestimmten Masse an den Sensor vor allem die Änderung der viskoelastischen Eigenschaften eine bedeutende Rolle, da sich diese in Abhängigkeit des Verhaltens der Vesikel auf der Sensoroberfläche unterscheiden. So beschrieben Stalgren *et al.* das Adhäsionsverhalten mit Hilfe der Änderungen in Frequenz und Dämpfung (Stalgren *et al.*, 2001). Dabei stellten sie fest, dass eine fest haftende Schicht als Bilayer auf dem Sensor ausgebildet wird und nicht vollständig gespreitete Liposomen eine aufgelagerte, nicht fest haftende Schicht bilden. Die Bildung von Bilayern lässt sich durch QCM sicher verfolgen. Wie Keller *et al.* (Keller *et al.*, 2000) an unilamellaren Vesikeln demonstrieren konnten, nimmt die Frequenz zunächst stark ab. Nachdem ein Frequenzminimum erreicht wurde, steigt die Frequenz wieder geringfügig an. Dieser Frequenzanstieg ist mit der Bildung des Bilayers zu erklären, der mit seiner im Vergleich zum Vesikel kompakteren Struktur den Sensor weniger dämpft. Sowohl die Adhäsion, als auch die Bildung von Bilayern sind stark von verschiedenen Einflüssen abhängig. So zeigten Reimhult *et al.* (Reimhult *et al.*, 2003), dass das Material der Sensoroberfläche, der Bedeckungsgrad, die Vesikelgröße und die Temperatur die Bildung von Bilayern beeinflussen. Auch die Ladung des Vesikels hat großen Einfluss auf das Verhalten an der Sensoroberfläche, wie Richter *et al.* zeigen konnten (Richter *et al.*, 2003). Dazu wurden positiv und negativ geladene, sowie zwitterionische Vesikel miteinander verglichen. Kalzium spielt dabei eine wichtige Rolle, da es als bivalentes Kation eine Brücke zwischen verschiedenen negativ geladenen Gruppen bilden kann. Dass sich an Sensoroberflächen gebundene Liposomen durch Detergenzien wie Triton-X 100 desintegrieren lassen zeigten Iwasaki *et al.* in ihrer Arbeit zur Anlagerung von Liposomen an Polymeroberflächen (Iwasaki *et al.*, 1997). Simultane Messungen mittels QCM-D und Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) führten Reimhult *et al.* durch (Reimhult *et al.*, 2004). Mit der Kombination beider Methoden ergeben sich genauere Erkenntnisse in Bezug auf gebundenes Wasser in den gebildeten Lipidschichten. Aus pharmazeutischer Sicht sind spezifische Wechselwirkungen von Liposomen mit Zielstrukturen hinsichtlich eines gerichteten Wirkstofftransports (*drug targeting*) von

besonderem Interesse. Dazu wird ein Wechselwirkungspartner in das Vesikel eingebaut, der andere als Teil der Funktionsschicht des Sensors immobilisiert. Besonders die Avidin-Biotin-Wechselwirkung ist gut untersucht. Verschiedene Arbeiten zeigen den deutlichen Unterschied zur unspezifischen Adsorption eines nicht spezifisch wechselwirkenden Vesikels (Pignataro *et al.*, 2000; Lüthgens *et al.*, 2003; Vermette *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2006). Auch hier hängt die Stärke der Wechselwirkung von verschiedenen Faktoren wie Vesikelgröße und Konzentration des inkorporierten Wechselwirkungspartners ab.

Auch die Zucker-Lektin-Wechselwirkung wurde mittels QCM-Experimenten für kolloidale Systeme dargestellt. Hildebrand *et al.* immobilisierten dazu Concanavalin A auf dem Sensor und überprüften die Wechselwirkung mit zuckergebundenen Liposomen und binären sowie tertiären Mizellen (Hildebrand *et al.*, 2002).

#### **2.4.2 Untersuchungen an Biomolekülen**

Erst die Nutzung von Biomolekülen als Erkennungsstruktur macht den Sensor zum Biosensor. Gemeint ist damit mehrheitlich die Nutzung von Biomolekülen als spezifische Erkennungsstruktur des Sensors, um mit der erworbenen Selektivität auch aus komplexeren Stoffgemischen die erwünschte Zielstruktur eindeutig nachweisen zu können. Außerdem spielt die QCM zur Untersuchung von Einflüssen auf Biomoleküle eine wichtige Rolle, weil gerade bei großen Molekülen Änderungen in Struktur und Orientierung Einfluss auf viskoelastische Eigenschaften haben. Diese Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften sind zum Beispiel durch veränderte Wasserbindungskapazitäten bedingt. Anhand der publizierten Arbeiten lässt sich sehen, dass das Hauptaugenmerk bei der Nutzung der QCM als Biosensor zum einen auf spezifisch bindenden Proteinen, inklusive Immunglobulinen liegt. Zum anderen wurden Bindungs- und Umlagerungsprozesse der Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit QCM intensiv untersucht.

Unter Nutzung der Protein-Ligand-Interaktion zwischen humanem Serumalbumin und Warfarin wiesen Zilberman und Smith Warfarin in verschiedenen Konzentrationen nach (Zilberman und Smith, 2005). Sie zeigten aber auch, dass die Änderungen in Frequenz und Dämpfung neben der Konzentration des Warfarins von der Art der Bindung des Albumins auf dem Sensorquarz abhängt. Lin *et al.* stellten mit Hilfe des *Molecular Imprinting* (siehe Abschnitt 3.2.1) einen Biosensor zum selektiven Nachweis von Albumin in Blutserum her (Lin *et al.*, 2004). Eine Kalibrierung ermöglichte eine Konzentrationsbestimmung und die

Selektivität des Sensors wurde durch Kontrollversuche mit Lysozym, Myoglobin und Cytochrome c nachgewiesen. Die Koagulation von Fibrin an verschiedenen Polymeroberflächen nach Kalziumzugabe wurde von Anderson *et al.* mit der QCM-D-Technik untersucht (Andersson *et al.*, 2005). Anhand der Frequenz-Zeit-Kurven ließen sich der Beginn der Koagulation und das Ausmaß der Fibrinabscheidung bestimmen, die stark von der Art des Polymers abhängen. Kontrollexperimente an heparinisierten Oberflächen zeigten keine Koagulation. Derartige Experimente können Bedeutung für die Auswahl von Oberflächenmaterialien in der Medizintechnik erlangen.

Die Änderung der Eigenschaften von Proteinen (Fibrinogen,  $\gamma$ -Immunglobulin, Albumin und Lysozym) bei ihrer Abscheidung auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen untersuchte Vörös (Vörös, 2004) und beschrieb die Änderungen in der Dichte als Ergebnis von Konformationsänderungen. Auf der hydrophilen Titandioxidoberfläche zeigten sich kompaktere Schichten aus kleineren Proteinen als jene aus größeren. Die hydrophobe Teflonschicht verursachte durch oberflächeninduzierte Denaturierung sehr kompakte Schichten aus Albumin und Lysozym.

Proteine können auch genutzt werden, um Multischichten auf einem Sensorquarz zu bilden. Diese als *layer-by-layer*-Technik bekannte Methode gelingt zum Beispiel durch die Ausnutzung der Wechselwirkung von Proteinen untereinander. Hoshi *et al.* (Hoshi *et al.*, 2002) führten einen Schichtaufbau aus zuckerbindendem Concanavalin A und dem Glykoprotein Avidin durch und charakterisierten die Multischicht unter anderem durch QCM-Messungen. Aus bovinem Serumalbumin und Natriumhyaluronat durch hydrophobe, elektrostatische und helikale Wechselwirkungen gebildete Multilayer stellten Nonogaki *et al.* vor (Nonogaki *et al.*, 2000). QCM wurde genutzt, um die jeweils angelagerten Mengen von Serumalbumin und Natriumhyaluronat zu bestimmen.

Die in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Modellmembranen werden auch genutzt, um daran die Adsorption von Proteinen zu untersuchen. So stellen Glasmästar *et al.* (Glasmästar *et al.*, 2002) unter anderem mit humanem Fibrinogen und Serumalbumin, Cytochrome c vom Pferd, humanem Immunglobulin und bovinem Hämoglobin gleich eine Reihe von Adsorptionsexperimenten vor und können die Stabilität des Phosphatidylcholin-Bilayers gegenüber den Proteinen zeigen. Die Inkorporation von spezifisch interagierenden Substanzen in Modellmembranen stellt einen weiteren Ansatz zur Herstellung von Biosensoren dar. Ihalainen und Peltonen stellten die Immobilisierung von Streptavidin durch in Phospholipid-Bilayer inkorporiertes Biotin vor (Ihalainen und Peltonen, 2004).

Durch die Spreitung von mit Integrinen beladenen Vesikeln auf ultradünnen Cellulosefilmen gelang Goennenwein *et al.* die Inkorporation von Transmembranproteinen in Modellmembranen (Goennenwein *et al.*, 2003). Die Wechselwirkung mit Vesikeln wurde durch spezifisch an das verwendete Integrin bindende, zyklische Hexapeptide realisiert.

Gleichartige Versuchsaufbauten lassen sich auch mit Immunglobulinen (Ig) realisieren, womit man Sensoren erhält, die in der Literatur unter Immunosensoren zusammengefasst werden. Erste Arbeiten dazu wurden noch in der Zeit vor der Anwendung der QCM in Flüssigkeiten durchgeführt. Shons *et al.* wiesen die spezifische Wechselwirkung zwischen bovinem Serumalbumin (BSA) und Anti-BSA-Antikörpern vom Hasen nach (Shons *et al.*, 1972). Die wechselseitig in die entsprechenden Lösungen getauchten Schwingquarze wurden vor der jeweiligen Messung getrocknet. Neuere Arbeiten mit QCM stellten die Wechselwirkungen zwischen Immunglobulinen und Proteinen unter anderem für IgG und Protein A (Carrigan *et al.*, 2005; Gerdon *et al.*, 2005) sowie humanes IgG und Anti-human-IgG (Su und Zhang, 2004) vor. Laricchia-Robbio und Revoltella publizierten eine Arbeit zur Charakterisierung der Bindung eines monoklonalen Antikörpers an ein C-terminales Heptapeptid von humanem Endothelin (Laricchia-Robbio und Revoltella, 2004).

In Bezug auf die Analyse von Genen und genetischen Veränderungen sowie forensischen Anwendungen spielen auch DNA-Sensoren eine zunehmende Rolle. Liss *et al.* konnten zeigen, dass Aptamere (einzelsträngige Oligonukleotide) in Bezug auf Selektivität und Spezifität vergleichbar zu Antikörpern sind (Liss *et al.*, 2002). Die Sensoren mit Aptameren erwiesen sich dabei als stabil, hitzeresistent und regenerierbar. Durch eine hochgeordnete Immobilisierung und ihre im Vergleich zu Immunglobulinen kleinere Größe fiel ihr Detektionsbereich zehnfach höher aus. Weitere Arbeiten befassen sich mit der Immobilisierung von DNA und deren Hybridisierung (Cho *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2005a). Auch die Kombination von DNA und der schon beschriebenen Biotin-Avidin-Wechselwirkung wurde genutzt, um Multischichten zu bilden, deren viskoelastische Eigenschaften, Wassergehalt und Orientierung mit QCM bestimmbar sind (Caruso *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2005b). Ein Sensor für Insertionen und Punktmutationen in DNA stellten Su *et al.* vor (Su *et al.*, 2004). Dazu wurde das MutS-Protein genutzt, das nach der DNA-Hybridisierung ungebundene Basen erkennt. Einen Sensor für genetisch veränderte Organismen (*genetically modified organisms*, GMOs)



publizierten Mannelli *et al.* (Mannelli *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde Einzelstrang-DNA auf dem Sensorquarz immobilisiert und die Hybridisierung mit durch Polymerase-Kettenreaktion gewonnener Proben-DNA untersucht. Der entwickelte Sensor konnte in Bezug auf Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Anwendungsdauer charakterisiert werden.

### 2.4.3 QCM-Biosensoren für Zellen und Viren

Konsequenterweise wurde die Anwendung der QCM für Adhäsionsversuche von Vesikeln auch auf die deutlich komplexeren lebenden Zellen erweitert. Zu beachten ist dabei vor allem, dass die Eindringtiefe der akustischen Welle in das angrenzende Medium (wenige hundert Nanometer) deutlich kleiner ist als ein durchschnittlicher Zelldurchmesser (einige Mikrometer). Damit „erfasst“ der Sensor zwar den direkten Kontakt der Zelle und eignet sich daher für Adhäsionsversuche, die Gesamtheit einer aufgelagerten Zelle ist mit der QCM aber nicht analysierbar.

Adhäsionsversuche mit verschiedenen Zelltypen führten Fredriksson *et al.* durch (Fredriksson *et al.*, 1998). Die Anlagerung der Zellen wurde auf hydrophilen und hydrophoben Oberflächen untersucht und mittels Frequenzverschiebung und Dämpfungsanalyse charakterisiert. Eine grafische Auswertung der Frequenzänderung in Bezug auf die Änderung der Dämpfung erlaubt dabei eine noch detailliertere Unterscheidung nach Zelltyp und Sensoroberfläche (*Df*-plots). Ebenfalls verschiedene Zelllinien (Epithelzellen und Fibroblasten) untersuchten Wegener *et al.* (Wegener *et al.*, 1998) und führten zusätzlich Versuche zur Inhibierung der Zelladhäsion durch. Dazu wurden verschiedene Oligopeptide getestet und ihr Einfluss aus den Änderungen der Frequenz pro Zeit ermittelt. Marx *et al.* (Marx *et al.*, 2001) untersuchten den konzentrationsabhängigen Einfluss von Nocodazol auf lebende Endothelzellen. Nocodazol beeinflusst durch Depolymerisierung der Mikrotubuli im Cytoskelett die Zellform und den Kontakt zwischen den Zellen. Auch Galli Marxer *et al.* (Galli Marxer *et al.*, 2003) untersuchten Einflüsse auf das Cytoskelett während einer Adhäsion an Schwingquarzsensoren und stellten dabei fest, dass nach einer Frequenzerniedrigung in der Absorptionsphase die Schwingungsfrequenz sogar über den Ausgangswert ansteigt. Die Autoren können auch hier eine deutliche Veränderung in der Viskoelastizität der Zellen zeigen. Pax *et al.* (Pax *et al.*, 2005) immobilisierten Muskelfaserzellen von Rattenherzen auf Schwingquarzen. Mit einer besonders schnellen Datenaufnahme (30 Datenpunkte pro

Sekunde) war es ihnen möglich, die Kontraktion der Muskelfaserzellen abzubilden und daran herzstimulierende Wirkstoffe zu untersuchen.

Ansätze, das Adhäsionsverhalten von Zellen mit den deutlich einfacher gebauten Liposomen zu modellieren, stoßen an Grenzen, wie in vergleichenden Studien zum Beispiel von Reiss *et al.* dargelegt wurde (Reiss *et al.*, 2003).

Auch Untersuchungen an Viren stellen ein Anwendungsgebiet der QCM dar. Durch die Immobilisierung von Antikörpern gelang Owen *et al.* der Nachweis von Influenza-A Viruspartikeln in vernebelten Proben (Owen *et al.*, 2007). Dickert *et al.* entwickelten unter Nutzung des *Molecular Imprinting* einen Sensor, mit dem man den Tabakmosaikvirus nachweisen kann (Dickert *et al.*, 2004). Der selektive Nachweis, zum Beispiel aus dem Pflanzensaft heraus, gelang über mehrere Größenordnungen auch ohne aufwendige Probenvorbereitung.

#### **2.4.4 Polymere**

Polymere dienen zum einen als Bestandteil der Funktionsschicht und sind daher bei vielen Anwendungen der QCM nicht mehr entbehrlich. Zum anderen eignet sich die QCM aber auch, um Entstehung, Eigenschaften und Veränderungen von Polymeren zu untersuchen. Entsprechende Arbeiten sollen in diesem Abschnitt kurz vorgestellt werden.

Moya *et al.* (Moya *et al.*, 2005) verfolgten mit der QCM-D-Technik das Wachstum eines Polymerfilms aus 2-(methacryloyloxy)ethyltrimethylammoniumchlorid (METAC). Dazu wurde eine Mischung aus Mercaptoundecan und Mercaptoundecanbromisobutyrat als Monolage (*self assembled monolayer*, SAM, siehe Abschnitt 3.2.1) auf dem Sensorquarz immobilisiert. Letztere Substanz dient als Initiator für eine radikalische Atomtransfer-Polymerisation (*atom transfer radical polymerization*, ATRP). METAC Monomere werden anschließend auf den Schwingquarz gegeben und verbinden sich dort zum Polymer. Durch die Aufzeichnung von Frequenz- und Dämpfungsänderung kann das Wachstum des Polymers in Echtzeit verfolgt werden. Eigenschaften des Polymers wie die Wasserabsorption können mit der QCM-D-Technik untersucht werden (Kitano *et al.*, 2009). Für die Bildung eines Polymers werden auch andere Polymerisationsmethoden, wie zum Beispiel die Elektropolymerisation, genutzt. Auch hier lässt sich der Polymerisationsverlauf mit QCM untersuchen (Taranekekar *et al.*, 2005). Den Einfluss der Salzkonzentration auf die Phasenumkehrtemperatur des Polymers Poly-N-isopropylacrylamid (PNIPAM) wurde mit der QCM-D-Technik von Jhon *et al.* untersucht

(Jhon *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass bei höheren Salzkonzentrationen die Phasenumkehrtemperatur sinkt. Erklärt wurde die Beobachtung mit dem Hofmeister-Effekt. Dass die temperaturinduzierte Strukturänderung bei diesem Polymer durch eine Dehydratation der Polymerketten erfolgt, zeigten Ishida und Biggs mit der gleichen Technik (Ishida und Biggs, 2007).

### 2.4.5 Bestimmung von kinetischen Parametern

Aus den bei QCM-Experimenten gewonnenen Messdaten lassen sich auch kinetische Parameter von Wechselwirkungen ableiten. Grundlegende Arbeiten dazu stammen von Eddowes (Eddowes, 1987). Für eine reversible Interaktion der Form



gilt für die Assoziation

$$\Delta f = -\frac{k_{ass} c \Delta f_{max}}{k_{ass} c + k_{diss}} (e^{-(k_{ass} c + k_{diss}) t} - 1) \quad (\text{Gleichung 2.11})$$

und für die Dissoziation

$$\Delta f = -\Delta f_0 e^{-k_{diss} (t-t_0)} \quad (\text{Gleichung 2.12})$$

wobei  $k_{ass}$  die Assoziationskonstante,  $k_{diss}$  die Dissoziationskonstante,  $c$  die Konzentration von freiem A (im Durchfluss konstant, daher Reaktion pseudo-erster Ordnung),  $\Delta f_{max}$  die Frequenzverschiebung bei voller Sensorbelegung,  $t$  die Zeit,  $t_0$  die Zeit beim Beginn der Reaktion und  $f_0$  die Frequenz zum Zeitpunkt  $t_0$  sind. Durch nichtlineare Regression der Verläufe der Frequenzänderung als Funktion der Zeit lassen sich  $k_{ass}$  und  $k_{diss}$  bestimmen. Die Gleichgewichtskonstante  $K_D$  ergibt sich dann nach

$$K_D = \frac{k_{diss}}{k_{ass}} \quad (\text{Gleichung 2.13})$$

Mit der Voraussetzung gleichberechtigter und homogen verteilter Bindungsplätze auf dem Sensor lassen sich die Bindungskonstanten ( $K_L$ ) auch durch Anpassung an eine Langmuir-Adsorptionsisotherme ermitteln.

$$\Delta f = \Delta f_{\max} \frac{K_L C_{\text{Ligand}}}{1 + K_L C_{\text{Ligand}}} \quad (\text{Gleichung 2.14})$$

Für kinetische Untersuchungen war die Zucker-Lektin-Wechselwirkung Gegenstand mehrerer Arbeiten (Ebara und Okahata, 1994; Pei *et al.*, 2005). Zhang *et al.* immobilisierten Heparin auf dem Sensorquarz und bestimmten  $k_{\text{ass}}$ ,  $k_{\text{diss}}$  und  $K_D$  für verschiedene Konzentrationen von Antithrombin III (Zhang *et al.*, 2005a). Die kinetischen Parameter für die Interaktion von Immunglobulin G und Histidin wurden von Liu *et al.* mit Hilfe der QCM bestimmt (Liu *et al.*, 2003a). Von pharmazeutischem Interesse sind auch die kinetischen Untersuchungen der Wechselwirkung von Antibiotika mit verschiedenen Proteinen, wie sie für Sulfamethazin und Sulfamethoxazol von Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2003b) und für Kanamycin von Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2005) vorgestellt wurden.

Auch Ligandenaustauschreaktionen unter Nutzung des *Molecular Imprinting* wurden durch QCM-Untersuchungen in ihrer Kinetik beschrieben (Ersöz *et al.*, 2005). Hier wurden für Glucose selektive Kavitäten in einem Polymer gebildet und die Bindungskinetik von Glucosemolekülen bestimmt.

#### 2.4.6 Elektrochemische Quarzmikrobalance

Einige der beschriebenen Anwendungen lassen sich nicht nur durch akustische Volumenwellen analysieren, sondern aufgrund von Ladungstransfers, Oxidations- oder Reduktionsreaktionen auch elektrochemisch. Daher hat sich für eine ganze Reihe von Untersuchungen die Analyse mit beiden Methoden als vorteilhaft erwiesen. Beide Verfahren sind Echtzeit-Messungen, womit eine simultane Analyse in kombinierten Messzellen erwünscht ist, die heute auch kommerziell erhältlich sind. Grundlegende Arbeiten zur elektrochemischen Quarzmikrobalance (EQCM) wurden beispielsweise von Buttry und Ward vorgelegt (Buttry und Ward, 1992). Die dem Medium zugewandte Elektrode des Schwingquarzes dient als Arbeitselektrode, als Gegenelektrode können zum Beispiel Platin oder Gold genutzt werden und als Referenz wird häufig die Silber/Silberchlorid-Elektrode verwendet.

Neben vielen Arbeiten, die die EQCM zur Charakterisierung von Monolagen auf der Goldelektrode nutzen [u.a. (Kawaguchi *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 2003)], stellen zunehmend auch biowissenschaftliche und polymertechnische Untersuchungen ein Einsatzgebiet der EQCM dar.

Christ *et al.* untersuchten den Einfluss von Ketoprofen bei verschieden starker UV-Bestrahlung auf die Permeabilität von Bilayern mittels EQCM (Christ *et al.*, 2005). Die Autoren konnten mit der kombinierten Untersuchungsmethode die Schädigung von Doppelmembranen aus gesättigten und ungesättigten Phospholipiden zeigen. Das Ausmaß einer Bilirubinadsorption an einem Phosphatidylcholin-Bilayer untersuchten Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2007). Es wurden Einflüsse durch Variation von pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke untersucht, die Adsorptionskinetik bestimmt und die photoinduzierte Zersetzung des Bilirubins auf dem Bilayer charakterisiert. Die Adsorption von Proteinen auf einer Platinelektrode in Abhängigkeit ihrer pH-induzierten Konformationsänderung wurde von Cosman und Roscoe beschrieben (Cosman und Roscoe, 2004). Die Autoren zeigten die für Biosensoren wichtige Möglichkeit, Änderungen in der Verteilung des Lösungsmittels, hier für Proteinschichten, durch EQCM-Experimente zu beschreiben. Die elektrostatische Inkorporation von anti-human IgG in einen Polymerfilm wurde von He *et al.* gezeigt (He *et al.*, 2005). Zusätzlich wurde der Polymerfilm hinsichtlich seiner Porosität untersucht und die Assoziationskonstante der IgG-Bindung bestimmt.

Weiterhin sind Untersuchungen zu Bildung, Wachstum und Charakterisierung von Polymeren ein wichtiges Anwendungsgebiet für die EQCM. Ein Beispiel zeigten Schneider *et al.* (Schneider *et al.*, 2005) mit der Untersuchung zur Elektropolymerisation von Benzen und der Charakterisierung des Ionenaustauschs des entstandenen Polymers. Auch Bauermann und Bartlett analysierten die Wanderung von Ionen und Lösungsmittel in Polymerschichten während eines Redoxprozesses (Bauermann und Bartlett, 2005). Dass sich auch die rheologischen Eigenschaften von Polymeren unter wechselnden elektrochemischen Bedingungen mit der Methode charakterisieren lassen, wurde von Brown *et al.* in ihrer Arbeit vorgestellt (Brown *et al.*, 2000).

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Das Experimentalsystem LiquiLab 21

Für die in dieser Arbeit vorgestellten QCM-Experimente stand das Experimentalsystem LiquiLab 21 vom Institut für Automation und Kommunikation e.V. (ifak e.V., Barleben) zur Verfügung. Das LiquiLab 21 ist ein modular aufgebautes Messsystem, mit dem bis zu vier Messzellen für je einen Quarzsensoren parallel betrieben werden können (Auge, 2005). Verwendung fanden bei den vorgestellten Experimenten AT-geschnittene 10 MHz Quarzsensoren (Quarz Technik GmbH, Daun und Lap-Tech Inc., Bowmanville, Kanada) mit einem Durchmesser von 14 mm. Die Anordnung in einem Mini-Inkubator 4010 (Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel) ermöglicht eine sehr genaue Temperaturregulierung. Dazu erfolgt eine Temperaturüberwachung durch ein Pt100-Element im Innenraum. Die Nutzung einer im Geräteboden verbauten Gegenkühlung ermöglicht eine weitere Verbesserung der Temperaturstabilität. An das verwendete LiquiLab 21 wurde dazu ein Julabo F25-EC Kälteumwälzthermostat angeschlossen und mit einer Diethylenglykol/Wasser-Mischung (40:60, *m/m*) betrieben.

Das LiquiLab 21 arbeitet nach dem Prinzip der Fließinjektion (*flow injection analysis*, FIA), bei dem die Proben in einem Lösungsmittelfluss auf die Sensoren gebracht werden. Für einen pulsationsarmen Transport der Spül- und Probemedien werden im LiquiLab 21 bis zu zwei 12-Rollen-Schlauchpumpen (Reglo analog 2/12 bzw. 4/12, ISMATEC Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld) verwendet. Diese lassen sich sowohl innerhalb als auch außerhalb des Inkubators platzieren. Der Transport der verwendeten Medien erfolgte in Silikon-Kautschukschläuchen mit einem Innendurchmesser von 1,0 mm und einer Wandstärke von 0,5 mm (DEAKTA Isolier- und Messtechnik GmbH & Co. KG, Norderstedt).

Die parallele Datenerfassung und –visualisierung aller Sensorsignale erfolgt über eine zum Messgerät gehörende Software. Das LiquiLab 21 kann dazu über eine RS232-Schnittstelle angeschlossen oder über eine Ethernet-Schnittstelle in einem Netzwerk betrieben werden. Die Aufzeichnung der Sensorsignale erfolgt üblicherweise mit einer Auflösung von 1 Hz. Neben der Erfassung der Schwingungsfrequenz erlaubt das LiquiLab 21 auch eine qualitative Dämpfungsanalyse. Der Verstärkungsgrad am Operationsverstärker der Oszillatorschaltung nimmt bei zunehmender Bedämpfung des Quarzsensors ab. Um ein Ende der Oszillation bei höherviskosen Medien zu verhindern, wird die Ausgangsspannung des Operationsverstärkers durch einen PI-Regler kontrolliert, gleichgerichtet und mit einem Sollwert verglichen. Veränderungen führen zu einer zusätzlichen Verstärkung, die die Verluste durch die Dämpfung kompensiert. Die Ausgangsspannung des PI-Reglers ist damit ein Maß für die Impedanz des Schwingquarzes. Sie wird zur besseren Erfassbarkeit in eine Frequenz ( $f_{\text{damp}}$ ) umgewandelt, die proportional zur Impedanz ist (Schröder *et al.*, 2002).

Eine Reihe von Modifikationen und Erweiterungen wurden an dem verwendeten LiquiLab 21 durchgeführt, um Reproduzierbarkeit und Handhabung zu verbessern. Die elektrische Trennung von Oszillatorelektronik und Heizsystem erwies sich als sehr hilfreich, um nicht bei jedem Wechsel einer Messzelle oder eines Sensors die eingestellte Temperatur neu einregeln zu müssen. Zu dem beschriebenen System von Pumpen und Schläuchen wurden direkt vor den Messzellen Blasenfallen angebracht, die in vielen Fällen Luftblasen auf dem Sensor und damit einen möglichen Abbruch des Experiments verhindern konnten. Dafür wurde ein Totvolumen von ca. 500  $\mu\text{L}$  in den Blasenfallen in Kauf genommen. Das gesamte Gerät wurde nachträglich mit einem schaumstoffisolierten Stahlblechmantel versehen, der in erster Linie zur besseren Temperaturstabilisierung diente und gleichzeitig elektromagnetische Störeinflüsse auf die Oszillatorschaltungen minimierte. Zur besseren Luftumwälzung innerhalb des Inkubators wurde ein weiterer Ventilator im Innenraum installiert. Mit diesen verschiedenen Maßnahmen konnte die Temperatur auch bei veränderten Umgebungsbedingungen auf  $\pm 0,1$  K stabilisiert werden. Messungen fanden meist bei einer Temperatur von 25 °C statt.

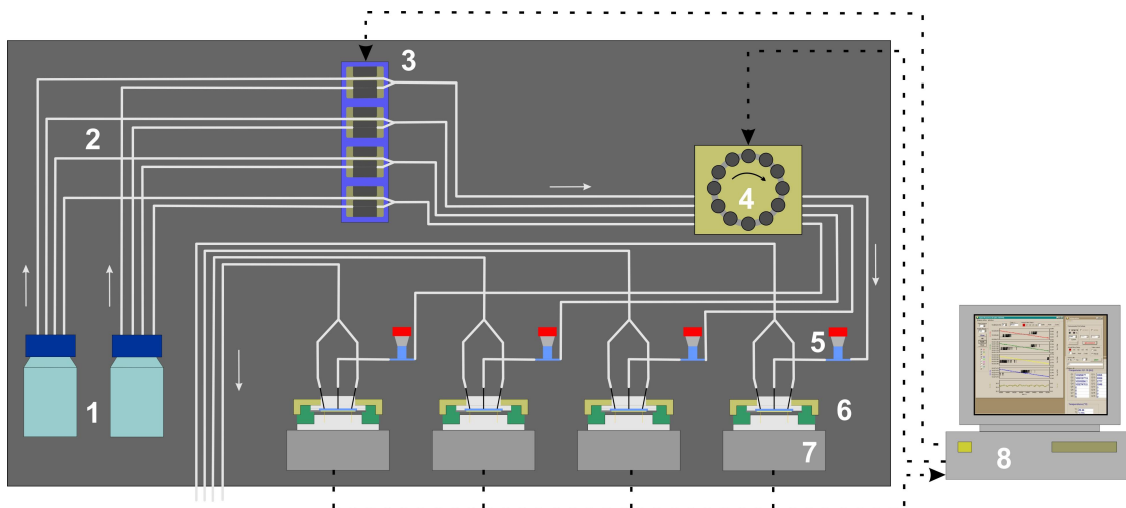


Abb. 3.1.3: Schema eines einfachen Versuchsaufbaus mit vier parallel betriebenen Messzellen.  
 1: Vorratsgefäße für Medien, 2: Schlauchverbindungen, 3: Ventile, 4: Pumpe, 5: Blasenfalle,  
 6: Messzelle, 7: Oszillatorelektronik, 8: Messrechner.

Die aus Polymethylmethacrylat gefertigten Messzellen des LiquiLab 21 wurden durch neu konstruierte Messzellen ersetzt. Dazu wurde ein am Institut für Mikro- und Sensorsysteme der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg entwickeltes Messzellendesign für das LiquiLab 21 angepasst. Hierbei werden die Quarzsensoren nicht mehr mittels eines leitenden Grafitrings fixiert, sondern der seitlich durch einen Fluor-Kautschuk-Ring eingefasste Sensorquarz wird über Federstifte kontaktiert. Diese seitliche Fassung des Quarzes in einem verschraubten Edelstahlring ermöglicht eine deutlich bessere Handhabung bei Reinigungs- und Beschichtungsvorgängen. Die Sensoren müssen dadurch nicht für jedes Experiment neu fixiert werden, sondern verbleiben in ihrer Fassung, die für Experimente in die Messzelle eingelegt wird. Insgesamt erwiesen sich die neu konstruierten Messzellen als deutlich robuster in der Handhabung. Die Deckel der Messzellen verfügen über Ein- und Auslässe, die durch Kanülen realisiert wurden. Hiermit ist ein einfacher Anschluss an die verwendeten Schläuche möglich. Zwei Arten in der Anordnung der Ein- und Auslässe wurden eingesetzt. Einerseits fanden Deckel mit nur einem Ein- und einem Auslass im Randbereich des kreisförmigen Deckels Verwendung, um im besonders sensitiven Zentrum des Sensors einen möglichst gleichmäßigen Fluss zu erzeugen. Die andere Variante des Messzellendeckels verfügte über einen zentralen Einlass und zwei außen gelegene Auslässe, um eine Wirbelströmung zu ermöglichen. Die erste Form wurde vorwiegend bei Beschichtungsexperimenten eingesetzt, die zweite bei



Adhäsionsversuchen zum Beispiel mit Liposomen. Die Deckel der Messzellen wurden außerdem aus unterschiedlichem Material gefertigt. Normalerweise wurden Deckel aus Polycarbonat verwendet, weil hierdurch eine optische Kontrolle des Sensors möglich ist. Für Experimente mit Stoffen, gegen die Polycarbonat nicht stabil ist, wurden aus Polytetrafluorethylen oder Keramik gefertigte Deckel verwendet. Damit sind zum Beispiel auch Messungen mit organischen Lösungsmitteln möglich.

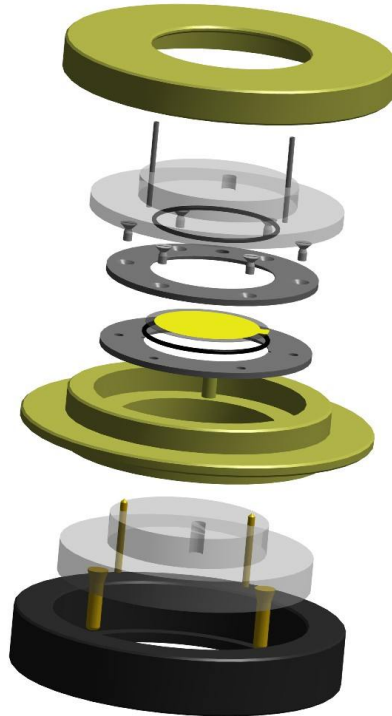


Abb. 3.1.2: Zeichnung der entwickelten Messzelle.

Als zusätzliche Erweiterung wurde die Kontrolle der Medienströme durch eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte automatisierte Ventilsteuerung eingerichtet. Dazu dienten acht 12 Volt-Micro-Schlauchquetschventile (Asco Joucomatic GmbH, Ölbronn-Dürren). Mit ihnen konnte der Medienfluss durch die verwendeten Silikonschläuche gestoppt werden, womit bei entsprechendem Aufbau des Schlauchsystems einen geregelter Zufluss von Proben- oder Spüllösungen ermöglicht werden konnte. Außerdem ließen sich so Probenschleifen realisieren, mit denen bestimmte Volumina wiederholt über den Sensor geleitet werden können. Diese Steuerung wurde zunächst unter Verwendung eines entsprechenden 12 Volt-Netzteils über manuell zu betätigende Schalter ermöglicht. Nachteilig dabei ist die Notwendigkeit, zu den geplanten Schaltvorgängen die Ventile per Hand zu schalten. Gerade bei längeren Experimenten erwies sich das als unpraktisch.

Daher wurde die beschriebene Schaltung zu einer computergestützten, automatisierten Ventilsteuerung erweitert, die in ihrer Funktionsweise kurz beschrieben werden soll. Eine mittels USB-Anschluss mit einem Computer verbundene Schalt- und Steuerbox (ME-Redlab PMD-1024LS, Meilhaus Electronic GmbH, Puchheim) wandelt die digitalen Ausgangssignale des Rechners in analoge Signale um. Um die Schlauchquetschventile schalten zu können, werden diese Signale durch eine Darlington-Schaltung (ULN2803A, STMicroelectronics N.V., Amsterdam, Niederlande) verstärkt. Somit können Relais (PCB Relay G5V-12, Omron GmbH, Nufingen) geschaltet werden, die den Stromkreis der einzelnen Ventile unterbrechen bzw. schließen. Die beschriebene Schaltung wurde auf einer Leiterplatte realisiert und zusätzlich zu den manuellen Schaltern angeordnet. Abbildung 3.1.3 zeigt den Schaltplan der Steuerung.

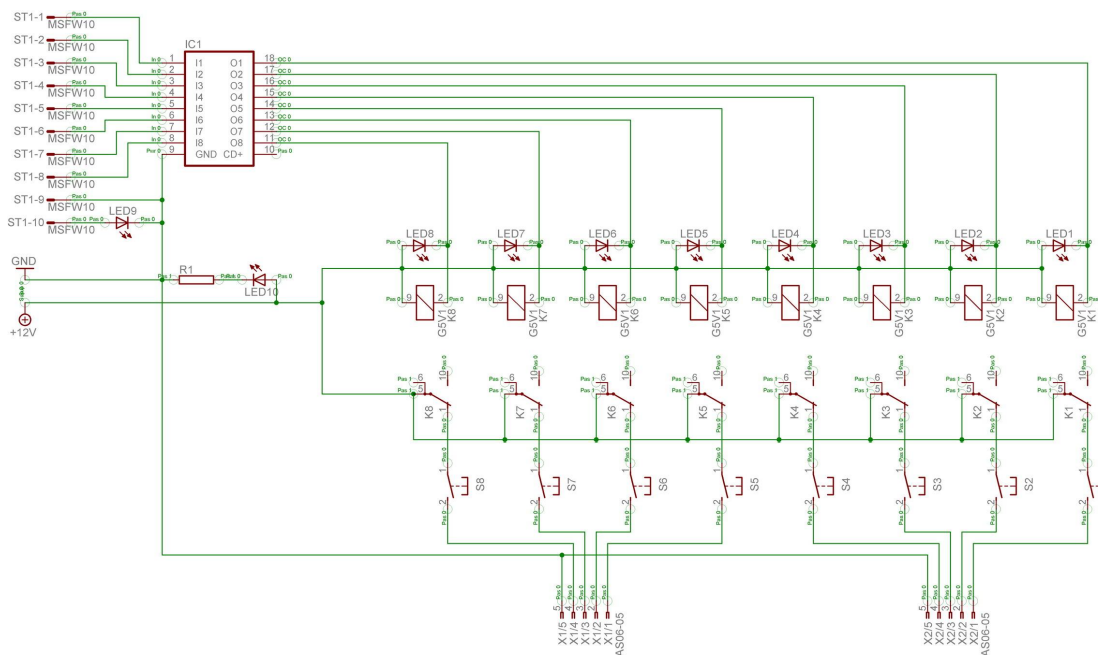


Abb. 3.1.3: Schaltplan der entwickelten Ventilsteuerung mit den Anschlüssen an die Schaltbox (ST1-1 bis ST1-10), der Darlington-Schaltung (IC1), den Relais (K1 bis K8), den manuellen Schaltern (S1 bis S8) und den Anschlüssen an die Schlauchquetschventile.

Die dazu passende Steuerungssoftware wurde mittels VisualBasic.NET (Microsoft Corporation, Redmond, WA; USA) unter Verwendung der grafischen Programmiererweiterung SoftWIRE 5.1 (Plug-In Electronic GmbH, Eichenau) erstellt. Sie erlaubt es, die Ventile per Mausklick zu bedienen oder bis zu 15 Schaltpunkte für jedes der acht Ventile festzulegen. Die Programmoberfläche ist in Abbildung 3.1.4 gezeigt.

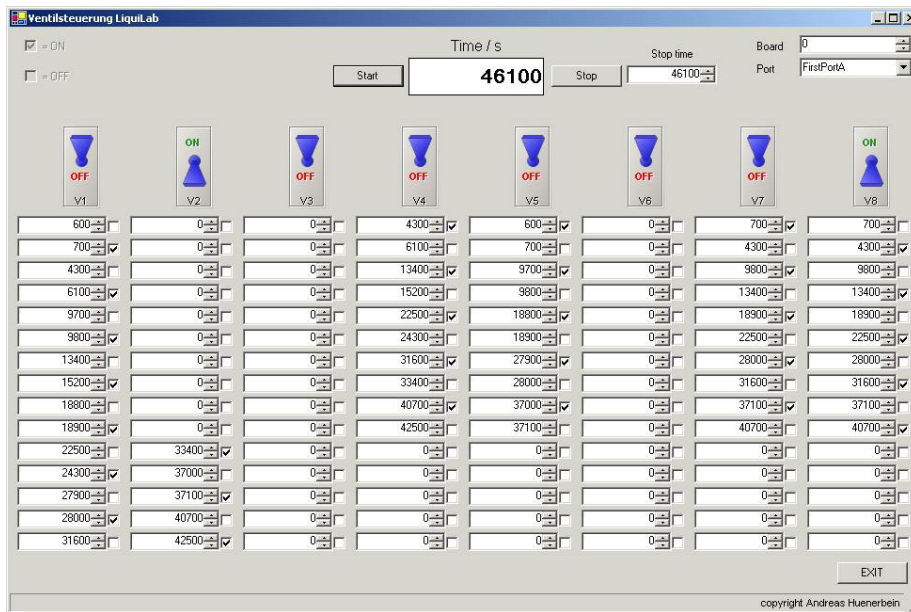


Abb. 3.1.4: Programmoberfläche der Software zur Ventilsteuerung.

Die Automatisierung von Medienfluss und Probenzugabe bei QCM-Messungen ist inzwischen ein wichtiger Teil der Produktentwicklung bei QCM-Geräten. So entwickelte die Firma Q-Sense einen Autosampler für ihr Q-Sense E4 (Q-Sense, 2009).

## 3.2 Funktionalisierung der Sensoroberfläche

Sollen Wechselwirkungen nicht nur direkt mit der Sensoroberfläche untersucht werden, ist die Immobilisierung eines Wechselwirkungspartners auf dem Sensor unbedingte Voraussetzung bei QCM-Experimenten. Dabei ist zu beachten, dass die aufgebrachtten Schichten entscheidend für die Sensitivität und Selektivität des Sensors sind und die Güte der Resonanzschwingung beeinflusst wird. Beschichtungen sollten stabil gegenüber den Bedingungen des Experimentes sein. Außerdem ist es erforderlich, dass sie gut reproduzierbar sind.

### 3.2.1 Methoden der Funktionalisierung

Für das mechanische Aufbringen von Schichten auf den Sensor stehen im Wesentlichen zwei Methoden zur Verfügung. Beim *Drop-Coating* wird der zu fixierende Stoff in leicht flüchtigen Lösungsmitteln gelöst und in Volumina von wenigen Mikrolitern auf den Sensor aufgetropft. Das Lösungsmittel verdampft und der zu fixierende Stoff verbleibt auf

der Sensoroberfläche. Nachteilig auf die Güte der Resonanzschwingung wirken sich die dabei entstehenden sehr inhomogenen Schichten aus. Erweitert man diese Methode, indem man den zu beschichtenden Sensor mit mehreren tausend Umdrehungen pro Minute horizontal rotieren lässt, spricht man vom *Spin-Coating*, womit relativ homogene und je nach Konzentration der applizierten Lösung auch sehr dünne Schichten erhalten werden können. Die zweite Methode zum mechanischen Aufbringen einer Sensorbeschichtung nutzt das Versprühen der betreffenden Substanzen. Das kann mittels *Airbrush*-Verfahren geschehen, wobei die Lösung der Substanz in einem flüchtigen Lösungsmittel durch Druckluft zerstäubt wird. Auch hier entstehen meist relativ inhomogene Schichten und durch die Ausbildung eines Spray-Kegels muss mit einem höheren Substanzverbrauch gerechnet werden. Mit einem zum Beispiel auch in der Massenspektrometrie zur Ionisierung genutzten Elektrospray kann eine deutlich feinere Verteilung der betreffenden Substanz erreicht werden. Dazu wird die Beschichtungslösung beispielsweise mittels Schrittmotor aus einer Hamiltonspritze freigesetzt und in einem Hochspannungsfeld zwischen der Kanüle der Spritze und dem Sensor sehr fein verteilt. Von den beschriebenen Methoden wurde das Spin-Coating in den Arbeiten im Abschnitt 4.5 verwendet.

Weitere Beschichtungsmethoden nutzen die Wechselwirkung zwischen Substanz und der Sensoroberfläche. Dabei werden zum einen unspezifische Wechselwirkungen ausgenutzt, wie sie bei der Adhäsion von Tensiden oder Proteinen an die Sensoroberfläche auftreten. Ausgehend von der Goldschicht des Sensors lassen sich aber auch spezifische Wechselwirkungen bis hin zu kovalenten Bindungen durch funktionelle Gruppen nutzen, um gezielt Schichten aufzubauen. Eine sehr häufig genutzte Methode ist die Verwendung von Thiolen zur kovalenten Bindung an die Goldoberfläche. So lassen sich einer Sensoroberfläche zum Beispiel hydrophile oder hydrophobe Eigenschaften verleihen, indem man Alkanthiole ohne weitere funktionelle Gruppen oder mit hydrophilen Alkohol- oder Carboxylgruppen an die Sensoroberfläche bindet. Dabei entstehen hochgeordnete Schichten, sog. *self assembled monolayer* (SAM) (Nakano *et al.*, 2000; Chaki und Vijayamohanan, 2002; Morita *et al.*, 2006). Diese lassen sich unter Nutzung von klassischen Kopplungsreaktionen der organischen Chemie als Grundlage für einen komplexeren Schichtaufbau nutzen, wie dies zum Beispiel in Abschnitt 4.6 beschrieben ist. Auch die Verwendung von Silanen zur Erzeugung von stabilen, reproduzierbaren Schichten auf piezoelektrischen Sensoren wurde beschrieben (Suri und Mishra, 1996).

Eine relativ neue Methode zur Realisierung von Strukturen für spezifische Erkennungsprozesse, zum Beispiel für Biosensoren, stellt das sog. *Molecular Imprinting* dar (Hillberg und Tabrizian, 2008). Dabei wird um ein als „Schablone“ dienendes Molekül herum ein Polymernetzwerk gebildet. Nach dem Auswaschen der Schablone verbleibt im Polymer ein Hohlraum (*imprint*), der zur Zielstruktur komplementär ist und beispielsweise über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit der Zielstruktur interagieren kann. Zur Bildung von *Molecular Imprinted Polymers* (MIP) können auch Photoreaktionen genutzt werden (Piacham *et al.*, 2005). Beispiele für die Anwendung bei QCM finden sich für die Untersuchung von Ligandenaustauschreaktionen (Ersöz *et al.*, 2005) und den Nachweis von Steroiden (Percival *et al.*, 2002).

### **3.2.2 Reinigung der Sensoroberfläche**

Die Reinigung der Sensoroberfläche gehört als Vorbereitung zu jeder Verwendung eines Quarzsensors. Vollständige und möglichst schonende Reinigung der Sensoroberfläche erlauben auch eine Wiederverwendung der Sensoren. Mechanische Methoden haben den Nachteil, dass sie Beschädigungen, zum Beispiel in Form von Kratzern in der Goldschicht, verursachen können. Das wirkt sich negativ auf die Güte des Sensors aus, und kann bei zu starker Beschädigung auch zum Ablösen der metallischen Beschichtung führen.

Bei FIA-Systemen können lose anhaftende Beschichtungen, wie zum Beispiel Liposomen, mit einem Fluss einer Detergenzlösung entfernt werden. Für die Reinigung fest anhaftender Schichten werden lösende und oxidierende Substanzen eingesetzt. Mischungen aus konzentrierter Schwefelsäure und 30 %igem Wasserstoffperoxid (Verhältnis 1:3, sog. Piranha-Lösung) oder in konzentrierter Schwefelsäure gelöstem Kaliumpermanganat werden für wenige Sekunden auf den zu reinigenden Quarz aufgebracht und anschließend gründlich abgespült. Auch eine zusätzliche Ultraschallbehandlung wird in einigen Reinigungsprotokollen angegeben. Diese kann aber unter Umständen auch zum Ablösen der Metallschichten führen.

Eine elegante Methode zur Reinigung stellt die Nutzung von UV und Ozon dar. Dafür stehen spezielle Lampen zur Verfügung. Beispielhaft soll die XERADEX<sup>TM</sup>-Lampe (Radium Lampenwerke GmbH, Wipperfürth) genannt werden. Noch mehr als bei der nasschemisch-oxidativen Reinigung entsteht durch die UV/Ozon-Behandlung eine sehr reaktive Goldoberfläche. Daher sollten frisch gereinigte Quarze möglichst schnell für Beschichtungen und Experimente weiterverwendet werden.

Die in dieser Arbeit genutzten Quarze wurden vorwiegend mit Kaliumpermanganat in Schwefelsäure gereinigt.

### **3.3 Methoden zur Überprüfung der Sensorbeschichtung**

Die im Folgenden vorgestellten Analysemethoden sind geeignet, die Sensoroberfläche und -beschichtung näher zu untersuchen. Sie können dazu dienen, die Funktionalisierung eingehender zu charakterisieren, Reinigungsschritte zu überprüfen oder Adhäsions- und Abbauprozesse unabhängig von der Sensorantwort zu bewerten.

#### **3.3.1 Rasterkraftmikroskopie**

Die 1986 vorgestellte Messtechnik der Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM) (Binnig *et al.*, 1986) bietet, im Unterschied zur Rastertunnelmikroskopie, die Möglichkeit, auch von nicht elektrisch leitenden Proben sehr genaue Abbilder der Oberflächentopographie zu erhalten. Damit sind vielfältige Anwendungsmöglichkeiten der AFM gegeben. Bedingt durch den Einsatz anwenderfreundlicher Analysesoftware ist sie heute in verschiedensten Forschungsrichtungen eine wichtige Untersuchungsmethode (West und Starostina, 2004). Die prinzipielle Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops kann anhand seines Aufbaus beschrieben werden. Eine Messspitze (engl. *tip*) mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern ist an einem Federarm (engl. *cantilever*) befestigt, der sich in Folge auftretender Kräfte zwischen Messspitze und Probe biegt. Die Auslenkung des Federarms wird typischerweise durch optische Sensoren bestimmt. Ein Laserstrahl wird dazu auf den Federarm gerichtet und reflektiert. Photodioden dienen zur Bestimmung der Lage des Laserpunktes und damit zur Ermittlung der Biegung des Federarmes. Die Aufnahme mehrerer Messpunkte auf einer Probenoberfläche ermöglichen piezoelektrische Stellelemente. Durch sie wird entweder die Messspitze über die Probe oder die Probe unter einer feststehenden Messspitze bewegt.

In Bezug auf die Wechselwirkung zwischen Probe und Messspitze lässt sich das Verfahren in verschiedene Betriebsmodi unterscheiden. Im Kontakt-Modus (engl. *contact mode*) steht die Messspitze in direktem Kontakt mit der Probenoberfläche, weshalb sich dieser Modus besonders für harte Oberflächen, wie zum Beispiel die Goldschicht eines nicht

funktionalisierten Schwingquarzes, eignet. Die statische Auslenkung des Federarms ergibt hier die Informationen zur Oberflächentopographie. Im Nicht-Kontakt-Modus (engl. *non-contact mode* oder *dynamic mode*) wird der Federarm zu Schwingungen angeregt, deren Frequenz sich in Folge wechselnder Kräfte zwischen Probenoberfläche und Messspitze ändert.

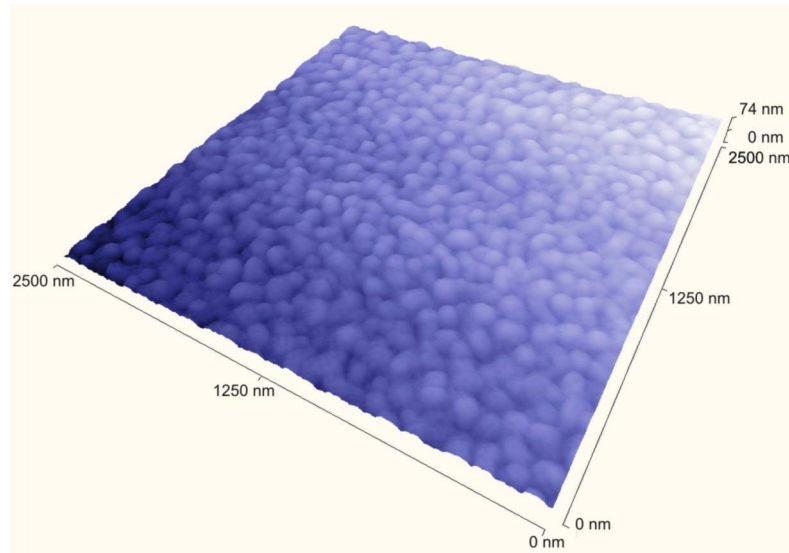


Abb. 3.3.1: AFM-Aufnahme zur Abbildung der Oberflächenmorphologie der Goldelektrode eines Schwingquarzes.

Im Zusammenhang mit QCM-Untersuchungen findet die AFM Anwendung zur näheren Charakterisierung immobilisierter Schichten aus Thiolen, Lipiden (Kim *et al.*, 1999; Naumann *et al.*, 2003) oder Polymeren (Mellbring *et al.*, 2001). Die Adhäsion von Lipidvesikeln (Richter *et al.*, 2003) oder die Wechselwirkung von Mikroorganismen mit Oberflächenstrukturen (Hayden *et al.*, 2003) wurden ebenfalls mit beiden Methoden untersucht. Zudem konnten beide Methoden auch apparativ kombiniert werden, um Parallelmessungen zu ermöglichen (Richter und Brisson, 2004).

### 3.3.2 Kontaktwinkelmessung

Flüssigkeitstropfen bilden auf festen Körpern mit deren Oberfläche einen Winkel. Für Messungen des Kontaktwinkels wird im Dreiphasenpunkt eine Tangente an den Flüssigkeitstropfen gelegt. Der Winkel der Tangente zur Festkörperoberfläche ist als Kontaktwinkel definiert. Er lässt Aussagen über die Stärke der Wechselwirkung zu. Für den häufigsten Spezialfall, der Kontaktwinkelbestimmung mit Wasser, ergeben sich Aussagen zur Hydrophilie bzw. Hydrophobie der Oberfläche. Der Messwert wird dabei

von Faktoren wie Temperatur, Oxidationsgrad oder Rauigkeit der Oberfläche beeinflusst. Für die Kontaktwinkelmessung von Wassertropfen auf Schwingquarzoberflächen wurde ein einfaches Messsystem angefertigt (Abbildung 3.3.2A). Ein in Längsposition und Höhe verstellbarer Probenstisch wird so vor einer Kamera positioniert, dass das der Kamera entgegenstrahlende Licht im Bild einen dunklen Tropfen vor hellem Hintergrund ergibt. Dabei sind scharfe Konturen des Tropfens, besonders im Dreiphasenpunkt, wichtig für die Auswertung. Der Einsatz einer an einen Computer angeschlossenen CCD-Kamera erlaubt die schnelle Aufnahme und Speicherung mehrerer Bilder und eine zeitversetzte Bestimmung des Kontaktwinkels.

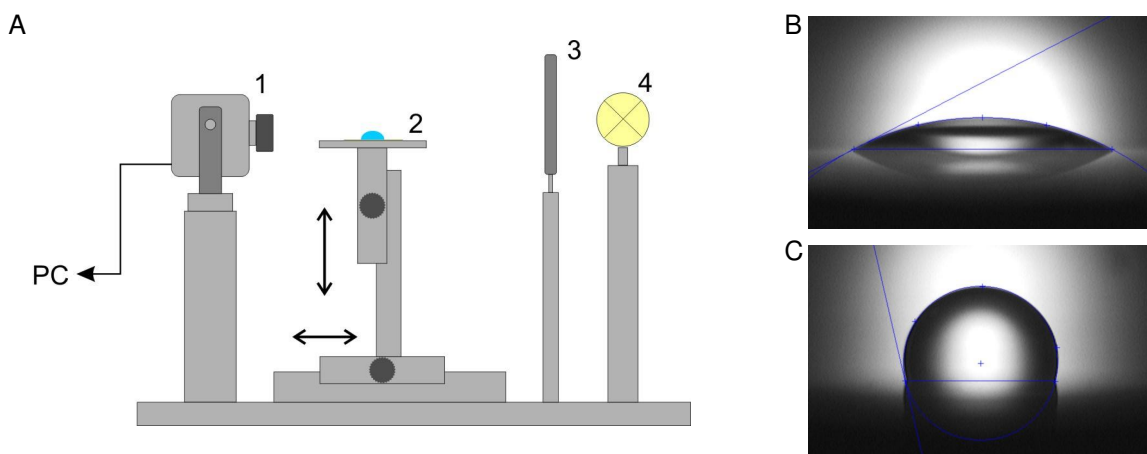


Abb. 3.3.2: A: Skizze des Messaufbaus mit der an einen PC angeschlossenen CCD-Kamera (1), einem in Höhe und Entfernung zur Kamera verstellbaren Probenstisch zum Ablegen eines Schwingquarzes (2), einem Schirm zur Erzeugung eines diffusen Gegenlichts (3) und einer Leuchtquelle (4). B: Bild eines Wassertropfens mit Kontaktwinkel auf einem hydrophil beschichteten Schwingquarz. C: Bild eines Wassertropfens mit Kontaktwinkel auf einem hydrophob beschichteten Schwingquarz.

Für die Bestimmung der Kontaktwinkel wurden jeweils 3  $\mu\text{L}$  bidestilliertes Wasser auf die Oberfläche des vor der Kamera positionierten Schwingquarzes pipettiert und das Bild sofort gespeichert. Die Auswertung kann mit entsprechenden Computerprogrammen erfolgen (zum Beispiel der Software SURFTENS der OEG GmbH, Frankfurt/Oder).

### 3.3.3 Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie

Eine spektroskopische Methode zur Untersuchung oberflächengebundener Stoffe stellt die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) dar. Mit ihr können dünne



Schichten und Moleküle auf Oberflächen charakterisiert werden. Verwendet wird die Methode auch zur Untersuchung von Filmen an Wasser/Luft-Grenzflächen, meist unter Verwendung der Langmuir-Blodgett-Technik. Bei dieser Variante der Infrarot-Spektroskopie wird das Licht über ein Spiegelsystem auf die Probe gestrahlt und von dieser reflektiert. Der Einfallswinkel lässt sich dabei typischerweise stufenlos variieren. Durch Verwendung der Polarisations-Modulations-Technik (PM-IRRAS) kann die Empfindlichkeit der Methode deutlich gesteigert werden. So sind mit geeigneten Geräten Messungen von molekularen Monolagen möglich (Zawisza *et al.*, 2004). Die kombinierte Anwendung von IRRAS und QCM findet sich in einer wachsenden Zahl von Veröffentlichungen wieder (Nakano *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004). Für IRRAS-Messungen wurde in dieser Arbeit ein Vertex 70 (Bruker Optik, Ettlingen) mit einer speziellen IRRAS-Einheit verwendet.

### **3.3.4 Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie beruht auf der Möglichkeit, gasförmige Ionen mit unterschiedlichen physikalischen Techniken nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) zu trennen. Bei der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) erfolgt die Ionisation aus fester Phase. Dazu wird die flüssige Probe beispielsweise mit der Lösung einer sogenannten Matrixsubstanz gemischt und auf einem metallischen Probenträger getrocknet (*dried-droplet*-Methode) oder Probe und Lösung werden übereinander geschichtet (*thin-layer*-Methode). Die kokristallisierte Analyt-Matrix-Mischung wird in der Ionenquelle mit kurzen, hochenergetischen UV-Laserimpulsen bestrahlt. Die Matrixsubstanz absorbiert die Laserenergie und über Gerüstschwingungen kommt es zur Desorption, bei der die Analytmoleküle in die Gasphase überführt und ionisiert werden. Vorwiegend wird im Positivmodus gearbeitet, wobei meist  $[M+H]^+$ - und  $[M+Na]^+$ -Ionen gebildet werden. Der Negativmodus wird bei aziden Verbindungen ebenfalls eingesetzt.

Als Matrixsubstanzen eignen sich aromatische Verbindungen, die entsprechende Absorptions- und Kristallisationseigenschaften haben, wie zum Beispiel 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB),  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) oder Sinapinsäure.

MALDI wird oft mit einem Flugzeitanalysator (*Time of Flight*, ToF) gekoppelt, mit dem sich ein weiter Massenbereich, bei speziellen Geräten bis in den Mega-Dalton-Bereich, abdecken lässt. Damit ist die Methode auch zur Molmassenbestimmung von Proteinen und zur Untersuchung der Molmassenverteilung von Polymeren geeignet. Insgesamt stellt MALDI-ToF ein schonendes Verfahren dar, bei dem auch empfindliche Makromoleküle intakt analysiert werden können.

MALDI-MS ist ein nützliches Werkzeug zur Oberflächenanalyse. Sie ist anwendbar sowohl für die Identifikation biologischer Stoffe, als auch zur Analyse von Biomolekülen und Oberflächen (Griesser *et al.*, 2004). MALDI-Imaging erlaubt darüber hinaus ein zweidimensionales Scannen von Oberflächen. Die Oberfläche wird dabei abgerastert und pro Messpunkt wird ein Massenspektrum aufgenommen, wobei einer Masse eine Signalintensität zugeordnet werden kann. Die Auflösung hängt dabei von der Größe des verwendeten Laserspots ab und ist physikalisch nur durch die Wellenlänge des Lasers begrenzt. Spotgrößen zwischen 5 und 100 µm sind gebräuchlich (Todd *et al.*, 2001). Spezielle Varianten erreichen eine effektive laterale Auflösung von 0,6 bis 1,5 µm und die Speicherung von bis zu 160000 Massenspektren in weniger als einer Stunde (Spengler und Hubert, 2002) MALDI-Imaging wurde entwickelt, um synthetische und natürliche Verbindungen in biologischen Proben zu analysieren (Caprioli *et al.*, 1997). Dabei ist auch ein automatisiertes MALDI-Imaging möglich (Stoeckli *et al.*, 1999), das vorteilhaft ist, da sowohl Probenpräparation als auch das Aufbringen der Matrix starken Einfluss auf die Messung haben kann (Garden und Sweedler, 2000; Sugiura *et al.*, 2006). Der Fokus in der Anwendung von MALDI-Imaging liegt bis heute auf der Untersuchung von Geweben. Die Lokalisation und Änderungen in der Verteilung von Peptiden und Proteinen, die als Biomarker oder Zielstrukturen von Interesse sind, wurden untersucht (Chaurand und Caprioli, 2002; Stoeckli *et al.*, 2002; Rohner *et al.*, 2005; Meistermann *et al.*, 2006). Außerdem lässt sich die Lokalisation und Umwandlung pharmazeutischer Wirkstoffe in Haut und Gehirn mit der Methode analysieren (Reyzer *et al.*, 2003; Bunch *et al.*, 2004). Eine aktuelle Übersicht zur Nutzung des MALDI-Imaging in der klinischen Diagnostik geben Franck *et al.* (Franck *et al.*, 2009). Solon *et al.* zeigen in Ihrer Übersichtsarbeit die Möglichkeit, radiochemische Methoden mit MALDI-Imaging zu ergänzen bzw. teilweise zu ersetzen (Solon *et al.*, 2010).

Eine neue Anwendung des MALDI-Imaging zur Analyse von Sensoroberflächen wird in Abschnitt 4.3 beschrieben.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Einfluss des Tensidgehaltes von Liposomen auf das Adsorptionsverhalten an modifizierten Sensoroberflächen

Liposomen sind nach wie vor für die pharmazeutische Forschung von großem Interesse. Die Vielfalt realer und potenzieller Anwendungen, zum Beispiel als Trägersysteme bei der parenteralen und dermalen Arzneistoffapplikation oder als Alternative zu viralen Vektoren in der Gentechnik, erhält den Liposomen die wissenschaftliche Aufmerksamkeit. Anwendungen der QCM in der Forschung zu Liposomen wurden in Abschnitt 2.4.1 vorgestellt. In den im Folgenden dargelegten Experimenten sind modifizierte Liposomen in ihrem Adhäsionsverhalten untersucht worden. Phosphatidylcholin der Sojabohne (SPC) und Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin (POPC) dienten zur Herstellung der Liposomen. Es wurde untersucht, ob ein unterschiedlicher Gehalt von nichtionischen Tensiden Einfluss auf das Adhäsionsverhalten an hydrophil oder hydrophob beschichteten Sensoroberflächen hat. Als Tenside dienten Polyoxyethylen-20-sorbitanmonooleat (Polysorbat 80) und Polyoxyethylen-10-oleylether (Brij 96).

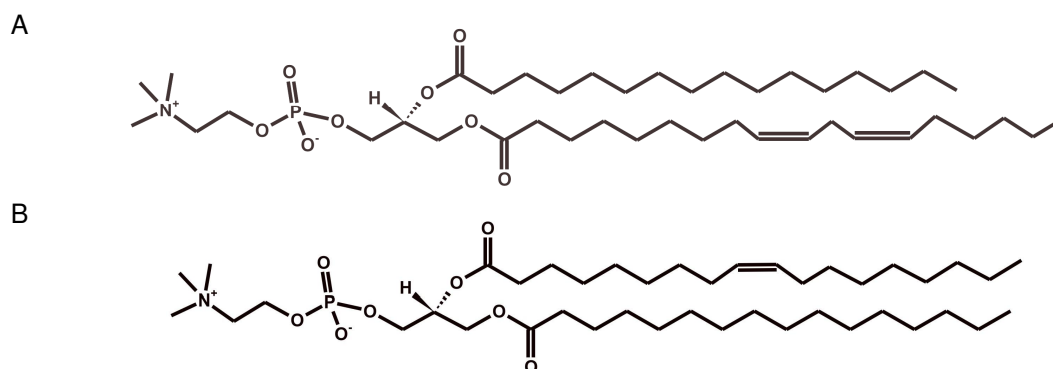


Abb. 4.1.1: Chemische Strukturen der verwendeten Phospholipide. A: Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin als ein möglicher Bestandteil des Stoffgemisches Sojaphosphatidylcholin (SPC). B: Palmitoyl-oleoylphosphatidylcholin (POPC).

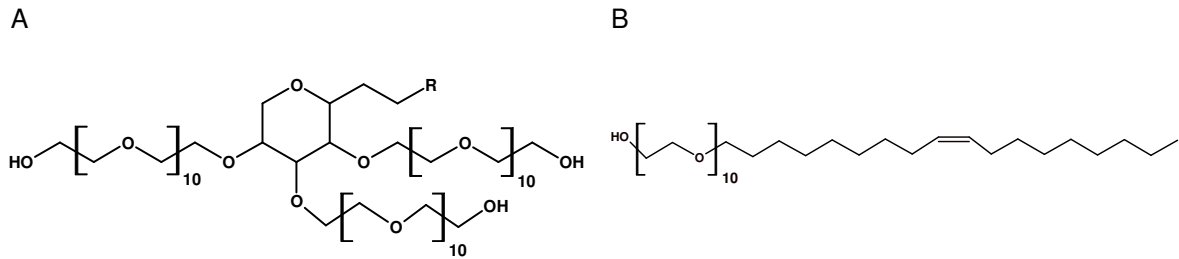


Abb. 4.1.2: Molekülstrukturen der eingesetzten Tenside. A: Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonooleat mit R=Oleat (Polysorbat 80). B: Polyoxyethylen-10-oleylether (Brij 96).

#### 4.1.1 Herstellung der Liposomen und Sensorbeschichtung

Liposomen aus jeweils 10 mM SPC (Phospholipid GmbH, Köln) und POPC (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) wurden mit einem Tensidgehalt von 0 %, 2 %, 5 % und 10 % ihres Phosphatidylcholingehaltes (bezogen auf die molare Konzentration) hergestellt. Die deklarierte Fettsäurezusammensetzung des SPC war 13 % Palmitinsäure, 10 % Ölsäure und 67 % Linolsäure. Die HLB-Werte nach Griffin betragen 15 für Polysorbat 80 (Serva GmbH, Heidelberg) und 12,4 für Brij 96 (Unichema Chemie GmbH, Oberhausen). Für die Herstellung wurden die Lösungen der Phospholipide in Chloroform und der Tenside in Methanol in den jeweiligen Verhältnissen gemischt. Die Lösungsmittel wurden mittels Rotationsverdampfer und anschließender zweistündiger Lagerung im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur entfernt. Die Zugabe von PBS-Puffer und 48-stündiges Schütteln führte zur Bildung der Liposomen. Um einheitliche Vesikelgrößen zu erhalten, wurden die hergestellten Suspensionen durch Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert. Untersuchungen mittels dynamischer Lichtstreuung (Malvern HPPS 5002, Malvern Instruments Ltd., Worcester Shire, UK) wurden zur Kontrolle der Vesikelgröße durchgeführt. Dabei zeigte sich für alle Proben, dass sich bei den verwendeten Tensidkonzentrationen keine zusätzlichen Strukturen wie zum Beispiel Mizellen gebildet haben. Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten von El Maghraby *et al.* (El Maghraby *et al.*, 2004) und Simões *et al.* (Simões *et al.*, 2005) überein. Die ermittelten Polydispersitätsindizes zwischen 0,045 und 0,105 bedeuten eine relative Polydispersität zwischen 21 % und 32 %. Tendenziell zeigte sich bei höheren Tensidkonzentrationen ein leicht geringerer hydrodynamischer Radius. Die Ergebnisse der Lichtstreuungsuntersuchungen sind in Abbildung 4.1.3 zusammengefasst.

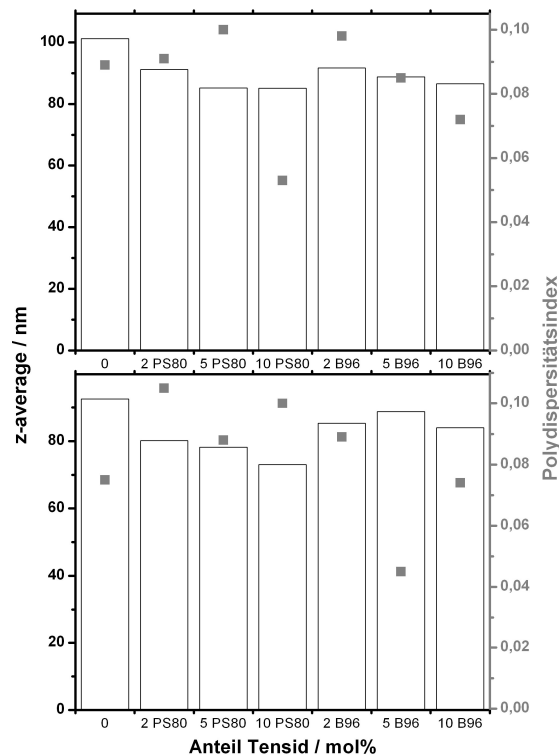


Abb. 4.1.3: Die durchgeführten PCS-Messungen ergaben für POPC-Liposomen (unten) und SPC-Liposomen (oben) eine leichte Abnahme der hydrodynamischen Durchmesser mit steigender Tensidkonzentration (Abkürzungen: PS80 für Polysorbat 80, B96 für Brij96). Die Polydispersitätsindizes (■) lagen im Bereich von 0,045 bis 0,105.

Für eine hydrophile Beschichtung wurden die gereinigten Quarzsensoren für sechs Stunden in 1 mM Mercaptohexadecansäure in Ethanol getaucht. Ein hydrophober SAM wurde durch Eintauchen der Quarze in 1 mM Mercaptohexadecan in Chloroform gebildet. Nach der Beschichtung wurden die Quarze mit reinem Lösungsmittel gespült und unter Stickstoff getrocknet.

#### 4.1.2 Adsorptionsuntersuchungen mittels QCM

Die Proben der hergestellten Liposomen wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  auf die präparierten Quarzsensoren geleitet. Die Werte für die Frequenzänderung ( $\Delta f$ ) und Dämpfungsänderung ( $\Delta f_{\text{damp}}$ ) wurden für zehn Minuten mit einer Rate von 1 Hz aufgezeichnet. Die Temperatur wurde während der Experimente auf  $25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  stabilisiert. Die Messungen für die jeweiligen Beschichtungen, Phospholipide und Tensidkonzentrationen wurden dreifach durchgeführt.

Liposomen ohne Tensidzusatz zeigen auf hydrophilen und hydrophoben Sensoroberflächen sehr verschiedenes Verhalten. So betrug  $\Delta f$  für reine POPC-Liposomen auf mit MHDA beschichteten Sensoren  $-879 \text{ Hz} \pm 22 \text{ Hz}$ , auf mit MHD beschichteten hingegen nur  $-321 \text{ Hz} \pm 13 \text{ Hz}$ . Das Verhältnis bei reinen SPC-Liposomen war entsprechend ( $\Delta f_{\text{hydrophil}} -516 \text{ Hz} \pm 58 \text{ Hz}$  und  $\Delta f_{\text{hydrophob}} -142 \text{ Hz} \pm 9 \text{ Hz}$ ). Die Ursache dafür ist die unterschiedliche Wechselwirkung der Liposomen mit den entsprechend präparierten Oberflächen. So kann die hydrophile Oberfläche der Liposomen deutlich stärker mit den SAMs aus MHDA wechselwirken, woraus deutlich größere Frequenzverschiebungen resultieren. Der Einbau von Tensiden in das Liposom führt zu deutlichen Veränderungen in der Sensorantwort im Vergleich zu den reinen POPC- bzw. SPC-Liposomen. Mit steigender Konzentration des Tensids wurden kleinere Werte für  $\Delta f$  und  $\Delta f_{\text{damp}}$  ermittelt. Das gilt sowohl für die hydrophile als auch für die hydrophobe Sensoroberfläche. Einzige Ausnahme bilden Liposomen mit einem Anteil von 2 mol% Polysorbat 80 auf hydrophoben Oberflächen. Hier betragen die  $\Delta f$ -Werte für die POPC-Liposomen  $-387 \text{ Hz} \pm 7 \text{ Hz}$  (vgl.  $-321 \text{ Hz} \pm 13 \text{ Hz}$  ohne Tensid) und für die SPC-Liposomen  $-149 \text{ Hz} \pm 3 \text{ Hz}$  (vgl.  $-142 \text{ Hz} \pm 9 \text{ Hz}$  ohne Tensid). In diesen Fällen könnte eine verringerte Hydrophilie der Liposomenoberfläche durch die Polyoxyethylenketten der Tenside zu einer besseren Wechselwirkung mit der MHD-Schicht auf dem Sensor führen, ohne die Wechselwirkung durch zu viele Seitenketten zu stören, wie es bei höheren Konzentrationen von Polysorbat 80 im Liposom beobachtet wurde.

Der deutliche Unterschied für  $\Delta f$  zwischen hydrophiler und hydrophober Sensorbeschichtung kann für die tensidhaltigen Liposomen mit zunehmender Konzentration nicht mehr beobachtet werden. Die Frequenzverschiebungen für die Adhäsion an hydrophoben Sensoroberflächen liegen hier im gleichen Größenbereich oder sind zum Teil größer als diejenigen der entsprechenden Liposomen auf hydrophil beschichteten Sensoren. So ist zum Beispiel  $\Delta f$  für SPC-Liposomen mit 2 mol% Polysorbat 80 auf MHD etwa 130 Hz kleiner als auf MHDA. Für 10 mol% Polysorbat 80 in SPC-Liposomen sind die Werte fast gleich ( $-49 \text{ Hz} \pm 22 \text{ Hz}$  und  $-60 \text{ Hz} \pm 9 \text{ Hz}$ ). Die Abbildungen 4.1.4 und 4.1.5 fassen die beschriebenen Ergebnisse zusammen.

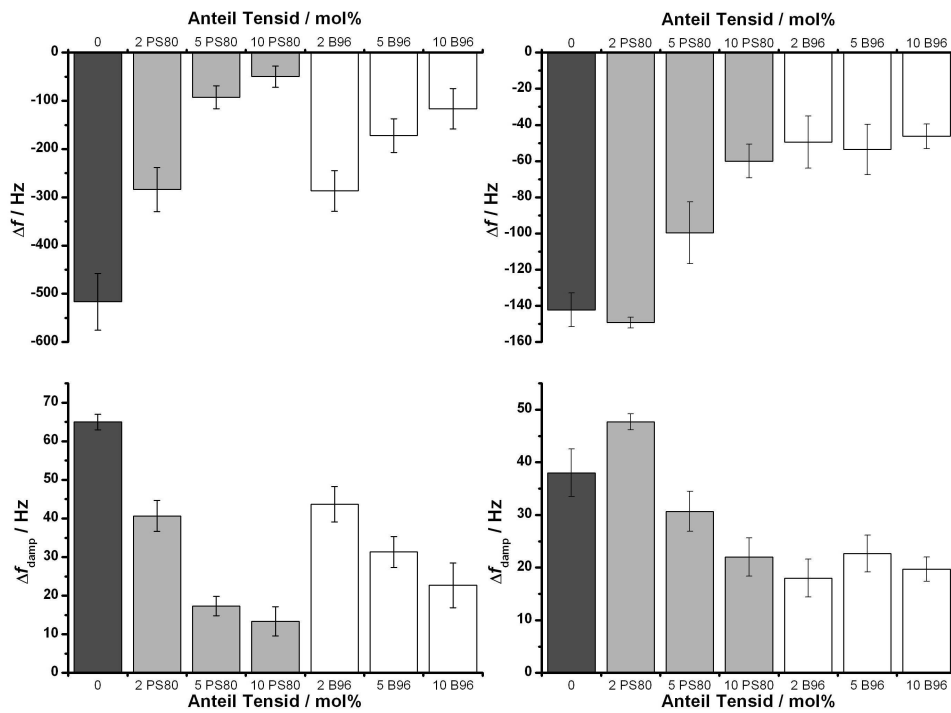


Abb. 4.1.4: Ergebnisse der SPC-Liposomen auf hydrophilen (links) und hydrophoben (rechts) Schwingquarzen in Abhängigkeit vom Tensid und dessen Gehalt (dunkelgrau: ohne Tensid, hellgrau: Polysorbat 80, weiß: Brij 96). Die oberen Diagramme zeigen die Frequenzänderung, die unteren die Änderung der Dämpfung.

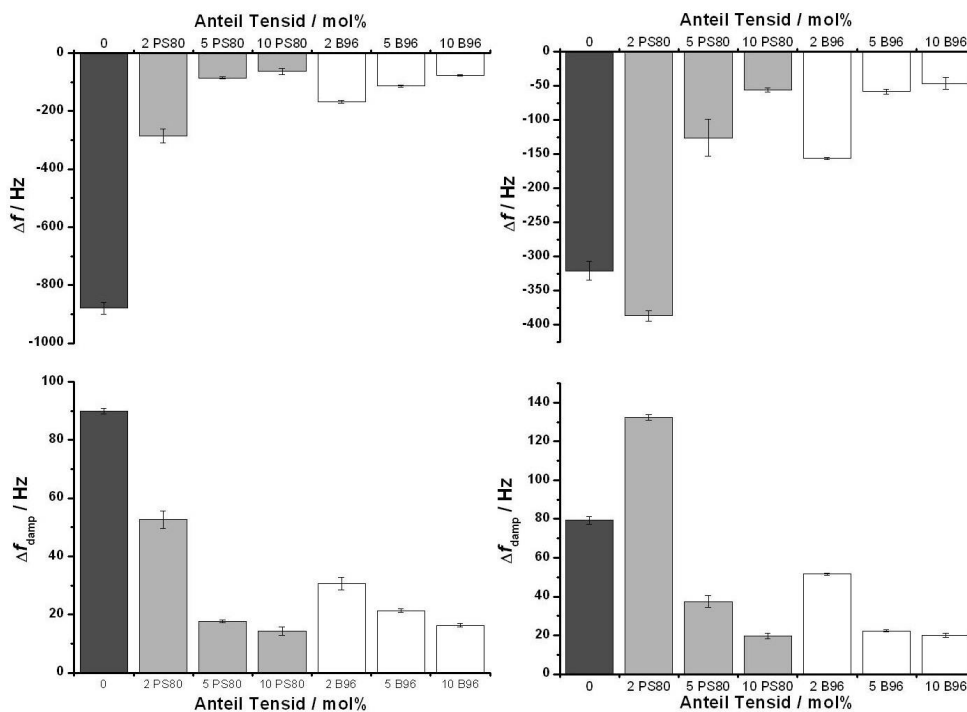


Abb. 4.1.5: Ergebnisse der POPC-Liposomen auf hydrophilen (links) und hydrophoben (rechts) Schwingquarzen in Abhängigkeit vom Tensid und dessen Gehalt (dunkelgrau: ohne Tensid, hellgrau: Polysorbat 80, weiß: Brij 96). Die oberen Diagramme zeigen die Frequenzänderung, die unteren die Änderung der Dämpfung.

Zusätzliche Informationen zum Adhäsionsverhalten konnten durch die Auswertung der Dämpfungsänderung gewonnen werden. Dazu wurde der Quotient aus Dämpfungs- und Frequenzänderung ( $\Delta f_{\text{damp}}/\Delta f$ ) gebildet. Da bei der Anlagerung der Liposomen immer ein Frequenzabfall gemessen wurde, sind alle Quotienten negativ. Bei gleicher Frequenzänderung sind also für stärker gedämpfte Schwingquarze kleinere Quotienten zu erwarten. Abbildung 4.1.4 zeigt für die einzelnen Liposomen die  $\Delta f_{\text{damp}}/\Delta f$ -Quotienten.

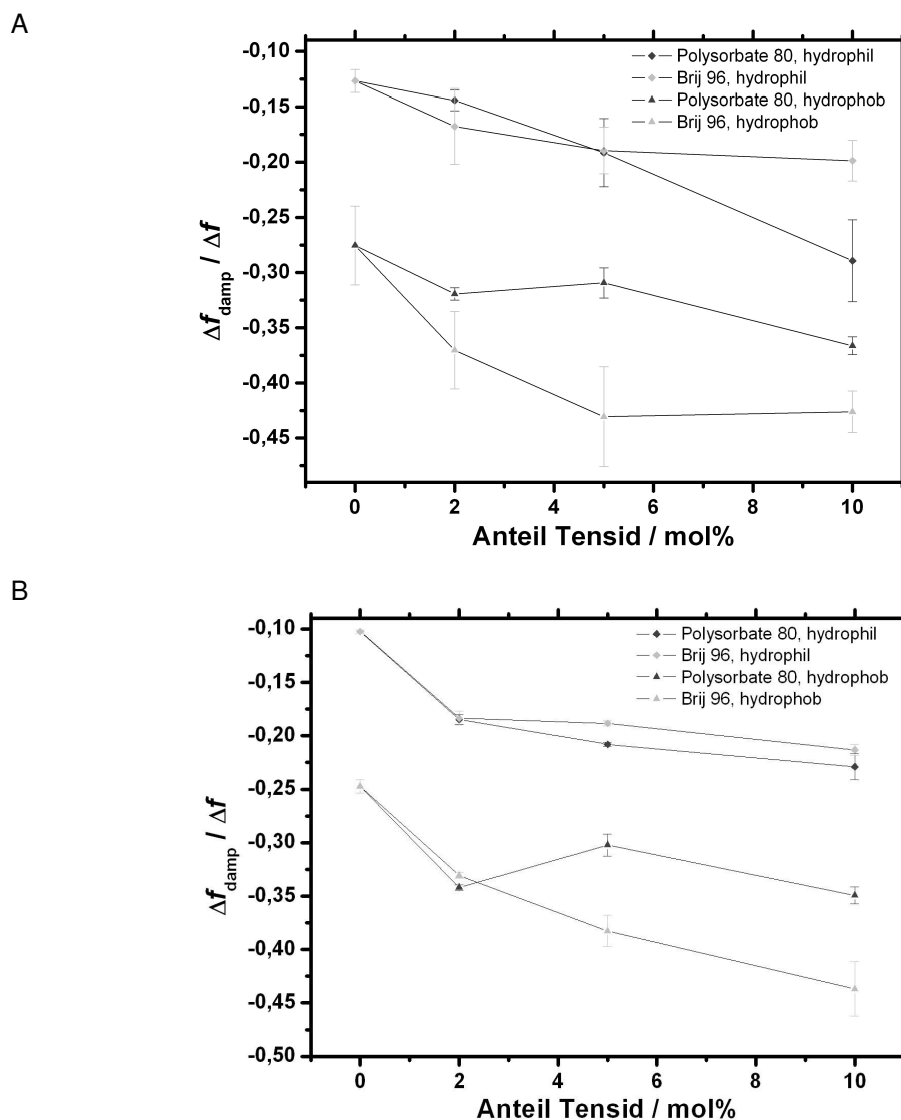


Abb. 4.1.4: Die  $\Delta f_{\text{damp}}/\Delta f$ -Quotienten in Abhängigkeit des Tensidgehalts für SPC-Liposomen (A) und POPC-Liposomen (B). Mit steigendem Tensidgehalt wird der Dämpfungsanteil an der Sensorantwort größer.

Bei allen untersuchten Liposomen wurden für steigende Tensidkonzentrationen kleinere Quotienten erhalten. Der viskoelastische Anteil an der Frequenzverschiebung nimmt also



zu. Das ist zum Beispiel durch eine sterische Behinderung aufgrund der Seitenketten im Tensidmolekül erklärbar. Weiterhin fällt auf, dass für hydrophobe Oberflächen immer kleinere Quotienten gefunden wurden als für hydrophil beschichtete Quarze. Liposomen sind nach außen hydrophile Gebilde. Beim Kontakt mit der Sensoroberfläche wird sich ein Liposom daher je nach Hydrophobizität anders verhalten. Auf hydrophil beschichteten Quarzen werden sich Liposomen in ihrer Form verändern, abflachen und vielleicht sogar spreiten, wohingegen sie auf hydrophoben Oberflächen eine Kugelform behalten werden. Letzteres führt durch mehr Wassereinlagerung in die Zwischenräume und insgesamt dickere Schichten zu einer verstärkten Dämpfung des Sensors.

#### **4.1.3 Zusammenfassung**

Anhand von Beispielen verschiedener Phosphatidylcholin-Liposomen konnte der Einfluss nichtionischer Tenside, eingebaut in die Liposomendoppelschicht, bei der Adhäsion an hydrophilen und hydrophoben Sensoroberflächen gezeigt werden. Zunehmende Tensidkonzentration führte dabei zu geringeren Frequenz- und Dämpfungsänderungen, wobei der Effekt auf hydrophilen Oberflächen deutlich stärker ausgeprägt war. Insgesamt waren die Frequenzverschiebungen bei hydrophiler Beschichtung größer. Der Quotient aus Dämpfungs- und Frequenzänderung zeigt, dass bei zunehmendem Tensidgehalt der Anteil der Dämpfung an der Sensorantwort steigt. Die Versuche zeigen deutlich, dass die QCM sehr gut geeignet ist, um Veränderungen von Liposomen durch Einbau von Molekülen in ihre Membranstruktur anhand ihres Adhäsionsverhaltens an modifizierten Oberflächen zu charakterisieren.

## 4.2 Adsorption von Nanopartikeln an Heparinlayer

Kolloidale Vehikelsysteme spielen eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen Forschung. Ziel der Anwendung solcher Systeme ist eine schnellere, nebenwirkungsärmere und auf den Wirkort gerichtete Gabe von Arzneistoffen. Dabei können Vehikelsysteme wie Liposomen, Nanokapseln oder Nanopartikel schlechte Löslichkeit verbessern, eine Inaktivierung von Wirkstoffen verzögern oder bei der Überwindung biologischer Barrieren helfen. So sind zum Beispiel die Endothelzellen der Blutgefäße eine erste Barriere für parenteral applizierte Nanopartikel. Voraussetzung für die Überwindung dieser Barrieren ist eine hinreichend gute Wechselwirkung mit der biologischen Struktur. Liebau (Liebau *et al.*, 1997) entwickelte auf Basis der QCM ein Adhäsionsmodell für Liposomen. Planare Doppelschichten aus Phospholipiden wurden hier zur modellhaften Nachahmung der Zellmembran genutzt. Natürlicherweise sind die Zellmembranen allerdings von einem ausgedehnten Geflecht negativ geladener und hydratisierter Glykoproteine und Glykolipide, der Glykokalyx, überzogen. Daher wurde in den folgenden Experimenten versucht, diese negativ geladene Kohlenhydratschicht genauer nachzubilden. Es wurde eine Polyelektrolytschicht verwendet, bei der das lineare Polyanion Heparin mit Hilfe des verzweigten Polykations Polyethylenimin an der Sensoroberfläche immobilisiert werden konnte, um die negativ geladene Kohlenhydratschicht nachzubilden. Untersucht wurde damit das Adhäsionsverhalten von Nanopartikeln aus Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) (PLGA). PLGA ist ein Polymer aus verestereter Milch- und Glykolsäure, das für die Herstellung von parenteral applizierten Nanopartikeln eingesetzt wird.

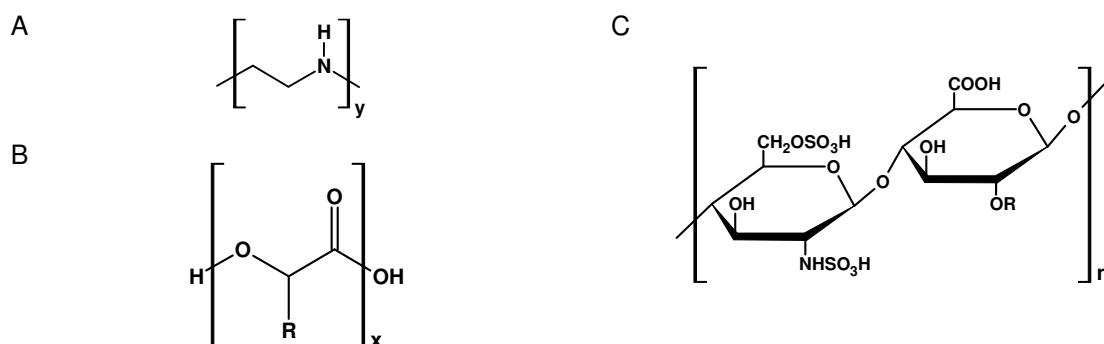


Abb. 4.2.1: Chemische Strukturen von A: Polyethylenimin, B: Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) mit R=CH<sub>3</sub> für Milchsäure und R=H für Glykolsäure sowie C: Heparin mit R=H oder R=SO<sub>3</sub>H.

Nanopartikel aus verschiedenen Typen von PLGA konnten mit dem entwickelten Versuchsaufbau verglichen werden. Der Unterschied besteht in der Kettenlänge des Polymers. Resomer RG 502 hat eine molekulare Masse von etwa 18 kDa, während Resomer RG 503 eine molekulare Masse von etwa 38 kDa besitzt. Die zusätzlich untersuchten Resomere RG 502H und 503H unterscheiden sich durch eine Carboxylgruppe am Kettenende des Polymers von den Grundtypen, die eine Methylgruppe am Kettenende aufweisen. Damit wurden insgesamt vier Typen von Nanopartikeln untersucht, die sich in der Molekülmasse des Polymers und/oder in der chemischen Struktur am Kettenende des Polymers unterschieden.

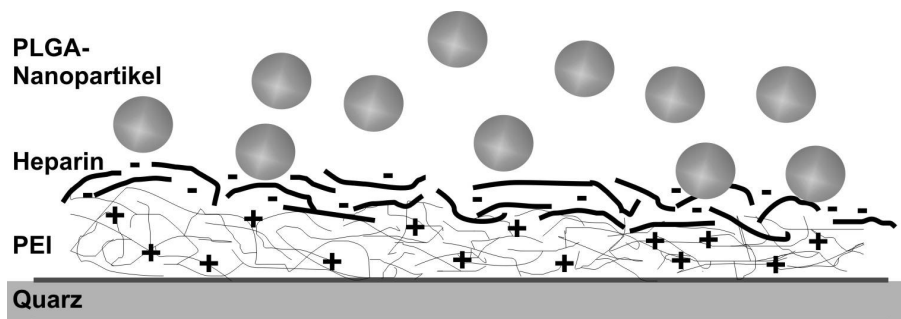


Abb. 4.2.2: Schema des Schichtaufbaus aus Polyethylenimin (PEI) und Heparin sowie der Adhäsion der Nanopartikel (nicht maßstabsgerecht).

#### 4.2.1 Herstellung und Charakterisierung der Nanopartikel

Zur Herstellung der Nanopartikel wurde eine *solvent-disposition*-Methode nach Fessi (Fessi *et al.*, 1989) mit einigen Modifikationen verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Polymere zu einer Konzentration von  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$  in Aceton gelöst und anschließend automatisiert mittels Schlauchpumpe in die doppelte Menge einer  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  Lösung von Poloxamer 188 (BASF, Ludwigshafen) injiziert. Poloxamer 188 diente zur Stabilisierung der Nanosuspension. Das Aceton wurde im Rotationsverdampfer entfernt und Lösungsmittel zu einem Endvolumen von 10 mL ergänzt. Als Lösungsmittel diente PBS-Puffer pH 7,4.

Charakterisiert wurden die entstandenen Nanopartikel hinsichtlich ihres hydrodynamischen Durchmessers und ihres Zetapotentials. Die PCS-Messungen (HPPS 5002, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). ergaben für Resomer RG 502 und 503 hydrodynamische Durchmesser von 183 nm bzw. 158 nm bei einem Polydispersitätsindex (PDI) von etwa 0,06. Die Nanopartikel aus Resomer RG 502H und 503H waren deutlich

kleiner. Sie lieferten Messergebnisse von 70 nm bzw. 90 nm (PDI 0,21 bzw. 0,14). Abbildung 4.2.3 zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der PCS-Untersuchungen.

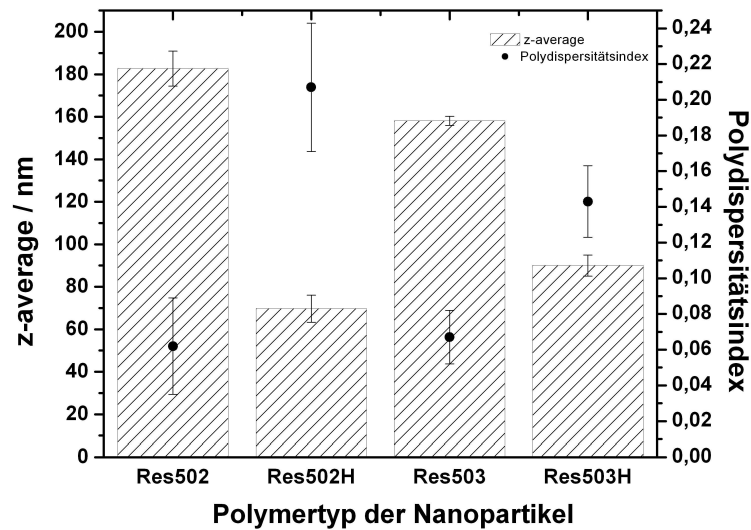


Abb. 4.2.3: Ergebnisse der PCS-Messungen.

Um den wichtigen Einfluss der Oberflächenladung bei der Adsorption an geladene Schichten zu untersuchen, wurde das  $\zeta$ -Potenzial der hergestellten Nanopartikel bestimmt (Mastersizer 3000, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Erwartungsgemäß zeigten Nanopartikel aus Resomer RG 502H und 503H ein negatives  $\zeta$ -Potenzial (-6,3 mV bzw. -3,2 mV), da die Carboxylgruppe bei dem vorgegebenen pH-Wert dissoziiert vorliegt. Die Ergebnisse der Messungen zeigt Abbildung 4.2.4.

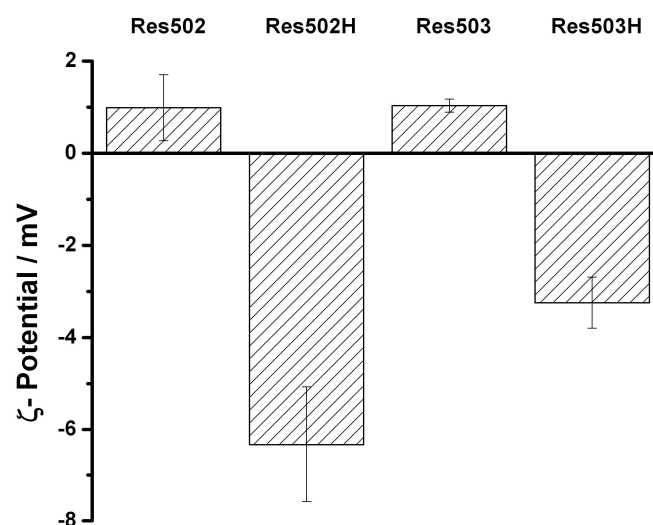


Abb. 4.2.4: Vergleich des  $\zeta$ -Potentials der untersuchten Polymertypen. Resomer RG 502 und 503 haben eine leicht positive Oberflächenladung. Die Carboxylgruppe in Resomer RG 502H und 503H führt durch Deprotonierung zu einer negativen Ladung an der Partikeloberfläche.

## 4.2.2 Sensorvorbereitung und QCM-Experimente

Um den Schichtaufbau mit abschließendem Heparinlayer zu erhalten, wurde das im Folgenden beschriebene Verfahren angewandt. Polyethylenimin (PEI) wurde unter Verwendung einer Methode nach Wu (Wu *et al.*, 2005) kovalent an die Sensoroberfläche gebunden. Dazu wurde die gereinigte Sensoroberfläche für zwölf Stunden mit einer 1 mM ethanolischen Lösung von Mercaptohexadecansäure (MHDA) (Sigma-Aldrich, Steinheim) zur Bildung einer Monoschicht (SAM) bedeckt. Die Carboxylgruppen der MHDA wurden durch eine wässrige Lösung von 5 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und 10 mM N-hydroxysuccinimid (NHS) (Sigma-Aldrich) aktiviert. PEI wurde an diese aktivierten Carboxylgruppen, wie in Abbildung 4.2.5 gezeigt, gebunden.

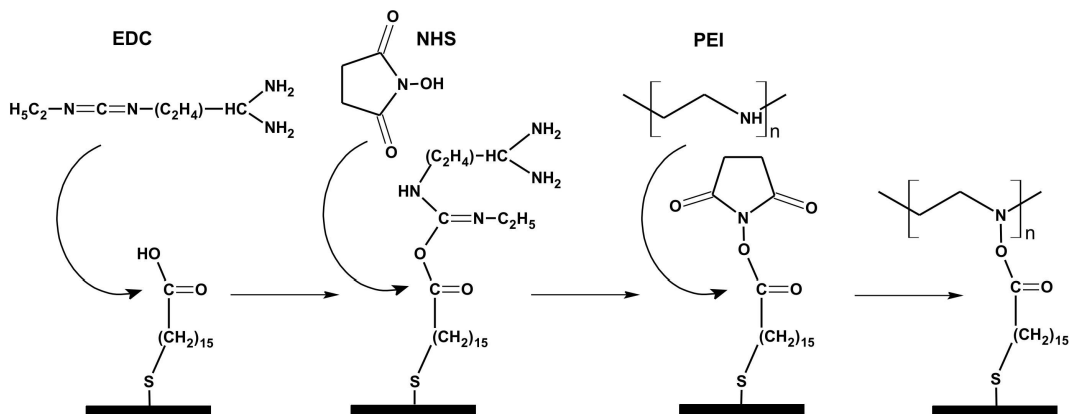


Abb. 4.2.5: Ablauf der kovalenten Bindung des Polyethylenimins an die aktivierten Carboxylgruppen.

Im Experiment wurden die beschichteten Sensoren zunächst mit einem Fluss von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  mit PBS-Puffer bis zur Einstellung einer konstanten Frequenz gespült, gefolgt von einer  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  Lösung von Heparin für 20 Minuten. In dieser Zeit bildete sich aufbauend auf die positiv geladene PEI-Schicht ein negativ geladener Heparinlayer. Erkennbar in der Sensorantwort war die Bindung von Heparin an einer Verringerung der Resonanzfrequenz ( $\Delta f$  ca.  $-40 \text{ Hz}$ ) und einer Zunahme der Dämpfung auf Grund der gewachsenen viskoelastischen Schicht (Abbildung 4.2.6). Nach weiterem Spülen zur Entfernung von ungebundenem Heparin wurden  $500 \text{ }\mu\text{L}$  der zu untersuchenden Nanosuspension in den Pufferfluss gegeben. Der Kontakt der Nanopartikel zur Heparinschicht verursachte wiederum negative Frequenzverschiebungen.

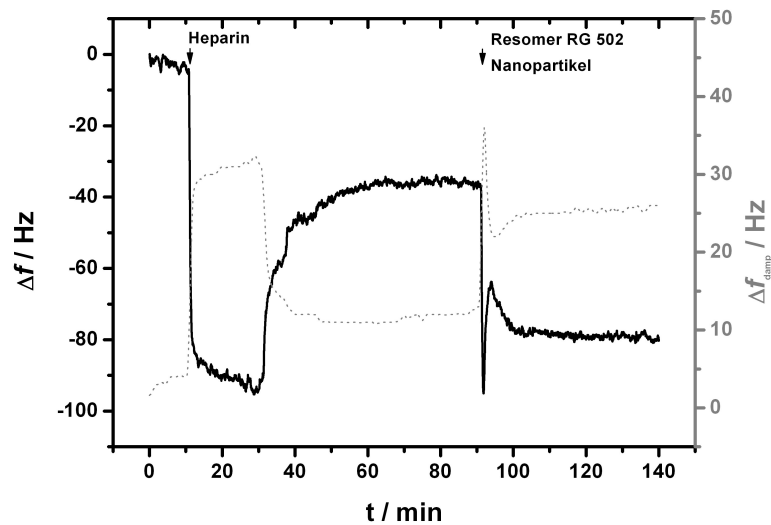


Abb. 4.2.6: Frequenz- und Dämpfungsänderungen des Sensors im Verlauf der Anlagerung von Heparin an die immobilisierte Polyethyleniminschicht und nachfolgend die Anlagerung der Nanopartikel, hier dargestellt für den Polymertyp Resomer RG 502.

Die Ergebnisse zeigen eine deutlich unterschiedliche Wechselwirkung der verschiedenen Nanopartikel mit der Heparinschicht. Nanopartikel aus Resomer RG 502 und 503 verursachten deutlich größere Frequenzverschiebungen ( $\Delta f = -48 \pm 5$  Hz bzw.  $\Delta f = -22 \pm 6$  Hz), was für eine stärkere Wechselwirkung spricht. Andererseits zeigten die Nanopartikel aus Resomer RG 502H und 503H nur Frequenzverschiebungen von  $\Delta f = -8 \pm 2$  Hz und  $\Delta f = -6 \pm 1$  Hz. Auch die Veränderung im Dämpfungsverhalten ( $\Delta f_{\text{damp}}$ ) ist bei den Nanopartikeln aus Resomer RG 502 und 503 größer, was eine stärkere Zunahme der Viskoelastizität der Gesamtschicht zeigt.

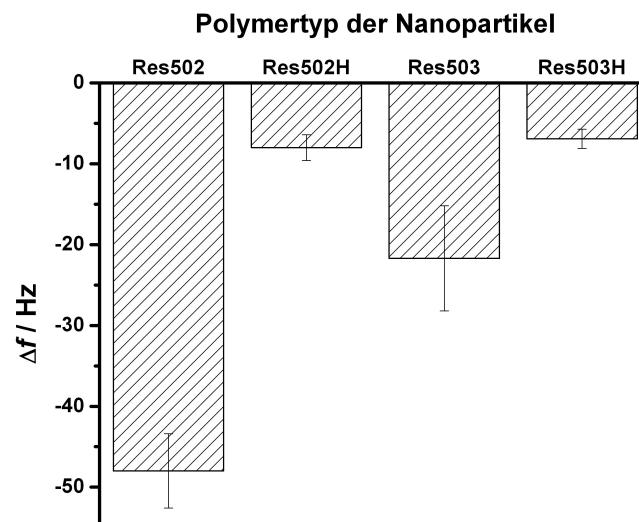


Abb. 4.2.7: Ergebnisse der QCM-Messungen der Nanopartikel aus verschiedenen Typen von PLGA. Die Frequenzverschiebung ist bei kleineren Partikeln mit negativer Oberflächenladung geringer.

Die im Vorfeld untersuchten Einflussgrößen hydrodynamischer Radius und Oberflächenladung ermöglichen eine klare Interpretation der Ergebnisse. Größere und leicht positiv geladene Nanopartikel (Resomer RG 502 und 503) unterliegen einer deutlich stärkeren Wechselwirkung mit dem Polyanion Heparin als das kleinere und negativ geladene Partikel tun.

### **4.2.3 Zusammenfassung**

Unter Nutzung der ionischen Wechselwirkung von PEI und Heparin ist es möglich, Kohlenhydratschichten mit einer negativen Gesamtladung auf der Sensoroberfläche zu immobilisieren. PEI kann kovalent unter Nutzung von Monoschichten und Carboxylgruppenaktivierung gebunden werden. Eine Zelloberfläche wird dabei durch eine negativ geladene Kohlenhydratschicht besser nachgebildet als bei anderen Sensoraufbauten. Adhärierende Nanopartikel verursachen Änderungen in Resonanzfrequenz und Dämpfung, die mit ihren Eigenschaften Größe und Oberflächenladung korrelieren.

Die beschriebenen Experimente erlauben eine modellhafte Untersuchung der Wechselwirkung interessierender kolloidaler Vehikelsysteme mit Biostrukturen, die eine negativ geladene Oberfläche besitzen.

## 4.3 Polyelektrolyt-Wechselschichten von Heparin und Chitosan

In der biomedizinischen Materialforschung gibt es ein großes Interesse an der Charakterisierung von Substanzen, die sich als Gerüststrukturen zum Beispiel für die Nachbildung der extrazellulären Matrix eignen. Da die Materialeigenschaften die Entwicklung und Funktion von aufgebrachtten Zellen stark beeinflussen, stehen verschiedene Substanzen und Materialstrukturen im Fokus, um eine höchstmögliche Biokompatibilität zu erreichen. Eine Möglichkeit dafür besteht in dem Aufbau von Multischichten aus gegensätzlich geladenen Polyionen. Dieses als *layer-by-layer* (LbL) *assembly* bezeichnete Verfahren stellt eine einfach durchzuführende Methode dar, Materialschichten verschiedener Dicke und mit unterschiedlichen Eigenschaften zu realisieren. Chitosane, Chondroitine, Heparine, Dextrane und Polyethylenimin stellen nur eine Auswahl untersuchter Polyelektrolyte dar.

Dass sich die QCM hier als gut geeignete Untersuchungsmethode erweist, ergibt sich aus ihrem Analyseprinzip und spiegelt sich in einer wachsenden Anzahl von Arbeiten wider (Serizawa *et al.*, 1999; Serizawa *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2004; Tezcaner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005b). Aber nicht nur der Aufbau der Schicht, sondern auch deren enzymatische Hydrolyse lässt sich mit QCM untersuchen, wie Serizawa *et al.* zeigen (Serizawa *et al.*, 2002).

Die hier vorgestellten QCM-Untersuchungen sind Bestandteil einer umfassenderen Arbeit zu Charakterisierung und Anwendung von Heparin-Chitosan-Wechselschichten (Kirchhof, 2009). Dabei stand für die QCM-Experimente der Einfluss des pH-Wertes im Mittelpunkt des Interesses.

### 4.3.1 Versuchsaufbau

Verwendung in den Experimenten fanden Lösungen von Polyethylenimin ( $m_M$  ca. 750 kDa), Heparin ( $m_M$  ca. 14 kDa) und Chitosan ( $m_M$  ca. 425 kDa) zu je 2 mg mL<sup>-1</sup> in einer 140 mM wässrigen Natriumchloridlösung.



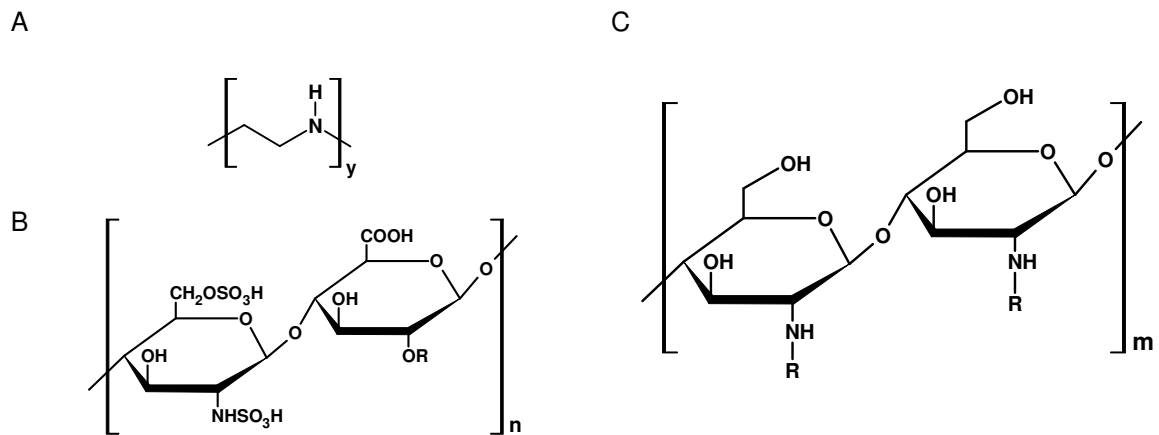


Abb. 4.3.1: Molekülstrukturen der verwendeten Substanzen. A: Polyethylenimin. B: Heparin mit R=H oder SO<sub>3</sub>H und C: Chitosan mit R=H (Glucosamin) oder R=Acetyl- (N-Acetyl-Glucosamin).

Für Polyethylenimin und Heparin wurden Lösungen für die pH-Werte 5, 7 und 9 untersucht, wohingegen Chitosan aufgrund seiner Lösungseigenschaften nur bei pH 5 untersucht werden konnte. Die Einstellung des pH-Wertes fand durch Titration mit Salzsäure bzw. Natronlauge statt. Als erste Schicht wurde jeweils das Polykation Polyethylenimin auf den gereinigten und in der Messzelle fixierten Sensorquarz gespült, gefolgt vom starken Polyanion Heparin und dem schwachen Polykation Chitosan. Dazwischen lagen Spülphasen mit Lösungsmittel des für die Substanz verwendeten pH-Wertes. Bei einer Flussrate von  $2 \text{ mL min}^{-1}$  war die Ventilautomatik auf sieben Minuten für die Anlagerungsphase und auf 15 Minuten für die Spülphase programmiert. Insgesamt wurden zehn Schichten aufgebracht: eine Polyethyleniminschicht als Basis und dann wechselweise Heparin und Chitosan bis zu einer Gesamtschichtzahl von zehn. Die Aufzeichnung der Frequenz- und Dämpfungsänderung erfolgte mit einer Rate von 1 Hz.

### 4.3.2 Ergebnisse der QCM-Messungen

Erwartungsgemäß zeigten sich mit zunehmender Schichtzahl eine Frequenzabnahme und eine Dämpfungszunahme, was durch die Anlagerung mehr oder weniger viskoelastischer Schichten erklärbar ist. Abbildung 4.3.2 zeigt einen typischen Verlauf der Frequenz- und Dämpfungsänderung mit der Zeit für eine Messung bei pH 5.

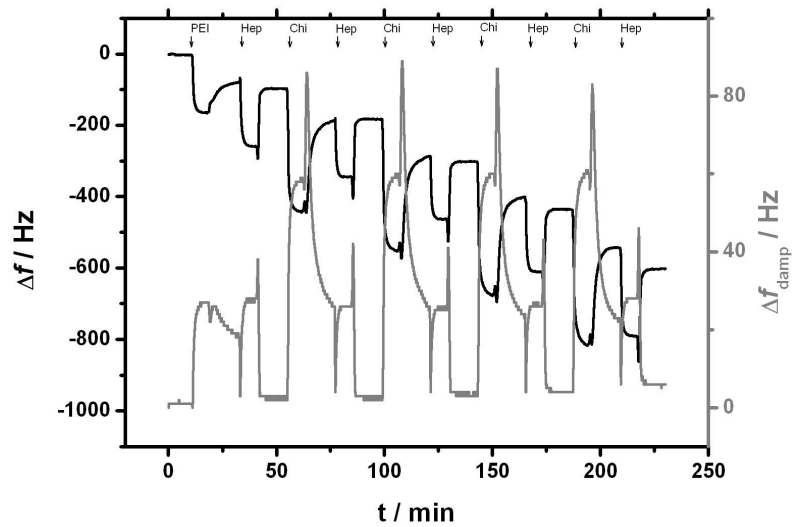


Abb. 4.3.2: Änderungen von Frequenz und Dämpfung für einen Multischichtaufbau aus einer Schicht Polyethylenimin (PEI) und nachfolgend wechselweise Heparin (Hep, insg. fünf Schichten) und Chitosan (Chi, insg. vier Schichten) bei pH 5.

Die einzelnen Schichten verhalten sich dabei aber in Abhängigkeit vom pH-Wert sehr unterschiedlich. Für die erste Schicht, Polyethylenimin, zeigten sich tendenziell größere Frequenzverschiebungen bei pH 9 als bei pH 7 oder pH 5. Mit einer Differenz zwischen pH 9 und pH 5 von nur ca. 20 Hz konnte aber kein sehr großer Einfluss des pH-Wertes auf die erste Schicht beobachtet werden. Für den folgenden Schichtaufbau aus Heparin und Chitosan ergibt sich hingegen ein anderes Bild.

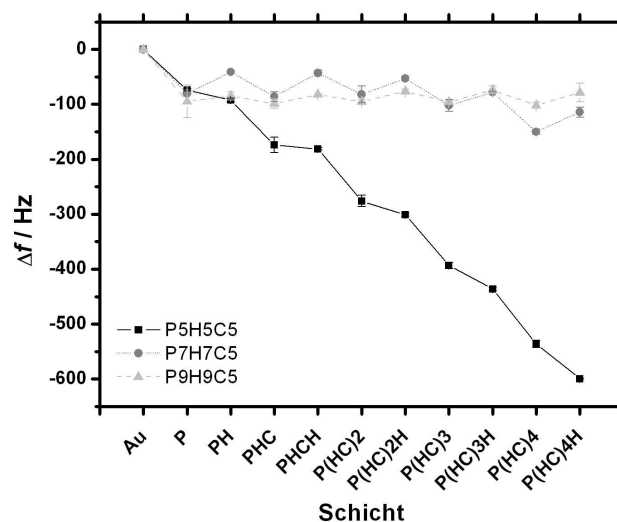


Abb. 4.3.3: Vergleich der Frequenzänderungen für den Schichtaufbau bei pH 5, pH 7 und pH 9 für die aufgebrauchte Schicht aus Polyethylenimin (P) und die nachfolgend aufgebrauchte Wechselschicht aus Heparin (H) und Chitosan (C). Chitosan wurde immer bei pH 5 verwendet.

Wie aus Abbildung 4.3.3 zu entnehmen ist, zeigen sich geringe Unterschiede für die Messungen bei pH 5 und pH 7 (Chitosan immer bei pH 5). Ein sehr deutlicher Unterschied ergibt sich aber für den Schichtaufbau bei pH 5. Die hier erhaltenen Frequenzänderungen liegen am Versuchsende ca. 500 Hz über denen der anderen untersuchten pH-Werte. Auffallend ist der stärkere Frequenzabfall für die Chitosanschichten. Da die vorangegangene Heparinschicht im gesamten untersuchten pH-Bereich negativ geladen ist, wird vermutet, dass die Lokalisation der Ladungen für die Anbindung der Chitosanmoleküle eine wichtige Rolle spielt. Auch Boddohi *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit zu Multischichten aus Heparin und Chitosan im pH-Bereich 5 dickere Schichten für das Polykation (Boddohi *et al.*, 2008).

Einen weiteren Einblick in den Schichtaufbau ermöglicht die Dämpfungsanalyse. Charakteristisch für alle untersuchten pH-Werte ist der sprunghafte Wechsel in der Dämpfung zwischen den Heparin- und den Chitosanschichten. Hier kann gefolgert werden, dass die viel größeren Moleküle des Chitosans bei ihrer Anlagerung und als oberste Lage der Multischicht viel mehr Wasser einbinden und damit zu einer hohen Dämpfung führen. Bildet Heparin die oberste Lage, sinken die Dämpfungswerte wieder deutlich und steigen im Gesamtverlauf der Versuche nur moderat an. Insgesamt zeigen die Messungen bei pH 9 die geringsten Dämpfungsänderungen, jene bei pH 5 die größten. Die Unterschiede der Sensordämpfung sind zwischen den pH-Werten aber nicht ausreichend groß, um die ermittelten Frequenzunterschiede für den Schichtaufbau rein viskoelastisch zu erklären. Abbildung 4.3.4 stellt die Dämpfungsanalyse zusammengefasst dar.

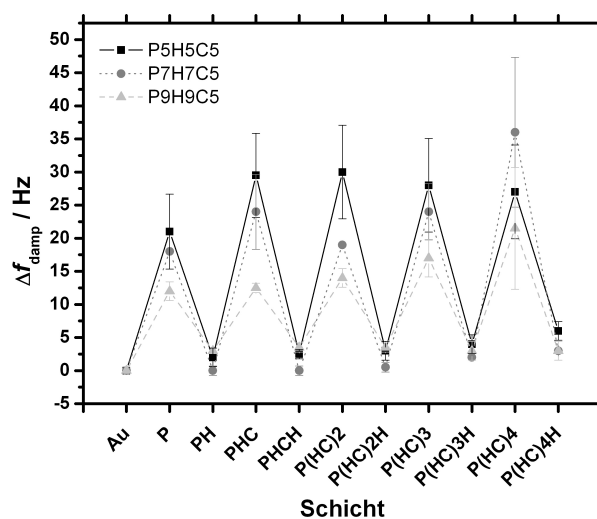


Abb. 4.3.4: Übersicht zu den Dämpfungswerten nach der Anlagerung der jeweiligen Schichten. Auffallend ist der sprunghafte Wechsel zwischen den Heparin- und Chitosanschichten.

### **4.3.3 Zusammenfassung**

Die QCM ist eine effiziente Methoden, den Aufbau von Multischichten in Echtzeit zu verfolgen. Dabei liefert die Frequenzänderung deutliche Hinweise auf das Ausmaß der angelagerten Schicht, wenn gleichzeitig die Veränderungen in der Sensordämpfung bewertet werden. Für die untersuchten Multischichten aus Heparin und Chitosan ergeben sich bei pH 5 die größten Frequenzunterschiede. Das bedeutet einen stärkeren Schichtaufbau bei diesem pH-Wert. Die vorgestellte Methode zur Charakterisierung von Biomaterialien bei einem Schichtaufbau aus Polyelektrolyten kann somit eine wertvolle Hilfe bei der Planung von Versuchen zur Zelladhäsion sein.

## **4.4 Nachweis der Wechselwirkung zwischen Concanavalin A und zuckergebundenen Liposomen durch QCM und MALDI-ToF-Imaging**

Wie im Abschnitt 3.3 ausgeführt, sind von der Sensorantwort unabhängige Analysemethoden eine wichtige Ergänzung von QCM-Untersuchungen. In Kombination mit QCM-Experimenten spielen dabei bisher vor allem die Rasterkraftmikroskopie (AFM) und optische Methoden wie IRRAS und Ellipsometrie (Sabatani *et al.*, 1993; Stalgren *et al.*, 2002; Forzani *et al.*, 2003) eine wichtige Rolle. Die in diesem Abschnitt vorgestellten Arbeiten erweitern diese Methoden um eine massensensitive Analyse von Sensorbeschichtung und Bindungsvorgängen.

Als Untersuchungsmodell wurde eine mit QCM bereits gut untersuchte Zucker-Lektin-Wechselwirkung genutzt (Hildebrand *et al.*, 2002; Lebed *et al.*, 2006). Concanavalin A (ConA) ist ein etwa 26 kDa großes Protein der Jackbohne (*Canavalia ensiformis* [L.]). Seine spezifische Wechselwirkung, insbesondere mit  $\alpha$ -D-Mannose und  $\alpha$ -D-Glukose, ist von großer Bedeutung für verschiedene molekulare Erkennungsprozesse wie der Interaktion von Zellen, bestimmten Signalwegen und inflammatorischen Prozessen (Lis und Sharon, 1998). Auch die pharmazeutische Bedeutung im Rahmen von bioadhäsiven *drug-delivery*-Prozessen ist für Lektine beschrieben (Lehr, 2000).

ConA wurde auf der Sensoroberfläche immobilisiert, um die Wechselwirkung mit zuckergekoppelten Liposomen zu untersuchen. Die Bindungsvorgänge lassen sich am Frequenzverlauf verfolgen. Im zweiten Schritt erfolgte die Detektion des ConA bzw. des zuckergebundenen Phospholipids aus den Liposomen mittels Massenspektrometrie. Dabei ging es nicht nur um den Nachweis der jeweiligen Wechselwirkungspartner, sondern um eine zweidimensionale Analyse der Sensoroberfläche.

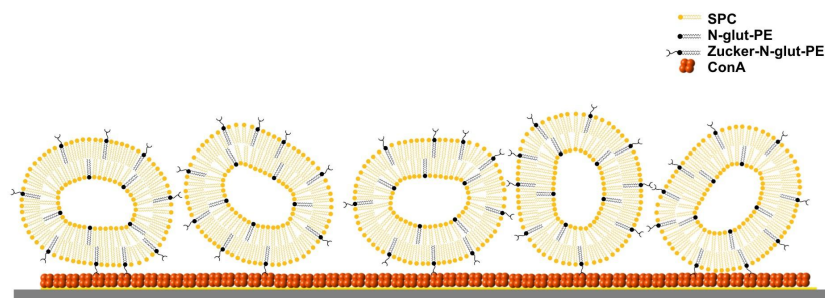


Abb. 4.4.1: Schematische Darstellung des mit Concanavalin A (ConA) beschichteten Quarzsensors und der angelagerten Liposomen.

#### 4.4.1 Vorbereitung und Durchführung der QCM-Experimente

Das zur Herstellung der zuckergebundenen Liposomen genutzte Verfahren ist der Literatur zu entnehmen (Hildebrand *et al.*, 2002). Phosphatidylcholin aus Soja (Phospholipon<sup>®</sup> 90 H, Phospholipid GmbH, Köln) und N-glytaryl-1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (N-glut-PE) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) wurden in einem molaren Verhältnis von 9:1 in Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der entstandene Lipidfilm im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Tris-Puffer pH 7,4 (20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1 mM Kalziumchlorid und 0,5 mM Manganchlorid) wurde zu einer Lipidkonzentration von 20 mM ergänzt. Zur Bildung der Liposomen wurde für 48 Stunden geschüttelt und anschließend durch eine Polykarbonatmembran (Millipore GmbH, Schwalbach) extrudiert. Die Kontrolle der Liposomengröße erfolgte durch PCS (Malvern HPPS 5002, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Ein Polydispersitätsindex kleiner 0,1 wurde akzeptiert. Die so hergestellten Liposomen fanden Verwendung in Kontrollexperimenten ohne spezifische Wechselwirkung. Spezifisch bindende Liposomen wurden durch die Bindung von p-Aminophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (APMP) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) an N-glut-PE erhalten. Dazu wurden durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) (Sigma-Aldrich, Steinheim) die Carboxylgruppen an den Glutarylresten des N-glut-PE aktiviert, um anschließend APMP zu binden. Das erhaltene zuckergekoppelte Phospholipid hat eine Masse von 1057 Da.

ConA, gelöst in Puffer zu einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , wurde für zehn Stunden in einer Schleife mit einem Fluss von  $0,15 \text{ mL min}^{-1}$  durch die Messzellen gepumpt. Eine anschließende Spülung mit Puffer ermöglichte eine Entfernung von nicht gebundenem Lektin. Die Immobilisierung von ConA führte zu Frequenzverschiebungen von etwa

250 Hz (Abbildung 4.4.2A). Als Grund für die gute Adsorption an der Goldschicht des Sensors wird das Vorhandensein von Schwefelatomen im ConA-Molekül beschrieben, da sich so starke Gold-Schwefelbindungen ausbilden können (Hildebrand *et al.*, 2002).

Im nächsten Schritt erfolgte die Adhäsion spezifisch oder unspezifisch bindender Liposomen an den mit Lektin beschichteten Quarzsensoren. Dafür wurde die entsprechende Probe für 170 Minuten über den Sensor gepumpt, wiederum gefolgt von einer Spülphase, um ungebundene Liposomen zu entfernen. Einen typischen Verlauf von  $\Delta f$  gegen die Zeit für beide Arten von Liposomen zeigt Abbildung 4.4.2B. Für die mannosidgebundenen Liposomen ergaben sich Frequenzverschiebungen von etwa 900 Hz, wohingegen nicht gekoppelte Liposomen so gut wie keine Frequenzverschiebung nach dem Spülvorgang zeigten.

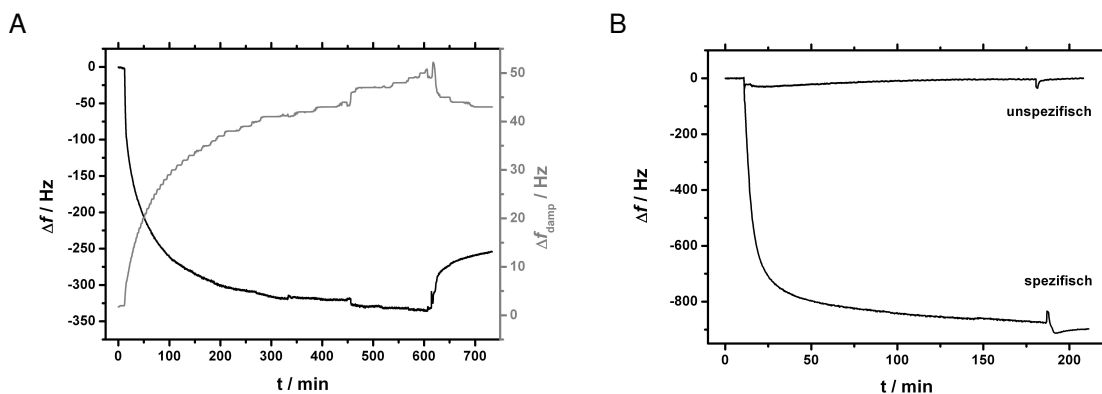


Abb. 4.4.2: A: Frequenz- und Dämpfungsverlauf für die Anlagerung von Concanavalin A an die Sensoroberfläche. B: Vergleich des Frequenzverlaufs für die Adhäsion spezifisch und unspezifisch bindender Liposomen an die Concanavalin A-Schicht.

#### 4.4.2 Analyse auf dem Schwingquarz mit MALDI-ToF-Imaging

Für die Analyse mittels MALDI-ToF-MS musste ein Weg gefunden werden, den zu untersuchenden Quarzsensoren im Hochvakuum des Messgerätes zu platzieren. Dazu wurde ein Probenträger angefertigt, der zentral eine Vertiefung für einen 14 mm Schwingquarz aufweist. Dabei war zu beachten, dass die ToF-Technik eine plane Oberfläche von Quarz und Probenträger voraussetzt. Erste Experimente machten deutlich, dass der Schwingquarz darüber hinaus noch fixiert werden musste, wozu Klebstoff auf Cyanacrylatbasis benutzt wurde. Dieser kann mit organischen Lösungsmitteln entfernt werden, womit eine Wiederverwendung der Schwingquarze möglich ist.

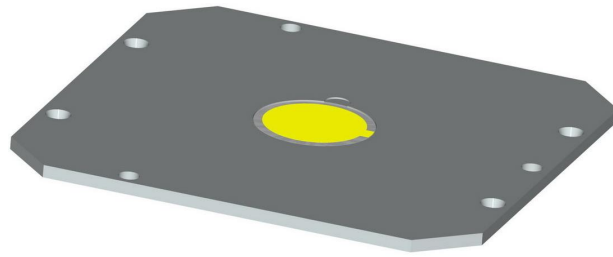


Abb. 4.4.3: Probenträger (*sample plate*) mit eingelegtem Schwingquarz für die Vermessung mit MALDI-MS.

In Vorversuchen wurden die bestmöglichen Matrizes und Geräteparameter für die zu analysierenden Stoffe ermittelt. Für die Experimente wurde das Massenspektrometer Voyager DE-Pro (AB Sciex, Foster City, CA, USA) mit einem gepulsten Stickstofflaser ( $\lambda=337$  nm, 3 ns Pulsrate, 20 Hz Wiederholungsrate) verwendet. Jede Sensoroberfläche wurde mit einem Raster von 50 mal 50 Messpunkten analysiert. Das entspricht 1111 Messpunkten pro  $\text{cm}^2$ . Der Nachweis von ConA erfolgte im Linearmodus mit dem  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Ion, während das mannosidgebundene Phospholipid als  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion im Reflektormodus gemessen wurde. Die Isolierung des  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions durch eine zeitliche Torschaltung ergab eine deutliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Als Matrix lieferte Sinapinsäure gute Ergebnisse für die Analyse von ConA. CHCA konnte sowohl für ConA wie auch für das Phospholipid verwendet werden. Bei der Auswahl der Matrizes spielte auch der Umstand eine Rolle, dass bei der eingesetzten Technik eine vollständige Erfassung der Schwingquarzoberfläche mehrere Stunden Messzeit bedeutet. Daher mussten auch mögliche Evaporationen im Hochvakuum des Messgerätes berücksichtigt werden, um gleiche Bedingungen für die gesamte Messzeit zu gewährleisten. Aufgrund des großen Unterschiedes in den Molekülmassen war eine simultane Analyse beider Stoffe nicht möglich.



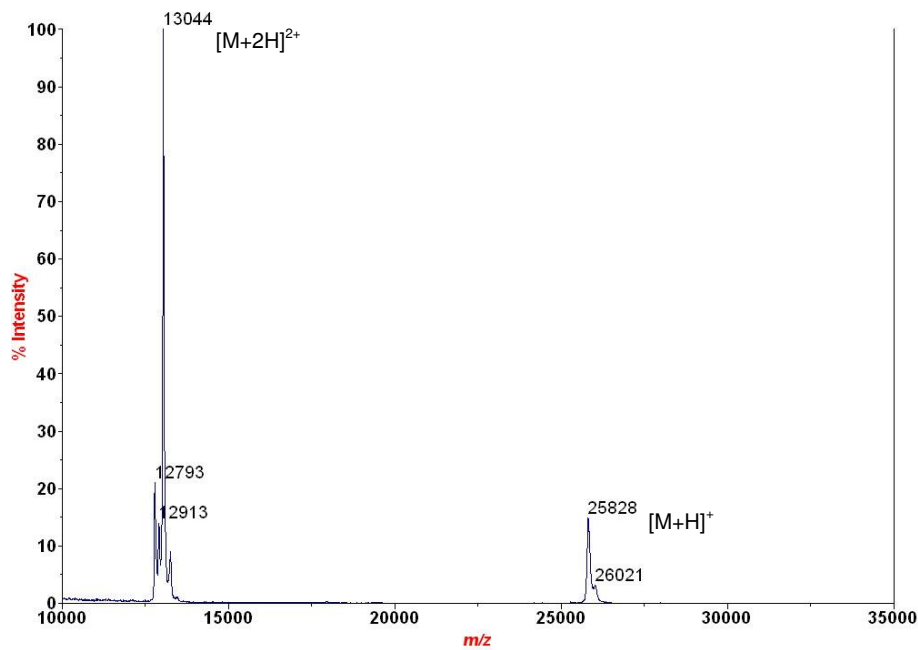


Abb. 4.4.4: MALDI-ToF-Massenspektrum von ConA. Zu sehen sind die einfach und zweifach geladenen Quasimolekülionen.

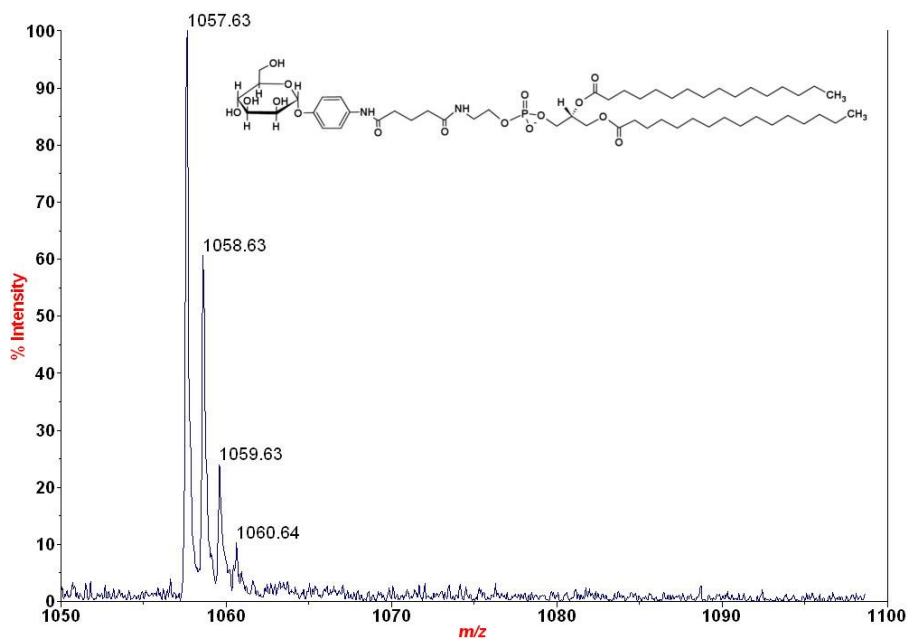


Abb. 4.4.5: MALDI-ToF-Massenspektrum und Strukturformel des mannosidgebundenen Phospholipids.

Für die Messung wurde der Quarzsensord aus der Durchflussmesszelle ausgebaut und mit destilliertem Wasser vorsichtig abgespült, um möglichst viel Salz der Pufferlösung zu entfernen. Die MALDI-MS ist zwar robuster gegenüber Suppressionseffekten durch salzhaltige Proben als andere Ionisationstechniken, die hohe Salzkonzentration der

Pufferlösung erwies sich aber für die Kristallisation der Matrix als störend. Nach anschließender Trocknung wurde der Quarz auf dem Probenträger fixiert. Das Aufbringen der Matrix erfolgte nach der *thin-layer*-Methode, wobei für eine möglichst homogene Verteilung ein Airbrush-System Verwendung fand. Die Matrix wurde unter einem leichten Luftstrom getrocknet.

Die Analyse einer Sensoroberfläche ergab 2500 Massenspektren. Ein für diesen Zweck geschriebenes C++-Programm führte eine Peakdetektion in dem entsprechenden Massenbereich durch und lieferte eine ASCII-Datei mit den Daten der x- und y-Position sowie der entsprechenden Signalintensität. Diese Datei lässt sich in eine beliebige wissenschaftliche Grafiksoftware importieren, womit das Analysenergebnis als Flächen- oder 3D-Plot darstellbar ist.

Abbildung 4.4.6 zeigt jeweils halbseitig den vermessenen Quarzsensordisk und das grafische Ergebnis. Für diesen Versuch wurde der Buchstabe A auf die Oberfläche eines Schwingquarzes pipettiert und vermessen.

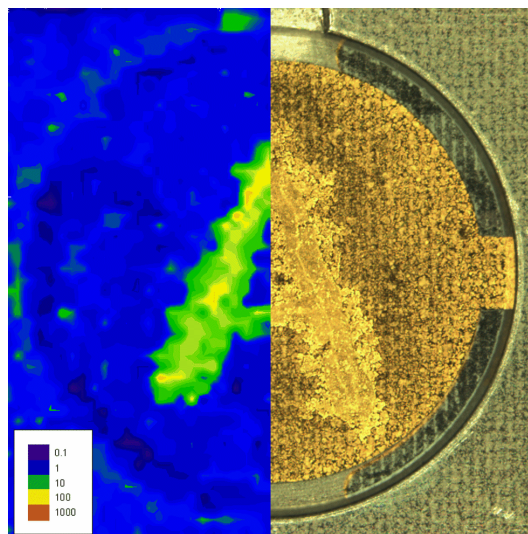


Abb. 4.4.6: Halbseitige Darstellung eines vermessenen Schwingquarzes (rechts) und des Ergebnisses als Contour-Plot nach den Signalintensitäten (links). Für den Versuch wurde der Buchstabe A mit einer Lösung von Concanavalin A auf die Sensoroberfläche pipettiert. Rechts sind die einzelnen Messpunkte deutlich zu erkennen.

Die folgende Abbildung zeigt die grafischen Analysenergebnisse für ConA und das zuckergebundene Phospholipid.

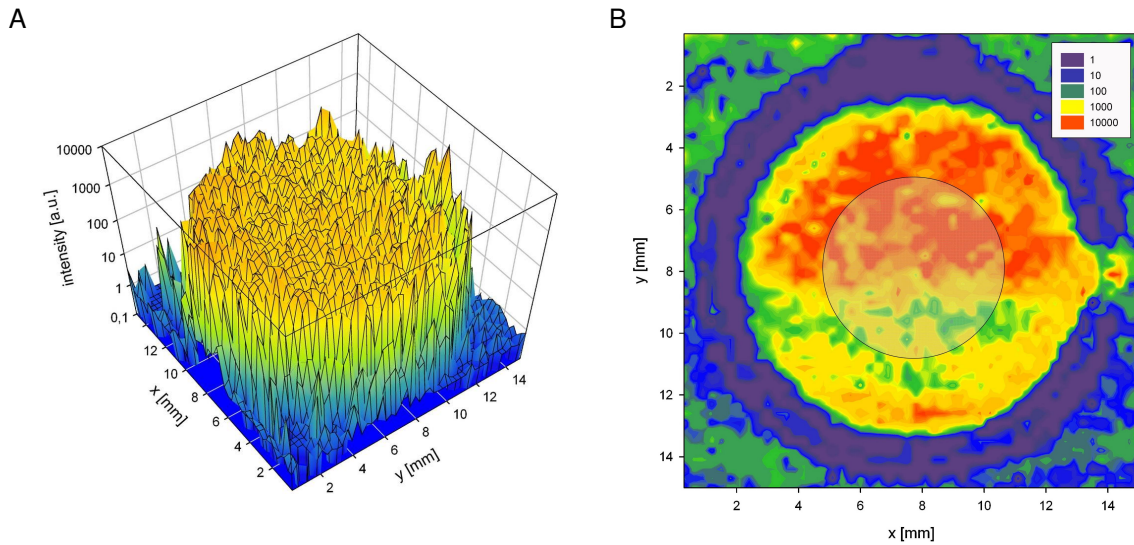


Abb. 4.4.7: A: Mesh-Plot der Intensitätsverteilung des Messsignals von Concanavalin A. B: Die Intensitätsverteilung des zuckergebundenen Phospholipids als Contour-Plot. Rechts ist die Umkontaktierung der Sensorelektrode sichtbar, da hier wie auf der übrigen Goldelektrode Bindungsvorgänge stattfinden. Der zentral eingezeichnete Kreis gibt die eigentliche Sensorfläche wider, die durch die Elektrodengröße auf der Quarzunterseite bestimmt wird.

#### 4.4.3 Zusammenfassung

Neben der schon bekannten Echtzeit-Analyse der Sensorbeschichtung sowie der spezifischen Wechselwirkung von zuckergebundenen Liposomen und Concanavalin A durch QCM wurde hier erstmals für einen QCM-Sensor das MALDI-ToF-Imaging als komplementäre Messmethode eingesetzt. Sowohl Verteilung als auch Homogenität von Sensorbeschichtung und gebundenem Wechselwirkungspartner lassen sich mit der vorgestellten Methode massenspektrometrisch bestimmen. Vorausblickend sind durch technische Änderungen noch einige Verbesserungen möglich. Die Laseroptik lässt sich zum Beispiel durch Sammellinsen dahingehend verändern, dass der einzelne Messpunkt im Durchmesser noch kleiner wird und somit eine höhere Auflösung erreicht werden kann. Schnellere Schrittmotoren zur Bewegung des Probenellers und eine dazu angepasste Rechnerleistung könnten die Messzeit deutlich verkürzen.

## 4.5 Enzymatischer Abbau von Polymerfilmen

Es ist unbestritten, dass synthetische Polymere auf vielen Gebieten des täglichen Lebens große Bedeutung gewonnen haben. Ihre Vielfältigkeit und die Möglichkeit, sie durch Kettenlänge oder Anzahl und Anordnung ihrer Monomere an bestimmte Anforderungen anpassen zu können, haben ein überaus umfassendes Einsatzspektrum zur Folge. Auch die Anzahl pharmazeutischer Anwendungen von synthetischen Polymeren steigt stetig. Sie reicht von der Anwendung in Verbandmaterialien und transdermalen therapeutischen Systemen über die Befilmung oraler Applikationsformen bis zur Herstellung kolloidaler Vehikelsysteme wie zum Beispiel Nanopartikeln. Sehr häufig ist es dabei besonders wichtig, die Eigenschaften des Polymers in Bezug auf die Freisetzung inkorporierter Wirkstoffe zu kennen, um diese voraussagen bzw. steuern zu können. Eine Möglichkeit der Wirkstofffreisetzung ist dabei der Abbau des Polymers. Außerdem ist es für im Körper auf diese Art angewendete Polymere entscheidend, dass sie bioabbaubar sind, damit eine Akkumulation im Organismus verhindert wird.

Um den beschleunigten Abbau von Polymeren durch bestimmte Enzyme zu untersuchen, kann QCM eine geeignete Analysenmethode darstellen. Dazu ist es notwendig, das Polymer als Sensorbeschichtung einzusetzen, um Veränderungen durch im vorbeiströmenden Medium enthaltene Enzyme zu charakterisieren.

Das in Abschnitt 4.2 für die Herstellung von Nanopartikeln verwendete Polymer Poly(D,L-Lactid-co-Glycolid) (PLGA, Resomer RG 502H) wurde für die hier beschriebenen Abbaustudien gewählt. Als Enzym wurde Pankreatin (Sigma-Aldrich, Steinheim) untersucht, das aus der Bauchspeicheldrüse von Hausschweinen gewonnen wurde. Pankreatin ist ein Enzymgemisch aus Lipasen, Amylasen und verschiedenen Proteasen. Von vornherein war davon auszugehen, dass bei der bekannten Struktur von PLGA nur esterspaltende Enzyme einen Abbau beschleunigen können. Daher wurden Kontrollversuche mit der Protease Trypsin durchgeführt.

### 4.5.1 Bildung und Analyse des PLGA-Films auf dem Quarzsensoren

Ein Film aus PLGA (Resomer RG 502H, Boehringer Ingelheim, Ingelheim) wurde mittels Rotationsbeschichtung (engl. *spin coating*) auf dem Quarzsensoren immobilisiert (Mellbring *et al.*, 2001). Dabei wird eine definierte Menge gelöstes Polymer auf den Sensor gebracht, der auf einem Drehteller montiert ist und mit definierter Umdrehungszahl für eine festgelegte Zeit rotiert. Für die PLGA-Filme wurden 50  $\mu\text{L}$  einer 5  $\text{mg mL}^{-1}$  Lösung des Polymers in Aceton auf den Sensor aufgebracht und bei 4000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute gedreht. Der Quarzsensoren wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur im Vakuumtrockenschrank gelagert, um Reste des Acetons zu entfernen. Die Beschichtung wurde durch AFM- und IRRAS-Messungen kontrolliert (Abbildung 4.5.1).

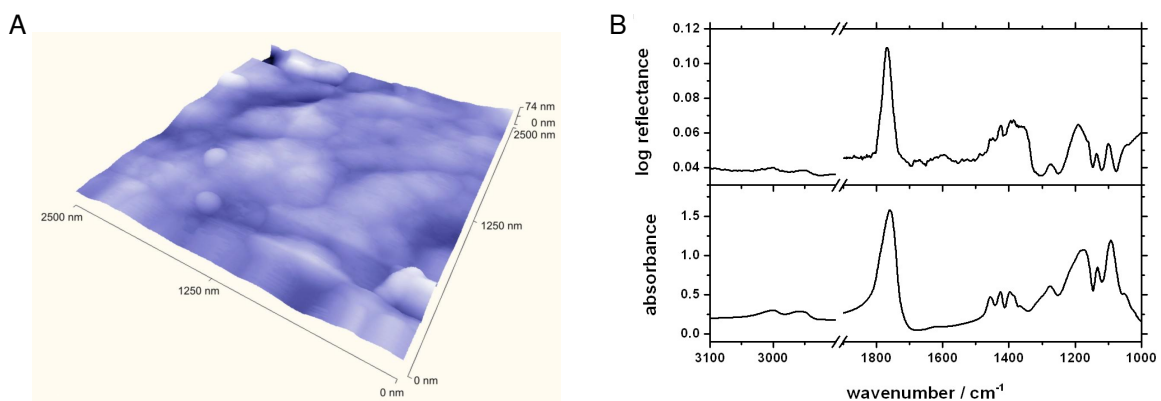


Abb. 4.5.1: A: AFM-Bild eines mit PLGA beschichteten Quarzes (gemessen im *non-contact mode*). B: IRRAS-Spektrum von PLGA (oben) und zum Vergleich ein klassisches IR-Spektrum von PLGA, gemessen in Kaliumbromid (unten).

### 4.5.2 Messung des Abbaus von PLGA-Filmen durch QCM

Die beschichteten Sensoren wurden in die Durchflussmesszellen montiert und bis zur Einstellung einer stabilen Frequenz gespült. Als Spüllösung und Lösungsmittel für die verwendeten Enzyme diente PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4, der im pH-Bereich des Dünndarms liegt. Die Enzyme wurden in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eingesetzt und für 360 Minuten über die PLGA-Filme geleitet. Die Flussrate betrug 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Für Pankreatin konnte in den ersten 30 bis 40 Minuten eine Frequenzabnahme ( $\Delta f$  ca. -25 Hz) beobachtet werden (Abbildung 4.5.2). Erklärt werden kann das mit der Adhäsion von im Pankreatin enthaltenden Makromolekülen am Polymerfilm.

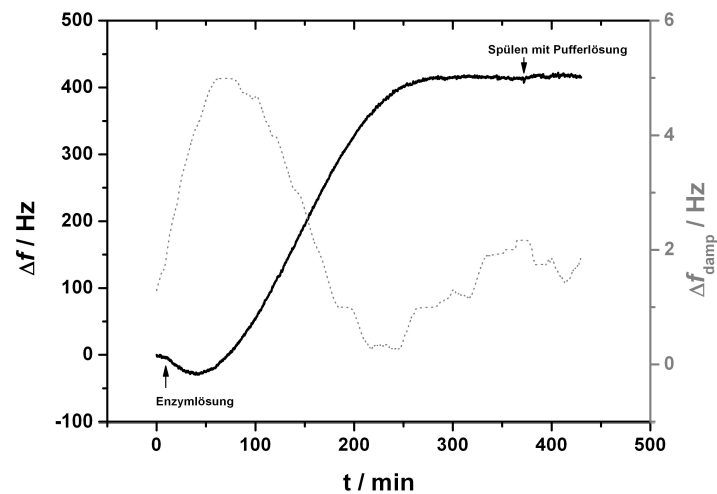


Abb. 4.5.2: Frequenz- und Dämpfungsverlauf für den Abbau eines auf dem Schwingquarz immobilisierten PLGA-Films. Die Enzymlösung wurde nach zehn Minuten, eine abschließende Pufferlösung zum Spülen des Sensors nach 370 Minuten auf den Sensor gespült.

Da die Dämpfung ( $\Delta f_{\text{damp}}$ ) sofort nach Versuchsbeginn zunahm, kann neben der Anlagerung auch der beginnende Abbau des Polymers zu einer höheren Viskoelastizität der Schicht auf dem Sensor geführt haben. Nach diesen 30 bis 40 Minuten überwog deutlich der Abbau des Polymers, erkennbar an der Zunahme der Sensorfrequenz. Nach ca. 250 Minuten wurde keine Änderung der Frequenz mehr festgestellt und auch ein anschließender Spülvorgang bewirkte keine weiteren Änderungen. Da  $f_{\text{damp}}$  am Ende des Experimentes nahezu wieder auf den Ausgangswert zurückging, kann gefolgert werden, dass der ursprüngliche Film eine relativ rigide Struktur aufwies.

Die Kontrollversuche mit Trypsin zeigten zu Beginn einen ähnlichen Verlauf wie die mit Pankreatin, was analog erklärt werden kann. Nachfolgend ist aber keinerlei Frequenzanstieg nachweisbar gewesen, der auf einen Abbau des Polymers schließen ließ, der wie oben erwähnt, aufgrund der Struktur von PLGA auch nicht vermutet wurde. Abbildung 4.5.3 zeigt im Vergleich die Frequenzverläufe für die Pankreatin- und die Trypsinexperimente.

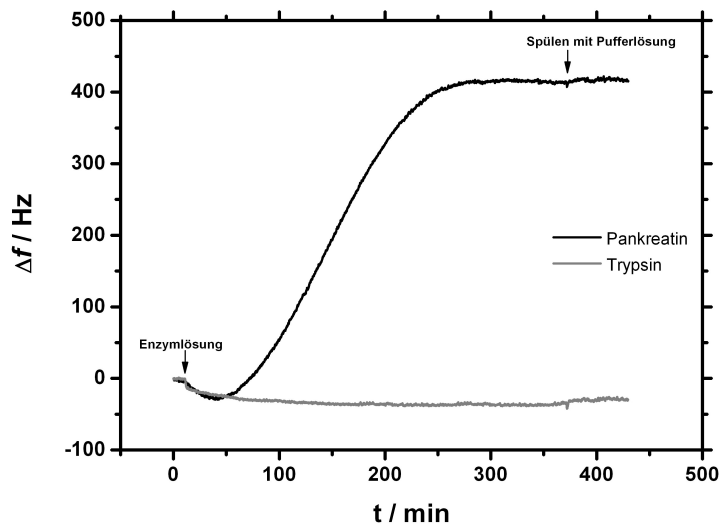


Abb. 4.5.3: Frequenzverläufe für den Abbau des PLGA mit Pankreatin und eines Kontrollversuchs mit Trypsin, das den PLGA-Film nicht abbaut.

### 4.5.3 Zusammenfassung

*Spin coating* ist ein gut geeignetes und schnelles Verfahren, um Quarzsensoren mit Polymeren zu beschichten. Pankreatin, nicht aber Trypsin ist in der Lage, einen PLGA-Film auf einem Quarzsensor abzubauen. Der beschriebene Versuchsaufbau erlaubt die vergleichende Analyse des Abbaus von Polymeren durch verschiedene Enzyme, wobei zusätzlich auch noch Faktoren wie pH-Wert, Salzgehalt usw. variiert werden können. Derartige Experimente können für die Untersuchung von Materialien z.B. für die Befilmung von oralen Arzneiformen oder für kolloidale Trägersysteme zur Charakterisierung der Biodegradation eingesetzt werden.

## 4.6 Peptischer und tryptischer Verdau von immobilisiertem $\beta$ -Casein

Die Kenntnis des enzymatischen Abbaus von Nahrungsproteinen ist eine Grundlage für das Verständnis der Versorgung des menschlichen Körpers mit Aminosäuren. Neben diesem ernährungswissenschaftlichen Aspekt, hat vor allem die Entdeckung, dass bestimmte Spaltprodukte der Proteine im Körper biologische Wirkungen hervorrufen, das biopharmazeutische Interesse an Nahrungsproteinen verstärkt. Diese sogenannten bioaktiven Peptide entstehen beim Verdauungsvorgang und können ihre Wirkung im Körper entfalten, wenn sie die Magen-Darm-Passage unverändert überstehen und in die Blutbahn aufgenommen werden bzw. durch eine geschädigte Magenwand resorbiert werden.

Werden durch einen enzymatischen Verdau Peptide von einem Protein abgespalten und durch die Anwendung einer Durchflussmesszelle vom Sensorquarz entfernt, so resultiert eine geringere Masse des Proteins. Wird das zu verdauende Protein dabei als immobilisierte Schicht auf dem Sensor fixiert, sollte sich mittels QCM nicht nur die Abnahme der Masse detektieren lassen, sondern auch die Änderung der viskoelastischen Eigenschaften. Um das experimentell zu bestätigen, wurde die massenspektrometrisch gut untersuchte Hydrolyse von bovinem  $\beta$ -Casein ( $\beta$ -CN) mit Pepsin sowie Trypsin genutzt.

$\beta$ -CN ist ein Phosphoprotein und gehört neben  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ - und  $\kappa$ -Casein zu den abundantesten Proteinen der Milch. Gebildet in den Milchdrüsen, wird es in Form kolloidaler Aggregate sezerniert und dient dem Transport von Kalzium (Ginger und Grigor, 1999; Horne, 2002). Außerdem sind eine Reihe weiterer Funktionen von Casein sowie aus Casein freigegebenen Peptiden untersucht worden. Lee und Lee isolierten Peptide eines Pankreasverdau von  $\beta$ -CN die Cathepsin B, eine lysosomale Cysteinprotease, inhibiert, die an verschiedenen Krankheiten wie muskulärer Dystrophie und an Tumormetastasen beteiligt ist (Lee und Lee, 2000). Die vermehrte Bildung von Tetanustoxin durch spezifische Peptide eines Pankreasverdau von  $\beta$ -CN wurde von Porfirio *et al.* untersucht (Porfirio *et al.*, 1997). Die Inhibierung der Lipidperoxidation durch Casein bzw. seine Hydrolyseprodukte und eine mögliche Nutzung als Antioxidanz wurde von Rival *et al.* publiziert (Rival *et al.*, 2001a; Rival *et al.*, 2001b). Eigenschaften



von  $\beta$ -CN ähnlich denen von Chaperonen untersuchten Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2005c). Verschiedene weitere Peptide aus Casein wurden als Agonisten von Opioidrezeptoren oder Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzyms identifiziert (Meisel und Schlimme, 1994). Diese Vielzahl von Eigenschaften und möglichen Einsatzgebieten von Casein und seinen Spaltprodukten macht  $\beta$ -CN zu einem interessanten Objekt auch in der biopharmazeutischen Forschung.

Durch die massenspektrometrischen Arbeiten von Schmelzer *et al.* (Schmelzer *et al.*, 2004) sind die Spaltstellen der Enzyme Pepsin und Trypsin bei  $\beta$ -CN bekannt. Damit steht gleichzeitig eine von der QCM unabhängige Methode zur Überprüfung des enzymatischen Verdaus zur Verfügung.

#### 4.6.1 Immobilisierung des $\beta$ -Caseins

$\beta$ -CN wurde durch die Verwendung einer Monoschicht aus Mercaptohexadecansäure (MHDA) kovalent an die Goldoberfläche des Sensors gebunden. Zunächst wurden die zu beschichtenden Quarzsensoren für zwölf Stunden in eine 1 mM ethanolische Lösung von MHDA getaucht. Nach Spülen mit Ethanol und Trocknen unter Stickstoff wurden die Carboxylgruppen von MHDA auf der Messelektrode mit einer  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  Lösung von *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) aktiviert. Nach erneutem Trocknen wurden die Sensoren für 2 Stunden in eine  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  Lösung von  $\beta$ -CN in Boratpuffer (pH 8,8) getaucht. Mit wiederholtem Spülen in Wasser und Trocknen unter Stickstoff wurde die Immobilisierung abgeschlossen.

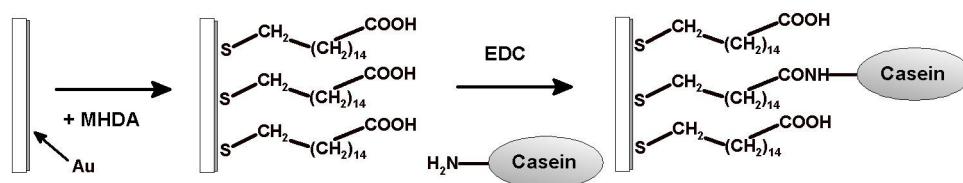


Abb. 4.6.1: Schematische Darstellung der Immobilisierungsschritte für  $\beta$ -Casein auf der Goldelektrode des Schwingquarzes.

Die Beschichtung der Sensoren wurde mittels AFM untersucht. Dabei zeigte sich, dass keine Monoschicht aus  $\beta$ -CN gebildet wird, sondern größere Agglomerate auf der Sensoroberfläche fixiert wurden. Von  $\beta$ -CN ist bekannt, dass es oberflächenaktiv ist. Horne (Horne, 2002) und Vessely *et al.* (Vessely *et al.*, 2005) haben diese Eigenschaft im

Detail beschrieben. Etwa 30 Caseinmonomere können eine so genannte Mizelle mit einem Durchmesser von 10 bis 20 nm bilden. Lagern sich mehrere dieser Mizellen zusammen, können Agglomerate mit Durchmessern bis zu 600 nm entstehen. Die durch AFM bestimmten Durchmesser der Caseinagglomerate auf den Sensoren hatten Durchmesser zwischen 100 nm und 300 nm (Abbildung 4.6.2). Dabei ist zu beachten, dass die beschichteten Sensoren in getrocknetem Zustand gemessen wurden.

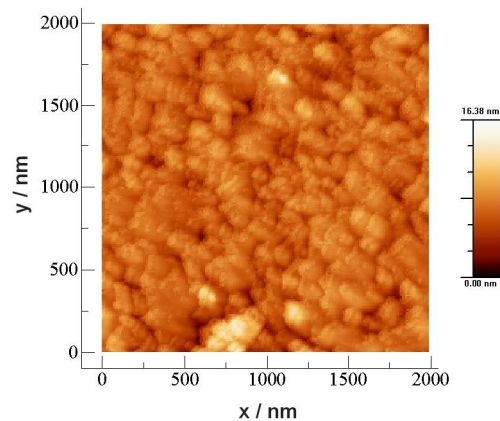


Abb. 4.6.2: AFM-Bild eines mit  $\beta$ -Casein beschichteten Schwingquarzes, aufgenommen im *non-contact mode*.

#### 4.6.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Caseinschicht

Vor den Experimenten zum enzymatischen Abbau der immobilisierten Caseinschicht, wurde zunächst der Einfluss von Veränderungen des pH-Wertes untersucht. Von Proteinen ist bekannt, dass sie Veränderungen unterliegen, wenn sich der pH-Wert ändert. Carboxyl- oder Aminogruppen der Seitenketten von Aminosäuren können dabei in geladenem oder ungeladenem Zustand vorliegen. Unterschiedliche Proteinfaltung und veränderte Mengen von eingeschlossenem Wasser hängen von diesem Ladungszustand ab. Dabei hat jedes Protein einen charakteristischen pH-Wert, an dem gleich viele positiv und negativ geladene Gruppen auftreten und das Protein nach außen neutral ist. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Der pI von bovinem  $\beta$ -CN ist 4,5 (Cordeschi *et al.*, 2003). Die pH-Werte für die Experimente wurden nach dem Aktivitätsbereich der Enzyme Pepsin und Trypsin so ausgewählt, wie sie in den anschließenden Verdaustudien verwendet wurden: für Pepsin die pH-Werte 2, 3 und 4, für Trypsin die pH-Werte 5,4, 6,4 und 7,4. Die Lösungen für die pH Werte 2, 3 und 4 bestanden aus verdünnter Salzsäure, die für die Experimente mit Trypsin aus entsprechend eingestelltem Phosphatpuffer. Für 60 Minuten wurden die Lösungen der jeweiligen pH-Werte durch die Messzellen geleitet. Die

Abbildung 4.6.3 zeigt typische Frequenz- und Dämpfungskurven, die bei den Experimenten erhalten wurden.

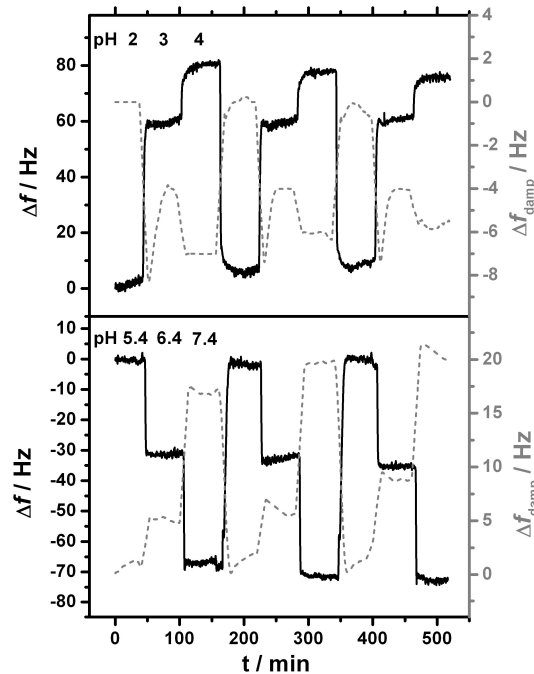


Abb. 4.6.3: Frequenz- und Dämpfungsänderung für die Untersuchungen des pH-Einflusses auf die immobilisierte Schicht aus  $\beta$ -Casein; oben: pH-Werte 2, 3 und 4 für den Bereich des peptischen Verdaus; unten: pH-Werte 5,4, 6,4 und 7,4 für den Bereich des tryptischen Verdaus (Details siehe Text).

In dem pH-Bereich für Pepsin von pH 2 bis pH 4 wurde eine Frequenzzunahme von etwa 60 Hz für den Wechsel von pH 2 zu pH 3 ermittelt. Eine weitere Frequenzzunahme von etwa 20 Hz zeigte sich für den Wechsel von pH 3 zu pH 4. Gleichzeitig verringerten sich die Dämpfungswerte mit steigendem pH um 4 Hz bei dem Wechsel von pH 2 zu pH 3 und um etwa 2 Hz von pH 3 zu pH 4.

In dem für Trypsin verwendeten pH-Bereich von pH 5,4 bis pH 7,4 zeigte sich mit steigendem pH-Wert ein entgegengesetztes Bild. Von pH 5,4 zu pH 6,4 sinkt die Frequenz um 30 Hz und die Dämpfung steigt um etwas 6 Hz. Für den Wechsel von pH 6,4 zu pH 7,4 sinkt die Frequenz um weitere 40 Hz. Die Dämpfung steigt um etwa 12 Hz. Bei den Experimenten im pH-Bereich von 5,4 bis 7,4 kommt zum Wechsel des pH-Wertes auch der Unterschied in den Salzkonzentration der jeweiligen Pufferlösungen, was die größeren Änderungen der Dämpfung gegenüber dem pH-Bereich von pH 2 bis pH 4 erklären kann.

Bei der gemeinsamen Auswertung der beiden Versuche zeigen sich eindeutige Ergebnisse. Die dreimalige Wiederholung der pH-Wechsel zeigt, dass die Frequenz- und

Dämpfungsänderungen nicht eine Folge von Ablösungen des  $\beta$ -CN von der Sensoroberfläche sind. Eine Frequenzabnahme und eine Dämpfungszunahme sind zu erkennen, wenn sich der pH-Wert der Lösung vom isoelektrischen Punkt entfernt. Das gilt sowohl für zunehmend saure als auch für zunehmend alkalische Lösungen. Grund dafür sind vermehrte Einlagerungen von Wasser, das als zusätzliche Masse vom Sensor registriert wird. Gleichzeitig führt das eingelagerte Wasser zu einer weniger rigiden, also stärker elastischen Proteinschicht, die zu einer stärkeren Dämpfung der akustischen Welle führt.

### **4.6.3 Verdau von bovinem $\beta$ -Casein**

Für die Experimente zum enzymatischen Verdau von  $\beta$ -CN wurden die beschichteten Sensoren in den Durchflusszellen so lange mit dem Medium gespült, bis sich eine konstante Frequenz eingestellt hatte. Die Flussrate betrug bei allen Experimenten  $0,15 \text{ mL min}^{-1}$ . Zehn Minuten nach Beginn des Experiments wurde eine  $0,1 \text{ } \mu\text{mol}$  Lösung des entsprechenden Enzyms für 240 Minuten durch die Messzelle gespült, gefolgt von einer Spülphase über 60 Minuten mit reinem Medium, um verbliebenes Enzym und freigesetzte Spaltprodukte vom Sensor zu entfernen. Ein Frequenz- und Dämpfungsverlauf ist in Abbildung 4.6.4 dargestellt. Es wurde deutlich, dass der Caseinabbau zum überwiegenden Teil in den ersten 60 Minuten stattfand. Für eine statistische Auswertung des Einflusses des pH-Wertes auf den Verdau wurden die Frequenzänderungen nach 30 Minuten und am Ende des Experiments ausgewertet ( $n = 3$  bis  $5$ ). Zunächst wurde ein F-Test durchgeführt, um die Gleichheit der Varianzen zu belegen. Ein anschließender zweiseitiger t-Test wurde genutzt, um die Unterschiede in der Frequenzänderung bei 30 Minuten und am Ende des Experimentes für die verschiedenen pH-Werte zu ermitteln ( $p < 0,01$ ).

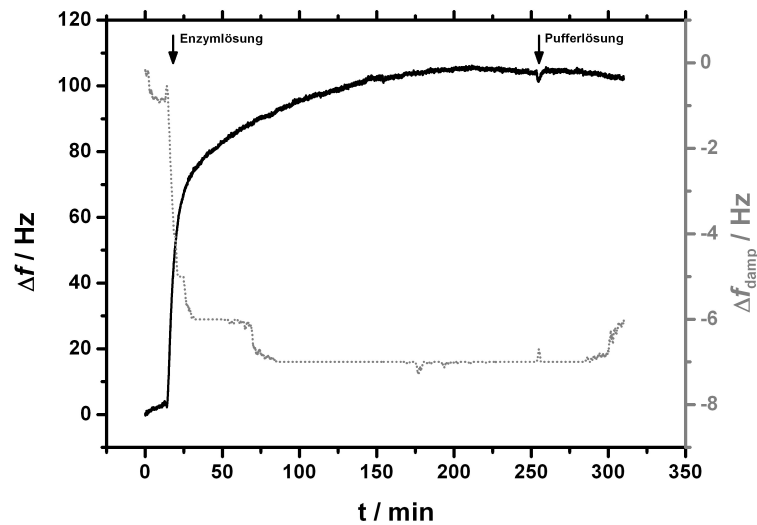


Abb. 4.6.4: Beispielhafter Frequenz- und Dämpfungsverlauf für den enzymatischen Abbau von  $\beta$ -Casein, hier für den tryptischen Abbau bei pH 7,4.

Die Experimente zum Verdau von  $\beta$ -CN mit Pepsin wurden bei den pH-Werten 2, 3 und 4 durchgeführt, um die gastroanaloge Proteolyse zu simulieren. Dabei können die pH-Werte als unterschiedliche Art und Menge von Nahrung im Magen interpretiert werden, die den pH-Wert im Magen bestimmen und damit die Aktivität des Pepsins beeinflussen. Von Pepsin ist bekannt, dass es die höchste Aktivität bei pH 1 und 2 besitzt (Loken *et al.*, 1958). Das wird mit Änderungen in der Konformation des Moleküls bei verschiedenen pH-Werten erklärt (Campos und Sancho, 2003). Diese Aktivitätsänderung zeigte sich auch in den QCM-Experimenten. Bei pH 2 resultierte während des Verdau eine Frequenzverschiebung von  $126 \pm 11$  Hz für 30 Minuten und von  $162 \pm 24$  Hz am Ende. Ein Anstieg des pH-Wertes auf pH 3 führte zu geringeren Frequenzverschiebungen von  $73 \pm 6$  Hz (30 Minuten) und  $98 \pm 15$  Hz (Ende). Bei pH 4 waren nur noch geringe Frequenzänderungen zu beobachten. Nach 30 Minuten wurden  $5 \pm 2$  Hz und am Ende  $15 \pm 7$  Hz erhalten. In Abbildung 4.6.5 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

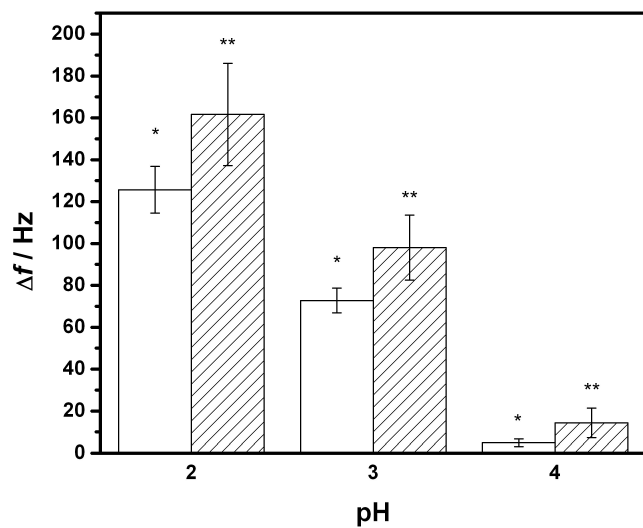


Abb. 4.6.5: pH-Wert abhängige Frequenzänderung beim peptischen Verdau von  $\beta$ -Casein. Die weißen Balken geben die Frequenzänderungen nach 30 Minuten an, die schraffierten jene nach der Spülphase am Ende des Versuchs. Die jeweiligen Werte sind dabei für die untersuchten pH-Werte signifikant verschieden.

Trypsin zeigt seine größte proteolytische Aktivität bei pH-Werten zwischen 7 und 9 (Vorob'ev *et al.*, 2000). Daher wurden Experimente bei pH-Werten von 7,4 und darunter durchgeführt um die abnehmende Aktivität Trypsins zu verfolgen. Trotz der größten Frequenzänderungen für pH 7,4 mit  $72 \pm 9$  Hz (30 Minuten) und  $96 \pm 5$  Hz (Ende), ist auch für die pH-Werte von 6,4 und 5,4 noch Enzymaktivität zu verzeichnen, die sich in deutlichen Frequenzänderungen zeigte. Nach 30 Minuten ergaben sich für pH 6,4 und pH 5,4 noch unterschiedliche Werte mit  $47 \pm 9$  Hz bzw.  $18 \pm 5$  Hz. Am Ende des Experiments wurden Frequenzänderungen von  $62 \pm 5$  Hz (pH 6,4) und  $61 \pm 8$  Hz (pH 5,4) erhalten. Wie Abbildung 4.6.6 zeigt, ergab sich damit für die pH-Werte 5,4 und 6,4 zwar ein statistischer Unterschied für die Frequenzverschiebung bei 30 Minuten, nicht aber am Ende des Experiments. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die höhere Aktivität Trypsins bei pH 6,4 zwar zu einem schnelleren Abbau des zu spaltenden Proteins führt. Der langsamere Abbau bei pH 5,4 hat aber nach entsprechend längerer Zeit ein vergleichbares Ausmaß.

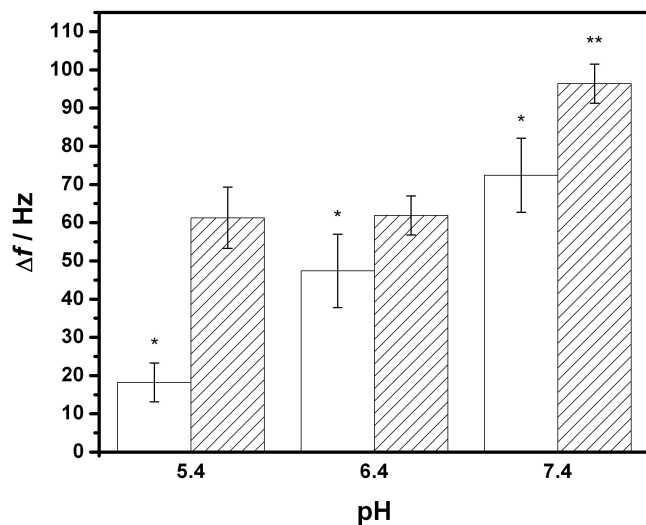


Abb. 4.6.6: pH-Wert-abhängige Frequenzänderung beim tryptischen Verdau von  $\beta$ -Casein. Die weißen Balken geben die Frequenzänderung nach 30 Minuten an, die schraffierten jene am Ende des Versuchs. Die jeweiligen Werte sind dabei für die untersuchten pH-Werte signifikant verschieden, mit Ausnahme der Frequenzänderung am Ende der Experimente bei pH 5,4 und pH 6,4.

#### 4.6.4 Bestätigung des Verdaus durch MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Die QCM-Experimente erlauben eine sichere Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Caseinabbaus in Abhängigkeit der Versuchsbedingungen, lassen aber keinen Schluss auf die entstandenen Peptide zu. MALDI-ToF-Massenspektrometrie erlaubt eine detaillierte Analyse der bei dem Verdau entstandenen Spaltprodukte des  $\beta$ -CNs. Aufgrund der hohen Salzkonzentration der bei dem Verdau mit Trypsin genutzten Pufferlösungen wurde für die massenspektrometrische Untersuchung der Verdau mit Pepsin bevorzugt. Dafür wurde das durch die Durchflussmesszelle geleitete Medium vom Beginn der Zugabe des Pepsins zum beschichteten Sensor an gesammelt, aufkonzentriert und vermessen. Um einen ungewollten Fortgang des Verdaus im Sammelgefäß zu verhindern, wurde eine  $2,88 \mu\text{g mL}^{-1}$  Lösung von Pepstatin A zugegeben, um ein molares 1:1-Verhältnis gegenüber der eingesetzten Pepsinmenge zu erhalten. Zur Aufkonzentrierung wurde das gesammelte Medium (ca. 40 mL) für eine Stunde wiederholt durch eine ZipTip-C<sub>18</sub>-Pipettenspitze (Millipore, Schwalbach, Deutschland) gepumpt. Die Peptide wurden anschließend in 5  $\mu\text{L}$  Acetonitril aufgenommen. Als Matrixsysteme dienten die Überstände sowohl einer gesättigten CHCA-Lösung, als auch einer gesättigten Sinapinsäure-Lösung in Acetonitril / 0,1 % Trifluoressigsäure (1:1, V/V). Probe und Matrix wurden im Verhältnis 1:3 (V/V) gemischt und auf einem Probenträger im Luftstrom bei ca. 35 °C getrocknet. Die

MALDI-ToF-Messungen fanden an einem Voyager DE-PRO (AB Sciex) mit Stickstofflaser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) statt. Gemessen wurde im Positiv-Ionen-Reflektor-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Eine Abtrennung von Molekülfragmenten mit kleinen Masse-Ladungs-Verhältnissen wurde durch ein sogenanntes *low mass gate* bei  $m/z$  850 erreicht. Damit wurde eine Sättigung des Detektors mit Matrixbestandteilen verhindert.

Ein Vergleich der erhaltenen Spektren mit solchen aus konventionellen *in-vitro*-Experimenten eines peptischen  $\beta$ -CN-Verdau zeigt eine qualitativ hohe Übereinstimmung.

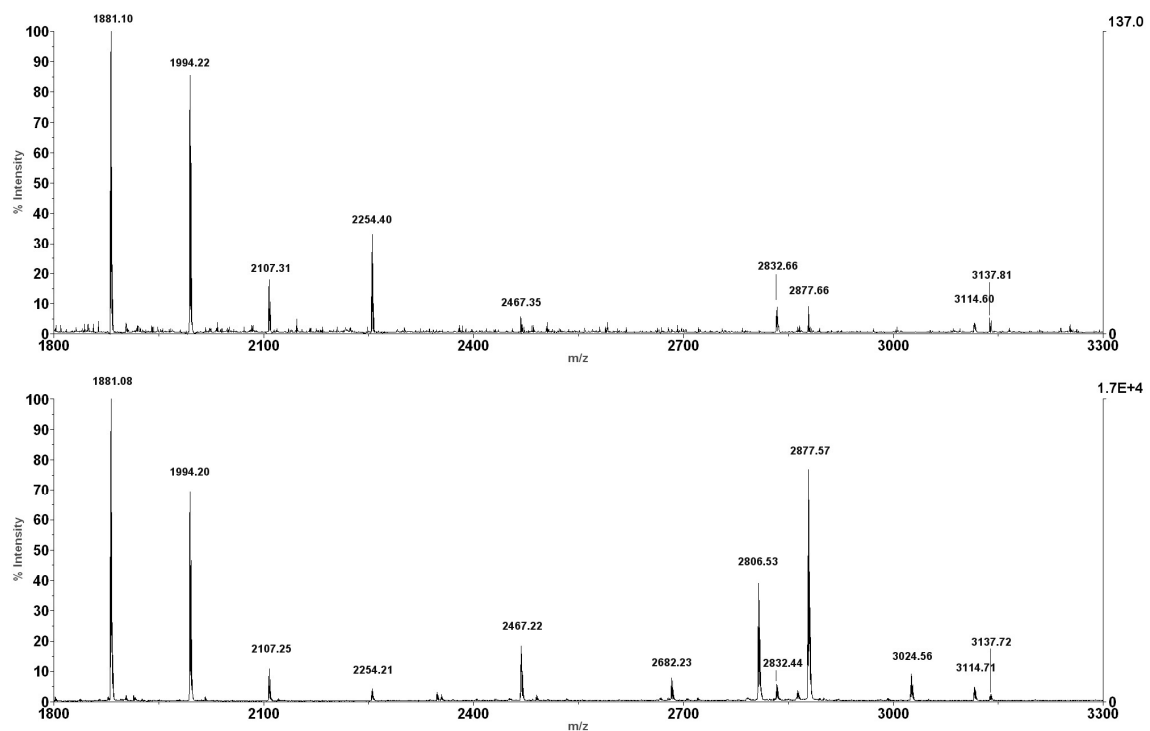


Abb. 4.6.7: MALDI-ToF-Spektren aus einem peptischen Caseinverdau, erhalten aus einem QCM-Experiment (oben) und aus einem klassischen *in-vitro*-Verdau (unten).

Die gekennzeichneten Peaks in Abbildung 4.6.7 machen deutlich, dass beide Proteolysen gleiche Peptide hervorbringen, die vorwiegend vom C-Terminus des  $\beta$ -CN stammen. Die zum Teil sehr unterschiedlichen Intensitäten der Peaks können mit der unterschiedlichen Ausgangskonzentration und dem Prozess der Aufkonzentrierung aus dem gesammelten Medium der Durchflussmesszellen erklärt werden.



#### **4.6.5 Zusammenfassung**

Proteolytische Vorgänge lassen sich durch QCM in Echtzeit verfolgen, wobei die Änderungen in Frequenz und Dämpfung die jeweiligen Einflüsse auf die immobilisierte Proteinschicht anzeigen. Sowohl Einflüsse des pH-Wertes als auch der enzymatische Abbau lassen sich untersuchen. Damit können verschiedene Einflussfaktoren auf die Enzymaktivität, die zum Beispiel eine Änderung im zeitlichen Verlauf des Proteinabbaus bedingen, studiert werden. Die Verbindung der QCM-Experimente mit einer nachgelagerten massenspektrometrischen Analyse der Spaltprodukte erlaubt eine umfassende Aussage zu den entstandenen Peptiden. Zusätzlich zu den zeitlichen Verläufen der Proteinspaltung können so auch entstandene Spaltprodukte qualitativ bewertet oder Spaltstellen identifiziert werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Zwei prinzipiell verschiedene Versuchsaufbauten wurden in dieser Arbeit gezeigt. In den Kapiteln 4.1 bis 4.4 wurden Experimente vorgestellt, bei denen die Änderung der Resonanzfrequenz negativ war, weil neue Schichten auf die Sensoroberfläche aufgelagert wurden. Pharmazeutisch interessante, kolloidale Vehikelsysteme wie Liposomen oder Nanopartikel wurden in ihrem Adhäsionsverhalten untersucht. Modifizierungen fanden dabei zum einen an den Vehikelsystemen selbst statt. Zum anderen wurde die Funktionsschicht des Sensors verändert. So zeigte sich ein deutlicher Einfluss des Gehaltes nichtionischer Tenside in Liposomen auf das Adhäsionsverhalten sowohl für hydrophil als auch für hydrophob beschichtete Sensorquarze. Der Einfluss des zur Herstellung von Nanopartikeln gewählten Polymers auf das Anlagerungsverhalten an immobilisierte Heparinschichten konnte in Kapitel 4.2 gezeigt werden. Partikelgröße und Oberflächenladung der Partikel bestimmen hier die Adhäsionseigenschaften. Aufgelagerte Wechschichten aus Polyelektrolyten führen ebenfalls zu negativen Verschiebungen der Resonanzfrequenz. Dabei war, wie bei den Vehikelsystemen, eine Auswertung der veränderten Dämpfungseigenschaften des Sensors sinnvoll, um die Aussagen der Experimente erweitern und besser interpretieren zu können.

Positive Verschiebungen der Resonanzfrequenz wurden bei den Versuchen zum Abbau von immobilisierten Schichten erhalten (Kapitel 4.5 und 4.6). Sowohl der durch Hydrolasen beschleunigte Abbau eines Polymers, als auch der Verdau von bovinem  $\beta$ -Casein mit Pepsin bzw. Trypsin konnten durch die QCM in ihrem Verlauf untersucht werden. Dabei wurde am Beispiel des Caseins auch die Möglichkeit gezeigt, Einflüsse auf eine immobilisierte Funktionsschicht mittels QCM zu verfolgen.

## 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Die vorgestellten Untersuchungen machen deutlich, dass die QCM-Analytik nicht nur bei materialwissenschaftlichen und biophysikalischen Forschungen Verwendung finden kann, sondern dass sie in hohem Maße für die anwendungsbezogenen Fragestellungen der pharmazeutischen Forschung tauglich ist. Die gezeigten Experimente zeigen die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten. Sehr einfache aber auch komplex aufgebaute Beschichtungen des Sensorquarzes erlauben einen der Fragestellung angepassten Aufbau des Experiments. Eine unabhängige Analyse dieser Sensorbeschichtung ist oft sinnvoll und kann teilweise auch Voraussetzung für ein erfolgreiches Experiment sein. Ein modulares QCM-System erlaubt darüber hinaus sehr verschiedene Versuchsanordnungen die wiederum an die individuelle Fragestellung angepasst werden können. Wie das System nach dem Beginn des Experiments möglichst bedienerunabhängig betrieben werden kann, wurde ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt. Ein weiterer Punkt dabei war die Eliminierung von Störeinflüssen wie Temperaturschwankungen und elektromagnetische Felder. Mit den gezeigten Modifikationen stellt das eingesetzte QCM-System ein leistungsfähiges und vielfältig anwendbares Analysensystem für die pharmazeutische Forschung dar. Die Charakteristik der pharmazeutischen Analytik, verschiedene Untersuchungsmethoden für die Bearbeitung einer wissenschaftlichen Aufgabe zu kombinieren, erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass dabei zukünftig auch akustische Sensoren wie die QCM verstärkt eine Rolle spielen. Wie einleitend erwähnt, ist dafür eine relativ einfache und sichere Bedienbarkeit Voraussetzung. Hier sind neben einer anwenderfreundlichen Bedienung der Geräte selbst vor allem Standardprozeduren, zum Beispiel für Reinigungs- und Beschichtungsschritte, hilfreich, wie sie in zunehmender Zahl entwickelt und publiziert werden. Über die praktische Arbeit mit der QCM hinaus sind aber auch die Entwicklungen zu den theoretischen Grundlagen von besonderem Interesse. Richtige und praktisch verwertbare Ergebnisse sind nur zu erzielen, wenn die entsprechenden Regeln und Modelle anwendungsspezifisch in Mess- und Auswerteverfahren, inklusive der verwendeten

Software, integriert werden. Das stellt besonders hinsichtlich Einflussfaktoren und nichtgravimetrischer Sensorantwort eine Herausforderung dar. Wie bei jeder Analytik müssen zudem die physikalisch vorgegebenen Grenzen einer Methode bekannt sein. Um diese zu erkennen und gewünschte Informationen trotzdem zu erhalten, ist die schon mehrfach angesprochene Integration der Methode in eine Reihe sich ergänzender Verfahren sinnvoll. Beispiele dazu, wie Rasterkraftmikroskopie, Infrarotspektroskopie und Massenspektrometrie wurden in dieser Arbeit vorgestellt. Ellipsometrie und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie sind weitere wichtige und mehrfach in Kombination mit QCM beschriebene Methoden. Vor allem in Verbindung mit anderen Analyseverfahren kann die QCM ein wertvolles Werkzeug der pharmazeutischen Analytik werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Andersson, M., Andersson, J., Sellborn, A., Berglin, M., Nilsson, B. und Elwing, H.** (2005) Quartz crystal microbalance-with dissipation monitoring (QCM-D) for real time measurements of blood coagulation density and immune complement activation on artificial surfaces. *Biosens Bioelectron* **21** (1): 79-86.
- Auge, J., Hauptmann, P., Eichelbaum, F. und Rösler, S.** (1994) Quartz crystal microbalance sensor in liquids. *Sensors and Actuators B* **18-19**: 518-522.
- Auge, J.** (2005) LiquiLab 21 - Technische Beschreibung, Institut für Automation und Kommunikation e.V., [http://www.ifak-md.de/fileadmin/home/user/auge/liquilab21\\_v3\\_deutsch.pdf](http://www.ifak-md.de/fileadmin/home/user/auge/liquilab21_v3_deutsch.pdf)
- Bauermann, L. P. und Bartlett, P. N.** (2005) EQCM measurements of the ion and solvent flux in thin poly(aniline)-poly(styrenesulfonate) films during redox switching. *Electrochim Acta* **50** (7-8): 1537-1546.
- Behling, C., Lucklum, R. und Hauptmann, P.** (1998) The non-gravimetric quartz crystal resonator response and its application for determination of polymer shear modulus. *Measurement Science and Technology* **9** (11): 1886.
- Binnig, G., Quate, C. F. und Gerber, C.** (1986) Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56** (9): 930-933.
- Boddohi, S., Killingsworth, C. E. und Kipper, M. J.** (2008) Polyelectrolyte multilayer assembly as a function of pH and ionic strength using the polysaccharides chitosan and heparin. *Biomacromolecules* **9** (7): 2021-2028.
- Brown, M. J., Hillman, A. R., Martin, S. J., Cernosek, R. W. und Bandey, H. L.** (2000) Manipulation of electroactive polymer film viscoelasticity: the roles of applied potential and frequency. *J Mater Chem* **10** (1): 115-126.
- Bunch, J., Clench, M. R. und Richards, D. S.** (2004) Determination of pharmaceutical compounds in skin by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18** (24): 3051-3060.
- Buttry, D. A. und Ward, M. D.** (1992) Measurement of interfacial processes at electrode surfaces with the electrochemical quartz crystal microbalance. *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* **92** (6): 1355-1379.
- Campos, L. A. und Sancho, J.** (2003) The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH. *FEBS Lett* **538** (1-3): 89-95.
- Caprioli, R. M., Farmer, T. B. und Gile, J.** (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* **69** (23): 4751-4760.
- Carrigan, S. D., Scott, G. und Tabrizian, M.** (2005) Real-time QCM-D immunoassay through oriented antibody immobilization using cross-linked hydrogel biointerfaces. *Langmuir* **21** (13): 5966-5973.

- Caruso, F., Rodda, E., Furlong, D. N., Niikura, K. und Okahata, Y.** (1997) Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development. *Anal Chem* **69** (11): 2043-2049.
- Chaki, N. K. und Vijayamohanan, K.** (2002) Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens Bioelectron* **17** (1-2): 1-12.
- Chaurand, P. und Caprioli, R. M.** (2002) Direct profiling and imaging of peptides and proteins from mammalian cells and tissue sections by mass spectrometry. *Electrophoresis* **23** (18): 3125-3135.
- Cho, Y.-K., Kim, S., Kim, Y. A., Lim, H. K., Lee, K., Yoon, D., Lim, G., Pak, Y. E., Ha, T. H. und Kim, K.** (2004) Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization using in situ quartz crystal microbalance, fluorescence spectroscopy, and surface plasmon resonance. *J Colloid Interface Sci* **278** (1): 44-52.
- Christ, K., Ruettinger, H.-H., Hoepfner, M., Rothe, U. und Bendas, G.** (2005) The detection of UV-induced membrane damages by a combination of two biosensor techniques. *Photochem Photobiol* **81** (Nov./Dec.): 1417-1423.
- Cordeschi, M., Di Paola, L., Marrelli, L. und Maschietti, M.** (2003) Net proton charge of beta- and kappa-casein in concentrated aqueous electrolyte solutions. *Biophys Chem* **103** (1): 77-88.
- Cosman, N. P. und Roscoe, S. G.** (2004) Electrochemical quartz crystal nanobalance to detect solvent displacement by pH-induced conformational changes of proteins at Pt. *Anal Chem* **76** (19): 5945-5952.
- Daikhin, L. und Urbakh, M.** (1997) Influence of surface roughness on the quartz crystal microbalance response in a solution. *Faraday Discussion* **107**: 27-38.
- Daikhin, L., Gileadi, E., Katz, G., Tsionsky, V., Urbakh, M. und Zagidulin, D.** (2002) Influence of Roughness on the Admittance of the Quartz Crystal Microbalance Immersed in Liquids. *Anal Chem* **74** (3): 554-561.
- Dickert, F. L., Hayden, O., Bindeus, R., Mann, K. J., Blaas, D. und Waigmann, E.** (2004) Bioimprinted QCM sensors for virus detection-screening of plant sap. *Anal Bioanal Chem* **378** (8): 1929-1934.
- Du, B., Goubaidouline, I. und Johannsmann, D.** (2004) Effects of laterally heterogeneous slip on the resonance properties of quartz crystals immersed in liquids. *Langmuir* **20** (24): 10617-10624.
- Ebara, Y. und Okahata, Y.** (1994) A Kinetic Study of Concanavalin A Binding to Glycolipid Monolayers by Using a Quartz-Crystal Microbalance. *J Am Chem Soc* **116** (25): 11209-11212.
- Eddowes, M. J.** (1987) Direct immunochemical sensing: basic chemical principles and fundamental limitations. *Biosensors* **3** (1): 1-15.
- El Maghraby, G. M., Williams, A. C. und Barry, B. W.** (2004) Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. *Int J Pharm* **276** (1-2): 143-161.
- Ersöz, A., Denizli, A., Ozcan, A. und Say, R.** (2005) Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron* **20** (11): 2197-2202.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. und Benita, S.** (1989) Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int J Pharm* **55** (1): R1-R4.

- Forzani, E. S., Lopez Teijelo, M., Nart, F., Calvo, E. J. und Solis, V. M.** (2003) Effect of the polycation nature on the structure of layer-by-layer electrostatically self-assembled multilayers of polyphenol oxidase. *Biomacromolecules* **4** (4): 869-879.
- Franck, J., Arafah, K., Elayed, M., Bonnel, D., Vergara, D., Jacquet, A., Vinatier, D., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I. und Salzert, M.** (2009) MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8** (9): 2023-2033.
- Fredriksson, C., Kihlman, S., Rodahl, M. und Kasemo, B.** (1998) The Piezoelectric Quartz Crystal Mass and Dissipation Sensor: A Means of Studying Cell Adhesion. *Langmuir* **14**: 248-251.
- Galli Marxer, C., Collaud Coen, M., Greber, T., Greber, U. F. und Schlapbach, L.** (2003) Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative of viscosity changes. *Anal Bioanal Chem* **377** (3): 578-586.
- Garden, R. W. und Sweedler, J. V.** (2000) Heterogeneity within MALDI samples as revealed by mass spectrometric imaging. *Anal Chem* **72** (1): 30-36.
- Gerdon, A. E., Wright, D. W. und Cliffel, D. E.** (2005) Quartz crystal microbalance detection of glutathione-protected nanoclusters using antibody recognition. *Anal Chem* **77** (1): 304-310.
- Ginger, M. R. und Grigor, M. R.** (1999) Comparative aspects of milk caseins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **124** (2): 133-145.
- Glasmästar, K., Larsson, C., Hoeoek, F. und Kasemo, B.** (2002) Protein Adsorption on Supported Phospholipid Bilayers. *J Colloid Interface Sci* **246** (1): 40-47.
- Goennenwein, S., Tanaka, M., Hu, B., Moroder, L. und Sackmann, E.** (2003) Functional incorporation of integrins into solid supported membranes on ultrathin films of cellulose: impact on adhesion. *Biophys J* **85** (1): 646-655.
- Griesser, H. J., Kingshott, P., McArthur, S. L., McLean, K. M., Kinsel, G. R. und Timmons, R. B.** (2004) Surface-MALDI mass spectrometry in biomaterials research. *Biomaterials* **25** (20): 4861-4875.
- Hayden, O., Bindeus, R. und Dickert, F. L.** (2003) Combining atomic force microscope and quartz crystal microbalance studies for cell detection. *Measurement Science and Technology* **14** (11): 1876-1881.
- He, H., Xie, Q. und Yao, S.** (2005) An electrochemical quartz crystal impedance study on anti-human immunoglobulin G immobilization in the polymer grown during dopamine oxidation at an Au electrode. *J Colloid Interface Sci* **289** (2): 446-454.
- Hildebrand, A., Schaedlich, A., Rothe, U. und Neubert, R. H. H.** (2002) Sensing Specific Adhesion of Liposomal and Micellar Systems with Attached Carbohydrate Recognition Structures at Lectin Surfaces. *J Colloid Interface Sci* **249** (2): 274-281.
- Hillberg, A. L. und Tabrizian, M.** (2008) Biomolecule imprinting: Developments in mimicking dynamic natural recognition systems. *IRBM* **29** (2-3): 89-104.
- Horne, D. S.** (2002) Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **7** (5,6): 456-461.
- Hoshi, T., Akase, S. und Anzai, J.-i.** (2002) Preparation of multilayer thin films containing avidin through sugar-lectin interactions and their binding properties. *Langmuir* **18** (18): 7024-7028.
- Ihalainen, P. und Peltonen, J.** (2004) Immobilization of streptavidin onto biotin-functionalized Langmuir-Schaefer binary monolayers chemisorbed on gold. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **B102** (2): 207-218.

- Ishida, N. und Biggs, S.** (2007) Direct observation of the phase transition for a poly(N-isopropylacryamide) layer grafted onto a solid surface by AFM and QCM-D. *Langmuir* **23** (22): 11083-11088.
- Iwasaki, Y., Tanaka, S., Hara, M., Ishihara, K. und Nakabayashi, N.** (1997) Stabilization of liposomes attached to polymer surfaces having phosphorylcholine groups. *J Colloid Interface Sci* **192** (2): 432-439.
- Jhon, Y. K., Bhat, R. R., Jeong, C., Rojas, O. J., Szleifer, I. und Genzer, J.** (2006) Salt-Induced Depression of Lower Critical Solution Temperature in a Surface-Grafted Neutral Thermoresponsive Polymer. *Macromolecular Rapid Communications* **27** (9): 697-701.
- Kanazawa, K. K. und Gordon, J. G.** (1985a) The Oscillation Frequency of a Quartz Resonator in Contact with a Liquid. *Anal Chim Acta* **175**: 99-105.
- Kanazawa, K. K. und Gordon, J. G.** (1985b) Frequency of a Quartz Microbalance in Contact with Liquid. *Anal Chem* **57**: 1171-1172.
- Kanazawa, K. K.** (2005) Some basics for operating and analyzing data using the thickness shear mode resonator. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* **130** (11): 1459-1464.
- Kankare, J.** (2002) Sauerbrey Equation of Quartz Crystal Microbalance in Liquid Medium. *Langmuir* **18** (18): 7092-7094.
- Kawaguchi, T., Yasuda, H., Shimazu, K. und Porter, M. D.** (2000) Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Investigation of the Reductive Desorption of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols and Mercaptoalkanoic Acids on Au. *Langmuir* **16** (25): 9830-9840.
- Keller, C. A., Glasmästar, K., Zhadanov, V. P. und Kasemo, B.** (2000) Formation of Supported Membranes from Vesicles. *Phys Rev Lett* **83** (23): 5443-5446.
- Kim, C. H., Han, S. W., Ha, T. H. und Kim, K.** (1999) o-Xylene-a,a'-dithiol Monolayer Film on Gold: Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Quartz Crystal Microbalance, and Atomic Force Microscopy Study. *Langmuir* **15** (24): 8399-8404.
- Kipling, A. L. und Thompson, M.** (1990) Network analysis method applied to liquid-phase acoustic wave sensors. *Anal Chem* **62** (14): 1514-1519.
- Kirchhof, K.** (2009) Nanostrukturierte Oberflächen biomedizinischer Materialien zur Steuerung von Zelladhäsion und -proliferation, Dissertation, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
- Kitano, K., Inoue, Y., Matsuno, R., Takai, M. und Ishihara, K.** (2009) Nanoscale evaluation of lubricity on well-defined polymer brush surfaces using QCM-D and AFM. *Colloids Surf B Biointerfaces* **74** (1): 350-357.
- Kreml, P., Schleinzer, G. und Wallnofer, W.** (1997) Gallium phosphate, GaPO<sub>4</sub>: a new piezoelectric crystal material for high-temperature sensorics. *Sensors and Actuators A: Physical, Proceedings of EUROSENSORS X* **61** (1-3): 361-363.
- Laricchia-Robbio, L. und Revoltella, R. P.** (2004) Comparison between the surface plasmon resonance (SPR) and the quartz crystal microbalance (QCM) method in a structural analysis of human endothelin-1. *Biosens Bioelectron* **19** (12): 1753-1758.
- Larsson, C., Rodahl, M. und Höök, F.** (2003) Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization on a 2D arrangement of streptavidin on a biotin-modified lipid bilayer supported on SiO<sub>2</sub>. *Anal Chem* **75** (19): 5080-5087.
- Lebed, K., Kulik, A. J., Forro, L. und Lekka, M.** (2006) Lectin-carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance. *J Colloid Interface Sci* **299** (1): 41-48.
- Lee, H. S. und Lee, K. J.** (2000) Cathepsin B inhibitory peptides derived from beta-casein. *Peptides* **21** (6): 807-809.



- Lehr, C.-M.** (2000) Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J Control Release* **65**: 19-29.
- Li, G., Morita, S., Ye, S., Tanaka, M. und Osawa, M.** (2004) Quartz Crystal Microbalance and Infrared Reflection Absorption Spectroscopy Characterization of Bisphenol A Absorption in the Poly(acrylate) Thin Films. *Anal Chem* **76** (3): 788-795.
- Liebau, M., Bendas, G., Rothe, U. und Neubert, R.** (1997) Adhesive interactions of liposomes with supported planar bilayers on QCM as a new adhesion model. *Sensors and Actuators B* **47**: 239-245.
- Lin, T.-Y., Hu, C.-H. und Chou, T.-C.** (2004) Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor. *Biosens Bioelectron* **20** (1): 75-81.
- Lis, H. und Sharon, N.** (1998) Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev* **98**: 637-674.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. und Prohaska, E.** (2002) An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem* **74** (17): 4488-4495.
- Liu, Y., Yu, X., Zhao, R., Shangguan, D.-H., Bo, Z. und Liu, G.** (2003a) Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution. *Biosens Bioelectron* **18** (11): 1419-1427.
- Liu, Y., Yu, X., Zhao, R., Shangguan, D.-H., Bo, Z. und Liu, G.** (2003b) Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents. *Biosens Bioelectron* **19** (1): 9-19.
- Liu, Y., Tang, X., Liu, F. und Li, K. a.** (2005) Selection of Ligands for Affinity Chromatography Using Quartz Crystal Biosensor. *Anal Chem: ACS ASAP*.
- Loken, M. K., Terrill, K. D., Marvin, J. F. und Mosser, D. G.** (1958) Comparative studies of three methods for measuring pepsin activity. *J Gen Physiol* **42** (2): 251-258.
- Lu, C. und Czanderna, A. W.** (1984) *Microbalances*. ELSEVIER, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.
- Lu, F., Lee, H. P. und Lim, S. P.** (2003) Mechanical description of interfacial slips for quartz crystal microbalances with viscoelastic liquid loading. *Smart Materials and Structures* **12** (6): 881-888.
- Lucklum, R.** (2002) Resonante Sensoren, Habilitationsschrift, Institut für Mikro- und Sensorsysteme, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
- Lucklum, R. und Hauptmann, P.** (2003) Transduction mechanism of acoustic-wave based chemical and biochemical sensors. *Measurement Science and Technology* **14** (11): 1854-1864.
- Lucklum, R.** (2005) Non-gravimetric contributions to QCR sensor response. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* **130** (11): 1465-1473.
- Lüthgens, E., Herrig, A., Kastl, K., Steinem, C., Reiss, B., Wegener, J., Pignataro, B. und Janshoff, A.** (2003) Adhesion of liposomes: A quartz crystal microbalance study. *Measurement Science and Technology* **14** (11): 1865-1875.
- Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S. und Mascini, M.** (2003) Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Biosens Bioelectron* **18** (2-3): 129-140.
- Martin, B. A. und Hager, H. E.** (1989) Velocity profile on quartz crystals oscillating in liquids. *J Appl Phys* **65** (7): 2630-2635.

- Martin, S. J., Granstaff, V. E. und Frye, G. C.** (1991) Characterization of a Quartz Crystal Microbalance with Simultaneous Mass and Liquid Loading. *Anal Chem* **63**: 2272-2281.
- Marx, K. A., Zhou, T., Montrone, A., Schulze, H. und Braunhut, S. J.** (2001) A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocodazole concentrations. *Biosens Bioelectron* **16** (9-12): 773-782.
- Mecea, V. M., Carlsson, J. O. und Bucur, R. V.** (1996) Extensions of the quartz-crystal-microbalance technique. *Sens Actuators, A* **A53** (1-3): 371-378.
- Mecea, V. M.** (2006) Is quartz crystal microbalance really a mass sensor? *Sens Actuators, A* **A128** (2): 270-277.
- Meisel, H. und Schlimme, E.** (1994) Inhibitors of angiotensin converting enzyme derived from bovine casein (casokinins). in: *Beta-Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments*. Brantl, V. und Teschemacher, H. (Hrsg.), Weinheim: VCH.: 27-33.
- Meistermann, H., Norris, J. L., Aerni, H. R., Cornett, D. S., Friedlein, A., Erskine, A. R., Augustin, A., De Vera Mudry, M. C., Ruepp, S., Suter, L., Langen, H., Caprioli, R. M. und Ducret, A.** (2006) Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Mol Cell Proteomics* **5** (10): 1876-1886.
- Mellbring, O., Oiseth, S. K., Krozer, A., Lausmaa, J. und Hjertberg, T.** (2001) Spin Coating and Characterization of Thin High-Density Polyethylene Films. *Macromolecules* **34** (21): 7496-7503.
- Morita, S., Nukui, M. und Kuboi, R.** (2006) Immobilization of liposomes onto quartz crystal microbalance to detect interaction between liposomes and proteins. *J Colloid Interface Sci* **298** (2): 672-678.
- Moya, S. E., Brown, A. A., Azzaroni, O. und Huck, W. T. S.** (2005) Following polymer brush growth using the quartz crystal microbalance technique. *Macromolecular Rapid Communications* **26** (14): 1117-1121.
- Nakano, K., Sato, T., Tazaki, M. und Takagi, M.** (2000) Self-assembled monolayer formation from decaneselenol on polycrystalline gold as characterized by electrochemical measurements, quartz-crystal microbalance, XPS, and IR spectroscopy. *Langmuir* **16** (5): 2225-2229.
- Naumann, R., Schiller, S. M., Giess, F., Grohe, B., Hartman, K. B., Kaercher, I., Koeper, I., Luebben, J., Vasilev, K. und Knoll, W.** (2003) Tethered Lipid Bilayers on Ultraflat Gold Surfaces. *Langmuir* **19** (13): 5435-5443.
- Nomura, T. und Okuhara, M.** (1982) Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Anal Chim Acta* **142**: 281-284.
- Nonogaki, T., Xu, S., Kugimiya, S.-i., Sato, S., Miyata, I. und Yonese, M.** (2000) Two Dimensional Auto-Organized Nanostructure Formation of Hyaluronate on Bovine Serum Albumin Monolayer and Its Surface Tension. *Langmuir* **16** (9): 4272-4278.
- Owen, T. W., Al-Kaysi, R. O., Bardeen, C. J. und Cheng, Q.** (2007) Microgravimetric immunosensor for direct detection of aerosolized influenza A virus particles. *Sensors and Actuators B: Chemical* **126** (2): 691-699.
- Pax, M., Rieger, J., Eibl, R. H., Thielemann, C. und Johannsmann, D.** (2005) Measurements of fast fluctuations of viscoelastic properties with the quartz crystal microbalance. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* **130** (11): 1474-1477.
- Pei, Z., Anderson, H., Aastrup, T. und Ramstrom, O.** (2005) Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal microbalance. *Biosens Bioelectron* **21** (1): 60-66.

- Percival, C. J., Stanley, S., Braithwaite, A., Newton, M. I. und McHale, G. (2002) Molecular imprinted polymer coated QCM for the detection of nandrolone. *Analyst* **127** (8): 1024-1026.
- Piacham, T., Josell, A., Arwin, H., Prachayasittikul, V. und Ye, L. (2005) Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator. *Anal Chim Acta* **536** (1-2): 191-196.
- Pignataro, B., Steinem, C., Galla, H.-J., Fuchs, H. und Janshoff, A. (2000) Specific Adhesion of Vesicles Monitored by Scanning Force Microscopy and Quartz Crystal Microbalance. *Biophys J* **78**: 487-498.
- Porfirio, Z., Prado, S. M., Vancetto, M. D., Fratelli, F., Alves, E. W., Raw, I., Fernandes, B. L., Camargo, A. C. und Lebrun, I. (1997) Specific peptides of casein pancreatic digestion enhance the production of tetanus toxin. *J Appl Microbiol* **83** (6): 678-684.
- Q-Sense (2009) Automated QCM-D Measurements Q-Sense E4 Auto, [http://www.q-sense.com/dbfiles/Q-Sense\\_E4%20Auto.pdf](http://www.q-sense.com/dbfiles/Q-Sense_E4%20Auto.pdf)
- Q-Sense (2010) Q-Sense Sensors, <http://www.q-sense.com/dbfiles/Q-Sense%20Sensors.pdf>
- Reimhult, E., Hoeoek, F. und Kasemo, B. (2003) Intact Vesicle Adsorption and Supported Biomembrane Formation from Vesicles in Solution: Influence of Surface Chemistry, Vesicle Size, Temperature, and Osmotic Pressure. *Langmuir* **19** (5): 1681-1691.
- Reimhult, E., Larsson, C., Kasemo, B. und Hoeoek, F. (2004) Simultaneous Surface Plasmon Resonance and Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring Measurements of Biomolecular Adsorption Events Involving Structural Transformations and Variations in Coupled Water. *Anal Chem* **76** (24): 7211-7220.
- Reiss, B., Janshoff, A., Steinem, C., Seebach, J. und Wegener, J. (2003) Adhesion Kinetics of Functionalized Vesicles and Mammalian Cells: A Comparative Study. *Langmuir* **19** (5): 1816-1823.
- Reyzer, M. L., Hsieh, Y., Ng, K., Korfmacher, W. A. und Caprioli, R. M. (2003) Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **38** (10): 1081-1092.
- Richter, R., Mukhopadhyay, A. und Brisson, A. (2003) Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. *Biophys J* **85** (5): 3035-3047.
- Richter, R. P. und Brisson, A. (2004) QCM-D on mica for parallel QCM-D-AFM studies. *Langmuir* **20** (11): 4609-4613.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G. und Wichers, H. J. (2001a) Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* **49** (1): 295-302.
- Rival, S. G., Fornaroli, S., Boeriu, C. G. und Wichers, H. J. (2001b) Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J Agric Food Chem* **49** (1): 287-294.
- Rodahl, M., Höök, F., Krozer, A., Brzezinski, P. und Kasemo, B. (1995) Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev Sci Instrum* **66** (7): 3924-3930.
- Rodahl, M., Höök, F. und Kasemo, B. (1996) QCM Operation in Liquids: An Explanation of Measured Variation in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity. *Anal Chem* **68** (No. 13): 2219-2227.

- Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C. A., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M. und Kasemo, B.** (1997) Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discussion* **107**: 229-246.
- Rohner, T. C., Staab, D. und Stoeckli, M.** (2005) MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech Ageing Dev* **126** (1): 177-185.
- Sabatani, E., Ticianelli, E., Redondo, A., Rubinstein, I., Rishpon, J. und Gottesfeld, S.** (1993) Morphological effects in conducting polymer films studied by combined QCM and spectroscopic ellipsometry. *Synth Met* **55** (2-3): 1293-1298.
- Sauerbrey, G.** (1959) The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing. *Zeitschrift fuer Physik* **155**: 206-222.
- Schmelzer, C. E. H., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R. H. H. und Raith, K.** (2004) Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine beta-casein. *J Chromatogr A* **1055** (1-2): 87-92.
- Schneider, O., Bund, A., Ispas, A., Borissenko, N., El Abedin, S. Z. und Endres, F.** (2005) An EQCM Study of the Electropolymerization of Benzene in an Ionic Liquid and Ion Exchange Characteristics of the Resulting Polymer Film. *Journal of Physical Chemistry B* **109** (15): 7159-7168.
- Schröder, J., Borngaber, R., Eichelbaum, F. und Hauptmann, P.** (2002) Advanced interface electronics and methods for QCM. *Sens Actuators, A* **A97-98**: 543-547.
- Serizawa, T., Goto, H., Kishida, A., Endo, T. und Akashi, M.** (1999) Improved alternate deposition of biodegradable naturally occurring polymers onto a quartz crystal microbalance. *J Polym Sci, Part A: Polym Chem* **37** (6): 801-804.
- Serizawa, T., Yamaguchi, M., Matsuyama, T. und Akashi, M.** (2000) Alternating bioactivity of polymeric layer-by-layer assemblies: anti- vs procoagulation of human blood on chitosan and dextran sulfate layers. *Biomacromolecules* **1** (3): 306-309.
- Serizawa, T., Yamaguchi, M. und Akashi, M.** (2002) Enzymatic Hydrolysis of a Layer-by-Layer Assembly Prepared from Chitosan and Dextran Sulfate. *Macromolecules* **35** (23): 8656-8658.
- Shons, A., Dorman, F. und Najarian, J.** (1972) An Immunospecific Microbalance. *Journal of Biomedical and Material Research* **6**: 565-570.
- Simões, S. I., Tapadas, J. M., Marques, C. M., Cruz, M. E., Martins, M. B. und Cevc, G.** (2005) Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. *Eur J Pharm Sci* **26** (3-4): 307-317.
- Solon, E. G., Schweitzer, A., Stoeckli, M. und Prideaux, B.** (2010) Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS imaging in pharmaceutical discovery and development. *The AAPS Journal* **12** (1): 11-26.
- Spassov, L.** (1992) Piezoelectric quartz resonators as highly sensitive temperature sensors. *Sensors and Actuators A: Physical* **30** (1-2): 67-72.
- Spengler, B. und Hubert, M.** (2002) Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* **13** (6): 735-748.
- Stalgren, J. J., Claesson, P. M. und Warnheim, T.** (2001) Adsorption of liposomes and emulsions studied with a quartz crystal microbalance. *Adv Colloid Interface Sci* **89-90**: 383-394.

- Stalgren, J. J. R., Eriksson, J. und Boschkova, K.** (2002) A Comparative Study of Surfactant Adsorption on Model Surfaces Using the Quartz Crystal Microbalance and the Ellipsometer. *J Colloid Interface Sci* **253** (1): 190-195.
- Stoeckli, M., Farmer, T. B. und Caprioli, R. M.** (1999) Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* **10** (1): 67-71.
- Stoeckli, M., Staab, D., Staufenbiel, M., Wiederhold, K. H. und Signor, L.** (2002) Molecular imaging of amyloid beta peptides in mouse brain sections using mass spectrometry. *Anal Biochem* **311** (1): 33-39.
- Su, X., Robelek, R., Wu, Y., Wang, G. und Knoll, W.** (2004) Detection of point mutation and insertion mutations in DNA using a quartz crystal microbalance and MutS, a mismatch binding protein. *Anal Chem* **76** (2): 489-494.
- Su, X. und Zhang, J.** (2004) Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance for human IgE quantification. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **B100** (3): 309-314.
- Su, X., Wu, Y. J. und Knoll, W.** (2005a) Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization. *Biosens Bioelectron* **21** (5): 719-726.
- Su, X., Wu, Y.-J., Robelek, R. und Knoll, W.** (2005b) Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance Study of Streptavidin Film Structure Effects on Biotinylated DNA Assembly and Target DNA Hybridization. *Langmuir* **21** (1): 348-353.
- Sugiura, Y., Shimma, S. und Setou, M.** (2006) Two-Step Matrix Application Technique To Improve Ionization Efficiency for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization in Imaging Mass Spectrometry. *Anal Chem: ACS ASAP*.
- Suri, C. R. und Mishra, G. C.** (1996) Activating piezoelectric crystal surface by silanization for microgravimetric immunobiosensor application. *Biosens Bioelectron* **11** (No.12): 1199-1205.
- Taranekar, P., Baba, A., Fulghum, T. M. und Advincula, R.** (2005) Conjugated polymer network films from precursor polymers: electro copolymerization of a binary electroactive monomer composition. *Macromolecules* **38** (9): 3679-3687.
- Tezcaner, A., Hicks, D., Boulmedais, F., Sahel, J., Schaaf, P., Voegel, J.-C. und Lavalle, P.** (2005) Polyelectrolyte Multilayer Films as Substrates for Photoreceptor Cells. *Biomacromolecules: ACS ASAP*.
- Todd, P. J., Schaaff, T. G., Chaurand, P. und Caprioli, R. M.** (2001) Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization. *J Mass Spectrom* **36** (4): 355-369.
- Urbakh, M. und Daikhin, L.** (1994) Roughness effect on the frequency of a quartz-crystal resonator in contact with a liquid. *Physical Review B Condensed Matter* **49** (7): 4866-4870.
- Vermette, P., Griesser, H. J., Kambouris, P. und Meagher, L.** (2004) Characterization of surface-immobilized layers of intact liposomes. *Biomacromolecules* **5** (4): 1496-1502.
- Vessely, C. R., Carpenter, J. F. und Schwartz, D. K.** (2005) Calcium-induced changes to the molecular conformation and aggregate structure of beta-casein at the air-water interface. *Biomacromolecules* **6** (6): 3334-3344.
- Viana, A. S., Kalaji, M. und Abrantes, L. M.** (2003) Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Study of Self-Assembled Monolayers and Multilayers of Ferrocenylthiol Derivatives on Gold. *Langmuir* **19** (22): 9542-9544.

- Vorob'ev, M. M., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M. und Haertle, T.** (2000) Kinetics of beta-casein hydrolysis by wild-type and engineered trypsin. *Biopolymers* **54** (5): 355-364.
- Vörös, J.** (2004) The density and refractive index of adsorbing protein layers. *Biophys J* **87** (1): 553-561.
- Ward, M. D. und Delawski, E. J.** (1991) Radial mass sensitivity of the quartz crystal microbalance in liquid media. *Anal Chem* **63** (9): 886-890.
- Wegener, J., Janshoff, A. und Galla, H.-J.** (1998) Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *European Biophysical Journal* **28**: 26-37.
- West, P. und Starostina, N.** (2004) Atomic force microscopy. *Adv Mater Process* **162** (2): 35-37.
- Wu, T. Z., Su, C. C., Chen, L. K., Yang, H. H., Tai, D. F. und Peng, K. C.** (2005) Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. *Biosens Bioelectron* **21** (5): 689-695.
- Yang, Z., Si, S., Zhang, C. und Song, G.** (2007) Quartz crystal microbalance studies on bilirubin adsorption on self-assembled phospholipid bilayers. *J Colloid Interface Sci* **305** (1): 1-6.
- Zawisza, I., Burgess, I., Szymanski, G., Lipkowski, J., Majewski, J. und Satija, S.** (2004) Electrochemical, neutron reflectivity and in situ PM-FT-IRRAS studies of a monolayer of n-octadecanol at a Au(1 1 1) electrode surface. *Electrochim Acta* **49** (22-23): 3651-3664.
- Zhang, H., Zhao, R., Chen, Z., Shanguan, D. H. und Liu, G.** (2005a) QCM-FIA with PGMA coating for dynamic interaction study of heparin and antithrombin III. *Biosens Bioelectron* **21** (1): 121-127.
- Zhang, J., Senger, B., Vautier, D., Picart, C., Schaaf, P., Voegel, J. C. und Lavalle, P.** (2005b) Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. *Biomaterials* **26** (16): 3353-3361.
- Zhang, X., Fu, X., Zhang, H., Liu, C., Jiao, W. und Chang, Z.** (2005c) Chaperone-like activity of beta-casein. *Int J Biochem Cell Biol* **37** (6): 1232-1240.
- Zhu, H., Ji, J. und Shen, J.** (2004) Biomacromolecules electrostatic self-assembly on 3-dimensional tissue engineering scaffold. *Biomacromolecules* **5** (5): 1933-1939.
- Zilberman, G. und Smith, A. L.** (2005) QCM/HCC as a platform for detecting the binding of warfarin to an immobilized film of human serum albumin. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)* **130** (11): 1483-1489.

## 8 EIGENE PUBLIKATIONEN

Publikationen in Fachzeitschriften:

- Huenerbein, A., Sipoli Marques, M. A., dos Santos Pereira, A. und Radler de Aquino Neto, F.** (2003) Improvement in steroid screening for doping control with special emphasis on stanozolol. *Journal of Chromatography, A* **985** (1-2): 375-386.
- Huenerbein, A., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H.** (2007) Real-time monitoring of peptic and tryptic digestions of bovine beta-casein using quartz crystal microbalance. *Anal Chim Acta* **584** (1): 72-77.
- Narayanan, S., Hünerbein, A., Getie, M., Jäckel, A. und Neubert, R. H. H.** (2007) Scavenging properties of metronidazole on free oxygen radicals in a skin lipid model system. *J Pharm Pharmacol* **59** (8): 1125-1130.

Buchbeiträge:

- Niepel, M., Kirchhof, K., Hünerbein, A., Neubert, R. und Groth, T.** (2008) Adhäsion und Vitalität von Fibroblasten auf Multischichten aus Polyethylenimin und Heparin, in: *Aktuelles aus der Klinischen Hämorheologie und Mikrozirkulation*, Pabst Science Publishers, Lengerich: 40-55.

Tagungsbeiträge:

- Schmelzer, C. E. H., Huenerbein, A., Raith, K. und Neubert, R. H. H.:** MALDI Imaging of Proteins and their Interaction Partners on Surfaces  
*38. Diskussionstagung der DGMS*, Rostock, 06.-09. März 2005 (Poster).
- Huenerbein, A., Schmelzer, C. E. H. und Neubert, R. H. H.:** Quartz Crystal Microbalance for On-line Investigations of Enzymatic Reactions on Dietary Proteins,  
*6th World Congress on Ultrasonics - Ultrasonics International*, Peking, 2005 (Poster).

- Schlatt-Masuth, B., Hempel, U., Coronel, D., Hünerbein, A., Lucklum, R. und Hauptmann, P.:** Influence of the intermediate layer on QCM *Euroensors XIX.*, Barcelona, 11. bis 14. September 2005, Proceedings, WA6.
- Raith, K., Schmelzer, C. E. H., Huenerbein, A. und Neubert, R. H. H.:** MALDI Imaging: Neue Perspektiven in der Pharmazeutischen Forschung, *Jahrestagung der DPhG 2005*, Mainz, 7. Oktober 2005 (Vortrag).
- Huenerbein, A. und Neubert, R. H. H.:** Influence of Surfactants on the Adhesion of Liposomes: A Quartz crystal microbalance study, *5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, and Pharmaceutical Technology*, Genf, 27. bis 30. März 2006 (Poster).
- Kirchhof, K., Huenerbein, A., Altankov, G. und Groth, T.:** Biomimetic Material Coatings using the Layer-by-Layer Technique, *2nd International Symposium "Interace Biology of Implants"*, Rostock, 17. bis 19. Mai 2006 (Poster).
- Kirchhof, K., Huenerbein, A., Altankow, G. und Groth, T.:** Layer-by-Layer Technique for the Formation of Extracellular Matrix-like Biomaterial Coatings, *2nd International Conference "Strategies in Tissue Engineering"*, Würzburg, 31. Mai bis 02. Juni 2006 (Poster).
- Huenerbein, A., Augsten, C., Maeder, K. und Neubert, R. H. H.:** The Adhesion of PLGA Nanoparticles studied with a new Cell Surface Model based on Quartz Crystal Microbalance, *Euroensors XX*, Göteborg, 17. bis 20. September 2006, Proceedings, T1B-P15.
- Huenerbein, A., Guenther, U. und Neubert, R. H. H.:** Polymeric Film Degradation studied by Quartz Crystal Microbalance, *Polypharma*, Halle, 25. bis 26. September 2006 (Poster).
- Huenerbein, A. und Neubert, R. H. H.:** Quartz crystal microbalance: Examples of use in pharmaceutical analysis *DPhG Joint Meeting*, Marburg, 4. bis 7. Oktober 2006 (Vortrag).
- Kirchhof, K., Hünerbein, A. und Groth, T.:** Formation of Biogenic Polyelectrolyte Multilayers, *Polymerwerkstoffe 2006*, 27. bis 29. September 2006, Halle (Poster).



## DANKSAGUNG

Das Entstehen der vorliegenden Arbeit verdanke ich auch einer Reihe von Personen, die an dieser Stelle erwähnt werden sollen.

Herrn Professor Dr. Dr. Reinhard Neubert danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe tätig sein zu können. Seine fachliche und vor allem organisatorische Unterstützung waren Voraussetzung, um das gestellte Thema zu bearbeiten.

Die Einbindung in die Arbeitsgruppen Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie ermöglichte auf verschiedenen Gebieten eine intensive Kooperation. Für eine konstruktive, kritische und freundschaftliche Zusammenarbeit bin ich Dr. Christian Schmelzer zu großem Dank verpflichtet. Vor allem die dargestellten massenspektrometrischen Messungen wären ohne ihn nicht Bestandteil dieser Arbeit. Aber auch die Diskussionen zu technischen Problemstellungen, z.B. bei der Entwicklung der Ventilsteuerung, haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Frau Dipl. Pharm. Ulrike Günther danke ich für die Anfertigung der IRRAS-Spektren, Herrn Dr. Christian Augsten für die Herstellung der Nanopartikel. Bei Frau Dr. Kristin Kirchhof möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den Versuchen mit den Polyelektrolytwechsellagen bedanken. Auch Dr. Sandra Heuschkel, Dr. Annett Schröter, PD Dr. Klaus Raith und vielen weiteren Mitarbeitern am Institut für Pharmazie danke ich für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dieter Reese und seinen Mitarbeitern aus der feinmechanischen Werkstatt. Ohne ihre hervorragende Arbeit und ihre konstruktiven Vorschläge wäre die Umsetzung vieler Ideen in tatsächlich einsetzbare Analysetechnik nicht möglich gewesen.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Hauptmann vom Institut für Mikro- und Sensorsysteme der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, insbesondere den Mitarbeitern Dr. Benedikt Schlatt-Masuth, Dr. Ulrike Hempel und PD Dr. Ralf Lucklum danke ich für eine gute Zusammenarbeit und einen informativen Erfahrungsaustausch. Herrn Dr. Anton Hauser möchte ich für die Anfertigung der AFM-Aufnahmen danken. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Matthias Höpfner und PD Dr. Ulrich Rothe vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität. Die Weitergabe ihrer Erfahrungen

mit dem LiquiLab 21 Experimentalsystem haben mir den praktischen Einstieg in die Arbeit mit der QCM sehr erleichtert.

Danken möchte ich abschließend meiner Familie, die mich nicht nur auf meinem beruflichen Weg bis heute unterstützt.

---

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

Name: Andreas Hünerbein  
Geburtsdatum / -ort: 06. März 1979 in Naumburg (Saale)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet, einen Sohn

## SCHULBILDUNG

1985 – 1991 Salztorschule Naumburg  
1991 – 1997 Domgymnasium Naumburg, Abschluss: Abitur

## WEHRDIENST

09/1997 – 10/1997 Panzerbataillon 403, Schwerin  
11/1997 – 06/1998 HFlgVsuStff 910, Heeresfliegerwaffenschule, Bückeburg

## AUSBILDUNG

10/1998 – 09/2002 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
07/2001-09/2001 Praktikum im Doping Control Laboratory, Ladetec,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasilien  
04/2003 – 09/2003 Pharmaziepraktikant in der Rathaus-Apotheke Tuttlingen  
12/2003 Approbation als Apotheker  
06/2010 Abschluss als Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

## WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

10/2002 – 03/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe  
Biopharmazie am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg  
10/2003 – 01/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe  
Biopharmazie am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg

**BERUFSTÄTIGKEIT**

seit 02/2007

selbstständiger Apotheker in Naumburg (Saale)

**MITGLIEDSCHAFT IN WISSENSCHAFTLICHEN VEREINIGUNGEN**

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG)

Gesellschaft für Dermopharmazie (GD)

Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik (APV)

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Absatz 2b der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorgelegte Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Andreas Hünerbein