

Erich Josef Uttenthaler

**Hochempfindliche akustische
Sensorelemente für die Flüssigkeits-
und Biosensorik**



Herbert Utz Verlag · Wissenschaft
München

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Ein Titeldatensatz für diese Publikation ist
bei Der Deutschen Bibliothek erhältlich

Zugleich: Dissertation, München, Univ. der Bundeswehr, 2002

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, der Entnahme von Abbildungen, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben – auch bei nur auszugsweiser Verwendung – vorbehalten.

Copyright © Herbert Utz Verlag GmbH 2002

ISBN 3-8316-0132-1

Printed in Germany

Herbert Utz Verlag GmbH, München

Tel.: 089/277791-00 – Fax: 089/277791-01

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	v
Summary	vi
Vorwort	vii
Inhaltsverzeichnis	xi
Kapitel 1 Einleitung	1
Kapitel 2 Theorie der akustischen Sensorelemente	5
2.1 Der piezoelektrische Effekt	5
2.2 Klassifizierung akustischer Sensorelemente.....	6
2.2.1 Elastische Volumenwellen.....	6
2.2.2 Oberflächenwellen.....	7
2.2.3 Plattenmoden.....	9
2.3 Der physikalische Messeffekt.....	10
2.3.1 Schwingquarzsensoren.....	10
2.3.2 Oberflächenwellenbauelemente.....	12
2.4 Akustische Impedanz.....	15
2.4.1 Definition der akustischen Impedanz	15
2.4.2 Stehende und laufende akustische Wellen.....	17
2.4.3 Impedanz einer viskoelastischen Schicht	18
2.4.4 Impedanz einer idealen elastischen Schicht.....	19
2.4.5 Impedanz einer viskoelastischen Flüssigkeit.....	20
2.4.6 Newtonsche Flüssigkeiten	22
2.5 Schwingquarzsensoren.....	24
2.5.1 Akustische Lasten	24
2.5.2 Schichtsysteme.....	25
2.5.3 Flüssigkeitslasten.....	27
2.6 Oberflächenwellensensoren.....	29
2.6.1 Akustische Lasten	29

2.6.2	Flüssigkeitslasten	30
2.6.3	Schichtsysteme	32
2.7	Empfindlichkeiten	36
Kapitel 3	Modellierung des Transducerverhaltens	39
3.1	Schwingquarzsensoren	39
3.1.1	Akustisches Ersatzschaltbild nach Mason	40
3.1.2	Ersatzschaltbild für den freien Quarz	42
3.1.3	Ersatzschaltbild für einen Quarzresonator mit Last	44
3.1.4	Modellrechnungen	45
3.1.5	Modenspektrum	49
3.1.6	Laterale Empfindlichkeitsverteilung	51
3.2	Oberflächenwellenbauelemente	52
3.2.1	Interdigitaltransducer	52
3.2.2	Elektrische Anregung einer akustischen Welle	53
3.2.3	Übertragungstrecke	55
3.2.4	Elektrisches Ersatzschaltbild des SAW	56
3.2.5	Reflektierte Volumenwellen	58
3.2.6	Modellrechnungen	59
3.3	Diskussion	63
Kapitel 4	Sensorelemente und Messmethodik	65
4.1	Schwingquarzsensoren	65
4.1.1	Aufbau der Schwingquarze	65
4.1.2	Mikrotechnologische Herstellung	67
4.2	Oberflächenwellensensoren	69
4.2.1	Sensordesign	69
4.2.2	Mikrotechnologische Herstellung	70
4.3	Elektrische Messmethoden	71
4.3.1	Impedanzmessung	71
4.3.2	Übertragungsmessung	73
4.3.3	Oszillatormethode	75
4.4	Fließinjektionsanalyse und Messsystem	78
4.5	Akustische Sensorelemente als Immunoassay	80
4.5.1	Immunreaktion	81
4.5.2	Immobilisierungsmethoden	83
4.6	Immunologische Analyseverfahren	85
4.6.1	Etablierte Methodik – ELISA	85
4.6.2	Realzeitmethoden der instrumentellen Analytik	86
4.7	Adsorptionskinetik und Detektionsgrenze	88
4.7.1	Adsorption und Desorption	88
4.7.2	Gleichgewichtskinetik	89
4.7.3	Detektionsgrenze	91

Kapitel 5	Störeinflüsse	93
5.1	Bauelementspezifische Einflüsse	94
5.1.1	Quarzresonatoren	96
5.1.2	Oberflächenwellenbauelemente	97
5.2	Äußere physikalische Einflüsse	101
5.2.1	Temperatureinfluss	101
5.2.2	Einfluss des Fluiddrucks	105
5.3	Systembedingte Störeinflüsse	107
5.3.1	Diffusion und Konvektion des Analyten	107
5.3.2	Kompressionswellen in der Flüssigkeitszelle	110
5.4	Diskussion	113
Kapitel 6	Flüssigkeitscharakterisierung	115
6.1	Newtonsche Flüssigkeiten	115
6.1.1	Konzentrationsabhängigkeit – Gesetz von Kanazawa	117
6.1.2	Frequenzabhängigkeit	120
6.2	Viskoelastische Flüssigkeiten	122
6.2.1	Konzentrationsabhängigkeit und Verlustwinkel	123
6.2.2	Relaxationseffekte	128
6.2.3	Modelrechnungen zum Maxwellmodell	129
6.3	Diskussion	133
Kapitel 7	Akustische Sensoren als Biosensoren	135
7.1	Nachweis von M13-Bakteriophagen	136
7.1.1	Empfindlichkeitssteigerung beim Phagennachweis	137
7.1.2	Bewertung von SAW- und HFF-Sensoren	140
7.2	Viskoelastisches Verhalten von Antikörperschichten	142
7.2.1	Antikörpermultilayer	142
7.2.2	Eindringtiefe für Antikörperschichten	146
7.2.3	Bewertung	147
7.3	Belegungsdichte und Stabilität der Rezeptorschicht	148
7.3.1	Belegungsdichte	148
7.3.2	Stabilität der Rezeptorschicht	149
7.4	Bakteriennachweis mit akustischen Sensoren	151
7.4.1	Nachweis von Legionella pneumophila	152
7.4.2	Betrachtung der Sensorempfindlichkeit	153
7.4.3	Bewertung des Bakteriennachweises	154
7.5	Bestimmung von Bindungsaffinitäten	155
7.6	Antikörpernachweis in Blutserum	158
7.7	Diskussion	161
Kapitel 8	Diskussion und Ausblick	163
Anhang A	Piezoelektrische Eigenschaften von Quarz	167

Anhang B	Simulationsprogramm für SAW-Sensoren	172
Anhang C	Polyethylenglykollösungen	174
Anhang D	Chemikalien und Bioreagenzien	175
Anhang E	Abkürzungen und Symbole	177
	Literaturverzeichnis	181

Kapitel 1

Einleitung

Schwingquarze und Oberflächenwellenbauelemente sind in allen elektronischen Geräten, die stabile Frequenzen benötigen, weitverbreitete Bauelemente. Deshalb finden sie in Funk-, Radioanlagen, Quarzuhren und anderen Geräten Verwendung. Wegen der weiten Verbreitung sind diese frequenzgebenden Bauelemente in vielen Variationen kostengünstig erhältlich. Neuere Anwendungen wie die moderne Telekommunikationstechnik erfordern die Verwendung immer höherer frequenzgebender Bauelemente. Aus diesem Grund werden seit den 70er Jahren auch Oberflächenwellenbauelemente, die Frequenzen bis in den GHz-Bereich erlauben, eingesetzt. Seit einigen Jahren gibt es zudem eine neue Generation von hochfrequenten Schwingquarzsensoren, die Frequenzen bis zu einigen 100 MHz ermöglichen [KAS98]. Die physikalischen Eigenschaften und der zugrunde liegende piezoelektrische Effekt sind gut erforscht. Schwingquarze und Oberflächenwellenbauelemente basieren auf dem Prinzip einer Kristallschwingung im Volumen bzw. an der Oberfläche eines piezoelektrischen Kristalls. Aus diesem Grund spricht man auch von akustischen Bauelementen.

Neben der rein elektronischen Anwendung können diese akustischen Bauelemente wegen der Wechselwirkung der elektroakustischen Kristallschwingung mit den elektrischen und akustischen Eigenschaften angrenzender Medien auch für sensorische Zwecke eingesetzt werden. Die heute existierenden, schnellen integrierten Schaltungen sind in der Lage, die Resonanzfrequenz akustischer Sensoren sehr genau und zuverlässig zu messen. Außerdem machte es die Miniaturisierung der elektronischen Bauelemente möglich, die für ein Schwingquarzmesssystem notwendige Elektronik in einem handlichen Gehäuse unterzubringen. Diese Tatsachen halfen der akustischen Sensorik sich neue Anwendungsgebiete zu erschließen. Dazu zählen die Flüssigkeitscharakterisierung, elektrochemische Anwendungen sowie die Gas- und Biosensorik.

Historische Entwicklung

Der überwiegende Anteil an Beiträgen zur akustischen Sensorik stammt aus dem Gebiet der Schwingquarzensensorik. In den 50er Jahren wurden Schwingquarze (AT-Schnitt) erstmals wegen ihrer Massensensitivität — sie reagieren mit Verstimmung ihrer Resonanzfrequenz bei Massebelegung an ihrer Oberfläche — in der Sensorik eingesetzt. Sauerbrey etablierte 1959 die Schichtdicken-Messung in Bedampfungsanlagen [SAU59]. Ausgehend von einem Modell, das die Massebelegung nur als zusätzliche Quarzlage beschreibt, konnte er eine lineare Beziehung zwischen dem Frequenzabfall und der Massebelegung herleiten. Er prägte den Begriff der Quarzkristall-Mikrowaage. Genauigkeiten von 0,1 ng konnten damals bereits erreicht werden. 1964 benutzte King einen beschichteten Schwingquarz, um einen empfindlichen und selektiven Detektor für die Gaschromatographie zu konstruieren [KIN64]. Er beschichtete die Quarze mit verschiedenen Substraten aus gaschromatographischen Säulen und untersuchte die sorbierenden Komponenten des vorbeiströmenden Gasflusses. Guilbault et al. konnten mit dieser Technik Schwefeldioxid mit einer Empfindlichkeit von 5 ppm nachweisen [GUI75]. Später wurden verschiedenste Gase auf diese Weise untersucht.

Der erste Einsatz eines Schwingquarzsensors als Immunosensor wurde 1972 von Shons et al. berichtet [SHO72]. Shons konnte mit einem Albumin-beschichteten Schwingquarz spezifische Antikörper detektieren. Die Messungen erfolgten nach der Inkubation am trockenen Quarz. Die direkte Messung in Flüssigkeiten war lange Zeit mit Schwierigkeiten behaftet. 1973 wurden von Schulz et. al. Aerosoltröpfchen aus einem Flüssigkeitschromatographen auf die Sensoroberfläche gesprüht und nach Verdampfung des Lösungsmittels, die gelöste Komponente detektiert [SCH73]. Erst in den 80er Jahren erschienen Berichte über Messungen, in denen eine Seite eines Schwingquarzes in direktem Kontakt mit einer Flüssigkeit stand und dieser gleichzeitig vermessen wurde [KON80][NOM80]. Kanazawa leitete 1985 aus einem einfachen Modell, welches das Eindringen einer evaneszenten, akustischen Scherwelle in die anliegende Flüssigkeit beschreibt, eine Beziehung zwischen dem Frequenzabfall und den physikalischen Eigenschaften (Viskosität, Dichte) von Flüssigkeit und Quarz ab [KAN85]. In den 80er Jahren erschienen überdies Beiträge zum elektrochemischen Einsatz der Schwingquarzmikrowaage [DEA88][GRZ87][SCH85].

In der Immunsensorik bieten akustische Sensoren im Vergleich zu etablierten Techniken den Vorteil, biologische Partikel in Realzeit zu detektieren und damit Erkenntnisse über den Bindungsvorgang zu liefern. Durch Verwendung von geeigneten Fließsystemen konnte die Leistungsfähigkeit der Schwingquarzmikrowaage im Bereich der Mikrowägung in der flüssigen Phase stark verbessert werden. Dies ermöglichte in den 90er Jahren immunologische Nachweise für eine Vielzahl von Analyten, z.B. der Nachweis von Enterobakterien [GUI92], die Detektion von HIV-positiven Humanserumproben [ABE94][KÖS94], der Nachweis von Atrazin [SKL97] sowie von Toxinen [HAR97]. Thompson konnte sogar die Hybridisierung von DNA-Einzelsträngen auf dem Sensor untersuchen [THO95]. Die Sensitivität dieser „Mikrowaagen“ war immer wieder Gegenstand von Optimierungsversuchen. Ward stellte 1993 eine neue Art von sehr empfindlichen hochfrequenten Schwingquarzsensoren für den Einsatz in Flüssigkeiten vor [WAR93]. Diese zentrisch dünngeätzten Schwingquarze wurden zur elektrochemischen Mikrowägung eingesetzt.

Die erfolgreiche Entwicklung des Interdigital-Transducers (IDT) durch White und Voltmer im Jahr 1965 [WHI65] erlaubte die direkte piezoelektrische Anregung von Oberflächenwellen und setzte damit den Grundstein für die Entwicklung einer Vielzahl von Sensorelementen, die auf oberflächengenerierten akustischen Wellen beruhen (Abbildung 2.2). Wohltjen und Dessy stellten 1979 den ersten chemischen Sensor auf Basis eines Rayleigh-Oberflächenwellensensors (SAW) vor [WOH79]. Dieser mit einem sensitiven Polymer beschichtete Sensor wurde für die Gassensorik eingesetzt. Es zeigte sich jedoch, dass diese Rayleigh-Oberflächenwelle, wegen ihrer Auslenkung normal zur Sensoroberfläche und Laufrichtung und einer damit verbundenen Energieabstrahlung, nicht für Flüssigkeitsanwendungen geeignet ist. Zwar wurde 1983 eine Studie über Antigen-Antikörper-Reaktionen auf Rayleigh-SAW-Sensoren [BAS83] vorgestellt, später wurde von Calabrese et al. [CAL87] jedoch gezeigt, dass anstelle der Rayleigh-SAW Mode eine akustische Plattenmode (Kapitel 2.2) vermessen wurde. Für Flüssigkeitsanwendungen sind transversal polarisierte Wellenformen (Scherwellen) besser geeignet, da sie zwar mit dem flüssigen Medium in Wechselwirkung treten, aber keine Energie durch Modenkonzersion einkoppeln. Wichtige Entwicklungen sind hier akustische Plattenmodensensoren [SHA91] [MAR89] sowie transversal polarisierte Oberflächenwellensensoren [DRO93][KON93] [LEI98]. Wichtige Beiträge zu immunosensorischen Anwendungen mit transversalen SAW-Sensoren wurden 1996 von Schickfus et al. [SCH96] und Wessa [WES96] vorgestellt.

Ziele und Organisation der Arbeit

Viele der im historischen Abriss beschriebenen Techniken und Anwendungen mit akustischen Sensoren haben in wichtigen Punkten entscheidende Nachteile. So reicht die Verwendung von Laboraufbauten oder Modellanalyten zwar aus, die prinzipielle Eignung akustischer Sensoren für gewisse Anwendungen aufzuzeigen, ein reeller Einsatz in der modernen Analytik und Diagnostik stellt jedoch höhere Anforderungen an die Sensortechnik, das Fluidsystem, aber auch an die genaue Kenntnis der Störeinflüsse. Weitere Problemfelder der beschriebenen Anwendungen sind die Quantifizierbarkeit und Genauigkeit der Messungen, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener akustischer Sensortechniken sowie anderer Messtechniken. Nicht zuletzt ist die bisher erzielte Empfindlichkeit und Nachweisgrenze für bestimmte Analytnachweise unzureichend.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einsatz der akustischen Sensorelemente, Schwingquarzmikrowaagen und Oberflächenwellensensoren, für die Flüssigkeitscharakterisierung und für die Mikrowägung in der Biosensorik mit dem Ziel beschrieben, neue Anwendungsfelder aufzuzeigen, höhere Ansprüche an die Genauigkeit, Quantifizierbarkeit und Vergleichbarkeit der Messungen zu stellen, sowie Wege zur deutlichen Empfindlichkeitssteigerung aufzuzeigen.

Für die Durchführung verschiedener Sensoranwendungen ist ein genaues Verständnis des Sensorprinzips und der zugrunde liegenden physikalischen Vorgänge von großer Bedeutung. Die theoretische Auswertung des physikalischen Messeffektes erlaubt die Charakterisierung des an den wellenführenden Bereich anliegenden Messmediums (Kapitel 2). Dabei wird der aus der Literatur bekannte Formalismus für Schichtsysteme mit Schwingquarzsensoren in dieser Arbeit bei Berücksichtigung eines Korrekturterms um-

fassend auch für Schichtsysteme mit horizontal polarisierten Oberflächenwellensensoren eingesetzt. Das Transducerverhalten wird weitgehend modelliert und erlaubt so Aussagen über die Auswirkung verschiedener Designgrößen und physikalischer Einflussfaktoren zu machen (Kapitel 3). Die Modellierung des Transducerverhaltens kann dabei durch den in dieser Arbeit erstellten Formalismus für beliebige Sensor-Schichtsysteme erfolgen. Als Sensorelemente werden neuartige hochfrequente Grundtonschwingquarze sowie horizontal-polarisierte Oberflächenwellenbauelemente mit spezieller Aufbau- und Kontaktierungstechnik eingesetzt. Die Wahl einer geeigneten Messmethodik beeinflusst entscheidend die Anzahl der Messparameter sowie die Auswertbarkeit für theoretische Berechnungen (Kapitel 4).

Im experimentellen Teil der Arbeit werden die Stärken und Schwächen der verschiedenen Sensorelemente in den verschiedenen Anwendungen und unter dem Einfluss von Störgrößen aufgezeigt. Ein störungsfreies Fluidsystem, ein optimiertes Transducerdesign sowie die Kontrolle externer physikalischer Störeinflüsse sind für Messungen unbedingt erforderlich (Kapitel 5). Akustische Sensoren eignen sich sehr gut für den Einsatz in der Rheologie. Neben der Bestimmung der Viskosität und Dichte newtonscher Glycerinlösungen können auch Relaxationseffekte viskoelastischer Polyethylenglykollösungen charakterisiert und quantifiziert werden. Die Verwendung der akustischen Sensoren als Rheometer wird im Vergleich zu kommerziellen Rheometern erörtert (Kapitel 6). Der Einsatz akustischer Sensoren zur Mikrowägung in der Biosensorik wird anhand der spezifischen Detektion reeller Analyten, wie des Hüllproteins *VP73* des Erregers der afrikanischen Schweinepest, des Bakteriophagen *M13* sowie des Bakteriums *Legionella pneumophila* erläutert. Die theoretisch vorhergesagte Sensitivitätssteigerung für höhere Arbeitsfrequenzen der verwendeten hochfrequenten Grundtonschwingquarze und Oberflächenwellenbauelemente wird experimentell überprüft. Anhand vergleichbarer Ergebnisse etablierter analytischer Methoden und neuer Realzeitmethoden, wie der Oberflächenplasmonenresonanz, wird die Leistungsfähigkeit akustischer Sensoren im klassischen Analytnachweis, der Klassifizierung von Serumproben sowie der Affinitätsbestimmung bewertet (Kapitel 7).