

**Entwicklung eines miniaturisierten elektrophoretischen Analysensystems
auf Keramikbasis zur Bestimmung von Polyphenolen**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marc Goldbach
aus
Gerolstein

Marburg 2006

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen

am

Erstgutachter	Prof. Dr. Michael Keusgen
Zweitgutachter	Prof. Dr. Udo Bakowsky

Tag der mündlichen Prüfung am

Für meine Eltern und Geschwister

Danke!

Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine unermüdliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie die Schaffung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Prof. Dr. Maike Petersen und Herr Prof. Dr. Gerhard Klebe danke ich für die weitere Teilnahme der Prüfungskommission.

Herrn PD Dr. Klaus Reuter danke ich für die Übernahme des Protokollführers.

Mein besonderen Dank gilt Herrn Dr. Markus Hartmann für die zahlreichen Anregungen, Diskussionen und psychologische Unterstützung, insbesondere zum Thema der muncalen Drife-of-Life-Methodik. Den übrigen Arbeitsgruppenmitgliedern, die es mir bitte nachsehen nicht alle einzeln genannt zu haben, gilt mein Dank für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre und den Spaß, den wir während aber auch nach der Arbeitszeit (Guddy says: Hello) hatten.

Herrn Helmut Axthelm danke ich für die Herstellung der Keramikchips und die zahlreichen Tipps zu LTCC.

Ein besonderer Dank geht an Erwin „Löter“ Schott für die unermüdliche Hilfe bei hochspannenden Fragestellungen und Problemen sowie der Herstellung des Hochspannungsnetzgerätes.

Herrn Andreas Hofmann gilt mein Dank für die schnelle Konstruktion der Chiphalterung.

Der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Bilitewski danke ich für die zahlreiche Unterstützung und die Fotoaufnahmen der Kapillaren.

Bedanken möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Frahm für die Kontaktwinkelmessungen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken ohne deren bedingungslose Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso herzlich danke ich Lydia, die mir jederzeit zur Seite stand und dafür sorgte, dass ich das Leben neben der Arbeit nicht vergessen habe. Ihr sei außerdem für ein immer offenes und geduldiges Ohr gedankt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
I.1. Kapillarelektrophorese (CE)	1
I.2. Definition eines Mikrototalanalysensystems (μ TAS).....	1
I.3. LTCC-Keramik	3
I.4. Elektrochemische Detektion (ECD)	4
I.5. Amperometrische Biosensoren	5
I.6. Zielsetzung dieser Arbeit	6
II. Grundlagen	9
II.1. μ -TAS (Mikrototalanalysensysteme)	9
II.2. Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE).....	9
II.2.1. Prinzip der Kapillarelektrophorese	9
II.2.2. Methoden der Kapillarelektrophorese	10
II.2.3. Theorie der Kapillarelektrophorese	15
II.2.4. Voltammetrie	33
II.2.5. Amperometrie	36
II.3. LTCC-Keramik.....	42
II.4. Biosensoren	44
II.5. Immobilisierung.....	51
II.6. Antikörper.....	53
II.7. Polyphenoloxidasen.....	56
III. Material und Methoden.....	61
III.1. Material	61
III.1.1. Chemikalien und Biochemikalien	61
III.1.2. Enzyme	63
III.1.3. Lösungen und Puffer	63
III.1.4. Geräte und Materialien.....	66
III.2. Amperometrische Messungen mit LTCC-Keramikchips.....	67
III.2.1. LTCC-Keramikchip	67
III.2.2. Eigenschaften und Kenngrößen der verwendeten LTCC-Keramik-Chips.....	68
III.3. Systemaufbau	70
III.4. Befüllungstechniken von LTCC-Keramikkapillaren	72
III.5. Konditionierung der Kapillaren	74
III.6. Durchführung amperometrischer Messungen	74
III.6.1. Trennkanalinjektion	75
III.6.2. Elektrokinetische Beladung.....	76
III.6.3. Sensorenüberprüfung	76
III.6.4. Herstellung einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode	77
III.6.5. Reinigung der Elektrodenkontakte.....	77
III.6.6. Silanisierung von LTCC-Keramiken	77
III.6.7. Kontaktwinkelmessung von LTCC-Keramiken.....	79
III.7. Herstellung biosensitiver Schichten	79
III.7.1. Reinigung der Goldprismen	79
III.7.2. Erzeugung und Aktivierung von Aminooberflächen	79
III.7.4. Erzeugung und Aktivierung von Carboxyoberflächen	80
III.7.5. Herstellung von Polymeroberflächen.....	81

III.7.6. Aktivierung von Polyethylenglykoloberflächen	82
III.7.7. H ₂ -Substitution mit Bernsteinsäureanhydrid.....	83
III.7.8. Blocken von SPR-Küvetten mit Rinderserumalbumin (BSA).....	83
III.7.9. Aktivitätsprüfung immobilisierter Enzyme.....	83
III.7.10. Berechnung der Schichtdickenzunahme	85
IV. Ergebnisse.....	87
IV.1. Entwicklung von Strategien zur Immobilisierung von Biomolekülen auf festen Trägern mit Hilfe der Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR)	87
IV.1.1. Immobilisierung	87
IV.1.1.1. Vorbereitung der Träger.....	87
IV.1.1.2. Reinigung der Goldprismen	87
IV.1.2. Erzeugung einer Aminooberfläche	88
IV.1.3. Erzeugung einer Carboxyoberfläche.....	88
IV.1.4. Erzeugung von PEG-Oberflächen auf aminofunktionalisierten Goldprismen	89
IV.1.5. Immobilisierung von Antikörpern auf funktionalisierten PEG-Oberflächen	91
IV.1.5.1. Oxidation von Amino-PEG beschichteten Goldprismen	92
IV.1.5.2. Immobilisierung von Antikörpern auf Goldträgern mit homobifunktionaler PEG-Beschichtung	97
IV.1.5.3. Ausrichtung der Antikörperbindung mit Hilfe von Na ₂ S ₂ O ₈ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Kobaltchlorid	105
IV.1.5.4. Immobilisierung von Antikörpern auf 3-MPS-Oberflächen.....	109
IV.2. Immobilisierung fungaler Polyphenoloxidasen auf funktionalisierten Goldprismen ...	111
IV.2.1. Vorbereitung der SPR-Küvetten	111
IV.2.2. Immobilisierung von Phenoloxidasen.....	112
IV.2.3. Photometrische Funktionskontrolle immobilisierter Phenoloxidasen mit ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat])	113
IV.2.4. Farbbassay mit Syringaldazin	114
IV.2.5. Laccase aus <i>Agaricus bisporus</i>	114
IV.2.6. Laccase aus <i>Trametes versicolor</i>	116
IV.2.8. Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i>	121
IV.3. Entwicklung eines Mikro-CE-Systems auf LTCC-Basis.....	125
IV.3.1. Hochspannungsnetzgeräte (HSPG).....	125
IV.3.2. Befüllung mikrofluidischer Systeme bei LTCC-Keramikchips.....	126
IV.3.3. Chipalterungen mit integrierter Kontaktierung.....	126
IV.3.4. Einfluss elektrischer und elektromagnetischer Störimpulse	127
IV.3.5. Kontaktwinkelmessungen	128
IV.3.6 Berechnung messspezifischer Parameter von LTCC-Keramikchips	131
IV.4. Amperometrische Messungen zur Trennung von Polyphenolen	134
IV.4.1. Vorbereitung der Kapillaren	134
IV.4.2. Überprüfung der amperometrischen Detektoreinheit (2-Elektrodenanordnung).....	135
IV.4.3. Konditionierung der Kapillaroberfläche mit Kaliumhydroxid	138
IV.4.4. Trennkanalinjektion	142
IV.4.4.1. Einfluss der Trennspannung auf den Elektrolytpuffer.....	142
IV.4.4.2. Trennkanalinjektion von Wasserstoffperoxid.....	144
IV.4.4.3. Trennkanalinjektion von Polyphenolen	146
IV.4.4.4. Amperometrische Detektion von Brenzkatechin in einem funktionalisierten LTCC-Keramikchip	152
IV.4.4.5. Trennung und Detektion von Polyphenolgemischen.....	155
IV.4.4.6. Gesamtübersicht gemessener Migrationszeiten von Polyphenolen	159
IV.4.5. Elektrokinetische Injektion von Polyphenolen in LTCC-Keramikchips	160

IV.4.5.1. Reinigung der Elektrodenkontakte.....	161
IV.4.5.2. Elektrolyttestung bei unterschiedlichen Potentialschaltungen.....	162
IV.4.5.3. Amperometrische Detektion von Polyphenolen nach elektrokinetischer Injektion	163
IV.4.5.3.1. Brenzkatechin.....	164
IV.4.5.3.2. Dopamin.....	170
IV.4.5.3.3. Pyrogallol.....	176
IV.4.5.3.4. Gallussäure.....	183
IV.4.5.3.5. Quercetin.....	188
IV.4.5.3.6. Resorcin.....	189
IV.4.5.3.7. Resveratrol.....	191
IV.4.5.3.8. Kaffeesäure.....	192
IV.4.5.4. Messparameter unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte.....	193
IV.4.5.5. Gesamtübersicht amperometrisch detektierter Polyphenole.....	196
IV.4.5.6. Trennung und amperometrische Detektion von Polyphenolgemischen in einem LTCC-Keramikchip nach elektrokinetischer Injektion	200
IV.4.5.7. Messparameter von Polyphenolgemischen.....	207
V. Diskussion.....	211
V.1. Entwicklung von Strategien zur Immobilisierung von Biomolekülen auf festen Trägern mit Hilfe der Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR)	211
V.1.1. Immobilisierung von Antikörpern auf funktionalisierten PEG-Oberflächen.....	212
V.1.1.1. Heterobiofunktionale PEG-Oberfläche	212
V.1.1.2. Homobiofunktionale PEG-Oberflächen.....	217
V.1.2. Ausrichtung der Antikörperbindung mit Hilfe von $N\alpha,N\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Kobaltchlorid.....	220
V.1.3. Immobilisierung von Antikörpern auf 3-MPS Oberflächen.....	222
V.2. Immobilisierung fungaler Polyphenoloxidasen auf funktionalisierten Goldprismen ...	225
V.2.1. Laccase aus <i>Agaricus bisporus</i>	225
V.2.2. Laccase aus <i>Trametes versicolor</i>	228
V.2.3. Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i>	230
V.3. Entwicklung eines Mikro-CE-Systems auf LTCC-Basis.....	232
V.3.1. Kontaktwinkelmessungen auf LTCC	233
V.3.2. Berechnung messspezifischer Parameter von LTCC-Keramikchips	235
V.4. Amperometrische Messungen zur Trennung von Polyphenolen	237
V.4.1. Vorbereitung der Kapillaren.....	237
V.4.2. Überprüfung der amperometrischen Detektoreinheit.....	238
V.4.3. Konditionierung der Kapillaroberfläche mit Kaliumhydroxid.....	242
V.4.4. Trennkanalinjektion.....	242
V.4.4.1. Einfluss der Trennspannung auf den Elektrolytpuffer	243
V.4.4.2. Trennkanalinjektion von Wasserstoffperoxid	244
V.4.4.3. Trennkanalinjektion von Polyphenolen.....	246
V.4.4.4. Amperometrische Detektion von Brenzkatechin in einem mit APTES silanisierten LTCC-Keramikchip	252
V.4.4.5. Trennung und Detektion von Polyphenolgemischen	254
V.4.5. Elektrokinetische Injektion von Polyphenolen in LTCC-Keramikchips	257
V.4.5.1. Reinigung der Elektrodenkontakte.....	257
V.4.5.2. Amperometrische Detektion von Polyphenolen nach elektrokinetischer Injektion	258
V.4.5.2.1. Brenzkatechin.....	259
V.4.5.2.2. Dopamin	263

V.4.5.2.3. Pyrogallol	266
V.4.5.2.4. Gallussäure	267
V.4.5.2.5. Quercetin	269
V.4.5.2.6. Resorcin.....	270
V.4.5.2.7. Resveratrol.....	272
V.4.5.2.8. Kaffeesäure.....	273
V.4.5.3. Einflüsse des Herstellungsprozesses auf Elektroden und Kapillaren.....	274
V.4.5.4. Messparameter unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte	278
V.4.5.5. Leistungsdaten des LTCC-Systems.....	279
V.4.5.6. Trennung und amperometrische Detektion von Polyphenolgemischen.....	281
VI. Zusammenfassung und Ausblick.....	283
VII. Literaturverzeichnis	287
VIII. Tabellenanhang.....	301

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche der Arbeitselektrode
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat]
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
AU	arbitrary unit
BDDG	1,4-Butandiol diglycidylether
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
C	Kapazität
CE	Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis)
CAE	Kapillaraffinitätselektrophorese
CCE	Chirale Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
d	Dicke
D	Diffusionskoeffizient
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e	Ladungsdichte der Oberfläche
E	elektrische Feldstärke
e ₀	Elementarladung
E ₀	Standardpotential
EOF	elektroosmotischer Fluss
E _{pot}	Potential der Arbeitselektrode
F	Faradaykonstante
F _e	Beschleunigungskraft
F _{fc}	Reibungskraft
F _{rel}	Relaxationskraft

F_{ret}	Retardationskraft
g	Gramm
G	Leitfähigkeit
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horse radish peroxidase
HSPG	Hochspannungsnetzgerät
I	Strom
I_c	kapazitiver Strom
i.d.R.	in der Regel
IF	Isoelektrische Fokussierung
ITP	Isotachophorese
J	Stromdichte
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
L_{eff}	Detektionslänge
L_{ges}	Gesamtlänge
ln	natürlicher Logarithmus
LTCC	low temperature co-fired ceramic
M	Molarität, molar
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm^2	Quadratmillimeter
MW	Molekulargewicht
MEKC	micellarelektrokinetische Chromatographie
mmol	millimolar
$\text{M}\Omega$	Megaohm
N	Bodenzahl
n.b.	nicht bestimmbar
nA	Nanoampere
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nl	Nanoliter
p.a.	pro analysis

PBS	phosphate buffered saline
PC	Polykarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEEK	Polyetheretherketon
PEG	Polyethylenglykol
PMMA	Polymethylmetacrylat
pH	pondus hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
ppb	parts per billion
Q	Joulesche Wärme
r	Stokes-Radius des Teilchens
R	ohmscher Widerstand oder ideale Gaskonstante
RT	Raumtemperatur
S	Siemens
S _E	Einheitsfläche
SDS	Nariumdodecylsulfat
SPR	surface plasmon resonance
SPS	Schlauchpumpensystem
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
u	Ionenmobilität
U	Spannung
U _{eff}	effektive Mobilität
U/min	Umdrehung pro Minute
v	Wanderungsgeschwindigkeit
v _{eof}	elektroosmotische Geschwindigkeit
V _{inj}	Injektionsvolumen
W	Watt
w	Peakbreite
w/2	Peakbreite bei halber Peakhöhe
z	Ladungszahl
α	Dissoziationsgrad

δ	Diffusionsschichtdicke
ϵ_0	absolute Dielektrizitätskonstante
ϵ_r	relative Dielektrizitätskonstante
η	Viskosität
φ	Potential
θ	totale Porosität
κ	spezifische Leitfähigkeit
μ	Mobilität
μ_{ep}	elektrophoretische Mobilität
μ_{eof}	elektroosmotische Mobilität
μA	Mikroampere
μm	Mikrometer
μT	Ionenmobilität
μ -TAS	Mikrozotalanalysensystem
σ^2	Varianz
ζ	Zeta-Potential
Ψ	Potentialdifferenz
Λ	molare Leitfähigkeit
Θ	Auflösung
$^{\circ}C$	Temperatur, Grad

I. Einleitung

I.1. Kapillarelektrophorese (CE)

Die Elektrophorese konnte sich erst in den vergangenen drei Jahrzehnten als Trenntechnik etablieren, obwohl die theoretischen Grundlagen seit mehr als 100 Jahren durch Kohlrausch (1897) bekannt sind. Der Schwede Arne Tiselius wird als Erfinder der Elektrophorese angesehen. Er hat als erster die chemisch-analytische Trenntechnik benutzt, wofür er 1948 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Hjerten (1967) führte erstmals Versuche zur Kapillarelektrophorese in freier Lösung durch. Die Quarzkapillaren besaßen einen Innendurchmesser von 1 bis 3 mm, die er mit Methylcellulose beschichtete, um Elektroosmose und Thermokonvektion zu unterdrücken. Mitte der 70er Jahre entwickelte sich daraus die Kapillar isotachophorese. Dabei wurden Kapillaren aus Glas oder Teflon verwendet, die einen Innendurchmessern von 300 bis 500 μm besaßen [Kuhn, 1995]. Durch den Gebrauch von Teflon konnte die Elektroosmose weitgehend unterdrückt werden. Die heute bekannten Trennleistungen der CE wurden erst durch die von Jorgenson und Lukacs (1981) verwendeten fused-silica Kapillaren mit Innendurchmessern von 50 bis 200 μm erreicht. In wesentlichen Punkten unterschied sich ihre Methode der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) von vorherigen Publikationen. Durch die Verwendung von Kapillaren mit Innendurchmessern von weniger als 100 μm konnte die Wärmeentwicklung während der Elektrophorese minimiert werden. Zudem wurde die Elektroosmose nicht unterdrückt, sondern als effizientes Pumpsystem zum Transport der Probe verwendet. In den folgenden Jahren wurden viele Verbesserungen in Bezug auf die Detektion und Leistungsfähigkeit der CZE durchgeführt. Darüber hinaus wurden einige neue, von der CZE abgeleitete Trenntechniken entwickelt (siehe Kapitel II.2.2.), um die hohen Anforderungen an eine moderne Trenntechnik zu erfüllen [Kuhn, 1995]. Anfang der 90er Jahre wurde mit der Elektrophorese auf Mikrochips eine noch stärker miniaturisierte Variante der CE entwickelt [Manz et al., 1992]. Ziel war es, neben der Verringerung der Gerätedimensionen eine erhöhte Trenneffizienz, verringerte Analysenzeiten sowie einen noch geringeren Verbrauch von Lösungsmitteln und Probenmenge zu erreichen.

I.2. Definition eines Mikrototalanalysensystems (μTAS)

Die weitere Miniaturisierung der Kapillarelektrophorese führte zu dem Begriff der Mikrototalanalysensysteme (μTAS). Darunter versteht man die Verkleinerung eines

gesamtanalytischen Prozesses von der Probenpräparation bis hin zur Injektion und Detektion. In diesem Zusammenhang wird häufig der Begriff „Lab-on-a-chip“ verwendet. Nach der von Lee und Lee (2004) verwendeten Terminologie wird damit ein miniaturisiertes Gerät mit unterschiedlich integrierten Prozessen auf einem Mikrochip verstanden. Heute werden meist beide Termini für dieselbe Applikation verwendet. Vorteil der μ TAS ist die Möglichkeit, ein vollständig analytisches Mikrosystem durch die Integration verschiedener funktioneller Module in einem kleinen Gerät zu vereinen. Unter diesen Modulen versteht man beispielsweise Methoden der Probenaufarbeitung, der Trennung oder der Detektion (Abb. 1).

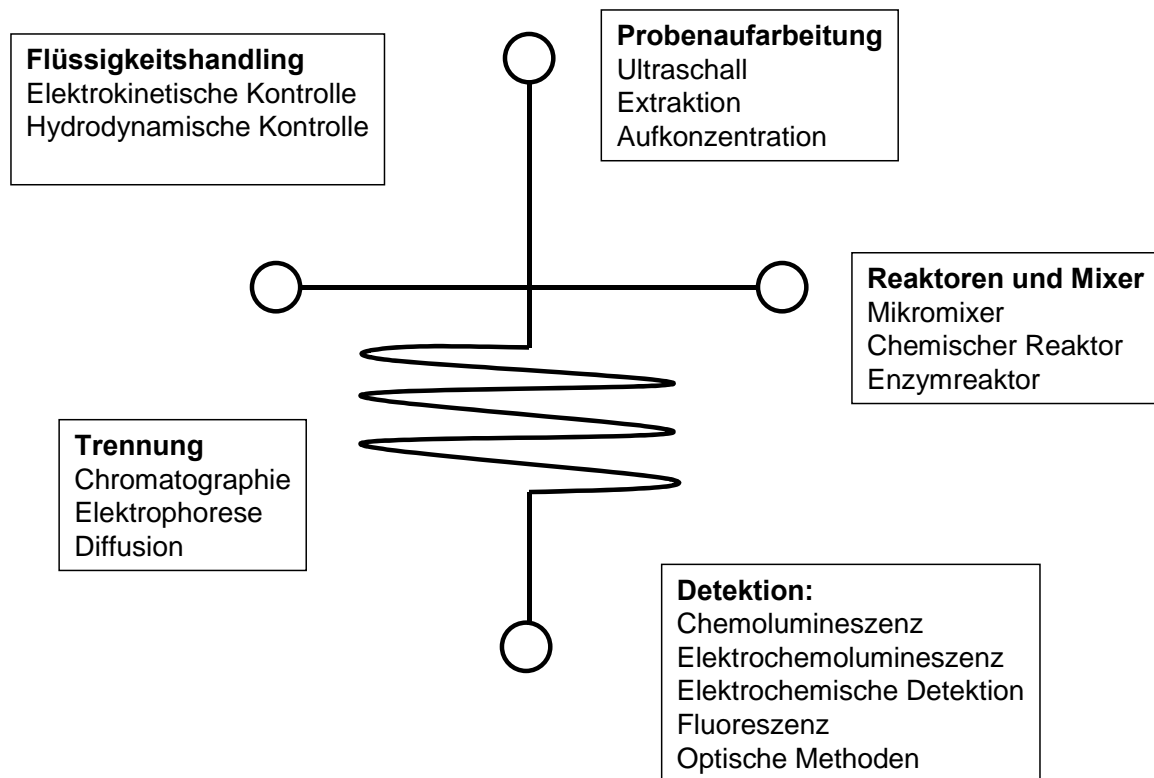


Abbildung 1: Integrierte Technologien in μ TAS Anwendungen.

Geringe Analysenzeiten, hohe anlegbare Feldstärken, geringer Bedarf an Lösungsmitteln und Probenvolumen machen die Entwicklung kleiner, portabler und hochintegrierter Analysensysteme in den unterschiedlichsten Anwendungsbereichen möglich. Klinische Diagnostik, Immunosassays, PCR, Sequenzierung, DNA-Trennung und Analyse, Proteinanalyse und Zellkulturtechniken sind nur einige der zahlreichen Applikationsfelder für mikrostrukturierte Chipsysteme (Tab. 1) [Auroux et al., 2002].

Lab-on-a-chip Anwendungen	
DNA-Analyse	Mikro-CE Chips für die Hochdurchsatz-DNA-Genotypisierung Mikrofluidikchips für eine Untersuchung des Genoms DNA Hybridisierungsassays in Mikrofluidikchips
Protein-Analyse	Proteintrennung in Mikrochips Mikrofluidiksysteme als Interface zur Massenspektroskopie Mikrofluidiksysteme für Immunoassays
weitere biologisch relevante Moleküle	Analyse von Kohlenhydraten, Lipiden und Fettsäuren
μ -Fließcytometrie	μ -FACS (fluorescence-activated cell sorting)
Integrierte Kleingeräte und weitere Applikationen	PCR basierte DNA-Amplifizierung Vor- bzw. nachgeschaltete Prozessschritte (z.B. Filterung)

Tabelle 1: Übersicht der Anwendungsgebiete von Lab-on-a-chip Applikationen.

Die Interaktion von Leukozyten mit ihrer physiologischen Umgebung wurde auf einem Mikrokapillar-Array im Längenumfang menschlicher Blutkapillaren untersucht [Bakajin et al., 1998]. Im Bereich der klinischen Diagnostik wurde beispielsweise nach Genen mit Brustkrebsverdacht mittels Polymer-beschichteter Mikrochips gescreent [Tian et al., 2000]. Die erste Generation analytischer Anwendungen auf Basis der Mikrofluidik kam 1999 auf den Markt [Lee und Lee, 2004]. Heute existieren bereits zahlreiche marktreife Produkte wie beispielsweise Genchips (Corning, Motorola, Affimetrix), integrierte Fluidikchips für die DNA-Analyse (Lab-on-a-chip von Caliper und Applied Biosystems), Wirkstofftransportsysteme (Alza, Battelle) und implantierbare Sensoren (Medtronic) [Popat und Desai, 2004].

I.3. LTCC-Keramik

Sehr wichtig für die Entwicklung eines Mikrochip CE-Systems ist die Wahl des Chipmaterials. Die meisten CE-Systeme, die auf Silizium, Glas oder Kunststoff basieren, sind transparent und werden bevorzugt mit optischen Detektionssystemen kombiniert. Die Laser induzierte Fluoreszenz (LIF) ist eine etablierte Methode für CE-Detektionen auf Grund ihrer hohen Sensitivität. Zudem kann sie bis zu einer bestimmten Größe an miniaturisierte Mikrokapillaren angepasst werden [Nie et al., 1994; Haab und Mathies, 1995]. Der Nachteil optischer Detektorsysteme ist die Notwendigkeit eines transparenten Materials wie beispielsweise Glas oder Kunststoff. Außerdem ist die Detektionseinheit sehr groß und nur schwer zu miniaturisieren. Zudem besitzen die meisten Analyten keine Autofluoreszenz. Glas in hoher Qualität ist sehr teuer, zerbrechlich und schwierig in mehreren Layern zu verbinden. Polymere wie Polycarbonat, Polymethylmetacrylate oder Polydimethylsiloxan, sind viel

preiswerter als Glas und kostengünstig als Massenprodukt herzustellen. Andererseits sind zahlreiche Polymere nicht ausreichend inert gegenüber organischen Lösungsmitteln. Zudem führt möglicherweise die Oberflächenbeschaffenheit der Kapillaren zu keiner Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses.

Zur Massenproduktion eines Mikrochips für μ TAS-Anwendungen wird ein Material benötigt, welches die Eigenschaften von Glas besitzt und sich kostengünstig herstellen lässt. Keramische Materialien scheinen dafür besonders geeignet zu sein. Sie sind zwar nicht transparent, besitzen aber vergleichbare physikalische und chemische Eigenschaften. Die sehr preiswerten Grünfolien "green sheets" können durch Laserablation, Ausstanzen, Schneiden oder Fräsen bearbeitet werden. Elektroden und Leitungsbahnen können vor der Laminierung und Sinterung aufgedruckt werden. Dabei unterscheidet man zwischen HTCC (high temperature co-fired ceramic) und LTCC (low temperature co-fired ceramic). Auf Grund einer Sintertemperatur von etwa 1600 °C können bei HTCC-Keramiken nur Leitungsmaterialien wie beispielsweise Wolfram eingesetzt werden, die erst bei höheren Temperaturen schmelzen. Die lederartigen LTCC-Folien benötigen lediglich eine Sintertemperatur von 850 °C. Dies macht den Einsatz anderer Materialien wie Gold oder Silber praktikabel. Nach dem Sintern sind die elektrophoretischen und elektroosmotischen Eigenschaften mit denen von Glas vergleichbar. Die in dieser Arbeit benutzten LTCC-Folien sind als hochkomplexe Multilayersysteme für elektronische Anwendungen verwendbar. Bevorzugte Einsatzgebiete für LTCC-Anwendungen sind Automobilbau, Unterhaltungselektronik, Medizintechnik und kabellose Datentransfer-Technologien.

I.4. Elektrochemische Detektion (ECD)

Betrachtet man sich die Entwicklung in der analytischen Chemie, so wird deutlich, dass elektrochemische Sensoren die am stärksten wachsende Klasse chemischer Sensoren darstellt. Es gibt drei Methoden zur elektrochemischen Detektion:

- Amperometrie
- Potentiometrie
- Konduktometrie

Die Amperometrie misst die zeitliche Veränderung des Stromsignals. Elektropherogramme, die Strom-Spannungskurven aufzeichnen, kennzeichnen die Potentiometrie. Änderungen der

Leitfähigkeit werden mittels Konduktometrie gemessen. Dabei kann als chemischer Sensor ein Gerät beschrieben werden, welches kontinuierlich Informationen über seine Umwelt liefert [Stradiotto et al., 2003]. Idealerweise liefert ein chemischer Sensor eine bestimmte Antwort in direktem Bezug zur Quantität der elektrochemischen Spezies.

Die Verwendung der elektrochemischen Detektion in LTCC-Mikrochips hat zahlreiche Vorteile. Die Sensitivität und Selektivität der ECD ist mit der Fluoreszenz detektierter Methoden vergleichbar. Verglichen mit optischen Systemen wie beispielsweise der LIF sind die benötigten Geräte für elektrochemische Systeme sehr preiswert. Darüber hinaus lassen sich die Detektion und Kontrolleinheit leicht miniaturisieren und in den Mikrochip integrieren. Der LTCC-Mikrochip ist auf Grund seiner Materialeigenschaften, der ökonomischen Herstellung und Miniaturisierbarkeit für die Massenproduktion geeignet. Einsatzbereiche sind Medizin, Pharmazie, lebensmittelchemische Analytik und die Umweltüberwachung.

I.5. Amperometrische Biosensoren

Eine weitere Entwicklung chemischer Sensoren sind so genannte Biosensoren. Darunter versteht man ein analytisches System, bei dem eine biologische Komponente mit einem Signalwandler (Transducer) kombiniert oder zumindest räumlich eng mit diesem verknüpft ist (Abb. 2) [Turner et al., 1987].

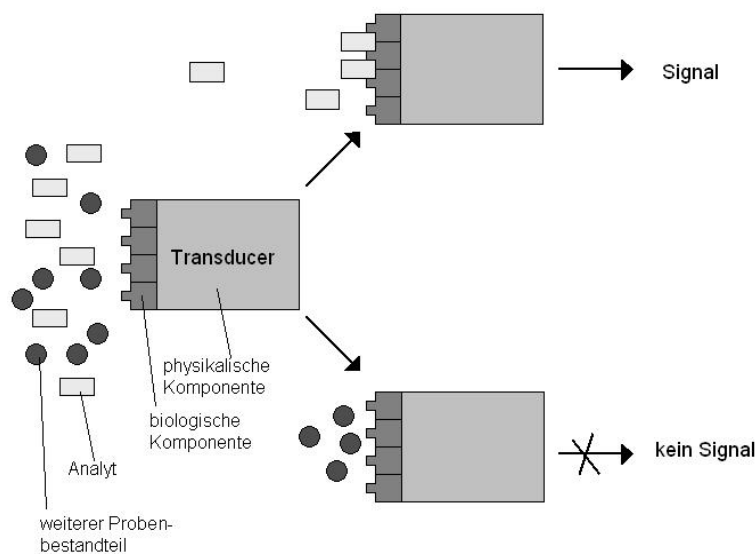


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Biosensors. Eine biologische Komponente (z.B. Enzym oder Antikörper) ist an eine physikalische Komponente („Transducer“) gekoppelt. Nur ein passender Analyt erzeugt ein Signal (Quelle: Hartmann, 2004).

Nach der Definition von IUPAC muss ein Biosensor zusätzlich regenerierbar und zur kontinuierlichen Messung fähig sein [Thevenot et al., 1999]. Diese engere Definition schließt erfolgreiche Entwicklungen wie Einmal-Enzymelektroden zur Blutzuckerbestimmung und

optische Immunosensoren nicht ein. Daher ist die Definition von Turner et al. (1987) von der „Wissenschaftsgemeinde“ allgemein akzeptiert [Scheller et al., 2001].

Die biologische Komponente eines Biosensors dient der spezifischen Erkennung eines Analyten, während der physikalischen die Rolle zukommt, das biologische Signal in ein elektrisches umzuwandeln (Hartmann, 2004). Dieses ist methodenabhängig der Analytkonzentration proportional oder indirekt proportional und kann zur Quantifizierung herangezogen werden. Als biologische Komponente werden meist Enzyme, Antikörper, Lektine, aber auch ganze Zellen eingesetzt. Physikalische Komponenten können Elektroden, Schwingquarze, Halbleiter oder optische Systeme sein [Keusgen, 1999].

Ein amperometrischer Biosensor nutzt die einfache und kostengünstige Messmethode der Amperometrie und die höhere Spezifität, die durch die Biomoleküle entsteht. Die Immobilisierung von Biomolekülen stellt ein Kernproblem bei der Entwicklung von leistungsfähigen Biosensoren dar. Bei diesem Vorgang ist es wichtig, dass es keine signifikante Beeinflussung der Stabilität, Funktionalität und Substratspezifität der immobilisierten Biokomponenten gibt.

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems auf Basis von LTCC-Mikrochips. Dabei handelt es sich um niedrig sinternde Keramiken mit Mikrokapillaren, aufgedruckten Hochspannungskontakten und Elektroden für amperometrische Messungen. Der Vorteil dieser Mikrochips im Vergleich mit bestehenden keramischen Systemen ist die 2-Elektrodenanordnung. Vorteile sind eine leichtere Handhabung und Reduzierung der Bandverbreiterung. Für die elektrokinetische Probenaufgaben war zudem die Konstruktion eines geeigneten Hochspannungsgerätes erforderlich. LTCC-Keramiken besitzen aufgrund ihrer Materialeigenschaften und kostengünstigen Herstellung einen großen Einsatzbereich in der Elektronik. Für analytische Anwendungen ist dieses Material weitestgehend unbekannt. Hierbei galt es zunächst mit elektroaktiven Substanzen zu zeigen, dass die entwickelte Messplattform generell verwendet werden konnte. Dies sollte, mit dem Ziel, Gemische kapillarelektrophoretisch auf Grund ihrer Migrationszeiten zu trennen, mit Polyphenolen durchgeführt werden. Natürliche Polyphenole kommen in Pflanzen als bioaktive Substanzen wie Farbstoffe und Gerbsäuren vor. Sie gelten als gesundheitsfördernd, entzündungshemmend, krebsvorbeugend und besitzen somit ein großes pharmazeutisches Interesse. Durch die Entwicklung eines kleinen, portablen und

hochintegrierten Analysensystems entstehen zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der Prozessanalytik und für Screening-Verfahren.

Auf diesem System aufbauend sollen fernerhin phenoxidierende Enzyme wie beispielsweise Laccase (O₂-Oxidoreduktase, EC 1.10.3.2) mit in das mikrofluidische System integriert werden. Hierdurch soll eine höhere Spezifität erreicht werden, um Polyphenole in matrixreichen Realproben zu detektieren. Dafür war es erforderlich, geeignete Immobilisierungsstrategien zu erarbeiten. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR) sollten diese Prozesse auf ihre Eignung hin untersucht werden, Biomoleküle stabil und ohne wesentliche Veränderung der Affinität und Spezifität an die Trägeroberfläche zu binden. Dafür waren Goldoberflächen so zu modifizieren, dass geeignete Immobilisierungsprotokolle ausgearbeitet werden konnten.

Folgende Arbeitspakete sollten bearbeitet werden:

- 1) Zur Vervollständigung der Messplattform war es zunächst notwendig, ein geeignetes 4-Kanal-Hochspannungsnetzgerät und eine Chipheraltung zu konstruieren. Da Adaptionssysteme für Mikrochips kommerziell nicht erhältlich sind, war eine spezielle Halterung erforderlich. Das Hochspannungsnetzgerät mit vier separaten Hochspannungsmodulen wurde für elektrokinetische Injektionen benötigt.
- 2) Zur blasenfreien Befüllung der Kapillaren war ein spezielles, auf die LTCC-Keramik angepasstes System zu entwickeln. Dabei sollte die Wiederverwendung der LTCC-Mikrochips berücksichtigt werden.
- 3) Für stabile und reproduzierbare elektrophoretischen Messungen sollten geeignete Protokolle zur chemischen Vorbehandlung der Kapillaren und zur Reinigung der Hochspannungs- und Elektrodenkontakte entwickelt werden.
- 4) Zur Steigerung der Oberflächenladung in den Kapillaren sollten entsprechende Funktionalisierungen getestet und ihre Übertragbarkeit in die Messapparatur überprüft werden.
- 5) Auf Basis der elektrokinetischen Injektion sollten geeignete Methoden zur Probenaufgabe in den Mikrochip erarbeitet werden. Unter Berücksichtigung der Kanalgeometrie waren Verfahren der „pinched“-Injektion so zu modifizieren, dass eine hohe Trenneffizienz und Auflösung des Systems vorliegt.

6) Für die amperometrische Detektion der Polyphenole waren zahlreiche Messparameter zur Beurteilung der Trenneffizienz eines kapillarelektrophoretischen Systems zu ermitteln.

7) Im Rahmen der Integration von Biokomponenten in das elektrophoretische Trennsystem war es erforderlich, Goldprismen mit unterschiedlichen biosensitiven Schichten zu versehen. Diese sollten als Modellsysteme für eine spätere Immobilisierung auf einer Goldelektrode dienen. Daher wurden zunächst Immobilisierungsprotokolle erarbeitet, mit deren Hilfe es möglich ist, Biomoleküle, wie beispielsweise Antikörper, auf einem Träger zu binden. Zum Teil konnte dabei auf Beschichtungsstrategien zurückgegriffen werden, die bereits für Goldoberflächen vorlagen.

8) Die Überprüfung der Funktionalität immobilisierter Enzyme sollte photometrisch mit Hilfe geeigneter Substrate erfolgen. Dabei wurde zunächst die erfolgreiche Immobilisierung durch SPR-Messungen überprüft. Für den anschließenden Übertrag in ein Photometer waren geeignete Protokolle anzufertigen.

II. Grundlagen

II.1. μ -TAS (Mikrototalanalysensysteme)

Kapillarelektrophoretische Systeme im Mikrochipformat erlangen in zunehmendem Maße als effiziente Trenntechnik an Bedeutung [Jacobson et al., 1994 und Woolley et al., 1994]. Durch die Entwicklung von Mikrototalanalysensystemen (μ TAS) bzw. „Lab-on-a-chip“-Anwendungen ist heutzutage die Herstellung kleiner, portabler und hochintegrierter Geräte auf Basis der Kapillarelektrophorese möglich, die sich durch geringe Probenvolumina, kurze Analysezeiten und kostengünstigere Herstellung auszeichnen [Manz et al., 1992]. Derartige Systeme werden häufig auf Silizium-, Glas-, oder Polymerbasis hergestellt. Als alternatives Material für diese Applikationen scheint LTCC (low temperature co-fired ceramic) geeignet zu sein. Innerhalb dieser Untersuchungen sollte der LTCC-Multilayer so strukturiert werden, dass ein „Lab-on-a-Chip“-System mit integrierter Probenvorbereitung, Kapillarelektrophorese und elektrochemischer Detektion sowie allen benötigten Elektroden und Kontakten entstand.

II.2. Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE)

Die Elektrophorese ist eine der am meisten verbreiteten Trenntechniken. Für die Entwicklung zahlreicher elektrophoretischer Trennmethode waren die theoretischen Grundlagenforschungen von Kohlrausch [1897] vor mehr als 100 Jahren ausschlaggebend. Die Anfang der achtziger Jahre beginnende Miniaturisierung führte zur Entwicklung einer Variante der CE: Der Elektrophorese auf Mikrochips [Manz et al., 1992]. Die Analyte werden am Ende eines Trennkanals entweder optisch (beispielsweise LIF) oder, wie in dieser Arbeit, elektrochemisch (Amperometrie) detektiert.

II.2.1. Prinzip der Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei der Ionen auf Grund ihrer Ladung und Größe in einem elektrischen Feld getrennt werden. Die Trennung erfolgt trägerfrei in einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von $\leq 150 \mu\text{m}$. Als Trennmedium werden üblicherweise wässrige Puffersysteme eingesetzt, um den Stromtransport zu gewährleisten und den pH-Wert konstant zu halten. Phosphat- und Citratpuffer bei saurem pH sowie TRIS- und Boratpuffer bei basischem pH sind häufig eingesetzte Elektrolyte. Die Pufferkapazität am gewünschten pH-Wert ist entscheidend für die Pufferwahl. Durch Zugabe von Pufferadditiven

sind unterschiedliche Trennverfahren möglich, die bei den einzelnen Trennmethoden (siehe Kapitel II.2.2.) genauer beschrieben werden.

Um die für die CE nötige hohe Feldstärke zu liefern, ist eine bis zu 30 kV regelbare Gleichspannungsquelle erforderlich, deren beide Pole in zwei Pufferreservoirire eintauchen. Die beiden Pufferreservoirire sind durch eine Trennkapillare miteinander verbunden (Abb. 3). Der hohe elektrische Widerstand der Kapillare macht ein Arbeiten bei sehr hohen Feldstärken möglich. Die Probeninjektion kann hydrodynamisch (durch Anlegen von Druck oder Vakuum), hydrostatisch (mittels Schwerkraft durch Höhenunterschied der Kapillarenden) oder elektrokinetisch (durch Anlegen einer Spannung) erfolgen. An dem der Injektionsseite gegenüberliegenden Ende der Kapillare ist ein Detektor angebracht. Moderne CE-Geräte sind zusätzlich mit Probengeber, Injektionssystem und Thermoregulator ausgestattet.

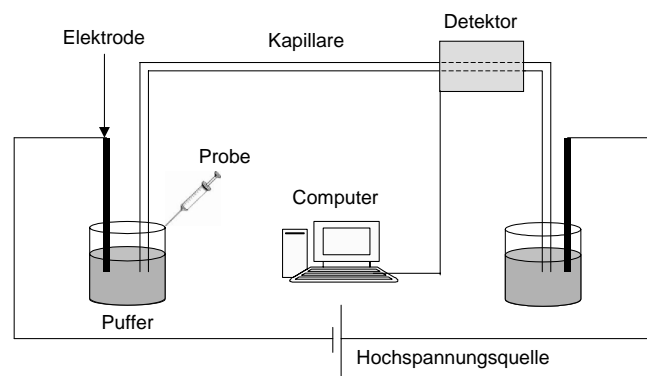


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Kapillarelektrophorese.

II.2.2. Methoden der Kapillarelektrophorese

Die verschiedenen Trenntechniken der Kapillarelektrophorese (Tab. 2) unterscheiden sich hinsichtlich der Pufferzusammensetzung, ihrer Anordnung und der substanzspezifischen Eigenschaften, die für die Trennung ausschlaggebend sind.

Trenntechnik	Applikation	Trennung nach
Kapillarzonenelektrophorese	Ionen, Peptide, Proteine	Größe, Ladung (Mobilität)
Isotachophorese	Ionen, Proteine	Größe, Ladung (Mobilität)
Kapillaraffinitätslektrophorese	Protein-Ligand-Wechselwirkung	Größe, Ladung (Mobilität), Wechselwirkung
Micellarelektrokinetische Chromatographie	Neutrale Teilchen, Aminosäuren	Polarität
Kapillargelelektrophorese	Proteine, DNA	Größe
Isoelektrische Fokussierung	Proteine	Ladung (isoelektrischer Punkt)
Chirale Kapillarelektrophorese	Ionen, Peptide, Proteine	Enantiomeren, Ladung

Tabelle 2: Trennprinzipien der CE.

Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Bei der in dieser Arbeit eingesetzten Kapillarzonenelektrophorese ist die gesamte Kapillare mit einem einheitlichen Elektrolytsystem befüllt, um Stromtransport, einheitliche Feldstärke und konstanten pH-Wert zu gewährleisten. Die Analytionen wandern mit einer ihrer Mobilität entsprechenden Geschwindigkeit und werden bei entsprechenden Mobilitätsunterschieden in Zonen getrennt (Abb. 4). Die Zonen wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Kapillare und sind im Optimalfall voneinander durch die Elektrolytlösung getrennt [Engelhardt et al., 1994].

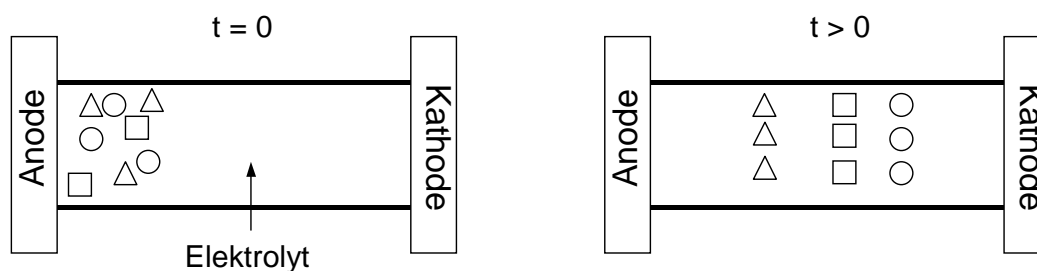


Abbildung 4: Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese.

Isotachophorese (ITP)

Die Isotachophorese verwendet ein diskontinuierliches Puffersystem aus einem Leit- und einem Endelektrolyten, das die injizierte Probe umgibt (Abb. 5) [Everaerts et al., 1967]. Da sich die Mobilitäten von Leitelektrolyt (höchste Mobilität), Probe und Endelektrolyt (niedrigste Mobilität) unterscheiden, bildet sich beim Anlegen eines konstanten Stroms unter

Einhaltung des Ohmschen Gesetzes ein Feldstärkegradient aus. Da sich die Analyten in hintereinander liegenden Zonen und nicht in getrennte Peaks anordnen, können sich Probleme bei der Detektion ergeben.

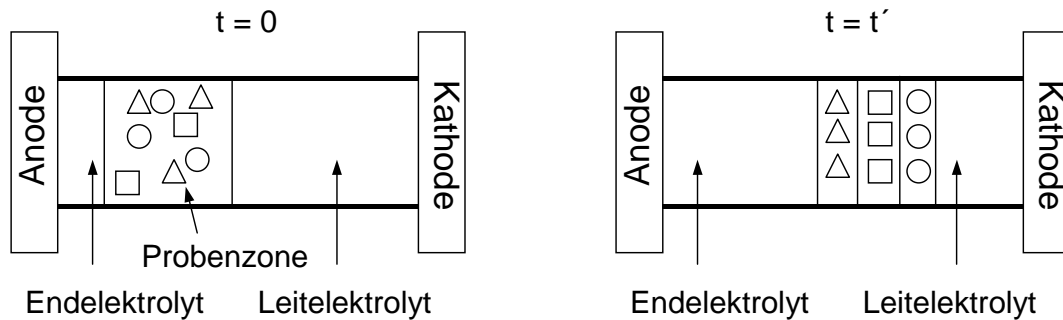


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Isotachophorese. Die Probeionen werden an der Grenzfläche zwischen Leit- und Endelektrolyt aufgebracht. Nach einer Zeit t' sind die Proben voneinander getrennt und bilden ihre eigene Zone, in der eine ihrer Mobilität entsprechenden Feldstärke herrscht.

Kapillaraffinitätselektrophorese (CAE)

Die Kapillaraffinitätselektrophorese wird zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt. Diese Wechselwirkungen führen zu Mobilitätsunterschieden zwischen Protein und dem gebildeten Komplex, wenn der Ligand eine Ladung trägt oder sich das Molekulargewicht des Komplexes von dem des Liganden wesentlich unterscheidet.

Micellarelektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)

Die micellarelektrokinetische Kapillarchromatographie, eine Hybridtechnik aus Elektrophorese und Chromatographie, erlaubt die Detektion elektrisch neutraler Teilchen [Terabe et al., 1984]. Durch Zugabe von Detergenzien bildet sich im Puffer eine "pseudo-stationäre" Phase aus geladenen Micellen aus. Dies führt zur Trennung neutraler Analyte entsprechend ihrer Verteilungsgleichgewichte zwischen Micellen und wässriger Phase [Terabe, 1989]. Als Detergenzien werden anionische, kationische und nichtionische Tenside verwendet, wobei Natriumdodecylsulfat (SDS) am häufigsten eingesetzt wird (Abb. 6).

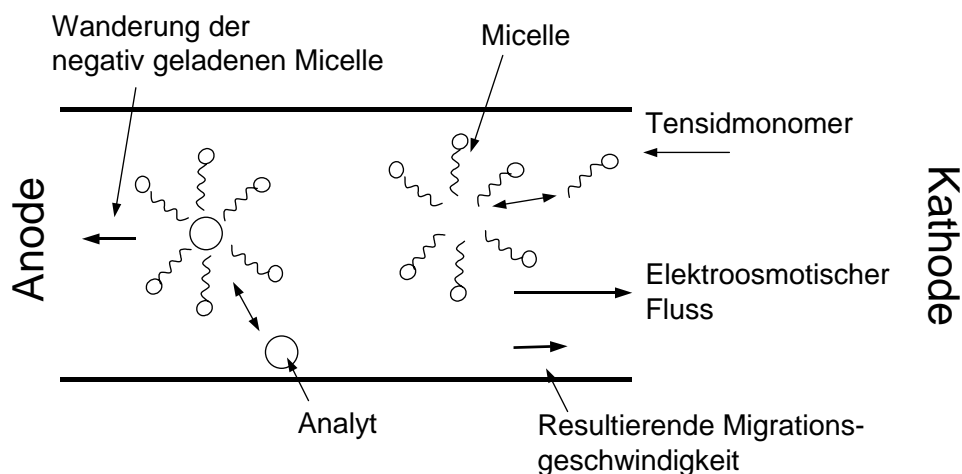


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der micellarelektrokinetischen Kapillarchromatographie.

Kapillargelelektrophorese (CGE)

Der Unterschied zwischen Ladung und Masse ist bei großen, geladenen Molekülen wie z.B. Proteinen, zu gering, weshalb man eine Trennung nicht mit der CZE durchführt, sondern mit der Kapillargelelektrophorese. Die CGE ist besonders für die Analyse von Biomolekülen wie Proteine und DNA geeignet. Dazu werden verschiedene Polymere verwendet. Diese können als physikalisches Gel löslicher, linearer Polymere Verwendung finden oder fest in der Kapillare fixiert (Quervernetzer) sein. Als quervernetzendes Gel verwendet man Polyacrylamid. Agarose, Dextrane und Polyethylenglykol (PEG) finden als lineare Polymere Verwendung [Lottspeich und Zorbas, 1998].

Isoelektrischen Fokussierung (IF)

Ampholyte werden bei der Isoelektrischen Fokussierung entlang eines pH-Gradienten getrennt (Abb. 7). Dabei wird eine Kapillare mit einem Gemisch aus Ampholyt und Probe befüllt. Nach anlegen eines elektrischen Feldes kommt es zur Ausbildung eines pH-Gradienten, da die Ampholyte des Puffers entsprechend ihres pI (isoelektrischer Punkt) wandern. Die Probenbestandteile, die selbst Ampholyte sind, wandern entlang dieses pH-Gradienten und werden an der Stelle $pI^{\text{Probe}} = \text{pH}$ fokussiert. Durch Druck-, Spannung-, oder chemische Mobilisierung erfolgt die Bewegung der Probe zum Detektor.

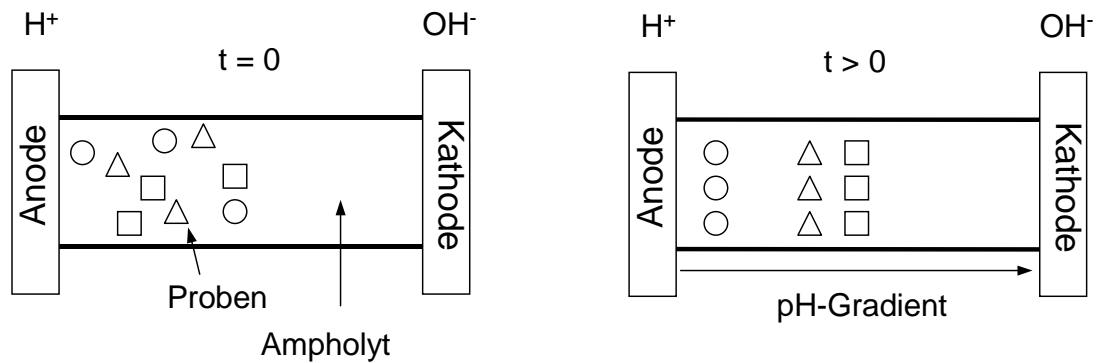


Abbildung 7: Prinzip der isoelektrischen Fokussierung.

Chirale Kapillarelektrophorese (CCE)

Im Zuge zunehmender Verwendung chiraler Verbindungen ist die chirale Kapillarelektrophorese von besonderer Bedeutung. Durch eine chirale „pseudo-stationäre“ Phase wird ein stereoselektives Umfeld geschaffen, so dass bei Wechselwirkungen mit den enantiomeren Probenbestandteilen ein diastereomerer Komplex entsteht. Eine Trennung der chiralen Probenbestandteile ist dann möglich, wenn die diastereomeren Komplexe entweder unterschiedliche Mobilitäten oder Stabilitätskonstanten aufweisen. Cyclodextrine (cyclische Verbindungen aus 6-8 D-Glucose-Einheiten) oder chirale Micellenbildner wie Cholsäuren dienen als pseudostationäre Phase.

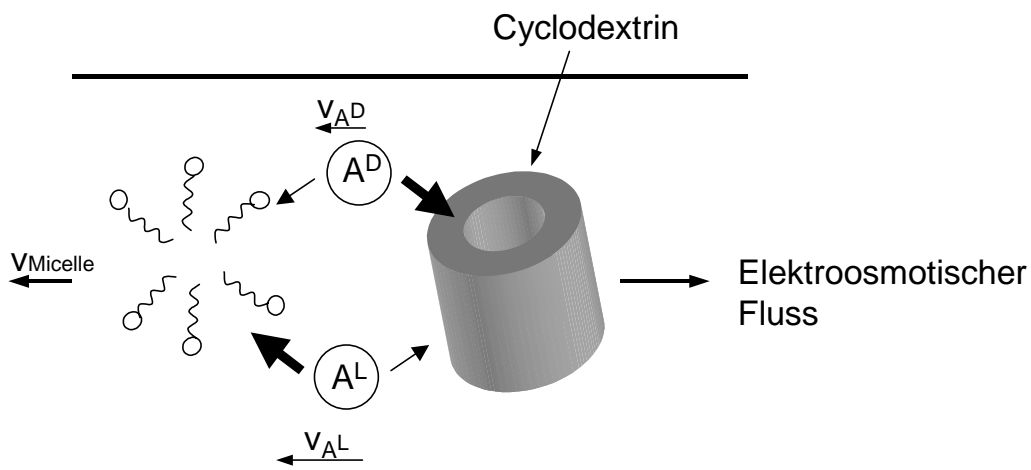


Abbildung 8: Prinzip der chiralen MEKC. Das schwächer mit Cyclodextrin interagierende Enantiomer eines ungeladenen, chiralen Analyten (hier A^L) hat eine höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Micelle und damit eine höhere effektive Mobilität. Cyclodextrin ist ebenfalls neutral und wird nur durch den EOF transportiert. Das bevorzugt mit Cyclodextrin komplexierte Enantiomer (hier A^D) erhält dadurch eine geringere Mobilität [Lottspeich und Zorbas, 1998].

II.2.3. Theorie der Kapillarelektrophorese

Ionenwanderung im elektrischen Feld

Die elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität) ist eine substanzspezifische Größe, welche die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bestimmt und somit für die Trennung entscheidend ist.

Eine geladene Komponente i , die sich in einer Lösung befindet, wird durch Anlegen eines homogenen elektrischen Feldes an die Lösung beschleunigt. Unter der Annahme, dass keine interionischen Wechselwirkungen auftreten, lässt sich die beschleunigende Kraft F_e durch Gleichung 1 beschreiben:

$$F_e = z_i * e_0 * E \text{ mit } q = z_i * e_0$$

E: elektrische Feldstärke [$V * cm^{-1}$] e_0 : Elementarladung [$1,602 * 10^{-19}C$]
 z_i : Ladungszahl der Komponente i C: elektrische Ladung

Gleichung 1: Berechnung der elektrischen Kraft F_e .

In einer wässrigen Lösung wirkt dieser elektrischen Kraft F_e die Reibungskraft F_R (Gleichung 2) entgegen.

$$F_R = k * \eta * v_i \text{ mit } f_c = k * \eta$$

k : Konstante [cm] η : Newtonsche Viskosität der Lösung [$Pa * s$]
 v_i : Wanderungsgeschwindigkeit der Komponente i [$cm * s^{-1}$]

Gleichung 2: Berechnung der Reibungskraft F_R .

Die konstante Geschwindigkeit des Teilchens im elektrischen Feld ermittelt sich nach Gleichung 3:

$$F_e = F_R; q * E = f_c * v_i \Rightarrow v_i = q * \frac{E}{f_c} = \mu * E \text{ mit } \mu = \text{Mobilität}$$

μ : Mobilität [$cm^2 * s^{-1}$] E: elektrische Feldstärke [$V * cm^{-1}$]

Gleichung 3: Berechnung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit.

Abbildung 9 zeigt eine schematische Trennung von zwei Komponenten mit Hilfe der CZE.

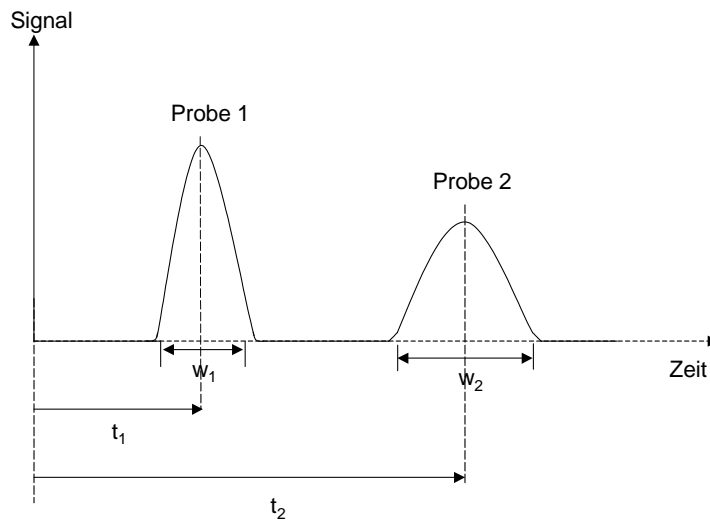


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer kapillarelektrophoretischen Trennung. t : Wanderungsgeschwindigkeit der Probenkomponenten, w : Peakbreite der Proben

Die Nettogeschwindigkeit einer Probe ist die Summe aus der elektrophoretischen und der elektroosmotischen Geschwindigkeit. Durch Anlegen einer Spannung erfolgt eine Trennung auf Grund verschiedener Wanderungsgeschwindigkeiten der Probe im Puffer. Dabei wandern die durch das elektrische Feld beschleunigten Ionen mit einer Mobilität μ_T , die nach Gleichung 4 berechnet wird:

$$\mu_T = \frac{L_{eff}}{t} * E = L_{eff} * \frac{L_{ges}}{t} * U$$

L_{eff} : Trennlänge [cm]

L_{ges} : gesamte Kapillarlänge [cm]

t : Wanderungszeit [s]

E : Feldstärke [$V * cm^{-1}$]

U : Spannung [V]

Gleichung 4: Berechnung der Ionenmobilität in einem elektrischen Feld.

Es ist wichtig, zwischen der gesamten Kapillarlänge (L_{ges}) und der Trennlänge (L_{eff}) zu unterscheiden, da das elektrische Feld über die Gesamtlänge abfällt, die Proben aber nur die effektive Trennstrecke in der Migrationszeit durchwandern [Engelhardt et al., 1994].

Die Mobilität ist eine substanzspezifische Größe und stellt den Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Feldstärke dar. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Ions ist proportional zur elektrischen Feldstärke. Nach dem Stokesschen Gesetz entspricht die Konstante k für sphärische Partikel $6\pi\eta r$. Für nichtsphärische Partikel ist der numerische Wert kleiner als 6. Nur für kleine kugelförmige Teilchen gilt das Stokessche Gesetz.

Die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} wird nach Gleichung 5 berechnet:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{f_c} = z_i * \frac{e_0}{6\pi * r * \eta} = \frac{v_i}{E}$$

e_0 : Elementarladung [$1,602 * 10^{-19}\text{C}$]

E : elektrische Feldstärke [$\text{V} * \text{cm}^{-1}$]

z_i : Ladungszahl der Komponente i

η : Newtonsche Viskosität der Lösung [$\text{Pa} * \text{s}$]

μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 * \text{V}^{-1} * \text{s}^{-1}$]

r : Stokes-Radius des Teilchens (Radius des hydratisierten Ions) [cm]

Gleichung 5: Ermittlung der Mobilität kugelförmiger Teilchen.

Gleichung 5 zeigt, dass kleine, hoch geladene Ionen eine hohe Mobilität besitzen, während große Ionen mit geringer Ladung niedrigere Mobilitäten aufweisen. Kationen haben positive und Anionen negative Mobilitäten. Zudem wird ersichtlich, dass neben der elektrischen Feldstärke Ladung und Radius des hydratisierten Moleküls sowie die Viskosität des verwendeten Puffers wichtige Einflussfaktoren sind [Lottspeich und Zorbas, 1998].

Für nicht kugelförmige Teilchen ergibt sich ein Zusammenhang zwischen Molekulargewicht (M) und Mobilität μ durch Gleichung 6:

$$\mu = \frac{q}{M^{2/3}} \text{ mit } q = z_i * e_0$$

e_0 : Elementarladung [$1,602 * 10^{-19}\text{C}$]

z_i : Ladungszahl der Komponente i

Gleichung 6: Ermittlung der Mobilität nicht-kugelförmiger Teilchen.

In unendlich verdünnten Lösungen gewinnen zwei weitere Kräfte, die auf ein geladenes Teilchen einwirken, an Bedeutung. Diese sind die durch die Ionenatmosphäre hervorgerufene Relaxationskraft und die Retardationskraft. Nach der Debye-Hückel-Theorie ist jedes Teilchen von einer Ionenatmosphäre entgegengesetzter Ladung umgeben, deren Radius von der Ionenstärke abhängt [Lottspeich und Zorbas, 1998]. Die Kraft, die das elektrische Feld auf die Ionen der Ionenatmosphäre ausübt, wird auf die Moleküle des Lösungsmittels übertragen. Dadurch wandert das Zentralion durch eine Lösung, die in Gegenrichtung fließt und somit nicht durch eine stationäre Flüssigkeit. Dieser Retardationseffekt bewirkt eine Verringerung der Geschwindigkeit des Zentralteilchens. Als Relaxationseffekt bezeichnet man einen Prozess, bei dem durch Anlegen eines elektrischen

Feldes die Ionenwolke dem Zentralion hinterherläuft und so eine abbremsende elektrische Kraft ausübt (Abb. 10).

Aufgrund dieser beiden Effekte nimmt die Mobilität mit zunehmender Ionenstärke ab.

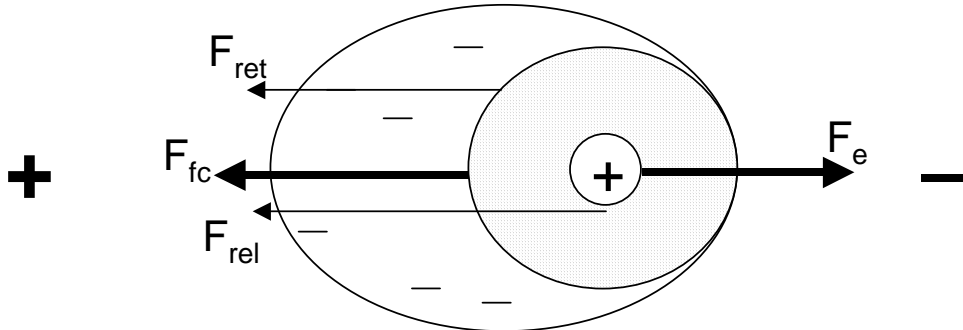


Abbildung 10: Auf ein geladenes, hydratisiertes Teilchen einwirkende beschleunigende und bremsende Kräfte in einem elektrischen Feld (F_e : Beschleunigungskraft, F_{fc} : Reibungskraft, F_{ret} : Retardationskraft, F_{rel} : Relaxationskraft).

Für die Wanderungsgeschwindigkeit schwacher Säuren und Basen ist nicht die Mobilität des vollständig dissoziierten Teilchens maßgebend, sondern die effektive Mobilität u_{eff} nach Gleichung 7:

$$U_{eff} = \sum_i \alpha_i * u_i$$

α : Dissoziationsgrad (Verhältnis zwischen Kation und Anion zur Gesamtkonzentration des Elektrolyten)
 u : Ionenmobilität

Gleichung 7: Effektive Mobilität.

Dies hat zur Folge, dass bei schwachen Säuren und Basen (z.B. Peptide und Proteine) die Wanderungsgeschwindigkeit und damit die Auflösung über den pH-Wert des Elektrolyten optimiert werden kann.

Alle ionischen Bestandteile des Elektrolyten tragen zum Ladungstransport und somit zum Strom bei [Kohlrausch, 1897]. Die Stromdichte J ist proportional zu den Konzentrationen, den Ladungen und den Mobilitäten der verschiedenen Ionen [Engelhardt et al., 1994]. Die Stromdichte, also der elektrische Strom I , der durch die Einheitsfläche S_E transportiert wird, ist durch das Ohmsche Gesetz mit der Feldstärke E verbunden (Gleichung 8):

$$J = \frac{I}{S_E} = E * \kappa$$

κ : spezifische Leitfähigkeit [$S * cm^{-1}$]

E: elektrische Feldstärke [$V * cm^{-1}$]

Gleichung 8: Berechnung der Stromdichte.

Die spezifische Leitfähigkeit κ einer Elektrolytlösung ergibt sich aus den effektiven Mobilitäten aller in Lösung befindlicher Teilchen (Gleichung 9):

$$\kappa = F * \sum c_i * u_i * |z_i|$$

F: Faraday-Konstante [$96485 C * mol^{-1}$]

c: Konzentration der einzelnen Komponenten [mol]

u: Ionenmobilität [$cm * s^{-1}$]

z: Ladungszahl

Gleichung 9: Spezifische Leitfähigkeit.

Da während einer elektrophoretischen Trennung durch den elektrischen Stromfluss Joulesche Wärme erzeugt wird, gilt für die pro Volumeneinheit erzeugte Wärme Q (Gleichung 10):

$$Q = E^2 * \Lambda * c * \theta$$

Q: Wärmeentwicklung pro Einheitsvolumen [$W * cm^{-3}$]

c: molare Konzentration des Elektrolyten [mol]

Λ : molare Leitfähigkeit [$S * cm^2 * mol^{-1}$]

E: elektrische Feldstärke [$V * cm^{-1}$]

θ : totale Porosität des Mediums (= 1 für eine offene Kapillare)

Gleichung 10: Berechnung der Jouleschen Wärme.

Für Λ gilt:

$$\Lambda = \frac{\kappa * 1000}{c * z * n}$$

κ : spezifische Leitfähigkeit [$S * cm^{-1}$]

z: Ladungszahl

c: Konzentration der einzelnen Komponenten [mol]

n: Zahl der Kationen bzw. Anionen

Gleichung 11: Äquivalentleitfähigkeit der Elektrolytlösung.

Über die Wände oder Seiten des Systems erfolgt die Wärmeabfuhr. Dadurch entsteht ein Temperaturgradient, der bei trägerfreien Elektrophoresen zu einer konvektiven Durchmischung führt. Um diese Temperaturdifferenz möglichst gering zu halten, sollten

geringe Kapillarinne Durchmesser verwendet werden. Ebenso sind Materialien mit einer guten Wärmeleitfähigkeit und einer geringen Wanddicke von Vorteil.

Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Die Elektroosmose, einer der ersten entdeckten elektrokinetischen Effekte, tritt bei allen elektrophoretischen Trennprozessen auf. Somit hängt die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} der Proben, die in diese Arbeit mittels Kapillarelektrophorese getestet wurden, neben der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit auch vom elektroosmotischen Fluss ab.

Sie lässt sich beschreiben als die Bewegung einer Flüssigkeit relativ zu einer geladenen Oberfläche unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (Abb. 11) [Kuhn, 1995].

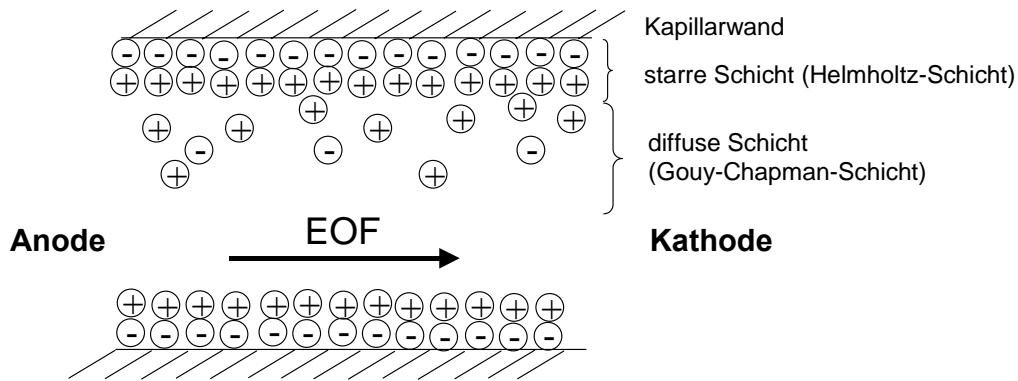


Abbildung 11: Ausbildung des elektroosmotischen Flusses an einer negativ geladenen Innenwand einer Kapillare.

Da der EOF auch die effektiven Mobilitäten der geladenen Probenbestandteile beeinflusst, überlagern sich die Geschwindigkeitsvektoren von Elektrophorese und Elektroosmose (Tab. 3).

Probenbestandteil	Nettomobilität [μ_{net}]	
Kationen	$\mu_{net} = \mu_{eof} + \mu_{ep}$	Gleichung 13
Anionen	$\mu_{net} = \mu_{eof} - \mu_{ep}$	Gleichung 14
Neutralteilchen	$\mu_{net} = \mu_{ep}$	Gleichung 15

μ_{eof} : elektroosmotische Mobilität μ_{ep} : elektrophoretische Mobilität

Tabelle 3: Nettomobilität von Probenbestandteilen.

Von der Beschaffenheit der Kapillaroberfläche und der Pufferzusammensetzung hängt die Größe und die Richtung des EOF ab. Geht man von deprotonierten Silanolgruppen aus, die an der Kapillarinnenwand mit den Kationen der Pufferlösung in Wechselwirkung stehen, erfolgt durch den Aufbau einer elektrochemischen Doppelschicht ein Ladungsausgleich (Abb. 11). Diese Doppelschicht besteht aus einer starren Schicht (Helmholtz- oder Stern-Schicht) und einer diffusen Schicht (Gouy-Chapman- oder Debye-Hückel-Schicht). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Kationen in Richtung Kathode. Da diese auch eine Hydrathülle aufweisen, bewegen sich auch die Wassermoleküle, welche die Kationen umgeben, in Richtung Kathode. Die Wassermoleküle bilden untereinander Wasserstoffbrückenbindungen aus und sind auf Grund ihrer hohen Dielektrizitätskonstanten gewöhnlich positiv polarisiert gegenüber der Kapillaroberfläche. Daher bewegt sich letzten Endes die gesamte Pufferlösung zur Kathode. Somit ist es durch den EOF möglich, in einem Experiment Kationen und Anionen gleichzeitig zu detektieren (Abb. 12)

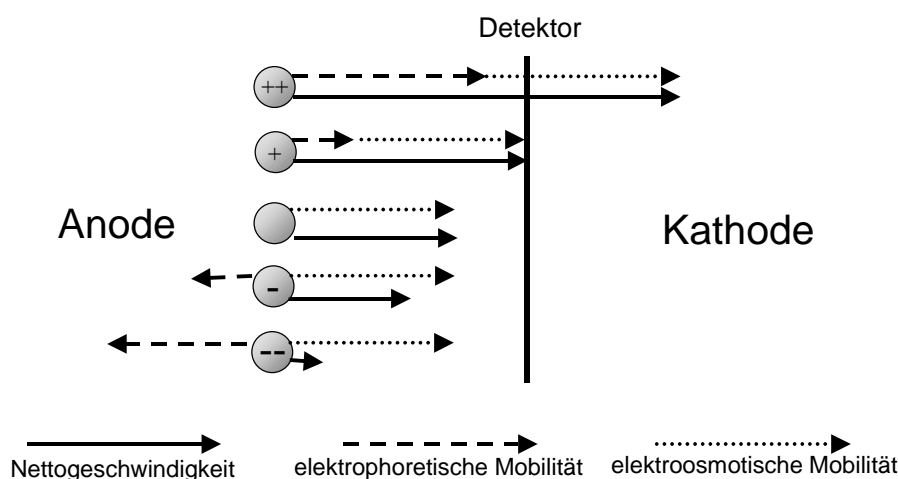


Abbildung 12: Vergleich elektrophoretischer und elektroosmotischer Mobilitäten bei unterschiedlich geladenen Teilchen.

Durch Reibungskräfte an der Grenzfläche zwischen Kapillarwand und Flüssigkeit kommt es in druckbetriebenen Systemen (z.B. HPLC) durch Druckabfall entlang des Kapillarquerschnitts zu einem laminaren Fließprofil. In Systemen, bei denen der Flüssigkeitstransport durch Elektroosmose verursacht wird, kommt es zur Ausbildung eines flachen Fließprofils (Abb. 13).

Auf Grund einer konstanten Flussrate trägt der EOF, anders als bei einem hydrodynamischen Fluss, nicht zur Peakverbreiterung bei. Deshalb können auch bei hohen EOF-Werten Trennungen durchgeführt werden.

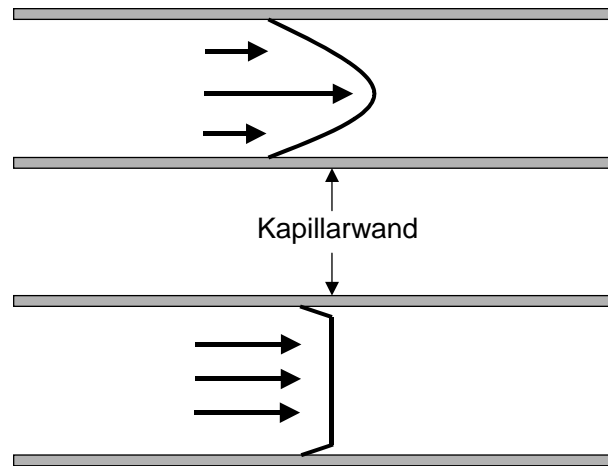


Abbildung 13: Strömungsprofil bei hydrodynamischem (oben) und elektroosmotischem Fluss (unten).

Nahe der Doppelschicht im Bereich der Kapillarwand geht der Geschwindigkeitsvektor der Flüssigkeit gegen null. Die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses ist proportional zum elektrischen Feld und über Gleichung 15 definiert:

$$v_{eof} = \mu_{eof} * E$$

μ_{eof} : elektroosmotische Mobilität [$\text{cm}^2 * \text{V}^{-1} * \text{s}^{-1}$]

E: elektrische Feldstärke [$\text{V} * \text{cm}^{-1}$]

Gleichung 15: Berechnung der elektroosmotischen Geschwindigkeit.

Die elektroosmotische Mobilität hängt vom Zeta-Potential ζ der Kapillaroberfläche, der Dielektrizitätskonstanten ϵ und der Viskosität η der Lösung ab (Gleichung 16):

$$\mu_{eof} = \frac{\zeta * \epsilon_0 * \epsilon_r}{4 * \pi * \eta}$$

ζ : Zeta-Potential [V]

ϵ_0 : absolute Dielektrizitätskonstante [$8,854 * 10^{-12} \text{ C/V} * \text{m}$]

ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante

η : dynamische Viskosität des Puffers [$\text{Pa} * \text{s}$]

Gleichung 16: Berechnung der elektroosmotischen Mobilität.

Obwohl der EOF selbst nicht zur Trennung der Probensubstanzen beiträgt, kann man durch gezielte Veränderung der elektroosmotischen Mobilität eine Verbesserung der Trenneffizienz erreichen (Tab. 4) [Kuhn, 1995].

Parameter	Einfluss auf den EOF	Bemerkungen
Elektrische Feldstärke	proportional zum EOF	Effizienz steigt bei Erhöhung
Temperatur	EOF steigt um ca. 2%/K durch Änderung der Viskosität	Temperaturerhöhung kann die Auflösung verhindern
pH-Wert	EOF klein bei niedrigem pH, ab pH 7-8 konstant	großer Einfluss auf die Selektivität des Systems
Ionenstärke des Puffers	reziprok zum Zeta-Potential und zum EOF, größere Ionenstärke führt zur Abnahme des EOF	vielfältiger Einfluss auf das Trennsystem: Joulesche Wärme, Adsorption, Peakform
Organische Lösungsmittel	Veränderung des Zeta-Potentials	vielfältiger Einfluss
Tensidzusätze	unterhalb der Micellenbildungskonzentration Adsorption an Kapillaroberfläche	Kationische Tenside: Abnahme oder Umkehr des EOF Anionische Tenside: Erhöhung des EOF
neutrale, hydrophobe Polymere	erniedrigt den EOF durch Abschirmung der Oberflächenladungen	adsorbieren an der Kapillaroberfläche
Kapillar-Coating	kovalente Beschichtung an der Kapillaroberfläche	Vielzahl von EOF-Modifikationen möglich
radial elektrisches Feld	Veränderung des EOF	begrenzt einsetzbar

Tabelle 4: Möglichkeiten zur Kontrolle des elektroosmotischen Flusses [Kuhn, 1995].

Zeta-Potential

Die Oberfläche der Kapillar-Innenwandung ist verantwortlich für das Zeta-Potential. Die am häufigsten verwendeten Kapillaren bei der CE sind aus fused-silica, an deren Oberfläche Silanolgruppen vorliegen. Diese Silanolgruppen sind in Abhängigkeit vom pH-Wert mehr oder weniger stark dissoziiert ($pK_s = 2$) [Beckmann, 1991]. Dadurch steigt mit zunehmendem pH die Oberflächenladung und somit das Zeta-Potential. Bei pH 7-8 sind alle Silanolgruppen vollständig dissoziiert und das Zeta-Potential bleibt konstant.

Es besteht zwischen den geladenen Teilchen der Flüssigkeit und der geladenen Oberfläche eine elektrische Potentialdifferenz $\Delta\Psi$ (Abb. 14). Dieses Oberflächenpotential ist abhängig von der geladenen Oberfläche und der Dicke der Doppelschicht. In der Helmholtz-Schicht nimmt das Potential ϕ linear mit zunehmendem Abstand von der Kapillarwand ab. In der diffusen Gouy-Chapman-Schicht nimmt das Zeta-Potential exponentiell ab.

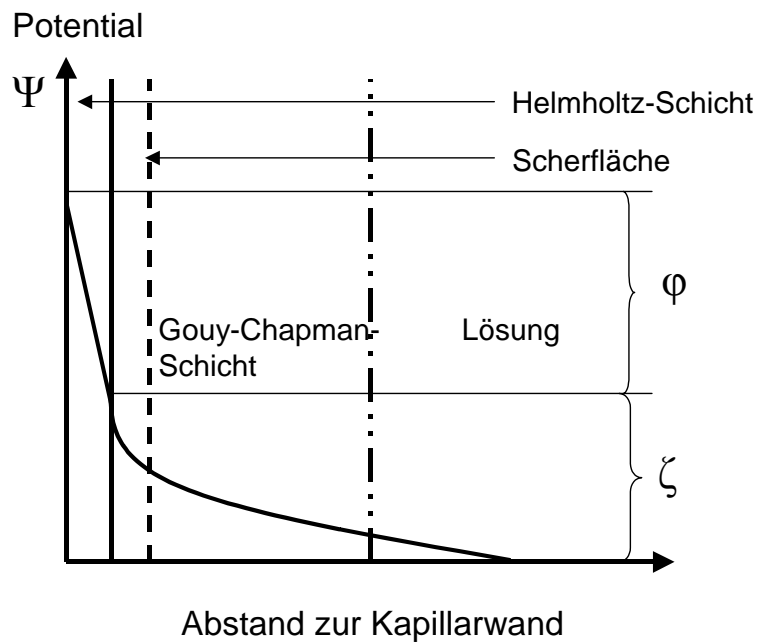


Abbildung 14: Potentialverlauf in Abhängigkeit des Abstandes zur Kapillarwand.

Das Zeta-Potential ist definiert durch Gleichung 17:

$$\zeta = \frac{4 \cdot \pi \cdot e \cdot d}{\varepsilon}$$

e: Ladungsdichte der Oberfläche [$C \cdot cm^{-2}$]

d: Dicke der diffusen Grenzschicht [cm]

ε : Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten [$8,854 \cdot 10^{-12} C \cdot V^{-1} \cdot m^{-1}$]

Gleichung 17: Ermittlung des Zeta-Potentials ζ .

Analytische Parameter

Zur Beschreibung der Leistungsfähigkeit der kapillarelektrophoretischen Trennung auf LTCC-Keramikchips werden die gleichen grundlegenden analytischen Parameter herangezogen, wie sie für die Chromatographie bekannt sind:

- Migrationszeit
- Effizienz
- Selektivität
- Auflösung

Migrationszeit

Wie bereits erwähnt, setzt sich die Nettogeschwindigkeit einer Komponente aus der eigentlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit des Ions und der Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses zusammen.

Die effektive elektrophoretische Mobilität μ_{eff} des Analyten lässt sich nach Gleichung 18 berechnen:

$$\mu_{\text{eff}} = L_{\text{eff}} * \frac{L_{\text{ges}}}{t} * V - L_{\text{eff}} * \frac{L_{\text{ges}}}{t_{\text{eof}}} * V$$

t:	Migrationszeit des Analyten [s]	L_{eff} :	effektive Kapillarlänge zum Detektor [cm]
L_{ges} :	Gesamtlänge der Kapillare [cm]	V:	angelegtes Potential [V]
t_{eof} :	Migrationszeit des EOF[s]		

Gleichung 18: Berechnung der effektiven elektrophoretischen Mobilität.

Effizienz

Die Effizienz eines elektrophoretischen Systems lässt sich durch die theoretische Bodenzahl N erfassen (Gleichung 19):

$$N = 16 * \left(\frac{t}{w} \right)^2$$

t: Wanderungszeit der Komponente [s] w: Peakbreite an der Basislinie [s]

Gleichung 19: Berechnung der Bodenzahl N (1. Möglichkeit).

Wenn der Peak ein Tailing zeigt und die Bestimmung der Peakbreite an der Basislinie erschwert ist, dann ist es einfacher, die Anzahl der theoretischen Böden N direkt aus dem Elektropherogramm zu ermitteln, indem man die Peakbreite $w/2$ bei halber Peakhöhe ermittelt (Gleichung 20):

$$N = 5,54 * \left(\frac{t}{w/2} \right)^2$$

$w/2$: Peakbreite auf halber Peakhöhe [s]

Gleichung 20: Berechnung der Bodenzahl N (2. Möglichkeit).

Der Hauptbeitrag für die Bandenverbreiterung in der Chromatographie in offenen Röhren hängt vom Hagen-Poiseuilleschen Strömungsprofil ab. Das Strömungsprofil in der CE ist, bedingt durch den EOF, stempelförmig. Somit kann der Beitrag des Strömungsprofils zur Bandenverbreiterung vernachlässigt werden.

Neben der Longitudinaldiffusion gibt es noch weitere Effekte, die zur Peakverbreiterung beitragen:

- Wandadsorption der Proben
- Verfälschung des stempelförmigen Flussprofils durch Temperatureffekte
- Überlagerung des EOF mit einem Druckflussprofil
- zu lange Probenaufgabenzonen
- Mobilitätsdifferenzen vom Puffer-Ion zu den zu analysierenden Ionen

Selektivität

Die Fähigkeit eines Trennsystems, zwei Substanzen voneinander trennen zu können, wird durch die Selektivität beschrieben. Sie ist umso größer, je stärker die Unterschiede ihrer elektrophoretischen Mobilitäten sind. Der Trennfaktor α in der CE ist definiert als (Gleichung 21):

$$\alpha = \frac{t_2}{t_1}$$

t_1 : Wanderungszeit der zuerst eluierten Komponente [s] t_2 : Wanderungszeit der zweiten Komponente [s]

Gleichung 21: Trennfaktor-Bestimmung.

Da definitionsgemäß $t_2 \geq t_1$ ist, ist α immer ≥ 1 .

Auflösung

Die Auflösung Θ zweier Analyten kann aus den Elektropherogrammen nach Gleichung 19 berechnet werden:

$$\Theta = \frac{1}{4} * \sqrt{N} * \frac{\Delta\mu}{\Delta\mu_{app}}$$

N: Anzahl theoretischer Böden μ : elektrophoretischer Mobilitätsunterschied der Ionen
 $\Delta\mu_{app}$: durchschnittlich beobachtete Bewegung der Ionen

Gleichung 19: Ermittlung der Auflösung.

Die Auflösung sinkt mit der Größe des elektroosmotischen Flusses, sofern alle Komponenten die gleiche Ladung aufweisen. Theoretisch wird dann die höchste Auflösung erzielt, wenn der Mittelwert der Analytmobilitäten durch die elektroosmotische Mobilität ausgeglichen wird. Eine solche Trennung würde jedoch sehr viel Zeit in Anspruch nehmen.

Kapillare und Detektion

Die am häufigsten eingesetzten Kapillaren bestehen aus fused-silica (amorpher Quarz) und werden für spektroskopische Detektions-Methoden verwendet. Dabei werden UV-Absorptions-Detektoren wegen ihres einfachen Aufbaus bevorzugt eingesetzt. Neben mechanischen Anforderungen spielt ein geringer Innendurchmesser für eine effiziente Wärmeableitung eine große Rolle. Heute sind Kapillaren bis 5 μm (Innendurchmesser) technisch herstellbar. Die üblicherweise verwendeten Kapillaren liegen im Bereich von 50-100 μm und werden mittels zahlreicher Verfahren, wie z.B. Fräsen, Stanzen oder Lasern, hergestellt. Neben den zu Beginn hauptsächlich verwendeten Glaschips finden immer mehr μ -TAS-Anwendungen z.B. auf Polycarbonat (PC), Polymethylmetacrylat (PMMA), Polydimethylsiloxan (PDMS) (Abb. 15) oder, wie in dieser Arbeit, auf Keramik statt.

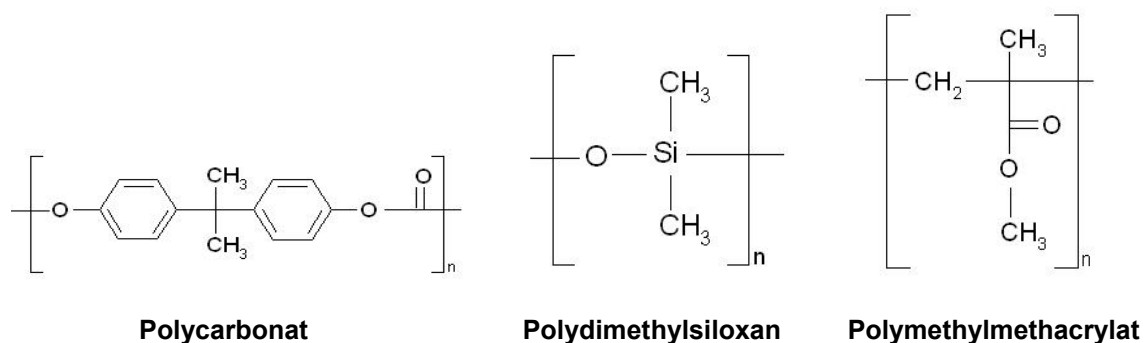


Abbildung 15: Struktureller Aufbau von Polycarbonat, PMMA und PDMA.

Ein Nachteil von einigen Polymeren wie PMMA ist die nicht ausreichende Stabilität gegenüber organischen Lösungsmittel.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über einige Detektionsmethoden in der CE und ihrer Nachweisgrenzen [Kuhn, 1995]:

Detektionsmethode	dynamischer Bereich [M]	Nachweisgrenze [M]	Bemerkung
UV-Absorption	10^{-6} - 10^{-3}	10^{-6} - 10^{-5}	universell einsetzbar, geringe Empfindlichkeit
Fluoreszenz	10^{-8} - 10^{-5}	10^{-8}	selektiv, empfindlich
Laser induzierte Fluoreszenz (LIF)	10^{-12} - 10^{-9}	10^{-12}	selektiv, sehr empfindlich
Amperometrie	10^{-8} - 10^{-5}	10^{-8}	beschränkt auf elektroaktive Analyten

Tabelle 5: CE-Detektionsmethoden und ihre Nachweisgrenzen.

Da der Kapillardurchmesser die maximale optische Weglänge darstellt, werden bei optischen Detektionssystemen besondere Anforderungen an die Optik, die Lichtführung und die Photomultiplier gestellt, um eine ausreichende Empfindlichkeit zu erreichen.

In der Mikrochip-Elektrophorese wird wegen der sehr hohen Empfindlichkeit die Fluoreszenzdetektion (LIF) bevorzugt eingesetzt. Die UV-Detektion ist nicht nur wegen der niedrigen optischen Wellenlänge problematisch, auch die üblicherweise verwendeten Chip-Materialien absorbieren UV-Licht im niedrigen Wellenlängenbereich und stören somit die Detektion [Höbel, 2003].

Die besondere Form der amperometrischen Detektion wird im Kapitel „Amperometrie“ ausführlich erläutert und soll hier nicht genauer beschrieben werden.

Injektionsmethoden der CE

Für eine hohe Trenneffizienz in der CE muss das Injektionsvolumen gering sein, um keinen signifikanten Beitrag zur Bandenverbreiterung zu leisten. Bei einem Gesamtvolumen in der Kapillare von einigen Mikroliter darf die injizierte Probenmenge nur einige Nanoliter betragen. Daher kommt der Probeninjektion eine zentrale Bedeutung zu. Die Injektion kann auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt werden:

- hydrodynamisch
- elektrokinetisch

Werden bei der klassischen CE beide Injektionsmethoden eingesetzt, so findet bei der CE auf Mikrochips ausschließlich die elektrokinetische Injektion Verwendung.

Hydrodynamische Injektion

Durch das kurzzeitige Anlegen einer Druckdifferenz zwischen den Kapillarenden erfolgt die hydrodynamische Injektion. Dies wird folgendermaßen durchgeführt:

Durch Anlegen von Druck auf der Einlassseite und Vakuum an der Detektionsseite oder mittels Gravitationskraft durch Anheben der Einlassseite. Das Volumen, welches auf diese Weise in die Kapillare injiziert wird, ist eine lineare Funktion der Druckdifferenz und der Injektionszeit und kann nach dem Hagen-Poiseuilleschen-Gesetz berechnet werden (Gleichung 23):

$$V_{inj} = \frac{\Delta p * \pi * t * r^4}{8 * \eta * L_{ges}}$$

V_{inj} : Injektionsvolumen [m³]
 t : Injektionszeit [s]

Δp : Druckdifferenz [Pa]
 η : Viskosität [Pa * s]

r : innerer Radius der Kapillare [m]
 L_{ges} : Gesamtlänge der Kapillare [m]

Gleichung 23: Hagen-Poiseuilleschen-Gesetz.

Nach Gleichung 23 lässt sich das Injektionsvolumen über die Injektionszeit und/oder die Druckdifferenz verändern.

Elektrokinetische Injektion

Alternativ zur hydrodynamischen Injektion kann man durch Anlegen einer Hochspannung die Probe elektrophoretisch und elektroosmotisch in die Kapillare transportieren. Die elektrokinetische Injektion ist bei Mikrochip-CE die bevorzugte Injektionsmethode. Die bei der μ CE eingesetzten Chips sind in der Regel nur wenige cm^2 groß. Die in dieser Arbeit verwendeten Chips zeigen alle eine gemeinsame Grundform (Abb. 16):

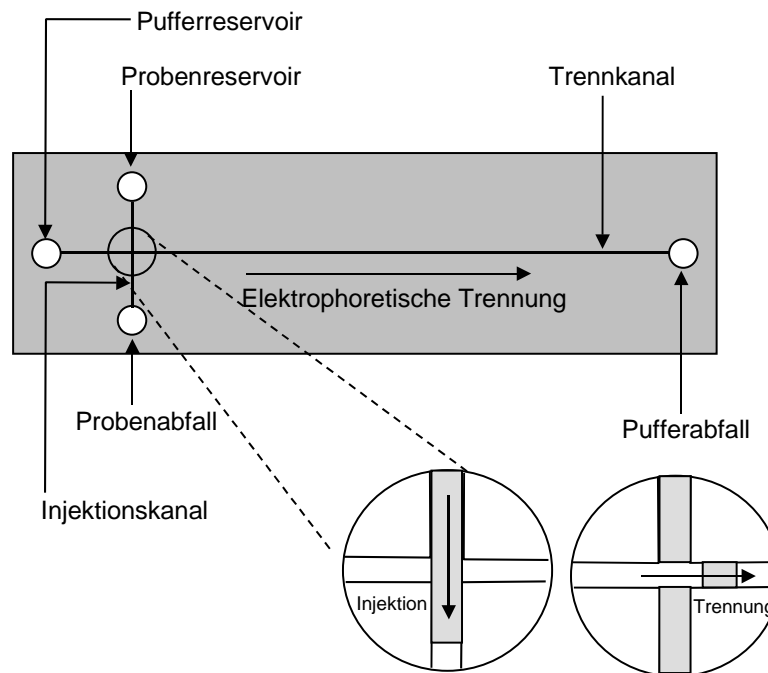


Abbildung 16: Schematische Darstellung zur elektrophoretischen Trennung in einem Mikrochip.

An den Kapillarenden befinden sich vier Reservoirs. Für Puffer und Probe gibt es jeweils ein Einlass- und ein Auslassgefäß, welche als Zugangsöffnung dienen. Zur Injektion und der nachfolgender Trennung in diesen mikrofluidischen Strukturen werden dann über Elektroden unterschiedliche Potentiale an die Reservoirs angelegt. Am Ende des Trennkanals erfolgt dann die Detektion. Als Detektor können UV-, Fluoreszenz- oder amperometrische Detektoren dienen. Alle Kanäle und alle Reservoirs bis auf das zur Probeneingabe werden mit der Elektrolytlösung befüllt. Das Probenreservoir wird mit der Probe befüllt. Durch Anlegen geeigneter Potentiale an den Elektroden über den Injektionskanal wird die Probe in Richtung Probenauslass transportiert. Über diese angelegten Potentiale lassen sich zwei Möglichkeiten der elektrokinetischen Injektion bei der Mikrochip-CE unterscheiden, die „pinched“-Injektion und die „gated“-Injektion [Jacobson et al., 1994].

Pinched-Injektion

In Abbildung 17 ist schematisch der Injektions- und Trennverlauf bei einer pinched-Injektion dargestellt. Die Probe strömt über Kanal 1 in Kanal 3. Damit die Probe nicht auch in die Kanäle 2 und 4 gelangt, werden dort durch elektrische Potentiale gegenläufige Elektrolytströme erzeugt. Somit wird die Probe im Injektionskrenz fokussiert. Durch Umschaltung der elektrischen Felder wird das genau definierte Probenvolumen, was sich im Kreuzungsbereich befindet, über Kanal 4 getrennt. Diese elektrischen Felder sind von ihrer Stärke so gewählt, dass von den Kanälen 1 und 3 keine weitere Probelösung in Kanal 4 gelangt.

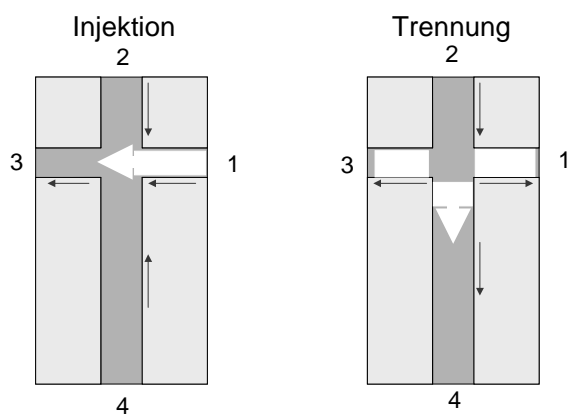


Abbildung 17: Schematische Darstellung der pinched-Injektion. Die Pfeile zeigen die Elektrolytströme an. Die Zahlen kennzeichnen Puffer- und Probenreservoir (1: Probeneinlass, 2: Puffereinlass, 3: Probenauslass, 4: Pufferauslass).

Gated-Injektion

Bei der gated-Injektion (Abb. 18) sind durch Änderungen der Injektionszeit auch variable Volumina injizierbar.

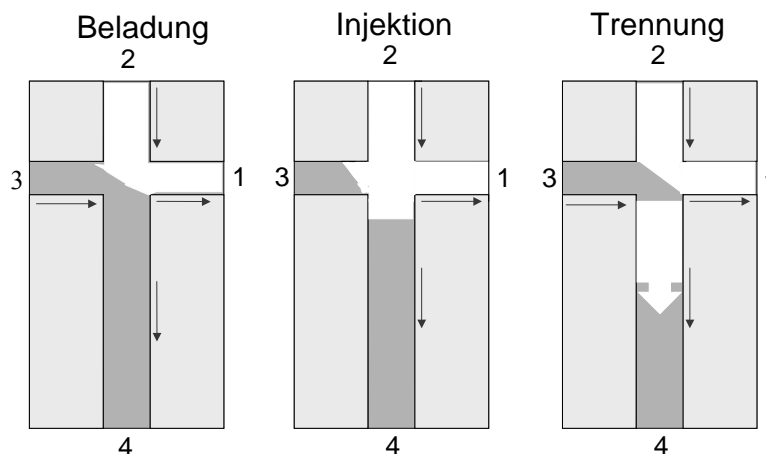


Abbildung 18: Schematische Darstellung der gated-Injektion. Die Pfeile zeigen die Elektrolytströme an. Die Zahlen kennzeichnen Puffer- und Probenreservoir (1: Probeneinlass, 2: Puffereinlass, 3: Probenauslass, 4: Pufferauslass).

Die Probe strömt aus Kanal 2 in Kanal 1. Gleichzeitig strömt Pufferlösung von Kanal 3 in Kanal 4 und wirkt wie ein Tor (gate), so dass keine Probelösung in den Trennkanal 4 gelangen kann. Das elektrische Potential wird zur Injektion an Kanal 3 reduziert und die Probe kann in den Trennkanal 4 strömen. Beim Trennvorgang wird der ursprüngliche Zustand der elektrischen Felder wieder hergestellt. Die dadurch wieder einsetzende Strömung aus Kanal 3 schneidet die im Trennkanal befindliche Probenzone vom restlichen Probenstrom ab. Durch Variation der Injektionszeit können unterschiedliche Probenmengen elektrophoretisch getrennt werden.

Elektroanalytische Messtechniken

Die elektroanalytische Messtechnik ist ein wichtiges Teilgebiet der instrumentellen Analytik. Diese elektrochemischen Analyseprinzipien beruhen auf Untersuchungen von Reaktionen, die an oder zwischen Elektroden ablaufen. Die Methoden dienen im allgemeinen dazu, aus einer elektrischen Größe die Konzentration c eines Stoffes zu bestimmen (Gleichung 24):

$$c = f(i, E, C, \kappa)$$

i : Stromstärke E : Potential C : Ladung κ : Leitfähigkeit

Gleichung 24: Funktioneller Zusammenhang der Konzentrationsbestimmung elektroanalytischer Methoden.

In einigen Fällen kommt als nicht-elektrische Größe die Zeit dazu. Die folgende Auflistung gibt eine Übersicht der heute angewandten Messtechniken, wobei im Zuge dieser Arbeit nur auf die Amperometrie und Voltammetrie ausführlicher eingegangen wird:

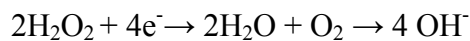
- Amperometrie
- Konduktometrie
- Potentiometrie
- Potentiometrische Stripping-Analyse
- Voltammetrie
- Voltametrische Titration

II.2.4. Voltammetrie

Messprinzip

Voltammetrische Messtechniken sind dadurch gekennzeichnet, dass man den über eine elektrochemische Zelle fließenden Strom in Abhängigkeit der angelegten Spannung registriert [Haase, 2002]. Diese Ströme entstehen durch elektrochemische Umsetzung von Analyten an den Elektroden. Wird eine elektrochemisch aktive Substanz oxidiert oder reduziert, fließt ein Strom, der in Abhängigkeit der angelegten Spannung in Strom-Spannungs-Kurven (Voltammogramme) oder in Strom-Zeit-Kurven (Elektropherogramme) bei der Amperometrie aufgezeichnet wird.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten LTCC-Keramikchips ist die Messelektrode kathodenseitig positioniert, so dass eine Reduktion von Wasserstoffperoxid nach Gleichung 25 erfolgt:



Gleichung 25: Reduktion von Wasserstoffperoxid an einer Messelektrode.

Bei den hier verwendeten Edelmetall-Elektroden (Gold) sind Elektronen Träger des Ladungstransports. Abgegebene Elektronen bewirken somit eine Reduktion des Analyten, aufgenommene Elektronen eine Oxidation. Die an der Elektrodenoberfläche stattfindende Reaktion ist eine Redoxreaktion und die Elektroden werden als Redoxelektroden bezeichnet.

Wenn sich die Elektrode im thermodynamischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung befindet, dann gilt für eine an dieser Elektrode ablaufende Redoxreaktion eines Redoxpaares mit $\text{Ox} + z \cdot \text{e}^- \rightarrow \text{Red}$ die folgende Gleichung:

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{F \cdot n} \cdot \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

E: Gleichgewichtspotential [V]
 R: ideale Gaskonstante [8,3145 J * mol⁻¹ * K⁻¹]
 F: Faraday-Konstante [96485 C * mol⁻¹]
 [Ox]: Konzentration der oxidierten Form [mol]

E₀: Standardpotential [V]
 n: Zahl übertragener Elektronen
 T: Temperatur [K]
 [Red]: Konzentration der reduzierten Form [mol]

Gleichung 26: Nernstsche Gleichung.

Eine Reduktion der oxidierten Form an der Elektrode erreicht man durch Veränderung des Potentials in negativer Richtung. Dabei erfolgt die Abnahme des Potentials so lange in negativer Richtung, bis die Oberflächenkonzentration des oxidierbaren Analyten auf Null abgesunken ist. Den bei diesem heterogenen Elektronentransfer fließenden Strom bezeichnet man als Faradayschen Strom. Diesem ist durch Änderungen an der elektrischen Doppelschicht (Kondensator) ein kapazitiver Strom überlagert. Messtechnisch ist eine Trennung dieser beiden Ströme nicht möglich. Für auswertbare Messungen sollte der Faradaysche Strom im Vergleich zum kapazitiven Strom wesentlich größer sein.

Eine Elektrode taucht in eine Elektrolytlösung mit dem Widerstand R und einer Doppelschicht mit einer Kapazität C . Kommt es zu einer sprunghaften Änderung des Potentials E , registriert man einen zeitabhängigen kapazitiven Strom (Gleichung 27):

$$I_c = \frac{\Delta E}{R} * e^{-t/R*C}$$

E: Potentialänderung der Elektrode [V]

t: Zeit [s]

R: Widerstand [Ω]

C: Doppelschichtkapazität [$A * s * cm^{-2}$]

Gleichung 27: Berechnung des kapazitiven Stroms I_c an einer Elektrode.

Je kleiner der RC-Term ist, desto schneller nimmt der kapazitive Strom ab. Die kleinere Elektrodenoberfläche bei Mikroelektroden wirkt sich dabei positiv auf das Detektionssignal aus. Der Grund dafür ist, dass die kapazitiven Ströme proportional zur Elektrodenoberfläche abnehmen, während die Faradayschen Ströme nur proportional zum Elektrodenradius abnehmen.

Messanordnung

In der Regel arbeitet man bei der Voltammetrie mit einer Dreielektrodenanordnung aus Arbeits-, Referenz-, und Gegenelektrode (Abbildung 19).

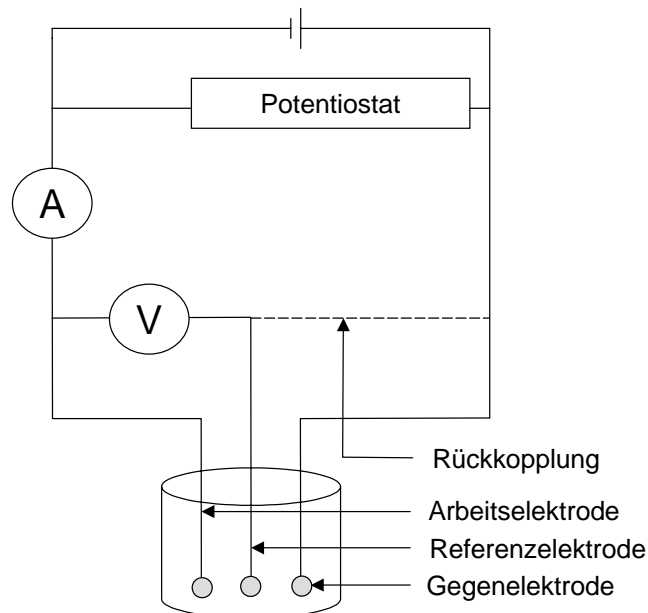


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Dreielektrodenanordnung bei voltammetrischen Messungen.

Bei der potentiostatischen Messtechnik in der Voltammetrie dient die Referenzelektrode zur Einstellung des Potentials der Arbeitselektrode auf den Sollwert. Da hierbei das Potential der Arbeitselektrode sehr hochohmig gemessen wird, fließt über die Referenzelektrode praktisch kein Strom. Das angelegte Arbeitspotential liegt zwischen Arbeits- und Referenzelektrode. Der Potentialsprung wird stromlos zwischen diesen gemessen. Auf Grund des ohmschen Widerstandes des Elektrolyten kommt es an der Gegenelektrode zu einem ohmschen Spannungsabfall. Dieser ist umso höher, je größer der Gesamtstrom (Faradayscher und kapazitiver) und je geringer die Leitfähigkeit des Elektrolyten ist. Da dieser ohmsche Spannungsabfall auch zwischen Arbeits- und Referenzelektrode auftritt und nicht von der Elektronik kompensiert werden kann, positioniert man die Referenzelektrode möglichst nah an die Arbeitselektrode.

Bei der Verwendung von Mikroelektroden fließen wegen der sehr kleinen Elektrodenoberfläche nur geringe Ströme im Mikroampere- bis Picoamperebereich. Ohne Polarisierung der strombelasteten Referenz-/Gegenelektrode kann die 2-Elektrodenanordnung verwendet werden. Dies bedeutet, dass bei der 2-Elektrodenanordnung die Gegenelektrode nicht unbedingt erforderlich ist.

II.2.5. Amperometrie

Während man bei der Voltammetrie den Strom in Abhängigkeit einer sich ändernden Spannung misst, bleibt bei der Amperometrie sowohl die Spannung als auch das Arbeitspotential konstant und man detektiert den durch die Phasengrenzfläche Elektrolyt/Elektrode fließenden Diffusionsgrenzstrom. Die auch in dieser Arbeit angewandte Amperometrie ist also ein elektrochemisches Messverfahren, dass auf der Konzentrationsabhängigkeit des Diffusionsgrenzstroms beruht.

Messprinzip

Eine amperometrische Messzelle besteht aus einem Elektrolyten, einer Arbeitselektrode (Messelektrode) und einer Referenzelektrode (Gegenelektrode). Eine von außen angelegte Gleichspannung bewirkt, dass die Arbeitselektrode polarisiert wird und praktisch kein Strom fließt [Haase, 2002]. Erst in Anwesenheit von Depolarisatoren (Analyt, Probe) fließt ein konzentrationsabhängiger Grenzstrom. Nicht die gesamte Strom-Spannungs-Kurve wird aufgenommen, sondern das Potential E_{pot} der Arbeitselektrode wird so gewählt, dass es im Diffusionsgrenzstromgebiet des zu untersuchenden Analyten liegt. Es muss eine Arbeitselektrode gewählt werden, an der die Reaktion so schnell abläuft, dass nur noch der Stofftransport aus der Lösung zur Phasengrenze die Reaktionsgeschwindigkeit und somit auch den über die Elektroden fließenden Strom bestimmt [Haase, 2002].

Nach dem 1. Fickschen Gesetz gilt:

$$\frac{J}{A} = -D * \frac{dc}{dx}$$

J/A : Stoffmengenstromdichte [$\text{mol} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$]

D : Diffusionskoeffizient [$\text{m}^2 * \text{s}^{-1}$]

dc/dx : Konzentrationsgradient vor der Messelektrode [$\text{mol}/\text{m}^3 * \text{m}^{-1}$]

Gleichung 28: Berechnung 1. Ficksches Gesetz.

Wenn man annimmt, dass die Konzentration c im Elektrolyten vor der Messelektrode in einer Grenzschicht der Dicke δ linear bis auf $c = 0$ an der Oberfläche abfällt, ist $dc/dx = c/\delta$ [Niebuhr und Lindner, 2002].

Somit ergibt sich aus dem Faradayschen Gesetz (Gleichung 29)

$$I = z * F * J$$

z: Zahl der Elementarladung F: Faradaykonstante [96485 C * mol⁻¹] J: Stofftransport [mol * s⁻¹]

Gleichung 29: Berechnung des Stroms nach dem Faradayschen Gesetz.

der Diffusionsgrenzstrom (Gleichung 30):

$$I_D = \frac{n * F * A * D * c}{\delta} \quad \text{mit} \quad I_D = k * \frac{c}{\delta}$$

n:	Anzahl ausgetauschter Elektronen	F:	Faradaykonstante [96485 C * mol ⁻¹]
A:	Fläche der Arbeitselektrode [m ²]	D:	Diffusionskoeffizient [mol/m ² * s]
c:	Konzentration des Depolarisators [mol]	δ:	Diffusionsschichtdicke [m]
k:	zusammengefasste Konstanten		

Gleichung 30: Ermittlung des Diffusionsgrenzstroms.

Aus der Gleichung 30 ergibt sich, dass der Diffusionsgrenzstrom proportional zur Konzentration des Depolarisators und umgekehrt proportional zur Diffusionsschichtdicke ist. Da die Diffusionsschichtdicke aber im wesentlichen von den hydrodynamischen Bedingungen bestimmt wird, muss die Strömung an der Arbeitselektrode sehr genau konstant gehalten werden [Haase, 2002].

Versuchsaufbau

Für eine potentiostatische Messung ist neben einem Hochspannungsnetzgerät (HSPG) ein Potentiostat zur Konstanthaltung des Arbeitspotentials nötig (Abb. 20).

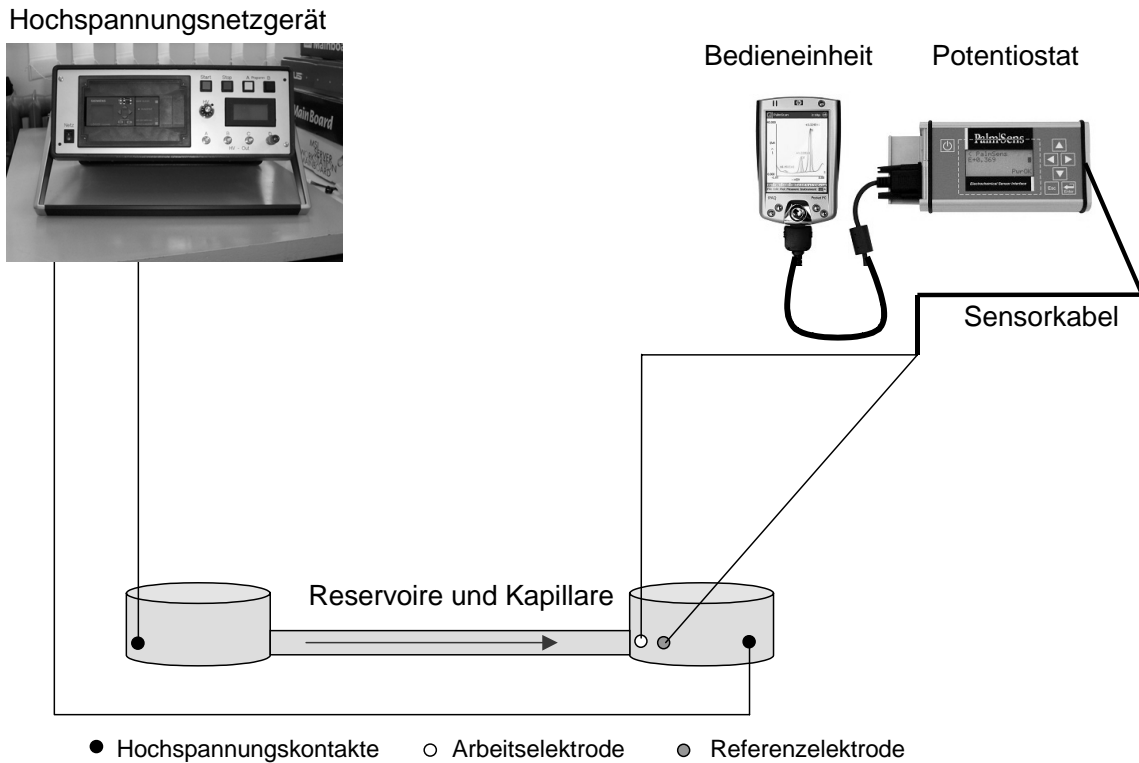


Abbildung 20: Schematischer Aufbau einer amperometrischen Messanordnung bei nicht-elektrokinetischer Beladung in dieser Arbeit.

Die Abbildung 20 zeigt eine 2-Elektrodenanordnung. Eine weitere Möglichkeit ist die Messung mit einer 3-Elektrodenanordnung. Dazu wird eine Gegenelektrode in den Reaktionsansatz eingebaut. Aufgabe dieser Gegenelektrode ist es, den für die Durchtrittsreaktion nötige Spannung zwischen der Messelektrode und dem Elektrolyten einzustellen. Der von der Messelektrode kommende Strom fließt nur über die Referenzelektrode, die Gegenelektrode bleibt stromlos.

Amperometrische Methoden

Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über einige amperometrischen Messmethoden.

Methode	Einsatzbeispiel
Flammen-Ionisations-Detektor	Messung der Konzentration von Kohlenwasserstoffen in Luft oder anderen Gasen
Amperometrie mit Festkörpernionenleitern	Gassensitive Elektroden (z.B. Messung von Sauerstoff)
Messung mit flüssigen Elektrolyten	Konzentrationsmessungen von Gasen

Tabelle 6: Amperometrische Messmethoden.

Amperometrische Sensoren

Unter amperometrischen Sensoren werden Messzellen verstanden, die für Konzentrationsmessungen von kathodisch reduzierbaren oder anodisch oxidierbaren chemischen Verbindungen verwendet werden. Amperometrische Sensoren für Lösungen lassen sich, ausgehend von der Beschaffenheit der Arbeitselektrode, in zwei Gruppen einteilen:

- Sensoren mit freier Arbeitselektrode
- Sensoren mit membranbedeckter Arbeitselektrode

Sensoren mit freier Arbeitselektrode

Bei dieser Messanordnung steht die Arbeitselektrode in direktem Kontakt mit der Probe. Dies hat zur Folge, dass neben der analytisch angestrebten Elektrodenreaktion auch unerwünschte Nebenreaktionen ablaufen können. Auch Leitfähigkeitsänderungen haben einen Effekt auf den Innenwiderstand des Sensors. Dadurch wird das Einsatzgebiet auf überwiegend matrixfreie Lösungen beschränkt. Von Vorteil ist, dass durch Vergrößerung der Oberfläche der Arbeitselektrode hohe Empfindlichkeiten im ppb-Bereich erreicht werden können.

Sensoren mit membranbedeckter Arbeitselektrode

Das Prinzip des Clark-Sensors (Abb. 21) ist noch heute Grundlage für universell einsetzbare amperometrische Sensoren.

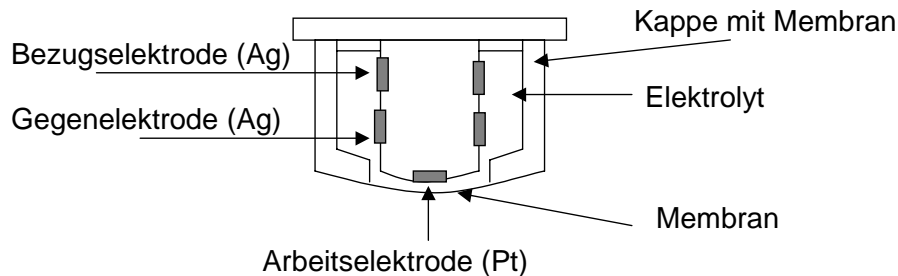


Abbildung 21: Schematischer Aufbau eines Clark-Sauerstoffsensors.

Sie besteht aus einer Platin-Kathode, zwei Silber-Elektroden und einem Elektrolyten aus KCl oder KBr. Das wesentliche Merkmal der Clark-Zelle ist die Trennung der Arbeitselektrode von der Untersuchungslösung durch eine permeable Polymermembran. Der durch die Membran diffundierte Sauerstoff löst sich in einem dünnen Elektrolytfilm, mit welchem die Arbeitselektrode in Kontakt steht. Sauerstoffmoleküle werden an der Messelektrode zu Hydroxidionen reduziert. Diese OH⁻-Ionen werden im elektrischen Feld aus der Grenzschicht heraustransportiert. Es muss jedoch wieder eine entsprechende Menge Sauerstoff aus dem Elektrolyten in die Messelektrode diffundieren, welches Zeit erfordert und der Strom begrenzt wird [Niebuhr und Lindner, 2000].

Durch die wachsende Silberhalogenidschicht verändert sich der Innenwiderstand. Bei zu niedriger Halogenidkonzentration reagiert Ag zu Ag₂O. Dadurch wird das Eigenpotential der Bezugselektrode verändert und der Sensor muss gewartet werden.

Elektrochemische Detektoren in der μ -Kapillaranalytik

Wie bereits im Abschnitt „Kapillare und Detektion“ erwähnt, sind optische Detektorsysteme die gebräuchlichsten. Jedoch ist der Vorteil elektrochemischer Detektoren ihr einfacher Aufbau und der damit verbundene geringere Anschaffungspreis. Zudem ist bei einigen verwendeten μ TAS-Materialien (z.B. Keramik) eine optische Detektion nicht möglich.

Der amperometrischen Detektion kommt daher große Bedeutung zu, da sie eine hohe Selektivität bei geringer Nachweisgrenze besitzt. Potentiometrische- und Leitfähigkeits-Detektoren sind auch Systeme mit guter Reproduzierbarkeit. Das Messsignal ist von der

Positionierung der Messelektroden abhängig. Diese werden meist, wie in dieser Arbeit, in der end-capillary (end-column)-Anordnung direkt vor dem Kapillarausgang positioniert (Abb. 43b-c) [Huang et al., 1991]. Idealerweise ist die Elektrode genauso breit wie der Kapillarquerschnitt. Um den Einfluss der Hochspannung noch weiter zu reduzieren, sollten Trennkapillaren mit möglichst geringem Durchmesser eingesetzt werden, so dass der elektrische Widerstand der Kapillare hoch wird und der Spannungsabfall in der Kapillare stattfindet. Der Prozess der Elektroden-Positionierung auf dem Chip wird in den Kapiteln III.3.1. und III.3.2. eingehend erläutert.

Weitere Möglichkeiten sind die on- und off-column-Detektion (Abb. 22). Bei der on-column-Detektion sitzt der Detektor auf der Kapillare. Diese Anordnung wird meist bei der optischen Detektion genutzt, seltener bei der elektrochemischen Detektion, da das elektrische Feld der Kapillare die Detektion in erheblichen Maße stört.

Die off-column-Anordnung wird auf Grund ihres sehr komplizierten Aufbaus nur selten bei μ TAS eingesetzt. Dabei wird die Trennkapillare an eine weitere Kapillare über eine poröse Matrix gebunden (Abb. 22). Das Hochspannungspotential kann über diese Verbindungsbrücke abfallen, wobei nur unter dem Einfluss des EOF der Analyt zum Detektor wandert.

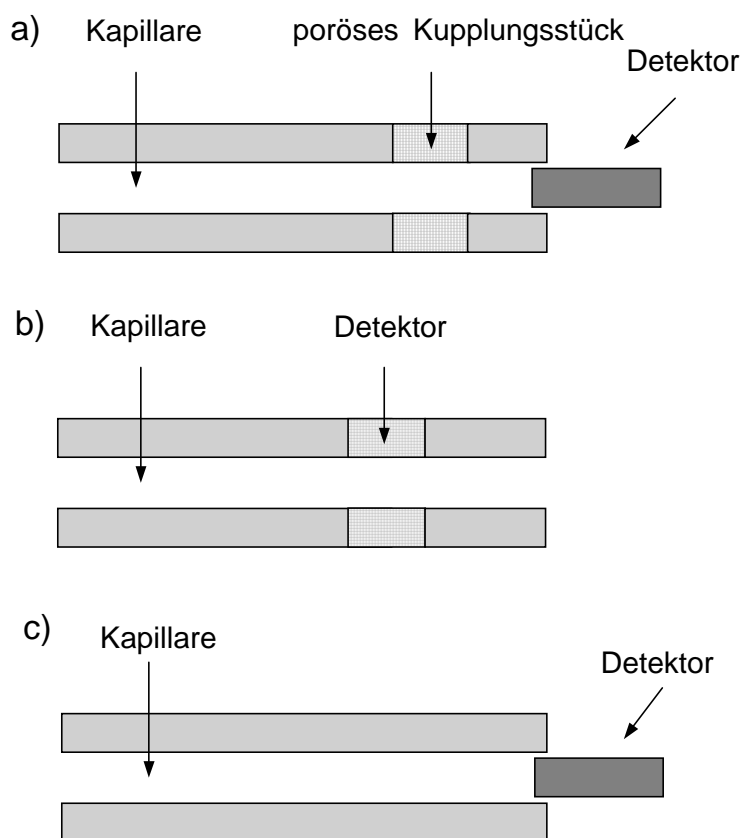


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Anordnung elektrochemischer Detektoren: a) off-column, b) on-column, c) end-capillary.

II.3. LTCC-Keramik

Einleitung

Unter LTCC versteht man eine neuartige Keramikfolie, mit deren Hilfe hochkomplexe und viellagige Systeme für elektronische Anwendungen entwickelt und aufgebaut werden können.

Die wesentlichsten Vorteile von LTCC-Keramiken sind:

- Niedrige Toleranz in der Dielektrizitätskonstanten
- Große Wärmeleitfähigkeit
- Hohe Chemikalienbeständigkeit
- Optimal für Multilayer-Designs
- Hohe Kosteneffizienz

Dieses Multilayer-System, bevorzugt in der Automobilelektronik eingesetzt, findet immer mehr Einsatzbereiche in der Unterhaltungselektronik, in der Medizintechnik und bei Bluetooth-Anwendungen [Informationsdatenblatt, Fa. ceramtec]. Die chemischen Eigenschaften und die geringen Kosten machen auch einen Einsatz in der pharmazeutischen und lebensmittelchemischen Analytik interessant. Im Zuge dieser Arbeit sollen in Verbindung mit neuen Herstellungs- und Bearbeitungsverfahren der LTCC-Keramik diese Einsatzgebiete, wie auch das der instrumentellen Analytik, erschlossen werden.

Fertigung

Vor dem Sintern besteht die LTCC hauptsächlich aus einer Art Keramik-Pulver mit einem hohen Glasanteil. Wesentliche Bestandteile sind Aluminiumsilikate wie beispielsweise $[\text{Al}_2(\text{OH})_4(\text{Si}_2\text{O}_5)]$ und Zusätze zur Schwingungsminderung beim Trocknen. Dazu kommen organische Inhaltsstoffe wie Weichmacher und Binder, die während des Sinterns verbrennen. Auf Grund des hohen Glasanteils härtet die Keramik schon bei Temperaturen von 850 °C aus. HTCC-Keramiken (high temperature co-fired ceramic) bestehen aus einem Aluminiumoxid-Substrat (Alumina), das erst bei einer Temperatur von 1600 °C gesintert werden kann.

Während man bei LTCC-Folien Gold- und Silberkontakte oder Legierungen mit Platin und Palladium aufdrucken, laminieren und abschließend sintern kann (Abb. 41), ist dies bei HTCC-Folien auf Grund der niedrigen Schmelztemperatur von Gold (1063 °C) und Silber

(961 °C) nicht möglich. Bei diesen wurde Wolfram (3410 °C) und Molybdän (2620 °C) verwendet, die allerdings eine niedrigere Leitfähigkeit aufweisen.

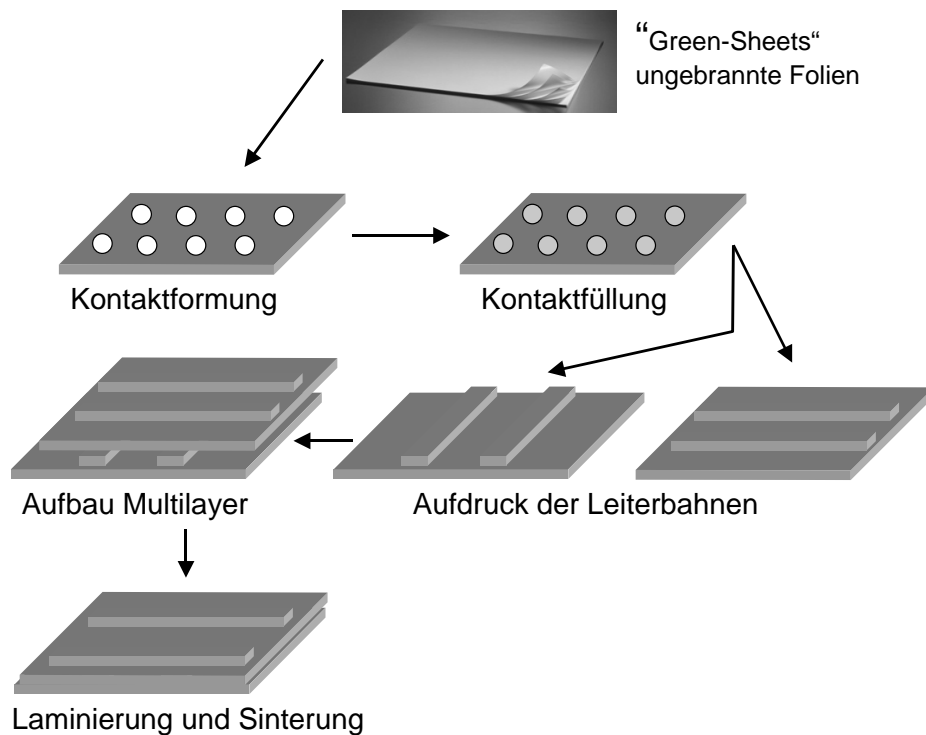


Abbildung 23: Schematischer Prozessaufbau zur LTCC-Herstellung.

Ein weiterer Vorteil von LTCC ist, dass sie nahezu formstabil und schrumpfungsfrei nach dem Sintern bleiben. Dies ist insbesondere bei dreidimensionalen Multilayer-Anordnungen von großer Bedeutung.

Großen industriellen Nutzen hat die LTCC-Keramik durch den Einsatz in fast allen Motorsteuerungselementen und ABS (Antiblockiersystem)-Einheiten erreicht.

II.4. Biosensoren

Ein Biosensor (Abb. 24) ist ein analytisches System, bei dem eine biologische Komponente mit einem Signalwandler (Transducer) kombiniert oder zumindest räumlich eng mit diesem verknüpft ist [Turner et al., 1987].

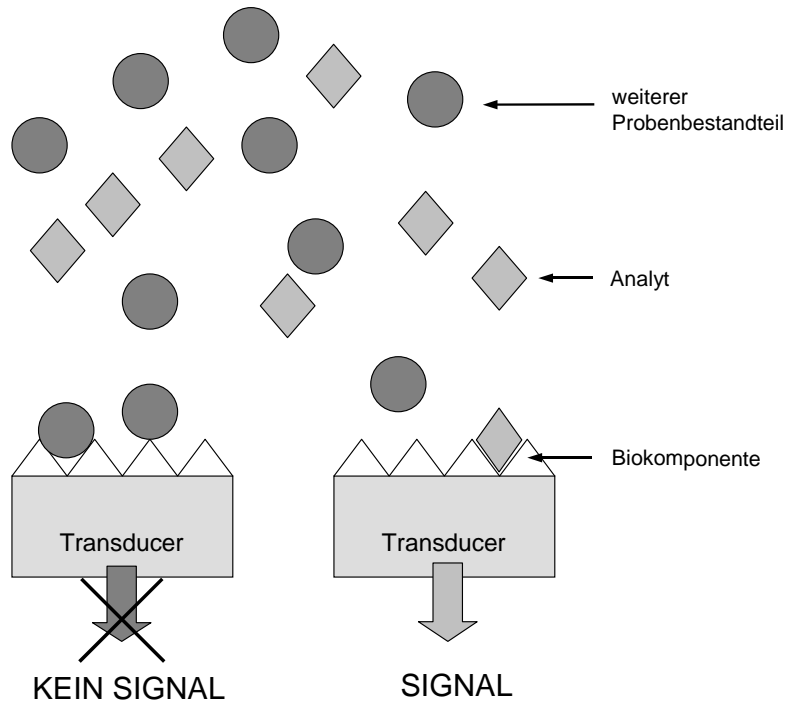


Abbildung 24: Schematische Funktionsweise eines Biosensors.

Mit Hilfe ihrer biologischen Komponente können Analyte aus komplexen Stoffgemischen spezifisch erfasst werden. Mittlerweile steht eine große Anzahl an Biosensoren zur Verfügung, mit denen einige hundert Analyten wie beispielsweise Aminosäuren, Zucker, Cofaktoren von Enzymen detektiert werden können [Keusgen, 2002]. Biosensoren können entweder nach der Art der Wechselwirkung oder nach dem Funktionsprinzip des Transducers klassifiziert werden.

Optische Biosensoren

Bei der Klassifizierung nach dem Signalwandlerprinzip unterscheidet man im Wesentlichen elektrochemische, kalorimetrische, mikrogravimetrische und optische Biosensoren. Die Gruppe der optischen Biosensoren kann nach ihrem physikalischen Prinzip in drei Gruppen eingeteilt werden [Keusgen, 1999]:

- Evaneszentfeldsensoren
- Indikatorsensoren
- reflektometrische Interferenzsensoren

Evaneszentfeldsensoren

Kernpunkt dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Mikrototalanalysensystems auf LTCC-Basis. Auf diesem System aufbauend sollen weiterhin phenoloxidierende Enzyme wie beispielsweise Laccase (O₂-Oxidoreduktase, EC 1.10.3.2) mit in das System integriert werden. Hierdurch soll eine höhere Spezifität erreicht werden, um Polyphenole in matrixreichen Realproben zu detektieren. Dazu sollen phenoloxidierende Enzyme wie Laccase (O₂-Oxidoreduktase, EC 1.10.3.2) und Tyrosinase (Monophenol-Monooxygenase, EC 1.14.18.1) als Modellenzyme auf modifizierten Goldoberflächen immobilisiert werden. Zur Beurteilung derartiger Immobilisierungsprozesse eignet sich besonders die Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR).

Evaneszentes Feld Trifft Licht aus einem optisch dichteren Medium (z.B. Glas) auf ein optisch dünneres Medium (z.B. Luft, Flüssigkeit), wird ein Teil des Lichtes an der Grenzfläche reflektiert, ein anderer Teil gebrochen. Bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem Grenzwinkel der Totalreflexion, wird das Licht parallel zur Grenzfläche gebrochen. Ist der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel, erfolgt Totalreflexion des Lichtstrahls.

Obwohl es zu einer Totalreflexion an der Grenzfläche kommt, fällt die Lichtintensität hinter der Grenzfläche nicht schlagartig auf Null ab, sondern klingt exponentiell ab. Diesen einige nm großen Bereich jenseits der Phasengrenze bezeichnet man als evaneszentes Feld. Das evaneszente Feld kann zur Anregung und Detektion von Prozessen an der Grenzfläche genutzt werden [Eggins, 1996].

Neben dem Gitter- und Prismenkoppler (Abb. 25 und 26) gehört zu den Evaneszentfeldsensoren die Oberflächenplasmonen-Resonanz.

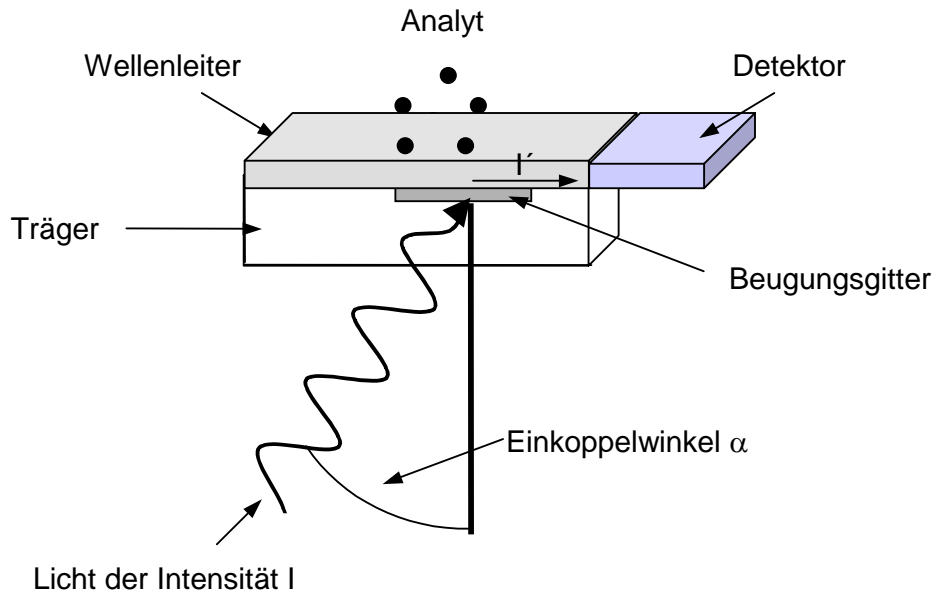


Abbildung 25: Prinzip eines Gitterkopplers. Die Intensität des eingekoppelten Lichtes I' ist vom Einkoppelwinkel α abhängig und bei einem bestimmten Winkel maximal. Durch Anlagerung von Analytmolekülen ändert sich der Einkoppelwinkel, bei dem die Intensität des eingekoppelten Lichtes I' maximal ist. Die Verschiebung des Kopplungswinkels wird zur Auswertung herangezogen.

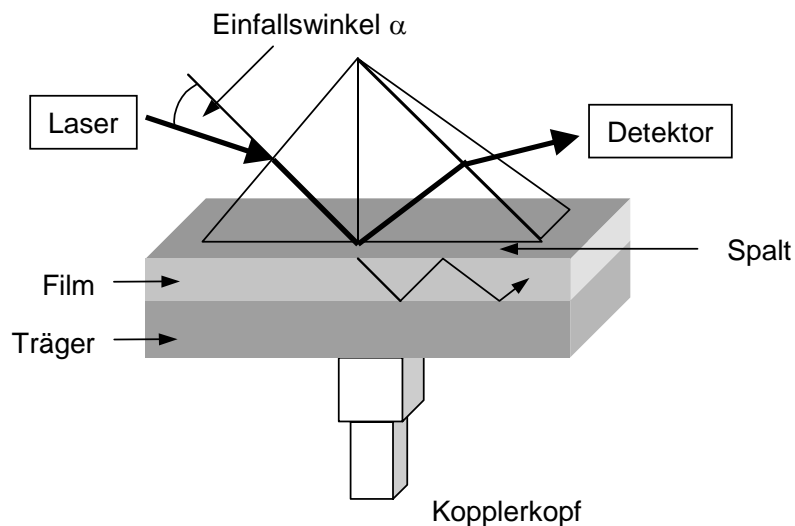


Abbildung 26: Prinzip eines Prismenkopplers. Laserlicht wird auf einer der beiden kurzen Seiten eines Prismas eingestrahlt, an der Grenzfläche Prisma/Luft totalreflektiert und die Intensität der Strahlung auf der zweiten kurzen Seite detektiert. Bei einem bestimmten Einstrahlwinkel, der abhängig ist von der Dicke und Brechungsindex des Filmes, kann die Strahlung in den Film „tunneln“. Die Intensität des detektierten Lichtes nimmt ab. Wird die Dicke bzw. der Brechungsindex des Filmes durch Anlagerung von Biomolekülen verändert, ist ein anderer Einstrahlwinkel zum Einkoppeln der Strahlung in den Film notwendig.

Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR)

Eine Technik, die ohne (Fluoreszenz-)Markierung auskommt und sich das evaneszente Feld zunutze macht, ist die Oberflächenplasmonen-Resonanz (surface plasmon resonance, SPR).

Obwohl der zugrunde liegende quantenmechanische Effekt schon einige Jahrzehnte bekannt ist [Otto, 1968; Kretschmann und Raether, 1968], wurde erst 1983 die Möglichkeit zur Echtzeitbeobachtung von Affinitätsreaktionen beschrieben [Liedberg et al., 1983].

Trifft monochromatisches, p-polarisiertes Licht (elektrische Feldkomponente verläuft parallel zur Einfallsebene des Lichtes) auf die Grenzfläche zwischen einem optisch dichteren und einem optisch dünneren Medium und ist diese Grenzfläche mit einem dünnen ($<$ Wellenlänge des monochromatischen Lichtes) Metallfilm beschichtet, so können die freien oszillierenden Elektronen der Metallschicht mit dem evaneszenten Feld wechselwirken [O'Shannessy et al., 1993].

Sofern die Resonanzbedingung erfüllt ist, können die Elektronen Licht absorbieren. Diese kollektive Anregung der Elektronen bezeichnet man als „(Oberflächen-)Plasmon“ (Abb. 27).

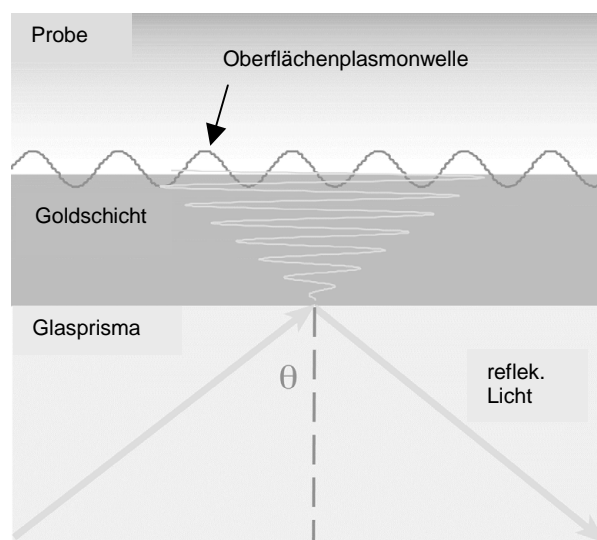


Abbildung 27: Oberflächenplasmonenwelle, die an der Grenzfläche Goldschicht/Probe entlang wandert. Als Plasmonen werden die Schwingungsmodi der Elektronen bezeichnet, die um die Metallionenkerne oszillieren. Erfüllt einfallendes Licht die Resonanzbedingung, so kann ein Teil der Lichtenergie in die Oberflächenplasmonenwelle eingekoppelt werden. Dies führt zu einer Energieverminderung des reflektierten Lichtes [Hartmann, 2004].

Die Energieabsorption durch die Elektronen hat zur Folge, dass die Intensität des reflektierten Lichtes eines bestimmten Einstrahlwinkels (nämlich der, für den die Resonanzbedingung erfüllt ist) vermindert ist. Dieser Winkel wird als Resonanzwinkel bezeichnet. Er ist sowohl von der Dicke des (eventuell zusätzlich beschichteten) Metallfilms, der Wellenlänge des einfallenden Lichtes und dem Brechungsindex auf beiden Seiten der Grenzfläche abhängig. Da die Eigenschaften des Metallfilms, die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes und der

Brechungsindex des optisch dichteren Mediums konstant sind, kann eine Brechungsindexänderung in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche bestimmt werden. Durch Interaktionen von Analytmolekülen mit der Metall- bzw. der biosensitiven Metallschicht kommt es zu Brechungsindexänderungen an der Metallschicht, welche dazu führen, dass sich die Resonanzbedingung und somit auch der Resonanzwinkel ändert. Diese Winkelverschiebung ist proportional zum Belegungsgrad der Oberfläche und wird zur Auswertung herangezogen (Abb. 28).

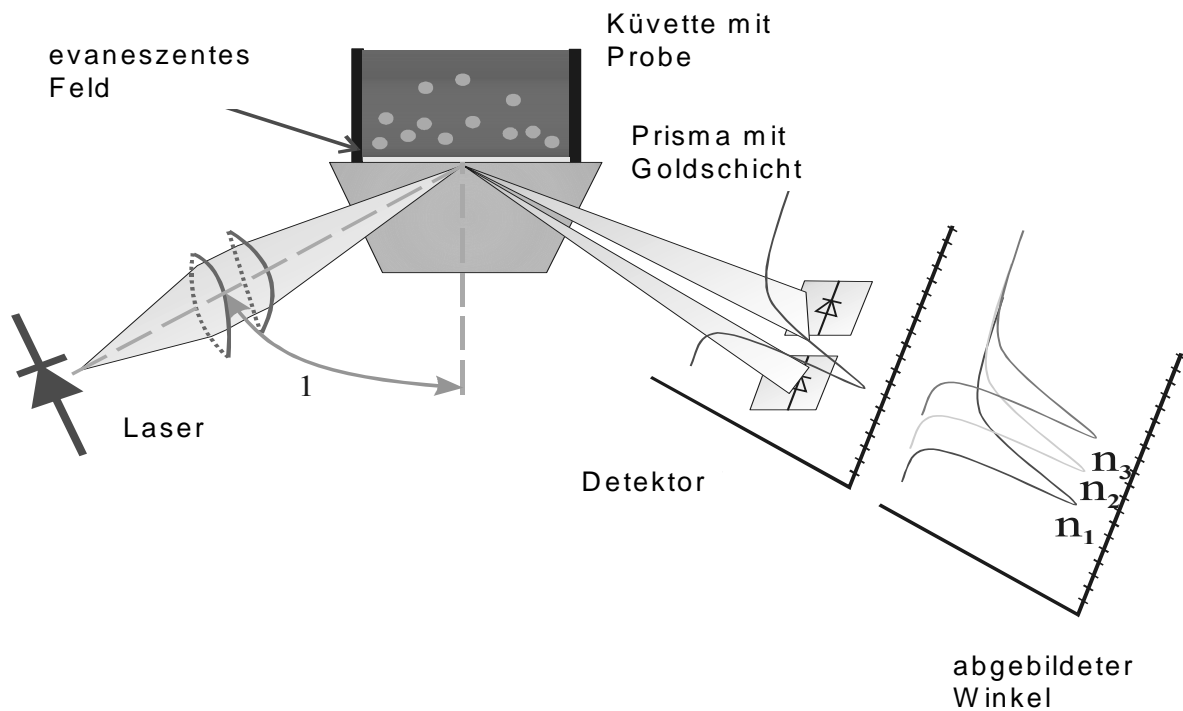


Abbildung 28: Resonanzwinkeländerung bei der SPR durch Interaktion des Analyten mit der (biosensitiven) Metallschicht. Bedingt durch Energieabsorption der Elektronen in der Metallschicht weist die Intensität der reflektierten Strahlung eines bestimmten Einstrahlwinkels (der für den die Resonanzbedingung erfüllt ist) ein Minimum auf (n_1). Durch Anlagerung des Analyten an die biosensitive Metalloberfläche wird die Resonanzbedingung geändert, was dazu führt, dass das Minimum der reflektierten Strahlung bei einem anderen Einstrahlwinkel vorliegt (n_2 , n_3). Diese Winkelverschiebung wird bei der SPR zur Auswertung herangezogen.

Zur Herstellung des Metallfilms können Gold, Silber, Kupfer oder Aluminium verwendet werden. Am häufigsten werden jedoch Gold und Silber genutzt. Gold zeigt bei gleicher Brechungsindexänderung eine größere Winkelverschiebung und ist chemisch stabiler als Silber. Silber liefert dagegen ein besseres Signal/Rauschverhältnis. In neuerer Zeit wird versucht, die positiven Eigenschaften beider Metalle in bimetalischen Schichten zu nutzen [Zynio et al., 2002]. Dabei wird Gold als äußere Schicht verwendet und verhindert so eine Oxidation des Silbers.

Die herausragenden Eigenschaften der SPR sind:

1. Es ist keine Probenmarkierung notwendig. Dies hat den großen Vorteil, dass Biomoleküle keine strukturellen Veränderungen erleiden, die etwa durch Fluoreszenz-, Farbstoff-, Enzym- oder radioaktive Markierung vorkommen können.
2. SPR arbeitet zerstörungsfrei, d.h. der Analyt kann einer weiteren, z.B. massenspektroskopischen Untersuchung zugeführt werden.
3. Der Verlauf einer Affinitätsreaktion, wie z.B. einer Antigen-Antikörper Reaktion, kann in Echtzeit verfolgt und kinetische Parameter bestimmt werden [Green et al., 2000].

Der Nachteil der Methode, dass Moleküle < 500 Da nur schwer detektierbar sind, kann in vielen Fällen durch kompetitive oder „Sandwich-Techniken“ umgangen werden [Keusgen, 2002].

Die Oberflächenplasmonen-Resonanz wird erfolgreich eingesetzt zur Analyse von Antigen-Antikörper, Protein-Protein oder Protein-DNA Interaktionen, aber auch zur Detektion der Konformationsänderung immobilisierter Proteine oder zur Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Funktion antibakterieller synthetischer Peptide [Homola et al., 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Plasmonic[®] (Abb. 29) der Hofmann Sensorsysteme eingesetzt. Es wird mit einem Küvettensystem, d.h. nicht im Durchfluss betrieben. Dieses System ermöglicht es, acht Messungen simultan auszuführen. Dabei kann eine Durchmischung des Küvetteninhaltes mit Hilfe der Pipettiereinheit auf mechanischem Wege erreicht werden. Das Plasmonic[®] verwendet als „optisch dichteres“ Medium ein Glasprisma, das mit einer Goldschicht ausgerüstet ist.

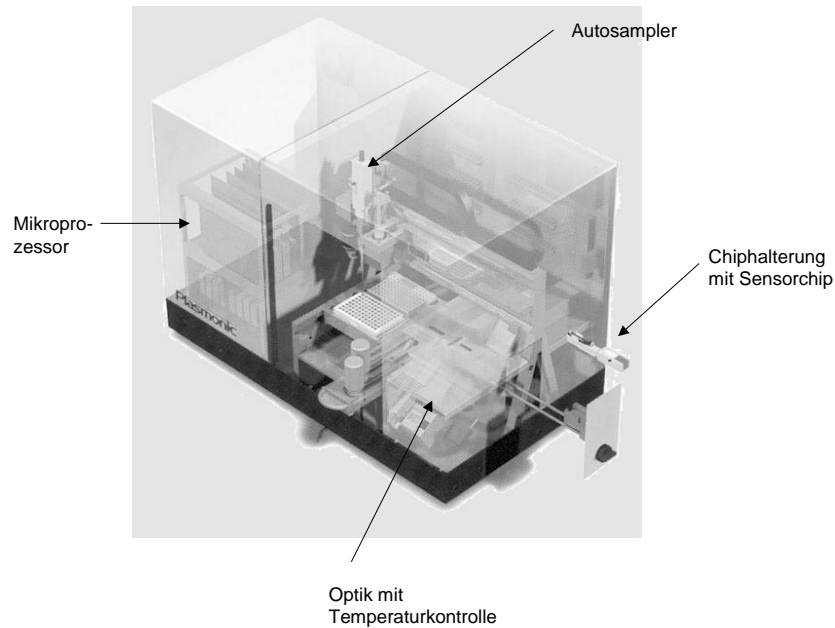


Abbildung 29: SPR-Gerät Plasmonic® (Quelle: Hofmann Sensorsysteme).

Das Plasmonic® arbeitet mit einer defokussiven Optik. Dabei wird die Strahlung unterschiedlicher Einstrahlwinkel auf verschiedene Stellen des Prismas geleitet (Abb. 30). Dies geschieht mit Hilfe einer Zylinderlinse, die sich zwischen der Lichtquelle und dem Prisma befindet.

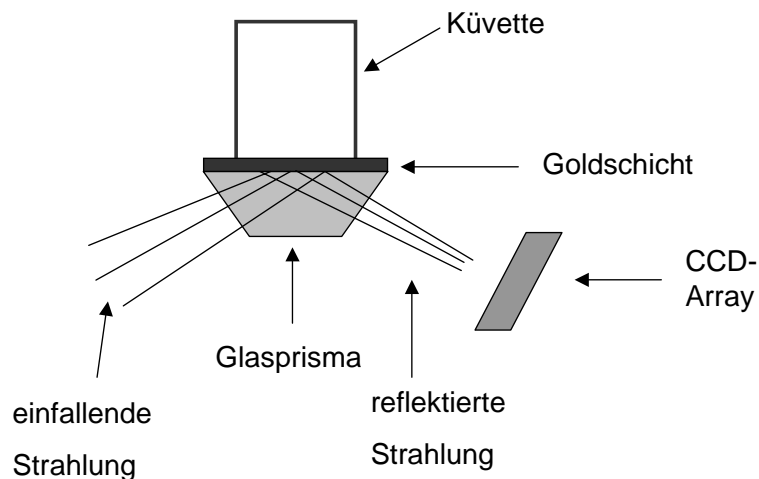


Abbildung 30: Strahlengang der defokussiven Optik des Plasmonic®. Die Strahlung unterschiedlicher Einfallswinkel wird auf verschiedene Stellen des Prismas geleitet [Hartmann, 2004].

Als Lichtquelle dient eine Laserdiode, die einen elliptischen Strahlenkegel aussendet. Durch die Zylinderlinse ist es möglich, die Strahlendivergenz in der Einfallsebene zu erhalten. Dabei werden alle zur Ermittlung des Resonanzwinkels in Betracht kommenden Einfallswinkel umfasst. Die Strahlendivergenz wird also im Plasmonic® dazu genutzt, ohne

Strahlformungsoptik und ohne Änderung der Ausrichtung der Lichtquelle die reflektierende Schicht mit Licht verschiedener Einfallswinkel auszuleuchten. Dies ermöglicht eine kostengünstigere Bauweise. Auf der anderen Seite erfordert diese Technik eine hohe Präzision bei der Herstellung der Goldschicht sowie der Immobilisierung der biosensitiven Schicht. Grund hierfür ist, dass im Verlauf beispielsweise einer biomolekularen Interaktionsanalyse bei Fortschreiten der Prozesse an der Oberfläche unterschiedliche Messpunkte zur Auswertung herangezogen werden. Inhomogenitäten würden zu Ungenauigkeiten innerhalb einer Messung führen. Die Detektion der reflektierten Strahlung erfolgt mit Hilfe einer CCD-Kamera.

II.5. Immobilisierung

Wie bereits in der Definition dargestellt, besteht ein Biosensor aus Biomolekülen, die in direktem Kontakt mit dem physikalischen Transducer stehen. Zu diesem Zweck muss die biologische Komponente auf der Oberfläche des Transducers immobilisiert werden (Abb. 31).

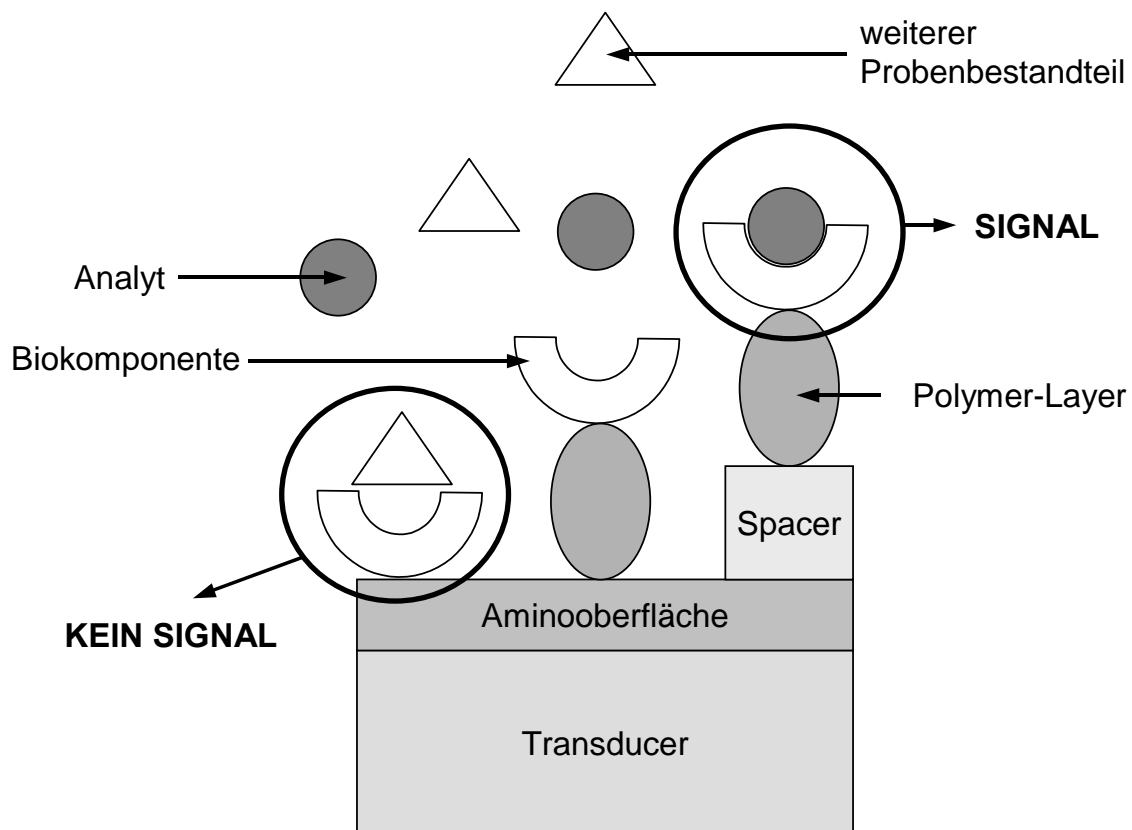


Abbildung 31: Schematische Funktionsweise eines Biosensors. Darstellung von Basisstrategien zur Immobilisierung von Biokomponenten am Beispiel funktionalisierter Amino-oberflächen.

Bei diesem Vorgang ist wichtig, dass es keine signifikante Beeinflussung der Stabilität, Funktionalität und Substratspezifität der immobilisierten DNA, Enzyme, Antikörper und sonstiger Proteine gibt [Keusgen, 2002]. Heute stehen zahlreiche Immobilisierungstechniken zur Verfügung, die diese Anforderungen erfüllen [Weetall, 1993; Turkova, 1999; Guilbault, 1988; Keusgen, 1999; Milka et al., 2000]. Allgemein können Biomoleküle durch kovalente Bindung, Komplexbildung, Adsorption, Zucker-Lektin oder Biotin-(Strept)Avidin Bindung sowie durch die Integration in Gele immobilisiert werden.

Geeignete kovalente Immobilisierungsprotokolle wurden bisher zumeist empirisch ermittelt. In diesem Zusammenhang stellt die SPR ein zweckmäßiges Werkzeug dar, um derartige Immobilisierungsprozesse entwickeln und beurteilen zu können. Hierbei ist die Aufnahme von Reaktionskinetiken (Bindungskinetiken) ein wesentlicher Bestandteil der Methode [Liedberg et al., 1983]. Durch eine ansonsten markierungsfreie Detektion können zusätzliche Veränderungen der immobilisierten Biokomponente vermieden werden.

Generell werden Trägermaterialien vor der Immobilisierung einer Biokomponente aktiviert, um eine möglichst hohe Zahl an Bindungsstellen zu generieren. Da die direkte Immobilisierung eines Biomoleküls auf einer Trägeroberfläche zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen kann, wird die Oberfläche in vielen Fällen nach der Aktivierung mit einem Spacer (Abstandshalter) versehen. Dies sind meist bifunktionale Moleküle, die sowohl eine Bindung mit den funktionellen Gruppen der Trägeroberfläche als auch mit dem Biomolekül eingehen können (Abb. 32).

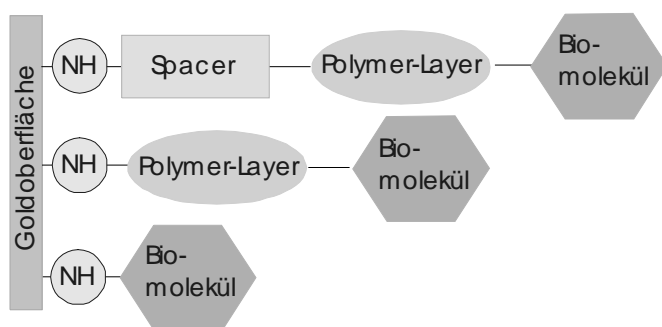


Abbildung 32: Basisstrategien zur Immobilisierung von Biomolekülen an aminofunktionalisierten Goldoberflächen.

II.6. Antikörper

Antikörper sind Plasmaproteine, die spezifisch an Antigene binden. Jedes Antikörpermolekül besitzt eine einzigartige Struktur, die es ermöglicht, ein bestimmtes Antigen zu binden. Die Grundstruktur ist jedoch bei allen Antikörpern gleich, man fasst sie daher unter dem Oberbegriff Immunglobuline zusammen.

Ein Antikörpermolekül (IgG) besteht aus jeweils zwei identischen leichten (je 25 kDa) und schweren (je 50 kDa) Peptidketten, welche zusammen die charakteristische Y-Form bilden (Abb. 33) [Diamandis und Christopoulos, 1996].

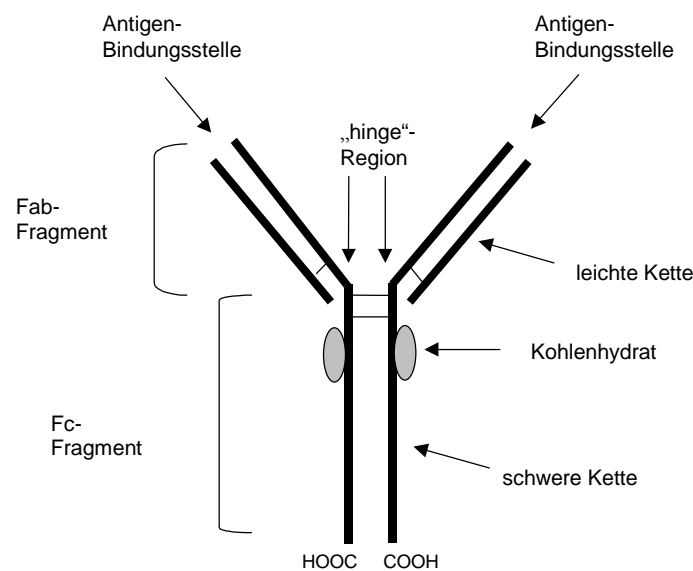


Abbildung 33: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (IgG-Molekül).

Je eine leichte Kette ist über eine oder mehrere Disulfidbrücken an eine schwere Kette gebunden. Die beiden schweren Ketten sind ebenfalls durch eine oder mehrere Disulfidbrücken in der sogenannten „hinge“-Region miteinander verbunden. In dieser Region ist das Molekül beweglich, was eine Variation des Abstandes der Antigenbindungsstellen ermöglicht. Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten besitzen Regionen mit konstanter und Bereiche mit stark variierender Aminosäuresequenz. Die konstanten Regionen der schweren Ketten bilden den „Fuß des Y“. Hier liegen auch die C-terminalen Enden der beiden Peptidketten. Die variablen Regionen am Aminoende der leichten und schweren Ketten bilden zusammen die beiden Antigenbindungsstellen an den Enden der „Arme des Y“. Die Sequenzvariabilität ist in den variablen Regionen nicht überall gleich. Es gibt drei besonders variable Bereiche, die als hypervariable Regionen bezeichnet werden. Die Abschnitte zwischen diesen Bereichen sind hinsichtlich ihrer Sequenz relativ konstant und werden Gerüstregionen genannt. Diese Gerüstregionen bilden die strukturelle Basis der

variablen Region (β -Faltblätter). Die hypervariablen Regionen erzeugen dabei drei Schleifen an einem Rand eines jeden Faltblattes, die sich im gefalteten Protein nebeneinander befinden. Ebenso liegen im Antikörpermolekül jeweils die hypervariablen Schleifen einer leichten und einer schweren Kette zusammen. Auf diese Weise entsteht eine hypervariable Oberfläche, die die antigenbindende Stelle bildet [Janeway und Travers, 1995].

Durch enzymatische Spaltung mit Papain in der „hinge“-Region erhält man zwei spezifische sogenannte Fab-Fragmente (Fragment antigen binding) mit der Antigenbindungsstelle und ein konstantes Fc-Fragment (Fragment crystallizable). Spaltung mit Pepsin führt zu einem $(\text{Fab})_2$ -Fragment, bei dem die „Arme“ des Antikörpermoleküls verbunden bleiben (Abb. 34).

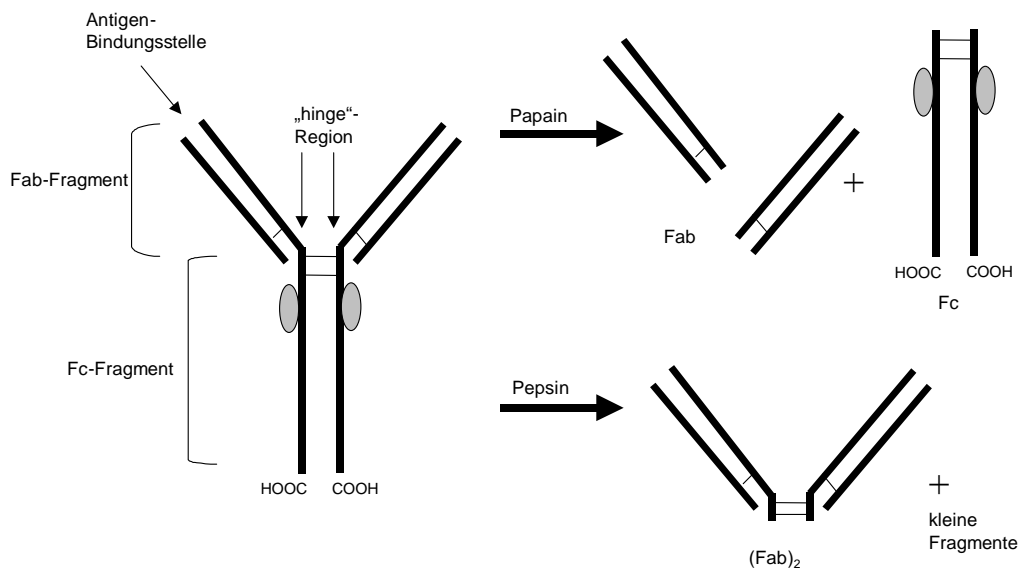


Abbildung 34: Enzymatische Spaltung eines IgG-Moleküls. Spaltung mit Papain führt zu zwei Fab-Fragmenten, Spaltung mit Pepsin zu einem $(\text{Fab})_2$ -Fragment.

Das Fc-Fragment eines Antikörpers ist für die Abtötung bzw. Beseitigung antikörpermarkierter Antigene entscheidend. Für die Beseitigung durch Phagozytose sind Leukozyten zuständig, die die konstante Region (Fc) des Antikörpermoleküls mit Hilfe von Fc-Rezeptoren erkennen.

Die Immunglobuline können in fünf Klassen eingeteilt werden: Immunglobulin M (IgM), G (IgG), A (IgA), D (IgD) und E (IgE) [Diamandis und Christopoulos, 1996]. Die Klassifizierung erfolgt nach der Anzahl Y-förmiger Einheiten und auf Basis struktureller Unterschiede in den schweren Ketten. Während es nur zwei Typen von leichten Ketten gibt (κ und λ), sind es bei den schweren deren fünf (γ , α , μ , δ und ϵ). Das oben beschriebene IgG Molekül besitzt beispielsweise zwei schwere Ketten vom γ -Typ und ein Molekulargewicht von ~ 150 kDa. IgA- und IgM-Moleküle sind dagegen aus zwei (IgA) bzw. fünf (IgM) Einheiten aufgebaut. Dabei sind die Einheiten durch Peptidketten und Disulfidbrücken

miteinander verbunden. Ein IgM-Molekül enthält im Unterschied zu IgG zehn statt nur zwei Antigenbindungsstellen (Abb. 35).

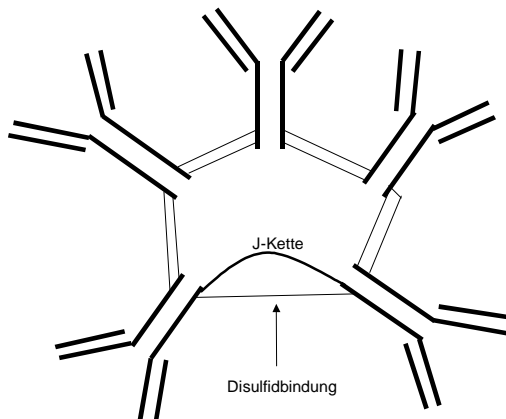


Abbildung 35: Schema eines IgM-Moleküls. Fünf IgM Monomere sind über Disulfidbrücken und eine Polypeptidkette (J-Kette) miteinander verknüpft. Das IgM-Molekül verfügt somit über zehn Antigenbindungsstellen.

Die verschiedenen Immunglobulinklassen nehmen unterschiedliche Aufgaben im Körper wahr: IgA ist beispielsweise der Hauptantikörper in äußeren Sekreten (Speichel, Tränenflüssigkeit) und bildet die erste Abwehr gegen bakterielle und virale Antigene, während IgG als vorherrschender Antikörper im Serum in zahlreiche Immunantworten durch Bindung des Antigens einerseits und Bindung an die Fc-Rezeptoren von Makrophagen andererseits eingebunden ist.

Antigen-Antikörper Wechselwirkung

Antigene sind Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Lipide oder Kombinationen aus diesen, die eine Immunantwort in dem entsprechenden Wirt hervorrufen können und von den gebildeten Antikörpern erkannt werden [Wu, 2000]. Die Eigenschaft, eine Immunantwort auslösen zu können, nennt man Immunogenität. Dabei sind kleine Moleküle meist nicht in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Sie werden erst durch Kupplung an ein Makromolekül immunogen.

Die Region eines Antigens, die von einem Antikörper erkannt wird, bezeichnet man als Epitop oder antigene Determinante. Da ein Epitop nur einen sehr kleinen Teil eines Antigens umfasst, ist es möglich, dass ein anderes Antigen über ein gleiches Epitop verfügt. Dies ist dann die molekulare Basis für Kreuzreaktionen.

Die Bindung des Antigens an den Antikörper erfolgt durch eine Kombination verschiedener, nichtkovalenter Wechselwirkungen. Im Einzelnen sind dies Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen (Coulomb-Wechselwirkungen), van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen. Die weitreichenden Kräfte wie ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken sind wichtig für die Bindungsrate des Antigen-Antikörper Kom-

plexes, die weniger weit reichenden sind wichtig für die Stärke der Bindung. Je stärker die Bindung des Antigens zum Antikörper ist, um so geringer ist die Dissoziationsrate. Typische Dissoziationskonstanten liegen bei Antigen-Antikörper-Komplexen bei 10^{-7} bis 10^{-9} M.

II.7. Polyphenoloxidasen

Polyphenoloxidasen sind Enzyme, die für die Qualität pflanzlicher Lebensmittel von Bedeutung sind, da sie die „enzymatische Bräunung“ unter anderem bei Äpfeln und Kartoffeln verursachen [Römpp-Lexikon, 1997]. Diese Enzyme, die mit Sauerstoff und zahlreichen Mono-, Di- und Polyphenolen reagieren, werden auch Tyrosinasen, Laccasen, Cresolasen, Catecholasen oder Phenolasen genannt. Tyrosinasen (E.C. 1.14.18.1, Monophenol-Monooxygenase) und Laccasen (E.C. 1.10.3.2, O₂-Oxidoreduktasen) gehören zur Familie der Typ-3-Kupferproteine, die eine Vielzahl biologischer Funktionen erfüllen. So dienen Hämocyanine als Sauerstofftransportproteine im Blut von Arthropoden und Mollusken, Tyrosinasen (Monophenolase-Aktivität) hydroxylieren Mono- zu *ortho*-Diphenolen und oxidieren diese weiter zu *ortho*-Chinonen [Salvato und Beltramini, 1990].

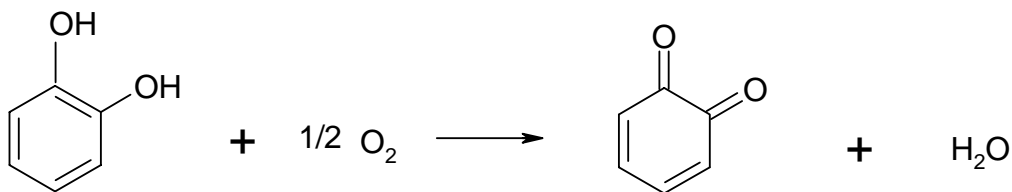


Abbildung 36: Bildung von *ortho*-Chinon aus Brenzkatechin.

Während die meisten Polyphenoloxidasen zwei Kupferionen als prosthetisches Zentrum besitzen, sind die Laccasen durch vier Kupferionen gekennzeichnet [Baiocco et al., 2003]. Gruppirt nach pflanzlicher und fungaler Herkunft sind Laccasen kupferhaltige Phenoloxidasen, die phenolische Substrate (Mono-, Di- und Polyphenole) [Buswell und Odier, 1987; Fakoussa und Hofrichter, 1999] über Ein-Elektronen-Reaktionen zu Phenoxyl-Radikalen oxidieren, während Sauerstoff zu Wasser reduziert wird (Abb. 37) [Solomon und Lowery, 1993].

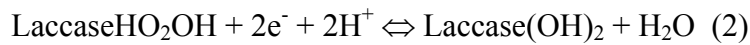
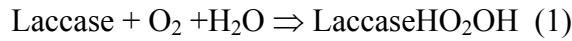


Abbildung 37: Enzymatische Katalyse der Laccase-Reaktion.

Weitere Reaktionen der Radikale können sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch erfolgen [Reinhammer und Malmström, 1981; Messerschmidt, 1997]. Laccasen stellen eine inhomogene Enzymgruppe glykosilierter Proteine mit einer hohen Variabilität der Molekulargewichte dar, die für biotechnologische Applikationen wie z.B. Ligninabbau eingesetzt werden. Bei Anwesenheit von Mediatorsubstanzen (z.B. ABTS, Syringaldazin) ist auch die Oxidation nicht-phenolischer aromatischer Komponenten möglich.

ABTS-Assay

Zur Überprüfung der Laccase-Aktivität verwendet man im Allgemeinen einen Farbttest auf Basis von Syringaldazin oder ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat]) [Childs und Bardsley, 1975].

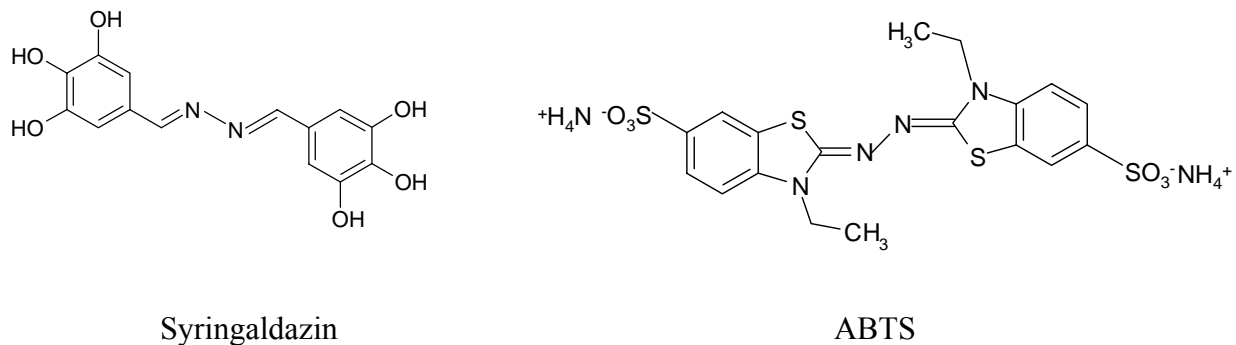


Abbildung 38: Strukturen von Substratmolekülen zur Überprüfung der Laccase-Aktivität.

Beide Substanzen bilden nach enzymatischer Aktivierung farbige Radikalkationen (Abb. 39) aus, die photometrisch vermessen werden können (ABTS: 420nm, Syringaldazin: 530nm).

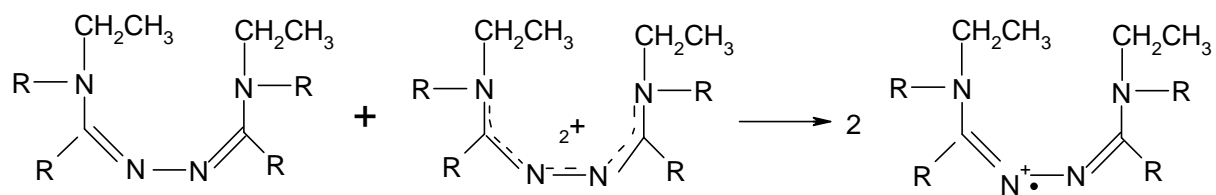


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Bildung von ABTS-Radikalen.

Charakterisierung der Modellanalyte

Für die Entwicklung eines neuen elektrochemisch-analytischen Detektionssystems sind einfach handhabbare Modellanalyte wie beispielsweise Polyphenole nötig. Polyphenole sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in vielen Obstarten zum Geschmack und der Farbe beitragen. Darüber hinaus spielen sie eine entscheidende Rolle als Antioxidantien, zur Vorsorge kardiovaskulärer Krankheiten und erlangen eine immer größere Bedeutung als antikarzinogene Substanzen [Arce et al., 1998]. Sie agieren als freie Radikalfänger, dienen zur Neutralisation sauerstoffreaktiver Verbindungen und bilden charakteristisch gefärbte Metallkomplexe. Man teilt sie hauptsächlich in Phenolsäuren und Flavonoide ein. In Früchten und Gemüse kommen Phenolsäuren vor allem in Form von Zimt- und Benzoesäurederivaten vor (z.B. Kaffeesäure aus Kaffee). Bei den Flavonoiden handelt es sich um eine Gruppe wasserlöslicher Pflanzenpigmente, die man in zahlreiche Untergruppen wie den Anthocyanen (z.B. Malvidin) oder Flavonolen (z.B. Quercetin) einteilt [Belitz und Grosch, 1992].

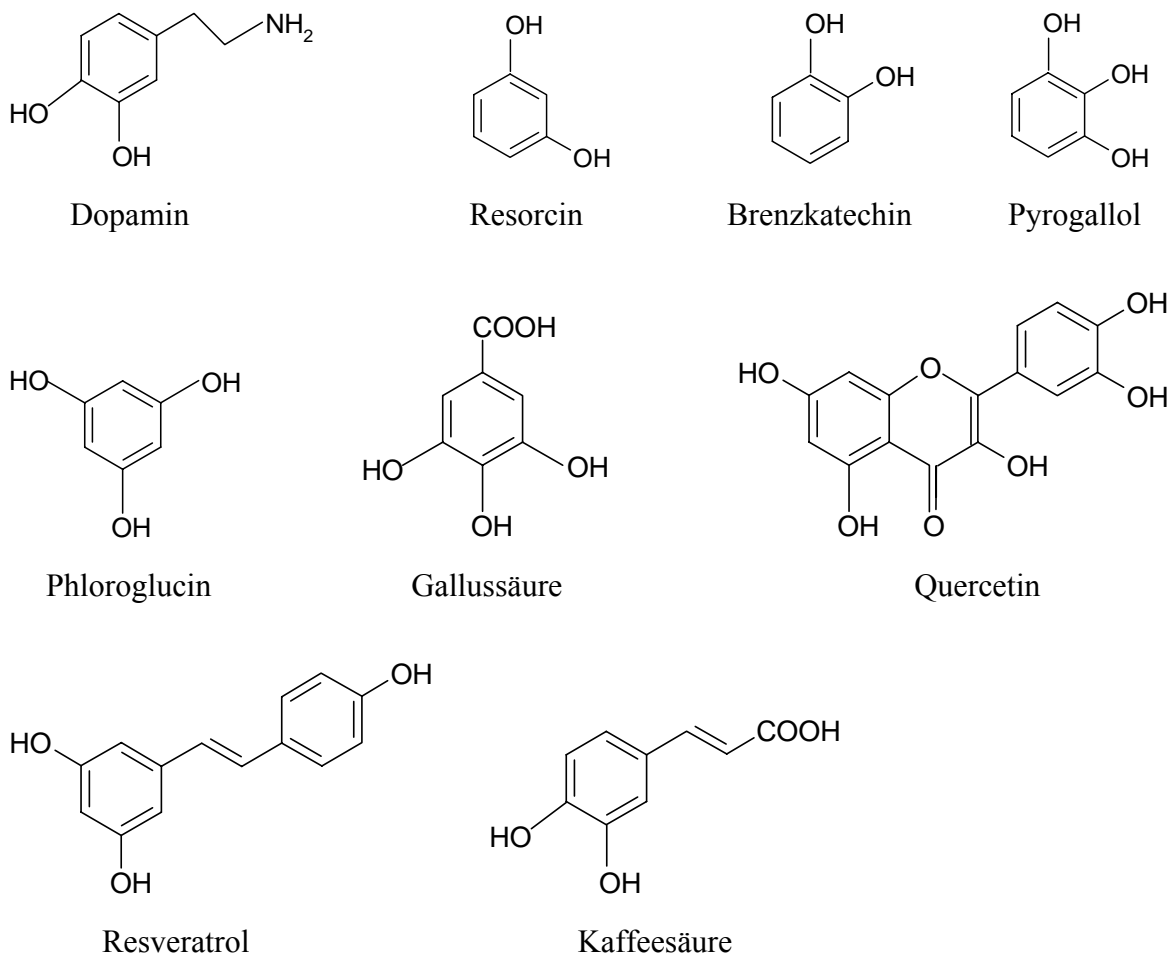


Abbildung 40: Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Polyphenole.

Darüber hinaus wurde mit Dopamin ein zur Gruppe der Katecholamine zählender Neurotransmitter verwendet. Wasserstoffperoxid wurde verwendet, um Wechselwirkungen zwischen den phenolischen Substanzen und deren Reaktionsprodukten mit dem elektrochemischen Detektor und der Kapillare auszuschließen.

III. Material und Methoden

III.1. Material

III.1.1. Chemikalien und Biochemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquelle sind in Tabelle 7a-b aufgeführt. Die verwendeten Biochemikalien entsprechend in Tabelle 8.

Chemikalie	Bezugsquelle
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 99% 3,4-Dihydroxycinnaminsäure, 99% Gallussäure, 98% 3-Hydroxytyraminhydrochlorid, 99% Phloroglucin, wasserfrei, 99% Quercetin, Dihydrat 99% Syringaldazin, 99%	Acros, Geel (Belgien)
2,2'-Azino-di-[3-ethylbenziazolin-6-sulfonat] (ABTS) 3-Aminopropyltriethoxysilan, purum Bernsteinsäureanhydrid, puriss. 1,4-Butandiol diglycidylether Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat, puriss. p.a. 3-Mercaptopropionsäure, 80% N-Hydroxysuccinimid (NHS), purum Natriumacetat, wasserfrei, puriss. p.a. Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, puriss. p.a. Natriumborhydrid, purum p.a. Natriumperodat, 99%	Fluka, Buchs (Schweiz)
2-Butanon Natriumcarbonat, wasserfrei, reinst	KMF, Bonn

Tabelle 7a: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton, SupraSolv Brenzkatechin, p.a. Citronensäure-Monohydrat, p.a. N,N'-Diisopropylcarbodiimid N,N-Dimethylformamid, SupraSolv Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, reinst 1,4-Dioxan Glutardialdehyd, 50% Kaliumpermanganat, p.a. Natriumchlorid, p.a. Salzsäure, 32%, p.a. Schwefelsäure, 95-97%, p.a. Toluol, SupraSolv Wasser, p.a. Wasserstoffperoxid, 30%, p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
Amino-Polyethylenglykol 3000Da Diamino-Polyethylenglykol 2000Da Dicarboxy-Polyethylenglykol 2000Da	Rapp-Polymere, Tübingen
Kaliumhydroxyd, puriss. Resorcin, puriss. p.a. Salpetersäure, 65%	Riedel-de Haen, Buchs (Schweiz)
Ethanol, ROTIPURAN, p.a.	Rot, Karlsruhe
N α ,N α -Bis(carboxymethyl)-L-lysin-trifluoracetat, ~95% MES Hydrat, 99% Bronidox L, \geq 99% Pyrogallol Resorcin, 99% Resveratrol, 99%	Sigma-Aldrich, Tauf- kirchen
Methanol, p.a.	SDS, Peypin (Frankreich)

Tabelle 7b: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Biochemikalie	Bezugsquelle
BSA (Albumin fraction V) <i>Legionella pneumophila</i> -spezifischer monoklonaler Antikörper, LP-F-003 <i>Legionella pneumophila</i> -Lysat	Merck KGaA, Darmstadt Strecker Diagnostica, Witten

Tabelle 8: Verwendete Biochemikalien und deren Bezugsquellen.

Verwendetes Wasser wurde mit den Milli-Q Reagent und Purelab plus Anlagen der Firma Millipore (Eschborn) entmineralisiert.

III.1.2. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Laccase aus <i>Agaricus bisporus</i> 6,3U/mg Laccase aus <i>Trametes versicolor</i> 26,8U/mg Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i> 216U/mg	Fluka, Buchs (Schweiz)

Tabelle 9: Verwendete Enzyme und deren Bezugsquellen.

III.1.3. Lösungen und Puffer

Es wurden die in Tabelle 9a-c aufgeführten Lösungen und Puffer verwendet.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
ABTS 3 mM	2,2'-Azino-di- [3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat] 0,019g	mit MES-Puffer (50 mM) auf 12 ml auffüllen
Bernsteinsäure- anhydrid 0,25 M	Bernsteinsäureanhydrid 1g	in 25 ml Natriumphosphatpuffer (0,05 M) lösen und mit NaOH auf pH 6,0 einstellen
Boratpuffer 0,2 M pH 10,0	Natriumtetraborat-Decahydrat 76,27g	in 1,0 l H ₂ O lösen, pH 10,0 mit Natronlauge einstellen, 0,2 µm filtrieren
Brenzkatechin 10 mM	Brenzkatechin 0,055g	in 50 ml Elektrophoresepuffer lösen, 0,2 µm filtrieren

Tabelle 9a: Verwendete Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
Carbonat-/Hydrogen-carbonatpuffer 0,1 M, pH 8,6	Natriumhydrogencarbonat 8,4 g	in 1,0 l H ₂ O lösen, pH 8,6 mit 0,1 M Natriumcarbonatlg. einstellen, 0,2 µm filtrieren
3,4-Dihydroxy-cinnaminsäure 50 mM	3,4-Dihydroxycinnaminsäure 0,225g	in 25 ml Elektrophoresepuffer lösen, 0,2 µm filtrieren
Dopamin 10 mM	Dopamin 0,0474g	in 25 ml Elektrophoresepuffer lösen, 0,2 µm filtrieren
Elektrophorese-puffer 10 mM, pH 7,3	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,534g 0,468g	in jeweils 300 ml H ₂ O lösen, mit Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat auf pH 7,3 einstellen, 0,2 µm filtrieren und entgasen
Elektrophorese-puffer 15 mM, pH 7,3	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,8g 0,7g	in jeweils 300 ml H ₂ O lösen, mit Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat auf pH 7,3 einstellen, 0,2 µm filtrieren und entgasen
Gallussäure 50 mM	Gallussäure 0,212g	in 25ml Elektrophoresepuffer lösen, vortexen, 0,2 µm filtrieren
Königswasser	Salzsäure, 32% Salpetersäure, 65% (V:V Salzsäure:Salpetersäure 3:1)	6ml 2ml Säuren vorsichtig unter dem Abzug mischen
Mercaptopropion-säure, 0,1 %	3-Mercaptopropionsäure 20µl	in 20 ml Ethanol lösen, vortexen
Natriumphosphat-puffer 0,2 M, pH 5,5	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,89g 0,78g	in jeweils 25 ml H ₂ O lösen, mit Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat auf pH 5,5 einstellen, 0,2 µm filtrieren
Natriumphosphat-puffer 0,05 M, pH 6,0	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,225g 0,195g	in jeweils 25 ml H ₂ O lösen, mit Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat auf pH 6,0 einstellen, 0,2 µm filtrieren

Tabelle 9b: Verwendete Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herstellung
Glutardialdehyd 10%	Glutardialdehyd 50% 2ml	in 8ml PBS-Puffer (pH 7,3) lösen
MES-Puffer 50 mM, pH 5,5	MES Hydrat 0,488g	in 50 ml H ₂ O lösen, pH 5,5 mit Natronlauge einstellen, 0,2 µm filtrieren
PBS-Puffer pH 7,3	Natriumchlorid 7,0g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 4,27g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 0,94g Bronidox L 0,5g	in 1,0 l H ₂ O lösen, pH 7,3 mit Natronlauge einstellen, 0,2 µm filtrieren
Phloroglucin 5 mM	Phloroglucin 5mM 0,0315g	in 50 ml Elektrophoresepuffer lösen, vortexen, 0,2 µm filtrieren
Pyrogallol 15 mM	Pyrogallol 0,0472g	in 25 ml Elektrophoresepuffer lösen, vortexen, 0,2 µm filtrieren
Quercetin 50 mM	Quercetin 0,423g	in 25 ml Elektrophoresepuffer lösen, vortexen
Resorcin 100 mM	Resorcin 0,55g	in 50 ml Elektrophoresepuffer lösen, 0,2 µm filtrieren
Resveratrol 100 mM	Resveratrol 0,57g	in 25 ml Elektrophoresepuffer lösen, vortexen
Substratpuffer 0,1 M, pH 5,5	Natriumacetat 0,82g	in 100 ml H ₂ O lösen, pH 5,5 mit 0,1M Citronensäurelösung 0,2 µm filtrieren

Tabelle 9c: Verwendete Lösungen und Puffer.

Die Kalibrierung des pH-Meters erfolgte bei pH 4,01, 7,00 und 10,00 mit Kalibrierungspuffern der Firma Merck (Darmstadt).

III.1.4. Geräte und Materialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Gerät/Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Adhäsivkleber	Upchurch Scientific, Oak Harbor (USA)
Chiphalterung HSS	Hofmann-Sensor-Systeme, Wallenfels
Chiphalterung GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig
Einmalküvetten für die SPR	Jandratek, Wallenfels
Glasradierstift 30103	Faber-Castell, Stein
goldbeschichtete Prismen für die SPR	Jandratek, Wallenfels
Hochspannungsnetzgerät Eigenbau	Elektronische Entwicklungsabteilung der Pharmazeutischen Chemie, Uni Marburg
Hochspannungsnetzgerät III/SPS	VIAelectronic, Hermsdorf
Hochspannungsnetzgerät MCN 35-2000	F.u.G Elektronik GmbH, Rosenheim
HPLC-Pumpe Waters 510	Millipore, Milford (USA)
Injektionsschlauch PEEK 0,005" x 1/32"	Upchurch Scientific, Oak Harbor (USA)
Injektionsschlauch PEEK 0,03" x 1/16"	Upchurch Scientific, Oak Harbor (USA)
LTCC-Keramikchips	VIAelectronic, Hermsdorf
Mikroküvette Quarz SUPRASIL, 20µl	Hellma GmbH, Mühlheim
Mikroskop Bresser Researcher ICD	Meade Instruments Europe GmbH, Borken
Multimeter 176DMM	Keithley Instruments Inc, Cleveland (USA)
NanoPorts 6/32coned	Upchurch Scientific, Oak Harbor (USA)
pH-Meter CG 701	Schott, Mainz
Potentiostat PalmSens	Palm Instruments BV, BZ Houten (Niederlande)
Pumpschlauch 2-Stopp Tygon2075	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Röhrchen aus PP, 14ml mit Schraubver- schluss	Greiner, Nürtingen
Schlauchpumpe MC-MS CA418	Ismatec, Wertheim-Mondfeld
Schüttler Titramax 101	Heidolph, Schwabach
Spektrometer, Uvikon 810	Kontron, Trappes (Frankreich)
SPR-Gerät Plasmonic	Jandratek, Wallenfels
Sterilfilter, 0,2µm und 0,45µm	Schleicher und Schuell, Dassel
Trockenschrank T6030	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Bransonic 12 Typ B16	PCE-Group oHG, Meschede
Vakuumpumpe	KNF Neuberger Laboport, Freiburg
Variomag Electronicrührer Poly 15	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vortexer Vibrofix VF1 Electronic	Janke + Kunkel, Staufen
Waage H11W	Mettler, Giessen

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Materialien.

III.2. Amperometrische Messungen mit LTCC-Keramikchips

III.2.1. LTCC-Keramikchip

Die in dieser Arbeit verwendeten LTCC-Keramikchips wurden von der Firma VIAelectronic, Hermsdorf, hergestellt (Abbildung 41).

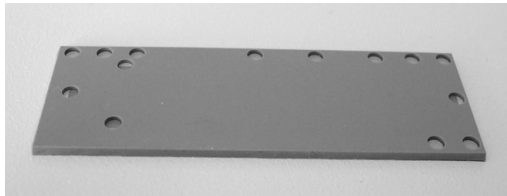


Abbildung 41: Foto des verwendeten LTCC-Keramik-Chips (aus DuPont™ 951-Folien) der Firma VIAelectronic, Hermsdorf.

Für die Herstellung der ungesinterten Keramik (grüne Folien, green sheets), gibt es mehrere Hersteller, deren Produkte sich in Zusammensetzung, Herstellung und somit Materialeigenschaften unterscheiden. Der für uns von der Fa. VIAelectronic hergestellte, dreiteilige Multilayer-Chip besteht aus DuPont™ 951-Folien (Wilmington, USA). Auf den ersten Layer werden Elektrodenkontakte im Siebdruckverfahren aufgebracht. Ein zweiter Layer mit ausgestanzten Kapillaren wird plan auf den ersten gelegt. Öffnungen für Reservoirs und Elektrodenkontakte werden aus einer dritten Folie gestanzt, plan aufgelegt und mit den anderen fixiert (Abb. 42). Anschließend erfolgt das Sintern bei 850 °C.

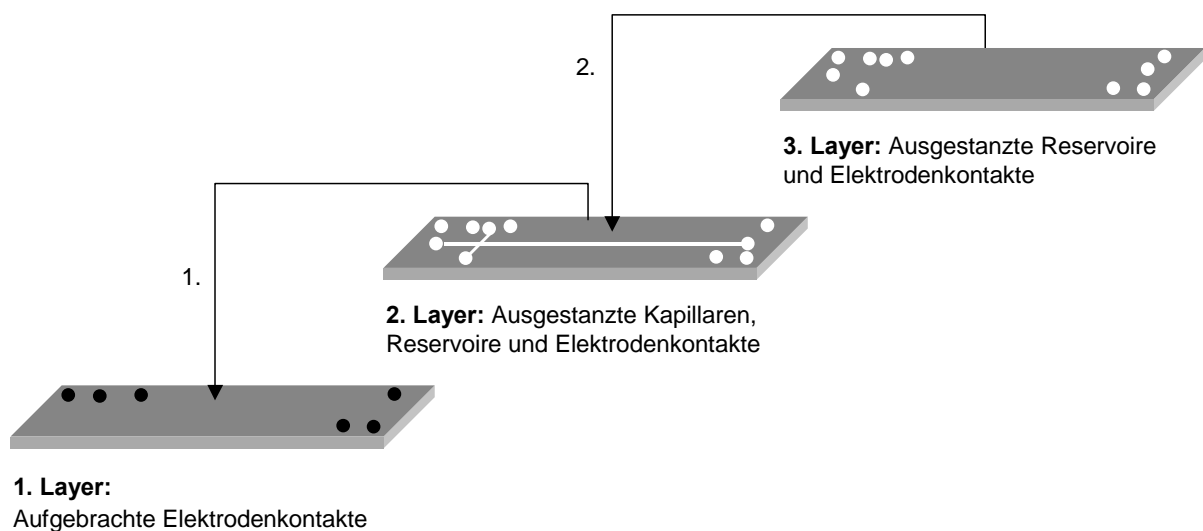


Abbildung 42: Schematische Querschnittszeichnung der für diese Arbeit hergestellten LTCC-Keramikchips.

III.2.2. Eigenschaften und Kenngrößen der verwendeten LTCC-Keramik-Chips

Wesentliche physikalische Materialeigenschaften sind in Tabelle 11 aufgelistet:

Materialeigenschaften von DuPont 951™-Folien	
Dielektrizitätskonstante bei 1 MHz	7,8
Schrumpfungsfaktor (X-, Y-Achse)	12,7% ± 0,3%
Schrumpfungsfaktor (Z-Achse)	15,0% ± 0,5%
Dichte	3,1g/cm ²
Oberflächenrauheit	<0,245 μm
Wärmeleitfähigkeit	3,0W/mK

Tabelle 11: Auflistung grundlegender physikalischer Materialeigenschaften von DuPont 951™ Folien.

Bei allen Keramikchips wurden die Grundabmessungen beibehalten (siehe Abbildungen 43a-c).

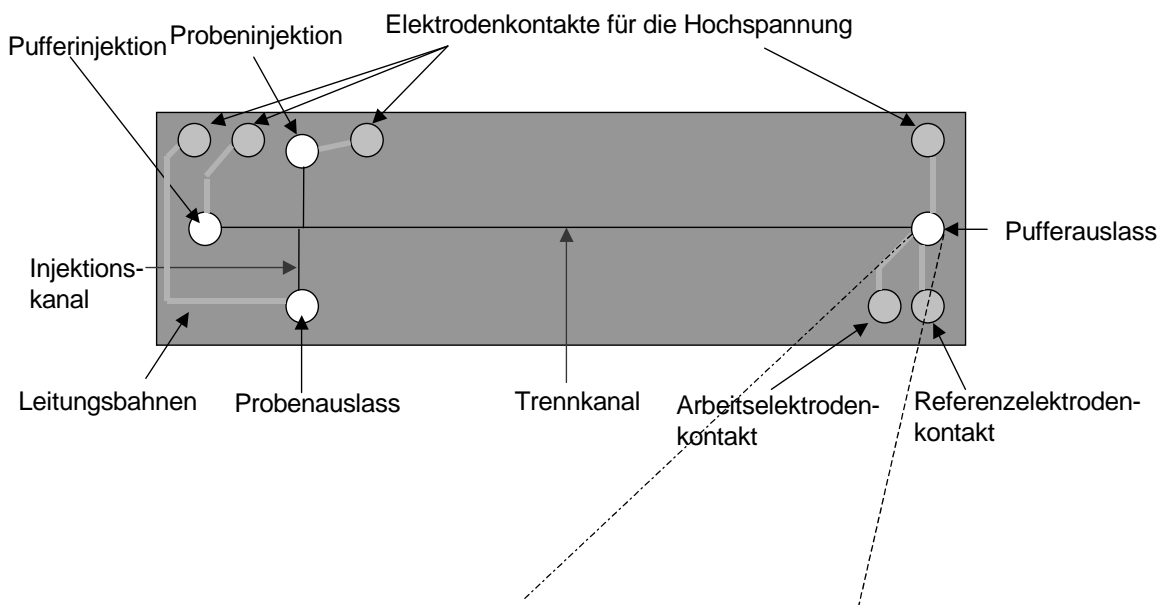


Abbildung 43a: Schematische Aufsicht auf einen Keramikchip. Der Injektionskanal ist keine durchgehende Kapillare, sondern beinhaltet auf Höhe des Trennkanals eine Versatzbreite von 210 μm (+/- 2 μm).

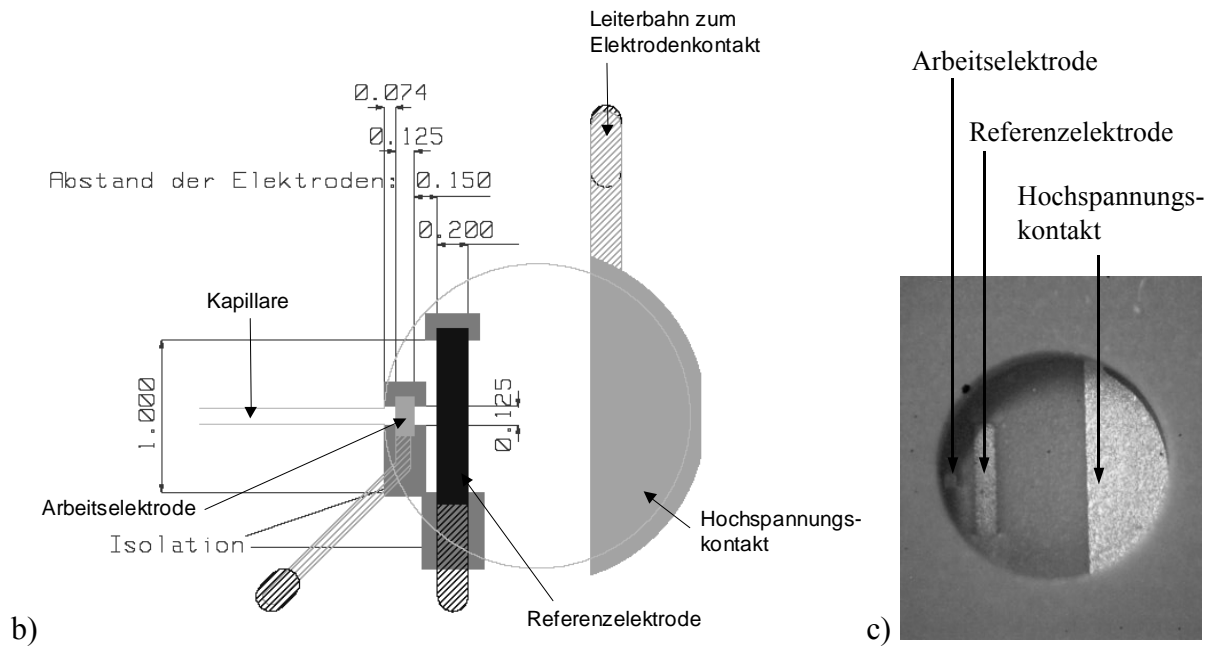


Abbildung 43b+c: Abb. b stellt eine Vergrößerung des Pufferauslasses mit den verwendeten Elektroden dar (Größenangaben in mm). (Quelle: VIAelectronic, Hermsdorf). Abb. c zeigt eine 40fache Vergrößerung der Elektrodenkontaktierung.

Amperometrische Messungen wurden mit den folgenden Chiptypen durchgeführt:

Typ A:

Für die unmittelbar mit der Elektrolytlösung in Kontakt stehenden internen Hochspannungskontakte und die Arbeits-elektrode wurde Gold verwendet. Die Referenzelektrode bestand aus Silber. Alle äußeren Elektrodenkontakte (Abb. 44a-b) und die Leitungsbahnen wurden aus einer Palladium-Silber-Legierung hergestellt.

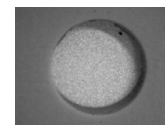


Abbildung 44a

Typ B:

Kontaktiert wie Typ A, jedoch wurden die äußeren Kontakte zusätzlich mit einer Schicht Löt-zinn beschichtet.

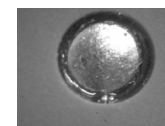


Abbildung 44b

Typ C:

Die Hochspannungskontakte, die äußeren Elektrodenkontakte und die Leitungsbahnen bestanden aus einer Gold-Platin-Legierung.

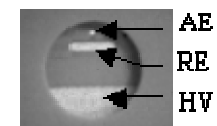


Abbildung 44c

Abbildungen 44a-c: Hochspannungskontakte der LTCC-Keramikchips. a: Äußerer Hochspannungskontakt aus einer Palladium-Silber-Legierung, b: Mit Löt-zinn beschichteter äußerer Hochspannungskontakt aus einer Palladium-Silber-Legierung, c: Innerer Hochspannungskontakt aus einer Gold-Platin-Legierung (AE: Arbeits-elektrode, RE: Referenzelektrode, HV: Hochspannungskontakt).

Die grundlegenden Abmessungen bleiben bei allen Chiptypen gleich (Tab. 12).

Chippparameter		
Kapillarlänge	46,3mm	
Detektorfläche der Arbeitselektrode	0,015mm ²	
Detektorfläche der Referenzelektrode	0,2mm ²	
Kapillarquerschnitt (je nach Charge)	80µm x 80µm; 80µm x 90µm	
Probenvolumen der Kapillare	80µm x 80µm	1,344nl (+/- 0,013nl)
	80µm x 90µm	1,512nl (+/- 0,014nl)
Gesamtoberfläche der Trennkapillare	3,0986mm ²	
Gesamtvolumen der Trennkapillare	296,32nl	
Verhältnis Oberfläche/Volumen	10,5 µm ⁻¹	
Kapillarwiderstand	35-50 MΩ	
Versatzbreite	210µm (+/- 2µm)	

Tabelle 12: Auflistung der LTCC-Chippparameter.

III.3. Systemaufbau

Für die Durchführung amperometrischer Messungen wurden die folgenden in Abb. 45 dargestellten Geräte verwendet.

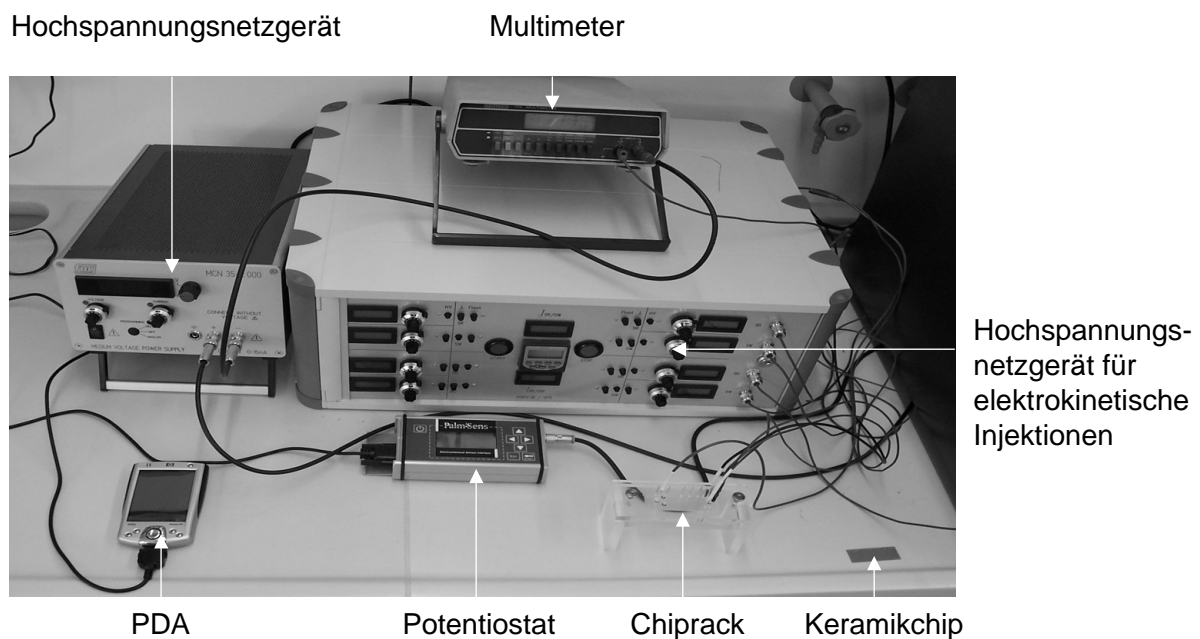
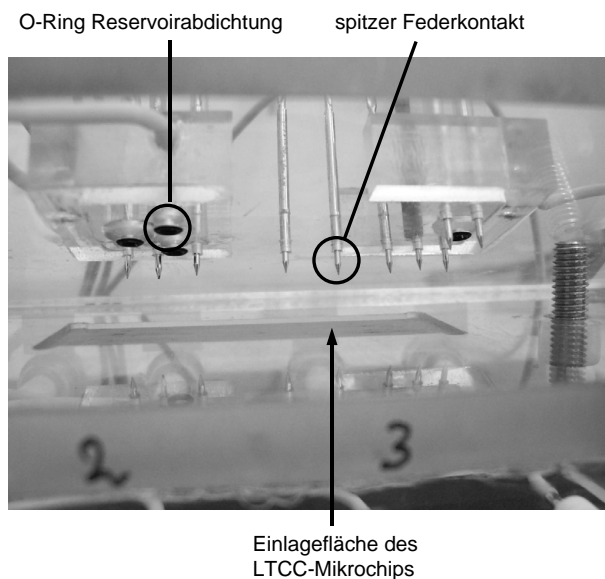


Abbildung 45: Übersicht der für eine amperometrische Messung verwendeten Geräte. Der Faradaysche Käfig ist nicht dargestellt.



Das selbstkonstruierte Hochspannungsnetzgerät besitzt eine maximale Ausgangsspannung von 1100 V und einen integrierten DC/DC-Wandler. Für die Programmierung der elektrokinetischen Injektion wurde ein SPS-Steuerrelais von Siemens (Siemens LOGO! 12/24RC, München) verwendet.

Abbildung 46: Eigenbau des Hochspannungsnetzgerätes.



Wichtig für die amperometrischen Detektion ist eine geeignete Chiphalterung zur Fixierung und Messung des Chips (Abb. 47).

Die äußeren Elektrodenkontakte wurden über Federkontakte aus Gold, die im Deckel der Halterung befestigt waren, abgegriffen.

Abbildung 47: Chiphalterung mit spitzen Federkontakten der Hofmann-Sensor-Systeme, Wallenfels.

Es wurden zwei, vom Grundaufbau identische Chiphalterungen verwendet. Diese unterschieden sich hinsichtlich der Reservoirgröße und der eingebauten Federkontakte. Die mit halbkugelförmigen Elektrodenkontakten ausgestattete Chiphalterung der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (Technische Entwicklungsabteilung der GBF, Braunschweig) wurde nur für die Trennkanalinjektion verwendet. Die Halterung von HSS (Hofmann-Sensor-Systeme, Wallenfels) mit spitzen Elektrodenkontakten ist darüber hinaus für alle elektrokinetischen Messungen eingesetzt worden. Bei beiden Chiphalterungen wurden die Reservoirs mit O-Ringen (Durchmesser: 2 mm) zum Chip hin abgedichtet.

Die Kabel für Arbeits- und Referenzelektrode wurden an das Sensorkabel des Potentiostaten (Palm Instruments BV, BZ Houten, Niederlande) angeschlossen. Eine mögliche Gegenelektrode wurde mit der Referenzelektrode zusammengeschaltet.

Die Messung und Einstellung der Messparameter erfolgte über eine PDA-Software (PalmTime „Version 1.4.3“, BZ Houten, Niederlande). Die Hochspannungskontakte wurden bei elektrokinetischer Beladungstechnik mit einem geeigneten HSPG-Gerät (Fa. VIAelectronic, Hermsdorf oder Eigenbau) verbunden. Mit diesem Gerät konnte jeder Hochspannungskontakt einzeln gesteuert werden. Für Messungen ohne elektrokinetische Injektion wurde ein Mittelspannungsnetzteil (Modell: MCN 35-2000) der Fa. fug-Elektronik, Rosenheim, benutzt.

Das Multimeter wurde bei der Verwendung des fug-Elektronik Netzgerätes als Gleichstromkontrolle eingesetzt. Bei dem HSPG-Gerät der Fa. VIAelectronic waren solche Amperemeter integriert.

III.4. Befüllungstechniken von LTCC-Keramikkapillaren

Ein grundlegendes Problem bei mikrofluidischen Anwendungen ist die blasenfreie Befüllung der Kapillare mit einer Elektrolytlösung. Mit Hilfe von NanoPorts™, der Fa. Upchurch Scientific, Oak Harbor, USA, konstruierten Komponenten für „Lab-on-a-chip“-Applikationen ist eine blasenfreie Injektion von Pufferlösung möglich.

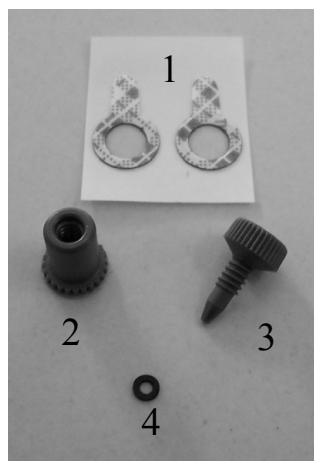


Abbildung 48: In den NanoPort™ (2) wird ein konischer Anschlussstutzen (3) gedreht, der beispielsweise einen HPLC-Schlauch fixiert und abdichtet. Die O-Dichtung (4) und die Adhäsivringe (1) dichten den Port zum benutzten Material nach unten hin ab.

Alle NanoPort™ Komponenten sind aus inertem Polyetheretherketon (PEEK™) hergestellt.

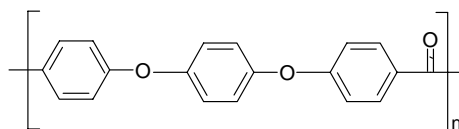


Abbildung 49: Chemische Struktur von PEEK™.

Für die Fixierung des Ports auf dem Chip gab es zwei Möglichkeiten:

1. Fixierung mittels Adhäsivkleber (Upchurch Scientific, Oak Harbor, USA)
2. Fixierung mittels Chipklammer

Zu 1.:

Auf die Unterseite des Ports wurde ein Adhäsivring (Abb. 48; 1) fixiert und zentral über die Kapillaröffnung des Chips positioniert. Eine Klammer diente zur Erhöhung des Anpressdrucks. Die Aushärtung erfolgte für 90 min bei 125 °C in einem Trockenschrank. Die Methode wurde insbesondere bei Silanisierungsprozessen verwendet. Der Port war danach nur noch durch eine mindestens einstündige Inkubation mit 2-Butanon entfernbar.

Eine weitere Möglichkeit war die Anbringung des Ports durch einen 2-Komponentenkleber. Auch hier diente eine Klammer zur Erhöhung des Anpressdrucks. Der Kleber wurde entweder für 24 h bei Raumtemperatur oder 1 h bei 50 °C ausgehärtet. Flüssigkeitsdruck und die geringe Chemikalienbeständigkeit führten zur Ablösung des Ports vom Chip. Deshalb wurden weitere Versuche mit dieser Methode nicht durchgeführt.

Zu 2.:

Für einfache und schnelle Kapillarbefüllungen war es ausreichend, den Port nur mit einem Dichtungsring zu versehen und mittels einer Klammer zu fixieren (Abb. 50). Die Dichtung musste dabei exakt über der Kapillaröffnung positioniert werden, um einen Verschluss der Kapillare bzw. seitlichen Flüssigkeitsverlust zu vermeiden.

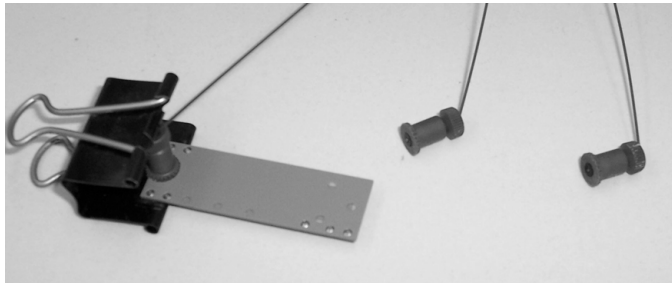


Abbildung 50: Fixierung eines NanoPorts™ auf einem LTCC-Keramikchip mittels Chipklammer.

Für die Befüllung wurden Kapillar-PEEK™-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 150 µm der Fa. upchurch, Oak Harbor, USA, verwendet. Ein Ende dieser ca. 15 cm langen Schläuche wurde mind. 1 cm in einen Pumpschlauch (Tygon®MH2075, Fa. Ismatec) geschoben und durch Verdrehen mit einem Stück Kupferdraht abgedichtet. Das andere Ende wurde durch den Anschlussstutzen geschoben und im NanoPort™ fingerfest verschraubt. Der NanoPort™ wurde über den Pufferauslass positioniert, da so ein gleichmäßiger Flüssigkeitsstrom durch Trenn- und Injektionskanal (Abb. 43a) gewährleistet werden konnte. Über eine Schlauchpumpe erfolgte dann die Kapillarbefüllung.

III.5. Konditionierung der Kapillaren

Eine negativ geladene Kapillaroberfläche ist nötig, um Proben auf Grund elektrophoretischer Prozesse zur Kathode zu transportieren und zu detektieren. Die getesteten LTCC-Keramikchips konnten nach einem Waschschrift mit Millipore[®]-Wasser für 15 min direkt zur Kapillarelektrophorese eingesetzt werden. Zur Stabilisierung der Basislinie und des Messsignals war es nötig, die Kapillaren mit Kaliumhydroxid zu konditionieren. Dazu wurden die Kapillaren für 15 min über das Schlauchpumpensystem (0,4 ml/min) in 0,1 M KOH inkubiert. Anschließend erfolgte das Spülen der Kapillaren mit Millipore[®]-Wasser für 15 min über das Schlauchpumpensystem (0,4 ml/min).

III.6. Durchführung amperometrischer Messungen

Jeder Keramikchip wurde zuerst für 10 min mit mehrfach filtriertem, entgastem Millipore[®]-Wasser bei einer Pumpleistung von 0,2-0,3 ml/min gespült. Bei gleicher Pumpleistung erfolgte anschließend die Befüllung mit einem Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Elektrolytpuffer für 10 min.

Der Port wurde entfernt und der Chip in der Aussparung des Chiphalters so positioniert, dass die äußeren Elektrodenkontakte exakt unter den Federkontakten lagen. Zudem musste auf eine exakte Stellung der Reservoirdichtungen über den Kapillaröffnungen geachtet werden. Nach Ausrichtung des Chips wurde der Deckel der Halterung mit dem Unterbau über zwei Rändelschrauben verschraubt. Die Chiphalterung befand sich zur Abschirmung elektromagnetischer Strahlung in einem Faradayschen Käfig.

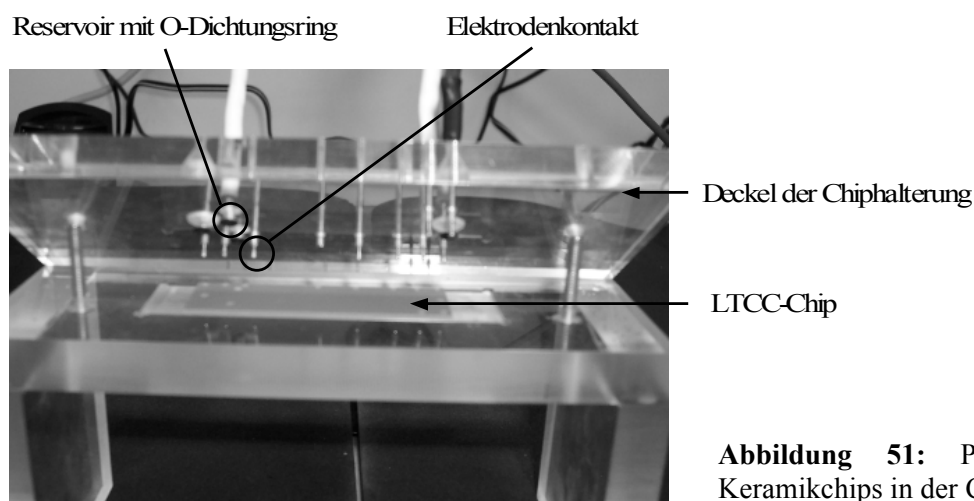


Abbildung 51: Positionierung des Keramikchips in der Chiphalterung.

Für die Probeninjektion wurden Flüssigkeitsreservoirs, die sich im Deckel der Chiphalterung befanden, ebenfalls mit Elektrolytlösung befüllt. Zur Verhinderung eines hydrostatischen Flüssigkeitsstroms wurden die Reservoirs der verwendeten Chiphalterungen ebenfalls mit der sich in der Kapillare befindlichen Elektrolytlösung blasenfrei befüllt, um ein gleichmäßiges Flüssigkeitsniveau zu erhalten.

Mit Hilfe der Messsoftware erfolgte dann die Konfiguration der Messparameter. Je nach Testsubstanz wurde, sowohl bei der Trennkanalinjektion als auch bei der elektrokinetischen Beladung, ein Arbeitspotential von 0,45-0,8 V verwendet.

III.6.1. Trennkanalinjektion

Die Probenzugabe erfolgte bei dieser Messmethode in das Reservoir der Pufferinjektion. Der Analyt wurde erst nach Messstart und Einstellung der Stromkennlinie auf einen niedrigen Basisliniendrift hinzupipettiert. Die angelegte Trennspannung betrug zwischen 200 V und 400 V. Es wurden die bereits erläuterten Chiphalterungen verwendet (Kapitel III.3.). Bei Verwendung der Chiphalterung von HSS sind von 80 µl vorgelegtem Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Elektrolytpuffer 70 µl (bei der Chiphalterung der GBF 45 µl von vorgelegten 50 µl) entnommen worden. Die gleiche Menge der Probenlösung wurde anschließend blasenfrei unter zwei- bis dreimaligem auf- und abpipettieren hinzugegeben. Es war darauf zu achten, dass keine Luftblasen ins System gelangten und keine Kontakte mit der Pipettenspitze berührt wurden. Dies führte zu unerwünschten Spikes und Drifts der Basislinie. Das Multimeter, als Kontrollmessgerät der angelegten Hochspannung, wird auf eine Skalierung im µA-Bereich eingestellt. Der dabei gemessene Strom sollte während der Messung nahezu konstant sein. Kommt es zu größeren Stromschwankungen, ist die Ursache meist eine unvollständige Befüllung der Kapillare mit Puffer oder Gasbildung auf den Hochspannungskontakten oder in der Kapillare. Nach Messende und Abschaltung des Hochspannungsnetzgerätes wurden die Reservoirs vor dem Ausbau des Chips entleert. Die großen Reservoirs wurden anschließend zweimal mit je 100 µl und die kleinen zweimal mit je 40 µl Millipore[®]-Wasser gespült.

III.6.2. Elektrokinetische Beladung

Die elektrokinetische Beladung wurde mit den HSPG-Geräten (Kapitel III.3.) und der HSS-Chiphalterung (Hofmann-Sensorsysteme, Wallenfels) durchgeführt. Dabei sind zwei Methoden getestet worden (Kapitel II.2.3.). Bei der Verwendung des Eigenbaus war durch vorgegebene Programmierung von Spannung und Timer keine weitere Einstellung mehr nötig. Nach Einstellung der Hochspannungsschaltung von Injektion und Trennung des HSPG-Geräts von VIAelectronic sowie der Programmierung des Timers konnte die Messung gestartet werden. Dabei war auf folgenden zeitlichen Ablauf zu achten: Nach Befüllung des Chips mit dem Elektrolyten erfolgte die Aufnahme der Stromkennlinie ohne angelegte Spannung. Dies diente zur Kontrolle des eingestellten Arbeitspotentials und möglicher Stromschwankungen. Ursache konnte ein nicht genau positionierten Chips in der Chiphalterung sein. Verließ diese Kontrolle positiv, konnte durch Befüllung des Probeneinlasses (Austausch von 28 µl Puffer gegen die gleiche Probenmenge) die Injektion durch Zuschaltung des Hochspannungsnetzgerätes gestartet werden. Die Umschaltung von Injektions- auf Trennmodus erfolgte automatisch über einen integrierten Timer nach 30 s. Sowohl Injektions- als auch Trennschaltung betragen 400V. Nach der Umschaltung auf den Trennmodus wurden die Injektionskontakte, unter Berücksichtigung des Injektionsverfahrens, auf 320 V oder auf hochohmig geschaltet. Nach Messende und Abschaltung des Hochspannungsnetzgerätes wurden die Reservoirs vor dem Ausbau des Chips entleert. Die großen Reservoirs wurden anschließend zweimal mit je 100 µl und die kleinen zweimal mit je 40 µl Millipore®-Wasser gespült.

III.6.3. Sensorenüberprüfung

Zur Testung der Sensorenfunktion ist der Keramikchip, wie bereits beschrieben, mit einem Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Elektrolytpuffer befüllt und in die Chiphalterung eingebaut worden. Die zu testenden Analyte wurden entweder ohne oder mit angelegter Trennschaltung (400 V) nach Einstellung einer stabilen Basiskennlinie in das Reservoir des Pufferauslasses pipettiert. Von den 80 µl (50 µl bei der Chiphalterung der GBF) vorgelegter Elektrolytlösung wurden 70 µl (45 µl bei der Chiphalterung der GBF) entnommen und die gleich Menge des Analyten vorsichtig und blasenfrei, unter zwei- bis dreimaligem auf- und abpipettieren, ohne Berührung der Elektrodenkontakte hinzugegeben. Nach 400 s wurde die Messung gestoppt und die Reservoirs vor dem Ausbau des Chips entleert. Anschließend wurden die großen Reservoirs zweimal mit je 100 µl und die kleinen zweimal mit je 40 µl Millipore®-Wasser gespült.

III.6.4. Herstellung einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode

Für die Generierung einer Silber/Silberchlorid-Elektrode wurde die aus Silber bestehende Referenzelektrode mit 32 %iger HCl inkubiert. Dazu tropfte man 50 µl Salzsäure in den Pufferauslass des Chips und ließ diesen für ca. 15 min bei Raumtemperatur (RT) einwirken.

Eine weitere Möglichkeit bestand in der Schaltung der Referenzelektrode als Kathode und des Hochspannungskontakts im Pufferauslass als Anode. Ein Strom von bis zu 5 Ampere wurde dann für 3-5 s angelegt. Bei beiden Methoden wurde der Chip anschließend für 20 min mit Millipore®-Wasser gespült (Schlauchpumpe: 0,2-0,3 ml/min).

III.6.5. Reinigung der Elektrodenkontakte

Zur Reinigung der Goldkontakte wurden 30 µl eines Gemischs aus 32 %iger HCl und 65 %iger HNO₃ (V:V 3:1) auf die entsprechende Kapillaröffnung pipettiert und sofort mit Millipore®-Wasser wieder abgewaschen. Anschließend wurde der Chip 20 min lang mit Millipore®-Wasser gespült (Schlauchpumpe: 0,2-0,3 ml/min).

III.6.6. Silanisierung von LTCC-Keramiken

Wie bereits erwähnt, gibt es zwei Möglichkeiten, NanoPorts™ auf einem Keramikchip zu fixieren. Bei der Silanisierung von Mikrokapillaren war jedoch die Anbringung mittels Adhäsiv-Ringkleber wegen der besseren Chemikalienbeständigkeit zu bevorzugen. Silanisierungsprotokolle von Hartmann (2004) und Pehler (2000) wurden in abgewandelter Form auf die LTCC-Keramik übertragen.

Nach Fixierung des Ports über einen Adhäsiv-Ringkleber und Anschluss an das Schlauchpumpensystem (SPS) wurden die Kapillaren bei RT 5 min mit Aceton gespült (0,2-0,3 ml/min). Es folgte eine Inkubation der Chipkapillaren mit einer 1 M KOH-Lösung für 12-16 h bei RT über SPS (0,2-0,3 ml/min). Anschließend wurden die Kapillaren mit Millipore®-Wasser 15 min lang (0,4 ml/min) und mit Methanol und Toluol jeweils 5 min (0,2-0,3 ml/min) lang durchspült. Beim Waschen von Methanol und Toluol wurde ein Tygon®MH2075-Schlauch (Ismatec) verwendet, da andere Pumpschläuche Weichmacher enthielten, die durch die verwendeten Chemikalien herausgewaschen werden konnten. Für jeden einzelnen Inkubationsansatz mit den Chemikalien wurde ein eigener Pump- und PEEK™-Schlauch verwendet.

Der verwendete Tygon[®]-Schlauch war, obwohl er keine Weichmacher beinhaltete, nur bedingt für Toluol geeignet. Da es bereits nach etwa 20 min zu einem sichtbaren Quellen und Einreißen des Pumpschlauchs kam, die Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) (Abb. 52) jedoch mehrere Stunden dauerte, wurde ein Beschichtungsverfahren mit einer HPLC-Pumpe entwickelt.

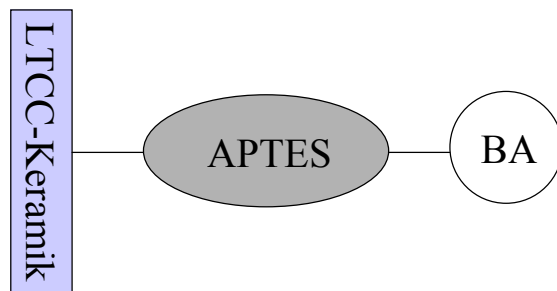


Abbildung 52: Schema des Schichtaufbaus einer silanisierten LTCC-Keramikoberfläche.

Eine leere HPLC-Säule (0,8 cm x 25 cm) wurde an einem Ende mit PEEK[™]-Schläuchen so präpariert, dass über sie ein Flüssigkeitsstrom durch die Chipkapillare möglich war. Während eine Öffnung der HPLC-Säule mit Parafilm abgedichtet wurde, konnte die andere Seite mit einer APTES-Lösung (1 Gewichtsprozent, 175,5 mg APTES in 20 ml Toluol) befüllt, mit einem Dichtungspfropf versehen und an die HPLC-Pumpe angeschlossen werden. Das in der HPLC befindliche Methanol/Wassergemisch im Verhältnis 1:1 drückte nun über den Pfropf das Silanisierungsreagenz über die PEEK[™]-Schläuche durch die Kapillare des Keramik-Chips. Der Chip wurde in einem Becherglas so positioniert, dass die drei offenen Kapillaröffnungen ebenfalls vollständig mit Silanisierungsreagenz bedeckt waren. Die Pumpleistung betrug 0,1 ml/min. Nach 10 min wurde der Chip 2 h stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt.

Nach der Silanisierung wurde der Chip 5 min mit Toluol und Methanol (je 0,2-0,3 ml/min) und 15 min lang mit Millipore[®]-Wasser (0,4 ml/min) gespült. Für eine anschließende Inkubation mit 0,25 M Bernsteinsäureanhydridlösung wurde der Chip für 90 min an das Schlauchpumpensystem angeschlossen (0,2 ml/min). Nach dem Spülen mit Millipore[®]-Wasser (0,2 ml/min) für 10 min konnte der Chip mit Elektrolytpuffer befüllt und getestet werden.

III.6.7. Kontaktwinkelmessung von LTCC-Keramiken

Zur Ermittlung des Hydrophobiezustandes von LTCC-Keramiken wurden Kontaktwinkelmessungen mit ca. 1 cm x 1 cm großen Keramikfragmenten durchgeführt. Dabei inkubierte man die Fragmente in einem Becherglas (5 ml/Fragment) 6 h lang bei RT auf einem Schüttler (250 U/min) in verschiedenen Soluten. Als Solute wurden Millipore[®]-Wasser, Aceton, Kaliumhydroxid (3 M), Kaliumhydroxid (3 M):Ethanol (V:V 1:1), Kaliumhydroxid (3 M):Ethanol (V:V 1:5) und Piranha-Lösung (60 %ige H₂SO₄ und 32 %ige H₂O₂ wurden im Verhältnis 3:2 gemischt) verwendet. Anschließend wurden die Keramikstücke jeweils zweimal mit 10 ml Millipore[®]-Wasser in einem Becherglas für jeweils 10-20 s lang gespült und dann im Vakuum getrocknet.

Die Messungen und Auswertungen der Tropfenkontur und des Kontaktwinkels erfolgten nach der Laplace-Young- bzw. Tangentenmethode bei RT mit einem 10 µl Tropfen (Millipore[®]-Wasser). Bei der Laplace-Young-Methode werden in der Regel symmetrische Tropfen vorausgesetzt, während man bei dynamischen Tropfenrandwinkeln die Tangentenmethode anwendet. Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von der AG Frahm, Nees-Institut für Biodiversität der Pflanzen, Universität Bonn, durchgeführt.

III.7. Herstellung biosensitiver Schichten

III.7.1. Reinigung der Goldprismen

Die Reinigung der Goldprismen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden sie 5-10 min in Aceton (6 ml/Goldprisma), dann 20 min in einer Mischung aus 0,1 M Kaliumhydroxid und 30 %igem Wasserstoffperoxid (V:V 1:1) bei 60-65 °C gereinigt (6 ml/Goldprisma). Im Anschluss wurde gründlich mit Millipore[®]-Wasser gespült, danach mit Methanol, gefolgt von Toluol. Dazu wurden die Träger nacheinander in jeweils drei mit 20 ml Millipore[®]-Wasser, 20 ml Methanol, dann in drei mit 20 ml Toluol gefüllten Bechergläsern für jeweils 30 bis 60 s inkubiert. Die Goldprismen wurden ungetrocknet zur Beschichtung eingesetzt.

III.7.2. Erzeugung und Aktivierung von Aminooberflächen

Zur Aminofunktionalisierung wurden die gereinigten Goldprismen sechs Stunden lang in einer Lösung aus 1 Massenprozent APTES in Toluol (6 ml/Goldprisma) bei Raumtemperatur auf einem Probenschüttler (250 U/min) aminosilanisiert. Anschließend wurde gründlich mit

Toluol (dreimal in jeweils 20 ml im Becherglas, 30 bis 60 s lang) und, abhängig von der weiteren Beschichtungsstrategie, mit weiteren Lösungsmitteln bzw. mit Millipore[®]-Wasser gespült. Die aminosilanisierten Träger wurden zur weiteren Beschichtung wiederum ungetrocknet verwendet.

Aktivierung von aminosilanisierten Oberflächen

Nach Aminofunktionalisierung wurden die Goldprismen mit Toluol, Methanol und Millipore[®]-Wasser (dreimal je 20 ml in einem Becherglas, 30 bis 60 s lang) gespült. Zur Aktivierung der Aminooberfläche inkubierte man die Träger für 2 h in 10 % Glutardialdehyd bei RT auf einem Schüttler (250 U/min). Nach dem Spülen mit Millipore[®]-Wasser (jeweils zweimal in je 20 ml im Becherglas, 30-60 s lang) und Wasser (p.a.) (einmal 30 s lang in 20 ml im Becherglas) wurden die Träger im Vakuum getrocknet.

III.7.4. Erzeugung und Aktivierung von Carboxyoberflächen

Immobilisierung von 3-Mercaptopropionsäure

Für die Herstellung von Carboxyoberflächen wurden die gereinigten Goldprismen zweimal in je 20 ml Ethanol (96%) bei RT 30-60 s gespült und 24 h lang mit einer 1 %igen 3-Mercaptopropionsäure in 96 %igem Ethanol (6 ml/Prisma) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 U/min) inkubiert. Anschließend wurden die Träger dreimal gründlich in einem Becherglas mit je 20 ml Millipore[®]-Wasser 30-60 s lang gespült. Dann erfolgte eine Trocknung im Vakuum oder die Weiterbehandlung mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)/ N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) zur Aktivierung der Carboxylgruppen.

Umfunktionalisierung von Amino- in Carboxylgruppen

Dazu wurden Goldprismen mit Diamino-PEG funktionalisiert (Kapitel III.7.5.) und in einer 0,25 M Bernsteinsäureanhydridlösung (11 ml/Prisma) bei RT auf einem Schüttler (250 U/min) für 90 min inkubiert. Danach wurden die Goldprismen mit Millipore[®]-Wasser, Methanol und Dioxan (dreimal je 20 ml in einem Becherglas, 30 bis 60 s lang) gespült. Anschließend erfolgte die NHS/DIC-Aktivierung.

NHS/DIC-Aktivierung

Dazu wurden die Träger nacheinander in jeweils zwei mit je 20 ml Methanol und in zwei, mit je 20 ml Dioxan gefüllten Bechergläsern, jeweils 30 bis 60 s lang inkubiert. In einem Becherglas wurden 200 mg NHS und 400 mg DIC in 10 ml Dioxan gelöst und der Träger 4 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (300 U/min) aktiviert. Anschließend wurden die Prismen nacheinander gründlich in je jeweils zwei mit 20 ml Dioxan, 20 ml Methanol und 20 ml Millipore[®]-Wasser gefüllten Bechergläsern für 30-60 s gereinigt. Nach Trocknung im Vakuum erfolgte der Einbau in das SPR-Gerät.

III.7.5. Herstellung von Polymeroberflächen

Als Polymeroberflächen wurden Amino-, Diamino- und Dicarboxypolyethylenglykol verwendet. Diese wurden über Butandioldiglycidylether (BDDG) als Spacer an aminofunktionalisierte Goldträger gekoppelt. Nach Herstellung einer aminofunktionalisierten Oberfläche (Kapitel III.7.2.) wurden die Prismen mit Toluol, Methanol und Millipore[®]-Wasser (jeweils zweimal in je 20 ml im Becherglas, 30 bis 60 s lang) gespült. Die nassen Träger wurden 16-18 h lang in einer Lösung (11 ml/Prisma) aus BDDG, Natriumtetraborhydrid und Natriumcarbonatlösung (0,2M, pH 10,0) bei RT auf einem Schüttler (250 U/min) inkubiert. Bei der Immobilisierung von Aminopolyethylenglykol wurde statt des Natriumcarbonatpuffers ein Na-Tetraboratpuffer (0,2 M, pH 10,0) verwendet. Nach Entnahme und Spülen mit Millipore[®]-Wasser (dreimal in je 20ml im Becherglas, 30 bis 60 s lang) erfolgte die Immobilisierung des Diamino- bzw. Dicarboxypolyethylenglykols (c = 50 mg/ml 0,2 M Natriumcarbonatpuffer pH 10,0) 24h lang bei RT auf einem Schüttler (250 U/min). Die Immobilisierung von Aminopolyethylenglykol erfolgte unter gleichen Bedingungen mit einem 0,2 M Na-Tetraboratpuffer (pH 10).

Die Träger wurden erneut mit Millipore[®]-Wasser gespült (dreimal in je 20 ml im Becherglas, 30 bis 60 s lang) und anschließend, je nach weiterer Immobilisierungstechnik, im Vakuum getrocknet oder nass weiterverarbeitet.

III.7.6. Aktivierung von Polyethylenglykoloberflächen

Diaminopolyethylenglykol

Zur Aktivierung einer Diaminopolyethylenglykoloberfläche wurde eine Inkubation in 10 % Glutardialdehyd (10 ml/Prisma) für 2 h bei RT auf einem Schüttler (250 U/min) durchgeführt. Nach dem Spülen in Millipore®-Wasser (jeweils zweimal in je 20 ml im Becherglas, 30-60 s lang) und Wasser (p.a.) (einmal in 20 ml im Becherglas 30 s lang) wurden die Träger unter Vakuum getrocknet.

Dicarboxypolyethylenglykol

Nach erfolgter Immobilisierung von Dicarboxypolyethylenglykol wurde der Träger vakuumgetrocknet und in ein Gefäß mit gesättigter Dimethylformamid-Atmosphäre gelegt. Anschließend wurden 250 µl eines NHS/DIC-Gemisches (0,115 g NHS wurden in 1 ml DMF unter Zugabe von DIC in einem 1,1fachen molaren Überschuss gelöst und dann 10 s lang gevortext) wurden vorsichtig auf die Goldprismen pipettiert. Der Inkubator wurde luftdicht verschlossen und die Träger 4 h lang bei RT inkubiert. Die Goldprismen wurden entnommen, in DMF, Millipore®-Wasser (jeweils zweimal in je 20 ml im Becherglas, 30-60 s lang) und Wasser (p.a.) (einmal in 20 ml im Becherglas für 30 s) gespült und anschließend im Vakuum getrocknet.

Aminopolyethylenglykol

Bei Aminopolyethylenglykol wurden mehrere Methoden zur Onlineoxidation der Aminogruppen getestet. Onlineoxidation bedeutet in diesem Zusammenhang, dass im SPR-Gerät getestet wurde. Die anschließende Verwendung von Antikörpern (*Legionella pneumophila*) diente als Kontrolle zur Überprüfung der Immobilisierung und Aktivierung.

In die Kavitäten der SPR-Küvette wurden 10 µl PBS-Puffer (pH 7,3) vorgelegt. Nach Zugabe von 10 µl einer 0,1 M Natriumperiodatlösung erfolgte ein Durchmischen für 5 min mit anschließender Inkubation für 40 min. Bei dem Einsatz von Kaliumpermanganat (Inkubation: 60 min, 0,1 M) und Wasserstoffperoxid (Inkubation 60 min bei 1,5 %, Inkubation 20 min bei 5 %) wurde genauso verfahren. Nach den anschließenden fünf Spül- und Mischschritten mit je 10 µl PBS-Puffer (pH 7,3) für jeweils 1 min wurden 10 µl des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers (0,5 mg/ml, 0,675 mg/ml) hinzupipettiert und 30 min inkubiert. Abschließend wurde erneut fünf Mal mit je 10 µl PBS-Puffer (pH 7,3) für jeweils 1 min gespült.

III.7.7. H₂-Substitution mit Bernsteinsäureanhydrid

Goldprismen mit Diaminopolyethylenglykol (Kapitel III.7.6.) wurden 90 min in einer 0,25 M Bernsteinsäureanhydridlösung (6 ml/Prisma) bei RT inkubiert. Nach dem Spülen in Millipore®-Wasser (jeweils zweimal in je 20 ml im Becherglas, 30-60 s lang) und Wasser (p.a.) (einmal in 20 ml im Becherglas 30 s lang) wurden die Träger im Vakuum getrocknet. Dann erfolgte die bereits im Kapitel III.7.3. beschriebene Aktivierung der Carboxylgruppen mit NHS/DIC.

III.7.8. Blocken von SPR-Küvetten mit Rinderserumalbumin (BSA)

SPR-Küvetten wurden, um eine Adsorption des zu immobilisierenden Biomoleküls an der Küvettenwand zu unterbinden, für 30 min in einer BSA-Lösung (25 mg BSA/15 ml Millipore®-Wasser) inkubiert. Auf Grund der sehr englumigen Kavitäten (Abb. 53) kommt es meist zu einem Luftabschluss, so dass auf eine vollständige Benetzung der einzelnen Kavitäten mit der BSA-Lösung zu achten ist. Anschließend wird die Küvette dreimal mit je 20 ml Millipore®-Wasser und einmal mit 20 ml Wasser (p.a.) gründlich gespült und im Vakuum getrocknet.

III.7.9. Aktivitätsprüfung immobilisierter Enzyme

Absorptionmessung „offline“

Vor Beginn der SPR-Messung wurden jeweils 20 µl eines Natriumphosphatpuffers (0,2 M, pH 5,5) für Laccasen und Tyrosinasen in die Kavitäten vorgelegt.

Nach Aufzeichnung der Bindungskinetiken mittels SPR wurden die einzelnen Kavitäten bis auf ein Restvolumen von 5 µl des vorgelegten Puffers entleert und die gesamte Halterung aus dem SPR-Gerät entnommen (Abb. 53).

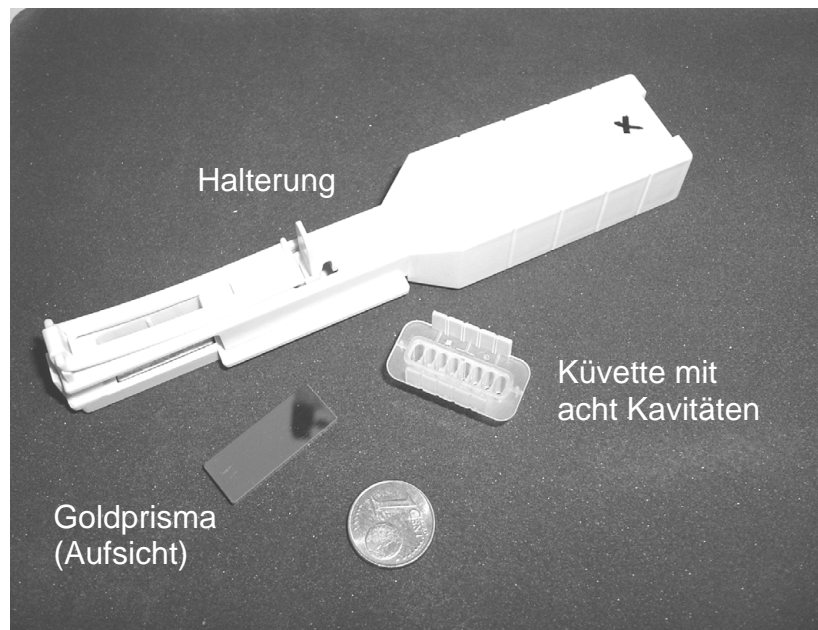


Abbildung 53: Goldprisma, Kunststoffküvette und Halterung. Zur Messung werden das (beschichtete) Goldprisma und die Küvette in die Halterung eingebaut und mittels einer Schublade (vergl. Abb. 29) in das SPR-Gerät eingeführt.

Als Puffer wurden bei der Tyrosinase und den Laccasen Natriumphosphatpuffer (0,2 M, pH 5,5) verwendet. In jede einzelne, der mit Enzymen immobilisierten Kavität, wurden 30 μl der Substratlösung (ABTS bei Laccasen, Brenzkatechin bei Tyrosinase) unter vorsichtigem zwei- bis dreimaligem Auf- und Abpipettieren und ohne Berührung der Trägeroberfläche pipettiert. Die Halterung wurde für die Dauer der Inkubation lichtgeschützt gelagert. Während der Inkubation (5 min) erfolgte der Nullabgleich des Photometers mit der eingesetzten Substratlösung und der verwendeten Mikroküvette. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 5 μl einer 8 %igen Schwefelsäurelösung unter vorsichtigem, zwei- bis dreimaligem Auf- und Abpipettieren hinzugegeben. Anschließend wurden 30 μl des Reaktionsansatz vorsichtig aus der Kavität entnommen, in eine Mikroküvette überführt und in einem Photometer vermessen. Brenzkatechin und ABTS wurden bei einer Wellenlänge von 420 nm, Syringaldazin bei 530 nm bestimmt.

Absorptionsmessung „online“

Nach Aufzeichnung der Bindungskinetiken wurden die frisch hergestellten Substratlösungen und das Stoppreagenz in die Mikrotiterplatte des SPR-Geräts pipettiert. Die einzelnen Kavitäten wurden bis auf 5 μl des eingesetzten Puffers entleert. Als Puffer wurden bei der Tyrosinase und den Laccasen ein Natriumphosphatpuffer (0,2 M, pH 5,5) eingesetzt. Nach Zugabe von 30 μl des Substratreagenzes erfolgte eine Durchmischung für 5 s. Nach der Inkubation (5 min) wurde zum Abstoppen der Reaktion 5 μl einer 8 %igen Schwefelsäurelösung hinzupipettiert und für 5 s gemischt. Nach der Entnahme der

Prismenhalterung aus dem SPR-Gerät wurden die Lösungen aus den einzelnen Kavitäten in eine Mikroküvette überführt und photometrisch vermessen. Dabei durfte kein Kontakt zwischen Pipettenspitze und Prismenoberfläche stattfinden. Je nach verwendeter Substratlösung wurden die Proben bei unterschiedlichen Wellenlängen photometrisch vermessen (Brenzkatechin und ABTS: 420 nm, Syringaldazin: 530 nm).

III.7.10. Berechnung der Schichtdickenzunahme

Durch die Inkubation zu immobilisierender Komponenten auf der Trägeroberfläche kommt es zu Änderungen des Brechungsindex, die in Form von Bindungskinetiken aufgezeichnet werden. Dadurch war es zur Herstellung des Ausgangszustands erforderlich, nach jeder Immobilisierung mit dem in der Messkavität vorgelegten Puffer fünf Mal zu spülen. Zur Berechnung der Schichtdickenzunahme wurde die Differenz zwischen Anfangssignal (vor der Immobilisierung) und Endsignal (nach dem Spülen) ermittelt.

IV. Ergebnisse

IV.1. Entwicklung von Strategien zur Immobilisierung von Biomolekülen auf festen Trägern mit Hilfe der Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR)

IV.1.1. Immobilisierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Mikrototalanalytensystem auf LTCC-Basis entwickelt werden, für das es erforderlich war, geeignete Immobilisierungsstrategien zu erarbeiten. Diese Strategien sollten die Integration von phenoloxidierenden Enzymen, wie beispielsweise Laccasen (O₂-Oxidoreduktase, EC 1.10.3.2), in das mikrofluidische System ermöglichen.

Bei der Immobilisierung von Biomolekülen ist es wichtig, dass diese stabil und ohne wesentliche Veränderung der Affinität und Spezifität an die Trägeroberfläche gebunden werden können. Zur Entwicklung und Beurteilung derartiger Immobilisierungsprozesse eignet sich besonders die Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR). Dies ist eine markierungsfreie Detektion ohne zusätzliche Veränderungen der immobilisierten Biokomponente. Dafür waren Goldoberflächen so zu modifizieren, dass mit Hilfe von Modellenzymen geeignete Immobilisierungsprotokolle zur Herstellung von Polyethylenglykol- und Metallionen-Oberflächen ausgearbeitet werden konnten.

IV.1.1.1. Vorbereitung der Träger

Um eine kovalente Beschichtung der Goldoberfläche zu ermöglichen, war es erforderlich, diese in geeigneter Weise vorzubereiten. Zu diesem Zweck musste der Träger gereinigt und funktionelle Gruppen in möglichst großer Zahl geschaffen werden.

IV.1.1.2. Reinigung der Goldprismen

Die Reinigung der Goldprismen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden sie 10 min lang in Aceton, dann 20 min in einer Mischung aus 30 %igem Wasserstoffperoxid und 0,1 M Kaliumhydroxid (V:V 1:1) bei 60-65 °C gereinigt. Die Goldprismen wurden ungetrocknet zur Beschichtung eingesetzt.

IV.1.2. Erzeugung einer Amino­oberfläche

Für die Immobilisation verschiedenster Polyethylenglykol-Derivate war es erforderlich, zunächst aminofunktionalisierte Goldoberflächen herzustellen. Dazu wurden die gereinigten Goldprismen sechs Stunden lang in einer Lösung aus 1 Massenprozent 3-APTES in Toluol bei Raumtemperatur auf einem Probenschüttler (250 U/min) aminosilanisiert. Die aminofunktionalisierten Prismen wurden zur weiteren Beschichtung ungetrocknet verwendet. Da Goldoberflächen nicht über geeignete funktionelle Gruppen zur Aminosilanisierung verfügen, wurde mittels ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) überprüft, ob die Silanisierung trotzdem möglich ist [Hartmann, 2004]. Die Untersuchungen ergaben die Ausbildung einer 1-2lagigen Silanschicht auf der Goldoberfläche. Somit ist die Aminosilanisierung auf einer gereinigten Goldoberfläche möglich.

IV.1.3. Erzeugung einer Carboxyloberfläche

Zur Herstellung weiterer carboxylfunktionalisierter Oberflächen wurde 3-Mercaptopropionsäure (3-MPS) verwendet. Dazu wurden die gereinigten Goldprismen zweimal in Ethanol (96 %) 30-60 s gespült. Anschließend wurde 24 h in einer 1 %igen 3-MPS-Lösung (in 96 %igem Ethanol) bei Raumtemperatur auf einem Probenschüttler (250 U/min) inkubiert. Die Aktivierung funktionalisierter Oberflächen mit NHS/DIC erfolgte nasschemisch. Für alle anderen Messungen wurden die carboxylfunktionalisierten Prismen mittels Vakuum getrocknet.

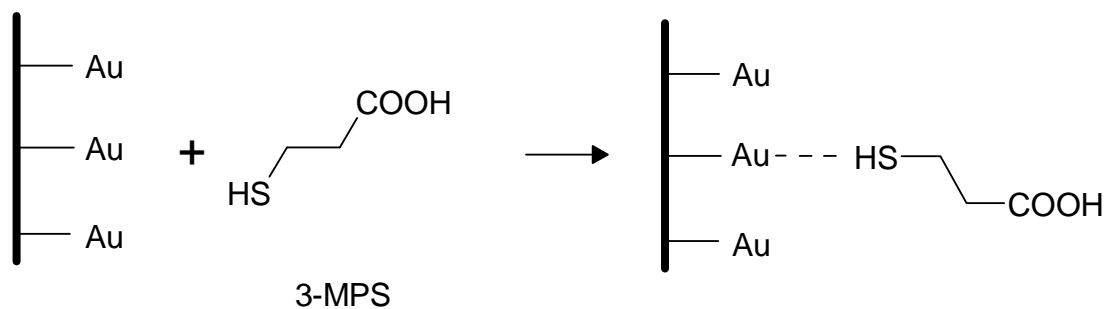


Abbildung 54: Carboxylfunktionalisierung einer Goldoberfläche mit 3-MPS.

Bei der Funktionalisierung von Goldoberflächen mit Organothi­ol-Molekülen wird die schwache Schwefel-Wasserstoffbindung gespalten und eine Gold-Thiolat-Bindung entsteht (Abb. 54). Es bilden sich selbstorganisierende Schichten, sogenannte SAMs (self-assembled

monolayers) aus. Der Begriff bezeichnet komplexe und hochgeordnete Strukturen, zu welchen sich Moleküle spontan bei der Adsorption auf ein Substrat organisieren können.

IV.1.4. Erzeugung von PEG-Oberflächen auf aminofunktionalisierten Goldprismen

Polyethylenglykol (PEG) ist ein von der Kettenlänge abhängiges, flüssiges oder festes, chemisch inertes, wasserlösliches, nicht toxisches Polymer. Aufgrund dieser Eigenschaften wird es beispielsweise in der Medizin als Wirkstoffträger eingesetzt. Dabei ist die Arznei mit einer Hülle aus verzweigtem PEG umgeben (z.B. bei Interferon). Dies verlangsamt den Abbau und die Folgen sind eine bessere Wirkung und weniger Nebenwirkungen. Durch die Entwicklung geeigneter Beschichtungssysteme sollten Ansätze erarbeitet werden, die zur Integration von Enzymen in Mikrofluidikstrukturen dienen.

Polyethylenglykol ist für solche Anwendungen besonders geeignet. Aufgrund der Molekülstruktur minimiert es die Anzahl unspezifischer Bindungen auf funktionalisierten Oberflächen. Zudem besitzt PEG eine ausgeprägte „Spacer“-Funktion, die bei der Immobilisierung von Biomolekülen eine übergeordnete Rolle spielen. Die Grundstruktur linear gebauter PEG-Ketten besteht aus Monomeren (-CH₂-CH₂-O-), die ab einem Polymerisationsgrad größer zehn die sogenannte Mäanderstruktur ausbilden (Abb. 55).

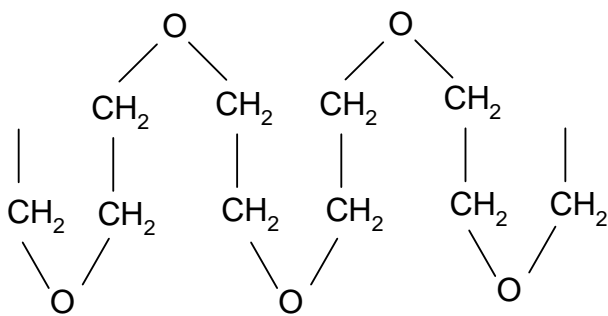


Abbildung 55: Ausschnitt einer Mäanderstruktur von Polyethylenglykol.

Für die Immobilisierung von Biomolekülen wurden aminofunktionalisierte Goldprismen mit drei verschiedenen Polyethylenglykol-Derivaten beschichtet (Abb. 56).

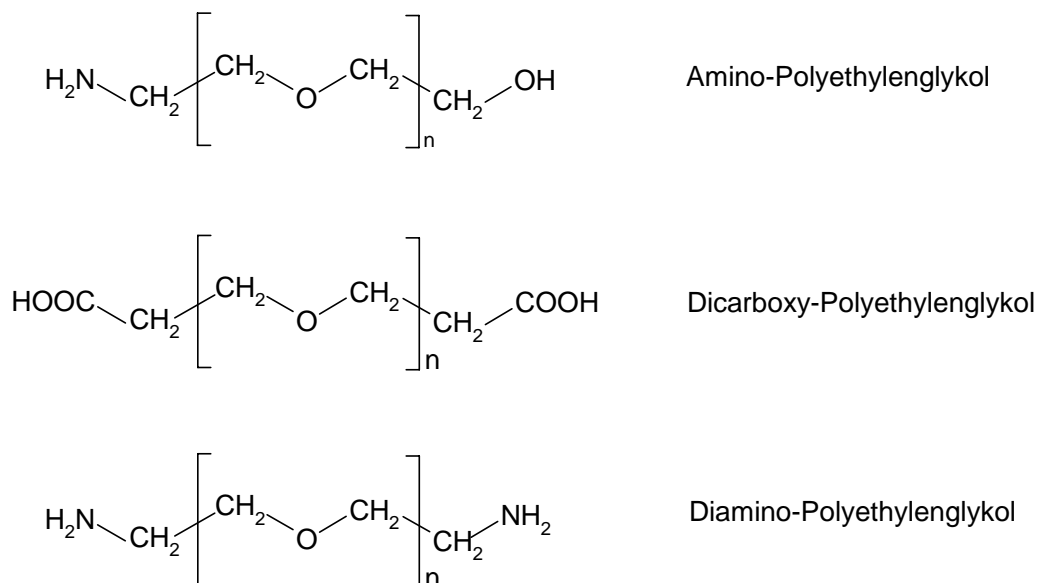


Abbildung 56: Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenglykol-Derivate. Die Zahl unspezifischer Bindungsstellen auf der Oberfläche des Trägers sollte durch die Beschichtung mit PEG verringert werden. Die Anlagerung von Amino-, Diamino- und Dicarboxy-PEG erfolgte über einen Spacer an aminosilanisierte Oberflächen (Abb. 58).

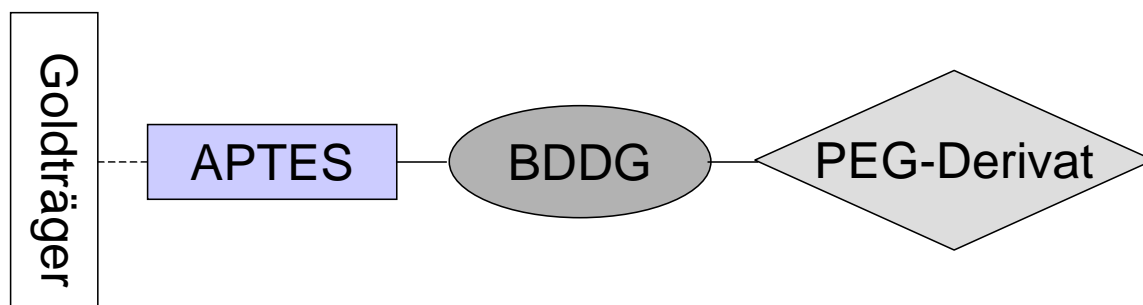


Abbildung 57: Schema des Schichtaufbaus eines mit PEG-Derivaten beschichteten Goldträgers.

Ausgehend von ungetrockneten, aminosilanisierten Goldprismen wurde zunächst über die Aminogruppe des Silans das homobifunktionale Epoxid 1,4-Butandiolglycidylether (BDDG) als Linker eingeführt. Anschließend erfolgte die Kupplung des PEG unter reduktiven Bedingungen: Die Träger wurden für die Immobilisierung von Amino-PEG zwölf Stunden lang in einer Lösung von BDDG (3 ml/10 ml Boratpuffer) und NaBH_4 ($c = 6 \text{ mg/ml}$) in 0,2 M Natriumtetraboratpuffer pH 10,0 bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 U/min) inkubiert. Analog erfolgte die Beschichtung mit Diamino- und Dicarboxy-PEG unter gleichen Bedingungen. Anstelle eines Boratpuffers wurde ein 0,2 M Natriumcarbonatpuffer pH 10,0 verwendet. Anschließend erfolgte die Aminierung der freien Epoxidgruppe durch die PEG-Komponente (Abb. 58).

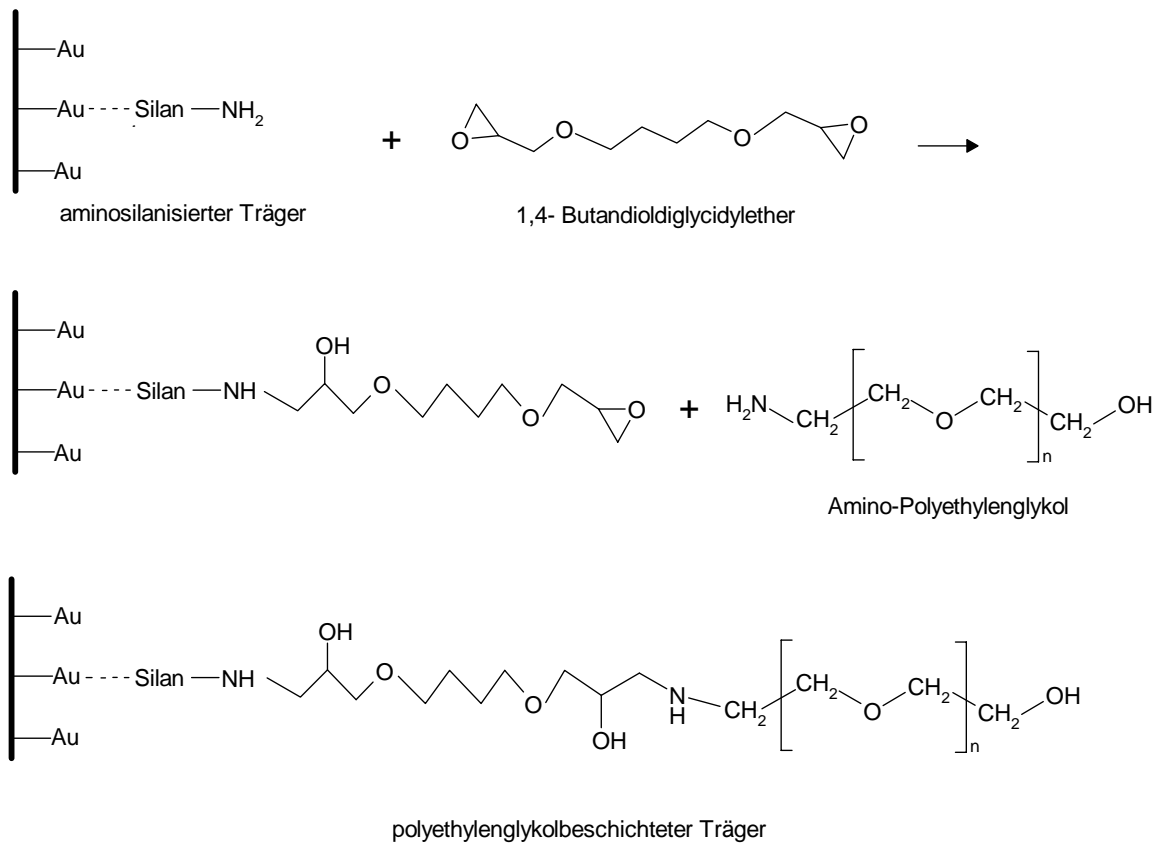


Abbildung 58: Übersicht der an der Amino-Polyethylen glykolbeschichtung eines aminosilanisierten Goldträgers beteiligten Reaktionen.

Dazu wurden die Träger in einer Lösung des jeweiligen Polyethylen glykols ($c = 50 \text{ mg/ml}$) 24 h auf einem Probenschüttler (250 U/min) bei Raumtemperatur inkubiert. Abhängig von der Beschichtungsstrategie erfolgte entweder eine direkte Weiterverarbeitung oder eine Vakuumtrocknung.

IV.1.5. Immobilisierung von Antikörpern auf funktionalisierten PEG-Oberflächen

Die erfolgreiche Immobilisation von Enzymen auf Messelektroden der LTCC-Mikrochips lässt sich nur unzureichend überprüfen. Die meisten Materialien, die für den Aufbau von μ -CE Systemen verwendet werden, sind transparent und häufig mit einer optischen Messeinheit zur LIF Methode ausgestattet. Da keramische Materialien lichtundurchlässig sind, ist eine Überprüfung der Immobilisierungsstrategien beispielsweise mittels Fluoreszenzmarkierung nicht möglich. Deshalb wurden die Immobilisierungsstrategien mittels SPR getestet. Die aufgezeichneten Bindungskinetiken und die daraus möglicherweise resultierenden Schichtdickenzuwächse sollten anzeigen, ob die Immobilisierung der Biokomponente

erfolgreich verlaufen ist. Da bei der Immobilisierung von phenoloxidierenden Enzymen keine Angabe zu einer gerichteten Kupplung möglich war, wurden Antikörper für die Modellentwicklung verwendet. Diese können über Antigene weitere Antikörper binden, wodurch ein Sandwichaufbau entsteht. Eine erfolgreiche Immobilisierung kann dann über die Schichtdickenzunahme der Antikörper ermittelt werden. Als markierungsfreie, biologische Testkomponente sollte der Antikörper über die Aminogruppen an das Polyethylenglykol kovalent gebunden werden. Zur Messung wurden die einzelnen Kavitäten polyethylenglykolbeschichteter Goldprismen zunächst mit 10 μl PBS-Puffer pH 7,3 befüllt. Nach Aufzeichnung der Basislinie erfolgte das Auffüllen auf 20 μl mit einer *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörperlösung. Während der 30-minütigen Inkubation wurde der Kavitäteninhalt zu Beginn 5 Minuten lang durchmischt.

IV.1.5.1. Oxidation von Amino-PEG beschichteten Goldprismen

Zur Steigerung der Bindungsaffinität beschichteter Träger wurden die Hydroxylgruppen des PEG mit verschiedenen Oxidationsmitteln (Natriumperiodat, Kaliumpermanganat und Wasserstoffperoxid) zu Carboxylgruppen oxidiert. Nach Zugabe des Antikörpers sollte dieser kovalent durch Bildung einer Säureamidgruppe (-CO-NH-) an die Oberfläche kuppeln (Abb. 59). Die Oxidation erfolgte „online“, dass heißt, im SPR-Gerät.

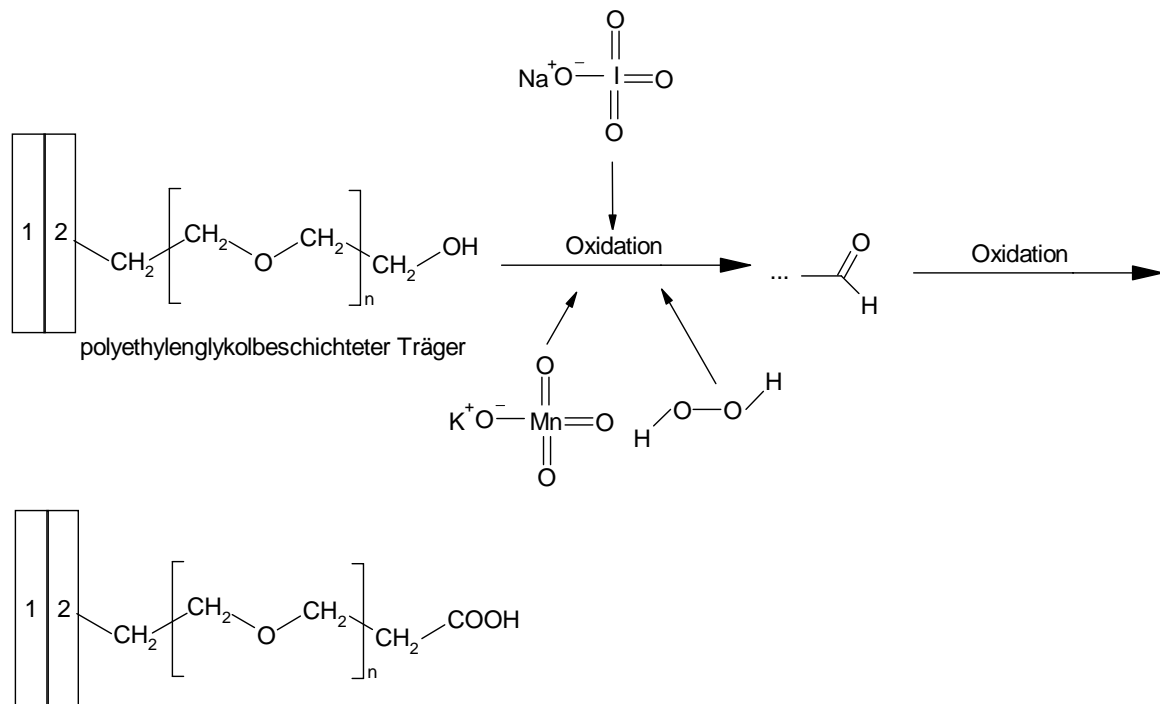


Abbildung 59: Oxidation der Hydroxylgruppe des polyethylenglykolbeschichteten Trägers mit Natriumperiodat, Kaliumpermanganat oder Wasserstoffperoxid zu einer Carboxylgruppe (1: Goldträger; 2: Primärbeschichtung aus APTES und BDDG).

Oxidation Amino-PEG beschichteten Goldoberflächen mit Natriumperiodat

Zur Oxidation Amino-PEG beschichteter Goldoberflächen mit Natriumperiodat wurden 10 μl PBS-Puffer (pH 7,3) in die Messkavität vorgelegt und 10 μl 0,1 M Natriumperiodatlosung hinzugegeben. Zu Beginn der 40-minütigen Inkubationszeit des Natriumperiodats wurde der Kavitäteninhalt für 5 min durchmischt. Anschließend wurde fünf Mal mit PBS-Puffer pH 7,3 gespült.

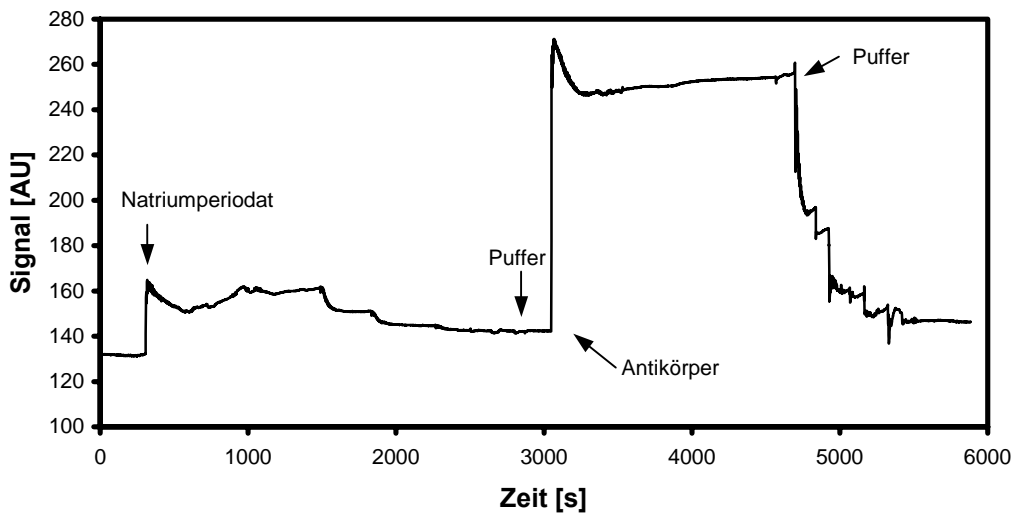


Abbildung 60: Oxidation eines mit Amino-PEG beschichteten Goldprismas mit Natriumperiodat (0,1 M) und anschließender Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3 \text{ mg/ml}$ in PBS-Puffer, pH 7,3)

Durch die Inkubation mit Natriumperiodat kam es zu einem Signalanstieg von 10 AU. Das Signal der Bindungskinetik verlief nach Zugabe des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers atypisch. Erwartet wurde ein hyperbolischer Verlauf der Anlagerungskinetik. Es wurde letztendlich ein Schichtdickenzuwachs von 5 AU ermittelt. Somit kam es nach Zugabe des Antikörpers zu keiner signifikanten Schichtzunahme.

Oxidation Amino-PEG beschichteter Goldoberflächen mit Wasserstoffperoxid

Die Versuche mit Natriumperiodat führten zu keinem hyperbolischen Verlauf der Bindungskinetik. Der Schichtzuwachs war minimal (Abb. 60). Deshalb wurde als weiteres Reagenz zur Oxidation von PEG beschichteten Goldträgern Wasserstoffperoxid eingesetzt. Dazu wurde die Messkavität mit 10 μl PBS-Puffer (pH 7,3) befüllt und anschließend mit 1,5 oder 5 %iger Wasserstoffperoxidlösung auf 20 μl aufgefüllt (Abb. 61 und 62). Während der ersten 5 Minuten der 30-minütigen Inkubationszeit wurde der Kavitäteninhalt mechanisch

durchmischt. Nach Zugabe des Antikörpers (0,3 mg/ml) und einer erneuten Durchmischung für 5 Minuten folgte eine 70 minütige Inkubation.

1,5 %ige Wasserstoffperoxidlösung

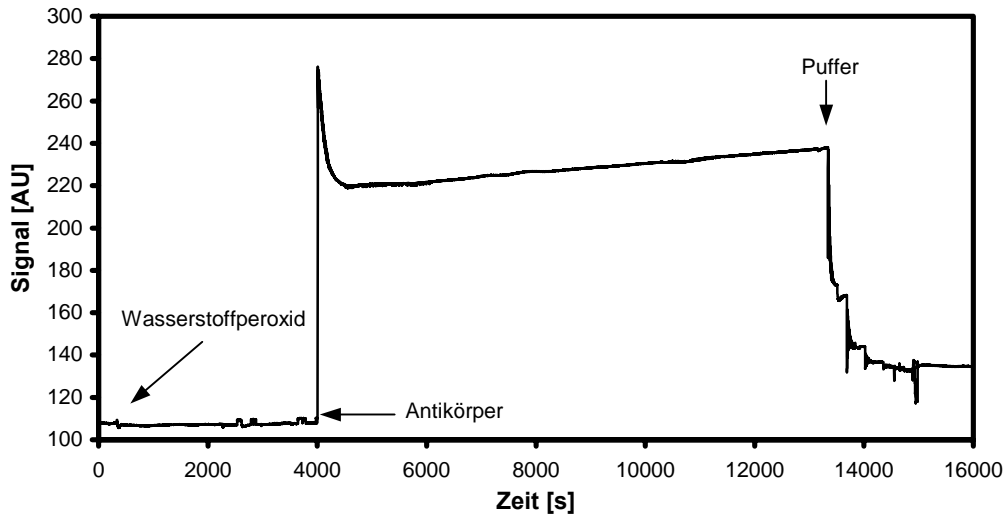


Abbildung 61: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in PBS-Puffer, pH 7,3) auf einem mit Amino-PEG beschichteten Goldprisma. Die PEG Schicht wurde vor der Immobilisierung mit Wasserstoffperoxid (1,5 %) oxidiert.

Die Bindungskurve zeigte während der Inkubation mit Wasserstoffperoxid keinen Anstieg. Die Immobilisierung des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers führte zu einem Schichtdickenzuwachs von 25 AU. Die Bindungskinetik verlief wiederum für die Anlagerung eines Biomoleküls atypisch.

5 %ige Wasserstoffperoxidlösung

Bei der Verwendung von 1,5 %iger Wasserstoffperoxidlösung kam es zu einer geringen Schichtdickenzunahme und einem atypischen Verlauf der Bindungskurve. In einer weiteren Versuchsreihe wurde 5 %iger Wasserstoffperoxidlösung getestet. Die Versuchsdurchführung war mit den vorherigen Versuchen identisch. Die Inkubationszeit wurde aufgrund der höheren Konzentration auf 20 min reduziert.

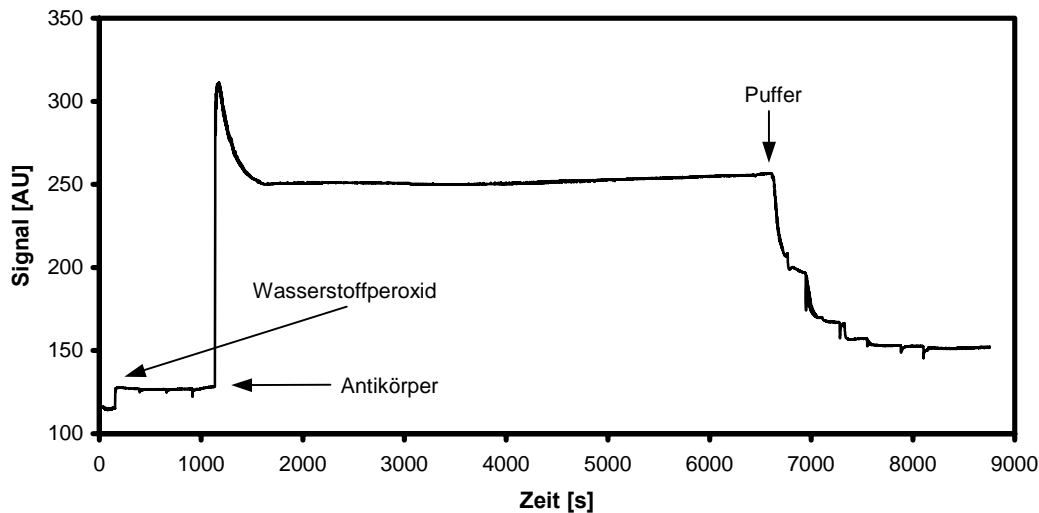


Abbildung 62: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3 \text{ mg/ml}$ in PBS-Puffer, pH 7,3) auf einem mit Amino-PEG beschichteten Goldprisma. Die PEG Schicht wurde vor der Immobilisierung mit Wasserstoffperoxid (5 %) oxidiert.

Der Signalzuwachs betrug nach Zugabe der 5 %igen Wasserstoffperoxidlösung 13 AU. Die Immobilisierung des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers führte zu einer Schichtdickenzunahme von 24 AU. Die Bindungskinetik wies, wie bei der Verwendung von 1,5 %iger Wasserstoffperoxidlösung, keinen hyperbolischen Verlauf auf. Die Zunahme der Schichtdicke war jedoch mit der einer 1,5 %igen Wasserstoffperoxidlösung vergleichbar.

Oxidation Amino-PEG beschichteter Goldoberfläche mit Kaliumpermanganat

Bei der Oxidation Amino-PEG beschichteter Goldträger kam es durch die Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers nur zu einer geringen Schichtdickenzunahme. Darüber hinaus waren alle Versuche mit Natriumperiodat und Wasserstoffperoxid durch einen peakähnlichen Verlauf der Bindungskinetik bei der Immobilisierung des Antikörpers gekennzeichnet.

Als weiteres Oxidationsmittel wurde eine 0,1 M Kaliumpermanganatlösung eingesetzt. Wie bei den vorherigen Versuchen wurde die Messkavität mit 10 μl PBS-Puffer (pH 7,3) befüllt. Nach Einstellung der Basislinie erfolgte die Zugabe von 10 μl der Kaliumpermanganatlösung (pH 7,0). Der Kavitäteninhalt wurde während der ersten 5 Minuten der 60-minütigen Inkubation durchmischt. Die im Anschluss 70-minütige Inkubation des Antikörpers ($c = 0,3 \text{ mg/ml}$) verlief analog.

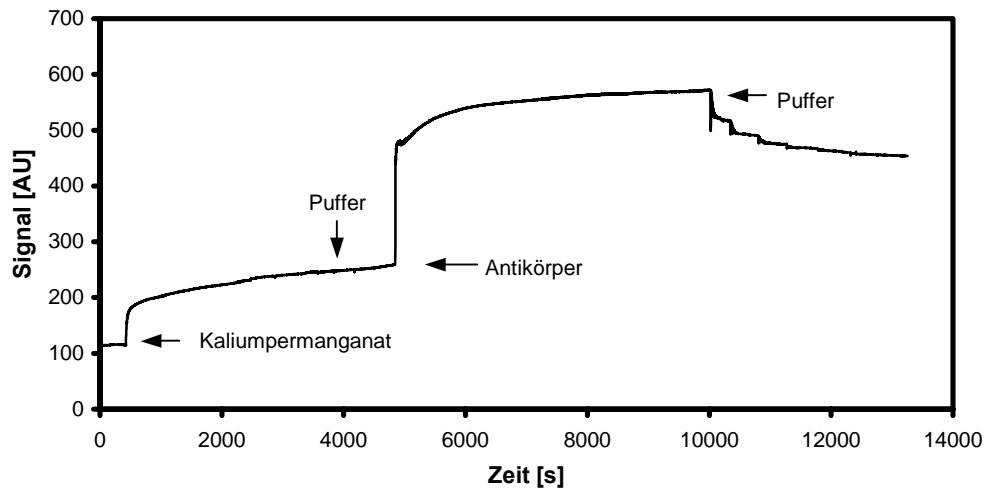


Abbildung 63: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in PBS-Puffer, pH 7,3) auf einem mit Amino-PEG beschichteten Goldprisma. Die PEG Schicht wurde vor der Immobilisierung mit Kaliumpermanganat (0,1 M, pH 7,0) oxidiert.

Durch Inkubation der beschichteten Goldoberfläche mit Kaliumpermanganat kam es zu einem Signalzuwachs von 144 AU. Fünfmaliges Spülen mit PBS-Puffer führte zu keiner signifikanten Abnahme des Signals. Nach Zugabe des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers kam es zu einem Signalzuwachs von 195 AU. Sowohl das Bindungssignal des Kaliumpermanganats als auch des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers verliefen hyperbolisch. Die Immobilisierung des Antikörpers führte zu einem auffälligen Signalverlauf. Nach einem Signalanstieg von etwa 250 AU blieb das Signal für rund 150 s auf diesem Niveau, bevor es zu einer weiteren Zunahme über die Dauer der Inkubation kam. Im Vergleich mit den anderen getesteten Oxidationsmitteln wurde eine rund 8-fach größere Schichtdickenzunahme gemessen. Die Methode mit Kaliumpermanganat war am besten geeignet, um Antikörper über oxidierte Amino-PEG Schichten an Goldträgern zu immobilisieren.

In Tabelle 12 sind die Schichtdickenzuwächse der Versuche zur Immobilisierung von Antikörpern auf oxidierten Amino-PEG Oberflächen zusammenfassend dargestellt.

Oxidationsmittel	Konzentration [mM]	Schichtdickenzuwachs [AU]
Natriumperodat	0,1	5
Wasserstoffperoxid	0,4	25
Wasserstoffperoxid	1,4	24
Kaliumpermanganat	0,1	195

Tabelle 12: Bindungsdaten der Versuche zum Schichtdickenzuwachs von Antikörpern auf oxidierten Amino-PEG Oberflächen.

IV.1.5.2. Immobilisierung von Antikörpern auf Goldträgern mit homobifunktionaler PEG-Beschichtung

Durch Immobilisierung von PEG-Derivaten auf Oberflächen lassen sich hydrophile und biokompatible Schichten erzeugen. Die dabei ausgebildete Matrix kann zur Kupplung von Biomolekülen genutzt werden. Da das Amino-PEG über seine Amino- oder Hydroxylgruppe an die Trägeroberfläche koppeln kann, wurden homobifunktionale PEG-Moleküle verwendet (Abb. 56). Somit war die freie, endständige funktionelle Gruppe bekannt. Diese homobifunktionalen PEG-Moleküle wurden, wie Amino-PEG, mittels BDDG an eine aminosilanisierte Goldoberfläche gekuppelt (Abb. 64).

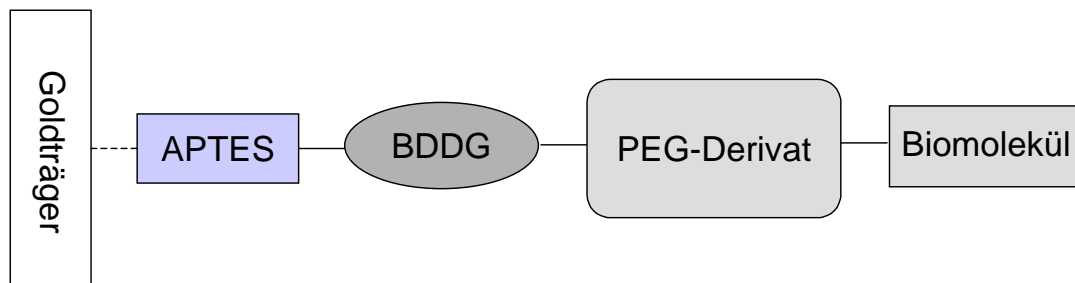


Abbildung 64: Schema des Schichtaufbaus eines mit einem PEG-Derivat beschichteten Goldträgers.

Dabei erfolgt die Aminierung bzw. Veresterung der freien Epoxidgruppe des Linkers mit der funktionellen Gruppe des PEG-Derivats. Als weitere Polyethylenglykole wurden Diamino- und Dicarboxy-PEG verwendet. Die Immobilisierung von Biokomponenten an Diamino-PEG führte erst zu einer Anlagerung von Bernsteinsäureanhydrid (Abb. 70). Dabei öffnete sich der Furanring des Bernsteinsäureanhydrids und eine endständige Carboxylgruppe wurde ausgebildet. Diese wurde vor der Immobilisierung eines Biomoleküls mit NHS/DIC aktiviert. Die Träger wurden in einer Lösung aus 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer (CBB-Puffer) pH 10,0 und dem jeweiligen Polyethylenglykol ($c = 50 \text{ mg/ml}$) 24 h auf einem Probenschüttler (250 U/min) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine direkte Weiterverarbeitung oder eine Vakuumtrocknung.

Immobilisierung von Antikörpern auf aktivierten Dicarboxy-PEG Oberflächen

Wie bereits erwähnt, ist bei der Immobilisierung von Biokomponenten an die Carboxylgruppen des Dicarboxy-PEGs eine Aktivierung nötig. Diese erfolgte mit einem Gemisch aus NHS/DIC. Dazu wurde der Träger nach erfolgreicher Beschichtung mit Dicarboxy-PEG vakuumgetrocknet und anschließend in einen Glastrog überführt. Ein in

Dimethylformamid angesetztes Gemisch aus N-Hydroxysuccinimid und N',N'-Diisopropylcarbodiimid wurde vorsichtig auf die Goldprismen pipettiert. Der Glastrog wurde luftdicht verschlossen und die Prismen 4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Diisopropylcarbodiimid lagert sich an die Carboxylgruppe des Polyethylenglykols an. NHS greift nucleophil über eine seiner Hydroxylgruppe das C-Atom der Carboxylgruppe an und aktiviert somit dieses. Dabei wird DIC mit einem Wassermolekül als Abgangsgruppe abgespalten. Das zu immobilisierende Biomolekül lagert sich über freie Aminogruppen an das aktivierte C-Atom an und wird unter Ausbildung einer Säureamidgruppe, unter gleichzeitiger NHS-Abspaltung, an das PEG gebunden (Abb. 65).

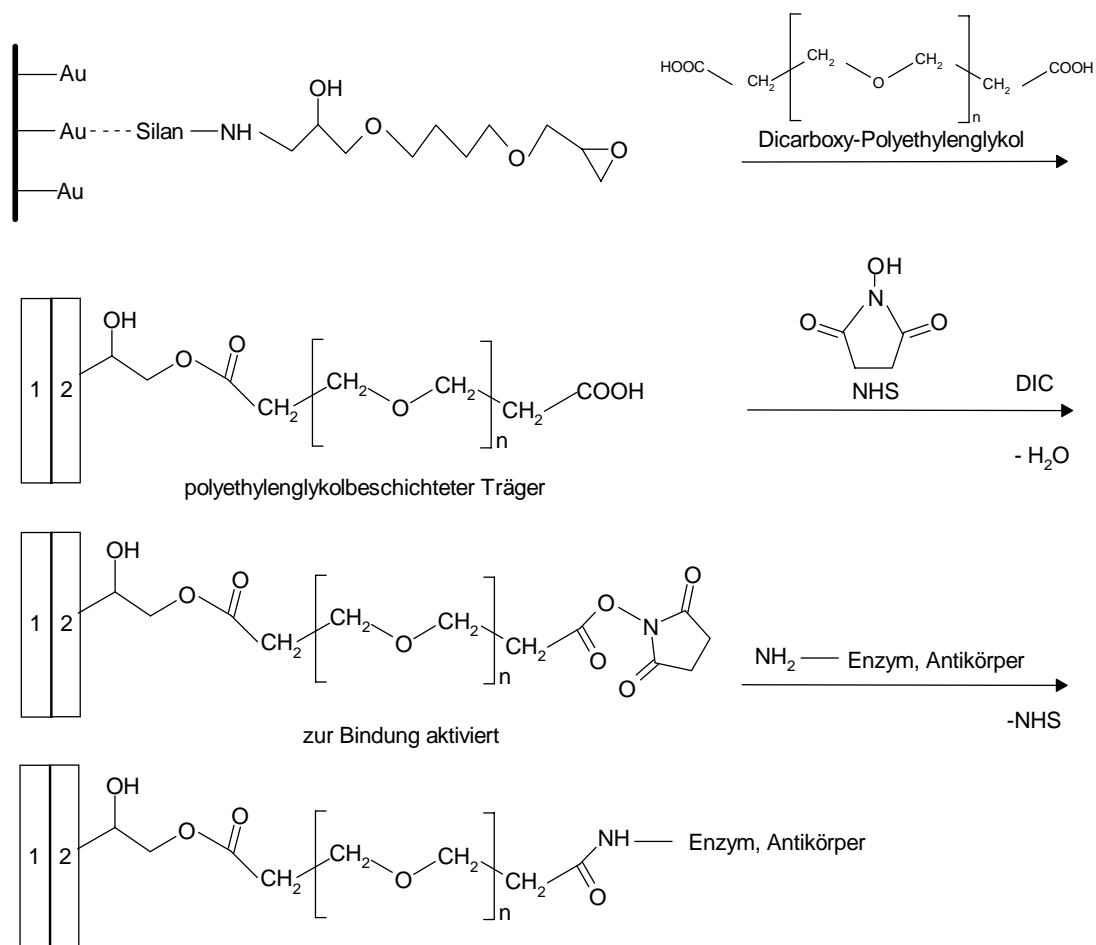


Abbildung 65: Übersicht der NHS/DIC-Aktivierung einer mit Dicarboxypolyethylenglykol beschichteten, aminosilanisierten Goldoberfläche (1: Goldträger; 2: Primärbeschichtung aus APTES und BDDG).

Die Messkavität wurde mit 10 µl CBB-Puffer (pH 10,0) befüllt. Nach Einstellung der Basislinie wurden 10 µl des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers (c = 0,3 mg/ml) hinzupipettiert. Der Kavitäteninhalt wurde während der ersten fünf Minuten der 60-minütigen Inkubation durchmischt.

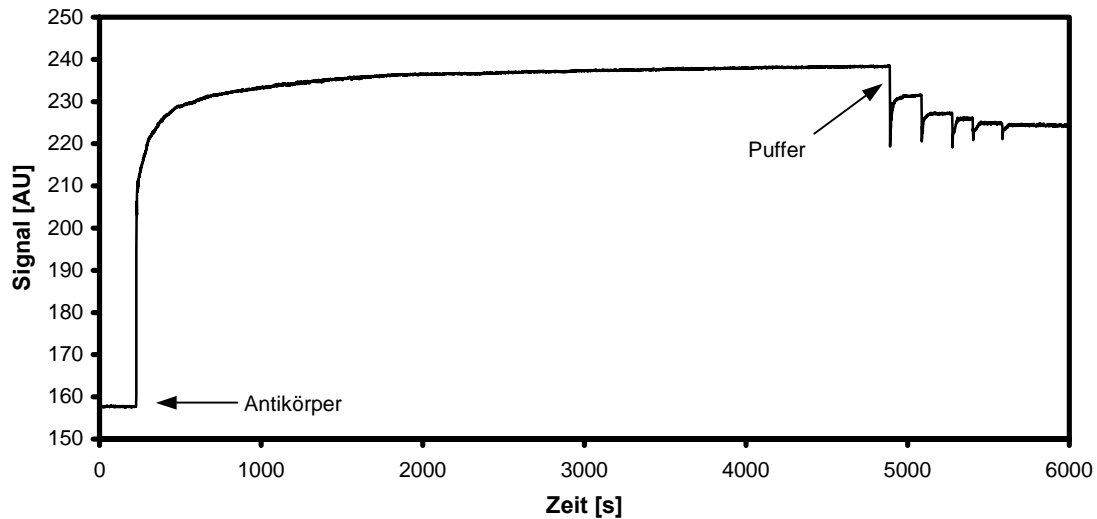


Abbildung 66: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in Natriumcarbonatpuffer, pH 10,0) auf einem mit Dicarboxy-PEG beschichteten und mit NHS/DIC aktivierten Goldprisma.

Nach Zugabe des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers konnte eine für Biomoleküle typische Bindungskinetik beobachtet werden (Abb. 66). Es wurde ein Schichtdickenzuwachs von 66 AU ermittelt.

Immobilisierung von Antikörpern auf Dicarboxy-PEG Oberflächen ohne NHS/DIC-Aktivierung

Um den Einfluss der Aktivierung auf die Immobilisierung von Biokomponenten besser beurteilen zu können, sollten auch Dicarboxy-PEG Träger ohne Aktivierung getestet werden. Dazu wurden mit Dicarboxy-PEG beschichtete Goldprismen ohne NHS/DIC-Aktivierung in gleicher Weise wie in Kapitel IV.1.5. vermessen. Nach Befüllung der Messkavität mit 10 μ l CBB-Puffer erfolgte die Zugabe von 10 μ l des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml). Während der ersten 5 Minuten der 60-minütigen Inkubationszeit wurde der Kavitäteninhalt mechanisch durchmischt (Abb. 67).

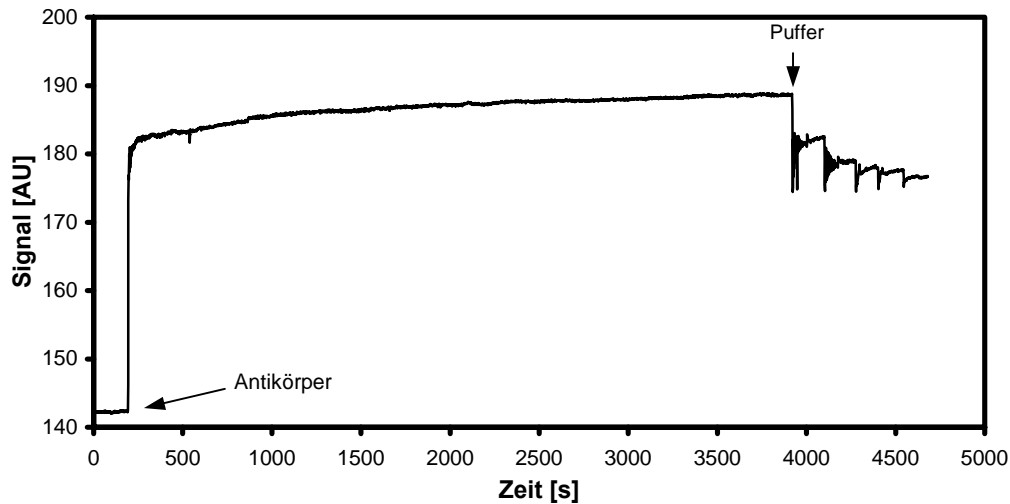


Abbildung 67: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in Natriumcarbonatpuffer, pH 8,6) auf einem mit Dicarboxy-PEG beschichteten Goldprisma ohne NHS/DIC-Aktivierung.

Wie bei der Aktivierung der Dicarboxy-PEG Schicht mit NHS/DIC verlief die Bindungskurve hyperbolisch. Nach fünfmaligem Spülen mit CBB-Puffer (pH 10,0) wurde eine Schichtzunahme von 35 AU ermittelt. Somit wurde eine um 47 % niedrigere Schichtzunahme als bei aktivierten Dicarboxy-PEG Oberflächen ermittelt.

Sandwichassay auf Dicarboxy-PEG

Wie die vorherigen Versuche zeigten, lassen sich *Legionella pneumophila* spezifische Antikörper über PEG-Derivate auf aminosilanisierten Oberflächen immobilisieren. Um darauf aufbauend weitere Beschichtungsprotokolle entwickeln zu können, musste die strukturelle Ausrichtung des immobilisierten Antikörpers untersucht werden. Dazu wurde ein Assay mit zwei Antikörpern durchgeführt. Basis dieses so genannten "Sandwichassays" waren auf Dicarboxy-PEG immobilisierte Antikörper (Abb. 68).

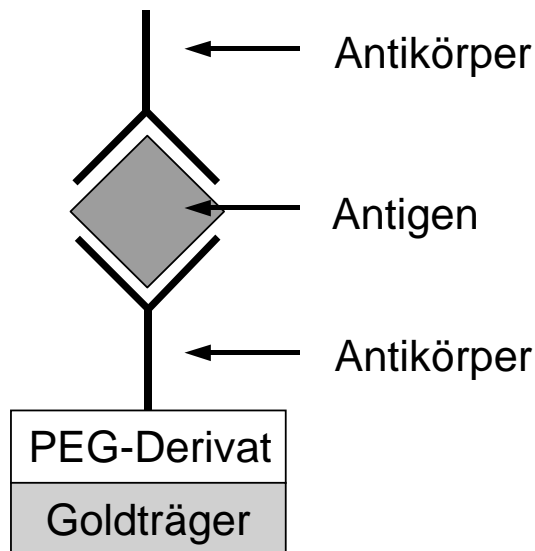


Abbildung 68: Schematischer Aufbau des Sandwichassays auf einem Goldträger mit PEG-Beschichtung.

Ein Antigen kann über sein Epitop an den Fab-Teil des immobilisierten Antikörpers binden. Gibt man einen weiteren Antikörper, einen sogenannten Detektionsantikörper hinzu, sollte dieser an das Antigen spezifisch binden.

Für die Durchführung des Sandwichassays wurde, wie in Kapitel IV.1.5.2. beschrieben, ein aminosilanisiertes Goldprisma mit Dicarboxy-PEG beschichtet. Alle weiteren Beschichtungsschritte erfolgten „online“. Die Messkavität wurde mit 10 µl CBB-Puffer befüllt und nach Einstellung der Basislinie mit einem *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörper auf 20 µl aufgefüllt. Der Kavitäteninhalt wurde während der ersten fünf Minuten der 60-minütige Inkubationsdauer durchmischt. Anschließend erfolgte nacheinander die Zugabe von 1 M Ethanolamin zur Beseitigung von Esterbindungen, des Blockingreagenz BSA (0,25 mg/ml) und des *Legionella pneumophila* spezifischen Antigens für jeweils 30 min. Abschließend wurde erneut mit einem *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörper für 60 min inkubiert (Abb. 69). Der Kavitäteninhalt wurde die ersten fünf Minuten während jeden Inkubationsschrittes durchmischt.

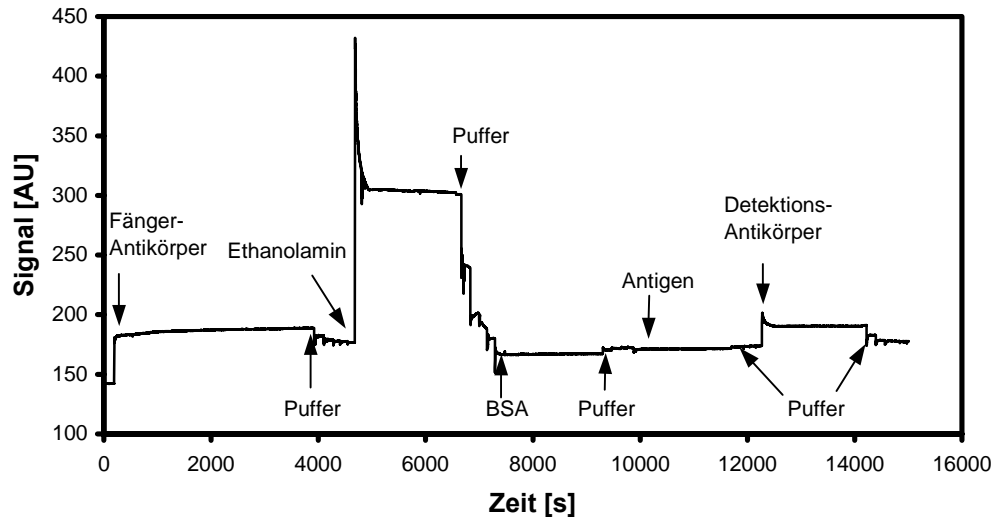


Abbildung 69: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in Natriumcarbonatpuffer, pH 10,0) auf einem mit Dicarboxy-PEG beschichteten Goldchip zur Testung der strukturellen Ausrichtung des Antikörpers. Durchführung eines Sandwichassays mit einem *Legionella pneumophila* spezifischen Antigen ($c = 10^7$ Partikel/ml). Zugabe von Ethanolamin ($c = 1$ M) und BSA ($c = 0,25$ mg/ml) zur Blockierung aktiver Bindungsstellen.

Die Immobilisierung des Fängerantikörpers führte zu einer Schichtzunahme von 30 AU. Der Schichtdickenzuwachs des Detektionsantikörpers betrug nach dem fünfmaligen Spülen mit CBB-Puffer 4 AU. Die Bindungskinetik verlief im Gegensatz zum Fängerantikörper atypisch. Die Immobilisierung des Antigens führte zu keiner signifikanten Schichtdickenänderung.

Immobilisierung von Antikörpern auf aktivierten Diamino-PEG Oberflächen

Eine weitere Möglichkeit zur Kupplung von Biokomponenten an PEG beschichteten Trägern besteht in der Verwendung von Diamino-PEG. Hierzu war es jedoch erforderlich, vor der Antikörper-Immobilisierung die freie Aminogruppe des immobilisierten Diamino-PEG mit Bernsteinsäureanhydrid zu einer Carboxylgruppe umzusetzen (Abb. 70). In einer 0,25 M Bernsteinsäureanhydridlösung erfolgte die Inkubation für 90 min auf einem Probenschüttler (250 U/min). Während dieses Vorgangs bildet sich eine Säureamidgruppe aus, die durch Reaktion des Furanderivates mit der Aminogruppe entsteht. Anschließend erfolgte die Aktivierung der Carboxyloberfläche mit NHS/DIC (siehe Kapitel IV.1.5.2.)

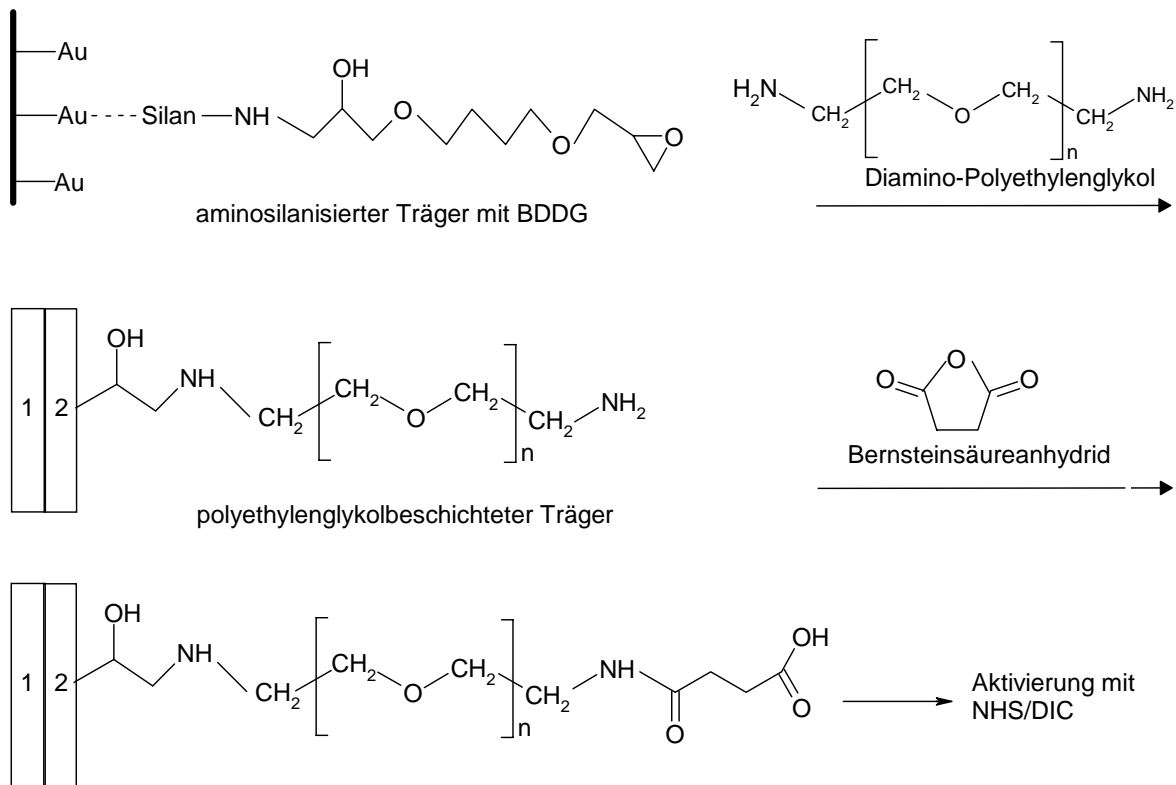


Abbildung 70: Übersicht über die Umsetzung der freien Aminogruppe von Diamino-Polyethylenglykol mit Bernsteinsäureanhydrid (1: Goldträger; 2: Primärbeschichtung aus APTES und BDDG).

Die Messkavität wurde mit 10 μ l CBB-Puffer (pH 10,0) befüllt. Nach Einstellung der Basislinie wurden 10 μ l des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml) hinzupipettiert. Anschließend wurde der Kavitäteninhalt während der ersten 5 Minuten der 60-minütigen Inkubation durchmischt (Abb. 71).

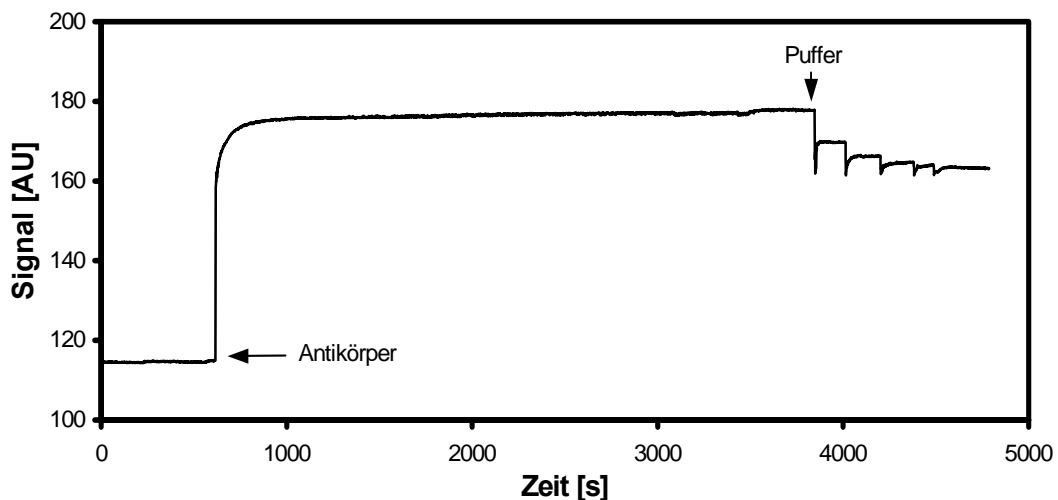


Abbildung 71: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in Natriumcarbonatpuffer, pH 10,0) auf einem mit Diamino-PEG beschichteten Goldprisma. Diamino-PEG wurde zur Schaffung einer Carboxyl-Oberfläche mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt und anschließend mit NHS/DIC aktiviert.

Nach Zugabe des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers kam es zu einem annähernd hyperbolischen Verlauf der Bindungskurve. Die Zunahme der Schichtdicke betrug 51 AU und damit 25 % weniger als bei vergleichbaren aktivierten Dicarboxy-PEG Oberflächen. Mit beiden Beschichtungsstrategien wurde ein *Legionella pneumophila* spezifischer Antikörper auf aktivierten PEG-Oberflächen immobilisiert. Das Verfahren der indirekten Kupplung über Bernsteinsäureanhydrid führte jedoch zu einer geringeren Schichtdickenzunahme.

Immobilisierung von Antikörpern auf nicht aktivierten Diamino-PEG Oberflächen

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, inwieweit die Aktivierung mit NHS/DIC einen Einfluss auf die Höhe des Schichtdickenzuwachses bei Diamino-PEG Oberflächen hat. Dazu wurden Diamino-PEG beschichtete Goldprismen mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt und ohne Aktivierung getestet. Die Messkavität wurde mit 10 μ l CBB-Puffer befüllt. Nach Zugabe von 10 μ l des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml) wurde der Kavitäteninhalt zu Beginn der 60-minütigen Inkubation fünf Minuten durchmischt (Abb. 72).

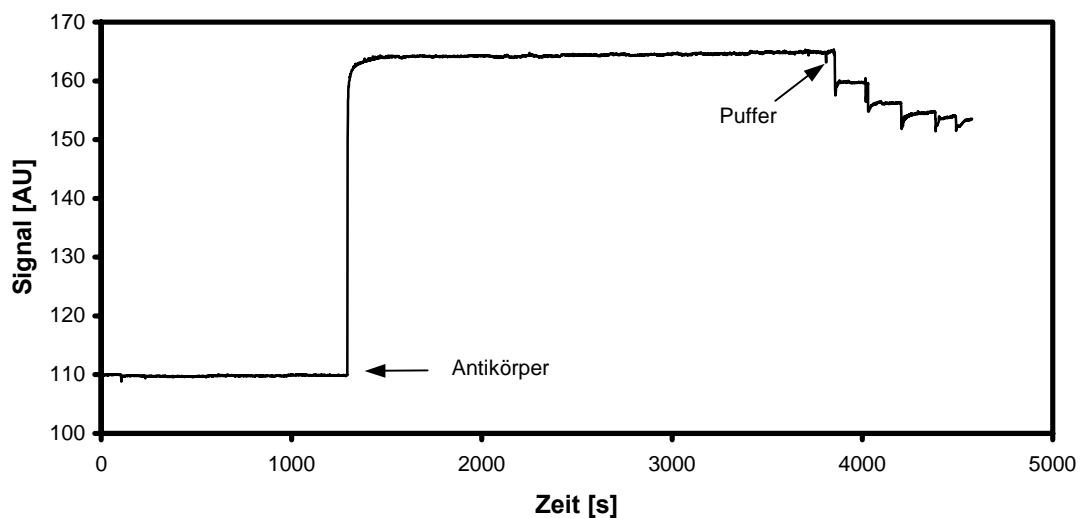


Abbildung 72: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in Natriumcarbonatpuffer, pH 10,0) auf einem mit Diamino-PEG beschichteten Goldprisma. Diamino-PEG wurde zur Schaffung einer Carboxyoberfläche mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt ohne anschließende Aktivierung der Carboxylgruppe mit NHS/DIC.

Durch die Immobilisierung des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers kam es zu einer Schichtdickenzunahme von 43 AU. Der Anstieg der Bindungskurve verlief hyperbolisch. Verglichen mit aktivierten Diamino-PEG Oberflächen war der Wert um 15,5 % geringer.

IV.1.5.3. Ausrichtung der Antikörperbindung mit Hilfe von $N\alpha,N\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Kobaltchlorid

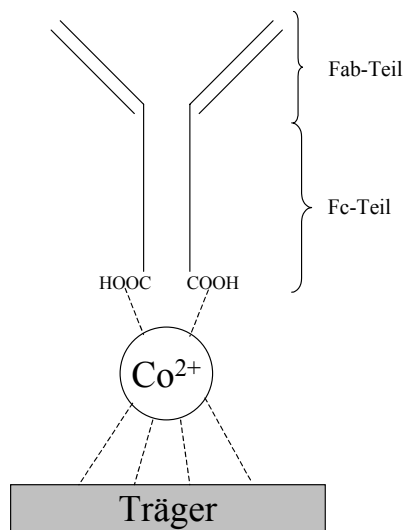


Abbildung 73: Schema der gerichteten Immobilisierung eines Antikörpers durch Komplexbildung mit Co^{2+} .

Der unter IV.1.5.2.3 durchgeführte Sandwichassay führte zu keiner Klärung der strukturellen Ausrichtung des Antikörpers. Daraufhin sollte alternativ eine Co^{2+} -Beschichtung entwickelt werden. Eine Co^{2+} -Beschichtung wurde bereits für Glasträger entwickelt [Hartmann, 2004]. Damit war es möglich, Antikörper an planare Glasträger zu binden. Die Bindung an die Co^{2+} -Oberfläche erfolgt gerichtet über Komplexbildung der endständigen Carboxylgruppen des Fc-Teils des Antikörpers [Hale, 1995]. Dies hatte den Vorteil, dass der Fab-Teil des Antikörpers für das Antigen frei zugänglich blieb (Abb. 73).

Die Co^{2+} -Beschichtung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Es erfolgte zunächst die Herstellung einer (Tri)carboxyloberfläche (Abb. 75), dann die Belegung mit Co^{2+} (Abb. 74).

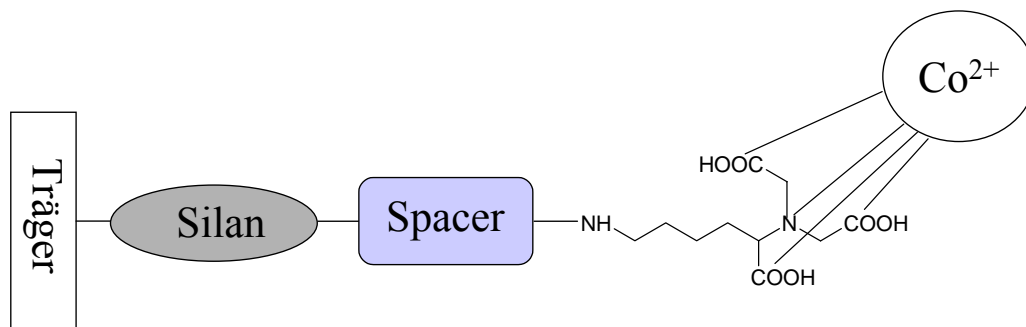


Abbildung 74: Schema des Schichtaufbaus einer Co^{2+} -Oberfläche.

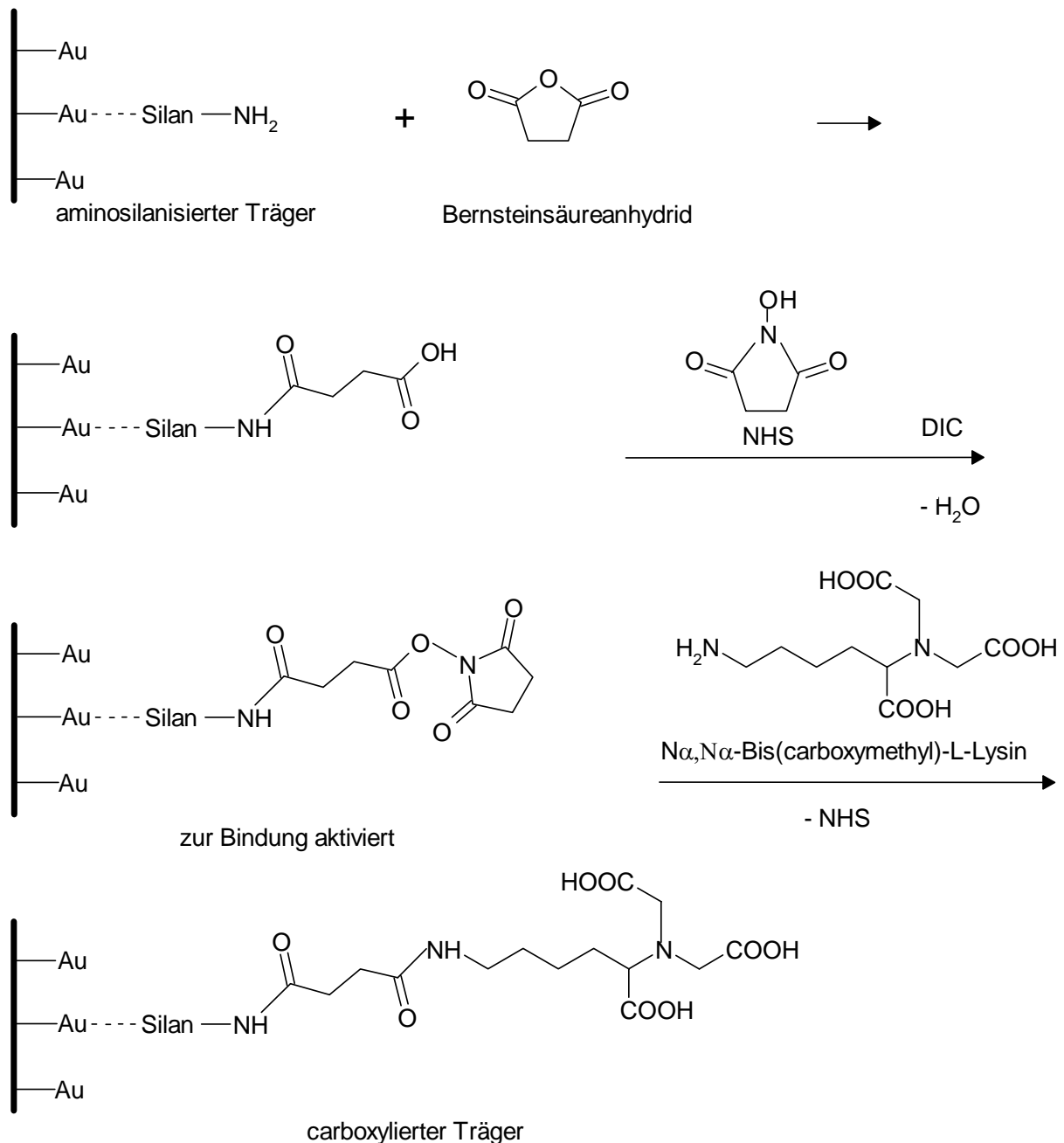


Abbildung 75: Reaktionsschema der (Tri)carboxylbeschichtung auf einer aminosilanisierten Goldoberfläche.

Diese wurde online unmittelbar vor der Antikörper-Immobilisierung ausgeführt. Basis für die Co²⁺-Beschichtung waren ungetrocknete, aminosilanisierte Goldprismen. Die Aminogruppen des Trägers wurden mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt. Bernsteinsäureanhydrid diente zum einen als Spacer, zum anderen wurde eine Carboxyloberfläche erzeugt, die für die weiteren Schritte erforderlich war. Dazu wurden die Goldprismen für 12 h in einer 0,25 M Bernsteinsäureanhydridlösung bei Raumtemperatur inkubiert (Probenschüttler, 250 U/min). Die so geschaffene Carboxyloberfläche wurde mittels einer Aktivierung mit NHS und DIC für die Immobilisierung eines Triessigsäurederivates vorbereitet. Die Aktivierung geschah für

4 h in einer Lösung von 1,6 g DIC und 0,8 g NHS in 40 ml Dioxan (Schüttler, 250 U/min) bei Raumtemperatur. Anschließend konnte das Triessigsäurederivat immobilisiert werden. Dazu wurden die Goldprismen in einer Lösung von N_{α},N_{α} -Bis(carboxymethyl)-L-lysin-trifluoracetat in einem 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer pH 8,3 ($c = 0,15$ mg/ml) ca. 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Trocknen im Vakuum konnten die Prismen zur online-Beschichtung mit Co^{2+} ($CoCl_2 \times 6 H_2O$, $c = 5$ mg/ml) verwendet oder im Exsikkator gelagert werden.

Der zu immobilisierende Antikörper soll über seine Carboxylgruppen am Fc-Teil an das Metallion komplexiert werden. Durch die gerichtete Anlagerung über den Fc-Teil des Antikörpers ist bei Bindung des Antigens die Immobilisierung eines weiteren Antikörpers denkbar. Es wurden je ein *Legionella pneumophila* (Abb. 76) und ein rabbit anti-*Salmonella sp.* (Abb. 77) spezifischer Antikörper ($c = 0,3$ mg/ml) verwendet. Vor Immobilisierung des Fänger-Antikörpers fand zunächst die Kupplung von Co^{2+} an das N_{α},N_{α} -Bis(carboxymethyl)-L-lysin-trifluoracetat durch Komplexbildung statt. Dazu wurden 10 μ l von Cobalt-(II)-chlorid-Hexahydrat ($c = 20$ mM) in die mit 10 μ l CBB-Puffer (pH 10,0) befüllte Messkavität pipettiert, fünf Minuten mechanisch durchmischt und für weitere 55 min bei Raumtemperatur ohne Durchmischung inkubiert. Nach fünfmaligem Spülen mit CBB-Puffer erfolgte die Immobilisierung des Fänger-Antikörpers. Die Kupplung des Antigens ($c = 10^7$ Partikel/ml) und des Detektions-Antikörpers wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt.

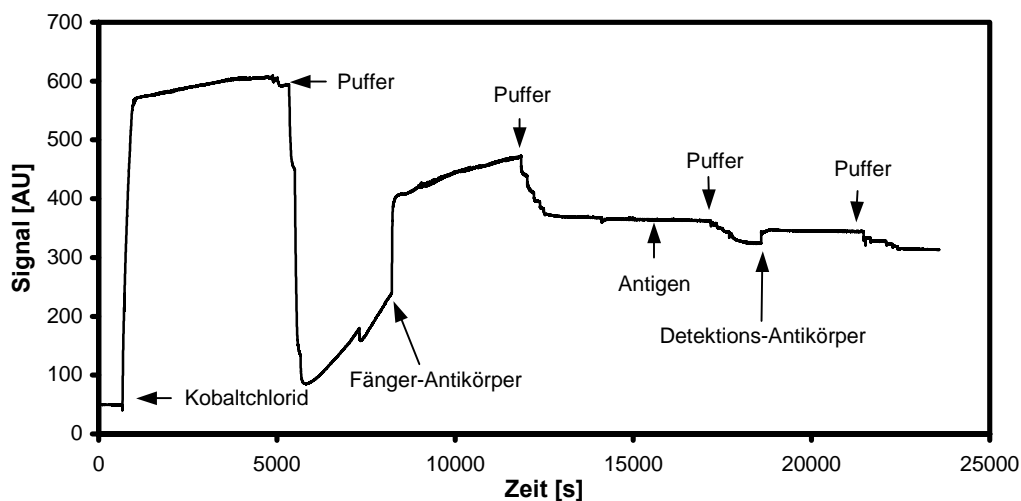


Abbildung 76: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml) in Natriumcarbonatpuffer (pH 10,0). Sandwichbeschichtung mit Cobalt-(II)-chlorid-Hexahydrat ($c = 20$ mM) auf einem mit APTES beschichteten Goldprisma.

Ein Schichtdickenzuwachs von 125 AU wurde bei der ersten Immobilisierung des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ermittelt. Nach Beschichtung mit Cobalt-(II)-chlorid-Hexahydrat und spülen mit Puffer kam es über einen Zeitraum von 40 min zu einem stetigen Anstieg des Signals. Die Immobilisierung des Antikörpers führte zu einem auffälligen Signalverlauf. Nach einem Signalanstieg von etwa 167 AU blieb das Signal für rund 300 s auf diesem Niveau, bevor es zu einer weiteren Zunahme über die Dauer der Inkubation kam. Sowohl nach der Immobilisierung des Antigens als auch des zweiten Antikörpers wurde das Ausgangsniveau um jeweils 20 AU unterschritten. Da es zu keiner effektiven Signalzunahme kam, wurde auf Basis der mit Co^{2+} aktivierten Metallionen-Oberfläche ein Sandwichassay mit einem polyklonalen rabbit anti-*Salmonella sp.* spezifischen Antikörper ($c = 0,3 \text{ mg/ml}$) weiter gearbeitet.

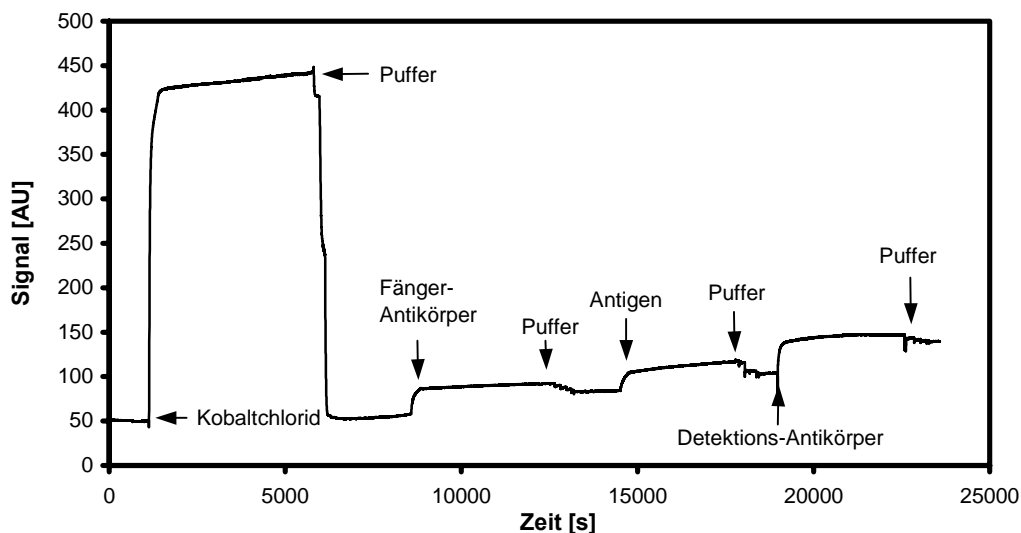


Abbildung 77: Immobilisierung eines rabbit anti-*Salmonella sp.* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3 \text{ mg/ml}$ in einem Natriumcarbonatpuffer, pH 10,0). Sandwichbeschichtung mit Cobalt-(II)-chlorid-Hexahydrat (20 mM) auf einem mit APTES beschichteten Goldchip.

Die Immobilisierung des rabbit anti-*Salmonella sp.* spezifischen Fänger-Antikörpers auf die Co^{2+} komplexierte Oberfläche führte zu einem Schichtdickenzuwachs von 22 AU. Verglichen mit immobilisierten *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpern entsprach dieser Signalzuwachs nur etwa 15 % der dort erzielten Schichtdickenzunahme. Der Schichtdickenzuwachs betrug bei der Immobilisierung des Antigens 17 AU. Die Immobilisierung des Detektions-Antikörpers ergab eine Zunahme von 33 AU. Bei allen Immobilisierungen wurde ein annähernd hyperbolischer Verlauf der Bindungskurve beobachtet. Demnach kam es durch die Herstellung einer Co^{2+} komplexierten Oberfläche zu einer gerichteten Anlagerung des rabbit anti-*Salmonella sp.* spezifischen Antikörpern über den Fc-Teil.

IV.1.5.4. Immobilisierung von Antikörpern auf 3-MPS-Oberflächen

Alle bisher beschriebenen Versuche zur Immobilisierung von Antikörpern fanden auf PEG beschichteten Oberflächen statt. Dafür wurde ein aminosilanisierter Goldträger mit Spacer und PEG beschichtet. Aufgrund der Molekülstruktur minimiert PEG die Anzahl unspezifischer Bindungen auf funktionalisierten Oberflächen. Außerdem besitzt es eine ausgeprägte „Spacer“-Funktion. Durch die Verwendung von 3-Mercaptopropionsäure (MPS) ist nur ein Beschichtungsschritt nötig. Die Eigenschaften des PEGs sind jedoch nicht gegeben. Neben einer Carboxylgruppe zur Kupplung der Biokomponente besitzt MPS eine Thiolgruppe. Über diese Thiolgruppe kann MPS, unter Ausbildung einer Gold-Thiolat-Bindung, an die Goldoberfläche binden (Abb. 78).

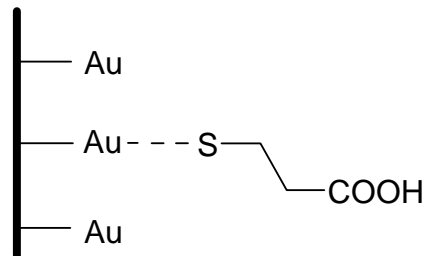


Abbildung 78: Schema des Schichtaufbaus eines Goldträgers mit 3-Mercaptopropionsäure.

Zur Beschichtung mit MPS wurden die gereinigten Goldprismen für 24 h in einer 1 %igen 3-Mercaptopropionsäurelösung (in 96 %igem Ethanol) bei Raumtemperatur auf einem Probenschüttler (250 U/min) inkubiert. Danach erfolgte eine Vakuumtrocknung. Bei einer anschließenden NHS/DIC Aktivierung wurden die Träger in einen Glastrog überführt. Ein in Dimethylformamid angesetztes Gemisch aus N-Hydroxysuccinimid und Diisopropylcarbodiimid wurde vorsichtig auf die Goldprismen pipettiert. Der Glastrog wurde luftdicht verschlossen und die Prismen 4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Messkavität wurde mit 10 µl CBB-Puffer befüllt. Nach Zugabe von 10 µl des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers (c = 0,3 mg/ml) wurde der Kavitäteninhalt zu Beginn der 60-minütigen Inkubation fünf Minuten durchmischt (Abb. 79).

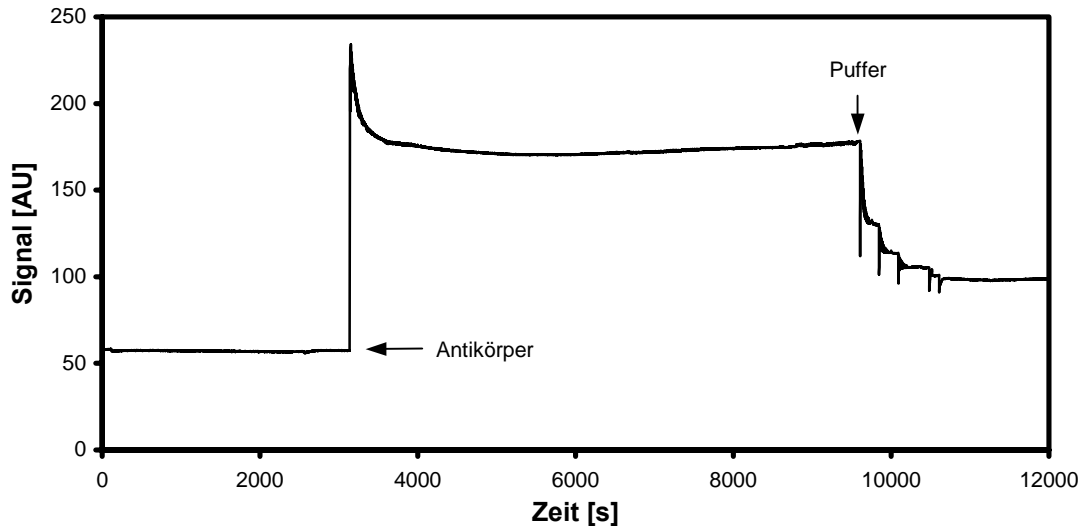


Abbildung 79: Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ($c = 0,3$ mg/ml in PBS-Puffer, pH 8,6) auf einem mit 3-Mercaptopropionsäure beschichteten und mit NHS/DIC aktivierten Goldprisma.

Nach Zugabe des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers kam es zu einem atypischen Verlauf der Bindungskurve. Der Schichtdickenzuwachs betrug 44 AU. Verglichen mit der Immobilisierung auf nicht aktivierten MPS-Oberflächen wurde bei gleichem atypischen Signalverlauf eine 10 %ige Signalzunahme ermittelt.

Tabelle 13 zeigt zusammenfassend die Schichtdickenzunahmen aller Antikörper- und Antigen-Anlagerungen der verschiedenen Versuche zur Erarbeitung geeigneter Immobilisierungsstrategien auf SPR-Basis.

Versuch	Fängerak. [AU]	Antigen [AU]	Detektionsak. [AU]
Dicarboxy-PEG mit NHS/DIC Aktivierung	66	entfällt	entfällt
Dicarboxy-PEG ohne NHS/DIC Aktivierung	35	entfällt	entfällt
Sandwichassay auf Dicarboxy-PEG Basis	30	kein Zuwachs	4
Diamino-PEG mit NHS/DIC Aktivierung	50	entfällt	entfällt
Diamino-PEG ohne NHS/DIC Aktivierung	44	entfällt	entfällt
Sandwichassay auf Co^{2+} -Basis mit <i>Legionella pneumophila</i> sp. Antikörper	125	kein Zuwachs	kein Zuwachs
Sandwichassay auf Co^{2+} -Basis mit rabbit anti- <i>Salmonella</i> sp. Antikörper	22	17	33
3-MPS mit NHS/DIC Aktivierung	44	entfällt	entfällt
3-MPS ohne NHS/DIC Aktivierung	40	entfällt	entfällt

Tabelle 13: Bindungsdaten der Versuche zur Erarbeitung geeigneter Immobilisierungsstrategien auf SPR-Basis.

IV.2. Immobilisierung fungaler Polyphenoloxidasen auf funktionalisierten Goldprismen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Immobilisierungsstrategien mit Hilfe der SPR zur Integration phenoloxidierender Enzyme, wie beispielsweise Laccasen, in LTCC-Mikrochips erarbeiten werden. Die immobilisierten Enzyme sollten stabil und ohne wesentliche Veränderung der Affinität und Spezifität an die Trägeroberfläche binden. Dabei wurde zunächst eine erfolgreiche Immobilisierung und die strukturelle Ausrichtung auf funktionalisierten Oberflächen mittels Antikörpern getestet (siehe Kapitel IV.1.5.2. und IV.1.5.3).

Die Funktionalität und Substratspezifität der verwendeten Polyphenoloxidasen wurde in zwei Schritten analysiert:

1. Überprüfung des Immobilisierungserfolges mittels SPR
2. Photometrische Funktionskontrolle

Mit Hilfe der Oberflächenplasmonen-Resonanz kann der Immobilisierungsumfang überprüft werden. Die Klärung der strukturellen Ausrichtung erfolgte mittels Sandwichassays. Da dieses bei Enzymen nicht möglich ist, erfolgte die Funktionskontrolle photometrisch. Dabei kommt es durch die Verwendung geeigneter Substrate zur Ausbildung von Radikalkationen, die sich in einer Farbreaktion photometrisch auswerten lassen. Dadurch ist eine Aussage zur Güte der Immobilisierung möglich.

IV.2.1. Vorbereitung der SPR-Küvetten

Die Inkubation geeigneter Substrate zur photometrischen Funktionskontrolle erfolgte in der Messkavität. Dazu ist es erforderlich, eine Adsorption des Biomoleküls an der Küvettenwandung zu verhindern. Dafür wurden die SPR-Küvetten 30 min in einer BSA-Lösung ($c = 25 \text{ mg}/15 \text{ ml}$ Wasser) auf einem Probenschüttler (250 U/min) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Trocknung unter Vakuum.

IV.2.2. Immobilisierung von Phenoloxidasen

Die zur Familie der Typ-3-Kupferproteine zählende Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1, Monophenol-Monooxygenase) und zwei Laccasen (E.C. 1.10.3.2, O₂-Oxidoreduktasen) wurden zur Immobilisierung verwendet. Eingeteilt nach fungaler und pflanzlicher Herkunft sind Laccasen kupferhaltige Phenoloxidasen, die phenolische Substrate zu Phenoxy-Radikalen oxidieren. Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind fungaler Herkunft und stammen aus den Basidiomyceten *Agaricus bisporus* (Tyrosinase, Laccase) und *Trametes versicolor* (Laccase).

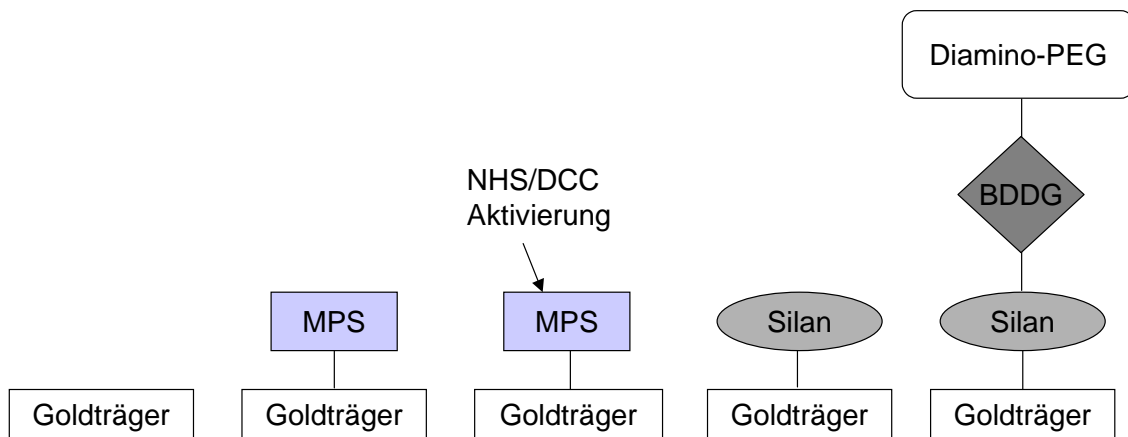


Abbildung 80: Vergleich der Beschichtungsmethoden bei der Immobilisierung von Phenoloxidasen auf funktionalisierten Goldträgern.

Es kamen fünf Beschichtungsmethoden zum Einsatz, von denen eine auf gereinigten, nicht funktionalisierten Goldträgern durchgeführt wurde. Zwei Immobilisierungsstrategien wurden auf MPS beschichteten Oberflächen durchgeführt, von denen eine mit NHS/DIC aktiviert war. Eine Immobilisierung erfolgte auf aminosilanisierten Goldträgern. Eine weitere wurde auf Diamino-PEG Oberflächen durchgeführt. Hierzu war es jedoch erforderlich, vor der Antikörper-Immobilisierung die freie Aminogruppe des immobilisierten Diamino-PEG mit Bernsteinsäureanhydrid zu einer Carboxylgruppe umzusetzen (Abb. 70).

Die Messkavität wurde mit 10 µl 0,2 M Natriumphosphatpuffer (pH 5,5) befüllt. Nach Zugabe von 10 µl Enzymlösung (0,5 mg/ml) wurde der Kavitäteninhalt zu Beginn der 30-minütigen Inkubation 5 min durchmischt.

IV.2.3. Photometrische Funktionskontrolle immobilisierter Phenoloxidasen mit ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat])

Die Aktivität der immobilisierten Phenoloxidasen wurde durch Modifizierung bestehender Farbausays mit Syringaldazin oder ABTS photometrisch bestimmt. Beides sind Diazo-Verbindungen, die nach enzymatischer Umsetzung farbige Radikalkationen ausbilden (Abb. 81).

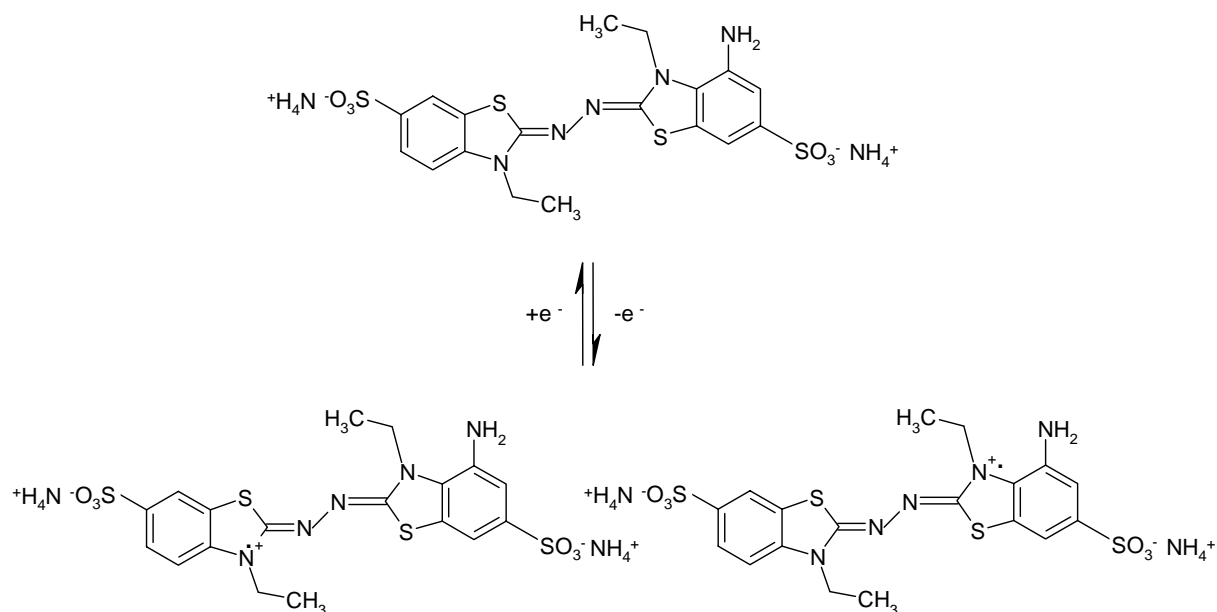


Abbildung 81: Bildung des ABTS-Kationradikals (unten) aus ABTS (oben) durch Laccase.

In Abbildung 81 ist die enzymatische Umsetzung von ABTS zum Radikalkation durch Laccase dargestellt. Die chemische Reaktion ist bei Syringaldazin (Abb. 39) identisch. Für die Absorptionsmessung der Tyrosinase wurde Brenzkatechin als Substrat verwendet. Nach Aufzeichnung der Bindungskinetiken wurden die einzelnen Kavitäten bis auf ein Volumen von 5 μl entleert. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 30 μl der Substratlösungen (ABTS bei Laccasen, Brenzkatechin bei Tyrosinase) in die jeweiligen Kavitäten. Die unter Lichtausschluss ausgeführte fünfminütige Inkubation wurde durch Zugabe von 5 μl einer 8 %igen H_2SO_4 beendet. Nach der Überführung von 30 μl des Reaktionsansatzes in eine Mikroküvette erfolgte die photometrische Messung bei 420 nm (Brenzkatechin, ABTS) oder 530 nm (Syringaldazin). Bis zum Abstoppen der Reaktion konnten alle Reaktionsschritte auch innerhalb („online“) des SPR-Gerätes durchgeführt werden.

IV.2.4. Farbassay mit Syringaldazin

Eine Inkubation der Enzyme mit dem Substrat Syringaldazin sollte zu einer Violettfärbung durch die Bildung von Radikalkationen führen. Sowohl in Natriumacetatpuffer als auch in Natriumacetat-Methanol-Gemischen wurde das Reagenz gelöst in die Messkavität eingesetzt. Die photometrische Messung führte zu keinen messbaren Ergebnissen. Verlängerte Inkubationszeiten und verschiedene Konzentrationen führten zum gleichen Ergebnis. Alle Versuche wurden daraufhin mit ABTS als Substrat durchgeführt.

IV.2.5. Laccase aus *Agaricus bisporus*

Die Aktivitätsbestimmung immobilisierter Enzyme gliederte sich in zwei Schritte. Zur Beurteilung geeigneter Immobilisierungsstrategien dienten die Aufnahmen der Bindungskurve. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit und Substratspezifität erfolgte anschließend photometrisch. Geeignete Immobilisierungsstrategien sollten durch vergleichen der Absorptionswerte mit den ermittelten Schichtdickenzunahmen erarbeitet werden. Dazu wurden die in Abb. 80 dargestellten Beschichtungsstrategien getestet.

In die Messkavität wurde 10 μ l 0,2 M Natriumphosphatpuffer (pH 5,5) vorgelegt und nach Einstellung der Basislinie mit der Enzymlösung (c = 0,5 mg/ml) auf 20 μ l aufgefüllt. Der Kavitäteninhalt wurde zu Beginn der 30-minütigen Inkubation 5min durchmischt.

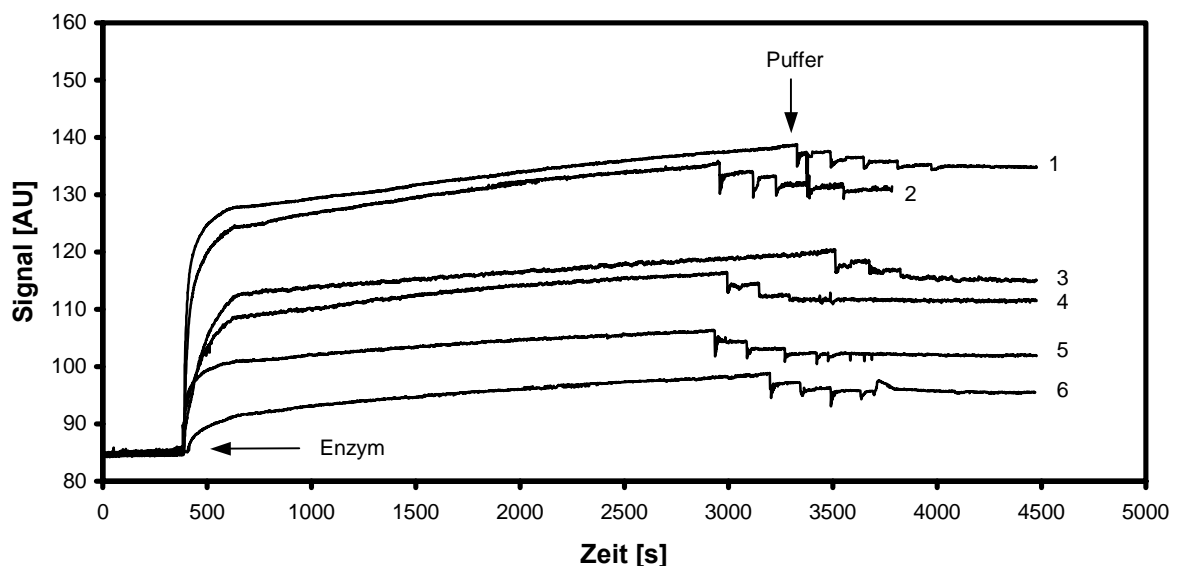


Abbildung 82: SPR-Sensorgramme der Immobilisierung der Laccase aus *Agaricus bisporus* (0,5 mg/ml) auf unterschiedlich funktionalisierten Goldoberflächen: ohne Funktionalisierung (1), 3-Aminopropyltriethoxysilan (2), Mercaptopropionsäure ohne NHS/DIC-Aktivierung (3), Mercaptopropionsäure mit NHS/DIC (4), Diamino-PEG (5) und ohne Funktionalisierung mit BSA geblockt (6).

Die Bindungskurven zeigten bei der Immobilisierung der Laccase aus *Agaricus bisporus* einen Anstieg von 8-25 AU/10 s (Abb. 82). Mit 47 ± 2 AU wurde der höchste Schichtdickenzuwachs bei der Immobilisierung auf einem gereinigten, nicht funktionalisierten Goldprisma ermittelt (Abb. 83).

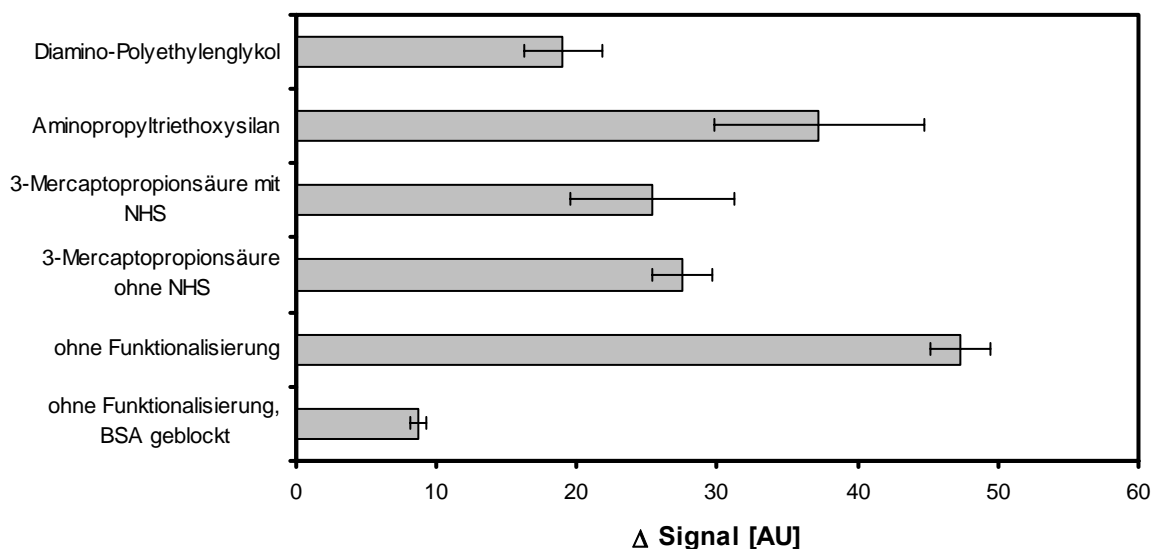


Abbildung 83: Vergleichende Darstellung der mittels SPR ermittelten Signaldifferenzen der aus *Agaricus bisporus* immobilisierten Laccase bei unterschiedlichen Immobilisierungsverfahren.

Die Immobilisierung auf einem aminosilanisierten Goldträger führte zu einer Schichtdickenzunahme von 38 ± 6 AU. Für MPS beschichtete Goldprismen wurden 26 ± 2 AU (nicht NHS/DIC aktiviert) und 28 ± 6 AU (aktiviert) ermittelt. Die Zuwächse lagen somit 42 % und 47 % unterhalb der durchschnittlichen Signalzunahme nicht funktionalisierter, ungeblockter Goldprismen. Zwar differierte die Signalzunahme zwischen beiden Strategien nur um 5 %, doch war die Standardabweichung bei NHS/DIC aktivierten MPS-Oberflächen mehr als 300 % höher. Signalzunahmen von 19 ± 3 AU wurden mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt und mit NHS/DIC aktivierten Diamino-PEG Oberflächen gemessen. Die geringsten Zuwächse wurden mit 9 ± 1 AU auf BSA geblockten, nicht funktionalisierten Oberflächen gemessen.

Aussagen zur Funktionsfähigkeit waren erst nach der photometrischen Funktionskontrolle mit 1 M ABTS möglich. Alle immobilisierten Laccasen, deren aktives Zentrum für das Substrat frei zugänglich war, konnten dieses zu Radikalkationen umsetzen (Abb. 81). Somit muss ein hoher Schichtdickenzuwachs nicht unbedingt mit einer hohen Absorption korrelieren.

Bei BSA geblockten, nicht funktionalisierten Oberflächen wurde eine Absorption von $0,17 \pm 0,06$ AU gemessen. Die Absorption bei nicht funktionalisierten Oberflächen betrug

$0,5 \pm 0,07$, bei NHS/DIC aktivierten MPS-Oberflächen $0,48 \pm 0,06$ (Abb. 84). Die Differenz betrug bei Berechnung der Schichtdicke zwischen beiden Methoden noch 42 %. Nach der Absorptionsmessung verringerte sich diese auf etwa 4 %.

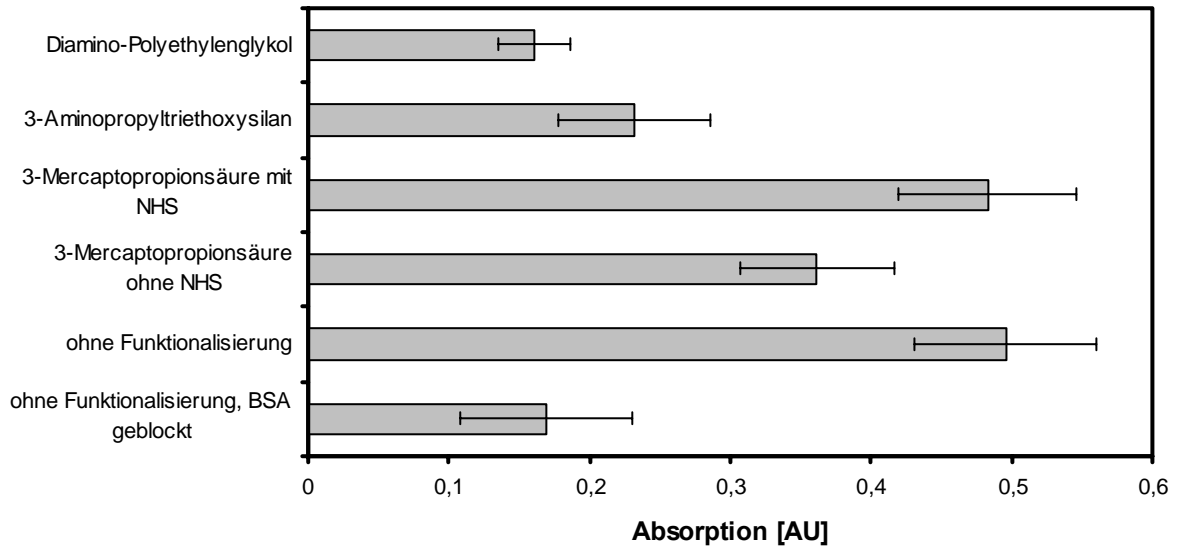


Abbildung 84: Photometrische Funktionskontrolle der mittels verschiedener Strategien immobilisierten Laccase aus *Agaricus bisporus*. Dargestellt sind die Absorptionswerte mit 1 mM ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat])-Lösung. Je höher der Absorptionswert, desto höher die Aktivität des immobilisierten Enzyms.

Auf nicht aktivierten MPS-Oberflächen wurde eine Absorption von $0,36 \pm 0,05$ ermittelt, die 25 % unter dem Durchschnittswert aktivierter MPS-Oberflächen lag. Die Absorption immobilisierter Laccasen auf aminosilanisierten Oberflächen war unter Berücksichtigung eines Schichtdickenzuwachses von 37 ± 8 AU mit $0,23 \pm 0,05$ gering. Die photometrische Funktionsanalyse ergab für Diamino-PEG mit $0,16 \pm 0,03$ die geringste Absorption.

Die Immobilisierung der Laccase aus *Agaricus bisporus* führte bei nicht funktionalisierten und mit NHS/DIC aktivierten MPS beschichteten Goldträgern zu den höchsten Absorptionswerten (Tab. 15).

IV.2.6. Laccase aus *Trametes versicolor*

Mit der Laccase aus dem Schmetterlingsporling (*Trametes versicolor*) sollten weitere Versuche zur Immobilisierung und Funktionsfähigkeit durchgeführt werden. Die biologische Funktion stimmt mit der Laccase aus *Agaricus bisporus* überein. Unterschiede bestehen hinsichtlich des Molekulargewichtes und der Aktivität. Das Molekulargewicht der aus

Agaricus bisporus extrahierten Laccase beträgt 65,0 kDa, die aus *Trametes versicolor* 53,3 kDa. Die Aktivität der verwendeten Laccase aus *Trametes versicolor* war um den Faktor 4,25 höher, weshalb eine ABTS-Konzentration von 0,1 mM eingesetzt wurde. Die Durchführung erfolgte unter denselben Bedingungen wie in Kapitel IV.2.5.

SPR-Messungen

Wie bereits in Abb. 80 dargestellt, wurden vier funktionalisierte und eine nicht funktionalisierte Goldoberfläche getestet. Dazu wurde die Messkavität mit 10 μ l eines 0,2 M Natriumphosphatpuffers (pH 5,5) befüllt. Nach Einstellung der Basislinie erfolgte die Zugabe von 10 μ l Enzymlösung ($c = 0,5$ mg/ml). Anschließend wurde der Kavitäteninhalt zu Beginn der 30-minütigen Inkubation 5 min durchmischt.

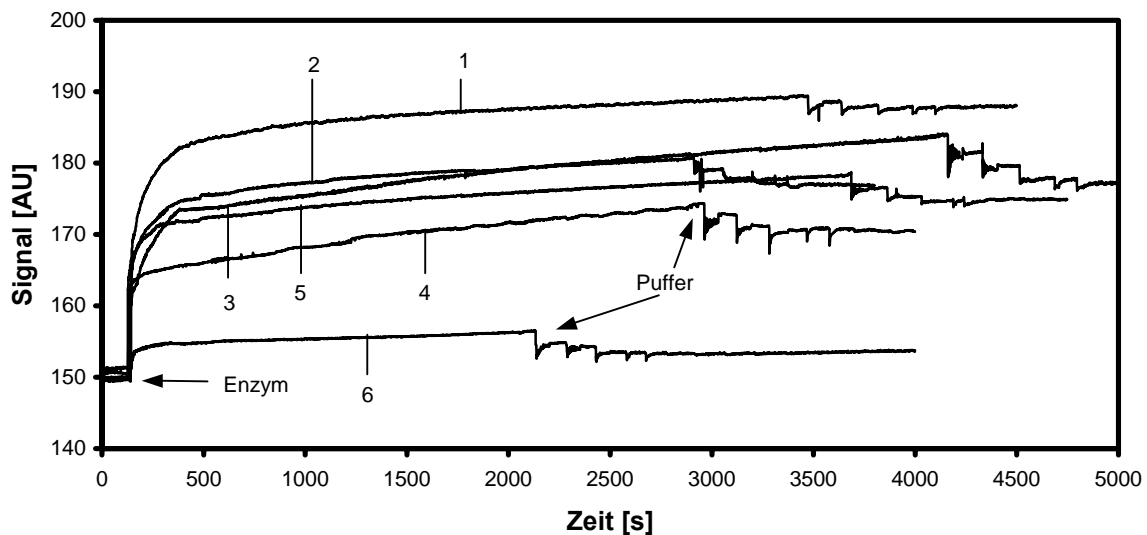


Abbildung 85: SPR-Sensorgramme der Immobilisierung der Laccase aus *Trametes versicolor* ($c = 0,5$ mg/ml) auf unterschiedlich funktionalisierten Goldoberflächen: ohne Funktionalisierung (1), Mercaptopropionsäure ohne NHS/DIC-Aktivierung (2), Mercaptopropionsäure mit NHS/DIC-Aktivierung (3), 3-Aminopropyltriethoxysilan (4), Diamino-PEG (5) und ohne Funktionalisierung mit BSA geblockt (6).

Die höchsten Schichtdickenzunahmen wurden bei der Verwendung eines gereinigten, nicht funktionalisierten Goldträgers ermittelt (Abb. 85). Mit 34 ± 2 AU lag der Schichtdickenzuwachs 28 % unter dem immobilisierter Laccase aus *Agaricus bisporus*.

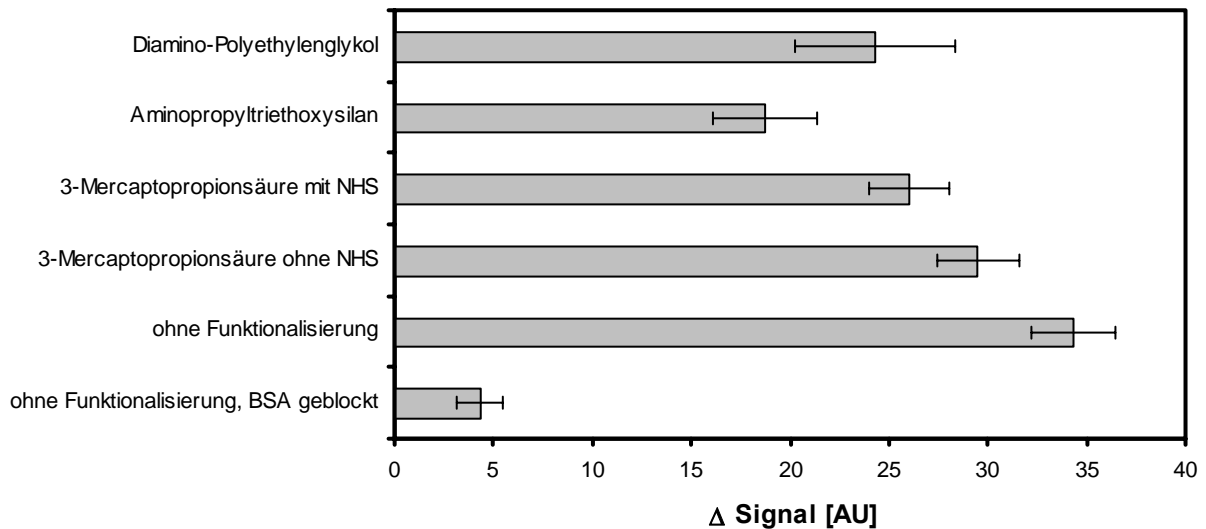


Abbildung 86: Vergleichende Darstellung der mittels SPR ermittelten Schichtdickenzunahmen der aus *Trametes versicolor* immobilisierten Laccase bei unterschiedlichen Immobilisierungsverfahren.

Die Immobilisierung auf NHS/DIC aktivierten MPS-Oberflächen führte zu einer Schichtdickenzunahme von 26 ± 2 AU und 29 ± 2 AU bei nicht aktivierten Oberflächen. Die Bindungskurven verliefen bei allen hyperbolisch. Für Diamino-PEG wurde ein Schichtdickenzuwachs von 24 ± 4 AU, für aminosilanisierten Oberflächen von 18 ± 3 AU ermittelt. Der geringste Zuwachse an Schichtdicke wurde bei nicht funktionalisierten, BSA geblockten Oberflächen beobachtet. Mit 4 ± 1 AU lag der Schichtdickenzuwachs 50 % unter dem immobilisierter Laccase aus *Agaricus bisporus*.

Photometrische Funktionskontrolle

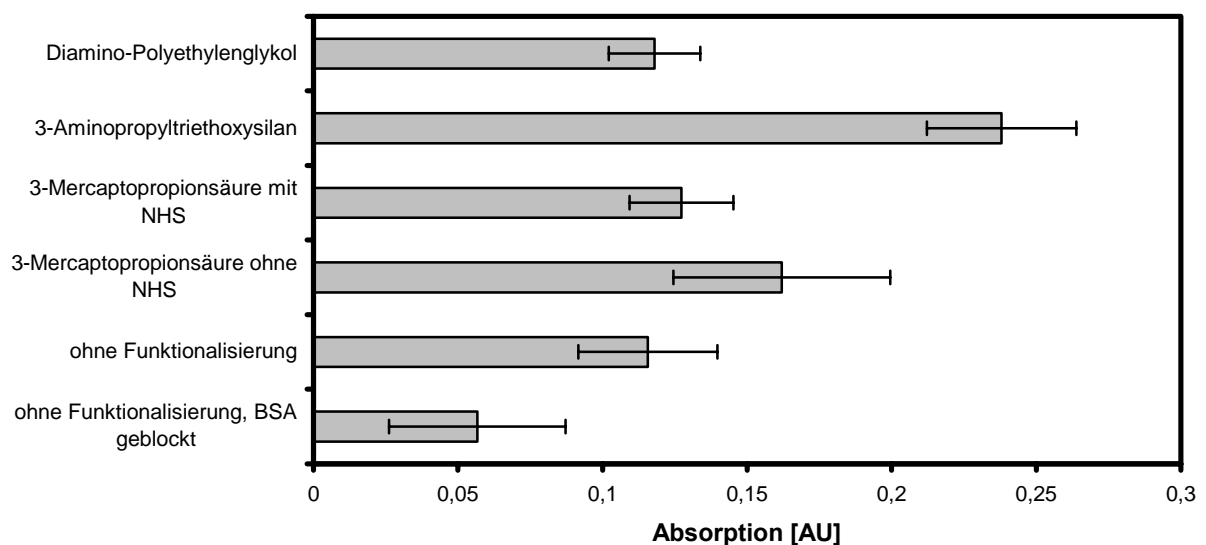


Abbildung 87: Photometrische Funktionskontrolle der mittels verschiedener Strategien immobilisierten Laccase aus *Trametes versicolor*. Dargestellt sind die Absorptionswerte bei Verwendung von 0,1 mM 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat]-Lösung (ABTS) als Substrat. Je höher der Absorptionswert, desto höher die Aktivität des immobilisierten Enzyms.

Bei der photometrischen Funktionskontrolle wurde die höchste Absorption mit $0,24 \pm 0,03$ bei der Immobilisierung auf aminosilanisierten Trägern ermittelt (Abb. 87). Die Aufzeichnung der Bindungskinetik ergab für diese Immobilisierungsstrategie den geringsten Schichtdickenzuwachs. Mit $0,16 \pm 0,04$ bzw. $0,13 \pm 0,02$ für nicht aktivierte bzw. aktivierte MPS-Oberflächen wurden Absorptionswerte gemessen, die mit den ermittelten Schichtdickenzuwächsen korrelierten. Die Absorption betrug bei nicht funktionalisierten Oberflächen $0,12 \pm 0,03$. Derselbe Wert $0,12 \pm 0,02$ wurde bei Diamino-PEG Oberflächen gemessen (Tab. 15). Mit $0,06 \pm 0,03$ wurde bei BSA geblockten, nicht funktionalisierten Oberflächen die geringste Absorption ermittelt. Diese Werte korrelierten mit den geringen Schichtdickenzuwächsen von 4 ± 1 AU.

In Bezug zu den SPR-Sensorgrammen erfolgte erst mit Hilfe der photometrischen Funktionskontrolle eine genauere Aussage zur Güte der Immobilisierungsstrategien. Sterische Hinderung des Substrats zum aktiven Zentrum, Änderungen der Proteinkonformation, sowie Änderungen der Dissoziationskonstanten basischer und saurer Seitenketten (Änderung der elektrischen Ladungsverteilung) sind Faktoren, die dann bei der Charakterisierung der Immobilisierungsstrategien berücksichtigt werden müssen.

Konzentrationsabhängigkeit immobilisierter Laccasen auf aktivierten Mercaptopropionsäure-Oberflächen

Eine mögliche Abhängigkeit der Schichtdickenzunahme und der Absorption von der Enzymkonzentration wurde mit einer Versuchsreihe der Laccase aus *Trametes versicolor* auf aktivierten MPS-Oberflächen getestet. Alle bisher mit Laccasen durchgeführten Messungen erfolgten mit einer Konzentration von 0,3 mg/ml. Für die Messungen wurden mehrere Enzymkonzentrationen von 0,2 mg/ml bis 1 mg/ml, in 0,2 mg/ml-Schritten, auf einer mit NHS/DIC aktivierten MPS-Oberfläche aufgebracht. Nach Zugabe von 10 µl eines 0,2 M Natriumphosphatpuffers (pH 5,5) in die Messkavität wurden von jeder Enzymlösung 10 µl in je eine Kavität gegeben. Anschließend wurde der Kavitäteninhalts zu Beginn der 30-minütigen Inkubation 5 min durchmischt.

Nach Aufzeichnung der Bindungskurven wurden die Schichtdickenzuwächse ermittelt und gegen die eingesetzten Laccasekonzentrationen aufgetragen. Anschließend wurde die Regressionsgerade berechnet (Abb. 88).

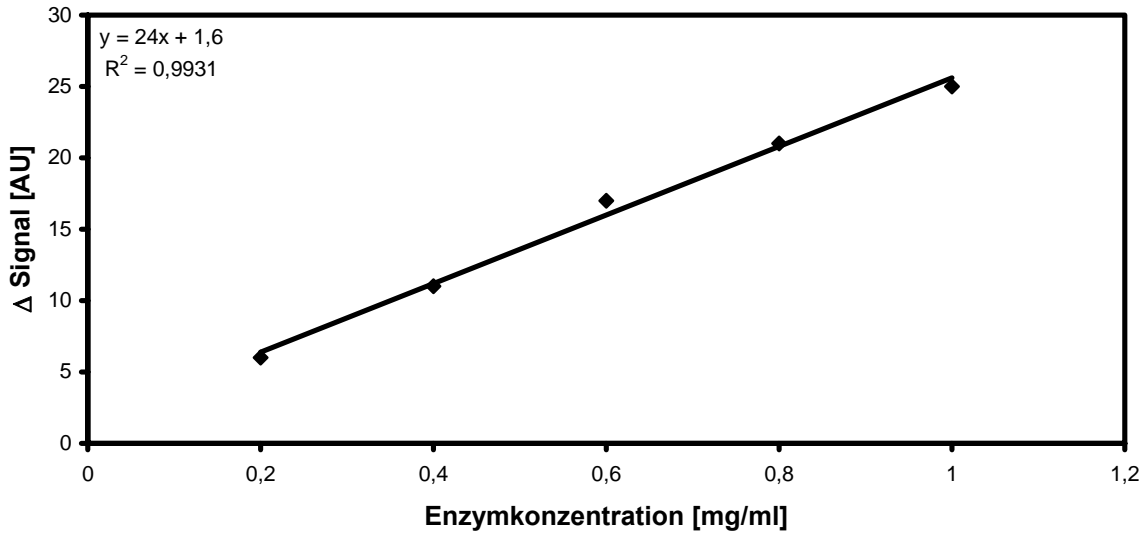


Abbildung 88: Abhängigkeit des Signals von der Konzentration der Laccase aus *Trametes versicolor* auf einen mit 3-Mercaptopropionsäure beschichteten und mit NHS/DIC aktivierten Goldchip.

Als Maß für die Güte des gewählten Regressionsansatzes wurde der Determinationskoeffizient oder Bestimmtheitskoeffizient r^2 als das Quadrat des Korrelationskoeffizienten zwischen x und y angegeben. Für die Konzentrationsabhängigkeit der Signaldifferenzen wurde ein Determinationskoeffizient von 0,9931 ermittelt. Je größer r^2 , desto höher der Anteil der durch die Enzymkonzentration erklärten Streuung des Signals. Somit liegt r^2 zwischen 0 und 1, wobei $r^2 = 0$ bedeutete, dass Laccasekonzentration und Signaldifferenz unkorreliert waren. Ist $r^2 = 1$ würden die x - und y -Werte eine Gerade bilden. Eine lineare Abhängigkeit der Signaldifferenz von der eingesetzten Enzymkonzentration wurde durch das Bestimmtheitsmaß von 0,9931 ermittelt.

Ob diese Linearität auch bei der Absorption auftrat, wurde durch eine photometrische Funktionskontrolle mit 0,5 mM ABTS getestet. Die ermittelten Absorptionswerte wurden gegen die eingesetzte Enzymkonzentration aufgetragen. Im Anschluss daran folgte wiederum die Berechnung einer Ausgleichsgeraden (Abb. 89).

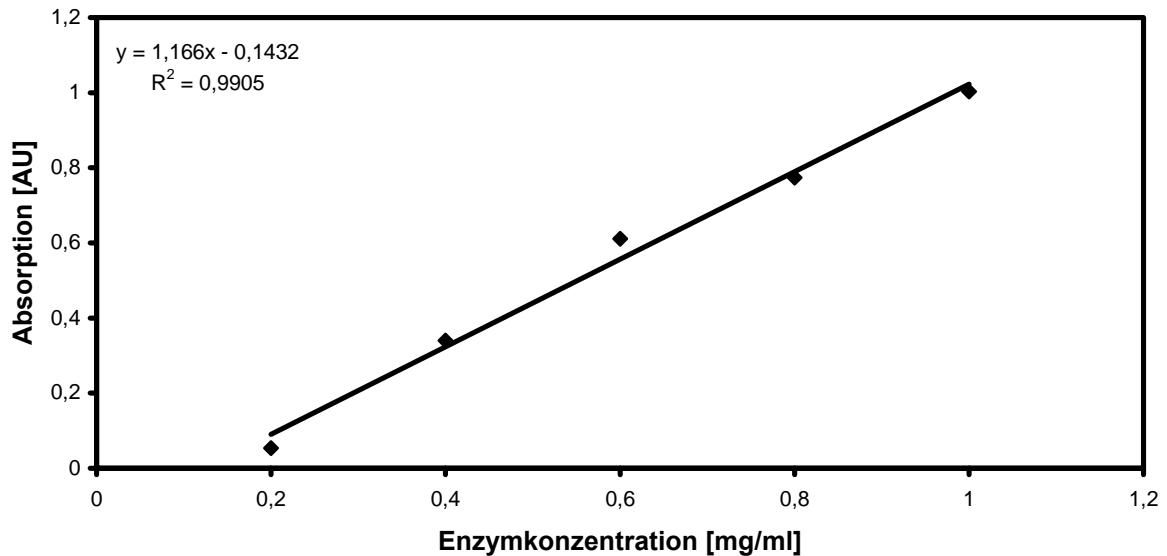


Abbildung 89: Abhängigkeit der Absorption von der Konzentration der Laccase aus *Trametes versicolor* auf einen mit 3-Mercaptopropionsäure beschichteten und mit NHS aktivierten Goldchip. Im Anschluss daran erfolgte eine photometrische Funktionskontrolle mit 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonat].

Verglichen mit der Signalabhängigkeit wurde mit $r^2 = 0,9905$ ein nahezu gleicher Determinationskoeffizient ermittelt. Eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration wurde demnach sowohl bei der Zunahme des Bindungssignals als auch bei Messung der Absorption beobachtet.

IV.2.8. Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*

Die Tyrosinase, eine Monophenol-Monooxygenase, wurde als weiteres mit den Laccasen funktionell verwandtes Typ-3-Kupferprotein verwendet. Verglichen mit den Laccasen besitzt das aus dem Basidiomyceten *Agaricus bisporus* stammende Enzym mit 125 kDa ein nahezu doppelt so hohes Molekulargewicht. Die Aufnahme der Bindungskinetik und die anschließende photometrische Funktionskontrolle erfolgte analog der Durchführung bei Laccasen (siehe Kapitel IV.2.5.). Die Absorptionmessungen wurden mit einer 5 mM Bernsteinsäurelösung anstelle von ABTS (siehe Kapitel IV.2.3.) durchgeführt.

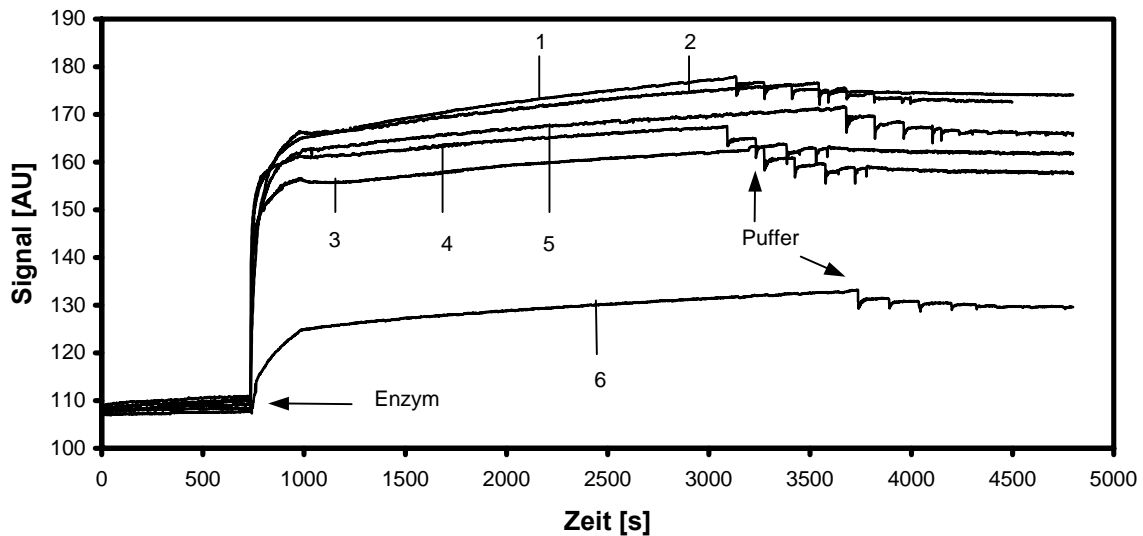


Abbildung 90: SPR-Sensorgramme der Immobilisierung von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (0,5 mg/ml) auf unterschiedlich funktionalisierten Goldoberflächen: ohne Funktionalisierung (1), 3-Aminopropyltriethoxysilan (2), Mercaptopropionsäure mit NHS/DIC-Aktivierung (3), Mercaptopropionsäure ohne NHS/DIC-Aktivierung (4), Diamino-PEG (5) und ohne Funktionalisierung mit BSA geblockt (6).

Die höchsten Schichtdickenzunahmen wurden mit 61 ± 6 AU bei der Verwendung eines aminosilanisierten Goldträgers ermittelt (Abb. 90). Die Immobilisierung auf NHS/DIC aktivierten MPS-Oberflächen führte zu einer Schichtdickenzunahme von 56 ± 4 AU und 53 ± 5 AU bei nicht aktivierten Oberflächen. Bei Verwendung einer Diamino-PEG Oberfläche wurde eine Zunahme der Schichtdicke von 49 ± 1 AU gemessen.

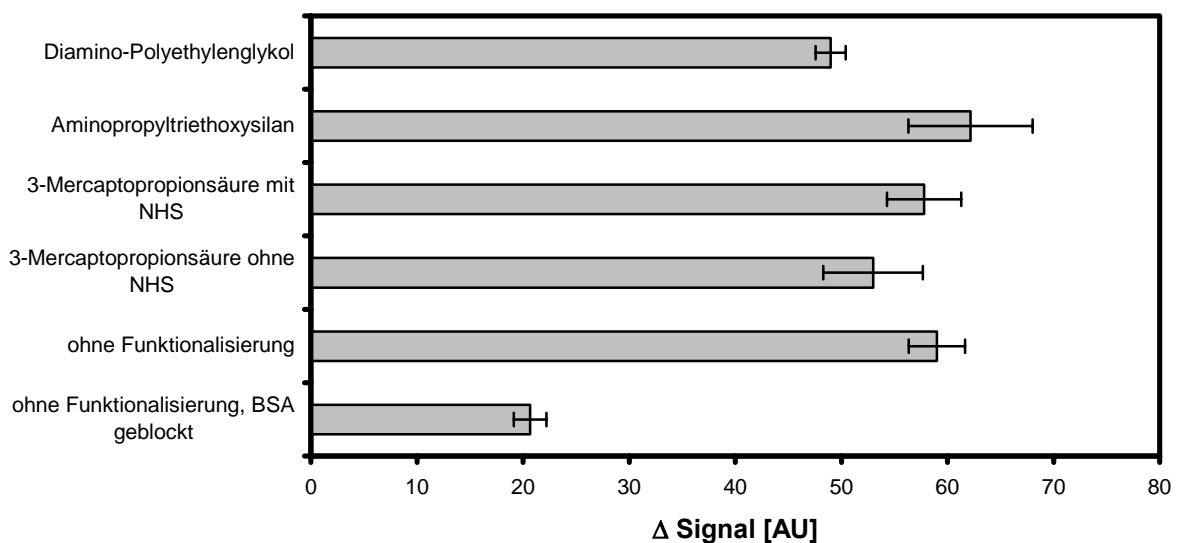


Abbildung 91: Vergleichende Darstellung der mittels SPR ermittelten Schichtdickenzunahmen der aus *Agaricus bisporus* immobilisierten Tyrosinase bei unterschiedlichen Immobilisierungsstrategien.

Bei der Verwendung eines mit BSA geblockten, nicht funktionalisierten Goldträgers wurde ein Schichtdickenzuwachs von 21 ± 2 AU ermittelt, 60 ± 3 AU bei nicht geblockten Goldträgern. Alle Messungen zeigten einen hyperbolischen Verlauf der Bindungskurve.

Für die Kupplung der Tyrosinase auf nicht funktionalisierten Oberflächen wurde mit $0,38 \pm 0,03$ die höchste Absorption gemessen. Die geringste Absorption wurde mit $0,09 \pm 0,01$ bei nicht funktionalisierten, BSA geblockten Oberflächen ermittelt. Alle funktionalisierten Oberflächen lagen zwischen 39 % und 51 % unterhalb dieser Absorption. (Abb. 92).

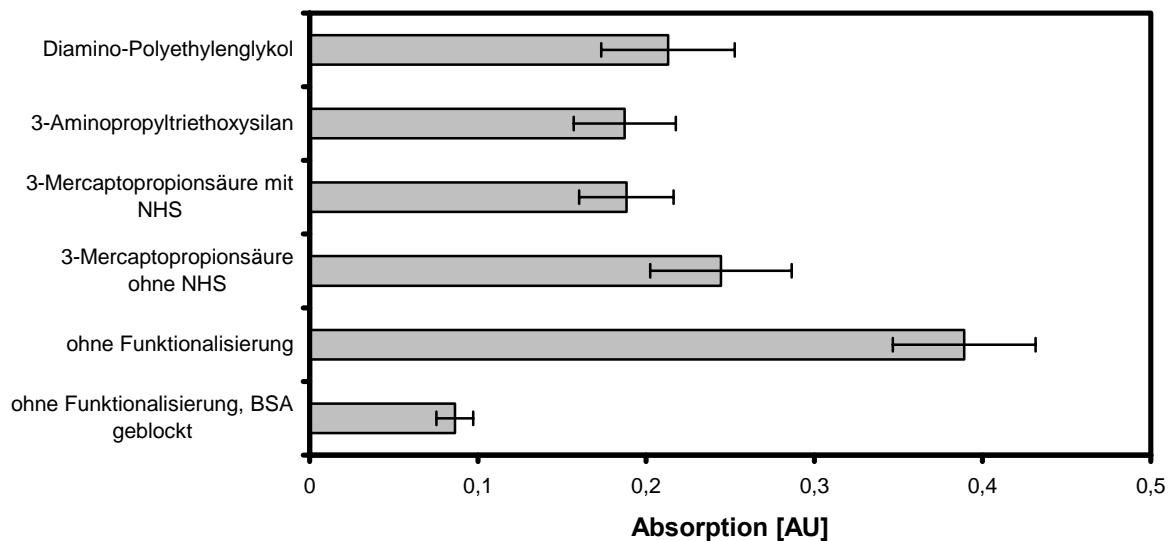


Abbildung 92: Photometrische Funktionskontrolle der mittels verschiedener Strategien immobilisierten Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Dargestellt sind die Absorptionswerte mit dem Substrat Brenzkatechin ($c = 5$ mM). Je höher der Absorptionswert, desto höher die Aktivität des immobilisierten Enzyms.

Mit $0,23 \pm 0,02$ bzw. $0,19 \pm 0,03$ für nicht aktivierte bzw. aktivierte MPS-Oberflächen wurden Absorptionswerte gemessen, die mit den ermittelten Schichtdickenzuwächsen korrelierten (Tab. 14). Die Absorption immobilisierter Laccasen auf aminosilanisierten Oberflächen war unter Berücksichtigung eines Schichtdickenzuwachses von 62 ± 6 AU, mit $0,19 \pm 0,03$ sehr gering. Die Absorption für Diamino-PEG Oberflächen betrug $0,21 \pm 0,04$. Bei gereinigten, nicht funktionalisierten Oberflächen, korrelierte die Absorption mit dem ermittelten Schichtdickenzuwachs. Die höchsten Schichtdickenzuwächse wurden auf aminosilanisierten Oberflächen gemessen. Mit 0,19 war jedoch die ermittelte Absorption am geringsten und wies den gleichen Wert auf wie für NHS/DIC aktivierte MPS-Oberflächen.

Auf nicht aktivierten MPS-Oberflächen wurde eine Absorption von $0,36 \pm 0,05$ ermittelt, die 25 % unter dem Durchschnittswert aktivierter MPS-Oberflächen lag. Die Absorption immobilisierter Laccasen auf aminosilanisierten Oberflächen war unter Berücksichtigung

eines Schichtdickenzuwachses von 37 ± 8 AU mit $0,23 \pm 0,05$ gering. Die photometrische Funktionsanalyse ergab für Diamino-PEG mit $0,16 \pm 0,03$ die geringste Absorption.

Die Immobilisierung der Laccase aus *Agaricus bisporus* führte bei nicht funktionalisierten und mit NHS/DIC aktivierten MPS beschichteten Goldträgern zu den höchsten Absorptionswerten (Tab. 15).

Tabelle 14 zeigt zusammenfassend die Schichtdickenzunahmen aller immobilisierten Phenoloxidasen (Laccasen, Tyrosinase) der verschiedenen Versuche zur Erarbeitung geeigneter Immobilisierungsstrategien auf SPR-Basis. In Tabelle 15 sind die dazu gemessenen Absorptionswerte aufgeführt.

Immobilisierungsstrategie	<i>Agaricus bisporus</i> [AU]	<i>Trametes versicolor</i> [AU]	Tyrosinase [AU]
nicht funktionalisiert	47 ± 2	34 ± 2	59 ± 3
nicht funktionalisiert, BSA geblockt	9 ± 1	4 ± 1	21 ± 2
3-Aminopropyltriethoxysilan	38 ± 8	18 ± 3	62 ± 6
MPS mit NHS/DIC aktiviert	27 ± 2	26 ± 2	56 ± 4
MPS ohne NHS/DIC aktiviert	28 ± 6	29 ± 2	53 ± 5
Diamino-PEG	19 ± 3	24 ± 4	49 ± 1

Tabelle 14: Bindungsdaten der Versuche zur Immobilisierung von Phenoloxidasen auf unterschiedlich funktionalisierten Goldträgern.

Immobilisierungsstrategie	<i>Agaricus bisporus</i> [AU]	<i>Trametes versicolor</i> [AU]	Tyrosinase [AU]
nicht funktionalisiert	$0,50 \pm 0,07$	$0,12 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,03$
nicht funktionalisiert, BSA geblockt	$0,17 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,07$	$0,08 \pm 0,01$
3-Aminopropyltriethoxysilan	$0,23 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,03$
MPS ohne NHS/DIC aktiviert	$0,35 \pm 0,05$	$0,16 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,04$
MPS mit NHS/DIC aktiviert	$0,48 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,03$
Diamino-PEG	$0,16 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,04$

Tabelle 15: Absorptionswerte der Versuche zur Immobilisierung von Phenoloxidasen auf unterschiedlich funktionalisierten Goldträgern.

IV.3. Entwicklung eines Mikro-CE-Systems auf LTCC-Basis

Die Entwicklung eines Mikrototalanalytensystems auf LTCC-Keramikchips setzte die Herstellung neuer Messkomponenten voraus. Neben einer speziellen, auf den Mikrochip angepassten Kontaktierung lag ein weiterer Schwerpunkt auf der Entwicklung eines effektiven Befüllungssystems der Mikrokapillaren. Anschließend sollte das System durch ein Hochspannungsnetzgerät und einen Potentiostaten zur Prozesskontrolle komplettiert werden.

IV.3.1. Hochspannungsnetzgeräte (HSPG)

Um die für die CE nötige hohe Feldstärke zu liefern, ist eine regelbare Gleichspannungsquelle erforderlich. Die über den Trennkanal angelegte Hochspannung ermöglicht eine Trennung der Proben auf Grund ihrer Ladung und Größe. Die in dieser Arbeit eingesetzten Hochspannungsnetzgeräte unterschieden sich in Aufbau, Spezifikation und Einsatzbereich (Kapitel III.3.).

Die mit dem MCN-35-2000, F.u.G. Rosenheim (Abb. 45), durchgeführten amperometrischen Messungen beschränkten sich ausschließlich auf eine nicht elektrokinetische Probeninjektion. Sowohl Injektion als auch Trennung erfolgten dabei über den Trennkanal (Trennkanalinjektion).

Zur Verringerung der Probenmenge wurde die Probe mittels elektrokinetischer Verfahren über einen Injektionskanal aufgetragen. Dafür war ein Hochspannungsnetzgerät mit einzeln ansteuerbaren Hochspannungskontakten nötig (siehe Kapitel III.3.). Das erste von der Firma VIAelectronic, Hermsdorf, entwickelte HSPG genügte nicht den geforderten Ansprüchen, so dass ein eigenes konstruiert und gebaut wurde (Abb. 46).

Das Hochspannungsnetzgerät (Eigenbau) wurde mit einem programmierbaren SPS-Steuerrelais von Siemens (Siemens LOGO! 12/24RC, München) ausgestattet. Außerdem wurden ein integrierter Gleichstromwandler (DC/DC-Wandler) und ein Hochspannungsnetzteil mit einer maximalen Ausgangsspannung von 1100 V verwendet. Durch eine modulartige Konstruktion ist ein schneller Austausch einzelner Komponenten, wie dem Hochspannungsnetzteil, möglich.

Die Vorteile dieses Hochspannungsnetzgerätes sind:

- leichte Bedienbarkeit durch Programmsteuerung
- geringe Herstellungskosten
- einfache, modulartige Bauweise

Das andere Hochspannungsnetzgerät zur elektrokinetischen Injektion wurde nach zahlreichen Modifikationen ebenfalls für die elektrokinetische Injektion verwendet.

IV.3.2. Befüllung mikrofluidischer Systeme bei LTCC-Keramikchips

Neben der Konstruktion eines neuen „Lab-on-a-chip“-Systems auf LTCC-Basis sollte auch eine geeignete Methode zur blasenfreien Befüllung des mikrofluidischen Systems entwickelt werden. Hydrodynamische Verfahren mit Druck oder Vakuum sind aufgrund des Fehlens geeigneter Komponenten nur unzureichend auf die Keramikchips übertragbar. Somit wurde mittels NanoPorts™ der Fa. Upchurch Scientific, Oak Harbor, USA, ein neues Befüllungssystem auf LTCC-Keramikchips adaptiert (siehe Kapitel III.3.4.).

Der aus PEEK bestehende Port wurde über die Kapillaröffnung des „Pufferauslasses“ positioniert und mittels O-Ring gegen seitlichen Flüssigkeitsverlust abgedichtet. Anschließend wurden die Kapillaren über ein System aus Kapillar- und Pumpschläuchen mit Elektrolytlösung blasenfrei befüllt.

IV.3.3. Chiphalterungen mit integrierter Kontaktierung

Wichtig für die amperometrischen Detektion war eine geeignete Halterung zur Fixierung des Chips (Abb. 93).

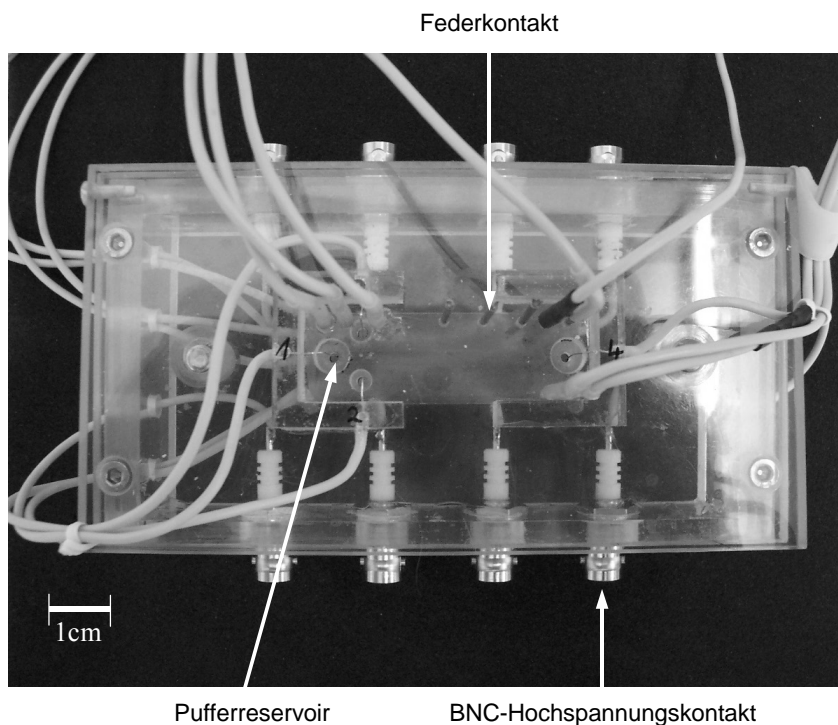


Abbildung 93: Chiphalterung der Hofmann-Sensor-Systeme, Wallenfels.

Die amperometrischen Messungen wurden mit zwei, vom Grundaufbau her identischen Chiphalterungen durchgeführt. Diese bestanden aus einem miteinander zu verschraubenden Unterbau und einem Deckel mit integrierten Federkontakten. Die im Deckel vorhandenen Reservoirs wurden mit O-Ringen zum Chip hin abgedichtet (Abb. 47).

Die von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung gefertigte Chiphalterung mit halbkugelförmigen Kontakten (Technische Entwicklungsabteilung der GBF, Braunschweig) wurde nur für die Trennkanalinjektion verwendet (GBF-Halterung). Die Halterung von HSS (Hofmann-Sensor-Systeme, Wallenfels) mit spitzen Elektrodenkontakten wurde darüber hinaus für alle elektrokinetischen Messungen eingesetzt (HSS-Halterung). Außerdem erfolgte der Einbau von BNC-Hochspannungskontakten und einer Messanordnung mit externen Platinkontakten. Die äußeren Elektrodenkontakte wurden bei beiden Halterungen über Federkontakte aus Gold, die im Deckel der Halterung befestigt waren, abgegriffen.

IV.3.4. Einfluss elektrischer und elektromagnetischer Störimpulse

Mit Hilfe der Kapillaronenelektrophorese auf Mikrochips sollten Polyphenole aufgrund ihrer Migrationszeiten getrennt und amperometrisch detektiert werden. Da die gemessenen Ströme sehr gering sind, können elektrische und elektromagnetische Störquellen zu einer Beeinflussung der Messung führen. Deshalb wurde die Chiphalterung zur Abschirmung in einem Stahlkasten (Faradayscher Käfig) positioniert. Mit Hilfe eines Sensors zur Messung der Störimpulse wurden Vergleichsmessungen mit und ohne Faradayschem Käfig durchgeführt (Abb. 94a-b).

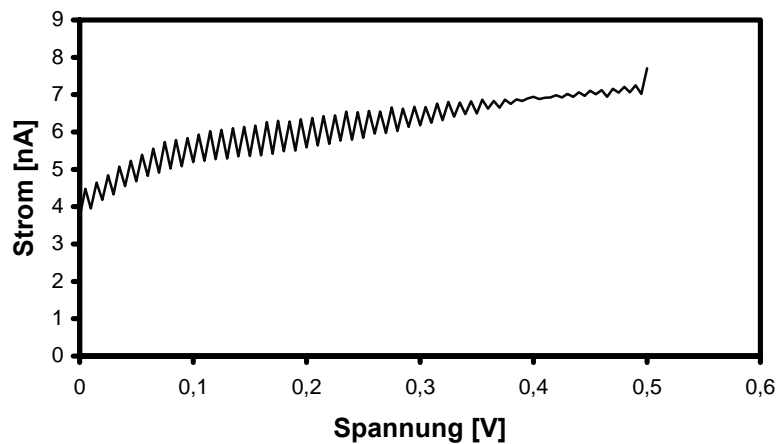


Abbildung 94a: Messung ohne Faradayschem Käfig.

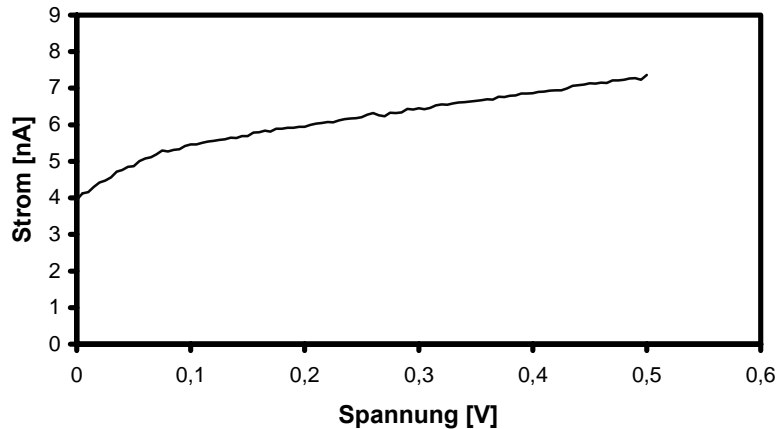


Abbildung 94b: Messung mit Faradayschem Käfig.

Abbildung 94a-b: Überprüfung der amperometrischen Detektionseinheit auf elektrische und elektromagnetische Störfelder mit Hilfe eines Testsensors (Messbereich: 0 V bis 0,5 V; Scanrate: 0,05 V/s). Abb. 94a zeigt eine Messung ohne, Abb. 94b eine Messung mit Faradayschem Käfig.

Die Messungen in einem Faradayschem Käfig führten zu einem geringeren Grundrauschen der Strom-Spannungs-Kurve. Somit wurden alle amperometrischen Messungen in dem Faradayschen Käfig durchgeführt.

IV.3.5. Kontaktwinkelmessungen

Eine negativ geladene Kapillaroberfläche ist nötig, um Proben auf Grund elektrophoretischer Vorgänge zur Kathode zu transportieren und zu detektieren (Kapitel II.2.3.). Aufgrund der chemischen Zusammensetzung der LTCC-Keramik konnten die Mikrochips nach 15-minütigem Spülen mit Millipore®-Wasser direkt zur Kapillarelektrophorese eingesetzt werden. Zur Stabilisierung der Basislinie und des Messsignals war es jedoch nötig, die Kapillaren zu konditionieren (IV.4.1.).

Die Migrationszeit der Proben zur Kathode hängt von der negativen Oberflächenladung der Kapillaren ab. Zur Erhöhung dieser wurden mehrere Lösungen getestet. Anschließend wurde mittels Kontaktwinkelmessungen die Auswirkung auf die LTCC-Oberfläche ermittelt. Dazu wurden die Keramikchips für 6 h in den entsprechenden Lösungen inkubiert. Nach Spülen mit Millipore®-Wasser und Vakuumtrocknung erfolgte die Kontaktwinkelmessung mittels Tangenten- und Laplace-Methode (Abb. 96).

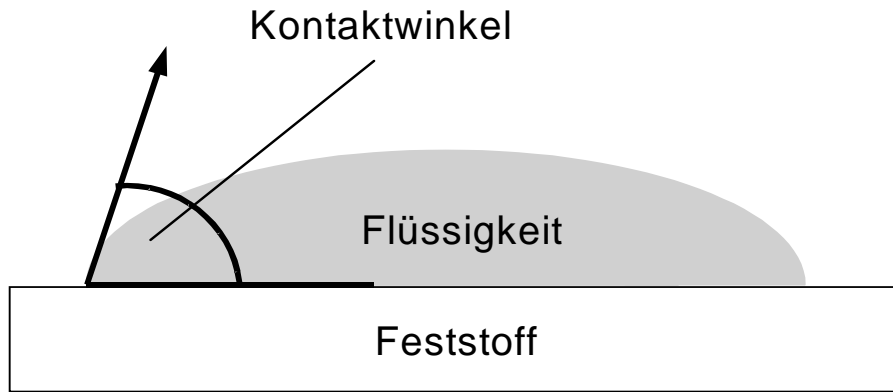


Abbildung 95: Schematische Darstellung der Kontaktwinkelbestimmung (Feststoff: LTCC-Keramik).

Den Winkel, den ein Flüssigkeitstropfen auf der Oberfläche eines Feststoffs zu dieser bildet, bezeichnet man als Kontaktwinkel (Abb. 95). Dieser ist abhängig von der Wechselwirkung zwischen den Stoffen an der Berührungsfläche. Je größer diese Wechselwirkung ist, desto kleiner wird der Kontaktwinkel.

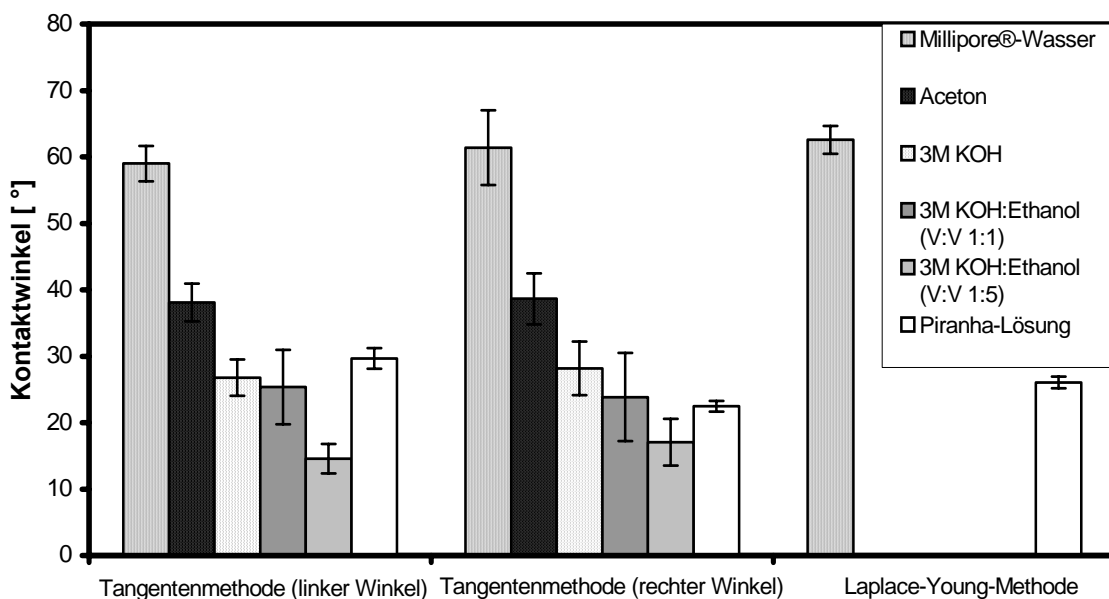


Abbildung 96: Bestimmung der Kontaktwinkel mit Hilfe eines 10 µl Wassertropfens auf LTCC-Keramikchips mittels Tangenten- und Laplace-Young-Methode. Die Keramikchips wurden dazu für 6 h in verschiedenen Soluten inkubiert. Symmetrische Tropfenform (Laplace-Young-Methode); dynamische Tropfenform (Tangenten-Methode).

Während die Laplace-Young-Methode von einer symmetrischen, idealen Tropfenform ausgeht, berücksichtigt die Tangentenmethode eine dynamische Tropfenform. Die Inkubation mit Millipore®-Wasser ergab bei der Laplace-Young-Methode einen Kontaktwinkel von $62,6 \pm 2,1$ °. Bei der Tangentenmethode wurden $59,0 \pm 2,6$ ° für die linke und $61,4 \pm 5,6$ ° für die rechte Tropfenseite ermittelt. Die Kontaktwinkelmessung eines Wassertropfens auf einer

mit Piranha-Lösung behandelten LTCC-Oberfläche ergab eine Verringerung um etwa 60 %. Somit wurden $26,1 \pm 0,9^\circ$ für die Laplace-Methode ermittelt. Bei der Tangenten-Methode wurden $29,7 \pm 1,5^\circ$ (linker Winkel) und $22,4 \pm 0,8^\circ$ (rechter Winkel) gemessen.

Nach Inkubation mit Aceton wurde ein Kontaktwinkel von $34,8 \pm 2,8^\circ$ (links) und $38,6 \pm 3,8^\circ$ (rechts) mit der Tangentenmethode gemessen. Die 3 M KOH-Lösung führte zu Kontaktwinkeln von $26,8 \pm 2,7^\circ$ (links) und $28,2 \pm 4,0^\circ$ (rechts). Bei einem 1:1-Gemisch von 3 M KOH und Ethanol verringerte sich der linke Kontaktwinkel auf $25,4 \pm 5,6^\circ$ und der rechte auf $23,8 \pm 6,6^\circ$. Eine weitere Verringerung auf $14,6 \pm 2,2^\circ$ (linker Kontaktwinkel) und $17,0 \pm 3,5^\circ$ (rechter Kontaktwinkel) wurde bei 3 M KOH-Ethanol (V:V 1:5) behandelten LTCC-Oberflächen gemessen. Durch zunehmende Hydrophilie kam es zu einem starken Verlaufen des aufgetragenen Wassertropfens, so dass keine ideale Tropfenform mehr vorlag. Somit waren Kontaktwinkelmessungen von KOH behandelten LTCC-Keramikchips mit der Laplace-Young-Methode nicht möglich.

KOH-Lösungen waren somit geeignet, die hydrophilen Eigenschaften von LTCC-Keramikchips zu verbessern (Erhöhung der Oberflächenladungen). Es zeigte sich jedoch, dass der Einsatz der getesteten KOH-Solute nicht praktikabel war. Höher konzentrierte Lösungen führten zu einer Ablösung der Glaskeramik (Isolation; Abb. 43b), die zur Begrenzung der Detektionsfläche bei Arbeits- und Referenzelektrode verwendet wurde. Somit wurde die Konditionierung der Mikrokapillaren mit einer 0,1 M KOH-Lösung durchgeführt.

Tabelle 16 zeigt zusammenfassend die Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf behandelte LTCC-Oberflächen. Dies dient der Erarbeitung geeigneter Strategien zur Konditionierung von Kapillaren.

Solut	Kontaktwinkel [°]		
	Tangentenmethode (links)	Tangentenmethode (rechts)	Laplace-Young-Methode
Millipore-Wasser	$59,0 \pm 2,6$	$61,4 \pm 5,6$	$62,6 \pm 2,1$
Aceton	$34,8 \pm 2,8$	$38,6 \pm 3,8$	nicht ermittelbar
3M KOH	$26,8 \pm 2,7$	$28,2 \pm 4,0$	nicht ermittelbar
3M KOH : EtOH (V:V 1:1)	$25,4 \pm 5,6$	$23,8 \pm 6,6$	nicht ermittelbar
3M KOH : EtOH (V:V 1:5)	$14,6 \pm 2,2$	$17,0 \pm 3,5$	nicht ermittelbar
Piranha-Lösung	$29,7 \pm 1,5$	$22,4 \pm 0,8$	$26,1 \pm 0,9$

Tabelle 16: Kontaktwinkel der Versuche zur Erhöhung der Hydrophilie von LTCC-Oberflächen mit unterschiedlichen Soluten.

IV.3.6 Berechnung messspezifischer Parameter von LTCC-Keramikchips

Zur Beschreibung der Leistungsfähigkeit eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems auf LTCC-Keramikchips wurden neben den in Kapitel IV.4.5.5. elektrochemisch-analytischen Parametern wie der Migrationszeit, der Wanderungsgeschwindigkeit und der effektiven elektrophoretischen Mobilität, zahlreiche Leistungsdaten ermittelt. Darüber hinaus waren zur Spezifizierung der Trenneffizienz weitere Messparameter nötig:

- Leitfähigkeit des Elektrolytpuffers
- Joulesche Wärme
- Feldstärke
- Mobilität des elektroosmotischen Flusses
- Stromdichte

Leitfähigkeit des Elektrolytpuffers

Der Transport von Proben aufgrund der Elektrophorese und Elektroosmose ist von der angelegten Hochspannung und der Fähigkeit des Elektrolytpuffers abhängig, den elektrischen Strom zu leiten. Diese elektrische Leitfähigkeit wird als Kehrwert des spezifischen elektrischen Widerstandes definiert. Die spezifische Leitfähigkeit einer Elektrolytlösung ergibt sich aus den effektiven Mobilitäten aller in Lösung befindlicher Teilchen (Gleichung 9). Um Lösungen verschiedener Art und Zahl von Ionen vergleichen zu können, wird die Äquivalentleitfähigkeit berechnet (Gleichung 11).

Parameter	Wert	Einheit
Spezifische Leitfähigkeit Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ Puffer	0,128	R ⁻¹ *cm ⁻¹
Äquivalentleitfähigkeit Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ Puffer	12,8	R ⁻¹ *cm ⁻¹ *mol ⁻²

Tabelle 17: Berechnete spezifische Leitfähigkeit und Äquivalentleitfähigkeit des verwendeten Elektrolytpuffers (R^{-1} = Leitwert [Siemens] mit R = Spannung/Stromstärke).

Für die kapillarelektrophoretischen Versuche wurde ein 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ Puffer pH 7,3 verwendet. Dafür wurde eine spezifische Leitfähigkeit von 0,128 R⁻¹*cm⁻¹ berechnet. Die Äquivalentleitfähigkeit betrug 12,8 R⁻¹*cm⁻¹*mol⁻².

Joulesche Wärme

Durch den elektrischen Stromfluss wird während einer elektrophoretischen Trennung ein Teil der elektrischen Energie in Wärme (Joulesche Wärme) umgesetzt. Diese abgegebene Wärme beeinflusst die Auflösung des Trennsystems durch Änderung des elektroosmotischen Flusses. Die pro Volumeneinheit erzeugte Wärme Q wurde nach Gleichung 10 berechnet (Tab. 18).

Trennungsspannung	Wert	Einheit
bei 300 V	535,47	$W \cdot cm^{-3}$
bei 400 V	955,51	$W \cdot cm^{-3}$
bei 500 V	1343,68	$W \cdot cm^{-3}$

Tabelle 18: Berechnete Joulesche Wärme bei unterschiedlichen Trennungsspannungen.

Die bei einer Trennungsspannung angelegten 300 V führten zu einer erzeugten Wärmemenge von $535,47 W \cdot cm^{-3}$. Diese stieg mit zunehmender Hochspannung auf $955,51 W \cdot cm^{-3}$ (400 V) bzw. $1343,68 W \cdot cm^{-3}$ (500 V) an.

Feldstärke

Die Stärke eines elektrischen Feldes an einem gegebenen Punkt im Raum wird als Feldstärke bezeichnet und ist für jede Trennungsspannung spezifisch (Tab. 19).

Trennungsspannung	Wert	Einheit
bei 300 V	64,8	$V \cdot cm^{-1}$
bei 400 V	84,6	$V \cdot cm^{-1}$
bei 500 V	108,0	$V \cdot cm^{-1}$

Tabelle 19: Berechnete Feldstärke bei unterschiedlichen Trennungsspannungen.

Die ansteigende Trennungsspannung führte zu einer Zunahme der Feldstärke. Bei einer Trennungsspannung von 300 V wurden $64,8 V \cdot cm^{-1}$ berechnet. Die Feldstärke stieg mit zunehmender Hochspannung von $84,6 V \cdot cm^{-1}$ (400 V) auf $108,0 V \cdot cm^{-1}$ (500 V).

Stromdichte

Alle ionischen Bestandteile des Elektrolytpuffers tragen zum Ladungstransport und somit zum Strom bei. Die Stromdichte, durch das Ohmsche Gesetz mit der Feldstärke verbunden, ist proportional zu den Konzentrationen, den Ladungen und den Mobilitäten der verschiedenen Ionen. Diese sollte nach Gleichung 8 für unterschiedliche Trennungsspannung berechnet werden (Tab. 20).

Trennungsspannung	Wert	Einheit
bei 300 V	8,29	A*cm ⁻²
bei 400 V	11,11	A*cm ⁻²
bei 500 V	13,82	A*cm ⁻²

Tabelle 20: Berechnete Stromdichte des Elektrolytpuffers bei unterschiedlichen Trennungsspannungen (A = SI-Basiseinheit der elektrischen Stromstärke).

Die Stromdichte bei einer Trennungsspannung von 300 V betrug 8,29 A*cm⁻². Bei einer Hochspannung von 400 V wurden 11,11 A*cm⁻² und bei 500 V 13,82 A*cm⁻² ermittelt.

Mobilität des elektroosmotischen Flusses

Die elektrophoretische Mobilität der Proben, die in diese Arbeit mittels Kapillarelektrophorese getestet wurden, ist neben der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit auch vom elektroosmotischen Fluss abhängig. Größe und Richtung des EOF hängen von der Beschaffenheit der Kapillaroberfläche und der Pufferzusammensetzung ab. Der Beitrag des verwendeten Elektrolytpuffers zum elektroosmotischen Fluss sollte bei unterschiedlichen Trennungsspannung nach Gleichung 16 berechnet werden (Tab. 21).

Trennungsspannung	Wert	Einheit
bei 300 V	3,56E-05	cm*s ⁻¹
bei 400 V	4,78E-05	cm*s ⁻¹
bei 500 V	5,93E-05	cm*s ⁻¹

Tabelle 21: Berechnete Mobilität des elektroosmotischen Flusses bei unterschiedlichen Trennungsspannungen.

Die berechnete Mobilität des elektroosmotischen Flusses bei einer Trennungsspannung von 300 V betrug 3,56*10⁻⁵ cm*s⁻¹. Bei einer Hochspannung von 400 V wurden 4,78*10⁻⁵ cm*s⁻¹ ermittelt. Diese Mobilität stieg mit zunehmender Hochspannung auf 5,93*10⁻⁵ cm*s⁻¹ (500 V).

IV.4. Amperometrische Messungen zur Trennung von Polyphenolen

Innerhalb dieser Arbeit sollten auf LTCC-Keramikchips mit Hilfe der Kapillarelektrophorese elektrochemisch aktive Substanzen getrennt und amperometrisch detektiert werden. Bei der dabei angewendeten Kapillarzonenlektrophorese (CZE) ist die gesamte Kapillare mit einem einheitlichen Elektrolytpuffer befüllt, um Stromtransport, einheitliche Feldstärke und konstanten pH-Wert zu gewährleisten. Dieses Trennverfahren, bei dem Ionen auf Grund ihrer Ladung und Größe in einem elektrischen Feld getrennt werden, basiert auf der Wanderung von Analyten mit einer ihrer Mobilität entsprechenden Geschwindigkeit. Als elektrochemisches Messverfahren wurde die Amperometrie verwendet, die aufgrund der hohen Selektivität bei geringer Nachweisgrenze eine große Bedeutung besitzt.

Das Messsignal ist von der Positionierung der Messzelle abhängig. Diese werden meist, wie in dieser Arbeit, in der end-capillary-Anordnung direkt vor dem Kapillarausgang positioniert (Abb. 43a und c). Eine solche amperometrische Messzelle besteht aus einem Elektrolyten, einer Arbeitselektrode (Messelektrode) und einer Referenzelektrode (Gegenelektrode). Eine von außen angelegte Gleichspannung bewirkt, dass die Arbeitselektrode polarisiert wird und praktisch kein Strom fließt [Haase, 2002]. Erst in Anwesenheit von Depolarisatoren (Analyt, Probe) fließt ein konzentrationsabhängiger Grenzstrom. Für die Entwicklung eines neuen elektrochemisch-analytischen Detektionssystems sind einfach handhabbare Modellanalyte wie beispielsweise Polyphenole nötig. Neben den dargestellten Polyphenolen in Abbildung 40 wurde als nicht phenolische Substanz Wasserstoffperoxid getestet. Durch die Aufzeichnung von Elektropherogrammen sollten die Migrationszeiten der elektrochemisch aktiven Substanzen ermittelt werden. Die Bestimmung analytischer Messparameter zur Leistungsfähigkeit der kapillarelektrophoretischen Trennung auf LTCC-Keramikchips sollte ebenfalls durchgeführt werden.

IV.4.1. Vorbereitung der Kapillaren

Um Polyphenole in LTCC-Keramikchips amperometrisch detektieren zu können, war es erforderlich, diese in geeigneter Weise vorzubereiten. Zu diesem Zweck wurden die Kapillaren gereinigt und konditioniert (Kapitel IV.4.1.).

Reinigung mit Millipore®-Wasser

Zur Reinigung der Kapillaren und Überprüfung der Mikrofluidik sollte jeder Keramikchip mit Wasser gespült werden. Dazu wurden die Kapillaren nach 10-minütigem Spülen mit mehrfach filtriertem und entgastem Millipore®-Wasser mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) befüllt und zur kapillarelektrophoretischen Trennung verwendet.

Konditionierung der Kapillaren

Zur Stabilisierung der Basislinie und des Messsignals war eine Konditionierung der Kapillaren mit Kaliumhydroxidlösung nötig. Dazu wurden die Kapillaren 15 min mit 0,1 M KOH gespült. Nach 15-minütigem Spülen der Kapillaren mit Millipore®-Wasser wurden diese mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer befüllt. Anschließend wurde der Keramikchip in die Halterung eingebaut.

Herstellung einer Silber/Silberchlorid-Elektrode

Als Referenzelektrode wird heute bevorzugt die Silber/Silberchlorid-Elektrode verwendet, um den Umgang mit giftigem Quecksilber/Quecksilber(I)-Chlorid (Kalomel) zu vermeiden. Es handelt sich um Elektroden zweiter Art (Metallionenelektroden), bei denen die Metallionen in der Lösung im Gleichgewicht mit einem schwerlöslichen Salz des Metalls stehen.

Dazu wurde die aus Silber bestehende Referenzelektrode 15 min mit 32 %iger HCl inkubiert. Zudem bestand die Möglichkeit, die Referenzelektrode als Kathode und den Hochspannungskontakt im „Pufferauslass“ (Abb. 43a) als Anode zu schalten. Ein Strom von bis zu 5 Milliampere wurde dann für 3-5 s angelegt. Anschließend wurden die Kapillaren jeweils für 20 min mit Millipore®-Wasser gespült.

IV.4.2. Überprüfung der amperometrischen Detektoreinheit (2-Elektrodenanordnung)

Die amperometrische Detektoreinheit des LTCC-Keramikchips besteht aus einer 2-Elektrodenanordnung mit Arbeits- und Referenzelektrode. Diese Messanordnung sollte vor der elektrophoretischen Auftrennung aus folgenden Gründen getestet werden:

- Funktionskontrolle von Arbeits-, Referenzelektrode und der Messanordnung
- Überprüfung der elektrochemischen Aktivität des Analyten

Dazu wurden die Kapillaren des LTCC-Keramikchips 15 min mit Millipore®-Wasser gespült, mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer befüllt und in die Halterung eingebaut. Zur Verhinderung eines hydrostatischen Flüssigkeitsstroms wurden die Reservoirs der verwendeten Chiphalterungen ebenfalls mit der sich in der Kapillare befindlichen Elektrolytlösung blasenfrei befüllt, um ein gleichmäßiges Flüssigkeitsniveau zu erhalten.

Nach Einstellung der Basislinie wurden bei der HSS-Halterung von 80 µl vorgelegtem Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) 70 µl aus dem Detektorreservoir entnommen (45 µl bei GBF-Halterung). Die gleiche Menge der Probenlösung wurde anschließend blasenfrei unter zwei- bis dreimaligem auf- und abpipettieren hinzugegeben.

Testung der amperometrischen Detektoreinheit mit Brenzkatechin

Zur Überprüfung der Detektoreinheit wurden LTCC-Keramikchips mit und ohne verzinnter Kontaktierung der Hochspannungskontakte verwendet. Dabei erfolgte die Kontrolle mit unterschiedlich konzentrierten Brenzkatechinelösungen (2,5 mM bis 5 mM).

Testung unterschiedlicher Chiphalterungen

Die Detektorfunktion der LTCC-Keramikchips wurde mit unterschiedlichen Chiphalterungen getestet. Eine Halterung (GBF) ist mit kugelförmigen, die andere mit spitzen Federkontakten ausgestattet (HSS). Nach Einstellung der Basislinie wurden 70 µl (HSS) bzw. 45 µl (GBF) des vorgelegten Elektrolytlpuffers entnommen. Anschließend erfolgte die Zugabe einer 2,5 mM Brenzkatechinelösung ohne Anlegen einer Hochspannung (Abb. 97).

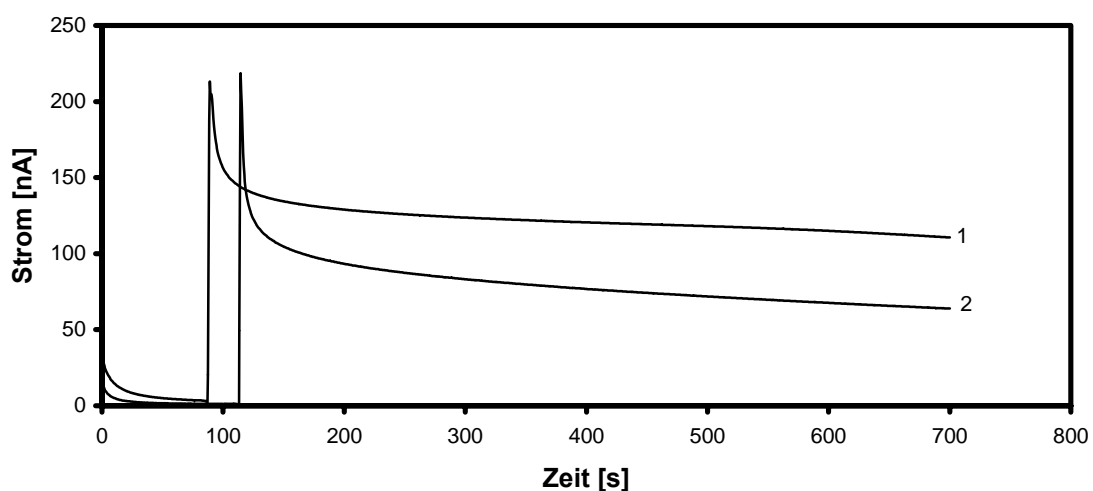


Abbildung 97: Elektropherogramme der Überprüfung der Detektorfunktion von einem Keramikchip durch direkte Injektion von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) auf den Detektor ($E_{\text{pot.}} = 0,8 \text{ V}$) ohne angelegte Hochspannung. Elektropherogramme: (1) HSS-Chiphalterung, (2) GBF-Chiphalterung.

Bei den verwendeten Halterungen kam es zu einem peakähnlichen Stromverlauf. Nach einer Messdauer von 600 s wurde für die GBF-Halterung ein Strom von 64 nA gemessen. Der ermittelte Strom bei der HSS-Halterung lag bei 111 nA und damit etwa 75 % höher.

LTCC-Keramikchip mit verzinnter äußerer Kontaktierung

Zur Funktionskontrolle der amperometrischen Messeinheit wurden nach Einstellung der Basislinie 70 μl vorgelegten Elektrolytlösung entnommen. Anschließend erfolgte die Zugabe einer 2,5 mM oder 5 mM Brenzkatechinlösung. Es wurde keine Hochspannung angelegt.

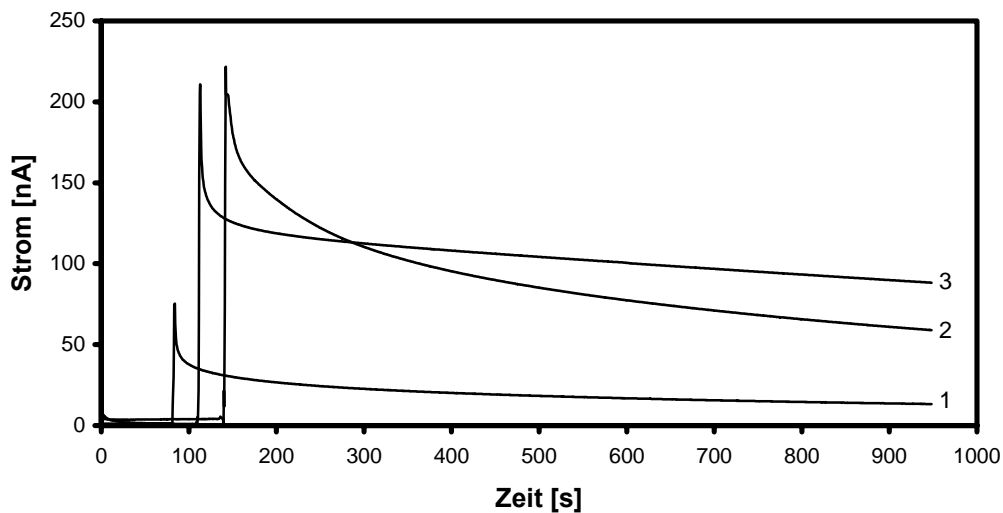


Abbildung 98: Überprüfung der Detektorfunktion eines Keramikchips mit verzinnten äußeren Kontakten durch direkte Injektion von Brenzkatechin auf Arbeits- und Referenzelektrode (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) ohne angelegte Hochspannung. Elektropherogramme: (1) 2,5 mM, (2) 5 mM, (3) 2,5 mM nach Behandlung der Referenzelektrode mit HCl.

Die direkte Injektion von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) auf den Detektor führte zu einem peakähnlichen Stromanstieg auf 75 nA (Abb. 98, Elektropherogramm 1). Anschließend kam es über einen Zeitraum von 600 s zu einem Abfall des Signals auf 15 nA. Bei einer Konzentration von 5 mM stieg der Strom auf 220 nA. Nach 600 s wurde ein Strom von 68 nA gemessen (Abb. 98, Elektropherogramm 2). Das dritte Elektropherogramm zeigt die Injektion von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) nach Behandlung der Referenzelektrode mit HCl. Wie bei den vorigen Messungen wurde ein peakähnlicher Stromverlauf mit einem Maximalwert von 211 nA beobachtet. Nach einer Inkubationszeit von 600 s verringerte sich dieser auf 95 nA. Verglichen mit nicht behandelten Referenzelektroden betrug die Zunahme zwischen 50 % ($c = 5 \text{ mM}$) und 85 % ($c = 2,5 \text{ mM}$) des nach 600 s gemessenen Stroms.

Einfluss der Hochspannung auf den Detektor

Die Messungen zur Detektorkontrolle erfolgten ohne angelegte Hochspannung. Bei einer angelegten Hochspannung von 400 V sollte der Einfluss auf die amperometrische Detektoreinheit ermittelt werden. Nach Einstellung der Basislinie wurden 70 μl der vorgelegten Elektrolytlösung entnommen und das gleiche Volumen Brenzkatechinelösung ($c = 2,5 \text{ mM}$) zugegeben.

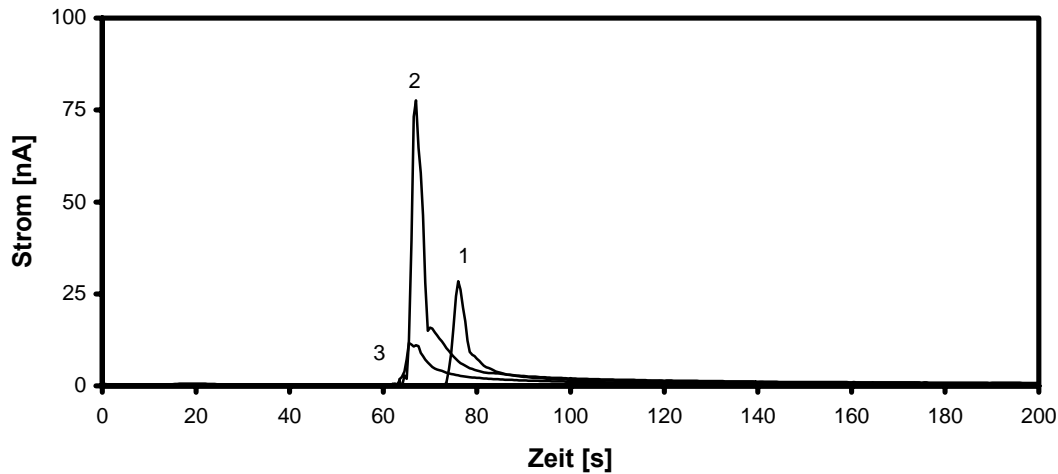


Abbildung 99: Elektropherogramme der Überprüfung der Detektorfunktion von einem Keramikchip durch direkte Injektion von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) auf den Detektor (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) bei angelegter Hochspannung von 400 V. Elektropherogramme: (1) ohne HCl-Behandlung (2) nach Behandlung der Referenzelektrode mit HCl, (3) nach 9 Messungen mit dem Keramikchip.

Die Injektion von Brenzkatechin auf die Messeinheit führte zu einem peakähnlichen Stromanstieg auf 30 nA (Abb. 99, 1. Elektropherogramm). Durch Behandlung der Referenzelektrode mit HCl wurde eine 272 %ige Zunahme des Stroms auf 78 nA gemessen (Abb. 99, 2. Elektropherogramm). Das dritte Elektropherogramm zeigt den Stromverlauf des LTCC-Keramikchips nach 9 Messungen mit einem maximalen Strom von 11 nA.

IV.4.3. Konditionierung der Kapillaroberfläche mit Kaliumhydroxid

Die Kapillaren der LTCC-Keramikchips waren nach 10-minütigem Spülen mit Millipore[®]-Wasser für kapillarelektrophoretische Versuche verwendbar. Eine Konditionierung der Kapillaroberfläche mit KOH führte jedoch zur Stabilisierung und Erhöhung des Messsignals. Deshalb wurden die Kapillaren vor der Befüllung mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer 15 min lang mit 0,1 M KOH behandelt. Anschließend erfolgte der Einbau in die Chiphalterung und die Befüllung der Reservoirs.

Amperometrische Detektion von Wasserstoffperoxid

In konditionierten und nicht behandelten Kapillaren sollte der Signalverlauf bei der amperometrischen Detektion von elektroaktiven Substanzen beobachtet werden. Dabei wurde zunächst Wasserstoffperoxid verwendet, um mögliche Einflüsse der Polyphenole auf den elektroosmotischen Transport unter Hochspannung auszuschließen. Eine Hochspannung von 400 V wurde über dem Trennkanal eines unbehandelten LTCC-Keramikchips angelegt. Nach Einstellung der Basislinie wurden 70 μl der vorgelegten Elektrolytlösung aus dem Reservoir der „Pufferinjektion“ (Abb. 43a) entnommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Wasserstoffperoxid ($c = 110 \mu\text{M}$). Nach der Messung wurde der Chip entnommen, mit 0,1 M KOH konditioniert und erneut mit Elektrolytlösung befüllt. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid erfolgte wie beschrieben über die „Pufferinjektion“ (Abb. 100).

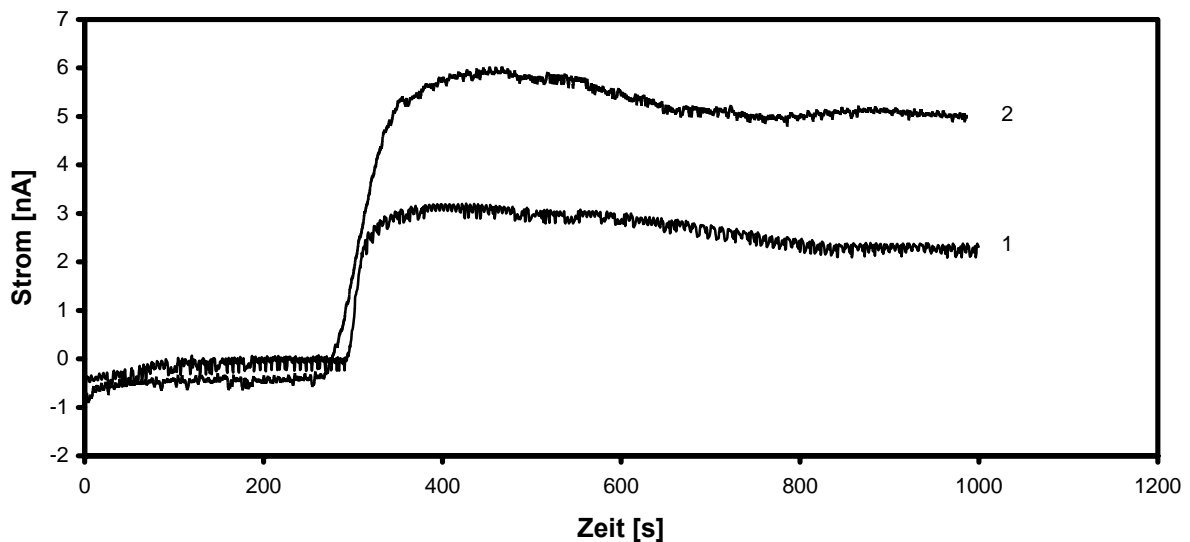


Abbildung 100: Elektropherogramme der Überprüfung des Einflusses einer KOH-Konditionierung auf die amperometrische Detektion (E_{pot} : 0,45 V, HSS-Chipalterung) von H_2O_2 ($c = 110 \mu\text{M}$) in einem Keramikchip bei direkter Trennkanalinjektion und einer Trennspannung von 400 V. Elektropherogramme: (1) mit Millipore[®]-Wasser vorbehandelt, (2) konditioniert mit 0,1 M KOH.

Die Injektion von Wasserstoffperoxid führte zu einer Sättigungskennlinie des Stromsignals. Bei der amperometrischen Detektion in unbehandelten Kapillaren kam es zu einem Anstieg des Signals auf 2 nA nach einer Messdauer über 700 s (Abb. 100, Elektropherogramm 1). Eine Steigerung von etwa 150 % auf 5 nA wurde bei konditionierten Kapillaren beobachtet (Abb. 100, Elektropherogramm 2).

Amperometrische Detektion von Brenzkatechin

Als phenolische Testsubstanz wurde Brenzkatechin verwendet. Dabei erfolgte nach Anlegen einer 400 V Hochspannung über den Trennkanal die Einstellung der Basislinie. Im Austausch gegen 70 μl des vorgelegten Elektrolytpuffers erfolgte die Zugabe von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) in das Reservoir der „Pufferinjektion“ (Abb. 43a). Der Chip wurde nach der Messung entnommen, mit 0,1 M KOH konditioniert und erneut mit Elektrolytlösung befüllt. Die Zugabe von Brenzkatechin erfolgte in die Pufferinjektion-Kavität (Abb. 101).

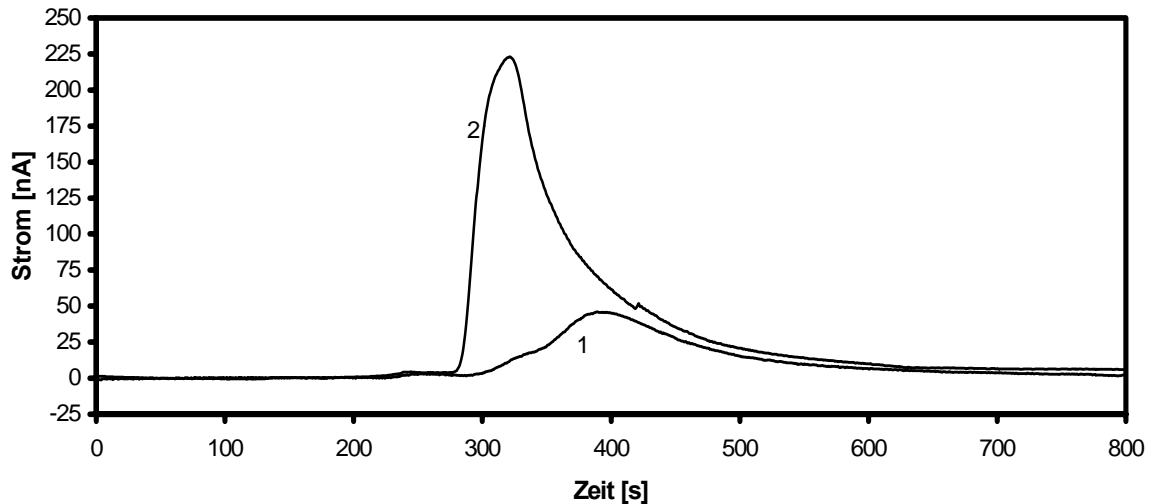


Abbildung 101: Elektropherogramme der Überprüfung des Einflusses einer KOH-Konditionierung auf die amperometrische Detektion (E_{pot} : 0,8 V, GBF-Chiphalterung) von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) in einem Keramikchip bei direkter Trennkanalinjektion der Probe und einer Trennungsspannung von 400 V. Elektropherogramme: (1) mit Millipore®-Wasser vorbehandelt, (2) konditioniert mit 0,1 M KOH.

Die amperometrische Detektion von Brenzkatechin in einem unbehandelten LTCC-Keramikchip führte zu einem langsamen Anstieg des Signals. Bei der Verwendung konditionierter Kapillaren wurde ein Stromanstieg auf 219 nA ermittelt (Abb. 101, Elektropherogramm 2). Ein Anstieg des Stromsignals auf 45 nA wurde über einen Zeitraum von 100 s bei nicht konditionierten Kapillaren beobachtet (Abb. 101, Elektropherogramm 1).

Amperometrische Detektion von Polyphenolgemischen

Polyphenolgemische sollten mittels CZE aufgrund ihrer Migrationszeiten getrennt werden. Dabei wurde der Signalverlauf der amperometrischen Detektion in konditionierten und nicht behandelten Kapillaren beobachtet. Das Polyphenolgemisch, bestehend aus Dopamin ($c = 100 \mu\text{M}$), Pyrogallol ($c = 300 \mu\text{M}$) und Gallussäure ($c = 5 \text{ mM}$) wurde elektrokinetisch in den Keramikchip injiziert (Kapitel IV.4.5.) und bei 400 V Hochspannung getrennt. Der Chip wurde nach der Messung entnommen, mit 0,1 M KOH konditioniert und erneut mit Elektrolytlösung befüllt (Abb. 102).

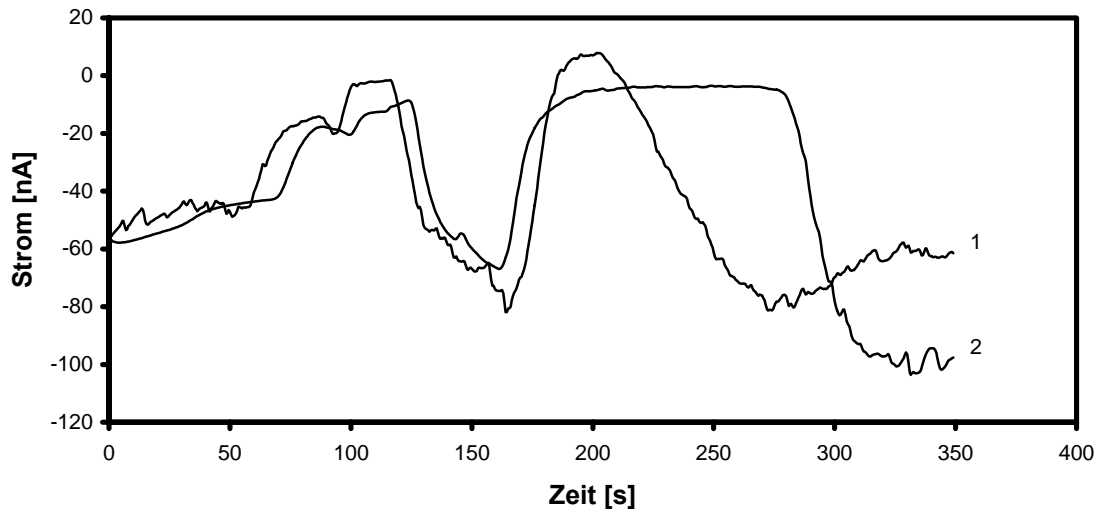


Abbildung 102: Elektropherogramme der Überprüfung des Einflusses einer KOH-Konditionierung auf die amperometrische Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) eines Gemisches aus Dopamin ($c = 100 \mu\text{M}$), Pyrogallol ($c = 300 \mu\text{M}$) und Gallussäure ($c = 5 \text{ mM}$) in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Probeninjektion und einer über dem Trennkanal angelegten Spannung von 400 V. Elektropherogramme: (1) unbehandelt, (2) konditioniert mit 0,1 M KOH.

Die Konditionierung der Kapillaren eines LTCC-Keramikchips führte zu einer Stabilisierung der Basislinie und des Messsignals bei der amperometrischen Detektion von Polyphenolgemischen. Bei der Detektion von Gallussäure in konditionierten Kapillaren wurde ein plateauähnlicher Stromverlauf über 150 s beobachtet. Eine Verbesserung der Trenneffizienz wurde durch Konditionierung nicht erreicht.

Tabelle 22 zeigt zusammenfassend die Signalhöhen der verschiedenen Versuche zur Überprüfung der amperometrischen Detektoreinheit von LTCC-Keramikchips. Tabelle 23 gibt die Signalhöhen der verschiedenen Versuche zur Konditionierung von LTCC-Kapillaren wieder.

Versuche zur Überprüfung der Messeinheit	Hochspannung [V]	Konzentration [mM]	Signalthöhe [nA]
Brenzkatechin	keine	2,5	$111 \pm 3,5$
Brenzkatechin, GBF-Halterung	keine	2,5	$64 \pm 2,1$
Brenzkatechin, verzinnte Kontakte	keine	2,5	$15 \pm 3,1$
Brenzkatechin, verzinnte Kontakte	keine	5,0	$68 \pm 4,0$
Brenzkatechin, verzinnte Kontakte, HCl-Inkubation	keine	2,5	$95 \pm 3,8$
Brenzkatechin	400	2,5	$29 \pm 1,1$
Brenzkatechin, HCl-Inkubation	400	2,5	$78 \pm 1,4$
Brenzkatechin, nach 9. Messung	400	2,5	$11 \pm 0,8$

Tabelle 22: Gemessene Ströme zur Überprüfung der amperometrischen Messeinheit durch direkte Injektion von Brenzkatechin in die Pufferauslass-Kavität.

Versuche zur Konditionierung	Hochspannung [V]	Konzentration [mM]	Signalhöhe [nA]
Wasserstoffperoxid, unbehandelte Kapillaren	400	0,1	2 ± 0,3
Wasserstoffperoxid, behandelte Kapillaren	400	0,1	5 ± 0,3
Brenzkatechin, unbehandelte Kapillaren	400	2,5	45 ± 4,0
Brenzkatechin, behandelte Kapillaren	400	2,5	219 ± 13,1

Tabelle 23: Gemessene Ströme zur Überprüfung des Einflusses einer Konditionierung der Kapillaren mit 0,1 M KOH.

IV.4.4. Trennkanalinjektion

Durch die CZE sollten Polyphenole amperometrisch detektiert und aufgrund ihrer Migrationszeiten getrennt werden. Der Probeninjektion kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. Eine hohe Trenneffizienz in der CZE wird durch ein geringes Injektionsvolumen erreicht, um keinen signifikanten Beitrag zur Bandenverbreiterung zu leisten. Neben der elektrokinetischen Injektion (siehe Kapitel IV.4.5.) wurde innerhalb dieser Untersuchungen mit der Trennkanalinjektion eine nicht elektrokinetische Probenaufgabe durchgeführt. Dabei wurde zur Ermittlung von Migrationszeiten und Stromfluss nur mit angelegter Trennspannung (Hochspannungsnetzgerät: F.u.G Elektronik GmbH, Rosenheim) gemessen.

Dazu wurde die gesamte Kapillare mit einem einheitlichen Elektrolytpuffer gefüllt. Dies sollte den Stromtransport, einheitliche Feldstärke und einen konstanten pH-Wert gewährleisten. Die Probenzugabe erfolgte bei dieser Messmethode in die Kavitäten der Pufferinjektion. Die Probensubstanz wurde erst nach Messstart und Einstellung der Stromkennlinie auf einen niedrigen Basisliniendrift hinzugegeben. Die angelegte Trennspannung betrug zwischen 200 V und 400 V.

IV.4.4.1. Einfluss der Trennspannung auf den Elektrolytpuffer

Die Ionenstärke des Puffers besitzt beispielsweise über Peakform oder Joulesche Wärme einen vielfältigen Einfluss auf das Trennsystem. In Vorversuchen stellte sich ein 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer (pH 7,3) als geeigneter Elektrolytpuffer zur Kapillarelektrophorese heraus. Dieser wurde bei einer angelegten Trennspannung von 400 V getestet. Nach Befüllung der Kapillaren mit dem Elektrolytpuffer erfolgte das Anlegen der Spannung über den Trennkanal und die Aufzeichnung der Stromkennlinie (Abb. 103). Dabei wurden das selbstkonstruierte Hochspannungsnetzgerät und das der Firma VIAelectronic, Hermsdorf

(HSPG Modell 1), verwendet um mögliche gerätespezifische Einflüsse auf die Messung zu untersuchen (Kapitel III.3.).

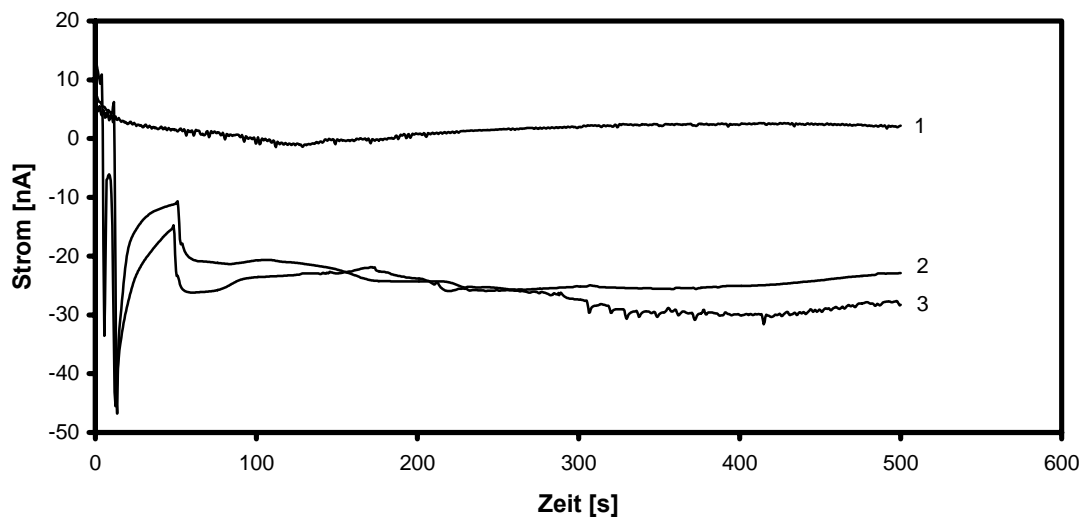


Abbildung 103: Testung des eingesetzten Elektrolytpuffers (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,3) mit verschiedenen Hochspannungsnetzgeräten bei einer angelegten Trennschaltung von 400 V (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung). Elektropherogramme: (1) Hochspannungsnetzgerät für direkte Trennkanalinjektion, (2) HSPG Modell 1, (3) HSPG Eigenbau.

Die Verwendung des HSPGs zur direkten Trennkanalinjektion führte während der siebenminütigen Messdauer zu einem Basisliniendrift von etwa 3 nA (Abb. 103, 1. Elektropherogramm). Die Messungen 2 und 3 stellen die Elektropherogramme der verwendeten Hochspannungsnetzgeräte zur elektrokinetischen Injektion dar. Bei diesem Injektionsverfahren kommt es durch Umschaltung der Injektions- auf Trennschaltung zu Beginn der Messung (abhängig von der Injektionsdauer) zu starken Schwankungen der Stromstärke. Die Basislinienmessung des Elektrolytpuffers mit dem HSPG Modell 1 zeigte über die Dauer von 5 min eine Schwankung von 6 nA (Abb. 103, 2. Elektropherogramm). Eine Drift von 8 nA wurde mit dem selbst konstruierten HSPG gemessen (Abb. 103, 3. Elektropherogramm).

IV.4.4.2. Trennkanalinjektion von Wasserstoffperoxid

Wie in Kapitel IV.4.3. beschrieben, wurde der Signalverlauf bei der amperometrischen Detektion von Wasserstoffperoxid ermittelt. Dabei sollten zunächst mögliche Einflüsse der Hochspannung auf Polyphenole während der Migration und der Detektion ausgeschlossen werden. Dazu wurde eine Hochspannung von 400 V über den Trennkanal angelegt. Nach Einstellung der Basislinie wurden 70 μl (45 μl bei Verwendung der GBF-Chiphalterung) der vorgelegten Elektrolytlösung aus dem Reservoir der Pufferinjektion entnommen. Anschließend erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens einer Wasserstoffperoxidlösung. Bei einer angelegten Trennschaltung von 400 V wurde eine Wasserstoffperoxidlösung ($c = 350 \mu\text{M}$) über die Pufferinjektion in den Trennkanal injiziert (Abb. 104).

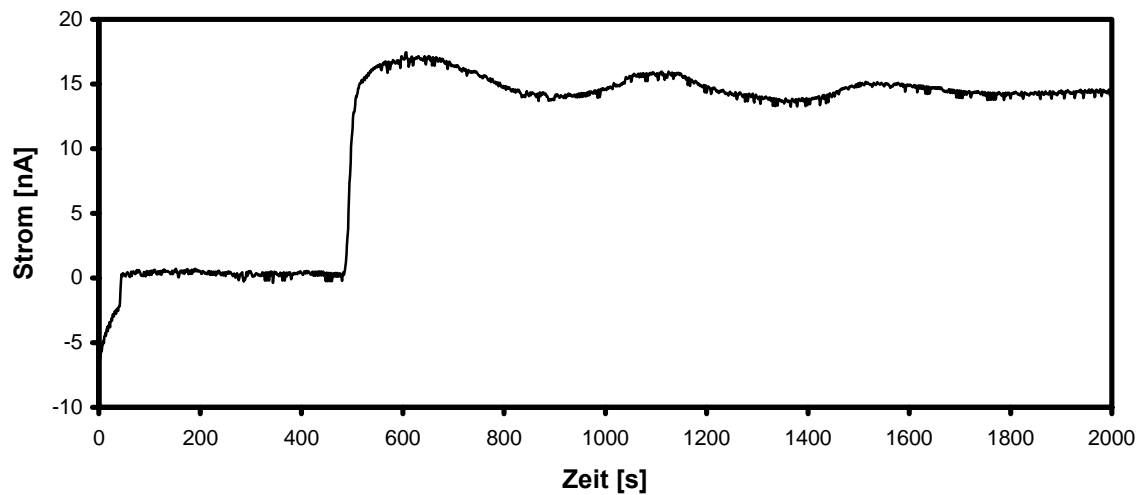


Abbildung 104: Elektropherogramm der amperometrischen Detektion von H_2O_2 ($c = 350 \mu\text{M}$) in einem Keramikchip bei direkter Trennkanalinjektion und einer angelegten Trennschaltung von 400 V (Elektrolytpuffer: 15 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,3), E_{pot} : 0,5 V, GBF-Chiphalterung).

Die amperometrische Detektion einer $350 \mu\text{M}$ Wasserstoffperoxidlösung führte zu einem Anstieg des Stroms auf 15 nA. Während der restlichen Messdauer kam es zu Schwankungen um diese Niveau von $\pm 2,5$ nA. Es wurde eine Migrationszeit von 155 s ermittelt.

Die Konzentration des Wasserstoffperoxids wurde auf $135 \mu\text{M}$ verringert und die Referenzelektrode mit HCl (Kapitel IV.4.1.) behandelt (Abb. 105).

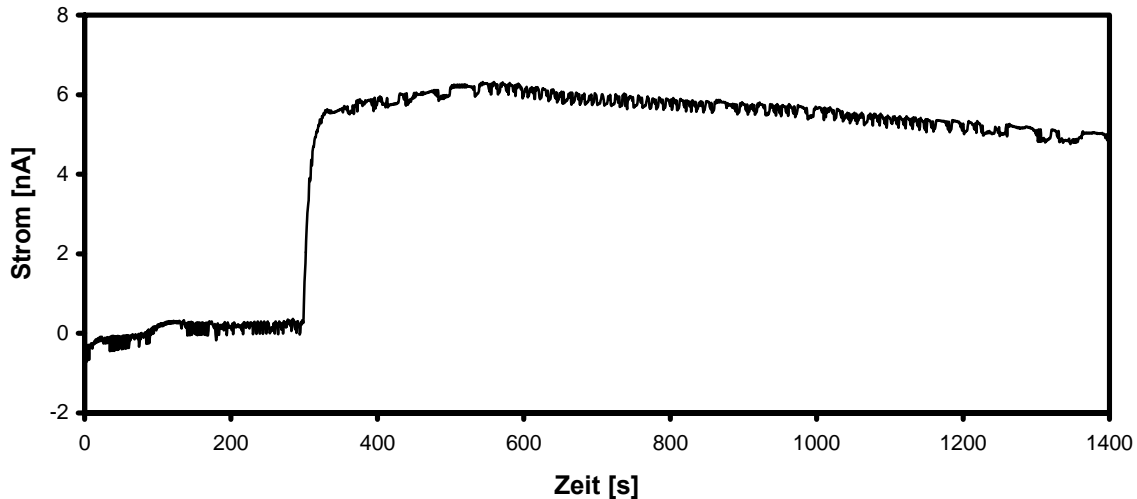


Abbildung 105: Elektropherogramm der amperometrischen Detektion von H_2O_2 ($c = 135 \mu\text{M}$) in einem Keramikchip nach vorheriger Behandlung der Referenzelektrode mit HCl bei direkter Trennkanalinjektion und einer Trennungsspannung von 400 V (E_{pot} : 0,5 V, GBF-Chiphalterung).

Ein Stromanstieg auf 6 nA wurde bei der amperometrischen Detektion von Wasserstoffperoxid ($c = 135 \mu\text{M}$) gemessen. Verglichen mit den gemessenen 15 nA einer 350 μM Wasserstoffperoxidlösung verringerte sich das Messsignal um etwa 60 %. Die Migrationszeit betrug 149 s.

Die Reproduzierbarkeit der Elektropherogramme wurde mit einem neuen, unbehandelten LTCC-Keramikchip überprüft. Dazu wurde in drei aufeinanderfolgenden Messungen Wasserstoffperoxid ($c = 135 \mu\text{M}$) in die Pufferinjektions-Kavität gegeben. Die Trennungsspannung betrug 400 V.

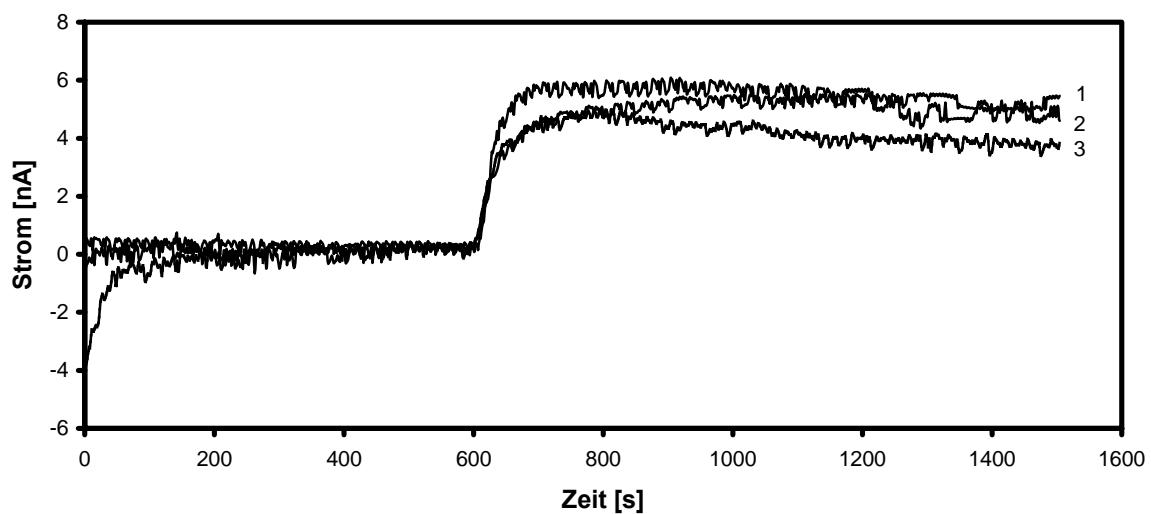


Abbildung 106: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion von H_2O_2 ($c = 135 \mu\text{M}$) in einem Keramikchip. Direkte Trennkanalinjektion der Probe bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Elektropherogramme: Aufeinanderfolgende amperometrische Messungen (1-3) (Elektrolytpuffer: 15 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,3), E_{pot} : 0,5 V, GBF-Chiphalterung).

Die amperometrische Detektion von Wasserstoffperoxid ($c = 135 \mu\text{M}$) führte ohne Inkubation der Referenzelektrode mit HCl zu einer Sättigungskennlinie des Stroms auf etwa 5 nA (Abb. 106, Elektropherogramm 1). Dabei wurde eine Verringerung um 0,5 nA bei der 2. Messung beobachtet. Nach der 3. Messung verringerte sich das Stromsignal um etwa 1 nA. Die Migrationszeiten betragen 154 s (1. Messung), 151 s (2. Messung), 145 s (3. Messung).

Tabelle 24 zeigt zusammenfassend die Signalhöhen der verschiedenen Versuche zur Trennkanalinjektion von Wasserstoffperoxid in LTCC-Keramikchips.

Versuche mit Wasserstoffperoxid	Konzentration [μM]	Signalhöhe [nA]
Trennkanalinjektion	350	15,0
Trennkanalinjektion, HCl-Inkubation	135	6,0
Trennkanalinjektion, 1.Messung	135	5,0
Trennkanalinjektion, 2.Messung	135	4,5
Trennkanalinjektion, 3.Messung	135	4,0

Tabelle 24: Gemessene Ströme bei der amperometrischen Detektion von Wasserstoffperoxid durch Trennkanalinjektion.

IV.4.4.3. Trennkanalinjektion von Polyphenolen

Die Injektion von Polyphenolen in das mikrofluidische System des LTCC-Keramikchips wurde, wie bei Wasserstoffperoxid, über das Reservoir der Pufferinjektion ausgeführt. Dazu wurde eine Hochspannung über den Trennkanal angelegt. Nach Einstellung der Basislinie erfolgte die Entnahme eines definierten Volumens (abhängig von der Chipalterung) des vorgelegten Elektrolytpuffers aus dem Reservoir der Pufferinjektion. Im Anschluss folgte die Zugabe des gleichen Volumens einer Polyphenollösung.

Pyrogallol

Bei der amperometrischen Detektion von Pyrogallol (Abb. 40) wurde eine Trennschaltung von 300 V angelegt. Nach der Probenzugabe erfolgte die Ermittlung von Detektionsstrom und Migrationszeit.

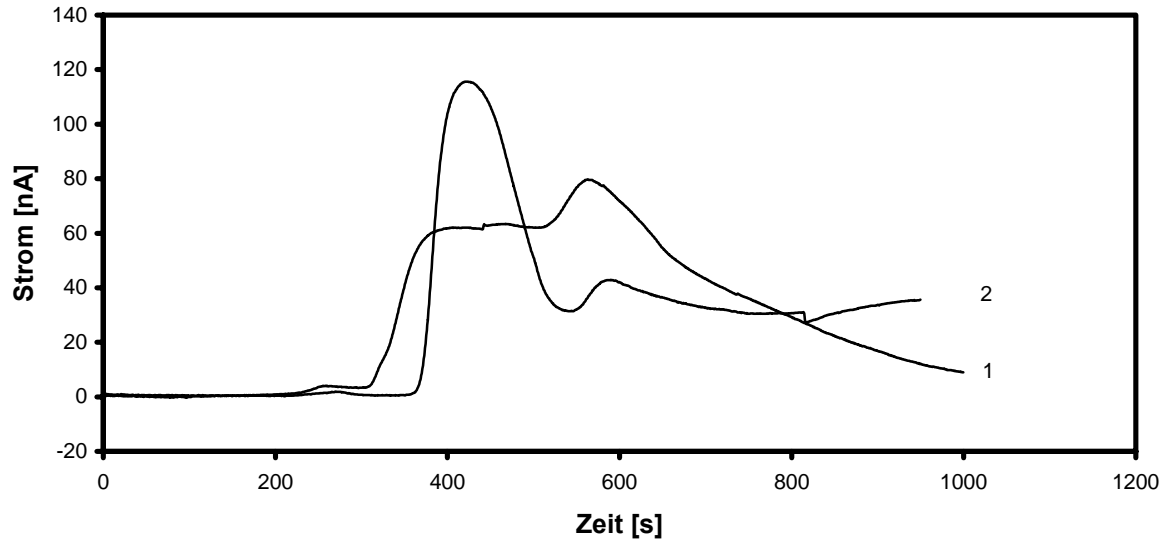


Abbildung 107: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion von Pyrogallol ($c = 2,5 \text{ mM}$) in einem Keramikchip bei direkter Trennkanalinjektion der Probe. Identischer Injektionszeitpunkt bei einer angelegten Trennspannung von 300 V ($E_{\text{pot}}: 0,8 \text{ V}$, GBF-Chiphalterung).

Eine Stromzunahme von 62 nA wurde bei der amperometrischen Detektion von Pyrogallol ($c = 2,5 \text{ mM}$) gemessen (Abb. 107, Elektropherogramm 1). Nach 200 s kam es zu einer weiteren Zunahme auf 80 nA, bevor das Stromsignal über einem Zeitraum von 400 s stetig bis auf 10 nA abfiel. Die gemessene Migrationszeit betrug 220 s. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde nach Reinigung der Kapillaren erneut Pyrogallol zugegeben. Verglichen mit der hyperbolischen Zunahme der 1. Messung wurde ein peakähnlicher Anstieg des Detektionsstroms auf 114 nA beobachtet (Abb. 107, Elektropherogramm 2). Es wurde eine Migrationszeit von 251 s ermittelt.

Bei einer Trennungsspannung von 300 V wurde Pyrogallol in die Kavität der Pufferinjektion eines Keramikchips mit verzinnnten äußeren Kontakten und Hochspannungskontakten aus Platin injiziert (Abb. 108). Die Injektionen erfolgten zu identischen Zeitpunkten.

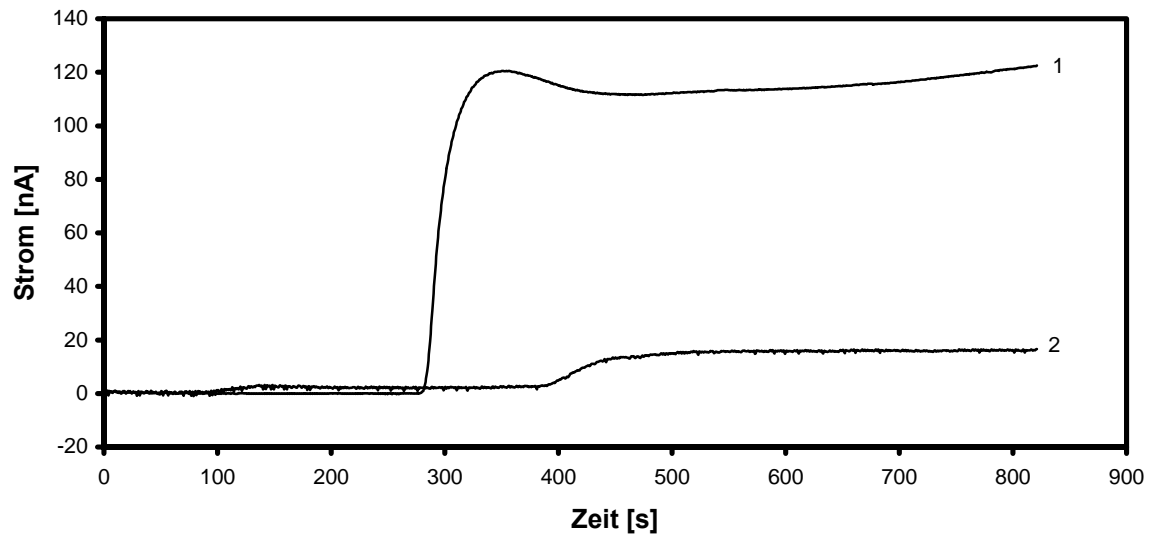


Abbildung 108: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, GBF-Chiphalterung) von Pyrogallol in unterschiedlichen Keramikchips bei einer angelegten Trennungsspannung von 300 V. Identischer Zeitpunkt der direkter Trennkanalinjektion: (1) Injektion von 2,5 mM, (2) Injektion von 5 mM in einen Keramikchip mit verzinnnten äußeren Kontakten und Hochspannungskontakten aus Platin.

Eine Zunahme des Stroms auf etwa 120 nA wurde bei der amperometrischen Detektion von Pyrogallol ($c = 2,5 \text{ mM}$) gemessen (Abb. 108, Elektropherogramm 1). Verglichen mit einer 5 mM Probenlösung (Abb. 108, Elektropherogramm 2) wurde ein etwa 90 % geringeres Stromsignal ermittelt. Die Differenz der Migrationszeiten betrug mehr als 100 s.

Dopamin

Wie bei Pyrogallol (Abb. 108) wurde für diese Messung ein LTCC-Keramikchip mit verzinnten äußeren Kontakten getestet. Die Hochspannungskontakte bestanden jedoch aus Gold. Bei der amperometrischen Detektion von Dopamin wurde eine Trennungsspannung von 400 V angelegt. Nach der Probenzugabe erfolgte die Messung von Detektionsstrom und Migrationszeit.

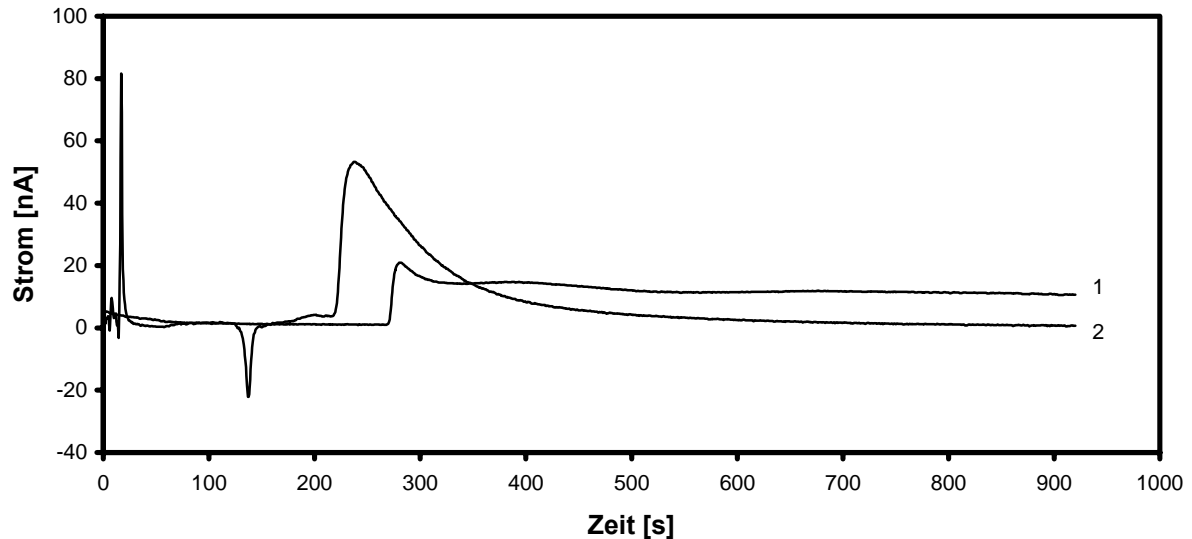


Abbildung 109: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, GBF-Chiphalterung) von Dopamin ($c = 2,5$ mM) in Keramikchips mit verzinnten äußeren Kontakten bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Identischer Zeitpunkt der direkten Trennkanalinjektion der Probe: (1) Detektion mit 20-fach vermessenem Chip, (2) Detektion eines neuen, unbehandelten Keramikchips.

Die amperometrische Detektion von Dopamin ($c = 2,5$ mM) in einem bereits mehrfach verwendeten Keramikchip mit verzinnten Kontakten führte bei einer Trennungsspannung von 400 V zu einer Stromzunahme von 15 nA (Abb. 109, Elektropherogramm 1). Eine Zunahme von 52 nA wurde bei der Verwendung eines neuen, unbehandelten Keramikchips gemessen (Elektropherogramm 2). Der Stromabfall nach 138 s auf -22 nA war keine direkte Folge der Probeninjektion. Diese erfolgte bereits nach 100 s.

Zur amperometrischen Detektion von Polyphenolen in LTCC-Keramikchips mit verzinnten äußeren Kontakten wurden Chiphalterungen mit kugelförmigen und spitzen Federkontakten verwendet. Mittels Dopamin als Testsubstanz sollten Einflüsse der Chiphalterung auf Migrationszeit und Stromsignal ermittelt werden. Dazu wurde ein Keramikchip zunächst mit der GBF-, dann mit der HSS-Chiphalterung getestet. Es wurde eine 400 V Trennungsspannung zur Ermittlung von Migrationszeit und Stromsignal angelegt (Abb. 110).

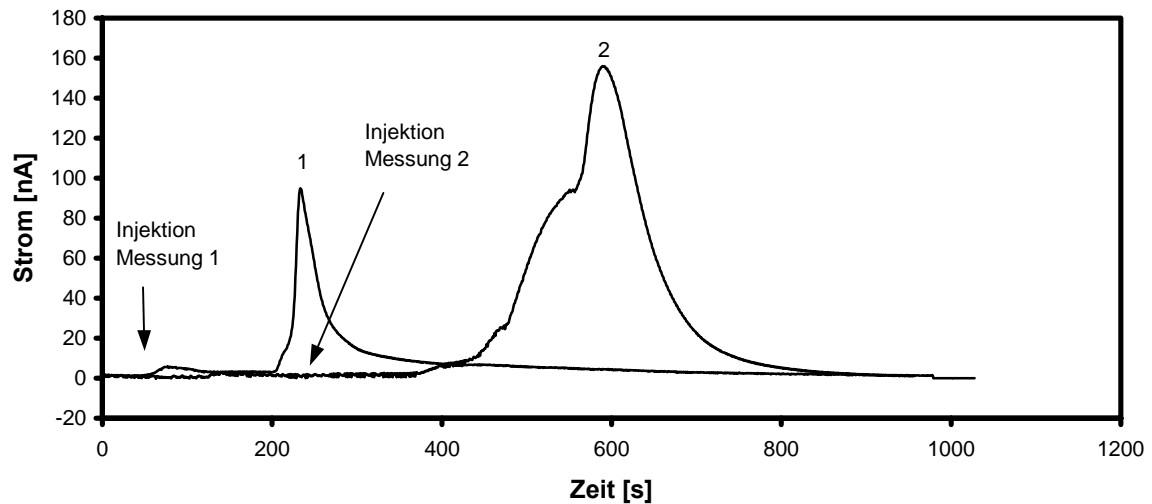


Abbildung 110: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion ($E_{\text{pot.}}$: 0,8 V) von Dopamin ($c = 2,5$ mM) in einem Keramikchip mit verzinnnten äußeren Kontakten bei einer angelegten Trennschaltung von 400 V und direkter Trennkanalinjektion: (1) kugelförmige Elektrodenkontakte in der GBF-Chiphalterung, (2) spitze Elektrodenkontakte in der HSS-Chiphalterung.

Die Verwendung kugelförmiger Federkontakte führte zu einem Anstieg des Detektionsstroms auf 90 nA bei einer Migrationszeit von 143 s (Abb. 110, Elektropherogramm 1). Eine Zunahme auf 159 nA wurde bei der HSS-Chiphalterung gemessen (Elektropherogramm 2). Die Migrationszeit betrug 144 s.

Phloroglucin

Die amperometrische Detektion von Phloroglucin wurde bei einer Trennspannung von 400 V mit Hilfe einer HSS-Chiphalterung durchgeführt. Die Probeninjektion erfolgte wie in Kapitel IV.4.4. beschrieben.

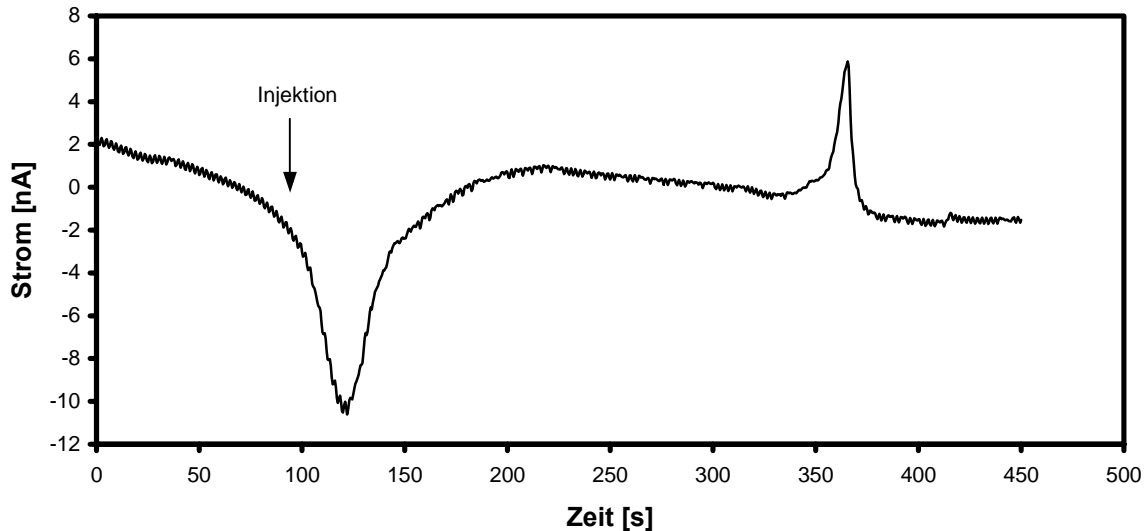


Abbildung 111: Amperometrische Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Phloroglucin ($c = 15 \text{ mM}$) in einem Keramikchip. Trennkanalinjektion bei einer angelegten Trennspannung von 400 V.

Die Migrationszeit von Phloroglucin betrug 226 s. Es wurde ein Signalpeak von 8 nA gemessen. Der Stromabfall zu Beginn der Messung (120 s) auf -10 nA war keine direkte Folge der Probeninjektion. Diese erfolgte bereits nach 100 s.

Brenzkatechin

Die gemessenen Elektropherogramme (Abb. 107-109) zeigten bei der Trennkanalinjektion bisweilen unterschiedliche Verläufe des Detektorstroms. Mit Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) sollte durch Injektion der Probe in verschiedene Reservoirs ein Nachlaufen des Elektrolytpuffers aus den Seitenkapillaren untersucht werden. Nach Einstellung der Basislinie wurden $70 \mu\text{l}$ des vorgelegten Elektrolytpuffers aus dem Reservoir der Pufferinjektion entnommen. Die Zugabe des gleichen Volumens der Probenlösung erfolgte anschließend. In derselben Art und Weise wurde bei der Verwendung der Kavitäten von Puffereinlass und Pufferauslass verfahren. Dabei wurden $25 \mu\text{l}$ des vorgelegten Elektrolytpuffers durch Brenzkatechin ersetzt (Abb. 112).

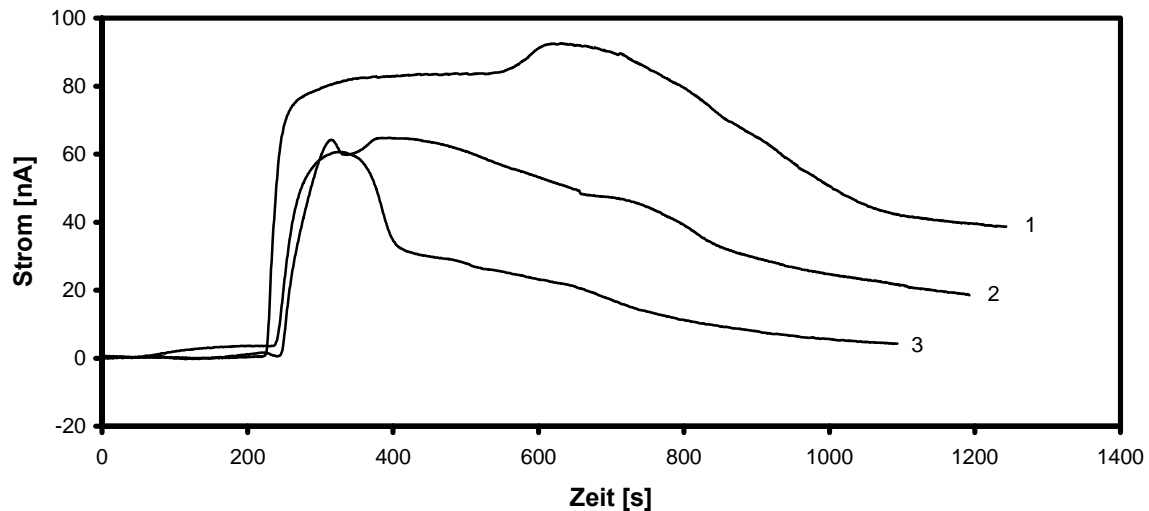


Abbildung 112: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) in einem Keramikchip bei einer angelegten Trennspannung von 400 V und direkter Trennkanalinjektion der Probe in unterschiedliche Kapillaröffnungen: (1) Injektion in Probeneinlass, Probenauslass und Puffereinlass, (2) Injektion in Puffereinlass, (3) Injektion in Probeneinlass und -auslass (Seitenkapillaren).

Die Probeninjektion in die Kavität des Puffereinlasses führte zu einem Stromanstieg auf 65 nA (Abb. 112, Elektropherogramm 2). Ein Anstieg auf 83 nA wurde bei der Injektion von Brenzkatechin in die Reservoirs Probeneinlass, Probenauslass und Puffereinlass gemessen (Abb. 112, Elektropherogramm 1). Die amperometrische Detektion von Brenzkatechin führte nach Injektion der Probe in die Seitenkapillaren (Probeneinlass und Probenauslass) zu einem Detektionsstrom von 60 nA.

IV.4.4.4. Amperometrische Detektion von Brenzkatechin in einem funktionalisierten LTCC-Keramikchip

Mit Hilfe des elektroosmotischen Flusses war auf Grund einer negativ geladenen Kapillaroberfläche ein Transport und somit amperometrische Detektion der Polyphenole an der Kathode möglich. Zur Steigerung der Anzahl negativer Ladungen an der Kapillaroberfläche sollten bereits getestete Beschichtungsprotokolle verwendet werden (Abb. 80). Dazu wurden die Kapillaren nach einer 16-stündigen Inkubation mit 1 M KOH mit Millipore®-Wasser, Methanol und Toluol gespült. Anschließend erfolgte die Silanisierung der Kapillaren mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (1 Gewichtsprozent) über eine HPLC-Pumpe für 6 Stunden. Nach der Silanisierung wurden die Kapillaren mit Toluol, Methanol und Millipore®-Wasser gespült. Anschließend erfolgte der Anschluss an das Schlauchpumpensystem und die 90-minütige Inkubation der Kapillaren mit 0,25 M

Bernsteinsäureanhydridlösung. Nach dem Spülen mit Millipore[®]-Wasser für 10 min konnte der Keramikchip mit Elektrolytpuffer (pH 7,3) befüllt und getestet werden.

Testung der amperometrischen Detektoreinheit

Die Beschichtungsreagenzien zur Funktionalisierung der Kapillaren kamen aufgrund der Befüllungstechnik mit der Detektoreinheit in Kontakt. Einflüsse auf den amperometrischen Detektor des LTCC-Keramikchips auf Grund der Immobilisierungen sollten durch Messungen vor und nach der Silanisierung ermittelt werden. Dazu wurde über den Trennkanal eines unbehandelten Keramikchips eine Hochspannung von 400 V angelegt. Nach Einstellung der Basislinie wurden 70 μ l der vorgelegten Elektrolytpuffer aus dem Detektorreservoir entnommen und durch Zugabe von Brenzkatechin ($c = 2,5$ mM) ersetzt. Nach Beendigung der Messung erfolgte die Funktionalisierung mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid (siehe Kapitel IV.4.5.3). Im Anschluss wurde eine weitere Testung der Messeinheit durchgeführt (Abb. 113).

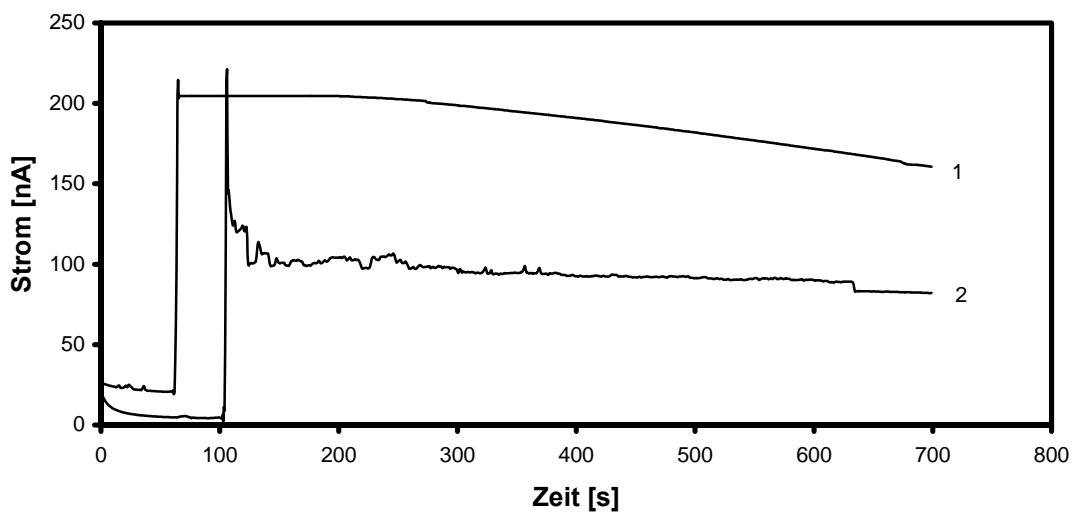


Abbildung 113: Überprüfung der Detektorfunktion eines Keramikchips vor und nach einer Silanisierung mittels direkter Injektion von Brenzkatechin ($c = 2,5$ mM) auf Arbeits- und Referenzelektrode (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) ohne angelegte Hochspannung. Elektropherogramme: (1) nicht silanisiert, (2) mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid funktionalisiert.

Ein Stromanstieg um 129 nA wurde nach 600 s bei Testung der Messeinheit vor der Silanisierung ermittelt (Abb. 113, Elektropherogramm 1). Das 2. Elektropherogramm zeigt den Stromverlauf nach Behandlung mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid. Dabei wurde ein Strom von 90 nA gemessen.

Amperometrische Detektion von Brenzkatechin

Nach erfolgter Funktionalisierung der LTCC-Kapillaren mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid wurde Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V amperometrisch detektiert. Aufgrund der Funktionalisierung wurde ein geringerer Flüssigkeitsstrom (Fluidik) des Elektrolytpuffers in den Kapillaren beobachtet. Somit wurde die Probe in die Reservoire Probeneinlass, Puffereinlass und Probeneinlass injiziert. Anschließend erfolgte die Ermittlung von Migrationszeit und Detektionsstrom in einem silanisierten Keramikchip (Abb. 114).

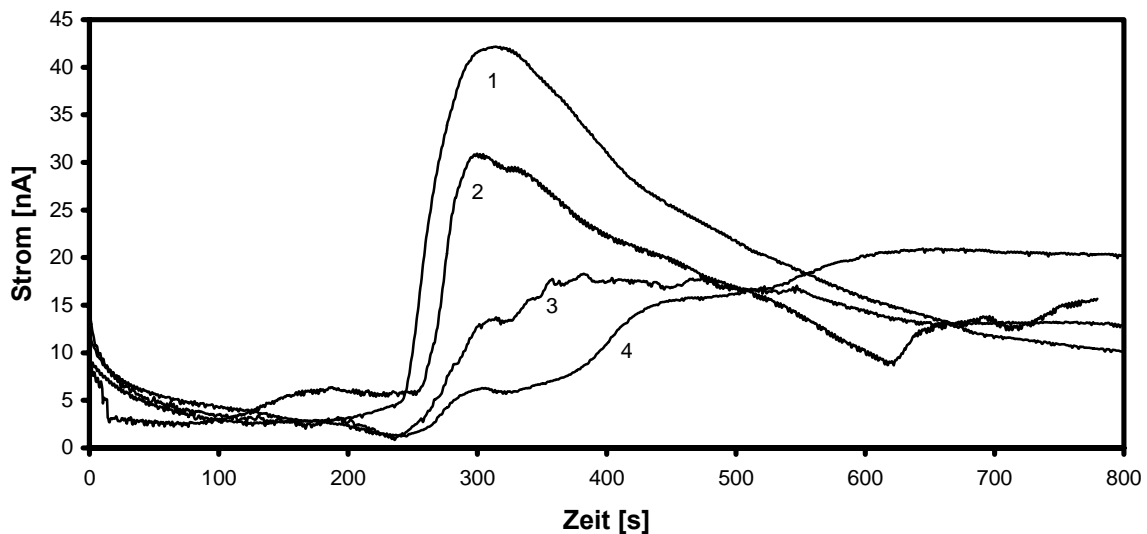


Abbildung 114: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion ($E_{\text{pot}}: 0,8 \text{ V}$, HSS-Chiphalterung) von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$) in einem mit APTES silanisierten und mit Bernsteinsäureanhydrid funktionalisierten Keramikchip. Probeninjektion in Probenauslass, Puffer-, und Probeneinlass nach direkter Trennkanalinjektion bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V : (1-4) Reihenfolge der durchgeführten Messungen.

Eine Wiederholung der Messungen mit Brenzkatechin führte zu einer Abnahme des Detektionsstroms. Wurde in der ersten Messung ein Strommaximum von 42 nA gemessen, verringerte sich dieses über 31 nA (2. Messung) auf 17 nA in der 3. Messung. Bei der 4. Messung konnte keine eindeutiger Signalpeak ermittelt werden. Es kam zu einem Stromanstieg über einen Zeitraum von etwa 350 s auf 20 nA .

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der verschiedenen Versuche zur Trennkanalinjektion von Polyphenolen in LTCC-Keramikchips in Tabelle 25 dargestellt.

Versuche mit Polyphenolen	Konzentration [mM]	Signalhöhe [nA]
Pyrogallol		
Pyrogallol	2,5	62
Pyrogallol	2,5	114
Pyrogallol, Platinelektroden, verzinnte Kontakte	2,5	120
Pyrogallol, Platinelektroden, verzinnte Kontakte	5,0	15
Dopamin		
Dopamin, verzinnte Kontakte	2,5	15
Dopamin, verzinnte Kontakte, neuer Chip	2,5	52
Dopamin, verzinnte Kontakte, GBF-Halterung, konditioniert	2,5	90
Dopamin, verzinnte Kontakte, HSS-Halterung, konditioniert	2,5	159
Phloroglucin		
Phloroglucin	15,0	8
Brenzkatechin		
Brenzkatechin, Injektion in Reservoir 3	2,5	65
Brenzkatechin, Injektion in Reservoir 1, 2 und 3	2,5	83
Brenzkatechin, Injektion in Reservoir 1 und 2	2,5	60
silanisierter LTCC-Chip		
Testung der Messeinheit mit Brenzkatechin vor der Silanisierung	2,5	159
Testung der Messeinheit mit Brenzkatechin nach der Silanisierung	2,5	90
Brenzkatechin, 1. Injektion in Reservoir 1, 2 und 3	2,5	42
Brenzkatechin, 2. Injektion in Reservoir 1, 2 und 3	2,5	31
Brenzkatechin, 3. Injektion in Reservoir 1, 2 und 3	2,5	17
Brenzkatechin, 4. Injektion in Reservoir 1, 2 und 3	2,5	nicht ermittelbar

Tabelle 25: Gemessene Ströme bei der amperometrischen Detektion von Polyphenolen. Die Injektion erfolgte über den Trennkanal bei einer angelegten Hochspannung von 400 V (Versuche mit Pyrogallol bei 300 V).

IV4.4.5. Trennung und Detektion von Polyphenolgemischen

Innerhalb dieser Untersuchungen sollten auf LTCC-Keramikchips mit Hilfe der Kapillarzonenlektrophorese Polyphenolgemische in die Kapillaren injiziert und die einzelnen Polyphenole anhand ihrer Migrationszeit getrennt werden. Diese Untersuchungen wurden wie Kapitel IV.4.4.3. beschrieben mittels Trennkanalinjektion ausgeführt. Dazu wurde die gesamte Kapillare mit dem Elektrolytpuffer befüllt. Anschließend erfolgte das Anlegen einer 400 V Hochspannung über den Trennkanal. Die Proben wurde nach Messstart und

Einstellung der Stromkennlinie auf einen niedrigen Basisliniendrift in die Pufferinjektions-Kavität injiziert. Im Anschluss erfolgte die Identifizierung der Polyphenole aufgrund der ermittelten Migrationszeiten.

Gemisch aus zwei Polyphenolen

Die Trenneffizienz des LTCC-Systems wurde zunächst mit zwei Polyphenolen getestet. Dabei wurden Gemische aus Dopamin mit Brenzkatechin und Dopamin mit Pyrogallol in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die Injektion erfolgte wie in Kapitel IV.4.4.3. beschrieben (Abb. 115).

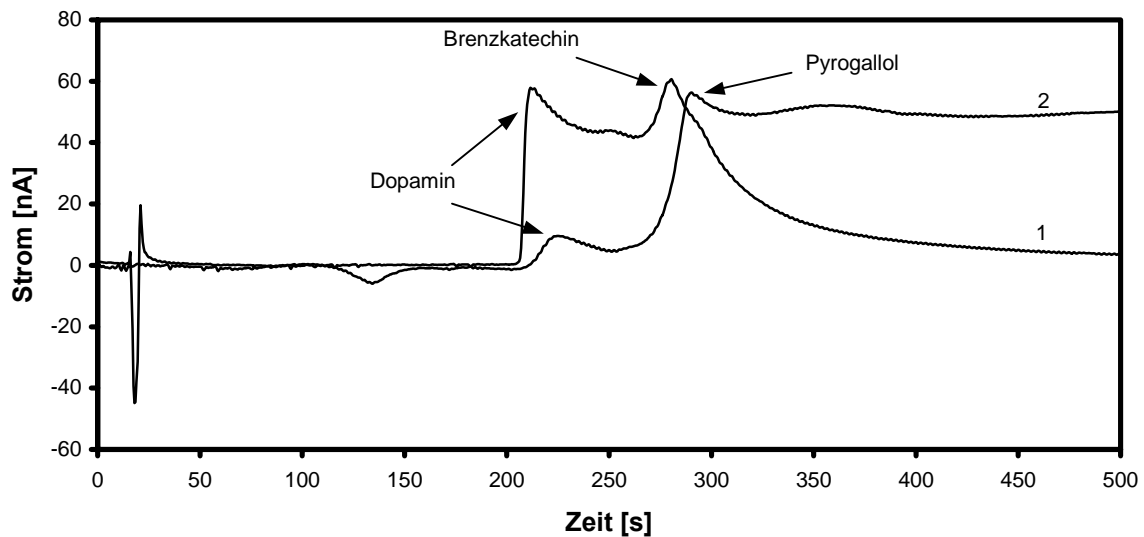


Abbildung 115: Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Gemischen aus zwei Polyphenolen in verschiedenen Keramikchips bei einer Trennspannung von 400 V und direkter Trennkanalinjektion zum selben Zeitpunkt: (1) je 2,5 mM Dopamin und Brenzkatechin, (2) 0,3 mM Dopamin und 4,5 mM Pyrogallol.

Das erste Elektropherogramm zeigt die amperometrische Detektion eines Gemisches aus Dopamin und Brenzkatechin ($c = \text{je } 2,5 \text{ mM}$). Dabei wurde ein Stromanstieg auf 57 nA bei Dopamin und 59 nA bei Brenzkatechin gemessen. Die Migrationszeit betrug für Dopamin 110 s, für Brenzkatechin 159 s. Ein Gemisch aus Dopamin ($c = 0,3 \text{ mM}$) und Pyrogallol ($c = 4,5 \text{ mM}$) führte zu einem Stromsignal von 9 nA bei Dopamin und 55 nA bei Pyrogallol (Abb. 115, Elektropherogramm 2). Dabei wurde eine Migrationszeit von 108 s für Dopamin und 164 s für Pyrogallol ermittelt. Die Migrationszeiten der einzelnen Polyphenole wurden bereits in Einzelversuchen ermittelt und zur Auswertung herangezogen.

Gemisch aus drei Polyphenolen

Gemische aus zwei Polyphenolen konnten durch CZE getrennt und aufgrund ihrer Migrationszeiten identifiziert werden. Nach diesem Ergebnis sollte die Trennung eines Gemisches aus drei Polyphenolen durchgeführt werden (Abb. 116 und 117).

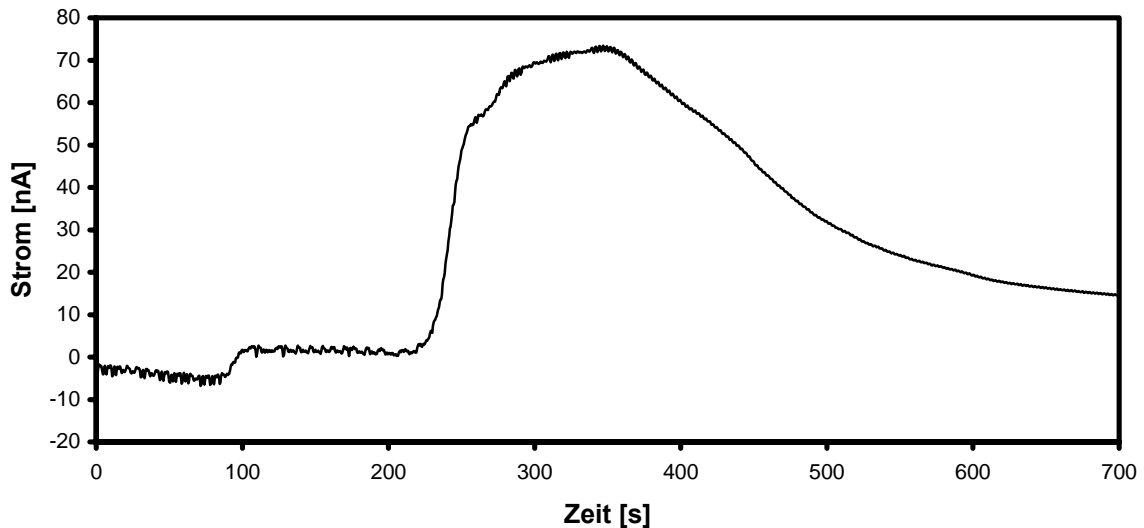


Abbildung 116: Elektropherogramm der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) eines Polyphenolgemisches in einem Keramikchip bei angelegter Trennspannung von 400 V und direkter Trennkanalinjektion von je 1,6 mM Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol.

Die amperometrische Detektion eines Gemisches aus Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol ($c = \text{je } 1,6 \text{ mM}$) führte zu keiner Trennung der einzelnen Polyphenole. Es wurde ein Stromanstieg auf 73 nA gemessen. Die Detektionszeit von 108 s entsprach der Migrationszeit von Dopamin.

Es konnte keine Trennung von Gemischen mit den Polyphenolen Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol erzielt werden. Änderungen der Hochspannung, des Injektionsverfahren und des Puffersystems führten zu keiner Verbesserung der Trennleistung. Somit sollte für weitere Versuche Brenzkatechin gegen Phloroglucin ausgetauscht werden. Zudem wurden die Polyphenole in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt (Abb. 117).

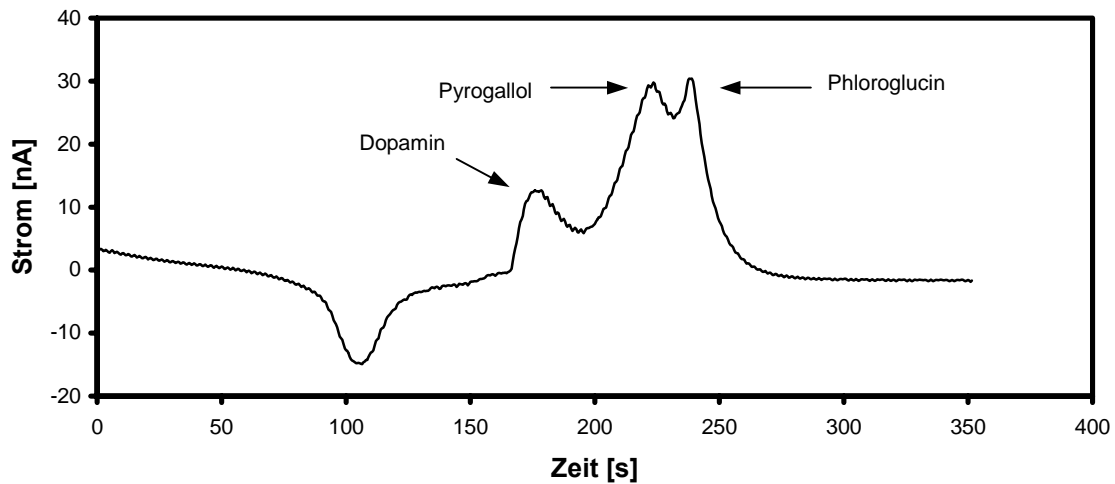


Abbildung 117: Elektropherogramm der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chipalterung) eines Polyphenolgemisches in einem Keramikchip bei angelegter Trennungsspannung von 400 V und direkter Trennkanalinjektion von Dopamin ($c = 1$ mM), Pyrogallol ($c = 2,5$ mM) und Phloroglucin ($c = 5$ mM).

Ein Gemisch aus Dopamin ($c = 1$ mM), Pyrogallol ($c = 2,5$ mM) und Phloroglucin ($c = 5$ mM) konnten aufgrund der Migrationszeiten in einem LTCC-Keramikchip getrennt werden. Dabei führte die amperometrische Detektion zu einem Stromanstieg auf 10 nA (Dopamin), 29 nA (Pyrogallol) und 30 nA (Phloroglucin). Die Migrationszeiten betragen 109 s, 140 s und 174 s.

Tabelle 26 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse zur Trennung von Polyphenolen aus Gemischen der verschiedenen Versuche zur Erarbeitung eines geeigneten Trennsystems auf LTCC-Keramikchips.

Polyphenolgemische	Differenz der Migrationszeiten [s]		Trennung
	Probe 1 und 2	Probe 2 und 3	
Dopamin und Brenzkatechin	21	X	ja
Dopamin und Pyrogallol	40	X	ja
Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol	X		nein
Dopamin, Pyrogallol, Phloroglucin	38	60	ja

Tabelle 26: Trennung von Polyphenolgemischen. Aufbringen der Probe mittels Trennkanalinjektion bei einer angelegten Hochspannung von 400 V.

IV.4.4.6. Gesamtübersicht gemessener Migrationszeiten von Polyphenolen

Abbildung 118 und Tabelle 27 zeigen zusammenfassend die ermittelten Migrationszeiten aller verwendeter Polyphenole mit der Methode der Trennkanalinjektion zur Erarbeitung eines mikrofluidischen Trennsystems auf LTCC-Basis.

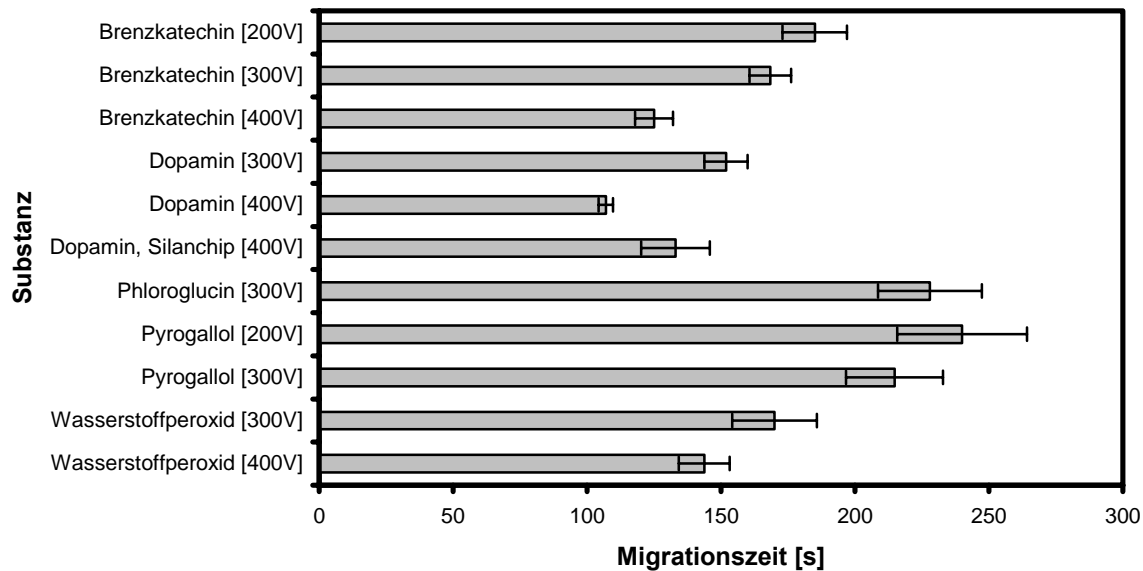


Abbildung 118: Übersicht der Migrationszeiten (Mittelwert aus drei Messungen) von Wasserstoffperoxid und der eingesetzten Polyphenole in einem konditionierten LTCC-Keramikchip bei direkter Trennkanalinjektion. Die angelegte Trennspannung ist in Klammern angegeben.

Substanz	Hochspannung [V]	Migrationszeit [s]	Standardabweichung [s]
Brenzkatechin	200	185	12,0
Brenzkatechin	300	168	7,8
Brenzkatechin	400	125	7,1
Dopamin	300	152	8,1
Dopamin	400	107	2,7
Dopamin(Silanchip)	400	133	12,8
Phloroglucin	300	228	19,4
Pyrogallol	200	240	24,2
Pyrogallol	300	215	18,1
Wasserstoffperoxid	300	170	15,8
Wasserstoffperoxid	400	144	9,5

Tabelle 27: Numerische Auflistung der Migrationszeiten (Mittelwert aus drei Messungen) von Wasserstoffperoxid und der eingesetzten Polyphenole bei direkter Trennkanalinjektion in LTCC-Keramikchips.

IV.4.5. Elektrokinetische Injektion von Polyphenolen in LTCC-Keramikchips

Die Probenaufgabe in das Reservoir des Puffereinlasses, führte bei der Trennkanalinjektion zu einem stetigen Nachfließen der Probenlösung in den Trennkanal. Dies bewirkte ein plateauähnliches Stromsignal mit geringer Trenneffizienz. Das Injektionsvolumen in der CE muss jedoch für eine hohe Trenneffizienz minimiert sein um den Beitrag zur Bandenverbreiterung gering zu halten. Demnach darf die injizierte Probe bei einem Gesamtvolumen von einigen Mikrolitern nur wenige Nanoliter betragen. Somit findet bei der CE auf Mikrochips ausschließlich die elektrokinetische Injektion Anwendung. Die Probe wird durch Anlegen geeigneter Potentiale an den Elektroden über den Trennkanal elektrophoretisch und elektroosmotisch in die Kapillare transportiert (Abb. 17). Durch gegenläufige Elektrolytströme wird die Probe im Injektionskreuz fokussiert und nach dem Umschalten der elektrischen Felder über den Trennkanal aufgetrennt.

Ziel sollte die Entwicklung eines geeigneten elektrokinetischen Injektionsverfahren zur amperometrische Detektion von Polyphenolen sein. Zudem sollten Polyphenolgemische auf Grund ihrer Migrationszeiten mittels Kapillarzonenelktrophorese getrennt werden. Dazu wurde die HSS-Chiphalterung an das Hochspannungsnetzgerät zur elektrokinetischen Beladung angeschlossen. Anschließend wurden die Kapillaren mit Elektrolytpuffer befüllt und der LTCC-Keramikchip in die Halterung eingebaut. Die Aufnahme der Stromkennlinie erfolgte zur Kontrolle des eingestellten Arbeitspotentials und möglicher Stromschwankungen zunächst ohne angelegte Spannung. Nach Zuschaltung des Hochspannungsnetzgerätes wurde durch Befüllung des Probeneinlasses (Austausch von 28 μl Puffer gegen die gleiche Probenmenge) die Messung gestartet. Die Umschaltung von Injektions- auf Trennmodus erfolgte automatisch über einen integrierten Timer nach 30 s. Sowohl Injektions- als auch Trennspeisung betragen 400 V. Nach Umschaltung auf den Trennmodus wurden die Injektionskontakte, unter Berücksichtigung des Injektionsverfahrens, auf 320 V oder auf hochohmig geschaltet. Vor dem Ausbau des LTCC-Keramikchips wurden die Reservoirs entleert und mit Millipore[®]-Wasser gespült.

IV.4.5.1. Reinigung der Elektrodenkontakte

Mit zunehmenden Messungen kam es zu Ablagerungen auf der Arbeitselektrode. Dies führte zu einem abnehmenden Stromsignal.

Da mechanische Reinigungen zu Beschädigungen an der Messeinheit führten, sollten Schwefelsäure, Salpetersäure, Kaliumhydroxid und Königswasser getestet werden, um diese Ablagerungen zu entfernen (Abb. 177). Dazu wurden diese auf den amperometrischen Detektor pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Reservoir entleert und die Kapillaren 20 min lang mit Millipore®-Wasser gespült.

Substanz	Konzentration [M]	Inkubationsdauer [min]	Ergebnis
Schwefelsäure	1	20	-
Schwefelsäure	2	20	-
Salpetersäure	0,1	20	-
Salpetersäure	1	20	-
Kaliumhydroxid	0,1	20-60	-
Kaliumhydroxid	1	20-60	-
Königswasser	2	0,1	+

Tabelle 28: Reinigung der Arbeitselektrode (“-“: keine Entfernung; “+“: Entfernung der Ablagerungen).

Die Verwendung von Königswasser führte bei einer Einwirkzeit von etwa 3-5 s zu einer Entfernung der Ablagerungen auf der Arbeitselektrode. Die Versuche mit den anderen Substanzen verliefen negativ.

IV.4.5.2. Elektrolyttestung bei unterschiedlichen Potentialschaltungen

Durch gegenläufige Elektrolytströme wird bei der elektrokinetischen Beladung die Probe im Injektionskreuz fokussiert und ein Nachlaufen aus den seitlichen Kapillaren verhindert. Zur Erzeugung solcher Elektrolytströme ist das Anlegen geeigneter Potentiale an den Elektroden erforderlich (Abb. 119).

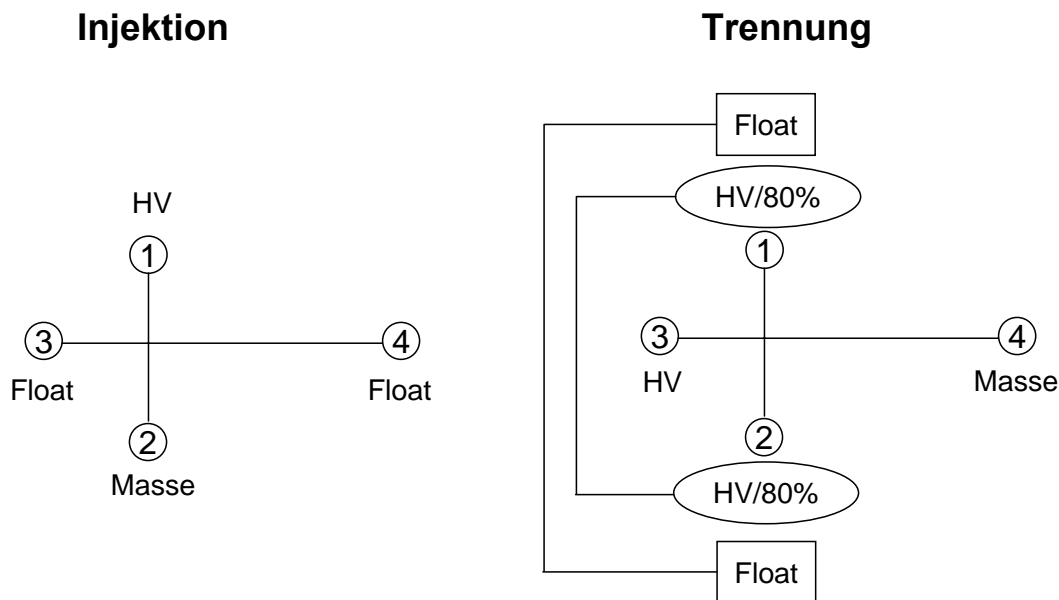


Abbildung 119: Schematische Darstellung zur Schaltung der Hochspannungskontakte bei Injektion und Trennung (HV: Hochspannung).

In dieser Arbeit wurden zwei Trennschaltungen zur amperometrischen Detektion von Polyphenolen getestet (Abb. 119).

1. Schaltung der Hochspannungskontakte auf hochohmig (Float)
2. Schaltung der Hochspannungskontakte auf etwa 80 % der Trennspannung (Stromfluss beträgt 0 Ampere)

Diese Schaltungen sollten zunächst nur mit dem verwendeten 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) überprüft werden (ohne Testsubstanz). Dazu wurden die Kapillaren mit Elektrolytpuffer befüllt und der LTCC-Keramikchip in die HSS-Halterung eingebaut. Nach Kontrolle des eingestellten Arbeitspotentials und möglicher Stromschwankungen wurde die Messung durch Zuschaltung der Hochspannung gestartet. Dabei erfolgte die Umschaltung von Injektions- auf Trennungsmodus automatisch über einen integrierten Timer nach 30 s. Sowohl Injektions- als auch Trennspannung betragen 400 V.

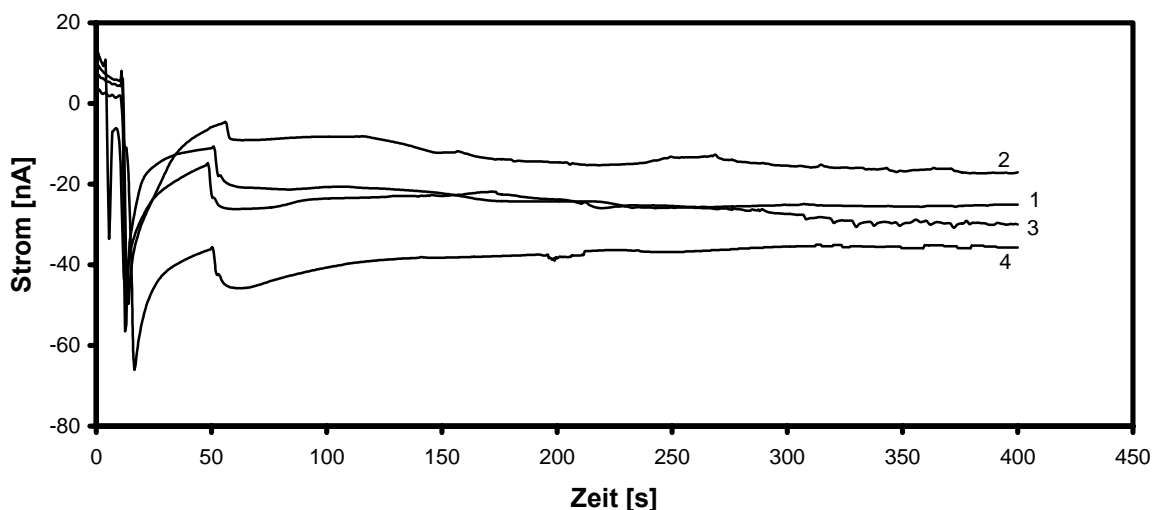


Abbildung 120: Amperometrische Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) des verwendeten 0,1 M Natriumphosphatpuffers (pH 7,3) bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Testung unterschiedlicher Schaltungsmodi der Kontakte für die elektrokinetische Injektion für jeweils 30 s: (1) Schaltung auf jeweils 320 V mit HSPG Modell 1, (2) Schaltung auf jeweils 80 % der angelegten Trennungsspannung mit HSPG Eigenbau, (3) Schaltung auf hochohmig mit HSPG Eigenbau, (4) Schaltung auf hochohmig mit HSPG Modell 1.

Die Stromschwankungen zu Beginn der Messungen beruhen auf dem Umschalten der Hochspannung von Injektions- auf Trennmodus. Die Testung des Elektrolytpuffers führte bei allen amperometrischen Messungen über einen Zeitraum von 300 s zu einer Signaldrift von etwa 5-8 nA.

IV.4.5.3. Amperometrische Detektion von Polyphenolen nach elektrokinetischer Injektion

Für die Entwicklung eines neuen elektrochemisch-analytischen Detektionssystems auf LTCC-Mikrochips wurden die Polyphenole Brenzkatechin, Dopamin, Pyrogallol, Gallussäure, Quercetin, Resveratrol, Resorcin und Kaffeesäure als Modellanalyte verwendet (Abb. 40). Aufgrund von Vorversuchen sollte der Focus auf Brenzkatechin, Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure liegen. Durch die Auswertung der Elektropherogramme sollten substanzspezifische und analytische Messparameter ermittelt werden. Diese sollten zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit der kapillarelektrophoretischen Trennung auf LTCC-Keramikchips herangezogen werden. Dazu wurden die Kapillaren nach Konditionierung mit KOH und Behandlung der Referenzelektrode mit HCl mit Elektrolytpuffer befüllt. Anschließend wurde der LTCC-Keramikchip in die HSS-Halterung eingebaut. Die Messung wurde nach Kontrolle des eingestellten Arbeitspotentials gestartet. Dabei erfolgte die

Umschaltung von Injektions- auf Trennmodus automatisch über einen integrierten Timer nach 30 s. Die angelegte Injektions- und Trennschaltung betrug 400 V.

IV.4.5.3.1. Brenzkatechin

Die elektrokinetische Injektion von 1,2-Dihydroxybenzol erfolgte durch unterschiedliche Schaltung der Injektionskontakte (Kapitel IV.4.5.2.) bei einer angelegten Injektions- und Trennschaltung von jeweils 400 V. Dazu wurden die Kapillaren mit KOH konditioniert und die Referenzelektrode mit HCl behandelt. Anschließend wurden die Kapillaren mit Elektrolytpuffer befüllt und in die HSS-Halterung eingebaut. Dabei erfolgte zunächst die Einstellung der Basislinie und die Kontrolle des eingestellten Arbeitspotentials ohne angelegte Hochspannung. Nach Zuschaltung des Hochspannungsnetzgerätes wurde durch Befüllung des Probeneinlasses (Austausch von 28 μl Puffer gegen die gleiche Probenmenge) die Messung gestartet. Die Umschaltung von Injektion- auf Trennmodus erfolgte automatisch über einen integrierten Timer nach 30 s.

Eine Brenzkatechinlösung ($c = 5 \text{ mM}$) wurde durch Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der angelegten Trennschaltung (Abb. 121, Elektropherogramm 1) und Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig (Abb. 121, Elektropherogramm 2) amperometrisch detektiert (Abb. 121).

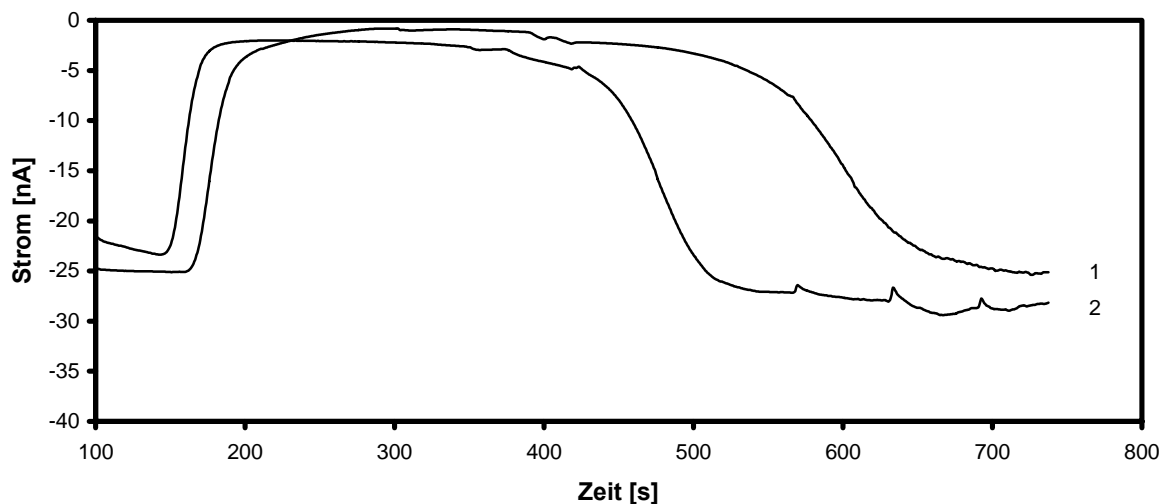


Abbildung 121: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Brenzkatechin ($c = 5 \text{ mM}$) in einem Keramikchip bei einer angelegten Trennschaltung von 400 V und elektrokinetischer Injektion: (1) Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der angelegten Trennschaltung, Migrationszeit: 177 s, (2) Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig, Migrationszeit: 160 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin ($c = 5 \text{ mM}$) wurde ein Stromanstieg beobachtet, der nach 250 s bis 300 s auf das Ausgangsniveau zurückging. Eine Stromzunahme von 24 nA wurde bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin gemessen (1. Messung). Die Peakfläche betrug 9,5 AU, die Migrationszeit 177 s. Nach 10-minütigem Spülen mit Millipore[®]-Wasser wurden die Kapillaren erneut mit Elektrolytpuffer befüllt. Die anschließende Messung bei hochohmig geschalteten Injektionskontakten führte zu einer Migrationszeit von 160 s (2. Messung). Es wurde eine Stromzunahme von 20 nA ermittelt. Die Peakfläche betrug 6,9 AU.

Die Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennungsspannung führte zu einem Stromfluss von 0 Ampere im Injektionskanal. Folglich fließt während des Trennmodus mittels elektroosmotischen Flusses keine Probe aus den seitlichen Kapillaren in den Trennkanal. Es sollte eine Verringerung der angelegten Hochspannung auf 60 % der Trennungsspannung getestet werden (Abb. 122). Dies wurde mit Brenzkatechin ($c = 5 \text{ mM}$) unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen durchgeführt.

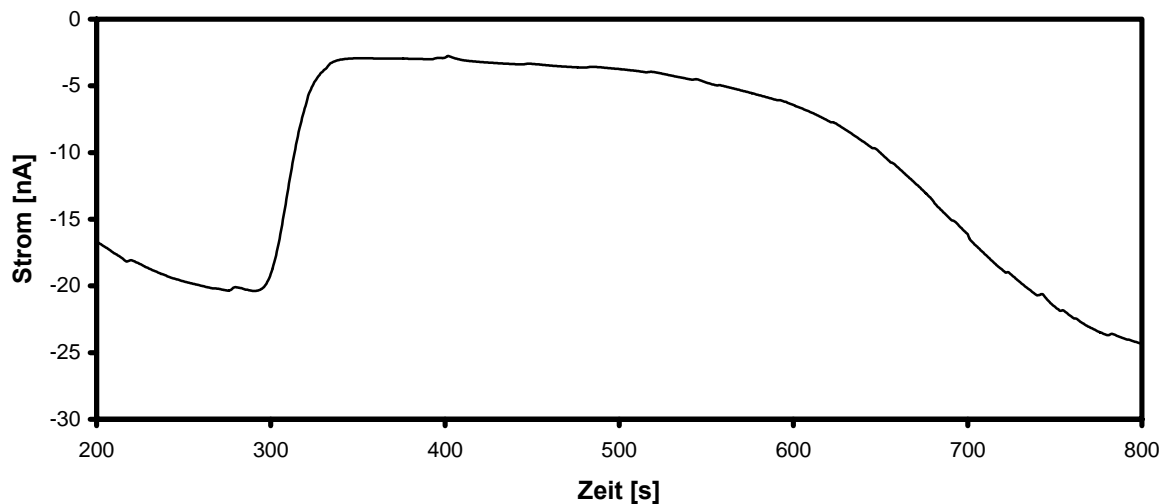


Abbildung 122: Amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Brenzkatechin ($c = 5 \text{ mM}$) in einem Keramikchip mit einer Injektionsspannung von 60 % der angelegten 400 V Trennungsspannung. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum. Migrationszeit: 209 s.

Verglichen mit der Migrationszeit bei einer Injektionsspannung von 80 % der angelegten Trennungsspannung (Abb. 122) erhöhte sich diese auf 209 s. Bei nahezu identischem Stromverlauf wurde ein Anstieg um 18 nA und eine daraus resultierende Peakfläche von 6,7 AU ermittelt. Zudem wurde im Injektionskanal ein Strom von $-0,13 \text{ mA}$ gemessen.

Eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit der Stromzunahme und der Peakfläche wurde in einer Versuchsreihe mit konditionierten Kapillaren getestet. Für die Messungen wurde Brenzkatechin in Konzentrationen von 0,025 mM bis 0,5 mM elektrokinetisch injiziert. Höhere Konzentrationen führten zu einem Anstieg der Ströme, die erst nach 300 s bis 500 s auf das Ausgangsniveau zurückfielen (Abb. 121).

Dazu wurde ein LTCC-Keramikchip 10 min lang mit Millipore®-Wasser gespült und mit Elektrolytpuffer befüllt. Nach Einbau in die HSS-Halterung erfolgte zunächst die Aufnahme der Stromkennlinie zur Kontrolle des eingestellten Arbeitspotentials und möglicher Stromschwankungen. Dies wurde ohne angelegte Hochspannung durchgeführt. Nach Zuschaltung des Hochspannungsnetzgerätes wurde die Messung durch Befüllung des Probeneinlasses gestartet. Dabei wurden 28 μ l Elektrolytpuffer gegen die gleiche Menge Brenzkatechin ausgetauscht. Die Umschaltung von Injektions- auf Trennmodus erfolgte automatisch über einen integrierten Timer nach 30 s (Abb. 123 und 124).

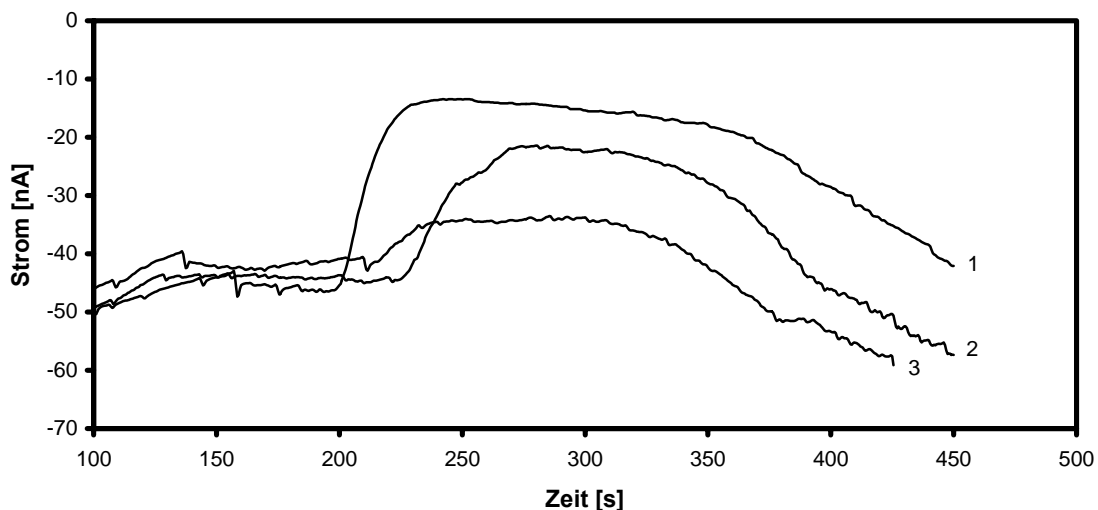


Abbildung 123: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Brenzkatechin in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Injektion bei einer Trennspannung von 400 V: (1) 0,5 mM, Migrationszeit: 119 s, (2) 0,25 mM, Migrationszeit: 139 s, (3) 0,1 mM, Migrationszeit: 137 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die amperometrischen Detektion von Brenzkatechin führte bei einer Trennspannung von 400 V zu Migrationszeiten von 119 s (0,5 mM), 139 s (0,25 mM) und 137 s (0,1 mM). Die Peakflächen betragen entsprechend 6,0 AU, 2,9 AU und 1,5 AU.

Das erste Elektropherogramm zeigt die amperometrische Detektion von 0,05 mM Brenzkatechin (Abb. 124). Die Migrationszeit betrug 127 s bei einer ermittelten Peakfläche von 0,14 AU. Die Verwendung von 0,025 mM Brenzkatechin führte zu einer Peakfläche von 0,11 AU. Es wurde eine Migrationszeit von 124 s gemessen (Abb. 124, Elektropherogramm 2).

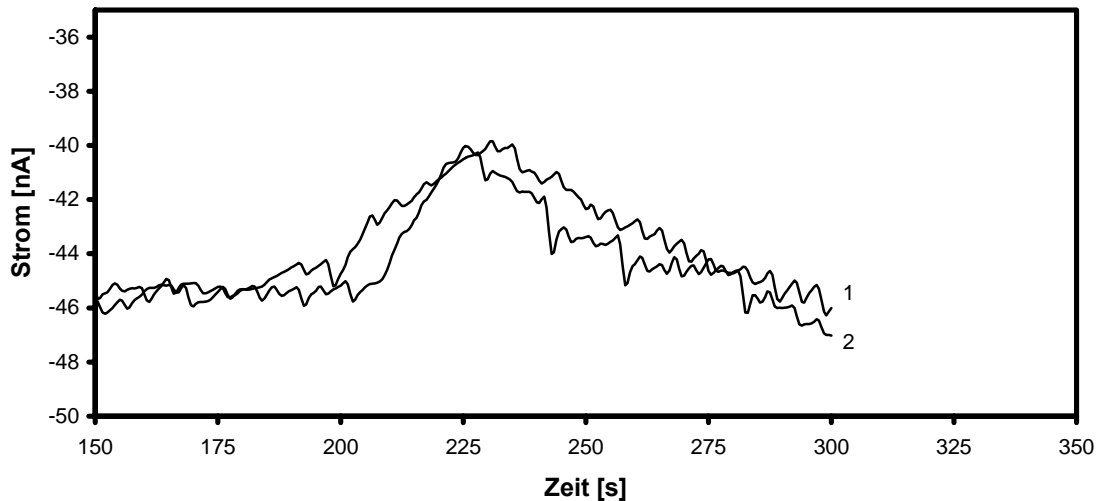


Abbildung 124: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Brenzkatechin in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Injektion bei einer Trennungsspannung von 400 V: (1) 0,05 mM, Migrationszeit: 127 s, (2) 0,025 mM, Migrationszeit: 124 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die Ermittlung der Peakbreite an der Peakbasis ist ein wichtiger Messparameter zur Berechnung der Effizienz eines elektrophoretischen Trennsystems. Diese sollte in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration ermittelt werden (Abb. 125).

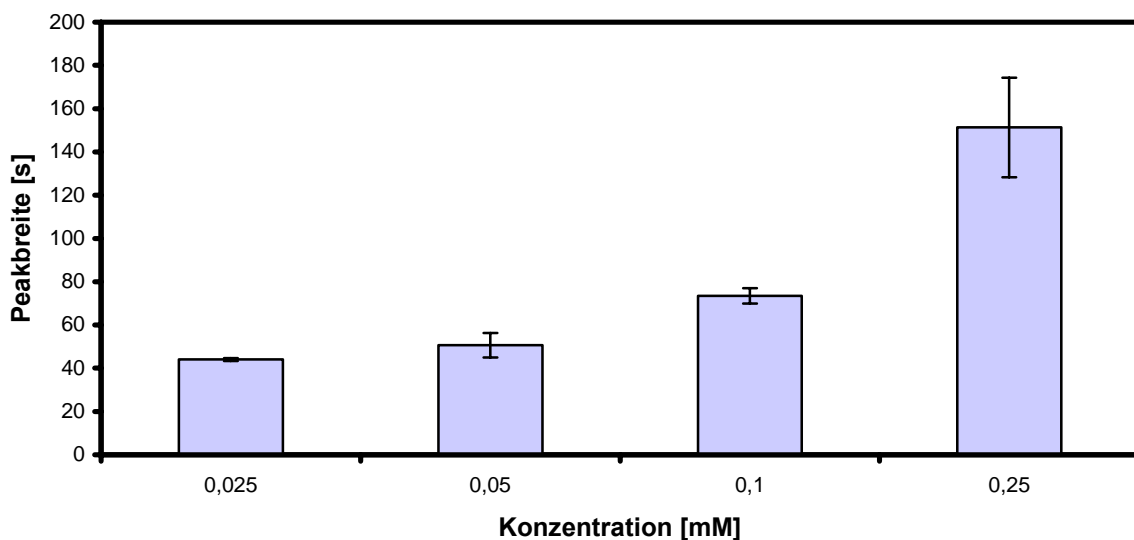


Abbildung 125: Vergleich der von Brenzkatechin ermittelten durchschnittlichen Peakbreiten in Abhängigkeit von der Konzentration (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Die Peakbreite bei einer Konzentration von 0,025 betrug $44,5 \pm 0,6$ s. Bei 0,05 mM wurden $50,5 \pm 5,2$ s ermittelt. Eine Zunahme von 23 % auf $73,3 \pm 3,4$ s wurde bei einer Konzentration von 0,1 mM beobachtet. Bei einer 0,25 mM Brenzkatechinelösung stieg die Peakbreite um mehr als 100 % auf $151,0 \pm 20,8$ s.

Zur Beurteilung der Trenneffizienz eines kapillarelektrophoretischen Systems sollte als weiterer Messparameter die Signalhöhe ermittelt werden. Da bei höheren Konzentrationen der zunehmende Stroms erst nach einigen hundert Sekunden auf das Ausgangsniveau zurückfällt, wurden nur Elektropherogramme bis zu einer Brenzkatechinkonzentration von 0,25 mM ausgewertet. Die ermittelten Signalhöhen wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Anschließend sollte zur Überprüfung des linearen Zusammenhangs zwischen Signalhöhe und Konzentration das Bestimmtheitsmaß ermittelt werden.

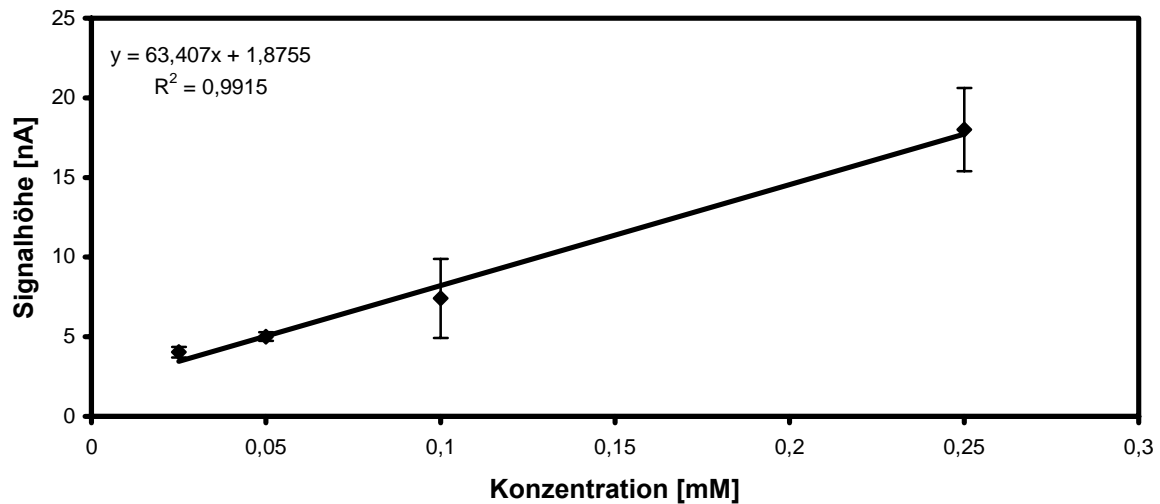


Abbildung 126: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Signalhöhe von der Konzentration bei der Bestimmung von Brenzkatechin (Mittelwerte aus drei Messungen).

Im Konzentrationsbereich von 0,025 mM bis 0,25 mM wurde ein linearer Verlauf der Kalibrationsgerade beobachtet. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,9915 ermittelt. Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tabelle 62 zusammengefasst.

Bei gut aufgelösten Peaks ist die Peakfläche zur Konzentration des Analyten proportional. Aufgrund der unsymmetrischen Peaks sollte zur Beurteilung des elektrophoretischen Trennsystems auf LTCC-Mikrochips die Peakfläche ausgewertet werden. Diese wurden nach Aufzeichnung der Bindungskurven ermittelt und gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Anschließend erfolgte die Berechnung der Regressionsgerade (Abb. 127).

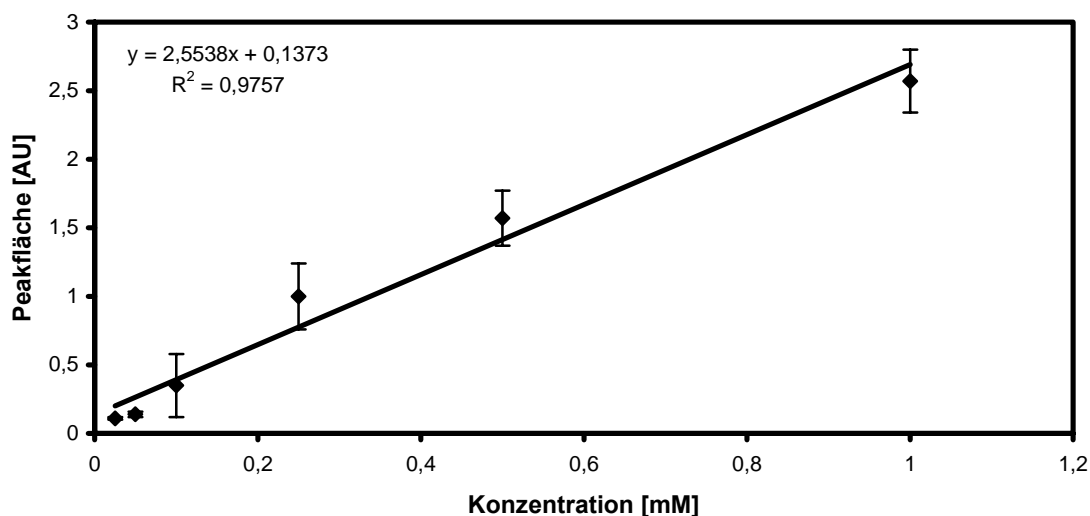


Abbildung 127: Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration von Brenzkatechin (Mittelwerte aus drei Messungen).

Ein linearer Verlauf der Kalibrationsgeraden wurde im Konzentrationsbereich von 0,025 mM bis 1 mM beobachtet. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,9757 ermittelt. Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tabelle 65 zusammengefasst.

Zusammenfassend werden in Tabelle 29 die wichtigsten elektrochemisch-analytischen Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin zur Erarbeitung eines geeigneten Trennsystems auf LTCC-Keramikchips aufgezeigt.

Elektrochemisch-analytische Messparameter von Brenzkatechin	
Migrationszeit [s]	$134,2 \pm 15,1$
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	$3,1 \cdot 10^{-2} \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]	$3,5 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 29: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V.

IV.4.5.3.2. Dopamin

Das zur Gruppe der Katecholamine gehörende Dopamin (3,4-Dihydroxyphenethylenamin) wurde entsprechend den Versuchen mit Brenzkatechin bei einer angelegten Injektions- und Trennungsspannung von jeweils 400 V elektrokinetisch injiziert und anschließend amperometrisch detektiert. Durch die Auswertung von Elektropherogrammen sollten elektrochemisch-analytische Messparameter von Dopamin ermittelt werden. Dazu wurden die Kapillaren nach der Konditionierung mit Elektrolytpuffer befüllt und in die HSS-Halterung eingebaut. Die Einstellung der Basislinie erfolgte zur Kontrolle des eingestellten Arbeitspotentials und möglicher Stromschwankungen ohne angelegte Hochspannung. Nach Zuschaltung des Hochspannungsnetzgerätes wurde durch Befüllung der Probeneinlass-Kavität (Austausch von 28 μl Puffer gegen die gleiche Probenmenge) die Messung gestartet. Die Umschaltung von Injektion- auf Trennmodus erfolgte automatisch über einen integrierten Timer nach 30 s. Nach jeder Messung wurde der LTCC-Keramikchip aus der Halterung ausgebaut und 15 min lang mit Millipore[®]-Wasser gespült. Für weitere Messungen wurden die Kapillaren erneut mit Elektrolytpuffer befüllt und in die HSS-Halterung eingebaut. Die Dopaminlösungen wurden durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert (Abb. 128).

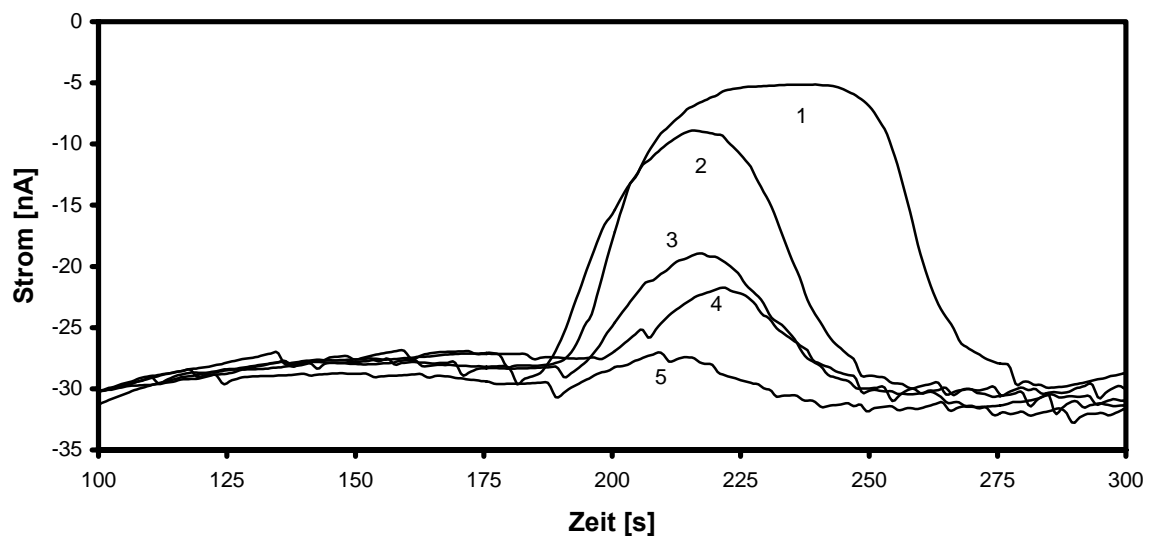


Abbildung 128: Abhängigkeit der Signalhöhe von der Dopaminkonzentration. Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Dopamin in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Beladung und angelegter Trennungsspannung von 400 V: (1) 0,5 mM, Migrationszeit: 112 s, (2) 0,25 mM, Migrationszeit: 108 s, (3) 0,1 mM, Migrationszeit: 115 s, (4) 0,05 mM, Migrationszeit: 129 s, (5) 0,025 mM Migrationszeit: 115 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Bei der amperometrischen Detektion von Dopamin wurde ein peakähnlicher Verlauf der Stromkurven im Konzentrationsbereich von 0,025 mM bis 0,5 mM beobachtet. Für die eingesetzten Konzentrationen wurden folgende Migrationszeiten und Peakflächen ermittelt (Tab. 30):

Konzentration [mM]	Migrationszeit [s]	Peakfläche [AU]
0,5	112	3,94
0,25	108	1,78
0,1	115	0,86
0,05	129	0,31
0,025	115	0,08

Tabelle 30: Auflistung der in Abbildung 128 ermittelten Migrationszeiten und Peakflächen.

Die in diesem Versuch ermittelten Peakflächen (Tab. 30) wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Anschließend sollte zur Überprüfung des linearen Zusammenhangs zwischen Peakfläche und Konzentration das Bestimmtheitsmaß ermittelt werden.

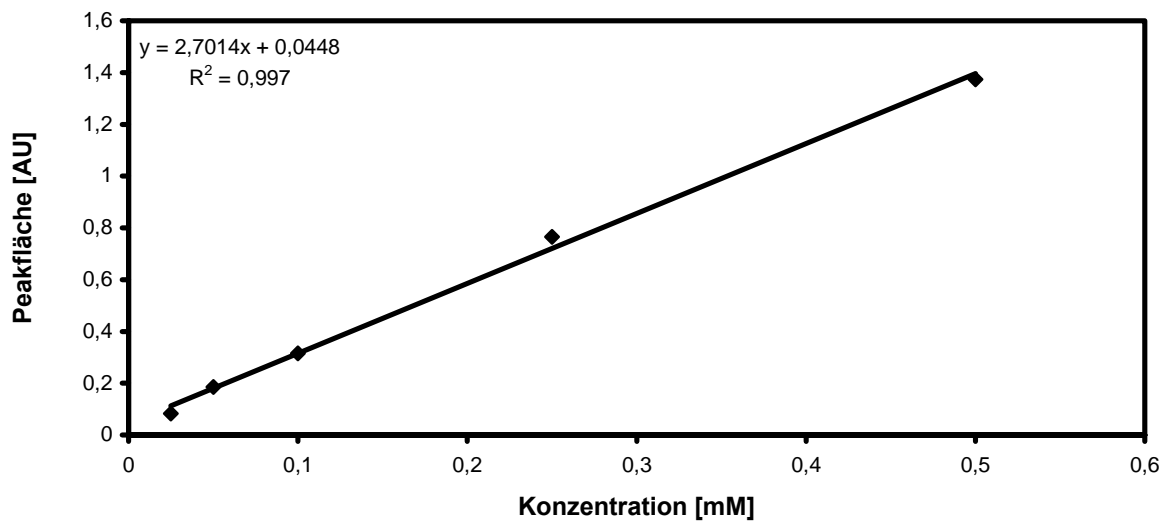


Abbildung 129: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration auf Basis der in Abb. 128 durchgeführten amperometrischen Detektion von Dopamin.

Ein linearer Verlauf der Kalibrationsgeraden wurde im Konzentrationsbereich von 0,025 mM bis 0,5 mM beobachtet. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß betrug 0,997. Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tab. 65 zusammengefasst.

Zur Berechnung der Effizienz eines elektro-phoretischen Systems sollte die Peakbreite an der Peakbasis in Abhängigkeit der Dopaminkonzentration ermittelt werden (Abb. 130).

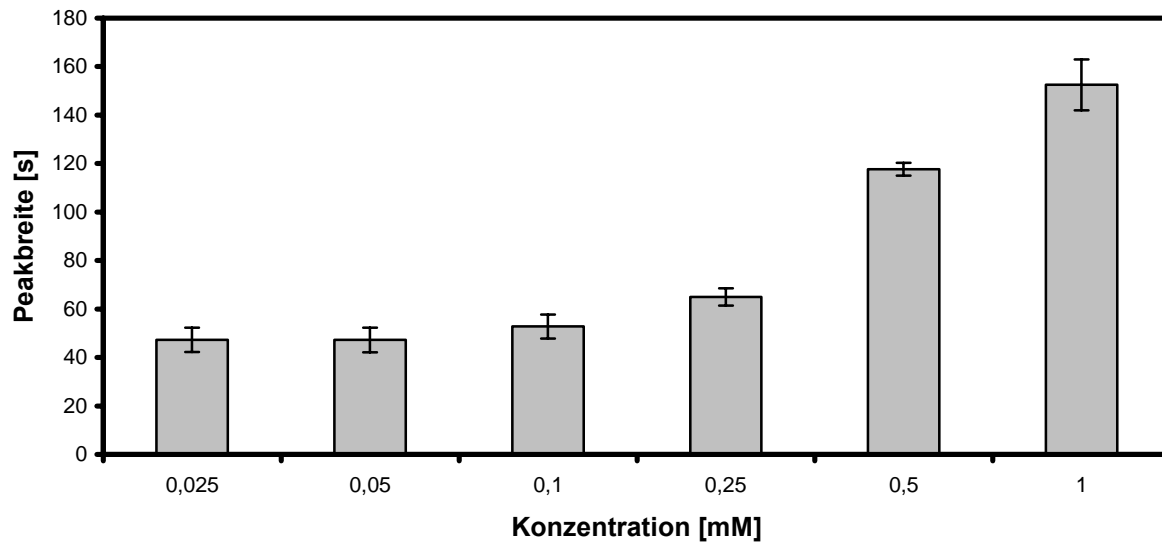


Abbildung 130: Vergleich der von Dopamin ermittelten durchschnittlichen Peakbreiten in Abhängigkeit von der Konzentration (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Im Konzentrationsbereich von 0,025 mM bis 0,25 mM kam es zu einem Anstieg der Peakbreite von $46,8 \pm 5,1$ s auf $65,2 \pm 2,6$ s. Eine Steigerung um 80 % auf $116,8 \pm 10,7$ s wurde bei einer Konzentration von 0,5 mM ermittelt. Bei 1 mM wurde ein weiterer Anstieg um 30 % auf $149,0 \pm 30,3$ s beobachtet.

Ein weiterer Messparameter zur Beurteilung der Trenneffizienz eines kapillarelektrophoretischen Systems ist die Signalhöhe. Da bei höheren Konzentrationen der zunehmende Strom erst nach einigen hundert Sekunden auf das Ausgangsniveau zurückfällt, wurden nur Elektropherogramme bis zu einer Konzentration von 0,2 mM ausgewertet. Die ermittelten Signalhöhen wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen.

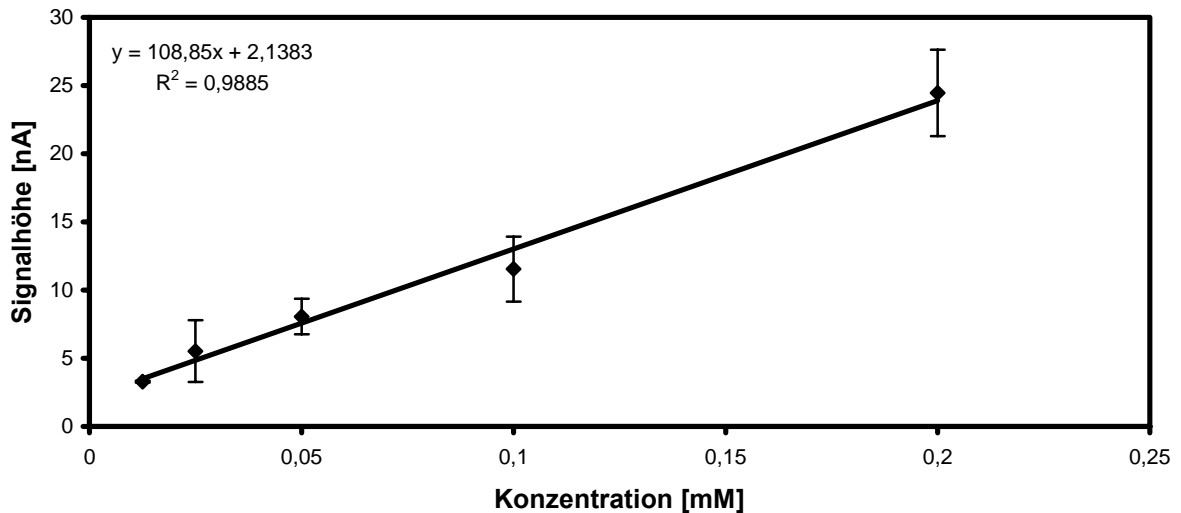


Abbildung 131: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Signalthöhe von der Konzentration bei der Bestimmung von Dopamin (Mittelwerte aus fünf Messungen).

Im Konzentrationsbereich von 0,0125 mM bis 0,2 mM wurde ein linearer Verlauf der Kalibrationsgeraden beobachtet. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,9885 ermittelt. In Tab. 61 sind die zugrunde liegenden Daten zusammengefasst.

Wie bereits erwähnt wurden in dieser Arbeit zwei Methoden der elektrokinetischen Injektion („pinched“-Injektion) von Polyphenolen getestet (Abb. 119). Bei den in Abbildung 128 dargestellten Elektropherogrammen wurden die Hochspannungskontakte auf hochohmig geschaltet. Diese sollten nun auf 80 % der Trennungsspannung eingestellt werden.

Die Versuchsdurchführung ist mit den in Kapitel IV.4.5.3.1. gemachten Angaben identisch.

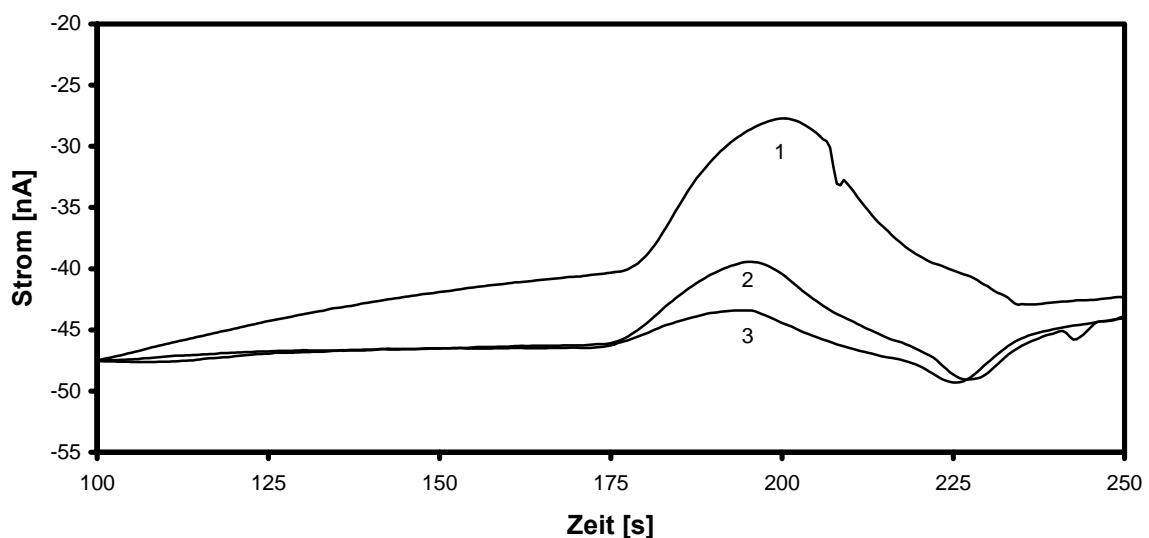


Abbildung 132: Elektropherogramme in Abhängigkeit der Signalthöhe von der Dopaminkonzentration. Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Dopamin in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Beladung. Schaltung der Injektionskontakte auf 320 V bei angelegter Trennungsspannung von 400 V: (1) 50 μ M, Migrationszeit: 101 s, (2) 25 μ M, Migrationszeit: 97 s, (3) 12,5 μ M, Migrationszeit: 95 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die amperometrische Detektion von Dopamin ($c = 50 \mu\text{M}$) führte bei Schaltung der Injektionskontakte auf 320 V zu einer Migrationszeit von 101 s (Abb. 132, Elektropherogramm 1). Für Konzentrationen von $25 \mu\text{M}$ bzw. $12,5 \mu\text{M}$ wurden Migrationszeiten von 97 s bzw. 95 s ermittelt (Abb. 132, Elektropherogramm 2 und 3). Die Peakflächen betragen 0,36 AU ($50 \mu\text{M}$), 0,21 AU ($25 \mu\text{M}$) und 0,07 AU ($12,5 \mu\text{M}$).

Die Migrationszeiten und Peakflächen von Dopamin sollten in weiteren Versuchen in LTCC-Keramikchips mit verzinnten, externen Elektrodenkontakten und Hochspannungskontakten aus Platin ermittelt werden. Nach Konditionierung der Kapillaren erfolgte der Einbau in die HSS-Halterung. Die Messung wurde nach Zuschaltung des Hochspannungsnetzgerätes durch Befüllung der Probeneinlass-Kavität mit Dopaminlösung gestartet.

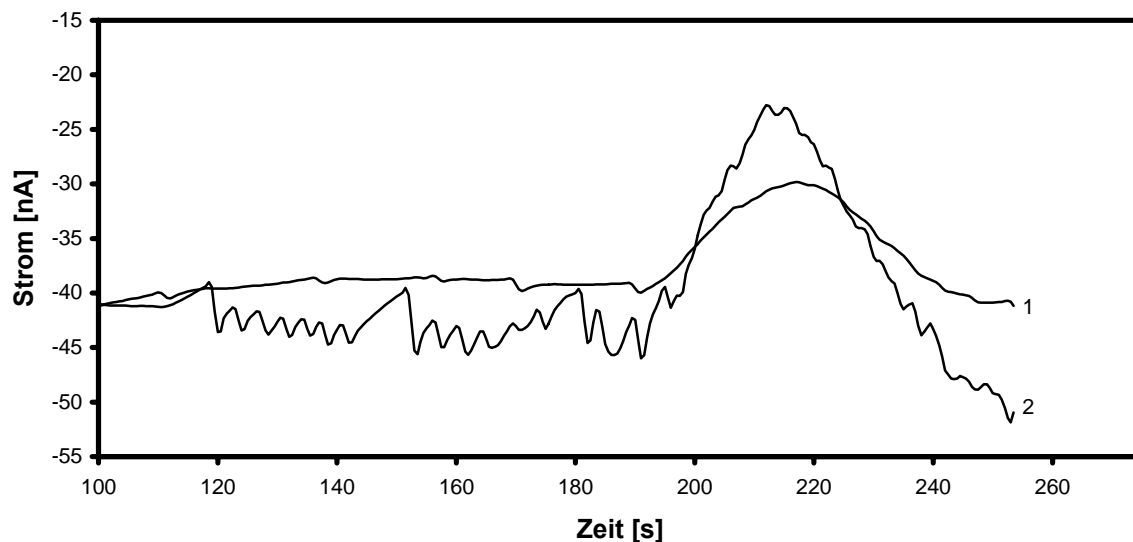


Abbildung 133: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Dopamin ($c = 100 \mu\text{M}$) in verschiedenen Keramikchips bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V: (1) Keramikchip ohne verzinnte äußere Kontakte, Migrationszeit: 115 s, (2) Chip mit verzinnten Kontakten, Migrationszeit: 128 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die amperometrische Detektion von Dopamin ($c = 100 \mu\text{M}$) führte bei der kapillarelektrophoretischen Trennung in LTCC-Keramikchips ohne verzinnte Hochspannungskontakte zu einer Migrationszeit von 115 s (Abb. 133, Elektropherogramm 1). Das 2. Elektropherogramm zeigt die amperometrische Detektion von Dopamin in einem Keramikchip mit verzinnten Kontakten. Das Stromsignal schwankte um etwa $\pm 2,5 \text{ nA}$. Es wurde eine Migrationszeit von 128 s ermittelt. Die Peakflächen betragen 0,32 AU (nicht verzinnte Elektrodenkontakte) und 0,50 AU (verzinnte Elektrodenkontakte).

Zur Beurteilung des elektrophoretischen Trennsystems auf LTCC-Keramikchips sollte aufgrund der unsymmetrischen Peakform die Peakfläche berechnet werden. Diese wurden nach Aufzeichnung der Elektropherogramme ermittelt und gegen die eingesetzten Dopaminkonzentrationen aufgetragen. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Regressionsgerade (Abb. 134).

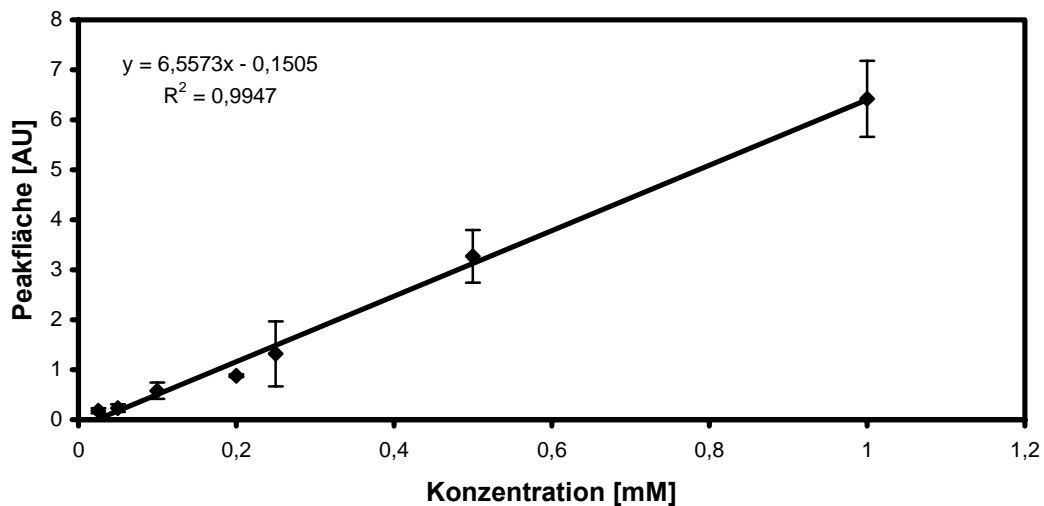


Abbildung 134: Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration bei der Bestimmung von Dopamin (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Im Konzentrationsbereich von 0,0125 mM bis 1 mM wurde ein linearer Verlauf der Kalibrationsgeraden beobachtet. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,9947 ermittelt. Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tab. 65 zusammengefasst.

Zusammenfassend werden in Tabelle 31 die wichtigsten ermittelten elektrochemisch-analytischen Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Dopamin zur Erarbeitung eines geeigneten Trennsystems auf LTCC-Keramik aufgezeigt.

Elektrochemisch-analytische Messparameter	HSPG		pH-Wert		Messwert
	Modell 1	Eigenbau	7,3	9,0	
Migrationszeit [s]	X		X		113,6 ± 11,2
Migrationszeit [s]		X	X		110,8 ± 8,9
Migrationszeit [s]		X		X	78,6 ± 10,7
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]	X		X		3,7*10 ⁻² ± 2,5*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]		X	X		3,9*10 ⁻² ± 3,0*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]		X		X	4,6*10 ⁻² ± 1,0*10 ⁻²
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	X		X		4,1*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]		X	X		4,5*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]		X		X	6,0*10 ⁻⁴

Tabelle 31: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Dopamin bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V sowie die Überprüfung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte (HSPG) und der pH-Werte.

IV.4.5.3.3. Pyrogallol

Als weiteres Polyphenol wurde 1,2,3-Trihydroxybenzol (Abb. 40) entsprechend den vorherigen Versuchen bei einer angelegten Injektions- und Trennungsspannung von jeweils 400 V elektrokinetisch injiziert und anschließend amperometrisch detektiert. Die aufgenommenen Elektropherogramme sollte zur Ermittlung elektrochemisch-analytischer Messparameter herangezogen werden. Zudem sollte der Einfluss des pH-Wertes auf Migrationszeit und Peakform untersucht werden. Dazu wurden die Kapillaren, wie in Kapitel IV.4.1. beschrieben, konditioniert und mit dem 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,3) befüllt. Die Probeninjektion erfolgte in die Probeneinlass-Kavität nach Zuschaltung des Hochspannungsnetzgerätes. Der LTCC-Keramikchip wurde nach jeder Messung aus der Chiphalterung ausgebaut und 15 min lang mit Millipore®-Wasser gespült. Die Pyrogallollösung wurde durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert (Abb. 134).

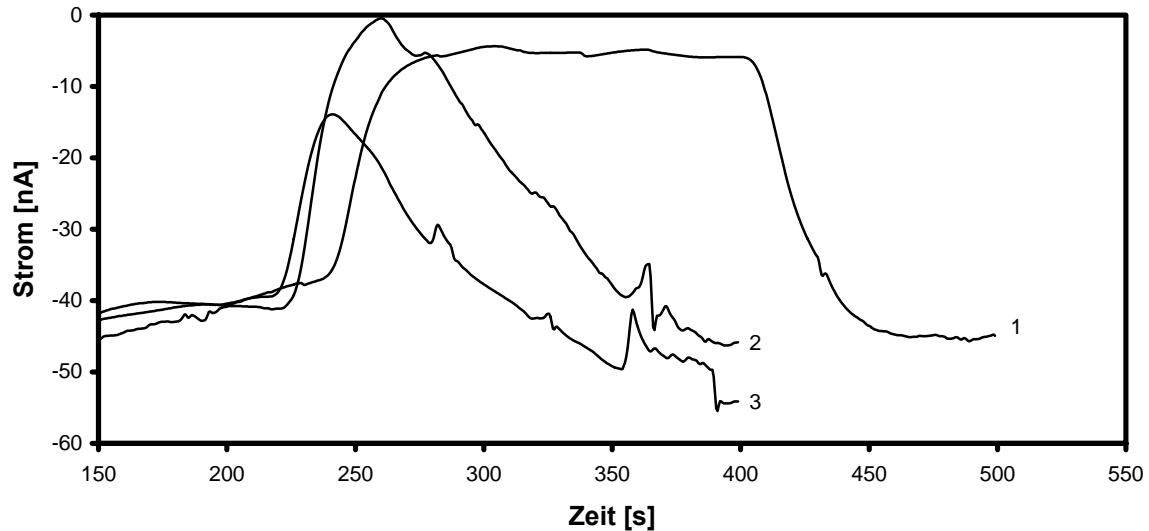


Abbildung 135: Elektropherogramme in Abhängigkeit der Signalhöhe von der Pyrogallolkonzentration. Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Pyrogallol in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Beladung bei angelegter Trennungsspannung von 400 V: (1) 0,8 mM, Migrationszeit: 149 s, (2) 0,4 mM, Migrationszeit: 138 s, (3) 0,2 mM, Migrationszeit: 127 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die amperometrische Detektion von Pyrogallol ($c = 0,8 \text{ mM}$) führte zu einem Stromanstieg von 35 nA, der erst nach 150 s auf das Ausgangsniveau zurückfiel (Abb. 134, Elektropherogramm 1). Die Migrationszeit betrug 149 s und die Peakfläche 6,0 AU. Bei Konzentrationen von 0,4 mM (Abb. 134, Elektropherogramm 2) und 0,2 mM (Abb. 134, Elektropherogramm 3) kam es nach dem Signalpeak zu einer Abnahme des Stroms über einen Zeitraum von etwa 100 s. Die Migrationszeiten betragen 138 s (0,4 mM) und 127 s (0,2 mM). Für die Peakflächen wurden 2,7 AU (0,4 mM) und 0,9 AU (0,2 mM) ermittelt.

Die in diesem Versuch ermittelten Peakflächen wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Ergänzt wurde dies durch eine Testreihe mit einer Schaltung der Injektionsspannung auf 80 % der angelegten Trennspannung (Abb. 136).

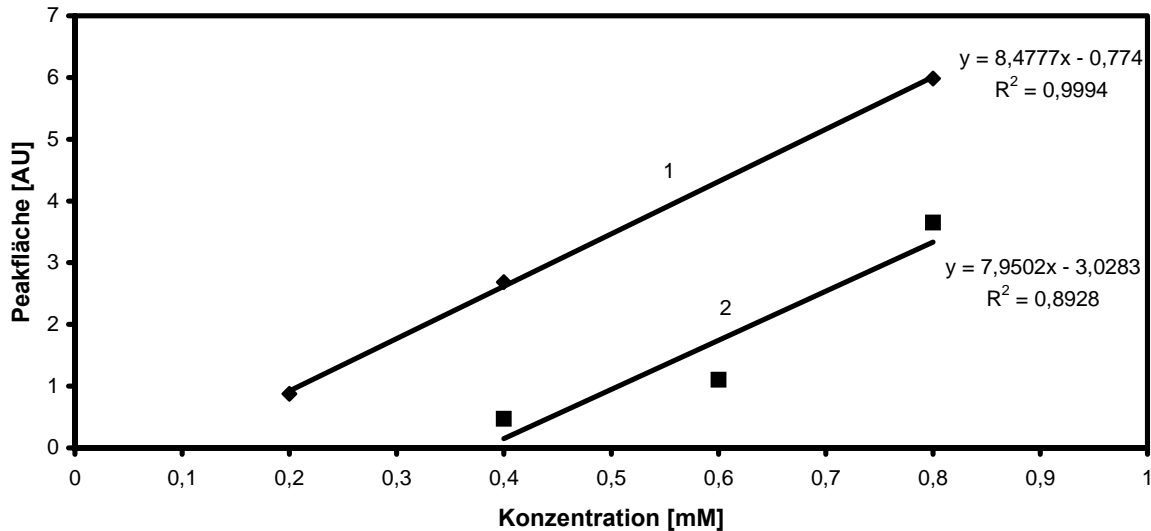


Abbildung 136: Kalibrationsgeraden zur Abhängigkeit der Peakfläche auf Basis der in Abb. 135 durchgeführten Pyrogallolbestimmung. Vergleich der Schaltmodi des Injektionssystems: (1) hochohmige Schaltung, (2) Schaltung auf 80 % der Trennspannung (graphisch nicht dargestellt).

Bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte wurde im Konzentrationsbereich von 0,2 mM bis 0,8 mM Pyrogallol ein linearer Verlauf der Kalibrationsgeraden beobachtet. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,9994 ermittelt. Bei einer Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennspannung betrug das Bestimmtheitsmaß 0,8928. Zusammenfassend sind die verwendeten Messwerte in Tab. 65 dargestellt.

Die Migrationszeit von Pyrogallol sollte in Abhängigkeit vom pH-Wert des Elektrolytpuffers ermittelt werden. Nach Vorbehandlung der Keramikchips mit KOH und HCl erfolgte die Befüllung mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 4,9). Unter Verwendung der HSS-Halterung wurde die Pyrogallollösung, nach Zuschaltung der Hochspannung, in die Puffereinlass-Kavität pipettiert. Die Probe wurde durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert. Gleichmaßen erfolgte die Durchführung mit dem Elektrolytpuffer pH 7,3 und pH 9,0 (Abb. 137).

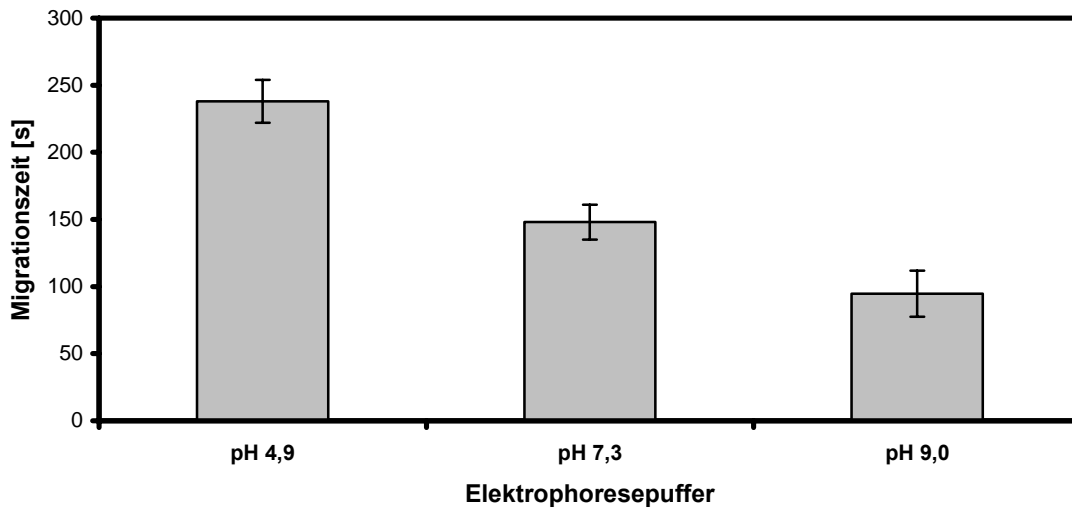


Abbildung 137: Ermittlung der Migrationszeit in Abhängigkeit vom pH-Wert des Elektrophoresepuffers am Beispiel von Pyrogallol ($c = 1 \text{ mM}$). Elektrokinetische Injektion bei angelegter Trennungsspannung von 400 V in einem LTCC-Keramikchip (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Die Migrationszeit von Pyrogallol betrug bei einem Elektrolytpuffer mit pH 4,9 $238,0 \pm 15,9 \text{ s}$. Eine Verringerung um 62 % auf $145,5 \pm 12,8 \text{ s}$ (HSPG Eigenbau) wurde bei einem Elektrolytpuffer mit pH 7,3 ermittelt. Um weitere 44 % auf $94,6 \pm 17,1 \text{ s}$ verringert sich die Migrationszeit bei Verwendung eines Elektrolytpuffers pH 9,0. Zudem wurde im Vergleich mit dem eingesetzten Elektrolytpuffer pH 7,3 keine Verbesserung der Peakform beobachtet.

Die Peakbreite sollte zur Beurteilung der Effizienz des kapillarelektrophoretischen Trennsystems in Abhängigkeit der Pyrogallolkonzentration ermittelt werden. Dazu wurde die Peakbreite durch Anlegen einer Basislinie aus den Elektropherogrammen bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen (Abb. 138).

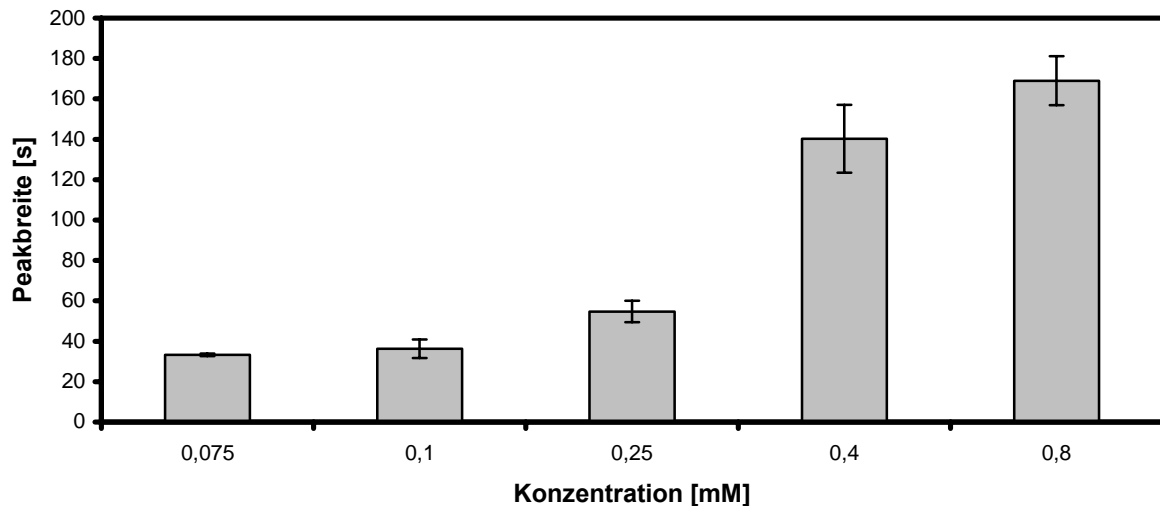


Abbildung 138: Vergleich der von Pyrogallol ermittelten durchschnittlichen Peakbreiten in Abhängigkeit von der Konzentration (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Im Konzentrationsbereich von 0,075 mM bis 0,1 mM Pyrogallol kam es zu einem Anstieg der Peakbreite von $33,3 \pm 0,6$ s auf $36,3 \pm 4,6$ s. Eine Steigerung um 48 % auf $53,8 \pm 5,4$ s wurde bei einer Konzentration von 0,25 mM ermittelt. Bei Konzentrationen von 0,4 mM und 0,8 mM betrug die Peakbreite $140,0 \pm 16,9$ s und $169,0 \pm 11,6$ s.

Die vorherigen Versuche zeigten, dass höhere Konzentrationen zu einer Sättigungskennlinie des Stroms führen. Diese fällt erst nach einigen hundert Sekunden auf das Ausgangsniveau zurück. Somit wurden nur Elektropherogramme bis zu einer Konzentration von 0,6 mM ausgewertet. Die berechneten Signalthöhen wurden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Anschließend sollte zur Überprüfung des linearen Zusammenhangs zwischen Signalthöhe und Konzentration das Bestimmtheitsmaß ermittelt werden.

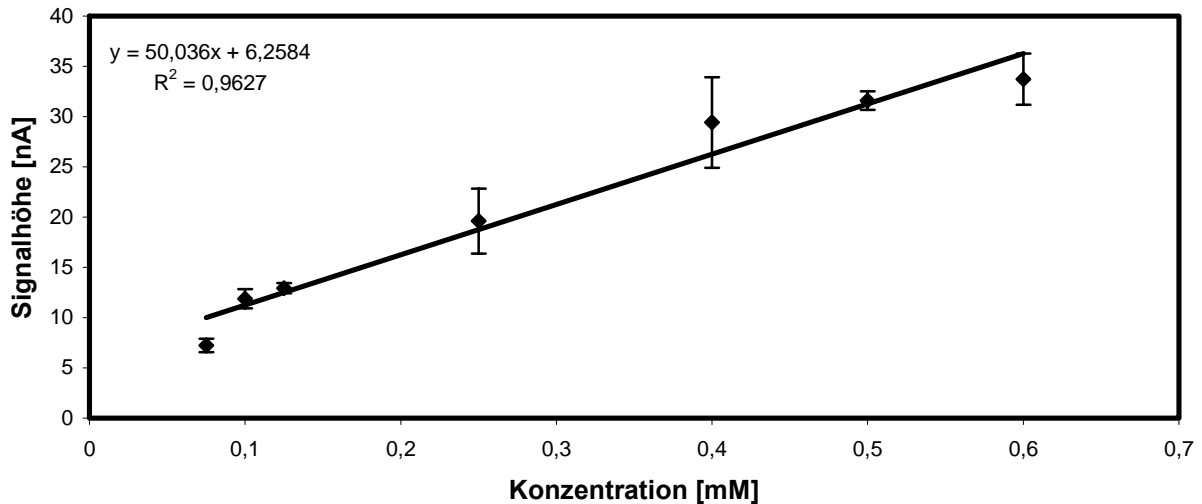


Abbildung 139: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Signalthöhe von der Konzentration bei der Bestimmung von Pyrogallol (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Bei den ermittelten Signalthöhen wurde im Konzentrationsbereich von 0,075 mM bis 0,6 mM ein linearer Verlauf der Kalibrationsgerade beobachtet. Die Standardabweichungen betragen etwa 8 % im Durchschnitt. Lediglich bei der Verwendung von 0,25 mM und 0,4 mM Pyrogallollösungen wurden 17 % bzw. 15 % berechnet. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß betrug 0,9627. Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tab. 63 zusammengefasst.

Die aufgezeichneten Elektropherogramme sind bei den untersuchten Polyphenolen durch breite, asymmetrische Peaks gekennzeichnet. Zudem strebt die Stromstärke bei steigenden Konzentrationen einem Maximalwert (Sättigungswert) zu. Deshalb ist es erforderlich, zur Beurteilung des elektrophoretischen Trennsystems auf LTCC-Mikrochips die Peakfläche zu berechnen. Diese wurden nach Aufzeichnung der Elektropherogramme ermittelt und gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen.

Für den Konzentrationsbereich von 0,075 mM bis 0,6 mM Pyrogallol wurde ein linearer Verlauf der Regressionsgeraden beobachtet. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,9886 ermittelt (Abb. 140). Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tab. 65 zusammengefasst.

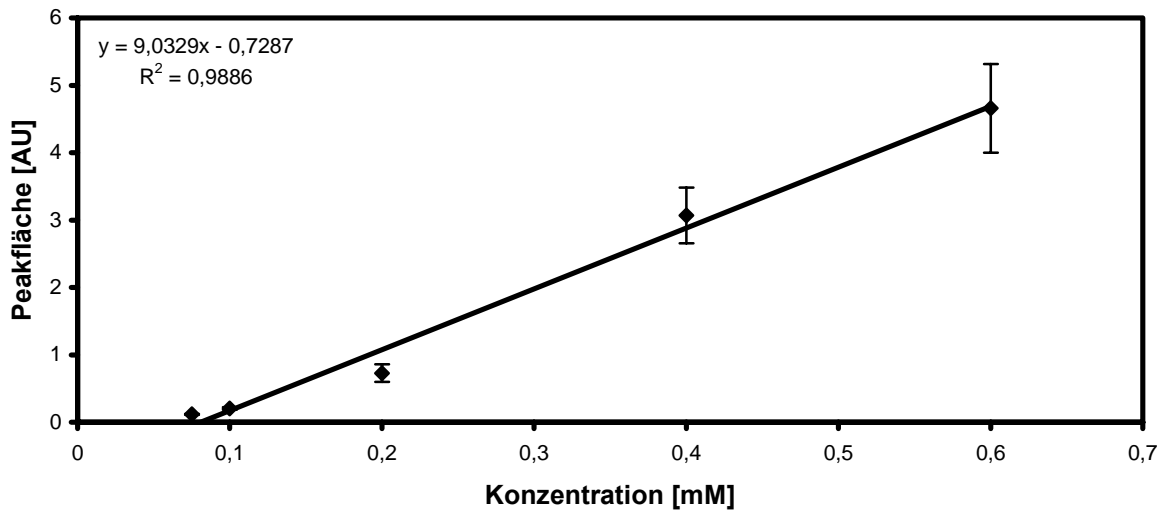


Abbildung 140: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Peakfläche bei der Bestimmung von Pyrogallol bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Wie bereits erwähnt, kam es bei steigenden Konzentrationen zur Ausbildung einer Sättigungskennlinie des Stroms. Die in Abb. 140 berechneten Peakflächen wurden durch Messpunkte bei Konzentrationen von 0,8 mM, 1 mM, 5 mM und 15 mM ergänzt und logarithmisch aufgetragen. Dies ergab eine logarithmische Abhängigkeit der Peakfläche und der Pyrogallolkonzentration. Die Standardabweichungen lagen zwischen 8 % und 23,2 % (1 mM). Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,9845. Die zugrunde liegenden Messwerte sind in Tab. 63 zusammengefasst.

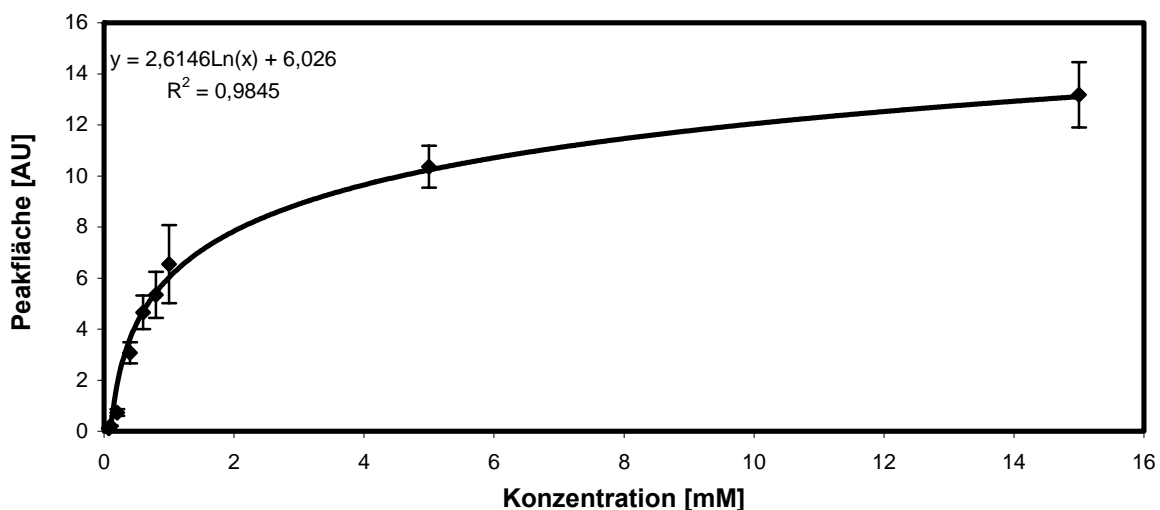


Abbildung 141: Logarithmisch aufgetragene Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Peakfläche bei der Bestimmung von Pyrogallol bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

In Tabelle 32 sind zusammenfassend die ermittelten elektrochemisch-analytischen Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Pyrogallol zur Beurteilung eines geeigneten Trennsystems auf LTCC-Keramikchips dargestellt.

Elektrochemisch-analytische Messparameter	HSPG		pH-Wert			Messwert
	Modell 1	Eigenbau	4,9	7,3	9,0	
Migrationszeit [s]	X			X		150,6 ± 13,3
Migrationszeit [s]		X		X		145,5 ± 12,8
Migrationszeit [s]	X				X	94,6 ± 17,1
Migrationszeit [s]		X	X			238,0 ± 15,9
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]	X			X		$2,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]		X		X		$2,8 \cdot 10^{-2} \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]	X				X	$3,9 \cdot 10^{-2} \pm 1,5 \cdot 10^{-2}$
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]		X	X			$1,8 \cdot 10^{-2} \pm 2,0 \cdot 10^{-3}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]	X			X		$3,1 \cdot 10^{-4}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]		X		X		$3,2 \cdot 10^{-4}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]	X				X	$5,0 \cdot 10^{-4}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]		X	X			$1,9 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 32: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Pyrogallol bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Testung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte (HSPG) und pH-Werte.

IV.4.5.3.4. Gallussäure

Als weiteres Polyphenol sollte Gallussäure (Abb. 40) entsprechend den vorherigen Versuchen bei einer angelegten Injektions- und Trennungsspannung von jeweils 400 V elektrokinetisch injiziert und anschließend amperometrisch detektiert werden. Die Vorbehandlung der Kapillaren ist mit den in Kapitel IV.4.1. gemachten Angaben identisch. Die Gallussäurelösungen wurden durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert (Abb. 142). Die aufgenommenen Elektropherogramme wurden zur Bestimmung elektrochemisch-analytischer Messparameter herangezogen.

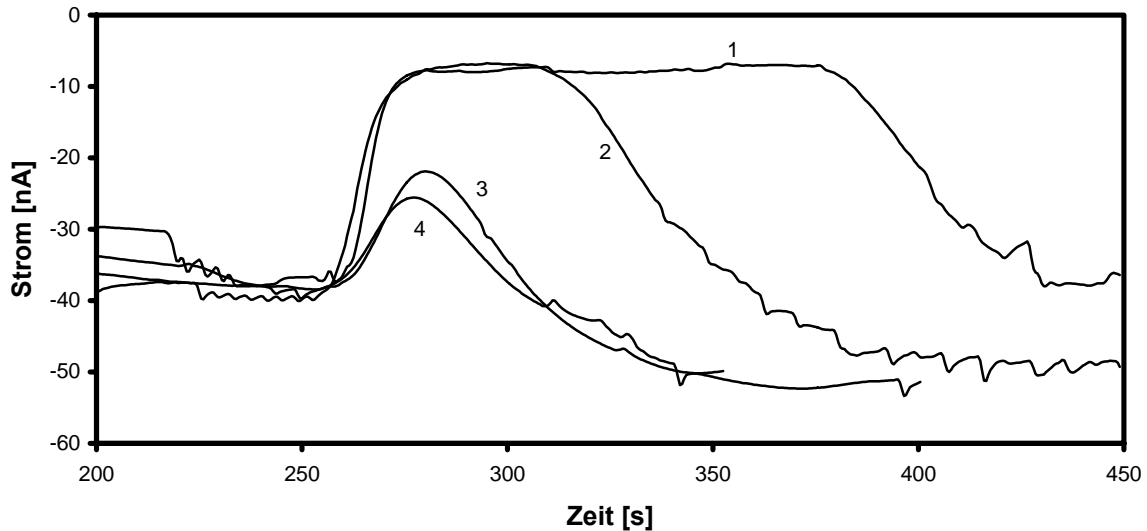


Abbildung 142: Elektropherogramme zur Abhängigkeit der Signalhöhe von der Gallussäurekonzentration. Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Gallussäure in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Beladung bei angelegter Trennungsspannung von 400 V: (1) 5 mM, Migrationszeit: 199 s, (2) 2,5 mM, Migrationszeit: 197 s (3) 1 mM, Migrationszeit: 195 s, (4) 0,75 mM, Migrationszeit: 181 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die amperometrische Detektion einer 2,5 mM Gallussäurelösung führte zu einem Stromanstieg von 31 nA, der erst nach 100 s auf das Ausgangsniveau zurückfiel (Abb. 142, Elektropherogramm 1). Es wurde eine Peakfläche von 4,06 AU ermittelt. Die Migrationszeit betrug 199 s. Bei einer 2,5 mM Lösung bildete sich nach einer Stromzunahme von 30 nA eine Sättigungskennlinie über einen Zeitraum von 50 s. Es wurde eine Migrationszeit von 197 s ermittelt, die Peakfläche betrug 2,28 AU (Elektropherogramm 2). Migrationszeiten von 195 s und 181 s wurden bei peakähnlichem Stromverlauf einer 1 mM und 0,75 mM Lösung ermittelt (Elektropherogramm 3 und 4). Die Peakflächen betragen 0,67 AU bzw. 0,40 AU.

Die in diesem Versuch ermittelten Peakflächen wurden gegen die eingesetzten Gallussäurekonzentrationen aufgetragen (Abb. 143).

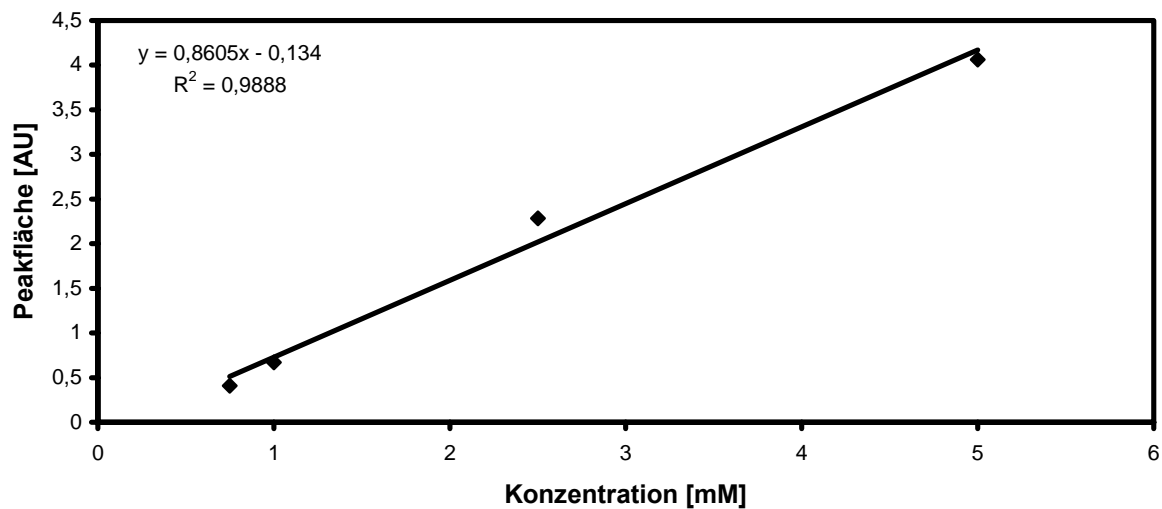


Abbildung 143: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Peakfläche auf Basis der in Abb. 142 durchgeführten Gallussäurebestimmung.

Die in Abb. 143 berechneten Peakflächen zeigten im Konzentrationsbereich von 0,75 mM bis 5 mM einen linearen Verlauf der Regressionsgeraden. Es wurde ein Bestimmtheitsmaß von 0,9887 ermittelt.

Beim Auftrag der Peakbreite gegen die Konzentration wurde im Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 1,25 mM lediglich eine Differenz der Peakbreite von 8 s gemessen (Abb. 144).

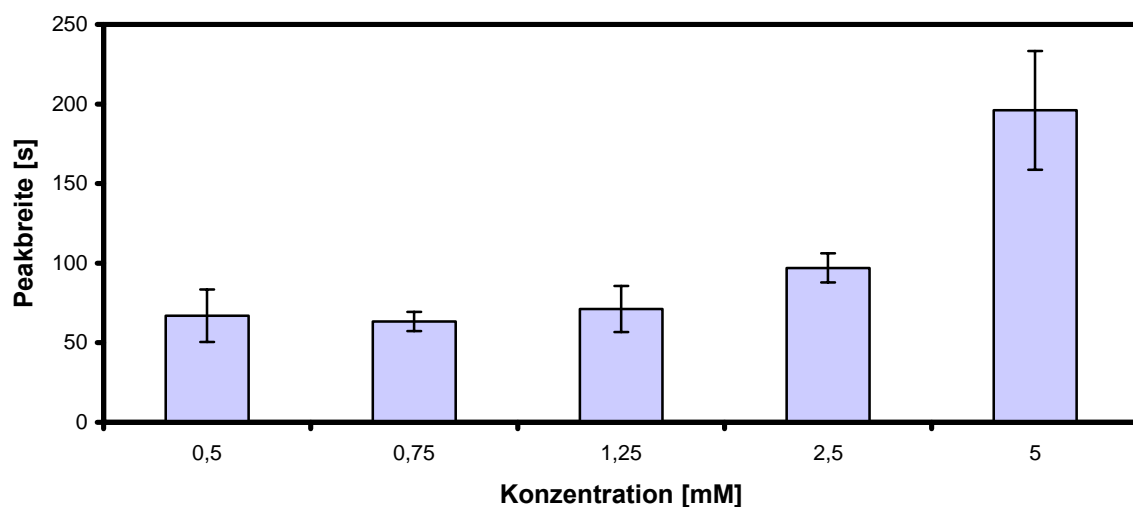


Abbildung 144: Vergleich der von Gallussäure ermittelten durchschnittlichen Peakbreiten in Abhängigkeit von der Konzentration (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Die Peakbreiten betragen $63,0 \pm 6,2$ s (0,75 mM), $67,0 \pm 14,6$ s (0,5 mM) und $71,3 \pm 14,5$ s (1,25 mM). Eine Verbreiterung des Peaks um etwa 36 % auf $96,5 \pm 8,9$ s wurde bei einer Konzentration von 2,5 mM ermittelt. Die Erhöhung der Konzentration auf 5 mM führte zu einer Verdoppelung der Peakbreite auf $196,0 \pm 32,7$ s.

Als weiterer Messparameter elektrophoretischer Trennungen wurde die Signalhöhe ausgewertet. Ab einer bestimmten, substanzabhängigen Konzentration, wurde ein Maximalwert des Detektionsstroms beobachtet. Diese Sättigungskennlinie wurde nach einem Stromanstieg von etwa 30 nA bis 40 nA erreicht. Die Verringerung auf das Ausgangsniveau erfolgte konzentrationsabhängig erst nach einer bestimmten Zeit. Somit wurde die maximal auswertbare Konzentration für Gallussäure auf 2,5 mM festgelegt (Abb. 145).

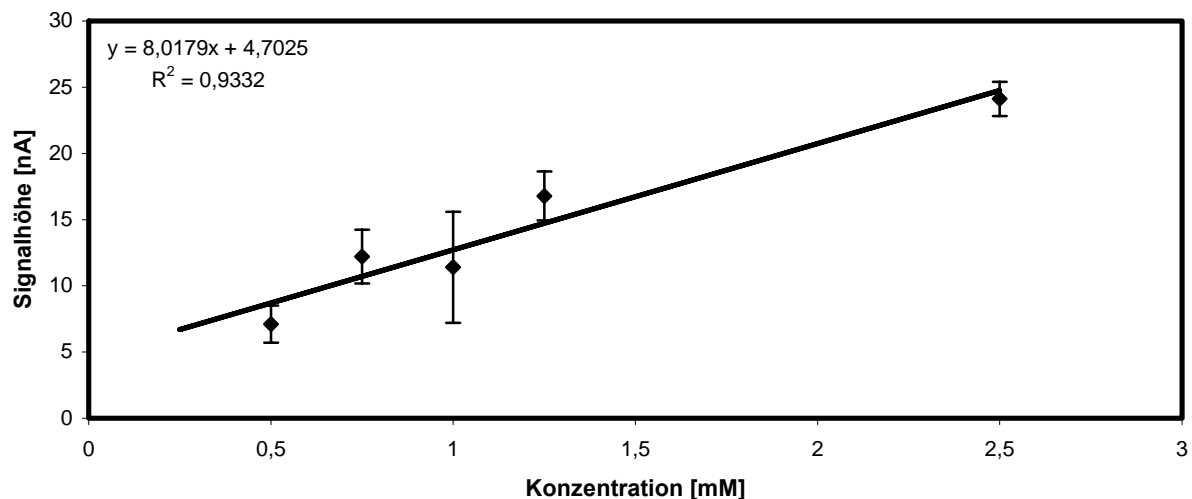


Abbildung 145: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Signalhöhe bei der Bestimmung von Gallussäure (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Im Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 2,5 mM wurde bei den ermittelten Signalhöhen ein linearer Verlauf der Kalibrationsgerade beobachtet. Dabei wurden Standardabweichungen im Bereich zwischen 5,3 % (2,5 mM) und 36,6 % (1 mM) ermittelt. Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,9134. In Tabelle 64 sind die zugrunde liegenden Messwerte zusammengefasst.

Wie bereits dargestellt (Kapitel IV 4.5.3.1-3) waren auch die Elektropherogramme von Gallussäure durch breite, asymmetrische Peaks gekennzeichnet. Zudem wurde beobachtet, dass die Stromstärke mit zunehmender Konzentrationen einen Maximalwert (Sättigungswert) erreicht. Folglich wurde die Signalhöhe nur bis zu einer bestimmten Konzentration ermittelt. Zur besseren Darstellung des elektrophoretischen Trennsystems auf LTCC-Mikrochips wurde somit die Peakfläche berechnet (Abb. 146).

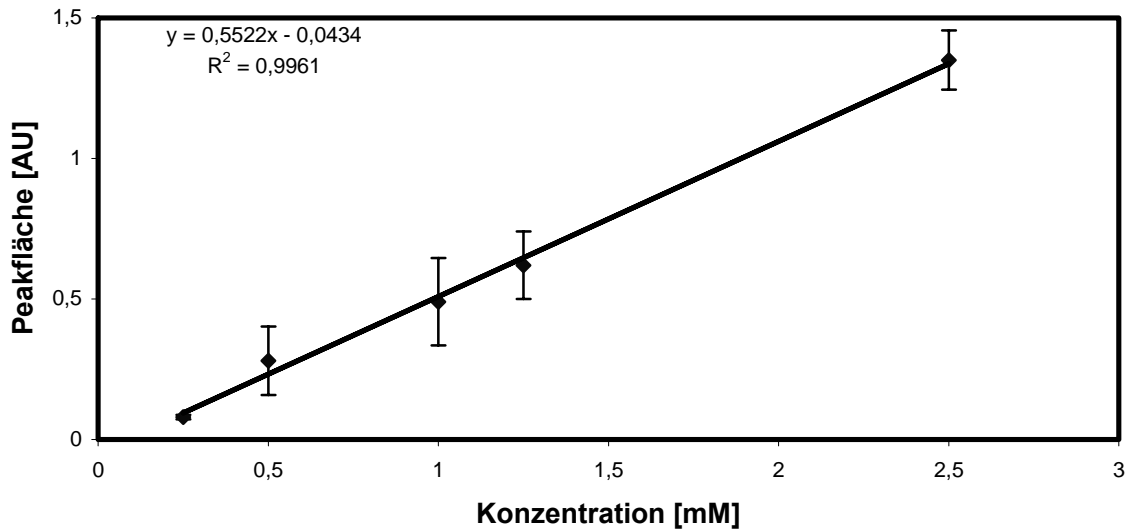


Abbildung 146: Kalibrationsgerade zur Abhängigkeit der Peakfläche bei der Bestimmung von Gallussäure und hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte (Mittelwerte aus mindestens drei Messungen).

Die anschließende Berechnung der Regressionsgerade zeigte für den Konzentrationsbereich von 0,25 mM bis 2,5 mM einen linearen Verlauf. Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,9961. Die Darstellung erfolgte aufgrund der in Tabelle 65 zusammengefassten Messwerte.

Zur Beurteilung eines geeigneten kapillarelektrophoretischen Trennsystems auf LTCC-Basis sind wichtige elektrochemisch-analytische Messparameter nötig. Dazu zählt beispielsweise die Migrationszeit. Der Vergleich mit anderen Trennsystemen machte die Ermittlung der durchschnittlichen effektiven Migrationszeit (Wanderungsgeschwindigkeit) und der effektiven elektrophoretischen Mobilität notwendig. Diese Daten wurden für Gallussäure in Tabelle 33 zusammengefasst.

Elektrochemisch-analytische Messparameter	HSPG		Messwert
	Modell 1	Eigenbau	
Migrationszeit [s]	X		223,5 ± 15,8
Migrationszeit [s]		X	197,6 ± 10,7
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]	X		1,8*10 ⁻² ± 1,2*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]		X	2,0*10 ⁻² ± 1,1*10 ⁻³
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	X		2,1*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]		X	2,4*10 ⁻⁴

Tabelle 33: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Gallussäure bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Testung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte (HSPG) und pH-Werte.

IV.4.5.3.5. Quercetin

Wie bereits in Kapitel IV.4.5.3. erwähnt, sollte der Focus der untersuchten Polyphenole auf Brenzkatechin, Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure liegen. Als zusätzliche Substanz sollten neben Resorcin (Kapitel IV.4.5.3.6.), Resveratrol (Kapitel IV.4.5.3.7.) und Kaffeesäure (Kapitel IV.4.5.3.8.), das zu den Flavonoiden zählende Quercetin entsprechend den vorherigen Versuchen elektrokinetisch injiziert und anschließend amperometrisch detektiert werden. Unter Berücksichtigung der längeren Migrationszeit erfolgte die automatische Umschaltung von Injektion- auf Trennmodus nach 60 s.

Quercetin besitzt nur eine geringe Löslichkeit in wässrigem Milieu. Eine Inkubation in weniger polaren Lösungen wie beispielsweise Ethanol oder Ethanol-Wasser-Gemischen führte aufgrund sehr starker Schwankungen der Basislinie zu nicht auswertbaren Elektropherogrammen. Somit wurde die entsprechende Menge Quercetin in ein Reaktionsgefäß gegeben, mit dem Elektrolytpuffer vermischt und kurz vor Zugabe in das Reservoir für 15 s gevortext.

Die Quercetinlösungen wurden durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert. Die aufgenommenen Elektropherogramme wurden zur Bestimmung elektrochemisch-analytischer Messparameter herangezogen (Abb. 147).

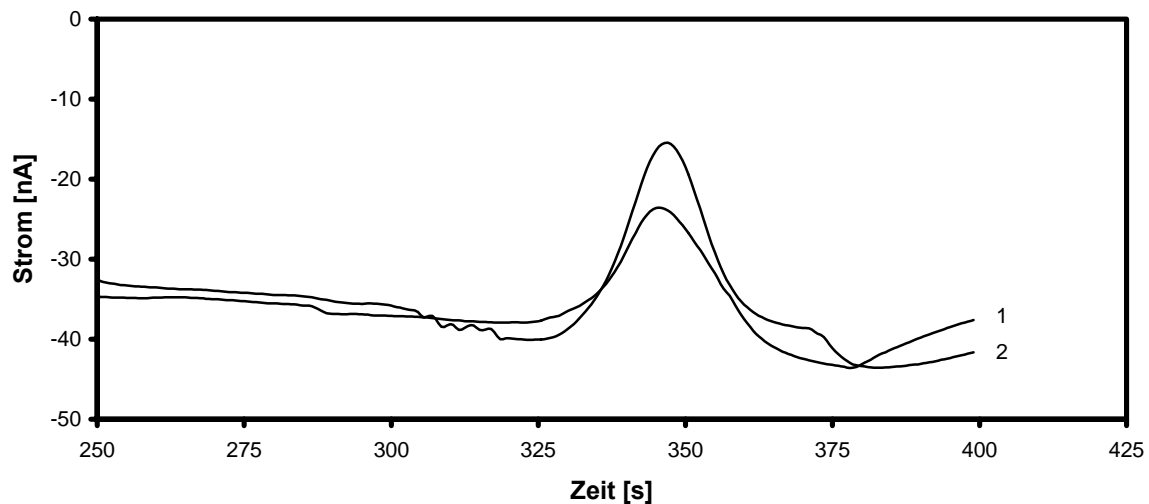


Abbildung 147: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Quercetin ($c = 12,5$ mM) in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Injektion bei einer angelegter Trennspannung von 400 V: (1) 1. Messung, Migrationszeit: 256 s, (2) 2. Messung, Migrationszeit: 257 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die Migrationszeiten betragen für eine 12,5 mM Quercetinlösung 256 s bzw. 257 s. Es wurde eine Peakfläche von 0,39 AU (Abb. 147, Elektropherogramm 1) und 0,30 AU (Elektropherogramm 2) ermittelt. Die Peakbreite betrug bei beiden Messungen etwa 40 s. Eine Signalhöhe von 24 nA wurde beim ersten Elektropherogramm gemessen, 18 nA bei der zweiten Messung.

In Tabelle 34 sind die wichtigsten ermittelten elektrochemisch-analytischen Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Quercetin zusammengefasst.

Elektrochemisch-analytische Messparameter von Quercetin	
Migrationszeit [s]	273,0 ± 19,9
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]	$1,4 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]	$1,7 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 34: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Quercetin bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Testung bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte. Elektrolytpuffer pH 7,3.

IV.4.5.3.6. Resorcin

Nach Konditionierung der Kapillaren mit KOH und Behandlung der Referenzelektrode mit HCl wurde 1,3-Dihydroxyphenol (Abb. 40) durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert. Die Befüllung und der Einbau des LTCC-Keramikchips wurde wie in Kapitel IV.4.5. beschrieben ausgeführt. Anschließend erfolgte nach Zuschaltung der Hochspannung die Probenzugabe in die Probeneinlass-Kavität. Die Injektionszeit wurde auf 30 s eingestellt (Abb. 148).

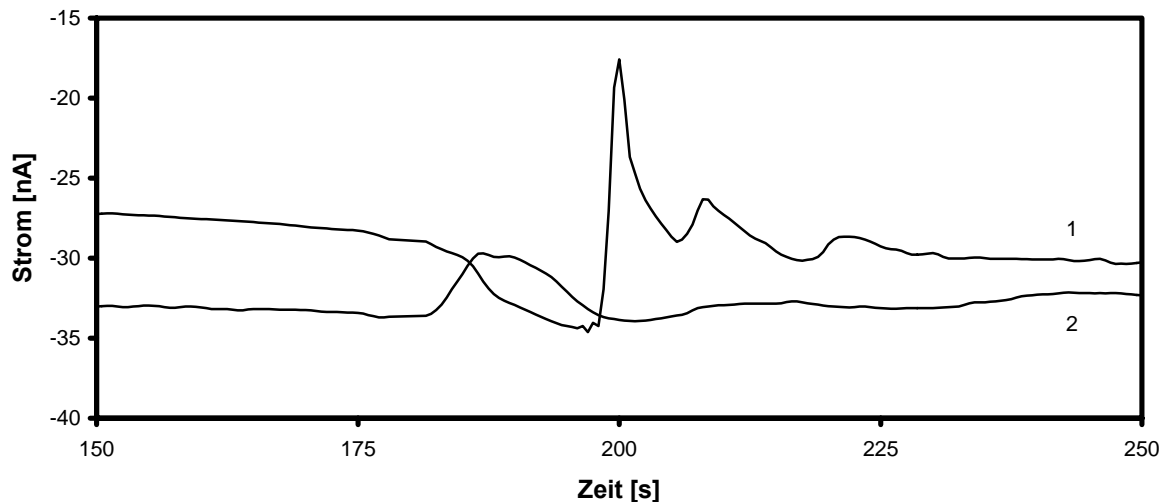


Abbildung 148: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion unterschiedlicher Konzentrationen von Resorcin (1: 500 mM, 2: 100 mM) in einem Keramikchip nach elektrokinetischer Injektion bei 400 V Trennungsspannung: (1) 500 mM, Migrationszeit: 120 s, (2) 100 mM, Migrationszeit: 101 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung, HSPG-Eigenbau).

Die amperometrische Detektion von Resorcin ($c = 500 \text{ mM}$) führte zu einer Migrationszeit von 120 s (Abb. 148, Elektropherogramm 1). Die Peakfläche betrug 0,09 AU. Bei einer 100 mM Lösung wurde bei einer Peakfläche von 0,04 AU eine Migrationszeit von 101 s ermittelt.

In Tabelle 35 sind aufgrund der ermittelten Messdaten, die Migrationszeit, die durchschnittliche effektive Migrationszeit (Wanderungsgeschwindigkeit) und die effektive elektrophoretische Mobilität zusammengefasst.

Elektrochemisch-analytische Messparameter von Resorcin	
Migrationszeit [s]	$104,6 \pm 13,9$
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]	$3,9 \cdot 10^{-2} \pm 5,0 \cdot 10^{-3}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]	$4,8 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 35: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Resorcin bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Testung bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte. Elektrolytpuffer pH 7,3.

IV.4.5.3.7. Resveratrol

Die Durchführung der amperometrischen Detektion von Resveratrol (3,4',5-Stilbentriol; Abb. 40) wurde wie in Kapitel IV.4.5.3.6. beschrieben durchgeführt. Die über den Trennkanal angelegte Hochspannung betrug 400 V (Abb. 149).

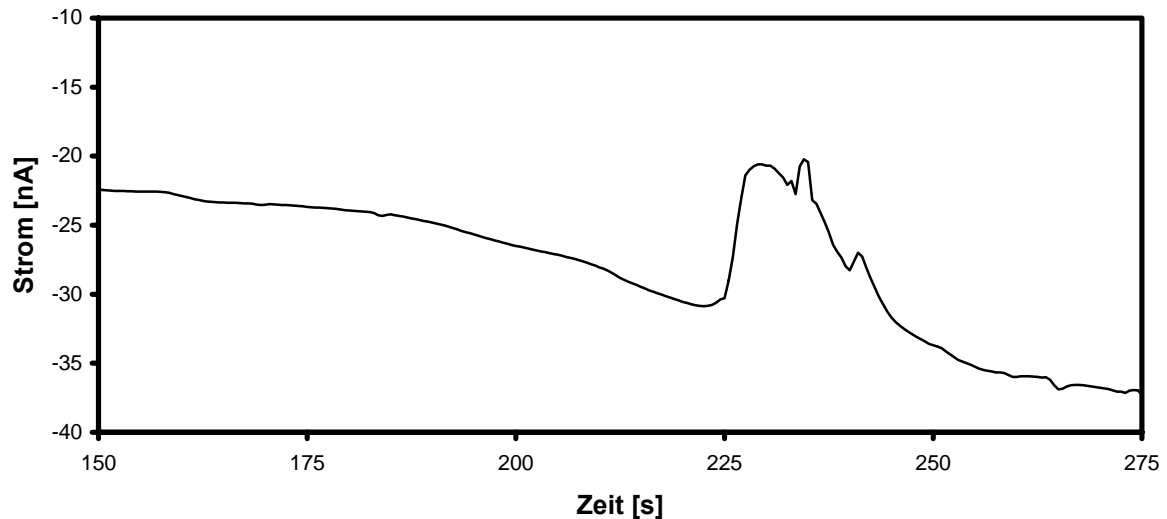


Abbildung 149: Elektropherogramm der amperometrischen Detektion von Resveratrol ($c = 10 \text{ mM}$, Migrationszeit: 150 s) in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und 400 V angelegter Trennschaltung. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum ($E_{\text{pot}}: 0,8 \text{ V}$, HSS-Chiphalterung, HSPG Eigenbau).

Bei einer Lösung von 10 mM Resveratrol wurde eine Migrationszeit von 150 s ermittelt. Die Peakfläche betrug 0,47 AU. Nach einem Stromanstieg um 11 nA fiel das Signal über einen Zeitraum von 20 s auf das Grundniveau. Dabei kam es zu weiteren kurzfristigen Peaks von etwa 2 nA (Abb. 149).

Die wichtigsten elektrochemisch-analytischen Messparameter der amperometrischen Detektion von Resveratrol sind in Tabelle 46 zusammengefasst.

Elektrochemisch-analytische Messparameter von Resveratrol	
Migrationszeit [s]	$136,6 \pm 15,9$
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]	$3,0 \cdot 10^{-2} \pm 3,7 \cdot 10^{-3}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]	$3,4 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 36: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Resveratrol bei einer angelegten Trennschaltung von 400 V. Testung bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte. Elektrolytpuffer pH 7,3.

IV.4.5.3.8. Kaffeesäure

Kaffeesäure (Dihydroxycinnaminsäure) sollte wie die vorherigen Polyphenole mittels elektrokinetischer Injektion in den LTCC-Mikrochip injiziert werden. Die amperometrische Detektion erfolgte nach elektrophoretischem Transport über den Trennkanal bei einer Hochspannung von 400 V. Die Vorbehandlung des LTCC-Keramikchips erfolgte wie in Kapitel IV.4.1. beschrieben. Unter Verwendung der HSS-Halterung erfolgte die Befüllung mit der Probe über die Probeneinlass-Kavität. Die Umschaltung von Injektion- auf Trennmodus erfolgte automatisch nach 60 s.

Die Kaffeesäurelösung wurde durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert. Zur Bestimmung elektrochemisch-analytischer Messparameter wurden die aufgenommenen Elektropherogramme herangezogen (Abb. 150).

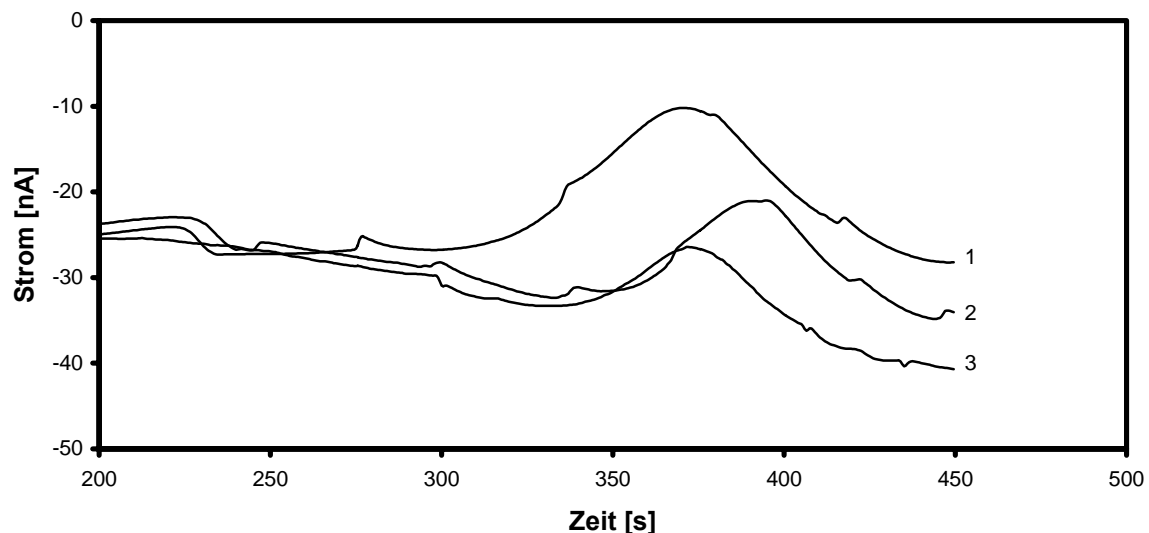


Abbildung 150: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) von Dihydroxycinnaminsäure ($c = 25$ mM) in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und 400 V Trennspeisung: (1) 1. Messung, Migrationszeit: 240 s, (2) 2. Messung, Migrationszeit: 277 s, (3) 3. Messung, Migrationszeit: 283 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die amperometrische Detektion von Kaffeesäure führte bei einer Lösung von 25 mM zu Migrationszeiten von 240 s (Abb. 150, Elektropherogramm 1), 277 s (Abb. 150, Elektropherogramm 2) und 283 s (Abb. 150, Elektropherogramm 3). Die Peakflächen betragen 1,07 AU, 0,54 AU und 0,36 AU. Der Signalverlauf war bei der amperometrischen Detektion von Kaffeesäure durch einen sehr langsamen Anstieg des Signals gekennzeichnet.

Elektrochemische-analytische Messparameter die mit Kaffeesäure ermittelt wurden sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

Elektrochemisch-analytische Messparameter von Kaffeesäure	
Migrationszeit [s]	272,3 ± 8,1
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm^2s^{-1}]	$1,5 \cdot 10^{-2} \pm 3,7 \cdot 10^{-4}$
Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$]	$1,7 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 37: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Kaffeesäure bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Testung bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte. Elektrolytpuffer pH 7,3.

IV.4.5.4 Messparameter unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte

In dieser Arbeit wurden zwei Hochspannungsnetzgeräte zur amperometrischen Detektion von Polyphenolen eingesetzt. Diese unterschieden sich hinsichtlich Aufbau, Spezifikation und Einsatzbereich (Kapitel III.3.). Neben dem selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerät wurde das HSPG Modell 1 nach elektrotechnischen Modifikationen im Systemaufbau ebenfalls zur elektrokinetischen Injektion eingesetzt.

Migrationszeit

Die Polyphenole Dopamin, Gallussäure und Pyrogallol wurden mit beiden Hochspannungsnetzgeräten gemessen. Zur amperometrischen Detektion der anderen Polyphenole wurde ausschließlich das selbstkonstruierte HSPG verwendet (Abb. 46)

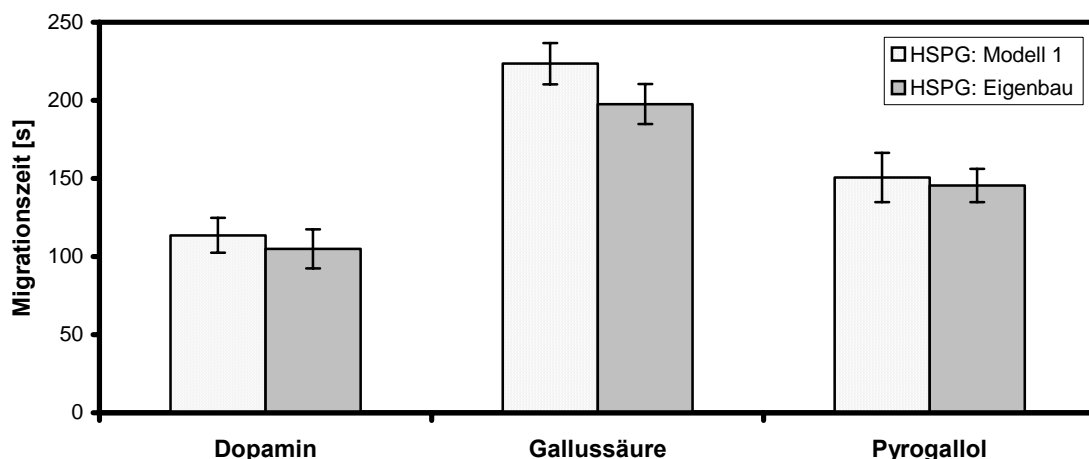


Abbildung 151: Vergleich der Migrationszeiten ausgewählter Polyphenole in Abhängigkeit der eingesetzten Hochspannungsnetzgeräte bei einem pH-Wert von 7,3. Die Trennungsspannung betrug 400 V.

Die Messungen führten bei Verwendung des HSPG Modell 1 zu höheren Migrationszeiten und höheren Standardabweichungen. Eine Verringerung der Migrationszeit um 2,5 % von $113,6 \pm 11,2$ s (HSPG Modell 1) auf $110,8 \pm 8,9$ s (HSPG Eigenbau) wurde bei der amperometrischen Detektion von Dopamin beobachtet. Um 13,1 % auf $197,6 \pm 10,7$ s (HSPG Modell 1: $223,5 \pm 15,8$) s nahm die Migrationszeit bei Gallussäure ab. Bei Pyrogallol wurde eine Abnahme von $150,6 \pm 13,2$ s auf $145,5 \pm 12,8$ s (HSPG: Eigenbau) beobachtet.

Wanderungsgeschwindigkeit

Einen genaueren Vergleich der Migrationszeiten in unterschiedlichen Messsystemen lässt sich unter Berücksichtigung der effektiven Trennstrecke durch die Wanderungsgeschwindigkeit ausdrücken (Abb. 152). Die effektive Länge des Trennkanals betrug 4,11 cm.

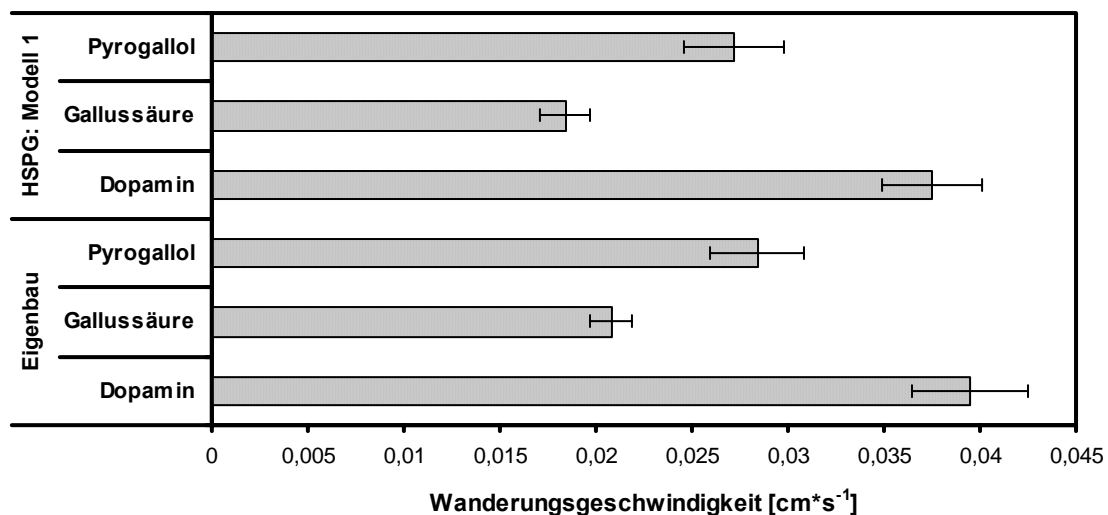


Abbildung 152: Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten ausgewählter Polyphenole in Abhängigkeit der eingesetzten Hochspannungsnetzgeräte bei einem pH-Wert von 7,3.

Bei der Wanderungsgeschwindigkeit von Dopamin wurde eine Verringerung um 5,6 % von $3,9 \cdot 10^{-2} \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$ s (Eigenbau) auf $3,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$ s (HSPG Modell 1) beobachtet. Um 13,0 % auf $2,0 \cdot 10^{-2} \pm 1,1 \cdot 10^{-3}$ s (HSPG Modell 1: $1,8 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-3}$ s) nahm die Wanderungsgeschwindigkeit bei Gallussäure ab. Bei Pyrogallol wurde eine Abnahme von $2,8 \cdot 10^{-2} \pm 2,5 \cdot 10^{-3}$ s (Eigenbau) auf $2,7 \cdot 10^{-2} \pm 2,4 \cdot 10^{-3}$ s (HSPG Modell 1) beobachtet.

Ionenmobilität

Die effektive Geschwindigkeit einer Probe ist die Summe der elektrophoretischen und elektroosmotischen Geschwindigkeit. Durch Anlegen einer Spannung wandern die durch das elektrische Feld beschleunigten Ionen mit einer Mobilität die nach Gleichung 4 berechnet wurde. Dabei wird zwischen der gesamten Kapillarlänge und der Trennlänge unterschieden, da das elektrische Feld über die Gesamtlänge abfällt, die Proben aber nur die effektive Kapillarlänge in der Migrationszeit durchwandern (Abb. 153).

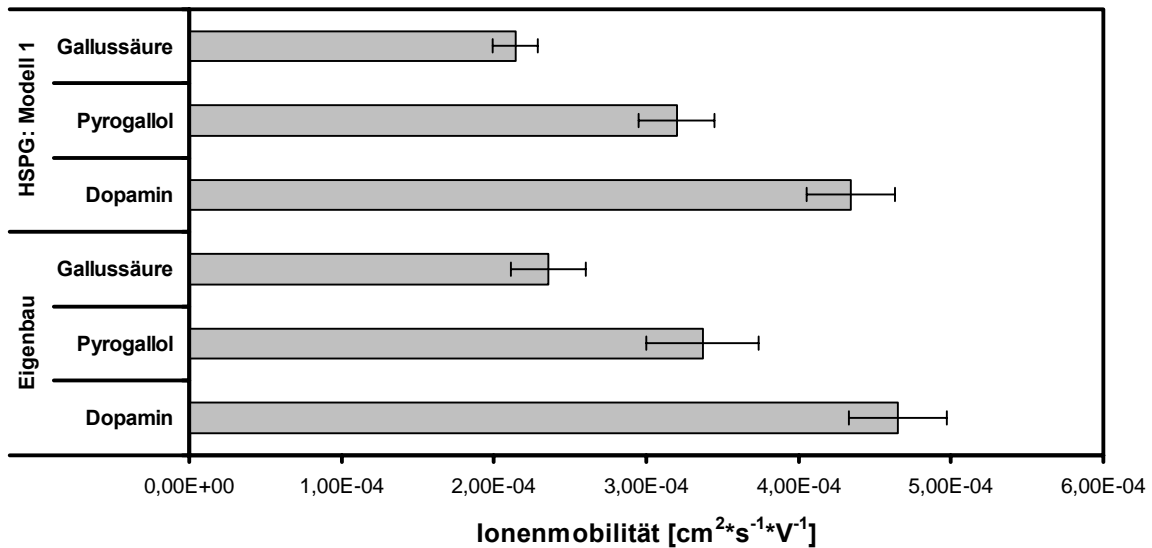


Abbildung 153: Vergleich der durchschnittlichen Ionenmobilität ausgewählter Polyphenole (Dopamin, Pyrogallol, Gallussäure) unter Berücksichtigung der verwendeten Hochspannungsnetzgeräte bei einem pH-Wert von 7,3.

Die Ionenmobilität von Dopamin verringerte sich von $4,6 \cdot 10^{-4} \pm 2,3 \cdot 10^{-5}$ s (Eigenbau) auf $4,3 \cdot 10^{-4} \pm 3,0 \cdot 10^{-5}$ s (HSPG Modell 1). Um 10,0 % von $2,4 \cdot 10^{-4} \pm 2,5 \cdot 10^{-5}$ s auf $2,1 \cdot 10^{-4} \pm 1,5 \cdot 10^{-5}$ s (HSPG Modell 1) nahm die Ionenmobilität bei Gallussäure ab. Bei Pyrogallol wurde eine Abnahme von $3,3 \cdot 10^{-4} \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$ s (Eigenbau) auf $3,2 \cdot 10^{-4} \pm 2,5 \cdot 10^{-5}$ s (HSPG Modell 1) beobachtet.

IV.4.5.5. Gesamtübersicht amperometrisch detektierter Polyphenole

Mit LTCC-Mikrochips wurden Dopamin, Pyrogallol, Gallussäure und Quercetin amperometrisch detektiert (Abb. 154). Abhängig von Ionenstärke und pH-Wert des eingesetzten Puffers wurden die Proben über ihre unterschiedlichen Migrationszeiten auf Grund des elektroosmotischen Flusses identifiziert.

In den folgenden Abbildungen (Abb. 155-157) und Tabellen (Tab. 38-40) sind die wichtigsten elektrochemisch-analytischen Messparameter und Nachweisgrenzen bei der amperometrischen Detektion von Polyphenolen zur Beurteilung eines geeigneten Trennsystems auf LTCC-Keramikchips zusammengefasst.

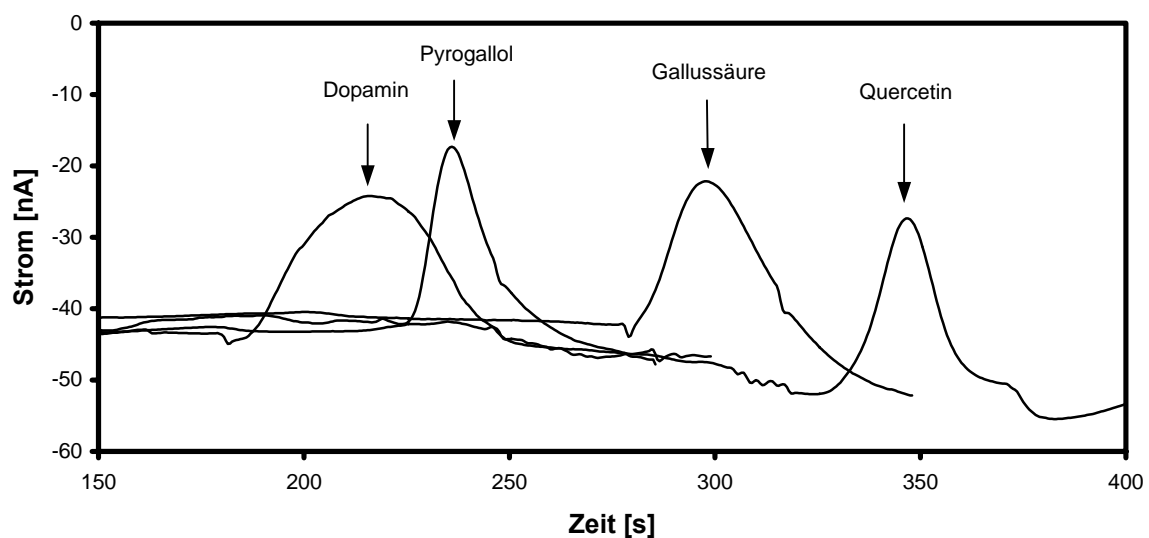


Abbildung 154: Vergleich von vier Elektropherogrammen unterschiedlicher Polyphenole. Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) der einzelnen Polyphenole in aufeinanderfolgenden Messungen in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und einer angelegter Trennungsspannung von 400 V. Umschaltung auf Trennmodus nach 30 s bzw. 60 s. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Leistungsdaten des LTCC-Systems

Zur Beurteilung eines Trennsystems auf Grundlage von LTCC-Keramikchips sollten neben elektrochemisch-analytischen Parametern zahlreiche Leistungsdaten ermittelt werden. Dazu zählte das Grundrauschen, die Basislinienstabilität und die Nachweis- und Bestimmungsgrenze der untersuchten Proben. Die Messwerte des Grundrauschens und der Basisliniendrift (nA/300 s) bei der Verwendung unterschiedlicher Keramikchips und Hochspannungsnetzgeräte sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

Parameter	Wert [nA]
Grundrauschen LTCC-Chips ohne verzinnte Elektrodenkontakte	1,0
Grundrauschen LTCC-Chips mit verzinnten Elektrodenkontakten	2,5
Drift der Basislinie bei 300 s; HSPG Modell 1, hochohmige Schaltung	6,0
Drift der Basislinie bei 300 s; Eigenbau, hochohmige Schaltung	5,0
Drift der Basislinie bei 300 s; HSPG Modell 1, 80 % der Trennschaltung	5,5
Drift der Basislinie bei 300 s; HSPG Eigenbau, 80 % der Trennschaltung	7,5
Drift der Basislinie eines LTCC-Chips mit verzinnten Elektrodenkontakten bei 300 s, HSPG Modell 1, hochohmige Schaltung	11,0
Drift der Basislinie eines LTCC-Chips mit verzinnten Elektrodenkontakten bei 300s, Eigenbau, hochohmige Schaltung	10,5

Tabelle 38: Messparameter des kapillarelektrophoretischen Trennsystems auf LTCC-Basis bei der Verwendung unterschiedlicher Keramikchips und Hochspannungsnetzgeräte.

Auf Basis der in Tabelle 38 dargestellten Messwerte zum Grundrauschen des LTCC-Systems sollte für jedes in dieser Arbeit getestete Polyphenol die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt werden (Tab. 39).

Substanz	Nachweisgrenze (3 * Grundrauschen) [mM]	Bestimmungsgrenze (10 * Grundrauschen) [mM]
Dopamin	0,0125	0,06
Brenzkatechin	0,025	0,12
Gallussäure	0,25	0,5
Pyrogallol	0,05	0,1
Quercetin	5	7,5
Resveratrol	5	7,5
Kaffeensäure	10	25
Resorcin	100	400

Tabelle 39: Auflistung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der in dieser Arbeit getesteten Polyphenole auf Basis von LTCC-Keramikchips.

Migrationszeit

In Abbildung 155 sind die Migrationszeiten der getesteten Polyphenole zur Erarbeitung eines geeigneten mikrofluidischen Trennsystems auf LTCC-Keramikchips zusammengefasst.

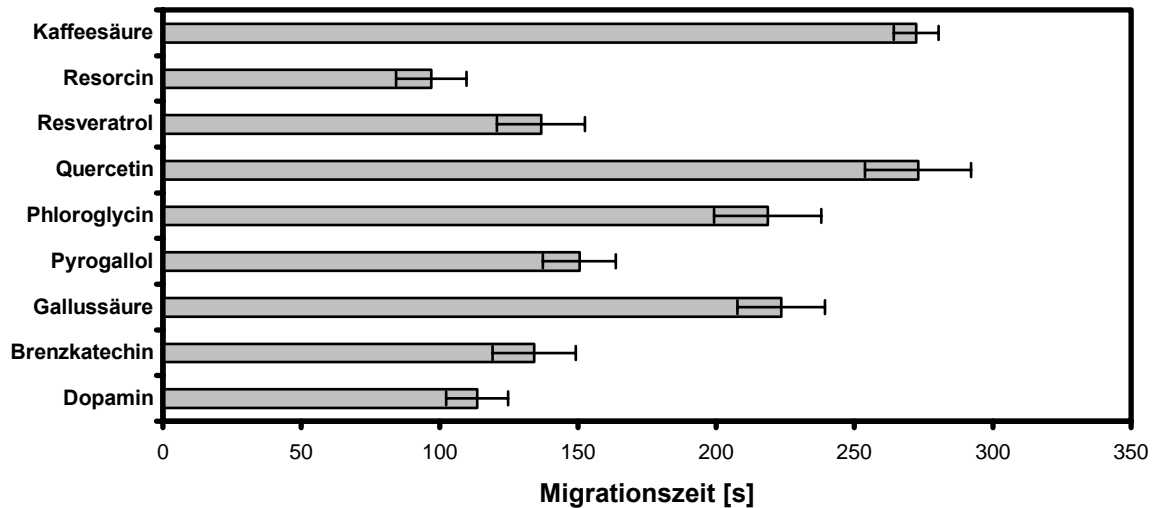


Abbildung 155: Übersicht der Migrationszeiten der untersuchten Polyphenole in einem LTCC-Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und einer Trennungsspannung von 400 V bei einem pH-Wert von 7,3.

Wanderungsgeschwindigkeit

Die Berücksichtigung der effektiven Trennstrecke von 4,11 cm führte zur Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeit bzw. der durchschnittlichen effektiven Migrationszeit der einzelnen Komponenten (Abb. 156)

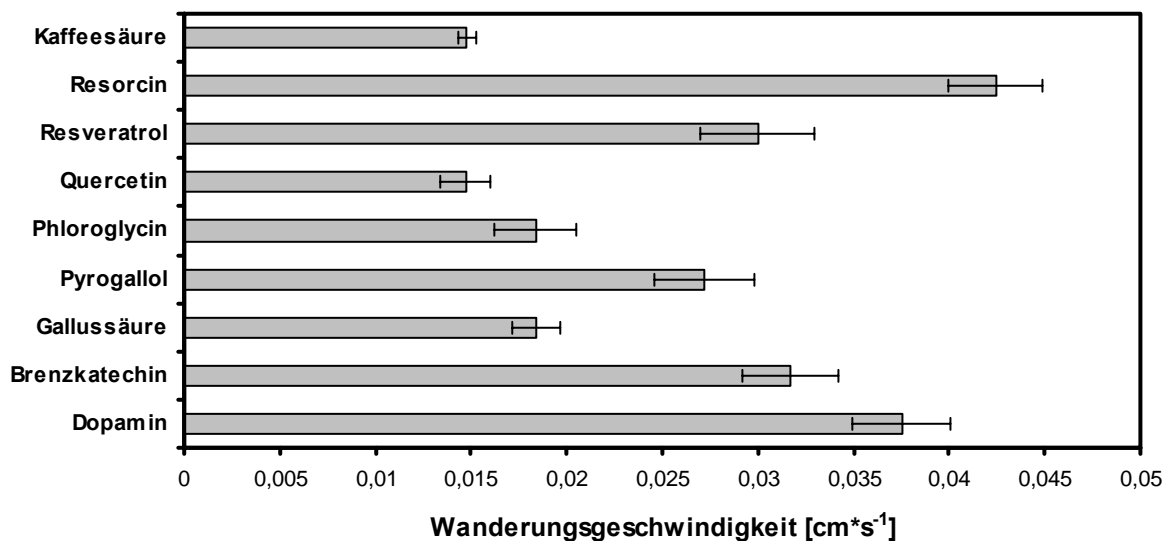


Abbildung 156: Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit der untersuchten Polyphenole auf Basis der in Abb. 155 ermittelten Migrationszeiten.

Effektive elektrophoretische Geschwindigkeit (Ionenmobilität)

Der Messparameter der effektiven elektrophoretischen Geschwindigkeit unter Berücksichtigung der effektiven Trennstrecke des Analyten, wird aus elektrophoretischer und elektroosmotischer Geschwindigkeit berechnet (Abb. 157).

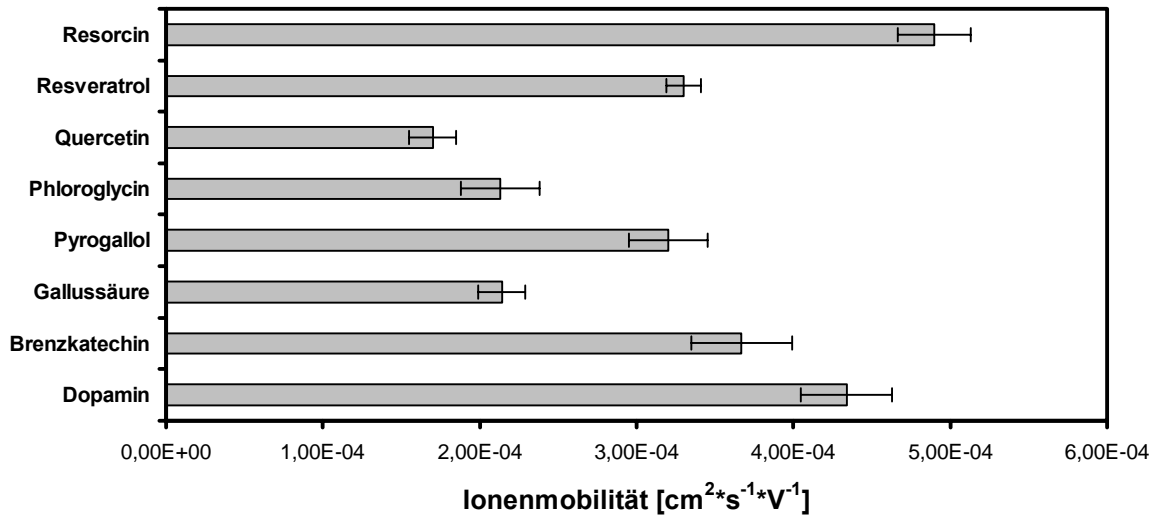


Abbildung 157: Vergleich der Ionenmobilität der untersuchten Polyphenole unter Berücksichtigung der effektiven Kapillarlänge, der durchschnittlichen Migrationzeit und der Trennungsspannung von 400 V bei einem pH-Wert von 7,3.

Die berechneten effektiven Migrationszeiten und die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten der untersuchten Polyphenole bei unterschiedlichen pH-Werten und Hochspannungsnetzgeräten sind zur Beurteilung eines geeigneten Trennsystems auf LTCC-Keramikchips notwendig. Diese Messwerte sind zusammengefasst in Tabelle 40 dargestellt.

Phenol	pH-Wert	Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm/s]	Effektive elektrophoretische Mobilität [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$]
Dopamin	pH 7,3 (1)	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$
	pH 7,3 (2)	$3,9 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$
	pH 9,0 (2)	$5,2 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$
Pyrogallol	pH 7,3 (1)	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-4}$
	pH 9,0 (1)	$4,3 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$
	pH 7,3 (2)	$2,8 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$
	pH 4,9 (2)	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$1,9 \cdot 10^{-4}$
Brenzkatechin	pH 7,3 (1)	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$
Gallussäure	pH 7,3 (1)	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$
	pH 7,3 (2)	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$
	pH 4,9 (2)	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$1,9 \cdot 10^{-4}$
Phloroglucin	pH 7,3 (1)	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$
Quercetin	pH 7,3 (2)	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$
Resveratrol	pH 7,3 (2)	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$3,4 \cdot 10^{-4}$
Resorcin	pH 7,3 (2)	$4,2 \cdot 10^{-2}$	$4,8 \cdot 10^{-4}$
Kaffeensäure	pH 7,3 (2)	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$

Tabelle 40: Übersicht über die berechnete effektive Migrationszeit und die effektive elektrophoretische Mobilität der untersuchten Polyphenole bei unterschiedlichen pH-Werten. Die hinter dem pH-Wert angegebene Nummer stellt das jeweils verwendete Hochspannungsnetzgerät dar (1: Modell 1, 2: Eigenbau).

IV.4.5.6. Trennung und amperometrische Detektion von Polyphenolgemischen in einem LTCC-Keramikchip nach elektrokinetischer Injektion

Innerhalb dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich mit Hilfe der Kapillaronenelektrophorese auf LTCC-Keramikchips einzelne Polyphenole amperometrisch detektieren und auf Grund ihrer Migrationszeiten elektrophoretisch trennen lassen. In weiteren Versuchen sollten Polyphenolgemische in die Kapillaren injiziert und die einzelnen Polyphenole auf Grund ihrer Migrationszeit getrennt werden.

Die Vorbehandlung der Keramikchips erfolgte wie in Kapitel IV.4.1. beschrieben. Die Polyphenolgemische wurden durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig über die Probeneinlass-Kavität elektrokinetisch injiziert. Die elektrophoretische Trennung wurde bei einer angelegten Hochspannung von 400 V durchgeführt. Die Identifizierung der einzelnen Polyphenole erfolgte auf Grund der ermittelten Migrationszeiten.

Amperometrische Detektion eines Polyphenolgemisches mit zwei Substanzen

Die Trenneffizienz des LTCC-Systems wurde zunächst mit zwei Polyphenolen getestet. Dabei wurden bevorzugt Gemische aus Dopamin und Pyrogallol in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die Injektion erfolgte, wie in Kapitel IV.4.5.3. beschrieben, elektrokinetisch in die Kavität des Probeneinlass (Abb. 158).

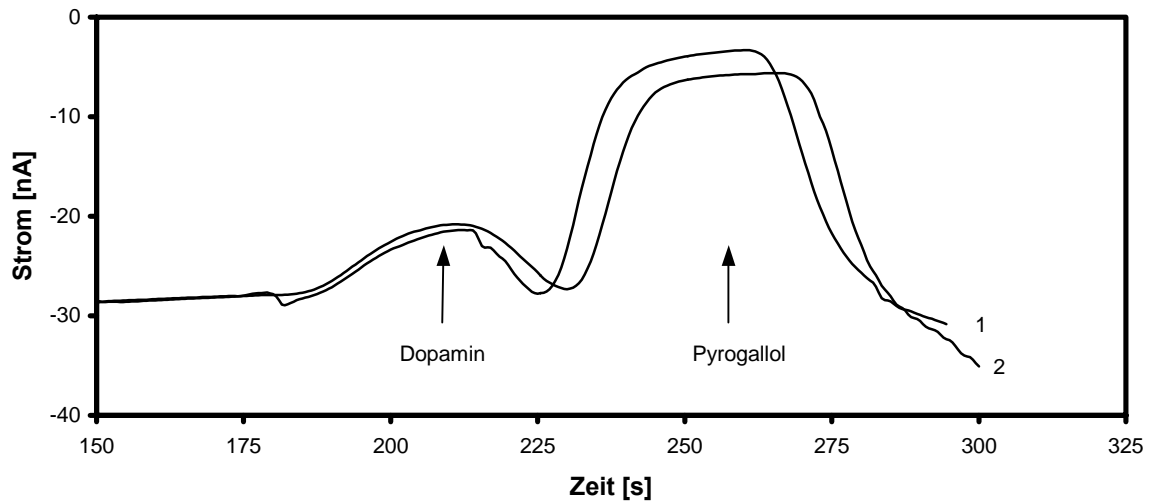


Abbildung 158: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung) eines Gemisches aus Dopamin ($c = 0,05$ mM) und Pyrogallol ($c = 0,5$ mM) in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und 400 V Trennspeisung: (1) Migrationszeiten: 107 s Dopamin, 144 s Pyrogallol, (2) Migrationszeiten: 110 s Dopamin, 156 s Pyrogallol. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Ein Polyphenolgemisch aus 0,05 mM Dopamin und 0,5 mM Pyrogallol wurde aufgrund der Migrationszeiten bestimmt. Für Dopamin wurden 107 s (Abb. 158, Elektropherogramm 1) und 110 s (Abb. 158, Elektropherogramm 2) ermittelt. Die durchschnittliche Migrationszeit von $110,8 \pm 8,9$ s bei Einzelmessungen verringerte sich um etwa 10 % auf $100,7 \pm 7,9$ s bei der amperometrischen Detektion eines Polyphenolgemisches aus zwei Substanzen und 400 V Trennspeisung. Die Peakflächen betragen 0,23 AU und 0,35 AU. Die Migrationszeiten von Pyrogallol betragen 144 s (Elektropherogramm 1) und 156 s (Elektropherogramm 3). Verglichen mit der Migrationszeit bei Einzelmessungen von $145,5 \pm 12,8$ s verringerte sich diese in der Mischung um 3,5 % auf $140,6 \pm 11,8$ s. Mit 0,90 AU und 0,93 AU wurden annähernd identische Peakflächen ermittelt. Die Migrationszeiten der einzelnen Polyphenole wurden bereits in Einzelversuchen ermittelt und zur Auswertung herangezogen.

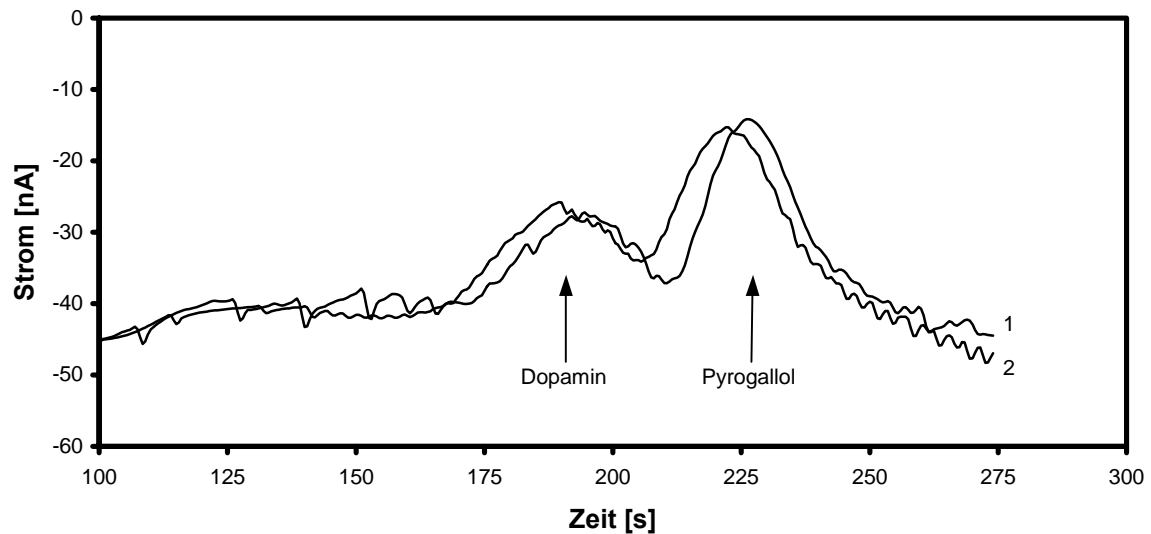


Abbildung 159: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chipalterung) eines Gemisches aus Dopamin ($c = 0,05\text{mM}$) und Pyrogallol ($c = 0,2\text{ mM}$) in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und 400 V Trennungsspannung: (1) Migrationszeiten: 100 s Dopamin, 138 s Pyrogallol, (2) Migrationszeiten: 96 s Dopamin, 132 s Pyrogallol. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

In weiteren Versuchen wurde die Pyrogallolkonzentration auf 0,2 mM verringert (Abb. 159). Die Migrationszeit von Dopamin betrug 100 s (Abb. 159, Elektropherogramm 1) und 96 s (Abb. 159, Elektropherogramm 2). Für die Peakfläche wurden 0,13 AU und 0,15 AU berechnet. Die Ermittlung der Migrationszeiten von Pyrogallol ergaben 138 s (Elektropherogramm 1) und 132 s (Elektropherogramm 2). Die Peakflächen betragen 0,45 AU und 0,59 AU.

Tabelle 41 zeigt zusammenfassend den Vergleich elektrochemisch-analytischer Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Einzelmessungen und Polyphenolgemischen am Beispiel von Dopamin und Pyrogallol.

Dopamin	Messwert
Migrationszeit [s]	110,8 ± 8,9
Migrationszeit im Substanzgemisch [s]	100,7 ± 7,9
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]	3,9*10 ⁻² ± 3,0*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente im Substanzgemisch [cm*s ⁻¹]	4,1*10 ⁻² ± 3,7*10 ⁻³
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	4,5*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität im Substanzgemisch [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	4,6*10 ⁻⁴
Pyrogallol	Messwert
Migrationszeit [s]	145,5 ± 12,8
Migrationszeit im Substanzgemisch [s]	140,6 ± 11,8
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]	2,8*10 ⁻² ± 2,4*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente im Substanzgemisch [cm*s ⁻¹]	2,9*10 ⁻² ± 2,5*10 ⁻³
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	3,2*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität im Substanzgemisch [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	3,2*10 ⁻⁴

Tabelle 41: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Dopamin und Pyrogallol bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Vergleich zwischen Einzelmessungen und in Substanzgemischen. Testung bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte. Elektrolytpuffer pH 7,3.

Amperometrische Detektion eines Polyphenolgemisches mit drei Substanzen

Auf Grund der durchführbaren elektrophoretischen Trennung von Gemischen aus zwei Polyphenolen sollten Gemische aus drei Analyten elektrokinetisch injiziert und amperometrisch detektiert werden (Abb. 160 und 161). Die Identifizierung erfolgte über einen Vergleich der Migrationszeiten mit durchgeführten Einzelmessungen.

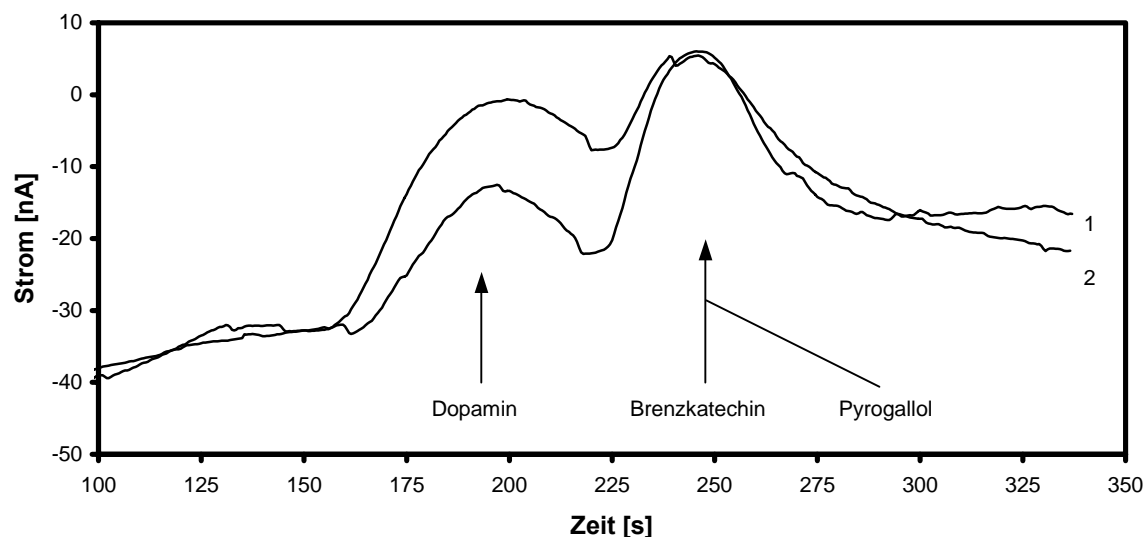


Abbildung 160: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chiphalterung, Umschaltung auf Trennmodus nach 70 s) eines Gemisches aus Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und 400 V Trennungsspannung: (1) Dopamin ($c = 0,2 \text{ mM}$), Brenzkatechin und Pyrogallol ($c = \text{je } 0,4 \text{ mM}$), (2) Dopamin ($c = 0,05 \text{ mM}$), Brenzkatechin und Pyrogallol ($c = \text{je } 0,25 \text{ mM}$). Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die amperometrische Detektion eines Polyphenolgemisches aus Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol führte zu keiner eindeutigen Trennung der Einzelsubstanzen auf Grund der Migrationszeiten. Das erste Elektropherogramm zeigte bei Konzentrationen von 0,2 mM Dopamin und je 0,4 mM Brenzkatechin und Pyrogallol nur zwei Stromzunahmen. Eine Verringerung der Konzentration auf 0,05 mM Dopamin und je 0,25 mM Brenzkatechin und Pyrogallol (Elektropherogramm 2) sowie weitere Änderungen von Konzentrationen, Hochspannung und Injektionsverfahren (nicht abgebildet) führten zu keiner Verbesserung der Trenneffizienz. Die Migrationszeiten der einzelnen Polyphenole wurden bereits in Einzelversuchen ermittelt und zur Auswertung herangezogen.

In weiteren Versuchen sollte Brenzkatechin gegen Gallussäure ausgetauscht werden. Es wurde ein Polyphenolgemisch aus 0,1 mM Dopamin, 0,3 mM Pyrogallol und 5 mM Gallussäure hergestellt. Für eine bessere Auswertung der Proben wurden unterschiedliche

Konzentrationen eingesetzt. Das Polyphenolgemisch wurde durch Schaltung der Injektionskontakte auf hochohmig elektrokinetisch injiziert (Abb. 161).

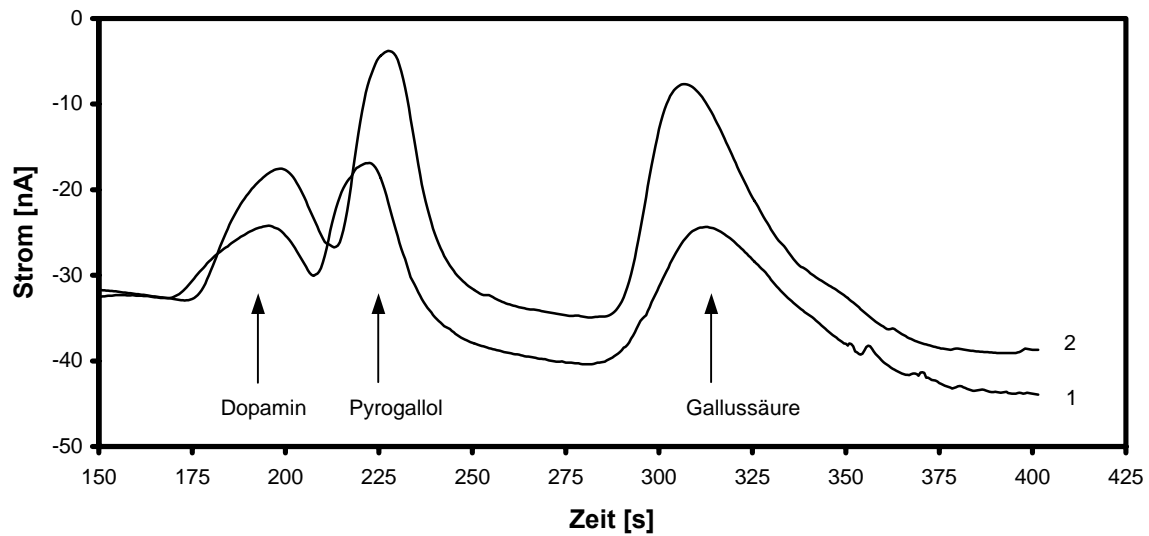


Abbildung 161: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chipalterung, Umschaltung auf Trennmodus nach 70 s) eines Gemisches aus Dopamin ($c = 0,1$ mM), Pyrogallol ($c = 0,3$ mM) und Gallussäure ($c = 5$ mM) in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion, hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte und 400 V angelegter Trennspeisung: (1) Verwendung von HSPG Modell 1, (2) Verwendung HSPG Eigenkonstruktion. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die Einzelkomponenten eines Polyphenolgemisches aus Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure wurden amperometrisch detektiert und aufgrund der Migrationszeiten bestimmt. Die Verwendung des HSPG Modell 1 (Elektropherogramm 1) führte zu Migrationszeiten von 102 s (Dopamin), 143 s (Pyrogallol) und 203 s (Gallussäure). Bei dem selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerät (Elektropherogramm 2) wurden 92 s (Dopamin), 130 s (Pyrogallol) und 208 s ermittelt.

Die Signalhöhen betragen beim selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerät 14 nA (Dopamin), 22 nA (Pyrogallol) und 26 nA (Gallussäure). Diese waren damit um 36 % (Dopamin), 45 % (Pyrogallol) und 38 % (Gallussäure) höher als bei dem HSPG Modell 1. Veränderungen der Konzentrationen, Hochspannung und Injektion führten zu keiner signifikanten Verbesserung der Trenneffizienz.

Die durchgeführte Trennung eines Polyphenolgemisches mit drei Substanzen sollte mit einer Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der angelegten Trennspannung wiederholt werden (Abb. 162).

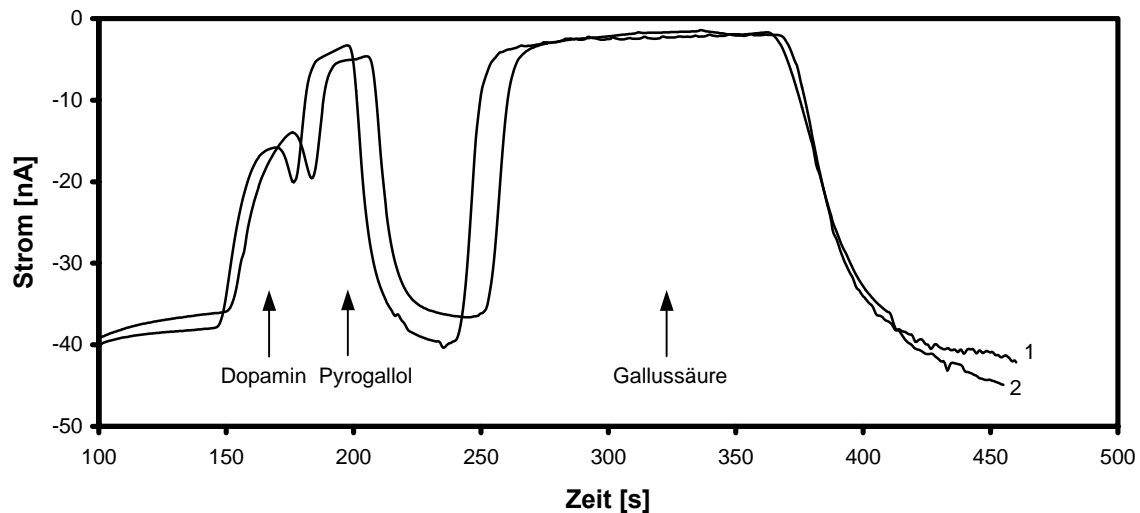


Abbildung 162: Elektropherogramme der amperometrischen Detektion (E_{pot} : 0,8 V, HSS-Chipalterung, Umschaltung auf Trennmodus nach 70 s) eines Gemisches aus Dopamin ($c = 0,1$ mM), Pyrogallol ($c = 0,3$ mM) und Gallussäure ($c = 5$ mM) in einem Keramikchip bei elektrokinetischer Injektion und Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der angelegten 400 V Trennspannung: (1) Verwendung von HSPG Modell 1, (2) Verwendung HSPG Eigenkonstruktion. Dargestellt ist der für die Detektion relevante Zeitraum.

Die Bestimmung von Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure aus einem Polyphenolgemisch erfolgte auf Grund der Migrationszeiten. Verglichen mit dem Signalverlauf bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte wurde eine geringere Auflösung bei der amperometrischen Detektion zwischen Dopamin und Pyrogallol erzielt. Zudem wurde bei Gallussäure ein Stromanstieg beobachtet, der nach 150 s auf das Ausgangsniveau zurückfiel. Die Verwendung des HSPG Modell 1 (Abb. 162, Elektropherogramm 1) führte zu Migrationszeiten von 80 s (Dopamin), 113 s (Pyrogallol) und 181 s (Gallussäure). Bei dem selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerät (Elektropherogramm 2) wurden 73 s (Dopamin), 103 s (Pyrogallol) und 166 s ermittelt. Veränderungen der Konzentrationen, Hochspannung und Injektionsverfahren führten zu keiner signifikanten Verbesserung der Trenneffizienz.

IV.4.5.7. Messparameter von Polyphenolgemischen

Mit Hilfe von LTCC-Mikrochips wurden die Einzelsubstanzen eines Polyphenolgemisches nach kapillarelektrophoretischer Trennung amperometrisch detektiert und auf Grund ihrer Migrationszeiten differenziert (Abb. 161).

Migrationszeit

Ein Polyphenolgemisch aus Dopamin, Gallussäure und Pyrogallol wurde mit beiden Hochspannungsnetzgeräten kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die Migrationszeiten wurden für jedes Polyphenol ermittelt (Abb. 163)

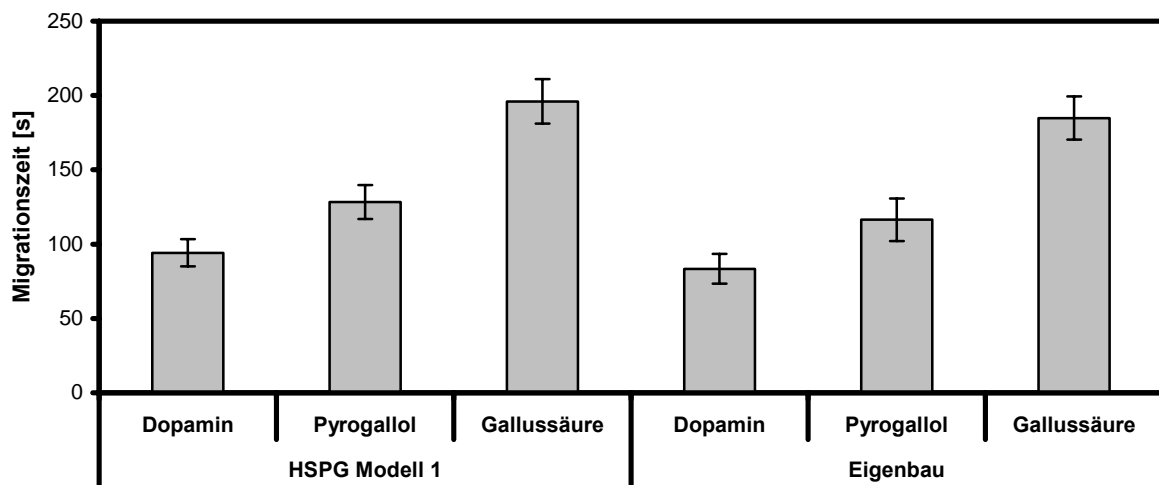


Abbildung 163: Vergleich der Migrationszeiten von Substanzgemischen aus drei Polyphenolen (Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure) unter Berücksichtigung der eingesetzten Hochspannungsnetzgeräte bei elektrokinetische Injektion und 400 V Trennspeisung in einem Keramikchip.

Die amperometrischen Messungen führten bei Verwendung des HSPG Modell 1 zu höheren Migrationszeiten bei geringeren Standardabweichungen. Eine Verringerung der Migrationszeit um 12 % von $94,2 \pm 9,1$ s auf $83,4 \pm 10,0$ s wurde bei der amperometrischen Detektion von Dopamin beobachtet. Um 10,1 % auf $116,4 \pm 14,3$ s (HSPG Modell 1: $128,4 \pm 11,5$ s) verringerte sich die Migrationszeit bei Pyrogallol. Die Migrationszeit von Gallussäure verringerte sich von $196,0 \pm 14,9$ s auf $184,8 \pm 14,5$ s (Eigenbau).

Wanderungsgeschwindigkeit

Ein genauerer Vergleich der Migrationszeiten in unterschiedlichen Messsysteme lässt sich unter Berücksichtigung der effektiven Trennstrecke mit der Wanderungsgeschwindigkeit ausdrücken (Abb. 164). Die effektive Länge des Trennkanals betrug 4,11 cm.

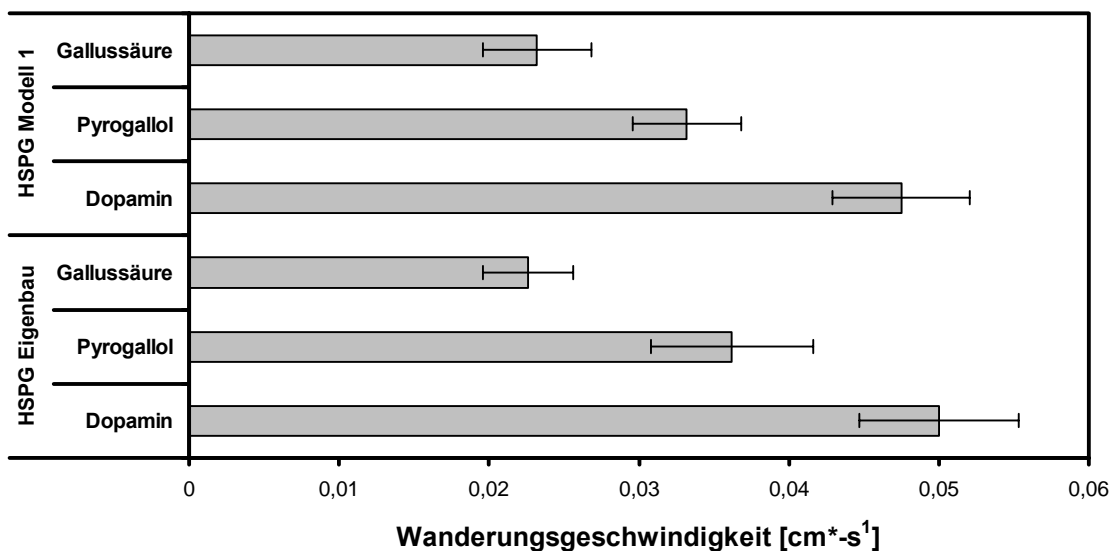


Abbildung 164: Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten von Polyphenolen in Gemischen bei einem pH-Wert von 7,3. Messung mit hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte bei Verwendung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte.

Bei der Wanderungsgeschwindigkeit von Dopamin wurde eine Verringerung um 4,8 % von $5,0 \cdot 10^{-2} \pm 5,3 \cdot 10^{-3}$ s (Eigenbau) auf $4,8 \cdot 10^{-2} \pm 4,6 \cdot 10^{-3}$ s (HSPG Modell 1) beobachtet. Um 9,0 % auf $3,3 \cdot 10^{-2} \pm 3,6 \cdot 10^{-3}$ s (HSPG Eigenbau: $3,6 \cdot 10^{-2} \pm 5,4 \cdot 10^{-3}$ s) nahm die Wanderungsgeschwindigkeit bei Pyrogallol ab. Bei Gallussäure wurde eine Abnahme von $2,3 \cdot 10^{-2} \pm 3,6 \cdot 10^{-3}$ s auf $2,2 \cdot 10^{-2} \pm 3,0 \cdot 10^{-3}$ s (Eigenbau) ermittelt.

Effektive elektrophoretische Geschwindigkeit

Die Summe aus elektrophoretischer und elektroosmotischer Geschwindigkeit ergibt die effektive Geschwindigkeit einer Probe. Durch Anlegen einer Spannung wandern die durch das elektrische Feld beschleunigten Ionen mit einer Mobilität, die nach Gleichung 4 berechnet wurde (Abb. 165).

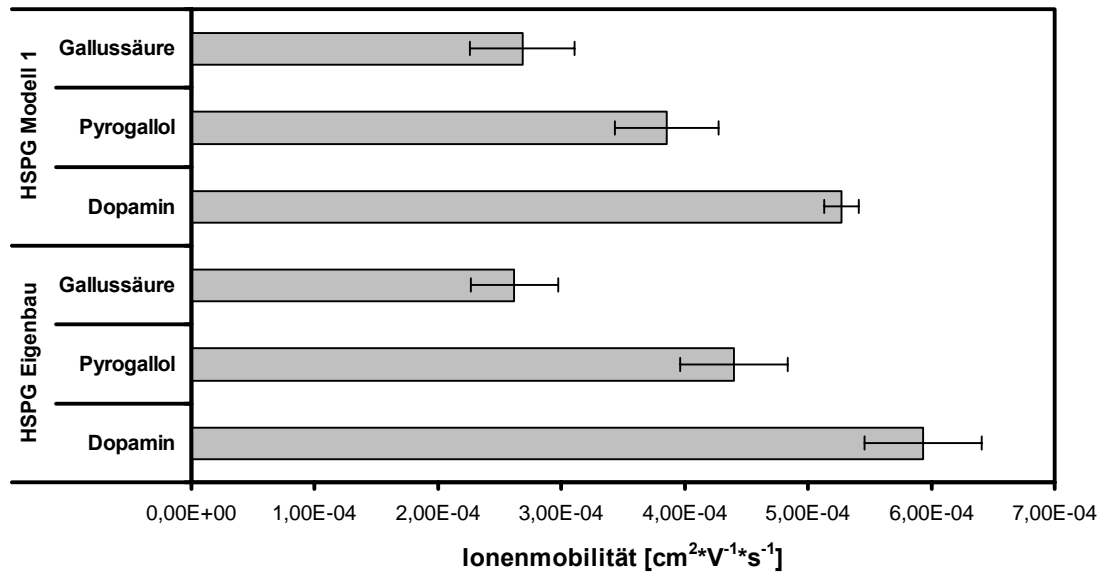


Abbildung 165: Vergleich der Ionenmobilität von Polyphenolen in Gemischen bei einem pH-Wert von 7,3. Messung mit hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte bei Verwendung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte.

Die Ionenmobilität von Dopamin verringerte sich von $5,9 \cdot 10^{-4} \pm 4,8 \cdot 10^{-5}$ s (Eigenbau) auf $5,3 \cdot 10^{-4} \pm 1,4 \cdot 10^{-5}$ s (HSPG Modell 1). Um 14,2% auf $3,9 \cdot 10^{-4} \pm 4,2 \cdot 10^{-5}$ s (Eigenbau: $4,4 \cdot 10^{-4} \pm 4,4 \cdot 10^{-5}$ s) nahm die Ionenmobilität bei Pyrogallol ab. Bei Gallussäure wurde eine Zunahme von $2,6 \cdot 10^{-4} \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$ s (Eigenbau) auf $2,7 \cdot 10^{-4} \pm 4,3 \cdot 10^{-5}$ s beobachtet.

Tabelle 42 zeigt zusammenfassend den Vergleich elektrochemisch-analytischer Messparameter (Migrationszeit, durchschnittliche effektive Migrationszeit und effektive elektrophoretische Mobilität) bei der amperometrischen Detektion von Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure in Polyphenolgemischen zur Beurteilung eines geeigneten Trennsystems auf LTCC-Basis.

Dopamin	Hochspannungsnetzgerät		Messwert
	Modell 1	Eigenbau	
Migrationszeit [s]	X		94,2 ± 9,1
Migrationszeit [s]		X	83,4 ± 10,0
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]	X		4,8*10 ⁻² ± 4,6*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]		X	5,0*10 ⁻² ± 5,3*10 ⁻³
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	X		5,0*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]		X	5,7*10 ⁻⁴
Pyrogallol	Hochspannungsnetzgerät		Messwert
	Modell 1	Eigenbau	
Migrationszeit [s]	X		128,4 ± 11,5
Migrationszeit [s]		X	116,4 ± 14,3
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]	X		3,3*10 ⁻² ± 3,6*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]		X	3,6*10 ⁻² ± 5,4*10 ⁻³
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	X		3,7*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]		X	4,1*10 ⁻⁴
Gallussäure	Hochspannungsnetzgerät		Messwert
	Modell 1	Eigenbau	
Migrationszeit [s]	X		196,0 ± 14,9
Migrationszeit [s]		X	184,8 ± 14,5
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]	X		2,3*10 ⁻² ± 3,6*10 ⁻³
Durchschnittliche effektive Migrationszeit der Komponente [cm*s ⁻¹]		X	2,3*10 ⁻² ± 2,5*10 ⁻³
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]	X		2,4*10 ⁻⁴
Effektive elektrophoretische Mobilität [cm ² *s ⁻¹ *V ⁻¹]		X	2,6*10 ⁻⁴

Tabelle 42: Ermittelte elektrochemisch-analytische Messparameter bei der amperometrischen Detektion von Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure in Polyphenolgemischen bei einer angelegten Trennungsspannung von 400 V. Testung verschiedener Hochspannungsnetzgeräte bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte. Elektrolytpuffer pH 7,3.

V. Diskussion

V.1. Entwicklung von Strategien zur Immobilisierung von Biomolekülen auf festen Trägern mit Hilfe der Oberflächenplasmonen-Resonanz (SPR)

Zur Integration von Biomolekülen in ein mikrofluidisches Trennsystem war es erforderlich, geeignete Immobilisierungsstrategien zu erarbeiten. Das Immobilisat sollte ohne signifikante Veränderungen von Affinität und Spezifität an die Trägeroberfläche binden können. Gängige Methoden zur Entwicklung und Beurteilung von Immobilisierungsprozessen beruhen auf der Markierung des Analyten, beispielweise durch Fluorophore. Dieses Labeling stellt nicht nur einen weiteren zeitaufwendigen Schritt dar, er kann auch zu einer Änderung der Affinität und Spezifität des Biomoleküls führen. Deshalb haben sich in den letzten Jahren für die biomolekulare Interaktionsanalyse markierungsfreie Methoden wie die SPR durchgesetzt [Piehler et al., 2002]. Dafür war eine Funktionalisierung der Goldoberflächen mit verschiedenen Substanzen erforderlich. In dieser Arbeit wurden überwiegend amino- und carboxylfunktionalisierte Oberflächen verwendet. Diese funktionellen Gruppen waren auf Grund von Vorversuchen für die Immobilisierung von Biomolekülen am besten geeignet.

Bevor die Biokomponenten auf die Goldoberfläche aufgetragen werden konnten, musste dieser in geeigneter Weise vorbereitet werden. Die Oberfläche sollte gereinigt und aktiviert werden. Unter Aktivierung ist dabei die Schaffung einer möglichst hohen Anzahl an funktionellen Gruppen zu verstehen, die für die nachfolgenden Immobilisierungsschritte genutzt werden konnten. Die Reinigung erfolgte mit einem Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Kaliumhydroxid. Da häufig hydrophobe Filme auf den Goldträgern zu erkennen waren, wurde eine Behandlung mit Aceton zusätzlich vorgeschaltet. Hartmann (2004) zeigte mit Hilfe der ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis), dass nach einer Funktionalisierung mit APTES eine 1-2lagige Silanschicht auf der Goldoberfläche vorlag. Eine mögliche Anlagerung des Silans an den Goldträger könnte aufgrund einer Verschmutzung der Oberfläche mit Fremdpartikeln erfolgen (Abb. 166).

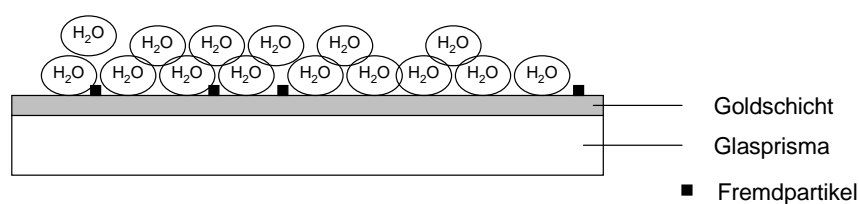


Abbildung 166: Schema der Hydratisierung der Goldoberfläche eines Goldprismas (Quelle: Hartmann, 2004)

Die Lagerung der Goldprismen in Millipore®-Wasser könnte zu einer Hydratisierung des Goldes geführt haben [Hartmann, 2004]. Dabei wäre es möglich, dass die Wassermoleküle, vergleichbar mit den Silanolgruppen von Glas reagierten und so die Silanschicht durch „Grafting“ fixiert wird.

V.1.1. Immobilisierung von Antikörpern auf funktionalisierten PEG-Oberflächen

V.1.1.1. Heterobiofunktionale PEG-Oberfläche

Zusätzlich zur Entwicklung eines Mikrototalanalytensystems sollten Strategien zur Immobilisierung von phenoloxidierenden Enzymen in das amperometrische Trennsystem auf LTCC-Basis erarbeitet werden. Die Immobilisierung phenoloxidierender Enzyme sollte zu keiner Beeinträchtigung von Funktionalität und Stabilität führen. Dieses ist mit Hilfe einer photometrischen Funktionskontrolle möglich. Für die Entwicklung geeigneter Immobilisierungsprotokolle wurden zunächst Antikörper als Modellkomponenten verwendet. Dabei bestand der erste Beschichtungsschritt in einer erfolgreichen Aminosilanisierung (1-2lagige Silanschicht) der Goldoberfläche mit APTES [Hartmann, 2004].

Zur Immobilisierung von Biomolekülen ist die Beschichtung des Trägers mit Abstandsmolekülen, so genannten „Spacern“, vorteilhaft. Dadurch entsteht eine größere Distanz zur Trägeroberfläche, mit einer möglicherweise besseren Bindung des Biomoleküls. In dieser Arbeit wurde Polyethylenglykol (PEG) als Spacer verwendet. PEG ist ein gut untersuchtes Polymer zur kovalenten Modifikation von Biomolekülen und Oberflächen für pharmazeutische und biotechnologische Anwendungen [Roberts et al., 2002]. Die Konjugation von PEG mit Biomolekülen führt beispielsweise zur Abschirmung antigener und immunogener Epitope und zu einer Inkorporation verschiedener funktioneller Gruppen. Zudem wurde eine signifikante Kontrolle der Protein-Adsorption bei der Oberflächen-Immobilisierung von PEG erreicht [Llanos und Sefton, 1993; Mrksich und Whitesides, 1996]. PEG verringert die Anzahl unspezifischer Bindungen auf der Oberfläche und ist aufgrund seiner Löslichkeit in wässrigen und organischen Soluten für die Endgruppen-Derivatisierung und Konjugation biologischer Komponenten geeignet [Roberts et al., 2002]. Da homo- oder heterobifunktionale PEG-Derivate nicht ohne Aktivierung an die Aminogruppe des Silans binden, wurde das homobifunktionale Butandiolglycidylether (BDDG) verwendet. Neben der Funktion als Spacer wurde es in dieser Arbeit als Linker zwischen silanisierter Oberfläche

und PEG verwendet. Bei heterobifunktionalen PEG-Molekülen, wie beispielsweise Amino-PEG, sollte die Aminogruppe des PEG mit der entständigen Epoxidgruppe des immobilisierten Butandioldiglycidylethers reagieren (Abb. 167).

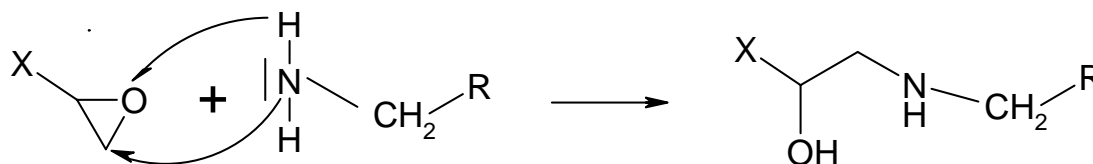


Abbildung 167: Reaktion der Aminogruppe des PEGs mit der freien Epoxidgruppe des funktionalisierten Goldträgers. X: Mit BDDG silanisierte Goldoberfläche, R: Rest des Polyethylenglykols.

Das Stickstoffatom übt einen elektronenziehenden Effekt auf die Wasserstoffatome aus und besitzt somit eine negative Partialladung. Es greift das C-Atom der Epoxidgruppe nucleophil an. Ein H-Atom der Aminogruppe lagert sich unter Ausbildung einer Hydroxylgruppe an das O-Atom des Epoxids.

Ziel sollte es sein, den zu immobilisierenden Antikörper kovalent über eine Säureamidgruppe an die Oberfläche zu binden. Somit würde der Antikörper auf der Oberfläche binden und durch die kovalente Bindung die stabilste Valenzbindung aufweisen. Dazu war es zunächst erforderlich, die Bindungsaffinität des polyethylenglykolbeschichteten Trägers zu steigern. Mit Hilfe verschiedener Oxidationsmittel sollten dazu die Hydroxylgruppen des PEG zu Carboxylgruppen oxidiert werden (Abb. 59). Die Verwendung von Natriumperiodat und Wasserstoffperoxid führte bei Zugabe eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers zu starken Erhöhungen des Messsignals. Dieses ist jedoch nicht auf eine umfangreiche Bindung des Antikörpers zurückzuführen. Das brechungsindexbereinigte Messsignal, welches man nach dem Austausch der Antikörperlösung gegen reine Pufferlösung erhält, zeigte nur eine geringe Anlagerung des Antikörpers (Abb. 60 bis 62). Das SPR-Messprinzip beruht auf einer Detektion der Änderung des Brechungsindexes in unmittelbarer Nähe der Goldschicht. Somit üben Brechungsindexänderungen der Lösung über der Metallschicht einen Einfluss auf das Messsignal aus [Hartmann, 2004]. Das brechungsindexbereinigte Messsignal ist in diesem Zusammenhang als die Differenz zu verstehen, die aus den Signalen bei mit Puffer bedeckten Messfläche vor und nach der Aufgabe einer Biokomponente ermittelt wird. Das Messsignal des *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers verlief nach Zugabe auf die Amino-PEG Oberfläche peakförmig. Nach Erreichen des Signalmaximums wurde über einen Zeitraum von etwa fünf Minuten ein Abfall des Signals beobachtet. Die Schichtdickenzuwächse betragen 5 bis 25 AU. Eine solche Form der Bindungskurve ist für

die Kinetik der Anlagerung einer Biokomponente an eine biosensitive Oberfläche untypisch. Ein möglicher Grund wären Pufferzusätze der Antikörperlösung, die eine sofortige, starke Änderung des Brechungsindex in der Nähe der Metallschicht bewirkten. Ursachen könnten eine hohe Salzkonzentration oder Spuren organischer Lösungsmittel sein. Ebenso ist der Einfluss von Konservierungsstoffen wie beispielweise Thiomersal denkbar. Ein möglicher Effekt des Verdünnungspuffers (PBS-Puffer pH 7,3) kann ausgeschlossen werden, da die Kavitäten vor der Antikörperaufgabe mit diesem befüllt waren.

Nach Erreichen eines Maximums nimmt das Messsignal über einen Zeitraum von fünf Minuten ab. Dies entspricht zeitlich genau dem verwendeten Mischmodus. Lediglich Scher- oder Druckeffekte könnten beispielsweise durch Beeinflussung des Belegungsgrades auf der beschichteten Oberfläche als möglicher Grund in Betracht kommen.

Bei Oxidation des beschichteten Trägers mit Natriumperodat bzw. Wasserstoffperoxid wurden nur geringe Schichtdickenzuwächse ermittelt (Tab. 12). Die morphologische Struktur der beschichteten Oberfläche könnte ein Grund für die geringe Signalzunahme sein. Zwar wurde die gesamte Goldoberfläche mit den Beschichtungschemikalien behandelt, doch besteht die Möglichkeit der Ausbildung lokaler Fehlstellen [Mrksich und Whitesides, 1996]. Dadurch würde sich die Anzahl effektiver Bindungsstellen verringern.

Wie bereits erläutert, besteht das heterobifunktionale PEG-Derivat aus einer Amino- und einer Hydroxylgruppe als endständige, funktionelle Gruppe. Der stärkere induktive Effekt der Aminogruppe sollte somit zur bevorzugten Anlagerung an die freie Epoxidkomponente des BDDGs führen. Trotzdem kann die Möglichkeit einer Bindung des PEG-Moleküls über seine Hydroxylgruppe an die funktionalisierte Oberfläche nicht vollends ausgeschlossen werden. Dadurch würde sich eine aminofunktionalisierte Oberfläche ausbilden mit dem Ergebnis einer fehlenden Umsetzung zu einer Carboxylgruppe.

Wie bereits erwähnt, sollte die Hydroxylgruppe des immobilisierten Polyethylenglykols mit Hilfe von Oxidationsmitteln zu einer Carboxylgruppe umfunktionalisiert werden. Die Bindung des Antikörpers an die Oberfläche würde somit über eine Säureamidbindung erfolgen. Der Oxidationsprozess einer Hydroxylgruppe zu einer Carboxylgruppe verläuft über ein Aldehyd als Zwischenstufe (Abb. 59). Sollte die Oxidation nur bis zur Zwischenstufe ablaufen, käme es zur einer nucleophilen Addition des Amins der Biokomponente an die Aldehydgruppe unter Bildung eines Halbaminals als Zwischenprodukt (Abb. 168).

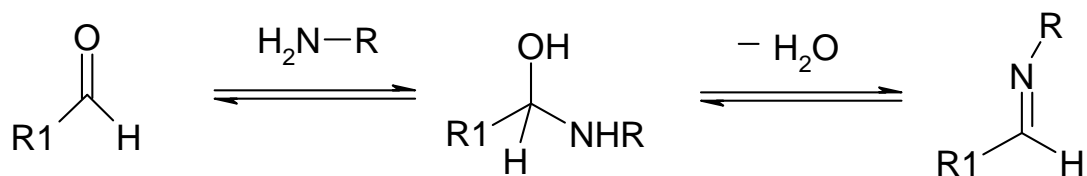


Abbildung 168: Mechanismus der Iminbildung aus primären Aminen und Aldehyden.

Sowohl die Imin- als auch die Amidbindung sind kovalente Bindungen. Somit würde auch bei einer unzureichenden Oxidation eine stabile Immobilisierung des Antikörpers an der biosensitiven Oberfläche vorliegen.

Der Oxidationsgrad der Oberfläche ist vom verwendeten Oxidationsmittel abhängig. Natriumperodat ist ein schwächeres Oxidationsmittel als Wasserstoffperoxid mit dem Resultat einer geringeren Schichtdickenzunahme aufgrund einer niedrigeren Oxidationsrate der PEG-Oberfläche. Dies würde die geringe Schichtdickenzunahme von 5 AU im Vergleich zu den etwa 25 AU bei Wasserstoffperoxid erklären. Verglichen mit Natriumperodat und Wasserstoffperoxid ist Kaliumpermanganat das stärkste Oxidationsmittel [Schröter et al., 1990]. Eine vollständigere Oxidation der Amino-PEG Oberflächen durch Kaliumpermanganat erklärt möglicherweise den fast 8-fach höheren Schichtdickenzuwachs auf 195 AU (Abb. 63). Das SPR-Sensorgramm zeigte eine Bindungskurve, die für die Anlagerungskinetik einer Biokomponente ebenfalls atypisch verlief. Wie bereits diskutiert, könnten Pufferzusätze der Antikörperlösung wie beispielsweise Konservierungsstoffe, organische Lösungsmittel oder eine hohe Salzkonzentration, eine sofortige, starke Änderung des Brechungsindex bewirken. Die Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen ist ein komplizierter und vielseitiger Prozess [Ramsden, 1995]. Abbildung 169 zeigt mögliche Effekte bei der Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen.

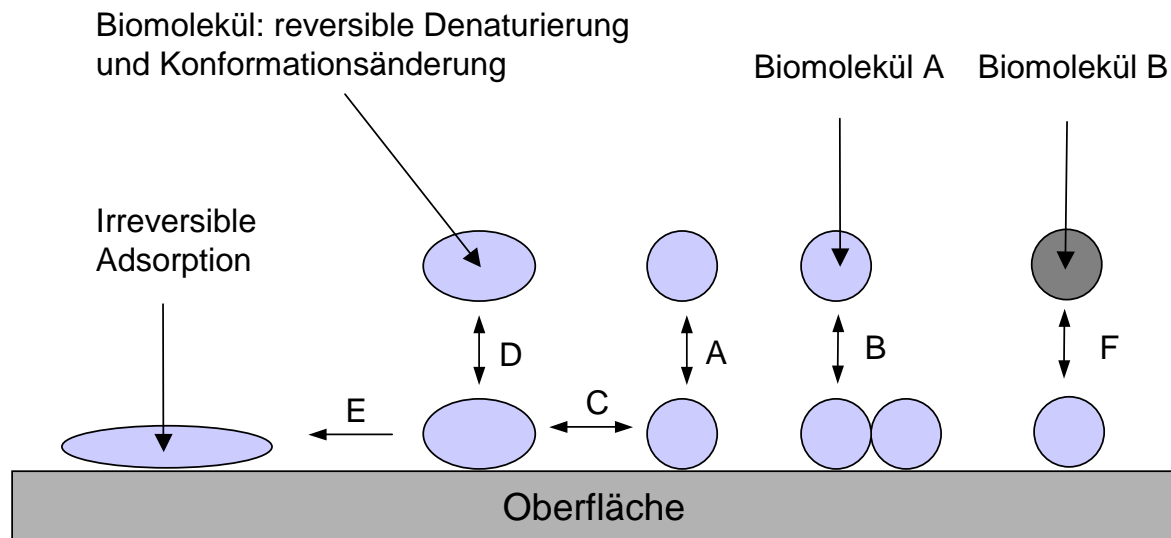


Abbildung 169: Möglichkeiten der Adsorption von Biomolekülen, insbesondere von Proteinen, auf Oberflächen. A: Adsorption an der Oberfläche durch Diffusion/Konvektion, B: Dissoziation eines Biomoleküls an ein anderes, C: Reversible Denaturierung und Konformationsänderung, D: Dissoziation des veränderten Biomoleküls, E: Denaturierung mit dem Ergebnis einer irreversiblen Adsorption, F: Austausch eines Biomoleküls mit einem anderen aus der Lösung.

Die Adsorption von Biomolekülen an biosensitive Oberflächen kann durch weitere Faktoren, wie beispielsweise elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Biomolekülen, Interaktion/Coadsorption mit niedermolekularen Ionen oder dem pH-Wert, beeinflusst werden [Sadana, 1992]. Dies wären weitere Erklärungen für die Unterschiede im Schichtdickenzuwachs und dem atypischen Verlauf der Bindungskinetiken. Die Kavitäten wurden nach der Inkubation mit dem Oxidationsmittel fünfmal mit PBS-Puffer gespült. Da mit der SPR eine Brechungsindexänderung in unmittelbarer Nähe der Metalloberfläche bestimmt wird, führte ein Entleeren der Küvette zu einem Einfluss auf das Messsignal. Bis zur Neubefüllung der Küvette ist somit kein Plasmon und damit auch kein Messsignal zu beobachten. Dieses Problem wurde durch eine Teilbefüllung der Kavität umgangen [Hartmann, 2004]. Eine wiederholte Teilentleerung war nötig, um ein von dem Brechungsindex der Analytlösung bereinigtes Material zu erhalten.

Möglich ist auch, dass trotz mehrmaligem Spülen mit Puffer noch Reste der Oxidationsmittel vorliegen. Eine Interaktion mit Antikörpern könnte zu einer Beeinträchtigung in der Adsorption an die funktionalisierte Oberfläche führen [Sadana, 1992].

V.1.1.2. Homobiofunktionale PEG-Oberflächen

Wie in V.1.1.1 diskutiert, führte die Verwendung eines heterobifunktionalen PEG-Derivates zu geringen Schichtdickenzuwächsen und atypischen Verläufen der Bindungskinetik. Das eingesetzte Amino-PEG kann über seine Amino- oder Hydroxylgruppe an die Trägeroberfläche kuppeln. Da für weitere Beschichtungsvorgänge die freie funktionelle Gruppe bekannt sein muss, wurden homobifunktionale PEG-Derivate, wie beispielsweise Diamino- oder Dicarboxy-PEG, verwendet.

Dicarboxy-PEG

In dieser Arbeit war ein verwendetes homobifunktionales PEG-Derivat das Dicarboxy-PEG. Dabei bindet eine Carboxylgruppe unter Ausbildung eines Esters an die freie Epoxidgruppe des BDDG (Abb. 65). Anschließend wurde die zweite Gruppe durch NHS/DIC aktiviert. Dabei stellen aktivierte Carboxylgruppen ein bevorzugtes acylierendes Agens der Proteinmodifikation dar [Roberts et al., 2002]. Mit NHS hergestellte Aktivester reagieren mit primären Aminen unter physiologischen Bedingungen zu stabilen Amidien. Die Aktivierung der PEG-Carboxylgruppe zum Bernsteinsäure-Aktivester erfolgte durch NHS und einem Carbodiimid (Abb. 65).

Die Abhängigkeit des Schichtdickenzuwachses von der Aktivierung endständiger Carboxylgruppen mit NHS zeigte sich bei der Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers auf biosensitiven Oberflächen (Abb. 66 und 67). Verglichen mit der Bindungskinetik bei oxidierten PEG-Hydroxylgruppen wurde ein typischer Verlauf des Messsignals bei der Immobilisierung von Antikörpern beobachtet (Abb. 66). Dabei wurde bei aktivierten PEG-Carboxylgruppen eine Schichtdickenzunahme von 66 AU ermittelt, bei nicht aktivierten 35 AU. Durch die Aktivierung der PEG-Carboxylgruppe wurde eine höhere Anzahl aktiver Gruppen geschaffen, die mit primären Aminen zu Säureamiden reagieren können. Der etwa 50 % geringere Schichtdickenzuwachs bei nicht aktivierten Carboxylgruppen zeigte aber auch, dass eine Aktivierung förderlich, jedoch nicht zwingend notwendig sein muss. Die Aktivierung fördert die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Oberfläche und Antikörper. Das diese bei einer Nichtaktivierung der Carboxylgruppen ebenfalls ausgebildet wird, ist nicht vollends auszuschließen. Wahrscheinlicher ist jedoch eine adsorptive Bindung des Antikörpers an die Oberfläche.

Sandwichassay auf Dicarboxy-PEG

Die in V.1.1.2. durchgeführten Versuche zeigten die erfolgreiche Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörper auf Dicarboxy-PEG beschichteten Oberflächen. Dabei bestehen mehrere Möglichkeiten, wie der Antikörper an die Oberfläche kuppelt (Abb. 170).

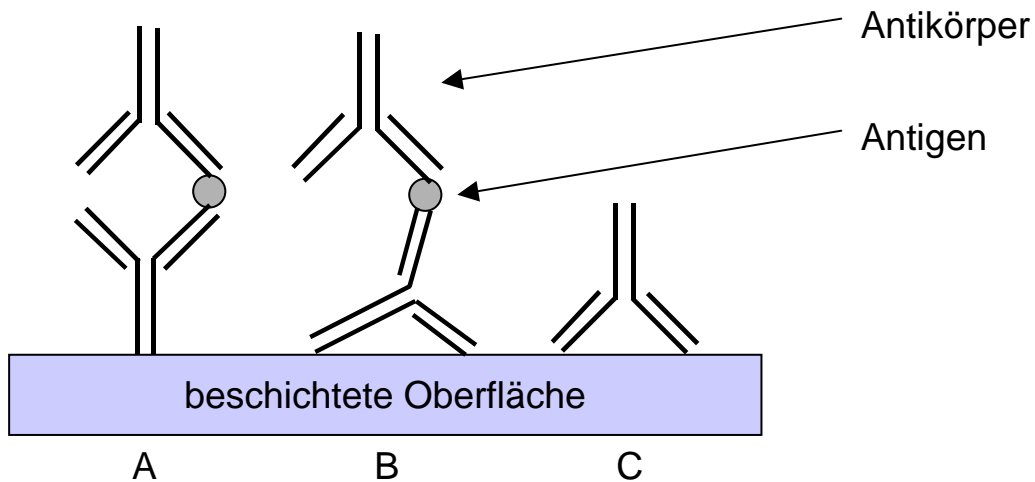


Abbildung 170: Schematische Darstellung zur Ausrichtung eines Antikörpers (Fängerantikörper) auf einer biosensitiven Oberfläche und möglicher Aufbau eines Sandwich-Assay. A: Bindung an die Oberfläche über den Fc-Teil des Antikörpers. Antigenbindung und Kupplung eines Detektionsantikörpers über den Fab-Teil möglich; B: Bindung an die Oberfläche über Seitenketten des Fc-Teil des Antikörpers. Ebenfalls Kupplung eines Detektionsantikörpers möglich; C: Bindung des Antikörpers über den Fab-Teil. Aufbau eines Sandwich-Assay ist nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich.

Mit Hilfe eines Sandwich-Assays sollte die strukturelle Ausrichtung des auf Dicarboxy-PEG immobilisierten *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers ermittelt werden (Abb. 69). Der geringe Schichtdickenzuwachs des Detektionsantikörpers von 4 AU ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Fab-Teil des Fängerantikörpers für das Antigen nicht frei zugänglich war. Dies ist beispielsweise durch Bindung über die Antigenbindungsstelle an die Oberfläche möglich (Abb. 170; C). Ein weiterer Antikörper könnte aufgrund der sterischen Behinderung nur erschwert an die beschichtete Oberfläche kuppeln.

Auffällig war die Form der Bindungskurve für die Kinetik der Anlagerung des Detektionsantikörpers. Dabei wurde der *Legionella pneumophila* spezifische Antikörper sowohl als Fänger- als auch Detektionsantikörper eingesetzt. Wie bereits in Kapitel V.1.1. diskutiert, führen Pufferzusätze der Antikörperlösung zu einer sofortigen Änderung des Brechungsindex in der Nähe der Metallschicht und damit zu einem sofortigen Anstieg der Bindungskurve.

Eine weitere Möglichkeit besteht in unterschiedlichen Bindungsgeschwindigkeiten für ionische und kovalente Bindungen, die zwischen Antikörper und funktionalisierter PEG-Oberfläche ausgebildet werden. Möglicherweise liegen zu Beginn der Immobilisierung überwiegend ionische Bindungen zwischen Antikörper und Oberfläche vor. Durch Druck- und Sogwirkungen der automatischen Pipettiereinheit könnten Antikörper von der Oberfläche auf Grund geringer Bindungsstärke abdissoziieren. Dies würde zu einer Abnahme des Messsignals führen. Erst eine Absättigung der aktiven Bindungsstellen durch Antikörper, die kovalent an der Oberfläche gebunden sind, würde zu einer Stabilisierung des Messsignals führen.

Diamino-PEG

Ein weitere Möglichkeit zur Kupplung von Antikörpern an beschichteten Goldoberflächen bestand in der Verwendung von Diamino-PEG. Die Aminogruppe des immobilisierten PEGs wurde durch Bernsteinsäureanhydrid zu einer Carboxylgruppe umgesetzt. Anschließend erfolgte eine Aktivierung mit NHS/DIC (Abb. 70). Die Immobilisierung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers führte nach fünfmaligem Spülen mit CBB-Puffer zu einer Zunahme der Schichtdicke von 51 AU (Abb. 71). Verglichen mit der Immobilisierung auf aktivierten Dicarboxy-PEG Oberflächen bedeutete dies eine Verringerung um etwa 25 %. Der zusätzliche Reaktionsschritt zur Umsetzung der Amino- in eine Dicarboxygruppe führte wahrscheinlich zu einer Verringerung aktiver Bindungsstellen durch mögliche Kreuzreaktionen. Sehr unwahrscheinlich ist die Ausbildung eines Anhydrids zwischen zwei immobilisierten Molekülen von Bernsteinsäureanhydrid. Dieses würde durch Wassermoleküle sofort wieder aufgespalten. Wahrscheinlicher ist die direkte Verknüpfung zweier Aminogruppen durch Bernsteinsäureanhydrid (Abb. 171).

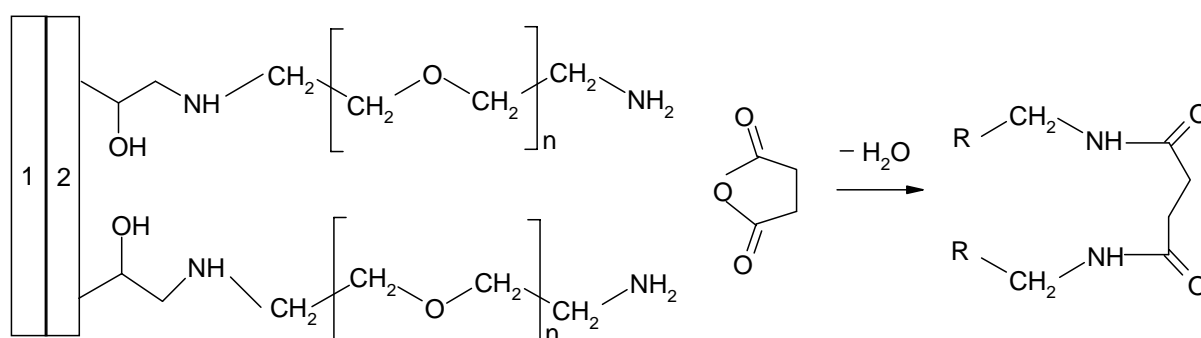


Abbildung 171: Schema einer Reaktion zwischen zwei, durch Bernsteinsäureanhydrid umgesetzte Aminogruppen des Polyethylenglykols (1: Goldträger, 2: Primärbeschichtung aus APTES und BDDG).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die umgesetzte Carboxylgruppe nicht aktiviert. Dabei wurde ein Schichtdickenzuwachs von 43 AU ermittelt (Abb. 72). Wie bereits bei der Verwendung von Dicarboxy-PEG erwähnt, dürfte der Grund die fehlende Ausbildung stabiler Amine sein. Verglichen mit nicht aktivierten Carboxylgruppen führen Aktivester an Carboxylgruppen zu einer besseren Ausbildung von Säureamidgruppen [Roberts et al., 2002]. Bei Dicarboxy-PEG Oberflächen reduzierte sich die Schichtdickenzunahme bei nicht aktivierten Carboxylgruppen um etwa die Hälfte auf 35 AU. Trotzdem wurde bei Diamino-PEG lediglich eine Verringerung um etwa 17 % auf 43 AU beobachtet. Im Idealfall wären alle Aminogruppen des Diamino-PEG durch Bernsteinsäureanhydrid zu einer Carboxylgruppe umgesetzt worden. Dies hätte zu einem nahezu gleichen Schichtdickenzuwachs wie bei Dicarboxy-PEG geführt. Der *Legionella pneumophila* spezifische Antikörper könnte beispielsweise über ionische Wechselwirkungen mit nicht umgesetzten Aminogruppen interagieren. Dabei könnten dieser so positioniert sein, dass die aktive Substratbindungsstelle sterisch frei zugänglich bleibt. Dies würde die um etwa 20 % höhere Schichtdickenzunahme erklären.

V.1.2. Ausrichtung der Antikörperbindung mit Hilfe von $N\alpha,N\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Kobaltchlorid

Wie in Kapitel V.1.1. dargestellt, ist die Ausrichtung der Antikörperbindung auf PEG beschichteten Oberflächen mit Hilfe der SPR nicht möglich. Dabei wurde versucht, den Antikörper über Aminogruppen an aktivierte PEG-Carboxylgruppen zu binden. Eine weitere Möglichkeit bestand in der Komplexbildung der endständigen Carboxylgruppen des Fc-Teils des Antikörpers an eine mit Kobaltchlorid behandelte Tricarboxyloberfläche (Abb. 75). Somit würde der antigenbindende Fab-Teil frei zugänglich bleiben. Durch die gerichtete Anlagerung ist bei Bindung eines Antigens die Immobilisierung eines weiteren Antikörpers möglich.

Die Verwendung eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers führte zu keiner signifikanten Schichtdickenzunahme nach Immobilisierung des Detektionsantikörpers (Abb. 76). Ein Grund könnte die bereits erwähnte Ausrichtung des immobilisierten Fängerantikörpers sein. Die Bindung eines (Fänger-)Antikörpers an die Co^{2+} -Oberfläche erfolgt gerichtet über Komplexbildung der endständigen Carboxylgruppen des Fc-Teils des Antikörpers (Abb. 75) [Hale, 1995]. Bindet der Antikörper über den Fab-Teil an die Oberfläche, ist die Kupplung eines Antigens und somit des Detektionsantikörpers nicht möglich. Auffällig war der Verlauf des brechungsindexbereinigten Messsignals bei der

Antigen- und Fängerantikörper-Zugabe. Bei diesen wurde das Ausgangsniveau um etwa 20 AU unterschritten. Die Abdissoziation des Co^{2+} komplexierten Fängerantikörpers während der Waschschrte ist auf Grund der hohen Affinität zwischen dem Metallion und den Carboxylgruppen unwahrscheinlich. Es würde aber zu einer Abnahme der Schichtdicke und somit des Messsignals führen. Ein weiterer Grund betrifft die Bindungsmöglichkeiten der verwendeten Antigene. Eine anschließende Detektion mit einem polyklonalen rabbit *anti-Salmonella sp.* spezifischen Antikörper war möglich (Abb. 77), obwohl von einer ungefähr gleichen Antikörpergröße ausgegangen werden kann. Dies spricht dafür, dass das immobilisierte *Salmonella*-Antigen dem Antikörper eine Vielzahl an Bindungsmöglichkeiten zur Verfügung stellt und daher mehrere Antikörper an ein Antigenmolekül binden kann.

Ein Schichtdickenzuwachs von 22 AU wurde bei der Immobilisierung des rabbit *anti-Salmonella sp.* spezifischen Fängerantikörpers beobachtet. Das Messsignal der Anlagerung des Detektionsantikörpers übertraf dasjenige des Fängerantikörpers. Unter idealen Bedingungen wäre ein gleich hoher Schichtdickenzuwachs erwartet worden. Dabei heißt ideal, dass jeder Fängerantikörper ein Antigen bindet und jeder Fängerantikörper-Antigenkomplex wiederum einen Detektionsantikörper (gleiche Größe wie Fängerantikörper) bindet. Das evaneszente Feld nimmt jedoch exponentiell in dem Raum über dem Prisma ab, weshalb es nicht zu einer 100 %-igen Übereinstimmung des Messsignale kommt. Je weiter die Entfernung zur Metalloberfläche ist, umso geringer ist das erzeugte Messsignal. Jeder Schritt des Sandwichassays findet in einem größeren Abstand zur Metalloberfläche und damit auch bei einem verminderten evaneszenten Feld statt als der erste [Hartmann, 2004]. Bei einer *Salmonella*-Antigenkonzentration von 10^7 Partikel/ml kam es zu einem brechungsindexbereinigten Messsignal, welches bei rund 133 % desjenigen des Fängerantikörpers lag. Möglicherweise wird pro immobilisiertem Antigenmolekül mehr als ein Detektionsantikörper gebunden. Dies ist möglich, da das verwendete *Salmonella*-Antigen über eine Vielzahl an Bindungsmöglichkeiten für den *Salmonella*-spezifischen Antikörper verfügt. Prinzipiell kann an jeder Bindungseinheit ein Antikörper binden. Somit können mehrere Antikörper an das Antigen binden [Hartmann, 2004]. Es ist wahrscheinlich, dass der Fängerantikörper über die Carboxylgruppen seines Fc-Teils an die Oberfläche bindet. Die Antigenbindungsstelle wäre frei zugänglich und über Fängerantikörper-Antigenkomplexe könnte ein Detektionsantikörper gebunden werden.

V.1.3. Immobilisierung von Antikörpern auf 3-MPS Oberflächen

Wie bereits diskutiert, sind zahlreiche Beschichtungsschritte zur Immobilisierung von Antikörpern auf PEG-Oberflächen notwendig. Eine Möglichkeit, die Anzahl der Immobilisierungsschritte und somit von Fehlerquellen zu verringern, ist die Verwendung von Mercaptopropionsäure (MPS). Durch die endständige Carboxylgruppe liegt bereits die gewünschte funktionelle Gruppe vor (Abb. 78). MPS besitzt „Spacer“-Funktion und auf Grund der Thiolgruppe ist nur ein Beschichtungsschritt notwendig. Der Grund ist, dass die Thiolgruppe mit der Goldoberfläche unter Ausbildung einer stabilen Gold-Thiolat-Bindung reagiert. Somit entfällt die Silanisierung und MPS kann direkt an die Oberfläche kuppeln. Die Spezifität von MPS gegenüber Gold ist insbesondere für die geplante Entwicklung eines Biosensors auf LTCC-Basis relevant [Hyung et al., 1997]. Die Integration von beispielsweise Laccasen in das mikrofluidische Trennsystem würde durch Immobilisierung der aus Gold bestehenden Arbeitselektrode erfolgen. Durch Reduzierung der Anzahl an Immobilisierungsschritten würde sich auch ein möglicher Einfluss der Chemikalien auf Detektoreinheit und Oberflächenstruktur verringern. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von MPS ist die Ausbildung eines so genannten SAM (Self Assembled Monolayer). Darunter versteht man die bei Adsorption von Sulfhydryl-terminierten organischen Molekülen auf glatten Goldoberflächen entstehende, selbstorganisierte Einzelschicht mit definierter, geordneter Struktur. Dabei basiert die spontane Chemisorption der Schicht-Komponenten aus Lösung oder Gasphase direkt auf dem Substrat unter Bildung einer mehr oder weniger perfekt geordneten Monolagenstruktur [Gupta et al., 2004; Tosatti, 1999]. Dieser ausgebildete Monolayer sollte auf die Ausbildung einer Au-S-Bindungen zurückgehen [Gooding und Hibbert, 1999]. Die Bindungsart wird durch ein Thiolat erklärt, doch konnte bis heute dieser Prozess durch Markierung der freiwerdenden H-Atome noch nicht geklärt werden. Neben Alkylthiolen zeigt auch die Thiolgruppe bifunktionaler Thiole, wie beispielsweise MPS, eine höhere Affinität zu Gold. Somit sollte MPS ausschließlich über seine Thiolgruppe an die Goldoberfläche kuppeln (Abb. 172).

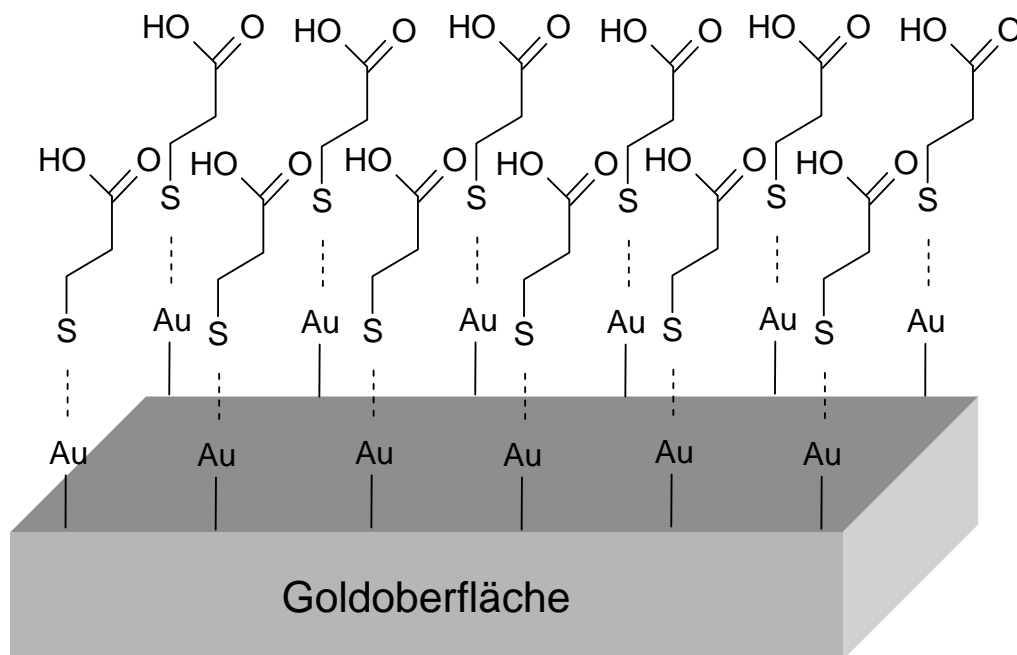


Abbildung 172: Schematische Darstellung einer SAM-Schicht von MPS auf einer Goldoberfläche.

Die Moleküle sind wegen der Au-S-Bindung geometrisch angeordnet. Zudem sind sie auf Grund von Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Alkanketten dicht gepackt. Dichte und Ordnungsgrad der Schicht hängen vom Substrat, der Länge der Alkankette, der Größe und vom Typ der funktionellen Gruppe ab [Poirier und Pylant, 1996]. Mercaptopropionsäure besitzt zwar aufgrund der Thiolgruppe eine hohe Affinität zu Gold; die kurze Alkankette könnte jedoch die Dichte und den Ordnungsgrad der Schicht beeinflussen. Die Folgen wären möglicherweise keine gleichmäßige Belegung der Oberfläche mit aktiven Bindungsstellen. Es würde sich kein selbstorganisierender Monolayer, sondern eine ungeordnete Struktur von MPS-Molekülen auf der Oberfläche ausbilden.

Die Bildung eines SAM ist ein für Alkanthiole grundlegend bekannter Vorgang. Die Alkankette liegt parallel zur Oberfläche und baut zunächst eine Schicht mit geringer Dichte auf. Ist die Oberfläche belegt, macht die Einzelschicht einen Phasenübergang durch. Dies hat zur Folge, dass sich die Ketten „normal“ zur Oberfläche ausrichten und eine dichtere Phasenschicht ausbilden. Eine Orientierung erfolgt mit einem 20 bis 30 ° großen Winkel zur Flächenebene [Poirier und Pylant, 1996]. Dabei hängt die Adsorptionsgeschwindigkeit von Faktoren, wie beispielsweise Temperatur, Konzentration und Kettenlänge der Immobilisate ab. Somit sollte bei einem Molekül mit kurzer Alkankette der Phasenübergang wesentlich schwieriger sein. Findet dieser nicht statt, würden die MPS-Moleküle überwiegend plan auf der Oberfläche aufliegen. Die Folge wäre ein Verlust an Bindungsstellen mit dem Resultat eines geringen Schichtdickenzuwachses. Der Thioltyp bestimmt dabei nicht nur die

Reaktivität des Monolayers, sondern auch die thermische Stabilität. Diese vergrößert sich mit zunehmender Kettenlänge. Die chemische Reaktivität wird durch die freie, endständige funktionelle Gruppe des Thiolats bestimmt; diese nimmt mit zunehmenden Alter der Schicht ab [Bain et al., 1989; Lee et al., 1998].

Die Zugabe eines *Legionella pneumophila* spezifischen Antikörpers auf eine mit NHS/DIC aktivierte MPS-Oberfläche führte zu einem Schichtdickenzuwachs von 44 AU. Dies entspricht 66 % des Messsignals, welches bei Dicarboxy-PEG Oberflächen ermittelt wurde. Ursachen für den peakförmigen Verlauf der Bindungskinetik wurden bereits in Kapitel V.1.1 diskutiert. Aufgrund des geringeren Molekulargewichtes und der Ausbildung eines SAM wurde erwartet, dass eine höhere Anzahl von Bindungsstellen vorliegt, die zu einem mindestens gleich großen Schichtdickenzuwachs führen. Ein Grund für das im Vergleich mit Dicarboxy-PEG geringere Messsignal könnte die Carboxylgruppe der Mercaptopropionsäure sein.

Wie bereits diskutiert, findet die Ausbildung einer stabilen, selbstorganisierenden Schicht besonders bei der Verwendung von Alkanthiolen statt. Die dichte Packung entsteht durch die Ausbildung von Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten. Auf Grund der geringen Moleküllänge dürfte die Ausbildung stabilisierender Van-der-Waals Kräfte nur gering sein. Hinzu kommt, dass die endständige Carboxylgruppe diese Ausbildung wahrscheinlich sterisch behindert. Die Folge ist eine geringe Packungsdichte der Ketten und einen verminderten Ordnungsgrad der Oberflächenbeschichtung. Somit würde eine geringere Anzahl aktiver Bindungsstellen für die Immobilisierung von Antikörpern zur Verfügung stehen. Ebenfalls könnte dadurch der Phasenübergang, also die Aufrichtung der Thiolmoleküle, nicht oder nur unzureichend mit dem Ergebnis stattfinden, dass sich die Thiole nahezu parallel zur Oberfläche ausrichten. Die Folge wäre ebenfalls eine Verringerung der Anzahl an Bindungsstellen. Die Ausbildung von SAMs mit Hilfe von bifunktionalen Thiolen ist zwar möglich, doch entscheidend von der Kettenlänge und der funktionellen Gruppe abhängig [Poirier und Pylant, 1996].

V.2. Immobilisierung fungaler Polyphenoloxidasen auf funktionalisierten Goldprismen

Durch die Immobilisierung von Antikörpern auf funktionalisierten Oberflächen sollten Immobilisierungsstrategien mit Hilfe der SPR überprüft werden. Die Überprüfung der strukturellen Ausrichtung der Antikörper erfolgte dabei mit Hilfe von Sandwich-Assays. Bei der Integration phenoloxidierender Enzyme in ein mikrofluidisches Trennsystem ist jedoch ein anderer Lösungsansatz notwendig. Die Enzyme sind dabei so auf der (Elektroden-) Oberfläche zu immobilisieren, dass sie stabil und ohne signifikante Beeinträchtigung von Affinität und Spezifität katalytisch aktiv sind. Dies bedeutet: 1) Die Substratbindungsstelle ist nach der Immobilisierung frei zugänglich, und 2) mögliche Konformationsänderungen aufgrund der Immobilisierung an die Oberfläche beeinflussen nur gering die Affinität und Spezifität. Die biomolekulare Interaktion zwischen Enzym und Substrat lässt sich nicht wie bei Antikörper und Antigen mittels Sandwich-Assays überprüfen. Dies erfolgte photometrisch mit Hilfe geeigneter Substrate.

Die Funktionskontrolle von Laccasen wird überwiegend mit ABTS durchgeführt [Quan et al., 2002]. Durch die Anwesenheit von Sauerstoff erfolgt die Umsetzung zu farbigen Radikalkationen, die beispielsweise amperometrisch oder, wie in dieser Arbeit, photometrisch vermessen werden können (Abb. 39 und 81). Im Gegensatz zu ABTS führte die Verwendung von Syringaldazin als phenolisches Substrats bei immobilisierten Laccasen zu keinem photometrisch messbaren Ergebnis. In nicht immobilisierten Enzymlösungen wurde lediglich eine sehr geringe Absorptionsänderung von $\leq 0,05$ gemessen. Eine Verlängerung der Inkubationszeiten und Änderungen in der Konzentration erzielten keine Verbesserung. Das pH-Optimum ist stark substratabhängig und zeigt für phenolische Substrate wie Syringaldazin ein glockenförmiges Aktivitätsprofil mit einem Optimum zwischen 3 und 4,5 [Galhaup, 2001]. Unter Berücksichtigung der verwendeten Laccasen wurde in dieser Arbeit ein Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 eingesetzt. Die resultierende pH-Differenz wäre ein möglicher Grund für die photometrisch nicht messbare Umsetzung von Syringaldazin. Somit wurden alle photometrischen Untersuchungen mit ABTS durchgeführt.

V.2.1. Laccase aus *Agaricus bisporus*

Laccase ist eine kupferhaltige Oxidase, welche phenolische Substrate (Mono-, Di- und Polyphenole) [Buswell und Odier, 1987; Fakoussa und Hofrichter, 1999] über Ein-Elektronen-Reaktionen zu Phenoxy-Radikalen oxidiert, während Sauerstoff zu Wasser

reduziert wird (Abb. 37) [Solomon und Lowery, 1993]. Die Laccase des Zuchtchampignons *Agaricus bisporus* wurde auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen immobilisiert (Abb. 80). Nach Aufzeichnung der Bindungskurven mit der SPR erfolgte die photometrische Funktionskontrolle.

Dabei konnte zunächst kein stabiler Absorptionswert gemessen werden. Bei dem Übertrag der ABTS-Substratlösung aus der SPR-Kavität in eine Mikroküvette wurde möglicherweise Laccase mit übertragen. Dies kann durch Kontakt der Pipettenspitze mit der Oberfläche geschehen. Dies würde in der Mikroküvette zu einer weiteren enzymatischen Umsetzung von ABTS und somit zu einem Ansteigen der Absorption führen. Mit Hilfe von Schwefelsäure wurde dieser Effekt verringert. Eine vollständige Inhibition wäre möglicherweise durch den Einsatz von Natriumazid denkbar [Johannes und Majcherczyk, 2000]. Azide hemmen spezifisch Enzyme, die Schwermetalle enthalten. Laccasen gehören zu den Typ-3-Kupferproteinen und sollten somit durch Azide effektiv gehemmt werden. Verglichen mit Schwefelsäure führten Versuche jedoch zu keiner signifikanten Verbesserung. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einfluss durch den Mediator ABTS. Das immobilisierte Enzym katalysiert die Oxidation von ABTS zum $ABTS^{+*}$ -Radikal, welches die Laccase inhibieren und auch denaturieren kann (Abb. 81) [Quan, 2002]. Ein weiterer Grund für die schwankenden Absorptionswerte könnten Inkorporationen des $ABTS^{+*}$ -Radikals in den Enzymlayer durch elektrostatische oder kovalente Interaktionen sein. Die Stabilität des Radikals ist dabei beispielsweise vom pH-Wert und der Zusammensetzung des Puffers abhängig. Abhängig von der eingesetzten Laccase ist ein inhibitorischer Effekt bereits durch eine erhöhte ABTS-Konzentration möglich [Bourbonnais und Paice, 1990].

Wie bereits erwähnt, verlief die Funktionskontrolle der Laccasen in einem zweistufigen Prozess. Dabei erfolgte zunächst eine Überprüfung der erfolgreichen Immobilisierung auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen (Abb. 80.). Die höchste Zunahme der Schichtdicke mit 47 ± 2 AU wurde bei gereinigten, nicht funktionalisierten Goldchips gemessen (Abb. 83). Die photometrische Funktionskontrolle ergab eine Absorption von $0,5 \pm 0,07$. Eine Erklärung für die hohen Messwerte bei nicht funktionalisierten Oberflächen könnte die bei Laccasen relativ häufig verwendete Aminosäure Cystein sein [Koroljova-Skorobogat'ka, 1998]. Möglicherweise kuppelt die Laccase über die Thiolgruppe von Cysteinresten an die Goldoberfläche unter Ausbildung einer stabilen Gold-Thiolat-Bindung. Eine weitere Möglichkeit sind die von Andrade (1985) gemachten Angaben zu Proteininteraktionen. Dabei dominieren hydrophobe Wechselwirkungen die Adsorption von Proteinen. Je stärker hydrophob die Oberfläche ist, desto größer ist die Proteinadsorption. Verglichen mit den beschichteten Oberflächen weist die nicht funktionalisierte

Goldoberfläche die größte Hydrophobie auf. Nach einer Passivierung unspezifischer Bindungsstellen der nicht funktionalisierten Goldoberfläche mit BSA wurde nur ein Schichtdickenzuwachs von 9 AU gemessen. Verglichen mit einer nicht geblockten Goldoberfläche verringerte sich bei der photometrischen Funktionskontrolle die Absorption um nahezu 70 %.

Im Gegensatz mit nicht funktionalisierten Goldoberflächen wurde bei Diamino-PEG und MPS-Oberflächen eine Verringerung des Schichtdickenzuwachses von 40 bis 60 % beobachtet. Obwohl bei aktivierten MPS-Oberflächen mit $0,48 \pm 0,06$ die zweithöchsten Absorptionswerte gemessen wurde, betrug der Schichtdickenzuwachs lediglich 28 ± 6 AU. Dagegen zeigten nicht aktivierte MPS-Oberflächen, trotz eines etwa 10 % höheren Schichtdickenzuwachses, nur eine Absorption von $0,36 \pm 0,05$. Die Beschichtung des Goldchips mit MPS führt zur Ausbildung einer funktionalisierten Oberfläche mit Carboxylgruppen. Deren Aktivierung fördert eine kovalente Bindung des Enzyms über Aminogruppen durch die Ausbildung einer Säureamidbindung. Gupta et al. (2004) zeigten, dass die kovalente Kupplung von Laccase an einen selbstorganisierten Monolayer aus einem Thiol zu einer signifikanten katalytischen Aktivität führt. Somit ist die vergleichsweise geringere Absorption nicht aktivierter MPS-Oberflächen wahrscheinlich durch eine überwiegend adsorptive Immobilisierung des Enzyms erklärbar. Mit APTES aminofunktionalisierte Oberflächen führten zwar zu einem hohen Schichtdickenzuwachs von 37 ± 8 AU; die Absorption betrug jedoch lediglich $0,23 \pm 0,05$. Dies lässt sich möglicherweise durch eine höhere Anzahl unspezifisch gebundener Laccasen auf der funktionalisierten Oberfläche erklären. Dabei beeinflussen zahlreiche Faktoren, wie beispielsweise ionische oder elektrostatische Wechselwirkungen, die Adsorption [Sadana, 1992]. Die Kupplung der Laccase über Bereiche des aktiven Zentrums würde somit zu keiner katalytischen Umsetzung des Substrates führen. Eine weitere Möglichkeit besteht in Konformationsänderungen des Enzyms zur Maximierung der Interaktion mit der Oberfläche. Anpassungen für eine energetisch günstigere Position können zu einer irreversiblen Adsorption und Änderung im Bereich der Substratbindungsstelle führen [Green et al., 1999]. Mögliche Umorganisationen der Enzyme auf der Oberfläche führen zu unterschiedlichen Adsorptionsraten. Dies wäre eine Erklärung für die hohe Standardabweichung von etwa 22 % bei der Immobilisierung auf APTES behandelten Oberflächen [Green et al., 1999].

Die geringste Absorption wurde mit $0,16 \pm 0,03$ AU bei Diamino-PEG Oberflächen ermittelt. Dies korrelierte mit den geringen Schichtdickenzuwächsen von 19 ± 3 AU. Auf Grund der Größe der PEG-Moleküle von etwa 3000 kDa verringert sich die Anzahl spezifischer Bindungsstellen auf der Goldoberfläche. Zudem können weitere Bindungsstellen durch die

Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid und die anschließende NHS/DIC-Aktivierung verloren gehen (Abb. 171). Denkbar ist aber auch, dass es bei der Immobilisierung des Spacers 1,4-Butandiolglycidylether zu einem Verlust an Bindungsstellen kommt. Bindet der Spacer über beide Epoxidgruppen an den aminosilanisierten Träger, steht keine Bindungsstelle für die Immobilisierung von Diamino-PEG mehr zur Verfügung (Abb. 173).

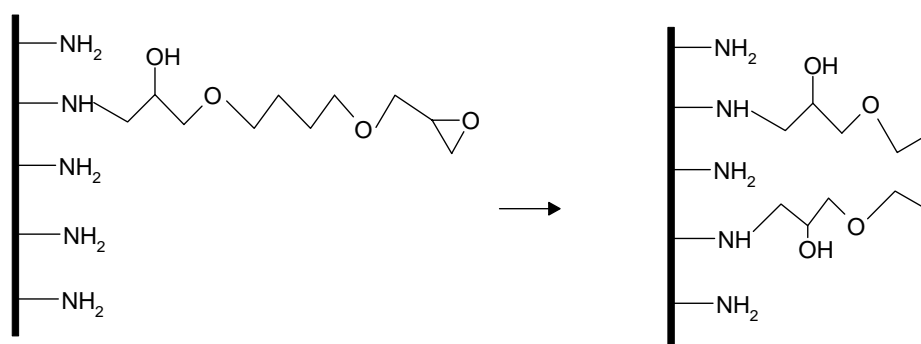


Abbildung 173: Reaktion der zweiten Epoxidgruppe des BDDG mit dem aminobeschichteten Goldträger. Die Immobilisierung des Diamino-PEG ist im Anschluss nicht mehr möglich.

Prinzipiell zeigten alle verwendeten Oberflächen die Möglichkeit zur Immobilisierung der Laccase aus *Agaricus bisporus*. Es muss jedoch die Stabilität und Affinität der immobilisierten Enzyme berücksichtigt werden. Für weitere Versuche in einem mikrofluidischen Trennsystem sind sicherlich kovalente Bindungen zu bevorzugen. Somit wären Diamino-PEG und aktivierte MPS Oberflächen erste Wahl. Diamino-PEG zeigte nur eine geringe Schichtdickenzunahme und Absorption. Es ist jedoch die geringere Anzahl aktivierter Bindungsstellen auf Grund der Molekülgröße des PEG-Derivates zu berücksichtigen. Bei nicht funktionalisierten Oberflächen erfolgte die Kupplung der Laccase überwiegend adsorptiv unter Beeinträchtigung des aktiven Zentrums. Dies erklärt die im Vergleich mit aktivierten MPS Oberflächen geringere Absorption.

V.2.2. Laccase aus *Trametes versicolor*

Laccasen besitzen die Eigenschaft, eine große Anzahl phenolischer Substrate zu oxidieren. Obwohl die chemische Umsetzung nahezu identisch ist, unterscheiden sich Laccasen in zahlreichen Faktoren wie beispielsweise Molekulargewicht, pH-Optimum und Umsatzrate. Eine zweite fungale Laccase aus *Trametes versicolor* wurde auf den bereits in Kapitel V.2.1 diskutierten Oberflächen immobilisiert. Durch den zweistufigen Messprozess sollte zunächst

die Immobilisierung überprüft werden, bevor die eigentliche Funktionskontrolle mittels Photometer erfolgte.

Nicht funktionalisierte Oberflächen zeigten mit 32 ± 2 AU den höchsten Schichtdickenzuwachs und mit $0,12 \pm 0,03$ die geringste Absorption (Abb. 86 und 87). Bei der Laccase aus *Agaricus bisporus* wurde bei diesem Beschichtungsverfahren die höchste Absorption gemessen. Mögliche Gründe wurden bereits in Kapitel V.2.1. diskutiert. Bei der Laccase aus *Trametes versicolor* scheint dabei jedoch die Kupplung über Bereiche des aktiven Zentrums zu erfolgen. Dies würde die im Vergleich zur Schichtdickenzunahme geringen Absorptionswerte erklären. Möglicherweise führt auch eine Konformationsänderung oder Denaturierung nach der Immobilisierung an die Goldoberfläche zu einer Abnahme in der Substrataffinität [Sadana, 1992]. Verglichen mit nicht funktionalisierten Oberflächen wurde eine doppelt so hohe Absorption bei APTES beschichteten Oberflächen gemessen (Abb. 86). Der Zuwachs an Schichtdicke war jedoch mit 19 ± 3 AU am niedrigsten. Die Laccase aus *Trametes versicolor* ist mit sieben N-Acetylglucosamin-Domänen glykosyliert. Möglicherweise sind Wechselwirkungen einer oder mehrerer dieser Domänen mit der aminofunktionalisierten Oberfläche dafür verantwortlich [Piontek et al., 2002]. Verglichen mit den meisten kupferhaltigen Enzymen ist der Typ-1-Kupfer lediglich dreifach koordiniert und weist keinen Axial-Liganden auf. Eine mögliche Konformationsänderung nach der Adsorption auf der Oberfläche könnte sich somit nachteilig auf den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum auswirken. Der Schichtdickenzuwachs einer mit BSA geblockten, nicht funktionalisierten Goldoberfläche betrug etwa 90 % dessen, was bei einer nicht geblockten Oberfläche gemessen wurde. Die Verringerung der Absorption betrug etwa 50 % (Abb. 87). Wie bereits in Kapitel V.2.1. diskutiert, verringert sich die Absorption durch die Passivierung der unspezifischen Bindungen durch die Verwendung von BSA.

Die photometrische Funktionskontrolle bei Diamino-PEG und aktivierten MPS-Oberflächen zeigte nur eine geringe Absorption von etwa 0,12. Erwartet wurde, wie bei der Laccase aus *Agaricus bisporus*, eine höhere Absorption bei aktivierten MPS-Oberflächen. Durch die Ausbildung eines selbstorganisierten Monolayers sollte eine Oberfläche mit hoher Packungsdichte und somit zahlreicher aktiver Bindungsstellen entstehen. Mögliche Gründe für die geringe Absorption könnten die bereits diskutierten strukturellen Unterschiede der Laccase aus *Trametes versicolor* sein. Beispielsweise könnte eine geringere Anzahl von Lysinseitenketten zu einer verminderten Ausbildung an Säureamidgruppen führen. Sekundär- oder Tertiärstrukturen des Enzyms könnten zudem einen erheblichen Einfluss auf Konformationsänderungen besitzen. Änderungen der Dissoziationskonstanten saurer und basischer Seitenketten und Hinderungen des Substrats auf Grund der Adsorption des Enzyms

über das aktive Zentrum sind weitere mögliche Gründe. Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der Schichtdickenzunahme und der Absorption wurde ein Intraassay auf aktivierter MPS-Oberfläche durchgeführt. Im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 1 mg Enzym/ml zeigte sich eine lineare Abhängigkeit zur Signaldifferenz (Abb. 88). Dabei wurde eine Schichtdickenzunahme von jeweils 5 AU für jede Steigerung der Konzentration um 0,2 mg/ml ermittelt. Für dieselben Konzentrationsschritte wurde bei der anschließenden photometrischen Funktionskontrolle eine Zunahme der Absorption um jeweils 0,2 ermittelt. Somit wurde eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration sowohl bei der Aufzeichnung des Bindungssignals als auch bei der photometrischen Funktionskontrolle beobachtet.

V.2.3. Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*

Die photometrische Funktionskontrolle wurde bei der Tyrosinase nicht mit ABTS sondern mit einer 5 mM Brenzkatechinlösung durchgeführt. Die Umsetzung von Brenzkatechin zum *ortho*-Chinon stellte sich in Vorversuchungen als geeignetere Methode dar. Die Schichtdickenzunahmen der Tyrosinase lagen für die verwendeten funktionalisierten Oberflächen in einem Bereich von 49 bis 62 AU. Verglichen mit der Zunahme des Bindungssignals bei Laccasen konnte je nach Beschichtungsmethode ein Anstieg zwischen 10 und 50 % beobachtet werden. Ein Grund ist möglicherweise das größere Molekulargewicht der Tyrosinase mit 125 kDa, wodurch eine größere Anzahl aktiver Bindungsstellen besetzt werden. Dies hat aber den Vorteil, dass größere Proteine eine stabilere Adsorption an Oberflächen aufweisen. Im Gegensatz zu kleinen, globulären Molekülen belegen sie eine größere Oberfläche und damit mehr Bindungsdomänen [Green et al., 1999].

Nicht funktionalisierte Goldträger zeigten mit $0,39 \pm 0,04$ die höchsten Absorptionswerte. Alle funktionalisierten Goldoberflächen lagen im Bereich von 0,19 bis 0,24. Mögliche Erklärungsansätze wurden bereits in Kapitel V.2.1. und V.2.2. diskutiert. Erfolgte vor der Immobilisierung der Tyrosinase an die Goldoberfläche eine Inkubation mit BSA, verringerte sich die Absorption um nahezu 80 % auf etwa 0,09. Durch die Inkubation der Oberfläche mit BSA ist eine Kupplung der Tyrosinase über Thiolgruppen nicht mehr möglich. Verglichen mit den übrigen funktionalisierten Oberflächen ist die hohe Absorption von $0,24 \pm 0,04$ für nicht aktivierte MPS Oberflächen auffällig. Aktivierte MPS Oberflächen zeigten eine etwa 20 % geringere Absorption. Dabei wurde erwartet, dass bei einem selbstorganisierten Monolayer die Kupplung über eine kovalente Bindung zu einer höheren katalytischen

Aktivität führt [Gupta et al., 1999]. Möglicherweise führt dies jedoch zu einer Immobilisierung, die einen ungehinderten Zugang des Substrates zur Bindungstasche nicht mehr ermöglicht. Das Ergebnis wäre eine verminderte Absorption. Bei nicht aktivierten Oberflächen kann die Immobilisierung, basierend auf überwiegend elektrostatischen und/oder ionischen Wechselwirkungen, auch ohne Beteiligung von Aminogruppen erfolgen. Bei Diamino-PEG Oberflächen wird ebenfalls eine Aktivierung mit NHS/DIC durchgeführt. Die Absorption war mit 0,21 etwa 10 % höher als bei einer vergleichbaren Aktivierung auf MPS-Oberflächen. Bei dieser Methode bestand die Möglichkeit eines Verlustes an Bindungsstellen durch eine Reaktion der Epoxidgruppe des immobilisierten Butandiolglycidylethers mit der aminofunktionalisierten Oberfläche (Abb. 173). Berücksichtigt man zusätzlich die Größe von Diamino-PEG, ist der Unterschied möglicherweise auf Struktur und Anordnung des selbstorganisierenden Monolayers zurückzuführen. Wie bereits in Kapitel V.1.3. diskutiert, ist die Packungsdichte und Anordnung eines SAM von zahlreichen Faktoren, wie beispielsweise der Alkylkettenlänge oder zusätzlicher funktioneller Gruppen, abhängig. Die Verwendung von Mercaptopropionsäure könnte auf Grund der Carboxylgruppe zu einem niedrigeren Belegungsgrad auf der Goldoberfläche führen. Zudem bewirken möglicherweise die geringeren Van-der-Waals Kräfte zwischen den kurzen Alkylketten eine verminderte Packungsdichte.

Die Versuche mit Tyrosinase und Laccasen aus *Agaricus bisporus* und *Trametes versicolor* zeigten, dass diese phenoloxidierenden Enzyme auf funktionalisierten Oberflächen immobilisiert werden können. Auf einer gereinigten, nicht funktionalisierten Oberfläche war ebenfalls eine Immobilisation der Enzyme möglich. Für eine spätere Integration, beispielsweise in ein mikrofluidisches Trennsystem, ist für ihre Funktion die Ausrichtung auf der Oberfläche entscheidend. Dies wurde mit Hilfe eines Farbausays überprüft. Bei nicht funktionalisierten Oberflächen wurden die höchsten Absorptionswerte gemessen. Funktionalisierte Oberflächen zeigten alle eine geringe Absorption, wobei jedoch die Beschichtungsmethode zu berücksichtigen ist. Der Verlust von Bindungsstellen aufgrund von Kreuzreaktionen, eine möglicherweise geringe Oberflächendichte von MPS-beschichteten Trägern oder die Molekülgröße von Diamino-PEG können zu einer Verringerung von Bindungsstellen führen. Bei der Laccase aus *Agaricus bisporus* zeigten sich die höchsten Absorptionswerte bei nicht funktionalisierten und aktivierten MPS-Oberflächen. Mit APTES funktionalisierte Goldträger wären zur Immobilisierung der Laccase aus *Trametes versicolor* zu bevorzugen. Bei der Tyrosinase zeigte sich die höchste Absorption bei nicht funktionalisierten Goldoberflächen. Die Kupplung beruht dabei auf adsorptiven Vorgängen.

Für eine Anwendung in einem mikrofluidischen System ist jedoch auch die Stabilität der Immobilisierung entscheidend. Somit wären aktivierte MPS- und Diamino-PEG-Oberflächen auf Grund einer kovalenten Immobilisation der Enzyme besser geeignet.

V.3. Entwicklung eines Mikro-CE-Systems auf LTCC-Basis

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Entwicklung eines LTCC basierten Lab-on-a-chip-Systems zwei neue Messkomponenten geplant und konstruiert. Zur potentiometrischen Ansteuerung des integrierten elektrochemischen Detektors des Mikrochips war eine spezielle Kontakthalterung notwendig. Ein preiswertes, modulartiges Hochspannungsnetzgerät wurde zur elektrokinetischen Injektion benötigt. Bei diesem Verfahren werden die Injektions- und Trennkontakte durch unterschiedliche Elektrodenpotentialen belegt. Dabei ist die separate Steuerung jedes Hochspannungskontaktes durch ein eigenes Hochspannungsmodul erforderlich. Die zur Regelung von Injektions- und Trennmodus üblichen Module wurden bei dem selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerät durch ein programmierbares SPS-Steuerrelais ausgetauscht. Dies führte zur Reduzierung von Herstellungskosten und Gerätegewicht. Zudem war die Bedienung benutzerfreundlicher.

Da es keine kommerziell erhältlichen Kontaktierungssysteme für mikrofluidische Anwendungen gibt, wurden zwei Chiphalterungen mit integrierter Kontaktierung hergestellt (Abb. 93). Die HSS-Chiphalterung verfügte zudem über eine Messanordnung aus externen Platinkontakten. Somit wurde eine mögliche Abhängigkeit der amperometrischen Detektion von Polyphenolen unter Verwendung von externen und integrierten Kontakten ausgeschlossen.

Da die gemessenen Ströme im Bereich weniger Nanoampere lagen, konnten elektrische und elektromagnetische Störquellen zu einer Beeinflussung der Messung führen. Deshalb wurde die Messeinheit in einem Faradayschen Käfig positioniert. Ohne diesen Stahlkäfig wurde bei den aufgezeichneten Elektropherogrammen ein Grundrauschen von etwa 0,5-1 nA (Abb. 94a-b) beobachtet. In einem geschlossenen, geerdeten Käfig beträgt die elektrische Feldstärke null. Die Ladung, die an der Außenseite eines geladenen Leiters konzentriert ist, hat somit keinen Einfluss auf Objekte die sich innerhalb des vom Leiter umschlossenen Raumes befinden. Somit ist die Störung der Messung durch externe Quellen nahezu ausgeschlossen.

Ein weiteres Kernelement zur Konstruktion eines geeigneten kapillarelektrophoretischen Trennsystems war die Entwicklung einer geeigneten Methode zur blasenfreien Befüllung der Kapillaren. Ein häufiges Problem bei der Befüllung ist die unzureichende Entfernung von Lufteinschlüssen in der Mikrokapillare. Diese können durch einen abreißen

Flüssigkeitsstrom oder Inhomogenitäten in der Kapillarwand entstehen. Freisetzungen von Luftblasen in den Elektrolytstrom führen zu einem Stromanstieg im Trennkanal.

Die Ursache liegt darin, dass die Elektrolytlösung in der Kapillare als Ohmscher Widerstand funktioniert. Die Zunahme des elektrischen Widerstands in der Kapillare durch vorhandene Luftblasen führt zu einem Stromanstieg und somit zu einem Drift der Basislinie. Die beispielsweise auf fused-silica oder Polymeren angewendeten Mikrochipinjektionen erfolgen überwiegend durch hydrodynamische Verfahren wie Druck oder Vakuum [Crabtree et al., 2001]. Diese Techniken waren durch das Fehlen geeigneter Komponenten nicht auf LTCC-Keramiken übertragbar. Deshalb wurde ein Befüllungssystem auf Basis von Polyetheretherketon (PEEK)-Schläuchen in Verbindung mit einer Schlauchpumpe entwickelt. Mit Hilfe von NanoPorts™ wurde eine einfache und effiziente Methode zur Befüllung, Reinigung und Konditionierung von Kapillaren auf LTCC-Keramikchips adaptiert.

V.3.1. Kontaktwinkelmessungen auf LTCC

Bei kapillarelektrophoretischen Trennungen ist die Mobilität der Proben abhängig von der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und dem elektroosmotischen Fluss [Ren und Li, 2002]. Dieser lässt sich beschreiben als die Bewegung einer Flüssigkeit relativ zu einer geladenen Oberfläche unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (Abb. 11) [Kuhn, 1995]. Größe und Richtung des EOF sind von der Beschaffenheit der Kapillaroberfläche und der Pufferzusammensetzung abhängig. Da die amperometrische Detektion kathodisch erfolgte, war zur Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht (Transport der Pufferlösung zur Kathode) eine negativ geladene Kapillaroberfläche erforderlich (Kapitel II.3.).

Mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen sollten geeignete Reagenzien zur Erhöhung der Hydrophilie auf LTCC-Oberflächen ermittelt werden. Somit würde sich bei zunehmender Oberflächenladung die Migrationszeit verringern. Es wurden Substanzen ausgewählt, die bereits bei der Oberflächenbehandlung von fused-silica und LTCC-Keramiken Verwendung fanden [Henry et al., 1999]. Neben KOH, KOH/Ethanol-Gemischen wurden die Keramikoberflächen mit Aceton, Wasser und Piranha-Lösung inkubiert. Zur Untersuchung möglicher Einflüsse auf den elektrochemischen Detektor wurden die Reagenzien ebenfalls in die Kavität des Pufferauslasses gegeben.

Die Verwendung von Piranha-Lösung führte zu einer Schwarzfärbung und Gasentwicklung an der Referenzelektrode. Möglicherweise war der Grund dafür die verwendete

Schwefelsäure. Diese reagierte mit der Silberelektrode in einer irreversiblen Reaktion zu Schwefeldioxid und Silbersulfat (Gleichung 31).



Gleichung 31: Reaktion von Silber mit Schwefelsäure.

Eine Verwendung würde beispielsweise zu einer fehlerhaften Einstellung des Elektrodenpotentials führen. Für weitere Versuche war die Piranha-Lösung somit nicht nutzbar. Zur Erhöhung der hydrophilen Eigenschaften von LTCC-Keramiken schienen KOH-Lösungen geeignet zu sein. Verglichen mit den anderen Reagenzien wurden bei der Verwendung von KOH-Lösungen die niedrigsten Kontaktwinkel gemessen. Eine hohe Hydrophilie führt zu einer höheren Benetzbarkeit der Oberfläche und somit geringen Kontaktwinkeln. Somit sollte die Hydrophilie bei diesen Substanzen am höchsten sein. Beispielsweise ergab die Inkubation der Keramikoberflächen mit einem Gemisch aus 3 M KOH und Ethanol (V:V 1:5) Kontaktwinkel von $14,6 \pm 2,2^\circ$ bei der Tangentenmethode (Tab. 16). Nur mit dieser Methode sind unsymmetrische Tropfen, wie sie bei der Messung auf LTCC-Oberflächen auftraten, zu vermessen [Exl und Kindersberger, 2004]. Eine Inkubation mit Aceton führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Hydrophilie. Der Kontaktwinkel war mit etwa 36° mehr als doppelt so hoch als bei einer Inkubation mit KOH.

Ein Grund, warum eine hohe Hydrophilie bei Verwendung von KOH-Lösungen vorliegt könnte die chemische Zusammensetzung der LTCC-Keramik sein. Ausgangsmaterial zur Herstellung der LTCC-Mikrochips waren Dupont 951TM-Folien. Diese Folien bestehen auf einem $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (Korund) basierten Glas-Keramik-Composit, das mit der Glasphase $\text{CaO-PbO-B}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ vermischt ist [Wagner, 2004]. Hauptbestandteile sind Al_2O_3 (42,43 %), SiO_2 (27,20 %), PbO (8,25 %) und CaO (4,03 %). Weitere Bestandteile sind Metalloxide (z.B. CrO , ZnO , K_2O , ZrO_4). Nach dem Sintern zeigt das Tape Bestandteile von Korund und Anorthit ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$), ein zur Gruppe der Feldspate gehörendes Silikat-Mineral mit triklinem Kristallsystem. Obwohl diese Silikate unlöslich in Säuren und Laugen sind, könnte es durch die Einwirkung der getesteten Solute, insbesondere von KOH, zu einer Erhöhung der Oberflächenladung gekommen sein. Beigefügte organische Binder, Plastifikatoren, organische Lösungsmittel oder Bestandteile des Glaspulvers könnten nach dem Sintern als Schicht auf der Oberfläche vorhanden sein. Eine Entfernung durch die verwendeten Chemikalien würde zur Verbesserung der Hydrophilie beitragen.

Eine weiterer Grund ist möglicherweise die Kristallstruktur der LTCC-Oberfläche. KOH könnte mit den Kristallatomen so interagieren, dass Sauerstoff in Form von O^- an der Oberfläche vorliegt (Abb. 174). Dies würde ebenfalls eine Erhöhung der Hydrophilie bewirken. Die zur Herstellung von LTCC-Applikationen notwendigen grünen, ungesinterten Folien sind Glas-Keramik-Gemische, dessen Hauptbestandteile auch im Glas zu finden sind. Bei längerer Einwirkung von alkalischen Lösungen auf Glas beobachtet man eine Trübung auf Grund der Interaktion der OH^- -Ionen, die mit polymeren Silikaten reagieren (Abb. 174) [Vogel, 1992].

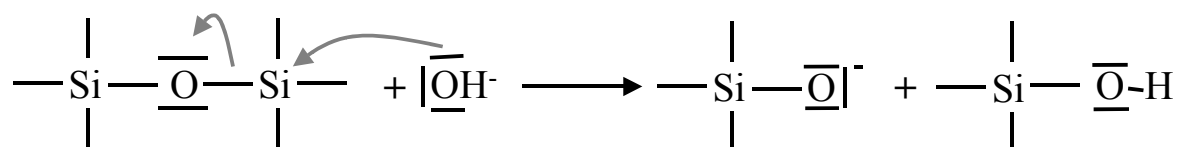


Abbildung 174: Reaktion von OH^- -Ionen aus alkalischen Lösungen mit Silikaten.

Die Reaktion der Hydroxidionen mit den Silikaten erfolgt dabei unter gleichmäßiger Abtragung der Siliziumoxidschicht. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs wird schon durch kleine Mengen von in Lösung gegangenen $[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$ oder SiO_2^- stark vermindert.

Es zeigte sich jedoch, dass die Verwendung der getesteten KOH-Lösungen nicht praktikabel war. Die verwendeten KOH-Lösungen waren zu konzentriert und führten mit zunehmender Messdauer (> 50 Messungen) zu einer langsamen Auflösung der Glaskeramik (Isolation) von Arbeits- und Referenzelektrode (Abb. 53b-c). Um diese trotz des beschriebenen Effektes zu verwenden, wurde die Konzentration auf 0,1 M reduziert. Eine mikroskopische Betrachtung der Glaskeramik zeigte nach mehr als 100 Messungen keine Veränderung.

V.3.2. Berechnung messspezifischer Parameter von LTCC-Keramikchips

Zur Charakterisierung der Trenneffizienz eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems wurden die Messparameter Feldstärke, Stromdichte, elektrophoretische Mobilität und Joulesche Wärme ermittelt.

Feldstärke und Stromdichte

Die Berechnung der Feldstärke und der Stromdichte erfolgte in Abhängigkeit von der angelegten Hochspannung und der Kapillarlänge des LTCC-Mikrochips. Bei 400 V wurde eine Feldstärke von $84,6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ ermittelt (Tab. 19). Unter Berücksichtigung eines kürzeren

Trennkanals wurden bei einer vergleichbaren LTCC-Applikation Feldstärken von mehr als $200 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ angelegt [Henry et al., 1999]. Höhere Feldstärken erwiesen sich bei den verwendeten LTCC-Keramikchips als nicht praktikabel. Der Grund ist das bei Trennspannungen von mehr als 500 V höhere Grundrauschen und Schwanken des Messsignals. Dies lässt sich wahrscheinlich durch die zusätzlichen, seitlich integrierten Elektrodenkontakte erklären. Diese Kontakte sollten später zur Messung weiterer Parameter genutzt werden. Aufgrund von Leitungsbahnen führten diese bis in den Trennkanal und bewirkten möglicherweise somit eine Störung des homogenen elektrischen Feldes (Abb. 175).

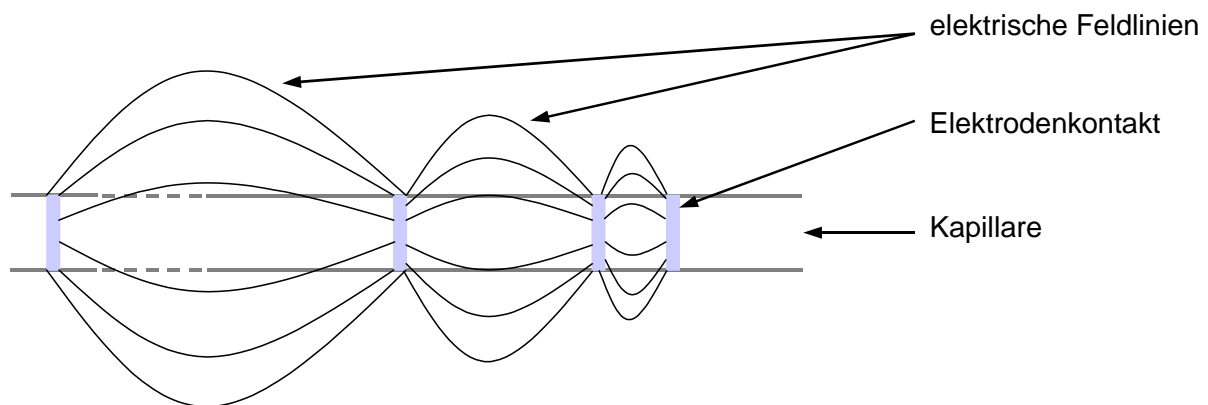


Abbildung 175: Schematische Darstellung der elektrischen Feldlinien bei zusätzlichen Elektrodenkontakten in der Kapillare.

Elektrophoretische Mobilität

Die elektrophoretische Mobilität ist die Summe aus der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und des elektroosmotischen Flusses. Wie bereits in Kapitel V.3.1. erwähnt, hängen Richtung und Größe des EOF von der Beschaffenheit der Kapillaroberfläche und der Pufferzusammensetzung ab. Der Beitrag des Natriumphosphatpuffers zum elektroosmotischen Fluss wurde bei unterschiedlichen Hochspannungen berechnet (Tab. 21). Neben den in Kapitel V.3.1. erwähnten Faktoren hängt die Mobilität des elektroosmotischen Flusses von der angelegten Hochspannung ab und vergrößert sich mit zunehmender Spannung (Gleichung 15 und 16).

Joulesche Wärme

Während einer elektrophoretischen Trennung wird ein Teil der elektrischen Energie in Wärme umgewandelt, die den elektroosmotischen Fluss beeinflusst. Diese Joulesche Wärme wurde nach Gleichung 10 bei unterschiedlichen Trennspannungen berechnet (Tab. 18). Da diese freiwerdende Wärme den elektroosmotischen Fluss beeinflusst, ist der Abtransport über die LTCC-Keramik von Bedeutung. Die Fähigkeit eines Stoffes, thermische Energie zu transportieren, wird durch die spezifische Wärmeleitfähigkeit angegeben. Die meisten kapillarelektrophoretischen Anwendungen werden auf Glaschips durchgeführt mit einer Wärmeleitfähigkeit für Glas von $1,0 \text{ W/m}\cdot\text{K}$ [Vogel, 1992]. Die in dieser Arbeit verwendeten DuPont 951TM-Folien besitzen mit $3,0 \text{ W/m}\cdot\text{K}$ eine um 200 % höhere spezifische Leitfähigkeit [Dateninformationsblatt, DuPont]. Dies bedeutet, dass LTCC-Keramiken entstandene Wärme schneller ableiten als Glas. Somit wird der Einfluss auf die elektrophoretische Trennung gering gehalten und die Messungen sollten stabiler ablaufen.

V.4. Amperometrische Messungen zur Trennung von Polyphenolen

Die Amperometrie besitzt als elektrochemisches Detektionsverfahren für kapillarelektrophoretische Messungen eine Nachweisgrenze von 10^{-6} bis 10^{-8} M [Kappes und Hause, 2000]. Verglichen mit der Potentiometrie (10^{-5} bis 10^{-7} M) und der Leitfähigkeitsmessung (10^{-6} M), ist die Nachweisgrenze bei der Amperometrie um den Faktor 10 bis 100 größer. Bei der Laser induzierten Fluoreszenz, der häufigsten Detektionsmethode kapillarelektrophoretischer Anwendungen, ist diese mit 10^{-12} M um 50 % höher [Kuhn, 1995]. Der Vorteil elektrochemischer Detektionen ist jedoch die kostengünstige Miniaturisierbarkeit des Gerätes und der Messeinheit. Die Messelektroden waren bei den verwendeten LTCC-Keramikchips vor dem Kapillarausgang (end-capillary) positioniert (Abb. 43b-c).

V.4.1. Vorbereitung der Kapillaren

Vor Durchführung einer amperometrischen Messung war eine Vorbereitung der Kapillaren und der Referenzelektrode erforderlich. Dazu gehörte zum einen die Konditionierung der Kapillaren mit KOH-Lösung und zum anderen die Herstellung einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode. Die Behandlung mit KOH führte zu einer Stabilisierung der Basislinie und des Messsignals (Abb. 100). Wie in Kapitel V.2. erläutert, wurde durch die Inkubation der LTCC-Keramik mit KOH eine Erhöhung der Hydrophilie erreicht. Je höher die Hydrophilie

der Oberfläche ist, desto größer ist der EOF und desto geringer ist die Migrationszeit. Dabei bewirkt eine gleichmäßige Hydrophilie ein flaches, stempelförmiges und stabiles Profil des elektroosmotischen Flusses (Abb. 13).

Die Referenz- oder Bezugselektrode wurde zur Messung des Elektrodenpotentials an der Arbeitselektrode eingesetzt. Diese Potentialmessung erfolgte hochohmig und daher nahezu stromlos. Zur Verringerung des Ohmschen Spannungsabfalls wurde diese aus Silber bestehende Elektrode möglichst dicht an die Arbeitselektrode positioniert. Bei amperometrischen Messungen wurden jedoch Schwankungen im Gleichgewichtspotential und der Basislinie beobachtet. Die Verwendung eines Natriumphosphatpuffers als Elektrolytpuffer führte möglicherweise an der Oberfläche der Silberelektrode zur Ausbildung von Ag_2O mit einem unterschiedlichen Gleichgewichtspotential als AgCl (Gleichung. 32) [Boehme, 2001].

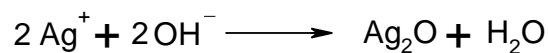


Abbildung 32: Bildung von Silberoxid.

Durch Veränderungen der Elektrodenoberfläche verändern sich nur die absoluten Messwerte. Diese Änderungen sind jedoch nur vorübergehend, was wahrscheinlich in den Gleichgewichtspotentialen von Silberoxid begründet liegt. Mit 0,34 V ist es deutlich größer als Silberchlorid (0,22 V) im Bezug zu einer Normalwasserstoffelektrode [Weast, 1987]. Die in der Nernst-Gleichung dargestellte Aktivität der Metallionen ist somit durch das entsprechende Löslichkeitsprodukt und die Aktivität der Anionen des schwerlöslichen Salzes bestimmt. Elektroden 2. Art, wie die Silber/Silberchlorid-Elektroden, zeichnen sich durch eine rasche und gut reproduzierbare Einstellung der Gleichgewichtsgalvanispannung aus und bewirken somit eine geringere Schwankung der Basislinie und des Messsignals [Buchberger, 1998].

V.4.2. Überprüfung der amperometrischen Detektoreinheit

Die integrierte amperometrische Messeinheit aus Arbeitselektrode und Referenzelektrode war eine 2-Elektrodenanordnung. Die Funktionsüberprüfung der Messanordnung und der elektrochemischen Aktivität des Analyten wurde mit verschiedenen Chipalterungen und unterschiedlich kontaktierten LTCC-Keramikchips durchgeführt. Zudem wurde der Einfluss der Hochspannung auf den Detektor überprüft.

Die verwendeten GBF- und HSS-Chiphalterungen unterschieden sich in den verwendeten Federkontakten (Abb. 176). Dies waren bei der GBF-Halterung halbkugelförmige, bei der HSS-Halterung spitze Federkontakte.

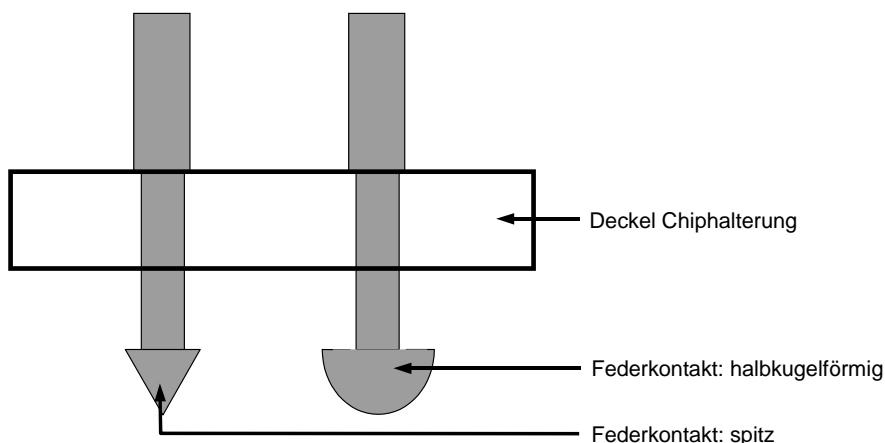


Abbildung 176: Schematische Darstellung der verwendeten Federkontakte.

Die Verwendung der HSS-Halterung führte im Vergleich zur halbkugelförmigen Kontaktierung der GBF-Halterung zu einem 75 % höheren Messsignal bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin ($c = 2,5 \text{ mM}$; Abb. 97). Ein Grund wäre die Berührungsfläche zwischen Federkontakt und externem Elektrodenkontakt. Das Abgreifen des Signals und der Hochspannung erfolgte über Palladium-Silber-Kontakte auf dem LTCC-Keramikchip. Obwohl Silber als Edelmetall relativ reaktionsträge ist, läuft es bei Luftkontakt mit der Zeit schwarz an (Abb. 177).

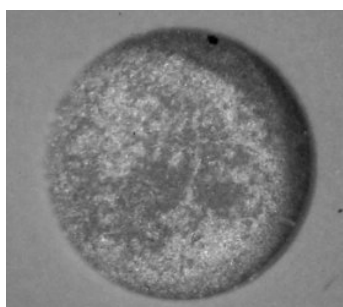
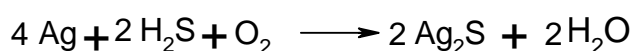


Abbildung 177: Aufnahme (40-fach) eines oxidierten Palladium-Silber-Kontaktes (oxidiert: dunkle Bereiche; nicht oxidiert: helle Bereiche).

Insbesondere Schwefelwasserstoff, welches aus Laborluft stammen kann, oxidiert das Silber zu Silbersulfid (Ag_2S) nach Gleichung 33:



Gleichung 33: Oxidation von Silber zu Silbersulfid durch Schwefelwasserstoff.

Licht, höhere Temperaturen, Feuchtigkeit, Schwefelspuren und Sauerstoff beschleunigen diesen Prozess. Eine Palladium-Silber-Legierung, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, macht Silber zwar anlaufbeständiger, doch kann der Oxidationsprozess dadurch nicht unterbunden werden. Somit wurde mit zunehmender Messdauer nicht nur eine sichtbare Ausbildung der Oxidschicht beobachtet, sondern auch ein größeres Grundrauschen. Möglicherweise liegt ein kugelförmiger Kontakt nur auf der Oxidschicht auf und führt so zu einer verminderten Signalübertragung. Spitze Kontakte wurden durch die anliegende Druckfeder in die Legierung gedrückt. Somit ist die Kontaktfläche zwischen Federkontakt und Oxidschicht minimiert. Das Ergebnis ist ein höheres Signal bei Verwendung spitzer Federkontakte. Um einen Einfluss der Oxidschicht weitestgehend auszuschließen, wurden die externen Kontakte des Keramikchips in regelmäßigen Abständen vorsichtig mit einem Glasradierer gereinigt. Dies führte zu einer Entfernung der Oxidschicht auf der Kontaktoberfläche (Abb. 178).

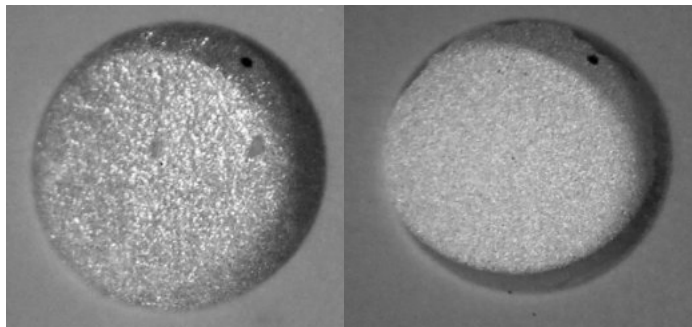


Abbildung 178: Aufnahme (40-fach) eines gereinigten Palladium-Silber-Kontaktes (links) und eines neuen Kontaktes (rechts).

Elektrochemische Detektionen von LTCC-Keramikchips mit verzinnnten äußeren Kontakten wurden mit unterschiedlich konzentrierten Brenzkatechinelösungen durchgeführt. Auf Grund der Bildung einer Oxidschicht auf den externen Kontakten wurde ausschließlich mit spitzen Federkontakten gemessen. Ohne angelegte Hochspannung wurde bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin eine lineare Abhängigkeit der Signalthöhe von der Konzentration beobachtet (Abb. 98). Da höhere Konzentrationen zu einer höheren Umsatzrate an der Arbeitselektrode führen, steigt auch das Messsignal. Eine weitere Erhöhung des Stromsignals wurde nach Inkubation der Referenzelektrode mit Salzsäure beobachtet. Bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin wurde bei vergleichbaren Konzentrationen ein etwa 85 % höheres Signal gemessen. Ursache ist die in Kapitel V.4.1. erläuterte Problematik einer nicht reproduzierbar einstellbaren Potentialdifferenz zwischen der Referenzelektrode aus Silber und der Arbeitselektrode. Dieses ist jedoch für ein konstantes Elektrodenpotential notwendig. Erst dadurch liegen während der elektrochemischen Detektion gleichbleibende Redoxbedingungen an der Arbeitselektrode vor.

Eine Funktionsüberprüfung der aus Arbeits- und Referenzelektrode bestehenden elektrochemischen Detektionseinheit mittels Brenzkatechin erfolgte unter Zuschaltung der Hochspannung. Dabei zeigte sich mit zunehmender Anzahl und Dauer der Messungen eine Abnahme des Stromsignals. Bei den in Abb. 99 dargestellten Elektropherogramme kommt es nach Zugabe des Analyten zu einem starken Stromanstieg. Der anschließende Abfall des Signals über die restliche Messdauer lässt sich durch das bei elektrophoretischen Prozessen auftretende "Elektroden-Fouling" erklären. Darunter versteht man die Reduzierung der Elektrodenantwort durch Adsorption des Analyten und/oder seiner Oxidationsprodukte an der Arbeitselektrode [Moane et al., 1998]. Die Ablagerungen führen zu einer größeren Diffusionsstrecke der Analyte zur Elektrodenoberfläche. Die elektrochemische Umsetzung verzögert sich und durch die Verringerung der effektiven Elektrodenoberfläche vermindert sich ebenfalls das elektrochemische Signal. Dadurch wird die Diffusion des Analyten zur Elektrodenoberfläche zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.

Die Zugabe des Analyten führte zu einem starken Anstieg des Detektionsstroms. Bereits während der ersten Redoxreaktionen kann es zu Ablagerungen auf der Arbeitselektrode kommen (siehe Kapitel V.4.4.4.).

Es muss berücksichtigt werden, dass die oben genannten Elektropherogramme eine direkte Injektion der Probe auf den Detektor darstellen. Die Probenmenge und damit auch der Grad des Elektroden-Foulings verringerte sich in den folgenden Versuchen auf Grund elektrokinetischer Injektionsverfahren auf wenige Nanoliter und damit das Volumen, welches zum Detektor transportiert wird. Verglichen mit der direkten Injektion ist somit während der Messung eine größere effektive Elektrodenoberfläche zur elektrochemischen Umsetzung über eine längere Zeit verfügbar.

Unter dem Einfluss der Hochspannung wurden ebenfalls Elektroden-Fouling und höhere Signale nach Ausbildung einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode beobachtet. Im Gegensatz zu einer nicht behandelten Referenzelektrode wurde bei konditionierten Referenzelektroden eine etwa 2,5-fache Erhöhung des Stroms ermittelt (Abb. 99). Nach mehreren Messungen verringerte sich der Strom auf etwa 90 % des bei konditionierten Referenzelektroden gemessenen Signals. Eine Möglichkeit zur Minimierung der Ablagerung auf der Arbeitselektrode und Erhöhung der Sensitivität ist die Verwendung einer Platin-Arbeitselektrode mit elektrochemisch aufgebrachtem Zinn [Hilmi et al., 1997]. Der dabei zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt.

V.4.3. Konditionierung der Kapillaroberfläche mit Kaliumhydroxid

Wie in Kapitel V.3.1. erläutert, war zur Stabilisierung und Erhöhung des Messsignals eine Konditionierung der Kapillare mit KOH erforderlich. Die bei der Kontaktwinkelmessung ermittelten Messwerte zur Hydrophilie sollten durch Elektropherogramme von Wasserstoffperoxid, Brenzkatechin und Polyphenolgemischen bestätigt werden. Verglichen mit den nicht behandelten Kapillaren führte die amperometrische Detektion von Wasserstoffperoxid und Brenzkatechin in konditionierten Kapillaren zu einer 150 %-igen bzw. 300 %-igen Zunahme des Detektionsstroms (Abb. 100 und 101).

Eine Möglichkeit wäre die bessere Probenzonenseparierung bei KOH behandelten Kapillaren. Durch die Inkubation mit KOH wurde eine gleichmäßige Beschaffenheit der Kapillaroberfläche erreicht. Die dadurch zunehmende Hydrophilie führte zu einem homogenen, stempelförmigen Fließprofil. Zudem kam es zu einer Stabilisierung der Basislinie und des Messsignals (Abb. 13). Der dadurch resultierende stabilere elektroosmotische Fluss könnte zu einer exakteren Separierung der Proben in diskrete Zonen führen. Aus der Korrelation von Hydrophilie und EOF ist ebenfalls die um etwa 5 % verringerte Migrationszeit erklärbar (Abb. 101). Die Abhängigkeit des elektroosmotischen Flusses vom Zeta-Potential und somit dem Grad der Hydrophilie ist der Grund für den größeren EOF (Gleichung 16).

Es konnte gezeigt werden, dass bei direkter Probeninjektion in die Kavität des Pufferauslass, eine Behandlung der Referenzelektrode mit Salzsäure zu einer Verdoppelung der Signalhöhe führt. Eine weitere Erhöhung des Signals wurde durch Konditionierung der Kapillaren mit Kaliumhydroxid erreicht. Dabei wurde stoffabhängig, eine Steigerung von 50 bis 100 % beobachtet.

V.4.4. Trennkanalinjektion

Die Probeninjektion besitzt bei der Entwicklung eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems eine bedeutende Funktion. Die amperometrische Detektion von Polyphenolen und ihre Trennung nach der Migrationszeit wurde neben einer elektrokinetischen Injektion (Kapitel V.4.5.) zunächst mit einer nicht elektrokinetischen Probenaufgabe durchgeführt. Dadurch sollte die Detektoreinheit und die Fluidik der Kapillaren überprüft werden. Dabei erfolgte die Probeninjektion in die Kavität zur Pufferinjektion (Abb. 43a).

V.4.4.1. Einfluss der Trennungsspannung auf den Elektrolytpuffer

Der Elektrolytpuffer wurde zunächst mit den zur Verfügung stehenden Hochspannungsnetzgeräten bei unterschiedlichen Injektionsverfahren unter dem Einfluss der angelegten Hochspannung getestet. Die Gründe, einen Puffer mit geringer Ionenstärke und neutralem pH-Wert zu verwenden, waren Größe und Stabilität des EOF. Bei einem pH-Wert von 7-8 liegt ein konstanter EOF vor. Da die Ionenstärke reziprok zum EOF ist, bewirkt eine größere Ionenstärke eine Verringerung des EOF [Kuhn, 1995].

Verglichen mit der Trennkanalinjektion betrug der Basisliniendrift bei elektrokinetischer Injektion mehr als das Doppelte. Eine mögliche Ursache könnten Feldeffekte der angelegten Spannungen und Potentiale während Injektion und Trennung sein. Eine Überlagerung der elektrischen Feldlinien könnte zu einer Beeinflussung des Zeta-Potentials und somit des elektroosmotischen Flusses führen. Das Umschalten von Injektions- auf Trennmodus führte zu Beginn der Messung zu starken Schwankungen der Basislinie (Abb. 103).

Grundsätzlich sind mehrere Ursachen des Rauschens denkbar, wie beispielsweise das Eigenrauschen des Potentiostaten, die Arbeitselektrode selbst oder das CE-System (Elektroden, Kapillare und Hochspannungsquelle). Bei amperometrischen Messungen zeigte sich, dass das Rauschen mit dem Anlegen der Elektrophoresespannung deutlich anstieg [Wilke, 2002]. Das CE-System, einschließlich des Hochspannungsgeräts, stellt offenbar eine wesentliche Quelle des Rauschens dar. Es sind wahrscheinlich unmittelbare elektrische Auswirkungen durch die galvanische Kopplung von Elektrophorese und Detektionsstromkreis zu erwarten, die zu einer Veränderung der effektiven Spannung an der Arbeitselektrode führen [Wilke, 2002]. Die Funktion des Elektrolytpuffers entspricht dem eines Ohmschen Widerstandes. Kommt es in der Kapillare zu lokalen Konzentrationsgefällen, würde dies zu einer Veränderung der Ladungsdichte an der Oberfläche führen. Aufgrund der Abhängigkeit des Zeta-Potentials von der Ladungsdichte (Gleichung 17) würden Änderungen zu einem verminderten Oberflächenpotential führen. Die Folge wäre eine Verminderung der elektrischen Doppelschicht und somit der Geschwindigkeit des EOF, denn dieses ist vom Zeta-Potential abhängig (Gleichung 16). Ein weiterer Grund könnte die Abhängigkeit des spezifischen Widerstandes (Berechnung des Widerstandes eines Leiters über seine geometrischen Abmessungen) von der Temperatur sein. Der Einfluss der Messtemperatur auf kapillarelektrophoretische Trennsysteme wurde durch Arundell et al. (2000) beschrieben. Die Temperatur beeinflusst die Viskosität des Elektrolytpuffers und damit die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses. Änderungen in der Geschwindigkeit des EOF führen zu Änderungen in der Basislinie. Ebenso sind unmittelbare Einflüsse des Elektrophoresestroms wegen der Jouleschen Wärmeentwicklung in der Kapillare zu erwarten. Diese nach Gleichung

10 pro Volumeneinheit erzeugte Wärme beeinflusst den elektroosmotischen Fluss durch Änderung der Viskosität [Kuhn, 1995]. Demnach gilt die allgemeine Temperaturabhängigkeit nicht nur für die Detektion sondern auch für Gleichgewichte und Prozesse, die sich in der Kapillare abspielen. Obwohl es nach Chang und Edward (1993) zu selbstregulierenden Vorgängen in der Kapillare kommen kann, sind in der Kapillare auch unregelmäßige Bereiche bezüglich Elektrolytzusammensetzung, Geschwindigkeit und Temperatur zu erwarten. Eine Stromzunahme führt zu einer zunehmenden Erwärmung der Kapillare und somit des Elektrolytpuffers. Dies führt wiederum zu einer Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit des Puffers und somit des Grundrauschens.

Während der elektrophoretischen Trennung wurde mit Hilfe eines zwischengeschalteten Amperemeters eine geringfügige Änderung des Stroms von wenigen Mikroampere beobachtet. Da die vom Hochspannungsgerät gelieferte Trennspannung stabil war, sind die Schwankungen des Stroms nur auf Widerstandsschwankungen in der Kapillare zurückzuführen [Wilke, 2002]. Temperaturschwankungen in der Kapillare gehen einher mit entsprechenden Schwankungen der Leitfähigkeit und anderer physikalischer Parameter, wie beispielsweise Viskosität, Ionenbeweglichkeit und Zeta-Potential. Somit ist ein besonderer Punkt der Wärmeleitkoeffizient des benutzten Materials. Im Vergleich mit fused-silica besitzen LTCC-Keramiken eine um den Faktor 3 höhere Wärmeleitfähigkeit [DuPont Dateninformationsblatt]. Einflüsse der Temperatur können dadurch aber nur verringert und nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dies muss für die kapillarelektrophoretischen Messungen der Polyphenole berücksichtigt werden. Durch einen temperaturgeregelten Apparateaufbau wäre eine weitere Reduzierung der Temperatureffekte möglich.

V.4.4.2. Trennkanalinjektion von Wasserstoffperoxid

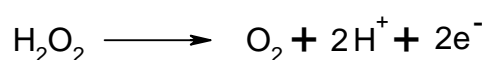
Um zunächst mögliche Reaktionen der Polyphenole, wie beispielsweise die Adsorption an die Kapillarwand oder die Ausbildung von Polymerisationsprodukten während der Migration und der Detektion auszuschließen, wurde zunächst Wasserstoffperoxid amperometrisch detektiert. Dabei wurde kein linearer Anstieg des Detektionsstroms sondern die Ausbildung eines Signalplateaus beobachtet (Abb. 100). Dies ist durch die Injektionsmethode erklärbar.

Bei der Trennkanalinjektion kommt es aufgrund der Probeninjektion in die Kavität des Puffereinlasses zu einem permanenten Transport der Probe zum Detektor. Wenn das Potential der Arbeitselektrode dem Oxidations- bzw. Reduktionspotentials des Depolarisators (Wasserstoffperoxid oder Polyphenol) entspricht, so werden diese an der Arbeitselektrode oxidiert oder reduziert [Haase, 2002]. Die dann stattfindende elektrochemische Reaktion

wirkt der weiteren Aufladung der Doppelschichtkapazität der Elektrode entgegen und es beginnt ein Strom zu fließen. Dabei unterscheidet man zwischen einem Faraday'schen und einem kapazitiven Strom. Das Messsignal einer elektrochemischen Umsetzung an der Elektrodenoberfläche bezeichnet man als Faradayschen Strom. Zu diesem Signal kommt noch ein nicht Faradayscher Strom dazu, der als so genannter kapazitiver Strom bezeichnet wird und nicht mit der elektrochemischen Umsetzung von Analyten an der Elektrode verbunden ist [Buchberger, 1998]. Dabei spielt die Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt eine wesentliche Rolle. An dieser liegt eine elektrochemische Doppelschicht vor, welche einen Kondensator darstellt. Eine elektrochemische Umsetzung führt dann zu einer Verringerung der Doppelschichtkapazität und einem Stromfluss. Werden alle Analyten, die die Arbeitselektrode erreichen, entladen, so dass die Depolarisationskonzentration an der Elektrodenoberfläche auf Null absinkt, kann der Strom nicht weiter steigen. Dieser bleibt konstant, bis das Elektrodenpotential einen Wert erreicht hat, bei dem eine weitere elektrochemische Reaktion stattfinden kann [Haase, 2002].

Verglichen mit nicht konditionierten Referenzelektroden wurde bei HCl behandelten Silberelektroden ein 20 % höheres Stromsignal gemessen (Abb. 100). Ursache dürfte der in Kapitel V.4.2. beschriebene Vorgang der besser einstellbaren und reproduzierbareren Gleichgewichtsspannung bei AgCl sein.

Die Abnahme der Signalthöhe mit zunehmender Messdauer ist nicht auf den Effekt des Elektroden-Fouling zurückzuführen. Wasserstoffperoxid wurde an der Arbeitselektrode nach Gleichung 34 oxidiert.



Gleichung 34: Reaktion von Wasserstoffperoxid an der Arbeitselektrode.

Die gebildeten Reaktionsprodukte tragen nicht zu einem möglichen Elektroden-Fouling der Arbeitselektrode bei. Wahrscheinlich ist der Grund die Bildung unterschiedlicher Metalloxide an der Referenzelektrode in Abhängigkeit des vorhandenen Elektrolytpuffers. Bei reinen Silberelektroden könnte sich möglicherweise auf dessen Oberfläche durch Natriumphosphat als Elektrolytpuffer Ag₂O bilden. Somit könnte es über eine längere Messdauer zu einer Verminderung von AgCl an der Elektrodenoberfläche kommen. Fehlstellen auf der Silber/Silberchlorid-Elektrode könnten mit anderen Metalloxiden besetzt werden. Diese Effekte würden zu Schwankungen in den Gleichgewichtspotentialen bzw. der Elektrodenpotentialen mit einer verringerten elektrochemischen Umsetzung an der

Arbeitselektrode führen. Die Verringerung des Signals um etwa 1 nA könnte auf mögliche Temperatureffekte und somit Änderungen der Viskosität bei den einzelnen Messungen zurückzuführen sein.

V.4.4.3. Trennkanalinjektion von Polyphenolen

Die Probeninjektion der Polyphenole erfolgte ebenfalls über die Kavität des Pufferreservoirs. Auf Grund des stetigen Proben transports zum Detektor wurde ein Signalverlauf wie bei der amperometrischen Detektion von Wasserstoffperoxid erwartet (Kapitel V.4.4.2.). Als phenolische Komponenten wurden Pyrogallol, Dopamin, Phloroglucin und Brenzkatechin amperometrisch detektiert.

End-Capillary-Anordnung

Eine Erhöhung der Hochspannung führte zu einer stetigen Verringerung der Migrationszeit. Dies lässt sich durch die Abhängigkeit der elektrophoretischen und elektroosmotischen Mobilität von der angelegten Trennspannung erklären (Gleichung 5 und 16). Ebenfalls verringerte sich mit zunehmender Hochspannung die Standardabweichung. Möglicherweise kommt es zu einer Stabilisierung des Zeta-Potentials und somit des elektroosmotischen Flusses.

Auffällig bei der amperometrischen Detektion der getesteten Polyphenole sind der flache Anstieg (Fronting) und die gelegentlich auftretenden, peakähnlichen Signalverläufe (Abb. 107). Ein Elektropherogramm der amperometrischen Detektion von Pyrogallol zeigte einen peakähnlichen Anstieg des Signals auf 114 nA. Unter identischen Versuchsbedingungen stieg das Signal bei einer weiteren elektrochemischen Detektion nur auf 62 nA. Auf Grund eines Puffernachlaufs aus den Seitenkapillaren in den Trennkanal könnte es zu einer Verdünnung der Probe kommen. Das Ergebnis wäre eine geringere Menge an elektrochemisch umsetzbaren Analyten an der Arbeitselektrode. Mögliche Ursachen des Frontings könnten Überlagerungen des EOF durch elektrophoretische Effekte oder eine ungenaue Probenseparierung während der Kapillarzonenelektrophorese sein. Hauptgrund des langsamen Signalanstiegs dürfte jedoch die sogenannte End-Capillary-Anordnung der Arbeitselektrode sein. Bei dieser Form der elektrochemischen Detektion wird die Arbeitselektrode möglichst nah vor dem Kapillarausgang positioniert. Da der Spannungsabfall vor der Arbeitselektrode erfolgt, darf diese nicht in die Kapillare integriert werden. Eine zu nahe Positionierung der Arbeitselektrode an den Kanal würde zu geringen Fluktuationen in der Trennspannung führen. Dies hätte zur Folge, dass die Sensitivität abnimmt [Wallenborg et al., 1999].

Positioniert man die Arbeitselektrode weiter in die Kavität des Pufferauslass, ist diese zwar grundsätzlich geerdet, die Folgen wären jedoch Effizienzverlust und Bandenverbreiterung auf Grund von Diffusion [Martin et al., 2002].

Die angelegte Hochspannung kann infolge der galvanischen Kopplung über den Elektrolyten die Arbeitselektrode erheblich beeinflussen und zu einer Störung der Detektion führen [Wilke, 2002]. Ein konstanter Fluss der Elektrophoresespannung kann elektrisch kompensiert werden, jedoch nicht seine zeitlichen Schwankungen. Diese machen sich als Detektorrauschen bemerkbar. Zur Entkopplung der beiden Stromkreise sind in der Literatur zahlreiche Entkoppler (Kapitel V.4.5.2.1.) vorgeschlagen worden. Deren Herstellung und Handhabung ist jedoch kompliziert. Trotzdem sollte die Hochspannung bei der End-Capillary-Anordnung keinen großen Einfluss auf den Detektor besitzen. Auf Grund des starken Abfalls des elektrischen Feldes am Ende der Kapillare kommt es zu einer gewissen Entkopplung von Detektor und Hochspannung [Huang et al., 1991].

Hinsichtlich ihres Aufbaus ähnelt die End-Capillary-Anordnung der bei der elektrochemischen Detektion in FIA und HPLC angewendeten Wall-Jet-Anordnung. Die Wall-Jet-Anordnung ist durch einen freien Flüssigkeitsstrahl gekennzeichnet, der sich über mehrere Millimeter erstrecken kann. Auf Grund veränderter Volumenströme, Kapillardurchmesser und des Strömungsprofils unterscheiden sich die Strömungsverhältnisse zwischen Wall-Jet- und End-Capillary-Anordnung. Die von Wilke (2002) gemachten Berechnungen zum Strömungsschema bei Kapillaraustritt zeigen, dass man nicht von einem geradlinigen Strömungsprofil außerhalb der Kapillare sprechen kann. Die Strömung tritt etwa halbkugelförmig unter rascher Abnahme der Geschwindigkeit aus der Kapillare aus (Abb. 179).

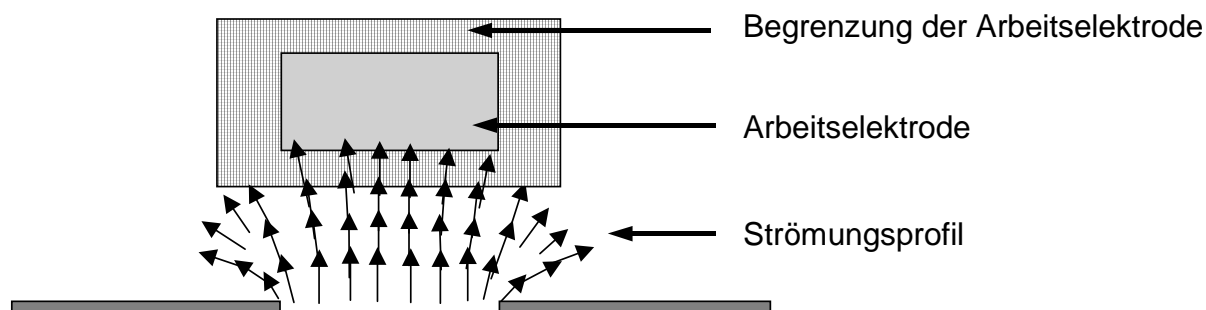


Abbildung 179: Schematische Darstellung der aus dem Kapillarende austretenden Strömung.

Der an der Arbeitselektrode entstehende Strom wird durch konvektive Diffusion bestimmt. Somit muss bei größeren Abständen wegen rasch abfallender Strömungsgeschwindigkeit mit

einer verringerten Signalintensität und gegebenenfalls mit einer unerwünschten Signalverbreiterung durch Diffusion gerechnet werden [Wilke, 2002]. Der Abstand zwischen Arbeitselektrode und Kapillarausgang sollte möglichst gering gehalten werden.

Temperatureffekte

Das gelegentliche Auftreten peakähnlicher Signalkurven wie beispielsweise in Abb. 107 könnte auf bereits erwähnte Temperatureffekte zurückzuführen sein (Kapitel V.4.4.1). Die auf Grund des angelegten elektrischen Feldes entstehende Joulesche Wärme führt zu einer Induzierung eines radialen Temperaturgradienten in der Kapillare mit einem ansteigen der Puffertemperatur (Abb. 180) [Crabtree, 2001]. Der daraus resultierende Einfluss auf den EOF könnte zu Schwankungen des Signalverlaufs führen.

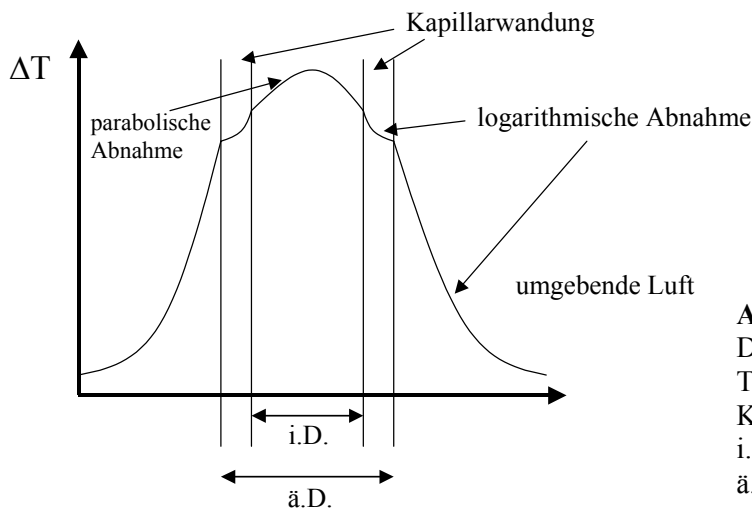


Abbildung 180: Schematische Darstellung eines induzierten Temperaturgradienten in einer Kapillare. T: Temperaturgradient, i.D.: innerer Kapillardurchmesser, ä.D.: äußerer Kapillardurchmesser.

Verdunstungseffekte in den Reservoirien können eine Konzentrationserhöhung in der Kapillare erzeugen. Dadurch steigt die Ionenstärke des Puffers und die Konzentration des Analyten. Somit kommt es zu einer Abnahme des elektroosmotischen Flusses mit dem Ergebnis einer größeren Signalschwankung [Salomon et al., 1991]. Die resultierende Veränderung der Pufferkonzentration und des Flüssigkeitsvolumens in den Reservoirien hat einen direkten Einfluss auf die Joulesche Wärme und den hydrodynamischen Flüssigkeitsdruck in den Kapillaren. Damit korreliert auch eine mögliche Hydrolyse des Wassers. Eine Pufferverarmung führt dann ebenfalls zu einer Änderung der Ionenstärke mit den bereits erwähnten Folgen. Da jedoch eine elektrophoretische Messung im Allgemeinen nicht länger als 12 Minuten dauerte, kann dieser Effekte vernachlässigt werden.

Siphon-Effekt

Auf Grund unterschiedlicher Flüssigkeitsniveaus in den Reservoirien durch Verdunstungseffekte kommt es zu einer Überlagerung von Elektroosmose und Elektrophorese durch ein hydrodynamisches Druckprofil. Unterschiede in der Füllhöhe würden zu einem Siphon-Effekt zwischen den Reservoirien führen. Die lineare Flussrate bei unterschiedlicher Füllhöhe der Reservoirien Höhendifferenzen ist bei einer D-förmigen Kapillarstruktur nach Gleichung 35 zu berechnen [Boer et al., 1998].

$$v_p = \frac{\Delta h p g D_h^2}{(2 * 15,626) \eta L}$$

Δh : Füllhöhendifferenz p : Dichte der Lösung g : Erdbeschleunigung;
 D_h : 4 (bei Kreuzungskapillaren) η : Viskosität L : Kapillarlänge

Gleichung 35: Berechnung der linearen Flussrate bei unterschiedlicher Füllhöhe der Reservoirien.

Setzt man beispielsweise die Dichte und Viskosität von Wasser bei 20 °C ein, dann würde eine Füllhöhendifferenz in den Seitenkapillaren von 1 mm zu einer linearen Flussrate von $6,9 * 10^{-8}$ m/s führen. Durch Berechnung der maximalen Füllmenge in den Reservoirien war eine genaue Abmessung der Flüssigkeitshöhe gewährleistet. Mögliche Fülldifferenzen sollten auf Grund zügig durchgeführter Messungen nur einen geringen Einfluss auf die Flussrate haben.

LTCC-Keramikchips mit verzinnter Kontaktierung

Die Verwendung von LTCC-Keramikchips mit verzinnnten Hochspannungskontakten hatte zwei Gründe: 1. sollte die Leitfähigkeit durch eine "weichere" Auflage aus Zinn für die Federkontakte verbessert werden, 2. eine dickere und damit haltbarere Kontaktierung herzustellen (Abb. 44b). Es zeigte sich jedoch, dass das Stromsignal bei doppelt so hoher Pyrogallolkonzentration um 90 % geringer ausfiel. Zudem erhöhte sich die Migrationszeit um etwa 100 s (Abb. 108). Eine Verringerung der Schwankung von Basislinie oder Messsignal wurde nicht beobachtet. Zudem konnte bei verzinnnten Keramikchips kein Unterschied zwischen Hochspannungskontakten aus Platin oder Gold beobachtet werden. Ebenso nicht bei unterschiedlichen Arbeitselektroden (Gold oder Platin). Demnach dürften die verzinnnten Hochspannungskontakte aufgrund der sich ausbildenden Oxidschicht die Ursache für ein höheres Grundrauschen und eine geringere Signalthöhe sein. Der Aufbau der verzinnnten Mikrochips zeigt mehrere Metalle, die an der Kontaktierung der Hochspannungskontakte und des Detektors beteiligt sind. Die Arbeitselektrode ist aus Gold oder Platin. Die Leitungsbahnen und die äußeren Kontakte sind aus einer Palladium-Silber-Legierung. Auf die

äußeren Kontakte wurde Lötzinn aufgebracht. Bei der Berührung zweier Metalle entsteht an der Grenzfläche im Allgemeinen eine Ladungstrennung und damit eine elektrische Doppelschicht. Die Ladungstrennung zwischen zwei Metallen erfolgt durch deren unterschiedliche Elektronendichte. Dieses wird durch das elektronische Fermi-Niveau beschrieben. Werden zwei Metalle mit unterschiedlicher Fermi-Energie in Kontakt gebracht, so gleichen sich infolge der Ladungsverschiebung die Fermi-Niveaus an (Abb. 181) [Slater, 1967].

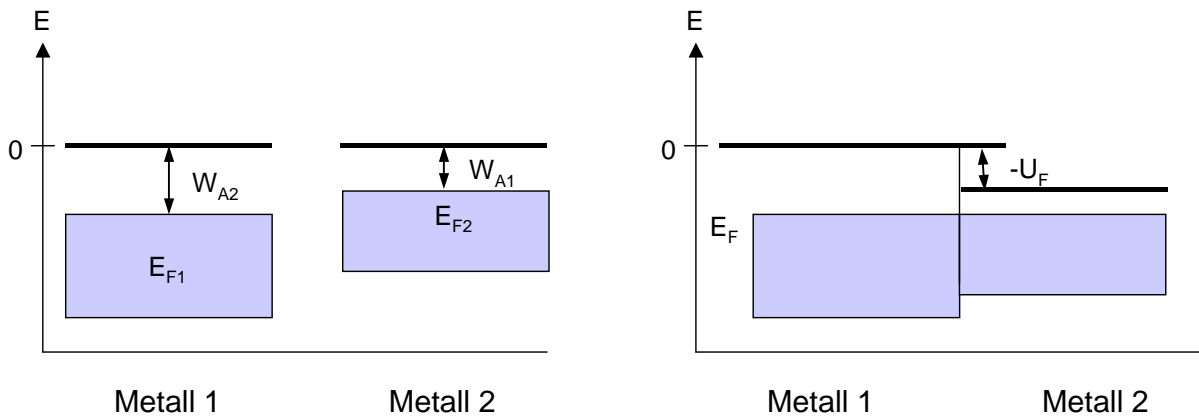


Abbildung 181: Entstehung eines Kontaktpotentials. Eine Berührungsspannung U_F wird ausgebildet, wenn sich zwei Metalle mit unterschiedlichen Austrittsarbeiten W_{A1} und W_{A2} berühren (linke Abbildung). Dabei gleichen sich die Fermi-Niveaus E_{F1} und E_{F2} dadurch an, dass eine geringe Anzahl von Elektronen aus Metall 1 in Metall 2 mit der größeren Austrittsarbeit fließt (rechte Abbildung). Metall 2 wird gegenüber Metall 1 negativ aufgeladen bis die Fermi-Niveaus übereinstimmen (Quelle: Marti und Plettl, Ulm).

Die dabei auftretende Differenz der Austrittsarbeiten ist die Kontaktspannung. Wenn die beiden Kontakte eine unterschiedliche Temperatur besitzen, so beginnt ein Strom zu fließen, der sogenannte Thermostrom. Dieses Phänomen bezeichnet man als Seebeck-Effekt. Dieser Strom und das daraus resultierende elektrische Feld treten am Übergangsbereich jeder Metall-Metall-Kontaktfläche auf. Somit könnten Einflüsse auf den EOF (z.B. Verminderung des Zeta-Potentials) zu der beobachteten Erhöhung der Migrationszeit beitragen. Ursache für den geringen Detektionsstrom wäre möglicherweise eine Schwankung im Elektrodenpotential.

Die beschriebenen Messungen wurden mit kugelförmigen Federkontakten durchgeführt. In Kapitel V.4.2. wurde unter Berücksichtigung einer sich ausbildenden Oxidschicht auf der Kontaktoberfläche des Keramikchips der Nachteil kugelförmiger Federkontakte dargestellt. Verglichen mit spitzen Federkontakten sollte die Verwendung kugelförmiger Kontakte zu einer geringeren Abnutzung der externen Elektrodenkontakte führen. Diese würden nur der Elektrodenoberfläche aufliegen, während spitze Kontakte in die Palladium-Silber-Legierung eindringen.

Dopamin wurde in einem LTCC-Keramikchip mit verzinnten äußeren Kontakten unter Verwendung der HSS- und der GBF-Halterung amperometrisch detektiert (Abb. 110). Verglichen mit kugelförmigen Federkontakten war bei nahezu identischer Migrationszeit der Signalanstieg bei der Verwendung spitzer Federkontakte etwa 75 % höher. Durch das Hereindrücken eines spitzen Federkontaktes in das "weiche" Zinn ist wahrscheinlich eine bessere Kontaktierung möglich. Die sich störend auswirkende Oxidschicht kann dann vernachlässigt werden.

Systempeaks

Neben den Probenpeaks treten häufig vor der eigentlichen Detektion so genannte Systempeaks auf (Abb. 109 und 111). Unter Systempeaks versteht man nicht näher definierte Detektionssignale, die beispielsweise durch die Messapparatur oder angeschlossenen Geräte entstehen können. Diese bewirkten bei der Verwendung von LTCC-Keramikchips einen kurzzeitigen Abfall des Stromniveaus von bis zu 20 nA. Direkte Folgen auf Grund der Probeninjektion konnten durch variable Injektionszeitpunkte ausgeschlossen werden. Diese Systempeaks ergaben sich möglicherweise durch indirekte Folgen der Probenzugabe auf Grund von Konzentrationsstörung im Trennkanal [Poppe, 1992]. Bei der späteren elektrokinetischen Probeninjektion wurden solche Systempeaks nicht mehr beobachtet.

Elektrolytnachlauf aus den Seitenkapillaren

Bei der Trennkanalinjektion zeigten die bisher gemessenen Elektropherogramme unterschiedlich verlaufende Detektionsströme (beispielsweise Abb.107 und 111). Vermutet wurde, dass es gelegentlich zu einem Nachlaufen der Lösung aus den seitlichen Kapillaren kommt. Um dieses zu bestätigen wurde Brenzkatechin in unterschiedliche Kavitäten injiziert (Abb. 112). Eine Probeninjektion in die seitlichen Kavitäten führte bei angelegter Hochspannung über den Trennkanal zu einer starken Stromzunahme. Die dabei gemessene Signalthöhe von 60 nA war mit der einer Injektion in die Kavität des Puffereinlasses vergleichbar (65 nA). Der Signalverlauf war jedoch unterschiedlich. Die Injektion der Probe erfolgte immer in die Kavität des Puffereinlasses. Daraus resultierende Schwankungen im Signalverlauf sind wahrscheinlich auf ein ungleiches Nachlaufen von Elektrolytpuffer aus den seitlichen Kapillaren zurückzuführen (Abb. 182).

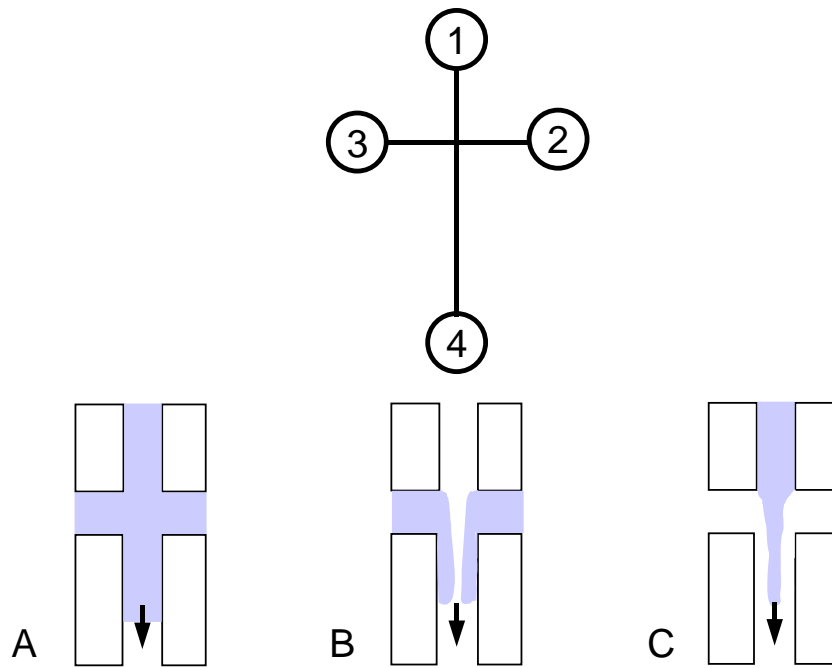


Abbildung 182: Schema der Probenströmung bei unterschiedlichen Injektionen. A: Probeninjektion in die Kavitäten 1, 2 und 3; B: Probeninjektion in Kavität 2 und 3; C: Probeninjektion in Kavität 1.

Der dabei auftretende Verdünnungseffekt der Probe während der Probenmigration führte zu Elektropherogrammen mit unterschiedlichem Signalverlauf (Abb. 107). Einige amperometrische Elektropherogramme waren durch einen peakähnlichen Signalverlauf gekennzeichnet. Andere wiederum durch ein starkes Fronting mit einer geringeren Signalthöhe und plateauähnlichem Kurvenverlauf. Auf Grund von Diffusion und elektroosmotischem Fluss kommt es infolge des angelegten elektrischen Feldes zu einem seitlichen Einstrom in den Trennkanaal. Wurde die Probe in die Kavitäten 1-3 (Abb. 119) injiziert, kam es zu einem etwa 30 % höheren Anstieg des Stromsignals auf etwa 83 nA. Wahrscheinlich kommt es während der elektrophoretischen Trennung durch fehlende gegenläufige elektrolytische Potentialströme in den Seitenkapillaren zu einem Nachlaufen der Probenlösung in den Trennkanaal. Die sich daraus ergebene Verringerung der Trenneffizienz sollte durch elektrokinetische Injektion unterbunden werden (Kapitel V.4.5.).

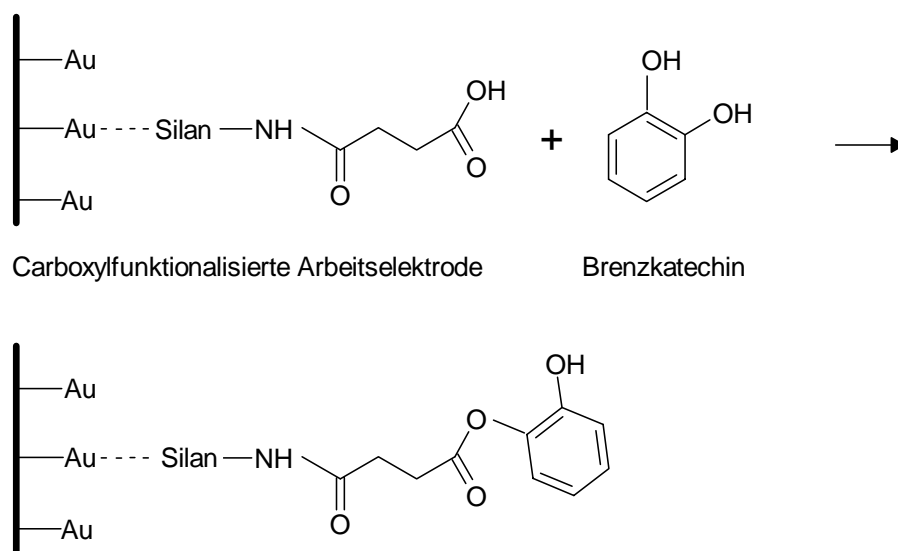
V.4.4.4. Amperometrische Detektion von Brenzkatechin in einem mit APTES silanisierten LTCC-Keramikchip

Wie bereits in den Kapiteln V.3.1. und V.4.1. erläutert, kann durch Konditionierung der Kapillaren mit KOH eine Erhöhung der Hydrophilie erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Hydrophilie ist die Beschichtung der Kapillaroberfläche mit geeigneten Reagenzien. Substanzen könnten so auf der Oberfläche immobilisiert werden, dass bestimmte funktionelle Gruppe des Immobilisats die Oberflächenladung erhöhen. Dabei

besteht die Möglichkeit, bereits auf Glas- und Goldoberflächen getestete Immobilisierungsprotokolle zu verwenden (Kapitel V.2.; Hartmann, 2004]. Beispielsweise sollte nach Silanisierung der Kapillaren mit APTES und der Behandlung mit Bernsteinsäureanhydrid die Oberfläche mit Carboxylgruppen funktionalisiert vorliegen (Abb. 70). Diese könnten zur Erhöhung der Hydrophilie beitragen.

Die Beschichtung der Kapillaren mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid führte zu einer eindeutigen Abnahme des Messsignals. Der Einfluss der Beschichtungschemikalien auf die Messeinheit zeigte sich bei Testung der amperometrischen Detektoreinheit (Abb. 113). Dazu wurde der Detektor vor und nach der Beschichtung durch direkte Injektion mit Brenzkatechin getestet. Nach Silanisierung und Behandlung mit Bernsteinsäureanhydrid wurde ein etwa 75 % niedrigeres Stromniveau gemessen. Die Abnahme lässt sich durch die Beschichtung der Elektroden erklären. Die LTCC-Kapillaren lassen sich nicht ohne Kontakt der Elektroden mit den Beschichtungsmaterialien befüllen. Dadurch wurden auch Elektroden hergestellt, die mit Carboxylgruppen funktionalisiert waren. Durch die Untersuchungen von Hartmann (2004) ist die Aminosilanisierung auf einer Goldoberfläche möglich. Da dies auch auf die Referenzelektrode aus Silber zutrifft [Foster, 1996], führte eine anschließende Inkubation mit Bernsteinsäureanhydrid zur Ausbildung endständiger Carboxylgruppen auf der Arbeits- und Referenzelektrode.

Der dabei auftretende Effekt des Elektroden-Fouling's dürfte für die Verringerung des Signals bei der Trennkanalinjektion von Brenzkatechin (Abb. 114) von 42 nA auf 17 nA verantwortlich sein (Abb. 183).



Veresterung von Brenzkatechin mit der carboxylfunktionalisierten Arbeitselektrode

Abbildung 183: Veresterung einer mit Carboxylgruppen funktionalisierten Goldoberfläche mit Brenzkatechin.

Auf Grund der Carboxylgruppen wird Brenzkatechin über eine Esterbindung an die Oberfläche gebunden. Somit steht ein Teil der Probe nicht mehr zur Umsetzung an der Oberfläche der Arbeitselektrode zur Verfügung. Außerdem ist der Weg zur Elektrodenoberfläche für weitere Probenmoleküle gestört. Dies tritt ebenfalls bei einer möglichen Quervernetzung der gebundenen Brenzkatechinmoleküle auf. Die Abgabe des ersten Elektrons bei der Elektro-Oxidation des Brenzkatechin führte zu einer Radikalbildung. Diese Radikale können sehr leicht polymerisieren und das entstandene Polymer, wie beispielsweise Polychinon, sich auf der Elektrodenoberfläche ablagern [Hilmi, et al., 1997]. Durch die Beschichtung der Referenzelektrode könnte zudem eine Veränderung des angelegten Elektrodenpotentials bei der Oxidation von Brenzkatechin eintreten. Dies würde ebenfalls in einem abnehmenden Stromsignal resultieren.

V.4.4.5. Trennung und Detektion von Polyphenolgemischen

Basierend auf der Trennkanalinjektion sollten Polyphenolgemische amperometrisch detektiert und die einzelnen Probenbestandteile auf Grund ihrer Migrationszeit differenziert werden. Dabei wurden zunächst Gemische aus zwei Polyphenolen getestet (Dopamin-Brenzkatechin und Dopamin-Pyrogallol), die sich auf Grund ihrer Migrationszeiten trennen ließen (Abb. 115). Dabei ist die elektrophoretische Mobilität der Proben (Migrationszeit) von der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und vom elektroosmotischen Fluss abhängig. Diese hängen wiederum von der Ionenstärke und dem pH-Wert des Elektrolytpuffers ab. Dadurch wird sowohl Größe und Stabilität des EOF bestimmt, als auch die Eigenladung der Probenmoleküle (Abb. 11).

Das biogene Amin Dopamin hatte mit $107 \pm 2,7$ s die niedrigste Migrationszeit. Dies war erwartungsgemäß durch den pH-Wert des verwendeten Elektrolytpuffers erklärbar. Die Aminogruppe von Dopamin ist bei pH-Werten um 7,0 positiv geladen (Abb. 187) [Giz and Tao, 1999].

Die Wanderungsgeschwindigkeit resultiert aus elektrophoretischer und elektroosmotischer Mobilität und ist dabei nur von der elektrophoretischen Geschwindigkeit abhängig. Durch die positive Ladung einer Probe ist die elektrophoretische Mobilität zur Kathode beispielsweise höher als bei einem ungeladenen Molekül (Abb. 12). Verglichen mit Brenzkatechin und Pyrogallol die geringer positiv geladen sind, führte dies zu einer höheren Wanderungsgeschwindigkeit ($4,3 \cdot 10^{-2} \pm 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$).

Für Brenzkatechin und Pyrogallol wurden Wanderungsgeschwindigkeiten von $3,3 \cdot 10^{-2} \pm 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ und $3,1 \cdot 10^{-2} \pm 1,7 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ berechnet. Ursache für die Differenz der Wanderungsgeschwindigkeit ist die Anzahl der Hydroxylgruppen am Benzolring (Abb. 40). Pyrogallol (pK_s 8,55) besitzt unter den vorliegenden Versuchsbedingungen auf Grund der zusätzlichen Hydroxylgruppe am Benzolring eine negativere Eigenladung als Brenzkatechin (pK_s 8,85). Somit wirkt dem elektroosmotischen Fluss (Wanderung zur Kathode) eine größere elektrophoretische Mobilität entgegen. Die Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Hochspannung ist durch die Proportionalität von Geschwindigkeit zur elektrischen Feldstärke erklärbar. Eine Trennung von Brenzkatechin und Pyrogallol war ungeachtet der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten nicht möglich. Die Effizienz bzw. die Auflösung des elektrophoretischen Trennsystems ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu gering.

Bei einer Injektion des Gemisches in die Kavität des Pufferreservoirs wurde ein stufenförmiger Signalverlauf erwartet. Ein Grund für den beobachteten peakähnlichen Verlauf des Signals dürfte das bereits in Kapitel V.4.4.3. beschriebene Nachlaufen des Elektrolytpuffers aus den Seitenkapillaren sein. Der resultierende Verdünnungseffekt oder das Entstehen einer separierten Probenzone (sample-plug) würden zu einer geringeren detektierbaren Probenmenge am Detektor führen. Dies wäre ein Grund für die nicht durchführbare Trennung eines Gemisches aus Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol mit Hilfe der Trennkanalinjektion (Tab. 26). Die Migrationszeiten stimmten mit denjenigen der Einzelmessungen überein.

Wie bereits erwähnt, kommt es möglicherweise bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin und Pyrogallol aufgrund nahezu identischer Wanderungsgeschwindigkeiten zu Überlagerungseffekten (Abb. 116). Durch eine unscharfe Fokussierung der Probenbande und mögliche Adsorptionseffekte an der Kapillarwand (Kapitel V.4.5.2.2.) werden möglicherweise beide Substanzen nahezu zeitgleich an der Arbeitselektrode elektrochemisch umgesetzt. Auf Grund zu geringer Differenzen in den Migrationszeiten, ist unter diesen Bedingungen keine einzelne Detektion möglich. Bei der Oxidation von Brenzkatechin zu *ortho*-Chinon handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion mit einem radikalischen Zwischenprodukt. Diese können polymerisieren und sich als Polymer auf der Oberfläche anlagern (Elektroden-Fouling). Ob bei einer elektrochemischen Oxidation zuerst der Elektronentransfer mit anschließender Protonenübertragung stattfindet oder umgekehrt, hängt vom pH-Wert, dem Potentialbereich, dem Elektrodenmaterial und dem Analyten ab. Bei neutralem pH-Wert läuft die Reaktion nach folgendem Schema ab:

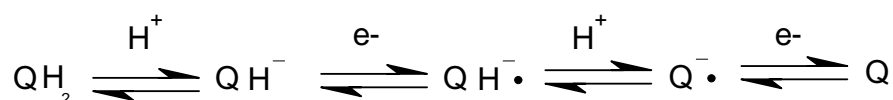


Abbildung 184: Schema der Oxidation von Brenzkatechin (QH₂) zum *ortho*-Chinon (Q).

Pyrogallol und Dopamin können ebenfalls zu Chinon-Derivaten umgesetzt werden (Abb. 185).

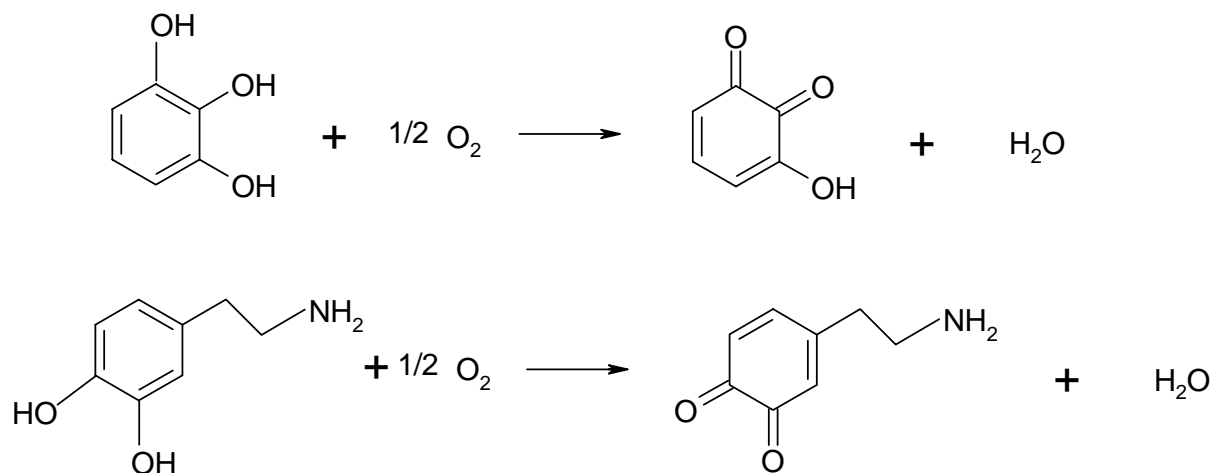


Abbildung 185: Oxidation von Pyrogallol und Dopamin zum entsprechenden Chinon.

Somit wäre die Diffusion der Analyten zur Elektrodenoberfläche bei der Ausbildung von Foulingschichten auf der Elektrodenoberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die elektrochemische Umsatzrate der einzelnen Polyphenole würde abnehmen und als peakförmiger Verlauf in den Elektrophenogrammen sichtbar werden.

Nach dem Austausch von Brenzkatechin gegen Phloroglucin konnte ein Gemisch aus drei Polyphenolen erfolgreich auf Grund ihrer Migrationszeiten differenziert werden. Phloroglucin besitzt mit $2,6 \cdot 10^{-2} \pm 1,9 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ eine etwa 20 % niedrigere Wanderungsgeschwindigkeit als Brenzkatechin. Von Pyrogallol unterscheidet es sich lediglich in der Positionierung einer Hydroxylgruppe. Der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit von etwa 20 % ist durch den geringeren pK_s-Wert von 7,95 (Phloroglucin) zu 8,55 (Pyrogallol) erklärbar. Unter Berücksichtigung der Versuchsbedingungen besitzt Phloroglucin eine etwas negativere Eigenladung als Pyrogallol. Damit ist zwar die elektrophoretische Mobilität größer, die effektive Mobilität zur Kathode jedoch geringer. Die zeitliche Differenz der Migrationszeiten ist somit für eine Trennung der Polyphenole ausreichend. Weiterführende Messungen sollten mit Hilfe der elektrokinetischen Injektion durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine amperometrische Detektion von Polyphenolen mit LTCC-Keramikchips möglich war. Dabei zeigte sich, dass solche mit verzinnter Kontaktierung nur unzureichend für kapillarelektrophoretische Trennungen geeignet sind. Verminderte Signalhöhe, Ausbildung von Oxidschichten an den externen Elektrodenkontakten und die damit verbundene höhere Schwankung von Basislinie und Messsignal sind Nachteile verzinnter LTCC-Keramikchips. Es zeigte sich, dass die Seitenkapillaren bei der Probeninjektion in die Kavität des Pufferreservoirs zu einem Nachlaufen des Elektrolytpuffers in den Trennkanal führen. Dies und die End-Capillary-Anordnung dürften die Hauptgründe für das Fronting bzw. Tailing der Peaks sein.

Die Beschichtung von Kapillaren mit APTES und Bernsteinsäureanhydrid zur Erhöhung der Hydrophilie führten zu keiner Verbesserung des Messsignals. Die Abnahme des Stromsignals von durchschnittlich 50 % resultierte aus einem Elektroden-Fouling mit den Beschichtungskemikalien und den damit verbundenen Reaktionen mit der Probe. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich Gemische aus drei Polyphenolen mit Hilfe der Trennkanalinjektion auf Grund ihrer Migrationszeit unterscheiden lassen.

V.4.5. Elektrokinetische Injektion von Polyphenolen in LTCC-Keramikchips

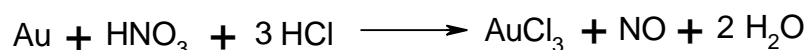
Das Injektionsvolumen in kapillarelektrophoretischen Trennsystemen muss zur Erhöhung der Trenneffizienz im Bereich weniger Nanoliter liegen, um den Beitrag zur Bandenverbreiterung gering zu halten. Die Injektion der Probe in die Kavität des Puffereinlasses führt auf Grund des hohen Probenvolumens zu einer geringen Trenneffizienz. Somit sollte die Probe elektrokinetisch injiziert werden. Durch einen Versatz im Kreuzungsbereich zwischen den Seitenkapillaren von etwa 210 μm sollte im Idealfall ein Volumen von ca. 1,5 nl mit Hilfe der pinched-Injektion zur Kathode transportiert werden (Abb. 43a).

V.4.5.1. Reinigung der Elektrodenkontakte

Mit zunehmender Anzahl an Messungen kam es zu einer Abnahme des Signals auf Grund von Ablagerungen auf der Arbeitselektrode (Kapitel V.4.2.). Aus diesem Grunde wurden verschiedene Säuren und Laugen getestet (Tab. 28). Salpetersäure und konzentrierte Säuren sollten mögliche Etherverbindungen, die durch Kondensationsreaktionen zwischen den Hydroxylgruppen der einzelnen Polyphenole entstanden sind, spalten können. Jedoch führte

lediglich Königswasser, ein Gemisch aus Salzsäure und Salpetersäure, zu einer Entfernung der Ablagerungen. Möglicherweise wird durch beide Substanzen die oxidative Wirkung verstärkt.

Eine weitere Ursache könnte die Entfernung der Ablagerungen durch die oxidierende Wirkung von Chlor und Nitrosylchlorid auf das Gold der Arbeitselektrode sein (Gleichung 35).



Gleichung 32: Zersetzung von Gold durch Königswasser zu einem Chloro-Komplex.

Die hohe Konzentration von Chloridionen steigert die Löslichkeit von Edelmetallen, die in Form anionischer Chloro-Komplexe gelöst werden. Das Silber der Referenzelektrode wird dabei nicht angegriffen, da dieses durch Bildung einer unlöslichen Silberchloridschicht weitestgehend geschützt wird. Durch Königswasser könnte die oberste Goldschicht, zusammen mit den Ablagerungen, abgelöst worden sein. Nachteilig ist, dass dieses Verfahren zu einer langsamen Auflösung der aus Gold bestehenden Arbeitselektrode führt.

Eine weniger angreifende Möglichkeit besteht in der Verwendung einer bipolaren Rechteckspannung von $\pm 1,8$ V bei 30 Hz für die Dauer von 30 Sekunden [Martin et al., 2002].

V.4.5.2. Amperometrische Detektion von Polyphenolen nach elektrokinetischer Injektion

Eine sehr weit verbreitete Methode zur elektrokinetischen Injektion bei Mikrototalanalysensystemen ist die pinched-Injektion [Lin et al., 2004]. Dabei wird über den Injektionskanal eine Injektionsspannung angelegt und durch Umschaltung der Potentiale die sich im Versatz befindliche Probenmenge zum Detektor transportiert (Abb. 17). Als phenolische Modell-Komponenten wurden die Polyphenole Brenzkatechin, Dopamin, Pyrogallol, Gallussäure, Phloroglucin, Quercetin, Resveratrol, Resorcin und Kaffeesäure verwendet. Dabei lag aufgrund von Vorversuchen der Fokus auf Brenzkatechin, Dopamin, Pyrogallol, Gallussäure. Von diesen wurden bereits vergleichende kapillarelektrophoretische

Messungen auf fused-silica und LTCC durchgeführt. Zudem waren die elektrochemischen Detektionen mit LTCC-Keramikchips reproduzierbar durchführbar.

V.4.5.2.1. Brenzkatechin

Alle Messungen der elektrokinetischen Injektion waren durch eine negativ verlaufende Basislinie gekennzeichnet. Änderungen der Potentialströme durch unterschiedliche Schaltung der Hochspannungskontakte führten zu keiner signifikanten Verbesserung. Zudem zeigten die Elektropherogramme, dass ein Stromanstieg lediglich bis zur Nullstromlinie erfolgte (beispielsweise Abb. 121).

Möglicherweise können Hochspannungseffekte, die auf die Arbeitselektrode wirken, Ursache für die negativ verlaufende Basislinie sein. Wie bereits erläutert, kann die Hochspannung infolge der galvanischen Kopplung über den Elektrolyten die Arbeitselektrode beeinflussen [Wilke, 2002]. Huang (2001) publizierte, dass es bei End-Capillary-Anordnungen zu einer Art Entkopplung von Detektor und Hochspannung kommt. Ursache ist der Abfall des elektrischen Feldes am Ende der Kapillare. Da dieser Effekt nicht bei der Trennkanalinjektion auftrat, muss die Ursache in den zusätzlich angelegten Potentialen der Injektionskontakte liegen. Bei der Trennkanalinjektion wurden diese nicht benötigt. Möglicherweise beeinflussen die Potentiale der Seitenkapillaren das elektrische Feld über den Trennkanal und führen somit zu keiner vollständigen Entkopplung von Hochspannung und Detektor. Ein weiterer Grund könnte die Positionierung der Arbeitselektrode vor den Kapillarausgang sein, die im Bereich von 5-20 μm liegen sollte [Lacher und Lunte, 2004]. Diese ist, herstellungsbedingt, bei den verwendeten LTCC-Keramikchips weiter vom Kapillarausgang positioniert (Kapitel V.4.4.3.). Somit könnte es zu einer Störung der von Huang (1991) erwähnten Entkopplung von Hochspannung und Detektor kommen.

Ein Lösungsansatz wäre die Integration eines Entkopplers aus Palladium [Lacher und Lunte, 2004; Chen et al., 2001]. Dabei ist die Arbeitselektrode ohne Einfluss der angelegten Hochspannung frei in der Kapillare positionierbar. Nachteilig ist die komplizierte Herstellung und die schwierige Handhabung. Zudem muss der Entkoppler eine optimale Position zur Arbeitselektrode aufweisen [Lacher und Lunte, 2004]. Deshalb wurde die Entwicklung und der Einbau eines Entkopplers in LTCC-Keramikchips vorerst noch nicht realisiert.

Die aufgezählten Gründe könnten auch die "Deckelung" des Detektionssignals verursachen (Abb. 121). Nach dem Signalanstieg von -25 nA auf nahezu 0 nA kommt es zur Ausbildung eines Signalplateaus über einen Zeitraum von etwa 300 s. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentration wurde ein mehr als doppelt so hoher Anstieg erwartet. Erst die

Verwendung einer niedriger konzentrierten Probenlösung führte zur Ausbildung eines Signalpeaks (Abb. 128). Hohe Konzentrationen können zu einer „Überladung“ der Kapillare führen.

Inwiefern die elektrokinetische Injektion einen signifikanten Einfluss auf den Signalverlauf hat, sollte durch zwei Trennmethode getestet werden (Abb. 119). Bei der einen Methode wurden während des Trennmodus die Injektionskontakte auf hochohmig geschaltet, bei der anderen auf 80 % der angelegten Trennspeisung. Ziel war es, einen möglichen Nachlauf der Probe aus den Seitenkapillaren in den Trennkanal zu unterbinden. Die hochohmige Schaltung der Injektionskontakte führte bei der amperometrischen Detektion von Brenzkatechin zu einem Stromanstieg von 20 nA, bei einer Migrationszeit von 160 s. Eine Erhöhung des Stromsignals auf 24 nA und der Migrationszeit auf 177 s wurde bei Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der angelegten Trennspeisung ermittelt. Verglichen mit der durchschnittlichen Migrationszeit von $134,2 \pm 15,1$ s wurde eine Erhöhung von etwa 20 % beobachtet. Die Ursachen dafür sind vielfältig: unterschiedliche Reservoirfüllhöhen mit dem Resultat eines hydrodynamischen Fliesprofils, Änderung der Ionenstärke durch Verdunstung oder Joulesche Wärme mit dem Ergebnis einer Verringerung der elektroosmotischen Geschwindigkeit, Oxidationsprozesse an der Arbeitselektrode (Kapitel V.4.2.) oder Adsorptionsprozesse an der Kapillarwand (Kapitel V.4.5.2.2.).

Die Potentialströme der Injektionskapillaren zeigten bei einer hochohmigen Schaltung einen geringen Stromfluss von wenigen Mikroampere. Dies ist ein bei der traditionellen Doppel-T-Injektionsmethode auftretendes Phänomen und Ursache für ein Nachlaufen der Probe aus dem Injektions- in den Trennkanal [Lin et al., 2004].

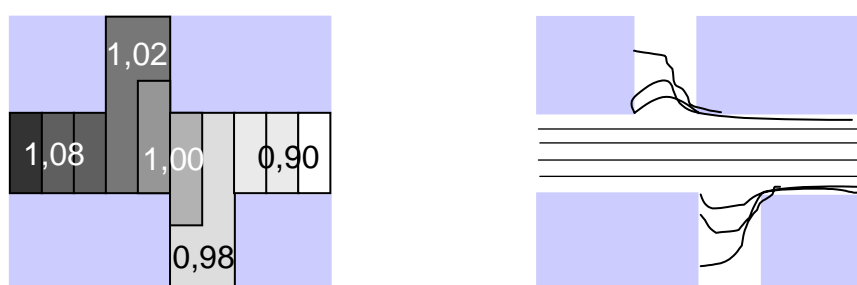


Abbildung 186: Schematische Darstellung der Potentialkonturen (links) und Geschwindigkeitsprofile (rechts) bei der Doppel-T-Injektionsmethode im Kreuzungsbereich. Die Zahlen geben die Potentialgradienten in den Kapillaren wieder [Lin et al., 2004].

Nach dem Modell von Lin (2004) kommt es zu einem Gradientengefälle zwischen den einzelnen Reservoirs (Abb. 186). Dies führt zu einer verstärkten elektrokinetischen Kraft,

die auf den Elektrolytpuffer einwirkt mit dem Ergebnis eines Probennachlaufs aus den Seitenkapillaren. Dieser Effekt steigt mit zunehmender Trennungsspannung. Dieser Effekt sollte sich durch Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennungsspannung minimieren bzw. ausschalten. Bei einer solchen Schaltung der Hochspannungskontakte summieren sich aufgrund des 2. Kirchhoffschen Gesetzes, im Kreuzungsbereich alle Teilspannungen eines Umlaufs bzw. einer Masche in einem elektrischen Feld zu 0 V. Dies sollte somit auch für die einzelnen Kapillarabschnitte und demnach des Kreuzungsbereiches der LTCC-Keramikchips zutreffen. Verglichen mit einer hochohmigen Schaltung betragen die Potentialströme bei fast allen Messungen 0 Ampere. Der in den Seitenkapillaren gemessene Strom machte den Einfluss der Potentialströme, die sich auf Grund des höheren elektrischen Gradienten ausbildeten, auf den elektroosmotischen Fluss deutlich. Positive Potentialströme führen zu einem Nachlaufen der Probe und einem schnelleren EOF des Elektrolytpuffers [Lin et al., 2004]. In dieser Arbeit führte dies zu einer verkürzten Migrationszeit der Probe zur Kathode. Keine Potentialströme wurden bei Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennungsspannung gemessen. Somit wird der Einfluss auf den elektroosmotischen Fluss unterbunden mit dem Resultat einer längeren Migrationszeit. Zudem sollte aus den seitlichen Kapillaren keine Probe nachlaufen. Wie in Kapitel V.4.4. erläutert, zeigte sich das Phänomen jedoch auch bei dieser Methode der elektrokinetischen Injektion. Die Testung des Elektrolytpuffers mit verschiedenen Hochspannungsnetzgeräten bei unterschiedlicher Kontaktierung der Injektionskontakte führte zu keinem signifikanten Unterschied im Signalverlauf der Basislinie (Abb. 120).

Um diesen Effekt der verstärkten Potentialströme weiter zu untersuchen, wurde die Spannung auf 60 % der angelegten Hochspannung verringert (Abb. 122). Es wurde ein negativer Potentialverlauf an den Injektionskontakten beobachtet. Somit sollte sich der Probenfluss in den Seitenkanälen von der Kreuzungszone wegbewegen und zu einer Verringerung der Puffergeschwindigkeit führen. Verglichen mit einer Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennungsspannung erhöhte sich die Migrationszeit bei Brenzkatechin um etwa 15 % auf 209 s. Eine einfache Methode zur Untersuchung von Fließverhalten in mikrofluidischen Strukturen ist die Verwendung von Farbstoffen wie beispielsweise Rhodamin B. Auf Grund des nicht transparenten Charakters der LTCC-Keramikchips ist eine solche Kontrolle ohne zusätzliche, komplizierte Lichtleiterkonstruktionen nicht möglich [Golonka et al., 2005].

Die Verringerung der Brenzkatechinkonzentration führte zur Abnahme von Signalhöhe und Peakfläche (Abb. 123 und 124). Beispielsweise wurde bei einer 25 μM Lösung eine Signalhöhe von 6 nA und eine Peakbreite von etwa 50 s beobachtet (Abb. 125). Eine Erhöhung der Konzentration um den Faktor 10 führte zu einer Erhöhung der Peakbreite um

das Vierfache. Die Peakbreite ist ein wichtiger elektrochemisch-analytischer Parameter zur Beurteilung der Trenneffizienz eines mikrofluidischen Trennsystems. Peakbreite und Peakform sind verglichen mit anderen μ TAS-Applikationen auf LTCC-Keramikchips sehr groß und unsymmetrisch [Henry et al., 1999]. Trotzdem konnte unter Berücksichtigung der Peakfläche ein linearer Verlauf der Kalibrationsgeraden im Bereich von 0,025 mM bis 1 mM beobachtet werden.

Für die Bandenverbreiterung in den getesteten LTCC-Keramikchips sind die folgende Ursachen verantwortlich:

Durch die End-Capillary-Anordnung kommt es auf Grund von Diffusionseffekten zu einer Bandenverbreiterung und somit Effizienzverlust [Martin et al., 2002]. Das Nachlaufen der Probe ist das Ergebnis unterschiedlicher Potentialgradienten zwischen den Kapillaren (Abb. 186). Eine verminderte Probenzonierung kann durch Bereiche unterschiedlicher Leitfähigkeit entstehen [Wätzig und Günter, 2003]. Zudem können Überladungseffekte in den Kapillaren auftreten.

Ren und Li (2002) zeigten durch theoretische Modelle zu mikrofluidischen Prozessen, dass eine kleine Probenzone und somit größere Komprimierung durch Zunahme der elektroosmotischen Mobilität erreicht werden kann. Zudem wurde eine komplexe Abhängigkeit der Probenzone von Hochspannung, Injektions- und Trennmodus und vom Längenverhältnis Injektions- zu Trennkanal dargestellt [Ren und Li, 2002]. Die elektrokinetischen Trennmethode und das Längenverhältnis der Kapillaren der verwendeten LTCC-Keramikchips korrelieren weitestgehend mit den von Ren und Li (2002) angegebenen Daten. Dabei wurde der Einfluss unterschiedlicher Kapillardurchmesser von Injektions- und Trennkanal auf die elektrokinetische Injektion und das Probenvolumen getestet. Unterschiedliche Kapillargrößen von Injektion und Trennung (Verhältnis Durchmesser Trennkanal zu Durchmesser Injektionskanal 1:2 bzw. 2:1) führten zu einer Verringerung des Probenvolumens. Auf Grund der resultierenden Änderung des elektrischen Feldes kommt es zu einer Änderung des Probenvolumens während des Injektionsprozesses. Eine Verbesserung des Injektionsprozesses ist bei unterschiedlichen Kapillardurchmessern nicht gegeben [Ren und Li, 2002]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der geringen Feldstärke von $86,4 \text{ V}\cdot\text{cm}^2$. Durch Verringerung der Injektionszeit und Erhöhung der Trennspannung würde man eine Minimierung der Bandenverbreiterung erreichen. Die Vormigration der Probe in den Trennkanal würde sich unter Ausbildung einer stärker fokussierten Probenzone verringern [Jacobson et al., 1994].

Vergleicht man unterschiedliche kapillarelektrophoretische Trennsysteme muss unter Berücksichtigung der elektrischen Feldstärke und der elektrophoretischen Trennstrecke, die

effektive elektrophoretische Mobilität herangezogen werden. Die durchschnittliche effektive Migrationszeit (Wanderungsgeschwindigkeit) berücksichtigt zwar die effektive Trennstrecke, jedoch nicht die elektrische Feldstärke. Für Brenzkatechin wurde eine effektive Migrationszeit von $3,1 \cdot 10^{-2} \pm 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ermittelt. Unter Berücksichtigung der Feldstärke von $86,4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ betrug die effektive elektrophoretische Mobilität $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Anwendungen mit fused-silica Kapillaren zeigten bei ähnlichem pH-Wert effektive elektrophoretische Mobilitäten von $4,0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ [Huang et al., 1991; Tsuda et al., 1983]. Bei einem vergleichenden LTCC-Trennsystem wurde mit $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ bei pH 7,0 eine 17 % geringere Mobilität ermittelt [Henry et al., 1999].

Unterschiede in dem zu Henry et al. (1999) getesteten Trennsystem auf LTCC-Basis bestehen in der Verwendung eines LTCC-Keramikchips mit integrierter Elektrodenkontaktierung und einer Arbeitselektrode aus Gold.

V.4.5.2.2. Dopamin

Der Neurotransmitter Dopamin wurde unter vergleichbaren Versuchsbedingungen getestet. Die amperometrische Detektion führte zu keiner Verbesserung der Bandenverbreiterung und somit der Trenneffizienz (Abb. 128). Betrachtet man die Peakbreite, wurde im Konzentrationsbereich von 0,025 mM bis 0,25 mM lediglich eine Vergrößerung um etwa 30 % auf $65 \pm 2,6 \text{ s}$ beobachtet (Abb. 130). Erst eine Konzentration von 0,5 mM führte zu einer Vergrößerung der Peakbreite um etwa 80 % auf $117,7 \pm 10,5 \text{ s}$. Ein plateauähnlicher Signalverlauf mit der bereits erwähnten Begrenzung der Signalhöhe wurde ab Konzentrationen von 0,5 mM beobachtet. Somit führten höhere Konzentrationen zu einer Verbreiterung des Peaks auf Grund von Fronting und Tailing. Dessen ungeachtet wurde im Bereich von 0,025 mM bis 0,5 mM ein linearer Verlauf der Kalibrationsgeraden von Peakfläche zur Konzentration beobachtet (Abb. 129).

Trotz unterschiedlicher Konzentrationen sollte bei allen Versuchen dieselbe Migrationszeit ermittelt werden. Die Mobilität eines Analyten ist bei kapillarelektrophoretischen Trennsystemen nicht von der eingesetzten Konzentration sondern seiner Eigenladung abhängig [Kuhn, 1995]. Innerhalb dieser Messungen wurden Migrationszeiten im Bereich von 108 s bis 129 s ermittelt (Abb. 128). Eine weitere Erklärung der unterschiedlichen Detektionszeiten und der Bandenverbreiterung ist möglicherweise die Adsorption der Probe an der Kapillarwand. Auf Grund der elektrochemisch-kathodischen Detektion muss eine negative geladenen Oberfläche für den elektroosmotischen Fluss vorliegen. Da beispielsweise

Dopamin unter den vorliegenden Versuchsbedingungen positiv geladen ist, könnte es zu ionischen Wechselwirkungen mit der Kapillaroberfläche kommen (Abb. 187).

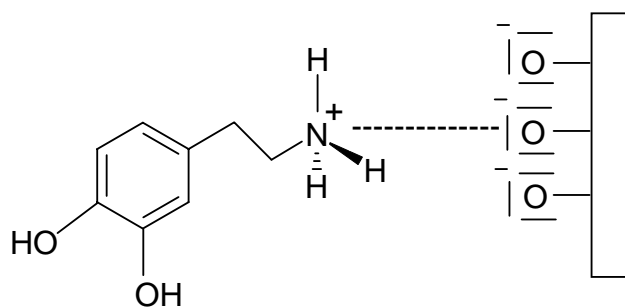


Abbildung 187: Möglichkeit ionischer Interaktion von Dopamin mit der LTCC-Kapillaroberfläche.

Wesentliche Bestandteile der keramischen Folien sind Metalloxide wie beispielsweise SiO_2 , Al_2O_3 oder PbO [Wagner, 2004]. Nach dem Sintern zeigt die Keramik überwiegende Anteile von Korund und Anorthit (siehe Kapitel V.3.1.). Die dabei auftretende Silikatstruktur macht die Adsorption von Polyphenolen über Hydroxylgruppen möglich (Abb. 188) [Yariv, 1996].

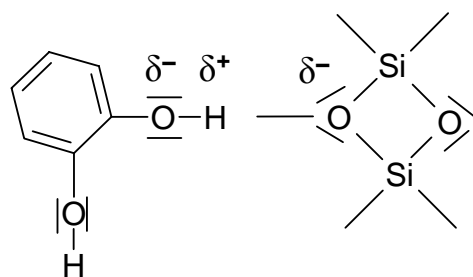


Abbildung 188: Anlagerung von Brenzkatechin an eine Silikatoberfläche über Wasserstoffbrückenbindung.

Polyphenole, die an die Kapillarwand adsorbieren, können zu unterschiedlichen Migrationszeiten führen. Ein Grund besteht in der Störung des elektroosmotischen Flusses. Die Anlagerung von Polyphenolen führt in dem adsorbierten Bereich zu einer Verringerung des Zeta-Potentials. Ursache ist die Abhängigkeit von einer geladenen Oberfläche und der Dicke der elektrochemischen Doppelschicht. Verringert sich die Ladung und somit das Potential in der Helmholtz- und Gouy-Chapman-Schicht in Folge einer Adsorption, kommt es zu einer Abnahme des Zeta-Potentials (Abb. 14). Aufgrund der in Gleichung 16 dargestellten mathematischen Abhängigkeit resultiert daraus eine Abnahme der elektroosmotischen Mobilität. Zudem wird durch Adsorption an der Kapillarwand die Anzahl elektrochemisch detektierbarer Probemoleküle reduziert. Abhängig von der Stärke der Wechselwirkung kann es zu einer späteren Freisetzung der adsorbierten Bestandteile während der Messung kommen. Dies wäre ein weiterer Beitrag zur Bandverbreiterung und würde somit die Trenneffizienz verringern. Eine Möglichkeit zur Verringerung dieses Biofouling wäre die Beschichtung der Kapillare mit Polyethylenglykol [Popat und Desai, 2004]. Dies konnte auf Grund der bereits in Kapitel V.4.4.4. beschriebenen Verminderung des Flüssigkeitsstroms in den Kapillaren

nicht durchgeführt werden. Ein weiteres Problem wurde durch die Beschichtung der Elektrodenoberfläche mit den Silanisierungschemikalien beobachtet. Dies würde ebenfalls bei der Beschichtung mit Polyethylenglykol auftreten. Zudem ist ein vollständiger Verschluss der Kapillaren durch einen weiteren Immobilisierungsprozess nicht ausgeschlossen.

Die bereits erwähnten Methoden zur Schaltung der Injektionskontakte (hochohmig, 80 % der angelegten Trennungsspannung) während der elektrophoretischen Trennung wurden mit niedrigen Dopaminkonzentrationen durchgeführt (Abb. 128 und Abb. 132). Vergleicht man die amperometrischen Detektionen mit 50 μM und 25 μM wurde keine Verringerung der Bandenverbreiterung beobachtet. Lediglich bei Schaltung auf 80 % der angelegten Trennungsspannung wurde ein geringeres Signalrauschen und eine höhere Peakfläche ermittelt. Mögliche Gründe dafür können Joulesche Wärme, Veränderungen des EOF, Elektrodenfouling an der Arbeitselektrode, Adsorptionsprozesse oder Einflüsse der unterschiedlichen Elektrodenpotentiale sein. Bei beiden Injektionsmethoden lag die minimal gemessene Peakbreite bei $47,3 \text{ s} \pm 5,1 \text{ s}$. Die hochohmige Schaltung der Injektionskontakte führt möglicherweise zu einem Nachlaufen der Lösung aus den Seitenkapillaren in den Trennkanal [Lin et al., 2004]. Dieser Effekt sollte bei einer Schaltung auf 80 % der Trennungsspannung nicht auftreten. Somit wäre ein anderer Effekt für die Bandenverbreiterung verantwortlich (Kapitel V.4.5.3.).

Neben dem Hochspannungsnetzgerät der Fa. VIAelectronic wurde für die amperometrische Detektion auch das selbstkonstruierte Hochspannungsnetzgerät verwendet. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede im Signalverlauf und der Messstabilität beobachtet. Abweichungen gab es in der Migrationszeit und somit in der effektiven elektrophoretischen Mobilität (Tab. 31). Eine um 2,5 % geringere Migrationszeit wurde mit dem selbstkonstruierten HSPG gemessen. Unter Berücksichtigung der Feldstärke und der effektiven Trennstrecke vergrößerte sich dieser Wert von $4,1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ um etwa 9,0 % auf $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Verglichen mit Brenzkatechin verringerte sich die Migrationszeit um etwa 20 %. Dies lässt sich durch die bereits erwähnte positive Ladung von Dopamin und die daraus resultierende höhere Wanderungsgeschwindigkeit zur Kathode erklären. Die Unterschiede in der Mobilität von Dopamin zwischen den Hochspannungsnetzgeräten sind wahrscheinlich auf konstruktionsbedingt notwendige Änderungen des VIAelectronic Gerätes zurückzuführen.

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Migrationszeit und den Signalverlauf zu testen, wurde Dopamin bei pH 9,0 amperometrisch detektiert. Die Migrationszeiten verringerten sich dabei um durchschnittlich 30 %. Demnach erhöhte sich die effektive elektrophoretische Mobilität von $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ um 30 % auf $6,0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ (Tab. 31). Die

Abhängigkeit des elektroosmotischen Flusses vom pH-Wert erklärt die höheren Mobilitäten bei pH 9,0. Der EOF ist von der Dielektrizitätskonstanten und der Viskosität des Puffers und des Zeta-Potentials abhängig (Gleichung 17). Wird der Elektrophoresepuffer konstant gehalten, ist der EOF ausschließlich vom Zeta-Potential abhängig. Dieser basiert wiederum auf der Oberflächenladung der Kapillaroberfläche. Somit führt ein zunehmender pH-Wert zu einem ansteigenden EOF. Die Größe des elektroosmotischen Flusses wird in Abhängigkeit vom pH-Wert durch eine Hysterese-Kurve beschrieben [Lambert und Middleton, 1990].

V.4.5.2.3. Pyrogallol

Verglichen mit Dopamin wurde bei Pyrogallol eine größere Peakfläche bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte beobachtet (Abb. 136). Bei Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennungsspannung verringerte sich diese um etwa 50 %. Da kein Versuchsparameter geändert wurde, ist dieser Effekt wahrscheinlich auf den Analyten zurückzuführen. Pyrogallol könnte beispielsweise ein geringeres Bio-Fouling an der Kapillarwand verursachen. Ebenfalls ist ein ungleiches Elektroden-Fouling an der Arbeitselektrode bei unterschiedlich geschalteten Injektionskontakten möglich.

Die bereits erwähnte Abhängigkeit des elektroosmotischen Flusses vom pH-Wert wurde bei Pyrogallol durch zusätzliche Messungen bei pH 4,9 untersucht (Abb. 137). Die Migrationszeit verringerte sich von $238,0 \pm 15,9$ s bei pH 4,9 um etwa 50 % auf $145,5 \pm 12,8$ s (HSPG Eigenbau) bei pH 7,3. Um weitere 45 % auf $94,6 \pm 17,1$ s nahm die Migrationszeit bei pH 9,0 ab. Der Grund dafür ist die Abhängigkeit des elektroosmotischen Flusses vom Zeta-Potential und somit des pH-Wertes [Bohlin et al., 2005]. Eine signifikante Verbesserung der Selektivität wurde bei pH-Werten $\neq 7,3$ nicht beobachtet. Dies zeigte sich auch bei den Peakbreiten (Abb. 138). Verglichen mit Dopamin wurde bei Konzentrationen von $75 \mu\text{M}$ eine Verringerung der Peakbreite von etwa 20 % auf $33,3 \text{ s} \pm 0,5 \text{ s}$ ermittelt. Ein Grund könnte die geringe Fokussierung der Probe auf Grund des Nachlaufens aus den Seitenkapillaren sein. Weitere Ursachen sind möglicherweise die geringe Hochspannung und die Injektionszeit. Je höher die angelegte Spannung, umso schneller ist die Migration bei einer Abnahme der Bandenverbreiterung [Schwarz et al., 2001]. Dem gegenüber stehen die Untersuchungen von Alarie et al. (2000). Dabei führen Feldstärken von mehr als 2 kV zu einer geringeren Befüllung im Kreuzungsbereich und somit verringerter Signalhöhe. Da die kapillarelektrophoretischen Messungen mit Hochspannungen von etwa 0,4 kV durchgeführt wurden, sollte dies keinen Effekt auf die durchgeführten Messungen haben.

Signalhöhe und Peakfläche zeigten im Konzentrationsbereich von 0,075 mM bis 0,6 mM einen linearen Verlauf der Kalibrationsgeraden (Abb. 139 und 140). Eine Erhöhung der Konzentration auf 15 mM führte zu einer logarithmische Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration. Ab einer Konzentration von 0,6 mM wurde kein peakförmiger Verlauf des Signals beobachtet. Somit führte eine Konzentrationserhöhung lediglich zu einer zeitlichen Verlängerung des Signalplateaus (Abb. 135). Wie bereits erwähnt, ist der Grund für diesen Signalverlauf möglicherweise der Einfluss der Hochspannung auf die elektrochemische Detektionseinheit, in Folge unzureichender Entkopplung [Martin et al., 2002].

Die beiden Hochspannungsnetzgeräte zeigten bei der amperometrischen Messung von Pyrogallol nur geringe Unterschiede in den ermittelten Messwerten. Wie bereits bei der Testung von Dopamin, zeigte sich eine etwa 3 % niedrigere Migrationszeit bei dem selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerät. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die bereits erwähnten Änderungen des VIAelectronic Gerätes zurückzuführen (Kapitel V.4.5.2.2.). Verglichen mit Dopamin und Brenzkatechin ist die Wanderungsgeschwindigkeit um 30 % bzw. 11 % geringer. Die zusätzliche Hydroxylgruppe im Vergleich zu Brenzkatechin führt zu einer partiell negativeren Ladung des Moleküls. Positiv geladene Moleküle besitzen auf Grund der Summe elektrophoretischer und elektroosmotischer Mobilitäten eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit zur Kathode als negativ geladene Moleküle.

Die Abhängigkeit der elektroosmotischen Geschwindigkeit vom pH-Wert des Elektrolytpuffers führte zu unterschiedlichen effektiven elektrophoretischen Mobilitäten. Somit verringerte sich diese bei pH 9,0 von $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ um etwa 35 % auf $3,2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ bei pH 7,3 (Tab. 32). Eine weitere Abnahme um 40 % wurde bei pH 4,9 ermittelt. Ein Erklärungsansatz der durch Lambert und Middleton (1990) gemachten Abhängigkeit von pH-Wert und EOF wurde bereits in Kapitel V.4.5.2.2. gegeben.

V.4.5.2.4. Gallussäure

Wie bereits beschrieben sollten zur amperometrischen Detektion in LTCC-Keramikchips verschiedene Polyphenole getestet werden. Der Fokus lag dabei auf Brenzkatechin, Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure. Verglichen mit Pyrogallol (pK_s -Wert 8,55) besitzt Gallussäure (pK_s -Wert 8,25) eine zusätzliche Carboxylgruppe. Mit $197,6 \pm 10,7 \text{ s}$ (HSPG Eigenbau) und $223,5 \pm 15,8 \text{ s}$ (HSPG VIAelectronic) wurde eine etwa 30 % höhere Migrationszeit als bei Pyrogallol ermittelt. Die zusätzliche Carboxylgruppe erklärt die höhere Migrationszeit. Das

Molekül ist negativ geladen und erfährt somit eine gerichtete elektrophoretische Mobilität zur Anode. Da die Mobilität auf dem elektroosmotischen Fluss beruht, bewirkt eine entgegengesetzt wirkende elektrophoretische Kraft eine längere Migration des Analyten zur Kathode.

Die amperometrische Detektion von Gallussäure führte zu einer höheren Schwankung der Basislinie und des Messsignals (Abb. 142). Ein möglicher Grund könnten unterschiedliche pH-Werte und Ionenstärken zwischen Probenzone und Elektrolytpuffer sein. Der resultierende Einfluss auf die elektrochemische Doppelschicht würde zu einer Veränderung des elektroosmotischen Flusses führen. Überlagernde elektrophoretische Effekte wären dadurch ebenfalls möglich. Joulesche Wärme, die sich auf Grund des angelegten elektrischen Feldes bildet, oder eine höhere Umgebungstemperatur können zu Verdunstungseffekten und Änderungen der Viskosität führen. Die Folge wären unterschiedliche Reservoirhöhen und eine höhere Ionenstärke des Elektrolytpuffers. Änderungen der Füllhöhe würden zu einem laminaren Druckprofil in der Kapillare führen. Ein Rücklauf der Probe in den Trennkanal könnte die Folge sein [Crabtree et al., 2001].

Die Peakbreite lag im Konzentrationsbereich von 0,5 mM bis 1,25 mM zwischen $63,3 \text{ s} \pm 6,1 \text{ s}$ und $71,3 \text{ s} \pm 14,2 \text{ s}$ und damit 50 % höher als bei Pyrogallol. Ursachen zu dem Einfluss der Injektionsschaltung auf den Probennachlauf wurden durch die Arbeiten von Lin et al. (2004), Ren und Li (2002) und Martin et al. (2002) bereits in Kapitel V.4.5.2.1. und V.4.5.2.2. diskutiert.

Trotz der möglichen Fehlerquellen einer amperometrischen Messung wurde eine lineare Abhängigkeit der Signalthöhe und der Peakfläche von der Konzentration ermittelt (Abb. 143 und Abb. 146). Ablagerungen der Polyphenole oder deren Oxidationsprodukte auf der Arbeitselektrode können mit zunehmender Messdauer zu einer Verringerung der elektrochemische Umsatz führen [Moane et al., 1998].

Unter Berücksichtigung der Trennstrecke beträgt die durchschnittliche effektive Migrationszeit von Gallussäure $1,9 \cdot 10^{-2} \pm 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (Mittelwert der verwendeten Hochspannungsnetzgeräte). Verglichen mit Pyrogallol entspricht dies einer Verringerung um etwa 35 %. Die effektive elektrophoretische Mobilität verringerte sich um durchschnittlich 30 % auf $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ (HSPG VIAelectronic) bzw. $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ (HSPG Eigenbau). Durch die Carboxylgruppe erfährt das Molekül unter den gegebenen Bedingungen eine negative Ladung und wandert dadurch langsamer zum kathodenseitigen Detektor.

V.4.5.2.5. Quercetin

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Polyphenolen wurden Quercetin, Resorcin, Resveratrol und Kaffeesäure amperometrisch detektiert. Auf Grund der geringen Löslichkeit von Quercetin in wässrigem Milieu waren amperometrische Messungen nur schwer durchführbar. In einem Wasser-Ethanol-Gemisch konnte Quercetin gelöst werden. Die Verwendung eines solchen Gemisches führte jedoch zu einer erhöhten Schwankung von Basislinie und Messsignal [Kuhn, 1995]. Die Ursache liegt in der Beeinflussung des elektroosmotischen Flusses durch organische Lösungsmittel, die die Polarität und Viskosität des Elektrolyten ändern [Tran et al., 1991]. Beispielsweise sinkt durch den Zusatz von Methanol zur Pufferlösung der elektroosmotische Fluss fast linear mit steigender Konzentration des organischen Lösungsmittels [Fujiwara und Honda, 1987]. Das Problem der Bandenverbreiterung mit den bereits diskutierten Ursachen wurde ebenfalls bei der elektrochemischen Detektion von Quercetin beobachtet. Auf Grund der geringen Löslichkeit besteht die Möglichkeit einer Ausfällung während der Messung. Dazu können auch Änderungen der Viskosität durch Joulesche Wärme oder pH-Gradienten im Trennkanal führen. Das Resultat wäre eine abnehmende Signallhöhe aufgrund einer verringerten elektrochemischen Umsetzung des Analyten an der Arbeitselektrode. Dies kann auch durch Ablagerungen von Quercetin oder seiner Oxidationsprodukte verursacht werden. Ein mögliches Oxidationsprodukt des Quercetins ist die Umsetzung zum Chinon am B-Ring-System (Abb. 189).

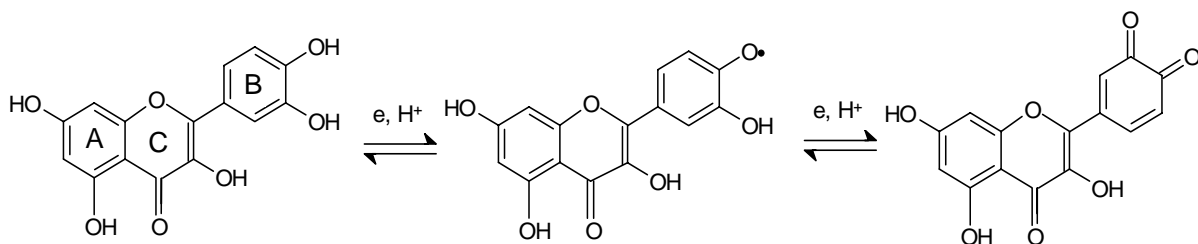


Abbildung 189: Oxidation des Brenzkatechinrests in Ring B von Quercetin zum Chinon.

Alle Hydroxylgruppe im Quercetin sind elektroaktiv [Brett und Ghica, 2003]. Die Umsetzung zum Chinon am B-Ring erfolgt bei niedrigen positiven Elektrodenpotentialen von etwa 0,2 bis 0,3 V. Bei Elektrodenpotentialen zwischen 0,6 und 0,8 V erfolgt die Oxidation der Hydroxylgruppen in Ring A [Brett und Ghica, 2003]. Weitere Gründe für eine geringe Umsatzrate sind möglicherweise die Größe des Analyten und die Körnung der Arbeitselektrode. Je größer die Moleküle, desto geringer ist die Umsatzrate pro

Elektrodenfläche. Mikroskopische Aufnahmen von Siebdruckleiterbahnen aus Gold sind durch eine starke Körnung gekennzeichnet [Kulke et al., 2003]. Die zweidimensionale Fläche der aus Gold bestehenden Arbeitselektrode bleibt bei jedem Chip erhalten. Bei einer dreidimensionalen Betrachtung ist eine Änderung der Elektrodenoberfläche möglich. Dies würde ebenfalls zu Änderungen in der Signalhöhe führen.

Die lange Migrationszeit von $273,0 \pm 19,9$ s lässt sich durch den pK_s -Wert von 6,89 erklären. Verglichen mit Gallussäure besitzt das Molekül eine negativere Eigenladung, die zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität zur Anode führt. Da der elektroosmotische Fluss auch eine Detektion von Anionen an der Kathode ermöglicht, wandern diese Moleküle mit einer längeren Migrationszeit. Die effektive elektrophoretische Mobilität betrug $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Bei Analysen mit fused-silica Kapillaren wurden mit $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ bis zu 35 % geringere Mobilitäten ermittelt [Volpi, 2004]. Vergleichende Daten zu Mobilitäten auf keramischen Materialien liegen nicht vor.

V.4.5.2.6. Resorcin

Resorcin (pK_s -Wert 8,66) ist das so genannte *meta*-Dihydroxybenzol. Verglichen mit Brenzkatechin, dem *ortho*-Dihydroxybenzol, waren die Elektropherogramme schwer auswertbar. Die amperometrischen Messungen waren durch schwankende Migrationszeiten und unterschiedliche Signalverläufe gekennzeichnet (Abb. 148) deren Ursachen bereits diskutiert wurden (Kapitel V.4.5.2.1. bis V.4.5.2.5.). Durch Oxidation der Polyphenole an der Arbeitselektrode kommt es zur Ausbildung chinoider Verbindungen (Abb. 190). Diese können sich auf der Elektrode ablagern und zu einer Verminderung der elektrochemischen Umsetzung beitragen. Ein Teil der Chinone kann zudem als Katalysator für eine weitere Reaktionen der Polyphenole dienen [Rechner, 2000].

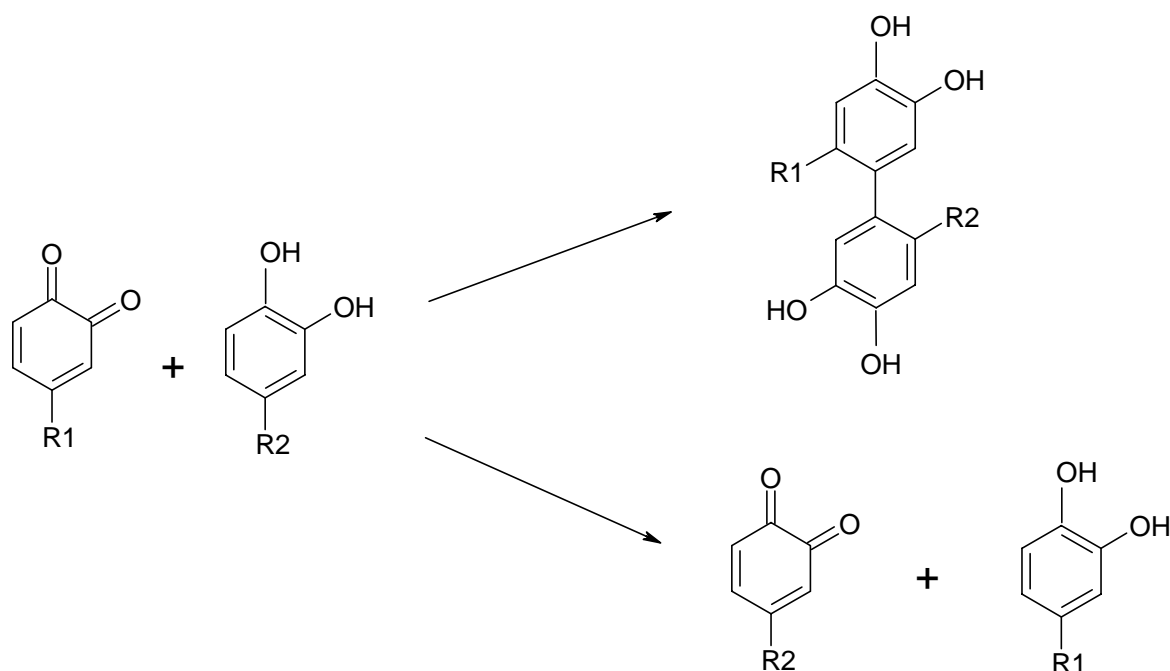


Abbildung 190: Reaktionen von *ortho*-Chinonen mit Polyphenolen.

Verglichen mit Brenzkatechin ist Resorcin ein viel schwächeres Reduktionsmittel. So wird Fehling-Reagenz erst nach Erhitzen von Resorcin reduziert. Der Grund für das unterschiedliche Reaktionsverhalten liegt darin, dass Resorcin als meta-Verbindung (anders als ortho- oder para-Verbindungen) kein Chinon ausbilden kann (Abb. 191).

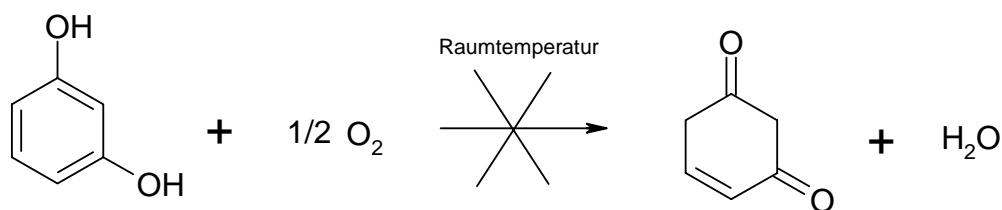


Abbildung 191: Nicht stattfindende Umsetzung von Resorcin zum chinoiden System.

Unter hohem Energieaufwand ist eine oxidative Öffnung des Benzolrings möglich. Trotzdem ist eine elektrochemische Oxidation von Resorcin durchführbar [Nasr et al., 2005]. Die vorliegenden Versuchsbedingungen führen jedoch nur zu einem geringen elektrochemischen Umsatz an der Arbeitselektrode. Verglichen mit Brenzkatechin wurde eine geringere Migrationszeit von etwa 30 s gemessen. Die effektive elektrophoretische Mobilität erhöhte sich von $3,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ auf $4,8 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ bei nahezu identischen pK_s -Werten. Möglicherweise führt die Hydroxylgruppe in meta-Stellung zu einer anderen Verteilung der Ladung und Stabilität im Molekül mit dem Resultat einer kürzeren Migrationszeit.

V.4.5.2.7. Resveratrol

Das als 3,4',5-Trihydroxystilben bezeichnete Resveratrol tritt in der Natur überwiegend als trans-Isomer auf [Deianova et al., 2003]. Es existiert kein signifikanter Unterschied in der elektrochemischen Detektion zwischen dem trans- und dem cis-Isomer von Resveratrol [Corduneanu et al., 2006]. Die Elektropherogramme dieses Antioxidants zeigten eine relativ geringe Peakbreite von etwa 25 s bei einer Migrationszeit von $136,6 \text{ s} \pm 15,9 \text{ s}$ (Abb. 149). Dieser Wert liegt damit im Messbereich von Brenzkatechin. Ebenso die effektive elektrophoretische Mobilität von $3,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Verglichen mit einer auf fused-silica basierten LIF-Kapillarzonenelektrophorese wurde mit $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ eine etwa 30 % höhere Mobilität ermittelt [Volpi, 2004]. Schwankungen in Basislinie und Messsignal sowie eine niedrige Signalhöhe führten zu einer komplizierteren Auswertung der Messungen. Neben bereits diskutierter Gründe, die zu Änderungen des elektroosmotischen Flusses beitragen, könnte eine weitere Ursache das unterschiedliche Oxidationspotential der Hydroxylgruppen sein. Resveratrol ist durch zwei Oxidationspeaks gekennzeichnet. Der erste resultiert aus der Oxidation der Phenolgruppe bei etwa 0,5 V (abhängig von pH-Wert und Puffer). Der zweite, ebenfalls irreversible Vorgang, ist die Oxidation der Resorcin-Komponente bei etwa 0,8 V [Corduneanu et al., 2006]. Auf Grund eines konstanten Elektrodenpotentials bei amperometrischen Detektionen ist nur ein Oxidationspotential erfassbar. Bei pH 7,0 (Ethanol-Phosphatpuffer) und einem Elektrodenpotential von etwa 0,7 V führte die Oxidation der Resorcin-Komponente zum höchsten Signal [Corduneanu et al., 2006]. Dabei werden beide Hydroxylgruppen der Resorcin-Komponente elektrochemisch erfasst. Das Elektrodenpotential betrug bei der amperometrischen Detektion von Resveratrol 0,8 V bei vergleichbarem pH-Wert von 7,3. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, Polyphenolgemische amperometrisch zu detektieren und auf Grund ihrer unterschiedlichen Migrationszeiten zu trennen. Wie bereits erwähnt ist dies nur mit einem konstanten Elektrodenpotential möglich. Die Potentialdifferenz von 0,1 V bewirkt wahrscheinlich eine geringere elektrochemische Erfassung der Hydroxylgruppen mit dem Ergebnis einer niedrigeren Umsatzrate am Detektor. Der Oxidationsprozess von Resveratrol ist kompliziert, pH- und pufferabhängig. Resveratrol adsorbiert sehr stark an die Oberfläche einer Kohlenstoffelektrode. Die gebildeten Oxidationsprodukte blockieren dann die Elektrodenoberfläche und verringern das elektrochemische Signal [Corduneanu et al., 2006]. Diese Oxidationsprodukte sind jedoch keine Chinone. Möglicherweise besitzt Resveratrol zu Gold als Elektrodenmaterial dieselben Adsorptionseigenschaften wie zu einer Kohlenstoffelektrode [Corduneanu et al., 2006].

V.4.5.2.8. Kaffeesäure

Der neben der Ferulasäure am häufigsten vorkommende sekundäre Pflanzenstoff ist die Kaffeesäure (pK_s -Wert 4,1). Sie unterscheidet sich von Dopamin durch den Austausch von Ethylamin gegen Propensäure (Abb. 40). Verglichen mit den getesteten Polyphenolen zeigten die Elektrochromogramme eine größere Bandenverbreiterung mit einer Peakbreite von etwa 100 s. Mögliche Gründe wurden bereits in den vorherigen Kapitel diskutiert.

Die Migrationszeit betrug $272,3 \pm 8,1$ s und ist mit derjenigen von Quercetin vergleichbar. Ebenso die resultierende effektive Migrationszeit von $1,5 \cdot 10^{-2} \pm 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und die effektive elektrophoretische Mobilität von $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Elektrochemische Detektionen von Kaffeesäure in fused-silica Kapillaren zeigten mit $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ eine mehr als doppelt so hohe effektive elektrophoretische Mobilität [Peng et al., 2004]. Die unterschiedlichen Mobilitäten resultieren wahrscheinlich aus einer veränderten Adsorption an der Kapillarwand. Diese könnten bei der verwendeten niedrigsinternden Keramik höher sein als bei fused-silica Materialien. Die geringe Mobilität ist durch die chemische Struktur erklärbar. Die Carboxylgruppe und die Hydroxylgruppe in 4'-Position sind unter den gegebenen Versuchsbedingungen negativ geladen (Abb. 192). Dies führt auf Grund des elektroosmotischen Flusses zur Kathode zu einer verminderten Mobilität. Ein weiterer Grund für die breite Peakbasis könnte das Elektroden-Fouling sein. Dabei kommt es in Lösungen größer als pH 5,5 zu einer Elektrooxidation von Kaffeesäure nach dem folgenden Mechanismus (Abb. 192):

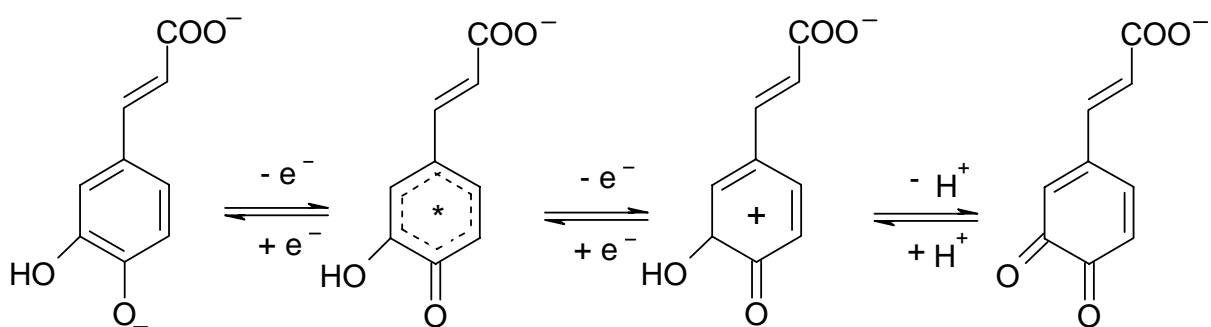


Abbildung 192: Mechanismus der Elektrooxidation von Kaffeesäure bei einem pH-Wert $> 5,5$.

Das Hauptoxidationsprodukt ist das korrespondierende *ortho*-Chinon, welches bei pH-Werten größer 7,4 sehr schnell zerfällt [Giacomelli et al., 2002]. Untersuchungen mit einer Kohlenstoffelektrode ergaben mit einer Kalomel-Referenzelektrode für Kaffeesäure bei pH 7,4 ein Oxidationspotential von etwa 0,2 V. Eine Verringerung des Elektrodenpotentials

auf diesen Wert würde bei der Testung von Polyphenolen bzw. Polyphenolgemischen auf LTCC-Keramikchips zu keiner oder nur geringen elektrochemischen Umsetzung von Dopamin, Brenzkatechin oder Pyrogallol führen.

V.4.5.3. Einflüsse des Herstellungsprozesses auf Elektroden und Kapillaren

Zahlreiche beschriebene Effekte, wie beispielsweise das Nachlaufen der Probenlösung aus den Seitenkapillaren, führten zu einer Verbreiterung der Peaks. Das Resultat ist eine geringere Auflösung und Trenneffizienz der einzelnen Proben. Mögliche Gründe wurden in Kapitel V.4.5.2. bereits diskutiert. Ein weiterer Grund ergibt sich bei der Betrachtung des Herstellungsprozesses des Multilayers (Abb. 193).

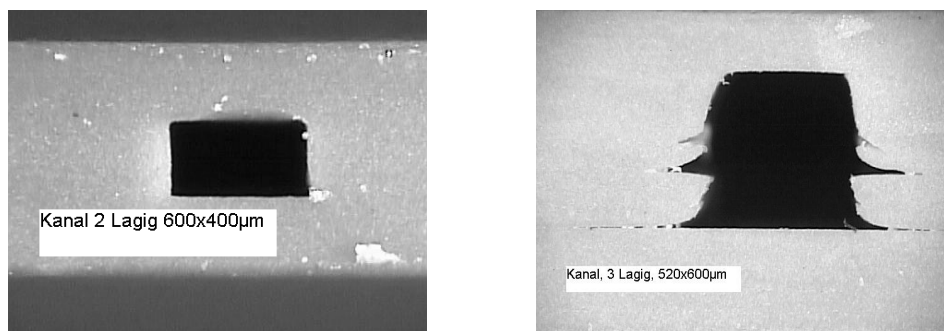


Abbildung 193: Querschnitte durch die Kapillare einer gesinterten LTCC-Keramik. Linkes Foto: Idealer Querschnitt einer Kapillare nach dem Sintern. Rechtes Foto: Nach dem Sintern entstandene Todvolumina an den Foliengrenzflächen (100-fache Vergrößerung; Quelle: VIAelectronic, Hermsdorf).

Das verwendete Trennsystem auf LTCC-Basis ist ein Multilayer aus drei Grünfolien, die laminiert und anschließend gesintert werden. Durch das Sintern bei 850 °C entstehen durch Schrumpfungsprozesse an den Kontaktflächen der einzelnen Grünfolien zusätzliche Leerräume in der Kapillare (Abb. 193 , rechts). Der Schrumpfungsfaktor beträgt, abhängig von der Laminierung, für die hier verwendeten DuPont951™-Folien 12,7 % ± 0,3 % für die X- und Y-Achse und 15 % ± 0,5 % für die Z-Achse [persönliche Mitteilung H. Axthelm, VIAelectronic]. Besonders an den Kontaktflächen zum Kapillarraum kann die Schrumpfung der Grünfolien während des Sinterns das Kapillarovolumen beeinflussen. Es ist auch möglich, dass diese Räume im Zusammenhang mit dem Ausstanzen der Kapillaren entstehen. Das Stanzen kann zu einer ungleichmäßigen Randstruktur der Kapillare führen. Dadurch wäre schon während der Lamination keine plan abgeschlossene Auflagefläche mehr gegeben. Das Sintern würde diesen Effekt noch verstärken.

Verwirbelungen oder Luftblasen, die an diesen Leerräumen entstehen, können eine Störung des elektroosmotischen Flussprofils und der Detektoreinheit verursachen. Luftblasen führen zu einer Erhöhung des ohmschen Widerstandes in der Kapillare. Dies resultiert in einer Änderung des in der Kapillare fließenden Stroms und somit des angelegten elektrischen Feldes [Xue und Yeung, 1994]. Außerdem ist aufgrund der unförmigen Wandstruktur die Ausbildung eines stabilen, elektroosmotischen Flussprofils nicht gegeben. Dies würde zur Bandenverbreiterung beitragen und somit die Trenneffizienz verringern.

Für die bereits beschriebenen Effekte, die bei der amperometrischen Detektion von Polyphenolen in den LTCC-Keramikchips beobachtet wurden, ist möglicherweise auch die Struktur der Kapillarwand in erheblichem Maße verantwortlich. Aufnahmen von Trennkanal und Kreuzungsbereich eines gesinterten LTCC-Keramikchip ohne Grundlayer zeigten stark unebene Kapillarwände (Abb. 194 und 195a,b).

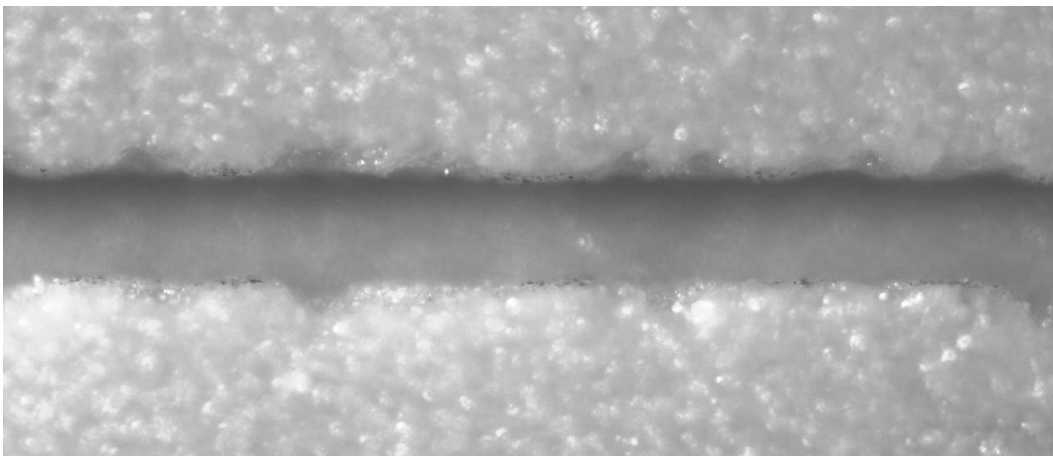
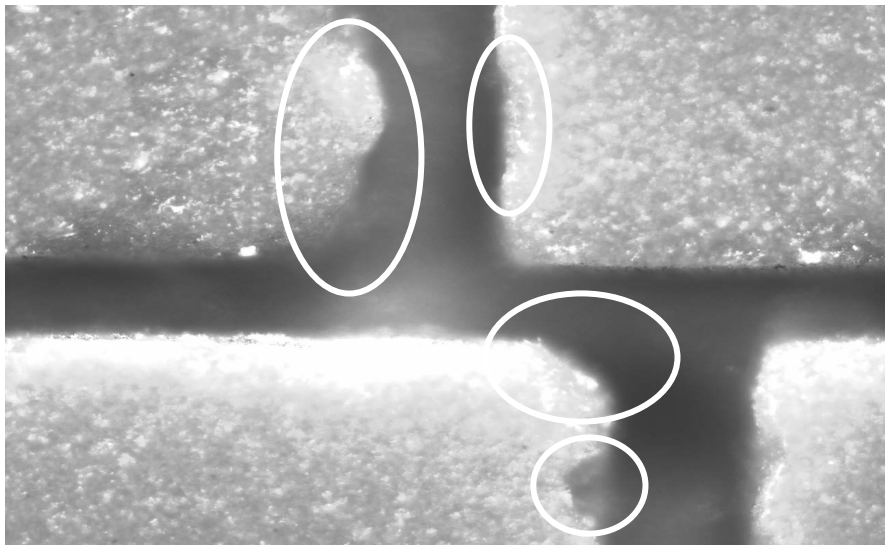


Abbildung 194: 100fache Vergrößerung des Trennkanals eines LTCC-Keramikchips (Quelle GBF Braunschweig).

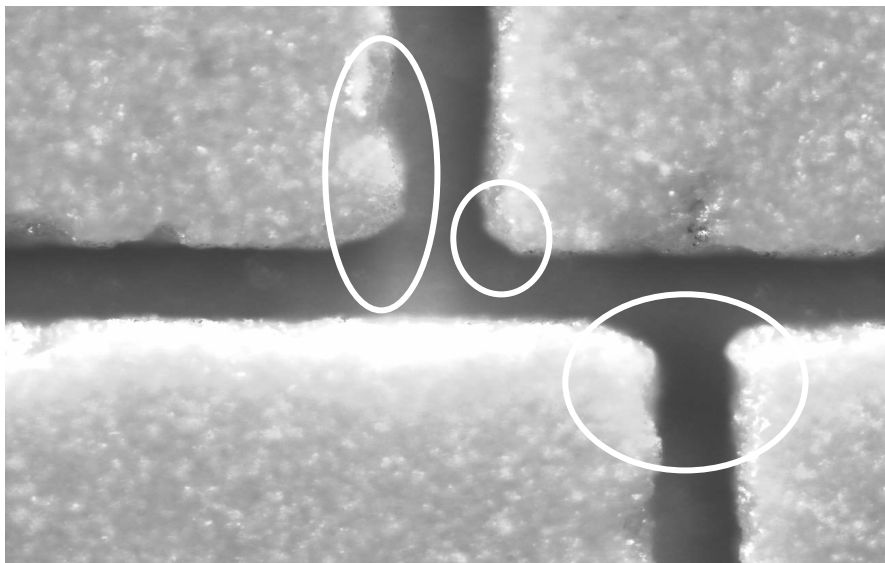
Bei solchen unebenen Kapillarwände besteht die Möglichkeit der Luftblasenbildung/-freisetzung in den Kapillarnischen. Luftblasen in der Kapillare führen zu einem Stromanstieg in der Kapillare. Dieser erhöhte Stromfluss bewirkt eine Temperaturerhöhung, die zu einer Änderung der Viskosität führt [Crabtree et al., 2001]. Das Ergebnis ist ein sich ändernder elektroosmotischer Fluss. Luftblasen am Detektor führen auf Grund von Potentialänderungen zu Schwankungen des Messsignals.

Die Probensubstanz könnte sich in diesen Kapillarnischen anreichern und zu einem späteren Zeitpunkt freigesetzt werden. Dies würde zur Bandenverbreiterung führen und somit die Trenneffizienz verringern. Eine Änderung des EOF ist möglicherweise durch die Ausbildung von pH-Gradienten und Zonen unterschiedlicher Ionenstärke gegeben. Zudem können die

ungleichmäßigen Wandstrukturen das elektroosmotische Flussprofil durch lokale Verwirbelungen beeinflussen. Die Folge wäre ein mehr hydrodynamisches Flussprofil mit dem Resultat einer Bandenverbreiterung auf Grund einer breiten Probenzone. Eine unterschiedliche Oberflächenstruktur kann einen direkten Einfluss auf die elektrochemische Doppelschicht ausüben. Eine gleichmäßig geladenen Oberfläche wird für die Ausbildung eines stabilen elektroosmotischen Flusses benötigt. Lokale Änderungen der Ladungsdichte und Verteilung auf der Kapillaroberfläche könnten zu einer Veränderung des EOF hinsichtlich Größe, Stabilität und Flussprofil führen. Die aufgeführten Punkte treffen ebenfalls für das Injektionskreuz der LTCC-Keramikchips zu (Abb. 195 a-b).



a)



b)

Abbildung 195 a-b: Mikroskopische Aufnahmen (100fach) des Kreuzungsbereich von zwei LTCC-Keramikchips. Die Kreise zeigen die Unebenheiten und abgerundeten Ecken im Versatz zwischen Injektions- und Trennkanal. (Quelle GBF-Braunschweig).

Eine stark abgegrenzte Probenzone ist primär vom elektroosmotischen Fluss im Kreuzungsbereich abhängig [Lin et al., 2004]. Wie bereits erwähnt, sollte bei einer Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennungsspannung kein Nachlaufen der Probenlösung aus den Seitenkapillaren mehr auftreten. Ein signifikanter Unterschied zwischen dieser und einer hochohmigen Schaltung war in den Versuchen nicht erkennbar. Möglicherweise sind die stark abgerundeten Kanten im Injektionskreuz dafür verantwortlich [Cohen und Grushka, 1994]. In Abb. 186 ist die Potentialkontur und das Geschwindigkeitsprofil im Kreuzungsbereich bei idealen Kanten dargestellt. Sind diese Kanten abgerundet, ist keine klare Trennung der Potentialbereich mehr vorhanden. Die Folge ist ein Nachlaufen der Lösung aus den Seitenkapillaren während des Trennmodus (Abb. 196).

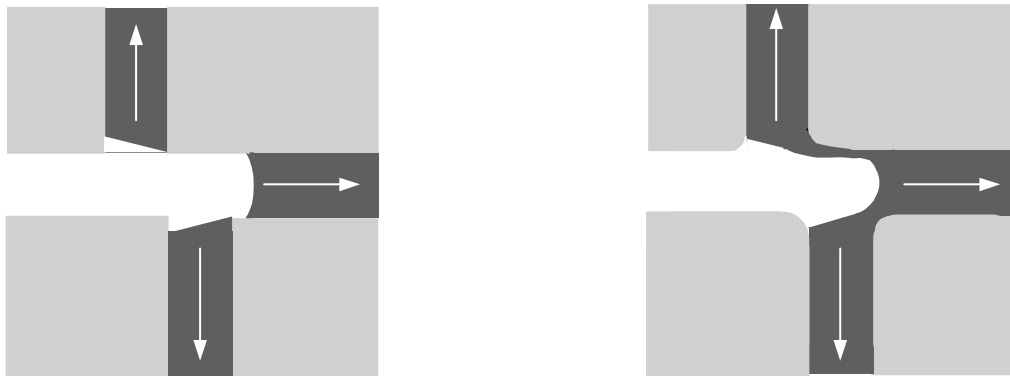


Abbildung 196: Ausbildung der Probenzone im Injektionskreuz bei der Verwendung von spitzen Kanten (linke Zeichnung) und abgerundeten Kanten (rechte Zeichnung). Die Pfeile geben die Fließrichtung der Potentiale an.

Zur Überprüfung der Annahmen wurde ein in fused-silica hergestellter Mikrochip mit identischen Maßen hergestellt. Diese zeigte bei bis zu drei Wiederholungen keinen Nachlauf der Probe in den Trennkanal [Quelle: GBF, Braunschweig]. Die Schaltung der Injektionskontakte betrug dabei etwa 80 % der Trennungsspannung von 500 V.

Die Gründe für solche unebenen Strukturen liegen in der Herstellung der Kapillaren. Diese wurden für die verwendeten LTCC-Keramikchips gestanzt. Die Kanten der Kapillaren, insbesondere im Injektionskreuz, sind dabei durch deutlich erkennbare Unebenheiten gekennzeichnet. Für die Herstellung sind zahlreiche Fertigungstechniken (Präge-, Stanz-, Fräse- und Lasertechniken) und unterschiedliche Materialsysteme einsetzbar, was zu unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften der gefertigten Strukturen, aber auch zu unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften (z.B.: optische Transparenz, elektrischer Widerstand, thermische Leitfähigkeit) führt [VIAelectronic, Hermsdorf]. Kohlepasten, die beim Sintern rückstandsfrei verbrennen sollten, stellten sich zur Herstellung von Kapillaren als

nicht praktikabel heraus. Neue Untersuchungen laufen mit einem NeodymYAG (Yttrium-Aluminium-Granat Kristall)-Laser.

Eine weitere Ursache könnte das Ablösen der Hochspannungskontakte in den Reservoirien sein (Abb. 197).

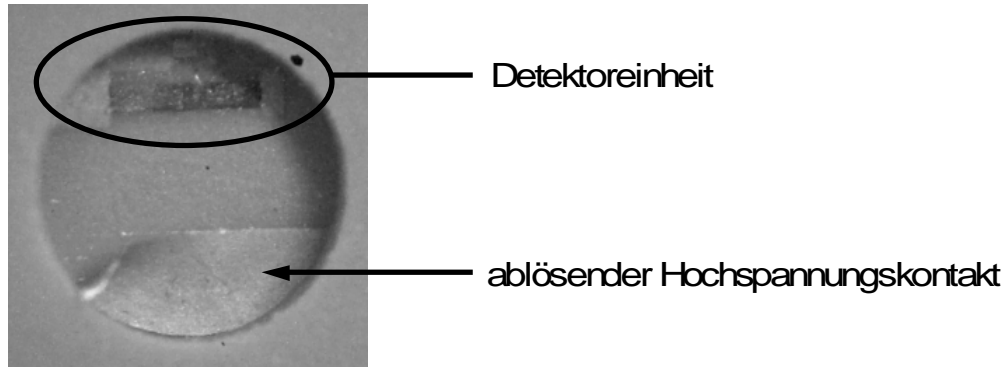


Abbildung 197: Mikroskopische Aufnahme (40-fache Vergrößerung) der Kavität des Pufferauslasses mit Detektoreinheit und Hochspannungskontakt.

Die Auftragung der Kontakte erfolgte mit einer Paste durch das Siebdruckverfahren. Diese Pasten, wie beispielsweise die Goldpaste, bestehen aus 80-82 % Feststoff (Gold und Glasfritte). Die anderen 20 % sind organische Hilfsstoffe, die aus dem Metall/Glaspulver eine Paste machen. Die Glasfritte der Paste interagiert mit den Glasbestandteilen in der Keramik. Durch den Übergangsbereich vom Glas zu Metall entsteht dann die Haftung des Metalls beim Sintern [persönliche Mitteilungen H. Axthelm, VIAelectronic]. Durch häufige Konditionierung der Kapillaren und somit auch der Reservoirie mit KOH kommt es wahrscheinlich zur Auflösung des Übergangsbereichs und somit der Haftung zwischen Keramik und Paste mit dem Resultat der Kontaktablösung.

V.4.5.4. Messparameter unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte

Die amperometrische Detektion von Dopamin, Gallussäure und Pyrogallol wurde mit zwei unterschiedlichen Hochspannungsgeräten durchgeführt. Die Unterschiede in der Migrationszeit, der Wanderungsgeschwindigkeit bzw. effektiven elektrophoretischen Mobilität betragen zwischen 2,5 % bei Pyrogallol und 13,1 % bei Gallussäure (Abb. 151, 152 und 153). Möglicherweise ist die unzureichende Erdung der Hochspannungsteile des VIAelectronic-Gerätes dafür verantwortlich. Daraus könnte ein fehlender Potentialausgleich resultieren, der zu einer längeren Migrationszeit führt. Die Überprüfung der Gleichspannungsregler mit Hilfe eines Oszillographen ergab zudem bei einer Hochspannung

von 400 V eine effektiv angelegte Spannung von etwa 392 V. Die Größe des elektroosmotischen Flusses ist von der angelegten effektiven Hochspannung abhängig (Gleichung 15). Somit führt eine große elektrische Feldstärke zu einer höheren Mobilität des Analyten. Die Überprüfung des selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerätes ergab eine Effektivspannung von 399 V bei eingestellten 400 V.

V.4.5.5. Leistungsdaten des LTCC-Systems

Grundrauschen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine amperometrische Detektion von Polyphenolen mittels LTCC-Keramikchips möglich ist (Abb. 154). Grundrauschen, Basislinienstabilität und die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind zur Beurteilung eines elektrophoretischen Trennsystems notwendig (Tab. 38 und 39). Vergleicht man beispielsweise LTCC-Keramikchips mit verzinnter und nicht verzinnter Kontaktierung, so zeigte sich bei verzinnten LTCC-Keramikchips mit 2,5 nA ein 150 % höheres Grundrauschen. Zudem zeigten diese Keramikchips eine etwa 100 %ige Zunahme der Basisliniendrift über einen Zeitraum von 300 s. Mögliche Ursache könnte die bereits in Kapitel V.4.2. erwähnte Oxidschicht auf den Palladium-Silber-Kontakten sein, die zu einer Störung der Signalübertragung führt. Zudem kann es durch die Verwendung verschiedener Kontakte zu einer Ladungstrennung zwischen den Metallen auf Grund unterschiedlicher Elektrodendichten kommen. Diese Ladungsverschiebung könnte ebenfalls zu dem höheren Signal beitragen. Der Basisliniendrift von LTCC-Keramikchips mit unverzinneten Hochspannungskontakten beträgt je nach Schaltung der Injektionskontakte und verwendeter Hochspannungsnetzgeräte zwischen 5,0 nA und 7,5 nA. Möglicherweise ist die Arbeitselektrode so positioniert, dass es bei der verwendeten End-Capillary-Anordnung zu keiner vollständigen Entkopplung von Detektor und Hochspannung kommt [Martin et al., 2002]. Je höher die elektrische Feldstärke ist, desto größer ist dieser Effekt. Dies würde zudem die ab 500 V zunehmenden Schwankungen der Basislinie erklären. Bei der Doppel-T-Injektion (hochohmige Schaltung der Injektionskontakte) kommt es mit zunehmender Messdauer zu einem Basisliniendrift [Lin et al., 2004]. Dieser Effekt beruht auf einem höheren elektrischen Gradienten zwischen den hochohmigen Kanälen und der Kavität des Pufferauslasses (Abb. 186). Dieser höhere Gradient führt zu einer größeren elektrokinetischen Kraft auf die Flüssigkeiten mit dem Ergebnis eines Probennachlaufs [Lin et al., 2004]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Abhängigkeit des elektroosmotischen Flusses von der Qualität des Kapillarschnittes. Die

Elektrolytlösung kann eine höhere oder niedrigere Konzentration aufweisen als die zugehörigen Elektrodenkompartimente. Dies führt zu einem positiven oder negativen Drift der Basislinie [Colyer et al., 1995; Colyer und Oldham, 1995]. Temperatureffekte (Joulesche Wärme, Verdunstung) mit dem Resultat einer Änderung der Viskosität führen zu einer Änderung des elektroosmotischen Flusses und somit der Basislinienstabilität.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Jedes Polyphenol hat unter Berücksichtigung von pH-Wert, Puffer und Trennsystem ein unterschiedliches Oxidationspotential. Bei der elektrophoretischen Trennung von Polyphenolgemischen mittels Amperometrie ist nur ein Elektrodenpotential verwendbar. Somit unterscheiden sich die getesteten Polyphenole bezüglich der Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenze (Tab. 30). Beispielsweise unterscheiden sich Brenzkatechin und Resorcin lediglich in der Positionierung einer Hydroxylgruppe in ortho- oder para-Stellung. Die Nachweisgrenze liegt bei Resorcin um den Faktor 4000 höher. Wahrscheinlich ist die fehlende elektrochemische Oxidation zum Chinon die Ursache. Die Nachweisgrenze von Dopamin und Brenzkatechin stimmen weitestgehend mit den bei Henry et al. (1999) gemachten Untersuchungen auf einem LTCC-Keramikchip mit externen Platinkontakten überein. Gründe für die hohen Nachweisgrenzen von 5 mM bis 10 mM für Quercetin, Resveratrol und Kaffeesäure wurden bereits in Kapitel V.4.5.2. erläutert.

Zum Vergleich mit anderen kapillarelektrophoretischen Trennsystemen auf Basis elektrochemischer Detektion sind die Mobilitäten der getesteten Substanzen notwendig. Die Migrationszeit lässt sich einfach ermitteln, kann aber auf Grund unterschiedlicher Trennlängen nicht zum Vergleich mit anderen Trennsystemen herangezogen werden (Abb. 155). Unter Berücksichtigung der effektiven Trennstrecke und der angelegten Trennungsspannung wird die Wanderungsgeschwindigkeit (Abb. 156) und die effektive elektrophoretische Mobilität ermittelt (Abb. 157). Die Mobilitäten der Polyphenole sind von grundlegenden Faktoren wie etwa der Ladung des Moleküls abhängig. Dopamin ist positiv geladen und wird schneller zur Kathode transportiert als Gallussäure mit einer negativ geladenen Carboxylgruppe. Somit besitzen die negativ geladenen Moleküle Quercetin und Kaffeesäure mit $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ eine etwa 60 % niedrigere effektive elektrophoretische Mobilität als Dopamin (Tab. 40). Wie bereits in Kapitel V.4.5.2.2. erwähnt, ist die Adsorption an der Kapillarwand ein weiterer Grund für unterschiedliche Mobilitäten. Ebenso sind Oxidationsprozesse an der Arbeitselektrode möglich, die zum Elektroden-Fouling und somit verminderter Signalstärke führen. Änderungen in der Probenzonierung aufgrund von pH- oder Ionengradienten sind ebenfalls möglich.

V.4.5.6. Trennung und amperometrische Detektion von Polyphenolgemischen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich einzelne Polyphenole amperometrisch detektieren und auf Grund ihrer unterschiedlichen Migrationszeiten trennen lassen. Dies sollte auch mit Polyphenolgemischen durchgeführt werden. Dazu wurden zunächst zwei Substanzen amperometrisch detektiert (Abb. 158 und Abb. 159) und auf Grund vorheriger Einzelbestimmungen ausgewertet. Dabei wurde eine Verringerung der Migrationszeiten bei Verwendung im Substanzgemisch beobachtet. Verglichen mit Einzelmessungen verringerte sich die Migrationszeit bei Dopamin im Substanzgemisch um etwa 10 %, bei Pyrogallol um etwa 3,5 %. Eine kürzere Migrationszeit ist das Ergebnis eines schnelleren elektroosmotischen Flusses. Mögliche Ursachen wie beispielsweise eine gerätebedingte Abweichung der effektiven Hochspannung wurden bereits in Kapitel V.4.5.3. erläutert. Verglichen mit vorherigen Einzelmessungen führte die amperometrische Detektion von Dopamin und Pyrogallol ebenfalls zu einer Verringerung der Migrationszeit. Wahrscheinlich ist der Grund dafür die Positionierung der Arbeitselektrode. Zwischen Arbeitselektrode und Kapillarausgang wurden bei den Prototypen der LTCC-Keramikchips Abstände von etwa 60 bis 100 μm gemessen. Wird die Arbeitselektrode näher an den Kapillarausgang positioniert, verringern sich Diffusionsprozesse, die zur Bandenverbreiterung beitragen. Die verwendeten LTCC-Keramikchips für die kapillarelektrophoretische Trennung von Polyphenolgemischen besaßen einen Abstand zwischen Arbeitselektrode und Kapillarausgang von etwa 80 μm . Bei den in Kapitel V.4.5.3. aufgezeigten Einzelmessungen betrug der Abstand etwa 100 μm . Der Grund für den unterschiedlichen Elektrodenabstand liegt im Herstellungsprozess der Elektroden, der somit zu einer Veränderung der Migrationszeit beiträgt. Für elektrochemische Detektionen ist eine genau definierte Fläche der Arbeitselektrode erforderlich. Dazu wurden die Elektrodenfläche der amperometrischen Detektionseinheit mit einer Glaskeramik auf eine definierte Fläche begrenzt. Diese Begrenzung lässt sich momentan nur in großem Abstand zum Kapillarausgang herstellen (persönliche Mitteilung H. Axthelm, VIAelectronic].

Die amperometrische Trennung eines Polyphenolgemisches mit drei Substanzen wurde zunächst mit Dopamin, Brenzkatechin und Pyrogallol durchgeführt (Abb. 160). Auf Grund der nahezu identischen Wanderungsgeschwindigkeit von Pyrogallol ($2,8 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) und Brenzkatechin ($3,0 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) wurde für beide Substanzen nur ein Signalpeak beobachtet. Mögliche Ursachen wurden in den vorherigen Kapitel diskutiert. Eine Änderung der Konzentration der getesteten Polyphenole führte zu keiner signifikanten Verbesserung der

Trenneffizienz. Somit wurde Brenzkatechin gegen Gallussäure ausgetauscht (Abb. 161). Die Einzelkomponenten des aus Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure bestehenden Polyphenolgemisches konnten amperometrisch detektiert und aufgrund ihrer Migrationszeiten bestimmt werden. Verglichen mit einer Schaltung der Injektionskontakte auf 80 % der Trennungsspannung wurden bei hochohmiger Schaltung die besten Trennungen erreicht (Abb. 161 und Abb. 162). Die Gründe dafür wurden bereits in Kapitel V.4.5. erläutert. Die Verwendung des Hochspannungsnetzgerätes der Fa. VIAelectronic führte bei hochohmiger Schaltung der Injektionskontakte zu einer geringeren Signalhöhe von 36 % (Dopamin), 38 % (Gallussäure) und 45 % (Pyrogallol). Bei einer Schaltung auf 80 % der angelegten Trennungsspannung wurden lediglich längere Migrationszeiten beobachtet. Mögliche Ursachen wie beispielsweise unterschiedliche Potentialgradienten wurden bereits in Kapitel V.4.5.3. aufgezeigt.

Die Analyse von Phenolderivaten wird überwiegend mit der Laser induzierte Fluoreszenz auf Basis einer Kapillarzonenelektrophorese durchgeführt [Suntornsuk et al., 2003; Demianova et al., 2003; Sterbova et al., 2006]. Eine weitere Methode in der Phenolanalytik ist die elektrochemische Detektion [Peng et al., 2005]. Die Amperometrie als Teilgebiet der elektrochemischen Analyse besitzt zwar einen einfachen und leicht zu miniaturisierenden Aufbau, benötigt zur Analyse jedoch elektroaktive Substanzen. Polyphenole sind elektroaktive Substanzen, die allerdings unterschiedliche Redoxpotentiale aufweisen. Bei einer amperometrischen Messung wird nur ein konstantes Elektrodenpotential verwendet. Eine optimale elektrochemische Detektion der einzelnen Probenbestandteil ist somit nicht möglich. Mit Hilfe der LTCC-Keramikchips war eine amperometrische Detektion von bis zu drei Polyphenolen in Gemischen möglich. Dabei wurde eine Nachweisgrenze von 10^{-4} bis 10^{-6} M ermittelt. Verglichen mit amperometrischen Trennsystem auf Basis von fused-silica Kapillaren wurde ein um den Faktor 100 geringere Nachweisgrenze erreicht. Die Gründe dafür wurden bereits ausführlich in Kapitel V.4. erläutert. Weiter wurden eine geringe Trenneffizienz, schwankende Detektionszeiten und die Begrenzung der Signalhöhe bei elektrokinetischer Schaltung der Hochspannungskontakte beobachtet. Konstruktionsbedingte Effekte wie beispielsweise die Positionierung der Arbeitselektrode oder die Wandstrukturen der Kapillaren im Kreuzungsbereich wären mögliche Ursachen.

VI. Zusammenfassung und Ausblick

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines LTCC-Mikrochips als kapillarelektrophoretisches Trennsystem für „Lab-on-a-chip“-Applikationen.

Es ist gelungen, innerhalb eines Verbundprojektes eine Apparatur zu konstruieren, mit deren Hilfe sich elektroaktive Substanzen nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung in LTCC-Mikrochips amperometrisch detektieren lassen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Gemische von bis zu drei Polyphenolen elektrochemisch detektiert und auf Grund ihrer Migrationszeiten trennbar sind.

Ein fundamentales Problem der Untersuchungen war die Entwicklung eines geeigneten Befüllungssystems für die Kapillaren. Dies war nötig, um Modifikationen der inneren Oberfläche zu ermöglichen. NanoPorts™, die durch ein spezielles Klebe- und Klemmsystem über den Reservoirs positioniert wurden, waren für eine blasenfreie Befüllungen der Kapillaren am besten geeignet.

Der Haupttransportmechanismus der Kapillarzonenelektrophorese ist der elektroosmotische Fluss. Dieses von der Oberflächenladung und -struktur abhängige elektrophoretische Phänomen machte es notwendig, Kapillaren so zu modifizieren, dass stabile, reproduzierbare Messungen durchgeführt werden konnten. Dies wurde durch ein Inkubationsprotokoll mit Kaliumhydroxid erreicht. Dabei war die Herstellung der Detektoreinheit als 2-Elektrodensystem auf Basis einer Glaskeramik zu berücksichtigen. Modifikationen zur Erhöhung des elektroosmotischen Flusses auf Grund der Zunahme an Oberflächenladungen führten zu einer Abnahme des Messsignals. Eine veränderte Befüllungstechnik bewirkte eine Funktionalisierung der Kapillaroberfläche mit Carboxylgruppen. Dadurch wurden ebenfalls die Messelektroden beschichtet, was zu einer erheblichen Abnahme des Messsignals führte. Da dies auf Grund der Chipgeometrie nicht vermieden werden konnte, wurden diese Prozesse nicht weiter verfolgt.

Erste Messungen mit den LTCC-Mikrochips zeigten, dass Polyphenole getrennt werden konnten. Verglichen mit einem publizierten LTCC-System (Henry et. al., 1999) waren die Standardabweichung der berechneten Migrationszeiten und effektiven elektrophoretischen Geschwindigkeiten etwa 7 bis 10 % größer. Ein weiterer Nachteil waren die großen Peakbreiten.

Diese Nachteile können zahlreiche Ursachen besitzen:

1) Aufgrund der Laminierung lässt sich die Arbeitselektrode nicht genau vor den Kapillarausgang positionieren. Schrumpfungseffekte können diesen Prozess verstärken. Ist die Elektrode zu nah an dem Ausgang positioniert, kommt es zu Fluktuationen in der Trennungsspannung und zu einer Abnahme der Sensitivität. Andererseits führt ein zu großer Abstand zu Diffusionseffekten, die ebenfalls zur Bandenverbreiterung beitragen. Abhilfe schafft hier möglicherweise eine neue Sinter-Technologie, bei der die Schrumpfung einen geringen Einfluss auf dreidimensionale Strukturen besitzt. Eine andere Lösungsansatz wäre die Integration der elektrochemischen Messeinheit in den Kanal. Eine Entkopplung des angelegten elektrischen Feldes wäre durch den Einbau eines Platin-Entkopplers möglich.

2) Eine andere Möglichkeit für die geringere Trenneffizienz ist die Größe der Probenzone. Durch die Konstruktion eines speziell auf μ TAS-Anwendungen angepassten Hochspannungsnetzgerätes wurde die elektrokinetische Injektion so modifiziert, dass nur wenige Nanoliter der Probenlösung benötigt wurden. Dennoch wurden eine Bandenverbreiterung und eine geringe Auflösung der Peaks beobachtet. Bei der pinched-Injektion kann ein langsames Umschalten der angelegten Potentiale zu einer großen Probenzone führen. Die Probe ist dann nicht in diskreten, genau definierten Zonen geschichtet. Dies ist wahrscheinlich auf konstruktionsbedingte Effekte zurückzuführen, die ein Nachlaufen der Probenlösung aus den Seitenkapillaren bewirken.

Mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Kanten im Kreuzungsbereich der Kapillaren stark abgerundet waren. Eine exakte Potentialtrennung ist dadurch zwischen den einzelnen Kapillaren nicht mehr möglich. Durch das mechanische Stanzen der Kapillaren kommt es zu unebenen Wandstrukturen nach Laminierung und Sintern besonders in der Kreuzungszone. Dies kann auch zu einer Beeinflussung des elektroosmotischen Flusses führen. Durch den Einsatz neuer Lasertechnik (Neodym:YAB-Laser) sollten diese Inhomogenitäten ausgeschlossen werden.

Die Proben wurden durch eine elektrokinetische Methode injiziert und amperometrisch detektiert. Die Nachweisgrenze lag je nach Polyphenol zwischen 12,5 μ mol und 100 mM. Obwohl Bandenverbreiterung zu einer Abnahme der Trenneffizienz führt, konnte ein Gemisch aus Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure in LTCC-Mikrochips eindeutig getrennt und amperometrisch detektiert werden. Migrationszeit und -geschwindigkeit waren mit den Einzelmessungen vergleichbar. Ebenso Höhe und Breite der Peaks.

Für die Detektion von Polyphenolen in matrixreichen Realproben ist eine höhere Spezifität erforderlich. Um dies zu erreichen, wurden Versuche zur Integration phenoxidierender Enzyme in das mikrofluidische Trennsystem durchgeführt. Dabei wurden Modellsysteme erarbeitet, die für eine spätere Immobilisierung auf einer Goldelektrode dienen. Die Überprüfung der Funktionalität immobilisierter Enzyme erfolgte photometrisch mittels geeigneter Substrate.

Je nach Enzym waren unterschiedliche Oberflächen geeignet, diese so zu immobilisieren, dass keine Beeinflussung der Bindungstasche vorlag. Bei der Immobilisierung auf nicht funktionalisierten Goldträgern wurden teilweise die höchsten Absorptionen gemessen. Dabei ist jedoch die Stabilität der Bindung, insbesondere im Hinblick auf die Verwendung in einem Durchflusssystem, zu berücksichtigen. Die anschließende photometrische Überprüfung der Enzymaktivität mit Hilfe eines Farbausays war bei allen Immobilisierungsmethoden anwendbar.

LTCC ist als Material für die Entwicklung von „Lab-on-a-chip“-Anwendungen prinzipiell geeignet. Die zu Glas vergleichbaren Eigenschaften, wesentlich kostengünstigere und einfachere Herstellung machen diese niedrig sinternde Keramik zu einem idealen Ersatz bestehender Mikrochip-Applikationen. Die durchgeführten Versuche waren vielversprechend. Änderungen in der Herstellung und Konstruktion der LTCC-Mikrochips sollten zur Minimierung der erwähnten Nachteile führen. Der Absatzmarkt in der medizinischen und pharmazeutischen Industrie ist enorm und der Bedarf an kleinen, transportablen Analysengeräte mit einfacher Bedienung wird in den kommenden Jahren weiter zunehmen.

VII. Literaturverzeichnis

Alarie, J.P., Jacobson, S.C., Culbertson, C.T., Ramsey, J.M. "Effects of the electric field distribution on microchip valving performance", *Electrophoresis*, **21**, 100-106 (2000)

Andrade, J.D. "Protein adsorption, surface and interfacial aspects of biomedical polymers, *New York, Plenum Press, Vol. 2*, 1-88 (1985)

Arce, L., Rios, A., Valcárcel, M. "Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system", *Journal of Chromatography A*, **827**, 113-120 (1998)

Arundell, M., Whalley, P.D., Manz, A. "Indirect fluorescence detection of phenolic compounds by capillary electrophoresis on a glass device", *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, **367**, 686-691 (2000)

Auroux, P.A., Iossifidis, D., Reyes, D.R., Manz, A. "Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications", *Analytical Chemistry*, **74**, 2637-2652 (2002)

Bain, C.D., Troughton, E.B., Tao, Y.T., Evall, J., Whitesides, G.M., Nuzzo, R.G. "Formation of Monolayer Films by Spontaneous Assembly of Organic Thiols", *Journal of the American Chemical Society*, **111**, 321-335 (1989)

Baiocco, P., Barecca, A. M., Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. "Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems", *Organic Biomolecular Chemistry*, **1**, 191-197 (2003)

Beckmann "Introduction to Capillary Electrophoresis", Publication No. 360643, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA (1991)

Belitz, H.D. und Grosch, W. "Lehrbuch der Lebensmittelchemie", 4. überarbeitete Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 239-245 (1992)

Boehme, T. "Pulsuntersuchungen an Ag/AgCl-Polymerelektroden in wässrigen Elektrolyten im Frequenzbereich 1Hz bis 1000Hz", Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2001)

Boer, G., Dodge, A., Flurri, K., van der Schoot, B.H., Verpoorte, E., de Rooij, N.F. "Studies of Hydrostatic Pressure Effects in Electrokinetically Driven μ TAS", Micro Total Analysis Systems '98, Banff, Alberta, Kanada 1998, Kluiver Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande 406S. (1998)

Bohlin, M.E., Blomberg, L.G., Heegaard, N.H.H. "Utilizing the pH hysteresis effect for versatile and simple electrophoretic analysis of proteins in bare fused-silica capillaries", *Electrophoresis*, **26**, 4043-4049 (2005)

Bourbonnais, R., Paice, M.G. "Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation", *Federation of European Biochemical Societies*, **267(1)**, 99-102 (1990)

Brett, A.M.O., Ghica, M.E. "Electrochemical Oxidation of Quercetin", *Electroanalysis*, **15(22)**, 1745-1750 (2003).

Buchberger, W. "Elektrochemische Analysenverfahren: Grundlagen, Instrumentation, Anwendungen", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 306S. (1998)

Buswell, J. A., Odier, E. "Lignin degradation", *Critical Reviews in Biotechnology*, **6**, 1-60, (1987)

Ceramtec, Informationen zu niedrig sinternden Keramiken, www.ceramtec.com

Chang, H.T., Yeung, E. "Self-Regulating Dynamic Control of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, **65**, 650-652 (1993)

Childs, R.E., Bardsley, W.E. "The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenziazoline-6-sulfonic acid) as chromogen", *Journal of Biochemistry*, **145**, 163-202 (1975)

-
- Cohen, N., Grushka, E. "Influence of the capillary edge on the separation efficiency in capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, **684**(2), 323-328 (1994)
- Colyer, C.L., Oldham, K.B., Sokirko, A.V. "Electroosmotically Transported Baseline Perturbations in Capillary Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, **67**, 3234-3245 (1995)
- Colyer, C.L., Oldham, K.B. "Emersion peaks in capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, **716**, 3-15 (1995)
- Corduneanu, O., Janeiro, P., Brett, A.M.O. "On the Electrochemical Oxidation of Resveratrol", *Electroanalysis*, Accepted February 2006, In Press (2006)
- Crabtree, H.J., Cheong, E.C.S, Tilroe, D.A., Backhouse, C.J. "Microchip Injection and Separation Anomalies Due to Pressure Effects", *Analytical Chemistry*, **73**, 4079-4086 (2001)
- Demianova, Z., Siren, H., Kuldvee, R., Riekkola, M.L. "Nonaqueous capillary electrophoretic separation of polyphenolic compounds in wine using coated capillaries at high pH in methanol", *Electrophoresis*, **24**, 4264-4272 (2003)
- Diamandis, E.P., Christopoulos, T.K. "Immunoassay", Academic Press, San Diego, 579 p. (1996)
- DuPont, Dateninformationsblatt zu 951 Green Tape™, www.dupont.com
- Eggins, B.R. "Biosensors: an introduction", Teubner, Stuttgart, 224 S. (1996)
- Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T. "Kapillarelektrophorese", vieweg Verlagsgesellschaft mbH, 206 S. (1994)
- Everaerts, F.M., Beckers, J.L., Verheggen, M. "Isotachopheresis: Theory, Instruments and Applications", Elsevier-Verlag, 432 S. (1976)
- Exl, F., Kindersberger, J. "Messung an Tropfenrandwinkeln auf Isolieroberflächen", ETG-Fachbericht 97, VDE-Verlag GmbH Berlin, Offenbach, 67-72 (2004)

Fakoussa R.M., Frost, P.J. "In vivo-decolorisation of coal-derived humic acids by laccase secreting fungus *Trametes versicolor*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**, 60-65 (1999)

Foster, M.W. "Surface plasmon resonance sensor and methods for utilization thereof", United States Patent 5485277

Fujiwara, S., Honda, S. "Effect of Addition of Organic Solvent on the Separation of Positional Isomers in High-Voltage Capillary Zone Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, **59**, 487-490 (1987)

Galhaup, C. "Kupfer induzierte Laccasen aus *Trametes pubescens*", Dissertation, Institut für Lebensmitteltechnologie der Universität für Bodenkultur Wien, 2001

Giacomelli, C., Ckless, K., Galato, D., Miranda, F.S., Spinelli, A. "Electrochemistry of Caffeic Acid Aqueous Solutions with pH 2.0 to 8.5", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **3**, 332-338 (2002)

Giddings, J.C. "A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities" *Separation Science and Technology*, **1**, 123-125 (1966)

Giz, M.J., Tao, N.J. "In situ STM study of self-assembled mercaptopropionic acid monolayers for electrochemical detection of dopamine", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **465**, 72-79 (1999)

Golonka, L.J., Roguszczak, H., Zawada, T., Radojewski, J., Grabowska, I., Chudy, M., Dybko, A., Brzozka, Z., Stadnik, D. "LTCC based microfluidic system with optical detection", *Sensors and Actuators B*, **111-112**, 396-402 (2005)

Gooding, J.J., Hibbert, D.B. "Immobilisation of enzyme throughout a polytryamine matrix: a versatile procedure for fabricating biosensors", *Analytica Chimica Acta*, **394**, 211-223 (1999)

Green, R.J., Davies, M.C., Roberts C.J., Tendler, S.J.B. "Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance", *Biomaterials*, **20**, 385-391 (1999)

Green, R.J., Frazier, R.A., Shakesheff, K.M., Davies, M.C., Roberts C.J., Tendler, S.J.B. "Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials", *Biomaterials*, **21**, 1823-1835 (2000)

Guilbault, G.G. "Enzyme electrode probes", *Methods in Enzymology*, **137**, 14-29 (1988)

Gupta, G., Rajendran, V., Atanassov, P. "Bioelectrocatalysis of Oxygen Reduction Reaction by Laccase on Gold Electrodes", *Electroanalysis*, **16 (13-14)**, 1182-1185 (2004)

Haase, H.-J. "Praxis der Elektroanalytischen Messtechnik", Books on demand GmbH, 292 S. (2002)

Hale, J.E. "Irreversible, oriented immobilization of antibodies to cobalt-iminodiacetate resin for us as immunoaffinity media", *Analytical Biochemistry*, **231 (1)**, 46-49, (1995)

Hartmann, M. "Neue Ansätze in der biomolekularen Interaktionsanalyse unter besonderer Berücksichtigung pharmazeutischer und lebensmittelchemischer Fragestellungen", Dissertation, Institut für Pharmazeutische Biologie, Bonn (2004)

Henry, C.S, Zhong, M., Lunte, S.M., Kim, M., Bau, H., Santiago, J.J. "Ceramic microchips for capillary electrophoresis-electrochemistry", *Analytical Communications*, **36**, 305-307 (1999)

Hilmi, A., Luong, J.H.T, Nguyen, A.L. "Capillary electrophoretic separation of chlorophenols using amperometric detection", *Journal of Chromatography A*, **761**, 259-268 (1997)

Hjerten, S. "Free zone electrophoresis", *Chromatography Review*, **9**, 122-219

Höbel, J. "Spektralaufgelöste laserinduzierte Fluoreszenz-Detektion mit abstimmbarer UV-Strahlung in der Kapillarzonenelektrophorese", Dissertation, Fakultät für Physik der Universität Bielefeld (1998)

Homola, J., Sinclair, S., Yee, Gauglitz, G. "Surface plasmon resonance sensors: review" *Sensors and Actuators B*, **54**, 3-15 (1999)

Huang, X., Zare, R.N., Sloss, S., Ewing, A.G. "End-Column Detection for Capillary Zone Electrophoresis", *Analytical Chemistry*, **63**, 189-192 (1991)

Hyung, K.H., Jun, K.Y., Hong, H.G., Kim, H.S., Shin, W. "Immobilization of Laccase onto the Gold Electrode Using β -Mercaptopropionate", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **18(6)**, 564-566 (1997)

Institut für Experimentelle Physik der Humboldts-Universität zu Berlin, www.hu-berlin.de

Jacobson S.C., Hergenröder R., Koutny L.B., Ramsey J.M. "High Speed Separations on a Microchip", *Analytical Chemistry*, **66**, 1114 (1994).

Janeway, C.A., Travers, P. "Immunologie", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 634S. (1995)

Johannes, C., Majcherczyk, A. "Laccase activity tests and laccase inhibitors", *Journal of Biotechnology*, **78(2)**, 193-199 (2000)

Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. "Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries", *Analytical Chemistry*, **59**, 1298-1302

Kappes, T., Hauser, P.C. "Recent developments in electrochemical detection methods for capillary electrophoresis", *Electroanalysis*, **12 (3)**, 165-170 (2000)

Keusgen, M. "Biosensorische Methoden zur Quantitativen Bestimmung von Cysteinsulfoxiden", Shaker Verlag, Aachen, 152 S. (1999)

Keusgen, M. "Biosensors: new approaches in drug discovery", *Naturwissenschaften*, **89**, 433-444 (2002)

Kohlrausch, F. "Ueber Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen", *Annals of Physics*, **62**, 209-239 (1897)

-
- Koroljova-Skorobogat'ka, O.V., Stepanova, E.V., Gavrilova, V.P., Morozova, O.V., Lubimova, N.V., Dzachafarova, A.D., Jaropolov, A.I., Makower, A. "Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **28**, 47-54 (1998)
- Kretschmann, E., Raether, H. "Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light", *Zeitschrift für Naturforschung Teil A*, **23**, 2135-2136 (1968)
- Kuhn, R. "Kapillarelektrophorese", *Analytiker-Taschenbuch*, Bd. 13, 79 S., Springer-Verlag (1995)
- Kulke, R., Simon, W., Günner, C., Möllenbeck, G., Köther, D., Rittweger, M. "Vergleichstest verlustarmer LTCC-Systeme bis 40 GHz", *Fachzeitschrift PLUS: Produktion von Leiterbahnen und Systemen*, 1407-1415 (2003)
- Lacher, N.A., Lunte, S.M. "Development of a Microfabricated Palladium Decoupler/Electrochemical Detector for Microchip Capillary Electrophoresis Using a Hybrid Glass/Polydimethylsiloxane Device", *Analytical Chemistry*, **76**, 2482-2491 (2004)
- Lambert, W.J., Middleton, D.L. "pH Hysteresis Effect with Silica Capillaries in Capillary Zone Electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, **62**, 1585-1587 (1990)
- Lee, M.T., Hsueh, C.C., Freund, M.S., Ferguson, G.S. "Air oxidation of Self-Assembled Monolayers on Polycrystalline Gold: The Role of the Gold Substrate", *Langmuir*, **14**, 6419-6423 (1998)
- Lee, S.J., Lee, S.Y. "Micro total analysis system (μ -TAS) in biotechnology", *Applied Microbiological Biotechnology*, **64**, 289-299 (2004)
- Liedberg, B., Nylander, C., Lundström, I. "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing", *Sensors and Actuators*, **4 (2)**, 299-304 (1983)

Lin, C.H., Yang, R.J., Tai, C.H., Lee, C.Y., Fu, L.M. "Double-L injection technique for high performance capillary electrophoresis detection in microfluidic chips", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **14**, 639-616 (2004)

Llanos, G.R., Sefton, M.V. "Does polyethylene oxide possess a low thrombogenicity", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **4**, 381-400 (1993)

Lottspeich, F., Zorbas, H. "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1035 S. (1998)

Manz, A., Harrison, D.J., Verpoorte, E.M.J., Fellingner, J.C., Paulus, A., Ldi, H., Widmer, H.M. "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip", *Journal of Chromatography*, **593**, 253-258 (1992)

Marti, O., Plettl, A. "Physikalische Elektronik und Messtechnik", Vorlesungsskript, 218 S., Institut für Physik der Universität Ulm (2006)

Martin, R.S., Ratzlaff, K.L., Huynh, B.H., Lunte, S.M. "In-Channel Electrochemical Detection for Microchip Capillary Electrophoresis Using an Electrically Isolated Potentiostat", *Analytical Chemistry*, **74**, 1136-1143 (2002)

Messerschmidt, A. "Spatial structures of ascorbate oxidase, laccase and related proteins: implication for catalytic mechanism", *Multicopper Oxidases*, World Scientific, Singapore, 23-80 (1997)

Milka, P., Krest, I. and Keusgen, M. "Immobilization of alliinase on porous aluminium oxide", *Biotechnology and Bioengineering*, **69 (3)**, 344-348 (2000)

Moane, S., Park, S., Lunte, C.E., Smyth, M.R. "Detection of phenolic acids in beverages by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *The Analyst*, **123**, 1931-1936 (1998)

Mrksich, M., Whitesides, G.M. "Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells", *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **25**, 55-78 (1996)

Nasr, B., Abdellatif, G., Canizares, P., Saez, C., Lobato, J., Rodrigo, M.A. "Electrochemical Oxidation of Hydroquinone, Resorcinol and Catechol on Boron-Doped Diamond Anodes", *Environmental Science & Technology*, **39**, 7234-7239 (2005)

Niebuhr, J., Lindner, G. "Physikalische Messtechnik mit Sensoren", 5. Auflage, 492 S. Oldenbourg Industrieverlag GmbH (2002)

Nishi, H., Tsumagari, N., Terabe, S. "Effect of tetraalkylammonium salts on micellar electrokinetic chromatography of ionic substances", *Analytical Chemistry*, **61**, 2434-2439 (1989)

O'Shannessy, D.J., Burke, M.B., Soneson, K.K., Hensley, P., Brooks, I. "Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods", *Analytical biochemistry*, **212**, 457-468 (1993)

Otto, A. "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection", *Zeitschrift für Physik*, **216 (4)**, 398-410 (1968)

Peng, Y., Liu, F., Ye, J. "Determination of Phenolic Acids and Flavones in *Lonicera japonica* Thumb. by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection", *Electroanalysis*, **17(4)**, 356-362 (2004)

Persönliche Mitteilungen von Axthelm, H., VIAelectronic (2005)

Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B., Gauglitz, G. "A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces", *Biosensors & Bioelectronics*, **15**, 473-481 (2000)

Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T. "Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers", *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (48), 37663-37669 (2002)

Popat, K.C., Desai, T.A. "Poly(ethylene glycol) interfaces: An approach for enhanced performance of microfluidic systems", *Biosensors and Bioelectronics*, **19**(9), 1037-1040 (2004)

Poppe, H. "Overloading and Interaction Phenomena in Electrophoretic Separations", *Analytical Chemistry*, **64**, 1908-1919 (1992)

Poirier, G.E., Pylant, E.D. "The Self-Assembly Mechanism of Alkanthiols on Au(111)", *Science*, **272**, 1145-1148 (1996)

Quan, D., Kim, Y., Yoon, K.B., Shin, W. "Assembly of Laccase over Platinum Oxide Surface and Application as an Amperometric Biosensor", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **23**(3), 385-390, 2002

Ramsden, J.J. "Puzzles and paradoxes in protein adsorption", *Chemical Society Reviews*, 73-78 (1995)

Rechner, A. "Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die Polyphenole und antioxidative Kapazität von Apfel- und Beerenobstsäften", Dissertation, Institut für Oenologie und Getränkeforschung, Forschungsanstalt Geisenheim (2000)

Reinhammar B., Malmström, B.G. "Blue" copper-containing oxidases.", *Copper proteins (Metal ions in biology 3)*, Wiley-Liss, New York, 109-149 (1981)

Ren, L., Li, D. "Theoretical Studies of Microfluidic Dispensing Processes", *Journal of Colloid and Interface Science*, **254**, 384-395 (2002)

Roberts, M.J., Bentley, M.D., Harris, J.M. "Chemistry for peptide and protein PEGylation", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**, 459-476 (2002)

Römpp-Lexikon Chemie, Band 4 M-Pk, 10. völlig überarbeitete Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 3253 (1997)

Sadana, A. "Protein Adsorption and Inactivation on Surfaces. Influence and Heterogeneities", *Chemical Reviews*, **92**, 1799-1818 (1992)

Salomon, K., Burgi, D.S., Helmer, J.C. "Evaluation of Fundamental Properties of a Silica Capillary Used for Capillary Electrophoresis", *Journal of Chromatography*, **559**, 69-80 (1991)

Salvato, B., Beltramini, M. "Hemocyanin: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site.", *Life Chemistry Report*, **8**, 1-47 (1990)

Schwarz, M.A., Galliker, B., Fluri, K., Kappes, T., Hauser, P.C. "A two-electrode configuration for simplified amperometric detection in a microfabricated electrophoretic separation device.", *Analyst*, **126**, 147-151 (2001)

Schröter, W., Lautenschläger, K.H., Bibrack, H. "Taschenbuch der Chemie", Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt, 676 S. (1990)

Skoog, A., Leary, J. "Instrumentelle Analytik", Springer-Verlag, 898 S. (1996)

Slack, S.M., Horbett, T.A. "The Vroman effect – a critical review.", *American Chemical Society, Symposium Series*, **602**, 112-128 (1995)

Slater, J.C. "The current state of solid-state and molecular theory", *International Journal of Quantum Chemistry*, **1(1)**, 37-102 (1967)

Solná, R., Skládal, P. "Amperometric Flow-Injection Determination of Phenolic Compounds Using a Biosensor with Immobilized Laccase, Peroxidase and Tyrosinase", *Electroanalysis*, **17 (23)**, 2137-2146 (2005)

Solomon, E.I., Lowery, M.D. "Electronic Structure Contributions to Function in Bioinorganic Chemistry", *Science*, **259**, 1575-1581 (1993)

Sterbova, D., Vlcek, J., Kuban, V. "Capillary zone electrophoresis determination of phenolic compounds in chess (*Bromus inermis* L.) plant extracts", *Journal of Separation Science*, **29**, 308-313 (2006)

Stradiotto, N.R., Yamanaka, H., Zanoni, M.V.B. "Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14(2)**, 159-173 (2003)

Suntornsuk, L., Kasemsook, S., Wongyai, S. "Quantitative analysis of aglycone quercetin in mulberry leaves (*Morus alba* L.) by capillary zone electrophoresis", *Electrophoresis*, **24**, 1236-1241 (2003)

Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T. "Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries", *Analytical Chemistry*, **56**, S.111 (1984)

Tosatti, S. "Selbstorganisierte Monoschichten (SAM) von Alkanthiolen auf Goldoberflächen mit hoher spezifischer Oberfläche", Diplomarbeit, Laboratory for Surface Science and Technology, ETH Zürich, 1999

Tran, A.D., Park, S., List, P.J., Huynh, O.T., Ryan, R.R., Lane, P.A. "Separation of Carbohydrate-mediated Microheterogeneity of Recombinant Human Erythropoietin by Free Solution Capillary Electrophoresis. Effects of pH, Buffer, Type and Organic Additives", *Journal of Chromatography*, **542**, 459 (1991)

Tsuda, T., Nomura, K., Nakagawa, G. "Separation of organic and metal ions by high-voltage capillary electrophoresis", *Journal of Chromatography*, **264**, 385-390 (1983)

Turkova, J. "Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and functions", *Journal of Chromatography B*, **722**, 11-31 (1999)

Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S. "Biosensors: Fundamentals and Applications", Oxford University Press, Oxford, 770 p. (1987)

Vogel, W. "Glas Chemie", Springer-Verlag Berlin, 292 S. (1992)

Volpi, N. "Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis", *Electrophoresis*, **25**, 1872-1878 (2004)

Wätzig, H., Günter, S. "Capillary Electrophoresis-A High Performance Analytical Separation Technique", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **41(6)**, 724-738 (2003)

Wagner, M. "Prozessparameter und ihr Einfluss auf die Schwindungsgenauigkeit von hochintegrierten keramischen Mehrlagenschaltungen", Dissertation, Technische Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg (2004)

Wallenborg, S.R., Nyholm, L., Lunte, C.E. "End-Column Amperometric Detection in Capillary Electrophoresis: Influence of Separation-Related Parameters on the Observed Half-Wave Potential for Dopamine and Catechol", *Analytical Chemistry*, **71**, 544-549 (1999)

Weast, R.C. "Handbook of Chemistry and Physics", Verlag CRC Press, Inc. Boca Raton, 67. Edition, Florida (1987)

Weetall, H.H. "Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **41**, 157-188 (1993)

Wilke, S. "Zum Ionentransfer an der Grenzfläche wenig mischbarer Elektrolytlösungen und dessen analytischer Anwendungen", Habilitationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002)

Woolley, A.T., Mathies, R.A. "Ultra-High-Speed DNA Fragment Separations Using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chips", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 11348-11352 (1994)

Wu, J.T. "Quantitative immunoassay: A practical guide for assay establishment, troubleshooting and clinical application", American Association for Clinical Chemistry, Inc., Washington, 255 p. (2000)

Xue, Y., Yeung, E.S. "Characterization of Band Broadening in Capillary Electrophoresis due to Nonuniform Capillary Geometries", *Analytical Chemistry*, **64**, 3575-3580 (1994)

Yariv, S. "Thermo-IR-spectroscopy analysis of the interactions between organic pollutants and clay minerals ", *Termochimica Acta*, **274**, 1-35 (1996)

Zynio, S.A., Samoylov, A.V., Surovtseva, E.R., Mirsky, V.M., Shirshov, Y.M. "Bimetallic layers increase sensitivity of affinity sensors based on surface plasmon resonance", *Sensors*, **2**, 62-70 (2002)

VIII. Tabellenanhang

Laccase aus <i>Agaricus bisporus</i>			
Beschichtungsmethode	Δ Signal Messung 1	Δ Signal Messung 2	Δ Signal Messung 3
ohne Funktionalisierung, BSA geblockt	8	9	9
ohne Funktionalisierung	50	53	49
Mercaptopropionsäure, NHS aktiviert	26	26	29
Mercaptopropionsäure, nicht NHS aktiviert	32	23	21
APTES	46	41	31
Diamino-Polyethylenglykol	17	21	21

Tabelle 43: Einzelwerte der Bindungsdaten der Versuche zur Immobilisierung der Laccase aus *Agaricus bisporus* auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen.

Laccase aus <i>Trametes versicolor</i>			
Beschichtungsmethode	Δ Signal Messung 1	Δ Signal Messung 2	Δ Signal Messung 3
ohne Funktionalisierung, BSA geblockt	5	3	5
ohne Funktionalisierung	35	32	36
Mercaptopropionsäure, NHS aktiviert	27	28	31
Mercaptopropionsäure, nicht NHS aktiviert	24	26	28
APTES	15	21	19
Diamino-Polyethylenglykol	25	28	20

Tabelle 44: Einzelwerte der Bindungsdaten der Versuche zur Immobilisierung der Laccase aus *Trametes versicolor* auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen.

Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i>			
Beschichtungsmethode	Δ Signal Messung 1	Δ Signal Messung 2	Δ Signal Messung 3
ohne Funktionalisierung, BSA geblockt	21	22	19
ohne Funktionalisierung	57	61	62
Mercaptopropionsäure, NHS aktiviert	60	54	54
Mercaptopropionsäure, nicht NHS aktiviert	60	61	54
APTES	63	66	55
Diamino-Polyethylenglykol	47	49	50

Tabelle 45: Einzelwerte der Bindungsdaten der Versuche zur Immobilisierung der Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen.

Beschichtungsmethode	OD Messung 1	OD Messung 2	OD Messung 3
ohne Funktionalisierung, BSA geblockt	0,15	0,12	0,24
ohne Funktionalisierung	0,42	0,55	0,52
Mercaptopropionsäure, nicht NHS aktiviert	0,37	0,40	0,32
Mercaptopropionsäure, NHS aktiviert	0,48	0,53	0,49
APTES	0,26	0,25	0,17
Diamino-Polyethylenglykol	0,17	0,20	0,15

Tabelle 46: Einzelwerte der Absorptionswerte zur Überprüfung der Funktionalität immobilisierter Laccase aus *Agaricus bisporus* auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen.

Beschichtungsmethode	OD Messung 1	OD Messung 2	OD Messung 3
ohne Funktionalisierung, BSA geblockt	0,03	0,05	0,09
ohne Funktionalisierung	0,14	0,11	0,09
Mercaptopropionsäure, nicht NHS aktiviert	0,13	0,20	0,15
Mercaptopropionsäure, NHS aktiviert	0,14	0,13	0,11
APTES	0,26	0,24	0,21
Diamino-Polyethylenglykol	0,11	0,11	0,14

Tabelle 47: Einzelwerte der Absorptionswerte zur Überprüfung der Funktionalität immobilisierter Laccase aus *Trametes versicolor* auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen.

Beschichtungsmethode	OD Messung 1	OD Messung 2	OD Messung 3
ohne Funktionalisierung, BSA geblockt	0,1	0,09	0,07
ohne Funktionalisierung	0,42	0,36	0,37
Mercaptopropionsäure, nicht NHS aktiviert	0,23	0,25	0,20
Mercaptopropionsäure, NHS aktiviert	0,20	0,16	0,21
APTES	0,15	0,22	0,17
Diamino-Polyethylenglykol	0,27	0,18	0,21

Tabelle 48: Einzelwerte der Absorptionswerte zur Überprüfung der Funktionalität immobilisierter Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen.

Solut	Tangenten-Methode		Laplace-Young-Methode
	linker Winkel [°]	rechter Winkel [°]	Winkel [°]
Wasser			
Messung 1	58,0	67,0	62,5
Messung 2	57,0	61,5	60,5
Messung 3	62,0	55,7	64,7
Aceton			
Messung 1	34,8	34,2	36,3
Messung 2	40,0	40,6	n.b.
Messung 3	39,4	41,1	n.b.
3M KOH			
Messung 1	24,5	27,9	n.b.
Messung 2	26,0	32,3	n.b.
Messung 3	29,8	24,3	n.b.
KOH (3M):EtOH 1:1			
Messung 1	19,8	26,4	n.b.
Messung 2	31,0	28,8	n.b.
Messung 3	25,3	16,3	n.b.
KOH (3M):EtOH 1:5			
Messung 1	13,7	19,4	n.b.
Messung 2	17,1	13,0	n.b.
Messung 3	12,9	18,7	n.b.
Piranha-Lösung			
Messung 1	30,5	22,0	26,4
Messung 2	30,6	23,4	27,7
Messung 3	27,9	22,0	26,1

Tabelle 49: Einzelwerte zur Ermittlung der Kontaktwinkel auf behandelten LTCC-Oberflächen mit Hilfe der Tangenten- und Laplace-Young-Methode (n.b.= nicht bestimmbar).

Die folgenden Tabellen beinhalten die Einzelwerte der Ermittlung der Migrationszeiten getesteter Polyphenole in einem LTCC-Keramikchip mit unterschiedlichen Hochspannungsnetzgeräten und pH-Werten.

Migrationszeiten [s] (HSPG VIAelectronic, pH 7,3)					
131	115	116	116	102	95
110	114	101	139	128	122
112	118	105	109	107	131
127	117	97	112	124	94
108	115	108	108		
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
107	107	120	115	99	126
103	109				
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 9,0)					
66	68	87	89	83	

Tabelle 50: Ermittelte Migrationszeiten von Dopamin in einem LTCC-Keramikchip unter der Verwendung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte und pH-Werte.

Migrationszeiten [s] (HSPG VIAelectronic, pH 7,3)					
130	127	152	121	123	161
136	124	152	139	121	160
119	111	143	137	125	

Tabelle 51: Ermittelte Migrationszeiten von Brenzkatechin in einem LTCC-Keramikchip bei pH 7,3 unter der Verwendung des Hochspannungsnetzgerätes der Fa. VIAelectronic.

Migrationszeiten [s] (HSPG VIAelectronic, pH 7,3)					
244	224	211	206	207	219
246	231				
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
199	197	212	203	181	216
195	192	200	195	202	179
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 4,9)					
253	226	219	253	253	

Tabelle 52: Ermittelte Migrationszeiten von Gallussäure in einem LTCC-Keramikchip unter der Verwendung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte und pH-Werte.

Migrationszeiten [s] (HSPG VIAelectronic, pH 7,3)					
159	168	137	131	158	145
158	154	169	132	141	162
180	146	148	131	146	156
165	145	142	136	154	
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 9,0)					
106	109	80	105	72	
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
141	163	140	143	171	161
153	135	148	141	153	154
159	138	127	135	154	126
150	128	131	133	143	164
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 4,9)					
265	230	229	226	240	

Tabelle 53: Ermittelte Migrationszeiten von Pyrogallol in einem LTCC-Keramikchip unter der Verwendung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte und pH-Werte.

Migrationszeiten [s] (HSPG VIAelectronic, pH 7,3)					
253	254	277	284	297	

Tabelle 54: Ermittelte Migrationszeiten von Quercetin in einem LTCC-Keramikchip bei pH 7,3 unter der Verwendung des Hochspannungsnetzgerätes der Fa. VIAelectronic.

Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
141	150	119			

Tabelle 55: Ermittelte Migrationszeiten von Resveratrol in einem LTCC-Keramikchip bei pH 7,3 unter der Verwendung des selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerätes.

Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
93	93	101	101		

Tabelle 56: Ermittelte Migrationszeiten von Resorcin in einem LTCC-Keramikchip bei pH 7,3 unter der Verwendung des selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerätes.

Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
277	263	277			

Tabelle 57: Ermittelte Migrationszeiten von Kaffeesäure in einem LTCC-Keramikchip bei pH 7,3 unter der Verwendung des selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerätes.

Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
<i>Dopamin</i>			<i>Pyrogallol</i>		
107	100	86	144	138	124
103	96	103	150	132	156

Tabelle 58: Ermittelte Migrationszeiten eines Gemisches aus Dopamin und Pyrogallol in einem LTCC-Keramikchip bei pH 7,3 unter der Verwendung des selbstkonstruierten Hochspannungsnetzgerätes.

Migrationszeiten [s] (HSPG VIAelectronic, pH 7,3)					
<i>Dopamin</i>		<i>Pyrogallol</i>		<i>Gallussäure</i>	
110	92	147	130	160	177
92	90	117	126	141	208
87	74	122	106	208	191
Migrationszeiten [s] (HSPG Eigenbau, pH 7,3)					
<i>Dopamin</i>		<i>Pyrogallol</i>		<i>Gallussäure</i>	
89	80	124	113	196	166
102	74	143	105	203	183
73	84	103	118	184	200
75	90	100	125	167	181

Tabelle 59: Ermittelte Migrationszeiten eines Gemisches aus Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure in einem LTCC-Keramikchip bei pH 7,3 unter der Verwendung unterschiedlicher Hochspannungsnetzgeräte.

Dopamin	Peakbreite [s]				
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
0,025	42	48	52	41	51
0,05	50	42	53	51	42
0,1	48	56	47	58	55
0,25	63	64	68	63	68
0,5	113	108	125	131	107
1	126	181	124	183	131

Brenzkatechin	Peakbreite [s]			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
0,025	44	45	45	44
0,05	57	45	48	52
0,1	78	70	73	72
0,25	174	140	162	128

Progallol	Peakbreite [s]			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
0,075	33	33	34	34
0,1	39	31	34	41
0,25	53	60	55	47
0,4	139	164	133	125
0,8	180	155	177	164

Gallussäure	Peakbreite [s]			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4
0,5	85	50	70	63
0,75	58	62	72	60
1,25	88	75	69	53
2,5	89	108	99	90
5	204	239	170	171

Tabelle 60: Einzelwerte der Peakbreite zur Beurteilung der kapillarelektrophoretischen Trenneffizienz des LTCC-Keramikchips bei unterschiedlichen Endkonzentrationen.

Signalhöhe [nA]			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,0125	3,3	3,2	3,2
0,025	3,5	5,0	8,0
0,05	8,5	8,8	6,9
0,1	14,3	10,3	10,1
0,2	21,0	27,1	23,8

Tabelle 61: Einzelwerte der Signalhöhe von Dopamin bei unterschiedlichen Endkonzentrationen.

Signalhöhe [nA]			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,025	4,0	4,5	3,6
0,05	4,7	5,2	5,1
0,1	4,3	8,5	9,4
0,25	20,7	117,8	15,5

Tabelle 62: Einzelwerte der Signalhöhe von Brenzkatechin bei unterschiedlichen Endkonzentrationen.

Signalhöhe [nA]			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,075	6,7	7,9	7,0
0,1	12,7	10,8	12,1
0,125	13,5	12,5	12,8
0,4	34,5	26,0	27,8
0,6	33,2	36,5	31,5

Tabelle 63: Einzelwerte der Signalhöhe von Pyrogallol bei unterschiedlichen Endkonzentrationen.

Signalhöhe [nA]			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,5	8,7	6,7	5,9
0,75	14,5	10,6	11,6
1	7,8	10,4	15,9
1,25	18,9	16,0	15,4
2,5	24,8	24,9	22,6

Tabelle 64: Einzelwerte der Signalhöhe von Gallussäure bei unterschiedlichen Endkonzentrationen.

Dopamin			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,025	0,15	0,22	0,15
0,1	0,69	0,70	0,42
0,2	0,90	0,86	0,87
0,25	1,78	1,10	0,86
0,5	3,86	2,68	3,11
1	5,88	6,96	6,22

Brenzkatechin			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,025	0,12	0,11	0,12
0,05	0,14	0,15	0,14
0,1	0,15	0,17	0,73
0,25	1,22	0,75	1,01
0,5	1,72	1,42	1,65
1	2,40	2,83	2,49

Gallussäure			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,25	0,09	0,08	0,07
0,5	0,52	0,18	0,25
1	0,43	0,67	0,64
1,25	0,73	0,49	0,38
2,5	1,44	1,20	1,40

Pyrogallol			
Konzentration [mmol]	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,075	0,12	0,11	0,12
0,1	0,22	0,19	0,20
0,2	0,62	2,48	0,88
0,4	2,68	3,50	0,97
0,6	1,10	3,67	5,07

Tabelle 65: Einzelwerte der ermittelten Integralflächen von Dopamin, Brenzkatechin, Gallussäure und Pyrogallol.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marc Goldbach
Geboren: Am 08. April 1974 in Gerolstein
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

1984-1993 St. Matthias-Gymnasium in Gerolstein, Abschluss:
Abitur

Wehrdienst:

07/1993-06/1995 Amt für Nachrichtenwesen der Bundeswehr in Ahrweiler

Studium:

10/1995-05/2002 Studium der Biologie an der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Thema der Diplomarbeit: Bakterielle Cyanidasen aus
Pseudomonaden für biosensorische Applikationen

Promotionsstudium:

09/2002-09/2003 Beginn der Dissertation am Institut für Pharmazeutische
Biologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität
Bonn

seit Oktober 2003 Fortsetzung der Arbeit am Institut für Pharmazeutische
Chemie der Philipps-Universität Marburg