

Synthese und Charakterisierung von Ceroxid-Nanopartikeln für biosensorische Anwendungen

Von
Sarah Andreas
aus Stuttgart

Angenommene Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
Fachbereich 3: Mathematik/Naturwissenschaften
Universität Koblenz

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Peter Quirnbach
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jan Werner

Prüfungskommission:

Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Peter Quirnbach
JProf. Dr. Marie-T. Hopp
Prof. Dr. rer. nat. Werner Manz

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation verfasst und alle von mir für die Arbeit benutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben habe und dass Anteile beteiligter Mitarbeiterinnen oder Mitarbeiter sowie anderer Autorinnen oder Autoren klar gekennzeichnet sind.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten (Promotionsberatern oder anderen Personen) in Anspruch genommen.

Ich habe die Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung im In- oder Ausland eingereicht sowie keine andere Abhandlung in einem anderen Fachbereich oder einer anderen wissenschaftlichen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Mir ist bewusst, dass ein Verstoß gegen einen der vorgenannten Punkte den Entzug des Dokortitels bedeuten und ggf. auch weitere rechtliche Konsequenzen haben kann.

Bonn, 12.12.2023

Vorwort und Danksagung

Diese Arbeit ist im Rahmen meiner Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Technische Chemie und Korrosionswissenschaften an der Universität Koblenz-Landau und Academic-Fellow des Forschungskolleges CerMaProS in den Jahren 2019 bis 2022 entstanden. Die Zeit der Promotion war neben der fachlichen Herausforderung auch eine organisatorische Herausforderung, da die Covid-19 Pandemie einige Lockdowns und andere Schwierigkeiten mit sich brachte. Den vorgesehenen Zeitplan, einen längeren Forschungsaufenthalt am Department of Physical and Analytical Chemistry, Institute of Biotechnology of Asturias an der Universität Oviedo in Spanien zu absolvieren, musste ich nach nicht mal einem Jahr Arbeit auf Eis legen, da nicht absehbar war, wie sich die pandemische Lage entwickeln würde. Ebenfalls waren regelmäßige Besuche des Forschungsinstituts für Glas | Keramik (FGK) in Höhr-Grenzhausa im ersten Jahr der Pandemie nicht möglich, sodass einige Versuche am Mikro-Jet-Reaktor nicht von mir selbst durchgeführt werden konnten. Für die Durchführung und Organisation in diesen Zeiten danke ich ganz herzlich Stefan Vetter und Caroline Volk.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Peter Quirnbach, der mir den Rahmen zum Erstellen dieser Arbeit gegeben und mich auf dem Weg zur Fertigstellung mit Engagement und Interesse unterstützt hat.

Ich danke ganz herzlich Prof. Jan Werner für das Interesse an meiner Arbeit, seine fachlichen Anregungen und Hilfestellungen. Außerdem möchte ich den Mitarbeitenden des FGK für die Unterstützung bei Versuchen und Charakterisierungen sowie deren Diskussionsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Prof. Carmen Blanco, die mich im Rahmen ihrer Möglichkeiten während der Pandemie und bei meinem Aufenthalt in Spanien mit ihrem Fachwissen und ihrer Erfahrung wertvoll unterstützt hat. Auch danke ich Dr. Alberto Sanchez Calvo für die Unterstützung der Versuche mit dem elektrochemischen Sensor und Dr. Esther Serrano Pertierra für die Unterstützung der kolorimetrischen Versuche sowie der gesamten Arbeitsgruppe des Institute of Biotechnology of Asturias für das Interesse an meiner Arbeit und zahlreiche

Hilfestellungen bzw. Diskussionen während meiner Zeit in Oviedo. Muchas Gracias por todo!

Des Weiteren bedanke ich mich für die finanzielle, wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Unterstützung des Forschungskollegs CerMaProS, ohne die die Arbeit in diesem Umfang und in Kooperation mit der Universität Oviedo nicht gelungen wäre. Ganz besonders bedanke ich mich bei den anderen Fellows für die regelmäßigen digitalen Kaffeeklatschrunden, die mir gezeigt haben, dass ich mit dem ein oder anderen Problem nicht alleine bin, sowie für den fachlichen Austausch und die instrumentelle Unterstützung bei Charakterisierungen meiner Nanopartikel an der Hochschule Koblenz.

Ich bedanke mich außerdem bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Technische Chemie und Korrosionswissenschaften für die, wenn auch durch Pandemie und Forschungsaufenthalte wenigen, Gespräche und Diskussionen, ob nun fachlicher oder privater Natur, und Hilfestellungen während meiner Arbeit, sowie allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Integrierte Naturwissenschaften für die angenehme Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, die mich in der ganzen Zeit unterstützt haben und viel Geduld mit mir hatten, die mich von der Arbeit abgelenkt oder auch mal mit fachlichen Diskussionen und der kritischen Durchsicht dieser Arbeit unterstützt haben. Ich bin froh, dass es euch gibt und dass ich in Spanien neue Freundschaften schließen konnte, ich freue mich auf weitere Besuche.

Inhaltsverzeichnis

I.	Kurzfassung.....	5
II.	Abstract	6
III.	Abbildungsverzeichnis	7
IV.	Tabellenverzeichnis	11
V.	Abkürzungen, Symbole.....	12
1	Einleitung.....	13
2	Stand der Wissenschaft und Technik	15
2.1	Nanotechnologie.....	15
2.2	Ceroxid-Nanopartikel.....	16
2.2.1	Charakterisierung von Ceroxid-Nanopartikeln	18
2.2.2	Syntheseverfahren für Ceroxid-Nanopartikel.....	21
2.3	Kontinuierliche Syntheseverfahren	23
2.4	Biosensoren.....	27
2.4.1	Heterogene Katalyse	28
2.4.2	Elektrochemische Sensorik	32
2.4.3	Kolorimetrischer Biosensor.....	34
2.5	Verwendete Analyten in den Anwendungsversuchen.....	36
2.5.1	Histamin.....	36
2.5.2	Glukose	37
2.5.3	TMB.....	38
3	Material und Methoden	40
3.1	Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln	40
3.1.1	Fällungssynthese mit Ammoniumhydrogencarbonat	41
3.1.2	Fällungssynthese mit Ammoniumhydroxid	42
3.1.3	Mikroemulsionssynthese	43
3.2	Überführung in eine kontinuierliche Synthese mittels Mikro-Jet-Reaktor	45
3.3	Charakterisierungsmethoden.....	46
3.3.1	Partikelgröße und Stabilität.....	46
3.3.2	Chemische Analyse	47
3.3.3	Katalytische Aktivität.....	49
3.4	Anwendung in einem elektrochemischen Sensor	52
3.4.1	Herstellung des elektrochemischen Sensors.....	52
3.4.2	Durchführung der elektrochemischen Messung	53
3.5	Anwendung im Lateralen Flusstest.....	54
3.5.1	Funktionalisierung der Ceroxid-Nanopartikel.....	54
3.5.2	Herstellung eines lateralen Flusstest.....	55

3.5.3	Durchführung eines lateralen Flusstest	55
3.5.4	Nachweis von Histamin im lateralen Flusstest.....	56
4	Ergebnisse.....	58
4.1	Charakterisierung der Nanopartikel	58
4.1.1	Röntgenbeugungsanalyse	65
4.1.2	Raman-Spektroskopie	68
4.1.3	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	74
4.1.4	Katalytische Aktivität.....	80
4.2	Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel im Biosensor	85
4.2.1	Kolorimetrischer Sensor	85
4.2.2	Elektrochemischer Sensor.....	89
5	Diskussion	93
5.1	Vergleich verschiedener Ceroxid-Nanopartikel-Syntheserouten	93
5.2	Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel	97
5.2.1	Elektrochemischer Biosensor	99
5.2.2	Kolorimetrischer Biosensor.....	101
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	105
7	Literaturverzeichnis.....	107
8	Anhang	115

I. Kurzfassung

Nanopartikel sind sensitive und gleichzeitig robuste Systeme, sie sind auf Grund ihrer großen Oberfläche besonders reaktiv und besitzen Eigenschaften, die das Bulk-Material nicht aufweist. Gleichzeitig ist die Herstellung von Nanopartikeln selbst bei gleichen Parametern und Bedingungen eine Herausforderung, da sich die Parameter von Durchgang zu Durchgang ein bisschen unterscheiden können. Um dies zu verhindern soll, in dieser Arbeit eine kontinuierliche Synthese im Mikro-Jet-Reaktor für Ceroxid-Nanopartikel entwickelt werden. Ziel war es, monodisperse Nanopartikel zu erhalten, die in Biosensoren Anwendung finden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen zwei Fällungssynthesen mit den Zwischenschritten Cercarbonat und Cerhydroxid sowie eine Mikroemulsionssynthese zur Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln. Die Ceroxid-Nanopartikel werden anhand verschiedener Charakterisierungs- und Anwendungsmethoden verglichen, dabei werden die synthetisierten Nanopartikel hinsichtlich ihrer Größe, Stabilität, chemischen Zusammensetzung und katalytischen Fähigkeiten durch Elektronenmikroskopie, Röntgenbeugung, Raman- und Photoelektronen-Spektroskopie charakterisiert.

Die Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel erfolgte in biologischen Sensorsystemen. Die Sensorsysteme sind so konzipiert, dass sie Histamin und Glukose oder Wasserstoffperoxid, welches bei der Oxidation von Histamin und Glukose entsteht, nachweisen. Wasserstoffperoxid und Glukose werden in dieser Arbeit durch einen elektrochemischen Sensor und Histamin durch ein kolorimetrisches Sensorsystem nachgewiesen.

II. Abstract

Nanoparticles are sensitive and robust systems; they are particularly reactive due to their large surface area and have properties that the bulk material does not have. At the same time, the production of nanoparticles is challenging, because even with the same parameters and conditions, the parameters can vary slightly from run to run. In order to avoid this, this work aims to develop a continuous synthesis in the microjet reactor for nanocerium. The aim is to obtain monodisperse nanoparticles that can be used in biosensors.

This work focuses on two precipitation syntheses with the intermediate steps of cerium carbonate and cerium hydroxide, as well as a microemulsion synthesis for the production of nanocerium. The cerium oxide nanoparticles are compared using different characterisation and application methods. The synthesised nanoparticles will be characterised with respect to their size, stability, chemical composition and catalytic capabilities, by electron microscopy, X-ray diffraction, Raman spectroscopy and photoelectron spectroscopy.

The biosensor systems to evaluate the nanocerium are designed to detect histamine and glucose or hydrogen peroxide, which are resulting from the oxidation of histamine and glucose. Hydrogen peroxide and glucose are detected by an electrochemical sensor and histamine by a colorimetric sensor system.

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gitterstruktur des Ceroxides nach [Kar2018], rote Kugel O^{2-} , blaue Kugel Ce^{4+} -Ionen.....	16
Abbildung 2: Raman-Spektren von Ceroxid-Proben, die bei unterschiedlichen pH-Werten synthetisiert und bei $T = 500\text{ °C}$ behandelt wurden (a, b) sowie bei $pH = 2$ und unterschiedlichen Temperaturen (c). Abbildung übernommen von [Cal2019].	19
Abbildung 3: Kurvenangepasste $Ce3d$ -XP-Spektren von CeO_2 und $CeAlO_3$ (als Beispiel für $Ce(III)$). Abbildung übernommen aus [Shy1988] Unten: berechnete $Ce3d$ -Spektren für reines CeO_2 (durchgezogene Linie) und Ce_2O_3 (gestrichelte Linie). Abbildung übernommen von [Fal1995].	20
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mikroemulsionssynthese (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt).....	23
Abbildung 5: Aufbau des Mikro-Jet Reaktors, Bildquelle FGK.....	25
Abbildung 6: Nahaufnahme des Mikro-Jet-Reaktors, Bildquelle FGK.	25
Abbildung 7: Darstellung eines Mikrofluid-Reaktors nach [Kah2004]. L1 und L1 sind jeweils die Edukte, O das Produkt.	26
Abbildung 8: Schema eines T-Mixers nach [Gao2015].	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Mars-van-Krevelen-Mechanismus aus [Sch2010].	28
Abbildung 10: Verschiedene mimetische Aktivitäten von Ceroxid-Nanopartikeln, als Nanozym für die Grundlage von Biosensoren [Sai2021]	31
Abbildung 11: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik aus [Str2014]	32
Abbildung 12: Genereller Aufbau eines lateralen Flusstests (oben) und positiver Nachweis bei bspw. Covid-19.	35
Abbildung 13: Histaminabbau mittels Enzymen, links mit Diaminoxidase und rechts mit Histamin-N-methyltransferase, aus [Mor2021].....	37
Abbildung 14: Oxidation von TMB [Imm o.D.].....	39
Abbildung 15: Experimentelle Durchführung zur Überprüfung der katalytischen Aktivität (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt).....	50
Abbildung 16: Lineweaver-Burk-Diagramm aus [Str2014].....	51
Abbildung 17: Siebgedruckte Elektrode von DropSens	52
Abbildung 18: Schaubild des lateralen Flusstests Histamin mit in der Probenlösung (links) und ohne Histamin in der Probenlösung (rechts). (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.)	57

Abbildung 19: TEM-Aufnahme der Probe MNE1 (der Größenbalken links ist 50 nm).....	59
Abbildung 20: DLS-Messungen der Probe MNE1.....	60
Abbildung 21: Zeta-Potenzial-Messungen der Probe MNE1.....	60
Abbildung 22: TEM- (oben, links 0,1 μm und rechts 50 nm) und FE-SEM-Aufnahmen (unten, links 1 μm und rechts 100 nm) von MNK1.8Dx-Synthese.....	62
Abbildung 23: TEM-Aufnahme von MNK1.8Dx in Chlorid-Schmelze (links) und Hydroxid-Schmelze (rechts) bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$, $t_K = 3\text{ h}$ kalziniert. .	63
Abbildung 24: TEM-Aufnahmen (oben) und FE-SEM-Aufnahmen (unten) der Probe MNA2. Die Größenbalken oben links: 0,5 μm ; oben rechts 50 nm; unten links 10 μm und unten rechts 100 nm.....	64
Abbildung 25: Vergleich der Synthesen im MJR (schwarz) und Becherglas (rot) anhand einer Fällungssynthese mit AHC nach Kalzinierung bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$ und des Referenzdiffraktogramms PDF 00-034-0395 (grau).....	65
Abbildung 26: XRD-Vergleich aller drei Syntheseverfahren. XRD-Diffraktogramme wurden zur besseren Vergleichbarkeit normiert.	66
Abbildung 27: XRD-Messung der Zwischenstufe der Synthese mit AHC (blau) im Vergleich mit Ceroxid-Nanopartikeln nach der Kalzinierung bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$ (schwarz). Rot gibt das Literaturspektrum (PDF 00-034-0395) zu CeO_2 wieder.....	67
Abbildung 28: Raman-Messungen von MNK1.8Dx vor (blau), während (rot) und nach (schwarz) der Kalzinierung bei $T_M = 500\text{ }^\circ\text{C}$. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$	68
Abbildung 29: Raman-Messungen von MNE1 vor (blau), während (rot) und nach (schwarz) der Kalzinierung bei $T_M = 500\text{ }^\circ\text{C}$. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$	69
Abbildung 30: Raman-Spektrum von MNE1 mit Wellenzahlen der Banden. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$ Messung bei RT.	70
Abbildung 31: Raman-Messungen zum Vergleich der Synthese im Becherglas (grau) und MJR (rot) mit AHC als Fällungsmittel, ohne Hilfsstoff nach der Kalzinierung bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$ Messung bei RT.	72
Abbildung 32: Raman-Messungen zum Vergleich der Synthesen MNE3 kalziniert bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$ (oben links) MNK1.5 kalziniert bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$ (unten links), MNE (oben rechts) und MNA1 (unten rechts), normiert. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$ Messung bei RT.	73

Abbildung 33: Übersichts-XPS-Spektrum der Probe MNK1.3 (oben links), ausgewertet nach Cer (oben rechts), Sauerstoff (unten links) und Kohlenstoff (unten rechts).	74
Abbildung 34: Auswertung der XPS-Spektren nach Ce 3d der Proben MNE1 und MNA1, MNK1.3, MNK1.6Dx und MNK1.8CTAB_Cl (von oben nach unten).	76
Abbildung 35: Auswertung der XPS-Spektren nach Sauerstoff der Proben MNE1 und MNA1, MNK1.3, MNK1.6Dx und MNK1.8CTAB_Cl (von oben nach unten).	77
Abbildung 36: Auswertung der XPS-Spektren nach Kohlenstoff der Proben MNE1 und MNA1, MNK1.3, MNK1.6Dx und MNK1.8CTAB_Cl (von oben nach unten).	78
Abbildung 37: UV-VIS-Messungen von TMB-Lösungen mit verschiedenen Mengen an Ceroxid-Nanopartikeln in der Lösung.	80
Abbildung 38: Kalibrierung der TMB-Absorption mit linearer Anpassung abhängig von der Ceroxid-Nanopartikel-Konzentration.....	81
Abbildung 39: UV-VIS Messungen mit verschiedenen TMB Konzentrationen. Die Menge von CeO ₂ -NP und H ₂ O ₂ -Konzentration wurde konstant gehalten.	82
Abbildung 40: Linewear-Burk-Diagramm von Ceroxid-Nanopartikeln mit Wasserstoffperoxid und variabler Substratkonzentration des TMB für die Messung nach t = 300 s.	83
Abbildung 41: UV-VIS Messungen mit verschiedenen H ₂ O ₂ Konzentrationen mit Ceroxid-Nanopartikel und TMB.	84
Abbildung 42: Lateraler Flusstest mit Histamin 15 Minuten nach Beendigung des Tests. Steigende Histamin-Konzentration in der Probe von rechts nach links. Ganz links kein Histamin in der Probe (blank). Der rote Pfeil zeigt auf die Testlinie, der schwarze Pfeil auf die Kontrolllinie.....	86
Abbildung 43: Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Histamin-Konzentrationen im lateralen Flusstest an der Testlinie mit dem Lateral-Flow-Reader.....	86
Abbildung 44: Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Histamin-Konzentrationen im lateralen Flusstest an der Kontrolllinie mit dem Lateral-Flow-Reader.....	87
Abbildung 45: UV-VIS-Messungen mit Ceroxid-Nanopartikeln, TMB und unterschiedlichen Histamin-Konzentrationen.	88
Abbildung 46: Wasserstoffperoxid-Kalibrierung der mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichteten siebgedruckten Kohlenstoffelektrode (mit einem Konfidenzband von 95 %).	90

Abbildung 47: Ergebnisse der Messungen zur Kalibrierung von Histamin im elektrochemischen Sensor mit den konzentrationsabhängigen Messdaten.....	91
Abbildung 48: Glukose im elektrochemischen Sensor, mit $c = 0,1$ mM Glukose (lila) und $c = 0,01$ mM Glukose (grün), schwarz gibt eine Hintergrund-Messung wieder.	92
Abbildung 49: Graphische Darstellung des Problems am lateralen Flusstest zum Nachweis von Histamin in der Probelösung. (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.)	102
Abbildung 50: Mögliche Erklärung des Problems mit TMB, durch Histamin und CeO_2 in der Lösung.....	103
Abbildung 51: Aufbau einer Hochtemperaturkammer von Renishaw aus der Beschreibung des Herstellers.	115
Abbildung 52: Darstellung einer Cyclovoltametrie-Messung mit derselben Elektrode, die mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichtet war. Zwischen den beiden Messungen folgte ein Wasch- und Trocknungsschritt. Die schwarze Kurve zeigt die Messung vor und die blaue nach dem Waschschrift.	116

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Synthesen im MJR mit Ammoniumhydrogencarbonat als Fällungsmittel	42
Tabelle 2: Übersicht der Salzschmelze vor der Kalzinierung der Probe MNK1.8Dx.....	42
Tabelle 3: Übersicht der Synthesen im MJR mit Ammoniumhydroxid als Fällungsmittel	43
Tabelle 4: Übersicht der Synthesen im MJR mittels Mikroemulsionssynthese .	44
Tabelle 5: Messparameter und instrumenteller Aufbau der Raman-Messungen	48
Tabelle 6: Parameter im Labert-Beerschen Gesetz	50
Tabelle 7: Übersicht über die Partikelgrößen und das Zeta-Potential (n/a bedeutet, dass aufgrund mangelnder Dispergierbarkeit der Nanopartikel keine Messung möglich war).....	61
Tabelle 8: Zuordnung der gemessenen Raman-Banden zu Literaturwerten (bei den leeren Zeilen wurden zum Zeitpunkt der Analyse keine passenden Literaturwerte gefunden).....	71
Tabelle 9: Zusammenfassung der Intensitäten der Bindungsenergien nach Cer, Sauerstoff und Kohlenstoff nach [Rom1993, Fal1995, Nat2005]	79
Tabelle 10: Bestimmung von v_{\max} und K_M mittels Lineweaver-Burk	83
Tabelle 11: Analytische Charakteristika der Kalibriergeraden von H_2O_2 in Abbildung 46.	90

V. Abkürzungen, Symbole

Abkürzung	Bedeutung
AHC	Ammoniumhydrogencarbonat
c	Konzentration
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Dicke
DAO	Diaminoxidase
DLS	<i>Engl. Dynamic light scattering</i> , Dynamische Lichtstreuung
[ES]	Enzym-Substrat-Komplex
FE-SEM	<i>Field Emission Scanning Electron Microscope</i>
HNTM	Histamin-N-Methyltransferase
I	Strom
IR	Infrarot-Spektroskopie
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LFA	<i>Engl.: lateral flow assay</i> , Lateraler Flusstest
NP	Nanopartikel
m	Masse
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MJR	Mikro-Jet-Reaktor
p	Druck
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
[S]	Substratkonzentration
SPE	Siebgedruckte-Elektrode DRP-110
t	Zeit
T	Temperatur
T _K	Kalzinierungstemperatur
TEM	Transmissionen-Elektronenmikroskop
TGA	Thermogravimetrische Analyse
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U	Spannung
V	Volumen
v _{max}	Maximalgeschwindigkeit
XPS	<i>Engl. X-ray photoelectron spectroscopy</i> , Röntgenphotoelektronen-Spektroskopie
XRD	Röntgenbeugungsanalyse (<i>Engl. X-ray diffraction</i>)
σ	Standardabweichung
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

Ceroxid-Nanopartikel sind aktuell Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten, da sie auf Grund ihrer ungefüllten 4f-Elektronenhülle und ihrer Fluorit-ähnlichen Struktur viele Eigenschaften besitzen, die in unterschiedlichen Bereichen Anwendungen finden. Diese reichen von Abgaskatalysatoren in Automobilen bis hin zu biomedizinischen Anwendungen, beispielsweise der Detektion von Wasserstoffperoxid, welches bei der Oxidation von Histamin und Glukose entsteht. Für diese Detektionsverfahren werden aktuell vor allem Enzyme eingesetzt. Neben dem ökonomischen Aspekt sind Enzyme nur in speziellen Umgebungen stabil, was eine breite Anwendung erschwert. In der heutigen Zeit wird immer mehr gefordert, dass medizinische Diagnosesysteme handlich, schnell und einfach funktionieren. Zur Lösung dieser Anforderungen wird auf Diagnosesysteme mit Gold- oder Silber-Nanopartikeln zurückgegriffen. Aus wirtschaftlichen Gründen ist es erforderlich, die Edelmetall-Nanopartikel zu ersetzen, daher konzentriert sich diese Dissertation auf kontinuierlich hergestellte Ceroxid-Nanopartikel für biotechnologische Anwendungen. Als eine solche biotechnologische Anwendung dient zum einen ein elektrochemischer Sensor, der Wasserstoffperoxid mit Hilfe von Ceroxid-Nanopartikeln detektiert, welches bei der Zersetzung von verschiedenen biologischen Molekülen, bspw. Glukose und Histamin, entsteht. Zum anderen soll auch Histamin mittels der Ceroxid-Nanopartikel in einem lateralen Flusstest detektiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Batch-Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln in eine kontinuierliche Synthese in einem Mikro-Jet-Reaktor zu überführen und die daraus erhaltenen Partikel in biosensorischen Anwendungen einzusetzen. Dabei werden die Fällungssynthese und Mikroemulsionssynthese in eine kontinuierliche Synthese überführt und anschließend in zwei verschiedenen Sensorsystemen auf ihre sensorischen Fähigkeiten zur Detektion von Histamin bzw. Wasserstoffperoxid hin überprüft.

In der Literatur sind verschiedene Batch-Syntheseverfahren und Zwischenstufen für die Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln bereits beschrieben. Fokus dieser Arbeit sind zwei Fällungssynthesen mit den Zwischenstufen Cercarbonat und Cerhydroxid sowie eine Mikroemulsionssynthese zur Herstellung von Ceroxid-

Nanopartikel. Mittels diverser Charakterisierungs- und Anwendungsmethoden werden die Ceroxid-Nanopartikel miteinander verglichen. Die Ceroxid-Nanopartikel werden mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Verfahren, Röntgenbeugung, Raman-Spektroskopie und Photoelektronen-Spektroskopie charakterisiert. Für die Anwendung werden die Ceroxid-Nanopartikel in einem elektrochemischen Sensor mit Wasserstoffperoxid und Glukose als Analyten getestet sowie in einem kolorimetrischen Sensor zur Detektion von Histamin angewendet.

Die Forschungslücke, die mit dieser Arbeit geschlossen werden soll, ist die Herstellung von Ceroxid-Nanopartikel in einem kontinuierlichen Verfahren mittels des Mikro-Jet-Reaktors sowie die Detektion von Histamin und Wasserstoffperoxid mittels dieser kontinuierlich hergestellten Ceroxid-Nanopartikel.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Nanotechnologie

Die Nanotechnologie ist seit einigen Jahrzehnten ein aufstrebender Bereich der Forschung und Produktion. Das Wort „Nano“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Zwerg“ und dabei ist ein Nanometer ein Milliardstel Meter (10^{-9} m).

Die Nanotechnologie ist ein Sammelbegriff für verschiedene Materialklassen und umfasst diverse Fachbereiche. Die durch chemische Verfahren hergestellten Nanomaterialien werden je nach Form und Größe unterschieden und entsprechend benannt, so gibt es unter anderem Nanopartikel, Nanoplättchen und Nanofasern. Die Partikelgröße von Nanopartikeln ist in einer europäischen Richtlinie (2011/696/EU) definiert, die besagt, dass alle drei Dimensionen $d \leq 100$ nm sein müssen, um das Material als Nanopartikel definieren zu können. Nanoskalige Materialien haben zum Teil andere Eigenschaften (siehe weiter unten) als der entsprechende Feststoff des gleichen Materials. Auf Grund ihrer geringen Größe ist das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis von Nanopartikeln besonders groß. Da die Oberfläche von Materialien reaktiver ist als die Atome im Inneren eines Festkörpers, ist die Reaktivität von Nanopartikeln höher als die des entsprechenden großvolumigen Festkörpers. Diese Eigenschaft wird sich bei einigen Anwendungen, bspw. der Katalyse, zunutze gemacht. Neben der Katalyse werden Nanopartikel häufig in der Medizin als neuartige Therapeutika oder in der Diagnostik verwendet.

Darüber hinaus besitzen Nanopartikel auf Grund ihrer geringen Größe weitere Eigenschaften, die das Bulkmaterial des gleichen Stoffes nicht aufweisen können. Dies können magnetische, leitende oder optische Eigenschaften sein. So sind bspw. Eisenoxid-Nanopartikel in einer Größenordnung von 7 – 10 nm superparamagnetisch oder Goldkolloide können in Abhängigkeit von der Partikelgröße verschiedene Farben aufweisen. Die Herstellung von Nanopartikel erfolgt nicht nur synthetisch, sondern auch innerhalb von alltäglichen Prozessen wie bei Verbrennung im Straßenverkehr oder als Nebenprodukt von anderen industriellen Verfahren [Raa2008]. Die Forschung im Bereich Nanopartikel ist noch jung, weshalb die toxischen Auswirkungen auf den menschlichen Körper und die Umwelt nicht abschließend erforscht sind. Dies ist vor allem bei der

natürlichen Entstehung der Nanopartikel ein relevanter und meist nicht berücksichtigter Faktor. Synthetisch hergestellte Silber-Nanopartikel können bspw. Bakterien abtöten und werden deshalb auch gezielt in Haushalts- und Kosmetikprodukten verwendet. Ob und wie gefährlich dies für den Menschen, der diese Produkte verwendet ist, wird aktuell untersucht. [BMB2019]

Die meisten Methoden der Nanopartikel-Herstellung beruhen auf dem Bottom-up-Verfahren. Während eines Bottom-up-Verfahrens wird aus Molekülen oder Ionen der Nanopartikel aufgebaut [Sho2008]. Typische Bottom-up-Verfahren sind die Fällungssynthese oder die chemische Gasphasenabscheidung. Im Gegensatz dazu steht das Top-down-Verfahren, bei dem das Substrat zu Nanopartikeln zerkleinert wird. Dies kann durch Ätzen, Lithographie oder mechanische Verfahren wie Mahlen geschehen. [Raa2008]

2.2 Ceroxid-Nanopartikel

Cer (Ce) ist eines der häufigsten Seltenerdmetalle und gehört im Periodensystem zu den Lanthanoiden. Cer kommt in zwei Oxidationsstufen (Ce^{3+} und Ce^{4+}) vor, was zur Bildung von Oxiden führt, die als Cerdioxid (CeO_2) und Cersesquioxid (Ce_2O_3) bezeichnet werden. Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Ceroxid-Nanopartikel sind Nanopartikel des Moleküls Cerdioxid (CeO_2). CeO_2 liegt in einer Fluorit-Kristallstruktur vor, in der das Cer-Kation (Ce^{4+}) von acht Sauerstoffanionen (O^{2-}) umgeben ist, siehe Abbildung 1.

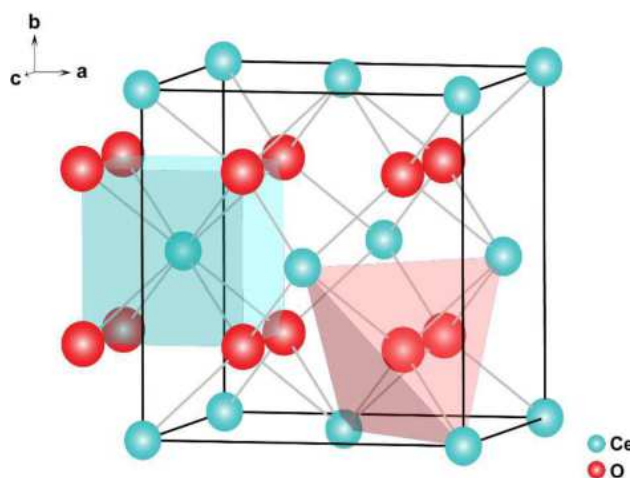


Abbildung 1: Gitterstruktur des Ceroxides nach [Kar2018], rote Kugel O^{2-} , blaue Kugel Ce^{4+} -Ionen.

Das Fluorit-Gitter des CeO_2 weist sowohl intrinsische als auch extrinsische Fehlstellen auf. Die intrinsischen Fehlstellen stammen von Ce(III) -Ionen im Gitter und sind auf das Reaktionsgleichgewicht $\text{Ce(IV)}/\text{Ce(III)}$ zurückzuführen. Die zusätzliche negative Ladung im Gitter wird durch Sauerstoff-Fehlstellen kompensiert. Somit besitzt CeO_2 eine hohe Sauerstoffspeicherkapazität sowie ein hohes $\text{Ce(IV)}/\text{Ce(III)}$ - Reaktionsgleichgewicht und kann sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Temperaturen als Katalysatorsystem eingesetzt werden. [Wu2006] Ceroxid-Nanopartikel können auf Grund dieser katalytischen Eigenschaften in vielen industriellen Anwendungen nützlich sein. Dazu gehören neben der bereits erwähnten Kraftstoffkatalyse auch die innerhalb dieser Arbeit wichtigen Biosensoren. Außerdem wird im Bereich der Elektronik und für den Einsatz als therapeutisches Mittel geforscht [Sai2021]. Im Vergleich zu Ce(III) ist die Oxidationsstufe Ce(IV) aufgrund ihrer elektronischen Struktur in der Natur stabiler. An der Oberfläche von Ceroxid im Nanomaßstab liegt jedoch eine Mischung aus Ce(III) und Ce(IV) vor. Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl der Ce(III) -Ionen mit abnehmendem Partikeldurchmesser zunimmt, was zu einem Verlust von Sauerstoffatomen (Sauerstofflücken) an der Oberfläche von Ceroxid-Nanopartikeln führt. Der $\text{Ce(IV)}/\text{Ce(III)}$ -Redoxzyklus verleiht den Ceroxid-Nanopartikeln eine mimetische Multienzymaktivität, die freie Radikale abfängt, vor Strahlung schützt und oxidativen Stress mildert. [Sad2020, Ree2014]

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Biosensorik gelegt. Charbgo et al. beschreiben eine ganze Reihe von biosensorischen Anwendungen von Ceroxid-Nanopartikeln, welche teilweise mit anderen Elementen wie Platin oder Zirkonium dotiert waren [Cha2017]. Die Arbeitsgruppe um Asati beschreibt in mehreren Fachartikeln die Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln mit verschiedenen Beschichtungen und deren Anwendungen, unter anderem auch die Anwendung als Biosensor [Asa2009]. Ihre Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies auf enzymähnliche Weise abzufangen, macht sie zu einer geeigneten biokompatiblen Alternative für natürliche Enzyme. Die Funktionsweise von Ceroxid-Nanopartikeln als Enzymersatz, sogenannten Nanozymen, wird in Kapitel 2.4.1 im Detail erläutert.

Jüngste Forschungsergebnisse über Ceroxid-Nanopartikel ergaben widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der toxischen Wirkung. Es wurde

berichtet, dass Ceroxid-Nanopartikel sowohl als Antioxidans als auch als oxidationsauslösender Stoff (engl.: reactive oxygen species, kurz: ROS) in verschiedenen Prozessen wirkt. [Dah2015] Ein Beispiel ist die Studie von Hirst et al. zur Auswirkung von Ceroxid-Nanopartikel auf Mäuse [Hir2009]. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass sich Ceroxid-Nanopartikel im Gewebe der Mäuse einlagern und die Stickstoffmonoxid-Produktion in bestimmten Makrophagen reduzieren, dabei aber keine toxische Wirkung zeigen. Wie diese und andere Studien zu bewerten sind, ist nicht Gegenstand dieser Arbeit, sollte aber bei der Risikoabschätzung berücksichtigt werden. Saifi et al. fassen in ihrem Review ebenfalls die toxischen Auswirkungen von Ceroxid-Nanopartikel zusammen und berichten, dass es in den meisten Studien keinen Unterschied zwischen der Toxizität von ionischem Cer und Ceroxid-Nanopartikeln gibt [Sai2021].

2.2.1 Charakterisierung von Ceroxid-Nanopartikeln

Ceroxid lässt sich mit Hilfe verschiedener Charakterisierungsmethoden analysieren. In dieser Arbeit werden neben zwei bildgebenden Methoden (FE-SEM und TEM) auch chemische Analysemethoden verwendet. Unter anderem werden oberflächensensitive Methoden wie Raman- und Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) sowie die Röntgenbeugung (XRD) eingesetzt. In Abbildung 2 sind exemplarische Raman-Spektren von Ceroxid dargestellt. Charakteristisch für Ceroxid ist die F2g-Bande, die die symmetrische Streckung des Ce-O bei einer Wellenzahl von $1/\lambda = 465 \text{ cm}^{-1}$ wiedergibt.

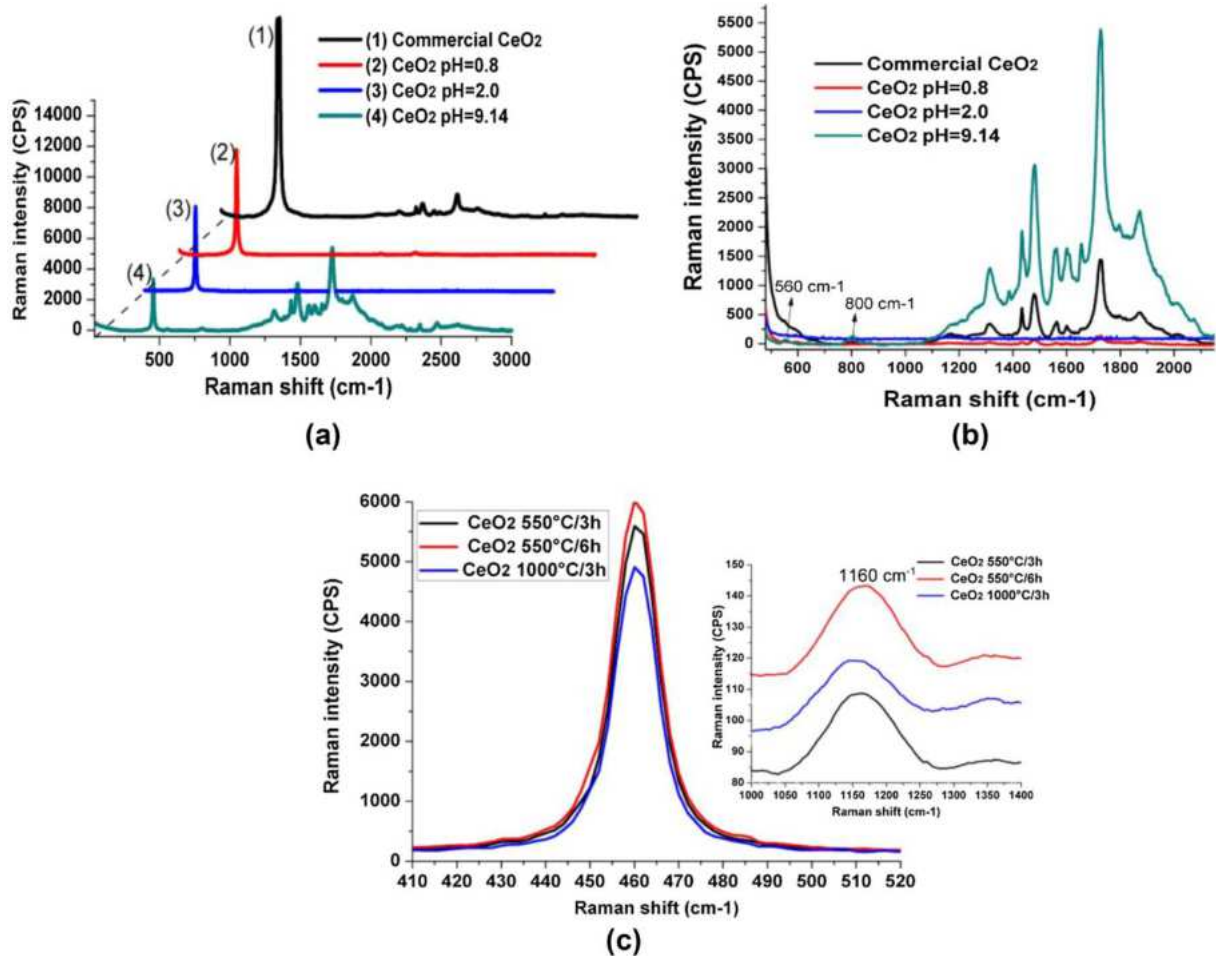


Abbildung 2: Raman-Spektren von Ceroxid-Proben, die bei unterschiedlichen pH-Werten synthetisiert und bei $T = 500\text{ °C}$ behandelt wurden (a, b) sowie bei $\text{pH} = 2$ und unterschiedlichen Temperaturen (c). Abbildung übernommen von [Cal2019].

Als weitere Analysemethode wird die XPS verwendet. Abbildung 3 zeigt zwei kurvenangepasste XPS-Spektren von Cer in den Oxidationsstufen (III) und (IV). Im Ce 3d-Spektrum von Ce(IV)-Oxid können sechs Peaks identifiziert werden, die drei Paaren von Spin-Bahn-Doppelgängern entsprechen, und mit [V, U], [V'', U''] und [V''', U'''] beschriftet sind. Während vier Peaks, genauer zwei Dublett Paare, [V°, U°] und [V', U'], das Ce 3d-Spektrum von Ce(III)-Oxid wiedergeben. Die Bezeichnungen folgen der von Burroughs et al. festgelegten Konvention. V(n) und U(n) beziehen sich hierbei auf die 3d 5/2- bzw. 3d 3/2-Aufspaltung-Spinbahn. [Nat2005] Die Verhältnisse der Peaks bei $E_{\text{Ce}} = 880\text{ eV}$ und $E_{\text{Ce}} = 885\text{ eV}$ sowie um $E_{\text{Ce}} = 900\text{ eV}$ sind dabei insofern aussagekräftig, ob mehr Ce(IV) oder Ce(III) in der Probe vorhanden ist. [Wan2015] In einer Ceroxid-Verbindung liegen beim Vorhandensein von Sauerstoff-Leerstellen beide Oxidationsstufen vor.

Entscheidend ist, welche der beiden Oxidationsstufen quantitativ überwiegt, um eine Aussage über die Form des Ceroxids (CeO_2 oder Ce_2O_3) treffen zu können.

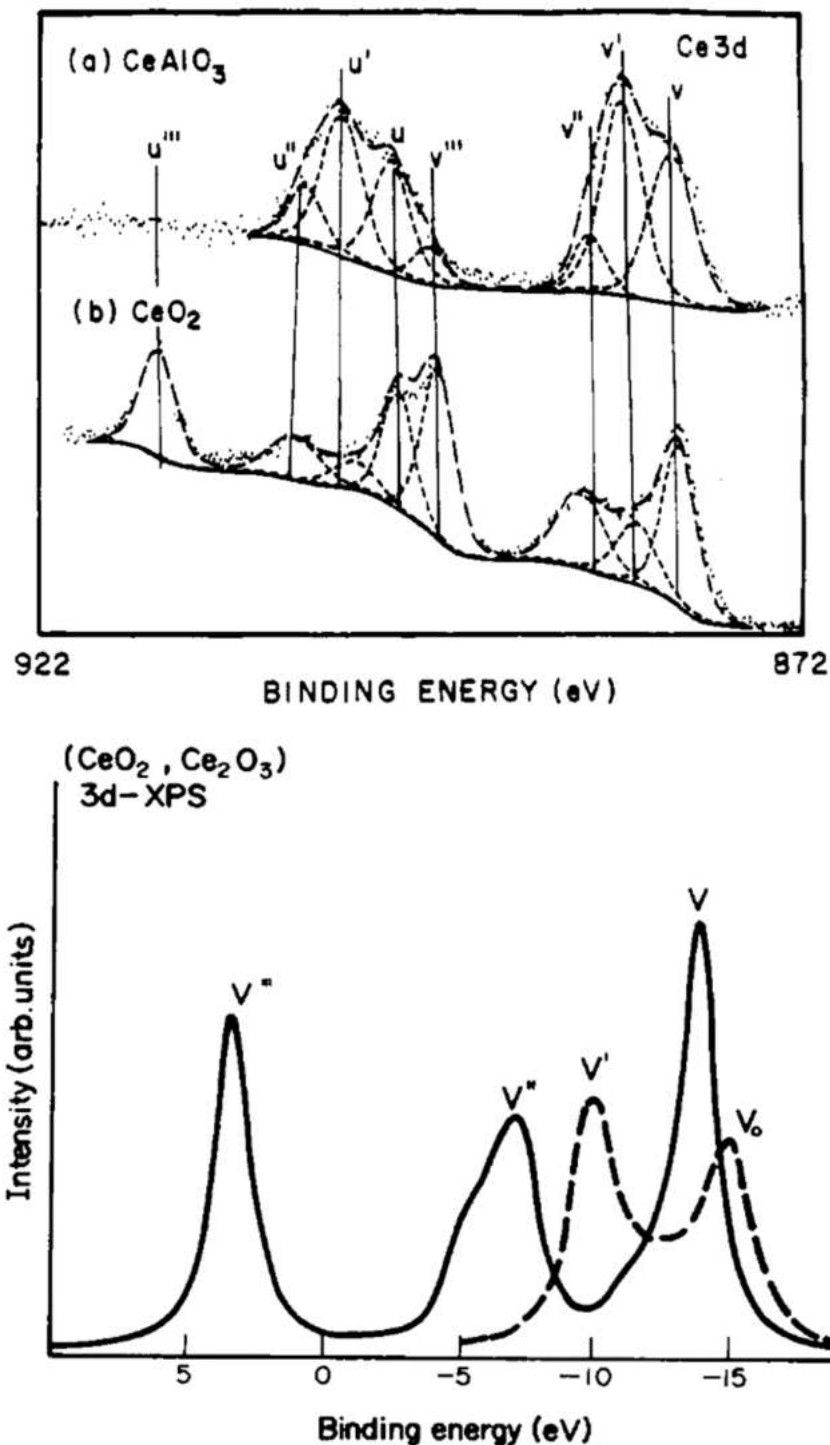


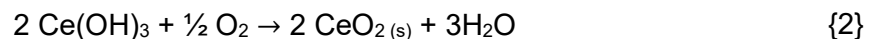
Abbildung 3: Kurvenangepasste Ce3d-XP-Spektren von CeO_2 und CeAlO_3 (als Beispiel für Ce(III)). Abbildung übernommen aus [Shy1988] Unten: berechnete Ce3d-Spektren für reines CeO_2 (durchgezogene Linie) und Ce_2O_3 (gestrichelte Linie). Abbildung übernommen von [Fal1995].

2.2.2 Syntheseverfahren für Ceroxid-Nanopartikel

Typische Syntheseverfahren für nanoskaliges Ceroxid ($d = 4 - 50 \text{ nm}$) sind Bottom-up-Verfahren, wie die Fällungssynthese oder Mikroemulsionssynthese. Diese Methoden werden im Folgenden vorgestellt.

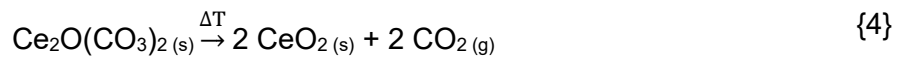
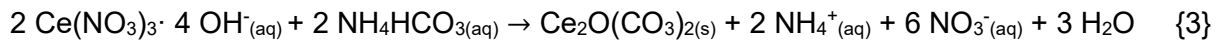
Die Fällungssynthese, auch Präzipitation genannt, ist eine unkomplizierte und schnelle Synthesemethode zur Herstellung von Nanopartikeln. Dabei wird zu einer gelösten Cer-Verbindung ein Fällungsmittel gegeben, welches eine unlösliche Verbindung mit dem Cer-Kation eingeht und ausfällt. Als Cer-Verbindung wird ausgangsseitig meist ein Cernitrat verwendet, um den Eintrag von z. B. Chlorid-Ionen in das Gitter zu vermeiden. Während der Zugabe eines alkalischen Fällungsmittels wird der pH-Wert der Lösung von $\text{pH} = 7$ an der Zugabestelle durch Übersättigung zu $\text{pH} \geq 9$ verändert und es entsteht eine Keimbildung. Nach der Keimbildung folgt das Wachstum der Partikel. Die Bildung von Nanopartikeln wurde von LaMer und Dinegar untersucht und beschrieben [LaM1950].

Je nach Fällungsmittel entstehen verschiedene Zwischenstufen zum endgültigen Ceroxid. Üblicherweise werden die Partikel als Hydroxide oder Carbonate gefällt, da die Zersetzungstemperatur niedriger ist als ihre Schmelztemperatur. Mittels Ammoniakwasser wird bspw. Cerhydroxid gefällt, welches sich anschließend durch Trocknung zu Ceroxid umwandelt. Anis et al. beschreiben in ihrer Darstellung zur Synthese von Cerhydroxid, dass sich das Hydroxid beim Entzug des Lösemittels zu Oxid umwandelt, sodass die Synthese via Cerhydroxid als Zwischenstufe auch ohne Temperaturbehandlung erfolgen kann. Die Reaktionen sind in den Gleichungen {1} und {2} beschrieben [Ani2011].



Als weitere Zwischenstufe wird in dieser Arbeit Cercarbonat verwendet, welches entsteht, wenn Ammoniumhydrogencarbonat (AHC) als Fällungsmittel eingesetzt wird. Die Reaktion findet unter Bildung eines Niederschlags von Cer(III)-Carbonat statt, der ausfällt, während Ammoniak und Kohlenstoffdioxid als Gas freigesetzt werden [Ede2019].

Das Cercarbonat wird durch eine Temperaturbehandlung (Kalzinierung) in Ceroxid umgewandelt. Die Kalzinierung hat den Vorteil, dass Verunreinigungen durch die Umwandlung reduziert werden können. Die Reaktionsgleichungen nach Ederer et al. [Ede2019] hierzu lauten:



Eine Fällungssynthese benötigt häufig wenig Vorbereitung und die Nachbereitung besteht in vielen Fällen nur aus Waschen und einer Temperaturbehandlung und wird deshalb häufig zur Nanopartikel-Herstellung verwendet. Jalilpour et al. beschreiben, dass bei der Fällungssynthese, so wie es LeMer und Dinegar publizierten, neben einem Zusammenhang zwischen Alterungszeit und Partikelgröße bzw. Agglomerationen auch die Kalzinierungstemperatur einen Einfluss auf die Kristallitgröße hat [Jal2012].

Eine weitere Syntheseroute zur Herstellung von Nanopartikeln sind Mikroemulsionssynthesen. Mikroemulsionen sind Wasser-Öl-Emulsionen, die durch Zugabe eines Additivs (meist ein Tensid) Mizellen bilden, in denen die Reaktanten in den Wasserphasen miteinander reagieren. In Abbildung 4 ist schematisch die Synthese von Nanopartikeln mittels Mikroemulsionssynthese dargestellt.

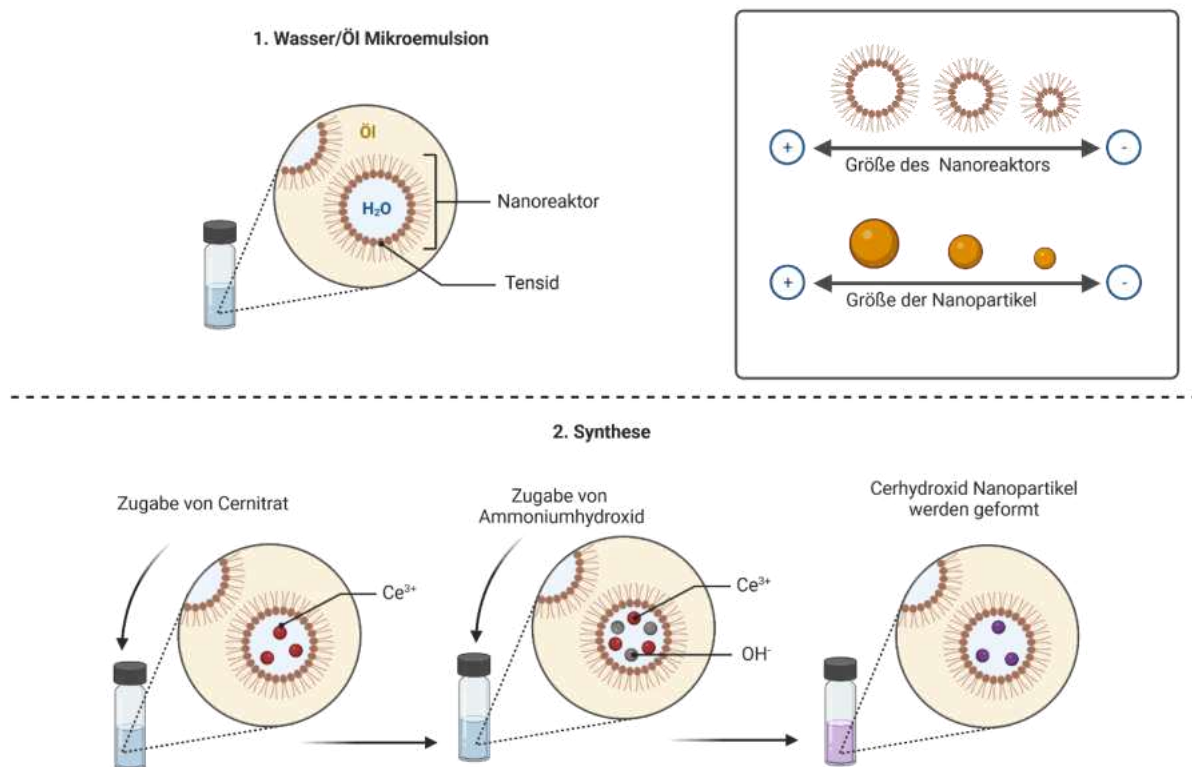


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mikroemulsionssynthese (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt).

Ein Vorteil der Mikroemulsionssynthesen ist, dass durch die Zusammensetzung der Öl-Phase sowie das Verhältnis von Öl- zu Wasserphase der Mizellen-Durchmesser bestimmt und damit die Partikelgröße genauer kontrolliert werden kann (siehe auch Abbildung 4 oben rechts). [Wol2016]

In dieser Arbeit wird sowohl die Synthese der Mikroemulsion als auch die der Fällung angewandt und in eine kontinuierliche Syntheseform überführt.

2.3 Kontinuierliche Syntheseverfahren

Die Herstellung von Nanopartikeln mittels eines kontinuierlichen Verfahrens bietet einige Vorteile. Ein entscheidender ist, dass Unterschiede wie z. B. die Partikelgröße zwischen den Nanopartikeln aus verschiedenen Synthesedurchgängen verringert werden können, da die technologischen Parameter über die kontinuierliche Synthese gleichbleiben und der Durchsatz

deutlich höher ist als bei einer Synthese im Batch-Verfahren. Somit kann eine größere Menge an Partikeln mit den gleichen Eigenschaften hergestellt werden. Dies ist gerade für die produktseitige Anwendung von Nanopartikeln sehr hilfreich, da sich die Partikel trotz identischer Syntheseparameter von Durchgang zu Durchgang minimal unterscheiden.

Mikroreaktoren stellen ein Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung von Nanopartikeln dar. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Mikroreaktoren für die chemische Synthese von Nanopartikeln entwickelt [Pen2001]. Dabei kann die Ausbeute trotz Verkleinerung der Wirkräume im Vergleich zur Synthese in Produktionsreaktoren durch konsequente Prozessführung erhöht werden [Hes2002]. Penth hat einen Mikro-Jet-Reaktor (MJR) entwickelt. Dabei ist das Konstruktionsprinzip des MJR anders als bei bisherigen Mikroreaktoren. Die Reaktion verläuft unter Inertgas, welches dazu dienen soll, das Produkt zu kühlen und zügig aus dem Reaktionsraum zu entfernen. Die Reaktanten treffen im Reaktionsraum aufeinander und bilden einen feinen Nebel, in dem sie miteinander reagieren. [Pen2001] In Abbildung 5 ist ein Bild des MJR dargestellt. Die eigentliche Reaktion findet in dem Bereich statt, der mit einem roten Kreis gekennzeichnet und in Abbildung 6 nochmal vergrößert dargestellt ist. Damit die Reaktion im Reaktor ablaufen kann, werden die Lösungen mittels Vakuumpumpen in den Reaktor gepumpt. Bei Bedarf können die Lösungen durch ein Wasserbad geleitet werden, um diese zu erhitzen. Die Bestandteile eines MJR bestehen laut Penth überwiegend aus den Standardprodukten der Wasserstrahlschneidtechnik. [Pen2001]

Beim MJR lassen sich die einzelnen Parameter unabhängig voneinander einstellen:

- Druck der Reaktanten
- Temperatur der Reaktanten
- Düsenweite
- Druck des Inertgases bzw. Druckluft
- Konzentration der Reaktanten

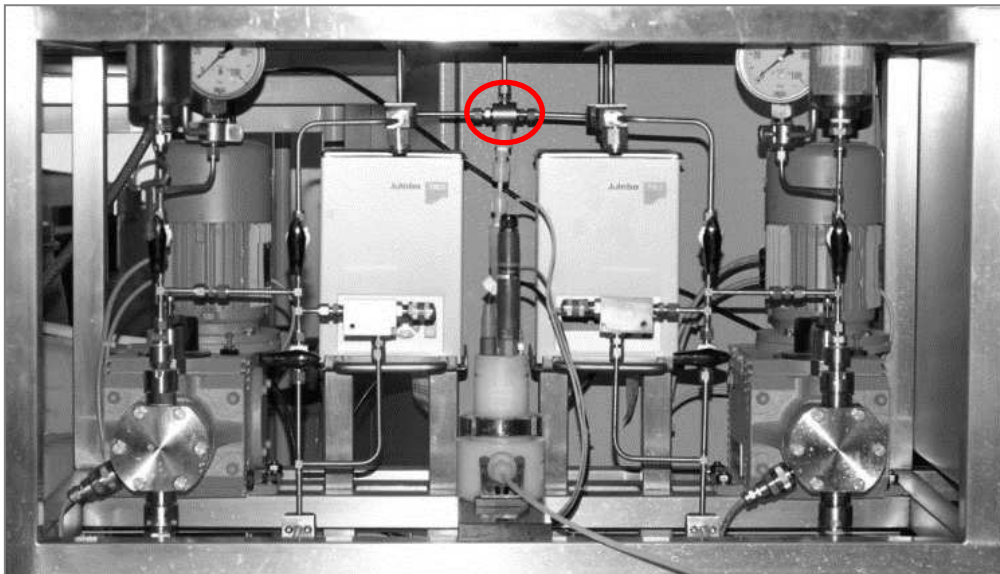


Abbildung 5: Aufbau des Mikro-Jet Reaktors, Bildquelle FGK.

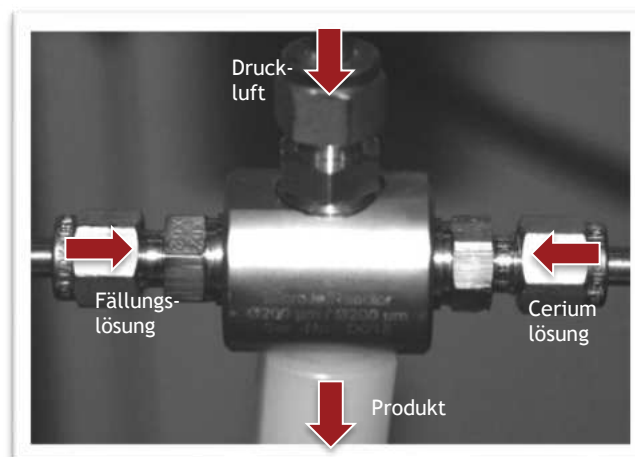


Abbildung 6: Nahaufnahme des Mikro-Jet-Reaktors, Bildquelle FGK.

In dieser Arbeit soll die Herstellung der Ceroxid-Nanopartikel in eine kontinuierliche Synthese mittels MJR überführt werden. Wie die Literatur zeigt, ist die Synthese von anorganischen Mikro- und Nanopartikeln mittels MJR möglich. [Bet2014, Ode2019, Hie2019, Rüt2009, Vol2017, Dit2011] Die kontinuierliche Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln mittels eines MJR stellt eine Forschungslücke dar, welche mit dieser Arbeit geschlossen werden kann.

Bei anderen Mikroreaktoren, wie bspw. in Abbildung 7 dargestellt, werden zwei Fluide, bestehend aus den jeweiligen Reaktanten, miteinander vermischt. Dabei spielt die Diffusion eine wichtige Rolle. Diese kann durch die Geschwindigkeit der

Fluide und durch die entstehende turbulente oder laminare Strömung beeinflusst werden. In Mikrofluid-Reaktoren mit langsamen Geschwindigkeiten und laminarer Strömung kommt es nur an der Grenzschicht zwischen den Fluiden zu Reaktionen durch Diffusion und somit zu langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten und längeren Verweilzeiten im Reaktor. [Kah2004]

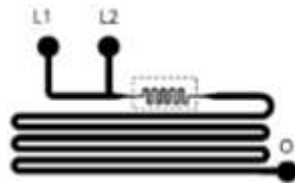


Abbildung 7: Darstellung eines Mikrofluid-Reaktors nach [Kah2004]. L1 und L1 sind jeweils die Edukte, O das Produkt.

Höhere Geschwindigkeiten und turbulente Strömungen oder, wie im Fall des MJR, kollidierende Fluide sind eine andere Art von Mikroreaktoren als der oben beschriebene Mikrofluidreaktor. Durch die hohe Geschwindigkeit und die geringe Größe der Strahlen kommt es im Reaktorraum des MJR (Abbildung 6) zu einer schnellen und intensiven Durchmischung der Reaktanten, die nach der Reaktion mit Hilfe von Sauerstoff als Inertgas direkt wieder aus dem Reaktorraum transportiert werden, sodass dort kein weiteres Keimwachstum entstehen kann. Dies unterscheidet den MJR von einem T-Mixer, dessen Schema in Abbildung 8 dargestellt ist. Im Gegensatz zum MJR arbeitet der T-Mixer ohne zusätzliche Druckluft, somit verbleibt das Produkt längere Zeit im Reaktorraum und könnte die Kanäle verstopfen. [Pen2001]

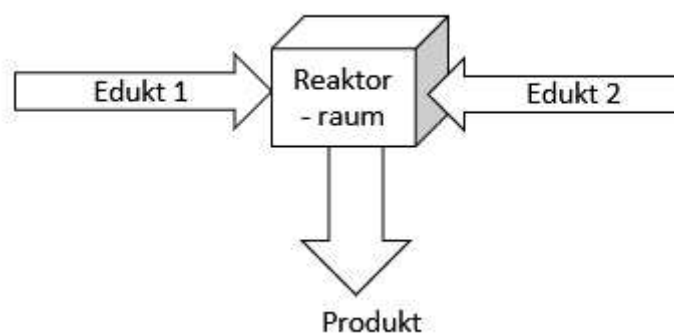


Abbildung 8: Schema eines T-Mixers nach [Gao2015].

In der Literatur werden bereits verschiedene kontinuierliche Syntheseformen von Ceroxid-Nanopartikel im Labormaßstab beschrieben. Palanisamy et al. untersuchten den Einfluss der Reynoldszahl auf die Partikelgröße und deren Verteilung von Ceroxid-Nanopartikel in einem T-Mixer. Dabei wurde ermittelt, dass sich die Reynoldszahl ändert und Ceroxid-Nanopartikel mit der Partikelgröße von 15 nm hergestellt werden können. [Pal2012]

2.4 Biosensoren

Die Definition der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) zu Biosensoren besagt, dass Sensoren, welche durch eine direkte Kopplung von immobilisierten Molekülen (z. B. Enzymen oder Antikörpern) mit dem Analyten ein Signal erzeugen, als Biosensoren bezeichnet werden können [IUPAC2019]. Dabei ist es nicht relevant, ob dieses Signal kolorimetrisch, elektrisch oder in anderer Form auftritt. Somit ist die Bandbreite von Biosensoren sehr groß. In dieser Arbeit werden zwei Arten von Biosensoren näher betrachtet und mittels kontinuierlich hergestellten Ceroxid-Nanopartikeln für Detektionszwecke eingesetzt. Im Folgenden werden die Funktionsweise von kolorimetrischen und elektrochemischen Biosensoren, in Kombination mit Ceroxid-Nanopartikeln, genauer beschrieben.

Wie bereits erwähnt, werden für Biosensoren Enzyme benötigt. Enzyme sind häufig nur in bestimmten Temperaturbereichen und bei definierten pH-Werten stabil, sodass die Produktion, Lagerung und Anwendung von Biosensoren äußerst sensibel ist. In einigen Veröffentlichungen werden Biomoleküle wie Enzyme bereits durch Nanopartikel ersetzt, da diese in einem breiten Temperatur- und pH-Wert-Spektrum stabil bleiben und die gleichen Katalysefähigkeiten wie Enzyme aufweisen. [Jia2018] Diese Funktion von Ceroxid-Nanopartikeln soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

2.4.1 Heterogene Katalyse

Generell wichtig bei Biosensoren ist die katalytische Funktion von Enzymen und Nanopartikeln. Um den Zusammenhang besser erläutern zu können, werden in diesem Abschnitt kurz die heterogene Katalyse und die Funktion von Enzymen beschrieben.

Ein Katalysator eröffnet einer Reaktion einen alternativen Reaktionsweg bei geringerer Aktivierungsenergie. Dabei bleibt die Gleichgewichtszusammensetzung des Systems unverändert, allerdings stellt sich das Gleichgewicht zügiger ein. So wird die Teilnahme eines Reaktanten durch Fragmentierung, auf Grund von Ad- und Desorption am Katalysator, an der Reaktion erleichtert. Bei einer heterogenen Katalyse liegt zwischen dem Katalysator und dem Reaktionsgemisch eine Phasengrenze vor. Dabei ist der Katalysator in der Regel ein Feststoff, im Fall dieser Arbeit in Form von Nanopartikeln, und der Reaktant ist flüssig oder gasförmig. Der Vorteil der heterogenen Katalyse ist die einfache Katalysatorabtrennung und die durch den Mars-van-Krevelen-Mechanismus hervorgerufene Regeneration des Katalysators. Die Regeneration verläuft dabei durch Chemisorption von Sauerstoff-Ionen an den zuvor durch Desorption freigewordenen Gitterplätzen. [Atk2006] In Abbildung 9 ist der Mars-van-Krevelen Mechanismus anhand einer CO_2 -Katalyse an einer Sauerstoff-Metall-Oberfläche schematisch dargestellt.

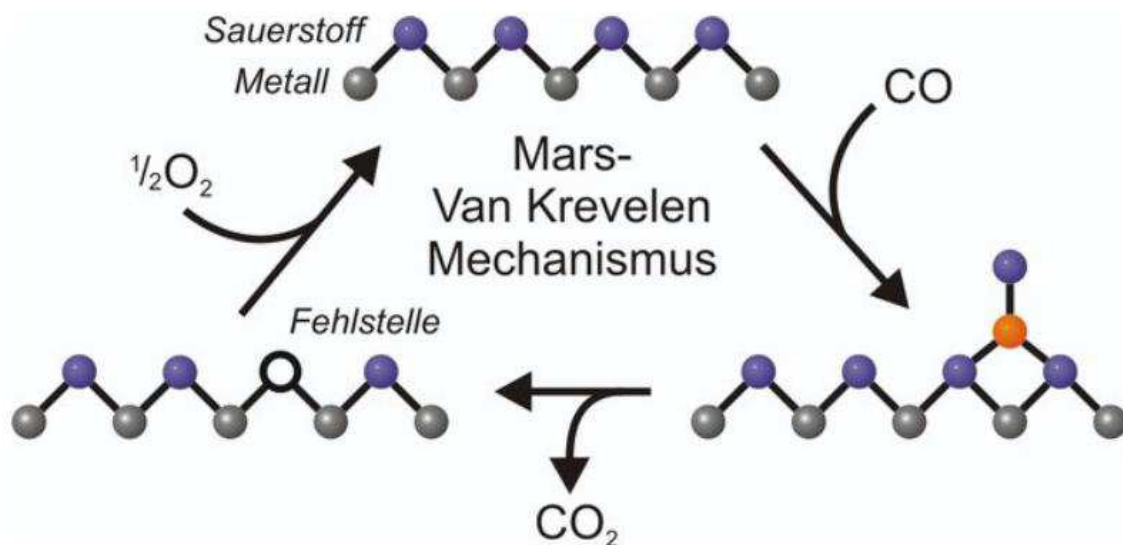


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Mars-van-Krevelen-Mechanismus aus [Sch2010].

Im Rahmen dieser Arbeit besteht der Katalysator aus Enzymen und Nanopartikeln, deren Wirkungsweisen in den folgenden Abschnitten erläutert werden. Der Reaktionsverlauf der Katalyse kann durch Photometrie und die Änderung der Absorptionsintensität bestimmt werden, wenn einer der beiden Reaktanten eine charakteristische Absorptionsfrequenz aufweist. [Atk2006]

2.4.1.1 Enzyme

Enzyme bestehen aus Proteinen mit einem aktiven Zentrum, das die katalytische Wirkung des Enzyms durch reaktive Gruppen (bspw. Metallionen) bewirkt und nur auf ein spezifisches Substrat passt. Enzyme können als Biokatalysatoren chemische Reaktionen beschleunigen, indem sie die Aktivierungsenergie zur Stoffumsetzung herabsetzen. Es gibt verschiedene Klassen an Enzymen. So katalysiert eine Oxidoreduktase bspw. Redoxreaktionen sowie Isomerasen die intramolekularen Umlagerungen. Die Edukte einer enzymatischen Umsetzung werden Substrate (S) genannt und bilden mit dem Enzym (E) einen Enzym-Substrat-Komplex ([ES]), indem sie sich an das aktive Zentrum des Enzyms binden und nach der Umsetzung in das Produkt (P) freigesetzt werden.



Durch Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe, ionische und van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat wird der Übergangszustand stabilisiert und das Substrat kann wesentlich schneller in das Produkt umgesetzt werden. Wie alle Katalysatoren liegt das Enzym nach der Reaktion wieder in der Ausgangsform vor. Bereits ein kleiner struktureller Unterschied in der Raumstruktur oder der Ladungsverteilung kann dazu führen, dass das Substrat nicht mehr erkannt wird und somit die Reaktion nicht weiter ablaufen kann. Da nahezu jede biochemische Reaktion von Enzymen kontrolliert oder ermöglicht wird, kann ein Fehler im Enzym oder das Fehlen des Enzyms zu Auswirkungen auf den Organismus führen. [Löf2008]

2.4.1.2 Nanozyme

Nanopartikel, welche eine ähnliche Aktivität wie Enzyme aufweisen, werden Nanozyme genannt. Neben der besseren Stabilität von Nanopartikeln sind die Produktionskosten und der Produktionsaufwand von anorganischen Nanozymen deutlich geringer als die der Produktion von Enzymen. Ein weiterer Vorteil von Nanozymen ist die Wiederverwendbarkeit und das breite Anwendungsspektrum der Nanozyme. Enzyme hingegen sind spezifisch für eine bestimmte Reaktion und müssen nach einmaliger Anwendung entsorgt werden [Jia2018]. Das Verwendungsspektrum der anorganischen Nanozyme ist deutlich breiter als das von Enzymen. Ein Enzym kann, im Gegensatz zu Nanopartikeln, nur ein Biomolekül nachweisen. Eisenoxid-Nanopartikel hingegen können z. B. für den Nachweis von Glukose, Histamin, dem Ebola Virus und weiteren Biomolekülen eingesetzt werden. In der Literatur steht bereits beschrieben, dass sich Glukose nicht nur mittels Eisenoxid-Nanopartikeln, sondern auch mittels Ceroxid-Nanopartikeln nachweisen lässt. [Jia2018]

Das breite Anwendungsspektrum von Ceroxid-Nanopartikeln in Biosensoren ist auf die verschiedenen mimetischen Aktivitäten von Ceroxid-Nanopartikeln zurückzuführen, die in Abbildung 10 dargestellt sind. In dieser Arbeit wird die Katalase-Aktivität (unten rechts in der Abbildung) genutzt, um einen Analyten (hier Wasserstoffperoxid) durch eine elektrochemische Reaktion zu detektieren. Außerdem wird ebenfalls die Oxidase-Aktivität (oben links in der Abbildung) für den kolorimetrischen Nachweis von Histamin verwendet.

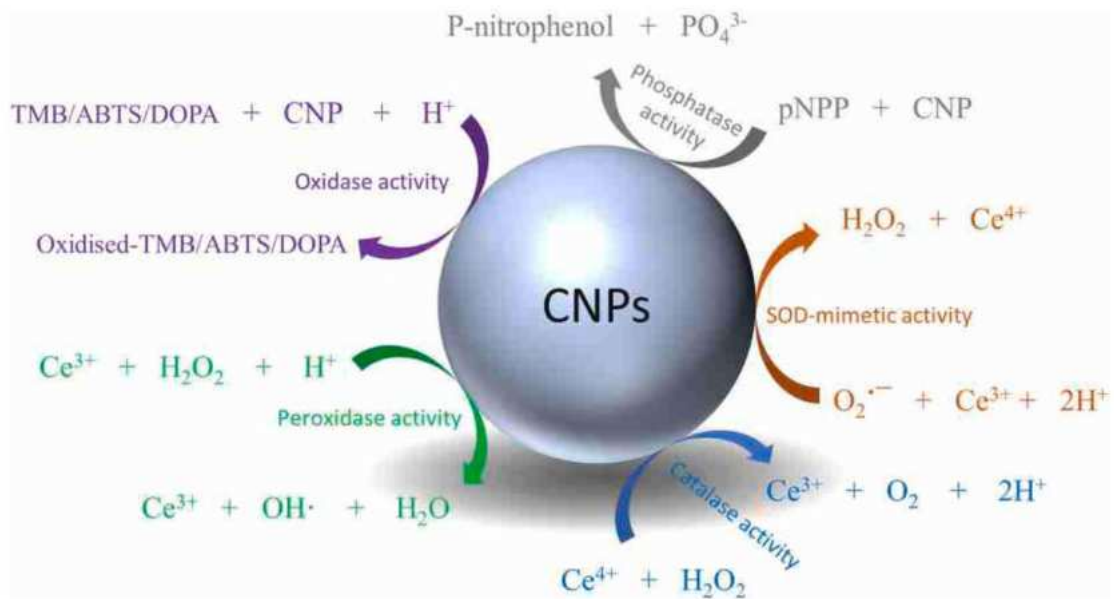


Abbildung 10: Verschiedene mimetische Aktivitäten von Ceroxid-Nanopartikeln, als Nanozym für die Grundlage von Biosensoren [Sai2021]

Um eine Aussage über die katalytische Aktivität von Nanopartikeln als Nanozyme zu treffen ist die Michaelis-Menten-Konstante wichtig. Diese wird im folgenden Abschnitt näher erläutert.

2.4.1.3 Enzymkinetik

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) verwendet. Diese dient als Grundlage aller Enzymreaktionen. Der K_M -Wert gibt an, welche Substratkonzentration benötigt wird, um die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Enzyme mit einem niedrigen K_M -Wert haben eine höhere Affinität zum Substrat als solche mit einem höheren K_M -Wert [Löf2008]. Der K_M -Wert kann über die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung {6}) bestimmt werden. Diese beschreibt die Geschwindigkeit der Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[S]$.

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \{6\}$$

Sie besagt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit zunächst mit steigender Substratkonzentration ansteigt und sich dann bei zunehmender Substrat-

konzentration allmählich asymptotisch einem maximalen Wert annähert, der als maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) bezeichnet wird. Diese Beziehung lässt sich grafisch als Sättigungskurve darstellen und wird als Michaelis-Menten-Kurve bezeichnet. In Abbildung 11 ist die Michaelis-Menten-Kinetik graphisch dargestellt. Dabei wird die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen und v_{\max} sowie K_M graphisch bestimmt. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) definiert die Substratkonzentration, bei halber Maximalgeschwindigkeit v_{\max} . Hohe K_M -Werte bedeuten, dass die Bindungsstärke zwischen Substrat und Enzym niedrig sind und die Reaktion langsam verläuft. [Löf2008]

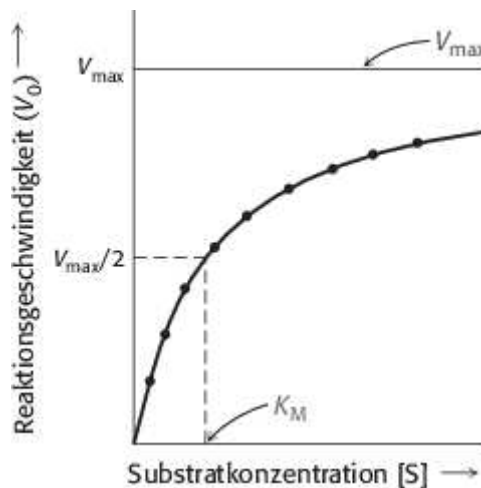


Abbildung 11: Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik aus [Str2014]

2.4.2 Elektrochemische Sensorik

Ein elektrochemischer Biosensor ist ein biotechnologisches Instrument, das zur Erkennung von biologischen Stoffen, wie beispielsweise Enzymen, Proteinen, Bakterien oder Viren, eingesetzt wird. Dies geschieht mit Hilfe von elektrochemischen Messungen, die eine Veränderung des elektrischen Potentials oder des elektrischen Stroms bei der Wechselwirkung zwischen dem biologischen Stoff und dem Sensor aufzeichnen. Die Anwendung eines elektrochemischen Sensors als Basis für die Detektion von Biomolekülen beruht auf zwei Reaktionen, zum einen der chemischen Reaktion, welche zwischen dem Biomolekül und den Nanopartikeln oder Enzymen abläuft, und zum anderen auf

der elektrochemischen Reaktion, die durch Zugabe eines Potentials in der Elektrode gemessen werden kann. [Raj2021]

Ein elektrochemischer Biosensor besteht in der Regel aus drei Hauptkomponenten:

- 1.) einem biologischen Erkennungselement
- 2.) einer elektrochemischen Transduktionseinheit
- 3.) einem Auswertungssystem

Das biologische Erkennungselement, in der Regel ein Enzym, ein Antikörper oder eine DNA, ist spezifisch für den zu detektierenden biologischen Stoff. In dieser Arbeit werden dafür Ceroxid-Nanopartikel eingesetzt. Das biologische Erkennungselement kann in einem Biosensor auf einer Membran oder auf einer Elektrode immobilisiert sein. Die elektrochemische Transduktionseinheit wandelt die biochemischen Reaktionen, die durch die Wechselwirkung zwischen dem biologischen Stoff und dem Erkennungselement ausgelöst werden, in ein elektrisches Signal um. Hierbei können verschiedene Verfahren wie die potentiometrische, amperometrische oder impedimetrische Messung verwendet werden. Das Auswertungssystem analysiert das elektrische Signal und berechnet daraus den Gehalt oder die Konzentration des zu detektierenden biologischen Stoffs. Dies kann beispielsweise mithilfe von Kalibrierungskurven erfolgen, die die Beziehung zwischen dem elektrischen Signal und der Konzentration des biologischen Stoffs darstellen.

Elektrochemische Biosensoren haben zahlreiche Anwendungen in der medizinischen Diagnostik, der Umweltüberwachung, der Lebensmittel- und Getränkeindustrie sowie in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. Sie müssen schnell, präzise und kosteneffektiv sein und haben das Potenzial, eine wichtige Rolle bei der schnellen und genauen Detektion von biologischen Stoffen zu spielen. Ein bekanntes Beispiel ist der amperometrische Glukosesensor für Messungen des Blutzuckerspiegels bei Menschen mit Diabetes. Das Prinzip des amperometrischen Glukosesensors funktioniert wie folgt: Die Glukose im Blut wird durch das Enzym Glukose-Oxidase (GOD) zu Glukonalacton und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert. Das durch die Enzymreaktion freigesetzte H_2O_2 wird an einer Elektrode oxidiert und erzeugt

einen Strom, der amperometrisch gemessen und aufgezeichnet wird. Der Strom ist proportional zur Konzentration von H_2O_2 , welches wiederum proportional zur Glukosekonzentration in der Probe ist, sodass diese innerhalb von kurzer Zeit überprüft werden kann. Hieraus folgt, ob Insulin gespritzt werden muss, um die Glukosekonzentration im Blut des Patienten zu reduzieren. [Amo2017]

2.4.3 Kolorimetrischer Biosensor

Kolorimetrische Biosensoren sind eine Art von Biosensoren, die auf Basis von Farbänderungen funktionieren, um das Vorhandensein von biologischen Molekülen oder analytischen Verbindungen zu erkennen. Diese Biosensoren nutzen in der Regel spezifische Biomoleküle (wie Antikörper oder Enzyme) um eine spezifische Identifikation des Zielmoleküls zu gewährleisten. Kolorimetrische Biosensoren sind einfach herzustellen, kostengünstig und erfordern keine teure Ausstattung. Daher können sie in vielen Anwendungen eingesetzt werden, zum Beispiel in der Umweltüberwachung, Lebensmittelsicherheit oder medizinischen Diagnostik. Ein Beispiel für den kolorimetrischen Biosensor ist ein lateraler Flusstest (engl.: lateral flow assay, Abk.: LFA). Der LFA ist eine Art immunologischer Schnelltest, der zur qualitativen oder semi-quantitativen Erkennung von bestimmten biologischen Analyten, zum Beispiel Antigenen, Antikörpern oder Nukleinsäuren, verwendet wird. [Won2009] Der Test ist einfach durchzuführen, bedarf keiner speziellen Ausrüstung und wird deshalb als patientennahe Diagnostikverfahren (engl. point-of-care, POC) eingesetzt. Auf Grund der einfachen und schnellen Handhabung sind LFA in der medizinischen Diagnostik etablierte Tests, insbesondere zur schnellen Diagnostik, z. B. für Infektionskrankheiten wie COVID-19, oder in Form eines Schwangerschaftstests. [Lup2008]

Wie in Abbildung 12 schematisch dargestellt, besteht ein lateraler Flusstest aus einem Teststreifen, aus einem saugfähigen Material wie Papier oder Nitrozellulose. Die Probe wird am Anfang des Teststreifens aufgetragen und fließt mittels Kapillarkräften über die verschiedenen Abschnitte des Teststreifens. Wenn der Analyt vorhanden ist, bindet er an spezifische Reagenzien im Teststreifen, wodurch eine sichtbare Linie entsteht, die das Vorhandensein des

Analyten anzeigt [Won2009]. Beim COVID-19-Schnelltest bindet ein Antigen an einen auf der Testoberfläche immobilisierten Antikörper und Gold-Nanopartikel bilden durch Agglomeration eine sichtbare rote Linie auf der Antigenlinie. Die zweite rote Linie dient als Kontrolle und enthält unspezifische Antikörper, die anzeigen, ob der Test erfolgreich war. [Koc2016]

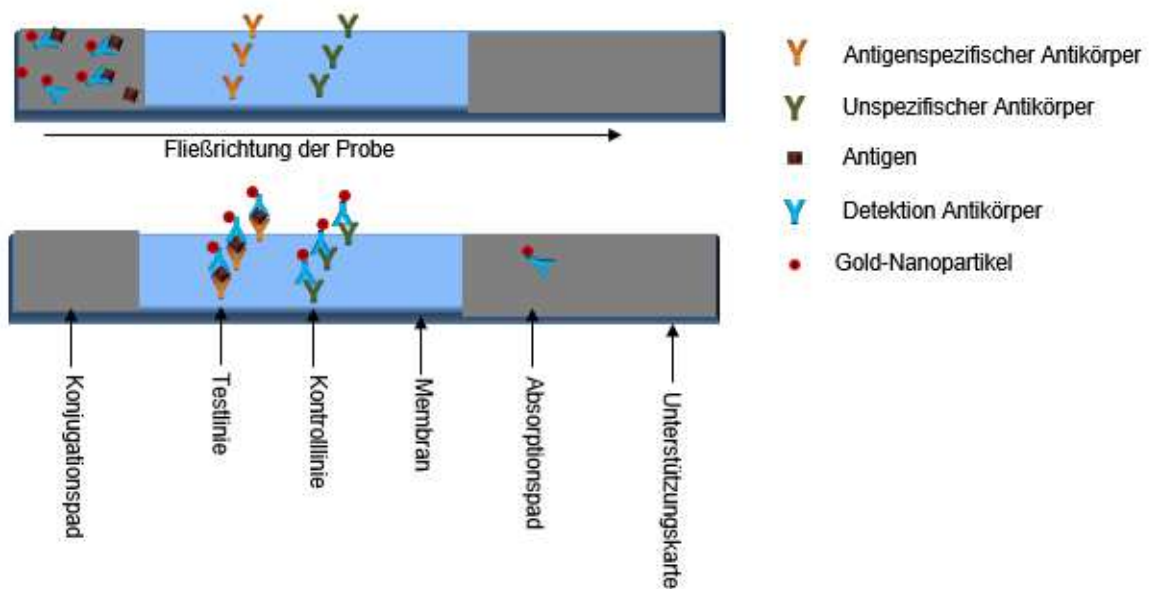


Abbildung 12: Genereller Aufbau eines lateralen Flusstests (oben) und positiver Nachweis bei bspw. Covid-19.

Im lateralen Flusstest werden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt, zum einen die Chromatographie und zum anderen die Bindung verschiedener Moleküle, z. B. Antikörper an Proteinen oder Antikörper an Biomolekülen, oder wie in dieser Arbeit das Histamin. Die Bindung des Biomarkers an die auf dem Test immobilisierten Moleküle ist spezifisch, sodass falsch positive Ergebnisse reduziert werden können. Das chromatographische Prinzip des lateralen Flusstests unterstützt dies, da größere Moleküle, z. B. Verunreinigungen, die Testlinie deutlich später erreichen. Daher ist die Zeitspanne für ein zuverlässiges Ergebnis nicht sehr lang. [Koc2016]

Wie bereits von Moyano et al. beschrieben, kann Histamin in Wein durch einen LFA detektiert werden. [Moy2019] In dieser Arbeit wird das Verfahren mit Eisenoxid-Nanopartikeln auf Ceroxid-Nanopartikel umgestellt, um diese als Markierungspartikel an Antikörper zu binden, welche eine Farbreaktion beim

nachfolgend hinzugefügten Tetramethylbenzidin (TMB) auslösen [Wan2022]. Der genaue Aufbau der Teststreifen wird in Kapitel 3.5.2 beschrieben.

2.5 Verwendete Analyten in den Anwendungsversuchen

2.5.1 Histamin

Histamin ist ein biogenes Amin, welches im menschlichen Körper natürlich vorkommt und an vielen physiologischen Prozessen beteiligt ist. Histamin wird vom Körper selbst produziert und kommt in zahlreichen Lebensmitteln vor. Liegt Histamin allerdings im Überschuss vor oder wird es vom Körper nicht richtig abgebaut, kann es zu allergischen Reaktionen kommen. Für den Abbau von Histamin sind die Enzyme Diaminoxidase (kurz DAO) und Histamin-N-Methyltransferase (kurz HNMT) verantwortlich. In Abbildung 13 ist die jeweilige Abbaureaktion von Histamin mit den oben genannten Enzymen abgebildet. Fehlt dem Körper DAO oder wird dieses durch Medikamente blockiert, kommt es zu einer Histamin-Intoleranz und die Betroffenen leiden unter verschiedenen allergischen Reaktionen, wie Bauchschmerzen, Atemnot, Juckreiz oder Herzrasen. Aber auch ein gesunder Körper kann bei übermäßigem Konsum von Histamin allergisch reagieren. Dabei ist ein typisches Symptom eine schlechte Luftzufuhr durch die Nase nach dem Verzehr von Rotwein oder Käse. Da es keine medikamentöse Behandlung einer Histamin-Intoleranz gibt, müssen Betroffene auf Histaminhaltige Lebensmittel sowie Lebensmittel und Medikamente, die körpereigenes Histamin freisetzen, verzichten. Um den Betroffenen das Leben zu erleichtern, soll im Rahmen dieser Arbeit ein anwendungsfreundlicher Test entwickelt werden, der Histamin in Lebensmittel nachweisen kann. Eine weitere Anwendung von Histamin-Detektion ist die Überprüfung des Gehalts in Lebensmitteln. Für die Herstellung von Rotwein gibt es für Histamin Grenzwerte, für deren Nachweis die Entwicklung eines elektrochemischen Sensors geplant ist. Herkömmliche Laterale Flusstests zum Nachweis von Histamin basieren auf einer Enzymreaktion, deshalb sind für die Lagerung des Testkits niedrige Temperaturen notwendig. Dies soll durch die Verwendung von Ceroxid-Nanopartikeln anstelle des Enzyms DAO vermieden werden. [Mai2006]

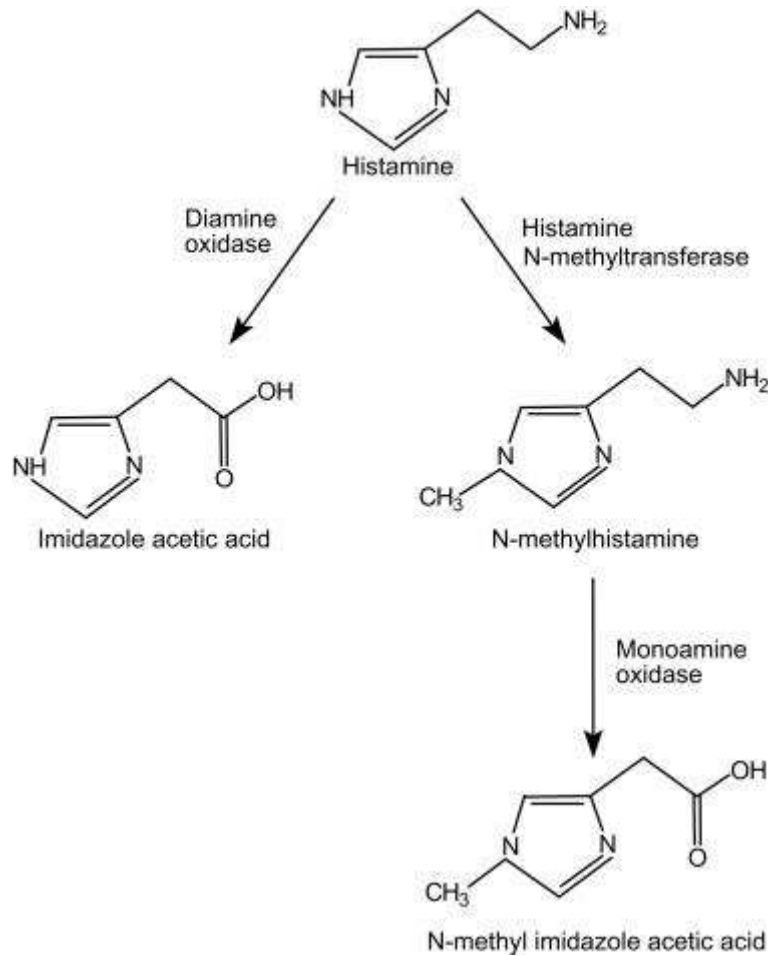


Abbildung 13: Histaminabbau mittels Enzymen, links mit Diaminoxidase und rechts mit Histamin-N-methyltransferase, aus [Mor2021].

Zur Detektion mittels kolorimetrischer und elektrochemischer Analyse wird Histamin-dihydrochlorid Pulver von Sigma-Aldrich verwendet.

2.5.2 Glukose

Glukose ist eine Zuckerart, die in vielen Lebensmitteln vorkommt und vom Körper durch Aufspaltung von komplexeren Kohlenhydraten wie Stärke und Glykogen produziert und zur Energiegewinnung benötigt wird. Überschüssige Glukose wird in Form von Glykogen in der Leber und in den Muskeln gespeichert oder in Fett umgewandelt und als Energiereserve genutzt. Glukose spielt auch eine wichtige Rolle in der Medizin und wird in verschiedenen Tests und Untersuchungen, wie dem Glukosetoleranztest, zur Diagnose und Überwachung von Diabetes und anderen Stoffwechselstörungen eingesetzt. Bei Diabetes kann der Körper

Glukose nicht effektiv nutzen, da entweder der Körper kein Insulin produziert (Typ-1-Diabetes) oder die Insulinproduktion unzureichend ist oder die Zellen des Körpers nicht auf das vorhandene Insulin reagieren (Typ-2-Diabetes). Insulin ist ein Hormon, das von der Bauchspeicheldrüse produziert wird und die Aufnahme von Glukose in die Zellen des Körpers reguliert. Wenn der Körper nicht genügend Insulin produziert oder es nicht richtig verwendet, kann Glukose nicht in die Zellen aufgenommen werden, sondern verbleibt im Blutkreislauf und erhöht den Blutzuckerspiegel. Glukose wird in dieser Arbeit als Analyt verwendet. Die Detektion von Glukose mittels Ceroxid-Nanopartikeln erfolgt mit Hilfe des Enzyms Glukoseoxidase (GOx). Glukose reagiert mit GOx zu Gluconalactone und Wasserstoffperoxid, siehe Gleichung {7}. Das produzierte Wasserstoffperoxid kann in einem elektrochemischen Sensor nachgewiesen werden, der mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichtet ist. [Pat2012, Rah2010]



Für die elektrochemischen Versuche wird D-(+)-Glukose ACS von Sigma Aldrich verwendet.

2.5.3 TMB

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) ist ein gebräuchliches Substrat in der Biochemie zur Detektion von Enzymaktivitäten, insbesondere von Peroxidase-Enzymen. Die Verwendung von TMB als Substrat basiert auf der Reaktion mit Wasserstoffperoxid. In Gegenwart von Peroxidase-Enzymen oxidiert H_2O_2 TMB zu einer farbigen Verbindung, die bei $\lambda = 653 \text{ nm}$ mittels Photometer detektiert werden kann. Die Intensität des gemessenen Photometer-Signals ist proportional zur Konzentration des Enzyms oder des Substrates im Assay. Wie in Abbildung 14 dargestellt, ist die blaue Farbe des TMBs nur eine Zwischenstufe der Oxidation, das Endprodukt des oxidierten TMBs hat eine gelbe Farbe. Dieser endgültige Oxidationsschritt kann mit einer Säure, z. B. Schwefelsäure unterbunden werden. [Fu2018, Imm o.D.]

In dieser Arbeit wird TMB als Substrat und als Farbstoff im kolorimetrischen Sensorsystem, um die Abwesenheit von Histamin in der Probe anzuzeigen.

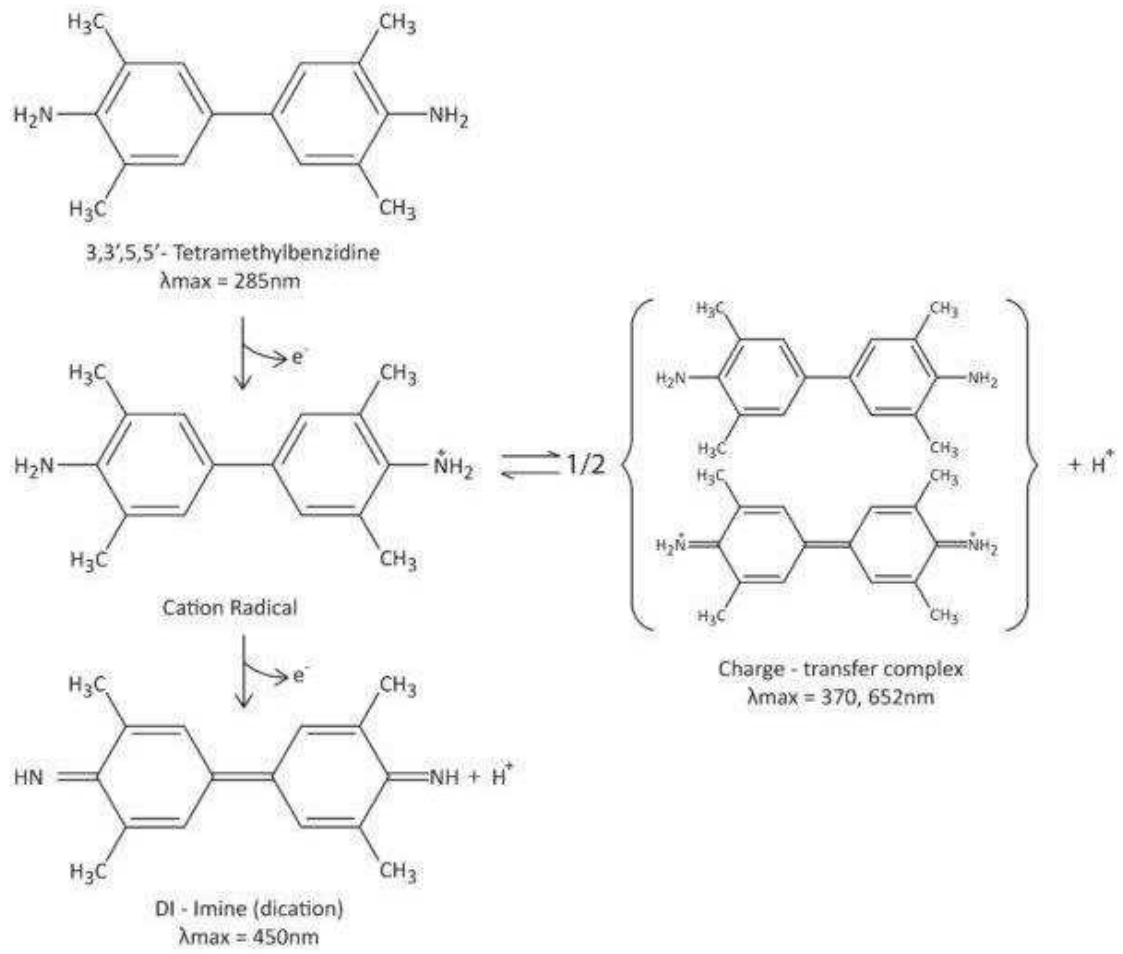


Abbildung 14: Oxidation von TMB [Imm o.D.]

3 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die Herstellung der Ceroxid-Nanopartikel und deren Anwendungen im Detail beschrieben.

3.1 Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln

Zur Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln wurde eine Fällungssynthese verwendet und dabei wurden zwei verschiedene Fällungsmittel miteinander verglichen. Außerdem wurde eine Mikroemulsionssynthese durchgeführt. Alle Nanopartikel-Synthesen wurden zunächst im Becherglas durchgeführt und die erfolgversprechendsten Syntheseparameter anschließend auf eine kontinuierliche Produktion im MJR übertragen. Dieses Material wurde verwendet, um Analysen (z. B. XRD- und Raman-Spektroskopie) an den Nanopartikeln durchzuführen und Biosensor-Anwendungen mit den Nanopartikeln zu testen. Zur Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln mittels Fällungssynthese wurde zu einer gelösten Cer (III)-Nitrat-Hexahydrat-Verbindung ein Fällungsmittel gegeben, welches eine unlösliche Verbindung mit dem Cer eingeht und ausfällt. [Zha2009, Li2002, Bab2015] Die Fällungssynthese bedarf nur eines geringen Aufwandes, da neben einer wässrigen Cer-Lösung nur eine Fällungslösung benötigt wird. Beide Lösungen werden entweder mittels Büretten in ein Becherglas getropft oder bei der kontinuierlichen Synthese jeweils in einen Behälter für den MJR überführt und mit gleichem Druck in den Reaktor gepumpt, wo sie miteinander reagieren. Die Auswahl der Fällungslösung sowie ihrer Konzentration und die Konzentration der Cer-Lösung, die Geschwindigkeit der Tropfen bzw. des Aufeinanderprallens der Lösungen im Reaktor sowie die Temperatur der Lösungen wirken sich dabei auf die Größe und Größenverteilung der Ceroxid-Nanopartikel aus [Cho2010]. Die Parameter der kontinuierlichen Synthesen sind in Kapitel 3.2 ausführlich dargestellt. Im Folgenden werden die drei Syntheserouten, die anschließend in den MJR überführt wurden, näher beschrieben. Die Vorversuche zur Bestimmung der jeweiligen Konzentrationswerte sind nicht angegeben, da sie den Rahmen des Dokuments überschreiten würden.

3.1.1 Fällungssynthese mit Ammoniumhydrogencarbonat

Die Ceroxid-Nanopartikel aus der Fällungssynthese mit der Zwischenstufe Cercarbonat, mit den Ausgangsstoffen Cer(III)-Nitrat-Hexahydrat und Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3) (abk.: AHC) als alkalisches Fällungsmittel [Ede2019], wurden durch Kalzinieren des Cercarbonats hergestellt. Mittels Vorversuchen zur Bestimmung der Konzentrationen in den Bereichen $c_{\text{Cer}} = 0,05$ bis 1 M und $c_{\text{AHC}} = 0,1$ bis $0,35 \text{ M}$ wurden folgende Parameter für die Lösungen festgelegt:

- $c_{\text{Cer}} = 0,5 \text{ mM}$
- $c_{\text{AHC}} = 0,2 \text{ M}$

Das hergestellte Cercarbonat-Pulver wurde mit Wasser gewaschen und anschließend im Trockenschrank getrocknet. Die Kalzinierung erfolgte unter den folgenden Bedingungen: Haltezeit $t_{\text{kalz}} = 3 \text{ h}$ bei $T_{\text{kalz}} = 500 \text{ }^\circ\text{C}$, ruhend in einer Abdampfschale aus Porzellan, um alle Additive und Verunreinigungen zu entfernen und die Umwandlung zu Ceroxid vollständig zu erreichen [Jan2017].

Zur Untersuchung des Agglomerationsverhaltens und der Partikelgröße wurden Änderungen des Parameters Temperatur vorgenommen. Außerdem wurden während der Synthese die Additive CTAB (MNK1.7CTAB) und Dextran eingesetzt, um die entstehenden Agglomerate zu reduzieren. Das Dextran wurde einmal nach der Fällung der Produktlösung (MNK1.6Dx) und einmal vor der Synthese der Cernitrat-Lösung (MNK1.8Dx) zugegeben. Das CTAB wurde ausschließlich der Produkt-Lösung hinzugefügt. In Tabelle 1 sind die Synthesen im MJR mit AHC als Fällungsmittel zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der Synthesen im MJR mit Ammoniumhydrogencarbonat als Fällungsmittel

Name	Synthesetemperatur	Fällungsmittel	Additiv
MNK1.3	Raumtemperatur	AHC	-
MNK1.4	70 ° C (Temperatur des Wasserbades)	AHC	-
MNK1.5	90 ° C (Temperatur des Wasserbades)	AHC	-
MNK1.6Dx	Raumtemperatur	AHC	Dextran (Zugabe nach der Fällung)
MNK1.7CTAB	Raumtemperatur	AHC	CTAB (Zugabe nach der Fällung)
MNK1.8Dx	Raumtemperatur	AHC	Dextran (Zugabe zur Cer-Lösung)

Um die Verarbeitbarkeit der Ceroxid-Nanopartikel in der Anwendung zu verbessern, wurde eine Salzschnmelze mittels eines Precursors eingesetzt (siehe Tabelle 2). Die Proben wurden vor der Kalzinierung mit einem Salzschnmelze aus Chlorid oder Hydroxid vermischt und anschließend wie gewohnt kalziniert [LAN2018, LAN2017]. Dies wurde mit den gefriergetrockneten Proben der Synthese MNK1.8Dx durchgeführt.

Tabelle 2: Übersicht der Salzschnmelze vor der Kalzinierung der Probe MNK1.8Dx

NAME	ZUSAMMENSETZUNG DER SALZSCHMELZE
MNK1.8Dx_CI	$m_{\text{LiCl}} = 8,8 \text{ g}$ $m_{\text{KCl}} = 11,2 \text{ g}$ $m_{\text{Precursor}} = 2,5 \text{ g}$
MNK1.8Dx_OH	$m_{\text{NaOH}} = 9,5 \text{ g}$ $m_{\text{KOH}} = 11,8 \text{ g}$ $m_{\text{Precursor}} = 2,0 \text{ g}$

3.1.2 Fällungssynthese mit Ammoniumhydroxid

Als weiteres Fällungsmittel wurde Ammoniumhydroxid (NH_4OH) eingesetzt, das als Zwischenprodukt Ceroxid ($\text{Ce}(\text{OH})_3$) bildete. Dafür wurden eine $c_{\text{Cer}} = 1$ molare Cernitrat-Lösung und $V_{F1} = 30 \text{ mL}$ einer 28%igen Ammoniumhydroxid-Lösung gleichmäßig in ein Becherglas getropft. Die nach

bereits einer Stunde dunkellila gefärbten Nanopartikel wurden mit $v_z = 4000$ rpm $t_z = 30$ Minuten zentrifugiert, mit Wasser gewaschen und nochmals zentrifugiert, um die überschüssigen Reagenzien zu entfernen, abzufüllen und anschließend zu trocknen. Anhand von Vorversuchen wurde festgestellt, dass ein Additiv (bspw. PAA und Dextran) notwendig ist, um Agglomerationen zu reduzieren. In Tabelle 3 sind die Fällungssynthesen mit Ammoniumhydroxid im MJR aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht der Synthesen im MJR mit Ammoniumhydroxid als Fällungsmittel

Name	Additiv
MNA1	PAA
MNA2	Dextran

3.1.3 Mikroemulsionssynthese

Für die Anwendung der Nanopartikel in einem lateralen Flusstest ist eine Dispersion unerlässlich, daher wurde eine weitere Syntheseroute evaluiert. Dazu wurde die für Eisenoxid-Nanopartikel etablierte Methode der Mikroemulsion für Ceroxid angepasst.

Für die Synthese wurde eine Mikroemulsion nach Salvador et al. hergestellt [Sal2021]. Dazu wurde $m_{CTAB1} = 4,8$ g CTAB in $m_{But1} = 3,2$ g 1-Butanol und $m_{Hex1} = 9,0$ g 1-Hexanol gelöst. Sobald sich keine großen CTAB-Agglomerate mehr in der Lösung befanden, wurde $m_{Cer} = 3,0$ g einer $c_{Cer} = 1$ molaren Cernitrat-Lösung hinzugegeben (MNE1). Sowie diese Lösung wiederum klar war und keine CTAB-Agglomerate mehr sichtbar waren, begann die Zugabe des Ammoniumhydroxides (NH_4OH). Das NH_4OH wurde tröpfchenweise hinzugegeben, bis die Lösung eine lila Färbung annahm. Die Lösung wurde zwei weitere Stunden gerührt, um das gesamte Cer umzusetzen und eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen.

Nach der Synthese wurde die Nanopartikel-Lösung zentrifugiert und drei Mal mit einer 75:25 Ethanol-Wasser-Lösung gewaschen, um die organischen Lösemittel und nicht umgesetzten Reagenzien zu entfernen. Die Lösung wurde nach Zugabe des NH_4OH lila, nach dem zweiten Waschschrift wurde die Lösung gelblich, welches die typische Farbe des Cerdioxides darstellt. Die Nanopartikel

konnten anschließend entweder getrocknet oder in Lösung aufbewahrt und verwendet werden.

Um den Einfluss der Öl-Wasserphasen-Zusammensetzung zu analysieren, wurde eine zweite Synthese (MNE2) durchgeführt, bei der $m_{\text{CTAB}2} = 3$ g CTAB, $m_{\text{But}2} = 2$ g 1-Butanol und $m_{\text{Hex}2} = 11,4$ g 1-Hexanol verwendet wurden. Die Lösung wurde solange gerührt bis das CTAB aufgelöst war; anschließend wurden $m_{\text{Cer}} = 3,6$ g einer $c_{\text{Cer}} = 1$ molaren Cernitrat-Lösung als Wasserphase hinzugegeben und so verfahren wie bei der vorherigen Synthese auch. Das NH_4OH wurde tröpfchenweise hinzugegeben, bis sich die Farbe der Lösung ändert. Nach der Zugabe des NH_4OH wurde die Lösung zwei Stunden gerührt, anschließend zentrifugiert und drei Mal mit einer 75:25 Ethanol-Wasser-Lösung gewaschen.

Bei der kontinuierlichen Synthese im MJR war eine Tropfen-Zugabe der basischen Lösung NH_4OH nicht möglich, weshalb im Vorfeld Versuche mit verschiedenen Konzentrationen des NH_4OH zur Analyse der Ausbeute durchgeführt wurden. Neben der Ausbeute wurde auch das Verhältnis der Ce-O Raman-Bande zu den übrigen Banden bestimmt, um die Proben auf Verunreinigungen zu untersuchen. In Tabelle 4 sind die Mikroemulsionssynthesen, die im MJR durchgeführt wurden, nach Zusammensetzung der Mikroemulsion und Fällungsmittel aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht der Synthesen im MJR mittels Mikroemulsionssynthese

Name	Zusammensetzung Mikroemulsion	Fällungsmittel
MNE1	$m_{\text{CTAB}1} = 4,8$ g CTAB $m_{\text{But}1} = 3,2$ g 1-Butanol $m_{\text{Hex}1} = 9,0$ g 1-Hexanol $m_{\text{Cer}} = 3,0$ g wässrige Cernitrat-Lösung	NH_4OH
MNE2	$m_{\text{CTAB}2} = 3$ g CTAB $m_{\text{But}2} = 2$ g 1-Butanol $m_{\text{Hex}2} = 11,4$ g 1-Hexanol $m_{\text{Cer}} = 3,6$ g wässrige Cernitrat-Lösung	NH_4OH
MNE3	$m_{\text{CTAB}1} = 4,8$ g CTAB $m_{\text{But}1} = 3,2$ g 1-Butanol $m_{\text{Hex}1} = 9,0$ g 1-Hexanol $m_{\text{Cer}} = 3,0$ g wässrige Cernitrat-Lösung	NH_4HCO_3

Die Synthese MNE3 wurde anstatt mit NH_4OH als Fällungsmittel mit AHC durchgeführt, um einen Unterschied zwischen beiden Fällungsmitteln in der Mikroemulsion zu veranschaulichen. Die Partikel wurden wie bei der regulären Fällungssynthese mit AHC bei $T_K = 500\text{ °C}$ $t_K = 3\text{ h}$ kalziniert. Diese Synthese wurde ausschließlich im Becherglas durchgeführt und mit der Raman-Spektroskopie analysiert, um den Einfluss der Syntheseart auf die chemische Zusammensetzung der Partikel beurteilen zu können.

3.2 Überführung in eine kontinuierliche Synthese mittels Mikro-Jet-Reaktor

Der MJR bietet als ein kontinuierliches Verfahren die Möglichkeit zur Herstellung größerer Mengen Ceroxid-Nanopartikel. Das Hochskalieren der Synthesen wurde in Kooperation mit dem FGK in Höhr-Grenzhausen durchgeführt. Die angewendeten Synthesen wurden bereits im vorherigen Kapitel aufgeführt. In diesem Kapitel soll nochmal die Durchführung der Synthese im MJR näher beschrieben werden.

Die Synthesen im MJR wurden bei einem Pumpendruck von $p = 45\text{-}50\text{ bar}$ mit einer Düsenweite von $\varnothing = 300\text{ mm}$ durchgeführt. Die Produktlösung wurde nach der Synthese mittels Zentrifuge und Wasser gewaschen, um mögliche Verunreinigungen zu entfernen und die Konzentration des Nitrates zu reduzieren.

Die Lösungen wurden bei $T = -18\text{ °C}$ eingefroren, um anschließend mittels eines Gefriertrockners das Nanopartikel-Pulver herzustellen. Die Parameter des Gefriertrockners der Firma Christ sind wie folgt:

- Trocknungsdauer Haupttrocknung 20 Std.
- Trocknungsdauer Nachtrocknung 4 Std.
- Sollwert Vakuum Haupttrocknung 0,940 mbar
- Sollwert Stellfläche Haupttrocknung 20°C
- Temperatur Eiskondensatorraum ca. -70°C

Je nach Synthesemethode wurde das Pulver weiterverarbeitet oder direkt verwendet. Bei der Verwendung einer Fällungssynthese wurden die Proben im Anschluss gewaschen und gefriergetrocknet. Bei der Verwendung von AHC als

Fällungsmittel war im Anschluss, wie oben beschrieben, noch eine Kalzinierung notwendig.

Das Produkt, welches aus der Mikroemulsionssynthese hergestellt wurde, musste zur weiteren Verwendung nicht gefriergetrocknet werden, sondern konnte als kolloidale Lösung direkt verwendet werden. Aufgrund der charakteristischen Merkmale der Ceroxid-Nanopartikel (Partikelgröße, kolloidales Lösungsverhalten) aus verschiedenen Syntheseverfahren wurden die Nanopartikel aus der MNE1 Synthese für die Anwendung in den Biosensoren verwendet.

3.3 Charakterisierungsmethoden

3.3.1 Partikelgröße und Stabilität

Bei der Analyse der hergestellten Ceroxid-Nanopartikel, spielt neben der chemischen und mineralogischen Analyse auch die Größe der Nanopartikel eine wichtige Rolle. Zur Größenanalyse wurden vorwiegend zwei Verfahren angewandt, neben der bildgebenden Elektronenmikroskopie wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) eingesetzt. Die DLS ist eine schnelle und einfache Methode zur Partikelgrößenbestimmung. Dabei wird über die Viskosität, Temperatur und Diffusionskonstante der Lösung der hydrodynamische Radius bestimmt. Dieser ist meist kleiner als der reale Radius des Teilchens, kann aber als pragmatische Abschätzung der Partikelgröße verwendet werden. Für diese Methode ist eine disperse Probe erforderlich.

Die elektromikroskopische Analyse wurde an einem FE-SEM JSM-7200F von JOEL an der Hochschule Koblenz durchgeführt. Die Pulverprobe wurde auf ein Kohlenstoffpad aufgebracht und mit $d_w = 3$ nm Wolfram bedampft. Die Aufnahmen wurden mit einer Spannung von $U = 15,0$ kV und Vergrößerungen zwischen 100- und 200 000-fach durchgeführt.

Zusätzlich wurden an der Universität Oviedo TEM-Aufnahmen mit einem TEM JOEL 1011 gemacht, um die Verteilung und Größe der einzelnen Nanopartikel besser bestimmen zu können, da die FE-SEM-Aufnahmen hauptsächlich

Agglomerate zeigten. Die Aufnahmen wurden mit 50 000 bis 300 000-facher Vergrößerung gemacht.

Zur Bestimmung der Partikelgrößen wurden je nach Aufnahmequalität der TEM- und FE-SEM-Aufnahmen 15 bis 100 Nanopartikel pro Probe mittel der Software ImageJ manuell gemessen und ausgewertet.

Für die technologische Anwendung der Nanopartikel ist neben der Partikelgröße auch die sterische Stabilisierung der Partikel wichtig. Zur Messung des Stabilisierungsgrades wurde das Zeta-Potential bestimmt. Dieses beschreibt die Partikelladung und die Wechselwirkungen zwischen den dispergierten Partikeln und dem Medium. Die Bewegungsgeschwindigkeit der Teilchen hängt von der Teilchenladung, Viskosität und Dielektrizitätskonstante des Mediums ab. Je höher die Stabilität der Dispersion und somit die Oberflächenladungsdichte, desto höher ist das Zeta-Potential. Dieses gibt eine Aussage über die Partikelladung und die physikalische Stabilität der Lösung.

Die DLS- und Zeta-Potential-Messungen fanden an einem Zetasizer NanoSeries der Firma Malvern an der Universität Oviedo statt.

3.3.2 Chemische Analyse

Zur chemischen und mineralogischen Analyse der Ceroxid-Nanopartikel wurde die Raman-Spektroskopie, die Röntgenphotonenelektronenspektroskopie (XPS) und die Röntgenbeugungsanalyse (XRD) verwendet.

Culica et al. haben gezeigt, dass die Analyse von Ceroxid mittels Raman-Messungen besser durchgeführt werden kann als mit FTIR-Messungen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die chemische Analyse mittels Raman-Spektroskopie durchgeführt anstatt mit FTIR [Cul2020]. Bei der Raman-Spektroskopie wird die Wechselwirkung eines Materials mit monochromatischem Licht betrachtet. Das Licht wird an der Probe gestreut. Der größte Teil des gestreuten Lichtes entspricht der Anregungswellenlänge und wird als elastische Streuung oder auch Rayleigh-Streuung bezeichnet. Ein kleiner Teil des eingestrahlten Lichtes wird inelastisch gestreut, wobei es zu einem Energietransfer zwischen Photon und Molekül kommt, der zu einer Frequenzverschiebung des Photons führt. In der Raman-Spektroskopie wird die

inelastische Streuung untersucht. Die Raman-Spektroskopie wird mit einem Gerät der Firma Renishaw bei einer Laserwellenlänge von $\lambda = 785 \text{ nm}$ durchgeführt.

In Tabelle 5 sind die Messparameter der Raman-Messungen zusammengefasst. Vergleichsspektren für CeO_2 aus der Literatur sind in Abbildung 2 (Kapitel 2.2.1) dargestellt.

Tabelle 5: Messparameter und instrumenteller Aufbau der Raman-Messungen

Messgerät	Renishaw inVia Raman Microscope
Laser	Rot, $\lambda = 785 \text{ nm}$
Detektor	Renishaw CCD Kamera
Optisches Gitter	2400 gr/mm
Objektiv	100-fache Vergrößerung
Expositionszeit	10 s
Laserpower	500 mW
Laserintensität	100 %
Raman-shift	100 bis 4500 cm^{-1}
Auswertungssoftware	Wire 5.1

Durch eine Hochtemperaturkammer im Raman-Spektrometer konnten Messungen bei $T = 500 \text{ °C}$ aufgenommen werden. Dazu wurde die Pulverprobe in die Kammer gegeben und mit einem Quarzglas vor dem Ausdampfen geschützt (der Aufbau der Hochtemperaturzelle ist im Anhang dargestellt). Anschließend wurde die Temperatur in der Hochtemperaturkammer auf $T = 500 \text{ °C}$ erhitzt und einige Minuten gehalten, bevor ein Mapping der Probenoberfläche durchgeführt wurde. Die Aufheizrate lag bei $T = 50 \text{ °C/min}$. Nachdem die Probe wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde ein weiteres Spektrum aufgenommen, um das Raman-Spektrum der jeweiligen Probe vor, nach und während der Kalzinierung miteinander zu vergleichen.

Eine weitere Methode zur chemischen Analyse der Oberfläche ist die XPS. Diese wird verwendet, um die Bindungsverhältnisse, elektronische Struktur und chemische Zusammensetzung der Probenoberflächen zu detektieren. Dabei bezieht sich die Analyse auf eine Tiefe von maximal 5 nm. Die nicht destruktive

Analyse mit hoher Empfindlichkeit ist für alle Elemente, außer Wasserstoff und Helium, geeignet. Die XPS-Analysen fanden an der Universität Oviedo statt.

Für die XPS-Messung ist ein Ultrahochvakuum notwendig. Die Photonenquelle besteht aus einer Magnesiumquelle mit einer Energie von $E_Q = 225 \text{ W}$. Zur qualitativen Analyse der Oberflächenszusammensetzung wird die Intensität, bestimmt durch die Fläche, der Photoelektronenlinien betrachtet.

Die Röntgenbeugungsanalyse (XRD) gibt Informationen über die mineralogische Zusammensetzung und Kristallstruktur der hergestellten Partikel. Hierzu werden Röntgenstrahlen einer definierten Wellenlänge auf die Probe gelenkt und von den Gitterebenen reflektiert. Über die Reflexionswinkel kann das Material mit Hilfe einer Datenbank bestimmt werden. Während der Messung wird der Eintrittswinkel kontinuierlich verändert, um möglichst viele Gitterebenen zu erreichen. Die Analysen fanden am FGK in Höhr-Grenzhausen statt.

3.3.3 Katalytische Aktivität

Die katalytische Aktivität von Nanopartikeln, die als Enzymersatz verwendet werden sollen, sogenannte Nanozymen, kann mit Hilfe von UV-VIS-Messungen nach Vinothkumar [Vin2019] kolorimetrisch nachgewiesen werden. Dazu wurde der Ceroxid-Nanopartikel-Suspension zuerst ein Farbstoff (hier TMB) und anschließend Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Die Konzentrationen von TMB, H_2O_2 oder Ceroxid-Nanopartikel können dabei, je nach Versuchsanordnung, variieren. Die Prozedur ist in Abbildung 15 dargestellt und wurde mit einem UV-2600 UV-VIS-Spektrometer von Shimadzu durchgeführt. Die gemessene Absorption wird gegen die Konzentration aufgetragen und anschließend kann mittels Michaelis-Menten-Gleichung die katalytische Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel bestimmt werden. Die Michaelis-Menten-Konstante gibt dabei die Reaktionsgeschwindigkeit über die Zeit für verschiedene Konzentrationen des Substrates (TMB) wieder.

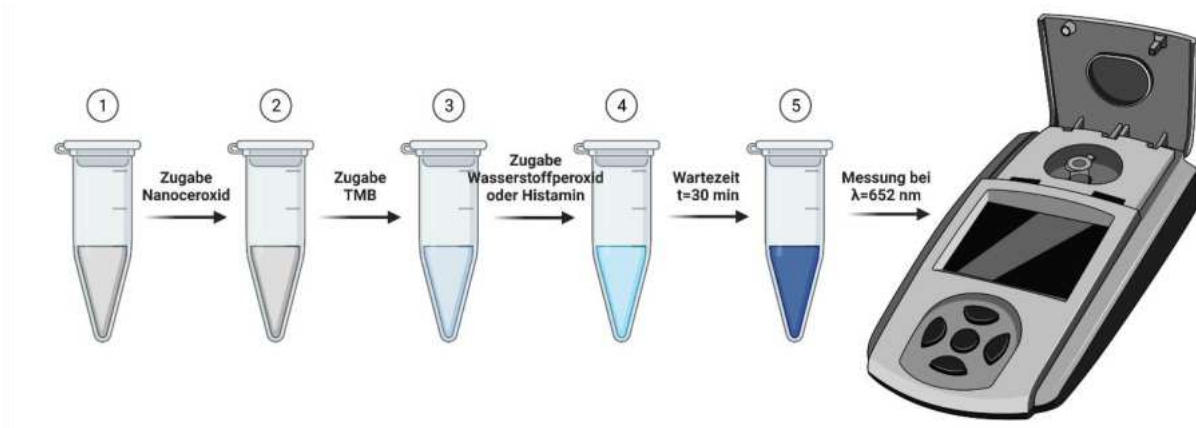


Abbildung 15: Experimentelle Durchführung zur Überprüfung der katalytischen Aktivität (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt).

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel als Nanozyme werden mit Hilfe von Michaelis-Menten die Konstanten K_m und v_{max} bestimmt (siehe Gleichung {6}, Kapitel 2.4.1.3).

Mittels verschiedener TMB-Konzentrationen und der Änderung der Absorption über die Zeit wird mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung {8}) die Substratkonzentration bestimmt, die zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante K_m und v_{max} benötigt wird.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad \{8\}$$

Tabelle 6: Parameter im Lambert-Beerschen Gesetz

Formelzeichen	Bedeutung	Wert im Versuch
ε	Absorptionskoeffizient	39000 $/(M \cdot cm)$ (für TMB bei $\lambda = 652 \text{ nm}$)
d	Dicke der Küvette	1 cm

Sollte die Sättigung der Geschwindigkeit nicht erreicht werden, kann über

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad \{9\}$$

die Geschwindigkeit bestimmt werden. Diese wird verwendet, um mittels der reziproken Auftragung der Geschwindigkeit über die doppeltreziproke Darstellung der Enzymkinetik im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 16) die Werte K_m und v_{max} graphisch zu ermitteln.

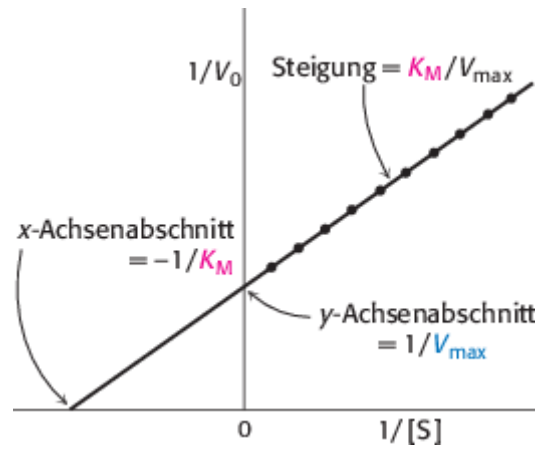


Abbildung 16: Lineweaver-Burk-Diagramm aus [Str2014]

3.4 Anwendung in einem elektrochemischen Sensor

Bei der Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel im elektrochemischen Sensor wurden zwei Messverfahren verwendet.

- 1.) Die Cyclovoltametrie, eine schnelle und präzise Methode zur Untersuchung von Redoxreaktionen, um das geeignete Potential zur Messung des Stroms zu bestimmen.
- 2.) Die Amperometrie zur quantitativen Messung der elektrochemischen Reaktion an einer Elektrode.

3.4.1 Herstellung des elektrochemischen Sensors

Für die elektrochemischen Messungen wurde eine „siebgedruckte“ Elektrode DRP-110 (SPE) von Metrohm DropSens (Oviedo, Spanien) verwendet, siehe rechts. Diese besteht aus einer Arbeits- (mittlerer schwarzer Kreis) und einer Hilfselektrode (schwarzer Kreis außen) aus Kohlenstoff sowie einer Pseudoreferenzelektrode



Abbildung 17: Siebgedruckte Elektrode von DropSens

aus Silber (Teilkreis unten links). Die Arbeitselektrode wurde mit unterschiedlichen Volumina ($V = 2 - 10 \mu\text{L}$) einer Ceroxid-Nanopartikel-Lösung beschichtet und luftgetrocknet. Die Sensoren mit Ceroxid-Nanopartikeln können laut Singh et al. mittels Wärme bei $T = 80^\circ \text{C}$ wieder regeneriert werden [Sin2016]. Im Verlauf der Versuche hat sich gezeigt, dass das Reinigen mittels MilliQ®-Wassers und das Trocknen bei Raumtemperatur ausreicht, um die Nanopartikel auf den Elektroden zu regenerieren. Somit wurde bei den endgültigen Anwendungsversuchen auf den Schritt des Erhitzens verzichtet. Für den Nachweis von Glukose wurden die Elektroden zusätzlich mit Glukoseoxidase (GOx) beschichtet.

Die Herstellung der Ceroxid-Nanopartikel-Lösung erfolgte mit getrockneten Ceroxid-Nanopartikeln. Dazu wurden $m_{\text{NP}} = 2,0 \text{ mg/mL}$ Ceroxid-Nanopartikel in einer Lösung aus MilliQ®-Wasser und Essigsäure mit einem $\text{pH} = 3,5$ dispergiert. Zur Sicherstellung einer homogenen Dispersion wurde die Lösung nach der Herstellung und vor jeder Verwendung zweimal für $t_{\text{disp.}} = 15$ Minuten in ein Ultraschallbad gegeben und zwischendurch geschüttelt, um eine gleichmäßige

Verteilung der Partikel zu erzielen und Agglomerat-Bildung zu verringern. Aus Vorversuchen hat sich ergeben, dass $V_{\text{disp}} = 4 \mu\text{L}$ der Ceroxid-Nanopartikel-Lösung stabile Messergebnisse liefert.

3.4.2 Durchführung der elektrochemischen Messung

Die elektrochemischen Messungen erfolgten mittels eines Potentiostats von Metrohm DropSens (Oviedo, Spanien). Es wurde eine Kalibrierung der beschichteten Elektroden erstellt, indem verschiedene Wasserstoffperoxid-Lösungen mit einem $\text{pH} = 7$ aus einer $c_{\text{PBS}} = 0,1 \text{ M}$ phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) und $c_{\text{Elekt.}} = 0,5 \text{ mM}$ Natriumsulfat als Leitsalz hergestellt wurden. Das Leitsalz wurde benötigt, um einen konstanten Ionenfluss zur Elektrode zu gewährleisten [Kur2020]. Die Durchführung der chronoamperometrischen Messungen erfolgte nach einem bereits erprobten Verfahren: Von der Analyt-Lösung wurde ein Tropfen $V_{\text{Sample}} = 40 \mu\text{L}$ über die gesamte Elektrode inklusive Referenz- und Hilfselektrode gegeben, um den Elektronenfluss über die gesamte Elektrode zu gewährleisten [Bis2011]. Die Messeinstellungen für die chronoamperometrische Messung haben sich aus Vorversuchen mittels Cyclovoltametrie ergeben.

Für die Cyclovoltametrie wurden folgende Einstellungen verwendet:

- Startpotential $E_{\text{Start}} = -0,2 \text{ V}$
- Endpotential $E_{\text{End}} = 0.9 \text{ V}$
- Scanrate 50 mV/s
- Schrittweite $E_{\text{Schritt}} = 2 \text{ mV}$

Daraus ergaben sich folgende Messeinstellungen für die Amperometrischen Messungen:

- Potential $E_{\text{Messung}} = 0,75 \text{ V}$
- Zeit $t_{\text{Messung}} = 180 \text{ s}$
- Volumen Probe $V_{\text{sample}} = 40 \mu\text{L}$

Um die Diffusion zu berücksichtigen, wurde über einen Zeitraum von $t_m = 180 \text{ s}$ gemessen. Zur Erstellung des Kalibrierdiagramms wurde der Strom bei

$t_m = 120$ s abgelesen, da der gemessene Strom zu diesem Zeitpunkt stabil ist, und über die Konzentration aufgetragen.

Mit diesen Ergebnissen wurde ein Kalibrierungsdiagramm erstellt und anschließend eine kommerzielle Wasserstoffperoxid-Lösung (5 %) gemessen, um zu überprüfen, ob die Kalibrierung der Elektrode auch auf echte Proben anwendbar ist. Diese wurde mit $c_{\text{PBS}} = 0,1$ M PBS-Lösung und $c_{\text{Elekt.}} = 0,5$ mM Hintergrundelektrolyten verdünnt und wie oben bereits beschrieben gemessen. Die Herstellung einer Kalibrierung und der Nachweis von Histamin und Glucose erfolgte mit den gleichen Parametern.

Die Elektroden wurden nach jeder Messung mit Reinstwasser abgespült, anschließend getrocknet und wiederverwendet. So ließen sich vergleichbare Messungen mit derselben Elektrode erzielen.

3.5 Anwendung im Lateralen Flusstest

Der Nachweis von Histamin durch Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel im Lateralen Flusstest (LFA) soll über einen kompetitives Testverfahren erfolgen. Die Intensität des Testsignals nimmt mit zunehmender Konzentration des Analyten ab, da es zu einer Bindungskonkurrenz zwischen Analyten und immobilisierten Reaktanten kommt. [Kle2005]

3.5.1 Funktionalisierung der Ceroxid-Nanopartikel

Für die Verwendung der Nanopartikel im Lateralen Flusstest werden diese mit dem Bindungsprotein Protein G konjugiert, welches an die Antikörper bindet und diese entsprechend markiert. Für die Konjugation wurden $V_G = 100$ μl von $c_G = 1,5$ mg/mL Protein G zu $V_{\text{CeO}_2} = 1,5$ mL Ceroxid-Nanopartikel in Suspension gegeben. Nach $t = 1$ h Schütteln wurden $V = 100$ μL Blockierungslösung bestehend aus $c_{\text{BSA}} = 1$ mg/mL Rinderserumalbumin (BSA) in $c_{\text{PBS}} = 10$ mM PBS mit $\text{pH} = 7,4$, zugegeben, um die restlichen Oberflächen der Nanopartikel zu blockieren. Nach $t = 20$ min Blockierungsreaktion wurde das Gemisch für $t = 20$ min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $c = 2$ mM PB-Pufferlösung mit $\text{pH} = 7,4$, mit einer Lösung aus 1 % BSA

und 10 % Saccharose in $V = 200 \mu\text{L}$ PBS und $V = 800 \mu\text{L}$ MilliQ®-Wasser suspendiert. Das Protein-G-Ceroxid-Nanopartikel-Konjugat wurde bis zur Verwendung bei $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. [Moy2019]

3.5.2 Herstellung eines lateralen Flusstest

Für den Nachweis des Histamins wurden Teststreifen wie folgt hergestellt: Auf einer 25-mm-Nitrocellulose-Membran mit Plastikrücken zur Stabilisierung wurden mit einem IsoFlow-Reagenzien-Dosiersystem von Imagene Technology (Hanover, USA) mit einer Dispergierrate von $0,100 \mu\text{L}/\text{mm}$ ein Teststreifen und ein Kontrollstreifen dispergiert. Die Testlinie bestand aus einem $c_{\text{test}} = 1 \text{ mg/mL}$ Histamin-BSA-Komplex und die Kontrolllinie aus einer $c_{\text{Kontr.}} = 1 \text{ mg/mL}$ anti-IgG. Nach dem Druckvorgang wurde die Membran bei $T_{\text{trock}} = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ für $t_{\text{trock}} = 20 \text{ min}$ getrocknet. Anschließend wurden Konjugations- und Absorptionspad auf die Membran geklebt und danach mit einer Guillotine Fellowes Gamma (Madrid, Spanien) in 5 mm breite Teststreifen geschnitten. Zur Quantifizierung der Nachweislinien wurde ein tragbares ESE Quant LR3 Lateral Flow System (Qiagen Inc., Hilden, Deutschland) verwendet, dabei wurden mittels Reflexionsmessungen die Intensität der Testlinie ermittelt. [Moy2019]

3.5.3 Durchführung eines lateralen Flusstest

Die ersten Versuche mit Ceroxid-Nanopartikel im Teststreifen dienten zur Ermittlung eines geeigneten Laufmittels. Dabei wurden unterschiedlichen Konzentrationen und pH-Werte des Laufmittels getestet. Die endgültige Zusammensetzung lautete wie folgt:

- 1 % Rinderserumalbumin (BSA)
- Volumen 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) $V_{\text{MES}} = 850 \mu\text{L}$ (mit $\text{pH} = 5$)
- Volumen Natriumchlorid $V_{\text{NaCl}} = 150 \mu\text{L}$
- 15 % Tween-20 (15 %)

3.5.4 Nachweis von Histamin im lateralen Flusstest

Der Nachweis von Histamin mittels eines Lateralen Flusstestes erfolgte in drei Schritten (siehe Abbildung 18). Zunächst wurde eine Probelösung mit Antikörpern gemischt, wobei das in der Probelösung enthaltene Histamin an die Antikörper band. Die Histamin-Antikörper-Lösung wurde über den Teststreifen geleitet, und die noch freien Antikörper banden an das Histamin auf der Testlinie. Anschließend wurde eine Lösung mit Ceroxid-Nanopartikeln über den Teststreifen geleitet und die Nanopartikel banden an die Antikörper. Der dritte Schritt wurde durchgeführt, da die Ceroxid-Nanopartikel, anders als bspw. Gold-Nanopartikel, keine eindeutige Farbgebung aufweisen. Um die Antikörper sichtbar zu machen, wurde TMB auf den Teststreifen gegeben. Dieses oxidierte mit den an die Antikörper gebundenen Ceroxid-Nanopartikeln und zeigte an, ob Ceroxid-Nanopartikel an den Streifen gebunden waren.

In Abbildung 18 ist die Reaktion des Teststreifens eines lateralen Flusstests mit Histamin dargestellt. Das blaue Signal entsteht, wenn sich kein oder wenig Histamin in der Probelösung befindet und der histaminspezifische Antikörper an das auf dem Streifen gebundene Histamin binden kann. Ähnlich wie bei Moyano et al. wird eine umgekehrt proportionale Intensität der Testlinie zur Histamin-Konzentration in der Probe erwartet [Moy2019].

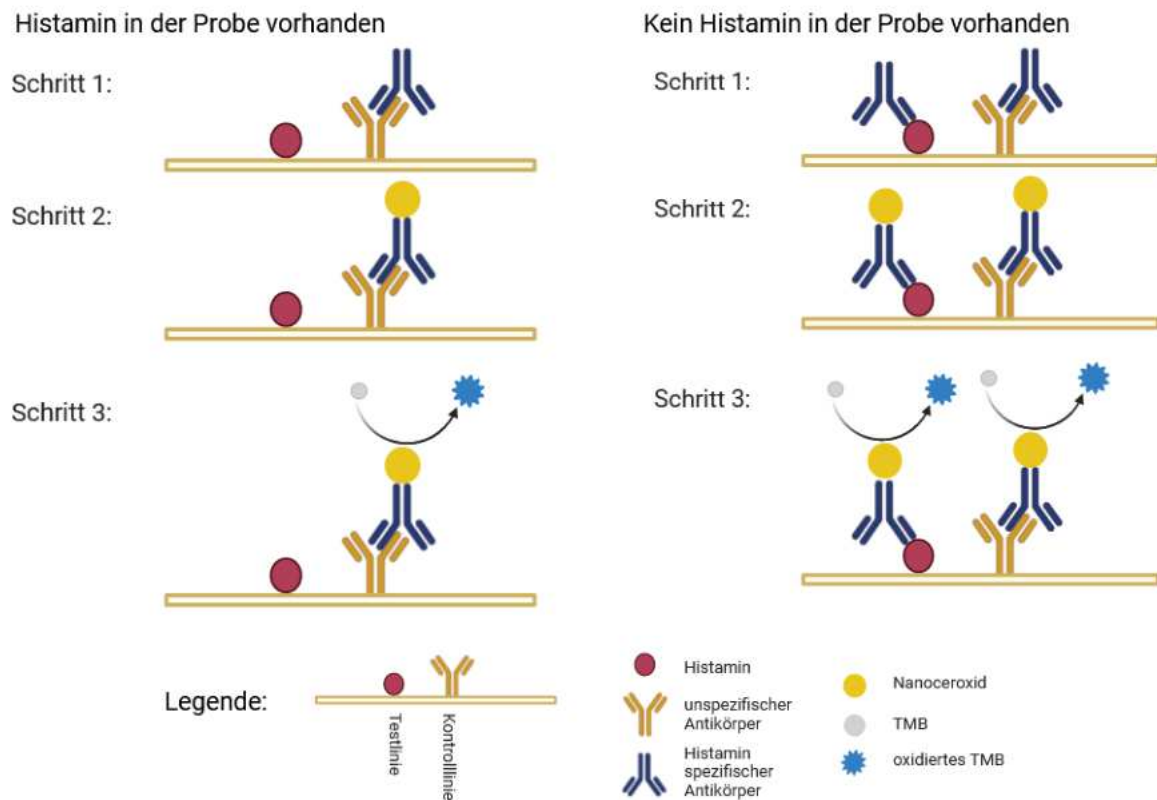


Abbildung 18: Schaubild des lateralen Flusstests Histamin mit in der Probenlösung (links) und ohne Histamin in der Probenlösung (rechts). (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.)

Zur Kalibrierung der Streifen mit Histamin wurden verschiedene Konzentrationen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) hergestellt. Das Histamin wurde jeweils mit der Laufmittellösung auf $V = 100 \mu\text{L}$ aufgefüllt.

Anschließend wurde eine Weinprobe mit bekannter Histamin-Konzentration verwendet, um das Verfahren zu validieren.

Um zu überprüfen, an welchen Parametern etwas verändert werden muss, wurden einige Versuche in Eppendorf-Tubes mit $V_{\text{Tube}} = 2 \text{ mL}$ durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass TMB bereits in Anwesenheit von Ceroxid-Nanopartikeln und Histamin reagiert. Die daraufhin aufgestellte Hypothese ist in Kapitel 5 erläutert. Die Durchführung ähnelt dem Test zur katalytischen Aktivität welcher in 3.3.3 ausführlich beschrieben wird.

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Charakterisierung der Ceroxid-Nanopartikel und deren Anwendung dargestellt. Zunächst werden die Ceroxid-Nanopartikel der verschiedenen Syntheseverfahren und Fällungsmittel mit unterschiedlichen Methoden hinsichtlich ihrer Größe und chemischen Eigenschaften charakterisiert. Die Anwendung der Nanopartikel erfolgte mit den Ceroxid-Nanopartikeln aus der Mikroemulsionssynthese und wird im zweiten Abschnitt dieses Kapitels dargestellt.

4.1 Charakterisierung der Nanopartikel

Zur optischen Analyse und Charakterisierung der Partikelgrößen werden FE-SEM- und TEM-Aufnahmen verwendet. Anhand dieser Aufnahmen und der DLS-Ergebnisse wird eine Größenverteilung der Nanopartikel erstellt (Tabelle 7).

Im Folgenden wird anhand der Probe MNE1 die Stabilitätsanalyse der Lösung durch Zeta-Potential-Messungen sowie die Charakterisierung der Partikelgröße mittels DLS-Messungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen beispielhaft dargestellt. Die TEM-Aufnahmen (Abbildung 19) und die DLS-Messungen () belegen, dass im Zuge der Mikroemulsionssynthese monodisperse Nanopartikel mit einer engen Größenverteilung in einer stabilen Dispersion hergestellt wurden. Dies wurde durch das Zeta-Potential (Abbildung 21), welches bei $E = 32,3 \text{ mV}$ liegt, bekräftigt. Die Nanopartikel auf dem TEM-Bild (Abbildung 19) haben eine Durchschnittsgröße von $d = 4,1 \pm 1,2 \text{ nm}$, in der DLS-Messung () beträgt der Mittelwert des hydrodynamischen Radius aller drei Messungen $d = 187,7 \text{ nm}$.

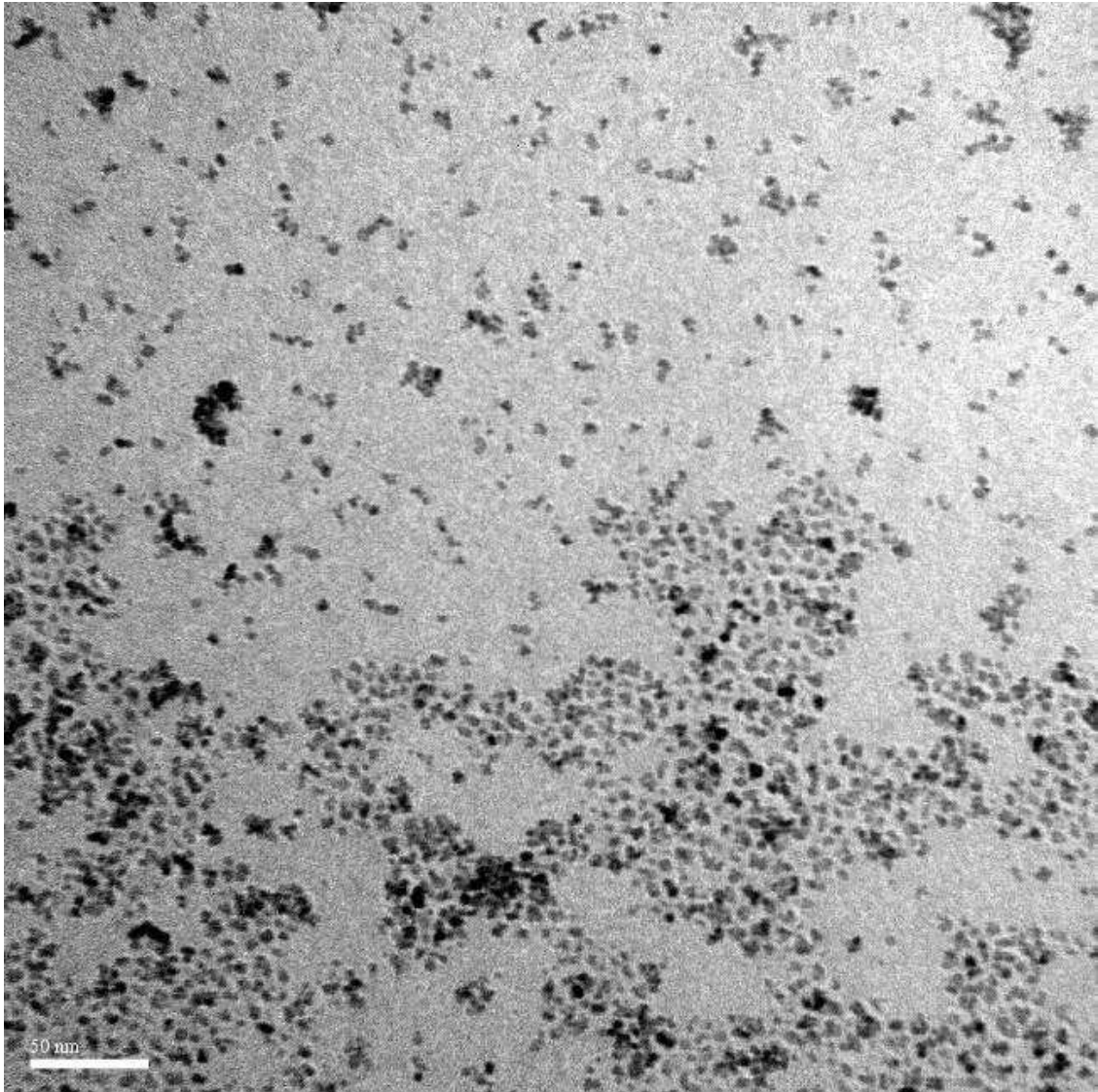


Abbildung 19: TEM-Aufnahme der Probe MNE1 (der Größenbalken links ist 50 nm).

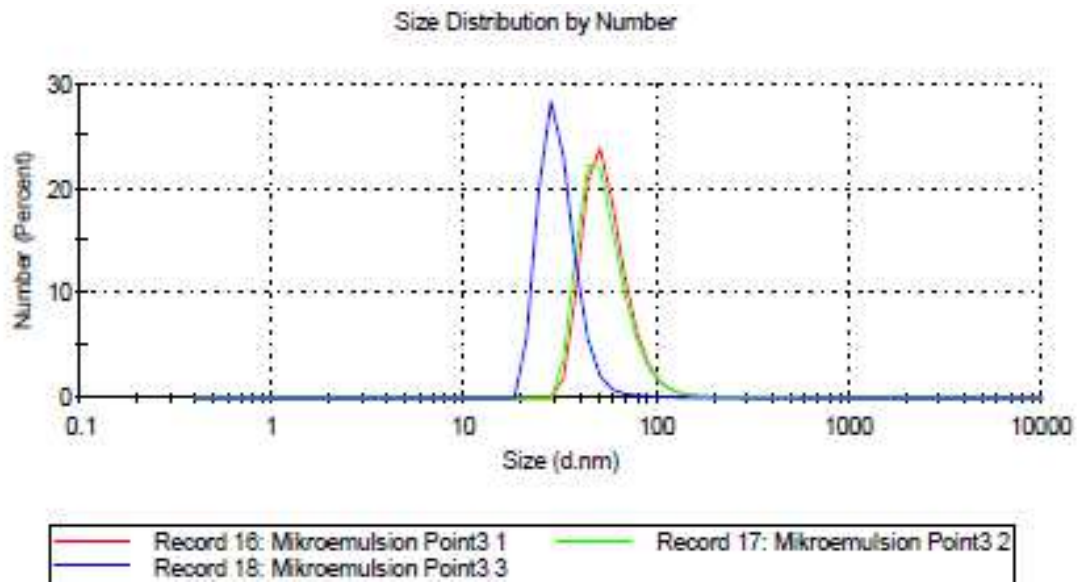


Abbildung 20: DLS-Messungen der Probe MNE1.

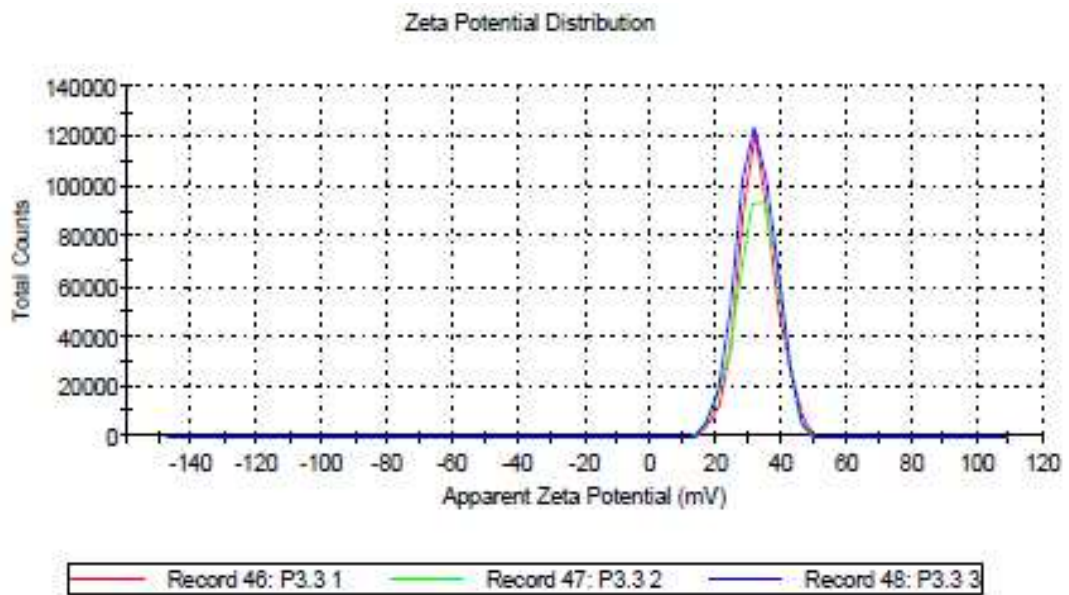


Abbildung 21: Zeta-Potenzial-Messungen der Probe MNE1.

In Tabelle 7 sind die Messwerte der Partikelgrößen aus den Analysen der elektromikroskopischen Aufnahmen sowie die Ergebnisse der dynamische Lichtstreuung und des Zeta-Potentials zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen, dass die Nanopartikel der Synthesen MNE1 und MNE2 mit $d = 4 \pm 1$ nm deutlich kleiner sind als die Partikel aus den Fällungssynthesen MNK und MNA, deren Mittelwerte um $d = 20$ nm liegen, teilweise mit Standardabweichungen von $\sigma = 5 - 15$ nm. Das Zeta-Potential der Mikroemulsionssynthesen (MNE1 und MNE2) liegt für MNE1 bei $32,0 \pm 1,0$ mV und für MNE2 bei $37,4 \pm 0,6$ mV. Anhand dieser Ergebnisse wurden die Nanopartikel der Synthesen MNE für die Anwendungsversuche ausgewählt. Bei den Fällungssynthesen konnten aufgrund unlöslicher Agglomerate keine stabilen Dispersionen hergestellt werden, sodass eine Analyse mittels DLS und Zeta-Potenzial zu keinem Ergebnis führte (dies wird in Tabelle 7 mit n/a gekennzeichnet).

Tabelle 7: Übersicht über die Partikelgrößen und das Zeta-Potential (n/a bedeutet, dass aufgrund mangelnder Dispergierbarkeit der Nanopartikel keine Messung möglich war).

Probe	Mittelwert der Partikelgrößen aus TEM/FE-SEM	Mittelwert der Partikelgrößen aus DLS	Zeta-Potential
MNA1	$25,5 \pm 11,7$ nm	1281 ± 139 nm	$20,4 \pm 0,7$ mV
MNA2	$19,6 \pm 7,6$ nm	$337,9 \pm 79,1$ nm	$29,9 \pm 0,4$ mV
MNK1.3	$24,1 \pm 9,3$ nm	n/a	n/a
MNK1.4	$26,8 \pm 15,2$ nm	n/a	n/a
MNK1.5	$21,0 \pm 9,5$ nm	n/a	n/a
MNK1.6Dx	$21,7 \pm 8,8$ nm	n/a	n/a
MNK1.7CTAB	$19,2 \pm 4,8$ nm	n/a	n/a
MNK1.8Dx	$19,0 \pm 5,6$ nm	n/a	n/a
MNK1.8Dx CI	$22,5 \pm 13,3$ nm	n/a	n/a
MNK2.1	$18,3 \pm 4,9$ nm	$890,2 \pm 141,1$ nm	n/a
MNE1	$4,1 \pm 1,2$ nm	$187,7 \pm 25,8$ nm	$32,0 \pm 1,0$ mV
MNE2	$4,4 \pm 1,4$ nm	$959,2 \pm 138$ nm	$37,4 \pm 0,6$ mV

Wie bereits erwähnt, war es nicht möglich, mit den Proben der Synthesen MNA und MNK stabile Dispersionen herzustellen. Daher wurden die Proben elektronenmikroskopisch genauer analysiert, wie in Abbildung 22 bis Abbildung 24 dargestellt. In Abbildung 22 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Probe MNK1.8Dx abgebildet. Die TEM-Aufnahmen (oben) und FE-SEM-Aufnahmen (unten) der Probe MNK1.8Dx zeigen, dass die Nanopartikel zu Platten agglomeriert sind und nur selten monodispers vorliegen. Das TEM-Bild oben links zeigt, dass die Platte sehr dünn ist und aus maximal zwei Schichten von Nanopartikeln besteht. Die FE-SEM-Aufnahmen zeigen, dass diese Plättchen in größeren Agglomeraten vorliegen. Unten rechts und oben links ist zu erkennen, dass die Platten aus diskreten Nanopartikeln bestehen.

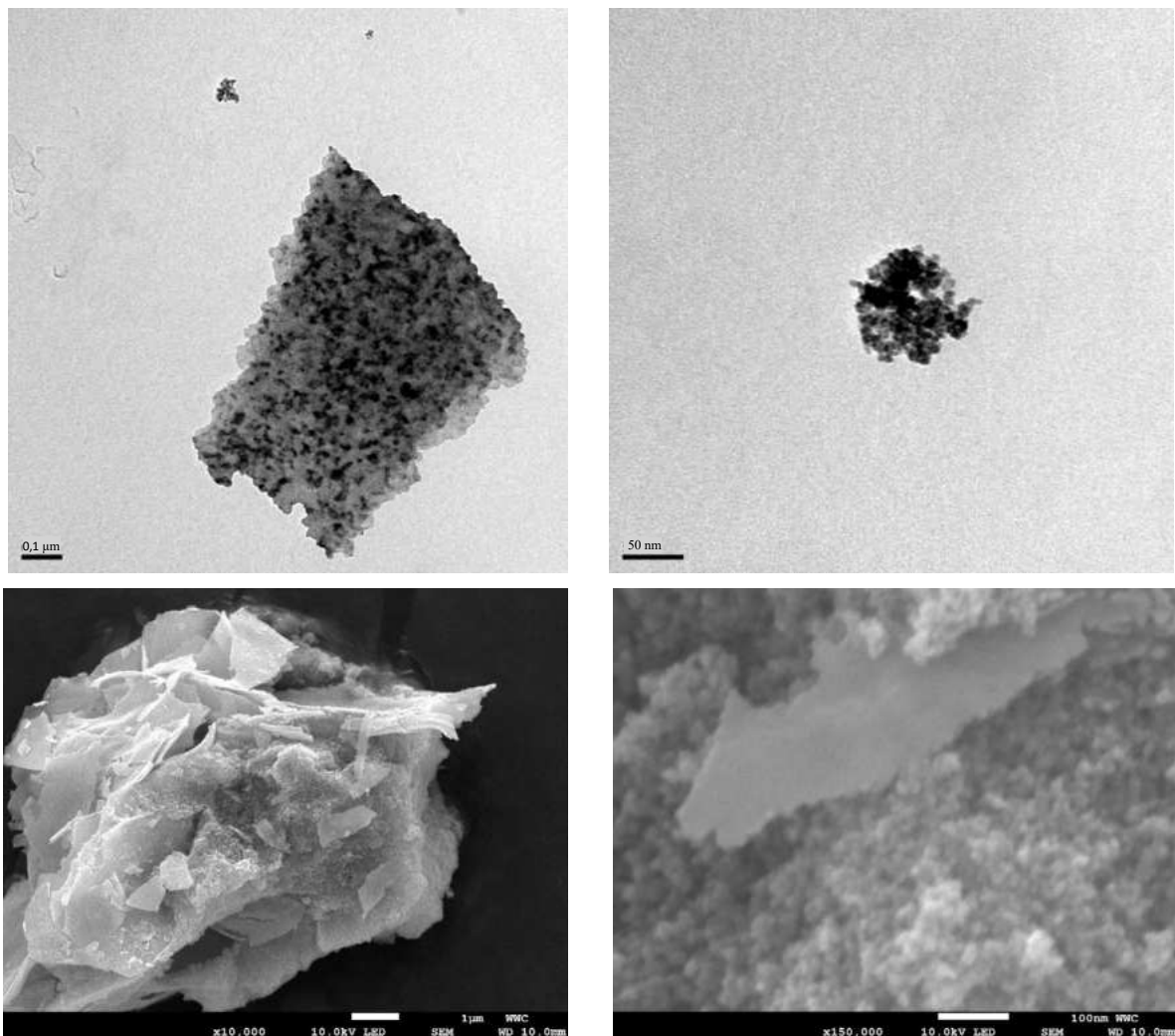


Abbildung 22: TEM- (oben, links 0,1 μm und rechts 50 nm) und FE-SEM-Aufnahmen (unten, links 1 μm und rechts 100 nm) von MNK1.8Dx-Synthese.

Um die Agglomerat-Verfestigung während der Kalzinierung zu verhindern, wurden Teilproben von MNK1.8Dx (Abbildung 22) jeweils mit einer Chlorid- und einer Hydroxid-Schmelze vermischt. Die genaue Zusammensetzung ist in Kapitel 3.1.1 aufgeführt. Die Resultate der verschiedenen Schmelzen sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Ergebnisse der Chlorid-Schmelze befinden sich rechts und die Ergebnisse der Hydroxid-Schmelze links. Nach der Kalzinierung sind deutlich unterschiedlich große Partikel zu erkennen. Das TEM-Bild der Hydroxid-Schmelze zeigt eine netzartige Struktur neben Nanopartikeln, die nicht näher untersucht wurde. Im Vergleich zu den Partikeln ohne Chlorid-Schmelze in Abbildung 22 liegen die Partikel mit Chlorid-Schmelze einzeln und klar definiert vor.

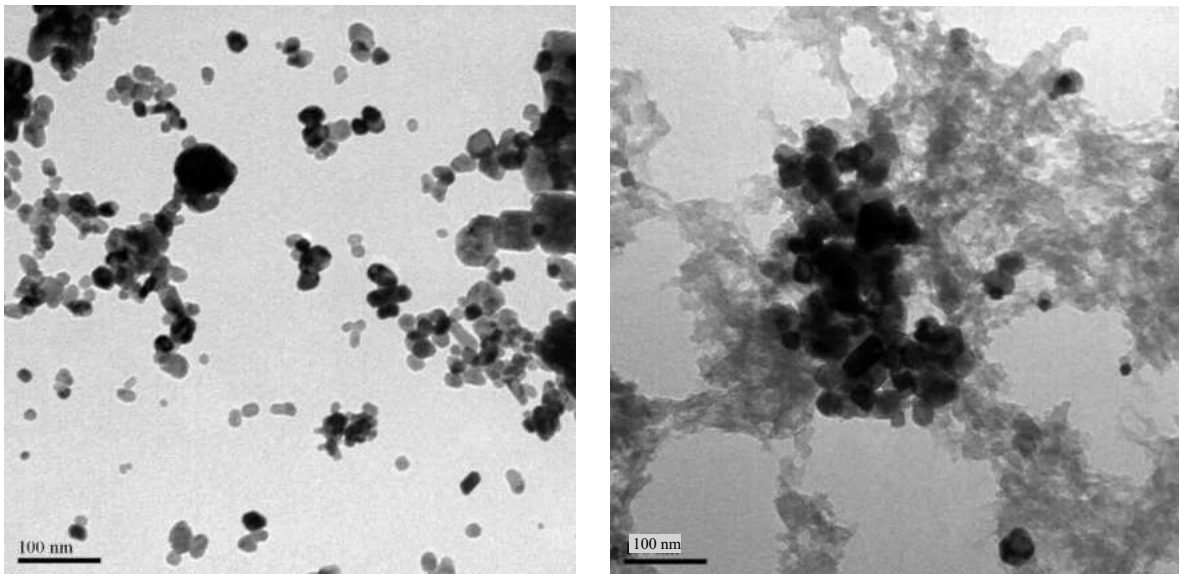


Abbildung 23: TEM-Aufnahme von MNK1.8Dx in Chlorid-Schmelze (links) und Hydroxid-Schmelze (rechts) bei $T_K = 500\text{ °C}$, $t_K = 3\text{ h}$ kalzinieren.

Neben der Mikroemulsionssynthese und der Fällungssynthese mit AHC wurden zusätzlich Synthesen mit Ammoniakwasser durchgeführt. Zur Analyse und zum Vergleich der verschiedenen Synthesen wurde eine Form mit dem gleichem Hilfsstoff (Dextran) wie bei der Fällungssynthese mit AHC (dargestellt in Abbildung 22) verwendet. In Abbildung 24 ist die bildgebende Analyse der Synthese mit Ammoniakwasser als Fällungsmittel und Dextran als Hilfsstoff dargestellt. In den TEM-Aufnahmen (oben links) sind neben fadenförmigen Agglomeraten auch einzelne Nanopartikel zu erkennen, welche auch in den FE-SEM-Aufnahmen (unten rechts) vorliegen. Es ist ersichtlich, dass die

Größenverteilung der Nanopartikel breit ist. Neben sehr kleinen, auf den Abbildungen nicht messbaren Nanopartikeln sind auch einige ca. $d = 10$ nm große Nanopartikel im Bild oben rechts zu sehen.

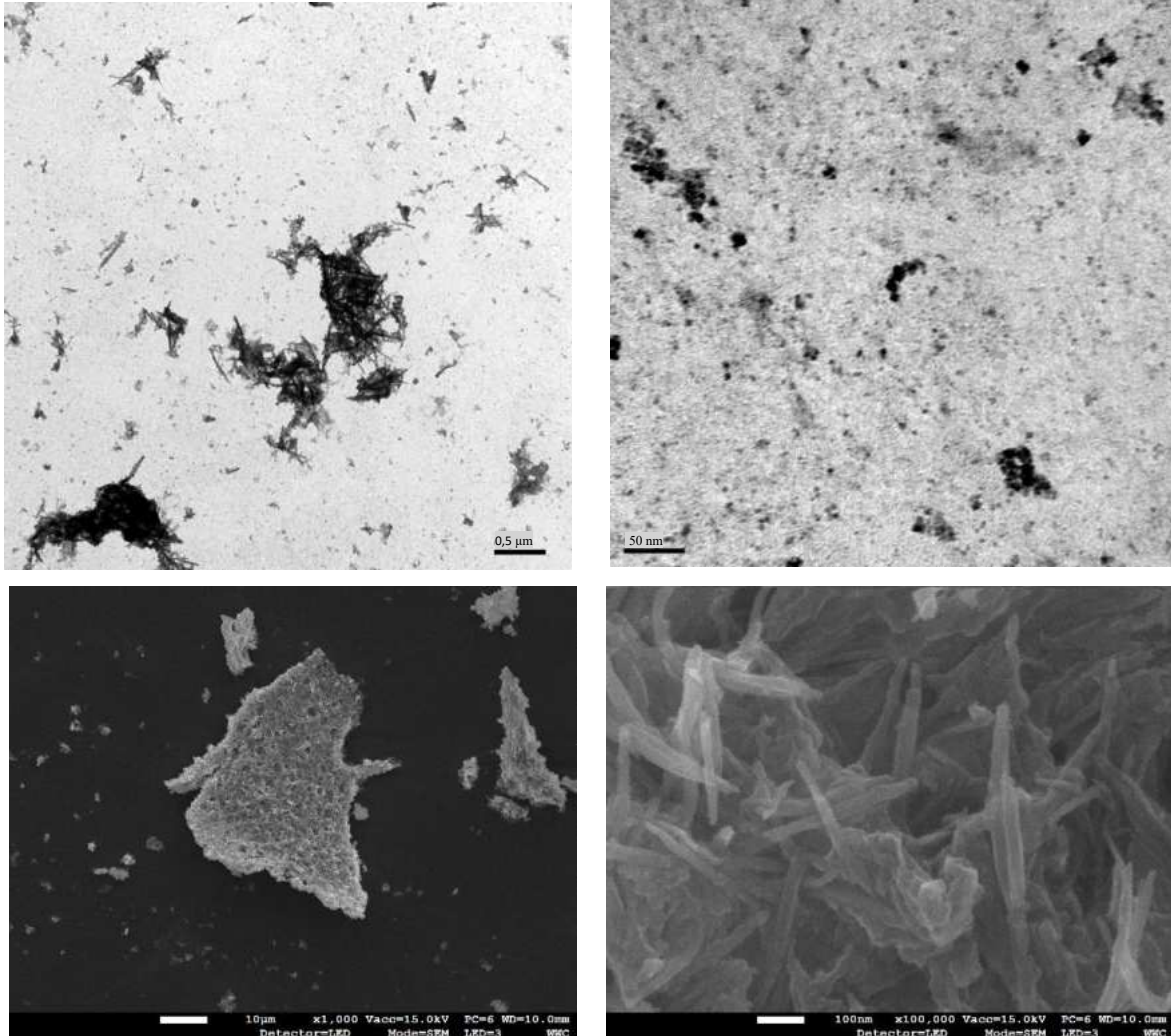


Abbildung 24: TEM-Aufnahmen (oben) und FE-SEM-Aufnahmen (unten) der Probe MNA2. Die Größenbalken oben links: 0,5 µm; oben rechts 50 nm; unten links 10 µm und unten rechts 100 nm.

Die Ergebnisse der bildgebenden Analysen, welche in Tabelle 7 dargestellt sind, zeigen, dass die Synthesemethoden die Partikelgröße beeinflussen und das Agglomerationsverhalten je nach Methode variiert.

4.1.1 Röntgenbeugungsanalyse

Um zu prüfen, ob es mineralogische Unterschiede zwischen den Nanopartikeln der verschiedenen Synthesemethoden und Fällungsmittel gibt, werden im folgenden XRD-Daten ausgewertet. Dabei ist es unter anderem wichtig, ob es Unterschiede zwischen den Herstellungsverfahren im MJR oder im Becherglas gibt. Abbildung 25 zeigt zwei Diffraktogramme der Fällungssynthese mit AHC nach der Kalzinierung bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$ für $t_K = 3\text{ h}$, unter gleichen Synthesebedingungen. Die Ergebnisse in schwarz geben im MJR synthetisierte Proben und in rot im Becherglas hergestellte Proben wieder. Aus diesen Diffraktogrammen und der Referenz geht hervor, dass es keinen mineralogischen Unterschied zwischen der Herstellung im MJR und der Herstellung im Becherglas gibt, weshalb im Folgenden nur die Diffraktogramme des im MJR hergestellten Ceroxid-Nanopartikel gezeigt und analysiert werden.

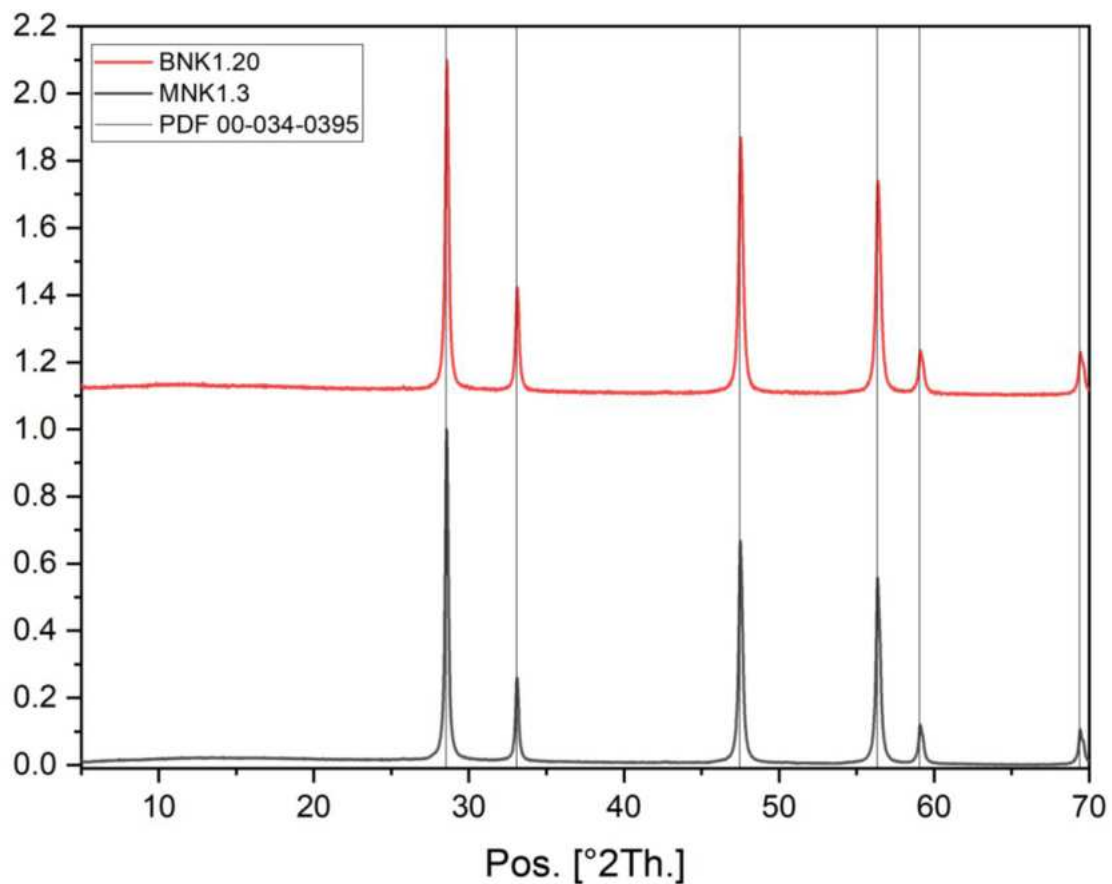


Abbildung 25: Vergleich der Synthesen im MJR (schwarz) und Becherglas (rot) anhand einer Fällungssynthese mit AHC nach Kalzinierung bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$ und des Referenzdiffraktogramms PDF 00-034-0395 (grau).

In Abbildung 26 wird eine Übersicht aller Probensubstanzen der verschiedenen Synthesemethoden und der verwendeten Fällungsmittel dargestellt. Die beiden oberen Diffraktogramme zeigen die Daten der Mikroemulsionssynthese (MNE1 und MNE2), gefolgt von zwei Diffraktogrammen der Fällungssynthese mit Ammoniakwasser (MNA1 und MNA2) und den drei unteren Diffraktogrammen der Fällungssynthese mit AHC (MNK1.3) mit verschiedenen Additiven (MNK1.8CTAB und MNK1.6Dx). Die jeweiligen Kalzinierungsbedingungen für die MNK-Synthesen waren $T_K = 500 \text{ }^\circ\text{C}$ für $t_K = 3 \text{ h}$. Die Syntheseverfahren und Additive zeigen, abgesehen von Untergrund und Reflexbreite, keine Unterschiede in den Reflexen, die dem CeO_2 zugeordnet sind. Die Banden der Diffraktogramme ohne Kalzinierung sind breiter und mit einem höheren Untergrund als die der Fällungssynthese mit anschließender Kalzinierung. Die Ergebnisse zeigen, dass in allen Fällen CeO_2 hergestellt wurde.

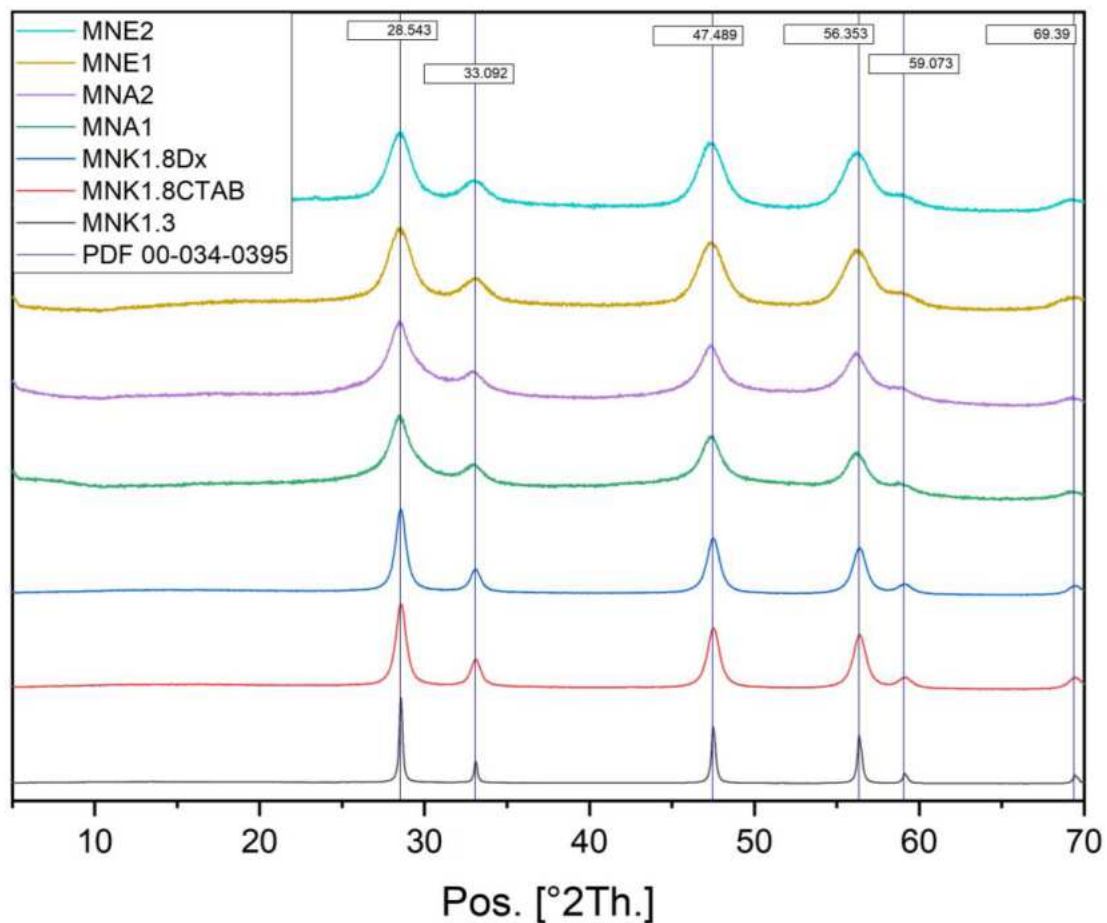


Abbildung 26: XRD-Vergleich aller drei Syntheseverfahren. XRD-Diffraktogramme wurden zur besseren Vergleichbarkeit normiert.

Um zu prüfen, ob die Fällungssynthese mit AHC auch ohne Kalzinierung auskommen könnte, wurde eine XRD-Analyse des Precursors gemacht, deren Ergebnisse in Abbildung 27 in blau dargestellt sind. Das Diffraktogramm gibt die XRD-Ergebnisse vor der Kalzinierung und (in rot) die nach einer durchgeführten Kalzinierung bei $T_K = 500^\circ\text{C}$ über $t_K = 3\text{ h}$ wieder. Zudem ist das Referenzspektrum für CeO_2 PDF 00-034-0395 in schwarz dargestellt. Wie in Abbildung 27 erkennbar stimmt das Diffraktogramm des Precursors nicht mit dem Referenzspektrum für CeO_2 überein, sodass bei der Fällungssynthese mit AHC als Fällungsmittel eine Temperaturbehandlung erfolgen muss, um Cerdioxid zu erhalten. Die Ergebnisse des Precursors sind mit den Ergebnissen von Ederer vergleichbar [Ede2019], sodass, wie in Gleichung {3} dargestellt, die Zwischenstufe als $\text{Ce}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2$ charakterisiert werden kann.

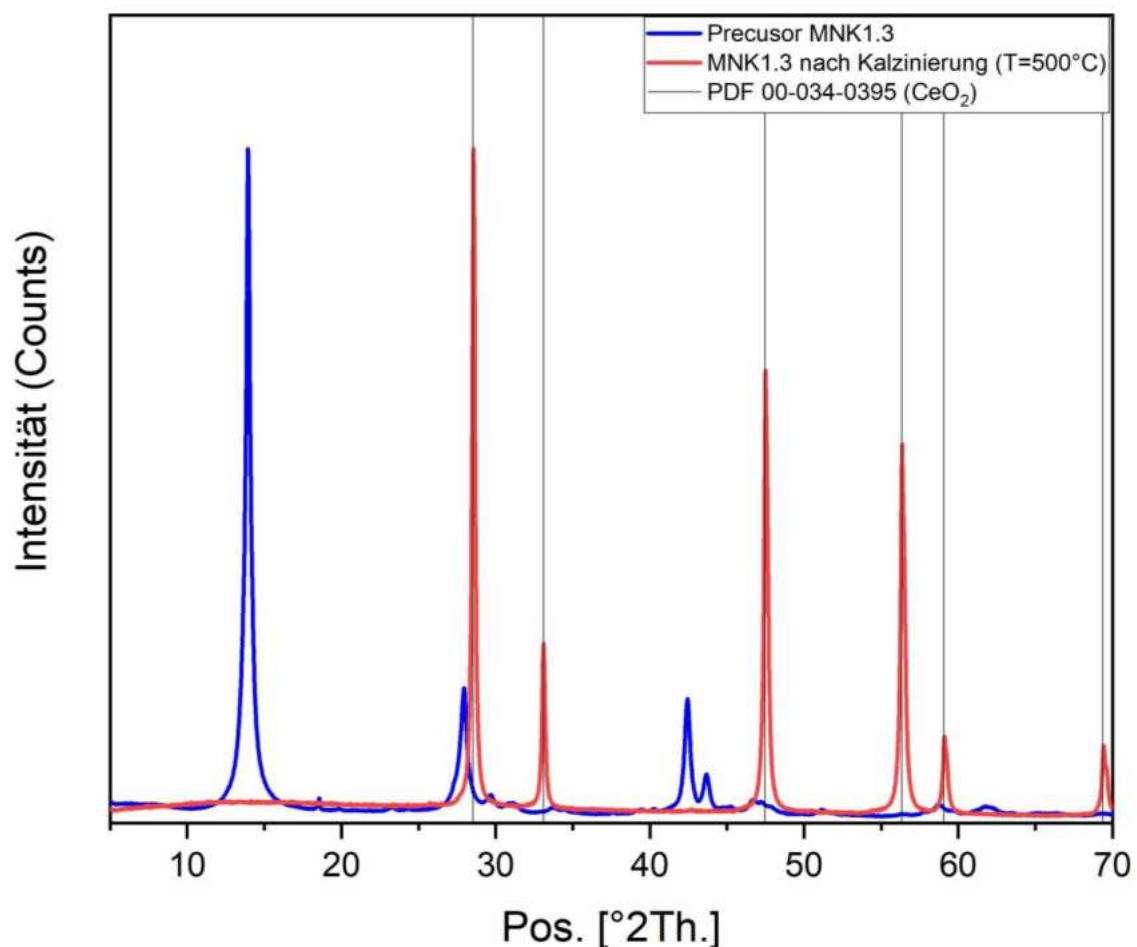


Abbildung 27: XRD-Messung der Zwischenstufe der Synthese mit AHC (blau) im Vergleich mit Ceroxid-Nanopartikeln nach der Kalzinierung bei $T_K = 500^\circ\text{C}$ (schwarz). Rot gibt das Literaturspektrum (PDF 00-034-0395) zu CeO_2 wieder.

4.1.2 Raman-Spektroskopie

Weitere Untersuchungen zum Nachweis der Notwendigkeit einer Kalzinierung der MNK-Synthesen wurden mittels der Raman-Spektroskopie durchgeführt (Abbildung 28). Der blaue Graph zeigt eine Raman-Messung vor der Kalzinierung der Probe MNK1.8Dx. Der rote Graph zeigt die Bildung von CeO_2 während der Kalzinierung bei $T_K = 500\text{ °C}$, die durch die Bande bei $1/\lambda = 465\text{ cm}^{-1}$ identifiziert werden kann. Das schwarze Spektrum belegt, dass beim Abkühlen der Probe neue Banden ab einer Wellenzahl von $1/\lambda = 1\,000\text{ cm}^{-1}$ gemessen werden können. Die einzelnen Banden und laut Literatur zugehörigen Gruppen sind in Tabelle 8 und Abbildung 30 detailliert dargestellt.

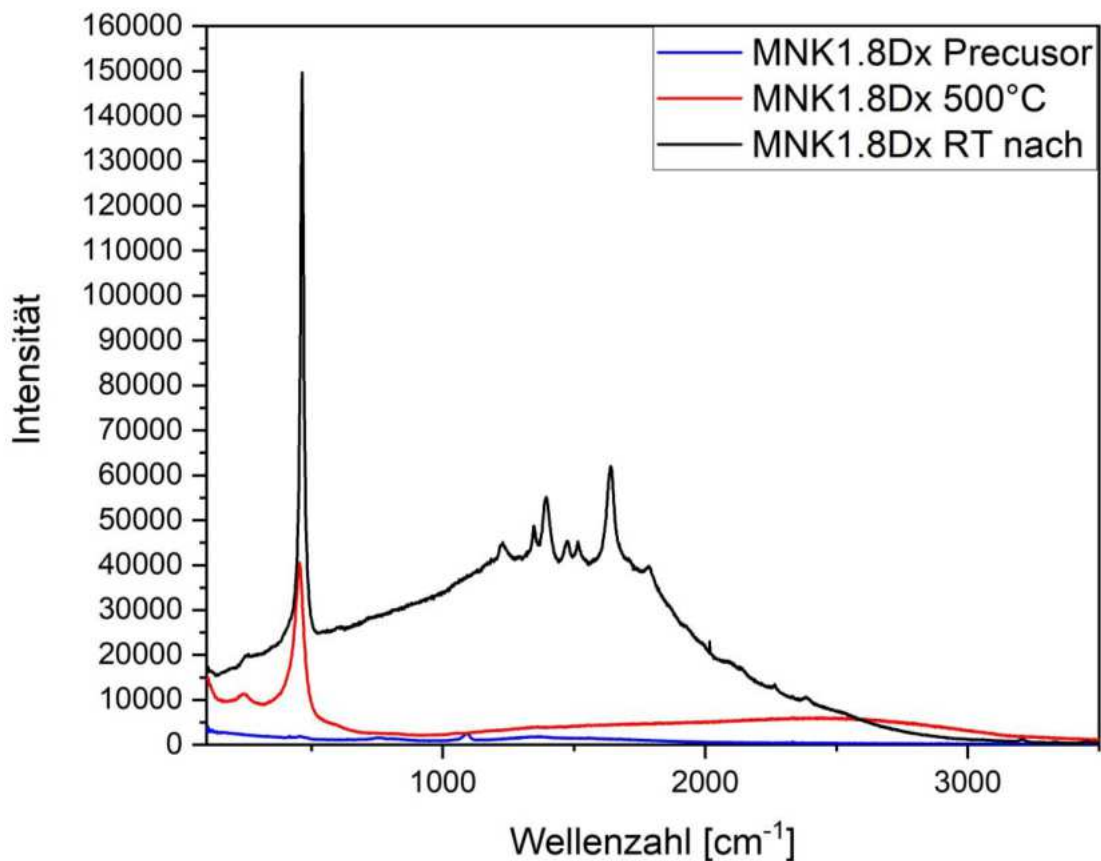


Abbildung 28: Raman-Messungen von MNK1.8Dx vor (blau), während (rot) und nach (schwarz) der Kalzinierung bei $T_M = 500\text{ °C}$. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$.

Zur Überprüfung, ob bei der Mikroemulsionssynthese ebenfalls eine Veränderung durch Kalzinierung erfolgt, wurde die Probe MNE1 den gleichen

Kalzinerungsbedingungen wie MNK1.8Dx unterzogen. Die Farben in Abbildung 29 stellen den gleichen Zeitpunkt der Kalzinierung wie oben dar, blau vor, rot während und schwarz nach der Kalzinierung bei $T_K = 500\text{ °C}$. In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass die Ce-O Bande bei $1/\lambda = 465\text{ cm}^{-1}$ bedingt durch die Kalzinierung zunimmt, während nach dem Abkühlen der Probe die Banden der funktionellen Gruppen überwiegen. Die Ce-O Bande bei $1/\lambda = 465\text{ cm}^{-1}$ ist vor der Kalzinierung im Vergleich zu dem Raman-Spektrum nach der Kalzinierung höher, sodass eine Kalzinierung kontraproduktiv erscheint.

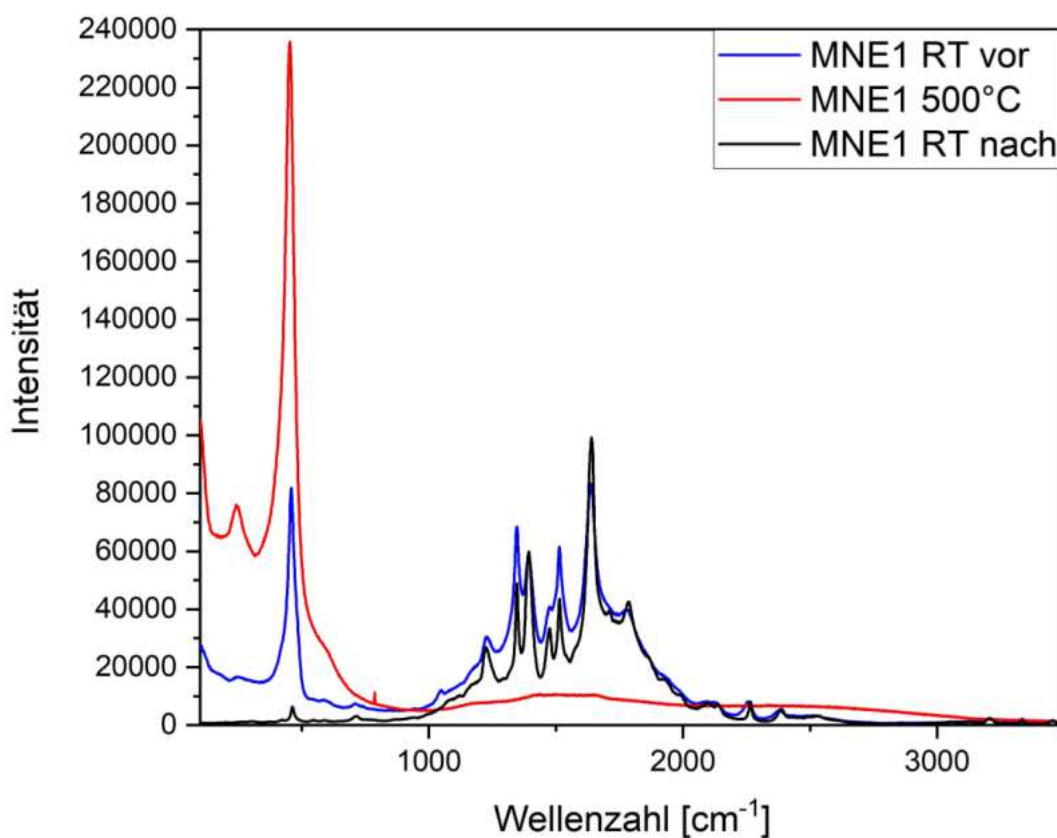


Abbildung 29: Raman-Messungen von MNE1 vor (blau), während (rot) und nach (schwarz) der Kalzinierung bei $T_M = 500\text{ °C}$. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$.

Um die funktionellen Gruppen des Ceroxid-Raman-Spektrums genauer zu identifizieren, sind diese in Abbildung 30 mit den entsprechenden Wellenzahlen versehen und werden in Tabelle 8 den funktionellen Gruppen nach Literaturwerten zugeordnet. In der Literatur wird beschrieben, dass die F2g-Bande bei $1/\lambda = 465\text{ cm}^{-1}$ eine symmetrische Streckung des Ce-O wiedergibt,

sodass dies die wichtigste Bande im Raman-Spektrum zur chemischen Identifikation des Ceroxides darstellt.

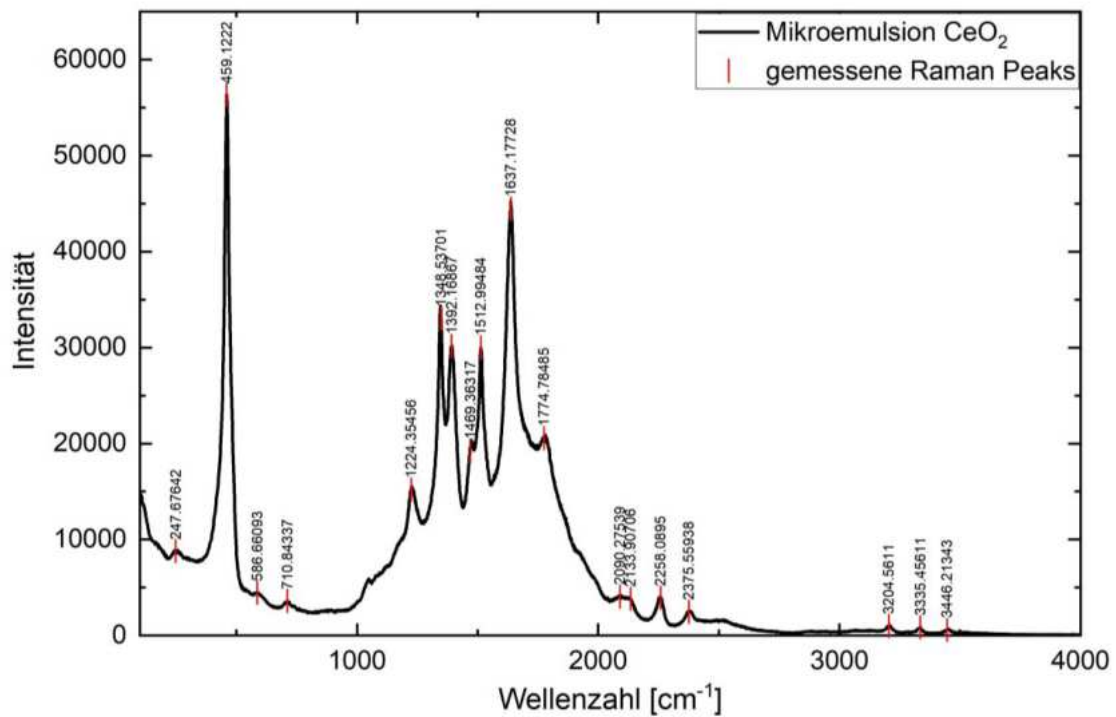


Abbildung 30: Raman-Spektrum von MNE1 mit Wellenzahlen der Banden. Messparameter: $\lambda = 785 \text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10 \text{ s}$ Messung bei RT.

Tabelle 8: Zuordnung der gemessenen Raman-Banden zu Literaturwerten (bei den leeren Zeilen wurden zum Zeitpunkt der Analyse keine passenden Literaturwerte gefunden).

Gemessene Raman-Peaks $1/\lambda$ [cm^{-1}]	Zugeordnete Schwingung	Literaturstellen
240		
460	Ce-O	
588		
711		
1049	NO_3	[Lia2021]
1226	C^{18}O_2	[Win2011]
1346	C^{18}O_2	[Win2011]
1394	C^{16}O_2	[Win2011]
1471		
1514		
1637	OH	[Cui2020]
1778		
2086		
2139	CO	
2257		
2378		
3207	NH_4^+	[Liu2020]
3336		
3451	$\text{NH}_3\text{-NH}_3$ oder OH	[Liu2020] oder [Lia2021]

Wie bereits mit der XRD nachgewiesen, zeigt auch das Raman-Spektrum in Abbildung 31, dass es zwischen den Synthesen im Becherglas (BNK1.20, schwarz) und im MJR (MNK1.3, rot) mit AHC als Fällungsmittel nach einer Kalzination bei $T_K = 500\text{ }^\circ\text{C}$ $t_K = 3\text{ h}$ keinen signifikanten Unterschied in den vorhandenen Banden gibt. Es gibt jedoch signifikante Unterschiede in der Höhe des Untergrundes, wobei der Untergrund der im Becherglas hergestellten Ceroxid-Nanopartikel höher ist als der der im MJR hergestellten Nanopartikel.

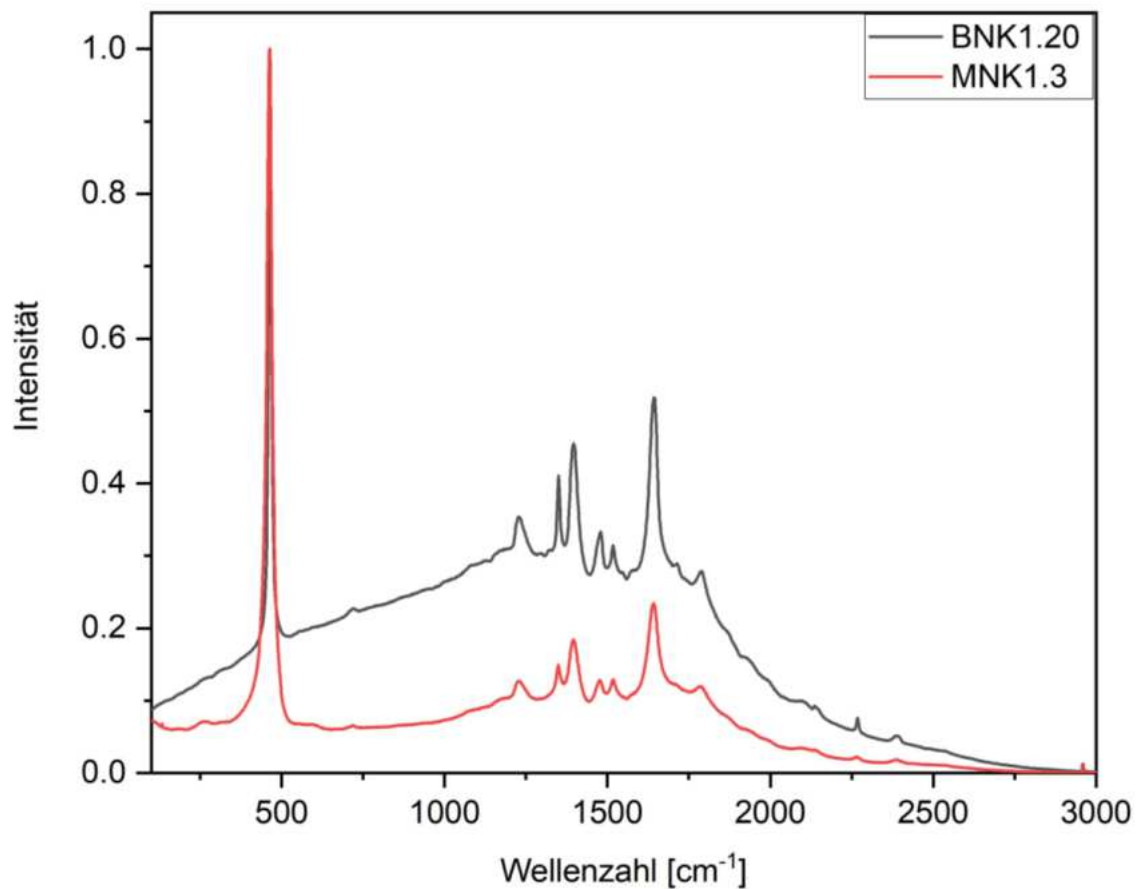


Abbildung 31: Raman-Messungen zum Vergleich der Synthese im Becherglas (grau) und MJR (rot) mit AHC als Fällungsmittel, ohne Hilfsstoff nach der Kalzinierung bei $T_K = 500$ °C. Messparameter: $\lambda = 785$ nm, $t_{\text{Messung}} = 10$ s Messung bei RT.

Abbildung 32 zeigt Raman-Spektren der Proben aller verwendeten Verfahren und Fällungsmittel. Oben sind die Spektren der Mikroemulsionssynthesen und unten die der Fällungssynthesen dargestellt. Links werden die Synthesen mit AHC als Fällungsmittel und anschließender Kalzinierung bei $T_K = 500$ °C $t_K = 3$ h wiedergegeben und rechts die Nanopartikel, die mit Ammoniumhydroxid als Fällungsmittel ohne anschließende Temperaturbehandlung hergestellt wurden. Dabei ist zu erkennen, dass die Ce-O Schwingung bei den Fällungssynthesen deutlich stärker ist als bei den Ceroxid-Nanopartikeln aus den Mikroemulsionssynthesen. Wie bereits das Spektrum von MNE1 in Abbildung 29 zeigt, überwiegt nach einer Kalzination der Teil des Spektrums mit den funktionellen Gruppen, wie auch in Abbildung 32 oben links der Mikroemulsionssynthese mit AHC zu erkennen ist.

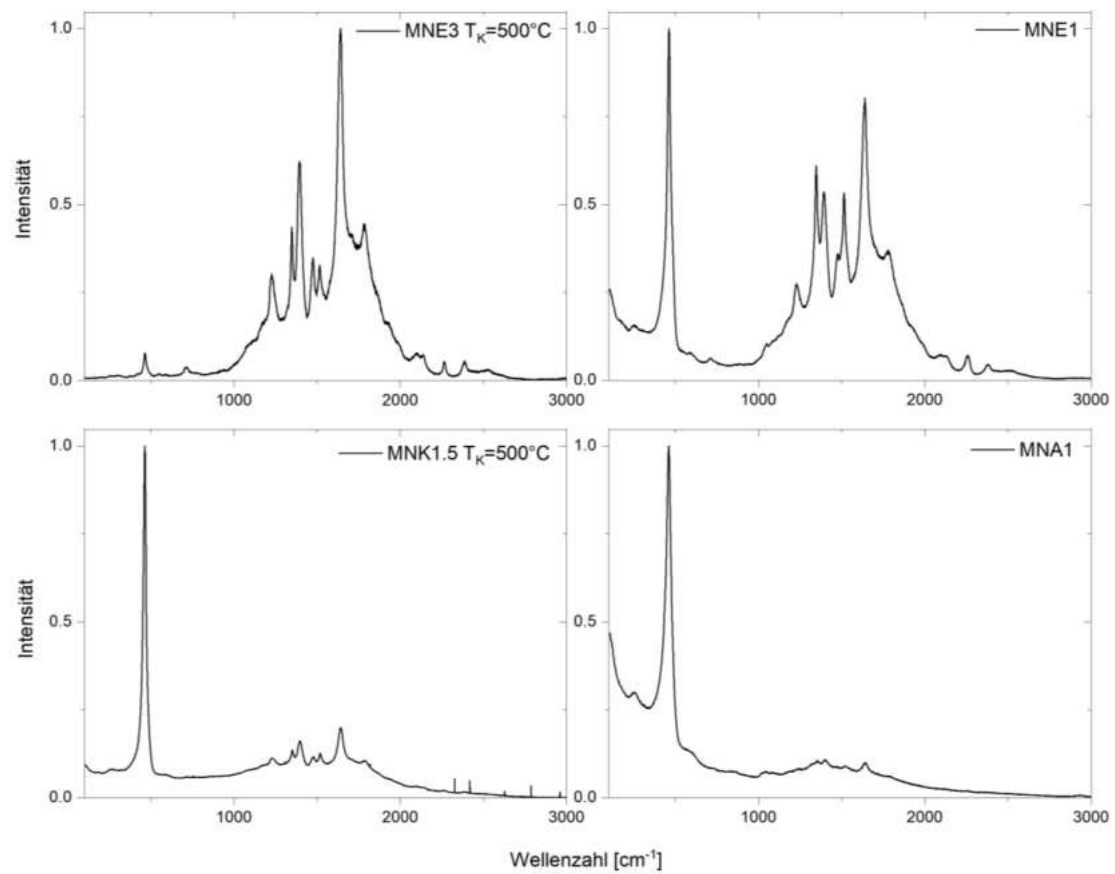


Abbildung 32: Raman-Messungen zum Vergleich der Synthesen MNE3 kalziniert bei $T_K = 500\text{ °C}$ (oben links) MNK1.5 kalziniert bei $T_K = 500\text{ °C}$ (unten links), MNE (oben rechts) und MNA1 (unten rechts), normiert. Messparameter: $\lambda = 785\text{ nm}$, $t_{\text{Messung}} = 10\text{ s}$ Messung bei RT.

4.1.3 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die XPS-Analysen zeigen das Verhältnis von Cer, Sauerstoff und Kohlenstoff auf der Oberfläche der Nanopartikel. Dies ist in Abbildung 33 anhand der Probe MNK1.3 dargestellt, wobei sich oben links das gemessene Übersichtsspektrum befindet. Oben rechts ist der Bereich der Bindungsenergien für Ce 3d dargestellt und ausgewertet, unten links das Spektrum der Bindungsenergien des O 1s und unten rechts das Spektrum des C 1s.

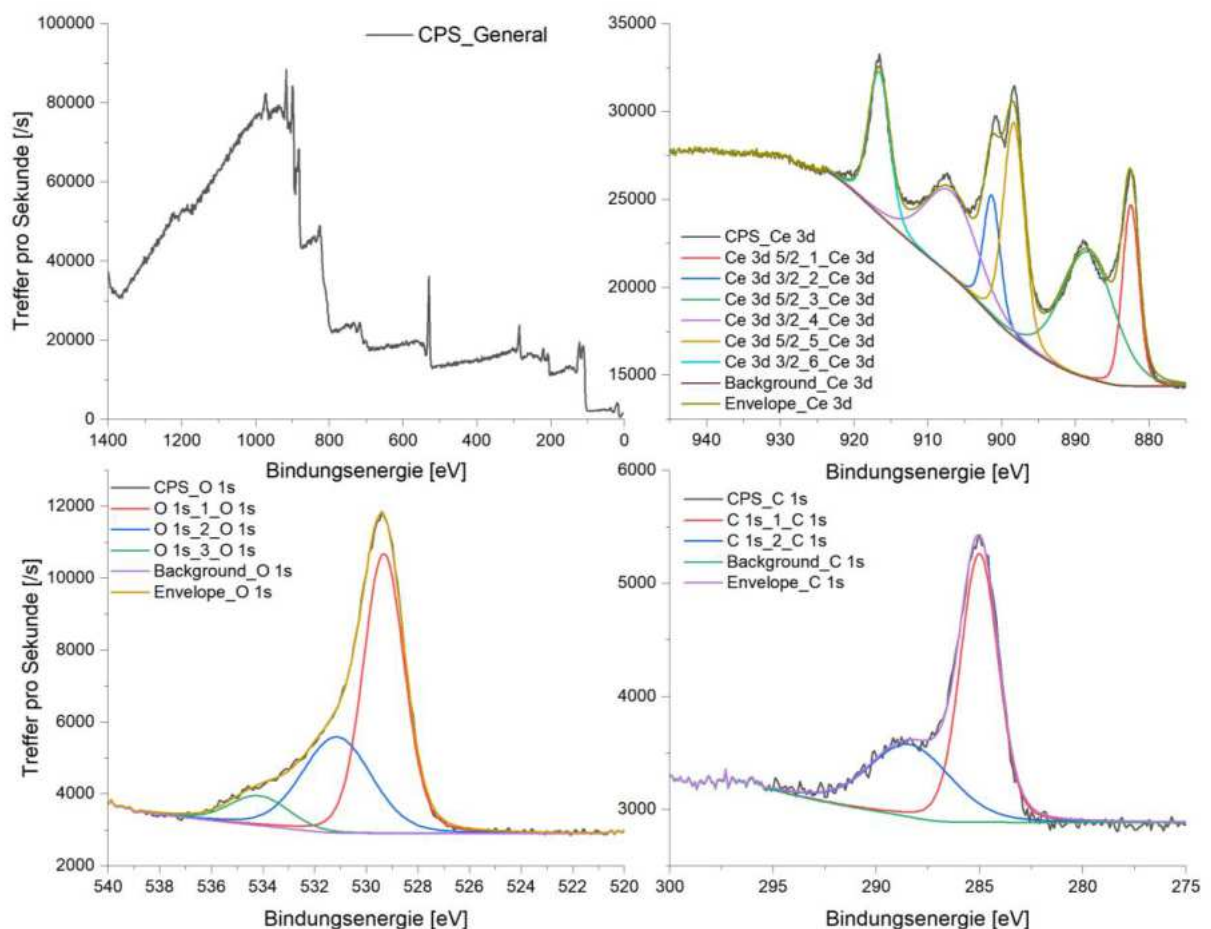


Abbildung 33: Übersichts-XPS-Spektrum der Probe MNK1.3 (oben links), ausgewertet nach Cer (oben rechts), Sauerstoff (unten links) und Kohlenstoff (unten rechts).

Der Vergleich mit Calvache-Muñoz et al. [Cal2019] zeigt ein leicht verschobenes Sauerstoffmaximum und ein stärker ausgeprägtes Maximum des Cers bei $E = 890$ eV und $E = 902$ eV [Fis2019, Fis2019].

Abbildung 34 gibt die XPS-Spektren des Elementes Cer der Proben MNE1, MNA1, MNK1.3, MNK1.6Dx und MNK1.8CTAB_CI (absteigend) wieder, die von

$E = 880 - 899 \text{ eV}$ $\text{Ce } d_{5/2}$ und von $E = 900 - 920 \text{ eV}$ $\text{Ce } d_{3/2}$ beinhalten [Muh2014]. Die Bindungsenergien des Sauerstoffes sind in Abbildung 35 dargestellt. Das Maximum von MNK1.3 liegt bei $E = 527 \text{ eV}$ und bei MNE1 liegt das Maximum bei $E = 530 \text{ eV}$ mit einer Schulter bei $E = 532 \text{ eV}$. Dieses Verhältnis verschiebt sich bei MNA1 hin zu einem Maximum bei $E = 532 \text{ eV}$ mit einer Schulter bei $E = 530 \text{ eV}$. Die Auswertung der XPS-Spektren zum Element Kohlenstoff sind in Abbildung 36 dargestellt.

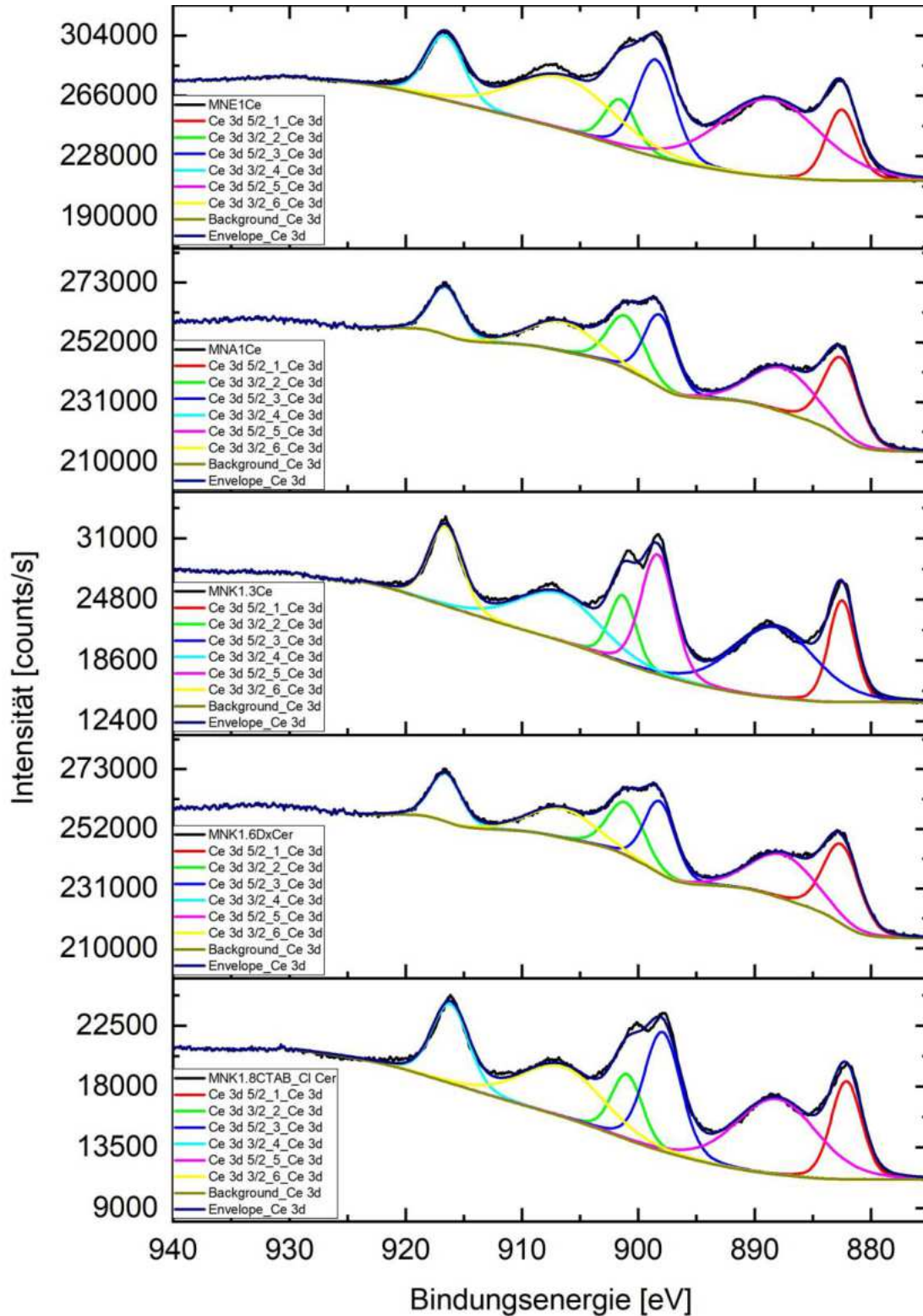


Abbildung 34: Auswertung der XPS-Spektren nach Ce 3d der Proben MNE1 und MNA1, MNK1.3, MNK1.6Dx und MNK1.8CTAB_Cl (von oben nach unten).

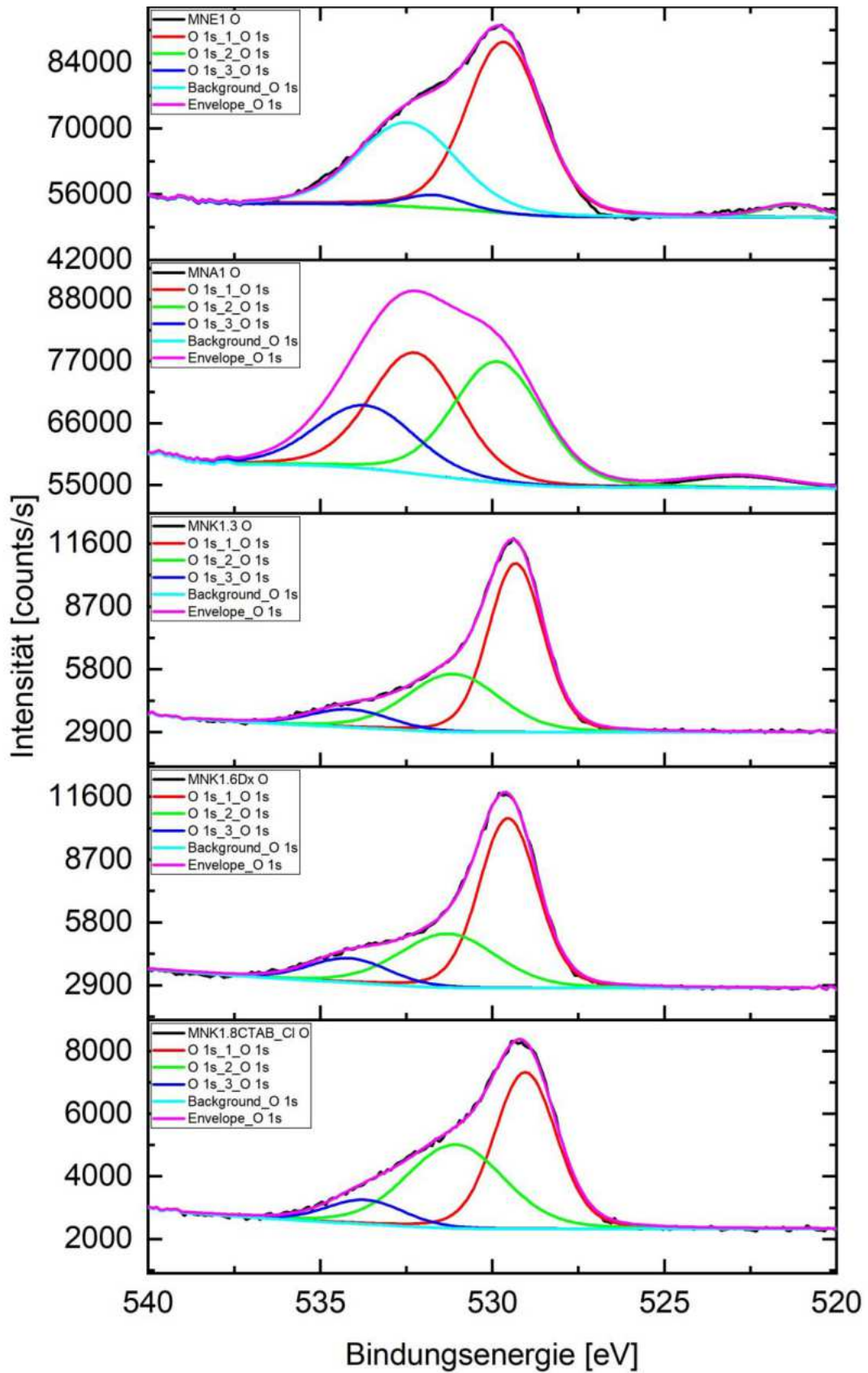


Abbildung 35: Auswertung der XPS-Spektren nach Sauerstoff der Proben MNE1 und MNA1, MNK1.3, MNK1.6Dx und MNK1.8CTAB_Cl (von oben nach unten).

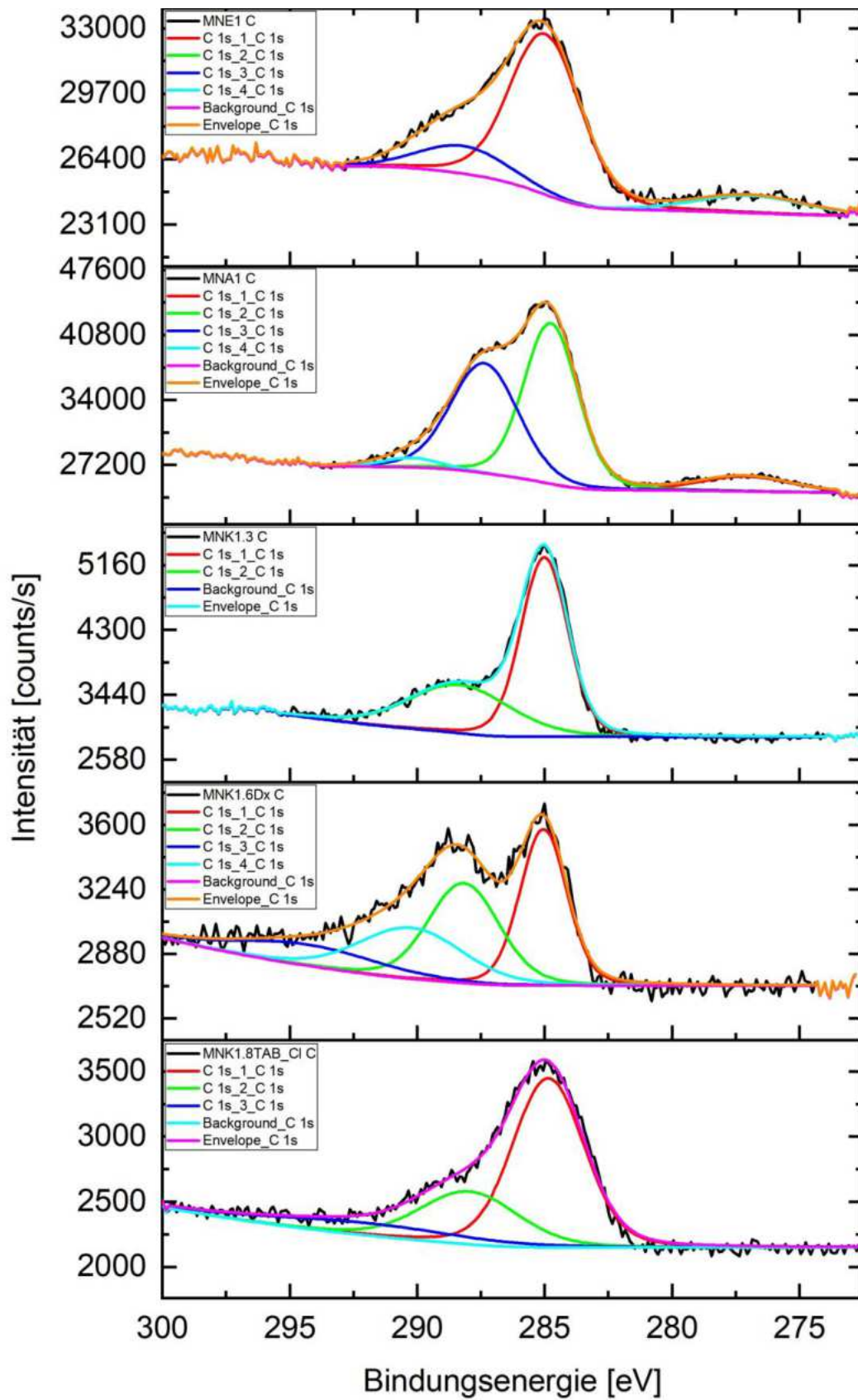


Abbildung 36: Auswertung der XPS-Spektren nach Kohlenstoff der Proben MNE1 und MNA1, MNK1.3, MNK1.6Dx und MNK1.8CTAB_Cl (von oben nach unten).

Eine Zusammenfassung der XPS-Ergebnisse erfolgt in Tabelle 9. Dort sind die Analysen nach prozentualer Verteilung der jeweiligen Bindungsenergien für Cer, Sauerstoff und Kohlenstoff aufgelistet. Die Analyse der XPS-Spektren wurde nur nach Cer mit der Oxidationsstufe (IV) durchgeführt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, dass das Verhältnis von Ce 3/2 zu Ce 5/2 bei allen Proben annähernd gleich ist. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass in allen Proben CeO₂ vorhanden ist.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Intensitäten der Bindungsenergien nach Cer, Sauerstoff und Kohlenstoff nach [Rom1993, Fal1995, Nat2005]

Bindungsenergie [eV]	Peak	Oxidationsstufe Cer	MNE 1	MNA 1	MNK 1.3	MNK1.8 Dx	MNK1.8 Dx_CI
880,60	v ₀	III					
882,60	v	IV	9,78	21,90	12,94	13,16	13,48
885,45	v'	III					
888,85	v''	IV	34,69	21,88	28,32	28,43	27,53
898,40	v'''	IV	16,14	16,86	19,12	18,80	19,36
898,90	u ₀	III					
901,05	u	IV	6,35	14,23	8,49	8,63	8,85
904,05	u'	III					
907,45	u''	IV	22,55	14,20	18,58	18,66	18,07
916,70	u'''	IV	10,48	10,94	12,54	12,33	12,70
		O 1s					
521,30			3,31	4,01			
529,04			56,99	37,26	57,73	58,04	49,19
531,08			3,29		33,35	30,68	41,40
532,48			36,41	37,20			
533,70				21,54	8,92	11,28	9,40
		C 1s					
276,92			10,49	7,63			
284,86			62,62	48,25	63,14	32,18	61,20
287,96			13,44	41,17	36,86	31,20	26,26
290,24				2,95		23,25	
292,13						37,37	12,54

4.1.4 Katalytische Aktivität

Die katalytische Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel wird mittels UV-VIS bestimmt. In Abbildung 37 sind die Resultate der UV-VIS-Messungen dargestellt, welche in eine Kalibriergerade in Abbildung 38 überführt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Farbintensität des oxidierten TMB von der Menge der Ceroxid-Nanopartikel in der Lösung abhängig ist. Mit steigender Menge an Ceroxid-Nanopartikeln in der Lösung steigt die Absorption proportional an.

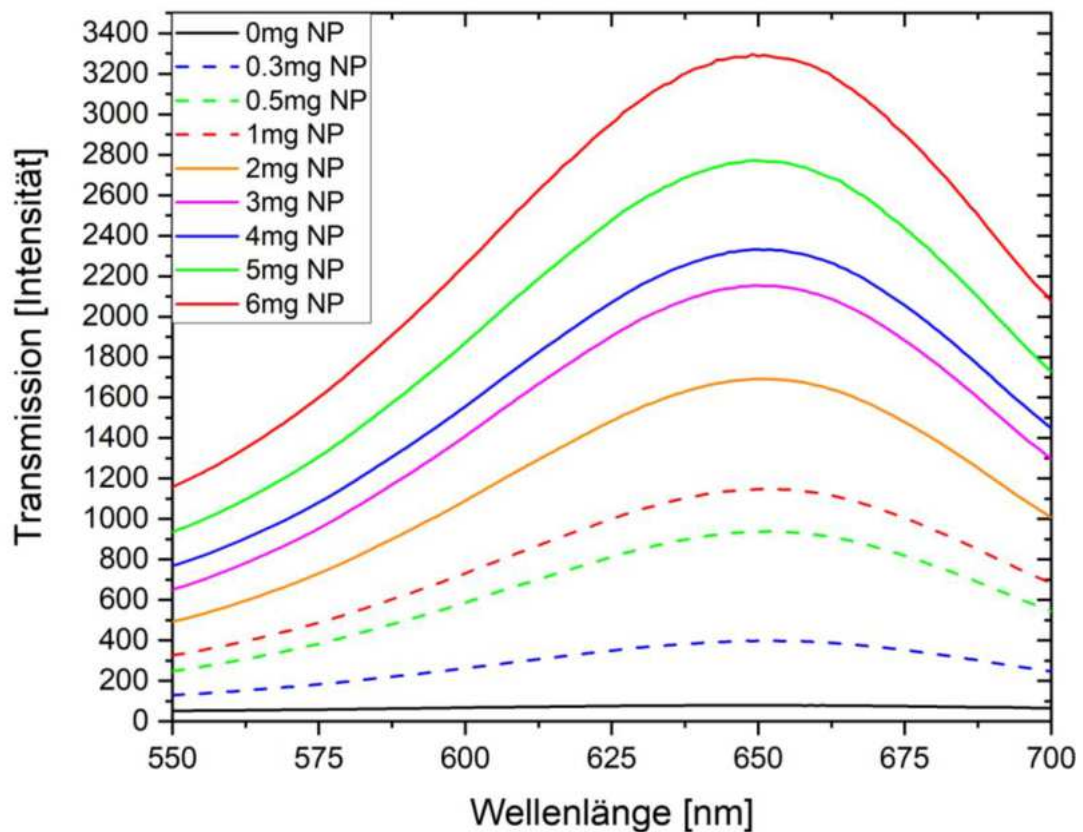


Abbildung 37: UV-VIS-Messungen von TMB-Lösungen mit verschiedenen Mengen an Ceroxid-Nanopartikeln in der Lösung.

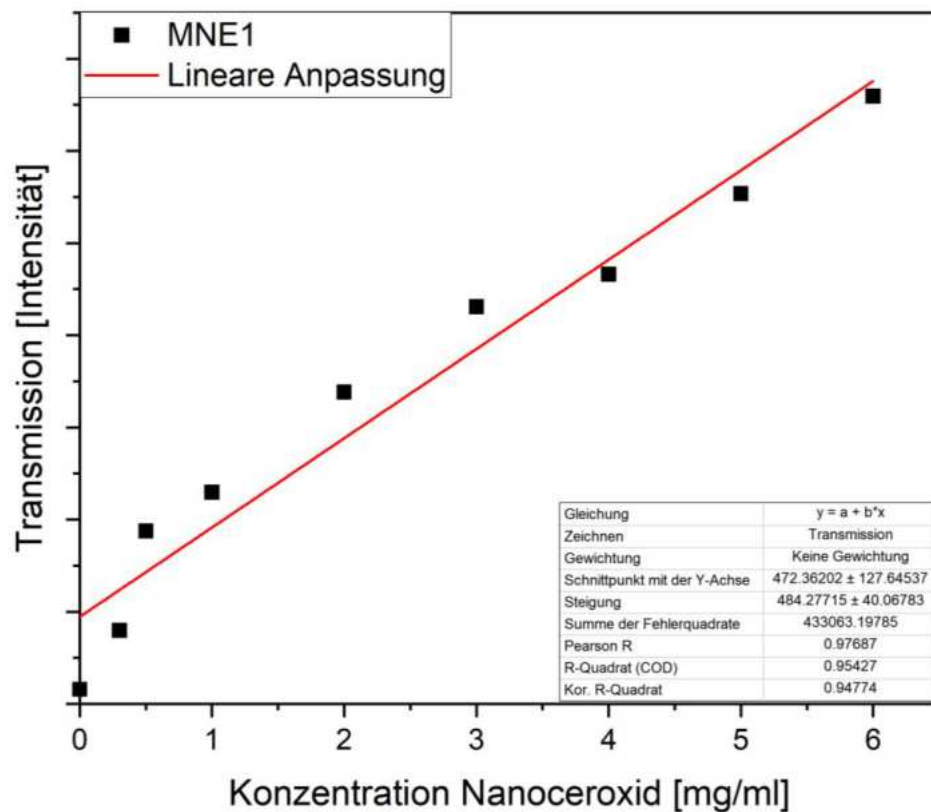


Abbildung 38: Kalibrierung der TMB-Absorption mit linearer Anpassung abhängig von der Ceroxid-Nanopartikel-Konzentration.

Außerdem ist die Abhängigkeit der Substratkonzentration von Bedeutung, um die idealen Bedingungen für die Anwendung im Sensor zu bestimmen. Dazu werden die Mengen der Ceroxid-Nanopartikel und das Wasserstoffperoxid konstant gehalten und die Menge des Substrates, in diesem Falle TMB, variiert. Abbildung 39 zeigt die Absorption über die Reaktionszeit abhängig von den Substratkonzentration. Mit steigender TMB-Menge steigt die Farbintensität der Lösung.

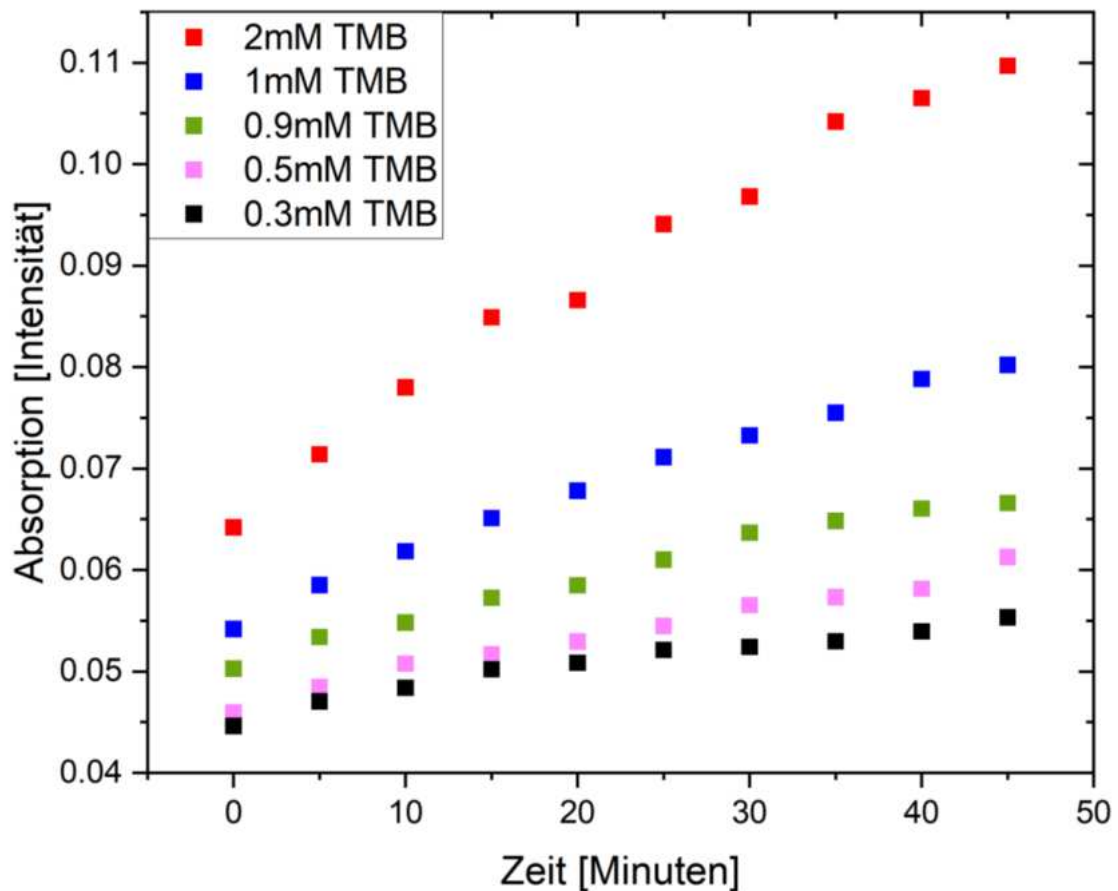


Abbildung 39: UV-VIS Messungen mit verschiedenen TMB Konzentrationen. Die Menge von $\text{CeO}_2\text{-NP}$ und H_2O_2 -Konzentration wurde konstant gehalten.

Die zur Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante notwendige Sättigung wurde in diesem Experiment nicht erreicht, weshalb auf die Bestimmung mittels Lineweaver-Burk (siehe Kapitel 3.3.3, Abbildung 16) zurückgegriffen wird. In Abbildung 40 ist die reziproke Geschwindigkeit über die reziproke Substrat-Konzentration aufgetragen, woraus sich nach einer linearen Anpassung die Werte für $1/v_{\text{max}}$ und $1/K_m$ ergeben, die in Tabelle 10 dargestellt und zur Vergleichbarkeit mit Literaturwerten umgerechnet werden (hervorgehoben).

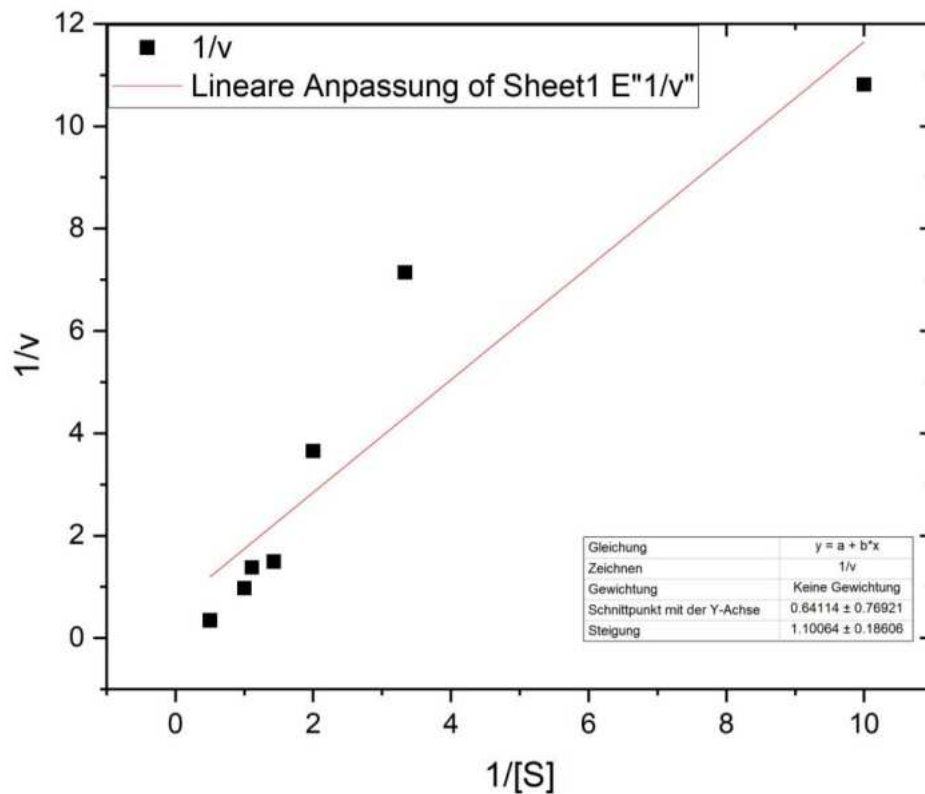


Abbildung 40: Lineweaver-Burk-Diagramm von Ceroxid-Nanopartikeln mit Wasserstoffperoxid und variabler Substratkonzentration des TMB für die Messung nach $t = 300$ s.

Tabelle 10: Bestimmung von v_{\max} und K_M mittels Lineweaver-Burk

Wert	Berechneter Wert	Literaturwert [Jia2012]
Schnittpunkt mit der y-Achse	$0,641 \pm 0,769$	$5,07 \pm 0,03 [10^{-8} \text{ M/s}]$
Schnittpunkt mit der x-Achse	$-0,583 \pm 0,768$	$646 \pm 32 [10^{-4} \text{ M}]$
	$v_{\max} = 1,560 \pm 1,3 \text{ M/s}$	
	$K_M = 1,717 \pm 1,3 \text{ M}$	

Als zweites Substrat wurde in dieser Arbeit Wasserstoffperoxid verwendet. Die Abhängigkeit der Absorption von der Menge des zugegebenen Substrates bei gleicher Ceroxid-Nanopartikel- und TMB-Menge ist in Abbildung 41 dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass auch die Menge des Wasserstoffperoxides einen Einfluss auf die Absorptionsintensität des TMB hat. Mit steigender H_2O_2 -Konzentration steigt die Farbintensität des TMB an.

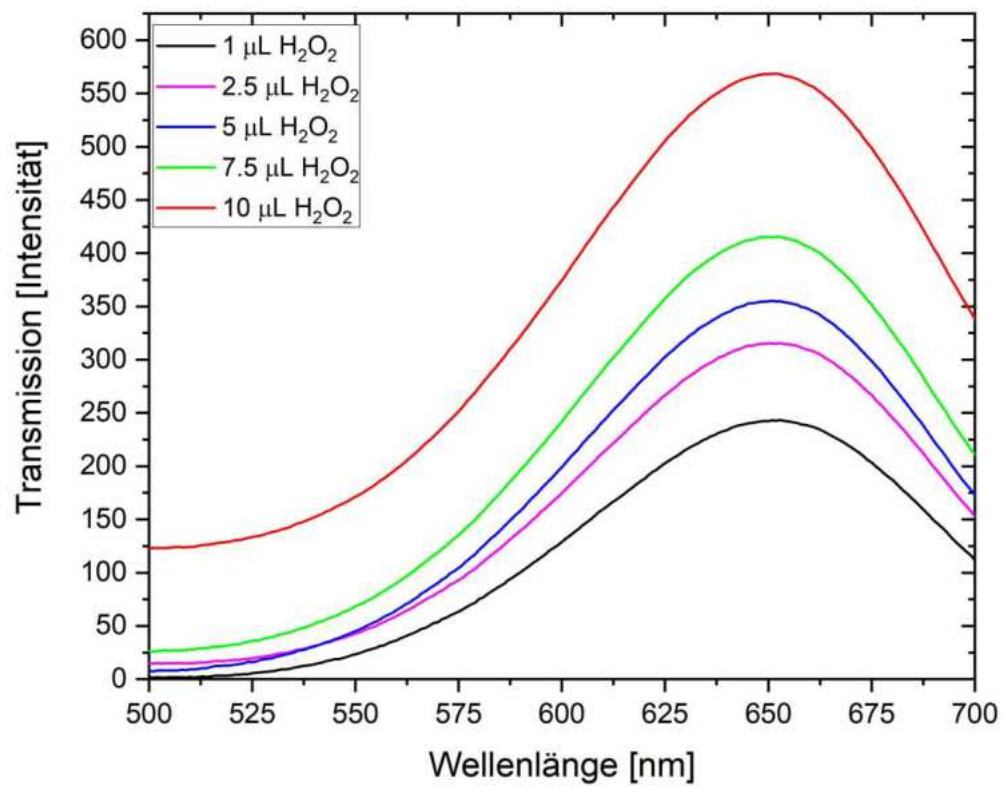


Abbildung 41: UV-VIS Messungen mit verschiedenen H₂O₂ Konzentrationen mit Ceroxid-Nanopartikel und TMB.

4.2 Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel im Biosensor

Anhand der charakteristischen Merkmale der Ceroxid-Nanopartikel aus Kapitel 4.1 aus den verschiedenen Syntheseverfahren wurden die Nanopartikel aus der MNE1-Synthese für die Anwendung in den Biosensoren verwendet. Diese lagen bereits in Lösung vor, woraus für die Anwendungen Aliquote eingesetzt wurden (siehe Kapitel 3).

4.2.1 Kolorimetrischer Sensor

Der kolorimetrische Sensor wird in Form eines lateralen Flusstests umgesetzt. Abbildung 42 zeigt den Aufbau des verwendeten Sensorsystems. Der rote Pfeil zeigt auf die Testlinie und der schwarze auf die Kontrolllinie (siehe auch Kapitel 3.5.2 und Abbildung 12 zur genauen Erklärung). Im Vorfeld der hier dargestellten Versuche wurden verschiedene Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten getestet. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden unter Verwendung einer MES-Lösung mit dem pH = 5 ermittelt. Laut Theorie müsste die Testlinie mit steigender Histamin-Konzentration schwächer werden [Moy2019].

Dies wurde mit Hilfe eines „Lateral-Flow-Readers“ überprüft, in dem die Reflexionen der Linien gemessen und die Ergebnisse gegen die Histamin-Konzentration aufgetragen wurden. In Abbildung 44 sind die Mittelwerte der Testlinie inklusive Standardabweichungen dargestellt. Entgegen der Erwartung kann bei der Testlinie kein antiproportionaler Verlauf in diesem Aufbau festgestellt werden. Allerdings zeigen die Ergebnisse der Kontrolllinie in Abbildung 44 den bei der Testlinie erwarteten antiproportionalen Verlauf.

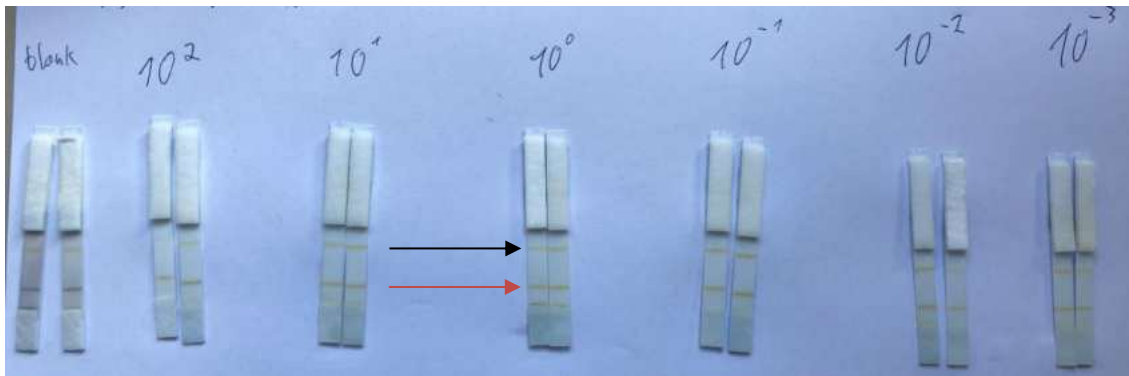


Abbildung 42: Lateraler Flusstest mit Histamin 15 Minuten nach Beendigung des Tests. Steigende Histamin-Konzentration in der Probe von rechts nach links. Ganz links kein Histamin in der Probe (blank). Der rote Pfeil zeigt auf die Testlinie, der schwarze Pfeil auf die Kontrolllinie.

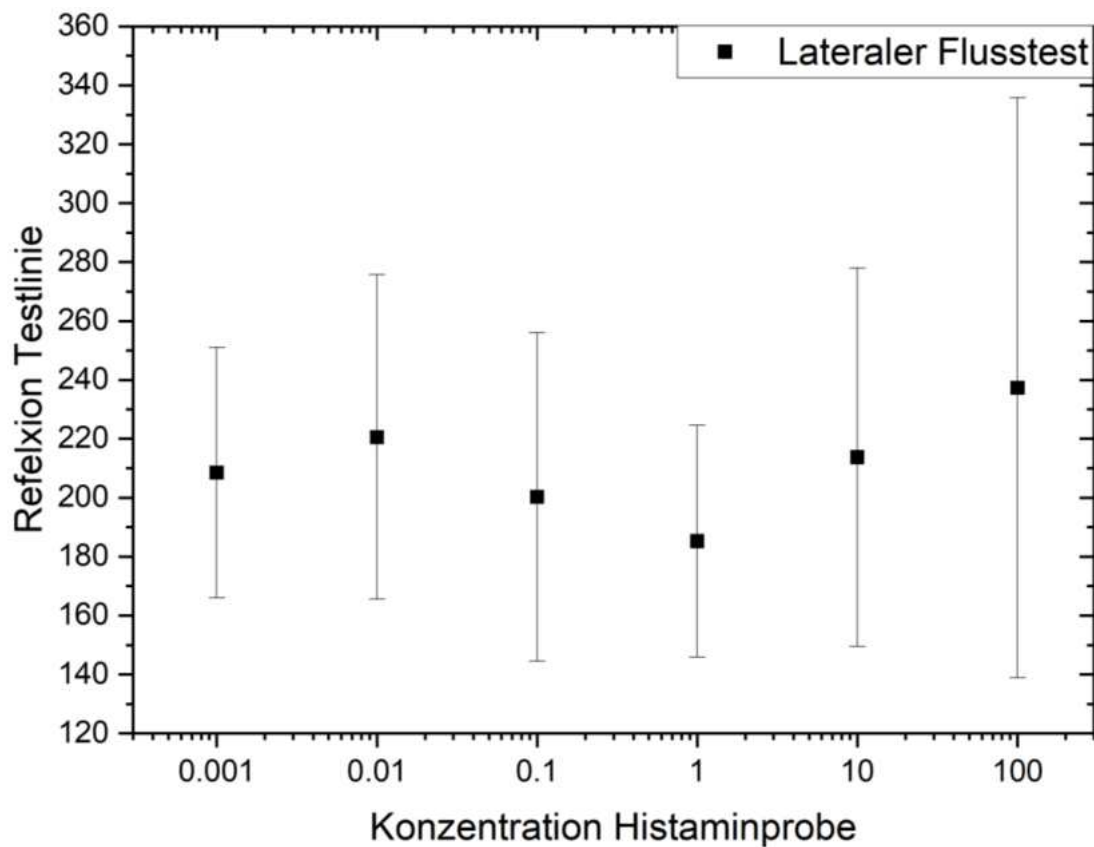


Abbildung 43: Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Histamin-Konzentrationen im lateralen Flusstest an der Testlinie mit dem Lateral-Flow-Reader.

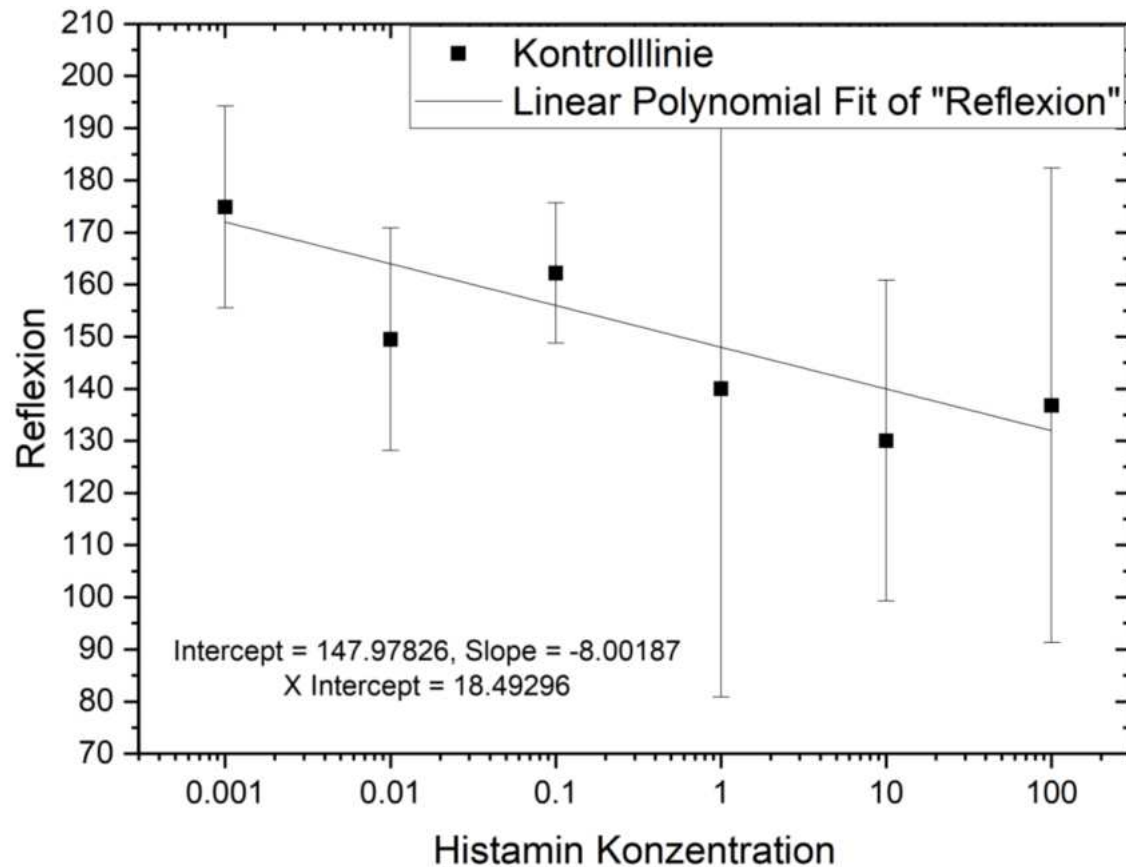


Abbildung 44: Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Histamin-Konzentrationen im lateralen Flusstest an der Kontrolllinie mit dem Lateral-Flow-Reader.

Diese Ergebnisse erlauben daher keine Kalibrierung für den Histamin-Test mittels eines lateralen Flusstests.

Um die Ursache für diese Ergebnisse zu ermitteln, wurde ein photometrischer Test durchgeführt, mit dem gezeigt werden konnte, dass Histamin ebenso wie Wasserstoffperoxid direkt mit TMB reagiert. Die Intensität des Farbumschlages in Abhängigkeit von der Histamin-Konzentration ist in Abbildung 45 dargestellt. Eine Hypothese für eine mögliche Erklärung wird in Kapitel 5.2 und Abbildung 49 diskutiert.

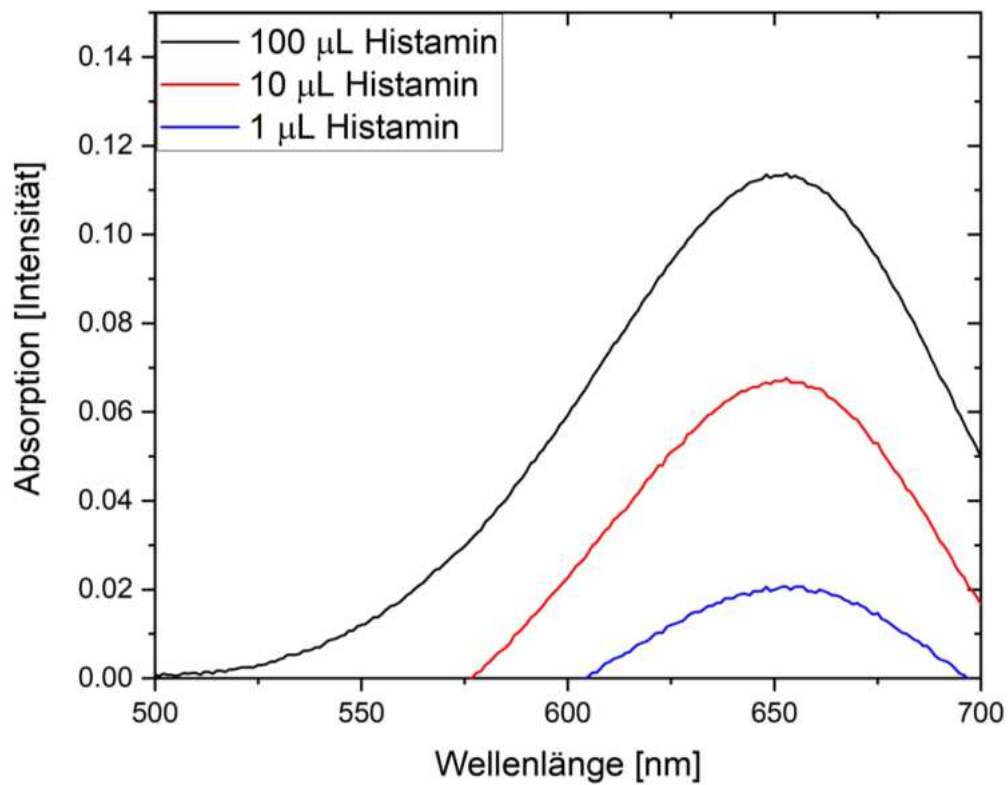


Abbildung 45: UV-VIS-Messungen mit Ceroxid-Nanopartikeln, TMB und unterschiedlichen Histamin-Konzentrationen.

Da mit Histamin im lateralen Flusstest keine Kalibriergerade erstellt werden kann und die UV-VIS-Messungen zeigen, dass die Kombination Nanoceria, TMB und Histamin in Lösung zu einem Farbumschlag führt, wurde auf den Nachweis von Histamin in einer realen Weinprobe verzichtet. Der Grund dafür ist, dass die Lösung mit Wein als Analyt leicht rötlich gefärbt ist und somit der Farbumschlag nicht eindeutig nachgewiesen werden kann.

4.2.2 Elektrochemischer Sensor

Eine weitere Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel soll in Form eines elektrochemischen Sensors stattfinden. Dazu wird eine siebgedruckte Elektrode (SPE) mit unterschiedlichen Mengen Ceroxid-Nanopartikeln beschichtet. Vorversuche haben ergeben, dass $V_{\text{NP-Lsg}} = 4 \mu\text{l}$ einer $3,2 \cdot 10^6$ ppb NP-Lösung aus der MNE1-Synthese das stabilste Ergebnis erzielt, sodass im Folgenden nur die Auswertung dieser Ceroxid-Nanopartikel auf dem Sensor aufgeführt wird. Im Vorfeld der amperometrischen Messungen wurden Cyclovoltametrie-Messungen durchgeführt, die zeigten, dass im Potentialbereich zwischen $E = 0,7 - 0,8$ V eine Oxidation stattfindet, sodass daraus das Messpotential für die Amperometrie bestimmt werden konnte. Um an der Stelle des höchsten Stromwertes messen zu können, hat sich folgende Messeinstellung ergeben:

- Potential $E_{\text{Messung}} = 0,75$ V

Um die Diffusion zu berücksichtigen, wird über einen Zeitraum von $t_m = 180$ s gemessen. Zur Erstellung des Kalibrierdiagramms wird der Strom bei $t_m = 120$ s abgelesen, da der gemessene Strom zu diesem Zeitpunkt stabil ist und über die Konzentration aufgetragen werden kann.

In Abbildung 46 ist die Kalibrierung des Stroms gegen die Wasserstoffperoxid-Konzentration aufgetragen. Das Signal des Sensors entwickelt sich proportional zur H_2O_2 -Konzentration. In Tabelle 11 sind die daraus ermittelten analytischen Charakteristika sowie die Fehlertoleranz der Messungen aus einer realen Probe angegeben. Diese ist mit $\pm 6,4$ % relativ gering, sodass diese Methode zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration in Lösung gute Ergebnisse erzielt.

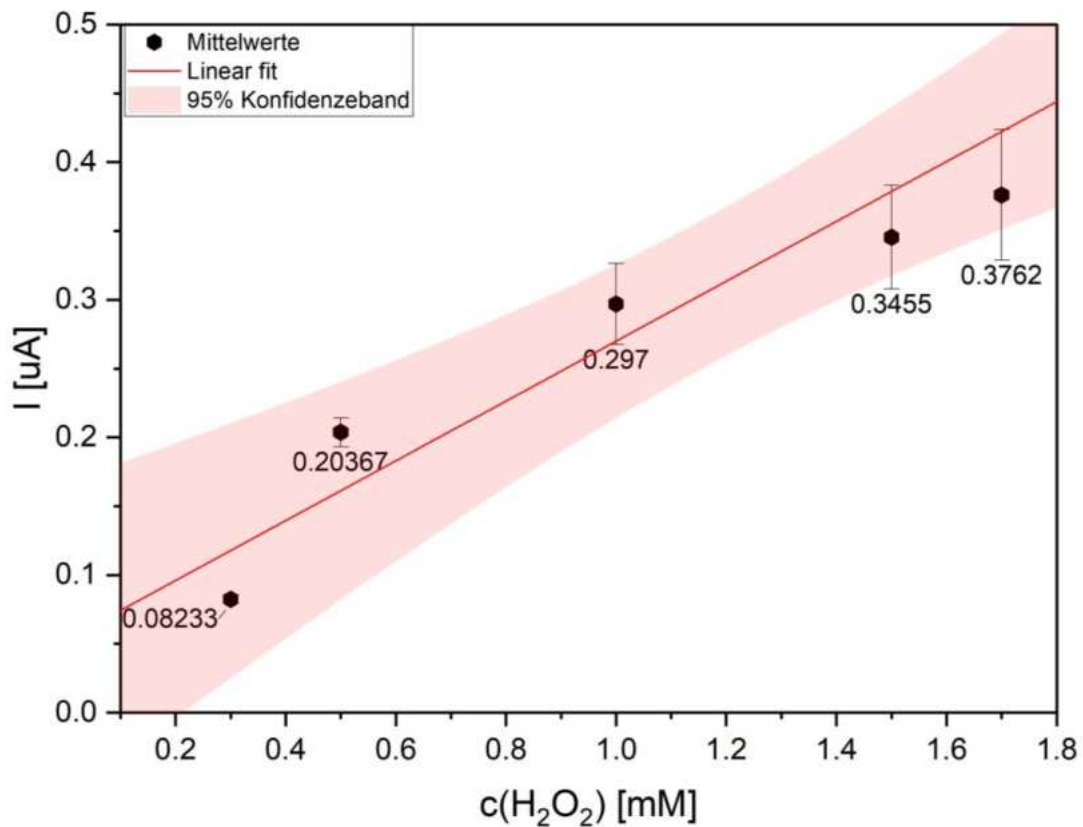


Abbildung 46: Wasserstoffperoxid-Kalibrierung der mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichteten siebgedruckten Kohlenstoffelektrode (mit einem Konfidenzband von 95 %).

Tabelle 11: Analytische Charakteristika der Kalibriergeraden von H_2O_2 in Abbildung 46.

Parameter	Bestimmt
Kalibriergerade	$y = 0,053x + 0,217$
R^2	0,924
Nachweisgrenze	$c = 0,204 \text{ mM}$
Linear Range	$c = 0,2 - 2 \text{ mM}$
Fehler einer realen H_2O_2 -Probe ($c = 0,5 \text{ mM}$)	$\pm 6,2 \%$

Um den Histamin-Gehalt einer Probe mittels elektrochemischen Sensors zu ermitteln, wurden ebenfalls Messungen für eine Kalibrierung durchgeführt. Allerdings ließ sich keine Kalibrierung erstellen, da die Messergebnisse, wie in Abbildung 47 dargestellt, keinen Zusammenhang zur Histamin-Konzentration in der Probe zeigten.

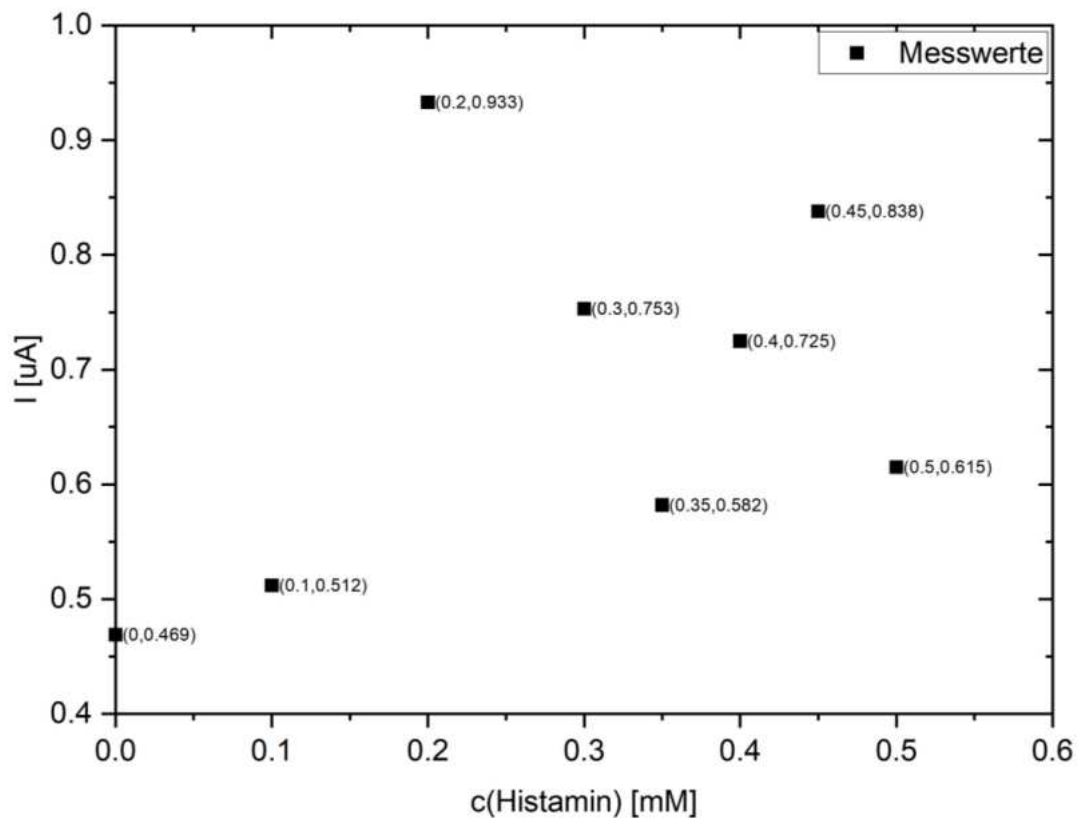


Abbildung 47: Ergebnisse der Messungen zur Kalibrierung von Histamin im elektrochemischen Sensor mit den konzentrationsabhängigen Messdaten.

In der Literatur wird beschrieben, dass siebgedruckte Elektroden, welche mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichtet wurden, Glukose nachweisen können. Dies wurde anhand von zwei verschiedenen Glukose-Konzentrationen überprüft, um zu sehen, ob die in dieser Arbeit hergestellten Ceroxid-Nanopartikel die gleichen Fähigkeiten besitzen, wie in der Literatur beschrieben [Pat2012]. In Abbildung 48 sind Cyclovoltametrie-Messungen von zwei verschiedenen Glukose-Konzentrationen (lila $c_1 = 0,1$ mM Glukose und grün $c_2 = 0,01$ mM Glukose) sowie des Untergrundes ohne Glukose (schwarz) dargestellt. Wie erkennbar, ist der aufgenommene Strom abhängig von der Glukose-Konzentration auf der Elektrode. Dies bestätigt die Fähigkeit der Ceroxid-Nanopartikel, Glukose im elektrochemischen Sensor zu detektieren.

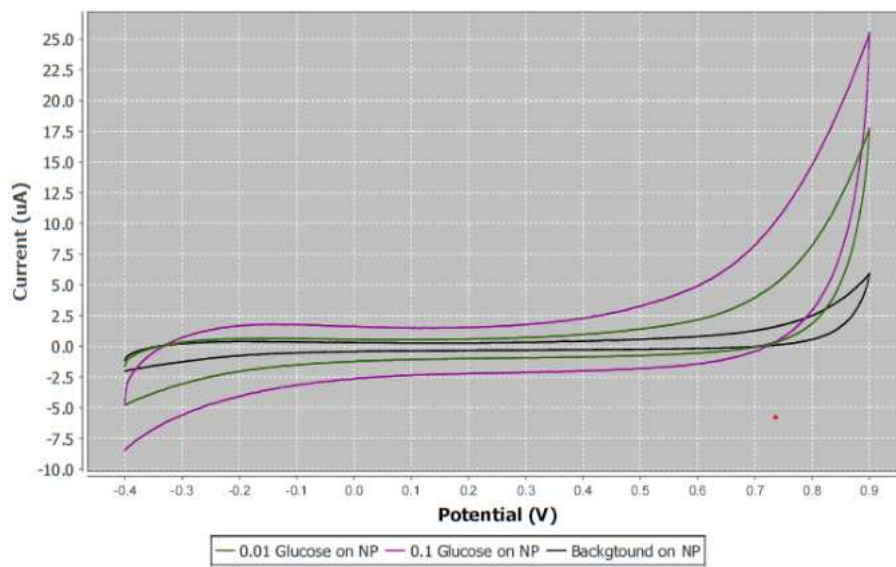


Abbildung 48: Glukose im elektrochemischen Sensor, mit $c = 0,1$ mM Glukose (lila) und $c = 0,01$ mM Glukose (grün), schwarz gibt eine Hintergrund-Messung wieder.

5 Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Resultate aus Kapitel 4 diskutiert. Dabei werden zuerst die Ergebnisse der Nanopartikel-Herstellung mittels MJR behandelt, indem die verschiedenen Synthesen miteinander und mit der entsprechenden Literatur verglichen werden. Anschließend werden die verschiedenen Sensortypen und ihre Eignung zum Nachweis von Histamin diskutiert.

5.1 Vergleich verschiedener Ceroxid-Nanopartikel-Syntheserouten

Die Herstellung von monodispersen Ceroxid-Nanopartikeln ist abhängig vom verwendeten Fällungsmittel, Hilfsstoff und der Synthese-Methode. Wie in Kapitel 4.1 dargestellt, liegen Ceroxid-Nanopartikel, welche mittels Mikroemulsions-synthese hergestellt werden, monodispers vor (siehe Abbildung 19). Ceroxid-Nanopartikel aus einer Fällungssynthese, wie in Abbildung 22 und Abbildung 24 dargestellt, agglomerierten trotz zugegebenem Hilfsstoff während der Synthese. Große, unlösliche Agglomerationen (wie in Abbildung 22 abgebildet), z.T. in Form von Stäbchen oder Flakes, werden auch in der Literatur bei Tyrpekl et al. beschrieben [Tyr2019]. Dieses Phänomen der Flakes bzw. Sternstruktur bei der Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln ist also kein Phänomen der Synthese im MJR allein, sondern liegt vermutlich an der Auswahl des Fällungsmittels AHC in Kombination mit der Synthese-Methode im MJR. Dai et al. [Dai2014] beschreibt, dass eine niedrige Temperatur und hohe Übersättigung die Bildung von Flakes begünstigt. Die Konzentration des Fällungsmittels wird während der Reaktion durch das Aufeinanderprallen der Reaktionslösungen im MJR stark übersättigt. Auch eine Reduzierung der AHC-Konzentration konnte dieses Problem nicht lösen. Bei der Kalzinierung der Synthese MNK1.8CTAB (Abbildung 22) wurde zur Unterstützung ein Hilfsstoff hinzugefügt, um die Agglomerationen, die sich während der Synthese bilden und durch die Kalzinierung versintern, zu reduzieren. Die Ergebnisse in Abbildung 23 zeigen, dass diese Nanopartikel im Vergleich zu den Nanoceria ohne Hilfsstoff während der Kalzinierung monodispers vorliegen. Die Zugabe von bspw. einer Chlorid-Schmelze hat einen

positiven Einfluss auf die Versinterung der Nanopartikel bei einer Kalzination. Wie in Abbildung 23 ebenfalls gut erkennbar, ist die Partikelverteilung breiter als bspw. bei MNE1. Dies zeigen auch die Standardabweichungen aus Tabelle 7. Ebenfalls aus Tabelle 7 ist zu entnehmen, dass die Nanopartikel aus den Mikroemulsionssynthesen deutlich kleiner sind und eine schmalere Größenverteilung haben als die Partikel aus den Fällungssynthesen. Als ein weiteres Fällungsmittel wurde Ammoniakwasser verwendet. In Vorversuchen wurde die Zwischenstufe getrocknet und anschließend ebenfalls kalziniert, wobei auch in diesem Fall die Bildung unlöslicher Aggregate die Folge war. Durch die Verwendung einer Mikroemulsionssynthese und das Waschen der Partikel mit Ethanol wurde deutlich, dass eine Kalzinierung nicht notwendig ist, sodass diese Versuche nochmals ohne Kalzinierung und mit einem Hilfsstoff (siehe Tabelle 3) durchgeführt wurden. Wie die Ergebnisse in Abbildung 22 zeigen, sind trotz der Zugabe verschiedener Hilfsstoffe bei der Synthese und ohne Temperaturbehandlung Agglomerationen entstanden.

Im Allgemeinen zeigen die Resultate aus Kapitel 4.1, dass die in dieser Arbeit verwendeten Syntheseverfahren und Fällungsmittel mit unterschiedlichen Zwischenstufen zur Herstellung von Ceroxid verwendet werden können. Die XRD-, XPS- und Raman-Messungen bestätigen dieses Ergebnis. Allerdings zeigen die XRD-Messungen (siehe Abbildung 26) der Ceroxid-Nanopartikel, welche mittels Mikroemulsionen und Ammoniakwasser hergestellt wurden, dass deutlich mehr Untergrund und breitere Reflexe auftraten als bei den Ceroxid-Nanopartikeln, welche mit AHC gefällt wurden. Dies kann zwei Gründe haben. Zum einen sind die Partikel der Mikroemulsionssynthese deutlich kleiner, sodass durch die geringere Größe der Nanopartikel eine nicht ausreichende Menge an Gitterebenen vorhanden ist. Zum anderen könnte ein zu hoher amorpher Anteil in der Probe dazu führen, dass dieser durch die Kalzinierung verringert wird. Die XRD-Daten der Fällungssynthesen mit AHC in Abbildung 27 zeigen allerdings, dass die in der Literatur beschriebene Kalzinierung notwendig ist, da die Diffraktogramme von Precursor und Produkt signifikante Unterschiede aufweisen. Für das Spektrum des Precursors konnte in der Literatur kein Referenzspektrum ermittelt werden. Die Ergebnisse sind zum Teil mit den Ergebnissen von Ederer vergleichbar [Ede2019], sodass eine Fraktion der Zwischenstufe, wie in

Gleichung {3} dargestellt, als $\text{Ce}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2$ charakterisiert werden kann. Allerdings zeigen Vergleiche mit Diffraktogrammen verschiedener Cer-Verbindungen, dass es keine eindeutige Formel für diese Zwischenstufe gibt, sondern dass die Zwischenstufe aus verschiedenen Ceroxid- und Hydroxycarbonaten mit geringen amorphen Anteil ohne eindeutige Formel besteht (vgl. [Ani2011] und [Dai2014]). Außerdem zeigen die Daten der AHC-Fällungssynthese, dass die anschließende Temperaturbehandlung zu schmäleren Reflexen mit wenig Untergrund führen. Daraus ist abzuleiten, dass die Temperaturbehandlung einen Einfluss auf die Kristallinität der Ceroxid-Nanopartikel hat und gleichzeitig mögliche Verunreinigungen aus der Synthese-Mischung durch Verdampfen besser entfernt werden können als durch mehrmaliges Waschen. Dies bestätigen auch die Raman-Messungen. Die F_2g -Bande bei $1/\lambda = 465 \text{ cm}^{-1}$ zeigt, dass in allen Synthesen Ce-O hergestellt wurde. Die weiteren Banden ab $1/\lambda = 1\,100 \text{ cm}^{-1}$ im Raman-Spektrum deuten darauf hin, dass auf Grund der sehr großen Oberfläche der Nanopartikel weitere funktionelle Gruppen wie Hydroxid- oder Kohlenstoffoxid-Gruppen aus der Atmosphäre an die Oberfläche binden (siehe auch Tabelle 8). Cer ist ein sehr reaktives Element, welches leicht Sauerstoffatome und Hydroxidmoleküle chemisorbiert, deren relevante Banden sich bei $1/\lambda = 1\,636 \text{ cm}^{-1}$ als intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen befinden. [Kim2001] Bei Wellenzahlen ab $1/\lambda = 3\,000 \text{ cm}^{-1}$ liegen unter anderem O-H- und N-H-Verbindungen vor [Cul2020]. Zwischen den Wellenzahlen $1/\lambda = 1\,200 \text{ cm}^{-1}$ und $1/\lambda = 1\,600 \text{ cm}^{-1}$ werden C-O-Verbindungen detektiert [Win2011]. Calvache-Muñoz beschreibt, dass Ceroxid-Nanopartikel je nach Herstellungsmedium unterschiedliche Banden aufweisen, da es durch die verschiedenen Synthese-Umgebungen zu einer ungleichmäßigen Ausbildung von Sauerstoff-Leerstellen und Einbau verschiedener funktioneller Gruppen auf der Cer-Sauerstoff-Oberfläche kommen kann. Außerdem ordnet er die Bande bei einer Wellenzahl von $1/\lambda = 1\,160 \text{ cm}^{-1}$ den Sauerstoff-Leerstellen zu. [Cal2019]

Die Raman-Messungen bei $T_M = 500 \text{ °C}$ in Abbildung 28 zeigen, dass bei $T_M = 500 \text{ °C}$ nur die Ce-O Bande bei $1/\lambda = 465 \text{ cm}^{-1}$ identifizierbar ist. Sobald die Probe wieder auf Raumtemperatur abgekühlt ist, sind diverse Banden bei

Wellenzahlen ab $1/\lambda = 1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ messbar. Da die meisten Raman-Spektren für CeO_2 in der Literatur nur bis zu einer Wellenzahl von $1/\lambda = 1\ 100\ \text{cm}^{-1}$ dargestellt oder die weiteren Banden nicht beschrieben sind, wie bspw. bei Calvache-Munoz et al. [Cal2019], ist eine sichere Zuordnung zu CeO_2 -Nanopartikel nicht gewährleistet. Anhand von Literaturwerten zu anderen Nanopartikeln und allgemeiner Literatur zur Raman-Spektroskopie konnte ein Großteil der gemessenen Raman-Banden dennoch zugeordnet werden, siehe Tabelle 8.

Die Analysen der XPS zeigen, dass es nicht zwingend notwendig ist, die Nanopartikel zu kalzinieren, um Ceroxid herzustellen, da auf allen Oberflächen Ce-O nachgewiesen werden konnte. Allerdings ist die Menge an Kohlenstoff bei den nicht kalzinierten Proben höher als bei den Proben, die eine Temperaturbehandlung erfahren haben. Dies bestätigen auch die Raman-Messungen, aus denen erkennbar ist, dass auf den Nanopartikeln ohne Kalzinierung im Vergleich zur Ce-O-Bande deutlich mehr funktionelle Gruppen gemessen wurden, als auf den Nanopartikeln mit Kalzinierung. Welchen Einfluss dies auf die enzymatische Aktivität hat, lässt sich in dieser Arbeit nicht bestimmen, da durch die Agglomerationen, die durch die Kalzinierung verfestigt werden, die Menge an Nanopartikeln pro Suspensionsvolumen nicht vergleichbar ist.

Im Allgemeinen ist das Überführen der Batch-Synthesen zur Herstellung der Ceroxid-Nanopartikel in eine kontinuierliche Synthese gelungen. Um zunächst auf Additive zu verzichten, wurde die Synthese mit AHC durchgeführt. Allerdings entstanden hierbei Probleme durch Agglomerationen der Nanopartikel, die durch die thermische Umsetzung des Zwischenproduktes irreversibel zu Ceroxid versintert wurden. Aus dieser Erfahrung wurde geschlossen, dass eine Synthese mit Additiven notwendig ist. Dies wurde zuerst mittels der Fällungssynthese AHC durchgeführt, anschließend wurde eine Mikroemulsionssynthese angewendet. Die Überführung der Mikroemulsionssynthese in den MJR zeigte, dass positive Ergebnisse hinsichtlich der Größe und chemischen Analyse der Nanopartikel erzielt werden können. Allein die Reinigungsarbeiten am MJR waren hier deutlich zeitaufwändiger als bei der Synthese mit AHC, da die Tenside lange in den Kanälen des Reaktors verblieben und nach einigen Spülgängen immer noch

Schaum produzierten. Aus diesem Grund gab es keine Wiederholung dieser Syntheseroute. Bei einer kontinuierlichen Synthese, ohne ständiges Wechseln der Reaktanten, ist nach Auswerten aller Ergebnisse und Anwendungen die Mikroemulsionssynthese von Ceroxid-Nanopartikeln die Syntheseroute der Wahl, da so monodisperse, direkt in Lösung vorliegende Ceroxid-Nanopartikel hergestellt werden können. Die Synthesen mit Ammoniumhydroxid als Fällungsmittel lassen sich im MJR ebenfalls deutlich schlechter umsetzen, da die organischen Löse- und Hilfsmittel mehr Reinigungsaufwand benötigen. So reagiert in der Fällungssynthese das PAA (MNA1) bereits im Reaktor zu einem dickflüssigen Gel, welches sogar durch den Reaktor in die Leitungen der Cer-Lösung geschossen wird und sich daraus schlecht entfernen lässt. Obwohl, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, Penth [Pen2001] Verstopfungen im MJR ausschließt, kommt es bei der Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln mit Ammoniumhydroxid als Fällungsmittel zu Verstopfungen des Austrittkanals. Wie er bereits für andere Mikroreaktoren erwähnte, ist die Verstopfung von Kanälen ein ökonomisches Problem, welches durch die Demontage- und Reinigungsarbeiten der verstopften Leitungen begründen lässt. Daher sollte unter Berücksichtigung der wissenschaftlichen Erkenntnisse auch für den Einsatz von Ammoniumhydroxid und einigen Hilfsstoffen (z. B. CTAB oder PAA) der Reinigungsaufwand des MJR in Relation zur Ausbeute und damit zu wirtschaftlichen Faktoren gesetzt werden. Abschließend kann jedoch gesagt werden, dass die Synthesen unabhängig von der Syntheseroute und dem Fällungsmittel von der Batchsynthese in den MJR überführt werden konnten und in allen Fällen Ceroxid hergestellt wurde. Somit konnte dieser Teil der Arbeit erfolgreich abgeschlossen werden.

5.2 Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel

Die Herstellung der Ceroxid-Nanopartikel mittels eines Mikro-Jet-Reaktors und der Nachweis von Wasserstoffperoxid durch Ceroxid-Nanopartikel sind in dieser Arbeit gelungen. Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.1.4 zeigen, können Ceroxid-Nanopartikel als Nanozym in Kombination mit TMB und Wasserstoffperoxid als Substrate verwendet werden. Der Vergleich der in Kapitel 4.1.4 bestimmten Michaels-Menten-Konstante K_M und v_{max} mit Ergebnissen aus der Literatur

[Jia2012] zeigt, dass die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Ceroxid-Nanopartikel eine deutlich geringere Enzymaktivität aufweisen. Ein hoher K_M -Wert deutet auf eine geringe Affinität des Substrats zu seinem Enzym hin, während ein niedriger Wert eine hohe Affinität und damit eine stabile Enzym-Substrat-Bindung bedeutet. Die in dieser Arbeit hergestellten Ceroxid-Nanopartikel zeigen im Vergleich zu Literaturwerten (beide Werte in Tabelle 10 dargestellt), dass der K_M -Wert größer ist. Dies bedeutet, dass die Bindung zwischen Enzym und Substrat weniger stabil ist und die Enzymaktivität verringert wird.

Der Nachweis von Histamin mittels Ceroxid-Nanopartikeln ist in den verwendeten Sensorsystemen nicht gelungen, da, wie im Verlauf dieses Kapitels anhand der jeweiligen Sensortypen im Detail erklärt wird, das Histamin mit den Ceroxid-Nanopartikeln unerwartete Wechselwirkungen zeigt.

Für die Anwendung in Biosensoren wurden die Ceroxid-Nanopartikel aus der Mikroemulsionssynthese ausgewählt, da diese bereits in Lösung vorliegen, keine irreversiblen Agglomerationen zeigten und somit leichter zu dosieren waren. Die Detektion von Wasserstoffperoxid mit den hergestellten Ceroxid-Nanopartikeln verlief erfolgreich. Somit konnte die Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel in einem Biosensor in dieser Arbeit erfüllt werden. Die zweistufige Synthese von Ceroxid-Nanopartikeln mittels AHC hat sich für die Anwendung in den beiden biotechnologischen Sensorsystemen als nicht geeignet erwiesen, da die Nanopartikel zu stark aggregierten und sich nicht homogen dispergieren ließen. Die Synthesen über die Zwischenstufe Cercarbonat zeigten Agglomerationen (siehe Kapitel 5.1) zu z. T. einlagigen Platten, welche sich für die Anwendung nicht gut verwenden ließen, da die Konzentration der Nanopartikel innerhalb der Agglomerationen größer ist als bei einzelnen Nanopartikeln. Welchen Einfluss eine mechanische Zerkleinerung die Agglomerate für die Enzymaktivität der Ceroxid-Nanopartikel haben, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Dennoch sollten diese in Form von Platten agglomerierten Partikel nicht verworfen werden, denn die Form der Agglomeration lässt sich eventuell für andere Anwendungen einsetzen, bei denen weder eine Dispersion noch die Oberfläche der einzelnen Nanopartikel benötigt wird, sondern die Menge der Ceroxid-Nanopartikel.

5.2.1 Elektrochemischer Biosensor

Die Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel in einem elektrochemischen Sensor, wie sie in dieser Arbeit mittels einer siebgedruckten Elektrode erfolgte, wurde mit verschiedenen Analyten getestet. Dabei wurde Wasserstoffperoxid, Histamin und Glukose gemessen; die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind in Kapitel 4.2.2 dargestellt und werden im Folgenden analysiert und diskutiert.

Mit Wasserstoffperoxid konnte eine Kalibrierung durchgeführt und eine reale Probe gemessen werden. Für Histamin war die Durchführung einer Kalibrierung nicht möglich. Vorversuche (näher beschrieben in Kapitel 3.4.1) haben gezeigt, dass die Menge der Ceroxid-Nanopartikel auf der Elektrode keinen Einfluss auf das Ergebnis hat. Zur Überprüfung potentieller Probleme beim Nachweis von Histamin in Verbindung mit den Ceroxid-Nanopartikeln wurde Glukose auf einer Elektrode getestet, welche ebenfalls mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichtet war. Die Ergebnisse aus den Messungen mit einer Glukose-Lösung (siehe Abbildung 48) haben gezeigt, dass die kontinuierlich hergestellten Ceroxid-Nanopartikel in dieser Anwendung nutzbar sind und, wie bereits in der Literatur von Patil et al. [Pat2012] beschrieben, Glukose mit Hilfe des Enzyms GOx nachgewiesen werden konnte. Hier zeigte sich, wie beim Wasserstoffperoxid auch, dass die Höhe des gemessenen Stroms von der Höhe der Analyt-Konzentration abhängt. Um den gleichen Aufbau wie bei Glukose für Histamin zu verwenden, wurde das entsprechende Enzym (DAO) auf der Elektrode getrocknet. Auch hier zeigte sich das gleiche Phänomen wie beim Versuch ohne Enzym und zwar, dass der gemessene Strom nicht proportional zur Histamin-Konzentration war. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es eine Wechselwirkung zwischen Histamin und Ceroxid-Nanopartikel gibt, welche die Detektion von Histamin mit dem vorgestellten Sensor nicht möglich machen.

Die Detektion von reinem Wasserstoffperoxid hingegen funktionierte gut, der Fehler der Messungen einer realen Probe liegt bei $\pm 6,2\%$. Diese Streuung der Werte ist gut, da mit verschiedenen Elektroden gemessen wurde und die Beschichtung der Elektroden mit Ceroxid-Nanopartikeln, trotz einer annähernd homogenen Verteilung in der Lösung, vermutlich nicht überall exakt gleich war und durch Bildung von Agglomeraten die Verteilung der Nanopartikel auf der Elektrode nicht gleichmäßig sein wird. Dadurch war die Menge und Verteilung

der Ceroxid-Nanopartikel auf den Elektroden unterschiedlich. Hieraus ergibt sich, dass für eine Quantifizierung der Analyten immer dieselbe Elektrode verwendet werden sollte. Deswegen ist die Anwendung der SPE nicht für eine schnelle Detektion der H_2O_2 -Konzentration geeignet, da für jede Elektrode vorab eine Kalibrierung durchgeführt werden muss. Dabei muss der langsamste Teilschritt einer Reaktion, in diesem Fall die Diffusion, berücksichtigt werden, um eine stabile Messung durchführen zu können. Um die Stabilität der Messung zu gewährleisten, wurde jede Elektrode $t_m = 180$ s bei gleicher Spannung gemessen, was bei einer Dreifachbestimmung je Probenlösung und Elektrode pro Elektrode erhebliche Zeit in Anspruch nimmt, da die Elektroden zwischen den einzelnen Messungen getrocknet werden müssen. Des Weiteren haben Experimente über verschiedene Jahreszeiten hinweg gezeigt, dass die Umgebungstemperatur Einfluss auf die Wärmekapazität und den Ionenfluss hat. Somit kam es bei verschiedenen Elektroden und an verschiedenen Tagen zu unterschiedlichen Ergebnissen; auf Grund der örtlichen Gegebenheiten war es nicht möglich, isotherme Messungen durchzuführen. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Messsystems, das jederzeit und an jedem Ort von Anwendern genutzt werden kann, Temperaturschwankungen sollten daher keinen Einfluss auf das Ergebnis haben. Des Weiteren lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Menge an Ceroxid-Nanopartikeln auf den Elektroden mit der Zeit abnahm. Nach jeder Messung wurde die Elektrode mit Wasser gewaschen, um die Probe zu entfernen. Dabei liegt die Vermutung nahe, dass bei diesem Vorgang auch ein Teil der Ceroxid-Nanopartikel von der Elektrode gewaschen wurden. Die Überprüfung des Waschwassers auf Ceroxid-Nanopartikel wurde allerdings nicht durchgeführt. Dieses Phänomen lässt sich dadurch untermauern, dass der gemessene Strom mit einem Standard nach der Probenmessung geringer ist als vor der Probenmessung (siehe Anhang). Somit ließ sich die Kalibrierung nach einigen Durchgängen nicht exakt wiederholen. Auf der Suche nach Alternativen zu den siebgedruckten Elektroden (SPE) von Dropsens ist in Gesprächen mit anderen Forschenden aus dem Bereich der Elektrochemie bestätigt worden, dass die Reproduzierbarkeit der Messungen mit den SPE von Dropsens kaum gewährleistet ist. Es wurde berichtet, dass die Elektroden aus verschiedenen Chargen sehr unterschiedlich hohe Signale liefern, die Menge an Versuchen aber eine Charge übersteigt. So können Versuche nicht mit kommerziell hergestellten

Elektroden durchgeführt werden, da so das Ergebnis verfälscht wird. Hier wäre ein Einbau der Ceroxid-Nanopartikel in die Oberfläche der SPE sinnvoller, um eine gleichmäßigere Verteilung zu gewährleisten. Allerdings müsste dafür die komplette Produktion der Elektrode im eigenen Labor erfolgen, was auf Grund fehlender Ausstattung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

5.2.2 Kolorimetrischer Biosensor

Als zweites Sensorsystem wurde in dieser Arbeit der kolorimetrische Sensor mit Ceroxid-Nanopartikeln in Form eines lateralen Flusstestes verwendet. Die Linien der lateralen Flusstests werden nach dem Durchlauf der drei Lösungen in einem Lateral-Flow-Reader gemessen, um die Intensität der Linien besser vergleichen zu können. Die Ergebnisse des lateralen Flusstest-Systems müsste, ähnlich wie bei Moyano et al. [Moy2019], einen antiproportionalen Verlauf anzeigen, da durch die steigende Histamin-Konzentration in der Probe ein Großteil der Antikörper an dieses gebunden ist und nicht an das Histamin auf der Testlinie binden konnte. Dieses wurde anschließend durch Ceroxid-Nanopartikel und TMB farblich gekennzeichnet (siehe Abbildung 44). Nach den ersten Versuchen stellte sich allerdings heraus, dass sich Histamin, wie bei der elektrochemischen Messung, nicht eindeutig nachweisen lässt und die Erstellung einer Kalibrierkurve nicht möglich war, da die Testlinie unabhängig von der vorhandenen Histamin-Konzentration der Probe sichtbar war. Die Erwartungen und Erfahrungen von Moyano et al. zeigten, dass die Intensität der Linie mit steigender Analyt-Konzentration abnimmt. Deshalb wurden weitere Versuche in einem Eppendorf-Tube unternommen. Dabei wurde festgestellt, dass der Farbumschlag des TMBs bereits durch die Anwesenheit von Histamin erfolgte. Dies stellt ein Problem im Versuchsaufbau dar. Das Histamin war bereits auf dem Teststreifen immobilisiert, somit erfolgte die Reaktion des TMBs unabhängig von den gebundenen Ceroxid-Nanopartikeln am Teststreifen. Die Umsetzung des TMBs am Teststreifen wird außerdem durch die geringere Intensität des Kontrollstreifens deutlich, hier liegt die Vermutung nahe, dass der Großteil des TMBs bereits am Teststreifen umgesetzt wurde und nicht bis zum Kontrollstreifen gelangte. In Abbildung 49 ist dieses Problem graphisch dargestellt.

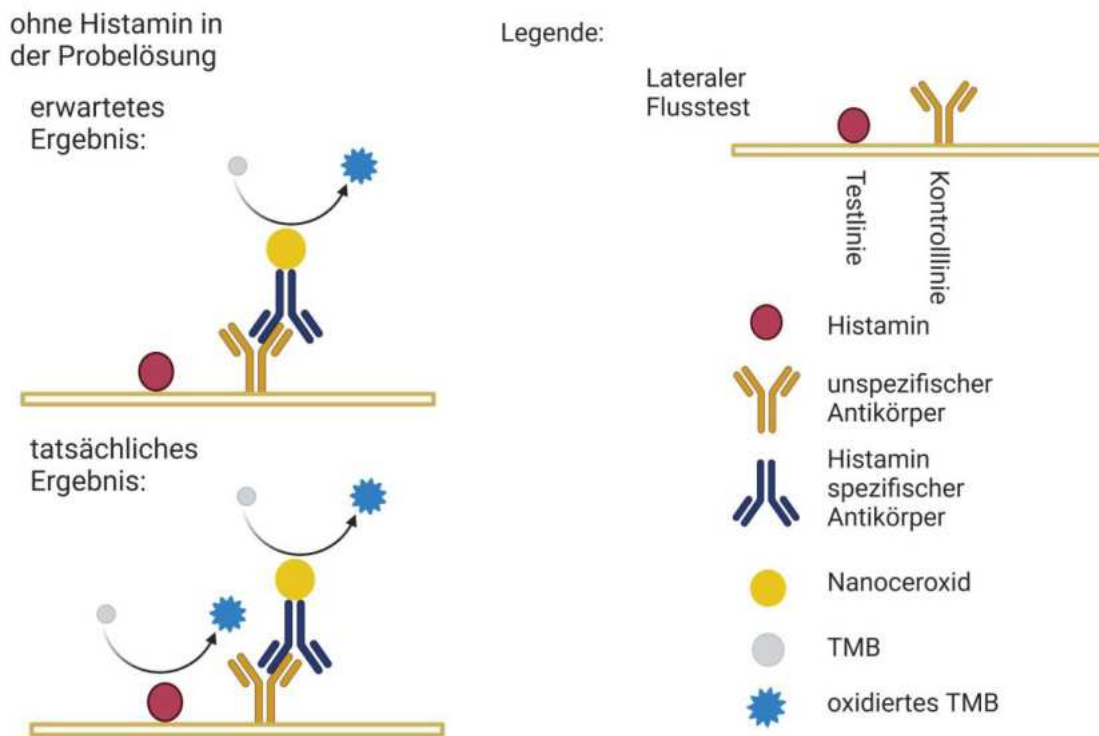


Abbildung 49: Graphische Darstellung des Problems am lateralen Flusstest zum Nachweis von Histamin in der Probelösung. (Die Graphik wurde mit BioRender.com erstellt.)

In Abbildung 50 ist eine mögliche Erklärung des Ablaufs am Teststreifen dargestellt. Durch den Kontakt mit Ceroxid reagiert das Histamin unter anderem zu Wasserstoffperoxid, was im anderen Sensorsystem gemessen werden sollte. Das entstandene Wasserstoffperoxid am Teststreifen soll in Folge des Versuches mit TMB reagieren und einen Farbumschlag, in diesem Fall die Sichtbarkeit der Linie, erzeugen. Bei der Umsetzung des TMBs wird Sauerstoff frei, welcher im hier beschriebenen Fall für eine weitere Umsetzung des Histamins verantwortlich sein könnte, sodass hier eine Kettenreaktion entsteht. Das Histamin produziert mit Hilfe von Ceroxid Wasserstoffperoxid, welches dann mittels TMB wieder Sauerstoff produziert, der zur Umsetzung von Histamin benötigt wird. Für diese Hypothese konnten allerdings in der Literatur keine Belege gefunden werden. Der Nachweis der Reaktion von Histamin und Ceroxid lässt sich mit den gegebenen Analysemethoden bislang nicht durchführen und so kann nur die Hypothese aufgestellt werden, dass das Ceroxid als Katalysator zur Umsetzung des Histamins wirkt und Wasserstoffperoxid freigesetzt wird,

welches den Farbumschlag des TMBs herbeiführt. Der Einfluss der Histamin-Menge auf die Farbintensität ist in Abbildung 38 dargestellt.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Histamin eine unterstützende Wirkung auf die oxidaseähnliche Aktivität der Ceroxid-Nanopartikel hat.

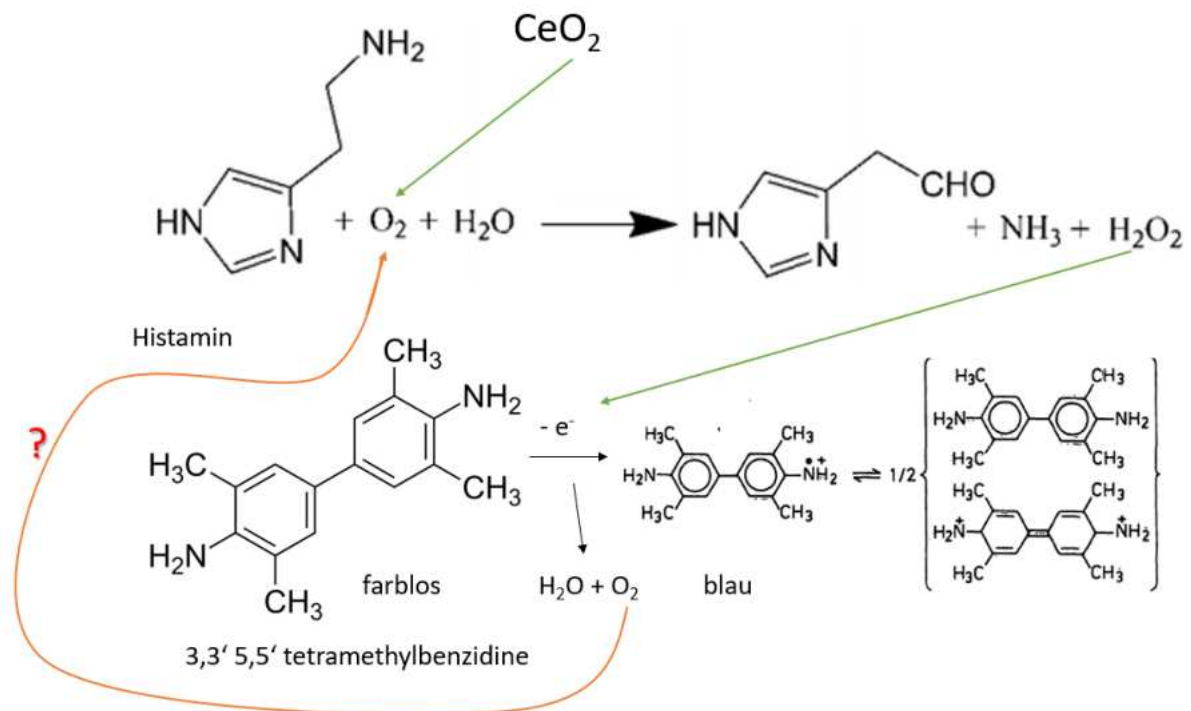


Abbildung 50: Mögliche Erklärung des Problems mit TMB, durch Histamin und CeO₂ in der Lösung.

Als Fazit aus den Versuchen zur Anwendung von Ceroxid-Nanopartikeln im kolorimetrischen Sensor lässt sich außerdem ziehen, dass neben den Problemen mit Histamin der Aufwand einer Messung des lateralen Flusstests mit Gold-Nanopartikeln deutlich geringer ist, da nur ein Durchlauf erfolgen muss und nicht, wie bei Ceroxid, drei. Allerdings kann das Gold, im Gegensatz zum Ceroxid, nicht das Enzym ersetzen, sodass eine Kombination aus beiden Verfahren möglicherweise den Lateralen Flusstest um einen Arbeitsschritt reduzieren und beständiger machen könnte. Dies könnte thematisch in weiteren wissenschaftlichen Arbeiten untersucht werden.

Allerdings zeigen die Ergebnisse aus Abbildung 44, dass eine Kombination aus Histamin und Ceroxid-Nanopartikeln als Peroxidase für das TMB eingesetzt werden kann. Mittels des Histamins und der Ceroxid-Nanopartikel erfolgt ein

schnellerer und intensiverer Farbumschlag des TMBs zu blau als mit Ceroxid-Nanopartikeln alleine. So kann in einem Vergleichstest von Probe und Blank festgestellt werden, ob Histamin in der Probe vorliegt. Somit wäre der kolorimetrische Nachweis von Histamin zwar nicht in dem vorgesehenen System eines lateralen Flusstests möglich, könnte aber dennoch durchgeführt werden.

Die Erwartungen an die ausgewählten Sensorsysteme zum Nachweis von Histamin mittels Ceroxid-Nanopartikeln sind nicht erfüllt worden. Die im MJR kontinuierlich hergestellten Ceroxid-Nanopartikel lassen sich dennoch für den Nachweis von biochemischen Stoffen, im elektrochemischen Sensor für den Nachweis von Wasserstoffperoxid und Glukose sowie als kolorimetrischer Nachweis von Histamin mittels TMB einsetzen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Überführung einer Ceroxid-Nanopartikel-Synthese in den kontinuierlichen Herstellungsprozess durch einen Mikro-Jet-Reaktor war erfolgreich. Im Laufe der Arbeit wurden zwei verschiedene Synthesemethoden (Mikroemulsionssynthese und Fällungssynthese) durchgeführt, welche beide Ceroxid-Nanopartikel hervorbrachten. Dabei wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal eine kontinuierliche Mikroemulsionssynthese von Ceroxid-Nanopartikeln durchgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Nanopartikel aus Ceroxid kontinuierlich in einem Mikro-Jet-Reaktor herzustellen und mit diesem Material Histamin zu detektieren. Sowohl die kontinuierliche Herstellung als auch die Anwendung von Ceroxid-Nanopartikeln ist gelungen. Für die spätere indikatorische Anwendung der Ceroxid-Nanopartikel hat sich die Synthesemethode der Mikroemulsion als geeignet herausgestellt, da diese nach der Herstellung im MJR und einigen Waschschritten direkt als Dispersion verwendbar ist. Ein zwischengeschalteter Trocknungs- und Kalzinierungsprozess hingegen führt zu Aggregationen und damit inhomogenen Dispersionen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass AHC kein geeignetes Fällungsmittel für Ceroxid-Nanopartikel ist. Die Verwendung von Ammoniumhydroxid hingegen zeigt, dass eine Fällungs- und Mikroemulsionssynthese für die Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln deutlich geeigneter ist. Allerdings werden bei der Fällungssynthese deutlich größere Nanopartikel hergestellt als bei der Mikroemulsionssynthese. Die kleineren Nanopartikel sind für die Anwendung des Ceroxides in der Biosensorik geeigneter, da die spezifische Oberfläche der Partikel größer ist und sie somit reaktiver sind.

Der Nachweis von Histamin mittels Ceroxid-Nanopartikeln und des Farbstoffes TMB ist gelungen, da die Oxidation und damit der Farbumschlag des TMBs unter Zugabe von Histamin und Ceroxid-Nanopartikeln schneller eintritt als ohne Histamin, woraus sich prinzipiell die Anwesenheit von Histamin in der Probe bestimmen lässt. Die Anwendung von Ceroxid-Nanopartikeln in einem elektrochemischen Sensor war erfolgreich, da mithilfe von mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichteten Elektroden der Nachweis von Wasserstoffperoxid und Glukose erbracht werden konnte.

Auf Grund von äußeren Einflüssen, wie Temperatur und Luftdruck, kann sich die Geschwindigkeit der Elektronenreaktion verändern. Somit haben Messungen im Sommer bei $T \geq 30 \text{ }^\circ\text{C}$ im Labor andere Ergebnisse erzielt als Versuche zu einem späteren Zeitpunkt bei Außentemperaturen von $T \sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Stabilität der Elektroden, Lösungen und Messapparaturen muss allerdings für die Produktion eines kommerziellen Produktes gewährleistet sein. Hier bedarf es noch einiger Forschung. Zur Verbesserung der Verwendung der siebgedruckten Elektroden wäre es ebenfalls denkbar, die Elektroden selbst herzustellen und dabei die Kohlenstoff-Arbeits Elektrode schon während des Drucks mit Ceroxid-Nanopartikeln zu versehen, um die gleichmäßige Verteilung der Partikel auf der Oberfläche der Elektrode zu verbessern. Außerdem ist es denkbar, die Anwendung auf weitere Biomoleküle auszuweiten.

Ein evidenzbasiertes Arbeiten war auf Grund von pandemischen Einschränkungen nicht in Gänze möglich. So konnten Effekte zwischen Analyt und Ceroxid-Nanopartikel nicht wie ursprünglich geplant während des Herstellungsprozesses der Nanopartikel überprüft werden, sondern wurden erst gemessen, als der Herstellungsprozess schon abgeschlossen war. Somit ergaben sich für diese Promotion zwei Teilprojekte, die Herstellung von Ceroxid-Nanopartikeln und deren Anwendung in einem elektrochemischen und einem kolorimetrischen Biosensor.

7 Literaturverzeichnis

- [Amo2017] Amor-Gutiérrez, O., u. a. Bioelectroanalysis in a Drop: Construction of a Glucose Biosensor. *Journal of Chemical Education*, 2017 94, 6.
- [Ani2011] Anis-ur-Rehman, M.; Abdullah, A.: Synthesis and Structural Properties of Ce(OH)₃ for Useful Applications. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 2011 24, 1-2.
- [Asa2009] Asati, A., u. a. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2009 48, 13.
- [Atk2006] Peter W. Atkins, Julio de Paula: *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [Bab2015] K.K. Babitha, A. Sreedevi, K.P. Pryanka, B. Sabu & T. Carghese: Structural characterization and optical studies of CeO₂ NP synthesized by chemical precipitation. *Indian Journal of Pure & Applied Physics*, 2015 53.
- [Bet2014] Betke, A.; Kickelbick, G.: Bottom-Up, Wet Chemical Technique for the Continuous Synthesis of Inorganic Nanoparticles. *Inorganics*, 2014 2, 1.
- [Bis2011] Biscay, J., u. a. Enzymatic Sensor Using Mediator-Screen-Printed Carbon Electrodes. *Electroanalysis*, 2011 23, 1.
- [BMB2019] BMBF, R. S.: Nanopartikel – eine Gefahr für unser Gehirn? <https://www.bmbf.de/bmbf/shareddocs/interviews/de/nanopartikel.html>, 09.08.2022.
- [Cal2019] Calvache-Muñoz, J., u. a. Structural and Optical Properties of CeO₂ Nanoparticles Synthesized by Modified Polymer Complex Method. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 2019 29, 3.

- [Cha2017] Charbgoon, F., u. a. Bio-sensing applications of cerium oxide nanoparticles: Advantages and disadvantages. *Biosensors & bioelectronics*, 2017 96.
- [Cho2010] Cho, M.-Y., u. a. Control of particle size and shape of precursors for ceria using ammonium carbonate as a precipitant. *Materials Letters*, 2010 64, 3.
- [Cul2020] M. E. Culica, A. L. Chibac-Scutaru, V. Melinte and S. Coseri: Cellulose Acetate Incorporating Organically Functionalized CeO₂ NPs: Efficient Materials for UV Filtering Applications. *MDPI materials*, 2020.
- [Dah2015] Dahle, J. T.; Arai, Y.: Environmental geochemistry of cerium: applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles. *International journal of environmental research and public health*, 2015 12, 2.
- [Dai2014] Dai, Q., u. a. Template-free and non-hydrothermal synthesis of CeO₂ nanosheets via a facile aqueous-phase precipitation route with catalytic oxidation properties. *CrystEngComm*, 2014 16, 42.
- [Dit2011] Dittert, B., u. a. Phase content controlled TiO₂ nanoparticles using the MicroJetReactor technology. *Journal of the European Ceramic Society*, 2011 31, 14.
- [Ede2019] Ederer, J., u. a. Mesoporous cerium oxide for fast degradation of aryl organophosphate flame retardant triphenyl phosphate. *RSC Adv*, 2019 9, 55.
- [Fal1995] J. El Fallah, L. Hilaire, M. Roméo, F. Le Normand: Effects of surface treatments, photon and electron impacts on the ceria 3d core level. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 1995 73.
- [Fis2019] Fisher, T. J., u. a. Structure-activity relationship of nanostructured ceria for the catalytic generation of hydroxyl radicals_{sup}. *Nanoscale*, 2019 11, 10.
- [Fis2019] Fisher, T. J., u. a. Structure-activity relationship of nanostructured ceria for the catalytic generation of hydroxyl radicals. *Nanoscale*, 2019 11, 10.

- [Fu2018] Fu, G., u. a. Exploration of Nanoparticle-Mediated Photothermal Effect of TMB-H₂O₂ Colorimetric System and Its Application in a Visual Quantitative Photothermal Immunoassay. *Analytical chemistry*, 2018 90, 9.
- [Gao2015]Gao, Z., u. a. Micromixing efficiency in a T-shaped confined impinging jet reactor. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2015 23, 2.
- [Hes2002]Volker Hessel und Holger Löwe: Mikroverfahrenstechnik: Komponenten – Anlagenkonzeption – Anwenderakzeptanz – Teil 1. *Chemie Ingenieur Technik*, 2002 74.
- [Hie2019] Hiemer, J., u. a. MicroJet Reactor Technology: An Automated, Continuous Approach for Nanoparticle Syntheses. *Chemical Engineering & Technology*, 2019 42, 10.
- [Hir2009] Hirst, S. M., u. a. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2009 5, 24.
- [Imm o.D.]ImmunoChemistry Technologies: HRP Redox Reaction Driven TMB Color Development. <https://www.immunochemistry.com/pages/hrp-redox-reaction-driven-tmb-color-development>, 27.08.2023.
- [IUPAC2019]Gold, V.: The IUPAC Compendium of Chemical Terminology. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC, 2019.
- [Jal2012] Jalilpour, M.: Effect of aging time and calcination temperature on the cerium oxide nanoparticles synthesis via reverse co-precipitation method. *International Journal of the Physical Sciences*, 2012 7, 6.
- [Jan2017] Janoš, P., u. a. Nanocrystalline cerium oxide prepared from a carbonate precursor and its ability to breakdown biologically relevant organophosphates. *Environ. Sci.: Nano*, 2017 4, 6.
- [Jia2012] Xue Jiao, Hongjie Song, Huihui Zhao, Wei Bai, Lichun Zhang and Yi Lv: Well-redispersed ceria nanoparticles: Promising peroxidase mimetics for H₂O₂ and glucose detection. *Analytical Methods*, 2012.

- [Jia2018] Jiang, B., u. a. Standardized assays for determining the catalytic activity and kinetics of peroxidase-like nanozymes. *Nature protocols*, 2018 13, 7.
- [Kah2004] Khan, S. A., u. a. Microfluidic synthesis of colloidal silica. *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids*, 2004 20, 20.
- [Kar2018] Kargozar, S., u. a. Biomedical applications of nanocerium: new roles for an old player. *Nanomedicine (London, England)*, 2018 13, 23.
- [Kim2001] Kim, C.-G.: Green emission from cerium hydroxide layers formed in Si/In/CeO₂/Si structures. *Applied Physics Letters*, 2001 79, 19.
- [Kle2005] Entwicklung eines quantitativen Lateral-Flow-Immunoassay zum Nachweis von Analyten in geringen Konzentrationen: Timo Klewitz, 2005.
- [Koc2016] Koczula, K. M.; Gallotta, A.: Lateral flow assays. *Essays in biochemistry*, 2016 60, 1.
- [Kur2020] Kurzweil, P.: *Angewandte Elektrochemie. Grundlagen, Messtechnik, Elektroanalytik, Energiewandlung, technische Verfahren*. Springer Vieweg, Wiesbaden, 2020.
- [LaM1950] LaMer, V. K.; Dinigar, R. H.: Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society*, 1950 72, 11.
- [LAN2017] Lan, Y.-P., u. a. Nanocerium synthesis in the KCl-LiCl salt system: Crystal formation and properties. *Journal of the American Ceramic Society*, 2017 100, 5.
- [LAN2018] Lan, Y.-P.; Sohn, H. Y.: Nanocerium synthesis in molten KOH-NaOH mixture: Characterization and oxygen vacancy formation. *Ceramics International*, 2018 44, 4.
- [Li2002] Li, J.-G., u. a. Reactive Ceria Nanopowders via Carbonate Precipitation. *Journal of the American Ceramic Society*, 2002 85, 9.
- [Lia2021] Liang, Z., u. a. Single-particle Raman spectroscopy for studying physical and chemical processes of atmospheric particles, 2021.

- [Liu2020] Liu, Y., u. a. Facile All-Optical Method for In Situ Detection of Low Amounts of Ammonia. *iScience*, 2020 23, 11.
- [Löf2008] Löffler: Basiswissen Biochemie. mit Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008.
- [Lup2008] Luppä; Schlebusch Hrsg.: POCT - Patientennahe Labordiagnostik. Springer Medizin, Heidelberg, 2008.
- [Mai2006] Laura Maintz, Thomas Bieber, Natalija Novak: Die verschiedenen Gesichter der Histaminintoleranz. *Deutsches Ärzteblatt*, 2006.
- [Mor2021] Moreno-Arribas, M. V., u. a. Biogenic amines and the winemaking process. In (Reynolds, A. G. Hrsg.): *Managing Wine Quality: Volume 2: Oenology and Wine Quality*. Woodhead Publishing, 2021; S. 595–627.
- [Moy2019] Amanda Moyano, u. a. Magnetic immunochromatographic test for histamine detection in wine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2019.
- [Muh2014] Muhammad, F., u. a. Intracellular antioxidants dissolve man-made antioxidant nanoparticles: using redox vulnerability of nanoceria to develop a responsive drug delivery system. *ACS applied materials & interfaces*, 2014 6, 21.
- [Nat2005] Natile, M. M., u. a. Properties and Reactivity of Nanostructured CeO₂ Powders: Comparison among Two Synthesis Procedures. *Chemistry of Materials*, 2005 17, 25.
- [Ode2019] Odenwald, C.; Kickelbick, G.: Additive-free continuous synthesis of silica and ORMOSIL micro- and nanoparticles applying a microjet reactor. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2019 89, 1.
- [Pal2012] Palanisamy, B.; Paul, B.: Continuous flow synthesis of ceria nanoparticles using static T-mixers. *Chemical Engineering Science*, 2012 78.
- [Pat2012] Patil, D., u. a. Enzymatic glucose biosensor based on CeO₂ nanorods synthesized by non-isothermal precipitation. *Biosensors & bioelectronics*, 2012 31, 1.

- [Pen2001] Dr. Bernd Penth: New Non - Clogging Microreactor, 2001.
- [Raa2008] C. Raab, M. Simkó, A. Gzásó, U. Fiedeler, N. Nentwich: Was sind synthetische Nanopartikel?, 2008.
- [Raa2008] C. Raab, M. Simkó, U. Fiedeler, N. Nentwich, A. Gzásó: Herstellungsverfahren von Nanopartikeln und Nanomaterialien, 2008.
- [Rah2010] Rahman, M. M., u. a. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2010 10, 5.
- [Raj2021] Raja, I. S., u. a. Development of Two-Dimensional Nanomaterials Based Electrochemical Biosensors on Enhancing the Analysis of Food Toxicants. *International journal of molecular sciences*, 2021 22, 6.
- [Ree2014] Reed, K., u. a. Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom? *Environ. Sci.: Nano*, 2014 1, 5.
- [Rom1993] M. Romeo, K. Bak, J. El Fallah, F. Le Normand and L. Hilaire: XPS Study of the reduction of cerium dioxide. *Surface Characterization Techniques*, 1993, 20.
- [Rüf2009] Rüfer, A., u. a. Kontinuierliche Darstellung von Bariumsulfat-Nanopartikeln im MicroJet -Reaktor. *Chemie Ingenieur Technik*, 2009 81, 12.
- [Sad2020] Sadidi, H., u. a. Cerium Oxide Nanoparticles (Nanoceria): Hopes in Soft Tissue Engineering. *Molecules*, 2020 25, 19.
- [Sai2021] Saifi, M. A., u. a. Nanoceria, the versatile nanoparticles: Promising biomedical applications. *Journal of controlled release official journal of the Controlled Release Society*, 2021 338.
- [Sal2021] Salvador, M., u. a. Microemulsion Synthesis of Superparamagnetic Nanoparticles for Bioapplications. *International journal of molecular sciences*, 2021 22, 1.

- [Sch2010] Andreas Schaefer: Herstellung und Charakterisierung dünner Praseodymoxid-Schichten auf Silizium-Substraten als Modellsystem für die Katalyse und Mikroelektronik, Bremen, 2010.
- [Sho2008] Shoseyov, O.; Levy, I.: NanoBioTechnology. BioInspired Devices and Materials of the Future. Humana Press, Totowa N.J., 2008.
- [Shy1988] J. Z. Shyu, W. H. Weber, and H. S. Gandhi: Surface characterization of alumina-supported ceria. J. Phys. Chem., **[Jahr ermittelt fehlt!]** 1988, 92.
- [Sin2016] Singh, S.: Cerium oxide based nanozymes: Redox phenomenon at biointerfaces. Biointerphases, 2016 11, 4.
- [Str2014] Lubert Stryer, u. a. Biochemie. Springer Spektrum, 2014.
- [Tyr2019] Tyrpekl, V., u. a. Cerium Oxalate Morphotypes: Synthesis and Conversion into Nanocrystalline Oxide. Inorganic chemistry, 2019 58, 15.
- [Vin2019] Vinothkumar, G., u. a. Cerium Phosphate-Cerium Oxide Heterogeneous Composite Nanozymes with Enhanced Peroxidase-Like Biomimetic Activity for Glucose and Hydrogen Peroxide Sensing. Inorganic chemistry, 2019 58, 1.
- [Vol2017] Volk, C., u. a. Synthese und Herstellung von hochreinen Yttriumvanadat-Keramiken für optische Anwendungen. Keramische Zeitschrift, 2017.
- [Wan2015] Wang, L., u. a. Semi-Quantitative Estimation of Ce^{3+}/Ce^{4+} Ratio in YAG: Ce^{3+} Phosphor under Different Sintering Atmosphere. Open Journal of Inorganic Chemistry, 2015 05, 01.
- [Wan2022] Wang, B., u. a. Nanozyme-Based Lateral Flow Immunoassay (LFIA) for Extracellular Vesicle Detection. Biosensors, 2022 12, 7.
- [Win2011] Charles F. Windisch Jr., Vassiliki-Alexandra Glezakou, Paul F. Martin, B. Peter McGrail and Herbert T. Schaefer: Raman spectrum of supercritical $C_{18}O_2$ and re-evaluation of the Fermi resonance. RSC Adv, 2011.

-
- [Wol2016] Wolf, S.; Feldmann, C.: Mikroemulsionen: neue Möglichkeiten zur Erweiterung der Synthese anorganischer Nanopartikel. *Angewandte Chemie*, 2016 128, 51.
- [Won2009] Wong, R.; Tse, H.: *Lateral Flow Immunoassay*. Humana Press, Totowa, NJ, 2009.
- [Wu2006] Wu, K., u. a. Recent Progress in Well-Controlled Synthesis of Ceria-Based Nanocatalysts towards Enhanced Catalytic Performance. *Advanced Energy Materials*, 2016 6, 17.
- [Zha2009] Zhang, Q. L., u. a. Synthesis of Cerium Oxide Nanoparticles by the Precipitation Method. *Materials Science Forum*, 2009 610-613.

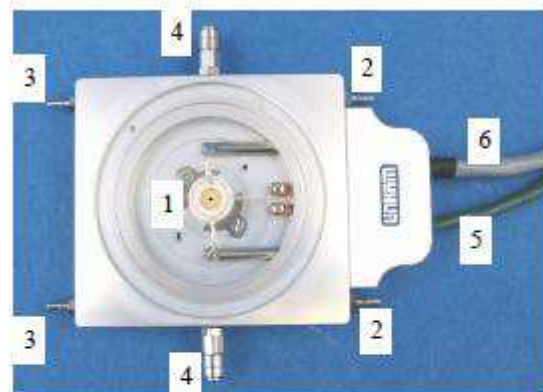
8 Anhang

8.1. Aufbau einer Hochtemperaturkammer von Renishaw

Stage Anatomy

Stage Assembly

1. Ceramic Heating Crucible
2. Water Cooling Connector
3. Bypass Water Cooling Connector
4. Gas Connector
5. Temperature sensor cable
6. Stage Cable



Lid Assembly

The lid is removed by unscrewing it from the stage.

7. Stage Lid
8. Inner Lid
9. Viewing Window (8mm diameter)

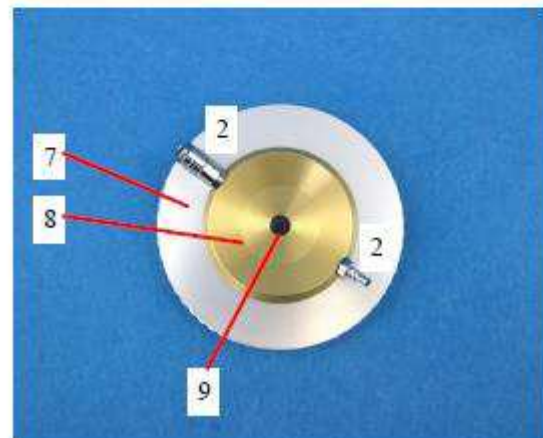


Abbildung 51: Aufbau einer Hochtemperaturkammer von Renishaw aus der Beschreibung des Herstellers.

8.2. Reproduzierbarkeit des elektrochemischen Sensors

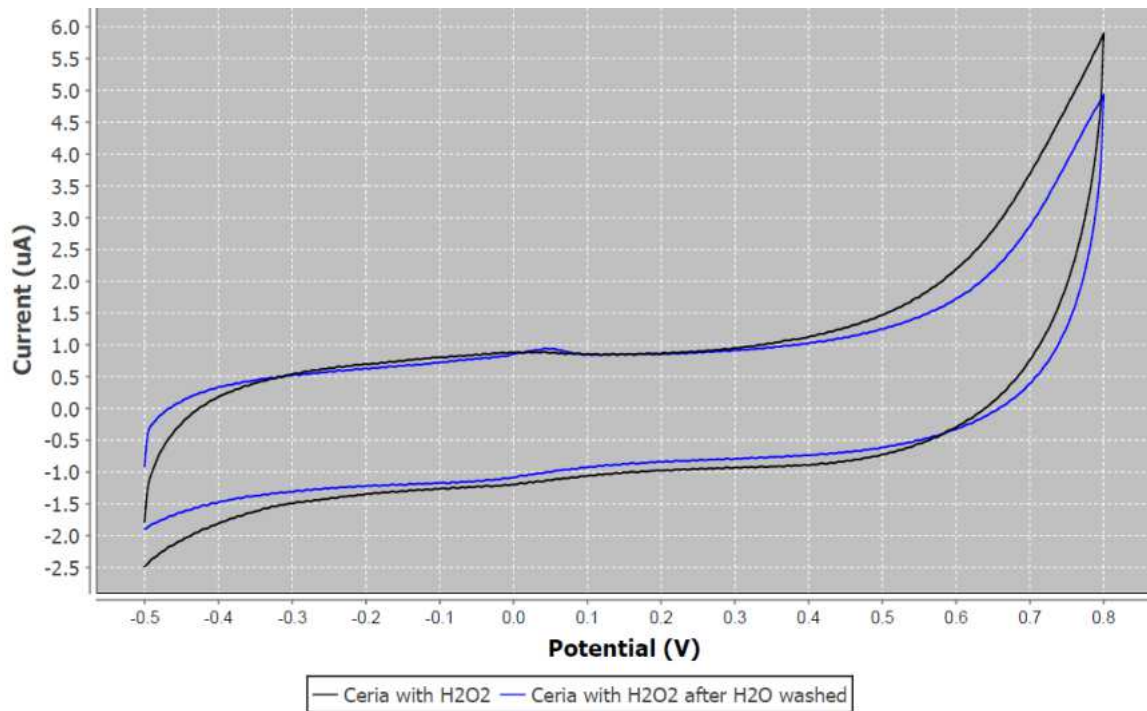


Abbildung 52: Darstellung einer Cyclovoltametrie-Messung mit derselben Elektrode, die mit Ceroxid-Nanopartikeln beschichtet war. Zwischen den beiden Messungen folgte ein Wasch- und Trocknungsschritt. Die schwarze Kurve zeigt die Messung vor und die blaue nach dem Waschschritt.