Etablierung der Magnetpartikelspektroskopie zum Nachweis von Biomolekülen anhand der Quervernetzung mit magnetischen Nanopartikeln

Wissenschaftliche Arbeit zur Erlangung des Grades Bachelor of Engineering (B. Eng.) an der Fakultät für Technik der Hochschule Pforzheim im Wintersemester 2021/22

vorgelegt von Studiengang	Elisa-Marie Lux Medizintechnik
Betreuer	DrIng. Norbert Löwa
	Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin
Erstprüfer	Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Heinen
	Fakultät für Technik, Hochschule Pforzheim
Zweitprüfer	Prof. Dr. rer. nat. Tobias Preckel
	Fakultät für Technik, Hochschule Pforzheim
Abgabetermin	15.01.2022

Inhalt

Eide	sstattlic	he Erklärung	•••••• V			
Kurz	fassung	ζ	vi			
Abst	ract		vii			
Abki	irzungs	verzeichnis	viii			
Forn	nelzeich	enverzeichnis	ix			
1	Einlei	itung	1			
1.1	Stand	der Forschung	2			
1.2	Ziele	der Arbeit	4			
2	Theor	retische Grundlagen	5			
2.1	Magn	etische Nanopartikel	5			
	2.1.1	Aufbau	5			
	2.1.2	Magnetische Eigenschaften	7			
	2.1	.2.1 Magnetische Relaxation	7			
	2.1	2.1.2.2 Verhalten in einem statischen Magnetfeld				
	2.1	.2.3 Verhalten in einem oszillierenden Magnetfeld				
2.2	Messr	Messmethoden				
	2.2.1	MPS				
	2.2.2	NMR-Relaxometrie				
	2.2	2.2.1 Prinzip der Messung	14			
	2.2	2.2.2 Einfluss von MNP	15			
2.3	Nachv	veis von Biomolekülen mit der MPS	16			
	2.3.1	Streptavidin-Biotin-System	16			
	2.3.2	BSA als Quervernetzungssubstanz				
	2.3.3	MPS-Signaländerung	19			
2.4	Immo	bilisierung von MNP mithilfe von D-Mannitol				
3	Mate	rial und Methoden				
3.1	Verwe	endete Materialien				
	3.1.1	MNP-Systeme				
	3.1.2	Geräte und Laborzubehör				
	3.1.3	Reagenzien	25			
3.2	Messr	nethoden				
	3.2.1	MPS				
	3.2.1.1 Ablauf der Messung					
	3.2	2.1.2 Auswertung				
	3.2.2	NMR-Relaxometrie				

3.3	Pipettiermethodik	30
4	Ergebnisse und Diskussion	31
4.1	Unsicherheitsbetrachtung	31
	4.1.1 Ermittlung der Pipettierunsicherheit	32
	4.1.2 Ermittlung des Hintergrundrauschens der MPS	34
4.2	Voruntersuchungen	37
	4.2.1 Ermittlung eines geeigneten MNP-Konzentrationsbereichs	37
	4.2.2 Ermittlung der Sensitivität	40
	4.2.3 Konzentrationsunabhängige Signalparameter	43
	4.2.3.1 <i>A</i> ₅ / <i>A</i> ₃ -Verhältnis	43
	4.2.3.2 Phase der dritten Harmonischen φ_3	44
	4.2.4 Immobilisierung der MNP	46
4.3	Quervernetzung der MNP mit B-BSA	50
	4.3.1 Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion von der	
	Anregungsfeldstärke	50
	4.3.2 Reproduzierbarkeit der Methodik	57
	4.3.3 Abhängigkeit von der Inkubationszeit	59
	4.3.4 Feldabhängige Inkubation	62
4.4	Kontrollexperimente	66
	4.4.1 Abhängigkeit von der Oberflächenfunktionalisierung der MNP	66
	4.4.2 Abhängigkeit von freiem Biotin / Spezifität der Methodik	67
4.5	Leistungsfähigkeit der entwickelten Methodik	70
	4.5.1 Ermittlung der gebundenen Menge BSA	70
	4.5.2 Bestimmung der Sensitivität	71
	4.5.3 Nachweisgrenze der Methodik	71
4.6	NMR als Vergleichsmethode	73
5	Fazit	75
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
5.2	Ausblick	76
Litera	aturverzeichnis	78
Abbil	dungsverzeichnis	82
Tabel	lenverzeichnis	86
Anha	ng A Versuchsdurchführungen	87
A.1	Probenpräparationen	87
A 2	Messskrinte der feldabhängigen Inkubation	95
Anha	ng P A yowartungan	
Anna	ng D Auswertungen	97
B.I	Berechnung der Eisenmasse	97

B.2	Ermittlung des Untergrundsignals der	MPS
-----	--------------------------------------	-----

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, die beiliegende Bachelorthesis selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie alle wörtlich oder sinngemäß übernommenen Stellen in der Arbeit gekennzeichnet zu haben.

Berlin-Charlottenburg, den 14.01.2022

Z. Jox

(Ort und Datum)

(Unterschrift)

Kurzfassung

Mit der Magnetpartikelspektroskopie (MPS) steht ein empfindliches Messverfahren für den spezifischen Nachweis von magnetischen Nanopartikeln (MNP) zur Verfügung. Das Verfahren beruht auf der Detektion der nicht-linearen magnetischen dynamischen Suszeptibilität der MNP und eignet sich neben dem direkten Nachweis der MNP auch zur Untersuchung der biologischen Umgebung der MNP in biomedizinischen Anwendungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das MPS für den Nachweis von Biomolekülen über die Quervernetzung mit MNP untersucht. Als Modellsystem für eine Quervernetzung werden MNP unterschiedlicher Größe eingesetzt, deren organische Hülle mit Streptavidin funktionalisiert ist. Streptavidin ist ein Protein, das spezifisch an Biotin bindet. Des Weiteren wird biotinyliertes BSA (B-BSA) verwendet, das aufgrund mehrerer Biotin-Bindungsstellen die Quervernetzung der MNP ermöglicht. Die spezifische Bindung der Streptavidinmoleküle auf der Oberfläche der MNP an Biotin auf der Oberfläche des BSA führt zu einer Quervernetzung der MNP. Durch die Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers der MNP-Agglomerate resultiert ein verändertes dynamisches Magnetisierungsverhalten, das mit Hilfe der MPS gemessen werden kann. Damit hat der Bindungszustand bzw. der Grad der Quervernetzung der MNP einen Einfluss auf das MPS-Signal.

Zur Etablierung der MPS zum Nachweis des Biomoleküls BSA werden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen zwischen MNP und B-BSA durchgeführt. Hierbei wird die Abhängigkeit, der durch die Quervernetzung induzierten MPS-Signaländerung, von der Anregungsfeldstärke untersucht. Des Weiteren wird der Einfluss der Inkubationszeit der Proben und der Einfluss eines äußeren Feldes während der Inkubation auf den Grad der Quervernetzung untersucht. Aus den Analysen wird die Nachweisgrenze der Methodik, die Menge an gebundenem BSA und die Sensitivität des Nachweises ermittelt. Die Spezifität der Methodik wird anhand eines Kontrollexperiments mit freiem Biotin bestimmt. Zum Vergleich des Nachweises mit bereits etablierten MNPbasierten Verfahren wird die Kernspin-Relaxometrie (NMR-Relaxometrie) herangezogen.

Abstract

Establishment of the magnetic particle spectroscopy for the detection of biomolecules based on crosslinking with magnetic nanoparticles

Magnetic particle spectroscopy (MPS) is a sensitive measurement method for the specific detection of magnetic nanoparticles (MNP). The method is based on the detection of the non-linear magnetic dynamic susceptibility of MNP and is suitable not only for the direct detection of MNP but also for the investigation of the biological environment of MNP in biomedical applications.

In this work, the MPS is investigated for the detection of biomolecules via cross-linking with MNP. MNP of different sizes, whose organic shell is functionalized with streptavidin, are used as a model system for cross-linking. Streptavidin is a protein that binds specifically to biotin. Furthermore, biotinylated BSA (B-BSA) is used, which enables cross-linking of the MNP due to several biotin binding sites. The specific binding of the streptavidin molecules on the surface of the MNP to biotin on the surface of the BSA leads to cross-linking of the MNP. The increase in the hydrodynamic diameter of the MNP agglomerates results in a changed dynamic magnetisation behaviour, which can be measured using the MPS. Thus, the binding state or the degree of cross-linking of the MNP has an influence on the MPS signal.

To establish the MPS for the detection of the biomolecule BSA, series of experiments with different concentration ratios between MNP and B-BSA are carried out. The dependence of the MPS signal change induced by the cross-linking on the excitation field strength is investigated. Furthermore, the influence of the incubation time of the samples and the influence of an external field during incubation on the degree of cross-linking is investigated. From the analyses, the detection limit of the methodology, the amount of bound BSA and the sensitivity of the detection are determined. The specificity of the method is determined by a control experiment with free biotin. Nuclear magnetic resonance (NMR) relaxometry is used to compare the detection with MNP-based methods which are already established.

Abkürzungsverzeichnis

B-BSA	biotinyliertes Bovines Serumalbumin
B-BSA-MNP-Komplex	Komplexbildung der MNP anhand der Quervernetzung mit B-BSA
B-BSA-MNP-Verhältnis	Verhältnis der verwendeten B-BSA-Konzentration zur
	Eisenkonzentration des MNP-Systems in der Probe
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderalbumin)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
GCX	Glykokalyx
MNP	Magnetische Nanopartikel
MPI	Magnetpartikelbildgebung
	engl.: Magnetic Particle Imaging
MPMS	Messsystem für Magnetische Eigenschaften
	engl.: magnetic properties measurement system
MPS	Magnetpartikelspektroskopie
	engl.: Magnetic Particle Spectroscopy
MRT	Magnetresonanztomographie
	engl.: magnetic resonance tomography
MRX	Magnetrelaxometrie
	engl.: Magnetrelaxometry
NMR-Relaxometrie	Kernspin-Relaxometrie
	engl.: Nuclear Magnetic Resonance
PE21	MNP-System Perimag [®] (#21)
PE23	MNP-System Perimag [®] (#23)
РТВ	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
PTB-ID	PTB-interne Identifikationsnummer für das jeweilige
	MNP-System
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung
	engl.: Small-angle X-ray Scattering
SPION	superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel
	engl.: super-paramagnetic iron oxide nanoparticle
SY50	MNP-System Synomag [®] (#050)
SY64	MNP-System Synomag [®] (#064)
VF	Verdünnungsfaktor

Formelzeichenverzeichnis

A_3	Amplitude der dritten Harmonischen
A_3^*	Sensitivität
	(Amplitude der dritten Harmonischen normiert auf die Eisen-
	masse)
A5	Amplitude der fünften Harmonischen
A ₅ /A ₃ -Verhältnis	prozentuales Verhältnis der Amplitude der dritten zu der
	Amplitude der fünften Harmonischen
An	Amplitude der n-ten Harmonischen
В	magnetische Flussdichte
B_0	Statisches Magnetfeld bei der NMR-Relaxometrie
Ba	Amplitude des dynamischen Anregungsfeldes bei der MPS
С	Konzentration
$C_{\text{B-BSA}}$	B-BSA-Konzentration
$c_{\text{B-BSA}}/c_{\text{Fe}}$	B-BSA-MNP-Verhältnis
c_{Biotin}	Biotinkonzentration
CFe	Eisenkonzentration
CZiel	Zielkonzentration
\mathcal{C}_{ZW}	Zwischenkonzentration
d_{hyd}	hydrodynamischer Durchmesser der MNP
d_K	Kerndurchmesser der MNP
f_0	Anregungsfrequenz
Н	magnetische Feldstärke
H_{A}	Amplitude des magnetischen Wechselfeldes
$H_{\rm c}$	Koerzitivfeldstärke
Κ	magnetische Anisotropiekonstante
$k_{\rm B}T_{\rm a}$	thermische Energie
LOD	Detektionslimit, Nachweisgrenze
	engl.: Limit of detection
LOD _{A5}	Nachweisgrenze bezüglich der Amplitude der fünften Harmo-
	nischen
LOD _{B-BSA}	Nachweisgrenze bezüglich der B-BSA-Masse
m	Masse
m _{Biotin}	Biotinmasse
m _{Fe}	Eisenmasse
М	Magnetisierung
$M_{ m BSA}$	molare Masse von BSA
$M_{ m Fe}$	molare Masse von Eisen
$M_{ m r}$	Restmagnetisierung (Remanenz)
$M_{ m S}$	Sättigungsmagnetisierung
n	Drehzahl
Ν	Verdünnungsstufe
pI	Isoelektrischer Punkt

R_2	transversale Relaxationsrate
r_2	transversale Relaxivität
t	Zeit
T_1	longitudinale Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxation)
T_2	transversale Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxation)
$T_{2,M}$	transversale Relaxationszeit der gemessenen Probe
$T_{2,W}$	transversale Relaxationszeit von Wasser
и	Spannung
$u_{ m rel}$	relative Unsicherheit
V	Volumen
$V_{\text{B-BSA}}$	Volumen der B-BSA-Lösung
$V_{\rm BSA}$	Volumen der verwendeten BSA-Lösung
$V_{ m E}$	Endvolumen
V _{E,Überstand}	Endvolumen nach dem Abpipettieren des Überstandes
$V_{ m Hyd}$	hydrodynamisches Volumen der MNP
$V_{\rm K}$	Kernvolumen des MNP
V_{\max}	maximales Volumen
V _{MNP}	Volumen der MNP-Lösung
V _{NaOH}	Volumen der 0,1 M NaOH-Lösung
V_{Probe}	Probenvolumen
$V_{ m Ziel}$	Zielvolumen
γ	gyromagnetisches Verhältnis (NMR-Relaxometrie)
η	dynamische Viskosität
λ	Wellenlänge
μ	magnetisches Dipolmoment
σ	Standardabweichung
$ au_{ m B}$	Brown-Relaxationszeit
τ _N	Nèel-Relaxationszeit
φ_3	Phase der dritten Harmonischen
ω_0	Winkelfrequenz
ωL	Lamorfrequenz (NMR-Relaxometrie)

1 Einleitung

Magnetische Nanopartikel (MNP) sind aufgrund ihres besonderen Magnetismus für vielfältige technische Einsatzgebiete attraktiv [1]. Neben technischen Anwendungen wie z.B. zur magnetischen Datenspeicherung [2] oder der Wasseraufbereitung [3] finden sie vor allem in der medizinischen Diagnostik und Therapie Anwendung. MNP sind bereits als Kontrastmittel für die medizinische Bildgebung auf der Grundlage der Magnetresonanztomographie (MRT) zugelassen worden. Des Weiteren können MNP zur magnetischen Separation von Biomolekülen und Zellen sowie zur gezielten lokalen Anreicherung von Arzneimitteln eingesetzt werden [4] [5]. An weiteren Einsatzmöglichkeiten von MNP in der Biomedizin wird aktuell intensiv geforscht [6].

Eine neuartige Bildgebungsmethode, die Magnetpartikelbildgebung (MPI), nutzt MNP als signalgebende Sonden (sog. Tracer), deren Verteilung durch eine dynamische Magnetisierungsmessung erfasst wird [4]. Die lokale Konzentration der MNP im Körper lässt sich dreidimensional mit einer hohen zeitlichen Auflösung darstellen [4]. Hierbei wird das zu untersuchende Medium einem sinusförmigen Anregungsfeld ausgesetzt. Die gemessene Magnetisierungsantwort der MNP enthält aufgrund des nichtlinearen Magnetisierungsverhalten der MNP höhere Harmonische, die für jedes MNP-System einzigartig sind. Die höheren Harmonischen werden für die Bildrekonstruktion in der MPI verwendet. Mithilfe eines Gradientenfeldes wird das gesamte Bildgebungsvolumen abgetastet, sodass durch das erzeugte MPI-Signal ein Bild rekonstruiert werden kann. Das MPI-Signal ist vom dynamischen Magnetisierungsverhalten der MNP sowie von der vorhandenen MNP-Menge abhängig. Zusätzlich bestimmen lokale Umgebungsbedingungen der MNP, wie z.B. der MNP-Bindungszustand, das dynamische Magnetisierungsverhalten und damit auch das MPI-Signal der MNP [1].

Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, inwieweit die Magnetpartikelspektroskopie (MPS) zum Nachweis der Bindung von MNP an biotinyliertes Rinder-Albumin (B-BSA) geeignet ist. Die MPS basiert auf dem gleichen physikalischen Prinzip wie die MPI. Im Wesentlichen handelt es sich bei der MPS um einen MPI-Scanner ohne räumliche Kodierung. Sie eignet sich zur schnellen und hochempfindlichen Charakterisierung von MNP-Proben [4]. Aus dem MPS-Signal der MNP-Proben kann die Eignung der MNP als MPI-Tracer abgeleitet werden. Neben dem direkten Nachweis der MNP eignet sich die MPS auch zur Untersuchung der biologischen Umgebung der MNP in biomedizinischen Anwendungen [1].

In dieser Arbeit werden MNP mit unterschiedlichen hydrodynamischen Durchmessern verwendet, deren organische Dextran-Hülle mit Streptavidin funktionalisiert ist. Streptavidin ist ein Protein, das nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip spezifisch an Biotin bindet. Durch die Verwendung B-BSA ist es möglich, eine Quervernetzung der Streptavidinfunktionalisierten MNP und dem B-BSA hervorzurufen (siehe Abschnitt 2.3). Die Ausbildung der Quervernetzung von MNP hat ein verändertes MPS-Signal zur Folge (siehe Abschnitt 2.3.3). Durch die Änderung des MPS-Signals ist es möglich, das Vorhandensein von B-BSA in einer Probe über die Quervernetzung mit MNP zu untersuchen.

In diesem Abschnitt wird zuerst auf den aktuellen Stand der Forschung bezüglich des Nachweises der Quervernetzung von Streptavidin-funktionalisierten MNP mit B-BSA eingegangen. Anschließend wird die Zielsetzung dieser Arbeit konkretisiert.

1.1 Stand der Forschung

Diese Arbeit baut auf den bisherigen Erkenntnissen bezüglich der Quervernetzungsreaktion von Streptavidin-funktionalisierten MNP mit B-BSA von Heim [7] auf. Heim untersuchte im Rahmen seiner Dissertation neben der Quervernetzung mit B-BSA zudem die Bindung von Streptavidin-funktionalisierten MNP an biotinylierte Agarose-Beads. Der Nachweis der Quervernetzung mit B-BSA und die Bindung an biotinylierte Agarose-Beads erfolgte mithilfe der Magnetrelaxometrie (MRX), die auf der Messung der Relaxationszeit der MNP basiert. B-BSA ist mit einem Durchmesser von d = 6 nm um einiges kleiner als die verwendeten MNP [7]. Durch die geringe Größe von B-BSA können sich die MNP trotz der Quervernetzung als Ganzes mit dem angelegten Magnetfeld ausrichten (Brown-Relaxation). Durch die Bindung an die Agarose-Beads nimmt die Brown-Relaxationszeit aufgrund des erheblichen hydrodynamischen Durchmessers des Komplexes drastisch zu, sodass die kürzere Neél-Relaxationszeit dominiert. Der Relaxationsmechanismus der MNP ist dementsprechend von der Größe der Bindungspartner abhängig. Im Folgenden wird auf den Nachweis der Quervernetzung der MNP mit B-BSA von Heim [7] eingegangen.

Für die Untersuchung der Quervernetzungsreaktion wurden neun Proben mit einer B-BSA-Konzentrationen von 14 µmol/L bis 71 µmol/L hergestellt. Als magnetischer Marker wurde das MNP-System fluidMAG/BC-streptavidin der Firma *chemicell GmbH* mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 100$ nm verwendet. Die Proben wurden nach der Präparation für 8 h bei 20°C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung der Proben wurden diese durch mehrmaliges Wenden der Probengefäße nochmals gemischt. In Abbildung 1 ist die Entwicklung der B-BSA-MNP-Komplexgröße in Abhängigkeit von der B-BSA-Konzentration dargestellt [7].



Abbildung 1: Entwicklung der B-BSA-MNP-Komplexgröße in Abhängigkeit von der B-BSA-Konzentration. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis der Fläche unter der Relaxationskurve bezogen auf die Fläche unter der immobilisierten Referenzprobe aufgetragen [7].

Das Maximum der Quervernetzungskurve bildet sich bei einer B-BSA-Konzentration von 28,3 µmol/L aus (siehe Abbildung 1). Der Verlauf der Quervernetzungskurve entspricht der Heidelberger Kurve [7] [8]. Die Heidelberger Kurve ist durch die Entstehung von größeren Komplexen mit zunehmender Analytkonzentration bei Markerüberschuss gekennzeichnet [7]. In der Arbeit von Heim wird die B-BSA-Konzentration bei gleichbleibender MNP-Konzentration erhöht. Bei MNP-Überschuss bilden sich mit zunehmender B-BSA-Konzentration größere B-BSA-MNP-Komplexe aus. Im Äquivalenzbereich ist die größte Komplexgröße erreicht. Nimmt die B-BSA-Konzentration weiter zu, verkleinert sich die Komplexgröße wieder [7].

Heim verwendete in seiner Arbeit eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0,42 \text{ mg/mL}$. Durch die Kenntnis der Eisenkonzentration kann das B-BSA-MNP-Verhältnis berechnet werden, das in Tabelle 1 dargestellt ist. Diese dienen als Richtgröße für die Durchführung von Quervernetzungsexperimenten mit anderen MNP-Systemen.

B-BSA-Konzentration		Eisenkonzentration	Probenvolumen	B-BSA-MNP-Verhältnis
CB-BSA	CB-BSA	СFe	V_{Probe}	CB-BSA/CFe
[µmol/L]	[mg/mL]	[mg/mL]	[µL]	[-]
14	0,9	0,42	150	2,1
21,16	1,4	0,42	150	3,3
28,33	1,9	0,42	150	4,5
35,49	2,3	0,42	150	5,5
42,65	2,8	0,42	150	6,6
49,81	3,3	0,42	150	7,9

58,98	3,8	0,42	150	9,1
64,14	4,2	0,42	150	10,0
71,3	4,7	0,42	150	11,2

Tabelle 1: Berechnung des B-BSA-MNP-Verhältnisses, das in [7] angewendet wurde. Zur Umrechnung der B-BSA-Konzentration in [mg/mL] kann die Molare Masse des biotinylierten BSA aufgrund der geringen Masse von Biotin mit der Molaren Masse von BSA $(M_{BSA} = 6,6 \cdot 10^4 \text{ g/mol})$ gleichgesetzt werden.

Im Maximum der Quervernetzungsreaktion liegt ein B-BSA-MNP-Verhältnis von vier vor (siehe Tabelle 1). Die Ergebnisse von Heim [7] werden bei der Planung der Quervernetzungsexperimente, die im Rahmen dieser Bachelorarbeit mit den MNP-Systemen Synomag[®] (SY50 und SY64) und Perimag[®] (PE23) der Firma *micromod Partikeltechnologie GmbH*, durchgeführt werden, berücksichtigt.

1.2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit soll der Nachweis von Biomolekülen über die Quervernetzung mit MNP mit Hilfe der MPS untersucht und etabliert werden. Als Modellsystem werden hierfür analog zu [7] MNP-Systeme eingesetzt, die mit Streptavidin beschichtet sind. Die verwendeten MNP-Systeme sind kommerziell verfügbar und haben einen hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 50$ nm (SY50), $d_{hyd} = 70$ nm (SY64) und $d_{hyd} = 130$ nm (PE23). Die spezifische Bindung von MNP mit Streptavidin-Funktionalisierung an biotinyliertes BSA führt über die Quervernetzung zu einer Agglomeration der MNP. Die damit verbundene Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers der MNP-Agglomerate hat ein verändertes dynamisches Magnetisierungsverhalten der MNP zur Folge. Damit ändert sich auch das MPS-Signal der MNP-Komplexe. Die Änderung des MPS-Signals wird für unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse zwischen MNP und B-BSA untersucht. Es soll die Menge an gebundenem BSA, die Sensitivität und die Spezifität des Nachweises ermittelt werden.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen für das Verständnis dieser Arbeit geschaffen. Der erste Abschnitt beinhaltet den Aufbau von MNP und deren magnetische Eigenschaften. Darauf aufbauend wird das Verhalten von MNP in einem oszillierenden Magnetfeld beschrieben, das die Grundlage für die magnetische Charakterisierung von MNP mit der MPS bildet.

Im Zuge dessen werden die Messprinzipien der MPS und der NMR-Relaxometrie beschrieben, die zur Untersuchung der Quervernetzung von MNP mit B-BSA herangezogen werden.

Des Weiteren werden die biochemischen Grundlagen zum Verständnis der Quervernetzungsreaktion zwischen Streptavidin-beschichteten MNP und B-BSA thematisiert. Zuletzt wird auf die Immobilisierung von MNP mithilfe von Mannitol eingegangen.

2.1 Magnetische Nanopartikel

Im Folgenden wird auf den Aufbau und das magnetische Verhalten der in dieser Arbeit verwendeten MNP-Systeme eingegangen. Hierbei wird zwischen dem magnetischen Verhalten der MNP in einem statischen und in einem oszillierenden äußeren Magnetfeld unterschieden.

2.1.1 Aufbau

MNP bestehen aus einem magnetischen Kern und einer nichtmagnetischen Hülle aus Polysacchariden, wie z.B. Dextran. Die Namensgebung beruht auf dem geringen Durchmesser der MNP, der typischerweise nur wenige Nanometer beträgt. MNP werden aufgrund der physikalischen Eigenschaften oftmals als superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (SPION) bezeichnet [9]. Aufgrund der weitreichenden Einsatzgebiete – unter anderem in der Medizin und Bioanalytik – ist neben den magnetischen Eigenschaften zudem der Aufbau und die Größe der Partikel von Bedeutung [10]. Die Partikelgröße ist entscheidend für das magnetische Verhalten der MNP. Zudem bestimmt das Verhältnis von der organischen Hülle zum magnetischen Kern maßgeblich die magnetischen Eigenschaften in einem äußeren Magnetfeld [11].

Der magnetische Kern der innerhalb dieser Arbeit verwendeten MNP-Systeme besteht aus Magnetit¹ (Fe_2O_4). Magnetit ist ein Eisenoxid, das im nanoskaligen Bereich bereits bei Raumtemperatur zu Maghemit¹ ($\gamma - Fe_2O_3$) reagiert [11] [12]. Beide Eisenoxide sind ferromagnetisch. Da die enthaltenen Sauerstoffatome keine ungepaarten Elektronen besitzen, tragen sie nicht zum magnetischen Moment bei. Im Gegensatz zu anderen

¹ Magnetit und Maghemit unterscheiden sich durch die Anzahl der Elektronen der äußeren Atomhülle des Eisenions [14].

Metallen bieten Eisenoxide den Vorteil, aufgrund der guten Biokompatibilität nach dem Abbau in das Eisen-Reservoir des Körpers aufgenommen zu werden [12]. Die organische Hülle der MNP verursacht, dass die MNP langsamer abgebaut werden. Zudem wird die Wahrscheinlichkeit der Agglomeration der MNP aufgrund des Abstands der Kerne zueinander verringert [11].

Durch unterschiedliche Syntheseverfahren [13] können Einkern- oder Multikern-MNP hergestellt werden. Multikern-MNP können beabsichtigt durch spezielle Syntheseverfahren oder unbeabsichtigt durch Agglomeration der MNP in Lösung entstehen. Die Multikern-MNP bestehen dabei aus mehreren umhüllten Kernpartikeln, die von einer gemeinsamen Hülle umschlossen werden [12]. In dieser Arbeit werden synthetisierte Multikern-MNP der Firma *micromod Partikeltechnologie GmbH* mit den hydrodynamischen Durchmessern von $d_{hyd} = 50$ nm, $d_{hyd} = 70$ nm und $d_{hyd} = 130$ nm verwendet [12].

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MNP bestehen aus einem Maghemit-Multikern, der von einer organischen Dextran-Hülle umgeben ist (siehe Abbildung 2). Zudem sind die MNP mit Streptavidin funktionalisiert. Durch die Funktionalisierung der MNP mit Streptavidin wird die spezifische Bindung der MNP an Biotin ermöglicht.



Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Multikern-MNP mit organischer Dextran-Hülle und Streptavidin-Funktionalisierung auf der Oberfläche mit dem hydrodynamischen Durchmesser d_{hyd} . Das MNP-System besteht aus mehreren Kernen mit dem Gesamtdurchmesser d_k und einer organischen Dextran-Hülle.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, werden die Eisenoxidkerne mit einer organischen Hülle versehen, sodass die MNP nicht agglomerieren. Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten MNP wurden mit Dextran beschichtet. Dextrine bestehen aus Monosacchariden, die mittels glykosidischer Bindungen miteinander verknüpft sind. Aufgrund der einfachen Herstellung, der sehr guten Biokompatibilität und der biologischen Abbaubarkeit von Dextrinen eignen sie sich hervorragend zur Beschichtung von MNP [14].

2.1.2 Magnetische Eigenschaften

In diesem Abschnitt werden die magnetischen Eigenschaften der MNP thematisiert. Hierfür werden zunächst die magnetischen Relaxationsmechanismen beschrieben. Anschließend wird auf das das Verhalten von MNP in einem statischen und in einem oszillierenden Magnetfeld eingegangen.

2.1.2.1 Magnetische Relaxation

Die atomaren magnetischen Momente sind aufgrund des geringen Kerndurchmessers der MNP miteinander gekoppelt und wirken nach außen wie ein einziges großes magnetisches Moment μ [4]. Bei Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes *B* auf die MNP, ändert sich die Richtung der Magnetisierung der MNP in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit der Magnetfeldänderung des angelegten Feldes *B*. Die Richtung der Magnetisierung der MNP kann sich durch zwei unterschiedliche Prinzipien ändern. Zum einen führt die Brown-Relaxation zur Rotation des gesamten Partikels, während sich bei der Néel-Relaxation die Magnetisierungsrichtung im Kern der MNP ändert [14]. In Abbildung 3 sind die Relaxationsmechanismen schematisch dargestellt.



Abbildung 3: Schematische Darstellung des (a) Brown- und (b) Néel-Relaxationsmechanismus, nach denen sich die magnetischen Momente μ der MNP in einem äußeren Magnetfeld *B* ausrichten. (Quelle: Darstellung nach [15])

Durch die folgende Formel kann die Brown-Relaxationszeit τ_B berechnet werden:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_{Hyd}}{k_B T_a} \tag{1}$$

Dabei entspricht V_{Hyd} dem hydrodynamischen Volumen der MNP und η der dynamischen Viskosität des Mediums. Der Ausdruck $k_{\text{B}}T_{a}$ entspricht der thermischen Energie.

Im Gegensatz zur Brown-Relaxation hängt die Néel-Relaxation von dem Kernvolumen der MNP ab. Die Néel-Relaxation führt zu einer Ummagnetisierung der magnetischen Momente im Eisenkern ohne geometrische Rotation des MNP (siehe Abbildung 3b)). Die Néel-Relaxationszeit τ_N kann durch die Formel

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV_K}{k_B T_a}\right) \tag{2}$$

bestimmt werden. Durch Multiplikation der magnetischen Anisotropiekonstante K mit dem Kernvolumen $V_{\rm K}$ der MNP kann die benötigte Energie zur Ausrichtung der Magnetisierung des MNP mit dem äußeren Magnetfeld berechnet werden [14] [16].

Unterhalb eines Kerndurchmessers von $d_{\rm K} \approx 17$ nm ist die Néel-Relaxationszeit kürzer als die Brown-Relaxationszeit. Sobald der Kerndurchmesser der MNP eine gewisse Größe überschreitet, dominiert die schnellere Brown-Relaxationszeit [14]. Sehr kleine MNP tendieren demnach dazu, ihre Magnetisierung ohne geometrische Rotation mit dem angelegten Magnetfeld auszurichten. Demzufolge ist die Quervernetzung von Partikeln mit sehr kleinem Kerndurchmessern von $d_{\rm K} \leq 17$ nm mithilfe der MPS nicht nachweisbar [16].

2.1.2.2 Verhalten in einem statischen Magnetfeld

In ferromagnetischen² Materialien bestehen starke Wechselwirkungen zwischen den Dipolmomenten, die zur Ausbildung von Domänen bzw. der Weiss-Bezirke – benannt nach Pierre Erest Weiss – führen. Die Grenzen zwischen den einzelnen Weiss-Bezirken werden als Bloch-Wände bezeichnet [14]. MNP mit einem Kerndurchmesser von $d_k < 100$ nm bestehen aus nur einem *Weiss*-Bezirk. Der Weiss-Bezirk weist dabei eine einheitliche Magnetisierung auf, dessen Dipolmoment μ sich aus der Sättigungsmagnetisierung M_s und dem Kernvolumen V_K der Partikel berechnen lässt [17]:

$$\mu = M_S \cdot V_K. \tag{3}$$

Innerhalb einer Domäne sind alle Dipolmomente parallel zueinander ausgerichtet, wodurch sich eine maximale Magnetisierung einstellt. Bei dem Anlegen eines äußeren

(2)

² Ein Material wird als ferromagnetisch bezeichnet, wenn es in einem externen Magnetfeld selbst magnetisiert werden kann und nach dem Abschalten des externen Magnetfeldes eine Restmagnetisierung (Remanenz) aufweist. Das wohl bekannteste Beispiel für ein ferromagnetisches Material ist Eisen.

Magnetfeldes verschieben sich die Bloch-Wände, was zu einer Vergrößerung der Domänen führt. Da die Magnetisierung der Domänen in Richtung des angelegten äußeren Magnetfeldes zeigen, steigt dadurch die Magnetisierung des Materials. Dies würde bei einem immer weiter ansteigenden externen Magnetfeld dazu führen, dass das gesamte Material nur noch aus lediglich einem einzigen Weiss-Bezirk bestünde, dessen Magnetisierung in dieselbe Richtung zeigt. Wenn nun das äußere Magnetfeld abgeschaltet wird, bilden sich die Bloch-Wände nicht mehr vollständig zurück. Dies führt zu einer Restmagnetisierung des Materials, die auch als Remanenz bezeichnet wird. Durch dieses Phänomen entsteht die für ferromagnetische Materialien typische Hysteresekurve (siehe Abbildung 4 a)) [14].

Die Magnetisierung ferromagnetischer Materialien hängt von der Korngröße ab, da durch die Verkleinerung der Korngröße die Anzahl der Weiss-Bezirke abnimmt. Wenn die Korngröße so klein wird, dass sich innerhalb eines Korns lediglich ein Weiss-Bezirk ausbildet, ist die benötige thermische Energie zur Ummagnetisierung der Partikel so gering, dass bereits bei Zimmertemperatur eine zufällige Ausrichtung der Domäne entsteht [14] [18]. In diesem Zustand wird jedes Korn als ein Dipol angesehen. Dies hat zur Folge, dass sich das gesamte Material paramagnetisch³ verhält. Durch diesen Mechanismus kommt es zu einer Verstärkung des Magnetfeldes in dem paramagnetischen Material. Aufgrund der Betrachtung von ganzen Körnern anstatt von elementaren Dipolmomenten, wird dieser Zustand als Superparamagnetismus bezeichnet [14].

In Abbildung 4 a) ist die charakteristische Hysteresekurve eines magnetischen Mehrdomänenmaterials dargestellt. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 4 b) die Magnetisierungskurve von superparamagnetischen Materialien dargestellt.



Abbildung 4: (a) Charakteristischer Hysterese-Zyklus eines magnetischen Mehrdomänenmaterials nach [19], wobei H der Amplitude des magnetischen Feldes und M der Magnetisierung des Materials entspricht. M_r kennzeichnet die Restmagnetisierung bei Ausschalten des Magnetfeldes und H_c die Koerzitivfeldstärke. (b) Charakteristische Magnetisierungskurve von

³ Die magnetischen Momente richten sich parallel zu dem externen Magnetfeld aus.

superparamagnetischen Materialien in Abhängigkeit von dem Kerndurchmesser $d_{\rm K}$ als Funktion der Feldstärke *H* eines externen Magnetfeldes nach [14].

Bei Eisenoxidkernen mit einem Kerndurchmesser von $d_k < 20$ nm findet bereits bei Raumtemperatur eine Umorientierung des magnetischen Moments μ statt [20]. Nach Abschalten eines äußeren Magnetfeldes verbleibt größenbedingt bei superparamagnetischen Materialien keine Remanenz (siehe Abbildung 4 b)) [10].

Durch die Einwirkung eines Magnetfeldes können Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den magnetischen Dipolen der MNP entstehen. Durch die Ausbildung der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen kommt es zu einer Kettenbildung der MNP, wobei sich die magnetischen Dipolmomente entlang der MNP-Kette ausrichten [21]. Die Kettenbildung von MNP führt dazu, dass sich das dynamische Magnetisierungsverhalten der MNP stark ändert. Die MNP weisen durch die Kettenbildung keine superparamagnetischen Eigenschaften mehr auf, weshalb die Magnetisierungskurve dem charakteristischen Hysterese-Zyklus aus Abbildung 4 a) gleicht.

Des Weiteren weisen MNP in MNP-Suspensionen keine superparamagnetischen Eigenschaften auf, da die MNP nicht vereinzelt vorliegen und daher eine Interaktion mit benachbarten MNP stattfindet. Durch die Erhöhung der MNP-Konzentration wird die Kettenbildung aufgrund der abnehmenden Abstände der MNP untereinander begünstigt. Da die Dipolmomente vom Kernvolumen $V_{\rm K}$ abhängig sind, nimmt die Kettenbildung mit zunehmendem Kernvolumen zu. Die Wahrscheinlichkeit der Kettenbildung kann minimiert werden, indem die MNP keinem äußeren Magnetfeld ausgesetzt werden [21] [22].

Bei einer Anregungsfrequenz von $f_0 = 25$ kHz, wie sie im MPS verwendet wird, sind die MNP nicht superparamagnetisch und weisen daher eine Restmagnetisierung auf. Die MNP können der Anregung nur verzögert folgen und weisen demzufolge eine Phasenverschiebung auf. Nur bei einer sehr geringen Anregungsfrequenz weisen die MNP ein superparamagnetisches Verhalten, wie in Abbildung 4 b) dargestellt, auf.

2.1.2.3 Verhalten in einem oszillierenden Magnetfeld

Unter dem Einfluss eines zeitabhängigen Magnetfeldes H weisen die MNP ein dynamisches Magnetisierungsverhalten auf. Das Anregungsfeld, dem die MNP ausgesetzt werden, entspricht einem sinusförmigen, zeitabhängigen Wechselfeld H(t). Die Magnetisierungsänderung der MNP ist von der Winkelfrequenz ω_0 und der Anregungsamplitude H_A des Wechselfeldes H(t) abhängig [23].

$$H(t) = H_A \sin(\omega_0 t) \tag{3}$$

Die Geschwindigkeit, mit der sich die MNP im magnetischen Feld ausrichten, wird durch die magnetischen Relaxationsmechanismen bestimmt (siehe Abschnitt 2.1.2.1) [24].

In Abbildung 5 ist die Anregung der MNP mit dem sich periodisch ändernden Wechselfeld H(t) dargestellt, auf der die Signalkodierung im MPS basiert (siehe Abschnitt 2.2.1).



Abbildung 5: Schematische Darstellung des Messprinzips der MPS nach [23]. Die MNP mit einer charakteristischen, nichtlineare Magnetisierungskurve M(B) (b) werden einem sinusförmigen Magnetfeld H(t) (a) ausgesetzt. Die zeitabhängige Magnetisierungsantwort M(t) (c) auf das Anregungsfeld besteht aus der Anregungsfrequenz f_0 und höheren Harmonischen der Anregungsfrequenz $n \cdot f_0$. Die Magnetisierung induziert eine Spannung $u(t) \propto dM(t)/dt$ (d) in der Empfangsspule. Aufgrund der nichtlinearen Magnetisierungskurve der MNP enthält das Spektrum (e) des Signals die Anregungsfrequenz f_0 und Oberwellen der Anregungsfrequenz.

Die Magnetisierungsantwort der MNP auf die Anregung mit dem Wechselfeld H(t), die in Abbildung 5 c) dargestellt ist, ist als Folge der nichtlinearen Magnetisierungskurve rechteckförmig verzerrt. Durch die Fouriertransformation der Magnetisierungsantwort kann das Frequenzspektrum dargestellt werden. Aus dem Frequenzspektrum werden anschließend die höheren Harmonischen der Anregungsfrequenz ($n \cdot f_0$) extrahiert. Die Signalamplitude der Harmonischen klingt exponentiell ab [14].

2.2 Messmethoden

In diesem Abschnitt wird auf die Messmethoden eingegangen, die im Rahmen dieser Bachelorarbeit verwendet werden. Häufig eingesetzte Messmodalitäten zur Charakterisierung und Analyse von MNP der Arbeitsgruppe 8.23 der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) sind die MPS, die Magnetrelaxometrie (MRX), die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) und das Messsystem für Magnetische Eigenschaften (MPMS) [4]. Im Rahmen dieser Arbeit wird die MPS zur Untersuchung der Quervernetzungsreaktion von MNP mit B-BSA verwendet. Als Vergleichsmethode wird die NMR-Relaxometrie angewendet.

2.2.1 MPS

Die MPS basiert auf den gleichen physikalischen Prinzipien (siehe Abbildung 5) wie die MPI und kann daher als nulldimensionaler MPI-Scanner interpretiert werden [4] [17] [25]. Die MPS ist eine massensensitive Methode für die Analyse und Quantifizierung von MNP. Ursprünglich wurde die MPS für die Charakterisierung von MNP entwickelt, um deren Eignung als MPI-Tracer zu untersuchen [1].

Mit der MPS kann das nicht-lineare dynamische Magnetisierungsverhalten der MNP durch die Anregung mit einem magnetischen Wechselfeld B_a von bis zu 25 mT bei einer festen Anregungsfrequenz f_0 von 25 kHz gemessen werden [14]. Das Anregungsfeld B_a verursacht eine wechselweise Ummagnetisierung der MNP. Die Ummagnetisierung erfolgt hierbei nach den bekannten Relaxationsmechanismen (siehe Abschnitt 2.1.2.1). Die nichtlineare Magnetisierungskure M(B) der MNP führt zur Verzerrung der MNP-Antwort M(t). Die zeitabhängige Induktionsspannung wird mithilfe einer Empfangsspule gemessen (siehe Abschnitt 2.1.2.3) [26].

Die induzierte Spannung in der Empfangsspule, die durch die Magnetisierungsänderung der MNP und das Anregungsfeld entsteht, ist proportional zur negativen zeitlichen Ableitung der Magnetisierung der MNP. Der Gradiometeraufbau der Detektionsspule und zusätzliche Filter unterdrücken die um ein Vielfaches größere Anregung mit der Grundfrequenz f_0 . Das Messsignal wird mit einem rauscharmen Verstärker verstärkt und anschließend gemessen. Daraufhin erfolgt die Zerlegung des Zeitsignals in seine Frequenzkomponenten mithilfe der Fouriertransformation [4]. Die signaltragenden Komponenten des MPS-Spektrums sind die ungeraden Vielfachen der Grundfrequenz f_0 . Einen wesentlichen Einfluss auf das MPS-Spektrum hat die MNP-Menge in der Probe und die Anregungsamplitude. Durch eine höhere Anregungsamplitude B_a wird ein größerer Bereich der nicht-linearen Magnetisierungskurve der MNP abgefahren. Daraus resultiert eine höhere induzierte Spannung in der Empfangsspule und höhere Signale in den höheren Harmonischen [4] [14].

In dieser Arbeit werden die Amplituden der Harmonischen A_3 und A_5 , das konzentrationsunabhängige A_5/A_3 -Verhältnis und die Phase der dritten Harmonischen φ_3 ausgewertet. Zudem wird die Sensitivität A_3^* bestimmt. Im Folgenden werden die charakteristischen MPS-Parameter genauer beschrieben:

A3:	Die Amplitude der dritten Harmonischen A_3 [Am ²] beschreibt das magnetische Dipolmoment der stärksten Signalamplitude. Da die erste Harmonische A_1 gefiltert wird, kann diese für die Auswertung der Messergebnisse nicht berücksichtigt werden [27]. Die Amplitude der dritten Harmonischen A_3 ist direkt proportional zum MNP-Gehalt der Probe und kann daher zur Quantifizierung der MNP verwendet werden [28].
A ₅ :	Die Amplitude der fünften Harmonischen A_5 [Am ²] beschreibt das magnetische Dipolmoment der zweitstärksten Signalamplitude. Der Parameter A_5 (als auch der Parameter A_3) muss aufgrund des Ein- flusses auf das A_5/A_3 -Verhältnis über der Nachweisgrenze der MPS liegen.
A5/A3:	Das konzentrationsunabhängige A_5/A_3 -Verhältnis [%] wird durch die Division von A_5 durch A_3 berechnet. Der Wert dient vor allem zur Beurteilung von magnetischen Änderungen der MNP, die z.B. durch eine Quervernetzung hervorgerufen werden können [29].
A3*:	Die spezifische Amplitude A_3^* [Am ² /g _{Fe}] stellt die auf die absolute Eisenmasse der Probe normierte A_3 -Amplitude dar. Der Parameter A_3^* wird auch als Sensitivität bezeichnet und wird verwendet, um die Signalstärke verschiedener MNP-Systeme miteinander zu ver- gleichen [28].
<i>φ</i> 3:	Die Phase φ_3 [°] beschreibt die Phasenverschiebung der dritten Har- monischen des Zeitsignals. Die Phasenwerte werden negativ darge- stellt. Durch die Beeinträchtigung der Magnetisierungsrotation führt die Entstehung von MNP-Komplexen zu einer Zunahme der Phasenverschiebung [1].

2.2.2 NMR-Relaxometrie

Die NMR-Messung beruht auf dem magnetischen Moment der Nukleonen⁴, den Kernspins. Ein Kernspin wird durch die Rotation des magnetischen Moments um die eigene Achse eines Teilchens beschrieben. Bei Atomkernen mit einer geraden Anzahl an Nukleonen heben sich die magnetischen Momente gegenseitig auf. Aufgrund dessen weisen

⁴ Unter dem Begriff Nukleonen werden die Komponenten eines Atomkerns, bestehend aus Protonen und Neutronen, verstanden.

nur Atomkerne mit einer ungeraden Anzahl an Nukleonen ein magnetisches Gesamtmoment auf, der als Kernspin bezeichnet wird [12] [30].

In diesem Abschnitt wird auf die theoretischen Grundlagen der NMR-Messung und den Einfluss von MNP auf die Signalparameter eingegangen. Da im Rahmen dieser Arbeit die NMR-Relaxometrie als Vergleichsmethode zur MPS Anwendung findet und daher nur die T_2 -Relaxationszeit gemessen wird, beschränkt sich dieser Abschnitt auf die hierfür notwendigen theoretischen Grundlagen.

2.2.2.1 Prinzip der Messung

Werden Atome mit einer ungeraden Anzahl an Nukleonen einem äußeren Magnetfeld B_0 ausgesetzt, richten sich die Kernspins parallel und antiparallel zu den Feldlinien aus. Durch den leichten Überschuss parallel ausgerichteter Spins ist eine Magnetisierung messbar [12]. Die Einwirkung eines äußeren Feldes auf die Spins führt dazu, dass diese mit der sogenannten Lamorfrequenz ω_L um die Feldachse präzidieren⁵. Die Lamorfrequenz ist dabei vom gyromagnetischen Verhältnis γ des Kerns und dem externen Magnetfeld B_0 abhängig [30]:

$$\omega_L = \gamma B_0 \tag{4}$$

Mit einem gyromagnetischen Verhältnis von $\gamma = 2,675 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1} \text{T}^{-1}$ beträgt die Lamorfrequenz ω_{L} von Wasserstoffprotonen in einem Feld von $B_0 = 1$ T etwa 42 MHz [12]. Da die Spins in unterschiedlichen Phasenlagen präzidieren ist nur eine mittlere Magnetisierung in Richtung des externen Magnetfeldes B_0 (z-Richtung), die auch als Längsmagnetisierung bezeichnet wird, messbar. Durch die Anregung des Systems mit einem Hochfrequenzimpuls (HF-Puls), der mit der Lamorfrequenz des Magnetisierungsvektors übereinstimmen muss, kann eine Rotation des Magnetisierungsvektors des Kerns aus der Richtung der z-Achse in die xy-Ebene bewirkt werden [12]. Durch die Rotation des Magnetisierungsvektors mit der Lamorfrequenz in der xy-Ebene entsteht eine Magnetisierung senkrecht zum extern angelegten Magnetfeld B_0 , die auch als Quermagnetisierung bezeichnet wird. Wenn nun der HF-Puls abgeschaltet wird, präzidiert der Magnetisierungsvektor aus der xy-Ebene in den Ausgangszustand zurück [12]. Die bewegten Ladungen induzieren eine Spannung, die mit einer Empfangsspule gemessen werden kann [30].

Die Relaxation der Kernspins von der Magnetisierung in einem äußeren Magnetfeld wird durch die T₁- und T₂-Relaxationszeit beschrieben. Die T₁-Relaxationszeit wird auch als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet, da die absorbierte Energie durch den HF-Puls an die Umgebung abgegeben wird, wodurch es zu einer Wiederherstellung der Längsmagnetisierung kommt. Dieser Vorgang wird auch als longitudinale Relaxation beschrieben. Zeitgleich zur Wiederherstellung der Längsmagnetisierung findet ein Intensitätsabfall der Quermagnetisierung statt. Durch die Spin-Gitter-Relaxation und die Abnahme der

⁵ Unter dem Begriff Präzession wird die Richtungsänderung der Rotationsachse der Kernspins durch die Einwirkung eines Drehmomentes verstanden.

Phasenkohärenz der Spins findet ein sogenannter *freier Induktionsabfall* statt. Der *freie Induktionsabfall* wird mit einer Spule als abfallende Schwingung aufgezeichnet und als transversale Relaxation bezeichnet. Durch Inhomogenitäten in der Umgebung der Protonen kommt es zur Entstehung von Phasenunterschieden. Die Quermagnetisierung relaxiert aufgrund dessen mit der Zeitkonstante T_2 , die der Zeit entspricht, nach der die Quermagnetisierung um 63 % des Ausgangssignals zerfallen ist. Im Gegensatz dazu entspricht T_1 der Zeit, nach der die Längsmagnetisierung wieder 63 % des Ausgangssignals erreicht hat [12]. Da das angelegte Magnetfeld in der Realität lokale Inhomogenitäten aufweist, erfahren Spins, die auf diesen Bereich treffen, andere Lamorfrequenzen und rotieren somit unterschiedlich schnell um die Feldachse. Mithilfe einer besonderen HF-Impulsfolge (Refokussierungspulse der sog. Spin-Echo-Sequenz) werden diese reversiblen Effekte eliminiert [30] [31].

2.2.2.2 Einfluss von MNP

Im Vergleich zu Wasserstoffprotonen weisen MNP ein großes magnetisches Moment auf, welches zu lokalen Feldinhomogenitäten in deren unmittelbaren Umgebung führt. Das NMR-Verhalten der Wasserstoffprotonen unter der Anwesenheit von MNP wird maßgeblich durch die Änderung der Lamorfrequenz der Wasserstoffprotonen in der äußeren Schicht um die MNP beeinflusst. Zudem wird das NMR-Verhalten durch chemische Austauschprozesse in der Grenzschicht des MNP zum umgebenden Medium beeinflusst.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wird lediglich der Einfluss der MNP-Komplexe auf die T_2 -Relaxationszeit gemessen, aus der sich die transversale Relaxationsrate R_2 wie folgt bestimmen lässt:

$$R_2 = \frac{1}{T_2}.$$
(5)

Zur Auswertung wird die transversale Relaxationsrate auf die Eisenkonzentration der Proben normiert. Diese wird als Relaxivität r_2 bezeichnet, die sich wie folgt bestimmen lässt:

$$r_2 = \frac{\frac{1}{T_{2,M}} - \frac{1}{T_{2,W}}}{c_{Fe}}.$$
(6)

Dabei ist $T_{2,M}$ die gemessene transversale Relaxationszeit der jeweiligen Probe mit der Eisenkonzentration c_{Fe} und $T_{2,w}$ die transversale Relaxationszeit von Wasser.

Durch die Zunahme der transversalen Relaxivität r_2 lässt sich die Quervernetzung der MNP mit B-BSA aufgrund des Einflusses auf die T_2 -Relaxationszeit ermitteln.

2.3 Nachweis von Biomolekülen mit der MPS

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Biomoleküle über die Quervernetzung mit MNP nachgewiesen werden, die zu einem veränderten MPS-Signal führen. Zur Etablierung der Methodik beschränkt sich diese Arbeit auf den Nachweis von B-BSA, indem Streptavidinfunktionalisierte MNP an das Biotin auf der Oberfläche des BSA binden. Dieser Prozess führt zu einer Quervernetzung der MNP mit B-BSA.

In diesem Abschnitt wird zuerst auf die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin eingegangen. Anschließend wird die Quervernetzungsreaktion und die durch die Quervernetzung verursachte MPS-Signaländerung thematisiert.

2.3.1 Streptavidin-Biotin-System

Streptavidin ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit vier Biotin-Bindungsstellen und gilt in der Biologie als hochaffines Molekül [32]. Das 67 kDa große Protein wird von dem Bakterium Streptomyces avidinii hergestellt. Die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur von Streptavidin ist nahezu identisch zu Avidin6. In der Primärstruktur unterscheiden sich die beiden Proteine jedoch signifikant voneinander. Sowohl Streptavidin als auch Avidin werden seit langem für eine Vielzahl von medizinischen und biotechnologischen Anwendungen untersucht. Streptavidin bietet im Vergleich zu Avidin den Vorteil, dass aufgrund des niedrigen isoelektrischen Punktes (pI = 6, 1 - 7, 5) die Wahrscheinlichkeit zur Bindung von biologischen Komponenten des umgebenden Mediums minimiert ist. Biotin⁷ ist ein wasserlösliches Vitamin, das nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an die Biotin-Bindungsstelle des Streptavidins bindet. Da Biotin viel kleiner ist als Streptavidin, kann Streptavidin sterisch die Bindung bei höheren Biotinkonzentration blockieren [33]. Mit einem $K_{\rm D}$ -Wert⁸ von 10⁻¹⁴-10⁻¹⁶ M weist Streptavidin eine hohe Affinität zu Biotin auf [34]. Die hohe Affinität lässt sich durch die Lokalisation hydrophiler Aminosäuren an der Biotin-Bindungsstelle des Streptavidins erklären, die Wasserstoffbrückenbindungen zu Biotin ausbilden [35]. Des Weiteren stabilisieren aromatische Aminosäuren an der Biotin-Bindungsstelle die Bindung durch hydrophobe Wechselwirkungen [36]. Durch die Bindung von Biotin an Streptavidin kommt es zu einer Konformitätsänderung der Tertiärund Quartärstruktur, wodurch das Biotin-Molekül in das Streptavidin-Monomer eingebettet wird [35]. In Abbildung 6 ist die Bindung eines Biotin-Moleküls an eine Biotin-Bindungsstelle der Quartärstruktur von Streptavidin-C1⁹ schematisch dargestellt.

⁶ Avidin ist ein Glykoprotein, das im Eiklar von Vogeleiern vorkommt.

⁷ Biotin ist auch unter dem Namen Vitamin H oder Coenzym K bekannt.

⁸ Die Bindungsaffinität gibt die Stärke der bindenden Wechselwirkung zwischen einem Biomolekül und seinem Bindungspartner an und wird mit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D gemessen. Je kleiner der K_D-Wert ist, desto größer ist die Bindungsaffinität [48].

⁹ Streptavidin-C1 ist ein neuartiges antimykotisches Protein, das von dem Bakterium *S. cinnamonensis* produziert wird, dessen Gesamtstruktur ähnliche tetraedrische Merkmale wie andere Streptavidin-Strukturen aufweist. Der Unterschied zu anderen Streptavidin-Molekülen besteht darin, dass Streptavidin-C1 im C-terminalen Bereich eine kurze alpha-Helix und ein C-terminales Verlängerungspeptid aufweist, das sich in die Biotin-Bindungsstellen desselben Monomers erstreckt [19].



Abbildung 6: Schematische Darstellung der Streptavidin-C1-Struktur im Komplex mit Biotin, das über ein Wasserstoffbrückennetzwerk gebunden wird. Zwischen Biotin und den aromatischen Aminosäuren (L58 in Loop1-2, V80 in Loop3-4, Y111 in Loop5-6, W140 in β 7 und L142 in β 7) treten hydrophobe Wechselwirkungen auf. Das Biotin-Molekül wird durch eine Konformitätsänderung des Streptavidin-Moleküls bei Bindung von Biotin durch die flexible Schleife 3-4 (Untereinheit Mol C) eingebettet [34].

Aufgrund der Stabilität der spezifischen Wechselwirkungen zwischen Streptavidin und Biotin eignet sich das Streptavidin-Biotin-System für biomedizinische Anwendungen, bei denen das System denaturierenden Enzymen, ungünstigen pH-Werten und Temperaturen oder anderen Reagenzien ausgesetzt ist [37].

2.3.2 BSA als Quervernetzungssubstanz

Biotin kann aufgrund seiner Größe nur an eine Streptavidin-Bindungsstelle binden. Um eine Quervernetzung der MNP hervorzurufen, wird daher B-BSA verwendet, das mehrere Biotin-Moleküle auf der Oberfläche gebunden hat. Das Biotin wird mithilfe eines Spacermoleküls an das BSA gekoppelt. Der Kennzeichnungsgrad des BSA beträgt 8 - 16 mol Biotin pro mol BSA [38]. In Abbildung 7 ist die Quervernetzung von MNP mit B-BSA schematisch dargestellt.



Abbildung 7: Quervernetzung von Streptavidin-funktionalisierten MNP mithilfe von B-BSA als Quervernetzungssubstanz.

B-BSA als Analyt der Quervernetzungsreaktion ist mit einem Durchmesser von d = 6 nm um einiges kleiner als die in dieser Arbeit verwendeten MNP-Systeme (siehe 3.1.1). Da beide Reaktionspartner mehrere Bindungsstellen aufweisen, bilden sich mit der Zeit immer größere B-BSA-MNP-Komplexe aus (siehe Abbildung 7). Dies führt dazu, dass aufgrund der Größe der Komplexe die Néel-Relaxation dominiert [7]. Der Grad der Quervernetzung ist zeit- und konzentrationsabhängig. Wenn zu wenige B-BSA-Moleküle vorhanden sind, werden nicht alle MNP vernetzt. Wenn zu viele B-BSA-Moleküle vorhanden sind, werden alle Biotin-Bindungsstellen der funktionalisierten MNP belegt. Dadurch ist keine Quervernetzung der MNP möglich [7]. Die Anzahl der Biotin-Bindungsstellen ist von der hydrodynamischen Größe der verwendeten MNP-Systeme abhängig. Daher muss der geeignete B-BSA-Konzentrationsbereich für das entsprechende MNP-System zuvor mithilfe einer B-BSA-Verdünnungsreihe untersucht werden [39].

2.3.3 MPS-Signaländerung

Bei MPS-Messungen wird das dynamische Magnetisierungsverhalten der oszillierenden MNP aufgezeichnet und als Maß für die Freiheit der Rotationsbewegung verwendet, die auf die gebundenen Zustände der MNP hinweist. Durch die Quervernetzung der MNP mithilfe des B-BSA entstehen B-BSA-MNP-Komplexe, wodurch sich das dynamische Magnetisierungsverhalten der MNP ändert. Durch die Quervernetzung nimmt die Rotationsfreiheit der MNP ab. Dieser Effekt führt zu einer Abnahme der Amplituden im MPS-Spektrum [15]. Durch diesen Effekt ist die Quervernetzung von MNP durch Änderungen der MPS-Signalintensität im konzentrationsunabhängigen A_5/A_3 -Verhältnis feststellbar. In Abbildung 8 ist der Zusammenhang zwischen den Amplituden des MPS-Spektrums und der hydrodynamischen Größe der B-BSA-MNP-Komplexe dargestellt.



MNP-Quervernetzungslevel

Abbildung 8: Abhängigkeit der Amplitude der Harmonischen im MPS-Spektrum von dem Quervernetzungslevel der MNP. (Quelle: Eigene Darstellung nach [15])

Mit zunehmenden Quervernetzungsgrad nimmt die hydrodynamische Größe der Komplexe zu. Je größer die Komplexe werden, desto schlechter können sie dem oszillierenden Anregungsfeld folgen. Dies führt zu einer geringeren Amplitude der Harmonischen im MPS-Spektrum. Des Weiteren nimmt die Phasenverschiebung mit zunehmender hydrodynamischer Größe zu [15]. Zudem kann es zur Kettenbildung der MNP mit B-BSA kommen, die durch die Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes unterstützt wird (siehe Abbildung 9).



Abbildung 9: Schematische Darstellung der Kettenbildung von MNP mit B-BSA.

Die Kettenbildung führt zu einer höheren Signalamplitude im MPS-Spektrum, wodurch die Quervernetzung der MNP mit B-BSA nachgewiesen werden kann.

2.4 Immobilisierung von MNP mithilfe von D-Mannitol

Die Immobilisierung von MNP kann durch die Gefriertrocknung einer MNP-Lösung mit unterschiedlichen Hilfsmitteln, wie z.B. einer NaCl-Lösung als Medium, durchgeführt werden. Die Wahl des Lösungsmittels beeinflusst dabei maßgeblich die atomare Struktur des Endresultats.

Durch die Gefriertrocknung, die auch als Lyophilisation bezeichnet wird, wird den Proben durch Sublimation¹⁰ Wasser entzogen. Im ersten Schritt werden die Proben eingefroren, wodurch sich Eiskristalle aus reinem Wasser bilden. Mit zunehmender Bildung von Eiskristallen nimmt die Viskosität der verbleibenden Lösung zu, die die weitere Entstehung von Eiskristallen hemmt. Die hochkonzentrierte, zähflüssige Flüssigkeit erstarrt und bildet eine Kombination aus amorpher und kristalliner Phase. Ein geringer Anteil des Wassers gefriert nicht und wird als gebundenes Wasser bezeichnet. Im nächsten Schritt wird die Primärtrocknung durchgeführt, wodurch die gebildeten Eiskristalle sublimieren. Darauf folgt die Sekundärtrocknung, welche die Entfernung des gebundenen Wassers beschreibt [40].

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Immobilisierung der MNP mithilfe einer 10 %-w/w D-Mannitol-Lösung durchgeführt. D-Mannitol ist ein weit verbreiteter natürlicher Zuckeralkohol, der in verschiedenen Pflanzenarten vorkommt und von einigen verschiedenen Mikroorganismen produziert wird [41]. Mit einer Partikelgröße von 50 - 150 µm ist das Molekül um ca. 1000-mal größer als die in dieser Arbeit verwendeten MNP [42]. Die physikalische Form des D-Mannitols hängt im endgültigen Lyophilisat von der D-Mannitol-Konzentration, der Abkühlungsgeschwindigkeit und der Konzentration der MNP ab. D-Mannitol kristallisiert bei hohen D-Mannitol-Konzentrationen von \geq 7,5 %-w/w während des Einfrierens unvollständig. Zur Unterstützung des Kristallisationsprozesses kann das sogenannte Annealing, bei dem die Temperatur vorübergehend erhöht wird, in den Prozess mit aufgenommen werden [43].

Durch die Kristallisation des D-Mannitols werden die MNP in einem Kristallgitter immobilisiert. Dadurch ist die Brown-Relaxation der immobilisierten MNP gehemmt. Dies führt dazu, dass die Ummagnetisierung der MNP allein vom Néel-Mechanismus bestimmt wird [7]. Daraus resultiert, dass das MPS-Signal der immobilisierten MNP im Vergleich zu den mobilen MNP aufgrund der Rotationseinschränkung geringer ist. Des Weiteren nimmt die Phasenverschiebung der MNP durch die Immobilisierung zu.

Bei der Gefriertrocknung von MNP können einige Belastungen auftreten, die diese destabilisieren. Durch die Einfrierung kommt es zu einer Phasentrennung in Eis und einer konzentrierten Lösung, die in diesem Fall aus MNP und D-Mannitol besteht. Die durch die Phasentrennung entstehende hohe MNP-Konzentration kann zur Aggregation der MNP führen. Des Weiteren bewirkt die Kristallisation von Wasser eine mechanische Belastung auf die MNP. Die Verwendung von D-Mannitol führt zu einem größeren

¹⁰ Übergang eines festen Stoffes in den gasförmigen Zustand unter Umgehung der flüssigen Phase.

Volumen der Probe, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Aggregation der MNP verringert wird. Zudem schützt Mannitol die MNP als Stabilisator vor den mechanischen Belastungen während des Einfrier- und Trocknungsprozesses. Des Weiteren führt D-Mannitol zur Ausbildung einer isotonischen Lösung, wodurch der osmotische Druck der Lösung kontrolliert wird [40].

3 Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die Materialien und Methoden vorgestellt, die im Rahmen dieser Bachelorarbeit verwendet werden. Für das Verständnis der Ergebnisse wird auf die Messmethodik der MPS und der NMR-Relaxometrie als Vergleichsmethode eingegangen. Zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird des Weiteren die Pipettiermethodik thematisiert.

3.1 Verwendete Materialien

Zunächst werden die verwendeten Materialien thematisiert. Dies beinhaltet neben den MNP-Systemen zudem die Laborgeräte und die Reagenzien, die für die Quervernetzung der MNP mit B-BSA benötigt werden.

3.1.1 MNP-Systeme

Für diese Arbeit werden die kommerziell verfügbaren MNP-Systeme Synomag[®] und Perimag[®] der Firma *micromod Partikeltechnologie GmbH* eingesetzt. Der magnetische Kern, der aus Magnetit oder Maghemit besteht, ist von einer organischen Dextran-Hülle umgeben. Zusätzlich sind die MNP mit Streptavidin funktionalisiert. Dies ermöglicht die Quervernetzung der MNP mit biotinylierten Biomolekülen anhand der spezifischen Bindung von Streptavidin an Biotin [44]. Zudem wird das MNP-System Perimag[®] Plain, das keine Oberflächenfunktionalisierung aufweist, für das Kontrollexperiment verwendet. Die Eisenoxid-Kerne der MNP-Produktlinien Synomag[®] und Perimag[®] bestehen nicht wie andere MNP-Systeme aus einem einzelnen magnetischen Kern. Stattdessen bestehen sie aus mehreren Kernen und werden daher auch als Multikern-MNP bezeichnet. Eine schematische Darstellung solcher Multikern-MNP ist in Kapitel 2.1.1 zu finden.

In Tabelle 2 sind die verwendeten MNP-Systeme mit den relevanten Eigenschaften aufgelistet.

MNP-	Oberflächen-	Eisenkonzentration		Größe	PTB-ID
System	funktionalisierung	Hersteller	gemessen		
			(PTB)	$d_{ m hyd}$	
		$c_{\rm Fe}$	$c_{\rm Fe}$	[nm]	
		[mmol/L]	[mmol/L]		
Synomag [®] -D	Streptavidin	53,7	51,3	50	SY50;
					MNP005
Synomag [®] -D	Streptavidin	53,7	72,1	70	SY64;
					MNP009
Perimag®	Streptavidin	44,8	42,9	130	PE23
					MNP014
Perimag®	Plain	152,2	138,4	130	PE21;
					MNP011

Tabelle 2: Wesentliche Eigenschaften der verwendeten MNP-Produktlinien Synomag® und Perimag®. Im Folgenden werden die jeweiligen MNP-Systeme mit der PTB-ID SY50, SY64 bzw. PE23 bezeichnet.

Gemäß der Herstellerangabe haben die MNP-Systeme SY50 und SY64 eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 53,7$ mmol/L. Das MNP-System PE23 hat gemäß dieser Angabe eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 44,8$ mmol/L und das MNP-System PE21 eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 152,2$ mmol/L. Die tatsächliche Eisenkonzentration wurde im Rahmen einer anderen Bachelorarbeit mithilfe der Phenanthrolin-Methode an der PTB bestimmt [45]. Bei der Eisengehaltsbestimmung mithilfe des Phenanthrolin-Assays werden die MNP zunächst mit Salzsäure gemischt, sodass die MNP-Kerne aufgelöst werden und nur noch freies Eisen vorliegt. Dies ermöglicht die Bildung eines roten Chelatkomplexes aus Eisen(II)-Ionen und Phenanthrolin, der auch als Ferroin bezeichnet wird [46]. Anschließend wird die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda = 510$ nm mit einem Spektralphotometer gemessen [47]. Aus dieser Vorgehensweise ergeben sich die gemessenen Eisenkonzentrationen, die in Tabelle 2 zu finden sind.

Für alle Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden, wird die an der PTB gemessene Eisenkonzentration der Proben berücksichtigt.

3.1.2 Geräte und Laborzubehör

In Tabelle 3 sind die verwendeten Geräte und das verwendete Laborzubehör aufgelistet, die für die Messung und Präparation der Proben eingesetzt werden.

Materialien und Geräte	Hersteller	Produkttyp	
Magnetpartikelspektrometer (MPS)	Bruker	Biospin MPS-3	
Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Relaxometer	Bruker	The minispec mq60	
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5702	
Vortexer	Scientific Industries, Inc	Vortex Genie 2 Digital	
Mikrowaage / Analysenwaage	A&D Discover Precision	BM-20	
Gefriertrocknungsanlage	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Alpha 1-4 LSC	
Reinstwasser- Anlage	Evoqua Water Technologies	Ultra-Clear™ TWF UV UF TM (mit TOC-Monitor)	
Mikroliterpipetten	Eppendorf	Research [®] Plus 1-Kanal	

Pipettenspitzen für Mikroliterpi- petten	Eppendorf	epT.I.P.S [®] Standard
2 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf	Safe-Lock-Tubes Eppendorf-Quality™
0,2 mL PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf	Safe-Lock-Tubes PCR clean

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte und Laborzubehör unter Angabe des Herstellers und des Produkttyps.

3.1.3 Reagenzien

In Tabelle 4 sind die verwendeten Reagenzien aufgelistet, die für die Durchführung der Experimente benötigt werden.

Reagenzien	Darreichungsform / Vorkommen	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Lyophilisiertes Pulver	Sigma Aldrich
Biotinyliertes BSA (B-BSA)	Lyophilisiertes Pulver	Sigma Aldrich
Biotin	Lyophilisiertes Pulver	Sigma Aldrich
0,1 mol/L Natronlauge (NaOH)	Flüssigkeit	chemicell GmbH

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien unter Angabe der Darreichungsform und des Herstellers.

Das BSA, B-BSA und das Biotin liegen in einer lyophilisierten Pulverform vor. Zur Verarbeitung pulverförmiger Reagenzien wird die vorher berechnete Menge mithilfe einer Analysenwaage abgewogen und anschließend in 0,1 %-w/w BSA-Lösung suspendiert. Das pulverförmige Biotin ist aufgrund der leichten Lipophilie schlecht in wässrigen Lösungen löslich. In 1 mL H₂O sind lediglich 0,22 mg Biotin löslich. Zur Herstellung höherer Biotinkonzentrationen wird das Biotin basierend auf den Ergebnissen anderer Arbeiten in 0,1 mol/L Natronlauge suspendiert [48]. In diesem basischen Verdünnungsmedium sind bis zu 10 mg/mL Biotin löslich [49].

3.2 Messmethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wird die MPS als Messmethode zum Nachweis der Quervernetzung von MNP mit B-BSA gewählt. Als Vergleichsmethode wird die Messung der NMR-Relaxationszeiten herangezogen.

3.2.1 MPS

Im MPS werden die Proben einem sinusförmigem Anregungsfeld mit einer Frequenz $f_0 = 25,25$ kHz ausgesetzt, wodurch die MNP ständig ihre Magnetisierungsrichtung

ändern. Durch die sich ändernde Magnetisierung der MNP in der Probe wird in der Empfangsspule eine Spannung induziert. Die zeitabhängige Antwort der MNP auf das Anregungsfeld wird anschließend Fourier-transformiert [17]. Aufgrund des nicht-linearen Magnetisierungsverhaltens der MNP weist das gemessene MPS-Spektrum charakteristische Amplituden bei den ungeraden Vielfachen 2k + 1 der Anregungsfrequenz f_0 auf [10] [21].

Am vorhandenen MPS kann die Amplitude des Anregungsfeldes B_a zwischen 0,04 mT und 25 mT und die Mittelungszeit zwischen 0,1 s und 30 s eingestellt werden. In dieser Arbeit werden Anregungsfelder mit einer Amplitude von $B_a = 5 \text{ mT}$, $B_a = 12 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}$ verwendet. Die MPS-Messungen können zusätzlich über einen Skript-Modus automatisiert durchgeführt werden. Der Skript-Modus erlaubt das Implementieren einer automatisierten Messfolge unter Angabe der Anregungsfeldstärke, der Messdauer und der zugehörigen Untergrunddatei ohne jegliche Interaktion mit dem Bediener. Nachdem eine Probe mit den zuvor definierten Parametern gemessen worden ist, fordert der Skriptmodus dazu auf, die nächste Probe einzusetzen. Das Messskript wird für diese Arbeit so geschrieben, dass nach jedem Messzyklus eine Messung bei $B_a = 0.05$ mT erfolgt, da bei dieser geringen Anregungsfeldstärke die magnetische Wechselwirkung zwischen den MNP gering ist. Die eingestellte Anregungsfeldstärke im MPS bleibt bis zur nächsten Messung bei einer anderen Anregungsfeldstärke bestehen. Ein komplettes Ausschalten der Anregung ist am vorhandenen Gerät nur durch Schließen der Software möglich. Durch dieses Vorgehen ist die nächste Probe beim Einsetzen in das MPS keinem Feld von $B_a = 25$ mT, sondern lediglich von $B_a = 0.05$ mT ausgesetzt, bevor die Messreihe beginnt [29].

In Abbildung 10 a) ist das verwendete MPS an der PTB zu sehen. In Abbildung 10 b) ist der Probenstab mit einer Probe dargestellt, welche zur Messung in das MPS (Öffnung ^① der Abbildung 10 a)) eingeführt wird.


Abbildung 10: (a) Verwendetes MPS an der PTB. Die Probe wird durch die Öffnung ① eingeführt. Ein Deckel dient der Positionierung des Probenstabes und dem Schutz vor Verunreinigungen der Probenkammer. Im Hochfrequenzkäfig des MPS ② befindet sich die Messkammer mit der Sende- und Empfangsspule. Ein Regler ③ sorgt für eine stabile Kammerinnentemperatur von 37°C. Zur Verstärkung des erzeugten Anregungssignals wird ein konventioneller Audioverstärker ④ verwendet. (b) Ein speziell geformter Probenstab ① dient der reproduzierbaren Positionierung der Probe im MPS. Die MNP-Probe wird in eine PCR Kapsel abgefüllt, im Probenstabunterteil ② versenkt und mit dem Probenstab ① verschraubt und fixiert.

In Abbildung 11 ist der Hochfrequenzkäfig des MPS mit den wichtigsten Komponenten und der Positionierung der Probe schematisch dargestellt.



Abbildung 11: Schematische Darstellung der Komponenten im Hochfrequenzkäfig des MPS. Die Probe [®] wird mit dem Probenstab ^① eingeführt. Die Messung findet in der Probenkammer ^② satt, in dem sich die Empfangsspule ^③ befindet. Die Anregungsspule ^④ befindet sich außerhalb der Probenkammer. Die zur Messung notwendigen Komponenten befinden sich im Hochfrequenzkäfig ^⑤. Ein Positionierstift ^⑥ sorgt für eine reproduzierbare Zentrierung der PCR-Kapsel in der Empfangsspule ^③. Ein temperierter Gasstrom ^⑦ sorgt für eine konstante Temperatur in der Kammer und verhindert, dass Staub durch die Öffnung in die Messkammer gelangt. Die MNP-Probe befindet sich in einem PCR-Gefäß [®], das in dem Probenstab fixiert wird. (Quelle: Darstellung in Anlehnung an [17].)

3.2.1.1 Ablauf der Messung

Nach dem Einschalten des MPS wird zunächst eine Feldstärke von $B_a = 25$ mT eingestellt. Erst nach einer Aufwärmzeit von ca. 30 min kann mit den Messungen begonnen werden. Während der Aufwärmzeit stellt sich die Solltemperatur von 37°C ein. Für die Messung der Proben werden diese in PCR Kapseln abgefüllt und anschließend im Probenstab fixiert. Der Probenstab wird mit der fixierten Probe in das MPS eingeführt, sodass sich die Probe im Zentrum der Empfangsspule befindet (siehe Abbildung 11).

Zur Vorbereitung der Messung mit dem MPS wird zunächst die leere Probenkammer (*empty chamber*) gemessen. Im nächsten Schritt erfolgt eine Untergrundmessung durch die Messung des leeren Probenstabes (*empty sample holder*). Anschließend wird eine Leermessung mit Offset-Korrektur durch den Abzug des Untergrundsignals durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass die Untergrundsignale bei allen benötigten Anregungsfeldstärken aufgezeichnet werden müssen. Anschließend können die vorbereiteten Proben gemessen werden. Von dem gemessenen Probensignal wird das zuvor aufgezeichnete Untergrundsignal abgezogen.

Während der Messung werden regelmäßig Leermessungen durchgeführt, die zur Kontrolle der zeitlichen Stabilität des Untergrundsignals und zur Erkennung von möglichen Verunreinigungen, z.B. durch Staub, dienen.

Nach dem Abspeichern der Messergebnisse im XML-Format werden die relevanten Informationen mithilfe von PTB-internen Skripten extrahiert. Die Messdaten werden in einer Übersichtsdateien mit allen relevanten Messdaten im CSV-Format abgespeichert. Die Messdaten stehen jedem Mitarbeiter im internen PTB-Messrechnernetz zur Verfügung.

3.2.1.2 Auswertung

Die Auswertung der MPS-Messungen erfolgt anhand den Amplituden A_n mit der Einheit [Am²] und der Phase φ_n mit der Einheit [°]. Hierbei werden die signaltragenden ungeraden Harmonischen mit den Frequenzen $f = n \cdot f_0$ berücksichtigt [10].

In den durch ein PTB-internes Skript extrahierten Datensätzen sind die Messwerte der Amplitude der Harmonischen A_3 , das konzentrationsunabhängige A_5/A_3 -Verhältnis und die Phase der dritten Harmonischen φ_3 für jede durchgeführte Messung tabellarisch abgespeichert. Die Amplituden des MPS-Spektrums hängen von der MNP-Menge in der Probe ab. Die Amplitude A_3 stellt üblicherweise die Amplitude mit der höchsten Intensität im MPS-Spektrum dar und eignet sich daher besonders zur Quantifizierung von MNP in unbekannten Proben.

Die Auswertung der Quervernetzungsexperimente erfolgt anhand des A_5/A_3 -Verhältnisses und der Phase der dritten Harmonischen φ_3 . Das A_5/A_3 -Verhältnis ist ein konzentrationsunabhängiger Parameter, der Rückschlüsse auf die Wechselwirkung der MNP mit dem umgebenden Medium erlaubt. Die Phase beschreibt die Fähigkeit der MNP dem Anregungssignal von $f_0 = 25$ kHz zu folgen. Da die Phasenverschiebung mit der Vergrößerung der MNP-Komplexe zunimmt, eignet sich die Phase ebenfalls zur Auswertung der Quervernetzungsexperimente. In dieser Arbeit wird die Phase der dritten Harmonischen φ_3 zur Beurteilung der Entstehung von Quervernetzungen der MNP mit B-BSA ausgewertet [16].

Zur Bestimmung der Sensitivität der MPS in Bezug auf die verwendeten MNP-Systeme wird zusätzlich der Parameter A_3^* mit der Einheit [Am²/kg] benötigt. Dieser ist in den extrahierten Daten der MPS nicht aufgeführt, da zur Berechnung die Eisenmasse des verwendeten MNP-Systems bekannt sein muss. Der Parameter A_3^* ergibt sich aus der Normierung der Amplitude der dritten Harmonischen A_3 bzgl. der Eisenmasse der verwendeten MNP-Probe. Jedes MNP-System weist einen anderen A_3^* -Wert auf. Die Bestimmung von A_3^* erfolgt nach der folgenden Formel:

$$A_{3}^{*} = \frac{A_{3}}{m_{Fe}} = \frac{A_{3}}{c_{Fe} \cdot M_{Fe} \cdot V_{Probe}}.$$
(7)

Hierbei entspricht m_{Fe} der Eisenmasse der Probe in [g], A_3 der Amplitude der dritten Harmonischen, c_{Fe} der Eisenkonzentration der verwendeten MNP-Systeme in [mol/L], M_{Fe} der molaren Masse von Eisen ($M_{\text{Fe}} = 55,845$ g/mol) und V_{Probe} dem Probenvolumen in [L].

Eine genauere Variante zur Bestimmung der Sensitivität A_3^* ist die Berechnung der Geradensteigung für die Funktion $A_3(m_{\text{Fe}})$. Dazu wird eine Verdünnungsreihe des jeweiligen MNP-Systems angefertigt, mit der MPS gemessen und die Amplitude A_3 über die Eisenmasse m_{Fe} aufgetragen.

3.2.2 NMR-Relaxometrie

Die NMR-Relaxometriemessung wird im Rahmen dieser Arbeit als Vergleichsmethode zur Untersuchung der Quervernetzungsreaktion durchgeführt. Das Messprinzip der NMR-Relaxometrie wurde bereits in Abschnitt 2.2.2 behandelt. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wird die transversale Relaxationszeit T_2 mit einem NMR-Relaxometer (*minispec mq60, Bruker*) bei 1,4 T mit einer Protonen-Resonanz-Frequenz von 60 MHz gemessen. Die Bestimmung der T_2 -Relaxationszeit erfolgt mit der Spin-Echo-Sequenz CPMG (= *Carr-Purcell-Meiboom-Gill-Sequenz*¹¹). Zur Auswertung wird die transversale Relaxivität r_2 ermittelt (siehe 2.2.2, Formel (6)).

Zur Messung werden die präparierten Quervernetzungsproben mithilfe eines von einem PTB-Mitarbeiter selbstgebauten Probenhalters für PCR-Kapseln in den Messbereich des Gerätes überführt. Die Messergebnisse werden mittels der geräteeigenen Steuer- und Auswertesoftware ausgewertet und manuell protokolliert.

3.3 Pipettiermethodik

Für die Herstellung von Verdünnungsreihen mit viskosen Verdünnungsmedien wird zur Minimierung der Pipettierunsicherheit die Methodik des reversen Pipettierens angewendet. Bei dieser Methodik wird der Pipettenknopf beim Aufsaugen einer Flüssigkeit bis zum zweiten Druckpunkt durchgedrückt. Beim Entlassen der Flüssigkeit wird der Pipettenknopf nur bis zum ersten Druckpunkt durchgedrückt. Das in der Pipettenspitze übriggebliebene Restvolumen wird verworfen. Für die Herstellung der B-BSA-Verdünnungsreihe und der MNP-Verdünnung werden Eppendorf-Gefäße genutzt. Die Präparation der Quervernetzungsproben findet in den MPS-Messgefäßen (PCR-Tubes) statt.

Für jede Probe wird eine neue Pipettenspitze verwendet, auch wenn die zu pipettierende Flüssigkeit identisch ist. Durch diese Vorgehensweise kann das zuvor eingestellte Volumen mit einer geringeren Abweichung durch das Verbleiben von Lösung in der Pipettenspitze pipettiert werden.

¹¹ Datenpunkte: 1500, Echozeit: $t_{Echo} = 0,4$ ms, Durchläufe: 4

4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Experimente ausgewertet und diskutiert, die mithilfe der in Abschnitt 3 beschriebenen Materialien und Methoden durchgeführt werden.

Zu Beginn wird eine Unsicherheitsbetrachtung durchgeführt, die für die Interpretation der Messdaten notwendig ist. Anschließend erfolgt die Durchführung von Voruntersuchungen. Im Rahmen der Voruntersuchungen werden zunächst die für die Quervernetzung entscheidenden Signalparameter untersucht.

Im Zuge dessen werden die Quervernetzungsexperimente in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern ausgewertet. Abschließend erfolgt der Vergleich der entwickelten Methodik mit der NMR-Relaxometrie. Im Anschluss wird die Leistungsfähigkeit der Methodik anhand der Sensitivität, der Nachweisgrenze und der gebundenen Menge BSA untersucht.

4.1 Unsicherheitsbetrachtung

Erste Anhaltspunkte für die Suche nach Unsicherheiten bei der MPS-Messung liefert die Bachelorarbeit von Kyri [17]. Eine mögliche Quelle für das Auftreten von Messunsicherheiten ist das MPS-Gerät selbst. Im Dauerbetrieb können Driften aufgrund der Elektronikerwärmung auftreten. Des Weiteren treten Messunsicherheiten des Geräterauschens auf, welche mit der Berechnung des LOD analysiert und ausgewertet werden.

Neben den Messunsicherheiten, die von dem Messgerät selbst ausgehen, beeinflussen bestimmte Umweltfaktoren, wie z.B. die Raumtemperatur und die Luftfeuchtigkeit die Messung. Diese Einflussfaktoren sind allerdings sehr gering, weshalb auf diese Faktoren im Folgenden nicht weiter eingegangen wird.

Zudem haben ebenso das Probengefäß und das Probenvolumen einen Einfluss auf die Unsicherheit der Messergebnisse. Die induzierte Spannung in der Empfangsspule ist von der Eisenmasse der Probe abhängig, weshalb die Probenmenge einen direkten Einfluss auf das magnetische Dipolmoment hat. Zudem kann es durch magnetischen Staub in der Luft zu Verunreinigungen der Probe kommen, die zu einem höheren MPS-Signal der Probe führt [17]. Deshalb ist bei der Präparation der Proben darauf geachtet worden, dass die Probengefäße nur für die Befüllung geöffnet werden. Des Weiteren sorgt der Überdruck in der MPS-Messkammer dafür, dass sich kein Staub in der Probenkammer ansammeln kann (siehe Abschnitt 3.2.1).

In Abhängigkeit von der Viskosität der zu pipettierenden Flüssigkeit kann es zu Variationen des Probenvolumens kommen. Um die relative Pipettierunsicherheit zu minimieren, wird die Pipettiertechnik des reversen Pipettierens angewendet (siehe Kapitel 3.3). Da die Betrachtung der Pipettierunsicherheit und des Untergrundrauschens der MPS für die Bewertung der Unsicherheit unerlässlich sind, werden diese im Folgenden eingehend untersucht.

4.1.1 Ermittlung der Pipettierunsicherheit

In diesem Abschnitt wird auf die Abhängigkeit der Pipettierunsicherheit von der Viskosität des Mediums eingegangen. In den folgenden Experimenten zur Untersuchung der Quervernetzung der funktionalisierten MNP mit B-BSA sollen die MNP in einer BSA-Lösung verdünnt werden. Da die Viskosität mit der Konzentration von BSA zunimmt, wird die Pipettierunsicherheit bei einer BSA-Konzentration von 0,1 %-w/w, 1 %-w/w und 10 %-w/w bestimmt. Auf Grundlage dieses Experiments folgt die Auswahl einer geeigneten BSA-Konzentration für die Quervernetzungsexperimente.

Probenpräparation

Für die Untersuchung der Pipettierunsicherheit werden zehn Proben des MNP-Systems SY64 mit einem Probenvolumen von $V = 18 \,\mu\text{L}$ und einer Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 7,2 \,\text{mmol/L}$ in 0,1 %-w/w, 1 %-w/w und 10 %-w/w BSA-Lösung hergestellt. Zur Herstellung der Verdünnungsproben werden 3 μL des MNP-Systems SY64 zu jeweils 27 μL BSA-Lösung pipettiert. Zur Kontrolle werden zudem zehn Proben des MNP-Systems SY64 nach demselben Pipettierschema in doppelt-destilliertem Wasser (ddH₂O) anstatt in BSA-Lösung hergestellt. Nach der Herstellung der Proben werden diese im Vortexer für t = 10 s bei n = 2200 rpm gemischt, sodass eine homogene Lösung entsteht. Anschließend wird das MPS-Signal bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25 \,\text{mT}$ gemessen.

Die hierfür benötigten BSA-Lösungen werden für ein Gesamtvolumen von V = 45 mL berechnet. Von der 10 %-w/w BSA-Lösung wird ein geringeres Volumen von V = 5 ml hergestellt (siehe Anhang A.1.a).

Auswertung und Ergebnis

Aus den zehn präparierten Proben mit demselben Verdünnungsmedium wird der Mittelwert $\overline{A_3}$ und die Standardabweichung $\sigma(A_3)$ für die Amplitude der dritten Harmonischen A_3 ermittelt. Anschließend wird die relative Pipettierunsicherheit gemäß der Formel

$$u_{rel} = \frac{\sigma(A_3)}{\overline{A_3}} \cdot 100 \tag{8}$$

berechnet. In Tabelle 5 sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die daraus resultierenden relativen Pipettierunsicherheiten in Abhängigkeit der Verdünnungsmedien aufgelistet.

	Mittelwert Ā3 [nAm ²]	Standardabweichung σ (A3) [nAm ²]	Relative Unsicherheit u _{rel} [%]
0,1 %-w/w	279	7,0	2,51
BSA-Lösung			
1 %-w/w	276	6,8	2,46
BSA-Lösung			
10 %-w/w	269	19	6,92
BSA-Lösung			
ddH2O	265	12	4,64

Tabelle 5: Relative Pipettierunsicherheit für 0,1 %-w/w BSA-Lösung, 1 %-w/w BSA-Lösung, 10 %-w/w BSA-Lösung und Reinstwasser.

Die relative Pipettierunsicherheit unterscheidet sich bei den Verdünnungsmedien von 0,1 %-w/w und 1 %-w/w BSA-Lösung um 0,05 %-Punkte voneinander (siehe Tabelle 5). Wird allerdings eine 10 %-w/w BSA-Lösung zur Verdünnung der MNP eingesetzt, steigt die relative Pipettierunsicherheit um 4,41 %-Punkte im Vergleich zu der relativen Pipettierunsicherheit unter Verwendung der 0,1 %-w/w BSA-Lösung an.

Diskussion und Fazit

Aufgrund der erhöhten Viskosität kommt es häufiger zu Pipettierfehlern, da Reste der pipettierten Lösung in der Pipettenspitze verbleiben oder bei Wiederverwendung der gleichen Pipettenspitze (bei Pipettieren derselben Flüssigkeit), Reste der Lösung an dem äußeren Rand der Spitze verbleiben können. Durch diese Fehlerquellen kommt es zu einer Erhöhung oder Verminderung des Probenvolumens, wodurch die Konzentration der MNP in dem Verdünnungsmedium beeinflusst wird. Diese Konzentrationsänderung führt zu einem veränderten MPS-Signal.

Aus Tabelle 5 geht hervor, dass die relative Pipettierunsicherheit bei der Verwendung von doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) um 2,12 %-Punkte höher ist als bei der Verwendung von 0,1 %-w/w BSA-Lösung. Aufgrund der niedrigeren Viskosität von ddH₂O im Vergleich zu 0,1 %-w/w BSA-Lösung wird eine geringere Pipettierunsicherheit erwartet. Die höhere relative Unsicherheit bei dem Pipettieren von Reinstwasser ergibt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Verunreinigung des verwendeten PCR-Gefäßes z.B. mit magnetischen Staubkörnchen. Die BSA-Lösungen wurden in verschließbaren Falcon-Tubes präpariert, währenddessen das ddH₂O in ein Reagenzglas abgefüllt wurde, bevor dieses zu der MNP-Lösung pipettiert wurde. Aufgrund der erhöhten Fehlerquote durch Verunreinigungen mit Staub wird empfohlen, die Probengefäße nur kurzzeitig geöffnet zu lassen. Diese Methodik wird für alle weiteren Experimente innerhalb dieser Arbeit angewendet.

Die relative Pipettierunsicherheit ist von der Viskosität des Mediums abhängig. Trotz der geringen relativen Pipettierunsicherheit bei der Verwendung von 1 %-w/w BSA-Lösung ist es während des Pipettierens aufgrund der erhöhten Viskosität zur Bläschenbildung gekommen. Bei Verwendung von 0,1 %-w/w BSA-Lösung ist dieser Effekt beim Pipettieren nicht aufgetreten. Aufgrund dessen wird für die folgenden Experimente eine 0,1 %-w/w BSA-Lösung als Verdünnungsmedium verwendet.

4.1.2 Ermittlung des Hintergrundrauschens der MPS

Das Rauschen wird auch als Untergrundsignal der MPS bezeichnet und beschreibt die Instabilität der Messwerte. Aus der Ermittlung des Untergrundrauschens wird anschließend die Nachweisgrenze (*eng.* limit of detection; LOD) der MPS ermittelt. Die Nachweisgrenze gibt Aufschluss darüber, ab welcher Harmonischen das Signal nicht mehr vom Rauschen unterscheidbar ist. Da bei dieser Arbeit geringe Eisenkonzentrationen verwendet werden, muss zuvor die Nachweisgrenze bezüglich der Harmonischen A_3 und A_5 bekannt sein.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der MPS werden 30 Messungen des leeren Probenstabes nach Abzug des Untergrundsignals bei den Feldstärken $B_a = 5 \text{ mT}$, $B_a = 12 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}$ durchgeführt.

Auswertung und Ergebnis

Durch die Mehrfachmessung lässt sich ein Mittelwert und eine Standardabweichung des Untergrundsignals der MPS ermitteln. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, die Nachweisgrenze rechnerisch durch die folgende Formel zu bestimmen:

$$LOD = \overline{A_{3,5}} + 3 \cdot \sigma(A_{3,5}). \tag{9}$$

Zur Auswertung der Messungen werden die ungeraden Harmonischen A_3 und A_5 berücksichtigt. In Abbildung 12 sind die berechneten Mittelwerte des Untergrundsignals grafisch dargestellt. Die Standardabweichung ist als Unsicherheitsbalken der Mittelwerte eingezeichnet.



Abbildung 12: Grafische Darstellung des Mittelwertes $\overline{A_{3,5}}$ und der Standardabweichung $\sigma(A_{3,5})$ des Untergrundsignals der MPS in Abhängigkeit von der Anregungsfeldstärke B_a .

In Tabelle 6 sind die Nachweisgrenzen der MPS in Abhängigkeit von der Anregungsfeldstärke B_a dargestellt.

	$B_a = 5 \text{ mT}$ $[\text{Am}^2]$	$B_a = 12 \text{ mT}$ $[\text{Am}^2]$	$B_{\rm a} = 25 \text{ mT}$ $[\text{Am}^2]$
LOD _{A3}	1,05 · 10 ⁻¹¹	1,06 · 10 ⁻¹¹	2,35 · 10 ⁻¹¹
LOD _{A5}	5 · 10 ⁻¹²	5,41 · 10 ⁻¹²	1,03 · 10 ⁻¹¹

Tabelle 6: Nachweisgrenzen der MPS bei den Feldstärken $B_a = 5 \text{ mT}$, $B_a = 12 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}$.

Die Nachweisgrenze ist von der Anzahl der Harmonischen und der Feldstärke B_a abhängig (siehe Tabelle 6).

Für die Auswahl einer geeigneten MNP-Konzentration es ist essenziell, dass die Amplitude der Harmonischen A_5 über der Nachweisgrenze liegt, sodass das konzentrationsunabhängige A_5/A_3 -Verhältnis bestimmt werden kann.

Diskussion und Fazit

Das höhere Untergrundsignal bei steigender Feldstärke lässt sich durch die Zunahme der thermischen Belastung der Elektronik der MPS mit zunehmender Anregungsfeldstärke erklären. Darüber hinaus erzeugen mögliche magnetische Verunreinigungen in der Probenkammer erst bei hohen Anregungsamplituden ein Signal, das das thermische Rauschen der Elektronik unter Umständen übersteigt.

Die in Tabelle 6 voneinander abweichenden Nachweisgrenzen bei Auswertung unterschiedlicher Harmonischen kommt durch die unterschiedliche Intensität der erzeugten Harmonischen durch den Sendeverstärker zustande sowie durch einen unterschiedlichen Beitrag magnetischer Verunreinigungen zu den jeweiligen Harmonischen. Das Rauschen ist umso stärker, je näher die Frequenz bei der Anregungsfrequenz von $f_0 = 25$ kHz liegt. Bei Auswertung der Amplitude der Harmonischen A_3 ist dementsprechend das Rauschen höher als bei der Harmonischen A_5 [50].

Trotz der zunehmenden Intensität des Untergrundsignals bei steigender Anregungsfeldstärke erfolgt die Auswertung der Quervernetzungsexperimente bei $B_a = 25$ mT, da dadurch das höchste MPS-Signal erzeugt werden kann. Dies setzt voraus, dass eine genügend hohe Eisenkonzentration der verwendeten MNP-Systeme verwendet wird, dessen MPS-Signal sich eindeutig vom Untergrundsignal der MPS unterscheidet.

4.2 Voruntersuchungen

In diesem Abschnitt wird die Auswahl eines geeigneten MNP-Konzentrationsbereichs für die Quervernetzung thematisiert. Zudem werden die MNP durch Gefriertrocknung immobilisiert und die Signaländerung im MPS durch die Immobilisierung untersucht. Des Weiteren werden die charakteristischen Signalparameter dargestellt, die zur Auswertung der Quervernetzungsexperimente herangezogen werden.

4.2.1 Ermittlung eines geeigneten MNP-Konzentrationsbereichs

Zur Versuchsplanung der Quervernetzungsexperimente ist es notwendig, zuvor einen Konzentrationsbereich zu definieren, in dem die MNP-Systeme mittels der MPS nachweisbar sind. Die Bestimmung eines geeigneten Konzentrationsbereichs erfolgt durch die Herstellung einer Verdünnungsreihe der verwendeten MNP-Systeme in 0,1 %-w/w BSA-Lösung, da bei diesem Medium die geringste Pipettierunsicherheit festgestellt wurde (siehe Abschnitt 4.1.1). Weiterhin werden Messungen bei unterschiedlichen Anregungsfeldstärken durchgeführt, da diese einen Einfluss auf die gemessenen MPS-Signalamplituden haben (siehe 4.1.2).

Probenpräparation

Es wird eine logarithmische Verdünnungsreihe der MNP in 0,1 %-w/w BSA-Lösung hergestellt. Das eingesetzte Probenvolumen beträgt jeweils $V = 18 \ \mu$ L. Für die erste Verdünnungsstufe 1:10 werden 2 μ L MNP zu 18 μ L 0,1 %-w/w BSA-Lösung pipettiert. Diese Verdünnung entspricht einer Eisenkonzentration des MNP-Systems SY50 von $c_{\text{Fe}} = 5,1 \text{ mmol/L}$. Zur Herstellung der zweiten Verdünnungsstufe 1:100 mit einer Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0,51 \text{ mmol/L}$ werden entsprechend 2 μ L der 1:10 Verdünnung zu 18 μ L 0,1%-w/w BSA-Lösung pipettiert. Anschließend werden die Proben für jeweils t = 10 s bei n = 2200 rpm gevortext. Diese Vorgehensweise wird bis zu einer Verdünnung von 1:10⁷ und einer Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 5,1 \text{ nmol/L}$ des MNP-Systems wiederholt.

Die Herstellung der Verdünnungsreihe (siehe dazu Anhang A.1.b) erfolgt für die Streptavidin-funktionalisierten MNP-Systeme SY50, SY64 und PE23.

Auswertung und Ergebnis

In Abbildung 13 ist die Abhängigkeit der Amplitude der Harmonischen A_3 von der Eisenmasse dargestellt, welche mit zunehmender Verdünnungsstufe abnimmt.



Abbildung 13: Amplitude der dritten Harmonischen A_3 in Abhängigkeit von der Eisenmasse m_{Fe} des MNP-Systems bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT.

Bis zu der Verdünnungsstufe 1:10.000 mit einer Eisenmasse von 5,13 ng ist die Amplitude der dritten Harmonischen A_3 bei allen verwendeten MNP-Systemen SY50, SY65 und PE23 deutlich vom Untergrundrauschen unterscheidbar. Im Bereich der Nachweisgrenze der MPS gehen die Messwerte in ein Sättigungsverhalten über, da die Amplitude des Untergrundsignals erreicht ist.

Die aus diesem Experiment gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen es im weiteren Verlauf, eine geeignete MNP-Konzentration für die Quervernetzung der MNP mit B-BSA festzulegen. Hierfür ist vor allem entscheidend, dass sich die Amplitude der dritten und fünften Harmonischen von der Amplitude des Untergrundsignals der MPS abheben.

Die Amplitude der fünften Harmonischen A_5 hat eine geringere Intensität als die der dritten Harmonischen. Aufgrund der Abhängigkeit des A_5/A_3 -Verhältnisses von der Amplitude der fünften Harmonischen wird die geeignete MNP-Konzentration anhand der Auswertung der Harmonischen A_5 ermittelt.

In Abbildung 14 ist die Amplitude der fünften Harmonische A_5 der verwendeten MNP-Systeme in Abhängigkeit von der Eisenmasse der Verdünnungsprobe dargestellt.



Abbildung 14: Darstellung der Amplitude der fünften Harmonischen A_5 für die verwendeten MNP-Systeme bei $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT. Die Verdünnungsstufe 1:100 ist rot umrandet. Bei dieser Verdünnungsstufe wird eine Eisenmasse von ca. 1 µg Eisen je Probe verwendet, die zu einer Signalintensität im Bereich von 10⁻⁸ Am² führt.

Wenn die Messung bei $B_a = 5 \text{ mT}$ durchgeführt wird, befindet sich die Verdünnungsstufe 1:10.000 bereits im Bereich der Nachweisgrenze. Aufgrund der Abhängigkeit der Signalintensität von dem Eisengehalt der Probe wird für die folgenden Versuche 1 µg Eisen pro Probe verwendet. Aus Abbildung 14 kann entnommen werden, dass 1 µg Eisen bei allen drei MNP-Systemen und einer Feldstärke von $B_a = 25 \text{ mT}$ zu einer Amplitude der fünften Harmonischen im Bereich von 1 nAm² und bei einer Feldstärke von $B_a = 5 \text{ mT}$ zu einer Amplitude im Bereich von 0,1 nAm² führt. Damit befindet sich das MPS-Signal bei der Feldstärke $B_a = 25 \text{ mT}$ um den Faktor 1000 und bei der Feldstärke $B_a = 5 \text{ mT}$ um den Faktor 100 über der Nachweisgrenze der MPS.

Wenn eine lineare Funktion an die Messwerte der fünften Harmonischen bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT angelegt wird, schneidet diese Funktion die horizontale Nachweisgrenze bei einer Eisenmasse von $m_{Fe} = 7,39$ ng. Bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT schneit die lineare Funktion die Nachweisgrenze bei $m_{Fe} = 1,30$ ng. Dies entspricht der minimalen Eisenmasse, die zum Nachweis mit der MPS bei der jeweiligen Anregungsfeldstärke verwendet werden muss.

Bei Verwendung einer Eisenmasse von 1 µg je Probe kann ein ausreichend hohes MPS-Signal generiert und zugleich B-BSA gespart werden, da das B-BSA-MNP-Verhältnis für die Quervernetzung entscheidend ist.

Diskussion und Fazit

In den folgenden Quervernetzungsversuchen wird mit einem Endvolumen von $V = 20 \,\mu\text{L}$ gearbeitet, woraus sich eine benötigte Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0.05 \,\text{g/L}$ je Probe ergibt.

Eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0,05 \text{ g/L}$ führt im MPS zu einer Signalamplitude der fünften Harmonischen A_5 im Bereich von 1 nAm². Diese Signalintensität ist für den Nachweis der Quervernetzung mittels der MPS aufgrund der hohen Sensitivität der Methodik ausreichend.

Wenn die Eisenkonzentration der Proben erhöht wird, muss für die Quervernetzung ebenso die B-BSA-Konzentration erhöht werden, da für die Quervernetzung das B-BSA-MNP-Verhältnis ausschlaggebend ist. Dies erfordert den Verbrauch von einer sehr hohen Menge B-BSA, weshalb im Rahmen dieser Arbeit geringe Eisenkonzentrationen verwendet werden.

4.2.2 Ermittlung der Sensitivität

Die Sensitivität der MPS entspricht der Änderungsrate der dritten Harmonischen A_3 in Abhängigkeit der Eisenmasse des jeweiligen MNP-Systems und stellt demzufolge die Steigung der Geraden in Abbildung 15 dar.

Auswertung und Ergebnis

Zur Bestimmung der Sensitivität der MPS wird eine lineare Kurvenanpassung ("Linear Fit") durchgeführt, wodurch die Steigung der Geraden durch eine definierte Anzahl von Messpunkten bestimmt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die ersten fünf Messwerte der dritten Harmonischen gewählt (Verdünnung 1:1 bis 1:100 000), da diese über der Nachweisgrenze der MPS liegen (siehe Abschnitt 4.2.1). In Abbildung 15 ist die lineare Kurvenanpassung für das MNP-System SY50 bei $B_a = 25$ mT dargestellt.



Abbildung 15: Lineare Kurvenanpassung der MPS-Signalamplitude A_3 für das MNP-System SY50 bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT.

Die Steigung der Geraden und damit die Sensitivität der MPS für das MNP-System SY50 entspricht 0,028 Am²/g (siehe Abbildung 15). Entsprechend dieser Vorgehensweise ergeben sich für die drei verwendeten MNP-Systeme die in Tabelle 7 dargestellten Sensitivitäten.

MNP-System	Sensitivität B _a = 25 mT [Am²/g]	Sensitivität B _a = 5 mT [Am ² /g]
SY50	0,028	3,9 · 10 ⁻³
SY64	0,027	4,3 · 10 ⁻³
PE23	0,017	3,1 · 10 ⁻³

Tabelle 7: Sensitivitäten der MNP-Systeme SY50, SY64 und PE23 bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT.

In Abbildung 16 sind die Sensitivitäten in Abhängigkeit von dem hydrodynamischen Durchmesser der MNP-Systeme dargestellt.



Abbildung 16: Sensitivität A_3^* in Abhängigkeit von dem hydrodynamischen Durchmesser d_{hyd} der verwendeten MNP-Systeme bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT.

Bei Auswertung der Sensitivität bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT ist erkennbar, dass die Sensitivität mit der Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers sinkt (siehe Abbildung 16). Die Differenz zwischen dem MNP-System PE23 mit der geringsten Sensitivität und SY50 mit der höchsten Sensitivität beträgt 39,29 %. Die Sensitivitäten der MNP-Systeme SY50 und SY64 unterscheiden sich mit 3,57 % nur gering voneinander. Bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT ist die Sensitivität für das MNP-System PE23 mit dem größten hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 130$ nm ebenfalls am geringsten. Allerdings ist die Sensitivität des MNP-Systems SY64 mit dem hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 70$ nm um 10,26 % höher als die des MNP-Systems SY50 mit dem geringsten hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 50$ nm.

Die Signalintensitäten im MPS sind von dem hydrodynamischen Durchmesser der MNP-Systeme abhängig. Bei Auswertung der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT nimmt die Sensitivität mit der Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers ab. Bei der Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT ist derselbe Effekt zu beobachten, mit der Ausnahme, dass die Sensitivität bei dem MNP-System SY64 im Vergleich zu SY50 zunimmt.

Diskussion und Fazit

Je größer der hydrodynamische Durchmesser der MNP-Systeme ist, desto schlechter können die magnetischen Momente der hochfrequenten Anregung folgen. Mobile MNP relaxieren nach Brown, da die Drehung des Magnetisierungsvektors innerhalb der MNP langsamer ist als die Rotation des gesamten MNP [7]. Die Brown-Relaxationszeit ist von der hydrodynamischen Größe der MNP abhängig. Je größer der hydrodynamische Durchmesser der MNP ist, desto höher ist die Brown-Relaxationszeit (siehe Abschnitt 2.1.2.1, Formel (1)). Dieser Mechanismus führt dazu, dass die MPS-Signalamplitude mit zunehmender Größe der MNP abnimmt.

Das MNP-System SY50 weist die höchste Sensitivität auf, wodurch dieses MNP-System für die MPS-Messungen am besten geeignet ist. Das MNP-System PE23 erzeugt hingegen im Vergleich zu den MNP-Systemen SY50 und SY64 die geringste Signalintensität. Für die Quervernetzungsexperimente mit B-BSA eignet aufgrund dessen das MNP-System SY50 mit einer Sensitivität von $A_3^* = 0,028 \text{ Am}^2/g_{Fe}$ am besten.

4.2.3 Konzentrationsunabhängige Signalparameter

Zur Auswertung der Messergebnisse stehen unterschiedliche Signalparameter der MPS zur Verfügung. In dem folgenden Abschnitt wird auf zwei wichtige Signalparameter eingegangen, anhand derer die Quervernetzung der MNP mit B-BSA beurteilt werden kann.

Im Zuge dessen werden die Messdaten aus Abschnitt 4.2.1 in Bezug auf das A_5/A_3 -Verhältnis und die Phase der dritten Harmonischen φ_3 ausgewertet.

4.2.3.1 A5/A3-Verhältnis

Zur Auswertung wird anstatt der Amplitude der Harmonischen das in Abbildung 17 dargestellte konzentrationsunabhängige A_5/A_3 -Verhältnis ausgewertet.



Abbildung 17: Untersuchung des konzentrationsunabhängigen A_5/A_3 -Verhältnisses der verwendeten MNP-Systeme in Abhängigkeit von der Eisenmasse der Probe bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT.

Anhand der Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnisses sind Rückschlüsse auf die Wechselwirkung der MNP-Systeme mit dem Medium möglich. Das A_5/A_3 -Verhältnis bleibt bei diesem Experiment aufgrund der logarithmischen Verdünnung der MNP-Proben bis zur Nachweisgrenze der MPS konstant. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sich die magnetischen Eigenschaften der MNP nicht durch die Verdünnung der Proben mit 0,1 w/w-% BSA-Lösung verändern. Bei geringeren Eisenkonzentrationen kommt es aufgrund der Nachweisgrenze der MPS sowohl bei $B_a = 5$ mT als auch bei $B_a = 25$ mT zu starken Schwankungen im A_5/A_3 -Verhältnis.

Das A_5/A_3 -Verhältnis bleibt bei den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:10⁴ bei beiden Anregungsfeldstärken nahezu konstant.

4.2.3.2 Phase der dritten Harmonischen Ø3

Anhand der Phasenverschiebung der dritten Harmonischen sind Rückschlüsse auf die Größe der ausgebildeten Komplexe möglich. Durch die Quervernetzung der MNP mit B-BSA wird der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe erhöht. Größere Komplexe führen zu einer verlängerten Brown-Relaxationszeit, wodurch die Phasenverschiebung zunimmt.

In Abbildung 18 ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 der Verdünnungsreihen der MNP-Systeme aus Kapitel 4.2.1 dargestellt.



Abbildung 18: Untersuchung der Phasenverschiebung des Zeitsignals auf das wechselnde Anregungsfeld der dritten Harmonischen A_3 der verwendeten MNP-Systeme in Abhängigkeit von der Eisenmasse m_{Fe} der Probe bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}$.

Die Phase φ_3 bleibt bis zu der Verdünnungsstufe 1:10³ konstant (siehe Abbildung 13). Ab der Verdünnungsstufe 1:10⁴ befinden sich die Messwerte bei der Feldstärke $B_a = 5$ mT bereits im Bereich der Nachweisgrenze der MPS. Daher sind die Messwerte nicht mehr eindeutig vom Rauschen des Messsystems unterscheidbar. Bei Auswertung der Messdaten bei den Feldstärken $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT ist auffällig, dass die Phasenverschiebung des MNP-Systems SY64 am höchsten ist, obwohl dieses MNP-System lediglich einen hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 70$ nm aufweist. Das MNP-System PE23 mit dem größten hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 130$ nm weist wie erwartet eine größere Phasenverschiebung als das MNP-System SY50 mit dem geringsten hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 50$ nm auf.

Die Phase der dritten Harmonischen φ_3 bleibt bei den Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:10³ bei beiden Anregungsfeldstärken nahezu konstant. Für weitere Experimente im Rahmen dieser Arbeit wird eine Eisenmasse von 1 µg verwendet, da sowohl im A_5/A_3 -Verhältnis als auch in der Phase der dritten Harmonischen unter Verwendung dieser Eisenmasse keine Schwankungen auftreten. Mit einem Probenvolumen von $V_{\text{Probe}} = 20 \,\mu\text{L}$ ergibt sich eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0,05 \,\text{g/L}.$

4.2.4 Immobilisierung der MNP

In diesem Abschnitt wird auf die Immobilisierung der MNP-Systeme mithilfe der Gefriertrocknung in einer Mannitol-Lösung eingegangen. Durch die Immobilisierung wird die Brown-Relaxation der MNP verhindert. Neben der Brown-Relaxation können die MNP auch nach Nèel relaxieren, wobei sich lediglich die atomaren magnetischen Momente mit dem angelegten Magnetfeld ausrichten (siehe 2.1.2.1).

Probenpräparation und Messablauf

Es wird eine 1:2 Verdünnung der MNP-Systeme SY50, SY64 und PE23 mit einer 10 %w/w Mannitol-Lösung hergestellt. Hierfür werden jeweils 6 µl der MNP-Lösung und 12 µl der 10 %-w/w Mannitol-Lösung in ein PCR-Tube pipettiert. Anschließend werden die Proben für t = 10 s bei n = 2200 rpm mit dem Vortexer gemischt. Vor der Immobilisierung der MNP wird das MPS-Signal der mobilen MNP als Vergleichswert gemessen.

Im nächsten Schritt werden die MNP in der Gefriertrocknungsanlage gefriergetrocknet, wodurch die Mannitol-Lösung kristallisiert und die MNP in dem entstanden Kristallgitter immobilisiert werden (siehe 2.4). Anschließend wird das MPS-Signal der gefriergetrockneten MNP-Proben gemessen.

Auswertung und Ergebnis

Zur Auswertung der Messergebnisse wird die Änderung des A_5/A_3 -Verhältnisses und die Phase der dritten Harmonischen φ_3 untersucht.

A₅/A₃-Verhältnis

In Abbildung 19 sind die Änderungen der A_5/A_3 -Verhältnisse durch die Immobilisierung der MNP-Systeme dargestellt.



Abbildung 19: Änderung des A_5/A_3 -Verhältnisses durch die Immobilisierung der MNP-Systeme (a) SY50, (b) SY64 und (c) PE23 in Abhängigkeit von der Anregungsfeldstärke B_a .

Das A_5/A_3 -Verhältnis des MNP-Systems SY50 nimmt durch die Immobilisierung bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT und $B_a = 12$ mT im Durchschnitt um 1,89 %-Punkte zu. Bei einer Anregungsfeldstärken von $B_a = 25$ mT nimmt das A_5/A_3 -Verhältnis um 2,29 %-Punkte ab. Bei dem MNP-System SY64 nimmt das A_5/A_3 -Verhältnis durch die Immobilisierung im Durchschnitt um 6,48 %-Punkte ab. Das A_5/A_3 -Verhältnis des MNP-Systems PE23 nimmt im Durchschnitt durch die Immobilisierung um 3,81 %-Punkte ab.

Bei den MNP-Systemen SY64 und PE23 ist eine Abnahme des A_5/A_3 -Verhältnisses messbar. Bei dem MNP-System SY50 ist nur bei der Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT eine Abnahme des A_5/A_3 -Verhältnisses nachweisbar.

Phase der dritten Harmonischen φ_3

In Abbildung 20 ist die Änderung der Phase φ_3 durch die Immobilisierung der MNP-Systeme dargestellt.



Abbildung 20: Änderung der Phase φ_3 durch die Immobilisierung der MNP-Systeme (a) SY50, (b) SY64 und (c) PE23 in Abhängigkeit von der Anregungsfeldstärke B_a .

Durch die Immobilisierung nimmt die Phasenverschiebung bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 5 \text{ mT}$ bei dem MNP-System SY50 um 19,55°, bei SY64 um 24,38° und bei PE23 um 2,47 ° zu.

Die Phasenverschiebung bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 12$ mT nimmt bei dem MNP-System SY50 um 5,76° und bei SY64 um 12,39° zu. Bei dem MNP-System PE23 nimmt die Phasenverschiebung um 0,93° ab.

Bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25 \text{ mT}$ nimmt die Phasenverschiebung bei dem MNP-System SY50 um 0,44° und bei PE23 um 2,07° ab. Bei dem MNP-System SY64 nimmt die Phasenverschiebung um 1,47° zu.

Eine signifikante Zunahme der Phasenverschiebung ist nur bei den Anregungsfeldstärke $B_a = 5 \text{ mT}$ und $B_a = 12 \text{ mT}$ messbar (SY50 und SY64). Bei dem MNP-System PE23 ist eine Zunahme der Phasenverschiebung lediglich bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 5 \text{ mT}$ messbar.

Diskussion und Fazit

Durch die Gefriertrocknung der MNP-Mannitol-Lösung werden die MNP in einer Mannitol-Matrix immobilisiert. Dadurch können die MNP nicht mehr rotieren und ihre magnetischen Momente durch den Brown-Relaxationsmechanismus mit dem Anregungsfeld ausrichten. [51] Dies ist im MPS durch ein geringeres A_5/A_3 -Verhältnis und eine höhere Phasenverschiebung nachweisbar. Allerdings können die MNP zudem nach Nèel relaxieren (siehe Abschnitt 2.1.2.1), wodurch sich lediglich die magnetischen Momente der MNP mit dem Anregungsfeld ausrichten, ohne zu rotieren. Dieser Relaxationsmechanismus findet trotz Immobilisierung statt und führt zu einem höheren A_5/A_3 -Verhältnis der immobilisierten Proben.

Durch die Immobilisierung der MNP nimmt das A_5/A_3 -Verhältnis der MNP-Systeme SY64 und PE23 bei allen Anregungsfeldstärken ab. Diese Beobachtung ist durch die erhöhte Brown-Relaxationszeit der MNP zu erklären. Bei dem MNP-System SY50 ist eine Zunahme des A_5/A_3 -Verhältnisses zu beobachten. Dieser Effekt lässt sich durch die Kettenbildung der MNP erklären, die zu einer Signalzunahme führt [52] [53]. Der Zusammenhang zwischen der Kettenbildung von MNP und der Zunahme des A_5/A_3 -Verhältnisses wird durch das Experiment der feldabhängigen Feldexposition während der Inkubation untersucht. (siehe Abschnitt 4.3.4).

Die Abnahme des A_5/A_3 -Verhältnisses lässt sich dadurch erklären, dass sich die magnetischen Momente der immobilen MNP dem Anregungssignal von $f_0 = 25$ kHz langsamer mit dem angelegten Magnetfeld ausrichten. Dadurch wird erwartet, dass die Phasenverschiebung zunimmt. Bei einem Anregungsfeld von $B_a = 25$ mT wird allerdings eine geringe Abnahme der Phasenverschiebung festgestellt. Die Differenz zwischen der Phasenverschiebung der immobilisierten MNP und den mobilen MNP ist sehr gering. Je höher das Anregungsfeld B_a ist, desto weniger ist die Phasenverschiebung messbar, da die hohe Anregungsfeldstärke zu einer schnelleren Ausrichtung der magnetischen Momente führt.

Das Experiment zeigt, dass die Änderung des A_5/A_3 -Verhältnisses durch die Immobilisierung bei allen verwendeten MNP-Systemen SY50, SY64 und PE23 nachweisbar ist. Aufgrund der schnelleren Ausrichtung der magnetischen Momente der MNP mit zunehmender Anregungsfeldstärke B_a ist der Effekt der Phasenverschiebung nur bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT bei allen verwendeten MNP-Systemen nachweisbar. Dies bedeutet, dass die Signaländerung bei $B_a = 5$ mT hoch genug ist, um eine Quervernetzung der MNP-Systeme anhand des MPS-Signals nachzuweisen.

4.3 Quervernetzung der MNP mit B-BSA

Die Quervernetzung der MNP mit B-BSA stellt den Hauptteil dieser Arbeit dar. Innerhalb dieses Abschnitts wird zunächst auf die Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion von der Anregungsfeldstärke eingegangen. Anschließend wird die Reproduzierbarkeit der Methodik nachgewiesen. Zuletzt wird der Einfluss der Inkubationszeit und der Einfluss eines externen Magnetfeldes auf das MPS-Signal der Proben während der Inkubation untersucht.

4.3.1 Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion von der Anregungsfeldstärke

In diesem Abschnitt wird die Änderung des MPS-Signals durch die Quervernetzungsreaktion der MNP-Systeme mit B-BSA in Abhängigkeit von der Anregungsfeldstärke untersucht.

Probenpräparation und Messablauf

Herstellung der B-BSA-Verdünnungsreihe

Zur Bestimmung der Vernetzungsfähigkeit wird eine Konzentrationsreihe mit unterschiedlichem Gehalt an B-BSA präpariert. Einen ersten Anhaltspunkt für eine geeignete Konzentrationsreihe des B-BSA liefert die Dissertation von Heim [39]. Das B-BSA zu MNP-Verhältnis aus jener Arbeit wird auf die erste Verdünnungsreihe dieser Arbeit übertragen. Anschließend wird die Verdünnungsreihe im Rahmen eines weiteren Experiments konkretisiert, sodass das Maximum der Quervernetzungsreaktion und damit das optimale Verhältnis der Reaktanden feiner abgetastet werden kann. Die Pipettierschemata zur Herstellung der B-BSA-Verdünnungen sind in Anhang A.1.c zu finden.

Herstellung der MNP-Verdünnung

Die MNP-Lösungen werden vor der Durchführung des Quervernetzungsexperiments mit 0,1 %-w/w BSA-Lösung verdünnt, sodass eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0,05$ g/L je Probe erreicht wird. Hierfür wird die an der PTB gemessene Eisenkonzentration der MNP-Systeme (siehe Tabelle 2) berücksichtig. Das Pipettierschema ist in Anhang A.1.d zu finden.

Nachdem die entsprechende MNP-Lösung hergestellt worden ist, werden die Proben für t = 30 s bei n = 2200 rpm zentrifugiert, sodass sich größere Agglomerate der MNP am Boden des Eppendorf-Gefäßes absetzen. Anschließend werden 80 % des Überstandes in ein weiteres Eppendorf-Gefäß pipettiert. Der Überstand wird für die folgenden Quervernetzungsexperimente verwendet. Durch diese Vorgehensweise wird sichergestellt, dass potenziell vorhandene MNP-Agglomerate das Messergebnis nicht beeinflussen und vor jedem Experiment einheitliche Messbedingungen herrschen. Durch die Zentrifugation der Proben nimmt die Eisenkonzentration im Überstand ab. Dieser Effekt wird allerdings als unerheblich erachtet, da die Abnahme der Eisenkonzentration durch die kurze

Zentrifugationszeit erfahrungsgemäß geringfügig ist. Für das Quervernetzungsexperiment mit dem MNP-System PE23 werden 270 μ L MNP-Lösung (26 Proben + 1 Kontrolle) benötigt. Für MNP-System SY50 und SY64 werden aufgrund weniger Verdünnungsschritte lediglich 230 μ L der MNP-Lösung benötigt. Da nur 80 % der Ausgangslösung durch das Abpipettieren des Überstandes verwendet werden, werden je MNP-System 320 μ L MNP-Lösung hergestellt. Das übrigbleibende Volumen wird als Reserve zurückbehalten.

Herstellung der Quervernetzungsproben

Für die Präparation der Quervernetzungsproben werden die zuvor hergestellten B-BSA-Verdünnungen und die MNP-Verdünnungen benötigt. Es jeweils 10 µL der B-BSA-Verdünnung und 10 µL der MNP-Verdünnung in ein PCR-Tube pipettiert. Das PCR-Tube wird anschließend für t = 10 s bei n = 2200 rpm gevortext und für 4 h bei Rautemperatur inkubiert.

Messablauf

Die Messung erfolgt im MPS bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5 \text{ mT}$, $B_a = 12 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}$ im Skriptmodus (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Damit die darauffolgende Probe keinem 25 mT Magnetfeld ausgesetzt ist, wird eine Abschlussmessung bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 0,05 \text{ mT}$ und einer Akquisitionszeit von t = 0,1 s durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise wird die Wahrscheinlichkeit der Kettenbildung der MNP im Magnetfeld minimiert [52].

Die Proben werden für alle drei MNP-Systeme nacheinander präpariert und anschließend nach Ablauf der Inkubationszeit von 4 h in derselben Reihenfolge gemessen, in der die Proben präpariert wurden. Durch die vierstündige Inkubationszeit sind geringe Abweichungen in der Inkubationszeit durch die Präparation der Proben für die Messung nicht relevant. Während der Messung wird in regelmäßigen Abständen eine neue Offset-Datei durch die Messung des leeren Probenstabs erstellt.

Auswertung und Ergebnis

In diesem Abschnitt wird auf die Auswertung der Quervernetzungsexperimente in Abhängigkeit von der Anregungsfeldstärke B_a eingegangen. Die angegebene relative Unsicherheit der Messwerte von $u_{rel} = 0,25$ % als Unsicherheitsbalken resultiert aus der Reproduzierbarkeit der Quervernetzungsreaktion (siehe Abschnitt 4.3.2).

MNP-System SY50

In Abbildung 21 ist das Quervernetzungsexperiment mit dem MNP-System SY50 dargestellt.



Abbildung 21: Quervernetzung des MNP-Systems SY50 mit B-BSA. In (a), (c) und (e) ist das A_5/A_3 -Verhältnis und in (b), (d) und (f) ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 bei der jeweiligen Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT, $B_a = 12$ mT und $B_a = 25$ mT dargestellt.

Bei einer geringen Anregungsfeldstärke von $B_a = 5 \text{ mT}$ richten sich die B-BSA-MNP-Komplexe entsprechend langsamer mit dem angelegten Feld aus. Durch diesen Effekt ist ein geringeres A_5/A_3 -Verhältnis messbar im Vergleich zu den Anregungsfeldstärken $B_a = 12 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}$.

Bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT wird im A_5/A_3 -Verhältnis und der Phase φ_3 bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von ca. 10⁻⁴ ein Ausreißer gemessen. In der Phase der dritten Harmonischen φ_3 ist dieser Effekt auch bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 12$ mT und $B_a = 25$ mT zu beobachten. Bei Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnisses schwanken die Messwerte im Rahmen der relativen Unsicherheit von 0,25 %, wodurch keine Minima oder Maxima erkennbar sind. Daraus geht hervor, dass mit dem MNP-System SY50 keine Quervernetzung mit B-BSA beobachtet werden kann.

MNP-System SY64

In Abbildung 22 ist das Quervernetzungsexperiment mit dem MNP-System SY64 dargestellt.



Abbildung 22: Quervernetzung des MNP-Systems SY64 mit B-BSA. In (a), (c) und (e) ist das A_5/A_3 -Verhältnis und in (b), (d) und (f) ist die Phasen der dritten Harmonischen φ_3 bei der jeweiligen Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT, $B_a = 12$ mT und $B_a = 25$ mT dargestellt.

Bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von ca. 10^{-3} bildet sich im A_5/A_3 -Verhältnis ein Minimum aus, das allerdings im Rahmen der relativen Unsicherheit von 0,25 % liegt (siehe Abbildung 22). Es ist keine Änderung des A_5/A_3 -Verhältnisses oder der Phasenverschiebung messbar. Daraus geht hervor, dass das MNP-System SY64 keine mit dem MPS nachweisbare Quervernetzung mit B-BSA ausbildet.

MNP-System PE23

In Abbildung 23 ist das Quervernetzungsexperiment mit dem MNP-Systems PE23 dargestellt.



Abbildung 23: Quervernetzung des MNP-Systems PE23 mit B-BSA. In (a), (c) und (e) ist das A_5/A_3 -Verhältnis und in (b), (d) und (f) ist die Phasen der dritten Harmonischen φ_3 bei der jeweiligen Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT, $B_a = 12$ mT und $B_a = 25$ mT dargestellt.

Das A_5/A_3 -Verhältnis erhöht sich bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 0,59 bis zu der Ausbildung eines Maximums bei 37,5 (siehe Abbildung 23). Das A_5/A_3 -Verhältnis nimmt anschließend mit weiterer Erhöhung des B-BSA-MNP-Verhältnisses bis zu einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 300 ab. Bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 600 steigt der A_5/A_3 -Wert weiter an und übersteigt sogar das A_5/A_3 -Verhältnis des Maximums. Die Phasenverschiebung der dritten Harmonischen nimmt bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 0,59 bis zur Ausbildung eines Minimums bei 9,38 zu. Bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 18,75 bis 600 nimmt die Phasenverschiebung wieder ab.

Bei Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnisses bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5 \text{ mT}$ steigt der A_5/A_3 -Wert im Maximum im Vergleich zur Basislinie¹² um 0,62 %-Punkte an. Bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 12 \text{ mT}$ steigt der A_5/A_3 -Wert im Maximum um 0,79 %-Punkte und bei $B_a = 25 \text{ mT}$ um 0,7 %-Punkte an. Zudem kann bei der Anregungsfeldstärke von $B_a = 25 \text{ mT}$ eine Zunahme der Phasenverschiebung um 0,2° beobachtet

¹² Zur Ermittlung der Basislinie wird der Mittelwert der Messungen bei der jeweiligen Feldstärke von Probe 12 – 26 berechnet.

werden. Bei den anderen Anregungsfeldstärken ist hingegen keine Änderung der Phasenverschiebung messbar.

Bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 0,59 bis 300 wird bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT ein Anstieg des A_5/A_3 -Verhältnisses um 0,7 %-Punkte und eine Zunahme der Phasenverschiebung um 0,2° beobachtet. Diese Signaländerung lässt auf die Entstehung von B-BSA-MNP-Quervernetzungen schließen, die zu einer höheren Phasenverschiebung und einem höheren A_5/A_3 -Verhältnis führen.

Die anderen MNP-Systeme SY50 und SY64 eigenen sich nicht für den Nachweis der Quervernetzungsreaktion mit B-BSA mithilfe der MPS, da innerhalb der durchgeführten Experimente keine signifikante Signaländerung beobachtet werden kann.

Diskussion und Fazit

Unter Verwendung des MNP-Systems PE23 ist bei Variation der BSA-Konzentration unter gleichbleibender Eisenkonzentration eine Zunahme des *A*₅/*A*₃-Verhältnisses und der Phasenverschiebung mit steigender B-BSA-Konzentration zu beobachten. Die Signaländerung deutet auf eine Quervernetzung der MNP mit B-BSA hin, wodurch sich das dynamische Magnetisierungsverhalten der MNP verändert. Das Maximum der Quervernetzung ist bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 zu erkennen. Dies entspricht dem Äquivalenzbereich, in dem die größte Komplexgröße erreicht ist. Die Quervernetzungsreaktion entspricht dem Kurvenverlauf von Heidelberger und Kendall [8] (siehe Abschnitt 1.1). Nimmt das B-BSA-MNP-Verhältnis weiter zu, verkleinert sich die Komplexgröße wieder [7]. Bei der Arbeit von Heim [7] findet die maximale Signaländerung bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 4,5 statt. Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass das Optimum der Quervernetzungsreaktion von dem MNP-System abhängig ist.

Das erhöhte *A*₅/*A*₃-Verhältnis bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 600 kann durch die Agglomeration von B-BSA entstehen. In der Phase der dritten Harmonischen ist keine Erhöhung der Phasenverschiebung wie bei der Ausbildung des Maximums zu erkennen. Diese Beobachtung indiziert, dass die B-BSA-Moleküle bei einer sehr hohen Konzentration teilweise ohne MNP agglomerieren. Die Agglomeration von B-BSA könnte dazu führen, dass größere B-BSA-Komplexe entstehen, die die Streptavidin-funktionalisierten MNP binden können, wodurch eine quervernetzungsähnliche Reaktion stattfinden könnte.

Die Voruntersuchungen haben ergeben, dass das A_5/A_3 -Verhältnis durch die Immobilisierung der MNP abnimmt (siehe Abschnitt 4.2.4). Aufgrund dessen wurde erwartet, dass das A_5/A_3 -Verhältnis durch die Quervernetzung der MNP mit B-BSA ebenfalls abnimmt. Allerdings wird durch das vorliegende Experiment nachgewiesen, dass das A_5/A_3 -Verhältnis durch die Quervernetzungsreaktion zunimmt. Dieses Phänomen könnte auf die Kettenbildung der MNP zurückzuführen sein, die erfahrungsgemäß ein höheres A_5/A_3 -Verhältnis und eine höhere Phasenverschiebung verursacht. Die MNP-Systeme SY50 und SY64 haben im Vergleich zu PE23 eine höhere Sensitivität (siehe Abschnitt 4.2.2). Aufgrund dessen würde SY50 und SY64 bevorzugt für die Quervernetzungsexperimente eingesetzt werden. Allerdings ist eine signifikante MPS-Signaländerung, die auf eine Quervernetzung der MNP mit B-BSA schließen lässt, nur mit dem MNP-System PE23 messbar.

Die Auswertung der Quervernetzungsreaktion des MNP-Systems PE23 erfolgt für alle weiteren Experimente bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT, da bei dieser Feldstärke sowohl im A_5/A_3 -Verhältnis (0,7 %-Punkte) als auch in der Phasenverschiebung (0,2°) eine Signaländerung messbar ist. Des Weiteren ist die Sensitivität bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT am höchsten (siehe Abschnitt 4.2.2).

4.3.2 Reproduzierbarkeit der Methodik

Die Reproduzierbarkeit der Methodik wird anhand des MNP-Systems PE23 untersucht. Dazu wird das Quervernetzungsexperiment dreimal durchgeführt. Anschließend wird die Unsicherheit des Experiments ermittelt.

Probenpräparation und Messablauf

Die Probenpräparation für die Quervernetzung des MNP-Systems PE23 erfolgt analog zu Kapitel 4.3.1. Der Messzyklus entspricht dem in Kapitel 4.3.1 beschriebenem Ablauf.

Auswertung und Ergebnis

In Abbildung 24 sind die Messwerte des Originalexperiment und die im Rahmen des Wiederholungsexperiments erfassten Messwerte bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25 \text{ mT}$ dargestellt.



Abbildung 24: Darstellung der Reproduzierbarkeit der Methodik anhand der Durchführung von zwei Wiederholungsexperimenten mit identischem Ablauf. In (a), (c) und (e) ist das A_5/A_3 -Verhältnis dargestellt. In (b), (d) und (f) ist die Phasen der dritten Harmonischen φ_3 zu sehen. In (a) und (b) sind die Ergebnisse des Originalexperiments abgebildet. In (c) und (d) ist das erste und in (e) und (f) ist das zweite Wiederholungsexperiment abgebildet. Die Auswertung erfolgt bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT.

Zur Berechnung der relativen Unsicherheit wird der Mittelwert und die Standardabweichung der A_5/A_3 -Messwerte der drei durchgeführten Experimente ermittelt. Anschließend wird die relative Unsicherheit für jeden Messwert mit der Formel (8) berechnet. Daraus ergibt sich eine mittlere relative Unsicherheit von $u_{rel} = 0,25$ %. Die relative Unsicherheit von $u_{rel} = 0.25$ % wird im Rahmen eines Unsicherheitsbalkens für jeden Messwert berücksichtigt.

Diskussion und Fazit

Die Quervernetzungsreaktion ist durch alle drei Experimente mit einer relativen Unsicherheit von $u_{rel} = 0.25$ % reproduzierbar (siehe Abbildung 24).

Die Quervernetzung der MNP mit B-BSA ist durch die Ausbildung eines Maximums im A_5/A_3 -Verhältnis bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 4,69 bis 37,5 gekennzeichnet. Die Quervernetzung der MNP mit B-BSA verursacht zudem eine Phasenverschiebung durch die Größe der entstandenen B-BSA-MNP-Komplexe. Die Phasenverschiebung erreicht das Maximum ebenfalls bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 bis 37,5.

Auffällig ist, dass bei einem sehr hohen B-BSA-MNP-Verhältnis von 600 (bzw. einer B-BSA-Konzentration von 60 mg/mL) bei Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnises ein Anstieg des MPS-Signals nachgewiesen werden kann. Nach Berücksichtigung der Unsicherheit von $u_{rel} = 0,25$ % liegt der Messwert bei 60 mg/mL B-BSA im Bereich des Maximums der Quervernetzungsreaktion. Da dieser Messwert reproduzierbar nachweisbar ist, kann dieser Effekt durch die erhöhte Viskosität bei hohen B-BSA-Konzentrationen erklärt werden. Durch die erhöhte Viskosität kann es zu einer Agglomeration der B-BSA-Moleküle ohne MNP kommen. Die Agglomeration von B-BSA könnte dazu führen, dass eine quervernetzungsähnliche Reaktion stattfindet.

Bei Betrachtung der Phase der dritten Harmonischen φ_3 ist auffällig, dass die größte Phasenverschiebung bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 bis 18,8 stattfindet. Bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 nimmt die Phasenverschiebung und damit die Größe der Komplexe wieder ab.

4.3.3 Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In diesem Abschnitt wird die Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion des MNP-Systems PE23 von der Inkubationszeit untersucht.

Probenpräparation und Messablauf

Die Probenherstellung für das MNP-System PE23 erfolgt gemäß Kapitel 4.3.1. Vor jedem Messzyklus werden die Proben für t = 10 s bei n = 2200 rpm gevortext.

Der Messzyklus entspricht dem in Kapitel 4.3.1 beschriebenem Ablauf. Zur Beurteilung des Einflusses der Inkubationszeit auf das A_5/A_3 -Verhältnis und die Phase φ_3 der Quervernetzungsproben werden die quervernetzten Proben des MNP-Systems PE23 nach 4 h, 24 h, 72 h und 168 h im MPS gemessen.

Auswertung und Ergebnis

In Abbildung 25 ist das A_5/A_3 -Verhältnis in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT dargestellt.



Abbildung 25: Abhängigkeit des A_5/A_3 -Verhältnisses von der Inkubationszeit (4 h rot, 24 h grau, 72 h blau und 158 h grün). Die Messung erfolgt bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT.

Das A_5/A_3 -Verhältnis erhöht sich mit zunehmender Inkubationszeit deutlich (siehe Abbildung 25). Die Basislinie bleibt unter Berücksichtigung der relativen Unsicherheit von $u_{rel} = 0,25$ % bis zu einer Inkubationszeit von 72 h konstant. Das Maximum, welches die Quervernetzung von B-BSA mit dem MNP-System indiziert, steigt mit der Erhöhung der Inkubationszeit.

PE23

Des Weiteren geht aus Abbildung 25 hervor, dass die Differenz der A_5/A_3 -Werte zwischen den B-BSA-MNP-Verhältnissen von 600 und 300 mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt.

In Abbildung 26 ist die Abhängigkeit der Phase der dritten Harmonischen φ_3 von der Inkubationszeit dargestellt.



Abbildung 26: Abhängigkeit der Phase der dritten Harmonischen φ_3 von der Inkubationszeit (4 h rot, 24 h grau, 72 h blau und 168 h grün). Die Messung erfolgt bei der Anregungsfeldstärke $B_a = 25$ mT.

Die Phasenverschiebung steigt mit zunehmender Inkubationszeit (siehe Abbildung 26). Bei einer Inkubationszeit von 72 h wird beobachtet, dass die Messwerte der Basislinie zunehmen. Im Gegensatz dazu verschiebt sich die Basislinie bei Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnises im Rahmen der Unsicherheit.

Bei einer Inkubationszeit von 168 h unterscheidet sich die Basislinie bei geringen B-BSA-MNP-Verhältnissen sowohl bei Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnisses als auch der Phasenverschiebung signifikant von der Basislinie bei kürzeren Inkubationszeiten. Der Effekt der Quervernetzung kann bereits nach einer Inkubationszeit von 4 h anhand des A_5/A_3 -Verhältnisses und der Phase der dritten Harmonischen A_3 beobachtet werden. Mit zunehmender Inkubationszeit verstärkt sich der Effekt.

Diskussion und Fazit

Bei einer Inkubationszeit von 168 h kommt es zu einem signifikanten Anstieg des A_5/A_3 -Verhältnisses bei geringen B-BSA-MNP-Verhältnissen. Der Anstieg der Basislinie kann durch Entstehung von B-BSA-MNP-Komplexe trotz geringer B-BSA-Konzentrationen erklärt werden.

Die Phasenverschiebung sowie das *A*₅/*A*₃-Verhältnis steigt mit zunehmender Inkubationszeit. Diese Beobachtung impliziert, dass die Entstehung der B-BSA-MNP-Komplexe zeitabhängig ist.

Auf der Basis dieser Ergebnisse kann die Überschreitung einer Inkubationszeit von 24 h nicht empfohlen werden, da sich die Messwerte der Basislinie signifikant voneinander unterscheiden. Dies würde zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen.

4.3.4 Feldabhängige Inkubation

In diesem Abschnitt wird der Einfluss eines externen Magnetfeldes während der Inkubation auf die Quervernetzungsreaktion untersucht. Die feldabhängige Inkubation wird analog zu den vorherigen Experimenten anhand des MNP-Systems PE23 durchgeführt.

Probenpräparation

Zur Untersuchung des Einflusses eines externen Magnetfeldes während der Inkubationszeit von 4 h werden abweichend zu den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Experimenten nicht alle B-BSA-Verdünnungsstufen verwendet. Stattdessen wird die Probe verwendet, bei der die größte Signaländerung zu erwarten ist. Die maximale Signaländerung findet bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 statt. Zudem wird die Probe mit der geringsten B-BSA-Konzentration verwendet. Das geringste B-BSA-MNP-Verhältnis des Hauptexperiments liegt bei $1,43 \cdot 10^{-10}$ (siehe Anhang A.1.f).

Die Inkubation der Proben erfolgt mithilfe des Skriptmodus direkt im MPS.

Messablauf

Das Experiment ist in zwei Teilexperimente aufgeteilt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Kontinuierliche Feldexposition (= KFE)

Das erste Teilexperiment sieht eine kontinuierliche Feldexposition der Proben im MPS vor. Hierfür wird ein Messskript verwendet, das nach jeder Messung bei $B_a = 25$ mT für t = 1 s eine Minute bis zur nächsten Messung bei $B_a = 25$ mT für t = 1 s wartet. Während der Wartezeit von einer Minute verbleibt die zu messende Probe in der Probenkammer des MPS. Zwischen den Messungen bleibt hierbei das Anregungsfeld von $B_a = 25$ mT bestehen (siehe Anhang A.2).

Diskontinuierliche Feldexposition (= DFE)

Das zweite Teilexperiment sieht eine diskontinuierlichen Feldexposition der Proben im MPS vor. Bei diesem Experiment werden die Proben innerhalb der Inkubationszeit von 4 h alle 15 Minuten für jeweils t = 1 s einem Feld von $B_a = 25$ mT ausgesetzt. Nach jeder Messung bei $B_a = 25$ mT wird eine Messung bei $B_a = 0,05$ mT für t = 0,1 s durchgeführt. Das MPS behält die Anregungsamplitude von $B_a = 0,05$ mT während der anschließenden Pause bis zur nächsten Messung bei. Da das Feld so gering ist, sind keine Auswirkungen auf das Komplexbildungsverhalten der Quervernetzungsproben zu erwarten. Durch diese Vorgehensweise sind die Proben bei diesem Experiment insgesamt 16-mal einem Feld von $B_a = 25$ mT für jeweils eine Sekunde ausgesetzt (siehe Anhang A.2).

Des Weiteren sei zu erwähnen, dass das MPS bei einer Kammertemperatur von $T = 37^{\circ}$ C misst. Die Inkubation erfolgte bei den vorherigen Experimenten bei Raumtemperatur, was im MPS-Labor einer Temperatur von ca. $T = 22^{\circ}$ C entspricht.
Auswertung und Ergebnis

In Abbildung 27 ist die Änderung des A_5/A_3 -Verhältnisses bei einer kontinuierlichen (KFE) und diskontinuierlichen (DFE) Feldexposition mit einer Anregungsamplitude von $B_a = 25$ mT während der Inkubationszeit dargestellt. In blau sind die Messwerte der Probe mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 aufgetragen. Das A_5/A_3 -Verhältnis dieser Probe liegt bei Inkubation ohne Feld im Rahmen des Hauptexperiments bei 42,43 % (siehe Abschnitt 4.3.1). In rot sind die Messwerte der Probe mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 1,43 \cdot 10⁻¹⁰ dargestellt, dessen A_5/A_3 -Verhältnis bei Inkubation ohne Feld im Rahmen des Hauptexperiments bei 42,43 % (siehe Abschnitt 4.3.1).



Abbildung 27: Darstellung des A_5/A_3 -Verhältnisses bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Feldexposition bei einem Anregungsfeld von $B_a = 25$ mT während der Inkubationszeit von 4 h. Die Probe, bei der im Rahmen der Quervernetzungsreaktion der maximale Effekt erzielt wurde (Probe 5) mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5, ist in blau dargestellt. Die Probe mit dem geringsten B-BSA-MNP-Verhältnis (Probe 26), ist in rot dargestellt.

Durch die kontinuierliche Feldexposition bei der Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT während der Inkubationszeit wird bei der Probe 5 mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 ein A_5/A_3 -Verhältnis von 44,06 % erreicht. Dies entspricht einem Anstieg von 1,63 %-Punkten im Vergleich zu der Inkubation ohne Feld. Bei der diskontinuierlichen Feldexposition wird ein A_5/A_3 -Verhältnis von 42,54 % erreicht. Im Vergleich zu der Inkubation ohne Feld entspricht dies einem Anstieg von 0,11 %-Punkten.

Bei der kontinuierlichen Feldexposition bei der Anregungsfeldstärke von $B_a = 25 \text{ mT}$ steigt das A_5/A_3 -Verhältnis der Probe 26 auf einen Wert von 43,53 % an. Das A_5/A_3 -

PE23

Verhältnis ist damit um 1,8 %-Punkte im Vergleich zu dem A_5/A_3 -Verhältnis derselben Probe bei Inkubation ohne Feldeinfluss gestiegen.

Bei der diskontinuierlichen Feldexposition steigt das A_5/A_3 -Verhältnis auf einen Wert von 42,04 % an. Das A_5/A_3 -Verhältnis ist damit um 0,31 %-Punkte im Vergleich zu der Inkubation ohne Feldeinfluss angestiegen.

In Abbildung 28 ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 dargestellt. Die Phase φ_3 der dritten Harmonischen der Probe 5 mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 liegt bei der diskontinuierlichen Feldexposition während der Inkubationszeit im Rahmen der Quervernetzungsexperiments bei -16,36°. Bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 1,43 · 10⁻¹⁰ liegt die Phasenverschiebung bei -16,23°. (siehe Abschnitt 4.3.1)



Abbildung 28: Darstellung der Phase der dritten Harmonischen φ_3 bei kontinuierlicher und diskontinuierlicher Feldexposition bei einem Anregungsfeld von $B_a = 25$ mT während der Inkubationszeit von 4 h. Die Probe, bei der der maximale Effekt erzielt wurde (Probe 5) mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5, ist in blau dargestellt. Die Probe mit dem geringsten B-BSA-MNP-Verhältnis (Probe 26), ist in rot dargestellt.

Durch die Auswertung der Phase der dritten Harmonischen φ_3 ist ein ähnlicher Trend wie bei der Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnisses erkennbar. Die Probe mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5, die kontinuierlich bei einem Anregungsfeld von $B_a = 25$ mT inkubiert wurde, weist eine Phasenverschiebung von -15,67° auf. Dies entspricht einer Differenz von 0,69° zur Phase des Hauptexperiments. Bei der diskontinuierlichen Feldexposition wird eine Phasenverschiebung von -15,44° gemessen. Die Phasenverschiebung bei der diskontinuierlichen Feldexposition ist um -0,23° geringer als bei der kontinuierlichen Feldexposition. Dies ist auf die Größe der entstandenen Komplexe zurückzuführen, da sich größere Komplexe langsamer mit dem äußeren Anregungsfeld ausrichten.

PE23

Bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von $1,43 \cdot 10^{-10}$ wird bei der kontinuierlichen Feldexposition bei $B_a = 25$ mT eine Phasenverschiebung von $-15,56^{\circ}$ ermittelt. Dies entspricht einer Differenz von $0,67^{\circ}$ zur Phasenverschiebung der Probe 26 des Quervernetzungsexperiments. Bei der diskontinuierlichen Feldexposition wird eine Phasenverschiebung von $-15,35^{\circ}$ gemessen. Die Phasenverschiebung bei der diskontinuierlichen Feldexposition ist um $0,21^{\circ}$ geringer als bei der kontinuierlichen Feldexposition. Dies ist ebenfalls auf die Größe der entstandenen Komplexe zurückzuführen.

Diskussion und Fazit

Aus der feldabhängigen Inkubation geht hervor, dass diese Vorgehensweise zu einer Erhöhung des A_5/A_3 -Verhältnisses führt. Dieser Effekt tritt allerdings nicht nur bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis auf, bei dem die Quervernetzungsreaktion erwartet wird. Der Effekt ist ebenfalls bei einem sehr geringen B-BSA-MNP-Verhältnis von $1,43 \cdot 10^{-10}$ nachweisbar. Diese Beobachtung spricht für die Kettenbildung der MNP während der Inkubation im Feld, die zu einer Zunahme des A_5/A_3 -Verhältnisses und der Phasenverschiebung führt.

Dieses Phänomen ist sowohl bei der kontinuierlichen als auch bei der diskontinuierlichen Feldexposition während der Inkubation feststellbar. Die Kettenbildung tritt hierbei bei der kontinuierlicher Feldexposition während der Inkubation verstärkt auf.

Neben dem Einfluss eines äußeren Feldes auf die Kettenbildung der MNP ist ebenso die Temperatur in der Messkammer des MPS entscheidend. Die Temperatur im MPS beträgt $T = 37^{\circ}$ C. Die Inkubation ohne Feldeinwirkung erfolgt bei Raumtemperatur, was einer Temperatur von ca. $T = 22^{\circ}$ C entspricht. Dieser Temperaturunterschied könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Quervernetzungsreaktion und die Kettenbildung der MNP haben.

Auf der Basis dieser Ergebnisse kann die Inkubation mit einer äußeren Feldeinwirkung nicht empfohlen werden, da es aufgrund der Kettenbildung der MNP zu Fehlinterpretationen der Signaländerungen kommen kann.

4.4 Kontrollexperimente

Zur Verifikation der entwickelten Methodik werden zwei Kontrollexperimente durchgeführt.

4.4.1 Abhängigkeit von der Oberflächenfunktionalisierung der MNP

In diesem Abschnitt wird die Quervernetzungsreaktion mit dem MNP-System PE21 durchgeführt, dessen organische Oberflächenbeschichtung nicht mit Streptavidin funktionalisiert ist. Durch dieses Kontrollexperiment wird die Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion von der Oberflächenfunktionalisierung der MNP untersucht.

Probenpräparation und Messablauf

Zur Durchführung dieses Experiments werden die Quervernetzungsproben gemäß Kapitel 4.3.1 mit dem MNP-System PE21 hergestellt. Die Messung der Proben im MPS erfolgt wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

Auswertung und Ergebnis

In Abbildung 29 ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 und das A_5/A_3 -Verhältnis dargestellt.



Abbildung 29: Kontrollexperiment zur Untersuchung der Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion von der Oberflächenfunktionalisierung der MNP. Hierbei wird das MNP-System PE23 durch PE21 ausgetauscht, das kein Streptavidin auf der Oberfläche gebunden hat. In (a) ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 und in (b) ist das A_5/A_3 -Verhältnis dargestellt. Unter Verwendung des MNP-Systems PE21 ohne Streptavidin-Funktionalisierung auf der MNP-Oberfläche ist kein signifikanter Anstieg des A_5/A_3 -Verhältnisses messbar. Zudem ist keine Phasenverschiebung feststellbar.

Die Phasenverschiebung des MNP-Systems PE21 liegt in einem Größenbereich von ca. - 24,4°. Damit ist die Phasenverschiebung um den Faktor 1,5 größer als bei dem MNP-Systems PE23 mit Streptavidin-Funktionalisierung auf der Oberfläche (siehe 4.3.1).

Des Weiteren kann ein Ausreißer bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 4,69 beobachtet werden, der nicht im Rahmen der Unsicherheit liegt.

Diskussion und Fazit

Ein möglicher Grund für die größere Phasenverschiebung des MNP-Systems PE21 im Vergleich zu PE23 ist, dass die MNP-Kerne mit großer Wahrscheinlichkeit nicht identisch sind. Aufgrund dessen kann sich der Magnetismus und damit das MPS-Signal deutlich unterscheiden.

Durch dieses Experiment wird nachgewiesen, dass die messbaren Signaländerungen im A_5/A_3 -Verhältnis und der Phase der dritten Harmonischen φ_3 bei der Quervernetzungsreaktion mit dem MNP-System PE23 auf die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin auf der MNP-Oberfläche zurückzuführen ist.

4.4.2 Abhängigkeit von freiem Biotin / Spezifität der Methodik

Im Rahmen dieses Kontrollexperiments wird die Abhängigkeit des A_5/A_3 -Verhältnisses und der Phase φ_3 von B-BSA untersucht. Mit diesem Versuchsaufbau wird zudem die Spezifität der Bindung von Streptavidin-funktionalisierten MNP an Biotin untersucht.

Probenpräparation und Messablauf

Für dieses Kontrollexperiment wird eine Verdünnungsreihe von Biotin hergestellt. Aufgrund der geringen Hydrophilie des Biotins sind in 100 mL Wasser nur 22 mg Biotin löslich. Um höhere Konzentrationen herzustellen, wird das Biotin daher zunächst in Natronlauge gelöst. Für die Ausgangslösung werden 9,21 mg Biotin in 1000 µL Natronlauge suspendiert. Diese Ausgangslösung wird in den nächsten Schritten mit 0,1 %-w/w BSA-Lösung verdünnt. (Pipettierschema: siehe Anhang A.1.g)

Für das Kontrollexperiment mit freiem Biotin wird das MNP-System PE23 verwendet, dessen Oberfläche mit Streptavidin funktionalisiert ist. Die Verdünnung der MNP-Lösung auf eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0.05$ g/L erfolgt analog zu Abschnitt 4.3.1.

Die Messung der Proben im MPS erfolgt wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

Auswertung und Ergebnis

In Abbildung 30 ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 und das A_5/A_3 -Verhältnis in Abhängigkeit von dem Biotin-MNP-Verhältnis dargestellt.



Abbildung 30: Kontrollexperiment zur Untersuchung der Abhängigkeit des Quervernetzungsexperiments von der freien Biotin-Konzentration. In (a) ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 und in (b) ist das A_5/A_3 -Verhältnis dargestellt.

Die Phasenverschiebung der dritten Harmonischen nimmt bei einem Biotin-MNP-Verhältnis im Bereich von 1,4 (Probe 7) bis 92,1 (Probe 1) um ca. 0,9° zu. Bei einem Biotin-MNP-Verhältnis von 0,7 (Probe 8) bis 5,6 \cdot 10⁻⁷ (Probe 19) bleibt die Phasenverschiebung im Rahmen der Unsicherheit von $u_{rel} = 0,25 \%$ – mit Ausnahme eines Ausreißers bei dem Biotin-MNP-Verhältnis von 5,6 \cdot 10⁻⁴ (Probe 16) – konstant.

Das A_5/A_3 -Verhältnis nimmt bei einem Biotin-MNP-Verhältnis im Bereich von 1,4 (Probe 7) bis 92,1 (Probe 1) um ca. 1,75 %-Punkte zu. Bei einem Biotin-MNP-Verhältnis von 0,7 (Probe 8) bis 5,62 \cdot 10⁻⁷ (Probe 19) bleibt das A_5/A_3 -Verhältnis im Rahmen der Unsicherheit von 0,25 % konstant.

Diskussion und Fazit:

Unter der Zugabe von freiem Biotin ist ein anderer Effekt wie bei der Quervernetzungsreaktion mit B-BSA zu beobachten. Der Effekt tritt bei einem Biotin-MNP-Verhältnis von 1,4 bis 92,1 auf. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die Biotin-Moleküle bei sehr hohen Biotinkonzentration nicht vereinzelt vorliegen, sondern sich zu größeren Biotin-Komplexen zusammenlagern. Dies hat zur Folge, dass ein Biotin-Komplex mehrere Bindungsstellen aufweist, an den die Streptavidin-funktionalisierten MNP gebundenen werden können. Dadurch können größere Biotin-MNP-Komplexe ähnlich zu der Quervernetzung mit B-BSA entstehen. Die Größe der entstandenen Biotin-MNP-Komplexe führt dementsprechend zu einer Phasenverschiebung und einem Anstieg des A_5/A_3 -Verhältnisses bei hohen Biotin-Konzentrationen. Bei geringen Biotin-Konzentrationen liegt das Biotin hingegen vereinzelt vor, wodurch die MNP mit Biotin gesättigt werden. Dadurch kann keine Agglomeration der MNP mit Biotin entstehen, da alle Bindungsstellen der MNP besetzt sind. Aufgrund dessen bleibt das A_5/A_3 -Verhältnis und die Phase φ_3 bei geringen Biotin-Konzentrationen konstant.

Aufgrund dieser Beobachtung muss bei der Durchführung der Quervernetzung von Streptavidin-funktionalisierter MNP und B-BSA darauf geachtet werden, dass kein freies Biotin in der Lösung vorliegt. Ansonsten kann es zu Fehlinterpretationen der Messwerte kommen.

Zur Vermeidung dieses Effektes wird auf Basis dieser Ergebnisse empfohlen, die Proben z.B. mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators zu mischen, um die vermuteten Aggregate aufzulösen.

Die Funktionalisierung der MNP mit Streptavidin führt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu der Quervernetzung der MNP mit Biotin. Die Streptavidin-funktionalisierten MNP binden spezifisch an das Biotin, wodurch unter Zugabe von B-BSA eine Quervernetzung hervorgerufen wird.

4.5 Leistungsfähigkeit der entwickelten Methodik

In diesem Abschnitt wird die Menge des gebundenen BSAs im Maximum der Quervernetzungsreaktion, die Sensitivität und die Nachweisgrenze der entwickelten Methodik untersucht. Die Spezifität der Methodik wird im Rahmen des Kontrollexperiments mit freiem Biotin thematisiert (siehe Abschnitt 4.4.2).

4.5.1 Ermittlung der gebundenen Menge BSA

Zur Ermittlung der gebundenen Menge BSA wird angenommen, dass im Maximum der Quervernetzungsreaktion aus Abschnitt 4.3.1 (Probe 5) mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5, alle B-BSA-Moleküle im Medium durch die MNP gebunden vorliegen. Die Kurve nimmt hierbei nach der Sättigung der MNP mit B-BSA ab. Eine übersättigte B-BSA-MNP-Lösung führt dazu, dass sich aufgrund des überschüssigen Angebots an Bindungspartnern (B-BSA) alle Biotin-Bindungsstellen der MNP mit Biotin besetzt sind. Durch diesen Effekt ist keine Quervernetzung der MNP mit B-BSA bei zu hohen B-BSA-Konzentrationen möglich.



Abbildung 31: Darstellung des A_5/A_3 -Verhältnisses der Quervernetzungsreaktion aus Abschnitt 4.3.1 des MNP-Systems PE23 bei der Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT.

Im Maximum der Quervernetzungsreaktion (Probe 5 von rechts in Abbildung 31) liegt eine Konzentration von 3,75 g/L des B-BSA vor. Da ca. 80 % des B-BSA¹³ aus BSA besteht kann von einer BSA-Konzentration von 3 g/L im Maximum ausgegangen werden.

¹³ Gemäß der Herstellerangabe besteht das biotinylierte BSA zu ≥ 80 % aus BSA.

Durch Multiplikation des Probenvolumens von $V_{Probe} = 20 \,\mu\text{L}$ mit der BSA-Konzentration von $c = 3 \,\text{g/L}$ kann die Masse von BSA im Maximum berechnet werden:

$$m_{BSA} = V_{Probe} \cdot c_{BSA} \,. \tag{10}$$

Dadurch ergibt sich eine BSA-Masse von $m_{BSA} = 60 \ \mu g$ im Maximum der Quervernetzungsreaktion mit dem MNP-Systems PE23. Aufgrund der Sättigung der MNP im Maximum mit B-BSA, entspricht die berechnete BSA-Masse der gebundenen Menge BSA.

4.5.2 Bestimmung der Sensitivität

Da das A_5/A_3 -Verhältnis konzentrationsunabhängig ist und die Auswertbarkeit des A_5/A_3 -Verhältnisses letztlich durch A_5 limitiert wird, wird die Sensitivität anhand der fünften Harmonischen bestimmt. Im Maximum der Quervernetzungsreaktion bei einem B-BSA-Verhältnis von 37,5 wird eine Amplitude der fünften Harmonischen von $A_5 = 7,79 \cdot 10^{-9}$ Am² bei einer Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0,05$ g/L gemessen (siehe Abschnitt 4.3.1).

Die Sensitivität der entwickelten Methodik zum Nachweis der Quervernetzung des MNP-Systems PE23 mit B-BSA wird durch die folgende Formel bestimmt:

$$A_{5}^{*}(Fe) = \frac{A_{5}}{m_{Fe}} = \frac{A_{5}}{c_{Fe} \cdot V_{Probe}}.$$
(11)

Mit $c_{\text{Fe}} = 0,05 \text{ g/L}$ und $V_{\text{Probe}} = 20 \mu \text{L}$ berechnet sich eine Sensitivität von $A_3^* = 7,97 \text{ Am}^2/\text{kg}_{\text{Fe}}$. Durch die Division der Sensitivität A_5^* (Fe) durch das B-BSA-MNP-Verhältnis $c_{\text{B-BSA}}/c_{\text{Fe}} = 37,5$ im Maximum der Quervernetzungsreaktion kann die Sensitivität in Bezug auf die B-BSA-Masse berechnet werden:

$$A_5^*(B - BSA) = \frac{A_5^*(Fe)}{\left(\frac{C_{B-BSA}}{C_{Fe}}\right)}.$$
(12)

Dadurch ergibt sich eine Sensitivität von A_5^* (B-BSA) = 0,21 Am²/kg_{B-BSA}.

4.5.3 Nachweisgrenze der Methodik

Neben der Sensitivität kann zudem die Nachweisgrenze der Methodik bestimmt werden. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze kann der Schnittpunkt der Kalibriergeraden aus Abschnitt 4.2.1 mit der Nachweisgrenze des MPS bei $LOD_{A5} = 1,03 \cdot 10^{-11}$ Am² ermittelt werden.

(10)

Des Weiteren kann die Nachweisgrenze bei Kenntnis der Sensitivität (siehe 4.5.2) A_5^* (B-BSA) und der Nachweisgrenze der MPS LOD_{A5} mithilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$LOD_{B-BSA} = \frac{LOD_{A5}}{A_5^*(B - BSA)}.$$
(13)

Daraus ergibt sich eine Nachweisgrenze von $LOD_{B-BSA} = 49,05$ ng B-BSA. Eine geringere B-BSA-Masse würde dazu führen, dass eine zu geringe Eisenmasse zur Erreichung eines B-BSA-MNP-Verhältnisses von 37,5 benötigt werden würde, die aufgrund des Untergrundrauschens der MPS nicht messbar wäre.

Da einige Methoden zum Nachweis der Bindung von Biomolekülen konzentrationsabhängig – nicht massensensitiv wie die MPS – sind, kann die B-BSA-Konzentration an der Nachweisgrenze durch die folgende Formel berechnet werden:

$$c_{\rm B-BSA} = \frac{LOD_{\rm B-BSA}}{V_{\rm max}}.$$
(14)

Mit einem maximalen Probenvolumen von $V_{\text{max}} = 100 \,\mu\text{L}$ ergibt sich eine B-BSA-Konzentration von $c_{\text{B-BSA}} = 485 \,\text{ng/mL}$, die mit der MPS nachgewiesen kann.

4.6 NMR als Vergleichsmethode

Als Vergleichsmethode wird die NMR-Relaxometrie herangezogen. Die Methodik basiert, anders als bei der MPS, auf dem Signalverhalten der magnetischen Momente der Wasserstoffprotonen in einem homogenen Magnetfeld. In der Umgebung von MNP treten starke Streufelder auf, die zu lokalen Verzerrungen des ansonsten homogenen äußeren Magnetfeldes führen (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Dadurch wird das Signalverhalten der Wasserstoffprotonen in der Nähe von MNP messbar verändert. Der Einfluss der lokalen Feldverzerrungen (bzw. Feldinhomogenitäten) auf das Signalverhalten der Wasserstoffprotonen hängt maßgeblich von der Größe der MNP/MNP-Komplexe ab [54].

Probenpräparation und Messablauf

Die Probenherstellung für das MNP-System PE23 erfolgt gemäß Kapitel 4.3.1. Die Proben werden vor der Messung für t = 10 s bei n = 2200 rpm gevortext.

Auswertung und Ergebnis

In Abbildung 32 ist die transversale Relaxivität r_2 der gemessenen Proben dargestellt.



Abbildung 32: Transversale Relaxivität der Quervernetzungsproben des MNP-Systems PE23 bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 1,4$ T.

Ab einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 0,59 (Probe 11) bis 9,38 (Probe 7) ist ein Anstieg von r_2 zu beobachten. Mit zunehmendem B-BSA-Verhältnis nimmt r_2 bis zu einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 300 ab. Bei einer sehr hohen B-BSA-Konzentration von 60 g/L (B-BSA-MNP-Verhältnis von 600) ist ein Anstieg von r_2 feststellbar.

PE23

Bei einem geringen B-BSA-MNP-Verhältnis von $1,43 \cdot 10^{-10}$ bis 0,29 ist keine signifikante Änderung von r_2 messbar.

Diskussion und Fazit

Die transversale Relaxivität r_2 ist bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 am höchsten. Dieser Anstieg kann durch die Entstehung von B-BSA-MNP-Komplexen erklärt werden. Durch die zunehmende Größe der B-BSA-MNP-Komplexe kommt es zu einem höheren r_2 -Wert, welcher durch Feldinhomogenitäten in der Nähe der MNP-Komplexe verursacht wird (siehe Abschnitt 2.2.2.2).

Im MPS wird ein Maximum im A_5/A_3 -Verhältnis bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 beobachtet. In der Phase der dritten Harmonischen bildet sich allerdings eine maximale Phasenverschiebung bei Probe 7 mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 aus (siehe 4.3.1). In diesem Vergleichsexperiment wird das Maximum der Quervernetzungsreaktion ebenfalls bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 der Quervernetzungsgrad der MNP am höchsten ist, was zu einem größeren Einfluss der lokalen Feldinhomogenitäten auf das Signalverhalten der Wasserstoffprotonen und damit zu einer höheren transversalen Relaxivität führt.

Die Quervernetzung des MNP-Systems PE23 mit B-BSA kann mit der NMR-Relaxometrie als Vergleichsmethode nachgewiesen werden.

5 Fazit

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst dargestellt. Anschließend wird auf weiterführende Anwendungen der entwickelten Methodik eingegangen.

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MPS zum Nachweis von B-BSA anhand der Quervernetzung mit dem MNP-System PE23 etabliert. Eine MPS-Signaländerung konnte nur bei dem MNP-System PE23 beobachtet werden. Bei den MNP-System SY50 und SY64 ist durch die Quervernetzung keine signifikante Signaländerung feststellbar. Die maximale Signaländerung der Quervernetzungskurve wird bei Auswertung des A_5/A_3 -Verhältnisses bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 erreicht. Das A_5/A_3 -Verhältnis nahm bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT, $B_a = 12$ mT und $B_a = 25$ mT im Bereich der Quervernetzung signifikant zu. Bei Auswertung der Phase der dritten Harmonischen φ_3 wird bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 die maximale Signaländerung erzielt. Die Phasenverschiebung ist nur bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT zu beobachten. Der Nachweis der Quervernetzungsreaktion mithilfe der MPS ist mit einer relativen Unsicherheit von 0,25 % reproduzierbar. Mit Hilfe der NMR-Relaxometrie als Vergleichsmethode wird die maximale Signaländerung bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 9,38 ermittelt.

Das Maximum der Quervernetzungsreaktion von Heim [7] liegt bei einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 4,5. Die Ausbildung des Maximums der Quervernetzungsreaktion ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von dem verwendeten MNP-System abhängig. Heim verwendete für seine Arbeit das MNP-System fluidMAG/BC-streptavidin der Firma *chemicell GmbH* mit einem hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 100$ nm. Gemäß der Herstellerangabe kann dieses MNP-System 80 pmol B-BSA pro 1 mg MNP-Lösung binden. Das in dieser Arbeit verwendete MNP-System PE23 hat stattdessen einen hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 130$ nm. Auf der Dextran-Hülle der MNP sind im Mittel 10 Streptavidin-Moleküle gebunden. Der Hersteller *micromod Partikeltechnologie GmbH* macht keine Angaben zur Quantifizierung der Bindung von biotinylierten Substanzen an die MNP-Systeme.

Durch das Kontrollexperiment mit freiem Biotin wurde die Spezifität der Bindung von Streptavidin-funktionalisierten MNP an Biotin untersucht. Dabei kann beobachtet werden, dass bei hohen Biotin-MNP-Verhältnissen von 1,4 bis 92,1 eine andere MPS-Signaländerung beobachtet werden kann wie bei der Quervernetzungsreaktion mit B-BSA. Dieses Phänomen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Agglomeration der Biotin-Moleküle bei hohen Biotin-Konzentrationen zurückzuführen, wodurch es zu Quervernetzungsähnlichen Reaktionen kommen könnte.

Im Rahmen eines weiteren Kontrollexperiments wurde das MNP-System PE23 durch das MNP-System PE21 mit dem gleichen hydrodynamischen Durchmesser von $d_{hyd} = 130$ nm ohne Streptavidin-Funktionalisierung auf der Oberfläche ersetzt. Aus diesem Experiment ging hervor, dass die Quervernetzungsreaktion der MNP mit B-BSA von der spezifischen Bindung von Streptavidin an Biotin abhängig ist.

Die Sensitivität der Methodik wurde rechnerisch durch Betrachtung der Amplitude der fünften Harmonischen und der Eisenmasse der Probe bestimmt. Daraus ergibt sich eine Sensitivität von $A_5^*(Fe) = 7,97 \text{ Am}^2/\text{kg}_{Fe}$. Wird die Sensitivität durch das B-BSA-MNP-Verhältnis im Maximum der Quervernetzungsreaktion dividiert, ergibt sich eine Sensitivität von $A_5^*(B-BSA) = 0,21 \text{ Am}^2/\text{kg}_{B-BSA}$. Im Maximum der Quervernetzungsreaktion wurden 60 µg BSA gebunden. Die Nachweisgrenze der entwickelten Methodik liegt bei einer B-BSA-Konzentration von 485 ng/mL.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die Ausbildung der B-BSA-MNP-Komplexe untersucht. Aufgrund der daraus resultierenden Ergebnisse wird empfohlen, die Inkubationszeit von 24 h nicht zu überschreiten, da bei längeren Inkubationszeiten auch bei geringen B-BSA-Konzentrationen eine MPS-Signaländerung zu beobachten ist. Des Weiteren muss während der Inkubation der Proben darauf geachtet werden, dass die Proben keinem äußeren Magnetfeld ausgesetzt werden, da dies die Kettenbildung der MNP unterstützt und die Ergebnisse verändert. Die Kettenbildung führt zu einer MPS-Signaländerung bei geringen B-BSA-Konzentration und damit zu einer Fehlinterpretation der Quervernetzungskurve.

5.2 Ausblick

Der Nachweis von Biomolekülen mithilfe der Quervernetzung mit MNP ist eine vielversprechende Biosensorik-Methode und hat das Potenzial in einer Vielzahl biomedizinischer Anwendungen eingesetzt zu werden. Aufgrund der hohen Biokompatibilität der MNP können diese neben der in-vitro Diagnostik ebenso in der in-vivo Diagnostik eingesetzt werden. Des Weiteren bietet die MPS den Vorteil einer schnellen Messung [55].

Durch Weiterentwicklung der Methodik ließe sich möglicherweise die Glykokalyx (GCX) von Zellen untersuchen. Die GCX gehört zu der extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Zellen. Sie besteht aus Oligosacchariden, die an Membranproteine- und lipide der Zelle gebunden sind [56]. Die Struktur ist spezifisch für jeden Zelltyp und individuell für jeden Organismus, weshalb die Bindung von funktionalisierten MNP an bestimmte Strukturen der GCX einen bedeutenden Fortschritt in der Biomedizin zur Folge haben könnte. Durch Wechselwirkungen der MNP mit Zellstrukturen wie der GCX können die magnetischen Eigenschaften der MNP verändert werden. Die Änderung der magnetischen Eigenschaften der MNP durch die Bindung an Bestandteile der GCX können mithilfe der MPS detektiert werden [57].

Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Methodik können Bindungsreaktionen zwischen MNP und derartigen Biomolekülen im Labor nur valide untersucht werden, um sie in Zukunft auf die Bildgebung mittels MPI zu übertragen.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Wells, N. Löwa, H. Paysen, U. Steinhoff und F. Wiekhorst, "Probing particlematrix interactions during magnetic particle spectroscopy," in *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 475, Berlin, ELSEVIER, 2019, pp. 421-428.
- [2] S. P. Gubin, Y. I. Spichkin, G. Y. Yurkov und A. M. Tishin, "Nanomaterial for High-Density Magnetic Data Storage," in *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, Moskow, Russland, 2002, pp. 32-67.
- [3] J. You, L. Wang, Y. Zhao und W. Bao, "A review of amino-functionalized magnetic nanoparticles for water treatment: Features and prospects," in *Journal of Cleaner Production*, Shenyang, China, 2020.
- [4] P. Radon, Aufbau und Inbetriebnahme eines Flussphantoms zur Bestimmung der Targeting Effizienz von magnetischen Nanopartikeln mittels Magnetpartikelspektroskopie., Berlin, 2015.
- [5] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones und J. Dobson, "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine," in *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2003.
- [6] A. Lascialfari, "In vivo biomedical applications of magnetic resonance and magnetic materials," in *La Rivista del Nuovo Cimento*, 2013.
- [7] E. A. Heim, "Fluxgate-Magnetrelaxometrie magnetischer Nanopartikel in der Bioanalytik," in *Berichte aus dem Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagend er Elektrotechnik*, Braunschweig, 2009.
- [8] M. Heidelberger und F. E. Kendall, "A quantitative study of the preceptin reaction between type II pneumococcus polysaccaride and purified homologous antibody," in *Journal of Experimental Medicine*, 1929, pp. 809-823.
- [9] M. Weber, Magnetic Particle Imaging Neuartige Bildgebungskonzepte mit einer feldfreien Linie, Lübeck: Infinite Science Publishing, 2017.
- K. M. Krishnan, "Biomedical Nanomagnetics: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy," in *IEEE Transactions on magnetics*, Vol. 46, No. 7 Hrsg., Department of Materials Science, University of Washington, Seattle, Advances in Magnetics, 2010.
- [11] F. Wiekhorst und L. Trahms, "Use of Magnetic Nanoparticles in Biomedical Applications," in *Nanomagnetism: Applications and Perspectives*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017, pp. 137-164.
- [12] N. Löwa, "Messung und Analyse magnetischer Nanopartikel Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem NMR-Verhalten und der Struktur sowie den magnetischen Eigenschaften verschiedener superparamagnetischer Eisenoxid-Nanopartikel," Berlin, 2011.
- [13] S. F. Hasany, J. Rajan und A. Rehman, "Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles," in *Nanoscience and Nanotechnology*, Pahang, Malaysia, 2012.
- [14] S. Biederer, Magnet-Partikel-Spektrometer, Universität zu Lübeck : Springer Vieweg, 2012.

- [15] K. Wu, J. Liu, D. Su, R. Saha und J.-P. Wang, "Magnetic nanoparticle Relaxation Dynamics-Based Magnetic Particle Spectroscopy for Rapid and Wash-Free Molecular Sensing," in ACS Applied Materials & Interfaces, Mennesota, USA, 2019.
- [16] K. Wu, D. Su, R. Saha, D. Wong und J.-P. Wang, "Magnetic Particle Spectroscopy-based Bioassays: Methods, Applications, Advances, and Future Opporunities," in *Journal of Physics D Applied Physics*, ResearchGate, 2019.
- [17] P. Kyri, "Entwicklung einer Einheit für die temperaturabhängige Aufzeichnung von MPI-Systemfunktionen mit einem Positionierroboter," Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin, 2021.
- [18] T. Weis, Fernsteuerung superparamagnetischer Partikel und Charakterisierung von Magnetkraftmikroskopiespitzen in externen Magnetfeldern mit magnetisch strukturierten Substraten, Kassel, 2009.
- [19] D. S. Mathew und R.-S. Juang, "An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions.," ELSEVIER, Department of Chemical Engineering and Material Science, Yuan Ze University, Chung-Li, Taiwan, 2006.
- [20] S. Mørup, M. F. Hansen und C. Frandsen, "Magnetic interactions between nanoparticles," in *Beilstein Journal of Nanotechnology*, Beilstein, 2010, pp. 182-190.
- [21] S. Morup, M. F. Hansen und C. Frandsen, "Magnetic interactions between nanoparticles," in *Journal of Applied Physics 116.16*, 2014, pp. 182 190.
- [22] E. Myrovali, N. Maniotis, A. Makridis, A. Terzopoulou, V. Ntomprougkidis, K. Simeonidis, D. Skellari, O. Kalogirou, T. Samaras, R. Salikhov, M. Spasova, M. Farle, U. Wiedwald und M. Angelakeris, "Arrangement at the nanoscale: Effect on magnetic particle hyperthermia," in *Scientific Reports 6.1*, 2016.
- [23] S. Biederer, T. Knopp, T. F. Sattel, K. Lüdtke-Buzug, B. Gleich, J. Weizenecker, J. Borgert und T. M. Buzug, "Magnetization response spectroscopy of superparamagnetic nanoparticles fpr magnetic particle imaging," in *Journal of Physics D: Applied Physics*, Lübeck/Hamburg, Germany, 2009.
- [24] S. Draack, T. Viereck, C. Kuhlmann, M. Schilling und F. Ludwig, "Temperaturedependent MPS measurements," in *Interntional Journal on Magnetic Particle Imaging*, 2017.
- [25] N. Panagiotopoulos, R. L. Duschka, M. Ahlborg, G. Bringout, C. Debbeler, M. Graeder, C. Kaethner, K. Lüdtke-Buzug, H. Medimagh, I. Stelzner, T. M. Buzug, J. Barkhausen, F. M. Vogt und J. Haegele, "Magnetic particle imaging: current developments and future directions," Dovepress, Lübeck, 2015.
- [26] V. K. Chugh, K. Wu, V. Dk und J.-P. Wang, "Magnetic Particle Spectroscopy (MPS) with One-stage Lock-in Implementation for Magnetic Bioassays with Improved Sensitivities.," 2021.
- [27] N. Löwa, M. Seidel, P. Radon und F. Wiekhorst, "Magnetic nanoparticles in different biological environments analyzed by magnetic particle spectroscopy," in *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Berlin, ELSEVIER, 2017, pp. 133-138.
- [28] A. Remmo, N. Löwa, J. Peter und F. Wiekhorst, "Physical characterization of biomedical magnetic nanoparticles using multi-detector centrifugal field-flow fractionation," in *Current Directions in Biomedical Engineering*, Berlin, De Gruyter, 2017, pp. 327-330.

- [29] N. Löwa, M. Seidel, P. Radon und F. Wiekhorst, "Magnetic nanoparticles in different biological environments analyzed by magnetic particle spectroscopy," ELSEVIER, Berlin, 2016.
- [30] J. V. Bayer, F. Jaeger und G. E. Schaumann, "Proton Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Relaxometry in Soil Science Applications," in *The Open Magnetic Resonance Journal*, Landau, Germany, 2010, pp. 15-26.
- [31] R. Kimmich und E. Anoardo, "Field-cycling NMR relaxometry," in *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Ulm, Germany, ELSEVIER, 2004.
- [32] B. Liu, J. Wang, Y. Chen, Z. Li, S. C. B. Gopinath, T. Lakshmipriya und Z. Huo, "Detection of microRNA-335-5p on an Interdigitated Electrode Surface for Determination of the Severity of Abdominal Aortic Aneurysms," in *Nanoscale Research Letters*, 2020.
- [33] P. H. E. Hamming und J. Huskens, "Streptavidin Coverage on Biotinylated Surfaces," in SCS Applied Materialis & Interfaces, Enschede, The Netherlands, 2021.
- [34] J. J. Byeong, K. Sulhee, K. Min-Seok, L. Ji-Ho, K. Beom Seok und H. Kwang Yeon, "Insights into the structure of mature streptavidin C1 from Streptomyces cinnamonensis reveal the self-binding of the extension C-terminal peptide to biotin-binding sites," in *IUCrJ: Biology and Medicine*, 2021, pp. 168-177.
- [35] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski und F. R. Salemme, "Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin," in *Science*, 1989.
- [36] S. Freitag, I. L. Trong, L. Klumb, P. S. Stayton und R. E. Stenkamp, "Structural studies of the streptavidin binding loop," in *Protein Sci*, 1997.
- [37] H. R. Yoon, K. Ju Yeon, J. M. Seok, L. Hye Sun, H. Changhyun, P. Kyong Hwa und K. W. Bong, "Direct Conjugation of Streptavidin to Encoded Hydrogel Microparticles for Multiplex Biomolecule Detection with Rapid Probe-Set Modification," in *polymers*, Seoul, Korea, 2020.
- [38] U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmetti, P. Wagner, M. Dreier, W. Huber und H.-J. Güntherodt, "Specific Antigen/Antibody Interactions Measured by Force Microscopy," in *Biophysical Journal*, 1996, pp. 2437-2441.
- [39] E. Heim, F. Ludwig und M. Schilling, "Binding assay with streptavidinfunctionalized superparamagnetic nanoparticles and biotinylated analytes using fluxgate magnetorelaxometry," in *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* , TU Braunschweig Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik, ELSEVIER, 2009.
- [40] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse und H. Fessi, "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations," in *Advanced Drug Delivery Reviews*, Lyon, Frankreich, ELSEVIER, 2006, pp. 1688-1713.
- [41] A. Shrivastava, S. Sharma, M. Kaurav und A. Sharma, "Characteristics and analytical methods of Mannitol: an update," in *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2021.
- [42] S. G. Maas, "Optimierung trägerbasierter Pulverinhalate durch Modifikation der Trägeroberfläche mittels Sprühtrocknung," Düsseldorf, 2009.
- [43] X. Liao, R. Krishnamurthy und R. Suryanarayanan, "Influence of Processing Conditions on the Physical State of Mannitol - Implications in Freeze-Drying," in *Pharmaceutical Research*, SpringerLink, 2007, pp. 370-376.
- [44] "www.micromod.de," 04 10 2021. [Online]. Available: https://www.micromod.de/en/produkte-233-magnetic_syno_streptavidin.html.

- [45] T. Bülbül, Entwicklung eines Verfahrens zur Partikelcharakterisierung für die MPI-Bildgebung von Entzündungszellen, Berlin, 2021.
- [46] R. K. Adhikamsetty, N. R. Gollapalli und S. B. Jonnalagadda, "Complexation kinetics of Fe2+ with 1,10-phenanthroline forming ferroin in acidic solutions," in *International Journal of Chemical Kinetics*, Durban, Südafrika, Wiley-VCH GmbH, 2008, pp. 515-523.
- [47] L. G. Saywell und B. B. Cunningham, "Determination of Iron: Colorimetric o-Phenanthroline Method," in *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, Berkeley, California, 1937, pp. 67-69.
- [48] J. Zanardi, V. Reboul und P. Metzner, Direct Utilization of Naturally Occurring Sulfides for the Asymmetric Epoxisation of Aldehydes Mediated by Catalytic Yildes, Caen, Frankreich: Bulletin of the Korean Chemical Society, 2004.
- [49] J. Zempleni, S. S. Wijeratne und Y. I. Hassan, "Review Article: Biotin," in *BioFactors*, 2009.
- [50] K. Wu, R. Saha, J. Liu, V. K. Chugh und J.-P. Wang, "Magnetic Particle Spectoscopy: A short Review of Applications Using Magnetic Nanoparticles," in *Applied Nano Materials*, 2020.
- [51] D. B. Mangarova, J. Brangsch, A. Mohtashamdolatshahi, O. Kosch, H. Paysen, F. Wiekhorst, R. Klopfleisch, R. Buchholz, U. Karst, M. Taupitz, J. Schnorr, B. Hamm und M. R. Makowski, "Ex vivo magnetic particle imaging of vascular inflammation in abdominal aortic aneurysm in a murine model," in *Scientific Reports*, natureresearch, 2020.
- [52] D. Eberbeck und L. Trahms, "Experimental investigation of dipolar interaction in suspensions of magnetic nanoparticles," in *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, ELSEVIER, 2011, pp. 1228-1232.
- [53] N. Löwa, P. Radon, O. Kosch und F. Wiekhorst, "Concentration Dependent MPI Tracer Perfomance," in *International Journal on Magnetic Particle Imaging*, Berlin, InfiniteScience Publishing, 2016.
- [54] S. Schrittwieser, B. Pelaz, W. J. Parak, S. Lentijo-Mozo, K. Soulantica, J. Dieckhoff, F. Ludwig, A. Guenther, A. Tschöpe und J. Schotter, Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels, Sensors, 2016.
- [55] X. Zhang, D. R. Reeves, I. M. Perreard, W. C. Kett, K. E. Griswold, B. Gimi und J. B. Weaver, "Molecular Sensing with Magnetic Nanoparticles Using Magnetic Spectroscopy of Nanoparticle Brownian Motion," in *Biosens Bioelectron*, Hanover, 2013.
- [56] A. C. Cavalcanti Fernandes Hering, Frühzeitige Veränderungen der Mikrozirkulation und Verlust der endothelialen Glykokalix bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ I, München, 2017.
- [57] M. Schleicher, "Magnetische Nanopartikel für die Bildgebung der Atherosklerose Wechselwirkung mit Strukturen der Zelloberfläche," Berlin, 2021.
- [58] H. Gohlke und G. Klebe, "Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren," in *Angewandte Chemie*, WILEY-VHC, 2002, pp. 2764-2798.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 4: (a) Charakteristischer Hysterese-Zyklus eines magnetischen Mehrdomänenmaterials nach [19], wobei H der Amplitude des magnetischen Feldes und M der Magnetisierung des Materials entspricht. M_r kennzeichnet die Restmagnetisierung bei Ausschalten des Magnetfeldes und H_c die Koerzitivfeldstärke. (b) Charakteristische Magnetisierungskurve von superparamagnetischen Materialien in Abhängigkeit von dem Kerndurchmesser d_K als Funktion der Feldstärke H eines externen Magnetfeldes nach [14]......9

- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Kettenbildung von MNP mit B-BSA. 20

- Abbildung 17: Untersuchung des konzentrationsunabhängigen A_5/A_3 -Verhältnisses der verwendeten MNP-Systeme in Abhängigkeit von der Eisenmasse der Probe bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT. 44
- Abbildung 18: Untersuchung der Phasenverschiebung des Zeitsignals auf das wechselnde Anregungsfeld der dritten Harmonischen A_3 der verwendeten MNP-Systeme in Abhängigkeit von der Eisenmasse m_{Fe} der Probe bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT. 45

- Abbildung 29: Kontrollexperiment zur Untersuchung der Abhängigkeit der Quervernetzungsreaktion von der Oberflächenfunktionalisierung der MNP. Hierbei wird das MNP-System PE23 durch PE21 ausgetauscht,

das kein Streptavidin auf der Oberfläche gebunden hat. In (a) ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 und in (b) ist das A_5/A_3 -Verhältnis dargestellt
Abbildung 30: Kontrollexperiment zur Untersuchung der Abhängigkeit des Quervernetzungsexperiments von der freien Biotin-Konzentration. In (a) ist die Phase der dritten Harmonischen φ_3 und in (b) ist das A_5/A_3 - Verhältnis dargestellt
Abbildung 31: Darstellung des A_5/A_3 -Verhältnisses der Quervernetzungsreaktion aus Abschnitt 4.3.1 des MNP-Systems PE23 bei der Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT
Abbildung 32: Transversale Relaxivität der Quervernetzungsproben des MNP- Systems PE23 bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 1,4$ T
Abbildung 33: Logarithmische Verdünnungsreihe der MNP-Ausgangslösung des MNP-Systems SY50 mit einer Ausgangseisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 51 \text{ mmol/L}$
Abbildung 34: Ausschnitt des Messskripts zur kontinuierlichen Feldexposition bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT95
Abbildung 35: Messskript zur diskontinuierlichen Feldexposition bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT
Abbildung 36: Messung des Untergrundsignals der MPS bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT, $B_a = 12$ mT und $B_a = 25$ mT zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Abhängigkeit der Feldstärke. In dieser Grafik sind die Mehrfachbestimmungen der Harmonischen A_3 und A_5 abgebildet

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Berechnung des B-BSA-MNP-Verhältnisses, das in [7] angewendet wurde. Zur Umrechnung der B-BSA-Konzentration in [mg/mL] kann die Molare Masse des biotinylierten BSA aufgrund der geringen Masse von Biotin mit der Molaren Masse von BSA ($M_{BSA} = 6.6 \cdot 10^4$ g/mol) gleichgesetzt werden
Tabelle 2: Wesentliche Eigenschaften der verwendeten MNP-Produktlinien Synomag® und Perimag®. Im Folgenden werden die jeweiligen MNP- Systeme mit der PTB-ID SY50, SY64 bzw. PE23 bezeichnet
Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte und Laborzubehör unter Angabe des Herstellers und des Produkttyps
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien unter Angabe der Darreichungsform und des Herstellers. 25
Tabelle 5: Relative Pipettierunsicherheit für 0,1 %-w/w BSA-Lösung, 1 %-w/wBSA-Lösung, 10 %-w/w BSA-Lösung und Reinstwasser
Tabelle 6: Nachweisgrenzen der MPS bei den Feldstärken $B_a = 5 \text{ mT}, B_a = 12 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}.$ 35
Tabelle 7: Sensitivitäten der MNP-Systeme SY50, SY64 und PE23 bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 5$ mT und $B_a = 25$ mT
Tabelle 8: Herstellung der BSA-Lösungen
Tabelle 9: Pipettierschema zur Herstellung der B-BSA-Verdünnungsreihe für die MNP-Systeme SY50 und SY64
Tabelle 10: Pipettierschema zur Herstellung der B-BSA-Verdünnungsreihe für das MNP-System PE23. 89
Tabelle 11: Pipettierschema zur Herstellung der MNP-Verdünnungen
Tabelle 12: Pipettierschema zur Herstellung der Quervernetzungsproben mit den MNP-Systemen SY50 und SY64
Tabelle 13: Pipettierschema zur Herstellung der Quervernetzungsproben mit dem MNP-System PE23. 92
Tabelle 14: Pipettierschema zur Herstellung von Quervernetzungsproben mit einemB-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 und 1,43 · 10- 11
Tabelle 15: Pipettierschema zur Herstellung der Biotin-Verdünnungsreihe94
Tabelle 16: Eisenkonzentrationen der Verdünnungsstufen 0 bis 7
Tabelle 17: Eisenmassen der MNP-Verdünnungsstufen

Anhang A Versuchsdurchführungen

A.1 Probenpräparationen

A.1.a Herstellung der BSA-Lösungen

Die BSA-Verdünnungsmedien werden gemäß des in Tabelle 8 dargestellten Schemas hergestellt.

	0,1 %-w/w BSA	1 %-w/w BSA	10 %-w/w BSA
	<i>m</i> BSA	<i>m</i> BSA	<i>m</i> BSA
	[g]	[g]	[g]
BSA	0,045	0,45	0,5
ddH ₂ O	44,95	44,55	4,5
Gesamtmasse	45	45	5

Tabelle 8: Herstellung der BSA-Lösungen.

Die 0,1 %-w/w und 1 %-w/w BSA-Lösungen werden für ein Gesamtvolumen von 45 mL berechnet. Von der 10 %-w/w BSA-Lösung wird ein geringeres Volumen von V = 5 mL hergestellt. Das Abwiegen des BSA erfolgt mit der Analysenwaage.

A.1.b Logarithmische Verdünnungsreihe

In Abbildung 33 ist das Pipettierschema einer logarithmischen Verdünnungsreihe am Beispiel des MNP-Systems SY50 mit einer Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 51 \text{ mmol/L}$ dargestellt. Das Schema lässt sich analog auf andere MNP-Systeme übertragen.



Abbildung 33: Logarithmische Verdünnungsreihe der MNP-Ausgangslösung des MNP-Systems SY50 mit einer Ausgangseisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 51 \text{ mmol/L}$.

A.1.c Herstellung der B-BSA-Verdünnungen

Aufgrund der verschiedenen MNP-Systeme ist es notwendig, zwei unterschiedliche B-BSA-Verdünnungsreihen herzustellen, die das optimale Verhältnis der Reaktanden abbilden.

MNP-System SY50 und SY64

In Tabelle 9 ist die B-BSA-Verdünnungsreihe für die MNP-Systeme SY50 und SY64 dargestellt.

ID	VF	B-BSA- MNP- Verhältnis	B-BSA- Konz. (Ziel)	Masse B-BSA	0,1 % BSA-Lö- sung	B-BSA- Lösung	B-BSA- Lösung (Ziel)
		Св-в5А/СFe [-]	св-вsa [mg/mL]	M _{B-BSA} [mg]	V _{BSA} [µL]	Vb-bsa [µL]	V _{Ziel} [µL]
22	100	6,85 · 10 ⁻¹¹	6,85 · 10 ⁻¹²	$1,03 \cdot 10^{-12}$	148,5	1,5	150
21	100	6,85 · 10 ⁻⁹	6,85 · 10 ⁻¹⁰	1,03 · 10 ⁻¹⁰	148,5	1,5	150
20	100	6,85 · 10 ⁻⁷	6,85 · 10 ⁻⁸	1,03 · 10-8	148,5	1,5	150
19	4	8,56 · 10 ⁻⁶	8,56 · 10 ⁻⁷	1,28 · 10-7	113	38	150
18	2	1,71 · 10-5	$1,71 \cdot 10^{-6}$	2,57 · 10 ⁻⁷	75	75	150
17	2	3,42 · 10 ⁻⁵	3,42 · 10-6	5,14 · 10-7	75	75	150
16	2	6,85 · 10 ⁻⁵	6,85 · 10 ⁻⁶	1,03 · 10-6	75	75	150
15	2	1,37 · 10-4	$1,37 \cdot 10^{-5}$	2,05 · 10 ⁻⁶	75	75	150
14	2	2,74 · 10-4	$2,74 \cdot 10^{-5}$	4,11 · 10 ⁻⁶	75	75	150
13	2	5,48 · 10 ⁻⁴	5,48 · 10 ⁻⁵	8,22 · 10 ⁻⁶	75	75	150
12	2	1,10 · 10-3	$1,10 \cdot 10^{-4}$	1,64 · 10-5	75	75	150
11	2	$2,19 \cdot 10^{-3}$	2,19 · 10 ⁻⁴	3,29 · 10 ⁻⁵	75	75	150
10	2	$4,38 \cdot 10^{-3}$	$4,38 \cdot 10^{-4}$	6,57 · 10 ⁻⁵	75	75	150
9	2	8,76 · 10 ⁻³	8,76 · 10 ⁻⁴	1,31 · 10-4	75	75	150
8	2	$1,75 \cdot 10^{-2}$	$1,75 \cdot 10^{-3}$	2,63 · 10 ⁻⁴	75	75	150
7	4	3,51 · 10 ⁻²	$3,51 \cdot 10^{-3}$	5,26 · 10 ⁻⁴	112,5	37,5	150
6	4	$1,40 \cdot 10^{-1}$	$1,40 \cdot 10^{-2}$	$2,10 \cdot 10^{-3}$	112,5	37,5	150
5	4	5,61 · 10 ⁻¹	5,61 · 10 ⁻²	8,41 · 10 ⁻³	112,5	37,5	150
4	4	2,24	$2,24 \cdot 10^{-1}$	3,37 · 10 ⁻²	112,5	37,5	150
3	4	8,98	8,98 · 10 ⁻¹	1,35 · 10-1	112,5	37,5	150
2	4	35,9	3,59	5,39 · 10 ⁻¹	112,5	37,5	150
1	0	144	14,1	2,15	150	0	150

Tabelle 9: Pipettierschema zur Herstellung der B-BSA-Verdünnungsreihe für die MNP-Systeme SY50 und SY64.

MNP-System PE23

In Tabelle 10 ist das Pipettierschema zur Herstellung der B-BSA-Verdünnungsreihe für das MNP-System PE23 dargestellt.

ID	VF	B-BSA- MNP-	B-BSA- Konz.	Masse B-BSA	0,1 % BSA-Lö-	B-BSA- Lösung	B-BSA- Lösung
		Verhältnis	(Ziel)		sung		(Ziel)
		СВ-ВSА/СFe [-]	св-вsa [mg/mL]	<i>т</i> в-вза [mg]	V _{BSA} [µL]	Vb-bsa [µL]	Vziel [µL]
26	100	1,43 · 10 ⁻¹⁰	1,43 · 10 ⁻¹¹	7,15 · 10 ⁻¹³	49,50	0,50	50
25	100	1,43 · 10-8	1,43 · 10 ⁻⁹	7,15 · 10 ⁻¹¹	49,50	0,50	50
24	100	1,43 · 10-6	1,43 · 10-7	7,15 · 10 ⁻⁹	49,50	0,50	50
23	2	1,43 · 10-4	1,43 · 10-5	7,15 · 10 ⁻⁷	25	25	50
22	2	2,86 · 10 ⁻⁴	2,86 · 10 ⁻⁵	1,43 · 10-6	25	25	50
21	2	$5,72 \cdot 10^{-4}$	$5,72 \cdot 10^{-5}$	2,86 · 10 ⁻⁶	25	25	50
20	2	$1,14 \cdot 10^{-3}$	$1,14 \cdot 10^{-4}$	5,72 · 10 ⁻⁶	25	25	50
19	2	$2,29 \cdot 10^{-3}$	2,29 · 10 ⁻⁴	$1,14 \cdot 10^{-5}$	25	25	50
18	2	$4,58 \cdot 10^{-3}$	$4,58 \cdot 10^{-4}$	$2,29 \cdot 10^{-5}$	25	25	50
17	2	9,16 · 10 ⁻³	9,16 · 10 ⁻⁴	$4,58 \cdot 10^{-5}$	25	25	50
16	2	1,83 · 10 ⁻²	1,83 · 10 ⁻³	9,16 · 10 ⁻⁵	25	25	50
15	2	3,66 · 10 ⁻²	3,66 · 10 ⁻³	1,83 · 10-4	25	25	50
14	2	7,32 · 10 ⁻²	7,32 · 10 ⁻³	3,66 · 10 ⁻⁴	25	25	50
13	2	$1,46 \cdot 10^{-1}$	1,46 · 10 ⁻²	7,32 · 10 ⁻⁴	25	25	50
12	2	2,93 · 10 ⁻¹	$2,93 \cdot 10^{-2}$	1,46 · 10 ⁻³	25	25	50
11	2	5,86 · 10 ⁻¹	5,86 · 10 ⁻²	$2,93 \cdot 10^{-3}$	25	25	50
10	2	1,17	$1,17 \cdot 10^{-1}$	5,86 · 10 ⁻³	25	25	50
9	2	2,34	$2,34 \cdot 10^{-1}$	1,17 · 10-2	25	25	50
8	2	4,69	$4,69 \cdot 10^{-1}$	$2,34 \cdot 10^{-2}$	25	25	50
7	2	9,38	9,38 · 10 ⁻¹	4,69 · 10 ⁻²	25	25	50
6	2	18,8	1,88	9,38 · 10 ⁻²	25	25	50
5	2	37,5	3,75	$1,88 \cdot 10^{-1}$	25	25	50
4	2	75	7,50	3,75 · 10 ⁻¹	25	25	50
3	2	150	15	$7,50 \cdot 10^{-1}$	25	25	50
2	2	300	30	1,50	25	25	50
1	0	600	60	3,00	50	0	50

Tabelle 10: Pipettierschema zur Herstellung der B-BSA-Verdünnungsreihe für das MNP-System PE23.

A.1.d Herstellung der MNP-Verdünnungen

Für die Quervernetzungsexperimente werden die MNP-Systeme auf eine Eisenkonzentration von $c_{\text{Fe}} = 0,05 \text{ mg/mL}$ verdünnt. In Tabelle 11 ist das Pipettierschema zur Herstellung der MNP-Verdünnungen dargestellt.

MNP - Sys-	Aus- gangs- konz.	Ziel- konz.	Späterer VF (10 µL	Zwi- schen- konz.	End- volu- men	Endvolumen 80 % des Überstandes	<i>MNP-</i> Volu- men	0.1 % BSA- Lösung
tem	MNP		MNP + 10 μL B- BSA)					
	С [g/[_]	CZiel		CZw [g/ I _]		VE, Überstand	V _{MNP}	
SY50	2,87	0,05	2	0,1	400	320	13,94	386,06
SY64	4,03	0,05	2	0,1	400	320	9,93	390,07
PE23	2,4	0,05	2	0,1	400	320	16,67	383,33
PE21	7,73	0,05	2	0,1	400	320	5,17	394,83

Tabelle 11: Pipettierschema zur Herstellung der MNP-Verdünnungen.

A.1.e Herstellung der Quervernetzungsproben

Zur Quervernetzung der MNP mit B-BSA werden die zuvor hergestellten B-BSA-Verdünnungen und die MNP-Verdünnungen miteinander gemischt. Hierfür werden jeweils 10 µL der MNP-Lösung zu 10 µL der B-BSA-Lösung pipettiert

MNP-System SY50 und SY64

In Tabelle 12 ist das Pipettierschema zur Herstellung der Quervernetzungsproben mit den MNP-Systemen SY50 und SY64 dargestellt.

	ID	Zielvo- lumen	MNP Volu- men	B-BSA Volu- men	0,1 %- w/w BSA-Lö- sung	MNP Konz.	B-BSA Konz.	B-BSA- MNP Verhält- nis
		Vziel [µL]	V _{MNP} [µL]	V _{B-BSA} [µL]	V _{BSA} [µL]	CFe [mg/mL]	св-вsa [mg/mL]	СВ-ВЅА/СГе [-]
SY50, SY64	K	20	10	0	10	0,05	0,00	0,00
SY50, SY64	22	20	10	10	0	0,05	2,86 · 10 ⁻⁵	5,72 · 10 ⁻⁴
SY50, SY64	21	20	10	10	0	0,05	5,72 · 10 ⁻⁵	1,14 · 10 ⁻³
SY50, SY64	20	20	10	10	0	0,05	1,14 · 10 ⁻⁴	2,29 · 10 ⁻³
SY50, SY64	19	20	10	10	0	0,05	2,29 · 10 ⁻⁴	4,58 · 10 ⁻³
SY50, SY64	18	20	10	10	0	0,05	4,58 · 10-4	9,16 · 10 ⁻³
SY50, SY64	17	20	10	10	0	0,05	9,16 · 10 ⁻⁴	1,83 · 10 ⁻²

SY50, SY64	16	20	10	10	0	0,05	1,83 · 10 ⁻³	3,66 · 10 ⁻²
SY50, SY64	15	20	10	10	0	0,05	3,66 · 10 ⁻³	7,32 · 10 ⁻²
SY50, SY64	14	20	10	10	0	0,05	7,32 · 10 ⁻³	1,46 · 10-1
SY50, SY64	13	20	10	10	0	0,05	1,46 · 10 ⁻²	2,93 · 10 ⁻¹
SY50, SY64	12	20	10	10	0	0,05	2,93 · 10 ⁻²	5,86 · 10 ⁻¹
SY50, SY64	11	20	10	10	0	0,05	5,86 · 10 ⁻²	1,17
SY50, SY64	10	20	10	10	0	0,05	1,17 · 10-1	2,34
SY50, SY64	9	20	10	10	0	0,05	2,34 · 10-1	4,69
SY50, SY64	8	20	10	10	0	0,05	4,69 · 10 ⁻¹	9,38
SY50, SY64	7	20	10	10	0	0,05	9,38 · 10 ⁻¹	18,8
SY50, SY64	6	20	10	10	0	0,05	1,88	37,5
SY50, SY64	5	20	10	10	0	0,05	3,75	75
SY50, SY64	4	20	10	10	0	0,05	7,50	150
SY50, SY64	3	20	10	10	0	0,05	15	300
SY50, SY64	2	20	10	10	0	0,05	30	600
SY50, SY54	1	20	10	10	0	0,05	60	1200

Tabelle 12: Pipettierschema zur Herstellung der Quervernetzungsproben mit den MNP-Systemen SY50 und SY64.

MNP-System PE23

In Tabelle 13 ist das Pipettierschema zur Herstellung der Quervernetzungsproben mit dem MNP-System PE23 dargestellt.

MNP-	ID	Ziel-	Volumen	B-BSA	0,1 %-	MNP	B-BSA	B-BSA-
Sys-		Volu-	der	Volumen	w/w	Konz.	Konz.	MNP
tem		men	MNP- Lösung		BSA- Lösung			Verhaltnis
			Losung		Losung			
		VZiel	VMNP	VB-BSA	VBSA	СFe	CB-BSA	CB-BSA/CFe
		[µL]	[µL]	[µL]	[µL]	[mg/mL]	[mg/mL]	[-]
PE23	K	20	10	0	10	0,05	0,00	0,00
PE23	26	20	10	10	0	0,05	$7,15 \cdot 10^{-12}$	$1,43 \cdot 10^{-10}$
PE23	25	20	10	10	0	0,05	$7,15 \cdot 10^{-10}$	$1,43 \cdot 10^{-8}$
PE23	24	20	10	10	0	0,05	$7,15 \cdot 10^{-8}$	$1,43 \cdot 10^{-6}$
PE23	23	20	10	10	0	0,05	$7,15 \cdot 10^{-6}$	$1,43 \cdot 10^{-4}$
PE23	22	20	10	10	0	0,05	$1,43 \cdot 10^{-5}$	$2,86 \cdot 10^{-4}$
PE23	21	20	10	10	0	0,05	2,86 · 10 ⁻⁵	5,72 · 10 ⁻⁴
PE23	20	20	10	10	0	0,05	$5,72 \cdot 10^{-5}$	$1,14 \cdot 10^{-3}$
PE23	19	20	10	10	0	0,05	$1,14 \cdot 10^{-4}$	$2,29 \cdot 10^{-3}$
PE23	18	20	10	10	0	0,05	$2,29 \cdot 10^{-4}$	$4,58 \cdot 10^{-3}$
PE23	17	20	10	10	0	0,05	$4,58 \cdot 10^{-4}$	9,16 · 10 ⁻³
PE23	16	20	10	10	0	0,05	9,16 · 10 ⁻⁴	1,83 · 10-2
PE23	15	20	10	10	0	0,05	1,83 · 10 ⁻³	3,66 · 10 ⁻²
PE23	14	20	10	10	0	0,05	3,66 · 10 ⁻³	7,32 · 10 ⁻²
PE23	13	20	10	10	0	0,05	7,32 · 10 ⁻³	1,46 · 10 ⁻¹
PE23	12	20	10	10	0	0,05	1,46 · 10 ⁻²	2,93 · 10 ⁻¹
PE23	11	20	10	10	0	0,05	$2,93 \cdot 10^{-2}$	5,86 · 10 ⁻¹
PE23	10	20	10	10	0	0,05	5,86 · 10 ⁻²	1,17
PE23	9	20	10	10	0	0,05	$1,17 \cdot 10^{-1}$	2,34
PE23	8	20	10	10	0	0,05	$2,34 \cdot 10^{-1}$	4,69
PE23	7	20	10	10	0	0,05	4,69 · 10 ⁻¹	9,38
PE23	6	20	10	10	0	0,05	9,38 · 10 ⁻¹	18,8
PE23	5	20	10	10	0	0,05	1,88	37,5
PE23	4	20	10	10	0	0,05	3,75	75
PE23	3	20	10	10	0	0,05	7,5	150
PE23	2	20	10	10	0	0,05	15	300
PE23	1	20	10	10	0	0,05	30	600

Tabelle 13: Pipettierschema zur Herstellung der Quervernetzungsproben mit dem MNP-System PE23.

A.1.f Feldabhängige Inkubation

Für die Untersuchung der Einwirkung eines äußeren Feldes während der Inkubationszeit auf die Quervernetzungsreaktion des MNP-Systems PE23 mit B-BSA werden lediglich zwei Proben hergestellt. Zum einen wird eine Probe mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 hergestellt, da bei diesem B-BSA-MNP-Verhältnis die größte Signaländerung zu erwarten ist. Des Weiteren wird eine Probe mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von $1,43 \cdot 10^{-11}$ hergestellt. Zur Präparation wird das in Tabelle 14 dargestellte Pipettierschema verwendet.

ID	VF	B-BSA- MNP- Verhältnis	B-BSA-Konz. (Ziel)	Masse B- BSA	0,1% BSA-Lö- sung	B-BSA- Lösung	B-BSA- Lösung
		CB-BSA/CFe	CB-BSA	mB-BSA	V _{BSA}	VB-BSA	
7	26,23	$1,43 \cdot 10^{-10}$	$1,43 \cdot 10^{-11}$	$7,15 \cdot 10^{-13}$	48,094	1,906	50
6	100	3,75 · 10 ⁻⁹	$3,75 \cdot 10^{-10}$	1,88 · 10 ⁻¹¹	49,5	0,5	50
5	100	$3,75 \cdot 10^{-7}$	$3,75 \cdot 10^{-8}$	1,88 · 10 ⁻⁹	49,5	0,5	50
4	100	$3,75 \cdot 10^{-5}$	$3,75 \cdot 10^{-6}$	$1,88 \cdot 10^{-7}$	49,5	0,5	50
3	100	$3,75 \cdot 10^{-3}$	$3,75 \cdot 10^{-4}$	$1,88 \cdot 10^{-5}$	49,5	0,5	50
2	100	3,75 · 10 ⁻¹	3,75 · 10 ⁻²	1,88 · 10 ⁻³	49,5	0,5	50
1	0	37,5	3,75	1,88 · 10 ⁻¹	50	0	50

Tabelle 14: Pipettierschema zur Herstellung von Quervernetzungsproben mit einem B-BSA-MNP-Verhältnis von 37,5 und 1,43 · 10- 11.

A.1.g Kontrollexperiment: Freies Biotin

Für das Kontrollexperiment wird anstelle der B-BSA-Verdünnungsreihe eine Biotin-Verdünnungsreihe verwendet. Das Pipettierschema ist in Tabelle 15 dargestellt.

ID	VF	Biotin- MNP-Ver- hältnis	Biotin- Konz. (Ziel)	Masse Biotin	0,1 % BSA- Lö- sung	Biotin- Lösung	Biotin- Lösung (Ziel)	0,1 M NaOH- Lösung
		CB-BSA/CFe [-]	^{C Biotin} [mg/mL]	m _{Biotin} [mg]	V _{BSA} [µL]	V Biotin [µL]	V Ziel [µL]	ν _{NaOH} [μl]
19	10	$5,62 \cdot 10^{-7}$	$5,62 \cdot 10^{-8}$	$5,62 \cdot 10^{-8}$	900	100	1000	0
18	10	5,62 · 10 ⁻⁶	5,62 · 10 ⁻⁷	5,62 · 10 ⁻⁷	900	100	1000	0
17	10	5,62 · 10 ⁻⁵	5,62 · 10 ⁻⁶	5,62 · 10 ⁻⁶	900	100	1000	0
16	10	5,62 · 10 ⁻⁴	5,62 · 10 ⁻⁵	5,62 · 10 ⁻⁵	900	100	1000	0
15	2	5,62 · 10 ⁻³	5,62 · 10 ⁻⁴	5,62 · 10 ⁻⁴	500	500	1000	0
14	2	$1,12 \cdot 10^{-2}$	$1,12 \cdot 10^{-3}$	$1,12 \cdot 10^{-3}$	500	500	1000	0
13	2	2,25 · 10 ⁻²	$2,25 \cdot 10^{-3}$	$2,25 \cdot 10^{-3}$	500	500	1000	0
12	2	$4,50 \cdot 10^{-2}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	500	500	1000	0
11	2	8,99 · 10 ⁻²	8,99 · 10 ⁻³	8,99 · 10 ⁻³	500	500	1000	0
10	2	$1,80 \cdot 10^{-1}$	$1,80 \cdot 10^{-2}$	$1,80 \cdot 10^{-2}$	500	500	1000	0
9	2	3,60 · 10 ⁻¹	$3,60 \cdot 10^{-2}$	$3,60 \cdot 10^{-2}$	500	500	1000	0
8	2	7,20 · 10 ⁻¹	7,20 · 10 ⁻²	7,20 · 10 ⁻²	500	500	1000	0

7	2	1,44	$1,44 \cdot 10^{-1}$	$1,44 \cdot 10^{-1}$	500	500	1000	0
6	2	2,88	$2,88 \cdot 10^{-1}$	$2,88 \cdot 10^{-1}$	500	500	1000	0
5	2	5,76	$5,76 \cdot 10^{-1}$	$5,76 \cdot 10^{-1}$	500	500	1000	0
4	2	11,5	1,15	1,15	500	500	1000	0
3	2	23	2,30	2,30	500	500	1000	0
2	2	46,1	4,61	4,61	500	500	1000	0
1	0	92,1	9,21	9,21	0	0	1000	1000

Tabelle 15: Pipettierschema zur Herstellung der Biotin-Verdünnungsreihe.

A.2 Messskripte der feldabhängigen Inkubation

A.2.a Kontinuierliche Feldexposition

In Abbildung 34 ist ein Ausschnitt des Messskriptes zur kontinuierlichen Feldexposition bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT dargestellt. Das Messskript wird nach einer Inkubationszeit von 4 h abgebrochen.

```
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait:60
measurement; 25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement; 25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement; 25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement; 25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement; 25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement; 25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement; 25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211105\20211105_154342_empty_h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
measurement;25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211105\20211105 154342 empty h
older (25.000mT 1.0s).mps
wait;60
```

Abbildung 34: Ausschnitt des Messskripts zur kontinuierlichen Feldexposition bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT.

A.2.b Diskontinuierliche Feldexposition

Das Messskript zur diskontinuierlichen Feldexposition sieht eine Gesamtinkubationszeit von 4 h vor. Nach einer Messung bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT und t = 1 s wird eine Messung bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 0,05$ mT und t = 0,1 s durchgeführt.

Anhang A: Versuchsdurchführungen

measurement; 25.000; 1; C:\MPS Results\2021\20211104\20211104 151506 empty h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait:900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait:900 measurement;25.000;1;C:\MPS Results\2021\20211104\20211104 151506 empty h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement; 25.000; 1; C:\MPS Results\2021\20211104\20211104 151506 empty h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps walt;900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement; 25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mp/ measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps walt;900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS Results\2021\20211104\20211104 151516 empty holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement; 25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait:900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement; 25.000; 1; C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement; 25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement;25.000;1;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151506_empty_h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps wait;900 measurement; 25.000; 1; C:\MPS Results\2021\20211104\20211104 151506 empty h older (25.000mT 1.0s).mps measurement;0.05;0.01;C:\MPS_Results\2021\20211104\20211104_151516_empty_ holder (0.050mT 0.1s).mps

Abbildung 35: Messskript zur diskontinuierlichen Feldexposition bei einer Anregungsfeldstärke von $B_a = 25$ mT.

Anhang B Auswertungen

B.1 Berechnung der Eisenmasse

Das A_5/A_3 -Verhältnis und die Phase der dritten Harmonischen φ_3 ist von der Eisenmasse abhängig. Zur Berechnung der Eisenmasse der MNP-Systeme SY50, SY64, PE23 und PE21 wird die molare Masse von Eisen ($M_{Fe} = 55,845$ g/mol) und die Eisenkonzentration der unverdünnten MNP-Lösung c_{Fe} benötigt. Hierbei wird nicht die Herstellerangabe, sondern die an der PTB gemessene Eisenkonzentration des jeweiligen MNP-Systems verwendet (siehe Seite 23). Durch Division der Eisenkonzentration durch die molare Masse von Eisen M_{Fe} kann die Eisenkonzentration von mg/mL in mol/L umgerechnet werden:

SY50:
$$c_{Fe,mol} = \frac{c_{Fe,mg}}{M_{Fe}} = \frac{2,87 \frac{g}{L}}{55,845 \frac{g}{mol}} = 51,3 \frac{mmol}{L}$$

SY64:
$$c_{Fe,mol} = \frac{c_{Fe,mg}}{M_{Fe}} = \frac{4,03 \frac{g}{L}}{55,845 \frac{g}{mol}} = 72,1 \frac{mmol}{L}$$

$$PE23: c_{Fe,mol} = \frac{c_{Fe,mg}}{M_{Fe}} = \frac{2,40 \ \frac{g}{L}}{55,845 \ \frac{g}{mol}} = 42,9 \ \frac{mmol}{L}$$

$$PE21: c_{Fe,mol} = \frac{c_{Fe,mg}}{M_{Fe}} = \frac{7,73 \ \frac{g}{L}}{55,845 \ \frac{g}{mol}} = 138,4 \ \frac{mmol}{L}$$

Im Rahmen der Voruntersuchungen wird, die für die Quervernetzung benötigte Eisenmasse, untersucht, die ein ausreichenden MPS-Signal erzeugt. Die Eisenkonzentrationen der MNP-Verdünnungsstufen 1 bis 7 sind in Tabelle 16 dargestellt. Die Eisenmasse des MNP-Systems PE21 wird für das Kontrollexperiment benötigt (siehe Abschnitt 4.4.1).

Verdünnungs- stufe N	VF	SY50 c _{Fe} [mmol/L]	SY64 c _{Fe} [mmol/L]	PE23 c _{Fe} [mmol/L]
0	0	51,3	72,1	42,9
1	10	5,13	7,21	4,29
2	10	0,513	0,721	0,429
3	10	0,0513	0,0721	0,0429
4	10	0,00513	0,00721	0,00429
5	10	5,13 · 10 ⁻⁴	7,21 · 10 ⁻⁴	4,29 · 10 ⁻⁴
6	10	5,13 · 10 ⁻⁵	7,21 · 10 ⁻⁵	4,29 · 10 ⁻⁵
7	10	5,13 · 10 ⁻⁶	7,21 · 10 ⁻⁶	4,29 · 10 ⁻⁶

Tabelle 16: Eisenkonzentrationen der Verdünnungsstufen 0 bis 7.

Da die MPS massensensitiv ist, wird die Eisenmasse der Verdünnungsstufen benötigt, die sich nach der folgenden Formel berechnet:

$$m_{Fe} = c_{Fe} \cdot M_{Fe} \cdot V_{Probe} \tag{15}$$

Mit einem Probenvolumen von $V_{\text{Probe}} = 18 \ \mu\text{L}$ und der Molaren Masse $M_{\text{Fe}} = 55,458 \ \text{mol/L}$ von Eisen ergibt sich für das MNP-System SY50 eine Eisenmasse von $m_{\text{Fe}} = 5,127 \cdot 10^{-5} \text{ g}$ für die unverdünnte Probe. Für das MNP-System SY65 berechnet sich eine Eisenmasse von $m_{\text{Fe}} = 7,238 \cdot 10^{-5} \text{ g}$ und für PE23 eine Eisenmasse von $m_{\text{Fe}} = 4,322 \cdot 10^{-5} \text{ g}$. Mit dem Verdünnungsfaktor VF = 10 werden die Eisenmassen der Verdünnungsstufen berechnet (siehe Tabelle 17).

Verdünnungsstufe	VF	SY50	SY64	PE23
Ν		<i>m</i> Fe	<i>m</i> Fe	<i>М</i> Fe
		[g]	[g]	[g]
0	0	5,127 · 10-5	7,238 · 10 ⁻⁵	4,322 · 10 ⁻⁵
1	10	5,127 · 10-6	7,238 · 10 ⁻⁶	4,322 · 10 ⁻⁶
2	10	5,127 · 10-7	7,238 · 10 ⁻⁷	4,322 · 10 ⁻⁷
3	10	5,127 · 10-8	7,238 · 10 ⁻⁸	4,322 · 10 ⁻⁸
4	10	5,127 · 10-9	7,238 · 10 ⁻⁹	4,322 · 10 ⁻⁹
5	10	5,127 · 10 ⁻¹⁰	7,238 · 10 ⁻¹⁰	$4,322 \cdot 10^{-10}$
6	10	5,127 · 10 ⁻¹¹	7,238 · 10 ⁻¹¹	4,322 · 10 ⁻¹¹
7	10	5,127 · 10-12	7,238 · 10 ⁻¹²	4,322 · 10 ⁻¹²

Tabelle 17: Eisenmassen der MNP-Verdünnungsstufen.

Anhand der berechneten Eisenmassen der Verdünnungsstufen (siehe Tabelle 17) wird die zu verwendende Eisenmasse zur Quervernetzung der MNP mit B-BSA (siehe Seite 37) und die Sensitivität der MPS (siehe Seite 40) untersucht.
B.2 Ermittlung des Untergrundsignals der MPS

In Abbildung 36 ist das Untergrundsignal durch Messung des leeren Probenstabes der Harmonischen A_3 und A_5 bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5$ mT, $B_a = 12$ mT und $B_a = 25$ mT dargestellt.



Abbildung 36: Messung des Untergrundsignals der MPS bei den Anregungsfeldstärken $B_a = 5 \text{ mT}$, $B_a = 12 \text{ mT}$ und $B_a = 25 \text{ mT}$ zur Ermittlung der Nachweisgrenze in Abhängigkeit der Feldstärke. In dieser Grafik sind die Mehrfachbestimmungen der Harmonischen A_3 und A_5 abgebildet.

Das Untergrundsignal des leeren Probenstabes bei einer Feldstärke von $B_a = 25$ mT ist im Durchschnitt höher ist als bei der Messung bei $B_a = 5$ mT oder $B_a = 12$ mT (siehe Abbildung 36).