

Nachweis von Cyanid und Schwermetallen mittels Chip-basierter Chemo- und Biosensoren

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

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Monika Turek
aus Rybnik (Polen)

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
20.01.2010 angenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. M.J. Schöning
Zweitgutachter Prof. Dr. M. Keusgen
Tag der mündlichen Prüfung am 21.01.2010

Erklärung

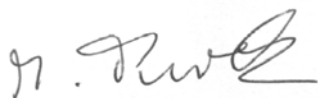
Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Nachweis von Cyanid und Schwermetallen mittels Chip-basierter Chemo- und Biosensoren“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 20.01.2010

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'H. K. W. K.', written in a cursive style.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Kurzfassung

1. Einleitung und Motivation	1
1.1. Einleitung in Chemo- und Biosensorik.....	2
1.2. Cyanid und Schwermetalle als Schadstoffe.....	4
1.3. Stand der Wissenschaft und Technik.....	8
1.3.1. Cyaniderfassung mittels Biosensoren.....	8
1.3.2. Cyaniderfassung mittels Ag-basierter ionenselektiver Elektroden.....	12
1.3.3. Schwermetallerfassung mittels Chalkogenidglassensoren.....	15
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	17
2. Theorie	19
2.1. Enzymkinetik.....	19
2.2. Bio- und Chemosensoren.....	25
2.2.1. Phasengrenze „Fest/Flüssig“.....	25
2.2.2. Nernst- und Nikolskygleichung.....	27
2.2.3. Potentiometrische und Feldeffekt-basierte Sensoranordnungen.....	29
2.2.3.1. Ionenselektive Elektroden (ISE).....	29
2.2.3.2. Kapazitive Elektrolyt-Isolator-Silizium- (EIS-) Strukturen	31
2.2.3.3. Referenzelektroden	36
2.3. <i>Cyanidase</i> -basierte EIS-Strukturen für die Cyaniderfassung.....	39
2.3.1. Immobilisierung von Enzymen.....	39
2.3.2. Funktionsprinzip.....	42
2.4. Ag-basierte ISE für die Cyaniderfassung.....	47
2.4.1. Funktionsprinzip der Ag-Halogenid-ISE.....	47
2.4.2. Funktionsprinzip der Ag-Chalkogenidglas-ISE.....	49
2.5. Chalkogenidglas-ISE für die Schwermetallbestimmung.....	51
3. Experimentelles	52
3.1. Bestimmung der Enzymmenge und Enzymaktivität.....	52
3.1.1. Enzymmengenbestimmung mittels Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
3.1.2. Enzymaktivitätsbestimmung mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode.....	54

3.1.3. Enzymaktivitätsbestimmung mittels Ammoniak-ISE.....	57
3.2. Physikalische Charakterisierung der Sensorstrukturen.....	60
3.2.1. Mikroskopische Verfahren.....	60
3.2.2. Rutherford-Rückstreu-Spektroskopie (RBS).....	62
3.2.3. Profilometrie.....	64
3.3. Elektrochemische Charakterisierung der Sensorstrukturen.....	66
3.3.1. Kapazitäts-/Spannungs- (C/V-) und Konstant-Kapazitäts- (ConCap-) Messungen.....	66
3.3.2. Elektrochemische Impedanzspektroskopie.....	70
3.3.3. Ionenselektive Potentiometrie.....	71
3.4. Sensorherstellung.....	74
3.4.1. <i>Cyanidase</i> -basierte EIS-Struktur.....	74
3.4.2. Ag-Halogenid-ISE.....	78
3.4.3. Chalkogenidglas-ISE.....	79
4. Ergebnisse.....	83
4.1. <i>Cyanidase</i> -EIS-Sensor.....	83
4.1.1. Charakterisierung der EIS-Struktur.....	83
4.1.1.1. Physikalische Charakterisierung.....	84
4.1.1.2. Elektrochemische Charakterisierung.....	86
4.1.2. Charakterisierung der <i>Cyanidase</i> -basierten EIS-Struktur.....	97
4.1.2.1. Optimierung der Immobilisierung.....	97
4.1.2.2. Physikalische Charakterisierung.....	107
4.1.2.3. Elektrochemische Charakterisierung.....	110
4.2. Ag-basierte ISE.....	118
4.2.1. Ag-Halogenid-ISE.....	118
4.2.1.1. Physikalische Charakterisierung.....	118
4.2.1.2. Elektrochemische Charakterisierung.....	120
4.2.2. Ag-Chalkogenidglas-ISE.....	127
4.2.2.1. Physikalische Charakterisierung.....	128
4.2.2.2. Elektrochemische Charakterisierung.....	134
4.3. Simultane Messung von Cyanid und Schwermetallen.....	143
4.3.1. Aufbau und Messprinzip der hybriden Messzelle.....	143
4.3.2. Messergebnisse.....	145
4.4. Nachweis von Schwermetallen in gemischten Lösungszusammensetzungen.....	151
4.4.1. Einführung in die Fuzzy-Logic.....	151
4.4.2. Messergebnisse.....	153

5. Diskussion	159
5.1. Vergleich <i>Cyanidase</i> -basierte EIS-Struktur und Ag-basierte ISE für die Erfassung von Cyanid.....	159
5.2. Simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen.....	166
5.3. Fuzzy-Logik Programm als intelligente Software für Messungen in gemischten Schwermetall-Lösungen.....	170
6. Zusammenfassung und Ausblick	174
7. Eigene Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit	179
Literaturverzeichnis.....	183
Anhang.....	200
Danksagung	
Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines a) Chemosensors und b) Biosensors.....	2
Abb. 1.2: Foto von konventionellen Chalkogenidglas-ISEs für die Erfassung von Pb^{2+} -, Cu^{2+} -, Cd^{2+} -, Tl^+ - und Ag^+ -Ionen in Flüssigkeiten.....	16
Abb. 2.1: Schematische Darstellung a) des „Schlüssel-Schloss“-Prinzips, b) des „Induced-fit“-Modells und c) des „Three-point attachment“-Modells.....	20
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Energieniveaus und benötigten Aktivierungsenergien für eine enzymatisch katalysierte (rot) und eine chemische Reaktion ohne Enzym (blau) [147,148].....	22
Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Michaelis-Menten-Diagramms [147,148].....	24
Abb. 2.4: Schematische Darstellung a) der Phasengrenze „Elektrode/Elektrolyt“, b) der dazugehörigen Potentialverteilung und c) des elektrischen Ersatzschaltbildes (nach [158,165]).....	26
Abb. 2.5: Schematische Darstellung a) einer MOS- und b) einer EIS-Struktur.....	32
Abb. 2.6: Vereinfachte schematische Darstellung a) der Anreicherung, b) der Verarmung und c) der Inversion einer MOS-Struktur mit Hilfe von Ladungsverteilung (oben) und von Energie-Bändermodell (unten).....	33
Abb. 2.7: Schematische Darstellung a) einer Ag/AgCl-Referenzelektrode und b) einer Ag/AgCl-Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode.....	37
Abb. 2.8: Schematische Darstellung von physikalischen und chemischen Immobilisierungsmethoden für Enzyme.....	40
Abb. 2.9: pH-Wert-Differenz durch die enzymatische Katalyse von Cyanid im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl berechnet aus der Tab. 2.5 und berechnet mit dem Programm „Visual MINTEQ“.....	46
Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer SDS-PAGE.....	53
Abb. 3.2: Darstellung einer exemplarischen Transmissionsmessung mit einem LCK315-Küvettest.....	55
Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Messprotokolls zur Bestimmung der <i>Cyanidase</i> -Aktivität mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode.....	56
Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung einer Kalibriermessung mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode; a) Foto der LCK315-Küvettestests, b) dazugehörige Kalibriergerade.....	57
Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Messaufbaus für die Enzymaktivitätsmessungen mittels NH_3 -ISE.....	58
Abb. 3.6: Exemplarische Darstellung einer a) Kalibriermessung und b) der dazugehörigen Enzymaktivitätsmessung von 30 μ l nativer <i>Cyanidase</i>	59
Abb. 3.7: Schematische Darstellung der AFM-Messung und Signalerfassung.....	61
Abb. 3.8: Schematische Darstellung der RBS-Streugeometrie.....	62
Abb. 3.9: Schematische Darstellung eines RBS-Spektrums.....	64
Abb. 3.10: Exemplarische Schichtdickenmessung einer AgAsSeTe-Chalkogenidglasschicht mit dem Oberflächenprofilometer der Firma KLA Tencor Cooperation.....	64

Abb. 3.11: C/V-Kurve einer p-dotierten EIS-Struktur.....	67
Abb. 3.12: Schematische Darstellung von C/V- und ConCap-Messung und die dazugehörige Kalibrierkurve eines p-dotierten pH-sensitiven EIS-Sensors in verschiedenen pH-Lösungen.....	68
Abb. 3.13: Schematische Darstellung des Messaufbaus für die elektrochemische Charakterisierung der Feldeffekt-basierten EIS-Sensoren.....	69
Abb. 3.14: Schematische Darstellung des Messaufbaus für die elektrochemische Charakterisierung der potentiometrischen ISEs a) für Einkanalmessungen und b) für Mehrkanalmessungen.....	72
Abb. 3.15: Schematische Darstellung einer EIS-Struktur mit einer pH-sensitiven Ta ₂ O ₅ -Schicht.....	76
Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> a) an NHS-aktivierte Sepharose™ und b) an Eupergit C®.....	77
Abb. 3.17: Foto einer Ag/AgCl-ISE für Messungen in Cyanid-haltigen Lösungen.....	79
Abb. 3.18: Schematische Darstellung des PLD-Prozesses in „Off-axis“-Anordnung.....	81
Abb. 3.19: Foto einer Chalkogenidglas-ISE für Messungen in Cyanid-haltigen oder Silber-haltigen Lösungen.....	82
Abb. 4.1: Foto einer EIS-Struktur mit a) Si ₃ N ₄ -Schicht und b) Ta ₂ O ₅ -Schicht, c) schematische Darstellung der EIS-Struktur.....	84
Abb. 4.2: REM-Aufnahmen einer EIS-Struktur mit einer a) und c) Si ₃ N ₄ -Schicht und b) und d) Ta ₂ O ₅ -Schicht. Oben dargestellt sind die Aufnahmen unter einem Winkel von 90° und bei einer 500.000-fachen Vergrößerung, unten gezeigt sind die Aufnahmen des Querschnitts unter einem Winkel von 60° und bei einer 200.000-fachen Vergrößerung.....	85
Abb. 4.3: Höhenbilder der AFM-Aufnahmen einer EIS-Struktur mit a) Si ₃ N ₄ - und b) Ta ₂ O ₅ -Schicht.....	86
Abb. 4.4: Bode-Diagramme aus Impedanzmessungen mit einer EIS-Struktur mit a) Si ₃ N ₄ - und b) Ta ₂ O ₅ -Schicht im Verarmungsbereich.....	87
Abb. 4.5: C/V-Messungen bei 120 Hz in Titrisol-Puffer, pH 7, einer EIS-Struktur mit einer a) Si ₃ N ₄ - und b) Ta ₂ O ₅ -Schicht.....	88
Abb. 4.6: ConCap-Messungen bei 120 Hz in Titrisol-Puffer einer EIS-Struktur mit a) Si ₃ N ₄ - und c) Ta ₂ O ₅ -Schicht; b) zeigt die Kalibrierkurve aus a).....	90
Abb. 4.7: a) C/V- und b) ConCap-Messungen mit dem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor ohne und mit zusätzlichen „Schichten“ in Titrisol-Puffer bei 120 Hz; c) ist die dazugehörige Kalibrierkurve.....	92
Abb. 4.8: Zeitabhängige Aufnahme von C/V-Kurven in Titrisol-Puffer, pH 7, mit einem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor, ohne und mit Dialysemembran.....	94
Abb. 4.9: a) Kalibrierkurven aus ConCap-Messungen mit einem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor mit 25 mg „Cyanidase-Gel“ und Dialysemembran im Na-P-Puffer (pH 8,0, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit verschiedenen Molaritäten in verschiedenen KCN-Konzentrationen; b) dazugehörige pH-Werte im Vergleich zu den berechneten pH-Werten nach Gln. 2.49 in Kap. 2.3.2.....	96

Abb. 4.10: Enzymaktivitätsmessungen a) mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode und b) mittels NH ₃ -ISE von <i>Cyanidase</i> -Aktivitätsmessungen von nativer <i>Cyanidase</i> im Na-P-Puffer (pH 8,0, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl als Funktion der Verweildauer von <i>Cyanidase</i> bei Raumtemperatur.....	99
Abb. 4.11: Bestimmung der Enzymmenge bei der Optimierung des pH-Wertes der Immobilisierungslösung, Na-P-Puffer (pH X, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl, für die Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> an Eupergit C® bei 4 °C für 24 h. a) Gel nach der Gelelektrophorese, b) dazugehörige Auswertung mittels Gelscan.....	100
Abb. 4.12: Enzymaktivitätsmessungen mit einer NH ₃ -ISE bei der Optimierung des pH-Wertes der Immobilisierungslösung, Na-P-Puffer (pH X, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl, für die Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> an Eupergit C® bei 4 °C für 24 h. a) Messkurven, b) Kalibrierkurven und c) die dazugehörigen Enzymaktivitätskurven...	101
Abb. 4.13: Enzymaktivitätskurven nach der Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> an Eupergit C® in Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei Raumtemperatur für 12 h und 24 h und bei 4 °C für 24 h.....	102
Abb. 4.14: Enzymaktivitätskurven nach der Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> an Eupergit C® im Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei 4 °C für 12 h bis 72 h..	103
Abb. 4.15: Enzymaktivitätskurven nach der Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> an Eupergit C® im Na-P-Puffer (pH 8,5, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei 4 °C für 72 h mit unterschiedlichen Puffermolaritäten.....	104
Abb. 4.16: Enzymaktivitätskurven von nativer und immobilisierter <i>Cyanidase</i> gleicher Enzymcharge a) bei der Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> an Eupergit C® und b) bei der Immobilisierung von <i>Cyanidase</i> an NHS-aktivierte Sepharose™.....	105
Abb. 4.17: Stabilitätsmessungen der immobilisierten <i>Cyanidase</i> an Eupergit C® und an NHS-aktivierte Sepharose™.....	106
Abb. 4.18: Videomikroskopische Aufnahmen von einer EIS-Struktur a) mit NHS-aktivierter Sepharose™ mit <i>Cyanidase</i> und b) mit Eupergit C® mit <i>Cyanidase</i>	107
Abb. 4.19: REM-Aufnahmen von NHS-aktivierter Sepharose™ a) ohne und b) mit <i>Cyanidase</i> , und c) von Eupergit C® mit <i>Cyanidase</i> bei einer 100.000-fachen Vergrößerung bei -130 °C. d) REM-Aufnahmen von adsorptiv immobilisierter <i>Cyanidase</i> auf einer EIS-Struktur bei einer 50.000-fachen Vergrößerung und einem Winkel von 60°.....	108
Abb. 4.20: Höhenbilder der AFM-Aufnahmen im 3-D Format von a) NHS-aktivierten Sepharose™ mit <i>Cyanidase</i> und b) Eupergit C® mit <i>Cyanidase</i>	109
Abb. 4.21: Foto der Messzelle mit einem eingebauten <i>Cyanidase</i> -basierten EIS-Sensor.....	110
Abb. 4.22: C/V-Kurven von einem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™, mit und ohne <i>Cyanidase</i>	112
Abb. 4.23: ConCap-Messung von einem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™, mit und ohne <i>Cyanidase</i> , in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 µmol/l bis 1 mmol/l.....	112
Abb. 4.24: Kalibrierkurve der Differenzspannung aus den ConCap-Messungen von einem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™, mit und ohne <i>Cyanidase</i> , im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 µmol/l bis 1 mmol/l im Vergleich zu berechneten Kalibrierkurven (s. Kap. 2.3.2).....	114

Abb. 4.25: Kalibrierkurven der Differenzspannung aus drei aufeinander folgenden ConCap-Messungen mit einem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™, mit und ohne <i>Cyanidase</i> , im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 µmol/l bis 1 mmol/l.....	115
Abb. 4.26: Schematische Darstellung von Reaktionsräumen eines EIS-Sensors a) mit NHS-aktivierter Sepharose™ und b) mit Eupergit C®.....	115
Abb. 4.27: Kalibrierkurven der Differenzspannungen aus ConCap-Messungen von einem Ta ₂ O ₅ -EIS-Sensor mit 25 mg Eupergit C® und 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™ mit und ohne <i>Cyanidase</i> , in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 µmol/l bis 1 mmol/l.....	116
Abb. 4.28: Enzymaktivitätskurven mit NHS-aktivierter Sepharose™ mit <i>Cyanidase</i> in 10 mmol/l KCN-, 10 mmol/l K ₃ Fe(CN) ₆ - und 10 mmol/l KSCN-Lösung, sowie in einer 10 mmol/l KCN-Lösung mit 10 µmol/l bzw. 0,1 mmol/l Cu ²⁺ -Ionen.....	117
Abb. 4.29: REM-Aufnahmen von einer Ag/AgCl-Membran mit a) einer 1.000-fachen Vergrößerung und b) einer 50.000-fachen Vergrößerung.....	119
Abb. 4.30: Videomikroskopische Aufnahmen von einer Ag/AgCl-Membran mit 25-facher Vergrößerung a) vor dem Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen und b) nach 14 Wochen Messung in Cyanid-haltigen Lösungen.....	119
Abb. 4.31: Messkurven von Kalibriermessungen mit einer Ag/AgCl-ISE und einer kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, mit KCN-Konzentrationen von 1 µmol/l bis 10 mmol/l (Messzeit: jeweils 5 min).....	121
Abb. 4.32: Kalibriergraphen aus den Messkurven der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, mit KCN-Konzentrationen von 1 µmol/l bis 10 mmol/l.....	122
Abb. 4.33: Bestimmung der Hysterese aus den Messkurven der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, mit KCN-Konzentrationen von 1 µmol/l bis 10 mmol/l.....	122
Abb. 4.34: Bestimmung der Ansprechzeit (t _{90%}) der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE.....	123
Abb. 4.35: Bestimmung der Drift der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5.....	124
Abb. 4.36: Bestimmung der Stabilität der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE aus Kalibriermessungen in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, mit einem KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 1 mmol/l.....	124
Abb. 4.37: Kalibriergraphen aus Messungen mit der Ag/AgCl-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 1 mmol/l, ohne Störionen und mit 0,1 mmol/l K ₂ S, für die Bestimmung des Selektivitätskoeffizienten.....	126
Abb. 4.38: Kalibriergraphen aus Messungen mit einer Ag/AgCl-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, mit verschiedenen Cyanidverbindungen im Konzentrationsbereich von 0,1 µmol/l bis 1 mmol/l.....	127
Abb. 4.39: Videomikroskopische Aufnahmen mit einer 25-fachen Vergrößerung von Ag-Chalkogenidglaschips mit unterschiedlichen Membranzusammensetzungen. Die Abscheidungsdauer der Membranen betrug jeweils 7,5 min.....	130

Abb. 4.40: REM-Aufnahmen mit einer 10.000-fachen Vergrößerung von Ag-Chalkogenidglas-ISEs mit unterschiedlichen Membranzusammensetzungen. Die Abscheidungsdauer der Membranen betrug jeweils 7,5 min.....	131
Abb. 4.41: AFM-Aufnahme der Topologie im 3-D-Format einer AgAsSeTe-Membran (Abscheidungsdauer von 7,5 min).....	132
Abb. 4.42: RBS-Spektren von AgAsSeTe-Membranen mit einer Abscheidungsdauer von 5 min, 7,5 min und 10 min.....	133
Abb. 4.43: RBS-Spektren von einer AgAsSeTe-Membran mit einer Abscheidungsdauer von 7,5 min, vor und nach Kontakt mit Cyanid-haltiger Lösung.....	133
Abb. 4.44: Videomikroskopische Aufnahmen mit einer 250-fachen Vergrößerung von AgAsSeTe-ISE mit einer Abscheidungsdauer von a) 5 min, b) 7,5 min und c) 10 min, nach Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen.....	134
Abb. 4.45: Messkurve einer Kalibriermessung mit einer AgAsSeTe-ISE (Abscheidungsdauer 7,5 min) in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 10 mmol/l.....	135
Abb. 4.46: Kalibriergraph aus der Messkurve der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 10 mmol/l.....	135
Abb. 4.47: Bestimmung der Hysterese aus der Messkurve der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 10 mmol/l.....	136
Abb. 4.48: Bestimmung der Ansprechzeit (t _{90%}) der AgAsSeTe-ISE bei einem KCN-Konzentrationswechsel von 0,1 mmol/l zu 1 mmol/l.....	137
Abb. 4.49: Bestimmung der Drift der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5.....	137
Abb. 4.50: Bestimmung der Stabilität der unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-ISEs aus Kalibriermessungen in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, im mit einem KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 1 mmol/l.....	138
Abb. 4.51: Messkurven der AgAsSeTe-ISE mit einer Abscheidungsdauer von 5 min, 7,5 min und 10 min, in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 10 mmol/l.....	140
Abb. 4.52: Kalibriergraphen aus Messungen mit der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 µmol/l bis 1 mmol/l, ohne Störion und mit 0,1 mmol/l KBr für die Bestimmung des Selektivitätskoeffizienten.....	140
Abb. 4.53: Kalibriergraphen aus Messungen mit der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO ₃ , pH 11,5, mit verschiedenen Cyanidverbindungen im Konzentrationsbereich von 0,1 µmol/l bis 1 mmol/l.....	142
Abb. 4.54: Foto der hybriden Messzelle und schematische Darstellung der simultanen Erfassung von Cu ²⁺ - und CN ⁻ -Ionen.....	144
Abb. 4.55: Foto der hybriden Messzelle während einer simultanten Messung von Cyanid- und Schwermetallionen.....	145
Abb. 4.56: Messkurven der Kalibriermessungen der Ag-ISE und der Cu-, Cd- und Pb-ISE in den jeweiligen CN ⁻ -Ionenkonzentrationen und Cu ²⁺ - Cd ²⁺ - und Pb ²⁺ -Ionenkonzentrationen im Bereich von 0,1 µmol/l bis 1,1 mmol/l.....	146
Abb. 4.57: Messkurven der Cu- und Ag-ISE bei einer simultanen Messung von Cu ²⁺ - und CN ⁻ -Ionen in der hybriden Messzelle.....	147

Abb. 4.58: Kalibrierkurven der Cu- und der Ag-ISE bei einer simultanen Messung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen in der hybriden Messzelle.....	148
Abb. 4.59: Vergleich der Messkurven der Cu- und der Ag-ISE bei simultanen Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen in der hybriden Messzelle unter Einsatz einer Diffusionsmembran mit einer Porengröße von 0,2 μm und 0,45 μm	149
Abb. 4.60: Kalibrierkurven der Cu- und Ag-ISE, der Cd- und Ag-ISE und der Pb- und Ag-ISE bei simultanen Messung von jeweils Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, Cd^{2+} - und CN^- -Ionen und Pb^{2+} - und CN^- -Ionen.....	150
Abb. 4.61: Schematische Darstellung der LV „Alter“ mit den jeweiligen Fuzzy-Sets jung, erwachsen und alt.....	152
Abb. 4.62: Messkurven von Kalibriermessungen mit einer Ag-ISE in verschiedenen Schwermetallösungen mit Ionenkonzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l	154
Abb. 4.63: a) Charakteristische Kurven der Ag-ISE aus Kalibriermessungen in drei verschiedenen Schwermetallgemischen und konstanter Messwert bei Messung mit der Ag-ISE in unbekannter Lösung; b) das zu Komposition 2 und zur Ag-ISE dazugehörige Fuzzy-Set.....	155
Abb. 4.64: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Fuzzy-Logic-Programms, das auf einem Sensorarray aus Ag-, Cu- und Pb-ISE, auf drei Kalibriermessungen und konstanten Messwerten der jeweiligen Sensoren basiert. Die graue Fläche repräsentiert die Überlappung aller drei Fuzzy-Sets bei der Komposition 3.....	156
Abb. 4.65: Mathematische Diagramme der Aussagen des entwickelten Fuzzy-Logic-Programms für Messungen mit der „elektronischen Zunge“ in für das Programm unbekanntem Schwermetallösungen: a) gleiche Lösungen wie sie für die Erstellung der charakteristischen Kurven verwendet werden, b) gleiche Lösungen wie bei a) jedoch ohne die Ionenkonzentration 1 $\mu\text{mol/l}$, c) gleiche Lösungen wie bei b) mit einem Offset von ± 5 mV und d) gleiche Lösungen wie bei b) mit einem Offset von ± 10 mV.....	157
Abb. 5.1: Enzymaktivitätskurven von nativer <i>Cyanidase</i> im Na-P-Puffer (pH X, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit unterschiedlichen pH-Werten.....	160
Abb. 5.2: Vergleich der Kalibrierkurven der AgAsSeTe-ISE in verschiedenen KCN-Konzentrationen, gemessen gegenüber unterschiedlichen Referenzelektroden. Vergleich gegenüber einer kombinierten kommerziellen Cyanid-ISE.....	161
Abb. 5.3: Messungen in unterschiedlichen Weinsorten mit dem Sensorarray a) Ag-, Cu- und Pb-ISE und b) Ag-, Cu-, Pb- und Cd-ISE für die Implementierung der Fuzzy-Logic-Software.....	172

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Schwermetallkonzentrationen in Erdkruste und Meerwasser [2].....	6
Tab. 1.2: Grenzwerte von Schwermetallen im Trinkwasser nach WHO (2003/2004) und Trinkwasserverordnung (2001) [2,44-46].....	7
Tab. 1.3: Zusammenfassung von Biosensoren für die Cyaniderfassung.....	11
Tab. 2.1: Zusammenfassung der Enzymklassen und ihre Funktion.....	20
Tab. 2.2: pH-Werte vor der enzymatischen Katalyse von Cyanid für unterschiedliche KCN- Konzentrationen a) in H ₂ O, b) in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und c) in Na-P- Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl.....	44
Tab. 2.3: pH-Werte nach der enzymatischen Katalyse von Cyanid für unterschiedliche KCN- Konzentrationen unter der Berücksichtigung von a) nur dem Einfluss von Ammoniak und Formiat, b) Einfluss von Ammoniak und Formiat und dem Verbrauch von HCN und c) pH-Werte vor der enzymatischen Katalyse in Na-P- Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl, d) die Differenz der pH-Werte vor und nach der Katalyse dar.....	45
Tab. 2.4: pK _L -Werte und pK _K -Werte für unterschiedliche Ag-Halogenid-Membranen und verschiedene Ag-CN-Komplexe in Lösung bei 25 °C [171,218-222].....	48
Tab. 2.5: pK _L -Werte und pK _K -Werte für unterschiedliche Ag-Chalkogenidglas-Membranen und verschiedene Ag-CN-Komplexe in Lösung bei 25 °C [171,218-222].....	49
Tab. 3.1: Zusammensetzung und dazugehörige Prozessschritte der EIS-Strukturen.....	74
Tab. 3.2: Zusammenstellung der Immobilisierungsprotokolle für die kovalente Kopplung der <i>Cyanidase</i> an NHS-aktivierte Sepharose TM und an Eupergit C®.....	78
Tab. 3.3: Verwendete Prozessparameter der gepulsten Laserabscheidung.....	81
Tab. 3.4: Verwendete Chalkogenidglas-Targetmaterialien für das PLD-Verfahren und die dazugehörigen Primärionen.....	82
Tab. 4.1: Zusammenfassung der Schichtdicken von pH-sensitiven EIS-Strukturen.....	84
Tab. 4.2: Protokoll für die ConCap-Messungen mit einer Si ₃ N ₄ - und Ta ₂ O ₅ -EIS-Struktur.....	89
Tab. 4.3: Zusammenfassung der Sensorparameter für pH-sensitive EIS-Strukturen mit einer Si ₃ N ₄ - und einer Ta ₂ O ₅ -Schicht.....	91
Tab. 4.4: Zusammenfassung der Sensorparameter für die pH-sensitive Ta ₂ O ₅ -EIS-Struktur ohne und mit zusätzlichen „Schichten“.....	93
Tab 4.5: pH-Werte und spezifische Leitfähigkeiten von den Messlösungen für den <i>Cyanidase</i> - basierten EIS-Sensor.....	111
Tab. 4.6: pH-Werte und spezifische Leitfähigkeitswerte der Messlösungen für die Ag- basierten ISEs.....	120
Tab. 4.7: Zusammenfassung der intrinsischen Sensorparameter der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE.....	125
Tab. 4.8: Zusammenfassung der Selektivitätskoeffizienten, bestimmt nach der „Fixed interference“-Methode, für die Ag/AgCl-ISE.....	126

Tab. 4.9: Zusammenfassung der Schichtdicken und der Abscheidungsrate für die unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-Membranen.....	129
Tab. 4.10: Zusammenfassung der RMS-Werte für die unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-Membranen bei einer Abscheidungsdauer von 7,5 min.....	132
Tab. 4.11: Zusammenfassung der intrinsischen Sensorparameter von Ag-Chalkogenidglas-ISEs mit unterschiedlichen Membranen bei einer Abscheidungsdauer von 7,5 min...	138
Tab. 4.12: Zusammenfassung der Selektivitätskoeffizienten (bestimmt nach der „Fixed interference“-Methode) für die AgAsSeTe-ISE.....	141
Tab. 5.1: Zusammenfassung der intrinsischen Sensorparameter der hergestellten Bio- und Si-Chip-ISEs, sowie der kommerziellen Cyanid-ISE für die Cyaniderfassung.....	162
Tab. 5.2: Cyanid-Schwermetallkomplexe und ihre pK_K -Werte bei 25 °C nach [22,222,273].....	168

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AES	atomare Emissionsspektroskopie
AFM	Rasterkraftmikroskopie
ConCap	Konstant-Kapazitäts
C/V	Kapazitäts/Spannungs
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EIS	Elektrolyt-Isolator-Silizium
FPLC	schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HMDS	Hexamethyldisiloxan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<i>HRP</i>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IC	Ionenchromatographie
ICP	induktiv gekoppelte Plasma Methode
ISE	ionenselektive Elektrode
ISFET	ionensensitiver Feldeffekttransistor
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KI	künstliche Intelligenz
KNN	künstliche neuronale Netzwerke
LPCVD	Low pressure chemical vapour deposition
<i>LV</i>	<i>linguistische Variable</i>
MOSFET	Metall-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor
MWCO	Molecular weight cut off
NAD ⁺ / NADH	Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid
NHS	N-hydroxysuccinimide
PAD	gepulste amperometrische Detektion
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PLD	gepulste Laserabscheidung
PLS	Partial least squares
<i>PPO</i>	<i>Polyphenol Oxidase</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
PZC	Point of zero charge
RBS	Rutherford-Rückstreuung-Spektroskopie
RCA	Radio Cooperation of America
REM	Rasterelektronenmikroskopie

Abkürzung	Beschreibung
RF	Hochfrequenz
RMS	mittlere Rauigkeit
RTP	Rapid Thermal Processing
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHE	Standard-Wasserstoffelektrode
SIMCA	Soft independent modelling by class analogy
uNwG	untere Nachweisgrenze
UV-VIS	optische Ultraviolett-Spektroskopie
WHO	World Health Organisation

Kurzfassung

In der Umweltanalytik spielen Cyanid und Schwermetalle eine wichtige Rolle, denn beide Komponenten sind schädlich für den Menschen. Aufgrund ihrer guten chemischen und physikalischen Eigenschaften werden sowohl Cyanid als auch Schwermetalle häufig für industrielle Zwecke verwendet und können somit über industrielle Abgase und Abwässer in die Umwelt gelangen. Darüber hinaus kommen beide Komponenten in der Natur vor [1,2].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Silizium-basierte Chemo-/Biosensoren für die qualitative und quantitative Erfassung von Cyanid und Schwermetallen in Flüssigkeiten entwickelt. Im Falle der Cyaniderfassung wurden kapazitive Elektrolyt-Isolator-Silizium (EIS-) Strukturen, auf denen das Enzym *Cyanidase* immobilisiert wurde, sowie Ag-basierte ionenselektive Elektroden (ISEs) konzeptioniert, mittels Dünnschicht-/Dickschichttechnik prozessiert und hinsichtlich ihrer intrinsischen Sensoreigenschaften charakterisiert und optimiert. Der Cyanid-Biosensor nutzt die lokale pH-Wert-Verschiebung, die bei der enzymatischen Katalyse von Cyanid durch die *Cyanidase* zu Ammoniak und Formiat entsteht. Die Cyaniderfassung mittels Ag-Halogenid- bzw. Ag-Chalkogenidglas-ISE basiert auf der Komplexbindung zwischen CN^- -Ionen in der Lösung und Ag^+ -Ionen in der Membran, die in einer Änderung des Oberflächenpotentials des Sensors resultiert. Sowohl der Enzym-Biosensor als auch die Ag-basierte ISE zeigten ein von der Cyanidkonzentration abhängiges Signal, das gut mit den theoretischen und experimentellen Werten aus der Literatur übereinstimmte. Aufgrund der geringen Aktivität und Stabilität der immobilisierten *Cyanidase* und unter Berücksichtigung von theoretischen Modellberechnungen zeigte sich jedoch, dass der entwickelte Biosensor nur unter optimalen Labor-Bedingungen für die Cyaniderfassung eingesetzt werden konnte.

Für die Schwermetallerfassung in Flüssigkeiten wurden unterschiedliche Chip-basierte Chalkogenidglas-ISEs mittels gepulster Laserabscheidung hergestellt und für die Messung von Ag^+ -, Cu^{2+} -, Pb^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen charakterisiert. Das Messprinzip dieser Sensoren basiert auf einem konzentrationsabhängigen, dynamischen Ionenaustausch zwischen Schwermetallionen aus der Messlösung und Schwermetallionen in der Sensormembran, was zu einer Veränderung des Oberflächenpotentials führt. Die Chalkogenidglas-ISEs zeigten ein von der Schwermetallkonzentration abhängiges Signal, entsprechend der theoretisch zu erwartenden Nernstempfindlichkeit [3].

In gemischten Schwermetalllösungen konnte neben der hohen Sensitivität der Chalkogenidglas-ISE (z.B. Cu-ISE gegenüber Cu^{2+} -Ionen) zusätzlich deren Querempfindlichkeit zu anderen Schwermetallionen in Form einer Multi-Sensoranordnung vorteilhaft eingesetzt werden. Deshalb wurde in einem grundlegenden Experiment in Kooperation mit der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg (Prof. W. Heiden) eine „einfache“ elektronische Zunge – bestehend aus drei

Chalkogenidglas-ISEs (für Ag^+ -, Cu^{2+} - und Pb^{2+} -Ionen) – aufgebaut. Unter Zuhilfenahme einer Fuzzy-Logic-Software war es im ersten Schritt möglich, Schwermetalle aus Zwei-Komponentengemischen zu separieren.

Darüber hinaus wurde für die gleichzeitige Erfassung von Cyanid und Schwermetallen in Lösungen erstmalig eine portable hybride Messzelle entwickelt und ein Messprotokoll vorgestellt, bei dem Cyanid und Schwermetalle zunächst über eine Ansäuerung und Temperaturbehandlung voneinander getrennt wurden, um anschließend simultan mittels der jeweiligen Chalkogenidglas-ISE potentiometrisch erfasst werden zu können. Diese hybride Messzelle konnte erfolgreich für simultane Messungen von Cu^{2+} -, Pb^{2+} - bzw. Cd^{2+} -Ionen und CN^- -Ionen im μ -molaren Konzentrationsbereich eingesetzt werden.

1. Einleitung und Motivation

In der heutigen Zeit spielen Sensoren und die damit verbundene Messtechnik eine wichtige Rolle und sind in vielen Einsatzbereichen, wie z.B. in der Industrie, der Lebensmittelkontrolle und im Transportwesen, nicht mehr wegzudenken. Darüber hinaus werden Sensoren in der Umweltanalytik, Medizintechnik und Pharmazie eingesetzt. In der Umweltanalytik werden u.a. industrielle Abwässer und Abgase, Grund- und Trinkwasser sowie Bodenproben mit Hilfe von Sensoren und instrumenteller Analytik auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Hier sollen umweltrelevante Parameter, wie beispielsweise die Schwermetall- und Cyanidkonzentration, überwacht werden, damit zulässige Höchstgrenzen nicht überschritten werden, denn beide Umweltgifte können zu akuten und chronischen Krankheiten bei Mensch und Tier führen [4-6]. In der Medizintechnik und Pharmazie werden Sensoren bevorzugt zur Überprüfung von krankheitsbedingten Parametern (Temperatur, Blutdruck, etc.) und Stoffwechselprodukten im Urin und im Blut (Calcium, Glukose, etc.) eingesetzt. Darüber hinaus können der Einfluss von neu entwickelten Medikamenten auf z.B. Bakterien und neu entdeckte Wirkstoffe in Pflanzen auf Ihre Tauglichkeit für pharmazeutische Applikationen mit Hilfe von Sensoren untersucht werden [7-11]. Gut etablierte industrielle Analytik und Bioanalytik in der Umweltmesstechnik, Medizintechnik und Pharmazie stellen hierzu unterschiedliche Detektions- und Trennmethoden, wie z.B. die gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), die optische Ultraviolett-Spektroskopie (UV-VIS), die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder die schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie (FPLC) für die Untersuchung verschiedener Parameter zur Verfügung. Der Vorteil solcher Methoden liegt häufig in einem umfangreichen Analysespektrum und ihrer vielseitigen Anwendbarkeit. Nachteilig ist jedoch, dass solche Anlagen auf den Laborbetrieb beschränkt sind und somit keine „Vor-Ort“-Messungen durchgeführt werden können. Darüber hinaus sind sie oft sehr teuer, hoch-komplex in der Handhabung und somit mit geschultem Fachpersonal verbunden [12,13]. Im Hinblick auf eine „Vor-Ort“-Analytik von umweltrelevanten Parametern und für kostengünstige und schnelle Analysen in der Pharmazie und Medizintechnik wird derzeit in der Forschung und Entwicklung deshalb an miniaturisierten und portablen Chemo- und Biosensoren gearbeitet.

1.1. Einleitung in Chemo- und Biosensorik

Chemo- und Biosensoren sind nach der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) folgendermaßen definiert: „Ein Chemosensor ist ein miniaturisierter Messwertaufnehmer, der selektiv und reversibel eine chemische Information, von der Konzentration eines spezifischen Analyten bis hin zu Gesamtkomposition der Messprobe, in ein analytisch verwertbares Signal transformiert. Ein Chemosensor besteht hauptsächlich aus zwei Komponenten, dem chemischen Erkennungssystem und dem physikochemischen Transducer. Ein Biosensor ist eine Untergruppe des Chemosensors, bei dem biologische Erkennungsmechanismen oder -prinzipien zur Analyterkennung angewendet werden“ [14,15]. Die wichtigsten Anwendungsgebiete von Chemo- und Biosensoren reichen von der Umweltanalytik und dem Gesundheitswesen über die Drogendetektion und industriellen Prozessen bis hin zur Lebensmittelanalytik und zum Transportwesen. Ziel der Chemo- und Biosensorik ist die Vereinfachung von Messmethoden, u.a. im Hinblick auf „Vor-Ort“-Analysen und Routinemessungen. Hierbei soll per „Knopfdruck“ die gewünschte Information der untersuchten Probe direkt am Messgerät abgelesen werden können. Die Klassifizierung von Chemo- und Biosensoren erfolgt häufig nach Art des verwendeten Transducers, der Messgröße und des Messprinzips. Darüber hinaus können Biosensoren nach Art des Biorezeptors unterschieden werden. Abb. 1.1 a) und Abb. 1.1 b) zeigen die schematische Darstellung eines Chemo- und Biosensors. Für ein besseres Verständnis des Funktionsprinzips werden der Rezeptor und der Transducer um die Analytlösung und die Signalverarbeitung erweitert.

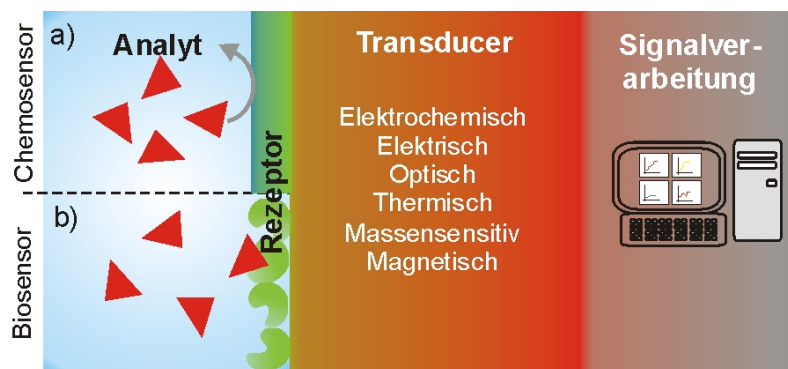


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines a) Chemosensors und b) Biosensors.

Ist ein bestimmter Analyt in der Analytlösung vorhanden, so reagiert er selektiv und reversibel mit dem Rezeptor. Das hierbei entstandene Signal, das die chemische Information des Analyten trägt (z.B. Konzentration des Analyten), wird mittels des Transducers in ein analytisch verwertbares Signal transformiert und mit Hilfe der Signalverarbeitung verstärkt und ausgegeben. Bei einem Chemosensor ist der Rezeptor eine anorganische oder organische Sensormembran. Der Rezeptor eines Biosensors ist eine biologische Membran und kann beispielsweise aus Enzym,

Antikörper/Antigen, Desoxyribonukleinsäure (DNS), Gewebeschnitt/Zellkultur oder Mikroorganismus bestehen. Durch die Reaktion zwischen dem Rezeptor und Analyten entsteht ein Signal, das mit Hilfe des Transducers in ein elektrisches oder optisches Signal umgewandelt wird. Als Transducer können z.B. elektrochemische, elektrische, optische, thermische, massensensitive oder magnetische Verfahren bzw. Transducer eingesetzt werden [16-19].

Die Anforderungen an einen Chemo- und Biosensor sind vielfältig. So soll die Reaktion zwischen Analyten und Rezeptor schnell, selektiv und reversibel sein. Darüber hinaus soll die Sensitivität auf den Analyten hoch, die Lebensdauer des Chemo- und Biosensors lang, und der Sensor soll klein, portabel und günstig sein [16-18]. Für eine möglichst lange Lebensdauer werden häufig Chemosensoren und für eine hohe Selektivität Biosensoren eingesetzt [17,19].

Im Rahmen dieser Arbeit werden Enzym-basierte Feldeffekt-Strukturen als elektrochemische Biosensoren für die Cyaniderfassung und elektrochemische (potentiometrische) Chemosensoren auf Basis von Chalkogenidglasmembranen und Ag-Halogenid-Membranen als Rezeptorschicht für die Bestimmung von Cyanid und Schwermetallen in Flüssigkeiten verwendet.

1.2. Cyanid und Schwermetalle als Schadstoffe

Cyanide und deren Derivate werden häufig in der Industrie eingesetzt. Darüber hinaus kommt Cyanid z.B. als cyanogenes Glykosid und Liposid in vielen Pflanzen vor. Dieser Schadstoff kann in unterschiedlichen Formen auftreten: als freies Cyanid (Cyanwasserstoff (HCN), CN⁻-Ionen), als einfach gebundenes Cyanid (Bindungen mit Alkali- und Erdalkalisalzen), in Komplexverbindung mit unterschiedlichen Schwermetallen (Ag⁺-, Cu²⁺-, Cd²⁺- und Pb²⁺-Ionen) und als Thiocyanat (SCN⁻). Je stärker die Cyanidverbindungen sind, desto niedriger ist das toxische Potential von Cyanid [4,20-24].

Freies Cyanid ist hoch toxisch. Schon 1-1,5 mg/kg Körpergewicht als Gesamtdosis reichen aus, um einen Menschen zu töten. Gelangt Cyanid (über orale Einnahme, Inhalation, Haut) in den Körper, so bindet es reversibel an das Eisen-Ion (Fe³⁺-Ion) der *Cytochromoxidase*, die für die Zellatmung zuständig ist. Die aerobe Zellatmung geht in eine anaerobe Zellatmung über. Dabei entstehen für die Zellen giftige Beiprodukte, wie z.B. die Laktose, die in einer Ansäuerung der Zelle resultieren. Gleichzeitig sinkt die Pufferkapazität und somit auch der pH-Wert des Blutes. Die Regelmöglichkeiten des Organismus werden erschöpft, dieses resultiert in einem Zusammenbruch des Metabolismus. Herzstillstand und Atemnot können eintreten. Aufgrund des hohen Sauerstoffverbrauchs werden vor allem das zentrale Nervensystem, Herz und Lunge angegriffen [4,5,24]. In kleinen Mengen kann Cyanid auch vom menschlichen Körper als Thiocyanat über Urin abgeschieden werden. Hierbei wird in der Leber das Sulfon-Sulfur vom Thiosulfat mit Hilfe der *Rhodanese* auf das Cyanid transferiert und somit das weniger giftige Thiocyanat gebildet. Diese spontane Detoxifikation von Cyanid ist durch die Menge von Thiosulfat im Körper limitiert und beträgt ca. 1 µg Cyanid pro 1 kg Körpergewicht und 1 min. Bei höheren Cyanidkonzentrationen kann der Tod binnen weniger Sekunden bis mehreren Stunden eintreten [4,20,24].

In der Natur kommt Cyanid als cyanogenes Glykosid oder Liposid in mehr als 2500 Pflanzen vor. Hierzu gehören z.B. Hülsenfrüchte, Kernobst, Bittermandel und Wurzeln. Dabei fungiert Cyanid auf der einen Seite als natürlicher Schutz der Pflanzen vor Insekten, Pilzen und Tieren, denn Cyanid hat einen bitteren Geschmack. Auf der anderen Seite kann durch „falsche“ Nahrungszubereitung, sowie bei Beschädigung von Zellwänden in der Glykolyse das hoch toxische HCN entstehen und bei Aufnahme zu akuten und chronischen Vergiftungen führen. Insbesondere in Ländern der dritten Welt führt die regelmäßige Aufnahme der Wurzel *Cassava* zu chronischen Vergiftungen [4,20,24-28].

Darüber hinaus wird Cyanid aufgrund seiner unterschiedlichen Formen und guten chemischen Eigenschaften häufig für industrielle Zwecke eingesetzt. Nach Untersuchungen der World Health Organisation (WHO) von 2007 werden allein im Jahr 2000 weltweit 1,4 Millionen Tonnen HCN für die chemische Industrie produziert

[20,29]. Die industriellen Einsatzgebiete von Cyanid reichen von der Gold- und Silbergewinnung über Galvanisierungszwecke und Metallurgie bis hin zur Landwirtschaft, Kohle- und pharmazeutischen Industrie. Für die Gewinnung von nur 1 g Gold werden insgesamt 500 l Wasser mit 166 g Cyanid verseucht. Pro Jahr werden weltweit 500.000 Tonnen Cyanid für die Goldgewinnung eingesetzt und somit 1,5 Billionen Liter Wasser kontaminiert [30]. Über industrielle Abgase und Abwässer, aber auch über Industrieunfälle, wie z.B. Bruch oder Leck eines Rückhaltebeckens und Brände, kann der hochtoxische Schadstoff in die Umwelt gelangen und die Ökologie im Umkreis von mehreren Kilometern zerstören [20,21,30-35]. Nach der WHO und der Trinkwasserverordnung 2001 beträgt die zulässige Höchstgrenze für Cyanid im Trinkwasser 0,07 mg/l bzw. 0,05 mg/l. Derzeitige Aufbereitungen von kontaminiertem Trinkwasser beruhen auf unterschiedlichen Verfahren, beispielsweise der Chlorinierung, Verdünnung, reversiblen Osmose und dem Ionenaustausch [20,23,36-38]. Bei der Chlorinierung von Cyanid-haltigem Wasser werden CN⁻-Ionen mit Hilfe von Hypochlorit zu weniger giftigem Bicarbonat und Stickstoff reduziert. Neuere Forschungsansätze zur Behandlung von kontaminierten Gewässern basieren auf dem Einsatz von Enzymen oder Bakterien, die das toxische Cyanid in eine weniger giftige Form transferieren [39-42].

Über das Cyanid hinaus sind auch Schwermetalle in der Umweltanalytik relevant. Schwermetalle, wie z.B. Blei (Pb), Cadmium (Cd) und Kupfer (Cu), kommen in der Natur als Spurenelemente vor und werden aufgrund ihrer guten elektrischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften häufig in der Industrie eingesetzt. Schwermetalle haben eine hohe Dichte ($>5 \text{ g/cm}^3$) und sehr lange biologische Halbwertszeiten. Cadmium beispielsweise hat eine biologische Halbwertszeit von bis zu 35 Jahren, d.h. erst nach 35 Jahren ist die halbe Menge Cadmium biologisch abgebaut. Auf der einen Seite können Schwermetalle im menschlichen Körper zu akuten und chronischen Vergiftungen führen und auf der anderen Seite sind einige Schwermetalle für den Menschen essentiell. Der tägliche Bedarf von Kupfer für einen Erwachsenen liegt bei 2 mg. In kleinen Mengen wird Kupfer im Körper als Coenzym für sog. Metalloenzyme für die Katalyse von biochemischen Prozessen gebraucht. Andere Schwermetalle, wie z.B. Cd und Pb, sind schon in kleinen Mengen toxisch für den Menschen. Dabei inhibieren sie Enzyme (bevorzugt mit vielen SH-Gruppen) und somit biochemische Vorgänge bzw. hemmen Stoffwechselforgänge in der Niere und Leber, so dass es oftmals zu Nieren- und Leberschäden bei der Kontamination mit Schwermetallen kommt. Darüber hinaus wird bei Vergiftungen mit Schwermetallen das zentrale und periphere Nervensystem angegriffen. Die Symptome solcher Vergiftungen sind unterschiedlich und reichen von kolikartige Schmerzen und Appetitlosigkeit über Schlaflosigkeit und Halluzinationen bis hin zu Bewusstlosigkeit und Blutanämie [5,43-46]. Chronische Massenvergiftung durch einen hohen Cadmiumgehalt im Trinkwasser und Reis wird erstmals 1947 in Japan beobachtet. Hierbei litten die Menschen an der sog. „Itai-Itai“ (Autsch-Autsch) Krankheit unter

großen Schmerzen, verstärkt traten Osteoporose, Skelettdeformation, Schrumpfung der Körpergröße und spontanen Knochenbrüche auf. Als Ursache für die Krankheit wird die Störung des Calcium-, Phosphat- und Vitamin-D-Stoffwechsels aufgrund von zu hohen Cadmiumwerten in der Niere festgestellt. Darüber hinaus führen hohe Kupferkonzentrationen bei Kleinkindern in Indien und in Deutschland zu der sog. „Indian/German Childhoodcirrhosis“. Diese Krankheit ist in Indien auf das verwendete Kupfergeschirr für Zubereitung und Aufbewahrung von Kinderessen und in Deutschland vor allem bei früh abgestillten Kindern auf die Zubereitung der Nahrung mit Wasser aus kontaminierten Hausbrunnen zurückzuführen. Leberschäden sind die Folgen. Weitere bekannte Krankheiten, die durch Schwermetalle verursacht werden, sind die „Minamata-“ und „Black-Foot-“ Krankheit, die jeweils durch die Vergiftung mit Quecksilber und Arsen zurückzuführen sind [5,43]. Die klinische Behandlung von Patienten mit Schwermetall-Vergiftungen erfolgt u.a. unter Einsatz von Komplexbildnern (Dimercaptobersteinsäure, D-Penicillamin) und anschließender Ausscheidung über Urin oder Faeces. Jedoch ist die Behandlung nicht ganz unproblematisch, da es im Urin zu Umverteilungen der Schwermetalle kommen kann [5]. Tab. 1.1 fasst die Mengen von einigen Schwermetallen als natürliche Elemente in der Erdkruste und in Meerwasser zusammen.

Tab. 1.1: Schwermetallkonzentrationen in Erdkruste und Meerwasser [2].

Schwermetall	Konzentration von Schwermetall in Erdkruste in g/t	Konzentration von Schwermetall in Meerwasser in µg/l
Pb	13	0,03
Cd	0,2	0,1
Cu	55	3

Die industriellen Anwendungen von Schwermetallen sind enorm und vielfältig. Sie reichen von der Herstellung elektronischer Bauteile und Kabel über Galvanisierungsprozesse und Korrosionsschutz bis hin zu Herstellung von Farbpigmenten und Kunststoffen. Beispielsweise werden jährlich weltweit etwa 12.000-15.000 Tonnen Cadmium und 5,3 Millionen Tonnen Blei für industrielle Anwendungen produziert [5,43]. Über industrielle Abgase und Abwässer sowie durch industrielle Unfälle können diese Schadstoffe in die Umwelt gelangen und die Natur stark belasten. Greenpeace berichtet von einem „hochgiftigen Cocktail aus Abwässern, Düngemitteln und Schwermetallen“, der über die Donau und Flüsse in der Türkei ins Schwarze Meer geleitet wird und dort den kommerziellen Fischbestand von 26 Arten auf sechs Fischarten reduziert [47]. Darüber hinaus werden in chinesischen Kräutertees aus Apotheken in Deutschland bis zu 100-mal höhere Schwermetallkonzentrationen (Cadmium, Thallium) gefunden, als die zulässigen Grenzwerte solcher Schadstoffe sind. Diese sind auf die schwer belasteten Böden in China zurückzuführen [48].

Die Grenzwerte von Schwermetallen im Trinkwasser sind nach der WHO und Trinkwasserverordnung festgelegt und in Tab. 1.2 wiedergegeben.

Tab. 1.2: Grenzwerte von Schwermetallen im Trinkwasser nach WHO (2003/2004) und Trinkwasserverordnung (2001) [2,44-46].

Schwermetall	WHO (2003/2004) in mg/l	Trinkwasserverordnung (2001) in mg/l
Pb	0,01	0,01
Cd	0,003	0,005
Cu	2	2

1.3. Stand der Wissenschaft und Technik

In den folgenden Unterkapiteln sollen der Stand der Wissenschaft und Technik für die Cyaniderfassung und die Schwermetallerfassung bewertend gegenüber gestellt werden.

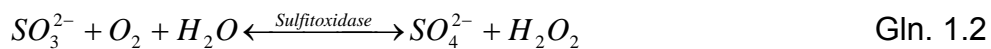
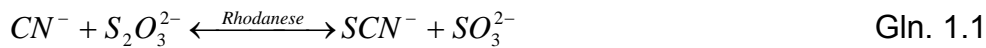
1.3.1. Cyaniderfassung mittels Biosensoren

Biosensoren werden in der Umweltanalytik häufig für die Überwachung von Phosphat, Ammoniak und gelöstem Sauerstoff in Gewässern eingesetzt. Die Vorteile von Biosensoren liegen hauptsächlich in ihrer Selektivität und den schnellen Reaktionszeiten. Für die Cyaniderfassung in Flüssigkeiten werden Biosensoren sowohl auf der Basis von Mikroorganismen als auch auf der Basis von Enzymen entwickelt. Mikroorganismen mit *Cyanidoxidase* können unter Sauerstoffverbrauch (O_2 -Verbrauch) das toxische Cyanid abbauen. Darüber hinaus verwenden einige Bakterienstämme, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, Cyanid als ihre einzige Stickstoffquelle. Für die Entwicklung von Biosensoren auf Basis von Mikroorganismen immobilisieren J.M. Lee und I. Karube diese Bakterien auf eine Clark-Sauerstoffelektrode und können Cyanid in Flüssigkeiten über den O_2 -Verbrauch amperometrisch erfassen. Sie können CN^- -Ionenkonzentrationen im Bereich von $3,8 \mu\text{mol/l}$ bis $38 \mu\text{mol/l}$ im Flusswasser nachweisen [49,50]. Auf der Basis der gleichen Bakterien entwickeln sie auch einen amperometrischen Sensor für die HCN-Bestimmung in einer Gasphase. Dafür wird ebenfalls der Mikroorganismus auf eine Clark-Sauerstoffelektrode immobilisiert, jedoch werden die Bakterien in der Gasphase zusätzlich über eine gaspermeable Teflon-Membran von der Messlösung getrennt. Durch eine Ansäuerung der Messlösung wird HCN erzeugt, das durch die gaspermeable Membran hin zu den Bakterien diffundiert und amperometrisch erfasst werden kann. Der lineare Messbereich liegt zwischen $1,5 \mu\text{mol/l}$ und $15,3 \mu\text{mol/l}$ Cyanid. Dieser Sensor zeigt nur geringe Interferenzen, da die Messlösung von dem Mikroorganismus über eine Membran getrennt ist [51].

Weitere Biosensoren auf Basis von Mikroorganismen nutzen die Inhibierung von *Cytochromoxidase*, die für die Zellatmung zuständig ist. Cyanid blockiert die *Cytochromoxidase* und reduziert somit den O_2 -Verbrauch von Mikroorganismen, der dann mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode amperometrisch erfasst werden kann. K. Ikebukuro et al. verwenden Hefebakterien (*Saccharomyces cerevisiae*) als Rezeptoren für die Erfassung von Cyanid [52]. Z. Filipovic-Kovacevic et al. setzen ebenfalls *Saccharomyces cerevisiae* für die Messung von Cyanid in Obstbränden ein. Die untere Nachweisgrenze liegt bei $30,4 \mu\text{mol/l}$ Cyanid [53]. Die Vorteile von Biosensoren auf der Basis von Mikroorganismen sind eine hohe Robustheit, ein relativ einfacher Umgang und eine relativ einfache Präparation des Biosensors. Nachteilig ist die verminderte Selektivität der Mikroorganismus-basierten

Biosensoren im Vergleich zu Enzym-basierten Biosensoren [32]. Für die Erhöhung der Selektivität von Biosensoren werden Enzyme aus Bakterien exprimiert und als Biorezeptoren direkt auf Transducerstrukturen immobilisiert. Enzym-basierte Sensoren können sowohl als direkte als auch als indirekte Sensoren für den Cyanidnachweis eingesetzt werden. Die Inhibierung von unterschiedlichen Enzymen und somit die Änderung der Enzymaktivität durch Cyanid in der Analytlösung ist eine indirekte Methode. W.J. Albery et al. und A. Amine et al. immobilisieren die *Cytochromoxidase* auf eine amperometrischen Elektrode, die die O_2 -Konzentration in Flüssigkeiten misst. Ist Cyanid in der Messlösung vorhanden, so wird die Aktivität von *Cytochromoxidase* reversibel reduziert und somit weniger O_2 produziert. Mit dem *Cytochromoxidase*-modifizierten amperometrischen Inhibierungssensor kann eine untere Nachweisgrenze von 0,4 $\mu\text{mol/l}$ bis 0,5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht werden [54,55]. C. Mousty et al. untersuchen unterschiedliche Enzyme, wie z.B. *Polyphenol Oxidase (PPO)*, *Horseradish Peroxidase (HRP)* und *Lakkase*, die für einen besseren und schnelleren Elektronentransport mit Hilfe eines Mediators auf eine amperometrische Elektrode immobilisiert werden. Dabei inhibiert Cyanid reversibel die eingesetzten Enzyme und vermindert somit deren Enzymaktivität, die über den reduzierten Verbrauch von Peroxid (H_2O_2) oder O_2 amperometrisch erfasst werden kann. C. Mousty et al. können untere Nachweisgrenzen für Cyanid von 0,1 nmol/l (für *PPO*) bis 6,2 nmol/l (für *Lakkase*) erreichen [56-58]. M.H. Smit et al. verwenden ebenfalls die *HRP* als Rezeptorenzym für einen amperometrischen Biosensor für die Cyaniderfassung. Mit diesem Sensor kann eine Stabilität des Sensors von bis zu sechs Monaten erreicht werden [59]. T. Tatsuma zeigt, dass mit Hilfe eines *HRP*-modifizierten Biosensors der Cyanidgehalt von cyanogenen Glykosiden in einem linearen Messbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 5 mmol/l erfasst werden kann [60]. Darüber hinaus wird die *HRP* auf einen ionensensitiven Feldeffekttransistor (ISFET) in einer Differenzanordnung für den Einsatz in Cyanid-haltigen Lösungen immobilisiert. Hierbei setzt *HRP* unter Verbrauch von H_2O_2 die Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure um, was in einer lokalen pH-Wert-Verschiebung resultiert, die mit Hilfe eines pH-sensitiven ISFETs erfasst werden kann. Die Inhibierung von *HRP* durch Cyanid resultiert in einer verminderten pH-Wert-Verschiebung und somit in einem Cyanid-abhängigen Signal. Die in Poly(4-Vinylpyridin-Costyren) immobilisierte *HRP* zeigt einen linearen Messbereich von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 $\mu\text{mol/l}$ Cyanid [61]. J.-L. Besombes et al. setzen die *Tyrosinase* für die Cyanidbestimmung ein und erreichen eine untere Nachweisgrenze von 0,02 $\mu\text{mol/l}$ [62]. Der große Vorteil von Cyanid-Biosensoren auf Basis einer Enzyminhibierung liegt in der sehr niedrigen unteren Nachweisgrenze. Solche Sensoren können sehr gut in definierten Cyanid-haltigen Lösungen eingesetzt werden, allerdings ist bei der indirekten Nachweismethode für Cyanid die Selektivität begrenzt. Biosensoren, die auf der direkten Katalyse von Cyanid basieren, sind sehr selektiv, denn Enzyme katalysieren substratspezifisch und wirkungsspezifisch.

Für den direkten Cyanidnachweis wird bevorzugt die *Rhodanese*, die auch im menschlichen Körper Cyanid zu Thiocyanat selektiv umsetzt, eingesetzt [63-65]. C.A. Groom et al. entwickeln ein Zwei-Enzym-System aus *Rhodanese* in Kombination mit *Sulfitoxidase* für die Cyaniderfassung. Hierbei wird entsprechend Gln. 1.1 bis Gln. 1.3 zuerst Cyanid zu Thiocyanat katalytisch von *Rhodanese* umgesetzt. Das dabei entstandene Sulfit wird über die *Sulfitoxidase* zu Sulfat und H_2O_2 transferiert, welches bei einer Spannung von 700 mV an einer Platin- (Pt-) Arbeitselektrode oxidiert wird und somit amperometrisch gemessen werden kann. Cyanid kann in einem linearen Messbereich von 5 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l selektiv erfasst werden [32,63].



K. Ikebukuro et al. verwenden ebenfalls die *Rhodanese* und *Sulfitoxidase*, um Cyanid zu bestimmen. Jedoch wird das entstandene H_2O_2 nachfolgend mittels *Peroxidase* katalysiert. Dabei entsteht Licht einer bestimmten Wellenlänge, das als Cyanid-abhängiges Chemolumineszenzsignal ausgewertet werden kann. Sie erreichen einen linearen Messbereich von 0,12 $\mu\text{mol/l}$ bis 3,8 $\mu\text{mol/l}$ und können den Sensor bis zu 150-mal wieder verwenden [64]. Darüber hinaus wird die *Rhodanese* auf einem Thermistor für die Cyaniderfassung immobilisiert. Die bei der selektiven Katalyse entstandene Reaktionswärme wird als Cyanid-abhängiges Signal gemessen. Der lineare Messbereich ist von 20 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l Cyanid mit einer Stabilität des Biosensors von bis zu 200 h im Betrieb [66]. A. Merkoci et al. entwickeln eine direkte Nachweismethode für Cyanid aus cyanogenen Glykosiden basierend auf der β -*Glukosidase*, die in eine Silberiodid/Silbersulfid- ($\text{AgI}/\text{Ag}_2\text{S}$ -) Matrix gepresst wird. Die Stabilität des Sensors beträgt mehr als drei Monate [67].

Ein weiteres Enzym für die direkte Katalyse von Cyanid ist die *Cyanidase*. Der Vorteil für den Einsatz von *Cyanidase* in der Biosensorik ist, dass sie nicht, wie die *Rhodanese*, Sulfit für die katalytische Reaktion benötigt. Die *Cyanidase* setzt Cyanid selektiv und reversibel zu Ammoniak (NH_3) und Formiat (HCOOH) (s. Gln. 1.4) um [32,68-70].



S. Basheer et al. verwenden die *Cyanidase* direkt für den Abbau von Cyanid in industriellen Abwässern [71,72]. K.K.W. Mak setzt die *Cyanidase* in einem Drei-Enzym-System ein. Das durch die enzymatische Katalyse von Cyanid mit *Cyanidase* entstandene Formiat wird nachfolgend durch die *Formiatdehydrogenase* unter Verbrauch von Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) zu Kohlenstoff (CO_2) und der oxidierten Form von NAD^+ , zu NADH , katalysiert. Die *Salicylathydroxylase* setzt wieder das entstandene NADH unter Verbrauch von O_2 zu NAD^+ um. Dabei kann der

Verbrauch von O₂ mittels einer Clark-Sauerstoffelektrode als Cyanid-abhängiges Signal amperometrisch erfasst werden [32,73]. Mit dieser direkten Nachweismethode für Cyanid werden eine untere Nachweisgrenze von bis zu 0,1 µmol/l Cyanid und eine Stabilität von sieben Tagen erreicht. Solche Multienzymsysteme haben jedoch den Nachteil von mehreren Enzymen, die jeweils durch ihre Umgebung negativ beeinflusst werden können. Je nach Wahl der Analyt-Hintergrundlösung können nicht die Aktivitätsoptima (pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration) von allen drei Enzymen eingestellt werden, was zu einer verminderten Enzymaktivität der einzelnen Enzyme führen kann. Darüber hinaus kann der Biosensor nur dann funktionieren, wenn alle Enzyme aktiv sind. Um einen relativ einfachen und selektiven Cyanidsensor auf Basis der *Cyanidase* zu entwickeln, wird von M. Keusgen et al. die *Cyanidase* [EC 3.5.5.1] von Novo Nordisk, Mainz, in einem Durchflusssystem in Kombination mit einer potentiometrischen Ammoniak-ISE für Cyanidkonzentrationen von 20 µmol/l bis 300 µmol/l erfolgreich eingesetzt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 6 µmol/l Cyanid [74,75]. Die exemplarisch in diesem Kapitel vorgestellten Biosensoren sind in Tab. 1.3 zusammengefasst.

Tab. 1.3: Zusammenfassung von Biosensoren für die Cyaniderfassung.

Biosensor	Linearer Messbereich und untere Nachweisgrenze (uNwG)	Referenz
Mikroorganismus-basierter Sensor		
O ₂ -Verbrauch von Bakterien	3,8-38 µmol/l	[49,50]
O ₂ -Verbrauch von Bakterien (Gasphase)	1,53-15,3 µmol/l	[51]
Inhibierung von <i>Cytochromoxidase</i>	0,15-30,4 µmol/l (uNwG)	[52,53]
Enzym-basierter Sensor (indirekt)		
Inhibierung von <i>Cytochromoxidase</i>	0,4-0,5 µmol/l (uNwG)	[54,55]
Inhibierung von <i>HRP</i> (amperometrisch)	0,0017-2,1 µmol/l, 10-5000 µmol/l	[57,59,60]
Inhibierung von <i>HRP</i> (ISFET)	0,1-10 µmol/l, 10-1000 µmol/l	[61]
Inhibierung von <i>PPO</i>	0,0001 µmol/l (uNwG)	[56]
Inhibierung von <i>Lakkase</i>	0,01-0,05 µmol/l, 6,2 µmol/l (uNwG)	[58]
Inhibierung von <i>Tyrosinase</i>	0,02 µmol/l (uNwG)	[62]
Enzym-basierter Sensor (direkt)		
<i>Rhodanese</i> (amperometrisch)	5-1000 µmol/l	[63]
<i>Rhodanese</i> (chemolumineszent)	0,12-3,8 µmol/l	[64]
<i>Rhodanese</i> (thermisch)	20-1000 µmol/l	[66]
<i>Injectase</i> (thermisch)	20-600 µmol/l	[66]
β-Glukosidase (potentiometrisch)	25,1 µmol/l (uNwG)	[67]
Enzym-basierter Sensor (direkt)		
<i>Cyanidase</i> (amperometrisch)	0,1 µmol/l (uNwG)	[32,73]
<i>Cyanidase</i> (potentiometrisch)	20-300 µmol/l	[74,75]

1.3.2. Cyaniderfassung mittels Ag-basierter ionenselektiver Elektroden

Die Cyaniderfassung mittels Ag-basierter Sensoren funktioniert hauptsächlich auf der Bildung von Silberdicyano- ($\text{Ag}(\text{CN})_2^-$) Komplexen. Diese Komplexbildung von CN^- -Ionen und Ag^+ -Ionen wird bereits 1850 von Liebig (Liebig's Titrierung) für die Titrierung von Cyanid-haltigen Lösungen mit einer Silbernitrat-Lösung genutzt. Dabei wird der Überschuss von Silber in der Lösung mit unterschiedlichen Methoden, wie z.B. Kolorimetrie, Spektrophotometrie, Amperometrie oder Potentiometrie, gemessen. Der große Vorteil solcher indirekten Methoden zum Cyanidnachweis ist die relativ einfache Handhabung. Nachteilig jedoch ist die Notwendigkeit von relativ hohen CN^- -Ionenkonzentrationen ($>15 \mu\text{mol/l}$), was zu relativ hohen unteren Nachweisgrenzen führt. Darüber hinaus wird die Probe durch die Zugabe von AgNO_3 verändert [76,77].

Für die direkte Erfassung von Cyanid in Lösungen werden weiterhin die amperometrische und die gepulste amperometrische Detektion (PAD) vorgeschlagen. Hierbei wird bei einer bestimmten angelegten Spannung durch die Bildung von $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ -Komplexen die Silberelektrode oxidiert. An der Silberelektrode werden Elektronen freigesetzt, die als Strom in Abhängigkeit von der CN^- -Ionenkonzentration gemessen werden können (s. Gln. 1.5).



B. Pihlar et al. machen sich einen Ag-Draht als Arbeitselektrode mit einer angelegten konstanten Spannung von -500 mV in einer zylindrischen Durchflussmessanordnung für die Bestimmung des Cyanidgehalts in pharmazeutischen Abwässern zunutze. Der lineare Messbereich liegt zwischen 7 nmol/l und 15 mmol/l Cyanid [78]. A. Nagy et al. und H. Hachiya et al. verwenden Ag-Disk-Elektroden mit einem Durchmesser von 1-5 mm als „Air-Gap“-Arbeitselektroden für die Erfassung von gasförmigem HCN und können damit eine untere Nachweisgrenze von 83 nmol/l Cyanid erreichen. Jedoch wird das Sensorsignal stark durch Sulfide in der Messlösung beeinflusst. Bei der Ansäuerung der Probe zur Freisetzung von HCN wird ebenfalls gasförmiger Schwefelwasserstoff gebildet, der von der Ag-Elektrode erfasst wird [79,80]. X. Dai et al. erweitern die amperometrische Erfassung von freien CN^- -Ionen und HCN mit einer Ag-Arbeitselektrode auf eine zusätzliche Erfassung von Cyanid-Kupfer-Komplexen [81]. Da bei der amperometrischen Cyaniderfassung mit einer angelegten konstanten Spannung $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ an der Elektrodenoberfläche angelagert wird (Elektrodenfouling), muss die verwendete Arbeitselektrode regelmäßig poliert bzw. ausgetauscht werden. Um dieses zu umgehen, wird die PAD von Cyanid eingeführt. Hierbei wird nach der Oxidation der Elektrode durch eine angelegte negative Spannung, eine positive Spannung an die Elektrode angelegt, um diese wieder zu reduzieren und somit zu „reinigen“. C. Giuriati et al. und T.T. Christison et al. verwenden Ag-Sensoren für die PAD von Cyanid mit vorangegangener Separation der Probe durch den Einsatz von Ionenchromatographie (IC) [82,83]. Die Sensoren zeigen eine Stabilität von einem Monat. Unter Anwendung der PAD für die

Cyaniddetektion können J. Cheng et al. mit Ag-Dünnschichtsensoren eine Stabilität von 5-7 Tagen erzielen [84]. In den letzten Jahren führt die Firma Dionex kommerzielle automatisierte Systeme mit IC und PAD für die Cyanidmessung mit sog. Wegwerf/Einweg-Dünnschichtsensoren auf Ag-Basis ein [85].

Neben amperometrischen Sensoren werden seit den 1970er Jahren potentiometrische ISEs auf der Basis von Ag-Halogeniden und Ag-Chalkogenidgläsern für die direkte Messung von Cyanid in Flüssigkeiten eingesetzt [32,77]. Zu den Ag-Halogeniden gehören z.B. AgCl, AgBr und AgI. Der Messmechanismus von ISEs mit einer Ag-Halogenid-Membran basiert auf der partiellen Korrosion der Membran durch die Bildung von $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ -Komplexen (s. Kap. 2.4.1). Die zu erwartende Sensitivität beträgt 59 mV/pCN. E. Pungor et al. untersuchen unterschiedliche heterogene Ag-Halogenid-Membranen (Ag-Halogenide in Silikongummi) in Cyanid-haltigen Lösungen. Für Cyanidkonzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l (linearer Bereich) korrelieren die experimentellen Ergebnisse mit einer Silberiodid-ISE mit den berechneten theoretischen Betrachtungen sehr gut. Darüber hinaus wird gezeigt, dass auch Silberchlorid- und Silberbromid-Membranen für die Cyaniderfassung eingesetzt werden können [86-90]. Zusätzlich können E. Pungor et al. pharmazeutisch relevante Pflanzen, wie z.B. Cyanocobalamin, mit Hilfe einer AgI-ISE auf deren Cyanidgehalt quantitativ untersuchen [91,92]. Bulk-ISEs mit homogenen AgI-Membranen als Presslinge werden von der Firma Orion kommerziell vertrieben. Die untere Nachweisgrenze solcher Elektroden liegt bei 10 $\mu\text{mol/l}$ Cyanid [93-96]. Da die Membran der Ag-Halogenid-Sensoren bei den Cyanidmessungen partiell zerstört und somit verbraucht wird, ist die Langzeitstabilität der Elektroden über Membranoberfläche, -dicke und Cyanidkonzentration der Probe bestimmt und kann relativ kurz sein. Daher entwickeln Harzdorf et al. eine „Second kind“-Ag/AgI-Elektrode für die Cyaniderfassung. Hierbei wird ein Ag-Draht elektrolytisch mit einer AgI-Schicht bedeckt, die nach der Korrosion bei den Cyanidmessungen wieder elektrolytisch beschichtet werden kann. Der lineare Messbereich mit dieser Elektrode beträgt zwischen 1 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l Cyanid und die Stabilität der Elektrode ist bis zu drei Wochen [97]. Darüber hinaus wird für die Erhöhung der Stabilität von Ag-Halogenid-Elektroden der AgI-Membran eine stabile Silbersulfid- Matrix zugemischt. Da Ag_2S eine sehr kleine Löslichkeitskonstante besitzt, wird es nur wenig von Cyanid gelöst und dient somit in der AgI/ Ag_2S -Membran als stabile Matrix. Homogene und heterogene Bulk-AgI/ Ag_2S -ISEs für die Bestimmung von Cyanid in Flüssigkeiten sind kommerziell erhältlich [93,98,99].

Um die Stabilität und Sensitivität von potentiometrischen Ag-ISEs für die quantitative Erfassung von Cyanid zu erhöhen, werden parallel zu den Entwicklungen von Ag-Halogenid-Sensoren, die Ag-Chalkogenidglas-ISEs eingeführt. Zu den Ag-Chalkogenidglas-Membranen gehören z.B. Ag_2S -, Ag_2Se - und Ag_2Te -Materialien. Sie zeichnen sich vor allem durch eine hohe Stabilität in den aggressiven Cyanidlösungen aus. Der Messmechanismus von Cyanid mittels solcher Ag-Chalkogenidglas-ISEs basiert ebenfalls auf der Komplexbildung von $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ und

wird von W.E. Morf et al. 1974 beschrieben (s. Kap. 2.4.2) [98,100,101]. Die zu erwartende Sensitivität beträgt 118 mV/pCN und ist somit 2-mal so groß wie die der Ag-Halogenid-ISEs. In der Literatur finden sich Sensitivitäten zwischen 100 mV/pCN und 120 mV/pCN mit unterschiedlichen Bulk-Ag₂S-ISEs (heterogene, homogene, ein- und polykristalline Elektroden) [100,102,103]. Weitere Membransysteme, wie z.B. AgSeTe- oder AgSe-Membranen, werden von M.T. Neshkova et al. in Form von Dünnschichtsensoren für die Cyaniderfassung vorgestellt. Die Herstellung von solchen nicht-stöchiometrischen µm-dünnen Schichten erfolgt mittels elektrochemischer Abscheidung. Neshkova et al. charakterisieren diese Sensoren in einer Fließinjektionsanalyse und auch den Einfluss von unterschiedlichen Interferenzen auf die Sensorsignale [104-108]. Mit Dünnschicht-ISEs mit Membranen aus AgSeTe und AgSe können sie Sensitivitäten von jeweils 101 mV/pCN (5 µmol/l bis 1 mmol/l Cyanid) und 108 mV/pCN (6 µmol/l bis 1 mmol/l Cyanid) erreichen [109].

Darüber hinaus wird im Hinblick auf eine höhere Stabilität und Sensitivität von bis zu 118 mV/pCN und eine niedrige untere Nachweisgrenze von Cyanid mit unterschiedlichen Ag-ISEs die Indikatorstechnik in Kombination mit dem Gran-Plot von M.S. Frant et al. entwickelt [110]. Hierbei wird in eine Indikatorlösung, beispielsweise eine 10 µmol/l Ag(CN)₂⁻-Lösung, die Cyanid-haltige Probe sequentiell hinzu pipettiert und das Spannungssignal an der Ag-ISE in der Lösung gemessen. Durch die Zugabe der Cyanid-haltigen Probe in die Indikatorlösung verschiebt sich das dynamische Gleichgewicht (Gln. 1.6) nach rechts. Um die vorherige Gleichgewichtslage zu erreichen, werden Ag⁺-Ionen verbraucht. Der Verbrauch dieser Ag⁺-Ionen wird direkt mittels einer Ag-ISE erfasst. Bei einer unbekannt kleinen Konzentration von CN⁻-Ionen in der Lösung kann mit Hilfe des Gran-Plots die unbekannt Konzentration über Extrapolation graphisch ermittelt werden [110].



M.S. Frant et al. erreichen mittels dieser Methode zum Cyanidnachweis eine 10-mal kleinere untere Nachweisgrenze als bei Messungen ohne Indikatorstechnik. M. Hofton kann in einer kontinuierlichen Messanordnung unter Verwendung einer Ag-ISE und der Indikatorstechnik in industriellen Abwässern von Stahlwerken CN⁻-Ionenkonzentrationen von bis hinzu 0,15 µmol/l nachweisen [111]. R.A. Durst et al. und J. Fligier et al. fixieren zur Bestimmung von HCN die AgNO₃-Lösung mit Hilfe einer gaspermeablen Membran direkt an die Oberfläche einer Ag-ISE. Wird die Messlösung angesäuert, so entsteht das gasförmige HCN, das durch die gaspermeable Membran in die Indikatorlösung diffundieren und dort mit Hilfe der Ag-ISE direkt gemessen werden kann [112-114].

Weitere Entwicklungen bezüglich Ag-basierter Chemosensoren für Cyanid nutzen z.B. Ag-Nanopartikel auf einem Piezoquartzkristall-Sensor [115], „Nano-Ag coated multiwalled carbon nanotubes“ [116], Ag-Nanopartikel in Sol-Gel-Netzwerken [117] und AgI/Ag₂S-Salz in Öltröpfchen als sensitive Membran einer ISE [118].

1.3.3. Schwermetallerfassung mittels Chalkogenidglassensoren

Für die qualitative und quantitative Bestimmung von Schwermetallen in Flüssigkeiten werden ISEs auf Basis von Chalkogenidgläsern in den 1970er Jahren von C.T. Baker, I. Trachtenberg und R. Jasinski eingeführt [119-121]. Sie entwickeln Chalkogenidglasmembranen für den Nachweis von Fe^{3+} - und Cu^{2+} -Ionen. Die Herstellung von Sensormembranen auf Chalkogenidglasbasis wird 1980/1981 von A.E. Owen und C. Bohnke et al. für die Bestimmung von Cu^{2+} -, Pb^{2+} - und Hg^{2+} -Ionen vorgestellt [122,123]. 1986 untersuchen N. Tohge et al. Sensoren für den Nachweis von Hg^{2+} -, Cd^{2+} - und Cu^{2+} -Ionen [124]. Darüber hinaus führen Y.G. Vlasov et al. ab Ende der 1970er Jahre eine systematische Synthese sowie intensive physikalische und elektrochemische Untersuchungen von neuartigen nicht-kristallinen Chalkogenidglasmaterialien für die Erfassung von Cu^{2+} -, Pb^{2+} -, Ag^+ - und Cd^{2+} -Ionen in Flüssigkeiten durch. Y.G. Vlasov et al. untersuchen ebenfalls den Potentialbildungsmechanismus von Chalkogenidglasmembranen für die Bestimmung von Cu^{2+} -Ionen [125-133]. Die Erfassung von Schwermetallionen mit solchen ISEs basiert auf einem aktiven, dynamischen Austausch von Schwermetallionen aus der Analytlösung mit Schwermetallionen in der Chalkogenidglasmembran. Dies führt zu einer Änderung des Oberflächenpotentials, die von der Konzentration der Schwermetalle in der Messlösung abhängt (s. Kap. 2.5).

Für die Herstellung der Chalkogenidglasmaterialien werden die benötigten chemischen Komponenten des Chalkogenidglases in Quarzampullen gefüllt, evakuiert, auf 600-1000 °C nach einem bestimmten Temperaturregime erhitzt und anschließend schnell wieder auf Raumtemperatur abgeschreckt (z.B. im Eisbad, flüssigem Stickstoff). Die sensorischen Eigenschaften (ionische, elektrische Leitfähigkeit) sind von der Zusammensetzung der einzelnen Komponenten abhängig [125]. Für konventionelle potentiometrische Chalkogenidglas-ISEs wird das feste Chalkogenidglasmaterial aus den Ampullen herausgenommen, in Scheiben gesägt, in ein wasserdichtes Gehäuse montiert und mittels Silberdraht über einen Festkörperkontakt elektrisch kontaktiert. Zur messtechnischen Kontaktierung wird ein Kabel aus dem Gehäuse herausgeführt. Abb. 1.2 zeigt ein Foto konventioneller Chalkogenidglas-ISEs für die Erfassung von Pb^{2+} -, Cu^{2+} -, Cd^{2+} -, TI^+ - und Ag^+ -Ionen in Flüssigkeiten.

Im Hinblick auf eine „Vor-Ort“- bzw. „Lab-on-a-chip“-Analytik werden solche Chalkogenidglas-ISEs in jüngster Vergangenheit miniaturisiert. Hierbei wird hauptsächlich das Bulk-Chalkogenidglas-Material mit Hilfe von unterschiedlichen Dünnschicht-Verfahren als dünne Membran auf z.B. potentiometrische oder Feldeffekt-basierte Sensortransducer abgeschieden. In den 1980er Jahren werden erste Versuche von Y.G. Vlasov et al. und Y.A. Tarantov et al. durchgeführt, um dünne Chalkogenidglasmembranen auf ISFETs abzuscheiden. Hierbei wird mittels Hochfrequenz- (RF-) Co-Sputtern eine Cu^{2+} -ionensensitive Membran auf die Feldeffekt-Struktur aufgebracht [133,134]. Darüber hinaus werden weitere Verfahren

wie z.B. RF-Magnetron-Sputtern [135], Sputtern in Kombination mit Ionenimplantation [136], Ionenimplantation [133], Aufdampfen [137,138] und thermische Verdampfung mit Photodotierung [139,140] für die Herstellung von Dünnschichtsensoren für die Schwermetallanalytik in Flüssigkeiten in der Literatur diskutiert. Die elektrochemische Deposition von dünnen Chalkogenidglasmembranen für den Nachweis von Schwermetall- und Cyanidionen wird von A.V. Legin et al. und M.T. Neshkova et al. vorgestellt [107,141,142]. Jedoch stellen physikalische Verfahren zur stöchiometrischen Deposition von dünnen Chalkogenidglasmembranen häufig ein Problem dar, da diese Multikomponentengemische sind. Sie können bis zu sechs unterschiedliche Komponenten enthalten, die unterschiedliche Dampfdrücke besitzen. Für eine definierte Funktionalität der Chalkogenidglas-ISEs (Bulk- und Dünnschichtsensoren) ist deshalb die Einhaltung der Stöchiometrie der Membran vorrangig. Für die stöchiometrische Abscheidung von Chalkogenidglasmembranen wird die gepulste Laserabscheidung (PLD-Verfahren) von M.J. Schöning et al. verwendet und so potentiometrische Dünnschicht-ISEs für die Schwermetallanalytik realisiert [143-146]. Bei diesem Verfahren wird das Chalkogenidglas vom Bulkmaterial "schlagartig" abgetragen und auf der Transducerstruktur abgeschieden, so dass die ursprüngliche Stöchiometrie des Targetmaterials erhalten bleibt.



Abb. 1.2: Foto von konventionellen Chalkogenidglas-ISEs für die Erfassung von Pb^{2+} -, Cu^{2+} -, Cd^{2+} -, TI^+ - und Ag^+ -Ionen in Flüssigkeiten.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Promotionsarbeit ist die Entwicklung von Silizium-basierten Bio-/Chemosensoren für die qualitative und quantitative Erfassung von Cyanid und/oder Schwermetallen in Flüssigkeiten. Die Vorteile von solchen Chipsensoren liegen in der guten Kompatibilität zur Siliziumtechnologie und in der Möglichkeit, die Sensoren als Sensorarrays zu miniaturisieren und somit „Vor-Ort“-Analysen durchzuführen. Darüber hinaus kann die Herstellung von Si-basierten Sensoren in großen Stückzahlen kostengünstig erfolgen. Die einzelnen Arbeitsziele der Promotion werden nachfolgend stichpunktartig dargestellt:

- Entwicklung eines kapazitiven Cyanidase-basierten EIS Sensors für die Cyaniderfassung: Hierbei sollen im ersten Schritt unterschiedliche kapazitive, pH-sensitive EIS-Strukturen im Hinblick auf die physikalischen/optischen Eigenschaften und im Hinblick auf die intrinsischen Sensoreigenschaften in verschiedenen pH-Puffern charakterisiert werden. Darüber hinaus soll der Einfluss der Enzymschicht und der Messbedingungen auf das Verhalten der pH-sensitiven Feldeffekt-Struktur untersucht werden. Im zweiten Schritt soll, im Hinblick auf eine möglichst große Enzymaktivität der *Cyanidase* auf dem Sensorchip, die Immobilisierung der *Cyanidase* mit Hilfe von Enzymaktivitätsmessungen und Enzymmengenbestimmung optimiert werden. Im dritten Schritt soll der *Cyanidase*-basierte EIS-Sensor für den Einsatz in Cyanid-haltigen Lösungen charakterisiert und bezüglich einer optimalen Signalausbeute optimiert werden.
- Entwicklung von potentiometrischen Ag-basierten ionenselektiven Elektroden für die Cyaniderfassung: Es sollen sowohl Ag-Halogenid-ISEs als auch Ag-Chalkogenidglas-ISEs auf Chipbasis mit Hilfe der Dickschichttechnik und des PLD-Verfahrens hergestellt und im Hinblick auf die physikalischen/optischen Eigenschaften sowie bezüglich der intrinsischen Sensorparameter in Cyanid-haltigen Lösungen charakterisiert werden. Die elektrochemischen Untersuchungen sollen im direkten Vergleich zu Messungen mit einer kommerziellen Bulk-Ag-Halogenid-ISE durchgeführt werden. Es soll evaluiert werden, welche Ag-basierte ISE für die Cyaniderfassung in realen Probenlösungen am geeignetsten ist.
- Entwicklung einer hybriden Messzelle und eines Messprotokolls für simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen: Für die Herstellung eines hybriden Messsystems für simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen sollen im ersten Schritt unterschiedliche Schwermetall-ISEs mit einer spezifischen Schwermetall-Chalkogenidglasmembran unter Anwendung des PLD-Verfahrens hergestellt werden. Sie sollen physikalisch im Hinblick auf ihre physikalischen/optischen Eigenschaften und in den jeweiligen Schwermetalllösungen elektrochemisch auf ihre intrinsischen

Sensoreigenschaften hin charakterisiert werden. Für die Messung von Cyanid soll die optimierte Ag-Chalkogenidglas-ISE eingesetzt werden. Für die simultanen Messungen von Schwermetallen und Cyanid sollen eine hybride Messzelle und ein zugehöriges Messprotokoll entwickelt werden. Die Validierung der hybriden Messzelle und des Messprotokolls soll anhand von simultanen Messungen von Schwermetallen und Cyanid erfolgen.

- Entwicklung einer „elektronischen Zunge“ für die qualitative und quantitative Erfassung von unterschiedlichen Schwermetallgemischen: Für den Einsatz von Chalkogenidglas-basierten ISEs in gemischten Schwermetalllösungen soll eine Multisensoranordnung in Form einer „elektronischen Zunge“ entwickelt werden. Hierzu soll zunächst ein Sensorarray hergestellt und charakterisiert werden. Für die Entwicklung der dazugehörigen intelligenten Software – eines Fuzzy-Logic-Programms – soll das Sensorarray in Schwermetallgemischen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und Konzentrationen kalibriert werden. Die entwickelte Sensorarrayanordnung auf Chalkogenidglasbasis soll anhand von Selbsttests bzw. Messungen in unbekanntem Schwermetalllösungen evaluiert werden.

2. Theorie

Zum Verständnis der gewählten Verfahren zur Herstellung der Sensorstrukturen, der Messmethoden und der Funktion der Sensoren werden in diesem Kapitel die theoretischen Grundlagen, von der Enzymkinetik über die Eigenschaften und Funktionalität von Feldeffekt-basierten und potentiometrischen Sensoren, bis hin zu den theoretischen Grundlagen zur Funktionalität der entwickelten Bio-/Chemosensoren für die Cyanid- und Schwermetallbestimmung in Flüssigkeiten, dargestellt.

2.1. Enzymkinetik

Enzyme (griech. Enzymos) sind essentielle Proteine, die (bio-)chemische Prozesse beschleunigen (katalysieren), ohne dabei selbst verbraucht zu werden. Viele biochemische Reaktionen würden ohne Enzyme wesentlich langsamer ablaufen und somit quasi nicht stattfinden. Diese Katalysatoren werden schon vor 4000 Jahren für die Herstellung von Brot, Wein und Käse verwendet. Heutzutage finden Enzyme verbreitet sowohl in der Industrie (Lebensmittel-/Getränkeindustrie, chemische Industrie, Pharmazie, etc.) als auch in der Wissenschaft, wie z.B. für Untersuchungen von kinetischen und strukturellen Grundlagen, ihren Einsatz. In der Pharmazie werden gezielt Inhibitoren für Enzyme, die eine bestimmte Krankheit beschleunigen, entwickelt und für therapeutische Zwecke eingesetzt. Aspirin wirkt beispielsweise als Inhibitor für das Enzym *Prostaglandinsynthase*, welches für die Entzündung im Körper verantwortlich ist. Hierbei bindet Aspirin an das aktive Zentrum der *Prostaglandinsynthase* und verhindert damit die katalytische Umsetzung von Substraten zu entzündenden Produkten. Für die Enzymaktivität spielt somit die Struktur des Enzyms, vor allem seines aktiven Zentrums, eine wichtige Rolle [147-149].

Enzyme bestehen aus gefalteten Proteinketten, die hauptsächlich aus den 20 natürlichen Aminosäuren aufgebaut sind. Für die Primärstruktur kondensieren die einzelnen Aminosäuren zu Peptiden, Polypeptiden und Proteinen, die dann in der Sekundärstruktur über nicht-kovalente Bindungen zur α -Helix und/oder β -Planarstruktur zusammen gefügt werden. Für die katalytische Funktionalität der Proteine werden diese in eine drei-dimensionale Struktur, der Tertiärstruktur und/oder der Quartiärstruktur unter Einbindung weiterer Proteine/Subeinheiten, unter Entstehung eines definierten aktiven Zentrums gefaltet. Viele Enzyme benötigen zusätzlich für die katalytische Umsetzung des Substrats noch Co-Enzyme, die häufig auch im aktiven Zentrum gebunden sind.

Enzyme sind sowohl wirkungsspezifisch als auch substratspezifisch. Nach der IUPAC werden Enzyme in sechs verschiedene Klassen, abhängig von ihrer

Wirkung/Reaktion eingeteilt (s. Tab. 2.1). Von der Enzyme Commission werden die Enzyme systematisch numerisch katalogisiert [150].

Tab. 2.1: Zusammenfassung der Enzymklassen und ihre Funktion.

EC-Nummer	Enzymklasse	Reaktion
1	<i>Oxido-Reduktase</i>	Oxidation-Reduktion
2	<i>Transferase</i>	Transfer von chemischen Gruppen
3	<i>Hydrolase</i>	Schnitt von hydrolytischen Bindungen
4	<i>Lyase</i>	Schnitt von nicht hydrolytischen Bindungen
5	<i>Isomerase</i>	Änderung der Position von Atomen in Molekülen
6	<i>Ligase</i>	Zusammenfügen von mehreren Molekülen

Die Substratspezifität und somit die Selektivität eines Enzyms werden von E. Fischer und D. Koshland [151,152] über die Bindung des Substrats an das aktive Zentrum des Enzyms beschrieben. Es werden drei Bindungsmechanismen des Substrats an das Enzym diskutiert (s. Abb. 2.1): Beim „Schlüssel-Schloss“-Prinzip hat das Enzym ein starres aktives Zentrum mit einer bestimmten Struktur, in das nur ein Substrat mit komplementärer Struktur stereochemisch hinein passt, um katalysiert zu werden. Um die Flexibilität des aktiven Zentrums des Enzyms zu erfassen, wird von D. Koshland das „Induced-fit“-Modell vorgeschlagen. Hierbei fügt sich das aktive Zentrum um das Substrat, um eine enge komplementäre Bindung zwischen Substrat und Enzym für die enzymatische Katalyse zu erreichen. Wenn Co-Enzyme für die enzymatische Reaktion benötigt werden, wird in der Literatur auf das sog. „Three-point attachment“-Modell verwiesen. Hier wird das Substrat insgesamt über drei Stellen mit dem aktiven Zentrum des Enzyms und dem Co-Enzym im aktiven Zentrum gebunden [148,153].

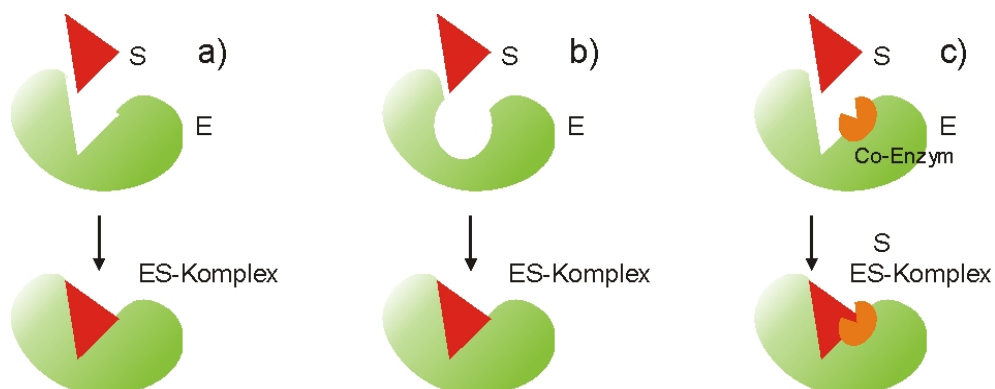


Abb. 2.1: Schematische Darstellung a) des „Schlüssel-Schloss“-Prinzips, b) des „Induced-fit“-Modells und c) des „Three-point attachment“-Modells.

Die Kinetik von Enzymen kann mit Hilfe des zweiten Hauptsatzes der Thermodynamik angenähert werden (Gln. 2.1).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Gln. 2.1}$$

Dabei ändert sich die freie Reaktionsenthalpie (ΔG) bei einer konstanten Temperatur (T) mit der Änderung der Enthalpie (Wärme) (ΔH) und Entropie (Unordnung) (ΔS) in einer chemischen Reaktion. Für die freie Energie gilt:

$\Delta G < 0 \rightarrow$ spontane Reaktion, Energie wird frei,

$\Delta G > 0 \rightarrow$ nichtspontane Reaktion, Energie wird benötigt,

$\Delta G = 0 \rightarrow$ Reaktion ist im Gleichgewichtszustand.

Darüber hinaus ist ΔG unabhängig vom Weg, d.h. die Energie vom Anfangs- und Endzustand ist nicht abhängig von energetischen Zwischenzuständen. Für eine reversible chemische Reaktion zwischen Substrat (S) und Produkt (P) (Gln. 2.2) kann die freie Reaktionsenthalpie mit Gln. 2.3 beschrieben werden.



$$\Delta G = \Delta G_0 + RT \ln\left(\frac{[P]}{[S]}\right) \quad \text{Gln. 2.3}$$

Hierbei ist ΔG_0 die freie Energie einer Reaktion unter Standardbedingungen (Konzentration 1 mol/l, Druck 1 atm). Durch die eckigen Klammern wird die Konzentration des Substrats und Produkts in mol/l ausgedrückt, und R und T sind jeweils die ideale Gaskonstante ($1,98 \cdot 10^{-3}$ kcal/(mol $^\circ$ C)) und die Temperatur in K. Für einen Gleichgewichtszustand der Reaktion ist $\Delta G = 0$ und aus Gln. 2.3 resultiert Gln. 2.4.

$$\Delta G_0 = -RT \ln\left(\frac{[P]}{[S]}\right) \quad \text{Gln. 2.4}$$

Bei der katalytischen Umsetzung des Substrats durch das Enzym werden im aktiven Zentrum gleichzeitig sowohl kovalente Bindungen gebrochen als auch erstellt. Diesen hochenergetischen Zustand nennt man den Transitionszustand. Damit eine Reaktion stattfinden kann, muss das Substrat in diesen hochenergetischen und instabilen Zustand gelangen. Hierfür wird die sog. Aktivierungsenergie (E_a) benötigt, die die Differenz aus der Energie des Transitionszustands und der Energie des Reaktionszustands ist. Für das Gleichgewicht des Substrats im Transitionszustand (S^{++}) und des Substrats im Reaktionszustand, kann nun Gln. 2.5 unter zu Hilfenahme von Gln. 2.4 abgeleitet werden.

$$[S^{++}] = [S] \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Gln. 2.5}$$

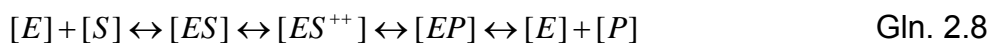
Die Geschwindigkeit der Reaktion (v), d.h. die dynamische Abnahme von Substrat im Reaktionszustand, kann mit Hilfe der Vibrationsfrequenz (ν) nach Gln. 2.6 beschrieben werden.

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = v[S^{++}] = [S] \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Gln. 2.6}$$

Hierbei sind k_B die Boltzmann Konstante ($1,381 \cdot 10^{-23}$ J/K) und h das Planck'sche Wirkungsquantum ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Js). Die Geschwindigkeitskonstante ersten Grades (k) kann dann anschließend über die Arrhenius-Gleichung ausgedrückt werden (s. Gln. 2.7).

$$k = [S] \frac{k_B T}{h} \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Gln. 2.7}$$

Bei der thermodynamischen Betrachtung der enzymatischen Katalyse vom Substrat zum Produkt ergeben sich folgende energetische Zustände (Gln. 2.8).



Bei der enzymatischen Katalyse bindet zunächst das Substrat an das aktive Zentrum des Enzyms (E), ein Enzym-Substrat-Komplex (ES) entsteht. Dieser geht dann reversibel in den Transitionszustand (ES^{++}) und anschließend reversibel in den Enzym-Produkt-Komplex (EP) über. Anschließend zerfällt der Enzym-Produkt-Komplex in Enzym und Produkt. In Abb. 2.2 werden schematisch die Energiezustände einer enzymatisch katalysierten Reaktion im Vergleich zu einer chemischen Reaktion ohne Enzym dargestellt.

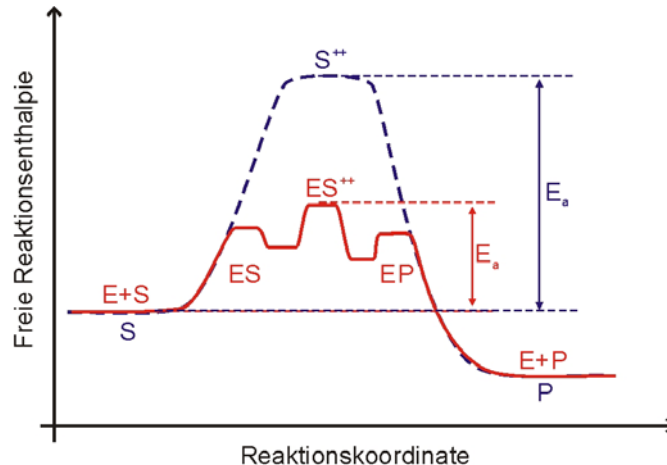
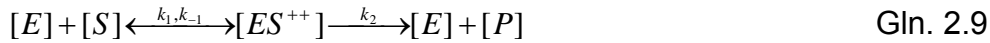


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Energieniveaus und benötigten Aktivierungsenergien für eine enzymatisch katalysierte (rot) und eine chemische Reaktion ohne Enzym (blau) [147,148].

Das Anfangs- und Endniveau beider Reaktionen sind identisch, jedoch benötigt das Substrat ohne Enzym eine wesentlich höhere Aktivierungsenergie, damit die Reaktion zum Produkt stattfinden kann. Daraus folgt, dass die Reaktion unabhängig vom Reaktionsweg ist, denn die energetischen Zustände von Substrat und Produkt sind für beide Reaktionen gleich. Das Enzym beeinflusst somit nicht die Lage des Reaktionsgleichgewichtes, sondern setzt die für die Reaktion benötigte Aktivierungsenergie herab und beschleunigt somit den Reaktionsablauf. Wird die

Aktivierungsenergie durch das Enzym um z.B. 4 kcal/mol herabgesetzt, so wird die Geschwindigkeit der Reaktion (v) nach Gln. 2.6, um den Faktor 1000 beschleunigt.

Für die Berechnungen der enzymatischen Gleichgewichte wird 1913 von V. Henri und L. Michaelis et al. ein vereinfachtes Modell, das nur auf drei Energiezuständen basiert, herangezogen (Gln. 2.9) [154,155].



Dabei beschreiben k_1 , k_{-1} und k_2 die Geschwindigkeiten der Teilreaktionen. Mit Hilfe der vereinfachten/reduzierten Reaktionsgleichgewichte in Gln. 2.9 wird die Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit der gesamten Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration hergeleitet und ist in Gln. 2.10 dargestellt.

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Gln. 2.10}$$

Hierbei sind v_{\max} die maximale Geschwindigkeit des Enzyms (höchste Enzymaktivität) und K_m die Michaelis-Konstante, die die Substratkonzentration bei der halben maximalen Geschwindigkeit des Enzyms beschreibt. Für die Herleitung von Gln. 2.10 siehe [148,156,157].

Für Gln. 2.10 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gilt:

$$[S] \ll K_m \rightarrow v = \frac{v_{\max}}{K_m} [S] \quad \text{lineares Verhalten von } v \text{ in Abhängigkeit von } [S],$$

$$[S] \gg K_m \rightarrow v = v_{\max} \quad v \text{ ist unabhängig von } [S] \text{ und geht asymptotisch gegen } v_{\max} \text{ (Sättigung),}$$

$$[S] = K_m \rightarrow v = \frac{v_{\max} K_m}{K_m + K_m} = \frac{v_{\max}}{2} \quad v \text{ ist } 0,5 v_{\max}.$$

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentrationen ist graphisch in Abb. 2.3 dargestellt (Michaelis-Menten-Diagramm) und in ihren linearen ($v = v_{\max}/K_m \cdot [S]$) und asymptotischen Zustand ($v = v_{\max}$) eingeteilt.

K_m und v_{\max} sind für jedes Enzym und jede Reaktion charakteristisch und werden somit in der Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Die Enzymaktivität ist diejenige Substratkonzentration, die in einer bestimmten Zeit vom Enzym umgesetzt wird. Nach IUPAC wird die Enzymaktivität in der Einheit Unit beschrieben. Ein Unit ist die Enzymmenge, die für die katalytische Umsetzung von einem μmol Substrat in einer Minute notwendig ist. Die spezifische Enzymaktivität ist als 1 μmol Substrat pro 1 min und pro 1 mg Protein definiert. Darüber hinaus wird die Enzymaktivität auch als bestimmte Substratkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ pro Minute beschrieben [147,148].

Über die Substratkonzentration hinaus können weitere Parameter (pH-Wert, Temperatur und Salzkonzentration) die Reaktionsgeschwindigkeit und somit die Enzymaktivität und Stabilität beeinflussen. Für die optimale Enzymaktivität hat jedes

Enzym einen optimalen pH-Wert und eine optimale Temperatur, man spricht auch vom pH- bzw. Temperatur-Optimum. Diese Optima liegen häufig in der Nähe der physiologischen Parameter, wie z.B. einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur zwischen 24 °C und 37 °C [148,156]. Bei zu großen Abweichungen der Messbedingungen zu den Aktivitätsoptima denaturieren die Enzyme. Durch eine optimale Salzkonzentration wird für die Enzyme ein elektrostatisches Feld erzeugt, das die Enzymstruktur begünstigt [147-149,156,157].

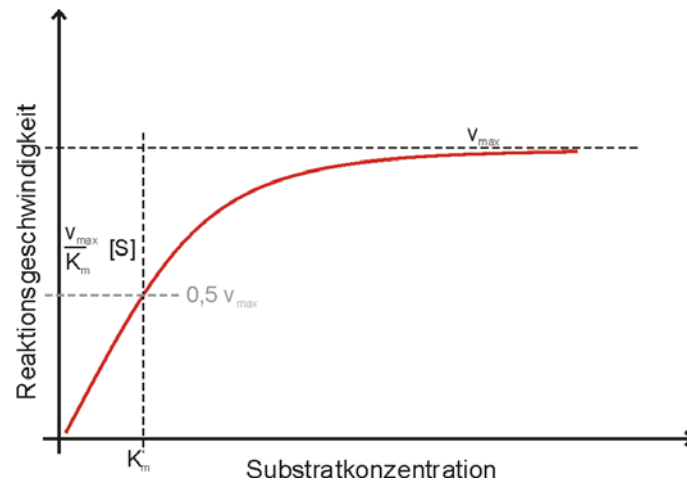


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Michaelis-Menten-Diagramms [147,148].

2.2. Bio- und Chemosensoren

In diesem Kapitel sollen die theoretischen Grundlagen für ISEs und Referenzelektroden sowie für Feldeffekt-basierte Sensoren erläutert werden. Darüber hinaus sollen die Funktionsmechanismen der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Cyanid- und Schwermetallsensoren theoretisch beschrieben werden.

2.2.1. Phasengrenze „Fest/Flüssig“

Für die Beschreibung der elektrochemischen Vorgänge an der Phasengrenze „Elektrode/Elektrolyt“, d.h. „Fest/Flüssig“ gibt es in der Literatur unterschiedliche Modelle, die sich zum Teil ergänzen. Das älteste Modell geht auf H. Helmholtz (1881) zurück, der die Phase „Fest/Flüssig“ mit Hilfe einer starren Doppelschichtkapazität beschreibt. Wird die Elektrode in den Elektrolyten eingetaucht, so bildet sich als Folge der Eigenladung der Elektrode eine gleich große entgegengesetzte Ladung in einem bestimmten Abstand zur Elektrode aus, die als Doppelschicht bezeichnet wird. Sie kann mit Hilfe eines Plattenkondensators mit der Helmholtzkapazität (C_H) elektrisch dargestellt werden [158-160]. Die Helmholtzdoppelschicht teilt sich in eine innere und eine äußere Helmholtzebene mit jeweils einer inneren und äußeren Helmholtzkapazität (C_i und C_a) auf. Die innere Helmholtzebene besteht aus einem Monolayer von Solventmolekülen und spezifisch adsorbierten Ionen. Sie wird durch den Radius der Solventmoleküle begrenzt (x_i). Die äußere Helmholtzebene beschreibt eine imaginäre Ebene, an der sich Solventionen an- und abreichern können. Sie ist durch den minimalen Abstand der Solventionen zur Elektrode definiert (x_a) [160,161]. Die Helmholtzkapazität findet sich als Funktion der Dielektrizitätskonstanten der Solventlösung (ϵ) und x_a in Gln. 2.11.

$$C_H = -\frac{\epsilon}{4\pi x_a} \quad \text{Gln. 2.11}$$

Die Kapazität der Helmholtzebene steigt sowohl mit der Verringerung des Abstands der äußeren Helmholtzebene zur Elektrode als auch mit steigender Dielektrizitätskonstante der Solventlösung.

Im Gegensatz zur starren Helmholtzdoppelschicht wird eine diffuse Doppelschicht an der Phasengrenze „Fest/Flüssig“, die die Wärmebewegung der Solventionen berücksichtigt, 1910-13 von A. Gouy und D.L. Chapman eingeführt [160,162,163]. Für $z_i F \xi / (RT) \ll 1$ kann die diffuse Doppelschichtkapazität (C_{GC}) in Abhängigkeit von der Temperatur und Ionenkonzentration mit Gln. 2.12 beschrieben werden [160].

$$C_{GC} = \sqrt{\frac{\epsilon F^2}{4\pi RT} \sum_i z_i^2 c_i} \quad \text{Gln. 2.12}$$

Hierbei sind z_i und c_i jeweils die Elementarladung und die Konzentration des Solventions (i), F ist die Faradaykonstante mit $9,648 \cdot 10^{28}$ C/mol, ξ das Potential der diffusen Doppelschicht an der Stelle der größtmöglichen Annäherung und ϵ die Dielektrizitätskonstante der Lösung. Hieraus folgt, je größer die Ionenkonzentration, desto größer ist die diffuse Doppelschichtkapazität. Im Jahre 1924 kombiniert O. Stern anschließend beide Theorien miteinander. Die gesamte Doppelschichtkapazität wird als Reihenschaltung von starrer Doppelschichtkapazität und diffuser Kapazität definiert und ist in Gln. 2.13 zusammengefasst [160,164-166].

$$C = \frac{C_H C_{GC}}{C_H + C_{GC}} \quad \text{Gln. 2.13}$$

Die schematische Darstellung der Phasengrenzfläche „Fest/Flüssig“ mit der starren und diffusen Doppelschicht und der dazugehörige Potentialverlauf sind jeweils in Abb. 2.4 a) und Abb. 2.4 b) gezeigt.

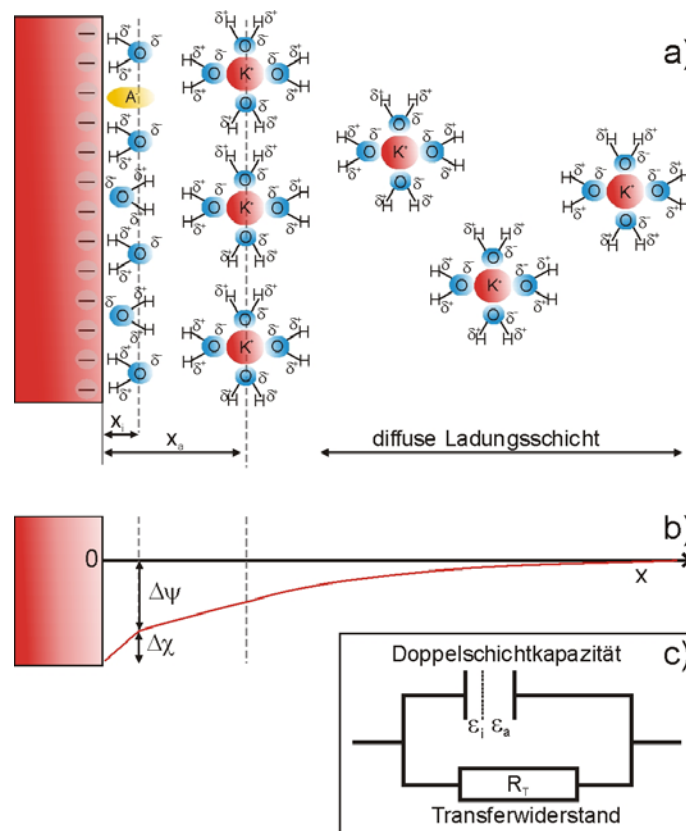


Abb. 2.4: Schematische Darstellung a) der Phasengrenzfläche „Elektrode/Elektrolyt“, b) der dazugehörigen Potentialverteilung und c) des elektrischen Ersatzschaltbildes (nach [158,165]).

Der gesamte Spannungsabfall zwischen der Elektrode und dem Elektrolyten ergibt sich aus der Summe der Oberflächenspannung ($\Delta\psi$) in der inneren Helmholtzebene und der Voltaspannung ($\Delta\chi$) in der äußeren Helmholtzebene und ist als Galvanispannung ($\Delta\Phi$) in Gln. 2.14 beschrieben.

$$\Delta\Phi = \Delta\psi + \Delta\chi \quad \text{Gln. 2.14}$$

Die Doppelschichtkapazität für die Phase „Elektrode/Elektrolyt“ kann mit einem vereinfachten Ersatzschaltbild (Abb. 2.4 c)) dargestellt werden. Hierbei werden die Kapazitäten der inneren und äußeren Helmholtzebene in Reihe und mit einem Transferwiderstand (R_T) parallel geschaltet. R_T beschreibt den Ladungsdurchtritt von Ionen in die Elektrode oder umgekehrt. Für eine ideal polarisierbare Elektrode ist der Transferwiderstand unendlich groß ($R_T \rightarrow \infty$) und somit ist kein Ladungsdurchtritt möglich. Für $R_T \rightarrow 0$ spricht man von einer nicht-polarisierbaren Elektrode.

2.2.2. Nernst- und Nikolskygleichung

Wird eine Elektrode in einen Elektrolyten getaucht, so wird aufgrund von chemischen und elektrischen Wechselwirkungen an der Phasengrenze „Fest/Flüssig“ ein elektrochemisches Potential ($\bar{\mu}_i$) gebildet. Die chemischen Vorgänge können mittels des chemischen Potentials (μ_i) und die elektrischen Wechselwirkung als elektrisches Potential ($z_i F\Phi$) beschrieben werden. Das elektrochemische Potential ist die Summe des chemischen und elektrischen Potentials (Gln. 2.15) [167-169].

$$\bar{\mu}_i = \mu_i + z_i F\Phi \quad \text{Gln. 2.15}$$

Das chemische Potential kann durch die Änderung der freien Reaktionsenthalpie (∂G) bei einem Übergang von n Mol (∂n) von einem Zustand in den anderen unter konstanten Bedingungen, wie Temperatur und Druck (p), mit Gln. 2.16 beschrieben werden.

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n} \right)_{T,p=\text{konstant}} \quad \text{Gln. 2.16}$$

Das chemische Potential ändert sich mit der Aktivität (a_i) der Ionen in der Lösung (Gln. 2.17).

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln(a_i) \quad \text{Gln. 2.17}$$

Hierbei ist μ_i^0 das chemische Standardpotential. Wird Gln. 2.15 μ_i durch Gln. 2.17 substituiert, so ergibt sich für das elektrochemische Potential (Gln. 2.18):

$$\bar{\mu}_i = \mu_i^0 + RT \ln(a_i) + z_i F\Phi \quad \text{Gln. 2.18}$$

Bei einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Ionen in der Lösung (Index: L) und Ionen in der Elektrode (Index: E), kann das elektrochemische Potential im Gleichgewicht (Gln. 2.19) mit Gln. 2.20 beschrieben werden.



$$\mu_{i,E}^0 + RT \ln(a_{i,E}) + z_{i,E} F\Phi_E = \mu_{i,L}^0 + RT \ln(a_{i,L}) + z_{i,L} F\Phi_L \quad \text{Gln. 2.20}$$

Die Gleichgewichtsgalvanispannung ($\Delta\Phi_{Gl}$) ergibt sich aus der Differenz der Galvanipotentiale in der Elektrode und in der Lösung (Gln. 2.21).

$$\Delta\Phi_{Gl} = \Phi_E - \Phi_L = \frac{\mu_L^0 - \mu_E^0}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{a_{i,L}}{a_{i,E}}\right) \quad \text{Gln. 2.21}$$

Die chemischen Standardpotentiale sind konstant und können somit durch eine Standardgleichgewichtsgalvanispannung ($\Delta\Phi_{Gl}^0$) ausgedrückt werden. Die Ionenaktivität in der Elektrode ist vereinbarungsgemäß 1. Unter diesen Betrachtungen ergibt sich aus Gln. 2.21 die Nernst-Gleichung (Gln. 2.22), die 1889 von W.H. Nernst formuliert wird [170].

$$\Delta\Phi_{Gl} = \Phi_{Gl}^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_{i,L}) \quad \text{Gln. 2.22}$$

Hierbei wird der Term $RT/(z_i F) = S$ als Steilheit (S) bezeichnet. Er beträgt für einwertige und zweiwertige Ionen in der Lösung bei Raumtemperatur (298,15 K) idealerweise 59,2 mV/Dekade bzw. 29,6 mV/Dekade.

$\Delta\Phi_{Gl}$ ist an der Phasengrenze alleine nicht messbar, daher muss das Potential in einer potentiometrischen Anordnung gegenüber einem konstanten, Ionen-unabhängigen Potential gemessen werden. Für die messbare Spannung (U) ergibt sich Gln. 2.22.

$$U = U^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln(a_{i,L}) \quad \text{Gln. 2.23}$$

U^0 ist das Standardelektrodenpotential. Für geringe Ionenkonzentrationen, $c_i \leq 0,01$ mol/l, kann darüber hinaus die Ionenaktivität durch die Ionenkonzentration angenähert werden. Der Zusammenhang zwischen a_i und c_i ist über den Aktivitätskoeffizienten (f_i) nach Gln. 2.24 gegeben [171].

$$a_i = f_i c_i \quad \text{mit } f_i \leq 1 \quad \text{Gln. 2.24}$$

Durch den Aktivitätskoeffizienten wird die sich gegenseitige Beeinflussung der Ionen in der Messlösung bei hohen Ionenkonzentrationen beschrieben.

In der Praxis sind nicht nur die Primärionen in der Messlösung, sondern auch andere Ionen, sog. Störionen (j), vorhanden. Diese können das Gleichgewichtspotential beeinflussen und somit zu einer veränderten Messspannung führen. Um diesen Einfluss berücksichtigen zu können, wird die Nikolsky-Eisenman-Gleichung als eine „Erweiterung“ der Nernst-Gleichung entwickelt (Gln. 2.25) [169,172].

$$U = U^0 + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(a_i + \sum_j K_{ij} a_j^{\frac{z_i}{z_j}}\right) \quad \text{Gln. 2.25}$$

Nach der Nikolsky-Eisenman-Gleichung ist die Messspannung von der Aktivität der zu messenden Primärionen (Messionen) und Störionen abhängig. Der Selektivitätskoeffizient (K_{ij}) beschreibt dabei den Zusammenhang zwischen der

Aktivität der Messionen und Störionen und ist nach IUPAC [172] folgendermaßen definiert (Gln. 2.26).

$$K_{ij} = \frac{a_i}{\frac{z_i}{a_j^{z_j}}} \quad \text{Gln. 2.26}$$

Gln. 2.26 gilt nur für die Bestimmung des Selektivitätskoeffizienten nach der „Fixed interference“-Methode. Für eine möglichst selektive Messung sollte K_{ij} möglichst klein sein.

2.2.3. Potentiometrische und Feldeffekt-basierte Sensoranordnungen

Für die potentiometrische Messung wird eine ionenselektive Elektrode (ISE) mit einer Bezugs elektrode (Referenzelektrode) über einen Elektrolyten und einem hochohmigen Messgerät zu einem Messkreis zusammengeschlossen. Für die kapazitive, Feldeffekt-basierte Messung wird ebenfalls eine Referenzelektrode über den Elektrolyten mit einer Feldeffekt-Struktur und einem Impedanzanalysator zu einem elektrischen Messkreis verbunden. In diesem Kapitel werden deshalb unterschiedliche ionenselektive Elektroden, Bezugs elektroden und kapazitive Feldeffekt-Strukturen und deren Funktionsprinzip vorgestellt.

2.2.3.1. Ionenselektive Elektroden (ISE)

Der eigentliche Sensor einer potentiometrischen Messkette ist die ISE, mit der das zu messende Ion in der Analytlösung möglichst selektiv erfasst werden soll. Für die Realisierung einer ISE ist die sensitive und selektive Sensormembran von großer Bedeutung. ISEs werden in Festkörpermembran- und Flüssigmembran-Elektroden, Enzymelektroden, Gaselektroden und Chip-basierte Elektroden eingeteilt [167,169].

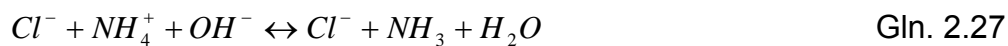
Festkörpermembran-Elektroden können aus unterschiedlichen homogenen und heterogenen Membranen, wie z.B. Metall-, Einkristall-, Polykristall- oder Glas-Membranen, bestehen. Die ältesten und einfachsten Festkörpermembran-Elektroden sind Metallelektroden, wie z.B. Silber- und Kupferelektroden. Hierbei gehen die Metallionen aus der Lösung ein chemisches Gleichgewicht mit den Metallionen in der Sensormembran ein und erzeugen somit ein konzentrationsabhängiges Signal [167]. Ein bekannter Vertreter von einkristallinen Festkörpermembran-Elektroden ist die Lantanfluorid-ISE für den Nachweis von Fluoridionen. Hierbei findet ebenfalls ein dynamischer, konzentrationsabhängiger Austausch von Fluoridionen aus der Lösung mit Fluoridionen in der Membran statt. Bei den Silber-haltigen ISEs spielt die Beweglichkeit der Ag^+ -Ionen in der Membran eine wichtige Rolle. Ag-Halogenid-ISEs mit z.B. einer AgI-, AgBr- oder AgI-Membran und Ag-Chalkogenidglas-ISEs können

sowohl für den Nachweis von Ag^+ -Ionen als auch für den Nachweis von den komplementären Anionen (Cl^- , Br^- , I^- -Ionen) oder Pseudohalogeniden (CN^- -Ionen) verwendet werden. Bestimmt durch das Löslichkeitsprodukt der Ag-Verbindungen gehen die Ionen in der Membran ein dynamisches Gleichgewicht mit den äquivalenten oder komplementären Ionen in der Messlösung ein und erzeugen somit ein Signal [104,167,169]. Heterogene Festkörpermembran-Elektroden enthalten ein Trägermaterial, in dem das nachzuweisende Ion eingebettet wird. E. Pungor et al. verwenden Silikongummi, in dem das elektronegative, Ag-haltige Material für den Nachweis von CN^- -Ionen eingebracht wird [173]. Eine der bekanntesten und am häufigsten eingesetzten Glasmembran-ISEs ist die klassische pH-Elektrode nach Cremer (1906). Das Glas der pH-ISE hat eine spezielle Zusammensetzung aus Siliziumdioxid (SiO_2), Natriumoxid (Na_2O) und Kalziumoxid (Ca_2O). Nach Konditionierung der pH-ISE in Flüssigkeit bildet sich eine Quellschicht aus, die abhängig von der Wasserstoff-Ionenkonzentration in der Messlösung sowohl H^+ -Ionen aufnehmen als auch abgeben kann. Das pH-abhängige Potential der Quellschicht wird gegenüber einem konstanten Potential an der Innenseite der Glasmembran gemessen [167,174,175]. Weitere Vertreter von Glasmembran-ISEs basieren auf Aluminiumsilikaten, beispielsweise für den Nachweis von Ag^+ -, H^+ -, Na^+ - oder K^+ - Ionen [167,176]. Die Vorteile von Festkörpermembran-Elektroden liegen hauptsächlich in der relativ einfachen Herstellung und Handhabbarkeit. Nachteilig ist jedoch oftmals die geringe Leitfähigkeit, die allerdings durch dünne Membranschichten oder Dotierung der Membran verbessert werden kann. Darüber hinaus ist die Selektivität dieser Elektroden hauptsächlich über das Löslichkeitsprodukt der Membran bestimmt.

Flüssigmembran-ISEs repräsentieren eine weitere Ausführungsvariante von ISEs. Bei den Flüssigmembran-ISEs wird eine hydrophobe, organische Flüssigmembran als sensitive Membran verwendet. Wird eine solche ISE in die Messlösung getaucht, so diffundieren Messionen aus der Lösung in die organische Membran und assoziieren mit den entsprechenden Gegenionen oder werden in Hohlräumen von spezifischen Ionophoren gebunden. Dabei wird die Konzentration des Messions in der Membran erhöht, was zu einer Änderung der Gleichgewichtsgalvanispannung an der Phasengrenze „Elektrode/Elektrolyt“ und somit zu einem konzentrationsabhängigen Messsignal führt. Die Selektivität der hydrophoben Flüssigmembran-ISEs wird durch die Wahl der Gegenionen bzw. Ionophore in der Membran und darüber hinaus über die lipophilen Eigenschaften der Messionen bestimmt. Die lipophilen Eigenschaften von Ionen können der Hofmeister'schen Reihe entnommen werden [177]. Als ungeladene Ionenaustauscher in der Membran werden häufig Antibiotika als Ionophore verwendet. Es werden z.B. Nonactin und Valinomycin für den Nachweis von jeweils NH_4^+ - bzw. K^+ -Ionen eingesetzt [169,178-180]. Die Matrix für die Ionophore besteht oftmals aus Polyvinylchlorid (PVC) mit zusätzlichen Weichmachern. Weitere Flüssigmembran-Elektroden existieren für den Nachweis von Li^+ -, Ca^{2+} -, Mg^{2+} - sowie für Fe^{3+} -, Zn^{2+} - und Pb^{2+} -Ionen [167,181-183].

Enzymelektroden stellen eine weitere Gruppe der ISEs dar. Bei diesen wird zur Erhöhung der Selektivität einer ISE die Festkörpermembran durch eine biologische Komponente, wie z.B. ein Enzym, Antigene oder DNA, als Rezeptorschicht ausgetauscht oder ergänzt. Das durch die chemische Reaktion zwischen biologischer Komponente und Mession entstandene Produkt oder auch das bei der Reaktion verbrauchte Edukt kann anschließend mit Hilfe der ISE direkt erfasst werden. Eine typische Enzym-basierte ISE ist die *Urease*-modifizierte ISE für den Nachweis von Harnstoff. Bei der enzymatischen Katalyse von Urea wird der pH-Wert der Lösung lokal verändert. Diese Änderung kann dann direkt mit Hilfe einer pH-ISE als konzentrationsabhängiges Signal erfasst werden [181,182]. Weitere Enzym-basierte ISEs existieren für den Nachweis von Cyanid, Pestiziden und Penicillin in Flüssigkeiten [73,74,184,185].

Darüber hinaus werden ISEs auch in der Gassensorik eingesetzt. Man spricht von sog. Gas-ISEs. Sie bestehen häufig aus einer Festkörpermembran-ISE, die mit einer gaspermeablen Membran kombiniert ist. Für den Nachweis vom NH_3 -Gas wird z.B. eine pH-ISE in eine Ammoniumchlorid-Lösung getaucht, die über eine gaspermeable Teflonmembran von der Messlösung getrennt ist. Bei der Messung von Ammoniak diffundiert dieser durch die Teflonmembran in die NH_4Cl -Lösung und verändert somit die NH_3 -Konzentration. Das Gleichgewicht zwischen NH_4^+ -Ionen und NH_3 verschiebt sich (Gln. 2.27); als Folge ändert sich der pH-Wert, der als konzentrationsabhängiges Signal direkt an der pH-ISE erfasst werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die Severinghaus-ISE zur CO_2 -Bestimmung [181,183].



Einen weiteren Fortschritt in der Entwicklung von ISEs stellen Feldeffekt-basierte Sensoren, wie z.B. EIS-Strukturen dar, die nachfolgend beschrieben werden.

2.2.3.2. Kapazitive Elektrolyt-Isolator-Silizium- (EIS-) Strukturen

Die kapazitive EIS-Struktur ist eine Feldeffekt-basierte Sensorstruktur und stellt den Gatebereich eines ISFETs dar. Der ISFET wird 1970 vom P. Bergveld als Sensor für die Ionenanalytik in Flüssigkeiten vorgestellt [186,187]. Die Vorteile solcher Feldeffekt-basierten Strukturen liegen in der Miniaturisierbarkeit der Sensoren, einer relativ einfachen Möglichkeit zur Veränderung der ionenselektiven Membran im Hinblick auf unterschiedliche Anwendungen (Steuerung der Selektivität) und einem direkten Auslesen des elektrischen Messsignals [188,189]. Der ISFET leitet sich von einem Metall-Oxid-Silizium-Feldeffekttransistor (MOSFET) ab. Somit kann das Funktionsprinzip eines ISFETs mit Hilfe des Funktionsprinzips eines MOSFETs beschrieben werden [188,190]. Die EIS- und MOS-Struktur repräsentieren jeweils den Gatebereich vom ISFET und MOSFET. Zum Vergleich sind beide „Gatestrukturen“ in Abb. 2.5 schematisch dargestellt.

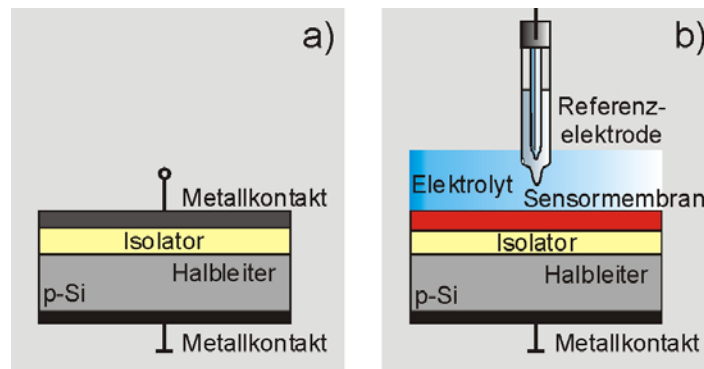


Abb. 2.5: Schematische Darstellung a) einer MOS- und b) einer EIS-Struktur.

Die MOS-Struktur besteht aus einem Halbleiter (z.B. p-dotiertes Silizium) mit einer 10-100 nm dünnen Isolatorschicht (z.B. SiO_2), einem Metallkontakt an der Oberseite und einer Metallschicht zur Kontaktierung (z.B. Al) auf der Rückseite. Bei der EIS-Struktur wird für die Ionenanalytik in Flüssigkeiten der Metallkontakt an der Vorderseite durch eine Sensormembran, den Elektrolyten und eine Referenzelektrode ersetzt. Zum besseren Verständnis der halbleiterphysikalischen Vorgänge in der EIS-Struktur wird im Folgenden die MOS-Struktur verwendet. Im Anschluss erfolgt der Übergang zur EIS-Struktur. Die MOS-Struktur kann elektrisch wie ein Plattenkondensator behandelt werden, obwohl die Arbeitscharakteristika von MOS-Struktur und Plattenkondensator unterschiedlich sind. Die Kapazität der MOS-Struktur (C) kann als Reihenschaltung von der Kapazität des Isolators (C_{Is}) und der Kapazität des Siliziums (C_{Si}) mit Hilfe von Gln. 2.28 beschrieben werden. C_{Si} ist von den halbleiterphysikalischen Vorgängen im Halbleiter abhängig [191].

$$C = \frac{C_{Is} C_{Si}}{C_{Is} + C_{Si}} \quad \text{Gln. 2.28}$$

Die Kapazität eines Plattenkondensators ist, wie folgt, definiert (Gln. 2.29).

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{A}{d} \quad \text{Gln. 2.29}$$

Dabei sind ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante mit $8,85418 \cdot 10^{-12}$ F/m, ϵ_r die relative Dielektrizitätskonstante des Isolators, A die Fläche der Platten in m^2 und d die Schichtdicke der Isolatorschicht in m. Die relativen Dielektrizitätskonstanten für SiO_2 -, Si_3N_4 - und Ta_2O_5 betragen jeweils 4, 7,5 und 25-27 [192,193]. Bei einer doppelten Isolatorschicht können beide Isolatorschichten als Reihenschaltung von zwei Plattenkondensatoren (C_{Is1} , C_{Is2}) betrachtet werden (Gln. 2.30).

$$C = \frac{C_{Is1} C_{Is2}}{C_{Is1} + C_{Is2}} \quad \text{Gln. 2.30}$$

Wird an die MOS-Struktur im Falle von p-Si über die obere Metallschicht eine „Gleichspannungsrampe“ von negativer Spannung zu positiver Spannung durchfahren, so kann das festkörperphysikalische Verhalten der Feldeffekt-Struktur

in drei Zustände, die Anreicherung, die Verarmung und die Inversion, eingeteilt werden. Zur Erklärung dieses Halbleiterphysikalischen Verhaltens wird nachfolgend das Energie-Bändermodell einer idealen MOS-Struktur verwendet. Sowohl die jeweiligen Energiebänder-Modelle als auch die dazugehörigen Ladungsverteilungs-Diagramme sind in Abb. 2.6 dargestellt. Hierbei sind E_L das niedrigste Energieniveau im Leitungsband, E_V das höchste Energieniveau im Valenzband, E_G die Band-Gap-Energie (mit 1,1 eV für Silizium), E_F die Fermi-Energie im Silizium, W_M und W_{Si} die Austrittsarbeiten der Elektronen jeweils im Metall und im Silizium und q die Elementarladung mit $1,6 \cdot 10^{-19}$ C. Die Fermi-Energie ist diejenige Energie, die ein Elektron mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,5 besitzt. W_M und W_{Si} sind diejenigen Energien, die ein Elektron im Metall oder Silizium besitzen muss, um aus dem Fermi-Level ins Vakuum zu gelangen. Für einen intrinsischen Halbleiter liegt die Fermi-Energie in der Mitte von E_L und E_V und wird als E_i abgekürzt. Für einen p-dotierten Halbleiter liegt E_F unterhalb von E_i und ist damit näher am Valenzband. Im Gleichgewichtszustand einer idealen MOS-Struktur sind die Austrittsarbeiten in Metall und Halbleiter gleich groß. Es existieren keine Überschussladungen im Halbleiter und an der Oberfläche. Alle Energieniveaus sind „flach“, man spricht von einem Flachbandzustand.

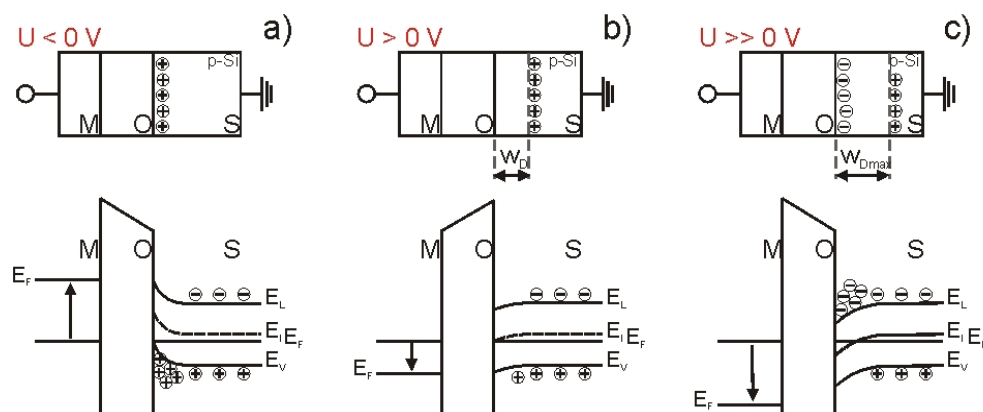


Abb. 2.6: Vereinfachte schematische Darstellung a) der Anreicherung, b) der Verarmung und c) der Inversion einer MOS-Struktur mit Hilfe von Ladungsverteilung (oben) und von Energie-Bändermodell (unten).

Wird eine negative Spannung ($U \ll 0V$) über die obere Metallschicht an die MOS-Struktur angelegt, so werden durch das elektrische Feld die positiven Majoritätsladungsträger (+) im p-Si zur Phasengrenze „p-Si/Isolator“ hingezogen und dort angereichert. E_V verbiegt sich an der Phase hin zu E_F . Parallel zu E_V verbiegen sich auch das Leitungs- und intrinsische Energieband. Durch die Akkumulation von Majoritätsladungsträgern am Interface spricht man von einer Anreicherung. Die Gesamtkapazität der MOS-Struktur in der Anreicherung wird durch die Isolatorkapazität dominiert. Für kleine positive Spannungen ($U > 0V$) werden die positiven Ladungsträger ins Halbleiterinnere zurück gedrängt. E_V wird weg von E_F verbogen und parallel dazu auch E_L und E_i . Es kommt zu einer Verarmung der

Majoritätsladungsträger an der Phasengrenze „p-Si/Isolator“ und somit zur Ausbildung einer sog. Raumladungszone. Die Breite der Raumladungszone im Si (w_V) ist abhängig von der angelegten Spannung, der Dotierkonzentration (N_A , N_D), der Dielektrizitätskonstanten des Siliziums (ϵ_{Si}) und der Isolatorschichtdicke (d). Die Verarmungszone ist für das Oberflächenpotential des Siliziums $\Phi_{Si} = 0$ bis $\Phi_{Si} = \Phi_B$ definiert. Φ_B ist das Potential, welches notwendig ist, um ein Elektron von E_F in E_I zu bringen. Die Kapazität der MOS-Struktur im Verarmungsbereich kann mit Gln. 2.31 beschrieben werden.

$$C = \frac{C_{Is}}{(1 + (\epsilon_{Is} w_V / (\epsilon_{Si} d)))} \quad \text{Gln. 2.31}$$

ϵ_{Is} ist die Dielektrizitätskonstante des Isolators. Die maximale Breite der Verarmungszone (w_{Vmax}) ist durch den Beginn des starken Inversionsbereichs definiert und kann mit Gln. 2.32 berechnet werden.

$$w_{Vmax} = \sqrt{\frac{4\epsilon_{Si} kT \ln(N_A / n_i)}{q^2 N_A}} \quad \text{Gln. 2.32}$$

Hierbei sind n_i die Elektronendichte im intrinsischen Halbleiter am Interface „p-Si/Isolator“ und N_A die Dotierkonzentration der Akzeptorionen.

Wird die Spannung an der Metallschicht weiter erhöht ($U \gg 0$ V), so verbiegen sich die Energiebänder (E_V , E_L und E_I) am Interface von „p-Si/Isolator“ weiter nach unten. Die positiven Ladungsträger werden weiter ins Halbleiterinnere gedrängt und eine dünne Schicht von negativen Minoritätsladungen (-) akkumuliert an der Grenzfläche zum Isolator. Der p-dotierte Halbleiter invertiert zum n-dotierten Silizium. Man spricht von einer Inversion. Für $\Phi_{Si} = \Phi_B$ und für $\Phi_{Si} = 2\Phi_B$ ist die Inversion in eine schwache und eine starke Inversion eingeteilt. Werden kleine Frequenzen ($f < 100$ Hz) an die MOS-Struktur angelegt, können die Majoritätsladungsträger dem Wechselfeld folgen und somit mit den Minoritätsladungsträgern im Inversionsbereich rekombinieren. Für höhere Frequenzen bleiben die Ladungsträger getrennt.

Die minimale Kapazität der MOS-Struktur (C_{HFmin}) für hohe Frequenzen ist in Gln. 2.33 beschrieben.

$$C_{HFmin} = \frac{\epsilon_{Is}}{(d + (\epsilon_{Is} / \epsilon_{Si}) w_{Vmax})} \quad \text{Gln. 2.33}$$

Der Flachbandzustand der MOS-Struktur wird beim Übergang vom Anreicherungs- zum Verarmungszustand erreicht. Bei $\Phi_{Si} = 0$ V sind alle Energiebänder flach. Die dazugehörige Flachbandkapazität (C_{FB}) zeigt Gln. 2.34.

$$C_{FB} = \frac{\epsilon_{Is}}{(d + (\epsilon_{Is} / \epsilon_{Si}) \sqrt{kT \epsilon_{Si} / (p_0 q^2)})} \quad \text{Gln. 2.34}$$

Dabei ist p_0 die Gleichgewichtsdichte von positiven Ladungsträgern im p-Si. Für eine ideale MOS-Struktur wird der Flachbandzustand bei einer Spannung am Gatemetall

von $U = 0 \text{ V}$ erreicht. Bei einer realen MOS-Struktur wird der Flachbandzustand bei einer Gatespannung von $U < 0 \text{ V}$ erreicht, da hier die Austrittsarbeiten in Metall und Silizium unterschiedlich sind, sowie Ladungen im Isolator (Q_{Is}) bzw. Oberflächen- und Interface-Zustände (Q_{SiS}) berücksichtigt werden müssen [191,194]. Die Flachbandspannung einer realen MOS-Struktur errechnet sich somit nach Gln. 2.35.

$$U_{FB} = \frac{W_M - W_{Si}}{q} - \frac{Q_{Is} + Q_{SiS}}{C_{Is}} \quad \text{Gln. 2.35}$$

Im Rahmen dieser Arbeit wird für den Feldeffekt-basierten Cyanidsensor eine EIS-Struktur eingesetzt. Diese besteht aus einem p-dotierten Si, einer SiO_2 -Isolatorschicht und einer pH-sensitiven Ta_2O_5 - bzw. Si_3N_4 -Schicht, die im direkten Kontakt mit dem Elektrolyten steht. Die pH-Empfindlichkeit kann mit Hilfe der „Site-binding“-Theorie beschrieben werden, die die Oberflächenladung von Oxiden in Elektrolyten wiedergibt. Die Oberfläche der pH-sensitiven Metalloxid-Schicht (Ta_2O_5) bildet in Lösung amphotere Hydroxylgruppen, die in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung Protonen abgeben bzw. aufnehmen können. Bei der Si_3N_4 -Schicht werden als aktive Oberflächengruppen Aminogruppen (SiNH_2) und Silanol (SiOH) gebildet. Dabei wird die Oberfläche der pH-sensitiven Schicht als Funktion des pH-Wertes der Bulk-Lösung (Elektrolyt) positiv bzw. negativ geladen (Gln. 2.36 und Gln. 2.37).



Hierbei sind H_B^+ die Protonen in der Bulk-Lösung und k_1 sowie k_2 die Gleichgewichtskonstanten der chemischen Reaktionen. Für $\text{pH} > \text{pH}_{\text{PZC}}$ (PZC: „Point of zero charge“) und für $\text{pH} < \text{pH}_{\text{PZC}}$ ist die EIS-Struktur negativ bzw. positiv geladen. pH_{PZC} ist der pH-Wert, bei dem die Oberflächenladung null ist. Ändert sich das Oberflächenpotential als Funktion des pH-Wertes der Elektrolytlösung, so ändert sich die Gesamtkapazität der EIS-Struktur. Die Sensitivität einer EIS-Struktur ist als Änderung des Potentials an der Phasengrenze pH-sensitive Schicht/Elektrolyt ($\partial\varphi$) in Folge der pH-Wert-Änderung vom Elektrolyten (∂pH_B) definiert (s. Gln. 2.38 und Gln. 2.39).

$$\frac{\partial\varphi}{\partial\text{pH}_B} = -2,3 \frac{kT}{q} \alpha \quad \text{mit} \quad \text{Gln. 2.38}$$

$$\alpha = \frac{1}{\left(\frac{2,3kTC_{diff}}{q^2\beta_{int}}\right) + 1} \quad \text{Gln. 2.39}$$

Dabei ist α eine dimensionslose Sensitivität mit Werten von $0 \leq \alpha \leq 1$. Sie ist von der intrinsischen Pufferkapazität (β_{int}) und der differentiellen Doppelschichtkapazität (C_{diff}) abhängig. β_{int} beschreibt die Fähigkeit der pH-sensitiven Schicht, Protonen abzugeben bzw. aufzunehmen, d.h. die Dichte der Oberflächenladungen. C_{diff} ist

über die Ionenkonzentration in der Lösung mittels der Debye-Länge definiert. Für $\alpha \approx 1$ beträgt die zu erwartende Sensitivität (bei 25 °C) 59 mV/pH (Nernstsensitivität). Für kleinere Werte von α wird eine sub-Nernstsensitivität erwartet. Die Ladungsdichte der aktiven Oberflächengruppen einer Ta₂O₅- und Si₃N₄-Schicht liegt bei ca. 10¹⁵ cm⁻², die zu einem großen Wert von β_{int} und somit eine ideale Nernstsensitivität zur Folge hat [188,195,196].

Für die Cyaniderfassung wird auf die pH-sensitive EIS-Struktur die *Cyanidase* immobilisiert. Diese setzt katalytisch Cyanid zu Ammoniak und Formiat um, was in einer lokalen pH-Wert-Verschiebung resultiert. Diese pH-Wert-Änderung kann anschließend mittels der pH-sensitiven EIS-Struktur nach der „Site-binding“-Theorie erfasst werden.

2.2.3.3. Referenzelektroden

Zur Komplettierung der potentiometrischen Messkette ist eine Referenzelektrode wichtig. Diese Bezugselektrode soll in der Messkette ein von der Konzentration der Ionen in der Messlösung unabhängiges und konstantes Potential zur Verfügung stellen, damit eine Spannung zwischen der Bezugselektrode und konzentrationsabhängigen ISE gemessen werden kann. Eine der bekanntesten und genauesten Referenzelektroden ist die Standard-Wasserstoffelektrode (SHE). Sie ist genügend unpolarisierbar und liefert reproduzierbare Potentiale. Diese Elektrode besteht aus einem platinieren Draht oder Blech, der in einen Elektrolyten mit einer Ionenkonzentration von 1 mol/l taucht und wird für die Messung mit Wasserstoff (H₂), bei einem Druck von 1013,25 mbar, gleichmäßig umspült. Dabei stellt sich zwischen dem Wasserstoff und dem Elektrolyten ein dynamisches Gleichgewicht ein (Gln. 2.40), das zum Gleichgewichtsgalvanipotential an der Referenzelektrode führt [167,169].



Da sich hier nur ein einzelnes dynamisches Gleichgewicht ausbildet, wird die SHE auch als Elektrode erster Art bezeichnet. Unter den genannten Bedingungen ist das Gleichgewichtsgalvanipotential 0 mV. Die Nachteile dieser Elektrode sind eine mögliche pH-Empfindlichkeit (Gln. 2.40), eine komplizierte Handhabung für die Messungen (Elektrode muss mit H₂ umspült werden) und ein Gefahrenpotential durch die Verwendung von Wasserstoff. Deshalb werden heutzutage in der Praxis bevorzugt andere Referenzelektroden verwendet.

Die am häufigsten eingesetzte Referenzelektrode ist die Silber/Silberchlorid-Bezugselektrode. Sie zeigt eine hohe Temperaturstabilität (bis zu 150 °C) und liefert reproduzierbare Potentiale (in 3,5 mol/l KCl-Lösung und bei 25 °C: 200±0,2 mV

versus SHE). Darüber hinaus ist die Handhabung einfach und ungefährlich. Wie in Abb. 2.7 a) gezeigt, besteht die Ag/AgCl-Referenzelektrode aus einem schwer löslichen Ag/AgCl-Draht, der in einen KCl-Elektrolyten getaucht wird. Dieser ist über ein Diaphragma (Stromschlüssel) mit der Messlösung in Kontakt. Hierbei stellen sich an dem Ag/AgCl-Draht zwei dynamische Gleichgewichte ein (Gln. 2.41 und Gln. 2.42). Diese Referenzelektrode wird aufgrund der Anzahl der chemischen Gleichgewichte auch Elektrode zweiter Art genannt.



Weitere kommerziell erhältlichen Bezugselektroden sind die Kalomel- und die Thalamid-Elektrode. Die Kalomel-Referenzelektrode ist früher die am häufigsten verwendete Bezugselektrode gewesen. Sie wird heute jedoch aufgrund des giftigen Quecksilbers als Elektrolyt und einer hohen Temperaturhysterese nur noch vereinzelt eingesetzt. Die Thalamid-Elektrode zeigt sehr gutes Temperaturverhalten, ist aber ebenfalls giftig und findet somit nur noch selten praktische Anwendung [167,169].

Über einen sog. Stromschlüssel hat jede Referenzelektrode (Innenelektrolyt der Elektrode) Kontakt mit der Messlösung und ist somit nicht-polarisierbar. Gängige Diaphragmen sind z.B. das Schliff- und das Keramikdiaphragma. Der wesentliche Unterschied der Diaphragmen liegt in der Ausflussrate des Elektrolyts in die Messlösung. Für sehr saure oder basische Messlösungen, sowie für Lösungen mit Ionen, die als „Elektrodengifte“ wirken, werden bevorzugt Doppelstromschlüssel-Referenzelektroden eingesetzt (Abb. 2.7 b)).

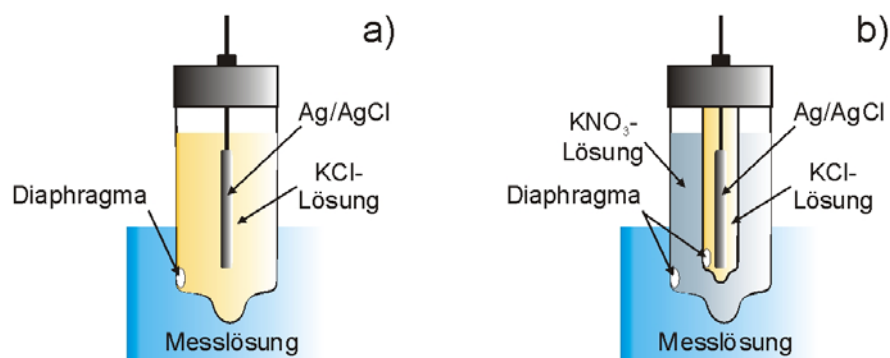


Abb. 2.7: Schematische Darstellung a) einer Ag/AgCl-Referenzelektrode und b) einer Ag/AgCl-Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode.

Zu den „Elektrodengiften“ gehören unter anderem Cyanid und Schwermetalle. Die Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode besteht aus einer inneren Kammer mit z.B. einem Ag/AgCl-Draht, der in eine KCl-Innenelektrolytlösung eingetaucht ist, und aus einer äußeren Kammer mit einer Außenelektrolytlösung (z.B. einer KNO₃-Lösung), die über ein Diaphragma mit der Messlösung in Kontakt ist. Die Innenelektrolytlösung ist über ein zweites Diaphragma mit dem Außenelektrolyten in Verbindung. Mit

diesem Aufbau soll die Diffusion des „giftigen“ Messions in den Innenelektrolyten der Referenzelektrode erschwert werden [167,169]. Darüber hinaus wird bei modernen Messsystemen die Bezugselektrode häufig direkt mit der Messelektrode in einer sog. Einstabmesskette kombiniert. Für miniaturisierte Elektroden und Elektrodenarrays ist eine miniaturisierte Referenzelektrode wünschenswert. In der Grundlagenforschung wird derzeit z.B. an Ag/AgCl-Bezugselektroden ohne Elektrolyten und „Coated-wire“-Referenzelektroden für miniaturisierte Sensorsysteme geforscht [197-201].

2.3. *Cyanidase*-basierte EIS-Strukturen für die Cyaniderfassung

In diesem Unterkapitel werden die Grundlagen für die Immobilisierung von Enzymen und der *Cyanidase* sowie das Funktionsprinzip der *Cyanidase*-basierten Feldeffekt-Struktur beschrieben.

2.3.1. Immobilisierung von Enzymen

Zur Herstellung der Biosensoren werden die Enzyme auf dem Transducer fixiert, d.h. immobilisiert. Die Vorteile einer Immobilisierung sind:

- Wiederverwendbarkeit der Enzyme und somit des Biosensors,
- Einsatz des Biosensors für kontinuierliche Messungen,
- einfache Abtrennung des Enzym-Träger-Systems von der Analytlösung,
- höhere Stabilität des Enzyms.

Die Immobilisierung von Enzymen wird häufig in der Pharma-, Lebensmittel-, Getränke- und Chemieindustrie, in der Biotechnologie und in der Sensorik eingesetzt. Typische Beispiele für Biosensoren auf Enzymbasis sind Glukose-, Urea- und Laktosesensoren [16-18,202]. Darüber hinaus stellt die Entwicklung und Optimierung von neuen Immobilisierungsprotokollen ein interessantes Themenspektrum in der Wissenschaft dar.

Etablierte Immobilisierungsmethoden können in physikalische Immobilisierung (Adsorption, Einschluss unter Membran, Geleinschluss), chemische Immobilisierung (kovalente Bindung, Vernetzung) und eine Kombination aus physikalischer und chemischer Immobilisierung eingeteilt werden [17,18,202].

Bei der Adsorption von Enzymen wird eine wässrige Enzymlösung auf das Trägersubstrat bzw. den Transducer aufgetragen und für eine bestimmte Zeit mit diesem in Kontakt gebracht. Abschließend werden die nicht immobilisierten Enzymmoleküle wieder abgespült. Als aktive Trägermaterialien werden beispielsweise anionische oder kationische Ionenaustauscher, Aktivkohle, poröse Gläser oder Keramiken verwendet. Die Adsorption ist eine relativ einfache, günstige, und durch die unphysiologische Kopplung des Enzyms an den Träger, eine Enzymschonende Methode. Jedoch kann das immobilisierte Enzym mit der Zeit oder durch Änderung von Parametern der Lösung, wie z.B. Änderung des pH-Wertes, der Substratkonzentration und der Temperatur, vom Trägermaterial/Transducer wieder gelöst werden. Man spricht auch vom „Ausbluten“ des Biosensors.

Beim Einschlussverfahren werden die Biomoleküle unter eine Dialysemembran bzw. in den Poren eines polymeren Gels auf dem Träger/Transducer fixiert. Dabei müssen die Poren der Membran und des Gels klein genug sein, um die Enzyme auf dem

Träger zurückzuhalten, aber gleichzeitig groß genug sein, damit das Substrat und das Produkt in und aus der Membran oder dem Gel diffundieren können. Als polymere Gele werden häufig Agar, Kollagen und Polyvinylalkohol eingesetzt, die durch Wasserzugabe oder Lichteinfluss endvernetzt werden können. Die Vor- und Nachteile der Einschlussmethode von Biomolekülen sind analog zu den Vor- und Nachteilen der Immobilisierung mittels Adsorption. Durch die zusätzliche Schicht (Membran oder Gel) bei der Immobilisierung mit Hilfe des Einschlussverfahrens ist jedoch die Diffusion von Substrat und Produkt langsamer. Dies kann zu verzögerten Signaländerungen und höheren Ansprechzeiten führen.

Die kovalente Immobilisierung von Enzymen an ein Trägersubstrat bzw. den Transducer verläuft in drei Schritten: Aktivierung des Trägers, kovalente Bindung des Enzyms an den Träger/Transducer und Ausspülen der nicht immobilisierten Enzymmoleküle. Die kovalente Kopplung erfolgt häufig über Amino- und Carboxylgruppen, über Phenolreste oder Imidazolgruppen. Der große Vorteil der kovalenten Immobilisierung ist eine echte chemische und stabile Bindung zwischen dem Enzym und dem Träger/Transducer. Auf der anderen Seite kann durch kovalente Bindungen jedoch auch die Enzymaktivität negativ beeinflusst werden, wenn die Bindungen im aktiven Zentrum des Enzyms stattfinden oder Konformationsänderungen des Enzymmoleküls für die Katalyse durch zu viele Bindungen zwischen Enzym und Träger/Transducer nicht mehr möglich sind („Multi-point attachments“).

Darüber hinaus können Enzyme über bi- oder multifunktionelle Reagenzien intermolekular vernetzt werden. Hierbei können die Biomoleküle direkt oder über funktionell inerte Proteine miteinander verknüpft werden. Als bifunktionelle Reagenzien können beispielsweise Glutaraldehyd, bis-Isocyanatderivate und bis-Diazobenzidin eingesetzt werden. Die Vor- und Nachteile dieser Immobilisierung entsprechen den Vor- und Nachteilen der kovalenten Immobilisierung von Enzymen. Die vorgestellten Immobilisierungsarten sind schematisch in Abb. 2.8 dargestellt.

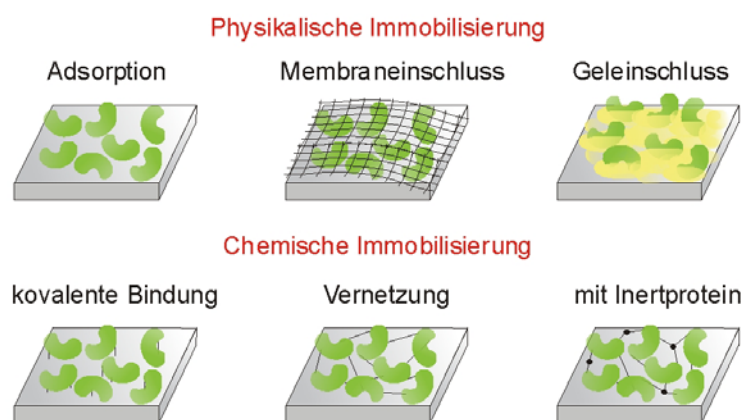


Abb. 2.8: Schematische Darstellung von physikalischen und chemischen Immobilisierungsmethoden für Enzyme.

Die Wahl der Immobilisierungsmethode ist vom Enzym und von der Anwendung des Biosensors abhängig, denn durch die Immobilisierung von Enzymen kann das Biomolekül einerseits stabilisiert werden, andererseits aber auch große Aktivitätsverluste erleiden. Daher ist die optimale Immobilisierungsmethode für jedes Enzym individuell auszuwählen.

Für die Immobilisierung von *Cyanidase* werden in der Literatur nur wenige Methoden vorgestellt. S. Basheer et al. immobilisieren die *Cyanidase* von Novo Nordisk, Dänemark, in Granulatform in einem Bioreaktor (Einschlussverfahren) bzw. adsorptiv in einem Fließmaterial [71,72]. K.K.W. Mak et al. fixieren die *Cyanidase* (*Klebsiella* sp.) unter Einschluss in PVA [73]. M. Keusgen et al. verwenden die kovalente Kopplung von *Cyanidase* [EC 3.5.5.1] [74,75] an N-hydroxysuccinimide- (NHS-) aktivierte Sepharose™.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die *Cyanidase* [EC 3.5.5.1] mit Hilfe der kovalenten Bindung an NHS-aktivierte Sepharose™ bzw. an Eupergit C® erfolgen und anschließend unter eine Dialysemembran auf dem Transducer physikalisch immobilisiert werden.

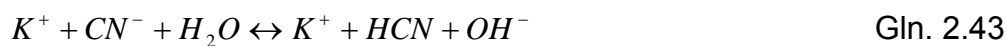
Bei der Immobilisierung von *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ wird das Enzym über Aminogruppen und unter Abspaltung der NHS (Aktivierung) kovalent gebunden. NHS-Ester werden von Anderson 1964 für die Immobilisierung von Proteinen entwickelt [203,204]. Sie werden für die Immobilisierung von unterschiedlichen Enzymen wie z.B. von *HRP*, *Lyasen*, *Naringinase* sowie für die Immobilisierung von Immunoglobulinen eingesetzt. Darüber hinaus finden diese auch Anwendung bei der Affinitätschromatographie zur Trennung von Substanzen [205-209]. Die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen an Eupergit C® erfolgt in alkalischen Lösungen zwischen Oxirangruppen von Eupergit C® und Aminogruppen des Enzyms. Diese Epoxy-Oxiran-aktivierten „Kügelchen“ (Eupergit C®) werden oft für die Immobilisierung von Enzymen, beispielsweise von *Lakkase*, *β-Glukosidase*, *β-Galaktosidase*, *Dextransukrase* und *Penicillinase*, eingesetzt. Abhängig vom pH-Wert der Lösung, kann die Immobilisierung über Amino- oder Carboxylgruppen des Enzyms verlaufen [210-215].

Die Vorteile der kovalenten Kopplung des Enzyms an NHS-aktivierte Sepharose™ oder an Eupergit C® liegen in der chemisch stabilen Bindung zwischen Enzym und Träger, in der hohen Reaktionsgruppendichte am Träger und in einer eventuellen Thermostabilisierung durch die Bildung von sog. „Multi-point attachments“ zwischen Enzym und Träger. Darüber hinaus kann die kovalente Bindung des Enzyms an das Trägermaterial unter variablen Bedingungen, d.h. pH-Wert und Temperatur können individuell eingestellt werden, stattfinden [202,211].

2.3.2. Funktionsprinzip

Das Funktionsprinzip der *Cyanidase*-basierten EIS-Struktur nutzt die lokale pH-Wert-Verschiebung durch die enzymatische Katalyse von Cyanid zu Ammoniak und Formiat (Gln. 1.4), die mit Hilfe der pH-sensitiven EIS-Struktur direkt erfasst werden kann [68-70,216,217]. Für die Berechnung der pH-Wert-Verschiebung soll der pH-Wert der Analytlösung vor und nach der enzymatischen Reaktion berechnet werden. Die Berechnung der pH-Werte vor und nach der Katalyse von Cyanid wird in diesem Kapitel exemplarisch für unterschiedliche KCN-Konzentrationen in der Analytlösung mit Natrium-Phosphat-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l Natriumchlorid (Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl) hergeleitet. Die relevante Cyanidkonzentration ist zwischen 1 µmol/l und 1 mmol/l, die hier rechnerisch betrachtet wird.

Wird KCN in Wasser gegeben (Löslichkeit 67,7 g/(100 g H₂O)), so entstehen K⁺- und CN⁻-Ionen. Die CN⁻-Ionen stehen im chemischen Gleichgewicht mit dem HCN nach Gln. 2.43.



Die Lage des chemischen Gleichgewichtes ist vom pH-Wert der Lösung abhängig und kann mit Hilfe des pK_S-Wertes bzw. pK_B-Wertes (Säure-/Baseexponent) bestimmt werden. Der pK_S-/pK_B-Wert ist für jede Säure/Base charakteristisch und beschreibt denjenigen pH-Wert, bei dem die Säure/Base zu 50% protoniert vorliegt. Darüber hinaus kann die Säure/Base durch den pK_S-/pK_B-Wert in eine sehr starke (pK_S/pK_B<-1,74), starke (-1,74<pK_S/pK_B<4,5), mittel starke (4,5<pK_S/pK_B<9,0), schwache (9,0<pK_S/pK_B<15,74) und sehr schwache (pK_S/pK_B>15,74) Säure oder Base eingeteilt werden. Der Zusammenhang zwischen einer Säure und deren konjugierten Base kann über den pK_W-Wert nach Gln. 2.44 beschrieben werden [218,219].

$$pK_W = pK_S + pK_B = 14 \quad \text{mit} \quad \text{Gln. 2.44}$$

$$pK_S = -\lg K_S = -\lg\left(\frac{[Säureion] \cdot [H_3O^+]}{[Säure]}\right) \quad \text{und} \quad \text{Gln. 2.45}$$

$$pK_B = -\lg K_B = -\lg\left(\frac{[Baseion] \cdot [OH^-]}{[Base]}\right) \quad \text{Gln. 2.46}$$

Die eckigen Klammern sind die Konzentration in mol/l und K_S und K_B die Säure- und Basekonstante.

Der pK_S-Wert von HCN bei 25 °C ist 9,31. Somit kann für die Berechnung der pH-Werte der Cyanidlösung vor der enzymatischen Katalyse das Ostwaldsche Verdünnungsgesetz, für die pH-Wert-Berechnung von Salzen (CN⁻-Ionen) einer schwachen Säure, eingesetzt werden (Gln. 2.47).

$$pH = 0,5(pK_s + 14 + \lg[CN^-]) \quad \text{Gln. 2.47}$$

Für den gewählten KCN-Konzentrationsbereich (1 µmol/l bis 1 mmol/l KCN) können mit Hilfe der Gln. 2.47 die pH-Werte für KCN in Wasser berechnet werden, diese sind in Tab. 2.2 a) zusammengefasst. Je höher die KCN-Konzentration ist, desto höher ist der pH-Wert der Lösung (s. Gln. 2.43).

Für die pH-Wert-Messungen mit dem *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor wird eine Lösung aus Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl verwendet. Der Einfluss des Puffers auf den pH-Wert der Cyanidlösungen kann mit Hilfe der Henderson-Hasselbalch Gleichung berechnet werden (Gln. 2.48) [171,218-222].

$$pH = pK_s - \lg\left(\frac{[Säure]}{[konj. Base]}\right) \quad \text{Gln. 2.48}$$

Für den Na-P-Puffer werden Dihydrogenphosphatsäure ($H_2PO_4^-$) mit einem pK_s -Wert von 7,21 (bei 25 °C) und als konjugierte Base Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) verwendet. Der pH-Wert des Puffers (pH 8,0) kann über das Verhältnis von Säure und konjugierter Base und die Molarität des Puffers (5 mmol/l) über die Summe der Konzentration von Säure und Base eingestellt werden. Somit ergibt sich für einen Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) aus Gln. 2.48 die Gln. 2.49.

$$pH = 7,21 - \lg\left(\frac{[H_2PO_4^-]}{[HPO_4^{2-}]}\right) = 7,21 - \lg\left(\frac{[H_2PO_4^-]}{5\text{mmol/l} - [H_2PO_4^-]}\right) \quad \text{Gln. 2.49}$$

Wird die Pufferlösung mit einer Base (OH^-) oder Säure (H_3O^+) titriert, so kann der pH-Wert der Lösung nach Gln. 2.50 bzw. Gln. 2.51 bestimmt werden.

$$pH = pK_s - \lg\left(\frac{[Säure] - [OH^-]}{[konj.Base] + [OH^-]}\right) \quad \text{Gln. 2.50}$$

$$pH = pK_s - \lg\left(\frac{[Säure] + [H_3O^+]}{[konj.Base] - [H_3O^+]}\right) \quad \text{Gln. 2.51}$$

Für die berechneten pH-Werte in Tab. 2.2 a) kann die Hydroxidionenkonzentration für den gewählten KCN-Konzentrationsbereich mit Hilfe von Gln. 2.52 bestimmt werden.

$$[OH^-] = 10^{-(14-pH)} \quad \text{Gln. 2.52}$$

Die pH-Werte für die unterschiedlichen Cyanidkonzentrationen im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) können anschließend mittels Gln. 2.50 und Gln. 2.52 berechnet werden. Sie sind in Tab. 2.2 b) zusammengefasst. Die Zugabe von 200 mmol/l NaCl verschiebt den pH-Wert der Lösungen um 0,4 pH zu kleineren pH-Werten bei einem 5 mmol/l Puffer (experimentell bestimmt). Die berechneten pH-Werte der gewählten KCN-Konzentrationen im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl sind in Tab. 2.2 c) gezeigt und werden als pH-Werte der Cyanidlösungen vor der enzymatischen Katalyse definiert.

Tab. 2.2: pH-Werte vor der enzymatischen Katalyse von Cyanid für unterschiedliche KCN-Konzentrationen a) in H₂O, b) in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und c) in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl.

[KCN] in µmol/l	1	10	100	250	500	750	1000
a) pH-Wert	8,655	9,155	9,655	9,854	10,004	10,093	10,155
b) pH-Wert	8,001	8,007	8,027	8,045	8,066	8,082	8,097
c) pH-Wert	7,601	7,607	7,627	7,645	7,666	7,682	7,697

Bei der enzymatischen Katalyse wird HCN durch die *Cyanidase* zu Ammoniak und Formiat umgesetzt. Der pH-Wert einer Lösung mit Ammoniak und Formiat kann mit Hilfe von Gln. 2.53 berechnet werden. Gln. 2.54 und Gln. 2.55 beschreiben die dazugehörigen chemischen Gleichgewichte und Säureexponenten von Ammoniak und Formiat [218,219,222].

$$pH = 0,5(pK_{S1} + pK_{S2}) \quad \text{Gln. 2.53}$$



Dabei sind $pK_S(NH_4^+) = pK_{S1} = 9,25$ und $pK_S(HCOOH) = pK_{S2} = 3,75$ bei 25 °C.

Aus Gln. 2.53 wird deutlich, dass der pH-Wert einer Ammoniak-Formiat-Lösung unabhängig von der Konzentration der einzelnen Komponenten ist. Der berechnete pH-Wert für die angegebenen pK_S -Werte beträgt 6,5. Die dazugehörige H_3O^+ -Konzentration kann mit Hilfe der Gln. 2.56 bestimmt werden und beträgt 0,32 µmol/l.

$$[H_3O^+] = 10^{-pH} \quad \text{Gln. 2.56}$$

Mit Hilfe von Gln. 2.50 und Gln. 2.51 können die pH-Werte der KCN-Lösungen im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol) und 200 mmol/l NaCl nach der enzymatischen Umsetzung und nur unter der Berücksichtigung der Edukte, d.h. des Einflusses von Ammoniak und Formiat auf den pH-Wert der Lösungen, berechnet werden. Sie sind in Tab. 2.3 a) dargestellt. Die pH-Wert-Verschiebung aufgrund der Katalyse von Cyanid durch die *Cyanidase* unter der ausschließlichen Betrachtung der Produkte ist für den gezeigten KCN-Konzentrationsbereich nur sehr gering (Tab. 2.3 a)). Die maximale pH-Wert-Änderung beträgt lediglich 0,015 pH für 1 mmol/l KCN.

Durch die enzymatische Katalyse wird HCN zu Ammoniak und Formiat umgesetzt, und somit verbraucht (s. Gln. 1.4 in Kap. 1.3.1). Für die Berechnung des pH-Wertes nach der enzymatischen Katalyse muss deshalb zusätzlich zum pH-Wert der Produkte, die pH-Wert-Verschiebung, die durch den Verbrauch von HCN bei der enzymatischen Reaktion entsteht, betrachtet werden. Chemische Gleichgewichte haben das Bestreben, die Lage des Gleichgewichtes zu halten. Wird HCN für die enzymatische Katalyse aus dem Gleichgewicht (Gln. 1.4 in Kap. 1.3.1) durch die

Cyanidase herausgenommen, so verschiebt sich die Lage des chemischen Gleichgewichtes, d.h. das Verhältnis zwischen HCN und CN⁻-Ionen ändert sich. Um die Lage des vorherigen Gleichgewichtes zu erreichen, werden aus CN⁻-Ionen wieder HCN. Das bedeutet, dass wenn zwei mol HCN durch die *Cyanidase* umgesetzt und somit aus dem Gleichgewicht entnommen werden, wird für die Erhaltung des chemischen Gleichgewichtes wieder ein mol CN⁻-Ionen zu HCN transferiert. Dabei entsteht ein mol OH⁻-Ionen und der pH-Wert ändert sich. Unter der Annahme, dass beim chemischen Gleichgewicht HCN:CN⁻-Ionen mit 50%:50% das HCN enzymatisch umgesetzt wird, so entstehen 25% der CN⁻-Ionen, d.h. 25% der KCN-Konzentration, OH⁻-Ionen, um das vorherige chemische Gleichgewicht zu erhalten. Die dazugehörigen pH-Werte können mit Hilfe der Gln. 2.50 berechnet werden und sind in Tab. 2.3 b) dargestellt. Diese Werte werden als pH-Werte der KCN-Konzentrationen im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl nach der enzymatischen Katalyse definiert. Die Berechnung der pH-Werte nach der Katalyse von Cyanid ist nur vereinfacht dargestellt, denn hierbei wird die Lage des chemischen Gleichgewichtes von HCN und CN⁻-Ionen als konstant definiert. Jedoch ist die Lage des chemischen Gleichgewichtes auch vom pH-Wert abhängig. Darüber hinaus wird zur exemplarischen Berechnung der pH-Werte der einzelnen Lösungen nur eine Katalyse von 50% der vorhandenen Cyanidkonzentrationen angenommen.

Tab. 2.3: pH-Werte nach der enzymatischen Katalyse von Cyanid für unterschiedliche KCN-Konzentrationen unter der Berücksichtigung von a) nur dem Einfluss von Ammoniak und Formiat, b) Einfluss von Ammoniak und Formiat und dem Verbrauch von HCN und c) pH-Werte vor der enzymatischen Katalyse in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl, d) die Differenz der pH-Werte vor und nach der Katalyse.

[KCN] in µmol/l	1	10	100	250	500	750	1000
a) pH-Wert	7,601	7,609	7,632	7,652	7,676	7,695	7,712
b) pH-Wert	7,602	7,610	7,651	7,704	7,790	7,884	7,994
c) pH-Wert	7,601	7,607	7,627	7,645	7,666	7,682	7,697
d) ΔpH-Wert	0,001	0,003	0,024	0,059	0,124	0,201	0,297

Die Lage des chemischen Gleichgewichtes einer Säure/Base kann mit Hilfe des Säure-/Basebruchs nach Gln. 2.57/Gln. 2.58 berechnet werden, wobei der Index: 0, die Gesamtkonzentration von Säure/Base beschreibt [218].

$$[Säure] = \frac{[Säure]_0}{1 + 10^{(pH - pK_s)}} \quad \text{Gln. 2.57}$$

$$[Base] = \frac{[Base]_0}{1 + 10^{(pK_s - pH)}} \quad \text{Gln. 2.58}$$

In Tab. 2.3 d) ist die Differenz der berechneten pH-Werte vor und nach der enzymatischen Katalyse für die gewählten KCN-Konzentrationen im Na-P-Puffer

(pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl dargestellt. Wie man aus der Tab. 2.3 b) bis Tab. 2.3 d) entnehmen kann, verschiebt sich der pH-Wert der Lösung nach der Umsetzung von HCN durch die *Cyanidase* zu höheren pH-Werten. Darüber hinaus nimmt die pH-Wert-Differenz mit steigender KCN-Konzentration zu.

Für eine genauere Berechnung der pH-Werte vor und nach der katalytischen Umsetzung von Cyanid durch die *Cyanidase* kann das Freeware-Programm „Visual MINTEQ“ eingesetzt werden [223]. Hierbei werden weitere dynamische Gleichgewichte und Löslichkeitsprodukte für die Bestimmungen der pH-Werte vor und nach der Reaktion betrachtet. Abb. 2.9 zeigt exemplarisch den berechneten Vergleich der pH-Wert-Differenz nach und vor der enzymatischen Katalyse aus Tab. 2.3 und der pH-Wert-Differenz, die mit dem Programm „Visual MINTEQ“ simuliert wird.

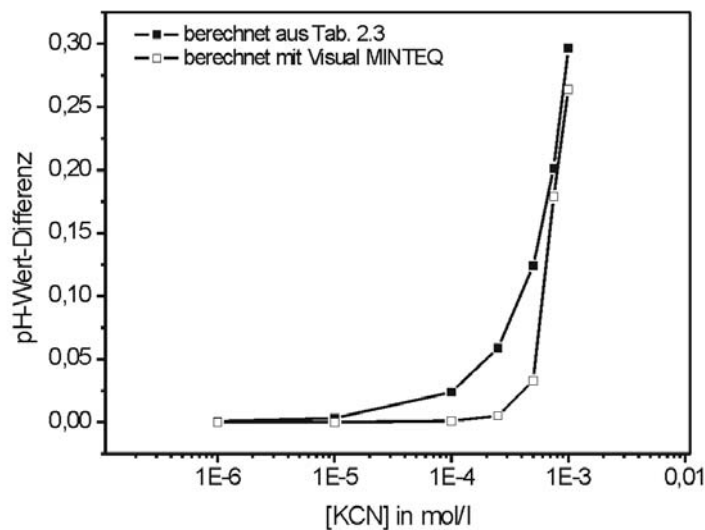


Abb. 2.9: pH-Wert-Differenz durch die enzymatische Katalyse von Cyanid im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl berechnet aus der Tab. 2.5 und berechnet mit dem Programm „Visual MINTEQ“.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die *Cyanidase* auf eine pH-sensitive EIS-Struktur immobilisiert. Die Verschiebung des pH-Wertes durch die selektive enzymatische Katalyse von Cyanid kann mit der EIS-Struktur in einer Differenzanordnung (EIS-Struktur mit und ohne *Cyanidase*) direkt kapazitiv erfasst werden.

2.4. Ag-basierte ISE für die Cyaniderfassung

Die potentiometrische Erfassung von Cyanid kann mit Hilfe von Ag-basierten ISEs erfolgen. Hierzu können sowohl Ag-Halogenid-ISEs als auch Ag-Chalkogenidglas-ISEs eingesetzt werden. Im Folgenden soll der Funktionsmechanismus von Ag-basierten ISEs für die Cyaniderfassung in Flüssigkeiten erklärt werden.

2.4.1. Funktionsprinzip der Ag-Halogenid-ISE

Für die potentiometrische Erfassung von CN^- -Ionen in Flüssigkeiten können Ag-Halogenid-ISEs mit einer sensitiven Membran aus AgCl, AgBr oder AgI verwendet werden. Diese Membranen werden sowohl als homogene (Presslinge) als auch als heterogene Membranen (eingebettet in Silikongummi oder in PVC) hergestellt [86,87,93,100,167,224,225]. Für die theoretische Betrachtung des Funktionsmechanismus der Ag-Halogenid-ISE in Cyanid-haltigen Flüssigkeiten müssen die Löslichkeitskonstanten (K_L) bzw. die $\text{p}K_L$ -Werte der Ag-Halogenide (AgX) und die Komplexbildungskonstanten (K_K) bzw. die $\text{p}K_K$ -Werte der Ag-CN-Komplexverbindungen betrachtet werden. Löslichkeitskonstante und $\text{p}K_L$ -Wert einer AgX-Verbindung (Gln. 2.59) sind jeweils in Gln. 2.60 und Gln. 2.61 ausgeführt.



$$K_L = [\text{Ag}^+] \cdot [\text{X}^-] \quad \text{Gln. 2.60}$$

$$\text{p}K_L = -\lg(K_L) \quad \text{Gln. 2.61}$$

Die Komplexbildungskonstante und der $\text{p}K_K$ -Wert einer $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ -Komplexverbindung (Gln. 2.62) sind nach Gln. 2.63 und Gln. 2.64 definiert.



$$K_K = \frac{[\text{Ag}(\text{CN})_2^-]}{[\text{Ag}^+] \cdot [\text{CN}^-]^2} \quad \text{Gln. 2.63}$$

$$\text{p}K_K = \lg(K_K) \quad \text{Gln. 2.64}$$

Je größer der $\text{p}K_L$ -Wert bzw. der $\text{p}K_K$ -Wert ist, desto stabiler ist die Ag-Halogenid-Verbindung bzw. desto stabiler ist die Ag-CN-Komplexverbindung. Wenn der $\text{p}K_K$ -Wert größer ist als der $\text{p}K_L$ -Wert, so wird die Komplexverbindung begünstigt.

Die $\text{p}K_L$ -Werte und $\text{p}K_K$ -Werte von unterschiedlichen Ag-Halogenid-Membranen und verschiedenen Ag-CN-Komplexverbindungen sind in Tab. 2.4 zusammengefasst [171,218-222].

Tab. 2.4: pK_L -Werte und pK_K -Werte für unterschiedliche Ag-Halogenid-Membranen und verschiedene Ag-CN-Komplexe in Lösung bei 25 °C [171,218-222].

	AgCl	AgBr	AgI	Ag(CN)	Ag(CN) ₂ ⁻	Ag(CN) ₃ ²⁻
pK_L-Wert	9,8	12,3	16,1			
pK_K-Wert				14	20	22

Da die pK_L -Werte der AgX-Verbindungen kleiner sind als die pK_K -Werte der Ag-CN-Komplexverbindungen (Ag(CN)₂⁻ und Ag(CN)₃²⁻), wird beim Eintauchen einer AgX-ISE in eine Cyanid-haltige Probe die Sensormembran z.T. gelöst; die entstandenen freien Ag⁺-Ionen gehen eine Komplexverbindung mit den CN⁻-Ionen aus der Messlösung ein (Gln. 2.65). Dabei wird die AgX-Membran „korrodiert“.



Je nach CN⁻-Ionenkonzentration der Lösung können weitere Ag-CN-Komplexverbindungen zwischen Ag⁺-Ionen in der Membran und CN⁻-Ionen aus der Lösung (s. Tab. 2.4) entstehen. Unter Berücksichtigung der Löslichkeits- und Komplexbildungskonstanten und der Diffusionsvorgänge von CN⁻- und X⁻-Ionen und Ag(CN)₂⁻ an der Membran werden 1974 von Morf et al. theoretische Betrachtungen zum elektrochemischen Funktionsmechanismus von Ag-Halogenid-ISEs durchgeführt und experimentell belegt. Das Messsignal an der AgX-ISE in Abhängigkeit von der CN⁻-Ionenaktivität (a_{CN^-}) kann nach Gln. 2.66 berechnet werden [100].

$$U = U_0 - \frac{RT}{F} \lg(0,5a_{CN^-}) \quad \text{Gln. 2.66}$$

Hierbei entspricht $0,5 a_{CN^-}$ der Ionenaktivität von Silber (a_{Ag^+}) (s. Gln. 2.65). Das Messsignal, wird durch die Ag-CN-Komplexe an der Phase „Membran/Messlösung“ dominiert. Die theoretische Sensitivität beträgt 59 mV/pCN. Die Diffusionsvorgänge der Ionen und Komplexe an der Sensormembran in Cyanid-haltigen Lösungen werden auch von anderen Wissenschaftlern theoretisch beschrieben und experimentell belegt [86,87,93,101,167,226,227]. Darüber hinaus werden von E. Pungor et al. weitere Betrachtungen zum Funktionsmechanismus von AgI-ISEs für die Cyaniderfassung gemacht, daraus wird die Gln. 2.67 hergeleitet.

$$U = U_0 - \frac{RT}{F} \lg(0,5a_{CN^-} + K_{K(Ag(CN)_2^-)} a_{CN^-}) \quad \text{Gln. 2.67}$$

Auch hier wurde eine Sensitivität von 59 mV/pCN beschrieben und experimentell bestätigt [86,87,93].

2.4.2. Funktionsprinzip der Ag-Chalkogenidglas-ISE

Über die Erfassung von CN^- -Ionen mittels Ag-Halogenid-ISEs hinaus können CN^- -Ionen in Flüssigkeiten auch mit Hilfe von Ag-Chalkogenidglas-ISEs qualitativ und quantitativ bestimmt werden, so wird vor ca. 40 Jahren die Ag_2S -ISE für die Cyanidbestimmung eingeführt [93,98,100,102]. In der Literatur sind unterschiedliche Funktionsmechanismen beschrieben, jedoch wird von allen Wissenschaftlern eine Komplexbindung von Ag^+ -Ionen in der Membran mit CN^- -Ionen aus der Analytlösung vorgestellt. J. Vesely et al., B. Fleet et al. und V.M. Jovanovic et al. stellen unterschiedliche Komplexbildungsreaktionen zwischen Ag^+ -Ionen und CN^- -Ionen dar, die in Gln. 2.68 bis Gln. 2.70 gezeigt sind [94,102,103]. Welche Reaktion stattfindet, ist von der Konzentration der CN^- -Ionen in der Messlösung abhängig.



Hierbei wird für die publizierten CN^- -Ionenkonzentrationen der Messlösungen hauptsächlich die Komplexbildung nach Gln. 2.69 angenommen [94,103]. Unter Einbeziehung der dazugehörigen Komplexbildungskonstanten kann das Messsignal der Ag_2S -ISE mit Hilfe von Gln. 2.71 und Gln. 2.72 berechnet werden.

$$[\text{Ag}^+] = \frac{[\text{Ag}(\text{CN})_2^-]}{K_{(\text{Ag}(\text{CN})_2^-)} * [\text{CN}^-]^2} \quad \text{Gln. 2.71}$$

$$U = U_0 - \frac{RT}{zF} \lg(K_{K(\text{Ag}(\text{CN})_2^-)}) + \frac{RT}{zF} \lg(a_{\text{Ag}(\text{CN})_2^-}) - 2 \frac{RT}{zF} \lg(a_{\text{CN}^-}) \quad \text{Gln. 2.72}$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich eine Sensitivität von 118 mV/pCN. Beim Vergleich der pK_L -Werte von Ag-Chalkogenidglas-Verbindungen, beispielsweise von Ag_2S , Ag_2Se oder Ag_2Te , mit den pK_K -Werten der Ag-CN-Komplexe, sind in diesem Fall die pK_L -Werte wesentlich größer als die pK_K -Werte der Ag-CN-Komplexe (Tab. 2.5) [171,218-222].

Tab. 2.5: pK_L -Werte und pK_K -Werte für unterschiedliche Ag-Chalkogenidglas-Membranen und verschiedene Ag-CN-Komplexe in Lösung bei 25 °C [171,218-222].

	Ag_2S	Ag_2Se	Ag_2Te	$\text{Ag}(\text{CN})$	$\text{Ag}(\text{CN})_2^-$	$\text{Ag}(\text{CN})_3^{2-}$
pK_L	48,5	58	67			
pK_K				14	20	22

Aus energetischen Betrachtungen heraus ergibt sich, dass die Ag-Chalkogenidglas-Membran, nicht wie bei den Ag-Halogenid-Membranen, durch CN^- -Ionen in freie Ag^+ -Ionen und S^{2-} -Ionen gelöst wird. Somit werden fast keine freien Ag^+ -Ionen für die

Komplexverbindung mit CN^- -Ionen zur Verfügung gestellt [87,88,93,98,100,101,228]. Auf der Basis von Löslichkeits- und Komplexbildungskonstanten für eine Ag_2S -Membran und $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ -Komplexverbindung wird 1974 von W.E. Morf et al. eine neue Theorie zum Funktionsmechanismus von Ag-Chalkogenidglas-Membranen entwickelt und experimentell belegt [100]. Hierbei geht man von freien Ag^+ -Ionen auf Zwischengitterplätzen in der Sensormembran aus. Diese sog. Frenkel-Ionen (Ag^{+*} -Ionen) können mit den CN^- -Ionen aus der Analytlösung Ag-CN-Komplexverbindungen eingehen und somit zur Änderung des Oberflächenpotentials der ISE, d.h. zum Signal, führen. Gln. 2.73 und Gln. 2.74 geben jeweils das chemische Gleichgewicht und die dazugehörige Messspannung nach W.E. Morf et al. an [100].



$$U = U_0 + \frac{RT}{F} \lg(a_{\text{Ag}^{+*}}) - 2 \frac{RT}{F} \ln(\sqrt{K_{\text{K}(\text{Ag}(\text{CN})_2^-)} K_L} * a_{\text{CN}^-}) \quad \text{Gln. 2.74}$$

Hierbei beschreibt der Faktor $K_{\text{K}(\text{Ag}(\text{CN})_2^-)} * K_L$ die relative Komplexbildung in Bezug auf Gln 2.69 und ist konstant. Die Ionenaktivität der Frenkel-Ionen (a_{Ag^+}) wird experimentell bestimmt und beträgt für Ag_2S $10^{-5,5}$. Auch bei dieser Betrachtung ergibt sich rechnerisch eine Sensitivität von Ag-Chalkogenidglas-Membranen gegenüber CN^- -Ionen von 118 mV/pCN [100]. Diese theoretischen Betrachtungen werden auch von E. Buck et al., I. Sekerka et al. und A.R. Surleva et al. für den Einsatz von Ag_2S -Membranen in Cyanid-haltigen Lösungen herangezogen [109,228,229]. Darüber hinaus werden neuere Untersuchungen von M.T. Neshkova et al. mit unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-Dünnschichtmembranen, wie z.B. Ag_2Se -, Ag_xSe - und $\text{Ag}_x\text{Se}_y\text{Te}_z$ -Membranen, in Cyanid-haltigen Lösungen mit Hilfe dieser Theorie beschrieben und Sensitivitäten zwischen 90 mV/pCN und 140 mV/pCN experimentell erreicht [104-109].

2.5. Chalkogenidglas-ISE für die Schwermetallbestimmung

Wie in Kap. 1.3.3 beschrieben, werden Chalkogenidglas-ISEs für die Schwermetallbestimmung in Flüssigkeiten von C.T. Baker, I. Trachtenberg und R. Jasinski eingeführt [119-121]. Der Potentialbildungsmechanismus wird von Y.G. Vlasov et al. und I. Trachtenberg et al. für Cu^{2+} -ISEs und Pb^{2+} -ISEs theoretisch und experimentell untersucht [125-133]. In jüngster Zeit wird der Mechanismus auf weitere Chalkogenidglasmaterialien für die Schwermetallanalytik von J.P. Kloock und M.J. Schöning experimentell erweitert [3,190]. Wird eine Chalkogenidglas-ISE in die Analytlösung getaucht, so bildet sich eine 20-200 nm dünne modifizierte Oberflächenschicht aus. In dieser Schicht wird das Glasnetzwerk partiell zerstört und aktive Austauschgruppen werden gebildet. Die atomare Dichte im modifizierten Glasnetzwerk sinkt um einen Faktor von 2-2,5. Damit wird eine höhere Diffusion von Schwermetallionen aus dem Analyten in die Glasschicht ermöglicht. Die Schwermetallionen aus der Analytlösung ($\text{Me}_{\text{Analyt}}$) gehen ein dynamisches konzentrationsabhängiges Austauschgleichgewicht mit den Schwermetallionen in der modifizierten Chalkogenidglasschicht ($\text{Me}_{\text{mod. Chalkogenidglas}}$) ein (Ionenleiter) (Gln. 2.75).



Die Metallionen im modifizierten Chalkogenidglas gehen darüber hinaus ein dynamisches Gleichgewicht mit den Metallionen im nicht-modifizierten Chalkogenidglasmaterial (Me_{Bulk}) ein, welches in einem Elektronentransport im Bulk-Material als Funktion der Schwermetallionenkonzentration im Elektrolyten resultiert (Gln. 2.76).



Hierbei wird ein positives „Loch“ (h^+), d.h. ein positiver Ladungsträger, als Folge von zwei Prozessen erzeugt: Disproportionierung von Metallionen (monovalent) und anschließende Oxidation sowie direkte Diffusion von Metallionen (bivalent) aus der Lösung in das Bulk-Material. Dabei wird das Potential der Chalkogenidglasschicht verändert. Die Anzahl der positiven Ladungsträger im Bulk-Material ist abhängig von der Anzahl der aktiven Austauschseiten in der Chalkogenidglasmembran und somit von der Schwermetallionenkonzentration in der Messlösung. Durch die partielle Zerstörung des Chalkogenidglas-Netzwerks am Interface „Elektrode/Elektrolyt“ wird die Membran bei jeder Messung verbraucht [125,190].

3. Experimentelles

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Verfahren zur Herstellung und Optimierung der unterschiedlichen Sensorstrukturen sowie die erforderlichen Methoden zu deren physikalischer und elektrochemischer Charakterisierung vorgestellt.

3.1. Bestimmung der Enzymmenge und Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Enzymmenge wird die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Silberfärbung und Gelscan angewendet. Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgt sowohl spektrophotometrisch mit Hilfe der Pyridin-Barbitursäure-Methode als auch potentiometrisch mittels einer Ammoniak-ISE. Beide Verfahren werden im Folgenden näher beschrieben.

3.1.1. Enzymmengenbestimmung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Bestimmung der *Cyanidase*-Menge wird mittels der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung und Gelscan durchgeführt. Bei der SDS-PAGE werden denaturierte Proteine durch Anlegen einer Spannung nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Hierzu werden die Proteine durch Zugabe von SDS, d.h. einem anionischen Tensid (Detergent), zu stark negativen Protein-Detergent-Komplexen. Es bildet sich eine negativ geladene Doppelschicht um das Protein, die die Eigenladung der Proteine überdeckt. Die Ladung der Protein-Detergent-Komplexe ist für Proteine mit einer Größe im Bereich von 15 kDa bis 70 kDa proportional zum molekularen Gewicht der Proteine [230]. Für reproduzierbare Ergebnisse werden Enzyme zusätzlich bei 100 °C für 2-5 min erhitzt, um somit Sekundär- und Tertiärstrukturen zu brechen; die Enzyme werden denaturiert. Als Trenngel für die Elektrophorese wird häufig ein Gel aus Polyacrylamid mit kleiner Porengröße verwendet [12,230]. Die SDS-PAGE erfolgt in einer Elektrophoresekammer, bei der die Proben in bestimmte Probenfächer im Gel oder über einen Probekamm auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden. Hierbei wirkt das Gel wie ein Sieb, die großen Proteine migrieren langsamer als die kleinen Proteine. Anschließend sind die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Je nach Gelkonzentration kann der Bereich der Proteingröße eingestellt werden. Typische Gelkonzentrationen liegen bei 5-20%. Zur Visualisierung der getrennten Proteinbanden wird das Gel entwickelt; gängige Verfahren hierfür sind die Coomassie-Blau- und die Silberfärbung. Für die

Bestimmung des Molekulargewichtes einer bestimmten Proteinbande wird beispielsweise parallel zu den Proben ein Standard, d.h. eine Referenz mit bekannten Proteinen und deren Molekulargewichten, aufgetragen. In Abb. 3.1 ist schematisch und exemplarisch der Messaufbau einer Gel-Elektrophorese mit schon entwickeltem Gel dargestellt. Auf der ersten Position wird der Standard und auf den Positionen zwei bis acht werden die *Cyanidase*-haltigen Proben (Proben 1-7) mit einer abnehmenden *Cyanidase*-Konzentration, aufgetragen. Das Molekulargewicht von *Cyanidase* beträgt 37,5 kDa [68-70].

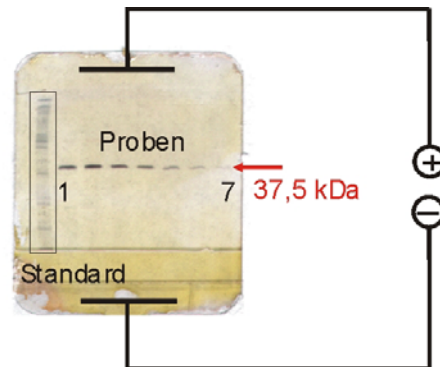


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer SDS-PAGE.

Für die quantitative Evaluierung der getrennten Proteinbanden im Hinblick auf die Proteinmenge kann die Gelscan-Methode eingesetzt werden. Hierbei wird spektrophotometrisch, über eine Transmissions- oder Remissionsmessung bei einer bestimmten Wellenlänge, die Intensität der Proteinbande analysiert [231]. Mit Hilfe einer Transmissions-/Remissions-Orts-Kurve wird als Messgröße beispielsweise die Peakfläche ausgewertet. Ist die Proteinkonzentration der Probe eins bekannt, so kann auf eine unbekannte Proteinkonzentration über das Verhältnis der Peakflächen von bekannter zu unbekannter Probe zurückgeschlossen werden.

Für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der Gele wird der Analysator PhastSystems der Firma Pharmacia LKB Biotechnology mit einer integrierten Entwicklereinheit eingesetzt. Als Gel wird das PhastGel Homogeneous 12,5 mit einem Trennbereich von 15-250 kDa verwendet. Die Vorbehandlung der *Cyanidase*-haltigen Proben erfolgt in zwei Schritten:

- Einstellen der Proteinmenge auf 1 mg/l mit Hilfe von SDS-Puffer,
- Denaturierung der Enzyme durch Erhitzen auf 100 °C für 5 min.

Anschließend werden die Proben mit Bromphenylblau gefärbt. Diese Lösungen werden mit einem Probenkamm mit acht Kammaufnehmern auf das Gel aufgetragen. Die Trennung der Proben erfolgt bei 6 mA und 15 °C mit einem Spannungsgradienten von 0 V bis 200 V. Die getrennten Proben werden mit Hilfe von Silbernitrat gefärbt. Hierbei werden zuerst die Protein-Detergent-Komplexe fixiert und die Pufferionen ausgewaschen (Schritt Nr. 1-3). Die Proteine werden mit Hilfe von Glutardialdehyd „sensibilisiert“ und das Glutardialdehyd wird darauf hin wieder

ausgewaschen (Schritt Nr. 4-8). Anschließend erfolgt die eigentliche Färbung mit Silbernitrat (Schritt Nr. 9), danach wird die Silberfärbung gestoppt (Schritt Nr. 10-12). Abschließend wird das Gel mit Glycerol konditioniert (Schritt Nr. 13-14). Die verwendeten Lösungen und Parameter der Silberfärbung sind in Tab. A im Anhang zusammengefasst.

Für die quantitative Auswertung der Gele werden die Gelscanner CS-9001 PC der Firma Shimadzu und TLC Scanner 3 der Firma CAMAG eingesetzt. Hierbei werden die *Cyanidase*-Banden der Proben bei einem Molekulargewicht von 37,5 kDa mittels Remissionsmessungen bei einer Wellenlänge von 495 nm im Mäander- bzw. Linear-Verfahren analysiert [231]. Als Standardprobe wird der Roti®-Mark-Standard der Firma Carl Roth GmbH verwendet. Die Zusammensetzung des Standards (Proteine und deren Molekulargewicht) ist in Tab. B im Anhang wieder gegeben.

Die Bestimmung der *Cyanidase*-Menge werden für die Optimierung der Immobilisierung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ und an Eupergit C® eingesetzt.

3.1.2. Enzymaktivitätsbestimmung mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode

Für die Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität, sowohl im nativen als auch im immobilisierten Zustand, wird die Pyridin-Barbitursäure-Methode gewählt. Sowohl in der Forschung als auch in der industriellen Umweltanalytik nach EN ISO 14403:2002 und DIN 38405-D13 wird diese Methode zur quantitativen Erfassung von Cyanid eingesetzt [13,232,233]. Bei der Pyridin-Barbitursäure-Methode wird freies Cyanid (CN⁻-Ionen) über eine Farbreaktion spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge zwischen 580 nm und 600 nm mittels Transmissionsmessung bestimmt. Die freien CN⁻-Ionen in der Probe reagieren mit Chloramit-T zu Chlorcyan. Durch die Zugabe von Pyridin wird Glutacondialdehyd gebildet, welches anschließend mit der Barbitursäure einen rot-violetten Polymethin-Farbstoff bildet. Die Intensität des Farbstoffs ist abhängig von der Konzentration der freien CN⁻-Ionen und kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet werden (Gln. 3.1 und Gln. 3.2).

$$E = \varepsilon * c * d \quad \text{Gln. 3.1}$$

$$E = \lg\left(\frac{I_0}{I_a}\right) \quad \text{Gln. 3.2}$$

Hierbei sind E die Extinktion, ε der molare Absorptionskoeffizient, c die Konzentration der Substanz in mol/l, d die Schichtdicke, I_0 die Intensität des eingestrahelten Lichtes und I_a die Intensität des durch Absorption geschwächten Lichtes.

Für die Messungen der *Cyanidase*-Aktivität werden kommerzielle Küvettentests des Typs LCK315 und das Spektrophotometer XION 500 der Firma HachLange eingesetzt. Laut Herstellerangaben beträgt der lineare Messbereich für CN^- -Ionen von $0,15 \mu\text{mol/l}$ bis $9,21 \mu\text{mol/l}$. Für die Cyaniderfassung erfolgt die Transmissionsmessung bei einer Wellenlänge von 590 nm , denn hier wird experimentell der Transmissionspeak der Küvettentests bestimmt (s. Abb. 3.2).

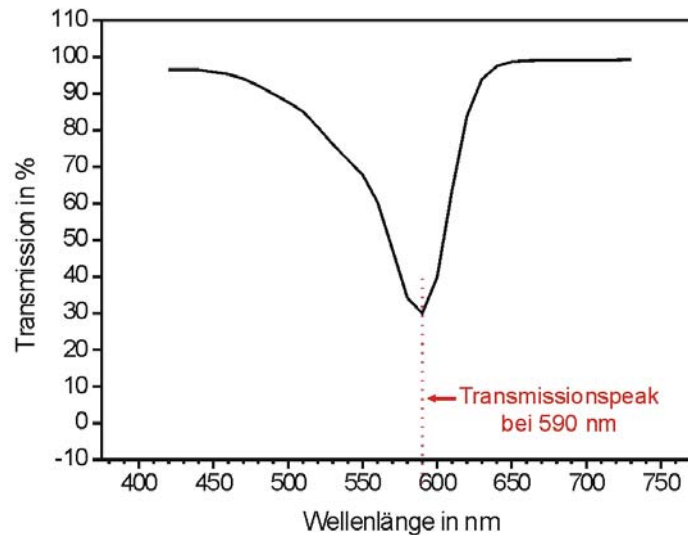


Abb. 3.2: Darstellung einer exemplarischen Transmissionsmessung mit einem LCK315-Küvettentest.

Die *Cyanidase* setzt katalytisch Cyanid zu Ammoniak und Formiat um, dabei wird Cyanid verbraucht. Bei der Messung der *Cyanidase*-Aktivität wird in definierten zeitlichen Abständen die noch nicht umgesetzte Cyanidmenge spektrophotometrisch bestimmt. Für diese Messung werden eine Reaktionslösung (Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl) und eine Stopplösung (33 ml Reaktionslösung und 18 ml 200 mmol/l NaOH-Lösung) vorbereitet. Zur $540 \mu\text{l}$ Reaktionslösung werden $60 \mu\text{l}$ 100 mmol/l KCN-Lösung und anschließend $30 \mu\text{l}$ native *Cyanidase* oder $100 \mu\text{l}$ immobilisierte *Cyanidase* hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Somit wird eine KCN-Konzentration von 10 mmol/l im Reaktionsgefäß eingestellt. Anschließend werden jeweils $8 \mu\text{l}$ dieser Lösung in bestimmten zeitlichen Abständen in jeweils 1 ml Stopplösung pipettiert. Diese Lösung wird mit Hilfe der LCK315-Küvettentests evaluiert. In Abb. 3.3 ist das Messprotokoll zur Bestimmung der Enzymaktivität von *Cyanidase* mit der Pyridin-Barbitursäure-Methode schematisch dargestellt.

Für die Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität wird eine 10 mmol/l KCN-Konzentration in der Reaktionslösung eingestellt, da bei dieser Cyanidkonzentration die *Cyanidase* mit einer konstanten und maximalen Umsatzgeschwindigkeit aktiv ist. Der K_m -Wert von *Cyanidase* beträgt $1,7 \text{ mmol/l}$ Cyanid [68,69,234]. Wie in Kap. 2.1 dargestellt, beschreibt der K_m -Wert diejenige Substratkonzentration (Cyanidkonzentration), bei der das Enzym (*Cyanidase*) mit 50% der maximalen Umsatzgeschwindigkeit arbeitet. Für Substratkonzentrationen, die größer als 2-mal der K_m -Wert sind, ist das Enzym

mit einer konstanten Umsatzgeschwindigkeit aktiv. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wird normalerweise eine Substratkonzentration gewählt, bei der das Enzym konstant das Substrat umsetzt. Somit wird für die Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität eine ca. 6-fach größere Cyanidmenge gewählt als der K_m -Wert von *Cyanidase*. In der Stopplösung wird die *Cyanidase* aufgrund des hohen pH-Wertes (pH 13) denaturiert und somit die Katalyse gestoppt. Darüber hinaus liegt bei diesen pH-Werten Cyanid zu 100% in Ionenform vor und kann somit direkt mit Chloramin-T für die spektrophotometrische Analyse reagieren.

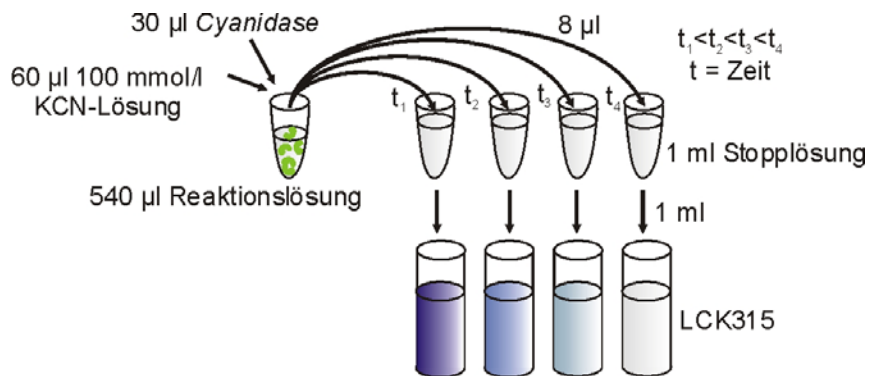


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des Messprotokolls zur Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode.

Mit Hilfe einer Kalibriergeraden (Transmission als Funktion des dekadischen Logarithmus der KCN-Konzentration) kann dem Messsignal (Transmission) einer unbekanntem Cyanid-haltigen Probe die Cyanidkonzentration direkt zugeordnet werden. Somit kann die *Cyanidase*-Aktivität als dynamische Abnahme der Cyanidkonzentration (Einheit: (mol/l)/min oder $\mu\text{mol}/\text{min}$) bestimmt werden. Für die Kalibriermessung werden Cyanidkonzentrationen zwischen 10 $\mu\text{mol/l}$ und 10 mmol/l KCN in der Reaktionslösung hergestellt. Analog zur Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität werden jeweils 8 μl der Cyanid-haltigen Lösung in jeweils 1 ml Stopplösung pipettiert und spektrophotometrisch ausgewertet. Abb. 3.4 zeigt exemplarisch eine Kalibriermessung mittels der Pyridin-Barbitursäure-Methode; a) Foto der LCK315-Küvettentests und b) die dazugehörige Kalibriergerade. Der lineare Messbereich dieser Methode liegt zwischen 50 $\mu\text{mol/l}$ und 5 mmol/l KCN in der Reaktionslösung.

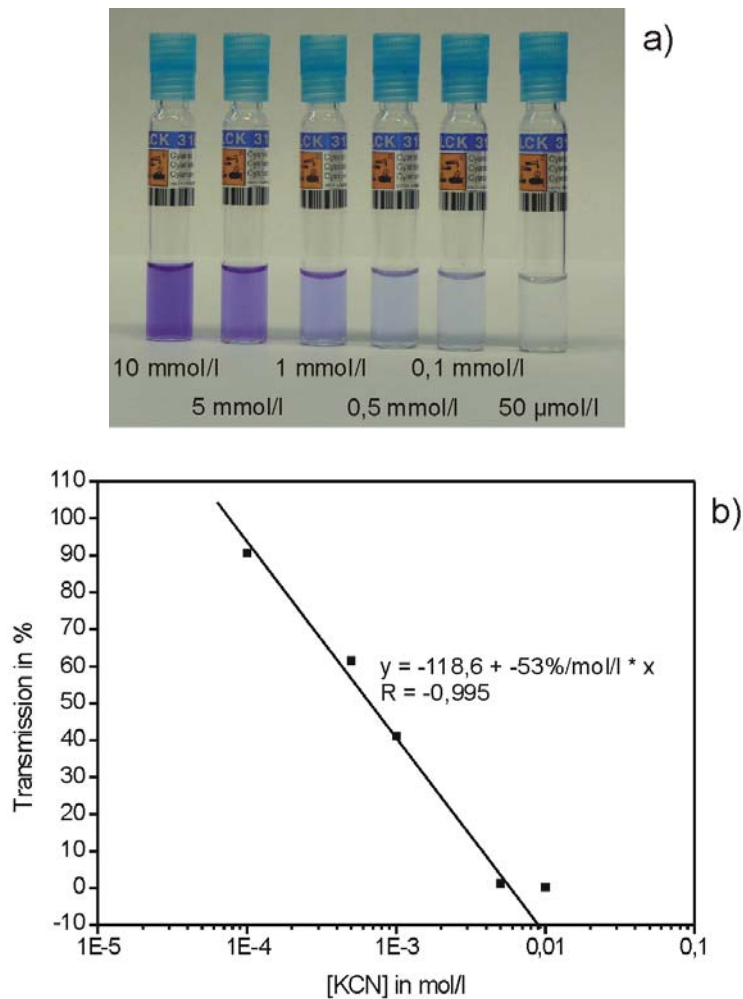


Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung einer Kalibriermessung mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode; a) Foto der LCK315-Küvettentests, b) dazugehörige Kalibriergerade.

3.1.3. Enzymaktivitätsbestimmung mittels Ammoniak-ISE

Als eine weitere Methode für die Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität wird die Potentiometrie mittels Ammoniak-ISE gewählt. Da die Küvettentests LCK315 Einwegtests und somit relativ teuer sind, stellt die Enzymaktivitätsbestimmung mittels NH_3 -ISE eine kostengünstige Alternative dar. Bei dieser Methode werden eine NH_3 -ISE der Firma Satorius als Einstabmesskette (Typ: PY-102) und ein Potentiometer (Typ: MPC 227) der Firma Mettler Toledo eingesetzt. Da bei der Katalyse von Cyanid NH_3 entsteht, kann für die Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität bei dieser Methode die NH_3 -Konzentration als Messsignal dynamisch erfasst werden. Wenn 1 mol Cyanid enzymatisch umgesetzt wird, entsteht 1 mol NH_3 (s. Gl. 1.4 in Kap. 1.3.1), d.h. der dynamische Verbrauch von Cyanid entspricht der dynamischen Zunahme von NH_3 im Verhältnis 1:1. Für die Messung der NH_3 -Konzentration wird die gleiche Reaktionslösung wie bei der Pyridin-Barbitursäure-Methode verwendet. Zu 2,7 ml

Reaktionslösung werden 0,3 ml 100 mmol/l KCN-Lösung und 30 μ l native *Cyanidase* bzw. 100 μ l immobilisierte *Cyanidase* hinzugegeben und vorsichtig gerührt. Somit wird ebenfalls eine KCN-Konzentration von 10 mmol/l im Reaktionsgefäß eingestellt. Als Messsignal wird die Spannung dynamisch über einen Zeitraum von 10 min erfasst. Wie in Kap. 2.2.3.1 in Gln. 2.27 für eine potentiometrische NH_3 -ISE dargestellt, steigt mit zunehmender NH_3 -Konzentration der pH-Wert des Innenelektrolyten der NH_3 -ISE, der mittels einer integrierten pH-ISE als Messsignal erfasst wird. Daraus resultiert, je größer die NH_3 -Konzentration, d.h. je mehr Cyanid katalytisch umgesetzt wird, desto größer ist der pH-Wert des Innenelektrolyten und desto kleiner ist die gemessene Spannung. Um aus den gemessenen Spannungswerten auf die NH_3 -, bzw. KCN-Konzentration zurückschließen zu können, wird die NH_3 -ISE vor jeder Messreihe in Ammoniumformiat-Lösungen mit Konzentrationen von 10 μ mol/l bis 10 mmol/l kalibriert. Als Hintergrundlösung wird die Reaktionslösung gewählt und der pH-Wert auf pH 8,9 eingestellt. Dieser pH-Wert entspricht dem pH-Wert, der bei den *Cyanidase*-Aktivitätsmessungen entsteht, wenn eine 10 mmol/l KCN-Anfangskonzentration eingestellt wird (experimentell bestimmt). Mit Hilfe von Ammoniumformiat können die Produkte der Katalyse der *Cyanidase*, Ammoniak und Formiat, für die Kalibriermessungen der NH_3 -ISE gut simuliert werden. In Abb. 3.5 ist der Messaufbau für die potentiometrische *Cyanidase*-Aktivitätsbestimmung schematisch dargestellt.

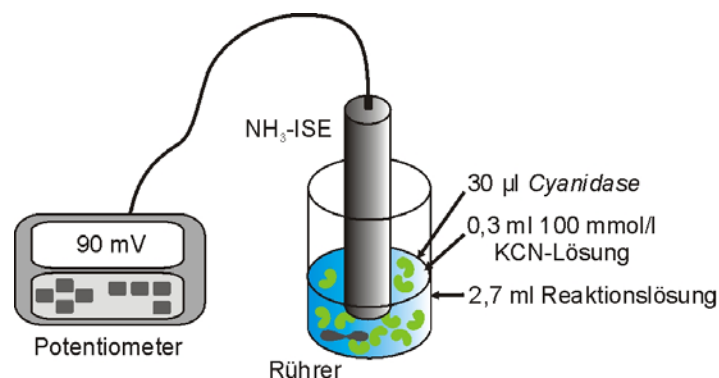


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Messaufbaus für die Enzymaktivitätsmessungen mittels NH_3 -ISE.

In in Abb. 3.6 a) und Abb. 3.6 b) sind eine Kalibriermessung der NH_3 -ISE und eine Enzymaktivitätsmessung mit nativer *Cyanidase* exemplarisch gezeigt. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wird die Messkurve linear gefittet. Aus der Steigung der Geraden wird die *Cyanidase*-Aktivität als lineare Zunahme der NH_3 -Konzentration pro Zeiteinheit (Einheit: (mmol/l)/min) bestimmt. Wird die Enzymaktivität auf das Messvolumen bezogen, so ergibt sich die Einheit der Enzymaktivität μ mol/min [147,156,235].

Alle Enzymaktivitätsmessungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

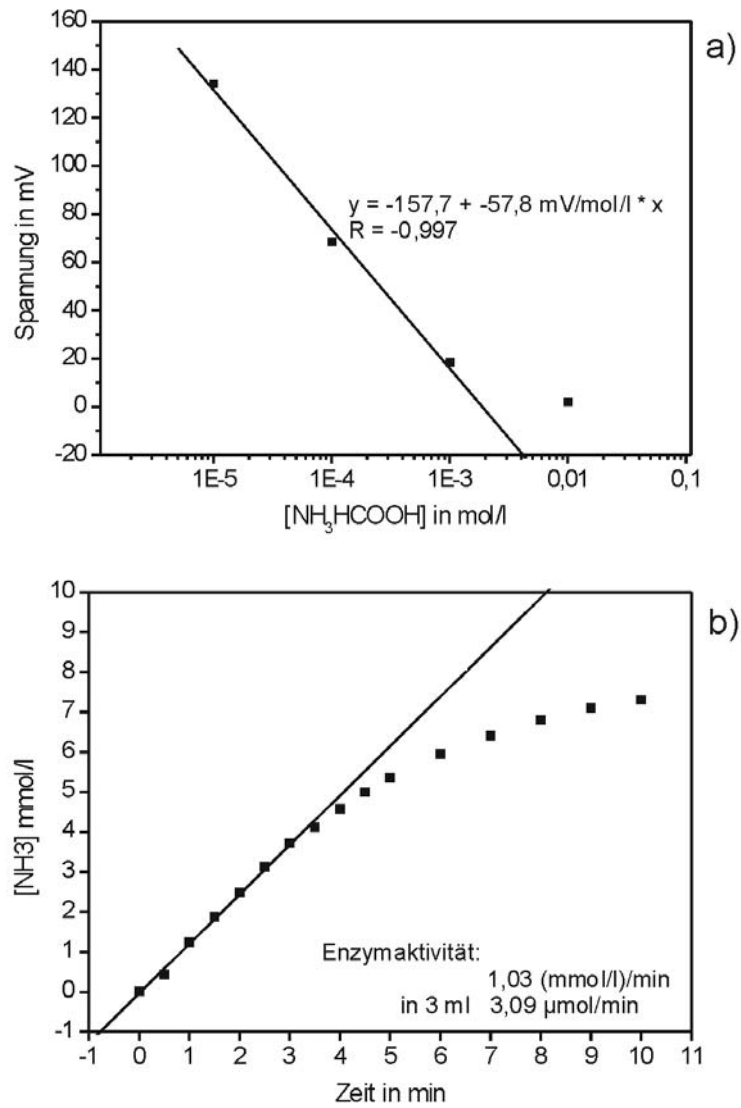


Abb. 3.6: Exemplarische Darstellung einer a) Kalibriermessung und b) der dazugehörigen Enzymaktivitätsmessung von $30 \mu\text{l}$ nativer *Cyanidase*.

3.2. Physikalische Charakterisierung der Sensorstrukturen

Die physikalische Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Sensorstrukturen wird mit Hilfe von mikroskopischen Verfahren, wie der 3-D-Videomikroskopie, der Rasterelektronenmikroskopie (REM), der Rasterkraftmikroskopie (AFM), der Rutherford-Rückstreuung-Spektroskopie (RBS) und mit der Profilometrie durchgeführt. Diese Verfahren werden in den folgenden Unterkapiteln näher beschrieben.

3.2.1. Mikroskopische Verfahren

Zur Charakterisierung der Oberflächen der hergestellten Halbleitersensoren im Hinblick auf die Homogenität, die Morphologie und die Topologie werden die Sensoren direkt nach der Herstellung und in regelmäßigen zeitlichen Abständen mit Hilfe der optischen Mikroskopie, der REM und der AFM untersucht. Hiermit sollen das Herstellungsverfahren und eventuelle Veränderungen der Sensoroberfläche nach Kontakt mit den Cyanid- und Schwermetall-haltigen Lösungen physikalisch validiert werden.

Mit dem VHX-Digitalmikroskop der Firma Keyence werden die optischen Aufnahmen der Chemo- und Biosensoren bis zu einer 5.000-fachen Vergrößerung durchgeführt. Kernstück des optischen Digitalmikroskops ist eine CCD-Kamera mit einer maximalen Auflösung von 18 Mega-Pixel, mit der unterschiedliche Einzelobjektive betrieben werden können. Des Weiteren können durch das „Depth from defocus“-Verfahren, 3-D Aufnahmen und Oberflächenprofile mit einer hohen Tiefenschärfe der Objekte erzielt werden. Der im Vergleich zum konventionellen optischen Mikroskop relativ weite Abstand des Objektivs zur Probe ermöglicht auch scharfe Aufnahmen von biologischen Proben.

Für die Darstellung der Oberflächenmorphologie und -topologie der Sensorstrukturen mit einer höheren Auflösung wird die REM verwendet. Bei dieser Methode wird die Oberfläche einer leitfähigen Probe mit einem Elektronenstrahl „abgetastet“. Dabei wechselwirken diese Primärelektronen elastisch und inelastisch mit den Atomen und Elektronen der Probe im spezifischen Volumen und bilden in Abhängigkeit vom Material und von der Beschleunigungsspannung der Primärelektronen Sekundärprodukte, die für die Analyse der Probe genutzt werden. Die am häufigsten für die Bilderzeugung verwendeten Sekundärprodukte sind die niederenergetischen Sekundärelektronen (<50 eV) und die höher energetischen Rückstreuelektronen, die jeweils Informationen über die Probenoberfläche und Materialtiefe enthalten [236,237]. Für die Erzeugung des Primärelektronenstrahls wird häufig eine thermische Feldemissionskathode eingesetzt. Die Energie der Elektronen liegt gewöhnlich zwischen 5 keV und 30 keV. Über ein elektromagnetisches Linsensystem

und mittels eines Ablenkspulensystems wird der Primärelektronenstrahl auf die Probe fokussiert und über die Probenoberfläche gerastert. Die erzeugten Sekundär- und Rückstreuelektronen werden über ein Detektorsystem, das aus einem Szintillator und einem Photomultiplier besteht, als elektrisch verwertbares Signal ausgegeben. Die Intensität des Messsignals wird einem Grauwert als entsprechender Punkt auf dem Bildschirm zugeordnet. Um eine möglichst hohe freie mittlere Weglänge der Elektronen und somit wenig Einfluss der Luftmoleküle auf die Bildqualität zu erreichen, werden die REM-Messungen im Hochvakuum ($<10^{-6}$ mbar) durchgeführt. Die Vorteile der REM liegen in einem hohen Auflösungsvermögen (bis zu 1 nm), einer hohen Tiefenschärfe, einem großen Vergrößerungsbereich und einem relativ geringen präparativen Probenaufwand, insbesondere bei nichtleitenden Materialproben. Hierbei behilft man sich häufig mit einer zusätzlichen nm- bis μm -dünnen Metallschicht auf der Probe (Iridium- oder Platin-Schicht). Darüber hinaus können biologische Proben während der Untersuchung gekühlt werden, damit keine Deformationen der Probe aufgrund der verwendeten hohen Energien auftreten. Für die REM-Aufnahmen wird ein Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss (Typ: GEMINI 1550) verwendet.

Für die Oberflächencharakterisierung der Sensorchips im nm- und sub-nm Bereich wird die AFM eingesetzt. Bei diesem Verfahren werden die kleinen Kräfte, die bei der Annäherung der Messspitze (Cantilever) an die Oberfläche auftreten, d.h. die Anziehung und Abstoßung zwischen Atomen bzw. Molekülen, gemessen. Bei einer AFM-Messung wird der Cantilever mit einer bestimmten Federkraft zeilenweise über die Probe geführt. Dabei wird auf der Rückseite des Cantilevers ein Laserstrahl reflektiert. Ändert sich die Position des Cantilevers in y-Richtung durch z.B. höhere und niedrigere Topographien oder in x-Richtung durch beispielsweise Verkipfung der Oberfläche, so ändert sich der Reflexionswinkel der Messspitze. Diese Veränderungen können als Signal mit einer 4-Quadranten-Photodiode (Detektor) erfasst werden. Das Detektorsignal ergibt sich aus den Photosignalen aller Quadranten, siehe Abb. 3.7.

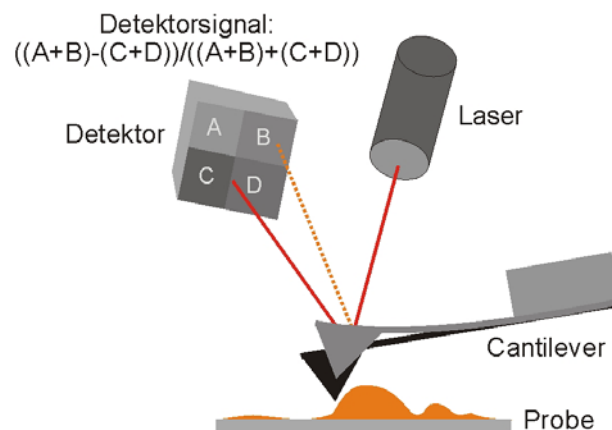


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der AFM-Messung und Signalerfassung.

Die AFM bietet verschiedene Modi, wie den „Kontakt“-, den „Intermittent“- und den „Nicht-Kontakt“-Modus, an, bei denen unterschiedliche Kräfte und Verweildauern des Cantilevers auf der Probenoberfläche wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit wird zur Untersuchung der biologischen und chemischen Sensoroberflächen der „Intermittent“-Modus verwendet, bei dem ein oszillierender Cantilever über die Probe „getippt“ wird. Somit können topographische und morphologische Informationen der Oberfläche relativ zerstörungsfrei gewonnen werden. Für die AFM-Messungen werden das NanoWizard Bio-Rasterkraftmikroskop der Firma JPK Instruments und das Rasterkraftmikroskop der Firma Ambios Technology eingesetzt [238].

3.2.2. Rutherford-Rückstreu-Spektroskopie (RBS)

Die Rutherford-Rückstreu-Spektroskopie (RBS) ist eine nahezu zerstörungsfreie Methode zur Analyse von dünnen Festkörperschichten. Mit Hilfe der RBS können Informationen über die elementare Zusammensetzung der Probe, d.h. über deren Stöchiometrie, Schichtdicke und Tiefenverteilung erhalten werden. Darüber hinaus können bei sog. „Channeling“-Versuchen Kristallstrukturen und Kristalldefekte untersucht werden [239,240]. Bei der RBS-Analyse werden leichte monoenergetische Ionen (Projektilionen), wie z.B. H^+ -, He^+ - oder He^{2+} -Ionen, mit Energien zwischen 0,1 MeV und 5 MeV auf die zu untersuchende Probe „geschossen“. Hierbei kommt es zu elastischen und inelastischen Streuungen der Projektilionen durch die Targetatome. Die Energie der rückgestreuten Projektilionen wird mit Hilfe eines Teilchenzählers erfasst und anschließend analysiert. Die übliche Streugeometrie mit Winkeldefinitionen ist in Abb. 3.8 schematisch dargestellt.

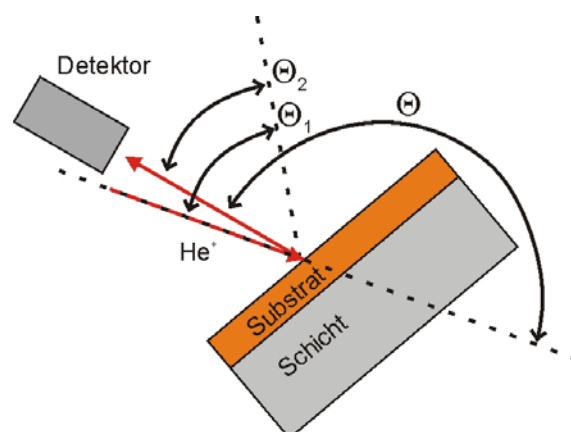


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der RBS-Streugeometrie.

Für die elastische Streuung der Projektilionen kann die Energie der rückgestreuten Ionen klassisch mit Hilfe des Impuls- und Energieerhaltungssatzes berechnet werden [240]. Das Verhältnis der Energie rückgestreuter Projektilionen (E_1) zu der Energie

der einfallenden Projektionen (E_0) wird über den kinematischen Faktor (k) beschrieben (Gln. 3.3). Wenn die Masse der Projektionen kleiner ist als die Masse der Targetatome ($m_1 < m_2$), kann der kinematische Faktor (k_{m2}), bezogen auf m_2 , mit Gln. 3.4 berechnet werden.

$$E_1 = k * E_0 \quad \text{Gln. 3.3}$$

$$k_{m2} = \left[\frac{(m_2^2 - m_1^2 \sin^2 \Theta)^{1/2} + m_1 \cos \Theta}{m_1 + m_2} \right]^2 \quad \text{Gln. 3.4}$$

Bei gegebener Projektionenenergie und konstanter Geometrie ist der kinematische Faktor und somit auch die gemessene Energie (E_1) nur noch von der Masse der Targetatome abhängig. Je größer die gemessene Energie der rückgestreuten Ionen, desto größer ist die Targetatommasse. Durch diese Abhängigkeit kann mit Hilfe von RBS-Messungen die Masse der Targetatome und somit die elementare Zusammensetzung der Probe bestimmt werden.

Wird das Projektion nicht direkt an der Probenoberfläche zurückgestreut, sondern erst in einer Tiefe (x), so verliert es durch Wechselwirkungen mit anderen Ionen und Elektronen sowohl auf dem Hinweg (Index: in) als auch auf dem Rückweg (Index: out) zum bzw. vom Targetatom Energie. Die Differenz der Rückstreueenergie (ΔE) kann mit Hilfe des Energieverlustfaktors ($[S]$) in der Oberflächennäherung beschrieben werden (Gln. 3.5 und Gln. 3.6).

$$\Delta E = [S]x \quad \text{Gln. 3.5}$$

$$[S] = \frac{k}{\cos \Theta_1} \frac{dE}{dx} \Big|_{in} + \frac{1}{\cos \Theta_2} \frac{dE}{dx} \Big|_{out} \quad \text{Gln. 3.6}$$

Aus der RBS-Messung resultiert ein Rückstreupektrum, bei dem die Anzahl der rückgestreuten Projektionen als Funktion der jeweiligen Energie dargestellt wird. Jede gemessene Energie wird einem Kanal zugeordnet. Nach einer Kalibrierung erhält man die dazugehörigen Energien. Mit Hilfe von Gln. 3.3 und Gln. 3.4 kann über die gemessenen „Energiekanten“ im Spektrum auf die Art der Targetatome zurückgeschlossen werden. Die Höhe der Energiekanten gibt Auskunft über die relative Quantität der jeweiligen Elemente in der Probe. Darüber hinaus, wenn die Dichte des Materials bekannt ist, kann über die „Breite“ des Spektrums die Schichtdicke bestimmt werden. In Abb. 3.9 ist eine schematische Darstellung eines RBS-Rückstreupektrums für eine Dünnschicht aus zwei Komponenten dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die RBS zur Analyse von dünnen Chalkogenidglasschichten verwendet. Hierbei werden Untersuchungen hinsichtlich der Zusammensetzung, der Stöchiometrie und eventueller Veränderungen der Zusammensetzungen nach Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen durchgeführt. Für die RBS-Messungen werden He^+ -Projektionen mit einer Energie von 1,4 MeV

eingesetzt. Der Streuwinkel (θ) liegt bei 170° . Für die Auswertung der gemessenen Rückstreuenspektren wird die Software RUMP eingesetzt.

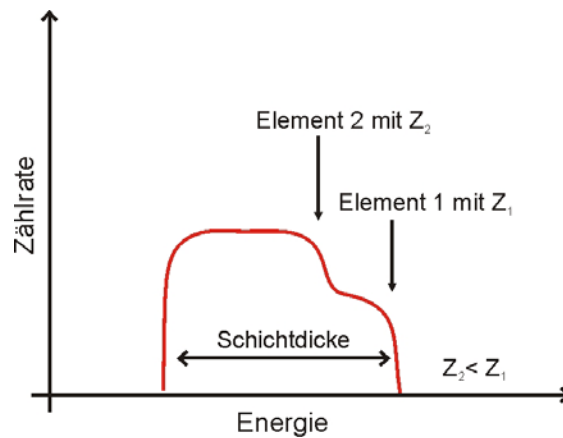


Abb. 3.9: Schematische Darstellung eines RBS-Spektrums.

3.2.3. Profilometrie

Da für die Chalkogenidgläser die Dichte unbekannt ist, wird die Schichtdicke der Chalkogenidglasmembranen und die Schichtdicke der Ag-Halogenid-Membran mit Hilfe der Profilometrie mit dem Stylusverfahren bestimmt. Hierbei wird eine Prüfspitze aus Diamant mit einer konstanten Geschwindigkeit und Druckkraft über die Probenoberfläche geführt und somit ein Oberflächenprofil erstellt (s. Abb. 3.10). Mit Hilfe eines piezoelektrischen Wandlers werden alle Unebenheiten der Probe in ein elektrisches Signal transferiert. Voraussetzungen für diese Art der Schichtdickenmessung sind Kanten oder Erhebungen, die größer als der Durchmesser der Prüfspitze sind, eine hinreichende Härte des Materials und eine möglichst ebene Probenoberfläche [241].

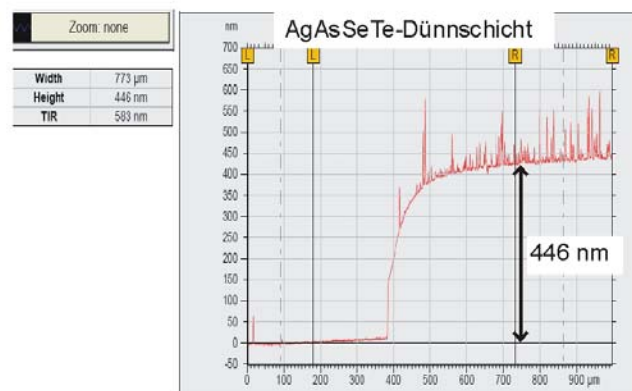


Abb. 3.10: Exemplarische Schichtdickenmessung einer AgAsSeTe-Chalkogenidglas-schicht mit dem Oberflächenprofilometer der Firma KLA Tencor Cooperation.

In dieser Arbeit wird das Alpha Step IQ Stylus Oberflächenprofilometer der Firma KLA Tencor Cooperation verwendet. Die Diamant-Prüfspitze hat einen Radius von $5\ \mu\text{m}$. Das Auflagegewicht beträgt $10\ \text{mg}$ und die Geschwindigkeit der Messspitze ist $10\ \mu\text{m/s}$. Abb. 3.10 zeigt beispielhaft eine profilometrische Messung einer AgAsSeTe-Chalkogenidglasschicht.

3.3. Elektrochemische Charakterisierung der Sensorstrukturen

Die hergestellten Cyanidsensoren (EIS-Strukturen) auf Feldeffektbasis werden mit Hilfe von Kapazitäts/Spannungs- (C/V-) Messungen, Konstant-Kapazitäts- (ConCap-) Messungen sowie mittels Impedanzspektroskopie elektrochemisch charakterisiert. Die potentiometrischen ISEs für die Cyanid- und Schwermetallerfassung werden mit Hilfe der ionenselektiven Potentiometrie auf ihre intrinsischen Sensoreigenschaften hin untersucht. Diese Verfahren sollen in den folgenden Kapiteln näher vorgestellt werden.

3.3.1. Kapazitäts-/Spannungs- (C/V-) und Konstant-Kapazitäts- (ConCap-) Messungen

Die elektrochemische Charakterisierung der hergestellten EIS-Strukturen ohne und mit *Cyanidase* wird mit Hilfe von C/V- und ConCap-Messungen sowie mittels der Impedanzspektroskopie durchgeführt. Diese Messungen beruhen auf der Erfassung der Impedanz der Feldeffekt-Struktur. Dabei wird für die Messung der Impedanz eine kleine sinusförmige Wechselspannung ($U_{\text{Mess_freq}}$) mit einer Amplitude von bis zu 100 mV an die Sensorstruktur angelegt und der durch die Probe fließende Wechselstrom (I_{AC}) und die am Sensor abfallende Wechselspannung (U_{AC}) werden erfasst. Aus dem Verhältnis der Amplituden, \hat{I}_{AC} und \hat{U}_{AC} , und deren Phasenverschiebung (φ) können der Betrag und die Phase der Impedanz nach Gln. 3.7 und Gln. 3.8 berechnet werden.

$$\underline{Z} = |\underline{Z}| * e^{j\varphi} \quad \text{mit} \quad \text{Gln. 3.7}$$

$$|\underline{Z}| = \left| \frac{\hat{U}_{\text{AC}}}{\hat{I}_{\text{AC}}} \right| \quad \text{Gln. 3.8}$$

Dabei ist $j = (-1)^{1/2}$. Im Gegensatz zur Impedanzspektroskopie wird bei der C/V-Messung die Frequenz (f) auf einen konstanten Wert eingestellt; normalerweise liegt $U_{\text{Mess_freq}}$ zwischen 10 mV und 50 mV [188]. Zusätzlich wird eine Gleichspannungsrampe U_{Bias} angelegt. Die Impedanz und somit die Kapazität werden als Funktion von U_{Bias} gemessen. Als vereinfachtes Ersatzschaltbild der Messanordnung kann die Reihenschaltung des ohmschen Widerstands (Referenzelektrode und Elektrolyt) und der Kapazität der Feldeffekt-basierten EIS-Struktur herangezogen werden. Die resultierende Impedanz kann dann mit Gln. 3.9 beschrieben werden:

$$\underline{Z} = R + \frac{1}{j\omega C(U_{\text{Bias}})} \quad \text{Gln. 3.9}$$

ω ist die Kreisfrequenz mit $\omega = 2\pi f$. Die Gesamtkapazität der EIS-Struktur $C(U_{\text{freq}})$ kann für Frequenzen kleiner 1000 Hz, Ionenkonzentrationen größer 10 $\mu\text{mol/l}$ und Isolatorschichtdicken der EIS-Struktur zwischen 30 nm und 1000 nm vereinfacht als Reihenschaltung von Isolatorkapazität (C_{Is}) und Siliziumkapazität ($C_{\text{Si}}(U_{\text{Bias}})$), die von dem Oberflächenpotential der EIS-Struktur abhängig ist, mit Gln. 2.28 in Kap. 2.2.3.2 ausgedrückt werden [188].

In Abhängigkeit von U_{Bias} kann die charakteristische C/V-Kurve eines EIS-Sensors in drei Abschnitte, in die Anreicherung, die Verarmung und die Inversion, eingeteilt werden; dies ist schematisch in Abb. 3.11 für einen p-dotierten EIS-Sensor dargestellt.

Die theoretischen Betrachtungen hierzu sind in Kap. 2.2.3.2 erläutert. Je nach Konzentration des Elektrolyten, beispielsweise der H^+ -Konzentration, verschiebt sich die C/V-Kurve entlang der Spannungsachse. Für die quantitative Auswertung wird die jeweilige Flachbandspannung U_{FB} , die normalerweise im linearen Bereich liegt (d.h. bei 60-70% der maximalen Kapazität), herangezogen [188].

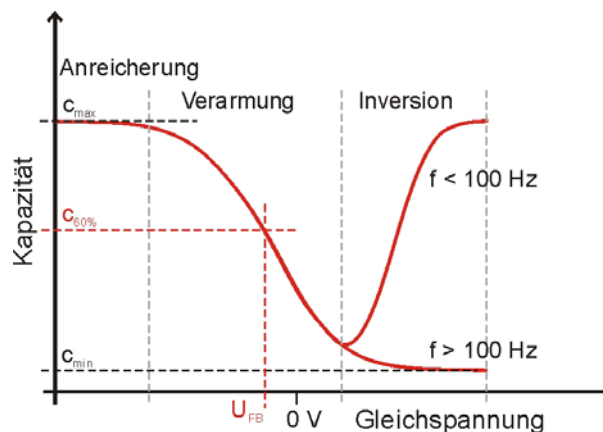


Abb. 3.11: C/V-Kurve einer p-dotierten EIS-Struktur.

Das Auftragen der gemessenen U_{FB} als Funktion des dekadischen Logarithmus der Ionenkonzentration resultiert in der Kalibrierkurve des Sensors. Für die Bestimmung von dynamischen Sensorparametern, wie z.B. Ansprechzeit, Ansprechverhalten und Drift, wird die ConCap-Messung eingesetzt. Hierbei wird die Kapazität der EIS-Struktur auf eine konstante Kapazität bei der Flachbandspannung über eine Regelspannung zurückgeregelt. Die hierfür benötigte Regelspannung wird als Funktion der Ionenkonzentration dynamisch aufgenommen. Auch hier resultiert das Auftragen der Regelspannung als Funktion des dekadischen Logarithmus der Ionenkonzentration in einer Kalibrierkurve des Sensors. Sowohl die C/V-Kurven als auch die ConCap-Messung und die dazugehörige Kalibrierkurve eines p-dotierten pH-sensitiven EIS-Sensors in verschiedenen pH-Lösungen sind schematisch in Abb. 3.12 dargestellt.

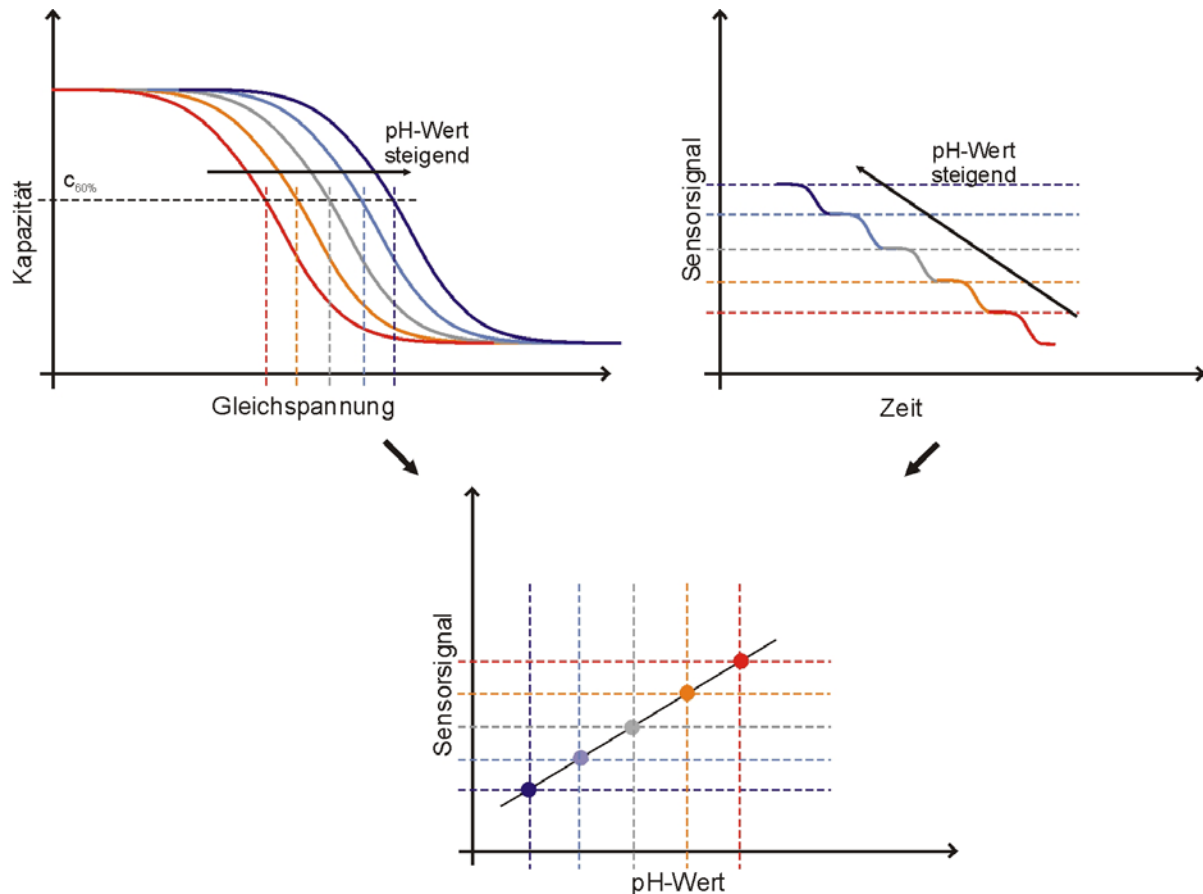


Abb. 3.12: Schematische Darstellung von C/V- und ConCap-Messung und die dazugehörige Kalibrierkurve eines p-dotierten pH-sensitiven EIS-Sensors in verschiedenen pH-Lösungen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit werden die C/V- und ConCap-Messungen mit einem Messsystem der Firma Zahner Elektronik (Typ: IM5d) durchgeführt. Bei dem verwendeten Messsystem können ein Frequenzbereich von 0,1 MHz bis 1 MHz, eine Gleichspannung der Messanordnung U_{Bias} zwischen -4 V und 4 V und eine Wechsellspannungsamplitude $U_{\text{Mess_freq}}$ von 1 mV bis 100 mV eingestellt werden. Die Messsoftware ist Thales. Die Auswertungen werden mit der mathematischen Software OriginLab7.5 durchgeführt.

Für die elektrochemischen Messungen wird der EIS-Sensor in eine Plexiglas-Messzelle eingebaut und mittels eines O-Rings abgedichtet. Der Durchmesser des O-Rings beträgt 8 mm; somit ist die aktive Sensoroberfläche 50 mm^2 . Über die Analytlösung und die Referenzelektrode wird der Sensor von „oben“ und über eine vergoldete Schraube an der EIS-Struktur von „unten“ elektrisch kontaktiert. Sowohl $U_{\text{Mess_freq}}$ (20 mV, $f = 30\text{-}150 \text{ Hz}$) als auch U_{Bias} werden über das Messsystem eingespeist. Der Messaufbau ist schematisch in Abb. 3.13 dargestellt.

Für die Charakterisierung der pH-sensitiven EIS-Strukturen wird als Referenzelektrode eine konventionelle Ag/AgCl-Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode der Firma Metrohm (Typ: 6.0726.100) mit einem 0,1 mol/l KCl-

Innenelektrolyten und einem 0,1 mol/l KNO_3 -Außenelektrolyten eingesetzt. Für die Untersuchungen mit der *Cyanidase*-modifizierten EIS-Struktur wird eine Ag/AgCl-Referenzelektrode aus der Einstabmesskette einer pH-ISE (Typ: InLab®423) der Firma Mettler Toledo mit einem Innenelektrolyten aus 3 mol/l KCl gewählt, um in der Messzelle möglichst kleine Volumina zu erreichen.

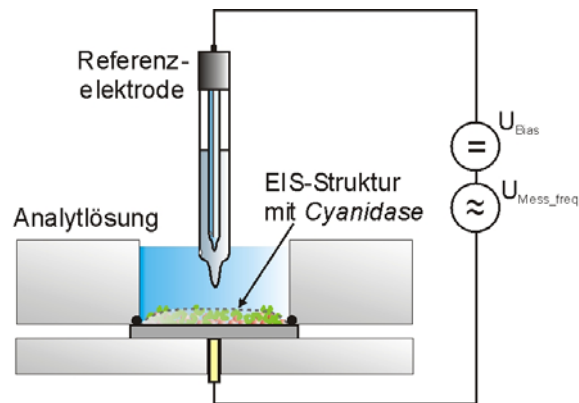


Abb. 3.13: Schematische Darstellung des Messaufbaus für die elektrochemische Charakterisierung der Feldeffekt-basierten EIS-Sensoren.

Die elektrochemischen Untersuchungen der EIS-Strukturen werden sowohl in pH-Standardlösungen (Typ: Titrisol) der Firma Merck KGaA als auch in Na-P-Puffern (pH 8,0, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit unterschiedlichen Molaritäten in verschiedenen Cyanidkonzentrationen durchgeführt. Als Stammlösung wird eine 0,1 mol/l KCN-Lösung hergestellt. Die verschiedenen CN^- -Ionenkonzentrationen werden mittels Verdünnungsreihe im jeweiligen Puffer eingestellt. Um Störungen von außen zu vermeiden, finden alle Messungen in einem lichtundurchlässigen Faradaykäfig statt.

Im Rahmen der elektrochemischen Charakterisierungen der kapazitiven EIS-Strukturen und der potentiometrischen ISEs (s. Kap. 3.3.3) werden die nachfolgenden Parameter untersucht.

- **Sensitivität**: Die Sensitivität eines Sensors bezeichnet die Empfindlichkeit des Sensors auf das Mession (Primärion). Sie ergibt sich aus der Steigung der Kalibriergeraden und hat die Einheit mV/Konzentrationsdekade.
- **Selektivität**: Die Selektivität eines Sensors bezeichnet die Reaktion des Sensors sowohl auf das Primärion als auch auf Störionen in der Analytlösung. Die Selektivität kann durch den Selektivitätskoeffizienten K_{ij} (s. Gl. 2.26 in Kap. 2.2.2) beschrieben werden und ist im Idealfall sehr klein. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Selektivität mit Hilfe der „Fixed interference“-Methode, bei der eine konstante Störionenkonzentration eingestellt und die Primärionenkonzentration variiert wird, ermittelt [172,189].
- **Stabilität**: Als Langzeitstabilität des Sensors wird die Sensitivität der Sensorstruktur als Funktion von Messtagen aufgetragen. Hierbei werden die

EIS-Strukturen zwischen den Messungen in Lösung und die potentiometrischen ISEs an Luft gelagert.

- Untere Nachweisgrenze: Die untere Nachweisgrenze beschreibt die kleinste Ionenkonzentration des linearen Messbereichs und wird nach IUPAC-Regularien bestimmt. Sie ergibt sich in der Kalibrierkurve aus dem Schnittpunkt der Tangente des linearen Messbereichs mit der Tangente der Messwerte für sehr geringe Ionenkonzentrationen [172].
- Ansprechzeit: Die Ansprechzeit ($t_{90\%}$) wird als das Zeitintervall bestimmt, welches der Sensor benötigt, um 90% des konstanten Messendwertes zu erreichen. Die Ansprechzeit wird bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt.
- Hysterese: Als Hysterese wird die Signaldifferenz des Sensors nach einer zyklischen Messung für gleiche Ionenkonzentration und -art bezeichnet. Beispielsweise wird zuerst in einer niedrigen, dann in einer hohen und wieder in einer niedrigen Ionenkonzentration gemessen. Die Differenz des Messsignals bei gleicher Konzentration ist die Hysterese und sollte im Idealfall so gering wie möglich sein.
- Drift: Die Drift beschreibt die zeitliche Signaländerung des Sensors in einer Lösung.

3.3.2. Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Für die Validierung des Impedanzverhaltens der Feldeffekt-basierten EIS-Sensoren und zur Bestimmung der Arbeitsfrequenz für die C/V- und ConCap-Messungen wird in dieser Arbeit die elektrochemische Impedanzspektroskopie eingesetzt. Die Impedanzspektroskopie ist eine gut etablierte Methode zur Charakterisierung von Korrosions- und Elektrodenprozessen, Halbleitern, Biomaterialien, etc. [242,243]. Bei der Impedanzspektroskopie wird bei einer konstanten U_{Bias} die Messfrequenz an der Sensorstruktur variiert und der durch die Probe fließende Wechselstrom und die am Sensor abfallende Wechselspannung werden erfasst. Aus den Amplituden der gemessenen Parameter ergibt sich anschließend die Impedanz (Gln. 3.7).

Mit Hilfe der Euler'schen Formel ($e^{j\varphi} = \cos\varphi + j\sin\varphi$) kann die Impedanz (Gln. 3.7) anschließend in Realteil (Z_{re}) und Imaginärteil (Z_{im}) aufgeteilt werden (Gln. 3.10 und Gln. 3.11).

$$\underline{Z} = |\underline{Z}|^* (\cos \varphi + j \sin \varphi) \quad \text{Gln. 3.10}$$

$$\underline{Z} = |\underline{Z}|_{\text{re}} + j|\underline{Z}|_{\text{im}} \quad \text{Gln. 3.11}$$

Die Darstellung der elektrochemischen Impedanzspektren kann beispielsweise als Bode-Diagramm und als Nyquist-Diagramm erfolgen. Beim Bode-Diagramm wird der dekadische Logarithmus des Betrags der Impedanz und der Phasenwinkel als Funktion des dekadischen Logarithmus der angelegten Frequenz dargestellt. Beim Nyquist-Diagramm wird der Imaginärteil der Impedanz gegenüber dem Realteil der Impedanz mit der Frequenz als Parameter aufgetragen [242-246].

Die Impedanzmessungen werden analog zu den C/V- und ConCap-Messungen mit einem Messsystem von Zahner Elektronik (Typ: IM5d) und gleichem Messaufbau, wie in Kap. 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Die Messsoftware ist wiederum Thales und die Auswertung der Impedanzspektren wird mit dem mathematischen Programm OriginLab7.5 gemacht. Für die Impedanzmessungen wird die Frequenz von 0,1 Hz bis zu 1 MHz variiert, $U_{\text{Mess_freq}}$ wird auf 20 mV und U_{Bias} auf die mittels C/V-Messungen ermittelte U_{FB} eingestellt.

3.3.3. Ionenselektive Potentiometrie

Die elektrochemische Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten ISEs für die Cyanid- und Schwermetallanalytik wird mit Hilfe der ionenselektiven Potentiometrie durchgeführt. Die ionenselektive Potentiometrie beruht auf den Grundlagen, die in Kap. 2.2 erläutert wurden. Hierbei wird eine Potentialdifferenz zwischen einer ISE und einer Referenzelektrode in Abhängigkeit von der Ionenaktivität als Messsignal erfasst. Die Messkette besteht aus einer ISE, einer Referenzelektrode, einem hochohmigen Messgerät und einem Elektrolyten (Analytlösung). Die Änderung des Signals soll hierbei nur von der Änderung der Spannung an der Grenzfläche zwischen der ISE und dem Elektrolyten als Funktion der Ionenaktivität des Elektrolyten abhängig sein. Alle anderen Spannungen der Messkette müssen konstant bleiben.

Für die potentiometrischen Messungen von Cyanid und Schwermetallen werden im Rahmen dieser Arbeit sowohl ein Potentiometer (Typ: MPC 227) der Firma Mettler Toledo (Einkanalmessungen) als auch ein Digitalmultimeter der Firma Keithley (Typ: 2700) mit einer 20-Kanal-Multiplexkarte (Typ: 7700) und der Software LabView eingesetzt. Abb. 3.14 a) und Abb. 3.14 b) zeigen jeweils den Messaufbau für die Einkanal- und die Multikanalmessungen. An das hochohmige Messsystem (10 G Ω) werden die ISE/ISEs und eine Referenzelektrode angeschlossen. Sowohl für die Cyanid- als auch für die Schwermetallanalyse wird eine konventionelle Ag/AgCl-Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode der Firma Metrohm (Typ: 6.0726.100) eingesetzt. Als Innen- und Außenelektrolyten werden jeweils 0,1 mol/l KCl und 0,1 mol/l KNO₃ gewählt.

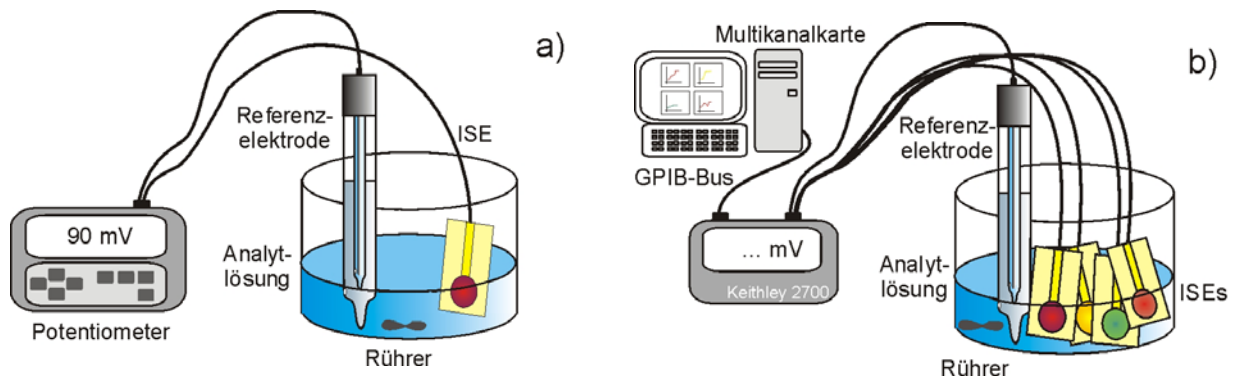


Abb. 3.14: Schematische Darstellung des Messaufbaus für die elektrochemische Charakterisierung der potentiometrischen ISEs a) für Einkanalmessungen und b) für Mehrkanalmessungen.

Für die elektrochemische Charakterisierung der Cyanid-sensitiven ISEs wird 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, als Hintergrundlösung verwendet. Dabei kann aufgrund der relativ hohen Ionenkonzentration eine hohe und konstante Leitfähigkeit der Lösung, auch bei unterschiedlichen Cyanidkonzentrationen, eingestellt werden. Darüber hinaus wird über den gewählten pH-Wert gewährleistet, dass Cyanid zu 99,4% als CN^- -Ionen vorliegt und somit direkt mit einer Ag-basierten ISE erfasst werden kann. Für die Cyanidmessungen mit den ISEs wird eine 0,1 mol/l KCN-Stammlösung mit der Hintergrundlösung angesetzt; für die Cyaniderfassung in der hybriden Messzelle für simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen wird eine 0,1 mol/l KCN-Stammlösung in Wasser vorbereitet. Die Einstellung der unterschiedlichen Ionenkonzentrationen erfolgt über eine Verdünnungsreihe oder mit dem Standardadditionsverfahren [158]. Die Stammlösung wird in einer lichtgeschützten Flasche aufbewahrt und jede Woche neu angesetzt.

Für die Durchführung von Referenzmessungen für die Cyanidanalytik wird eine kommerzielle kombinierte Cyanid-ISE der Firma Fischerblock Scientific (Typ: T010800) eingesetzt. Die interne Ag/AgCl-Referenzelektrode hat einen 10% KNO_3 -Elektrolyten; die Membran der Cyanid-ISE ist ein Pressling aus AgI/Ag₂S.

Die elektrochemische Charakterisierung der ISEs für die Schwermetallanalytik wird in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 3,0, als Hintergrundlösung durchgeführt. Dabei kann ebenfalls aufgrund der relativ hohen Ionenkonzentration eine hohe und konstante Leitfähigkeit der Lösung, auch bei unterschiedlichen Schwermetallkonzentrationen, eingestellt werden. Darüber hinaus wird über den gewählten pH-Wert gewährleistet, dass die Schwermetallionen vollständig gelöst sind und in einem pH-Wert-unabhängigen Bereich gemessen werden. Für die Charakterisierung der Schwermetall-ISEs werden als Stammlösungen 0,1 mol/l $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, 0,1 mol/l $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 0,1 mol/l $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und 0,01 mol/l $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ in der Hintergrundlösung hergestellt. Für die Entwicklung der „elektronischen Zunge“ werden 0,01 mol/l $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2^-$, 0,01 mol/l $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2^-$ und 0,01 mol/l $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ -Stammlösungen vorbereitet. Für die Herstellung von unterschiedlichen Schwermetallgemischen werden jeweils zwei der Stammlösungen

in unterschiedlichen Verhältnissen zusammengemischt. Dabei werden jeweils Cu:Pb, Cu:Ag und Pb:Ag in einem Verhältnis von 100%:0%, 80%:20%, 60%:40%, 40%:60%, 20%:80% und 0%:100% als Gemische der Stammlösungen hergestellt. Die Einstellung der unterschiedlichen Ionenkonzentrationen erfolgt über eine Verdünnungsreihe oder mit dem Standardadditionsverfahren [158]. Alle Stammlösungen werden jeden Monat neu angesetzt.

Um externe Einflüsse möglichst gering zuhalten, werden alle Messungen in einem lichtundurchlässigen Faraday-Käfig durchgeführt.

3.4. Sensorherstellung

In diesem Kapitel wird die Herstellung der Sensoren für die Cyanid- und Schwermetallerfassung in Flüssigkeiten vorgestellt. Es werden einzelne Prozessschritte für die Herstellung der *Cyanidase*-basierten EIS-Struktur, der Ag-Halogenid-ISE und der Chalkogenidglas-ISE von der Bearbeitung der Siliziumwafer, über die Oxidation und die photolithographischen Prozesse, bis hin zum fertigen Sensorchip beschrieben.

3.4.1. *Cyanidase*-basierte EIS-Struktur

Für die Herstellung der *Cyanidase*-basierten Feldeffekt-Strukturen werden im ersten Schritt pH-sensitive EIS-Strukturen (s. Tab. 3.1) mit Hilfe der Siliziumtechnologie prozessiert und im zweiten Schritt auf diese EIS-Strukturen die *Cyanidase* immobilisiert. Als pH-sensitive EIS-Strukturen werden sowohl Feldeffekt-Strukturen mit einer Siliziumnitrid- als auch mit einer Tantalpentoxid-Schicht als pH-sensitive Membran hergestellt. Die Prozessierung der Grundstrukturen wird im Reinraum der Klasse 10-100 im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

Tab. 3.1: Zusammensetzung und dazugehörige Prozessschritte der EIS-Strukturen.

Prozess-Nr.	EIS-Struktur mit einer pH-sensitiven Si_3N_4 -Schicht		EIS-Struktur mit einer pH-sensitiven Ta_2O_5 -Schicht	
	Schicht	Prozess	Schicht	Prozess
2	50 nm Si_3N_4	LPCVD	50 nm Ta_2O_5	Elektronenstrahlverdampfung, thermische Trockenoxidation
1	30 nm SiO_2	Thermische Trockenoxidation	30 nm SiO_2	thermische Trockenoxidation
0	356-406 μm p-Si		356-406 μm p-Si	
3	300 nm Al	Elektronenstrahlverdampfung, RTP	300 nm Al	Elektronenstrahlverdampfung, RTP

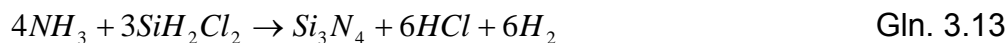
Für die pH-sensitiven EIS-Strukturen dient als Ausgangsmaterial ein Si-Wafer der Firma Wacker-Chemitronic mit folgenden Parametern: p-Dotierung mit Bor, 3'' Durchmesser, 356-406 μm Dicke, <100> Kristallorientierung und 1-10 Ωcm spezifischer Widerstand. Vor der eigentlichen Schichtabscheidung wird der Wafer mit Hilfe der Radio Cooperation of America- (RCA-) Reinigung von Oxiden, organischen und ionischen Verunreinigungen befreit. Für die Abscheidung der 30 nm dünnen SiO_2 -Schicht wird die thermische Trockenoxidation eingesetzt. Hierbei wird unter O_2 -

Atmosphäre und hoher Temperatur Silizium zu SiO_2 oxidiert (Gln. 3.12). Für die Herstellung von 1 nm SiO_2 werden dabei 440 μm Si (Wafer) verbraucht.



Die Herstellung der 30 nm dünnen SiO_2 -Isolatorschicht wird bei einer Prozesstemperatur von 1000 °C für 30 min durchgeführt.

Für die Herstellung der pH-sensitiven Si_3N_4 -Schicht wird das chemische „Low pressure chemical vapour deposition“- (LPCVD-) Verfahren eingesetzt. Bei diesem Verfahren wird bei relativ geringen Drücken (10-100 Pa) das Quellgas im ersten Schritt zum Substrat hintransportiert, anschließend thermisch zersetzt und auf das Siliziumsubstrat abgeschieden. Danach wird das desorbierte Restgas wieder abtransportiert. Die Zersetzung des Quellgases ist im Wesentlichen von der Temperatur im Reaktionsofen abhängig [247-249]. Die Herstellung der 50 nm dünnen Si_3N_4 -Schicht, als pH-sensitive Schicht der EIS-Struktur, erfolgt bei 800 °C nach folgender Reaktionsgleichung (Gln. 3.13). Die Abscheidungsrate beträgt zwischen 1,5 nm/min und 2,5 nm/min.

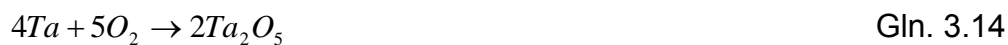


Sowohl bei der thermischen Oxidation als auch beim LPCVD-Verfahren werden beide Seiten des Si-Wafers beschichtet. Um die SiO_2 - und Si_3N_4 -Schicht auf der „Rückseite“ zu entfernen, wird das reaktive Ionenätzen (RIE) eingesetzt. Bei diesem anisotropen Trockenätz-Verfahren wird der prozessierte Wafer mit der Rückseite nach oben auf die Kathode mit einer Biasspannung von -1000 V in die Reaktionskammer gelegt. Ein Chlor- oder Fluor-haltiges Reaktionsgas wird eingeleitet und ein Hochfrequenzfeld von bis zu 13,56 MHz appliziert, um das Reaktionsgas zu ionisieren. Der Materialabtrag verläuft sowohl physikalisch als auch chemisch. Bei dem physikalischen Materialabtrag werden die positiven Ionen durch das elektrische Feld hin zur Kathode beschleunigt und geben dort ihre kinetische Energie an das zu entfernende Material ab. Bei der chemischen Materialabtragung reagieren die ungeladenen Radikale im Reaktionsgas mit den Molekülen im Material. Anschließend wird das Gas abgepumpt. Die Selektivität der Materialabtragung mittels RIE wird hauptsächlich über die Wahl des Gases und den Prozessdruck gesteuert [247-249]. Für die Entfernung der Si_3N_4 - und SiO_2 -Schicht wird eine RIE-Anlage der Firma Oxford Plasma Technology mit einem Reaktionsgasgemisch aus CHF_4/CF_4 bei einer Frequenz von 13,56 MHz eingesetzt. Die Ätzrate beträgt 100 nm/min.

Der elektrische Rückseitenkontakt der EIS-Struktur, eine 300 nm dicke Aluminium-Schicht, wird mit Hilfe der Elektronenstrahlverdampfung abgeschieden. Bei dieser Methode wird ein Elektronenstrahl auf das aufzutragende Material fokussiert und das Material verdampft. Aufgrund des eingestellten Vakuums von ca. 10^{-6} mbar haben die verdampften Teilchen eine relativ weite mittlere freie Weglänge und können somit auf dem Siliziumsubstrat abgeschieden werden. Die Al-Schicht wird mit einer

Aufdampftrate von 120 nm/min in einer Anlage der Firma Pfeiffer Vakuum (Typ: PLS 500) aufgebracht. Im Hinblick auf eine gute Haftung der Al-Schicht auf dem Si-Wafer wird anschließend die aufgedampfte Al-Schicht für 10 min bei 400 °C in einem Rapid Thermal Processing- (RTP-) Ofen der Firma AET Addox unter N₂-Atmosphäre getempert [249,250].

Die Herstellung der Ta₂O₅-EIS-Strukturen erfolgt analog zur Herstellung der Si₃N₄-EIS-Sensoren. Jedoch wird hier anstatt der pH-sensitiven Si₃N₄-Schicht eine pH-sensitive Ta₂O₅-Schicht (ebenfalls 50 nm) abgeschieden. Dafür wird im ersten Schritt eine 25 nm dünne Tantal-Schicht mit Hilfe der Elektronenstrahlverdampfung abgeschieden und im zweiten Schritt wird diese Schicht bei einer Temperatur von 515-520 °C für 1 h zu 50 nm Ta₂O₅ thermisch trockenoxidiert [251,252]. Die dazugehörige Reaktionsgleichung ist (Gln. 3.14):



Bevor die Aluminiumschicht als Rückseitenkontakt aufgedampft werden kann, wird die SiO₂-Schicht auf der Rückseite des Wafers mittels Nassätzen mit 10%iger HF-Lösung entfernt.

Die prozessierten Wafer werden anschließend zum mechanischen Schutz belackt und in 10 mm * 10 mm Chips gesägt. Dann werden die pH-sensitiven EIS-Chips mittels Aceton, 2-Propanol und deionisiertem Wasser, für jeweils 5 min, entlackt und mit Stickstoff getrocknet. Abb. 3.15 zeigt schematisch den Aufbau eines EIS-Sensors mit einer pH-sensitiven Ta₂O₅-Schicht.

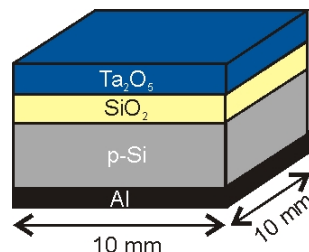


Abb. 3.15: Schematische Darstellung einer EIS-Struktur mit einer pH-sensitiven Ta₂O₅-Schicht.

Für die elektrochemische Charakterisierung der Feldeffekt-Strukturen werden die Chips in eine Messzelle eingebaut und mittels 1%iger Flusssäure für 15 s für die Si₃N₄-Sensorstrukturen und mittels deionisiertem Wasser für 24 h für die Ta₂O₅-EIS-Strukturen vorkonditioniert.

Um den *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor für die Cyanidmessungen zu realisieren, wird im nächsten Schritt die *Cyanidase* [EC 3.5.5.1] nach einem schonenden Verfahren auf die pH-sensitiven EIS-Strukturen immobilisiert. Die Immobilisierung der *Cyanidase* erfolgt in einem Zweischnittverfahren:

- chemische Immobilisierung der *Cyanidase* über kovalente Bindung an NHS-aktivierte Sepharose™ 4 Fast Flow der Firma Amersham Biosciences AB oder an Eupergit C® der Firma Degussa,
- physikalische Immobilisierung des „*Cyanidase*-Gels“ auf die EIS-Struktur unter einer Dialysemembran mit einem „Molecular weight cut off“- (MWCO-) Wert von 10 kDa (Typ: Servapor® Dialysemembran 44144) der Firma Serva Electrophoresis GmbH.

Dieses Verfahren wird aufgrund der geringen Enzymaktivität von *Cyanidase* (1-2 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg Protein})$) gewählt und optimiert. Hierbei können bis zu 10 mg *Cyanidase* auf 1 g Trägersubstanz kovalent gekoppelt werden. Auf die EIS-Strukturen werden anschließend 25-50 mg des „*Cyanidase*-Gels“ unter Einschluss immobilisiert. Die optimale Enzymaktivität auf dem EIS-Sensor kann nach Gln. 3.15 berechnet werden und resultiert exemplarisch für 25 mg des „*Cyanidase*-Gels“ in 0,5 $\mu\text{mol}/\text{min}$, d.h. in 0,5 Unit. Dabei wird kein Verlust der Enzymaktivität durch die kovalente Bindung vorausgesetzt.

$$\text{Enzymaktivität} = 2 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}(\text{Cyanidase})} * 10 \frac{\text{mg}(\text{Cyanidase})}{1\text{g}(\text{Gel})} * 0,025\text{g}(\text{Cyanidase - Gel})$$

$$\text{Enzymaktivität} = 0,5 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = 0,5 \text{ Unit} \quad \text{Gln. 3.15}$$

In dieser Arbeit werden zwei Immobilisierungsprotokolle optimiert: die kovalente Kopplung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ (mittlere Partikelgröße 90 μm) und die kovalente Bindung der *Cyanidase* an Eupergit C® (mittlere Partikelgröße: 200 μm). Die chemischen Immobilisierungen erfolgen jeweils über Bindung von Aminogruppen der *Cyanidase* an Aminogruppen von NHS-aktivierten Sepharose™ unter Abspaltung von NHS, und über Bindung von Aminogruppen der *Cyanidase* an Oxirangruppen von Eupergit C® (s. Abb. 3.16). Die Optimierung beider Immobilisierungsprotokolle wird exemplarisch in Kap. 4.1.2.1 vorgestellt. Die optimierten Protokolle sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

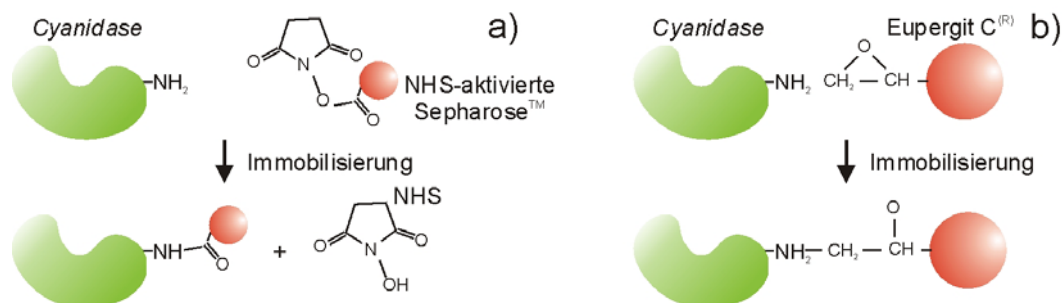


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Immobilisierung von *Cyanidase* a) an NHS-aktivierte Sepharose™ und b) an Eupergit C®.

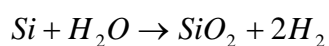
Tab. 3.2: Zusammenstellung der Immobilisierungsprotokolle für die kovalente Kopplung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ und an Eupergit C®.

Immobilisierung an NHS-aktivierte Sepharose™	Immobilisierung an Eupergit C®
<ul style="list-style-type: none"> • 1 ml NHS-aktivierte Sepharose™ in Säule geben • mit 2 ml 1 mmol/l Salzsäure- (HCl-) Lösung konditionieren • für 2 min im Ultraschallbad entgasen • mit 13 ml 1 mmol/l HCl-Lösung konditionieren • mit 1 ml Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl equilibrieren • 10 mg <i>Cyanidase</i> hinzu geben und für 24 h bei 4 °C immobilisieren • mit 5 ml Na-P-Puffer (pH 7,0, 150 mmol/l), 200 mmol/l NaCl und 200 mmol/l Imidazol spülen und bei 4 °C lagern 	<ul style="list-style-type: none"> • 500 mg Eupergit C® in Säule geben • mit 3 ml Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl konditionieren • für 2 min im Ultraschallbad entgasen • 10 mg <i>Cyanidase</i> hinzu geben und für 72 h bei 4 °C immobilisieren • mit 5 ml Na-P-Puffer (pH 7,0, 150 mmol/l), 200 mmol/l NaCl und 200 mmol/l Imidazol spülen und bei 4 °C lagern

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Cyanidase* [EC 3.5.5.1] wird beim Kooperationspartner Prof. M. Keusgen aus *Escherichia Coli*- (*E.coli*-) Bakterien mit Hilfe eines Plasmids exprimiert. Die native *Cyanidase* wird im Na-P-Puffer (pH 7,0, 150 mmol/l), 200 mmol/l NaCl und 200 mmol/l Imidazol gelagert. Die Enzymaktivität der nativen *Cyanidase* beträgt zwischen 1-2 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg Protein})$, die mit einer NH_3 -ISE in einer Fließinjektionsanalyse bestimmt wurde. Die Enzymmenge der nativen *Cyanidase* variiert zwischen 2 mg bis 10 mg *Cyanidase* pro ml Puffer und wurde mit Hilfe der Bradford-Lowry-Methode bestimmt. Diese Charakterisierungen wurden ebenfalls beim Kooperationspartner in Marburg durchgeführt.

3.4.2. Ag-Halogenid-ISE

Die Herstellung der Cyanid-sensitiven Ag-Halogenid-ISEs (Ag/AgCl-ISEs) wird mit Hilfe der Siliziumtechnologie und der Dickschichttechnik durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Ag-Halogenid-ISE dient ein 3" Si-Wafer der Firma Topsil-Aurel mit folgenden Parametern: p-Dotierung mit Bor, 356-406 μm Dicke, <100> Kristallorientierung und ein spezifischer Widerstand von $>1000 \Omega\text{cm}$. Analog zur Herstellung der EIS-Strukturen (s. Kap. 3.4.1) wird der Wafer zuerst mit der RCA-Reinigung von Oxiden, organischen und ionischen Verunreinigungen befreit. Anschließend wird mit Hilfe der thermischen Nassoxydation eine 500 nm dicke Oxidschicht realisiert (Gln. 3.16).



Gln. 3.16

Die Oxidation wird bei einer Prozesstemperatur von 1100 °C für 43 min durchgeführt. Bei der Prozessierung von relativ dicken Isolatorschichten wird bevorzugt die thermische Nassoxidation eingesetzt, da hier im Vergleich zur thermischen Trockenoxidation bei gleicher Temperatur höhere Oxidationsraten erzielt werden können. Der Faktor zwischen der Oxidationsrate bei der thermischen Nassoxidation und der Oxidationsrate bei der thermischen Trockenoxidation bei einer Temperatur von 1100 °C beträgt etwa fünf [247-250].

Die Cyanid-sensitive Ag/AgCl-Schicht wird mit Hilfe der Dickschichttechnologie abgeschieden. Hierbei wird eine Ag/AgCl-Paste, Typ: R-414 (DPM-68) der Firma Ercon über eine Schablone mittels eines rakelgeführten Schablonendruckers (Typ: SP002-R, Firma Essemtec) auf den prozessierten Si-Wafer aufgetragen und anschließend bei 120 °C für 1 h getrocknet und gehärtet (Typ: LMF-A550/120, Firma Omegalux). Dieser Schritt wird insgesamt 6-mal durchgeführt. Die Membranschichtdicke beträgt anschließend 300 µm. Der prozessierte Wafer wird in 10 mm * 20 mm Sensorchips vereinzelt. Die Sensorchips werden auf Epoxy-Substratträger geklebt und mit Hilfe eines Aluminiumstreifens mit Silberleitlack elektrisch kontaktiert. Abschließend wird der Sensorchip, bis auf die Cyanid-sensitive Fläche und den elektrischen Kontakt, mittels Silikon gegenüber dem aggressiven Messmedium verkapselt. Die sensitive Fläche beträgt, analog zu den EIS-Strukturen, 50 mm². Abb. 3.17 zeigt exemplarisch ein Foto einer fertig prozessierten Ag/AgCl-ISE.

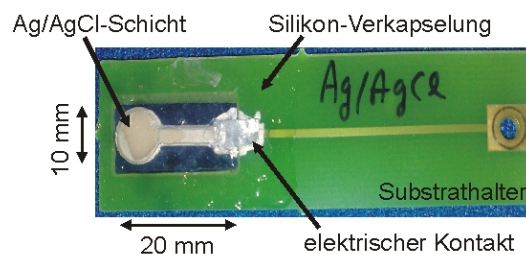


Abb. 3.17: Foto einer Ag/AgCl-ISE für Messungen in Cyanid-haltigen Lösungen.

3.4.3. Chalkogenidglas-ISE

Für die Erfassung von Cyanid und Schwermetallen werden in dieser Arbeit potentiometrische ISEs auf Chalkogenidglasbasis mit Hilfe der Siliziumtechnologie und des PLD-Verfahrens hergestellt. Hierfür werden im ersten Schritt Silizium-basierte Chips mit elektrischer Kontaktstelle hergestellt und anschließend die ionenaktive Chalkogenidglasmembran als Dünnschichtmembran mittels PLD-Verfahren abgeschieden.

Als Ausgangsmaterial dient ebenfalls ein 3'' Si-Wafer der Firma Topsil-Aurel, analog zur Herstellung der Ag/AgCl-ISE. Auch dieser Wafer wird mittels RCA-Reinigung

gereinigt und anschließend wird eine 500 nm dicke SiO₂-Schicht mit thermischer Nassoxidation realisiert (s. Kap. 3.4.2). Für die Abscheidung der Chalkogenidglasschichten werden zusätzlich elektrische Kontakte auf dem Wafer aufgebracht. Hierzu wird der p-Si-SiO₂-Wafer zunächst mittels Photolithographie strukturiert und anschließend mit Hilfe der Elektronenstrahlverdampfung metallisiert. Für die Strukturierung der ISEs werden folgende photolithographische Schritte durchgeführt: Aufbringen eines Haftvermittlers (Hexamethyldisiloxan (HMDS)) und eines lichtsensitiven Photolacks (Typ: AZ 5214, Clariant) mittels Spin-coating bei 4000 U/min, Belichten des Wafers über eine strukturierte Maske mittels eines Kontaktbelichters der Firma Süss Microtech (Typ: MA6) bei einer Wellenlänge von 356 nm für 6 s und Entwickeln des Photolacks mit dem Entwickler Clariant (Typ: AZ326 MF). Nach der Strukturierung wird der Wafer mittels Elektronenstrahlverdampfung bei einem Druck von 10⁻⁶ mbar mit den Schichten Titan:Platin:Gold mit den Schichtdicken 30:60:250 nm metallisiert. Bei diesem Dreischichtsystem dienen Titan als Haftvermittler, Platin als Diffusionsbarriere und Gold als elektrische Kontaktschicht. Anschließend wird der restliche Photolack, der mit der Metallschicht bedeckt ist, mit einem „Lift-off“-Prozess entfernt. Hierfür wird eine Acetonlösung verwendet. Der fertige Wafer wird zum mechanischen Schutz belackt, in 10 mm * 20 mm Sensorchips gesägt und mittels Aceton, 2-Isopropanol und destilliertem Wasser wieder entlackt und gereinigt.

Für die Herstellung von Cyanid- und Schwermetall-sensitiven Chalkogenidglas-ISEs wird im zweiten Schritt mit Hilfe der Dünnschichttechnologie eine µm-dünne Chalkogenidglasschicht auf den hergestellten Si-Chips abgeschieden. Für eine definierte Funktionalität der Chalkogenidglas-ISEs ist die Stöchiometrie von großer Bedeutung. Darüber hinaus können solche Chalkogenidglassysteme aus bis zu sechs verschiedenen Materialien bestehen. Daher wird für die stöchiometrische Abscheidung der Chalkogenidglasmaterialien das PLD-Verfahren gewählt. Die Vorteile des PLD-Prozesses sind die stöchiometrische Deposition von Multikomponenten-Festkörpermateriale, kurze Prozesszeiten, Prozess im Vorvakuumbereich, Abscheidung bei Raumtemperatur und Kompatibilität zur Siliziumtechnologie. Abb. 3.18. zeigt schematisch den PLD-Prozess in der sog. „Off-axis“-Anordnung [253-255].

Die PLD-Anlage besteht aus einer Vakuumkammer mit Vorvakuumssystem. Die Öffnung auf der Oberseite dient zur manuellen Einführung der Si-Chips und des Targetmaterials. Die Halterungen für die Chips (Substrat) und Targetmaterial befinden sich in einem Winkel von 90° zueinander („Off-axis“-Anordnung) und sind mit einem Elektromotor versehen, so dass diese während des PLD-Prozesses für eine homogene Abtragung des Chalkogenidglasmaterials und Abscheidung der Schichten in Dünnschicht rotiert werden können. Der Laserstrahl wird durch einen KrF-Excimer-Laser mit einer Wellenlänge von 248 nm im sog. „Constant voltage“-Modus betrieben. Die Energie des Laserstrahls liegt bei 0,9 J/Puls bis 1,1 J/Puls. Der gesamte PLD-Prozess wird über eine Software gesteuert. Zu Beginn des

Abscheidungsprozesses wird ein Vorkammerdruck von $2 \cdot 10^{-2}$ mbar eingestellt und die Kammer evakuiert. Die Frequenz des Laserstrahls beträgt 10 Hz. Um eine Oxidation der Schichten zu verhindern, wird kontinuierlich N_2 -Gas (10 ml/min) durch die Kammer gepumpt. Die verwendeten Prozessparameter sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

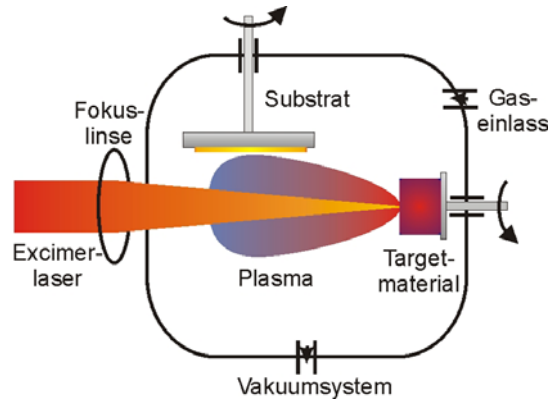


Abb. 3.18: Schematische Darstellung des PLD-Prozesses in „Off-axis“-Anordnung.

Tab. 3.3: Verwendete Prozessparameter der gepulsten Laserabscheidung.

Laser:	Lambda LPX 305 KrF-Excimer
Wellenlänge:	248 nm
Energie:	0,9-1,1 J/Puls
Pulsrate:	10 Hz
Start-Kammerdruck:	$2 \cdot 10^{-2}$ mbar
Prozessdruck:	$1,5 \cdot 10^{-1}$ mbar
Prozessgas:	10 ml/min N_2
Substrattemperatur:	Raumtemperatur

Bei der Abscheidung des Targetmaterials mittels PLD-Verfahren laufen unterschiedliche Prozesse innerhalb eines Pulses mit einer Dauer von ca. 30 ns ab. Trifft der Laserstrahl auf das Chalkogenidglastarget so wird zuerst die Targetoberfläche durch optische Strahlung aufgeheizt und die Oberfläche schmilzt. Anschließend wird das Chalkogenidglas emittiert und photoionisiert, ein Plasma entsteht. Die Ausbreitung des Plasmas ist senkrecht zur Targetoberfläche und der Prozess ist selbstregulierend [256,257].

Da bei dem PLD-Verfahren mit hohen Laserleistungen von 10^7 W/cm² bis 10^8 W/cm² gearbeitet wird, reagieren alle Targetkomponenten simultan mit einer Aufheizung. Für eine „schlagartige“ Abscheidung von Multikomponenten-Materialien sind kurze Pulsweiten und Wellenlängen notwendig, was durch diesen Aufbau gegeben ist.

In dieser Promotionsarbeit werden sowohl Ag-basierte Chalkogenidglas-ISEs für den Nachweis von Cyanid als auch ISEs mit Chalkogenidglasmembranen für den

Nachweis von Cu^{2+} -, Cd^{2+} -, Pb^{2+} - und Ag^+ -Ionen in Flüssigkeiten mit Hilfe des PLD-Verfahrens hergestellt. Die verwendeten Chalkogenidglas-Targetmaterialien mit den dazugehörigen Primärionen sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: Verwendete Chalkogenidglas-Targetmaterialien für das PLD-Verfahren und die dazugehörigen Primärionen.

Membranen für die Cyaniderfassung		Membranen für die Schwermetallerfassung	
Primärion	Materialsystem	Primärion	Materialsystem
CN^-	AgAsSeTe	Cu^{2+}	CuAgAsSe
CN^-	$\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$	Cd^{2+}	$\text{CdSAgIAs}_2\text{S}_3$
CN^-	$\text{AgIAs}_2\text{Se}_3$	Pb^{2+}	$\text{PbSAgIAs}_2\text{S}_3$
CN^-	AgIAsS	Ag^+	AgAsSeTe
CN^-	$\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$		

Nach der Herstellung der Chalkogenidglas-Sensorchips werden diese, analog zu den Ag/AgCl-Chips, auf einen Epoxy-Substratträger aufgeklebt, mittels Aluminiumstreifen und Silberleitlack elektrisch kontaktiert und mit Silikon gegenüber der aggressiven Messlösungen verkapselt. Abb. 3.19 zeigt exemplarisch ein Foto einer Chalkogenidglas-ISE.

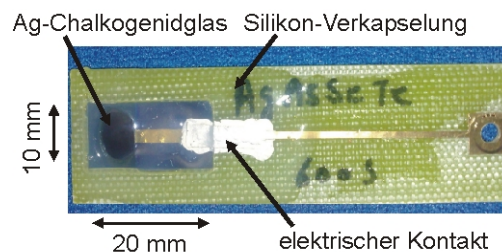


Abb. 3.19: Foto einer Chalkogenidglas-ISE für Messungen in Cyanid-haltigen oder Silber-haltigen Lösungen.

4. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die im Rahmen der Promotionsarbeit erzielten Ergebnisse vorgestellt. Das Kapitel teilt sich in vier größere Unterkapitel auf: *Cyanidase*-basierter EIS-Sensor, Ag-basierte ISEs für die Cyaniderfassung, simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen, sowie Nachweis von Schwermetallen in gemischten Lösungen. In den ersten beiden Unterkapiteln sollen die hergestellten Bio- und Chemosensoren physikalisch und elektrochemisch im Hinblick auf ihren Einsatz in Cyanid-haltigen Lösungen untersucht werden. In Unterkapitel 4.3 werden erstmalig simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen mit Hilfe einer portablen hybriden Messzelle gezeigt. Darüber hinaus soll im letzten Unterkapitel die Entwicklung und Validierung eines Fuzzy-Logik-Programms als intelligente Software für Messungen in gemischten Schwermetalllösungen („elektronische Zunge“) vorgestellt werden.

4.1. *Cyanidase*-EIS-Sensor

Enzym-basierte Biosensoren, die nicht auf der Inhibierung von Enzymen basieren, zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Selektivität aus, denn Enzyme katalysieren sowohl wirkungs- als auch substratspezifisch. Darüber hinaus ermöglichen Feldeffekt-Sensoren auf Silizium-Basis ein direktes Auslesen des Signals, haben Potential zur Miniaturisierbarkeit und für „Vor-Ort“-Analysen. Im Hinblick auf einen selektiven Sensor für die Erfassung des toxischen Cyanids wird in dieser Arbeit ein kapazitiver *Cyanidase*-basierter Feldeffekt-Sensor entwickelt. Der *Cyanidase*-EIS-Sensor nutzt die lokale pH-Wert-Verschiebung, die durch die enzymatische Katalyse von Cyanid zu Ammoniak und Formiat entsteht, und dies mit einer pH-sensitiven Feldeffekt-Struktur direkt erfasst werden kann. Somit besteht der Biosensor aus einer pH-sensitiven EIS-Struktur für die direkte kapazitive Erfassung von H^+ -Ionen und der darauf immobilisierten *Cyanidase*, die selektiv Cyanid katalytisch umsetzt. In den folgenden Unterkapiteln sollen sowohl die Charakterisierung und Optimierung von pH-sensitiven EIS-Strukturen als auch die Optimierung der Immobilisierung von *Cyanidase* und die Charakterisierung des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors für die Cyaniderfassung dargestellt werden.

4.1.1. Charakterisierung der EIS-Struktur

Für die Realisierung eines Biosensors auf der Basis einer pH-sensitiven Feldeffekt-Struktur für die Erfassung von Cyanid in Flüssigkeiten sollen die EIS-Strukturen im Hinblick auf ihre pH-Empfindlichkeit untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit

werden mittels Siliziumtechnologie pH-sensitive EIS-Sensoren mit unterschiedlichen pH-sensitiven Membranen (Si_3N_4 und Ta_2O_5) hergestellt.

4.1.1.1. Physikalische Charakterisierung

Die hergestellten EIS-Sensoren und deren Schichtdicken sind in Tab. 4.1 zusammengestellt. Die gemittelten Schichtdicken und deren Standardabweichungen sind aus Messungen von drei Sensorchargen, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, ermittelt. Die Schichtdicken werden während der Herstellung der EIS-Strukturen nach jeder Schichtabscheidung mittels Ellipsometrie bzw. Profilometrie bestimmt. Für die theoretischen Betrachtungen der Maximalkapazität, wie es in Kap. 4.1.1.2 gezeigt wird, sind die Schichtdicken der pH-sensitiven und der Isolator- (SiO_2 -) Schicht notwendig.

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Schichtdicken von pH-sensitiven EIS-Strukturen.

	EIS-Struktur mit Si_3N_4 als pH-sensitive Schicht	EIS-Struktur mit Ta_2O_5 als pH-sensitive Schicht
pH-sensitive Schicht	51±5 nm	52±2 nm
SiO_2	33±1 nm	31±3 nm
p-Si	381±25 μm	381±25 μm
Al	300±5 nm	308±5 nm

Wie man aus Tab. 4.1 entnehmen kann, werden für den Vergleich der pH-sensitiven EIS-Strukturen möglichst gleiche Schichtdicken angestrebt, um somit nur den Einfluss der pH-sensitiven Schicht auf das Sensorverhalten untersuchen zu können. Abb. 4.1 a) und Abb. 4.1 b) zeigen Fotos von den hergestellten EIS-Strukturen mit jeweils einer Si_3N_4 - und Ta_2O_5 -Schicht. Abb. 4.1 c) ist eine schematische Darstellung des EIS-Sensors.

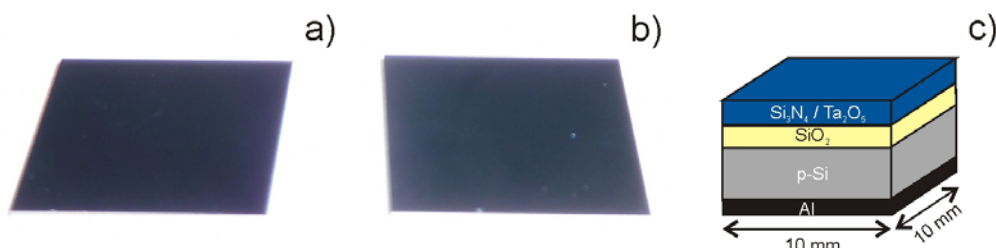


Abb. 4.1: Foto einer EIS-Struktur mit a) Si_3N_4 -Schicht und b) Ta_2O_5 -Schicht, c) schematische Darstellung der EIS-Struktur.

Die physikalische Charakterisierung der pH-sensitiven Schicht und die Qualität der einzelnen Sensorschichten werden mittels Videomikroskopie, REM und AFM im

Hinblick auf die Homogenität, Morphologie und Topologie durchgeführt und untersucht. Abb. 4.2 zeigt exemplarisch REM-Aufnahmen der pH-sensitiven Schicht bei 90° und 500.000-facher Vergrößerung (oben) und REM-Aufnahmen vom Querschnitt bei 60° und 200.000-facher Vergrößerung (unten) eines EIS-Chips mit einer Si_3N_4 - (Abb. 4.2 a), c)) und einer Ta_2O_5 -Schicht (Abb. 4.2 b), d)).

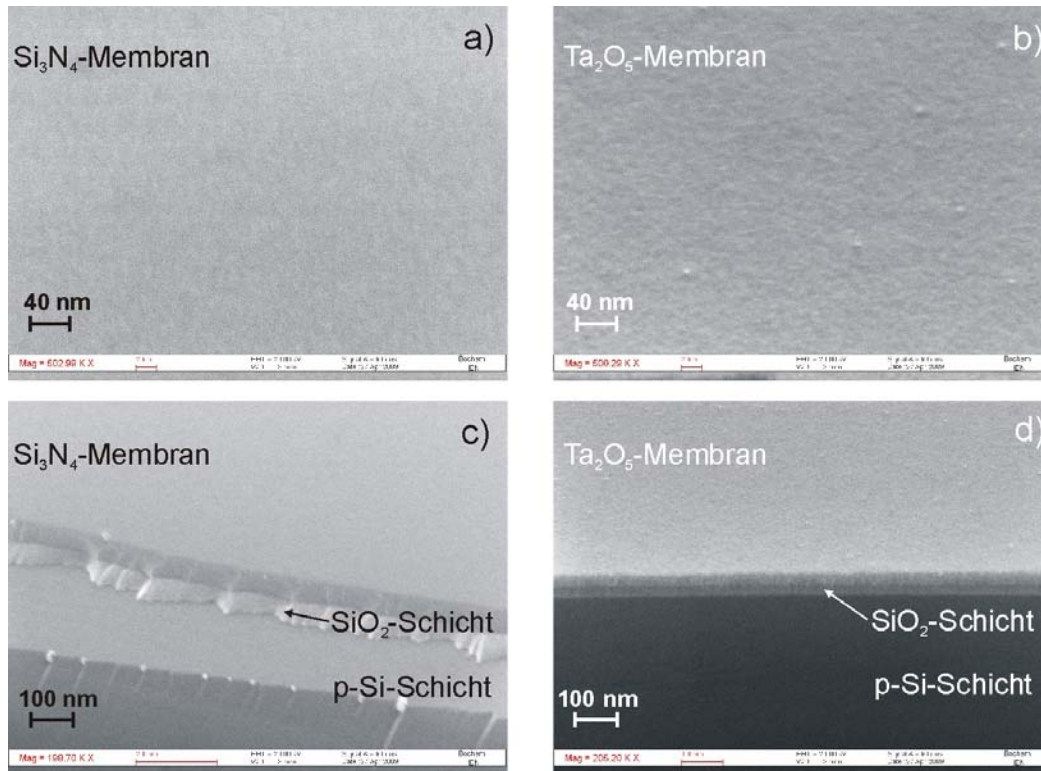


Abb. 4.2: REM-Aufnahmen einer EIS-Struktur mit einer a) und c) Si_3N_4 -Schicht und b) und d) Ta_2O_5 -Schicht. Oben dargestellt sind die Aufnahmen unter einem Winkel von 90° und bei einer 500.000-fachen Vergrößerung, unten gezeigt sind die Aufnahmen des Querschnitts unter einem Winkel von 60° und bei einer 200.000-fachen Vergrößerung.

Wie man aus Abb. 4.1 und Abb. 4.2 entnehmen kann, sind die pH-sensitiven Schichten homogen verteilt und komplett geschlossen. Dieses wird auch bei sehr hohen Vergrößerungen beobachtet. Abb. 4.2 c) und Abb. 4.2 d) zeigen die Querschnitte der pH-sensitiven EIS-Strukturen. Die einzelnen Schichten sind klar von einander getrennt. Dies ist für eine definierte und gute Funktionalität von EIS-Strukturen notwendig. Um die Oberflächenbeschaffenheit und Rauigkeit der pH-sensitiven Membranen zu untersuchen, werden die EIS-Strukturen mittels AFM charakterisiert. Abb. 4.3 a) und Abb. 4.3 b) zeigen exemplarisch Höhenbilder der AFM-Aufnahmen von einem EIS-Chip mit Si_3N_4 -Schicht und einem EIS-Chip mit einer Ta_2O_5 -Schicht. Auch bei dieser Vergrößerung wird eine geschlossene Oberfläche der pH-sensitiven Schicht beobachtet. Die maximal dargestellte Höhe beträgt 6,53 nm. Die mittels „Root mean square“- (RMS-) Wert bestimmte Rauigkeit über die gesamte dargestellte Fläche ergibt einen RMS-Wert von 1,5 nm für die

Si_3N_4 - und einen RMS-Wert von 1,4 nm für die Ta_2O_5 -Oberfläche. Damit haben beide Sensoroberflächen vergleichbar kleine Rauigkeiten und sind extrem glatt.

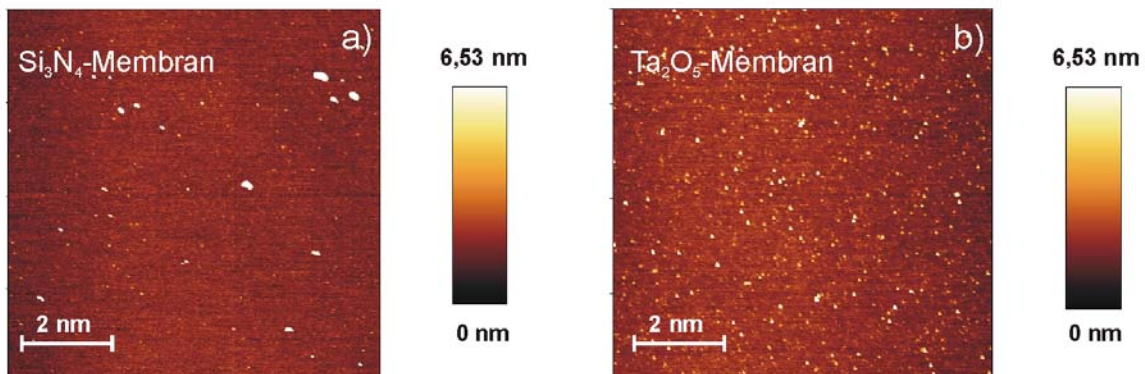


Abb. 4.3: Höhenbilder der AFM-Aufnahmen einer EIS-Struktur mit a) Si_3N_4 - und b) Ta_2O_5 -Schicht.

4.1.1.2. Elektrochemische Charakterisierung

Die pH-sensitiven EIS-Strukturen werden anschließend elektrochemisch mittels C/V- und ConCap-Messungen auf ihre intrinsischen Sensoreigenschaften, wie Sensitivität, Ansprechverhalten, Hysterese und Drift, hin untersucht und miteinander verglichen. Die aktive Sensorfläche beträgt 50 mm^2 . Die elektrochemischen Messungen werden in Titrisol-Puffern im pH-Wert-Bereich von pH 3 bis pH 11 durchgeführt. Für die Einstellung der Arbeitsfrequenz für die C/V- und ConCap-Messungen werden zuerst Impedanzspektren bei einer angelegten Flachbandspannung und einem pH-Wert von pH 7 im Frequenzbereich von 100 mHz bis 1 MHz durchgeführt. Abb. 4.4 a) und Abb. 4.4 b) zeigen exemplarisch die Impedanzspektren als Bode-Diagramme für einen Si_3N_4 - bzw. einen Ta_2O_5 -EIS-Sensor. Für die Impedanzmessungen wird jeweils eine Flachbandspannung von -570 mV und -660 mV über die Referenzelektrode an die EIS-Struktur angelegt. Die Impedanzspektren der EIS-Strukturen in dem gewählten Frequenzbereich können in drei Bereiche eingeteilt werden: kapazitiver, resistiver und kapazitiver Bereich. Im kapazitiven Bereich beträgt die Phasenverschiebung zwischen Widerstand und Kapazität im Idealfall 90° und im resistiven Bereich geht die Phasenverschiebung gegen 0° . Für die C/V- und ConCap-Messungen sollte eine konstante Messfrequenz im kapazitiven Bereich gewählt werden. Für Messungen von elektrochemischen Vorgängen an der Sensoroberfläche eignet sich eine möglichst kleine Messfrequenz ($<1 \text{ kHz}$). Somit wird für die Messungen, in guter Übereinstimmung mit Werten für EIS-Strukturen aus der Literatur [188], eine Frequenz von 120 Hz gewählt. Die dazugehörigen Impedanz- und Phasenwerte betragen $62 \text{ k}\Omega$ und -78° bzw. $64 \text{ k}\Omega$ und -81° für jeweils die EIS-Struktur mit einer Si_3N_4 - und mit einer Ta_2O_5 -Schicht [258,259].

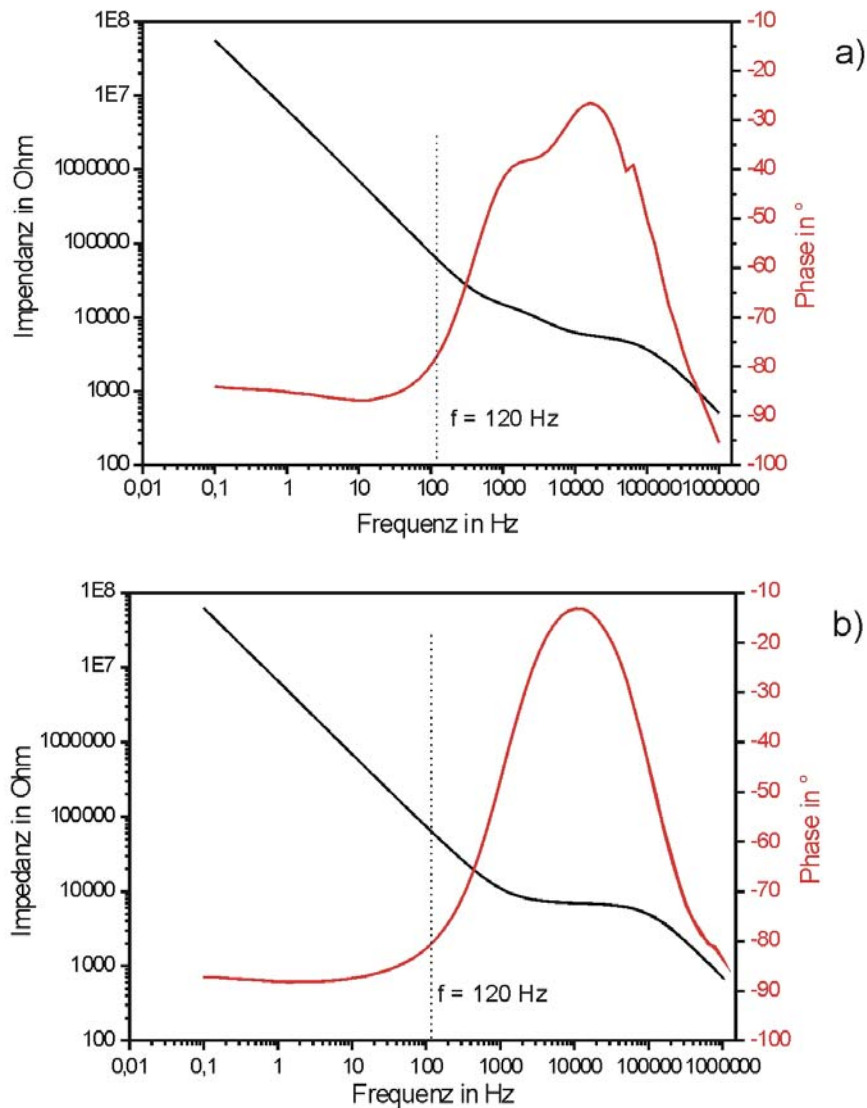


Abb. 4.4: Bode-Diagramme aus Impedanzmessungen mit einer EIS-Struktur mit a) Si_3N_4 - und b) Ta_2O_5 -Schicht im Verarmungsbereich.

Die C/V-Messungen werden bei der gewählten Frequenz von 120 Hz in Titrisol-Puffer, pH 7, von -2 V bis 0,25 V durchgeführt. Im Rahmen dieser elektrochemischen Untersuchungen werden die C/V-Messungen in erster Linie für die Einstellung der Arbeitskapazität für die dynamischen ConCap-Messungen verwendet. Abb. 4.5 a) und Abb. 4.5 b) stellen exemplarisch die C/V-Messungen mit EIS-Strukturen mit einer Si_3N_4 - und mit einer Ta_2O_5 -Schicht dar. Beide C/V-Kurven zeigen einen charakteristischen Verlauf für eine kapazitive EIS-Struktur mit einem p-dotierten Silizium (s. Abb. 3.11 in Kap. 3.3.1). Die gemessene Maximalkapazität der EIS-Strukturen beträgt 30 nF bzw. 44 nF. Theoretische Berechnungen der maximalen Kapazität der untersuchten EIS-Strukturen nach Gln. 2.30 in Kap. 2.2.3.2 resultieren in einer Maximalkapazität von 36 nF bzw. 58 nF für den Si_3N_4 -EIS-Sensor und den Ta_2O_5 -EIS-Sensor und unter Einbeziehung der gemittelten Schichtdicken aus Tab. 4.1. Diese Abweichungen von 16% bis 24% können auf die sensitive Fläche der EIS-Sensoren in der Messzelle zurückzuführen werden.

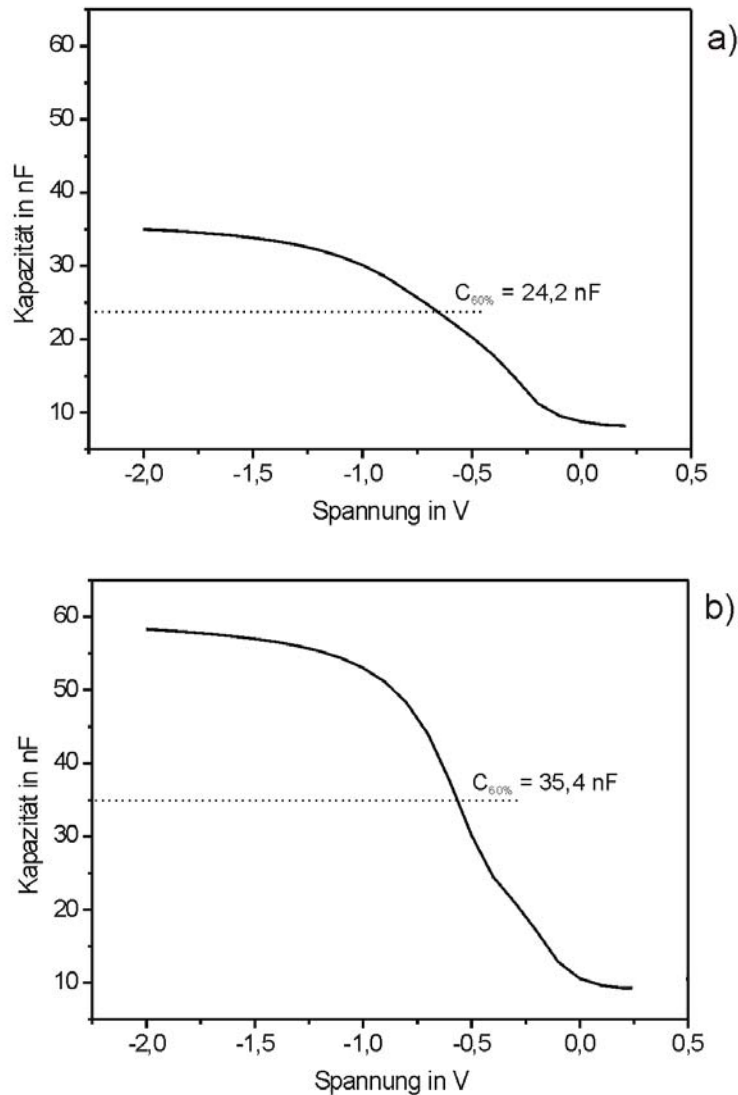


Abb. 4.5: C/V-Messungen bei 120 Hz in Titrisol-Puffer, pH 7, einer EIS-Struktur mit einer a) Si₃N₄- und b) Ta₂O₅-Schicht.

Aus den C/V-Messungen wird die Arbeitskapazität bei 60% der maximalen Kapazität für die dynamischen ConCap-Messungen errechnet. Die Arbeitskapazitäten für die exemplarisch dargestellten C/V-Messungen betragen 24,2 nF bzw. 35,4 nF für den Si₃N₄-EIS-Sensor und den Ta₂O₅-EIS-Sensor. Bei diesen Kapazitäten befinden sich die EIS-Strukturen im Flachbandbereich und sind somit nur von den elektrochemischen Reaktionen an der Sensoroberfläche abhängig. Für die Untersuchung der intrinsischen Parameter werden ConCap-Messungen bei der zuvor ermittelten Messfrequenz und Arbeitskapazität durchgeführt. Hierbei werden Änderungen der Kapazität des Feldeffekt-basierten EIS-Sensors, die aufgrund von elektrochemischen Reaktionen an der Sensoroberfläche entstehen, mit Hilfe der angelegten Bias-Spannung auf die eingestellte Arbeitskapazität zurückgeregelt. Diese Regelspannung wird als ionenabhängiges Messsignal dynamisch aufgetragen. Die ConCap-Messungen werden in Titrisol-Puffern nach einem spezifischen Protokoll

durchgeführt (Tab. 4.2), um das Ansprechverhalten, die Hysterese, die Sensitivität und die Drift der pH-sensitiven EIS-Strukturen untersuchen zu können.

Tab. 4.2: Protokoll für die ConCap-Messungen mit einer Si_3N_4 - und Ta_2O_5 -EIS-Struktur.

Titrisol-Puffer	Zeit in min	Parameter
pH 7	1	Ansprechzeit Hysterese
pH 3	1	
pH 11	1	
pH 3	1	
pH 11	1	
pH 3	1	
pH 11	1	
pH 3	2	Sensitivität Hysterese
pH 7	2	
pH 11	2	
pH 7	10	Drift

Die Ansprechzeit ($t_{90\%}$) wird als diejenige Zeit bestimmt, bei der das Signal 90% des konstanten Messsignals erreicht. Die Hysterese wird als maximale Signaldifferenz (bei konstanten Signalen) in gleichen pH-Wert-Lösungen ermittelt und die Drift als Signaländerung pro Zeiteinheit in der Analytlösung bestimmt. Diese Parameter sind exemplarisch in Abb. 4.6 a) gezeigt. Für die Berechnung der Sensitivität werden Kalibrierkurven erstellt, bei denen das Messsignal als Funktion des dekadischen Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration bzw. des pH-Wertes aufgetragen wird. Die Sensitivität wird als Steigung des linearen Fits der Kalibrierkurve definiert. Abb. 4.6 a) und Abb. 4.6 c) zeigen exemplarisch die Messkurven von ConCap-Messungen mit einer Si_3N_4 - und Ta_2O_5 -EIS-Struktur und Abb. 4.6 b) die Kalibrierkurve aus der Messung mit dem Si_3N_4 -EIS-Sensor. Wie man aus den ConCap-Messungen für den Si_3N_4 - und Ta_2O_5 -EIS-Sensor entnehmen kann, beträgt die Ansprechzeit jeweils bis zu einer Minute bzw. nur wenige Sekunden. Die gemittelte Hysterese für Messungen in Pufferlösungen mit pH 3, pH 7 und pH 11 wird jeweils auf 18 mV (Si_3N_4) und 2,7 mV (Ta_2O_5) berechnet. Die Drift und die Sensitivität betragen jeweils 2,4 mV/min und 0,2 mV/min bzw. 56,8 mV/pH und 56,9 mV/pH für den Si_3N_4 -EIS-Sensor bzw. den Ta_2O_5 -EIS-Sensor. Somit zeigen beide charakterisierten pH-sensitiven Feldeffekt-Strukturen eine nahezu ideale Nernstsensitivität von 59,2 mV/pH für monovalente Ionen unter Standardbedingungen (s. Gl. 2.23 in Kap. 2.2.2). Darüber hinaus korrelieren die gemessenen Sensitivitäten sehr gut mit Literaturwerten für Sensoren mit gleichen pH-sensitiven Schichten, die mit gleicher Methode hergestellt werden; diese betragen jeweils 53-54 mV/pH bzw. 55-58,5 mV/pH [188]. Im Vergleich zu den EIS-Strukturen mit einer Ta_2O_5 -Membran resultiert der Si_3N_4 -Sensor in einer 6-mal größeren Hysterese und um den Faktor 10 höheren Drift.

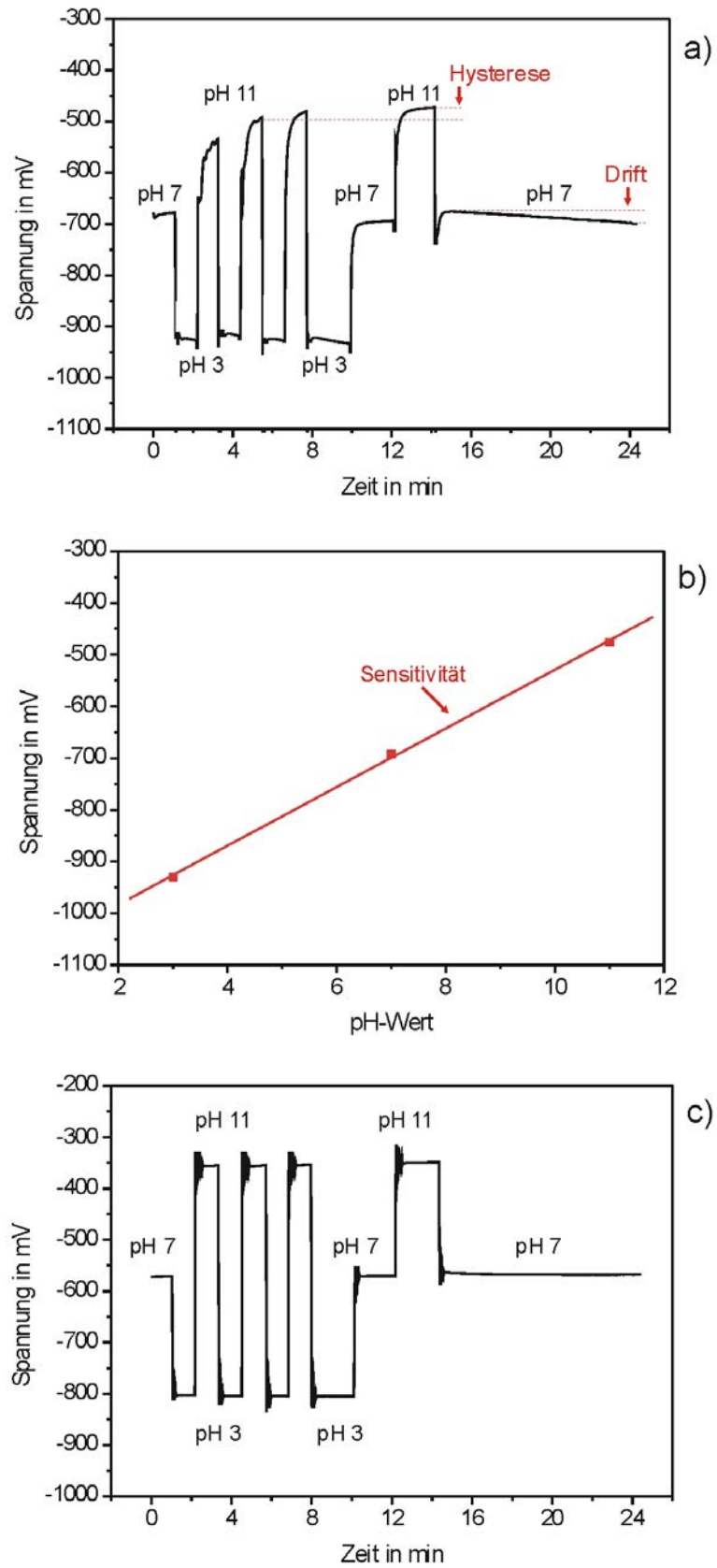


Abb. 4.6: ConCap-Messungen bei 120 Hz in Titrisol-Puffer einer EIS-Struktur mit a) Si_3N_4 - und c) Ta_2O_5 -Schicht; b) zeigt die Kalibrierkurve aus a).

Darüber hinaus, wie es aus Abb. 4.6 c) ersichtlich wird, ist das Ansprechverhalten des Ta₂O₅-Sensors sehr schnell und stabil.

In Tab. 4.3 sind die intrinsischen Sensorparameter aus jeweils drei Messungen für die Si₃N₄-EIS-Struktur und Ta₂O₅-EIS-Struktur zusammengefasst.

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Sensorparameter für pH-sensitive EIS-Strukturen mit einer Si₃N₄- und einer Ta₂O₅-Schicht.

	EIS-Struktur mit Si₃N₄ als pH-sensitive Schicht	EIS-Struktur mit Ta₂O₅ als pH-sensitive Schicht
Sensitivität in mV/pH	54,8±2,0	55,7±1,1
Ansprechzeit in s	10-60	2-5
Hysterese in mV	18±3,8	2,7±1,1
Drift in mV/min	2,4	0,2

Diese Untersuchungen ergeben, dass EIS-Sensoren mit einer pH-sensitiven Ta₂O₅-Schicht bessere intrinsische Sensoreigenschaften besitzen als Si₃N₄-EIS-Strukturen. Somit wird für die weiteren Charakterisierungen und für den Einsatz als Biosensor die pH-sensitive Feldeffekt-Struktur auf Ta₂O₅-Basis gewählt.

Im Hinblick auf den Einsatz der EIS-Struktur für einen Cyanid-sensitiven *Cyanidase*-modifizierten Feldeffekt-Sensor werden sowohl der Einfluss der Immobilisierung als auch der Einfluss der Messbedingungen auf die pH-Sensitivität und das Sensorverhalten der EIS-Struktur untersucht.

Für den Biosensor wird die *Cyanidase* zuerst an ein organisches „Gel“ kovalent gebunden, das anschließend unter einer Dialysemembran auf die pH-sensitive EIS-Struktur immobilisiert wird. Somit werden zusätzliche „Schichten“ auf der EIS-Struktur aufgebracht, die das Sensorverhalten ändern können. Um den Einfluss auf das Sensorverhalten bei zusätzlichen „Schichten“ auf der Ta₂O₅-EIS-Struktur zu untersuchen, werden ebenfalls C/V- und ConCap-Messungen nach dem gleichen Messprotokoll durchgeführt. Dabei werden systematisch sowohl der Einfluss der Dialysemembran auf der EIS-Struktur als auch der Einfluss von 25 mg „*Cyanidase*-Gel“ (die gleiche Menge soll für die Immobilisierung des „Enzym-Gels“ genommen werden) und Dialysemembran auf der Feldeffekt-Struktur auf das Sensorverhalten experimentell bestimmt. Abb. 4.7 a) zeigt exemplarisch die C/V-Kurven für einen Ta₂O₅-EIS-Sensor, einen Ta₂O₅-EIS-Sensor mit Dialysemembran und einen Ta₂O₅-EIS-Sensor mit 25 mg „*Cyanidase*-Gel“ und Dialysemembran, gemessen bei 120 Hz in Titrisol-Puffer, pH 7.

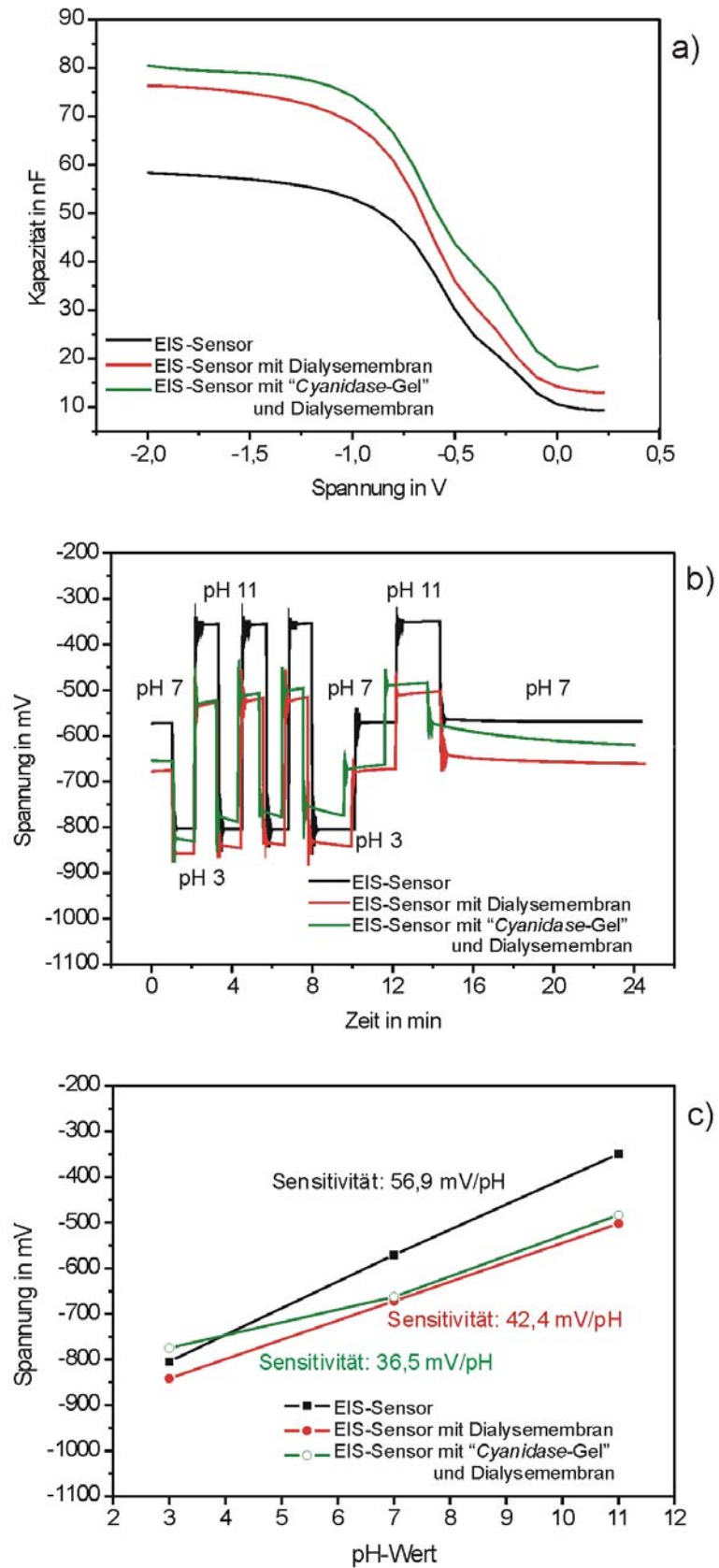


Abb. 4.7: a) C/V- und b) ConCap-Messungen mit dem Ta₂O₅-EIS-Sensor ohne und mit zusätzlichen „Schichten“ in Titrisol-Puffer bei 120 Hz; c) ist die dazugehörige Kalibrierkurve.

Mit zusätzlichen „Schichten“ auf der EIS-Struktur kann eine Verschiebung der maximalen Kapazität von 59 nF zu höheren Werten von 77 nF und 81 nF beobachtet werden. Hierbei würde man jedoch mit zusätzlichen „Schichten“, d.h. mit zusätzlichen Kapazitäten, eine Verminderung der maximalen Kapazität erwarten. Dieses Verhalten wird mit einem weiteren Experiment untersucht und nachfolgend erklärt (s. Abb. 4.8). In Abb. 4.7 b) sind die zu den C/V-Kurven aus Abb. 4.7 a) dazugehörigen dynamischen ConCap-Messungen dargestellt. Für die Messung der EIS-Struktur mit dem „Cyanidase-Gel“ und der Membran wird beim Wechsel der einzelnen Lösungen eine Konditionierungspause von 10 min eingehalten. Im Vergleich zu den Sensoreigenschaften der pH-sensitiven Ta₂O₅-EIS-Struktur ohne Gel und mit Membran werden sowohl eine höhere Hysterese von bis zu 42 mV als auch eine höhere Drift von bis zu 4 mV/min beobachtet. Diese Effekte können durch die Haftung von Ionen in der porösen Membran und dem „Gel“ sowie veränderten Diffusionseigenschaften erklärt werden. Durch die zusätzliche „Enzym-Schicht“ auf der pH-sensitiven Oberfläche, die eine Diffusionsbarriere für Ionen darstellt, steigt die Ansprechzeit auf mehrere Minuten. Die Kalibrierkurven der drei EIS-Sensoren ohne und mit zusätzlichen „Schichten“ sind in Abb. 4.7 c) dargestellt. Mit zusätzlichen „Schichten“ auf der EIS-Struktur sinkt die Sensitivität im pH-Wert-Bereich von pH 3 bis pH 11 von 56,9 mV/pH auf 42,4 mV/pH bzw. 36,5 mV/pH für jeweils einen EIS-Sensor, einen EIS-Sensor mit Dialysemembran und einen EIS-Sensor mit 25 mg „Cyanidase-Gel“ und Dialysemembran. Dieses Verhalten kann aufgrund einer verminderten aktiven Oberfläche durch die Dialysemembran oder „Gel-Kügelchen“ auf der Sensoroberfläche und durch zusätzliche Diffusionsbarrieren erklärt werden. In Tab. 4.4 sind die ermittelten Parameter der EIS-Struktur mit zusätzlichen „Schichten“ zusammen gefasst.

Tab. 4.4: Zusammenfassung der Sensorparameter für die pH-sensitive Ta₂O₅-EIS-Struktur ohne und mit zusätzlichen „Schichten“.

	EIS-Sensor	EIS-Sensor mit Dialysemembran	EIS-Sensor mit 25 mg „Cyanidase-Gel“ und Dialysemembran
Sensitivität in mV/pH	56,9	42,4	36,5
Ansprechzeit in s	2-5	10-60	<660
Hysterese in mV	2,7±1,1	13,7±4,7	42,3±5,9
Drift in mV/min	0,2	1,6	4,2

Wie aus Abb. 4.7 a) zu erkennen ist, werden die maximalen Kapazitäten der C/V-Kurven mit zusätzlichen „Schichten“ zu höheren Kapazitätswerten hin verschoben. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu dem zu erwartenden Verhalten einer Feldeffekt-Struktur mit zusätzlichen „Schichten“ bzw. Kapazitäten. Um dieses Verhalten der EIS-Struktur zu verstehen, wird das Verhalten des EIS-Sensors mit Dialysemembran in Form von zeitabhängigen Aufnahmen von C/V-Kurven vor und

nach dem Aufbringen der Dialysemembran untersucht; dies ist exemplarisch in Abb. 4.8 dargestellt. Die C/V-Messungen werden in Abhängigkeit von der Zeit im Titrisol-Puffer, pH 7, bei einer Frequenz von 120 Hz gemessen. Wie man aus Abb. 4.8 entnehmen kann, sinkt die maximale Kapazität der EIS-Struktur direkt nach dem Aufbringen der Dialysemembran auf 33 nF und steigt anschließend auf einen konstanten Wert von 72 nF nach einem Tag an. Eine mögliche Ursache hierfür ist die Diffusion der Messionen durch die poröse Membran in den durch den O-Ring in der Messzelle abgegrenzten Bereich auf dem Sensor. Dadurch wird eine größere Sensorfläche von maximal 10 mm * 10 mm generiert. Die berechnete maximale Kapazität für einen Ta₂O₅-EIS-Sensor mit einer sensitiven Fläche von 100 mm² resultiert in einer Kapazität von 87 nF. Diese ist in guter Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Werten.

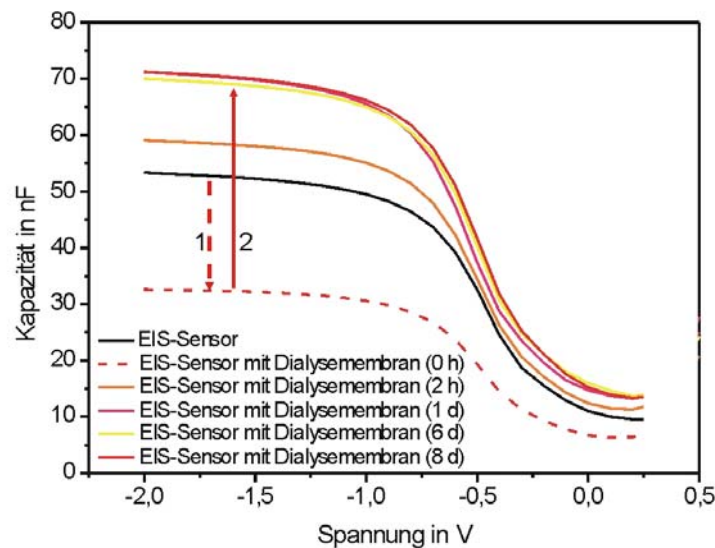


Abb. 4.8: Zeitabhängige Aufnahme von C/V-Kurven in Titrisol-Puffer, pH 7, mit einem Ta₂O₅-EIS-Sensor, ohne und mit Dialysemembran.

Die Messungen mit einem *Cyanidase*-EIS-Sensor, der auf der lokalen pH-Wert-Verschiebung durch die enzymatische Katalyse von Cyanid zu Ammoniak und Formiat basiert, sollen in einem Na-P-Puffer (pH 8,0) und 200 mmol/l NaCl durchgeführt werden. Auf der einen Seite soll der Puffer eine möglichst konstante und stabile Umgebung für die *Cyanidase* gewährleisten und auf der anderen Seite Messungen von pH-Wert-Änderungen ermöglichen. Somit wird im Hinblick auf die Messungen von Cyanid mit einem *Cyanidase*-basierten Ta₂O₅-EIS-Sensor der Einfluss der Puffermolarität auf das Sensorverhalten untersucht. Hierbei sollen sowohl das Verhalten der EIS-Struktur als auch die Puffermolarität des Na-P-Puffers mit verschiedenen Pufferkapazitäten und bei unterschiedlichen Cyanidkonzentrationen untersucht werden. Abb. 4.9 a) zeigt exemplarisch Kalibrierkurven von ConCap-Messungen mit einem Ta₂O₅-EIS-Sensor mit 25 mg „*Cyanidase*-Gel“ und Dialysemembran in Na-P-Puffer (pH 8,0, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit verschiedenen Puffermolaritäten von 5 mmol/l, 50 mmol/l und 70 mmol/l. Die CN⁻-

Ionenkonzentration wird zwischen 1 $\mu\text{mol/l}$ und 10 mmol/l variiert. Die Messfrequenz beträgt 120 Hz. Wie man aus den Kalibrierkurven entnehmen kann, je größer die CN^- -Ionenkonzentration ist, desto größer ist der Absolutwert der gemessenen Spannung und je kleiner die Puffermolarität des Na-P-Puffers ist, desto größer ist die gemessene Spannungsänderung. Für Cyanidkonzentrationen bis zu 100 $\mu\text{mol/l}$ kann für alle drei untersuchten Puffermolaritäten keine Signaländerung beobachtet werden. Für diesen KCN-Konzentrationsbereich können die pH-Wert-Änderungen, die durch das KCN in Lösung entstehen (s. Gln. 2.43 in Kap. 2.3.2), von allen untersuchten Puffern abgepuffert werden und der pH-Wert bleibt konstant. Für Cyanidkonzentrationen von 0,1 mmol/l bis 1 mmol/l zeigt der EIS-Sensor im 5 mmol/l Puffer eine Spannungserhöhung von 7 mV und zwischen 1 mmol/l und 10 mmol/l Cyanid eine Spannungsänderung von 65 mV. Der Sensor zeigt sowohl im 50 mmol/l als auch im 70 mmol/l Puffer keine Signaländerung bei KCN-Konzentrationen bis 1 mmol/l . Bei höheren Cyanidkonzentrationen kann eine Spannungserhöhung jeweils von 37 mV und 31 mV beobachtet werden. Mit Hilfe der ermittelten Sensitivität von 36,5 mV/pH (Tab. 4.4) für die modifizierte EIS-Struktur mit 25 mg „Cyanidase-Gel“ und Dialysemembran können die Spannungsänderungen in pH-Wert-Änderungen umgerechnet werden. Diese sind in Abb. 4.9 b) im direkten Vergleich zu den nach Gln. 2.49 in Kap. 2.3.2 berechneten pH-Werten für einen Na-P-Puffer (pH 8, 5 mmol/l /50 mmol/l /70 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl in verschiedenen Cyanidkonzentrationen dargestellt. Für CN^- -Ionenkonzentrationen bis 1 mmol/l in einem 50 mmol/l und 70 mmol/l Puffer bleibt der pH-Wert der Lösung konstant, d.h. er wird vom Puffer abgepuffert. Messungen im 5 mmol/l Puffer zeigen schon ab einer CN^- -Ionenkonzentration von 0,1 mmol/l eine leichte Erhöhung des pH-Wertes, was auf eine geringere Pufferkapazität zurückzuführen ist. Diese Werte stimmen gut mit den berechneten pH-Werten überein. Für KCN-Konzentrationen höher als 1 mmol/l wird eine deutliche Spannungsänderung, d.h. eine deutliche pH-Wert-Erhöhung für alle drei Puffermolaritäten gemessen. Die berechneten Werte nach Gln. 2.49 in Kap. 2.3.2 zeigen jedoch nur eine geringfügige pH-Wert-Erhöhung und stimmen somit nicht mit den gemessenen Werten überein. Bei diesen CN^- -Ionenkonzentrationen ist die Pufferkapazität des Na-P-Puffers erschöpft und der Puffer kann den pH-Wert der Lösung nicht mehr konstant halten. Die Pufferkapazität des gewählten Na-P-Puffers liegt im Bereich von $\text{pK}_s = 7,21 \pm 1$ [218,219]. Daraus resultiert, dass für die theoretischen pH-Wert-Berechnungen von KCN-Konzentrationen in Na-P-Puffer (pH 8,0, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit den untersuchten Puffermolaritäten, für KCN-Konzentrationen, die höher sind als 1 mmol/l , Gln. 2.49 in Kap. 2.3.2 nicht mehr eingesetzt werden darf. Denn hierbei liegen die pH-Werte des Puffers außerhalb deren Pufferkapazität. Der Offset der Kalibrierkurve von der Messung im 5 mmol/l Puffer zu kleineren Spannungswerten, d.h. zu kleineren pH-Werten, kann durch den erhöhten Einfluss von 200 mmol/l NaCl, das den pH-Wert des Na-P-Puffers (pH 8,0, 5 mmol/l) zu kleineren pH-Werten verschiebt, erklärt werden.

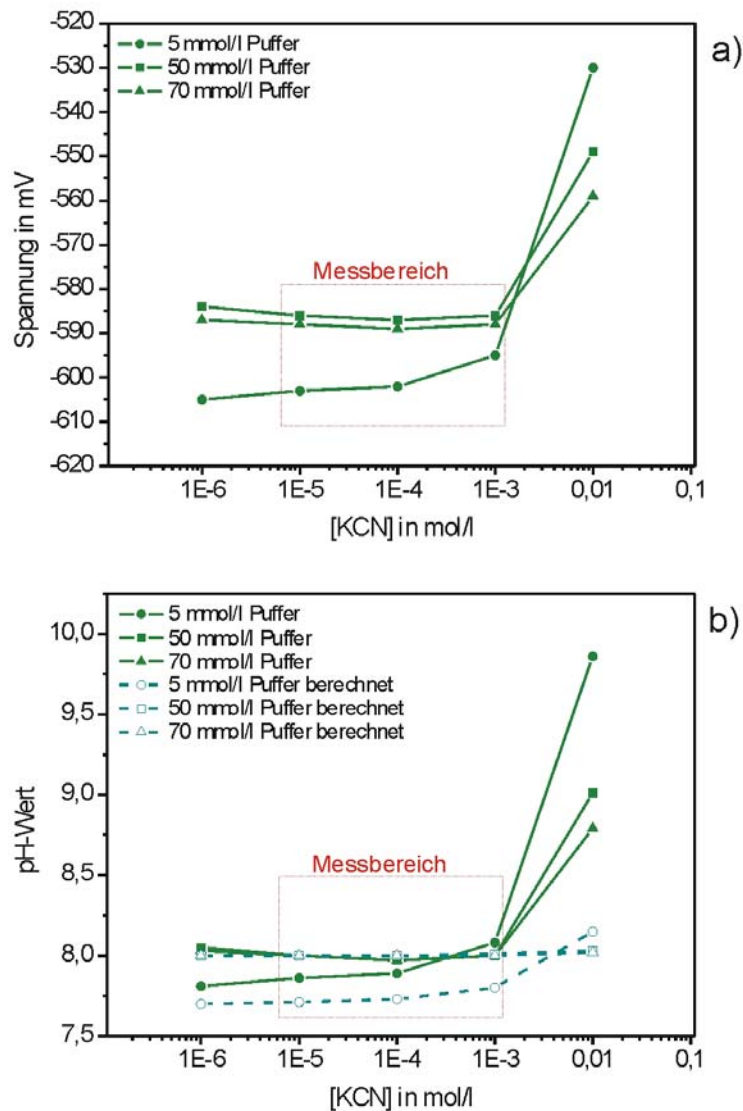


Abb. 4.9: a) Kalibrierkurven aus ConCap-Messungen mit einem Ta_2O_5 -EIS-Sensor mit 25 mg „Cyanidase-Gel“ und Dialysemembran im Na-P-Puffer (pH 8,0, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit verschiedenen Molaritäten in verschiedenen KCN-Konzentrationen; b) dazugehörige pH-Werte im Vergleich zu den berechneten pH-Werten nach Gln. 2.49 in Kap. 2.3.2.

Aus diesen Untersuchungen resultiert, dass die gewählten Puffer nur für CN^- -Ionenkonzentrationen bis zu 1 mmol/l eingesetzt werden dürfen. Je größer die Puffermolarität ist, desto stärker können pH-Wert-Änderungen vom Puffer abgepuffert werden. Für den Einsatz der *Cyanidase*-basierten EIS-Struktur für die Cyaniderfassung muss jedoch der Puffer eine möglichst geringe Puffermolarität haben, da die berechneten pH-Wert-Änderungen aufgrund der enzymatischen Katalyse von Cyanid zu Ammoniak und Formiat nur sehr gering sind (s. Kap. 2.3.2). Weitere Untersuchungen mit niedrigen Puffermolaritäten zeigen, dass der pH-Wert der Lösungen mit kleineren Puffermolaritäten als 5 mmol/l mit der Zeit sehr instabil ist. Somit wird für die Messungen mit dem *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor ein Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl gewählt. Darüber hinaus, wie aus

den theoretischen Berechnungen im Kap. 2.3.2 ersichtlich, liegt der relevante KCN-Konzentrationsbereich für die Cyaniderfassung mit Hilfe eines *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors zwischen 10 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l .

4.1.2. Charakterisierung der *Cyanidase*-basierten EIS-Struktur

Zur Realisierung des *Cyanidase*-basierten Feldeffekt-Sensors werden die charakterisierten und optimierten pH-sensitiven EIS-Strukturen mit dem Enzym *Cyanidase* modifiziert. In diesem Unterkapitel sollen zunächst die Optimierung der Immobilisierung der *Cyanidase* und anschließend die physikalische und elektrochemische Charakterisierung des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors gezeigt werden.

4.1.2.1. Optimierung der Immobilisierung

Für die Realisierung eines *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors wird die *Cyanidase* in zwei Schritten auf die pH-sensitive Ta_2O_5 -EIS-Struktur immobilisiert:

- chemische Immobilisierung der *Cyanidase* über kovalente Bindung an NHS-aktivierte SepharoseTM oder an Eupergit C®,
- physikalische Immobilisierung des „*Cyanidase*-Gels“ auf die EIS-Struktur unter eine Dialysemembran mit einem MWCO-Wert von 10 kDa.

Da die *Cyanidase* eine relativ geringe Enzymaktivität von 1-2 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg Protein})$ aufweist und die theoretisch zu erwartenden Sensorsignale nur sehr klein sind (s. Kap. 2.3.2), wird mit der gewählten Immobilisierungsmethode eine möglichst große Enzymmenge und somit eine möglichst hohe *Cyanidase*-Aktivität pro Sensorfläche angestrebt. Für die kovalente Immobilisierung der *Cyanidase* werden zwei organische „Gele“ gewählt: NHS-aktivierte SepharoseTM und Eupergit C®. Da die Eupergit C® „Kügelchen“ einen ca. 2-mal so großen Durchmesser (200 μm) wie die NHS-aktivierte SepharoseTM „Kügelchen“ aufweisen, sollen mit Hilfe der „Gele“ unterschiedlich große Reaktions- und Diffusionsräume für die *Cyanidase* auf der Sensoroberfläche realisiert werden. Darüber hinaus soll mittels organischer „Gele“ eine zusätzliche Diffusionsbarriere für die Edukte und Produkte der katalytischen Reaktion geschaffen werden, um somit das relativ kleine Sensorsignal optimal erfassen zu können. Bei einer kovalenten Immobilisierung von Enzymen kann die Enzymaktivität jedoch aufgrund der starken chemischen Bindung negativ beeinflusst werden [17,147,153]. Darüber hinaus hängt das Resultat der Immobilisierung von unterschiedlichen Parametern, wie beispielsweise vom pH-Wert, von der Temperatur und der Immobilisierungsdauer, ab [210,211]. Um eine möglichst hohe Aktivität der immobilisierten *Cyanidase* zu erreichen, werden in dieser Arbeit die kovalente

Immobilisierung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ und an Eupergit C® für diese Immobilisierungsparameter optimiert. Die Evaluierung der Immobilisierungen erfolgt hauptsächlich mittels Enzymaktivitätsmessung und Bestimmung der Enzymmenge. Die Enzymaktivität wird als μmol umgesetztes Substrat (Cyanid) pro Minute bestimmt. Die Messungen werden spektrophotometrisch mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode und/oder potentiometrisch mit Hilfe einer NH_3 -ISE durchgeführt. Da bei der spektrophotometrischen Methode sehr kleine Volumina der Probe, von $8 \mu\text{l}$, in diskreten und sehr exakten Zeitpunkten in die Stopplösungen pipettiert werden müssen und die verwendeten Küvettentests darüber hinaus relativ teuer sind, wird für eine wiederholte Evaluierung der *Cyanidase*-Aktivität bevorzugt die NH_3 -ISE verwendet. Abb. 4.10 a) und Abb. 4.10 b) zeigen exemplarisch die Enzymaktivitätsmessungen mit nativer *Cyanidase* im Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l, die bei Raumtemperatur für 1 h, 2 h und 4 h im gleichen Puffer gelagert wird, mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode und NH_3 -ISE.

Bei der spektrophotometrischen Methode variiert die gemessene Enzymaktivität zwischen $2,7 \mu\text{mol}/\text{min}$ und $2,9 \mu\text{mol}/\text{min}$ und zeigt keine definierte Abhängigkeit von der Verweilzeit der *Cyanidase* bei Raumtemperatur. Die Enzymaktivität wird als Produkt der Steigung der Fitgeraden (in $(\text{mol}/\text{l})/\text{min}$) und des Messvolumens im Reaktionsgefäß ($0,0006 \text{ l}$) berechnet. Im Gegensatz dazu zeigen die Messungen mit der NH_3 -ISE, dass die *Cyanidase*-Aktivität von $2,1 \mu\text{mol}/\text{min}$ nach 4 h Lagerung bei Raumtemperatur um 30% sinkt. Der Mittelwert und die Standardabweichung werden aus jeweils drei Enzymaktivitätsmessungen berechnet. Hierbei beträgt das Messvolumen im Reaktionsgefäß $0,003 \text{ l}$. Die Diskrepanz der absoluten Werte der Enzymaktivitäten und der Aussagen wird auf die erschwerte Bestimmung der Enzymaktivität mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode zurückgeführt. Ein weiterer Vorteil der potentiometrischen Methode liegt in der direkten Bestimmung der *Cyanidase*-Aktivität in der Reaktionslösung und ermöglicht somit auch eine direkte Messung der Enzymaktivität in der Messzelle für elektrochemische Untersuchungen.

Für die Optimierung der kovalenten Immobilisierungen der *Cyanidase* wird die immobilisierte Enzymmenge mittels Gelelektrophorese mit anschließendem Gelscan bei einem Molekulargewicht von $37,5 \text{ kDa}$ bestimmt. Die Optimierung der kovalenten Immobilisierungen der *Cyanidase* an die organischen „Gele“ wird im Folgenden exemplarisch anhand der Immobilisierung der Enzyme an Eupergit C® dargestellt. Für die Optimierung des pH-Wertes der Immobilisierungslösung wird die *Cyanidase* im Na-P-Puffer (60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit verschiedenen pH-Werten für 24 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ immobilisiert. Es werden pH-Werte im Bereich von pH 8,0 bis pH 9,0 gewählt, da bei höheren pH-Werten die Oxirangruppen schneller hydrolysieren und somit eine höhere Kopplungsrate erwartet wird. Die obere pH-Wert-Grenze wird über die Eigenschaften der *Cyanidase* bestimmt. Das pH-Wert-Optimum für die *Cyanidase* liegt bei pH 8,5 (experimentell bestimmt), bei höheren pH-Werten denaturieren die Enzyme [147,148,153]. Abb. 4.11 und Abb. 4.12 zeigen

exemplarisch die Ergebnisse der Enzymmenge- und Enzymaktivitätsbestimmung nach der Immobilisierung von *Cyanidase* bei unterschiedlichen pH-Werten.

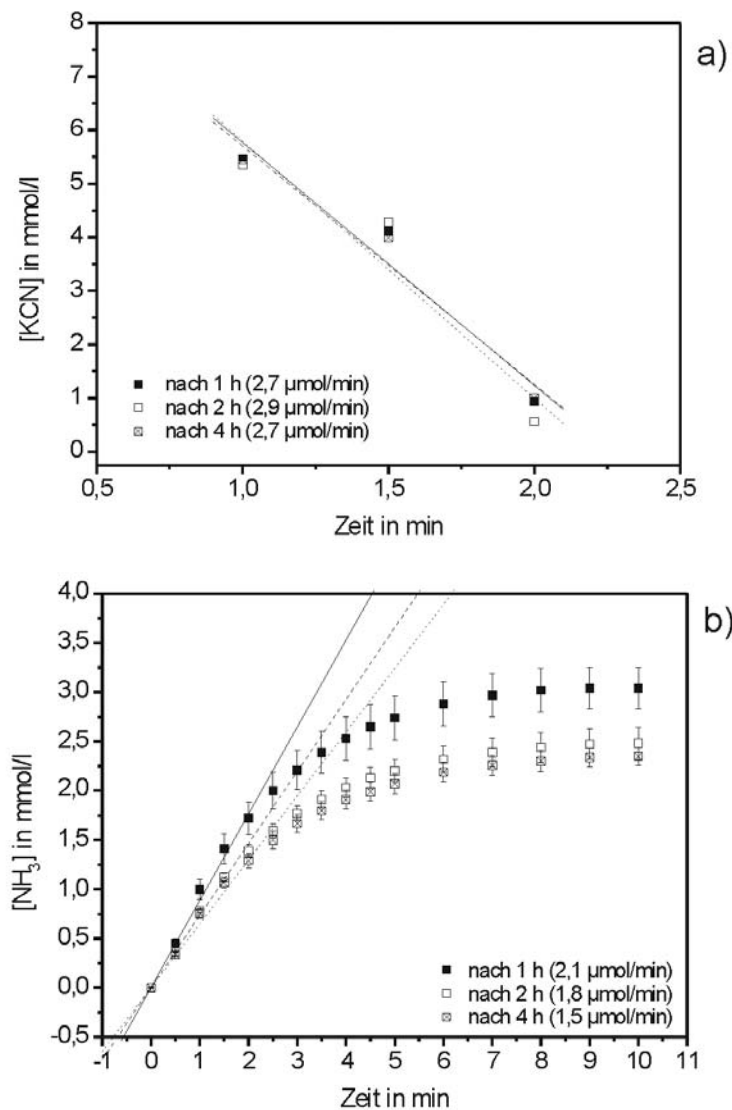


Abb. 4.10: Enzymaktivitätsmessungen a) mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode und b) mittels NH₃-ISE von *Cyanidase*-Aktivitätsmessungen von nativer *Cyanidase* im Na-P-Puffer (pH 8,0, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl als Funktion der Verweildauer von *Cyanidase* bei Raumtemperatur.

In Abb. 4.11 a) ist ein Foto des entwickelten Gels mit den Enzymproben, die nach der jeweiligen Immobilisierung aus der Immobilisierungslösung entnommen und evaluiert werden, im Vergleich zur Enzymprobe vor der Immobilisierung, dargestellt. Die dazugehörige quantitative Evaluierung der Proteinbanden bei 37,5 kDa mittels Gelscan ist in Abb. 4.11 b) gezeigt. Hierbei wird die Peakfläche der Remissionsmessungen der Banden ausgewertet. Die Peakfläche der Probe vor der Immobilisierung wird auf 100% Enzymmenge in der Immobilisierungslösung gesetzt. Bei allen drei verschiedenen pH-Werten des Puffers ist eine Abnahme der Intensität der *Cyanidase*-Bande zu beobachten, d.h. die Enzymprobe (Immobilisierungslösung)

enthält weniger *Cyanidase*, als die gleiche Lösung vor der Immobilisierung. Die *Cyanidase* wird bei allen drei pH-Werten der Immobilisierungslösung an Eupergit C® immobilisiert. Beim pH-Wert von 8,5 kann die kleinste Enzymmenge in der Probe, d.h. die höchste immobilisierte Enzymmenge, bestimmt werden. Es werden 68% der Anfangskonzentration von *Cyanidase* (Anfangskonzentration von 0,06 $\mu\text{mol/l}$) an 150 mg Eupergit C® kovalent immobilisiert. Somit wird eine *Cyanidase*-Konzentration von 11 mg *Cyanidase* pro 1 g Eupergit C® erreicht. Bei pH 9,0 kann eine verminderte immobilisierte Enzymmenge von nur 33% bestimmt werden, was auf Stabilitätsverluste der *Cyanidase* bei hohen pH-Werten zurückzuführen ist.

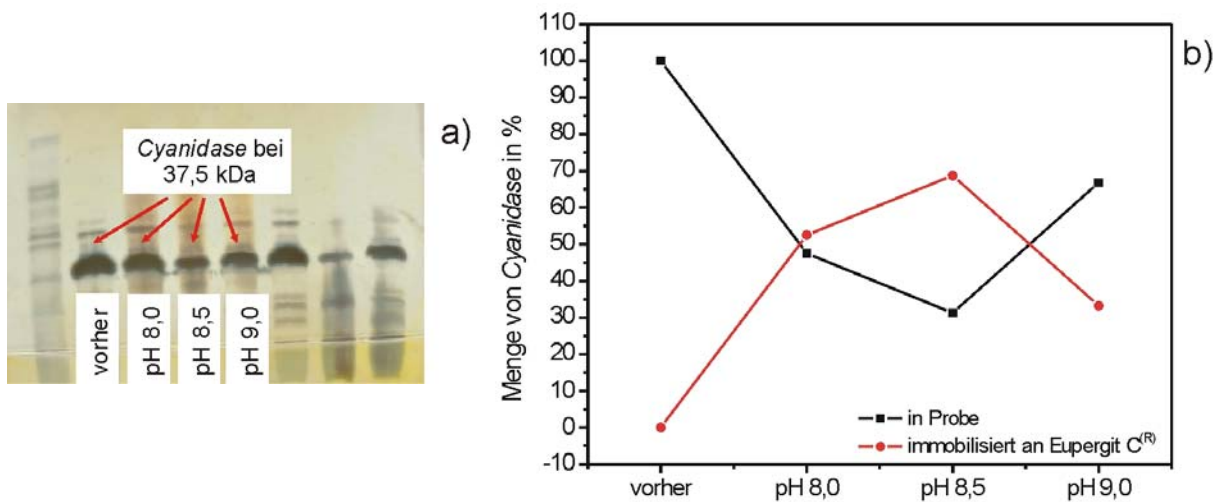


Abb. 4.11: Bestimmung der Enzymmenge bei der Optimierung des pH-Wertes der Immobilisierungslösung, Na-P-Puffer (pH X, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl, für die Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C® bei 4 °C für 24 h. a) Gel nach der Gelelektrophorese, b) dazugehörige Auswertung mittels Gelscan.

Jede Enzymaktivitätsmessung wird 3-mal durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte. Darüber hinaus wird die Optimierung der jeweiligen Parameter zeitlich parallel durchgeführt, um somit dynamische Stabilitätsverluste der *Cyanidase* für den Vergleich und für die Evaluierung zu vermeiden.

Abb. 4.12 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung nach der Immobilisierung der *Cyanidase* bei unterschiedlichen pH-Werten. Abb. 4.12 a) stellt die dazugehörigen Messkurven der Enzymaktivitätsmessung mit dem „*Cyanidase*-Gel“ im Na-P-Puffer (pH 8,0, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei einer Cyanidkonzentration von 10 mmol/l KCN dar. Mit Hilfe der Kalibriergeraden (Abb. 4.12 b)) kann anschließend aus den gemessenen Spannungswerten die NH_3 -Konzentration als Funktion der Zeit berechnet werden (s. Abb. 4.12 c)). Die Kalibriermessung der NH_3 -ISE wird in einem Na-P-Puffer (pH 8,9, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei verschiedenen Ammoniumformiat-Konzentrationen durchgeführt. Die NH_3 -ISE zeigt im linearen Konzentrationsbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l Ammoniumformiat eine Sensitivität von 55,9 mV/Dekade.

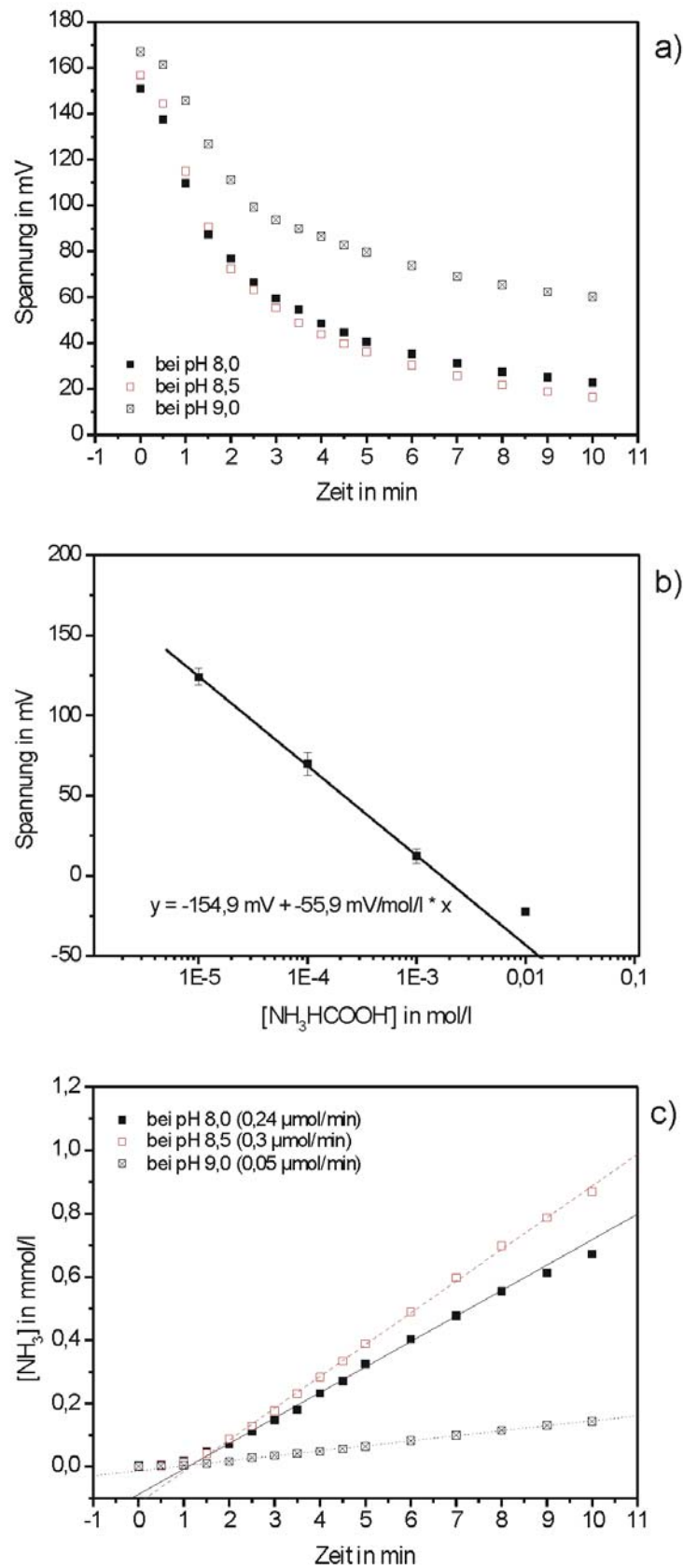


Abb. 4.12: Enzymaktivitätsmessungen mit einer NH_3 -ISE bei der Optimierung des pH-Wertes der Immobilisierungslösung, Na-P-Puffer (pH X, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl, für die Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C® bei 4 °C für 24 h. a) Messkurven, b) Kalibrierkurven und c) die dazugehörigen Enzymaktivitätskurven.

Aus Abb. 4.12 c) wird die zu den Messkurven in Abb. 4.12 a) dazugehörige Enzymaktivität bestimmt. Bezogen auf das Messvolumen wird die Enzymaktivität als μmol Ammoniak pro min definiert, denn die *Cyanidase* setzt $1 \mu\text{mol}$ Cyanid für $1 \mu\text{mol}$ Ammoniak katalytisch um. Wie man aus der Abb. 4.12 c) entnehmen kann, wird die höchste Enzymaktivität von $0,3 \mu\text{mol}/\text{min}$ bei der Immobilisierung im Puffer bei einem pH-Wert von 8,5 beobachtet, was gut mit den Ergebnissen aus der Bestimmung der immobilisierten *Cyanidase*-Menge korreliert. Die Enzymaktivität vom „*Cyanidase*-Gel“ aus der Immobilisierung bei pH 9,0 ist 6-mal kleiner als bei der Immobilisierung in pH 8,5.

Bei den Messungen der Enzymmenge wird jedoch eine 2-mal kleinere Enzymmenge gemessen. Dieses kann auf die zeitliche Denaturierung der Enzyme (native und immobilisierte *Cyanidase*) bei dem relativ hohen pH-Wert der Pufferlösung zurückgeführt werden.

Für die nachfolgende Optimierung der Immobilisierung wird der pH-Wert der Pufferlösung auf pH 8,5 gesetzt. In einem weiteren Schritt wird untersucht, wie sich die Temperatur auf die Immobilisierung der *Cyanidase* auswirkt. Hierbei werden Immobilisierungen bei Raumtemperatur in Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl für 12 h und 24 h im Vergleich zur Immobilisierung der *Cyanidase* bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 h durchgeführt. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung sind für alle drei Immobilisierungen in Abb. 4.13 dargestellt.

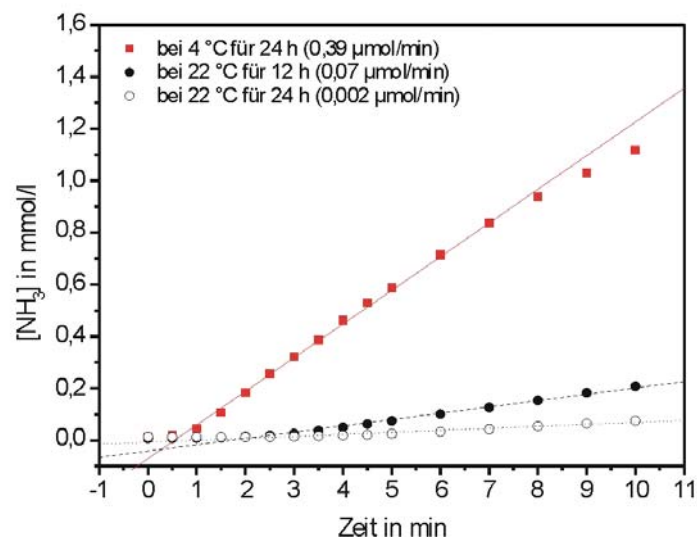


Abb. 4.13: Enzymaktivitätskurven nach der Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C® in Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei Raumtemperatur für 12 h und 24 h und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 h.

Die Messungen der *Cyanidase*-Aktivität nach der Immobilisierung bei Raumtemperatur zeigen deutliche Aktivitätsverluste von 82% nach 12 h und 99% nach 24 h. Dies bedeutet, dass die *Cyanidase* bei einem pH-Wert von 8,5 und bei Raumtemperatur sehr schnell instabil wird und denaturiert. Die Bestimmung der

dazugehörigen Enzymmenge zeigt zwar, dass bereits nach 12 h Immobilisierung bei Raumtemperatur ebenfalls 10 mg *Cyanidase* pro 1 g Eupergit C® kovalent gekoppelt werden, was bedeutet, dass die Immobilisierung bei Raumtemperatur schneller als bei 4 °C abläuft, aber die Sensitivität stark sinkt. Deshalb werden weitere Immobilisierungen bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt.

Darüber hinaus wird die Immobilisierungsdauer von *Cyanidase* an Eupergit C® im Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei 4 °C optimiert. Es soll untersucht werden, ob durch längere Immobilisierungszeiten eventuell entstandene Mehrfachbindungen „Multi-point attachments“ der *Cyanidase* an Eupergit C® zu einer Verschlechterung der Enzymaktivität führen [211]. Nach Herstellerangaben für Eupergit C® soll eine maximale Immobilisierungsdauer von drei Tagen eingehalten werden [260]. Somit wird die Immobilisierungsdauer von 12 h bis 72 h variiert. Die dazugehörigen Enzymaktivitätskurven sind in Abb. 4.14 exemplarisch dargestellt.

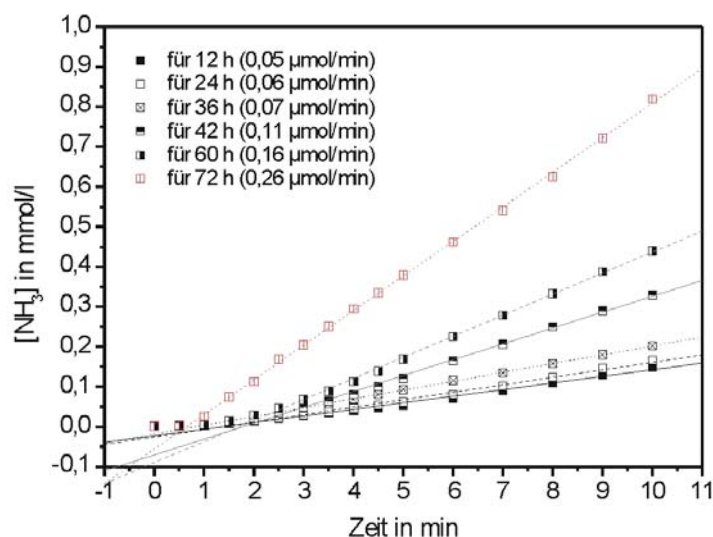


Abb. 4.14: Enzymaktivitätskurven nach der Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C® im Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei 4 °C für 12 h bis 72 h.

Nach einer Immobilisierungsdauer von 72 h kann eine bis zu 5-mal größere Enzymaktivität von 0,26 μmol/min als bei einer Immobilisierung von 12 h erreicht werden. Nach 72 h Immobilisierung können bis zu 14 mg *Cyanidase* an 1 g Eupergit C® kovalent gebunden werden. Daraus resultiert, dass eventuell entstandene „Multi-point attachments“ zwischen *Cyanidase* und Eupergit C® bei der Immobilisierung keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität zeigen. Dieses wird auch in einem weiteren Experiment überprüft, in dem man die Bildung solcher Mehrfachverbindungen nach der eigentlichen Immobilisierung mittels 0,01% Aminoethanol-Lösung durch Blockieren der restlichen aktiven Gruppen an Eupergit C® verhindert. Die Enzymaktivitätstests von immobilisierter *Cyanidase* ohne und mit anschließender Behandlung mit Aminoethanol zeigen keinen Unterschied in der Stabilität der *Cyanidase*.

Für die Untersuchung der geeigneten Puffermolarität werden Immobilisierungen von *Cyanidase* an Eupergit C® im Na-P-Puffer (pH 8,5, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit Puffermolaritäten von 20 mmol/l bis 100 mmol/l und bei 4 °C für 72 h durchgeführt. Abb. 4.15 zeigt exemplarisch die Enzymaktivitätskurven nach der Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C® im 20 mmol/l, 60 mmol/l und 100 mmol/l Puffer. Die Enzymaktivitäten variieren zwischen 0,014 $\mu\text{mol}/\text{min}$ und 0,015 $\mu\text{mol}/\text{min}$ und zeigen keine eindeutige Abhängigkeit von der Molarität, was gut mit der Bestimmung der Enzymmenge korreliert. Die deutlich niedrigeren Enzymaktivitäten sind auf die *Cyanidase* aus einer anderen Herstellungs-Charge zurückzuführen.

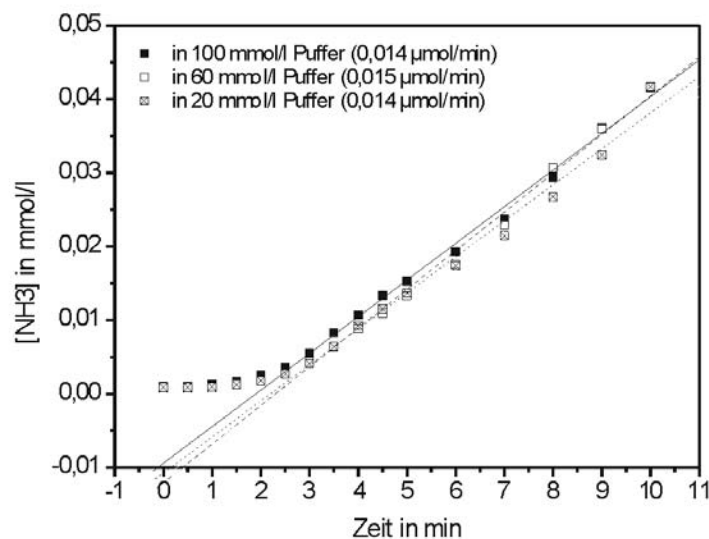


Abb. 4.15: Enzymaktivitätskurven nach der Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C® im Na-P-Puffer (pH 8,5, X mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei 4 °C für 72 h mit unterschiedlichen Puffermolaritäten.

Die Optimierung der Immobilisierung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ erfolgt analog zur Optimierung der Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C®. Der optimale pH-Wert des Immobilisierungspuffers beträgt ebenfalls pH 8,5. Das Enzym zeigt eine höhere Stabilität bei einer Immobilisierung bei 4 °C im Vergleich zur kovalenten Bindung bei Raumtemperatur. Die untersuchte Molarität des Puffers hat ebenfalls keinen eindeutigen Einfluss auf die Enzymaktivität und immobilisierte Enzymmenge. Hierbei wird die Immobilisierungsdauer zwischen 12 h und 24 h untersucht, da NHS-aktivierte Sepharose™ nach Herstellerangaben für kovalente Bindungen von Enzymen von bis 24 h geeignet ist [261]. Die optimale Immobilisierungsdauer beträgt 24 h. Es können bis zu 10 mg *Cyanidase* an 1 g NHS-aktivierte Sepharose™ kovalent gebunden werden, was gut mit Werten aus der Literatur für andere Proteine, die an NHS-aktivierte Sepharose™ immobilisiert werden, korreliert [262].

Im Rahmen dieser Arbeit werden beide Immobilisierungsprotokolle optimiert. Für die kovalente Bindung der *Cyanidase* an Eupergit C® werden die besten Ergebnisse der

Enzymaktivität bei einer Immobilisierung der *Cyanidase* im Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei 4°C für 72 h und für die Immobilisierung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ in Na-P-Puffer (pH 8,5, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl bei 4°C für 24 h erreicht. Abb. 4.16 a) und Abb. 4.16 b) zeigen exemplarisch jeweils die Enzymaktivitätskurven von Messungen mit nativer und immobilisierter *Cyanidase* an Eupergit C® bzw. an NHS-aktivierte Sepharose™ unter Anwendung der optimierten Immobilisierungsprotokolle.

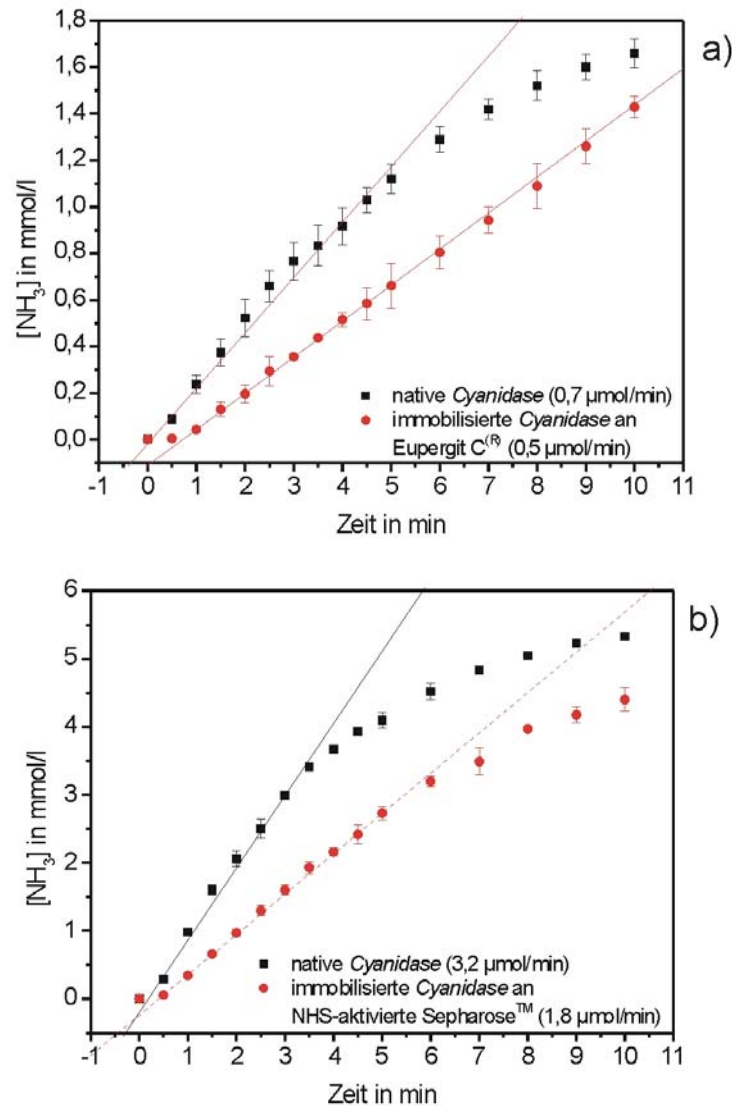


Abb. 4.16: Enzymaktivitätskurven von nativer und immobilisierter *Cyanidase* gleicher Enzymcharge a) bei der Immobilisierung von *Cyanidase* an Eupergit C® und b) bei der Immobilisierung von *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™.

Es werden jeweils die Enzymaktivitätsmessungen von *Cyanidase* (nativ und immobilisiert) gleicher Charge miteinander verglichen. Bei der optimierten Immobilisierung der *Cyanidase* an Eupergit C® können bis zu 35% der Enzymaktivität von der nativen *Cyanidase* gleicher Charge erreicht werden. Die Enzymmenge bei den Enzymaktivitätsmessungen ist im Verhältnis 1:4 native

Cyanidase zur immobilisierten *Cyanidase*. Die optimierte Immobilisierung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ zeigt 30% der Enzymaktivität von der nativen *Cyanidase* gleicher Charge. Das Mengenverhältnis hierbei beträgt 1:6 native *Cyanidase* zu immobilisierter *Cyanidase*.

Die immobilisierte *Cyanidase* wird analog zur nativen *Cyanidase* in Na-P-Puffer (pH 7,0, 150 mmol/l), 200 mmol/l NaCl und 200 mmol/l Imidazol bei 4 °C gelagert. Die Lagerstabilität der immobilisierten *Cyanidase* wird ebenfalls mittels Enzymaktivitätsmessungen dynamisch bestimmt. Dabei wird die Aktivität der *Cyanidase* unmittelbar nach der Immobilisierung auf 100% gesetzt. Die Stabilitätsmessungen von immobilisierter *Cyanidase* an Eupergit C® und von immobilisierter *Cyanidase* an NHS-aktivierte Sepharose™ sind exemplarisch in Abb. 4.17 dargestellt. Die Enzymaktivität der *Cyanidase* sinkt nach acht Tagen auf 63% (Eupergit C®) bzw. 37% (NHS-aktivierte Sepharose™) der Anfangsaktivität und beträgt nach 26 Tagen nur noch 28% (Eupergit C®) bzw. 12% (NHS-aktivierte Sepharose™). Daraus resultiert, dass Messungen mit dem *Cyanidase*-Biosensor möglichst innerhalb der ersten 1-2 Wochen nach der kovalenten Immobilisierung der *Cyanidase* durchgeführt werden sollen. Die native *Cyanidase* zeigt nach acht Tagen 50% ihrer Anfangsaktivität. Daraus folgt, dass im Rahmen dieser Arbeit keine signifikante Erhöhung der Stabilität mittels kovalenter Immobilisierung der *Cyanidase* erreicht werden kann.

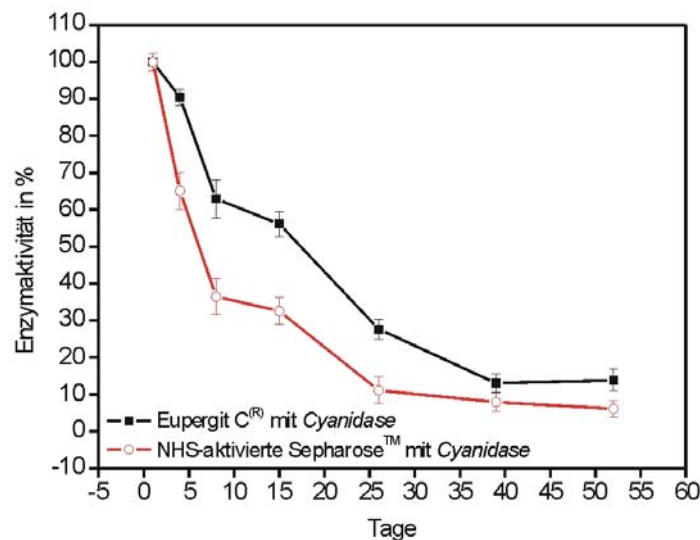


Abb. 4.17: Stabilitätsmessungen der immobilisierten *Cyanidase* an Eupergit C® und an NHS-aktivierte Sepharose™.

Für die Realisierung einer *Cyanidase*-basierten Feldeffekt-Struktur für die selektive Erfassung von Cyanid in Flüssigkeiten wird im zweiten Schritt das „*Cyanidase*-Gel“ unter eine Dialysemembran auf die pH-sensitive Ta₂O₅-EIS-Struktur eingeschlossen. Hierbei werden 25-50 mg des „*Cyanidase*-Gels“ immobilisiert. Die Evaluierung dieser physikalischen Immobilisierung wird im Rahmen von elektrochemischen Untersuchungen des Biosensors in Cyanid-haltigen Lösungen durchgeführt.

4.1.2.2. Physikalische Charakterisierung

Die physikalische Charakterisierung der hergestellten *Cyanidase*-basierten EIS-Sensoren erfolgt im Hinblick auf die Topologie und Morphologie sowie zur Visualisierung von Größenverhältnissen und der immobilisierten *Cyanidase* mittels Videomikroskopie, REM und AFM. Wie im Kap. 4.1.2.1 dargestellt, wird die *Cyanidase* zuerst kovalent an NHS-aktivierte Sepharose™ oder an Eupergit C® gebunden. Anschließend wird das „*Cyanidase*-Gel“ unter eine Dialysemembran auf die pH-sensitive EIS-Struktur immobilisiert. Zur Visualisierung und Überprüfung der Größenverhältnisse der zwei unterschiedlichen „*Cyanidase*-Gele“ werden videomikroskopische Aufnahmen gemacht. Abb. 4.18 a) und Abb. 4.18 b) zeigen exemplarisch videomikroskopische Aufnahmen von NHS-aktivierter Sepharose™ mit *Cyanidase* und von Eupergit C® mit *Cyanidase* auf einer Ta₂O₅-EIS-Struktur.

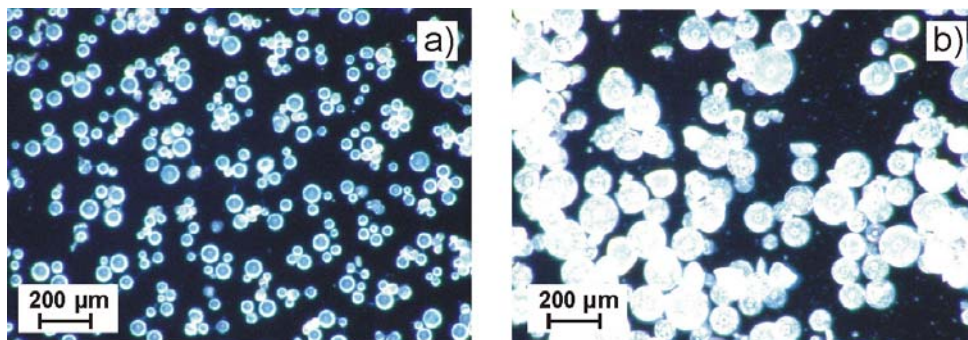


Abb. 4.18: Videomikroskopische Aufnahmen von einer EIS-Struktur a) mit NHS-aktivierter Sepharose™ mit *Cyanidase* und b) mit Eupergit C® mit *Cyanidase*.

Beide „Enzym-Gele“ haben eine „Kügelchen“-Form. Der optisch ermittelte Durchmesser der „Kügelchen“ von Eupergit C® ist annähernd 2-mal so groß wie der Durchmesser der „Kügelchen“ von NHS-aktivierter Sepharose™, der zwischen 80 µm bis 100 µm liegt. Dieses stimmt gut mit den Herstellerangaben überein. Für Eupergit C® wird ein mittlerer Durchmesser von ca. 200 µm und für NHS-aktivierte Sepharose™ ein mittlerer Durchmesser von 90 µm angegeben [260,261]. Aufgrund der Größenunterschiede können bei einer geschlossenen „Gelschicht“ auf der EIS-Struktur unterschiedlich große Reaktionsräume für die enzymatische Katalyse realisiert werden.

Für die Visualisierung der kovalent gebundenen *Cyanidase* an die organischen „Gele“ werden REM-Aufnahmen von NHS-aktivierter Sepharose™ und von Eupergit C® ohne und mit *Cyanidase* gemacht und miteinander verglichen. Für diese Untersuchungen muss zusätzlich eine 1-2 nm dünne Iridium-Schicht auf die organischen „Kügelchen“ aufgesputtert werden, da diese nur eine geringe Elektronen-Leitfähigkeit und aufgrund ihrer runden Form nur eine geringe Kontaktfläche zum EIS-Sensor haben. Darüber hinaus müssen die REM-Messungen bei einer Temperatur von -130 °C durchgeführt werden, um Aufladungseffekte bei

höheren Vergrößerungen, die zu Deformationen und Rissen der „Kügelchen“ führen können, möglichst zu vermeiden. Abb. 4.19 a) und Abb. 4.19 b) zeigen exemplarisch REM-Aufnahmen von jeweils NHS-aktivierter SepharoseTM ohne und mit kovalent immobilisierter *Cyanidase* bei einer 100.000-fachen Vergrößerung.

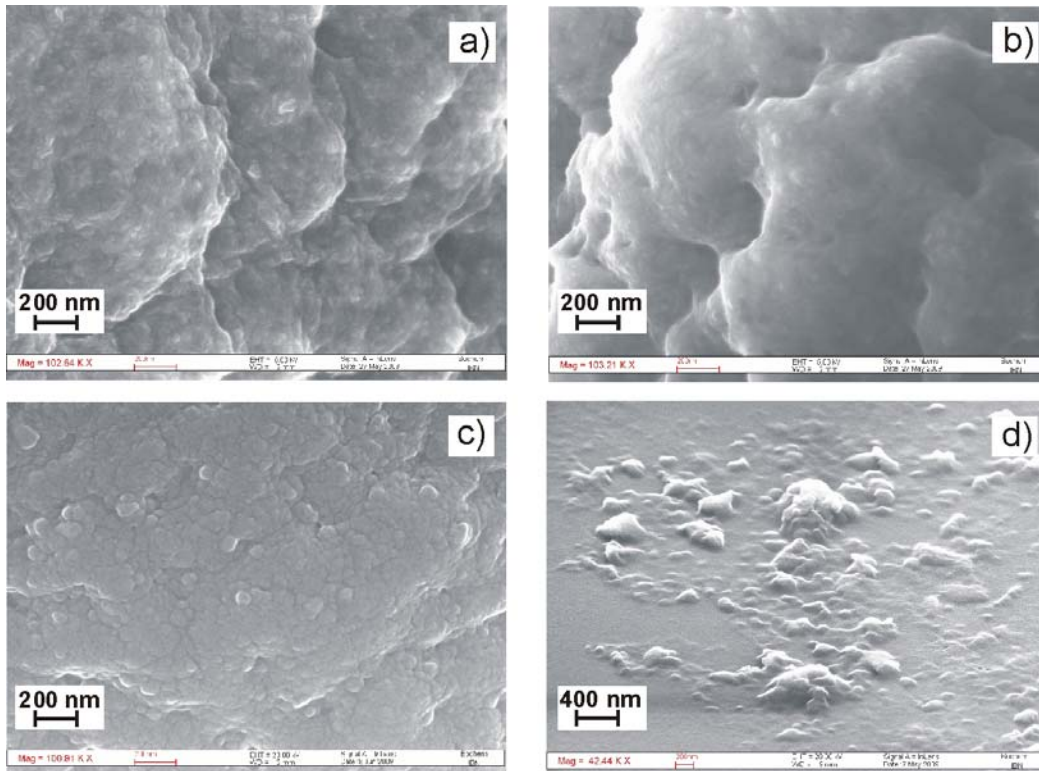


Abb. 4.19: REM-Aufnahmen von NHS-aktivierter SepharoseTM a) ohne und b) mit *Cyanidase*, und c) von Eupergit C® mit *Cyanidase* bei einer 100.000-fachen Vergrößerung bei -130 °C. d) REM-Aufnahmen von adsorptiv immobilisierter *Cyanidase* auf einer EIS-Struktur bei einer 50.000-fachen Vergrößerung und einem Winkel von 60°.

Beide Strukturen sind sehr „wellig“ und haben kleine „Pünktchen“ auf der Oberfläche. Der einzige Unterschied ist, dass NHS-aktivierte SepharoseTM mit Enzym im Vergleich zu NHS-aktivierter SepharoseTM ohne *Cyanidase* eine „gelartigere“ Oberfläche aufweist, die durch die Immobilisierung der *Cyanidase* im Puffer herrühren kann. Abb. 4.19 c) zeigt die Oberfläche von Eupergit C® mit *Cyanidase* bei gleicher Vergrößerung. Aufgrund des relativ großen Durchmessers von Eupergit C® wird zusätzlich noch eine 3 µm „dicke“ Pt-Schicht (über die Sputteranlage definiert) auf die Eupergit C® Oberfläche aufgebracht werden, um Aufladungseffekte der „Kügelchen“ zu vermeiden. Diese Schicht verursacht jedoch zusätzliche kleine „Kügelchen“ auf der Oberfläche, die die direkte Visualisierung der *Cyanidase* auf der Oberfläche von Eupergit C® nicht ermöglichen. Jedoch zeigen Enzymaktivitätsmessungen mit NHS-aktivierter SepharoseTM mit *Cyanidase* und mit Eupergit C® mit *Cyanidase* eine deutliche Enzymaktivität, so dass *Cyanidase* auf der Oberfläche der organischen „Kügelchen“ kovalent immobilisiert wird. Für die

Abschätzung der Größe und Form der *Cyanidase* auf den organischen „Kügelchen“ werden darüber hinaus REM-Aufnahmen von *Cyanidase*, die adsorptiv auf einer EIS-Struktur immobilisiert wird, gemacht. Abb. 4.19 d) zeigt exemplarisch diese REM-Aufnahme von *Cyanidase*, die direkt auf dem Sensorchip immobilisiert wird, bei einer 50.000-fachen Vergrößerung. Sowohl Enzym-Konglomerate als auch einzelne Enzympartikel sind deutlich sichtbar. Bei weiteren Vergrößerungen wird die „Enzymgröße“ auf 20 nm bis 50 nm bestimmt. Die *Cyanidase* zeigt eine rundliche Form. Für die Darstellung der kleinen Strukturen auf den sehr stark „gewellten“ organischen „Kügelchen“ bedarf es höheren Vergrößerungen und keiner 3 µm-dicken Pt-Schicht. Diese Bedingungen sind jedoch aufgrund von starken Aufladungseffekten, die zu Deformationen und Rissen der „Kügelchen“ führen, nicht möglich.

Darüber hinaus werden AFM-Aufnahmen der „Enzym-Kügelchen“ ohne und mit *Cyanidase* erstellt. Abb. 4.20 zeigt exemplarisch die Höhenbilder in einem 3-D-Format der AFM-Aufnahmen a) von NHS-aktivierter SepharoseTM mit *Cyanidase* und b) von Eupergit C® mit *Cyanidase*. Sie bestätigen die „wellige“ Struktur der „Enzym-Gele“. Die über den ganzen Messbereich von 8 µm * 8 µm dargestellte mittlere Rauigkeit (RMS-Wert) der „Kügelchen mit Enzym“ beträgt jeweils 161 nm (NHS-aktivierte SepharoseTM) und 103 nm (Eupergit C®). AFM-Aufnahmen der „Kügelchen“ ohne *Cyanidase* ergeben eine 2-2,5-fach größere Rauigkeit. Diese Beobachtung korreliert gut mit den REM-Aufnahmen mit und ohne Enzym, wobei bei Aufnahmen mit kovalent gebundener *Cyanidase* eine „gelartige“ Oberfläche beobachtet werden kann.

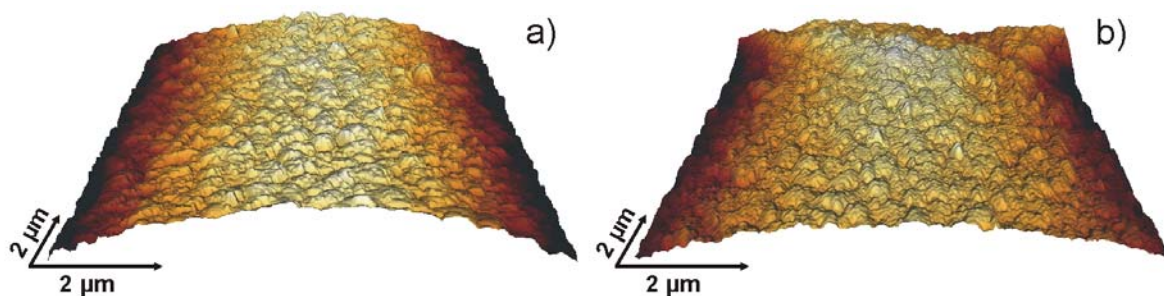


Abb. 4.20: Höhenbilder der AFM-Aufnahmen im 3-D Format von a) NHS-aktivierten SepharoseTM mit *Cyanidase* und b) Eupergit C® mit *Cyanidase*.

Die an NHS-aktivierte SepharoseTM und an Eupergit C® kovalent gekoppelte *Cyanidase* wird anschließend unter eine Dialysemembran auf die pH-sensitive Feldeffekt-Struktur mittels O-Ring eingeschlossen, um somit einen *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor zu realisieren. Abb. 4.21 zeigt exemplarisch ein Foto von dem eingebauten *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor in der Messzelle.

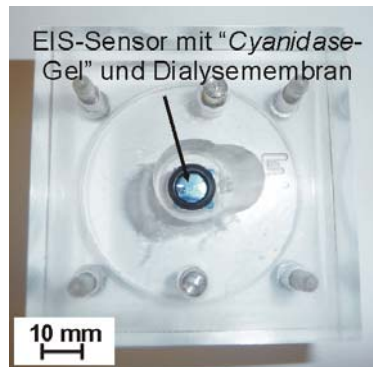


Abb. 4.21: Foto der Messzelle mit einem eingebauten *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor.

4.1.2.3. Elektrochemische Charakterisierung

Im Hinblick auf die Funktionalität und die intrinsischen Sensorparameter werden die hergestellten *Cyanidase*-basierten EIS-Sensoren in Cyanid-haltigen Lösungen mittels C/V- und ConCap-Messungen elektrochemisch charakterisiert. Diese Messungen werden bei einer Frequenz von 30 Hz in einem Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl in einem KCN-Konzentrationsbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l (bei Raumtemperatur) durchgeführt. Die *Cyanidase* setzt Cyanid zu Ammoniak und Formiat katalytisch um, was in einer lokalen pH-Wert-Verschiebung resultiert. Da die theoretisch berechnete Verschiebung des pH-Wertes aufgrund der enzymatischen Katalyse sehr gering ist, wird für eine möglichst hohe Signalausbeute eine kleine Puffermolarität des Na-P-Puffers gewählt, um die geringen pH-Wert-Unterschiede mit Hilfe der pH-sensitiven EIS-Struktur kapazitiv erfassen zu können. Der pH-Wert des Puffers und die Temperatur werden so gewählt, dass die *Cyanidase* möglichst nahe an ihrem pH- und Temperaturoptimum (pH 8,5 und 30 °C) aktiv ist [68,69,234]. In den Optima zeigen Enzyme die höchste Aktivität, jedoch auch eine geringe Stabilität [147,148,153]. Darüber hinaus werden die pH-sensitiven EIS-Strukturen noch zusätzlich mittels Silikon in der Messzelle verkapselt, um somit Diffusionseffekte durch die Dialysemembran in die Bereiche außerhalb des O-Ringes zu vermeiden (s. Abb. 4.8 in Kap. 4.1.1.2). Da mit steigender KCN-Konzentration sich auch der pH-Wert der Messlösung leicht erhöht, d.h. sich unabhängig von der enzymatischen Katalyse mit der CN^- -Ionenkonzentration ändert, werden die elektrochemischen Messungen mit dem *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor in einer Differenzanordnung durchgeführt. Jede Messung wird mit einem pH-sensitiven Ta_2O_5 -EIS-Sensor mit „*Cyanidase*-Gel“ und Dialysemembran (ohne Enzym) und dem gleichen Sensor jedoch nur mit „Gel“ und Dialysemembran gemacht. Die Signalverschiebung, die durch die enzymatische Katalyse von Cyanid entsteht, wird als Differenz der Messsignale (Differenzspannung) von der EIS-Struktur mit und ohne *Cyanidase* berechnet. Die Differenzmessungen werden sequentiell mit jeweils

der gleichen EIS-Struktur und unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Für den Vergleich der gemessenen Differenzspannungen mit den theoretisch berechneten pH-Wert-Änderungen (s. Tab. 2.3 in Kap. 2.3.2) wird aus den Charakterisierungen der pH-Sensitivität einer Ta₂O₅-EIS-Struktur mit zusätzlichen „Schichten“ die pH-Sensitivität von 36,5 mV/pH eingesetzt (s. Tab. 4.4 in Kap. 4.1.1.2).

Während der Messung mit dem Biosensor werden sowohl der pH-Wert als auch die Leitfähigkeit der Messlösung mit Hilfe einer kommerziellen pH-ISE und Leitfähigkeitselektrode (Typ: MPC 227 der Firma Mettler Toledo) überprüft (s. Tab. 4.5). Die spezifische Leitfähigkeit variiert nur geringfügig von 20,0 mS/cm bis 20,1 mS/cm und der pH-Wert steigt mit steigender CN⁻-Ionenkonzentration von pH 7,47 bis pH 8,08.

Tab 4.5: pH-Werte und spezifische Leitfähigkeiten von den Messlösungen für den *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor.

	10 µmol/l KCN	0,1 mmol/l KCN	0,25 mmol/l KCN	0,5 mmol/l KCN	0,75 mmol/l KCN	1 mmol/l KCN
pH-Wert	7,47	7,54	7,68	7,78	7,90	8,08
spezifische Leitfähigkeit in mS/cm	20,0	20,0	20,1	20,1	20,1	20,1

Die elektrochemische Charakterisierung der *Cyanidase*-basierten EIS-Struktur soll exemplarisch am Beispiel einer Ta₂O₅-EIS-Struktur mit 25 mg NHS-aktivierter SepharoseTM, mit und ohne *Cyanidase* und Dialysemembran gezeigt werden. Abb. 4.22 stellt die C/V-Messungen von dem EIS-Sensor, mit und ohne *Cyanidase*, in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl in einem Spannungsbereich von -1,5 V bis 1,5 V dar. Beide Messungen zeigen einen charakteristischen C/V-Kurvenverlauf für p-dotierte EIS-Strukturen. Die C/V-Kurven liegen sehr gut übereinander. Die Maximalkapazität im Anreicherungsbereich beträgt 36-37 nF und ist somit niedriger als die theoretisch erwartete Maximalkapazität von 44 nF für eine Ta₂O₅-Sensorstruktur mit einer sensitiven Fläche von 8 mm im Durchmesser. Aufgrund der zusätzlichen Verkapselung wird die sensitive Fläche um ca. 1 mm im Durchmesser verkleinert. Die berechnete Maximalkapazität (s. Gl. 2.30 in Kap. 2.2.3.2) für eine solche Sensorfläche von 38 mm² resultiert in 34 nF und ist somit in guter Übereinstimmung mit dem experimentellen Wert.

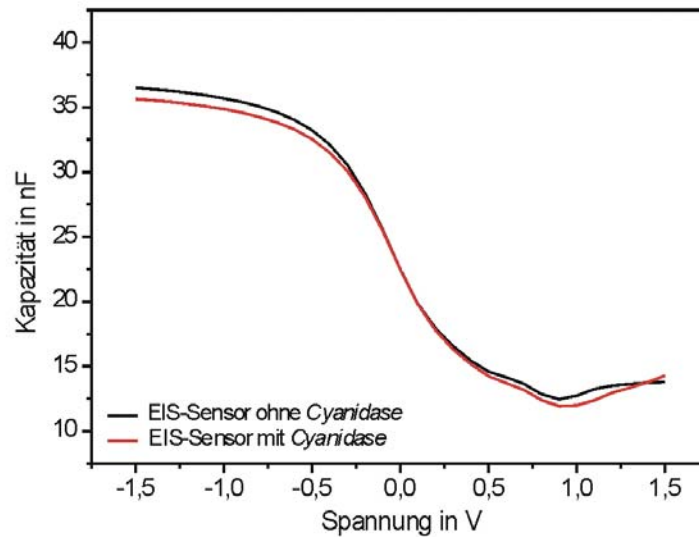


Abb. 4.22: C/V-Kurven von einem Ta_2O_5 -EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter SepharoseTM, mit und ohne *Cyanidase*.

Für die dynamischen ConCap-Messungen wird die Kapazität auf 27 nF eingestellt. Die Messdauer für die jeweiligen Analytlösungen beträgt 10 min. Abb. 4.23 zeigt exemplarisch ConCap-Messungen mit einer EIS-Struktur mit und ohne *Cyanidase* für verschiedene KCN-Konzentrationen.

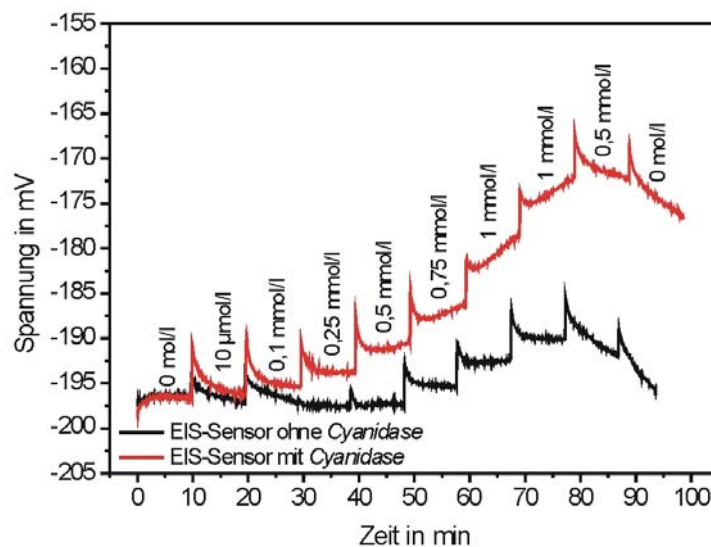


Abb. 4.23: ConCap-Messung von einem Ta_2O_5 -EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter SepharoseTM, mit und ohne *Cyanidase*, in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l.

Zur Ermittlung der Differenzspannung werden die beiden ConCap-Kurven auf den gleichen Spannungswert bei der Messung im Puffer ohne KCN-Konzentration normiert. Beide Messkurven zeigen einen Anstieg des Messsignals, d.h. eine Erhöhung des pH-Wertes, mit steigender KCN-Konzentration. Bei der elektrochemischen Charakterisierung der pH-sensitiven EIS-Strukturen in pH-

Standardlösungen wurde bereits gezeigt, dass mit steigendem pH-Wert der Messlösung sich die gemessene Spannung erhöht (Kap. 4.1.1.2). Aus Abb. 4.23 wird für die Messung mit dem EIS-Sensor ohne *Cyanidase* ab KCN-Konzentrationen $\geq 0,5$ mmol/l ein Anstieg von etwa 2 mV pro Konzentration gemessen, was einer pH-Wert-Änderung von 0,07 pH entspricht. Die pH-Messungen mit der pH-ISE und die theoretischen Berechnungen der pH-Wert-Änderung bei den KCN-Konzentrationen in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l zeigen maximale Änderungen von ca. 0,02 pH (s. Tab. 2.2 in Kap. 2.3.2). Diese Differenz zwischen den experimentellen und theoretischen Werten bzw. Messungen mit der pH-ISE können mittels möglicher Anreicherungseffekte von KCN an der Sensoroberfläche aufgrund der „Gel-Schicht“ erklärt werden. Die Hysterese für den Feldeffekt-Sensor ohne *Cyanidase* beträgt max. 2 mV im gemessenen KCN-Konzentrationsbereich und die Ansprechzeit variiert zwischen 1-2 min mit steigender CN^- -Ionenkonzentration und bis zu 10 min mit sinkender CN^- -Ionenkonzentration. Diese Effekte sind ebenfalls auf Diffusionseffekte in der relativ dicken „Gel-Schicht“ zurückzuführen. Die ConCap-Messungen mit der *Cyanidase*-basierten EIS-Struktur zeigen für steigende KCN-Konzentrationen deutlich höhere Spannungssignale als die Messung ohne *Cyanidase*. Darüber hinaus wird für KCN-Konzentrationen ab $\geq 0,5$ mmol/l ein stetig steigendes Signal beobachtet, was auf die Katalyse von Cyanid durch die *Cyanidase* und somit auf eine dynamische Änderung des pH-Wertes zu höheren Werten zurückzuführen ist. Die Differenz zwischen den Signalen der Messungen mit Enzym und Messungen ohne Enzym nimmt mit steigender Cyanidkonzentration zu. Die Hysterese für den Biosensor ist max. 17 mV im gemessenen KCN-Konzentrationsbereich, die Ansprechzeit beträgt zwischen 1-2 min für kleine CN^- -Ionenkonzentrationen (bei steigender Cyanidkonzentration) und bis zu 10 min für höhere CN^- -Ionenkonzentrationen. Dieses Verhalten des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors kann ebenfalls mit Hilfe von Anreicherungseffekten der Edukte und Produkte an der Sensoroberfläche aufgrund der relativ dicken „Enzym-Gelschicht“ erklärt werden.

Für die Evaluierung des Signals, das bei der enzymatischen Katalyse von Cyanid durch die *Cyanidase* entsteht, werden die Differenzspannung aus den beiden ConCap-Messungen berechnet und die Kalibrierkurve ermittelt. Abb. 4.24 zeigt die zu Abb. 4.23 dazugehörige Sensitivitätskurve im direkten Vergleich zu den theoretisch berechneten Differenzspannungswerten im Kap. 2.3.2 (Tab. 2.3 und mittels „Visual MINTEQ“). Mit steigender KCN-Konzentration erhöht sich die Differenzspannung und korreliert somit gut mit den berechneten Signaländerungen. Für den CN^- -Ionenkonzentrationsbereich von 0,25 mmol/l bis 1 mmol/l zeigt die Differenzanordnung des *Cyanidase*-Biosensors eine Sensitivität von 14,3 mV/pCN. Die untere Nachweisgrenze beträgt 200 $\mu\text{mol/l}$ KCN. Die berechneten Kalibrierkurven in Kap. 2.3.2 sowie mit dem Programm „Visual MINTEQ“ resultieren in nahezu identischen Sensitivitäten von 13,6 mV/pCN bzw. 15,8 mV/pCN. Die unteren Nachweisgrenzen betragen 240 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 300 $\mu\text{mol/l}$ KCN.

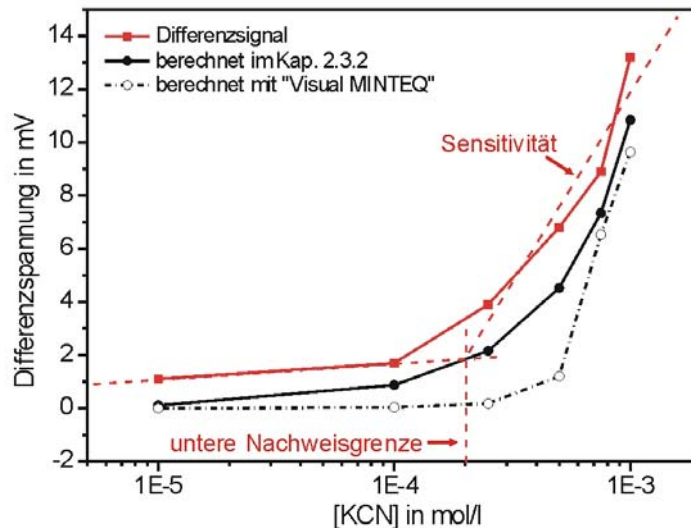


Abb. 4.24: Kalibrierkurve der Differenzspannung aus den ConCap-Messungen von einem Ta₂O₅-EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter SepharoseTM, mit und ohne *Cyanidase*, im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 µmol/l bis 1 mmol/l im Vergleich zu berechneten Kalibrierkurven (s. Kap. 2.3.2).

Um die Reproduzierbarkeit des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors darzustellen, zeigt Abb. 4.25 exemplarisch die Kalibrierkurven aus drei aufeinander folgenden Messungen. Im Vergleich zur Messung Nr. 1 zeigen die Messungen Nr. 2 und Nr. 3 eine Sensitivität von 14,1 mV/pCN bzw. 10,7 mV/pCN im KCN-Konzentrationsbereich von 0,25 mmol/l bis 1 mmol/l. Die unteren Nachweisgrenzen betragen jeweils 200 µmol/l und 150 µmol/l. Sowohl die Sensitivitäten als auch die unteren Nachweisgrenzen stimmen gut mit der ersten Messung überein. Die leicht abnehmende Sensitivität im Falle von Messung Nr. 3 im Vergleich zur ersten Messung wird auf die abnehmende *Cyanidase*-Aktivität bei Lagerung des Enzyms bei Raumtemperatur zurückgeführt.

Wie in Kap. 4.1.2.1 dargestellt, wird die *Cyanidase* sowohl an NHS-aktivierte SepharoseTM als auch an Eupergit C® kovalent immobilisiert. Da beide „Gel-Kügelchen“ unterschiedlich große Durchmesser besitzen, sollen somit unterschiedlich große Reaktionsräume für die *Cyanidase* auf dem pH-sensitiven EIS-Chip realisiert und deren Einfluss auf das Signal des Biosensors untersucht werden.

Das Verhältnis der Reaktionsräume ist schematisch in Abb. 4.26 dargestellt und wird über die Berechnung eines Kegelvolumens angenähert (Gln. 4.1).

$$V_{\text{Reaktionsraum}} = \frac{1}{3} \pi r^2 * h \quad \text{Gln. 4.1}$$

Hierbei sind $V_{\text{Reaktionsraum}}$ das Volumen, r der Radius der Kreisfläche und h die Höhe des Kegelvolumens.

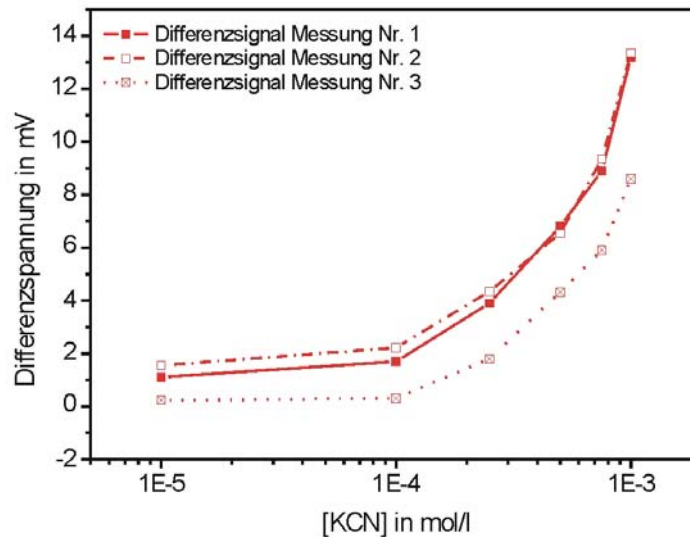


Abb. 4.25: Kalibrierkurven der Differenzspannung aus drei aufeinander folgenden ConCap-Messungen mit einem Ta₂O₅-EIS-Sensor mit 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™, mit und ohne *Cyanidase*, im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 µmol/l bis 1 mmol/l.

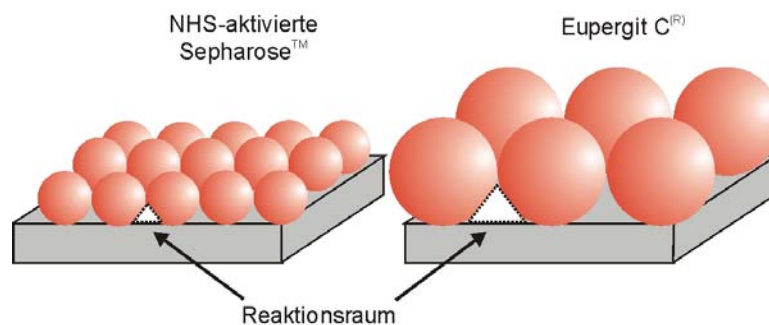


Abb. 4.26: Schematische Darstellung von Reaktionsräumen eines EIS-Sensors a) mit NHS-aktivierter Sepharose™ und b) mit Eupergit C®.

Berechnungen der Reaktionsräume für die erste Schicht eines „Enzym-Gels“ auf einer kreisförmigen Sensorfläche mit dem Durchmesser von 7 mm ergeben für NHS-aktivierter Sepharose™ und Eupergit C® Reaktionsvolumina von 0,75 mm² bzw. 1,68 mm². Hierbei werden für r und h jeweils der Radius der „Gel-Kügelchen“ von 45 µm oder 100 µm eingesetzt und der Kontakt der „Kügelchen“ zum Chip als Punkt betrachtet.

Die Kalibrierkurven der Messungen mit 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™ und 25 mg Eupergit C®, mit und ohne *Cyanidase*, sind in Abb. 4.27 dargestellt. Die Messung mit Eupergit C® resultiert in einer Sensitivität von 4,3 mV/pCN im KCN-Konzentrationsbereich von 0,25 mmol/l bis 1 mmol/l. Das bedeutet, dass diese Differenzanordnung lediglich 30% der Sensitivität im Vergleich zu Messungen mit NHS-aktivierter Sepharose™, mit und ohne *Cyanidase*, besitzt. Diese Untersuchungen wurden acht Tage nach der Immobilisierung der *Cyanidase* an Eupergit C® durchgeführt. Somit muss für die Auswertung der Messung der

Aktivitätsverlust von immobilisierter *Cyanidase* an Eupergit C® berücksichtigt werden. Nach acht Tagen wird ein Enzymaktivitätsverlust von 37% gemessen (s. Abb. 4.17 in Kap. 4.1.2.1). Unter Berücksichtigung der Enzymstabilität ergibt sich somit eine Sensitivität von ca. 7 mV/pCN, die etwa 50% kleiner ist, als die gemessene Sensitivität mit der EIS-Struktur mit 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™. Dies lässt darauf schließen, dass bei kleinen Reaktionsräumen größere Sensorsignale resultieren, denn bei kleineren Reaktionsräumen befinden sich die Produkte näher an der Sensoroberfläche als bei größeren Reaktionsvolumina. Diese Beobachtung stimmt auch gut mit Untersuchungen in der Literatur überein [263].

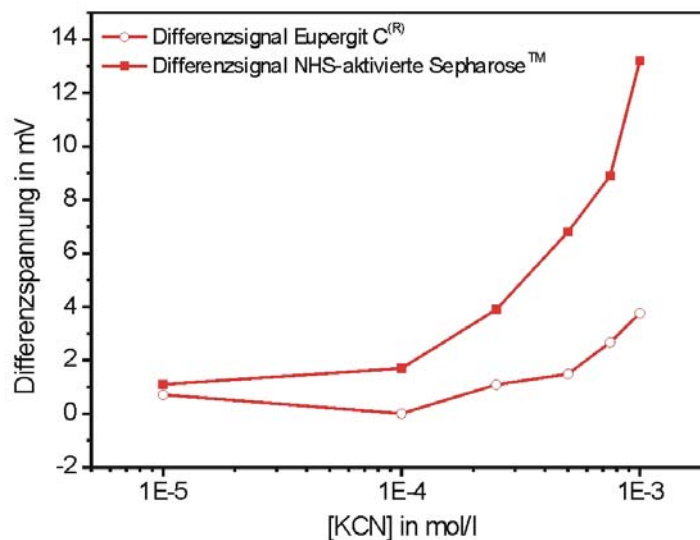


Abb. 4.27: Kalibrierkurven der Differenzspannungen aus ConCap-Messungen von einem Ta₂O₅-EIS-Sensor mit 25 mg Eupergit C® und 25 mg NHS-aktivierter Sepharose™ mit und ohne *Cyanidase*, in Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit KCN-Konzentrationen von 10 µmol/l bis 1 mmol/l.

Im Hinblick auf den Einsatz des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors für die Erfassung von weiteren Cyaniden wird die Selektivität der immobilisierten *Cyanidase* an NHS-aktivierter Sepharose™ mit Hilfe von Enzymaktivitätsmessungen untersucht. Darüber hinaus wird der Einfluss von Schwermetallen in Cyanid-haltigen Lösungen auf die Aktivität der *Cyanidase* überprüft. Abb. 4.28 zeigt verschiedene Enzymaktivitätskurven von immobilisierten *Cyanidase* in einer 10 mmol/l KCN-, einer 10 mmol/l Kaliumhexacyanidoferrat III- (K₃Fe(CN)₆⁻) und einer 10 mmol/l Kaliumthiocyanat- (KSCN-) Lösung. In der KCN-Lösung kann eine Enzymaktivität von 0,3 µmol/min gemessen werden, während bei den anderen Cyanidlösungen keine Aktivität der *Cyanidase* erfasst wird. Das heißt, die *Cyanidase* kann sowohl kein Hexacyanoferrat III als auch kein Thiocyanat katalytisch umsetzen. Da Enzyme von Schwermetallen inhibiert werden können, wird in einem weiteren Experiment mit der immobilisierten *Cyanidase* der Einfluss von unterschiedlichen Cu²⁺-Konzentrationen auf die Enzymaktivität überprüft (Abb. 4.28). Bei der Zugabe von 10 µmol/l und 0,1 mmol/l Cu²⁺-Ionen sinkt die Enzymaktivität minimal von

0,3 $\mu\text{mol}/\text{min}$ ohne Cu^{2+} -Ionen auf 0,28 $\mu\text{mol}/\text{min}$ mit 0,1 mmol/l Cu^{2+} -Ionen. Daraus resultiert, dass die Cu^{2+} -Ionen im untersuchten Konzentrationsbereich keinen singnifikanten Einfluss auf die *Cyanidase*-Aktivität aufweisen.

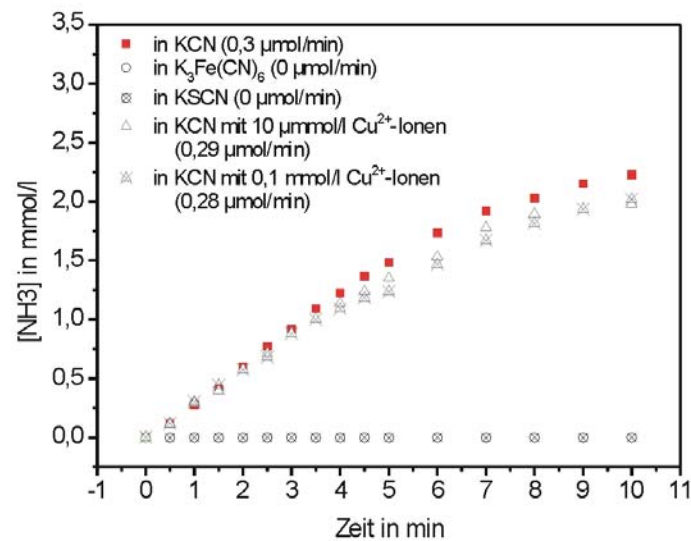


Abb. 4.28: Enzymaktivitätskurven mit NHS-aktivierter Sepharose™ mit *Cyanidase* in 10 mmol/l KCN-, 10 mmol/l $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - und 10 mmol/l KSCN-Lösung, sowie in einer 10 mmol/l KCN-Lösung mit 10 $\mu\text{mol}/\text{l}$ bzw. 0,1 mmol/l Cu^{2+} -Ionen.

4.2. Ag-basierte ISE

Über die Entwicklung eines kapazitiven Biosensors hinaus, werden im Rahmen dieser Arbeit potentiometrische Ag-basierte ISEs für die Erfassung von Cyanid in Flüssigkeiten entwickelt. Im Vergleich zu Biosensoren haben solche Chemosensoren oftmals eine höhere Stabilität und einen größeren linearen Messbereich. Für die Cyaniderfassung werden Ag-basierte Halogenid-ISEs und Ag-basierte Chalkogenidglas-ISEs physikalisch und elektrochemisch charakterisiert (s. nachfolgende Kapitel).

4.2.1. Ag-Halogenid-ISE

ISEs auf Ag-Halogenidbasis wurden vor mehr als 40 Jahren für die Cyaniderfassung eingeführt. Als Cyanid-sensitive Membran wird bevorzugt eine AgI-Membran eingesetzt. Jedoch wird auch gezeigt, dass weitere Ag-Halogenide, wie AgCl und AgBr, für die Messung von Cyanid verwendet werden können [86-90]. Darüber hinaus werden die Ag-Halogenid-Membranen häufig als relativ „dicke“ Membranen, beispielsweise als Presslinge aus AgI/Ag₂S, hergestellt, da sie bei der Messung von Cyanid partiell korrodieren [93,98,99]. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit werden Ag-Halogenid-ISEs auf Basis von Ag/AgCl-Membranen auf Si-Chips mittels Dickschichttechnik für die Cyaniderfassung hergestellt und charakterisiert. Diese Ag/AgCl-Sensoren sind auf der einen Seite relativ „dünne“ und kleine Sensoren im Vergleich zu kommerziellen Cyanid-ISEs auf Ag-Halogenidbasis mit einer 1 cm dicken Membran; die Membranschicht der Ag/AgCl-ISE hat eine Dicke von 300 µm und eine sensitive Fläche von 50 mm². Auf der anderen Seite sind sie direkt kompatibel zur Siliziumtechnologie. In den kommenden Unterkapiteln sollen die physikalische Charakterisierung (im Hinblick auf Morphologie, Topologie und Homogenität) und die elektrochemische Charakterisierung der Ag/AgCl-ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen auf ihre intrinsischen Sensorparameter vorgestellt werden. Die elektrochemische Charakterisierung der hergestellten Sensoren erfolgt im direkten Vergleich zur kommerziellen Cyanid-ISE mit der AgI/Ag₂S-Membran.

4.2.1.1. Physikalische Charakterisierung

Für eine definierte Funktionalität der Ag/AgCl-ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen ist eine geschlossene, dichte und homogene Cyanid-sensitive Membran von Bedeutung. Daher wird die Ag/AgCl-Membran der prozessierten Sensoren mittels Videomikroskopie und REM bezüglich Homogenität, Morphologie und Topologie hin untersucht. Darüber hinaus werden optische Veränderungen der Membran nach dem

Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen verfolgt. Abb. 4.29 a) und Abb. 4.29 b) zeigen typische REM-Aufnahmen der Ag/AgCl-Membran mit jeweils einer 1.000-fachen und 50.000-fachen Vergrößerung. Wie man aus Abb. 4.29 a) entnehmen kann, hat die Ag/AgCl-Membran eine „blättrartige“ Struktur, die auf die Pastenzusammensetzung und die Herstellungsmethode der Membran, d.h. ein mehrfaches Aufbringen der Ag/AgCl-Paste und Trocknen derselben, zurückzuführen ist. Die Schicht ist relativ homogen und über mehrere Lagen der „Ag/AgCl-Blätter“ übereinander dicht und geschlossen. Bei weiterer Vergrößerung (s. Abb. 4.29 b)) kann eine „gelartige“ Matrix zwischen den „Ag/AgCl-Blättern“ beobachtet werden.

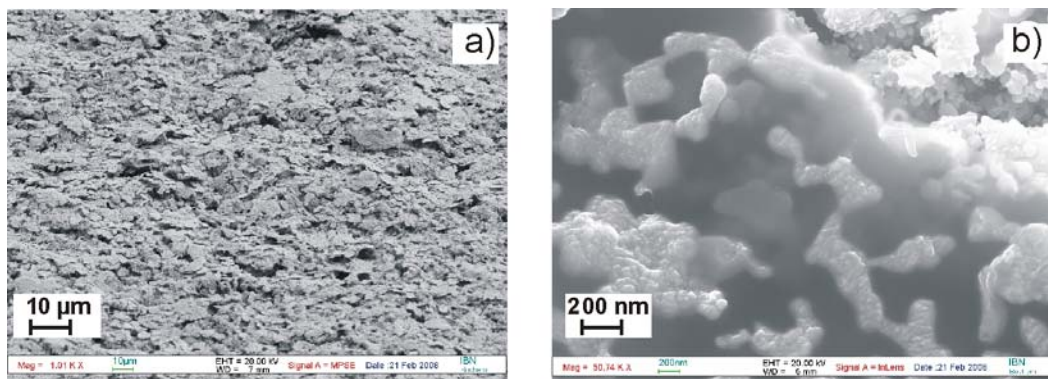


Abb. 4.29: REM-Aufnahmen von einer Ag/AgCl-Membran mit a) einer 1.000-fachen Vergrößerung und b) einer 50.000-fachen Vergrößerung.

Darüber hinaus wird die Ag/AgCl-Membran vor und nach dem Kontakt mit Cyanid-haltiger Lösung mit Hilfe der Videomikroskopie untersucht. Abb. 4.30 a) und Abb. 4.30 b) zeigen exemplarisch videomikroskopische Aufnahmen mit einer 25-fachen Vergrößerung einer Ag/AgCl-Membran jeweils direkt nach der Herstellung des Sensors und nach 14 Wochen Messzeit in 0,1 mol/l KNO_3^- , pH 11,5, Lösungen mit unterschiedlichen KCN-Konzentrationen.

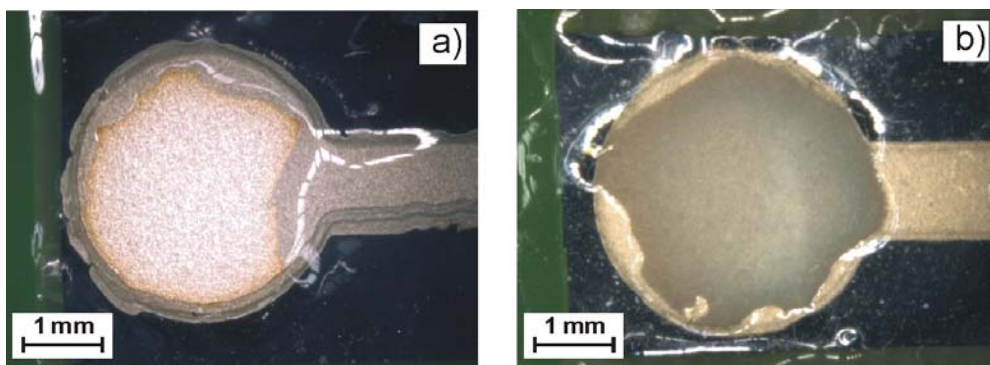


Abb. 4.30: Videomikroskopische Aufnahmen von einer Ag/AgCl-Membran mit 25-facher Vergrößerung a) vor dem Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen und b) nach 14 Wochen Messung in Cyanid-haltigen Lösungen.

Vor dem Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen hat die ISE eine homogene, geschlossene und weiße Ag/AgCl-Schicht. Nach dem Gebrauch der ISE für Cyanidmessungen ist diese Schicht immer noch homogen und geschlossen, jedoch hat sich die Farbe der Ag/AgCl-Membran von weiß zu silber verändert. Bei den Messungen in Cyanidlösungen werden aufgrund des Messmechanismus der Ag-Halogenid-ISE Cl-Ionen aus der Membran gelöst und aus der Ag/AgCl-Membran wird sukzessive eine Ag-Membran. Dies führt zu einer Silberfärbung der Membran. Diese Beobachtungen korrelieren gut mit Ergebnissen aus den elektrochemischen Untersuchungen, die im folgenden Kapitel beschrieben werden.

4.2.1.2. Elektrochemische Charakterisierung

Im Hinblick auf die intrinsischen Sensorparameter, wie Sensitivität, linearer Messbereich, untere Nachweisgrenze, Ansprechverhalten, Hysterese, Drift, Stabilität und Selektivität, werden die hergestellten Ag/AgCl-ISEs mit Hilfe der ionenselektiven Potentiometrie charakterisiert. Die elektrochemischen Messungen werden in einer Hintergrundlösung 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, im Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ bis zu 1 mmol/l bzw. 10 mmol/l KCN durchgeführt. Hierbei soll über die relativ hohe Molarität der Hintergrundlösung eine möglichst konstante Leitfähigkeit bei unterschiedlichen CN^- -Ionenkonzentrationen gewährleistet sein. Beim gewählten pH-Wert der Hintergrundlösung liegen ca. 99,4% des Cyanids in Form von CN^- -Ionen in der Lösung vor (s. Gl. 2.57 in Kap. 2.3.2) und können somit direkt von der Ag-Halogenid-ISE erfasst werden. Für die Validierung der relativ „dünnen“ Ag/AgCl-ISEs auf Siliziumbasis wird die elektrochemische Charakterisierung im direkten Vergleich mit einer kommerziellen Bulk-Cyanid-ISE mit einer AgI/Ag₂S-Membran durchgeführt.

Vor der elektrochemischen Charakterisierung der Ag-basierten ISEs werden sowohl der pH-Wert als auch die spezifische Leitfähigkeit der Messlösungen mit Hilfe einer kommerziellen pH-ISE und Leitfähigkeitselektrode überprüft. Die Ergebnisse für den relevanten Cyanidkonzentrationsbereich sind in Tab. 4.6 zusammengefasst.

Tab. 4.6: pH-Werte und spezifische Leitfähigkeitswerte der Messlösungen für die Ag-basierten ISEs.

	0,1 $\mu\text{mol/l}$ KCN	1 $\mu\text{mol/l}$ KCN	10 $\mu\text{mol/l}$ KCN	0,1 mmol/l KCN	1 mmol/l KCN	10 mmol/l KCN
pH-Wert	11,54	11,56	11,56	11,57	11,57	11,58
spezifische Leitfähigkeit in mS/cm	12,20	12,21	12,19	12,20	12,31	13,33

Der pH-Wert der Lösungen ist konstant zwischen pH 11,54 und pH 11,58. Die spezifische Leitfähigkeit erhöht sich für die KCN-Konzentration von 1 mmol/l um 1% und für 10 mmol/l um 10%. Somit sind beide Parameter annähernd konstant und können für die Interpretation der Sensorsignale vernachlässigt werden.

Abb. 4.31 zeigt die charakteristischen Messkurven der kommerziellen Bulk-ISE und des Ag/AgCl-Sensors in Abhängigkeit von der Cyanidkonzentration. Mit steigender Cyanidkonzentration sinkt die gemessene Spannung und mit sinkender Cyanidkonzentration steigt das Messsignal. Für alle gemessenen Cyanidkonzentrationen erreichen beide Sensoren schon nach maximal drei Minuten ein konstantes Signal.

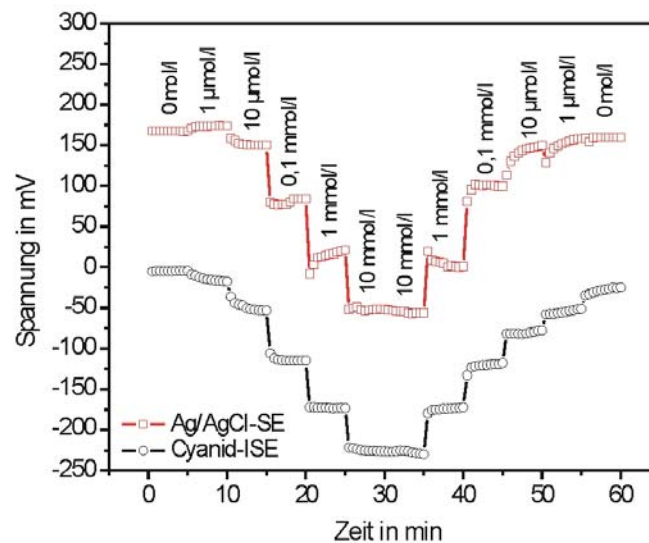


Abb. 4.31: Messkurven von Kalibriermessungen mit einer Ag/AgCl-ISE und einer kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, mit KCN-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l (Messzeit: jeweils 5 min).

Aus den Messkurven werden die Sensitivität, der lineare Messbereich und die untere Nachweisgrenze anhand der Kalibrierkurven ermittelt, die in Abb. 4.32 dargestellt sind. Im linearen Messbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l zeigen die Ag/AgCl-ISE eine Sensitivität von 61 mV/pCN und die kommerzielle Cyanid-ISE eine Sensitivität von 59 mV/pCN. Die unteren Nachweisgrenzen betragen jeweils 5,5 $\mu\text{mol/l}$ (Ag/AgCl-ISE) bzw. 2,0 $\mu\text{mol/l}$ Cyanid (kommerzielle Cyanid-ISE). Die Sensitivitäten korrelieren gut mit der theoretisch zu erwartenden Nernstempfindlichkeit von 59 mV/Dekade für Ag-Halogenid-Sensoren in Cyanid-haltigen Lösungen [86,87]. Sowohl der lineare Messbereich als auch die unteren Nachweisgrenzen beider ISEs sind vergleichbar und stimmen gut mit den Herstellerangaben für die kommerzielle Cyanid-ISE und Werten aus der Literatur überein [93-96,264].

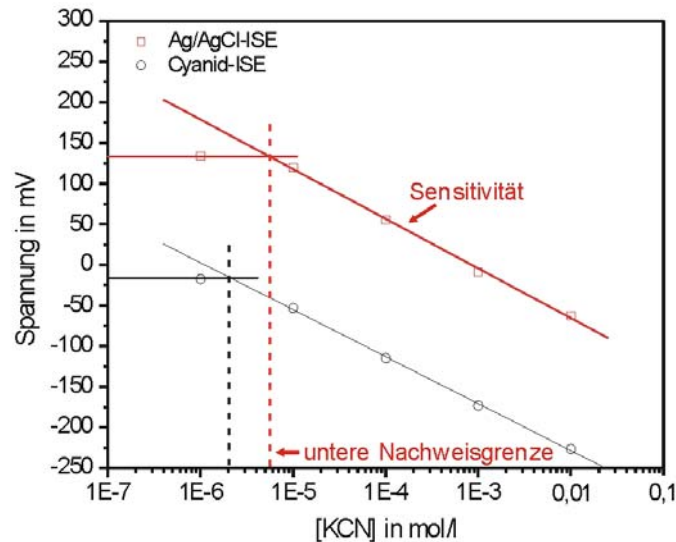


Abb. 4.32: Kalibriergraphen aus den Messkurven der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, mit KCN-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l.

Darüber hinaus kann aus den Messkurven die Hysterese der Ag-Halogenid-ISEs bestimmt werden (s. Abb. 4.33). Diese wird als Differenz der Messspannung mit sinkender und steigender KCN-Konzentration bestimmt. Im linearen Messbereich der ISE beträgt die Hysterese für die kleinste gemessene Konzentration im linearen Messbereich jeweils 1 mV (Ag/AgCl-ISE) und 25 mV (kommerzielle Cyanid-ISE) (10 $\mu\text{mol/l}$ Cyanid) und für die größte gemessene CN^- -Ionenkonzentration jeweils 4 mV für die Ag/AgCl-ISE und kommerzielle Cyanid-ISE.

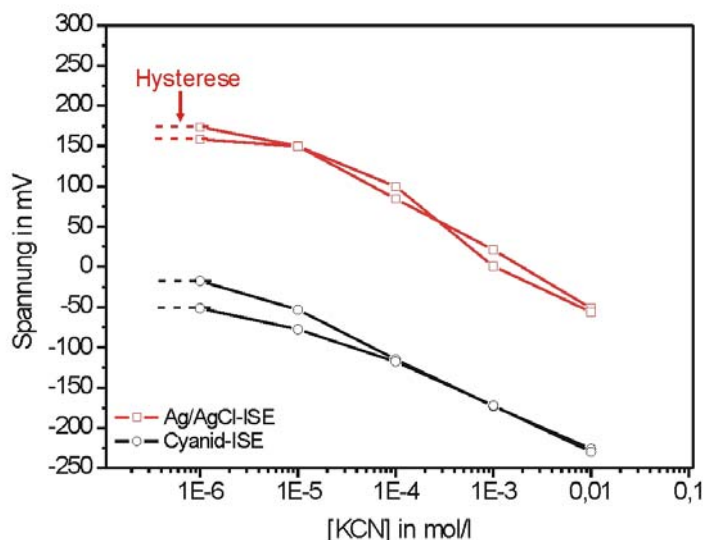


Abb. 4.33: Bestimmung der Hysterese aus den Messkurven der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, mit KCN-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l.

Für die Bestimmung der Ansprechzeit ($t_{90\%}$) werden die Sensoren für jeweils 10 min in einer 0,1 mmol/l und anschließend in einer 1 mmol/l KCN-Lösung vermessen. Zur Erhöhung der Konzentration wird das Standardadditionsverfahren verwendet, so dass die Sensoren für den Wechsel der CN^- -Ionenkonzentration nicht aus der Analytlösung heraus genommen werden müssen und somit vernachlässigbare, zeitliche Verzögerungen der Messung entstehen. Abb. 4.34 zeigt die Messkurven der beiden Ag-Halogenid-Sensoren für die Bestimmung der Ansprechzeit ($t_{90\%}$). Der Ag/AgCl-Sensor benötigt 25 s und die Cyanid-ISE 120 s, um 90% des stabilen Messsignals zu erreichen. Die schnelle Ansprechzeit der Ag/AgCl-ISE kann auf die Schichtdicke der Membran zurückgeführt werden, die ca. 30-mal kleiner ist, als die Membrandicke der kommerziellen Cyanid-ISE (1 cm).

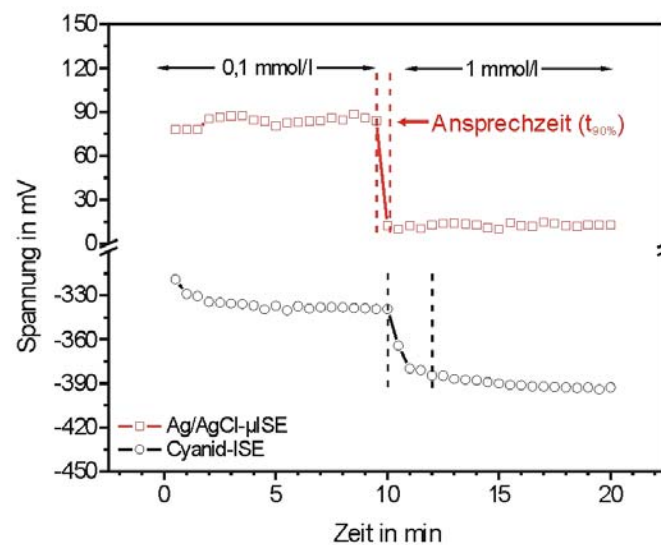


Abb. 4.34: Bestimmung der Ansprechzeit ($t_{90\%}$) der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE.

Die Drift der Ag-basierten Sensoren wird in einer kontinuierlichen Messung in der Hintergrundlösung für insgesamt 11 h charakterisiert und ist in Abb. 4.35 gezeigt. Die kommerzielle Cyanid-ISE besitzt ein relativ stabiles Sensorsignal über die gesamte Dauer mit einer Drift von 0,01 mV/min. Die Dickschicht Ag/AgCl-ISE resultiert in den ersten drei Stunden der Messung in einem stark verrauschten Signal und zeigt nach drei Stunden eine Drift von 0,07 mV/min. Diese Schwankungen des Spannungssignals lassen sich auf die partielle Korrosion der dünnen Sensorschicht zurückführen.

Im Hinblick auf einen „Vor-Ort“-Einsatz der Ag-Halogenid-ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen wird die Stabilität der Sensoren untersucht. Hierbei werden Kalibriermessungen mit den beiden ISEs in Cyanidkonzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l in definierten Zeitabständen durchgeführt und die Stabilität der Sensoren anhand der Sensitivitäten ermittelt. Abb. 4.36 zeigt die Stabilitätsmessungen der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE. Hierbei werden die mittleren Sensitivitäten der ISEs als Funktion der Messwochen aufgetragen.

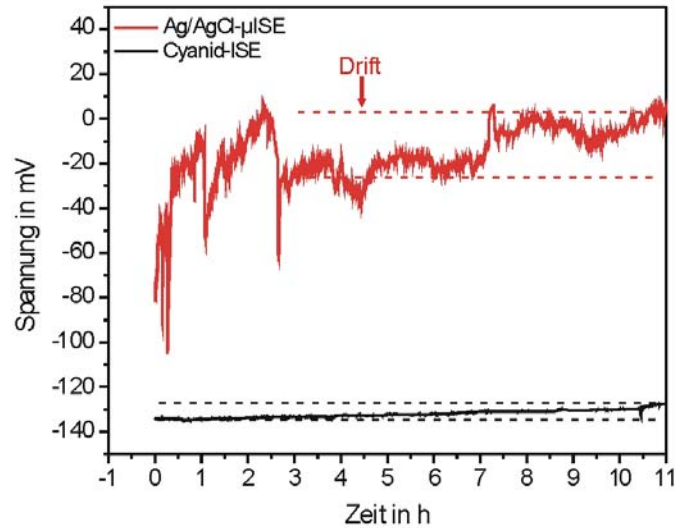


Abb. 4.35: Bestimmung der Drift der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5.

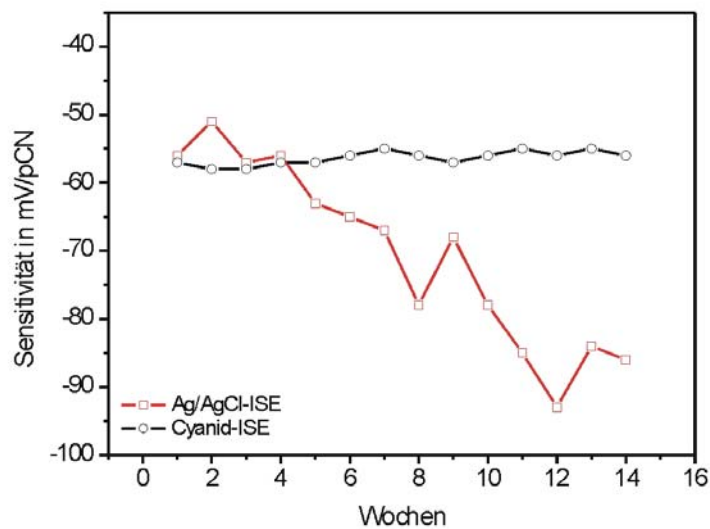


Abb. 4.36: Bestimmung der Stabilität der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE aus Kalibriermessungen in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, mit einem KCN-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l.

Die Sensitivität der hergestellten Ag/AgCl-ISE steigt von 56 mV/pCN auf 85 mV/pCN nach 14 Wochen Messzeit. Im Gegensatz dazu resultiert die kommerzielle Cyanid-ISE nach 14 Wochen in einer konstanten Sensitivität zwischen 55 mV/pCN und 58 mV/pCN. Das zeitlich stabilere Verhalten der kommerziellen ISE kann anhand der Membranzusammensetzung (stabile Matrix aus Ag_2S) und anhand der Membranschichtdicke erklärt werden. Die steigende Sensitivität der hergestellten Ag/AgCl-ISE ist auf den Verbrauch von Cl^- -Ionen aus der Membran durch den Messmechanismus zurückzuführen. Dabei sinkt die Cl^- -Ionenkonzentration in der Membran und die Ag/AgCl-Membran wird sukzessiv zu einer Ag-Membran. Messungen mit einer Ag-ISE in Cyanid-haltigen Lösungen in der Literatur zeigen

eine Sensitivität von 113 mV/CN bis 120 mV/pCN [113,114,265]. Darüber hinaus korreliert diese Beobachtung gut mit der Silberfärbung der Membran nach wiederholten Kontakt mit den Cyanidlösungen (s. Abb. 4.30 in Kap. 4.2.1.1).

Die elektrochemischen Messungen werden jeweils 3-mal durchgeführt. Die intrinsischen Sensorparameter für die Ag/AgCl-ISE und die kommerzielle Cyanid-ISE sind in Tab. 4.7 zusammengefasst.

Tab. 4.7: Zusammenfassung der intrinsischen Sensorparameter der Ag/AgCl-ISE und der kommerziellen Cyanid-ISE.

	Ag/AgCl-ISE	Cyanid-ISE
Sensitivität in mV/pCN	62±4	58±1
untere Nachweisgrenze in µmol/l	5,1±0,2	1,9±0,2
lineare Messbereich in µmol/l	10-10.000	10-10.000
Hysterese in mV	1-20	1-25
Ansprechzeit (t_{90%}) in s bei 1 mmol KCN	25±6	125±12
Drift in mV/min	0,07	0,01

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Ag/AgCl-ISE zeigt vergleichbar gute Sensoreigenschaften wie die kommerzielle Cyanid-ISE. Durch ihre relativ dünne sensitive Membran können mit der Ag/AgCl-ISE wesentlich schnellere Ansprechzeiten erreicht werden.

Im Hinblick auf den Einsatz der hergestellten Ag/AgCl-ISEs in realen Cyanid-haltigen Lösungen muss der Einfluss von anderen Ionen (Störionen) in der Messlösung auf das Sensorsignal der Elektrode untersucht werden. Da die Ag-Halogenid-Membranen auch für die Messung von Halogeniden eingesetzt werden können, soll zunächst der Einfluss von Chlorid, Bromid und Iodid auf das Sensorsignal bestimmt werden. Darüber hinaus können Sulfide das Messsignal stark stören, wenn mit Ag-basierten ISEs gemessen wird, denn Sulfide bilden starke Komplexe mit Ag⁺-Ionen [107,109,264]. Zur Bestimmung des Einflusses von Störionen auf die Sensitivität der Ag/AgCl-ISE in Cyanid-haltigen Lösungen werden die Selektivitätskoeffizienten mittels „Fixed interference“-Methode ermittelt. Dabei werden eine bestimmte Störionenkonzentration (c_j) in der Hintergrundlösung eingestellt und die Konzentration des Primärions, d.h. von CN⁻-Ionen, mittels Standardadditionsverfahren erhöht. Aus dem Schnittpunkt der beiden Tangenten an der Kalibrierkurve kann die Konzentration des Primärions (c_i) für die Berechnung des Selektivitätskoeffizienten (K_{ij}) (s. Gl. 2.26 in Kap. 2.2.2) bestimmt werden. Je kleiner der Selektivitätskoeffizient ist, desto kleiner ist der Einfluss des untersuchten Störions auf das Messsignal. Abb. 4.37 zeigt exemplarisch die Kalibrierkurven von Messungen mit einer Ag/AgCl-ISE in CN⁻-Ionenkonzentrationen von 0,1 µmol/l bis 1 mmol/l ohne Störionen und mit 0,1 mmol/l Sulfid (S²⁻) als Störion. Im Vergleich zur

Messung ohne Störionen führen die Sulfidionen zu kleineren Spannungssignalen bei kleinen CN^- -Ionenkonzentrationen und somit zur Verschiebung der unteren Nachweisgrenze in Richtung größerer KCN -Konzentrationen. Aus der eingestellten K_2S -Konzentration und der Cyanidkonzentration im Schnittpunkt der angelegten Tangenten kann eine Selektivitätskonstante von 0,33 für K_2S berechnet werden. Nach gleichem Verfahren werden auch der Einfluss von KBr , KCl und KI auf das Sensorsignal der Ag/AgCl -ISE untersucht. Die dazugehörigen Selektivitätskoeffizienten sind in Tab. 4.8 zusammengefasst.

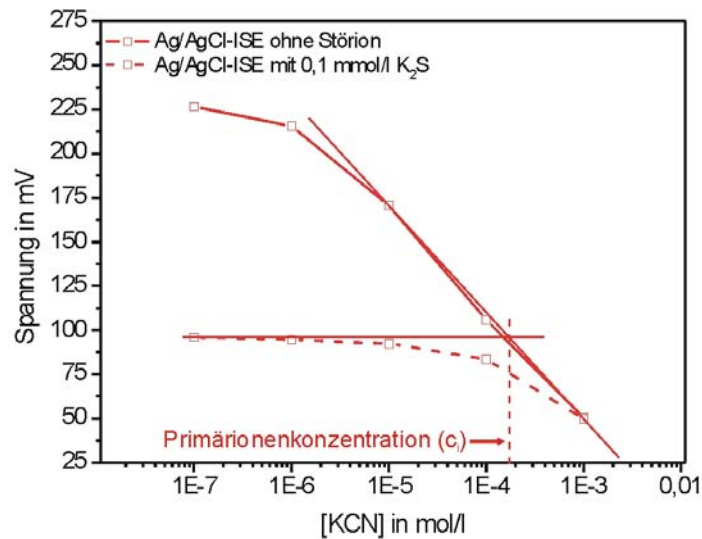


Abb. 4.37: Kalibriergraphen aus Messungen mit der Ag/AgCl -ISE in $0,1 \text{ mol/l KNO}_3$, $\text{pH } 11,5$, im KCN -Konzentrationsbereich von $1 \mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l , ohne Störionen und mit $0,1 \text{ mmol/l K}_2\text{S}$, für die Bestimmung des Selektivitätskoeffizienten.

Tab. 4.8: Zusammenfassung der Selektivitätskoeffizienten, bestimmt nach der „Fixed interference“-Methode, für die Ag/AgCl -ISE.

	KCl	KBr	KI	K_2S
K_{ij}	0,12	0,85	1,3	0,33

KCl und KI zeigen jeweils den kleinsten und größten Einfluss auf das Sensorverhalten der Ag/AgCl -ISE. Für alle untersuchten Störionen kann ein Einfluss auf das Messsignal der Ag/AgCl -ISE festgestellt werden. Dies bedeutet, dass für Cyanidmessungen mit der Ag/AgCl -ISE Halogenide und Sulfide vermieden werden sollen. Darüber hinaus korrelieren diese Ergebnisse gut mit den Löslichkeitskonstanten bzw. den pK_L -Werten von Ag -Halogenid-Verbindungen (s. Tab. 2.4 in Kap. 2.4.1) Je kleiner die Löslichkeitskonstante ist, d.h. je größer der pK_L -Wert ist, desto größer sollte der Einfluss des jeweiligen Störions auf das Messsignal einer Ag -ISE sein.

Im Hinblick auf einen Einsatz der Ag/AgCl-ISE für eine direkte Bestimmung von beispielsweise $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und KSCN werden Kalibriermessungen mit den entsprechenden Cyanidverbindungen durchgeführt. Abb. 4.38 stellt den Vergleich der Kalibrierkurven mit einer Ag/AgCl-ISE in KCN-, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - und KSCN-Lösungen im Konzentrationsbereich von $0,1 \mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l dar. Die Ag/AgCl-ISE zeigt in allen drei verschiedenen Cyanidverbindungen ein konzentrationsabhängiges Signal und resultiert in einer Sensitivität von 41 mV/Dekade für Messungen in $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ - bzw. KSCN-Lösungen und 56 mV/Dekade für Messungen in verschiedenen KCN-Konzentrationen. Die unteren Nachweisgrenzen liegen bei $1,1 \mu\text{mol/l}$ KSCN, $8,3 \mu\text{mol/l}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und bei $3 \mu\text{mol/l}$ KCN. Daraus resultiert, dass die hergestellte Ag-Halogenid-ISE sowohl für Messungen von Cyanidsalzen (KCN) als auch für die Bestimmung von weiteren Cyanidverbindungen wie $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und KSCN, eingesetzt werden kann. R.M. Luna zeigt, dass Ag^+ -Ionen mit SCN^- -Ionen $\text{Ag}(\text{SCN})_2^-$ -Komplexe bilden können [266]. Der $\text{p}K_K$ -Wert des Komplexes ist 12 und somit größer als der $\text{p}K_L$ -Wert einer AgCl-Verbindung von 9,8. Das heißt, dass im Falle der Messung von KSCN solche $\text{Ag}(\text{SCN})_2^-$ -Verbindungen entstehen können, die zu einem Signal an der Ag-Halogenid-ISE führen [267].

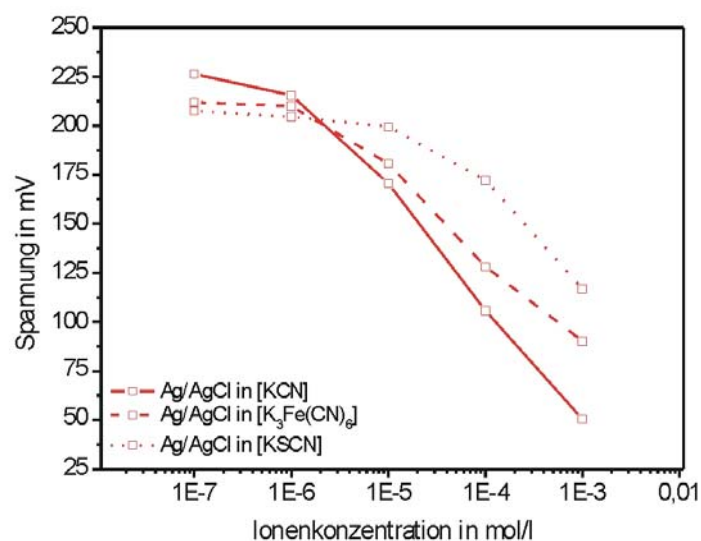


Abb. 4.38: Kalibriergraphen aus Messungen mit einer Ag/AgCl-ISE in $0,1 \text{ mol/l}$ KNO_3 , $\text{pH } 11,5$, mit verschiedenen Cyanidverbindungen im Konzentrationsbereich von $0,1 \mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l .

4.2.2. Ag-Chalkogenidglas-ISE

Ag-basierte Chalkogenidglas-ISEs werden in der Literatur parallel zur Entwicklung von Ag-Halogenid-ISEs für die Cyanid erfassung eingeführt. Hierbei wird hauptsächlich die Ag_2S -Membran in Kombination mit der Indikator-technik für Cyanidmessungen in Flüssigkeiten eingesetzt [86,87,101,110]. Die Vorteile solcher

Ag-Chalkogenidglas-ISEs gegenüber den Ag-Halogenid-ISEs liegen hauptsächlich in der Stabilität der Membran, denn Ag-Chalkogenidglas-Verbindungen haben eine 40-fach bis 50-fach kleinere Löslichkeitskonstante als Ag-Halogenid-Verbindungen (s. Tab. 2.4 in Kap. 2.4.1 und Tab. 2.5 in Kap. 2.4.2). Darüber hinaus wird eine doppelte Nernstsensitivität für die Cyaniderfassung mittels Ag-Chalkogenidglassensoren berechnet und experimentell bewiesen [87,100]. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit neben den Ag-Halogenid-ISEs auch Ag-Chalkogenidglas-ISEs für den Einsatz in Cyanid-haltigen Lösungen entwickelt. Hierbei werden unterschiedliche Cyanid-sensitive Membranen auf Ag-Chalkogenidglasbasis mittels PLD-Verfahrens als nm- μ m dünne Schichten auf Si-Chips abgeschieden. Diese werden physikalisch und elektrochemisch im Hinblick auf die Cyaniderfassung untersucht.

4.2.2.1. Physikalische Charakterisierung

Für die Erfassung von Cyanid in Flüssigkeiten mit Ag-Chalkogenidglas-ISEs werden auf den hergestellten Si-Chips mittels PLD-Verfahren fünf unterschiedliche Ag-Chalkogenidglas-Membranen in Dünnschicht abgeschieden. Die verwendeten Targetmaterialien haben folgende chemische Zusammensetzung: $\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$, AgAsSeTe , $\text{AgIAs}_2\text{Se}_3$, AgIAsS und $\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$. Die Targetmaterialien werden mit unterschiedlichen Prozesszeiten von 5 min, 7,5 min und 10 min auf die Si-Substrate abgeschieden, um somit auch den Einfluss der Membranschichtdicke auf die Sensoreigenschaften zu untersuchen. Die Schichtdicke der Membranen wird mit einem Profilometer bestimmt. Aus dem Verhältnis von Membranschichtdicke zur Abscheidungsrate kann die Abscheidungsrate des jeweiligen Targetmaterials bestimmt werden. Diese Parameter für die unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-Membranen mit unterschiedlichen Schichtdicken sind in Tab. 4.9 zusammengefasst. Für die Membrankompositionen AgAsSeTe und $\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ werden die kleinste Abscheidungsrate von 56 ± 4 nm/min bzw. die größte Abscheidungsrate von 1178 ± 65 nm aller untersuchten Materialien bestimmt. Die unterschiedlichen Abscheidungsraten sind auf die Membrankomposition zurückzuführen. Wie man aus dem Verhältnis der Schichtdicke zur Abscheidungsrate für die unterschiedlichen Membranschichtdicken entnehmen kann, ist die Deposition des jeweiligen Chalkogenidglasmaterials linear. Bei einer Abscheidungsrate von 10 min einer AgAsSeTe -Membran wird eine etwa doppelt so dicke Membranschicht erreicht, wie bei einer Abscheidungsrate von 5 min. Die Schichtdicken der Ag-Chalkogenidglas-Membranen variieren von 297 nm bis 11833 nm für die AgAsSeTe -Membran (5 min Abscheidungsrate) bzw. die $\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ -Membran (10 min Abscheidungsrate).

Tab. 4.9: Zusammenfassung der Schichtdicken und der Abscheidungsrate für die unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-Membranen.

	Abscheidungs- dauer in min	Schichtdicke in nm	Abscheidungs- rate in nm/min	mittlere Abscheidungsrate, Standardabweichung in nm/min
Ag₂SAs₂S₃	5	419	84	81±7
	7,5	644	86	
	10	736	74	
AgAsSeTe	5	297	59	56±4
	7,5	385	51	
	10	576	58	
AgIAs₂Se₃	5	1191	238	235±16
	7,5	1868	249	
	10	2180	218	
AgIAsS	5	850	170	171±5
	7,5	1330	177	
	10	1671	167	
AgIAg₂SAs₂S₃	5	6206	1241	1178±65
	7,5	8330	1111	
	10	11833	1183	

Im Hinblick auf eine definierte und interpretierbare Funktionalität der hergestellten Ag-Chalkogenidglas-ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen ist eine homogene, geschlossene und dichte Ag-Chalkogenidglas-Membran wichtig. Daher werden die Ag-Chalkogenidglaschips direkt nach der Herstellung mittels Videomikroskopie, REM und AFM im Bezug auf Homogenität, Morphologie und Topologie untersucht. Die Ergebnisse werden exemplarisch anhand der Membranen mit der mittleren Abscheidungsdauer von 7,5 min vorgestellt. Abb. 4.39 zeigt videomikroskopische Aufnahmen mit einer 25-fachen Vergrößerung von den Ag-Chalkogenidglaschips mit unterschiedlichen Membranmaterialien. Alle Sensoren weisen eine homogene und geschlossene Membran auf. Aufgrund der unterschiedlichen Abscheidungsraten und somit der unterschiedlichen Schichtdicken der Membranen, und wegen der verschiedenen Zusammensetzungen der Ag-Chalkogenidglas-Membranen, zeigen die dargestellten ISEs unterschiedliche Farben der Membran. Beispielsweise resultieren Membranen mit einem Schwefelanteil oder Membranen mit einem Selenanteil in einer rötlichen bzw. grauen Färbung.

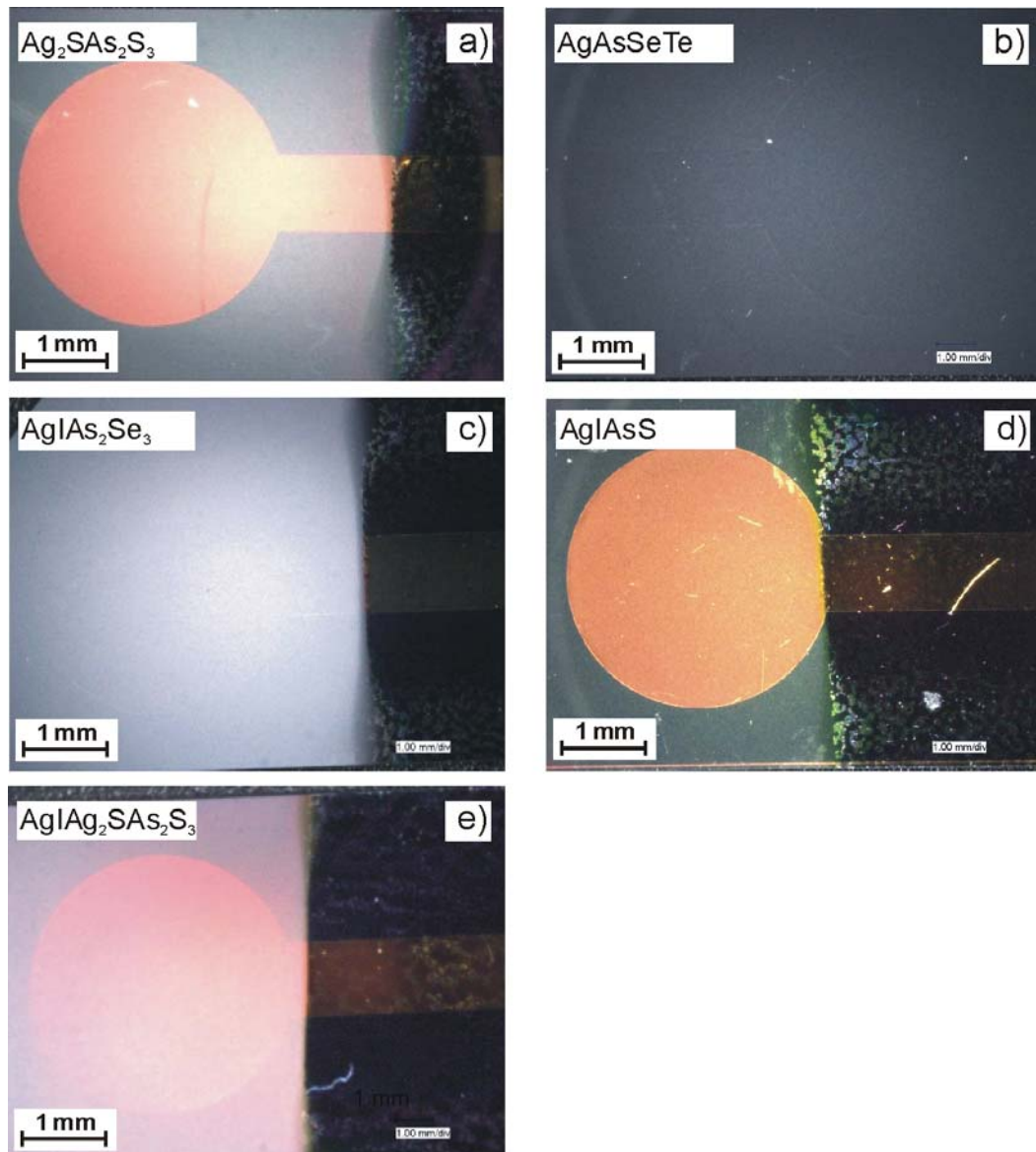


Abb. 4.39: Videomikroskopische Aufnahmen mit einer 25-fachen Vergrößerung von Ag-Chalkogenidglaschips mit unterschiedlichen Membranzusammensetzungen. Die Abscheidungsdauer der Membranen betrug jeweils 7,5 min.

In Abb. 4.40 sind die dazugehörigen REM-Aufnahmen mit einer 10.000-fachen Vergrößerung dargestellt. Wie man aus Abb. 4.40 entnehmen kann, zeigen alle Sensoren, auch bei weiterer Vergrößerung, eine geschlossene, dichte und homogene Membran. Die Membranen besitzen sog. Droplets, die typisch für den PLD-Prozess sind, jedoch keinen negativen Einfluss auf die Sensoreigenschaften haben [143-146]. Zusätzlich können bei der AgAsSeTe-Membran pyramidenartige Strukturen ermittelt werden, die in der Literatur bei Chalkogenidglassystemen mit hohem Anteil von Silber beobachtet wurden [268].

Für die Bestimmung der Morphologie und Rauigkeit der Ag-Chalkogenidglas-Membranen werden AFM-Aufnahmen aufgenommen. Abb. 4.41 zeigt als Beispiel eine AFM-Messung der Topologie einer AgAsSeTe-ISE (Abscheidungsdauer von 7,5 min) mit einem Scanbereich von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Die größeren Strukturen der

Membran haben einen Durchmesser von ca. 2 nm und eine maximale Höhe von bis zu 800 nm. Diese Beobachtungen stimmen gut mit den Ergebnissen aus den REM-Messungen überein. Für die Bestimmung der Rauigkeit wird ein Scanbereich von $40\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ gewählt und der RMS-Wert über diesen ermittelt. Die Rauigkeitswerte für die fünf unterschiedlichen Membranzusammensetzungen, bei der Abscheidungszeit von 7,5 min, sind in Tab. 4.10 zusammengefasst. Analog zu den qualitativen Ergebnissen aus den REM-Aufnahmen werden die kleinste mittlere Rauigkeit für die AgIAsS-ISE und der größte RMS-Wert für die AgAsSeTe-ISE gemessen.

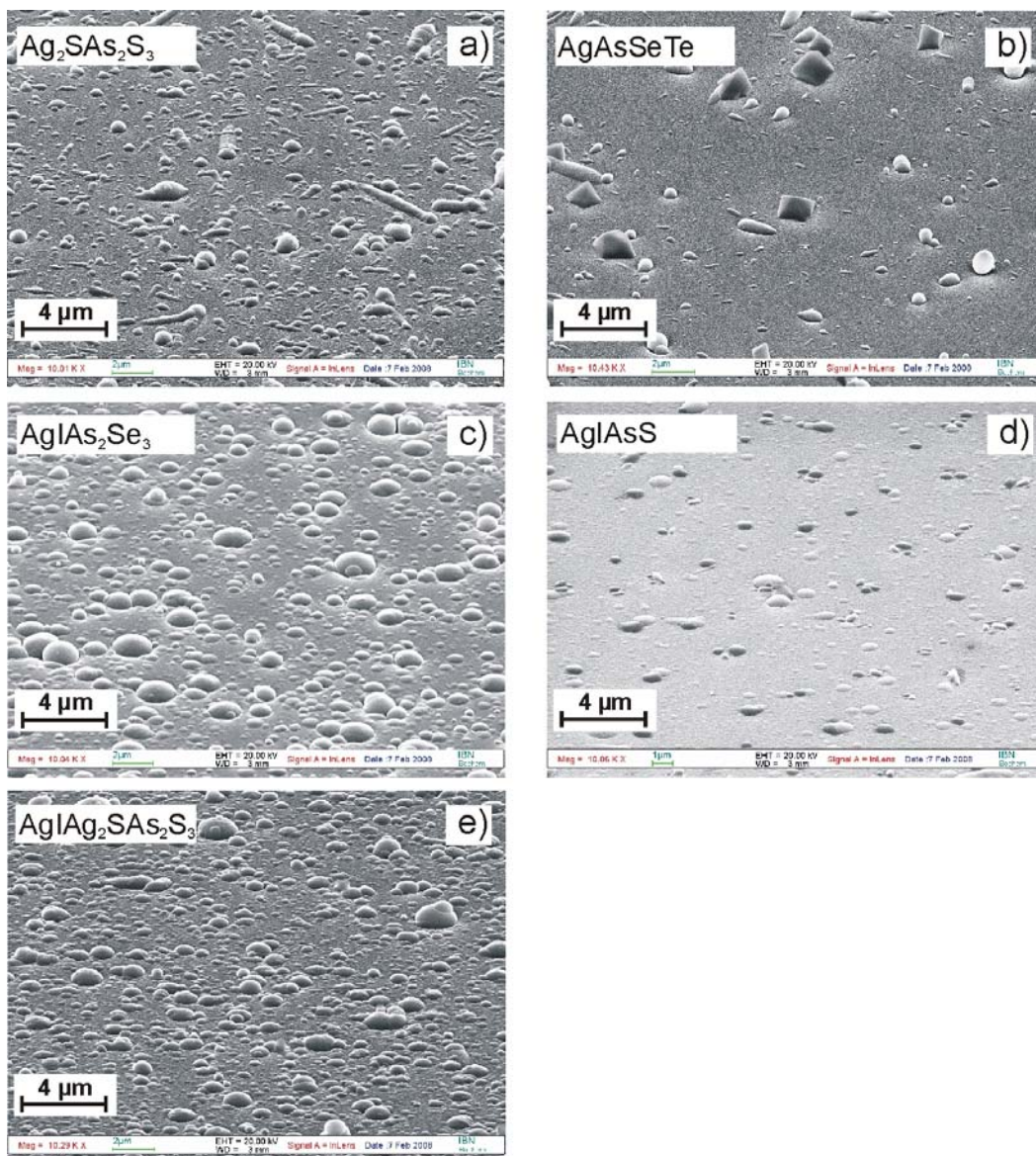


Abb. 4.40: REM-Aufnahmen mit einer 10.000-fachen Vergrößerung von Ag-Chalkogenidglas-ISEs mit unterschiedlichen Membranzusammensetzungen. Die Abscheidungsdauer der Membranen betrug jeweils 7,5 min.

Tab. 4.10: Zusammenfassung der RMS-Werte für die unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-Membranen bei einer Abscheidungsdauer von 7,5 min.

	$\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$	AgAsSeTe	$\text{AgIAs}_2\text{Se}_3$	AgIAsS	$\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$
RMS in nm	90	240	170	60	160

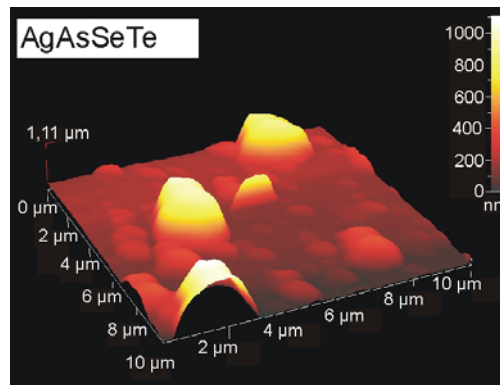


Abb. 4.41: AFM-Aufnahme der Topologie im 3-D-Format einer AgAsSeTe -Membran (Abscheidungsdauer von 7,5 min).

Im Hinblick auf eine definierte Funktionalität der Ag-Chalkogenidglas-ISEs ist die Stöchiometrie der sensitiven Membranen von großer Bedeutung. Für die Herstellung der dünnen Ag-Chalkogenidglasschichten wird für einen stöchiometrischen Transfer des Bulk-Targetmaterials in den Dünnschichtzustand das PLD-Verfahren gewählt, denn Untersuchungen bezüglich der stöchiometrischen Übertragung von Multikomponentenmaterialien in dünne Membranschichten mittels PLD-Verfahrens zeigen einen guten stöchiometrischen Transfer [3,190]. Die Bestimmung der stöchiometrischen Zusammensetzung der erzeugten Schichten wird mit Hilfe von RBS-Messungen durchgeführt. Abb. 4.42 zeigt exemplarisch die RBS-Spektren einer AgAsSeTe -Schicht mit unterschiedlichen Schichtdicken. Die vorderen „Energiekanten“ von allen drei Spektren überlappen sich sehr gut. Das bedeutet, dass die relative chemische Zusammensetzung der AgAsSeTe -Schichten mit unterschiedlichen Schichtdicken gleich ist. Das Targetmaterial wird reproduzierbar und mit gleicher Stöchiometrie in den Dünnschichtzustand übertragen. Die prozentuale Materialzusammensetzung für die Ag:As:Se:Te -Membran beträgt 11%:53%:35%:1%. Darüber hinaus zeigen die RBS-Spektren der drei unterschiedlichen Dünnschichten „Peaks“, deren Breite mit dünner werdenden Schicht abnimmt. Mit Hilfe der Breite dieser „Peaks“ und bei bekannter Dichte des Materials kann damit die Schichtdicke der AgAsSeTe -Membranen bestimmt werden.

Im Hinblick auf eventuelle Veränderungen der Materialzusammensetzung nach Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen werden ebenfalls RBS-Messungen durchgeführt und mit Spektren vor dem Kontakt der Dünnschicht mit Cyanid verglichen. Abb. 4.43 zeigt den Vergleich des RBS-Spektrums einer AgAsSeTe -

Membran (Abscheidungsdauer von 10 min) vor Kontakt mit Cyanid und nach 3 h Kontakt der Sensorschicht mit einer 10 mmol/l KCN-Lösung.

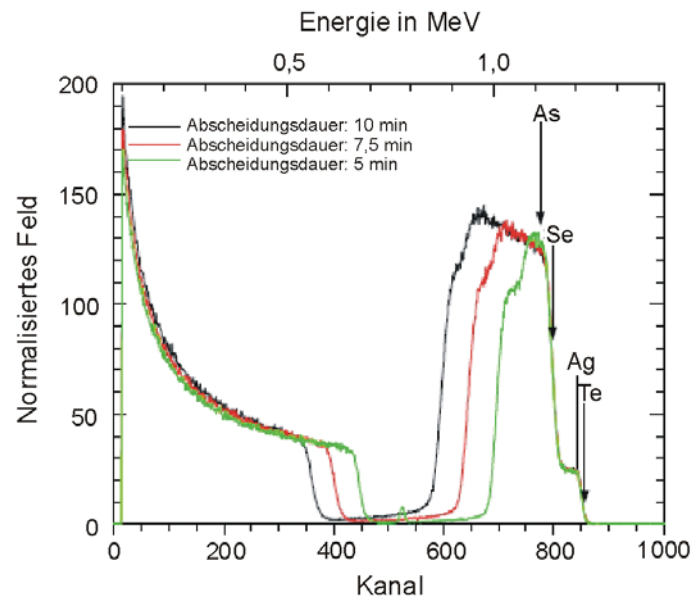


Abb. 4.42: RBS-Spektren von AgAsSeTe-Membranen mit einer Abscheidungsdauer von 5 min, 7,5 min und 10 min.

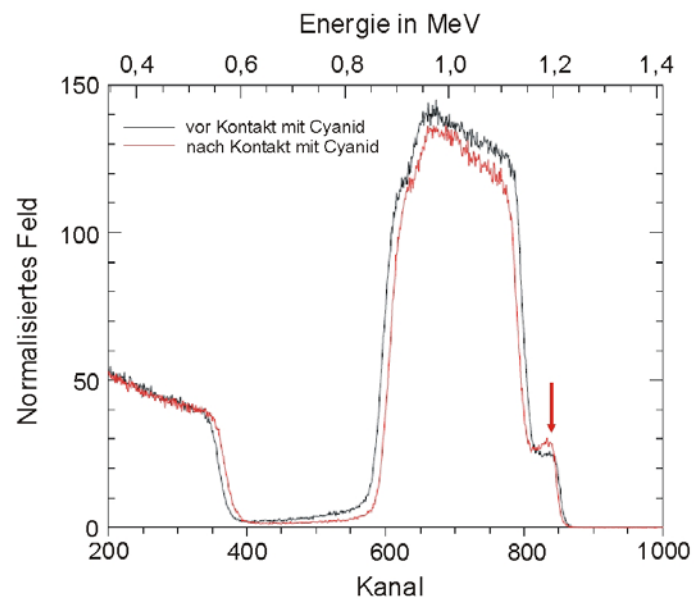


Abb. 4.43: RBS-Spektren von einer AgAsSeTe-Membran mit einer Abscheidungsdauer von 7,5 min, vor und nach Kontakt mit Cyanid-haltiger Lösung.

Die „Energiekante“ von Ag erhöht sich nach dem Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen. Für die AgAsSeTe-Membran ergibt sich, dass nach Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen eine Anreicherung von Ag an der Membranoberfläche mit einem gradientenartig abnehmenden Verlauf ins Membraninnere stattfindet. Dieses kann auf den Messmechanismus der Ag-Chalkogenidglas-ISEs von Cyanid zurückgeführt

werden, denn CN^- -Ionen bilden Ag-CN-Komplexe mit freien Ag^{+} -Ionen im Material am Interface „Elektrode/Elektrolyt“.

Darüber hinaus wird der Einfluss der relativ aggressiven Cyanidlösung auf die Ag-basierte Membran optisch mittels Videomikroskopie im Hinblick auf „Korrosionseffekte“ untersucht, denn durch die Komplexbindung zwischen CN^- -Ionen in der Lösung und freien Ag^{+} -Ionen in der Membran wird die Sensorschicht partiell zerstört. Abb. 4.44 zeigt exemplarisch videomikroskopische Aufnahmen mit einer 250-fachen Vergrößerung einer AgAsSeTe-ISE mit unterschiedlichen Schichtdicken (Abscheidungsdauer von a) 5 min, b) 7,5 min und c) 10 min) nach einem kompletten elektrochemischen Messzyklus (je drei Messungen der Sensitivität, Hysterese und Ansprechzeit und eine Driftmessung von 11 h). Während die dünnste AgAsSeTe-Schicht deutliche „Korrosionseffekte“ aufweist, kann bei den dickeren Sensorschichten noch kein Einfluss von Cyanid auf die Membran (optisch) bestimmt werden.

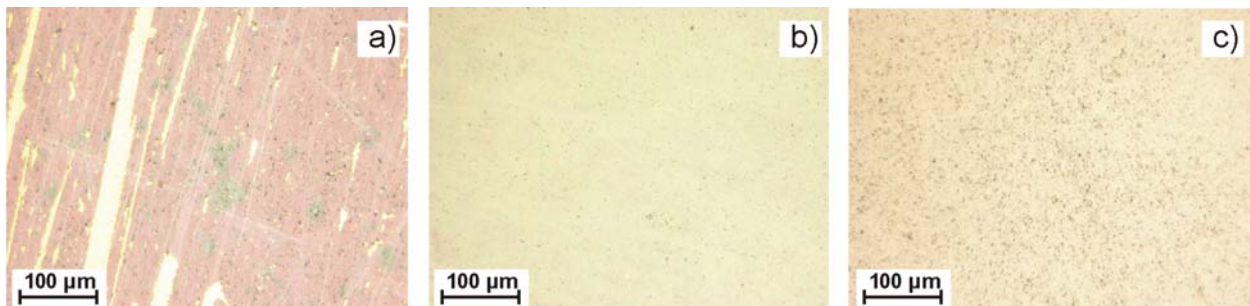


Abb. 4.44: Videomikroskopische Aufnahmen mit einer 250-fachen Vergrößerung von AgAsSeTe-ISE mit einer Abscheidungsdauer von a) 5 min, b) 7,5 min und c) 10 min, nach Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen.

4.2.2.2. Elektrochemische Charakterisierung

Die elektrochemische Charakterisierung der hergestellten Ag-Chalkogenidglas-ISEs wird analog zu den elektrochemischen Untersuchungen der Ag-Halogenid-Sensoren (Kap. 4.2.1.2) durchgeführt. Es wird ebenfalls 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, als Hintergrundlösung verwendet und die Cyanidkonzentration variiert von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l bzw. 10 mmol/l. Jede Messung wird 3-mal durchgeführt. Die elektrochemische Untersuchung von Ag-ISEs mit unterschiedlichen Chalkogenidglasmembranen wird zunächst exemplarisch anhand der Charakterisierung einer AgAsSeTe-ISE (Abscheidungsdauer 7,5 min) vorgestellt. Anschließend werden die intrinsischen Sensorparameter der unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-ISEs tabellarisch zusammengefasst und verglichen. Abb. 4.45 stellt die Messkurve der AgAsSeTe-ISE mit KCN-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l und in umgekehrter Reihenfolge dar. Die Messzeit für jede Konzentration

beträgt 5 min. Die Ag-Chalkogenidglas-ISE zeigt ein von der KCN-Konzentration abhängiges Spannungssignal. Mit steigender Cyanidkonzentration sinkt das Messsignal und mit sinkender CN^- -Ionenkonzentration steigt die gemessene Spannung. Die Sensorantwort ist schnell und für die jeweilige Konzentration konstant.

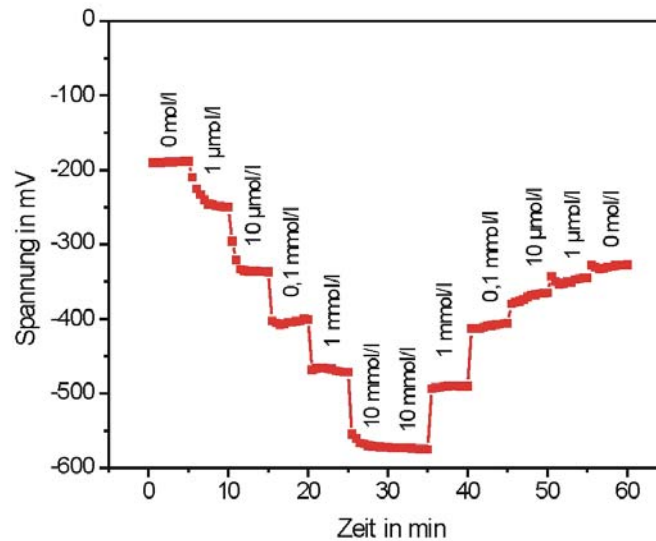


Abb. 4.45: Messkurve einer Kalibrierung mit einer AgAsSeTe-ISE (Abscheidungsdauer 7,5 min) in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l.

Mit Hilfe des dazugehörigen Kalibriergraphen für die Messsignale mit steigender Cyanidkonzentration können die Sensitivität und der lineare Messbereich der AgAsSeTe-ISE bestimmt werden; die Kalibrierkurve ist in Abb. 4.46 dargestellt.

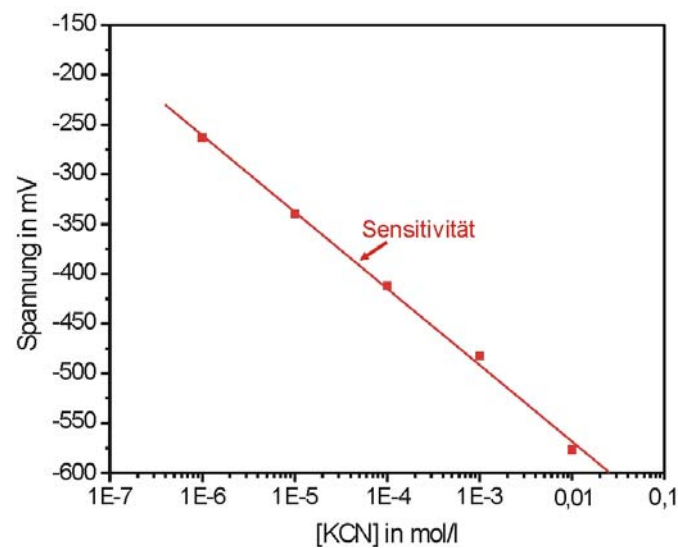


Abb. 4.46: Kalibriergraph aus der Messkurve der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l.

Im linearen Messbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l KCN kann eine Sensitivität von 77 mV/pCN erreicht werden. Die theoretisch zu erwartende Sensitivität für Ag-Chalkogenidglas-ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen beträgt 118 mV/pCN . Sie ist jedoch von der Ionenaktivität der freien Ag^{+} -Ionen in der Membran abhängig und kann auch kleinere bzw. größere Sensitivitätswerte aufweisen [100,104-109]. In Abb. 4.47 sind die zur Messung in Abb. 4.45 dazugehörigen Kalibrierkurven für steigende und sinkende KCN-Konzentration zur Bestimmung der Hysterese dargestellt. Es werden für die CN^{-} -Ionenkonzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$ und 10 mmol/l jeweils eine Hysterese von 28 mV und 3 mV gemessen.

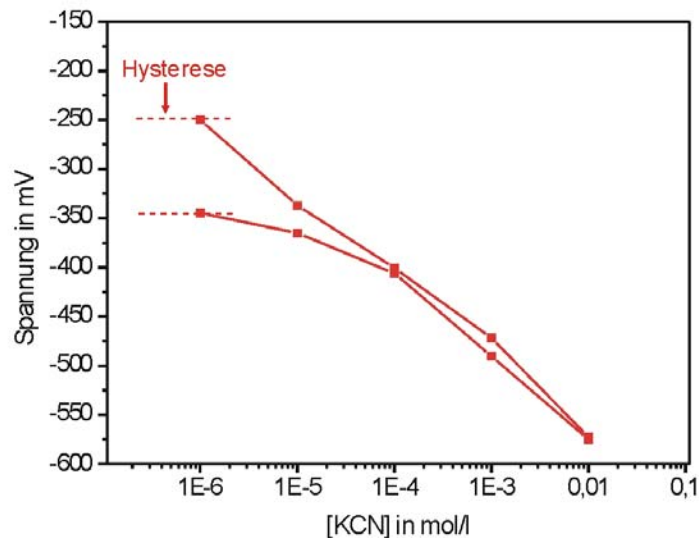


Abb. 4.47: Bestimmung der Hysterese aus der Messkurve der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l .

Die Bestimmung der Ansprechzeit ($t_{90\%}$) erfolgt ebenfalls analog zu den Untersuchungen mit den Ag-Halogenid-ISEs für einen KCN-Konzentrationswechsel von 0,1 mmol/l zu 1 mmol/l (s. Abb. 4.48). Die Ag-Chalkogenidglas-ISE erreicht nach 42 s 90% des konstanten Messsignalendwertes. Darüber hinaus wird auch die Drift der Ag-Chalkogenidglassensoren, analog zu den Driftmessungen mit Ag-Halogenid-ISEs, untersucht. Abb. 4.49 zeigt eine solche Driftmessung der AgAsSeTe-ISE über eine Messdauer von 11 h. Die gemessene Drift des Sensors beträgt 0,05 mV/min .

Im Hinblick auf einen dynamischen Einsatz der Ag-Chalkogenidglas-ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen wird die Stabilität der hergestellten Ag-Sensoren mit Hilfe von Kalibriermessungen in einem Zeitraum von 14 Wochen untersucht. Abb. 4.50 stellt die Stabilitätskurven für die hergestellten ISEs mit unterschiedlichen Chalkogenidglasmembranen (Abscheidungsdauer 7,5 min) gegenüber.

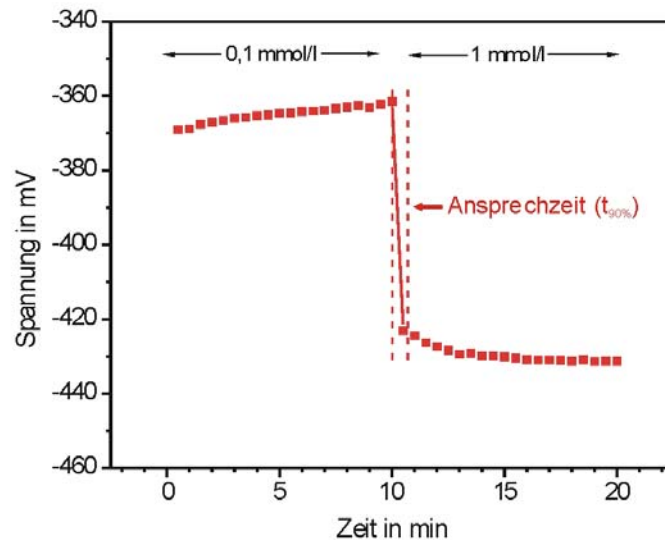


Abb. 4.48: Bestimmung der Ansprechzeit ($t_{90\%}$) der AgAsSeTe-ISE bei einem KCN-Konzentrationswechsel von 0,1 mmol/l zu 1 mmol/l.

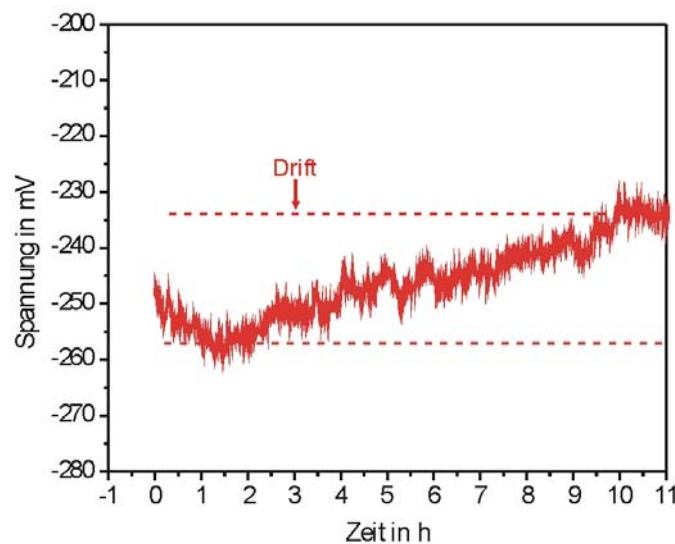


Abb. 4.49: Bestimmung der Drift der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5.

Über die gesamte Messdauer resultieren die AgAsSeTe-ISE und die AgI $\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ in einer mittleren Sensitivität von 74 ± 14 mV/pCN bzw. 77 ± 18 mV/pCN. Hierbei wird über die ersten Wochen eine mittlere Sensitivität von jeweils 66 ± 9 mV/pCN und 61 ± 6 mV/pCN erfasst, die nach sechs bis acht Wochen eine mittlere Sensitivität von 90 ± 6 mV/pCN bzw. 89 ± 12 mV/pCN erreichen. Die Ag $_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ -ISE und AgIAsS-ISE zeigen zunächst eine Sensitivität von jeweils 160 mV/pCN und 135 mV/pCN, die sich nach ein bis drei Wochen auf eine mittlere Sensitivität von 80 ± 4 mV/pCN bzw. 86 ± 10 mV/pCN einstellen. Im Vergleich dazu besitzt die AgIAs $_2\text{Se}_3$ -ISE über die gesamte Messdauer eine mittlere Sensitivität von 137 ± 24 mV/pCN. Daraus resultiert, dass sich schon nach wenigen Wochen die Sensitivitäten aller untersuchten Ag-Chalkogenidglas-ISEs, bis auf die ISE mit der AgIAs $_2\text{Se}_3$ -Membran, auf eine mittlere Sensitivität zwischen 80 mV/pCN und 90 mV/pCN „einpendeln“. Die verschiedenen

mittleren Sensitivitäten sind auf die unterschiedlichen Membranzusammensetzungen zurückzuführen.

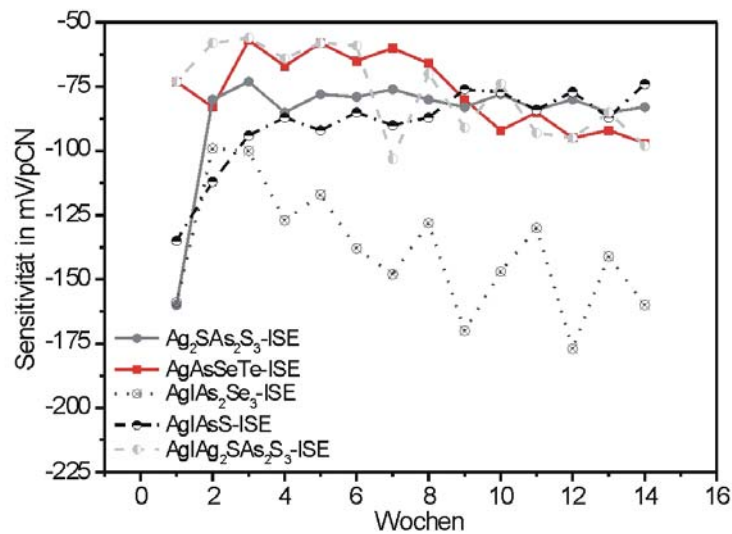


Abb. 4.50: Bestimmung der Stabilität der unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-ISEs aus Kalibriermessungen in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, im einem KCN-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l.

Die intrinsischen Sensorparameter für die Ag-ISEs mit den unterschiedlichen Chalkogenidglasmembranen (Abscheidungsdauer 7,5 min) sind in Tab. 4.11 zusammengefasst.

Tab. 4.11: Zusammenfassung der intrinsischen Sensorparameter von Ag-Chalkogenidglas-ISEs mit unterschiedlichen Membranen bei einer Abscheidungsdauer von 7,5 min.

	$\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$	AgAsSeTe	$\text{AgIAs}_2\text{Se}_3$	AgIAsS	$\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$
Sensitivität in mV/pCN	80±4	90±6	137±24	86±10	89±12
untere Nachweisgrenze in $\mu\text{mol/l}$	22±8	0,4±0,1	70±1	8±1	80±12
linearer Messbereich in $\mu\text{mol/l}$	100-10.000	1-10.000	100-10.000	10-10.000	100-10.000
Hysterese in mV	1-32	1-28	15-78	5-61	28-68
Ansprechzeit ($t_{90\%}$) in s bei 1 mmol CN	150±6	42±12	72±12	396±24	210±24
Drift in mV/min	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05

Den kleinsten und den größten Betrag der mittleren Sensitivität zeigen jeweils die $\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ -ISE und die $\text{AgIAs}_2\text{Se}_3$ -ISE mit 80 ± 4 mV/pCN und 137 ± 24 mV/pCN. Die unteren Nachweisgrenzen liegen zwischen $0,4 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/l}$ und 80 ± 12 $\mu\text{mol/l}$ KCN für die AgAsSeTe -ISE bzw. die $\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ -ISE. Den größten linearen Messbereich zeigt die AgAsSeTe -ISE mit 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l und den kleinsten linearen Messbereich haben die $\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ -ISE und die $\text{AgIAg}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ -ISE mit 0,1 mmol/l bis 10 mmol/l KCN. Für alle fünf Ag-Chalkogenidglas-ISEs wird eine relativ hohe Hysterese von bis zu 78 mV gemessen. Bei der Cyanidkonzentration von 1 mmol/l werden für die AgAsSeTe -ISE und für die AgIAsS die kleinste Ansprechzeit von 42 ± 12 s bzw. die größte Ansprechzeit von 396 ± 24 s gemessen. Der große Unterschied zwischen den Ansprechzeiten kann zum Teil auf die 4-mal dickere AgIAsS -Schicht zurückgeführt werden. Die Drift ist für alle Chalkogenidglas-ISEs vergleichbar und beträgt zwischen 0,05 mV/min und 0,06 mV/min. Für die Cyaniderfassung in der Umweltanalytik ist es von großem Interesse, bereits sehr niedrige Cyanidkonzentrationen erfassen zu können. Die Ergebnisse aus den elektrochemischen Messungen mit unterschiedlichen Ag-Chalkogenidglas-ISEs in Tab. 4.11 subsumieren, dass die AgAsSeTe -ISE für den Einsatz bei kleinen Cyanidkonzentrationen mit einer guten Sensitivität am besten geeignet ist. Somit wird die AgAsSeTe -ISE für weitere elektrochemische Charakterisierungen und für den Einsatz in simultanen Messungen von Cyanid und Schwermetallen in Flüssigkeiten ausgewählt (Kap. 4.3).

Es wird weiterhin der Einfluss der Schichtdicke der Sensormembran in Cyanid-haltigen Lösungen charakterisiert. Bei den Sensoren mit den dünnsten Ag-Chalkogenidglas-Membranen werden wesentlich früher „Korrosionseffekte“ der Membran in den Cyanid-haltigen Lösungen festgestellt als bei den „dickeren“ Ag-Membranen. Die Ag-ISEs mit einer Abscheidungsdauer von 10 min resultieren auf der einen Seite in größeren Ansprechzeiten und auf der anderen Seite in instabileren Sensorantworten. Abb. 4.51 zeigt den Vergleich der Messkurven einer AgAsSeTe -ISE mit einer 297 nm, einer 385 nm und einer 576 nm dünnen Sensorschicht (Abscheidungsdauer 5 min, 7,5 min und 10 min). Der AgAsSeTe -Sensor mit der dünnsten Membran resultiert in schnellen und stabilen Sensorsignalen. Die Sensitivität beträgt 61 mV/pCN und ist somit um 16 mV/pCN kleiner als die Sensitivität der AgAsSeTe -ISE mit einer Abscheidungsdauer von 7,5 min. Darüber hinaus zeigt der Ag-Sensor mit der „dicksten“ Membranschicht eine Sensitivität von 77 mV/pCN. Jedoch hat dieser Sensor eine bis zu 2,5-fach längere Ansprechzeit als die AgAsSeTe -ISE mit der mittleren Schichtdicke. Aus der optischen und elektrochemischen Charakterisierung der AgAsSeTe -Chalkogenidglas-ISE im Bezug auf die Sensoreigenschaften, wie Ansprechverhalten, Sensitivität und Stabilität, wird als Kompromiss für weitere Messungen die ISE mit der AgAsSeTe -Membran mit einer Abscheidungsdauer von 7,5 min, d.h. mit einer Schichtdicke von 385 nm, gewählt.

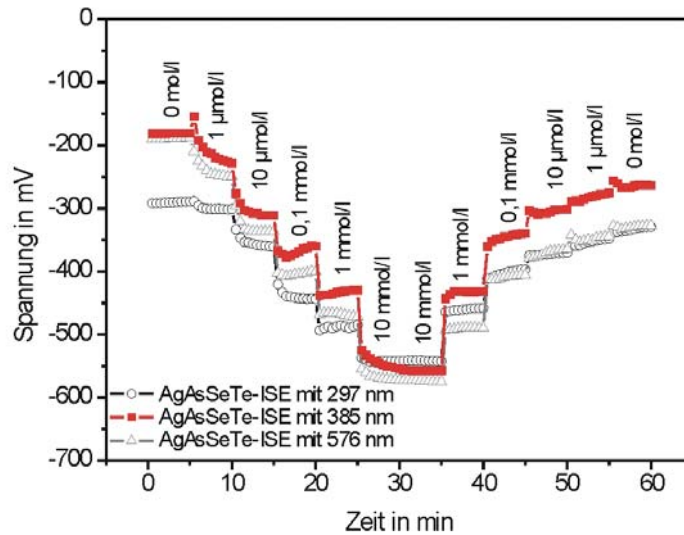


Abb. 4.51: Messkurven der AgAsSeTe-ISE mit einer Abscheidungsdauer von 5 min, 7,5 min und 10 min, in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l.

Im Hinblick auf einen Einsatz der gewählten AgAsSeTe-ISE in Cyanid-haltigen realen Probenlösungen wird der Einfluss von unterschiedlichen Störionen, analog zu den Selektivitätsmessungen mit den Ag-Halogenid-ISEs, untersucht. Hierbei werden sowohl der Einfluss von unterschiedlichen Halogeniden als auch von Sulfid auf die Eigenschaften der AgAsSeTe-ISE mit Hilfe der „Fixed interference“-Methode bestimmt. Abb. 4.52 zeigt als Beispiel den Vergleich der Kalibriergraphen ohne und mit 0,1 mmol/l KBr als konstante Störionenkonzentration (c_j) in einem KCN-Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l. Die Auswertung des Selektivitätskoeffizienten (K_{ij}) erfolgt wiederum graphisch.

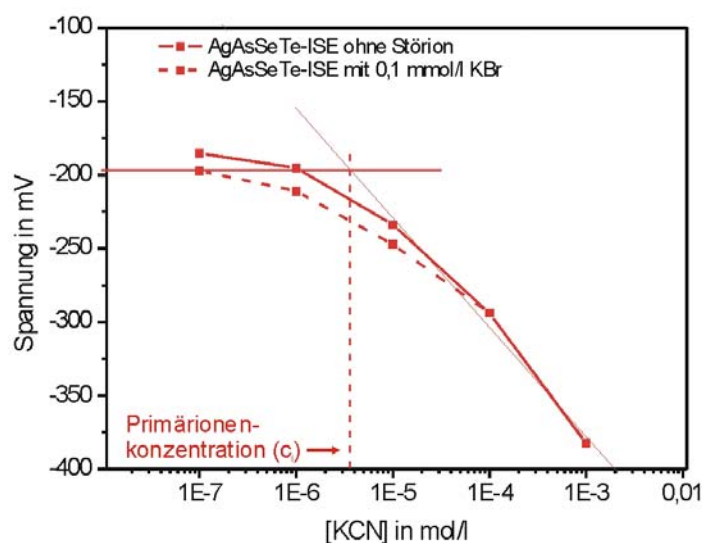


Abb. 4.52: Kalibriergraphen aus Messungen mit der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, im KCN-Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l, ohne Störion und mit 0,1 mmol/l KBr für die Bestimmung des Selektivitätskoeffizienten.

Wie man aus Abb. 4.52 entnehmen kann, zeigt KBr nur einen geringen Einfluss auf den Verlauf der Kalibrierkurve und somit nur einen geringen Einfluss auf das Sensorverhalten der AgAsSeTe-ISE. Die Selektivitätskonstante kann nach Gln. 2.26 im Kap. 2.2.2 berechnet werden und beträgt 0,025 für das Störion Br^- . Nach gleichem Verfahren werden auch der Einfluss von KCl, KI und K_2S auf das Sensorsignal der AgAsSeTe-ISE untersucht. Die dazugehörigen Selektivitätskoeffizienten sind in Tab. 4.12 zusammengefasst.

Tab. 4.12: Zusammenfassung der Selektivitätskoeffizienten (bestimmt nach der „Fixed interference“-Methode) für die AgAsSeTe-ISE.

	KCl	KBr	KI	K_2S
K_{ij}	0,02	0,025	0,07	0,75

Für alle Halogenide wird ein relativ kleiner Selektivitätskoeffizient bestimmt. Das heißt, Halogenide besitzen nur einen geringen (Quer-)Einfluss auf das Sensorverhalten. Der Selektivitätskoeffizient für K_2S ist 10- bis 35-mal größer, als die Selektivitätskoeffizienten für die untersuchten Halogenidionen. Dies bedeutet, dass ein Einfluss von Sulfiden auf das Sensorverhalten der AgAsSeTe-ISE existiert und somit Sulfide in Messlösungen für die Ag-ISE vermieden werden sollen. Die Selektivitätskoeffizienten korrelieren sehr gut mit den Löslichkeitskonstanten bzw. den $\text{p}K_L$ -Werten von Ag-Halogenid- und Ag_2S -Verbindungen (s. Tab. 2.4 in Kap. 2.4.1 und Tab. 2.5 in Kap. 2.4.2). Je kleiner die Löslichkeitskonstante ist, d.h. je größer der $\text{p}K_L$ -Wert, desto größer sollte der Einfluss des jeweiligen Störions auf das Messsignal sein.

Darüber hinaus wird der Einsatz der AgAsSeTe-ISE für die direkte Bestimmung von weiteren Cyanidverbindungen, beispielsweise von $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und KSCN, mit Hilfe von Kalibriermessungen mit den entsprechenden Cyanidverbindungen durchgeführt. Abb. 4.53 zeigt den Vergleich der jeweiligen Kalibrierkurven im Konzentrationsbereich von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l . Die Messung in unterschiedlichen KSCN-Konzentrationen zeigt keine Abhängigkeit der Elektrode von der Ionenkonzentration. Die AgAsSeTe-ISE resultiert in einer Sensitivität von 130 mV/Dekade für die Messung in $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Lösungen und in einer Sensitivität von 70 mV/Dekade für die Messung in KCN-Lösungen. Das inverse Verhalten der AgAsSeTe-ISE in $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Lösungen kann im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden und bedarf noch weiterer Untersuchungen.

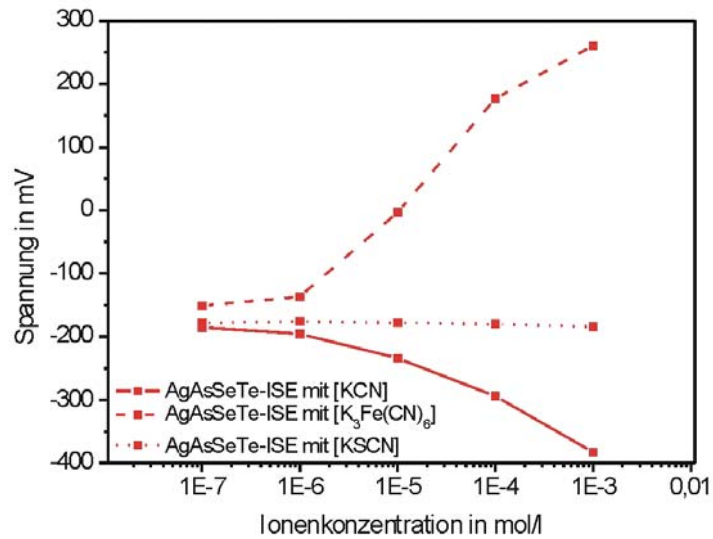


Abb. 4.53: Kalibriergraphen aus Messungen mit der AgAsSeTe-ISE in 0,1 mol/l KNO₃, pH 11,5, mit verschiedenen Cyanidverbindungen im Konzentrationsbereich von 0,1 µmol/l bis 1 mmol/l.

4.3. Simultane Messung von Cyanid und Schwermetallen

Heutzutage werden Cyanid und Schwermetalle separat mit unterschiedlichen Messsystemen erfasst, jedoch impliziert dies oftmals einen relativ hohen zeitlichen und apparativen Aufwand; darüber hinaus sind die Messsysteme häufig auf den Laborbetrieb beschränkt. Ein gut etabliertes DIN-Verfahren für die Cyaniderfassung ist beispielsweise die spektrophotometrische Bestimmung von Cyanid mittels Pyridin-Barbitursäure-Methode mit vorhergehender Destillation und Diffusion zur Freisetzung der toxischen Komponente [13,269]. Standardverfahren für die Schwermetallbestimmung basieren ebenfalls auf spektrophotometrischen Verfahren, wie der atomaren Adsorptionsspektroskopie (AAS) oder der atomaren Emissionsspektroskopie (AES) in Kombination mit der induktiv gekoppelten Plasma Methode (ICP) [270,271]. Für die Vermeidung von Kontaminationen oder von Abbaueffekten der Probe wäre ein Messsystem für eine simultane „Vor-Ort“-Analytik von Cyanid und Schwermetallen wünschenswert. Daher wird in dieser Promotionsarbeit ein portables Messsystem für die simultane Erfassung von Cyanid und Schwermetallen mit Hilfe von potentiometrischen Chalkogenidglassensoren entwickelt. Sowohl die hybride Messzelle und deren Messprinzip als auch die Evaluierung des Messsystems, anhand von simultanen Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, Cd^{2+} - und CN^- -Ionen und Pb^{2+} - und CN^- -Ionen, werden in den folgenden Unterkapiteln erläutert.

4.3.1. Aufbau und Messprinzip der hybriden Messzelle

Für die simultane Erfassung von Cyanid und Schwermetallen wird eine hybride Messzelle entwickelt. Da Cyanid bei kleinen pH-Werten ($\text{pK}_\text{S} = 9,31$) als gasförmiges HCN vorliegt und Schwermetalle bei hohen pH-Werten als Hydroxidionen ausfallen, ist eine zuverlässige Messung beider Komponenten bei gleichen pH-Werten der Analytlösung nicht möglich [222]. Für die simultane Messung von Cyanid und Schwermetallen wird somit eine hybride Messzelle entwickelt, in der im ersten Schritt Cyanid und Schwermetalle voneinander getrennt und im zweiten Schritt beide Komponenten simultan in separaten Messkammern erfasst werden können. Abb. 4.54 zeigt ein Foto der Messzelle und schematisch das Funktionsprinzip am Beispiel einer simultanen Messung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen. Die hybride Messzelle besteht aus einer unteren und einer gleichgroßen oberen Messkammer (20 ml), die über eine gaspermeable, hydrophobe Diffusionsmembran (Typ: TF-200, 47 mm, Firma: Pall Life Science) mit einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ von einander getrennt sind. In der oberen Messkammer werden eine Ag-Chalkogenidglas-ISE (AgAsSeTe-ISE) und eine kommerzielle Ag/AgCl-Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode in die Hintergrundlösung von $0,1 \text{ mol/l KNO}_3$, pH 11,5, für die Erfassung von Cyanidionen eingetaucht. In der unteren Messkammer werden eine Schwermetall-ISE, d.h. eine

Cu-ISE, Cd-ISE oder Pb-ISE, und ebenfalls eine kommerzielle Ag/AgCl-Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode in eine Hintergrundlösung von 0,1 mol/l KNO_3 , pH 3,0, für die Messung von Schwermetallen fixiert. Beide Sensorsysteme werden über ein hochohmiges Multimeter (2700, Keithley) zu geschlossenen elektrischen Kreisen gefasst.

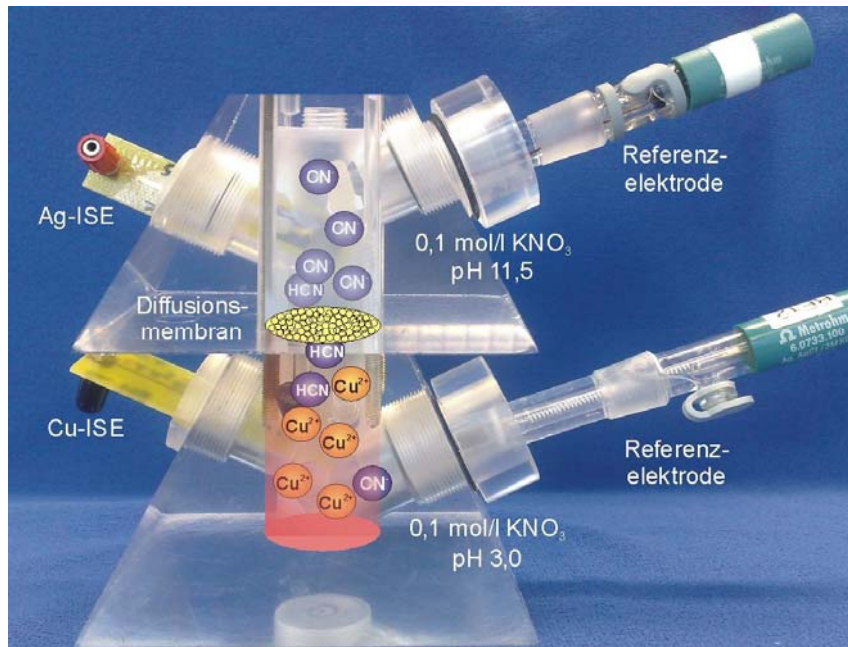


Abb. 4.54: Foto der hybriden Messzelle und schematische Darstellung der simultanen Erfassung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen.

Für die simultane Erfassung von Cyanid und Schwermetallen wird die Probe (Cyanid- oder Schwermetalllösung oder gemischte Cyanid-Schwermetalllösung) in die untere Messkammer gegeben. Schwermetallionen können direkt in der unteren Messkammer von der Schwermetall-ISE potentiometrisch gemessen werden. Beispielsweise können Cu^{2+} -Ionen direkt von einer Cu-ISE erfasst werden. Bei Zugabe einer Cyanid-haltigen Probe in die untere Messkammer werden aufgrund des pH-Wertes der Hintergrundlösung die Cyanidionen in das gasförmige HCN konvertiert. Mit Hilfe der angelegten Temperatur von 30 °C an das Messsystem kann das HCN in die obere Messkammer diffundieren, denn die Siedetemperatur von HCN beträgt 26 °C. Die Messlösung in der oberen Messkammer der hybriden Messzelle ist auf pH 11,5 eingestellt, so dass das HCN zu mehr als 99,4% als CN^- -Ion vorliegt und somit direkt mit Hilfe der Ag-ISE selektiv erfasst werden kann. Für eine schnelle Diffusion und eine homogene Verteilung der Ionen in den Messkammern werden beide Lösungen konstant gerührt. Abb. 4.55 zeigt exemplarisch ein Foto der hybriden Messzelle während einer simultanen Messung von Cyanid und Schwermetallen.

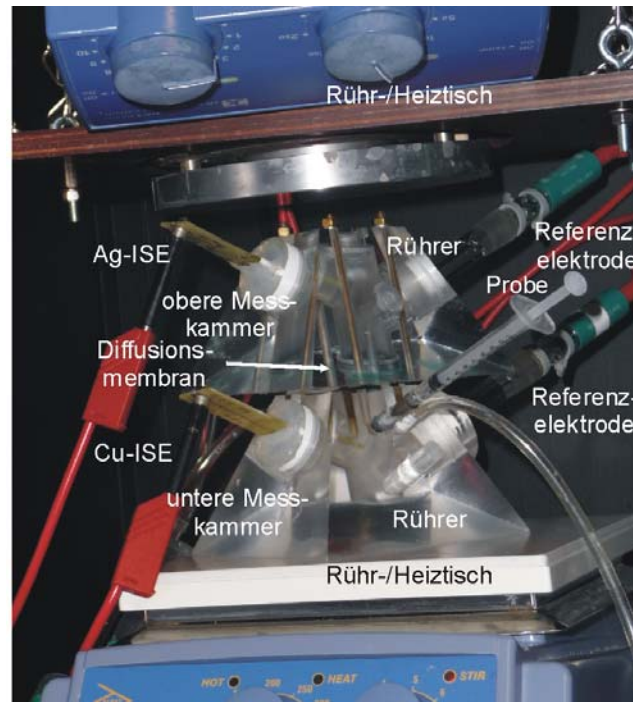


Abb. 4.55: Foto der hybriden Messzelle während einer simultanten Messung von Cyanid- und Schwermetallionen.

4.3.2. Messergebnisse

Für die simultanen Messungen von Cyanid und Schwermetallen mit Hilfe von Chalkogenidglas-ISEs in der hybriden Messzelle werden zunächst Kalibriermessungen mit der Ag-ISE in Cyanid-haltigen Lösungen und mit der Cu-, Cd- und Pb-ISE in Kupfer-, Cadmium- bzw. Blei-haltigen Lösungen im Ionenkonzentrationsbereich von $0,1 \mu\text{mol/l}$ bis $1,1 \text{mmol/l}$ durchgeführt. Abb. 4.56 zeigt die Messkurven der Kalibrierung in den jeweiligen Cyanid- bzw. Schwermetalllösungen. Für die Cyanidmessungen wird eine $0,1 \text{mol/l KNO}_3$, pH 11,5, Hintergrundlösung und für die Schwermetallerfassung wird eine $0,1 \text{mol/l KNO}_3$, pH 3,0, Hintergrundlösung verwendet. Die Ag-ISE resultiert in einem sinkenden Spannungssignal mit steigender Cyanidkonzentration. Die Sensitivität beträgt 100mV/pCN im Konzentrationsbereich von $1,1 \mu\text{mol/l}$ bis $1,1 \text{mmol/l}$ und die untere Nachweisgrenze liegt bei $0,5 \mu\text{mol/l KCN}$. Diese Werte stimmen gut mit den vorangegangenen Charakterisierungen für Ag-Chalkogenidglassensoren (Kap. 4.2.2.2) überein. Die höhere Sensitivität von AgAsSeTe-ISE bei diesen Untersuchungen kann durch zeitliche Effekte (weitere Anreicherung von Silber an der Sensoroberfläche) erklärt werden. Darüber hinaus korrelieren die Sensoreigenschaften sehr gut mit den Sensoreigenschaften von Chalkogenidglassensoren mit vergleichbarer Membranzusammensetzung aus der Literatur. M.T. Neshkova et al. zeigen für die ISE mit einer AgSeTe-Membran eine Sensitivität von 101mV/pCN im

Konzentrationsbereich von 5 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l [109]. Die Kalibriermessungen der Cu-, Cd- und Pb-ISE resultieren in Sensitivitäten jeweils von 28 mV/pCu im Konzentrationsbereich von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ bis 1,1 mmol/l , von 20 mV/pCd im Konzentrationsbereich von 1,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1,1 mmol/l und von 23 mV/pPb im Konzentrationsbereich von 1,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1,1 mmol/l . Die unteren Nachweisgrenzen sind 0,2 $\mu\text{mol/l}$ Cu^{2+} -Ionen, 3,8 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} -Ionen bzw. 5 $\mu\text{mol/l}$ Pb^{2+} -Ionen. Die Ansprechzeit $t_{90\%}$ ist für alle evaluierten ISEs kleiner als 30 s. Die Sensoreigenschaften der Schwermetall-ISEs stimmen gut mit den Sensoreigenschaften für Dünnschichtsensoren mit vergleichbarer Membrankomposition in der Literatur überein [3]. Darüber hinaus korrelieren die Sensitivitäten gut mit der theoretisch zu erwartenden Nernstsensitivität (s. Gln. 2.23 in Kap. 2.2.2) für bivalente Ionen von 29,6 mV/Dekade . Daraus resultiert, dass die hergestellten Dünnschichtsensoren auf Chalkogenidglasbasis gut funktionieren und für einen Einsatz in der hybriden Messzelle für simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen verwendet werden können.

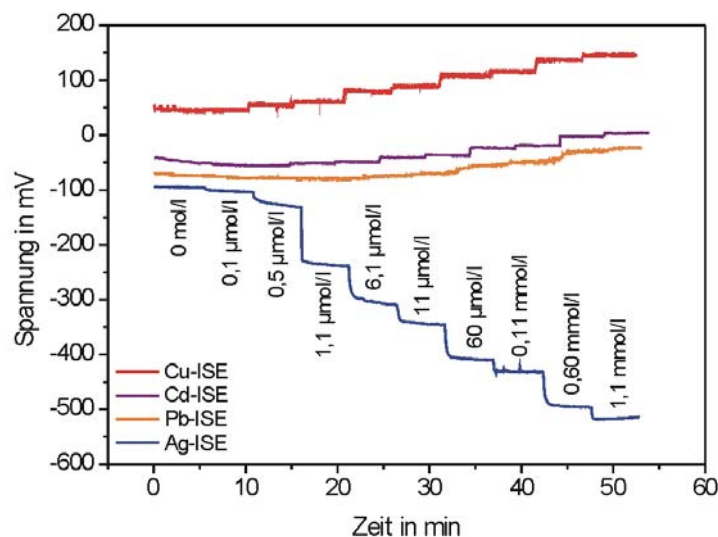


Abb. 4.56: Messkurven der Kalibriermessungen der Ag-ISE und der Cu-, Cd- und Pb-ISE in den jeweiligen CN^- -Ionenkonzentrationen und Cu^{2+} - Cd^{2+} - und Pb^{2+} -Ionenkonzentrationen im Bereich von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1,1 mmol/l .

Im Rahmen dieser Arbeit werden unterschiedliche simultane Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, Cd^{2+} - und CN^- -Ionen und Pb^{2+} - und CN^- -Ionen in der hybriden Messzelle durchgeführt. Das Messprinzip und die Ergebnisse sollen zunächst am Beispiel der simultanen Messung für Cu^{2+} - und CN^- -Ionen mittels Ag-ISE und Cu-ISE demonstriert werden. Anschließend wird ein Vergleich mit simultanen Messungen von Cyanid und weiteren Schwermetallen durchgeführt. Abb. 4.57 zeigt die Messkurven der Cu-ISE und der Ag-ISE in der unteren bzw. oberen Messkammer der hybriden Messzelle bei einer simultanen Messung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen.

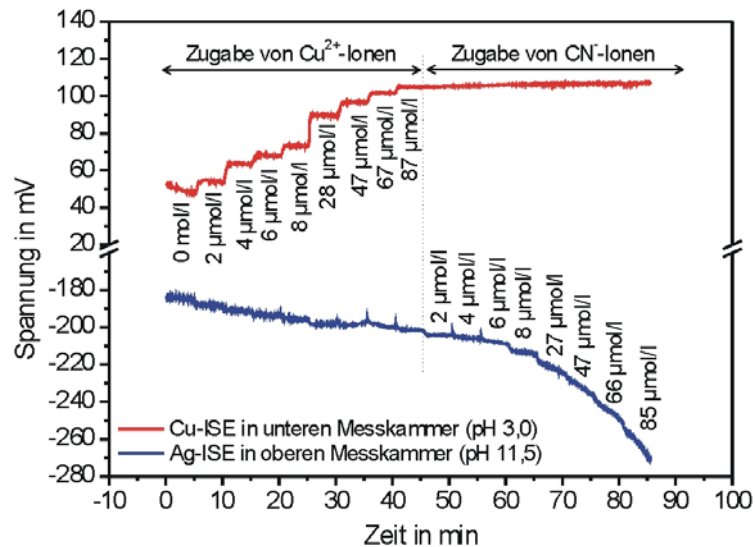


Abb. 4.57: Messkurven der Cu- und Ag-ISE bei einer simultanen Messung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen in der hybriden Messzelle.

Hierbei werden Proben mit Cu^{2+} - und CN^- -Ionen schrittweise in die untere Messkammer pipettiert. Zuerst werden 8-mal 50 μl der Cu^{2+} -Stammlösung (und deren verdünnte Lösungen) und anschließend bei einer konstanten Cu^{2+} -Ionenkonzentration 8-mal 50 μl von der CN^- -Stammlösung (und deren verdünnte Lösungen) hinzugegeben. Die Cu^{2+} -Ionenkonzentration variiert von 2 $\mu\text{mol/l}$ bis 87 $\mu\text{mol/l}$ und die CN^- -Ionenkonzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ bis 85 $\mu\text{mol/l}$. Mit steigender Cu^{2+} -Ionenkonzentration steigt das Messsignal an der Cu-ISE, während das Messsignal der Ag-ISE in der oberen Messkammer ein annähernd konstantes Verhalten zeigt, d.h. unabhängig von der Cu^{2+} -Konzentration in der unteren Messkammer ist. Anschließend wird schrittweise die CN^- -Ionenkonzentration in der unteren Messkammer bei einer konstanten Cu^{2+} -Ionenkonzentration von 87 $\mu\text{mol/l}$ erhöht. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Hintergrundlösung in der unteren Messkammer und der angelegten Temperatur konvertieren die CN^- -Ionen zu HCN und diffundieren in die obere Messkammer. Durch den dortigen pH-Wert der Hintergrundlösung von pH 11,5 in der oberen Messkammer können die CN^- -Ionen dann direkt mittels der Ag-ISE selektiv erfasst werden. Mit steigender CN^- -Ionenkonzentration bis zu 8 $\mu\text{mol/l}$ in der unteren Messkammer zeigt die Ag-ISE in der oberen Messkammer schnelle und stabile Signale. Bei höheren CN^- -Ionenkonzentration erhöht sich die Ansprechzeit des Sensors, die auf höhere Diffusionszeiten der CN^- -Ionen bei höheren Konzentrationen zurückzuführen ist. Mit steigender CN^- -Ionenkonzentration zeigt die Cu-ISE ein konstantes Signal, d.h. keine Abhängigkeit von der CN^- -Ionenkonzentration. Somit sind simultane Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen in dem gewählten Konzentrationsbereich möglich.

Die Evaluierung des linearen Messbereichs und der Sensitivität bei den simultanen Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen können aus den dazugehörigen Kalibriergraphen gewonnen werden, die in Abb. 4.58 dargestellt sind.

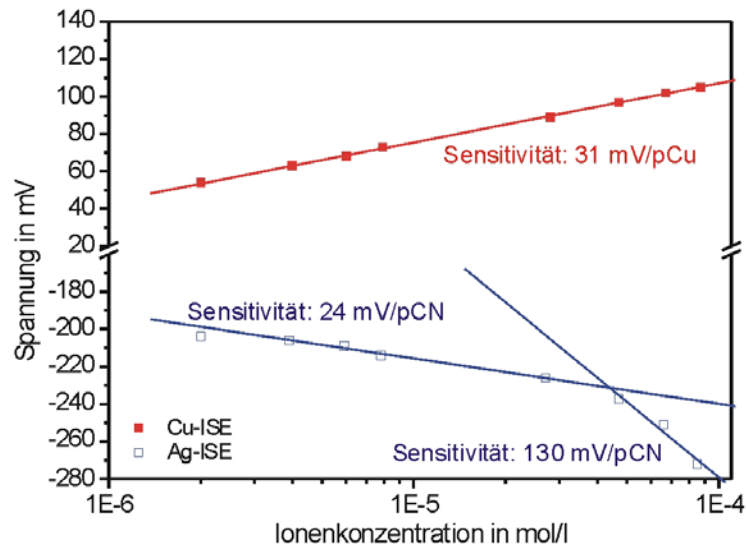


Abb. 4.58: Kalibrierkurven der Cu- und der Ag-ISE bei einer simultanen Messung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen in der hybriden Messzelle.

Die Cu-ISE zeigt für den ganzen gemessenen Cu^{2+} -Ionenkonzentrationsbereich ein lineares Verhalten mit einer Sensitivität von 31 mV/pCu, die sehr gut mit den Werten aus den Kalibriermessungen übereinstimmt. Für die CN^- -Ionenkonzentrationen von 2 $\mu\text{mol/l}$ bis 27 $\mu\text{mol/l}$ wird eine Sensitivität von 24 mV/pCN und für höhere CN^- -Ionenkonzentrationen eine Sensitivität von 130 mV/pCN gemessen. Die kleinere Sensitivität bei den niedrigen CN^- -Ionenkonzentrationen kann durch mögliche Komplexverbindungen zwischen Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, bevor die CN^- -Ionen der Probe in die HCN-Form konvertieren, in der unteren Messkammer erklärt werden. Es können mögliche Cu-CN-Komplexe wie $\text{Cu}(\text{CN})_2^-$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$ oder $\text{Cu}(\text{CN})_4^{3-}$ mit den Stabilitätskonstanten von 10^{16} , 10^{22} und 10^{23} entstehen [22,222,272,273]. Cyanid aus solchen Komplexen kann somit nicht in die obere Messkammer diffundieren und dort mittels der Ag-ISE erfasst werden. Das heißt, die CN^- -Ionenkonzentration in der oberen Messkammer ist niedriger als die eingestellte CN^- -Ionenkonzentration in der unteren Messkammer. Die Sensitivität der Ag-ISE bei höheren CN^- -Ionenkonzentrationen stimmt gut mit dem theoretischen Wert für Cyanidmessungen mit Hilfe von Ag-basierten Chalkogenidglassensoren von 118 mV/pCN überein. Darüber hinaus werden der pH-Wert und die Leitfähigkeit, die ebenfalls zu Signaländerungen führen können, bei gleichen Messungen mittels pH-ISE und Leitfähigkeitselektrode überprüft. Der pH-Wert der Lösung in der unteren Messkammer hat über die gesamte Messdauer einen annähernd konstanten Wert zwischen pH 3,01 und pH 3,05; der pH-Wert der Lösung in der oberen Messkammer ist über die ganze Messdauer konstant bei pH 11,4. Die Zugabe von Schwermetall- und Cyanidionen im μ -molaren Bereich hat keinen sichtbaren Einfluss auf die spezifische Leitfähigkeit der beiden Messlösungen und ist für die untere und obere Messkammer 12,8 mS/cm bzw. 12,9 mS/cm. Aufgrund der konstanten pH-Werte in der unteren und oberen Messkammer kann im Rahmen des Experiments darüber hinaus die Trennung beider Hintergrundlösungen bewiesen werden.

Um die Diffusionseigenschaften bei höheren Cyanidkonzentrationen zu verbessern und somit schnellere stabile Messwerte an der Ag-ISE in der oberen Messkammer zu erreichen, wird die Diffusionsmembran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ durch eine äquivalente Membran mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ ausgetauscht. Der Vergleich der Messsignale für simultane Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen bei der Verwendung der Diffusionsmembran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ und $0,45\ \mu\text{m}$ ist in Abb. 4.59 präsentiert.

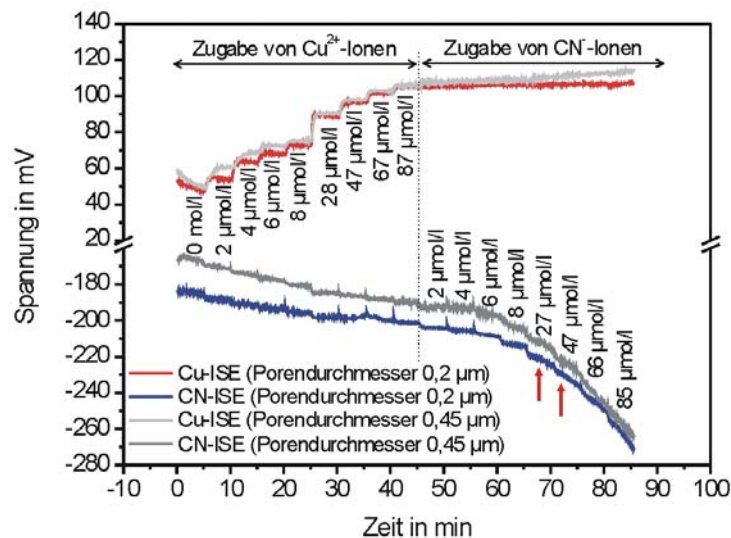


Abb. 4.59: Vergleich der Messkurven der Cu- und der Ag-ISE bei simultanen Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen in der hybriden Messzelle unter Einsatz einer Diffusionsmembran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ und $0,45\ \mu\text{m}$.

Das Verhalten der Cu-ISE und der Ag-ISE mit steigender Cu^{2+} - und CN^- -Ionenkonzentration ist für beide Messsysteme ähnlich. Die Sensitivitäten der Cu-ISE sind zwischen $28\ \text{mV/pCu}$ und $31\ \text{mV/pCu}$. Die Sensitivität der Ag-ISE im CN^- -Ionenkonzentrationsbereich von $2\ \mu\text{mol/l}$ bis $27\ \mu\text{mol/l}$ beträgt $28\ \text{mV/pCN}$ und ist für höhere Konzentrationen von Cyanid $126\ \text{mV/pCN}$ beim Einsatz der Diffusionsmembran mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$. Diese stimmen gut mit den erreichten Sensitivitäten der Ag-ISE bei Messungen unter Einsatz der Diffusionsmembran mit den kleineren Poren überein. Bei diesen Messungen kann lediglich eine „geringe“ Verbesserung der Diffusionseigenschaften erreicht werden. Im Vergleich zu den Messungen mit der Polytetrafluorethylen- (PTFE-) Membran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ wird bei der Verwendung der PTFE-Membran mit einer Porengröße von $0,45\ \mu\text{m}$ ein schnelleres und stabileres Signal bei den KCN-Konzentrationen zwischen $27\ \mu\text{mol/l}$ und $47\ \mu\text{mol/l}$ erzielt.

Für die Evaluierung der hybriden Messzelle und des Messprinzips werden neben der gleichzeitigen Bestimmung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen weitere simultane Messungen von Cd^{2+} - und CN^- -Ionen sowie Pb^{2+} - und CN^- -Ionen unter Verwendung der Membran mit einer Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ durchgeführt. Abb. 4.60 zeigt die Sensitivitätskurven aus den drei unterschiedlichen simultanen Messungen. Die

Sensitivitäten der Cu-, Cd- und Pb-ISEs sind jeweils 31 mV/pCu, 15 mV/pCd und 17 mV/pPb. Für Cyanidkonzentrationen größer als 27 $\mu\text{mol/l}$ zeigt die Ag-ISE bei allen drei Messungen vergleichbares Verhalten mit einer mittleren Sensitivität von 117 mV/pCN, die sehr gut mit der theoretisch zu erwarteten Sensitivität von 118 mV/pCN korreliert. Für kleinere Cyanidkonzentrationen werden Sensitivitäten von 24 mV/pCN, 16 mV/pCN und 14 mV/pCN mit der Ag-ISE bestimmt. Der Unterschied der Sensitivitäten kann mit Hilfe der unterschiedlichen Komplexverbindungen zwischen CN^- -Ionen und Cu^{2+} -, Cd^{2+} - oder Pb^{2+} -Ionen erklärt werden [22,222,273]. Für ein vollständiges Verständnis des Funktionsprinzips bedarf es jedoch noch weiter führenden Untersuchungen.

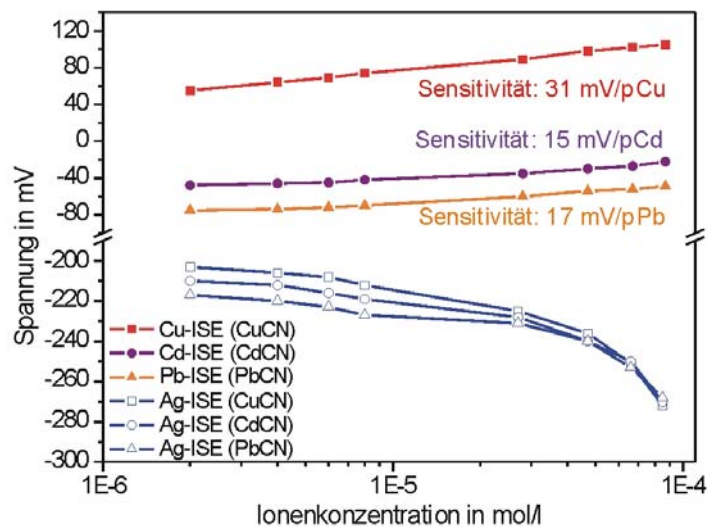


Abb. 4.60: Kalibrierkurven der Cu- und Ag-ISE, der Cd- und Ag-ISE und der Pb- und Ag-ISE bei simultanen Messung von jeweils Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, Cd^{2+} - und CN^- -Ionen und Pb^{2+} - und CN^- -Ionen.

4.4. Nachweis von Schwermetallen in gemischten Lösungszusammensetzungen

In Kap. 4.3 wird gezeigt, dass Schwermetallionen in definierten Flüssigkeiten sehr gut mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Chalkogenidglas-ISEs gemessen werden können. Jedoch besitzen die Chalkogenidglassensoren hohe Querempfindlichkeiten und können somit nur erschwert für gemischte Schwermetall-Lösungen verwendet werden. Für die Untersuchungen von gemischten Schwermetalllösungen, unterschiedlichen Weinen und Getränken sowie verschiedene Tomatensorten werden in der Literatur „elektronische Zungen“ vorgestellt. „Elektronische Zungen“ basieren auf einem Sensorarray in Kombination mit einer intelligenten Auswertesoftware, wie z.B. den künstlichen neuronalen Netzwerken (KNN), der Hauptkomponentenanalyse (PCA), „Partial least squares“ (PLS) oder „Soft independent modelling by class analogy“ (SIMCA). Sie nutzen entweder komplexe und zeitaufwändige Programme und/oder bestehen aus Sensorarrays mit einer großen Anzahl von Sensoren [274-287]. Für die qualitative und quantitative Bestimmung von unterschiedlichen Schwermetallen in gemischten Lösungen wird im Rahmen dieser Arbeit ein Sensorarray aus drei Chalkogenidglas-ISEs in Kombination mit einer intelligenten Software, der Fuzzy-Logic, als einfache „elektronische Zunge“ für die Schwermetalldetektion, in enger Zusammenarbeit mit der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg (Prof. W. Heiden), entwickelt. Die erzielten Ergebnisse werden in den folgenden Unterkapiteln vorgestellt.

4.4.1. Einführung in die Fuzzy-Logic

Die Fuzzy-Logic wurde vor mehr als 40 Jahren von Zadeh et al. erforscht und findet ab Mitte der 1980er Jahre in der Mikroelektronik, Steuer- und Regelungstechnik, beispielsweise bei der Mustererkennung, Chemometrik, Sensorik, Qualitätskontrolle etc., verbreitete Anwendung [288,289]. Die Fuzzy-Logic ist eine Form künstlicher Intelligenz (KI), die unscharfe Begriffe, wie weit/nah, sauber/schmutzig oder hell/dunkel, für die Entscheidungsfindung interpretieren kann, wie es auch bei dem Menschen der Fall ist. Im Allgemeinen basiert sie auf Vergleichen und unscharfen Begriffen und weniger auf diskreten Grenzwerten. Dadurch erhält sie bevorzugt Einsatz in Problemstellungen mit nicht diskreten und komplexen Vorgängen. Beispielsweise wird sie bei der Schärfeeinstellung einer Fotokamera oder Einstellung des Verschmutzungsgrades bei der Waschmaschine eingesetzt, wo andere Softwaremethoden, die auf definierten Werten und statischen Gesetzmäßigkeiten zur Entscheidungsfindung basieren, nicht verwendet werden können. Die Fuzzy-Set-Theorie hat vielseitige praktische Anwendungen. Die Bildverarbeitung für eine Segmentierung von molekularen Oberflächen durch physiko-chemische Potentiale ist ein Beispiel [290]. In Kombination mit weiteren intelligenten Software-Methoden, wie

z.B. den KNN, können die Vorteile beider Kls in einer schnellen und selbstbestimmenden Entscheidungssoftware resultieren [291-293]. Bei der Fuzzy-Set-Theorie ist jedes Element des Fuzzy-Sets (\tilde{A}) über eine Funktionsvariable (x) im Raum (X) und ihren Zugehörigkeitswert ($\mu_{\tilde{A}}$) definiert. Die Werte der Zugehörigkeit liegen normalerweise im Bereich $0 \leq \mu_{\tilde{A}} \leq 1$, d.h. zwischen Null und der kompletten Zugehörigkeit. Ein Fuzzy-Set kann mittels Gln. 4.2 beschrieben werden.

$$\tilde{A} = \left\{ x, \mu_{\tilde{A}} \mid x \in X \right\} \quad \text{Gln. 4.2}$$

Eines der wichtigsten Werkzeuge der Fuzzy-Set-Theorie ist das Konzept der *linguistischen Variable (LV)* [294]. Eine *LV* besteht aus einer Gruppe von sich (partiell) überlappenden Fuzzy-Sets über der Funktionsvariablen. Im Hinblick auf die Darstellung von einigen Klassen in einer *LV* sollten die Zugehörigkeitswerte im relevanten Funktionsbereich der Variable x über $0 \leq \mu_{\tilde{A}} \leq 1$ definiert sein. Die Überlappung der Zugehörigkeitsfunktionen in einer *LV* wird als Fuzziness bezeichnet. Mathematisch kann eine *LV* als Menge von n Fuzzy-Sets nach Gln. 4.3 und Gln. 4.4 beschrieben werden.

$$L = \left\{ \tilde{A}_1, \dots, \tilde{A}_n \right\} \quad \text{Gln. 4.3}$$

$$L = \left\{ \left\{ x, \mu_{\tilde{A}_1(x)} \right\}, \dots, \left\{ x, \mu_{\tilde{A}_n(x)} \right\} \right\} \quad \text{Gln. 4.4}$$

In Abb. 4.61 ist als Beispiel die *LV* „Alter“ mit den Fuzzy-Sets jung, erwachsen und alt über die Funktionsvariable Lebensjahre dargestellt. Die grauen Flächen sind die Fuzziness. Bei der Zugehörigkeit 1 im Fuzzy-Set „jung“ ist der Mensch zu 100% jung. Bei der Zugehörigkeit 0 ist er entweder zu 100% erwachsen, oder erwachsen und alt, oder zu 100% alt. Die Übergangsbereiche zwischen jung und erwachsen und zwischen erwachsen und alt werden mit einer linearen Zugehörigkeitsfunktion beschrieben.

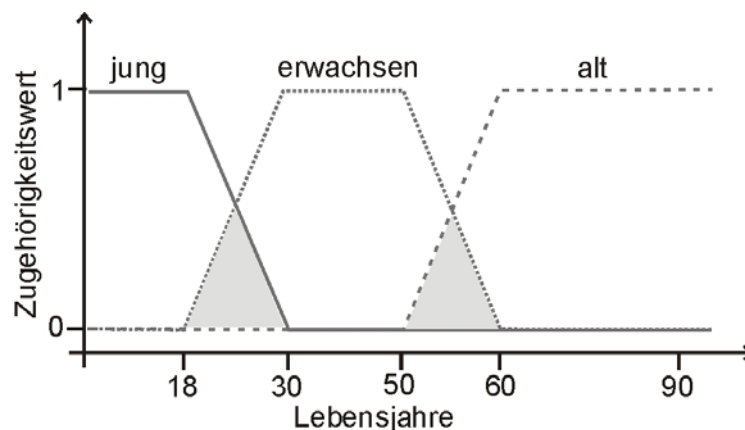


Abb. 4.61: Schematische Darstellung der *LV* „Alter“ mit den jeweiligen Fuzzy-Sets jung, erwachsen und alt.

Normalerweise ist die Information für die Entscheidungsfindung diskret, d.h. ein Sensorarray liefert diskrete Signalwerte für die Auswertung. Die Entscheidungsfindung selbst sollte wiederum auch diskrete Werte ausgeben, beispielsweise eine diskrete Aussage über die Lösungszusammensetzung und Konzentration von Schwermetallionen. Für die Anwendung der Fuzzy-Logic werden in einem solchen Fall die diskreten Inputdaten/Informationen zuerst als *LV* beschrieben. Diese Entscheidungsfindung erfolgt dann in drei Schritten:

- Fuzzifizierung,
- Fuzzy-Interferenz,
- Defuzzifizierung.

Bei der Fuzzifizierung werden die diskreten Inputdaten in Fuzzy-Sets konvertiert und *LV* gebildet. Anschließend werden diese *LV* mittels Fuzzy-Operatoren mathematisch evaluiert und neue *LV* gebildet (Fuzzy-Interferenz). Bei der Defuzzifizierung werden die Fuzzy-Sets aus den neu gebildeten *LV* in auswertbare, diskrete Ausgangsdaten konvertiert.

4.4.2. Messergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine „elektronische Zunge“ für die qualitative und quantitative Erfassung von Schwermetallen in gemischten Lösungen entwickelt. Die „elektronische Zunge“ basiert auf einem Sensorarray aus drei unterschiedlichen Chalkogenidglas-ISEs und einer intelligenten Software (Fuzzy-Logic-Programm). Für die Entwicklung des Fuzzy-Logic-Programms werden mit Hilfe des Sensorarrays, das aus einer Ag-, Cu-, und Pb-ISEs besteht, Kalibriermessungen in Ein- und Zwei-Schwermetallkomponenten-Gemischen durchgeführt. Hierfür werden Schwermetallgemische aus jeweils Cu:Pb, Cu:Ag und Pb:Ag in einem Verhältnis von 100%:0%, 80%:20%, 60%:40%, 40%:60%, 20%:80% und 0%:100% hergestellt. Die Kalibriermessungen erfolgen jeweils in 0,1 mol/l KNO_3 -Lösung, pH 3,0, in einem Konzentrationsbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l. Die Messzeit für jede Schwermetallkonzentration beträgt 3 min.

Abb. 4.62 stellt exemplarisch drei Kalibriermessungen mit der Ag-ISE in verschiedenen Lösungskompositionen mit Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l dar. Die Messung mit der Ag-ISE in der Ag:Cu 100%:0%-Lösung zeigt über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich ein lineares Verhalten mit einer mittleren Sensitivität von 60,5 mV/Dekade gegenüber dem Primärion (Ag^+ -Ion). Die Sensitivität korreliert sehr gut mit der theoretischen Nernstsensitivität für monovalente Ionen und mit Werten aus der Literatur für Ag-basierte Chalkogenidglassensoren [3,190]. Darüber hinaus zeigt die Ag-ISE auch ein konzentrationsabhängiges Verhalten gegenüber anderen Ionen, was auf die Querempfindlichkeit solcher Elektroden zurückzuführen und für die Entwicklung und

Anwendung des Fuzzy-Logic-Programms unabdingbar ist. Die Ag-ISE resultiert beispielsweise in einer 100% Pb^{2+} -Lösung und in einer gemischten Lösung mit Cu:Pb (60%:40%) jeweils in einer Sensitivität von 38,0 mV/Dekade bzw. 48,1 mV/Dekade. Die linearen Messbereiche sind jeweils von 0,1 mmol/l bis 1 mmol/l und zwischen 10 mol/l und 1 mmol/l. Die Ansprechzeit der Ag-ISE in Lösungen mit anderen Ionen steigt auf mehrere 10 s an. Solche Kalibriermessungen werden für alle dargestellten Schwermetallgemische mit dem gewählten Sensorarray durchgeführt. Es werden insgesamt 18 Kalibriermessungen mit drei ISEs gemacht, die für die Entwicklung der Fuzzy-Logic-Software in einer Datenbank hinterlegt werden.

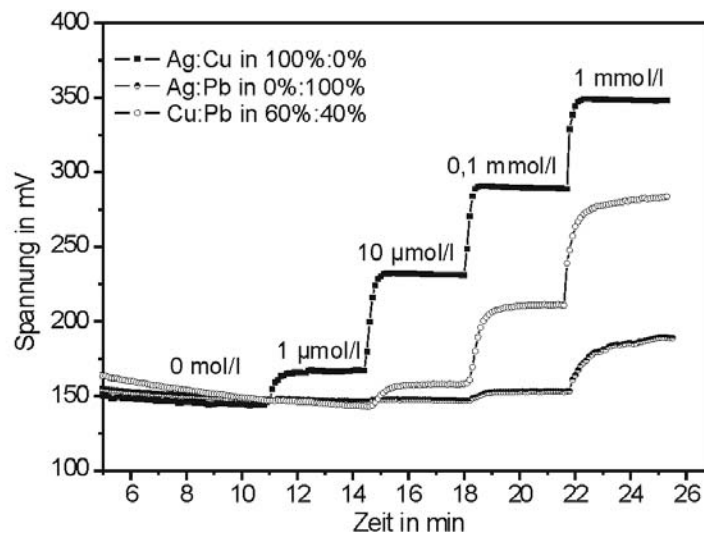


Abb. 4.62: Messkurven von Kalibriermessungen mit einer Ag-ISE in verschiedenen Schwermetalllösungen mit Ionenkonzentrationen von 1 µmol/l bis 1 mmol/l.

Zur Erstellung von sog. charakteristischen Kurven für jede Kalibriermessung und jeden Sensor werden jeweils die Signale der letzten 1,5 min der eingestellten Ionenkonzentration evaluiert. Daraus wird der Mittelwert und die Standardabweichung für jede Kalibrierkurve berechnet. Mit diesen Werten werden die charakteristischen Kurven erstellt, bei denen der Mittelwert der Signale und die dazugehörige Standardabweichung als Funktion des dekadischen Logarithmus der Ionenkonzentration aufgetragen werden. Somit ergeben sich für die 18 Kalibriermessungen mit drei Sensoren 54 charakteristische Kurven. Abb. 4.63 a) präsentiert schematisch drei charakteristische Kurven mit jeweils einem Mittelwert (schwarze Linie) und einer Standardabweichung (graue Zone). Wird mit dem Sensorarray nun in einer unbekanntem Lösung mit einer unbekanntem Schwermetallkomposition/Ionenkonzentration gemessen, so zeigt jeder Sensor des Sensorarrays einen konstanten Spannungswert. Für die Erstellung des Fuzzy-Sets wird dieses konstante Signal (Spannung) jedes Sensors mit allen charakteristischen Kurven geschnitten (Abb. 4.63 a)). Beim Schnitt der gemessenen Spannung mit dem Mittelwert einer charakteristischen Kurve wird der dazugehörigen

Ionenkonzentration, als Variable (x), der Zugehörigkeitswert 1 gegeben. Der Schnittmenge in der grauen Zone (Standardabweichung) werden Zugehörigkeiten zwischen 0 und 1 mit einer linearen Zugehörigkeitsfunktion zugeordnet. Außerhalb des Schnittbereichs ist die Zugehörigkeitsfunktion für die restlichen x -Werte 0. Ein solches Fuzzy-Set ist exemplarisch für die Komposition 2 dargestellt.

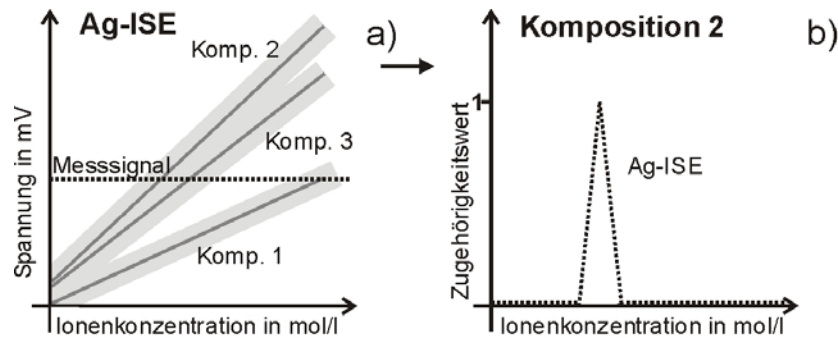


Abb. 4.63: a) Charakteristische Kurven der Ag-ISE aus Kalibriermessungen in drei verschiedenen Schwermetallgemischen und konstanter Messwert bei Messung mit der Ag-ISE in unbekannter Lösung; b) das zu Komposition 2 und zur Ag-ISE dazugehörige Fuzzy-Set.

Diesen Schritt bezeichnet man als Fuzzyifizierung. Anschließend werden für jede Lösungszusammensetzung (Komposition) die drei Fuzzy-Sets der verwendeten Sensoren zu einer LV zusammengefasst. Mit einem AND-Konnektiv werden die LV nach Gln. 4.5 mathematisch berechnet (Fuzzy-Interferenz).

$$\mu_{AND(x)} = \min\{\mu_{Ag-ISE(x)}, \mu_{Cu-ISE(x)}, \mu_{Pb-ISE(x)}\} \quad \text{Gln. 4.5}$$

Hierbei wird die Schnittmenge aller drei ISEs bestimmt, die in einer neuen LV resultiert. Dieser LV wird eine bestimmte Wahrscheinlichkeit für die Komposition und Ionenkonzentration der unbekannt Lösung zugeordnet. Die höchste Wahrscheinlichkeit wird der LV mit dem höchsten Maximum gegeben (Defuzzifizierung).

Das Funktionsprinzip des entwickelten Fuzzy-Logic-Programms ist schematisch in Abb. 4.64 dargestellt. Aus Messungen mit dem Sensorarray in drei verschiedenen Schwermetallgemischen (Kompositionen) mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen werden jeweils drei charakteristische Kurven für jeden Sensor gebildet und für die Evaluierung der Messung mit dem Sensorarray in einer unbekannt Lösung verwendet. Das Messsignal jeder Elektrode in einer unbekannt Schwermetalllösung wird mit den charakteristischen Kurven geschnitten und Fuzzy-Sets werden gebildet. Die LV wird nach Gln. 4.5 bestimmt. Nach Berechnung der neuen LV resultiert nur die Komposition 3 bei einer bestimmten Ionenkonzentration in einer Überlappung und somit in einem Maximum. Daher wird der Komposition 3 bei einer bestimmten Ionenkonzentration die höchste Wahrscheinlichkeit für die untersuchte unbekannt Lösung zugeordnet.

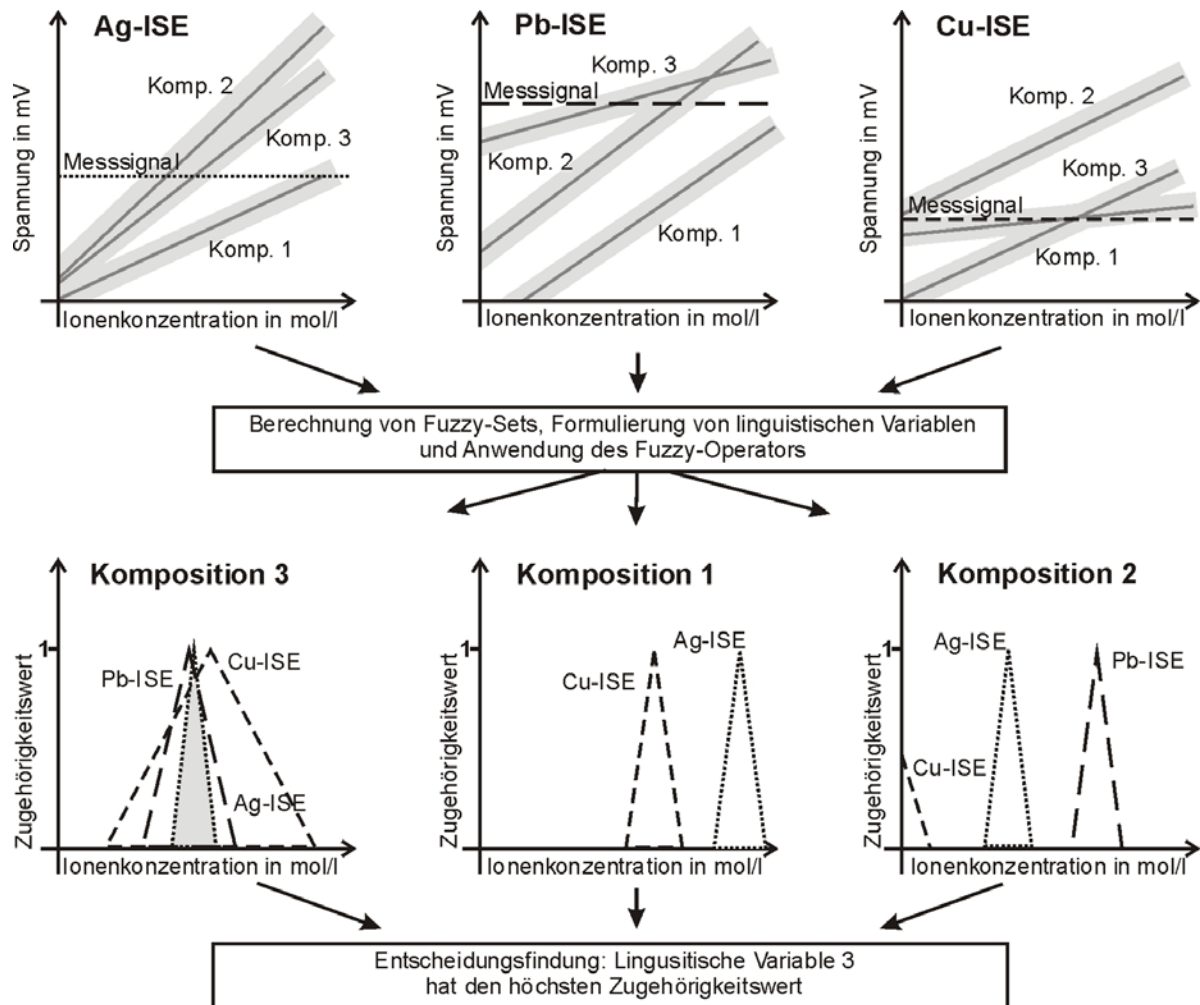


Abb. 4.64: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Fuzzy-Logic-Programms, das auf einem Sensorarray aus Ag-, Cu- und Pb-ISE, auf drei Kalibriermessungen und konstanten Messwerten der jeweiligen Sensoren basiert. Die graue Fläche repräsentiert die Überlappung aller drei Fuzzy-Sets bei der Komposition 3.

Die Evaluierung des entwickelten Fuzzy-Logic-Programms für Messungen mit einem Sensorarray aus drei Schwermetall-ISEs in Ein- und Zwei-Schwermetallkomponenten-Gemischen wird mit Hilfe von Selbsttests überprüft. Dabei werden konstante Spannungswerte aus den Kalibriermessungen, die für die Erstellung der charakteristischen Kurven verwendet werden, als unbekannte Werte in das Programm eingespeist und mittels des entwickelten Fuzzy-Logic-Programms ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.65 dargestellt. Hierbei werden auf der x-Achse eine Sequenz von unbekanntem Lösungszusammensetzungen und Ionenkonzentration als Inputdaten und auf der y-Achse in gleicher Reihenfolge wie auf der x-Achse, eine Sequenz von bekannten Lösungszusammensetzungen und Konzentration aufgetragen. Die Sequenz startet von links nach rechts (x-Achse) bzw. von unten nach oben (y-Achse), mit dem Gemisch Ag:Cu mit 0%:100% von der kleinsten bis zur höchsten Ionenkonzentration. Anschließend folgt das Gemisch

Ag:Cu mit 20%:80%, 40%:60%, 60%:40%, 80%:20% und 100%:0% mit jeweils von der kleinsten bis zur höchsten Ionenkonzentration. In gleicher Reihenfolge werden die Schwermetallgemische Pb:Ag und Pb:Cu aufgetragen. Der Wahrscheinlichkeitswert wird in Form eines Grauwertes des Kästchens ausgegeben. Schwarz bedeutet eine Wahrscheinlichkeit von 81% bis 100% und weiß die Wahrscheinlichkeit von 0% bis 20% für die jeweilige Komposition und Ionenkonzentration zugeordnet. Für die Auswertung einer unbekanntem Lösung, die auf der x-Achse dargestellt ist, können mehrere Lösungszusammensetzungen und Ionenkonzentrationen mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit von dem Fuzzy-Logic-Programm vorgeschlagen werden, was in mehreren y-Werten und unterschiedlichen Grauwerten der Kästchen ausgegeben wird. Eine zu 100% richtige Evaluierung aller unbekanntem Inputdaten in Abb. 4.65 würde in einer Diagonalen mit schwarzen Kästchen resultieren.

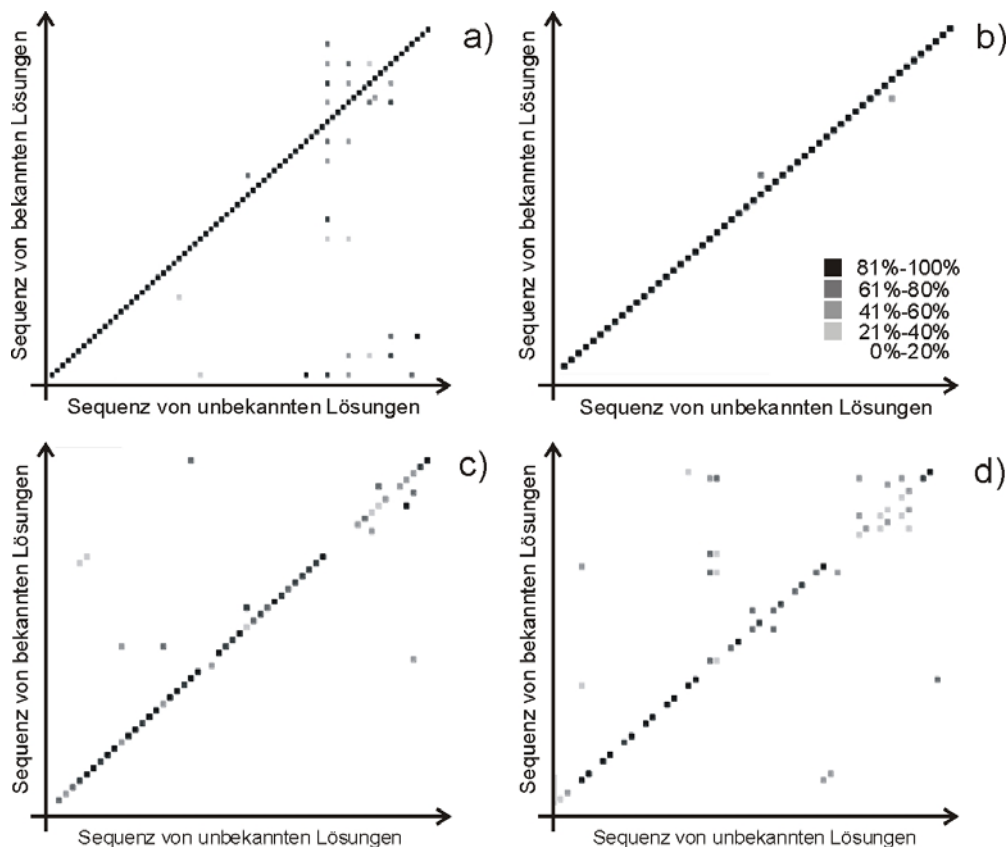


Abb. 4.65: Mathematische Diagramme der Aussagen des entwickelten Fuzzy-Logic-Programms für Messungen mit der „elektronischen Zunge“ in für das Programm unbekanntem Schwermetalllösungen: a) gleiche Lösungen wie sie für die Erstellung der charakteristischen Kurven verwendet werden, b) gleiche Lösungen wie bei a) jedoch ohne die Ionenkonzentration $1 \mu\text{mol/l}$, c) gleiche Lösungen wie bei b) mit einem Offset von $\pm 5 \text{ mV}$ und d) gleiche Lösungen wie bei b) mit einem Offset von $\pm 10 \text{ mV}$.

In Abb. 4.65 a) wird gezeigt, dass der Selbsttest des Fuzzy-Logic-Programms mit hohen Wahrscheinlichkeiten die richtige Schwermetalllösung vorschlägt. Jedoch

werden für einige unbekannte Lösungen auch weitere Kompositionen und Konzentrationen mit kleineren Wahrscheinlichkeiten offeriert. Dieses wird auf Lösungen mit kleinen Ionenkonzentrationen zurückgeführt und überprüft. Abb. 4.65 b) stellt exemplarisch die Ergebnisse vom gleichen Selbsttest wie in Abb. 4.65 a) vor, jedoch wird hierbei die kleinste Ionenkonzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ jedes Schwermetallgemisches nicht berücksichtigt. Bis auf zwei Vorschläge zur Lösungszusammensetzung liegen alle Vorschläge des Fuzzy-Logic-Programms auf der Diagonalen mit Wahrscheinlichkeiten zwischen 81% und 100%. Da die Absolutwerte der Schwermetall-ISEs in gleichen Schwermetalllösungen leicht variieren können, wird im nächsten Schritt überprüft, wie die Aussagen bzw. Vorschläge des Fuzzy-Logic-Programms sind, wenn die absoluten Werte um $\pm 5 \text{ mV}$ oder um $\pm 10 \text{ mV}$ von den absoluten Werten, die für die Erstellung der charakteristischen Kurven verwendet werden, abweichen. Somit werden die Inputdaten für den Selbsttest mit einem Offset von $\pm 5 \text{ mV}$ bzw. $\pm 10 \text{ mV}$ versehen. Die Ergebnisse sind jeweils in Abb. 4.65 c) und Abb. 4.65 d) aufgetragen. Bei einem Offset von $\pm 5 \text{ mV}$ werden die richtigen Aussagen für alle unbekanntes Schwermetalllösungen mit einer akzeptablen Trefferrate von 80% gemacht. Jedoch zeigt das Programm bei einem Offset von $\pm 10 \text{ mV}$, dass richtige Aussagen mit kleineren Wahrscheinlichkeiten und darüber hinaus falsche Aussagen mit höheren Wahrscheinlichkeitswerten ausgegeben werden. Daraus resultiert, dass die entwickelte „elektronische Zunge“ zuverlässig für Messungen in unbekanntes Schwermetallgemischen (Ein- und Zwei-Komponentengemische) eingesetzt werden kann, wenn die absoluten Messwerte des Sensorarrays $\leq 5 \text{ mV}$ von den Messwerten aus den Kalibriermessungen abweichen [295-297].

5. Diskussion

Im Rahmen dieses Kapitels sollen die in Kap. 4 dargestellten Ergebnisse miteinander verglichen und diskutiert werden. Es soll ein Vergleich des *Cyanidase*-basierten Biosensors mit den Ag-basierten ISEs für die Cyaniderfassung durchgeführt werden. Darüber hinaus sollen die simultanen Messungen von Cyanid und Schwermetallen und der Einsatz der Fuzzy-Logic für Messungen in gemischten Schwermetalllösungen evaluiert werden. Die Ergebnisse sollen im direkten Vergleich zu den theoretisch erwarteten Werten und zu Ergebnissen aus der Literatur bewertet werden.

5.1. Vergleich *Cyanidase*-basierte EIS-Struktur und Ag-basierte ISE für die Erfassung von Cyanid

Im Hinblick auf einen sehr selektiven Sensor und stabilen Sensor für die Cyaniderfassung in Flüssigkeiten werden in dieser Promotionsarbeit sowohl ein kapazitiver *Cyanidase*-basierter EIS-Sensor als auch potentiometrische Ag-basierte ISEs entwickelt. Beide Transducerarten (kapazitiv und potentiometrisch) ermöglichen ein direktes Auslesen des Messsignals. Der Biosensor basiert auf der Katalyse von Cyanid durch die *Cyanidase* zu Ammoniak und Formiat, die in einer lokalen pH-Wert-Verschiebung resultiert und mit Hilfe einer pH-sensitiven Feldeffekt-Struktur direkt kapazitiv ausgelesen werden kann. Dabei geht die *Cyanidase* unverbraucht wieder aus der Reaktion hervor. Die ISEs nutzen die Änderung des Oberflächenpotentials der Ag-haltigen Membran aufgrund der Komplexverbindung zwischen CN^- - und Ag^+ -Ionen. Durch die Komplexverbindung wird die Sensormembran verbraucht und partiell zerstört.

Für die Entwicklung des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors wird zuerst die Si-basierte Feldeffekt-Struktur hergestellt und eine geeignete Transducerstruktur ausgewählt. Anschließend wird die *Cyanidase* in einem Zwei-Schritt-Verfahren, der kovalenten Kopplung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte SepharoseTM oder an Eupergit C® und dem Einschluss des „*Cyanidase*-Gels“ unter einer Dialysemembran, auf der pH-sensitiven EIS-Struktur immobilisiert. Die *Cyanidase* wird beim Kooperationspartner aus *E.coli*-Bakterien exprimiert. Die Herstellung der Cyanid-sensitiven Membran ist sehr aufwändig und zeitintensiv, denn die Expression der *Cyanidase* dauert 1-2 Tage und die Immobilisierung der *Cyanidase* beträgt 1-3 Tage. Die Ag-basierten ISEs werden mittels Dünnschicht- und Siliziumtechnologie auf Si-Chips hergestellt. Hierbei werden die Ag-Halogenid-Membranen mit Hilfe von Dickschichttechnik innerhalb von wenigen Stunden und die Ag-Chalkogenidglas-Membranen mittels PLD-Verfahren innerhalb von einigen Minuten auf den Si-Substraten abgeschieden. Im Vergleich zur

Immobilisierung der *Cyanidase* für den Biosensor ist die Herstellung der Cyanid-sensitiven Ag-basierten Membranen relativ schnell und einfach.

Die physikalischen Untersuchungen der pH-sensitiven EIS-Strukturen und der Ag-basierten Sensoren resultieren in homogenen und geschlossenen Schichten, die für die definierte Funktionalität der Sensoren unabdingbar sind. Die elektrochemische Charakterisierung des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors erfolgt in einem definierten Puffer: Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl. Da die theoretisch erwartete pH-Wert-Verschiebung nur sehr gering ist, soll für die Messungen eine möglichst niedrige Puffermolarität gewählt werden. Darüber hinaus wird für die *Cyanidase* eine konstante Ionenstärke mit 200 mmol/l NaCl eingestellt, die für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität notwendig ist. Mit dem pH-Wert von pH 8,0 wird ein Kompromiss zwischen einer hohen Enzymaktivität und Stabilität von *Cyanidase* getroffen, denn das pH-Optimum der *Cyanidase* liegt bei pH 8,5 (s. Abb. 5.1). Bei pH 8,0 werden nur noch 26% der maximalen Enzymaktivität ($0,6 \mu\text{mol}/\text{min}$) erreicht und bei pH 9,0 zeigt die *Cyanidase* nach 5 min keine Enzymaktivität mehr (Abb. 5.1). Untersuchungen der Enzymaktivität bei Raumtemperatur resultieren in einem Verlust von 82% der Anfangsenzymaktivität nach 12 h Lagerung der immobilisierten *Cyanidase* bei pH 8,5 und Raumtemperatur (s. Abb. 4.13 in Kap. 4.1.2.1). Je größer der pH-Wert ist, desto schneller denaturieren die Enzyme [147,148,153,234].

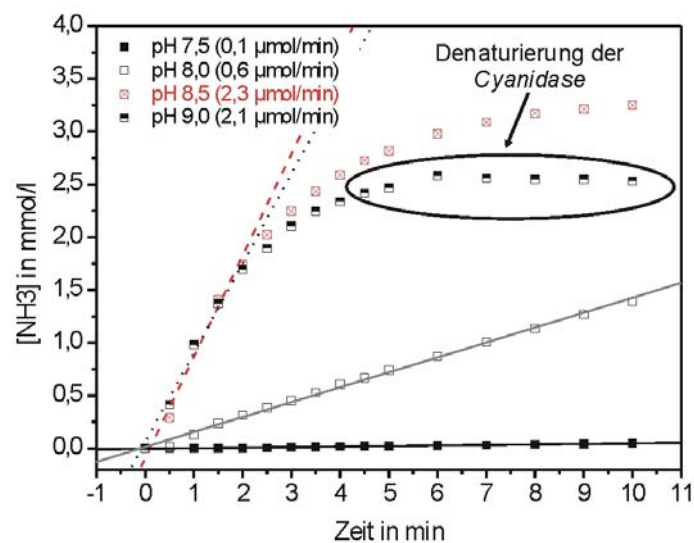


Abb. 5.1: Enzymaktivitätskurven von nativer *Cyanidase* im Na-P-Puffer (pH X, 60 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl mit unterschiedlichen pH-Werten.

Darüber hinaus liegt das Cyanid bei pH 8,0 zu 95% und bei pH 8,5 nur zu 87% als HCN vor (s. Gl. 2.57 in Kap. 2.3.2). Die *Cyanidase* setzt katalytisch HCN und nicht CN^- -Ionen um. Da sowohl die *Cyanidase* sehr „empfindlich“ ist und nur eine geringe Enzymaktivität hat als auch die theoretischen Berechnungen der pH-Wert-Verschiebung in kleinen Signalen resultieren, müssen die elektrochemischen Untersuchungen unter optimalen Bedingungen durchgeführt werden. Hierbei kann jedoch erstmalig gezeigt werden, dass der *Cyanidase*-EIS-Sensor auf Basis von

lokalen pH-Wert-Änderungen unter optimalen Bedingungen funktioniert, allerdings für den Einsatz in realen Lösungen nicht geeignet ist. Im Gegensatz zum Biosensor werden elektrochemische Untersuchungen mit den Ag-basierten ISEs in 0,1 mol/l KNO_3 , pH 11,5, durchgeführt. Über die Wahl der Molarität werden eine möglichst hohe Leitfähigkeit eingestellt und über den pH-Wert das chemische Gleichgewicht des Cyanids zu 99,4% in Richtung der CN^- -Ionen verschoben (s. Gl. 2.57 in Kap. 2.3.2); denn die Ag-basierten Sensoren bilden Komplexe mit den CN^- -Ionen und nicht mit HCN. Auch hier wird für eine optimale Signalausbeute eine definierte Lösung gewählt; jedoch können aufgrund der Festkörper- und nicht biologischen Membran mit den Ag-Sensoren Messungen auch in anderen Cyanid-haltigen Lösungen durchgeführt werden, die man zuvor möglichst auf einen hohen pH-Wert titriert. Für kleinere pH-Werte wird der Einfluss der HCN-Konzentration auf das Sensorsignal von B. Fleet et al. und R.A. Durst et al. berechnet und berücksichtigt [94,112]. Dadurch kann ein direkter Einsatz der Ag-basierten Elektroden auch in anderen Lösungen erfolgen.

Die elektrochemische Charakterisierung der entwickelten Cyanidsensoren wird gegenüber einer Ag/AgCl-Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode durchgeführt. Kalibriermessungen mit der Ag-ISE und unterschiedlichen Referenzelektroden in Cyanid-haltigen Lösungen zeigen, dass die Wahl der Referenzelektrode auf die Sensitivität der Ag-ISE keinen signifikanten Einfluss hat (s. Abb. 5.2) und für alle Referenzelektroden gleich ist. Darüber hinaus wird in der Literatur für die Cyanidmessungen mit Ag-Chemosensoren hauptsächlich der Einsatz von Kalomel- und Ag/AgCl-Referenzelektroden beschrieben [86,87,93,98,104-109].

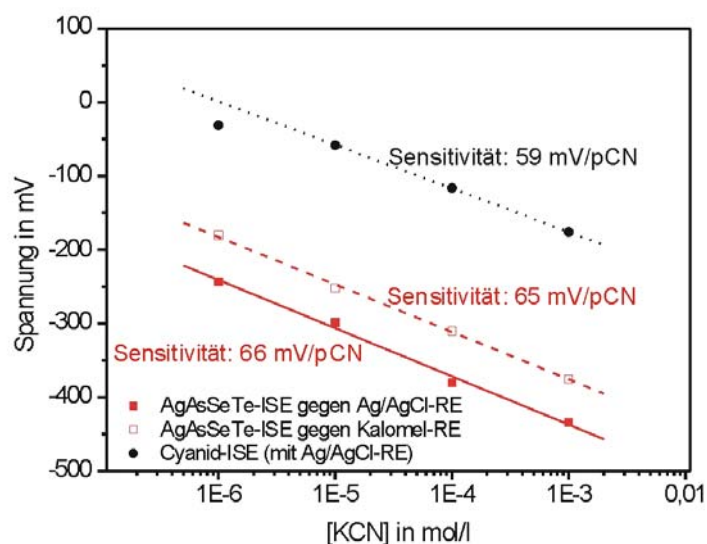


Abb. 5.2: Vergleich der Kalibrierkurven der AgAsSeTe-ISE in verschiedenen KCN-Konzentrationen, gemessen gegenüber unterschiedlichen Referenzelektroden. Vergleich gegenüber einer kombinierten kommerziellen Cyanid-ISE.

Die intrinsischen Sensorparameter der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und optimierten kapazitiven *Cyanidase*-basierten EIS-Strukturen und potentiometrischen

Ag-basierten ISEs sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Als Ag-Chalkogenidglas-ISE wird hierfür die ISE mit der AgAsSeTe-Membran gewählt. Darüber hinaus stehen die Ergebnisse im direkten Vergleich zur kommerziellen potentiometrischen Cyanid-ISE auf Basis einer Ag-Halogenid-Membran.

Tab. 5.1: Zusammenfassung der intrinsischen Sensorparameter der hergestellten Bio- und Si-Chip-ISEs, sowie der kommerziellen Cyanid-ISE für die Cyaniderfassung.

	Cyanidase- EIS-Struktur	Ag/AgCl-ISE	AgAsSeTe-ISE	kommerzielle Cyanid-ISE
Sensitivität in mV/pCN	13±2	62±4	90±6	58±1
untere Nachweisgrenze in µmol/l	200±1	5,1±0,2	0,4±0,1	1,9±0,2
lineare Messbereich in µmol/l	250-1.000	10-10.000	1-10.000	10-10.000
Hysterese in mV	4-17	1-20	1-28	1-25
Ansprechzeit ($t_{90\%}$) in s bei 1 mmol CN	>660	25±6	42±12	125±12

Wie man aus Tab. 5.1 entnehmen kann, zeigt der Biosensor im Vergleich zu den entwickelten Ag-basierten ISEs die kleinste mittlere Sensitivität von 13±2 mV/pCN, die gut mit den theoretischen Berechnungen von 13,6 mV/pCN bzw. 15,8 mV/pCN (Visual MINTEQ) übereinstimmt. Sowohl die Ag-Halogenid- als auch die Ag-Chalkogenidglas-ISE basieren auf der Komplexverbindung zwischen Ag⁺-Ionen in der Membran und CN⁻-Ionen in der Lösung. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeitskonstanten zwischen Ag-Halogeniden und Ag-Chalkogeniden werden jedoch in der Literatur unterschiedliche Mechanismen zur Signalbildung der beiden Elektrodenarten beschrieben und somit unterschiedliche Sensitivitäten erwartet. Für die Ag-Halogenid-ISE und für die Ag-Chalkogenid-ISE werden jeweils Sensitivitäten von 59 mV/pCN und 118 mV/pCN berechnet [86-89,93,98,100,104-109]. Sowohl die Sensitivität der Ag/AgCl-ISE als auch die der kommerziellen Ag-Halogenid-ISE korrelieren gut mit der theoretischen Sensitivität für Ag-Halogenid-ISEs. Die hergestellte AgAsSeTe-ISE zeigt eine kleinere Sensitivität als erwartet, was auf die freien Ag⁺-Ionen im Material zurückgeführt werden kann. Je nach Aktivität bzw. Konzentration der freien Ag⁺-Ionen in der Membran können unterschiedliche Sensitivitäten der Ag-Chalkogenidglas-ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen erreicht werden [100,104-109]. Der Vergleich der Sensitivität der AgAsSeTe-ISE mit ähnlichen Materialsystemen und Dünnschichtsensoren in der Literatur resultiert in einer akzeptablen Übereinstimmung. Neshkova et al. zeigen eine Sensitivität von 101 mV/pCN für einen Dünnschichtsensor mit einer AgSeTe-Membran [109].

Darüber hinaus besitzt die AgAsSeTe-ISE die höchste Sensitivität von den hergestellten und in Tab. 5.1 präsentierten Cyanidsensoren. Der lineare Messbereich der Ag/AgCl-ISE beträgt von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l und die untere Nachweisgrenze liegt im μ -molaren Bereich. Diese Parameter korrelieren gut mit den Parametern der kommerziellen Cyanid-ISE und den Werten aus der Literatur für Bulk-AgI-ISEs mit einem linearen Messbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l KCN [86-89]. Den größten linearen Messbereich zeigt die AgAsSeTe-ISE mit einer unteren Nachweisgrenze von $0,4 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$, die im Vergleich zu der unteren Nachweisgrenze der AgSeTe-ISE von Neshkova et al. etwa 12-mal niedriger ist [109]. Der *Cyanidase*-basierte EIS-Sensor hat den kleinsten linearen Messbereich von 0,1 mmol/l bis 1 mmol/l mit einer unteren Nachweisgrenze von $200 \pm 1 \mu\text{mol/l}$ KCN.

Im Vergleich zu Werten aus der Literatur für einen *Cyanidase*-basierten potentiometrischen Ammoniak-Sensor sind die untere Nachweisgrenze etwa 30-mal größer und der lineare Messbereich um den Faktor fünf höher [74,75]. Dies ist auf das Messprinzip der *Cyanidase*-basierten Feldeffekt-Struktur zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit kann jedoch erstmalig ein neues Messprinzip auf Basis einer pH-Wert-Verschiebung mittels Differenzmessungen für die Cyaniderfassung mit einer *Cyanidase*-basierten Feldeffekt-Struktur gezeigt werden. Wie in Tab. 5.1 zusammengefasst, ist die Hysterese für alle hergestellten Sensoren ähnlich und mit der kommerziellen Elektrode vergleichbar. Die relativ hohen Hysteresen im Falle der entwickelten Sensoren sind einerseits auf die relativ „dicke“ Enzymmembran und andererseits auf den Messmechanismus der potentiometrischen ISEs, d.h. auf die partielle Zerstörung der Membran, zurückzuführen. Die Ansprechzeiten der Ag-ISEs in 1 mmol/l KCN-Lösung sind unterhalb einer Minute und betragen für die kommerzielle Cyanid-ISE bis zu 2 min. Der Unterschied kann hauptsächlich über die Membranschichtdicke der Elektroden erklärt werden: je dicker die Membran, desto größer ist die Ansprechzeit. Für die 300 μm -dünne Ag/AgCl-Membran ist die Ansprechzeit etwa 5-mal kleiner als für die kommerzielle Bulk-Cyanid-ISE mit einer 1 cm dicken Membran. Aufgrund des unterschiedlichen Funktionsmechanismus der Ag-Chalkogenidglas-ISE in Cyanid-haltigen Lösungen im Vergleich zur Ag-Halogenid-ISE ist die Ansprechzeit der Ag-Chalkogenidglas-ISE mit einer 1000-fach dünneren Membran 1,8-mal größer: bei der Ag-Chalkogenidglas-ISE reagieren die CN^- -Ionen mit freien Ag^+ -Ionen in der Membran, wobei es bei der Ag/AgCl-ISE aufgrund der Löslichkeits- und Komplexbildungskonstante zum direkten Austausch von Cl^- -Ionen mit den CN^- -Ionen kommt [93,98,100]. Bei der Cyanidkonzentration von 1 mmol/l zeigt der Biosensor eine Ansprechzeit von über 10 min. Für den gewählten Biosensor sind 25 mg NHS-aktivierte SepharoseTM mit *Cyanidase* auf der pH-sensitiven EIS-Struktur immobilisiert; d.h. unter optimalen Bedingungen kann eine Enzymaktivität von 0,15 $\mu\text{mol/min}$ erreicht werden (s. Abb. 4.23 in Kap. 4.1.2.3). In einem Volumen von 0,7 ml mit einer Cyanidkonzentration von 1 mmol/l würde unter optimalen Bedingungen die gesamte Cyanidmenge nach 5 min umgesetzt werden. Unter Einbeziehung des K_m -Wertes aus der Literatur für die *Cyanidase* von

1,7 mmol/l würde es bedeuten, dass bei der Konzentration von 1 mmol/l die *Cyanidase* mit 30% der maximalen Geschwindigkeit katalysiert. Je mehr Cyanid umgesetzt wird, desto geringer ist die Enzymgeschwindigkeit, d.h. desto geringer ist die Enzymaktivität (s. Abb. 2.3 in Kap. 2.1). Dieses Verhalten des Enzyms führt zur längeren Ansprechzeiten der *Cyanidase*-basierten EIS-Struktur.

Stabilitätsuntersuchungen der immobilisierten *Cyanidase* an die NHS-aktivierte SepharoseTM zeigen, dass bei Lagerung der *Cyanidase* in Na-P-Puffer (pH 7,0, 150 mmol/l), 200 mmol/l NaCl und 200 mmol/l Imidazol bei 4 °C nach acht Tagen die Enzymaktivität auf 37% der *Cyanidase*-Anfangsaktivität sinkt (s. Abb. 4.17 in Kap. 4.1.2.1). Die native *Cyanidase* resultiert in 50% der *Cyanidase*-Anfangsaktivität nach acht Tagen unter gleichen Bedingungen und im gleichen Puffer. Das bedeutet auf der einen Seite, dass die Immobilisierung der *Cyanidase* an die NHS-aktivierte SepharoseTM im Vergleich zum nativen Enzym zu keiner signifikanten Verbesserung der Stabilität führt. Auf der anderen Seite soll der *Cyanidase*-basierte EIS-Sensor innerhalb von ein bis maximal zwei Wochen für die Cyanidmessungen eingesetzt werden. Stabilitätsmessungen der Ag-basierten ISEs in Cyanid-haltigen Lösungen zeigen nach 14 Wochen Sensitivitäten von 85 mV/pCN bzw. 97 mV/pCN für die Ag/AgCl-ISE und die AgAsSeTe-ISE. Die erhöhte Sensitivität der Ag/AgCl-ISE nach 14 Wochen (im Vergleich zur Sensitivität direkt nach der Herstellung) könnte auf den Messmechanismus zurückgeführt werden, bei dem Cl⁻-Ionen aus der Membran gelöst werden und somit die Ag/AgCl-Membran sich mit der Zeit zu einer Ag-Membran modifiziert. Dieses führt auch zu einer Silberfärbung der Membran. Cyanidmessungen mit einer Ag-ISE in der Literatur liefern eine Sensitivität von 113 mV/pCN bis 120 mV/pCN [113,114,265]. RBS-Untersuchungen der Chalkogenidglasmembran belegen, dass es durch den Kontakt der ISE mit Cyanid-haltigen Lösungen zu einer Anreicherung von Silber an der Sensoroberfläche kommt (s. Abb. 4.43 in Kap. 4.2.2.1). Dieses kann zur dynamischen Erhöhung der Sensitivität der AgAsSeTe-ISE führen. Darüber hinaus ergeben videomikroskopische Untersuchungen der sensitiven Membran nach Kontakt mit dem Messmedium, dass die Membran partiell zerstört wird. Je dünner die Membranschicht ist, desto schneller sind „Korrosionseffekte“ der Membranschicht zu beobachten. Nach dem kompletten Messzyklus (je drei Messungen der Sensitivität, Hysterese und Ansprechzeit und eine Driftmessung von 11 h) kann für die gewählte AgAsSeTe-ISE mit einer Schichtdicke von 385 nm allerdings immer noch eine geschlossene Membranschicht festgestellt werden (s. Abb. 4.44 in Kap. 4.2.2.1). Der Vergleich der Stabilität des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors mit den Ag-basierten ISEs zeigt, dass im Falle der ISEs bis zu drei Monaten Cyanid sensitiv erfasst werden kann, wobei die Stabilität der *Cyanidase*-basierten Feldeffekt-Struktur hauptsächlich von der Stabilität des Enzyms abhängig ist und der Sensor somit maximal für 1-2 Wochen eingesetzt werden kann.

Enzyme zeichnen sich durch ihre hohe Substrat- und Wirkungsspezifität aus, d.h. sie besitzen eine hohe Selektivität. Enzymaktivitätsmessungen der *Cyanidase* in

anderen Cyanidverbindungen, wie z.B. in $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6^-$ und KSCN -Lösungen, präsentieren keine katalytische Reaktion. Darüber hinaus zeigen Cu^{2+} -Ionen nur einen minimalen Einfluss auf die Enzymaktivität in KCN -Lösungen (s. Abb. 4.28 in Kap. 4.1.2.3). Weitere Störionen werden nicht untersucht, da der Einsatz des neuartigen *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors nur unter optimalen Laborbedingungen stattfinden kann und nicht für den Einsatz in realen Lösungen geeignet ist. Für die Ag/AgCl -ISE sollen sowohl Halogenide als auch Sulfide in der Messlösung vermieden werden, da beide das Sensorsignal signifikant beeinflussen. Die Selektivitätsmessungen der Ag -Chalkogenidglas-ISE resultieren in einem geringen Einfluss von Halogeniden auf das Messsignal. Jedoch sollen Sulfide in der Analytlösung ebenfalls vermieden werden, da sie das Messsignal stark beeinflussen. Dies kann durch die sehr kleine Löslichkeitskonstante (bzw. großen $\text{p}K_{\text{L}}$ -Werte) von Ag_2S im Vergleich zu der Komplexbildungskonstante (bzw. $\text{p}K_{\text{K}}$ -Werte) von $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ erklärt werden. Dieses Verhalten stimmt gut mit Selektivitätsuntersuchungen in der Literatur überein [86-89,107,109]. Darüber hinaus kann die Ag/AgCl -ISE für Messungen von unterschiedlichen $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6^-$ und KSCN -Konzentrationen erfolgreich eingesetzt werden, da die Ag^+ -Ionen beispielsweise $\text{Ag}(\text{SCN})_2^-$ -Komplexe mit SCN^- bilden können und somit in einem Signal resultieren [266,267].

5.2. Simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen

In der Umweltanalytik spielen sowohl Cyanid als auch Schwermetalle eine wichtige Rolle; aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften werden sie bevorzugt für zahlreiche industrielle Zwecke verwendet und können somit über Abgase und Abwässer in die Umwelt gelangen. Nach der WHO liegen die Grenzwerte für Cyanid und Schwermetalle bei jeweils 0,07 mg/l Cyanid und zwischen 0,003 mg/l bis 2 mg/l Schwermetall [2,20,44-46]. Heutzutage werden beide Komponenten separat erfasst. Die Messung ist oftmals zeitintensiv, instrumentell aufwändig und bedarf geschultem Fachpersonal. Eine zuverlässige simultane Erfassung von Cyanid und Schwermetallen in der gleichen Messprobe ist aufgrund der chemischen Eigenschaften von Cyanid und Schwermetallen schwierig. Der pK_S -Wert von Cyanid beträgt 9,31, somit liegt das Cyanid in sauren Lösungen hauptsächlich als gasförmiges HCN vor. Umgekehrt fallen Schwermetalle bei hohen pH-Werten als Hydroxide aus und können somit nicht mit einer ISE erfasst werden [171,218-222].

Daher müssen für eine qualitative und quantitative Erfassung von Cyanid und Schwermetallen zuerst beide Komponenten voneinander getrennt und anschließend simultan in separaten Lösungen gemessen werden. Für die Trennung von Cyanid aus der Messlösung wird in der Literatur häufig eine Ansäuerung in Kombination mit einer Erwärmung der Messlösung eingesetzt, denn die Siedetemperatur von HCN liegt bei 26 °C. Darüber hinaus wird Cyanid auch durch Ansäuerung in Kombination mit einem „Purge“-System, bei dem ein Gas durch die Messlösung strömt, aus der Messlösung freigesetzt [13,80,269,298]. Anschließend diffundiert das HCN durch eine gaspermeable und hydrophobe PTFE-Membran in eine weitere Lösung, wo es über die Verschiebung eines chemischen Gleichgewichtes oder über die direkte Messung von CN^- -Ionen erfasst werden kann [112-114]. Bei DIN-Standardverfahren für die Cyanidmessung wird für die Trennung von Cyanid eine Destillation bei 125 °C und anschließend eine Diffusion von freigesetztem Cyanid bei pH 3,8 und 30 °C durchgeführt. Zusätzlich werden mit Hilfe vom UV-Licht Ferrocyanidverbindungen und Thiocyanat freigesetzt. Anschließend wird das HCN als CN^- -Ion in einer basischen Lösung mit Hilfe der Pyridin-Barbitursäure-Methode spektrophotometrisch erfasst [13,269]. Für die qualitative und quantitative Messung von Schwermetallen wird mitunter die spektrophotometrische Methode AAS-ICP als Standardverfahren eingesetzt [270,271].

Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmalig ein System für die simultane Messung von Cyanid und Schwermetallen vorgestellt. In Anlehnung an die Trennverfahren von Cyanid in der Literatur werden eine hybride Messzelle sowie Messmethode entwickelt und anhand von simultanen Messungen von Cyanid und Schwermetallen evaluiert. Um ein möglichst einfaches Messsystem für die Cyanid- und Schwermetallerfassung zu realisieren, werden für die Messungen Cyanid-ISEs und Schwermetall-ISEs auf Chalkogenidglasbasis hergestellt und eingesetzt. Für die

Cyanidmessung werden die AgAsSeTe-ISE und für die Schwermetallerfassung werden die jeweilige Cu-, Cd- und Pb-ISE eingesetzt. Darüber hinaus werden für die Messkammern der hybriden Messzelle gleiche Hintergrundlösungen von 0,1 mol/l KNO_3 mit jeweils unterschiedlichen pH-Werten verwendet. Für die Messung von Schwermetallen in der unteren Messkammer und Cyanid in der oberen Messkammer ist der pH-Wert jeweils pH 3,0 und pH 11,5. Die Wahl der pH-Werte ist darin begründet, dass Schwermetall-ISEs auf Basis von Chalkogenidgläsern im Bereich von pH 3 bis pH 6 unabhängig vom pH-Wert der Lösung messen und Cyanid bei pH 11,5 zu 99,4% als Cyanidion vorliegt und somit von der Ag-basierten ISE direkt erfasst werden kann. Bei kleineren pH-Werten als pH 3 könnten weitere Cyanidkomplexe gebrochen und somit weitere Cyanide nachgewiesen werden [269], jedoch führen sehr kleine pH-Werte der Messlösung gleichzeitig zur schnellen Zerstörung der Chalkogenidglasmembran der Sensoren. Für die Diffusion von HCN aus der unteren Messkammer in die obere Messkammer wird die Temperatur der Lösungen auf 30 °C eingestellt und über die gesamte Messdauer konstant gehalten, denn die Siedetemperatur von HCN beträgt 26 °C. Damit wird auf der einen Seite gewährleistet, dass das HCN aus der sauren Lösung über die gaspermeable PTFE-Membran in die basische Lösung der oberen Messkammer diffundieren kann und auf der anderen Seite die Temperatur immer noch unterhalb der Glasübergangstemperatur für die Chalkogenidgläser liegt. Mit dem entwickelten Messsystem können freie und leicht freisetzbare Cyanide gemessen werden, jedoch kann Cyanid aus starken Cyanidkomplexen für den Nachweis nicht freigesetzt werden.

Die Evaluierung der Schwermetall- und Cyanid-Chalkogenidglas-ISEs für den Einsatz in der hybriden Messzelle wird vor jeder Messreihe separat mit Hilfe von Kalibriermessungen in Schwermetall- und Cyanid-haltigen Lösungen durchgeführt. Die AgAsSeTe-ISE und die Cu-ISE zeigen in den entsprechenden Lösungen Sensitivitäten von 100 mV/pCN im linearen Messbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l Cyanid und 28 mV/pCu im linearen Messbereich von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ bis 1,1 $\mu\text{mol/l}$ mit unteren Nachweisgrenzen im sub- μ -molaren Bereich (s. Abb. 4.56 in Kap. 4.3.2). Diese Werte stimmen sehr gut mit den Werten für potentiometrische Dünnschichtsensoren mit ähnlicher Membranzusammensetzung aus der Literatur überein [3,109]. Darüber hinaus korrelieren die Sensitivitäten gut mit den theoretisch zu erwartenden Werten von 118 mV/pCN und 30 mV/pCu (s. Gln. 2.74 in Kap. 2.4.2 und Gln. 2.23 in Kap. 2.2.2). Die unteren Nachweisgrenzen der Cyanid- und Kupfersensitiven ISE sind 0,5 $\mu\text{mol/l}$ Cyanid bzw. 0,2 $\mu\text{mol/l}$ Kupfer. Sie liegen damit sogar unterhalb der Höchstgrenze dieser Schadstoffe im Trinkwasser von 1,1 $\mu\text{mol/l}$ Cyanid und 11 $\mu\text{mol/l}$ Kupfer nach der WHO [20,46]. Die Validierung der hybriden Messzelle und des Messkonzepts wird anhand von simultanen Messungen von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, Cd^{2+} - und CN^- -Ionen, und Pb^{2+} - und CN^- -Ionen durchgeführt. Dabei werden sequentiell zuerst bestimmte Schwermetallionen und dann Cyanidionen in die untere Messkammer der hybriden Messzelle gegeben und die Spannungssignale

an beiden Elektroden in der unteren und oberen Messkammer erfasst. Bei Zugabe von beispielsweise Cu^{2+} -Ionen werden ein konzentrationsabhängiges Signal an der Cu-ISE in der unteren Messkammer und keine Signaländerung an der Ag-ISE in der oberen Messkammer erfasst. Bei Zugabe von CN^- -Ionen in die untere Messkammer (in die saure Lösung) werden keine Signaländerung an der Cu-ISE in der unteren Messkammer und ein konzentrationsabhängiges Signal an der Ag-ISE in der basischen Lösung gemessen. Es werden verschiedene Cu^{2+} -Ionenkonzentrationen und anschließend bei einer konstanten Cu^{2+} -Ionenkonzentration, für die simultane Messung von Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, unterschiedliche CN^- -Ionenkonzentrationen in die untere Messkammer pipettiert. Die Messungen der weiteren Schwermetalle (Cd^{2+} und Pb^{2+}) resultieren in Sensitivitäten, die gut mit den Sensitivitäten aus den Kalibriermessungen übereinstimmen. Dies ist insofern zu erwarten, da mit der gewählten Messmethode für die Schwermetall-ISE die Kalibrierung in der hybriden Messzelle durchgeführt wird. Die simultane Erfassung von Cyanid und Schwermetallen wird durch die Zugabe von CN^- -Ionen realisiert. Für deren Zugabe in die untere Messkammer bei einer bestimmten Schwermetallionenkonzentration ($87 \mu\text{mol/l}$) werden für CN^- -Ionenkonzentrationen von $2 \mu\text{mol/l}$ bis $27 \mu\text{mol/l}$ Sensitivitäten in der oberen Messkammer zwischen 14 mV/pCN und 24 mV/pCN je nach Art der Schwermetallionen und für größere CN^- -Ionenkonzentrationen bis zu $85 \mu\text{mol/l}$, eine mittlere Sensitivität von 117 mV/pCN gemessen. Die kleineren Sensitivitäten für sehr geringe CN^- -Ionenkonzentrationen könnten auf Komplexverbindungen zwischen CN^- -Ionen und Schwermetallionen in der unteren Messkammer zurück geführt werden. Somit stehen diese nicht mehr zur Diffusion in die obere Messkammer und Detektion zur Verfügung. Die CN^- -Ionenkonzentration in der oberen Messkammer ist somit geringer als die eingestellte CN^- -Ionenkonzentration in der unteren Messkammer der hybriden Messzelle.

In Tab. 5.2 sind mögliche Cyanid-Schwermetallkomplexe mit ihren pK_K -Wert für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten simultanen Messungen von Schwermetallen und Cyanid zusammengefasst.

Tab. 5.2: Cyanid-Schwermetallkomplexe und ihre pK_K -Werte bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach [22,222,273].

	Cyanid-Schwermetallkomplex	pK_K-Wert
Cu	$\text{Cu}(\text{CN})_2^-$	16
	$\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$	22
	$\text{Cu}(\text{CN})_4^{3-}$	23
Cd	$\text{Cd}(\text{CN})_2$	11
	$\text{Cd}(\text{CN})_3^-$	16
	$\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$	18
Pb	$\text{Pb}(\text{CN})_4^{2-}$	42
	$\text{Pb}(\text{CN})_5^{3-}$	45

Je größer der pK_K -Wert ist, desto größer sollte der Einfluss der Schwermetallionen auf die Zugabe von Cyanid in die Messlösung sein. In der Literatur wird gezeigt, dass für Messungen von CN^- -Ionen mit einer Ag-ISE in Lösungen, die sowohl CN^- -Ionen als auch Cu^{2+} -Ionen enthalten, die Signalantwort der Ag-ISE von unterschiedlichen Cyanid-Kupfer-Komplexen abhängig ist [299].

Für die Zugabe von CN^- -Ionenkonzentrationen größer als $27 \mu\text{mol/l}$ werden hohe Ansprechzeiten beobachtet, die auf längere Diffusionszeiten zurückzuführen sind. Der Einsatz einer PTFE-Membran mit ca. 2,3-mal größerem Porendurchmesser bringt lediglich schnellere stabile Signale bei den Ionenkonzentrationen zwischen $27 \mu\text{mol/l}$ und $47 \mu\text{mol/l}$ Cyanid. Für die Verbesserung der Diffusionseigenschaften wäre zukünftig von Interesse, noch dünnere PTFE-Membranen zu untersuchen und die Volumina der Messlösungen in beiden Messkammern zu verringern. Bei den Untersuchungen werden PTFE-Membranen mit einer Dicke von $135\text{-}139 \mu\text{m}$ und Volumina von 20 ml verwendet.

In dieser Promotionsarbeit werden erstmalig eine hybride Messzelle und ein Messprotokoll für simultane Messungen von Schwermetallen und Cyanid entwickelt und für Schwermetall- und Cyanidkonzentrationen im μ -molaren Bereich evaluiert. Für die Umweltanalytik, beispielsweise in der Trinkwasseranalytik, ist vor allem die Erfassung schon von geringen Konzentrationen der toxischen Komponenten interessant. Darüber hinaus können, aufgrund der kleinen Konzentrationen von Cyanid und Schwermetallen in der unteren Messkammer der hybriden Messzelle, Reaktionen zwischen CN^- -Ionen und Schwermetallionen der Chalkogenidglasmembran der Schwermetall-ISE, und somit eine partielle Zerstörung der ISE, weitestgehend vermieden werden. Aufgrund der relativ hohen Komplexbildungskonstante von Cyanid-Kupfer-Komplexen werden in der Literatur z.B. auch Cu-haltige Membranen für die Messung von Cyanid vorgeschlagen [300]. Für den Einsatz der hybriden Messzelle für simultane Messungen von gleichzeitig unterschiedlichen Schwermetallionen und CN^- -Ionen sollte eine „elektronische Zunge“ in Form eines Sensorarrays verwendet werden, denn Chalkogenidglasbasierte ISEs besitzen hohe Querempfindlichkeiten zu anderen Ionen [279,280]. Hierzu könnte die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte „elektronische Zunge“ auf Basis von unterschiedlichen Schwermetall-Chalkogenidglassensoren und einem Fuzzy-Logic-Programm mit der hybriden Messzelle kombiniert werden [295,301].

5.3. Fuzzy-Logic-Programm als intelligente Software für Messungen in gemischten Schwermetall-Lösungen

ISEs auf Chalkogenidglasbasis werden seit mehr als 20 Jahren für die qualitative und quantitative Erfassung von Schwermetallen in Flüssigkeiten eingesetzt. Dünnschichtsensoren mit einer Chalkogenidglasmembran haben eine hohe Sensitivität, einen großen linearen Messbereich und untere Nachweisgrenzen im μ -molaren Konzentrationsbereich. Darüber hinaus werden hohe Stabilitäten mit den Chalkogenidglas-ISEs von mehr als 150 Tagen gemessen [3]. Potentiometrische Dünnschichtsensoren auf Chalkogenidglasbasis eignen sich sehr gut für den Nachweis von Schwermetallionen in reinen Laborlösungen, jedoch aufgrund ihrer hohen Querempfindlichkeit zu anderen Schwermetallionen können diese nur unter bestimmten Randbedingungen in gemischten Schwermetalllösungen bzw. in realen Proben eingesetzt werden [279,280]. Für qualitative und quantitative Messungen von einzelnen Komponenten in gemischten und komplexen Schwermetalllösungen oder für die Unterscheidung von unterschiedlichen Getränken, wie z.B. Mineralwässern, Bieren, Weinen, Säften, Tomaten, etc. wurden in der Literatur sog. „elektronische Zungen“ bereits erfolgreich eingesetzt. Diese benutzen jedoch entweder eine große Anzahl von Sensoren und/oder mehrere Auswerteverfahren parallel, wie beispielsweise die PCA (Hauptkomponentenanalyse), die PLS („Partial least squares“), die SIMCA („Soft independent modelling by class analogy“) oder die KNN (künstliche neuronale Netzwerke); sie sind somit relativ komplex und zeitaufwändig [274-287].

Für die quantitative Erfassung von unterschiedlichen Schwermetallen in Flüssigkeiten und die qualitative Messung von verschiedenen Getränken, wie Bier, Wein und Säften, verwenden Y. Vlasov et al. bis zu 30 potentiometrische Chalkogenidglas-ISEs in Kombination mit der PCA und den KNN. Der Vorteil von Chalkogenidglas-basierten ISEs für die „elektronische Zunge“ liegt in der relativ kleinen Drift von 1-5 mV/Tag [279,280] und den hohen Querempfindlichkeiten. Als geeignete Auswerteverfahren für eine solche „elektronische Zunge“ wurden Clusterverfahren (PCA, PLS, SIMCA) oder künstliche Intelligenz eingesetzt. Zur künstlichen Intelligenz gehören die KNN oder auch die Fuzzy-Logic.

Clusterverfahren können relativ einfache Methoden sein, die Zusammengehörigkeiten von Koordinatentupeln im mehrdimensionalen Raum zu Gruppen zusammenfassen und somit klassifizieren. Dabei können jedoch relevante Informationen verloren gehen. Darüber hinaus sind Clusterverfahren oftmals für die Auswertung von unscharfen Informationen nicht geeignet und weitere Methoden, wie die KI, gefragt. Eine Form der künstlichen Intelligenz sind die KNN, bei denen die Software in einer sog. „Black box“ bzw. verschlüsselten Schichten trainiert wird. Für das Training wird eine ausreichend große Anzahl an Kalibriermessungen benötigt, die relativ zeitaufwändig sein können. Darüber hinaus bedürfen neue oder weitere Fragestellungen der Analyse eines erneuten Trainings dieser Software. Ein weiterer

Nachteil von KNN ist die Unübersichtlichkeit der „Black box“, in die kein Expertenwissen für eine einfachere Auswertung der Daten eingebunden werden kann. Eine alternative Methode der künstlichen Intelligenz für unscharfe Informationen ist die Fuzzy-Logic. Fuzzy-Logic kann Expertenwissen als „a priori“-Wissen integrieren und somit schon anhand von wenigen Kalibriermessungen hinreichend genau entwickelt werden. Darüber hinaus können neue/weitere Fragestellungen über das Expertenwissen und/oder zusätzliche Kalibriermessungen relativ einfach und flexibel in das Fuzzy-Logic-Programm eingebunden werden. Jedoch findet bei der Fuzzy-Logic kein Lernprozess, wie bei den KNN, statt. Die Kombination von beiden KI als Neuro-Fuzzy könnte die Vorteile beider Methoden miteinander kombinieren und in einer schnellen, selbstbestimmenden Entscheidungssoftware resultieren [291-293]. Für die qualitative und quantitative Bestimmung von gemischten Schwermetalllösungen wird in dieser Arbeit eine einfache und schnelle „elektronische Zunge“ auf Basis von lediglich drei unterschiedlichen Chalkogenidglas-ISEs und einem Fuzzy-Logic-Programm entwickelt.

Für die Entwicklung des Fuzzy-Logic-Programms für den Einsatz in Ein- und Zwei-Komponentengemischen werden insgesamt 18 Kalibriermessungen mit dem Sensorarray durchgeführt. Bei der Erweiterung der Software auf Lösungsgemische mit drei unterschiedlichen Schwermetallionen muss das Programm um nur sechs zusätzliche Kalibriermessungen erweitert werden. Das heißt, die entwickelte „elektronische Zunge“ auf Basis von Fuzzy-Logic ist relativ einfach erweiterbar und flexibel. Darüber hinaus kann bei erhöhtem Driftverhalten oder „älteren“ Sensoren die Drift in die mathematische Evaluierung über das „a priori“-Wissen in das Fuzzy-Logic-Programm implementiert werden. Die Evaluierung des entwickelten Fuzzy-Logic-Programms anhand von sog. Selbsttests zeigt, dass für Schwermetallionenkonzentrationen unterhalb von 10 $\mu\text{mol/l}$ auch andere Vorschläge zur Lösungszusammensetzung und zur Ionenkonzentration mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit getroffen werden. Jedoch werden mit dem entwickelten Programm richtige Aussagen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von >80% für alle untersuchten Schwermetallgemische mit Ionenkonzentrationen zwischen 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l ermöglicht. Darüber hinaus resultiert die Fuzzy-Logic-Software in einer Trefferquote von 80% über alle gemessenen Schwermetallgemische und Konzentrationen (insgesamt 54 Proben) von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l , wenn die Inputdaten bis zu $\pm 5 \text{ mV}$ von den Kalibrierdaten variieren. Bei höheren Abweichungen der gemessenen Spannungswerte zu den Kalibrierdaten sinkt die Wahrscheinlichkeit für eine richtige Aussage über die Zusammensetzung und Konzentration der gemischten Schwermetalllösung. Daraus lässt sich folgern, dass das entwickelte flexible Fuzzy-Logic-Programm für Messungen in Ein- oder Zwei-Komponentengemischen sehr gut eingesetzt werden kann.

Zur Überwachung der Qualität bzw. Untersuchung von Plagiaten in Lebensmitteln sowie Konsumgütern, z.B. bei Weinen, ist eine schnelle und einfache sensorische

Erfassung wünschenswert. Erste Messungen mit dem Sensorarray in sechs unterschiedlichen Weinen (weis, rot, rosé) zeigen, dass bei unterschiedlichen Weinsorten unterschiedliche Spannungen mit jeweils dem gleichen Sensor gemessen werden (s. Abb. 5.3 a)). Das heißt, das Verhalten des Sensorarrays und somit das Summensignal ist unterschiedlich für die verschiedenen Weine. Dies ist Voraussetzung für die Implementierung der Fuzzy-Logic-Software mit dem gewählten Sensorarray. Je größer die Unterschiede der Summensignale sind, desto besser und genauer kann die „elektronische Zunge“ die Weine voneinander differenzieren. Für eine genauere Unterscheidung der untersuchten Weine, d.h. größere Unterschiede der Summensignale, könnte beispielsweise eine Erweiterung des Sensorarrays nützlich sein (Abb. 5.3 b)).

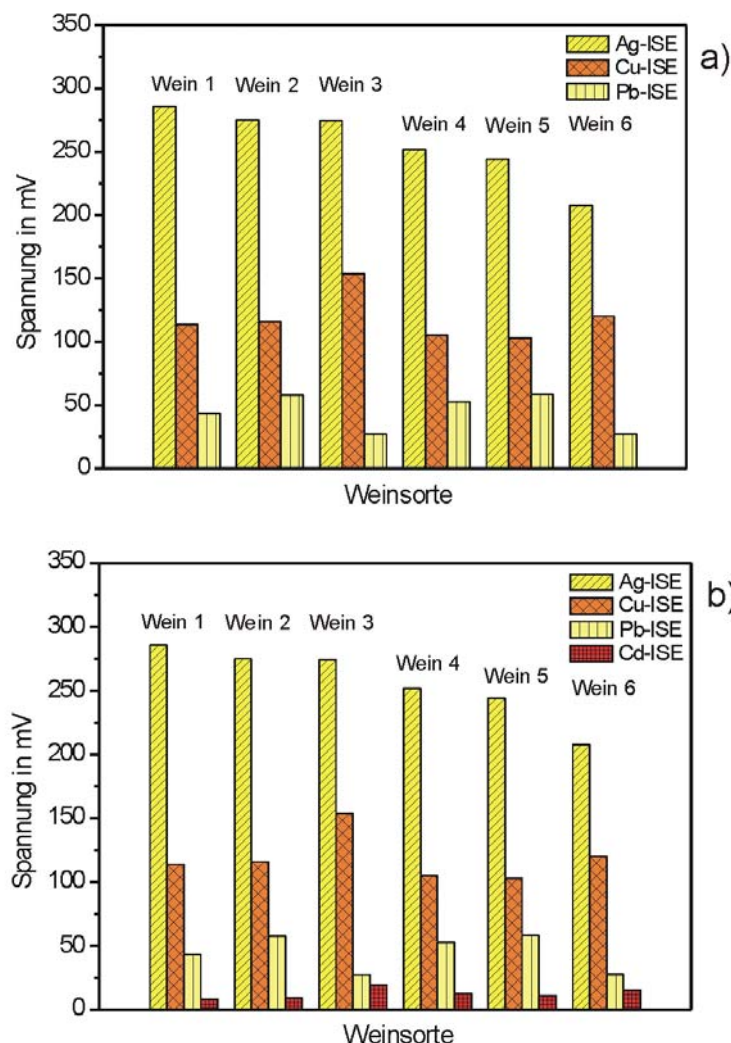


Abb. 5.3: Messungen in unterschiedlichen Weinsorten mit dem Sensorarray a) Ag-, Cu- und Pb-ISE und b) Ag-, Cu-, Pb- und Cd-ISE für die Implementierung der Fuzzy-Logic-Software.

Für einen verbesserten Einsatz der „elektronische Zunge“ in Qualitätsgetränken, wie z.B. Weinen oder Säften, oder für eine sensorische Unterscheidung von verschiedenen Lebensmitteln oder Konsumgütern, wäre die Erweiterung des

Sensorarrays um wenige zusätzliche Chalkogenidglassensoren und kommerzielle Sensoren, wie beispielsweise einen pH- und Leitfähigkeitssensor, sinnvoll. Dabei würde die Kalibrierung in z.B. 10 unterschiedlichen Weinen mit sechs Sensoren in 10 einzelnen Messungen resultieren, die je 2-mal wiederholt werden müssten. Pro Messung sind maximal drei Minuten erforderlich. Daraus folgt, dass für die Erfassung von 10 unterschiedlichen Analyten mit Hilfe einer solchen „elektronischen Zunge“, sich die Kalibrierzeit für die Entwicklung des Fuzzy-Logic-Programms auf ca. 90 Minuten belaufen könnte.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Si-basierte Sensoren für die qualitative und quantitative Erfassung der Umweltgifte „Cyanid und Schwermetalle“ entwickelt. Für die Messung von Cyanid wurden sowohl ein *Cyanidase*-basierter Biosensor als auch unterschiedliche Ag-basierte ISEs hergestellt und optimiert. Der *Cyanidase*-basierte EIS-Sensor besteht aus einer pH-sensitiven Feldeffekt-Struktur, auf diese das Cyanid-selektive Enzym, die *Cyanidase*, immobilisiert wurde. Die *Cyanidase* setzt katalytisch Cyanid zu Ammoniak und Formiat um, was in einer lokalen pH-Wert-Verschiebung resultiert. Diese kann dann direkt von der pH-sensitiven EIS-Struktur kapazitiv erfasst werden. Aufgrund der geringen Enzymaktivität und chemischen Gleichgewichte kann dieser Sensor jedoch nur unter optimalen Bedingungen, d.h. in einem bestimmten Puffer und unter optimalen Messbedingungen, funktionieren. Daraus resultiert, dass der entwickelte Biosensor nur für einen Laboreinsatz geeignet ist. Im Hinblick auf eine optimale Signalausbeute wurde der *Cyanidase*-basierte EIS-Sensor schrittweise optimiert. Es wurden sowohl die pH-sensitive EIS-Struktur ausgewählt als auch die Immobilisierung der *Cyanidase* optimiert. Als pH-sensitive EIS-Sensoren wurden unterschiedliche pH-sensitive Schichten (Si_3N_4 , Ta_2O_5) physikalisch und elektrochemisch charakterisiert. Aus den elektrochemischen Untersuchungen der intrinsischen Sensoreigenschaften in unterschiedlichen pH-Puffern resultierte, dass die EIS-Struktur mit einer Ta_2O_5 -Schicht für den Biosensor am besten geeignet war. Der Einfluss einer zusätzlichen Enzymschicht auf der EIS-Struktur resultierte in einer verringerten pH-Sensitivität von 36,5 mV/pH. Aufgrund der relativ kleinen Enzymaktivität der *Cyanidase* (1-2 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$) und theoretischen Modellberechnungen zur Signaländerung wurde die *Cyanidase* in einem Zwei-Schritt-Verfahren auf die pH-sensitive EIS-Struktur immobilisiert. Zuerst wurde die *Cyanidase* kovalent an ein organisches „Gel“ (NHS-aktivierte SepharoseTM, Eupergit C®) gebunden und anschließend wurde das „*Cyanidase*-Gel“ mittels einer Dialysemembran auf der EIS-Struktur eingeschlossen. Somit konnte eine möglichst große Menge *Cyanidase*, d.h. eine möglichst große Enzymaktivität pro Sensorfläche, auf der EIS-Struktur immobilisiert werden. Die Optimierung der kovalenten Kopplung der *Cyanidase* an NHS-aktivierte SepharoseTM und an Eupergit C® wurde mit Hilfe von Enzymaktivitätsmessungen mit einer NH_3 -ISE und Enzymmengenbestimmung mit der SDS-PAGE mit einer Silberfärbung und Gelscan durchgeführt. Unter optimalen Immobilisierungsbedingungen konnten jeweils 10 mg/g und 14 mg/g an NHS-aktivierter SepharoseTM und an Eupergit C® mit 30% bis 35% der Anfangsenzymaktivität kovalent gebunden werden. Der große Unterschied beider Gele liegt in der Größe der „Gel-Kügelchen“, die im Hinblick auf die Realisierung von unterschiedlich großen Reaktionsräumen auf dem EIS-Sensor gewählt wurden. Die elektrochemische Charakterisierung der *Cyanidase*-basierten EIS-Sensoren resultierte in einer sehr guten Signalausbeute, wenn 25 mg der NHS-aktivierten SepharoseTM mit *Cyanidase* unter eine Dialysemembran (MWCO-Wert

von 10 kDa) immobilisiert wurden. Im Vergleich zu den ca. 2-mal so großen Eupergit C®-„Kügelchen“ konnte mit dem optimierten Biosensor eine etwa 2-mal so große Sensitivität mit 13 ± 2 mV/pCN im linearen Messbereich von 0,25 mmol/l bis 1 mmol/l KCN im Na-P-Puffer (pH 8,0, 5 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl, reproduzierbar gemessen werden. Das Signal des Sensors stimmte gut mit den theoretischen Betrachtungen überein. Diese wurden auf der einen Seite mit Hilfe der chemischen Software Visual MINTEQ simuliert [223], und auf der anderen Seite über Berechnungen von relevanten chemischen Gleichgewichten unter den gegebenen Bedingungen berechnet (s. Kap. 2.3.2). Nach acht Tagen zeigten Enzymaktivitätsuntersuchungen der immobilisierten *Cyanidase* einen Aktivitätsverlust von bis zu 63%, der die Stabilität des *Cyanidase*-basierten EIS-Sensors eingrenzt. Um die pH-Wert-Verschiebung aufgrund von Cyanid in der Lösung (ohne enzymatische Katalyse) auszuschließen, wurden die elektrochemischen Messungen mit dem *Cyanidase*-basierten EIS-Sensor in einer sequentiellen Differenzanordnung mit und ohne Enzym durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig eine *Cyanidase*-basierte EIS-Struktur für eine selektive und sensitive Erfassung von Cyanid auf der Basis von einer lokalen pH-Wert-Verschiebung in einer solchen Differenzanordnung realisiert werden. Die experimentellen Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit den theoretisch zu erwarteten Werten.

Im Hinblick auf die Bestimmung des Cyanidgehalts in realen Lösungen wurden neben dem kapazitiven Biosensor potentiometrische Ag-basierte ISEs entwickelt. Das Messprinzip dieser Chemosensoren nutzt die Änderung des Oberflächenpotentials, wenn CN^- -Ionen in der Messlösung mit Ag^+ -Ionen aus der Membran Ag-CN-Komplexe bilden. Es wurden sowohl Ag-basierte Halogenid-ISEs als auch unterschiedliche Ag-basierte Chalkogenidglas-ISEs mit Hilfe der Dickschichttechnologie bzw. des PLD-Prozesses hergestellt. Die Schichtdicke der sensitiven Membran war im Bereich von einigen 100 nm für die Ag-basierten Chalkogenidglas-ISEs und bei einigen 100 μm für die Ag/AgCl-ISE. Die hergestellten Sensoren wurden sowohl im Hinblick auf die physikalischen und optischen Membraneigenschaften mit unterschiedlichen physikalischen Verfahren und im Hinblick auf die intrinsischen Sensoreigenschaften in Cyanid-haltigen Lösungen mit Hilfe der ionenselektiven Potentiometrie untersucht. Die elektrochemischen Untersuchungen wurden im direkten Vergleich zu einer kommerziellen Bulk-Ag-Halogenid-ISE mit einer ca. 1 cm dicken Ag/Ag₂S-Membran durchgeführt. Die intrinsischen Sensoreigenschaften der hergestellten Ag/AgCl-ISEs korrelierten sehr gut mit den Eigenschaften der kommerziellen Bulk-Cyanid-ISE. Sowohl der Dickschicht-Sensor als auch die Bulk-Cyanid-ISE resultierten in einer Sensitivität 62 ± 4 mV/pCN bzw. 58 ± 1 mV/pCN im linearen Messbereich von 10 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 mmol/l Cyanid. Aufgrund der dünnen Membran war die Ansprechzeit der Ag/AgCl-ISE im Vergleich zu der kommerziellen Ag-Halogenid-ISE für Cyanidmessungen um den Faktor fünf kürzer. Stabilitätsuntersuchungen der Ag/AgCl-ISE in Cyanid-haltigen Lösungen zeigten, dass sich die Sensitivität nach 14 Wochen Messdauer auf

85 mV/pCN erhöhte. Darüber hinaus konnten erste Versuche mit der Ag/AgCl-ISE zeigen, dass diese für die Messung von unterschiedlichen Cyanidverbindungen, beispielsweise von KCN, $K_3Fe(CN)_6$ und KSCN, eingesetzt werden konnte.

Als weitere Ag-basierte ISEs für die Cyaniderfassung wurden potentiometrische Ag-ISEs auf Basis von Chalkogenidglasmembran hergestellt. Der Vorteil solcher Ag-basierten Chalkogenidglas-ISEs gegenüber Ag-basierten Halogenid-ISEs liegt in der chemischen Zusammensetzung der Membran, die eine wesentlich geringere Löslichkeit in Cyanid-haltigen Lösungen aufweist als bei den Ag-Halogenidverbindungen. Somit haben Ag-Chalkogenidglas-Membranen eine höhere Stabilität. Darüber hinaus zeigen Ag-Chalkogenidglas-ISEs in der Literatur Sensitivitäten zwischen 90 mV/pCN und 120 mV/pCN [100-109]. Im Hinblick auf die Wahl einer geeigneten Ag-Chalkogenidglas-Membran wurden im Rahmen dieser Arbeit fünf unterschiedliche Ag-haltige Membranen mit je drei unterschiedlichen Schichtdicken physikalisch und elektrochemisch für die Cyaniderfassung charakterisiert. Als „beste“ Ag-Chalkogenidglas-ISE wurde diejenige Membran gewählt, die die kleinste untere Nachweisgrenze und eine akzeptable Sensitivität zeigte, da für den Einsatz in realen Lösungen die Detektion von möglichst kleinen Konzentrationen von Bedeutung ist. Die AgAsSeTe-ISE hatte als einzige der untersuchten Ag-Chalkogenidglas-ISE einen linearen Messbereich bis hinzu $\mu\text{mol/l}$ Cyanid und eine niedrige mittlere untere Nachweisgrenze von $0,4 \mu\text{mol/l}$ Cyanid. Die Sensitivität betrug $90 \pm 6 \text{ mV/pCN}$. Stabilitätsuntersuchungen zeigten auch hier, dass die Sensitivität mit zunehmender Kontaktzeit mit Cyanid-haltigen Lösungen von anfänglich $66 \pm 9 \text{ mV/pCN}$ auf $90 \pm 6 \text{ mV/pCN}$ stieg. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Anreicherung von Silber in der Sensoroberfläche beim Kontakt mit Cyanid-haltigen Lösungen, wie die RBS-Untersuchungen zeigten. Im Hinblick auf den direkten Einsatz der Ag-basierten ISEs in realen Lösungen wurde der Einfluss von unterschiedlichen Halogenid- und Sulfid-Ionen auf die Sensoreigenschaften der hergestellten Ag-basierten Chemosensoren untersucht. Für die Ag/AgCl-ISE störten sowohl Halogenide als auch Sulfide das Messsignal relativ stark. Für die Ag-Chalkogenidglas-ISE hatten die Halogenide nur einen geringfügigen Einfluss auf das Sensorverhalten, während Sulfid das Sensorsignal stark beeinflusste und somit bei Anwendungen der Ag-basierten ISEs nicht in der Messlösung vorhanden sein sollte. Diese Beobachtungen standen in guter Korrelation mit Selektivitätsmessungen in der Literatur und den Herstellerangaben für kommerzielle Cyanid-ISEs [86-89,109,264].

Über die Cyaniderfassung hinaus, spielt auch die Messung von Schwermetallionen in der Umweltanalytik eine wichtige Rolle. Heutzutage werden beide Umweltgifte separat erfasst. Um Kontaminations- bzw. Abbaueffekte, vor allem von Cyanid aber auch von Schwermetallen, zu vermeiden, ist eine schnelle „Vor-Ort“-Analytik erwünscht. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine portable Messzelle für die simultane Erfassung von Cyanid und Schwermetallen (Cu^{2+} - und CN^- -Ionen, Cd^{2+} - und CN^- -Ionen und Pb^{2+} - und CN^- -Ionen) in Flüssigkeiten entwickelt. Aufgrund der chemischen Eigenschaften von Cyanid und Schwermetallen besteht die hybride

Messzelle aus zwei gleichgroßen Messkammern, die über eine hydrophobe, gaspermeable Membran voneinander getrennt sind. In der unteren Messkammer wurden die Schwermetalle und in der oberen Messkammer Cyanid potentiometrisch erfasst. Für simultane Messungen von Cyanid und Schwermetallen wurden beide Komponenten in der hybriden Messzelle mit Hilfe der gewählten pH-Werte und der Temperatur zuerst voneinander getrennt und anschließend separat und simultan mit Hilfe von Chalkogenidglas-ISEs in der oberen und unteren Messkammer der Messzelle erfasst. Für die Detektion von Schwermetallen wurden, analog zu den Ag-basierten Chalkogenidglassensoren für die Cyaniderfassung, Chalkogenidglas-ISEs mittels PLD-Verfahrens hergestellt. Vor dem Einsatz der Chalkogenidglas-ISEs für die Schwermetallerfassung in der hybriden Messzelle wurden die Schwermetall-ISEs ebenfalls physikalisch und elektrochemisch mit Hilfe von ionenselektiver Potentiometrie auf ihre Funktionstauglichkeit für die Schwermetallerfassung hin charakterisiert. Die hergestellten Cu-, Cd- und Pb-ISEs resultierten in Sensitivitäten zwischen 20-28 mV/Dekade für die jeweiligen Schwermetallionen im linearen Messbereich von 1 $\mu\text{mol/l}$ bis 1 mmol/l. Diese Werte stimmten gut mit den Werten aus der Literatur für Chalkogenidglas-basierte ISEs für die Schwermetalldetektion überein [3]. Als ISE für die Cyaniddetektion wurde die AgAsSeTe-ISE eingesetzt. Für alle drei Schwermetall-Cyanid-Systeme konnte eine simultane Messung von Schwermetallionen und Cyanid in der hybriden Messzelle im μ -molaren Bereich gezeigt werden. Die Ag-basierte Chalkogenidglas-ISE für die Cyaniderfassung resultierte in einer Sensitivität von 14 mV/pCN bis 24 mV/pCN für CN⁻-Ionenkonzentrationen von 2 $\mu\text{mol/l}$ bis 27 $\mu\text{mol/l}$ bzw. in einer mittleren Sensitivität von 117 mV/pCN für höhere CN⁻-Ionenkonzentrationen von bis zu 85 $\mu\text{mol/l}$. Somit wurde erstmalig gezeigt, dass die hybride Messzelle für die simultane Erfassung von jeweils einer Sorte von Schwermetallionen und Cyanid geeignet ist.

Chalkogenidglas-basierte ISEs können gut für den Nachweis von einzelnen Schwermetallionensorten in Flüssigkeiten eingesetzt werden. Aufgrund ihrer hohen Querempfindlichkeit ist ein Einsatz in gemischten Lösungen nur unter Kenntnis der in dieser Lösung vorhandenen Schwermetallionen möglich. Daher wurde für die Bestimmung von Schwermetallionen in gemischten Lösungen eine „elektronische Zunge“ auf Basis von drei unterschiedlichen Schwermetall-ISEs (Ag-, Cu-, Pb-ISE) als Sensorarray in Kombination mit einer intelligenten Software (Fuzzy-Logic) in enger Kooperation mit der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Prof. W. Heiden, entwickelt. Im Vergleich zu den bestehenden „elektronischen Zungen“ für die Messung von unterschiedlichen Schwermetallionen in Flüssigkeiten stellt das neu entwickelte System ein relativ einfaches, erweiterbares und flexibles System dar [279,280]. Für die Entwicklung des Fuzzy-Logic-Programms für eine qualitative und quantitative Bestimmung von Ein- und Zwei-Schwermetallkomponentengemischen wurden 18 Kalibriermessungen benötigt. Mit sechs zusätzlichen Kalibriermessungen kann diese „elektronische Zunge“ für Messungen in Drei-Komponentengemischen erweitert werden. Die Validierung des entwickelten Programms erfolgte anhand von

Selbsttests und resultierte in einer guten Trefferquote von 80% für das „richtige“ Schwermetallgemisch und die „richtige“ Ionenkonzentration für insgesamt 54 untersuchte unbekannte Lösungen, wenn die absoluten Messwerte nicht mehr als ± 5 mV von den Kalibrierwerten abwichen.

In Zukunft soll das entwickelte Fuzzy-Logic-Programm zunächst auf Messungen mit dem Sensorarray in Schwermetalllösungen mit mehr als zwei unterschiedlichen Komponenten erweitert werden. Darüber hinaus soll der Einfluss der Hintergrundlösung (Trink-, Grundwasser, industrielle Abwässer) auf die Sensitivität der Sensoren bzw. die absoluten Werte der Sensorsignale untersucht werden. Der große Vorteil der Fuzzy-Logic gegenüber anderer KI ist die Möglichkeit, Expertenwissen für eine bessere Auswertung der Inputdaten in das Programm direkt einzubinden. Somit könnte beispielsweise das dynamische Driftverhalten der Chalkogenidglas-ISEs als Expertenwissen in das Fuzzy-Logic-Programm implementiert werden. So würde direkt und auf eine relativ einfache Weise das dynamische Verhalten des Sensorarrays in Schwermetall-haltigen Lösungen, im Hinblick auf eine langzeitstabilere „elektronische Zunge“, erfasst werden können.

Im Bezug auf einen möglichen Einsatz der entwickelten „elektronischen Zunge“ für Lebensmittel bzw. Konsumgüter, wie beispielsweise von unterschiedlichen Weinen oder Säften, könnte eine Erweiterung des Sensorarrays um wenige weitere Chalkogenidglas-ISEs zu einer besseren qualitativen und quantitativen Bestimmung solcher Proben führen. Damit könnten auf der einen Seite genauere Aussagen über die zu untersuchenden Flüssigkeiten gemacht werden. Auf der anderen Seite ließe sich das Spektrum, von z.B. Weinsorten oder Jahrgängen der Weine, erweitern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine hybride Messzelle für die simultane Messung von Cyanid und Schermetallen vorgestellt und evaluiert. Hierbei wurde eine einzelne Schwermetallionensorte in der unteren Messkammer mit Hilfe der Schwermetall-Chalkogenidglas-ISE erfasst. Für Messungen in gemischten Schwermetalllösungen könnte zukünftig die entwickelte „elektronische Zunge“ in die hybride Messzelle integriert werden.

Zur Bestimmung des Gesamtcyanids in Flüssigkeiten ist die Erfassung von weiteren Cyanidverbindungen, wie z.B. von Eisen-Cyanid- oder Kobalt-Cyanidverbindungen, notwendig. In Anlehnung an die Bestimmung des Gesamtcyanids mittels DIN-Verfahren, könnten in die hybride Messzelle UV-LEDs mit einer Wellenlänge von 300-350 nm integriert werden, um solche Verbindungen zu spalten und messen zu können [13,269,298]. Hierbei sollte jedoch der Einfluss von UV-Licht auf die Chalkogenidglasmembran untersucht werden, denn diese bestehen zum Teil auch aus photosensitiven Materialien, wie z.B. aus AgI-Verbindungen [218-222].

7. Eigene Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Artikel / Proceedings

Schöning, M.J.; Abouzar, M.H.; Wagner, T.; Näther, N.; Rolka, D.; Yoshinobu, T.; Kloock, J.P.; **Turek, M.**; Ingebrandt, S.; Schöning, M.J.: A semiconductor-based field-effect platform for (bio-)chemical and physical sensors: From capacitive EIS sensors and LAPS over ISFETs to nano-scale devices, *Material Research Society Symposium Proceedings 952* (2007) paper 0952-F08-02, S. 1-9

Turek, M.; Ketterer, L.; Claßen, M.; Berndt, H.K.; Elbers, G.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Development and electrochemical investigations on an EIS- (electrolyte-insulator-semiconductor) based biosensor for cyanide detection. *Sensors* 7 (2007), S. 1415-1426

Turek, M.; Keusgen, M.; Poghossian, A.; Mulchandani, A.; Wang, J.; Schöning, M.J.: Enzyme-modified electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) sensors, *Proc. 6th Int. Conf. on Semiconductor Micro- and Nanoelectronics*, Tsakhadzor (Armenia) 18-20 September (2007), ISBN: 978-5-8084-0868-5, S. 107-110

Turek, M.; Kloock, J.P.; Schöning, M.J.; Schubert, J.; Zander, W.; Krüger, P.; Keusgen, M.: Herstellung und Charakterisierung eines hybriden Sensorarrays auf Halbleiterbasis für die Umweltanalytik, *VDI-Berichte 2011* (2008), S. 775-782

Turek, M.; Keusgen, M.; Poghossian, A.; Mulchandani, A.; Wang, J.; Schöning, M.J.: Enzyme-modified electrolyte-insulator-semiconductor sensors. *Journal of Contemporary Physics* 43 (2008), S. 82-85

Turek, M.; Heiden, W.; Riesen, A.; Chhabda, T.A.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Artificial intelligence/fuzzy logic method for analysis of combined signals from heavy metal chemical sensors. *Electrochimica Acta* 54 (2009), S.6082-6088

Turek, M.; Heiden, W.; Guo, S.; Riesen, A.; Schubert, J.; Zander, W.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Simultaneous detection of cyanide and heavy metals for environmental analysis by means of μ ISEs. *Physica Status Solidi A* (2010), eingereicht

Tagungsbeiträge

Schöning, M.J.; Poghossian, A.; Kloock, J.P.; Näther, N.; **Turek, M.**; Wagner, T.; Platen, J.; Rolka, D.: Field-effect (bio-)chemical sensors: ISFET, capacitive EIS sensor and LAPS. *Int. Symposium on Bio- and Nano-electronics*, Sendai (Japan), 02.03.-03.03.2006

Poghossian, A.; Kloock, J.P.; Näther, N.; Rolka, D.; **Turek, M.**; Wagner, T.; Schöning, M.J.: (Bio-) chemical sensing based on a field-effect-transducer platform: scaling down from EIS sensor and LAPS over ISFET to nano-scale devices. *6th Int. Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technology*, Bonn (Germany), 22.08.-25.08.2006

Kloock, J.P.; **Turek, M.**; Huachupoma, S.; Schöning, M.J.: Electrochemical characterisation of chalcogenide-glass-based thin-film membranes for sensor applications in liquids. *6th Int. Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technology*, Bonn (Germany), 22.08.-25.08.2006

Schöning, M.J.; Abouzar, M.; Wagner, T.; Näther, N.; Rolka, D.; Yoshinobu, T.; Kloock, J.P.; **Turek, M.**; Ingebrandt, S.; Poghossian, A.: A semiconductor-based field-effect platform for (bio-)chemical and physical sensors: From capacitive EIS sensors and LAPS over ISFETs to nano-scale devices. *MRS Fall Meeting*, Boston (USA), 27.11.-1.12.2006

Turek, M.; Ketterer, L.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Elektrochemische Untersuchungen von EIS-Strukturen für die Entwicklung eines Biosensors zur Cyanid-Erfassung. *5. Deutsches BioSensor Symposium*, Bochum (Germany), 18.03.-21.03.2007

Kloock, J.P.; Wagner, T.; Näther, N.; Abouzar, M.; Beging, S.; **Turek, M.**; Rolka, D.; Poghossian, A.; Schöning, M.J.: Anwendungsmöglichkeiten von siliziumbasierten FETs in der Biomedizintechnik. *3. Jahrestagung BioMST*, Dortmund (Deutschland), 19.06.-20.06.2007

Kloock, J.P.; **Turek, M.**; Schöning, M.J.: Heavy metal detection with semiconductor devices based on PLD-prepared chalcogenide glass films. *6th Int. Conf. on Semiconductor Micro- and Nanoelectronics*, Tsakhcadzor (Armenia), 18.09.- 20.09.2007

Turek, M.; Keusgen, M.; Näther, N.; Poghossian, A.; Mulchandani, A.; Wang, J.; Schöning, M.J.: Enzyme-modified electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) sensors. *6th Int. Conf. on Semiconductor Micro- and Nanoelectronics*, Tsakhcadzor (Armenia), 18.09.- 20.09.2007

Kloock, J.P.; **Turek, M.;** Wagner, T.; Zander, W.; Schubert, J.; Schöning, M.J.: Heavy metal detection with semiconductor devices based on PLD-prepared chalcogenide glass thin films. 1. *INB-Kolloquium "Forschen für die Herausforderungen von Morgen"*, Jülich (Germany), 19.10.2007

Turek, M.; Keusgen, M.; Poghossian, A.; Näther, N.; Rolka, D.; Mulchandani, A.; Wang, J.; Schöning, M.J.: Enzyme-modified electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) sensor. 1. *INB-Kolloquium "Forschen für die Herausforderungen von Morgen"*, Jülich (Germany), 19.10.2007

Turek, M.; Schöning, M.J.: Umwelt schmecken und schützen – mit Silizium-Biosensoren werden Umweltgifte erfasst. *BMBF-Symposium „Forschung an den Fachhochschulen“*, Berlin (Germany), 22.11.2007

Turek, M.; Ketterer, L.; Schubert, J.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Detection of cyanide by means of silicon-based semiconductor sensors. 1. *Graduierten-Tagung der FH Aachen*, Jülich (Germany), 09.09.2008

Turek, M.; Kunchamwar, A.R.; Kloock, J.P.; Schubert, J.; Ziesmann, W.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Development and characterisation of a hybrid sensor system for the simultaneous detection of cyanide and heavy metals in aqueous solutions. *7th Int. Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technology*, Ein Gedi (Israel), 15.09.-18.09.2008

Turek, M.; Heiden, W.; Chhabda, T.A.; Riesen, A.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Artificial intelligence/fuzzy logic methods for analysis of combined signals from heavy metal chemical sensors. *7th Int. Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technology*, Ein Gedi (Israel), 15.09.-18.09.2008

→ „Best poster presentation award“

Turek, M.; Ketterer, L.; Schubert, J.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Cyaniderfassung mittels Silizium-basierten Bio- und Chemosensoren. *6. Deutsches BioSensor Symposium*, Freiburg (Germany), 29.03.-01.04.2009

Turek, M.; Heiden, W.; Riesen, A.; Guo, S.; Schubert, J.; Zander, W.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Simultaneous detection of cyanide and heavy metals for environmental analysis. *Engineering of Functional Interfaces*, Hasselt (Belgien), 18.06.-19.06.2009

Turek, M.; Schöning, M.J.: Processing and functionalising of oxides and non-conducting transducer materials for (bio-)chemical sensors. *Wilhelm and Else Heraeus Physics School: Nanoscaled oxides - Big opportunities in small structures*, Bad Honnef (Germany), 03.08.-08.08.2009

Turek, M.; Ketterer, L.; Guo, S.; Schubert, J.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Detection of cyanide by means of silicon-based semiconductor sensors. *2. Graduierten-Tagung der FH Aachen*, Aachen (Germany), 05.11.2009

A Semiconductor-based Field-effect Platform for (Bio-)Chemical and Physical sensors: From Capacitive EIS Sensors and LAPS over ISFETs to Nano-scale Devices

Michael J. Schöning^{1,2}, Maryam H. Abouzar^{1,2}, Torsten Wagner^{1,2}, Niko Näther¹, David Rolka², Tatsuo Yoshinobu³, Joachim P. Klock^{1,2}, Monika Turek^{1,2}, Sven Ingebrandt², and Arshak Poghosian^{1,2}

¹Laboratory for Chemical Sensors and Biosensors, Aachen University of Applied Sciences, Ginsterweg 1, Juelich, 52428, Germany

²Institute of Bio- and Nanosystems, Research Centre Juelich, Juelich, 52425, Germany

³Department of Electronic Engineering, Tohoku University, Sendai, 980-8579, Japan

ABSTRACT

The coupling of semiconductor field-effect devices (FED) together with chemical and biological recognition elements, like functional intelligent materials, biomolecules and living cells, represents an attractive platform for the creation of different (bio-)chemical sensors, multi-parameter analysis systems and bio-chips. This paper summarises recent developments and current research activities in the field of (bio-)chemically modified FEDs, scaling down from capacitive EIS (electrolyte-insulator-semiconductor) sensors and LAPS (light-addressable potentiometric sensor) to ISFETs (ion-sensitive field-effect transistor) that have been realised in our laboratory. Selected examples of application of ISFETs for the detection of physical parameters in liquids are presented, too. With the aim of future development of nano-devices for the detection of single biomolecules, the possibility of a simple preparation of different self-aligned nano-structures by using conventional photolithography and pattern-size reduction technique has been experimentally demonstrated.

INTRODUCTION

Nowadays, semiconductor field-effect devices (FED) based on an electrolyte-insulator-semiconductor system represent one of the key structural elements of a new generation of electronic chips for chemical and biological sensing with a direct electronic readout. These devices have been shown to be versatile tools for detecting pH, ion concentrations, enzymatic reactions, cellular metabolism and action potentials of living cells (see e.g., recent reviews [1-4]). More recently, researchers are highly interested in the coupling of charged macromolecules, like DNA (deoxyribonucleic acid), proteins and polyelectrolytes together with FEDs [5-15]. In addition, the possibility of detection of physical parameters in liquids with FEDs has been demonstrated [16,17]. Moreover, the inherent miniaturisation of FEDs and their compatibility with advanced microfabrication technology make them very attractive for the integration into microfluidic platforms and thus, for the creation of miniaturised analytical systems, like μ TAS (micro total analysis system), „lab on chip“ and electronic tongue devices.

The present paper summarises recent developments and current research activities in the field of FED-based (bio-)chemical and physical sensors as well as multi-parameter detection systems that have been realised. As transducers, ISFETs, capacitive EIS heterostructures and LAPS devices have been utilised. Two strategies have been proposed to integrate FEDs into a

flow-through cell: A hybrid-modular concept based on the same transducer principle has been applied to develop an ISFET-based multi-parameter detection system, while a capacitive EIS sensor and a LAPS, respectively, have been integrated into a cell set-up either as a separate component or as monolithic part of a micromachined cell. The realised devices have been utilised for the detection of different (bio-)chemical (pH, K^+ , heavy metals, penicillin, organophosphorus pesticides, alliin, cyanide, DNA and polyelectrolytes) and physical (temperature, flow velocity, flow direction, diffusion coefficient and liquid level) parameters.

With the aim of a future development of nano-biosensors, the possibility of a simple preparation of different nano-structures using conventional photolithography and layer-expansion or pattern-size reduction technique will be experimentally demonstrated.

HYBRID-MODULAR PLATFORM FOR AN ISFET-BASED MULTI-PARAMETER DETECTION SYSTEM

A hybrid-modular concept has been applied to realise an ISFET-based sensor system for the detection of three (bio-)chemical (pH, K^+ and penicillin concentrations) and five physical quantities (temperature, flow velocity, flow direction, diffusion coefficient of ions and liquid level) [17]. In this set-up, only four ISFET structures and one ion generator as an actuator have been used to detect eight quantities referring on the same transducer principle. In this system, the ISFET as an originally (bio-)chemical sensor at the same time serves as a physical sensor. The multi-parameter detection is achieved by means of different sensor arrangements and/or different working modes. This results in a multi-parameter sensor module that is flexible, easy exchangeable and cost-effective.

Fig. 1 shows the functional principle of an ISFET-based "time-of-flight"-type flow-velocity and flow-direction sensor using the in-situ electrochemical generation of H^+ - or OH^- -ions (a), and an example of the simultaneous detection of both the flow velocity and the flow direction with an upstream- and downstream-placed pH-sensitive device (b). In this experiment, the H^+ -ion pulse was generated by means of an Au ion-generator placed between the two ISFETs. The ISFETs were n-channel devices with a pH-sensitive Ta_2O_5 layer (ca. 80 nm thick) that also serves as a passivation layer. The Ta_2O_5 layer has been realised by thermal oxidation of a 40 nm thick sputtered Ta layer.

After being produced, the H^+ -ions will be transported to the downstream-placed ISFET2 by convection where they will be detected. As a result, the downstream-placed ISFET2 shows the typical peaks (see Fig. 1b; from this curve the flow velocity has been determined using the time difference ("time-of-flight": Δt) between the ion generation and the signal maximum of ISFET2), while for the upstream-placed ISFET1 practically no change in the sensor-output signal has been observed.

For the characterisation of the ISFETs, a wafer-level functionality testing system has been realised by means of integrating a specifically designed electrochemical capillary micro-droplet cell into a commercial wafer prober-station [18]. The developed system allows the identification and selection of "good" ISFETs (from the measured output and/or transfer characteristics) at the earliest stage avoiding expensive bonding, encapsulation and packaging processes for non-functioning ISFETs. In this way, costs which are wasted for bad dies, will be reduced. The developed system is also feasible for a wafer-level characterisation of ISFETs in terms of sensitivity, hysteresis and response time. Additionally, the system might be also utilised

for wafer-level testing of further electrochemical sensors. To our knowledge, there is no commercially available equipment for a wafer-level functionality testing and characterisation of ISFETs so far. In this context, the developed system might be a very attractive tool for both ISFET producers and ISFET users.

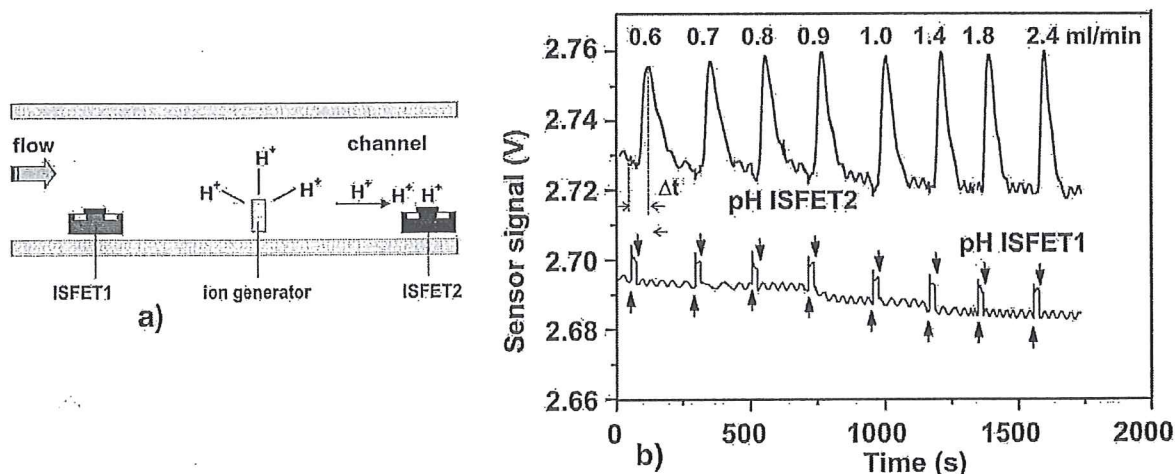


Figure 1. Functional principle of an ISFET-based “time-of-flight”-type flow-velocity and flow-direction sensor using the in-situ electrochemical generation of H^+ - or OH^- -ions (a), and example of the simultaneous detection of both the flow velocity and the flow direction with an upstream- and downstream-placed pH-sensitive ISFET (b). The arrows mark the time of the beginning and the end of ion generation.

CAPACITIVE EIS SENSORS

Capacitive EIS sensors have been integrated into a flow-through set-up either as a separate component or as monolithic part of a micromachined cell fabricated by combining Si and SU-8 technology. Separate EIS sensors sensitive to pH, K^+ -ions, penicillin, organophosphorus pesticides (paraoxon, parathion, diazinon and dichlorvos), alliin and cyanide have been realised [19]. Especially, the alliin and cyanide sensor attract a high commercial interest in food and pharmaceutical industries as they can be used to control the content of cyanides, which is acutely toxic to animals and humans, and of alliin, whose quantity defines the quality of most garlic herbal remedies (antidiabetic, antiatherosclerotic and cholesterol-lowering) produced from garlic powder.

In addition, a cleaning-in-place (CIP)-suitable Ta_2O_5 -gate EIS pH-sensor for the process control in food industry has been realised [20]. This sensor shows a nearly-Nernstian pH sensitivity, even after 30 CIP cycles in highly caustic media in combination with high temperatures (4% NaOH solution at 80°C during 15 min and subsequently in 0.65% HNO_3 solution at 80°C during 5 min). The video-microscopic and scanning electron microscopic investigations do not show any visible degradation or destruction of the Ta_2O_5 films. This type of non-glass, unbreakable sensor can be placed in direct contact with food for pH measurements without the risk of breakage.

With the aim of a future creation of DNA arrays and protein chips with direct electrical readout for fast, simple and low-cost analysis, capacitive EIS sensors have been applied for the detection of molecular interactions, in particular, for the label-free electrical DNA-hybridisation detection as well as for monitoring the layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes multilayers of cationic poly(allylamine hydrochloride) (PAH) and anionic poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS) [12-14]. The performed experiments could demonstrate the feasibility of the capacitive EIS sensors for the detection of the adsorption and binding of charged macromolecules. As an example, Fig. 2 depicts a capacitance-voltage ($C-V$) curves (a) and zoomed potential shifts in the depletion region (b) for an n-Si-SiO₂ EIS sensor functionalised with DNA molecules. The $C-V$ curves have been recorded in the immobilisation and hybridisation buffers before and after the (single-stranded) ssDNA immobilisation as well as before and after hybridisation with the (complementary) cDNA strand. The recorded immobilisation and hybridisation signals for three n-Si-SiO₂ EIS sensors were 35-55 mV and 24-33 mV, respectively.

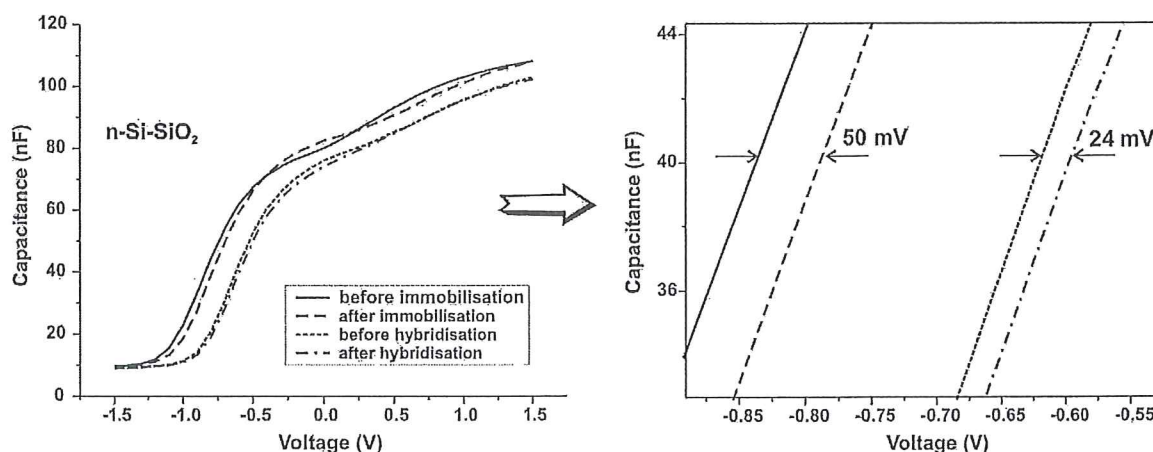


Figure 2. Label-free electrical detection of DNA immobilisation and hybridisation by means of a capacitive EIS sensor: (a) capacitance-voltage curves measured before and after the ssDNA immobilisation as well as before and after hybridisation with the cDNA strand; (b) zoomed potential shifts in the depletion region. In this experiment, ssDNA molecules were immobilised onto a silanised SiO₂ surface via linker molecules of succinic anhydride.

Micromachined cells with different sensor and/or flow-through channel layouts have been designed for different applications. Some of the layouts also include additional thin-film metal electrodes, which serve as electrodes for amperometric measurements or as an ion generator for flow-velocity and flow-direction measurements using the integrated EIS or LAPS device. Experimental details for the fabrication are given elsewhere [21,22]. The microcell with an integrated EIS sensor has been tested in flow-through and FIA (flow-injection analysis) mode for multi-parameter detection (pH, penicillin concentration, flow-velocity and flow direction) as well as in a LAPS configuration for the visualisation of a test sample injected into the microchannel (see Fig. 3).

Up to now, the commercialisation and wide application of EIS devices have been restricted due to the absence of inexpensive, portable and feasible measuring devices. Therefore, recently, we have developed a portable user-friendly measurement device for the characterisation

of EIS sensors in both the capacitance-voltage and the constant-capacitance mode, respectively [23]. In addition, to being inexpensive, robust and reliable, the device includes modern device interfaces. The software and hardware set-up follow the modern quasi-standards of handheld measurement devices. The new device was tested under real conditions for the measurement of the pH value in buffer solutions as well as in cell-culture medium for biotechnology applications.

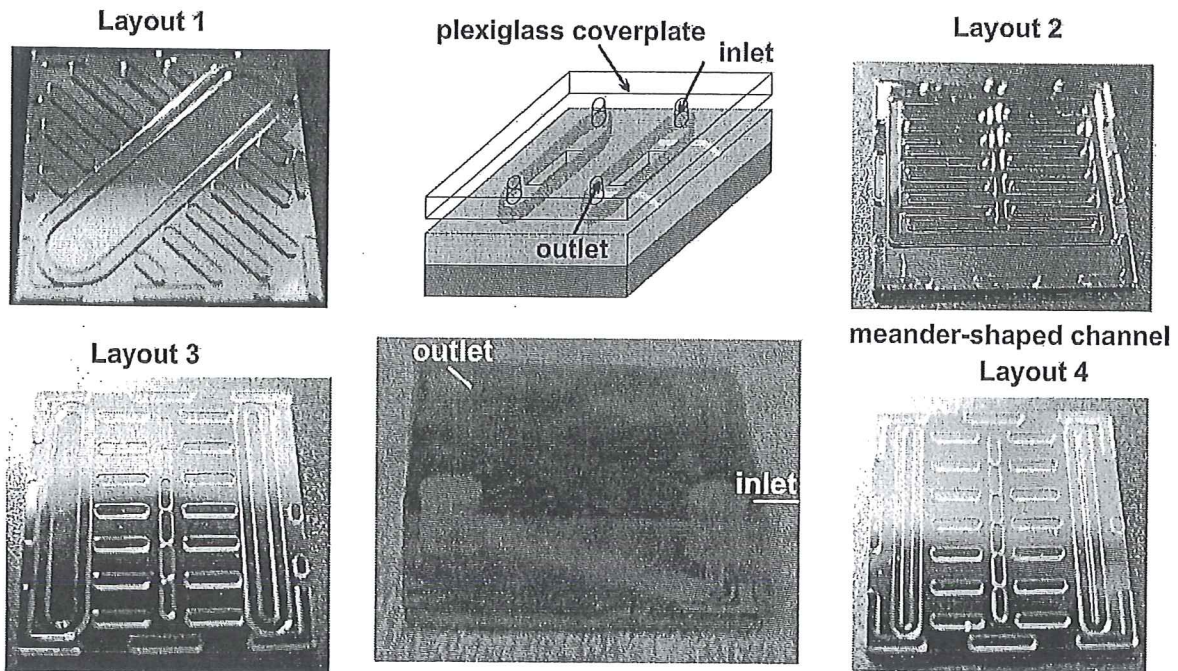


Figure 3. Schematic (middle) and four different layouts of the micromachined flow-through cell with an integrated field-effect sensor fabricated by combining Si and SU-8 technologies.

LAPS DEVICES

In contrast to the capacitive EIS sensor, where the measured value of the analyte concentration is an average value over the whole sensing surface in contact with the analyte, the LAPS measurement has the advantage to be spatially resolved. The measured area on the sensing surface is defined by the area of illumination, where the ac photocurrent to be measured has been generated. In order to measure an analyte-concentration distribution along the LAPS-sensor surface with spatial resolution, either the light pointer can be scanned along the surface or multiple light sources can be used.

Thanks to the structural similarity between LAPS, capacitive EIS sensor and ISFET, many of the sensitive materials, membrane-deposition techniques and enzyme-immobilisation strategies already developed for ISFETs and EIS sensors are also applicable to LAPS devices. However, many prior LAPS developments suffer from their lack in terms of non-portability, insufficient robustness, complicate handling, etc. Hence, a portable and robust 16 channel pen-shaped and “chip-card”-based LAPS with an integrated signal-processing unit has been

developed for multi-sensor and chemical imaging applications [24-28].

The utilisation of the 16 channel “chip-card” LAPS for multi-sensor applications has been demonstrated by means of the simultaneous measurement of the Cd^{2+} -ion concentration and the pH value with the same sensor chip. Fig. 4a shows a video-microscopic picture with an additional infrared picture of the measurement chamber and the sensor chip. The right side of the LAPS chip is covered with a chalcogenide glass layer and at the left side, the underlying pH-sensitive Ta_2O_5 layer is visible. The 16 IR-LEDs (infrared light-emitting diode) below the LAPS chip are visible as bright dots (eight spots with the chalcogenide glass, and eight spots with the bare Ta_2O_5).

Fig. 4b depicts the LAPS signal at different Cd^{2+} -ion concentrations in the range from 1×10^{-6} mol/l to 1×10^{-2} mol/l, whereas the pH value was fixed by HNO_3 at pH 3. The dynamic LAPS-signal response for the different Cd^{2+} -ion concentrations shows a stable signal for all measurement spots with an average Cd^{2+} -ion sensitivity of about 28.1 mV/decade at the chalcogenide glass region. At the same time, the photocurrent signals from the pH-sensitive Ta_2O_5 regions were not significantly influenced by the different Cd^{2+} -ion concentrations.

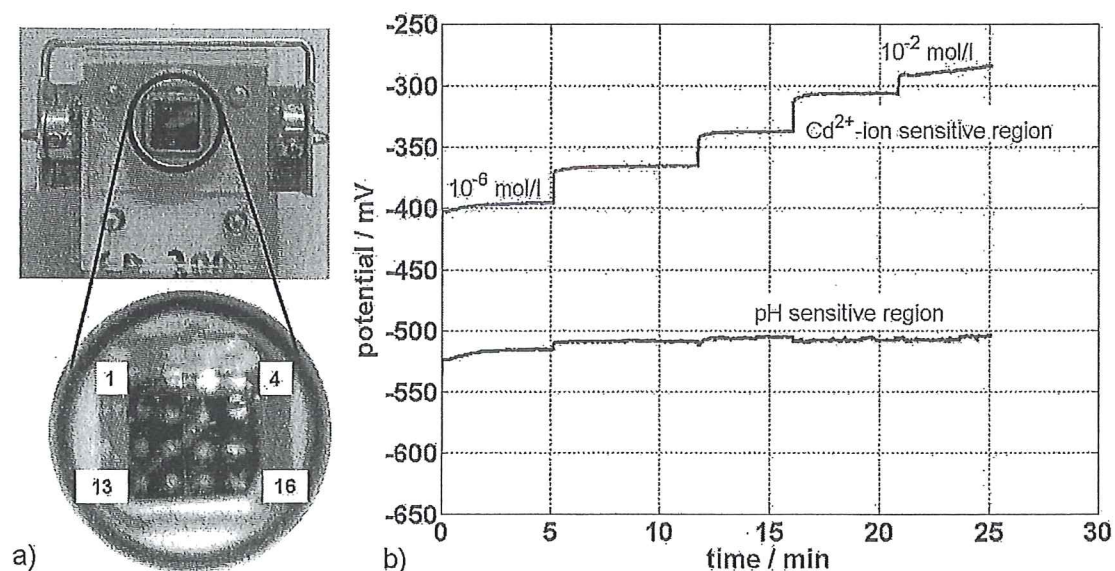


Figure 4. Chemical multi-sensor application of a 16 channel “chip-card” LAPS. a) LAPS set-up from top view; the left side of the LAPS chip defines the pH-sensitive Ta_2O_5 area, while the right side represents the chalcogenide glass area. The bright spots indicate the light beams of the 4x4 LED array. b) Constant photocurrent measurement of different Cd^{2+} -ion concentrations between 1×10^{-6} – 1×10^{-2} mol/l in a fixed pH-buffer solution of pH 3.

“MICROSTRUCTURED NANO-STRUCTURES”: NANO-STRUCTURING USING PHOTOLITHOGRAPHY AND LAYER-EXPANSION TECHNIQUE

The production of nano-structures has attracted great interest, not only as a way to increase the device-packing density, but also due to the creation of a new class of nano-

electronic devices. Scaling down from micro- to nano-structures and coupling them with biomolecules and living biological systems allow the creation of functional hybrid nano-biosystems with a molecular-scale proximity between the molecular recognition and transduction element as well as nano-sensors for the detection of even single biomolecules. Our strategy for the production of different nano-structures and nano-sensors (i.e., nano-gaps, nano-electrodes, nano-fluidic channels, etc.) combines conventional photolithography together with a layer-expansion or pattern-size reduction technique, and is based on the conversion of a photolithographically patterned metal layer (in this work, Ta) to its metal oxide (Ta_2O_5) using the oxidation process. Depending on the thickness of the metal layer and its ability to expand as it is converted to the respective metal oxide, the pattern-size resolution of the original photolithographically patterned structure can be scaled down to the nano-meter range [29,30]. By applying this “simple” technique, it is possible to prepare nm-scaled structures (even below 10 nm) with different layouts at both the laboratory and mass-production level.

Fig. 5 exemplarily demonstrates SEM (scanning electron microscopy) pictures of fabricated nano-structures before and after the Ta oxidation. A pattern-size reduction by a factor more than 25 has been achieved. In addition, an exemplary application as nano-biosensor is presented.

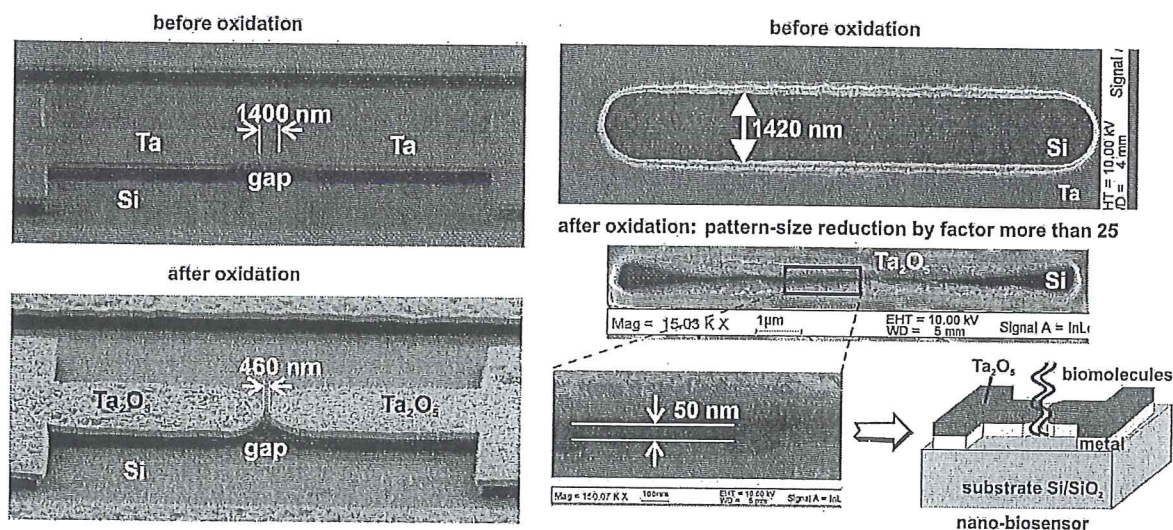


Figure 5. SEM photographs of different nano-structures fabricated by conventional photolithography and subsequent layer-expansion technique and possible application as nano-biosensor (schematically). A pattern-size reduction by a factor more than 25 has been achieved.

CONCLUSIONS

Different types of (bio-)chemically modified FEDs such as capacitive EIS sensors, LAPS and ISFETs have been realised utilising different strategies to integrate FEDs into a flow-through cell. A hybrid-modular concept has been applied to develop an ISFET-based multi-parameter system, while a capacitive EIS sensor and LAPS, respectively, have been integrated into a flow-through set-up either as a separate component or as monolithic part of a

micromachined cell fabricated by combining Si and SU-8 technology. The realised devices have been utilised for the detection of different (bio-)chemical and physical parameters that have been summarised in Table 1. In addition, the possibility of a simple preparation of different types of nano-structures by scaling down from micro- to nano-patterns using conventional photolithography and layer-expansion or pattern-size reduction technique has been experimentally demonstrated.

Table 1. Summary of the developed (bio-)chemical and physical FEDs.

(Bio-)chemical/ Physical sensor	Ion/Analyte; Physical parameter	Membrane/ Enzyme; Receptor	Transducer
pH sensor	H ⁺ , OH ⁻	SiO ₂ , Si ₃ N ₄ , Al ₂ O ₃ , Ta ₂ O ₅	EIS, LAPS, ISFET
Ion sensor	K ⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Cu ²⁺ , TI ⁺ , Ag ⁺	Polymer membrane/ionophore; chalcogenide glass	EIS, LAPS, ISFET
Enzyme sensor	Penicillin, pesticides, alliin, cyanide	Penicillinase, OHP, alliinase, cyanidase	EIS, LAPS, ISFET
DNA sensor	cDNA	ssDNA	EIS, ISFET
Polyelectrolyte sensor	PAH/PSS	PSS/PAH	EIS, ISFET
Physical sensor	Temperature, flow velocity, flow direction, diffusion coefficient of ions, liquid level		ISFET

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank M. Keusgen, M. Koudelka-Hep, A. Mulchandani and J. Wang for technical support and valuable discussions. Parts of this work were supported by the Ministerium für Innovation, Wissenschaft, Forschung und Technologie des Landes Nordrhein-Westfalen, Germany.

REFERENCES

1. P. Bergveld, *Sens. Actuators B* **88**, 1 (2003).
2. A. Poghossian, M.J. Schöning, In: *Encyclopedia of Sensors*. Eds. C.A. Grimes, E.C. Dickey, M.V. Pishko, Vol. 9, American Scientific Publisher, Stevenson Ranch, 2006, p. 463.
3. M.J. Schöning, A. Poghossian, *Electroanalysis* **18**, 1893 (2006).
4. M.J. Schöning, A. Poghossian, *Analyst* **127**, 1137 (2002).
5. F. Uslu, S. Ingebrandt, D. Mayer, S. Böcker-Meffert, M. Odenthal, A. Offenhäusser, *Biosens. Bioelectron.* **19**, 1723 (2004).

6. Y. Han, A. Offenhäusser, S. Ingebrandt, *Surf. Interface Anal.* **38**, 176 (2006).
7. S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, *Phys. Stat. Sol. (a)* **203**, 3399 (2006).
8. T. Sakata, M. Kamahori, Y. Miyahara, *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, 2854 (2005).
9. S.Q. Lud, M.G. Nikolaides, I. Haase, M. Fischer, A.R. Bausch, *ChemPhysChem* **7**, 379 (2006).
10. D. Landheer, G. Aers, W.R. McKinnon, M.J. Deen, J.C. Ranuarez, *J. Appl. Phys.* **98**, 044701 (2005).
11. M.J. Deen, M.W. Shinwari, J.C. Ranuarez, D. Landheer, *J. Appl. Phys.* **100**, 074703 (2006).
12. A. Poghossian, A. Cherstvy, S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B* **111-112**, 470 (2005).
13. A. Poghossian, M.H. Abouzar, M. Sakkari, T. Kassab, Y. Han, S. Ingebrandt, A. Offenhäusser, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B* **118**, 163 (2006).
14. M.J. Schöning, M.H. Abouzar, S. Ingebrandt, J. Platen, A. Offenhäusser, A. Poghossian, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol.* **915**, 0915-R05-04 (2006).
15. P.A. Neff, A. Naji, C. Ecker, B. Nickel, R. Klitzing, A.R. Bausch, *Macromolecules* **39**, 463 (2006).
16. A. Poghossian, J.W. Schultze, M.J. Schöning, *Electrochim. Acta* **48**, 3289 (2003).
17. A. Poghossian, M.J. Schöning, *Electroanalysis* **16**, 1863 (2004).
18. A. Poghossian, K. Schumacher, J.P. Kloock, C. Rosenkranz, J.W. Schultze, M. Müller-Veggian, M.J. Schöning, *Sensors* **6**, 397 (2006).
19. M.J. Schöning, *Sensors* **5**, 126 (2005).
20. M.J. Schöning, D. Brinkmann, D. Rolka, C. Demuth, A. Poghossian, *Sens. Actuators B* **111-112**, 423 (2005).
21. N. Näther, D. Rolka, A. Poghossian, M. Koudelka-Hep, M.J. Schöning, *Electrochimica Acta* **51(5)**, 924 (2005).
22. M.J. Schöning, N. Näther, V. Auger, A. Poghossian, M. Koudelka-Hep, *Sens. Actuators B* **108**, 986 (2005).
23. T. Wagner, R.J. Maris, H.-J. Ackermann, R. Otto, S. Beging, A. Poghossian, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B*, submitted.
24. M.J. Schöning, T. Wagner, C. Wang, R. Otto, T. Yoshinobu, *Sens. Actuators B* **108**, 808 (2005).
25. T. Wagner, T. Yoshinobu, C. Rao, R. Otto, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B* **117**, 472 (2006).
26. T. Wagner, C. Rao, J.P. Kloock, T. Yoshinobu, R. Otto, M. Keusgen, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B* **118**, 33 (2006).
27. J.P. Kloock, L. Moreno, A. Bratov, S. Huachupoma, J. Xu, T. Wagner, T. Yoshinobu, Y. Ermolenko, Y.G. Vlasov, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B* **118**, 149 (2006).
28. T. Wagner, R. Molina, T. Yoshinobu, J.P. Kloock, M. Biselli, M. Canzoneri, T. Schnitzler, M.J. Schöning, *Electrochim. Acta*, submitted.
29. A. Poghossian, J. Platen, M.J. Schöning, *Electrochim. Acta* **51**, 838 (2005).
30. J. Platen, A. Poghossian, M.J. Schöning, *Sensors* **6**, 361 (2006).

Full Research Paper

Development and Electrochemical Investigations of an EIS- (electrolyte-insulator-semiconductor) based Biosensor for Cyanide Detection

Monika Turek^{1,2}, Lothar Ketterer³, Melanie Claßen⁴, Heinz K. Berndt⁴, Gereon Elbers⁴, Peter Krüger⁵, Michael Keusgen³ and Michael J. Schöning^{1,2,*}

¹ Aachen University of Applied Sciences, Jülich Campus, Institute of Nano- and Biotechnologies, Ginsterweg 1, 52428 Jülich, Germany; E-mails: turek@fh-aachen.de; m.j.schoening@fz-juelich.de.

² Research Centre Jülich, Institute of Bio- and Nanosystems (IBN-2), 52428 Jülich, Germany; E-mails: turek@fh-aachen.de; m.j.schoening@fz-juelich.de.

³ Philipps-University Marburg, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Marbacher Weg 6, 35037 Marburg, Germany; E-mails: ketterer@staff.uni-marburg.de; keusgen@staff.uni-marburg.de.

⁴ Aachen University of Applied Sciences, Jülich Campus, Ginsterweg 1, 52428 Jülich, Germany; E-mails: melanie.classen@fh-aachen.de; h.berndt@fh-aachen.de; elbers@fh-aachen.de.

⁵ ALA Analytical Laboratory GmbH, Charlottenstraße 14, 52070 Aachen, Germany; E-mail: p.krueger@ala-aachen.de.

* Author to whom correspondence should be addressed. Email: m.j.schoening@fz-juelich.de

Received: 16 July 2007 / Accepted: 3 August 2007 / Published: 3 August 2007

Abstract: A cyanide biosensor based on a pH-sensitive p-doped electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) structure with an immobilised enzyme (cyanidase) is realised at the laboratory scale. The immobilisation of the cyanidase is performed in two distinct steps: first, the covalent coupling of cyanidase to an N-hydroxysuccinimide- (NHS) activated SepharoseTM gel and then, the physical entrapment of NHS-activated SepharoseTM with the immobilised cyanidase in a dialysis membrane onto the EIS structure. The immobilisation of the cyanidase to the NHS-activated SepharoseTM is studied by means of gel electrophoresis measurements and investigations using an ammonia- (NH₃) selective electrode. For the electrochemical characterisation of the cyanide biosensor, capacitance/voltage and constant capacitance measurements, respectively, have been carried out. A differential measurement procedure is presented to evaluate the cyanide concentration-dependent biosensor signals.

Keywords: cyanide biosensor, EIS structure, cyanidase, pH, differential measurement set-up.

1. Introduction

Cyanide and its derivatives are widely used in industrial mining and metal plating industry. Besides, many medical and food plants are toxic for human beings because of their (high) content of cyanogenic glycosides. Already a few mg/kg human weight (average lethal dose: 1.5 mg/kg human weight) can lead to death. Hereby, the enzyme cytochrome C oxidase, which is responsible for the cell-respiration cycle, is reversibly inhibited by cyanide so that the aerobic respiration of cells shifts to anaerobic conditions resulting in their acidification. The decreased carbon dioxide generation and oxygen uptake potential lead to a reduced buffer potential of the blood. The pH value of the blood decreases resulting in a slowed down glycolysis by inhibition of phosphofructokinase ending in a metabolic disaster, e.g. the cardiac arrest and apnoea. Due to their high requirement of oxygen, the nervous system, heart and lung are most affected by cyanide [1-4].

In nature, cyanogenic glycosides, from which cyanide can be liberated by enzymatic hydrolysis, can be found in more than 2500 plant species, e.g. bitter almonds, corn, wheat, rice, legumes, stone fruits and roots. On the one hand, cyanogenic glycosides act as natural protection mechanism of plants against insects, fungi, etc.. On the other hand, a wrong preparation or consumption of these plants can cause poisoning. Especially in developing countries, the root *Cassava*, containing a high amount of cyanogenic glycosides, often causes chronic poisoning [3,5-7]. Aside, cyanide is still (illegally) used for fishing in Asia, affecting the underwater environment as well as persons [8]. Due to its high affinity to metal components, cyanide is also often applied for the extraction of gold and/or silver in metal-, electroplating-, agricultural- and pharmaceutical industries. Since cyanide attains as industrial waste or by-product, ecological damage and accidents [9,10] must be minimised and thus, the direct and fast determination of cyanide in small amounts is of increasing interest.

For the detection of cyanide, different methods have been reported in literature: colorimetric methods such as the so-called König reaction or by means of methyl violet [11-14], amperometric detection of cyanide utilising an enzyme-based biosensor or by means of a flow-injection system together with an ammonium-selective electrode [3,15-17], sensing gaseous hydrogen cyanide employing an embedded piezoresistive microcantilever or a purge system [18,19], and the potentiometric determination of cyanide by means of a cyanide-ion selective electrode (ISE) [20-23]. The major drawbacks of all these analytical methods are, however, their insufficient possibility of miniaturisation and/or their difficult handling. Consequently, there is still a lack in miniaturised analytical (bio-)sensor systems for independent “in field” measurements of cyanide.

Therefore, in this work, the development and electrochemical characterisation of a miniaturisable silicon-based cyanide biosensor is presented. Both the immobilisation of the enzyme cyanidase on top of a capacitive EIS field-effect structure and the biosensor performance will be discussed. In order to improve the reliability and accuracy of the cyanide biosensor, a differential measurement procedure/set-up is suggested.

2. Experimental Section

The cyanide biosensor consists of a pH-sensitive EIS structure with immobilised enzyme cyanidase [EC 3.5.5.1]:

Cyanidase has been obtained by including the gene sequence of cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* [9,24] in a plasmide along with a six-fold histidine tag at the N-terminus of the protein. The plasmide has been transformed into *Escherichia coli* BL21. This strain has been used for expression of cyanidase. After growing the bacteria in lysogeny broth medium, they have been disrupted using lysozyme and sonification. Cyanidase has then been purified via the histidine-tag on a nickel ion-loaded HiTrap Chelating HP column (Amersham Biosciences) and stripped off the column with 60 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5, 150 mM NaCl + 200 mM imidazole).

For the EIS structure, a p-doped (boron) 3" single-crystal silicon wafer (Wacker-Chemitronic) with <100>-orientation, specific resistance 1-10 Ω cm and thickness of 356-406 μ m has been used. By means of thermal dry oxidation, a 30 nm thick SiO₂ layer has been grown on the silicon substrate as insulating layer. To realise the pH-sensitive Ta₂O₅ layer onto the SiO₂ layer, a 25 nm thick Ta layer has been evaporated by means of a physical vapour deposition process that is subsequently oxidised to a 50 nm thick Ta₂O₅ layer. As rear-side contact, 300 nm Al has been evaporated and treated by a rapid thermal annealing process. Finally, the wafer has been cut into single 10 mm*10 mm chips. For more process details, see elsewhere [25].

Onto the Ta₂O₅ layer of the EIS chip, ~24 mg of covalently coupled cyanidase to NHS-activated SepharoseTM (4 Fast Flow, Amersham Biosciences) has been physically immobilised under a dialysis membrane (molecular weight cut off 1200-1400, pore diameter 25 Å, ServaporTM 44144, Serva Electrophoresis). This entrapment method has been chosen in order to increase the enzyme activity on the EIS sensor chip. The covalent immobilisation of the cyanidase to NHS-activated SepharoseTM has been performed at 4 °C for 20-25 hours: NHS-activated SepharoseTM has been filled into a column with 35 μ m filter pore size (MoBiTec GmbH) for the immobilisation and activated by 1 mM HCl for 5 min. After equilibration with 60 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0, 200 mM NaCl) for 1 min, cyanidase has been coupled to the NHS-activated SepharoseTM in a closed circuit system from the cyanidase solution. The "cyanidase gel" has been stored in 150 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0, 200 mM NaCl + 0.2% NaN₃) at 4 °C.

The amount of the covalently immobilised cyanidase has been determined by means of the sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and a gel scanner (CS-9001 PC, SHIMADZU). To denaturise first the enzyme, each sample that has been taken regularly during the immobilisation process from the immobilisation solution, has been diluted with 247 μ l SDS-buffer (0.01 M trishydroxymethylaminomethane (TRIS)/HCl, pH 8.0, 0.001 M disodium-ethylene diamine tetraacetic acid (Na₂-EDTA), 25 g/l SDS, 5 vol-% 2-mercaptoethanol) and heated in a water bath for 5 min. In order to mark the front, 10 μ l of bromophenyl blue solution has been added to each sample. Then, the samples as well as the protein-molecular weight marker Roti-Mark standard (Carl Roth GmbH & Co. KG) have been applied to the gel (PhastGel Homogeneous 12.5, Amersham Biosciences) and the proteins have been separated by gel electrophoresis at 6 mA and 15 °C from 0 V up to 200 V (PhastSystem, Pharmacia LKB Biotechnology). The gel has been developed by means

of silver stain and evaluated quantitatively by means of a gel scanner determining the absorption at $\lambda = 550$ nm.

The measurements of the enzyme activity of the “cyanidase gel” have been performed by means of a NH_3 -sensitive ISE (PY-102, Sartorius AG) in 60 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0, 150 mM NaCl) at 30 °C in order to keep the conditions for the optimal activity of cyanidase. The calibration of the electrode has been done in standard ammonia solutions (60 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0, 150 mM NaCl)) at 30 °C from 10^{-5} M to 10^{-2} M.

For the electrochemical sensor characterisation, the cyanide biosensor has been mounted into a Plexiglas measuring cell in contact with the analyte solution together with a silver/silver chloride (Ag/AgCl) double-junction reference electrode (Metrohm AG). The biosensor measurements have been performed with an impedance analyzer Im5d (Zahner Elektronik) in the capacitance/voltage (C/V) and constant capacitance (ConCap) mode, respectively. For all measurements, an a.c. voltage with an amplitude of 20 mV and a frequency of 120 Hz has been chosen. A detailed description of the C/V and ConCap mode is given, e.g. in [26,27]. Freshly prepared cyanide standards (5 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0, 150 mM NaCl)) from 10^{-6} M to 10^{-2} M as well as pH buffer solutions (pH 3 to pH 11, TitriFix, Merck KGaA) were used in order to determine the substrate specifications of the biosensor and the pH behaviour of the transducer structure, respectively.

3. Results and Discussion

3.1. Immobilisation of cyanidase to NHS-activated SepharoseTM

In order to evaluate the covalent immobilisation procedure of the cyanidase on the NHS-activated SepharoseTM, samples of the circulating cyanidase solution during the immobilisation have been investigated by means of the SDS-PAGE with silver stain afterwards. The quantitative determination of the immobilised cyanidase has been calculated from the decreasing peak area at 37.5 kDa that corresponds to the molecular mass of cyanidase [24].

Figure 1 (top) shows a photograph of the gel including standard proteins and the quantitative evaluation by means of a gel scan (bottom). As can be seen from the figure, the width of the band at 37.5 kDa has been reduced from sample S1 at the beginning of the immobilisation procedure to sample S7 at the end of the immobilisation process. Calculations of the peak area at 37.5 kDa have resulted in an amount of 11 mg (originally 27 mg) of cyanidase that has been covalently coupled to 2 ml of NHS-activated SepharoseTM (“cyanidase gel”) (comparison between sample S1 and sample S6) after an immobilisation time of 22 h and 20 min. The investigations also exhibit that the enzyme is not completely homogeneously distributed in buffer solution (see e.g., sample S4 and sample S5). Nonetheless, a decreasing band width with increasing immobilisation time has been found that underlines the bonding of the cyanidase to the NHS-activated SepharoseTM.

The activity of the immobilised cyanidase to NHS-activated SepharoseTM has been qualitatively tested by means of NH_3 determination with an ammonia-sensitive ISE. In general, calibration measurements with an NH_3 -sensitive ISE result in a decreased output signal (voltage) with increasing ammonia concentration. In the presented experiment, the NH_3 -sensitive ISE was placed together with 100 μl „cyanidase gel“ in a baker glass with 10 ml buffer solution. By successively adding a certain

amount of potassium cyanide salt to the test sample, the ISE signal has been shifted towards smaller output signals, which corresponds to an active behaviour of the immobilised enzyme.

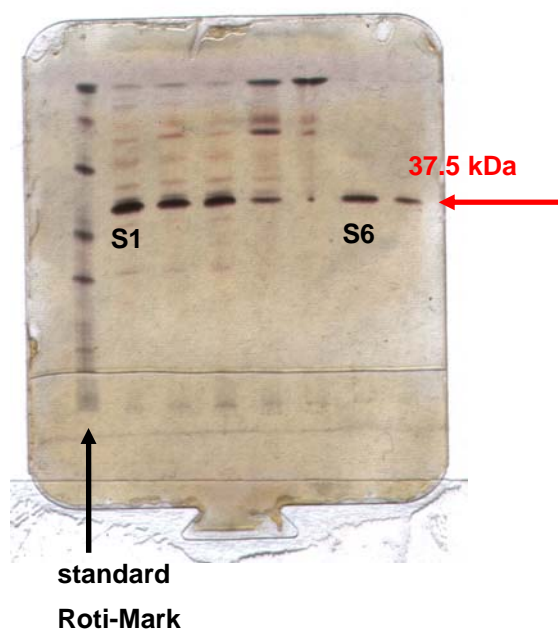
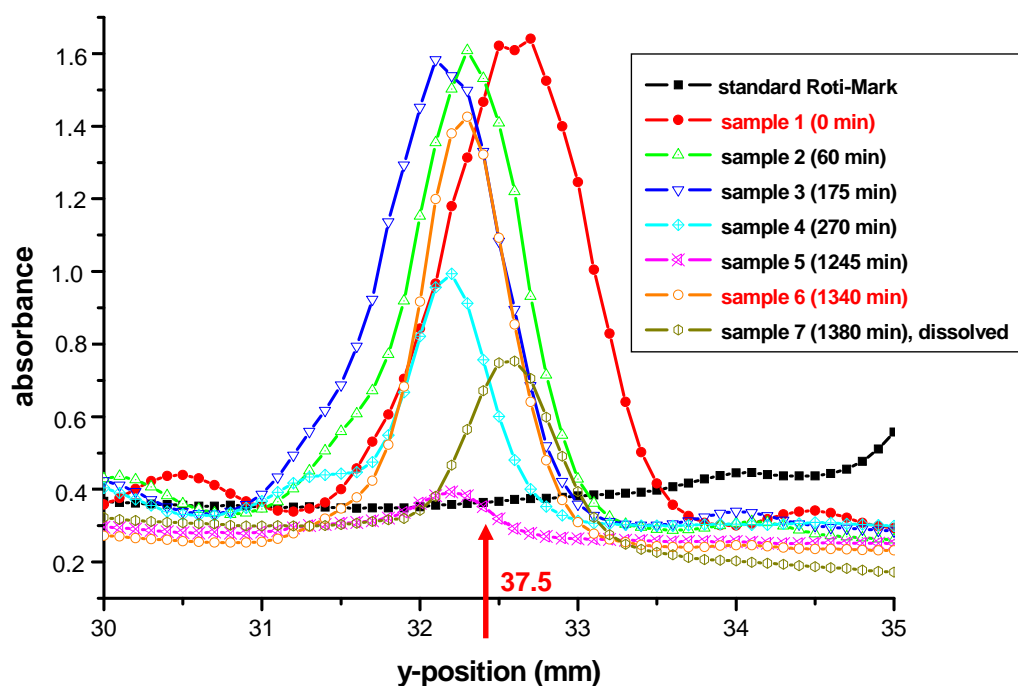


Figure 1. PhastGel Homogeneous 12.5 with silver stain (top) and dedicated gel scan in vertical direction (bottom) at y-position of 37.5 kDa in order to evaluate the immobilisation process of cyanidase to NHS-activated Sepharose™: sample S1 belongs to $t = 0$ h and sample S6 to $t = 22$ h 20 min.



3.2. Electrochemical characterisation of the cyanide biosensor

To systematically investigate the influence of the “cyanidase gel” and dialysis membrane onto the curve behaviour of the EIS structure and to determine the working point for the subsequent ConCap measurements, the different EIS sensor set-ups (EIS sensor bare; EIS sensor with dialysis membrane;

EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM without immobilised cyanidase; EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM with immobilised cyanidase) have been operated in the C/V mode. The total capacitance of a bare EIS structure can be simplified by a series connection of the two insulator capacitances (here, SiO₂ and Ta₂O₅ layer) and the space-charge capacitance. In figure 2, all C/V curves show a typical behaviour of a p-type EIS structure that can be distinguished into three regions: accumulation, depletion and inversion [27]. The difference in the maximum capacitance values can be explained due to the varying active sensor area, depending on the respective sensor configuration.

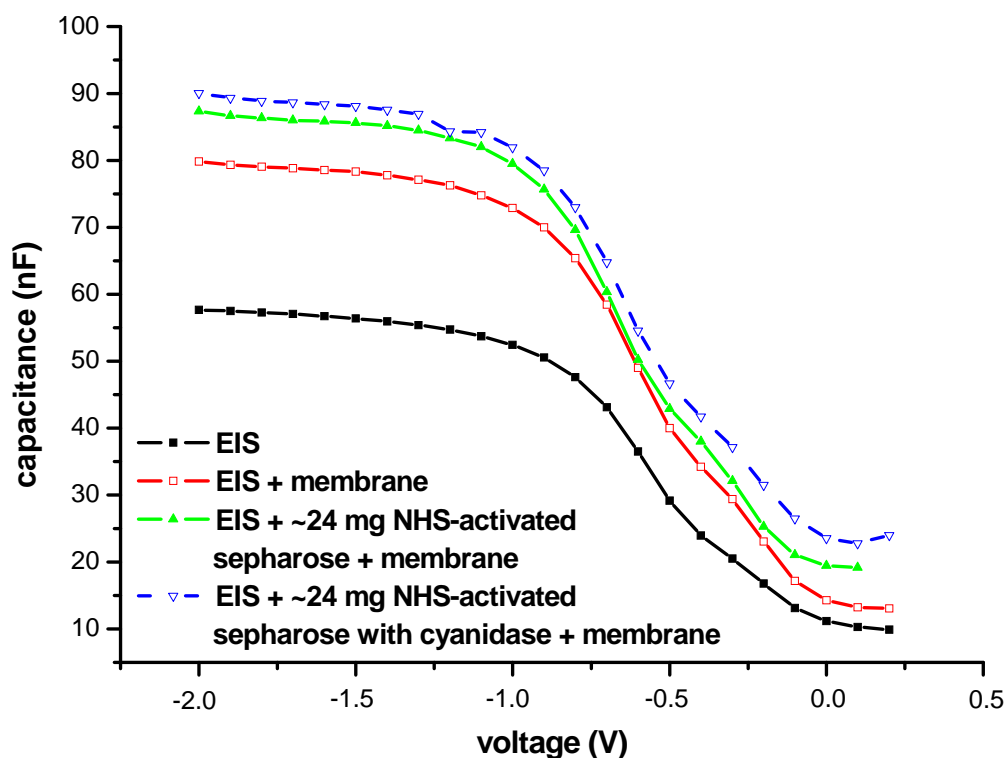
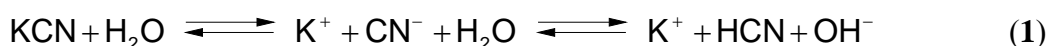


Figure 2. C/V curves of the field-effect-based EIS sensor. The influence of both the immobilised “cyanidase gel” and the dialysis membrane onto the C/V curve behaviour is shown (bare EIS sensor; EIS sensor with dialysis membrane; EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM without immobilised cyanidase; EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM with immobilised cyanidase).

For the ConCap measurements, working points at 60% of the maximum capacitance (flat-band condition) have been determined, which correspond to 38.4 nF, 53.0 nF, 59.1 nF and 62.7 nF, respectively, for the bare EIS sensor, the EIS sensor with dialysis membrane, the EIS sensor with NHS-activated SepharoseTM and dialysis membrane without immobilised cyanidase, and the EIS sensor with “cyanidase gel” and dialysis membrane.

In the ConCap mode, the surface-potential change due to a varying analyte concentration (e.g., pH value) can be directly recorded with the help of a feed-back control voltage, which serves as sensor output signal [26,27]. ConCap measurements of bare EIS structures have demonstrated a nearly Nernstian pH sensitivity [24].

Figure 3 shows a typical ConCap cycle of the bare EIS sensor in comparison to the EIS sensor with dialysis membrane, the EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated Sepharose™ without immobilised cyanidase and the EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated Sepharose™ with immobilised cyanidase EIS sensor in different KCN solutions (0 M to 10^{-2} M). For all sensor set-ups with increasing KCN concentration the voltage signal raises, too. For higher cyanide concentrations ($> 10^{-4}$ M), the sensor signals shift noticeably to higher voltage values because the buffer's capacity gets exhausted due to its very small buffer molarity of 5 mM. The pH shift can be described by the chemical dynamic equilibrium of KCN in solution:



The higher the KCN concentration, the more hydroxide ions are released into the analyte solution and the higher is the pH value. For KCN concentrations $< 10^{-4}$ M, only a slight increase of the voltage signal in the order of several millivolts has been observed.

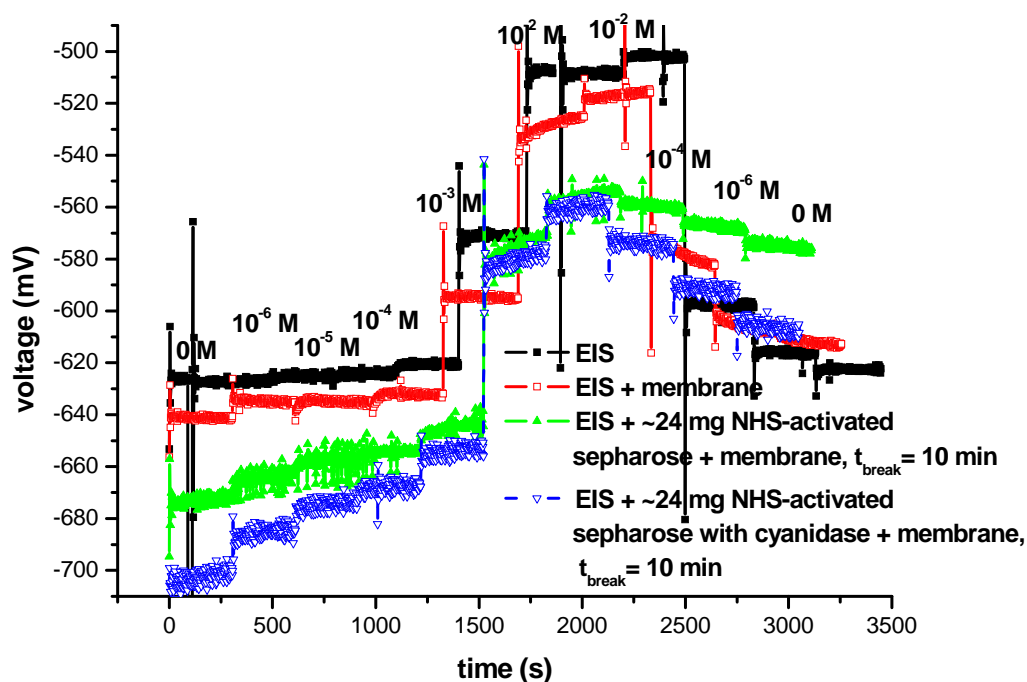


Figure 3. ConCap measurement of the field-effect-based EIS sensor. The influence of both the immobilised “cyanidase gel” and the dialysis membrane onto the biosensor signal is shown (bare EIS sensor; EIS sensor with dialysis membrane; EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated Sepharose™ without immobilised cyanidase; EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated Sepharose™ with immobilised cyanidase). Measurement concentration ranges from 0 M to 10^{-2} M KCN.

For higher cyanide concentrations (10^{-3} M to 10^{-2} M), a potential shift of about 70 mV has been achieved that corresponds to a pH change from originally pH 8.5 to pH 9.5. At the same time, the “intrinsic” properties of the different sensor set-ups (average pH sensitivity) show a distinct variation. The pH sensitivity has decreased from about 56 mV/pH for the bare EIS sensor, to 52 mV/pH and

approximately 43 mV/pH for the EIS sensor with dialysis membrane and the EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM without and with immobilised cyanidase and dialysis membrane, respectively. Thus, the dialysis membrane has only a slight effect on the sensor's signal behaviour, whereas the additionally applied NHS-activated SepharoseTM without and with cyanidase has reduced the sensor signal about 23%. This might be due to a limited diffusion of the analyte through the NHS-activated SepharoseTM and partially "blocked" pH-sensitive sites of the Ta₂O₅ layer. The response time has prolonged from originated 1-3 s for the bare EIS structure to about 10 min for the EIS sensor with dialysis membrane and cyanidase gel. The increased response time can be explained by a raising diffusion time of the analyte to reach the pH-sensitive transducer surface. The ConCap measurements with NHS-activated SepharoseTM have shown relatively high noise which might be probably explained due to dynamic interactions of the analyte with both the pH-sensitive transducer surface and the NHS-activated SepharoseTM.

To determine the biosensor signal that is originally from the catalytic reaction of the enzyme cyanidase, the ConCap measurement of the cyanide biosensor has been compared to an identical EIS sensor chip but without immobilised enzyme (see fig. 4).

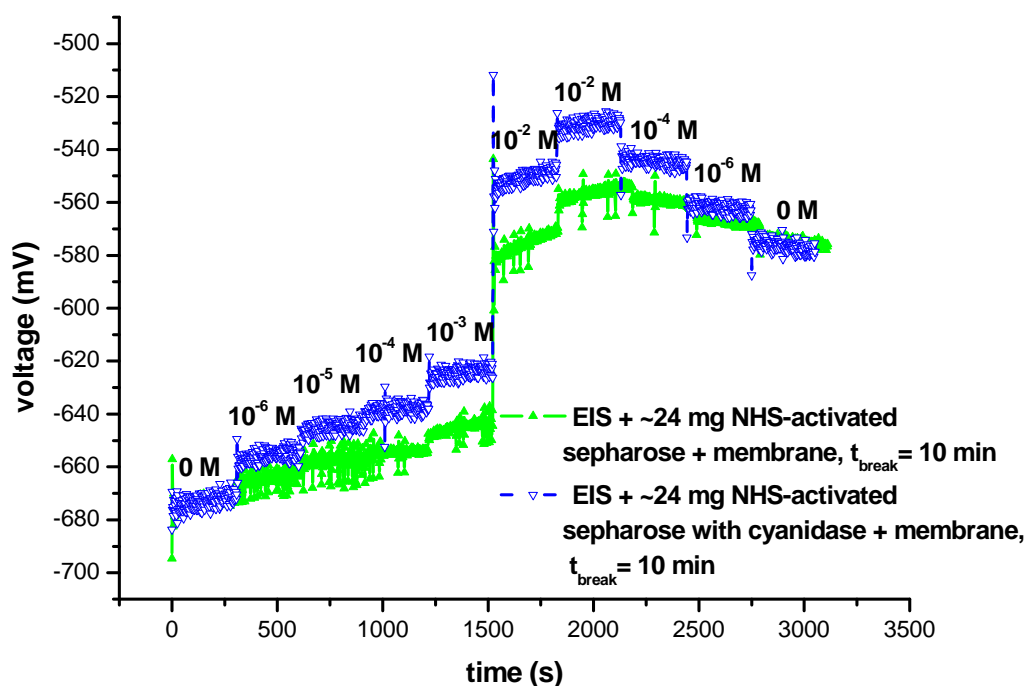
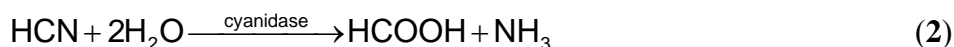


Figure 4. ConCap measurement of the cyanide biosensor (EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM with immobilised cyanidase) compared to a ConCap curve of an EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM but without immobilised cyanidase. Both measurement curves are normalised to the starting voltage value at 0 M in the beginning of the measurement cycle. Measurement concentration ranges from 0 M to 10⁻² M KCN.

The pH shift that is derived from the enzymatic reaction is described in eq. 2 (conversion of hydrogen cyanide to ammonia and formic acid by cyanidase) [28]. In the diagram, both ConCap curves have been normalised to their starting voltage values at a cyanide-free test sample. As can be seen, the resulting output voltage signals of the EIS sensor set-up with immobilised cyanidase has been

distinctly higher than the ConCap signal recorded with the same EIS sensor set-up but without enzyme. This is due to the additional catalytic conversion cyanide by cyanidase.



The differential voltage from both EIS sensor set-ups has been calculated in figure 5. An average differential voltage shift of about 4 mV/pCN with increased KCN concentration has been found. Calculations of pH values for a homogeneous system with cyanidase in KCN solutions result in an only slight pH shift to higher pH values in comparison to an identical system but without enzyme. These calculations have been performed assuming equilibrium conditions in aqueous solutions at room temperature. In the performed experiment, sensor signals have been observed as expected from the calculations. The even somewhat higher pH shift can be explained by a time-dependent effect due to the catalytic reaction in immediate vicinity of the sensor surface and thus, by a generated concentration gradient of the reaction products. This interpretation has been supported by means of additional experiments using micro pH electrode in KCN buffer solutions containing cyanidase.

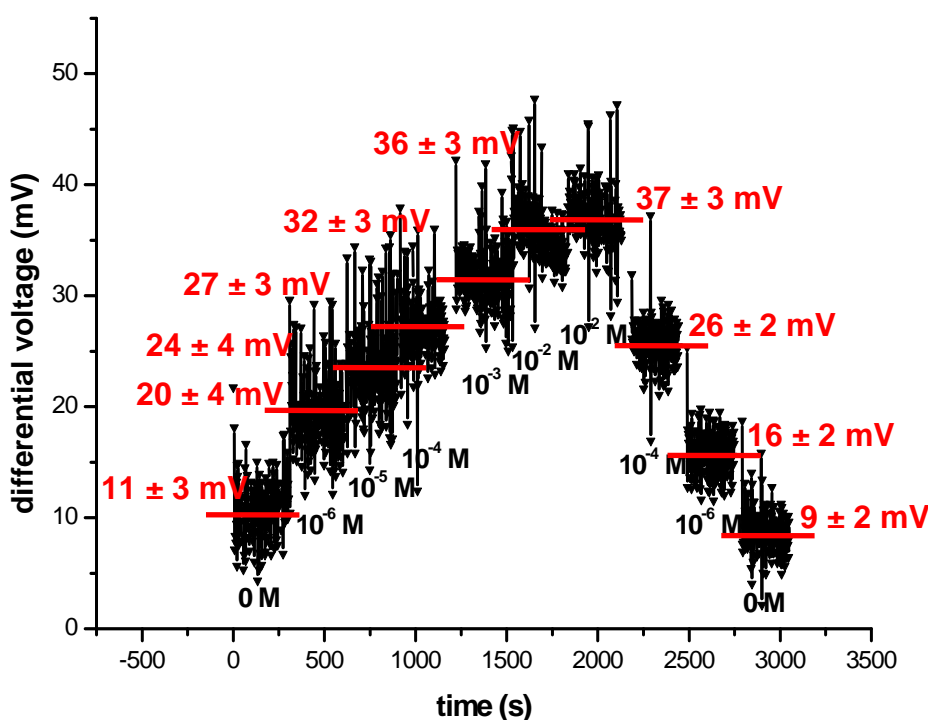


Figure 5. Differential output signal of the biosensor set-up calculated from normalised ConCap measurements. The EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM with immobilised cyanidase is compared to a ConCap curve of an EIS sensor with dialysis membrane and NHS-activated SepharoseTM without immobilised cyanidase. Measurement concentration ranges from 0 M to 10⁻² M KCN.

These results are in contrast to former findings using a similar experimental set-up [17]. In these investigations, a pH shift of the sensor towards lower pH was observed, which was explained by enzymatically formed formic acid. However, this reaction is only possible, if the by-product ammonia can either pass the dialysis membrane faster than formic acid or ammonia is chemically trapped. The

second possibility is more likely because immobilisation of cyanidase to NHS-activated Sepharose™ was carried out over a shorter time in these experiments resulting in succinic acid functions after hydrolysis of free binding sides of the NHS-activated Sepharose™. This succinic acid functions might trap the enzymatically formed ammonia. The same effect can be gained if a second, ammonia consuming enzyme like an ammonia transferase is added to the system.

4. Conclusions

A biosensor set-up for the detection of cyanide that is based on a pH-sensitive EIS structure in combination with the enzyme cyanidase has been realised. The experiment showed that about 5.5 mg of cyanidase could be covalently coupled to 1 ml NHS-activated Sepharose™ yielding a still active enzyme. The electrochemical behaviour of the cyanide biosensor has been studied by means of C/V and ConCap measurements. Here, the influence of the immobilised “cyanidase gel” and dialysis membrane onto the intrinsic pH behaviour of the EIS transducer structure as well as the biosensor performance towards cyanide have been investigated. By applying a differential measurement procedure consisting of a sensor with and a sensor without enzyme, an average cyanide sensitivity of about 4 mV/pCN in the concentration range from 10^{-6} M to 10^{-2} M could be found. The resulting sensor signal can be explained by the catalytic conversion of cyanide to ammonia and formic acid by means of the enzyme cyanidase. Future work will deal with further optimisation of the biosensor set-up (sensitivity, stability, detection limit) and application of the developed biosensor set-up to real test samples.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Bundesministerium für Bildung und Forschung (supported BMBF-project: “SAFE”) for the financial support and M. L. Heng, A. R. Kunchamwar, K. Adels and A. Poghossian for technical support and valuable discussions.

References

1. Marquardt, H.; Schäfer, S. G. *Lehrbuch der Toxikologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg Berlin, **1997**; pp 555-565.
2. U.S. Department of health and human services, public health service, agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for cyanide. **2006**.
3. Mak, K. K. W.; Law, A. W. C.; Tokuda, S.; Yanase, H.; Renneberg, R. Application of cyanide hydrolase from klebsiella sp. in a biosensor system for detection of low-level cyanide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 631-636.
4. Badugu, R.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Enhanced fluorescence cyanide detection at physiologically lethal levels: reduced ICT-based signal transduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3635-3641.
5. Jones, D. A. Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* **1997**, *47*(2), 155-162.
6. Keusgen, M. Biosensors: new approaches in drug discovery. *Naturwissenschaften* **2002**, *89*, 433-444.

7. Yeoh, H.-H.; Tatsuma, T.; Oyama, N. Monitoring the cyanogenic potential of cassava: the trend towards biosensor development. *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*(4), 234-240.
8. Mak, K. K. W.; Yanase, H.; Renneberg, R. Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2581-2593.
9. Watanabe, A.; Yano, K.; Ikebukuro, K.; Karube, I. Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology* **1998**, *144*, 1677-1682.
10. Von Tümpling, W. Schäden durch Cyanide im Flusswasser. *Chemie* **2006**, *4*, 67-67.
11. Aldridge, W. N. A new method for the estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanide. *Analyst* **1944**, *69*, 262-265.
12. Epstein, J. Estimation of microquantities of cyanide. *Anal. Chem.* **1947**, *19*(4), 272-274.
13. Lundquist, P.; Sörbo, B. Rapid determination of toxic cyanide concentration in blood. *Clin. Chem.* **1989**, *35*(4), 617-619.
14. Afkhami, A.; Sarlak, N. A novel cyanide sensing phase based on immobilization of methyl violet on triacetylcellulose membrane. *Sens. Actuators B* **2007**, *122*, 437-441.
15. Shan, D.; Mousty, C.; Cosnier, S. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 178-183.
16. Weinberg, H. S.; Cook, S. J. Segmented flow injection, UV digestion, and amperometric detection for the determination of total cyanide in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6055-6063.
17. Keusgen, M.; Kloock, J. P.; Knobbe, D.-T.; Jünger, M.; Krest, I.; Goldbach, M.; Klein, W.; Schöning, M. J. Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. *Sens. Actuators B* **2004**, *103*, 380-385.
18. Porter, T. L.; Vail, T. L.; Eastman, M. P.; Stewart, R.; Reed, J.; Venedam, R.; Delinger, W. A solid-state sensor platform for the detection of hydrogen cyanide gas. *Sens. Actuators B* **2007**, *123*, 313-317.
19. Hachiya, H.; Ito, S.; Fushinuki, Y.; Masadome, T.; Asano, Y.; Imato, T. Continuous monitoring for cyanide in waste water with a galvanic hydrogen cyanide sensor using a purge system. *Talanta* **1999**, *48*, 997-1004.
20. Hofton, M. Continuous determination of free cyanide in effluents using Ag₂S-ISE. *Environ. Sci. Technol.* **1976**, *10*(3), 277-280.
21. Ipatov, A.; Ivanov, M.; Makarychev-Mikhailov, S.; Kolodnikov, V.; Legin, A.; Vlasov, Y. Determination of cyanide using flow-injection multisensor system. *Talanta* **2002**, *58*, 1071-1076.
22. Neshkova, M. T.; Pancheva, E. M.; Pashova, V. A new generation of CN⁻ sensing silver chalcogenide-selective membranes for FIA application I. Flow-injection detector for CN⁻ based on thin Ag_{2+d}Se_{1-x}Te_x electropolated membrane. *Sens. Actuators B* **2006**, *119*, 625-631.
23. Volotovskiy, V.; Kim, N. Cyanide determination by an ISFET-based peroxidase biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 1029-1033.
24. Watanabe, A.; Yano, K.; Ikebukuro, K.; Karube, I. Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 93-97.
25. Schöning, M. J.; Brinkmann, D.; Rolka, D.; Demuth, C.; Poghosian, A. CIP (cleaning-in-place) suitable "non-glass" pH sensor based on Ta₂O₅-gate EIS structure. *Sens. Actuators B* **2005**, *111-112*, 423-429.

26. Poghossian, A.; Thust, M.; Schroth, P.; Steffen, A.; Lüth, H.; Schöning, M. J. Penicillin detection by means of silicon-based field-effect structures. *Sens. Mater.* **2001**, *13*(4), 207-223.
27. Poghossian, A.; Schöning, M. J. Silicon-based chemical and biological field-effect sensors. In *Encyclopedia of Sensors*; Grimes, C. A.; Dickey, E. C.; Pishko, M. V.; American Scientific Publishers, Stevenson Ranch: USA, **2006**; Vol. 9, pp 463-534.
28. Ingvorsen, K.; Hojer-Pedersen, B.; Godtfredsen, S. E. Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 1783-1789.

ENZYME-MODIFIED ELECTROLYTE-INSULATOR-SEMICONDUCTOR (EIS) SENSORS

M. Turek^{1,2}, M. Keusgen³, A. Poghosian^{1,2},

A. Mulchandani⁴, J. Wang⁵ and M.J. Schöningh^{1,2,*}

¹ Aachen University of Applied Sciences, Jülich Campus, Institute of Nano- and Biotechnologies

(INB), Ginsterweg 1, 52428 Jülich, Germany

² Research Centre Jülich, Institute of Bio- and Nanosystems (IBN-2), 52428 Jülich, Germany

³ Philipps-University Marburg, Institute of Pharmaceutical Chemistry,

Marbacher Weg 6, 35037 Marburg, Germany

⁴ University of Riverside California, Department of Chemical and Environmental Engineering,

Riverside, CA 92521, USA

⁵ Arizona State University, Center for Bioelectronics and Biosensors,

Tempe, AZ 85287-5801, USA

* Phone: +49 241 6009 53215, Fax: +49 241 6009 53235, E-mail: m.i.schoeningh@fz-juelich.de

1. Introduction

In recent years, semiconductor-based (bio-)chemical sensors became highly attractive for both research and industrial environment. This is mainly due to their excellent electrochemical properties, their potential of miniaturization and low-cost production, when compared to complex methods of environmental analysis. The application field of those (bio-)chemical sensors is versatile: it reaches from environmental monitoring over biomedical applications and biotechnology up to food analysis and drug industry. As a recognition element, very often enzymes have been utilized in order to detect highly selectively molecules in liquid test samples.

In this paper, investigations on enzyme-modified electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) sensors, which represent a typical silicon field-effect device, will be presented: By means of the enzymes alliinase [EC 4.4.1.4], penicillinase [EC 3.5.2.6], cyanidase [EC 3.5.5.1] and organophosphorous hydrolase [EC 3.1.8.1], the analytes alliin (cancer-protecting potential, in plants), penicillin (antibiotic, in animal food), cyanide (toxic, in environment) and organophosphates (toxic, in agriculture), respectively, will be detected.

2. Experimental

The presented enzyme-modified biosensors consist of a pH-sensitive EIS structure with immobilized enzyme. The EIS structure is typically built-up of a p-doped silicon substrate, a SiO₂ insulator layer, and a pH-sensitive layer (Ta₂O₅ or Si₃N₄ or Al₂O₃). On top of the pH-sensitive layer, the particular enzyme (alliinase, penicillinase, cyanidase, organophosphorous hydrolase) has been immobilized by means of different immobilization methods that are summarized in Table 1 (see section "Results and discussion"). For the electrochemical sensor characterization, the enzyme-modified EIS structure has been mounted in a home-made measuring cell in contact with the analyte solution together with an Ag/AgCl reference electrode. Using an impedance analyzer, electrochemical measurements in the capacitance/voltage (C/V) and constant capacitance (ConCap) mode, respectively, at a frequency of 120 Hz with 20 mV a.c.

voltage have been performed. Fig. 1 shows the set-up of the enzyme-based EIS sensor (top) and a typical measurement in the C/V (bottom, left) and ConCap mode (bottom, right) of a penicillinase-modified EIS sensor. For more detailed information on the C/V and ConCap mode, see elsewhere [1, 2]. The general detection principle of these sensors is based on the catalytic reaction of the current enzyme with the analyte that results in a shift of the pH value. This change can be directly recorded by the pH-sensitive EIS transducer structure.

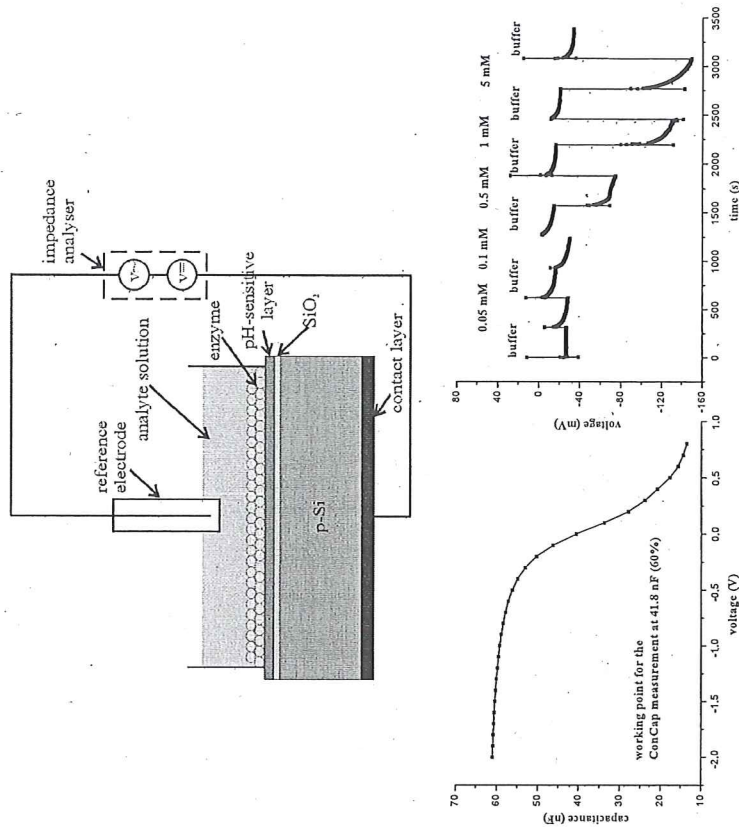


Fig. 1. Schematic of the enzyme-modified EIS sensor (top). Typical C/V (bottom, left) and ConCap measurement (bottom, right) with a penicillinase-modified EIS sensor for different penicillin G concentrations (from 0.05 mM to 5 mM) in 0.25 mM polymix buffer, pH 8

3. Results and discussion

The electrochemical investigations on the intrinsic sensor characteristics (sensitivity, linear working range, and selectivity) for all four enzyme-modified biosensors are summarized in Table 1. Investigations of selectivity of these enzyme-modified sensors have demonstrated that the biosensors are highly selective towards their biological substrates [3-6]. The lower detection limits have been in the range from submicro-

micromolar analyte concentrations [3-4, 7]. The stability of the investigated biosensors reaches from a few weeks (cyanide-modified EIS sensor) to about one year for the penicillin-modified EIS sensor [8]. For the penicillin biosensor, additional experiments could demonstrate both the adsorption of the enzyme into a porous EIS layer structure [9] resulting in a comparable signal behavior but miniaturized sensor area and the combination with a miniaturized microcell set-up, advantageously dealing with small sample volumes down to about 300 nl [10].

Table 1.
Summary of the specifications of the enzyme-modified EIS sensors

Enzyme	Immobilization method	Linear working range	Sensitivity	Reference
Alliinase [EC 4.4.1.4]	freeze-dried and entrapment under dialysis membrane	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ M	18 mV/dec. alliin	[3]
Penicillinase [EC 3.5.2.6]	cross-linking, adsorptive technique	0.1 - 2 mM	130 mV/mM penicillin G	[4,11-13]
Cyanidase [EC 3.5.5.1]	covalent coupling to NHS-activated Sepharose™ and entrapment under dialysis membrane	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2}$ M	4 mV/dec. cyanide	[14,15]
Organophosphorus hydrolase [EC 3.1.8.1]	adsorptive technique, cross-linking (glutaraldehyde), entrapment in nafion	10-100 µM	0.29 mV/µM paraoxon	[5,6,15-17]

4. Conclusions

Enzyme-modified electrochemical EIS biosensors for the determination of alliin, penicillin, cyanide, and organophosphates have been presented. The intrinsic biosensor characteristics have been summarized and discussed.

Acknowledgements: The authors gratefully thank the Bundesministerium für Bildung und Forschung (supported BMBF-project: "SAFE") for the financial support and J.P. Kloock, T. Wagner, N. Näther and D. Rolka for technical support and valuable discussions.

REFERENCES

1. M.J. Schöning, D. Brinkmann, D. Rolka, C. Demuth, and A. Poghossian. Sens. Actuators B, v. 111-112, 423 (2005).
2. A. Poghossian and M.J. Schöning. In Encyclopedia of Sensors (Ed. C.A. Grimes, E.C. Dickey, M.V. Pishko), American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, USA, 2006, pp. 463-534.
3. M. Keusgen, M. Jünger, I. Krest, and M.J. Schöning. Sens. Actuators B, v. 95, 297 (2003).
4. A. Poghossian, M. Thust, M.J. Schöning, M. Müller-Veggian, P. Kordos, and H. Lüth. Sens. Actuators B, v. 68, 260 (2000).

5. M.J. Schöning, R. Krause, K. Block, M. Musameh, A. Mulchandani, and J. Wang. Sens. Actuators B, v. 95, 291 (2003).
6. J. Wang, R. Krause, K. Block, M. Musameh, A. Mulchandani, P. Mulchandani, W. Chen, and M.J. Schöning. Anal. Chim. Acta, v. 469, 197 (2002).
7. M.J. Schöning, M. Arzdorf, P. Mulchandani, W. Chen, and A. Mulchandani. Sens. Actuators B, v. 91, 92 (2003).
8. A. Poghossian, M.J. Schöning, P. Schroth, A. Simonis, H. Lüth. Sens. Actuators B, v. 76, 519 (2001).
9. M.J. Schöning, A. Kurowski, M. Thust, P. Kordos, J.W. Schultze, and H. Lüth. Sens. Actuators B, v. 64, 59 (2000).
10. M.J. Schöning, N. Näther, V. Auger, A. Poghossian, and M. Koudelka-Hep. Sens. Actuators B, v. 108, 986 (2005).
11. A. Poghossian, M. Thust, P. Schroth, A. Steffen, H. Lüth, and M.J. Schöning. Sens. Mater., v. 13(4), 207 (2001).
12. A. Poghossian, T. Yoshinobu, A. Simonis, H. Ecken, H. Lüth, and M.J. Schöning. Sens. Actuators B, v. 78, 237 (2001).
13. D. Rolka, A. Poghossian, and M.J. Schöning. Sensors, v. 4, 84 (2004).
14. M. Keusgen, J.P. Kloock, D.-T. Knobbe, M. Jünger, I. Krest, M. Goldbach, W. Klein, and M.J. Schöning. Sens. Actuators B, v. 103, 380 (2004).
15. M.J. Schöning, J.P. Kloock, D.-T. Knobbe, R. Krause, W. Block, J. Wang, A. Mulchandani, and M. Keusgen. VDI Berichte, v. 1829, 699 (2004).
16. M.J. Schöning, M. Arzdorf, P. Mulchandani, W. Chen, and A. Mulchandani. Sensors, v. 3, 119 (2003).
17. J. Wang, R. Krause, K. Block, M. Musameh, A. Mulchandani, and M.J. Schöning. Biosens. Bioelectron., v. 18, 255 (2003).

Herstellung und Charakterisierung eines hybriden Sensorarrays auf Halbleiterbasis für die Umweltanalytik

Monika Turek^{1,2}, Joachim P. Kloock^{1,2}, Jürgen Schubert³, Willi Zander³, Peter Krüger⁴, Michael Keusgen⁵, Michael J. Schöning^{1,2}

¹: Fachhochschule Aachen, Institut für Nano- und Biotechnologien (INB), Ginsterweg 1, 52428 Jülich, Tel.: 0241/60095-3215, Fax: 0241/60095-3235, E-mail: schoening@fh-aachen.de

²: Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Bio- und Nanosysteme (IBN-2), 52425 Jülich

³: Forschungszentrum Jülich GmbH, Institut für Bio- und Nanosysteme (IBN-1), 52425 Jülich

⁴: ALA Analytisches Labor GmbH, Charlottenstraße 14, 52070 Aachen

⁵: Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie, Marbacher Weg 6, 35037 Marburg

Kurzfassung

Cyanid und Schwermetalle haben durch ihre hohe Toxizität und langwierigen Folgen, wie z.B. chronischen Vergiftungen, in der Umweltanalytik eine hohe Relevanz. Zurzeit werden beide Schadstoffkomponenten separat detektiert. In dieser Arbeit wird ein hybrides Sensorarray auf Siliziumbasis vorgestellt, mit dem elektrochemisch Cyanid und Schwermetalle gleichzeitig erfasst werden können. Hierzu werden miniaturisierte ionenselektive Dünnschichtsensoren hergestellt und auf ihre Sensoreigenschaften in Cu^{2+} -, Pb^{2+} -, Ag^+ - und CN^- -haltigen Analytlösungen untersucht. Die gemessenen Empfindlichkeiten auf sowohl die jeweiligen Schwermetallionen als auch auf Cyanid entsprechen den theoretisch erwarteten Werten [1,2].

1. Einleitung

In der Umweltanalytik spielen sowohl Schwermetalle als auch Cyanid eine wichtige Rolle. Schwermetalle wie z.B. Cadmium, Kupfer und Blei kommen als natürliche Spurenelemente im Boden vor und werden in der Industrie zur Herstellung von elektronischen Bauteilen, Kabeln, sowie zu Legierungs- und Galvanisierungszwecken verwendet. Da Schwermetalle eine hohe spezifische Dichte besitzen, können diese nur geringfügig oder gar nicht biologisch in der Ökologie und im menschlichen Körper abgebaut werden. Die Aufnahme kleinerer Dosen über einen längeren Zeitraum kann zu chronischen Schwermetallvergiftungen führen; Diabetes, Herz- und Nierenversagen sind die Folgen [3]. Cyanid und dessen Derivate kommen in mehr als 2500 Pflanzenspezies, wie z.B. in Hülsenfrüchten, Steinobst, Mandeln, Wurzeln, etc., als cyanogene Glykoside vor. Durch

seine hohe Affinität zu Metallen wird Cyanid bevorzugt sowohl für die Silber- und Goldgewinnung als auch für Galvanisierungszwecke eingesetzt. Die Aufnahme von Cyanid kann bereits in kleinsten Mengen (letale Dosis: 0,7-2,9 mg/kg Körpergewicht) tödlich sein. Wird der Körper cyanogenen Glykosiden über einen längeren Zeitraum ausgesetzt, so kann eine chronische Cyanidvergiftung eintreten. Hierbei blockiert Cyanid im Körper die Zellatmung: Das zentrale Nervensystem wird angegriffen, Atemnot und Herzstillstand treten ein [3-6].

Da sowohl Schwermetalle als auch Cyanid in der Umwelt vorkommen aber auch in die Natur durch industrielle Abwässer und Abgase gelangen, ist es von großer Bedeutung, beide Umweltgifte qualitativ und quantitativ sensorisch erfassen zu können. Derzeitige Sensoren können entweder für die Bestimmung von Schwermetallen [7-9] oder für die Erfassung von Cyanid [1,10,11], jedoch nicht für die simultane Bestimmung beider Komponenten eingesetzt werden.

Im Rahmen dieses Beitrages wird erstmals ein hybrides Sensorarraysystem vorgestellt, mit dem eine gleichzeitige Erfassung von unterschiedlichen Schwermetallen und Cyanid ermöglicht wird. Die mittels Silizium- und Dünnschichttechnologie hergestellten Sensoren basieren auf so genannten Chalkogenidglasschichten, die als selektive und sensitive Transducerschicht für die potentiometrische Signalerfassung agieren. Für die Erfassung dieser Umweltgifte wird sowohl auf der Sensor- als auch auf der Analytebene eine gemeinsame Plattform vorgestellt.

2. Experimentelles

Für die Abscheidung der ionenselektiven Chalkogenidgläser wurde die gepulste Laserabscheidung (PLD) im „offaxis“-Betrieb (Parameter: 248 nm, 0,1 Hz und 1 J/cm²) gewählt. Der erfolgreiche Einsatz dieses Verfahrens für die Abscheidung von hochkomplexen Chalkogenidglasmaterialien für die Herstellung von miniaturisierten Schwermetallsensoren konnte bereits in Vorarbeiten gezeigt werden [2,12-15]. Für den Nachweis von Schwermetallionen wie z.B. Cu²⁺, Pb²⁺ und Ag⁺ wurden jeweils die Chalkogenidglas-Materialsysteme CuAgAsSe, PbSAgIAs₂S₃, Ag₂SAsCl und AgIAsSe₃ verwendet. Für den Nachweis von Cyanid wurden die Chalkogenidglasmaterialien Ag₂SAsCl und AgIAsSe₃ eingesetzt. Als zusätzliches Referenzverfahren für die Cyanidmessungen wurde eine AgI-haltige cyanidionen-selektive Elektrode (CN-ISE) von der Fa. Fisher Bioblock Scientific eingesetzt. Für den potentiometrischen Messaufbau wurden ein Potentiometer der Fa. Orion (mode 720A), eine Doppelstromschlüssel-Referenzelektrode (Innen-/Außen-elektrolyt: 0,1 M KCl / 0,1 M KNO₃) der Fa. Metrohm AG Ionenanalytik und der jeweilige

miniaturisierte Chalkogenidglassensor über die Elektrolytlösung zu einer potentiometrischen Messkette geschlossen. Alle Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt. Für die elektrochemische Charakterisierung der Schwermetallsensoren wurde als Messlösung 0,1 M $\text{KNO}_3 + \text{HNO}_3$, pH 3,5 mit Schwermetallkonzentrationen von 10^{-7} mol/l bis 10^{-3} mol/l, und für die Ag-Chalkogenidglassensoren zur Cyaniddetektion wurde als Messlösung 0,1 M $\text{KNO}_3 + \text{NaOH}$, pH 11,0 mit KCN-Konzentrationen 10^{-7} mol/l bis 10^{-3} mol/l hergestellt. Sowohl die Leitfähigkeit als auch der pH-Wert wurden mittels des Leitfähigkeit-pH-Meter MPC 227 der Fa. Metler Toledo während der Messreihe protokolliert.

Die physikalische Charakterisierung der hergestellten miniaturisierten Chalkogenidglassensoren erfolgte mittels der Rutherford-Rückstreu-Spektrometrie (RBS) auf die stöchiometrische Zusammensetzung der Transducerschicht und mittels Videomikroskopie (Videomikroskop VHX-100 der Fa. Keyence) auf die Oberflächen-eigenschaften (Morphologie) des abgeschiedenen Materials.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die stöchiometrische Übertragung des Chalkogenidglas-Targetmaterials auf das Siliziumsubstrat mittels des PLD-Prozesses wurde mit Hilfe der RBS überprüft. Eine nahezu perfekte stöchiometrische Materialübertragung konnte belegt werden [14]. Die videomikroskopische Aufnahme einer AgIAsSe₃-Sensoroberfläche (Bild 1) als Beispiel zeigt die geschlossene, homogene Chalkogenidglasschicht. Die Droplets sind typisch für den PLD-Prozess und beeinflussen die Sensoreigenschaften nicht nachteilig.

Die elektrochemische Charakterisierung der miniaturisierten Chalkogenidglassensoren wurde mittels ionenselektiver Potentiometrie durchgeführt und wird hier am Beispiel der Blei-, Kupfer- und Silberbestimmung vorgestellt. Die Sensitivitäten, die untere Nachweisgrenze und der lineare Messbereich bezüglich der Pb^{2+} -, Cu^{2+} - und Ag^+ -Ionen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Sensitivität der Cu^{2+} -selektiven Sensoren beträgt im Mittel ca. 30 mV/pCu, die Sensitivität von Pb^{2+} -selektiven Sensoren liegt im Mittel bei 21 mV/pPb. Die Sensitivitäten beider Sensorarten entsprechen dabei nahezu der idealen Nernst-Sensitivität für zweiwertige Ionen. Die Schwankungen in den Absolutwerten der Empfindlichkeiten können auf das jeweilige Alter und die Einsatzdauer der Sensoren zurückgeführt werden. Die Ag^+ -selektiven Schwermetallelektroden zeigen eine Sensitivität von im Mittel 55 mV/pAg, die ebenfalls sehr gut mit der erwarteten Nernst-Sensitivität korreliert. Die jeweiligen unteren Nachweisgrenzen befinden sich im Bereich von 10^{-7} mol/l und der lineare Bereich erstreckt sich über etwa 4 Konzentrationsdekaden.

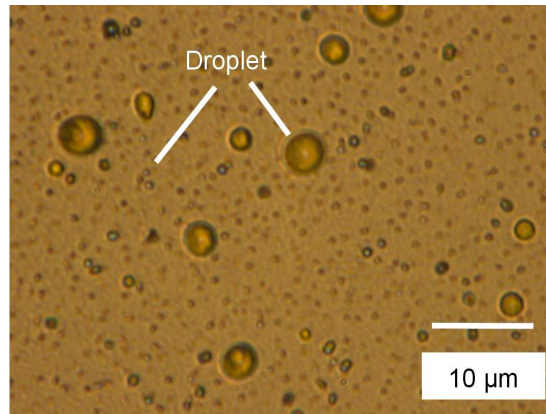


Bild 1: Videomikroskopische Aufnahme von einer ionenselektiven AgIAsSe₃-Chalkogenidglas-Sensoroberfläche.

Tabelle 1: Zusammenfassung der untersuchten elektrochemischen Parameter der miniaturisierten ionenselektiven Chalkogenidglassensoren innerhalb des Sensorhybrids in 0,1 M KNO₃-Lösung, pH 3,5.

Parameter	Pb ²⁺ -Sensor	Cu ²⁺ -Sensor	Ag ⁺ -Sensor
Sensitivität (mV/pX)	18-23	24-35	53-56
untere Nachweisgrenze (mol/l)	7,4*10 ⁻⁶	<10 ⁻⁷	<10 ⁻⁷
linearer Messbereich (mol/l)	10 ⁻⁵ -10 ⁻³	10 ⁻⁷ -10 ⁻³	10 ⁻⁷ -10 ⁻³

Die elektrochemische Charakterisierung der unterschiedlichen Silber-Chalkogenidglassensoren in Cyanid-Lösungen im direkten Vergleich mit einer kommerziellen CN-ISE auf Silberiodidbasis ist im Bild 2 dargestellt. Die erreichten Sensitivitäten der miniaturisierten Chalkogenidglassensoren auf Ag-Basis zur Bestimmung von Cyanid betragen -107 mV/pCN (AgIAsSe₃) bzw. -143 mV/pCN (Ag₂SAsCl) und liegen somit im Bereich der theoretisch erwarteten, doppelten Nernst-Sensitivität von -118 mV/pCN [1]. Hierbei dominiert die chemische Reaktion von gelösten CN⁻-Ionen mit den freien Ag⁺-Ionen im Chalkogenidglasmaterial; die Silberionen-Aktivität im Transducermaterial wird verändert. Die Reaktionsgleichung ist in Gln.(1) dargestellt.



Die Unterschiede in den Sensitivitäten für die beiden verschiedenen Materialsysteme sind durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Chalkogenidgläser und somit durch die Anzahl der freien Ag⁺-Ionen im Transducermaterial bedingt [16,17]. Die Sensitivität der

kommerziell erhältlichen CN-ISE auf AgI-Basis beträgt im Gegensatz dazu -71 mVpCN. Der lineare Bereich der cyanid-sensitiven Chalkogenidglaselektroden liegt zwischen 10^{-6} mol/l und 10^{-3} mol/l Cyanid, die untere Nachweisgrenze liegt bei $<10^{-6}$ mol/l Cyanid.

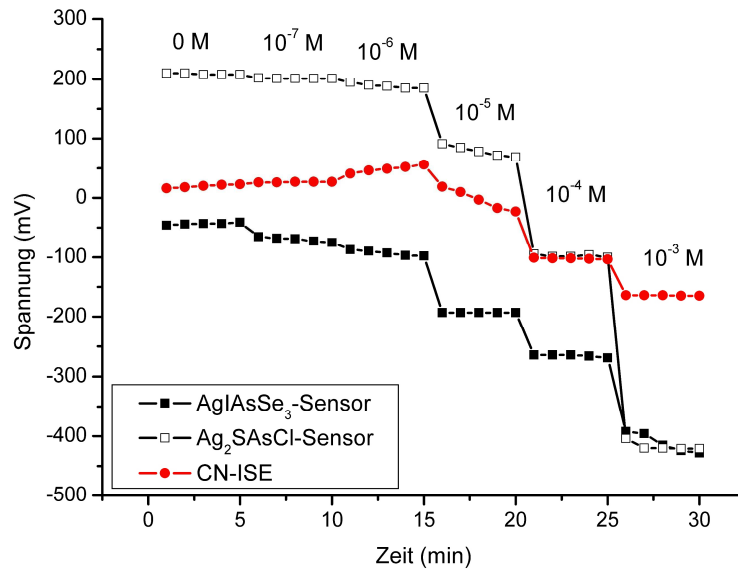


Bild 2: Empfindlichkeitscharakteristik von miniaturisierten AgIAsSe₃- und Ag₂SAsCl-Dünnschichtelektroden innerhalb des Sensorhybrids und einer AgI-haltigen CN-ISE in 0,1 M KNO₃-Lösung, pH 11, mit variierenden Cyanid-Konzentrationen (10⁻⁷ mol/l - 10⁻³ mol/l).

Für die simultane Erfassung von Cyanid und Schwermetallen soll im nächsten Schritt ein Analytgemisch (aus Cyanid und Schwermetallen) in 0,1 M KNO₃, pH 11 Lösung hergestellt werden, in dem der Nachweis für Cyanid erfolgt. Durch die anschließende Ansäuerung der Analytlösung mittels HNO₃-Zugabe sollen danach die Schwermetallionen mittels der miniaturisierten Chalkogenidglassensoren gemessen werden. Eine weitere Variante des hybriden Cyanid/Schwermetall-Messsystem besteht darin, beide Messlösungen (Analytgemisch in 0,1 M KNO₃, pH 11 bzw. 0,1 M KNO₃, pH 11) durch eine hydrophobe, gaspermeable Membran zu trennen. Durch die Zugabe von HNO₃ in die Analytlösung kann HCN durch die Membran in die 0,1 M KNO₃, pH 11-Lösung diffundieren und dort in Form von CN⁻-Ionen mittels eines Ag²⁺-sensitiven Chalkogenidglassensors nachgewiesen werden. Gleichzeitig ließen sich die Schwermetallionen in der sauren Analytlösung erfassen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Beitrag wurde eine Plattform auf Chalkogenidglasbasis zur simultanen Erfassung von Schwermetallen und Cyanid für die Umweltanalytik vorgestellt. Dieses hybride Sensorarray wurde im Labormaßstab charakterisiert. In naher Zukunft sollen noch weitere Chalkogenidglasmaterialien auf ihre Sensitivität gegenüber Cyanid untersucht und im Hinblick auf ihre Langzeitstabilität optimiert werden. Die Kombination zwischen einem enzymbasierten Cyanid-Sensor gemeinsam mit chalkogenidglasbasierten Schwermetallsensoren stellt einen Lösungsansatz für ein Chip-Array zum „online“-Monitoring dar [18].

Danksagung

Die Autoren möchten sich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (Projekt „SAFE“) beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und bei Dr. A. Poghosian, Dr. J. Gun, S. Pouyashman, T.S. Chhabda und L. Ketterer für Diskussionen und experimentelle Unterstützung bedanken.

Referenzen

- [1] Neshkova, M.T., Pancheva, E.M., Pashova, V.: A new generation of CN⁻ sensing silver chalcogenide-selective membranes for FIA application. *Sens. Actuators B* 19 (2006) S. 625-631.
- [2] Kloock, J.P., Schöning, M.J., Mourzina, Y.G., Schubert, J., Ermolenko, Y., Doll, T.: Inorganic thin-film sensor membranes with PLD-prepared chalcogenide glasses: Challenges and implementation. *Sensors* 4 (2004) S. 156-162.
- [3] Marquardt, H., Schäfer, S.G.: *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin (1997).
- [4] Jones, D.A.: Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* 47 (1997) S. 155-162.
- [5] Yeoh, H.-H., Tatsuma, T., Oyama, N.: Monitoring the cyanogenic potential of cassava: The trend towards biosensor development. *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) S. 234-240.
- [6] U.S. Department of health and human services, public health service, agency for toxic substances and disease registry: *Toxicological profile for cyanide* (2006).
- [7] Vlasov, Y.G., Bychkov, E.A.: Ion-selective chalcogenide glass electrodes. *Ion-selective Electrode Rev.* 9 (1987) S. 5-93.

- [8] Forzani, E.S., Zhang, H., Chen, W., Tao, N.: Detection of heavy metal ions in drinking water using a high-resolution differential surface plasmon resonance sensor. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) S. 1257-1262.
- [9] Men, H., Zou, S., Li, Y., Wang, Y., Ye, X., Wang, P.: A novel electronic tongue combined MLAPS with stripping voltammetry for environmental detection. *Sens. Actuators B* 110 (2005) S. 350-357.
- [10] Keusgen, M., Kloock, J.P., Knobbe, D.-T., Jünger, M., Krest, I., Goldbach, M., Klein, W., Schöning, M.J.: Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. *Sens. Actuators B* 103 (2004) S. 380-385.
- [11] Weinberg, H.S., Cook, S.J.: Segmented flow injection, UV digestion, and amperometric detection for the determination of total cyanide in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Chem.* 74 (2002) S. 6055-6063.
- [12] Schöning, M.J., Schmidt, C., Schubert, J., Zander, W., Mesters, S., Kordos, P., Lüth, H., Legin, A., Seleznev, B., Vlasov, Y.G.: Thin film sensors on the basis of chalcogenide glass materials prepared by pulsed laser deposition technique. *Sens. Actuators B* 68 (2000) S. 254-259.
- [13] Mourzina, Y.G., Schubert, J., Zander, W., Legin, A., Vlasov, Y.G., Lüth, H., Schöning, M.J.: Development of multisensor systems based on chalcogenide thin film chemical sensors for the simultaneous multicomponent analysis of metal ions in complex solutions. *Electrochim. Acta* 47 (2001) S. 251-258.
- [14] Kloock, J.P., Mourzina, Y.G., Schubert, J., Schöning, M.J.: A first step towards a microfabricated thin-film sensor array on the basis of chalcogenide glass materials. *Sensors* 2 (2002) S. 356-365.
- [15] Kloock, J.P., Moreno, L., Bratov, A., Huachupoma, S., Xu, J., Wagner, T., Yoshinobu, T., Ermolenko, Y., Vlasov, Y.G., Schöning, M.J.: PLD-prepared cadmium sensors based on chalcogenide glasses – ISFET, LAPS and μ ISE semiconductor structures. *Sens. Actuators B* 118 (2006) S. 149-155.
- [16] Morf, W.E., Kahr, G., Simon, W.: Theoretical treatment of the selectivity and detection limit of silver compound membrane electrodes. *Anal. Chem.* 46 (1974) S. 1538-1543.
- [17] Neshkova M.T., Pancheva, E.M.: Cyanide ion-selective electrodes based on thin electroplated membranes of silver chalcogenides. *Anal. Chim. Acta* 242 (1991) S. 73-83.
- [18] Turek, M., Ketterer, L., Claßen, M., Berndt, H.K., Elbers, G., Krüger, P., Keusgen, M., Schöning, M.J.: Development and electrochemical investigations of an EIS-

(electrolyte-insulator-semiconductor) based biosensor for cyanide detection. *Sensors* 7 (2007) S. 1415-1426.

Enzyme-Modified Electrolyte–Insulator–Semiconductor Sensors

M. Turek^{a,b}, M. Keusgen^c, A. Poghossian^{a,b}, A. Mulchandani^d, J. Wang^e,
M. J. Schöning^{a,b}

^aInstitute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Jülich, Germany

^bInstitute of Bio- and Nanosystems (IBN-2), Research Centre Jülich, Jülich, Germany

^cInstitute of Pharmaceutical Chemistry, Philipps University Marburg, Marburg, Germany

^dDepartment of Chemical and Environmental Engineering, University of Riverside California, Riverside, USA

^eCenter for Bioelectronics and Biosensors, Arizona State University, Tempe, USA

Received October 24, 2007

Abstract—The field-effect capacitive enzyme biosensors for the detection of penicillin, organophosphorous pesticides, the cysteine sulphoxide alliin, and cyanide have been realized by means of immobilization of the respective enzymes (penicillinase, organophosphorous hydrolase, alliinase, and cyanidase) onto the gate surface of a pH-sensitive EIS (electrolyte–insulator–semiconductor) structure. The functional principle of these biosensors is based on the detection of a local pH change resulting from the particular catalytic reaction of the enzyme. As pH-sensitive transducer materials, thin films of Ta₂O₅, Si₃N₄ or Al₂O₃ have been utilized. For each type of enzyme biosensor, the composition and pH value of the buffer solution have been optimized in terms of a high sensitivity, a wide linear measuring range, and a low detection limit. Basic characteristics of the developed enzyme biosensors are summarized.

PACS number: 82.47.Rs

DOI: 10.3103/S1068337208020072

Key words: enzyme biosensor, field-effect sensor, penicillin, organophosphorous pesticides, alliin, cyanide.

1. INTRODUCTION

In recent years, sensors based on semiconductor devices in combination with biological components have become highly attractive for both research and possible applications in industrial fields (see, e.g., recent reviews [1-4] and references therein). This is mainly due to their excellent electrochemical properties, their potential of miniaturization, and their low-cost production when compared to complex methods of conventional instrumental analysis. The application field of such biochemical sensors is versatile: it reaches from environmental monitoring over biomedical applications and biotechnology up to food analysis and drug industry. Due to their specific binding capabilities as well as their catalytic activity, enzymes have been often chosen as biological recognition element for highly selective analyte detection. Enzymes are proteins that exhibit a catalytic function and lower the energy threshold at which a given reaction takes place.

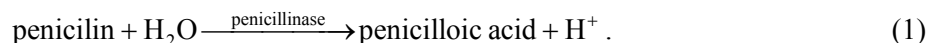
The present paper summarizes recent developments and current research activities in the field of enzyme-modified field-effect capacitive electrolyte–insulator–semiconductor (EIS) sensors. In contrast to well-known EnFETs (enzyme-modified field-effect transistors) [1–4], EIS sensors are more simple in layout, easier to fabricate at low cost (usually no photolithographic process steps are required) and can be relatively easy protected from the electrolyte solution by means of an O-ring, thereby circumventing the need for complex encapsulation processes.

Basic characteristics of the developed enzyme–modified EIS sensors for the detection of the antibiotic penicillin [4–7], organophosphorous pesticides (paraoxan, parathion, diazinon, and dichlorvos) [4, 8–11], the cysteine sulphoxide alliin [4, 12], and cyanide [4, 11, 13, 14] employing the enzymes penicillinase, organophosphorous hydrolase, alliinase, and cyanidase, respectively, will be presented in this paper. Especially, the last two types of sensors could represent a high commercial interest for the control of

content of cyanides (e.g., in metal mining or plating industry) which are acutely toxic to any animal and human, and of alliin, whose amount defines the quality of most garlic-containing herbal remedies that are known for their antidiabetic, antiatherosclerotic, and cholesterol-lowering effects.

2. FUNCTIONAL PRINCIPLE OF THE ENZYME-MODIFIED EIS SENSOR

The simplest field-effect enzyme biosensor is based on an EIS structure which represents a (bio-)chemically sensitive capacitor. The enzyme-modified sensor is usually constructed by immobilizing an enzyme onto the gate insulator of the EIS structure. Generally, the working principle of an enzyme-modified EIS sensor can be explained in the following way [1]: during the enzymatic reaction of the enzyme with its substrate, either products are generated or reactants are consumed. This concentration change can be measured by the underlying field-effect transducer. In this study, enzyme biosensors are built up of pH-sensitive EIS structures, which detect local pH changes as a result of the enzymatic reaction. As an example, equation (1) depicts the enzymatic reaction that takes place for the detection of penicillin:



The enzyme penicillinase catalyses the hydrolysis of penicillin to penicilloic acid yielding a local pH change near the gate region of the EIS structure that serves as the biosensor signal: the higher the penicillin concentration in the test sample, the higher the resulting pH change.

3. EXPERIMENTAL

The field-effect capacitive enzyme biosensors for the detection of penicillin, organophosphorous pesticides, the cysteine sulphoxide alliin, and cyanide have been realized by means of immobilization of the respective enzymes (penicillinase, organophosphorous hydrolase, alliinase, and cyanidase) onto the gate surface of the pH-sensitive EIS structure. Figure 1 shows a schematic cross-section of the layer structure of the enzyme-modified EIS sensor and the experimental set-up, which has been utilized for the characterization of the EIS sensors. As pH-sensitive transducer material, thin films of Ta_2O_5 , Si_3N_4 or Al_2O_3 have been used. For the measurements, the EIS biosensor was mounted into a home-made measuring cell, sealed by an O-ring and contacted on its front side by the electrolyte and a reference electrode (typically, Ag/AgCl electrode), and on its rear side by a gold-plated pin. The chip size of the EIS structure was $10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$. The contact area of the EIS sensor with the solution was about 0.5 cm^2 . For each type of the enzyme-modified biosensor, the composition and pH value of the buffer solution have been optimized in terms of achieving a high sensitivity, a wide linear measuring range, and a low detection limit [4, 9, 12, 14, 15].

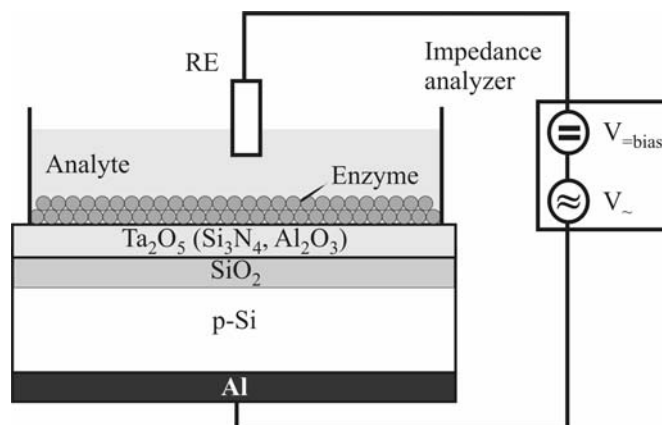


Fig. 1. Schematic cross-section of the layer structure of an enzyme-modified EIS sensor and experimental set-up, which has been utilized for the characterisation; RE is the reference electrode.

The developed enzyme-modified EIS sensors have been characterized with the help of an impedance analyzer (Zahner Elektrik). Two basic modes have been used: the capacitance–voltage ($C-V$) mode, similar to well-known measurements with a MOS (metal–oxide–semiconductor) capacitor, and the

constant-capacitance (ConCap) mode [1, 4]. The ConCap mode allows the investigation of the dynamic behavior of the sensor as well as to study drift and hysteresis effects. For the measurements, a d.c. polarization voltage is applied via the reference electrode to set the working point (usually, within the linear region of the $C-V$ curves at $\sim 60\%$ of the maximum capacitance), and a small a.c. voltage (10–80 mV) is set in order to measure the small-signal capacitance of the EIS sensor.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Results of the electrochemical characterisation of the enzyme-modified EIS sensors will be exemplarily demonstrated for a penicillin-sensitive biosensor. Figure 2 shows a typical $C-V$ curve (left) in a working buffer (0.25 mM polymix buffer, pH 8) and a ConCap response (right) in penicillin G solutions of different concentration for a penicillinase-modified EIS structure. In this experiment, the enzyme penicillinase (EC 3.5.2.6., *Bacillus cereus* from Sigma, specific activity: 1650 units/mg protein) was adsorptively immobilized onto a pH-sensitive Ta_2O_5 gate. The main advantages of the adsorptive immobilization technique are its simplicity and cheapness without any loss of the enzyme activity and the possibility of subsequent enzyme regeneration [1, 15].

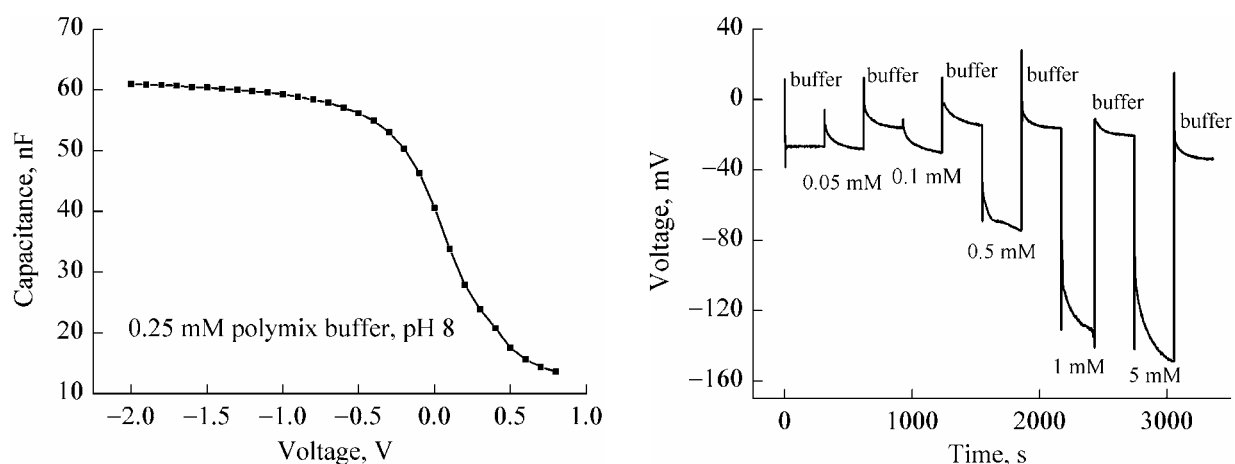


Fig. 2. Typical $C-V$ curve (left) in a working buffer (0.25 mM polymix buffer, pH 8) and ConCap response (right) in penicillin G solutions of different concentration for the penicillinase-modified EIS structure.

With increasing penicillin concentration from 0.05 to 5 mM, the concentration of the H^+ ions resulting from the penicillin catalysis is increased, too. The resulting changes in the gate-surface potential and thus changes in the sensor output voltage directly correlate with the respective penicillin concentration in the solution.

The characteristics of all four realized enzyme biosensors, i.e., sensitivity, linear working range, type of enzyme, immobilization method and analyte to be detected, are summarized in table. The lifetime of the realized EIS biosensors reaches from a few weeks for a cyanide-sensitive EIS sensor [4, 13, 14] to about one year for a penicillin-sensitive biosensor [1, 4, 15]. For the penicillin biosensor, additional experiments could demonstrate further features: the adsorption of the enzyme into a porous EIS layer structure [1, 4] resulting in a miniaturized biosensor with comparable sensitivity characteristics, and the wafer-level integration of the EIS biosensor with a micromachined flow-through microcell, advantageously dealing with small sample volumes down to about 300 nl [5, 6].

5. CONCLUSIONS

Enzyme-modified field-effect biosensors for the determination of penicillin, organophosphorous pesticides, alliin, and cyanide have been realized, using a simple in layout and easy in fabrication capacitive EIS structure. Some of these biosensors, for instance, sensors for the detection of penicillin and organophosphorous pesticides have been studied in detail to optimize the biosensor performance, while others such as sensors for the detection of the cysteine sulphoxide alliin or cyanide are in the stage of preliminary investigations and demonstrate the feasibility of detection of these analytes using enzyme-modified EIS structures.

Summary of specifications of the developed enzyme-modified EIS sensors including the enzyme type, immobilisation method and analyte to be detected.

Analyte	Enzyme	Immobilization method	Linear measuring range	Sensitivity
Alliin	Alliinase	Freeze-dried and entrapment under dialysis membrane	$1 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ M	~18 mV/decade
Penicillin	Penicillinase	Cross-linking; adsorptive	0.05 – 2 mM	~130 mV/mM
Cyanide	Cyanidase	Covalent coupling to NHS-activated Sepharose™ and entrapment under dialysis membrane	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-2}$ M	~4 mV/decade
Organo-phosphorous pesticides	Organo-phosphorous hydrolase	Adsorptive; Cross-linking (glutaraldehyde); entrapment in nafion	10 – 100 μ M	~0.29 mV/ μ M

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully thank the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF-project: “SAFE”) for the financial support, and J.P. Kloock, T. Wagner, N. Näther, and D. Rolka for technical support and valuable discussions.

REFERENCES

- Poghossian, A. and Schöning, M.J., *Silicon-based chemical and biological field-effect sensors, Encyclopedia of Sensors*, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch, USA, 2006, vol. 9, ISBN 1-58883-065-9, p. 463.
- Schöning, M.J. and Poghossian, A., *Electroanalysis*, 2006, vol. 18, p. 1893.
- Schöning, M.J. and Poghossian, A., *Analyst*, 2002, vol. 127, p. 1137.
- Schöning, M.J., *Sensors*, 2005, vol. 5, p. 126.
- Näther, N., Rolka, D., et al., *Electrochimica Acta*, 2005, vol. 51, p. 924.
- Schöning, M.J., Näther, N., et al., *Sens. Actuators B*, 2005, vol. 108, p. 986.
- Rolka, D., Poghossian, A., and Schöning, M.J., *Sensors*, 2004, vol. 4, p. 84.
- Schöning, M.J., Arzdorf, M., et al., *Sensors*, 2003, vol. 3, p. 119.
- Schöning, M.J., Arzdorf, et al., *Sens. Actuators B*, 2003, vol. 91, p. 92.
- Schöning, M.J., Krause, R., et al., *Sens. Actuators B*, 2003, vol. 95, p. 291.
- Schöning, M.J., Kloock, J.P., and Knobbe, D.-T., *VDI-Berichte*, 2004, vol. 1829, p. 699.
- Keusgen, M., Jünger, M., Krest, I., and Schöning, M.J., *Sens. Actuators B*, 2003, vol. 95, p. 297.
- Keusgen, M., Kloock, J.P., and Knobbe, D.-T., *Sens. Actuators B*, 2004, vol. 103, p. 380.
- Turek, M., Ketterer, L., and Claßen, M., *Sensors*, 2007, vol. 7, p. 1415.
- Poghossian, A., Thust, M., Schroth, P., et al., *Sens. Mater.*, 2001, vol. 13, p. 207.

УДК 621.315

СЕНСОРЫ НА СТРУКТУРАХ ЭЛЕКТРОЛИТ–ДИЭЛЕКТРИК–ПОЛУПРОВОДНИК, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТАМИ

М. ТУРЕК^{1,2}, М. КОЙСГЕН³, А. ПОГОСЯН^{1,2},
А. МУЛЧАНДАНИ⁴, Дж. ВАНГ⁵, М.Дж. ШЁНИНГ^{1,2}

¹Институт нано- и биотехнологий (ИНБ),

Аахенский университет прикладных наук, Юлих, Германия

² Институт био- и наносистем (ИБН-2), Исследовательский центр Юлих, Германия

³ Институт фармацевтической химии, Университет Филипс, Марбург, Германия

⁴ Инженерный отдел химии и охраны окружающей среды,

Университет Риверсайд, Калифорния, США

⁵ Центр биоэлектроники и биосенсоров, Университет штата Аризона, Темпе, США

(Поступила в редакцию 24 октября 2007 г.)

Реализованы полевые емкостные ферментные биосенсоры для детектирования пенициллина, фосфорорганических пестицидов, цистеин-сульфоксид аллиина и цианида. Биосенсоры получены путем иммобилизации соответствующих ферментов (пенициллиназы, фосфорорганической гидролазы, аллииназы и цианидазы) на поверхность элемента рН-чувствительной структуры ЭДП (электролит–диэлектрик–полупроводник). Принцип действия таких биосенсоров основан на детектировании изменения локального рН в результате той или иной каталитической реакции фермента. В качестве рН-чувствительных датчиков использовались тонкие пленки Ta₂O₅, Si₃N₄ или Al₂O₃. Для каждого типа ферментных биосенсоров оптимизировался состав и рН буферного раствора с целью получения высокой чувствительности, большого интервала линейного измерения и низкого предела детектирования. Дана сводка основных характеристик разработанных ферментных биосенсоров.

1. Введение

В последние годы сенсоры на полупроводниковых устройствах в сочетании с биологическими компонентами привлекают большое внимание как для исследований, так и для возможных промышленных применений (см., например, последние обзоры [1-4] и литературу в них). Это обусловлено их хорошими электрохимическими свойствами, возможностью миниатюризации и низкими расходами производства по сравнению с комплексными

методами обычного инструментального анализа. Применения подобных биохимических сенсоров весьма разнообразны: от мониторинга окружающей среды, биомедицинских и биотехнологических применений до анализа пищевых продуктов и лекарств. Благодаря особой способности связывания, а также каталитической активности ферменты часто используются в качестве элементов биологического распознавания для высокоселективного аналитического детектирования. Ферменты являются протеинами с каталитическим действием; они понижают энергетический порог, при котором данная реакция имеет место.

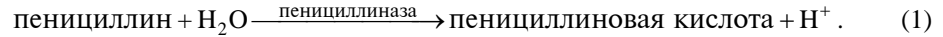
Настоящая работа подытоживает последние разработки и исследования в области ферментно-модифицированных полевых емкостных ЭДП-сенсоров. В отличие от хорошо известных ферментно-модифицированных полевых транзисторов [1-4], ЭДП-сенсоры более просто устроены, легче изготавливаются и обходятся дешевле (фотолитографические процессы обычно не требуются) и могут быть сравнительно легче защищены от действия раствора электролита посредством уплотнителей, позволяя таким образом обходиться без сложных процессов инкапсуляции.

В работе приводятся основные характеристики разработанных ферментно-модифицированных ЭДП-сенсоров для детектирования антибиотика пенициллина [4-7], фосфорорганических пестицидов (параоксан, паратион, диазинон и дихлорфос) [4,8-11], цистеин-сульфоксидного аллиина [4,12] и цианида [4,11,13,14] с использованием, соответственно, ферментов пенициллиназы, фосфорорганической гидролазы, аллииназы и цианидазы. Особенно большой коммерческий интерес представляют последние два типа сенсоров, которые могут применяться для контроля содержания цианидов (например, в металлодобывающей и штамповочной промышленности), остроотоксичных для животных и человека, и аллиинов, количество которых определяет качество растительных препаратов, содержащих чеснок и известных как антидиабетические, антиатеросклеротические и понижающие холестерин средства.

2. Принцип действия ферментно-модифицированного ЭДП-сенсора

Простейший полевой ферментный биосенсор основан на структуре ЭДП, являющейся (био)химически чувствительной емкостью. Ферментно-модифицированный сенсор строится обычно на иммобилизации фермента на диэлектрическом элементе структуры ЭДП. В общем случае действие такого сенсора можно объяснить следующим образом [1]: в процессе реакции фермента со своей подложкой либо образуются продукты реакции, либо расходуются реагенты. Это изменение концентраций может быть измерено полевым датчиком. В наших исследованиях ферментные биосенсоры сделаны на рН-чувствительных ЭДП-структурах, которые регистрируют изменения локального рН в результате ферментной реакции. В качестве примера приведем ферментную реакцию, происходящую при детектировании пени-

циллина:



Фермент пенициллиназы катализирует гидролиз пенициллина с образованием пенициллиновой кислоты, приводящей к изменению локального рН вблизи области элемента ЭДП-структуры. Это изменение является сигналом биосенсора: чем выше концентрация пенициллина в тестируемом образце, тем больше изменение рН.

3. Эксперимент

Нами получены полевые емкостные ферментные биосенсоры для детектирования пенициллина, фосфорорганических пестицидов, цистеин-сульфоксид аллиина и цианида. Биосенсоры получены путем иммобилизации соответствующих ферментов (пенициллиназы, фосфорорганической гидролазы, аллииназы и цианидазы) на поверхность элемента рН-чувствительной структуры ЭДП. Рис.1 схематически показывает сечение слоистой структуры ферментно-модифицированного ЭДП-сенсора и экспериментальную установку, использованную для измерения характеристик сенсора. В качестве датчиков использовались тонкие пленки Ta_2O_5 , Si_3N_4 или Al_2O_3 . Для проведения измерений ЭДП-биосенсор монтировался в самодельную ячейку с уплотнительным кольцом, которая соединена с фронтальной стороны с электродом и реперным электродом (обычно Ag/AgCl), а с тыльной стороны – с позолоченной иглой. Размеры чипа ЭДП-структуры составляли 10 мм \times 10 мм. Площадь контакта ЭДП-сенсора с раствором была примерно 0.5 см². Для каждого типа ферментных биосенсоров оптимизировались состав и рН буферного раствора с целью получения высокой чувствительности, большого интервала линейного измерения и низкого предела детектирования [4,9,12, 14,15].

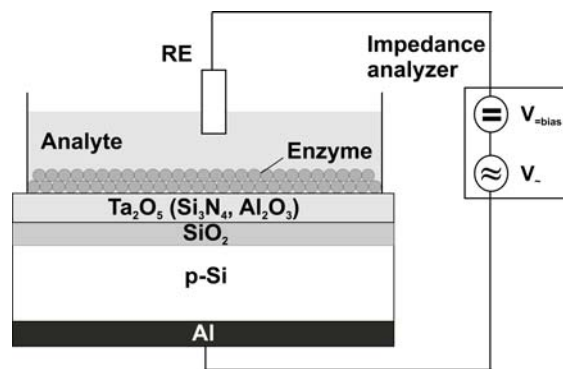


Рис.1. Схематическое изображение сечения слоистой структуры ферментно-модифицированного ЭДП-сенсора и экспериментальной установки, использованная для измерения характеристик сенсора. РЕ – реперный электрод.

Для снятия характеристик разработанных ЭДП-сенсоров использовались импедансные анализаторы (Zahner Elektrik). Применялись два основных метода измерений: метод емкость–напряжение (Е–Н), аналогичный известным измерениям в МОП (металл–оксид–полупроводник) конденсаторах и метод постоянной емкости (ПЕ) [1,4]. Метод ПЕ допускает исследование динамического поведения сенсора, а также изучение эффектов дрейфа и гистерезиса. Для измерений прикладывалось постоянное поляризующее напряжение посредством реперного электрода для установления рабочей точки (как правило, в линейной области кривой Е–Н на уровне 60% от максимальной емкости) и малое переменное напряжение (10–50 мВ) – для измерения емкости при слабых сигналах ЭДП-сенсора.

4. Результаты и обсуждение

Результаты электрохимического описания ферментно-модифицированных ЭДП-сенсоров продемонстрируем на примере биосенсора, реагирующего на пенициллин. На рис.2 приведены типичная Е–Н кривая (слева) в рабочем буфере (0.25 ммоль полимикс буфер с рН 8) и ПЕ-отклик (справа) в растворах пенициллина G различных концентраций от модифицированной пенициллиназой ЭДП-структуры. В данном эксперименте фермент пенициллиназы (ЕС 3.5.2.6., *Bacillus cereus* от Sigma, удельная активность 1650 ед/мг протеин) был адсорбционно иммобилизован на рН-чувствительный элемент Ta_2O_5 . Основными преимуществами метода адсорбционной иммобилизации являются простота и низкая стоимость без каких-либо потерь в активности фермента и возможности его последующей регенерации [1,15].

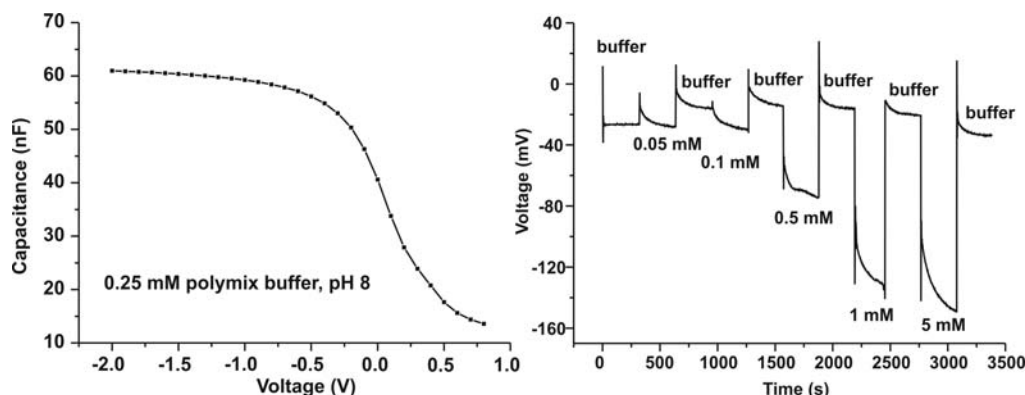


Рис.2. Типичная Е–Н кривая (слева) в рабочем буфере (0.25 ммоль полимикс буфер с рН 8) и ПЕ-отклик (справа) в растворах пенициллина G различных концентраций от модифицированной пенициллиназой ЭДП-структуры.

С увеличением концентрации пенициллина от 0.05 до 5 ммоль концентрация H^+ -ионов, образующихся при катализе пенициллина, также воз-

растает. Возникающие при этом изменения поверхностного потенциала элемента, а значит, изменения напряжения на выходе сенсора коррелируют непосредственно с соответствующей концентрацией пенициллина в растворе.

Характеристики всех четырех изготовленных ферментных биосенсоров, т.е. чувствительность, линейный рабочий интервал, тип фермента, способ иммобилизации и детектируемое вещество, приведены в табл.1. Время жизни полученных ЭДП-биосенсоров – от нескольких недель в случае сенсоров, чувствительных к цианидам [4,13,14], до примерно года для биосенсоров, чувствительных к пенициллину [1,4,15]. В случае пенициллиновых биосенсоров дополнительные эксперименты показывают также следующие свойства: адсорбция фермента на пористую структуру слоев ЭДП [1,4], позволяющая миниатюризировать сенсор, сохраняя сравнимую чувствительность и вафельное соединение ЭДП-биосенсора с микрообработанной проточной микрочаежкой, имеющая преимущество работы с образцами малого объема – до 300 нл [5,6].

Табл.1. Сводка характеристик разработанных ферментно-модифицированных ЭДП-сенсоров, включающая тип фермента, способ иммобилизации и детектируемое вещество.

Детектируемое вещество	Фермент	Иммобилизация	Линейный интервал измерения	Чувствительность
Аллиин	Аллииназа	Сублимационная сушка и захват под диализную мембрану	1×10^{-7} – 1×10^{-4} моль	~18 мВ/декада
Пенициллин	Пенициллиназа	Структурирующая; адсорбционная	0.05–2 ммоль	~130 мВ/моль
Цианид	Цианидаза	Ковалентная связь с NHS-активированной сефарозой TM и захват под диализную мембрану	1×10^{-6} – 1×10^{-2} моль	~4 мВ/декада
Фосфорорганические пестициды	Фосфорорганическая гидролаза	Адсорбционная; структурирующая (глутаральдегид); захват в нафине	10–100 ммоль	~0.29 мВ/ммоль

5. Заключение

Мы разработали ферментно-модифицированный полевой биосенсор для детектирования пенициллина, фосфорорганических пестицидов, аллиина и цианида, используя конструктивно простую, легко изготавливаемую емкостную ЭДП-структуру. Некоторые из этих биосенсоров, например, сенсоры для регистрации пенициллина и фосфорорганических пестицидов, подробно исследованы для оптимизации их работы, другие же подобные сенсоры, детектирующие цистеин-сульфоксид аллиин либо цианид, находятся в стадии предварительного изучения и показывают осуществимость регистрации вышеуказанных веществ при помощи ферментно-модифицированных ЭДП-структур.

Авторы благодарят Федеральное министерство образования и исследований (проект "SAFE" BMBF) за финансовую поддержку, а также J.P.Kloock, T.Wagner, N.Näther and D.Rolka за техническую поддержку и полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. **A.Poghossian, M.J.Schoning.** Silicon-based chemical and biological field-effect sensors, in C.A.Grimes, E.C.Dickey, M.V.Pishko (eds.), *Encyclopedia of Sensors*, American Scientific Publishers, Stevenson Ranch (USA), 2006, vol.9, pp.463-534.
2. **M.J.Schoning, A.Poghossian.** **18**, 1893 (2006).
3. **M.J.Schoning, A.Poghossian.** *Analyst*, **127**, 1137 (2002).
4. **M.J.Schoning.** *Sensors*, **5**, 126 (2005).
5. **N.Nather, D.Rolka, A.Poghossian, M.Koudelka-Hep, M.J.Schoning.** *Electrochimica Acta*, **51**, 924 (2005).
6. **M.J.Schoning, N.Nather, V.Auger, A.Poghossian, M.Koudelka-Hep.** *Sens. Actuators, B*, **108**, 986 (2005).
7. **D.Rolka, A.Poghossian, M.J.Schoning.** *Sensors*, **4**, 84 (2004).
8. **M.J.Schoning, M.Arzdorf, P.Mulchandani, W.Chen, A.Mulchandani.** *Sensors*, **3**, 119 (2003).
9. **M.J.Schoning, M.Arzdorf, P.Mulchandani, W.Chen, A.Mulchandani.** *Sens. Actuators B*, **91**, 92 (2003).
10. **M.J.Schoning, R.Krause, K.Block, M.Musameh, A.Mulchandani, J.Wang.** *Sens. Actuators B*, **95**, 291 (2003).
11. **M.J.Schoning, J.P.Kloock, D.-T.Knobbe, R.Krause, W.Block, J.Wang, A.Mulchandani, M.Keusgen.** *VDI-Berichte*, **1829**, 699 (2004).
12. **M.Keusgen, M.Junger, I.Krest, M.J.Schoning.** *Sens. Actuators B*, **95**, 297 (2003).
13. **M.Keusgen, J.P.Kloock, D.-T.Knobbe, M.Junger, I.Krest, M.Goldbach, W.Klein, M.J.Schoning.** *Sens. Actuators B*, **103**, 380 (2004).
14. **M.Turek, L.Ketterer, M.Classen, H.K.Berndt, G.Elbers, P.Kruger, M.Keusgen, M.J.Schoning.** *Sensors*, **7**, 1415 (2007).
15. **A.Poghossian, M.Thust, P.Schroth, A.Steffen, H.Luth, M.J.Schoning.** *Sens. Mater.*, **13**, 207 (2001).

ENZYME-MODIFIED ELECTROLYTE-INSULATOR-SEMICONDUCTOR SENSORS

M. TUREK, M. KEUSGEN, A. POGHOSSIAN,
A. MULCHANDANI, J. WANG, M.J. SCHÖNING

Field-effect capacitive enzyme biosensors for the detection of penicillin, organophosphorous pesticides, the cysteine sulphoxide alliin, and cyanide have been realized by means of immobilization of the respective enzymes (penicillinase, organophosphorous hydrolase, alliinase and cyanidase) onto the gate surface of a pH-sensitive EIS (electrolyte-insulator-semiconductor) structure. The functional principle of these biosensors is based on the detection of a local pH change resulting from the particular catalytic reaction of the enzyme. As pH-sensitive transducer materials, thin films of Ta_2O_5 , Si_3N_4 or Al_2O_3 have been utilized. For each type of enzyme biosensor, the composition and pH value of the buffer solution have been optimized in terms of a high sensitivity, a wide linear measuring range, and a low detection limit. Basic characteristics of the developed enzyme biosensors are summarized.



Artificial intelligence/fuzzy logic method for analysis of combined signals from heavy metal chemical sensors

M. Turek^{a,b}, W. Heiden^c, A. Riesen^c, T.A. Chhabda^a, J. Schubert^b, W. Zander^b, P. Krüger^d, M. Keusgen^e, M.J. Schöning^{a,b,*}

^a Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, Jülich, Germany

^b Institute of Bio- and Nanosystems (IBN), Research Centre Jülich GmbH, Jülich, Germany

^c Bonn-Rhein-Sieg University of Applied Sciences, Sankt Augustin, Germany

^d Institute of Biochemistry and Molecular Biology, RWTH Aachen, Aachen, Germany

^e Institute for Pharmaceutical Chemistry, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2008

Received in revised form 10 March 2009

Accepted 10 March 2009

Available online 24 March 2009

Keywords:

Fuzzy logic

Electronic tongue

Cross-sensitivity

Chalcogenide glass sensor

Multi-component heavy metal solution

ABSTRACT

The cross-sensitivity of chemical sensors for several metal ions resembles in a way the overlapping sensitivity of some biological sensors, like the optical colour receptors of human retinal cone cells. While it is difficult to assign crisp classification values to measurands based on complex overlapping sensory signals, fuzzy logic offers a possibility to mathematically model such systems. Current work goes into the direction of mixed heavy metal solutions and the combination of fuzzy logic with heavy metal-sensitive, silicon-based chemical sensors for training scenarios of arbitrary sensor/probe combinations in terms of an electronic tongue. Heavy metals play an important role in environmental analysis. As trace elements as well as water impurities released from industrial processes they occur in the environment. In this work, the development of a new fuzzy logic method based on potentiometric measurements performed with three different miniaturised chalcogenide glass sensors in different heavy metal solutions will be presented. The critical validation of the developed fuzzy logic program will be demonstrated by means of measurements in unknown single- and multi-component heavy metal solutions. Limitations of this program and a comparison between calculated and expected values in terms of analyte composition and heavy metal ion concentration will be shown and discussed.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The detection of heavy metal ions in aqueous solutions plays an important role in the field of environmental and industrial water analysis. Heavy metals e.g., copper, lead and silver, are not biodegradable and consumption of small amounts of them over a long period or intake of large amounts over a short period can lead to chronic or acute diseases, respectively. Here, essential enzymes and thus biochemical processes in the human body are inhibited [1]. In recent years, it could be demonstrated that miniaturised silicon-based chalcogenide glass sensors can be very well applied for the detection of heavy metals. Those sensors showed good stability in liquid media, high long-term stability in operation, low detection limit and compatibility to silicon technology [2–12]. However, in multi-component solutions potentiometric chalcogenide glass chemical sensors show cross-sensitivities towards

other/interfering ions in the test sample due to the nature of the complex sensing material. Based on cross-sensitivities of chemical sensors in combination with intelligent data analysis software, different electronic tongues for the detection of e.g., heavy metals, different kinds of wines, beverages and even tomatoes, have been developed [13–25]. However, such electronic tongues consist of either pattern or complex recognition tools, e.g., artificial neural networks (ANN), principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS) regression and soft-independent modelling of class analogy (SIMCA), and/or of a huge number of sensors. The calibration of these electronic tongues results in a complex, time-consuming and laborious procedure. In order to meet these problems fuzzy logic as intelligent (while different to many other techniques that mimic human intelligence, transparent and with short calculation times) data recognition software together with miniaturised silicon-based chalcogenide glass sensors can offer an innovative, relatively “simple” and fast approach for qualitative and quantitative detection of multi-component heavy metal solutions.

The concept of fuzzy logic was introduced more than 40 years ago by Zadeh [26]. Lying dormant for many years, it has been rediscovered in the mid-1980s for regulation in micro-electronics, automatic process regulation or in operation research. In general,

* Corresponding author at: Institute of Nano- and Biotechnologies (INB), Aachen University of Applied Sciences, Campus Jülich, Germany. Tel.: +49 241 600953215; fax: +49 241 600953235.

E-mail address: m.j.schoening@fz-juelich.de (M.J. Schöning).

fuzzy logic is an artificial intelligence (AI) technique that tries to emulate human decision processes, which are usually based on comparative estimation rather than on fixed thresholds. Whenever various measures with complex interrelationship have to be considered, static decision rules often fail. This is where fuzzy logic can help.

By now, the fuzzy set theory has many applications in a large variety of different domains. It has, for example, been used for segmentation of molecular surfaces by means of physico-chemical potentials [27]. In combination with other AI techniques, like neural networks, the benefits of both methods can lead to fast learning self-supervised decision-making systems [28]. Since the field is quite complex and in development, the basics of fuzzy logic cannot be discussed fully in this paper. For detailed representation refer to [29,30]. Here, only those concepts which are (more or less) directly used for the cross-sensitive sensor analysis are presented.

- *Fuzzy set theory* may be seen as a generalisation of classical set theory, each element of a fuzzy set \tilde{A} being defined by a function value x in definition space X together with its degree of membership to \tilde{A} . The latter is defined by a membership function $\mu_{\tilde{A}(x)}$, whose values lie normally within a range $0 \leq \mu_{\tilde{A}(x)} \leq 1$ between zero and complete membership, respectively:

$$\tilde{A} = \{x, \mu_{\tilde{A}(x)} | x \in X\}. \tag{1}$$

In classical (crisp) sets $\mu_{\tilde{A}(x)}$ can only be 0 or 1, while fuzzy logic allows almost any type of function for membership definitions.

- One of the most important tools in applications of fuzzy set theory is the *concept of linguistic variables (LV)* [31]. These are groups of fuzzy sets with (partially) overlapping membership functions over a common (crisp) basic variable x . In order to represent several classes within a LV the membership functions should cover all the relevant definition space of the basic variable x with membership function values $0 \leq \mu_{\tilde{A}(x)} \leq 1$ (see Fig. 1). Values of 0 or 1 are assigned to the rest of the definition space in all membership functions. The overlap of these functions defines the fuzziness. Generally, a linguistic variable \mathcal{L} , classified by n fuzzy sets \tilde{A}_i , can be defined as

$$\mathcal{L} = \{\tilde{A}_1, \dots, \tilde{A}_n\} \tag{2}$$

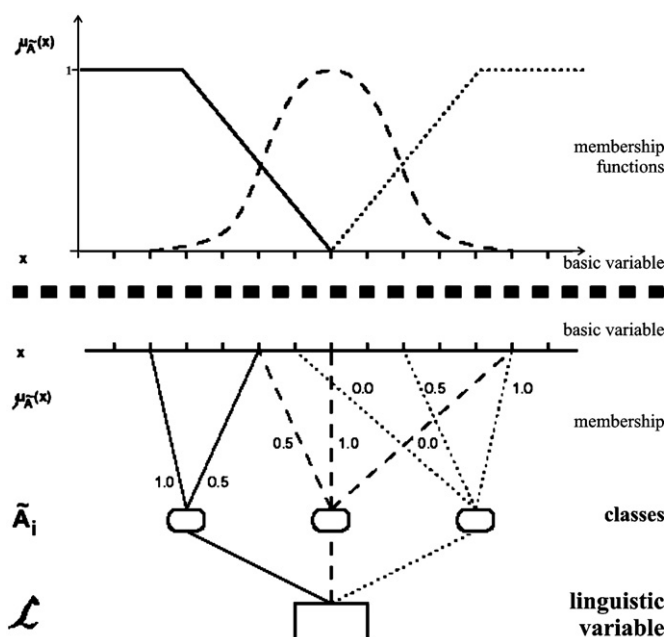


Fig. 1. Schematic of linguistic variables.

or, together with Eq. (1):

$$\mathcal{L} = \{x, \mu_{\tilde{A}_1(x)}, \dots, \mu_{\tilde{A}_n(x)}\}. \tag{3}$$

- Usually, the information of a decision (*decision making in fuzzy environments*) should be based upon, is given by crisp function values; for sensor signal analysis, this means e.g., the voltage output of an electrochemical sensor. Also the decision itself shall again lead to a crisp value: in this case, the binary decision about how to interpret the signal tuple of the applied sensor array in terms of ion type and concentration. However, in order to apply fuzzy logic tools to a problem, it has to be defined by linguistic variables. Thus, decision making requires three steps:
 1. fuzzification (the conversion of crisp input data into fuzzy sets and formulation of LV for further calculations),
 2. fuzzy inference (the application of fuzzy operators for the mathematical evaluation of the LV, thereby producing new fuzzy sets),
 3. defuzzification (the conversion of fuzzy sets resulting from the inference step into evaluable concrete crisp output data).

The details of these steps are discussed with the specific application patterns as far as necessary. For further details, see reference [30].

Aiming at the development of artificial sensors, like an “electronic tongue”, it might be helpful to have a look on biological sensors which have to cope with very similar problems (e.g., in particular cross-sensitivity of specific sensor cells for physical or chemical stimuli). Nature has been working on this problem for millions of years—and has solved it quite impressively in a multitude of organisms with highly accurate as well as broad-range perceptive abilities.

A well-known example is the reception of colour by the human visual system, where light is absorbed by three different receptor proteins in the retinal cone cells. These sensor cells then emit an electric signal according to the wavelength of the absorbed light, which finally leads to a cognitive impression of colour. The optical sensors have absorption maxima at different wavelengths, but with overlapping sensitivity curves (Fig. 2). These curves strikingly resemble the membership functions of a linguistic variable, which led to the idea to develop a software system based on fuzzy logic for the interpretation of signals derived from a set of cross-sensitive artificial sensors.

This work demonstrates a new concept of a recognition method for the qualitative and quantitative detection of different heavy

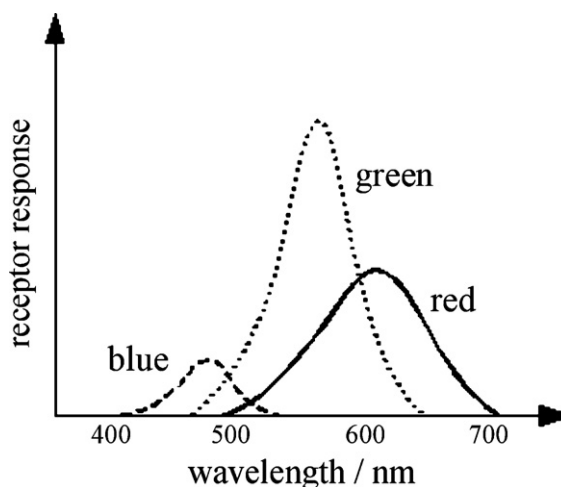


Fig. 2. Human colour perception: overlapping sensitivity curves of cone cell colour receptors (blue—dashed line; green—dotted line; red—continuous line); scheme after an image in [32].

metal ions in unknown mixed solutions by means of a miniaturised chalcogenide glass multi-sensor system. The method is based on fuzzy logic as an AI technique. The critical evaluation and validation of this fuzzy logic program will be presented by means of measurements in unknown single- and multi-component heavy metal solutions. Limitations of the fuzzy logic program due to the input data and a comparison between calculated and expected values in terms of analyte composition and heavy metal ion concentration will be shown and discussed.

2. Experimental and computations

2.1. Chemical sensors and measurement set-up

The miniaturised chalcogenide glass multi-sensor system consists of an Ag-, Cu- and Pb-selective sensor. Each sensor is made of a p-doped Si layer (specific resistance $>1000 \Omega \text{ cm}$) with a 500 nm thick SiO_2 layer for electrical insulation and a metal contact consisting of 15 nm Ti, 30 nm Pt and 250 nm Au on the sensor substrate. In order to realise the miniaturised Ag-, Cu- and Pb-sensors, complex chalcogenide glass material systems of AgIAsSe , CuAgAsSe , $\text{PbI}_2\text{Ag}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$, have been used, respectively. The deposition of these chalcogenide glass materials in a thin-film state onto the substrates has been performed by means of pulsed laser deposition (PLD) technique. The sensing area is approx. 40 mm^2 . For more detailed information of sensor fabrication, see [4,33,34].

The (ion-selective) potentiometry was presented to characterise the electrochemical behaviour of the chalcogenide glass sensors in single- and multi-component heavy metal solutions. Fig. 3 demonstrates schematically the measurement set-up, including the multi-sensor system (Ag-, Cu-, Pb-sensor) and a conventional double-liquid junction Ag/AgCl reference electrode which are immersed in the analyte solution and connected via a highly ohmic multimeter (2700, Keithley) to close the electrical circuit. The outer and inner electrolyte of the reference electrode is $10^{-1} \text{ mol/l KNO}_3$ and $10^{-1} \text{ mol/l KCl}$, respectively.

Three different stock solutions have been prepared: $10^{-2} \text{ mol/l Ag}(\text{NO}_3)$, $10^{-2} \text{ mol/l Cu}(\text{NO}_3)_2$ and $10^{-2} \text{ mol/l Pb}(\text{NO}_3)_2$. Every two stock solutions have been mixed in ratios of 100%:0%, 80%:20%, 60%:40%, 40%:60%, 20%:80% and 0%:100%, in order to realise different single- and multi-component analyte solutions with different ratios of heavy metal ions. As background solution $10^{-1} \text{ mol/l KNO}_3$ with $10^{-3} \text{ mol/l HNO}_3$ solution has been applied.

The calibration measurements as well as the potentiometric measurements in unknown heavy metal solutions have been per-

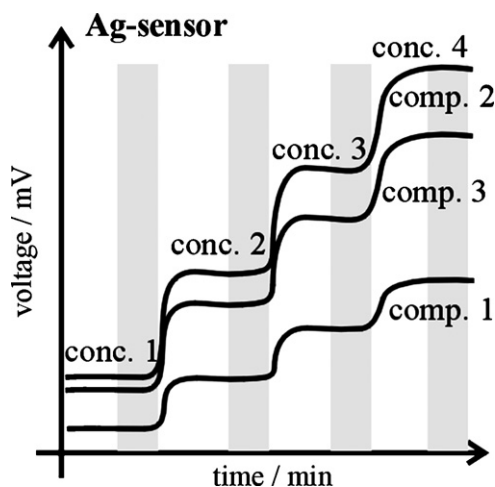


Fig. 4. Measurement curve from potentiometric measurements in three different heavy metal ion compositions (in diagram “comp. 1” to “comp. 3”) in concentration range “conc. 1” to “conc. 4” performed with an Ag-selective sensor. The measured potential values, which are underlined grey, are used as a priori knowledge for fuzzy logic calculations.

formed in the background solution increasing the heavy metal ion concentration from 10^{-6} mol/l to 10^{-3} mol/l by using the standard addition method.

2.2. Development of fuzzy logic software

For the development of the fuzzy logic software, the calibration measurements performed in different heavy metal solutions were imported into a database. The program extracted the information of relevant measurements. Here, relevant information was after 1.5 min of a measurement period in a certain ion concentration of the solution (Fig. 4, grey areas), because of the response time of the heavy metal sensors. Relevant information was used as a priori knowledge for further calculations. These measurements were assigned as characteristic curves to appropriate sensors. A characteristic curve consists of an average value of the calibration measurements in each heavy metal ion concentration of a solution (Fig. 5a, solid line) and the corresponding standard deviation (Fig. 5a, shade). All three sensors were associated with all calibration measurements resulting in a total number of 18 characteristic curves for each sensor, as 18 different calibration solutions for the single- and multi-component measurements have been investigated. Applying the sensor set to a heavy metal solution of unknown composition and concentration, from the relevant measured potentials (a priori knowledge) for each sensor a constant mean potential was calculated.

Fuzzy logic was used to combine the constant mean value of each sensor with the characteristic curves of the particular sensor to an intersection line. From the intersections of the measured constant mean potential with every characteristic curve a fuzzy set was calculated. An intersection was assigned as the highest membership value (1) if the constant mean potential cuts exactly the average of the curve and as the lowest membership value (0) if the measured mean potential was outside the standard deviation of the characteristic curve. Between the average value and its standard deviation the membership value was interpolated linearly. Fig. 5b shows exemplarily the membership function of the Ag-selective sensor from the intersection of the measured average potential with the characteristic curve from composition 2 (from Fig. 5a).

Three fuzzy sets were summarised to a linguistic variable, due to the number of constant mean potentials in a solution, and thus

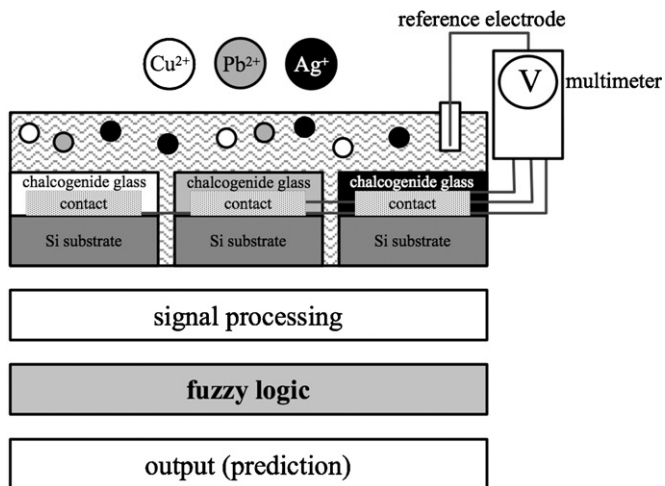


Fig. 3. Schematic of the measurement set-up for the development of a fuzzy logic program.

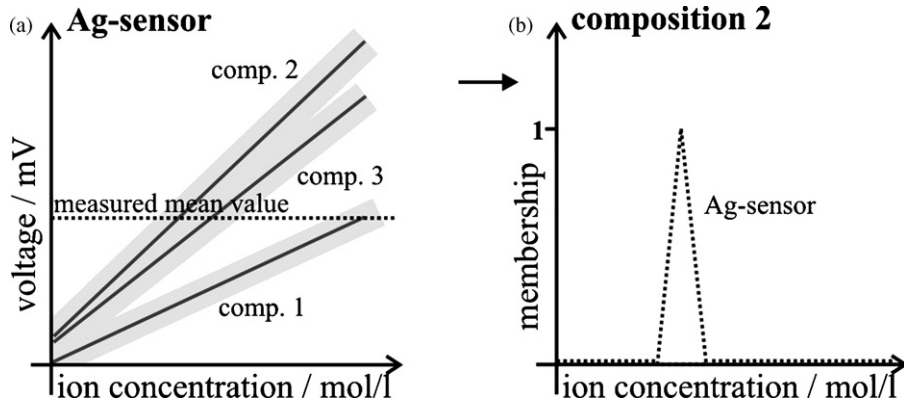


Fig. 5. (a) Characteristic curves of a Ag-selective sensor in three different heavy metal ion compositions with their mean value (solid line), their respective standard deviation (shade) and the constant mean potential measured in an unknown heavy metal ion solution by the Ag-selective sensor. (b) Fuzzy set based on the intersection between the measured constant mean value and the characteristic curve of composition 2 (see (a)).

to the number of applied sensors. This resulted in 18 different linguistic variables, according to the number of used calibration solutions.

For the prediction of the measured unknown heavy metal solution a fuzzy intersection operator (fuzzy AND connective) was applied to the three fuzzy sets of a linguistic variable through their membership functions. This fuzzy AND connective constituted a membership function for the unknown solution to a known solution represented by the linguistic variable (see

Eq. (4)).

$$\mu_{AND(x)} = \min\{\mu_{Ag-sensor(x)}, \mu_{Pb-sensor(x)}, \mu_{Cu-sensor(x)}\}, \quad x \in X \quad (4)$$

Through an analysis of all linguistic variables a likely conclusion on the composition of the unknown heavy metal solution was made. The most likely composition was the linguistic variable with the highest membership value of its fuzzy AND connective membership function.

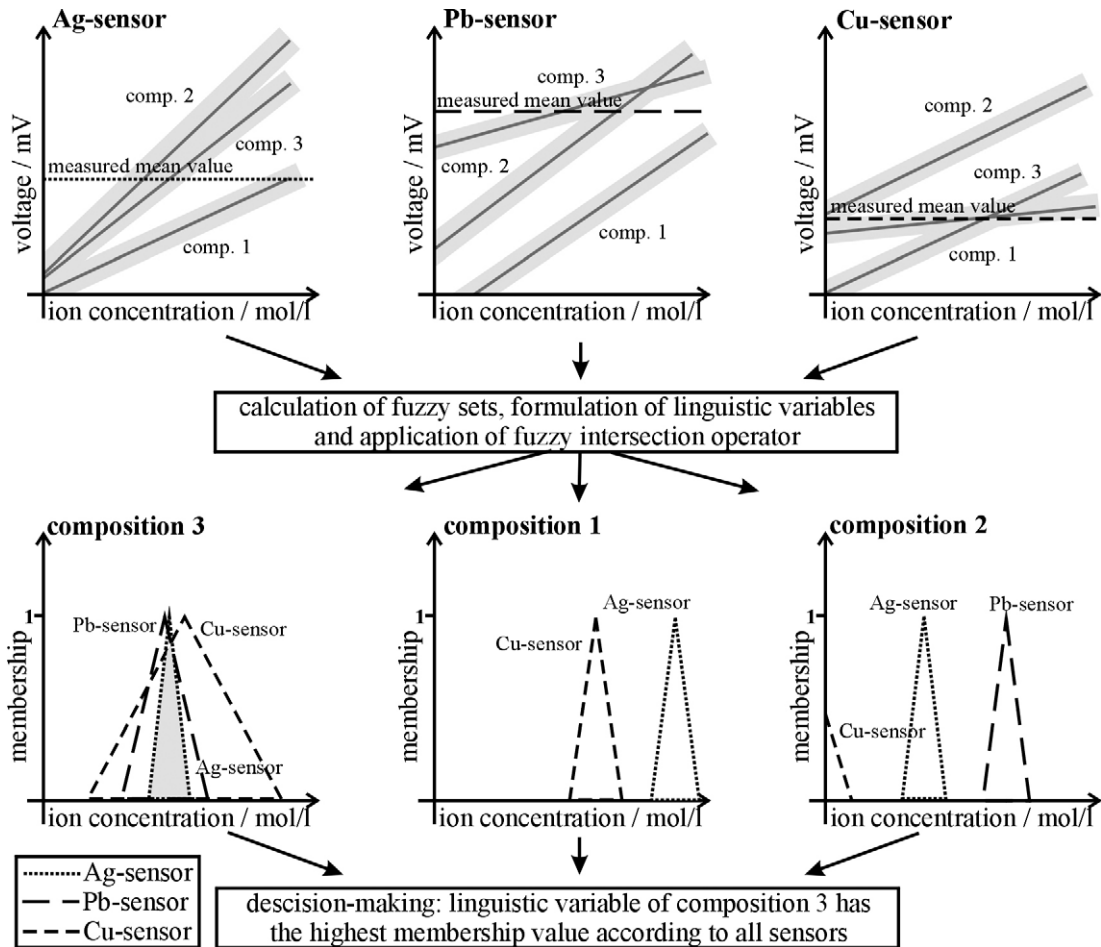


Fig. 6. Schematic of the procedure of the fuzzy logic program based on three chalcogenide glass sensors (Ag-, Pb- and Cu-selective sensor), three calibration compositions and the measured constant mean value in an unknown heavy metal solution. The “grey area” of the composition 3 represents the intersection membership function of the three fuzzy sets (see Eq. (4)).

An overview of the fuzzy logic program procedure is exemplarily shown in Fig. 6. Each one of the three sensors has measured a signal in an unknown heavy metal solution. The program calculated fuzzy sets based on the determined constant mean potential values and characteristic curves of known ion type and concentration combinations, that are compositions 1–3. In each case, three fuzzy sets, according to the three different sensors used, were formulated to a linguistic variable for each composition. On each linguistic variable the fuzzy intersection operator (Eq. (4)) was applied. The linguistic variable of compositions 1 or 2 did not have any intersection areas, thus the unknown heavy metal ion composition was neither composition 1 nor 2. However, composition 3 showed an intersection area of all electrodes (see “grey area” in Fig. 6), resulting in that the unknown measured heavy metal composition was most probably the composition 3 with the ion concentration where the highest membership value of the intersection area was found.

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of the sensors

In order to illustrate important sensor parameters in terms of electronic tongue behaviour, sensitivity, cross-sensitivity, response time and linear measuring range will be discussed exemplarily. Fig. 7 demonstrates calibration measurements with the miniaturised chalcogenide glass-based Ag-sensor in three different analyte solutions: Ag:Cu with 100%:0%, Ag:Pb with 0%:100% and Cu:Pb with 60%:40%. The measurement in analyte solution containing only Ag^+ -ions represents the sensor behaviour towards its primary ion. The Ag^+ -ion sensitivity was about 60.5 mV/dec. and correlates well with the expected Nernstian response for monovalent ions. The response time was around several seconds and the linear measuring range was extended over four decades down to 10^{-6} mol/l Ag^+ -ions. The measurements in 100% Pb^{2+} -ion and 60%:40% of Cu^{2+} : Pb^{2+} -ion solution demonstrate the cross-sensitivity properties of the chalcogenide glass-based Ag-sensor. The cross-sensitivity towards Pb^{2+} -ions and the Cu^{2+} : Pb^{2+} -ion mixture was about 38.0 mV/dec. and 48.1 mV/dec., respectively. The measurement time increased to several tenths of seconds, the linear range changed from 10^{-4} mol/l to 10^{-3} mol/l for measurements in 100% Pb^{2+} -ion and remained from 10^{-6} mol/l to 10^{-3} mol/l for Cu^{2+} : Pb^{2+} -ion mixture solution. The calibration measurements in Fig. 7 represent three characteristic examples from a set of 18 measurements that have been performed with different composition mixtures, as described in the experimental part (see Section 2.1).

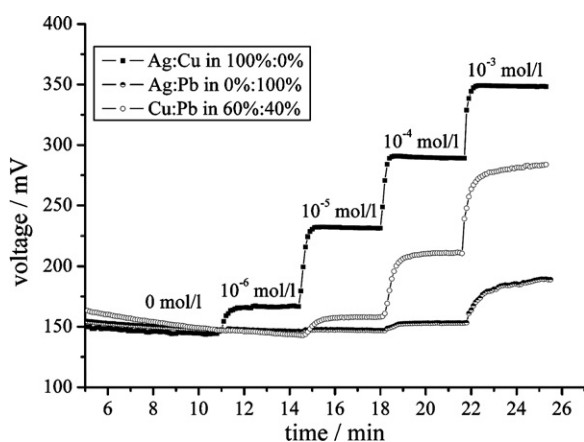


Fig. 7. Measurement curves from potentiometric measurements in different heavy metal ion compositions in the concentration range from 10^{-6} mol/l to 10^{-3} mol/l with the miniaturised chalcogenide glass Ag-selective sensor.

In order to feed the developed fuzzy logic program with calibration data, this procedure has been repeated with the Cu- and Pb-sensor in an analogue way, varying the mixture of the heavy metal compositions. The resulting cross-sensitivities and linear ranges have been determined (not shown here). With regard to its primary ion solution, the Cu-sensor had an average sensitivity of 30.0 ± 4.5 mV/pCu; thus a near-Nernstian response, which is in good agreement with previous published sensitivity values, has been achieved [2]. The Pb-sensor showed an average sensitivity of 20.0 ± 0.7 mV/pPb which is around 6–9 mV/pPb less than the expected value [2,5,8]. The decreased sensitivity (that has been constant during the experiment) is probably due to the already “aged” sensor chip used in this experiment.

3.2. Evaluation of the fuzzy logic program for heavy metal measurements

In order to validate the functionality of the developed program, a self-test was made. Here, to illustrate the results more clearly, a diagram representation was chosen (see Fig. 8). On the x-axis the sequence of the input data as unknown composition and on the y-axis the range of the proposable/known compositions are presented. Instead of calculating proposed composition proportions continuously, the suggestion of the software is assigned to a set of finite concentration ratios, namely Ag:Cu with 0%:100%, 100%:0%, 80%:20%, 20%:80%, 60%:40% and 40%:60% ratios from the lowest to the highest ion concentration followed by compositions Pb:Ag and Pb:Cu (same sequence of ratio and ion concentration) from bottom to top. Each proposal calculated by the fuzzy logic program is represented by a small rectangle. The colour of those rectangles represents the probability: black boxes mean high membership and thus high probability, while grey boxes mean minor membership (decreasing with increasing brightness).

In order to evaluate the limits of the fuzzy logic software, known heavy metal ion compositions were used as unknown data input. These input data are the same data as used for the calculation of the characteristic curves in the fuzzy logic program. The sequence of the input data in Fig. 8 on the x-axis (from left to right) is assigned in the same order as for the y-axis from bottom to top. The proposals of the fuzzy logic program for the unknown input data should ideally result in black rectangles on a diagonal. Further proposals for the same data input are shown as rectangles out of the diagonal, with the same x-value (input data) but with different y-values (output data).

Fig. 8a exemplarily shows the proposition results of the fuzzy logic program for the input data as described earlier. The diagonal of black rectangles illustrates that the highest probability was assigned to the correct compositions and concentrations by the program. However, for some compositions and concentrations by the program. However, for some compositions additional proposals with a lower probability have been calculated, too (additional grey boxes at the same x-value). These additional proposals of the fuzzy logic program were mainly due to unknown heavy metal solutions with a low ionic concentration. Without taking into account data from heavy metal ion concentrations of 10^{-6} mol/l, the fuzzy logic method recognised the unknown solutions with 100% probability (see Fig. 8b).

In order to demonstrate the limits of the fuzzy logic program for an acceptable analyte estimation, propositions of heavy metal ion composition and concentration equal to data from the calibration measurements but shifted with an offset of 5 mV have been calculated. The program still resulted in a relatively acceptable hit rate of approximately 80% (see Fig. 8c). Increasing the offset to 10 mV, the fuzzy logic program resulted in a larger number of different grey boxes and thus, for the estimation of the analyte solution less correct statements could be made. In some cases there were even erroneous proposals about the composition and concentration of

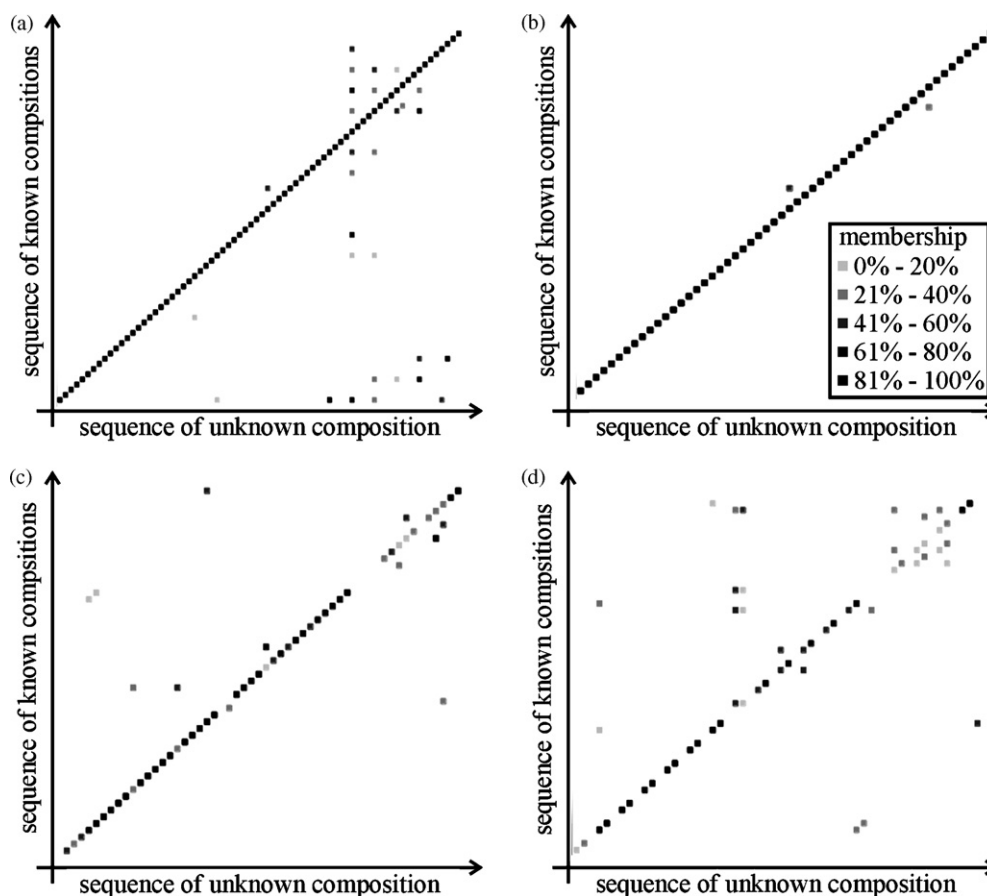


Fig. 8. Mathematical diagram of the prediction of potentiometric measurements in unknown heavy metal solution performed by the fuzzy logic program: (a) in unknown heavy metal solution with identical absolute potentials compared to calibration measurements; (b) in unknown heavy metal solution with identical absolute potentials compared to calibration measurements excluding heavy metal ion concentration of 10^{-6} mol/l; (c) in unknown heavy metal solution with an offset of 5 mV to the absolute potentials; (d) in unknown heavy metal solution with an offset of 10 mV to the absolute potentials.

the heavy metal solution (see Fig. 8d). Consequently, for the application of the developed fuzzy logic method it can be assumed that if the absolute input values of the unknown solutions differ less than ± 5 mV in comparison to the characteristic data used for calibration of the fuzzy program, a correct proposal about the composition and concentration of the heavy metal solution with a high probability is possible.

4. Conclusions

In this work, the development of a fuzzy logic method for analysis of combined signals from heavy metal chemical sensors has been demonstrated. The number of calibration data (database) for the fuzzy logic program could be minimised to 18 measurements for one- and two-component solutions of Ag^+ -, Pb^{2+} - and Cu^{2+} -ions and is expected to be 24 for application of this program for one-, two- and three-component heavy metal solutions. Potentiometric measurements in unknown single- and multi-component heavy metal solutions have validated the property of this AI/fuzzy logic method. The proposal of composition and concentration of heavy metal ions (Ag^+ -, Pb^{2+} - and Cu^{2+} -ions) in single- and two-component solutions have shown up to 80% hit rate when the measured absolute potentials in unknown solutions differ up to 5 mV from the absolute values of the respective calibration potentials. Thus, such a combination of miniaturised silicon-based chalcogenide glass sensors showing cross-sensitivities with combinatory analysis using fuzzy logic offers a relatively “simple” and fast approach towards

an electronic tongue-type sensor system for heavy metal detection in environmental and industrial analysis.

In future, the developed fuzzy logic program has to be validated by means of “real” unknown heavy metal solutions e.g., waste water analysis. Hereby, the sensed absolute potential values could vary more than ± 5 mV from the calibration values and therefore uncertain or false statements could result from the fuzzy logic program. Thus, an advancement of the artificial intelligence program should be considered. For a further increase of the prediction certainty of unknown multi-component solutions, more a priori knowledge in terms of sensor sensitivity and weighting factors for measured potentials of a certain concentration should be included. These additional factors might improve the correctness of proposals on the unknown compositions and allow an analysis not only predominantly based on absolute values. Additionally, the quantity of sensors could be slightly enhanced in order to explore the application of this electronic tongue arrangement towards real sample solutions for environmental and food analysis such as industrial waste water analysis or the analysis of luxury foodstuffs, like wine and juice towards their originality.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Federal Ministry for Education and Research (BMBF) within the project “SAFE”, “K2 Forschungsförderung”, the Ministry for Innovation, Science, Research, and Technology (MIWFT) of Nordrhein-Westfalen within the compe-

tence platform “Bioengineering” and PhD fellowship of FH Aachen for partial financial support.

References

- [1] S.G. Schäfer, B. Elsenhans, W. Forth, K. Schumann, in: M. Marquardt, S.G. Schäfer (Eds.), *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, 1997, p. 504.
- [2] M.J. Schöning, J.P. Klock, *Electroanalysis* 19 (2007) 2029.
- [3] T. Wagner, R. Molina, T. Yoshinobu, J.P. Klock, M. Biselli, M. Canzoneri, T. Schnitzler, M.J. Schöning, *Electrochim. Acta* 53 (2007) 305.
- [4] J.P. Klock, L. Moreno, A. Bratov, S. Huachupoma, J. Xu, T. Wagner, T. Yoshinobu, Y. Ermolenko, Y. Ermolenko, Y.G. Vlasov, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B* 118 (2006) 149.
- [5] J.P. Klock, Y.G. Mourzina, Y. Ermolenko, T. Doll, J. Schubert, M.J. Schöning, *Sensors* 4 (2004) 156.
- [6] J.P. Klock, Y.G. Mourzina, J. Schubert, M.J. Schöning, *Sensors* 2 (2002) 356.
- [7] Y.G. Mourzina, T. Yoshinobu, J. Schubert, H. Lüth, H. Iwasaki, M.J. Schöning, *Sens. Actuators B* 80 (2001) 136.
- [8] J. Schubert, M.J. Schöning, Y.G. Mourzina, A.V. Legin, Y.G. Vlasov, W. Zander, H. Lüth, *Sens. Actuators B* 76 (2001) 327.
- [9] Y.G. Vlasov, Y.G. Mourzina, A.V. Legin, Y.E. Ermolenko, J. Schubert, M.J. Schöning, H. Lüth, *Russ. J. Appl. Chem.* 75 (2001) 365.
- [10] Y.G. Mourzina, M.J. Schöning, J. Schubert, W. Zander, A.V. Legin, Y.G. Vlasov, H. Lüth, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 103.
- [11] M.J. Schöning, C. Schmidt, J. Schubert, W. Zander, S. Mesters, P. Kordos, H. Lüth, A.V. Legin, B. Seleznev, Y.G. Vlasov, *Sens. Actuators B* 68 (2000) 254.
- [12] Y.G. Mourzina, M.J. Schöning, J. Schubert, W. Zander, A.V. Legin, Y.G. Vlasov, P. Kordos, H. Lüth, *Sens. Actuators B* 71 (2000) 13.
- [13] A. Gutés, F. Céspedes, M. del Valle, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 90.
- [14] A.V. Legin, V.A. Babain, D.O. Kirsanov, O.V. Mednova, *Sens. Actuators B* 131 (2008) 29.
- [15] G. Verrelli, L. Francioso, R. Paolesse, P. Siciliano, D. di Natale, A. d'Amico, A. Logrieco, *Sens. Actuators B* 123 (2007) 191.
- [16] Y.G. Mourzina, J. Schubert, W. Zander, A.V. Legin, Y.G. Vlasov, H. Lüth, M.J. Schöning, *Electrochim. Acta* 47 (2001) 251.
- [17] Y.G. Vlasov, A.V. Legin, *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 255.
- [18] Y.G. Vlasov, A.V. Legin, A.M. Rudnitskaya, *Sens. Actuators B* 44 (1997) 532.
- [19] L. Moreno, J.P. Klock, M.J. Schöning, A. Baldi, A. Ipatov, A. Bratov, C. Jiménez-Jorquera, *Analyst* 133 (2008) 1440.
- [20] A. Ipatov, N. Abramova, A. Bratov, C. Domíquez, *Sens. Actuators B* 131 (2008) 48.
- [21] L. Moreno, A. Merlos, N. Abramova, C. Jiménez, A. Bratov, *Sens. Actuators B* 116 (2006) 130.
- [22] L. Lvova, R. Paolesse, C. di Natale, A. d'Amico, *Sens. Actuators B* 118 (2006) 439.
- [23] A.V. Legin, A.M. Rudnitskaya, Y.G. Vlasov, C. di Natale, E. Mazzone, A. d'Amico, *Electroanal.* 11 (1999) 814.
- [24] A.V. Legin, A.M. Rudnitskaya, Y.G. Vlasov, C. di Natale, A. d'Amico, *Sens. Actuators B* 58 (1999) 464.
- [25] K. Beullens, P. Mészáros, S. Vermeir, D. Kirsanov, A.V. Legin, S. Buysens, N. Cap, B.M. Nicolai, J. Lammertyn, *Sens. Actuators B* 131 (2008) 10.
- [26] L.A. Zadeh, *Inform. Control* 8 (1965) 338.
- [27] W. Heiden, J. Brickmann, *J. Mol. Graphics* 12 (1994) 106.
- [28] C.-T. Lin, C.S.G. Lee, *IEEE Trans. Comput.* 40 (1991) 1320.
- [29] H. Schildt, *Artificial Intelligence Using C*, McGraw-Hill, Berkeley, 1987.
- [30] H.-J. Zimmermann, *Fuzzy Set Theory and Its Applications*, Kluwer, Boston, 1991.
- [31] L.A. Zadeh, *The Concept of a Linguistic Variable and Its Application to Approximate Reasoning*, Memorandum ERL-M 411, Berkeley, 1973.
- [32] J. Watkinson, *Compression in Video and Audio*, Focal Press, London, 1995.
- [33] M.J. Schöning, Y.G. Mourzina, J. Schubert, W. Zander, A.V. Legin, Y.G. Vlasov, H. Lüth, *Electroanalysis* 13 (2001) 727.
- [34] J. Schubert, M.J. Schöning, C. Schmidt, M. Siegert, S. Mesters, W. Zander, P. Kordos, H. Lüth, A.V. Legin, Y.G. Mourzina, B. Seleznev, Y.G. Vlasov, *Appl. Phys. A* 69 (1999) 803.

Simultaneous detection of cyanide and heavy metals for environmental analysis by means of μ ISEs

Monika Turek^{1,2}, Wolfgang Heiden³, Sharon Guo^{1,2}, Alfred Riesen³, Jürgen Schubert², Willi Zander², Peter Krüger⁴, Michael Keusgen⁵, Michael J. Schöning^{*,1,2}

¹ Institute of Nano- and Biotechnologies, Aachen University of Applied Sciences, Ginsterweg 1, 52428 Jülich, Germany

² Institute of Bio- and Nanosystems, Research Centre Jülich GmbH, Leo-Brandt-Straße, 52425 Jülich, Germany

³ Bonn-Rhein-Sieg University of Applied Sciences, Grantham-Allee 20, 53757 Sankt Augustin, Germany

⁴ Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Pauwelsstraße. 30, 52074 Aachen, Germany

⁵ Institute for Pharmaceutical Chemistry, Philipps-University Marburg, Wilhelm-Roser-Straße 2, 35037 Marburg, Germany

Received ZZZ, revised ZZZ, accepted ZZZ

Published online ZZZ (Dates will be provided by the publisher.)

PACS 07.07.Df, 82.47.Rs, 07.88.+y, *92.40.qc, 07.05.Mh

* Michael J. Schöning: m.j.schoening@fz-juelich.de, Phone: +49 241 6009 53215, Fax: +49 241 6009 53235

In environmental analysis, cyanide and heavy metals play an important role, because these substances are highly toxic for biological systems. They can lead to chronic and acute diseases. Due to the chemical properties of cyanide it is frequently used for industrial processes such as extraction of silver and gold. Heavy metals can be found as trace elements in nature and are often applied in industries e.g., galvanisation processes. Up to now, cyanide and heavy metals can be detected by several sensors separately and their detection is often limited to laboratory investigations. In this publication, with regard to an in-situ analysis, a new miniaturised silicon-based sensor system for the simultaneous detection of cyanide and heavy metals in aqueous solutions is presented that is

based on chalcogenide glass-based micro ion-selective electrodes (μ ISEs). The μ ISEs are incorporated into a specially designed measuring system for the simultaneous detection of heavy metals and cyanide in solutions and validated by simultaneous measurements of Cu^{2+} - and CN^- -ions, Cd^{2+} - and CN^- -ions and Pb^{2+} - and CN^- -ions. The particular sensor system has shown good sensor properties in the μ -molar ion-concentration range. For simultaneous measurements in complex heavy metal and cyanide solutions an intelligent software using fuzzy logic is discussed.

Copyright line will be provided by the publisher

1 Introduction

In environmental monitoring, cyanide and heavy metals play an important role, because these substances are toxic for biological systems: Already a few mg cyanide/kg human weight (average lethal dose: 1.5 mg/kg human weight) can lead to death. Hereby, cyanide reversibly inhibits the enzyme cytochrome C oxidase, which is a key enzyme in the respiration cycle. This metabolic pathway triggers the synthesis of adenosine triphosphate (ATP), the chemical fuel of cells. Mostly, the nervous system, heart and lung are affected due to their high requirement of ATP and oxygen. Acute poisonings can occur in a few seconds to several hours. Cyanide occurs naturally in more than

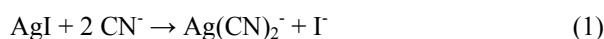
2,500 plants as cyanogenic glycoside or liposides e.g., in roots, stone fruits and bitter almonds. Furthermore, due to the relatively high affinity of cyanide to metal components and the chelating character it is frequently used for industrial processes such as the extraction of silver and gold, electroplating-, agricultural- and pharmaceutical industries. The maximum limit of cyanide in drinking water is 1.1 $\mu\text{mol/l}$ according to the world health organisation (WHO) [1-3].

Heavy metals, such as copper, cadmium and lead, can affect organs (e.g., liver and kidney) and block several enzymes in organs of the human body, which are responsible for essential biochemical processes. For example, in 1950

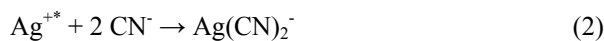
Copyright line will be provided by the publisher

cadmium in food and drinking water led to the “Itai-Itai” disease in Japan. Hereby, cadmium affected the kidney resulting in a decreased reabsorption of calcium and thus, in a deformation and destruction of bones. Heavy metals have already been used for hundreds of years by humans. Typical industrial application fields are metallic and electronic industries, galvanisation processes, fabrication of pigments and antimicrobial agents. The upper limit of heavy metals in drinking water lies between 0.012-11 $\mu\text{mol/l}$ (for Cu^{2+} -, Cd^{2+} - and Pb^{2+} -ions) according to the WHO [1, 4-6].

Up to now, cyanide and heavy metals can be detected by several sensors separately and their detection is often limited to laboratory investigations [7, 8]. A well-established and standardised method for cyanide detection in environmental analysis is based on the spectrophotometric detection of cyanide by means of the pyridine/barbituric acid reaction with prior diffusion or distillation treatment [9]. Commercially available sensors for cyanide determination in liquids are potentiometric sensors with cyanide-sensitive silver-halide membranes (e.g., AgI or $\text{AgI/Ag}_2\text{S}$). The mechanism of these electrodes is based on the complexation reaction of cyanide with silver-halides (Eqn. 1) resulting in a partial corrosive destruction of the membrane [10].



Due to the diffusion mechanism of CN^- , I^- and $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ in the membrane, the theoretically expected sensitivity corresponds to the Nernstian sensitivity of 59 mV/pCN at standard conditions. The Nernstian sensitivity describes the linear relation between the logarithm of ion activity (or ion concentration) and the sensor signal for potentiometric measurements. At standard conditions (25 °C) for monovalent and bivalent ions the sensitivity is 59,2 mV/decade and 29,6 mV/decade, respectively. Furthermore, potentiometric silver-based chalcogenide glass sensors for cyanide detection have been introduced [11]. The mechanism has been explained by W.E. Morf et al. by means of a complexation reaction between free interstitial Ag^{+*} -ions (Frenkel ions) in the solid membrane and CN^- -ions in the solution to silverdicyano-complexes (Eqn. 2). This is due to the low solubility constants of silver-chalcogenides [12].



The expected sensitivity hereby is a double-Nernstian sensitivity of 118 mV/pCN at standard conditions. Recently, M.T. Neshkova et al. have introduced miniaturised Ag-based chalcogenide glass electrodes for cyanide detection, which have been fabricated by electrochemical deposition [13, 14]. The advantages of such Ag-based chalcogenide glass electrodes are the high sensitivity and sufficient stability towards aggressive cyanide analyte solutions.

On the other hand, for the detection of heavy metals in environmental analysis, well-established and standardised methods are based on the simultaneous spectrophotometric determination of up to 20 different heavy metal ions. For

example, the atomic adsorption spectroscopy (AAS), or the atomic emission spectroscopy (AES) in combination with the inductively coupled plasma (ICP) method are applied [15]. Commercially available potentiometric sensors for the heavy metal detection in liquids utilise a particular chalcogenide glass membrane as sensitive membrane. Due to the modified surface layer, particular heavy metal ions in analyte solution dynamically interact with the heavy metal ions in the modified surface layer at the boundary “analyte/membrane”. This results in a change of the heavy metal ion concentration in the membrane, which is dependent on the ion concentration in the analyte solution, serving as sensor signal [16]. Recently, miniaturised heavy metal ion-selective electrodes (μISEs) have been introduced with thin-film chalcogenide glass membranes. Those sensors showed good stability in liquid media, high long-term stability in operation, low detection limit and compatibility to silicon technology [18, 19].

In this work, silicon-based chalcogenide glass μISEs have been applied for the simultaneous detection of cyanide and heavy metals in aqueous solutions for the first time. Physical and electrochemical investigations towards the homogeneity, morphology and topology as well as towards the intrinsic sensor properties, like sensitivity, response behavior and linear measuring range of such μISEs in cyanide and heavy metal analyte solutions will be performed. First measurements in a specifically designed, portable diffusion measuring cell for the simultaneous detection of different heavy metal ions, like Cu^{2+} -, Cd^{2+} -, Pb^{2+} -ions, and CN^- -ions will be presented and discussed.

2 Experimental

2.1 Fabrication of chalcogenide glass μISEs

For the detection of CN^- -ions Ag-based chalcogenide glass μISEs and for the detection of Cu^{2+} -, Cd^{2+} -, Pb^{2+} -ions Cu-, Cd- and Pb-based chalcogenide glass μISEs , respectively, have been fabricated by means of silicon- and thin-film planar technology. Each sensor is made of a p-doped Si layer (specific resistance $>1,000 \Omega\text{cm}$) with a 500 nm thick SiO_2 layer for electrical insulation and a metal contact consisting of 15 nm Ti, 30 nm Pt and 250 nm Au on the sensor substrate. In order to realise the particular miniaturised CN^- -, Cu-, Cd- and Pb-sensors, chalcogenide glass material systems of AgAsSeTe , CuAgAsSe , $\text{CdSAgAs}_2\text{S}_3$ and $\text{PbSAgAs}_2\text{S}_3$ have been used, respectively. The deposition of these chalcogenide glass materials in a thin-film state onto the substrates has been performed by means of pulsed laser deposition (PLD) technique. The sensing area is approximately 40 mm^2 . For more detailed information of sensor fabrication and PLD process, see [20-22].

2.2 Characterisation of single μISEs : Physical and electrochemical

The physical characterisation of the fabricated chalcogenide glass μISE has been performed by digital video-

microscopy (VHX-digital microscope, Z25/Z500, Keyence) and scanning electron microscopy (GEMINI 1550, Zeiss). Ion-selective potentiometry has been applied to investigate the electrochemical behaviour of the chalcogenide glass sensors in cyanide and heavy metal solutions. The measurement set-up includes the particular μ ISEs and a conventional double-liquid junction Ag/AgCl reference electrode, both immersed in the analyte solution and connected via a highly ohmic multimeter (2700, Keithley, 10 G Ω) to close the electrical circuit. The outer and inner electrolyte of the reference electrode is 0.1 mol/l KNO₃ and 0.1 mol/l KCl, respectively. As background solution for the investigation of cyanide and heavy metals 0.1 mol/l KNO₃, pH 11.5, and 0.1 mol/l KNO₃, pH 3, have been applied. 0.1 mol/l KCN in deionised water and 0.1 mol/l Cu(NO₃)₂, 0.1 mol/l Cd(NO₃)₂ and 0.1 mol/l Pb(NO₃)₂ in 0.1 M KNO₃, pH 3.0, have been prepared as stock solutions. The electrodes have been characterised in the particular background solution with cyanide or heavy metal ion concentration ranging from 0.1 μ mol/l to 1.1 mmol/l.

2.3 Simultaneous detection of heavy metals and cyanide: Measurement set-up and method

For the simultaneous detection of heavy metals and cyanide in liquids a specifically designed measuring cell has been developed. Fig. 1 shows a photo (with schematic of measuring set-up) of the measuring cell containing the two compartments (diameter 23 mm and height 50 mm), which are separated by a hydrophobic, gas-permeable membrane (TF-200, 47 mm, Pall Life Science).

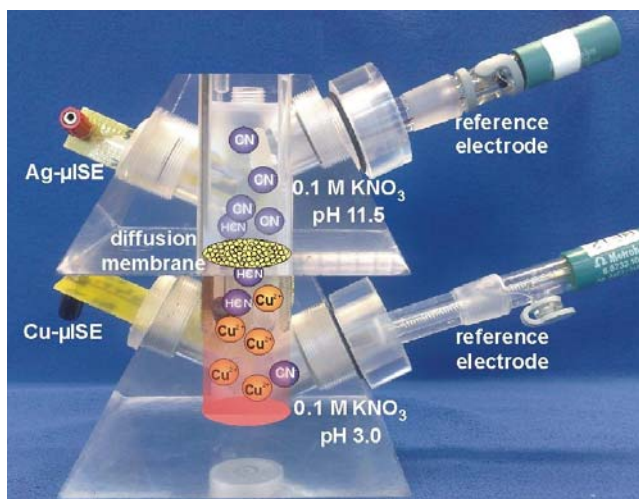


Figure 1 Photo of the measuring cell including a schematic of the measuring principle for the simultaneous detection of Cu²⁺- and CN⁻-ions.

For the simultaneous detection of heavy metals and cyanide, stock solutions (heavy metal and cyanide) have been added into the lower chamber. Heavy metal ions have been directly detected by means of the particular heavy metal μ ISE in the lower chamber. Furthermore, due to the

low pH value of the solution (pH 3.0), cyanide has been immediately converted into gaseous HCN ($pK_a = 9.31$), which has diffused through the gas-permeable membrane into the upper chamber. Due to the high pH value (pH 11.5) of the KNO₃ solution in the upper chamber, HCN has been changed back to CN⁻-ions and could be detected by means of the Ag-based chalcogenide glass μ ISE. During the measurement both solutions have been kept to 30 °C (boiling point of HCN is 26 °C) and stirred constantly by a miniaturised magnetic stirrer (not shown in Fig. 1).

3 Results and discussion

3.1 Characterisation of chalcogenide glass-based μ ISEs

Prior to the simultaneous detection of heavy metals and cyanide, the fabricated μ ISEs have been physically and electrochemically characterised. The physical investigation of the chalcogenide glass-based μ ISEs has been done by means of digital microscopy and SEM to study the homogeneity, morphology and topology of the sensitive thin-film chalcogenide glass membrane. Fig. 2 exemplarily shows a digital microscopy (a) and SEM (b) picture of the Ag-based μ ISE for cyanide detection. The sensor surface is very homogeneous, which is indicated by the same colour of the membrane in Fig. 2 (a). The distribution of so-called droplets (see Fig. 2 (b)) on the sensor surface is typical for the applied PLD process, but does not negatively affect the electrochemical sensor properties of these electrodes. Furthermore, the sensor membrane is completely dense and closed even at high resolutions. Both aspects are crucial for a defined and good functionality of the chalcogenide glass-based μ ISEs. Similar results have been observed for the Cu-, Cd- and Pb- μ ISEs.

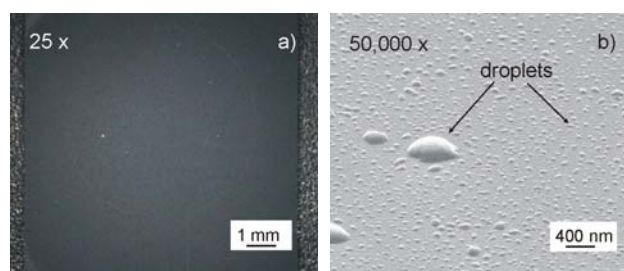


Figure 2 Digital microscopy (a) and scanning electron microscopy (b) picture of the Ag- μ ISE for CN⁻-ion detection.

In order to examine the intrinsic properties of the sensors, like sensitivity, response behaviour, linear measuring range and detection limit, electrochemical characterisation has been performed by means of ion-selective potentiometry. The Ag-based μ ISE and the Cu-, Cd- and Pb- μ ISEs have been investigated in cyanide and heavy metal solutions, respectively. Fig. 3 presents typical measurement curves of the Ag-, Cu-, Cd- and Pb- μ ISEs in CN⁻, Cu²⁺, Cd²⁺- and Pb²⁺-ion solutions. Cyanide measurements have been performed at pH 11.5 and measurements with heavy

metal ions have been done at pH 3.0 due to the chemical properties (solubility, ionic form) of these components. As shown in Fig. 3, the response signal of the Ag- μ ISE towards CN^- -ions in solution was decreasing with increasing CN^- -ion concentration. The resulted sensitivity was 100 mV/pCN in the cyanide concentration range between 1.1 $\mu\text{mol/l}$ to 1.1 mmol/l and the lower detection limit was 0.5 $\mu\text{mol/l}$ cyanide. The obtained values correspond well with the sensor properties of chalcogenide glass-based μ ISEs with similar membrane composition from the literature; M.T. Neshkova et al. obtained an average sensitivity of 101 mV/pCN in the concentration range of 5 $\mu\text{mol/l}$ to 1 mmol/l cyanide with a thin-film sensor of Ag-Se-Te membrane composition [13]. The calibration measurements of the heavy metal μ ISE resulted in a fast and stable, increasing sensor response with increasing heavy metal ion concentration. The sensitivities of the Cu-, Cd- and Pb- μ ISE were 28 mV/pCu, 20 mV/pCd and 23 mV/pPb, respectively. The lower detection limits for the Cu- μ ISE, Cd- μ ISE and Pb- μ ISE were 0.2 $\mu\text{mol/l}$, 3.8 $\mu\text{mol/l}$ and 5 $\mu\text{mol/l}$, respectively. The response time ($t_{90\%}$) was less than 30 s for all investigated μ ISEs. The obtained results from the calibration measurements of the heavy metal μ ISEs correspond well with data in literature [17]. Furthermore, it is in good agreement with the theoretically expected half-Nernstian sensitivity of 29.6 mV/decade for divalent ions. The intrinsic parameters of the μ ISEs are summarised in Tab. 1.

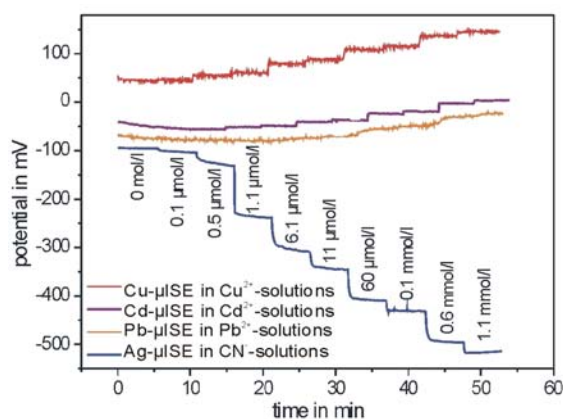


Figure 3 Calibration measurements of the Cu-, Cd- and Pb- μ ISE in the particular heavy metal ion solution and of the Ag- μ ISE in the CN^- -ion solution.

Table 1 Summary of the intrinsic sensor parameters.

	Ag- μ ISE	Cu- μ ISE	Cd- μ ISE	Pb- μ ISE
sensitivity in mV/dec.	100	28	20	23
lower detection limit in $\mu\text{mol/l}$	0.5	0.2	3.8	5
linear range in $\mu\text{mol/l}$	1.1-1,100	0.5-1,100	1.1-1,100	1.1-1,100

3.2 Simultaneous detection of heavy metals and cyanide

The presented chalcogenide glass μ ISEs have been applied to the measuring system for the simultaneous detection of heavy metals and cyanide. The measuring procedure and corresponding evaluations will be presented exemplarily by means of the simultaneous detection of Cu^{2+} - and CN^- -ions with a Cu- μ ISE and an Ag- μ ISE, respectively. Fig. 4 shows the measurement curves and Fig. 5 the corresponding calibration graphs.

For simultaneous measurements, a stock solution of the respective heavy metal and cyanide are added into the background solution in the lower chamber of the measuring cell. Here, in the first step, eight times 50 μl of Cu^{2+} -ion stock (and diluted stock) solution have been added. In the second step, for the simultaneous measurement of Cu^{2+} - and CN^- -ions at a fixed Cu^{2+} -ion concentration, stepwise a particular amount of cyanide stock (and diluted stock) solution have been added. The resulted concentration range for Cu^{2+} - and CN^- -ions has been from 2 $\mu\text{mol/l}$ to 87 $\mu\text{mol/l}$ and from 2 $\mu\text{mol/l}$ to 85 $\mu\text{mol/l}$, respectively.

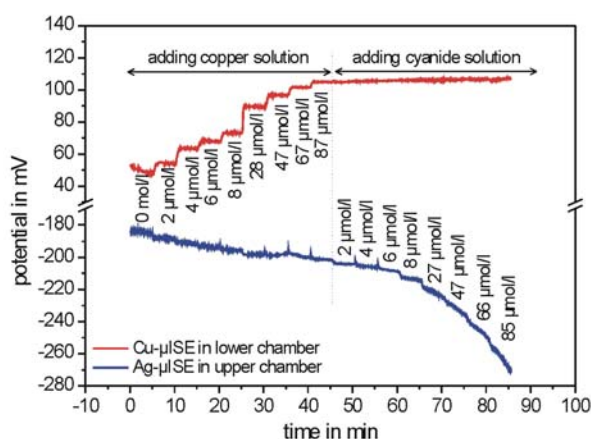


Figure 4 Measurement curves for simultaneous determination of Cu^{2+} - and CN^- -ions.

With increasing concentration of Cu^{2+} -ions the response signal of the Cu- μ ISE increased with fast and stable steps, while the sensor signal of the Ag- μ ISE in the upper part of the measuring cell remained nearly constant. At Cu^{2+} -ion concentration of 87 $\mu\text{mol/l}$, different CN^- -ion concentrations have been added into the lower chamber. Due to the low pH value of the background solution in this chamber and the applied temperature, cyanide as HCN diffused into the upper chamber, where CN^- -ions could be detected by means of the Ag- μ ISE. Therefore, with increasing cyanide concentration in the lower chamber the sensor response of the Ag- μ ISE in the upper chamber of this diffusion measuring cell was decreasing. At a CN^- -ion concentration up to 8 $\mu\text{mol/l}$ the sensor response was fast and stable. Due to longer diffusion times at higher cyanide concentrations the response time shifted to higher values. The sensor signal from the Cu- μ ISE remained constant.

That means that the Cu- μ ISE was not affected by CN^- -ions in the test sample at the utilised cyanide concentrations.

The linear measuring range and sensitivity of the μ ISEs for the applied simultaneous measurement of the heavy metal and cyanide could be achieved from the corresponding calibration curves. As can be seen in Fig. 5, the Cu- μ ISE showed in the whole applied Cu^{2+} -ion concentration range a linear behaviour with a slope of 31 mV/pCu. This is in good agreement with the theoretically expected value and with the achieved values from the calibration measurement (Fig. 3). In the CN^- -ion concentration range from 2 $\mu\text{mol/l}$ to 27 $\mu\text{mol/l}$, the Ag- μ ISE resulted in a sensitivity of 24 mV/pCN and for higher concentrations a slope of 130 mV/pCN was observed. The decreased sensitivity for very small cyanide concentrations could be explained by means of possible complexation reactions between the copper and cyanide ions, before CN^- -ions were converted to HCN in the lower chamber of the measuring cell. Copper cyanide complexes, like $\text{Cu}(\text{CN})_2^-$, $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$ and $\text{Cu}(\text{CN})_4^{3-}$ with stability constants (K_S) of $10^{20.5}$ (mol/l^{-2}), $10^{21.4}$ (mol/l^{-3}) and $10^{20.8}$ (mol/l^{-4}), respectively, might be formed [23, 24]. Cyanide from these complexes was not available to diffuse into the upper chamber and thus, the real CN^- -ion concentration in the upper chamber was smaller than the defined ion concentration in the lower chamber. For higher cyanide concentrations, the obtained sensitivity fits well with the theoretically expected sensitivity for Ag-based chalcogenide glass sensors for cyanide detection of 118 mV/pCN.

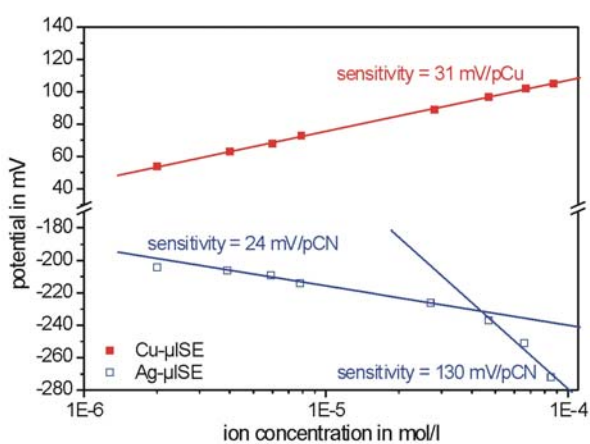


Figure 5 Calibration curves for simultaneous determination of Cu^{2+} - and CN^- -ions.

Table 2 Summary of the intrinsic sensor parameters of the μ ISEs for simultaneous detection of cyanide and heavy metals.

	Ag- μ ISE	Cu- μ ISE	Cd- μ ISE	Pb- μ ISE
sensitivity in mV/dec.	117	31	15	17
linear range in $\mu\text{mol/l}$	47-85	2-87	2-87	2-87

Furthermore, the simultaneous detection of Cd^{2+} - and CN^- -ions and Pb^{2+} - and CN^- -ions has been performed. Therefore, the same measuring procedure as presented for the simultaneous measurement of Cu^{2+} - and CN^- -ions has been applied. The comparison of the calibration curves from simultaneous detection of Cu^{2+} - and CN^- -ions, Cd^{2+} - and CN^- -ions, and Pb^{2+} - and CN^- -ions is shown in Fig. 6. The sensitivity of the Cu-, Cd- and Pb- μ ISE towards the respective heavy metal ions was 31 mV/pCu, 15 mV/pCd and 17 mV/pPb. For cyanide concentrations higher than 27 $\mu\text{mol/l}$, the Ag- μ ISE showed similar response behaviour for all three different simultaneous measurements of heavy metals and cyanide with an average sensitivity of 117 mV/pCN. This corresponds very well to the theoretically expected sensitivity value for Ag-chalcogenide glass based sensors for cyanide detection of 118 mV/pCN. At lower cyanide concentrations, the obtained slopes of the Ag- μ ISE were 24 mV/pCN, 16 mV/pCN and 14 mV/pCN for simultaneous measurements of Cu^{2+} - and CN^- -ions, Cd^{2+} - and CN^- -ions and Pb^{2+} - and CN^- -ions, respectively. The differences in the sensor behaviour at low cyanide concentrations may be explained by means of different heavy metal cyanide complexation reactions to e.g., $\text{Cd}(\text{CN})_2$ ($K_S = 10^{11.2}$ (mol/l^{-2})) or $\text{Pb}(\text{CN})_4^{2-}$ ($K_S = 10^{42.4}$ (mol/l^{-4})) [24]. However, further investigations are necessary for the complete understanding of this mechanism.

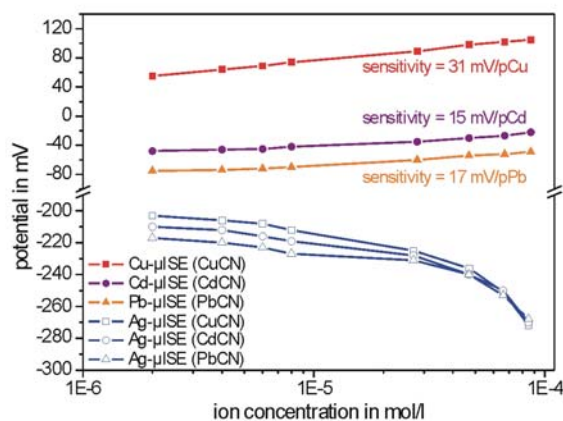


Figure 6 Comparison between calibration curves from simultaneous measurements of Cu^{2+} - and CN^- -ions, Cd^{2+} - and CN^- -ions, and Pb^{2+} - and CN^- -ions.

3.3 Fuzzy logic for simultaneous measurements of different heavy metal ions

In multi-component solutions potentiometric chalcogenide glass chemical sensors show cross-sensitivities towards other/interfering ions in the test sample due to the nature of the complex sensing material. Based on cross-sensitivities of chemical sensors in combination with intelligent data analysis software, different electronic tongues for the detection of e.g., heavy metals [25], different kinds of wines [26], beverages [27] and even tomatoes [28], have been developed. However, such electronic tongues consist

of either pattern or complex recognition tools. These tools may be artificial neuronal networks (ANN), principal component analysis (PCA), partial least squares regression (PLS) and soft-independent modeling of class analogy (SIMCA). Such electronic tongues usually include a huge number of sensors resulting in a complex, time-consuming and laborious calibration. Therefore, another approach has been followed for a combined analysis of heavy metal sensor data. Fuzzy logic as intelligent data recognition software can offer a relatively “simple” and fast approach for qualitative and quantitative detection of multi-component heavy metal solutions. Fuzzy logic, with the concept of “*linguistic variables*” in particular has been developed as a means to mimic human decision processes by mathematical structures and procedures [29, 30]. It is based on *fuzzy sets* as a generalisation of the classical set theory, associating each variable with a corresponding *membership function* value, which depicts a degree of membership to the fuzzy set. *Linguistic variables* are groups of fuzzy sets with (partially) overlapping membership functions over a common (crisp) basic variable. *Linguistic variables* have been used for segmentation of molecular surfaces by means of several physicochemical parameters [31].

Linguistic variables are formed linking sensor data with type and concentration of components in an aqueous solution by generating membership functions from the calibration curves of the different sensors according to the solution components that influence these sensors. The composition of unknown multi-component solutions can then be analysed with good accuracy by a simple *fuzzy inference* procedure [32]. For a combinatory approach, calibration curves for each sensor are generated with a set of solutions of known composition and concentration, resulting in a set of characteristic curves for each measurable component as related to a particular sensor. Fuzzy sets are calculated for each sensor from the intersection of a constant mean potential measured in a solution of unknown composition and concentration with the sensor’s characteristic curves. The fuzzy sets for all sensors are then integrated in a *linguistic variable*, where a fuzzy intersection operator (fuzzy AND connective) constitutes a membership function for the unknown solution to each of the known solutions used for calibration. Finally, through an analysis of all *linguistic variables* a likely conclusion on the composition of the unknown heavy metal solution can be made. The most likely composition is the *linguistic variable* with the highest membership value of its fuzzy AND connective membership function. Fig. 7 illustrates this procedure with measurement of a two-component solution of unknown types and concentration of heavy metal ions (as published in [32]). The example was taken from a set of measurements not used for calibration of the system.

The procedure could be shown to work well with single- and two-component solutions of heavy metal ions. Examinations of multi-component solutions are in progress. In order to investigate multi-component heavy metal solutions containing cyanide ions, the already developed fuzzy

logic algorithm] can be applied to the presented simultaneous detection of heavy metals and cyanide as a relatively “simple” evaluation tool.

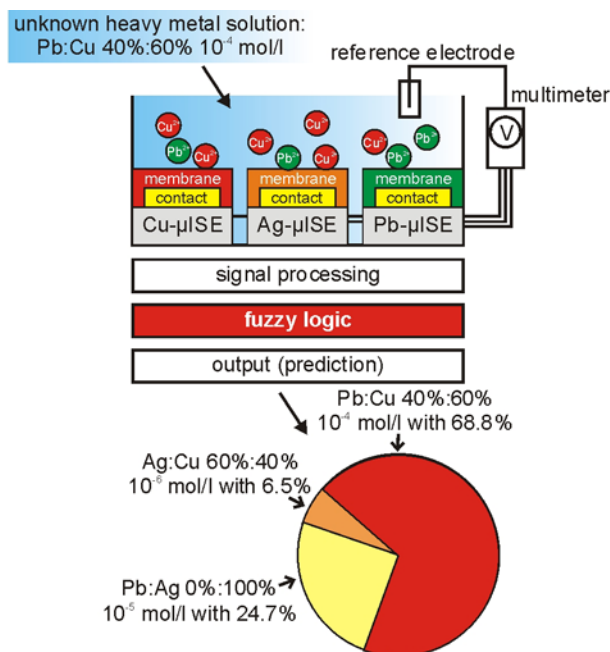


Figure 7 Schematic of determination of an unknown heavy metal solution by means of fuzzy logic and a chalcogenide glass sensor array.

4 Conclusions

Miniaturised ISEs on the basis of chalcogenide glass materials have been applied for the simultaneous detection of heavy metals and cyanide. Prior to the simultaneous determination of heavy metals and cyanide, electrochemical investigations in Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} -ion solutions and CN^- -ion solution with a Cu-, Cd-, Pb- and Ag- μ ISE, respectively, have resulted in good sensor properties in a concentration range over three decades. The Cu- μ ISE and Ag- μ ISE have presented lower detection limits of 0.2 $\mu\text{mol/l}$ copper and 0.5 $\mu\text{mol/l}$ cyanide ions, respectively, which are even lower than the upper limits of such toxic components in drinking water of 11 $\mu\text{mol/l}$ copper and 1.1 $\mu\text{mol/l}$ cyanide ions defined by the WHO. Simultaneous measurements of heavy metals and cyanide in liquids have been performed in a specially designed, portable measuring system. This system consists of two chambers which are separated by a diffusion membrane. The functionality of this measuring system has been proven and validated by means of simultaneous measurements of Cu^{2+} - and CN^- -ions, Cd^{2+} - and CN^- -ions, and by Pb^{2+} - and CN^- -ions for different ion concentrations in the μ -molar concentration range.

Future work will deal with both “following” fuzzy logic data processing for the simultaneous multi-heavy metal analysis together with cyanide detection and exten-

sion of the μ ISEs to sensor array arrangements. Here, different field-effect-based sensor platforms such as capacitive electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) structures [33], light-addressable potentiometric sensors (LAPS) [34] or ion-sensitive field-effect transistors (ISFETs) [35] can advantageously combine the chemical recognition (receptor) layer together with a first-stage microelectronic processing on the same chip. Moreover, alternative and highly long-term stable gate insulator materials, like Ta_2O_5 or Al_2O_3 [36, 37], might allow to improve the sensor's behaviour with regard to drift in the short as well as the long-term scale.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the Federal Ministry for Education and Research (BMBF) within the project "SAFE", "K2 Forschungsförderung" and the PhD fellowship of FH Aachen for partial financial support.

References

- [1] H. Marquardt, S. G. Schäfer, Lehrbuch der Toxikologie (Spektrum Akademischer Verl., Heidelberg Berlin, 1997).
- [2] D. A. Jones, *Phytochemistry* **47**, 155 (1998).
- [3] WHO/SDE/WSH/07.01/2, Cyanide in drinking-water (2007).
- [4] WHO/SDE/WSH/03.04/88, Copper in drinking-water (2004).
- [5] WHO/SDE/WSH/03.04/09, Lead in drinking-water (2003).
- [6] WHO/SDE/WSH/03.04/80, Cadmium in drinking-water (2004).
- [7] K. K. W. Mak and R. Renneberg, *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2581 (2005).
- [8] N. Jaffrezic-Renault and S. V. Dzyadevych, *Sensors* **8**, 2569 (2008).
- [9] EN ISO 14403:2002 (D), Bestimmung von Gesamtcyanid und freiem Cyanid mit der kontinuierlichen Fließanalytik.
- [10] J. Koryta, *Anal. Chim. Acta* **61**, 329 (1972).
- [11] J. Koryta, *Anal. Chim. Acta* **91**, 1 (1977).
- [12] E. W. Morf, G. Kahr, and W. Simon, *Anal. Chem.* **46**, 1538 (1974).
- [13] A. R. Surleva, V. D. Nikolova, and M. T. Neshkova, *Anal. Chim. Acta* **583**, 174 (2007).
- [14] A. R. Surleva and M. T. Neshkova, *Talanta* **76**, 914 (2008).
- [15] T. R. Crompton, *Analysis of Seawater* (Springer Verl., Heidelberg Berlin, 2006).
- [16] Y. G. Vlasov, E. A. Bychkov, and A. M. Medvedev, *Anal. Chim. Acta* **185**, 137 (1986).
- [17] M. J. Schöning and J. P. Kloock, *Electroanal.* **19**, 2029 (2007).
- [18] J. P. Kloock, L. Moreno, A. Bratov, S. Huachupoma, J. Xu, T. Wagner, T. Yoshinobu, Y. Ermolenko, Y. G. Vlasov, and M. J. Schöning, *Sens. Actuators B* **118**, 149 (2006).
- [19] J. P. Kloock, Y. G. Mourzina, Y. Ermolenko, T. Doll, J. Schubert, and M. J. Schöning, *Sensors* **4**, 156 (2004).
- [20] M. J. Schöning, Y. G. Mourzina, J. Schubert, W. Zander, A. V. Legin, Y. G. Vlasov, and H. Lüth, *Electroanal.* **13**, 727 (2001).
- [21] Y. G. Mourzina, M. J. Schöning, J. Schubert, W. Zander, A. V. Legin, Y. G. Vlasov, and H. Lüth, *Anal. Chim. Acta* **433**, 103 (2001).
- [22] J. P. Kloock, Y. G. Mourzina, J. Schubert, and M. J. Schöning, *Sensors* **2**, 356 (2002).
- [23] X. -H. Wang and K. S. E. Forssberg, *Mat. Eng.* **9**, 527 (1996).
- [24] R. M. Smith and A. E. Martell, *Critical stability constants* (New York, Plenum Press, 1989).
- [25] Y. Vlasov and A. Legin, *Fresenius J. Anal. Chem.* **361**, 255 (1998).
- [26] L. Moreno, J. P. Kloock, M. J. Schöning, A. Baldi, A. Ipatov, A. Bratov, and C. Jiménez-Jorquera, *Analyst* **133**, 1440 (2008).
- [27] L. Lvova, R. Paolesse, C. di Natale, and A. d'Amico, *Sens. Actuators B* **118**, 439 (2006).
- [28] K. Beullens, P. Mészáros, S. Vermeir, D. Kirsanov, A. V. Legin, S. Buysens, N. Cap, B. M. Nicolai, and J. Lamertyn, *Sens. Actuators B* **131**, 10 (2008).
- [29] L. A. Zadeh, The concept of a linguistic variable and its application to approximate reasoning (Memorandum ERL-M 411, Berkeley, 1973).
- [30] H. -J. Zimmermann, *Fuzzy set theory - and its applications* (Kluwer, Boston, 1991).
- [31] W. Heiden and J. Brickmann, *J. Mol. Graphics* **12**, 106 (1994).
- [32] M. Turek, W. Heiden, A. Riesen, T. A. Chhabda, J. Schubert, W. Zander, P. Krüger, and M. J. Schöning, *Electrochim. Acta* **54**, 6082 (2009).
- [33] M. J. Schöning and A. Poghossian, *Electroanal.* **18**, 1893 (2006).
- [34] T. Wagner, R. Molina, T. Yoshinobu, J. P. Kloock, M. Bisselli, M. Canzoneri, T. Schnitzler, and M. J. Schöning, *Electrochim. Acta* **53**, 305 (2007).
- [35] A. Poghossian, H. Lüth, J. W. Schultze, and M. J. Schöning, *Electrochim. Acta* **47**, 243 (2001).
- [36] M. J. Schöning, D. Brinkmann, D. Rolka, C. Demuth, and A. Poghossian, *Sens. Actuators B* **111-112**, 423 (2005).
- [37] M. J. Schöning, D. Tsarouchas, L. Beckers, J. Schubert, W. Zander, P. Kordos, and H. Lüth, *Sens. Actuators B* **35**, 228 (1996).

Literaturverzeichnis

- 1 DVGW: *Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung* vom 21. Mai 2001
- 2 Kölle, W.: *Wasseranalysen – richtig beurteilt. Grundlagen, Parameter, Wassertypen, Inhaltsstoffe, Grenzwerte nach Trinkwasserverordnung und EU-Trinkwasserrichtlinie*. Wiley-VCH, Weinheim-New York-Chichester-Singapore-Toronto, 2001
- 3 Schöning, M.J.; Kloock, J.P.: About 20 years of silicon-based thin-film sensors with chalcogenide glass materials for heavy metal analysis: technological aspects of fabrication and minaturization. *Electroanalytica* 19 (2007), S. 2029-2038
- 4 *Toxicological profile for cyanide*. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxid Substances and Disease Registry, 2006
- 5 Marquardt, H.; Schäfer, S.G.: *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 1997
- 6 Akcil, A.: Managing cyanide: health, safety and risk management practices at Turkey's ovacik gold-silver mine. *Journal of Cleaner Production* 14 (2006), S. 727-735
- 7 Barlen, B.; Mazumdar, S.D.; Lezrich, O.; Kämpfer, P.; Keusgen, M.: Detection of salmonella by surface plasmon resonance. *Sensors* 7 (2007), S. 1427-1446
- 8 Meyer, M.H.F.; Krause, H.-J.; Hartmann, M.; Miethe, P.; Oster, J.; Keusgen, M.: Francisella tularensis detection using magnetic lables and a magnetic biosensor based on frequency mixing. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (2007), S. 259-263
- 9 Keusgen, M.; Jünger, M.; Krest, I.; Schöning, M.J.: Biosensoric detection of the cysteine sulphoxide alliin. *Sensors and Actuators B* 95 (2003), S. 297-302
- 10 Beging, S.; Mlynek, D.; Hataihimakul, S.; Poghossian, A.; Baldsiefen, G.; Busch, H.; Laube, N.; Kleinen, L.; Schöning, M.J.: Field effect calcium sensor for the determination of the risk of urinary stone formation. *Sensors and Actuators B*, DOI: 10.1016/j.snb.2008.12.012
- 11 Wagner, T.; Molina, R.; Yoshinobu, T.; Kloock, J.P.; Biselli, M.; Canzoneri, M.; Schnitzler, T.; Schöning, M.J.: Handheld multi-channel LAPS device as a transducer platform for possible biological and chemical multi-sensor applications. *Electrochimica Acta* 53 (2007), S. 305-311
- 12 Gey, M.H.: *Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen. Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2008
- 13 EN ISO 14403: *Bestimmung von Gesamtcyanid und freiem Cyanid mit der kontinuierlichen Fließanalytik*. 2002
- 14 Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F.: Chemical sensors: definition and classification. *Pure and Applied Chemistry* 63 (1991), S. 1247-1250
- 15 Thevenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. *Pure and Applied Chemistry* 71 (1999), S. 2333-2348
- 16 Grattarola, M.; Massobrio, G.: *Bioelectronics handbook: MOSFETs, biosensors and neurons*. McGraw-Hill, New York, 1998
- 17 Scheller, F.; Schubert, F.: *Biosensoren*. Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 1989

- 18 Buerk, D.G.: *Biosensors. Theory and applications*. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster Basel, 1993
- 19 Gründler, P.: *Chemische Sensoren*. Springer-Verlag, Berlin, 2004
- 20 WHO/SDE/WSH/07.01/2: Cyanide in drinking-water. Background document for development of WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. (2007)
- 21 Guidotti, T.: Acute cyanide poisoning in prehospital care: new challenges, new tools for intervention. *Prehospital and Disaster Medicine* 21 (2006), S. 40-48
- 22 Landesweltamt Nordrhein-Westfalen: Mobilität und Mobilisierbarkeit von eisenkomplexierten Cyaniden. *Materialien zur Altlastensanierung und zum Bodenschutz (MALBO)* 16, S. 17-43
- 23 Whelton, A.J.; Jensen, J.L.; Richards, T.E.; Valdivia, R.M.: The cyanic threat to potable water. *Proceeding in American Water Works Association (AWWA) Annual Conference and Exposition*, 15-19.06.2003
- 24 *Toxicological profile for cyanide*. U.S. Department of health and human services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997
- 25 Jones, D.A.: Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* 47 (1997), S. 155-162
- 26 Santana, M.A.; Vásquez, V.; Matehus, J.; Aldao, R.R.: Linamarase expression in cassava cultivars with roots of low- and high-cyanide content. *Plant Physiology* 129 (2002), S. 1686-1694
- 27 Yeoh, H.-H.: Monitoring the cyanogenic potential of cassava: the trend towards biosensor development. *Trends in Analytical Chemistry* 17 (1998), S. 234-240
- 28 Keusgen, M.: Biosensors: new approach in drug discovery. *Naturwissenschaften* 89 (2002), S. 433-444
- 29 Mudder, T.I.; Botz, M.: A global perspective of cyanide. *UNEP/ICME Industry Codes of Practice Workshop: Cyanide Management Paris*, 26.-27.05.2000
- 30 Friedrich, M.: Glänzende Geschäfte mit schmutzigen Folgen. *Greenpeace Magazin* 3.00
- 31 Dudde, L.: Vom Goldrausch in die Katerstimmung. *Greenpeace Magazin* 5.98
- 32 Mak, K.K.W.; Yanase, H.; Renneberg, R.: Cyanide fishing and cyanide detection in coral reef fish using chemical tests and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005), S. 2581-2593
- 33 Von Tümppling, W.: Schäden durch Cyanide im Flusswasser. *Chemie* 4 (2006), S. 67-67
- 34 Chen, S.J.; Hovde, C.; Peterson, K.A.; Marshall, A.: Fire detection using smoke and gas sensors. *Fire Safty Journal* 161 (2007), S. 1-32
- 35 Eckstein, M.: Enhancing public health preparedness for a terrorist attack involving cyanide. *The Journal of Emergency Medicine* 35 (2008), S. 59-65
- 36 Young, C.A.; Jordan, T.S.: Cyanide remediation: current and past technologies. *Proceeding in 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research*, 23.-24.05.1995
- 37 Luque-Almagro, V.M.; Huertas, M.-J.; Martinez-Luque, M.; Moreno-Vivian, C.; Roldan, M.D.; Garcia-Gil, L.J.; Castillo, F.; Blasco, R.: Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005), S. 940-947
- 38 Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 330/32: *Richtlinie 98/83/EG des Rates vom 3. November 1998 über Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch*

- 39 Cipollone, R.; Ascenzi, P.; Frangipani, E.; Visca, P.: Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. *Chemosphere* 63 (2006), S. 942-949
- 40 Chen, C.Y.; Kao, C.M.; Chen, S.C.: Application of klebsiella oxytoca immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater. *Chemosphere* 71 (2008), S. 133-139
- 41 Barclay, M.; Tett, V.A.; Knowles, C.J.: Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by fusarium solani under neutral and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 23 (1998), S. 321-330
- 42 Sangave, P.C.; Pandit, A.B.: Enhancement in biodegradability of distillery wastewater using enzymatic pretreatment. *Journal of Environmental Management* 78 (2006), S. 77-85
- 43 Strubelt, O.: *Gifte in Natur und Umwelt. Pestizide und Schwermetalle, Arzneimittel und Drogen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford, 1996
- 44 WHO/SDE/WSH/03.04./09 Lead in drinking-water. Background document for development of WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. (2003)
- 45 WHO/SDE/WSH/03.04./80 Cadmium in drinking-water. Background document for development of WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. (2004)
- 46 WHO/SDE/WSH/03.04./88 Copper in drinking-water. Background document for development of WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. (2004)
- 47 Ein Meer auf der Kippe. *Greenpeace Magazin* 4.06
- 48 Hösch, A.: Gift aus der Apotheke. *Greenpeace Magazin* 4.04
- 49 Lee, J.M.; Karube, I.: A novel microbial sensor for the determination of cyanide. *Analytica Chimica Acta* 313 (1995), S. 69-74
- 50 Lee, J.M.; Karube, I.: Reactor type sensor for cyanide using an immobilized microorganism. *Electroanalysis* 8 (1996), S. 1117-1120
- 51 Lee, J.M.; Karube, I.: Development of a biosensor for gaseous cyanide in solution. *Biosensors and Bioelectronics* 11 (1996), S. 1147-1154
- 52 Ikebukuro, K.; Miyata, A.; Cho, S.J.; Nomura, Y.; Chang, S.M.; Yamauchi, Y.; Hasebe, Y.; Uchiyama, S.; Karube, I.: Microbial cyanide sensor for monitoring river water. *Journal of Biotechnology* 48 (1996), S. 73-80
- 53 Filipovic-Kovacevic, Z.; Miksaj, M.; Salamon, D.: Cyanide determination in fruit brandies by an amperometric biosensor with immobilised aaccharomyces cerevisiae. *European Food Research and Technology* 215 (2002), S. 347-352
- 54 Albery, W.J.; Cass, A.E.G.; Shu, Z.X.: Inhibited enzyme electrodes. Part 2. The kinetics of the cytochrome oxidase system. *Biosensors and Bioelectronics* 5 (1990), S. 379-395
- 55 Amine, A.; Alfandy, M.; Kauffmann, J.-M.; Pekli, M.N.: Cyanide determination using an amperometric biosensor based on cytochrome oxidase inhibition. *Analytical Chemistry* 67 (1995), S. 2822-2827
- 56 Shan, D.; Mousty, C.; Cosnier, S.: Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Analytical Chemistry* 76 (2004), S. 178-183
- 57 Shan, D.; Cosnier, S.; Mousty, C.: HRP/(Zn-Cr-ABTS) redox clay-based biosensor: design and optimization for cyanide detection. *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004), S. 390-396

- 58 Mousty, C.; Vieille, L.; Cosnier, S.: Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: a reagentless amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007), S. 1733-1738
- 59 Smit, M.H.; Cass, A.E.: Cyanide detection using a substrate-regenerating, peroxidase-based biosensor. *Analytical Chemistry* 62 (1990), S. 2429-2436
- 60 Tatsuma, T.; Oyama, N.: Monitoring the cyanogenic potential of cassava: the trend towards biosensor development. *Trends in Analytical Chemistry* 17 (1998), S. 234-240
- 61 Volotovskiy, V.; Kim, N.: Cyanide determination by an ISFET-based peroxidase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 13 (1998), S. 1029-1033
- 62 Besombes, J.-L.; Cosnier, S.; Reverdy, L.; Reverdy, G.: A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta* 311 (1995), S. 255-263
- 63 Groom, C.A.; Luong, J.H.T.: A flow through analysis biosensor system for cyanide. *Journal of Biotechnology* 21 (1991), S. 161-171
- 64 Ikebukuro, K.; Shimomura, M.; Onuma, N.; Watanabe, A.; Nomura, Y.; Nakanishi, K.; Arikawa, Y.; Karube, I.: A novel biosensor system for cyanide based on a chemiluminescence reaction. *Analytica Chimica Acta* 329 (1996), S. 111-116
- 65 Cipollone, R.; Ascenzi, P.; Frangipani, E.; Visca, P.: Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. *Chemosphere* 63 (2006), S. 942-949
- 66 Mattiasson, B.; Mosbach, K.; Svenson, A.: Application of cyanide-metabolizing enzymes to environmental control; enzyme thermistor assay of cyanide using immobilized rhodanese and injectase. *Biotechnology and Bioengineering* 19 (2004), S. 1643-1651
- 67 Merkoci, A.; Braga, S.; Fabregas, E.; Alegret, S.: A potentiometric biosensor for d-amygdalin based on a consolidated bio composite membrane. *Analytica Chimica Acta* 391 (1999), S. 65-72
- 68 Watanabe, A.; Yano, K.; Ikebukuro, K.; Karube, I.: Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology* 144 (1998), S. 1677-1682
- 69 Watanabe, A.; Yano, K.; Ikebukuro, K.; Karube, I.: Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1998), S. 93-97
- 70 Ingvorsen, K.; Hojer-Pedersen, B.; Godtfredsen, S.E.: Novel cyanide-hydrolyzing enzyme from *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (1991), S. 1738-1789
- 71 Basheer, S.; Kut, Ö.M.; Pernosil, J.E.; Bourne, J.R.: Kinetics of enzymatic degradation of cyanide. *Biotechnology and Bioengineering* 39 (1992), S. 629-634
- 72 Basheer, S.; Kut, Ö.M.; Pernosil, J.E.; Bourne, J.R.: Development of an enzyme membrane reactor for treatment of cyanide-containing wastewaters from the food industry. *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1993), S. 465-473
- 73 Mak, K.K.W.; Law, A.W.C.: Application of cyanide hydrolase from *Klebsiella* sp. in a biosensor system for the detection of low-level cyanide. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67 (2005), S. 631-636

- 74 Keusgen, M.; Kloock, J.P.; Knobbe, D.-T.; Jünger, M.; Krest, I.; Goldbach, M.; Klein, W.; Schöning, M.J.: Direct determination of cyanides by potentiometric biosensors. *Sensors and Actuators B* 103 (2004), S. 380-385
- 75 Keusgen, M.; Milka, P.; Krest, I.: Cyanidase from bacterial sources and its potential for the construction of biosensors. In: *Abstracts of Biosensor Symposium*, Tübingen, Germany, 2001
- 76 Bark, L.S.; Higson, H.G.: A review of the methods available for the detection and determination of small amounts of cyanide. *The Analyst* 88 (1963), S. 751-760
- 77 Singh, H.B.; Wasi, N.; Mehra, M.C.: Detection and determination of cyanide - a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 26 (1986), S. 115-136
- 78 Pihlar, B.; Kosta, L.; Hristovski, B.: Amperometric determination of cyanide by use of a flow-through electrode. *Talanta* 26 (1979), S. 805-810
- 79 Nagy, A.; Nagy, G.: Amperometric air gap for the measurement of free cyanide. *Analytica Chimica Acta* 283 (1993), S. 795-802
- 80 Hachiya, H.; Ito, S.; Fushinuki, Y.; Masadome, T.; Asano, Y.; Imato, T.: Continuous monitoring for cyanide in waste water with a galvanic hydrogen cyanide sensor using a purge system. *Talanta* 48 (1999), S. 997-1004
- 81 Dai, X.; Jeffrey, M.I.; Breuer, P.L.: The development of a flow injection analysis method for the quantification of free cyanide and copper cyanide complexes in gold leaching solutions. *Hydrometallurgy* 76 (2005), S. 87-96
- 82 Giuriati, C.; Cavalli, S.; Gorni, A.; Badocco, D.; Pastore, P.: Ion chromatographic determination of sulfide and cyanide in real matrices by using pulsed amperometric detection on a silver electrode. *Journal of Chromatography A* 1023 (2004), S. 105-112
- 83 Christison, T.T.; Rohrer, J.S.: Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A* 1155 (2007), S. 31-39
- 84 Cheng, J.; Jandik, P.; Avdalovic, N.: Pulsed amperometric detection of sulfide, cyanide, iodide, thiosulfate, bromide and thiocyanate with microfabricated disposable silver working electrodes in ion chromatography. *Analytica Chimica Acta* 536 (2005), S. 267-274
- 85 Christison, T.T.; Rohrer, J.S.: Direct determination of cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA (2006)
- 86 Tóth, K.; Pungor, E.: Determination of cyanides with ion-selective membrane electrodes. *Analytica Chimica Acta* 51 (1970), S. 221-230
- 87 Pungor, E.; Tóth, K.: Ion-selective membrane electrodes. *The Analyst* 95 (1970), S. 625-648
- 88 Pungor, E.; Tóth, K.: Selectivity of ion-specific membrane electrodes. *Analytica Chimica Acta* 47 (1969), S. 291-297
- 89 Pungor, E.; Toth, K.: Precipitate-based ion-selective electrodes. *Pure and Applied Chemistry* 34 (1973), S. 105-137
- 90 Noroozifar, M.; Khorasani-Motlagh, M.; Taheri, A.; Zare-Darabei, R.: A comparative study of AgX (X = Cl⁻, Br⁻, I⁻ and N₃⁻) solid-phase reactors for flow-injection determination of cyanide in electroplating wastewater. *Analytical Sciences* 24 (2008), S. 669-672

- 91 Dessouky, Y.M.; Pungor, E.: The application of anion-selective membrane electrodes in pharmaceutical analysis. *The Analyst* 96 (1971), S. 442-446
- 92 Gyorgy, B.; Andre, L.; Stehli, L.; Pungor, E.: Direct potentiometric determination of cyanide in biological systems. *Analytica Chimica Acta* 46 (1969), S. 314-318
- 93 Koryta, J.: Theory and application of ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* 61 (1972), S. 329-411
- 94 Fleet, B.; von Storp, H.: The determination of low levels of cyanide ion using a silver responsive ion selective electrode. *Analytical Letters* 4 (1971), S. 425-435
- 95 Fleet, B.; von Storp, H.: Analytical evaluation of a cyanide-ion selective membrane electrode under flow-stream conditions. *Analytical Chemistry* 43 (1971), S. 1575-1581
- 96 Fleet, B.; Ho, A.Y.W.: An ion-selective electrode system for continuously monitoring cyanide ion, based on a computerized gran plot technique. *Talanta* 20 (1973), S. 793-798
- 97 Harzdorf, C.: Silver/silver iodide electrodes of the second kind as sensors for cyanide. *Analytica Chimica Acta* 86 (1976), S. 103-108
- 98 Koryta, J.: Theory and application of ion-selective electrodes, part II. *Analytica Chimica Acta* 91 (1977), S. 1-85
- 99 Pohlandt, C.; Jones, E.A.; Lee, A.F.: A critical evaluation of methods applicable to the determination of cyanides. *Journal of South African Institute of Mining and Metallurgy* 1 (1983), S. 11-19
- 100 Morf, W.E.; Kahr, G.; Simon, W.: Theoretical treatment of the selectivity and detection limit of silver compound membrane electrodes. *Analytical Chemistry* 46 (1974), S. 1538-1543
- 101 Buck, R.P.; Ciani, S.: Electroanalytical chemistry of membranes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 5 (1976), S. 323-420
- 102 Jovanovic, V.M.: Determination of low levels of cyanide with a silver/silver sulphide wire electrode. *Analytica Chimica Acta* 196 (1987), S. 221-227
- 103 Vesely, J.; Jensen, O.J.; Nicolaisen, B.: Ion-selective electrodes based on silver sulphide. *Analytica Chimica Acta* 62 (1972), S. 1-13
- 104 Neshkova, M.T.; Pancheva, E.M.: Cyanide ion-selective electrodes based on thin electroplated membranes of silver chalcogenides. Part I. Membrane preparation and characterization. *Analytica Chimica Acta* 242 (1991), S. 73-83
- 105 Neshkova, M.T.: Electrochemically prepared chalcogenide ion-selective membranes as an alternative to conventional pressed-pellet ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* 273 (1993), S. 255-265
- 106 Neshkova, M.T.: Thin cathodically electroplated chalcogenide-based ion-selective membranes for flow-injection application. *Laboratory Robotics and Automation* 12 (2000), S. 216-225
- 107 Neshkova, M.T.; Pancheva, E.M.; Pashova, V.: A new generation of CN⁻ sensing silver chalcogenide-selective membranes for FIA applications. I. Flow-injection detector for CN⁻ based on thin Ag_{2+d}Se_{1-x}Te_x electroplated membrane. *Sensors and Actuators B* 119 (2006), S. 625-631
- 108 Surleva, A.R.; Neshkova, M.T.: A new generation of cyanide ion-selective membranes for flow injection application. Part III. A simple approach to the determination of toxic metal-cyanide complexes without preliminary separation. *Talanta* 76 (2008), S. 914-921

- 109 Surleva, A.R.; Nikolova, V.D.; Neshkova, M.T.: A new generation of cyanide ion-selective membranes for flow injection application. Part II. Comparative study of cyanide flow-injection detectors based on thin electroplated silver chalcogenide membranes. *Analytica Chimica Acta* 583 (2007), S. 174-181
- 110 Frant, M.S.; Ross, J.W.; Riseman, Jr.; Riseman, J.H.: Electrode indicator technique for measuring low levels of cyanide. *Analytical Chemistry* 44 (1972), S. 2227-2230
- 111 Hofton, M.: Continuous determination of free cyanide in effluents using silver ion selective electrode. *Environmental Science & Technology* 10 (1976), S. 277-280
- 112 Durst, R.A.: Continuous determination of free cyanide by means of membrane diffusion of gaseous HCN and an electrode indicator technique. *Analytical Letters* 10 (1977), S. 961-978
- 113 Fligier, J.; Gratzl, M.; Nagy, G.; Pungor, E.: Comparative study of different cyanide-selective air-gap electrodes. *Analytica Chimica Acta* 134 (1982), S. 263-269
- 114 Fligier, J.; Czichon, P.; Gregorowicz, Z.: A very simple air-gap cyanide sensor. *Analytica Chimica Acta* 118 (1980), S. 145-148
- 115 Sun, H.; Zhang, Y.Y.; Si, S.H.; Zhu, D.R.; Fung, Y.S.: Piezoelectric quartz crystal (PQC) with photochemically deposited nano-sized Ag particles for determining cyanide at trace levels in water. *Sensors and Actuators B* 108 (2005), S. 925-932
- 116 Yang, P.; Wei, W.; Tao, C.: Determination of trace thiocyanate with nano-silver coated multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta* 585 (2007), S. 331-336
- 117 Taheri, A.; Noroozifar, M.; Khorasani-Motlagh, M.: Investigation of a new electrochemical cyanide sensor based on Ag nanoparticles embedded in a three-dimensional sol-gel. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 628 (2009), S. 48-54
- 118 Tan, J.; Bergantin Jr., J.H.; Merkoci, A.; Alegret, S.; Sevilla III, F.: Oil dispersion of AgI/Ag₂S salts as a new electroactive material for potentiometric sensing of iodide and cyanide. *Sensors and Actuators B* 101 (2004), S. 57-62
- 119 Baker, C.T.; Trachtenberg, I.: Ion-selective electrochemical sensors - Fe³⁺, Cu²⁺. *Journal of the Electrochemical Society* 118 (1971), S. 571-576
- 120 Jasinski, R.; Trachtenberg, I.; Rice, G.: A chalcogenide glass electrode sensitive to cupric ions. *Journal of the Electrochemical Society* 121 (1974), S. 363-370
- 121 Jasinski, R.; Trachtenberg, I.: Evaluation of the ferric ion sensitive chalcogenide glass electrode. *Journal of the Electrochemical Society* 120 (1973), S. 1169-1173
- 122 Owen, A.E.: Chalcogenide glasses as ion-selective materials for solid-state electrochemical sensors. *Journal of Non-Crystalline Solids* 35-36 (1980), S. 1137-1142
- 123 Bohnke, C.; Malugani, J.P.; Saida, A.; Robert, G.: Conductivite électrique et selective ionique des verres AgPO₃-MI₂ et AgAsS₂-MI₂ avec M-Pb, Hg. *Electrochimica Acta* 26 (1981), S. 1137-1142
- 124 Tohge, N.; Tanaka, M.: Chalcogenide glass electrodes sensitive to heavy metal ions. *Journal of Non-Crystalline Solids* 80 (1986), S. 550-556
- 125 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.; Medvedev, A.M.: Copper ion-selective chalcogenide glass electrodes: Analytical characteristics and sensing mechanism. *Analytica Chimica Acta* 185 (1986), S. 137-158

- 126 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.: Ion-selective chalcogenide glass electrodes. *Ion-Selective Electrode Review* 9 (1987), S. 5-93
- 127 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.: Electrochemical ion-selective sensors based on chalcogenide glasses. *Sensors and Actuators B* 12 (1987), S. 275-283
- 128 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.: Sodium ion-selective chalcogenide glass electrodes. *Analytical Letters* 22 (1989), S. 1125-1144
- 129 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.; Seleznev, B.L.: Silver ion sensors based on Ag-As-Se-Te glasses II. Surface studies and tracer measurements of ion response. *Sensors and Actuators B* 2 (1990), S. 43-49
- 130 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.; Legin, A.V.: Chalcogenide glass chemical sensors. Research and analytical applications. *Talanta* 41 (1994), S. 1059-1063
- 131 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.; Legin, A.V.: Mechanism studies on lead ion-selective chalcogenide glass sensors. *Sensors and Actuators* 10 (1992), S. 55-60
- 132 Vlasov, Y.G.: New solid-state ion-selective electrodes - Sensors for chemical analysis of solutions. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie* 335 (1989), S. 92-99
- 133 Vlasov, Y.G.; Bychkov, E.A.; Seleznev, B.L.; Miloshova, M.S.: Ion-implanted chalcogenide glasses as membrane materials for solid-state chemical sensors. *Sensors and Actuators* 7 (1992), S. 501-504
- 134 Tarantov, Y.A.; Vlasov, Y.G.; Mesentsev, Y.A.; Averyanov, Y.L.: Physical and chemical processes in ISFETs with chalcogenide membranes. *Sensors and Actuators B* 1 (1990), S. 390-394
- 135 Salardenne, J.; Morcos, J.; Allal, M.A.; Portier, J.: New ISFET sensitive membranes. *Sensors and Actuators B* 1 (1990), S. 385-389
- 136 Hüller, J.; Pham, M.T.; Vopel, T.; Albrecht, J.: Ion-beam modification of ISFET membranes for copper ion detection. *Sensors and Actuators B* 24 (1995), S. 225-227
- 137 Guessous, A.; Papet, P.; Sarradin, J.; Ribes, M.: Thin films of chalcogenide glass as sensitive membranes for the detection of mercuric ions in solution. *Sensors and Actuators B* 24-25 (1995), S. 296-299
- 138 Guessous, A.; Sarradin, J.; Papet, P.; Elkacemi, K.; Belcadi, S.; Pradel, A.; Ribes, M.: Chemical microsensors based on chalcogenide glasses for the detection of cadmium ions in solution. *Sensors and Actuators B* 53 (1998), S. 13-18
- 139 Tomova, R.; Assa, J.; Stoycheva-Topalova, R.; Buroff, A.: As₂S₃ and AgI thin layers as ion sensitive membranes. *Journal of Non-Crystalline Solids* 260 (1999), S. 195-198
- 140 Tomova, R.; Spasov, G.; Stoycheva-Topalova, R.; Buroff, A.: Cu-ionselective membranes based on chalcogenide glasses. *Sensors and Actuators B* 103 (2004), S. 277-283
- 141 Legin, A.; Baidakov, D.; Batrakov, Y.; Vlasov, Y.: The state of copper in the CuI-As₂Se₃ and CuI-PbI₂-As₂Se₃ chalcogenide films prepared by chemical deposition. *Glass Physics and Chemistry* 23 (1997), S. 429-432
- 142 Legin, A.V.; Baidakov, D.L.; Vlasov, Y.G.: The CuI-PbI₂-As₂Se₃ thin films prepared by chemical deposition. *Glass Physics and Chemistry* 22 (1996), S. 98-102

- 143 Kloock, J.P.; Schöning, M.J.; Mourzina, Y.G.; Schubert, J.; Ermolenko, Y.; Doll, T.: Inorganic thin-film sensor membranes with PLD-prepared chalcogenide glasses: challenges and implementation. *Sensors* 4 (2004), S. 156-162
- 144 Kloock, J.P.; Mourzina, Y.G.; Schubert, J.; Ermolenko, Y.; Schöning, M.J.: Pulsed laser deposition: A tool for fabrication thin-film microsensors. *Biomedizinische Technik* 49 (2004), S. 1032-1033
- 145 Schöning, M.J.; Schubert, J.; Kloock, J.P.; Zander, W.; Mourzina, Y.G.; Legin, A.; Vlasov, Y.G.; Lüth, H.: Innovative thin film techniques for microfabricating electrochemical sensors. *Biocybernetics and Biomedical Engineering* 21 (2001), S. 107-119
- 146 Schöning, M.J.; Mourzina, Y.G.; Schubert, J.; Zander, W.; Legin, A.; Vlasov, Y.G.; Lüth, H.: Can pulsed laser deposition serve as an advanced technique in fabricating chemical sensors? *Sensors and Actuators B* 78 (2001), S. 273-278
- 147 Bisswanger, H.: *Enzymkinetik. Theorie und Methoden*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo, 1994
- 148 Copeland, R.A.: *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. VHC Publishers, Inc., 1996
- 149 Cox, M.M.; Phillips, G.N.: *Handbook of proteins. Structure, function and methods*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007
- 150 Webb, E.C.: *Enzyme nomenclature*. Academic Press, San Diego CA, 1992
- 151 Fischer, E.: Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 27 (1894), S. 2985-2993
- 152 Koshland, D.E.: Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 44 (1958), S. 98-104
- 153 Segel, I.H.: *Enzymes kinetics*. Wiley, New York, 1975
- 154 Henri, V.: *Lois Générales de l'action des diastases*. Hermann, Paris, 1903
- 155 Michaelis, L.; Menten, M.L.: The kinetics of invertase activity. *Biochemische Zeitschrift* 49 (1913), S. 333-369
- 156 Cornish-Bowden, A.: *Fundamentals of enzyme kinetics*. Portland Press, London, 1995
- 157 Page, M.I.; Neuberger, A.; Van Deenen, L.L.M.: *The chemistry of enzyme action*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1983
- 158 Wang, J.: *Analytical electrochemistry*. Wiley-VCH, New York, 2006
- 159 Helmholtz, H.v.: Studien über elektrische Grenzschichten. *Annalen der Physik und Chemie* 7 (1879), S. 337-382
- 160 Vetter, K.J.: *Elektrochemische Kinetik*. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1961
- 161 Grahame, D.C.: Measurement of the capacity of the electrical double layer at a mercury electrode. *Journal of American Chemical Society* 71 (1949), S. 2975-2978
- 162 Gouy, M.: Sur la constitution de la charge electrolyte. *Journal de Physique* 9 (1910), S. 457-468
- 163 Chapman, D.L.: A contribution to the theory of electrocapillary. *Philosophical Magazine* 25 (1913), S. 475-481

- 164 Stern, O.: Zur Theorie der elektrolytischen Doppelschicht. *Zeitschrift für Elektrochemie* 30 (1924), S. 508-516
- 165 Girault, H.H.: *Analytical and physical electrochemistry*. EPFL Press, New York, 2004
- 166 Sze, S.M.: *Semiconductor sensors*. John Wiley & Sons, Inc., New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore, 1994
- 167 Camman, K.; Galster, H.: *Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden. Eine Einführung für Praktiker*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1995
- 168 Li, D.: *Electrokinetics in microfluidics*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004
- 169 Schöning, M.J.: *Sensoren für chemische und biologische Größen*. Vorlesungsskriptum, 2000
- 170 Nernst, W.: Die elektrochemische Wirksamkeit der Ionen. *Zeitschrift für physikalische Chemie* 4 (1889), S. 129-181
- 171 Mortimer, C.E.; Müller, U.: *Chemie. Basiswissen der Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003
- 172 Buck, R.P.; Lindner, E.: Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes (IUPAC recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry* 66 (1994), S. 2527-2536
- 173 Pungor, E.: Theory and application of anion. *Analytical Chemistry* 39 (1967), S. 28A-45A
- 174 Dole, M.: *The glass electrode, methods, application and theory*. John Wiley, New York, 1941
- 175 Katz, L.: *Die Glaselektrode und ihre Anwendungen*. S. Steinkopff, Frankfurt Main, 1950
- 176 Eisenman, G.; Rudin, D.O.; Casby, J.U.: Glass electrode for measuring sodium ion. *Science* 126 (1957), S. 831-834
- 177 Hofmeister, F.: Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 24 (1888), S. 247-260
- 178 Benco, J.S.; Nienaber, H.A.; McGimpsey, W.G.: Synthesis of an ammonium-ionophore and its application in planar ion selective electrode. *Analytical Chemistry* 75 (2003), 152-156
- 179 Glyn Davies, O.; Moody, G.L.; Thomas, D.R.: Optimisation of poly(vinylchloride) matrix membrane ion-selective electrodes for ammonium ions. *The Analyst* 113 (1988), S. 497-500
- 180 Simon, W.; Wuhrmann H.R.; Vasak, M.; Pioda, L.A.R.; Dohner, R.; Stefanac, Z.: Ionenselektive Sensoren. *Angewandte Chemie* 82 (1970), S. 433-443
- 181 Frant, M.S.: Historical perspective. History of the early commercialization of ion-selective electrodes. *The Analyst* 119 (1994), S. 2293-2301
- 182 Thomas, J.D.R.: The development and scope of ion-selective electrodes. *Pure and Applied Chemistry* 66 (1994), S.2527-2536
- 183 Pranitis, D.M.; Telting-Diaz, M.; Meyerhoff, M.E.: Potentiometric ion-, gas-, and bio-selective membrane electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 23 (1992), S. 163-186
- 184 Campanella, L.; Colapicchioni, C.; Favero, G.; Sammartino, M.P.; Tomassetti, M.: Organophosphorus pesticide (paraoxon) analysis using solid state sensors. *Sensors and Actuators B* 33 (1996), S. 25-33
- 185 Sharma, S.K.; Sehgal, N.; Kumar, A.: Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics* 3 (2003), S. 307-316

- 186 Bergveld, P.: Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 17 (1970), S. 70-71
- 187 Bergveld, P.: Development, operation and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 19 (1972), S. 342-351
- 188 Poghosian, A.; Schöning, M.J.: Silicon-based chemical and biological field-effect sensors. Edited by Grimes, C.A.; Dickey, E.C.; Pishko, M.V., In: *Encyclopedia of Sensors* 9 (2006), S. 463-533
- 189 Hamann, C.H.; Vielstich, W.: *Elektrochemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
- 190 Kloock, J.P.: *Herstellung und Charakterisierung von Sensormembranen aus Chalkogenidglasschichten für den Einsatz als Schwermetallsensoren in Flüssigkeiten*. Dissertation an der Technischen Universität Ilmenau, 2008
- 191 Sze, S.M.: *Semiconductor devices. Physics and technology*. John Wiley & Sons, Inc., 2002
- 192 Völklein, F.; Zetterer, T.: *Praxiswissen Mikrosystemtechnik, Grundlagen, Technologie, Anwendung*. Friedrich Vieweg & Sohn Verlag, Wiesbaden, 2006
- 193 Albers, J.: *Grundlagen integrierter Schaltungen, Bauelemente und Mikrostrukturierung*. Carl Hanser Verlag, München, 2007
- 194 Bergveld, P.; Sibbald, A.: *Analytical and biomedical applications of ion-selective field-effect transistors*. Elsevier, Amsterdam, 1988
- 195 Van Hal, R.E.G.; Eijkel, J.C.T.; Bergveld, P.: A novel description of ISFET sensitivity with the buffer capacity and double-layer capacitance as key parameters. *Sensors and Actuators B* 24-25 (1995), S. 201-205
- 196 Bergveld, P.: ISFET, theory and practice. *IEEE Sensor Conference Toronto* (2003), S. 1-26
- 197 Lowry, D.A.; Oniciu, L.: Reference electrode for potentiometric analyses in corrosive media. *The Analyst* 121 (1996), S. 363-368
- 198 Nagy, K.; Eine, K.; Syverud, K.; Aune, O.: Promising new solid-state reference electrode. *Journal of the Electrochemical Society* 144 (1997), S. L1-L2
- 199 Simonis, A.; Lüth, H.; Wang, J.; Schöning, M.J.: New concepts of miniaturised reference electrodes in silicon technology for potentiometric sensor systems. *Sensors and Actuators B* 103 (2004), S. 429-435
- 200 Simonis, A.; Dawgul, M.; Lüth, H.; Schöning, M.J.: Miniaturised reference electrodes for field-effect sensors compatible to silicon chip technology. *Electrochimica Acta* 51 (2005), S. 930-937
- 201 Simonis, A.; Lüth, H.; Wang, J.; Schöning, M.J.: Strategies of miniaturised reference electrodes integrated in a silicon-based „one chip“ pH sensor, *Sensors* (2003), S. 330-339
- 202 Woodward, J.: *Immobilised cells and enzymes*. IRL Press, Oxford-Washington DC, 1985
- 203 Anderson, G.W.; Zimmerman, J.E.; Callahan, F.M.: The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 86 (1963), S. 1839-1842
- 204 Wilchek, M.; Miron, T.: Limitations of N-hydroxysuccinimide esters in affinity chromatography and protein immobilization. *Biochemistry* 26 (1987), S. 2155-2161

- 205** Yan, M.; Cai, S.X.; Wybourne, M.N.; Keana, F.W.: N-hydroxysuccinimide esters functionalized perfluorophenyl azides as novel photoactive heterobifunctional cross-linking reagents. The covalent immobilization of biomolecules to polymer surfaces. *Bioconjugate Chemistry* 5 (1994), S. 151-157
- 206** Tavernier, M.L.; Michaud, P.; Wadouachi, A.; Petit, E.: Continuous production of oligoglucuronans by immobilized glucuronan lyase. *Enzyme and Microbial Technology* 45 (2009), S. 48-52
- 207** Yao, Y.; Ma, Y.-Z.; Qin, M.; Ma, X.-J.; Wang, C.; Feng, X.-Z.: NHS-ester functionalized poly (PEGMA) brushes on silicon surface for covalent protein immobilization. *Colloids and Surface B: Biointerface* 66 (2008), S. 233-239
- 208** Magario, I.; Ma, X.; Neumann, A.; Syldatk, C.; Hausmann, R.: Non-porous magnetic micro-particles: comparison to porous enzyme carriers for a diffusion rate-controlled enzymatic conversion. *Journal of Biotechnology* 134 (2008), S. 72-78
- 209** Ohta, T.; Ikemoto, Y.; Usami, A.; Koide, T.; Wakabayashi, S.: High affinity interaction between histidine-rich glycoprotein and the cell surface type ATP synthase on T-cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2009), S. 1099-1107
- 210** Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M.: Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000), S. 509-515
- 211** Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R.: Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007), S. 1451-1463
- 212** Tu, M.; Zhang, X.; Kurabi, A.; Gilkes, N.; Mabee, W.; Saddler, J.: Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters* 28 (2006), S. 151-156
- 213** Gómez de Segura, A.; Alcalde, M.; Yates, M.; Rojas-Cervantes, M.L.; López-Cortés, N.; Ballesteros, A.; Plou, F.J.: Immobilization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C® supports. *Biotechnology Progress* 20 (2004), S. 1414-1420
- 214** Hernaiz, M.J.; Crout, D.H.G.: Immobilization/stabilization on Eupergit C® of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology* 27 (2000), S. 26-32
- 215** D'Annibale, A.; Stazi, S.R.; Vinciguerra, V.; Giovannozzi, G.: Oxirane-immobilized lentinula edodes laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology* 77 (2000), S. 265-273
- 216** Turek, M.; Keusgen, M.; Poghossian, A.; Mulchandani, A.; Wang, J.; Schöning, M.J.: Enzyme-modified electrolyte-insulator-semiconductor sensors. *Journal of Contemporary Physics* 43 (2008), S. 82-85
- 217** Turek, M.; Ketterer, L.; Claßen, M.; Berndt, H.K.; Elbers, G.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Development and electrochemical investigations on an EIS- (electrolyte-insulator-semiconductor) based biosensor for cyanide detection. *Sensors* 7 (2007), S. 1415-1426
- 218** Otto, M.: *Analytische Chemie*. VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995
- 219** Küster, F.W.; Thiel, A.; Ruland, A.: *Rechentafeln für die chemische Analytik*. Walter de Gruyter, Berlin-New York, 2003
- 220** Liersch, M.: *Chemie kurz & klar I*. Auer Verlag GmbH, Donauwörth, 2001

- 221 Liersch, M.: Chemie kurz & klar II. Auer Verlag GmbH, Donauwörth, 1996
- 222 Seel, F.: *Grundlagen der analytischen Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim New York, 1979
- 223 <http://www.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq>
- 224 Merkoci, A.; Braga, S.; Fàbregas, E.; Alegret, S.: A potentiometric biosensor for d-amygdalin based on a consolidated biocomposite membrane. *Analytica Chimica Acta* 391 (1999), S. 65-72
- 225 Ipatov, A.; Ivanov, M.; Makarychev-Mikhailov, S.; Kolodnikov, V.; Legin, A.; Vlasov, Y.: Determination of cyanide using flow-injection multisensor system. *Talanta* 58 (2002), S. 1071-1076
- 226 Hulanicki, A.; Lewenstam, A.: Interpretation of selectivity coefficients of solid-state ion-selective electrodes by means of the diffusion-layer model. *Talanta* 24 (1976), S. 171-175
- 227 Bound, G.P.; Fleet, B.; von Storp, H.: A new model for the response of a cyanide selective silver iodide membrane electrode. *Analytical Chemistry* 45 (1973), S. 788-789
- 228 Sekerka, I.; Flechner, J.F.: The response of the sulphide-selective electrodes to sulphide, iodide and cyanide. *Analytica Chimica Acta* 93 (1977), S. 139-144
- 229 Buck, R.P.; Shepard, V.R.: Reversible metal/salt interfaces and the relation of second kind and "all-solid-state" membrane electrodes. *Analytical Chemistry* 46 (1974), S. 2097-2103
- 230 Deyl, Z.; Everaerts, F.M.; Prusik, Z.; Svendsen, P.J.: *Electrophoresis a survey of techniques and applications part A: techniques*. Elsevier scientific publishing company, Amsterdam Oxford New York, 1979
- 231 Frey, H.-P.; Zieloff, K.: *Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie. Grundlagen und Praxis*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim-New York-Basel-Cambridge, 1993
- 232 Asmus, E.; Garschagen, H.: Über die Verwendung der Barbitursäure für die photometrische Bestimmung von Cyanid und Rhodanid. *Zeitschrift der Analytischen Chemie* 398 (1953), S. 414-422
- 233 Aldrige, W.N.: A new method for the estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanate. *The Analyst* 69 (1944), S. 262-265
- 234 Goldbach, M.: *Bakterielle Cyanidasen aus Pseudomonaden für biosensorische Applikationen*. Diplomarbeit an der Universität Bonn, Institut für Pharmazeutische Biologie, 2002
- 235 Cornish-Bowden, A.: *Fundamentals of enzyme kinetics*. Butterworths, London-Boston-Sydney-Wellington-Durban-Toronto, 1979
- 236 Chescoe, D.; Goodhew, P.J.: *The operation of transmission and scanning electron microscopes. Microscopy Handbooks*. Oxford university press, New York, 1990
- 237 Flegler, S.L.; Heckman Jr., J.W.; Klomparens, K.L.: *Elektronenmikroskopie. Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford, 1995
- 238 *JPK Instruments Nanotechnology for life science*. The NanoWizard® Handbook, Version 1.3, 2005
- 239 Walls, J.M.; Smith, R.: *Surface science techniques*. Elsevier Science Ltd Pergamon, 1994
- 240 Holländer, B.: *Untersuchung von Interdiffusion, elastischer Gitterverzerrung und Relaxation in epitaktischen Si_{1-x}Gex/Si-Heterostrukturen mit Ionenstrahlung*. Dissertation an der Universität Köln 1991, Berichte des Forschungszentrums Jülich 2498, ISSN 0366-0885

- 241 Herrmann, D.: *Schichtdickenmessung*. R. Oldenbourg, München, 1993
- 242 Macdonald, J.R.: *Impedance spectroscopy*. John Wiley & Sons, New York, 1987
- 243 Katz, E.; Willner, I.: Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis* 15 (2003), S. 913-947
- 244 Cottis, R.; Targoose, S.; Syrett, B.C.: *Electrochemical impedance and noise*. NACE International, Houston, 1999
- 245 Barsoukov, E.; Macdonald, J.R.: *Impedance spectroscopy. Theory, experiment, and applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken New Jersey, 2005
- 246 Henze, G.; Neeb, R.: *Elektrochemische Analytik*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1986
- 247 Hillerigmann, U.: *Silizium-Halbleitertechnologie. Grundlagen mikroelektronischer Integrationstechnik*. Vieweg und Teubner GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, 2008
- 248 May, G.S.; Sze, S.M.: *Fundamentals of semiconductor fabrication*. Wiley international edition, 2004
- 249 Madou, M.J.: *Fundamentals of microfabrication: The science of miniaturization*. CRC Press LLC, Boca-Raton, 2002
- 250 Hilleringmann, U.: *Silizium-Halbleitertechnologie*. Teubner, Stuttgart, 2002
- 251 Schöning, M.J.: Playing around with field-effect sensors on the basis of EIS structures, LAPS and ISFETs. *Sensors* 5 (2005), S. 126-138
- 252 Schöning M.J.; Näther, N.; Auger, V.; Poghossian, A.; Kondelka-Hep, M.: Miniaturised flow-trough cell with integrated capacitive EIS sensor fabricated at wafer level using Si and SU-8 technologies. *Sensors and Actuators B* 108 (2005), S. 986-992
- 253 Kloock, J.P.; Mourzina, Y.G.; Yoshinobu, T.; Schubert, J.; Schöning, M.J.: Chalkogenidglassensoren für die Schwermetallanalytik. In: *ITG/GMA. Sensoren und Messsysteme*, VDI-Verlag, 2002, S. 395-398
- 254 Kloock, J.P.; Moreno, L.; Huachupoma, S.; Xu, J.; Wagner, T.; Bratov, A.; Doll, T.; Vlasov, Y.G.; Schöning, M.J.: Halbleiterbasierte Schwermetallsensorik auf der Basis von Chalkogenidgläsern für zukünftige "Lab on Chip"-Anwendungen. In: Gerlach, G.; Kaden, H.: *7. Dresdner Sensor-Symposium – Neue Herausforderungen und Anwendungen in der Sensortechnik*, TUDpress, Dresden, 2005, S. 221-224
- 255 Schubert, J.; Schöning, M.J.; Schmidt, C.; Siegert, M.; Mesters, S.; Zander, W.; Kordos, P.; Lüth, H.; Legin, A.; Mourzina, Y.G.; Seleznev, B.; Vlasov, V.G.: Chalcogenide-based thin film sensors prepared by pulsed laser deposition technique. *Applied Physics A: Materials Science and Processing* 69 (1999), S. 803-805
- 256 Chrisey, D.B.; Hubler, G.K.: *Pulsed laser deposition of thin films*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994
- 257 Cheung, J.; Horwitz, J.: Pulsed laser deposition: history and laser-target interactions. *Materials Research Society Bulletin* 17 (1992), S. 30-36
- 258 Poghossian, A.; Abouzar, M.H.; Schöning, M.J.: Capacitance-voltage and impedance characteristics of field-effect EIS sensors functionalised with polyelectrolyte multilayers. *Innovation*

- et Technologie en Biologie et Medecine – une Revue de Technologie Biomedicale* 29 (2008), S. 149-154.
- 259** Park, S.-M.; Yoo, J.-S.: Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements. *Analytical Chemistry* (2003), S. 455A-461A
- 260** Datenblatt: Eupergit C®. Degussa, 2007
- 261** Datenblatt 18-1113-53: NHS-activated sepharose™ 4 fast flow. Amersham Biosciences
- 262** Van Sommeren, A.P.G.; Machielsen, P.A.G.M.; Gribnau, T.C.J.: Comparison of three activated agaroses for use in affinity chromatography: effects on coupling performance and ligand leakage. *Journal of Chromatography* 639 (1993), S. 23-31
- 263** Kallenberg, A.I.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A.: Immobilization of penicillin G acylase: The key of optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 347 (2005), S. 905-926
- 264** Fisher bioblock scientific cyanide ion electrodes instruction manual
- 265** Kameswara Rao, V.; Suresh, S.; Bhattacharya, A.; Rao, N.B.S.N.: A potentiometric detector for hydrogen cyanide gas using silver dicyano complex. *Talanta* 49 (1999), S. 367-371
- 266** Luna, R.M.; Lapidus, G.T.: Cyanidation kinetics of silver sulfide. *Hydrometallurgy* 56 (2000), S. 171-188
- 267** Christen, H.R.: *Grundlagen der allgemeinen und anorganischen Chemie*. Verlag Sauerländer, Aarau-Frankfurt am Main-Salzburg, 1988
- 268** Frumar, M.; Wagner, T.: Ag doped chalcogenide glass and their applications. *Current Opinion in Solid State and Material Science* 7 (2003), S. 117-126
- 269** Meeussen, J.C.L.N.; Temminghoff, E.J.M.; Keizer, M.G.; Novozamsky, I.: Spectrophotometric determination of total cyanide, iron-cyanide complexes, free cyanide and thiocyanate in water by a continuous-flow system. *The Analyst* 95 (1989), S. 959-963
- 270** Crompton, T.R.: *Analysis of seawater*. Springer-Verlag. Heidelberg-Berlin, 2006
- 271** Camman, K.: *Instrumentelle analytische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, 2001
- 272** Wang, X.-H.; Forssberg, K.S.E.: The solution electrochemistry of the sulfide-xanthate-cyanide systems in sulfide mineral flotation. *Minerals Engineering* 9 (1996), S. 527-546
- 273** Smith, R.M.; Martell, A.E.: *Critical stability constants*. Plenum Press, New York, 1989
- 274** Mourzina, Y.G.; Schöning, M.J.; Schubert, J.; Zander, W.; Legin, A.V.; Vlasov, Y.G.; Kordos, P.; Lüth, H.: A new thin-film Pb microsensor based on chalcogenide glasses. *Sensors and Actuators B* 71 (2000), S. 13-18
- 275** Gutés, A.; Céspedes, F.; del Valle, M.: Electronic tongues in flow analysis. *Analytica Chimica Acta* 600 (2007), S. 90-96
- 276** Legin, A.V.; Babain, V.A.; Kirsanov, D.O.; Mednova, O.V.: Cross-sensitive rare earth metal ion sensors based on extraction systems. *Sensors and Actuators B* 131 (2008), S. 29-36
- 277** Verrelli, G.; Francioso, L.; Paolesse, R.; Siciliano, P.; di Natale, D.; d'Amico, A.; Logrieco, A.: Development of silicon-based potentiometric sensors: towards a miniaturized electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 123 (2007), S. 191-197

- 278** Mourzina, Y.G.; Schubert, J.; Zander, W.; Legin, A.V.; Vlasov, Y.G.; Lüth, H.; Schöning, M.J.: Development of multisensor systems based on chalcogenide thin film chemical sensors for the simultaneous multicomponent analysis of metal ions in complex solutions. *Electrochimica Acta* 47 (2001), S. 251-258
- 279** Vlasov, Y.G.; Legin, A.V.: Non-selective chemical sensors in analytical chemistry: from "electronic nose" to "electronic tongue". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 361 (1998), S. 255-260
- 280** Vlasov, Y.G.; Legin, A.V.; Rudnitskaya, A.M.: Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions. *Sensors and Actuators B* 44 (1997), S. 532-537
- 281** Moreno, L.; Kloock, J.P.; Schöning, M.J.; Baldi, A.; Ipatov, A.; Bratov, A.; Jiménez-Jorquera, C.: Electronic integrated multisensor tongue applied to grape juice and wine analysis. *The Analyst* 133 (2008), S. 1440-1448
- 282** Ipatov, A.; Abramova, N.; Bratov, A.; Domíquez, C.: Integrated multisensor chip with sequential injection technique as a base for "electronic tongue" devices. *Sensors and Actuators B* 131 (2008), S. 48-52
- 283** Moreno, L.; Merlos, A.; Abramova, N.; Jiménez, C.; Bratov, A.: Multi-sensor array used an "electronic tongue" for mineral water analysis. *Sensors and Actuators B* 116 (2006), S. 130-134
- 284** Lvova, L.; Paolesse, R.; di Natale, C.; d'Amico, A.: Detection of alcohols in beverages: an application of porphyrin-based electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 118 (2006), S. 439-447
- 285** Legin, A.V.; Rudnitskaya, A.M.; Vlasov, Y.G.; di Natale, C.; Mazzone, E.; d'Amico, A.: Application of electronic tongue for quantitative analysis of mineral water and wine. *Electroanalysis* 11 (1999), S. 814-820
- 286** Legin, A.V.; Rudnitskaya, A.M.; Vlasov, Y.G.; di Natale, C.; d'Amico, A.: The features of the electronic tongue in comparison with the characteristics of the discrete ion-selective sensors. *Sensors and Actuators B* 58 (1999), S. 464-468
- 287** Beullens, K.; Mészáros, P.; Vermeir, S.; Kirsanov, D.; Legin, A.V.; Buysens, S.; Cap, N.; Nicolai, B.M.; Lammertyn, J.: Analysis of tomato taste using two types of electronic tongues. *Sensors and Actuators B* 131 (2008), S. 10-17
- 288** Zadeh, L.A.: Fuzzy sets. *Information and Control* 8 (1965), S. 338-353
- 289** Zimmermann, H.-J.: *Fuzzy set theory - and its applications*. Kluwer, Boston, 1991
- 290** Heiden, W.; Brickmann, J.: Segmentation of protein surfaces using fuzzy logic. *Journal of Molecular Graphics* 12 (1994), S. 106-115
- 291** Lin, C.-T.; Lee, C.S.G.: Neural-network-based fuzzy logic control and decision system. *IEEE Transaction on Computers* 40 (1991), S. 1320-1336
- 292** Firat, M.; Güngör, M.: River flow estimation using adaptive neuro fuzzy inference system. *Mathematics and Computers in Simulation* 75 (2007), S. 87-96
- 293** Esen, H.; Inalli, M.; Sengur, A.; Esen, M.: Modelling a ground-coupled heat pump system using adaptive neuro-fuzzy inference systems. *International Journal of Refrigeration* 31 (2008), S. 65-74
- 294** Zadeh, L.A.: *The concept of a linguistic variable and its application to approximate reasoning*. Memorandum ERL-M 411, Berkeley, 1973

- 295** Turek, M.; Heiden, W.; Riesen, A.; Chhabda, T.A.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Artificial intelligence/fuzzy logic method for analysis of combined signals from heavy metal chemical sensors. *Electrochimica Acta* 54 (2009), S. 6082-6088
- 296** Riesen, A.: *Analyse von kombinierten Signalen immobilisierter Chemosensoren mit Fuzzy Logic*. Bachelor Arbeit an der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Fachbereich Informatik, 2009
- 297** Chhabda, T.A.: *Investigation of multi-component heavy metal analytes with thin-film micro sensors using fuzzy logic data evaluation*. Master of Science Thesis an der Fachhochschule Aachen, Institut für Nano- und Biotechnologien, 2008
- 298** Goulden, P.D.; Afghan, B.K.; Brooksbank, P.: Determination of nanogram quantities of simple and complex cyanides in water. *Analytical Chemistry* 44 (1972), S. 1845-1849
- 299** Gattrell, M.; Cheng, S.C.; Guena, T.; MacDougall, B.: Cyanide ion-selective electrode measurements in the presence of copper. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 508 (2001), S. 97-104
- 300** Legako, J.A.; White, B.J.; Harmon, H.J.: Detection of cyanide using immobilized porphyrin and myoglobin surface. *Sensors and Actuators B* 91 (2003), S. 128-132
- 301** Turek, M.; Heiden, W.; Guo, S.; Riesen, A.; Schubert, J.; Zander, W.; Krüger, P.; Keusgen, M.; Schöning, M.J.: Simultaneous detection of cyanide and heavy metals for environmental analysis by means of μ ISEs. *Physica Status Solidi A* (2010), eingereicht
- 302** Manual: PhastSystem. Pharmacia Laboratory Separation Division

Anhang

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung und Gelscan für die Bestimmung der *Cyanidase*-Menge angewendet. In Tab. A sind die eingesetzten Lösungen und Parameter für die Silberfärbung zusammengefasst.

Tab. A: Programmablauf zur Silberfärbung der Gele [302].

Schritt Nr.	Lösung	Zeit in min	Temperatur in °C
1	50% Ethanol, 10% Essigsäure	2	50
2	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2	50
3	10% Ethanol, 5% Essigsäure	4	50
4	8,3% Glutardialdehyd	6	50
5	10% Ethanol, 5% Essigsäure	3	50
6	10% Ethanol, 5% Essigsäure	5	50
7	Destilliertes Wasser	2	50
8	Destilliertes Wasser	2	50
9	0,25% Silbernitrat	13	40
10	Destilliertes Wasser	0,5	30
11	Destilliertes Wasser	0,5	30
12	12,5% Natriumcarbonat (250 ml), 100 µl Formaldehyd	0,5	30
13	12,5% Natriumcarbonat (250 ml), 100 µl Formaldehyd	4	30
14	5% Essigsäure	2	50
15	10% Essigsäure, 5% Glycerol	3	50

Für die Zuordnung der Proteinbanden der Proben wurde ein Roti®-Mark-Standard der Firma Carl Roth GmbH verwendet. Tab. B zeigt die Zusammensetzung und die Molekulargewichte des Standards.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die elektrochemische Charakterisierung der Chip-basierten Sensoren folgende Stamm- und Hintergrundlösungen angesetzt (Tab. C).

Tab. B: Protein und zugehöriges Molekulargewicht des Standards Roti®-Mark.

Protein	Molekulargewicht in kDa
Myosin, beef	200
β -Galactosidase, rec. <i>E.coli</i>	119
Serumalbumin, beef	66
Ovalbumin, chicken	43
Carbonic, anhydrase	29
Trypsin inhibitor, soja	20
Lysozyme, chicken	14,5

Tab. C: Stammlösungen und Hintergrundlösungen für die elektrochemische Charakterisierung der Sensoren.

Lösung	Zusammensetzung	Firma
Na-P-Puffer (pH 8,5, 100 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl	1,695 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 0,066 g NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 1,169 g NaCl; add 100 ml H ₂ O	Merck KGaA
Na-P-Puffer (pH 8,0, 100 mmol/l) und 200 mmol/l NaCl	1,536 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 0,189 g NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 1,169 g NaCl; add 100 ml H ₂ O	Merck KGaA
200 mmol/l NaCl	11,689 g NaCl; add 1 l H ₂ O	Merck KGaA
100 mmol/l KNO ₃ , pH 11,5	10,111 g KNO ₃ ; add 1 l H ₂ O mit NaOH-Lösung auf pH 11,5 titrieren	Merck KGaA
100 mmol/l KNO ₃ , pH 3,0	10,111 g KNO ₃ ; add 1 l H ₂ O mit HCl-Lösung auf pH 3,0 titrieren	Merck KGaA
100 mmol/l KCN	0,651 g KCN; add 100 ml H ₂ O	Merck KGaA
100 mmol/l K ₃ Fe(CN) ₆	3,293 g K ₃ Fe(CN) ₆ ; add 100 ml H ₂ O	VWR Prolabo
100 mmol/l KSCN	0,972 g KSCN; add 100 ml H ₂ O	VWR Prolabo
100 mmol/l KBr	1,190 g KBr; add 100 ml H ₂ O	Merck KGaA
100 mmol/l KI	1,660 g KI; add 100 ml H ₂ O	Merck KGaA
100 mmol/l KCl	0,746 g KCl; add 100 ml H ₂ O	Merck KGaA
100 mmol/l K ₂ S-sol	1,103 g K ₂ S; add 100 ml H ₂ O	Merck KGaA
100 mmol/l Cu(NO ₃) ₂	2,235 g Cu(NO ₃) ₂ add 100 ml 100 mmol/l KNO ₃ , pH 3,0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
100 mmol/l Cd(NO ₃) ₂	3,085 g Cd(NO ₃) ₂ add 100 ml 100 mmol/l KNO ₃ , pH 3,0	Fluka Chemie GmbH
100 mmol/l Pb(NO ₃) ₂	3,312 g Pb(NO ₃) ₂ add 100 ml 100 mmol/l KNO ₃ , pH 3,0	Merck KGaA
100 mmol/l AgNO ₃	0,169 g AgNO ₃ add 100 ml 100 mmol/l KNO ₃ , pH 3,0	Merck KGaA

Danksagung

Danke an Prof. Dr. M.J. Schöning und an Prof. Dr. M. Keusgen, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, eine Doktorarbeit machen zu können. Danke für die fachliche und persönliche Unterstützung und Förderung. Danke!

Danke an die Nebenprüfer, dass Sie sich die Mühe gemacht haben, die Arbeit zu begutachten und die Disputation zu gestalten. Danke!

Danke an Frau G. Lins und an Frau F. Lorek für die schöne Organisation. Danke!

Danke an Frau A. Stühn und an das BMBF für die finanzielle Unterstützung und Motivation. Danke!

Danke an die FH Aachen und an das FZ Jülich. Danke!

Danke an Prof. Dr. A. Offenhäusser, an Prof. Dr. A. Poghosian, an Prof. Dr. H.K. Berndt, an Prof. Dr. G. Elbers, an Prof. Dr. O. Lev und an Dr. J. Gun für die fachliche Unterstützung und Bereitstellung von Laboratorien. Danke!

Danke an Prof. Dr. W. Heiden und an A. Riesen für die schöne iterative Zusammenarbeit. Danke!

Danke an Dr. P. Krüger für die schöne Zusammenarbeit am BMBF-Projekt. Danke!

Danke an das IBN im FZ Jülich. Danke an Dr. J. Schubert, Dr. B. Holländer und an W. Zander für die Nutzung der PLD-Anlage sowie die zahlreichen RBS-Untersuchungen. Danke an H.P. Bochem, A. Steffen und J. Müller für die Nutzung des Reinraumes und die zahlreichen REM-Aufnahmen. Danke!

Danke an das INB in der FH Aachen. Danke an meine ganze Arbeitsgruppe in Jülich für die schöne Zusammenarbeit, Unterstützung, Diskussionen, netten gemeinsamen Nachmittage und Abende. Danke Maryam, David, Stefan, Matthias, Heiko, Christina, Jose, Joachim, Niko, Totti, Steffen, Frederik, Patrick und an alle Studenten des INBs. Danke!

Danke an die Arbeitsgruppe in Marburg für die schöne Aufnahme und sehr gute Betreuung. Danke für die *Cyanidase* und die dazugehörigen Diskussionen. Danke Lothar, Gigi, Holger, Elvira und Anja. Danke!

Danke an alle fleißigen Studenten, die mit mir zusammengearbeitet haben. Danke an Ming Li, Abhishek, Tegpal, Somi, Arash, Shiyun und Udaya. Danke!

Danke an Melanie, Claudia, Silvia, Simone, Thomas und Vera für die fachliche Unterstützung, Bereitstellung von Gerätschaften, gemeinsame Organisation sowie für die schönen gemeinsamen Abende. Danke!

Danke an meine Familie, an meinen Freund und an meine Freunde für alles. Danke!



Monika Turek

Kleine Rurstraße 3, D-52428 Jülich
Tel.: +49 (0)241-6009/53125, Tel.: +49 (0)2461-61/2466
E-mail: turek@fh-aachen.de

Persönliche Angaben

Geb. 10. Oktober 1980, Rybnik (Polen)
Deutsch, Ledig

Berufspraxis

07.2005 - 01.2010

Doktorandin, FH Aachen

- Kooperative Promotion an der FH Aachen, Institut für Nano- und Biotechnologien (INB), mit der Philipps-Universität Marburg, Institut für Pharmazeutische Chemie
- Thema: „Nachweis von Cyanid und Schwermetallen mittels Chip-basierter Chemo- und Biosensoren“
- Mitbetreuung von Praktika, Übungen, „Freshman“-Kursen
- Mitbetreuung von Mini-Projekten, Bachelor- und Masterarbeiten im Bereich der Bio- und Chemosensorik
- Mitgestaltung von Schulungen für die Industrie im Bereich der Bio- und Chemosensorik
- Mitorganisation von internationalem Workshop „Engineering of Functional Interfaces 2008“
- Betreuung eines BMBF- und K2-Projektes
- Akquirierung von neuen Projekten

07.2008 - 01.2010

Promotionsstipendium für FH-Absolventinnen „Maßnahmen zur Steigerung des Frauenanteils an Hochschulprofessuren“

10.2004 - 06.2005

Wissenschaftliche Mitarbeiterin, DKFZ Heidelberg

- Abteilung für Medizinische Physik in der Radiologie
- Experimentelle Untersuchungen und Modellierung von pharmako- und molekularkinetischen Vorgängen

09.2001 - 07.2003

Studentische Hilfwissenschaftlerin

- Institut für Neurowissenschaften und Medizin (INM), Forschungszentrum Jülich GmbH, Gruppe: Positron Emission Tomographie (PET)
- Medizinisches Elektronik Praktikum, FH Aachen
- Informatik Praktikum, FH Aachen

09.2001 - 07.2003

Hochschulpolitik

- Studentische Vertreterin im Senat und Fachbereichsrat
- Tutorin für Studenten im ersten und zweiten Semester

Studium

09.2000 - 07.2004

Biomedizinische Technik, FH Aachen

- Abschluss: Diplom-Ingenieurin (FH)

03.2004 - 07.2004

Diplomarbeit, INFN-LNL Padua, **Italien**

- Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Laboratori Nazionali di Legnaro, Italien
- Thema: „Microdosimetry: An advanced tool for boron neutron capture therapy (BNCT)“

26.11.2004

Ehrenplakette für hervorragende Leistungen im Studium

Praktika

10.2003 - 02.2004

Praxissemester, INFN-LNL Padua, **Italien**

- Bereich der Medizinischen Physik, Mikrodosimetrie

09.2001

Biomedizintechnik, INM, Forschungszentrum Jülich GmbH, Gruppe: PET

02.2001 - 03.2001

Krankenpflege im St. Marien-Hospital, Borken

06.2000 - 09.2000

Maschinenbau bei Maschinenfabrik Fooke, Borken

Schulbildung

09.1997 - 06.2000

Gymnasium Remigianum, Borken

09.1991 - 06.1997

Realschule Schönstätter-Marienschule, Borken

09.1989 - 07.1991

Grundschule Johann-Wallingschule, Borken

09.1987 - 07.1989

Grundschule, Rybnik (Polen)

Sprachkenntnisse

Deutsch und Polnisch als Muttersprache

Englisch, sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift

Italienisch, gute Kenntnisse in Wort und Schrift

Französisch, fortgeschrittene Kenntnisse in Wort und Schrift

Marburg, den 20.01.2010

