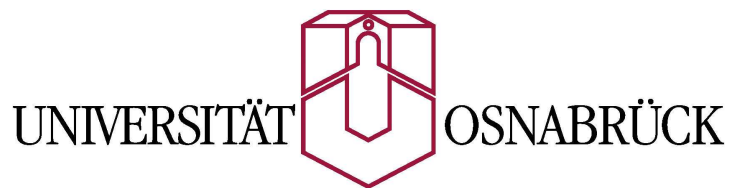


Adressierung elektrochemischer Sensoren in einer passiven Matrix

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat -

von
Burghard Lutter
aus Hilden Krs. Mettmann



Januar 2007

**Ich danke den Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit
beigetragen haben.**

Herrn Prof. L. Walder für die Betreuung und Diskussion während der
Promotionsarbeit

meinen Kolleginnen und Kollegen Holger Oelrich, Tesfaye Hailu Degefa, Ina
Rianasari, Dirk Bongard, Wolfdietrich Meyer, Simona Asaftei, Martin
Möller, Veronica Alina Konstantin, Dereje Hailu Taffa und Peter Schön

den Mitarbeitern der Elektronikwerkstatt für die Konstruktion und den
Aufbau des Potentiostaten

den Mitarbeitern in der Feinmechanischen Werkstatt für die Unterstützung
bei der Konstruktion der Presswerkzeuge

dem Land Niedersachsen für die finanzielle Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Zusammenfassung	5
3	Einleitung	7
4	Theoretische Grundlagen	9
4.1	Ansteuern einer Matrix	9
4.2	Elektrochemie	12
4.2.1	Chronoamperometrie	13
4.2.2	Cyclovoltammetrie	15
4.3	Sensorsysteme	17
4.3.1	Mechanismus des Ion Gatings	17
4.3.2	Mechanismus der enzymkatalysierten Sensoren	18
4.4	Mikrofluidik	22
4.4.1	Oberflächenspannungen	22
4.4.2	Kontaktwinkel	23
4.4.3	Einziehen von Flüssigkeiten in Kapillaren	25
4.4.4	Mikrofluides System in der Sensormatrix	27
4.5	Oberflächenmodifikation	29
4.5.1	Behandlung der Oberfläche des Glases mit Chlorsilanen	29
4.5.2	Behandlung der Oberfläche des Goldes mit Alkanthiolen	31
4.5.3	Enzymkatalysierte Sensoren	31
4.5.4	Synthese von Preußisch Blau auf Elektroden	33
4.5.5	Synthese von Polypyrrol auf Elektroden	35
4.5.6	Strukturieren der Oberfläche	36
5	Auswertung und Diskussion	41
5.1	Modifikation des Glases und mikrofluidische Systeme	41
5.1.1	Strukturierung und Hydrophobisierung der Elektroden	42
5.1.2	Mikrofluidik des Sensorarrays	46

5.1.3	Einfluss der Größe der Gegenelektrode	47
5.2	Kombinierte Gegen- und Referenzelektroden	49
5.2.1	Silber/Silberchlorid Elektrode	50
5.2.2	Polypyrrol Elektrode	51
5.2.3	Preußisch Blau Elektroden	52
5.2.4	Zusammenfassung der Gegenelektroden	55
5.3	Bewertung des Matrixarrays	56
5.4	Modifikation der Arbeitselektroden	61
5.5	Gemischte SAMs aus AUT und HDT	64
5.6	Enzymkatalysierte Sensoren	67
5.7	Immobilisierung von FDH auf Goldelektroden	70
5.8	Interferenzen bei der Fructosebestimmung	73
5.9	Immobilisierung von Ferrocenderivaten auf einer Elektrodenoberfläche	76
6	Schlussfolgerung	80
7	Ausblicke	82
8	Durchführung der Versuche	84
8.1	Mikrofluidik	84
8.1.1	Messung der Kontaktwinkel	84
8.1.2	Einziehen von Flüssigkeiten in Kapillaren	85
8.2	Unterteilung des Elektrolyten mit Hilfe von Silikondichtungen	86
8.3	Oberflächenmodifikation	87
8.3.1	Chemische Reaktion zur Oberflächenmodifikation . . .	87
8.3.2	Immobilisieren von Ferrocenen	92
8.3.3	Ausbildung von Thiol SAMs aus ethanolischen Lösungen	92
8.3.4	Ausbildung von Thiol SAMs durch Stempeln	93
8.3.5	Strukturieren der Oberfläche	94
8.3.6	Silikondichtungen für Mikrogefäße und Kapillaren . . .	98
8.3.7	Reinigen der Oberflächen	100
8.4	Elektrochemie	103
8.4.1	Messungen im Drei-Elektrodensystem	103
8.4.2	Messungen mit den Matrixarrays	104
9	Anhang	106
	Literatur	112
	Lebenslauf	123

Eidesstattliche Erklärung	124
Poster	125

Kapitel 1

Abkürzungen

Variablen

Abkürzung	Bedeutung	Wert/Einheit
A	Oberfläche	m^2
C	Konzentration	$\frac{mol}{l}$
C_{ox}	Konzentration der oxidierten Substanz	$\frac{mol}{l}$
C_{red}	Konzentration der reduzierten Substanz	$\frac{mol}{l}$
d	Zeitraum	Tage
D	Diffusionskoeffizient	$\frac{cm^2}{s}$
E	Potential	V
E^0	Standardpotential	V
E_{ob}	Energie der Oberflächen	J
F	Faraday-Konstante	$96485 \frac{C}{mol}$
I	Stromstärke	A
I_{max}	maximaler Strom	A
J	Teilchenstromdichte	$\frac{mol}{m^2*s}$
K_{mm}	Michaelis Menten Konstante Enzym - Mediator	$\frac{mol}{l}$
K_{ms}	Michaelis Menten Konstante Enzym - Substrat	$\frac{mol}{l}$
R	Ideale Gaskonstante	$8,314 \frac{J}{mol*K}$
T	Temperatur	K
v	Scanrate	$\frac{mV}{s}$
V	Verhältnis	$\frac{C_{ox}}{C_{red}}$

V	Reaktionsgeschwindigkeit bei enzymatischen Reaktionen	$\frac{mol}{s}$
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei enzymatischen Reaktionen	$\frac{mol}{s}$
W	Arbeit	J = Nm
d	Dicke der Kapillare im Dünnschichtsystem	m
n	Anzahl der Elektronen	
p_{innen}	Druck innerhalb der Flüssigkeit	Pa
$p_{außen}$	Umgebungsdruck	Pa
p	Druck	Pa
p_{um}	Druck der Umgebungsluft	Pa
p_{kap}	Kapillardruck	Pa
p_g	Gewichtsdruck	Pa
r	Radius der Krümmung der Flüssigkeit	m
l	Breite der Flüssigkeitssäule	m
γ	Oberflächenspannung	$\frac{N}{m} = \frac{J}{m^2}$
γ_{sg}	Oberflächenspannung Feststoff-Gas	$\frac{N}{m} = \frac{J}{m^2}$
γ_{lg}	Oberflächenspannung Flüssigkeit-Gas	$\frac{N}{m} = \frac{J}{m^2}$
γ_{sl}	Oberflächenspannung Feststoff-Flüssigkeit	$\frac{N}{m} = \frac{J}{m^2}$
ρ	Dichte	$\frac{g}{cm^3}$
σ	Größe der Oberfläche	m^2
Θ	Kontaktwinkel	$^\circ$

Chemikalien

Abkürzung	Substanz
FDH	Fructosedehydrogenase
HDT	Hexadecanthiol
MHA	Mercaptohexadecansäure
AUT	Aminouncanthiol
ODTNB	5-(Octyldithio)-2-nitrobenzoesäure
PB	Preußisch Blau

PDMS	Polydimethylsiloxan
PQQ	Pyrrloquinolinquinon
Piranha	Mischung aus $\frac{1}{3}$ H_2O_2 und $\frac{2}{3}$ konz. H_2SO_4 ¹
Si0	gereinigtes Glas
Si1	Dimethyldichlorsilan ²
Si2	1H,1H,2H,2H-Perfluordecyltrichlorsilan
Si3	1H,1H,2H,2H-Perfluordecylmethyldichlorsilan
Si4	1H,1H,2H,2H-Perfluordecyldimethylchlorsilan

Oberflächenmodifikationen und Messanordnungen

Abkürzung	Beschreibung
System 1	Drei-Elektrodensystem mit diskreter Ausführung von Platin GE, Ref Ag/AgCl in 3 M KCl und AE (siehe Text)
System 2	Zwei-Elektrodensystem mit diskreter Ausführung von Platin GE und AE (siehe Text)
System 3	Array: Zwei-Elektrodensystem mit 200 μm Plattenabstand. Befüllung über Sip-In. Preußisch Blau GE, AE aus gesputterten Gold
System 4	Array: Zwei-Elektrodensystem mit 2,5 mm Plattenabstand. Silikondichtung. Preußisch Blau GE, gesputtertes Gold, eventuell modifiziert AE

¹Volumenanteile

²2% (w/v) Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan: LKB-Produkte AB, Sweden

Weitere Abkürzungen

Abkürzung	Beschreibung
AE	Arbeitselektrode
GE	Gegenelektrode
Ref	Referenzelektrode
SAM	Self Assembled Monolayer
Mittelw	Mittelwert
Stabw	Standardabweichung

Kapitel 2

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird der Aufbau eines, auf einer passiven Matrix basierenden Sensorarrays beschrieben. Die Praxistauglichkeit des Arrays wird an einigen Anwendungsbeispielen demonstriert.

Das Sensorarray besteht aus zwei Glasplatten, auf denen sich parallele Leiterbahnen für die Gegen- und Arbeitselektroden befinden. Diese Platten werden so übereinander gelegt, dass sich die Leiterbahnen in einem Winkel von 90° kreuzen. Die einzelnen Sensorelemente können angesteuert werden, indem die Leiterbahnen der Gegen- und Arbeitselektroden, an dessen Kreuzungspunkt sich das gewünschte Sensorelement befindet, an einen Potentiostaten angeschlossen werden. Um unerwünschte Ströme, z.B. durch den Elektrolyten oder den Umweg über benachbarte Elemente zu verhindern, müssen zum einen der Elektrolyt in einzelne, parallel zur Gegenelektrode verlaufende Abschnitte unterteilt werden und zum anderen alle Leiterbahnen der Arbeitselektroden auf ein gleiches Potential gelegt werden. Die elektrische Ansteuerung eines solchen Arrays kann mit einem normalen Potentiostaten unter Verwendung einfacher Zusatzgeräte oder durch einen Mehrkanalpotentiostaten erfolgen.

Für die Unterteilung des Elektrolyten wurden zwei Lösungsansätze angewendet. Diese beruhen auf Kapillarkräften, sowie auf einer mechanischen Unterteilung. Beim ersten Ansatz wird der Elektrolyt durch Kapillarkräfte in die dazu vorgesehenen Bereiche eingezogen und zugleich wird das Ausbrechen aus den Kompartimenten unterbunden. Hierzu wurden die Glasplatten derart in einem *lift-off* Verfahren mit Silanen hydrophob strukturiert, dass sich beim zusammengebauten Matrixarray die modifizierten, hydrophoben Bereiche, sowie die hydrophilen, unbehandelten Bereiche übereinander befanden. Für die Modifizierung wurden unterschiedliche Silane erprobt. Hierbei erwies sich das *1H,1H,2H,2H Perfluordecylmethyldichlorsilan* als die ge-

eignetste Substanz um hydrophobe Oberflächen herzustellen. Die erzielten Kontaktwinkel betragen mindestens 95° .

Im Falle der mechanischen Unterteilung des Elektrolyten wurde diese mit Hilfe von Silikondichtungen und Presswerkzeugen bewerkstelligt.

Die Gegenelektrode wurde durch eine geeignete Modifikation mit einer elektrochemisch aktiven Substanz als kombinierte Gegen- und Referenzelektrode realisiert. Dieses erlaubte Messungen unter ähnlichen Bedingungen wie in einem Drei-Elektrodensystem. Hierfür wurden verschiedene Oberflächenmodifikationen erprobt: *Silber/Silberchlorid Paste*, *Polypyrrol* und *Preußisch Blau*. Letzteres erwies sich als das geeignetste Elektrodenmaterial. Es wies die beste Haftung auf der Gegenelektrode auf, zeigte gute elektrochemische Eigenschaften sowie eine extreme Hydrophilie.

Die Modifikation der Sensorelemente wurde mit Hilfe des Mikrokontaktdruckes oder durch Inkubation in Mikrogefäßen bewerkstelligt. Hierbei zeigte sich, dass die, durch Inkubation hergestellten SAMs eine wesentlich bessere Qualität aufwiesen als die gestempelten SAMs.

Die Sensorarrays wurde im Bereich der kombinatorischen Chemie eingesetzt. Es wurden unterschiedliche isolierende Eigenschaften von gemischten SAMs aus *Aminoundecanthiol* und *Hexadecanthiol* untersucht. Weitere Anwendungen dieses Arrays waren die Optimierung der Menge des Enzyms in enzymkatalysierten Sensoren, sowie die Optimierung von Oberflächen zur Unterdrückung von elektrochemischen Interferenzen während der Messungen.

Insgesamt erwies sich das Matrixarray als ein einfach und preiswert herzustellendes, sehr robustes Sensorarray für die unterschiedlichsten Anwendungen.

Kapitel 3

Einleitung

Bei der Charakterisierung von Modifikationen oder Reaktionen an Oberflächen sind mitunter viele einzelne Messungen durchzuführen. Gleichgültig, ob es sich dabei um medizinische Immunsensoren oder um Problemstellungen aus der kombinatorischen Chemie handelt, ein Array aus vielen Sensorelementen erleichtert und beschleunigt den Analysevorgang enorm.

Im medizinischen Bereich dominieren die optischen Systeme. Derartige Sensoren sind mit einer unterschiedlichen Anzahl von Analyten bereits kommerziell erhältlich, das Angebot reicht von der spezifischen Erkennung von Bakterien [1, 2], bis hin zur simultanen Erfassung einer großen Anzahl von DNA Sequenzen [3–6].

Weitere etablierte Detektionsmethoden für Vorgänge an Oberflächen sind z.B. *Oberflächen Plasmonen Resonanz* oder die *Quarz Mikrowaage* bzw. die nach dem gleichen Prinzip arbeitenden *Surface Acoustic Wave* Sensoren. Diese Detektionssysteme lassen sich jedoch, mit Ausnahme der optischen Systeme, nur schlecht miniaturisieren und erfordern komplizierte und kostspielige Apparaturen zur Erfassung der Messergebnisse.

Einen preiswerten Ansatz zur Herstellung von Sensoren bieten die elektrochemischen Sensoren. Das wohl bekannteste Beispiel für diese Art der Sensoren sind die fast allgegenwärtigen *Glukosesensoren* zur Bestimmung des Blutzuckers bei Diabetes Patienten.

Die Detektionsprinzipien der elektrochemischen Sensoren können, je nach Anforderung u.a. aus der Messung von Leitfähigkeiten, der direkten elektrochemischen Umsetzung von den angelagerten Analyten, enzymkatalysierten Reaktionen bzw. Redox Markern oder dem Ion Gate Mechanismus bestehen. Die Entwicklung und Miniaturisierung der elektrochemischen Sensoren ist bereits unter Verwendung von integrierten Bausteinen weit fortgeschritten und kommerzialisiert worden [7–10]. Exemplarisch für deren Leistungsfähigkeit

steht das, auf einem CMOS Chip aufgebaute EDDA ¹ mit einer Packungsdichte von $24 \frac{\text{Elektroden}}{\text{mm}^2}$ [11].

Die Adressierung der Sensorelemente durch einzelne Leiterbahnen beschränkt die Größe des Arrays durch den Platzbedarf der Leiterbahnen sowie der zum Anschluss an den Potentiostaten notwendigen Kontakte.

Der Bereich der mittelgroßen Arrays mit 16 bis etwa 100 Sensorelementen wurde bisher noch nicht abgedeckt. Für diesen Größenbereich sind Sensorarrays, die durch eine passive Matrix angesteuert werden, eine preiswerte Lösung. In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines solchen Sensorarrays erläutert, sowie dessen Eignung in der Analytik anhand einiger Beispiele aus dem Bereich der enzymkatalysierten Sensoren sowie der kombinatorischen Chemie, basierend auf dem *Ion Gating* Mechanismus, beschrieben.

¹Electrically Detected Displacement Assay: Friz Biochem

Kapitel 4

Theoretische Grundlagen

4.1 Ansteuern einer Matrix

In der Einleitung wurde erwähnt, dass die Sensoren mit einer passiven Matrix ausgelesen werden können. Um die Vorteile einer passiven Matrix, aber auch ihre Grenzen besser verdeutlichen zu können, lohnt es sich einen Blick auf die unterschiedlichen Methoden, mit denen ein Sensorarray angesteuert werden kann, zu werfen. Ebenso aufschlussreich ist es zu diesem Zweck, die *Matrixprobleme* und deren Lösungsansätze in der Elektrotechnik zu betrachten.

Die einfachste Möglichkeit ein Sensorarray anzusteuern besteht darin, jede Elektrode mit einer eigenen Zuleitung zu versehen. Eine schematische Darstellung einer solchen Elektrodenanordnung ist in der Abbildung 4.1 zu sehen. Obwohl es sich bei diesem aus 16 Elektroden bestehenden Array um eine vergleichsweise kleine Anordnung handelt, so fällt doch auf, dass die Leiterbahnen, die von den Anschlüssen des Arrays zu den einzelnen Sensorfeldern führen, einen nicht unerheblichen Platzbedarf haben. Würde nach dieser Methode versucht z.B. den CMOS Sensor mit seinen über 600 Sensorfeldern nachzubilden, so müsste ein Großteil des gesamten Sensors für Leiterbahnen verwendet werden. Der einzelne Anschluss der Sensorfelder in einem Array ist daher nur für eine begrenzte Anzahl von Sensorelementen

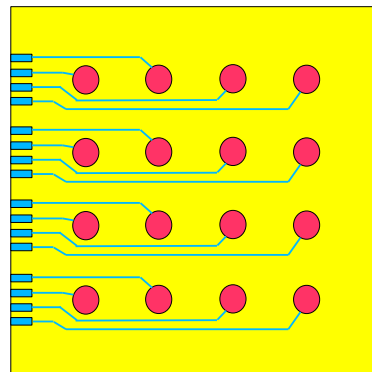


Abbildung 4.1: Einzeladressierung eines 16 Elektroden Arrays

geeignet und wird in diesem Bereich auch von einigen Herstellern von Sensorchips und Forschungsgruppen realisiert [12,13].

Ein vergleichbares Problem tritt in der Elektrotechnik auf, wenn z.B. Druckschalter von einem Mikrocontroller abgefragt werden sollen. Um Leitungen und somit Anschlüsse einzusparen, aber dennoch alle Tasten abfragen zu können, werden die Tasten in einer passiven Matrix geschaltet und von dem Controller sequentiell abgefragt. In der Abbildung 4.2 ist das Prinzip des Auslesens der Tasten abgebildet. [14] Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, werden für die 16 Elektroden nur noch 8 Leitungen und Eingänge am Controller benötigt. Als Beispiel soll der Zustand des Schalters 7 abgefragt werden. Um den Schalter 7 auszulesen, muss der Controller den Stromfluss zwischen den Eingängen 2 und 7 messen. Ist dieser geschlossen, so fließt ein Strom.

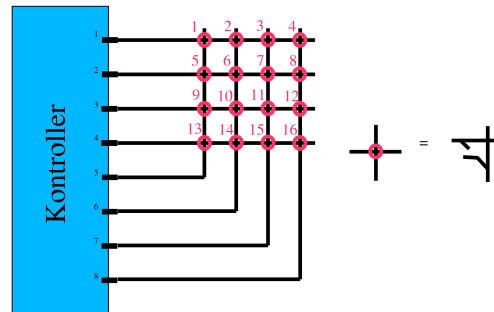


Abbildung 4.2: Auslesen von 16 Tasten in einer 4x4 Matrix. [14]

Ein ähnliches Prinzip liegt in den LED-Anzeigen vor, wie sie z.B. als Laufschrift für Werbezwecke verwendet wird. Auch hier werden die LEDs in einer Matrix sequentiell nacheinander angesteuert. Ein exemplarischer Schaltplan ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Als Beispiel soll die Diode 7 zum Leuchten gebracht werden. Dazu wird die Leitung 2 mit dem + Pol der Spannungsquelle verbunden, Leitung 7 mit dem - Pol. Der Strom kann durch die Diode 7 fließen und diese aufleuchten lassen. Gibt es noch andere Wege durch die der Strom fließen kann? In einem hypothetischen Fall könnte der Strom z.B. durch die Diode 6 auf die Leiterbahn 6 fließen. Von hier aus sind für den Strom aber alle Möglichkeiten zum Anschluss 7 zu gelangen versperrt, weil alle Dioden, die direkt oder indirekt die Leitung 6 mit der Leitung 7 verbinden, in Sperrrichtung liegen.

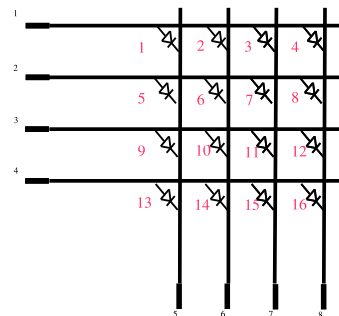


Abbildung 4.3: Ansteuern von 16 LEDs in einer 4x4 Matrix

Bei den Beispielen der *Schaltermatrix* bzw. der *Diodenmatrix* können direkt ein bestimmter Schalter ausgelesen werden bzw. eine bestimmte Diode

zum Leuchten gebracht werden. Andere Wege für den Strom sind entweder durch offene Schalter oder durch Dioden, die in Sperrichtung liegen, ver-sperrt.

Das elektrische Verhalten eines elektrochemischen Sensors kann in erster Näherung mit dem eines Wi-derstandes verglichen werden. Als ein Modellsystem für eine solches Sensorarray wird eine 4x4 Sensor-matrix (Abbildung 4.4) herangezo-gen. In diesem Beispiel soll der Wi-derstand 7 gemessen werden. Fol-glich werden die Anschlüsse 2 und 7 mit der Stromquelle verbunden und der Strom gemessen. Ein Teil des Stromes wird sicherlich durch den Widerstand 7 fließen, es ist aber auch möglich, dass der Strom durch die Widerstände 5, 6 und 8 auf die Leiterbahnen 5, 6 sowie 8 gelangt. Von hier aus kann der Strom über weitere Widerstände zum Anschluss 7 fließen. Was hier nun gemessen wird, ist der gesamte Widerstand des Netzwerkes, bei weitem aber nicht der des Widerstandes 7.

Durch einen Trick ist es möglich, trotz dieser Probleme einen Wider-stand ganz gezielt zu messen. Für dieses Prinzip muss man sich noch einmal in Erinnerung rufen, was die Voraussetzungen für den Strom-fluss sind. Damit ein Strom fließen kann, muss eine Potentialdifferenz zwischen zwei Punkten vorliegen. Umgekehrt, wenn zwei Punkte auf dem gleichen Potential liegen, kann zwischen ihnen kein Strom fließen. Für die Widerstandsmatrix bedeu-tet dies nun folgendes: Wenn, wie in dem obigen Beispiel der Widerstand 7 gemessen werden soll, so kann der Strom über die Widerstände 5, 6 und 8 auf die Leiterbahnen 5, 6 und 8 flie-ßen. Dadurch werden diese auf ein höheres Potential als das der Leiterbahn 7 angehoben. Es besteht also ein Potentialgefälle zwischen der Leiterbahn 7 und den restlichen Leiterbahnen. Dieser Stromfluss muss verhindert wer-

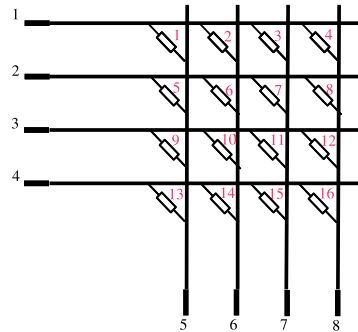


Abbildung 4.4: Ansteuern von 16 Wi-derständen in einer 4x4 Matrix.

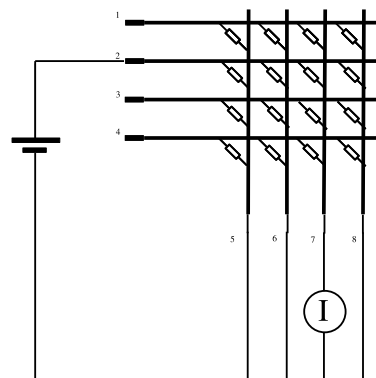


Abbildung 4.5: Ansteuern von 16 Wi-derständen in einer 4x4 Matrix mit *Gegen-spannung*

den. Dieses geschieht, indem diese Leitungen auf das gleiche Potential gelegt werden: Kein Potentialunterschied - kein Stromfluss.

Der Vorgang, alle Leiterbahnen der Arbeitselektroden auf das gleiche Potential zu legen, wird im Folgenden als *Gegenspannung* bezeichnet.

Eine komplette Messanordnung, unter Berücksichtigung dieser Überlegungen ist in der Abbildung 4.5 zu sehen.

Damit dieses vollständig geschehen kann, darf keine leitende Verbindung zwischen den nicht adressierten Sensorfeldern und der Leiterbahn, die zur Ansteuerung der gewünschten Arbeitselektrode dient, bestehen. Hierbei ist zu beachten, dass auch Elektrolyte, welche die Leiterbahnen der Arbeitselektroden bedecken, eine leitende Verbindung herstellen können.

Aus der Sicht der Elektrotechnik ist die Adressierung der einzelnen Elektroden gelöst. Wie aber erfolgt die Umsetzung dieses Konzeptes auf die elektrochemischen Sensoren? Diese Fragestellung wird in Kapitel 5.3 erläutert.

4.2 Elektrochemie

Die amperometrischen Messmethoden beruhen darauf, dass zwischen zwei Elektroden eine Spannung angelegt wird und der Strom, der durch eine durch die Spannung hervorgerufene elektrochemische Reaktion erzeugt wird, gemessen wird. Die angelegte Spannung wird durch einen *Potentiostaten* erzeugt, wobei ein solcher Potentiostat in einem Zwei- oder Drei-Elektrodensystem geschaltet werden kann. Die Zwei- oder Drei-Elektrodensysteme unterscheiden sich durch die Kontrolle des an die Arbeitselektrode angelegten Potentials. Die Schaltungsprinzipien sind in der Abbildung 4.6 zu sehen. Ein Potentiostat regelt die ausgegebene Spannung so, dass die an dem + und - dem Eingang des Potentiostaten anliegenden Spannungen den gleichen Wert aufweisen. Nach diesem Prinzip arbeitet auch der im Kapitel 8.4 erwähnte Spannungsfolger. Bei dem Zwei-Elektrodensystem ist der - Eingang des Potentiostaten direkt mit der Gegenelektrode bzw. dem Ausgang des Potentiostaten verbunden. Was in diesem Falle geregelt wird, ist die Spannungsdifferenz zwischen der Gegen- und der Arbeitselektrode. Der für die Elektrochemie interessantere Spannungsunterschied zwischen der Lösung und der Arbeitselektrode wird hingegen nicht kontrolliert. Dieser kann jedoch stark von der, zwischen der Gegen- und der Arbeitselektrode angelegten Spannung abweichen, weil u.a. der Übergang von der Gegenelektrode in die Lösung und die Lösung selber Widerstände für den Strom darstellen. An diesen Widerständen erfolgt, wenn ein Strom fließt, ein Spannungsabfall. Durch den Spannungsabfall wird die Spannung zwischen der Lösung und der Arbeitselektrode verringert. Diese negativen Auswirkungen kommen vor allem dann zum Tragen (Abschnitt

5.1.3), wenn kleine Gegenelektroden verwendet werden. Ein gleicher Effekt tritt dann auf, wenn zwar eine große Gegenelektrode verwendet wird, diese aber in einem sehr kleinen Abstand zur Arbeitselektrode angeordnet wird. In diesem Fall ist nur die Fläche der Gegenelektrode elektrochemisch aktiv, die der der Arbeitselektrode entspricht.

Anders verhält sich ein Drei-Elektrodensystem. Bei einem Drei-Elektrodensystem wird eine Referenzelektrode, welche in der Regel in der Nähe der Arbeitselektrode angeordnet ist, zur Kontrolle der Spannung verwendet. Somit kontrolliert der Potentiostat die Spannung zwischen der Arbeitselektrode und der Lösung selber. Spannungsabfälle, die beim Übergang zwischen der Gegenelektrode und der Lösung auftreten, werden ausgeglichen. Bei der Referenzelektrode handelt es sich um eine elektrochemisch aktive Elektrode, die ein genau definiertes Potential aufweist. In diesem Fall werden die vom Potentiostaten an die Messzelle angelegten Potentiale immer in Bezug auf eine genau bekannte Substanz bzw. Spannung angelegt. Spannungsabfälle, die beim Übergang zwischen der Gegenelektrode und der Lösung entstehen, werden von dem Potentiostaten durch eine höhere Spannung zwischen den Elektroden selber ausgeglichen.

Wie aus dieser Beschreibung zu erkennen ist, sind in einem Zwei-Elektrodensystem die effektiv für die Erzeugung einer elektrochemischen Reaktion an der Arbeitselektrode zur Verfügung stehenden Spannungen immer kleiner als es in einem Drei-Elektrodensystem der Fall ist. In einem Zwei-Elektrodensystem erscheinen elektrochemische Reaktionen daher immer langsamer als in einem Drei-Elektrodensystem. Wenn die Reaktion an der Gegenelektrode den Strom zu stark limitiert, sind mitunter keine aussagekräftigen elektrochemischen Messungen mehr möglich.

4.2.1 Chronoamperometrie

Die Chronoamperometrie ist die einfachste elektrochemische Messmethode. Zwischen der Gegen- und Arbeitselektrode wird eine Spannung angelegt und der resultierende Strom in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Die Gleichgewichtszusammensetzung der elektrochemisch aktiven Substanz an der Arbeitselektrode kann mit Hilfe der *Nernst-Gleichung*, 4.1 berechnet werden.

$$E = E^0 + \frac{R * T}{n * F} * \ln \left[\frac{C_{ox}}{C_{red}} \right] \quad (4.1)$$

Weicht die Zusammensetzung in der Lösung von der nach der *Nernst Gleichung* berechneten ab, so findet ein Elektronentransfer statt. Hierdurch diffundieren, entsprechend dem entstehenden Konzentrationsgradienten, die oxidierte bzw. die reduzierte Form der elektrochemisch aktiven Substanz zu

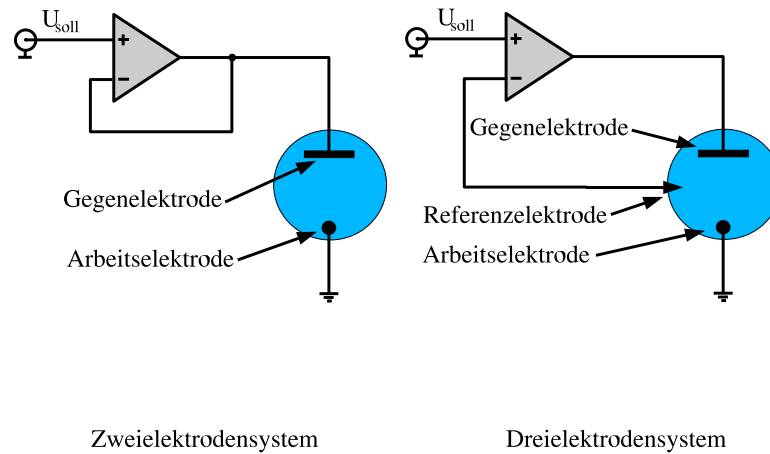


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung eines Zwei- bzw. Drei-Elektrodensystems

der Elektrode und werden an dieser umgesetzt. Der gemessene Strom ist von der Stoffmenge abhängig, die durch Diffusion zu der Oberfläche der Elektrode gelangt. Im Laufe der Zeit bildet sich eine Diffusionsschicht aus, in der die umzusetzende Substanz verarmt ist. Wie die Diffusionsschicht die Abhängigkeit des Stromes von der Zeit beeinflusst, hängt davon ab, ob die Diffusion planar oder kugelförmig erfolgt. Die entsprechenden Strom-Zeitkurven können mit Hilfe der *Cottrell Gleichung* für die planare Diffusion 4.2, bzw. der kugelförmigen Diffusion 4.3 berechnet werden. [15]

$$i(t) = \frac{nFA\sqrt{DC_0}}{\sqrt{\pi t}} \quad (4.2)$$

$$i(t) = nFADC_0 \left[\frac{1}{\sqrt{\pi Dt}} + \frac{1}{r_0} \right] \quad (4.3)$$

Für den Fall der planaren Diffusion ergibt sich eine ständige zeitliche Verringerung des Stromes, für den Fall der radialen Diffusion nimmt der Strom einen konstanten Wert an. Die radiale Diffusion tritt nicht nur an kugelförmigen Elektroden auf, sondern nach einer gewissen Zeit auch an quadratischen bzw. kreisförmigen Mikroelektroden [16]. Der Zeitpunkt, ab dem eine radiale Diffusion an Mikroelektroden zu beobachten ist, ist von der Größe der Elektroden abhängig. Bei kleinen Elektroden ist mit einem Mischverhalten aus planarer und radialer Diffusion zu rechnen.

Eine weitere Abweichung von den angegebenen Strom-Zeitkurven ist bei Messungen in einem Dünnschichtsystem zu beobachten. Wenn die Diffusionsschicht an die Wandung der Kapillare trifft, verarmt die Diffusionsschicht schneller an elektrochemisch umsetzbarer Substanz, als dieses bei der reinen planaren Diffusion der Fall wäre. Wie eigene Messungen ergaben, macht sich diese Verarmung in einem schnelleren Abfall des Stromes, als nach Gleichung 4.2 zu erwarten wäre, bemerkbar. Diese Limitierung kann bei dem, in dieser Arbeit vorgestelltem Sensorarray (System 3) auftreten.

4.2.2 Cyclovoltammetrie

Bei der Cyclovoltammetrie wird an die Arbeitselektrode eine Dreiecksspannung angelegt. Das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem Substanz an der Oberfläche der Elektrode stellt sich gemäß der Nernst Gleichung ein. Die zur Elektrode hin diffundierende Stoffmenge nimmt dadurch zunächst einmal zu, so dass ein Anstieg des Stromes zu verzeichnen ist. Wie bei den chronoamperometrischen Messungen bilden sich Diffusionsschichten aus. Handelt es sich um eine planare Diffusion, so tritt prinzipiell ein Abfall der

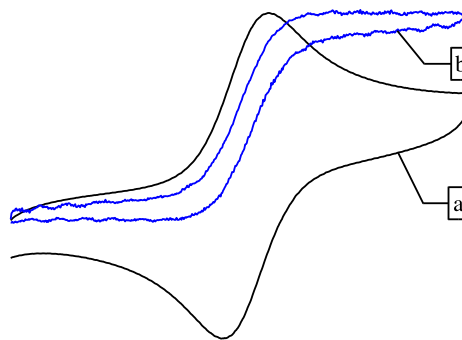


Abbildung 4.7: Qualitativer Verlauf von CV Messungen an a) 3 mm Methrom Elektrode, b) 25 μm -Elektroden in System 1. Scanrate $25 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$; Scanbereich -100 mV bis 500 mV

Stromstärke auf. Bei einer radialen Diffusion stellt sich im Laufe der Zeit ein konstanter Strom ein. Mit zunehmend größer bzw. kleiner werdendem Potential erfolgt eine weitere Verschiebung des Redox Gleichgewichts in Richtung der oxidierten bzw. reduzierten Spezies. Dadurch wird zwar der Konzentrationsunterschied zwischen der Elektrodenoberfläche und der Elektrolytlösung vergrößert, der für die Diffusion entscheidende Diffusionsgradient kann wegen der Ausbreitung der Diffusionsschicht nicht mehr vergrößert werden. Hinzu kommt, dass gemäß der Nernst Gleichung die Veränderung in der Zusammensetzung der elektrochemisch aktiven Substanz zunehmend kleiner ausfällt.

Für den Fall, dass eine eindimensionale Diffusion, senkrecht zur Oberfläche der Elektrode vorliegt, ergibt sich ein CV, welches Oxidations- und Reduktionspeaks aufweist (Abbildung 4.7 a). Befindet sich die elektrochemisch aktive Substanz frei in der Elektrolytlösung, so beträgt der Abstand zwischen dem Oxidations- und dem Reduktionspeak 59 mV, sofern es sich um

ein reversibles System handelt. Ist die elektrochemisch aktive Substanz direkt auf der Oberfläche der Elektrode gebunden, befinden sich die Oxidations- und Reduktionspeaks beim gleichen Potential. Mit einer zunehmend langsamer verlaufenden elektrochemischen Reaktion, wenn die Zusammensetzung an der Elektrodenoberfläche *hinterherhinkt*, wird der Abstand zwischen den Peaks zunehmend größer. Der gleiche Effekt ist jedoch auch zu beobachten, wenn zwischen der Elektrodenoberfläche und dem Potentiostaten ein hoher ohmscher Widerstand liegt, der vom Potentiostaten nicht kompensiert werden kann, oder in einem Zwei-Elektrodensystem die Gegenelektrode den Stromfluss limitiert.

Liegt hingegen eine radiale Diffusion, z.B. an einer Mikroelektrode vor, so ergibt sich ein sigmoides CV. (Abbildung 4.7 b)

Durch die sich abwechselnden Oxidationen und Reduktionen an der Arbeitselektrode liegen nach Ablauf des Retour-Scans wieder die Ausgangsbedingungen an der Elektrode vor. Die folgenden Scans sind alle identisch. Diese Regeneration des Elektrolyten ist eine zwingende Voraussetzung für die sequentielle Adressierung der einzelnen Sensorelemente in dem passiven Matrixarray.

An die elektrochemische Reaktion an der Elektrode kann eine chemische Reaktion gekoppelt werden. Es ist z.B. möglich, dass durch einen Katalysator die an der Oberfläche der Elektrode gebildete oxidierte Substanz sofort reduziert wird. In diesem Falle ist bei den CVs kein, oder nur ein verkleinerter Reduktionspeak zu sehen und der Oxidationspeak wird vergrößert. Bei einer ausreichend schnellen katalytischen Umsetzung tritt keine zunehmende Diffusionsschicht auf und das CV nimmt, unabhängig vom vorliegenden Diffusionsverhalten einen sigmoidalen Kurvenverlauf an. Dieses Verhalten ist z.B. bei dem, in Kapitel 4.3.2 vorgestellten und in Kapitel 5.6 beschriebenen Fructosesensor der Fall.

4.3 Sensorsysteme

In dem, in dieser Arbeit vorgestellten passiven Elektrodenarray wurden zwei Detektionsmechanismen implementiert. Das *Ion Gating* und die *enzymatische Katalyse*. Bei diesen beiden Detektionsmechanismen handelt es sich um voneinander unabhängige Mechanismen.

In Kapitel 5.8 werden Möglichkeiten beschrieben, wie diese beiden Mechanismen miteinander gekoppelt werden können, um Interferenzen bei elektrochemischen Messungen zu verringern.

4.3.1 Mechanismus des Ion Gatings

Unter dem Begriff *Ion Gating* verbergen sich zwei unterschiedliche Mechanismen. Um Unklarheiten aus dem Weg zu schaffen, werden beide Mechanismen zunächst einmal kurz erläutert.

Bei dem Ion Gating, welches in biologischen Systemen vorkommt, wird wirklich ein Strom von Ionen gesteuert. Hierbei handelt es sich um die ionenselektiven Poren in den Zellmembranen. Diese Ionenkanäle bestehen aus röhrenförmigen Proteinen, die durch die Zellmembran ragen. Durch eine Veränderung der Konformation der Proteine kann der Fluss der Ionen gesteuert werden. So unterschiedlich wie die Vorgänge, die durch diese Ionenkanäle ausgelöst werden, so unterschiedlich sind auch die Mechanismen, mit denen die Ionenkanäle geöffnet bzw. geschlossen werden können. Die Änderung der Konformation der Proteine kann durch eine Potentialdifferenz an der Zellmembran [17–20], eine mechanische Spannung innerhalb der Zellmembran [21] oder eine Anlagerung von Peptiden an die Porenproteine [22] hervorgerufen werden. Das Prinzip dieser wirklichen *Ionentore* wurde versuchsweise für die Sensorik nachgebildet [23, 24].

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *Ion Gating* wird eigentlich kein Fluss von Ionen gesteuert, sondern vielmehr nur der Austausch von Elektronen zwischen den Ionen mit der Elektrode. Der Wirkmechanismus ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

Obwohl für dieses Detektionsverfahren eigentlich der Begriff des *Electron Gatings* zutreffender wäre, hat sich fälschlicherweise der des *Ion Gatings* ein-

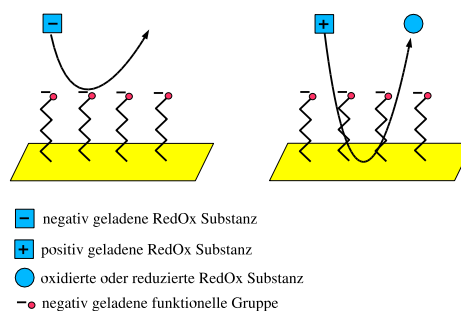


Abbildung 4.8: Mechanismus des Ion Gatings

gebürgert. Exemplarisch wird in diesem Fall eine Elektrode mit einer negativ geladenen Modifikation in Zusammenarbeit mit einer negativ bzw. einer positiv geladenen elektrochemisch aktiven Substanz betrachtet.

Im ersten Fall weisen die Substanz und die Oberfläche der Elektrode die gleiche Ladung auf. Unter diesen Bedingungen wird die Substanz von der Oberfläche abgestoßen und kann daher weder oxidiert noch reduziert werden [25]. Im zweiten Fall weisen die elektrochemisch aktive Substanz und die Oberfläche der Elektrode unterschiedliche Ladungen auf. In diesem Fall kann die Substanz in den SAM auf der Elektrode eindringen [26] und elektrochemisch umgesetzt werden. Ein solches Verhalten wurde u.a. an einer mit *Thyroglobulin* modifizierten Elektrode bei der Verwendung unterschiedlich geladener Markerionen beobachtet. [27] Das *Thyroglobulin* weist unter alkalischen Bedingungen eine negative, unter sauren Bedingungen eine positive Ladung auf. Es wird berichtet, dass unter alkalischen Bedingungen bei negativ geladenen Markerionen, wie dem *Hexacyanoferrat*, kein Strom zu beobachten ist, wohingegen bei positiv geladenen Markerionen, wie dem *Rutheniumhexamin*, eine elektrochemische Reaktion auftritt. Unter sauren Bedingungen wird von einem entgegengesetzten elektrochemischen Verhalten berichtet. Bei einer unbehandelten Elektrode hingegen zeigen beide Markerionen ein vom pH unabhängiges elektrochemisches Verhalten. Dieser Literaturstelle zufolge wird noch ein weiterer Hinweis auf die elektrostatischen Wechselwirkungen zur Kontrolle der Oxidation bzw. der Reduktion gegeben; ein neutrales Markerion zeigt unabhängig von der Oberflächenladung einen gleichbleibenden Stromfluss.

4.3.2 Mechanismus der enzymkatalysierten Sensoren

Bei den Enzymen handelt es sich um biologische Katalysatoren welche innerhalb einer bestimmten Zeit eine größere Zahl von substratspezifischen Reaktionen katalysieren können. Bei elektrochemischen Sensoren können die Enzyme für zwei Detektionsmechanismen eingesetzt werden:

- Marker für z.B. Immunosensoren z.B. ELISA ¹
- quantitative Bestimmung eines Stoffes z.B. Glukosesensoren

Für elektrochemische Sensoren sind Redox-Enzyme von Interesse. Bei dieser Enzymklasse wird die Aktivität der Enzyme auf einem direkten oder indirekten Weg mit der Elektrode gekoppelt. In der Abbildung 4.9 ist der Reaktionsmechanismus einer Oxidase dargestellt.

¹Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Bei einer typischen Reaktion an einem Redox Enzym wird ein Substrat spezifisch oxidiert, wobei das Enzym selber reduziert wird. Um das Enzym selber in einen aktiven Zustand zurückzusetzen, muss es selber oxidiert werden. Zur Oxidation eines Redox-Enzyms gibt es mehrere Möglichkeiten. Einige Enzyme können durch einen direkten Elektronentransfer mit der Elektrode regeneriert werden. Diese Möglichkeit scheidet jedoch für die meisten Enzyme aus, weil sich die redoxaktiven Zentren meist abgeschirmt im Inneren des Proteins befinden. Der Austausch von Elektronen muss in solchen Fällen mit Mediatoren bewerkstelligt werden.

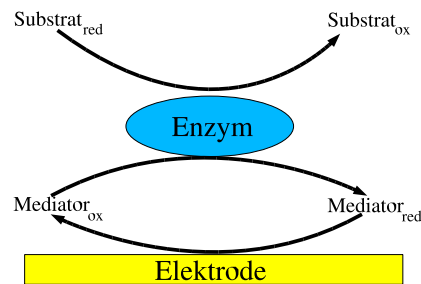


Abbildung 4.9: Reaktionsmechanismus einer Oxidase mit elektrochemischer Kopplung der Reaktion an eine Elektrode

Die Geschwindigkeit, mit der eine enzymatische Reaktion abläuft, kann mit Hilfe der *Michaelis Menten Kinetik* (Gleichung 4.4) beschrieben werden.

$$V = \frac{V_{max} C_s}{K_{ms} + C_s} \quad (4.4)$$

Die wichtigen Kenngrößen dieser Gleichung sind V_{max} und K_m . V_{max} beschreibt die maximale Umsatzrate eines Enzyms. Diese Umsatzrate wird bei einer sehr hohen Substratkonzentration erreicht. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann eine Enzymkinetik durch eine Reaktion nullter Ordnung beschrieben werden. Die *Michaelis Menten Konstante* K_m entspricht der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird.

Für den in Abbildung 4.9 abgebildeten Reaktionsmechanismus ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Substrates und der Konzentration des oxidierten Mediators abhängig. Für diesen Fall wird die *Michaelis Menten Kinetik* zu der in Gleichung 4.5 angegebenen Form erweitert. [28]

$$V = \frac{V_{max}}{\frac{K_{MS}}{C_s} + \frac{K_{MM}}{C_o} + 1} \quad (4.5)$$

Über die Mediatoren ist die enzymatische Aktivität direkt mit der Elektrode gekoppelt. Ein hoher Umsatz am Enzym bedeutet einen hohen Strom.

Bei einer sehr hohen Mediatorkonzentration vereinfacht sich die in Gleichung 4.5 angegebene erweiterte Michaelis Menten Gleichung zu Gleichung 4.4.

Die *Fructosedehydrogenase* katalysiert spezifisch die Oxidation von Fructose zu 5-Keto-D-Fructose, wobei das *Pyrroloquinolin Quinon* als die, für die Fructose wirksame katalytische Gruppe der FDH in Erscheinung tritt (Abbildung 4.10) [29–31].

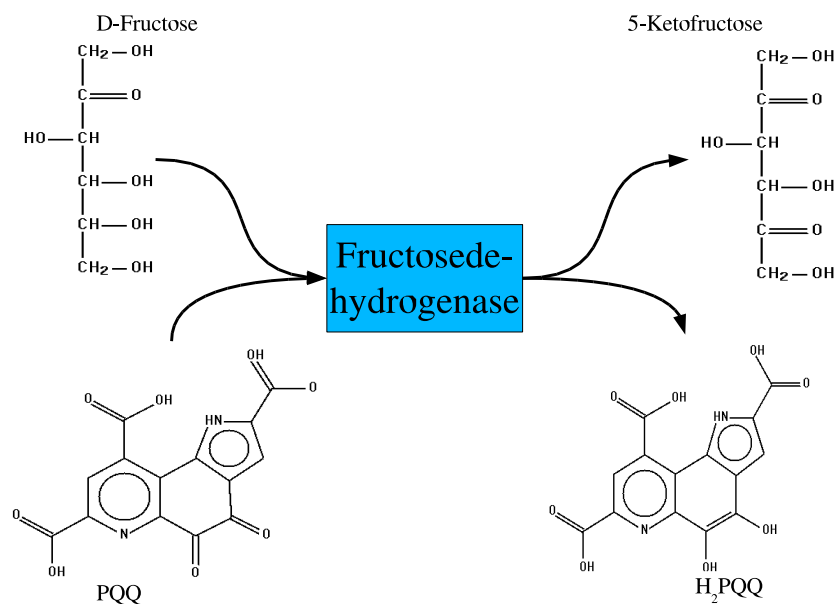


Abbildung 4.10: Umsetzung von D-Fructose durch das Enzym Fructosedehydrogenase

Das H_2PQQ muss zu PQQ oxidiert werden. Der Austausch der hierzu erforderlichen Elektronen kann durch einen direkten Elektronentransfer zwischen der Elektrode und dem Enzym erfolgen. Dieser Elektronentransfer kann auch über einen Mediator erfolgen.

Die FDH erreicht ihre maximale Aktivität bei einem pH von etwa 4.5 [31]. Die mit FDH modifizierten Elektroden können in einer Pufferlösung mit diesem pH Wert auch über längere Zeit von bis zu 30 Tagen gelagert werden [31].

Wie beschrieben, benötigen die Enzyme für die Regeneration zusätzliche Substanzen.

Im einfachsten Fall befindet sich der Mediator frei diffundierend in der Elektrolytlösung. Als Mediatoren für die FDH eignen sich unter anderem *Blutlaugensalz* [30], *Ferrocenylethanol* [29], *Coenzym Q₆*, *Osmiumkomplexe* oder *Benzoquinon* [31]. Prinzipiell ist es zwar auch möglich, die FDH durch

einen direkten Elektronenübergang zwischen der Elektrode und dem Enzym zu regenerieren, dieses erfordert jedoch eine hohe Überspannung und erlaubt nur geringe Stromdichten. [31] Andererseits bedeuten in der Elektrolytlösung befindliche Mediatoren aber einen zusätzlichen Aufwand in der Probenvorbereitung.

Diese Probleme werden bei den sogenannten *reagenzlosen Sensoren* umgangen. Reagenzlos bedeutet, dass der benötigte Mediator auf oder im Sensor selber aufgebracht bzw. immobilisiert ist. Die bekanntesten Vertreter dieser Sensorarten sind die Glukosesensoren, bei denen die benötigten Mediatoren meistens mit in das Elektrodenmaterial eingemischt sind. [32] Diese Methode ist jedoch für die angestrebten Dünnschichtsensoren nicht anwendbar.

In dieser Arbeit wird der Ansatz verfolgt, die Mediatoren, ebenso wie das Enzym auf einen SAM aus Thiolen zu immobilisieren.

Prinzipiell können auch die Thiole selber als Mediatoren eingesetzt werden. Hierzu sind jedoch sehr hohe Potentiale erforderlich, so dass Nebenreaktionen hervorgerufen werden können. Ein weiterer Nachteil ist, dass hierbei der SAM abgelöst wird [33].

4.4 Mikrofluidik

Die Mikrofluidik beschreibt das Fließverhalten von Flüssigkeiten in sehr kleinen Leitungssystemen, den Kapillaren. Dieses Verhalten wird durch die Oberflächenspannungen beeinflusst.

4.4.1 Oberflächenspannungen

Zentrale Größen in der Mikrofluidik sind die Oberflächenspannungen. Das Gleichgewicht von verschiedenen Oberflächenspannungen entscheidet darüber, ob eine Oberfläche hydrophil oder hydrophob ist und somit auch darüber, ob eine Flüssigkeit in eine Kapillare einzieht.

Die Ursache für die Oberflächenspannung sind die Wechselwirkungen der Moleküle innerhalb eines Flüssigkeitstropfen. Die Moleküle im Inneren der Flüssigkeit können in allen Richtungen mit gleichen Molekülen wechselwirken. Die Moleküle an der Oberfläche der Flüssigkeit können dieses nur eingeschränkt, wie aus der Abbildung 4.11 zu erkennen ist. Die Wechselwirkungen an der Oberfläche können nicht mehr in alle Richtungen erfolgen, dafür sind diese in den verbliebenen Richtungen umso stärker ausgeprägt. Die äußere Molekülschicht umgibt die Flüssigkeit wie eine elastische Hülle. Die Wechselwirkungen in dieser Hülle führen zu einem erhöhten Druck in dem Tropfen, zu dem sogenannten *Laplace Druck*

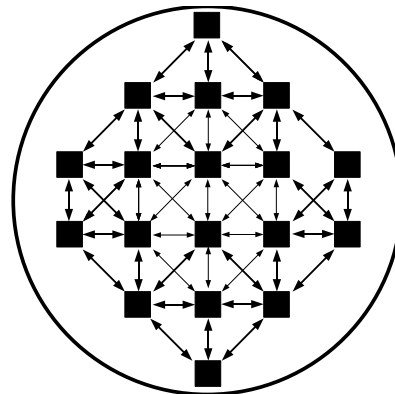


Abbildung 4.11: Intermolekulare Kräfte in einem Flüssigkeitstropfen

Die Oberflächenspannung kommt ins Spiel, wenn eine neue Oberfläche der Flüssigkeit ausgebildet oder vergrößert werden soll. In einem solchen Falle muss gegen den Laplace Druck gearbeitet werden. Die Oberflächenspannung γ ist definiert als die partielle Ableitung der Arbeit W nach der Oberfläche σ und ist in Gleichung 4.6 dargestellt. Hierbei ist es gleichgültig, ob es sich dabei um die Grenzfläche Flüssigkeit-Gas-, Gas-Feststoff- oder Flüssigkeit-Feststoff handelt.

$$\frac{\delta W}{\delta \sigma} = \gamma \quad (4.6)$$

$$[\gamma] = \frac{J}{m^2} = \frac{N}{m}$$

Der optimale Zustand eines Systems ist dann erreicht, wenn die Energie so weit wie möglich verringert ist. Auf die Flüssigkeit bezogen bedeutet dieses, dass die Oberflächenenergie so weit wie möglich verkleinert wird. Wird dabei nur die Flüssigkeit betrachtet, so ist ein Minimum der Energie erreicht, wenn diese die Form einer Kugel annimmt.

4.4.2 Kontaktwinkel

Befindet sich die Flüssigkeit hingegen auf einer Oberfläche, so weicht die Form des Tropfens mehr oder weniger von der Kugelform ab. Welche Form der Tropfen annimmt ist davon abhängig, wie gut die Flüssigkeit die Oberflächen benetzt. Beispiele für eine schlecht und eine gut benetzbare Oberfläche sind in Abbildung 4.12 zu sehen. Die unterschiedlichen Kontaktwinkel sind das Ergebnis des Zusammenspiels von drei Oberflächenspannungen. Im Einzelnen sind dieses:

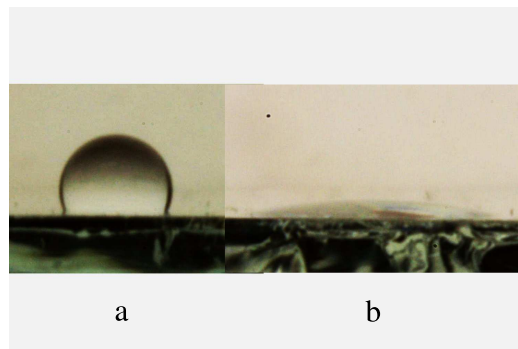


Abbildung 4.12: Unterschiedliche Kontaktwinkel von Wasser auf a) mit Perfluorsilanen modifiziertem Glas 110° , b) frisch gereinigtem Glas 17° . Diese Modifikationen wurden für die in dem Sensorarray verwendet.

- γ_{sg} : Oberflächenspannung Feststoff-Gas
- γ_{lg} : Oberflächenspannung Flüssigkeit-Gas
- γ_{sl} : Oberflächenspannung Feststoff-Flüssigkeit

Die endgültige Form eines Tropfens kommt durch die Minimierung der gesamten Energie der Oberflächen (Gleichung 4.7) zustande. In diesem Zustand kann das Verhältnis der Oberflächenspannungen zueinander durch die *Young-Gleichung* 4.8 (Abbildung 4.13) berechnet werden.

Eine Oberfläche ist hydrophil, wenn der Kontaktwinkel Θ kleiner als 90° ist und hydrophob, wenn er größer als 90° ist.

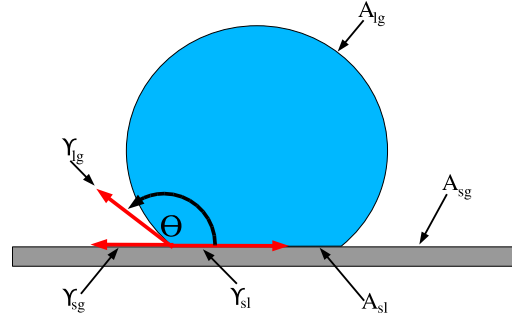


Abbildung 4.13: Gleichgewicht der Oberflächenspannungen γ_{sg} , γ_{sl} sowie γ_{lg} bei der Tropfenbildung auf einer (hydrophoben) Oberfläche

$$E_{ob} = A_{lg} * \gamma_{lg} + A_{sl} * \gamma_{sl} + (A_s - A_{sl}) * \gamma_{sg} \quad (4.7)$$

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} * \cos\Theta \quad (4.8)$$

$$\Theta = \arccos\left(\frac{\gamma_{sg} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lg}}\right)$$

Auf glatten Oberflächen können bei wässrigen Flüssigkeiten Kontaktwinkel von maximal 120° , z.B. auf Teflon realisiert werden [34, 35].

Auch bei dieser hydrophoben Oberfläche wirken Kräfte, die *van-der-Waals Kräfte*, welche die Flüssigkeit auf die Oberfläche ziehen. [36] Noch hydrophobere Oberflächen können nur dadurch erzielt werden, indem die Oberfläche strukturiert wird und somit eine Rauigkeit aufweist. Der Einfluss der Oberflächenstruktur wurde anhand einer, mit Wachs bedeckten Oberfläche nachgewiesen. Der Kontaktwinkel auf der glatten Oberfläche betrug 109° , auf einer strukturierten Oberfläche hingegen 174° [35, 37].

4.4.3 Einziehen von Flüssigkeiten in Kapillaren

Um berechnen zu können, wie hoch eine Flüssigkeit in einer Kapillare steigen kann, muss der durch die gekrümmte Oberfläche der Flüssigkeit hervorgerufene Unterdruck berechnet werden. Bei dem realisierten Sensorarray werden Kapillaren mit einem rechteckigen Querschnitt verwendet. (Abbildung 4.15)

Ausgegangen wird von der Definition der Oberflächenspannung (Gleichung 4.6). Wie sich die Oberfläche der Flüssigkeit verändert, kann für rechteckige Kapillaren nach der Gleichung 4.10 ermittelt werden. Dazu wird die Gleichung 4.9 nach dem Radius abgeleitet, so dass sich Gleichung 4.10 ergibt.

$$\sigma = 2 * \pi * r * l \quad (4.9)$$

$$\frac{\delta\sigma}{\delta r} = 2 * \pi * l \quad (4.10)$$

Die Gleichung 4.10 wird nach σ umgestellt und in die, nach δW umgestellte Gleichung 4.6 eingesetzt, so dass sich die Gleichung 4.11 ergibt. Diese beschreibt die Arbeit zur Vergrößerung der Oberfläche in Abhängigkeit vom Radius.

$$\delta W = 2 * \pi * l * \gamma * \delta r \quad (4.11)$$

Um den durch die Oberflächenspannung hervorgerufenen Druck zu berechnen, muss zunächst einmal die Kraft berechnet werden. Die Kraft kann über den Zusammenhang:

$$\delta W = F * \delta r$$

berechnet werden. Aus der Gleichung 4.11 ergibt sich somit für die Kraft die Gleichung 4.12.

$$F = 2 * \pi * l * \gamma \quad (4.12)$$

Der Druck der in den Kapillaren befindlichen Flüssigkeit kann nach Gleichung 4.13 berechnet werden.

$$F = P * A$$

$$2 * \pi * l * r * p_{innen} = 2 * \pi * l * r * p_{außen} + 2 * \pi * l * \gamma$$

$$p_{innen} = p_{außen} + \frac{\gamma}{r} \quad (4.13)$$

Durch die gekrümmte Oberfläche der Flüssigkeit, dem Meniskus, wird der Druck innerhalb der Flüssigkeitssäule verringert, wenn dieser von der Flüssigkeit abgewendet ist (Abbildung 4.14). Wenn der Meniskus der Flüssigkeit zugewendet ist, wird der Druck in der Kapillare vergrößert.

Steigt eine Flüssigkeit in einer Kapillare auf, so stehen zwei Drücke miteinander in Wechselwirkung (Abbildung 4.14). Zum einen ist es der Unterdruck, der Kapillardruck p_{kap} , welcher durch die gekrümmte Oberfläche der Flüssigkeit hervorgerufen wird. Zum anderen ist es der Druck p_{gew} , der durch die Gewichtskraft der Flüssigkeitssäule hervorgerufen wird.

Die maximale Steighöhe kann berechnet werden, indem Gleichung 4.14 zu Gleichung 4.15 umgestellt wird. Bei der Steighöhe ist zu beachten, dass es sich um die Höhe parallel zu dem Schwerfeld handelt.

$$\rho * g * h = \frac{\gamma}{r} \quad (4.14)$$

$$h = \frac{\gamma}{g * \rho * r} \quad (4.15)$$

Wenn die Flüssigkeit die Wand der Kapillare vollständig benetzt, entspricht der in den oben genannten Gleichungen erforderliche Radius dem des Meniskus der Kapillaren. Bei den hier betrachteten rechteckigen Kapillaren ist dann der halbe Plattenabstand einzusetzen. Wenn die Oberflächen der Kapillaren nicht vollständig benetzt werden, müssen die in den Gleichungen 4.13, 4.14 bzw. 4.15 einzusetzenden Radien durch die Gleichung 4.16 ersetzt werden. Die Steighöhe für nicht vollständig benetzbare Kapillaren kann nach Gleichung 4.17 berechnet werden.

$$r = \frac{d}{2 * \cos\Theta} \quad (4.16)$$

$$h = \frac{2 * \gamma * \cos\Theta}{g * \rho * d} \quad (4.17)$$

Ein zur Flüssigkeit hin gekrümmter Meniskus vergrößert den Druck in der Flüssigkeitssäule und drückt diese aus der Kapillare hinaus. Mit Hilfe

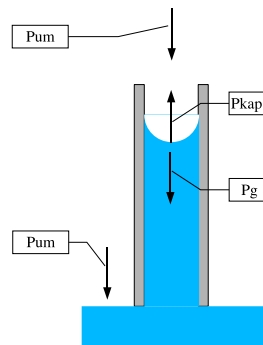


Abbildung 4.14: Gleichgewicht der Drücke beim Einziehen einer Flüssigkeit in eine Kapillare

der Gleichung 4.15 kann jetzt nicht die maximale Steighöhe in der Kapillare berechnet werden, sondern wie weit die Kapillare in eine Flüssigkeit eingetaucht werden kann, bevor diese in ihr eindringt.

4.4.4 Mikrofluides System in der Sensormatrix

Das in der Sensormatrix verwendete mikrofluides System wurde in Anlehnung an die in [38] und [39] beschriebenen Systemen aufgebaut. Die Glasplatten, auf denen sich die gesputterten Goldelektroden bzw. die auf ITO synthetisierten Preußisch Blau Elektroden befinden, werden gemäß dem in Abbildung 4.15 skizzierten Aufbau in hydrophile bzw. hydrophobe Bereiche strukturiert und zusammengesetzt. Bei der Platte der Gegenelektrode besteht der hydrophile Bereich aus der Preußisch Blau Gegen- und Referenzelektrode.

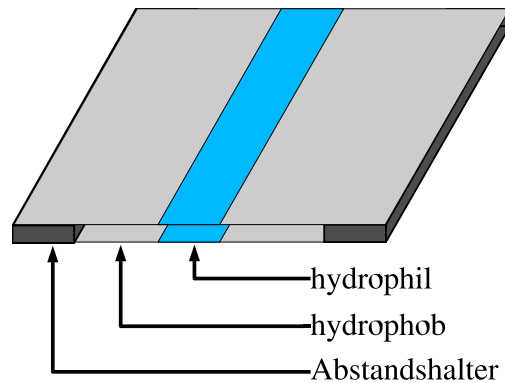


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des mikrofluiden *Sip In* Systems

Wie zu erkennen ist, basiert die vorgesehene Mikrofluidik aus den strukturierten Platten, die deckungsgleich mit Hilfe von Abstandhaltern übereinander gelegt werden. Die Flüssigkeit zieht entlang der hydrophilen Streifen, parallel zu den Gegenelektroden in die Kapillare ein. Ein Eindringen der Flüssigkeit in die hydrophoben Bereiche findet nicht statt, zumindest solange nicht, wie der Druck der Flüssigkeit kleiner als der Kapillardruck ist.

Angaben zu den maximalen theoretischen Leistungen des Systems werden im Kapitel 5.1.2 gemacht.

Bei der Seitenansicht auf die durch die hydrophilen Oberflächen gebildeten Kapillaren (Abbildung 4.16 a) ist zu erkennen, dass auf beiden Seiten die Flüssigkeit in die Kapillare gezogen wird. Durch die Zugkräfte bedingt, wird der Druck in der Flüssigkeit verringert. Der in der Frontansicht dargestellte Meniskus drückt die Flüssigkeit aus den hydrophoben Bereichen heraus. Wird durch einen zu hohen Druck in der Flüssigkeit der maximale Kontaktwinkel überschritten, bricht die Flüssigkeit in die hydrophob strukturierten Bereiche ein. Die Kombination aus den Zugkräften in Verbindung mit den hydrophoben Teilen der Kapillare verhindert effektiv ein Ausbrechen der Flüssigkeit aus den Kapillaren.

Für den Fall, dass die Kapillaren nicht vollständig mit Wasser gefüllt sind, ergeben sich die, in Abbildung 4.16 dargestellten Druckgleichgewichte. Die erwähnten Zugkräfte bewirken auch, dass die Flüssigkeit in die Kapillaren einzieht. Was bisher etwas außer Acht gelassen wurde, ist die folgende Frage: Wie schmal können die hydrophilen Streifen bei einem vorgegebenen Abstand der strukturierten Platten gefertigt werden? Der in der Abbildung 4.16 dargestellte Meniskus der Flüssigkeit zwischen den hydrophilen und hydrophoben Bereichen wird auch als *virtuelle Wand* bezeichnet. Diese Wand wird nur durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, also durch die Grenzfläche Flüssigkeit-Luft hergestellt. Nun wirkt diese *virtuelle Wand* nicht nur an den Seiten der vorhergesehenen Kapillare, sondern eben auch an der fortschreitenden Flüssigkeitsfront. Entlang der hydrophilen Glasstreifen wird die Flüssigkeit in die Kapillaren hineingezogen, die seitlichen *virtuellen Wände* drücken die Flüssigkeit aus der Kapillare hinaus. [39] Durch dieses Zusammenspiel der beiden Drücke schreitet die Flüssigkeit in der Mitte der Kapillare schneller voran, als dieses an den Seiten der Fall ist. Diese Situation ist in der Abbildung 4.16 dargestellt. Ausgedrückt wird dieses Druckgleichgewicht über die Radien r_1 für die *virtuelle Wand* und r_2 für die Kapillarkräfte. Die Drücke, die die jeweiligen Oberflächen hervorrufen können, ergeben sich nach der Gleichung 4.13.

Der Druck, der die Flüssigkeit in die Kapillare zieht, muss größer sein als der Druck der *virtuellen Wand*. Hieraus ergibt sich die Forderung (Gleichung 4.13), dass $|r_1| > |r_2|$ sein muss. Der Radius r_2 wird durch den Kontaktwinkel von der Flüssigkeit auf der hydrophilen Bahn bestimmt, wohingegen der Radius der virtuellen Wand, r_1 , von der Breite der hydrophilen Bahn vorgegeben wird. Falls die hydrophilen Bereiche einen Kontaktwinkel von 0° aufweisen, muss die Breite der Kapillaren mindestens dem Abstand der strukturierten Platten entsprechen. Für alle anderen Fälle kann die Mindestbreite der hydrophilen Bahn nach der Gleichung 4.18 [39] berechnet werden.

$$\text{Mindestbreite} = \frac{\text{Abstand}}{\cos(\Theta)} \quad (4.18)$$

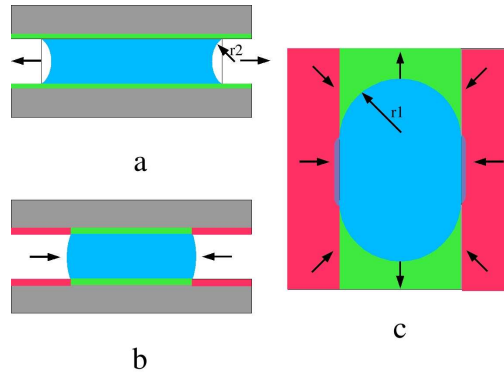


Abbildung 4.16: Kräftegleichgewicht in einer Kapillare des Matrixarrays a) Seitenansicht, b) Frontansicht und c) Draufsicht; rot : hydrophob; grün : hydrophil; r_1 : Radius der virtuellen Wand; r_2 : Radius der hydrophilen Front

4.5 Oberflächenmodifikation

4.5.1 Behandlung der Oberfläche des Glases mit Chlorsilanen

Für die Hydrophobisierung von Glasoberflächen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Alle Methoden resultieren in einer, meist aus Kohlenwasserstoffen bestehenden Oberflächenbeschichtung.

Als gängige Methoden zur Hydrophobisierung von Gläsern werden die im Plasma durchgeführte Synthese von Polymeren [34, 38, 40] und die Verankerung einer Monoschicht aus Chlor- oder Alkoxysilanen auf dem Glas erwähnt. [37, 41–46]

Die Synthese der hydrophoben Polymere erfolgt entweder für z.B. *Hexafluorpropen* in einem Niederdruckplasma [38] oder für z.B. einem Silikonöl in einem bei Atmosphärendruck erzeugten Plasma. [34] Auch wenn mit diesen Methoden zum Teil extrem hydrophobe Oberflächen hergestellt werden können, so erschien dieses Verfahren auf Grund des großen apparativen Aufwands ungeeignet. Dennoch werden die entsprechenden Literaturwerte im weiteren Verlauf als Referenzwerte für die Diskussion der Ergebnisse herangezogen. Wesentlich einfacher als die oben genannten Methoden zur Hydrophobisierung ist die Ausbildung von Monoschichten aus Silanen mit aliphatischen bzw. fluorierten Seitenketten. Erstrebenswert für eine effektive Modifizierung ist die Ausbildung einer dicht gepackten Monoschicht aus den entsprechenden Silanen. Der grundlegende Reaktionsmechanismus der Anlagerung der Silane auf der Oberfläche, ist in Abbildung 4.17 dargestellt.

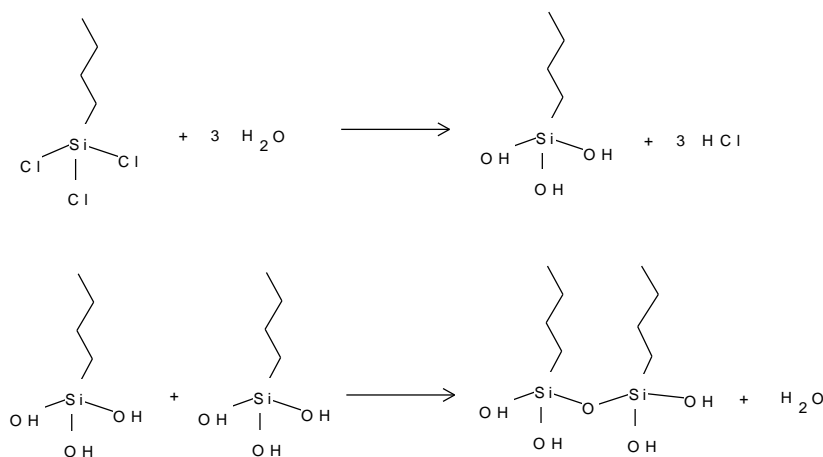


Abbildung 4.17: Reaktionsmechanismus von Chlorsilanen; 1. Hydrolyse der Chlorsilane zu Hydroxysilanen. 2. Kondensationsreaktionen der Hydroxysilane

Die Silane werden in Form von Chlorsilanen eingesetzt. Die Chlorsilane selber können weder eine Reaktion mit den auf der Oberfläche des Glases befindlichen Hydroxygruppen eingehen, noch mit weiteren Chlorsilanen polymerisieren. [47] Der erste Reaktionsschritt bei der Silanisierung ist die Umsetzung der Chlorsilane mit Wasser. [47–49] Diese Hydroxygruppen an den Silanen sind zwingend notwendig, damit diese über Kondensationsreaktionen mit den auf der Glasoberfläche vorhandenen Hydroxygruppen an die Glasoberfläche gebunden werden können. [50] Diese Reaktion läuft in der Regel innerhalb von einer Stunde ab. [46]

Neben den Kondensationsreaktionen der Silane mit der Oberfläche des Glases sind als Nebenreaktionen auch Kondensationsreaktionen der hydrolysierten Silane untereinander möglich. Bei einer großen Wasserkonzentration im Lösungsmittel können sich bereits vor der Anlagerung an die Oberfläche große Cluster aus Silanen bilden. Diese können bereits, nur durch die physikalischen Wechselwirkungen bedingt, an die Glasoberfläche anhaften. [50] Wie sich aus diesen beiden extremen Fällen erahnen lässt, ist die Modifikation von Gläsern extrem von der, auf der Oberfläche sowie im Lösungsmittel vorkommenden Feuchtigkeit abhängig. Um eine möglichst gute Monoschicht der Silane auf der Oberfläche zu erhalten, sollte sich Feuchtigkeit nur auf der Oberfläche des Werkstücks befinden. Trotz einer ortsnahen *Aktivierung* der Silanmoleküle ist es jedoch keinesfalls gewährleistet, dass diese ausschließlich an die Oberfläche des Glases binden. Bei den Monoschichten aus Silanen auf Glasoberflächen zeigte sich, dass diese glatter als die jeweiligen Substrate sind. Dieses wurde dahingehend gedeutet, dass die Silane eine wohlgeordnete Schicht bilden, die über der Oberfläche des Glases schwebt und nur mit etwa jedem fünften Silanmolekül kovalent mit dem Glas verankert ist. [49] Die Schicht, die durch die Anlagerung der ersten Silanmoleküle gebildet wird, weist noch einen recht ungeordneten Zustand auf. Ein geordneter Zustand ergibt sich erst, wenn im Zuge einer höheren Packungsdichte auch die Seitenketten in eine feste Struktur gezwungen werden [51].

Mit einer guten Monoschicht aus *Perfluordecyltrichlorsilan* auf einer glatten Oberfläche sind Kontaktwinkel von Wasser von 115° zu erzielen. Es ist allerdings festzuhalten, dass die Ausbildung von SAMs aus Silanen auf Glasoberflächen von wesentlich mehr Faktoren abhängig, als die der Thiole auf Gold. Die ist somit schwieriger zu kontrollieren [39, 48], als die Ausbildung eines SAMs aus Alkanthiolen. So gesehen ist es besser, im Falle von den Silanen von einer dünnen Schicht als von einer wohl geordneten Monoschicht zu sprechen.

4.5.2 Behandlung der Oberfläche des Goldes mit Alkanthiolen

Bei den, aus Thiolen auf Goldoberflächen gebildeten SAMs treten die kovalenten Bindung zwischen den Schwefel- und den Goldatomen, sowie die *Van der Waals Wechselwirkungen* zwischen den Seitenketten der Thiole in Erscheinung.

Die kovalenten Bindungen verankern die Thiole, so dass in wässrigen Medien keine Desorption der Thiole auftritt. [52]

Der Vorteil vieler SAMs, die Dichtestpackung der Moleküle und eine vollständige Abdeckung des Substrates wird durch die *Van der Waals Wechselwirkungen* hervorgerufen. Diese treten umso deutlicher in Erscheinung, je länger die Seitenketten sind. So ist bei einem SAM aus z.B. Thiolen mit einer C5 Seitenkette zwar eine hohe Packungsdichte zu verzeichnen, die Ordnung innerhalb des SAMs ist aber bei weitem nicht so ausgeprägt, wie dieses bei Thiolen mit mehr als 10 Kohlenstoffatomen der Fall ist. Die von diesen Thiolen gebildeten SAMs weisen Kristallstrukturen auf. [52] Ein ähnlicher Effekt ist bei den SAMs aus unsymmetrischen Disulfiden zu beobachten. Auch diese SAMs weisen eine geringere Ordnung auf, als die, die aus homogenen, langkettigen Thiolen gebildet werden.

Eine hohe Packungsdichte von Thiolen auf Goldoberflächen kann bereits ab einer Kontaktzeit mit der Thiollösung von 5 Minuten erreicht werden. Diese Schichten weisen jedoch in der Regel keine Fernordnung auf. Die Ausbildung der Fernordnung kann mitunter mehrere Tage in Anspruch nehmen.

4.5.3 Enzymkatalysierte Sensoren

Bei enzymkatalysierten Sensoren werden die Enzyme und Mediatoren häufig in eine Kohlenstoffpaste eingebunden. Zu Beginn der Messung muss der Elektrolyt in diese poröse Paste eindringen und die zur elektrochemischen Reaktion erforderlichen Substanzen herauslösen. Die Reproduzierbarkeit der Messungen ist sehr stark von der Kohlenstoffelektrode abhängig. Hinzu kommt noch, dass ein solcher Aufbau für die angestrebte Mikrofluidik der Sensoren nur wenig geeignet ist.

Das Problem einer nicht genau bekannten dreidimensionalen Struktur kann für den Fall von membrangebundenen Enzymen, wie z.B. der *Fructosedehydrogenase* [29, 53, 54], *D-Glukonat Dehydrogenase* [29], *Cytochrom c Oxidase* [55–57], *Meerrettich Peroxidase* [58] und *L-Laktat Dehydrogenase* [29] umgangen werden, indem diese Enzyme in einer Monoschicht auf der Oberfläche der Arbeitselektrode angeordnet werden. Die Anlagerung von

Glukoseoxidase an hydrophoben SAMs ist zwar ebenfalls möglich, jedoch weisen diese Modifikationen keine Langzeitstabilität auf. [26]

Für die Herstellung der Monoschicht aus Enzymen auf den Elektroden werden zwei Strategien verfolgt. Die Enzyme können direkt in oder auf einem SAM von Thiolen mit aliphatischen oder polaren Gruppen adsorbiert [29,53] oder teilweise kovalent gebunden werden [58]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Enzyme mitsamt den erforderlichen Co-Faktoren bzw. Mediatoren in einer Lipidschicht, welche wiederum mit Hilfe eines SAMs mit aliphatischen Gruppen [54–56,59] auf der Elektrode gehalten wird, eingebunden werden. Diese Methode bietet neben der Immobilisierung der Enzyme in einem SAM auch den Vorteil, dass die Enzyme sich in einer, den natürlichen Membranen nachempfundenen, *Lipidschicht* befinden. Hierdurch wird die Langzeitstabilität der Enzyme gewährleistet und deren Aktivität gesteigert [60,61]. Bei einer direkten, membrangebundenen Immobilisierung der Enzyme auf z.B. einer Goldelektrode fehlen stabilisierende Wechselwirkungen, so dass ein schneller Verlust der Aktivität der Enzyme zu verzeichnen ist. [58]

Neben der Immobilisierung der Enzyme bzw. von Lipidschichten können mit Hilfe von maßgeschneiderten SAMs auch Interferenzen, die bei Sensoranwendungen in realen Lösungen vorkommen, umgangen werden. Ein solches Problem tritt z.B. bei Sensoren zur Bestimmung von Fructose in Fruchtsäften auf. Einige Bestandteile der Fruchtsäfte, wie z.B. *Vitamin C* können ebenfalls direkt an der Elektrode umgesetzt werden und führen somit zu falschen Messergebnissen. [30] Abhilfe kann in diesem Fall durch die Implementierung von geladenen funktionellen Gruppen in den SAM geschaffen werden, die nach dem Prinzip des *Ion Gatings* (Abschnitt 4.3.1) die negativ geladenen, elektrochemisch aktiven Substanzen von der Elektrode abhalten. [54] Die Behandlung der Oberflächen von Goldelektroden mit SAMs kann auch einen direkten Einfluss auf die Elektrochemie von Substraten selber haben. So wurde berichtet, dass Dopamin an blanken Goldelektroden ein recht irreversibles elektrochemisches Verhalten aufweist, wohingegen an einer, mit einem SAM aus *3-Amino-5-mercapto-1,2,4-triazol* versehenen Goldelektrode Reaktionen reversibel ablaufen. [62]

In der Abbildung 4.18 sind die beiden oben erwähnten Methoden zur Immobilisierung der Enzyme dargestellt. Die Enzyme werden über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem SAM auf der Elektrodenoberfläche gebunden, wodurch auch eine geordnete räumliche Ausrichtung der Proteine erfolgt [58]. Der ideale Aufbau der SAM ist stark von dem zu verankernden Enzym abhängig. Teilweise sind hierzu weniger dichte, lückenhafte SAMs besser geeignet. Dies ist z.B. bei Enzymen bzw. Proteinen wie z.B. dem Serum Albumin der Fall. Diese dringen teilweise in den SAM ein um optimale hydrophobe Wechselwirkungen aufbauen zu können [53].

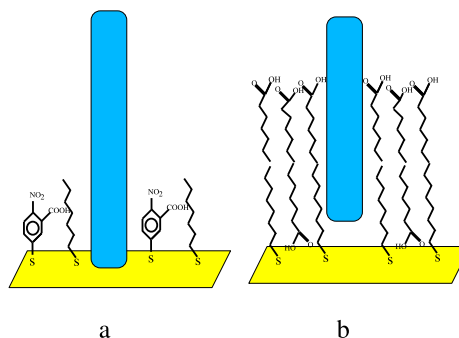


Abbildung 4.18: Immobilisierung der membrangebundenen Enzyme auf einer Gold-Elektrode. a) direkte Immobilisierung in einem SAM b) Immobilisierung in einer, auf einem SAM aufgetragenen Lipidschicht

4.5.4 Synthese von Preußisch Blau auf Elektroden

Das *Preußisch Blau* wurde in dieser Arbeit als Gegen- und Referenzelektrode verwendet. Bei dem *Preußisch Blau* handelt es sich um ein $Fe^{II/III}$ – *Koordinationspolymer*, welches ein kubisch flächenzentriertes Kristallgitter mit einer Kantenlänge der Raumzelle von $10,2\text{\AA}$ aufweist. [63] Bei diesem Kristallgitter sind die Fe^{III} Ionen oktaedrisch von den Stickstoffatomen und die Fe^{II} Ionen oktaedrisch von Kohlenstoffatomen der Brückenliganden umgeben.

Das *Preußisch Blau* kann elektrochemisch oxidiert bzw. reduziert werden. Die Oxidationsstufen des Preußisch Blaus sind in der folgenden Tabelle angegeben, wobei die für den weiteren Verlauf dieser Arbeit wichtigen Oxidationsstufen, das *Preußisch Blau* sowie das *Preußisch Weiß* markiert sind. In dünnen Schichten ist das *Preußisch Weiß* transparent.

Trivialname	Formel
Preußisch Braun	$[Fe^{III}Fe^{III}(CN)_6]$
Preußisch Grün	$[Fe_3^{III}\{Fe^{III}(CN)_6\}_2\{Fe^{II}(CN)_6\}]^-$
Preußisch Blau	$[Fe^{III}Fe^{II}(CN)_6]^-$
Preußisch Weiß	$[Fe^{II}Fe^{II}(CN)_6]^{2-}$

[64]

Für den Ladungsausgleich bei der Oxidation bzw. der Reduktion von *Preußisch Blau* werden in der Regel Kaliumionen in das Kristallgitter eingebaut bzw. ausgestoßen. [64] Neben den Kaliumionen sind auch Ammonium-, Caesium- sowie Rubidiumionen geeignet, alle weiteren Ionen können nicht in das Kristallgitter ein- und ausgelagert werden. [63] Bei einer geeigneten Methode zur Synthese des *Preußisch Blaus* ist dieses in neutralen bis sauren wässrigen Medien sehr stabil. Neben Anwendungen in der Elektrochromie [64, 65] wurde es unter anderem zur elektrochemischen Katalyse bei der Detektion von Wasserstoffperoxid als Ersatz für teure Platinkatalysatoren eingesetzt [63, 66]. Diese Eigenschaften können bei Biosensoren verwendet werden, die mit Reduktasen, wie z.B. der *Glukoseoxidase* arbeiten. Bei diesen Enzymen kann H_2O_2 als Nebenprodukt anfallen.

Um für den Einsatz als kombinierte Gegen- und Referenzelektrode geeignet zu sein, muss das *Preußisch Blau* in einer ausreichend dicken Schicht, welche über eine hohe Porosität verfügen muss, abgeschieden werden.

Die elektrochemische Synthese des *Preußisch Blaus* beruht darauf, dass in einer Lösung aus Fe^{3+} Salzen und Hexacyanoferrat(III) das Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert wird, welches sich mit dem Hexacyanoferrat(III) zu dem *Preußisch Blau* Komplex zusammenlagert.

Weitere Angaben zu den idealen Syntheseparametern sind im Abschnitt 8.3.1 angegeben.

4.5.5 Synthese von Polypyrrol auf Elektroden

Das Polypyrrol wurde als eine alternative Substanz zur Herstellung der kombinierten Gegen- und Referenzelektroden untersucht. Das Polypyrrol ist, wegen seiner elektrischen Eigenschaften und wegen seiner Anionenselektivität, ein breit einsetzbares Polymer. Auf Grund seiner elektrischen Leitfähigkeit wurde das Polypyrrol u.a. als Ladungsvermittler zwischen der ionenselektiven Membran und der Elektrode bei potentiometrischen Sensoren verwendet. [67] Die elektrische Leitfähigkeit des Polypyrrols wird durch die π -Elektronen hervorgerufen. Damit sich die Elektronen frei in dem Valenzband bewegen können, muss das Polypyrrol zuvor dotiert werden (Abbildung 4.19). Dazu wird es in Gegenwart von Anionen oxidiert.

Ein weiteres Anwendungsgebiet des Polypyrrols ist der amperometrische, enzymkatalysierte Sensor, bei dem das Enzym mit in das Polypyrrol eingeschlossen wird [9]. Dieses ermöglicht einen extrem kurzen Diffusionsweg für den zum Elektronentransfer notwendigen Mediator. [68] Neben der elektrischen Leitfähigkeit wird auch die *Siebwirkung* des Polypyrrols in der Elektrochemie, z.B. als *Anti Fouling* Überzug für Quecksilberelektroden verwendet. [69] Hierbei handelt es sich um ein stark überoxidiertes Polypyrrol, welches keine Leitfähigkeit mehr besitzt und wie ein Sieb für die Ionen wirkt [70, 71].

Die für diese Arbeit interessanteste Anwendung des Polypyrrols ist der Aufbau einer Pseudoreferenzelektrode, bei der das Polypyrrol in Gegenwart von Hexacyanoferraten polymerisiert wird. [68] Hierbei wird das Blutlaugensalz in das Polymer eingeschlossen. Die Lage des Referenzpotentials wird durch die Anteile des roten und gelben Blutlaugensalzes im Polymer bestimmt.

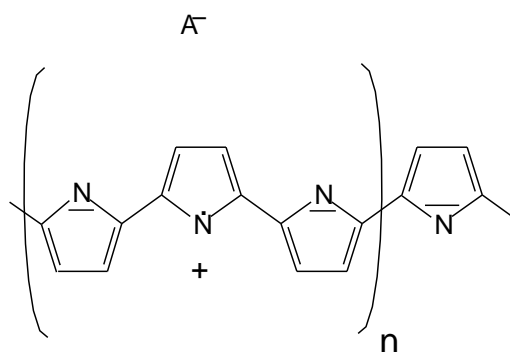


Abbildung 4.19: Grundgerüst des Polypyrrols im dotierten, leitfähigen Zustand

4.5.6 Strukturieren der Oberfläche

Für die Strukturierung von Monoschichten bzw. extrem dünnen Schichten wurden in dieser Arbeit folgende Verfahren verwendet:

- Photolithographie in Kombination mit
 - Ätzen
 - Lift-Off
- Mikrokontaktdruck
- Mikrogefäße

Photolithographie und Ätzen

Der auf das Werkstück aufgetragene Fotolack wird strukturiert, indem er durch eine Maske belichtet und anschließend entwickelt wird. In Abhängigkeit davon, ob es sich dabei um einen positiv oder einen negativ Resist handelt, werden beim Entwickeln die belichteten bzw. die unbelichteten Stellen aus der Lackschicht herausgelöst. In der Abbildung 4.20 ist der schematische Ablauf eines photolithographischen Ätzverfahrens mit einem positiv Ätzresist dargestellt. Die nicht durch einen Resist geschützten Bereiche werden geätzt.

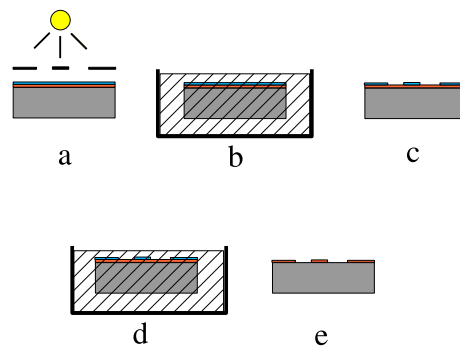


Abbildung 4.20: Mechanismus des strukturierten Ätzens. a) Belichten des mit Ätzresist beschichteten Werkstücks durch eine Maske; b) Entwickeln des Ätzresists; c) Strukturierter Ätzresist auf dem Werkstück; d) Ätzen der ungeschützten Stellen des Werkstücks e) Fertig strukturiertes Werkstück

Photolithographie und Lift-Off Verfahren

Das Lift Off Verfahren ist insofern mit dem des strukturierten Ätzens identisch, als dass die Strukturierung des Fotolacks bzw. des Ätz-resists über die Strukturierung des Werkstücks entscheidet. Bei dem Lift Off Verfahren wird auf eine, mit einem Fotolack strukturierte Oberfläche die gewünschte Substanz aufgetragen. Dieses kann, wie z.B. bei den Silanen, durch eine Reaktion in einer Flüssigkeit, oder bei dem Sputtern von Metallen in einem rein physikalischen Prozess geschehen. Nach der Modifikation wird der Fotolack abgelöst, so dass die nicht modifizierten Stellen zum Vorschein kommen.

Das Lift-Off Verfahren ist schematisch in Abbildung 4.21 dargestellt. Dieses Verfahren wurde u.a. zur strukturierten, hydrophoben Modifikation von Oberflächen mit Polymeren [40] oder Silanen [41, 42] verwendet.

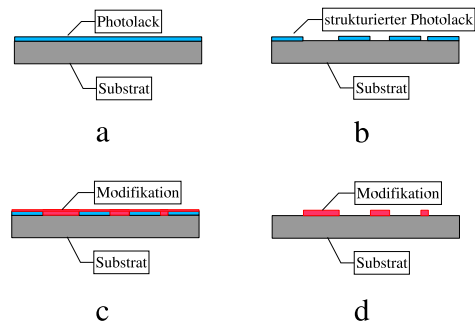


Abbildung 4.21: Mechanismus des Lift-Off Verfahrens: a) Bedecken des Substrates mit Fotolack; b) Strukturieren des Fotolacks; c) Aufbringen der Modifikation; d) Ablösen des Fotolacks

Mikrokontaktdruck

Der **Mikro-Kontaktdruck**, auch als **soft lithography** bezeichnet, ist eine vergleichsweise neue Methode zur Modifikation von Oberflächen. Der Mikrokontaktdruck wurde um 1993 von der Arbeitsgruppe Whitesides eingeführt. [72] Das Prinzip des Mikrokontaktdruckes erinnert stark an das in der Drucktechnik verwendete Hochdruckverfahren, welches in der Abbildung 4.22 dargestellt ist.

Bei dem Hochdruckverfahren wird nur an der Stelle, an der die Erhebungen im Stempel vorhanden sind, die Druckerschwärze auf das Papier, bzw. das zu bedruckende Substrat gebracht.

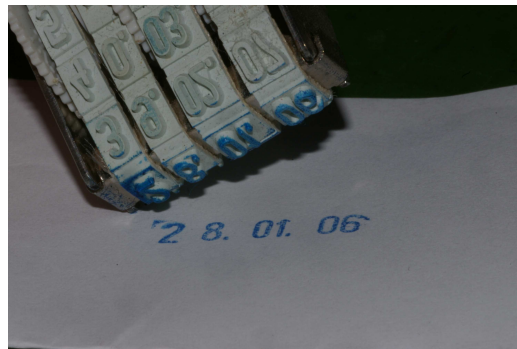


Abbildung 4.22: Mechanismus des Hochdruckverfahrens

Der Mikrokontaktdruck erfolgt nach dem gleichen Prinzip, wenn auch die Anwendungen weniger in der Herstellung von großformatigen Druckerzeugnissen, sondern vielmehr in der Strukturierung im μm Bereich liegt. Der μ -Kontaktdruck wird u.a. in folgenden Bereichen eingesetzt:

- Strukturierung von Thiolen auf Gold [73–75]
- Aufbringen von tierischen Zellen auf SAMs aus Alkanthiolen [76, 77]
- Aufbringen von Ätzresisten auf Gold und Silizium aus Alkanthiolen [78, 79]
- Hydrophile- bzw. hydrophobe Strukturierung von Gold durch Thiole. [78, 80, 81]
- Drucken von Elektrodenarrays durch gezielte Isolation von Goldelektroden. [16]
- Anbringen von Pyrrol-Thiolen als Ankergruppe für die Polypyrrol Synthese. [82]
- Aufbringen von Proteinen auf ITO ² [83]
- Aufbringen von Poly-L-Lysin-g-polyethylenglycol auf Titanoxid [84]
- Drucken von Proteinen auf Silikaten. [85–91]
- Entfernen von Proteinen oder Zellen aus geschlossenen Oberflächen. [92]

²Indium Zinn Oxid

Als Material für die Herstellung der Stempel wird ein elastischer Kunststoff, in der Regel PDMS verwendet. Es gibt zwei unterschiedliche Methoden, mit denen die zu druckenden Substanzen auf die Stempel aufgebracht werden können. In Abbildung 4.23 ist das in dieser Arbeit verwendete Verfahren des *Wet Inking* dargestellt. Hierbei werden die Stempel mit der *Tinte*, welche eine Lösung aus den zu druckenden Substanzen ist, bedeckt (Punkt **a** in Abbildung 4.23). Nach einer gewissen Zeit wird die überstehende Lösung von dem Stempel abgeschüttet und der Stempel getrocknet. Nach diesem Schritt bleibt eine Schicht der zu druckenden Substanzen auf dem Stempel zurück (**b**). Dieser Stempel wird nun auf das Substrat aufgelegt, wobei in der Regel das Eigengewicht des Stempels für einen ausreichenden Andruck reicht (**c**). Nach dem Entfernen des Stempels bleiben die gedruckten Substanzen auf dem Substrat zurück (**d**).

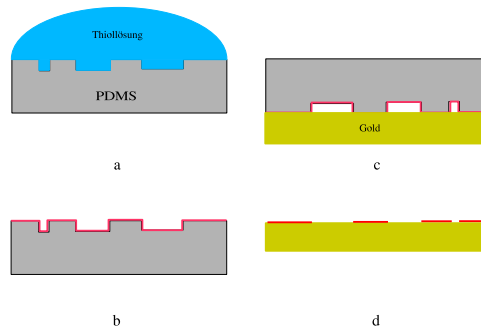


Abbildung 4.23: Mechanismus des Mikrokontaktdrucks (Wet Inking); a) Benetzen des Stempels mit der *Tinte* (Thiollösung); b) Trocknen des Stempels, Thiole bleiben auf der Oberfläche zurück; c) Der trockene Stempel wird auf das Substrat (Gold) gelegt; d) Thiole bleiben auf dem Gold zurück

- *Wet Inking:* Beim *Wet Inking* wird der Stempel eine gewisse Zeit in eine Lösung der zu druckenden Substanz eingetaucht oder mit dieser bedeckt. Nach dieser Zeit wird die Lösung von dem Stempel abgeschüttet und der Stempel gut getrocknet.
- *Contact Inking:* Beim *Contact Inking* wird der Stempel auf ein mit der zu druckenden Substanz getränktes Stempelkissen gedrückt. Dieses Stempelkissen besteht auch aus PDMS. Während der Kontaktzeit werden im ausreichenden Maße Substanzen von dem Stempelkissen auf den Stempel übertragen. [93]

Die Auflösung, welche mit dem Mikro Kontaktdruck erzielt werden kann, ist nur von dem verwendeten Stempel abhängig und kann bis in den oberen Nanometer-Bereich gehen [94]. Beim Drucken von sehr feinen Strukturen ist zu beachten, dass die aufliegenden Stellen des Stempels durch plastische Verformungen des PDMS größer ausfallen können, so dass für den Druck von extrem feinen Strukturen die Stempel aus härteren Kunststoffen, wie z.B. Polystyrol [94] verwendet werden.

Auch wenn die Übertragung der Substanzen vom Stempel auf das Substrat in einer trockenen Umgebung abläuft, kann die Ausbildung eines SAMs auf dem Substrat mitunter schneller ablaufen, als dieses bei einem Eintauchen des Substrates in einer entsprechenden Lösung der Fall wäre. [93] Der Mikrokontaktdruck von Thiolen auf Gold kommt nach übereinstimmenden Angaben in verschiedenen Literaturstellen sowohl für die Inkubation der Stempel in den Thiollösungen, als auch für das Stempeln selber mit relativ kurzen Zeiten aus. So betragen nach Literaturangaben die Zeiten für die Inkubation der Stempel weniger als eine Minute und die Kontaktzeit des Stempels auf dem Gold weniger als 30 Sekunden [74, 77, 79, 81, 94].

Kapitel 5

Auswertung und Diskussion

5.1 Modifikation des Glases und mikrofluidische Systeme

Um die in Kapitel 4.1 aufgeführten Anforderungen an die Fluidik in der Sensorzelle zu erfüllen, wurden zwei Lösungsansätze verfolgt. Zum einen handelt es sich dabei um eine mechanische Unterteilung des Elektrolyten, zum anderen um das in Abbildung 5.1 skizzierte und in Kapitel 4.4.4 beschriebene *Sip In* System.

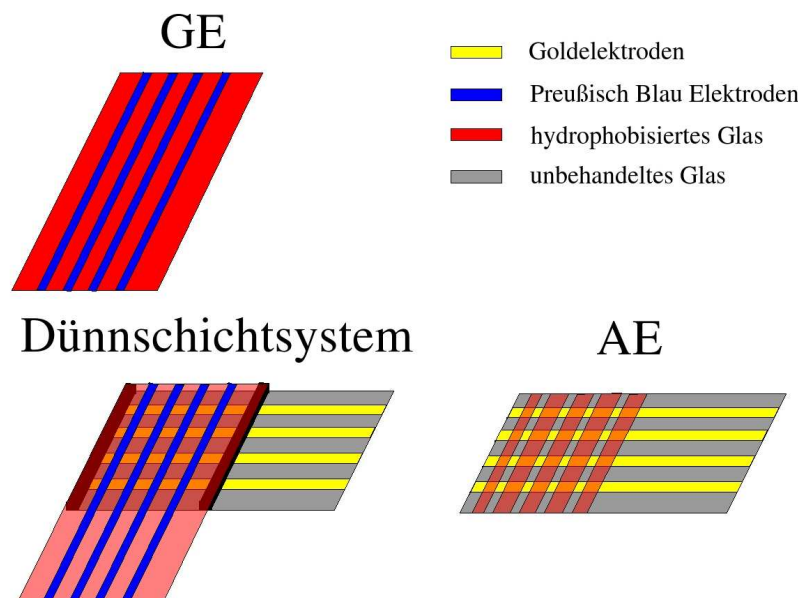


Abbildung 5.1: Aufbau des Matrixarrays mit einem mikrofluidischen System

Während bei der mechanischen Unterteilung des Elektrolyten auf eine Strukturierung der Elektrodenplatten in hydrophile und hydrophobe Bereiche verzichtet werden kann, spielt diese bei dem *Sip In* System, System 3 eine alles entscheidende Rolle.

Die grundlegende Technik für die Strukturierung der Platten ist die Photolithographie, mit deren Hilfe die hydrophoben SAMs in einem *Lift Off* Verfahren aufgebracht werden. Näheres zu den hydrophoben Modifikationen ist im folgenden Kapitel 5.1.1 beschreiben. Die hydrophilen Bereiche der Elektroden bestehen aus unbehandeltem Glas bzw. dem im Kapitel 5.2.3 näher erläuterten Preußisch Blau.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Modifikationen sollten die maximal möglichen Kontaktwinkel erreicht werden, auf hydrophoben Stellen ein Kontaktwinkel von 120° und auf den hydrophilen Stellen einer von 0° .

5.1.1 Strukturierung und Hydrophobisierung der Elektroden

Modifizierung des Glases

In Tabelle 5.1 sind die zur Hydrophobisierung des Glases verwendeten Substanzen, sowie die erreichten Kontaktwinkel abgebildet.

Abkürzung	Substanz	frisch hergestellt		8 Tage alt	
		Winkel	Stabw	Winkel	Stabw
Si0	gereinigtes Glas	15.6°	3.13°	23°	–
Si1	<i>Dimethyldichlorsilan</i>	90°	–	90°	–
Si2	1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyltrichlorsilan	$95,5^\circ$	1.73°	$94,5^\circ$	1°
Si3	1H,1H,2H,2H-Perfluorodecylmethyldichlorsilan	$95,5^\circ$	2,4	$96,5^\circ$	1,3 $^\circ$
Si4	1H,1H,2H,2H-Perfluorodecyldimethylchlorsilan	$82,8^\circ$	4.8°	$85,5^\circ$	2,4 $^\circ$
PB	Preußisch Blau	$< 20^\circ$		$< 20^\circ$	

Tabelle 5.1: Kontaktwinkel von destilliertem Wasser auf den modifizierten Glasoberflächen in Abhängigkeit von der Alterung

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Eignung der einzelnen Substanzen ist die Langzeitstabilität der jeweiligen Modifikationen. Die Ergebnisse der Langzeitversuche sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 angegeben.

$Zeit \frac{1}{d}$	Laborluft		Argon	
	Mittelw	Stabw	Mittelw	Stabw
1	15,6°	3,13°	10,17°	2,14°
8	23°	–	16,5°	–
17	31,6°	3,24°	17,4°	5,34°
23	32,1°	5°	20,63°	4,34°
31	29,8°	5,61°	22,4°	6,85°
38	29,2°	4,95°	22,7°	7,93°
45	37,8°	7,58°	22,1°	3,54°
52	44,2°	5,53°	19,5°	2,68°
59	42,1°	6,89°	19,2°	3,49°

Tabelle 5.2: Einfluss der Umgebung auf die Alterung von frisch gereinigten Glasplatten. Kontaktwinkel von destilliertem Wasser auf den Platten

Auffällig ist, dass die modifizierten Glasoberflächen Si1 - Si4 über die Zeit recht konstante Kontaktwinkel aufweisen, wohingegen beim frisch gereinigten Glas eine deutliche Zunahme des Kontaktwinkels von 16° auf 23° zu beobachten ist (Tabelle 5.1). Noch deutlicher ist dieser Effekt anhand der in Tabelle 5.2 angegebenen Werte zu erkennen.

Offenbar findet an der unbehandelten, an Raumluft gelagerten Glasoberfläche eine fortschreitende *Hydrophobisierung* von etwa 16° auf 42° statt, wohingegen bei den Glasplatten, welche unter Argon gelagert wurden, nur eine *Hydrophobisierung* auf 20° stattfindet.

Der Kontaktwinkel der gereinigten, aber nicht modifizierten Gläsern strebt auf einen Wert von etwa 42° zu. Diese Bereiche sind, in Verbindung mit der extrem hydrophilen Preußisch Blau Gegen- und Referenzelektrode noch ausreichend hydrophil, um ein sicheres *Sip In* Verhalten zu gewährleisten. Auf eine hydrophile Modifikation der entsprechenden Glasstellen wurde daher verzichtet.

Ausgehend von den, in Tabelle 5.1 angegebenen Kontaktwinkeln lässt sich erkennen, dass die Substanzen *Dimethyldichlorsilan* und *Perfluordecyldimethylchlorsilan* mit Kontaktwinkeln $< 90^\circ$ nicht für die hydrophobe Modifikation von Glasoberflächen geeignet sind, wohingegen die *Perfluordecyldi- und -trichlorsilane* mit Kontaktwinkeln von $> 96^\circ$ für die *Hydrophobisierung* der Oberflächen geeignet sind.

Um der Frage nachzugehen, inwiefern die Struktur der Chlorsilane (Alkankette oder Chlorgehalt) oder weitere Parameter wie die Beschaffenheit der Oberflächen zu unterschiedlichen Kontaktwinkeln führen, werden die erzielten Ergebnisse mit einigen in Tabelle 5.3 angegebenen Literaturwerten anderer Oberflächen verglichen.

Oberfläche	Quelle	Θ	Bemerkung
Teflon	[95–97]	120°	
Polydimethylsiloxan	[34]	120°	Modifikation in einem bei Normaldruck erzeugten Plasma
Pentadecafluor-1-octyl-8(11-trichlorsyl-1-oxoundecyloxymethyl)-3-nitrobenzoate	[39]	118°	
Hexafluorpropen	[38]	103°	Modifikation im Niederdruckplasma

Tabelle 5.3: Literaturwerte von Kontaktwinkeln auf unterschiedlichen Oberflächen

Aus den Tabellen 5.3 und 5.1 ist kein Zusammenhang zwischen den Kontaktwinkeln und der Art der Seitenketten zu erkennen. Die zur Modifikation verwendeten Reagenzien spielen also nicht die alleinige, dominierende Rolle; mit Alkylgruppen lassen sich offensichtlich die gleichen hydrophoben Oberflächen realisieren, wie mit fluorierten Alkylgruppen.

Ein Beispiel, bei dem trotz gleicher funktioneller Gruppen auf der Oberfläche unterschiedliche Kontaktwinkel auftreten, ist der Vergleich von *Dimethyldichlorsilan*, Abbildung 5.2, mit im Plasma bei Normaldruck synthetisierten Polydimethylsiloxan [34]. Es treten Kontaktwinkel von 90° bzw. 121° auf [34]. In beiden Fällen weist die Oberfläche der modifizierten Gläser an Siliziumatomen gebundene Methylgruppen auf. Der Unterschied liegt vermutlich in den unterschiedlichen Herstellungsmethoden, die zu verschiedenen Quervernetzungen führen. Beim *Dimethyldichlorsilan* erfolgt eine Anlagerung der Silane und

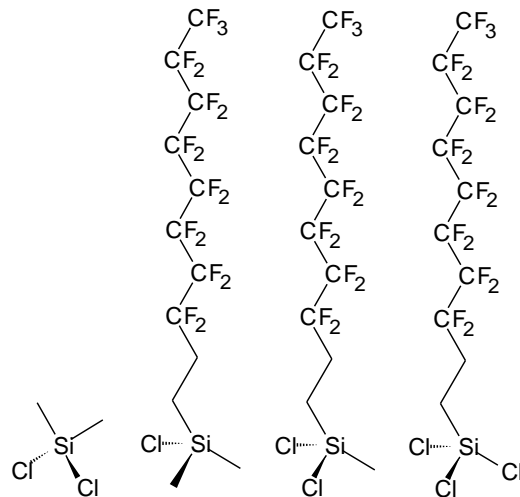


Abbildung 5.2: Die zur Modifikation der Glasoberflächen verwendeten Reagenzien. vlnr: Si1, Si2, Si3, Si4

somit der Methylgruppen, ohne dass die Oberflächenstruktur der Glassubstrate verändert wird. Nach der in [34] beschriebenen Modifikation wird die Oberfläche mit einem Silikonöl in einem unter Normaldruck erzeugten Plasma modifiziert. Unter diesen Reaktionsbedingungen findet neben einer Aktivierung der Glasoberfläche und des Silikonöles auch eine Aufrauung der Oberfläche statt.

Eine zweite Gruppe, die trotz ähnlicher Oberflächen stark unterschiedliche Kontaktwinkel aufweist, beinhaltet fluoridierte Seitenketten. Diese Gruppe beinhaltet Substanzen wie die Perfluordecylmono-, di- und trichloride, Teflon [95–97], das im Plasma polymerisierte Hexafluorpropen [38] sowie das Pentadecafluor-1-octyl-8(11-trichlorsyl-1-oxoundecyloxymethyl)-3-nitrobenzoate [39]. Als Referenzoberfläche wird das Teflon betrachtet, ein reiner Fluorkohlenstoff. Der mit reinem Wasser erzielte Kontaktwinkel von 120° entspricht dem maximal erreichbaren Kontaktwinkel auf glatten Oberflächen [95–97]. Im Vergleich zum Teflon ist die mit Si4 modifizierte Oberfläche mit einem Kontaktwinkel von 85° hydrophil. Im Gegensatz zum Si4 stehen Si2 und Si3. Alle Silane haben die gleichen Seitenketten, die mit ihnen erreichbaren Kontaktwinkel fallen jedoch mit 85° für das Si4 bzw. 95° für das Si2 und Si3 sehr unterschiedlich aus. Übertroffen wird die Hydrophobizität der Silane Si2, Si3 und Si4 durch den in [39] beschriebenen Sandwichtaufbau. Dieser weist die gleichen Seitenketten wie die Silane Si2, Si3 und Si4 auf. Im Gegensatz zu dem Teflon steht das in einem Niederdruckplasma synthetisierte Polymer aus Hexafluorpropen [38] mit einem Kontaktwinkel von *nur* 103° .

Alle diese Substanzen weisen die gleiche chemische Zusammensetzung der Oberfläche auf. Der Unterschied muss somit in der Struktur der Oberflächen liegen.

Wie in der Einleitung, Kapitel 4.5.1 bereits erwähnt wurde, weisen die fluoridierten Seitenketten bei einer geringen Packungsdichte der Silane keine Ordnung auf. Erst bei zunehmender Packungsdichte der Silane bilden die Seitenketten einen geordneten SAM. Das Si4 kann nur eine Bindung mit der Oberfläche des Glases eingehen. Bindet ein Monochlorsilan an die Glasoberfläche, so kann sich dessen Seitenkette auf die Oberfläche legen. Es ist somit denkbar, dass die Anlagerung eines weiteren Silanmoleküls verhindert bzw. erschwert wird.

Bei den Silanen Si2 und Si3 können sich bereits Cluster der Silane mit dicht gepackten Seitenketten in der Lösung bilden, bevor sich diese an die Oberflächen anlagern.

Die Monochlorsilane können zwar auch bereits in Lösung miteinander reagieren, jedoch können diese Dimere nur noch physikalisch auf der Oberfläche gehalten werden. Das Pentadecafluor-1-octyl-8(11-trichlorsyl-1-

oxoundecyloxymethyl)-3-nitrobenzoat wird über ein Trichlorsilan an die Oberfläche gebunden. Diese Ankergruppen können, wie oben beschrieben, bereits die erforderliche hohe Packungsdichte aufweisen.

Mit den Silanen Si2 und Si3 konnten in dieser Arbeit zuverlässig Kontaktwinkel zwischen 95° und 105° erzielt werden.

Ein großer Unsicherheitsfaktor bei der Modifikation von Glasoberflächen mit den Silanen ist das an der Glasoberfläche gebundene Wasser. Die Beladung der Oberfläche ist stark von der Luftfeuchtigkeit abhängig. Es ist somit möglich, dass von Ansatz zu Ansatz die vorpolymerisierten Silan-Cluster unterschiedlich groß ausfallen und sich somit auch zwangsläufig die Beschaffenheit der Oberflächenmodifikation ändert.

Ausgehend von den erzielten Kontaktwinkeln und den technischen Anforderungen für die Oberflächenmodifikation stellen sich die Silane Si2 und Si3 als geeignete Substanzen heraus. Die erzielten Kontaktwinkel liegen mit 95° bis 100° in dem Bereich, der mit vergleichbaren Silanen auf glatten Oberflächen, siehe Tabelle 5.3 erzielt werden kann. [98] Hydrophobere Oberflächen können nur durch eine Aufrauung der Oberfläche erzielt werden, was jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht realisiert werden konnte.

5.1.2 Mikrofluidik des Sensorarrays

Mit, durch Si3 strukturierten Glasplatten können mikrofluide Systeme aufgebaut werden (Abbildung 5.3). Mikrofluide Systeme, bei denen die in der Tabelle 5.1 angegebenen Kontaktwinkel erreicht wurden, erwiesen sich als recht robust und zuverlässig. Problematisch wird es, wenn der hydrophile bzw. der hydrophobe Charakter der entsprechend modifizierten Glasstellen etwas nachlässt. Bei vollständiger Füllung der Kapillaren bricht dann die Flüssigkeit in die ursprünglich hydrophoben Bereiche ein und kann dadurch eventuell zu einem Kurzschluss zwischen benachbarten Kompartimenten führen.

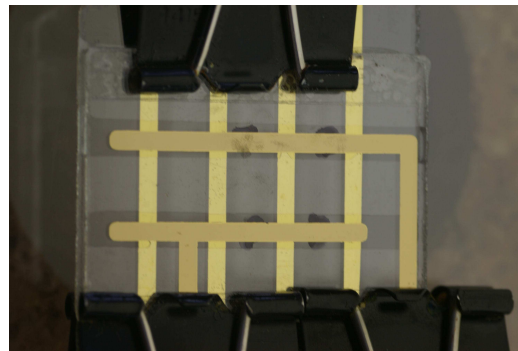


Abbildung 5.3: Mikrofluides System aus strukturiertem Glas. Modifikation mit Si3, $200\ \mu\text{m}$ Plattenabstand. Fluid: destilliertes Wasser

Auf eine Modifizierung der Goldstreifen konnte verzichtet werden. Im System 3 ergibt sich bei einem Plattenabstand von $200\ \mu\text{m}$ und einem durchschnittlichen Kontaktwinkel von $\Theta \simeq 25^\circ$ gemäß der Gleichung 4.18, dass

die Mindestbreite der hydrophilen Streifen $225\ \mu\text{m}$ betragen muss, damit die Flüssigkeit noch durch Kapillarkräfte in die Matrix eingezogen werden kann. Bei den, in diesem Matrixaufbau verwendeten Breiten der Kapillaren von $4\ \text{mm}$ kann der, in Kapitel 4.4.4 beschriebene Einfluss der virtuellen Wände auf das Einziehen der Flüssigkeiten in die Kapillaren vernachlässigt werden.

5.1.3 Einfluss der Größe der Gegenelektrode

Wie bereits in der Einleitung, Kapitel 4.2 erwähnt wurde, erscheint in einem Zwei-Elektrodensystem eine elektrochemische Reaktion immer langsamer als in einem Drei-Elektrodensystem.

Ein Teil des Potentialunterschiedes zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode wird in einem Zwei-Elektrodensystem dazu verwendet, um eine elektrochemische Reaktion an der Gegenelektrode zu erzwingen, die genügend Elektronen für die Reaktion an der Arbeitselektrode zur Verfügung stellt. Je größer die Gegenelektrode ist, umso langsamer braucht die Reaktion abzulaufen. Das bedeutet, dass nur ein geringer Potentialabfall als treibende Kraft an der Gegenelektrode erforderlich ist. Bei einer ausreichend großen Gegenelektrode ist ein elektrochemisches Verhalten ähnlich dem an einem Drei-Elektrodensystem zu beobachten. In Abbildung 5.4, linke Seite, ist zu erkennen, dass mit kleiner werdender Gegenelektrode der Abstand zwischen den Oxidations- und den Reduktionspeaks größer wird, die Vorgänge an den Elektroden zunehmend langsamer erscheinen.

Bei dem Sensorarray weist die Arbeitselektrode eine Fläche von 4mm^2 auf, wohingegen die der Gegenelektrode etwa 65mm^2 beträgt. Werden diese Dimensionen mit denen der den in Abbildung 5.4, linke Seite, dargestellten Versuchen verglichen, so kann die Vermutung nahe liegen, dass es in diesem Zwei-Elektrodensystem eigentlich keine Probleme geben sollte, die Gegenelektrode ist um ein vielfaches größer als die Arbeitselektrode. Diese Überlegung konnte allerdings durch Messungen in einer Matrixelektrode mit einem Plattenabstand von $200\ \mu\text{m}$ nicht bestätigt werden. Trotz der Verwendung von einer, aus zu je gleichen Teilen rotem und gelbem Blutlaugensalz bestehenden Elektrolyten, erschien die

Elektrochemie derart langsam, dass an eine komfortable Anwendung in einem Sensorarray nicht gedacht werden konnte. Was bisher nicht berücksichtigt wurde, ist der geringe Abstand zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode. Der Einfluss des Abstandes ist eindrucksvoll in Abbildung 5.4, rechte Seite zu sehen. In beiden Fällen beträgt die Größe der Arbeitselektrode etwa 4mm^2 und die der Gegenelektrode etwa 150mm^2 . Zu sehen ist hier der Vergleich zwischen einem Abstand der Elektroden voneinander von 3cm bzw. $125\ \mu\text{m}$. Im ersten Falle ist die gesamte Fläche der Gegenelektrode wirksam, die Elektrochemie erscheint reversibel, wohingegen sie im zweiten Falle sehr langsam erscheint. Hier ist der gleiche Effekt zu beobachten, der auch durch eine zu kleine Gegenelektrode hervorgerufen wird. Es kann daher angenommen werden, dass bei einem sehr kleinen Abstand zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode, die Fläche der Arbeitselektrode auf die der Gegenelektrode projiziert wird. Für die Matrixelektroden bedeutet dies, dass bei einer Fläche der Arbeitselektrode von 4mm^2 und einem Plattenabstand von $200\ \mu\text{m}$ die wirksame Fläche der Gegenelektrode ebenfalls nur 4mm^2 beträgt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es eigentlich erforderlich, dass eine Referenzelektrode mit in das Sensorarray implementiert wird. Ein Drei-Elektrodensystem kann nicht ohne weiteres in dem Matrixarray aufgebaut

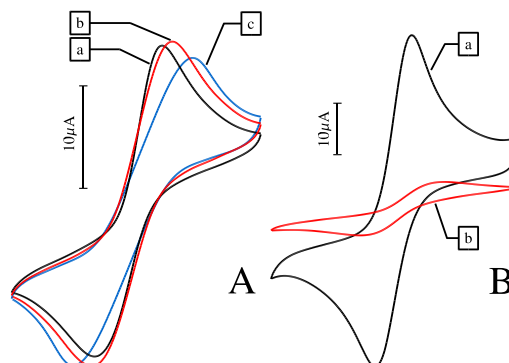


Abbildung 5.4: A: Einfluss der Größe der Gegenelektrode auf die Elektrochemie. System 2, AE: Methrom Goldelektrode $A=7\text{mm}^2$ GE: gesputterte Goldelektrode, isoliert mit Lack bis auf $A=7\text{mm}^2$, GE : a) 150mm^2 , b) 4mm^2 , c) 2mm^2 , Abstand AE-GE 3cm B: AE und GE gesputtertes Gold AE: 4mm^2 , GE : 150mm^2 , Abstand AE-GE a) 3cm , b) $125\ \mu\text{m}$ Elektrolytlösung: 1mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und $K_4[Fe(CN)_6]$, 154mM KCl. Scanrate $50\ \frac{\text{mV}}{\text{s}}$, Scanbereich $\pm 500\text{mV}$

werden, weil sich dadurch der Aufbau der einzelnen Platten wesentlich komplizierter gestalten würde. Es ist jedoch möglich, eine kombinierte Gegen- und Referenzelektrode einzusetzen.

5.2 Kombinierte Gegen- und Referenzelektroden

Bei einer kombinierten Gegen- und Referenzelektrode werden auf der Oberfläche der Elektroden redox-aktive Substanzen aufgebracht. Das Referenzpotential dieser Elektroden ergibt sich aus der *Nernst Gleichung* durch das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Substanz auf der Elektrodenoberfläche. Dieses Potential wird allerdings nur dann eingehalten, wenn diese Elektrode so gut wie nicht belastet wird, also die Gleichgewichtsbedingungen immer eingehalten werden.

Mit einer kombinierten Gegen- und Referenzelektrode wurden folgende Ziele verfolgt:

- Die elektrochemische Reaktion in den Sensorzellen im Vergleich zu der in einem reinen Zwei-Elektrodensystem zu beschleunigen. Im Idealfall soll das elektrochemische Verhalten eines Drei-Elektrodensystemes erreicht werden.
- Die elektrochemischen Reaktionen sollen in Bezug auf ein bekanntes, stabiles Referenzpotential durchgeführt werden.
- Die kombinierte Gegen- und Referenzelektrode soll in dem mikrofluiden System integriert werden. Sie muss daher sehr hydrophil sein.

Auch im Falle einer kombinierten Gegen- und Referenzelektrode gelten die im Kapitel 5.1.3 aufgeführten Überlegungen bezüglich der Größe der Gegenelektrode und des Abstandes von der Arbeitselektrode.

Auch in den Systemen 3 und 4 steht effektiv nur eine Gegen/Referenzelektrode zur Verfügung, die die Fläche der Arbeitselektrode aufweist. Um die oben genannten Anforderungen an die Konstanz des Potentials einhalten zu können, muss die kombinierte Gegen/Referenzelektrode über eine große Kapazität verfügen, so dass sich bei einer Messung das Verhältnis zwischen oxidiertem und reduziertem Substanz nur geringfügig verändert. Ebenso muss sie einen geringen Ausgangswiderstand aufweisen. Dieses wird durch einen sehr porösen Aufbau der Elektrode erreicht.

Die benötigte Kapazität der Gegenelektrode kann mit Hilfe der *Nernst Gleichung* berechnet werden. Bei einem maximalen Drift des Referenzpotentials von 30 mV im Laufe einer Messung dürfen maximal 14% des gesamten Materials der Gegenelektrode umgesetzt werden. Bei einer enzymkatalysierten Messung im System 1 werden typischerweise $1,0 \frac{mC}{cm^2}$ umgesetzt (Seite 67). Dieses erfordert eine Kapazität der Gegenelektrode von mindestens $7,2 \frac{mC}{cm^2}$. Der maximale Innenwiderstand der Gegenelektrode kann mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes berechnet werden. Hier wird ein maximaler Spannungsabfall von 10 mV angenommen. Bei einer maximalen Stromstärke von $20 \mu A$ bedeutet dieses einen Innenwiderstand von 500 Ohm.

Um eine kombinierte Gegen- und Referenzelektrode herzustellen wurden die folgenden Materialien untersucht:

- Silber/Silberchlorid
- Polypyrrol
- Preußisch Blau

5.2.1 Silber/Silberchlorid Elektrode

Die Silber/Silberchlorid Elektrode konnte nur durch Aufbringen einer Silber/Silberchlorid Paste auf die Gegenelektrode hergestellt werden. Die Gegen/Referenzelektrode wurde dadurch extrem dick. Dieses machte, um Kurzschlüsse zwischen der Gegen/Referenzelektrode und der Arbeitselektrode zu vermeiden, einen sehr großen Abstand zwischen den Platten erforderlich. Ein *Sip In* war somit nicht mehr zu realisieren. Ein weiterer gravierender Nachteil ist die Hydrophobizität der ausgehärteten Ag/AgCl Paste, was sich ebenfalls ungünstig auf das angestrebte *Sip In* Verfahren auswirkt. Unabhängig von den elektrochemischen Eigenschaften scheidet somit die Ag/AgCl Elektrode für einen Einsatz in einem nach System 3 aufgebauten Matrixarray aus. Die Ag/AgCl Elektrode könnte durchaus in einem, nach System 4 aufgebauten Matrixarray verwendet werden. Untersuchungen diesbezüglich fanden jedoch nicht statt, weil die Entwicklung des Systems 3 im Vordergrund stand.

5.2.2 Polypyrrol Elektrode

Bei den Gegen/Referenzelektroden aus Polypyrrol zeigte sich, dass sowohl die Topographie des Polypyrrols selber, als auch dessen Haftung auf den Goldelektroden von der Dauer der Synthese abhängig ist. Bei kurzzeitigen Synthesen, also bei sehr dünnen Polypyrrolschichten lag das Polypyrrol in Form von einem glatten, fest auf der Elektrode haftenden Film vor. Mit zunehmender Filmdicke wurde die Haftung des Polymeres auf den Goldelektroden zunehmend schlechter und es bildeten sich zunehmend raue Mikrostrukturen aus. Diese Ergebnisse stimmen mit den in [99] beschriebenen Beobachtungen überein. Bei der elektrochemischen Charakterisierung des Polypyrrols (Abbildung 5.5) zeigt sich, dass diese Elektrode nur eine sehr hohe Kapazität aufweist, also wie ein Kondensator wirkt.

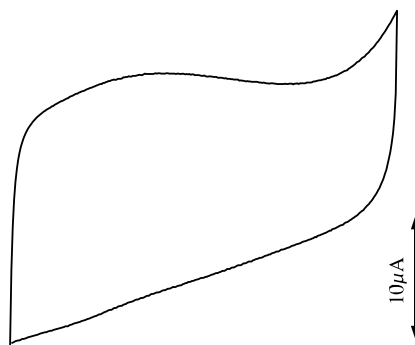


Abbildung 5.5: CV der Polypyrrol Elektrode; 200 mM KCl; Ref 3 M KCl Ag/AgCl, GE Edelstahl; Scanbereich -200 mV bis 500 mV; Scanrate $5 \frac{mV}{s}$

Trotz dieser Nachteile kann eine Polypyrrolelektrode als eine kombinierte Gegen- und Referenzelektrode verwendet werden. Wie in der Abbildung 5.6 zu sehen ist, weisen die CV Messungen, welche mit einer Polypyrrol Gegelektrode aufgenommen wurden, einen deutlich kleineren Abstand zwischen dem Oxidation- und Reduktionspeak auf, was auf kleinere Spannungsverluste an der Gegen- elektrode zurückzuführen ist. Zu beachten ist bei diesen CVs, dass die für die Fälle a und b verwendeten Elektroden unterschiedliche Größen aufwiesen. Die AE und GE sind jedoch bei den jeweiligen Messungen gleich groß, so dass zwar die absoluten Ströme nicht miteinander verglichen werden können, wohl aber die qualitativen Verläufe der CVs. Die beschleunigte Elektrochemie in dem Zwei Elek-

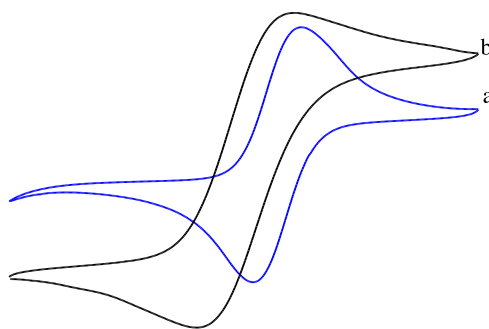


Abbildung 5.6: Einfluss des Polypyrrols auf die Elektrochemie. qualitativer Vergleich der CV Messungen: AE und GE gleich groß, Abstand 5mm, a) Polypyrrol-; b) Gold-GE, je 1mM rotes bzw. gelbes Blutlaugensalz, 100 mM KCl. Scanrate $50 \frac{mV}{s}$; Scanbereich $\pm 500 mV$

trodensystem ist auf die Umladungseffekte in der Gegenelektrode zurückzuführen, nicht auf elektrochemische Reaktionen in der Gegenelektrode.

5.2.3 Preußisch Blau Elektroden

Für die Synthese der *PB* Elektroden wurden zwei unterschiedliche Syntheseverfahren ausprobiert. Zum einen ist es die Synthese des *PBs* bei einem konstanten Strom [65,100], zum anderen ist es eine durch repetitive Cyclovoltammetrie hervorgerufene Synthese [66,101]. Diese beiden Synthesemöglichkeiten wurden auf ihre Eignung für die Synthese von den Gegen/Referenzelektroden untersucht.

In beiden Fällen konnten optisch gute *PB* Schichten erzeugt werden, die jedoch starke Unterschiede in ihrer Haltbarkeit aufwiesen. Diese zeigten sich bereits bei den, zur Konditionierung erforderlichen CV Messungen. Hierbei löste sich das durch Cyclovoltammetrie synthetisierte *PB* von den aus Gold bestehenden Leiterbahnen ab. Innerhalb von 60 Scans, gemessen bei einer Scanrate von $50 \frac{mV}{s}$ büßte diese Elektrode fast ihre gesamte Kapazität ein. Der Verlust der Kapazität konnte auch optisch verfolgt werden. Dieser Effekt war bei den *PB* Schichten, welche mit einer konstanten Stromdichte von $-20 \frac{\mu A}{cm^2}$ nach [65] und [100] synthetisiert wurden, nicht zu beobachten.

Für die Synthese von *PB* gibt es zwei *kritische* Potentiale. Das erste ist bei 400 mV, bei dem das Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert wird und mit dem in der Lösung befindlichen $[Fe(CN)_6]^{3-}$ den Hexacyanoferratkomplex bildet. Das zweite Potential befindet sich bei 200 mV. Potentiale unterhalb von 200 mV sind für die Synthese von *PB* wenig geeignet, es werden sowohl das Fe^{3+} zu Fe^{2+} als auch das $[Fe(CN)_6]^{3-}$ zu $[Fe(CN)_6]^{4-}$ reduziert. [63] Zwar könnte sich aus diesen, zumindest formell, das Preußisch Weiß bilden, die Kristallstruktur wird jedoch als unregelmäßig beschrieben. [63] Diese unregelmäßige Struktur könnte als Schwachpunkt der *PB* Schicht in Betracht gezogen werden.

Während des Synthesevorganges bildete sich auch auf der aus Edelstahl bestehenden Gegenelektrode *PB* aus. Von beiden Elektroden konnte sich *PB* in Form von feinen Kristallen ablösen und sich gleichmäßig u.a. auf den ursprünglich hydrophoben Bereichen der Platten absetzen.

Das kolloidale *PB* lässt sich leicht von den mit Si3 modifizierten Oberflächen abwischen, so dass aus diesem Grunde die Platte der Gegen/Referenzelektrode auch dann mit dem PFS behandelt werden sollte, wenn diese nicht für mikrofluide Systeme eingesetzt werden soll. Die Haftung des kolloidalen *PBs* auf den mit PFS behandelten Glasplatten kann vermindert werden, indem ältere Syntheselösungen mit bereits größeren *PB* Partikeln verwendet werden. Die Qualität der synthetisierten Elektroden lei-

Elektrode Nr.	$C_{ox}/\frac{mC}{cm^2}$	$C_{red}/\frac{mC}{cm^2}$	$C / \frac{mC}{cm^2}$
1	7,6	6	6,8
2	8,8	6,5	7,65
3	8,39	6,23	7,31
4	6,6	6,4	6,5
5	8,63	7,15	7,89
6	8,83	6,55	7,69

Tabelle 5.4: Abhängigkeit der Kapazität der *PB* GE von der Anzahl der synthetisierten Elektroden in der selben Lösung. Bestimmt mit System 1, 100mM KCl, $v = 2 \frac{mV}{s}$

det, wie aus der Tabelle 5.4 ersichtlich, nicht unter der Verwendung einer alten Syntheselösung.

Wie bereits in der Einleitung, Kapitel 4.5.4, erwähnt wurde, müssen Kaliumionen während der Oxidations- bzw. Reduktionsvorgänge zur Kompensation von Ladungen in die *PB* Schicht hinein bzw. hinausdiffundieren. Bei den, in diesem Falle verwendeten relativ dicken *PB* Schichten ist somit auf Grund der langsamen Diffusion der Kaliumionen durch das *PB* hindurch eine vollständige elektrochemische Umsetzung nur bei langsamen Scanraten möglich. Ein sicheres Zeichen dafür, dass die gesamte *PB* Schicht oxidiert bzw.

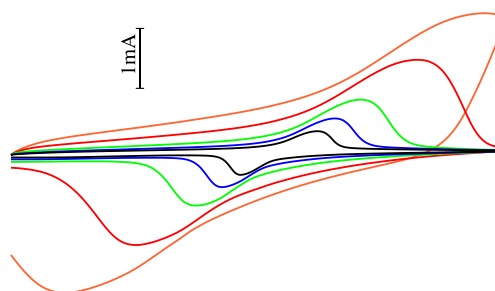


Abbildung 5.7: CVs einer *PB* Elektrode bei unterschiedlichen Scanraten; von innen nach außen; $0, 5 \frac{mV}{s}, 1 \frac{mV}{s}, 2 \frac{mV}{s}, 5 \frac{mV}{s}, 10 \frac{mV}{s}$; System 1; Scanbereich -100 mV bis 400 mV Elektrolyt 100 mM KCl pH4,5

reduziert wird ist, dass die elektrochemische Kapazität unabhängig von der Scanrate ist. Die CVs der Konditionierung und die bei diesen Messungen zugänglichen Kapazitäten sind in der Abbildung 5.7 und der Tabelle 5.5 angegeben. Es konnten Kapazitäten von etwa $8 \frac{mC}{cm^2}$ erzielt werden. Die vollständige Oxidation bzw. Reduktion des *PB* während der Konditionierung kann anhand der Blaufärbung bzw. der Entfärbung verfolgt werden.

Ein weiteres Indiz für den vollständigen elektrochemischen Umsatz ist die vollständige Entfärbung der *PB* Schicht bei den stark reduktiven Potentialen.

Bei den, in dieser Arbeit verwendeten Schichtdicken hat sich eine Scanrate von $2 \frac{mV}{s}$ als optimal erwiesen.

Scanrate $\frac{mV}{s}$	$C_{ox}/\frac{cm^2}{mC}$	$C_{red}/\frac{cm^2}{mC}$	$C/\frac{cm^2}{mC}$
0,5	8,95	8,18	8,56
1	8,5	8,15	8,33
2	8,35	6,93	7,64
5	8,15	8,43	8,29

Tabelle 5.5: Abhängigkeit der CV Messungen einer *PB* Elektrode von der Scanrate. System 1; Elektrolyt 100 mM KCl pH4,5

In einem Vergleich einer reinen ITO Gegenelektrode mit einer PB Gegen/Referenzelektrode im System 3 zeigt sich (Abbildung 5.8), dass durch die PB Elektrode die elektrochemischen Messungen wesentlich verbessert werden konnten. Bei ansonsten identischen Bedingungen verringerte sich der Abstand zwischen den Oxidations- zu Reduktionspeaks. Die Peaks sind bei Verwendung der PB Elektrode deutlicher ausgeprägt, als bei Verwendung einer reinen ITO Gegenelektrode.

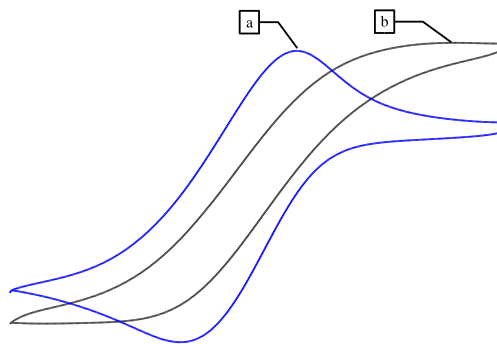


Abbildung 5.8: Einfluss des PBs auf die Elektrochemie; Vergleich der qualitativen Verläufe der CV Messungen. GE: a) *PB* b) ITO. System 3, Elektrolytlösung: je 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und $K_4[Fe(CN)_6]$ in 100 mM KCl; Scanrate $25 \frac{mV}{s}$; Scanbereich -300 mV bis 300 mV

5.2.4 Zusammenfassung der Gegenelektroden

Die Ag/AgCl Paste kann auf Grund der hohen Schichtdicken nicht als Material für die Gegen/Referenzelektrode eingesetzt werden, wenn ein mikrofluides System in der Matrixelektrode realisiert werden soll.

Werden die Eigenschaften der Polypyrrol- und PB Gegenelektroden miteinander verglichen, so zeigt sich, dass beide Materialien prinzipiell zur Herstellung von kombinierten Gegen/Referenzelektroden geeignet sind. Mit beiden Materialien konnte das elektrochemische Verhalten des Zwei-Elektrodensystems, im Vergleich zu einer reinen ITO Gegenelektrode deutlich verbessert werden.

Das Polypyrrol weist jedoch den Nachteil einer schlechten Haftung auf den aus Gold bestehenden Leiterbahnen auf. Dieses Problem war bei dem PB nicht gegeben. Mit dem PB konnten die Mindestanforderungen an die Kapazität der Gegenelektrode erfüllt werden. Ein weiteres Argument, welches für das PB als Elektrodenmaterial spricht, ist dessen extreme Hydrophilie. Die aus PB hergestellten Gegen/Referenzelektroden können als ein wesentlicher Bestandteil des mikrofluiden Systems eingesetzt werden. Von den elektrischen Eigenschaften (Abbildung 5.9) her betrachtet, sind sowohl die PB, als auch die Polypyrrol Gegenelektroden für den Einsatz in dem Sensorarray geeignet.

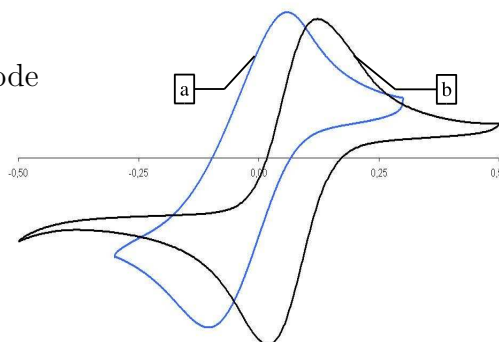


Abbildung 5.9: Vergleich von PB und Polypyrrol Gegenelektroden; qualitativer Vergleich der CVs: a) Preußisch Blau, b) Polypyrrol; AE und GE gleich groß; Abstand 5mm; je 1 mm $K_3[Fe(CN)_6]$ und $K_4[Fe(CN)_6]$ in 100 mM KCl; Scanrate $50 \frac{mV}{s}$

5.3 Bewertung des Matrixarrays

Wie bereits im Kapitel 4.1 erwähnt wurde, ist es für die Ansteuerung der einzelnen Sensorelemente erforderlich, dass kein Strom, außer durch das adressierte Sensorelement selber, von der Gegenelektrode auf die Leiterbahn der Arbeitselektroden gelangt. Das in Kapitel 4.1 beschriebene Problem, ein Widerstandsarray über eine passive Matrix auszulesen, ist in Abbildung 5.10 auf ein elektrochemisches Matrix Array übertragen worden.

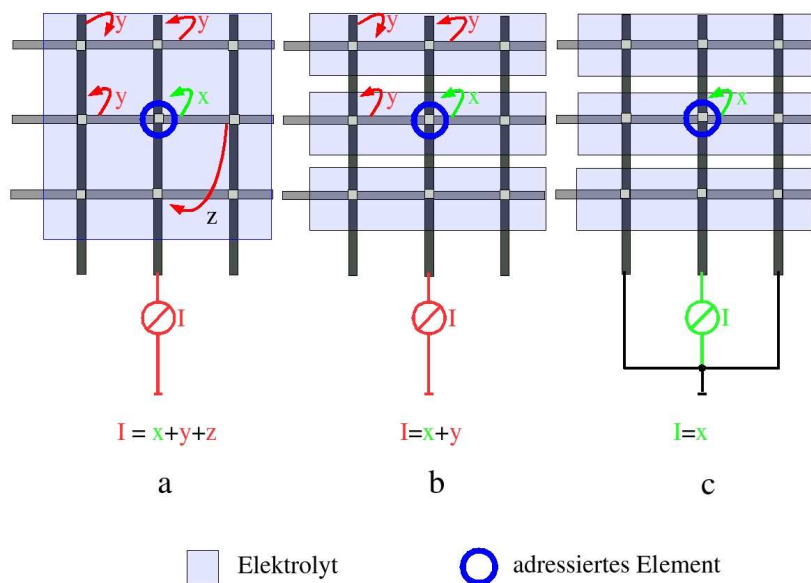


Abbildung 5.10: Ströme bei der Adressierung eines elektrochemischen passiven Matrix Arrays mit: a) gemeinsamen Elektrolyten; b) unterteiltem Elektrolyten; c) mit zusätzlicher Gegenspannung und unterteiltem Elektrolyten

In Abbildung 5.10 a ist eine Messung an einem passiven Matrix Array mit einem gemeinsamen Elektrolyten dargestellt. Es werden nur die Gegen/Referenzelektrode angeschlossen, an deren Kreuzungspunkt mit den Gegenelektroden sich die zu messenden Sensorelemente befindet. Wie bereits am Beispiel des einfachen Widerstandsarrays beschrieben wurde, wird ein mehr oder weniger großer Strom durch das adressierte Sensorelement fließen, hier mit x bezeichnet. Über den Umweg von benachbarten Sensorelementen fließen *parasitäre* Ströme, hier mit y und z bezeichnet. Zusätzlich zu den, im Widerstandsarray eingezeichneten Leitern, besteht bei einem mit Elektrolyt gefüllten Matrix Array noch die Möglichkeit, dass der Strom durch den Elektrolyten selber zu den weiteren Sensorelementen auf der adressierten Leiterbahn der Arbeitselektrode fließt. Dieser Strom ist hier mit z gekennzeichnet.

zeichnet. Der Strom, der in einem solchen Falle gemessen wird, setzt sich aus drei Strömen zusammen. $I_{ges} = I_x + I_y + I_z$. Eine brauchbare Auswertung einzelner Sensorelemente kann somit nicht erreicht werden. Der Strom z kann dadurch unterbunden werden, indem der Elektrolyt in einzelne Abschnitte parallel zu den Gegen-/Referenzelektroden unterteilt wird. Dieses ist in Abbildung 5.10 b geschehen, der gesamte gemessene Strom setzt sich nun nur noch aus zwei Strömen, $I_{ges} = I_x + I_y$ zusammen. Um brauchbare Messungen von einem Sensorelement zu bekommen, muss auch der letzte parasitäre Strom y unterbunden werden. Dieses geschieht dadurch, dass, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, alle nicht adressierten Leiterbahnen der Arbeitselektroden auf das gleiche Potential wie die adressierte Leiterbahn gelegt wird.

Auch wenn der Strom der nicht adressierten Leiterbahnen nun nicht mehr die Messung am adressierten Sensorfeld beeinträchtigt, so ist doch zu beachten, dass an den Kreuzungspunkten dieser Leiterbahnen und der angeschlossenen Gegenelektrode Ströme fließen und dementsprechend auch elektrochemische Umsätze ablaufen. Handelt es sich dabei um reversible Systeme, so ist dieses weiterhin nicht tragisch, weil nach einem CV Durchgang die Ausgangssituation wieder hergestellt ist. Werden jedoch irreversible Reaktionen, wie z.B. bei dem in Kapitel 5.6 beschriebenen Sensor für Fructose gemessen, so findet unabwendbar eine Verarmung des Analyten an dem Sensorelement statt. Wird dieses Element angesteuert führt dieses zwangsläufig zu kleineren Messergebnissen als auf Grund der ursprünglich vorhandenen Konzentrationen zu erwarten ist. Abhilfe kann in diesem Fall ein Multikanalpotentiostat (siehe Kapitel 8.4) bringen, mit dem alle vier Arbeitselektroden gleichzeitig gemessen werden können.

Welchen Einfluss die *parasitären* Ströme y und z auf die Messung haben hängt von mehreren Faktoren ab. Diese sind:

- Leitfähigkeit des Elektrolyten
- Abstand zwischen den einzelnen Sensorelementen
- Abstand zwischen den Platten der Arbeits- und Gegen/Referenzelektroden
- Anzahl der benachbarten offenen bzw geschlossenen Elektroden

Dieser Einfluss und der der *Gegenspannung* ist in Abbildung 5.11 zu erkennen. Es zeigt sich deutlich, dass ein passives Matrixarray ohne die Gegenspannung nicht ausgelesen werden kann. Die einzige Ausnahme besteht dann, wenn die weiteren Sensorelemente auf der adressierten Leiterbahn isoliert sind. Dieses dürfte aber in der praktischen Sensoranwendung nur äußerst selten der Fall sein. Damit die *Gegenspannung* wirksam werden kann, muss

der Widerstand der Leiterbahnen, auf denen sich die Sensorelemente befinden, so klein wie möglich sein.

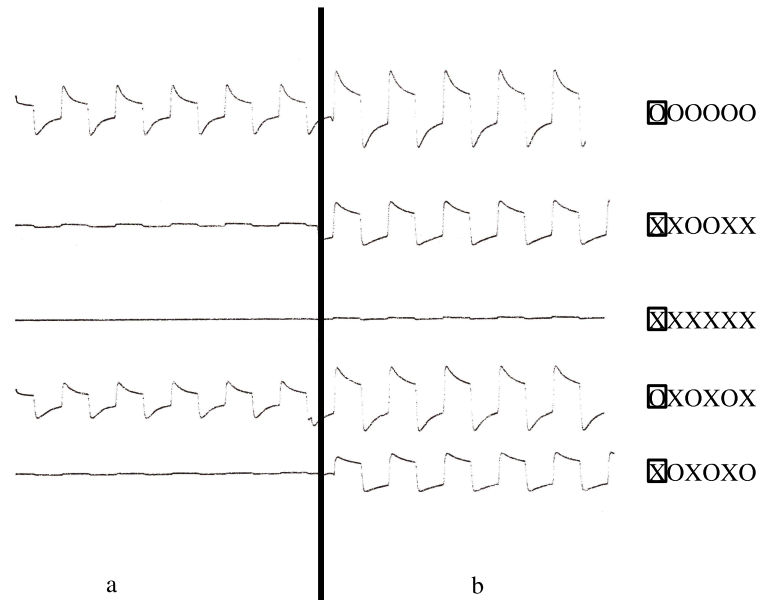


Abbildung 5.11: Einfluss der Gegenspannung auf die Adressierbarkeit eines 5x6 Matrixarrays in Abhängigkeit von den benachbarten Sensorelementen. Arbeits- und Gegenelektrode aus ITO. Messen der markierten Elektroden. O : offenes Sensorelement; X : mit Nagellack isoliertes Sensorelement; a) Mit Gegenspannung; b) Ohne Gegenspannung; 200 μm Plattenabstand. Elektrolyt unterteilt. je 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und $K_4[Fe(CN)_6]$, Rechteckspannung $\pm 800\text{ mV}$, Schaltfrequenz 1 Hz

Unter Berücksichtigung der bisher aufgeführten Kriterien ist es möglich, ein Matrixarray auszulesen. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 5.12 dargestellt. In diesem Fall wurden die Sensorelemente einer 4x4 Matrix abwechselnd mit SAMs aus HDT modifiziert, so dass sich ein Schachbrettmuster aus modifizierten und unbehandelten Goldelektroden ergab. Das Muster der modifizierten Sensorelemente und das der elektrochemischen Messungen sind identisch. Hierbei werden die modifizierten Elektroden durch die waagerechten Striche wiedergegeben, wohingegen die nicht modifizierten Elektroden durch die CVs wiedergegeben werden.

Messungen an den modifizierten Sensorelementen ergaben durchgängig keine Stromantwort. Dieses zeigt zum einen, dass die Ausbildung der HDT SAMs reproduzierbar ist und zum anderen, dass der Mechanismus der Adressierung zuverlässig funktioniert.

Wenn an den Sensorelementen Ströme auftreten, so können diese durch die Beschaffenheit der Elemente selber und der der Gegen/Referenzelektroden

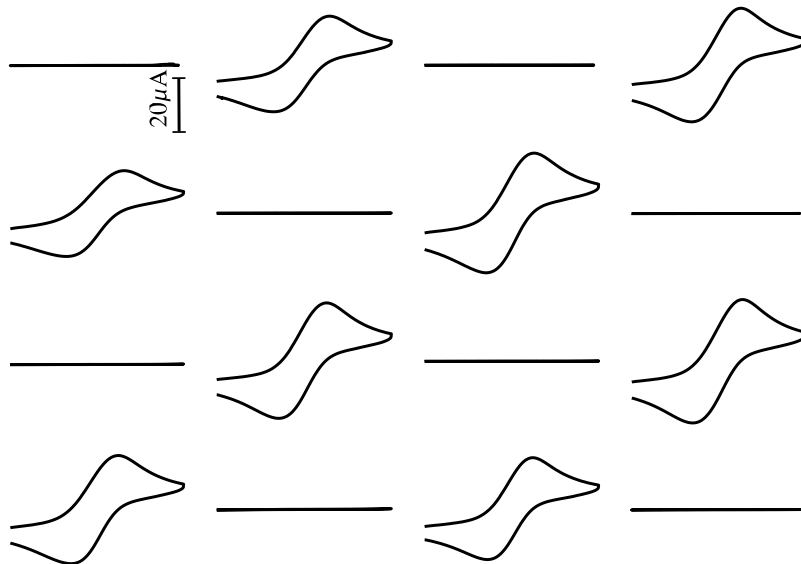


Abbildung 5.12: Adressierung eines durch HDT *schachbrettartig* isolierten 4x4 Matrixarrays. System 3, je 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ bzw. $K_4[Fe(CN)_6]$, 100 mM KCl, Scanrate $100 \frac{mV}{s}$, Scanbereich $-400 mV$ bis $300 mV$

beeinflusst werden. Wie im Abschnitt 5.1.3 gezeigt werden konnte, kommt bei den Dünnschichtsystemen nur der Teil der Gegen/Referenzelektrode zur Geltung, der den einzelnen Sensorelementen unmittelbar gegenüberliegt. Die Ergebnisse, welche an den offenen Sensorelemente erzielt wurden, sehen bereits reproduzierbar aus. Eine genauere Auswertung konnte anhand der angegebenen Peakpotentiale (Tabelle 5.6) und den Peakströmen vorgenommen werden.

Hierbei zeigt sich, dass insbesondere die ΔE^0 Werte nur eine sehr geringe Streuung aufweisen. Auch die weiteren Werte wie Peakströme und Peakpotentiale weisen eine ausreichende Reproduzierbarkeit auf.

Der Abstand der Oxidations- zu den Reduktionspeaks beträgt bei diesen Messungen etwa 200 mV, wohingegen die Peakabstände bei Messungen im System 1 etwa 110 mV betragen. Diese Peakverbreiterung ist allerdings nicht auf eine mangelnde Leistungsfähigkeit der Gegen/Referenzelektrode zurückzuführen, sondern auf eine unzureichende Reinigung. Wenn die gesputterten Goldelektroden durch Ätzen in Piranha und anschließender Ethanolbehandlung, siehe Abschnitt 8.3.7 gereinigt werden, verbleibt eine Oxidschicht auf den Sensorelementen. Diese führt, wie in diesen Versuchen zu sehen ist, zu einer Verlangsamung des Elektronentransfers an der Elektrode. Diese Beeinträchtigung konnte durch eine elektrochemische Reduktion, wie im weiteren

	Oxidationspeak		Reduktinospeak		$\Delta E^0 / V$
	E / V	I / μA	E / V	I / μA	
	0,04	20,5	-0,16	-20,3	-0,06
	0,044	22,2	-0,16	-22,1	-0,058
	0,041	21,5	-0,16	-21,2	-0,059
	0,035	18,5	-0,15	-17,8	-0,057
	0,063	17,6	-0,18	-16,7	-0,058
	0,037	21,0	-0,15	-20,4	-0,057
	0,059	15,3	-0,15	-15,4	-0,046
	0,038	19,3	-0,14	-19,3	-0,051
Durchschnitt	0,045	19,49	-0,156	-19,15	-0,056
Standardabweichung	0,010	2,29	0,012	2,32	0,005

Tabelle 5.6: charakteristische Daten der in Abbildung 5.12 gezeigten Messung an den nicht modifizierten Sensorfeldern.

Verlauf von Kapitel 8.3.7 beschrieben, oder durch eine Plasmareinigung, siehe Kapitel 8.3.7, beseitigt werden.

An einem, mit einem AUT SAM modifizierten Sensorelement, welches in System 4 mit einer Lösung aus rotem und gelbem Blutlaugensalz durchgemessen wurde, konnte ein Abstand der Oxidations- zu den Reduktionspeaks von 140 mV erreicht werden. Diese Werte kommen denen des Systems 1 recht nahe.

Weitere Angaben und Versuche zu diesem SAM sind in Kapitel 5.5 beschrieben. Bei Messungen mit unterschiedlichen Scanraten ergab sich in diesem Falle ein linearer Zusammenhang zwischen den Peakströmen und der Wurzel der Scanrate (Abbildung 5.13 dargestellt). Dieser Zusammenhang deutet auf eine diffusionskontrollierte Elektrochemie hin. Es liegt somit keine Beeinträchtigung durch die Gegen/Referenzelektrode vor.

Es stellt sich nun die Frage, über welchen Zeitraum im System 3 ungestörte Messungen vorgenommen werden können. Auf jeden Fall müssen die Messungen beendet sein, bevor die Diffusionsschichten die, den

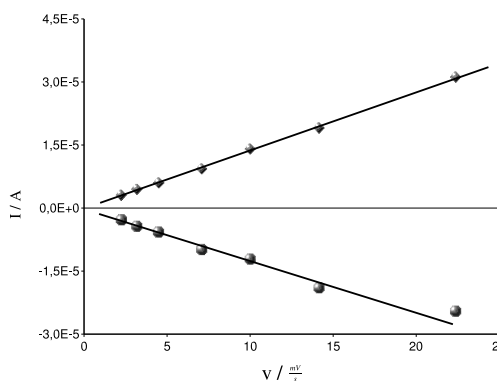


Abbildung 5.13: Abhängigkeit der Peakströme von der Wurzel der Scanrate; AUT SAM; je 1 mM rotes/gelbes Blutlaugensalz; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; System 4; gemessen mit 4 Kanal Potentiostat; Elektrodensystem; Scanraten $5 \frac{mV}{s}$ bis $500 \frac{mV}{s}$; Scanbereich $\pm 350 mV$

Sensorelementen gegenüberliegenden Gegen/Referenzelektroden erreicht haben. Die Zeit, in der die Diffusionsschicht die Gegenelektrode erreicht, kann nach Gleichung 5.1 [102] berechnet werden.

$$t = \frac{\delta^2}{\pi * D} \quad (5.1)$$

Bei einem Diffusionskoeffizienten von etwa $7 * 10^{-6} \frac{cm^2}{s}$ [103] ergibt sich eine Zeit von 18s.

5.4 Modifikation der Arbeitselektroden

Für die Modifikation der Sensorelemente wurden zwei Verfahren untersucht. Zum einen ist es der in Abbildung 5.14 dargestellte Mikrokontaktdruck, siehe Kapitel 4.5.6, zum anderen eine Inkubation der einzelnen Sensorelemente in den Mikrogefäßen (Abbildung 9.4). Mit dem Mikrokontaktdruck wurde ein *Schachbrettmuster*, bestehend aus gestempelten, also mit HDT modifizierten und nicht modifizierten Sensorelementen hergestellt. Die elektrochemischen Messungen sind in Abbildung 5.16 zu sehen.

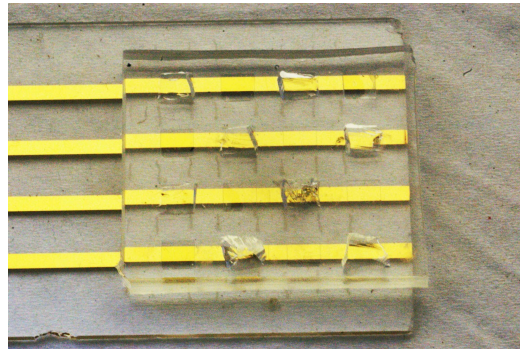


Abbildung 5.14: Mikrokontaktdruck auf Matrixelektroden mit einem aus PDMS hergestellten Stempel

Eine weitere Methode der Modifizierung der Sensorelemente ist die Ausbildung von SAMs aus Lösungen. Diese konnte auf den einzelnen Sensorelementen durchgeführt werden, indem mit Hilfe von Silikondichtungen und einem geeigneten Presswerkzeug Mikrogefäße (Abbildung 9.4) gebildet wurden. In diesen Gefäßen konnten die zur Modifikation der einzelnen Sensorelemente erforderlichen Lösungen eingefüllt werden.

Basierend auf den Versuchen zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit von Goldelektroden in Lösungen von Hexadecanthiol, (Abbildung 5.15) wurden die Sensorelemente für mindestens 20 Minuten inkubiert. Werden die inkubierten (Abbildung 5.12) mit den gestempelten (Abbildung 5.16) *Schachbrettmustern* verglichen, so fällt auf, dass die Isolation der durch Inkubation hergestellten HDT SAMs deutlich besser ausfällt, als die der gestempelten. Dieser Unterschied ist beim direkten Vergleich der mit HDT modifizierten Sensorelementen zu erkennen (Abbildung 5.17).

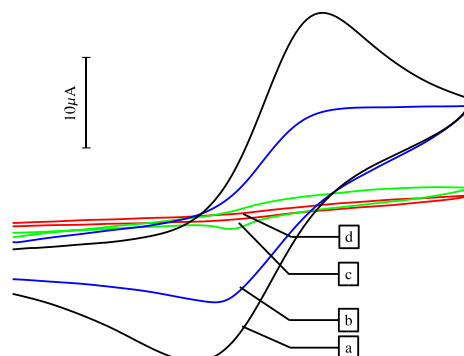


Abbildung 5.15: Abhängigkeit der Isolierung einer Goldelektrode von der Inkubationszeit in einer 15 mM ethanologischen HDT Lösung. a) 0s, b) 2 Minuten, c) 10 Minuten, d) 20 Minuten, System 1; je 1 mM rotes und gelbes Blutlaugensalz, 100 mM KCl, Scanrate $100 \frac{mV}{s}$; Scanbereich -70 mV bis 420 mV

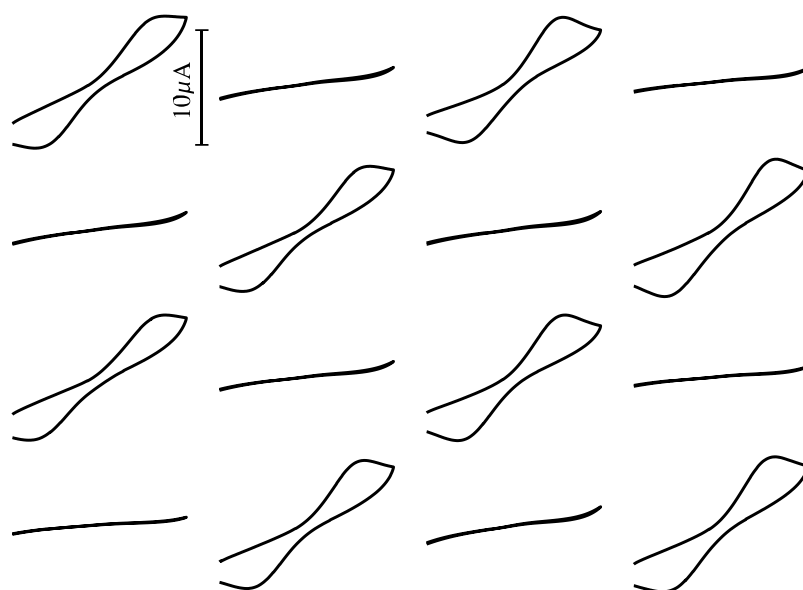


Abbildung 5.16: Mit Hexadecanthiol im Stempeldruck modifizierte Matrixelektrode. System 3, je 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ bzw. $K_4[Fe(CN)_6]$ Blutlaugensalz, 100 mM KCl, Scanrate $100 \frac{mV}{s}$, Scanbereich -400 mV bis 300 mV

Neben der Möglichkeit qualitativ hochwertigere SAMs herzustellen, bieten die Mikrogefäße eine höhere Flexibilität bei der Modifizierung an. Wenn die Dichtung einmal justiert ist, kann in jedes der Mikrogefäße eine beliebige Lösung eingefüllt werden, die Oberflächenreaktionen können zeitgleich ablaufen. Eine wahlfreie Modifikation der einzelnen Sensorelemente durch den Mikrokontaktdruck ist zwar prinzipiell auch machbar, jedoch ist für jedes Reagenz ein eigener Stempel erforderlich, der jedes Mal genau auf der Platte der Arbeitselektroden ausgerichtet werden muss.

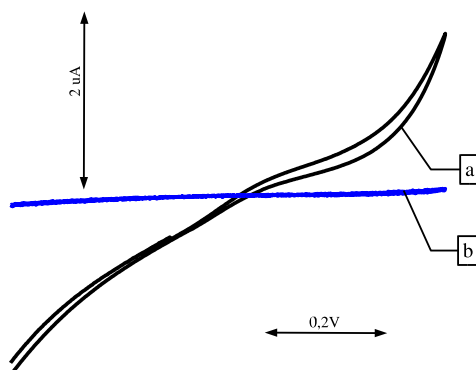


Abbildung 5.17: Mit HDT modifizierte Goldelektroden. Modifikation: a) Mikrokontaktdruck, b) Inkubation in Mikrozellen; System 3, je 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und $K_4[Fe(CN)_6]$ 100 mM KCl, Scanbereich -350 mV bis 350 mV; Scanrate $100 \frac{mV}{s}$

Wie die Messungen an den *Schachbrettmustern* zeigten, ist das Matrixarray dazu geeignet die chemischen Modifikationen der einzelnen Sensorelemente zu charakterisieren. Bei diesen Messungen zeigte sich jedoch, dass die auf hydrophiler/hydrophober Strukturierung basierenden Kapillaren nicht sehr zuverlässig funktionieren. Mit einem Kontaktwinkel von etwa 95° bis 105° befindet sich das System an der unteren Grenze, die ein solches Verfahren überhaupt erst gestattet. Häufig ergab sich, dass nach ein bis zweimaliger Benutzung die hydrophoben Stellen etwas von ihrem hydrophoben Charakter eingebüßt hatten, die Flüssigkeit brach daraufhin aus den vorgesehenen Kapillaren aus. Ein weiteres, wenn auch indirektes Problem ist die nicht optimale Reinigung der Sensorelemente durch Ätzen mit Piranha. Eine Plasmareinigung ermöglichte eine wesentlich bessere Elektrochemie an den Sensorelementen und ist in der Durchführung wesentlich einfacher als Ätzen mit anschließenden elektrochemischen Reduzieren. In der Plasmabehandlung wurde allerdings auch die hydrophobe Modifikation von den Glasplatten entfernt, so dass die bisher verwendete Mikrofluidik nicht mehr durchführbar war. Aus diesen Gründen wurde das System 3 für die weiteren Versuche nicht mehr verwendet und stattdessen eine mechanische Abtrennung der einzelnen Elektrolyträume angewendet (System 4).

5.5 Gemischte SAMs aus AUT und HDT

In den vorhergegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass ein SAM aus *HDT* eine Elektrode, unabhängig vom pH Wert, gegen Blutlaugensalz isolieren kann. Ein SAM aus *Mercaptoundecansäure* erwies sich unter sauren Bedingungen als durchlässig für *Hexacyanoferrat*. [104] Die isolierende Wirkung des *HDT* SAMs beruht in der Ausbildung einer dichten Alkanschicht. Das *AUT* hingegen weist bei einem pH von 4.5 positiv geladene, protonierte Aminogruppen auf. Die negativ geladenen $[Fe(CN)_6]^{3-}$ bzw. $[Fe(CN)_6]^{4-}$ können in diese Schicht eindringen und sich in dieser ablagern, ein Austausch von Elektronen mit der Elektrode wird dadurch ermöglicht.

Es stellt sich nun die Frage, wie dicht müssen die Aminogruppen in einem SAM sein, um über die elektrostatischen Wechselwirkungen einen Ladungsaustausch mit der Elektrode zu ermöglichen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein gemischter, in Mikrogefäßen aus ethanolischer Lösung hergestellter SAM aus *HDT* und *AUT* untersucht.

Die unterschiedlichen isolierenden Eigenschaften der gemischten SAMs sind in der Abbildung 5.18 zu erkennen. Die Angaben in der Abbildung beschreiben den prozentualen Anteil des AUT in der **Inkubationslösung**. Für die weitere Auswertung der Ergebnisse ist zu beachten, dass sich die Zu-

sammensetzung des SAMs in Abhängigkeit der Adsorptionskoeffizienten von *AUT* und *HDT* von der der Inkubationslösung unterscheiden kann. Wie in der Abbildung 5.18 zu sehen ist, verringern sich mit abnehmendem *AUT* Anteil die Peakströme, wohingegen die Abstände der Oxidations- und Reduktionspeaks zunehmend vergrößert werden. Bei sehr kleinen *AUT* Anteilen sind keine Peakströme mehr zu erkennen, eine Verbreiterung der CVs hingegen ist weiterhin gut sichtbar. Dieser Effekt ist besonders deutlich bei einem direkten Vergleich einiger ausgewählter CVs in Abbildung 5.19 bzw. der charakteristischen Werte in Tabelle 5.7 zu sehen.

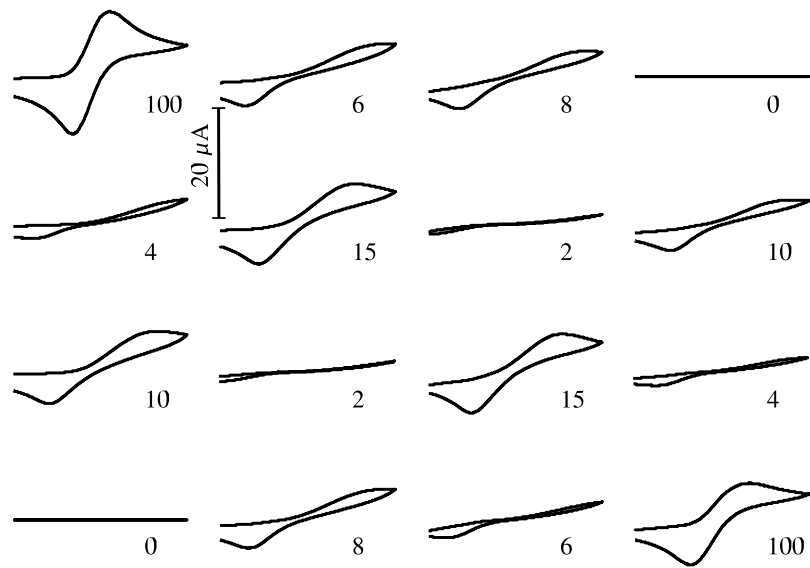


Abbildung 5.18: Einfluss des prozentualen *AUT* Anteils in einem *AUT/HDT* SAM auf die CVs von Blutlaugensalz; je 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ bzw. $K_4[Fe(CN)_6]$; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; System 4; gemessen mit 4 Kanal Potentiostat; Scanrate = $100 \frac{mV}{s}$; Scanbereich $\pm 350 mV$

% AUT	$20 \frac{mV}{s}$	$100 \frac{mV}{s}$	ΔE
100	140	158	18
15	326	411	85
10	320	444	124
8	433	570	137
6	429	575	146

Tabelle 5.7: Abstand von Oxidations- und Reduktionspeaks in Abhängigkeit von Scanrate und prozentualer Zusammensetzung (Molprozent) der Inkubationslösung zur Herstellung der AUT/HDT SAMs. je 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ bzw. $K_4[Fe(CN)_6]$; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; System 4; gemessen mit 4 Kanal Potentiostat; $100 \frac{mV}{s}$; Scanbereich $\pm 350 mV$

Die Verbreiterung der CVs treten mit kleiner werdenden Strömen auf. Sie ist deshalb auf eine Verlangsamung der Elektrochemie an den Elektroden zurückzuführen. Ein nicht kompensierter ohmscher Widerstand scheidet als Ursache aus.

Prinzipiell können aus der Verbreiterung der CV Messungen die Reaktionsgeschwindigkeiten an den Elektroden berechnet werden [105]. Mit Hilfe des Matrixarrays konnte jedoch bisher nur diese eine, brauchbare Messung aufgenommen werden. Für eine statistisch abgesicherte Auswertung der Reaktionsgeschwindigkeit fehlen die Messwerte, so dass auf sie verzichtet wurde. Weitere Ausführungen hierzu sind im Kapitel 7 gegeben.

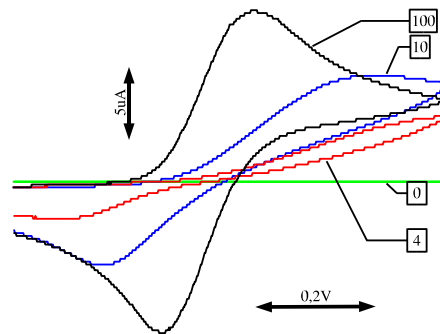


Abbildung 5.19: Einfluss des prozentualen AUT Anteils in einem AUT/HDT SAM auf die CVs von Blutlaugensalz; je 1 mM rotes/gelbes Blutlaugensalz; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; System 4; 4 Kanal Potentiostat; Scanrate = $100 \frac{mV}{s}$; Scanbereich $\pm 350 mV$

5.6 Enzymkatalysierte Sensoren

Unterschiedlich aufgebaute SAMs können als Grundlage für enzymkatalysierte Sensoren dienen. Auf diesen SAMs können die Enzyme verankert werden. Es wurden Versuche unternommen, durch die Wahl einer geeigneten Zusammensetzung der SAMs elektrochemische Störungen durch das Prinzip des *Ion Gatings* von dem Sensor fernzuhalten.

Für die kombinatorischen Untersuchungen wurde ein, in [29] beschriebener Sensor für Fructose verwendet. Die Grundlagen und die zu erwartenden Beeinträchtigungen dieses Sensortypes sind in den Kapiteln 4.5.3 und 5.8 erläutert.

Mit dem in [29] beschriebenen Sensor wurden Messungen bei unterschiedlichen Scanraten sowie Konzentrationen der Fructose in der Pufferlösung durchgeführt. Ausgehend von den Ergebnissen konnten weitere Anforderungen an die Sensormatrix bzw. den Potentiostaten gestellt werden.

Der Einfluss der Scanrate auf die Messung der enzymatischen Aktivität ist in Abbildung 5.20 dargestellt. Die für die spätere Auswertung der Messungen notwendigen Verhältnisse der Peakströme mit und ohne enzymatischer Aktivität, mit und ohne Fructose sind in Tabelle 5.8 angegeben. Hier ist zu erkennen, dass der enzymatische Umsatz besonders deutlich bei langsamen Scanraten in Form eines großen Verhältnisses zwischen Grundstrom und gemessenem Strom zum Vorschein kommt. In diesem Fall kann das oxidierte *Ferrocenylethanol*, es wird als Mediator eingesetzt, mit dem Enzym reagieren. Zu Gunsten einer möglichst großen Empfindlichkeit des Sensors wurden die weiteren Messungen bei langsamen Scanraten von $10 \frac{mV}{s}$ durchgeführt.

Scanrate $\frac{mV}{s}$	$\frac{I}{I_{max}}$
10	6,9
50	3,8
100	3

Tabelle 5.8: Einfluss der Scangeschwindigkeit auf die Empfindlichkeit enzymatischer Fructosesensoren; Verhältnis der Peakströme in Anwesenheit von Fructose mit denen ohne Fructose; System 1

Anhand der Verhältnisse der Peakströme der Oxidationspeaks bei unterschiedlichen Fructosekonzentrationen und denen ohne Fructose konnte die, in Abbildung 5.21 dargestellte Kalibrierfunktion erstellt werden. Die enzymatische Aktivität erreicht, unter den gegebenen Bedingungen, bei einer Konzentration von etwa 5 mM die Sättigung.

Wie bereits erwähnt wurde, läuft an den Sensorelementen, welche sich an den Kreuzungspunkten zwischen der adressierten Gegenelektrode und den

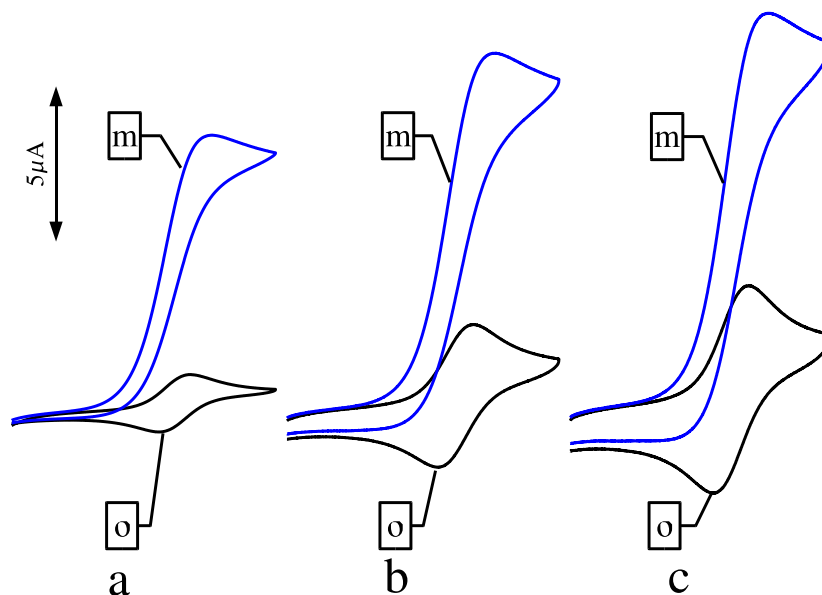


Abbildung 5.20: Einfluss der Scangeschwindigkeit auf die CVs von Ferrocenylethanol in den Fructosesensoren; a) $10 \frac{mV}{s}$; b) $50 \frac{mV}{s}$; c) $100 \frac{mV}{s}$ Messungen m : mit und o : ohne Fructose ; System 1; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5, 0,5 mM *Ferrocenylethanol*; Scanbereich -100 mV bis 400 mV

nicht adressierten Leiterbahnen der Arbeitselektroden befinden, auf Grund des Stromflusses immer eine elektrochemische bzw. in diesem Fall eine enzymatische Reaktion ab. Bei der enzymatischen Umsetzung von Fructose handelt es sich um eine irreversible Reaktion. In diesem Fall scheidet das sequentielle Auslesen der Sensormatrix aus. Der Verbrauch der Fructose an den einzelnen Sensorelementen würde dazu führen, dass das Messergebnis kleiner ausfällt, wenn das Sensorelement adressiert wird und zuvor der entsprechende Strom als parasitärer Strom abgeleitet wurde. Es ist daher eine simultane Messung an allen, einer adressierten Gegen/Referenzelektrode gegenüberliegenden Sensorelementen erforderlich. Dieses wird durch den, in Abschnitt 8.4 vorgestellten Mehrkanalpotentiostaten erreicht. Ein weiterer, positiver Effekt dieser Mehrkanaladressierung ist eine enorme Zeitersparnis bei den Messungen.

Ein weiteres Kriterium bei den enzymkatalysierten Sensoren ist die Haltbarkeit des Enzyms, sowohl bei den Messungen selber, als auch während der Lagerung. Sensoren, bei denen das Enzym in einem ODTNB SAM gemäß [29] immobilisiert wurde, konnten über Wochen hinweg in einem Phosphatpuffer bei pH 4,5 aufbewahrt werden, ohne dass die enzymatische Aktivität merk-

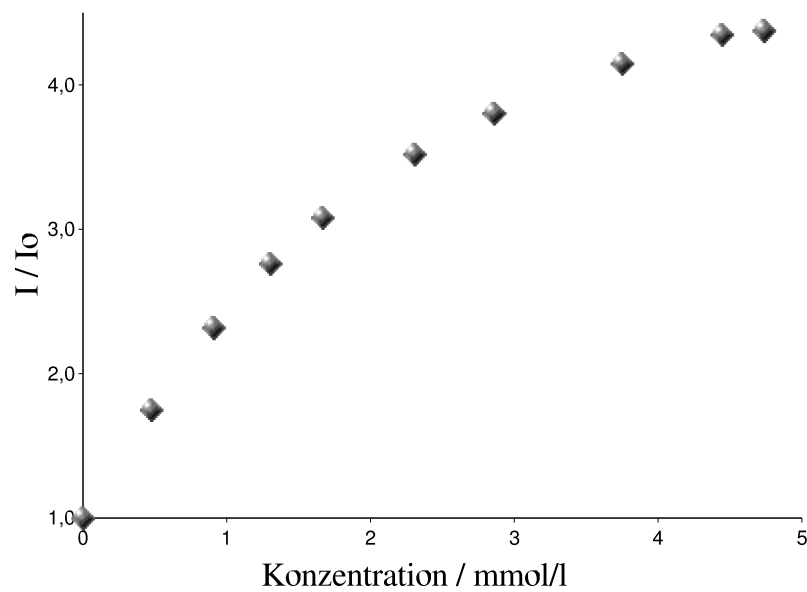


Abbildung 5.21: Verhältnis der Peakströme bei Fructosesensoren in Abhängigkeit der Fructosekonzentration; bezogen auf den Peakstrom I_0 bei 0 mM Fructose; System 1; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5, 0,4 mM *Ferrocenylethanol*, Scanrate $10 \frac{mV}{s}$; Scanbereich -100 mV bis 400 mV

lich gelitten hatte. Wurden diese Elektroden trocken an der Luft gelagert, so war ein rapider Verlust der enzymatischen Aktivität zu verzeichnen.

Diese Alterung ist in Abbildung 5.22 dargestellt. In diesem Fall wurde die Elektrode zwischen den Messungen für jeweils 20 Minuten an der Luft gelagert und danach in einer identischen Fructoselösung gemessen. Es zeigt sich, dass die enzymatische Aktivität etwa alle 20 Minuten auf die Hälfte verringert wurde.

Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die enzymkatalysierten Sensoren als System 4 aufgebaut werden sollten. In den durch Silikonichtungen hergestellten Kapillaren kann über einen nahezu unbegrenzten Zeitraum Pufferlösung gehalten und somit das Enzym stabilisiert werden. Bei dem Dünnschichtaufbau, System 3, tritt das Problem auf, dass die Flüssigkeit über die offenen Seiten der Kapillaren verdunsten kann. Dieses führt dazu, dass innerhalb von wenigen Stunden das Matrixarray ausgetrocknet ist.

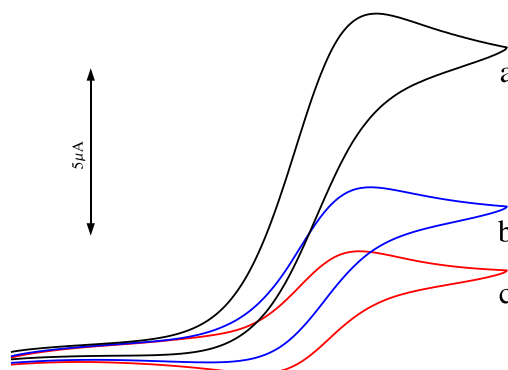


Abbildung 5.22: Verlust der enzymatischen Aktivität des Fructosesensors bei Lagerung an der Luft. a) frisch hergestellt, b) 20 Minuten an der Luft, c) 40 Minuten an der Luft; System 1; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5, 10 mM Fructose, 0,4 mM *Ferrocenylethanol*, Scanrate $10 \frac{mV}{s}$; Scanbereich -100 mV bis 400 mV

5.7 Immobilisierung von FDH auf Goldelektroden

Variation der Konzentration der FDH

Bei den bisher hergestellten FHD modifizierten Sensoren wurden hohe Konzentrationen des Enzyms verwendet. Mit Hilfe des Matrixarrays konnte die Auswirkung unterschiedlicher Konzentration des Enzyms in der Inkubationslösung untersucht werden. Bei diesen Versuchen wurden die einzelnen Sensorelemente in den Mikrogefäßen gemäß [29] mit ODTNB modifiziert. Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte ausgehend von der in [29] beschriebenen Konzentration von $0,74 \frac{\text{Einheiten}}{\mu\text{l}}$. Die Lösung wurde jeweils um den Faktor 2, 4 und 8 verdünnt.

Bei diesen Verdünnungsreihen waren zwei Faktoren von Interesse. Zum einen ist es die Frage, ob die immobilisierte FDH den Zugang des Mediators *Ferrocenylethanol* zur Elektrode beeinträchtigt, zum anderen wie hoch muss die Konzentration des Enzyms in der Lösung sein, damit eine enzymatische

Aktivität auf den Sensoren erkannt werden kann. Dieser Frage wurde nachgegangen, indem das gleiche mit FDH modifizierte Matrixarray in einer reinen Pufferlösung mit *Ferrocenylethanol* als Mediator (Abbildung 5.23) und anschließend in einer zusätzlich Fructose enthaltenden Lösung (Abbildung 5.24) vermessen wurde.

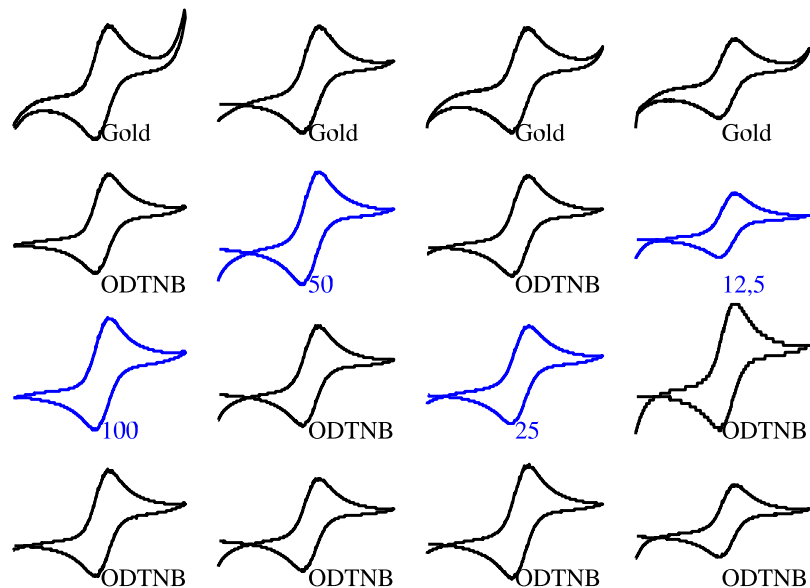


Abbildung 5.23: Variation der FDH Konzentration in der Inkubationslösung auf ODTNB modifizierten Goldelektroden, im Vergleich zu blanken und nur mit ODTNB modifizierten Elektroden. prozentuale Konzentration des Enzyms bezogen auf 0,74 $\frac{\text{Einheiten}}{\mu\text{l}}$ [29]; System 4; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; 0,47 mM Ferrocenylethanol; 0 mM Fructose; Scanrate 10 $\frac{\text{mV}}{\text{s}}$; Scanbereich $\pm 350 \text{ mV}$

Wie aus den Messungen ohne enzymatische Aktivität, Abbildung 5.23, zu erkennen ist, hat die Anwesenheit der FDH keinen erkennbaren Einfluss auf das System Mediator/Elektrode. Die Anwesenheit des Enzyms führt **nicht** zu einer Isolierung der Elektrode. Änderungen der katalytischen Ströme sind somit nur auf die enzymatische Aktivität selber zurückzuführen. Bei Messungen in einer fructosehaltigen Lösung, Abbildung 5.24, tritt hingegen ein deutlicher Einfluss der Konzentration der enzymhaltigen Lösung in Erscheinung. Die Verhältnisse der Peak- bzw. maximalen Ströme der enzymmodifizierten Sensorelemente in Bezug auf die Ströme des nach [29] modifizierten Sensorelementes sind in Tabelle 5.7 zu sehen. Diese Angaben beziehen sich jeweils auf die Differenz zwischen Oxidations- und Reduktionsströme.

Aus den Angaben aus Tabelle 5.7 und der Abbildung 5.24 kann geschlossen werden, dass die Konzentration der enzymhaltigen Inkubationslösung auf

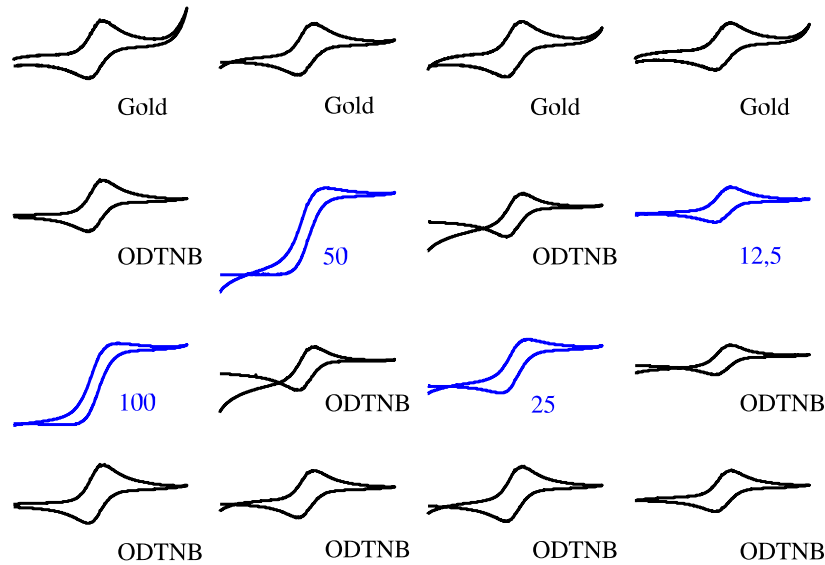


Abbildung 5.24: Variation der FDH Konzentration in der Inkubationslösung auf ODTNB modifizierten Goldelektroden, im Vergleich zu blanken und nur mit ODTNB modifizierten Elektroden. prozentuale Konzentration des Enzyms bezogen auf $0,74 \frac{\text{Einheiten}}{\mu\text{l}}$ [29]; System 4; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; 0,47 mM *Ferrocenylethanol*; 17,7 mM Fructose; Scanrate $10 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$; Scanbereich $\pm 350 \text{ mV}$

die Hälfte der in der [29] angegebenen Konzentration verringert werden kann, ohne dass sich dieses in dem Verhalten des Sensors bemerkbar macht. Wird die Konzentration auf $\frac{1}{4}$ der Originalkonzentration abgesenkt, so ist eine deutliche Verringerung der Stromantwort zu verzeichnen. Das enzymmodifizierte Sensorelement ist von den, nur mit ODTNB modifizierten Elementen zwar nicht mehr durch die Stromwerte der Oxidations- und Reduktionspeaks zu unterscheiden, wohl aber noch durch den qualitativen Verlauf der CVs. Wird die Enzymkonzentration noch weiter verdünnt, auf $\frac{1}{8}$ der Originalkonzentration, so entfällt auch dieses Unterscheidungsmerkmal.

Mit Hilfe des Matrixarrays konnte die, für die Modifikation der Sensorelemente notwendige Enzymmenge optimiert werden. Die Enzymmenge zur Herstellung der Sensoren kann folglich um 50% auf $0,37 \frac{\text{Einheiten}}{\mu\text{l}}$ reduziert werden.

Konzentration des Enzyms / $\frac{\text{Einheiten}}{\mu\text{l}}$	Stromstärke / %
0,74	100
0,37	100
0,185	64
0,0925	41

Tabelle 5.9: Variation der Peakströme mit der FDH Konzentration in der Inkubationslösung. Peakströme bezogen auf die Peakströme bei $0,74 \frac{\text{Einheiten}}{\mu\text{l}}$ Enzym in der Inkubationslösung. System 4; Scanrate $10 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; 0,47 mM *Ferrocenylethanol*; 17,7 mM Fructose

5.8 Interferenzen bei der Fructosebestimmung

Ein Anwendungsbereich für die Fructosesensoren ist z.B. die Analytik von Fruchtsäften. Die Säfte enthalten u.a. Vitamin C als elektrochemisch aktive Substanz. Diese kann die Messungen der enzymatischen Aktivität verfälschen. In Abbildung 5.25 ist ein CV von einem Fruchtsaft ¹, gemessen in System 1 dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, dass im Fruchtsaft elektrochemisch aktive Substanzen vorhanden sind, die potentiell mit der vorgesehenen enzymatischen Bestimmung von Fructose interferieren können.

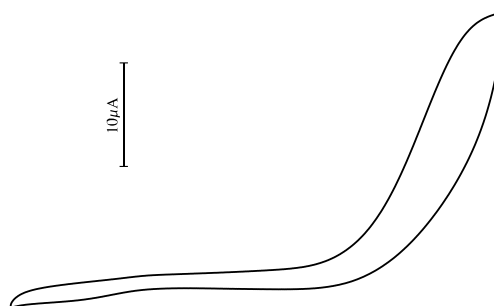


Abbildung 5.25: Fruchtsaft in System 1 gemessen; verdünnt in Phosphatpuffer pH 4,5; Scanbereich -530 mV bis 760 mV; Scanrate $20 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$

Die wichtigste, elektrochemisch aktive Substanz in Fruchtsäften ist das *Vitamin C* [106]. Es zeigt sich (Abbildung 5.26), dass das *Vitamin C* die Bestimmung der Fructosekonzentration stark beeinflussen kann.

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, dass das *Vitamin C* von dem Sensorelement ferngehalten werden muss. Dieses soll durch einen geeigneten SAM auf der Sensoroberfläche erreicht werden. Das *Vitamin C* weist einen pKs der ersten Deprotonierung von 4,2 auf. In einem Puffersystem mit einem pH von 4,5 ist es bereits zu 66% deprotoniert und weist somit eine mehrheitlich

¹hohes C Roter Multivitaminensaft ; Eckes Granini

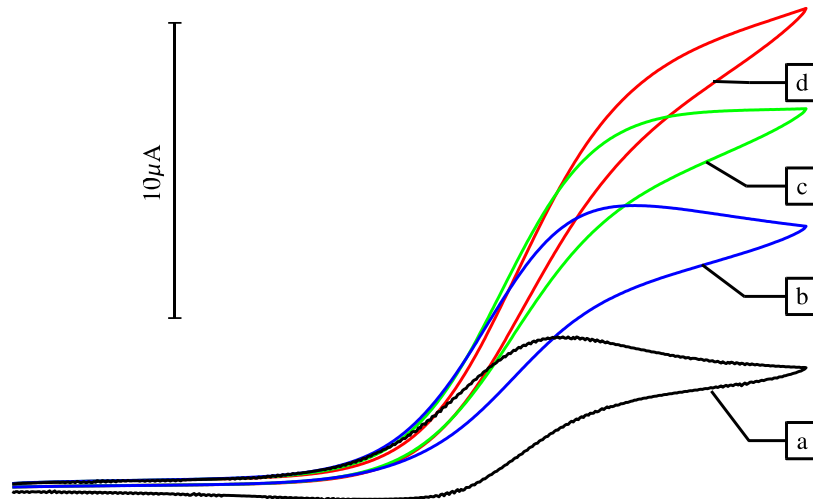


Abbildung 5.26: Beeinflussung der elektrochemisch katalysierten, enzymatischen Fructosebestimmung durch *Vitamin C*; System 1; 1 mM Fructose; 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5; 3 M KCl Ag/AgCl Referenzelektrode, Scanrate $20 \frac{mV}{s}$, *Vitamin C* Konzentrationen: a) 0 mM, b) 0,37 mM, c) 1 mM, d) 2,22 mM; Scanrate $20 \frac{mV}{s}$; Scanbereich -100 mV bis 400 mV

negative Ladung auf. Hiermit sind die Voraussetzungen für das, im Kapitel 4.3.1 beschriebene *Ion Gating* gegeben; ein negativ geladener SAM stößt das ebenfalls negativ geladene *Vitamin C* ab.

Das bisher für die Herstellung der FDH Elektroden verwendete ODTNB weist bereits eine, bei pH 4,5 negativ geladene funktionelle Gruppe auf. Diese Carboxygruppe ist jedoch lediglich durch einen, als *Abstandshalter* fungierenden Benzolring von der Oberfläche der Elektrode entfernt. Auf Grund des geringen Abstandes kommt es trotzdem zu einer Oxidation des *Vitamin C*.

Um eine effektive elektrostatische Abstoßung des *Vitamin C* zu erreichen, wurde ein gemischter SAM in Betracht gezogen. Dieser gemischte SAM sollte so beschaffen sein, dass das *Vitamin C* so weit wie möglich von der Elektrode ferngehalten wird, wohingegen die elektrochemischen Reaktionen mit dem *Ferrocenylethanol* nicht beeinträchtigt werden sollten. Als SAM wurde eine Mischung aus dem, für die Immobilisation der FDH bewährten ODTNB und der langkettigen *MHA* verwendet.

Zum Studium des Einflusses der Zusammensetzung des SAMs wurden zwei identische Gradienten auf den Sensorelementen des Matrixarrays inkubiert. Es wurden dann zeitgleich Messungen mit einem *Ferrocenylethanol* und

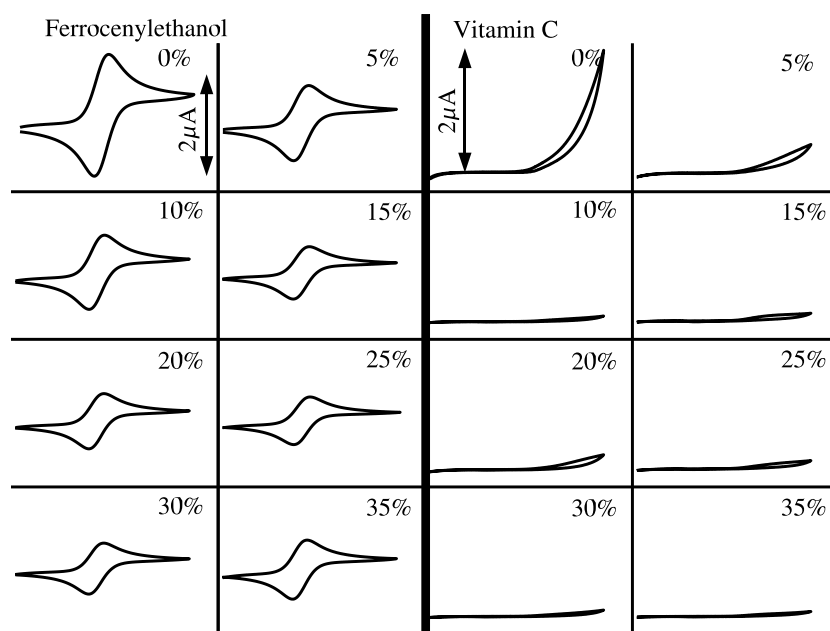


Abbildung 5.27: Isolation der Elektrode durch einen gemischten SAM aus *ODTNB* und *MHA* gegenüber *Ferrocenylethanol* und *Vitamin C*. prozentualer Anteil der *MHA* in der Inkubationslösung; System 4; Scanrate $20 \frac{mV}{s}$; Scanbereich -300 mV bis 400 mV

Vitamin C haltigen Phosphatpuffer durchgeführt. Aus den Messergebnissen (Abbildung 5.27) lässt sich erkennen, dass bereits ein Anteil von 10% *MHA* (Molprozent) in der Inkubationslösung ausreicht, um die Stromantwort des *Vitamin C* auf 10% des ursprünglichen Wertes absinken zu lassen. Die Stromantwort des *Ferrocenylethanol* beträgt bei dieser Zusammensetzung noch 60%.

Wie auch bei den Messungen an einem Drei-Elektrodensystem (Abbildungen 5.20 und 5.25) zeigte sich an dem Zwei-Elektrodensystem des Matrixarrays (Abbildung 5.27), dass die elektrochemische Oxidation des *Vitamin C* und des *Ferrocenylethanol* bei stark unterschiedlichen Potentialen auftreten. Eigentlich sollten hier keine Interferenzen zu erwarten sein. Es ist somit davon auszugehen, dass es zu einer Elektrokatalyse zwischen dem *Ferrocenylethanol* und dem *Vitamin C* kommt (Abbildung 5.26). Von einer derartigen Redox Reaktion wird an immobilisierten Ferrocenderivaten berichtet [107]. Diese treten in der Elektrolytlösung, außerhalb der elektrostatischen Reichweite der *MHA* auf. In Verbindung mit dem frei in der Elektrolytlösung diffundierenden Mediators *Ferrocenylethanol* ist die in Abbildung 5.27 gezeigte Schutzwirkung des Gemischten SAMs aus *ODTNB* und *MHA* wirkungslos.

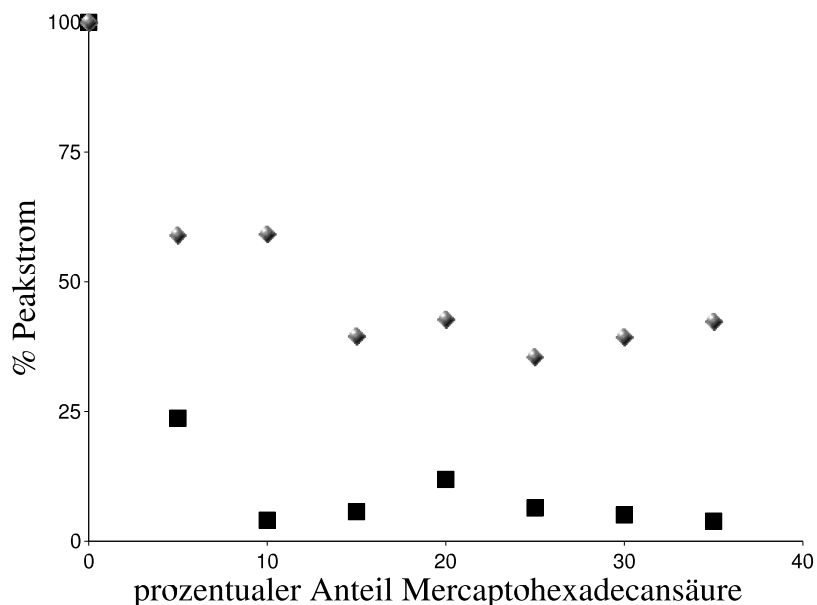


Abbildung 5.28: Peakstrom von ◆ *Ferrocenylethanol*, und ■ *Vitamin C* in Prozent als Funktion des MHA-Gehaltes in der Inkubationslösung (Molprozent). 100% = Peakstrom an einer ODTNB modifizierten Elektrode; Messbedingungen siehe Abbildung 5.27

5.9 Immobilisierung von Ferrocenderivaten auf einer Elektrodenoberfläche

Der in Kapitel 5.8 beschriebene SAM kann in einem enzymkatalysierten Sensor für Fructose nur dann die elektrokatalytische Oxidation von *Vitamin C* unterdrücken, wenn der Mediator nicht mit dem Vitamin C in Kontakt kommt. Diese Anforderung ist bei einem frei in der Probenflüssigkeit diffundierenden Mediator nicht zu erfüllen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Mediator als oberflächengebundene Substanz mit in die SAM integriert wird. Neben der erhofften Unterdrückung der Interferenzen durch das Vitamin C könnte dadurch auch ein reagenzloser Sensor realisiert werden, d.h. es bräuchte der Analytflüssigkeit, z.B. einem Fruchtsaft keine Mediatorlösung mehr zugesetzt zu werden.

In Anlehnung an eine, in [109–111] beschriebene Immobilisierung von Proteinen wurde ein Ferrocenderivat (Abbildung 5.29), welches zwei Aminogruppen aufwies, mit *Glutaraldehyd* zum einen quervernetzt, zum anderen an einen aus AUT und Ethanthiol bestehenden SAM angebunden. Hierbei ist davon auszugehen, dass das Polymer aus Ferrocenderivaten umso fester und dauerhafter an den SAM auf dem Sensorelement gebunden wird, je höher der AUT Anteil ist. Dem zu erwartenden Zuwachs an Stabilität steht jedoch die Tatsache entgegen, dass das AUT gegenüber den Ferrocenderivaten als Isolator auftritt, wie dieses in Kapitel 5.5 beschrieben wurde.

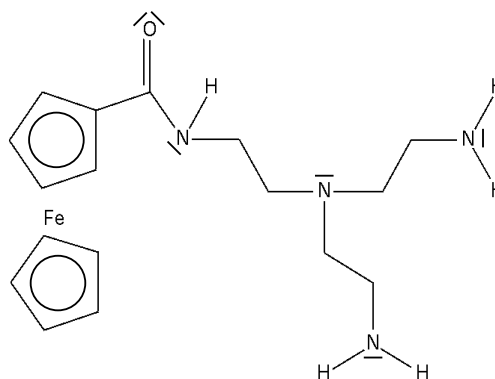


Abbildung 5.29: Ferrocenderivat mit Aminogruppen [108]

Elektrochemische Messungen mit den modifizierten Elektroden zeigten, dass es möglich ist, das Ferrocenderivat (Abbildung 5.29) auf die Oberfläche einer Elektrode zu binden. Bei mehreren hintereinander durchgeführten Messungen mit dieser Elektrode zeigte sich jedoch, dass die Stromantworten von Messung zu Messung abnahmen. Hierfür wurden zwei Ursachen in Betracht gezogen. Zum einen ist es denkbar, dass der SAM einschließlich dem darauf aufgebauten Polymer aus *Glutaraldehyd* und dem Ferrocenderivat thermisch instabil ist, vergleichbar mit den reinen AUT SAMs. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich Teile des Ferrocenderivat-Glutaraldehyd Polymeres von der Elektrode ablösen und somit die elektrochemisch aktive Masse an der Elektrode verringert wird.

Einen Aufschluss über diese beiden Möglichkeiten ergaben Messungen an dem Matrixarray. Bei diesen Messungen wurden unterschiedlich zusammengesetzt SAMs aus *Ethanthiol* und AUT als Grundlage für die weitere Modifikation verwendet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abbildungen 5.30 und 5.31 dargestellt. Die in diesen Abbildungen erwähnten Goldelektroden wurden weder mit SAMs noch mit Ferrocenderivaten oder *Glutaraldehyd* behandelt.

Das zu erwartende Maximum der Stromantwort ist in der Abbildung 5.30 bei einem Anteil von 10% AUT (Molprozent) zu erkennen. Wie auch bei den in Kapitel 5.5 beschriebenen Versuchen handelt es sich bei den Prozentangaben um den Anteil des AUT in der Inkubationslösung, aus der die SAMs hergestellt werden. Es fällt auf, dass die nicht modifizierten Elektroden die geringsten Stromantworten lieferten. An diesen Elektroden sollten eigentlich überhaupt keine Ströme auftreten. Auf Grund der wenig reproduzierbaren

Messungen (Abbildung 5.30) wurde auf eine Bestimmung der Oberflächenkonzentration verzichtet.

Diese Sensorelemente wurden im System 4 vermessen. Die einzelnen Kammern wurden so mit der Elektrolytlösung befüllt, dass diese zuerst über die modifizierten Sensorelemente fließen musste. Es ist denkbar, dass das Polymere aus Ferrocenyl-Glutaraldehyd von diesen Sensorelementen desorbiert worden sind und sich auf den bisher freien Goldelektroden abgeschieden haben. Bei den in Abbildung 5.31 dargestellten Messungen handelt es sich um das selbe Matrixarray mit dem auch die in Abbildung 5.30 dargestellten Messungen erzielt wurden. Bei dem gealterten Matrixarray sind keine Unterschiede zwischen den ursprünglich unterschiedlichen Sensorelementen zu erkennen; die Stromantworten auf den ursprünglich nicht behandelten Sensorelementen haben zugenommen, wohingegen die der ursprünglich optimal modifizierten Elemente abgenommen haben.

Die Immobilisierung der Ferrocenderivate mit *Glutaraldehyd* ist eventuell zur Herstellung von reagenzlosen Sensoren für kurzzeitige Anwendungen, z.B. Einwegprodukte geeignet. Für das in dieser Arbeit vorgestellte Matrixarray scheidet diese Methode jedoch aus. Zum einen ist es die fehlende Langzeitstabilität der Modifikation, vor allem aber die Desorptions- und Re-Adsorptionseigenschaften, die auf alle benachbarten Sensorelemente eine identische Stromantwort hervorrufen. Auch wenn diese Modifikation nicht für einen dauerhaften Einsatz in Sensorarrays geeignet ist, so konnte jedoch der Effekt der Adsorption und Desorption, durch mehrere aufeinander folgenden Messungen, nachgewiesen werden.

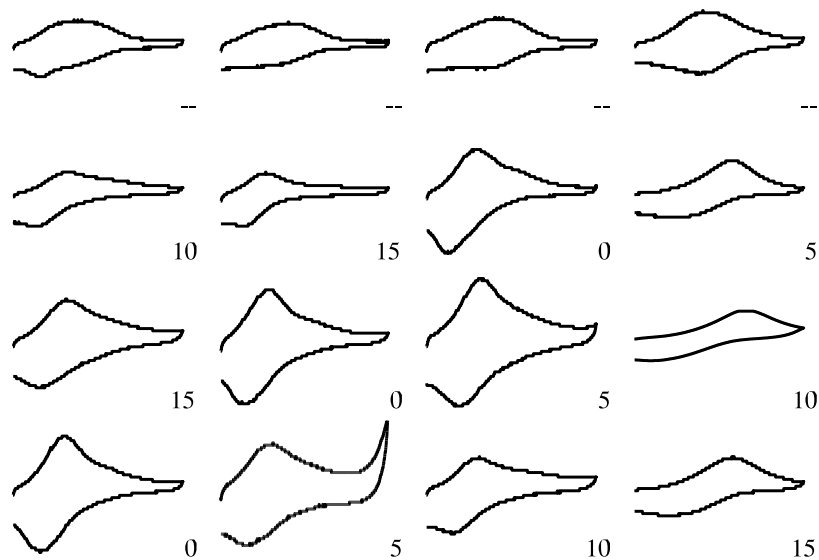


Abbildung 5.30: Ferrocenderivat (Abb 5.29) mit *Glutaraldehyd* auf einen SAM aus Ethan- und Aminoundecanethiol immobilisiert, prozentualer Anteil des *Aminoundecanethiols* in der Inkubationslösung, erste Messung, – freie Goldelektrode, System 4, 100 mM Phosphatpuffer pH 4,5, Scanrate $500 \frac{mV}{s}$, Scanbereich -500 mV bis 350 mV

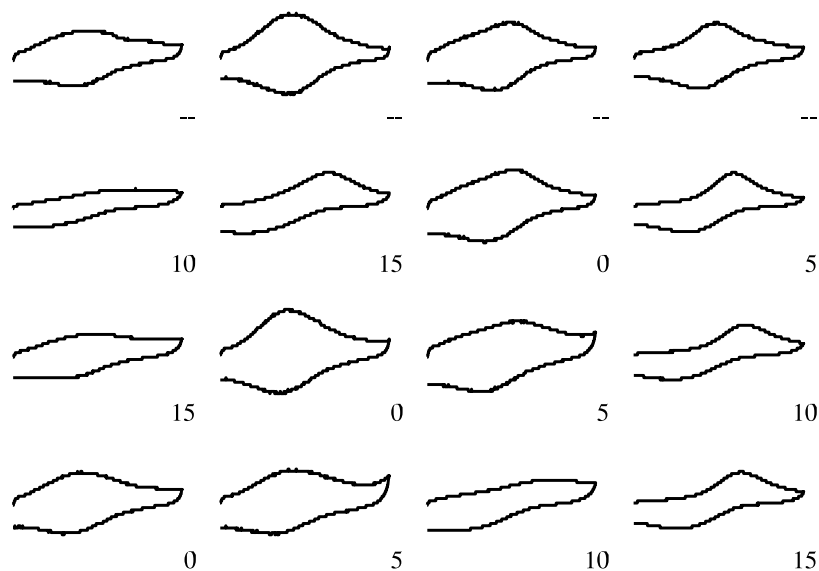


Abbildung 5.31: Ferrocenderivat (Abb 5.29) mit *Glutaraldehyd* auf einen SAM aus Ethan- und Aminoundecanethiol immobilisiert - spätere Messung; Bedingungen siehe Abbildung 5.30

Kapitel 6

Schlussfolgerung

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein einfach gestaltetes, passives Matrixarray für kombinatorische, elektrochemische Versuche verwendet werden kann.

Die erforderliche Unterteilung des Elektrolyten in einzelne, parallel zu den Gegenelektroden verlaufenden Abschnitte, kann durch eine hydrophile/hydrophobe Strukturierung der Platten, oder durch eine mechanische Abtrennung der einzelnen Bereiche erreicht werden. Im ersten Fall beträgt der Abstand zwischen den Elektrodenplatten $200\mu\text{m}$, was eine Befüllung der einzelnen Bereiche durch Kapillarkräfte, dem *Sip In* ermöglicht. Zu Gunsten einer höheren Betriebssicherheit ist jedoch eine mechanische Abtrennung des Elektrolyten in einzelne Kompartimente vorzuziehen. Bei der Verwendung von dickeren Dichtungen ist kein *Sip In* mehr möglich, der Elektrolyt muss in die einzelnen Kammern eingespritzt werden.

Die Adressierung des Matrixarrays kann bereits mit einem gewöhnlichen Potentiostaten und einem sehr einfach aufzubauenden Potentialfolger in Verbindung mit zwei Mehrfach-Schaltern bewerkstelligt werden. Hierdurch ist nur eine sequentielle Messung der einzelnen Sensorelemente möglich. Die Verwendung eines Mehrkanalpotentiostaten, mit dem zeitgleich alle Leiterbahnen der Arbeitselektroden vermessen werden können, ist zur Reduktion der Messzeit empfehlenswert, bzw. bei irreversiblen Reaktionen, z.B. enzymatische Reaktionen zwingend erforderlich.

Durch den einfachen und räumlich begrenzten Sensoraufbau bedingt muss ein Zwei-Elektrodensystem verwendet werden. Die normalerweise mit einem Zwei-Elektrodensystem verbundenen Nachteile einer sehr langsam erscheinenden Elektrochemie können durch eine, auf der Gegenelektrode befindlichen Preußisch Blau (PB) Schicht beseitigt werden. Durch die elektrochemischen Eigenschaften des PB weist die modifizierte Gegenelektrode Eigenschaften einer Referenzelektrode auf. Es ist somit möglich, die Messungen in

dem Matrixarray unter Bedingungen durchzuführen, die denen eines Drei-Elektrodensystems sehr nahe kommen.

Dieses System ist ein leistungsfähiges, robustes Werkzeug für die elektrochemische Charakterisierung eines kombinatorischen Ansatzes zur Modifikation von Elektroden. Es eignet sich für den Aufbau von Sensorarrays mittlerer Größe und kann selbst in geringen Stückzahlen, ohne besondere technische Anforderungen preiswert hergestellt werden.

Kapitel 7

Ausblicke

Weitere Schwerpunkte in der weiteren Entwicklung dieses Sensorsystems sind die Verbesserung der mechanischen Ausführung des Aufbaus sowie eine ausführlichere Validierung der mit diesem Array erzielbaren Resultate.

Die mechanische Ausführung zeigt teilweise Schwächen, insbesondere was das selbstständige Einziehen des Analyten, System 3, in die Kapillaren betrifft. Die mechanische Unterteilung des Elektrolyten garantierte zwar eine 100% Abtrennung der einzelnen Kompartimente voneinander, dieser Vorteil wurde jedoch mit dem Verlust des automatischen Einziehens des Elektrolyten in die einzelnen Kapillaren erkauft. Einzelne, $100\ \mu\text{m}$ bis $200\ \mu\text{m}$ dicke Dichtungen, die ein *Sip In* ermöglichen würden, sind mechanisch nicht mehr handhabbar. Die Dichtungsmaterialien müssten direkt auf den Platten der Gegenelektroden aufgebracht werden, wobei zu bedenken ist, dass die Dichtungsmaterialien auch tragende Funktionen des Matrixsystems übernehmen.

Eine mögliche zukünftige Konstruktion ist in Abbildung 7.1 dargestellt. In der Trägerplatte für die Gegen/Referenzelektroden befinden sich $200\ \mu\text{m}$ tiefe Kanäle. In diesen Kanälen befinden sich die Leiterbahnen der Gegenelektroden, auf denen z.B. PB als hydrophiles Material für die Gegen/Referenzelektrode aufgebracht werden kann. Auf den restlichen Stellen des Elektrodenträgers ist eine dünne Schicht des Dichtungsmaterials aufgebracht. Auf diesen Träger wird, wie bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Matrixaufbau der Träger mit den Arbeitselektroden gelegt und angedrückt. In die resultierende Kapillare mit einer Höhe von $200\ \mu\text{m}$ kann die Probenflüssigkeit über Kapillarkräfte eingefüllt und gehalten werden.

Bei Verwendung dieses Trägers könnte erneut eine, auf Kapillarkräften basierende Abdichtung in Betracht gezogen werden. Wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben wurde, nimmt der kapillare Druck mit abnehmendem Durchmesser bzw. abnehmender Dicke der Kapillare zu. Mit dem in Abbildung 7.1 skizzierten Träger für die Gegen/Referenzelektroden können die hydrophob

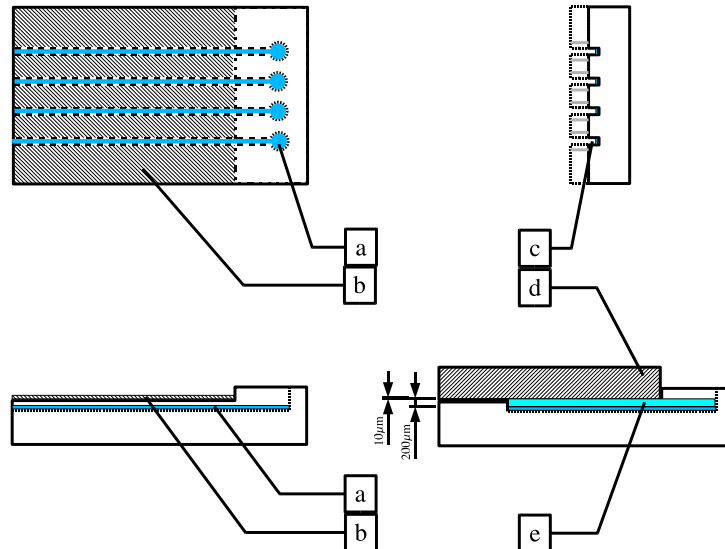


Abbildung 7.1: Entwurf der nächsten Generation der Matrixarrays; Stege mit der Dichtung bzw. hydrophober Modifikation sind in dem Träger der Gegen/Referenzelektrode integriert; a) Leiterbahn/PB; b) Dichtungsmaterial bzw. hydrophobe Beschichtung; c) 200 μm tiefe Kanäle; d) Trägerplatte der Arbeitselektroden; e) Flüssigkeit in den Kapillaren

modifizierten Bereiche so gefertigt werden, dass die resultierenden Kapillaren an den Kontaktstellen der Trägersubstrate von Arbeits- und Gegenelektroden nur eine Dicke von wenigen μm aufweisen. Diese Bereiche sind auf Grund des wesentlich höheren Kapillardruckes nun deutlich besser vor einem Durchbruch der Flüssigkeit geschützt, als dieses bei dem bisher verwendeten System mit einem einheitlichen Abstand von 200 μm der Fall ist.

Mit den hier skizzierten Ansätzen ist zu erwarten, dass das Sensorarray ohne Probleme mit der Analytflüssigkeit gefüllt werden kann.

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Validierung dieses Systems. Hierbei sind vor allem vergleichende Messungen mit den etablierten Drei Elektrodensystem durchzuführen. Ein solches Problem wurde bereits in Kapitel 5.5 bei der quantitativen Ermittlung der Geschwindigkeit des Elektronentransfers erwähnt. Es gibt zwar Hinweise darauf, dass sich die Elektrochemie durch den Einsatz einer kombinierten Gegen/Referenzelektrode ähnlich wie in einem Drei Elektrodensystem verhält, ob dieses jedoch zuverlässige quantitative Aussagen über z.B. Reaktionsgeschwindigkeiten gestattet, ist damit jedoch noch längst nicht gesichert.

Kapitel 8

Durchführung der Versuche

8.1 Mikrofluidik

8.1.1 Messung der Kontaktwinkel

Gemäß der folgenden Vorgehensweise wurden die statischen Kontaktwinkel von Wasser auf den modifizierten Oberflächen bestimmt.

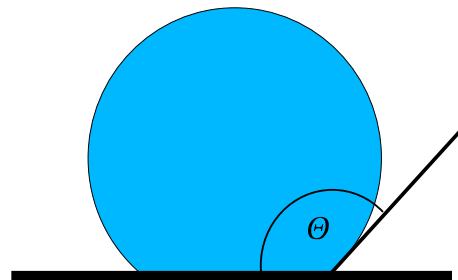


Abbildung 8.1: Ermittlung der Kontaktwinkel. hier 130°

- Die Substrate wurden bei 70°C in einem Trockenschrank getrocknet. Die Substrate wurden vor der Messung an Raumluft auf Raumtemperatur abgekühlt.
- Auf die Substrate wurden mit Hilfe einer Pipette $2\mu\text{l}$ destilliertes Wasser aufgetragen.
- Die Glasplatten wurden waagrecht vor eine Lampe gelegt und mit

Hilfe einer Kamera ¹ mit geeignetem Makroobjektiv ² gegen das Licht fotografiert.

- Die Kontaktwinkel wurden mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogrammes ³ bestimmt. Dazu wurden die Kontaktwinkel sowohl auf der linken, als auch auf der rechten Seite des Tropfen durch Anlegen von Tangenten gemäß Abbildung 8.1 bestimmt. Der angegebene Kontaktwinkel entspricht dem Mittelwert der Messungen von 5 Tropfen.

Die Langzeitstabilität der Modifikationen der Gläser wurde sowohl unter Raumluft, als auch unter Argon ermittelt. Die Kontaktwinkel wurden jeden Tag ermittelt und die Platten unmittelbar danach unter den, für den Versuch vorgesehenen Gasen gelagert. Als Vergleichsprobe wurde eine frisch gereinigte Glasplatte verwendet.

8.1.2 Einziehen von Flüssigkeiten in Kapillaren

Die Kapillarkräfte zum Befüllen der Sensormatrix wurden während der Erprobung der Modifikation der Glasflächen mit Hilfe von zwei hydrophob strukturierten Glasplatten untersucht.

- Zwei Lagen Klebeband ⁴ wurden parallel zu den hydrophilen Streifen auf eine der Platten aufgeklebt, im Falle der Sensormatrix parallel zu den Preußisch Blau Elektroden. Hierdurch wurde ein Plattenabstand von $200\mu\text{m}$ gewährleistet.
- Die Platten wurden so übereinander gelegt, dass sich die hydrophilen und hydrophoben Stellen direkt gegenüber lagen.
- Die Platten wurden mit Hilfe von Klammer zusammengedrückt. Die Klammern wurden so auf die Platten gesetzt, dass sie auf die Stellen drückten, unter denen sich die Klebestreifen befanden.
- Die Steighöhe des Wassers in den Kapillaren wurden ermittelt, indem die zusammengesetzten Platten senkrecht in ein, mit destilliertem Wasser gefülltes Becherglas 1 cm bis 2 cm tief eingetaucht wurden.

¹Pentax *istD*

²Tokina AT-X Makro 90mm, Tokina AT-X Macro Extender, Kenko 2X KAX Teleplus MC7

³GIMP : Gnu Image Manipulating Program

⁴Tesafilm; Henkel

- Für die Sensoranwendung wurden die Kapillaren gefüllt, indem etwas Flüssigkeit mit Hilfe einer Pipette auf die Kapillaren gegeben wurde. Es wurde nur so viel Flüssigkeit in die Öffnungen der Kapillaren gegeben, bis diese gerade gefüllt waren.

8.2 Unterteilung des Elektrolyten mit Hilfe von Silikondichtungen

Die Unterteilung des Elektrolyten durch eine mechanische Abtrennung, einer nach Kapitel 8.3.6 hergestellten Silikondichtung wurde beim Zusammenbau des Matrixarrays verwendet, wenn auf eine Modifikation der Oberflächen verzichtet werden sollte.

- Die Gegen/Referenzelektrode wurde in die in Abbildung 9.6 dargestellte Presse gelegt.
- Die in Kapitel 8.3.6 beschriebene Silikondichtung wurde so auf die Gegen/Referenzelektrode gelegt, dass sich die Kapillaren direkt auf den Preußisch Blau Streifen befanden.
- Die Arbeitselektrode wurde auf die Dichtung gelegt. Die Sensorelemente befanden sich dabei über den Kapillaren.
- Der Aufbau wurde mit der Presse unter Verwendung der Andruckplatte zusammengepresst.
- Zwei Nadeln wurden auf den gegenüber liegenden Seiten durch das Dichtungsmaterial gestochen. Das Matrixarray wurde schräg gehalten. Durch die unten liegende Nadel wurde die Flüssigkeit in die Kammern eingespritzt. Die Luft konnte durch die obere Nadel entweichen.

Die Abstandsbolzen der Presse garantierten einen reproduzierbaren Anpressdruck. Die Bolzen waren so bemessen, dass der Aufbau Platte - Dichtung - Platte so weit zusammengedrückt wurde, dass die einzelnen Bereiche gerade abgedichtet waren.

8.3 Oberflächenmodifikation

8.3.1 Chemische Reaktion zur Oberflächenmodifikation

Behandlung der Oberfläche des Glases mit Silanen

Durch die Behandlung mit fluorierten Silanen wurden die Glasplatten hydrophobisiert. Die im folgenden beschriebene Vorgehensweise ist für die Behandlung der reinen Glasplatten, als auch für die Silanisierung von, mit Fotolack strukturierten Glasplatten identisch.

Behandlung mit *Perfluordecylmethylsilanen*:

- Für die Silanisierung wurden frisch gereinigte Elektroden, siehe Abschnitt 8.3.7, verwendet.
- Für die Silanisierung mit *Perfluordecylmethylsilanen* wurde eine 2 mM Lösung aus *1H, 1H, 2H, 2H Perfluordecylmethyldichlorsilan* (PFS2) ⁵, *1H, 1H, 2H, 2H Perfluordecyldimethylchlorsilan* (PFS1) bzw. *1H, 1H, 2H, 2H Perfluordecylmethyltrichlorsilan* (PFS3) ⁶ in Isooctan ⁷ auf die Glasplatte gegeben. Eine weitere Glasplatte wurde mit der zu modifizierenden Seite so auf die untere Platte gelegt, dass sich ein Flüssigkeitsfilm zwischen den beiden Platten bildete.
- Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurden die Glasplatten zuerst mit Isooctan und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen.

Behandlung mit *Dimethyldichlorsilan* ⁸

- Für die Silanisierung wurden frisch gereinigte Platten, siehe Abschnitt 8.3.7, verwendet.
- Für die Silanisierung mit *Dimethyldichlorsilan* wurden $100 \frac{\mu\text{l}}{\text{cm}^2}$ der Lösung auf die Glasplatte gegeben. Die Reaktion ist dann beendet, wenn das Lösungsmittel verdunstet ist.

Sollten Glasplatten mit hydrophoben Stellen strukturiert werden, so wurden mit Fotolack strukturierte Platten, siehe Abschnitt 8.3.5, verwendet.

⁵Alfa Aesar

⁶Lancaster

⁷Merck

⁸2% *Dimethyldichlorsilan* in *1,1,1 Trichlorethan*; LKB Produkter AB, Bromma, Schweden

Der Fotolack wurde nach der Silanisierung mit Aceton im Ultraschallbad entfernt. Die Platten wurden mit reinem Aceton und destilliertem Wasser abgewaschen.

Elektrosynthese von Preußisch Blau auf Elektroden

Für die Synthese von Preußisch Blau (PB) wurden zwei unterschiedliche Syntheseverfahren verwendet. Es wurde die Synthese bei einer konstanten Stromdichte gemäß [65, 100] und mit Hilfe von repetitive Cyclovoltammetrie miteinander verglichen.

Synthese von PB bei konstanter Stromdichte

- Es wurde eine Lösung mit jeweils 2 mM $FeCl_3$ ⁹, $K_3[Fe(CN_6)]$ ¹⁰ und 10 mM HCl ¹¹ angesetzt.
- In einem Becherglas wurden die frisch strukturierten und gereinigten Gold- bzw. ITO Elektroden parallel zu einer gleich großen Gegenelektrode aus Edelstahl angeordnet. Die Syntheselösung wurde hinzu gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers kontinuierlich gerührt.
- Das PB wurde bei einer Stromdichte von $-20 \frac{\mu A}{cm^2}$ über einen Zeitraum von 1000 Sekunden abgeschieden.

Synthese von Preußisch Blau durch repetitive CV Scans

- Es wurde eine Lösung mit jeweils 2 mM $FeCl_3$, $K_3[Fe(CN_6)]$ und 100 mM KCl ¹² angesetzt.
- In einem Becherglas wurden die frisch strukturierten und gereinigten Gold- bzw. ITO Elektroden parallel zu einer gleichgroßen Gegenelektrode aus Edelstahl angeordnet. Die angesetzte Lösung wurde hinzu gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers kontinuierlich gerührt.
- Die Synthese vom PB erfolgte durch 20 CV Scans von 0V bis 500 mV bei einer Scanrate von $50 \frac{mV}{s}$ in Bezug auf eine Silber/Silberchloridelektrode (3 M KCl).

Die PB Elektroden wurden nach der Synthese konditioniert und vermessen (Abbildung 8.2).

⁹Fluka

¹⁰Fluka

¹¹Fluka

¹²Merck

Konditionieren der PB Elektroden

- Die PB Elektrode wurde durch CV Messungen in einer 100mM *KCl* Lösung, pH 3-4 konditioniert. Es wurden gegen eine Silber/Silberchlorid Gegenelektrode (3M *KCl*) 20 Scans von 0V bis 400 mV bei einer Scanrate von $2 \frac{mV}{s}$ gefahren. Die Gegenelektrode bestand aus Edelstahl und wies die gleiche Größe wie die Platte der PB Gegen/Referenzelektroden auf. Die Kapazität der PB Elektroden wurde aus dem letzten Scan ermittelt. Das Potential ΔE^o wurde als der Mittelwert der Potentiale der Oxiadtions- und Reduktinospeaks berechnet.
- Die PB Elektroden wurden für 600 Sekunden bei ΔE^o konditioniert
- Kolloidales PB, welches sich auf den hydrophilisierten Stellen der Platten abgesetzt hatte, wurde mit einem Wattestäbchen abgewischt.

Die bei einer konstante Stromstärke synthetisierten PB Elektroden wiesen eine Kapazität von etwa $8 \frac{mC}{cm^2}$ auf.

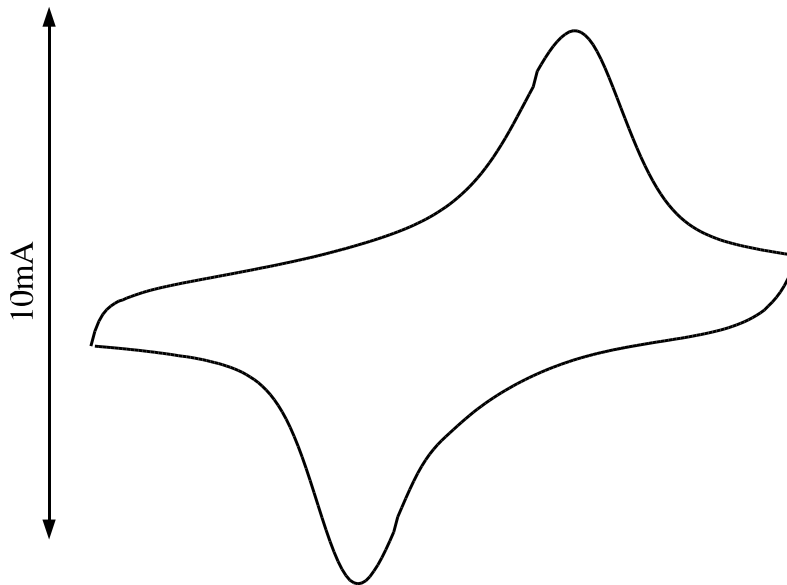


Abbildung 8.2: CV einer PB Elektrode nach dem Konditionieren in 100 mM *KCl* pH 4,5; $A = 8cm^2$; Scanbereich 0mV bis 350 mV; Ref 3M *KCl* Ag/AgCl, GE Edelstahl; Scanrate $10 \frac{mV}{s}$

Synthese von Polypyrrol auf Elektroden

Das Polypyrrol wurde aus wässriger Lösung auf Goldelektroden abgeschieden.

- Die Goldelektroden wurden gemäß Kapitel 8.3.7 gereinigt.
- Die Syntheselösung, bestehend aus 50 mM Pyrrol¹³ und 200 mM *KCl*¹⁴, wurde mit Stickstoff oder Argon entgast.
- Die Elektroden wurden in einem Becherglas parallel zu einer großflächigen Elektrode aus Edelstahl angeordnet.
- Die Synthese von Polypyrrol wurde gemäß [9,67] bei einem konstanten Potential von 0.8V gegen eine *Ag/AgCl* Referenzelektrode (3 M *KCl*) durchgeführt
- Die Elektroden wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen

Die Polypyrrol Elektroden sind selbst nicht elektrochemisch aktiv. Sie stellen jedoch eine sehr große elektrische Kapazität dar (Abbildung 5.5).

Immobilisierung von Enzymen

Die Immobilisierung von membrangebundenen Enzymen (Fructosedehydrogenase) wurde gemäß folgender Vorschrift [29] durchgeführt:

- Stammlösung des Enzyms
 - 1 mg FDH¹⁵ wurde in einer Mischung aus 50 μ l 100 mM Phosphatpuffer¹⁶, pH 4,5 und 50 μ l Glycerin gelöst.
- Reinigen und vorbehandeln der Makroelektroden
 - Polieren der Goldelektroden auf Aluminiumoxid¹⁷
 - Reinigen im Ultraschall in destilliertem Wasser über 10 Minuten
 - Elektrochemisches Oxidieren der Goldelektrode in 100 mM H_2SO_4 ¹⁸ über 5 Sekunden bei +2V

¹³Fluka

¹⁴Merck

¹⁵Sigma

¹⁶Riedel de Haën

¹⁷Metrohm

¹⁸Fluka

- Elektrochemisches Reduzieren in 100 mM H_2SO_4 über 10 Sekunden bei -0,35V
- Aktivieren der Oberfläche durch CV Messungen in 100 mM H_2SO_4 von -0,35 V bis 1,5 V bei $4 \frac{V}{s}$ über einen Zeitraum von 1 Minute
- CV Messung bei $100 \frac{mV}{s}$ unter den oben angegebenen Bedingungen, jedoch nur ein Scan
- Immobilisierung der Thiole
 - Inkubieren der gereinigten Elektroden über 3 Stunden bei Raumtemperatur in einer 10 mM ethanolischen Lösung von ODTNB¹⁹
 - Die Elektrode wurde mit Ethanol, Wasser und anschließend mit 100 mM Phosphatpuffer mit pH 7 abgewaschen
- Immobilisieren des Enzyms
 - 10 μl der FDH Stammlösung mit 10 μl des 100 mM Phosphatpuffers pH 4,5 mischen
 - Inkubation der mit ODTNB modifizierten Elektroden über 1 Stunde bei 4°C
 - Abwaschen mit 100 mM Phosphatpuffer
- Messlösung
 - Eine Lösung aus 100 mM *Hydroxymethylferrocen*, 100 mM Phosphatpuffer und 10 mM Fructose wurde mit Argon entgast
- Es wurden CVs in einem Bereich von -0,1 V bis 0,4 V mit einer Scanrate von $3 \frac{mV}{s}$ in Bezug auf eine *Ag/AgCl* (3M KCl) gemessen.

Die enzymmodifizierte Elektrode wurde immer in einem 100 mM pH 4,5 Puffer gelagert. Das Enzym verlor, wenn die Elektrode nicht in dem genannten Puffer gelagert wurde, sehr schnell an Aktivität; nach etwa 20 Minuten an der Luft sank die enzymatische Aktivität auf etwa 50 % ab.

¹⁹5-(Octyldithio)-2-nitrobenzoesäure: Fluka

8.3.2 Immobilisieren von Ferrocenen

Die Ferrocene wurden mit Hilfe von Aminoundecanthiol-SAMs und *Glutaraldehyd* auf einer Goldoberfläche immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgte in Anlehnung an die in [112] beschriebene Vorgehensweise. Hierbei erfolgte die Vernetzung der Aminogruppen des, in Abbildung 5.29 abgebildeten Ferrocenderivates²⁰ und die des *Aminoundecanthioles* mit *Glutaraldehyd*. Die Ferrocene wurden durch folgende Schritte auf der Elektrode immobilisiert:

- eine Matrixelektrode wurde gemäß, der im Abschnitt 8.3.3 beschriebenen Vorgehensweise mit einem gemischten SAM aus *Ethanthiol*²¹ und *AUT*²² modifiziert. Die Zusammensetzungen der Inkubationslösungen betragen 15 %, 10 %, 5 % und 0 % (Molprozent) AUT.
- Auf die Elektrode wurden einige Tropfen der ethanolischen Lösung des Ferrocenderivates gegeben und eingetrocknet.
- Die Elektrode wurde für 15 Minuten in eine 25 % Glutaraldehydlösung²³ (Gewichtsprozent) gelegt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült.

8.3.3 Ausbildung von Thiol SAMs aus ethanolischen Lösungen

Die Ausbildung von SAMs aus ethanolischen Lösungen wurde in den, in Abbildung 9.4 dargestellten Mikrogefäßen durchgeführt.

SAM aus HDT

- eine 10 mM ethanolische HDT²⁴ Lösung wurde in die Mikrogefäße (Abbildung 9.4) gegeben. Dabei wurde jedes zweite Gefäß gefüllt, so dass sich ein Schachbrettmuster aus gefüllten und nicht gefüllten Gefäßen ergab.
- nach drei Stunden wurde die ethanolische Lösung aus den Gefäßen abgesaugt und diese zwei mal mit reinem Ethanol durchgespült.

²⁰synthetisiert von Carmen Simona Asaftei nach [108]

²¹Merck

²²Dojindo Laboratories, Japan

²³Sigma-Aldrich

²⁴Fluka

Gemischter SAM aus AUT und HDT

- es wurden ethanolische Stammlösungen von HDT²⁵ und AUT²⁶ mit einer Konzentration von jeweils 1 mM hergestellt.
- Teile der Stammlösungen wurden entsprechend der erforderlichen Zusammensetzung in einem Eppendorfgefäß gemischt.
- die Mischungen wurden in die Gefäße eingefüllt und die Elektrode für drei Stunden bei -20°C aufbewahrt.
- die Lösung wurde aus den Kapillaren gesaugt und diese zwei mal mit auf -20°C gekühltem Ethanol gewaschen.
- die Elektroden wurden im weiteren Verlauf, auch während der Messungen gekühlt. Dieses wurde durch Auflegen eines Eisbeutels auf die Elektroden bzw. dem Sensorarray erreicht.

8.3.4 Ausbildung von Thiol SAMs durch Stempeln

Die Sensorelemente der Matrixelektroden wurden, durch Mikrokontaktdruck, in Anlehnung an die in [16, 78] beschriebene Vorgehensweise, mit Thiolen modifiziert. Für diese Arbeit wurden die Bedingungen wie folgt optimiert:

- Ein PDMS Stempel wurde mit einer ethanolischen Lösung des Thioles, beim *Hexadecanthiol*²⁷ 16 mM, über einen Zeitraum von 15 Minuten in einem geschlossenen Gefäß bedeckt. Nach dieser Zeit wurde das überstehende Ethanol abgegossen und der Stempel unter einem Argonstrom getrocknet.
- Der Stempel wurde für 5 Minuten auf die Oberfläche der frisch gereinigten Elektrode, siehe Abschnitt 8.3.7 gelegt.

Aufpinseln der Thiole

Alternativ zum Mikrokontaktdruck wurde die Thiollösung auf die Goldelektroden mit Hilfe von Wattestäbchen aufgepinselt.

²⁵Fluka

²⁶Dojindo

²⁷Fluka

8.3.5 Strukturieren der Oberfläche

Photolithographie und Ätzen von *ITO* beschichtetem Glas

In dieser Arbeit wurde ein positiv Fotolack²⁸ als Ätzresist für die Strukturierung des *ITO* Glases durch Ätzen, sowie für die Strukturierung der Oberfläche durch Silane verwendet. Die Verarbeitung dieses Lackes zum Abdecken von Glasplatten als auch für die Anwendung als Ätzresist ist identisch und wird im Folgenden beschrieben, wobei alle Fotoarbeiten nur in gelbem Licht durchgeführt werden:

- Die Glasplatten bzw. die mit *ITO* beschichteten Glasplatten²⁹ wurden gemäß der im Abschnitt 8.3.7 beschriebenen Methode gereinigt.
- Die Glasplatten wurden senkrecht in einen Excicator gestellt und dieser wurde mit Argon geflutet.
- Die Glasplatten wurden mit dem zuvor auf Zimmertemperatur erwärmten Fotolack besprüht. Es wurde so viel Lack aufgegeben bis dieser an den fast senkrecht stehenden Glasplatten hinunter lief. Der Fotolack wurde an der Laborluft im offenen Excicator für eine halbe Stunde getrocknet.
- Die beschichteten Glasplatten wurden auf einer Heizplatte unter Verwendung eines Kontaktthermometers bei 70°C 15 Minuten lang ausgeheizt. Anschließend wurden die Glasplatten auf Raumtemperatur abgekühlt.
- Die Lackschicht wurde mit Hilfe eines UV Belichtungsgerätes³⁰ über einen Zeitraum von 50 Minuten belichtet. Dabei lagen die mit Fotolack beschichteten Glasplatten auf einer Glasscheibe, welche sich wiederum etwa einen Meter oberhalb des Belichtungsgerätes befand. Die Abbildung der Belichtungsvorlage sowie deren Abmessungen sind im Anhang zu finden.
- Der Fotolack wurde in einer frisch angesetzten Natronlauge mit einer Konzentration von 7% entwickelt. Nachdem kein Fotolack mehr auf den belichteten Stellen zu sehen war, verblieben die Platten für eine weitere Minute in dem Entwickler.
- Vor der weiteren Verwendung wurden die Glasplatten auf der Heizplatte bei 70°C getrocknet.

²⁸Positiv 20; Kontakt Chemie

²⁹Indium Zinn Oxid; BTE Bedampfungstechnik, Elsoff, Deutschland

³⁰UV Belichtungsgerät 1; Isel

Ätzen der *ITO* beschichteten Glasplatten Um aus den mit *ITO* beschichteten Glasplatten die Elektroden, auf denen in einem späteren Schritt das Preußisch Blau synthetisiert wurde, herzustellen, wurde das *ITO* geätzt. Bei diesem Schritt bleibt nur an den Stellen das *ITO* stehen, welche zuvor mit dem Fotolack abgedeckt wurden.

- In einem geeigneten Gefäß wurde 16% *HCl* auf etwa 60°C erhitzt.
- Die zuvor mit dem Fotolack strukturierten *ITO* beschichteten Glasplatten wurden für 6 Minuten in die heiße *HCl* gelegt.
- Die *ITO* beschichteten Glasplatten wurden gut mit destilliertem Wasser abgewaschen. Es ist zu beachten, dass bereits eine geringe Menge an *HCl* auf der Oberfläche der Platten dazu führen kann, dass es zu Unterätzungen und somit zur Vernichtung der Elektroden kommen kann.
- Es wurde kontrolliert, ob das *ITO* zwischen den beabsichtigten Leiterbahnen komplett entfernt worden war. Diese Kontrolle erfolgt sowohl optisch, als auch durch eine Überprüfung der Leitfähigkeit der Platten. Falls noch Reste von dem *ITO* vorhanden waren, wurden die Glasplatten erneut in die heiße, 16% *HCl* gelegt.
- Die freien Glasstellen werden mit *1H, 1H, 2H, 2H Perfluordecylmethyl-dichlorsilan* gemäß der in Abschnitt 8.3.1 beschriebenen Vorgehensweise modifiziert.
- Der Fotolack wurde mit Aceton von den Platten entfernt.

Mikrokontaktdruck

Herstellung der Gussformen Die Gussformen für die Herstellung der PDMS Stempel wurden mit Hilfe von *SU8-50* Fotolack³¹ auf Glasplatten hergestellt. Der *SU8-50* Fotolack ist für den Aufbau sehr dicker Strukturen geeignet. Wie bei der Verarbeitung des *Positiv 20* Lackes wurden auch diese Fotoarbeiten unter gelben Licht durchgeführt.

- Auf frisch gereinigten Glasplatten (siehe Abschnitt 8.3.7) wurden an den Kanten vier Lagen Klebeband³² angebracht. Die daraus resultierenden Abstandhalter weisen eine Dicke von $400\ \mu\text{m}$ auf.
- Der SU8-50 Lack wurde mit Hilfe eines Glasstabes auf die Glasplatten aufgerakelt.
- Die beschichteten Glasplatten wurden auf einer Heizplatte unter Verwendung eines Kontaktthermometers ausgeheizt. Dazu wurden die Glasplatten über einen Zeitraum von 10 Minuten auf 65°C , anschließend für weitere 50 Minuten bei 95°C erhitzt. Bei dem *Pre Exposure Bake* wurde darauf geachtet, dass keine plötzlichen Temperaturschwankungen auftreten, weil dies zu Spannungsrissen im Lack führen kann [113]. Aus diesem Grund wurden die Platten auf die kalte Heizplatte gelegt, die dann erst aufgeheizt wird. Nach dem *Pre Exposure Bake* wurde die Heizplatte abgeschaltet und die Platten verblieben auf der Heizplatte bis diese auf Zimmertemperatur abgekühlt war.
- Die Lackschicht wurde mit Hilfe eines UV Belichtungsgerätes³³ über einen Zeitraum von 45 Minuten belichtet. Dabei lagen die mit Fotolack beschichteten Glasplatten auf einer Glasscheibe, welche sich wiederum etwa einen Meter oberhalb des Belichtungsgerätes befand. die Zeichnungen der Belichtungsvorlagen sowie der resultierenden Gussformen sind in den Abbildungen 9.7 und 9.8 zu finden. Belichtungsvorlage sowie deren Abmessungen sind im Anhang zu finden.
- Nach dem Belichten wurde der *Post Exposure Bake* durchgeführt. Dazu wurden die Glasplatten auf einer Heizplatte für eine Minute auf 65°C und für weitere 15 Minuten auf 95°C erhitzt. Auch bei diesem *Post Exposure Bake* sind plötzliche Temperaturschwankungen zu vermeiden.

³¹Micro Chem

³²Tesafilm; Henkel

³³Isel, UV Belichtungsgerät 1

- Der Fotolack wurde mit einem geeigneten Entwickler³⁴ entwickelt, bis die Strukturen klar zum Vorschein kamen, anschließend wurden die Platten in *Isopropanol* gewaschen. Traten dabei Trübungen auf den Glasplatten auf, so werden die Platten erneut in den Entwickler gelegt.

Herstellen der Stempel Auf die Gussformen wurde das noch flüssige PDMS³⁵ gegossen. Mit dem ersten Stempeln, welcher mit den Gussformen hergestellt wurde, wurden Verunreinigungen von der Oberfläche der Gussform entfernt. Dieser Stempel wurde daher verworfen.

- Die PDMS Monomere³⁶ und der Härter³⁷ wurden in einem Verhältnis von 10 : 1 gemischt und in die Gussformen gegossen.
- Die Gussformen mit dem noch flüssigen PDMS wurden in einem Excicator unter dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe gelagert, bis keine Luftblasen mehr aus dem flüssigen PDMS aufstiegen.
- Das PDMS wurde für mindestens vier Stunden bei 60°C in einem Trockenschrank ausgehärtet.
- Die Stempel wurden von den Gussformen gelöst und anschließend für 30 Minuten in Ethanol in einem Ultraschallbad gereinigt. Bei diesem Reinigungsschritt ist anzumerken, dass die Meinungen zur ausreichenden Reinigung weit auseinander gehen. Diese reichen von einem einfachen Abwaschen in Ethanol [81] bis hin zur stundenlangen Soxhlet-Extraktion mit Ethanol [113] oder stundenlanges Auslaugen in Hexan [74].

³⁴XP SU8 Entwickler; Mikro Resist

³⁵Poly Dimethyl Siloxan

³⁶Sylgard 184 Base Silicone Elastomer; Dow Corning

³⁷Sylgard 184 Curing agent; Dow Corning

8.3.6 Silikondichtungen für Mikrogefäße und Kapillaren

Silikondichtungen zur Herstellung der Mikrogefäße

Um lokal begrenzt SAMs durch Inkubation auf der Matrixelektrode aufzubringen, wurde mit Hilfe von weichen, aus *PDMS* gefertigten Dichtungen *Mikrogefäße* auf den Matrixelektroden hergestellt. Die verwendete Gussform ist in Abbildung 9.2 einschließlich der Abmessungen dargestellt. Die Vorder- und Rückseite der Gussform bestehen jeweils aus glatten Polystyrolplatten mit einer Dicke von 5mm, die Abdichtungen in der Gussform selber haben eine Dicke von 2,5mm. Die Abdichtungen sind auf der Rückseite der Gussform verklebt. Wie in der Abbildung 9.2 zu erkennen ist, wurde der Deckel der Gussform mit Hilfe von Klammern auf der Unterseite festgehalten. Um die Dichtungen herzustellen, wurde wie folgt vorgegangen:

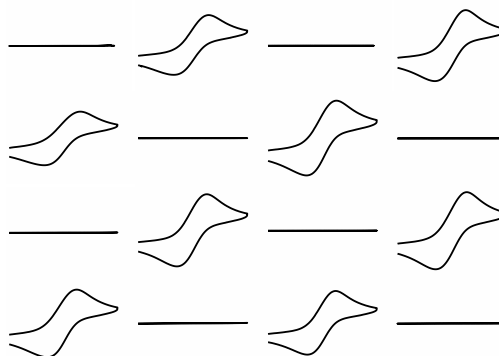


Abbildung 8.3: Inkubation von ethanolischer *HDT* in μ -Gefäßen. unbenutzte Silikondichtung; 16 mM *Hexadecanthal* in Ethanol. je 1 mM rotes bzw. gelbes Blutlaugensalz in 100 mM *KCl*; Scanrate $100 \frac{mV}{s}$; Scanbereich $-400 mV$ bis $300 mV$

- Das *PDMS*³⁸ wurde in einem Verhältnis Monomer / Härter von 20 / 1 vermischt.
- Das noch flüssige *PDMS* wurde unter Vakuum entgast.
- Die Gussform, siehe Abbildung 9.1, wurde wie in Abbildung 9.2 dargestellt zusammengesetzt.
- Das entgaste *PDMS* wurde in die zusammengesetzte, senkrecht stehende Gussform gegossen.
- Die Gussform wurde für etwa 10 Minuten unter Vakuum entgast.
- Das *PDMS* wurde für 4 Stunden bei 80 C gehärtet
- Die Gussform wurde auseinander genommen und die *PDMS* Dichtung vorsichtig aus der Gussform entfernt.

³⁸Sylgard 184; Dow Corning

- Die Dichtung, siehe Abbildung 9.3 wurde für mindestens vier Stunden in einer Soxlettextapparat mit Ethanol gereinigt.

Alle Silikondichtungen wurden, vor jeder Verwendung, mindestens vier Stunden lang in einer Soxlettapparat mit Ethanol gereinigt. Dieses gilt auch für die Dichtungen welche bereits für die Inkubationen verwendet wurden. Durch in dem Dichtungsmaterial absorbierten Thiolen können Kontaminationen in weiteren Modifikationen von Elektronen übertragen werden. Dieser Effekt ist aus den Abbildungen 8.3 und 8.4 zu erkennen.

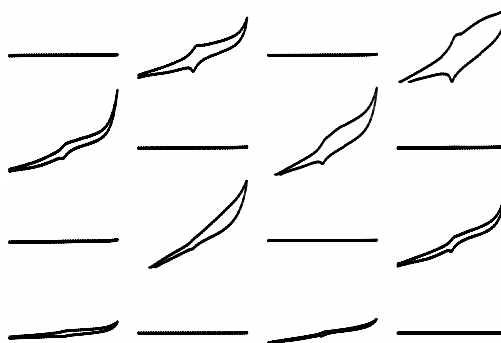


Abbildung 8.4: Inkubation von ethanolischer HDT in Mikrogefäßen. einmal benutzte, kurz mit Ethanol abgewaschene Silikondichtung; 16 mM *Hexadecanthal* in Ethanol. je 1 mM rotes bzw. gelbes Blutlaugensalz in 100 mM *KCl*; Scanrate $100 \frac{mV}{s}$; Scanbereich $-400 mV$ bis $300 mV$

Silikondichtung zur Herstellung der Kapillaren

Bei den, durch Dichtungen unterteilten Elektrolyten, muss dieser mit Spritzen, welche durch das Dichtungsmaterial hindurch gestochen werden müssen, in die einzelnen Bereiche eingespritzt werden. Das für die Mikrogefäße verwendete Silikon ist hierfür zu spröde, es reißt an den Einstichstellen ein. Als erforderliches, hochelastisches Dichtungsmaterial wurde *Sanitärsilikon*³⁹ verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Einkomponentensilikon, welches unter Wasseraufnahme und Abspaltung von Essigsäure aushärtet. Bedingt durch die hohe Viskosität im nicht ausgehärteten Zustand musste dieses Silikon in die Gussformen gepresst werden.

- Das Silikon wurde mit einigen Tropfen destilliertem Wasser vermischt.
- Das angefeuchtete Silikon wurde auf die geöffnete Guss- bzw. Pressform, siehe Abbildung 9.5, gestrichen und der Deckel auf die Form gelegt.
- Die Pressform wurde mit Hilfe einer Presse zusammengedrückt.

³⁹Ceresit; Henkel

- Die Form wurde bei 70°C über eine Stunde gelagert.
- Der Deckel der Grußform wurde abgenommen und die Silikondichtung für weitere zwei Stunden bei 70°C ausgehärtet.
- Die Dichtung wurde für mindestens vier Stunden durch eine Soxlettextraktion mit Ethanol gereinigt.

Wenn diese Dichtungen auf ein, frisch im Plasma gereinigtes Glas gelegt werden, kommt es zu einer Oberflächenreaktion, die zum Zusammenkleben von Dichtungsmaterial und Glas führt. Diese Reaktion kann verhindert werden, indem die Silikondichtungen mit *Perfluorsilanen* behandelt werden. Das Verkleben von Dichtung und Glasplatten läuft allerdings über mehrere Stunden hinweg ab. Für die, in dieser Arbeit beschriebenen Messungen konnte deshalb auf diese Vorsichtsmaßnahme verzichtet werden.

8.3.7 Reinigen der Oberflächen

Reinigen der Goldelektroden

Die Reinigung der Goldelektroden bzw. der gesputterten Goldelektroden wurde nach zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt, abhängig davon, ob die hydrophil/hydrophobe Strukturierung erhalten bleiben musste oder ob es einfach nur auf eine effiziente Reinigung des Goldes ankam. Wenn die hydrophile/hydrophobe Strukturierung erhalten bleiben sollte, wurden die Elektroden mit *Piranha*⁴⁰ und Ethanol gereinigt, gefolgt von einer elektrochemischen Nachbehandlung. Die Reinigung nach dieser Methode wurde wie folgt durchgeführt:

- Die Goldelektroden wurden für zwei Minuten in ein *Piranha*, bestehend aus 20 ml *Wasserstoffperoxid* und 40 ml konzentrierter *Schwefelsäure*, gelegt.
- Die Goldelektroden wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen und für mindestens 15 Minuten in reines Ethanol gelegt.
- Die Elektroden wurden mit Hilfe von elektrochemischen Messungen in einem Drei Elektrodensystem überprüft. Eine Elektrode ist für die weitere Verwendung geeignet, wenn sich ein CV wie in Abbildung 8.5 a) ergibt. Bei CVs, wie in Abbildung 8.5 b) ist die Elektrode für die weiteren Modifikationen und Messungen nicht geeignet.

⁴⁰konz. Schwefelsäure; Fluka, Wasserstoffperoxid; Fluka im Verhältnis 2:1

- Als letzter Reinigungsschritt wurden die Goldelektroden in 0,5 mM *Schwefelsäure* in einem Drei Elektrodensystem mit CV Messungen behandelt. Dazu wurden die Elektroden von 0,6V bis -1,4V bei $50 \frac{mV}{s}$ in Bezug auf eine Silber/Silberchloridelektrode in 3 M *KCl* gescannt. In diesem Reinigungsschritt wurden alle, eventuell noch vorhandenen Verunreinigungen auf der Oberfläche der Elektroden entfernt.

Bei dieser Reinigung wurde nicht nur die Goldoberfläche gereinigt, sondern auch die hydrophilen Stellen des strukturierten Glases reaktiviert. Die mit dem *Perfluordecylmethyldichlorsilan* modifizierten hydrophoben Glasstellen werden durch das Piranha **nicht** beeinträchtigt.

Wenn es nur auf eine effiziente Reinigung der Goldelektroden ankam, wurden die Elektroden in einem Plasma gereinigt. Dieses Verfahren ist einfacher durchzuführen als die Reinigung mit Piranha, beseitigt aber auch die hydrophobe

Beschichtung der Glasplatten. Um die Elektroden zu reinigen wurden diese in einem Plasmareiniger ⁴¹, unter Verwendung maximaler Leistung des Plasmagenerators und der Vakuumpumpe ⁴² für 20 Minuten in einem, aus der Raumluft erzeugten Plasma gelegt.

Reinigen der Elektrodenplatten

Die Reinigung der Goldelektroden vor der Modifikation ist ein, wenn nicht der entscheidende Faktor für das Gelingen der Messungen. Im Rahmen dieser Messungen wurden zwei Reinigungsverfahren für die gesputterten Goldelektroden ausprobiert:

Reinigen der Elektroden in Piranha mit anschließender elektrochemischer Reduktion und Reinigen der Elektroden im Plasma. Die genaue Vorgehensweise dieser Reinigungsverfahren ist dem Abschnitt 8.3.7 zu entnehmen. Wie in dem Kapitel 8.3.7 beschrieben, besteht bei dem Reinigen der Elektroden in

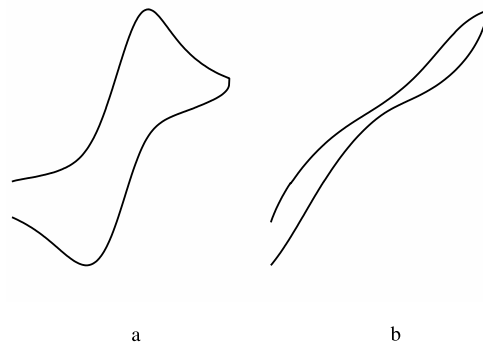


Abbildung 8.5: CV Messungen an einer mit b) Piranha gereinigten Goldelektrode im Vergleich zu einer a) offenen Elektrode. je 1 mM rotes und gelbes Blutlaugensalz, 100 mM *KCl*, System 3; Scanrate $100 \frac{mV}{s}$, Scanbereich $-400 mV$ bis $300 mV$

⁴¹Plasmacleaner/Sterilizer PDC32-G; Harricke

⁴²Drehschieber-Vacuumpumpe RC5; Vacuubrand;

Piranha die große Gefahr, dass die Elektroden ein enorm schlechtes elektrochemisches Verhalten aufweisen, wie es z.B. in der Abbildung 8.5 zu sehen ist. Diese Oxidschichten konnten durch die erwähnte elektrochemische Reduktion teilweise beseitigt werden. Dieses Verfahren war jedoch nicht sehr zuverlässig. Wegen der nicht sehr hohen Erfolgsquote, einem nicht zu unterschätzenden Arbeitsaufwand und den anfallenden Säureabfällen, wurden Anstrengungen unternommen, ein alternatives Reinigungsverfahren zu etablieren.

Dazu wurde die bereits zum Reinigen der Glasplatten (Abschnitt 8.3.7) verwendete Plasmareinigung verwendet. Es zeigte sich, dass hierdurch saubere freie Goldelektroden hergestellt werden konnten, unabhängig davon, mit welchen SAMs diese zuvor modifiziert wurden.

Bei der Plasmareinigung werden allerdings neben den Verunreinigungen von der Goldelektrode auch die hydrophoben Beschichtungen von den Glasplatten entfernt. In diesem Falle kann die Mikrofluidik nur mit Hilfe von den Silikondichtungen bewerkstelligt werden.

Im Vergleich zu der Reinigung der Goldelektroden in Piranha ist die Plasmareinigung mit wesentlich weniger Aufwand und schneller durchzuführen. Der Verwendung einer Silikondichtung für die Mikrofluidik ist kein wirklicher Nachteil, weil sich die auf hydrophil bzw. hydrophob strukturierten Glasstellen basierende Mikrofluidik als stör anfällig erwies. Neben einer einfacheren Handhabung ergeben sich auf den, im Plasma gereinigten Elektroden bessere elektrochemische Antworten als auf den in Piranha gereinigten Elektroden.

Bei den im Plasma gereinigten und dadurch auch aktivierten Glasoberflächen ist jedoch zu beachten, dass diese Oberflächen eine hohe Reaktivität u.a. mit anderen Siliziumverbindungen, wie z.B. den Silikondichtungen aufweisen. Dieses äußert sich dadurch, dass die Siliziumdichtungen innerhalb von einigen Stunden mit dem zuvor frisch im Plasma gereinigten Glasplatten verkleben. Abhilfe konnte dadurch erreicht werden, indem die Oberfläche der Silikondichtungen selber mit einer extrem inerten Modifikation versehen wurden. Hiermit kann ein Verkleben mit den Glasplatten verhindert werden.

Die Glasplatten bzw. die mit ITO beschichteten Glasplatten wurden wie folgt gereinigt:

- Die Glasplatten wurden für 30 Minuten in einer etwa 2% Tensidlösung⁴³ (Volumenprozent) im Ultraschallbad gereinigt.
- Zur besseren Entfernung des Tensides wurden die Glasplatten kurz in verdünnte HCl getaucht und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen.

⁴³Mukkasol

- Die Glasplatten wurden für 15 Minuten in destilliertem Wasser im Ultraschall behandelt.
- Die Glasplatten wurden in einem Trockenschrank bei 70°C getrocknet und in einem Plasmareiniger⁴⁴ unter Verwendung maximaler Leistung des Plasmagenerators und der Vakuumpumpe⁴⁵ für 15 Minuten in einem aus Raumluft erzeugten Plasma gereinigt.
- Die Glasplatten wurden bis zur weiteren Verwendung in einem Excicator mit frisch regeneriertem Trockenmittel gelagert. Die Glasplatten wurden dabei, als Vorbereitung für die Beschichtung mit dem Fotolack, fast senkrecht an die Wand des Excicator gestellt.

8.4 Elektrochemie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Charakterisierung der Elektroden und zum Auslesen der Sensoren die *Cyclovoltammetrie* verwendet. Hierbei kamen sowohl Drei-Elektrodensysteme, als auch Zwei-Elektrodensysteme zum Einsatz.

8.4.1 Messungen im Drei-Elektrodensystem

Elektrochemische Messungen im Drei-Elektrodensystem werden in dieser Arbeit verwendet, um zum einen die Oberflächenmodifikationen an den Makroelektroden⁴⁶ und zum anderen die Reinigung der Matrixelektrode vor dem Stempeln der Thiole zu charakterisieren. Als Referenzelektrode wird eine Silber/Silberchloridelektrode⁴⁷ in 3 M *KCl* verwendet. Die Salzbrücke der Gegenelektrode wird mit einer Salzlösung mit der gleichen Salzkonzentration wie die Messlösung befüllt. Als Gegenelektrode wird im Falle der Makroelektrode ein Platindraht, für die Matrixelektrode eine großflächige Edelstahlelektrode, die parallel zur Matrixelektrode angeordnet wird, verwendet. Der Scanbereich sowie die Scanrate sind abhängig von den jeweiligen Gegebenheiten und wird im Abschnitt 5.4 bei den jeweilig diskutierten Versuchen angegeben.

⁴⁴Plasmacleaner/Sterilizer PDC32-G; Harricke

⁴⁵Drehschieber-Vacuumpumpe RC5; Vacuubrand;

⁴⁶Goldelektrode, 3mm Durchmesser; Methrom

⁴⁷Metrohm

8.4.2 Messungen mit den Matrixarrays

Für die Messungen an den Matrixarrays wurden zwei unterschiedliche Geräte für die Ansteuerung entwickelt und verwendet.

Zusatzschaltung für einen konventionellen Potentiostaten

Die einfachste Methode das Matrixarray anzusteuern besteht darin, einen konventionellen Potentiostaten und eine Zusatzschaltung, bestehend aus einem Potentialfolger und zwei Mehrfachschaltern zu verwenden. Das Blockschaltbild dieses Messaufbaus ist in Abbildung 8.6 dargestellt. Dieser Aufbau wurde hauptsächlich bei der prinzipiellen Erprobung des Matrixarrays eingesetzt.

Gemäß diesem Schaltbild wird die anzusteuernde Gegenelektrode mit dem Schalter S1 auf die kurzgeschlossenen Anschlüsse für Gegen- und Referenzelektrode des Potentiostaten geschaltet. Die zu adressierende Leiterbahn der Arbeitselektroden wird mit dem Schalter S2 auf den entsprechenden Anschluss des Potentiostaten verbunden. Die restlichen, nicht adressierten Leiterbahnen der Arbeitselektroden werden auf den Potentialfolger geschaltet. Durch den Potentialfolger werden die nicht adressierten Leiterbahnen auf das gleiche Potential der adressierten Leiterbahn gelegt. Die entsprechenden Ströme werden aber, am Potentiostaten vorbei nach Masse abgeleitet. Mit diesem Messaufbau sind nur sequentielle Messungen an den einzelnen Sensorfeldern möglich.

In dieser Arbeit wurde für diesen Messaufbau ein PGSTAT20⁴⁸ verwendet. Der Potentialfolger bestand aus einem CA3140E welcher mit einer symmetrischen Versorgungsspannung von $\pm 9\text{ V}$ betrieben wurde.

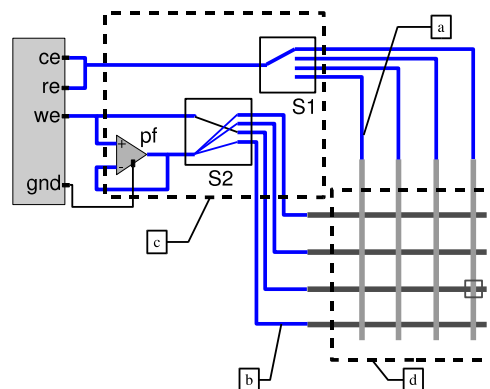


Abbildung 8.6: Ansteuerung eines Matrixarrays mit einem konventionellen Potentiostaten und einer Zusatzschaltung. Auslesen des markierten Sensorelementes; a) Gegen/Referenzelektroden; b) Arbeitselektroden; c) Zusatzschaltung aus Potentialfolger und Schalter; d) Matrixarray

⁴⁸Autolab

Messungen mit dem Vierkanalpotentiostaten

Mit einem Vierkanalpotentiostaten können alle vier Sensorfelder, die sich unter einer Gegen/Referenzelektrode befinden, gleichzeitig gemessen werden. Bei den Messungen befinden sich alle Leiterbahnen der Arbeitselektroden auf dem gleichen Potential. Das Blockschaltbild des Massaufbaus mit dem Vierkanalpotentiostaten ist in Abbildung 8.7 dargestellt. Der Vierkanalpotentiostat wurde von der Elektrowerkstatt der Universität selbst entworfen und gebaut. Die Ausgangsspannung des Potentiostaten kann in einem Bereich von $\pm 2,5\text{ V}$ mit einer Auflösung von 12 Bit bei einem maximalen Ausgangsstrom von 10 mA eingestellt werden. Cyclovoltammetrische Messungen können mit Scanraten zwischen $5\frac{\text{mV}}{\text{s}}$ und $1000\frac{\text{mV}}{\text{s}}$ durchgeführt werden. Er verfügt über vier, voneinander unabhängige Eingänge für die Arbeitselektroden. Jeder Kanal hat vier Messbereiche, $\pm 2,5\text{ mA}$, $\pm 250\text{ }\mu\text{A}$, $\pm 25\text{ }\mu\text{A}$ und $\pm 2,5\text{ }\mu\text{A}$ mit jeweils einer 8 Bit Auflösung.

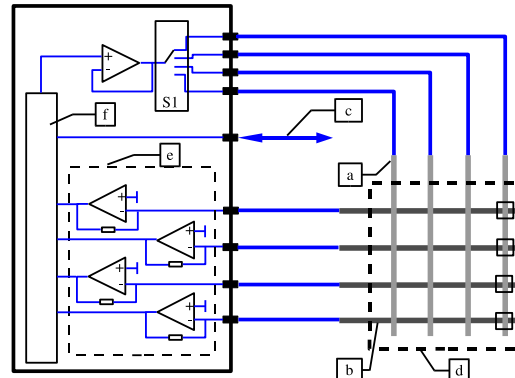


Abbildung 8.7: Blockschaltbild des 4 Kanal Potentiostaten; Ansteuerung eines Matrixarrays mit einem 4 Kanal Potentiostaten. Auslesen der markierten Sensorelemente; a) Gegen/Referenzelektroden; b) Arbeitselektroden; c) Datentransfer zum Computer; d) Matrixarray; e) voneinander unabhängige I/U Konverter

Kapitel 9

Anhang

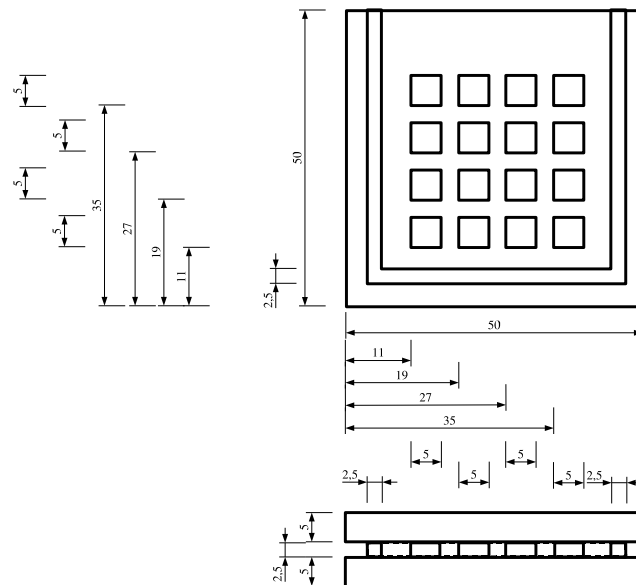


Abbildung 9.1: Konstruktionszeichnung der Gussform zur Herstellung der Silikondichtung für die Mikrogefäße.

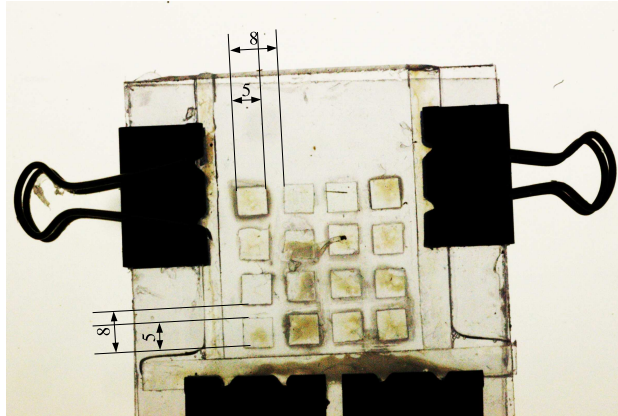


Abbildung 9.2: Gussform zur Herstellung der PDMS Dichtung.

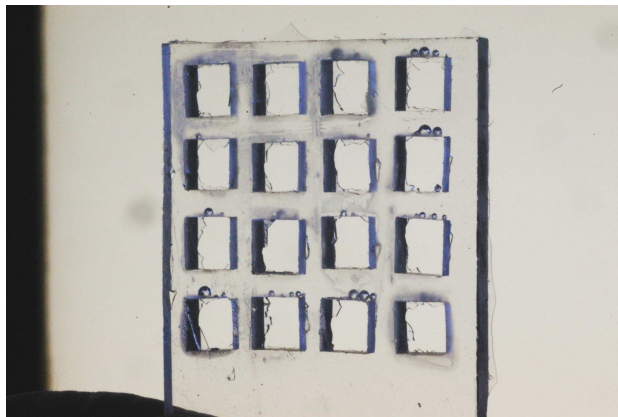


Abbildung 9.3: PDMS Dichtung zur Herstellung der Mikrogefäße auf den Matrixelektroden.

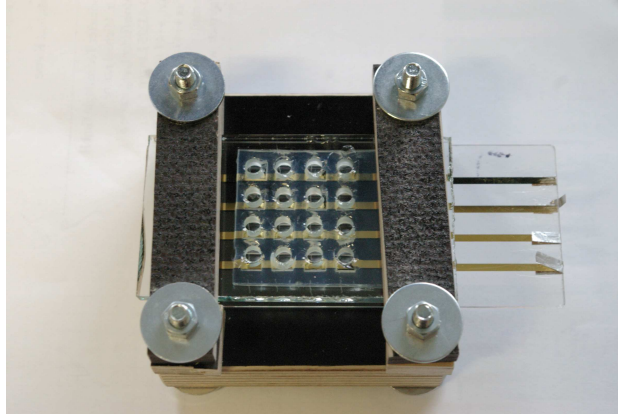


Abbildung 9.4: Zusammengesetzte Mikrogefäße für die Inkubation der einzelnen Sensorelemente.

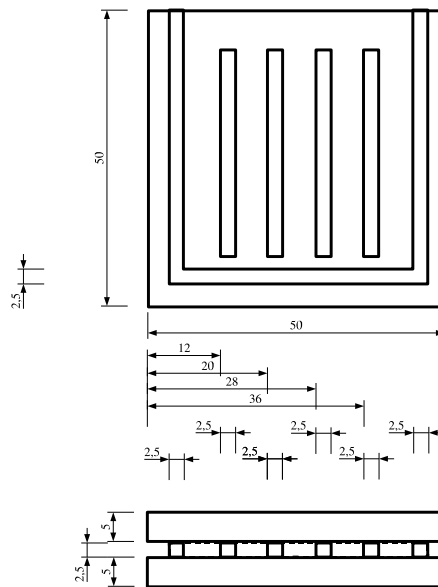


Abbildung 9.5: Konstruktionszeichnung der Gussform zur Herstellung der Dichtungen für die mechanische Unterteilung des Elektrolyten.

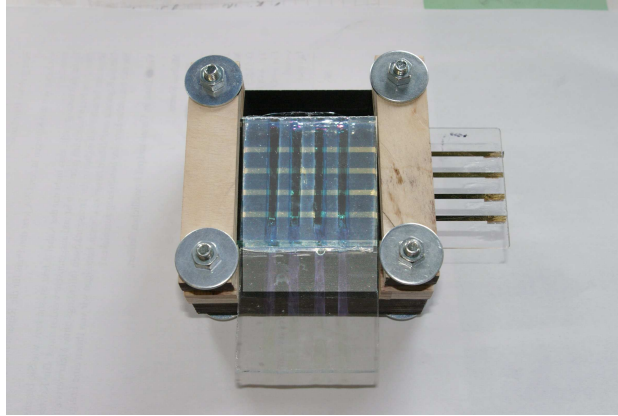


Abbildung 9.6: Durch die Silikondichtung und Andruckplatte aufgebaute Mikrofluidik der Matrixelektrode

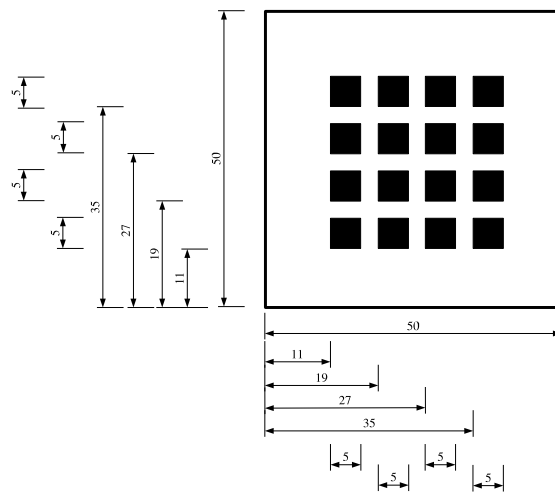


Abbildung 9.7: Zeichnung der Belichtungsvorlage für die Belichtung des SU8-50 Lackes zur Herstellung der PDMS Gussformen.

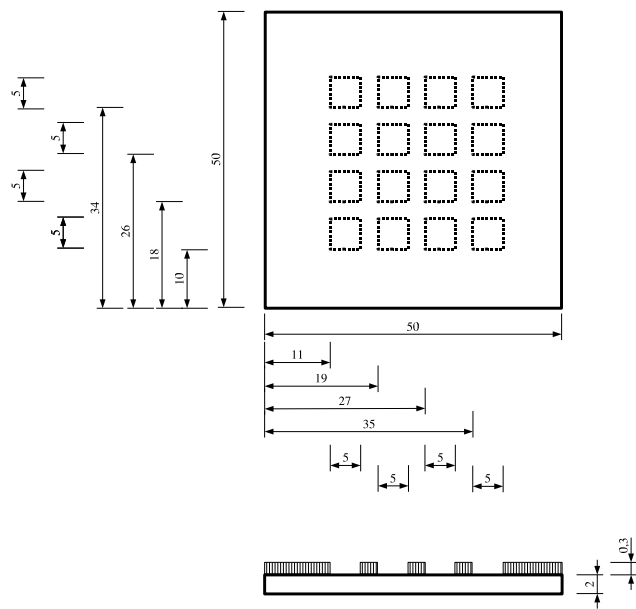


Abbildung 9.8: Gussform für die PDMS Stempel. Die Seitenansicht ist nicht maßstabsgerecht.

Publikationen / Patente / Poster

Poster

- B. Lutter, L. Walder. *Passive Matrix Addressing of an Electrochemical Sensor Array*. Center of Interface Science - Universität Oldenburg, 2006

Publikationen / Patente

- B. Lutter, L. Walder. Eine Publikation und ggf. Patente zur *Passiven Matrix Adressierung von elektrochemischen Sensoren* sind in Vorbereitung.

Literaturverzeichnis

- [1] *User manual : ParoCheck*. www.bgo.com/bioscience/parochek, 2006.
- [2] *Produktinformation: ParoCheck*. www.bgo.com/bioscience/parochek, 2006.
- [3] A. P. Abel, D. Utinger, S. Heusler, M. Sievers, and M. Ehrat. Hochempfindliche DNA-Microarrays zur Genexpressionsanalyse. *BioWorld*, 5:online, 2003.
- [4] M. Pawlak, M.J. Schneider, E. Schick, P. Oroszlan, and M. Ehrat. DNA- und Protein-Microarrays - Höchste Empfindlichkeit durch Planare Wellenleitertechnologie. *Laborwelt*, 3:44–48, 2002.
- [5] M. Pawlak, E. Schick, M.A. Bopp, M.J. Schneider, P. Oroszian, and M. Ehrat. Zeptosens protein microarrays: A novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis. *Proteomics*, 2:383–393, 2002.
- [6] J. Vörös, S.M. de Paul, M. Textor, A.P. Abel, E. Kauffmann, and M. Ehrat. Polymer cushions to analyze genes and proteins. *BioWorld*, 2:online, 2003.
- [7] R. Thewes, C. Paulus, M. Schienle, F. Hofmann, R. Brederlow, M. Augustyniak, M. Jenkner, B. Eversmann, P. Schindler-Bauer, M. Atzesberger, G. Beer, T. Haneder, and H.C. Hanke. CMOS-based biosensor arrays, 2005.
- [8] R. Campagnolo. eMICAM a new generation of active DNA chip with in situ electrochemical detection. Technical report, DEA/LETI-DTBS, Grenoble, France, 2006.
- [9] H. Meyer, H. Drewer, B. Gründig, K. Cammann, R. Kakerow, Y. Manoli, W. Mokwa, and M. Rospert. Two-dimensional imaging of O₂, H₂O₂ and glucose distributions by an array of 400 individually addressable microelectrodes. *Anal. Chem.*, 67:1164–1170, 1995.

- [10] K. Dill, D.D. Montgomery, A.L. Ghindilis, and K.R. Schwarzkopf. Immunoassay and sequence-specific DNA detection on a microchip using enzyme amplified electrochemical detection. *J. Biochem. Bioph. Methods*, 59:181–187, 2004.
- [11] *Biochip Specification*. FRIZ Biochem Gesellschaft für Bioanalytik mbH, Staffelseestr. 6, 81477 München; www.Frizbiochem.de, 2006.
- [12] E. Nebeling, T. Grunwald, J. Albers, P. Schäfer, and R. Hintsche. Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays. *Anal. Chem.*, 76:689–696, 2004.
- [13] Fraunhofer Insitut Siliziumtechnologie. Integration von Mikroelektronik und Mikrosystemen, 2006.
- [14] Tastenfeld mit wenigen Anschlüssen. *Elektor*, 7/8:110, 2001.
- [15] A.J. Bard and L.R. Faulkner. *Electrochemical Methods*, pages 143–145. John Wiley and Sons, 1980.
- [16] H.X. He, Q.G. Li, Z.Y. Zhou, H. Zhang, S.F.Y. Li, and Z.F. Liu. Fabrication of microelectrodes arrays using microcontact printing. *Langmuir*, 16:9683–9686, 2000.
- [17] M. Colombini. Voltage gating in the mitochondrial channel. *J. Membrane. Biol.*, 111:103–111, 1989.
- [18] Mangan. P.S. and M. Colombini. Ultrasteep voltage dependence in a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:4896–4900, 1987.
- [19] M. Colombini. Vdac: The channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.*, 256/257:107–115, 2004.
- [20] R. Massa, L.N. Marlier, A. Martorana, S. Ciccono, D. Pierucci, P. Giacomini, V. de Pinto, and L. Castellani. Intercellular localization and isoform expression of the voltage-dependent anion channel (VDAC) in normal and dystrophic skeletal muscle. *J. Muscle. Res. Cell. M.*, 21:433–442, 2000.
- [21] F. Sachs. Mechanical transduction by membrane ion channels: A mini review. *Mol. Cell. Biochem.*, 104:57–60, 1991.
- [22] G.A. Cottrell. The first peptide-gated ion channel. *J. Exp. Biol.*, 200:2377–2386, 1997.

- [23] E.D. Steinle, D.T. Mitchell, M. Wirtz, S.B. Lee, V.Y. Young, and C.R. Martin. Ion channel mimetic micropore and nanotube membrane sensors. *Anal. Chem.*, 74:2416–2422, 2002.
- [24] N. Fertig, C. Meyer, R.H. Blick, C. Trautmann, and J.C. Behrends. Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology. *Physical Review E*, 64:1–4, 2001.
- [25] S. Flink, F.C. van Veggel, and D.N. Reinhoudt. Sensor functionalities in self-assembled monolayers. *Adv. Mater.*, 12:1315–1328, 2000.
- [26] F. Cecchet, M. Marcaccio, M. Margotti, F. Paolucci, S. Rapino, and P. Rudolf. Redox mediation at 11-mercaptoundecanoic acid self-assembled monolayers on gold. *J. Phys. Chem. B*, 110:2241–2248, 2006.
- [27] Peter Schön. *Protein-modifizierte Elektroden: Immobilisierung und Elektronentransfer*. PhD thesis, Universität Osnabrück, 2003.
- [28] K. Yokoyama and Y. Kayanuma. Cyclic voltammetric simulation for electrochemically mediated enzyme reaction and determination of enzyme kinetic constants. *Anal. Chem.*, 70:3368–3376, 1998.
- [29] M. Darder, E. Casero, F. Pariente, and E. Lorenzo. Biosensors based on membrane-bound enzymes immobilized in a 5-(octyldithio)-2-nitrobenzoic acid layer on gold electrodes. *Anal. Chem.*, 72:3784–3792, 2000.
- [30] S. Kadow, E. Betiku, U. Rinas, and U. Bilitewski. Development of a rapid, quantitative glucosyltransferase assay based on a screen-printed fructose enzyme electrode and application to optimization studies on gtfD expression in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 91:145–161, 2005.
- [31] S. Campuzano, R. Gaalvez, M. Pedrero, F.J. de Villena, and J.M. Pingarron. An integrated electrochemical fructose biosensor based on tetrathiafulvarene-modified self-assembled monolayers on gold electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377:600–607, 2003.
- [32] W. Kutner, H.H. Wu, and K.M. Kadish. Condensation α -cyclodextrin polymer membrane with covalently immobilized glucose oxidase and molecularly included mediator for amperometric glucose biosensor. *Electroanal.*, 6:934–944, 1994.

- [33] P.W. Alexander and G.A. Rachniz. Enzyme inhibition assays with an amperometric glucose biosensor based on a thiolate self-assembled monolayer. *Electroanal.*, 12:343–350, 2000.
- [34] Z. Fang, Y. Qui, and E. Kuffel. Formation of hydrophobic coating on glass surface using atmospheric pressure non-thermal plasma in ambient air. *J. Phys. Appl. Phys.*, 37:2261–2266, 2004.
- [35] S.C.S.; Universiteit Leiden Lai. Mimicking nature: Physical basis and artificial synthesis of the lotus-effect, 2003.
- [36] *Measuring van der Waals Forces.* www.science-projects.com/vdWForce.htm, 2005.
- [37] J. Ou, B. Perot, and J.P. Rothstein. Laminar drag reduction in microchannels using ultrahydrophobic surfaces. *Phys. Fluids.*, 16:4635–4643, 2004.
- [38] S. Bouaidat, O. Hansen, H. Bruus, C. Berendsen, N.K. Bau-Madsen, P. Thomsen, A. Wolff, and J. Jonsmann. Surface-directed capillary systems: Theory, experiments and applications. *Lab on a Chip*, 5:827–836, 2005.
- [39] B. Zhao, J.S. Moore, and D.J. Beebe. Principles of surface-directed liquid flow in microfluidic channels. *Anal. Chem.*, 74:4259–4268, 2002.
- [40] C.S. Lee, S.H. Lee, S.S. Park, Y.K. Kim, and B.G. Kim. Protein patterning on silicon-based surface using background hydrophobic thin film. *Biosens. Bioelectron.*, 18:437–444, 2003.
- [41] H. Sorribas, C. Papeste, and L. Tiefenauer. Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. *Biomaterials*, 23:893–900, 2002.
- [42] D. Irimia and J.O.M. Karlsson. Development of a cell patterning technique using poly(ethyleneglycol)disilane. *Biomed. Microdevices*, 5:185–194, 2003.
- [43] G.S. Lee, Y.J. Lee, K. Ha, and K.B. Yoon. Orientation-controlled monolayer assembly of zeolite crystals on glass using terephthalaldehyde as a covalent linker. *Tetrahedron*, 56:6965–6968, 2000.
- [44] P. Facci, D. Alliata, L. Andolfi, B. Schnyder, and R. Kötz. Formation and characterization of protein monolayers on oxygen-exposing surfaces by multiple-step self chemisorption. *Surf. Sci.*, 504:282–292, 2002.

- [45] S.Y. Choi, Y.J. Lee, Y.S. Park, K. Ha, and K.B. Yoon. Monolayer assembly of zeolite crystals on glass with fullerene as the covalent linker. *J. AM. CHEM. SOC.*, 122:5201–5209, 2000.
- [46] D. Cossement, Z. Delrue, Y. Mekhalif, J. Delhalle, and L. Hevesi. Self-assembled monolayers of branched alkylsilanes on polycrystalline titanium surfaces. *Surf. Interface. Anal.*, 30:56–60, 2000.
- [47] C.P. Tripp and M.L. Hair. Reaction of methylsilanols with hydrated silica surfaces: the hydrolysis of trichloro-, dichloro-, and monochloromethylsilanes and the effects of curing. *Langmuir*, 11:149–155, 1995.
- [48] B.C. Bunker, R.W. Carpick, R.A. Assink, M.L. Thomas, M.G. Hankins, J.A. Voigt, D. Sipola, M.P. de Boer, and G.L. Gulley. The impact of solution agglomeration on the deposition of self assembled monolayers. *Langmuir*, 16:7742–7751, 2000.
- [49] J.D. Grange, J.L. Markham, and C.R. Kurkjian. Effects of surface hydration on the deposition of silane monolayers on silica. *Langmuir*, 9:1749–1753, 1993.
- [50] W. Yoshida, R.P. Castro, J.D. Jou, and Y. Cohen. Multilayer alkoxy-silane silylation of oxide surfaces. *Langmuir*, 17:5882–5888, 2001.
- [51] Y. Liu, L.K. Wolf, and M.C. Messmer. A study of alkyl chain conformational changes in self-assembled n-octadecyltrichlorosilane monolayers on fused silica surfaces. *Langmuir*, 17:4329–4335, 2001.
- [52] T. Wink, S.J. van Zuilen, A. Bult, and W.P. van Bennekom. Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst*, 122:43R–50R, 1997.
- [53] E. Casero, M. Darder, F. Pariente, E. Lorenzo, J. Marin-Benito, and L. Vazquez. Thiol-functionalized gold surfaces as a strategy to induce order in membrane-bound enzyme immobilization. *Nano Lett.*, 2:577–582, 2002.
- [54] K.T. Kinnear and H.G. Monbouquette. An amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase immobilized in a membrane mimetic layer on gold. *Anal. Chem.*, 69:1771–1775, 1997.
- [55] J.D. Burgess, M.C. Rhoten, and F.M. Hawkrige. Cytochrome c oxidase immobilized in stable supported lipid bilayer membranes. *Langmuir*, 14:2467–2475, 1998.

- [56] J.K. Cullison, F.M. Hawkridge, N. Nakashima, and S. Yoshikawa. A study of cytochrome c oxidase in lipid bilayer membranes on electrode surfaces. *Langmuir*, 10:877–882, 1994.
- [57] D. Mayer, K. Ataka, J. Heberle, and A. Offenhäuser. Scanning probe microscopy studies of the oriented attachment and membrane reconstitution of cytochrome c oxidase to a gold electrode. *Langmuir*, 21:8580–8583, 2005.
- [58] Heiko Zimmermann. *Untersuchungen zum direkten Elektronentransfer zwischen Elektrodenoberflächen und immobilisierten Redoxproteinen*. PhD thesis, Ruhr-Universität Bochum, 2000.
- [59] A.L. Plant. Self-assembled phospholipid alkanethiol biomimetic bilayers on gold. *Langmuir*, 9:2764–2767, 1993.
- [60] A. Kheirrolomoom, K. Miyazato, S. Katoh, and E. Sada. Incorporation and activation of a membrane-bound enzyme in bilayers of liposomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35:521–524, 1991.
- [61] K. Kato, P. Walde, H. Mitsui, and N. Higashi. Enzymatic activity and stability of d-fructose dehydrogenase and sarcosine dehydrogenase immobilized onto giant vesicles. *Biotechnol. Bioeng.*, 84:415–423, 2003.
- [62] S. Yixin and S.F. Wang. Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid at a triazole self-assembled monolayer-modified gold electrode. *Microchim. Acta*, 154:115–121, 2006.
- [63] A.A. Karyakin. Prussian blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications. *Electroanal.*, 13:813–819, 2001.
- [64] M. Rowley. New electrochromic material. *Sci. Prog.*, 85:243–262, 2002.
- [65] L.Y. Su, Q.Y. Hong, and Z.H. Lu. All solid-state electrochromic window of prussian blue and electrodeposited WO₃ film with PMMA gel electrolyte. *J. Mater. Chem.*, 8:85–88, 1998.
- [66] J.G. Guam, Y.Q. Miao, and J.R. Chen. Prussian blue modified amperometric FIA biosensor: one-step immunoassay for α -fetoprotein. *Biosens. Bioelectron.*, 19:789–794, 2004.
- [67] R.E. Gyurcsányi, A.S. Nybäck, K. Tóth, G. Nagy, and A. Ivaska. Novel polypyrrole based all-solid-state potassium-selective microelectrodes. *Analyst*, 123:1339–1344, 1998.

- [68] M. Trojanowicz. Application of conducting polymers in chemical analysis. *Microchim. Acta*, 143:75–91, 2003.
- [69] D.W. Arrigan and M.J. Lowens. Studies of the application of overoxidized polypyrrole films in anodic stripping voltammetry. *Anal. Commun.*, 35:61–62, 1998.
- [70] J. Wang, B.Z. Zeng, C. Fang, F. He, and X.Y. Zhou. Electrochemical study of a polypyrrole film/decanethiol self assembled monolayer on a gold electrode. *Electroanal.*, 11:1345–1349, 1999.
- [71] A. Ersöz, V.G. Gavalas, and L.G. Bachas. Potentiometric behavior of electrodes based on overoxidized polypyrrole films. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372:786–790, 2002.
- [72] Youan Xia. Soft lithography and the art of patterning - a tribute to professor George M. Whitesides. *Adv. Mater.*, 16:1245–1246, 2004.
- [73] J.C. Huie. Guided molecular self-assembly: A review of recent efforts. *Smart. Mater. Struct.*, 12:264–271, 2003.
- [74] D.J. Graham, D.D. Price, and B.D. Ratner. Solution assembled and microcontact printed monolayers of dodecanethiol on gold: A multivariate exploration of chemistry and contamination. *Langmuir*, 18:1518–1527, 2002.
- [75] E. Delamarche, H. Schmid, A. Bietsch, N.B. Larsen, H. Rothuizen, B. Michel, and H. Biebuyck. Transport mechanisms of alkanethiols during microcontact printing on gold. *J. Phys. Chem B*, 102:3324–3334, 1998.
- [76] R.S. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, Ingber D.E., and G.M. Whitesides. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials*, 20:2363–2376, 1999.
- [77] M. Mrksich, L.E. Dike, J. Tien, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Exp. Cell. Res.*, 235:305–313, 1997.
- [78] J.L. Wilbur, A. Kumar, H.A. Biebuyck, E. Kim, and G.M. Whitesides. Microcontact printing of self-assembled monolayers: applications in microfabrication. *Nanotechnology*, 7:452–457, 1996.

- [79] R.B. Bass and A.W. Lichtenberger. Microcontact printing with octadecanethiol. Technical report, Department of Electrical and Computer Engineering, University of Virginia, Charlottesville, 2004.
- [80] E. Meyer and H.G. Braun. Controlled dewetting processes on microstructured surfaces - a new procedure for thin film microstructuring. *Macromol. Mater. Eng.*, 276:44–50, 2000.
- [81] N.B. Larsen, H. Biebuyck, E. Delamarche, and B. Michel. Order in microcontact printed self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:3017–3026, 1997.
- [82] A.N. Grace and K. Pandian. A polypyrrole polymethylene pattern on gold using a micro-contact printing technique. *J. Solid. State. Electr.*, 7:296–300, 2003.
- [83] A.F. Runge and S.S. Saavedra. Comparison of microcontact printed and solution adsorbed cytochrome c films on indium tin oxide electrodes. *Langmuir*, 19:9418–9428, 2003.
- [84] J. Pascal. Microcontact printing of PLL-g-PEG and its derivatives. Technical report, ETH Zürich, 2001.
- [85] J.P. Renault, A. Bernard, A. Bietsch, B. Michel, H.R. Bosshard, E. Delamarche, M Kreiter, B Hecht, and U.P. Wild. Fabricating arrays of single protein molecules on glass using microcontact printing. *J. Phys. Chem. B.*, 107:703–711, 2003.
- [86] H.D. Inerowicz, S. Howell, F.E. Regnier, and R. Reifengerger. Multi-protein immunoassay arrays fabricated by microcontact printing. *Langmuir*, 18:5263–5268, 2002.
- [87] S.W. Howell, H.D. Inerowicz, F.E. Regnier, and R. Reifengerger. Patterned protein microarrays for bacterial detection. *Langmuir*, 19:436–439, 2003.
- [88] A. Bernard, J.P. Renault, B. Michel, H.R. Bosshard, and E. Delamarche. Microcontact printing of proteins. *Adv. Mater.*, 12:1067–1070, 2000.
- [89] A. Bernard, E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H.R. Bosshard, and H. Biebuyck. Printing patterns of proteins. *Langmuir*, 14:2225–2229, 1998.

- [90] S. Breisch, B. Heij, M. Löhr, and M. Stezle. Selective chemical surface modification of fluidic microsystems and characterization studies. *J. Micromech. Microeng.*, 14:497–505, 2004.
- [91] Y. Harada, G.S. Girolame, and R.G. Nuzzo. Growth kinetics and morphology of self-assembled monolayers formed by contact printing 7-octenyltrichlorosilane and octadecyltrichlorosilane on Si(111) wafers. *Langmuir*, 20:10878–10888, 2004.
- [92] A. Bernard, D. Fitzli, P. Sonderegger, E. Delamarche, B. Michel, H.R. Bosshard, and H. Biebuyck. Affinity capture of proteins from solution and their dissociation by contact printing. *Nat. Biotechnol.*, 19:866–869, 2001.
- [93] M. Fujihira, M. Furugori, U. Akiba, and Y. Tani. Study of microcontact printed patterns by chemical force microscopy. *Ultramicroscopy*, 86:75–83, 2001.
- [94] D. Trimbach, K. Feldman, N.D. Spencer, D.J. Broer, and C.W.M. Bastiaansen. Block copolymer thermoplastic elastomers for microcontact printing. *Langmuir*, 19:10957–10961, 2003.
- [95] J. Lee, H. Moon, J. Fowler, C.J. Kim, and T. Schoellhammer. Addressable micro liquid handling by electric control of surface tension. *IEEE*, pages 499–502, 2005.
- [96] A. Srinivasan, V. Pamula, M. Pollack, and R. Fair. A digital microfluidic biosensor for multianalyte detection. *IEEE*, pages 327–330, 2003.
- [97] P. Paik, V.K. Pamula, M.G. Pollack, and R.B. Fair. Electrowetting based droplet mixers for microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 3:28–33, 2003.
- [98] D. Cossement, Y. Delrue, Z. Mekhalif, J. Delhalle, and L. Hevesi. Self-assembled monolayers of branched alkylsilanes on polycrystalline titanium surfaces. *Surf. Interface. Anal.*, 30:56–60, 1999.
- [99] P. Gros, H. Durliat, and M. Comtat. Use of polypyrrole film containing $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ as pseudo-reference electrode: Application for amperometric biosensors. *Electrochim. Acta*, 46:643–650, 2000.
- [100] Q. Deng, B. Li, and S.J. Dong. Self-gelatinizable copolymer immobilized glucose biosensor based on prussian blue modified graphite electrode. *Analyst*, 123:1995–1999, 1998.

- [101] R. Hazen, R.M. Spaulding, and K.K. Kasem. Electrochemistry in thin solid films of prussian blue: A model demonstration on reversible behavior. *American Journal of Undergraduate Research*, 2:27–36, 2002.
- [102] M.M. Baizer and H. Lund. *Organic Electrochemistry*, page 113. Marcel Dekker, 1983.
- [103] S.J. Konopka and B. McDuffie. Diffusion coefficients of ferri- and ferrocyanide ions in aqueous media, using twin-electrode thin-layer electrochemistry. *Anal. Chem.*, 42:1741–1746, 1970.
- [104] Tesfaye Hailu Degefa. *Ion Channel (mimetic) sensors: Mechanism of Charge Propagation through Thiol-, Protein- and Dendrimer-Modified Electrodes*. PhD thesis, Universität Osnabrück, 2005.
- [105] A. J. Bard and L.R. Faulkner. *Electrochemical Methods*, chapter 6.5.2. John Wiley, 1980.
- [106] T.R.L. Paixao, D. Lowinsohn, and M. Bertotti. Use of an electrochemically etched platinum microelectrode for ascorbic acid mapping in oranges. *J. Agric. Food. Chem.*, 54:3072–3077, 2006.
- [107] S.X. Zhang, Y.Q. Fu, and C.Q. Sun. Fabrication of poly(allylamine)ferrocene monolayer based on electrostatic interaction and its electrocatalytic oxidation of ascorbic acid. *Electroanal.*, 15, 2003.
- [108] Carmen Simona Asaftei. *Synthesis of redox units and modification of mesoporous surfaces by covalent cascade reactions*. PhD thesis, Universität Osnabrück, 2005.
- [109] J. Kupec, K. Charvatova, M. Navratil, V. Kresalek, and M. Kresalkova. Effect of cross-linking waste protein with dialdehydes on its biodegradation under anaerobic conditions. *J. Polym. Environ.*, 11:93–100, 2003.
- [110] S. Matsuda, H. Iwata, N. Se, and Y. Ikada. Bioadhesion of gelatine films crosslinked with glutaraldehyde. *J. Biomed. Mater. Res.*, 45:20–27, 1998.
- [111] R. Koncki, I. Walcerz, F. Ruckruh, and S. Glab. Bionzymatic potentiometric electrodes for creatine and l-arginine determination. *Anal. Chim. Acta*, 333:215–222, 1996.

- [112] S. Campuzano, M. Pedrero, F.J.M. de Villena, and J.M. Pingarron. A lactose bienzyme biosensor based on self-assembled monolayer modified electrodes. *Electroanal.*, 16:1385–1392, 2004.
- [113] Kevin Raiber. *Herstellung von Mikrosensoren durch Softlithographie unter Verwendung organischer Monoschichten*. PhD thesis, Universität Hamburg, 2005.

Vita

Schulausbildung

1982 - 1986	Michael Grundschule in Ibbenbüren
1986 - 1992	Kardinal von Galen Realschule in Mettingen
1992 - 1995	Kardinal von Galen Gymnasium in Mettingen

Beruflicher Werdegang

WS 1995 - SS 1996	Studium der Chemie an der <i>Westfälische Wilhelms Universität</i> in Münster
WS 1996 - WS 2000	Studium Chemieingenieurwesen mit dem Schwerpunkt chemische Verfahrenstechnik an der <i>Fachhochschule Münster</i> ; Praxissemester bei <i>Croda Universal</i> in Hull, Großbritannien; Abschluss : Dipl.-Ing.
1. 2001 - 11. 2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter bei <i>Inventus Biotec, Gesellschaft für innovative Bioanalytik, Biosensoren und Diagnostika GmbH & Co. KG.</i> in Münster
Seit 12. 2002	Promotionsarbeit am Institut für Chemie der <i>Universität Osnabrück</i> , Arbeitsgruppe <i>organische Chemie II</i> , Prof. Dr. L.Walder; Forschungsschwerpunkt: elektrochemische Detektion an oberflächenmodifizierten Sensoren

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich vorliegende Arbeit selbständig angefertigt, und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Alle Stellen, die dem Wort oder Sinn nach anderen Arbeiten entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall, unter genauer Angabe der Quelle, als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ein früherer Promotionsversuch hat nicht stattgefunden.

Osnabrück, den 6. Februar 2007

Burghard Lutter

Passive Matrix Addressing of an Electrochemical Sensor Array

B. Lutter, L. Walder, University of Osnabrück

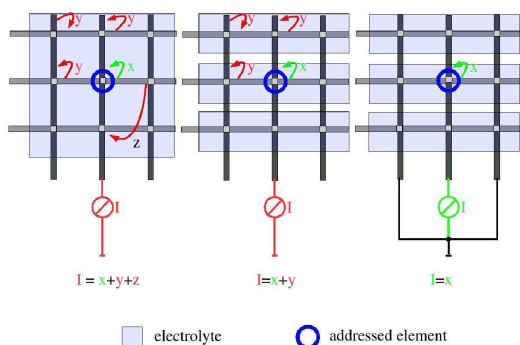


Introduction

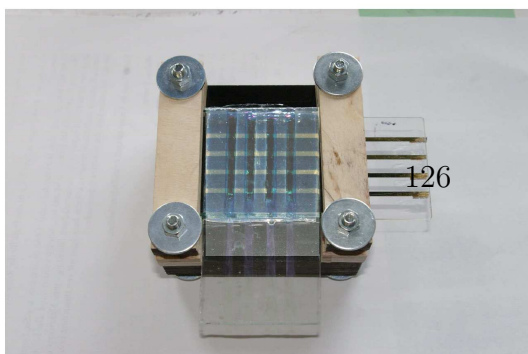
Individual addressing of sensor array lack applicability due to the high amount of conducting strips needed. Addressing the electrodes with a passive matrix helps to reduce the numbers of the required strips. Special steps have to be considered in order to allow a precise addressing of the passive matrix, especially at small arrays. Such an attempt has not been reported so far.

Assembly of the passive matrix array

Two plates bearing the conducting strips of the electrodes are mounted at a close distance to each other, so that the strips cross each other. A sensing spot is formed at each intersection. The electrolyte has to be separated into single compartments parallel to the counter electrodes and all working electrodes have to be put onto the same potential to avoid the flow of parasitic currents (y, z) in addition the current of the addressed sensor (x).

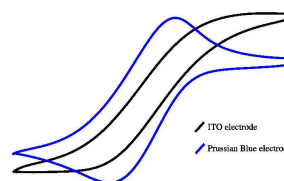


The most reliable compartmentation can be done by using a sealing. A separation based upon capillary forces can be used as an alternative allowing a *Sip In* filling of the compartments.



Combined counter/reference electrode

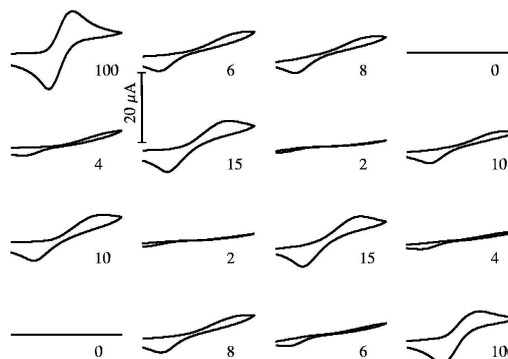
The apparently slow reaction observed at a two electrode systems makes it hard to obtain usable results. A combined counter/reference electrode made of *Prussian Blue* helps to obtain a diffusion controlled electrochemistry at the sensing spots.



1mM $K_3[Fe(CN)_6]$ and $K_3[Fe(CN)_6]$; 100 mM KCl; 200 μ m spacer; $\nu = 25 \frac{mV}{s}$; -300mV to 300mV

Combinatorial chemistry at the passive matrix array

This passive matrix array can be used in combinatorial chemistry. The loss of the insulating properties of a SAM made of *hexadecane thiole* [1] with an increasing content of *aminoundecane thiole* could be determined.



% of *aminoundecane thiole* in incubation solution; 1mM $K_3[Fe(CN)_6]$ and $K_3[Fe(CN)_6]$; 100 mM phosphate buffer pH 4; 2.5 mm spacing; $\nu = 100 \frac{mV}{s}$; -350mV to 350mV

Conclusion

The highlights of the described passive matrix array are its simple construction and applicability in routine analysis. The addressing can be done using a conventional potentiostat with an additional potential follower and some switches.

References

- [1] He, Li, Zhou, Zhang, Li, and Liu. Fabrication of microelectrodes arrays using microcontact printing. *Langmuir*, 16:9683-9686, 2000.