Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft Wissenschaftliche Berichte FZKA 6798

Miniaturisierte elektrochemische Detektoren für kapillare Analysesysteme

Mario Strasser

Institut für Instrumentelle Analytik

von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe 2002

Impressum der Print-Ausgabe:

Als Manuskript gedruckt Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

Miniaturisierte elektrochemische Detektoren für kapillare Analysesysteme

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel

von

Mario Strasser aus St. Martin, Deutschland

Basel, 2002

Miniaturisierte elektrochemische Detektoren für kapillare Analysesysteme

Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse umfassen drei Entwicklungsstufen. Zu Beginn stehen eine Einarbeitungsphase im Bereich der Kupfermikroscheibenelektroden und die Entwicklung einer beispielhaften Analysenmethode für die amperometrische Detektion an solchen Mikroelektroden.

Aufbauend auf die aus den Vorversuchen gewonnenen Ergebnisse erfolgt in der zweiten Entwicklungsstufe die Fertigung metallischer Dünnschichtelektroden mit Hilfe von Herstellungsverfahren aus dem Bereich der Mikrosystemtechnik und deren elektrochemische Charakterisierung. Dabei werden neben Dünnschichtelektroden aus Gold und Platin auch erstmalig Dünnschichtelektroden aus Kupfer eingeführt und näher untersucht. Im Anschluss daran steht der analytische Einsatz der Dünnschichtelektroden als diskrete elektrochemische Detektoren in der Kapillarelektrophorese. Dabei kommen insbesondere zwei Detektorgeometrien zum Einsatz. Neben der klassischen *wall-jet*-Anordnung wird die für planare Mikroelektroden einfach handhabbare tangential angeströmte Mikroelektrode näher untersucht.

Die letzte Entwicklungsstufe beschäftigt sich mit der Herstellung von Mikrokanälen aus polymeren Werkstoffen. Neu ist die Integration der Dünnschichtelektroden in das Mikrokanalsystem, wobei diese die Zu- und Ableitung der elektrophoretischen Hochspannung sowie die elektrochemische Detektion übernehmen. Daraus resultiert ein funktionstüchtiger CE-Chip mit elektrochemischer Detektion.

Miniaturized electrochemical detectors for capillary analysis systems

Summary

The following results consist of three stages of development. The first stage starts with an introduction to the field of copper microdisc electrodes and the evolution of an exemplary analysis method for the amperometric detection on such electrodes.

Building upon the results gained in the first stage it is possible to fabricate metallic thin layer electrodes in the second stage with the aid of microsystem technology. Also their electrochemical characterization is realized. Besides thin layer electrodes made of gold and platinum such electrodes made of copper are introduced for the first time. Further more the analytical use of thin layer electrodes as discrete electrochemical detectors in capillary electrophoresis is presented. In this context two detector layouts are compared. In addition to the classic wall jet detector using planar microelectrodes a new "tangentially approached" detector is closely studied in this work.

The last stage of development deals with the production of microchannels made of polymeric materials. New is the integration of thin layer electrodes for the high voltage as well as for the electrochemical detection. The combination of microchannels with thin layer electrodes results in a working CE-chip with electrochemical detection.

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung III
	Summary IV
	Inhaltsverzeichnis V
1	Einleitung 1
2	Theorie 5
2.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese 5
2.1.1	Aufbau der Kapillarelektrophorese 5
2.1.2	Ionenwanderung im elektrischen Feld 6
2.1.3	Der elektroosmotische Fluss (EOF) 8
2.1.4	Analytische Parameter 11
2.1.5	Die verschiedenen Arten der Kapillarelektrophorese 12
2.1.5.1	Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) 12
2.1.5.2	Die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC) 15
2.2	Elektrochemische Untersuchungsmethoden 17
2.2.1	Voltammetrie 17
2.2.2	Elektrochemische Detektoren in der Kapillaranalytik 24
2.2.2.1	Amperometrische Detektoren 27
2.2.2.2	Gepulste amperometrische Detektoren 29
2.2.2.3	Leitfähigkeitsdetektoren 30

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.2.4	Potentiometrische Detektoren 33
2.3	Mikrotechnik zur Herstellung miniaturisierter Analysesysteme 35
2.3.1	Photolithographie 36
2.3.2	Mikroabformung 41
2.3.2.1	Spritzgießen 41
2.3.2.2	Heißprägen 41
2.3.2.3	Mikroabformung mit Polydimethylsiloxan (PDMS) 42
2.3.3	Lasermikrobearbeitung 43
2.3.4	Herstellung dünner Schichten 45
3	Experimenteller Teil 48
3.1	Separation 48
3.1.1	Stationäres Kapillarelektrophoresesystem 48
3.1.2	CE-Chip 49
3.1.3	Mikrokanalsystem aus Polydimethylsiloxan (PDMS) 51
3.1.4	Sonstige Mikrokanalsysteme 54
3.2	Detektion 55
3.2.1	Konventionelle Strom- und Potentialmessung 55
3.2.2	Amperometrie mit der stromdurchflossenen Platinreferenz 56
3.2.3	Leitfähigkeitsdetektion 56
3.2.4	Mikroscheibenelektroden 58
3.2.5	Dünnschichtelektroden 60
3.3	Sonstige Methoden und Geräte 66
3.3.1	Kapillar-Batch-Injektions-Analyse (CBIA) 66

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.2	Weitere Geräte 67
3.4	Chemikalien 68
4	Ergebnisse 71
4.1	Kupfer als neues Material für die Herstellung von Dünnschichtelektroden 71
4.1.1	Einleitung 71
4.1.2	Einleitende Untersuchungen an Kupfer–Mikroscheibenelektroden 71
4.1.2.1	Voltammetrische Untersuchungen 71
4.1.2.2	Beispielhafte analytische Anwendung 77
4.1.3	Elektrochemische Charakterisierung von Kupfer-Dünnschichtelektroden 86
4.1.3.1	Voltammetrische Untersuchungen 86
4.1.3.2	Korrosionsverhalten dünner Kupferschichten in alkalischer Lösung 87
4.1.3.3	Voruntersuchungen zur analytischen Eignung der Kupfer- Dünnschichtelektroden 90
4.2	Der diskrete amperometrische Detektor 90
4.2.1	Untersuchungen an einer tangential angeströmten Dünnschichtelektrode 90
4.2.1.1	Grundlegende Untersuchungen zum Austritt der Probe am Kapillarende 90
4.2.1.2	Coulometrische Effizienz 90
4.2.1.3	Reproduzierbarkeit analytischer Kennzahlen 90
4.2.1.4	Lineare Regression und Nachweisgrenzen 90
4.2.2	Untersuchungen an einer Dünnschichtelektrode in der konventionellen wall-jet- Anordnung 90
4.2.2.1	Coulometrische Effizienz 90
4.2.2.2	Reproduzierbarkeit analytischer Kennzahlen 90
4.2.2.3	Lineare Regression und Eichung 90

INHALTSVERZEICHNIS

5	Schlussfolgerung 90
4.3.4	Kapillarelektrophoresesystemen 90
1.3.3.3	Brenzcatechin 90
4333	Separation und amperometrische Detektion von Dopamin und
4.3.3.2	Elektrokinetischer Transport und amperometrische Detektion von Eisensulfat 90
4.3.3.1	Amperometrische Detektion auf dem PDMS-Glas-Hybridchip 90
4.3.3	Amperometrische Detektion in miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystemen 90
4.3.2	Mikrosystemtechnische Realisierung von Mikrokanalstrukturen als Basis eines miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystems 90
4.3.1	Einleitung 90
4.3	Miniaturisierung eines Kapillarelektrophoresesystems 90
4.2.3	Häufig auftretende Probleme bei planaren Dünnschichtelektroden 90
4.2.2.4	Anwendung 90

6 Literatur 90

1 Einleitung

Die Anfänge des Miniaturisierungsstrebens in der Elektronik und Messtechnik liegen in den Entwicklungsarbeiten der Mikroelektronik in den 50er Jahren begründet und bis heute hat sich der Trend zur Realisierung immer kleiner Strukturen unbeirrt fortgesetzt. Auch im Bereich der instrumentellen Analytik spielt die Miniaturisierung von Analysengeräten eine wichtige Rolle, denn deren Vorteile sind offenbar: ressourcenschonende Herstellung, geringer Proben- und Chemikalienverbrauch und dementsprechend geringe Abfallmengen, sowie kurze Analysezeiten. Die konsequente Weiterentwicklung von einfachen miniaturisierten Analysensystemen beschreibt das µ-TAS-Konzept (*micro total analysis system*). Dabei wird das gesamte analytische Verfahren von der Probenvorbereitung über die Trennung bis hin zur Detektion und Signalverarbeitung von einem integrierten System durchgeführt [1].

Bei der Kapillarelektrophorese spielen neben den optischen Detektoren die elektroanalytischen Detektoren eine wichtige Rolle. Die Vielzahl der elektroanalytischen Methoden überspannen bei hohem Nachweisvermögen einen großen Anwendungsbereich in der anorganischen und organischen Analytik. Dabei zeichnen sich die elektroanalytischen Detektoren durch einen vergleichsweise geringen apparativen Aufwand im Bezug zu den optischen Detektoren aus. Für den Erhalt eines Analysesignals ist mit Ausnahme der Steuerelektronik letztendlich nur eine aus einem elektrisch leitfähigem Material bestehende Elektrode nötig, die sich hervorragend miniaturisieren lässt. Als Elektrodenmaterialien eignen sich unter anderem Graphit [2], Gold [3] und Platin [4], das

EINLEITUNG

hauptsächlich bei der Leitfähigkeitsdetektion eingesetzt wird. Kupfer stellt ein interessantes Elektrodenmaterial dar, das für die Detektion von Kohlenhydraten [5-7], Aminosäuren und Peptiden [8-10] eingesetzt werden kann.

Im Gegensatz zu den optischen Detektoren bewirkt bei den elektrochemischen Detektoren eine Verringerung des Zellvolumens bei der Detektorzelle in der Regel keine Verschlechterung des Nachweisvermögens. Unter Umständen kann die Miniaturisierung elektrochemischer Detektoren sogar Vorteile mit sich bringen:

Auf Grund der kleinen aktiven Fläche einer Mikroelektrode besitzt diese eine geringe Doppelschichtkapazität, wodurch kapazitive Einflüsse die Messung faradayscher Ströme weniger beeinflussen. Somit lassen sich voltammetrische Untersuchungen an Mikroelektroden mit hohen Potentialvorschubgeschwindigkeiten oder sehr kurzen Potentialpulsen durchführen. Weiterhin erhält man an Mikroelektroden ein gesteigertes Detektionssignal auf Grund eines erhöhten Massetransport zur Elektrodenoberfläche infolge sphärischer anstatt linearer Diffusion. Der geringe Stromfluss an Mikroelektroden und der damit verbundene geringe Spannungsabfall in der Messzelle ermöglicht den Einsatz hochohmiger Hintergrundelektrolyte. Aus dem gleichen Grund ergibt sich bei der amperometrischen Detektion eine apparative Vereinfachung, wodurch die Messung mit nur zwei Elektroden ermöglicht wird.

Bei der Kapillarelektrophorese handelt es sich um ein analytisches Trennverfahren ähnlich chromatographischer Verfahren. Dabei zeichnet sich die Kapillarelektrophorese durch eine hohe Trenneffizienz bei kurzen Analysezeiten aus, wobei die Trennung meist in unbeschichteten, kostengünstigen Quarzglaskapillaren erfolgt. Ursprünglich wurde die Kapillarelektrophorese für die Trennung organischer Verbindungen eingesetzt, jedoch hat

EINLEITUNG

sich ihr Einsatzgebiet über die Jahre bis in den Bereich der anorganischen Ionenanalytik ausgedehnt [11, 12].

Miniaturisierte elektrochemische Detektoren eignen sich ausgezeichnet für die Detektion an Kapillaren mit Innendurchmessern $< 50 \mu$ m. Für optische Detektoren ist das ein Problem, da die kurze optische Weglänge und die Lichtstreuung an dem runden Kapillarquerschnitt die Empfindlichkeit stark herabsetzen. Bei der Kapillarelektrophorese stellt jedoch der direkte Kontakt des elektrochemischen Detektors zum Leitelektrolyt einen Nachteil dar. Der Einfluss der Hochspannung kann hier im besonderen Maße die Detektion stören. Eine nicht zu unterschätzende Herausforderung stellt auch die korrekte Ausrichtung der Mikroelektrode zum Kapillarausgang dar.

Ziel der Einführung des CE-Chips ist eine nochmalige Steigerung der Leistungsfähigkeit der Kapillarelektrophorese [13]. Im Vordergrund stehen hierbei extrem kurze Analysenzeiten [14] und simultane Trennungen [15], um eine hohe Anzahl an Analysen zu ermöglichen (*high throughput screening*). Während erste CE-Chips noch aus Glas [16] gefertigt wurden, haben mittlerweile polymere Werkstoffe [17-20] ein großes Interesse erlangt, insbesondere im Hinblick auf zukünftige Einsatzgebiete, wie DNA- [21-24] und Proteinanalytik [25]. Dabei spielt auch die kostengünstige Herstellung von CE-Chips aus polymeren Werkstoffen, sowie deren physikalisch-chemischen Eigenschaften eine Rolle.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Miniaturisierung von elektrochemischen Detektoren und fluidischen Kanälen für die Kapillarelektrophorese, wobei sich die Herstellung der Mikrokanäle auf die Abformung in polymeren Werkstoffen beschränkt. Schließlich wird die elektrophoretische Trennung mit der elektrochemischen Detektion zu einem miniaturisierten *CE-Chip* (*capillary electrophoresis chip*) kombiniert.

EINLEITUNG

Im Folgenden sind die Ziele, die dieser Arbeit zugrunde lagen aufgeführt:

- Ein elektrochemischer Detektor soll unter dem Einsatz von Arbeitsweisen aus der Mikrosystemtechnik entwickelt werden. Er soll einfach handhabbar, kostengünstig und in größeren Stückzahlen herstellbar sein.
- Es soll eine Einarbeitung in das Funktionsprinzip der amperometrischen Detektion an klassischen Cu-Mikroscheibenelektroden erfolgen. Dabei ist eine beispielhafte Analysenmethode, die sich im Verlauf der Arbeit auf Cu-Dünnschichtelektroden übertragen lässt, zu entwickeln.
- Ein mit Hilfe von Fertigungstechniken aus der Mikrosystemtechnik hergestellter diskreter elektrochemischer Detektor soll an die Trennkapillare einer konventionellen Kapillarelektrophorese angekoppelt werden. Im Anschluss daran erfolgt die Optimierung der Leistungsfähigkeit des Detektors für ein Modellanalyt-System.
- Grundlegende Experimente zur Handhabung und zum elektrokinetischen Transport an aus Kunststoff gefertigten mikrofluidischen Kanälen bilden den Ausgangspunkt für die Entwicklung eines CE-Chips.
- An Hand eines CE-Chips auf der Basis mikrofluidischer Kanäle aus Kunststoff soll die elektrophoretische Separation mit elektrochemischer Detektion studiert werden.

2 Theorie

2.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

2.1.1 Aufbau der Kapillarelektrophorese

Bei der Kapillarelektrophorese handelt es sich um ein Trennverfahren, wobei Ionen auf Grund ihrer Größe und Ladung im elektrischen Feld getrennt werden. Über die erste kapillarelektrophoretische Trennung in einer offenen Glasröhre berichtete Hjerten [26]. Um störende Konvektionseffekte zu reduzieren, ließ er die Röhre um ihre Längsachse rotieren. Der eigentliche Beginn der Kapillarelektrophorese wurde jedoch erst zu Ende der 70er Jahre durch die Arbeiten von Mikkers et al. [27] und weiterhin zu Beginn der 80er Jahre von Jongenson et al. [28, 29] eingeleitet.

Zur Durchführung der Kapillarelektrophorese (Abbildung 2-1) wird eine Hochspannungsquelle benötigt, deren beide Pole in zwei Puffergefäße eintauchen. Die beiden Puffergefäße sind durch eine Trennkapillare mit Innendurchmessern normalerweise zwischen 25 µm und 100 µm verbunden. Der hohe elektrische Widerstand der Kapillare macht ein Arbeiten bei hohen Feldstärken von 100 – 500 V/cm möglich. Zur Probenaufgabe wird das eine Ende der Trennkapillare aus dem Puffergefäß genommen und in ein Probengefäß eingetaucht. Die Injektion der Probesubstanzen kann auf hydrodynamischem oder elektrokinetischem Weg erfolgen. Der Detektor ist an dem der Injektionsseite gegenüberliegenden Ende der Kapillare angebracht. Als Trennkapillare wird meist eine ungefüllte Quarzglaskapillare benutzt.



Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophoresegeräts.

2.1.2 Ionenwanderung im elektrischen Feld

Bei der Elektrophorese nutzt man die Tatsache, dass sich Ionen innerhalb des elektrischen Feldes mit konstanter Geschwindigkeit bewegen [30]. Die Geschwindigkeit eines Ions i ist proportional zur Feldstärke E und ist gegeben durch:

$$\mathbf{v}_{i} = \boldsymbol{\mu}_{i} \mathbf{E} \tag{2.1}$$

Der Proportionalitätsfaktor μ_i steht für die elektrophoretische Mobilität des Ions i. Im Bezug auf das Lösungsmittel stellt die Mobilität für das Ion i eine charakteristische Konstante dar. Die Mobilität wird zum einen durch die elektrische Kraft, die auf das Ion im elektrischen Feld einwirkt, beschrieben und zum anderen durch die Reibungskraft in der Flüssigkeit, die der elektrischen Kraft entgegen wirkt. Die elektrische Kraft F_e wird folgendermaßen berechnet:

$$F_e = q_i E \tag{2.2}$$

 q_i steht für die Ladung des Ions i. Die Reibungskraft F_r , die durch die Flüssigkeit dem kugelförmigen Ion i als Gegenkraft zur elektrischen Kraft F_e entgegenwirkt, lässt sich wie

folgt beschreiben:

$$F_r = -6\pi\eta r_i v_i \tag{2.3}$$

wobei η die Viskosität des Lösungsmittels darstellt und r_i den Ionenradius. Während der Elektrophorese bildet sich ein stationärer Zustand, wobei beide Kräfte gleich groß sind, jedoch entgegengesetzt wirken:

$$qE = -6\pi\eta r_i v_i \tag{2.4}$$

Indem man Gleichung 2.4 nach der Geschwindigkeit auflöst und in Gleichung 2.1 einsetzt, erhält man Gleichung 2.5, die die Mobilität in Abhängigkeit physikalischer Parameter darstellt:

$$\mu_i = \frac{q_i}{6\pi\eta r_i} \tag{2.5}$$

Aus Gleichung 2.5 ist ersichtlich, dass kleine, hoch geladene Ionen hohe Mobilitäten ausweisen, während große Ionen mit geringer Ladung kleine Mobilitäten besitzen. Laut Konvention haben Kationen positive und Anionen negative Mobilitäten.

Der messbare Stromfluss I in einer Elektrolytlösung ist abhängig von deren Leitfähigkeit G und der angelegten Spannung U:

$$I = U \cdot G \tag{2.6}$$

Die spezifische Leitfähigkeit einer Elektrolytlösung ist wie folgt definiert:

$$\kappa = \frac{G \cdot l}{A} = \frac{I}{E \cdot A}$$
(2.7)

Dabei ist l die Länge des Leiters, A dessen Querschnitt und $E = \frac{U}{I}$ die elektrische Feldstärke. Bei gegebener Konzentration der Elektrolytlösung ergibt sich deren molare

Leitfähigkeit A als Quotient aus spezifischer Leitfähigkeit κ und Konzentration c:

$$\Lambda_{\rm m} = \frac{\kappa}{\rm c} \tag{2.8}$$

2.1.3 Der elektroosmotische Fluss (EOF)

Einen fundamentalen Bestandteil der Kapillarelektrophorese stellt der elektroosmotische Fluss (EOF) [31] dar. Als EOF beschreibt man den Fluss des Lösungsmittels in der Kapillare hervorgerufen durch das angelegte elektrische Feld und die Oberflächenladung der Kapillarinnenwand. Die deprotonierten Silanolgruppen an der Kapillarinnenwand stehen in Wechselwirkung mit den Kationen im Lösungsmittel. Somit erfolgt ein Ladungsausgleich durch den Aufbau einer Doppelschicht (Stern-Modell) nahe der Kapillarwand. In der ersten Schicht, auch innere Helmholtz- oder Stern-Schicht genannt, bilden die Kationen eine starre Grenzschicht. Im Anschluss daran folgt die diffuse äußere Helmholtz-Schicht, in der bei angelegtem elektrischen Feld die Kationen in Richtung der Kathode wandern. Da die Kationen umgeben in Richtung der Kathode. Auf Grund von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen allen Wassermolekülen in dem Lösungsmittel bewegt sich letzten Endes auch das gesamte Lösungsmittel in Richtung der Kathode.

Die Doppelschicht in Nähe der Kapillarwand erzeugt eine elektrische Potentialdifferenz $\Delta \Psi$ zwischen der Quarzglasoberfläche der Kapillare und dem Lösungsmittel [32]. Innerhalb der starren Schicht fällt das Potential φ linear mit zunehmendem Abstand von der Kapillarwand ab. Im Gegensatz dazu nimmt das Zeta-Potential ζ der diffusen Schicht

mit zunehmendem Abstand zur Kapillarwand exponentiell ab (Abbildung 2-2). Das Zeta-Potential ζ ist gegeben durch:

$$\zeta = \frac{4\pi e\delta}{\varepsilon} \tag{2.9}$$

Dabei steht δ für die Dicke der diffusen Grenzschicht, e für die Ladungsdichte an der Oberfläche und ϵ ist die Dielektrizitätskonstante des Elektrolyten.



Abbildung 2-2: Stern-Modell einer elektrochemischen Doppelschicht.

Weiterhin ist das Zeta-Potential ζ direkt proportional zur Geschwindigkeit des EOF v_{eof}, die sich wie folgt berechnet:

$$v_{eof} = \frac{\varepsilon E \zeta}{4\pi e}$$
(2.10)

Bei chromatographischen Trennverfahren, bei denen der Analyt mittels Druck bewegt wird, erhält man eine laminares Strömungsprofil (Abbildung 2-3). Im Gegensatz dazu ist das Strömungsprofil bei der Kapillarelektrophorese nahezu eben, außer in unmittelbarer Nähe zur Kapillarwand. Dort geht die Fließgeschwindigkeit gegen Null [33]. Diese Tatsache sollte sich in einer verringerten Bandenverbreiterung bei der Kapillarelektrophorese im Vergleich zur HPLC bemerkbar machen.



Abbildung 2-3: Strömungsprofil bei a) hydrodynamischem und b) elektroosmotischem Fluss.

2.1.4 Analytische Parameter

Die analytischen Parameter der Kapillarelektrophorese leiten sich von der Säulenchromatographie ab. Darunter fallen Migrationszeiten, Mobilitäten, Peakparameter und auch peakverbreiternde Prozesse wie Diffusion, Joule-Wärme, Injektion und Adsorptionsprozesse.

Die Zeit, die ein Analyt braucht, um zum Detektor zu gelangen, nennt man Migrationszeit t. Aus der Migrationszeit t des Analyten, der Migrationszeit t_{eof} des elektroosmotischen Flusses, der effektiven Kapillarlänge zum Detektor l, der Gesamtlänge der Kapillare L und dem angelegten Potential V lässt sich die effektive Mobilität μ_e des Analyten berechnen:

$$\mu_{e} = \frac{IL}{tV} - \frac{IL}{t_{eof}V}$$
(2.11)

Die effektive Mobilität μ_e ist eine geräteunabhängige Größe. Sie ist jedoch stark vom pH-Wert und dem verwendeten Puffer abhängig.

Die Entstehung von Peakverbreiterungen kann man auf unterschiedliche Geschwindigkeiten innerhalb der Probenzone zurückführen. Für einen Gauss-Peak sollte für dessen Basislinienbreite w folgende Gleichung erfüllt sein:

$$w = 4\sigma \tag{2.12}$$

 σ beschreibt die Standardabweichung des Peaks.

Eine Beschreibung der Effektivität ausgedrückt durch die theoretische Bodenzahl N erhält man durch Gleichung (2.13):

$$N = \left(\frac{1}{\sigma}\right)^2$$
(2.13)

Einfacher ist es jedoch die Anzahl der theoretischen Böden direkt aus dem Elektropherogramm zu ermitteln, indem man die Peakbreite $w_{\frac{1}{2}}$ bei halber Peakhöhe ermittelt:

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2$$
(2.14)

2.1.5 Die verschiedenen Arten der Kapillarelektrophorese

Der Begriff "Kapillarelektrophorese" ist ein Sammelbegriff für eine Anzahl verschiedener Trenntechniken [34]. Die beiden wichtigsten Techniken sind die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC). Weitere elektrophoretische Verfahren sind die kapillare isoelektrische Fokussierung (CIEF), die kapillare Isotachophorese (CITP), die Kapillargelelektrophorese (CGE) und die Kapillarelektrochromatographie (CEC), bei der die Kapillare mit stationären Phasen aus der HPLC gefüllt ist.

2.1.5.1 Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Das am häufigsten eingesetzte Verfahren stellt die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) dar, wobei die ionischen Analyte auf Grund von Mobilitätsdifferenzen in elektrolytgefüllten Kapillaren getrennt werden. Eine gleichzeitige Trennung von Kationen und Anionen ist auf Grund des elektroosmotischen Flusses möglich. Neutrale Analyte können jedoch nicht getrennt werden und koeluieren mit dem elektroosmotischen Fluss. Eine Änderung des pH-Wertes des Leitelektrolyten bei der CZE hat eine unmittelbare Änderung des elektroosmotischen Flusse zur Folge. Diese Änderung wirkt sich nicht auf die Selektivität

(relative Elutionsreihenfolge) der Methode aus, jedoch beeinflusst sie Migrationszeit und Auflösung. Die Auflösung R zweier Analysensignale ist definiert durch:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$$
(2.15)

mit t₁ und t₂ als Migrationszeiten der beiden Analyte und w₁ und w₂ als Basislinienbreite der Analysensignale. Bei der Kapillarelektrophorese wird die Auflösung R zweier Analyte im Gegensatz zur Chromatographie vor allem durch die Effektivität und nicht durch die Selektivität bestimmt. Besitzt man jedoch die Fähigkeit die Selektivität zu manipulieren, so kann man die Auflösung verbessern. Die Zugabe von Additiven (anionisch, kationisch, zwitterionisch und nicht-ionisch) zum Leitelektrolyt bewirkt eine Änderung der Selektivität. Unterhalb ihrer kritischen Mizell-Bildungskonzentration (CMC) können diese Additive z. B. die Löslichkeit hydrophober Verbindungen ermöglichen oder die elektrischen Eigenschaften der Kapillarinnenwand verändern (Abbildung 2-4).



Abbildung 2-4: Einfluss der Konzentration an kationischen Tensiden im Leitelektrolyt auf den elektroosmotischen Fluss: a) Ohne Zugabe des Additivs ist der EOF in Richtung der Kathode gerichtet, b) Eliminierung des EOF bei geringen Additivkonzentrationen und c) Umkehr des EOF bei höheren Additivkonzentrationen.

2.1.5.2 Die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)

Erhöht man die Konzentration der Additive am Leitelektrolyt über die CMC so spricht man von der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie (MEKC) [35]. Erstmals wurde diese Art der Kapillarelektrophorese von Terabe et al. [36] beschrieben. Bei der MEKC können neben ionischen Analyten auch ungeladene Moleküle getrennt werden.

Bei Mizellen handelt es sich um sphärische Gebilde, deren hydrophobes Ende zur Mitte hin orientiert ist und deren geladener Teil nach außen in Richtung der Leitelektrolytmoleküle weist. Auf Grund ihrer Ladung wandern sie entweder mit oder gegen den elektroosmotischen Fluss. Des Weiteren können sie sowohl durch elektrostatische als auch durch Dispersionswechselwirkung mit dem Analytmolekül in Wechselwirkung treten. Für neutrale Analyte ist ausschließlich die Wechselwirkung mit den Mizellen für deren Trennung verantwortlich. Für den Fall negativ geladener Mizellen hat das Analytmolekül eine längere Migrationszeit mit zunehmender Wechselwirkung mit den Mizellen, da sich diese bezüglich des elektroosmotischen Flusses in entgegengesetzte Richtung bewegen. Besteht zwischen dem Analyt und den Mizellen keine Wechselwirkung, so wird der Analyt zur gleichen Zeit wie der elektroosmotische Fluss eluiert.

Die Trennung neutraler Analyte bei der MEKC ist der Chromatographie ähnlich. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden liegt darin, dass sich die stationäre Phase bei der MEKC im Gegensatz zur stationären Phase bei der Chromatographie bewegt und deshalb als pseudo-stationäre Phase bezeichnet wird. Das Verhältnis zwischen der Anzahl an Analytmolekülen in den Mizellen und der Anzahl an Analytmolekülen in der mobilen Phase wird als Kapazitätsfaktor k' bezeichnet:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 (1 - \frac{t_r}{t_w})}$$
(2.16)

Hierbei ist t_r die Migrationszeit des mit der Mizelle wechselwirkenden Analyten, t_0 ist die Migrationszeit eines Analyten in der mobilen Phase und t_m die Migrationszeit der Mizelle. Für den Fall der stationäre Phase in der Chromatographie ist t_m unendlich groß und die Gleichung geht in die bekannte Form über:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$
(2.17)

Die Auflösung R zweier Analyte in der MEKC beschreibt Gleichung 2.18:

$$\mathbf{R} = \left(\frac{\mathbf{N}^{\frac{1}{2}}}{4}\right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{\mathbf{k'}_2}{\mathbf{k'}_2 + 1}\right) \cdot \left(\frac{1 - \left(\frac{\mathbf{t}_0}{\mathbf{t}_m}\right)}{1 - \left(\frac{\mathbf{t}_0}{\mathbf{t}_m}\right) \cdot \mathbf{k}_1}\right)$$
(2.18)

Aus der Gleichung geht hervor, dass man die Auflösung durch Optimierung der

Effektivität
$$\left(\frac{N^{\frac{1}{2}}}{4}\right)$$
, Selektivität $\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)$ und Migration $\left(\frac{k'_2}{k'_2+1}\right) \cdot \left(\frac{1-\left(\frac{t_0}{t_m}\right)}{1-\left(\frac{t_0}{t_m}\right) \cdot k_1}\right)$

durch Variation der Additivkonzentration verbessern kann.

2.2 Elektrochemische Untersuchungsmethoden

2.2.1 Voltammetrie

Voltammetrische Verfahren beruhen auf einer Strommessung an Elektroden, an denen eine elektrochemische Umsetzung von Analyten stattfindet. Wird ein Analyt oxidiert oder reduziert, so fließt ein Strom, der in Abhängigkeit von der angelegten Spannung in Strom-Spannungs-Kurven registriert wird. Aus ihnen kann man sowohl quantitative als auch qualitative Informationen über den Analyten entnehmen.

Befindet sich die Elektrode im thermodynamischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung, dann gilt für eine an der Elektrode ablaufende Redoxreaktion eines Redoxpaares $Ox + ze^- \rightarrow Red$ die nernstsche Gleichung:

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 + \frac{\mathbf{RT}}{z\mathbf{F}} \cdot \ln \frac{[\mathbf{Ox}]}{[\mathbf{Red}]}$$
(2.19)

wobei E das Gleichgewichtspotential, E₀ das Standardpotential, R die ideale Gaskonstante, T die Temperatur, n die Zahl der übertragenen Elektronen, F die Faraday-Konstante, [Ox] die Konzentration der oxidierten Form und [Red] die Konzentration der reduzierten Form der am Redoxprozess beteiligten Spezies beschreibt. Die Reduktion der oxidierten Form an der Elektrode erreicht man durch eine Veränderung des Potentials in negativer Richtung, wobei ein Anstieg des Stromes in negativer Richtung so lange erfolgt bis die Oberflächenkonzentration der oxidierbaren Spezies auf Null abgesunken ist. Den bei diesem heterogenen Ladungstransfer fließenden Strom bezeichnet man als faradayscher Strom. Der weitere Stofftransport zur Elektrode erfolgt durch Diffusion, die jedoch langsamer als die Elektrodenreaktionen ist und zu einer Abnahme des fließenden Stroms führt (Diffusionskontrolle). Neben der Diffusion können in einer Lösung auch die Konvektion und die Migration von Ionen im elektrischen Feld zum Stofftransport zur Elektrode beitragen. Mathematisch lässt sich der gesamte Stofftransport J zur Elektrode durch die Nernst-Planck-Gleichung beschreiben [37]:

$$J(x,t) = -D\frac{\partial c(x,t)}{\partial x} - \frac{zDFc}{RT} \cdot \frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x} + c(x,t) \cdot V(x,t)$$
(2.20)

in der D den Diffusionskoeffizienten, $\frac{\partial c(x,t)}{\partial x}$ den Konzentrationsgradient, $\frac{\partial \phi(x,t)}{\partial x}$ den

Potentialgradient und V(x,t) die hydrodynamische Geschwindigkeit beschreibt.

Für den Fall, dass keine Konvektion stattfindet und die Migration durch Zugabe eines Leitsalzes unterdrückt wird, erfolgt der Stofftransport zur Elektrode ausschließlich durch Diffusion in Bezug auf den an der Elektrode vorherrschenden Konzentrationsgradienten. Die Elektrodengröße und –geometrie nimmt hierbei Einfluss auf die Diffusion. Für den Fall einer Elektrode mit einigen Quadratmillimetern Elektrodenfläche und einem sehr großen Elektrolytvolumen/Flächen-Verhältnis kommt es zu einer semiinfiniten planaren Diffusion unabhängig von der Form der Elektrode [38]. Beim Übergang zu kleineren Elektrodenflächen wird der Diffusionsprozess von der Größe und der Geometrie der Elektrodenfläche geprägt [39, 40]. Bei planaren Mikroelektroden wird zusätzlich zur planaren Diffusion eine radiale Diffusion wirksam, wobei ein räumliches Diffusionsfeld entsteht [41].



Abbildung 2-5: Diffusionsfelder an Makro- und Mikroelektroden: a) semiinfinite planare Diffusion an Makroelektroden, b) radiale Diffusion an Mikroelektroden.

Zur mathematischen Beschreibung von planaren Diffusionsverhältnissen an stationären Makroscheibenelektroden ist das zweite ficksche Gesetz anzuwenden [42]:

$$\frac{\partial \mathbf{c}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \mathbf{c}}{\partial x^2} \tag{2.21}$$

Dieses Gesetz führt zu einer Gleichung für den Diffusionsgrenzstrom I_{gr} an einer stationären Makroscheibenelektrode (Cottrell-Gleichung):

$$I_{gr} = -zFA \frac{D}{\sqrt{\pi Dt}}c \qquad (2.22)$$

welche besagt, dass sich der Diffusionsgrenzstrom I_{gr} umgekehrt proportional zu \sqrt{t} verhält und die Diffusionsschichtdicke $\sqrt{\pi Dt}$ eine Funktion der Zeit ist.

Für den Fall einer planaren Mikroscheibenelektrode mit radialen Diffusionsverhältnissen lautet das zweite ficksche Gesetz:

$$\frac{\partial \mathbf{c}}{\partial \mathbf{t}} = \mathbf{D} \left(\frac{\partial^2 \mathbf{c}}{\partial \mathbf{r}^2} + \frac{1}{\mathbf{r}} \cdot \frac{\partial \mathbf{c}}{\partial \mathbf{r}} + \frac{\partial^2 \mathbf{c}}{\partial z^2} \right)$$
(2.23)

Die Diffusion dehnt sich vor der Elektrodenoberfläche über einen größeren Raumwinkel aus und wächst damit bezogen auf die Elektrodenoberfläche überproportional an. Die Anzahl der pro Zeit- und Flächeneinheit auf die Elektrodenoberfläche auftreffenden Teilchen ist im Vergleich zur rein planaren Diffusion größer. Des Weiteren wächst die Diffusionsschicht mit fortschreitender Zeit nicht mehr an, wie das bei der rein planaren Diffusion an Makroelektroden der Fall ist. Durch eine Reihenentwicklung ergibt sich der Grenzstrom Igr für eine Mikroscheibenelektrode nach Abbruch nach dem zweiten Glied wie folgt [43]:

$$I_{gr} \approx 4zFc^*r + \frac{8}{\pi} \frac{zF\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}}cr^2 + \dots$$
 (2.24)

 c^* ist hierbei die Konzentration der elektroaktiven Spezies im Lösungsinnern. Der Gleichung ist zu entnehmen, dass sich der Diffusionsgrenzstrom I_{gr} aus einem zeitabhängigem und einem zeitunabhängigem Term zusammensetzt. Ist der Radius der Mikroelektrode sehr klein, so wird schon nach einer kurzen Zeit der zeitunabhängige Term dominieren, während man den zeitabhängigen Term vernachlässigen kann. Dann erhält man einen zeitunabhängigen konstanten (stationären) Grenzstrom.

Untersuchungen von Oldham et al. [44, 45] haben gezeigt, dass sich die stationären Grenzströme I_{gr}^{s} von Mikroelektroden mit unterschiedlichen Elektrodengeometrien durch eine Gleichung in Abhängigkeit des Oberflächendurchmessers χ beschreiben lassen:

$$I_{or}^{s} = 2z\chi FDc^{*}$$
(2.25)

Für eine Kugel gilt $\chi = 2\pi r$, für eine Halbkugel $\chi = \pi r$ und für eine Scheibe $\chi = 2r$.

Die Zeit t_{ε} , die notwendig ist bis sich der stationäre Zustand an einer Mikroelektrode eingestellt hat, wurde durch Zoski et al. [46] beschrieben:

$$t_{\varepsilon} = \frac{4 \cdot 10^4 r^2}{\pi^3 \varepsilon^2 D}$$
(2.26)

 ε berücksichtigt eine Abweichung und wird in Prozent ausgedrückt. Somit ergibt sich für eine typische Mikroscheibenelektrode mit einem Durchmesser von 25 µm eine Zeitspanne von t_{5%} = 8.1 s bis sich der stationäre Zustand eingestellt hat.

Bisher stammte das Messsignal an der Elektrode von einer elektrochemischen Umsetzung eines Analyten an der Elektrodenoberfläche (faradayscher Strom). Dem faradayschen Strom ist jedoch ein kapazitiver Strom überlagert, hervorgerufen durch Änderungen an der elektrochemischen Doppelschicht, welche sich wie ein Kondensator verhält. Es ist jedoch messtechnisch nicht möglich den kapazitiven Strom vom faradayschen Strom zu separieren. Um aussagekräftige Untersuchungen von Elektrodenreaktionen durchführen zu können, sollte der faradaysche Strom im Verhältnis zum kapazitiven Strom wesentlich größer sein. Bei einer sprunghaften Änderung des Potentials E an einer Elektrode in einer Elektrolytlösung mit dem Widerstand R und einer Doppelschicht mit einer Doppelschicht-kapazität C registriert man einen zeitabhängigen kapazitiven Strom I.

$$I_{c} = \frac{\Delta E}{R} e^{-t/RC}$$
(2.27)

Der kapazitive Strom I_c klingt umso schneller ab, je kleiner der RC-Term ist. Die bei Mikroelektroden kleine Elektrodenoberfläche wirkt sich dabei positiv auf das Analysen-

signal aus, da die kapazitiven Ströme proportional zur Elektrodenoberfläche abnehmen, während die faradayschen Ströme nur proportional zum Elektrodenradius abnehmen.

Bei voltammetrischen Untersuchungen arbeitet man in der Regel mit einem Dreielektrodensystem aus Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode (Abbildung 2-6). Das angelegte Arbeitspotential liegt zwischen einer Arbeitselektrode und der Gegenelektrode, wobei der Potentialsprung an der Gegenelektrode nicht unbedingt konstant zu sein braucht. Der Potentialsprung an der Arbeitselektrode wird stromlos zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode gemessen, welche so nah als möglich zur Arbeitselektrode positioniert werden sollte. Die Messelektronik registriert Veränderungen beim Potentialsprung Arbeitselektrode/Lösung und kompensiert diese, so dass der Potentialsprung wieder so hoch wie bei Stromlosigkeit ist. Auf Grund des ohmschen Widerstandes des Elektrolyten kommt es an der Gegenelektrode zu einem ohmschen Spannungsabfall IR. Dieser Effekt ist umso größer, je geringer die Leitfähigkeit des Elektrolyten und je größer der Gesamtstrom (faradayscher und kapazitiver) ist. Dieser ohmsche Spannungsabfall tritt natürlich auch zwischen der Referenz- und der Arbeitselektrode auf und kann von der Elektronik nicht kompensiert werden. Aus genau diesem Grund ist es wichtig, die Referenzelektrode so nah als möglich zur Arbeitselektrode platzieren.

An Mikroelektroden fließen auf Grund der kleinen Elektrodenoberflächen nur geringe Ströme im nA- und pA-Bereich. Somit kann die 2-Elektrodentechnik angewandt werden, ohne dass dabei die strombelastete Referenz-/Gegenelektrode merklich polarisiert wird, d.h. ohne nennenswerte Änderung des Arbeitspotentials.



Abbildung 2-6: Funktionsweise der Dreielektrodenanordnung bestehend aus Arbeitselektrode A, Gegenelektrode G und Referenzelektrode R: a) Schematische Darstellung des Messprinzips. b) Potentialsprünge an Mess- und Gegenelektrode im stromlosen Zustand (—) und bei Stromfluss (---).

Untersuchungen an Mikroelektroden haben gezeigt, dass bei einem stationären diffusionskontrollierten Grenzstrom der ohmsche Spannungsabfall nur von der spezifischen Leitfähigkeit des Elektrolyten abhängt [47-49].

Zwingt man der Arbeitselektrode ein sich nicht zu schnell ändernden linearen Potentialverlauf auf, so spricht man von der Dreiecksspannungsmethode oder der Zyklovoltammetrie. Dabei werden zwei Umkehrpotentiale definiert zwischen denen das Potential der Messelektrode hin- und herläuft. Die zyklische Voltammetrie ist in erster Linie ein Verfahren zur Untersuchung von Redoxvorgängen an Elektroden. Neben der zyklischen Voltammetrie kommt bei den voltammetrischen Untersuchungsverfahren der Polarographie eine große Bedeutung zu. Hierbei wird die Strom-Spannungskurve an einem stationären oder tropfenden Quecksilbertropfen aufgenommen.

2.2.2 Elektrochemische Detektoren in der Kapillaranalytik

Obwohl elektrochemische Detektoren im Routinebetrieb meist weniger robust sind als optische, finden sie dennoch häufig Anwendung. Ein wichtiger Grund dafür ist ihr einfacher Aufbau und der damit verbundene geringere Anschaffungspreis für die apparative Ausrüstung. Gerade bei einer Miniaturisierung von Detektorsystemen ist ein einfacher Aufbau von Vorteil.

Besondere Bedeutung unter den elektrochemischen Detektionsverfahren kommt der amperometrischen Detektion zu, da sie eine gute Selektivität bei hohem Nachweisvermögen mit sich bringt. Eine ebenfalls gute Selektivität bei geringerem Nachweisvermögen erhält man mit potentiometrischen Detektoren, wobei man das Potential an einer ionenselektiven Arbeitselektrode in Abhängigkeit einer Bezugselektrode misst. Immer mehr an Bedeutung gewinnt die Leitfähigkeitsdetektion als robuste Detektionsart mit guter Reproduzierbarkeit.



Abbildung 2-7: Anordnungen von elektrochemischen Detektoren: a) on-column-Detektion, b) off-column-Detektion, c) end-column-Detektion in der wall-jet Anordnung d) end-column-Detektion in der wall-tube-Anordnung.

Bei allen Arten der elektrochemischen Detektion hat die Positionierung der Mikroelektrode Einfluss auf das Analysensignal. Für die Positionierung von Mikroelektroden (Abbildung 2-7) bei der Kapillarelektrophorese finden vor allem 3 Anordnungsmöglichkeiten in der Literatur [42] Erwähnung. Die *on-column*-Anordnung zeichnet sich dadurch aus, dass der Detektor auf der Kapillare sitzt. Diese Möglichkeit wird vor allem bei der optischen Detektion genutzt, seltener bei der elektrochemischen Detektion, da das elektrische Feld in

der Kapillare die Detektion in erheblichem Maße stört. Durch eine geschickte Anordnung der Detektionselektroden im Mikrokanal und bei geeigneter Wahl des Detektionspotential war es Selvaganapathy et al. [50] dennoch gelungen, Neurotransmitter in der *on-column*-Anordnung zu detektieren. Durch die Verwendung eines elektrisch von der Hochspannung entkoppelten, batteriebetriebenen Potentiostaten war es Martin et al. [51] möglich, innerhalb eines Mikrokanals amperometrisch zu detektieren.

Bei der *off-column*-Anordnung wird die Trennkapillare an ein kurzes Stück Detektionskapillare mittels eines porösen Kupplungsstücks (z.B. poröses Glas oder Graphit [52], Nafion-Membran [53], Celluloseazetat [54] oder Palladium [55]) gebunden. Das Hochspannungspotential kann über das Kupplungsstück abfallen, wobei der Analyt - ohne den Einfluss der Hochspannung nur durch den elektroosmotischen Fluss - zum Detektor geschoben wird. Dabei geht das in der Trennkapillare vorhandene CE-typische flache Strömungsprofil in ein in der Detektionskapillare gegenwärtiges laminares Strömungsprofil über. Als Elektrode bietet sich die Verwendung einer Kohlefaser [56] an, die in die Kapillare eingeschoben wird. Auf Grund des recht komplizierten Aufbaus ist die *offcolumn*-Anordnung für den Einsatz bei Mikrokanälen auf CE-Chips wenig geeignet.

Die häufigste Verwendung bei den elektrochemischen Detektoren findet die *end-column*-Anordnung. Hierbei wird die Mikroelektrode meist unter Zuhilfenahme eines Mikromanipulators in geringem Abstand vom Kapillarausgang positioniert und ist somit vom elektrischen Feld der Hochspannung entkoppelt. Um den Einfluss der Hochspannung noch weiter zu minimieren, empfiehlt es sich, eine Trennkapillaren mit geringem Querschnitt einzusetzen, sodass der elektrische Widerstand der Kapillare hoch wird und der Spannungsabfall innerhalb der Kapillare stattfindet. Der Einsatz von Mikromanipulatoren

kann jedoch zu zeitaufwendigen Justierproblemen führen. Um diesen Problemen aus dem Weg zu gehen, haben Zhong et al. [57] die Detektionselektrode direkt mit dem Kapillarende verbunden, indem sie einen Golddraht quer über die Kapillaröffnung geklebt haben. Voegel et al. [58] gehen einen anderen Weg und sputtern das Elektrodenmaterial direkt auf das Kapillarende. Der Einsatz von *end-column*-Detektionszellen, die ein unproblematisches und schnelles Positionieren von Kapillarausgang und Elektrode ermöglichen, wurden von Jin et al. [59] und von Goto et al. [60] beschrieben. Eine wichtige Detektorkonfiguration bei den *end-column*-Anordnungen stellt die *wall-jet*-Anordnung dar [61]. Bei ihr ist der Kapillarinnendurchmesser der Trennkapillare wesentlich kleiner als der Elektrodendurchmesser und die Kapillare steht senkrecht zur Elektrodenoberfläche. Dabei verteilt sich der Analyt nach Austritt aus der Kapillare radial über die Elektrodenoberfläche. Haben Trennkapillare und Elektrode in etwa den gleichen Durchmesser, so spricht man von einer *wall-tube*-Anordnung [62].

2.2.2.1 Amperometrische Detektoren

Im Gegensatz zur Voltammetrie, bei der man den Strom in Abhängigkeit eines sich ändernden Potentials misst, beschränkt man sich bei der Amperometrie auf ein konstantes Arbeitspotential und detektiert dabei den durch die Phasengrenzfläche Lösung/Elektrode fließenden Diffusionsgrenzstrom. Wie bei der Voltammetrie kommt auch bei der Amperometrie eine Dreielektrodenanordnung zum Einsatz, um den Spannungsabfall in der Lösung zu kompensieren. Den gesamten Ablauf der amperometrischen Detektion kann man dabei in drei Schritte einteilen:

Als erstes erfolgt der Transport des Analyten aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche.
Dies ist durch Konvektion, Diffusion oder durch Migration geladener Analyte im elektrischen Feld möglich. Im zweiten Schritt findet der Elektonentransfer zwischen Analyt und Elektrode an der Phasengrenze Lösung/Elektrode statt. Im letzten Schritt erfolgt ein Abtransport der Reaktionsprodukte von der Elektrodenoberfläche, um eine Passivierung der Elektrode zu verhindern.

Der erste Einsatz eines amperometrischen Detektors bei der Kapillarelektrophorese wurde von Wallingford et al. [63] beschrieben, die Catecholamine an Kohlefasern detektierten. Bei der amperometrischen Detektion kommen verschiedene Elektrodenmaterialien zum Einsatz, die ein großes Anwendungsgebiet abdecken. Zu den wichtigsten Applikation gehören der Nachweis von Catecholaminen [56, 63-65] und anderen phenolischen Verbindungen [54, 66] an Kohlestoffelektroden, sowie der Nachweis von Catecholaminen an Goldelektroden [67]. Goldelektroden eignen sich außerdem für den Nachweis von anorganischen und organischen Quecksilberverbindungen [68, 69]. Die Detektion von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Peptiden kann neben Kupfer- auch an Nickelelektroden erfolgen. Dabei lassen sich Kohlenhydrate [5, 6, 70, 71] bei konstantem Potential detektieren ohne Vergiftung der Elektrodenoberfläche. Die Detektion erfolgt im alkalischen Milieu, da sich bei diesen Bedingungen eine Oxidschicht auf der Elektrodenoberfläche bildet, die die Oxidation der Kohlenhydrate katalysiert. Bei der amperometrischen Detektion von Aminosäuren werden zwei Mechanismen diskutiert. In stark alkalischem Milieu [10, 72] findet eine katalytische Oxidation analog der Kohlenhydrate statt, während in neutralem bis leicht alkalischem Milieu [8, 73] eine Komplexierung von Kupferionen durch die Aminosäuren stattfindet. Durch den Einsatz von Elektroden aus Quecksilber-Gold-Amalgan lassen sich Thiole [74] amperometrisch detektieren.

2.2.2.2 Gepulste amperometrische Detektoren

Infolge von Ablagerungen von Oxidations- oder Reduktionsprodukten an der Elektrodenoberfläche bei der amperometrischen Detektion kommt es zu einer Herabsetzung der Elektrodenaktivität. Diese Passivierung der Elektrodenoberfläche stellt einen beachtlichen Nachteil der amperometrischen Detektion dar. Sie kann vermieden werden, indem man eine mit bestimmter Frequenz sich wiederholende Sequenz unterschiedlicher Spannungspulse einsetzt. Ursprünglich wurde dieses als "gepulste amperometrische Detektion" (PAD, *pulsed amperometric detection*) bezeichnete Detektionsverfahren von Huges et al. [75] zur Detektion von Zuckern entwickelt.

Bei der gepulsten amperometrischen Detektion findet meist eine dreistufige Spannungs-Zeit-Funktion Verwendung (Abbildung 2-8). Die geeigneten Spannungswerte für die Messung, Reinigung und Reaktivierung bei der gepulsten amperometrischen Detektion können dem Zyklovoltammogramm des Elektrodenmaterials entnommen werden. Nach einer anfänglichen Ruhezeit t₀, die zum Abklingen nicht-faradayscher Ströme dient, erfolgt das Messintervall. Ruhezeit und Messung erfolgen bei demselben Potential E₁. Während der Messung wird das Stromsignal über die Zeit t₁ integriert. Danach erhöht man das angelegte Potential für eine Zeit t₂, um eine oxidative Desorption adsorbierter Reaktionsprodukte auf der Elektrodenoberfläche zu erreichen. Im Anschluss daran erfolgt eine Reaktivierung der Elektrodenoberfläche bei niedrigem Potential E₃ über den Zeitraum t₃. Ein derartiger Detektionsmechanismus gilt an Au-Elektroden unter stark alkalischen Bedingungen für Glucose, Polyalkohole, einfache Kohlenhydrate, Oligosaccharide und n-Alkanolamine [42]. Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus für die Glucoseoxidation zeigen eine Spaltung der C_1 - C_2 - und der C_5 - C_6 -Bindung, wobei sich Formiat und das entsprechende Dicarbonsäureanion im Verhältnis 2:1 bilden [76].



Abbildung 2-8: Spannungs-Zeit-Funktion für die gepulste amperometrische Detektion.

An Platinelektroden überschneiden sich die Spannungsbereiche für die anodische Sauerstoffreduktion und die Glucoseoxidation, was eine brauchbare Detektion verhindert. Jedoch sind Platinelektroden hervorragend geeignet, um im sauren pH-Bereich aliphatische Alkohole zu detektieren. Im Allgemeinen nimmt sowohl an Gold- als auch an Platinelektroden die Reaktionsgeschwindigkeit für die Oxidation aliphatischer Verbindungen mit sinkendem pH-Wert ab. Jedoch können Platinelektroden im Vergleich zu Goldelektroden auf Grund einer geringeren Anzahl an d-Elektronen bei Platin radikalische Oxidationsprodukte besser stabilisieren.

2.2.2.3 Leitfähigkeitsdetektoren

Die elektrische Leitfähigkeit einer Lösung ist definiert als der reziproke Wert des elektrischen Widerstands R:

$$G = \frac{1}{R}$$
(2.28)

Wird eine Messzelle mit zwei zueinander parallelen Elektroden mit der Fläche A im Abstand l voneinander verwendet, so ist die Leitfähigkeit direkt proportional zu A und indirekt proportional zu l unter Verwendung der spezifischen Leitfähigkeit κ :

$$G = \kappa \frac{A}{1} \tag{2.29}$$

Gemäß dem ohmschen Gesetz ist die Leitfähigkeit G = I/U direkt proportional zum fließenden Strom I und indirekt proportional zum angelegten Potential U. Um jedoch Elektrolysereaktionen an den Elektroden und somit zusätzliche Potentialunterschiede an den Phasengrenzflächen zu vermeiden, werden die Messungen nicht bei Gleichspannung sondern bei Wechselspannung durchgeführt. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass neben dem ohmschen Widerstand R noch ein kapazitiver Widerstand X_c auftritt, da sich die Phasengrenze Lösung/Elektrode wie ein Kondensator verhält. Für den Wert des kapazitiven Widerstands gilt:

$$X_{c} = \frac{1}{2\pi fC}$$
(2.30)

mit der Frequenz f der angelegten Spannung und der Kapazität C des Kondensators.

Unter der Annahme, dass die Leitfähigkeitszelle aus einer Reihenschaltung aus ohmschen Widerstand und Kondensator besteht, stellt man eine Phasenverschiebung fest. Der Strom am Kondensator läuft der Spannung um 90° voraus. Wenn man den Gesamtwiderstand der Zelle als Impedanz Z bezeichnet, so gilt für den Strom I in solch einer Zelle:

$$I = \frac{U}{Z} = \frac{U}{\sqrt{X_{c}^{2} + R^{2}}}$$
(2.31)

Da es sich bei dem Widerstand R um den Kehrwert der Leitfähigkeit G, die es zu bestimmen gilt, handelt, ist es für die Messung von R erforderlich den kapazitiven Widerstand X_e zu minimieren. Dies kann auf zwei Arten geschehen: erstens kann die Elektrodenoberfläche vergrößert werden und zweitens die Frequenz der angelegten Wechselspannung. Verwendet man jedoch zur Messung Frequenzen, die mehrere kHz betragen, so können wiederum Unterschiede zwischen Z und R auftreten, da sich dann die Messlösung wie ein Dielektrikum zwischen zwei Kondensatorplatten verhält. Im Ersatzschaltbild muss zusätzlich ein Kondensator C_p parallel zu einem ohmschen Widerstand R in Serie mit einem Kondensator C_s eingebracht werden (Abbildung 2-9). Die Impedanz dieser Anordnung beschreibt die folgende Gleichung:

$$Z = \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{1}{X_{c}}\right)^{2} + \left(\frac{1}{R}\right)^{2}}}$$
(2.32)

Mit zunehmender Frequenz wird der Unterschied zwischen Impedanz und ohmschen Widerstand größer. Somit ergibt sich für die Leitfähigkeitsmessung ein optimaler Frequenzbereich, in dem der Unterschied zwischen ohmschen Widerstand R und Impedanz Z gering ist. In Abhängigkeit von der Zellanordnung und der Leitfähigkeit der Lösung liegt dieser Frequenzbereich zwischen 50 Hz und 50 kHz.



Abbildung 2-9: Ersatzschaltbild für eine konduktometrische Messzelle.

Zunehmende Bedeutung kommt der Leitfähigkeitsdetektion im Bereich der Kapillarelektrophorese zu, wo diese die optischen Detektionsverfahren ersetzt. Leitfähigkeitsdetektoren sind zur Detektion von ionischen Analyten universell einsetzbar, jedoch wenig selektiv. Im Allgemeinen zeichnen sie sich durch ihre Robustheit aus und übertreffen in dieser Hinsicht die amperometrischen Detektoren, was sie für den Einsatz in der Routineanalytik auszeichnet.

Während der kapillarelektrophoretischen Trennung verdrängen die Analytionen in der Probenzone eine äquivalente Menge an Hintergrundelektrolytionen gleicher Ladung. Das Detektorsignal entspricht somit der Differenz zwischen der Leitfähigkeit der Analytionen und der des Hintergrundelektrolyten. Maximale Empfindlichkeit für die Detektion erhält man, wenn sich Analytionen und Hintergrundelektrolytionen in der Leitfähigkeit stark unterscheiden. Gleichzeitig verschlechtern sich die Bedingungen für die kapillarelektrophoretische Trennung, denn maximale Peaksymmetrie ist nur dann gegeben, wenn die Leitfähigkeiten von Analytionen und Hintergrundelektrolytionen gleich sind. Somit ist es notwendig für die Praxis einen Kompromiss zwischen ausreichender Empfindlichkeit und Peaksymmetrie zu finden.

2.2.2.4 Potentiometrische Detektoren

Potentiometrische Verfahren basieren auf einer Spannungsmessung an galvanischen Zellen. Aus den gemessenen Spannungswerten lassen sich Aussagen über die Konzentration eines gesuchten Stoffes machen. Für den analytischen Einsatz potentiometrischer Detektoren müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. Erstens muss die Analytlösung Teil einer galvanischen Zelle sein und zweitens die gemessene Spannung eine

eindeutige Funktion der Analytkonzentration sein. Dann lässt sich der Zusammenhang zwischen Spannung und Konzentration durch die Nernst-Gleichung beschreiben. Die Spannungsmessung erfolgt bei Stromlosigkeit. Die bei Stromlosigkeit gemessene Spannung bezeichnet man als elektromotorische Kraft (EMK) der galvanischen Zelle.

Für den Einsatz als potentiometrischer Detektor in der Kapillaranalytik sind ionenselektive Mikroelektroden bestens geeignet. Eine Abkopplung des elektrischen Feldes vom Detektor ist hierbei nicht nötig, wenn man Trennkapillaren mit Innendurchmessern < 25 µm einsetzt. Um die gleichzeitige Detektion verschiedener Ionen zu ermöglichen, bedient man sich der aus der Ionenchromatographie bekannten Elektroden mit Ionen-Carrier. Alternativ dazu bieten sich auch metallische Kupferelektroden zur potentiometrischen Detektion von Aminosäuren an [77], wobei die anfänglichen Untersuchungen zu diesem Thema auf Haddad et al. [78] zurückzuführen sind. Das Detektionssignal wird durch Konzentrationsänderungen der Cu(I)- bzw. der Cu(II)-Ionen an der Elektrodenoberfläche erzeugt. Dadurch bieten sich mehrere Möglichkeiten für die Detektion. Bei der direkten Detektion bilden die eluierten Analyte stabilere Cu-Komplexe als die Ionen des Hintergrundelektrolyten. Die Konzentration der Kupferionen an der Elektrodenoberfläche verringert sich und das Elektrodenpotential sinkt. Bei der indirekten Detektion tritt der umgekehrte Fall ein. Ist der Analyt ein starkes Oxidationsmittel, so oxidiert er die Oberfläche der Cu-Elektrode. Die Cu-Ionen-Konzentration steigt und somit auch das Elektrodenpotential. Analyte, die Cu(II)-Ionen zu Cu(I)-Ionen reduzieren, erhöhen ebenfalls das Elektrodenpotential. Der Grund liegt in dem Standardredoxpotential des Redoxpaares Cu(I)/Cu(0), das mit 0.520 V höher liegt als das des Redoxpaares Cu(II)/Cu(I) mit 0.337 V.

2.3 Mikrotechnik zur Herstellung miniaturisierter Analysesysteme

Mit Hilfe mikrosystemtechnischer Fertigungstechniken lassen sich miniaturisierte Analysensysteme herstellen. Unter den Schlagwörtern μ -TAS (*micro total analytical system*) oder *lab-on-the-chip* [79-81] haben in der letzten Zeit solche miniaturisierten Systeme ein besonderes Forschungsinteresse erlangt.

Ein miniaturisiertes Kapillarelektrophoresegerät besteht aus einem Mikrokanalsystem und einem miniaturisierten Detektor. Das Mikrokanalsystem kann aus Glas, [16] Silizium, [82] Keramik [83] oder auch SU8-Fotoresist [84] bestehen. In den letzten Jahren haben polymere Werkstoffe [13, 19, 84-86] immer mehr an Bedeutung gewonnen.

Da die Innenwände der aus polymeren Materialien gefertigten mikrofluidischen Kanäle meist hydrophob sind, kann es notwendig werden, die Wandeigenschaften durch chemische Zusätze zum Puffer zu ändern [87-90]. Auch das Herstellungsverfahren beeinflusst die Eigenschaften von Mikrokanälen. Mittels Laser hergestellte Mikrokanäle zeigen im Vergleich zu heiß geprägten unter Verwendung desselben Materials einen größeren elektroosmotischen Fluss bei kapillarelektrophoretischen Experimenten [91]. Bei Mikrokanälen in PMMA hat sich sogar gezeigt, dass die Innenwände eine hohe Oberflächenladung tragen, wenn man sie bei Raumtemperatur abformt, wobei heiß abgeformte Mikrokanäle eine wesentlich geringere Oberflächenladung tragen [92].

Auf der Detektorseite eignet sich neben der optischen vor allem die elektrochemische Detektion auf Grund ihrer einfach aufgebauten Detektoren (Elektroden). In Verbindung mit CE-Chips kommen immer öfter planare Elektroden zum Einsatz. Die Arbeitsgruppe von Wang et al. hat sowohl mit Hilfe des Siebdruckverfahrens hergestellte Dickschichtelektroden [3, 93-95] als auch gesputterte Dünnschichtelektroden [96] an einen abgeschnittenen Glaschip senkrecht zum Kapillarausgang angebracht. Ein anderer Weg ist die Integration von Dünnschichtelektroden in das Mikrokanalsystem [18, 50].

Grundsätzlich kann man die mikrosystemtechnischen Herstellungstechniken in Abformungs- und Direktstrukturierungstechniken einteilen. Zu den Abformungstechniken gehören das Spritzgießen (*injection molding*), Heißprägen (*hot embossing*) und das Abformen mittels Elastomeren auf Silikonbasis (*casting*). Allen Abformungstechniken ist gemein, dass sie einen Formeinsatz, auch *master tool* genannt, benötigen, der die Struktur als Negativ enthält. Die Genauigkeit der Abformungstechniken hängt entscheidend von der Oberflächenqualität des Formeinsatzes ab: Jeder Fehler auf der Oberfläche wird auf das Polymer übertragen. Komplementär zu den Abformungstechniken steht die direkte Strukturierung von Werkstoffen. Dabei können Verfahren wie die Direktstrukturierung mittels Laser, optische Lithographie und Opferschichttechniken zum Einsatz kommen.

2.3.1 Photolithographie

Unter dem Begriff Photolithographie versteht man ein Verfahren womit man planare und auch dreidimensionale Mikrostrukturen auf Substratoberflächen erzeugen kann. Ursprünglich wurde dieses Verfahren zur Herstellung integrierter Schaltungen auf Siliziumwafer entwickelt.

Der Ablauf eines photolithographischen Prozesses ist in Abbildung 2-10 skizziert. Vor der Belackung steht das Vorbereiten (*priming*) der meist hydrophilen Substratoberfläche für den hydrophoben Resist. Zuerst wird die Oberfläche durch Erwärmen getrocknet. Eine erneute Anlagerung von Wasser an die hydrophile Oberfläche kann durch eine Behandlung mit Hexamethyldisilazan (HMDS) unterbunden werden.

Jetzt wird durch die Belackung eine gleichmäßig dicke Resistschicht auf das Substrat aufgebracht und anschließend getrocknet (*prebake*). Dies geschieht, indem man den flüssigen Resist auf das Substrat gießt und anschließend den überschüssigen Resist bei hohen Drehzahlen (1000 – 6000 U/min) mit einem *spin coater* abschleudert.



Abbildung 2-10: Schematischer Ablauf der Photolithographie mit Positiv- und Negativresist.

Bei der darauf folgenden Belichtung (*exposure*) wird die Resistschicht mittels UV-Licht, das durch eine Strukturvorlage (Maske) auf die Resistschicht scheint, strukturiert. Dabei wird der Bindungszustand zwischen den Resistmolekülen geändert. Die erforderliche Lichtmenge ist abhängig von der Art des Resists und der Resistschichtdicke. Um einen hohen Kontrast zu erhalten, sollte der Resist möglichst hohe optische Transparenz und eine geringe Absorption zeigen, wobei die Absorption linear mit der Resistschichtdicke zunimmt. Als Folge der Transparenz muss bei Verwendung von monochromatischem Licht mit Reflexionen an der Luft/Resist- und der Resist/Substrat-Grenzfläche gerechnet werden. Dabei bilden sich stehende Wellen im Resist aus. Dies führt zu einer sich periodisch ändernden optimalen Belichtungsdosis, was durch *swing curves* ausgedrückt wird. Bei Resistschichtdicken, die dem Wendepunkt der *swing curve* entsprechen, erhält man T-förmige bzw. verrundete Strukturen. Entspricht die Resistflanke (Abbildung 2-11). Nach der Belichtung kann ein *post exposure bake* erfolgen, um Inhomogenitäten in der Belichtungsdosis durch stehende Wellen im Resist zu reduzieren.

Beim Entwickeln werden dann bei Positivresists die belichteten Bereiche, bei Negativresists die unbelichteten Bereiche abgelöst. In den übrigen Resistbereichen sollte kein Verlust bei der Resistschichtdicke eintreten. Positivresists sind jedoch auch in den unbelichteten Stellen geringfügig löslich, während Negativresists in den belichteten polymerisierten Bereichen vollständig unlöslich sind. Als Entwickler kommen sowohl organische Lösungsmittel als auch alkalische Lösungen zum Einsatz. Ein Entwickler zeichnet sich durch seine Entwicklungsrate (nm/s) und seinen Entwicklungsspielraum (Verlust an Linienbreite durch Variation der Entwicklungszeit) aus. Nach der Entwicklung

kann falls nötig eine thermische Behandlung (*hardbake*) zur Festigung der Resistschicht erfolgen.



Abbildung 2-11: Resistprofile: 1) verrundetes Resistbild, 2) optimales Resistbild und 3) T-förmiges Resistbild.

Durch einen Ätzschritt (nasschemisch durch Ätzbäder oder trocken durch Ätzgas) kann die Oberfläche des Substrats oder einer Funktionsschicht abgetragen werden. Mit Resist bedeckte Bereiche sind gegenüber dieser Abtragung geschützt.

Falls gewünscht, wird im letzten Schritt die Resistschicht von der Oberfläche entfernt (*stripping*) und diese einem zusätzlichen Reinigungsschritt unterzogen. Für die nasschemische Entfernung des Resists sind meist aggressive Chemikalien nötig, die auch das darunter liegende Substrat oder die Funktionsschicht zerstören können. Wurde die *hardbake*-Temperatur bei Positivresists nicht zu hoch gewählt, sollte auch eine Entfernung mit konzentriertem Entwickler nach einer Flutbelichtung möglich sein. Übrig bleibt eine strukturierte Oberfläche oder Funktionsschicht.

Eine weitere Technik in der Photolithographie ist die *lift-off*-Technik (Abbildung 2-12). Hierbei wird die zu strukturierende Funktionsschicht erst nach der Strukturierung der Resistschicht auf diese aufgebracht. Man erhält eine Abscheidung der Funktionsschicht, sowohl auf der frei entwickelten Substratoberfläche als auch auf der Resistschicht. Nach-

folgend wird die Resistschicht nasschemisch mit Hilfe eines geeigneten Lösungsmittels entfernt, wobei nur die auf dem Substrat abgeschiedene Funktionsschicht zurück bleibt.



Abbildung 2-12: Schematischer Ablauf der lift-off-Technik.

2.3.2 Mikroabformung

Bei der Mikroabformung von Kunststoffteilen spielen neben Spritzgießen und Heißprägen auch Spritzprägen, Reaktionsgießen und Vakuumgießen eine Rolle.

Wegen der einfachen Durchführbarkeit kommt in Laboratorien häufig eine Methode zur Anwendung, die als *soft lithography* durch die Arbeitsgruppe von Whitesides et al. [17, 97-99] bekannt wurde. Es handelt sich hierbei um eine mit Hilfe von Silikon-Elastomeren durchgeführte Abformungsmethode.

2.3.2.1 Spritzgießen

Beim Spritzgießen wird meist ein Granulat aufgeschmolzen und anschließend unter hohem Druck (500–2000 bar) in die evakuierte Mikroform eingespritzt. Die Verfestigung erfolgt bei Thermoplasten durch Abkühlen, bei Duroplasten durch reaktive Vernetzung (z.B. lichtinduzierter Reaktionsspritzguss). Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Phasen beim Spritzgießen kann der Fachliteratur entnommen werden [100]. Das Spritzgießen hat sich mittlerweile als ein Standardprozess für die Herstellung mikrostrukturierter Bauteile für Applikationen in den Bereichen Optik, Elektronik, Medizintechnik und Biochemie etabliert [101].

2.3.2.2 Heißprägen

Kunststoffplatten und Folien stellen das Ausgangsmaterial für das Heißprägen dar. Dabei kommen meist amorphe Thermoplaste zum Einsatz. Diese werden in einem Prägewerkzeug auf Temperaturen oberhalb der Erweichungstemperatur erwärmt. Bei Temperaturen zwischen 50°C und 100 °C über der Glasübergangstemperatur lassen sich die Kunststoffe

leicht formen. Die eigentliche Formung erfolgt durch einen Stempel, der in die erwärmte Kunststoffoberfläche gedrückt wird. Danach wird das Bauteil abgekühlt, wobei es verfestigt. Im Vergleich zum Spritzgießen stellt das Heißprägen eine einfachere Technologie dar. Das Heißprägen findet Anwendung bei optischen Bauteilen mit Strukturdimensionen von 10 nm bis 100 nm und bei fluidischen Mikrokanälen mit Kanaldurchmessern von nur wenigen 10 µm. Ein geringer Automatisierungsgrad und Zykluszeiten von mehreren Minuten lassen für das Heißprägen jedoch nur Produktionen mit kleineren Stückzahlen zu.

Wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit kommt in Laboratorien eine Variante des Heißprägens zur Herstellung von Mikrokanälen vor, die als *wire-imprinting*-Methode bezeichnet wird [20, 102]. Hierbei wird der Mikrokanal mit Hilfe eines einfachen Stück heißen Drahts abgeformt.

2.3.2.3 Mikroabformung mit Polydimethylsiloxan (PDMS)

Bei Polydimethylsiloxan handelt es sich um ein transparentes, flexibles Silikon mit guten optischen Eigenschaften oberhalb 230 nm und geringer Fluoreszenz [23].

Vor dem Abformungsprozess wird das flüssige Prepolymer des PDMS und der Polymerisationsstarter gemischt und dann auf die abzuformende Mikrostruktur gegossen. Nach dem Aushärten, das bei 60 °C ca. 4 Stunden dauert, kann das flexible PDMS-Negativ von der Mikrostruktur getrennt werden. Wegen der einfachen und schnellen Durchführbarkeit der Abformung mit nur wenigen Hilfsmitteln, fällt dieses Verfahren unter die Kategorie *rapid prototyping* [86].

Unbehandeltes PDMS hat eine hydrophobe Oberfläche. Durch Oxidation im Sauerstoff-Plasma erzeugt man eine hydrophile Oberfläche, indem man Silanolgruppen erzeugt. Allerdings ist die oxidierte Oberfläche nicht luftstabil und kehrt innerhalb von 30 Minuten zu ihrem ursprünglichen hydrophoben Zustand zurück. Hält man die Oberfläche jedoch permanent mit polarem Lösungsmittel bedeckt, behält sie ihre hydrophilen Eigenschaften [103, 104]. Um zwei Werkstücke aus PDMS miteinander irreversibel zu verbinden, ist ebenfalls eine Plasmaaktivierung erforderlich.

2.3.3 Lasermikrobearbeitung

Die Laserbearbeitung hat gegenüber anderen Fertigungstechniken einige Vorteile. Zu erwähnen sind hierbei die Werkzeugverschleißfreiheit, das berührungslose Arbeiten, wobei keine Kraft auf das Werkstück übertragen wird und der präzise Energieeintrag. Die Herstellung von Funktionsmuster in Kunststoffen mittels Laser wird oft auf Grund der kostengünstigen und schnellen Verfahrenszyklen als *rapid-prototyping*-Verfahren bezeichnet.

Die Verfahren der Lasermikrobearbeitung kann man in abtragende Verfahren und Fügetechiken einteilen. Bei der Herstellung von fluidischen Mikrokanälen kommen vorwiegend Abtragungsverfahren mit Maskenprojektion in Verbindung mit Excimer-Laser zum Einsatz [84, 105].

Prinzipiell möchte man bei allen Mikrostrukturierungen mit Laserstrahlung eine möglichst hohe laterale Auflösung A_L, d. h. möglichst kleine Strukturgrößen erhalten:

$$A_{L} = k \cdot \frac{\lambda}{NA}$$
(2.33)

Die Funktion ist abhängig von der Wellenlänge λ der Laserstrahlung, der numerischen Apertur NA der Bildoptik und einer Konstante k, welche den Kohärenzgrad der Strahlungsquelle beschreibt. Die erreichbare laterale Strukturgröße wird umso kleiner, je kurzwelliger die verwendete Laserstrahlung ist. Der Wellenlängenbereich heutiger Excimer-Laser, die zur Bearbeitung polymerer Werkstoffe zum Einsatz kommen, erstreckt sich im UV-Bereich von 351 nm (XeF) bis zu 157 nm (F₂). Der schematische Aufbau einer Mikrostrukturierungsanlage mit Excimer-Laser ist in Abbildung 2-13 dargestellt. Diese Laser besitzen vergleichsweise hohe Pulsenergien mit unterschiedlichen Pulsfrequenzen von nur wenigen Hz bis zu einigen kHz, was sie für die Abtragung polymerer Werkstoffe so geeignet macht. Die Absorption der Strahlung im Werkstück folgt dem lambertbeerschen Gesetz:

$$\mathbf{I} = \mathbf{I}_0 \cdot \mathbf{e}^{-\alpha \mathbf{I}} \tag{2.34}$$

wobei die Intensität I in Abhängigkeit der Ausgangsintensität I₀, dem Absorptionskoeffizienten α und der Weglänge I der Strahlung durch das Werkstück aufgetragen wird. Excimer-Laser haben ein rechteckiges Strahlprofil mit jeweils einer gaußförmigen Intensitätsverteilung entlang der zwei Achsen. Eine direkte Abtragung ist somit nicht möglich, da die inhomogene Intensitätsverteilung beim Abtrag reproduziert wird. Deshalb wird der Rohstrahl vor dem Durchtritt durch die Maske homogenisiert. Die Maske definiert den Abtragungsbereich, während die Mikrostruktur durch Bewegung des Substrats in x-y-Richtung erzeugt wird. Mit dieser Methode lassen sich eine Vielzahl polymerer Werkstoffe bearbeiten, unter anderem Polymethylmethacrylat (PMMA), Polystyren (PS), Polyethylenterephthalat (PET) und Polycarbonat (PC) [105, 106]. Hierbei

können Strukturbreiten von nur wenigen Mikrometern und Kanalhöhen bis 0.1 μm realisiert werden.



Abbildung 2-13: Schematischer Aufbau einer Mikrostrukturierungsanlage mit Excimer-Laser.

2.3.4 Herstellung dünner Schichten

Die Methoden zur Herstellung dünner Schichten können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören die PVD-Verfahren (*pysical vapour deposition*). Bei ihnen erfolgt der Aufbau einer dünnen Schicht durch Kondensation eines Dampfes auf dem Substrat [107]. Die Erzeugung des Dampfes geschieht entweder durch thermisches Verdampfen oder durch Herausschlagen von Teilchen aus einer Oberfläche mit Hilfe beschleunigter Ionen. Zu den PVD-Verfahren zählen das Aufdampfen und das Sputtern. Die zweite Gruppe bilden die CVD-Verfahren (*chemical vapour deposition*) bei denen die gasförmigen Ausgangsstoffe (*precursor*) in einer chemischen Reaktion nichtflüchtige Reaktionsprodukte bilden, die sich dann auf dem Substrat abscheiden.

Im Folgenden soll das Sputtern näher betrachtet werden. Der Sputter-Prozeß wird in drei Phasen eingeteilt: Teilchenerzeugung, Transport der Teilchen zum Substrat und Kondensation der Teilchen auf dem Substrat. Prinzipiell sind diese drei Phasen auch für das Aufdampfen gültig. Die Teilchenerzeugung erfolgt beim Sputtern nicht wie beim Aufdampfen durch thermische Energie sondern durch *target*-Zerstäubung. Durch eine Gasentladung wird meistens ein Argonplasma erzeugt. Die positiv geladenen Argonionen werden durch ein elektrisches Feld auf ein als Kathode gepoltes *target* beschleunigt. Dort tragen sie Atome und Molekülfragmente durch direkte Impulsübertragung vom *target*-Material ab. Die das *target* verlassenden Atome und Molekülfragmente gelangen nach Stößen mit den Gasatomen im Rezipienten zum Substrat und bilden dort eine dünne



Abbildung 2-14: Schematischer Querschnitt einer DC-Sputteranlage: 1) Rezipient, 2) Hochvakuumzuleitung,
 3) Gaseinlass, 4) Target, 5) Kathode, 6) Kühlung, 7) Spannungsquelle, 8) Substrat,
 9) Substratträger.

Eine Modifikation des DC-Sputterns ist das HF-Sputtern, wobei durch Anlegen einer Hochfrequenz-Spannungsversorgung an das *target* auch elektrisch isolierende *target*-

Materialien zum Einsatz kommen können. Eine Aufladung des *targets* und ein damit verbundener Abbruch der Gasentladung kann somit vermieden werden.

Kommt ein zusätzlich an der Kathode angebrachtes statisches Magnetfeld zum Einsatz, spricht man vom Magnetron-Sputtern. Das Magnetfeld bewirkt eine höhere Dichte ionisierter Gasteilchen unmittelbar vor der *target*-Oberfläche und ermöglicht damit eine höhere Sputterrate oder Sputterprozesse bei niedrigen Gasdrücken. Der Nachteil des Magnetron-Sputterns liegt in der durch die Magnetfeld-Inhomogenität bewirkte ungleichmäßige Abtragung des *targets*.

3 Experimenteller Teil

3.1 Separation

3.1.1 Stationäres Kapillarelektrophoresesystem

Die Experimente zum Thema Kupfer und zum diskreten amperometrischen Detektor wurden an einem Hewlett-Packard 3D-CE-System (Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Die Steuerung des 3D-CE-Systems sowie die Datenauswertung erfolgte mit der Chemstation-Software (Rev.A.08.03) von Hewlett-Packard. Die Kapillare wurde mit Hilfe der *CE-MS-Interface-Cassette* von Hewlett-Packard zum Ankoppeln eines Massenspektrometers aus dem Gerät herausgeführt. Das sich außerhalb des 3D-CE-Systems befindliche Ende der Kapillare, an dem der elektrochemische Detektor befestigt ist, taucht in ein Becherglas mit Pufferlösung ein. Ein Platindraht, der ebenfalls in das Puffergefäß eintaucht, diente als Gegenelektrode und war über ein Erdungskabel mit dem 3D-CE-Systems verbunden. Die Detektion fand in einem Faraday-Käfig zur Abschirmung elektromagnetischer Strahlung statt. Als Trennsäulen fanden ausschließlich Kapillaren der Firma Polymicro (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) Verwendung. Die Steuerung und Datenerfassung der elektrochemischen Detektion erfolgte mit einem Autolab-Potentiostat (Eco Chemie, Utrecht, Niederlande).

3.1.2 CE-Chip

Um eine effektive Untersuchung eines CE-Chip zu ermöglichen, musste ein geeigneter Versuchsstand (Abbildung 3-1) entworfen und gebaut werden.



Abbildung 3-1: Skizze des Versuchsaufbaus zur Untersuchung von Mikrokanälen für die Kapillarelektrophorese

Der Kapillarchip wurde mit einer Plexiglashalterung auf dem Mikroskoptisch fixiert. Ferner ermöglichte die Halterung, die auf dem Chip aufgebrachte Elektroden über Federkontakstifte zu kontaktieren. Die Hochspannung für den Injektionskanal lieferte ein Hochspannungsnetzteil mit einer maximalen Spannung von 3500 V und einer maximalen Stromstärke von 2.0 mA (F.u.G. Elektronik GmbH, Rosenheim, Deutschland). Für den Trennkanal stand ein Hochspannungsnetzteil mit einer maximalen Spannung von 35000 V und einem maximalen Strom von 0.2 mA (F.u.G. Elektronik GmbH, Rosenheim, Deutschland) zur Verfügung, das jedoch durch eine hardwareseitige Sperre auf eine maximale Spannung von 6300 V begrenzt wurde. Zur Umpolung der Hochspannung mussten die Hochspannungsnetzteile getauscht werden, da die verwendeten Netzteile über eine feste Polarität verfügten. Um die Hochspannung schnell an die Mikrokanäle anlegen zu können, wurde ein 6-Kanal-Relaissystem konstruiert. Die Steuerung der Hochspannungsquellen und des 6-Kanal-Relaissystems erfolgte durch eine PC-Steckkarte (PC-AO-2DC, National Instruments, Austin, TX, USA).



Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Hochspannungsversorgung für Injektions- und Trennkanal auf dem Kapillarelektrophoresechip: HV Hochspannungsquellen, R1, ..., R6 Hochspannungsrelais.

Eine speziell für diesen Zweck mit der Programmiersprache Labview von National Instruments entwickelte Steuersoftware übernahm die Verwaltung der PC-Steckkarte. Ein Mikroskop (IX 50, Olympus, Hamburg, Deutschland) erlaubte eine optische Kontrolle der Mikrokanäle. Zur Archivierung konnten die Mikroskopinformationen mit einer CCD-Kamera (ICD-700PAC, Ikegami) erfasst werden und mit Hilfe einer Videokarte (Video DC 30, Miro Computer Products AG, Braunschweig, Deutschland) auf einem PC digitalisiert werden. Parallel dazu konnte elektrochemisch detektiert werden, wobei der Autolab-Potentiostat (Eco Chemie, Utrecht, Niederlande) die Steuerung des Potentiostaten zur Messung mit nur zwei Elektroden (Eigenbau, Universität Basel) und die Datenerfassung übernahm.

3.1.3 Mikrokanalsystem aus Polydimethylsiloxan (PDMS)

Die Herstellung eines Mikrokanalsystems (Abbildung 3-3) aus Polydimethylsiloxan (Sylgard 184, Dow Corning Europe, La Hulpe, Belgien) erfolgte durch Abformung des Mikrokanals von einem aus SU-8-50-Fotoresist (Micro Resist Technology GmbH, Berlin Deutschland) hergestellten Abformwerkzeug (Abbildung 3-4).



Abbildung 3-3: Layout des in PDMS abgeformten Mikrokanalsystems.



Abbildung 3-4: Layout des Abformwerkzeugs. SU-8-50-Fotoresiststruktur auf 4"-Si-Wafer.

Herstellung des Abformwerkzeugs:

Ein 4"-Si-Wafer (Centrum für intelligente Sensorik, Erfurt, Deutschland) wurde in einem Bad aus gleichen Teilen Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid gereinigt, mit entionisiertem Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Zusätzlich erfolgte im Trockenschrank (Typ T6, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) ein *dehydration bake* bei 120°C für die Dauer von 10 Minuten. Nach dem gleichmäßigen Aufbringen des SU-8-50-Fotoresists auf der Waferoberfläche wurde der überschüssige Fotoresist mit dem *spin coater* (P-6000, Integrated Technologies) bei 2500 U/min für 45 s abgeschleudert. Das anschließende *soft bake* auf der *hotplate* (Präzitherm PZ 28/2, Störktronic) dauerte eine Stunde und begann bei 50 °C. Nach Auflegen des belackten Wafers wurde die *hotplate* bei einer Leistung von 80 % auf 95°C aufgeheizt. Die Belichtung erfolgte mit einer Chrommaske (Rose, Bergisch Gladbach, Deutschland), die direkt auf den belackten Wafer gelegt wurde (Kontaktbelichtung) und einer Hg/Xe-Lampe (Model 87332,

Oriel Corporation, Stratford, Connecticut, USA) mit einer Belichtungsdauer von 200 s. Nach dem Belichten erfolgte ein *post bake* auf der *hotplate* bei 95°C für die Dauer von 10 Minuten. Das Entwickeln der Lackstruktur benötigte 15 Minuten. Das Entwicklerbad befand sich auf einer Rüttelmaschine (100 U/min, Schüttler KS 125 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland). Es erfolgte kein *hard bake*, um Lackwölbungen und Spannungsrisse zu vermeiden. In einem letzten Schritt wurde ein Anti-Haftmittel ((Tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooktyl)trichlorosilan, ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgebracht, indem man den Wafer zusammen mit 2-3 Tropfen des Anti-Haftmittels in einen Exsikkator brachte und für 30 Minuten Wasserstrahl-Vakuum anlegte.

Abformungsprozess:

Zuerst musste das Abformwerkzeug mit Aceton und Ethanol gereinigt werden. Dann wurde das Prepolymer mit dem Starter im Verhältnis 10:1 gemischt. Das Prepolymer-Starter-Gemisch wurde auf das Abformwerkzeug gegossen. Um eingeschlossene Luftblasen zu entfernen, kam das Werkstück in den Exsikkator und es wurde für 20 Minuten Wasserstrahl-Vakuum angelegt. Das Aushärten erfolgte im Trockenschrank bei 65 °C für die Dauer von 45 Minuten. Anschließend wurde das flexible Polydimethylsiloxan mit dem Skalpell vom Abformwerkzeug getrennt und auf die gewünschte Größe zugeschnitten. Unter dem Mikroskop wurden mit einem Locheisen die Befüll-Reservoirs an den Kanalenden ausgestanzt. Ebenfalls unter dem Mikroskop erfolgte die Positionierung des Kanalsystems zum Deckel (Glas oder PDMS). Im letzten Schritt wurde das gedeckelte Mikrokanalsystem für 10 Minuten dem Wasserstrahl-Vakuum ausgesetzt.

3.1.4 Sonstige Mikrokanalsysteme

Planung und Herstellung der Mikrostrukturen in PMMA und PSU erfolgte in Zusammenarbeit mit den Instituten für Materialforschung (IMF) und Mikrosystemtechnik (IMT) am Forschungszentrum Karlsruhe.

Anfänglich war es nur möglich, die aus PMMA und PSU gefertigten Mikrokanalsysteme durch Anpressen eines ca. 1 mm dicken PDMS-Plättchen zu verschließen (Herstellung s. Kapitel 3.1.3). Im weiteren Verlauf der Arbeit war es dem Institut für Mikrosytemtechnik (IMT) möglich, Mikrokanäle in PMMA mit dünner PMMA-Folie zu verschließen.

3.2 Detektion

3.2.1 Konventionelle Strom- und Potentialmessung

Für voltammetrische, amperometrische und potentiometrische Untersuchungen wurde ein Potentiostat (Autolab, Eco Chemie, Utrecht, Niederlande) eingesetzt. Das Gerät war zusätzlich mit einem Verstärkermodul (ECD-Modul) ausgerüstet, das Messungen im pA-Bereich ermöglichte. Ein PC mit der Software GPES 4.9 dient zur Steuerung des Potentiostaten und zur Auswertung der Messergebnisse.

Alle Messungen erfolgten in einem Faraday-Käfig, um Signalstörungen durch elektromagnetische Felder zu eliminieren. Die voltammetrischen und amperometrischen Experimente wurden mit der Dreielektroden-Anordnung durchgeführt. Diese bestand aus einer Arbeitselektrode (Mikroelektrode), einer Referenzelektrode (Ag/AgCl gesättigt, Metrohm, Herisau, Schweiz) und einem 0.5 mm dicken Platindraht als Gegenelektrode. Für potentiometrische Messungen wird nur die Arbeits- und Referenzelektrode benutzt. Bei allen elektrochemischen Experimenten tauchten die Elektroden in ein mit Puffer gefülltes Becherglas.

Für die Experimente mit gepulster amperometrischer Detektion an einer 90-µm-Au-Mikroscheibenelektrode kam folgendes Pulsschema zum Einsatz: 100 mV für 300 ms (Messpotential), 600 mV für 120 ms (Reinigungspotential),-200 mV für 300ms (Regenerierungspotential).

Das Pulsschema für die PAD an einer 50-µm-Pt-Mikroscheibenelektrode war: 700 mV für 600 ms (Messpotential), 1200 mV für 100 ms (Reinigungspotential),-200 mV für 300 ms (Regenerierungspotential).

3.2.2 Amperometrie mit der stromdurchflossenen Platinreferenz

Bei dem miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystem wurde nicht das klassische Prinzip der amperometrischen Detektion mit drei Elektroden angewandt. Die Gesamtzahl der Elektroden im Detektionsreservoir sowohl für die Detektion als auch für die Ableitung des elektrophoretischen Strom waren auf zwei Dünnschichtelektroden beschränkt. Daher war eine Regel- und Messschaltung notwendig, die das gleichzeitige Anlegen eines Arbeitspotentials und das Messen eines Stromes an ein und derselben Arbeitselektrode ermöglichte. Kappes [108] beschreibt in seiner Dissertation eine Potentiostatenschaltung, die diese Voraussetzungen erfüllt und in einem tragbaren Kapillarelektrophoresesystem zum Einsatz kommt.

An dem Potentiostaten lassen sich das Arbeitspotential und drei Messbereiche (1 mA/V, 10 mA/V und 100 mA/V) einstellen. Ein Nullabgleich für das Detektionssignal ist ebenfalls möglich. Das Detektionssignal kann mit einem xy-Schreiber registriert werden oder über eine Analog-digital-Wandlerkarte elektronisch weiter verarbeitet werden. Das Gerät bietet ebenso die Möglichkeit einen externen Potentiostaten über eine BNC-Steckverbindung anzuschließen. Die Spannungsversorgung erfolgt durch ein externes Netzteil mit \pm 15 V.

3.2.3 Leitfähigkeitsdetektion

Die Schaltung für die Steuerung der Leitfähigkeitsdetektion wurde im Arbeitskreis Hauser an der Universität Basel gefertigt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. An die Schaltung wurde ein externer Frequenzgenerator (Voltcraft MX-2020, Conrad Electronic GmbH, Hirschau, Deutschland) angeschlossen, um sowohl die Frequenz als auch die

Amplitude des Anregungssignals variieren zu können. Für die Untersuchungen an den Alkalimetall-Kationen erzeugte der Sinusgenerator eine Wechselspannung mit einem Volt und einer Frequenz von 130 kHz. Anregungs- und Detektionselektrode waren galvanisch durch einen Kondensator vom Rest der Schaltung getrennt. Der an der Detektionselektrode aufgenommene Wechselstrom wurde mit Hilfe eines Operationsverstärkers in der Stromfolgekonfiguration in eine Spannung umgewandelt, gleichgerichtet und konnte somit durch die Analog-digital-Wandlereinheit des Autolabs (Eco Chemie, Utrecht, Niederlande) registriert werden.



Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der Leitfähigkeitsdetektion.

Als Detektionszelle für die Leitfähigkeitsdetektion diente das Befüllreservoir auf dem PDMS-Glas-Hybridchip. Sowohl die Anregungs- als auch die Detektionselektrode bestand aus einer 20 µm breiten Pt-Dünnschichtelektrode. Beide Elektroden waren außerhalb des Trennkanals in unmittelbarer Nähe zum Kanalausgang angebracht und hatten einen Abstand von 20 µm zueinander.

3.2.4 Mikroscheibenelektroden

Die Mikroscheibenelektroden für die amperometrische Detektion wurden durch Einbringen eines 50 µm dicken Metalldrahts (Cu, Au, Pt, Goodfellow, Cambridge, England) in eine Quarzglaskapillare (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) mit einem Innendurchmesser von 75 µm und einem Außendurchmesser von 365 µm hergestellt. Es wurde ein Stück Messleitung für die Verbindung der Elektrode mit dem Potentiostaten angelötet und die Lötstelle mit Epoxydharz (Araldit CW 229-3, Ciba Polymers, Basel, Schweiz) isoliert. Auf der Detektionsseite wurde der überstehende Draht mit etwas Epoxydharz eingeschlossen, nach dem Aushärten bündig abgeschnitten und mit Polierfolien verschiedener Körnung (Ehret, Emmendingen, Deutschland) geschliffen, um eine ebene Oberfläche zu erhalten (Abbildung 3-6).



Abbildung 3-6: Mikroskopaufnahme einer 50 µm Cu-Mikroelektrode.

Zur einfacheren Ausrichtung von Elektrode und Kapillare wurde eine aus Plexiglas gefertigte Halterung eingesetzt, basierend auf den Beschreibungen von Fermier et al. [109]. Hierbei wurde die Mikroscheibenelektrode in der *wall-jet*-Anordnung zum Kapillarausgang positioniert. Die aus einem Pt-Draht bestehende Gegenelektrode konnte ebenfalls mit der Plexiglashalterung fixiert werden. Eine schematische Darstellung der Halterung zeigt Abbildung 3-7.



Abbildung 3-7: Plexiglashalterung zur einfachen Ausrichtung von Elektroden und Kapillare: 1) Trennkapillare, 2) Klemmvorrichtung aus Plexiglas, 3) Mikroscheibenelektrode, 4) Gegenelektrode.

3.2.5 Dünnschichtelektroden

Die Herstellung der Dünnschichtelektroden gliedert sich in 5 Arbeitsschritte:

- 1, Strukturierung des Elektrodenlayouts mit Hilfe der Fotolithographie,
- 2, Aufbringen der dünnen Metallschichten,
- 3, Entfernen der Lackmaske (*lift-off*),
- 4, Zerteilen des Wafers in Einzelelektroden,
- 5, Aufbringen einer Schutzschicht mit Hilfe der Fotolithographie zur Isolation der Elektrodenzuleitung.

Die Dünnschichtelektroden für die amperometrische Detektion wurden im Batch-Verfahren hergestellt, wobei ca. 18 Elektrodenstrukturen auf einem 4"-Si-Wafer mit modifizierter Oberfläche (Si / SiO₂ (77 nm) / Si₃N₄ (77 nm), Centrum für intelligente Sensorik, Erfurt, Deutschland) Platz haben (Abbildung 3-8).



Abbildung 3-8: 4"-Wafer mit Au-Dünnschichtelektroden nach dem Zerteilen mit der Wafersäge.



Abbildung 3-9: Layout einer 13x20 mm² Dünnschichtelektrode. Stegbreiten der Zuleitungen: 100 μm, Elektrodenbreite und Elektrodenabstand: 20 μm.

Eine Elektrodenstruktur besteht aus zwei U-förmigen Metallbahnen mit insgesamt vier 2x2 mm² großen Kontaktierungsflächen an den Enden (Abbildung 3-9).

Für den Deckel des miniaturisierten Kapillarelektrophoresegeräts, auf dem auch die Zuund Ableitungen für die Hochspannung sowie die Detektionselektroden aufgebracht sind, wurden 4"-Pyrexglaswafer (Schott, Mainz, Deutschland) benutzt (Abbildung 3-10). Auf einen Pyrexglaswafer haben zwei Elektrodenstrukturen platz. Der letzte Arbeitsschritt, das Aufbringen einer Schutzschicht mit Hilfe der Fotolithographie zur Isolation der Elektrodenzuleitung, entfiel, da das angrenzende PDMS die Isolation übernimmt.



Abbildung 3-10: Layout eines 4"-Pyrexglaswafer mit Elektrodenstrukturen für die Zu- und Ableitungen der Hochspannung und für die Detektion.

Strukturierung des Elektrodenlayouts

Als Basis-Substrat dienten 4"-Wafer, die in einem Bad aus gleichen Teilen Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid gereinigt, mit entionisiertem Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet wurden. Zusätzlich erfolgte im Trockenschrank (Typ T6, Heraeus) ein *dehydration bake* bei 120°C für 10 Minuten. Anschließend wurde 0.5 ml Haftvermittler (Hexamethyldisilazan (HMDS), Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) auf die Waferoberfläche aufgebracht und überschüssiger Haftvermittler mit dem *spin coater* für 60 s bei 3000 U/min abgeschleudert. Das Trocknen erfolgte für 10 Minuten im Trockenschrank bei 120°C. Der AZ-Fotolack wurde auf die Waferoberfläche gegossen und überschüssiger Fotolack mit dem *spin coater* für 60 s bei 3000 U/min abgeschleudert. Das *prebake* bei 95°C auf der *hotplate* (Präzitherm PZ 28/2, Störk-tronic) dauerte 5 Minuten. Die Belichtung erfolgte mit einer Chrommaske (Rose, Bergisch Gladbach, Deutschland), die

direkt auf den belackten Wafer gelegt wurde (Kontaktbelichtung) und einer Hg/Xe-Lampe (Model 87332, Oriel Corporation) mit einer Belichtungsdauer von 220 s (200 mJ/cm²). Die Entwicklung erfolgte unter manuellem Rütteln und dauerte 2 Minuten. Im Anschluss daran erfolgte ein *postbake* bei 95°C auf der *hotplate* für 5 Minuten.

Aufbringen der dünnen Metallschichten

Das Aufbringen der dünnen Metallschichten auf den belackten Wafer erfolgte in einer Sputteranlage (Eigenkonstruktion, Forschungszentrum Karlsruhe). Zuerst wurden bei einer Leistung von 150 W 15 nm einer Ti-Haftschicht aufgebracht. Anschließend wurden - ohne das Vakuum zu brechen - bei einer Leistung von 75 W 150 nm einer Cu-, Au- oder Pt-Schicht aufgebracht.

Entfernen der Lackmaske

Der Wafer wurde für eine Stunde in eine Glasschale mit Aceton gelegt. Dabei löste sich die AZ-Resistschicht mit der darüber liegenden Metallschicht von der Waferoberfäche ab. An den Stellen, an denen sich kein Fotolack befand, blieb die dünne Metallschicht erhalten. Durch mehrmaliges Spülen mit Aceton wurde die Oberfläche gereinigt und anschließend mit Stickstoff trocken geblasen.

Zerteilen des Wafers in Einzelelektroden

Das Zerteilen des Wafers in 13x20 mm² Einzelelektroden erfolgte mit einer Wafersäge am Institut für Mikrosystemtechnik (IMT) am Forschungszentrum Karlsruhe.

Aufbringen einer Schutzschicht

Die 13x20 mm² großen Einzelelektroden wurden mit Ethanol gereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet. Zusätzlich erfolgte ein *dehydration bake* auf der *hotplate* bei 100°C für 3
3 EXPERIMENTELLER TEIL

Minuten. Der SU-8-10-Fotolack (Micro Resist Technology GmbH, Berlin Deutschland) wurde gleichmäßig auf der Elektrodenoberfläche verteilt und überschüssiger Fotolack mit dem *spin coater* für 45 s bei 5000 U/min abgeschleudert. Das *prebake* bei 100°C auf der *hotplate* dauerte 10 Minuten. Die Belichtung erfolgte mit Hilfe einer Chrommaske, die direkt auf den belackten Wafer gelegt wurde (Kontaktbelichtung) und einer Hg/Xe-Lampe. Die Belichtungsdauer betrug 200 s. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe einer Rüttelmaschine (100 U/min, Schüttler KS 125 basic, IKA Labortechnik) und dauerte 12 Minuten. Im Anschluss daran erfolgte ein *postbake* bei 200°C auf der *hotplate* für 5 Minuten.

Detektoranordnung

Beim Ankoppeln der Dünnschichtelektroden an den Kapillarausgang einer konventionellen Quarzglaskapillare (50 µm Innendurchmesser, 365 µm Außendurchmesser, Polymicro Technologies, Poenix, AZ, USA) kamen zwei Detektoranordnungen zum Einsatz.

Bei der *wall-jet*-Anordnung (Abbildung 3-11) wurde die Dünnschichtelektrode durch eine Plexiglashalterung fixiert. Mit Hilfe eines an die Halterung angebrachten Mikromanipulators konnte die Kapillare unter dem Mikroskop in x-y-z-Richtung zur Elektrodenoberfläche positioniert werden.

Bei der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode (Abbildung 3-12) wurde die Kapillare unter dem Mikroskop zur Elektrodenoberfläche ausgerichtet und mit etwas Epoxydharz auf die Dünnschichtelektrode aufgeklebt.

3 EXPERIMENTELLER TEIL



Abbildung 3-11: Wall-jet Detektor für die elektrochemische Detektion an planaren Dünnschichtelektroden bei konventioneller Kapillarelektrophorese mit Quarzglaskapillaren. 1) planare Dünnschichtelektrode (13x20 mm²), 2) Plexiglashalterung, 3) Mikromanipulator, 4) Quarzglaskapillare.



Abbildung 3-12: Tangential angeströmte Dünnschichtelektrode: 1) Kapillare, 2) Kontaktierungsfläche,
 3) Epoxydharz zum Fixieren der Kapillare, 4) aktive Elektrodenfläche (Resistfenster),
 5) planare Dünnschichtelektrode (13x20 mm²) mit SU8-Fotoresistschicht als Isolation gegenüber der Elektrolytlösung.

3.3 Sonstige Methoden und Geräte

3.3.1 Kapillar-Batch-Injektions-Analyse (CBIA)

Der Versuchsaufbau für die Kapillar-Batch-Injektions-Analyse lehnt sich an die Beschreibungen von Backofen [110] an. Die CBIA-Apparatur besteht aus einem 40 cm langen Stück Quarzglaskapillare (75 µm Innendurchmesser, 365 µm Außendurchmesser, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), wobei das eine Ende an eine Mikroliterspritze (5 µl, Hamilton, Deutschland) und das andere Ende an die Dünnschichtelektrode gekoppelt ist. Ein mikroprozessorgesteuertes Antriebssystem (EDOS 5221, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) übernimmt dabei die Bewegung des Spritzenkolbens.

Der Analyt wurde aus einem Probengefäß in die Kapillare aufgenommen. Danach wurde die Kapillare an die Dünnschichtelektrode angekoppelt. Dünnschicht-, Gegen- und Referenzelektrode tauchten in ein mit Puffer gefülltes Becherglas ein. Ein Magnetrührer sorgte für die ständige Konvektion des Puffers. Mit Hilfe des mikroprozessorgesteuerten Antriebssystems konnte eine definierte Menge der Analytlösung zur Elektrodenoberfläche gepumpt werden, woraufhin die elektrochemische Detektion stattfand. Steuerung und Datenerfassung der elektrochemischen Detektion erfolgte mit einem Autolab-Potentiostat (Eco Chemie, Utrecht, Niederlande).

3.3.2 Weitere Geräte

Analysenwaage:	Handy H 51, Sartorius AG, Göttigen, Deutschland
Auflichtmikroskop:	Typ Universal, Zeiss, Deutschland
Digitale Videokamera:	XL1, Canon, Krefeld, Deutschland
Oberflächenprofilometer:	P-10, Tencor, München, Deutschland
pH-Meter:	Typ 654, Metrohm, Herisau, Schweiz
Stereomikroskop:	M7A, Wild Heerbrugg AG, Schweiz
Ultraschallbäder:	Typ 2200, Branson, Danbury, Connecticut, USA
	8891E-DTH, Cole-Parmer, Vernon Hill, Illinois, USA

3.4 Chemikalien

Wässrige Puffer- und Stammlösungen wurden mit Milli-Q-Wasser (Millipore, Bedford, MA, USA) aus Chemikalien der höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsklasse (meist p.a.) hergestellt. Standardlösungen der Analyte wurden durch Verdünnen der Stammlösungen mit Wasser oder Pufferlösung hergestellt. Alle Lösungen zur Verwendung in kapillaren Kanalsystemen wurden vor Gebrauch über einen 0.45 µm Spritzenvorsatzfilter (Minisart RC 15, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) filtriert.

Alle verwendeten organische Lösungsmittel, wie Methanol, Ethanol, Isopropanol, Aceton und Acetonitril hatten die Reinheitsklasse p.a. und wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) oder der Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.



Abbildung 3-13: Strukturformeln der verwendeten Kohlenhydrate: a) Glucose, b) Fructose, c) Saccharose.

Im Rahmen der Kupferelektroden wurden Untersuchungen an den Kohlenhydraten (Abbildung 3-13) Glucose, Fructose, Saccharose und an den Aminosäuren (Abbildung 3-14) Alanin, Arginin, Asparagin, Glycin, Prolin und Tyrosin von der Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz) durchgeführt. Ebenfalls von der Fluka Chemie AG wurde das Natriumsulfit bezogen. Weinsäure wurde von der Firma Merck und Äpfelsäure von der Carl Roth GmbH bezogen.



Abbildung 3-14: Strukturformeln der verwendeten Aminosäuren: a) Glycin, b) Alanin, c) Asparagin, d) Prolin, e) Tyrosin, f) Arginin.

Des Weitern kamen folgende Verbindungen aus dem Bereich der Neurotransmitter (Abbildung 3-15) zur Detektion an Au-Elektroden zum Einsatz: Dopamin und Adrenalin von Sigma (St. Louis, MO, USA), Brenzcatechin von Fluka Chemie AG und Dihydroxyphenylserin (DOPS) von Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg, Deutschland).

An Pt-Elektroden wurde Natriumsulfit (Fluka Chemie AG) amperometrisch detektiert. Für die Leitfähigkeitsdetektion an Pt-Elektroden wurden Lithiumchlorid, Natriumchlorid und Kaliumchlorid von der Firma Merck verwendet.

Für die Untersuchung des Probenaustritts aus der Kapillare und die Visualisierung von Transportvorgängen in den Mikrokanälen wurde Fluorescein von Riedel-de-Haen (Seelze, Deutschland) eingesetzt.



Abbildung 3-15: Strukturformeln der verwendeten Neurotransmitter: a) Brenzcatechin, b) Dopamin, c) Adrenalin, d) Dihydroxyphenylserin (DOPS).

4 Ergebnisse

4.1 Kupfer als neues Material für die Herstellung von Dünnschichtelektroden

4.1.1 Einleitung

Kupferelektroden eignen sich hervorragend für die elektrochemische Detektion biologisch interessanter Verbindungen, wie z.B. Kohlenhydrate und Aminosäuren. Ferner handelt es sich bei Kupfer um ein kostengünstiges und gut verfügbares Ausgangsmaterial zur Herstellung von Mikroelektroden. Man kann es traditionell zur Herstellung konventioneller Mikroscheibenelektroden benutzen und es soll hier neu zur Herstellung von Dünnschichtelektroden eingeführt werden. Gerade bei der Amperometrie ist die Kupferelektrode eine interessante Alternative zu den etablierten Elektrodenmaterialien wie Gold, Platin und Kohlenstoff.

4.1.2 Einleitende Untersuchungen an Kupfer–Mikroscheibenelektroden

4.1.2.1 Voltammetrische Untersuchungen

Für Voruntersuchungen eignet sich die konventionelle Präparationstechnik von Mikroelektroden, die ohne das aufwendige Equipment der Mikrosystemtechnik auskommt. Bei der Mikroscheibenelektrode wird ein Stück Draht in ein Stück Kapillare eingebracht und mit Epoxydharz fixiert.

Um das Verhalten von Kupferelektroden in alkalischer Lösung zu studieren, bedient man sich der zyklischen Voltammetrie, ein Untersuchungsverfahren zur Charakterisierung von elektrochemischen Reaktionsmechanismen. Bei Arbeiten in stark alkalischem Milieu fungiert die Kupferelektroden als Metalloxid/Metallhydroxidelektrode, wobei den gebildeten Oxid/Hydroxidschichten eine katalytische Wirkung im Bezug auf die Oxidation organischer Spezies [111, 112] zugesprochen wird. Zahlreiche Untersuchungen zur Kupferelektrode [113-116] haben ergeben, dass in Abhängigkeit vom Arbeitspotential Kupfer in den Oxidationsstufen 0 bis +3 vorliegen kann. In Abbildung 4-1 sind deutlich 3 Oxidationspeaks (a1-a3) im anodischen Ast des Zyklovoltammogramms erkennbar. Der Peak a1 bei -0.58 V beschreibt die Oxidation des metallischen Kupfers zu Cu(I), dessen Bildung sich bis nach Peak a2 (-0.31 V) erstreckt. Die Entstehung von zweiwertigem Kupfer sowohl aus metallischem als auch aus schon vorhandenem Cu(I) zeigt der Peak a3 (-0.11 V). Die Entstehung von dreiwertigem Kupfer, wie schon 1969 von Miller [113] beschrieben, ist in dem vorliegenden Zyklovoltammogramm nicht zu erkennen. Oft verdeckt die in diesem Potentialbereich einsetzende anodische Sauerstoffproduktion (0.52 V) und der damit verbundene starke Anstieg des detektierten Stroms den Peak. Messungen bei höheren Temperaturen [114] weisen generell das Fehlen des Cu(III) Peaks auf, da die Überspannung für die Sauerstoffproduktion mit der Erhöhung der Temperatur herabgesetzt wird. Weiterführende NNIRS-Untersuchungen (near normal incidence reflectance spectroscopy) [117] der Kupferoberfläche haben ergeben, dass die anodische Oxidation von Kupfer in alkalischer Lösung zuerst zu Kupferhydroxiden führt, die dann chemisch zu Kupferoxiden weiterreagieren.



Abbildung 4-1: Zyklisches Voltammogramm einer Kupfer-Mikroscheibenelektrode in 50 mM NaOH. Referenzelektrode: Ag/AgCl. Vorschubgeschwindigkeit: 50 mV/s.

Bewegt man sich auf dem kathodischen Ast des Zyklovoltammogramms nach links, so trifft man auf die beiden Reduktionspeaks k1 (-0.51 V) und k2 (-0.80 V). Der Peak k1 korreliert mit a2 und beschreibt die Reduktion des zweiwertigen Kupfers zu Cu(I). Analog dazu beschreibt der Peak k2 die Reduktion von Cu(I) zu metallischem Kupfer bei negativerem Potential. Das Ende des kathodischen Zweigs bildet die reduktive Wasserstoffentwicklung für Potentiale kleiner -1.4 V. Während die Peakformen der oxidativen Peaks a1, a2 und a3 auf elektrochemische Reaktionen mit langsamer Kinetik hindeuteten, weisen die Peakformen beider reduktiven Peaks auf schnelle elektrochemische Reaktionen hin. Pyun [117] beschreibt die Peakform der kathodischen Peaks als typisch für Stripping-Analysen, was an eine stark an der Elektrodenoberfläche adsorbierte Verbindung hindeutet. Bei der Annahme einer langmuirschen Adsorptionsisotherme beträgt die

Peakbreite in halber Peakhöhe für den adsorbierten Analyt 90,6/n mV. Für den Peak k1 wurden 70,5 mV, für k2 66,9 mV ermittelt. Des Weiteren ist dem zyklischen Voltammogramm zu entnehmen, dass es sich bei der Oxidation einer Kupferelektrode in alkalischer Lösung mit anschließender Reduktion um einen reversiblen Vorgang handeln muss.

Für eine beispielhafte Anwendung der Cu-Mikroelektrode als amperometrischer Detektor in der Weinanalytik soll die Oxidation einer breiten Palette an organischen Verbindungen in alkalischer Lösung durchführbar sein. Dafür wird das Arbeitspotential so positiv als möglich gewählt, bevor die oxidative Sauerstoffproduktion an der Arbeitselektrode einsetzt.

Im Folgenden soll das Signalverhalten einer Kupfer-Mikroscheibenelektrode in alkalischem Milieu für die Detektion organischer Analyte (Abbildung 4-2) näher charakterisiert werden. Über weiterführende Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Oxidation von Zuckern [6, 7, 71, 111, 112] und Aminosäuren [72, 118] an Kupfer-elektroden gibt es zahlreiche Publikationen.

In dieser Arbeit werden die Zyklovoltammogramme einer Kupferelktrode in 50 mM Natronlauge auf den Einfluss der Zugabe des quartären Ammoniumsalzes CTAB, das kationtensidisches Verhalten zeigt, untersucht.

CTAB findet in der Kapillarelektrophorese meistens bei der Umkehr des elektroosmotischen Flusses Anwendung und ermöglicht somit die Separation von großen einfach geladenen Anionen bis hin zu mehrfach geladenen kleinen Anionen.



Abbildung 4-2: Zyklische Voltammogramme an einer 50 μm Kupfermikroscheibenelektrode: a) 10 mM Glucose, b) 10 mM Glycin und c) 10 mM Weinsäure in 50 mM NaOH mit verschiedenen Konzentrationen an CTAB-Zusätzen. Nur NaOH (schwarz), NaOH + Analyt (rot), + 0.2 mM CTAB-Zusatz (grün), + 2.0 mM CTAB Zusatz (blau) und + 20.0 mM CTAB-Zusatz (violett). Referenzelektrode: Ag/AgCl. Vorschubgeschwindigkeit: 50 mV/s.

Dass CTAB eine starke Affinität zu positiv geladenen Silberoberflächen [119] besitzt, ist bekannt, wobei das Molekül parallel zur Oberfläche mit dem ionischen Teil und der Alkylkette adsorbiert ist. Ob an die Kupferelektrode adsorbiertes CTAB deren elektrochemisches Verhalten ändert, soll im Folgenden untersucht werden. Im Potentialbereich um 0.6 V zeigt die schwarze Kurve (50 mM NaOH) wie erwartet keinen anodischen Peak. Es hat sich gezeigt, dass die Oxidation der organischen Verbindungen Glucose, Glycin und Weinsäure an der Kupferelektrode bei einem pH > 12 durch die Zugabe an CTAB zur Natronlauge beeinflusst wird. Gegenüber der Oxidationsstufe des Analyten in 50 mM Natronlauge ergibt schon ein geringer Zusatz von 0.2 mM an CTAB einen große Signalverstärkung. Die Zugabe von CTAB zur Lauge ohne das Vorhandensein eines oxidierbaren Analyten ändert das Zyklovoltammogramm einer Kupferelektrode in alkalischem Milieu nicht, wie schon von Xu [120] beschrieben. Eine Erhöhung der Konzentration an CTAB auf 2 mM und noch weiter bis weit in den Bereich der Mizellenbildung auf 20 mM liefert nur noch eine geringe Signalverstärkung. Im Fall der Weinsäure ist sogar eine Signalabschwächung bei der Zugabe von 20 mM und 2 mM CTAB im Vergleich zur Zugabe von 0.2 mM festzustellen. Das könnte auf eine Wechselwirkung zwischen den CTAB-Mizellen und der Weinsäure hindeuten. Eine Einlagerung der Weinsäuremoleküle in die Mizellen erschwert deren Annäherung an die Elektrodenoberfläche und im Weiteren deren Oxidation. Für Glucose und Glycin konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die gemessene Signalverstärkung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Fu et al. [121], der diesen Effekt bei verschiedenen Zuckern sowie Wein- und Ascorbinsäure beobachtete. Allerdings hat sich Fu auf eine Zugabe von 1.2 mM CTAB zur Natronlauge beschränkt.

Der Einfluss hoher CTAB-Konzentrationen auf die Signalverstärkung, bei Konzentrationen deutlich über der kritischen Mizell-Bildungskonzentration bleibt unerwähnt.

4.1.2.2 Beispielhafte analytische Anwendung

Der einfache Aufbau des amperometrischen Detektors, so wie dessen Potential zur Miniaturisierung machen ihn für den Einsatz in der Kapillaranalytik interessant. So wurde schon von tragbaren Kapillarelektrophoresegeräten [122] mit amperometrischer Detektion und auch von direkt auf den Kapillarausgang gesputterten amperometrischen Detektoren [58] berichtet. Durch den Einsatz verschiedener Elektrodenmaterialien [123, 124] wird ein breites Spektrum verschiedenster Analyte abgedeckt. Hierbei zeigt Kupfer gegenüber Gold und Platin (Abbildung 4-3) einige attraktive Eigenschaften, insbesondere wenn es sich dabei um die Detektion von biologisch interessanten Verbindungen wie Zuckern und Aminosäuren handelt. Kupferelektroden können sowohl als amperometrische als auch als potentiometrische Detektoren [124] bei der Bestimmung von Aminosäuren zum Einsatz kommen. Im Bereich der amperometrischen Detektion bieten sie gegenüber Gold- und Platinelektroden den Vorteil, dass man sie bei konstantem Potential betreiben kann. Im Gegensatz dazu muss bei Gold- und Platinelektroden in alkalischem Milieu die gepulste amperometrische Detektion zum Einsatz kommen, um einer Vergiftung der Metalloberfläche durch Reaktionsprodukte vorzubeugen. Hierbei handelt es sich um ein elektrochemisches Analyseverfahren, bei dem ein Messzyklus durchlaufen werden muss. Nach dem eigentlichen Messintervall erfolgt ein oxidativer Reinigungsschritt.



Abbildung 4-3: Elektropherogramme für a) 50-μm-Cu-, b) 90μm-Au- und c) 50-μm-Pt-Mikroscheibenelektroden in 50 mM NaOH mit Zusatz von 0.2 mM CTAB. Analyte: 1) Sulfit, 2) Weinsäure, 3) Glycin, 4) Alanin, 5) Prolin, 6) Fructose, 7) Glucose. Konzentrationen: a) c = 0.5 mM, b) c= 1.0 mM und c) c = 5.0 mM. Detektion: a) Detektion bei konstantem Potential: 600 mV, b) PAD: 100 mV/300 ms, 600 mV/120 ms, -200 mV/300 ms, c) PAD: 700 mV/600 ms, 1200 mV/100 ms, 200 mV/300 ms. Trennpotential CE: a) -15 kV, b) und c) -12kV. Probenaufgabe: a) Druckinjektion 50 mbar für 7 s, b) und c) Elektrokinetische Injektion -5 kV für 10 s.

Im Anschluss daran wird die Elektrodenoberfläche bei niedrigem Potential reduziert und steht somit erneut für weitere Messungen zur Verfügung. Gegenüber der amperometrischen Detektion bei konstantem Potential weist die gepulste amperometrische Detektion einen besonderen Nachteil auf. Durch das ständig wechselnde Arbeitspotential setzt sich der detektierte Gesamtstrom aus einem kleineren Anteil an faradayschem Strom (Stoffumsatz an der Elektrode) und einem großen Anteil kapazitiven Strom zusammen, wobei der gesamte Detektionsstrom relativ hoch ist. Dieser kapazitive Anteil, hervorgerufen durch das sich ständig ändernde Arbeitspotential, wirkt sich negativ auf das Detektionssignal aus und bedingt im Allgemeinen eine schlechtere Nachweisgrenze für das Pulsverfahren.

Bei der Analytik interessanter Weininhaltsstoffen wie Aminosäuren, Zuckern organischer Säuren und anorganischer Säureanionen zeigt die Kupferelektrode ein größeres Einsatzgebiet als die Platin- und Goldelektrode und erweist sich als Alternative zur indirekten UV-Detektion [125]. Unter den Weininhaltsstoffen spielen die Aminosäuren Arginin und Glycin eine besondere Rolle bei der Stickstoffversorgung der Hefen während der Gärung. Das Verhältnis von Glucose zu Fructose informiert über den Vergärungsgrad. Weiterhin sind Aminosäuren direkte Vorläufer von Aromastoffen im Wein. Die quantitative Bestimmung an Weinsäure im Beerensaft ermöglicht es, den Reifeverlauf der Traube zu studieren.

Die elektrophoretische Trennung von Zuckern im alkalischen Milieu kann bei positivem Trennpotential erfolgen und wurde von Huang [126] für eine große Auswahl an Zuckern beschrieben. In Leitelektrolyt mit hohem pH-Wert liegen Zucker als Anionen vor. Auf Grund ihrer negativen Ladung sollten sie im elektrischen Feld nicht in Richtung der

Kathode wandern. Da aber gerade bei Leitelektrolyt mit hohem pH-Wert ein großer elektroosmotischer Fluss in Richtung der Kathode vorhanden ist und die Wanderungsgeschwindigkeit der Zucker-Anionen im elektrischen Feld gegenüber dem EOF klein ist, ist eine Trennung in Richtung der Kathode trotzdem möglich. Möchte man simultan Zucker und organische Säuren trennen, so ist eine Umkehr des elektroosmotischen Flusses nötig, um wesentlich kürzere Migrationszeiten zu erhalten oder überhaupt eine gleichzeitige Trennung von Zuckern und organischen Säuren zu ermöglichen. Zur Umkehr des elektroosmotischen Flusses wird das quartäre Ammoniumsalz CTAB zum Laufelektrolyt zugegeben. Der Effekt tritt schon bei geringer CTAB-Konzentration im Leitelektrolyt auf. Erhöht man die Zugabe über die kritische Mizell-Bildungskonzentration, so setzt die Mizellenbildung ein. Der Einfluss verschiedener CTAB-Konzentrationen auf das Migrationsverhalten von Sulfit, Weinsäure, Glycin, Alanin, Prolin, Fructose, Glucose soll hier untersucht werden. Dabei soll der Unterschied zwischen Kapillarzonenelektrophorese und der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie demonstriert werden.

Auf Grund der guten Leitfähigkeit der Natronlauge werden die Experimente mit einer 65 cm langen Quarzglaskapillare mit einem Innendurchmesser von 25 µm durchgeführt. In Abbildung 4-4 ist zu erkennen, dass eine Erhöhung der CTAB-Zugabe von 0.2 mM auf 2.0 mM eine Reduzierung des elektroosmotischen Flusses zur Folge hat. Eine weitere Erhöhung der CTAB-Konzentration auf 20.0 mM ist mit einer Steigerung des elektroosmotischen Flusses verbunden. Ein Vergleich der Migrationszeiten aller Eluenten in Abhängigkeit von der eingestellten CTAB-Konzentration brachte folgende Ergebnisse: Durch eine Erhöhung der CTAB-Konzentration von 0.2 mM auf 2.0 mM verkleinert sich das Detektionsfenster zwischen der ersten und der letzten eluierten Analysensubstanz. Zunächst scheint es als werden sich die Analyte bezüglich ihrer Wanderung im elektrischen Feld ähnlicher, jedoch bringt eine weitere Erhöhung der CTAB-Konzentration auf 20 mM eine Vergrößerung des Detektionsfensters mit sich. Allerdings führt eine CTAB-Konzentration von 20 mM zu schlecht reproduzierbaren Migrationszeiten.



Abbildung 4-4: Elektropherogramme mit verschiedenen CTAB-Zusätzen: a) 0.2 mM, b) 2 mM und
c) 20 mM. Analyt (20 mM): 1) Sulfit, 2) Weinsäure, 3) Glycin, 4) Alanin, 5) Prolin,
6) Fructose, 7) Glucose, 8) Ethanol als EOF-Marker. Puffer: 0.05 M NaOH. Trenn-potential: -15 kV, Detektionspotential: 600 mV. Elektrokinetische Injektion: -5 kV für 7 s.

Der Anteil der CTAB-Konzentration am Laufelektrolyt ändert die relativen Mobilitäten (Abbildung 4-5). Der Vorteil in einer Betrachtung der Mobilität gegenüber der Migrationszeit liegt in der besseren Vergleichbarkeit aller untersuchten Analyte. Der Einfluss des elektroosmotischen Flusses, unterschiedlicher Kapillarlängen und Trennpotentiale wird durch diese Betrachtungsweise eliminiert. Die Zugabe von 0.2 mM zum Leitelektrolyt gilt als Referenzwert und wird auf 1 gesetzt. Eine größere relative Mobilität als 1 ist mit einer Verkürzung der Migrationszeit verbunden. Verringert sich die relative Mobilität, so eluiert

die Substanz zu einem späteren Zeitpunkt. Vor allem Sulfit und Weinsäure und in geringerem Maße auch Prolin zeigen sich durch die gesteigerte Zugabe an CTAB zum Leitelektrolyt beeinflusst. Sowohl eine Erhöhung der CTAB-Konzentration auf 2.0 mM als auch eine weitere Erhöhung auf 20.0 mM ist mit einer Verringerung der Mobilität verbunden. Für die restlichen Analyte bringt die Steigerung der CTAB-Konzentration eine wesentlich geringe Änderung der Mobilität mit sich. Die Wanderung von Ionen im elektrischen Feld wird von der Größe und der Ladung des jeweiligen Ions beeinflusst. Durch eine Wechselwirkung des Analyten mit den CTAB-Mizellen in der Lösung kann sich dessen Größe durch Okklusion in die Mizelle verändern oder dessen Ladung teilweise abgeschirmt werden. Beide Effekte würden das Abnehmen der Mobilitäten und die damit verbundenen längeren Migrationszeiten erklären. Das Eindringen der negativ geladenen Analyte in die positiv geladenen Mizellen kann ausgeschlossen werden [127]. Vielmehr ist



Abbildung 4-5: Abhängigkeit der relativen Mobilitäten der untersuchten Analyten von der CTAB-Zugabe zum Leitelektrolyt. Für c (CTAB) = 0.2 mM (schwarz) ist die relative Mobilität 1, c (CTAB) = 2.0 mM (grau), c (CTAB) = 20.0 mM (weiß).

die Existenz von Ionenpaarbildung oder anderen Analyt-Mizell-Wechselwirkungen zu diskutieren. Chang [128, 129] berichtete, dass die Ionenpaarbildung zwischen CTAB und Anionen eine Verlangsamung der Wanderung von Anionen im elektrischen Feld bewirkt. Nicht nur die Mobilität sondern auch die Effektivität der kapillarelektrophoretischen Trennung der untersuchten Analyte wird durch die Konzentration an CTAB im Leit-elektrolyt beeinflusst (Tabelle 4-1). Bessere Ergebnisse wurden bei 0.2 mM und 20 mM gegenüber 2.0 mM erreicht.

Analyt	Theoretische	Theoretische	Theoretische	
	Bodenzahl n	denzahl n Bodenzahl n		
	(+0.2 mM CTAB)	(+2.0 mM CTAB)	(+20.0 mM CTAB)	
Fructose	237216	85606	325697	
Glucose	289522	76859	616339	
Glycin	155771	81477	397365	
Alanin	342440	88844	206627	
Prolin	242765	61996	228563	
Sulfit	185529	79293	339451	
Weinsäure	61253	18684	6669925	

Tabelle 4-1: Theoretische Bodenzahl n bei verschiedenen CTAB-Konzentrationen.

Unter optimierten Bedingungen werden die Kalibrierkurven (Abbildung 4-6) im linearen Konzentrationsbereich zwischen 25 μ M und 500 μ M untersucht. Die Ergebnisse der linearen Regression sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Analyt	Korrelations-	Regressionsgleichung,	Nachweis-	Nachweis-
-	koeffizient r	c [mM], I [A]	grenze [µM]	grenze [µM],
				Fu [121]
Weinsäure	0.9996	I = 7.6E-11 + 7.5E-10 c	1.9	0.7
Fructose	0.9999	I = 2.7E-11 + 2.9E-10 c	4.8	1.25
Glucose	0.9995	I = 3.1E-11 + 3.1E-10 c	4.6	1.03

Tabelle 4-2: Regressionsgleichungen und Nachweisgrenzen.

Die berechneten Nachweisgrenzen liegen in etwa im selben Größenbereich wie die von Fu et al. an einer Kupfer-Mikroscheibenelektrode erhaltenen Nachweisgrenzen.



Abbildung 4-6: Lineare Regression für a) Weinsäure, b) Fructose und c) Glucose im Bereich von 0.025 mM bis 0.5 mM. 0.2 mM CTAB-Zusatz, sonstige Bedingungen wie in Abbildung 4-4.

Als konkretes Anwendungsbeispiel für eine kapillarelektrophoretische Trennung mit anschließender amperometrischer Detektion an einer Kupfer-Mikroscheibenelektrode in stark alkalischem Puffer steht die Untersuchung einer Weißweinprobe (Abbildung 4-7).

Eine Separation der Äpfelsäure von der Weinsäure ist bei einem CTAB-Zusatz von 0.2 mM nicht möglich. Eine Erhöhung der CTAB-Konzentration auf 2.0 mM ermöglicht die Trennung beider organischer Säuren. Die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei höheren CTAB-Konzentrationen schließt jedoch eine Routineanalytik aus.



Abbildung 4-7: Elektropherogramm einer Weißweinprobe (Müller-Thurgau) 1:100 verdünnt. CTAB-Konzentration: 0.2 mM, sonstige Bedingungen wie in Abbildung 4-4. Peaks: 1) Sulfit, 2+3) Wein und Äpfelsäure, 4) Fructose, 5) Glucose.

4.1.3 Elektrochemische Charakterisierung von Kupfer-Dünnschichtelektroden

4.1.3.1 Voltammetrische Untersuchungen

Der gegenwärtige Trend zur Miniaturisierung analytischer Geräte beeinflusst auch die Herstellung von Mikroelektroden. Der Einsatz mikrosystemtechnischer Basistechnologien bei ihrer Herstellung und die damit verbundene planare Schichttechnologie wird zur Notwendigkeit. Dabei sind zwei Standardverfahren für die Herstellung von Mikroelektroden geeignet und kommen bei der Herstellung der untersuchten Kupfer-Dünnschichtelektroden zum Einsatz. Die Lithographie dient der Strukturierung der Elektrodengeometrie und das Sputtern zum Erzeugen dünner Metallschichten auf planaren Trägermaterialien. Bevor jedoch die nur wenige 100 nm dicke Kupferschicht aufgebracht wird, muss eine Haftschicht als Interface zwischen Substrat und dem eigentlichen Elektrodenmaterial aufgebracht werden. In dieser Arbeit kommt eine 15 nm dicke Titanhaftschicht zum Einsatz. Von einer positiven Wirkung der Titanhaftschicht bei dünnen Kupferschichten die auf Polyimidsubstrat aufgebracht wurden, berichtet Iwamori et al. [130]. Gleichfalls dienen die Titanschichten als Diffusionsbarriere und verhindern eine Ausbreitung von Kupfer in das Substrat.

Die Kupferdünnschichtelektrode mit einer Schichtdicke von 800 nm wird unter dem Einsatz der zyklischen Voltammetrie in verdünnter Natronlauge charakterisiert. Das Zyklovoltammogramm hat das aus Kapitel 4.1.2.1 für eine Kupfermikroscheibenelektrode bekannte Aussehen. Die Oxidation der Glucose ist im Potentialbereich um 600 mV kurz vor dem Einsetzen der oxidativen Sauerstoffproduktion zu erkennen. Das elektrochemische

Verhalten der gesputterten dünnen Kupferschicht ist mit dem einer polierten Kupfer-Mikroscheibenelektrode vergleichbar.



Abbildung 4-8: Zyklisches Voltammogramm einer 2500 x 20 μm² Kupfer-Dünnschichtelektrode in 0.1 M Natronlauge (--) und mit Zugabe von Glucose zum Puffer (---). Referenzelektrode: Ag/AgCl. Vorschubgeschwindigkeit 100 mV/s.

4.1.3.2 Korrosionsverhalten dünner Kupferschichten in alkalischer Lösung

Kupfer bildet keine passivierende Oxidschicht wie beispielsweise Aluminium und deshalb ist es ratsam, das Korrosionsverhalten der nur wenigen 100 nm dicken Kupferschichten zu untersuchen. Zwei Kupfer-Dünnschichtelektroden mit aktiven Elektrodenoberflächen von 20x20 µm² werden in 0.1 M Natronlauge getaucht und ihr Verhalten über einen Zeitraum von 17 Stunden (Abbildung 4-9) untersucht. Während die eine Elektrode *floatend* in die Lösung eintaucht, wird an der zweiten Elektrode ein Potential von 600 mV - entsprechend dem Potential für die Glucoseoxidation - angelegt. Nach ca. 3 Stunden zeigt sich deutlich

eine schwarze Oxidschicht auf der *floatend* eintauchenden Elektrode und nach 17 Stunden ist die Elektrodenfläche zerstört. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass auch die Kupferschicht unter der Isolatorschicht beschädigt ist. Diese Beobachtungen bestätigt auch der an der Kupferschicht gemessene ohmsche Widerstand. Vor dem Experiment wurde zwischen den beiden Zuleitungen zur Elektrode ein Widerstand von 31.6 Ω gemessen, nach 17 Stunden waren es 256.1 Ω . Die Zunahme des Widerstands belegt die durch die alkalische Lösung hervorgerufene Oxidation des Kupfers und die Bildung nicht leitenden Kupferoxids. Diese chemische Oxidation führt zu einer inhomogenen, grobkörnigen Bildung von Kupferoxid, das eine schlechte Untergrundhaftung aufweist und sich leicht abwaschen lässt. Bei der zweiten Elektrode an der ein Potential von 600 mV angelegt ist, zeigt sich erst nach 17 Stunden eine etwas dunklere Färbung. Dennoch ist die Elektrode voll funktionsfähig, was zyklische Voltammetrie und gemessener Widerstand beweisen. Das angelegte Arbeitspotential scheint die Oxidation der Kupferschicht zu verlangsamen, was die Elektrode über längere Zeit vor der Zerstörung bewahrt.

Die Herkunft der dunklen Flecken auf der Kupferbahn unter der Isolatorschicht ist ungeklärt. Es ist jedoch anzunehmen, dass sie in Zusammenhang mit einer Unterwanderung der Isolatorschicht durch die Natronlauge stehen.

Die Untersuchungen zu Korrosion lieferten wichtige Ergebnisse zur Handhabung von Kupfer-Dünnschichtelektroden. Das Arbeitspotential sollte über den gesamten Zeitraum, in der sich die Elektrode in der Lösung befindet, angelegt sein, um eine frühzeitige Zerstörung der Elektrode zu verhindern.

- 88 -



Abbildung 4-9: Korrosionsverhalten zweier 20x20 µm² Kupfer-Dünnschichtelektroden in 0.1 M Natronlauge. Die obere Elektrode taucht floatend in die Lösung, an die untere Elektrode ist ein Potential von 600 mV gegen Ag/AgCl angelegt: a) Die Elektroden vor den elektrochemischen Versuchen, b) nach 5 Minuten, c) nach 3 Stunden und d) nach 17 Stunden. Isolatorschicht: SU8-Resist.

Wird die Elektrode über einen längeren Zeitraum für Experimente nicht benötigt, so ist es zweckmäßig, diese nicht im Puffer zu belassen. Ansonsten könnte sie durch Oxidationsprozesse oder eine Unterwanderung der Isolatorschicht zerstört werden.

4.1.3.3 Voruntersuchungen zur analytischen Eignung der Kupfer-Dünnschichtelektroden

Zur Charakterisierung der Reproduzierbarkeit des Detektionssignals eines elektrochemischen Detektors zeigt sich die Kapillar-Batch-Injektions-Analyse (CBIA) als zuverlässige Untersuchungsmethode. Dabei wird mit der Hilfe einer an eine Mikroliterspritze angekoppelte Kapillare Analyt zur Elektrode transportiert.

Eine präzise Einstellung der Konvektion in der elektrochemischen Zelle begünstigt das Analysensignal. Zu hohe Drehzahlen beim Rühren führen zu sehr kleinen Signalen. Zu niedrige Drehzahlen verursachen eine starke Signalverbreiterung. Insbesondere der zeitliche Verlauf der abfallenden Flanke des Signals wird dadurch stark beeinflusst.

Für 6 aufeinander folgende Injektionen (Abbildung 4-10) wurde die relative Standardabweichung für die gemessenen Signalhöhen von 6.75 % errechnet, d.h. die Detektion von Zuckern an Kupfer-Dünnschichtelektroden liefert reproduzierbare Analysenergebnisse.

Im nächsten Schritt erfolgt die elektrophoretische Separation mit anschließender amperometrischer Detektion. Hierbei wird unter üblichen Versuchsbedingungen bei einer 60 cm langen Kapillare mit einem Innendurchmesser von 25 µm weniger als 1 µl injiziert. Die injizierte Probe wandert dann unter dem Einfluss des elektrischen Feldes durch die Kapillare, wobei Diffusion und Temperaturgradient zur Dispersion führen.



Abbildung 4-10: CBIA von jeweils 150 nl einer 1 mM Glucoselösung an einer tangential angeströmten Kupfer-Dünnschichtelektrode (20x200μm²). Puffer: 50 mM Natronlauge + 0.2 mM CTAB. Kapillare: 40 cm lang, 75 μm Innendurchmesser, 365 μm Außendurchmesser. Detektionspotential: 700 mV gegen Ag/AgCl.

Um einen großen Probenpfropf bei der Probenaufgabe zu realisieren, wird eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von 100 µm verwendet. Die 20x100 µm² große Elektrodenfläche wird tangential von der Kapillare aus angeströmt. Die Kapillare hat einen Außendurchmesser von nur 240 µm, um den Kapillarausgang möglichst nahe an die Elektrodenoberfläche heranzubringen. Mittels eines Analysegemisches aus Weininhaltsstoffen wird die Durchführbarkeit der amperometrischen Detektion an einer tangential angeströmten Kupfer-Dünnschichtelektrode nach kapillarelektrophoretischer Trennung demonstriert (Abbildung 4-11). Dabei erweisen sich dünne Kupferschichten als geeignet für die amperometrische Detektion und Miniaturisierung. Das Anbringen einer Kapillare an eine Dünnschichtelektrode in der "tangential-Anordnung" führt zu verwertbaren Ergebnissen und ist Ausgangspunkt für weitere Experimente.



Abbildung 4-11: Elektropherogramm von Weininhaltsstoffen an einer Kupfer-Dünnschichtelektrode in 50 mM Natronlauge + 0.2 mM CTAB. Analyte (c = 1 mM): 1) Sulfit, 2) Weinsäure, 3) Glycin, 4) Alanin, 5) Prolin), 6) Glucose, 7) Arginin, 8) Ethanol als EOF-Marker. Quarzglaskapillare: 100 μm Innendurchmesser, 240 μm Außendurchmesser. Trennpotential: -5 kV, Detektionspotential: 600 mV. Elektrokinetische Injektion: -5 kV für 7 s.

Ergänzend zur Amperometrie kann die Potentiometrie zum Einsatz kommen. Ein wesentlicher Nachteil der Potentiometrie liegt in einem oft beobachteten *peak tailing*, das vor allem auf die logarithmische Konzentrationsabhängigkeit der Analysensignale zurückzuführen ist. Die logarithmische Kalibrierung führt vor allem bei niedrigen Konzentrationen zu einer Überbewertung.

Bei der potentiometrischen Detektion von Aminosäuren an Kupferelektroden macht man sich die Tatsache zunutze, dass diese Verbindungen Komplexe mit Kupferionen an der Elektrodenoberfläche bilden [78]. Die Cu(II)-Ionen zeigen eine große Affinität zu den Aminogruppen. Gerade bei hohen pH-Werten, bei denen die Aminogruppen nicht deprotoniert sind, ist diese Affinität am größten.



Abbildung 4-12: Potentiometrische Detektion von Aminosäuren (c = 0.3 mM) an Cu-Dünnschichtelektroden (20x200 μm²) in der wall-jet Anordnung. Elektropherogramm der Trennung von 1) Prolin, 2) Tyrosin, 3) Asparagin. Puffer: 3 mM Tetraborat, pH 10.5. Quarzglaskapillare: Innen-durchmesser 50 μm, Außendurchmesser 360 μm. Abstand zwischen Kapillarausgang und Elektrodenoberfläche: 150 μm. Injektion 30 mbar für 10 s. Trennpotential: 15 kV.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass es möglich ist Aminosäuren nach kapillarelektrophoretischer Trennung potentiometrisch an Kupfer-Dünnschichtelektroden zu detektieren (Abbildung 4-12). Somit zeigen gesputterte Dünnschichtelektroden aus Kupfer ein breites Einsatzgebiet im Bereich elektrochemischer Detektoren.

4.2 Der diskrete amperometrische Detektor

4.2.1 Untersuchungen an einer tangential angeströmten Dünnschichtelektrode

4.2.1.1 Grundlegende Untersuchungen zum Austritt der Probe am Kapillarende

Bei der Kapillarelektrophorese mit amperometrischer Detektion hat die Positionierung des amperometrischen Detektors zum Kapillarausgang [131] einen entscheidenden Einfluss auf das Detektionssignal. Am häufigsten kommt die *wall-jet*-Anordnung zum Einsatz, eine *end-column*-Anordnung bei der der Strahl der mobilen Phase senkrecht gegen die im Vergleich zum Kapillarinnendurchmesser viel größere Elektrode strömt.

Als neue Detektoranordnung bei den *end-column*-Varianten soll die tangential angeströmte Dünnschichtelektrode (Abbildung 4-13) untersucht werden. Diese ist technologisch gut realisierbar und soll zu einem einfach handhabbaren "Aufsteckdetektor" zur schnellen Ankopplung einer Kapillare an einen elektrochemischen Detektor ausgebaut werden. Im Vergleich zur Dünnschichtzelle liegt bei der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode der Kapillarausgang in einem Abstand von 140 µm senkrecht zur Elektrodenoberfläche, wobei der Analyt parallel zur Elektrodenoberfläche ausströmt. Untersuchungen zum Probenaustritt am Kapillarausgang von kapillaren Fließsystemen mit niedrigen linearen Strömungsgeschwindigkeiten wurden von Backofen [110] durchgeführt. Er beschreibt die Bildung einer diffusen Analytwolke in der Umgebung der Kapillaröffnung, deren Größe nicht signifikant von der Ausströmgeschwindigkeit abhängig ist. Wallenborg [132] berichtet außerdem, dass sich der Abstand zwischen dem Kapillarauslass und der Elektrode auf die Zahl der theoretischen Böden und somit auf die Effizienz der genannten Trennverfahren auswirkt. Bei der kapillarelektrophoretischen Trennung erfolgt der Transport der Probensubstanz jedoch nicht mittels Druck durch die Kapillare, sondern Ionen bewegen sich druckfrei im elektrischen Feld. Die Art und Weise wie der Analyt sich unter dem Einfluss der Hochspannung von der Kapillaröffnung aus ausbreitet, hat einen entscheidenden Einfluss auf die an der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode erhaltenen Signale.



Abbildung 4-13: Seitenansicht des diskreten amperometrischen Detektors mit tangential angeströmten Dünnschichtelektroden.

Der Austritt von Fluorescein am Kapillarausgang unter dem Einfluss der Hochspannung illustriert Abbildung 4-14. Zur Anregung der Fluoreszenz wird der Kapillarausgang mit ultraviolettem Licht beleuchtet. Der Umriss der Kapillare wurde zum besseren Verständnis nachgezeichnet. Im Vordergrund des Kapillarausgangs sind 6 Dünnschichtelektroden mit einer Breite von jeweils 20 µm und einem Band-zu-Band-Abstand von jeweils 20 µm zu erkennen. Die Kapillaröffnung kann mit einer Punktquelle verglichen werden. Von ihr breitet sich der austretende Analyt halbkugelförmig aus. Aus diesem Grund ist es möglich ein Signal von der direkt am Rand der Kapillare liegenden Dünnschichtelektrode zu

erhalten. Für die restlichen fünf Elektroden gilt dasselbe, wobei anzunehmen ist, dass die Signalstärke mit zunehmender Entfernung der Dünnschichtelektrode vom Kapillarausgang abnehmen wird. Würde sich die Probe nach dem Austritt aus der Kapillare linear ohne Richtungsänderung weiterbewegen, so wäre eine Detektion an einer tangential angeströmten Dünnschichtelektrode nicht möglich. An dieser wurden nach kapillarelektrophoretischer Separation einer Glucose- und Fructoselösung zwei Signale erhalten. Dies ist eine Bestätigung der mit Fluorescein erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich einer radialen Ausbreitung der Probe nach dem Austritt aus der Kapillare.



Abbildung 4-14: Zeitlicher Verlauf des Probenaustritts aus einer mit 5 mM Fluoresceinlösung gefüllten Quarzglaskapillare (Auβendurchmesser: 365 μm, Innendurchmesser 25 μm) über 6 tangential angeströmte Dünnschichtelektroden. Der Probenaustritt erfolgt ausschließlich durch die angelegte Hochspannung von 15 kV.

4.2.1.2 Coulometrische Effizienz

Um die Leistungsfähigkeit eines amperometrischen Detektors zu optimieren oder zu beurteilen, bietet sich die Bestimmung der coulometrischen Effizienz als aussagekräftiges Hilfsmittel an. Unter der coulometrischen Effizienz versteht man das Verhältnis zwischen der tatsächlich an der Arbeitselektrode gemessenen Ladungsmenge und der theoretisch berechneten elektrischen Ladung einer definierten Probemenge ($Q_{gemessen}/Q_{theoretisch}$). Bei einem Vergleich unterschiedlicher Detektoranordnungen ist eine höhere coulometrische Effizienz mit dem leistungsfähigeren Detektor verbunden.

Ein Vergleich der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode mit der *wall-jet*-Anordnung wird angestrebt. Dafür wird eine 1 mM Natriumsulfitlösung an einer Platinelektrode in alkalischer Lösung oxidiert. Die Kapillare wird so zur Elektrode angebracht, dass die Dünnschichtelektrode direkt an die Kapillare anstößt. Eine weitere Dünnschichtelektrode ist ca. 40 µm vom Kapillarende entfernt.

Die Untersuchung des Basislinienrauschens zeigt für beide Dünnschichtelektroden bei -10, -20 und -30 kV keine signifikanten Unterschiede und wird mit 6 pA bestimmt. Dieses Ergebnis belegt eine erfolgreiche Entkopplung der elektrophoretischen Hochspannung von der amperometrischen Detektion.

Der Einfluss des Abstandes (Tabelle 4-3) zwischen dem Kapillarausgang und der Dünnschichtelektrode spielt einen entscheidenden Einfluss auf die Stromausbeute. Mit zunehmender Entfernung der Elektrode vom Kapillarausgang nimmt die coulometrische Effizienz erwartungsgemäß ab. Durch die radiale Ausbreitung des aus der Kapillare tretenden Analyten nimmt dessen Volumen mit zunehmender Entfernung zu und eine

Verdünnung mit Puffer (Dispersion) findet statt. Im Vergleich zur näher gelegenen Dünnschichtelektrode trifft weniger Analyt auf die weiter entfernt liegende. Des Weiteren behindert die Stirnseite der Kapillare den ausströmenden Analyt in seiner Ausbreitung. Die direkt an die Kapillare angrenzende Elektrode sollte im Vergleich zur weiter entfernt liegenden eine übermäßig gesteigerte coulometrische Effizienz aufweisen, was auch beobachtet wurde. Obwohl der effektive Abstand vom Kapillarausgang zur nahe gelegenen Dünnschichtelektrode nur 4 % kürzer ist als zur weiter entfernt liegenden, konnte eine gesteigerte coulometrische Effizienz von nahezu 50 % detektiert werden. Im Vergleich dazu erhält man für eine konventionelle Mikroscheibenelektrode in der wall-jet-Anordnung (Plexiglashalterung) mit einem Durchmesser von 50 μ m (1963 μ m²) und einem effektiven Abstand zum Kapillarausgang von 35 µm eine coulometrische Effizienz von 3,3 %. Hierbei handelt es sich um eine relativ niedrige Stromausbeute, die auf die Positioniereinrichtung aus Plexiglas, sowie der unzufriedenstellenden Möglichkeit der Einstellung des Abstands zwischen Kapillarausgang und Dünnschichtelektrode zurückzuführen ist. Das exakte Einstellen von Abständen zwischen Kapillaren und Elektroden im Mikrometerbereich ist schwierig, da eine exakte Längenmessung unter dem Mikroskop schwer fällt. Nur mit Pinzette und Mikroskop und ohne weitere Hilfsmittel ist eine Positioniergenauigkeit von $\pm 20 \ \mu m$ realisierbar. Oft hilft dann nur noch der Einsatz eines Mikromanipulators. Der tangential angeströmte Detektor ist auf Grund seiner einfachen Aufbauweise vergleichsweise einfach zu positionieren, jedoch ist eine Fixierung der Kapillare durch Aufkleben auf das Substrat verhältnismäßig schwierig.

Tabelle 4-3: Coulometrische Effizienzen für tangential angeströmte Dünnschichtelektroden. Sulfit-Oxidation in pH 9 Puffer an 20x200 μm² großen Platindünnschichtelektrode. Trennpotential –20 kV. Kapillare: 360 μm Außendurchmesser, 25 μm Innendurchmesser. Injektionsvolumen: 0.8 nl.

Elektrode	Abstand zwischen	Effektiver Abstand zwischen	Coulometrische
	Kapillarende und	Kapillarausgang und	Effizienz [%]
	Elektrode [µm]	Elektrode [µm]	
1	0	140	2.1
2	40	146	1.2

Trotz vieler Versuche war es nicht möglich, die Kapillare in einer auf das Substrat aufgebrachten Plexiglasführung (Abbildung 4-15) an die Dünnschichtelektroden heranzuführen und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.



Abbildung 4-15: Tangential angeströmte Dünnschichtelektrode mit in Plexiglas gefrästem Kanal als Führung für die Kapillare (Aufsteckdetektor).

Der ursprünglich gedachte einfach handhabbare "Aufsteckdetektor", bei dem die Kapillare einfach in einen in Plexiglas gefrästen Kanal geschoben wird, wobei das Ende des Plexiglaskanals exakt zur Dünnschichtelektrode positioniert ist, konnte nicht realisiert werden. Es ist davon auszugehen, dass Toleranzen bei der Fertigung und Positionierung
der Halterung dafür verantwortlich sind, dass dieses Konzept nicht funktioniert. Bei den gelisteten Ergebnissen zur tangential angeströmten Dünnschichtelektrode wurde die Kapillare mit Hilfe von Epoxydharz auf dem Substrat fixiert.

4.2.1.3 Reproduzierbarkeit analytischer Kennzahlen

Die Reproduzierbarkeit einer Analyse wird als Maß für die Güte der Streuung der Einzelbestimmungen angesehen. Beim Aufbau der Kapillarelektrophorese mit einem tangential angekoppelten amperometrischen Detektor müssen zwei im Elektropherogramm enthaltenen Aussagen untersucht werden: die Migrationszeiten zur Beschreibung der Reproduzierbarkeit des Kapillarzustands und die Signalgröße vornehmlich zur Charakterisierung des Detektors. Die Reproduzierbarkeit wird durch die relative Standardabweichung ausgedrückt. Diese entspricht dem Verhältnis zwischen der Standardabweichung und dem Mittelwert der Analysensignale und wird in Prozent angegeben.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und Analysensignalen werden 10 nl einer 1 mM Eisensulfatlösung fünfmal injiziert. Die elektrophoretische Trennung wird in einer 60 cm langen Quarzglaskapillare mit einem Innendurchmesser von 50 µm unter dem Einfluss des Hochspannung bei 20 kV durchgeführt. Das Kapillarende wird direkt an der Dünnschichtelektrode mittels Epoxydharz fixiert. Die amperometrische Detektion erfolgt bei 800 mV an einer Platin-Dünnschichtelektrode mit einer aktiven Elektrodenoberfläche von 20x200µm².

Für die Migrationszeit des Fe(II)-Ions ergibt sich eine relative Standardabweichung von 0.7 %, was im Bezug auf eine kapillarelektrophoretische Trennung ein gutes Ergebnis darstellt. Wertet man das Analysensignal über die Signalhöhe aus, so erhält man eine

relative Standardabweichung von 1.5%. Bei der Auswertung des Analysensignals über seine Fläche ist die relative Standardabweichung mit 1 % sogar noch etwas besser als bei der Auswertung über die Signalhöhe. Bei der Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) an einer Platinelektrode als Modell für die amperometrische Detektion an einer tangential angeströmten Dünnschichtelektrode werden gut reproduzierbare Analysensignale erhalten. Die vorliegenden Ergebnisse zeichnen die tangential angeströmte Dünnschichtelektrode als geeigneten *end-column*-Detektor für den Routineeinsatz in der Kapillarelektrophorese aus.

4.2.1.4 Lineare Regression und Nachweisgrenzen

Zur Beschreibung der Anwendungstauglichkeit des diskreten amperometrischen Detektors mit tangential angeströmter Dünnschichtelektrode als Detektor in der Kapillarelektrophorese wird die Oxidation von Catecholaminen an Goldelektroden untersucht. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Neurotransmitter, deren Bestimmung in zahlreichen Arbeiten beschrieben wurde [58, 96, 133-137]. Adrenalin und Dopamin werden in einem MES-Puffer getrennt und an der tangential angeströmten Gold-Dünnschichtelektrode bei einem Potential von 800 mV detektiert. Das Elektropherogramm der 1 mM Standardlösung ist in Abbildung 4-16 dargestellt.

Die Signale für Dopamin und Adrenalin sind nicht durch die Basislinie getrennt, wie das bei der *wall-jet*-Anordnung zu beobachten ist. Über diesen Effekt hat auch Kurita et al. [138] bei einer der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode ähnlich aufgebauten *channel flow cell* berichtet. Der Vergleich zwischen einer *wall jet flow cell* mit Interdigitalelektroden und einer *channel flow cell* in der Kapillarelektrophorese zeigt eine Verbreiterung der Probenzone für die zuletzt genannte Detektorart. Die Verbreiterung wurde auf das größere Totvolumen für die *channel flow cell* zurückgeführt. Bei der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode ist die Signalverbreiterung wohl in der großen Distanz zwischen Kapillarausgang und Elektrode zu suchen.



Abbildung 4-16: Elektropherogramm von 1 mM Dopamin und Adrenalin in pH 6.5 MES-Puffer mit amperometrischer Detektion an einer tangential angeströmten 20x200 μm² Au-Dünnschichtelektrode. Quarzglaskapillare: 25 μm Innendurchmesser, 360 μm Außendurchmesser. Trennpotential: 20 kV, Detektionspotential: 800 mV. Druckinjektion: 50 mbar für 10 s.

Die Kalibrierkurven für beide Substanzen wurden im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 mM und 1 mM aufgenommen (Abbildung 4-17). Die Daten der linearen Regression und die Nachweisgrenzen sind in Tabelle 4-4 enthalten. Das *peak-to-peak*-Rauschen der Basislinie wurde mit 2.2 pA bestimmt. Zur Berechnung der Nachweisgrenzen wurde das dreifache *peak-to-peak*-Rauschen herangezogen.

Im Vergleich zu den Arbeiten von Voegel et al., die eine dünne Goldschicht direkt auf der Stirnseite der Kapillare aufgebracht haben, liegen die Nachweisgrenzen der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode um etwa eine Zehnerpotenz höher. Des Weiteren untermauert die von Voegel et al. berichtete niedrige Nachweisgrenze und die hohe coulometrische Effizienz die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete radiale Ausbreitung der Probe vom Kapillarausgang im elektrischen Feld.



Abbildung 4-17: Lineare Regression für a) Dopamin und b) Adrenalin im Bereich von 0.1 mM bis 1.0 mM. Versuchsparameter siehe Abbildung 4-16.

Tabelle 4-4: Regressionsgleichungen und Nachweisgrenzen für Dopamin und Adrenalin.

Analyt	Korrelations-	Regressionsgleichung,	Nachweis-	Nachweis-
	koeffizient r	c [mM], I [A]	grenze	grenze [µM],
			[µM]	Voegel et al. [58]
Dopamin	0.9968	I = -2.1E-11 + 4.6E-10 c	20.6	0.6
Adrenalin	0.9927	I = -3.4E-11 + 4.8E-10 c	21.1	1.5

4.2.2 Untersuchungen an einer Dünnschichtelektrode in der konventionellen walljet-Anordnung

4.2.2.1 Coulometrische Effizienz

Bei der kapillarelektrophoretischen Separation mit anschließender amperometrischer Detektion wird die *wall-jet*-Anordnung (Abbildung 4-18) wohl am häufigsten eingesetzt. Jedoch eignen sich planare Dünnschichtelektroden recht schlecht für diese Art der *endcolumn*-Detektion. Eine Halterung für die Dünnschichtelektrode mit Positioniereinrichtung für die Kapillare muss konstruiert werden. Eine unmittelbare Befestigung der Kapillare am planaren Substrat ist nicht möglich.



Abbildung 4-18: Schematische Seitenansicht des diskreten amperometrischen wall-jet-Detektors mit planarer Dünnschichtelektrode.

Die folgenden Experimente beschreiben im Wesentlichen den Einfluss der Größe der aktiven Elektrodenfläche und den Abstand zwischen Kapillarausgang und Elektrode auf die Stromausbeute. Betrachtet man die Größe der senkrecht zum Kapillarausgang positionierten Elektrodenoberfläche, so kann man feststellen, dass eine Zunahme der mit dem Puffer in Kontakt stehenden Elektrodenfläche auch mit einer Zunahme der coulometrischen Effizienz verbunden ist. Sowohl für die kleine als auch für die große Elektrodenfläche kann bei einer Abstandszunahme zwischen Kapillarausgang und Elektrode eine Abnahme der coulometrischen Effizienz verzeichnet werden.

Tabelle 4-5: Coulometrische Effizienzen für Platindünnschichtelektroden in der wall-jet-Anordnung. Sulfit-Oxidation in pH 9 Puffer. Trennpotential –20 kV. Kapillare: 360 μm Außendurchmesser, 25 μm Innendurchmesser. Injektionsvolumen: 0.8 nl.

Elektroden-	Aktive Elektroden-	Abstand zwischen	Coulometrische
anordnung	fläche [µm ²]	Kapillarende und	Effizienz [%]
		Elektrode [µm]	
1	20x200	50	11.3
2	20x200	100	7.4
3	2000x2000	50	64.2
4	2000x2000	100	54.5
5	2000x2000	200	35.0

Die coulometrischen Effizienzen für eine 20x200 µm² Platin-Dünnschichtelektrode in der *wall-jet*-Anordnung sind im Vergleich zur tangential angeströmten Dünnschichtelektrode etwas größer, wobei sich die Elektrode jedoch näher am Kapillarausgang befindet. Hier zeigt sich der limitierende Faktor der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode, die man nicht beliebig nah an den Kapillarausgang heran bringen kann. Während bei der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode die Kapillarwandstärke den Abstand zwischen Kapillarausgang und Elektrode bestimmt, kann bei der *wall-jet*-Anordnung die Elektrode beliebig nah an den Kapillarausgang mit Hilfe eines Mikromanipulators herangebracht werden. Jedoch sollte die Elektrode nicht in unmittelbarer Nähe zum Kapillarausgang platziert werden, um übermäßig starkes Basislinienrauschen zu vermeiden. Bei dem Versuch die Kapillare direkt auf der Elektrodenoberfläche abzusetzen, war es nicht möglich ein Analysensignal zu erhalten. Starkes Basislinienrauschen deutet auf eine von der Detektion nicht ausreichend entkoppelte Hochspannung hin.

4.2.2.2 Reproduzierbarkeit analytischer Kennzahlen

Zur grundlegenden analytischen Charakterisierung der Kapillarelektrophorese mit angekoppelter amperometrischen Detektion in der *wall-jet*-Anordnung wird die Reproduzierbarkeit von Migrationszeiten und Signalgrößen untersucht.

Eine 60 cm lange Quarzglaskapillare mit einem Innendurchmesser von 25 µm wird zu einer 20x200 µm² Platindünnschichtelektrode im Abstand von 100 µm positioniert. Für das Experiment wurden 5 nl einer 1 mM Natriumsulfitlösung injiziert. Als Potential für die Kapillarelektrophorese werden – 20 kV angelegt, die amperometrische Detektion erfolgt bei 700 mV. Die Schwankung bei den Migrationszeiten ist mit einer relativen Standardabweichung von 0.1 % als sehr guter Wert für die Kapillarelektrophorese zu beschreiben. Die sehr gut reproduzierbaren Migrationszeiten sowohl bei der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode als auch bei der *wall-jet*-Anordnung sind auf eine gut optimierte Analysenmethode zurückzuführen. Die Auswertung des Analysensignals über die Signalhöhe ergibt eine relative Standardabweichung von 5.3 %. Die Auswertung über die Signalfläche ist mit einer relativen Standardabweichung von 4.2 % noch etwas besser. Somit liegen die Reproduzierbarkeiten für Migrationszeit und Signale des untersuchten Analyten in einem für die Routineanalytik akzeptablen Rahmen.

4.2.2.3 Lineare Regression und Eichung

Um den direkten Vergleich zur tangential angeströmten Dünnschichtelektrode zu ermöglichen, wird die Kalibrierkurve für Dopamin und Adrenalin an einer 20x200 μ m² Au-Dünnschichtelektrode untersucht. Der Abstand zwischen Kapillarausgang und Elektrode beträgt 50 µm, alle übrigen Versuchsparameter sind mit denen in Kapitel 4.2.1.4 identisch. Das Elektropherogramm einer 1 mM Standardlösung ist in Abbildung 4-19 dargestellt. Das *peak-to-peak*-Rauschen der Basislinie wurde mit 1.6 pA bestimmt und liegt somit leicht unter der Messung von 2.2 pA bei der tangential angeströmten Dünnschichtelektrode.



Abbildung 4-19: Elektropherogramm von 1 mM Dopamin und Adrenalin in pH 6.5 MES-Puffer mit amperometrischer Detektion an einer 20x200 μm² Au-Dünnschichtelektrode in der wall-jet-Anordnung. Quarzglaskapillare: 25 μm Innendurchmesser, 360 μm Außendurchmesser. Trennpotential: 20 kV, Detektionspotential: 800 mV. Druckinjektion: 50 mbar für 10 s.

Die Kalibrierkurve für beide Substanzen wurden im linearen Konzentrationsbereich zwischen 0.05 mM und 1 mM aufgenommen (Abbildung 4-20). Die Daten der linearen Regression sind in Tabelle 4-6 enthalten.



Abbildung 4-20: Lineare Regression für a) Dopamin und b) Adrenalin im Bereich von 0.05 mM bis 1.0 mM. Versuchsparameter siehe Abbildung 4-16.

Der Vergleich zur tangential angeströmten Dünnschichtelektrode zeigt, dass sich die Nachweisgrenzen für Dopamin und Adrenalin nur geringfügig unterscheiden. In dieser Arbeit ist die *wall-jet*-Anordnung nicht empfindlicher als die tangential angeströmte Dünnschichtelektrode. Jedoch zeigt die *wall-jet*-Anordnung ein größeres Potential zur Optimierung der Positionierung der Elektrode zum Kapillarausgang. Aus diesem Grund muss man davon ausgehen, dass deutlich geringere Nachweisgrenzen möglich sind. Untersuchungen an Catecholaminen von verschiedenen Arbeitsgruppen, wobei sowohl die *end-column*- [139] als auch die *on*- und *in-column*-Detektoranordnungen [57, 64, 140] zum Einsatz kamen, weisen Nachweisgrenzen bis in nanomolare Konzentrationsbereiche auf.

	8	<i>v</i> 1		
Analyt	Korrelations-	Regressionsgleichung,	Nachweisgrenze,	Nachweisgrenze,
	koeffizient r	c [mM], I [A]	wall-jet-	Tangential
			Anordnung [µM]	angeströmte
				Dünnschicht-
				elektrode [µM]
Dopamin	0.9586	I = -4.5E-11 + 4.5E-9 c	13.9	20.6
Adrenalin	0.9567	I = -2.5E-10 + 7.4E-9 c	34.4	21.1

Tabelle 4-6: Lineare Regression für Dopamin und Adrenalin.

4.2.2.4 Anwendung

Zur Therapie des Parkinson-Syndroms wird das zu den Catecholaminen gehörende Dihydroxyphenylserin (DOPS) eingesetzt. Die Verbindung besitzt zwei Chiralitätszentren, woraus vier Diastereomere resultieren. Zur Therapie des noradrenergen Defizits wird L-Treo-3,4-Dihydroxyphenylserin eingesetzt. Bei L-Treo-DOPS handelt es sich um eine synthetische Aminosäure, welche in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen und durch enzymatische Decarboxylierung in Noradrenalin umgewandelt wird. Bei niedrigem pH-Wert und unter der Zugabe chiraler Hilfsstoffe ist eine simultane Detektion der vier Diastereomere möglich. Cyclodextrine sind für das vorliegende Analysenproblem die geeigneten chiralen Hilfsstoffe, da sie schon erfolgreich bei der Separation verschiedener Catecholaminen zum Einsatz kamen [137]. Die Detektion erfolgt wie schon bei Dopamin und Adrenalin an Gold-Dünnschichtelektroden bei konstantem Potential. Als Hintergrundelektrolyt wird ein Phosphatpuffer eingesetzt. Ohne die Zugabe des sulfatierten β-Cyclodextrin zum Puffer ist eine Trennung der vier Diastereomere nicht möglich. Es erfolgt lediglich eine Trennung der nicht enantiomeren Diastereomere, und man erhält zwei Signale. Durch die Zugabe des chiralen Hilfsstoffes werden auch die chiralen Diastereomere getrennt, und man erhält insgesamt vier Signale. Des Weitern kann man den Elektropherogrammen entnehmen, dass die Zugabe des chiralen Hilfsstoffes zum Puffer die Migrationszeiten für die Diastereomere um über 500 s verlängert, was auf eine Wechselwirkung zwischen chiralem Hilfsstoff und Analyt zurückzuführen ist. Außerdem verstärkt die Zugabe der chiralen Hilfsstoffe das Basislinienrauschen.



Abbildung 4-21: Elektropherogramme von 1 mM D/L-DOPS in pH 2.5 Phosphatpuffer mit amperometrischer Detektion an einer Golddünnschichtelektrode in der wall-jet-Anordnung:
a) ohne chirale Hilfsstoffe. b) mit 5 mg/ml sulfatiertem β-Cyclodextrin. Quarzglaskapillare:
50 μm Innendurchmesser, 360 μm Außendurchmesser. Trennpotential: 20 kV, Detektionspotential: 1200 mV. Druckinjektion: 50 mbar für 5s.

4.2.3 Häufig auftretende Probleme bei planaren Dünnschichtelektroden

Dünnschichtelektroden bedürfen besonderer Sorgfalt bei ihrer Handhabung. Unter dem Einsatz von Planartechnologie werden dünne Metallschichten auf besonders ebene Substrate aufgebracht. Die nur wenige hundert Nanometer dicken Schichten sind in wässriger Lösung besonders anfällig gegen oxidative Zerstörung, was ein Ablösen des Metalls vom Untergrund und die Zerstörung der Dünnschichtelektrode zur Folge haben kann.

Manuelles Polieren zur Reinigung der Elektrodenoberfläche, wie man es von in Kapillaren eingebetteten Mikroscheibenelektroden gewohnt ist, würde die dünnen Schichten zerstören und scheidet somit aus. Ist eine Elektrode verschmutzt, so kann man versuchen, mit wiederholten Oxidations- und Reduktionsschritten die Oberfläche zu reinigen ohne dabei die dünne Metallschicht durch Anlegen zu hoher Potentiale zu zerstören. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den von Brett et al. [141] berichteten Erkenntnissen. Deren gesputterte Gold-Dünnschichtelektroden auf PVC-Substrat nahmen bei Potentialen größer 0.8 V irreversiblen Schaden.

Um die Zuleitungen zur aktiven Elektrodenfläche zu isolieren, kommt ein Negativresist zum Einsatz. Um den Stofftransport zur Elektrode nicht zu beeinträchtigen, sollte diese Lackschicht so dünn als möglich sein. Doch hat sich immer wieder gezeigt, dass gerade diese dünnen Lackschichten sowohl gegen mechanische als auch chemische Einflüsse anfällig sind. Risse und defekte Stellen in der Isolatorschicht stellen einen Kontakt zwischen der Elektrolytlösung und der Elektrodenzuleitung her und vergrößern somit die aktive Elektrodenoberfläche. Eine Zunahname des Grundstroms und ein daraus resultierendes schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis ist die Folge.

4.3 Miniaturisierung eines Kapillarelektrophoresesystems

4.3.1 Einleitung

Nachdem der Übergang von der Mikroscheibenelektrode zur lithographisch strukturierten Dünnschichtelektrode wie in Kapitel 4.1 beschrieben geschafft war, wurde in Kapitel 4.2 das Ankoppeln von Dünnschichtelektroden an herkömmliche Quarzglaskapillaren realisiert. Im nächsten Schritt soll die Quarzglaskapillare durch Mikrokanäle, die aus polymeren Werkstoffen gefertigt sind, ersetzt werden. In dem mikrofluidischen Kanalsystem soll eine elektrokinetische Injektion mit anschließender elektrophoretischer Separation durchführbar sein. Zur Signalerfassung soll letztendlich ein elektrochemischer Detektor zum Einsatz kommen.

4.3.2 Mikrosystemtechnische Realisierung von Mikrokanalstrukturen als Basis eines miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystems

Im Zuge der Entwicklung eines polymeren Mikrokanals für kapillaranalytische Anwendungen kamen eine Reihe von Materialien zum Einsatz, deren Tauglichkeit in Bezug zu den zur Verfügung stehenden Herstellungstechniken untersucht werden musste. Die im Verlauf dieser Arbeit getesteten Werkstoffe in Verbindung mit den angewandten Verfahren sind in Tabelle 4-7 aufgelistet.

Um eine effektive Untersuchung der Mikrokanäle und deren Betrieb als miniaturisiertes Kapillarelektrophoresegerät zu ermöglichen, wurde ein geeigneter Versuchsstand, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, entworfen und gebaut.

Der Ausgangspunkt der Entwicklung mikrofluidischer Kanalstrukturen, die für eine elektrophoretische Separation einer Probenlösung geeignet sein sollten, bildeten die Abformungen in PMMA.

Bei dem lichtinduzierten Reaktionsspritzguss werden Prepolymer und Radikalstarter in eine Form mit Glasboden gefüllt. Mit Hilfe von UV-Licht wird die Polymerisation durchgeführt. Eine Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme, wie in Abbildung 4-22 dargestellt, zeigt deutlich die unebene Oberfläche des abgeformten Werkstücks. Dazu kommt die Sprödigkeit des Materials, die eine nachträgliche Bearbeitung erschwert.

Der Injektionskanal bildet mit dem Trennkanal eine Doppel-T-Struktur, wodurch ein Injektionspfropf mit einer definierten Länge von 250 µm erhalten werden soll. Die Güte des Kanalquerschnitts (Steilheit der Wände, Tiefe und Breite der Kanäle) wird mit einem Tastschnittgerät (Abbildung 4-23) bestimmt. Der Kanalquerschnitt zeigt deutlich, dass die Steilheit der Wände in der Anfangsphase der Produktion noch nicht optimal ist.

Material für	Strukturierungsmethode
die Kanalabformung	
PMMA	a) Abformung mittels lichtinduziertem Reaktionsspritzgusses
	von einem laserstrukturierten Abformwerkzeug.
	b) Abformung mittels Heißprägen mit einem aus Edelstahl
	gefrästen Abformwerkzeug.
	c) Laserdirektstrukturierung.
PDMS	a) Abformung (<i>casting</i>) von einem lithographisch strukturierten
	SU-8 Abformwerkzeug.
	b) Abformung (<i>casting</i>) von einem aus Edelstahl gefrästen
	Abformwerkzeug.
SU-8	Lithographische Strukturierung des Photoresists.
PSU	Laserdirektstrukturierung.

Tabelle 4-7: Getestete Materialien und Herstellungsverfahren für Mikrokanalstrukturen in polymeren Werkstoffen.



Abbildung 4-22: REM-Aufnahme des mit Hilfe des lichtinduzierten Reaktionsspritzgusses in PMMA abgeformten Mikrokanals. Doppel-T-Struktur für die elektrokinetische Injektion.



Abbildung 4-23: Kanalquerschnitt eines mit Hilfe des lichtinduzierten Reaktionsspritzgusses in PMMA abgeformten Mikrokanals. Höhe: ca. 9 µm, Breite ca. 60 µm.

Das trapezförmige Profil muss in Richtung rechtwinkliger Geometrien optimiert werden. Des Weiteren sind die zu Anfang produzierten Kanäle zu flach geraten, was sich bei späteren Deckelungsversuchen gerade mit flexiblen Materialien als hinderlich erwiesen hat. Um ein Verschließen der Kanäle durch den flexiblen Deckel zu verhindern, werden für weitere Versuche quadratische Kanalquerschnitte mit 50x50 μ m² angestrebt.

Mit Hilfe eines flexiblen Silikonscheibchens aus Polydimethylsiloxan können die mittels lichtinduzierten Reaktionsspritzgusses in PMMA abgeformten Mikrokanalstrukturen verschlossen werden. Daraufhin konnte unter dem Mikroskop die elektrokinetische Injektion von Fluorescein und dessen elektrokinetischer Transport im elektrischen Feld beobachtet werden (Abbildung 4-24).



Abbildung 4-24: Elektrokinetischer Transport von Fluorescein in mit verdünnter Natronlauge gefüllten Mikrokanälen aus PMMA. Die Befüllung des Injektionskanls verläuft innerhalb der Bilderserie von unten nach oben. Der Transport im Trennkanal erfolgt von rechts nach links:
a) alle Kanäle sind mit verdünnter Natronlauge gefüllt. b) und c) Befüllung des Injektionskanals und der Doppel-T-Struktur. Es wird im Trennkanal ein Injektionspfropf mit definierter Länge gebildet. d), e) und f) elektrokinetischer Transport von Fluorescein entlang des Trennkanals.

Ausgehend von den mit Hilfe der Spritzgusstechnik hergestellten Kanalstrukturen in PMMA kam als alternativer Herstellungsprozess das Heißprägen in PMMA zum Einsatz. Bei diesen Kanalstrukturen war es dem Institut für Mikrosystemtechnik am Forschungszentrum Karlsruhe möglich, sie mit einer dünnen Folie aus PMMA zu verschließen (Abbildung 4-25). Die Integration von Elektroden für die elektrochemische Detektion und auch für die Zu- und Ableitung der Hochspannung konnte bei den aus PMMA gefertigten Kanalstrukturen im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden. Das Gleiche gilt auch für die Kanalstrukturen in PSU, die durch Laserdirektablation hergestellt wurden.





Abbildung 4-25: Mikrofluidische Kanalstrukturen in polymeren Werkstoffen: a) Mittels Heißprägen in PMMA abgeformte und mit dünner PMMA-Folie verschlossene Struktur. b) Strukturierung von PSU mittels Laserdirektablation.

Ziel dieser Arbeit soll jedoch ein miniaturisierter Kapillarelektrophorese-Chip mit elektrochemischer Detektion sein. Für die Herstellung von Mikroelektroden bietet sich der Einsatz von lithographischen Verfahren zur Strukturierung von gesputterten Metallschichten an. Eine zuverlässige Herstellung der Elektroden ist jedoch nur auf Siliziumoder Glassubstrat möglich. Der Einsatz von PMMA als Basissubstrat ist wegen der Inkompatibilität mit den verwendeten Photolacken nicht möglich. Somit muss auch für das mikrofluidische Kanalsystem ein neuer Werkstoff gefunden werden, der sich mit Glas verbinden lässt. Dabei hat sich die Kanalabformung in Polydimethylsiloxan, dessen Verwendung in zahlreichen Publikationen von Whitesides et al. [17, 86, 97-99] beschrieben ist, bewährt. Die Entwicklung der im Folgenden als PDMS-Glas-Hybridchips bezeichneten Kapillarelektrophorese-Chips soll hier skizziert werden, da ausschließlich diese für die in den folgenden Kapiteln durchgeführten kapillarelektrophoretischen Trennungen mit elektrochemischer Detektion benutzt werden. Zuerst muss das für den Abformungsprozess notwendige Abformwerkzeug hergestellt werden. Das Negativ der Kanalstruktur besteht aus SU-8-Resist. Die Lackstruktur des Abformwerkzeugs ist 36 µm hoch und zwischen 25 μ m (oben) und 54 μ m (unten) breit (Abbildung 4-26).

Die flüssige Polymervorstufe des PDMS wird auf die SU-8-Lackstruktur gegossen und nach Aushärtung vom Master getrennt. Abbildung 4-27 zeigt eine REM-Aufnahme des SU-8-Abformwerkzeugs, sowie den abgeformten Mikrokanal in PDMS. Der Boden des abgeformten Kanals ist deutlich gewellt, was auf dem Abformwerkzeug nicht zu erkennen ist. Eine mögliche Erklärung ist eine Materialkontraktion während des Polymerisationsprozesses. Es werden vier Befüllreservoirs in das flexible Material gestanzt. Unter dem Mikroskop wird das PDMS-Kanalsystem zu den Dünnschichtelektroden positioniert. Die Herstellung der Dünnschichtelektroden gliedert sich wie folgt: Die Strukturierung der Dünnschichtelektroden auf Quarzglas erfolgt durch das *lift-off*-Verfahren. Eine Lackstruktur wird auf das Glas aufgebracht. Die Elektrodenstruktur wird entwickelt. Anschließend werden eine dünne Haftschicht aus Titan und das Elektrodenmaterial (Au oder Pt) gesputtert. Nach Ablösen der Lackschicht, welche die Elektrodenstruktur umgibt (*lift-off*) ist die Dünnschichtelektrode fertig.



Abbildung 4-26: Querschnitt einer Steg-Struktur des SU-8-Abformwerkzeuges.

Der fertige Kapillarelektrophorese-Chip mit integrierter Elektrodenstruktur basierend auf Dünnschichttechnologie ist in Abbildung 4-28 dargestellt. Um den Verlauf des Mikrokanalsystems besser sichtbar zu machen, wurde dieses nachträglich eingezeichnet. Der Chip enthält vier Elektroden für die Zu- und Ableitung der Hochspannung im Trennund Injektionskanal. Am Ende des Trennkanals stehen 5 Elektroden für elektrochemische Messungen zur Verfügung. Nochmals zwei Elektroden sind kurz nach dem Injektionskreuz

aufgebracht. In den folgenden Kapiteln soll die Praxistauglichkeit des Systems getestet werden, das Zusammenspiel von kapillarelektrophoretischer Trennung in Mikrokanälen und der elektrochemischen Detektion an Dünnschichtelektroden.



— 20 µm —



— 30 µm —

н

Abbildung 4-27: REM-Aufnahme eines Teils des Stegs des SU-8-Abformwerkzeugs (oben) und des in PDMS abgeformten Injektionskreuzes (unten).



Abbildung 4-28: Der PDMS-Glas-Hybridchip mit integrierten Dünnschichtelektroden.

4.3.3 Amperometrische Detektion in miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystemen

4.3.3.1 Amperometrische Detektion auf dem PDMS-Glas-Hybridchip

Bei der klassischen Amperometrie kommen drei Elektroden zum Einsatz: Arbeitselektrode, Gegenelektrode und Referenzelektrode. Gängige Materialien für die Arbeitselektrode sind Graphit oder Gold, aber auch Platin und Kupfer sind für spezielle Einsatzgebiete von Vorteil. Als Referenzelektroden werden Elektroden zweiter Art eingesetzt wie z. B. Ag/AgCl- oder Kalomelelektroden. Als Gegenelektrode wird meist ein Platindraht verwendet. Zusätzlich zu den Elektroden für die Amperometrie braucht man bei der Kapillarelektrophorese noch die Zu- und Ableitungen für die Hochspannung. Im Pufferreservoir auf der Detektionsseite befinden sich somit insgesamt vier Elektroden. Ziel ist eine Reduzierung der Elektrodenanzahl, um eine Vereinfachung der elektrochemischen Detektoreinheit auf dem CE-Chip zu erreichen. Insbesondere ist hier der Verzicht auf eine mit Flüssigkeit gefüllte Referenzelektrode zu nennen, deren Integration auf dem Chip unter Anwendung der Planartechnologie nur mit Einschränkungen realisierbar ist. Die

Möglichkeit eine Referenzelektrode durch Abscheidung von Silberchlorid auf eine Silber-Dünnschichtelektrode in das System einzubringen und die Zugabe einer definierten Chloridkonzentration zum Elektrolyt, soll hier nicht zum Einsatz kommen. Vielmehr soll hier die polarisierte Gegenelektrode des elektrophoretischen Systems als Referenzelektrode für die Amperometrie dienen. In wässriger Lösung tritt an den Hochspannungselektroden, je nach Polarität entweder reduktive Wasserstoff- oder oxidative Sauerstoffentwicklung auf. Sind das Hochspannungspotential, der Kapillarinnendurchmesser und das Puffersystem konstant, so ist auch der fließende Strom konstant und damit das sich ausbildende Elektrodenpotential. Da es sich bei der Elektrodenreaktion um eine kinetisch kontrollierte Zersetzung des Lösungsmittels handelt kann man davon ausgehen, dass die Abhängigkeit des Elektrodenpotentials vom fließenden Strom relativ gering ist. Dieses Prinzip wurde von Giner [142] vorgestellt, wobei Vielstich [143] es als Referenzsystem für zyklovoltammetrische Untersuchungen einsetzte. In den Arbeiten von Kappes et al. [67, 122, 135, 144, 145] wird dieses Prinzip konsequent weiter entwickelt und kommt in einem tragbaren Kapillarelektrophoresegerät zum Einsatz. Es wurde über die amperometrische Detektion von Catecholaminen, Kohlenhydraten und Schwermetallen sowie die potentiometrische Detektion von Alkali- und Erdalkalimetallen berichtet. In dieser Arbeit übernimmt eine Platindünnschichtelektrode die Funktion von drei Elektroden gleichzeitig. Sie ist sowohl Hilfs- und Referenzelektrode für die Amperometrie als auch Gegenelektrode für die elektrophoretische Hochspannung. Somit kann man die Anzahl der Dünnschichtelektroden im Detektionsreservoir auf zwei reduzieren.

4.3.3.2 Elektrokinetischer Transport und amperometrische Detektion von Eisensulfat

Im Folgenden sollen grundlegende Untersuchungen an einem miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystems in der PDMS-Glas-Hybridbauweise mit integrierten lithographisch strukturierten Dünnschichtelektroden sowohl für die amperometrische Detektion als auch für die Zu- und Ableitung der Hochspannung durchgeführt werden. Dabei soll die von Kappes [108] entwickelte Potentiostatenschaltung mit der polarisierten stromdurchflossenen Platinreferenz untersucht werden. Ebenso steht die Handhabung der Mikrokanäle im Vordergrund. Während die Bodenplatte aus hydrophilem Glas besteht, sind die restlichen drei Wände aus dem hydrophoben Polydimethylsiloxan gefertigt. Ein Befüllen der Kanäle mit wässrigen Puffersystemen gestaltet sich als schwierig. Des Weiteren bilden sich leicht Gasblasen im Kanal, welche eine Separation unmöglich machen. Durch Zugabe des Natriumsalzes der amphiphilen Taurodesoxycholsäure zum Leitpuffer, konnte eine blasenfreie Befüllung der Mikrokanäle erreicht werden. Die Befüllung der Mikrokanäle wurde im Exsikkator durchgeführt, wobei gleichzeitig alle Reservoirs mit Puffer gefüllt wurden [146].

Wie schon im vorhergehenden Kapitel erwähnt, ist das Potential der polarisierten stromdurchflossenen Platinreferenzelektrode abhängig von dem angelegten Hochspannungspotential, dem Kapillarinnendurchmesser und dem Puffersystem. Deshalb ist es notwendig, zur Bestimmung des Arbeitspotentials für die amperometrische Detektion vorab eine zyklovoltammetrische Untersuchung durchzuführen. Für die kapillarelektrophoretische Trennung mit einem Separationspotential von 650 V wird ein Detektionspotential für die amperometrische Detektion von 1400 mV eingestellt (Abbildung 4-29), was sich in den folgenden Versuchen als brauchbar erwies. Noch höhere Detektionspotentiale sind mit

einem höheren Grundstrom und stärkerem Basislinienrauschen verbunden und bringen keinen weiteren Vorteil.

Zur Charakterisierung der Güte des elektrokinetischen Transports in den Mikrokanälen des PDMS-Glas-Hybridchips wird die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten für sechs aufeinander folgende Injektionen einer 0.1 mM Eisensulfatlösung untersucht. Mit einer relativen Standardabweichung von nur 0.4 % ist die Reproduzierbarkeit der Migration der Ionen im elektrischen Feld sehr gut und würde im Bezug auf diesen Gesichtspunkt sogar eine Routineanalytik zulassen. Die Reproduzierbarkeit der Signalhöhe ist mit einer relativen Standardabweichung von 7.4 % noch im akzeptablen Bereich, jedoch im Vergleich zu der in Kapitel 4.2.1 vorgestellten tangential angeströmten Dünnschicht-elektrode mit 1.5 % deutlich höher.



Abbildung 4-29: Zyklisches Voltammogramm einer Platindünnschichtelektrode auf einem PDMS-Glas-Hybridchip mit einer polarisierten stromdurchflossenen Platinelektrode als Referenz in pH 2.5 Phosphatpuffer. Trennpotential 650 V. Vorschubgeschwindigkeit: 100 mV/s. Abstand zwischen Kapillarausgang und Dünnschichtelektrode: 42.5 μm.

Auf dem PDMS-Glas-Hybridchip sind in Abständen von 40 µm, 80 µm, 120 µm, 160 µm und 200 µm 5 Arbeitselektroden vor dem Kapillarausgang aufgebracht. Die Breite der aktiven Oberfläche der Dünnschichtelektroden beträgt 20 µm, wobei die Länge variiert, da sie durch die kreisförmige Grundfläche des Detektionsreservoirs definiert wird. Abbildung 4-30 zeigt das Signalverhalten einer 0.05 mM Eisensulfatlösung bei der amperometrischen Detektion an Platindünnschichtelektroden mit zunehmendem Abstand zwischen Kapillarausgang und Detektionselektrode. Es ist zu erkennen, dass mit zunehmendem Abstand zwischen Kapillarausgang und Elektrode die Signalhöhe deutlich abnimmt, während bei der Halbwertsbreite der Signale eine Zunahme zu verzeichnen ist. Nach dem Austritt des Analyten aus der Kapillare findet eine Ausbreitung in alle Raumrichtungen statt. Je weiter man sich vom Kapillarausgang entfernt, umso geringer ist die Konzentration der "diffusen Analytwolke" und desto kleiner ist folglich das Signal. Auf Grund der radialen Ausbreitung des Analyten und dem gegebenen Umstand, dass die Dünnschichtelektroden wesentlich länger als breit sind, nimmt die Zeit in der der Analyt sich über die Elektrode bewegt mit zunehmendem Abstand zwischen Kapillarausgang und Elektrode zu. Diese Tatsache erklärt die zunehmende Halbwertsbreite der Analytsignale. Mit zunehmender Distanz zwischen Kapillarausgang und Elektrode verlängert sich die Laufstrecke des Analyt, was eine Verlängerung der Migrationszeit zur Folge hat. Den stärksten Detektorrespons erhält man mit dem kleinsten Abstand zwischen Kapillarausgang und Dünnschichtelektrode von 40 µm.



Abbildung 4-30: Abhängigkeit des Analytensignals von dem Abstand zwischen Kapillarausgang und Dünnschichtelektrode mit (--) 40 μm, (--)80 μm, (--)160 μm und (--) 200 μm. Elektropherogramm einer 0.5 mM Eisensulfatlösung in pH 2.5 Phosphatpuffer mit amperometrischer Detektion an einer Platindünnschichtelektrode. Kapillare: 50x50 μm² PDMS-Glas-Hybridchip. Trennpotential: 650 V, Detektionspotential: 1400 mV. Elektrokinetische Injektion: 500 V für 2 s.

Im Folgenden soll der Einfluss der Hochspannung auf die Migrationszeit des Analyten bei der miniaturisierten Kapillarelektrophorese untersucht werden. Aus der Theorie ergibt sich für die Auftragung der Feldstärke E gegen die Wanderungsgeschwindigkeit v der Analytionen im elektrischen Feld laut $v = \mu E$ eine lineare Beziehung, wobei μ die elektrophoretische Mobilität darstellt. In Abbildung 4-31 ist diese Beziehung in guter Übereinstimmung mit der Theorie für Feldstärken zwischen 75 V/cm und 373 V/cm wiedergegeben.



Abbildung 4-31: Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von Eisensulfat von der Feldstärke bei der Kapillarelektrophorese auf einem PDMS-Glas-Hybridchip. Kanalquerschnitt: 50x50 μm². Puffer: pH 4 Essigsäure-TRIS-Puffer + 1 mM Na-TDC.

Um die Leistungsfähigkeit der amperometrischen Detektion mit nur zwei Pt-Dünnschichtelektroden zu testen, wird die Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich zwischen 0.05 mM und 1 mM aufgenommen. Das Ergebnis der linearen Regression ist in Abbildung 4-32 dargestellt. Für den gesamten Bereich ergibt sich folgende Regressionsgleichung: I = 8.1E-10 + 2.0E-8 c mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.9977. Für die Berechnung der Nachweisgrenze wurde das dreifache *peak-to-peak*-Rauschen mit 7.05E-11 A bestimmt. Somit ergibt sich für Eisensulfat eine Nachweisgrenze von 3.4 µM.



Abbildung 4-32: Lineare Regression für Eisensulfat im Bereich von 0.05 mM bis 1 mM in pH 2.5 Phosphat-Puffer. Trennpotential: 650 V, Detektionspotential 1400 mV. Elektrokinetische Injektion: 500 V für 2 s.

4.3.3.3 Separation und amperometrische Detektion von Dopamin und Brenzcatechin

Nachdem im vorangegangenen Kapitel grundlegende Untersuchungen zum elektrokinetischen Transport in Mikrokanalsystemen mit sich anschließender amperometrischer Detektion im Vordergrund standen, soll in diesem Kapitel die kapillarelektrophoretische Separation zweier chemisch verwandter Verbindungen in den PDMS-Glas-Kanälen studiert werden. Da die Länge der Trennstrecke zwischen Injektionskreuz und Detektor nur 33.5 mm beträgt, ist mit einer geringen elektrophoretischen Trennleistung zu rechnen. Dementsprechend wurden die Analyte gewählt. Dopamin liegt im sauren Milieu als Kation vor, während Brenzcatechin keine Ladung trägt. Somit kann Brenzcatechin zusätzlich noch als Marker für den elektroosmotischen Fluss dienen.

Für die kapillarelektrophoretische Separation von Dopamin und Brenzcatechin haben sich zwei Puffersysteme bewährt: Ein 10 mM Essigsäure-TRIS-Puffer (pH 4.0) mit einer spezifischen Leitfähigkeit von 717 µS/cm und ein 10 mM MES-TRIS-Puffer (pH 5.5) mit

einer geringeren Leitfähigkeit von nur 166 µS/cm, der Separationen bei hohen Feldstärken bis zu 1300 V/cm auf dem Hybridchip zulässt. Hierzu wurde der entlang des Trennkanals fließende Elektrophoresestrom in Abhängigkeit vom angelegten Hochspannungspotential registriert (Abbildung 4-33). Auch bei hohem Trennpotential bleibt die lineare Beziehung zwischen Elektrophoresestrom und Trennpotential erhalten. Eine übermäßige Erwärmung des Trennkanals und eine daraus resultierende schwächere Trennleistung ist bei Einsatz des pH 5.5 MES-TRIS-Puffer bis zu Potentialen von 5000 V nicht zu befürchten. Um eine einfache Befüllung der Mikrokanäle zu gewährleisten wird den Puffersystemen das Natriumsalz der amphiphilen Taurodesoxycholsäure (1 mM) zugesetzt.



Abbildung 4-33: Ohmsche Strom-Spannungs-Kurve zur Untersuchung der im Trennkanal generierten joulschen Wärme. Puffer: pH 5.5 MES-TRIS-Puffer (10 mM).

Auf dem miniaturisierten Kapillarelektrophoresechip mit integrierter amperometrischer Detektion sind fünf Arbeitselektroden in Abständen von 9 μm, 49 μm, 89 μm, 129 μm und

169 μm vom Kapillarausgang aufgebracht (Abbildung 4-34). Die Breite der aktiven Oberfläche der Dünnschichtelektroden beträgt 20 μm.



Abbildung 4-34: Mikroskopaufnahme im Bereich des Kapillarausgangs des Trennkanals eines PDMS-Glas-Hybridchips mit integrierten Au-Dünnschichtelektroden. Links im Bild ist die polarisierbare stromdurchflossene Referenzelektrode zu erkennen. Im rechten Teil der Aufnahme sind fünf zum Kapillarausgang positionierte Detektionselektroden für die amperometrische Detektion zu erkennen.

Bevor man mit der elektrophoretischen Separation beginnt, muss das Arbeitspotential für die amperometrische Detektion mit Hilfe von zyklovoltammetrischen Untersuchungen ermittelt werden. Da die polarisierbare stromdurchflossene Referenzelektrode sowohl vom Puffersystem als auch vom eingestellten Trennpotential abhängt, wird zu Anfang deren Einfluss untersucht. Die Unterschiede, die sich zwischen den beiden Puffersystemen ergeben, werden in Abbildung 4-35 vorgestellt. Bei dem MES-TRIS-Puffer ist im anodischen Ast des zyklischen Voltammogramms eine stark ausgeprägte Stufe für die oxidative Bildung von AuO zu erkennen, während man beim zyklischen Voltammogramm des Essigsäure-TRIS-Puffers zwei Stufen findet. Bewegt man sich in entgegengesetzter

Richtung auf dem kathodischen Ast des zyklischen Voltammogramms zurück, so trifft man auf den Peak für die reduktive Rückbildung der Goldoberfläche. Die Reduktion ist für den pH 5.5 Puffer gegenüber dem pH 4.0 Puffer zu positiverem Potential verschoben. Dennoch hat sich für beide Puffersysteme ein Detektionspotential im Bereich um 1400 mV bewährt. Der Einfluss der Hochspannung auf die Wahl eines geeigneten Arbeitspotentials für die amperometrische Detektion ist aus Abbildung 4-36 ersichtlich. Durch eine Erhöhung der Hochspannung für die Elektrophorese von 2000 V auf 5000 V wird das zyklische Voltammogramm um 0.2 V zu positiverem Potential verschoben, d.h. bei einer elektrophoretischen Separation bei 5000 V gegenüber 2000 V muss für eine analoge amperometrische Detektion das Detektionspotential um 0.2 V erhöht werden.



Abbildung 4-35: Zyklisches Voltammogramm einer Au-Dünnschichtelektrode in pH 4.0 HAc-TRIS-Puffer (—) und in pH 5.5 MES-TRIS-Puffer (- -) mit eingeschalteter Hochspannung (1800 V). Vorschubgeschwindigkeit: 100 mV/s.



Abbildung 4-36: Zyklisches Voltammogramm einer Au-Dünnschichtelektrode in pH 5.5 MES-TRIS-Puffer mit eingeschalteter Hochspannung: 2000 V (--) und 5000 V (--). Vorschubgeschwindigkeit: 100 mV/s.

Im Anschluss an die Vorversuche steht die kapillarelektrophoretische Separation von Dopamin und Brenzcatechin mit Hilfe eines mikrofluidischen PDMS-Glas-Hybridchip. Die Zu- und Ableitung der Hochspannung und die amperometrische Detektion mit nur zwei Elektroden erfolgt an auf dem Chip integrierten Dünnschichtelektroden. Eine Separation von Dopamin und Brenzcatechin kann bei beiden Puffersystemen erzielt werden (Abbildung 4-37). Aus der Berechnung der Mobilität für den elektroosmotischen Fluss ergibt sich bei gleicher Pufferkonzentration für den pH 4.0 Essigsäure-TRIS-Puffer 6.98E-4 cm/Vs und für den pH 5.5 MES-TRIS-Puffer 9.33E-4 cm/Vs. Der kleinere EOF-Wert für den pH 4 Puffer liegt in der Abnahme des elektroosmotischen Flusses mit sinkendem pH-Wert auf Grund geringerer negativer Überschussladung an der inneren Kapillaroberfläche.



Abbildung 4-37: Elektropherogramm von: 1) 0.1 mM Dopamin und 2) 0.1 mM Brenzcatechin. Elektrophoretische Separation auf einem PDMS-Glas-Hybridchip mit integrierter amperometrischer Detektion an einer Au-Dünnschichtelektrode: a) Puffer: pH 5.5 MES-TRIS-Puffer. Trennpotential: 2000 V, Detektionspotential 1400 mV. Elektrokinetische Injektion: 500 V für 2 s. b) Puffer: pH 4.0 HAc-TRIS-Puffer. Trennpotential: 1800 V, Detektionspotential 1400 mV. Elektrokinetische Injektions-potential 1400 mV. Elektrokinetische Injektion: 500 V für 2 s.

Der PDMS-Glas-Hybridchip besitzt ein einfaches Injektionskreuz. Wie in Abbildung 4-38 aus der Variation der Peakgrößen ersichtlich, ist es möglich die injizierte Analytmenge zu variieren. Die Erklärung liegt in der Art der Injektion, die auf dem PDMS-Glas-Hybridchip *floatend* erfolgt. Dabei wird ein Ende des Injektionskanals auf ein definiertes Potential gesetzt, das andere Ende ist geerdet. Die beiden Hochspannungselektroden des Trennkanals sind über geöffnete Hochspannungsrelais vom Stromkreis getrennt. Dabei strömt während der Injektion die Analytlösung nicht nur entlang des Injektionskanals, sondern teilweise auch in den Trennkanal. Die Ausmaße diese Effektes lassen sich durch die Dauer der Injektion und die Höhe des angelegten Injektionspotentials steuern. Während durch eine Verlängerung der Injektionszeit schnell eine Überladung der Säule zu beobachten ist,



Abbildung 4-38: Elektropherogramm von 0.1 mM Dopamin (links) und 0.1 mM Brenzcatechin (rechts) in pH 5.5 Puffer. Kapillarelektrophoretische Separation (2 kV) von Neurotransmitter auf einem PDMS-Glas-Hybridchip mit integrierter amperometrischer Detektion an Gold-Dünnschichtelektroden. a) Einfluss der Dauer der Injektionszeit auf das Analysensignal: 500 V für (-) 1 s, (-) 2s und (----) 5 s. b) Einfluss des Injektionspotentials auf das Analysensignal: (---) 300 V, (--) 500 V und (-----) 700 V für 2s.

ist für eine Vergrößerung der Injektionsmenge eine Erhöhung des Injektionspotentials bei unveränderter Injektionsdauer besser geeignet. Durch das Anlegen definierter Potentiale an alle vier Hochspannungselektroden während der Injektion (*pinched injection*) könnte man gleich große Injektionsmengen unabhängig von der Dauer der Injektion erhalten. Diese Injektionsmethode setzt jedoch vier voneinander unabhängig steuerbare Hochspannungsquellen voraus. Mit einer Injektionsdauer von 2 s und einem Injektionspotential von 500 V erzielt man für die *floatende* Injektion von Dopamin und Brenzcatechin ein ausreichend großes Signal ohne den Trennkanal zu überladen.

Die geringe Leitfähigkeit des MES-TRIS-Puffers begünstigt Trennungen bei hohen Potentialen (Abbildung 4-39). Während man für die Separation von Dopamin und Brenzcatechin bei einem Trennpotential von 1500 V noch etwas über 10 s braucht, sind bei 5000 V weniger als 3 s nötig. Weiterhin zeigt sich der Einfluss der stromdurchflossenen polarisierbaren Referenzelektrode. Da das Detektionspotential für die höheren Trennpotentiale (3000 V und 5000 V) nicht auf die neue Referenzsituation hin optimiert wurde, ist eine Signalverkleinerung zu beobachten. Hier zeigt sich nochmals deutlich der Einfluss des Hochspannungspotentials auf das Arbeitspotential der amperometrischen Detektion bei der Potentiostatenschaltung mit nur zwei Elektroden.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten und Analysensignale werden 8 Messungen herangezogen. Eine Standardlösung mit 0.1 mM Dopamin und Brenzcatechin wird unter dem Einfluss des elektrischen Feldes (600 V/cm) getrennt und amperometrisch bei 1200 mV an einer Au-Dünnschichtelektrode detektiert. Die relative Standardabweichung der Migrationszeiten wurde für beide Analyte < 0.4 % bestimmt. Die Berechnung der relativen Standardabweichung im Bezug auf die Peakfläche ergab für

Dopamin 3.9 % und für Brenzcatechin 4.7 %. Die deutlich gesteigerte Reproduzierbarkeit für die Signalflächen gegenüber den einleitenden Untersuchungen an Eisensulfat und Platin-Dünnschichtelektroden liegt in der exakteren Positionierung der Dünnschichtelektrode zum Kapillarausgang begründet. Dieser Umstand stellt ein allgemeines Problem der PDMS-Glas-Hybridchips dar. Der in das Polydimethylsiloxan abgeformte Mikrokanal muss unter dem Mikroskop manuell zur Dünnschichtelektrode positioniert werden. Da die Reservoirs mit Hilfe eines Korkbohrers aus dem weichen PDMS ausgestanzt werden, sind deren Wände leicht abgeschrägt, was eine exakte Positionierung erschwert. Diese unvermeidbaren Fertigungstoleranzen wirken sich direkt auf die Signalstärke und somit auch auf die Reproduzierbarkeit des Analysensignals aus.



 Abbildung 4-39: Elektropherogramm von 0.1 mM Dopamin und 0.1 mM Brenzcatechin in pH 5.5 MES-TRIS-Puffer. Kapillarelektrophoretische Separation auf einem PDMS-Glas-Hybridchip mit amperometrischer Detektion an einer Au-Dünnschichtelektrode. Quarzglaskapillare: 25 μm Innendurchmesser, 360 μm Außendurchmesser. Injektion: 500 V für 2s. Detektionspotential: 1400 mV, Trennpotential: a) 1500 V, b) 3000 V und c) 5000 V.
Für Dopamin und Brenzcatechin wurde die Kalibriergerade im linearen Konzentrationsbereich zwischen 0.01 mM und 1 mM aufgezeichnet (Abbildung 4-40). Die Daten der linearen Regression sind in Tabelle 4-8 enthalten. Die Nachweisgrenze für Dopamin wurde unter Berücksichtigung des dreifachen *peak-to-peak*-Rauschens mit 0.6 μM bestimmt. Für Brenzcatechin liegt die Nachweisgrenze bei 0.4 μM.



Abbildung 4-40: Lineare Regression für a) Dopamin und b) Brenzcatechin im Bereich von 0.01 mM bis 1.0 mM. Elektrophoretische Separation auf einem PDMS-Glas-Hybridchip mit integrierter amperometrischer Detektion an einer Au-Dünnschichtelektrode. Puffer: pH 5.5 MES-TRIS-Puffer. Trennpotential: 2000 V. Detektionspotential 1200 mV. Elektrokinetische Injektion: 500 V für 2 s.

4 ERGEBNISSE

 Tabelle 4-8: Lineare Regression für Dopamin und Adrenalin. Elektrophoretische Separation auf einem PDMS-Glas-Hybridchip mit integrierter amperometrischer Detektion an einer Au-Dünnschichtelektrode. Puffer: pH 5.5 MES-TRIS-Puffer. Trennpotential: 2000 V. Detektionspotential 1200 mV. Elektrokinetische Injektion: 500 V für 2 s.

Analyt	Korrelations-	Regressionsgleichung	Nachweis-	Nachweis-	Nachweis-
	koeffizient r	c [mM], I [A]	grenze	grenze	grenze
			[µM]	Wang et al.	Woolly et
				[96]	al. [147]
				[µM]	[µM]
Dopamin	0.9976	I = 3.4E-10 + 3.7E-8 c	0.6	1.0	3.7
Brenz- catechin	0.9981	I = 2.4E-10 + 5.6E-8 c	0.4	_	12.0

4.3.4 Leitfähigkeitsdetektion in miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystemen

Während die Funktionsweise von amperometrischen und auch potentiometrischen Detektoren auf Grenzflächenphänomenen zwischen Elektrode und Trägerelektrolyt in der Kapillarelektrophorese beruht, werden bei den Leitfähigkeitsdetektoren Volumeneigenschaften erfasst (*bulk*-Detektor).

Für die Trennung anorganischer Ionen haben sich zwitterionische Verbindungen wie 2-Morpholinoethansäure (MES) [148] als eine Komponente des Trägerelektrolyten bewährt, weshalb für die folgenden Versuche ein MES-HIS-Puffer gewählt wurde. Auf Grund der geringen Leitfähigkeit des Trägerelektrolyten erhält man positive Analysesignale.

Bei der Leitfähigkeitsdetektion auf dem PDMS-Glas-Hybridchip haben die Arbeitselektroden Kontakt mit der Lösung. Der Detektor besteht aus zwei Pt-Dünnschichtelektroden mit einer Breite von 20 µm und einem Abstand zwischen den beiden Elektroden von 20 µm. Untersuchungen zur optimalen Detektorgeometrie bei der direkten Leit-

4 ERGEBNISSE

fähigkeitsdetektion an Pt-Dünnschichtelektroden auf einem PMMA-Mikrochip wurden von Graß et al. [4, 149] angestellt. Hierbei hat sich gezeigt, dass kleine Detektorelektroden die Empfindlichkeit und Auflösung fördern, solange der Leitelektrolyt eine hinreichende Leitfähigkeit besitzt. Bei dem PDMS-Glas-Hybridchip erfolgt die Detektion in der *endcolumn*-Detektoranordnung, weshalb man den PDMS-Mikrokanal unter dem Mikroskop zu den gesputterten Pt-Dünnschichtelektroden positioniert.

Die Steuereinheit für das Anregungssignal lässt eine Anpassung von Frequenz und Amplitude der Wechselspannung an die Versuchsumgebung zu. Eine Optimierung der beiden Parameter zur Maximierung des Analytsignals ist nötig. Zu Beginn der Experimente steht der Test der Steuereinheit durch Simulation einer elektrochemischen Zelle mit Hilfe von Metallfilmwiderständen. Mit zunehmender Leitfähigkeit durch schrittweise Verkleinerung des ohmschen Widerstandes, nimmt das detektierte Ausgangssignal zu, d.h. ist die Leitfähigkeit der Analytionen größer als die Leitfähigkeit der Trägerelektrolytionen, dann erhält man positive Analysensignale.

Im Folgenden werden die Amplitude und Frequenz des Anregungssignals variiert, um deren Einfluss auf das Detektorsignal zu studieren (Abbildung 4-41). Als Analyt dient eine 1 mM Kaliumchloridlösung, 20 mM MES-HIS-Puffer (pH 6.0) als Trägerelektrolyt. Um eine einfache Befüllung der Mikrokanäle zu gewährleisten wird dem Trägerelektrolyt das Natriumsalz der amphiphilen Taurodesoxycholsäure (1 mM) zugesetzt. Die Erhöhung der Amplitude der Wechselspannung ist mit einer Signalverstärkung verbunden. Ebenso geht die Erhöhung der Frequenz der Wechselspannung mit einer Signalverstärkung konform. Für eine 1 mM Kaliumchloridlösung in pH 6 Puffer erhält man bei einer Amplitude von

einem Volt und einer Frequenz von 10 kHz in etwa das selbe Signal wie bei einer Amplitude von 3 V und einem Kilohertz.



Abbildung 4-41: Abhängigkeit des Detektorresponse bei der Leitfähigkeitsdetektion von der Anregungsfrequenz f und der Amplitude: 1 V (x) und 3V (+). Auftragung des Differenzsignals von Analyt und Puffer gegen die Anregungsfrequenz. Analyt: 1mM KCl. Puffer: 20 mM MES-HIS-Puffer (pH 6.0).

Im Bezug auf die kapillarelektrophoretische Separation von Alkalimetall-Ionen auf dem PDMS-Glas-Hybridchip und deren Detektion mit Hilfe der Leitfähigkeitsdetektion an den integrierten Pt-Dünnschichtelektroden wurden nochmals Veränderungen an Amplitude und Frequenz vorgenommen. Das Einschalten der Hochspannung für die Elektrophorese bewirkt eine starke Auslenkung der Basislinie. Bei einer Frequenz von 130 kHz und einer Amplitude von 1 V erfolgt eine schnelle Rückkehr der Basislinie (Abbildung 4-42). Eine Trennung von Kalium-, Natrium- und Lithium-Ionen ist in weniger als 20 s möglich. In Tabelle 4-9 sind für die untersuchten Alkalimetall-Ionen die Mobilität μ_e und die theoretische Bodenzahl N im Vergleich zu den Ergebnissen von Guijt et al. [150, 151] aufge-

tragen. Die Kapillarinnenwände bei Guijt et al. sind mit Siliziumnitrid beschichtet und zeigen bei einem pH-Wert von 6.0 einen elektroosmotischen Fluss von 4.1E-4 cm²/Vs. Im Vergleich dazu berichtet Ocvirk et al. [152] für ausschließlich aus PDMS gefertigte Mikrokanäle einen elektroosmotischen Fluss von 2.5E-4 cm²/Vs. Der PDMS-Glas-Hybridchip zeigt nach Zugabe von 1 mM Natriumtaurodesoxylat zum Leitelektrolyt einen elektroosmotischen Fluss von 7.7E-4 cm²/Vs. Ohne die Zugabe des amphiphilen Salzes ist der elektroosmotische Fluss mit 3.9E-4 cm²/Vs wesentlich geringer. Im Vergleich zum reinen PDMS-Kanal ist der elektroosmotische Fluss jedoch wie erwartet etwas größer, was auf das Vorhandensein einer Glasseite zurückzuführen ist. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass das Natriumsalz der Taurodesoxycholsäure eine Erhöhung der negativen Ladung an der Kapillarinnenwand bedingt und somit den elektroosmotischen Fluss steigert. Gleichzeitig steigert man auch die Hydrophilie der Mikrokanäle, womit sich das Arbeiten mit wässrigen Leitelektrolyten vereinfacht. Somit hat sich der PDMS-Glas-Hybridchip mit integrierten Pt-Dünnschichtelektroden als geeignet für die direkte Leitfähigkeitsdetektion erwiesen und bietet einen interessanten Ausgangspunkt für zukünftige Experimente.

separation and entern Glas I Diris Hybridenip in 20 min hills Hills High.							
Analyt	Mobilität µe	Mobilität µ _e	Theoretische	Theoretische			
	$[cm^2/Vs]$	$[\mathrm{cm}^2/\mathrm{Vs}],$	Bodenzahl N	Bodenzahl N,			
		Guijt et al. [151]		Guijt et al. [150]			
K ⁺	7.6E-4	1.4E-4	10183	4400			
Na ⁺	4.1E-4	1.0E-4	17539	15800			
Li ⁺	3.9E-4	0.8E-4	26729	28700			

Tabelle 4-9: Mobilität μ_e und theoretische Bodenzahl N für K^+ , Na⁺ und Li⁺ für die elektrophoretische Separation auf einem Glas-PDMS-Hybridchip in 20 mM MES-HIS-Puffer.



Abbildung 4-42: Elektropherogramm von 1 mM K⁺, Na⁺, und Li⁺ in 20 mM MES-HIS-Puffer. PDMS-Glas-Hybridchip mit integrierter Leitfähigkeitsdetektion an Pt-Dünnschichtelektroden. Trennpotential: 0.5 kV. Elektrokinetische Injektion: 0.5 kV für 1 s.

5 Schlussfolgerung

Einleitende Untersuchungen an Cu-Mikroscheibenelektroden bildeten den Einstieg in das Thema miniaturisierte elektrochemische Detektoren. Dabei spielte die amperometrische Detektion von Kohlenhydraten und Aminosäuren an Kupferelektroden eine besondere Rolle.

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese wurde ein Gemisch aus Kohlenhydrate und Aminosäuren getrennt und amperometrisch detektiert. Um kleine und große Anionen gleichzeitig trennen zu können, wurde dem Leitelektrolyt zur Umkehr des elektroosmotischen Flusses CTAB zugesetzt. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Zugabe von CTAB zum Leitelektrolyt das Detektionssignal an der Kupfer-Elektrode beeinflusste. Schon eine CTAB-Konzentration von 0.2 mM am Leitelektrolyt bewirkte eine deutliche Signalverstärkung, die bei höheren CTAB-Konzentrationen von 2 mM und 20 mM nur noch geringfügig zunahm. Im Falle der Weinsäure war bei CTAB-Konzentrationen von 2.0 mM und 20 mM gegenüber einem Zusatz an 0.2 mM sogar eine Abschwächung der Analytsignale erkennbar, wobei die Höhe der Analytsignale dennoch deutlich über dem Analytsignal ohne CTAB-Zugabe lag. Bei den kapillarelektrophoretischen Untersuchungen zeigte die CTAB-Konzentration einen Einfluss auf die Migrationsreihenfolge der untersuchten Verbindungen. Die Migrationszeiten von Weinsäure und Sulfit verlängerten sich mit zunehmender CTAB-Konzentration, was auf eine Wechselwirkung der Analyte mit den gebildeten CTAB-Mizellen zurückzuführen war.

5 SCHLUSSFOLGERUNG

Der Übergang zu den erstmals elektrochemisch charakterisierten Cu-Dünnschichtelektroden mit einer Schichtdicke von 150 nm und einer aktiven Elektrodenfläche von $20x200 \ \mu m^2$ lieferte folgende Ergebnisse:

Das elektrochemische Verhalten von gesputterten Cu-Dünnschichtelektroden ist mit dem polierter Cu-Mikroscheibenelektroden vergleichbar. Jedoch stellt die Oxidation der dünnen Kupferschichten in alkalischem Milieu und die damit verbundene Zerstörung der Dünnschichtelektrode einen gewissen Nachteil gegenüber den durch Polieren regenerierbaren Mikroscheibenelektroden dar.

Die Fertigung von Dünnschichtelektroden beschränkte sich nicht nur auf das Elektrodenmaterial Kupfer. Ebenso wurden Dünnschichtelektroden aus Gold und Platin gefertigt. Als geeignete Modellsubstanzen für die amperometrische Detektion an Goldelektroden haben sich Catecholamine wie Adrenalin und Dopamin bewährt. Bei den amperometrischen Untersuchungen an Platinelektroden wurden Sulfit-Ionen detektiert.

Die Positionierung der Elektrode zum Kapillarausgang hatte Einfluss auf die Größe des Analysensignals. Bezüglich der Dünnschichtelektroden wurden zwei Anordnungen untersucht. Neben der klassischen *wall-jet*-Anordnung kam eine neuartige tangential angeströmte Elektrodenanordnung zum Einsatz. Dabei wurde die Kapillare mit Hilfe von Epoxydharz direkt auf der planaren Dünnschichtelektrode befestigt, wobei das Ende der Kapillare bündig mit der ersten Dünnschichtelektrode abschloss. Eine weitere Elektrode befand sich 40 µm vom Kapillarende entfernt.

Untersuchungen zum Ausströmen des Analyten aus der Kapillare unter dem Einfluss des elektrischen Feldes zeigten, dass sich der Kapillarausgang wie eine Punktquelle verhält. Von ihm breitete sich der austretende Analyt halbkugelförmig aus, begrenzt durch die

5 SCHLUSSFOLGERUNG

Stirnseite der Kapillare. Diese Untersuchungen erklären grundlegend, weshalb es möglich ist, an einer tangential angeströmten Dünnschichtelektrode ein Analysensignal zu erhalten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die coulometrischen Effizienzen für die *wall-jet*-Anordnung und die tangential angeströmte Dünnschichtelektrode bestimmt. Bei beiden Detektoranordnungen zeigte sich mit zunehmendem Abstand zwischen Kapillarausgang und Dünnschichtelektrode eine Abnahme der coulometrischen Effizienz, d.h. es trifft weniger Analyt auf die aktive Elektrodenfläche. Ebenfalls zeigte sich, dass eine größere Elektrodenfläche zu einer höheren coulometrischen Effizienz führt. Jedoch ist ein direkter Vergleich der coulometrischen Effizienzen beider Detektoranordnungen wenig sinnvoll, da die Abstände zwischen Kapillarausgang und Dünnschichtelektrode zu unterschiedlich sind. Es ist sinnvoller, die Nachweisgrenzen für beide Detektoranordnungen an Hand von Modellsubstanzen zu vergleichen. Dabei zeigte sich, dass die Nachweisgrenzen für beide Detektoranordnungen vergleichbar waren.

Die *wall-jet*-Anordnung zeigt auf Grund der dreidimensionalen Positioniermöglichkeit der Elektrode ein größeres Potential zur Optimierung bei zukünftigen Experimenten. Im Vergleich dazu liegt der Vorteil der tangential angeströmten Elektrode bei ihrem einfachen und kompakten Aufbau.

Im letzten Teil der Arbeit war es möglich, die in PDMS abgeformten Mikrokanäle mit auf Pyrexglas aufgebrachten Dünnschichtelektroden zu einem miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystem zu verbinden. Dabei wurden anfängliche Schwierigkeiten überwunden: Zum Befüllen der hydrophoben Kanäle mit wässrigen Lösungen wurde den Lösungen das Natriumsalz der amphiphilen Taurodesoxycholsäure zugesetzt. Des Weiteren wurden, um

5 SCHLUSSFOLGERUNG

die Mikrokanäle blasenfrei zu befüllen, alle Pufferreservoirs gleichmäßig mit Puffer aufgefüllt, und der ganze CE-Chip ins Vakuum eingebracht.

Sowohl die amperometrische Detektion an Au-Dünnschichtelektroden als auch die Leitfähigkeitsdetektion an Pt-Dünnschichtelektroden auf dem CE-Chip konnte realisiert werden. Dopamin und Brenzcatechin wurden auf der 33.5 mm kurzen Trennstrecke getrennt und amperometrisch an Au-Dünnschichtelektroden detektiert, wobei eine Trennung in weniger als 3s möglich war. Für Dopamin ergab sich eine Nachweisgrenze von 0.6 μ M und für Brenzcatechin von 0.4 μ M. Mit Hilfe der Leitfähigkeitsdetektion war es möglich, K⁺-, Na⁺-, und Li⁺-Ionen nach kapillarelektrophoretischer Trennung auf dem CE-Chip zu bestimmen.

Trotz aller Bemühungen und Nutzung der verfügbaren Kooperationsmöglichkeiten war es im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht möglich, ein Mikrokanalsystem mit integrierten Dünnschichtelektroden zu fertigen bei dem alle vier Wände aus dem selben polymeren Werkstoff gefertigt sind. Das Deckeln der Mikrokanäle ohne den Einsatz von PDMS stellt hierbei noch immer ein großes technologisches Problem dar, das es für die Zukunft zu beseitigen gilt.

6 Literatur

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Miniaturized total chemical-analysis systems a novel concept for chemical sensing*. In: Sens. Actuator B, 1990, 1, S. 244-248.
- [2] R.S. Martin, A.J. Gawron, B.A. Fogarty, F.B. Regan, E. Dempsey, S.M. Lunte, Carbon paste-based electrochemical detectors for microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. In: Analyst, 2001, 126, S. 277-280.
- [3] J. Wang, M.P. Chatrathi, B.M. Tian, R. Polsky, *Microfabricated electrophoresis* chips for simultaneous bioassays of glucose, uric acid, ascorbic acid, and acetaminophen. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 2514-2518.
- [4] B. Graß, A. Neyer, M. Johnck, D. Siepe, F. Eisenbeiss, G. Weber, R. Hergenroder, *A new PMMA-microchip device for isotachophoresis with integrated conductivity detector*. In: Sens. Actuator B, 2001, 72, S. 249-258.
- [5] L.A. Colon, R. Dadoo, R.N. Zare, Determination of Carbohydrates by Capillary Zone Electrophoresis with Amperometric Detection at a Copper Microelectrode.
 In: Anal. Chem., 1993, 65, S. 476-481.
- [6] M.Z. Luo, R.P. Baldwin, Characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes. In: J. Electroanal. Chem., 1995, 387, S. 87-94.
- [7] J. Marioli, T. Kuwana, *Electrochemical characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes*. In: Electrochimica Acta, 1992, 37, S. 1187-1197.

- [8] J. Zhou, S. Lunte, Direct determination of amino acids by capillary electrophoresis/electrochemistry using a copper microelectrode and zwitterionic buffers. In: Electrophoresis, 1995, 16, S. 498-503.
- [9] S.A. Brazill, P. Singhal, W.G. Kuhr, *Detection of native amino acids and peptides utilizing sinusoidal voltammetry*. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 5542-5548.
- [10] J. Ye, R.P. Baldwin, Determination of Amino Acids and Peptides by Capillary Electrophoresis and Electrochemical Detection at a Copper Electrode. In: Anal. Chem., 1994, 66, S. 2669-2674.
- [11] A.R. Timerbaev, W. Buchberger, Prospects for detection and sensitivity enhancement of inorganic ions in capillary electrophoresis. In: J. Chromatogr., 1999, 834, S. 117-132.
- [12] T. Kappes, P. Schnierle, P.C. Hauser, Potentiometric Detection of Inorganic Anions and Cations in Capillary Electrophoresis With Coated-Wire Ion-Selective Electrodes. In: Anal. Chim. Acta, 1997, 350, S. 141-147.
- [13] C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Microchip devices for high-efficiency separations*. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 5814-5819.
- [14] S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, J.E. Daler, J.M. Ramsey, *Microchip structures for submillisecond electrophoresis*. In: Anal. Chem., 1998, 70, S. 3476-3480.
- [15] D.C. Duffy, H.L. Gillis, J. Lin, N.F. Sheppard, G.J. Kellogg, *Microfabricated centrifugal microfluidic systems: Characterization and multiple enzymatic assays*.
 In: Anal. Chem., 1999, 71, S. 4669-4678.

- [16] D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H.M. Widmer, *Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a planar glass Chip.* In: Anal. Chem., 1992, 64, S. 1926-1932.
- [17] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H.K. Wu, O.J.A. Schueller,
 G.M. Whitesides, *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. In:
 Electrophoresis, 2000, 21, S. 27-40.
- [18] J.S. Rossier, M.A. Roberts, R. Ferrigno, H.H. Girault, *Electrochemical detection in polymer microchannels*. In: Anal. Chem., 1999, 71, S. 4294-4299.
- [19] H. Becker, L. Locascio, *Polymer microfluidic devices*. In: Talanta, 2002, 56, S. 267-287.
- [20] L. Martynova, L.E. Locascio, M. Gaitan, G.W. Kramer, R.G. Christensen, W.A. MacCrehan, *Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods*. In: Anal. Chem., 1997, 69, S. 4783-4789.
- [21] J.W. Hong, T. Fujii, M. Seki, T. Yamamoto, I. Endo, Integration of gene amplification and capillary gel electrophoresis on a polydimethylsiloxane-glass hybrid microchip. In: Electrophoresis, 2001, 22, S. 328-333.
- [22] Y.H. Chen, S.H. Chen, Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method.
 In: Electrophoresis, 2000, 21, S. 165-170.
- [23] C.S. Effenhauser, G.J.M. Bruin, A. Paulus, M. Ehrat, Integrated Capillary Electrophoresis On Flexible Silicone Microdevices - Analysis of Dna Restriction

Fragments and Detection of Single Dna Molecules On Microchips. In: Anal. Chem., 1997, 69, S. 3451-3457.

- [24] R.M. McCormick, R.J. Nelson, M.G. Alonsoamigo, J. Benvegnu, H.H. Hooper, Microchannel Electrophoretic Separations of Dna in Injection-Molded Plastic Substrates. In: Anal. Chem., 1997, 69, S. 2626-2630.
- [25] V. Dolnik, S.R. Liu, S. Jovanovich, *Capillary electrophoresis on microchip*. In: Electrophoresis, 2000, 21, S. 41-54.
- [26] S. Hjerten, *High Performance Electrophoresis*. In: Chromatogr. Rev., 1967, 9, S.122.
- [27] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, *High-performance zone electrophoresis*. In: J. Chromatogr., 1979, 169, S. 11-20.
- [28] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. In: Anal. Chem., 1981, 53, S. 1298-1302.
- [29] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis*. In: J. Chromatogr., 1981, 218, S. 209-219.
- [30] D.N. Heiger. *High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction*, 1997, Hewlett Packard Company.
- [31] J.P. Landers (Hrsg.). *Handbook of capillary electrophoresis*. 1991, CRC Press, Boca Raton.
- [32] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, 1993, Springer-Verlag, Berlin.

- [33] R. Weinberger. *Practical Capillary Electrophoresis*, 2000, Academic Press, San Diego, California.
- [34] K. Cammann (Hrsg.). *Instrumentelle Analytische Chemie*. 2001, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [35] J. Vindevogel, P. Sandra. *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, 1992, Hüthig, Heidelberg.
- [36] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries*. In: Anal. Chem., 1984, 56, S. 111-113.
- [37] J. Wang. Analytical Electrochemistry, 1994, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [38] J. Heinze, Cyclovoltammetrie die "Spektroskopie" des Elektrochemikers. In: Angew. Chem., 1984, 96, S. 823-840.
- [39] A.M. Bond, K.B. Oldham, C.G. Zoski, *Steady-State Voltammetry*. In: Anal. Chim. Acta, 1989, 216, S. 177-230.
- [40] J. Heinze, Ultramikroelektroden eine neue Dimension der Elektrochemie. In: Angew. Chem., 1991, 103, S. 175-177.
- [41] J. Heinze, *Elektrochemie mit Ultramikroelektroden*. In: Angew. Chem., 1993, 105, S. 1327-1349.
- [42] W. Buchberger. *Elektrochemische Analyseverfahren: Grundlagen, Instrumentation, Anwendung*, 1998, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg; Berlin.
- [43] D. Shoup, A. Szabo, *Chronoamperometric current at finite disk electrodes*. In: J. Electroanal. Chem., 1982, 140, S. 237-245.

- [44] K.B. Oldham, *Edge effects in semiinfinite diffusion*. In: J. Electroanal. Chem., 1981, 122, S. 1-17.
- [45] K.B. Oldham, C.G. Zoski, Comparison of voltammetric steady-states at hemispherical and disk microelectrodes. In: J. Electroanal. Chem., 1988, 256, S. 11-19.
- [46] C.G. Zoski, A.M. Bond, E.T. Allinson, K.B. Oldham, *How long does it take a microelectrode to reach a voltammetric steady-state.* In: Anal. Chem., 1990, 62, S. 37-45.
- [47] A.M. Bond, D. Luscombe, K.B. Oldham, C.G. Zoski, A comparison of the chronoamperometric response at inlaid and recessed disk microelectrodes. In: J. Electroanal. Chem., 1988, 249, S. 1-14.
- [48] K.B. Oldham, All steady-state microelectrodes have the same IR drop. In: J. Electroanal. Chem., 1987, 237, S. 303-307.
- [49] S. Bruckenstein, *Ohmic potential drop at electrodes exhibiting steady-state diffusion currents*. In: Anal. Chem., 1987, 59, S. 2098-2101.
- [50] P. Selvaganapathy, M.A. Burns, D.T. Burke, C.H. Mastrangelo. Inline Electochemical Detection for Capillary Electrophoresis. MEMS, 2001, Interlaken, Schweiz.
- [51] R.S. Martin, K.L. Ratzlaff, B.H. Huynh, S.M. Lunte, *In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat*. In: Anal. Chem., 2002, 74, S. 1136-1143.

- [52] Y.F. Yik, H.K. Lee, S.F.Y. Li, S.B. Khoo, Micellar electrokinetic capillary chromatography of vitamin B₆ with electrochemical detection. In: J. Chromatogr., 1991, 585, S. 139-144.
- [53] T.J. O'Shea, R.D. Greenhagen, S.M. Lunte, C.E. Lunte, Capillary electrophoresis with electrochemical detection employing an on-column Nafion joint. In: J. Chromatogr., 1992, 593, S. 305-312.
- [54] I. Chen, C. Whang, *Capillary electrophoresis with amperometric detection using a porous cellulose acetate joint*. In: J. Chromatogr., 1993, 644, S. 208-212.
- [55] W.T. Kok, Y. Sahin, Solid-state field decoupler for off-column detection in capillary electrophoresis. In: Anal. Chem., 1993, 65, S. 2497-2501.
- [56] A.G. Ewing, J.M. Mesaros, P.F. Gavin, *Electrochemical detection in microcolumn separations*. In: Anal. Chem., 1994, 66, S. 527 A-537 A.
- [57] M. Zhong, L. S., Integrated On-Capillary Electrochemical Detector for Capillary Electrophoresis. In: Anal. Chem., 1996, 68, S. 2488-2493.
- [58] P.D. Voegel, W.H. Zhou, R.P. Baldwin, Integrated Capillary Electrophoresis/Electrochemical Detection With Metal Film Electrodes Directly Deposited Onto the Capillary Tip. In: Anal. Chem., 1997, 69, S. 951-957.
- [59] W. Jin, Q. Xu, W. Li, A new capillary electrophoresis end-column amperometric detection system without the need for capillary/electrode alignment. In: Electrophoresis, 2000, 21, S. 1527-1534.

- [60] M. Goto, S. Inagaki, Y. Esaka, Handy detection cell for end-column electrochemical detection in capillary electrophoresis. In: Analytical Sciences, 2001, 17, S. 1383-1387.
- [61] T. Kappes, P.C. Hauser, *Recent developments in electrochemical detection methods* for capillary electrophoresis. In: Electroanalysis, 2000, 12, S. 165-170.
- [62] D.T. Chin, C.H. Tsang, Mass transfer to an imprinting jet electrode. In: J. Electrochem. Soc., 1978, 125, S. 1461.
- [63] R.A. Wallingford, A.G. Ewing, *Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection*. In: Anal. Chem., 1987, 59, S. 1762-1766.
- [64] R.A. Wallingford, A.G. Ewing, Amperometric detection of catechols in capillary zone electrophoresis with normal and micellar solutions. In: Anal. Chem., 1988, 60, S. 258-263.
- [65] A.J. Gawron, R.S. Martin, S.M. Lunte, Fabrication and evaluation of a carbonbased dual-electrode detector for poly(dimethylsiloxane) electrophoresis chips. In: Electrophoresis, 2001, 22, S. 242-248.
- [66] A. Durgbanshi, W.T. Kok, *Capillary electrophoresis and electrochemical detection with a conventional detector cell.* In: J. Chromatogr. A, 1998, 798, S. 289-296.
- [67] M.A. Schwarz, B. Galliker, K. Fluri, T. Kappes, P.C. Hauser, *A two-electrode configuration for simplified amperometric detection in a microfabricated electrophoretic separation device*. In: Analyst, 2001, 126, S. 147-151.
- [68] E.P.C. Lai, W. Zhang, X. Trier, A. Georgi, S. Kowalski, S. Kennedy, T. MdMuslim, E. Dabek-Zlotorzynska, Speciation of mercury at ng/ml concentration

levels by capillary electrophoresis with amperometric detection. In: Anal. Chim. Acta, 1998, 364, S. 63-74.

- [69] E.P.C. Lai, E. Dabek-Zlotorzynska, *Capillary electrophoresis with amperometric detection for mercury speciation*. In: Am. Environ. Lab., 1996, 6, S. 1-8.
- [70] A.M. Fermier, L.A. Colon, *Capillary electrophoresis with constant potential amperometric detection using a nickel microelektrode for detection of carbohydrates.* In: J. High Resol. Chromatogr., 1996, 19, S. 613-616.
- [71] P.D. Voegel, R.P. Baldwin, *Electrochemical Detection With Copper Electrodes in Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*. In: American Laboratory, 1996, 28, S. 39 ff.
- [72] P. Luo, F. Zhang, R.P. Baldwin, Constant potential amperometric detection of underivatized amino acids and peptides at a copper electrode. In: Anal. Chem., 1991, 63, S. 1702-1707.
- [73] C.E. Engstrom-Silverman, A.G. Ewing, Copper wire amperometric detector for capillary electrophoresis. In: J. Microcol. Sep., 1991, 3, S. 141-145.
- [74] T.J. O'Shea, S.M. Lunte, Selective detection of free Thiols by capillary electrophoresis electrochemistry using a Gold Mercury amalgam microelectrode.
 In: Anal. Chem., 1993, 65, S. 247-250.
- [75] S. Huges, P.L. Meschi, D.C. Johnson, *Amperometric detection of simple alcohols in aqueous solutions by application of a triple-pulse potential waveform at platinum electrodes*. In: Anal. Chim. Acta, 1981, 132, S. 1-10.

- [76] L.A. Larew, D.C. Johnson, Concentration-dependence of the mechanism of Glucose-Oxidation at Gold electrodes in alkaline media. In: J. Electroanal. Chem., 1989, 262, S. 167-182.
- [77] T. Kappes, P.C. Hauser, *Potentiometric detection in capillary electrophoresis with a metallic copper electrode*. In: Anal. Chim. Acta, 1997, 354, S. 129-134.
- [78] P.R. Haddad, Developments in detection methods for ion chromatography. In: Chromatographia, 1987, 24, S. 217-225.
- [79] D. Figeys, D. Pinto, Lab-on-a-chip: A revolution in biological and medical sciences. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 330A-335A.
- [80] H. Suzuki, Advances in the microfabrication of electrochemical sensors and systems. In: Electroanalysis, 2000, 12, S. 703-715.
- [81] J. Wang, M. Pumera, M.P. Chatrathi, A. Escarpa, R. Konrad, A. Griebel, W. Dorner, H. Lowe, *Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate)* microchip electrophoresis device with electrochemical detection. In: Electrophoresis, 2002, 23, S. 596-601.
- [82] Y. Fintschenko, A. van den Berg, Silicon microtechnology and microstructures in separation science. In: J. Chromatogr., 1998, 819, S. 3-12.
- [83] C.S. Henry, M. Zhong, S.M. Lunte, M. Kim, H. Bau, J.J. Santiago, *Ceramic microchips for capillary electrophoresis- electrochemistry*. In: Anal. Comm., 1999, 36, S. 305-307.
- [84] H. Becker, C. Gartner, *Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications*. In: Electrophoresis, 2000, 21, S. 12-26.

- [85] G.J.M. Bruin, Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices. In: Electrophoresis, 2000, 21, S. 3931-3951.
- [86] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, *Rapid prototyping of microfuidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. In: Anal. Chem., 1998, 70, S. 4974-4984.
- [87] S.L.R. Barker, M.J. Tarlov, H. Canavan, J.J. Hickman, L.E. Locascio, *Plastic microfluidic devices modified with polyelectrolyte multilayers*. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 4899-4903.
- [88] S.L.R. Barker, D. Ross, M.J. Tarlov, M. Gaitan, L.E. Locascio, Control of flow direction in microfluidic devices with polyelectrolyte multilayers. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 5925-5929.
- [89] Y. Liu, J.C. Fanguy, J.M. Bledsoe, C.S. Henry, Dynamic coating using polyelectrolyte multilayers for chemical control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis microchips. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 5939-5944.
- [90] S.C. Wang, C.E. Perso, M.D. Morris, *Effects of alkaline hydrolysis and dynamic coating on the electroosmotic flow in polymeric microfabricated channels*. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 1704-1706.
- [91] T. Johnson, E.A. Waddell, G.W. Kramer, L.E. Locascio, Chemical mapping of hotembossed and UV-laser-ablated microchannels in poly(methylmethacrylate) using carboxylate specific fluorescent probes. In: Applied Surface Science, 2001, 181, S. 149-159.

- [92] M.L. Branham, W.A. MacCrehan, L.E. Locascio, *Chemical mapping of imprinted plastic microchannel surfaces using group-specific fluorescent probes*. In: J. Cap. Elec., 1999, 6, S. 43-50.
- [93] J. Wang, B.M. Tian, E. Sahlin, *Micromachined electrophoresis chips with thickfilm electrochemical detectors*. In: Anal. Chem., 1999, 71, S. 5436-5440.
- [94] J. Wang, M.P. Chatrathi, B.M. Tian, R. Polsky, *Capillary electrophoresis chips* with thick-film amperometric detectors: Separation and detection of hydrazine compounds. In: Electroanalysis, 2000, 12, S. 691-694.
- [95] J. Wang, R. Polsky, B.M. Tian, M.P. Chatrathi, Voltammetry on microfluidic chip platforms. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 5285-5289.
- [96] J. Wang, B.M. Tian, E. Sahlin, Integrated electrophoresis chips/amperometric detection with sputtered gold working electrodes. In: Anal. Chem., 1999, 71, S. 3901-3904.
- [97] J.R. Anderson, D.T. Chiu, R.J. Jackman, O. Cherniavskaya, J.C. McDonald, H.K.
 Wu, S.H. Whitesides, G.M. Whitesides, *Fabrication of topologically complex* three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. In: Anal. Chem., 2000, 72, S. 3158-3164.
- [98] R.J. Jackman, G.M. Whitesides, *Electrochemistry and soft lithography: A route to 3-D.* In: Chemtech, 1999, 29, S. 18-30.
- [99] Y. Xia, G.M. Whitesides, *Soft lithography*. In: Angew. Chem. Int. Ed., 1998, 37, S. 550-575.

- [100] W. Michaeli. *Einführung in die Kunststoffverarbeitung*, 1992, Carl Hanser Verlag, München.
- [101] W. Ehrfeld (Hrsg.). *Handbuch Mikrotechnik*. 2002, Carl Hanser Verlag, München.
- [102] L.E. Locascio, C.E. Perso, C.S. Lee, Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate. In: J. Chromatogr., 1999, 857, S. 275-284.
- [103] M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, P. Humphrey, D. Johnson, On the aging of oxygen plasma-treated Polydimethylsiloxane surfaces. In: J. Colloid Interface Sci., 1990, 137, S. 11-24.
- [104] M.K. Chaudhury, G.M. Whitesides, Direct measurement of interfacial interactions between semispherical lenses and flat sheets of Poly(dimethylsiloxane) and their chemical derivatives. In: Langmuir, 1991, 7, S. 1013-1025.
- [105] M.A. Roberts, J.S. Rossier, P. Bercier, H. Girault, UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. In: Anal. Chem., 1997, 69, S. 2035-2042.
- [106] R. Pethig, J.P.H. Burt, A. Parton, N. Rizvi, M.S. Talary, J.A. Tame, *Development of biofactory-on-a-chip technology using excimer laser micromachining*. In: Journal of Micromechanics & Microengineering, 1998, 8, S. 57-63.
- [107] O. Mildenberger (Hrsg.). *Einführung in die Mikrosystemtechnik*. 2000, Vieweg, Braunschweig.
- [108] T. Kappes, Tragbares Kapillarelektrophoresegerät mit elektrochemischer Detektion. Universität Basel, Diss., 1999.

- [109] A.M. Fermier, L.M. Gostkowski, L.A. Colon, Rudimentary capillary-electrode alignment for capillary electrophoresis with electrochemical detections. In: Anal. Chem., 1996, 68, S. 1661-1664.
- [110] U. Backofen, Methodische und applikative Untersuchungen zur elektrochemischen Detektion in Verbindung mit kapillaren Fließsystemen. Universität Leipzig, Diss., 1999.
- [111] A. Stitz, W. Buchberger, Studies on electrochemical reactions at metal-oxide electrodes for combination with high-performance liquid chromatography. In: Electroanalysis, 1994, 6, S. 251-258.
- [112] Y. Xie, C.O. Huber, *Electrocatalysis and Amperometric Detection Using an Electrode Made of Copper Oxide and Carbon Paste.* In: Anal. Chem., 1991, 63, S. 1714-1719.
- [113] B. Miller, Split-ring disk study of the anodic processes at a copper electrode in alkaline solution. In: J. Electrochem. Soc., 1969, 116, S. 1675-1680.
- [114] D.D. McDonald, Cyclic voltammetry of copper metal in lithium hydroxide solution at elevated temperatures. In: J. Electrochem. Soc., 1974, 121, S. 651-656.
- [115] S. Fletcher, R.G. Barradas, J.D. Porter, *The anodic oxidation of copper amalgam and polycrystalline copper electrodes in LiOH solution*. In: J. Electrochem. Soc., 1978, 125, S. 1960-1968.
- [116] L.D. Burke, An Investigation of the anodic behavior of copper and its anodically produced oxides in aqueous solutions of high pH. In: J. Electrochem. Soc., 1990, 137, S. 553-561.

- [117] C. Pyun, S. Park, In situ spectrochemical studies on anodic oxidation of copper in alkaline solution. In: J. Electrochem. Soc., 1986, 133, S. 2024-2030.
- [118] M. Fleischmann, K. Korinek, D. Pletcher, *The kinetics and mechanism of the oxidation of amines and alcohols at oxide-covered Nickel, Silver, Copper and Cobalt electrodes.* In: J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1972, 2, S. 1396-1403.
- [119] E. Koglin, A. Tarazona, S. Kreisig, M.J. Schwuger, *In-Situ Investigations of Coadsorbed Cationic Surfactants On Charged Surfaces a Sers Microprobe Study.* In: Colloids & Surfaces A-Physicochemical & Engineering Aspects, 1997, 123, S. 523-542.
- [120] D.K. Xu, H. Lin, H.Y. Chen, Amperometric Detection of Enzymes in Capillary Zone Electrophoresis Based On Dynamic Modification With Surfactants. In: Anal. Chim. Acta, 1997, 349, S. 215-219.
- [121] C.G. Fu, L.N. Song, Y.Z. Fang, Simultaneous determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection at a disk-shaped copper electrode. In: Anal. Chim. Acta, 1998, 371, S. 81-87.
- [122] T. Kappes, P. Schnierle, P.C. Hauser, *Field-portable capillary electrophoresis instrument with potentiometric and amperometric detection*. In: Anal. Chim. Acta, 1999, 393, S. 77-82.
- [123] T.Y. You, X.R. Yang, E.K. Wang, Applications of microelectrodes in capillary electrophoresis electrochemical detection. In: Electroanalysis, 1999, 11, S. 459-464.

- [124] W. Buchberger, Electrochemical Detectors Tailormade Techniques For Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. In: Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1996, 354, S. 797-802.
- [125] T. Soga, G.A. Ross, Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. In: J. Chromatogr., 1999, 837, S. 231-239.
- [126] X. Huang, W.T. Kok, Determination of sugars by capillary electrophoresis with electrochemical detection using cuprous oxide modified electrodes. In: J. Chromatogr. A, 1995, 707, S. 335-342.
- [127] W. Zhou, R. Baldwin, Capillary electrophoresis and electrochemical detection of underivatized oligo- and polysaccharides with surfactant-controlled electroosmotic flow. In: Electrophoresis, 1996, 17, S. 319-324.
- [128] H.T. Chang, E.S. Yeung, Self-Regulating Dynamic Control of Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis. In: Anal. Chem., 1993, 65, S. 650-652.
- [129] H.T. Chang, E.S. Yeung, Optimization of Selectivity in Capillary Zone Electrophoresis Via Dynamic Ph Gradient and Dynamic Flow Gradient. In: J. Chromatogr., 1992, 608, S. 65-72.
- [130] S. Iwamori, T. Miyashita, S. Fukuda, N. Fukuda, K. Sudoh, Effect of a Metallic Interfacial Layer On Peel Strength Deterioration Between a Cu Thin Film and a Polyimide Substrate. In: Journal of Vacuum Science & Technology B, 1997, 15, S. 53-59.

- [131] F. Matysik, Improved end column amperometric detection for capillary electrophoresis. In: J. Chromatogr. A, 1996, 742, S. 229-234.
- [132] S. Wallenborg, K. Markides, L. Nyholm, A microelectrochemical detector for use at low linear velocities in capillary column systems. In: Anal. Chim. Acta, 1997, 344, S. 77-85.
- [133] A.J. Tüdös, M.M.C. Van Dayck, H. Poppe, W.T. Kok, An electrochemical detector cell for open tubular liquid chromatography and capillary electrophoresis. In: Chromatographia, 1993, 37, S. 79-85.
- [134] D.C. Chen, S.S. Chang, C.H. Chen, Parallel-opposed dual-electrode detector with recycling amperometric enhancement for capillary electrophoresis. In: Anal. Chem., 1999, 71, S. 3200-3205.
- [135] T. Kappes, P.C. Hauser, Simplified amperometric detector for capillary electrophoresis. In: Analyst, 1999, 124, S. 1035-1039.
- [136] Z.M. Liu, O. Niwa, R. Kurita, T. Horiuchi, *Miniaturized thin-layer radial flow cell with interdigitated ring-shaped microarray electrode used as amperometric detector for capillary electrophoresis.* In: J. Chromatogr. A, 2000, 891, S. 149-156.
- [137] K. Gahm, A. Stalcup, Sulfated Cyclodextrins for the chiral separations of Catecholamines and related compounds in the reversed electrophoretic polarity mode. In: Chirality, 1996, 8, S. 316-324.
- [138] R. Kurita, H. Tabei, Z.M. Liu, T. Horiuchi, O. Niwa, Fabrication and electrochemical properties of an interdigitated array electrode in a microfabricated wall-jet cell. In: Sens. Actuator B, 2000, 71, S. 82-89.

- [139] X. Huang, R.N. Zare, *End-Column Detection for Capillary Zone Electrophoresis*.In: Anal. Chem., 1991, 63, S. 189-192.
- [140] S. Park, S. Lunte, C. Lunte, A Perfluorosulfonated Ionomer Joint for Capillary Electrophoresis with On-Column Electrochemical Detection. In: Anal. Chem., 1995, 67, S. 911-918.
- [141] A. Brett, M. F., M. Vieira, *Thin-Film gold electrodes produced by magnetron sputtering. Voltammetric characteristics and application in batch injection analysis with amperometric detection.* In: Electroanalysis, 1997, 9, S. 209-212.
- [142] J. Giner, A practical reference electrode. In: J. Electrochem. Soc., 1964, 111, S. 376-377.
- [143] W. Vielstich, Zur qualitativen Analyse von Elektrodenreaktionen mit der potentiostatischen Dreieckspannungsmethode. In: Z. Instrumentenkunde, 1963, 71, S. 29-36.
- [144] T. Kappes, P.C. Hauser, *Portable capillary electrophoresis instrument with potentiometric detection*. In: Anal. Comm., 1998, 35, S. 325-329.
- [145] T. Kappes, P.C. Hauser, *Potentiometric detection of alkali and alkaline earth metal cations in capillary electrophoresis with simplified electrode alignment and enhanced separation and sensitivity*. In: Anal. Chem., 1998, 70, S. 2487-2492.
- [146] J. Monahan, A.A. Gewirth, R.G. Nuzzo, A method for filling complex polymeric microfluidic devices and arrays. In: Anal. Chem., 2001, 73, S. 3193-3197.

- [147] A.T. Woolley, K.Q. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, *Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection*. In: Anal. Chem., 1998, 70, S. 684-688.
- [148] C. Haber, W.R. Jones, J. Soglia, M.A. Surve, M. McGlynn, A. Caplan, J.R. Reineck, C. Krstanovic, *Conductivity detection in capillary electrophoresis A powerful tool in ion analysis.* In: J. Cap. Elec., 1996, 3, S. 1-11.
- [149] B. Graß, D. Siepe, A. Neyer, R. Hergenröder, Comparison of different conductivity detector geometries on an isotachophoresis PMMA-microchip. In: Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2001, 371, S. 228-233.
- [150] R.M. Guijt, E. Baltussen, G. van der Steen, R.B.M. Schasfoort, S. Schlautmann, H.A.H. Billiet, J. Frank, G.W.K. van Dedem, A. van den Berg, *New approaches for fabrication of microfluidic capillary electrophoresis devices with on-chip conductivity detection*. In: Electrophoresis, 2001, 22, S. 235-241.
- [151] R.M. Guijt, E. Baltussen, G. van der Steen, H. Frank, H. Billiet, T. Schalkhammer,
 F. Laugere, M. Vellekoop, A. Berthold, L. Sarro, *et al.*, *Capillary electrophoresis with on-chip four-electrode capacitively coupled conductivity detection for application in bioanalysis*. In: Electrophoresis, 2001, 22, S. 2537-2541.
- [152] G. Ocvirk, M. Munroe, T. Tang, R. Oleschuk, K. Westra, D.J. Harrison, Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices. In: Electrophoresis, 2000, 21, S. 107-115.