Mikrosystemkomponenten aus Polymermaterialien für biochemische Analysensysteme

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

dem

Fachbereich
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Georgeta Vornicescu
aus
Traian

Marburg/Lahn 2007

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen

am

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

Tag der mündlichen Prüfung am

für Doru

Danksagung

Mein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen, meinem Doktorvater, der mich mit seinen unendlich vielen Ideen nicht nur mit Arbeit, sondern auch mit vielen Verbesserungsvorschlägen und Hilfestellungen eingedeckt hat. Ich denke, er hat es in hohem Maße erreicht, sowohl auf menschlicher als auch auf wissentschaftlicher Ebene seinen Mitarbeitern ein kreatives Umfeld sowie eine äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre zu bereiten.

Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky danke ich, sich Zeit genommen zu haben, meine Arbeit als Zweitgutachter zu betrachten.

Frau Prof. Dr. Maike Petersen sowie Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe bin ich für die Zusage dankbar, als Mitglieder der Prüfungskommision bei der Disputation meiner Arbeit teilzunehmen.

Danken möchte ich auch allen weiteren an dieser Arbeit beteiligten Kooperationspartnern, Frau Dr. Ulricke Michelsen (Bartels Mikrotechnik GmbH Dortmund) und Herr Helmut Axthelm (VIAelectronic Hermsdorf).

Herrn Erwin Schott möchte ich für den Aufbau des Messstandes sowie für die wertvolle technische Unterstützung über die ganze Dauer der Arbeit danken.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Insbesondere danke ich Jarmila Jedelska für die ständige Hilfsbereitschaft und die aufmunternden Worte während der letzten Phase der Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die meine Entscheidungen immer respektiert haben und mir immer die Sicherheit gegeben haben, sie eigenständig treffen zu können.

Mein unschätzbarer Dank gilt meinem Ehemann Doru für seine vielfältige Unterstützung. Er hat mir geholfen, mich auf meine Arbeit zu konzentrieren, ohne dabei meine seelische Ausgeglichenheit zu verlieren.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren und versehentlich nicht erwähnt worden sind.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Kapillarelektrophorese 1

1.1.1 Elektrophoretische Mobilität 3

1.1.2 Der elektroosmotische Fluss (EOF) 4

1.1.3 Trennverfahren 10

1.1.3.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE) 10

1.1.3.2 Die micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC*)* 11

1.1.3.3 Kapillar-Gelelektrophorese (CGE) 12

1.1.3.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF) 12

1.1.3.5 Isotachophorese (ITP) 13

1.2 Elektrochemische Detektion 14

1.2.1 Amperometrieprinzip 14

1.2.2 Amperometrische Enzymsensoren 15

1.3 Lab-on-a-chip-Systeme 17

1.4 Messplatzaufbau 19

1.5 Probenaufgabe 20

1.6 Modellsubstanzen als Analyte (Polyphenole) 20

1.7 Eigenschaften der untersuchten Substraten 22

1.7.1 Trägermaterialien 22

1.7.1.1 Keramik 23

1.7.1.2 Polycarbonat 24

1.7.1.3 Polystyrol 25

1.8 Enzymimmobilisierung 27

1.8.1 Adsorptive Immobilisierung 28

1.8.2 Kovalente Immobilisierung 28

1.8.3 Spacerchemie 29

1.9 Meerrettichperoxidase (HRP) als Modellprotein 30

1.10 Ziel der Arbeit 31

2. Material und Methoden 34

2.1 Material 34

2.1.1 Chemikalien 34

2.1.2 Lösungen und verwendete Puffer 36
2.1.3 Geräte 37
2.2 Methoden 38
2.2.1 Oberflächemodifikation 38
2.2.1.1 Reinigung der Keramikträger 39
2.2.1.2 Reinigung und Vorbehandlung der Polymerträger 40
2.2.1.3 Silanisierung 41
2.2.2. Adsoptive Kopplung von Enzym 43
2.2.3. Kovalente Kopplung von Enzymen 43
2.2.3.1 Immobilisierung über Glutardialdehyd (GDA) 44
2.2.3.2 Immobilisierung über Carbodiimid 45
2.2.3.3 Immobilisierung der oxidierten HRP an aminofunktionalisierte Oberflächen 47
2.2.4. Proteinchemie 47
2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford 47
2.2.4.2 Photometrische Bestimmung der Menge gebundener HRP 48
2.2.5. Elektrochemische Detektion 49
2.2.5.1 Amperometrische Messung mit Polycarbonat-Chips 49
2.2.5.2. Silanisierung der Kapillare 52
3. Ergebnisse 55
3.1 Eigenschaften und Modifizierung der Trägeroberflächen 55
3.1.1 Reinigung und Aktivierung von Keramikträger 56
3.1.1.1 Behandlung der Oberfläche mit Ethanol/Wasser 56
3.1.1.2 Behandlung der Oberfläche mit KOH 56
3.1.1.3 Behandlung der Oberfläche mit KOH/EtOH 56
3.1.2 Reinigung und Aktivierung von Polymerträger 57
3.1.2.1 Behandlung der Oberfläche mit EtOH/H_2O und UV-Licht 57
3.1.2.2 Behandlung der Oberfläche mit KOH/EtOH und UV-Licht 57
3.1.2.3 Behandlung der Oberfläche mit KOH 57
3.1.3 Funktionalisierung der Oberflächen mit Silangruppen 57
3.1.4 Adsorptive Kopplung von Meerrettichperoxidase (HRP) an Träger-oberfläche 58
3.1.5 Kovalente Proteinimmobilisierung 60
3.1.5.1 Immobilisierung vom Protein an aminofunktionalisierte Festkörper-oberflächen mittels NHS-DCC-Methode 61

3.1.5.2 Immobilisierung vom Protein an aminofunktionalisierte Festkörper-oberflächen mittels Glutardialdehyd 68
3.1.5.3 Immobilisierung der oxidierten HRP an einer mit Aminogruppen funktionalisierten Festkörperoberfläche 76
3.2 Voruntersuchungen zur Oberflächenbehandlung von Kapillaren 107
3.2.1 Oberflächenbehandlung der Chip-Komponenten 108
3.3 Mikrofluidische Analyse-Chips 110
3.3.1 Konditionierung der Mikrochips 110
3.3.2 Messplatzaufbau 111
3.4 Amperometrische Messungen 113
3.4.1 Amperometrische Messung von Phenolen mit einer Kapillare, die mit 114
3.4.2 Amperometrische Messung von Phenole mit einer Kapillare, die mit 122
3.4.3 Amperometrische Messung von Phenole mit einer Kapillare, die mit 127
3.5 Trennversuche von Mischungen 133
4. Diskussion 140
4.1 Bindungsverhalten verschiedener Materialoberfläche 140
4.2 Aktivierung und Silanisierung der Oberflächen 141
4.3 HRP als Modellprotein zur Charakterisierung der Trägermaterialien 145
4.3.1 Immobilisierung von HRP an aminofunktionalisierten Oberflächen mittels NHS-DCC Methode 145
4.3.2 Immobilisierung von HRP an aminofunktionalisierten Oberflächen mittels Glutardialdehyd 148
4.3.3 Immobilisierung der oxidierten HRP an aminofunktionalisierten Oberflächen 148
4.3.4 Immobilisierung der oxidierten HRP an Polymeroberflächen, die mit Plasma vorbehandelt wurden 150
4.4 Amperometrische Detektion 154
4.4.1 Konditionierung der Polycarbonat-Kapillare 155
4.4.2 Detektion von Phenolen 157
4.4.2.1 Dopamin 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-ethylamin 159
4.4.2.2 Hydrochinon (1,4-Dihydroxybenzol) 160
4.4.2.3 Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol) 162
4.4.2.4 Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol) 163
4.4.2.5 Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) 164
4.4.3 Trennung von Polyphenolmischungen 165

5. Zusammenfassung **169**

6. Literaturverzeichnis **173**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APTS	3-Aminoproyltriethoxysilan
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
$^{\circ}C$	Grad Celsius
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CGE	gel capillary electrophoresis (Kapillargelelektrophorese)
cm	Zentimeter
CZE	zone capillary electrophoresis (Kapillarzonenelektrophorese)
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e	Elementarladung
E	Elektrische Feldstärke
EOF	Elektroosmotischer Fluss
E_{pot}	Potential der Arbeitselektrode
E°	Standardpotential
EtOH	Ethanol
F	Faraday-Konstante
f_C	Reibungskoeffizient
F_e	Beschleunigungskraft
F_r	Reibungskraft
g	Gramm
GOPTS	3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ITP	Isotachophorese
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
kV	Kilovolt
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid

log	Dekalischer Logarithmus
L	Kapillarlänge
LTCC	low temperature co-fired ceramic
M	Molarität
mg	Milligramm
mm	Millimeter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MEKC	Micellare elektrokinetische Chromatographie
N	Bodenzahl
$NaBH_4$	Natriumborhydrid
NaOH	Natriumhydroxid
N_A	Avogadrozahl
nA	Nanoampere
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
p.a.	pro analyse
PBS	phosphat buffered saline
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PETG	Polyethyleneterephthalat
pH	Pondus hydrogenii
pI	Isoelektrischer Punkt
PMMA	Polymethylmetacrylat
r	Stokescher Radius
Re^*	Reynoldszahl
RT	Raumtemperatur
q	Ladung des Teilchens
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
t	Zeit

t_i	Injektionszeit
TMB	3,3`,5,5`-Tetramethylbenzidin
U_i	Spannung
UV	Ultraviolettlicht
V	Volt
z	Ladungszahl
z.B.	zum Beispiel
v_{EPH}	Wanderungsgeschwindigkeit
µA	Mikroampere
µ	Mobilität
μ_{EOF}	Elektroosmotische Mobilität
µg	Mikrogramm
μ_{EPH}	Elektrophoretische Mobilität
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µ-TAS	Mikrototalanalysensystem
ζ	Zeta-Potential
Φ	Durchmesser
η	Viskosität
ε	Dielektrizitätskonstante
δ	Dicke der diffussen Grenzschicht
σ	Varianz
ρ	Dichte

1. Einleitung

1.1. Kapillarelektrophorese

Die Grundlagen für die enorme Geschwindigkeit der CE-Entwicklung der letzten Jahre wurden in den vergangenen 110 Jahren gelegt. Das grundsätzliche Prinzip der Elektrophorese, als Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld definiert, wurde zuerst von Kohlrausch (1897) beschrieben. Geladene Teilchen wandern in Lösung unter Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in definierte Richtungen. Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit können zwei Ursachen haben: Unterschiedliche Ladungen erfahren im elektrischem Feld entsprechende elektrophoretische Kräfte oder bei gleicher effektiver Ladung können Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe sich im Reibungswiderstand unterscheiden. Auf diesem Prinzip beruhen die verschiedenen Trennungsmöglichkeiten der Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis = CE) [Engelhardt, H. 1994].

Hjerten (1958) gelang die erste Trennung in offenen Glasröhren mit 3 mm Innendurchmesser. Die weitere Verringerung des Innendurchmessers auf 0,2 mm bei 1 m Kapillarlänge durch Virtanen (1969) ermöglichte die Trennung von Alkalimetall-Ionen, die durch Messung der Potentialdifferenz detektiert wurden. Everaerts (1970) verwendete 0,5 mm dünne Teflonschläuche zur isotachophoretischen Trennung organischer Säuren mit thermometrischer online-Detektion. Zu Beginn der 80er Jahre konnten sich mit den Arbeiten von Jorgenson und Lukacs (1981) die CE als Analysetechnik durchsetzen. Dies war vor allem darauf zurückzuführen, dass mit Hilfe von Quarzkapillaren mit einem Innendurchmesser von 75 µm hocheffiziente Trennungen von Proteinen möglich wurden. Die enorme Verkleinerung des Innendurchmessers der Quarzkapillaren hatte zur Folge, dass der störende Einfluss der thermisch induzierten Konvektion aufgrund des relativ großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen stark vermindert war. Zudem führte die Einfachheit der Apparatur, die hohe Trenngeschwindigkeit und Trenneffizienz, die geringe Probenmenge zum Erfolg der HPCE (high performance capillary electrophoresis) als Analysemethode.

Die Elektrophorese mit planaren Chips wurde 1992 erstmals auf ein Glas-Substrat demonstriert [Harrison, D.J. et al. 1992]. In den folgenden Jahren wurden die beiden Systeme, mit Kapillaren und mit Chips, weiterentwickelt. Die CE stellt heute den am schnellsten wachsenden Zweig der Analysetechnik dar. Außer Biochemie und Molekularbiologie hat sich die CE sich auch in der pharmazeutischen Industrie, der Umweltanalytik und der chemischen Großindustrie etabliert.

Der prinzipielle Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abbildung 1-1 gezeigt.

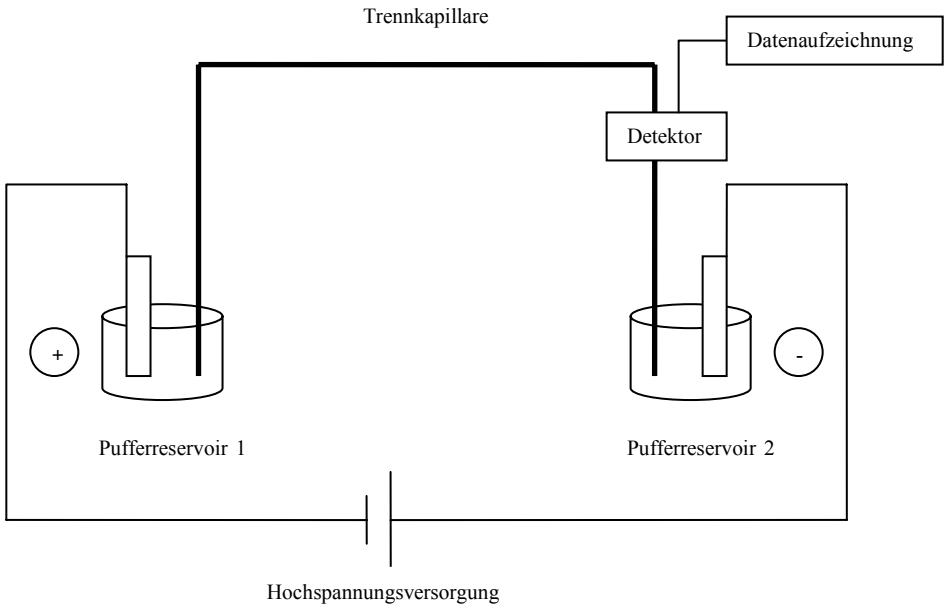


Abb. 1-1 Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Systems

Zur Durchführung der Kapillarelektrophorese (Abb.1-1) wird eine Hochspannungsquelle benötigt, deren beide Pole in zwei Puffergefäße eintauchen. Die beiden Puffergefäße sind durch eine Trennkapillare mit Innendurchmessern zwischen 25 µm und 100 µm verbunden. Als Trennmedium werden wässrige Puffersysteme eingesetzt, um den Stromtransport zu gewährleisten und den pH-Wert in der Kapillare konstant zu halten. Die Pufferlösungen, die häufig eingesetzt werden, sind TRIS- und Boratpuffer bei basischem pH oder Phosphat- und Citratpuffer bei saurem pH. Die Probenaufgabe oder Injektion der Probe erfolgt am anodischen Ende (Pufferreservoir 1) der Kapillare. Nur Lösungen können als Proben aufgegeben werden. In die Elektrolytgefäße an beiden Enden der Kapillare tauchen inerte Gold- und Platinelektroden. Zwischen diesen Elektroden wird mit Beginn der elektrophoretischen Trennung eine Spannung angelegt. Die Obergrenze der anlegbaren Spannung ist gerätetechnisch bedingt. Die Trennung der Bestandteile der Probe in Zonen erfolgt während des Laufes bei angelegter Hochspannung. Die Zonen werden meist in einem Segment der Kapillare detektiert. Der elektrophoretischen Wanderung ist immer ein elektroosmotischer Fluss (EOF) überlagert, der aktiv zum Transport der Probenzonen, weniger aber zu ihrer Trennung beiträgt. Nachdem in den meisten Puffern an der Oberfläche von Quarzkapillaren durch Dissoziation von Silanolgruppen negative Ladungen vorliegen, die positive Ladungen in der Nähe der Wand induzieren, geht der EOF in Richtung zur Kathode, weshalb der Detektor in der Nähe des Kathodenraums angebracht wird.

Wie schon erwähnt, wird die Kapillare in letzter Zeit teilweise durch einen Chip ersetzt. Dieses planare miniaturisierte CE-System wurde aus Silikon, Glas oder organischen Polymeren hergestellt. Ein Trennkanal wird auf die Bodenplatte eingefräst und eine andere Platte wird als Deckel gebraucht, um den Kanal zu schließen [Effenhauser, C.S. et al. 1993 und Wang, J. 2002].

1.1.1 Elektrophoretische Mobilität

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analytions im elektrischen Feld wird durch seine elektrophoretische Mobilität festgelegt. Auf ein geladenes Teilchen wirken in einem elektrischen Feld E verschiedene Kräfte, wie die beschleunigende Kraft F_e, die auf die Ladung q des Teilchens wirkt:

$$F_e = q \cdot E \quad \text{mit} \quad q = z \cdot e \qquad \text{Gl.1.1}$$

wobei E die elektrische Feldstärke [V/cm], z die Anzahl der effektiven Ladungen und e die Elementarladung [C] ist.

Bremsend wirkt die Reibungskraft F_r:

$$F_r = f_c \cdot v_{EPH} \qquad \text{Gl. 1.2}$$

wobei E die elektrische Feldstärke, v_{EPH} die Wanderungsgeschwindigkeit [cm/s] des Teilchens und f_c der Reibungskoeffizient ist. Der Reibungskoeffizient ist abhängig von der Viskosität des Mediums und gegebenenfalls der Porengröße der Matrix. Das Gleichgewicht dieser beiden Kräfte bewirkt (Abb.1-2), dass sich das Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit im elektrischen Feld bewegt:

$$F_e = F_r \Rightarrow q \cdot E = f_c \cdot v_{EPH} \Rightarrow v_{EPH} = \frac{q \cdot E}{f_c} = \mu_{EPH} \cdot E \qquad \text{Gl.1.3}$$

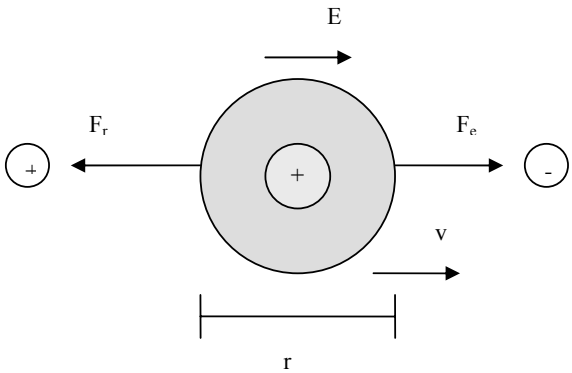


Abb.1-2 Beschleunigende und bremsende Kräfte, die in einem elektrischen Feld auf ein geladenes Teilchen wirken

Der Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Feldstärke ist die substanzspezifische Größe μ, die Mobilität. Für kleine sphärischer Teilchen lässt sich das Stokessche Gesetz anwenden, um die Reibungskraft zu berechnen:

$$F_R = 6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot v_{EPH} \qquad \text{Gl.1.4}$$

wobei η die dynamische Viskosität [$kg/m \cdot s$], r Stokescher Radius [cm] und v die Ionengeschwindigkeit ist.

Durch Einsetzen von F_r in Gleichung 1.3 erhählt man:

$$v_{EPH} = \frac{z \cdot F \cdot E}{6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot N_A} \Rightarrow \mu_{EPH} = \frac{z \cdot F}{6\pi \cdot \eta \cdot r \cdot N_A} \qquad \text{Gl.1.5}$$

wobei e die elementare Ladung [C], F die Faradaykonstante, N_A die Avogadrozahl, E elektrische Feldstärke [V/cm] und z die effektive Ladung des Ions ist. Laut Konvention haben Kationen positive und Anionen negative Mobilitäten.

Für nicht-kugelförmige Teilchen wie Peptide und Proteine lässt sich ein empirischer Zusammenhang zwischen Molekulargewicht [M] und Mobilität angeben:

$$\mu \approx \frac{q}{M^n} \qquad \text{Gl.1.6}$$

mit n $\in$ [1/3-2/3].

1.1.2 Der elektroosmotische Fluss (EOF)

Während die Elektrophorese die Trennung von Teilchen unterschiedlicher Mobilität bewirkt, verursacht die Elektroosmose einen Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld. In den meisten Fällen ist in der CE die elektrophoretische Wanderung der Ionen durch den elektroosmotischen Fluss (EOF) überlagert. Dieser EOF hängt von der Verteilung der Ladungen in der Nähe der Kapillaroberfläche ab. Nahezu alle Oberflächen tragen eine Ladung. Die Gesamtgeschwindigkeit der Analyt-Ionen setzt sich aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen und elektroosmotischen Geschwindigkeit zusammen, wie in Abbildung 1-3 dargestellt:

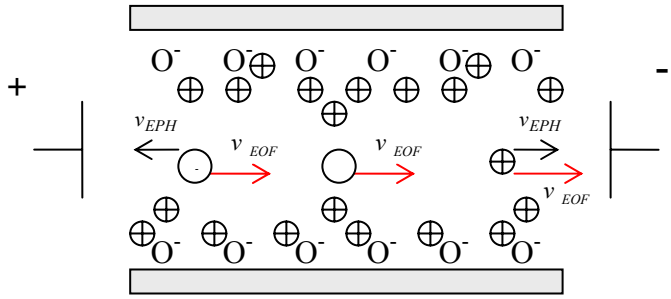


Abb.1-3 Elektroosmotischer und elektrophoretischer Transportmechanismus für Anionen, Kationen und Neutralteilchen in einer Kapillare (v_{EOF} = elektroosmotische Geschwindigkeit, v_{EPH} = elektrophoretische Geschwindigkeit).

Unter Berücksichtigung des EOF verändert sich die Gleichung zur Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten wie folgt:

$$v = \mu_t \cdot E = (\mu_{EPH} + \mu_{EOF}) \cdot E \qquad \text{Gl.1.7}$$

Die gesamte beobachtete Bewegung μ_t eines Ions setzt sich zusammen aus der elektrophoretischen Beweglichkeit des Ions μ_{EPH} und dem elektroosmotischen Fluss μ_{EOF} des Puffers.

Die resultierende Mobilität wird hierbei sowohl durch die elektrophoretische Beweglichkeit μ_{EPH}, die ausschließlich durch das angelegte elektrische Feld verursachen wird, als auch durch die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} bestimmt. Zu beachten ist, dass Elektrophorese und Elektroosmose für Anionen ein entgegengesetztes Vorzeichen haben (siehe Abb. 1-3). Hierdurch ist es möglich, dass bestimmte Ionen nicht detektierbar sind, wenn sich beide Effekte gerade aufheben.

Die deprotonierten Silanolgruppen an der Kapillarwand stehen in Wechselwirkung mit den Kationen im Lösungsmittel. Somit erfolgt ein Ladungsausgleich durch den Aufbau einer Doppelschicht (Stern-Modell) nahe der Kapillarwand. In dieser Doppelschicht, schematisch in Abbildung 1-4 dargestellt, überwiegen die positiven Ionen, die sich in einer starren und einer beweglicher Schicht an der Oberfläche anordnen. Das sich aufgrund der Ladungsverteilung aufbauende Potential wird nach der Theorie von Stern in zwei Regionen aufgeteilt, wie in Abbildung 1-5 schematisch dargestellt ist: eine lineare Abnahme des Potentials im Bereich der starren Grenzschicht (a) und einer exponentiellen Abnahme in der

diffusen Grenzschicht (b) [Bächmann, K. 1995]. Diese exponentielle Abnahme ist verantwortlich für die Elektroosmose und wird durch das ζ–Potential [Kirby, B.J. and Hasselbrink, E.F. 2004] beschrieben. Das Zeta-Potential ζ ist gegeben durch:

$$\zeta = \frac{4\pi \cdot e \cdot \delta}{\varepsilon} \qquad \text{Gl.1.8}$$

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

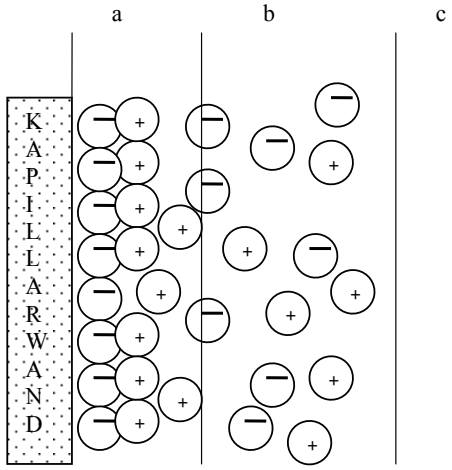


Abb.1-4 Ladungsverteilung in der Kapillarwand und Ausbildung des ζ–Potentials.

a: starre Grenzschicht mit adsorbierten Ionen

b: Stern- Grenzschicht (diffuse Grenzschicht)

c: Elektrolyt

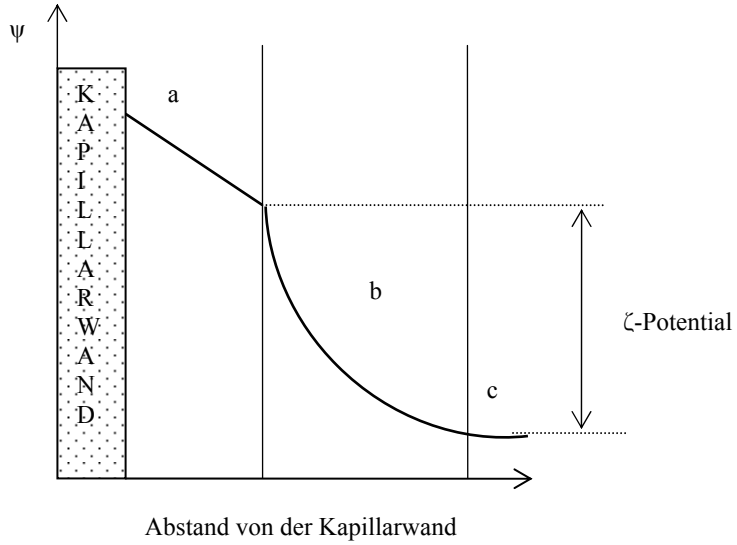


Abb.1-5 Verlauf des ζ–Potentials an der Grenzfläche Puffer/Kapillarwand.

Der Potentialabfall in starrer und diffuser Doppelschicht ist abhängig von der Ionenstärke der Lösung: je höher die Ionenstärke, desto steiler ist der Potentialabfall und desto geringer ist die

Dicke der Doppelschicht. Die Geschwindigkeit des EOF nimmt daher mit der Ionenstärke des Elektrolyten ab. Das ζ–Potential und damit der EOF sind abhängig von der Dissoziation der Silanolgruppen und dadurch vom pH-Wert der Elektrolytlösung. Bei basischem pH ist der EOF üblicherweise höher als die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen, bei saurem pH geringer. Unter normalen Bedingungen, dank dem EOF, wandern die meisten Teilchen unabhängig von der Ladung in dieselbe Richtung. Kationen wandern am schnellsten, da die elektrophoretische Anziehung zur Kathode und der EOF gleichgerichtet sind. Neutrale Moleküle werden mit der Geschwindigkeit des EOF transportiert, aber nicht voneinander getrennt. Anionen wandern am langsamsten, da sie von der Anode zwar angezogen, aber von dem überlagerten EOF zur Kathode bewegt werden.

Wenn Spannung angelegt wird, wandern die Kationen der diffusen Doppelschicht in Richtung Kathode. Da diese Kationen solvatisiert sind, wird die umgebende Lösung in Richtung Kathode bewegt. Es bildet sich ein extrem flaches Strömungsprofil aus. Dies führt zu einer wesentlich geringeren Bandverbreiterung als bei hydrodynamischen Flüssen, wo das stark vom Kapillarradius und Strömungsgeschwindigkeit abhängige parabolische Profil auftritt. Der elektroosmotische Fluss in Kapillaren wird mit steigender Konzentration des Elektrolyten herabgesetzt und wächst mit dem pH-Wert an. In Kapillaren mit einem Wandabstand von 25 bis 100 µm bildet sich durch den EOF ein nahezu ideales pfropfenförmiges Strömungsprofil aus. Für die Mikrokanäle muss die Strömungsmechanik beachtet werden. Die Fließgeschwindigkeit hängt von der Viskosität und von Oberflächeneffekten ab . Diese Oberflächeneffekte lassen sich vereinfacht als Reibungskraft zusammenfassen, wenn die Viskosität mit der Trägheitskraft gleichgesetzt wird. Der Quotient aus Trägheitskraft und Reibungskraft wird Reynoldszahl genannt. Die Reynoldszahl (Re^*) charakterisiert die Tendenz einer Flüssigkeit, sich turbulent oder laminar zu entwickeln (Gl.1.9):

$$Re^* = \frac{v \cdot d \cdot \rho}{\eta} \qquad \text{Gl.1.9}$$

wobei v die Fließgeschwindigkeit [m/s], d der Durchmesser der Kapillaren [m], ρ die Dichte [kg/cm^3] und η die Viskosität [kg/m s] ist. Der Wert von Re^*, bei dem eine laminare in eine turbulente Strömung umschlägt, wird kritische Reynoldszahl genannt und hängt von der Geometrie des Kanals an. Wenn der Kapillardurchmesser von 1 mm auf 50 µm reduziert wird und alle Materialparameter wie Fließgeschwindigkeit, Dichte, Viskosität beibehalten werden, geht der Kapillardurchmesser linear in die Reynoldszahl ein und verringert diese um den Faktor 20. So weist die Reynoldszahl in einer 1 mm Kapillare ein Wert von 4000 auf und damit eine Flüssigkeit, die turbulent ist, während die Reynoldszahl in einer 50 µm Kapillare

ein Wert von 200 zeigt und eine laminare Strömung resultiert. Für mikrofluidische Kapillaren liegt dieser Wert normalerweise bei 50-200. Die Fließfront ist von der Art des Flüssigkeitstransports abhängig. Bei einem durch EOF erzeugten Fluss ist sie nahezu eine Gerade, bei durch Druck erzeugtem Fluss bildet sich ein hydrodynamisches Profil aus. Abbildung 1-6 zeigt die verschiedenen Strömungsprofile in einer Mikrofluidik.

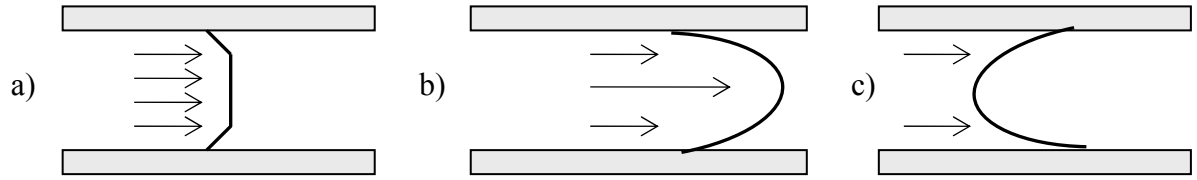


Abb.1-6 Darstellung der Flussprofile in der Mikrofluidik: a) Laminares Strömungsprofil, b) Hydrodynamisches Strömungsprofil, c) Fließbeginn bei der Elektroosmose

Die Wanderungsgeschwindigkeit (μ) des EOFs lässt sich vereinfacht mit Hilfe der sogenannten Helmholtz-Gleichung beschreiben:

$$\mu = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta} \qquad \text{Gl.1.10}$$

Der EOF ist umgekehrt proportional der Viskosität η [Pa • s] des Elektrolyten, proportional seiner Dielektrizitätskonstante ε [C/Vm], der angelegten Feldstärke E und dem ζ-Potential („Zeta-Potential“) [V].

Mit der Änderung von verschiedenen experimentellen Parametern kann man den EOF gezielt verändern, um unterschiedliche Effekte zu erzielen [Kuhn, R. 1994]:

1. *Pufferkonzentration*: Das ζ-Potential ist proportional zu der Dicke der diffusen Grenzschicht. Eine höhere Pufferkonzentration bedeutet auch eine größere Konzentration von Kationen, welche die Dicke der diffusen Grenzschicht verkleinert, was zu einem kleineren ζ-Potential führt, das folglich den EOF verringert.
2. *pH-Wert des Puffers*: Der EOF nimmt mit steigendem pH zu. Bei hohem pH-Werten sind mehr Silanolgruppen der Kapillare dissoziiert und das hat als Folge, dass das ζ -Potential und der EOF zunehmen. Unter pH 2 ist der EOF Null. Bei pH 7-8 sind alle Silanolgruppen vollständig dissoziiert und das Zeta-Potential bleibt konstant.

3. *Elektrische Feldstärke*: Die Geschwindigkeit der EOF ist proportional zu der Feldstärke und dementsprechend zur angelegten Hochspannung.
4. *Temperatur*: Bei einer Temperaturerhöhung nimmt die Viskosität zu und die Selektivität wird beeinflusst.
5. *Tenside als Pufferadditiv*: Eine Zugabe von positiv geladenen Detergenzien führt zu einer Richtungsumkehr des EOF [Lucy, C.A., Underhill, R.S. 1998].
6. *Dynamische Belegung mit Polymeren*: Eine Adsorption von Polymeren (z.B. Polyehylenglycol, Polyvinylpyrrolidon) an die Oberfläche führt zu einer Reduktion des EOF und zu einer besseren Trennung.
7. *Organische Lösungsmittel*: Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln verändert die Viskosität des Puffers und dementsprechend den EOF, was zu komplexen Veränderungen des Trennsystems führt.
8. *Kovalente Coatings*: Durch kovalente Coatings wird die Wandadsorption reduziert, was zu einer besseren Langzeitstabilität der Kapillare führt.

Die theoretischen Vorteile der Elektrophorese in miniaturisierten Kapillaren werden durch die Trennungseffizienz, die theoretischen Böden N, ausgedrückt [Becker, H. et al. 1999]. Dieser Wert N ist definiert als:

$$N = \frac{L^2}{\sigma_x^2} \qquad \text{Gl.1.11}$$

wobei L die Länge der Kapillare und σ_x^2 die Varianz der Wanderungs-Zonenbreite, nämlich die Aufweitung einen Detektionspeaks durch Diffusion für einen einzelnen Stoff, ist.
Die Anzahl der theoretischen Böden *N* wird hauptsächlich von der Länge der Kapillare *L*, der Wanderungszeit t_M und des Diffusionskoeffizienten *D* des Analytions. Somit lässt sich schreiben:

$$N = \frac{L^2}{2D \cdot t_M} \;\; ; \; N \approx \frac{L}{d} \qquad \text{Gl.1.12}$$

wobei *d* den Kapillardurchmesser anzeigt.
Die zweite wichtige Variable ist die Analysezeit t_M, das ist die Zeit, die eine Komponente benötigt, eine bestimmte Strecke *L* zurückzulegen. Diese ist gegeben durch:

$$t_M = \frac{L}{v} \qquad \text{Gl.1.13}$$

wobei v die resultierende Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Komponente ist.

Unter Nutzung der Gleichung 1.11, 1.12 und 1.13 ergibt sich:

$$t \approx L \cdot d \qquad \text{Gl.1.14}$$

Durch diese beiden Formel (1.12 und 1.14) ergibt sich ein Hauptvorteil der miniaturisierten Kapillarelektrophorese (CE). Diese beiden Formeln können weiter zusammengefasst werden und es ergibt sich schließlich:

$$\frac{N}{t} \approx \frac{1}{d^2} \qquad \text{Gl.1.15}$$

Daraus folgt, dass die Separationseffektivität pro Zeiteinheit umgekehrt proportional zum Durchmesser der Kapillare ist. Dies zeigt sehr anschaulich das Potential mikrostrukturierter Analyseeinheiten auf. Ein typischer Gewinn sind zwei Größenordnungen in Bezug auf die Analysezeit [Becker, H. et al. 2002].

1.1.3 Trennverfahren

Neben dem Flüssigkeitstransport ist für die Analytik wichtig, die Proben in ihre Bestandteile zu trennen, um sie detektieren zu können. Unter Kapillarelektrophorese vereint sich eine Vielzahl von Methoden [Cammann, K. 2001], die die analytische Trennung verschiedenster Substanzklassen erlauben. Die folgenden Methoden sind am weitesten verbreitet [Engelhardt, H. 1994].

1.1.3.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die Zonenelektrophorese ist von der hier zu beschreibenden Techniken das einfachste und am häufigsten angewendete Verfahren. Bei der Kapillarzonenelektrophorese bleiben der Puffer, der pH-Wert, wie auch die Feldstärke uber der Trennstrecke konstant. Die Proben werden aufgrund ihrer verschiedenen Mobilitäten getrennt. Sie werden als konkrete Zone im Gemisch am Anfang der Kapillare aufgegeben und als voneinander getrennte, diskrete Zonen durch den Detektor nachgewiesen. Der Puffer hat bei dieser Trenntechnik die Aufgabe, den pH-Wert konstant zu halten und den Ladungstransport zu gewährleisten. Eine schematische Trennung ist in Abbildung 1-7 dargestellt.

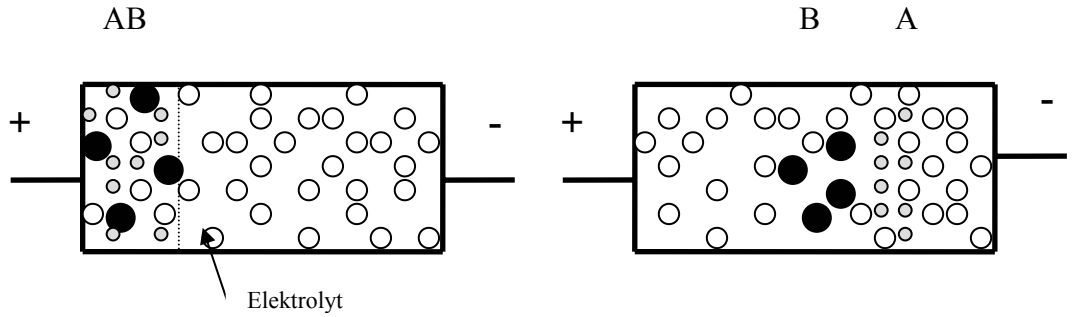


Abb.1-7 Das Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese. Die gesamte Kapillare ist mit Trägerelektrolyt gefüllt. Die Feldstärke ist über den gesamten Trennbereich konstant. Die Probe-Ionen A, B wandern aufgrund unterschiedlicher Mobilität verschieden schnell.

1.1.3.2 Die micellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC)

Die von Terabe beschriebene „Micellare elektrokinetische Chromatographie“ (MEKC) ermöglicht die Auftrennung ungeladener Substanzen durch unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in der wässrige mobilen- und einer pseudo-stationären Phase [Terabe, S. et al. 1984]. Durch den Zusatz von Detergenzien zum Puffer bilden sich nach der Überschreitung der so genannten kritischen micellaren Konzentration Micellen aus. Am häufigsten wird als Detergens SDS (sodium dodecylsulfat) verwendet. Diese Micellen besitzen im Inneren hydrophoben Charakter und sind nach außen hin geladen, wodurch im elektrischen Feld eine elektrophoretische Mobilität erzielt wird. In Abbildung 1-8 ist das Prinzip einer micellarer elektrokinetischer Chromatographie dargestellt.

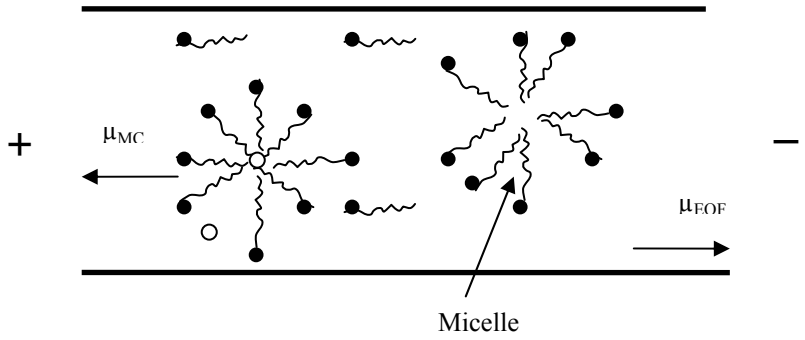


Abb.1-8 Schematische Darstellung der MEKC. Verteilung eines neutralen Analyten zwischen Lösung und Micelleninnerem. In Lösung entspricht die Mobilität des Neutralteilchens der des EOF (μ_{EOF}) und im Inneren der Micelle der Mobilität μ_{MC}.

1.1.3.3 Kapillar-Gelelektrophorese (CGE)

Die Kapillar-Gelelektrophorese ist eine Sonderform der CZE: In der CZE erfolgt die Trennung nach unterschiedlichen Masse/Ladungsverhältnissen, bzw. Mobilitäten. Sowohl DNA-Moleküle als auch SDS-denaturierte Proteine besitzen aber auch bei unterschiedlichen Massen sehr ähnliche Masse/Ladungsverhältnissen, so dass sie in freier Lösung nicht zu trennen sind. Die Kapillare wird mit einer Polymerlösung oder einem Gel gefüllt. Geladene Moleküle werden durch das Gel gebremst, wobei größere Moleküle (Abb.1-9) stärker gebremst werden als kleinere [Strege, M. et al. 1991]. Von den in der klassischen Gelelektrophorese gebrauchten Geltypen werden in Kapillaren hauptsächlich Acrylamide, Agarose und Cellulose als Matrix verwendet. Diese Gele unterscheiden sich stark in ihren physikalischen Eigenschaften, wobei als die wichtigsten die Viskosität, die Porengröße und die Stabilität im elektrischen Feld zu nennen sind.

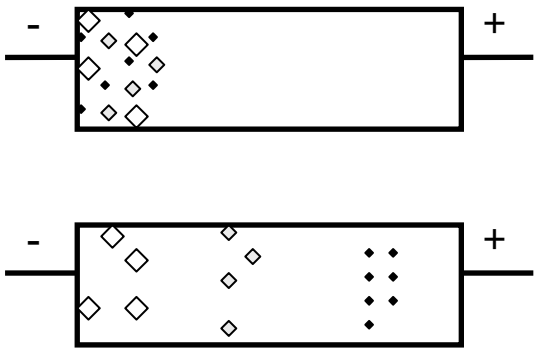


Abb.1-9 Schematische Darstellung der Trennung von ionischen Biopolymeren nach Molekülgröße

1.1.3.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Isoelektrische Fokussierung ist ein etabliertes Trennverfahren von hoher Effizienz [Righetti, P.G. 1983]. Sie wird überwiegend für zwitterionische und amphotere Proben wie Proteine und Peptide eingesetzt, die sich nicht in ihrer Mobilität aber in ihrem isolektrischen Punkt (pI-Wert) unterscheiden. Die Trennung erfolgt in einem pH-Gradienten (Abb.1-10), der sich durch Zusatz von Ampholyten zum Puffer im elektrischen Feld ausbildet. Durch das angelegte elektrische Feld wandern die geladenen Ampholyte und Proteine durch das Medium, bis sie die Zone mit dem pH-Wert erreichen, wo sie ungeladen sind. Wenn der Gleichgewichtzustand erreicht ist, fließt kein Strom mehr und die getrennten Proteine werden nur durch elektroosmotischen Druck zum Detektor transportiert. Als Ampholyte werden

aliphatische Aminocarbonsäure mit unterschiedlichen Verhältnissen von Aminogruppen und Carbonsäure eingesetzt [Righetti, P.G.1990].

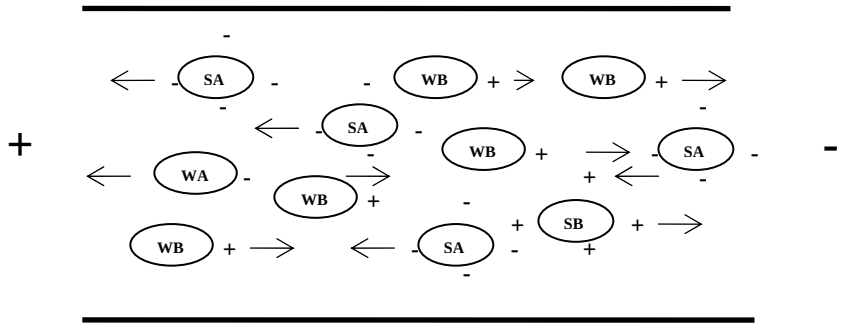


Abb.1-10 Schematische Darstellung der Entstehung eines pH-Gradienten in der IEF.
[SB]=Starke Base, [WB]=schwache Base, [SA]=starke Säure, [WA]=schwache Säure

1.1.3.5 Isotachophorese (ITP)

Die Trennung in der erfogt nach der Mobilität, d.h. nach Größe und Ladung der Ionen, analog wie in der CZE. Der Unterschied liegt in der Elektrolytanordnung. Während in der CZE die gesamte Kapillare mit einem Trägerelektrolyten gefüllt ist, der eine konstante Feldstärke bewirkt, verwendet man in der ITP eine Anordnung zweier Elektrolyte: einen Leitelektrolyten und einen Endelektrolyten, die so gewählt sind, dass die Mobilität des Leitelektrolyten höher als die Mobilitäten aller Analyt-Ionen ist und die des Endelektrolyten geringer. Neben der Mobilität sind auch die chemische und physikalische Stabilität zu berücksichtigen. Beide Elektrolyte sollten mit Probenbestandteilen nicht reagieren und nicht im angelegten elektrischen Feld zersetzt werden. Die aufgeführten Anforderungen führten in der anionischen ITP zum Einsatzt von Chlorid als Leition. Das Chloridion besitzt eine ausreichend hohe effektive Mobilität, ist chemisch relativ innert und wird durch Stromstärken im µA-Bereich elektrolytisch nicht zersetzt [Meißner, T. 2002]. Die Probe wird an der Grenzfläche der beiden Elektrolyte aufgebracht. Nach der Einstellung eines stationären Zustands bilden sich Zonen aus, die alle hintereinander mit einer konstanten Geschwindigkeit wandern. Man erhält nur ein Stufendiagramm und keine Peaks [Engelhardt, H. et al. 1994, Gebauer, P. and Bocek, P. 2002].

In dieser Arbeit wird als Trennmethode die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) benutzt. Sie wird im Folgenden nur Kapillarenelektrophorese (CE) genannt.

1.2 Elektrochemische Detektion

Die Detektion in der CE stellt eine besondere Herausforderung dar, bedingt durch die kleinen Dimensionen der Kapillaren und den damit verbundenen geringen Probenmenge. Obwohl elektrochemische Detektoren im Routinebetrieb 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. Für die CE bieten sich die Voltametrie und Amperometrie als elektrochemisches Nachweisverfahren an.
In dieser Arbeit wurde die Amperometrie als Detektionsmethode angewendet und wird im Folgenden näher erläutert.

1.2.1 Amperometrieprinzip

Die Fortschritte bei den Mikrostrukturierungs- und Mikrofluidiktechniken förderten eine Rückbesinnung auf analytische Methoden wie die Amperometrie, die sich einfach miniaturisieren lassen. So werden Mikroelektroden zunehmend als Detektorelement in der Kapillarelektrophorese eingesetzt. Besondere Bedeutung unter den elektrochemischen Detektionsverfahren kommt der amperometrischen Detektion zu, da sie eine gute Selektivität bei hohem Nachweisvermögen mit sich bringt. Bei der Amperometrie handelt es sich um eine potentiostatische Technik, d.h. es wird ein sich ändernder Strom bei einer konstanten Spannung gemessen. Durch ein vorgewähltes Potential kommt es zu einem erzwungenen Elektronentransfer zwischen den Analytionen an einer Elektrode. Der resultierende Strom *I* ist ein Maß für die pro Zeiteinheit an der Elektrodenoberfläche umgesetzten Moleküle, sprich ihrer freiwerdenden Ladungsträger.

$$I = z \cdot F \cdot A \cdot j \qquad \text{Gl.1.16}$$

Der Strom ist der Anzahl der pro Molekül übertragenen Elektronen *z*, der Faraday Konstante $F = 9{,}64853 \cdot 10^7$ [As/kmol], der Elektrodenfläche *A* [cm^2] und der Anzahl der pro Zeiteinheit an der Elektrode umgesetzten Molekülen *j* proportional. Der Transport der elektrochemisch aktiven Substanz (Probe) kann dabei durch Diffusion, Konvektion und Migration erfolgen. Im Fall der µ-CE kommt als treibende Kraft die Migration (Transport über die Elektrode) in Folge von EOF und Elektrophorese zum tragen.
Für amperometrische Messungen wird im allgemeinen das Elektrodenpotential sehr viel kleiner oder größer als das Standardpotential gewählt, so dass nicht der Elektronentransfer durch die Phasengrenzfläche, sondern die Transportprozesse geschwindigkeitsbestimmend sind. Die Messungen können entweder mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Technik (Mess- und Gegenelektrode) oder mit der Drei-Elektroden-Technik (Mess-, Gegen- und

Referenzelektrode) durchgeführt werden. Im Drei-Elektrodensystem wird der Strom über eine Hilfselektrode abgeführt, die Referenzelektrode bleibt damit stromlos und Potentialschwankungen können auf diese Weise vermieden werden [Hauser, P. et al. 1999]. In dieser Arbeit wurden amperometrischen Messungen ausschließlich im Zwei-Elektrodensystem durchgeführt.

1.2.2 Amperometrische Enzymsensoren

Biosensoren basieren auf der direkten räumlichen Kopplung einer immobilisierten biologisch aktiven Substanz (Erkennungselement) mit einem Signalwandler (Transducer) und einem Verstärker. Die Biosensoren werden entweder nach verwendeten Transducer oder nach der Biokomponente klassifiziert. Die Umwandlung der molekularen Erkennung kann optisch (Absorption, Fluoreszenz, Raman-Streuung), elektrochemisch (amperometrisch, potentiometrisch, konduktometrisch) oder thermisch (Thermistor) erfolgen.

Als Bioerkennungselemente werden Enzyme, Antikörper, Bakterien und nicht-immunochemische Rezeptoren (Lektine, Avidin-Biotin) verwendet [Keusgen, M. 2002]. Ähnlich dem Schloss-Schlüssel-Prinzip wird die zu messende Substanz durch die biologische Komponente selektiv und sehr sensitiv erkannt. Amperometrische Enzymsensoren sind die größte und wichtigste Gruppe unter den Biosensoren. Bei amperometrischen Enzymsensoren werden Redoxenzyme (Oxinasen, Dehydrogenasen, Peroxidasen) mit Elektroden kombiniert. Der Stromfluss wird dabei nach enzymatischer Umsetzung des Analyten durch Elektronenübertragung vom Enzym zur Elektrode erzeugt. Es wird ein Messsignal erzeugt, das durch den amperometrischen Signalwandler (Transducer) in ein Stromsignal gewandelt und durch das Messgerät ausgelesen, angezeigt und gespeichert wird. Als Mediatoren können synthetische Redoxpaare wie beispielweise Ferricen/Ferrocen oder Chinone dienen. Mediatoren müssen nicht nur reversible Redoxpaare sein, sondern auch schnell mit den Enzymen reagieren.

Als Integration von biologischen Erkennungselementen und Transducer vereinigen Biosensoren die Vor- und Nachteile der Komponenten (Tabelle 1-1). Der wesentliche Vorteil der Biosensoren liegt in der Möglichkeit der Miniaturisierung [Gründler, P. 2004].

Unter Nutzung der Dickschichttechnologie auf Keramik- oder Kunststoffträgern werden amperometrische Transducer in Form planarer Chip-Strukturen gefertigt und auf einer Arbeitselektrodenoberfläche mit der sensitiven und selektiven biologische Komponente beschichtet. Als Referenzelektrode dient eine Schicht aus Silber- und Silberchloridpartikeln. Als Arbeits- und Gegenelektrode dienen Schichten aus Glaskohlepartikeln oder Edelmetallen

[Gründler, P. 2004]

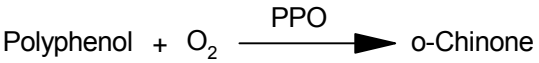
Tabelle 1-1 Integrierte Analysensysteme in der Bioanalytik

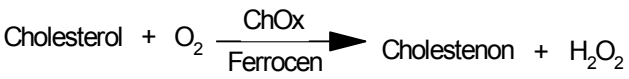
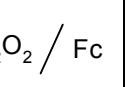
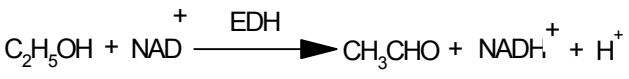
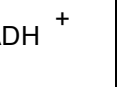
	Vorteile	**Nachteile**
Teststreifen	- einfache Handhabung	- nicht kalibrierbar - „halbquantitative“ Ergebnisse
Biosensoren	- kontinuierliche Konzentrationsmessung - Miniaturisierung möglich	- beschränkte Variationsbreite der Komponenten
µTAS	- hohe Flexibilität durch unterschiedliche Komponenten - effektive Stofftrennung - geringer Substanzverbrauch	- hohe Entwicklungs- und Produktionskosten - Beschränkung durch kleine Kanäle (Verstopfung)
Biochips/ Arrays	- parallele Multianalytbestimmung - geringer Probenverbrauch	- hohe Chip-Preise - beschränkte Reproduzierbarkeit - teuere Auswertegeräte

Praxistaugliche Enzymelektroden mit direkter kovalenter Bindung an kompakte Festkörperoberflächen sind noch relativ selten. Ein Beispiel ist ein amperometrischer Sensor mit Meerrettichperoxidase (HRP), die an eine mit Cyanurchlorid funktionalisierte Graphitoberfläche gebunden wurde. Ein spezielles Problem aller Enzymsensoren ist ihre begrenzte Lagerfähigkeit, die aus der schlechte Haltbarkeit der Enzyme resultiert. Es gibt auch Möglichkeiten, die Lagerfähigkeit durch chemische Behandlung zu verbessern. Eine Möglichkeit wäre die Enzyme über kovalente chemische Bindungen an Festkörperoberflächen zu immobilisieren. Die Bindung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst muss die Elektrodenoberflöche so vorbereitet werden, dass geeignete Ankergruppen vorhanden sind. Meist werden nucleophile Gruppen erzeugt, wie z.B. Carboxyl-, Hydroxyl-, Aminosäure-, Thiol-, und phenolische Gruppen. Nach dem chemischen Aktivierungsschritt wird die aktive Substanz an die Oberflächengruppe gebunden.

In Abhängigkeit von dem verwendeten Enzym oder Enzymsystem sind eine Vielzahl unterschiedlicher Analyte detektierbar (Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2 Amperometrische Enzymsensoren

Probe	**Enzym**	**Reaktion**	**Anzeige**
Polyphenole	Polyphenol-oxidase		o-Chinon

Probe	**Enzym**	**Reaktion**	**Anzeige**
Cholesterol	Cholesterol-oxidase		
Ethanol	Alkoholdehy-drogenase		

1.3 Lab-on-a-chip-Systeme

Das dahinterstehende Konzept wird µ-TAS genannt, was für „Miniaturized Total Analysis System“ steht: Ein kleines, transportables Gerät, das dem Anwender innerhalb von Sekunden direkt vor Ort die chemische Zusammensetzung einer beliebigen Probe mitteilt. Durch diese Technologie wird das gesamte analytische Labor miniaturisiert, wobei Trennung, Detektion und Flüssigkeitstransport in einem Mikrosystem auf einem Chip ausgeführt werden [Wollenberger, U. et al. 2003]. Neben der Bezeichnung µTAS hat sich in den letzten Jahren der Begriff Lab-on-a-chip für Systeme etabliert, die eine Durchführung aller für eine Analyse notwendigen Teilschritte auf einem Chip erlauben. Bei diesen Systemen wird großer Wert darauf gelegt, dass einzelne Komponenten, wie beispielsweise das Fluidiksystem, separat getauscht werden können. Im Gegensatz zur Elektronik muss dieses nach ein paar Messungen ausgetauscht werden. In dieser Arbeit wird die Elektronik nicht auf den Chip integriert.

Der Begriff *Chip* bedeutet ein Substrat aus Glas, Silikon oder Plastik. In dieser Unterlage werden Fließkanäle geformt, über die thermisch eine Deckplatte aufgebracht wird. Transport und Durchmischung erfolgen meist durch elektroosmotischen Fluss. Lab-on-a-Chip-Systeme mit mikrofluidischen Kanalstrukturen und integrierten Analytik finden zunehmende Interessen bei der Realisierung von sehr kompakt aufgebauten Mikroanalysesystemen. In vielen Bereichen der biotechnologischen Forschung und Industrie, der Pharmazeutik sowie in der chemischen Prozesstechnik ist es immer häufiger erforderlich, geringste Probenmengen in kürzester Zeit bei gleichzeitig hohem Durchsatz und bei niedrigen Kosten zu analysieren. Ein Haupteinsatzgebiet der mikrofluidischen Analytik liegt in der Analyse von DNA Fragmenten, hierbei spielt vor allem die Schnelligkeit und das geringe Probenvolumen eine wichtige Rolle. Immer mehr Kunststoffsubstrate finden Einzug in diesen Analysezweig [Liu, Y. et al. 2001]. Angaben der Firma Affymetrix (Santa Clara, Kalifornien) zufolge, einem Pionier bei der Herstellung von mit DNA beladenen Chips, ist es heute tatsächlich möglich, dass in einer Kassette aus Plastik, die kleiner ist als eine Kreditkarte, sieben verschiedenen experimentelle

Tätigkeiten ausgeführt werden, nachdem eine zuvor extrahierte DNA-Probe in eine Aufbewahrungskammer eingespritzt worden ist (Abb. 1-11).

Abb.1-11 DNA-Chips der Firma Affymetrix

Ein zweites Anwendungsgebiet ist die klinische Diagnostik. Ein Beispiel für solche Mikro-Labore ist der Liliput®-Chip, der in der klinischen Mikrobiologie zur Identifikation von Mikroorganismen und zum Screening von Antibiotikaresistenzen eingesetzt wird (Abb.1-12).

Abb.1-12 Der Lilliput®-Chip wird zur Feststellung von Antibiotika-Unverträglichkeiten eingesetzt

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Lebensmittelanalytik zu nennen [Dong, Y. 1999], wo Proteine und Aminosäuren, Kohlenhydraten und Vitamine detektiert werden können [Voegel, P. et al. 2005]. Es sollen die Qualität von Lebensmitteln gesichert werden, oder diese auf ihren Schadstoffgehalt hin untersucht werden.

Eine kostengünstige Produktion von mikrofluidischen Lab-on-a-Chip-Systemen auf Polymerbasis ist mit den gängigen Fertigungstechniken der Mikrosystemtechnik möglich. Die Vielfalt der zur Verfügung stehenden Materialien erlaubt dabei, den spezifischen Anforderungen an die Produkte gerecht zu werden. Die biokompatiblen und beschichtbaren Kunststoffe werden für die Diagnostik, sterilisierbare Kunststoffe für medizinische Applikationen sowie transparente Kunststoffe für optische Anwendungen genutzt.

1.4 Messplatzaufbau

Um eine effektive Untersuchung eines CE-Chip zu ermöglichen, sollte ein geeigneter Messplatz gebaut werden. Ein mikrofluidischer Messplatz besteht aus einem Hochspannungsnetzgerät, der für den Aufbau des elektrischen Feldes verwendet wird. Mit Hilfe eines Potentiostaten wird das Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode eingestellt. Die Messparameter werden bei der hier verwendeten Apparatur über einen PDA-Computer eingestellt. Die Auswertung der Daten erfolgt nach der Übertragung vom PDA zum Rechner anhand der PDA-Software. Der Kapillarchip wurde mit einer Plexiglashalterung fixiert. In Abbildung 1-13 ist ein solcher Messplatz schematisch dargestellt.

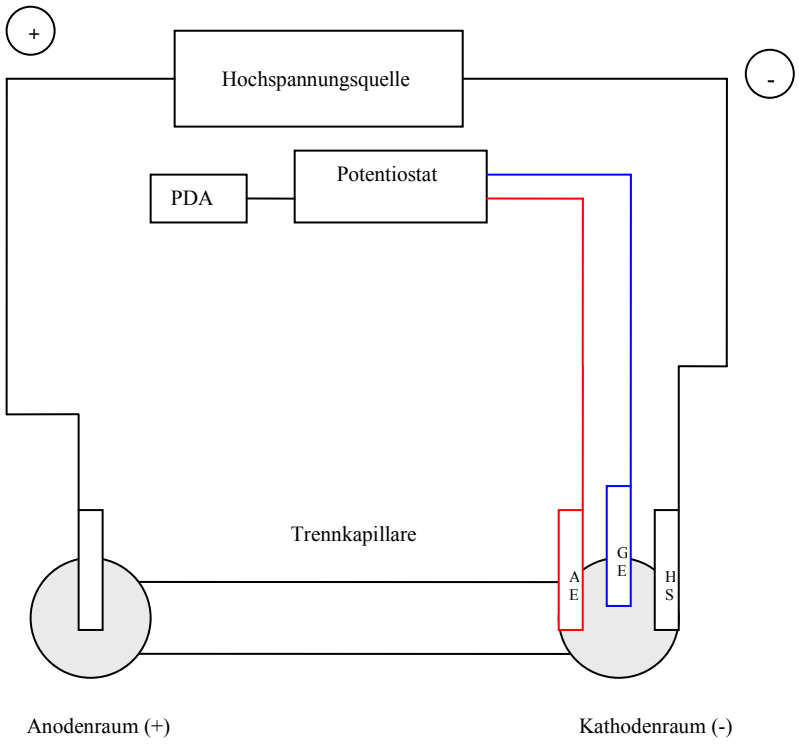


Abb. 1-13 Schematische Darstellung des mikrofluidischer Messplatz für die amperometrische Detektion

Bei der elektrochemischen Detektion hat der Positionierung der Elektrode Einfluss auf das Analysensignal. In dieser Arbeit wurden die Elektroden vor dem Kapillarausgang positioniert, wobei der Kapillarinnendurchmesser der Trennkapillare wesentlich kleiner als der Elektrodendurchmesser ist. Die Kapillare steht senkrecht zur Elektrodenoberfläche; dabei verteilt sich der Analyt nach Austritt aus der Kapillare radial über die Elektrodenoberfläche.

1.5 Probenaufgabe

Die reproduzierbare Aufgabe der kleinen Probenvolumina ist für die Quantifizierung bzw. die Standardabweichung bei der Analyse ein wichtiger Gesichtspunkt. In der CE werden nur kleine Probenvolumina benötigt, um eine hohe Effektivität zu erhalten. Die Aufgabe der Probe kann in zwei Injektionsarten geschehen: Druck- und elektrokinetische Injektion.

Druck-Injektion wird durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Einlassseite und Kapillarende. Die aufgegebene Probenmenge berechnet sich nach

$$Q = \frac{\Delta p \cdot t_i \cdot c \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot L} \qquad \text{Gl. 1.17}$$

und ist von der Druckdifferenz p, der Kapillarlänge L, der Viskosität η, der Injektionszeit t_i und vor allem dem Kapillarradius r abhängig. Die Berechnung des Injektionsvolumes basiert auf dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz (Gl. 1.17) und ist stark abhängig von Parametern, die teilweise nur unzulänglich bekannt sind. Als Beispiel hierfür ist die Viskosität η zu nennen.

Bei der elektrokinetischen Injektion wird für eine festgelegte Zeit eine einstellbare Spannung zwischen beiden Ende der Kapillare angelegt. Aufgrund elektrokinetischer Effekte wird eine Flüssigkeitsströmung in der Kapillare erzeugt [Engelhardt, H. et al. 1994]. Die aufgegebene Probenmenge ist bei diesem Injektionsverfahren von der Höhe der angelegten Spannung U_i, der Konzentration der Probe c in der Probenlösung, der Zeit t_i, in der die Spannung anlieg, und der Mobilität der Probenkomponenten μ abhängig, wobei L die Gesamtlänge der Kapillare ist:

$$Q = \frac{\left(\mu_p + \mu_{EOF}\right) \cdot U_i \cdot t_i \cdot c \cdot \pi \cdot r^2}{L} \qquad \text{Gl. 1.18}$$

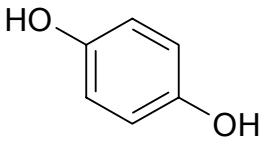
Bevor die Probe injiziert wird, sollen die Pufferreservoirs und die Trennkapillare mit der Elektrolytlösung befüllt werden. Nachdem das geeignete Potential angelegt wird, migriert die Probe in Richtung Kapillaroutlet.

1.6 Modellsubstanzen als Analyte (Polyphenole)

Für die amperometrische Messungen wurden Polyphenole als Testsubstanzen verwendet, wie z.B. Hydrochinon, Pyrogallol, Gallussäure, Resorcin und Dopamin. Polyphenole, früher auch unter den Begriffen „Tannine“ bzw. „Gerbstoffe“ bekannt, bilden eine Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe. Als Bestandteile pflanzlicher Lebensmittel sind eine Reihe dieser Verbindungen für die Farbgebung von Lebensmitteln (z.B. die Anthocyane in Rotwein, Rotkohl, Erdbeeren) verantwortlich. Was die lebensmittel relevante Wirkung dieser phenolischen Verbindungen anbetrifft, so sind die bekanten negativen (Verfärbungen,

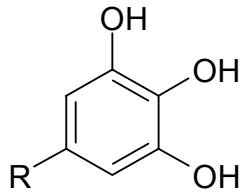
Trübungen, Geschmackbeeinflussung, Enzyminhibierung) und positiven Effekte (Farbgebung, antioxidative Wirkung, antimikrobielle Wirkung) zu erwähnen [Kroll, J. et al. 2003 und Rawel, H. et al. 2000]. Polyphenole zeichnen sich durch sehr vielfältige physiologische Wirkungen wie z. B. antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, entzündungshemmende, blutdruck- und blutglucosebeeinflussende Wirkungen aus [Dreosti, I.E. 1996, Yang et al. 2001, Mukhtar, H. und Ahmad, N. 2000]. Polyphenole mit Pyrogallol-, Catechol-, Galloyl- oder 3-Hydroxy-4-carbonylgruppen besitzen die Eigenschaft, mit dreiwertigem Eisen Komplexe zu bilden. Diese Wirkungsweise beruht auf dem nukleophilen Charakter des aromatischen Ringes dieser Phenole [Moran, J.F. et al. 1997, Hallberg, L. und Hulthen, L. 2000]. Aus diesen Gründen es ist von großem Interesse, Phenole mittels Kapillarelektrophorese aus Mischungen zu detektieren.

Hydrochinon



Hydrochinon ist in einer Reihe von Pflanzen vorhanden, so z.B. als Glucosid (Arbutin) in den Blättern der Bärentraube sowie in Preiselbeeren (Blätter und Blüten). Das Chinon/Hydrochinon-Redoxsystem spielt eine wichtige Rolle in der Atmungskette sowohl bei Tiere als auch bei Pflanzen.

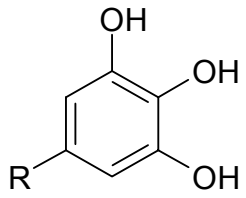
Pyrogallol



R = H: Pyrogallol

Medizinisch wurde Pyrogallol früher äußerlich bei Psoriasis angewendet. Aufgrund der ausgeprägten Toxizität spielte Pyrogallol heute auf dem kosmetischen und pharmazeutischen Sektor nur noch eine untergeordnete Rolle. Eine Reihe von Antioxidantien und Stabilisatoren für Treibstoffe, Hydrauliköle, Schmierfette und synthetischen Polymere leiteten sich von Pyrogallol bzw. seinen Derivaten ab.

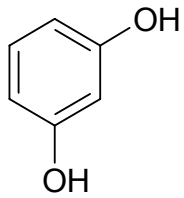
Gallussäure



R = COOH: Gallussäure

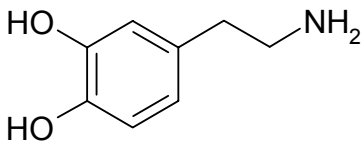
Gallussäure kommt hauptsächlich in holzigen Pflanzen vor, und zwar in löslicher Form gebunden an Glucose, als hydrolysierbares Gallotannin oder als Chinasäureester [Harborne, J. 1980]. Gallussäure kann zur Herstellung von Antioxidantien, Sonnenschutzmitteln und Farbstoffen sowie als Reduktionsmittel verwendet werden.

Resorcin



Medizinisch fand Resorcin äußerlich als Antiseptikum bei Hautkrankheiten und als mildes Ätzmittel Verwendung; es wirkt keratolytisch.

Dopamin



Als biogenes Amin kann Dopamin im Organismus durch Decarboxylierung von L-Dopa als Produkt des Tyrosin-Stoffwechsels entstehen. Dopamin kann als Sympathikomimetikum und kann zur Steigerung des arteriellen Blutdrucks eingesetzt werden.

1.7 Eigenschaften der untersuchten Substraten

1.7.1 Trägermaterialien

Nachdem die ersten µCE-Systeme in Silizium als Trägermaterial gefertigt wurden, hat sich die Verwendung von photostrukturierbarem Glas aufgrund der besseren optischen, elektrischen und chemischen Eigenschaften als geeigneter erwiesen. So können zum Transport von Flüssigkeiten und zur Trennung der Probe höhere Spannungen angelegt werden und eine optische Detektion wird durch die Transparenz des Materials erleichtert. Durch die Oberflächenbeschaffenheit des Glases wird darüber hinaus gewährleistet, dass sich

Reaktionen zur Beschichtung der Kapillaren problemlos von konventionellen Systemen auf einen Chip übertragen lassen. Trotz der beschriebenen Vorteile ist die Strukturierung des Glases jedoch nur mit instrumentell aufwendigen photolithographischen Methoden zu erzielen, so dass sich in den letzten zwei bis drei Jahren die Untersuchungen zu neuen Materialien und alternativen Herstellungsverfahren verstärkt haben. Von besonderem Interesse sind hierbei preiswerte Substrate wie organische Polymere, in die über Heißprägen [Becker et al. 2000] oder Laser-Ablation [Roberts et al. 1997] ein mikrofluides Kapillarnetzwerk abgebildet werden kann.

Die Oberflächenchemie für verschiedene Schichten ist auf Glas bereits etabliert, auf Kunststoff müssen jedoch alternative Konzepte erstellt werden. Kunststoffe sind lösungsmittelempfindlich, zum Teil hitzelabil und haben meist nur wenige funktionelle Gruppen, die sich für eine Kopplungschemie eignen.

Keramik, Polycarbonat und Polystyrol dienen im Rahmen dieser Arbeit als Trägermaterialien zur selektiven Bindung der Meerrettichperoxidase (HRP) als Modell-Immobilisat an deren Oberflächen. Im Folgenden werden die Trägermaterialien Keramik, Polycarbonat und Polystyrol nacheinander beschrieben und charakterisiert. Es wurden auch Verfahren zur gezielten Oberflächenmodifikation erarbeitet.

1.7.1.1 Keramik

Die "Substrate" werden immer kleiner, müssen aber immer mehr Eigenschaften haben. Daher wird intensiv nach neuen Materialien mit immer besseren Eigenschaften gesucht. Eines ist die "Low Temperature Cofired Ceramic" (LTCC). Der Kern dieser Technologie sind niedrig sinternde flexible Keramikfolien. Diese grünen (= ungebrannten) Folien werden mechanisch strukturiert, in bewährter Dickschichttechnik bedruckt, laminiert und dann bei 900°C gesintert (Abb.1-14). Das Ergebnis ist ein hochintegriertes, 3-dimensional vernetztes Multilayer-Board aus Keramik.

Abb.1-14 Ungebrannten Folien, wie sie zur Herstellung von LTCC-Multilayern verwendet werden

LTCC besteht vor dem Sintern im Wesentlichen aus Aluminiumsilikate wie beispielsweise $[Al_2(OH)_4(Si_2O_5)]$ mit hohem Glasanteil. Dazu kommen Weichmacher, um die Folie geschmeidig zu halten, Binder und organische Inhaltsstoffe. Die organischen Stoffe verbrennen während des Sinterns. Dank ihrer besonderen Zusammensetzung und ihres Glaspartikelanteils erhält die Keramik schon bei niedrigen Temperaturen die gewünschte Härte. Während entsprechende Keramiken bislang bei 1600 °C gesintert wurden, erhalten die zunächst lederartigen LTCC-Keramikfolien ihre Form bereits bei einer Temperatur von 900 °C. LTCC ermöglicht die Herstellung von Strukturen im Bereich von einem zehntel Millimeter.

LTCC ist insbesondere bei kleinen und mittleren Stückzahlen eine kostengünstige Alternative. Anwendungsgebiete lägen beispielsweise in der Mobilfunk-, Satelliten- und Medizintechnik.

1.7.1.2 Polycarbonat

Polycarbonat ist ein hochkristalliner und damit durchsichtiger Kunststoff mit hoher Temperaturbeständigkeit. Ihre Struktur ist in Abb.1-15 dargestellt.

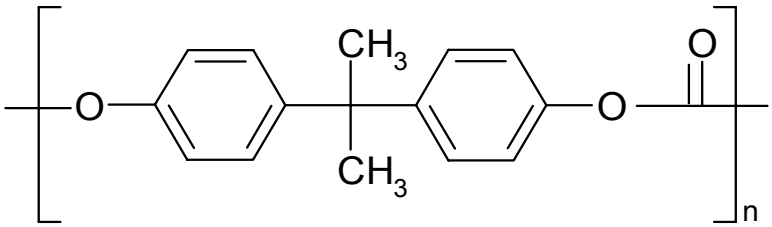


Abb. 1-15 Polycarbonat-Strukturformel

Tabelle 1-3 Beständigkeit des Polycarbonats gegen Chemikalien

Medium	**Dauer**	**Beständigkeit**	**Bemerkung**
Aceton		-	Quellung
Butanol	180 Tage	+	
Chloroform		-	gelöst
Dioxan		-	
Essigsäure	180 Tage	+	
Ethanol	180 Tage	+	
Heptan	180 Tage	+	

Medium	Dauer	Beständigkeit	Bemerkung
Kaliumhydroxid		-	
Natriumhydrogencarbonat	180 Tage	+	
Natriumhydroxid		-	
Wasserstoffperoxid	180 Tage	+	

+ beständig - nicht beständig

Die oben tabellierten Daten wurden uns von der Firma Bartels Mikrotechnik Dortmund zur Verfügung gestellt.

Bei der Modifizierung von nicht benetzbaren Kunststoffoberflächen sind die nasschemischen Verfahren nicht immer geeignet. Eine weitere Methode zur Funktionalisierung von Kunststoffoberflächen ist die Plasmabehandlung. Sind Gasmoleküle in der Plasmaphase, so werden diese radikalisch. Diesen Effekt kann man dazu benützen, um Oberflächen z.B. mit Sauerstoff zu oxidieren. Dabei entstehen Aldhyde und Carboxy-Gruppen an der Oberfläche [Friedrich, J. et al. 1995].

Trotzdem sind Kunststoffe als Ausgangsmaterialien gefragt: Sie lassen sich hervorragend formen und preiswert in Massen produzieren, beispielsweise für die μTAS. Diese sind als schnelle und exakte Mikrolabore für den Einmal-gebrauch konzipiert.

1.7.1.3 Polystyrol

Polystyrol ist ein Kunststoff, der seit 1930 durch radikalische Polymerisation von Styrol hergestellt wird (Abb. 1-16). Reines Polystyrol (PS) ist hart, farblos und spröde. Auffällig ist der brilliante Oberflächenglanz. Gegenüber Säuren, Laugen und Alkohol ist Polystyrol beständig. Es wird jedoch von vielen unpolaren Lösungsmitteln angegriffen. Polystyrol besitzt eine geringe Zähigkeit und hat eine wasserhelle Transparenz.

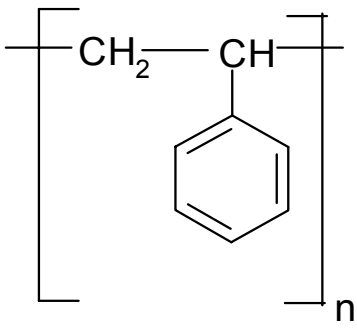


Abb. 1-16 Polystyrol-Strukturformel

Polystyrol findet in der medizinischen Forschung breite Anwendung und zeichnet sich durch chemische Beständigkeit, geringe Toxizität und leichte Funktionalisierbarkeit aus. Es wurden uns von der Firma Bartels Mikrotechnik Dortmund folgenden Daten zur Verfügung gestellt:

Tabelle 1-4 Beständigkeit des Polystyrols gegen Chemikalien

Medium	**Dauer**	**Beständigkeit**	**Bemerkung**
Aceton		-	gelöst
Butanol		+	
Chloroform		-	gelöst
Dioxan		-	
Essigsäure	1 Jahr	+	
Ethanol	1 Jahr	+	
Heptan	1 Jahr	+	
Kaliumhydroxid	1 Jahr	+	
Natriumhydrogencarbonat	1 Jahr	+	
Natriumhydroxid	1 Jahr	+	
Wasserstoffperoxid	1 Jahr	+	

+ beständig - nicht beständig

Nicht nur für Anwendungen der Biomedizintechnik ist es wichtig, die chemische Zusammensetzung von Kunststoffoberflächen verändern zu können. Die chemisch inerten Kunststoffe müssen vor einer Weiterverarbeitung aktiviert oder mit anderen spezifischen Funktionen ausgestattet werden. Nasschemische Verfahren sind meist ungeeignet, denn sie verändern in nicht tolerierbarer Weise das Material. Plasmaverfahren dagegen sind geradezu prädestiniert für die Modifikation empfindlicher Polymermaterialien: Sie wirken nur auf die oberen Moleküllagen der Kunststoffoberfläche ein und verändert nicht die grundlegenden Eigenschaften dieses Werkstoffes. Plasmakomponenten mit inerten Kunststoffoberflächen führen zum Einbau von chemischen Gruppen und damit zu deren Hydrophilierung. Dabei sind Plasmaprozesse äußerst vielseitig: Sie können Oberflächen aktivieren, funktionalisieren oder sehr dünne langzeitstabile Schutzschichten deponieren.

Inhalt des Projektes ist auch die Testung von plasmabehandelten Materialien in Versuchen zur Aktivierung, Reinigung, Beschichtung und Funktionalisierung. Lokalisierten Plasmen lassen sich auch nutzen, um auf Oberflächen gezielt Strukturen durch partielle Behandlung zu erzielen (Abb. 1-17). Dem eingesetzten Prozessgas entstehen beispielweise polare Gruppen an der Oberfläche der Kunststoffpartikel. Der so behandelte Kunststoff ist anschließend benetzbar.

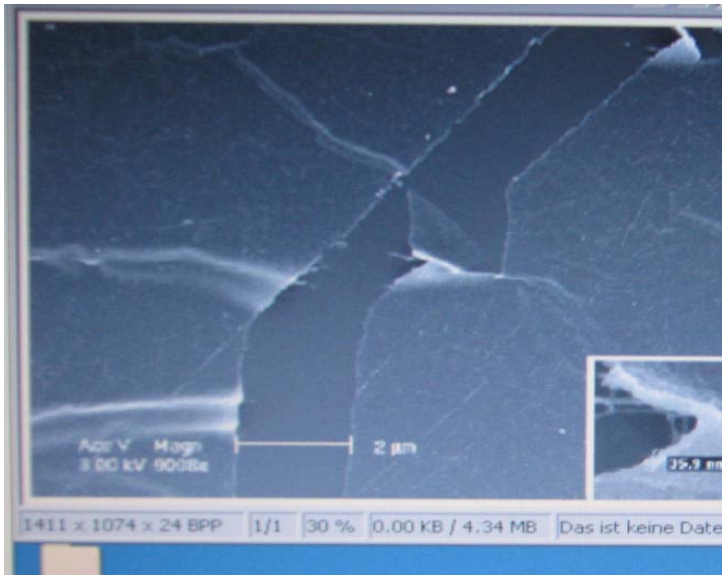


Abb. 1-17 Die Aufnahme zeigt eine a-C:H Schicht, die auf einer Polystyroloberfläche plasmadeponiert wurde und uns von der Firma NTTF GmbH Rheinbreitbach zur Verfügung gestellt.

Die bisherigen Arbeiten haben eine Vielzahl von Anwendungen gezeigt, bei denen durch den Einsatz von Plasmen Vorteile erzielt wurden. Beispiele sind die Aktivierung von Polymeren, Funktionalisierung von Biochips, Korrosionsschutz auf Stahlband, Haftvermittlung für Lacke und Klebemassen.

1.8 Enzymimmobilisierung

Bei der Immobilisierung können vier grundsätzliche Methoden unterschieden werden. Dazu gehören Adsorption, kovalente Bindung, Kopolymerisierung und Einschlußverfahren [Fagain, C.O. 1997]. Eine Immobilisierung von Enzymen, beispielweise Meerretichperoxidase, führt oftmals zu einer erhöhten Stabilität und Toleranz gegenüber denaturierenden Faktoren wie z.B. extremen pH-Werten und Temperaturen sowie Lösungsmitteln. Allerdings kann durch die Immobilisierung die Aktivität im Vergleich zum freien Enzym abnehmen. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher, die Stabilität der Meerretichperoxidase im Vergleich zu dem freien Enzym unter Erhalt ihrer Aktivität zu verbessern. Bei der Wahl der

Immobilisierungsmethode und geeigneter Trägermaterialien spielen prozesstechnische Gesichtspunkte eine Rolle, wie z.B. physikalische Eigenschaften der verwendeten Substrate.

1.8.1 Adsorptive Immobilisierung

Adsorption ist die einfachste Möglichkeit, bioaktive Substanzen an Oberflächen zu fixieren. Adsorption eignet sich für die Immobilisierung von Enzymen, Antikörpern und Nucleinsäuren. Bei **adsorptiv** gebundenen Enzymen durch hydrophobe, ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken ist die Bindungsstärke zwischen Protein und Substrat relativ schwach und reagiert daher sensitiv auf Veränderungen in der Umgebung (pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur). Dies erfordert eine strenge Kontrolle der Prozessbedingungen. Durch die Adsorptionskräfte werden die Proteine aber zum Teil so an die Oberfläche gebunden, dass ihre Tertiär- oder Quartärstruktur und damit die biologische Funktion zerstört werden. Vorteilhaft ist bedingt durch die Reversibilität der Bindung jedoch die einfache Regenerierbarkeit des Immobilisates im Falle einer Inaktivierung.

1.8.2 Kovalente Immobilisierung

Enzyme, Antikörper und Nucleinsäuren und andere bioaktive Substanzen können über kovalente chemische Bindungen an Festkörperoberfläche immobilisiert werden. Im Gegensatz zur Adsorption wird aber eine sehr feste Bindung erreicht. Bei einer **kovalenten** Kopplung eines Proteins an einen festen Träger werden eine oder mehrere Aminosäureseitenketten modifiziert. Die meisten Kopplungsreaktionen beruhen auf nukleophilen Angriffen durch Amino-, Thiol, Hydroxyl- und Phenolgruppen. Die Kopplungsreaktionen sollen spezifisch, schnell und nahezu quantitativ verlaufen. Im Allgemeinen werden solche Kopplungen oder Immobilisierungen mit Epoxiden oder Carbonsäuren, insbesondere aktivierten Succinimidylestern oder Carbonsäurechloriden, erreicht [Jones, G.L. et al. 1989]. Alle genannten Reagenzien benötigen eine Amino- oder eine Hydroxygruppe zur Reaktion. Meist wird die Reaktion mit einer Aminogruppe angestrebt, da das entstehende Carbonsäureamid stabiler ist als der Ester, der bei der Reaktion mit einer Hydroxygruppe entsteht. Für die Bereitstellung der aktiven Form des Proteins ist die kovalente Kopplung an eine Oberfläche möglich. Für diese Form der Immobilisierung wird üblicherweise eine Oberfläche gewählt, die Proteine gar nicht oder nur in geringem Maße adsorbiert. Die Oberfläche wird dann z. B. durch eine der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methoden funktionalisiert, so dass eine Reaktion mit Proteinseitenketten erfolgen kann. Die Reaktion der Proteinseitenketten mit der Trägeroberfläche findet meist direkt statt. Wenn eine

gewisse Beweglichkeit des Proteins erforderlich ist oder wenn Protein und Oberfläche sich in ihren Oberflächeneigenschaften stark unterscheiden, findet die Kopplung über einen so genannten Spacer statt [Soyez, H. et al. 1996].

1.8.3 Spacerchemie

Spacer sind im Allgemeinen bifunktionelle Moleküle, die als Kopplungsreagenzien eingesetzt werden. Die Spacermoleküle können aliphatische, aliphatisch-aromatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Heterozyklen oder Polyether sein. Sie gewährleisten durch gleichzeitige Bindung an eine Polymeroberfläche einerseits und an ein biologisch aktives Molekül andererseits einen für die biologische Funktion notwendigen Abstand. Durch einen zusätzlichen Reaktionsschritt werden Träger oder Spacer aktiviert und dadurch zur Reaktion mit Proteinen befähigt. Ihre Funktion ist in Abb. 1-17 verdeutlicht. In Abb. 1-18**A** ist ein direkt an eine Oberfläche gekoppeltes Substrat für ein sehr viel größeres Enzym gezeigt. Trotz der passenden ‚Schlüssel-Schloß' Kombination kann hier keine Erkennung stattfinden. In Abb. 1-18**B** ist das Substrat über ein anderes Molekül, den *Spacer*, an die Oberfläche gekoppelt und erhält so den notwendigen Abstand und eine erhöhte Beweglichkeit, um seine Bindungsstelle zu erkennen. Der notwendige Abstand des Substrates von der Oberfläche ist in erster Linie vom System abhängig.

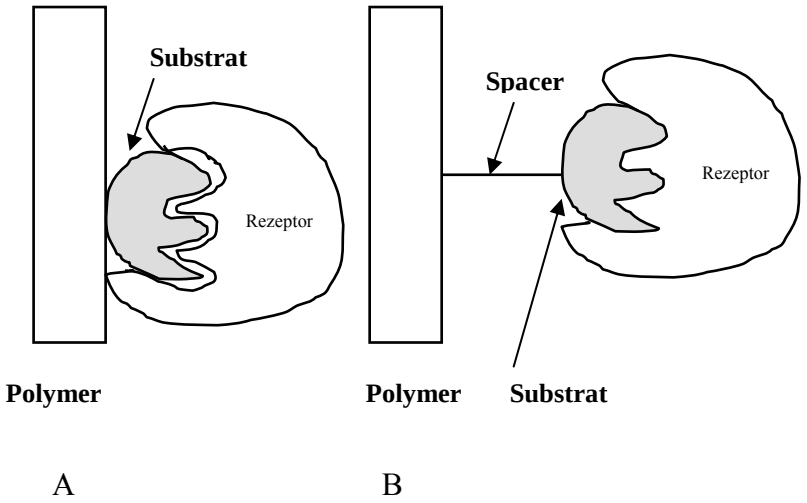


Abb. 1-18: Schematische Darstellung der Funktion eines Spacers bei der Erkennung und Bindung eines oberflächengekoppelten Substrates mit dem entsprechenden Rezeptor (**B**). Eine Bindung des Substrates an dem Rezeptor kommt bei einer direkten Kopplung des Substrates an die Oberfläche nicht zustande (**A**)

Die Wahl des Spacers ist maßgeblich von dem zu erzielenden Abstand abhängig. Für kleine Abstände werden meist kurze homobifunktionelle Reagenzien benutzt wie zum Beispiel Carbodiimide [Carraway, K.L. et al. 1972 und Kurzer, F. et al. 1967], Chloroformiate [Patramani, I. et al. 1969] oder Carbonyldiimidazole [Chang, S.I. et al. 1986]. Beispiele für einen einfachen, homobifunktionalen Alkylspacer stellt Hexamethylendiisocyanat (HDI) [Ozawa, H. 1967] dar; komplexere oder höhere Moleküle wie zum Beispiel Polyethylenglykole finden ebenfalls Verwendung [Harris, J.M. 1985 und Zalypsky, S. 1993]. Allgemein steigt mit zunehmender Spacerlänge die Beweglichkeit des gekoppelten Moleküls, und die Bindung eines Substrates an seinen Rezeptor wird verbessert.

1.9 Meerrettichperoxidase (HRP) als Modellprotein

Dieses Enzym Meerretichperoxidase HRP (horseradish peroxidase) wird aus der Wurzel der Meerrettichpflanze (*Armoracia rusticana* G. M. Sch.) gewonnen. Für diesen Glykoprotein beträgt das Molekulargewicht 40 000 Da und besitzt eine eisenhaltige Hämgruppe (Hämatin) als aktives Zentrum (Abb. 1-19). Der theoretische pI liegt bei pH 7,2 [Maehly, A. 1955]. Meerrettichperoxidase ist in Lösung braun gefärbt.

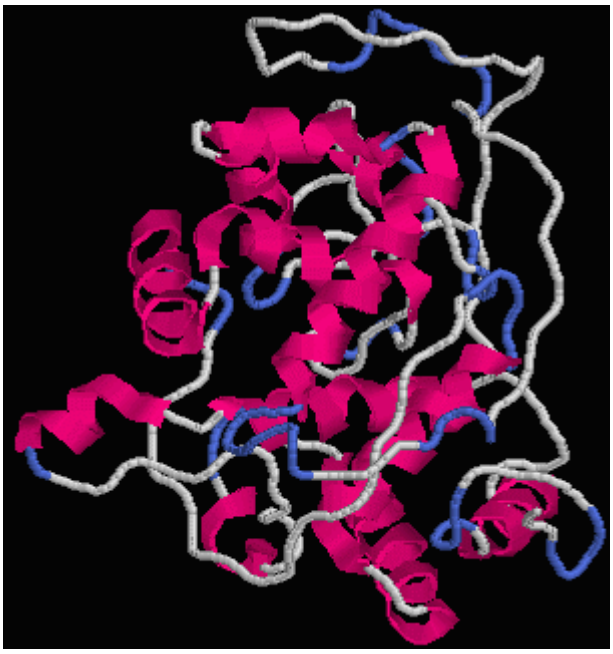


Abb. 1-19 Meerrettichperoxidase-Struktur

Das Protein ist als Enzym in der Lage, substratvermittelt mit verschiedenen Chromogenen unterschiedliche Farbreaktionen zu katalisieren. Dadurch eignet sich dieses Protein gut als immobilisierbares Modellprotein, das bequem nachgewiesen werden kann. Die Meerrettichperoxidase katalysiert ganz allgemein die Reaktion:

$$H_2O_2 + DH_2 \rightarrow 2H_2O + D$$

wobei DH_2 für die reduzierte, D für die oxidierte Form eines Donors steht. Als Donor kommen beispielweise Benzidin, besser aber Benzidin-Derivate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB) in Frage. Hierbei wird Wasserstoffperoxid reduziert. Das Enzym zeichnet sich durch sehr hohe Katalyseaktivität aus und ist relativ stabil. Durch die von dem Enzym katalisierte Reaktion wird ein farbloses Substrat in ein gefärbtes Produkt umgewandelt. Durch eine Einelektronen-Oxidation entsteht daraus ein blauen Kation-Radikal (Abb. 1-20), das bei der Zugabe von ausreichend Säure (H_2SO_4) durch ein weiteres Elektron vollständig oxidiert wird (gelb) [Josephy, P.D. et al. 1982].

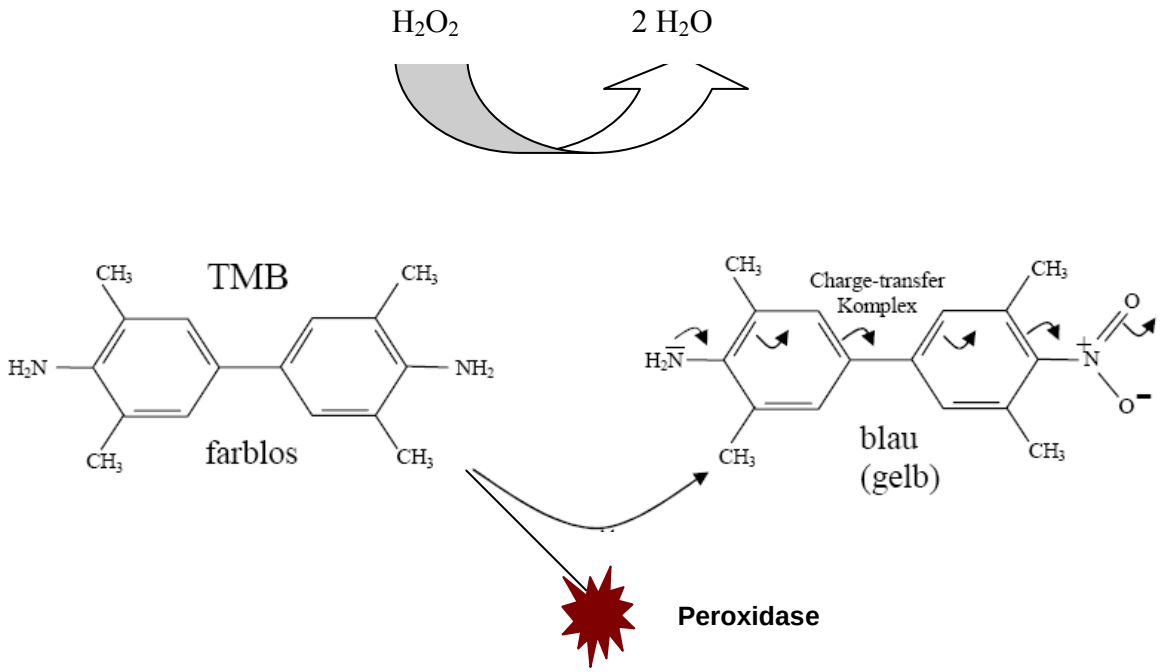


Abb. 1-20 Reaktionsschema zur Umsetzung von 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin durch HRP

1.10 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Projektes „Mikrokomponente für biochemische Analysensysteme" durchgeführt. Als essentieller Bestandteil von biochemischen Analysensystemen ist die Entwicklung von unterschiedlichen Mikrofluidik-Baugruppen vorgesehen. Kernpunkt dieser Entwicklung ist eine miniaturisierte Kapillarelektrophorese (CE), die als „Lab-on-a-Chip" ausgelegt sein soll. Dabei sind die zielgerichtete Modifikation der Oberfläche und die zuverlässige Integration von Elektroden in die benötigen Mikrostrukturen wesentliche Bestandteile des Vorhabens. Die Integration von Elektroden sollte zur Realisierung des Flüssigkeitstransportes und der Trennung von Analytgemischen über elektrische Felder verwendet werden. Diese Aspekte sollen in diesem Projekt schwerpunktmäßig berücksichtig und für unterschiedliche Anwendungen untersucht und optimiert werden. Dafür sollten verschiedene Materialien auf ihre Eignung bzw. Vor- und

Nachteile für verschiedene Chip-Anwendungen untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten einen Beitrag zur vergleichenden Charakterisierung der unterschiedlichen Material- und Fertigungsmöglichkeiten leisten, um den beteiligten Herstellerfirmen eine bessere Grundlage für zukünftige Produktentwicklungen zu geben. Mikrofluidik-Komponenten aus Polymermaterialien und Keramik sind für „Lab-on-a-Chip“-Applikationen von großem Interesse, da sie kostengünstig in größeren Stückzahlen hergestellt werden können. Bei derartigen Werkstoffen stellt sich jedoch oftmals das Problem, dass die Materialoberflächen für bioanalytische Trennsysteme typischerweise ungeeignet sind. Hier sollte eine Funktionalisierung der Materialoberflächen und Immobilisierungsmethoden untersucht werden. Des Weiteren sollten Modellsysteme zur Charakterisierung der eingesetzten Materialien entwickelt werden. Außerdem müssen die chemischen Wechselwirkungen der Trägeroberfläche mit dem Protein so beeinflusst werden, dass keine unerwünschten Effekte auftreten. Als Modellprotein sollte Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) immobilisiert werden, da dieses Enzym bequem nachgewiesen werden kann. Das Enzym ist in der Lage, mit verschiedenen Chromogenen unterschiedliche Farbreaktionen zu katalisieren. Die Menge des gebundenen Enzyms sollte eine Aussage über die Beschaffenheit der Oberfläche und der eingesetzten Immobilisierungsmethode ermöglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Oberfläche einer Polycarbonatkapillare so modifiziert werden, dass ein elektrophoretischer Transport oder eine Auftrennung von Polyphenolen möglich ist. Die Polyphenolgemische lassen sich kapillarelektrophoretisch auf Grund ihrer Migrazionszeiten trennen über einen einfachen elektrochemischen Detektor nachweisen. Polyphenole bilden eine Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe und zeichnen sich durch sehr vielfältige physiologische Wirkungen wie zum Beispiel antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative Wirkungen aus. Die Identifizierung dieser sekundären Pflanzenstoffe in dem unterschiedlichen Nahrungsmittel stellt enorme Anforderungen an die verwendeten Analysensysteme. Sie treten zum Teil nur im Spurenbereich auf und sind sehr lichtempfindlich. Die entsprechenden CE-Strukturen wurden von den Kooperationspartner Bartels Mikrotechnik GmbH angefertigt und zur Verfügung gestellt. Die Oberflächeneigenschaft hat, wie bereits erwähnt, einen entscheidenden Einfluss auf den Transport innerhalb der Kapillare. Die innere Oberfläche der Chip-Kapillaren sollte so modifiziert werden, dass ein gerichteter Flüssigkeitstransport und eine Auftrennung der gewünschten Analyte prinzipiell möglich ist. Durch gezielt einstellbare hydrophile Funktionen können die Fließ- und Trenneigenschaften der Kapillare kontrolliert beeinflusst werden. Um amperometrische Messungen durchzuführen, war zuerst notwendig, eine

Chiphalterung aufzubauen. Die Polycarbonat-Chips sollten anhand von phenolischen Modellsubstanzen hinsichtlich auf Trennleistung charakterisiert werden. Die elektrochemische Detektion ist eine wertvolle Ergänzung zur Fluoreszenzdetektion, da sie den Nachweis nicht-fluoreszierender Substanzen mit oxidierenden oder reduzierenden Eigenschaften gestattet, wie z.B. allgemein von Lebensmittelinhaltsstoffen mit antioxidativer Wirkung (Phenole, Flavonoide). Durch die geringen Dimensionen von Kapillaren ist der Massentransfer zur Detektoroberfläche sehr schnell, was zu einer Signalverstärkung beiträgt. Außerdem sind elektrochemische Detektoren deutlich preisgünstiger als Fluoreszenzdetektoren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Für alle Experimente dieser Arbeit wurden Chemikalien und deren Bezugsfirmen verwendet, die in Tabelle 2-1 aufgelistet sind. Für ausführliche Informationen über die Chemikalien möchte ich auf die Kataloge und Produktinformationen der einzelnen Hersteller verweisen.

Tabelle 2-1: Bezugsquellen wichtiger Chemikalien

Grundchemikalien	**Firma**
3-Aminopropyltriethoxysilan, purum	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Bernsteinsäureanhydrid, puriss	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Butanol	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
N,N`-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 99%	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Dimethylsulfoxid, puriss	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Dopamin, 99%	Acros, Geel (Belgien)
Ethanol, ROTIPURAN, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Gallussäure, 98%	Acros, Geel (Belgien)
Glutardialdehyd, 50%	Merck, Darmstadt
Glycerin 40%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
n-Hexan, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Hydrochinon, p.a.	Merck, Darmstadt
N-Hydroxysuccinimid, purum	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxyid, puriss.	Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Seelze

Grundchemikalien	Firma
Methanol, p.a.	sds, Peypin, France
Natriumacetat, wasserfrei, p.a.	Riedel de Haën, Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumborhydrid, p.a.	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumcarbonat, wasserfrei, p.a.	KMF, Bonn
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumhydroxid, puriss	Merck, Darmstadt
Natriumperjodat, 99%	Merck, Darmstadt
Natriumsilicat	Carl Roth, Karlsruhe
Pyrogallol	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Resorcin, 99%	Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salpetersäure, 65%	Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Schwefelsäure, 95-97%, p.a.	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Tetramethylbenzidin (TMB), 99%	Merck, Darmstadt
Thimerosal	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Toluol, SupraSolv	Merck, Darmstadt
Trimethylsylil-methanol, purum	Fluka, Sigma-Aldrich, Seelze
Wasser, p.a.	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 30%	Merck, Darmstadt

Proteine

Bovines Serumalbumin (BSA), ≥ 98%	Merck, Darmstadt
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.2 Lösungen und verwendete Puffer

Die Zusammensetzungen der Puffer für die Immobilisierung der Enzyme, für die Oberflächemodifikation und für die Kapillarelectrophorese sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

Tabelle 2-2: Lösungen zur Oberflächenmodifikation, Immobilisierung von Proteinen und Trennung von Phenolen

Lösung	**Zusammensetzung**	**Herstellung**
Aufbewahrungspuffer pH 7,0 (0,15 M)	0,05 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O 0,1 M NaCl 0,1 g Thiomersal	in 800 ml lösen auf pH 7,0 einstellen und mit H_2O auf 1000 ml auffüllen
CBB-Puffer pH 8,3 (0,05 M)	16,8 g $NaHCO_3$ 10 g NaCl	in 800 ml H_2O lösen und auf 1000 ml auffüllen
CBB-Puffer pH 9,5 (0,1 M)	0,1 M Na_2CO_3 0,1 M $NaHCO_3$	Na_2CO_3-Lösung und $NaHCO_3$-Lösung gegeneinander titrieren und auf pH 9,5 einstellen
Glycerol-Lösung	5 ml Glycerol (50%)	mit 5 ml Oxidationspuffer pH 5,5 mischen
Glutardialdehyd 10%	2 ml Glutardialdehyd 50%	in 8 ml Phosphatpuffer pH 7,0 lösen
Kupplungspuffer pH 4,5	0,1 M Na-Acetat 0,15 M NaCl	in 800 ml lösen, mit Essigsäure auf pH 4,5 einstellen und mit H_2O auf 1000 ml auffüllen
Natriumborhydrid-Lösung	0,1 g $NaBH_4$	in 1 ml Kupplungspuffer pH 4,5 lösen
Natriumperjodat-Lösung	1 g $NaJO_4$	in 10 ml H_2O lösen
Oxidationspuffer pH 5,5	0,1 M Natriumacetat 0,15 M NaCl	in 800 ml H_2O lösen mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen und mit Wasser auf 1000 ml auffüllen
Phosphatpuffer pH 6,0 (50 mM)	7,8 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O	in 800 ml H_2O lösen mit NaOH auf pH 6,0 einstellen und auf 1000 ml auffüllen

Lösung	Zusammensetzung	Herstellung
Phosphatpuffer pH 7,0 (0,15 M)	0,05 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O 0,1 M NaCl	in 800 ml lösen auf pH 7,0 einstellen und mit H_2O auf 1000 ml auffüllen
Phosphatpuffer pH 7,3 (10 mM) für Kapillarelektrophorese	0,534 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O 0,156 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O 0,75 g SDS	in 300ml H_2O lösen, gegeneinander auf pH 7,3 einstellen, zweimal filtrieren und entgasen
Phosphatpuffer pH 8,0	0,78 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O	ad 1000 ml mit H_2O lösen
PBS-Puffer pH 7,3	4,2g Na_2HPO_4 x 2 H_2O 0,94 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O 7,0 g NaCl	in 800 ml H_2O lösen mit NaOH auf pH 7,3 einstellen und auf 1000 ml mit H_2O auffüllen
Substratpuffer pH 4,9 (0,1 M)	0,1 M Natriumacetat 0,1 M Citronensäure	Natriumacetat-Lösung und Citronensäure-Lösung gegeneinander auf pH 4,9 einstellen
TMB-Lösung	10 mg TMB	in 1 ml DMSO lösen
Wasserstoffperoxid-Lösung	100 µl H_2O_2 30%	auf 1 ml mit H_2O auffüllen

2.1.3 Geräte

Die für diese Arbeit benutzten Geräte werden in Tabelle **2-3** aufgelistet.

Tabelle 2-3 Geräte

Gerät	Hersteller
Chiphalterung	Elektronische Abteilung der Pharmazeutischen Chemie, Uni Marburg
Hochspannungsnetzgerät MCN 35-2000	F.u.G Elektronik GmbH, Rosenheim
Mikroskop Bresser Researcher ICD	Meade Instruments Europe GmbH, Borken
Mikrotiterplattenreader	SLT Rainbow, SLT Labinstruments, Crailsheim

Gerät	Hersteller
Multimeter 176DMM	Keithley Instruments Inc, Cleveland (USA)
pH-Meter CG 701	Schott, Mainz
Potentiostat PalmSens	Palm Instruments BV, BZ Houten (Holland)
Pumpe	Miniplus 3, Gilson, Middleton, USA
Schüttler Titramax 101	Heidolph, Schwabach
Spektralphotometer, Uvikon 810	Kontron, München
Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad Bransonic 12 Typ B16	PCE-Group oHG, Meschede
Vakuumpumpe	KNF Neuberger Laborport, Freiburg
Vortexer	Janke + Kunkel, Staufen
Analysewaage H11W	Mettler, Giessen
Laborwaage K7	Mettler, Giessen

2.2 Methoden

2.2.1 Oberflächemodifikation

Der Oberflächenzustand des Substrates beeinflusst entscheidend die Qualität eines Beschichtungsprozesses. Zum einen wirkt sich die chemische Zusammensetzung der Oberfläche auf die Bindungsverhältnisse zwischen dem Substratmaterial und der zu immobilisierenden Schicht aus, zum anderen gibt die Oberfläche die Anfangsbedingungen für die Schichtbildung vor. Die Vorbearbeitung und Reinigung von Oberflächen und die reproduzierbare Einstellung der chemischen und physikalischen Oberflächeneigenschaften ist für die Mikrostrukturtechnik eine entscheidende Voraussetzung. Die Oberflächenbeschaffenheit von Substraten ist ihrerseits von den Materialien und der Vorbehandlung abhängig.

Oberflächen von Trägermaterialien benötigen für ihren speziellen Einsatzzweck in vielen Fällen bestimmte Eigenschaften. Häufig betreffen die Modifizierungen die Benetzbarkeit, also die Hydrophilie der Oberflächen. Des Weiteren lassen sich die Oberflächeneigenschaften der Träger hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens von Proteinen beeinflussen. Häufig wird

die Verhinderung einer unspezifischen Proteinadsorption angestrebt.

2.2.1.1 Reinigung der Keramikträger

Zur kovalenten Anbindung von Proteinen an die Substrat-Oberflächen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei besonders den Hydroxylgruppen die Rolle der aktiven Gruppe auf der Substratseite zukommt. Eine einfach zu handhabende Methode ist die Einführung einer geeigneten funktionellen Gruppe über eine Silanisierung. Eine Voraussetzung für die Präparation von Silanschichten ist eine gründliche Reinigung der Substratoberfläche. Dieser Schritt ist jedoch kritisch, da molekulare Mengen von Verunreinigung aller Art zu Unregelmäßigkeiten der Beschichtung führen. Ein weit verbreitetes Reinigungsmittel ist die so genannte „Piranha-Lösung", die aus zwei Teilen konzentrierter Schwefelsäure (96%) und ein Teil konzentriertem Wasserstoffperoxid (30%) besteht. Die Reinigung mit Piranha-Lösung führt zur effektiven Entfernung der meisten organischen und anorganischen Verunreinigungen. Für Kunststoff-Materialien ist diese Vorgehensweise zumeist ungeeignet. Ebenfalls können durch diese Behandlung feine Materialstrukturen zerstört werden. Deshalb musste nach Alternativen Ausschau gehalten werden.

2.2.1.1.1 Behandlung der Oberfläche von LTCC-Keramik mit Ethanol / Wasser und Piranha-Lösung

Die klein zerlegten Keramikstücke (0,5 x 0,5 cm) wurden zuerst einzeln in einem Becherglas für 2 Stunden mit einer Lösung aus Ethanol/Wasser im Verhältnis 1:1 auf einem Schüttler (300 m^{-1}) behandelt und dann mit Millipore-H_2O gespült. Danach wurden die Oberflächen für 20 Minuten mit „Piranha"-Lösung behandelt. Für jeden Reinigungsschritt wurden jeweils 3ml Lösung verwendet. Nach Entnahme aus der oxidierenden Lösung wurden die Plättchen ausgiebig mit Millipore-H_2O gewaschen und an der Luft getrocknet. Die trockenen Proben wurden für eine Stunde bei 60°C im Trockenschrank auf einer Petrischalle nachbehandelt.

2.2.1.1.2 Behandlung der Oberfläche von LTCC-Keramik mit KOH und Piranha-Lösung

Die Keramikproben wurden in kleine Stücke zerlegt (0,5 x 0,5 cm). Zuerst wurden die Plättchen einzeln in einem Becherglas mit 3 ml 3M KOH Lösung für 2 Stunden auf einem Schüttler (300 m^{-1}) gestellt und dann mit Millipore-H_2O gespült. Weiter wurden die Plättchen 20 Minuten mit einer „Piranha"-Lösung (96%iger Schwefelsäure und 30%igem

Wasserstoffperoxid im Verhältnis 3:1 inkubiert (3 ml/Keramikstück). Danach wurden die Proben dreimal in jeweils 10 ml Millipore-H_2O gespült und an der Luft abtrocknen gelassen. Anschließend wurden die Keramikproben auf eine Petrischalle für eine Stunde bei 60° C im Trockenschrank nachbehandelt.

2.2.1.1.3 Behandlung der Oberfläche von LTCC-Keramik mit KOH/EtOH und Piranha-Lösung

Jedes Keramikstück (0,5 x 0,5 cm) wurde für 2 Stunden in einem Becherglas mit 3 ml einer Mischung aus 3M KOH und Ethanol im Verhältnis 1:1 auf einem Schüttler (300 m^{-1}) inkubiert. Nach Entnahme aus der Lösung wurden die Proben zuerst mit Millipore-H_2O gespült und dann mit Piranha-Lösung für 20 Minuten inkubiert. Weiter wurden die Plättchen wie in Abschnitt 2.1.1.2 behandelt.

2.2.1.2 Reinigung und Vorbehandlung der Polymerträger

Um eine möglichst dauerhafte Beladung mit Aminogruppen zu erzielen, wurden die Polymeroberflächen zunächst mit oxidierenden Agentien, UV-Strahlung oder mit verschiedenen Niederdruckplasmen (Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff) vorbehandelt. Unter diesen Bedingungen konnte die Polymeroberfläche mit Hydroxygruppen funktionalisiert werden. Die Plasmareaktion ist eine effektive Methode, die ohne starkes Erwärmen der Kunststoffoberflächen funktionelle Gruppen einbringen kann. Die Wechselwirkung verschiedener Plasmakomponenten mit inerten Kunststoffoberflächen führt zum Einbau von chemischen Gruppen und damit zu deren Hydrophylierung.

2.2.1.2.1 Behandlung der Oberfläche mit EtOH/H_2O und UV-Licht

Vor den Kopplungsreaktionen wurden die Polycarbonatproben (0,4 x 0,4 cm) zuerst in einem Becherglas für 2 Stunden mit einer Lösung aus Ethanol/Wasser (Schüttler: 300 m^{-1}) gereinigt und dann mit H_2O pH 8,5 (leicht alkalisiert mit NaOH) gespült. Danach wurden die Plättchen in einer H_2O_2 -Lösung gebracht, die mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt wurde und für 24 Stunden mit UV-Licht (254nm) bestrahlt. Die gesamte Oberfläche musste hydrophil, also durch Wasser benetzbar sein. Nach der Aktivierung der Oberfläche werden die Proben dreimal in jeweils 10 ml Millipore-H_2O gewaschen, zwischen den Waschschritten auf Filterpapier abtropfen gelassen und anschließend bei 60° C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet.

2.2.1.2.2 Behandlung der Oberfläche mit KOH/EtOH und UV-Licht

Das Reinigungsverfahren verläuft in vier Schritten: Die Proben (0,5 x 0,5 cm) wurden zuerst mit einer Lösung aus 3M KOH und Ethanol für zwei Stunden auf einem Schüttler (300 m^{-1}) behandelt und dann mit H_2O pH 8,5 gespült. Die Plättchen wurden weiter mit einer H_2O_2-Lösung pH 8,5 inkubiert und für 24 Stunden mit UV-Licht (254nm) belichtet. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Millipore-H_2O gewaschen und bei 60° C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet.

2.2.1.2.3 Behandlung der Oberfläche mit KOH und UV-Licht

Die Polycarbonatplättchen (0,5 x 0,5 cm) wurden für zwei Stunden mit einer 3M KOH Lösung auf einem Schüttler (300 m^{-1}) gestellt und weiter mit H_2O pH 8,5 gespült. Dann wurden die gleichen Reinigungsschritten wie in dem Fall mit EtOH/H_2O durchgeführt.

2.2.1.2.4 Behandlung von mit Plasma vorbehandelten Polymerträgern

Eine Modifizierung der Oberfläche kann auf chemischem und physikalischem Wege erfolgen. Physikalisch initiierte Funktionalisierungen erfolgen zum Beispiel durch Plasmaaktivierung. Bei dieser Form der Aktivierung werden durch Plasma Radikalstellen an der Oberfläche geschaffen. Die Proben wurden uns von der Firma NTTF, Rheinbreitbach, zur Verfügung gestellt. Die Kunststoffoberfläche wurde z.B. mit Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff plasmabehandelt. Die Plättchen (0,4 x 0,4 cm) wurden nach der Plasmabehandlung zuerst in einem Becherglas für 5 Minuten mit einer Lösung aus Ethanol/Wasser (Schüttler 300 m^{-1}) gereinigt und im Abschluss mit Millipore-H_2O gespült. Anschließend wurden die Plättchen bei 60° C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet.

Frisch gereinigten Substrate haben eine große Oberflächenenergie, was sich in der sehr guten Benetzbarkeit widerspiegelt. Die Vorbehandlung mit Plasma in Kombination mit der nasschemischen Reinigung ergaben eine gute Oberflächenaktivierung, die jedoch eine schnelle Weiterverarbeitung erforderlich machten.

2.2.1.3 Silanisierung

In diesem Kapitel wird die Beschichtung der verwendeten Keramik-, Polycarbonat- oder Polystyrol-Oberflächen mit Organosilanen beschrieben. Es gibt mehrere Methoden für die chemische Modifizierung von Oberflächen. Die häufigste Methode ist die Silanisierung, also die Reaktion zwischen Silanolgruppen der Oberfläche und einem Organosilan, das hydrolysierbare funktionelle Gruppen trägt, wie Alkoxy- oder Amino-Gruppen. Silane

werden im Bereich der Oberflächenbehandlung in drei Klassen eingeteilt: Tri-, di-, und monofunktionelle Silane. Aminopropyltriethoxysilan (APTS) gehört zu den trifunktionellen Silanen, die nach dem Kontakt mit Wasser langsam zu den entsprechenden Silanolen hydrolysieren und anschließend polymerisieren. Die Si-O-Bindung kann eine sehr stabile Wechselwirkung zum Festkörper eingehen.

Die trifunktionellen Silane haben den Vorteil, dass sie kleine Unregelmäßigkeiten des Substrats überdecken können und daher leichter lückenlose Schichten ergeben. Die Aminofunktionen selbst werden üblicherweise für kovalente Kopplungen der Biomoleküle verwendet. Die weitere Funktionalisierung dieser aktivierten Oberflächen ist im Kapitel 2.2.3 erläutert.

2.2.1.3.1 Silanisierung der Keramikoberflächen

Die Beschichtung mit Alkoxysilanen kann nur an oxidierten Oberflächen erfolgen. Zur Einführung von Amino-Gruppen auf der Materialoberfläche werden die Keramikplättchen einzeln für 20 Minuten durch die Behandlung mit einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 3:1 oxidativ gereinigt [Nanci et al., 1998].

Nach Entnahme aus der oxidierenden Lösung werden die Proben ausgiebig mit Millipore-H_2O gewaschen und an der Luft getrocknet. Die trockenen Plättchen werden für eine Stunde bei 60°C im Trockenschrank nachgetrocknet und danach für 14 Stunden mit einer Lösung von 0,5% Aminopropyltriethoxysilan (APTS) in Hexan auf einem Schüttler (300 m^{-1}) behandelt (Abb. 2-1).

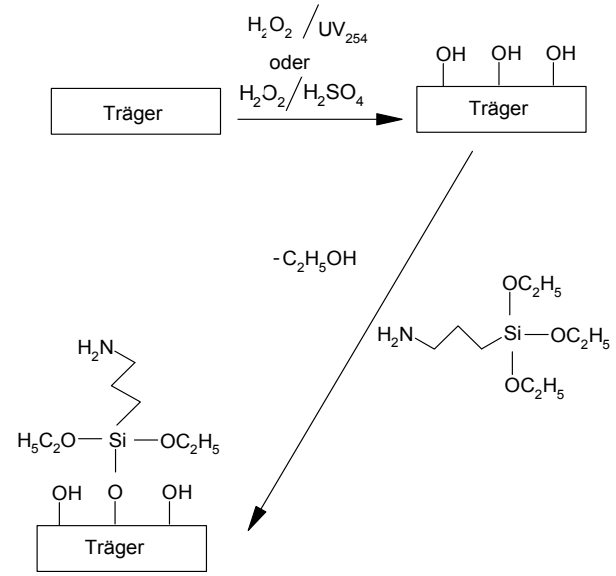


Abb. 2-1 Beispielhaftes Reaktionsschema zur Einführung von Amino-Gruppen auf Trägeroberflächen

Anschließend wurden die Proben an der Luft getrocknet und eine weitere Stunde im Trockenschrank bei 60°C nachbehandelt.

2.2.1.3.2 Silanisierung der Polymeroberflächen

Die entsprechend vorbehandelten Polycarbonatoberflächen wurden für 14 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (300 m^{-1}) mit einer Lösung von 0,5%igem Aminopropyltriethoxysilan (APTS) in Hexan zur Reaktion gebracht (Abb. 2-1). Anschließend wurden die Proben aus der Silanlösung entnommen, an der Luft getrocknet und bei 60°C für eine Stunde im Trockenschrank nachgetrocknet.

2.2.2. Adsoptive Kopplung von Enzym

Der große Vorteil der physikalischen Adsorption liegt darin, dass keine Reagenzien für die Immobilisierung benötigt werden. Zwischen dem Träger und dem Biomolekül finden nur geringe Wechselwirkungen statt, die auf Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zurückgehen. Die reversible Natur des Bindungsgleichgewichtes wird jedoch dadurch deutlich, dass es gegenüber Änderungen in den Umgebungsbedingungen (pH, Ionenstärke, Temperatur) empfindlich reagiert.

Um das Protein adsorptiv an Trägeroberfläche zu fixieren, wurden die gereinigten Proben zu einer Lösung des zu immobilisierenden Proteins in 50mM CBB-Puffer pH 8,3 gegeben. Jede Probe wurde in einem Becherglas über Nacht in die 20 µg/ml HRP-Lösung zur Beschichtung eingetaucht. Für jedes Plättchen wurden 3 ml Protein-Lösung gebraucht. In allen Versuchen wurde die Konzentration des immobilisierten Enzyms konstant gehalten.

Nach Entnahme aus der Lösung wurden die Proben fünfmal jeweils mit 10 ml 150 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gespült. Nach der adsorptiven Bindung des Enzyms an die Trägeroberfläche wurden die Plättchen in 150 mM Aufbewahrungspuffer pH 7,0 gelagert.

2.2.3. Kovalente Kopplung von Enzymen

Die kovalente Bindung der Biokomponente an der Oberfläche ist im allgemein am wenigsten reversibel. In einem Protein muss die Bindung durch die nucleophilen funktionellen Gruppen der Aminosäuren bewirkt werden, die nicht an der Funktion oder der Aktivität des aktiven Zentrums selbst beteiligt sind. Unterstützend wirkt dabei während des Immobilisierungsprozesses das Substrat der Biokomponente. Unterschiedliche Reaktionsmechanismen erlauben eine gezielte Auswahl der geeigneten Reaktion für ein spezielles biologisches System, über die das Biomolekül ohne Aktivitätsverlust gebunden

werden kann. Keine einzelne Kopplungsreaktion lässt sich jedoch universell zur Immobilisierung einsetzen; die jeweils am besten geeignete lässt sich nur experimentell finden [Hall, E.A.H. 1995].

In der Regel ist die kovalente Immobilisierung mit dem Einsatz relativ „harter“ Kupplungsreagenzien verbunden, wodurch zum Teil ein drastischer Eingriff in die native Konformation des Biomoleküls erfolgt [Hartmeier, W.1986, Kennedy, J.F. et al. 1990]. Damit geht ein mehr oder weniger großer Verlust der biologischen Funktion einher.

2.2.3.1 Immobilisierung über Glutardialdehyd (GDA)

Zur Anbindung des Enzyms (horseradish peroxidase HRP) an aminofunktionalisierte Trägeroberfläche wurden die Proben mit einem Dialdehyd zur Reaktion gebracht. Die Beschichtung mit Glutardialdehyd (Abb. 2-2) erfolgte bei Raumtemperatur in einer 1%igen wässrigen Lösung (50 mM Phosphatpuffer pH 7,0) für 4 Stunden [Nanci, A. et al. 1998].

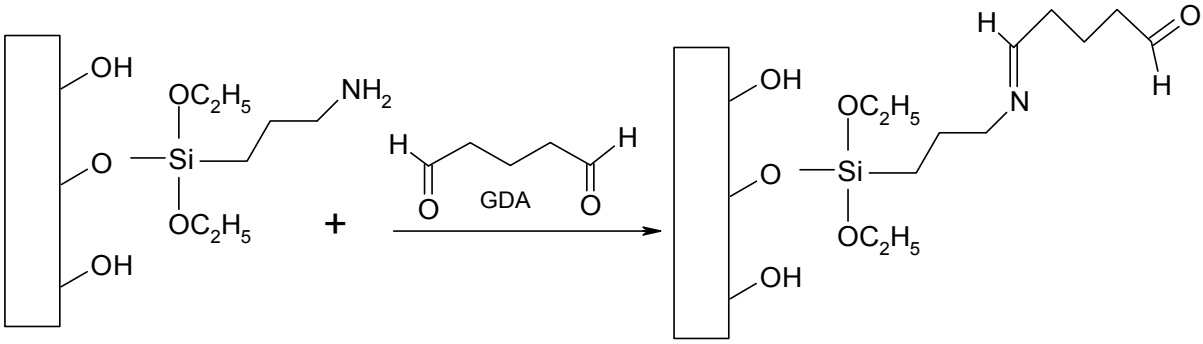


Abb.2-2 Behandlung von aminosilanisierten Oberflächen mit Glutardialdehyd (GDA)

Danach wurden die Plättchen dreimal jeweils mit 10 ml Phosphatpuffer pH 7,0 abgespült und mit einer Lösung des Proteins (20µg/ml) in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 über Nacht inkubiert. Durch Eintauchen in die entsprechende Lösung wurde das Enzym an den freien Aldehydgruppen fixiert (Abb. 2-3).

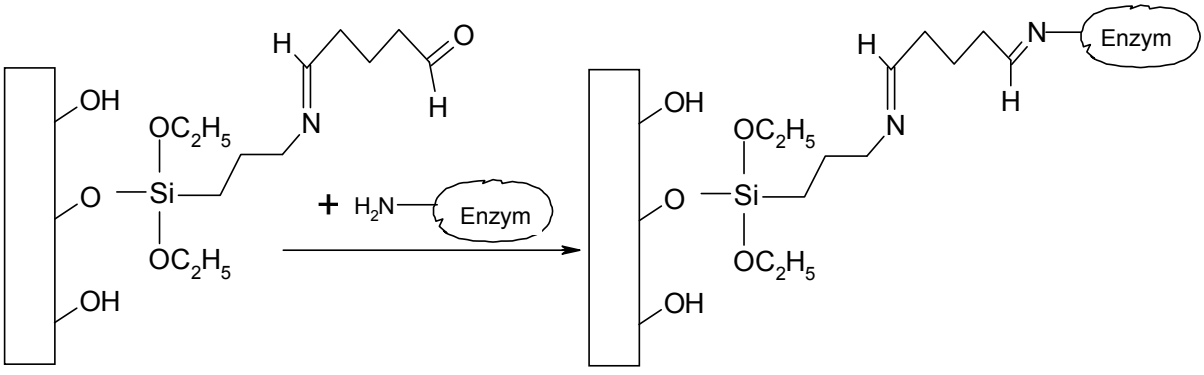
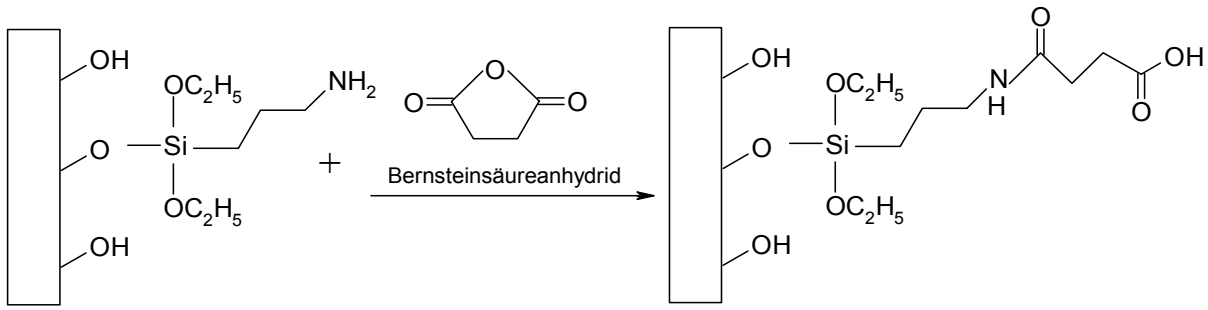


Abb. 2-3 Immobilisierung vom Enzym an der Oberfläche

Nach der Beschichtung wurden die Proben fünfmal jeweils mit 10 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gespült und in 150 mM Phosphatpuffer pH 7,0 aufbewahrt.

2.2.3.2 Immobilisierung über Carbodiimid

Durch die Silanisierungsreaktion entstand eine Oberfläche mit Aminopropylresten. Weitere chemische Modifikationen sollten eine Oberfläche schaffen, die keine oder nur eine geringe Proteinadsorption zeigt; andererseits sollte eine Abgangsgruppe eingeführt werden, die sich unter kontrollierten Bedingungen gegen Proteine austauschen lässt. Es wurde 1g Bersteinsäureanhydrid in 50 mM Phosphatpuffer pH 6 vollständig gelöst und dann die Proben über Nacht bei Raumtemperatur unter ständigen Rühren inkubiert (Abb. 2-4).



Silanisierte Oberfläche mit Aminofunktionen

Silanisierte Oberfläche mit Carboxylfunktionen

Abb. 2-4 Die aminofunktionalisierten Oberflächen wurden mit Bersteinsäureanhydrid verestert

Nach Entnahme aus der Lösung wurden die Proben zweimal mit Wasser, Ethanol und t-Butanol gewaschen. Danach erfolgte die Aktivierung für 4 Stunden mit einer Mischung aus 1,2 g 1-N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 2,4 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 60 ml t-Butanol (Abb. 2-5). Die Plättchen wurden ebenfalls bei Raumtemperatur (Schüttler 300 m^{-1}) gerührt.

Anschließend wurden die Proben zweimal mit t-Butanol, Ethanol und Wasser abgespült.

Die Bindung des Proteins (20µg/ml) erfolgte in wässriger Umgebung (Protein in 50 mM CBB-Puffer pH 8,3) gemäß folgenden Reaktion (Abb. 2-6).

Nach Entfernen der Proteinlösung wurden die Proben fünfmal mit 150 mM Phosphatpuffer pH 7,0 abgespült und in Aufbewahrungspuffer gelagert.

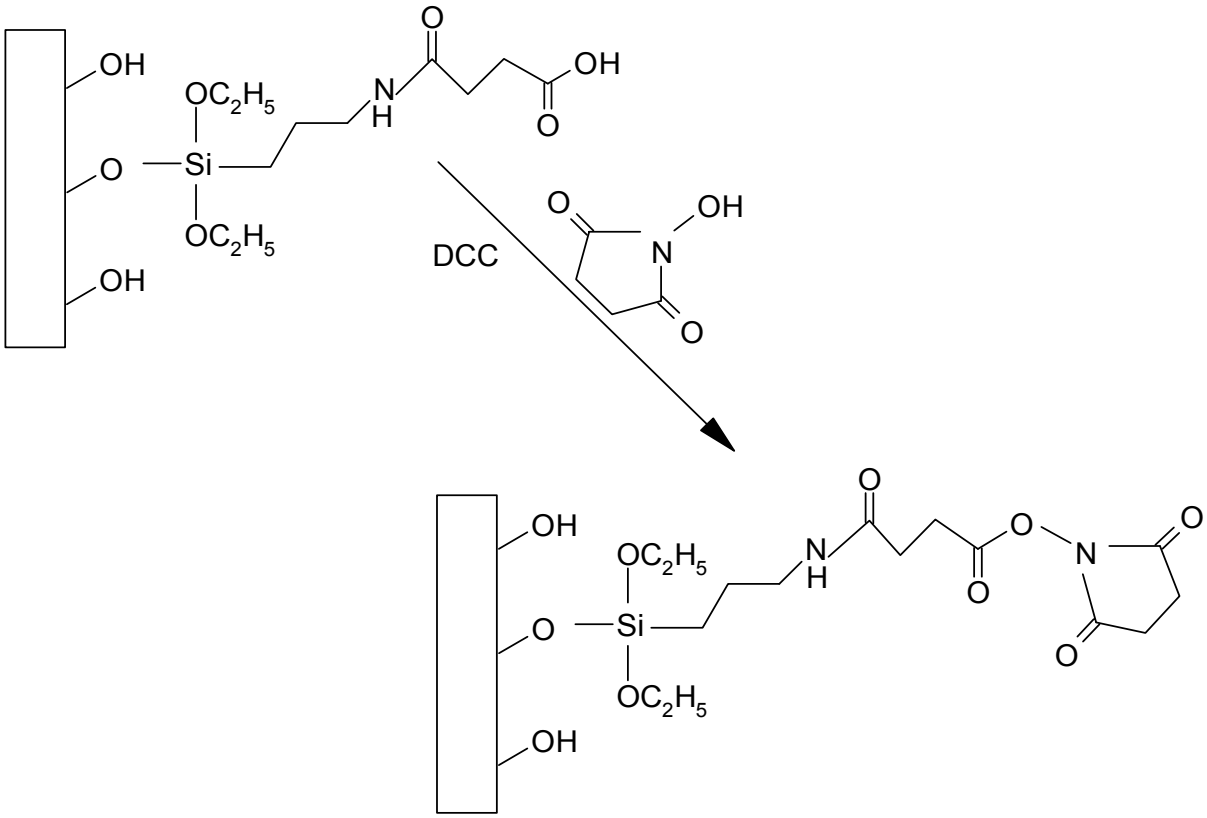


Abb. 2-5 Die Carboxygruppe wurde mit N-Hydroxysuccinimid NHS aktiviert

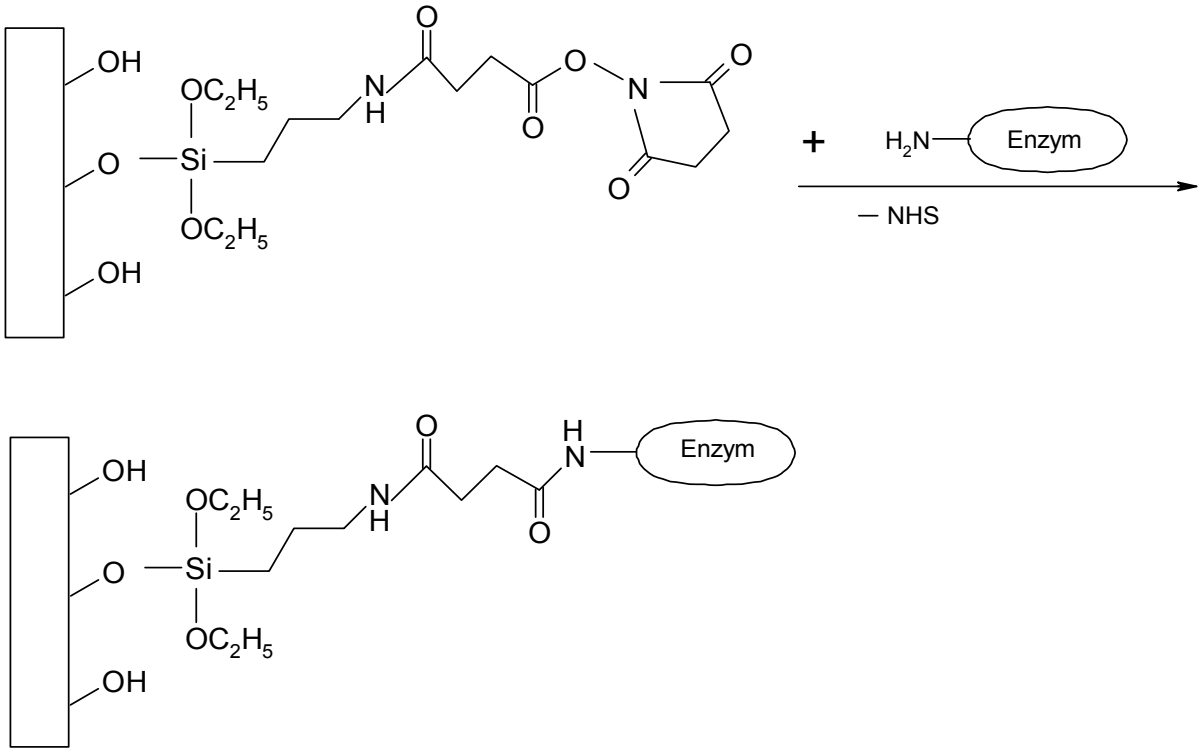


Abb. 2-6 Das Enzym wurde über eine Peptidbindung an die Oberfläche gebunden

2.2.3.3 Immobilisierung der oxidierten HRP an aminofunktionalisierte Oberflächen

Die Kopllung des an der Zuckerseitenkette oxidierten Enzyms an aminofunktionalisierte Oberflächen kann von einer intermediären Schiff'chen Base ausgehen, die mittels Natriumborhydrid reduziert werden kann und die Bindung somit stabilisiert wird. Das Enzym Meerretichperoxidase (HRP) wurde zuerst in Oxidationspuffer gelöst (8mg/ml) und auf Eis gekült. Dann wurde Natriumperjodat-Lösung (Endkonzentration 10mM) zugegeben und die Lösung 1 Stunde unter Lichtausschluss bei 4°C aufbewahrt. Eine Glycerol-Lösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt und der Ansatz weitere 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Das oxidierte Enzym wurde von nicht umgesetzten Reaktionspartnern durch Dialyse getrennt (siehe Kapitel 3.1.5.3). Die aminofunktionalisierten Proben wurden zu einer Lösung des oxidierten Proteins (20 µg/ml) in Kupplungspuffer für 14 Stunden bei 4°C gebracht. Für jedes Plättchen wurden 3 ml Protein-Lösung gebraucht.
Danach wurden die Proben mit Natriumborhydrid-Lösung (10µl/ml) reduziert und 2 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen der Proteinlösung wurden die Proben fünfmal (10 ml/Stück) mit 150 mM Phosphat-Puffer pH 7,0 gespült und in Aufbewahrungspuffer gelagert.

2.2.4. Proteinchemie

2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde nach Bradford-Methode bestimmt. Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brillant Blau G-250 (Abb.2-7) an positiv geladene Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 495 nm zu 595 nm ein. Grund dafür ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulphonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Da dies eine Gleichgewichtsreaktion ist, besteht ein Zusammenhang zwischen Protein-Konzentration und Extinktion.
Vor der eigentlichen Messung wurde eine Korrektur durchgeführt. Dazu wurden Probe- und Referenzküvette mit dem Dispersionsmedium gefüllt. Auf diese Weise wurden Unterschiede in den Küvetten abgeglichen. Um die Qualität der Messergebnisse überprüfen zu können, wurden zwei parallelen Messungen durchgeführt. Aufgrund der starken Bindung des Farbstoffes an das Glas und Küvetten wurden hier Kunststoff-Einmalküvetten verwendet. Als Kalibrationsstandard dient Rinderserumalbumin (BSA) 1mg/ml. Die Kalibrationen wurden in einem Bereich von 0,02-0,3 mg/ml aufgenommen. Hier wurden zu jedem Küvettenansatz 100

µl Probenlösung und 900 µl Bradford-Reagenz hinzupipettiert und gut gemischt. Fünf Minuten nach Zugabe des Farbreagenzens wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Kalibrierfunktion wurde durch eine Lineare Regression ermittelt. Die vorliegende Proteinkonzentration ergab sich aus der Extinktion über das Lambert-Beer-Gesetz [Hesse, M. et al. 1995, Winter, R. et al. 1998]:

$$E(\lambda) = \lg [I_0 / I] = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

wobei: E(λ): Extinktion

I_0: Intensität des in die Probe eintretenden Lichtstrahls

I: Intensität des aus der Probe austretenden Lichtstrahls

ε(λ): molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

c: Proteinkonzentration in mol l^{-1}

d: Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe

Die erhaltenen Konzentrationen müssen noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um auf die Konzentration des Enzyms in der Testlösung rückschließen zu können.

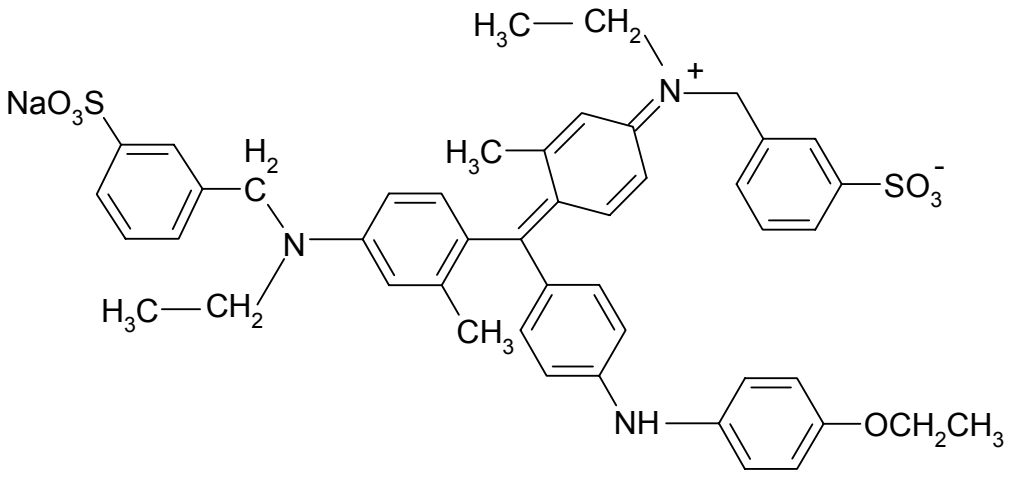


Abb.2-7 Das Reagenz des Bradford-Assays: Coomasie-Brillantblau G-250 (als Sulphonat)

2.2.4.2 Photometrische Bestimmung der Menge gebundener HRP

Zur Bestimmung der Menge gebundenen Proteins (HRP) wurde die Messung mit einer Stammlösung der Konzentrationen $5x10^{-3}$ µg/ml durchgeführt. Es wurde in Schritten von 5 µl gemessen. Obwohl für HRP eine große Anzahl verschiedener chromogener und fluorogener Substrate zur Verfügung steht, wird meistens Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Der Grund dafür ist, dass Tetramethylbenzidin im Gegensatz zu vielen anderen Substraten weder mutagen noch cancerogen ist (Bos, E.S. et al. 1981). Mit der Substratlösung (29,6 ml

Natrium-Acetat-Citrat-Puffer 100 mM pH 4,9/300µl einer Lösung von 10mg/ml 3,3',5, 5'-Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid (DMSO)/60µl H_2O_2 3%) wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte auf 210 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Substratlösung wurde frisch angesetzt.

Durch die von den Enzymen katalisierte Reaktion wird ein farbloses Substrat in ein gefärbtes Produkt umgewandelt. Über die Messung der optischen Dichte wird die Konzentration des Produkts in einem speziellen Mikrotiterplattenreader gemessen. Der Umsatz des eingesetzten Substrats Tetramethylbenzidin (TMB) ist in Kapitel 1.5.4 schematisch dargestellt.

Nach 15 Minuten wurden 40 µl H_2SO_4 8,3% zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt (Abb.2-8).

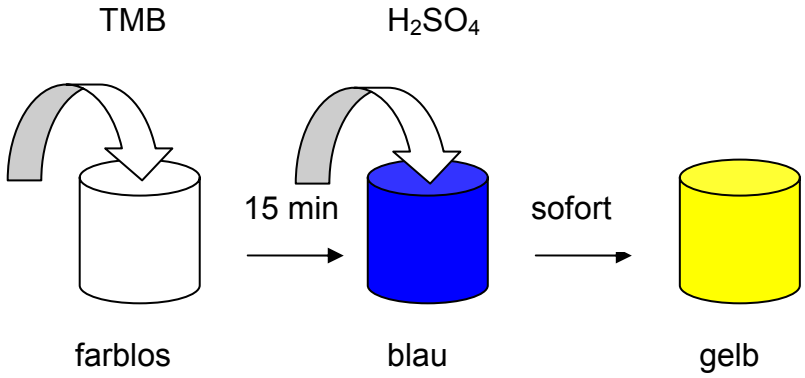


Abb. 2-8 Farbeänderung bei dem Umsatz des eingesetzten Substrats TMB

Die Konzentration wurde photometrisch bei 450nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt. Über diese zuvor erstellte Kalibrierfunktion kann daraus die zugehörige Menge HRP erhalten werden [Josephy, P.D. et al. 1982, Welinder, K.G. 1976].

2.2.5. Elektrochemische Detektion

2.2.5.1 Amperometrische Messung mit Polycarbonat-Chips

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine hocheffiziente Trennmethode der analytischen Chemie, die überwiegend zur Trennung und Detektion geladener Analyte eingesetzt wird. Eine hinreichende Möglichkeit zur Miniaturisierung bei hoher Präzision bietet Fa. Bartels Mikrotechnik Dortmund durch die Fertigung von Chips mit einem Excimerlasersystemen. Die Kanalgeometrien im Chipboden sind durch Laserstrukturierung frei wählbar. Durch das anschließende Kleben, dem Bonden von Chipboden und Chipdeckel, entstehen die fertigen CE-Chips.

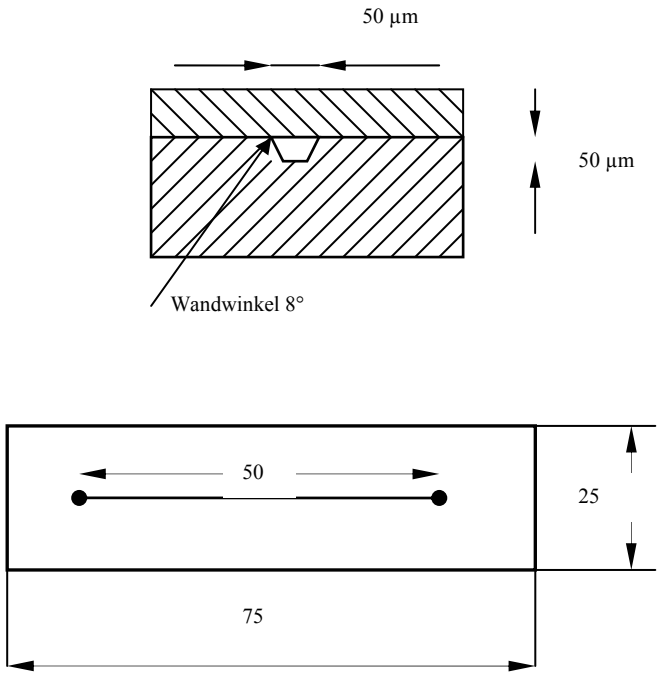


Abb. 2-9 Layout des in PC abgeformten Mikrokanalsystems

Für die Experimente wurden Standard-CE-Chips ohne Elektroden aus Polycarbonat (PC) von der Firma Bartels Mikrotechnik GmbH verwendet (Abb.2-9) mit den folgenden Parametern:

Material	**PC**
Chip-Deckel (LxHxB)	75 x 25 x 3
Chip-Boden (LxHxB)	75 x 25 x 1
Reservoirbohrungen	Ø 2 mm
Kanalbreite	50 µm
Kanaltiefe	50 µm
Kanalquerschnitt	Eckig (Wandwinkel 8°)

Für die elektrochemische Detektion (Amperometrie) und die Hochspannungsversorgung sind Elektroden notwendig. Die Detektionselektroden müssen chemisch innert sein, um eine reproduzierbare Messung gewährleisten zu können. Aus diesem Grund bietet sich Platin an. Das System besteht aus einer Arbeits-(AE) und Gegenelektrode (GE). Die Elektroden wurden aus 250 µm dicke Platindrähte angefertigt (Elektronische Abteilung der Pharmazeutischen

Chemie, Uni Marburg), mit Epoxydharz isoliert und mit Polierfolien verschiedener Körnung geschliffen, um eine glatte Oberfläche zu erhalten (Abb.2-10).

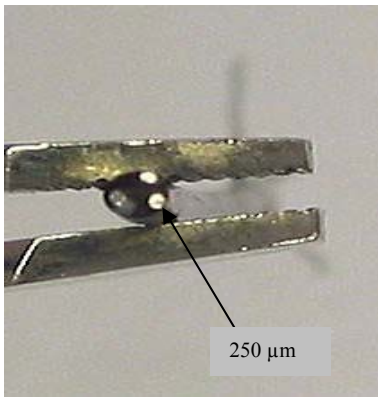


Abb. 2-10 Aufnahme der drei 250 µm Pt-Elektroden, die mit Epoxydharz isoliert wurden.

Die Pt-Elektroden wurden im Kathodenraum installiert. Die Arbeitselektrode (Detektor) und Gegenelektrode wurden an den Potentiostat angeschlossen und die Gegenelektrode mit der Referenzelektroden-Kontakt zusammengeschaltet. Als Anode dient eine Gold-Elektrode.
Zur einfacheren Ausrichtung von Elektrode und Kapillare wurde eine aus Plexiglas gefertigte Halterung (Elektronische Abteilung der Pharmazeutischen Chemie, Uni Marburg) eingesetzt. Die Elektroden konnten im Deckel der Halterung fixiert werden. Eine Darstellung der Halterung zeigt Abbildung 2-11.

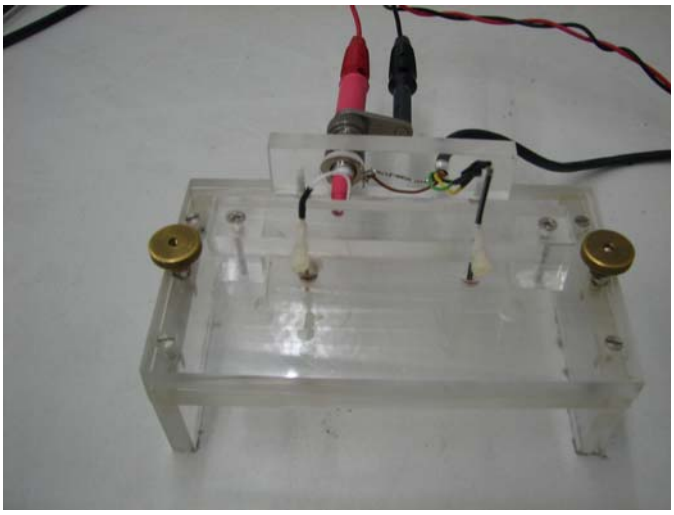


Abb.2-11 Plexiglashalterung mit befestigten Elektroden

Die aus Platin gefertigten Elektroden wurden am Kapillarausgang positioniert. Bei der Kapillarelektrophorese mit amperometrischer Detektion hat die Positionierung des amperometrischen Detektors zum Kapillarausgang einen entscheidenden Einfluss auf das Detektionssignal [Matysik, F. 1996]. Das exakte Einstellen von Abständen zwischen Kapillaren und Elektroden war schwierig, da eine genaue Längenmessung unter dem

Mikroskop schwer fiel. Die Arbeitselektrode wurde so nahe wie möglich an den Kapillarausgang herangeführt.

Es wurde einen Hochspannungsnetzgerät (MCN 35-2000) für den Aufbau des elektrischen Feldes verwendet und ein Multimeter angeschlossen, das als Gleichstromkontrolle diente. Mit Hilfe eines Potentiostaten wurde das Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode eingestellt. Die Messparameter wurden über einen PDA-Computer programmiert. In Abbildung 2-12 ist der Messplatz dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der Übertragung vom PDA zum stationären Rechner anhand der PDA-Software.

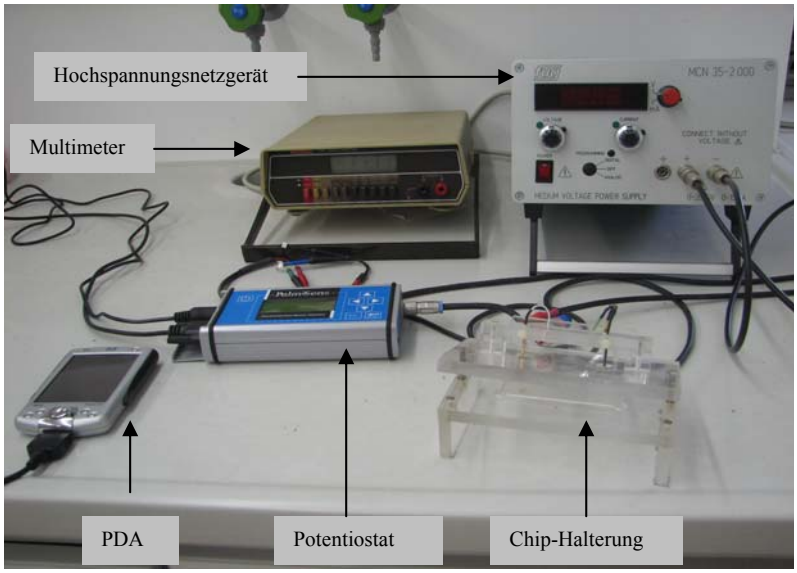


Abb. 2-12 Messplatz für eine einfache Kapillarelektrophorese

2.2.5.2. Silanisierung der Kapillare

Um die Proben zur Kathode zu transportieren und detektieren zu können, ist es notwendig, eine negativ geladene Oberfläche zu erzeugen. Zur Reinigung und Funktionalisierung der Kapillare wurde eine Gilson Pumpe an das Reservoir der Chips angeschlossen und es wurden die benötigten Lösungen durch den Trennkanal gepumpt. Für jede Lösung wurde ein neuer Schlauch verwendet. Sollte der Schlauch langsam von den relativ aggressiven Lösungen angegriffen werden, wurde er ausgetauscht. Wie in den meisten Flüssigkeitssystemen ist das Auftreten von Luftblasen unerwünscht. Um das zu verhindern, wurden die Lösungen zuerst im Vakuum entgast. Leider war dies mit erheblichem Aufwand verbunden.

2.2.5.2.1. Silanisierung mit Natriumsilikat

Zunächst wurde die Kapillare eine Stunde mit einer Lösung aus Ethanol und Wasser (1:1) gereinigt. Um die Verstopfung der Kapillare zu verhindern, wurde nach mehreren Versuchen

bei einer Flussrate von 1 ml/min eine ideale Konzentration für die Silanlösung von 0,3% in NaOH ermittelt. Die mit Ethanol/Wasser gereinigte Kapillare wurde weiter für 15 Minuten mit einer 0,3% Natriumsilikatlösung beschichtet. Während des Silanisierungsvorganges wurde der Chip mit einer Kapillaröffnung in einem Becherglas eingetaucht, indem sich auch Natriumsilikatlösung befand. Die Kapillare wurde 15 Minuten mit Wasser gespült und dann mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 befüllt.

Die so entstandenen Silanolgruppen können im Kontakt mit einer Elektrolytlösung in Abhängigkeit von pH-Wert dissoziiren. Dadurch entsteht eine negativ geladene Kapillaroberfläche, wodurch einerseits der EOF in Richtung Kathode resultiert, anderseits aber auch elektrostatische Wechselwirkungen mit entgegengesetzt geladenen Analyt-Ionen auftreten können.

2.2.5.2.2. Silanisierung mit Trimethylsylil-methanol

In einem weiteren Versuch wurde die neue Kapillare zunächst konditioniert, indem sie eine Stunde mit einer 500 mM KOH Lösung gespült und anschließend 15 Minuten mit 0,5% Trimethylsylil-methanol behandelt wurde. Die Befüllung der Kapillare wurde auch mit Hilfe einer Gilson-Pumpe durchgeführt. Die Silanlösung lässt sich an die Polycarbonatoberfläche adsorptiv binden, so dass sich die Hydroxylgruppe zum Inneren der Kapillare ausrichten. Die Kapillare wurde mit Wasser abgespült und anschließend mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 befüllt.

2.2.5.2.3. Silanisierung mit Glycidoxypropyltrimethoxysilan

Durch die Reaktion mit 3- Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) wurden auf den Kapillaroberflächen Epoxidgruppen eingeführt. Überschüssige Epoxidgruppen werden der Hydrolyse überlassen. Das führt zu einer sehr hydrophilen Oberfläche mit zahlreichen Hydroxylgruppen. Zunächst wurde die Kapillare für eine Stunde mit einer Lösung aus 500 mM KOH gereinigt. Nach der Spülung mit KOH wurde die Kapillare für 15 Minuten mit einer Lösung aus 0,3% GOPTS in Hexan behandelt. Die Kapillare wurde weiter 15 Minuten mit Wasser gespült, um das überschüssiges Silanisierungsreagenz zu entfernen. Anschließend wurde die Oberfläche der Kapillare durch halbstündiges Spülen in 80%iger Essigsäure zum Diol hydrolysiert und dann mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 befüllt. Die mit Glycidyloxypropyltrimethoxysilan modifizierten Träger wurden direkt nach ihrer Herstellung eingesetzt.

2.2.5.2.4. Probenaufgabe

Nachdem die Kapillaroberfläche funktionalisiert wurde, wurde der Chip in der Halterung positioniert und mit dem Deckel befestigt. Bevor die Probe injiziert wurde, sollten die Reservoirs mit 100 µl Phosphatpuffer pH 7,3 befüllt werden (Abb.2-13). Danach wurden die Messparameter mit dem PDA eingestellt: die Trennspannung betrug 500V und das Detektionspotential 1,1V. Erst nach Einstellung einer stabilen Basislinie des Stromverlaufs erfolgte die Probezugabe. Aus dem Anodenraum wurden 90 µl Elektrolytpuffer vorsichtig entnommen und durch die gleiche Menge Probe ersetzt.

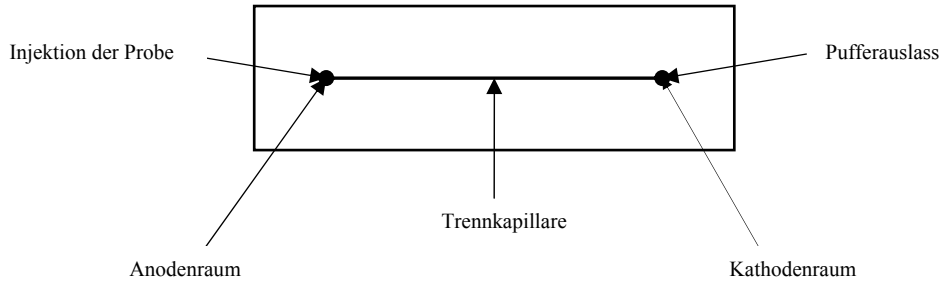


Abb. 2-13 Schematischer Aufbau des Polycarbonat-Chips

Es wurde beim Einfüllen der Probe darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden und die Füllhöhen der Reservoirs gleich bleiben. Die messbaren Ströme waren sehr gering und lagen im Bereich von nA. Die Messungen wurden innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Am Ende der Messung und nach der Abschaltung des Hochspannungsgeräts wurden die Reservoire entleert und dreimal mit jeweils 100µl Wasser ausgespült. Bevor eine neue Messung durchgeführt wurde, sollte die Kapillare 15 Minuten mit Phosphatpuffer pH 7,3 gespült werden, um eventuellen Probenbestandteilen zu entfernen.

3. Ergebnisse

Oberflächenmodifikationen von Mikrokomponenten

Innerhalb des Projektes „Mikrokomponenten für Biochemische Analysensysteme“ ist die Entwicklung von unterschiedlichen Mikrofluidik-Baugruppen als Bestandteil von biochemischen Analysensystemen vorgesehen. Kernpunkt dieser Entwicklung ist eine miniaturisierte Kapillarelektrophorese (CE), die als „Lab-on-a-chip“-System ausgelegt sein soll. Mikrofluidik - Komponenten aus Polymermaterialien und Keramik - sind für „Lab-on-a-Chip“-Applikationen von großem Interesse, da sie kostengünstig in größeren Stückzahlen hergestellt werden können. Bei derartigen Werkstoffen stellt sich jedoch oftmals das Problem, dass die Materialoberflächen für bioanalytische Trennsysteme typischerweise ungeeignet sind. Hier ist eine Funktionalisierung der Materialoberflächen dringend erforderlich. Fernerhin müssen die chemischen Wechselwirkungen der Trägeroberfläche mit dem Protein so beeinflusst werden, dass keine unerwünschten Effekte (z.B. Inaktivierung) auftreten.
Die zugängliche Oberfläche muss hinreichend groß sein, um genügend Enzym für einen Aktivitäts-Assay unterzubringen. Die Immobilisierung vom Protein hängt auch von der Hydrophilie der Trägeroberfläche ab. In den folgenden Abschnitten werden unterschiedliche Methoden zur Entwicklung verschiedener Oberflächen vorgestellt.

3.1 Eigenschaften und Modifizierung der Trägeroberflächen

Die Eigenschaften der Materialoberfläche wie Rauhigkeit, Benetzbarkeit, Ladung und Mobilität sind von größter Bedeutung. Der Oberflächenzustand des Substrates beeinflusst entscheidend die Qualität eines Beschichtungsprozessses. Zur kovalenten Anbindung von Proteinen an die Substrat-Oberflächen stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei besonders den Hydroxylgruppen die Rolle der aktiven Gruppe auf der Substratseite zukommt. Eine einfach zu handhabende Methode ist die Einführung einer geeigneten funktionellen Gruppe über Silan-Anbindung. Eine Voraussetzung für die Präparation von Silanschichten ist eine gründliche Reinigung und Aktivierung der Substratoberfläche (Erzeugung „freier“ OH-Gruppen).
Die nachfolgenden Verfahren wurden speziell für diese Fragestellung entwickelt. Aufgeführt sind hier die optimalen Reaktionsbedingungen.

3.1.1 Reinigung und Aktivierung von Keramikträger

Standardreinigungschritte setzen zum Beispiel wässrige Säuren, Alkalien und oxidierende Bäder ein, um organische und salzartige Oberflächenverunreinigungen aufzulösen. Es wurde folgende Reinigungsversuche durchgeführt:

3.1.1.1 Behandlung der Oberfläche mit Ethanol/Wasser

Die Keramikproben wurden für 2 Stunden mit einer Lösung aus Ethanol/Wasser im Verhältnis 1:1 gerührt und dann mit Millipore-H_2O gespült. Um eventuellen Verunreinigungen zu entfernen, kann man eine oxidative Behandlung mit einer Mischung aus Wasserstoffperoxid und konzentrierter Schwefelsäure verwenden. Deswegen wurden die Oberflächen mit einer Lösung aus 30% Wasserstoffperoxid und 96% Schwefelsäure (1:3) behandelt. Nach Entnahme aus der oxidierenden Lösung wurden die Plättchen ausgiebig mit Millipore-H_2O gewaschen und an der Luft getrocknet. Die trockenen Proben wurden für eine Stunde bei 60°C im Trockenschrank auf einer Petrischalle nachgetrocknet.

3.1.1.2 Behandlung der Oberfläche mit KOH

Zuerst wurden die Plättchen mit 3M KOH-Lösung für 2 Stunden auf einem Schüttler (300 m^{-1}) gestellt und dann mit Millipore-H_2O gespült. Weiter wurden die Proben mit einer Lösung aus 96%iger Schwefelsäure und 30%igem Wasserstoffperoxid (3:1) inkubiert. Danach wurden die Oberflächen dreimal in jeweils 10 ml Millipore-H_2O gespült und an der Luft abtrocknen gelassen. Anschließend wurden die Keramikproben auf eine Petrischalle für eine Stunde bei 60°C im Trockenschrank zugestellt.

Frisch gereinigte Substrate haben eine große Oberflächenenergie, was sich in der sehr guten Benetzbarkeit widerspiegelt.

3.1.1.3 Behandlung der Oberfläche mit KOH/EtOH

Jedes Keramikstück wurde für 2 Stunden mit einer Mischung aus 3M KOH und Ethanol im Verhältnis 1:1 auf einem Schüttler (300 m^{-1}) inkubiert. Nach Entnahme aus der Lösung wurden die Proben zuerst mit Millipore-H_2O gespült und dann mit Piranha-Lösung (30% Wasserstoffperoxidlösung und 96% Schwefelsäure im Verhältnis 1:3) für 24 Stunden inkubiert. Weiter wurden die Plättchen wie in Abschnitt 3.1.1.1 behandelt.

3.1.2 Reinigung und Aktivierung von Polymerträger

Um eine möglichst dauerhafte Beladung mit Aminogruppen zu erzielen, wurden die Polymeroberflächen zunächst mit oxidierenden Agentien, UV-Strahlung oder mit verschiedenen Niederdruck-Plasmen vorbehandelt. Unter diesen Bedingungen konnte die Polymeroberfläche mit Hydroxygruppen funktionalisiert werden.

3.1.2.1 Behandlung der Oberfläche mit EtOH/H_2O und UV-Licht

Vor den Kopplungsreaktionen wurden die Polycarbonatproben zuerst in einem Becherglas für 2 Stunden mit einer Lösung aus Ethanol/Wasser (Schüttler: 300 m^{-1}) gereinigt und dann mit H_2O pH 8,5 (leicht alkalisiert mit NaOH) gespült. Danach wurden die Plättchen in einer H_2O_2 -Lösung gebracht, die mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt wurde und für 24 Stunden mit UV-Licht (254nm) bestrahlt. Die gesamte Oberfläche musste hydrophil, also durch Wasser benetzbar sein. Nach der Aktivierung der Oberfläche werden die Proben dreimal in jeweils 10 ml mit Millipore-H_2O gewaschen, zwischen den Waschschritten auf Filterpapier abtropfen gelassen und anschließend bei 60° C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet.

3.1.2.2 Behandlung der Oberfläche mit KOH/EtOH und UV-Licht

Das Reinigungsverfahren verläuft in vier Schritten. Die Proben wurden zuerst mit einer Lösung aus 3M KOH und Ethanol für zwei Stunden und dann mit H_2O pH 8,5 gespült. Die Plättchen wurden weiter mit einer H_2O_2-Lösung pH 8,5 inkubiert und für 24 Stunden mit UV-Licht (254nm) strahlt. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Millipore-H_2O gewaschen und bei 60° C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet.

3.1.2.3 Behandlung der Oberfläche mit KOH

Die Polycarbonatplättchen wurden für zwei Stunden mit einer 3M KOH Lösung auf einem Schüttler (300 m^{-1}) gestellt und weiter mit H_2O pH 8,5 gespült. Dann wurden die gleichen Reinigungsschritten wie in dem bereits oben beschriebenen Fall mit EtOH/H_2O durchgeführt.

3.1.3 Funktionalisierung der Oberflächen mit Silangruppen

Für die Kopplung an OH-Oberflächen sind zum Beispiel Methoxysilane günstig. Sehr vorteilhaft wird ebenfalls Aminopropyltrimethoxysilan eingesetzt. Bei dieser Silanisierungsmethode ist unbedingt darauf zu achten, dass möglichst wasserfrei gearbeitet wird. Daher wurden alle Glasgefäße, die mit Reaktionslösung in Kontakt kamen, nach der

Reinigung im Trockenschrank getrocknet. Da APTS eine hygroskopische Flüssigkeit ist, nimmt mit steigender Wasserverunreinigung der Silanisierungsgrad ab. Diese Abnahme kann durch eine Verlängerung der Reaktionsdauer ausgeglichen werden [Hofer P. et al 1979].
Die gereinigten Substrate wurden zur Einführung von Amino-Gruppen verwendet. Die Funktionalisierung der Oberfläche mit Silangruppen erfolgt innerhalb von 14 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Schüttelfrequenz $300min^{-1}$) mit 0,5 % 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS) in Hexan. Da die Silane mit Wasser reagieren, wurden die Reaktionsgefäße dicht abgedeckt. Bei der Silylierung reagieren OH-Gruppen der Trägeroberfläche mit dem Silanisierungsreagenz APTS unter Ethanolabspaltung zu einer aminosilanisierten Oberfläche. Die Silanisierungslösung wurde bei jeder neuen Probenreihe frisch hergestellt.
Der Ablauf der Reaktion kann durch folgendes Reaktionsschema (Abb. 3-1) beschrieben werden:

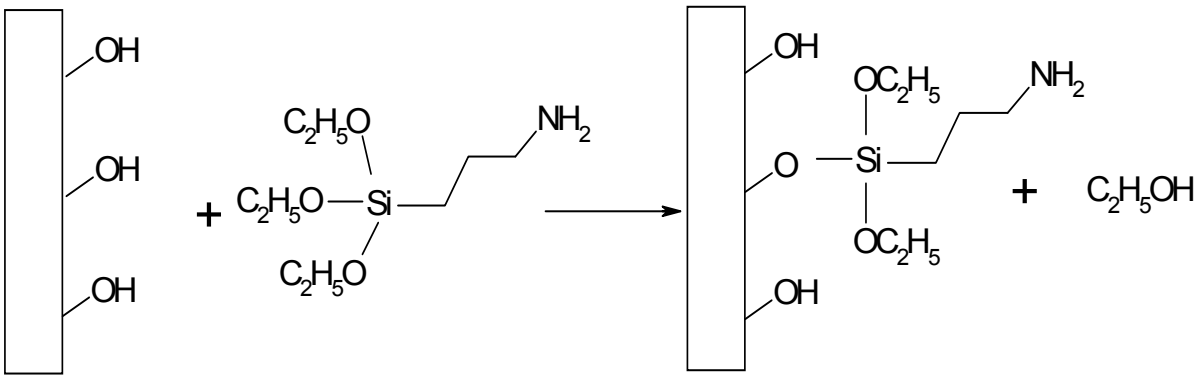


Abb. 3-1 Einführung von Aminopropyltriethoxysilan (APTS) an die Trägeroberfläche

Nach Entnahme aus der Lösung wurden die Proben an der Luft getrocknet und anschließend eine weitere Stunde im Trockenschrank bei 60°C.

3.1.4 Adsorptive Kopplung von Meerrettichperoxidase (HRP) an Trägeroberfläche

Die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase HRP) ist als Enzym in der Lage, substratvermittelt mit verschiedenen Chromogenen unterschiedliche Farbreaktionen zu katalysieren. Dadurch eignet sich dieses Protein gut als immobilisierbares Modellprotein, das bequem nachgewiesen werden kann. Die Meerrettichperoxidase katalysiert ganz allgemein die Reaktion:

$$H_2O_2 + DH_2 \rightarrow 2H_2O + D$$

wobei DH_2 für die reduzierte, D für die oxidierte Form eines Donors steht.

Um das Protein adsorptiv an Trägeroberfläche zu fixieren, wurden die gereinigten Proben zu einer Lösung des zu immobilisierenden Proteins in 50mM CBB-Puffer pH 8,3 gegeben. Jede Probe wurde in einem Becherglas über Nacht in die 20 µg/ml HRP-Lösung zur Beschichtung eingetaucht (Abb.3-2). Für jedes Plättchen wurden 3 ml Protein-Lösung gebraucht.
Nach Entnahme aus der Lösung wurden die Proben fünfmal jeweils mit 10 ml 150 mM Phosphatpuffer pH 7,0 gespült und dann in Aufbewahrungspuffer gelagert.

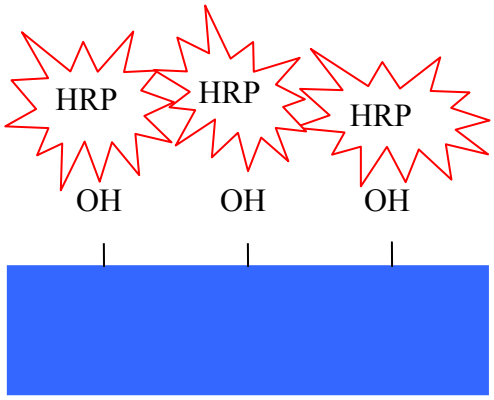


Abb.3-2 Adsorption von HRP an einer Trägeroberfläche

Um die Protein-Anbindung verfolgen und beurteilen zu können, ist es notwendig, ein geeignetes Verfahren zur Feststellung der Anzahl gebundener Moleküle zur Verfügung zu haben. Für einen empfindlichen, kostengünstigen, schnell und einfach durchzuführenden Nachweis eignet sich das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) in Verbindung mit dem Chromogen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als Enzymassay.
Zur quantitativen Ermittlung der gebundenen Proteinmenge muss dafür photometrisch eine Kalibriergerade (Abb.3-3) erstellt werden, die eine Beziehung zwischen der Extinktion der Chromogen-Lösung und der Konzentration des Enzyms herstellt.

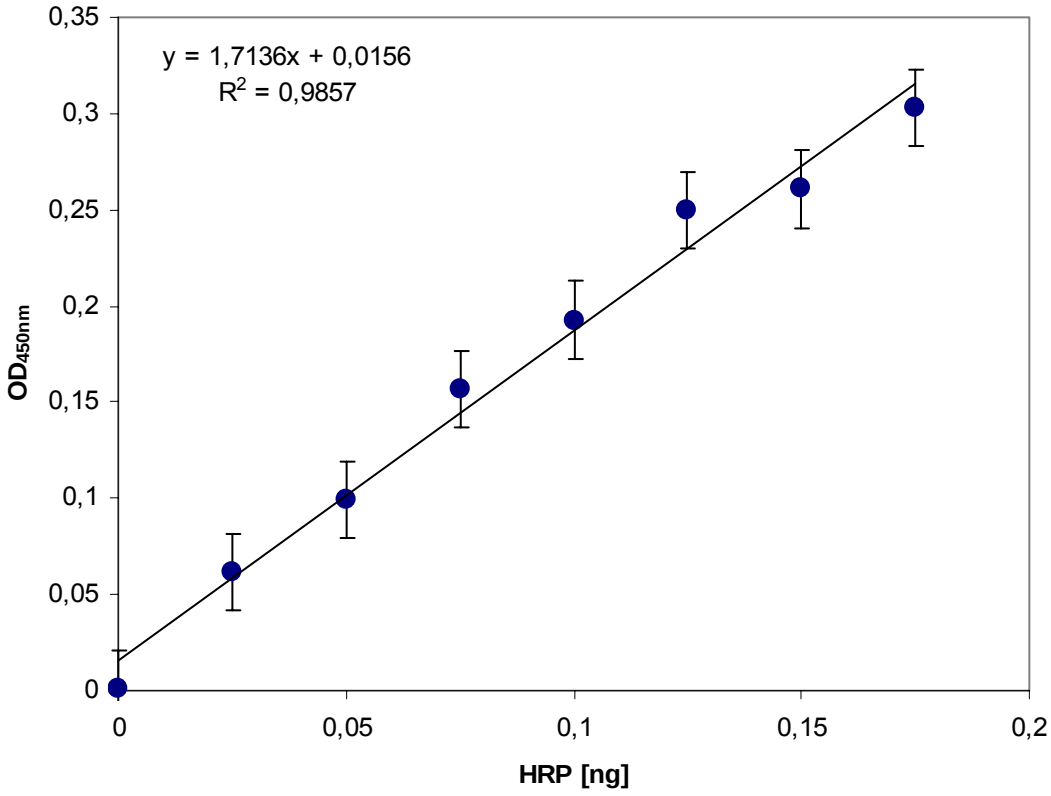


Abb.3-3 Kalibrationskurve der HRP. Die Messung wurde mit einer Stammlösung der Konzentrationen $5x10^{-3}$ µg/ml durchgeführt. Es wurde in Schritten von 5 µl Stammlösung gemessen. Mit Substratlösung (29,6 ml Natrium-Acetat-Citrat-Puffer 100 mM pH 4,9/300µl einer Lösung von 10mg/ml 3,3',5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Dimethylsulfoxid (DMSO)/60µl H_2O_2 3%) wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte auf 210 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach 15 Minuten wurden 40 µl H_2SO_4 8,3% zugegeben. Die Konzentration wurde photometrisch bei 450nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt.

Über diese zuvor erstellte Kalibrierfunktion kann daraus die zugehörige Menge HRP erhalten werden.

3.1.5 Kovalente Proteinimmobilisierung

Für die Bereitstellung der aktiven Form des Proteins ist die kovalente Kopplung an eine Oberfläche möglich. Für diese Form der Immobilisierung wurde eine Oberfläche ausgesucht, die Proteine gar nicht oder nur in geringem Maße adsorbieren lässt. Die Oberfläche wurde dann z.B. durch eine der in diesem Kapitel beschriebenen Methoden funktionalisiert, so dass eine Reaktion mit Proteinseitenketten erfolgen kann. Meist wurde dabei auf die Aminogruppe des Proteins zurückgegriffen. Es wurden das Bindungsverhalten des Proteins auf

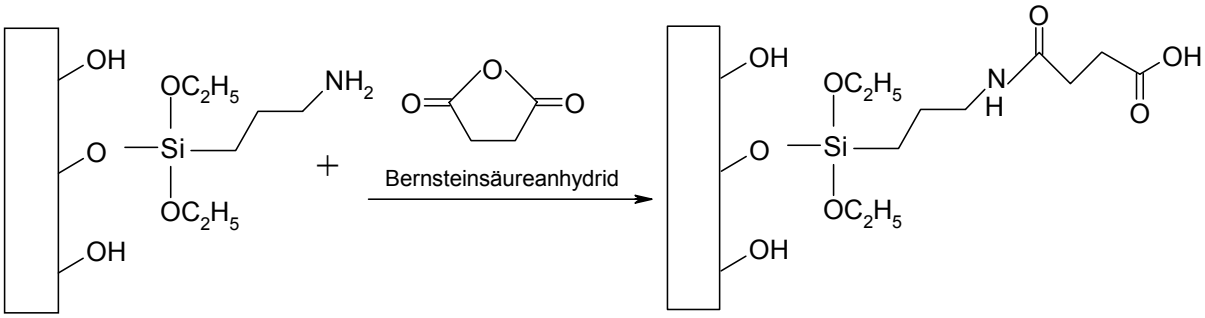
unterschiedlichen Oberflächen und der Einfluss der Kopplungs- und Aktivierungsmethode untersucht. In alle Messungen wurde die Konzentration des Enzyms konstant gehalten.

3.1.5.1 Immobilisierung vom Protein an aminofunktionalisierte Festkörperoberflächen mittels NHS-DCC-Methode

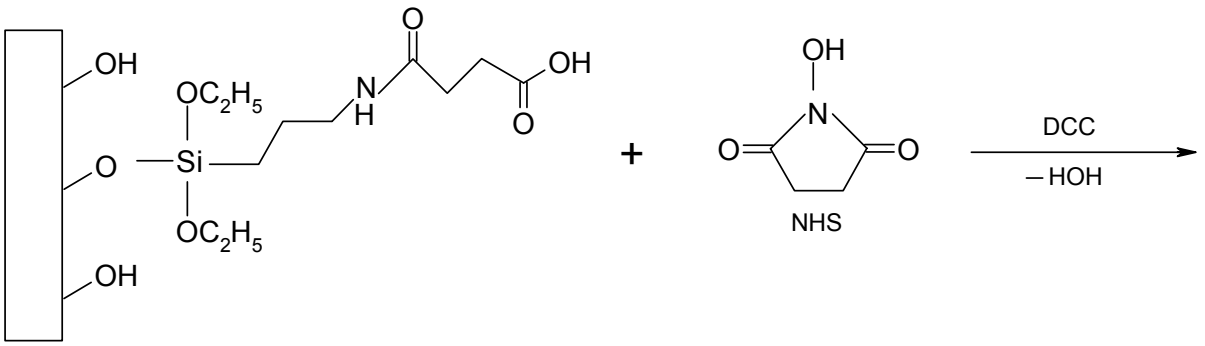
Die Aminogruppen lassen sich mit Bernsteinsäureanhydrid substituiren, so dass danach Carboxylgruppen an der Trägeroberfläche gebunden sind, die z.B. nach Aktivierung mit Carbodiimidderivaten, Aminogruppen von Proteinen über eine Peptidbindung fixieren.

Zur Anbindung der Proteine wurden die aminofunktionalisierten Oberflächen in einem ersten Schritt mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt. Die Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 1 g Bernsteinsäureanhydrid in 25 ml Phosphatpuffer pH 6 (mit NaOH eingestellt) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen im Becherglas mit Wasser, Ethanol und t-Buthanol erfolgte die Aktivierung mit einer Mischung aus 1,2 g 1-N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 2,4 g N,N'- Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 60 ml t-Butanol (10ml/Probenträger) für 4 Stunden bei RT.

Die Carboxylgruppen wurden durch Reaktion mit Hydroxysuccinimid (NHS) in Gegenwart des Carbodiimids (DCC) in eine Aktivesterstufe überführt. Es wurde anschließend je zweimal mit 10 ml t-Butanol, Ethanol und Wasser gewaschen. Das zu koppelnde Protein wurde als Lösung (20µg/ml) in 50 mM CBB-Puffer pH 8,3 über Nacht mit den aktivierten Carboxylgruppen zur Reaktion gebracht (Abb.3-4).



aminosilanisierte Oberfläche



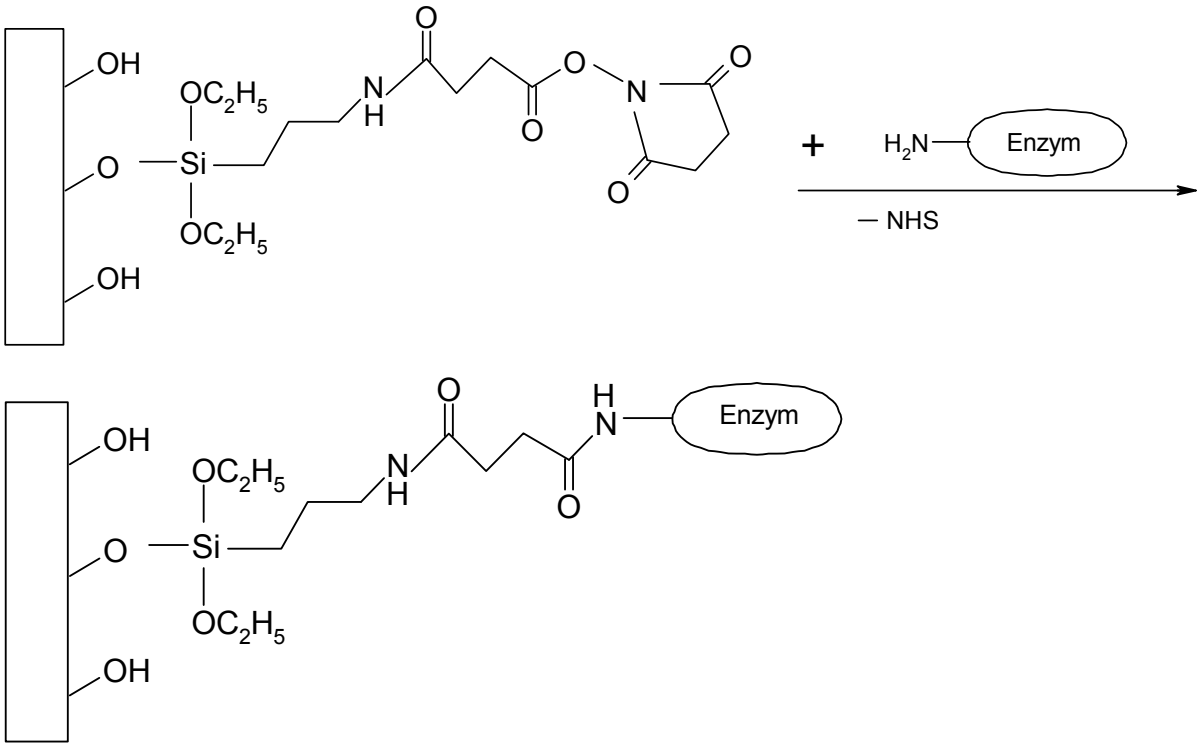


Abb.3-4 Immobilisierung von Enzymen über Bernsteinsäureanhydrid auf APTS-silanisierte Oberflächen

Nach Entfernen der Proteinlösung wurden die Proben fünfmal (10 ml/Stück) mit 150 mM Phosphat-Puffer pH 7,0 gespült und in Aufbewahrungspuffer gelagert.

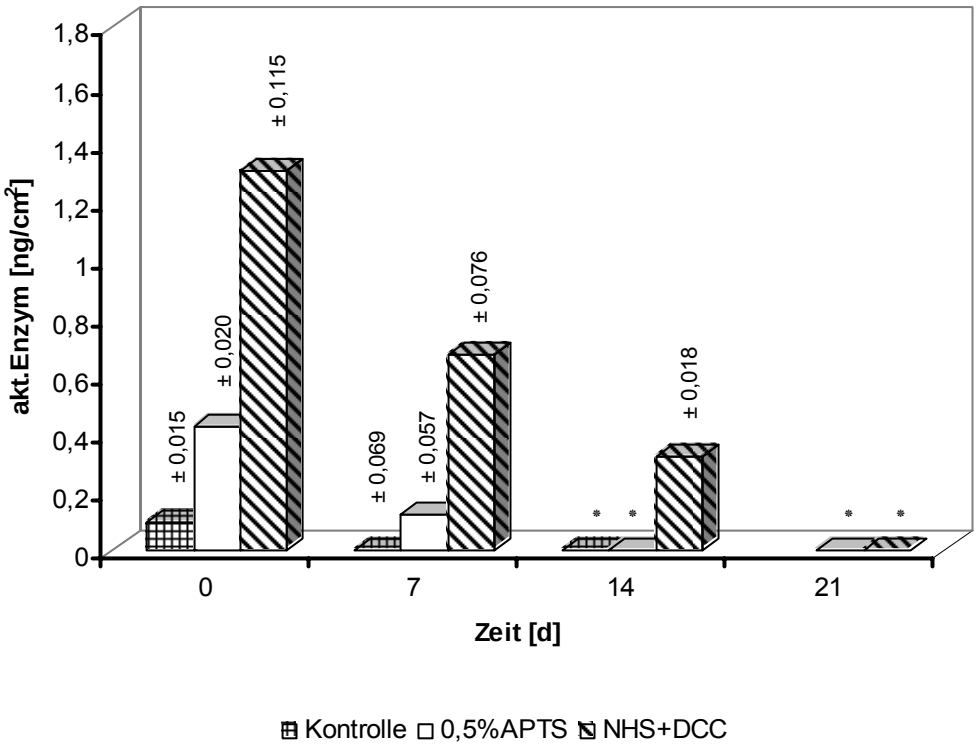
Die so hergestellten Proben wurden in 150 mM Phosphatpuffer pH 7,0 bei 4 °C gelagert und die Menge des aktiven Enzyms in regelmäßigen Abständen geprüft. Zur Bestimmung der Menge gebundenen Proteins wurden die beschichteten Keramikplättchen in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (8x12) gebracht und mit 210 µl Substratlösung (29,6 ml Natriumacetat-Citrat-Puffer 100 mM pH 4,9/300µl einer Lösung von 10 mg/ml 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin (TMB) in Dimethylsulfoxid (DMSO)/60µl H_2O_2 3%) versetzt. Die Mikrotiterplatte wurde ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 µl H_2SO_4 8,3% gestoppt. Die Farbstoff-Konzentration wurde photometrisch bei 450nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt.

Die Menge HRP konnte über eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion ausgerechnet werden (siehe Abb. 3-3). Für Keramik- und Polycarbonatproben wurden dieselben Lösungsmittel mit gleichen Konzentrationen verwendet, um vergleichen zu können, ob die Beschichtungsreaktionen besser bei Keramik- oder bei Polycarbonatoberflächen funktionieren. Abgesichert wurden die Messungen durch Negativkontrollen, bei denen der

Silanisierungsschritt nicht durchgeführt wurde. Es wurde deutliche Unterschiede in der Aktivitätsabnahme bei den einzelnen Messreihen beobachtet.

3.1.5.1.1 Bindung vom HRP an aminosilanisierten und mittels NHS-DCC aktivierten Keramikoberflächen

Als erstens wurden die Keramikplättchen untersucht. Der Ausgangswert, bezogen auf die Menge an immobilisiertem HRP-Enzym, für die Keramikproben, die mit 3M KOH vorbehandelt wurden, betrug 1,3 ng/cm^2 aktives Enzym (Abb.3-5). Nach 14 Tagen nahm die gebundene Enzymmenge um 75% ab. Während die mit 0,5% APTS-Lösung silanisierte Plättchen einen Ausgangswert von 0,4 ng/cm^2 zeigten, hatten die Proben, an welche direkt HRP immobilisiert wurde (Kontrolle), einen Wert von 0,1 ng/cm^2. Nach 21 Tagen wurde keine Aktivität nachgewiesen.

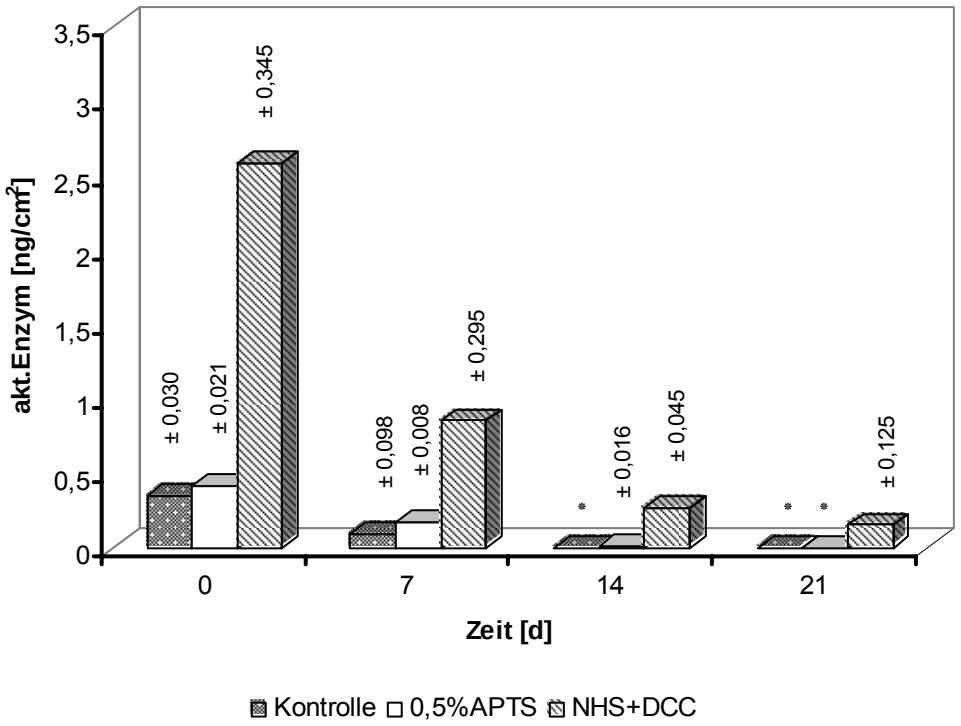


* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-5 Immobilisierung des Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit 3M KOH vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **NHS-DCC:** HRP mit NHS-DCC modifizierten Körperoberflächen.

Als die Oberflächen mit einer Mischung aus EtOH/H_2O gereinigt wurden, zeigten die Keramikplättchen nach 21 Tagen einen Wert von 0,16 ng/cm^2 (Abb. 3-6).

Die Proben, die mit Spacer vorgesehen wurden, zeigten eine Menge an aktivem Enzym nach der Immobilisierung von 2,5 ng/cm^2 und nach 21 Tagen von 0,1 ng/cm^2. Direkt nach der Immobilisierung wurden die Werte von 0,3 ng/cm^2 für die Kontrolle und 0,4 ng/cm^2 für die mit 0,5% APTS behandelten Proben nachgewiesen.



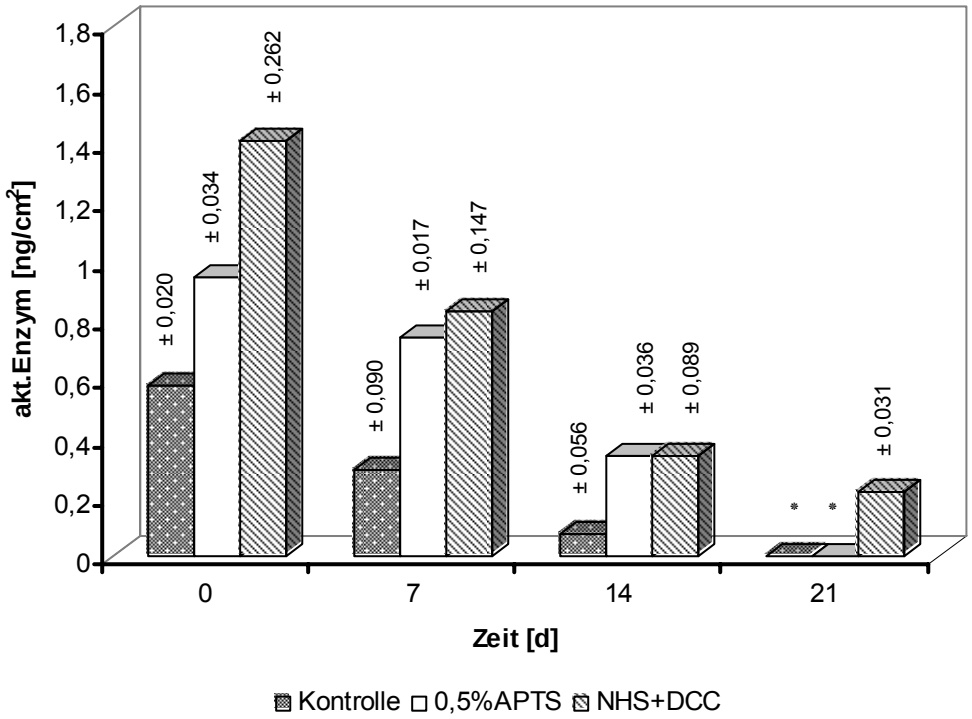
* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-6 Immobilisierung des Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus EtOH/H_2O im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **NHS-DCC:** HRP mit NHS-DCC modifizierten Körperoberflächen.

Nach 7 Tagen wurde eine starke Abnahme an immobilisiertem Enzym sowohl für die Proben, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind, als auch für die Proben, die mit NHS-DCC modifiziert wurden.

Wie aus Abbildung 3-7 ersichtlich ist, war nach 14 Tagen eine Aktivitätsbestimmung des Enzyms für die drei parallelen Versuche noch möglich. Für die Kontrolle wurde einen Wert von 0,07 ng/cm^2 ermittelt. Die mit 0,5% APTS silanisierten Oberflächen zeigten eine Enzymaktivität nach 14 Tagen von 0,13 ng/cm^2. Die Keramikoberflächen, die mit Bernsteinsäureanhydrid behandelt wurden, wiesen direkt nach der Immobilisierung eine

Menge an aktives Enzym von 1,4 ng/cm^2 und nach 14 Tagen eine von 0,33 ng/cm^2 auf. Nach 21 Tagen war nur 15% von Ausgangswert vorhanden.

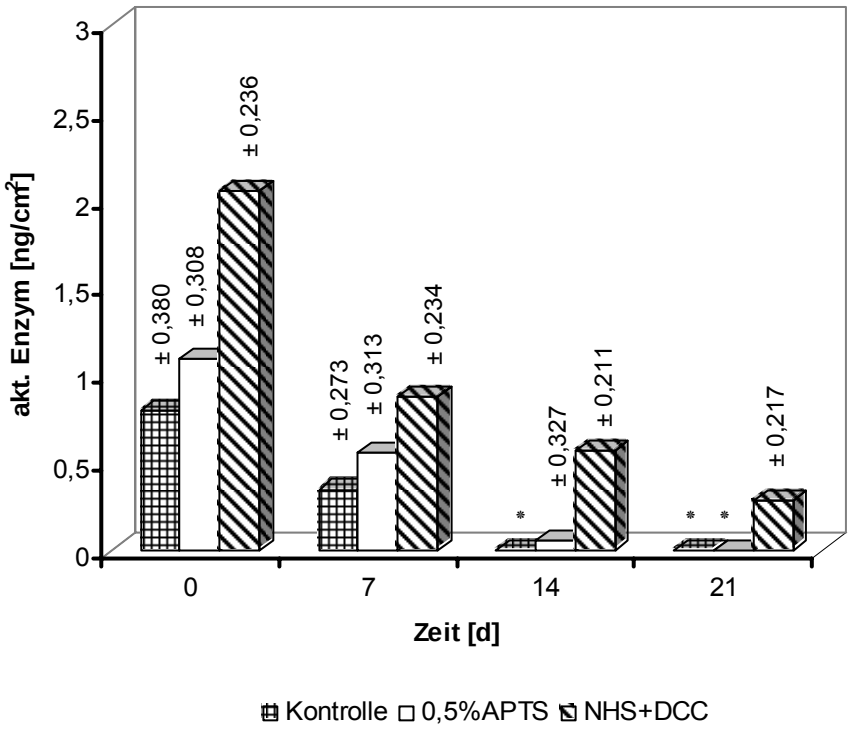


* konnte nicht bestimmt werden

Abb.3-7 Immobilisierung des Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit 3M KOH/EtOH vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **NHS-DCC:** HRP mit NHS-DCC modifizierten Körperoberflächen.

3.1.5.1.2 Immobilisierung vom HRP an aminosilanisierten und mittels NHS-DCC aktivierten Polycarbonatoberflächen

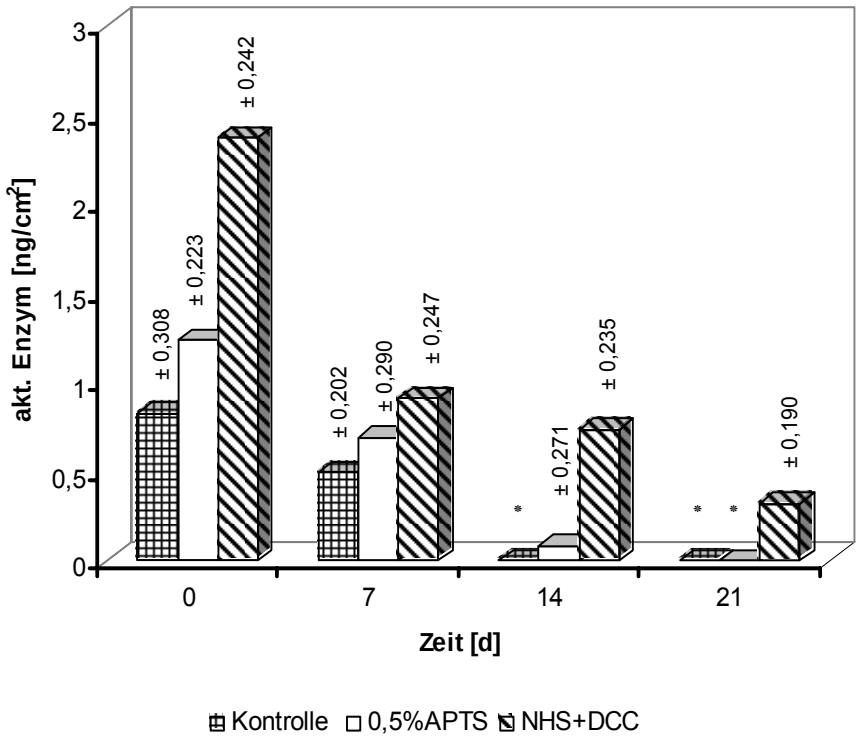
In den nächsten Versuch wurden die Polycarbonatproben nach dem gleichen Schema wie bereits beschrieben untersucht. Für alle drei Versuchsreihen wurde ein ähnlicher Verlauf beobachtet. Wie bei den Keramikproben zeigte das immobilisierte Enzym nach 21 Tagen für die Kontrolle und der mit 0,5%APTS behandelten Plättchen keine Aktivität mehr (Abb.3-8). Für die Oberflächen, die mit Spacer versehen wurden, wurde einen Ausgangswert von 2,05 ng/cm^2 ermittelt. Nach 21 Tagen lag den Wert bei 0,28 ng/cm^2.



* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-8 Immobilisierung des Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit 3M KOH und UV-Licht vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **NHS-DCC:** HRP mit NHS-DCC modifizierten Oberflächen.

Ähnliche Resultate wie bei den mit KOH gereinigten Proben wurden auch bei Verwendung einer Mischung aus Ethanol und KOH erhalten. Die Polycarbonatplättchen, die mit Bernsteinsäureanhydrid behandelt wurden, zeigten eine doppelt so große aktive Enzymmenge als diejenigen, die nur mit 0,5% APTS-Lösung behandelt wurden. In diesem Fall war einen Ausgangswert von 1,23 ng/cm^2 nachweisbar (Abb.3-9).

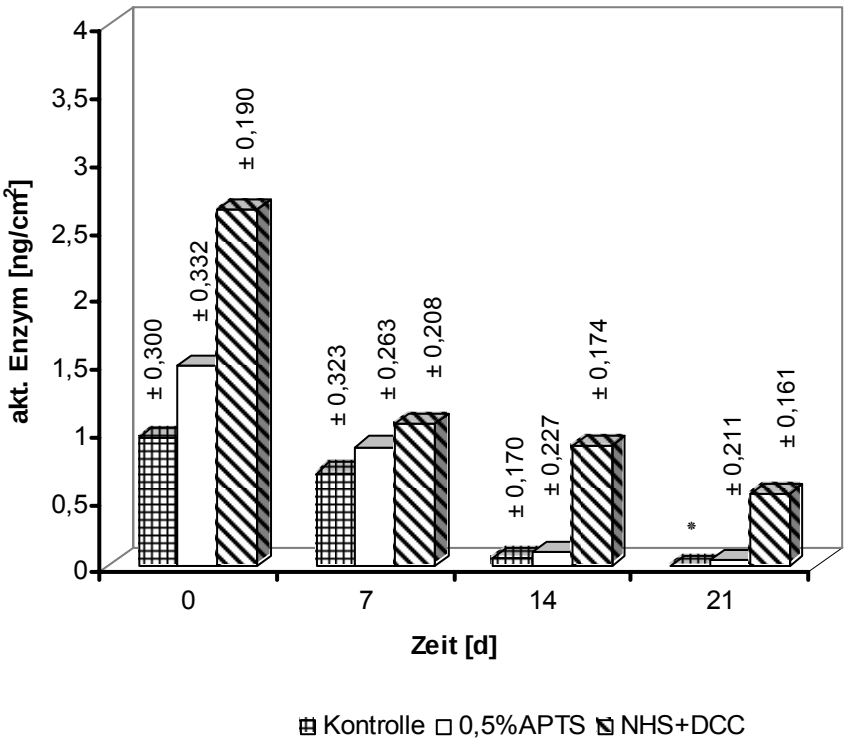


* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-9 Immobilisierung des Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit 3M KOH/EtOH und UV-Licht vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **NHS-DCC:** HRP mit NHS-DCC modifizierten Körperoberflächen.

Nach 21 Tagen zeigten die Polycarbonatoberflächen, die mit NHS-DCC modifiziert wurden, noch 0,3 ng/cm^2 an immobilisiertem, aktivem Enzym.

Durch die Behandlung der Oberflächen mit einer EtOH/H_2O-Lösung und UV-Licht wurde nach der Immobilisierung ein Wert von 2,63 ng/cm^2 gemessen (Abb.3-10). Nur 20% der Ausgangswert wurde nach 21 Tagen nachgewiesen. Die Kontrolle zeigte nach 21 Tagen wie bei allen anderen parallelen Versuchen keine Aktivität mehr.



* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-10 Immobilisierung des Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit einer Mischung aus EtOH/H_2O im Verhältnis 1:1 und UV-Licht vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **NHS-DCC:** HRP mit NHS-DCC modifizierten Körperoberflächen

Die Polycarbonatproben, die nur mit APTS modifiziert wurden, wiesen direkt nach der Immobilisierung einen Wert von 1,4 ng/cm^2 an gebundenem aktivem Enzym und nach 21 Tagen nur noch 0,03 ng/cm^2.

3.1.5.2 Immobilisierung vom Protein an aminofunktionalisierte Festkörper-oberflächen mittels Glutardialdehyd

Die mit Glutardialdehyd (GDA) aktivierten Alkylsilane können mit dem gewünschten Protein reagieren, um diese über Aminfunktionen kovalent an die Substratoberfläche zu immobilisieren. Zur Anbindung des Proteins an die mit APTS modifizierte Festkörperoberfläche wurden die Aminogruppen in einem ersten Schritt mit einem Dialdehyd zur Reaktion gebracht. Dazu werden die Plättchen für 4 Stunden auf einem Schüttler

(Schüttelfrequenz 300 min^{-1}) in eine 1%ige Glutaraldehyd-Lösung (GDA) in 0,05M Phosphatpuffer pH 7,0 inkubiert [Nanci, A. et al. 1998].

Danach wurden die Proben dreimal jeweils mit 10 ml Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und zu einer Lösung des anzubindenden Proteins (20µg/ml HRP) in 0,05M Phosphatpuffer pH 7,0 für 14 Stunden gebracht. Durch Eintauchen in die entsprechende Lösung wurde das Enzym an den freien Aldehydgruppen fixiert. Um die gebundene Proteinmenge ermitteln zu können, wurde eine Kalibriergerade erstellt. Die erhaltene Kalibrierfunktion ist in Abbildung 3-11 dargestellt.

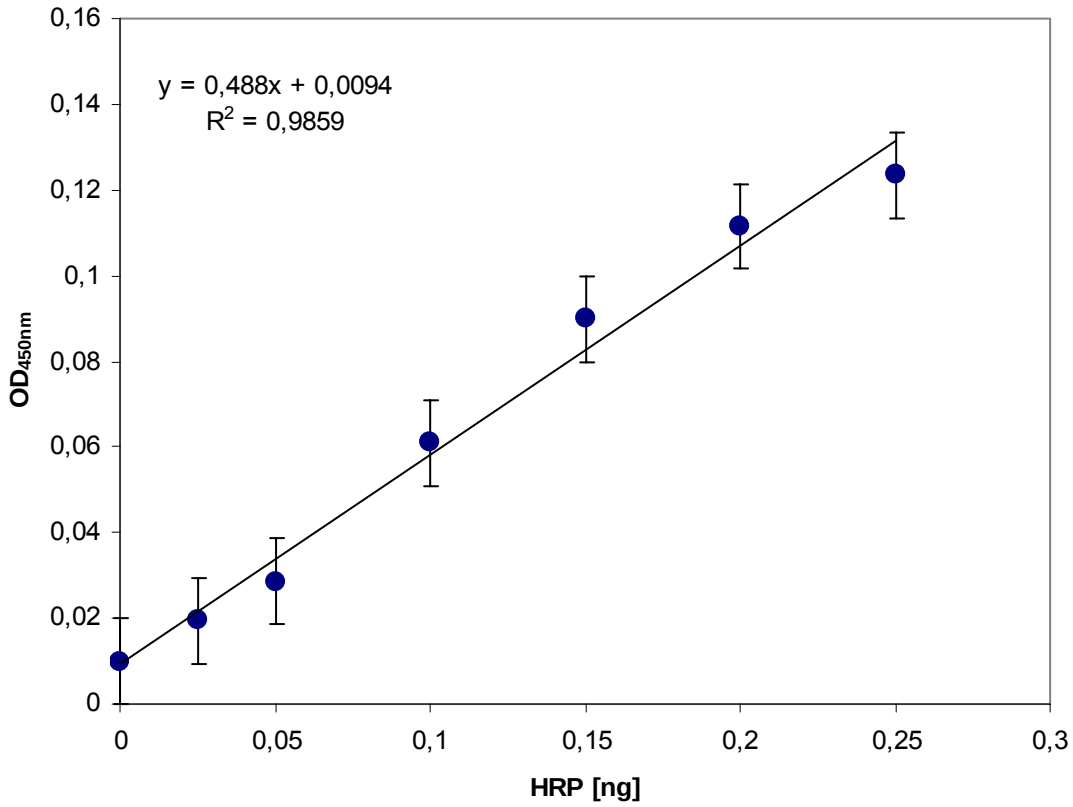


Abb.3-11 Kalibrationskurve der HRP. Die Messung wurde mit einer Stammlösung der Konzentrationen $5x10^{-3}$ µg/ml durchgeführt. Es wurde in Schritten von 5 µl Stammlösung gemessen. Mit der Substratlösung (29,6 ml Natriumacetat-Citrat-Puffer 100 mM pH 4,9/300µl einer Lösung von 10mg/ml 3,3',5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Dimethylsulfoxid (DMSO)/60µl H_2O_2 3%) wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte auf 210 µl aufgefüllt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach 15 Minuten wurden 40 µl H_2SO_4 8,3% zugegeben. Die Konzentration wurde photometrisch bei 450nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt.

Nach Entnahme aus der Lösung wurden die Proben fünfmal jeweils mit 10 ml 0,05M Phosphatpuffer pH 7,0 gespült und in Aufbewahrungspuffer (150mM Phosphatpuffer pH 7,0) gelagert. In Abbildung 3-12 ist das Schema einer Immobilisierung mit Aminopropyltriethoxysilan (APTS) und Glutardialdehyd abgebildet [Suri, C.R. et al. 1996].

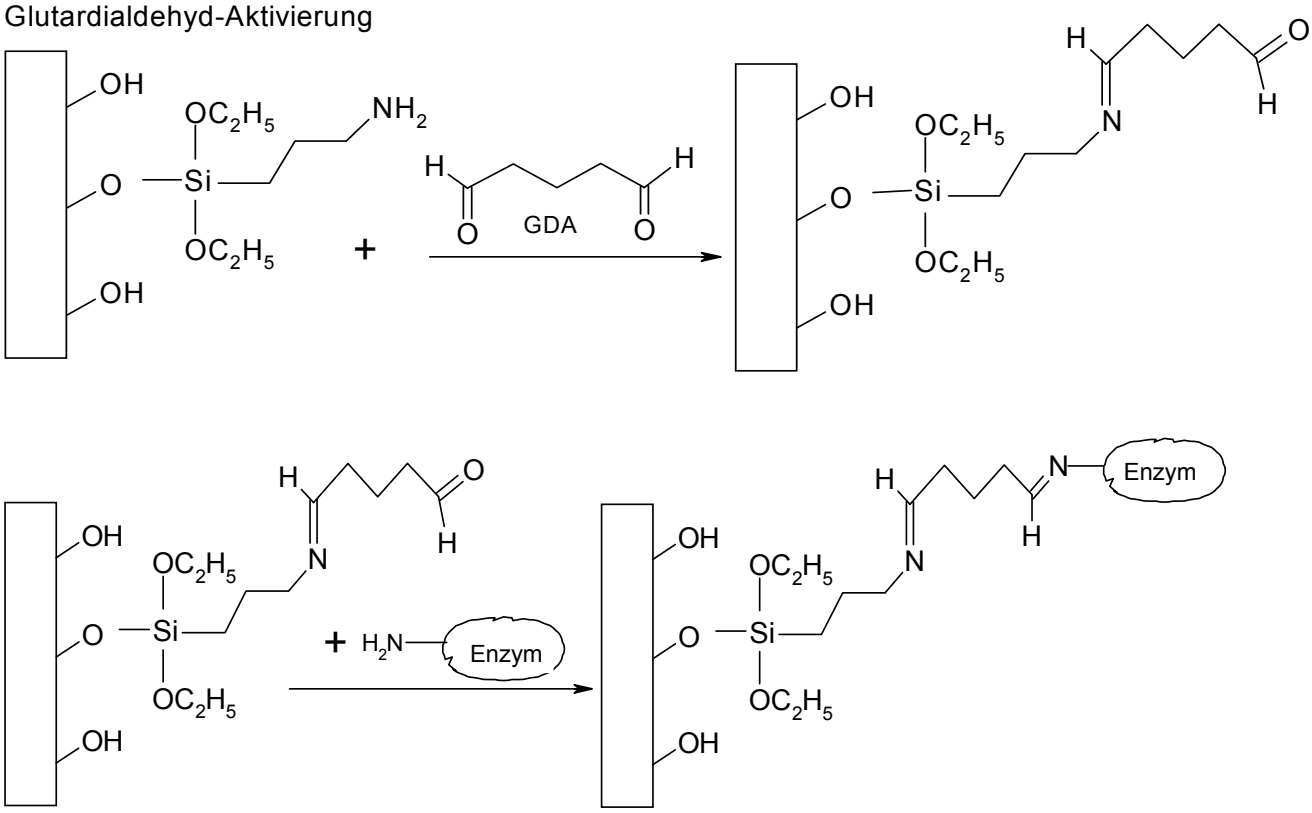


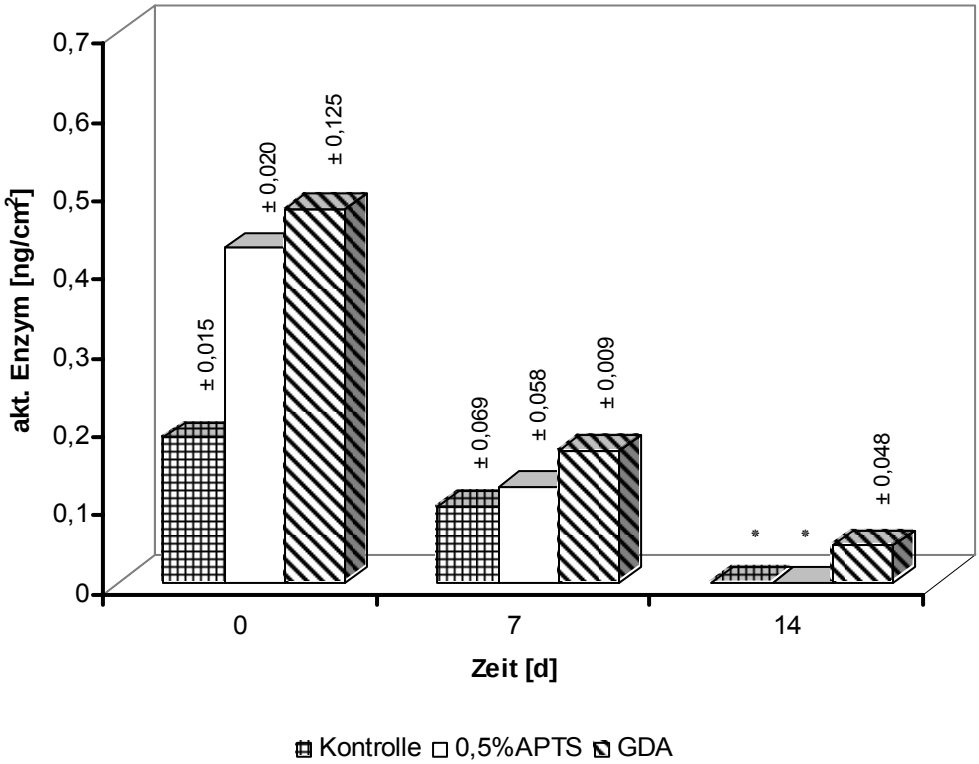
Abb.3-12 Immobilisierung von Enzymen über Glutardialdehyd an aminofunktionalisierte Oberflächen

Nach den photometrischen Messungen bei 450 nm wurde die Enzymmenge (aktives Enzym) pro cm^2 Probenfläche ausgerechnet. Für die einzelnen Messreihen wurden auch signifikante Unterschiede in der Enzymaktivität beobachtet.

3.1.5.2.1 Immobilisierung von HRP an aminosilanisierten und mittels GDA aktivierten Keramikoberflächen

Die APTS funktionalisierten Keramikoberflächen, die mit KOH vorbehandelt wurden (Abb. 3-13), erreichten eine Menge an immobilisiertes Enzym von 0,42 ng/cm^2. Die Oberflächen,

die mit Glutardialdehyd vorbehandelt wurden, ergaben direkt nach der Immobilisierung einen Wert von 0,47 ng/cm^2 und nach 14 Tagen einen Wert von 0,04 ng/cm^2.



* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-13 Immobilisierung des Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit 3M KOH vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsoptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **GDA:** Immobilisierung der HRP mittels Glutardialdehyd.

Bei diesen Experimenten wurde nach 21 Tagen kein gebundenes aktives Enzym mehr nachgewiesen.

An die mit Ethanol/KOH vorbehandelten Oberflächen (Abb.3-14) konnte eine größere Menge aktives Enzym immobilisiert werden. Die Anfangsaktivität war doppelt so groß (0,97 ng/cm^2) als die für die mit KOH behandelten Oberflächen. Sowohl die mit APTS funktionalisierten Oberflächen als auch die mit Glutardialdehyd behandelten Oberschichten wiesen nach 14 Tagen eine Enzymmenge von 0,1 ng/cm^2 auf.

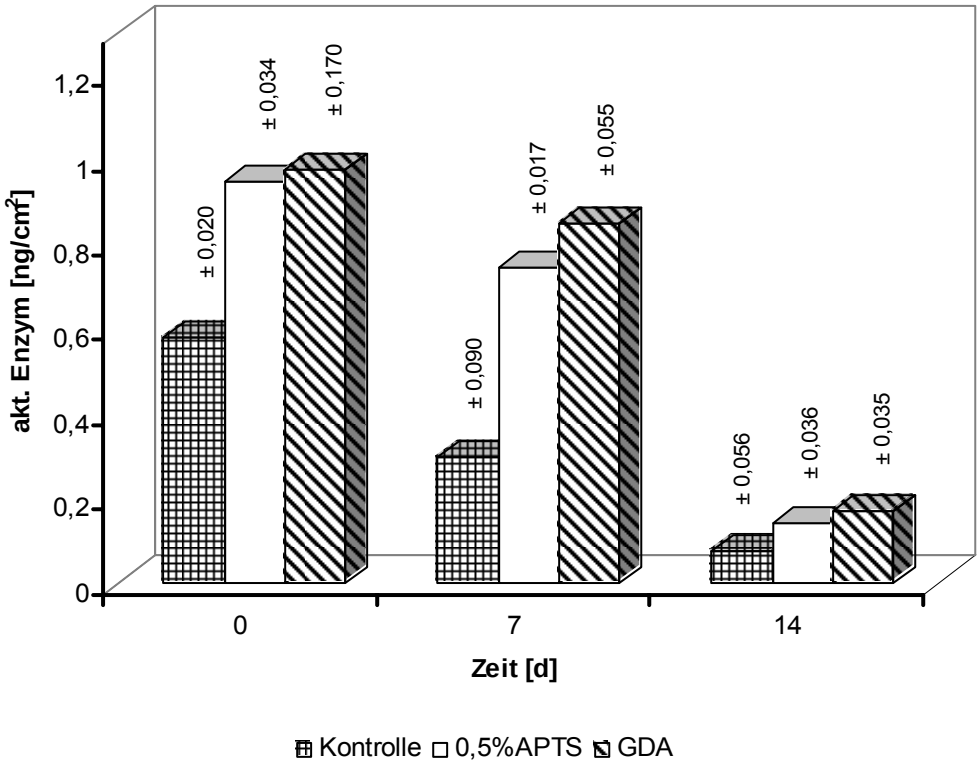


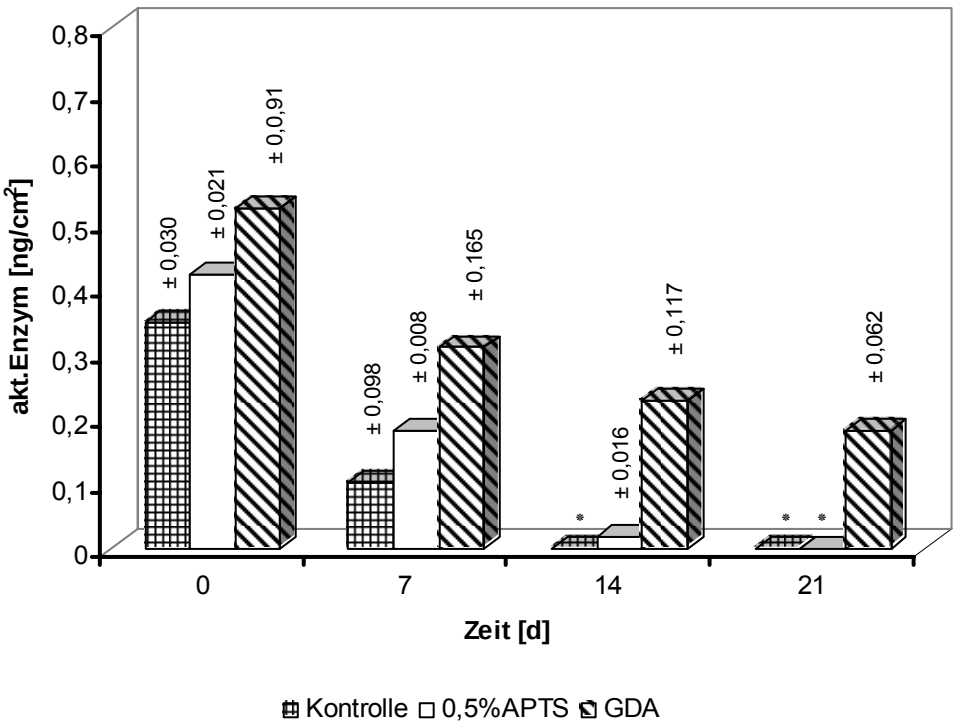
Abb.3-14 Immobilisierung des Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus EtOH/KOH im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsoptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **GDA:** Immobilisierung der HRP mittels Glutardialdehyd.

Auffallend war bei diesem Experiment, dass direkt nach der Immobilisierung die Menge an immobilisiertem Enzym bei den Oberflächen, die nur mit APTS behandelt wurden, ähnlich hoch wie bei den mit Glutardialdehyd modifizierten Proben war. In diesen Experimenten wurde nach 21 Tagen kein aktives Enzym mehr nachgewiesen.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei einer Versuchsreihe erzielt, bei der die Oberfläche der Proben mit Ethanol und Wasser im Verhältnis 1:1 behandelt wurde (Abb.3-15).

Neben der Aktivität auf der mit APTS eingeführten Oberfläche (0,42 ng/cm^2) war auch das nach Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd (GDA) aktive Enzym nachweisbar (0,52 ng/cm^2).

Nach 21 Tagen wurde die Menge des aktiven Enzyms mit 0,18 ng/cm^2 bestimmt. Für die Kontrollprobe wurde nach 14 Tagen in allen Versuchsreihen keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen.

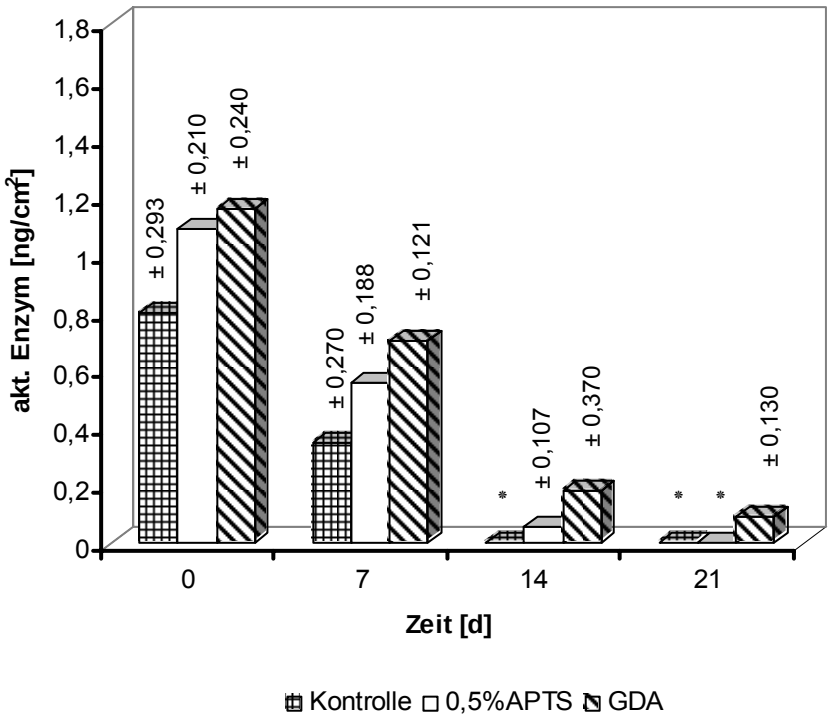


* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-15 Immobilisierung des Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsoptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **GDA:** Immobilisierung der HRP mittels Glutardialdehyd.

3.1.5.2.2 Immobilisierung von HRP an aminosilanisierten und mittels GDA aktivierten Polycarbonatoberflächen

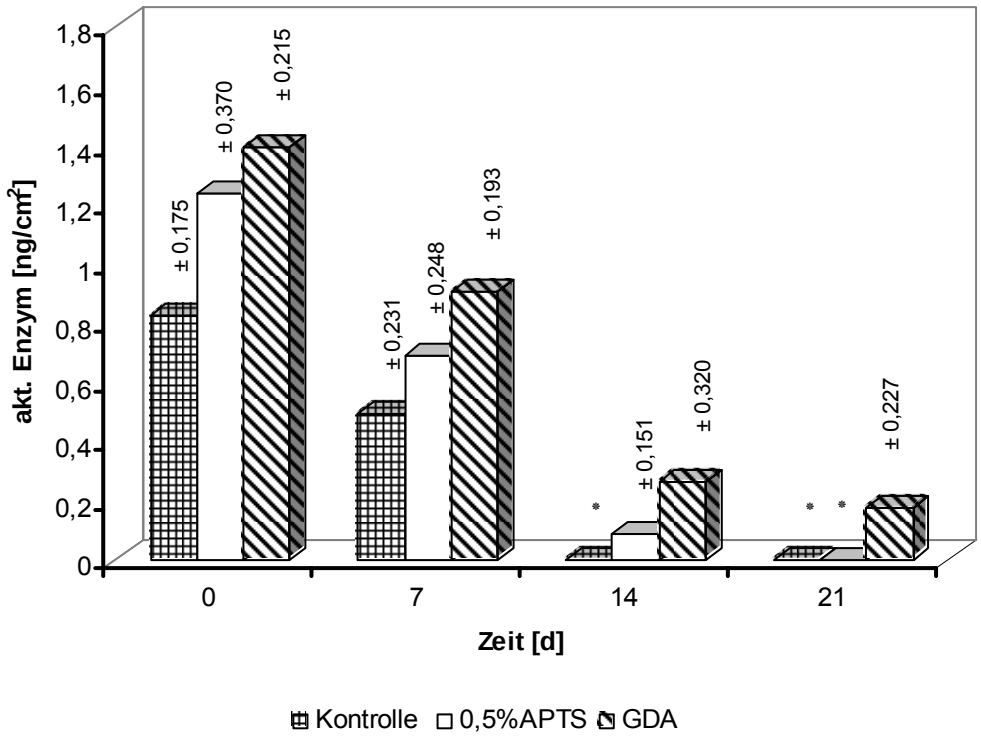
Analog zu den an Keramikproben durchgeführten Versuchen wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchsreihen Polycarbonat als Immobilisierungssubstrat getestet. Die Polycarbonatplättchen, die mit KOH, 0,5%APTS und Glutardialdehyd behandelt wurden, ergaben direkt nach der Immobilisierung eine Menge an aktives Enzym von 1,16 ng/cm^2 (Abb.3-16). Nach 21 Tagen betrug die Menge des aktiven Enzyms noch 7% des Ausgangswertes. Die unmodifizierten Oberflächen zeigten nach 14 Tagen keine Aktivität mehr.



* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-16 Immobilisierung des Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit 3M KOH vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsoptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Polycarbonatoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **GDA:** Immobilisierung der HRP mittels Glutardialdehyd.

Für die mit einer Mischung aus 3M KOH/EtOH und UV-Licht vorbehandelten Plättchen wurden wiederum ähnliche Verläufe für die Enzymaktivität über die Zeit gefunden (Abb.3-17). Während die immobilisierte Enzymmenge für die mit 0,5% APTS und Glutardialdehyd modifizierten Proben nach 14 Tagen 19% von Anfangswert betrug, wiesen die unbehandelten Proben keine Aktivität mehr auf.

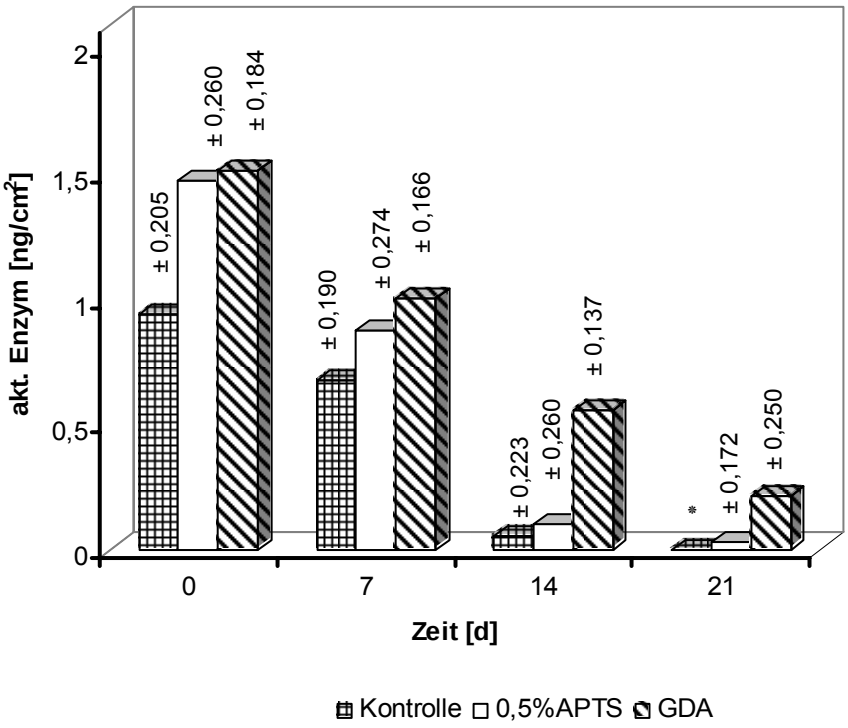


* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-17 Immobilisierung des Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit einer Mischung aus 3M KOH/EtOH im Verhältnis 1:1 und UV-Licht vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsoptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Polycarbonatoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **GDA:** Immobilisierung der HRP mittels Glutardialdehyd.

Auffallend ist jedoch die Beobachtung, dass direkt nach der Immobilisierung die Menge an gebundenem Enzym für die Proben, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind, ähnlich wie bei den mit Glutardialdehyd modifizierten Proben war.

Eine Reinigung der Oberfläche mit einer Mischung aus Ethanol/Wasser und eine UV-Behandlung führten zu erhöhten Werten (Abb.3-18). Die unmodifizierten Proben wiesen nach 21 Tagen keine Aktivität mehr auf. Die Oberflächen, die mit Glutardialdehyd behandelt wurden, wiesen nach 21 Tagen eine fünffach höhere Aktivität im Vergleich zu den aminosilanisierten Plättchen auf.



* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-18 Immobilisierung des Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit einer Mischung aus EtOH/H_2O im Verhältnis 1:1 und UV-Licht vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsoptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Polycarbonatoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind. **GDA:** Immobilisierung der HRP mittels Glutardialdehyd.

Eine Immobilisierung von Meerretichperoxidase über Glutardialdehyd führte nicht zu besseren Ergebnissen. Insgesamt zeigten die nach der Glutardialdehydmethode hergestellten Enzymoberflächen eine geringe Bindung.

3.1.5.3 Immobilisierung der oxidierten HRP an einer mit Aminogruppen funktionalisierten Festkörperoberfläche

Eine andere Methode zur Verknüpfung des Enzyms an aminofunktionalisierte Oberflächen besteht darin, dass Meerretichperoxidase zuerst oxidiert wird. Durch Oxidation von Kohlenhydraten stehen Aldehydgruppen zur Verfügung, die weiter mit Aminogruppen reagieren können (Abb.3-19). Diese Kopplung kann von einer intermediären Schiff'chen Base ausgehen, die mittels Natriumborhydrid reduziert werden kann und die Bindung somit stabilisiert wird.

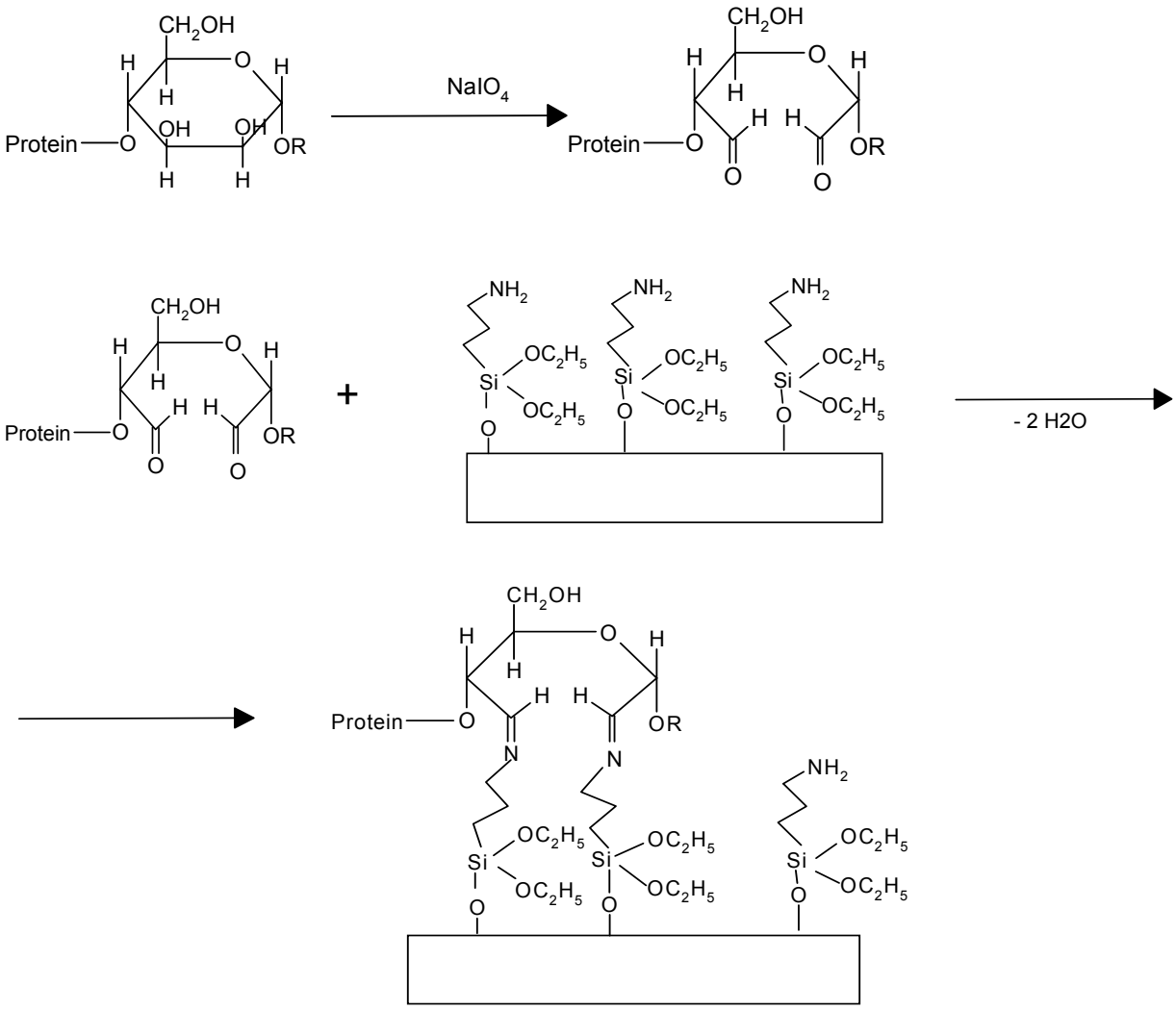


Abb.3-19 Reaktionsschema der Immobilisierung eines Enzyms an Oberflächen, die mit APTS funktionalisiert wurden.

Das Enzym Meerretichperoxidase (HRP) wurde zuerst in Oxidationspuffer gelöst (8mg/ml) und auf Eis gekült. Dann wurde Natriumperjodat-Lösung (Endkonzentration 10mM) zugegeben und die Lösung 1 Stunde im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Eine Glycerol-Lösung wurde bis zu einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt und der Ansatz weitere 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Das oxidierte Enzym wurde von nicht umgesetzten Reaktionspartnern durch Dialyse getrennt (Abb.3-20).

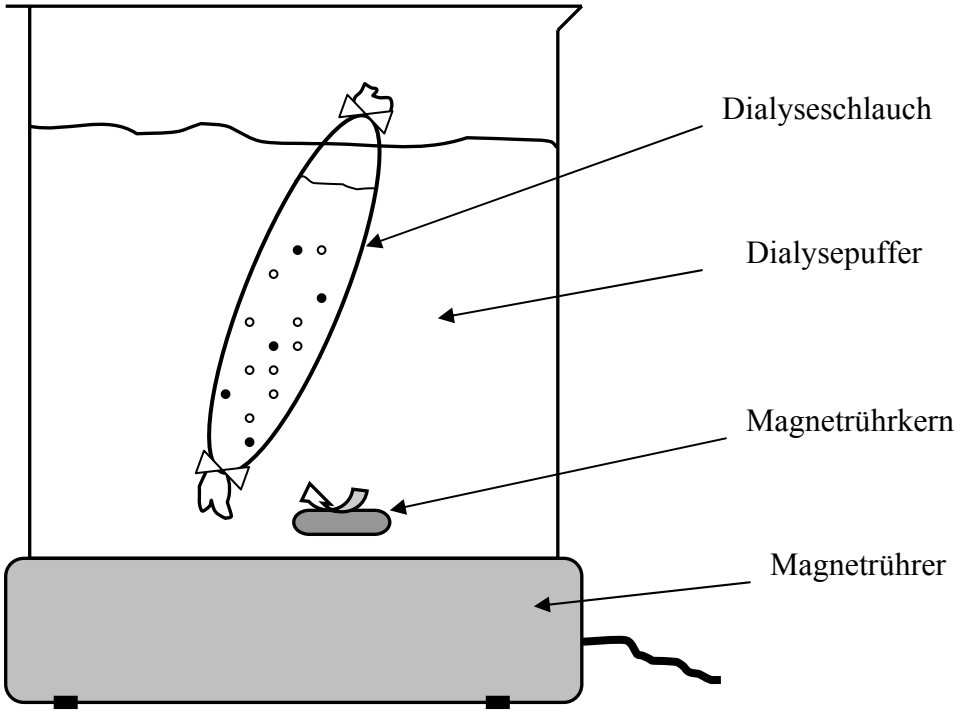


Abb.3-20 Dialyse in Dialyseschläuchen. Für die Dialyse wurde die zu dialysierende Lösung in einen Dialyseschlauch gefüllt, der verschlossen in einen Dialysepuffer getaucht und dort über eine bestimmte Zeit durch Rühren bewegt wurde.

Der Proteingehalt wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brillant Blau G-250 an positiv geladene Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 495 nm zu 595 nm ein. Als Kalibrationsstandard dient Rinderserumalbumin Stammlösung (BSA) 1mg/ml. Die Probe wird so verdünnt, dass ihr Proteingehalt in den Kalibrationsbereich fällt. Hierzu wurden zu jedem Küvettenansatz 100 µl Probenlösung und 900 µl Bradford-Reagenz hinzupipettiert und gut gemischt. Fünf Minuten nach Zugabe des Farbreagenzens wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert aus 100 µl H_2O und 900 µl Bradford-Reagenz gemessen (siehe Abb. 3-14).

Die aminofunktionalisierten Proben wurden zu einer Lösung des oxidierten Proteins (20 µg/ml) in Kupplungspuffer für 14 Stunden bei 4°C gegeben. Für jedes Plättchen wurden 3 ml Protein-Lösung eingesetzt.

Danach wurden die Proben mit Natriumborhydrid-Lösung (10µl/ml) reduziert und 2 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Entfernen der Proteinlösung wurden die Proben fünfmal (10 ml/Stück) mit 150 mM Phosphat-Puffer pH 7,0 gespült und in Aufbewahrungspuffer gelagert. Die Untersuchung der gebundenen Proteinmenge wurde wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben durchgeführt.

Die Kalibrierfunktion wurde durch eine lineare Regression ermittelt (Abb.3-21).

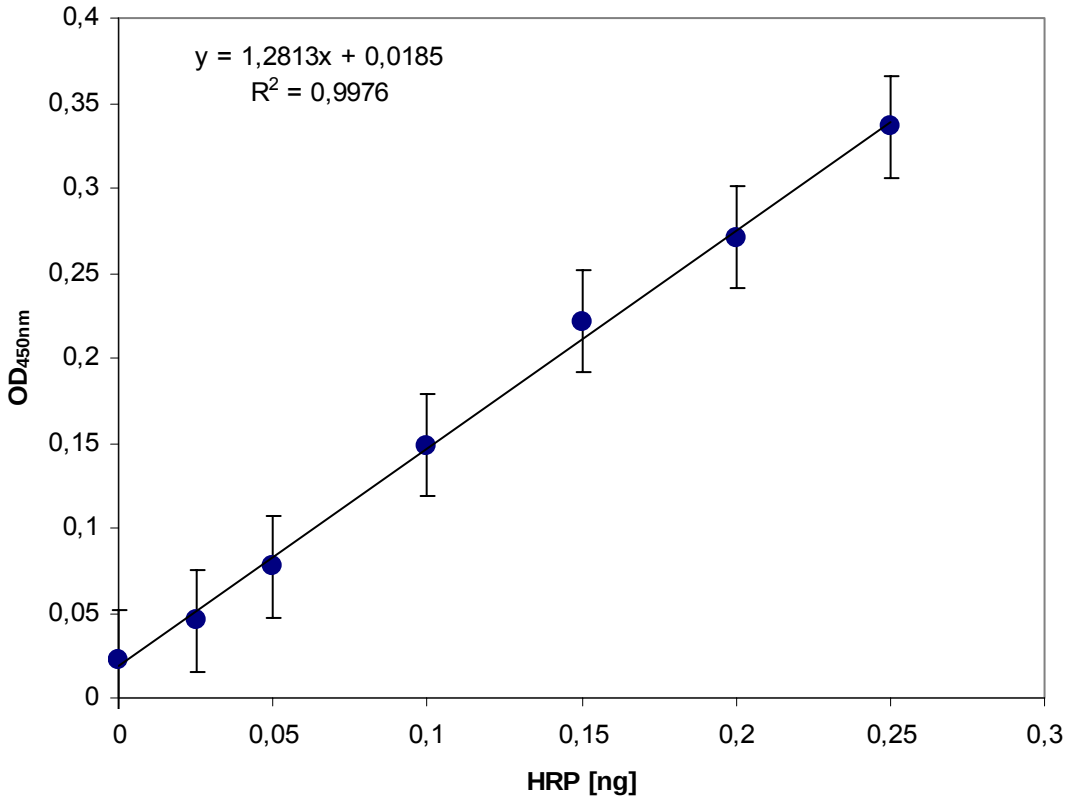


Abb.3-21 Kalibriergerade der oxidierten HRP. Die Messung wurde mit einer Stammlösung der Konzentrationen $5x10^{-3}$ µg/ml Enzym durchgeführt. HRP-Standards wurden mit TMB und Wasserstoffperoxid versetzt.

3.1.5.3.1 Immobilisierung vom HRP an Keramikoberflächen

In einer ersten Versuchsreihe sollte der Einfluss der Silankonzentration auf die immobilisierbare Proteinmenge an Keramikoberflächen untersucht werden. Aminopropyltriethoxysilan (APTS) wurde in Konzentrationen von 0,1% bis 0,6% eingesetzt. Es wurde eine Sättigungskonzentration beobachtet (0,4 %), bei deren Überschreitung kein weiterer Anstieg der Enzymaktivität erreicht wurde. Die Menge an aktivem Enzym bei unterschiedlichen Versuchen unter Verwendung verschiedener Silankonzentrationen ist in Abb.3-22 dargestellt.

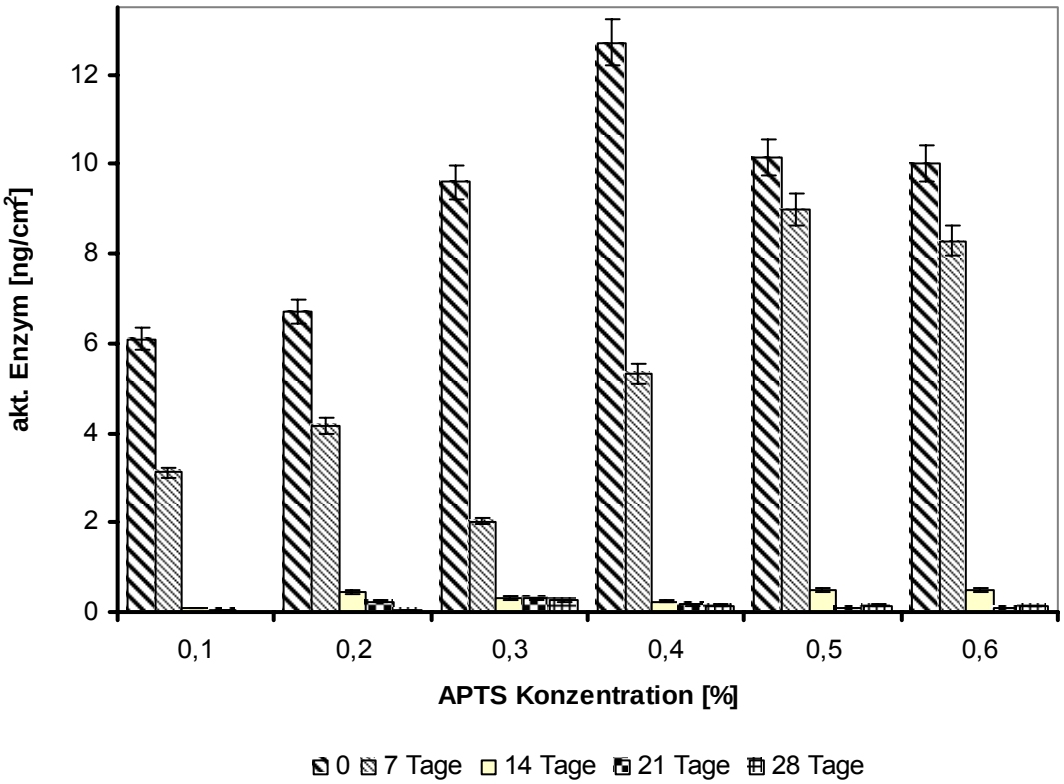
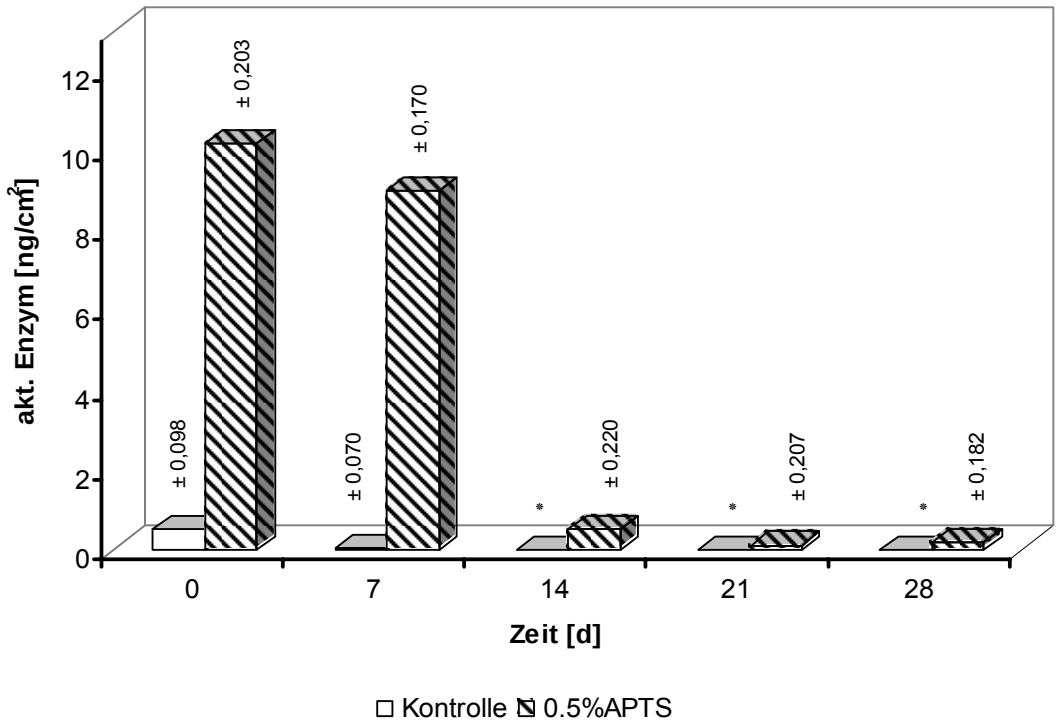


Abb.3-22 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit verschiedenen Silankonzentrationen vorbehandelt wurden.

Die Menge an aktivem Enzym lag für die Proben, die mit 0,1-0,2 % APTS behandelt wurde, nach der Immobilisierung bei 6,1 ng/cm^2. Das aktive Enzym für die mit 0,5% APTS silanisierten Plättchen wurde mit 10,1 ng/cm^2 bestimmt. Während die Menge an aktivem Enzym nach 28 Tagen für die mit 0,1% APTS behandelten Proben 0,01 ng/cm^2 war, wies die Plättchen, die mit 0,5% APTS silanisiert wurden, 0,15 ng/cm^2 auf. Für die nachfolgenden Versuche wurden die Proben mit 0,5% 3-Aminopropyltriethoxysilan behandelt.

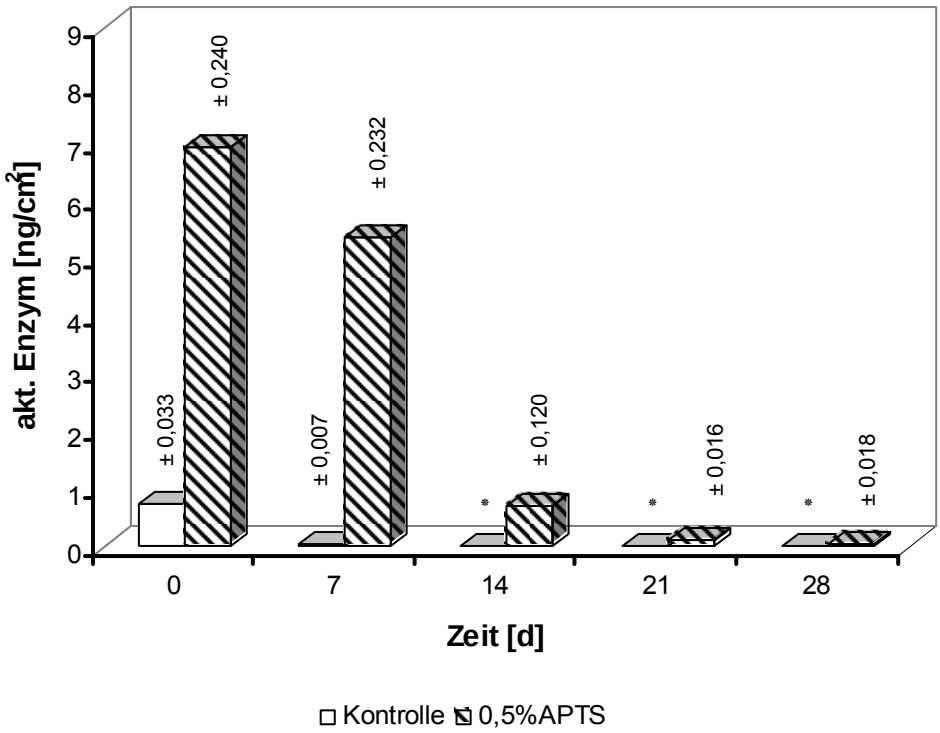
Zuerst wurden die Oberflächen mit einer Mischung aus EtOH/H_2O vorbehandelt (Abb.3-23). Während der Anfangsaktivität bei den modifizierten Oberflächen bei 10,16 ng/cm^2 lag, ergaben die unsilanisierten Proben einen Wert von 0,48 ng/cm^2. Nach 7 Tagen war noch 88% von Anfangsaktivität vorhanden. Die Kontrolle wies nach 14 Tagen im Vergleich zu silanisierten Probe keine Enzym-Aktivität mehr auf; für die silanisierte Probe ergab sich nach 28 Tagen einen Wert von 0,15 ng/cm^2. Insgesamt konnte an die mit 0,5% APTS derivatisierten Proben eine signifikant größere Menge aktives Enzym relativ stabil immobilisiert werden als an die nicht aminosilanisierten Plättchen.



* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-23 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus EtOH/H_2O im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind.

In die nächsten Versuchsreihen wurden die Keramikoberflächen mit 3M KOH Lösung vorbehandelt (Abb.3-24). Das immobilisierte Enzym für die Kontrolle zeigte einen Wert von 0,74 ng/cm^2 und der Wert für die mit 0,5% APTS behandelten Plättchen lag bei 6,94 ng/cm^2. Während die Aktivität nach 7 Tagen bei der Kontrolle um 95% abgenommen hatte, fiel die Aktivität bei der mit Silan beschichteten Probe auf 33 %. Die Plättchen, bei denen das Enzym direkt absorptiv immobilisiert wurde, zeigten nach 14 Tagen im Vergleich zu den mit APTS modifizierten Proben keine Aktivität mehr, die nach 28 Tagen noch gebundenes aktives Enzym aufwiesen (0,04 ng/cm^2).

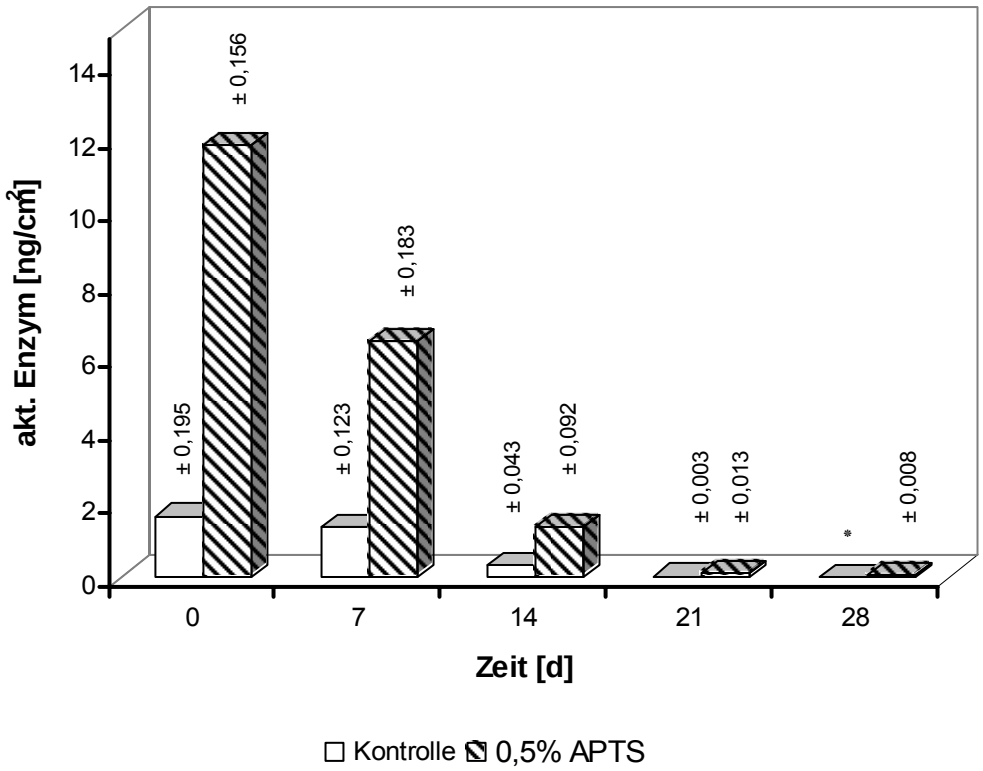


* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-24 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit 3M KOH vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind.

Darüber hinaus ist festzustellen, dass nach 7 Tagen die immobilisierte Proteinmenge des funktionsfähigen Enzyms stark abgenommen hat.

In dem folgenden Versuch wurden die Proben mit 3M KOH/EtOH gereinigt (Abb.3-25). Das gebundene Enzym zeigte bei den mit Aminopropyltriethoxisilan behandelten Plättchen zu Beginn der Messung einen Wert von 11,8 ng/cm^2. Nach 7 Tagen waren nur noch 55 % des aktiven Enzyms vorhanden und nach einem Monat lag der Wert bei 0,05 ng/cm^2. Obwohl die Kontrolle eine Menge an aktives Enzym von 1,66 ng/cm^2 aufwies, war nach 21 Tagen annähernd keine Enzymaktivität mehr feststellbar.



* *konnte nicht bestimmt werden*

Abb.3-25 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus 3M KOH/EtOH im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind.

Bei dieser Methode war zu beobachten, dass nach 28 Tagen noch die gebundenes aktives Enzym an Keramikoberfläche nachgewissen werden konnte.

Um den Abfall der Enzymaktivität genauer zu untersuchen, wurde noch eine weitere Messreihe durchgeführt (Ab.3-26).

Bei beiden Messungen zeigte sich nach 14 Tagen ein deutlicher Aktivitätsverlust. Deswegen wurde die Aktivität innerhalb dieses Zeitraumes genauso untersucht (Abb.3-26). Während das aktive Enzym für die nicht silanisierten Proben (Kontrolle) nach der Immobilisierung einen Wert von 1,76 ng/cm^2 aufwies, wurde für die mit Silan behandelten Plättchen einen Wert von 11,42 ng/cm^2 ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass die Enzymaktivität nach 7 Tagen bei den mit 0,5% APTS modifizierten Oberflächen auf 56 % des Ausgangswertes abfiel. Nach 9 und 11 Tagen ist die Aktivität bei den silanisierten Proben weiter auf 15% gesunken, so dass nach 14 Tagen nur 13% der Anfangsaktivität vorhanden waren.

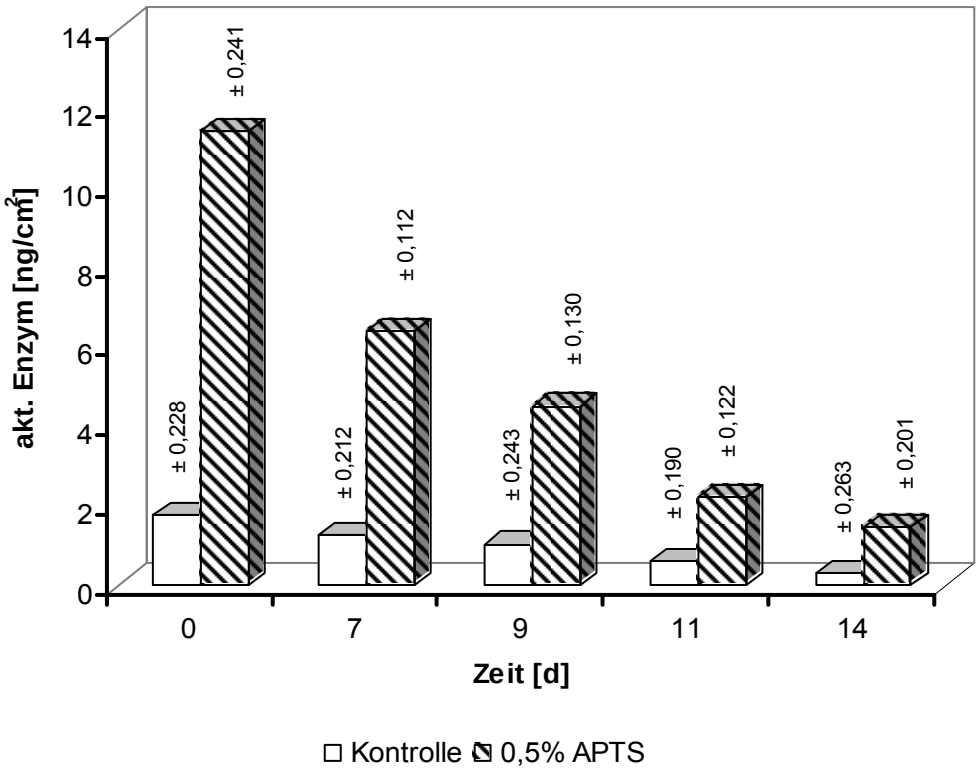


Abb.3-26 Überprüfung der Enzymaktivität innerhalb von 14 Tagen bei den behandelten und unbehandelten Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus 3M KOH/EtOH gereinigt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** HRP auf Keramikoberflächen, die mit 0,5% APTS derivatisiert worden sind.

3.1.5.3.2 Immobilisierung vom HRP an Polycarbonatoberflächen

Für alle nachfolgenden Bestimmungen der Enzymaktivität wurde an Stelle von Keramik-Polycarbonatproben verwendet. Die Versuche wurden analog zu den de Keramikproben durchgeführt, um vergleichen zu können, ob die Enzymimmobilisierung besser bei Polycarbonat- oder bei Keramikoberflächen funktioniert. Um die größtmögliche Empfindlichkeit der Testreihen erzielen zu können, mussten die Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien bei den einzelnen Versuchsreihen optimiert werden. Die Messungen wurden beginnend mit einer Startkonzentration der APTS-Lösung von 0,1% bis zu einer Endkonzentration von 0,6% durchgeführt. Die Konzentration des Proteins betrug 20 µg/ml. Das Enzym wurde wie in Abschnitt 3.1.4.3 vorbereitet und der Proteingehalt nach der Bradford-Methode bestimmt (Abb.3-27).

Die silanisierten Polycarbonatplättchen wurden für 14 Stunden mit einer Lösung der oxidierten HRP (20 µg/ml) inkubiert und dann in Aufbewahrungspuffer (150 mM Phosphat-Puffer pH 7,0) bei 4°C gelagert.

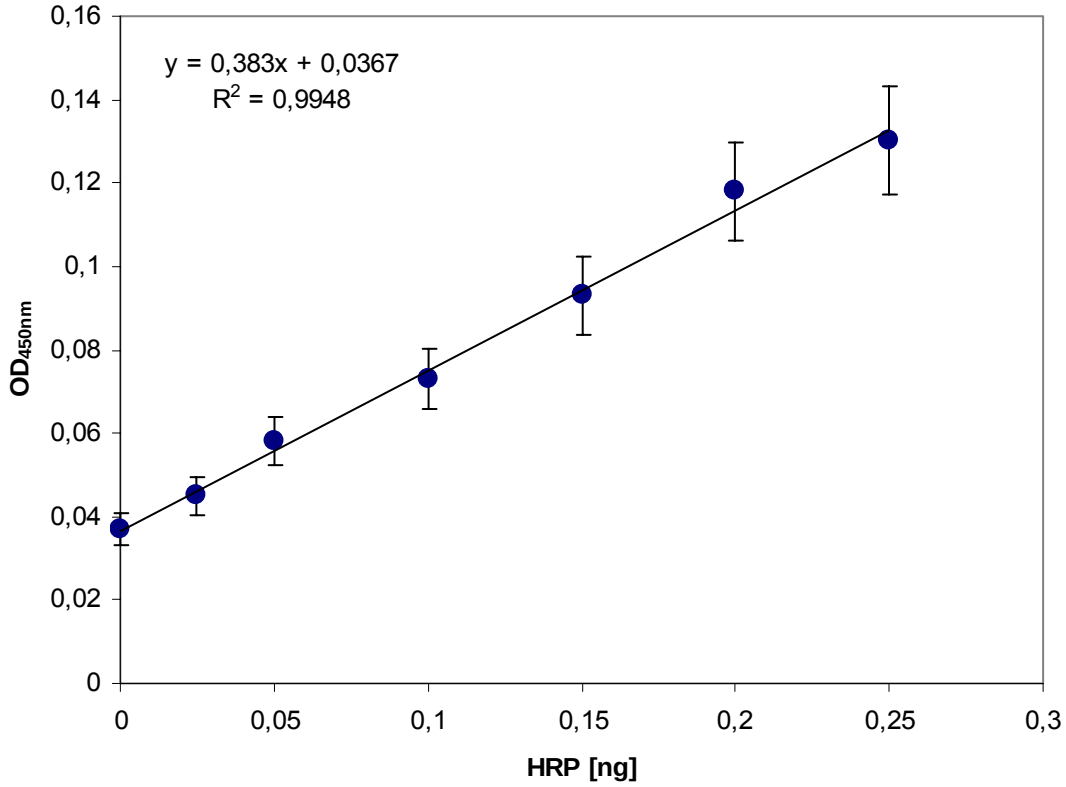


Abb. 3-27 Kalibriergerade der oxidierten HRP. Die Messung wurde mit einer Stammlösung der Konzentrationen $5x10^{-3}$ µg/ml durchgeführt. Die Aktivität der HRP wurde mittels eines photometrischen Assays auf der Basis von TMB und Wasserstoffperoxid bestimmt.

Wie in Abbildung 3-28 deutlich zu erkennen ist, konnten mit einer 0,5% APTS-Lösung die besten Ergebnisse erzielt werden. Obwohl die Enzym-Konzentration immer gleich war, zeigten die Werte der gebundenen HRP-Menge bei den Proben deutliche Unterschiede. Das bedeutet, dass die APTS-Konzentration bei den behandelten Plättchen eine wichtige Rolle spielt. Für die geringste eingesetzte Konzentration an APTS wurde mit der Zeit ein höherer Verlust an Aktivität des Enzyms beobachtet. Im Bereich von 0,1-0,2% APTS zeigte die Anfangsaktivität einen Wert von 4,0 ng/cm^2 und das aktive Enzym war nach 28 Tagen in einer Konzentration von 0,32 ng/cm^2 bzw. 0,54 ng/cm^2 nachweisbar. Bei einer 0,5% APTS-Lösung fiel die Aktivität innerhalb dieses Zeitraumes von 10,0 ng/cm^2 auf 1,81 ng/cm^2. Ab einer Konzentration von 0,5% APTS-Lösung trat ein Maximum auf, bei der eine Erhöhung der APTS-Konzentration keine größere Menge an gebundenem Enzym mehr zu Folge hatte. Somit wurde für dien weiteren Versuch mit einer APTS-Konzentration von 0,5%gearbeitet.

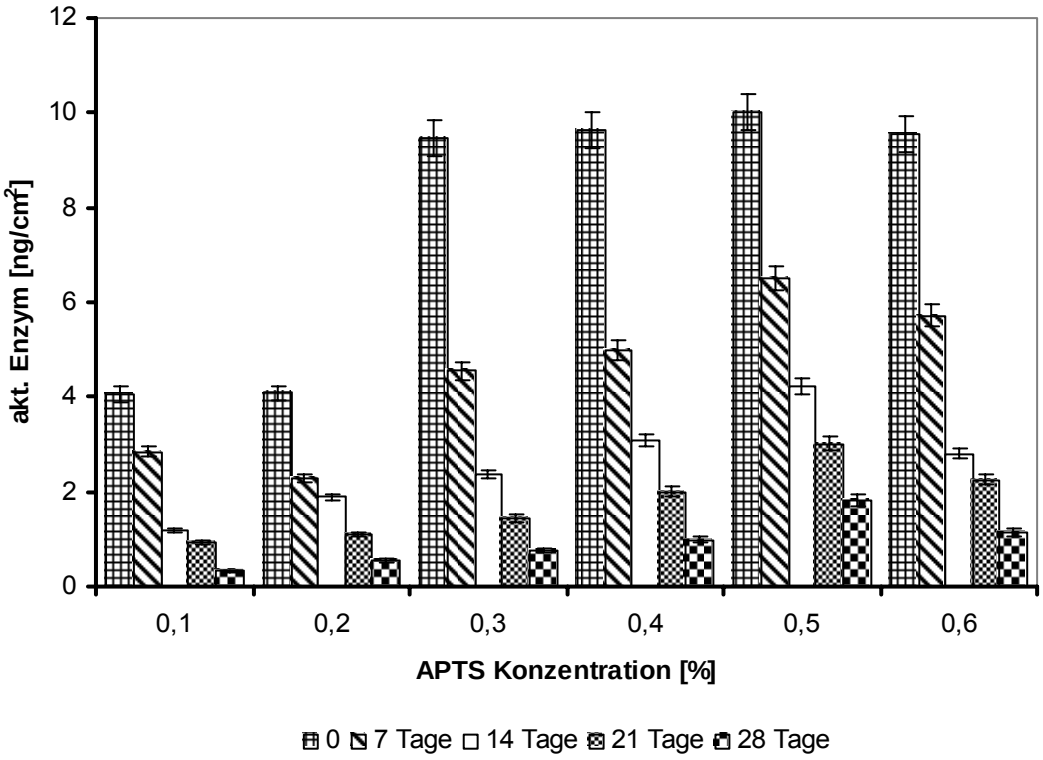


Abb. 3-28 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit verschiedenen Silankonzentrationen vorbehandelt wurden.

Wenn die Polycarbonatplättchen mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser und dann mit einer 0,5%igen APTS-Lösung vorbehandelt wurden, zeigte das aktive Enzym nach der Immobilisierung einen Wert von 10,0 ng/cm^2 (Abb.3-29). Nach 28 Tagen lag den Wert bei 1,81 ng/cm^2. Die Anfangsaktivität für die Proben, bei denen das Enzym adsoptiv gebunden wurde, wies einen Wert von 2,78 ng/cm^2 auf. Nur 4% des Ausgangswertes war nach 28 Tagen vorhanden.

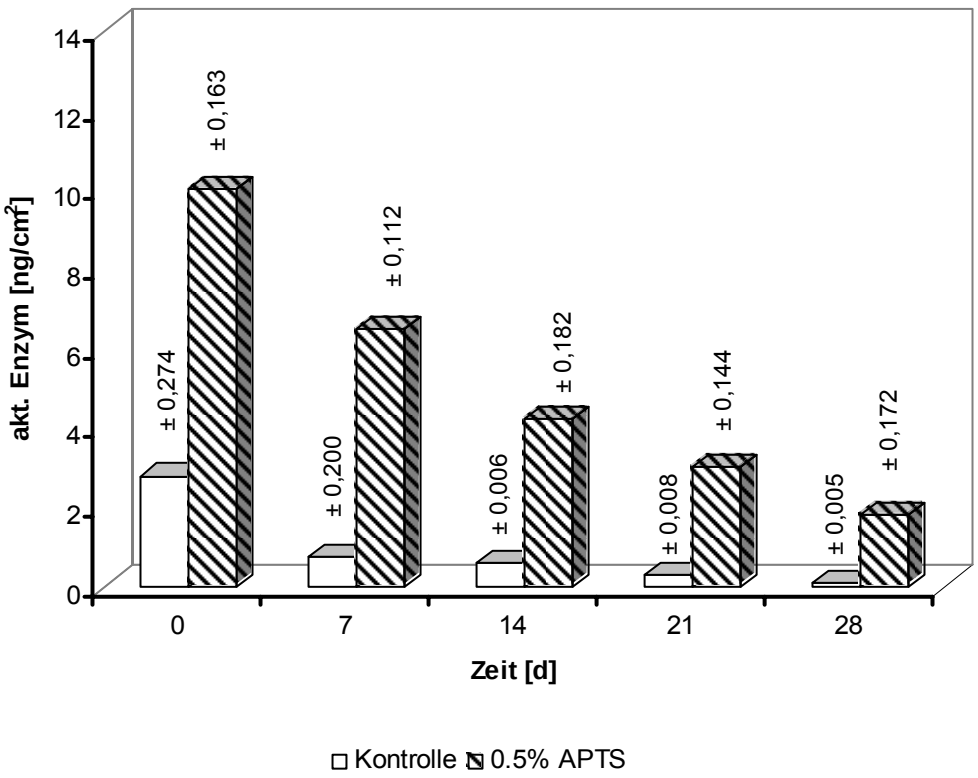


Abb.3-29 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** Immobilisierung des Enzyms auf die mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen.

Die Untersuchungen zeigten, dass direkt nach der Immobilisierung der Wert an gebundenem Enzym für die mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen dreimal größer war als für die Kontrolle.

Die mit 3M Kaliumhydroxid gereinigten Polycarbonat-Proben wiesen nach der Immobilisierung der HRP einen Wert von 7,5 ng/cm^2 auf. Nach 7 Tagen war nur noch die Hälfte des aktiven Enzyms an der Oberfläche gebunden (Abb. 3-30).

Das aktive Enzym zeigte nach 28 Tagen einen Wert von 0,6 ng/cm^2. Die unsilanisierten Proben zeigten einen ähnlichen Aktivitätsverlust wie bei den mit Ethanol und Wasser behandelten Plättchen.

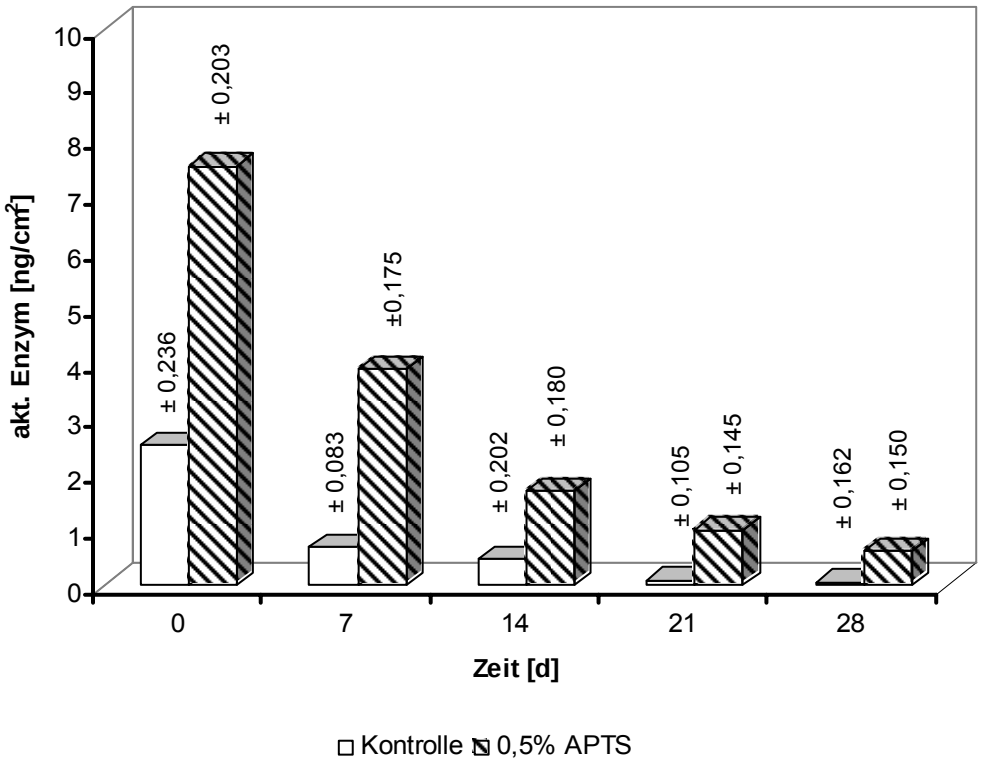


Abb.3-30 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit 3M Kaliumhydroxid vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt an die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** Immobilisierung des Enzyms auf die mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen.

Gleichartig wie bei den Keramikproben verhielt sich die Enzymaktivität bei den mit KOH/EtOH vorbehandelten PC-Plättchen. Während die Anfangsaktivität bei einem Wert von 8,1 ng/cm^2 lag, zeigte das aktive Enzym nach 14 Tagen den Wert 1,5 ng/cm^2 (Abb.3-31). Nur 10% von Ausgangswert waren nach 28 Tagen nachzuweisen.

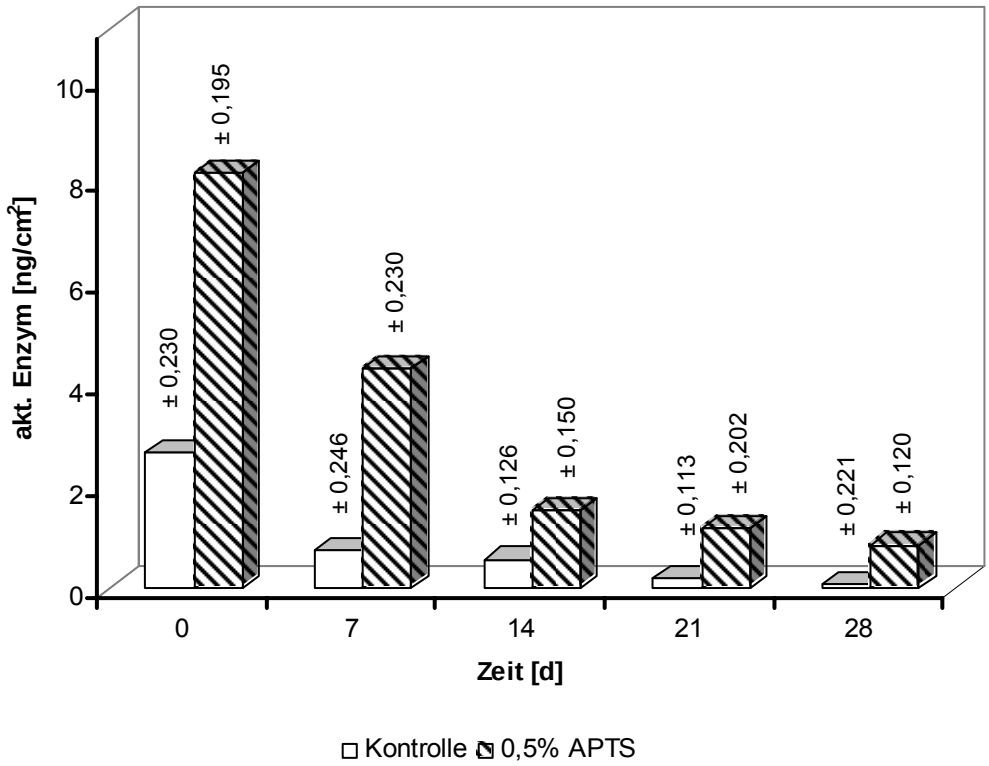


Abb.3-31 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Polycarbonatoberflächen, die mit einer Mischung aus 3M KOH/EtOH im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** Immobilisierung des Enzyms auf die mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen.

Die Oberfläche, die mit 0,5% APTS derivatisiert wurde, zeigte nach 14 Tagen nur noch eine leichte weitere Abnahme an immobilisiertem Enzym.

Wie bei der mit 3M KOH/EtOH vorbehandelten Keramikproben zeigte die Enzymaktivität nach 14 Tagen eine deutliche Abnahme. Innerhalb dieses Zeitabschnittes wurde die Abnahme des aktiven Enzyms genauso verfolgt (Abb. 3-32). Es wurde beobachtet, dass die Menge an aktivem, immobilisiertem Enzym nach 7 Tagen um 50% sank. Nach 9 Tagen hatte die Aktivität weiter auf 25% abgenommen, so dass das aktive Enzym nach 14 Tagen einen Wert von 1,55 ng/cm^2 zeigte.

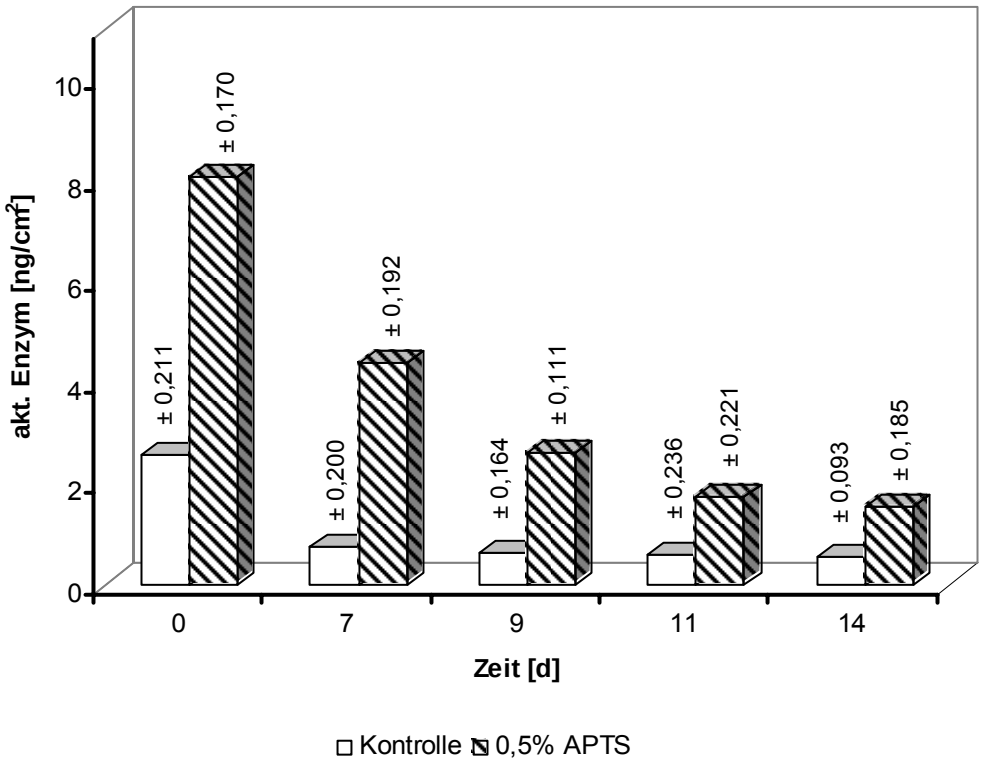


Abb.3-32 Überprüfung der Enzymaktivität innerhalb von 14 Tagen bei den behandelten und unbehandelten Polycarbonatoberflächen, die mit einer Mischung aus 3M KOH/EtOH gereinigt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde adsorptiv auf die Oberfläche immobilisiert. **APTS:** Immobilisierung des Enzyms auf die mit 0,5% APTS derivatisierten Polycarbonatoberflächen.

Es wurde festgestellt, dass die Modellsubstanz unter denselben Bedingungen wie in Kapitel 3.1.4.3.1 beschrieben auch an eine Polycarbonatoberfläche erfolgreich gekoppelt werden konnte.

Nach Nazari (2005) können sich das während der Substratentwicklung verwendete Wasserstoffperoxid sowie Intermediate der enzymatischen Reaktion sehr negativ auf die Enzymaktivität der HRP auswirken, was wiederum zur Inaktivierung des aktiven Zentrums führt. Ein wesentliches Qualitätskriterium eines Immobilisierungsverfahrens stellt die Lagerstabilität des immobilisierten Proteins dar. Die Stabilität hängt von der Aktivität des immobilisierten Enzyms in der Immobilisierungsmatrix ab. Die vorbehandelten Polycarbonatplättchen wurden nach der Inkubation mit der Proteinlösung (20 µg/ml) in 150 mM Aufbewahrungspuffer pH 7,0 bei 4°C gelagert. Die Enzymlösung wurde wie im Abschnitt 3.1.4.3 vorbereitet und der Proteingehalt nach Bradford-Methode bestimmt. Die zugehörige Kalibriergerade der verwendeten oxidierten Meerretichperoxidase ist in der Abbildung 3-33 dargestellt.

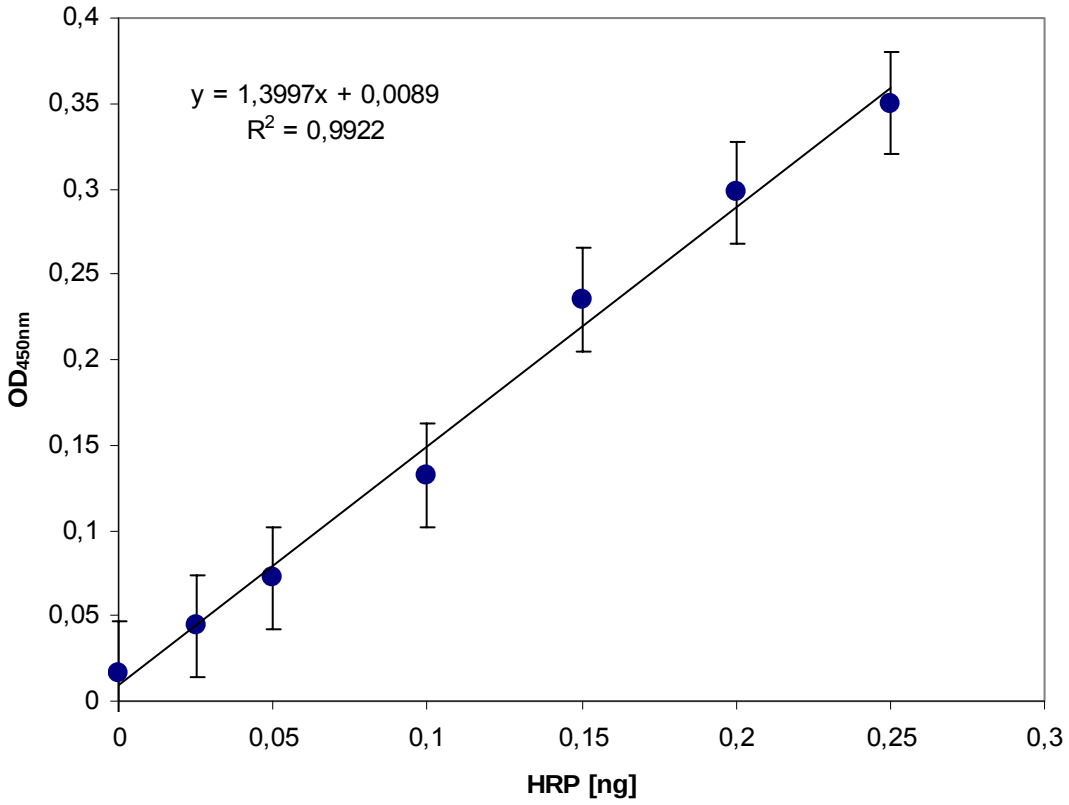


Abb. 3-33 Kalibriergerade der oxidierten HRP. Die Messung wurde mit einer Protein-Stammlösung der Konzentrationen $5x10^{-3}$ µg/ml durchgeführt. Die Aktivität der HRP wurde mittels eines photometrischen Assays auf der Basis von TMB und Wasserstoffperoxid bestimmt. Als Kalibrationsstandard zur Bestimmung der Enzymmenge wurde Rinderserumalbumin-Stammlösung (BSA) 1mg/ml verwendet.

Untersuchungen zur Stabilität des Imobilisates wurden über einen längeren Zeitraum für die mit 0,5% APTS behandelten Proben durchgeführt. Diese wurden über einen Zeitraum von 12 Monaten in Pufferlösung aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen wurde photometrisch die Enzymaktivität bestimmt (Abb. 3-34).

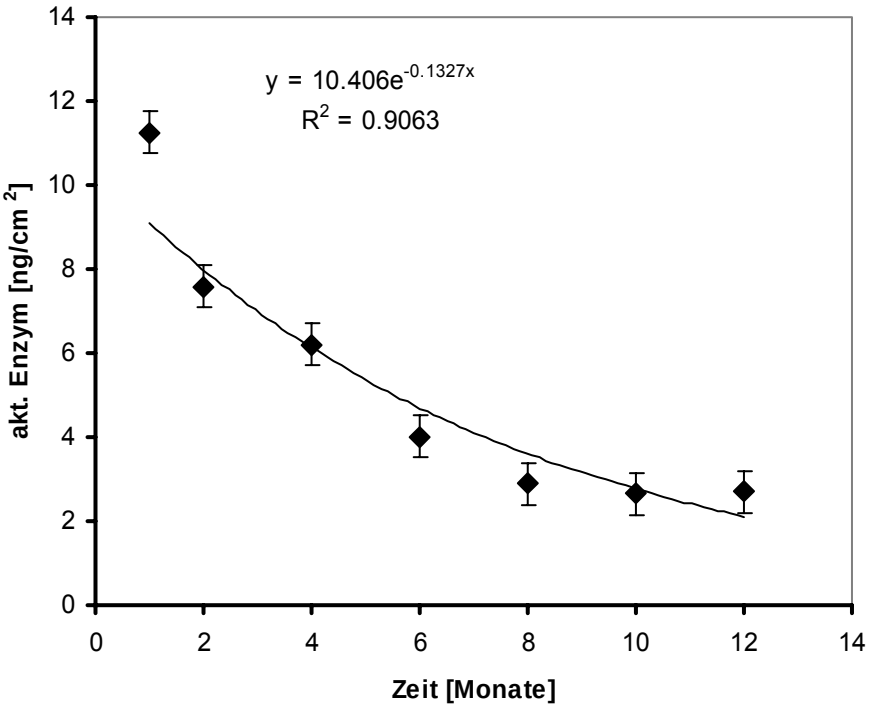


Abb. 3-34 Photometrisch ermittelte Enzymaktivitäten der Polycarbonatproben mit immobilisierter HRP nach unterschiedlichen Standzeiten der Proben in Pufferlösung. Die Oberflächen wurden mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser gereinigt und dann mit 0,5% Aminopropyltriethoxysilan behandelt. Die aminosilanisierte Oberflächen wurden mit HRP-Lösung (20 µg/ml) inkubiert.

Es konnte festgestellt werden, dass die Aktivität entsprechend einer Exponentialfunktion abnahm. Nach 6 Monaten betrug die Enzymaktivität 4,0 ng/cm^2. Nach 8 Monaten wurde eine konstante Aktivität (2,71 ng/cm^2) nachgewiesen. Eine Erklärung dafür wäre laut Nazari (2005), dass bei dieser Versuchsreihe keine Inaktivierung des aktiven Enzymzentrums stattfinden kann.

Da bei dieser Immobilisierungsmethode nahezu gute Ergebnisse in Bezug auf die Menge an immobilisiertem Enzym und eine relativ lange Stabilität erzielt werden konnten, erscheint diese Immobilisierungsmethode geeignet für die Entwicklung von Mikrosystemkomponenten mit einer biologisch aktiven Beschichtung.

3.1.5.3.3 Immobilisierung vom HRP an Polymeroberflächen, die mit Plasma vorbehandelt wurden

Eine Technik zur Modifikation von Polymeroberflächen basiert auf verschiedenen Varianten der Plasma-Aktivierung. Polymeroberflächen, die keine OH-Gruppen tragen, können auch

durch Behandlung in einem sauerstoffhaltigen Plasma mit OH-Gruppen versehen werden, so dass die Immobilisierung von organischen Molekülen auf Oberflächen anwendbar ist.

Weiter für die Experimente zur Immobilisierung von Meerretichperoxidase (HRP) wurden Polystyrol- und Polycarbonatplättchen verwendet, die mit Plasma behandelt wurden. Die Proben wurden uns von der Firma NTTF, Rheinbreitbach, zur Verfügung gestellt. Die hier in Frage kommenden Plasmen sind physikalisch und chemisch hochreaktive Mischungen von Atomen, wie z.B. Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff. Die so behandelten Kunststoffe sind anschließend benetzbar und für weitere Verarbeitungsverfahren geeignet. Die Hydrophilie der Oberfläche zeigte in folgenden Versuchen einen erheblichen Einfluss auf das Verhalten des Polymers. Der Kontaktwinkel ist ein Maß für die Benetzbarkeit einer Oberfläche mit der Messflüssigkeit. In Abbildung 3-35 kann man die Unterschiede zwischen verschiedenen Plasmabehandlungen beobachten. Es wurden jeweils exakt 10 µl Methylenblau-Lösung auf jedem Plättchen pippetiert.

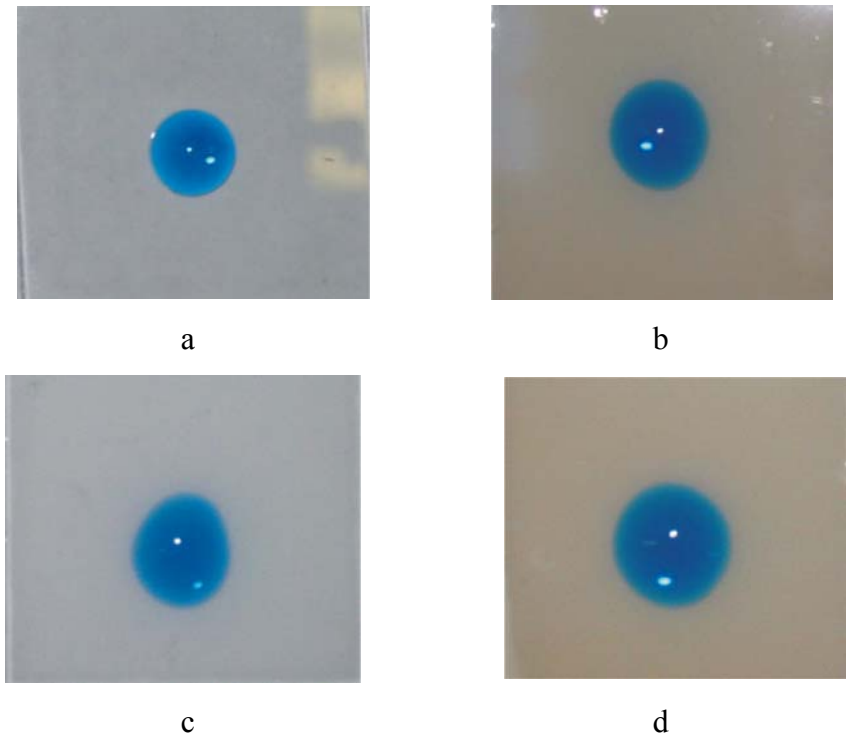


Abb. 3-35 Haftung eines Wassermoleküls an verschiedenen Polycarbonatoberflächen:
a) unbehandelte Polycarbonatprobe (r = 5,5 mm); b) Kohlenstoffplasma (r = 6,5 mm);
c) Sauerstoffplasma(r = 7,0 mm); d) Kohlenstoff- und Stickstoffplasma (r = 7,5 mm).

Die Oberflächen, die mit Kohlenstoff und Stickstoff Plasma behandelt wurden, präsentieren eine leicht braune Farbe und eine größere Benetzbarkeit im Vergleich zu anderen Proben. Der Flüssigkeitstropfen wurde stärker gespreitet als bei der Kontrolle.

In den nachfolgenden Versuchen wurden die aminosilanisierten Polystyrol- und Polycarbonatplättchen für 14 Stunden mit dem oxidierten Protein (20µg/ml) zur Reaktion gebracht. Die so hergestellten Materialproben wurden in 150 mM Phosphatpuffer pH 7,0 bei 4 °C gelagert und die Menge des aktiven Enzyms in zyklischen Abständen bestimmt. Dabei erfolgten die Aktivitätsmessungen über 28 Tage. Die Proteinlösung wurde wie im Abschnitt 3.1.4.3 angefertigt. Die Kalibriergerade ist in der Abbildung 3-36 dargestellt.

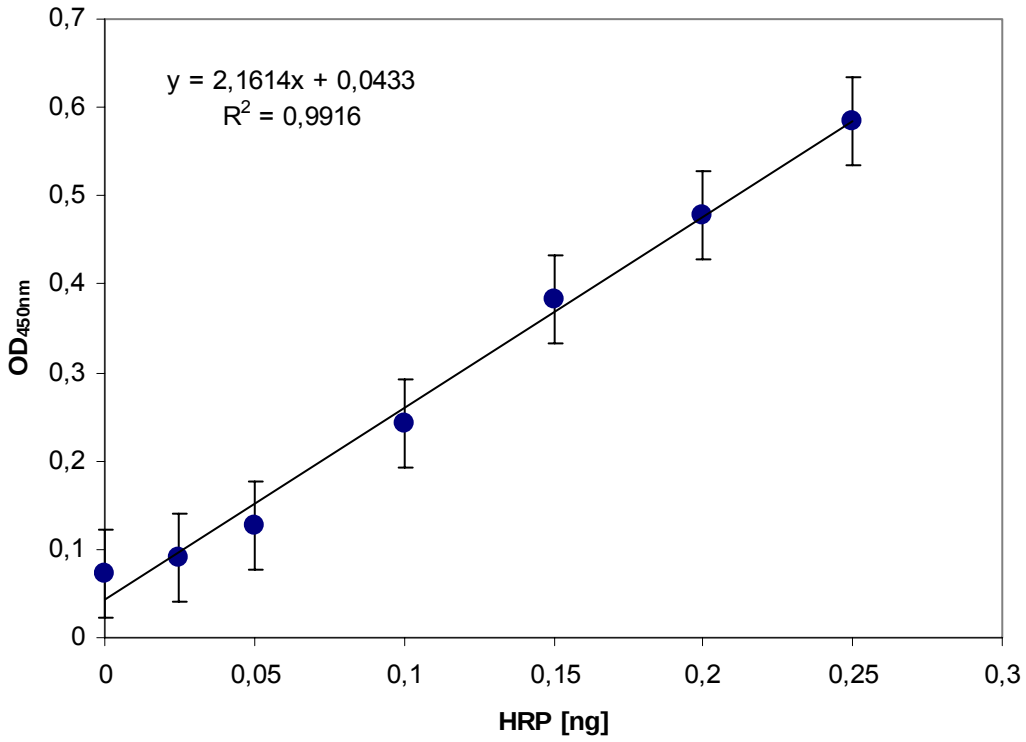


Abb. 3-36 Kalibriergerade der oxidierten HRP. Die Messung wurde mit einer Protein-Stammlösung der Konzentrationen $5x10^{-3}$ µg/ml durchgeführt. Die Aktivität der HRP wurde mittels eines photometrischen Assays auf der Basis von TMB und Wasserstoffperoxid bestimmt. Als Kalibrationsstandard wurde Rinderserumalbumin Stammlösung (BSA) 1mg/ml verwendet.

Es wurden deutliche Unterschiede in der Änderung der Enzymaktivität bei den einzelnen Messreihen beobachtet. Verschiedene Plasmabehandlungen bewirken Veränderungen auf Polymeroberflächen, die sich nur schwer direkt beobachten lassen. Polystyrol wurde ergänzend als Träger eingesetzt, da dieses Material routinemäßig von der Firma NTTF plasmabeschichtet wurde. Die Messungen sollten als Vergleich zu den nachfolgenden Reihen dienen, die an plasmabeschichteten Materialproben durchgeführt worden sind.

Als Kontrolle dienten Polystyrolproben, die nicht mit Plasma behandelt worden sind. Eine höhere Enzymaktivität (0,69 ng/cm^2) wiesen die aminosilanisierten Proben nach 21 Tagen auf

(Abb.3-37). Die Menge des gebundenen Enzyms zeigte nach 28 Tagen einen drei Mal höheren Wert in Bezug auf die Menge an aktivem Enzym als der Ausgangswert.

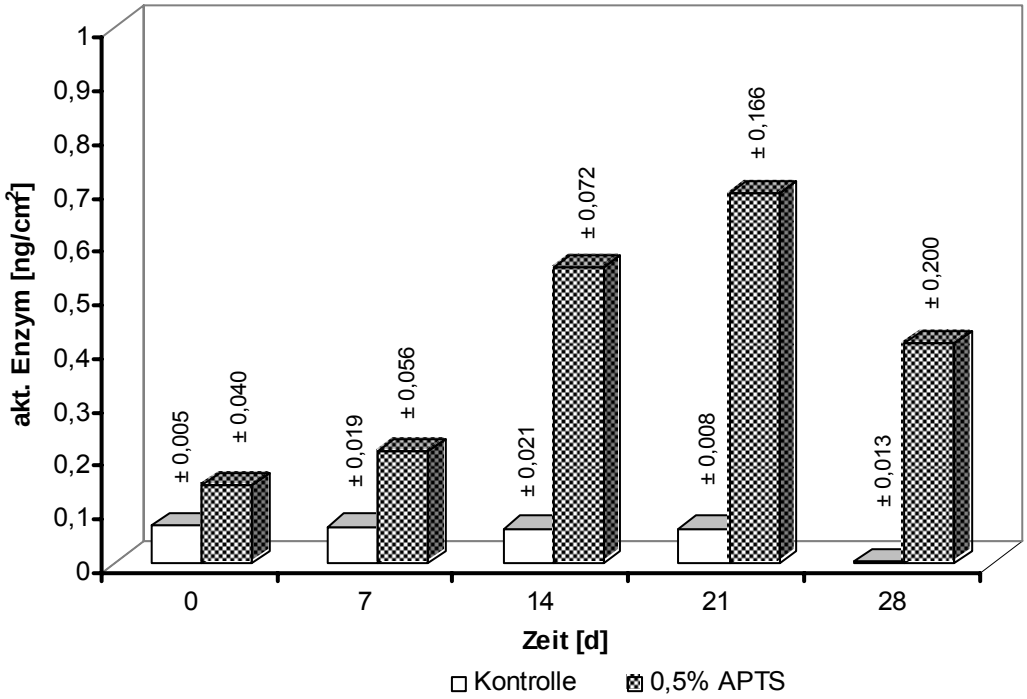


Abb. 3-37 Immobilisierung des oxidierten Enzyms auf Polystyroloberflächen. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **APTS:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen.

Auffallend war in diesem Experiment die starke Zunahme an aktivem Enzym nach 14 Tagen. Der Wert an aktivem Enzym war doppelt so groß als nach 7 Tagen. Insgesamt fielen die Werte jedoch deutlich geringer als bei den Messreihen mit Polycarbonat aus.

Die Enzymaktivität für die Materialproben, die mit Kohlenstoff plasmabeschichtet wurden, hat nach 28 Tagen im Vergleich zu Ausgangswert um 45% zugenommen (Abb.3-38). Die Polystyroloberflächen, die nicht mit Plasma behandelt wurden, zeigten deutlich niedrigere Werte an gebundenem aktivem Enzym. Eine starke Zunahme des aktiven Enzyms wurde nach 14 Tagen beobachtet. Die Werte waren erheblich größer als unmittelbar nach der Immobilisierung.

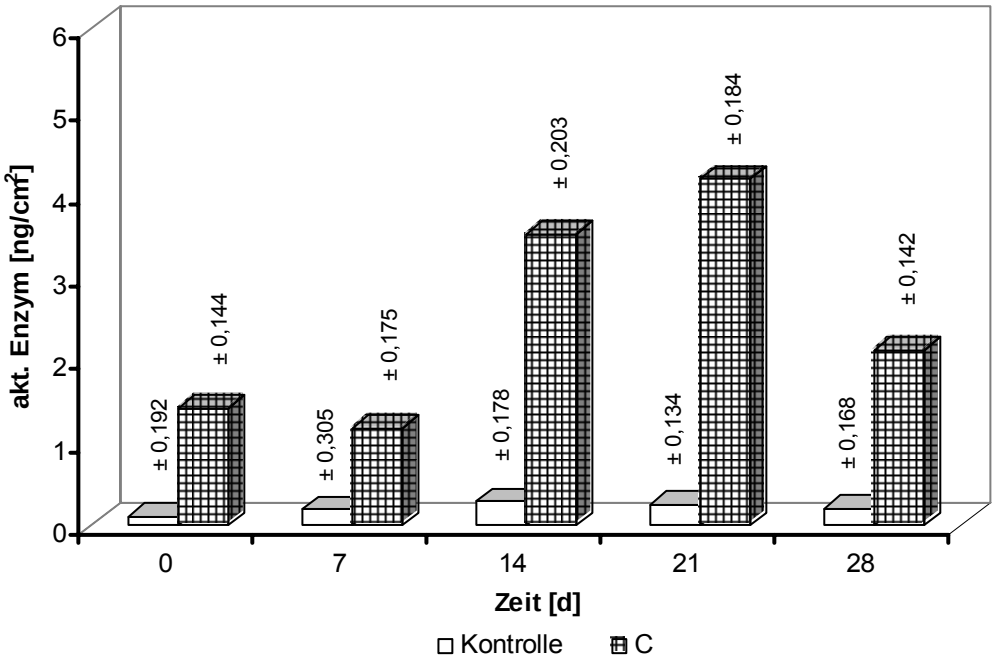


Abb. 3-38 Anbindung von Meerrettichperoxidase auf Polystyroloberflächen, die mit Kohlenstoff plasmabeschichtet wurden. **Kontrolle:** HRP wurde direkt auf die Oberfläche adsorptiv immobilisiert. **C:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen (nach Kohlenstoff-Plasmabeschichtung).

Die Menge des immobilisierten Enzyms zeigte nach 28 Tagen einen Wert von 2,11 ng/cm^2, d. h dass die Menge des Enzyms annähernd zweimal höher als der Ausgangswert ist. Die größte Menge aktiven Enzyms wurde nach 21 Tagen mit 4,1 ng/cm^2 ermittelt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die mit Sauerstoffplasma behandelten Proben untersucht. Von Bedeutung erscheint in diesem Fall der niedrige Verlust an Aktivität mit der Zeit zu sein, d.h. eine sehr gute Stabilität des Enzyms (Abb.3-39). Es konnte festgestellt werden, dass innerhalb von 28 Tage die Enzymaktivität für die Polystyrolplättchen, die mit Sauerstoff behandelt wurden, fast konstant blieb (1,8 ng/cm^2).

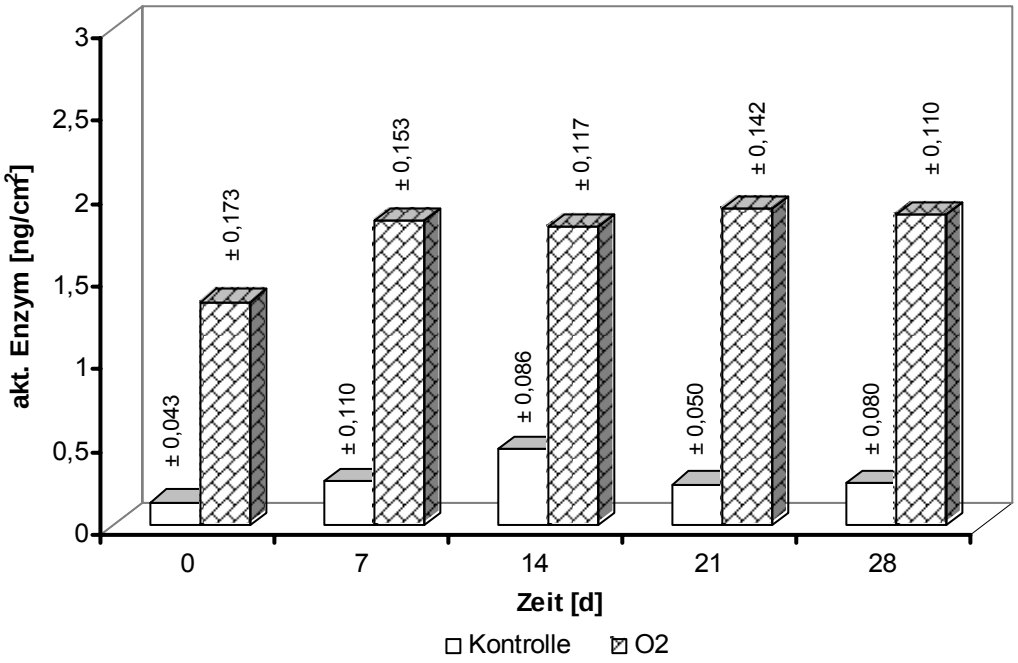


Abb. 3-39 Immobilisierung von Meerrettichperoxidase auf Polystyroloberflächen, die mit Sauerstoff vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde adsorptiv auf die Oberfläche immobilisiert. **O_2:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen (nach Sauerstoff-Plasmabeschichtung).

Auffallend bei diesen Experimente war, dass die Kontrollproben nach 7 Tagen eine Zunahme des aktiven Enzyms zeigten. Im Vergleich zu Ausgangswerten wurde eine dreifache Menge an aktivem Enzym nachgewiesen.

Überraschenderweise zeigten die aminosilanisierten Polystyrolproben, die mit Kohlenstoff und Stickstoff vorbehandelt wurden, nach 7 Tagen einen Wert von 3,5 ng/cm^2, also doppelt so hoch wie die Anfangsaktivität. Nach 28 Tagen war noch 2,7 ng/cm^2 aktives Enzym auf der Oberfläche vorhanden (Abb.3-40).

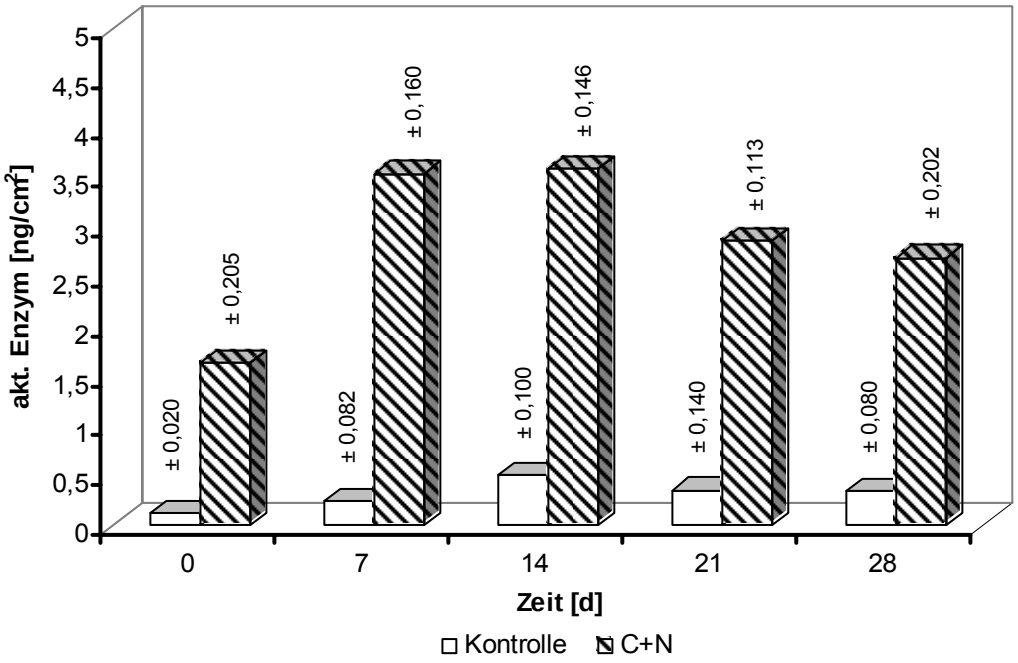


Abb. 3-40 Immobilisierung von Meerrettichperoxidase auf Polystyroloberflächen, die mit Kohlenstoff und Stickstoff vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde adsorptiv auf die Oberfläche immobilisiert. **C+N:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen (nach Kohlenstoff- und Stickstoff-Plasmabeschichtung).

Auch hier zeigten die Kontrollproben eine Zunahme des gebundenen, aktiven Enzyms nach 7 Tagen. Die Menge an aktivem Enzym hatte nach 14 Tagen einen Wert von 0,5 ng/cm^2. Die weiteren Untersuchungen zeigten eine leichte Abnahme des aktiven Enzyms mit der Zeit. Trotzdem war nach 28 Tagen der Wert für das aktive, immobilisierte Enzym dreimal höher als direkt nach der Immobilisierung.

Nachfolgend sind die erzielten Ergebnisse noch einmal zusammenfassend dargestellt. Wie in Abbildung 3-41 erkennbar ist, war die Enzymaktivität bei der mit Sauerstoff behandelten Polystyrolproben in einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen hinreichend stabil. Außerdem wiesen die Proben, die mit einer Mischung aus Kohlenstoff und Stickstoff vorbehandelt wurden, die besten Ergebnisse auf.

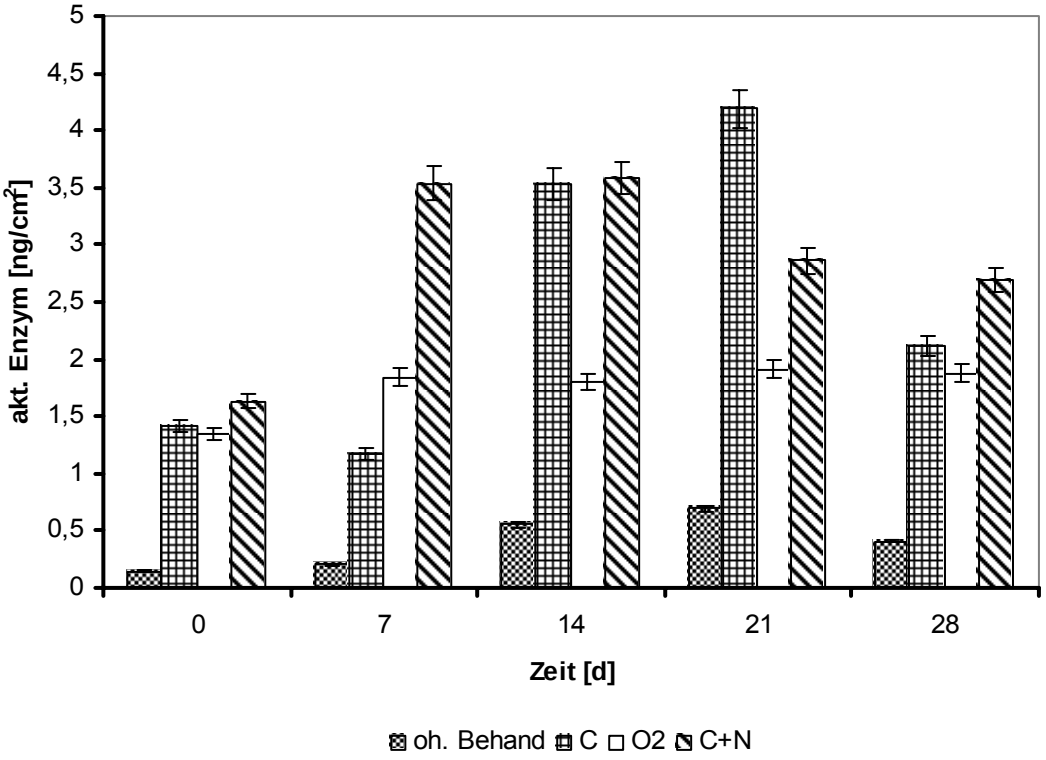


Abb.3-41 Vergleichende Darstellung des Aktivitätsverlaufes der immobilisierten HRP (0,5% APTS) über einen Zeitraum von 28 Tagen für Polystyrolproben nach Plasmabehandlung. **oh. Behand.:** die Oberfläche wurde nicht mit Plasma vorbehandelt.**C:** Plasma-Kohlenstoff. **O_2:** Plasma-Sauerstoff. **C+N:** Plasma-Kohlenstoff und Stickstoff.

Deswegen wurde weiter untersucht, welche Änderungen bei der Enzymaktivität auftreten können, wenn die Oberfläche mit einem Plasma vorbehandelt wurde, das drei Komponenten erhielt: Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff.

Besonders günstig verhielten sich Polystyroloberflächen, die neben die übliche kohlenstoff- und stickstoff- auch sauerstoffhaltige Funktionen trugen (Abb.3-42). Die Enzymaktivität hatte sich nach 7 Tagen verdoppelt. Nach 28 Tagen lagen die Werte konstant bei 2,4 ng/cm^2.

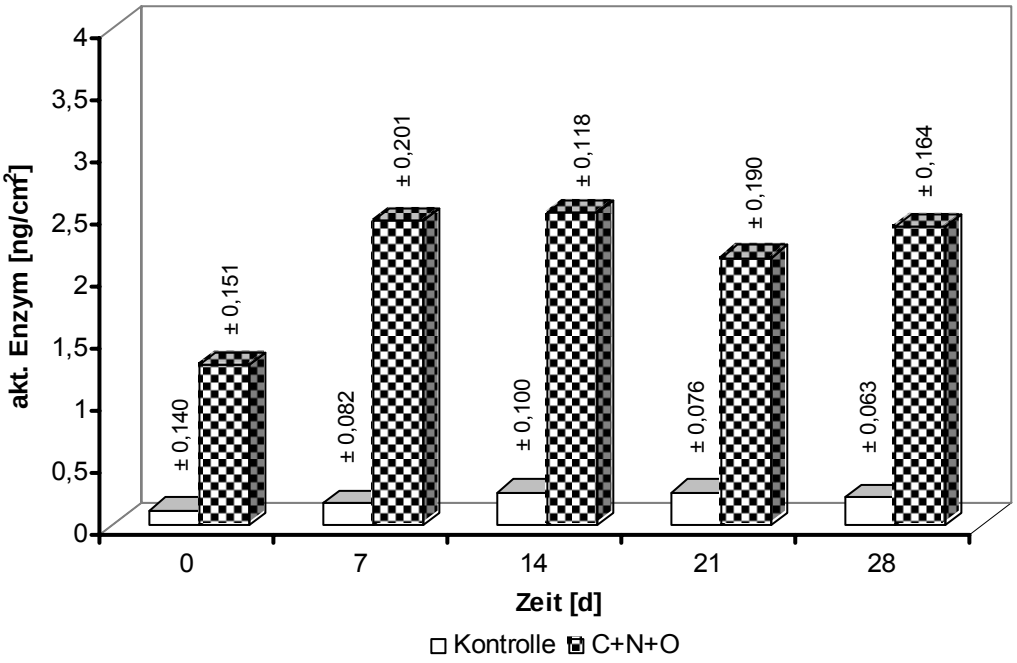


Abb.3-42 Immobilisierung von Meerrettichperoxidase an Polystyroloberflächen, die mit Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff vorbehandelt wurden. **Kontrolle:** HRP wurde adsorptiv auf die Oberfläche immobilisiert. **C+N+O:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen.

Die Kontrollproben zeigten in ersten 14 Tagen eine leichte Zunahme des aktiven Enzyms und dann wurden konstante Werte beobachtet. Nach 28 Tagen wurde einen Wert an aktivem Enzym von 0,2 ng/cm^2 ermittelt. Gleichzeitig ist zu beobachten, dass eine Funktionalisierung der Oberfläche mit Aminopropyltriethoxysilan zu erhebliche Erhöhung an immobilisierten Enzym führt. Wie in Abb. 3-42 zu sehen ist, nach 28 Tagen zeigten die Oberflächen, die mit APTS derivatisiert wurden, zehnmal größere Werte als die Kontrollproben.

Mit Ausnahme des Versuchsansatzes mit Kohlenstoff zeigten alle Polystyrolproben, die mit Plasma vorbehandelt wurden, nach 7 Tagen eine deutliche Aktivitätszunahme (Abb.3-43). Anschließend blieb die Enzymaktivität auf einem relativ hohen Niveau. Eine gute Stabilität über den Beobachtungszeitraum wiesen die Polystyroloberflächen auf, die sauerstoffhaltige Gruppe enthielten.

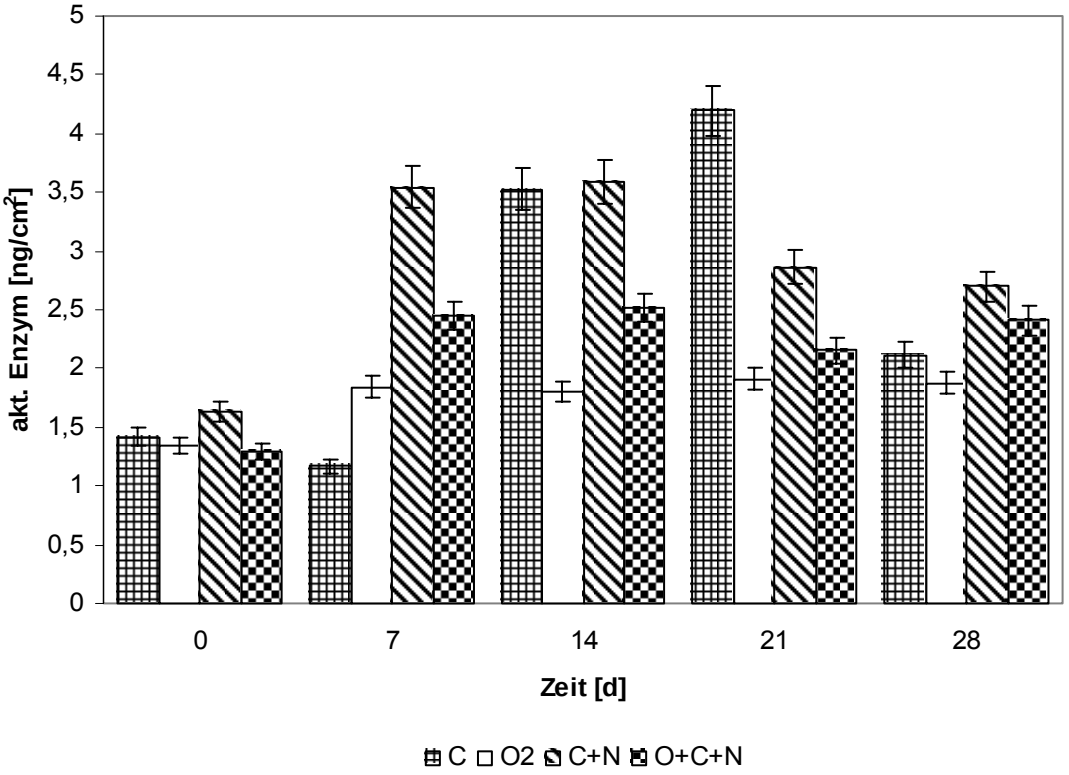


Abb.3-43 Vergleich des Aktivitätsverlaufes der immobilisierten HRP über einen Zeitraum von 28 Tagen für Polystyrol-Proben nach Plasmabehandlung. **C:** Plasma-Kohlenstoff. **O_2:** Plasma-Sauerstoff. **C+N:** Plasma-Kohlenstoff und Stickstoff. **O+C+N:** Plasma-Sauerstoff, Kohlenstoff und Stickstoff.

Das immobilisierte Enzym zeigte nach 28 Tagen für die Polystyrolobelflächen, die mit Kohlenstoff und Stickstoff bzw. Sauerstoff, Kohlenstoff und Stickstoff plasmabeschichtet waren, fast ähnliche Werte (2,4 ng/cm^2).

In einem weiteren Versuch wurden die mit Plasma behandelten Polystyrolproben für die Langzeitstabilität untersucht. Die Enzymaktivität wurde erst nach 8 Monaten überprüft (Abb.3-44). Während die Menge an aktivem Enzym nach einem Monat um Faktor 2 größer ist, nimmt die aktive Enzymmenge nach 8 Monaten bei der kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Gruppe um den Faktor 3 zu. Die Menge an aktivem Enzym lag bei 3,73 ng/cm^2.

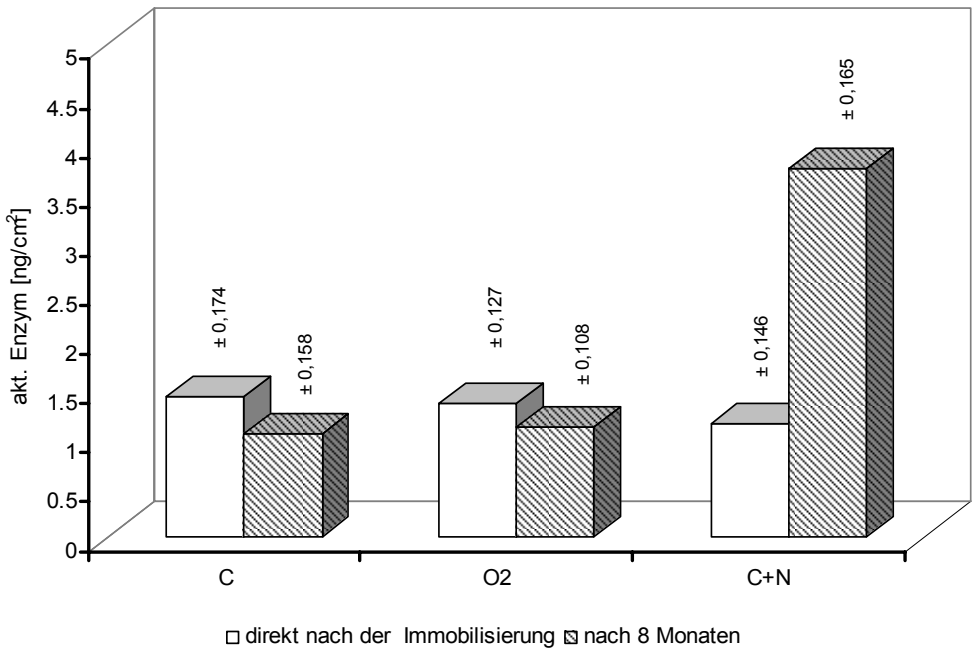


Abb.3-44 Vergleich des Aktivitätsverlaufes der immobilisierten HRP über einen Zeitraum von 8 Monaten für Polystyrol-Proben nach Plasmabehandlung. **C:** Plasma-Kohlenstoff. **O_2:** Plasma-Sauerstoff. **C+N:** Plasma-Kohlenstoff und Stickstoff.

Die Polystyrolproben, die entweder mit Kohlenstoff oder mit Sauerstoff behandelt wurde, zeigten nach 8 Monate einen konstanten Wert an immmobilisiertes Enzym (1,1 ng/cm^2). Wie in Abbildung 3-44 zu sehen ist, zeigten die Polystyroloberflächen nach 8 Monaten eine stabile Anbindung des aktiven Enzyms.

Als letzter Versuch dieser Experimentalreihe wurden Polycarbonatoberflächen analysiert, die mit Plasma vorbehandelt wurden. Zuerst wurden die Polycarbonatoberflächen untersucht, die mit Kohlenstoff plasmabeschichtet worden sind. Sowohl die underivatisierten als auch die aminisilanisierten Proben zeigten in einem Zeitraum von 28 Tagen einen kontinuierlichen Verlust an Aktivität (Abb.3-45). Nach 7 Tagen war bei den mit 0,5% APTS behandelten Oberflächen nur 35% der Ausgangsaktivität vorhanden.

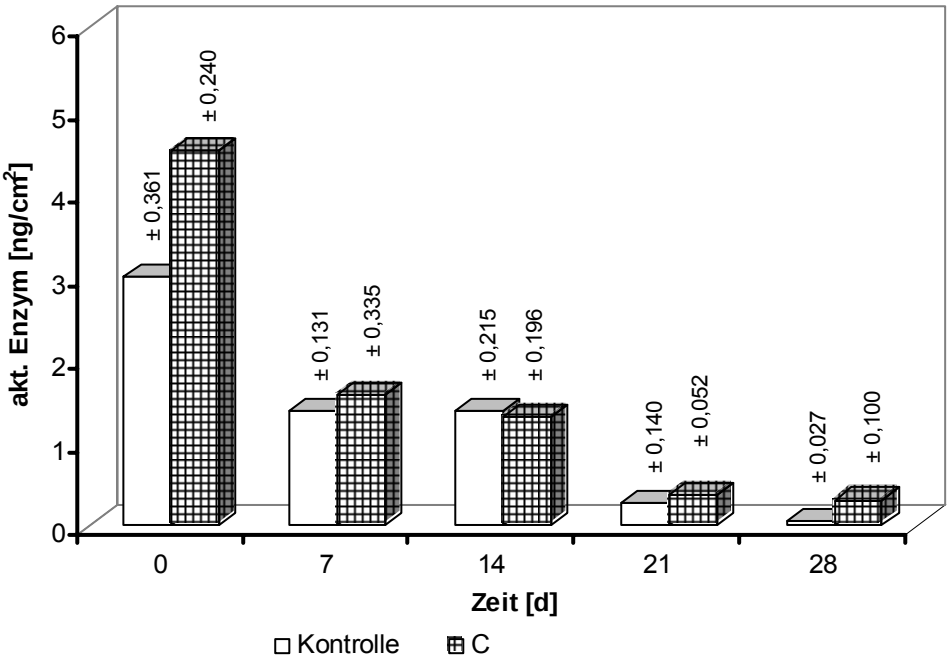


Abb.3-45 Immobilisierung von Meerrettichperoxidase an Polycarbonatoberflächen, die mit Kohlenstoff plasmabeschichtet wurden. **Kontrolle:** HRP wurde adsorptiv auf die Oberfläche immobilisiert. **C:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen (nach Kohlenstoff-Plasmabeschichtung).

Die Kontrollproben zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Polycarbonatproben, die mit 0,5% APTS derivatisiert wurden. Nach 7 Tagen sank die Menge an gebundenem Enzym auf 50% ab.

Obwohl der Wert von der Anfangsaktivität bei den mit Sauerstoff behandelten Polycarbonatproben bei 4,9 ng/cm^2 lag, wiesen die Proben nach 28 Tagen einen Wert von 1,8 ng/cm^2 auf (Abb.3-46). Die Aktivität blieb für die beiden parallelen Ansätze nach 21 Tagen relativ konstant.

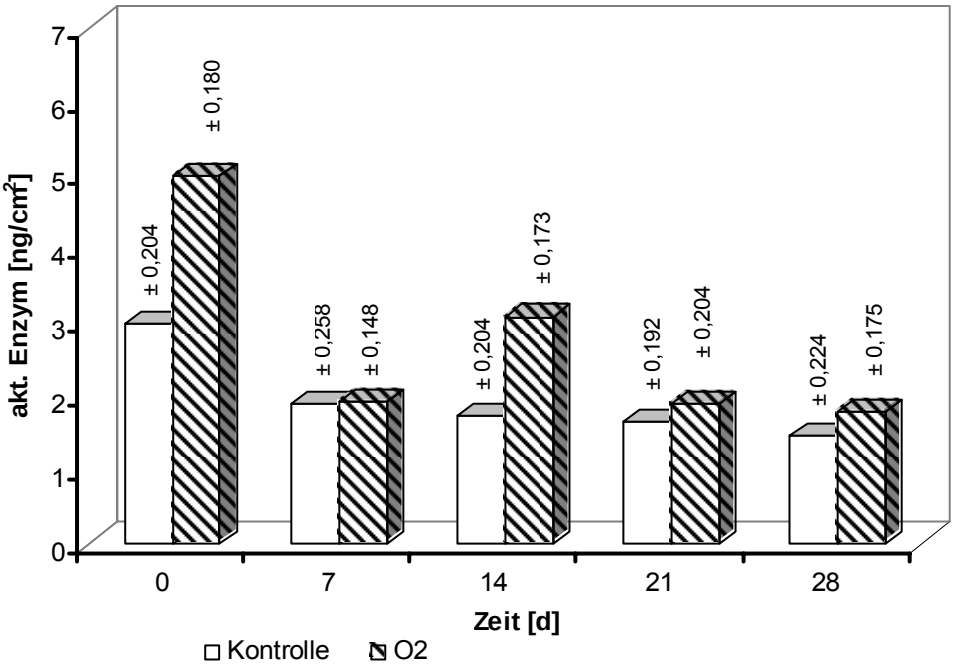


Abb.3-46 Immobilisierung von Meerrettichperoxidase auf Polycarbonatoberflächen, die mit Sauerstoff plasmabeschichtet wurden. **Kontrolle:** HRP wurde adsorptiv auf die Oberfläche immobilisiert. **O_2:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen (nach Sauerstoff-Plasmabeschichtung).

Die Kontrollproben verhalten sich ähnlich wie diejenige, die mit APTS derivatisiert wurden.. Die imobilisierte Menge an HRP lag nach 7 Tagen bei 1,8 ng/cm^2 Nach 14 Tagen wurde eine leichte Abnahme an aktivem, gebundenem Enzym beobachtet.

Die Polycarbonatoberflächen, die mit Kohlenstoff und Stickstoff-Plasma vorbehandelt wurden, wiesen eine große Menge an aktivem, gebundenem Enzym auf (Abb.3-47). In einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen wurde nur einen geringer Verlust festgestellt. Während der Ausganswert bei 16,3 ng/cm^2 lag, wurde nach 28 Tagen eine Menge an aktivem Enzym von 11,11 ng/cm^2 ermittelt.

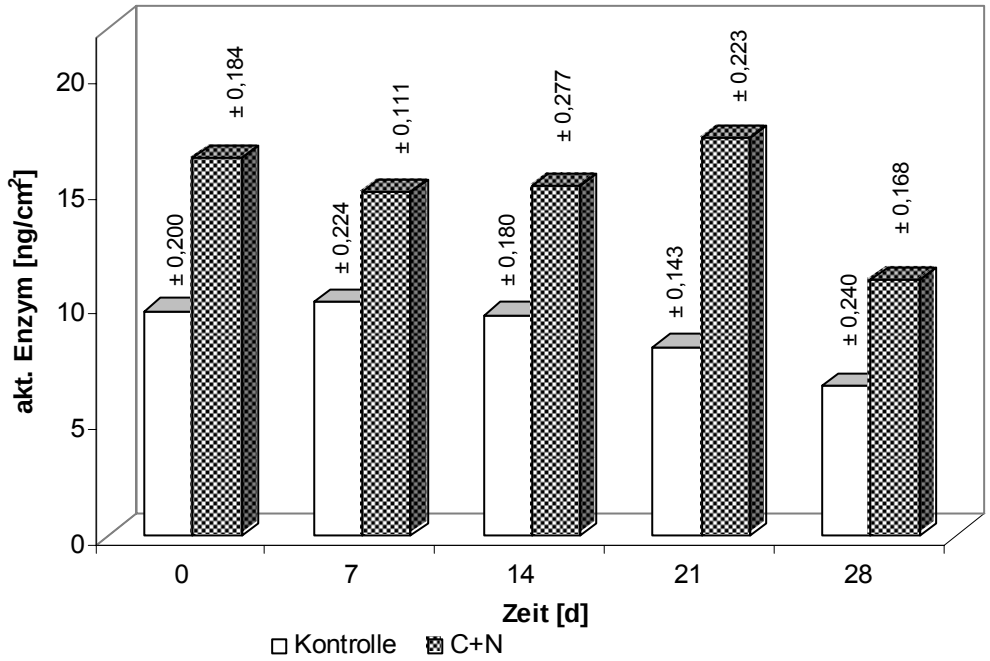


Abb.3-47 Immobilisierung von Meerrettichperoxidase auf Polycarbonatoberflächen, die mit Kohlenstoff und Stickstoff plasmabeschichtet wurden. **Kontrolle:** HRP wurde adsorptiv auf Oberfläche immobilisiert. **C+N:** Immobilisierung des Enzyms auf den mit 0,5% APTS derivatisierten Oberflächen (nach Kohlenstoff- und Stickstoff-Plasmabeschichtung).

Der geringe Verlust wurde sowohl bei den silanisierten als auch bei den nicht derivatisierten Oberflächen beobachtet. Die Abbildung 3-47 zeigt, dass die Werte an immobilisiertem Enzym in den ersten 14 Tagen konstant blieben. Nach 28 Tagen hatten die Kontrollproben einen Wert an aktivem Enzym von 6,4 ng/cm^2. Zu beachten ist jedoch, dass die freien Aldehydfunktionen der oxidierten HRP direkt mit den durch die Plasmabehandlung erzeugten Aminofunktionen auf der Polycarbonatoberfläche reagieren können und damit die relativ hohen Werte für den Kontrollversuch erklärt werden können.

Während bei den sauerstoffhaltigen Oberflächen die Enzymaktivität nach 28 Tagen auf 36% des Ausgangswertes sinkt, fällt die Aktivität bei den kohlenstoffhaltigen Oberflächen auf irrelevante 4% zurück (Abb.3-48).

Nach 28 Tage wurden die höchsten Werte der Enzymaktivität im Falle der mit Kohlenstoff und Stickstoff behandelten Polycarbonatproben erreicht. Der Wert lag bei 11,11 ng/cm^2.

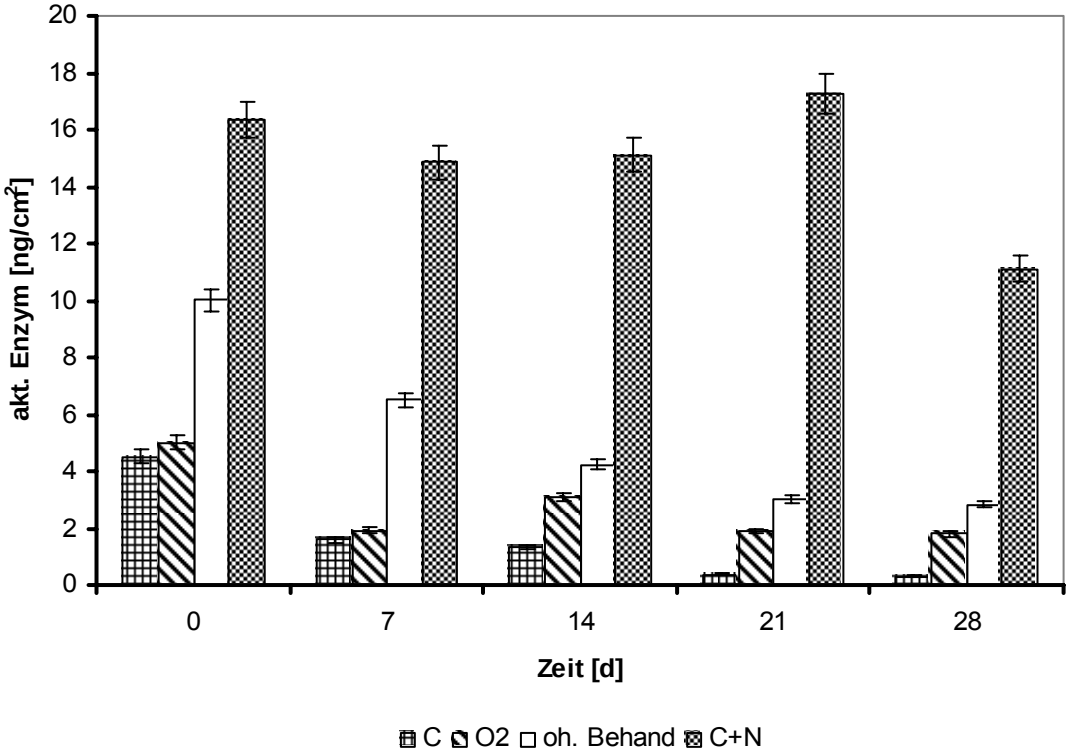


Abb.3-48 Unterschiede beim Aktivitätsverlauf der immobilisierten HRP über einen Zeitraum von 28 Tagen für Polycarbonatproben nach Plasmabehandlung. **C:** Plasma-Kohlenstoff. **O_2:** Plasma-Sauerstoff. **oh. Behand. :** die Oberfläche wurde nicht mit Plasma vorbehandelt. **C+N:** Plasma-Kohlenstoff und Stickstoff.

Nach der Immobilisierung zeigten die Polycarbonatproben, die mit Plasma behandelt wurden, eine sehr hohe gebundene Menge an aktivem Enzym. Die Aktivität betrug nach 28 Tage noch ca. 65% des Ausgangswertes.

Eine Langzeitstabilität des Enzyms von bis zu 8 Monaten wurde bei der Verwendung einer mit Kohlenstoff und Stickstoff behandelte Polycarbonatoberfläche erreicht (Abb.3-49).

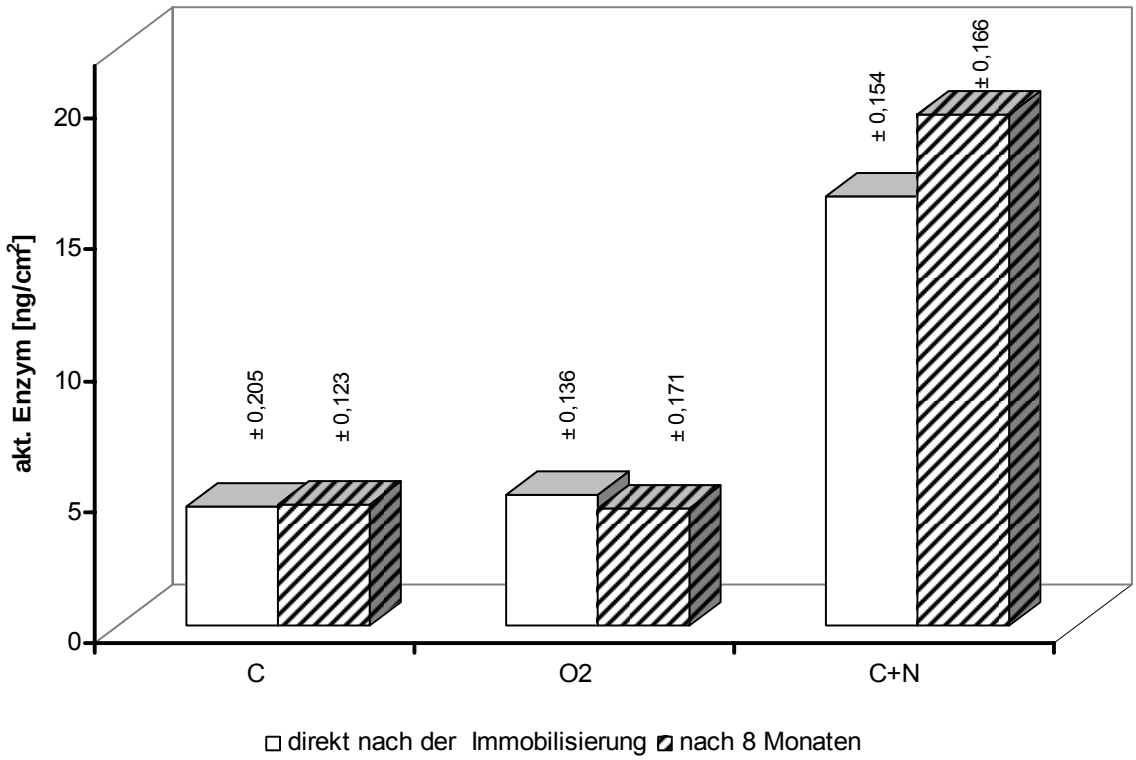


Abb.3-49 Vergleich des Aktivitätsverlaufes der immobilisierten HRP über einen Zeitraum von 8 Monaten für Polycarbonat-Proben nach Plasmabehandlung. **C:** Plasma-Kohlenstoff. **O_2:** Plasma-Sauerstoff. **C+N:** Plasma-Kohlenstoff und Stickstoff.

Die Polycarbonatoberflächen, die entweder mit Kohlenstoff, Sauerstoff oder Kohlenstoff und Stickstoff behandelt wurden, zeigten eine stabile Anbindung des Enzyms. Die Mengen an immobiliisertem Enzym waren sowohl nach der Immobilisierung als auch nach 8 Monaten vergleichbar. Die deutlich besten Ergebnisse wurden für die mit Kohlenstoff und Stickstoff plasmabehandelten Proben erzielt.

Mit Hilfe der Plasma-Verfahren können verschiedenen Polymeroberflächen so modifiziert werden, dass die Bindung von Proteinen über längere Zeit stabil bleibt. In Zukunft werden die Ansprüche an geeignete Oberflächen durch die Miniaturisierung steigen. Je kleiner die geplanten Analysensysteme werden, desto wichtiger werden ihre Oberflächen. Dies trifft insbesondere die Bauteile für die Mikrofluidik und Bioanalytik.

3.2 Voruntersuchungen zur Oberflächenbehandlung von Kapillaren

Aufbauend auf den aus den Vorversuchen gewonnenen Ergebnissen soll in der zweiten Entwicklungsstufe die elektrophoretische Separation mit elektrochemischer Detektion untersucht werden. Infolge neuerer Entwicklungen auf dem Gebiet der Kapillarelektrophorese (CE) auf Mikrochips sollten in dieser Arbeitsphase zusätzlich einige grundlegende

Experimente zur Eignung der Mikrochip-CE für die Auftrennung verschiedener Phenole durchgeführt werden. Da das verwendete CE-Verfahren einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet, wird im Folgenden auf die relevanten Grundlagen, Probleme und Techniken eingegangen. Da sich die Befüllung der bisher hergestellten CE-Chips als problematisch erwiesen hatte, wurden mit unserem Partner Bartels Mikrotechnik GmbH zwei Testphasen vereinbart. In einer ersten Phase wurden für verschiedene Beschichtungsversuche jeweils Versuchsmuster aus Polycarbonat zur Verfügung gestellt. In der zweiten Testphase wurden mit Plasma (Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff) vorbehandelte Polycarbonatproben zugesandt. Gegenstand unserer Forschungen sollte in dieser Arbeitsphase die Überprüfung des Einflusses der veränderten Oberflächen auf die bei Bartels Mikrotechnik GmbH angewandten Verfahren des klebstofffreien Bondens sein.

3.2.1 Oberflächenbehandlung der Chip-Komponenten

In der ersten Testphase wurden die Polycarbonatoberflächen mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 1:1 gereinigt und dann mit H_2O pH 8,5 (leicht alkalisiert mit NaOH) gewaschen. Danach wurden die Plättchen in eine H_2O_2 -Lösung gebracht, die mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt waren und für 24 Stunden mit UV-Licht (254nm) bestrahlt. Nach der Aktivierung der Oberfläche wurden die Proben dreimal in jeweils 10 ml Millipore-H_2O gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Kunststoffproben auf Filterpapier abgetropfnet und eine Stunde bei 60° C im Trockenschrank getrocknet. Anschließend wurden die Proben 14 Stunden mit einer 0,5 % 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS)-Lösung in Hexan inkubiert. Nach der Entnahme aus der Lösung wurden die Proben an der Luft getrocknet und für eine weitere Stunde bei 60°C im Trockenschrank nachbehandelt.
Das Ergebnis des Testens war positiv, d.h. die Oberflächebehandlung schränkte das Bondverfahren nicht ein (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 Bondergebnisse für Polycarbonatproben, die mit APTS behandelt wurden

Proben	**APTS-Konzentration [%]**	**Ergebnis**
1.	0,5	Bondung ist sehr gleichmäßig
2.	0,2	50%ige Bondung
3.	0,1	80%ige Bondung

Daraus konnte man schließen, dass die oben dargestellte Oberflächebehandlung eines mikrostrukturierten Chip zur Verbesserung der fluidischen Eigenschaften beitragen konnte, ohne einen negativen Einfluss auf das darauf folgende Bondverfahren zu nehmen.

In der zweiten Testphase wurden die mit Plasma vorbehandelte Polycarbonatproben mit einer Mischung aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 1:1 gereinigt und dann 14 Stunden mit einer 0,5 % 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS)-Lösung in Hexan inkubiert. Danach wurden die Proben an der Luft getrocknet und weiter eine Stunde bei 60°C im Trockenschrank nachgetrocknet.

Das von unserem Partner durchgeführte Bondverfahren erfüllte nicht die gewünschten Erwartungen. Zur Erläuterung wurden diese Ergebnisse in der folgenden Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tabelle 3-2 Bondergebnisse für Polycarbonatproben, die mit Plasma behandelt wurden

Proben	**Plasmabehandlung**	**Ergebnis**
1.	O_2	Keine gleichmäßige Bondung (bondet nur einseitig) Haftung: schlecht
2.	C + N	Keine Haftung
3.	C	Keine Haftung
4.	O_2 mit 3-APTS-Lösung	Keine gleichmäßige bondung Haftung: schlecht
5.	C + N mit 3-APTS-Lösung	Keine Haftung
6.	C mit 3-APTS-Lösung	Bondung nicht gleichmäßig Haftung: OK

Die Hauptprobleme beim Bonden der Chips mit mikrofluidischen Kanälen lagen darin, dass sie unabhängig von der bei uns durchgeführten Behandlung der Oberfläche die Kapillare in vielen Fällen nicht mehr durchlässig oder aber nicht richtig abgedichtet waren. Dies lässt sich aus der Abbildung 3-50 erkennen. Hier kann man sehen, dass der Kanal nicht abgedichtet ist, dadurch Flüssigkeit zwischen Deckel und Boden gelangen kann und somit der Chip unbrauchbar wird.

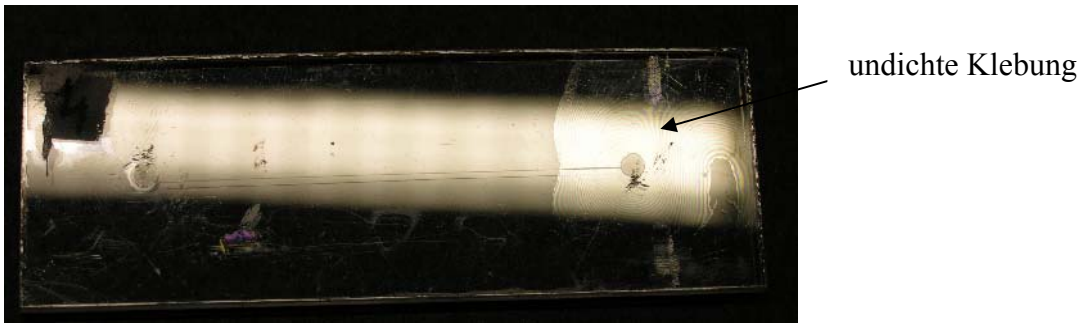


Abb. 3-50 Undichter Kanal durch Klebedefekte (klebstofffreies Bonden)

3.3 Mikrofluidische Analyse-Chips

Entsprechend den bereits erwähnten Ergebnissen wurden nachfolgend Chips verwendet, die zuerst gebonded und dann funktionalisiert wurden. Die Chips wurden aus Polycarbonat gefertigt (Abb. 3-51).

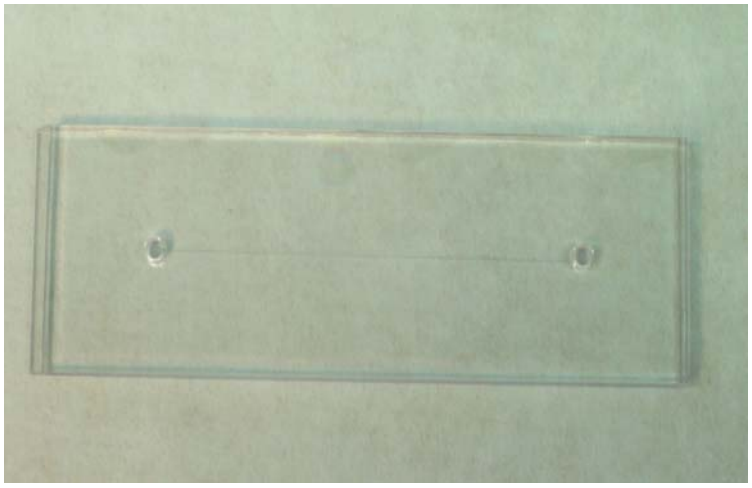


Abb. 3-51 Mikrofluidische Kanalstruktur eines Polycarbonat-Chips, der von Fa. Bartels Mikrotechnik GmbH hergestellt wurde. Die Kapillare war 50 mm lang und hatte einen Innendurchmesser von 50 µm.

3.3.1 Konditionierung der Mikrochips

Zu Beginn des Experiments musste der Mikrochip zunächst konditioniert werden. Durch die Beschaffenheit der Kapillare aus Polycarbonat ist ihre innere Oberfläche chemisch inert. Hier ist eine Funktionalisierung der Materialoberflächen dringend erforderlich, um einen elektroosmotischen Fluss (EOF) zu erzeugen und dann Polyphenole mittels Kapillarelektrophorese zu trennen (siehe Kap. 3.5). Es wurden zunächst Untersuchungen zur Füllgeschwindigkeit der Kapillaren mit unterschiedlichen Lösungen unternommen. Dafür wurde eine Gilson-Pumpe an das Reservoir der Chips angeschlossen und es wurden mittels Druck die verwendeten Lösungen (Ethanol, Kaliumhydroxid, Silanlösung und Phosphatpuffer pH 7,3 mit unterschiedlichen Konzentrationen, Wasser) durch den Trennkanal gepumpt (Abb. 3-52). Anhand dieser Untersuchungen wurden die benötigte Zeit und die Konzentrationen der einzelnen Konditionierungsschritte ermittelt.

Abb. 3-52 Befüllung der Trennkapillare mit verwendeten Lösungen

Für die Visualisierung der Transportvorgänge in den Mikrokanälen wurde den Puffern Methylenblau zugesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass die Lösungen nach ca. 10 Sekunden mit Hilfe einer Gilson-Pumpe bei einer Flussrate von 1 ml/min die Trennkapillare komplett durchlaufen haben.

3.3.2 Messplatzaufbau

Um die Funktionalität der Chip testen zu können, wurde ein Messplatz aufgebaut, der darüber hinaus verschiedene elektrochemische Detektoranordnungen ermöglichen sollte (Abb. 3-53).

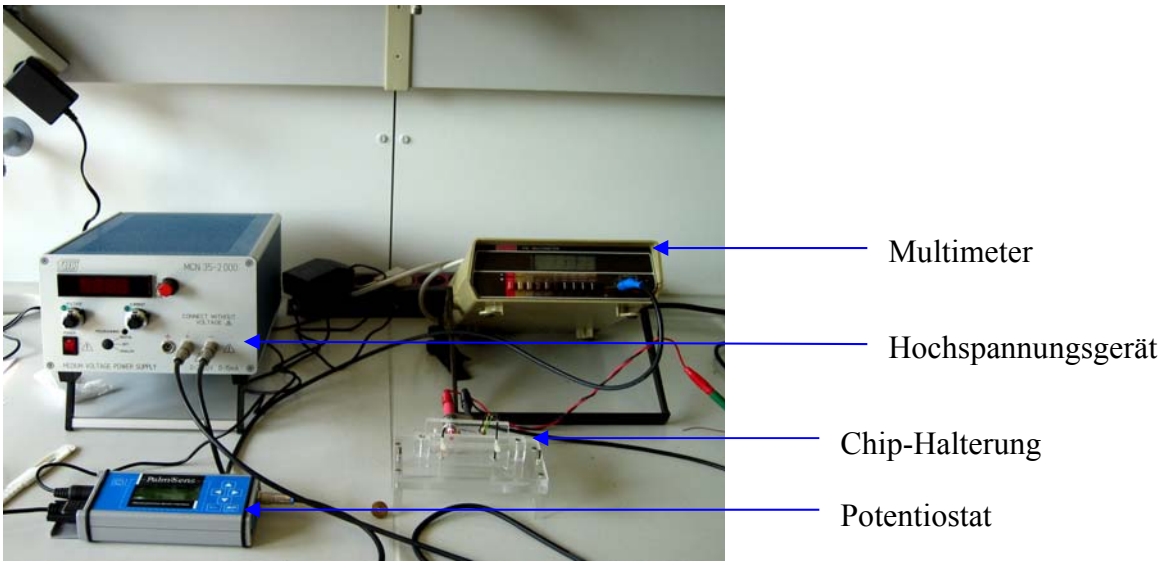


Abb. 3-53 Mikrofluidischer Messplatz für die CE mit amperometrischer Detektion

Der mikrofluidische Messplatz für die Kapillarelectrophorese bestand aus einem Hochspannungsnetzgerät für den Aufbau des elektrischen Feldes; einem Multimeter, das zur

Kontrolle des Stromflusses der Hochspannung während der Messung diente; einen Potentiostat für die Einstellung des Detektionspotentials zwischen Arbeits- und Gegenelektrode sowie der Chip-Halterung. Gesteuert wurde der Potentiostat mit einem PDA-Gerät. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der Übertragung vom PDA zum Rechner mittels der PDA-Software.

Zur einfacheren Ausrichtung von Elektrode und Kapillare wurde eine aus Plexiglas gefertigte Halterung verwendet. Die Abbildung 3-54 zeigt die Halterung. Als Anode diente eine Gold-Elektrode. Die Kathode, die Arbeitselektrode und die Referenzelektrode bestanden aus Platin.

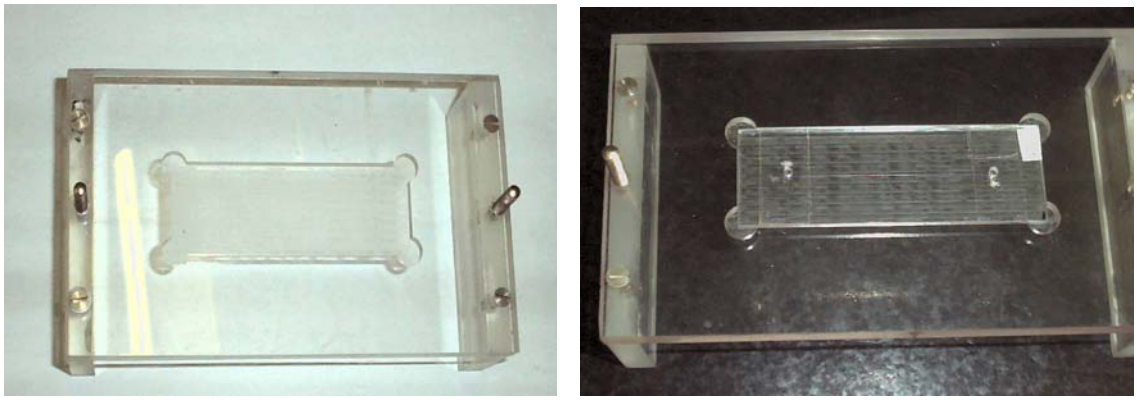


Abb. 3-54 Plexiglashalterung zur einfachen Ausrichtung von Elektroden und Kapillare

Die aus Platindraht bestehenden Elektroden wurden am Kapillarausgang positioniert (Abb. 3-55). Außer der Kathode sind zwei weitere Elektroden im Kathodenraum installiert: die Arbeitselektrode (Detektor) und eine Gegenelektrode, über welche das Potential konstant gehalten werden soll.

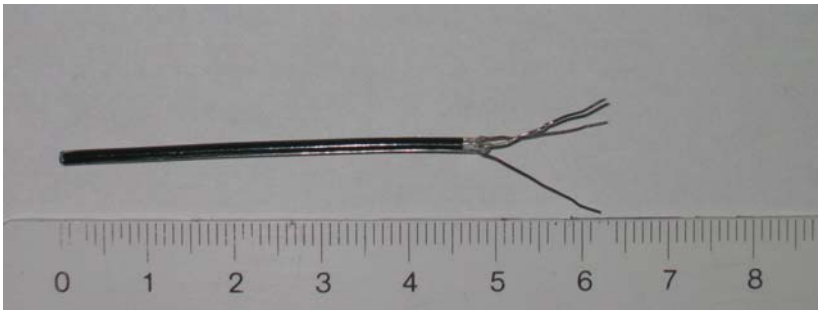


Abb. 3-55 Platindraht, aus dem die drei Elektroden angefertigt wurden

Die drei Elektroden waren außerhalb des Trennkanals in unmittelbarer Nähe zum Kanalausgang angebracht (Abb. 3-56). Grund dafür war, dass bei der Kapillarelektrophorese mit amperometrischer Detektion die Positionierung des amperometrischen Detektors zum Kapillarausgang einen entscheidenden Einfluss auf das Detektionssignal haben kann.

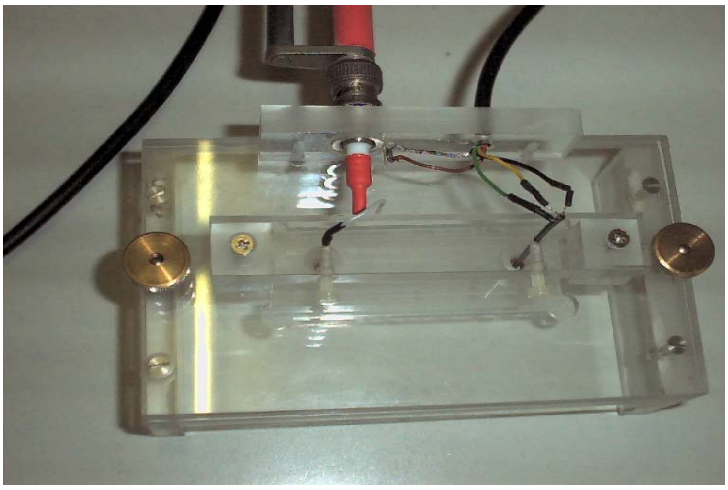


Abb. 3-56 Positionierung der Elektroden am Kapillarausgang. Die Elektroden wurden im Deckel der Halterung befestigt

Wallenborg [Wallenborg, S et al. 1997] berichtete, dass sich der Abstand zwischen dem Kapillarauslass und der Elektrode auf die Zahl der theoretischen Böden und somit auf die Effizienz eines Trennverfahrens auswirken kann. Bei der kapillarelektrophoretischen Trennung erfolgt der Transport der Probensubstanz jedoch nicht mittels Druck durch die Kapillare, sondern die Ionen bewegen sich durchfrei im elektrischen Feld. Der Analyt breitet sich in unserem Fall in Abhängigkeit von der darauf angewendeten Hochspannung aus und nimmt somit Einfluss auf die darauf zu messenden Signale. Deshalb wurde die Arbeitselektrode möglichst nah an das Kapillarende positioniert.

3.4 Amperometrische Messungen

In den folgenden Abschnitten werden exemplarische Messungen für die verschiedenen Phenole beschrieben. Phenole wurden als Testsubstanzen für diesen Versuchsaufbau gewählt, weil es sich dabei um kleine elektrochemisch aktive Substanzen handelt, die zudem in der Natur weit verbreitet sind. Sie sind Bestandteile vieler Pflanzenfarb- und Gerbstoffe. Im menschlichen Körper könnten Phenole als Stoffwechselprodukte entstehen. Das Testprinzip könnte also z.B. zur Überprüfung von Lebensmitteln und Phytopharmaka auf bestimmte Inhaltsstoffe oder in der medizinischen Diagnostik verwendet werden.

3.4.1 Amperometrische Messung von Phenolen mit einer Kapillare, die mit Natriumsilikatlösung derivatisiert wurde

Eine Voraussetzung für die Präparation von Silanschichten ist eine gründliche Reinigung und Aktivierung der Substratoberfläche. Hierfür wurde der Chip zunächst eine Stunde mit einer Lösung aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 1:1 gereinigt. Danach wurde die Kapillare für 15 Minuten mit einer 0,3% Natriumsilikatlösung beschichtet. Anschließend wurde die Kapillare jeweils 15 Minuten mit Wasser und 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 gespült.

Die so entstandenen Silanolgruppen können im Kontakt mit einer Elektrolytlösung in Abhängigkeit von pH-Wert dissoziiren. Dadurch entsteht eine negativ geladene Kapillaroberfläche, wodurch einerseits der EOF in Richtung Kathode resultiert, anderseits aber auch elektrostatische Wechselwirkungen mit entgegengesetzt geladenen Analyt-Ionen auftreten können.

Das Füllen der Kapillaren mit viskosen Lösungen erwies sich als schwierig. Um die Verstopfung der Kapillare zu verhindern, wurde nach mehreren Versuchen bei einer Flussrate von 1 ml/min eine ideale Konzentration für die Silanlösung von 0,3% in NaOH ermittelt.

Zu Beginn einer Untersuchung wurde die mit Natriumsilikat behandelte Kapillare mit 10 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4-Puffer pH 7,3 gespült. Anschließend wurde die Kapillare und die Reservoirs optisch auf Luftblasen untersucht und diese gegebenenfalls entfernt. Der Chip wurde in die Apparatur eingesetzt und alle Reservoirs mit Puffer des jeweiligen pH-Wertes befüllt, so dass sich gleichmäßige Füllhöhen ergeben, um hydrostatische Drücke so gering wie möglich zu halten.

Das optimale Detektionspotential (E_{pot}) der Platinreferenzelektrode ist abhängig von der Trennspannung (HS), dem Kapillarinnendurchmesser und dem Puffersystem. Deshalb ist es notwendig, zur Bestimmung des optimalen verwendeten Detektionspotentials (E_{pot}) für die amperometrische Detektion vorab Referenzmessungen mit verschiedenen Detektionspotentialen durchzuführen. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Trennspannung (HS) wurde auf 500V eingestellt und es wurden Detektionspotentiale zwischen 500 mV und 1100 mV angelegt (Abb. 3-57).

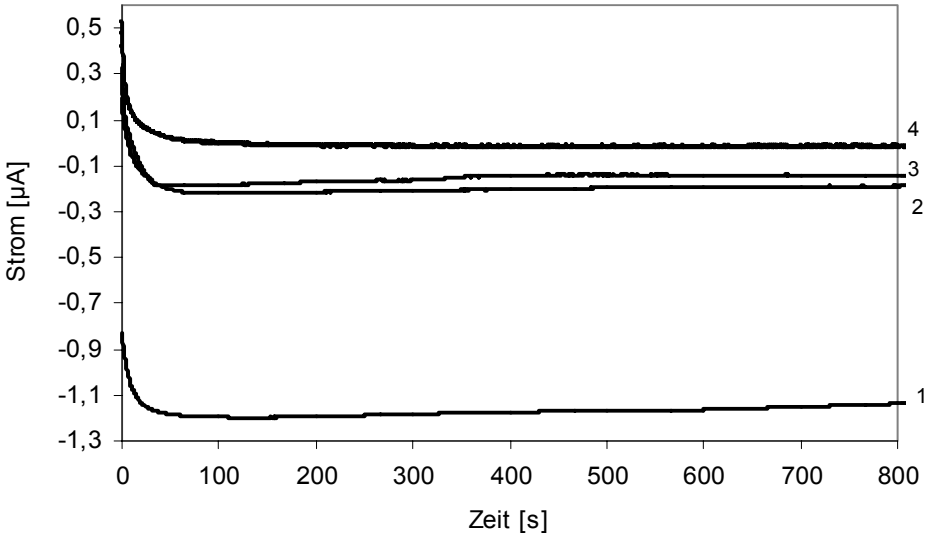


Abb. 3-57 Einfluß des Detektionspotentials auf den Grundstrom
1: 500mV; 2: 600mV; 3: 800mV; 4: 1100mV

Für die kapillarelektrophoretische Trennung mit einer Trennspannung von 500 V wurde ein optimales Detektionspotential für die amperometrische Detektion von 1100 mV ermittelt. Bei diesem Detektionspotential stellt sich eine stabile Grundlinie ein. Niedrigere Detektionspotentiale waren mit einem geringerem Grundstrom und einem stärkerem Basislinienrauschen verbunden und brachten keinen weiteren Vorteil.

Zur Ermittlung des Grundrauschens der Apparatur unabhängig vom Analyt wurde die Messung für die Kapillare, die nur mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 befüllt wurde, zuerst ohne Anlegen von Trennspannung gestartet. Dies ermöglichte eine Kontrolle der Messeinrichtung auf Stromschwankungen, die schon ohne Analyt entstanden. Nach ca. 200s stabilisiert sich die Grundlinie bei einem Strom von etwa 20 nA und einem Rauschen von < 2 nA (Abb. 3-58).

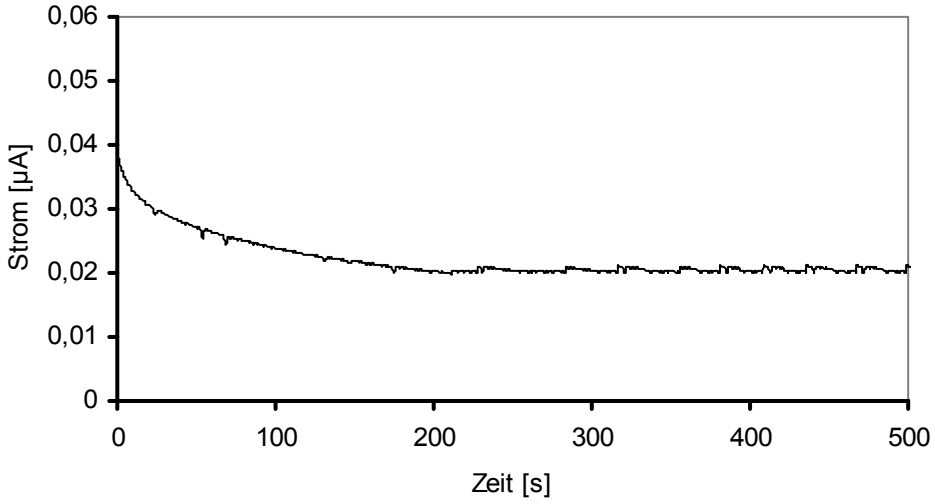


Abb. 3-58 Grundsignal des silanisierten Chip bei einem Epot=1100 mV ohne Trennspannung. Die Kapillare wurde mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 gefüllt

Danach wurde getestet, ob das Stromniveau bei Anlegung einer Trennspannung von 500 V stabil blieb. Aus Abbildung 3-59 ist ersichtlich, dass sich dabei nach ca. 50s ein konstanter Stromfluss ergab.

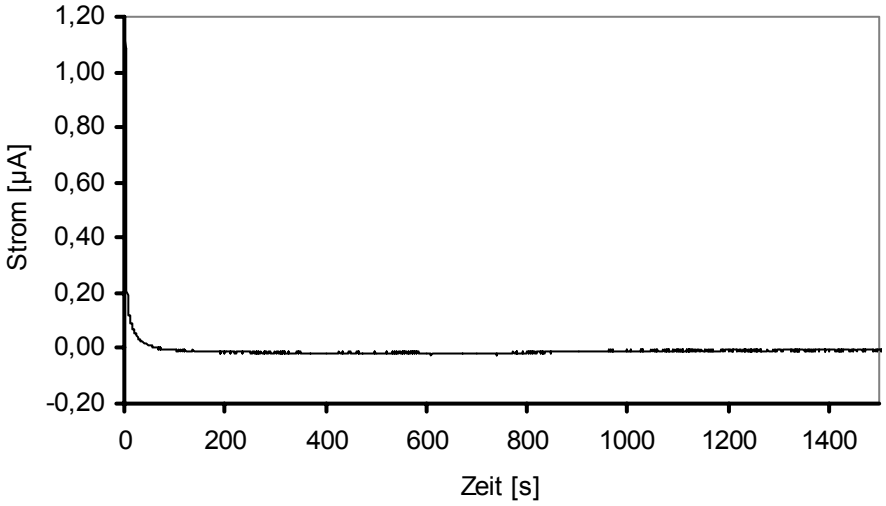


Abb. 3-59 Basislinie einer mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 befüllten Kapillare mit E_{pot}=1100 mV und HS=500 V

Die Reproduzierbarkeit einer Analyse wurde als Maß für die Güte der Streuung der Einzelbestimmungen angesehen. Beim Aufbau der Kapillarelektrophorese mit einem amperometrischen Detektor müssen zwei im Elektropherogramm enthaltenen Größen untersucht werden: Die Migrationszeiten zur Identifizierung des Analyten sowie zur

Beschreibung der Reproduzierbarkeit des Kapillarzustands, und die Signalhöhe vornehmlich zur Charakterisierung des Detektors sowie zur Konzentrationsermittlung des Analyten. Die Reproduzierbarkeit wurde durch die Standardabweichung ausgedrückt. Die elektrophoretische Trennung wurde in einer 50 mm langen Polycarbonatkapillare mit einem Innendurchmesser von 50 µm unter dem Einfluß einer Trennspannung von 500 V durchgeführt. Das Kapillarende wurde direkt an der Platin-Elektrode fixiert und die amperometrische Detektion erfolgte bei einem Detektionspotential von 1100 mV.

Jede Substanz wies unter gegebenen Versuchsbedingungen aufgrund ihrer Ladung bei dem eingesetzten pH-Wert eine bestimmte Migrationszeit auf. Die Ansprechzeiten t_{90}, d.h. die Zeitdauer bis 90% des maximalen Detektionssignals erreicht wurde, lagen zwischen 140 und 180 Sekunden, nachdem der Analyt den Detektor erreicht hat. Da es sich bei Phenolen um oxidationsempfindliche Stoffe handelte, sollte die Probe möglichst vor Licht geschützt werden. Aus diesem Grund wurde die Apparatur abgedeckt.

Bevor die Probe injiziert wurde, sollten die Anoden- und Kathodenreservoire mit Elektrolytlösung befüllt werden. Um einen hydrostatischen Druckunterschied zu vermeiden, wurden die beiden Flüssigkeitsreservoire, die in dem Deckel der Halterung vorgesehen waren, mit jeweils 100 µl Phosphatpuffer pH 7,3 (10 mM) befüllt. Die o.g. Trennspannung wurde angelegt und darüber hinaus der zeitliche Stromverlauf aufgenommen. Nach Einstellung einer stabilen Basislinie des Stromverlaufs erfolgte die Probezugabe. Aus dem Anodenreservoir (A) wurden 90 µl Pufferlösung vorsichtig entnommen und durch die gleiche Menge Probe ersetzt. Durch Anlegen der Trennspannung zwischen den Elektroden A und B wurde die an Elektrode A eingegebene Probe durch den Trennkanal in Richtung Reservoir B transportiert (Abb.3-60).

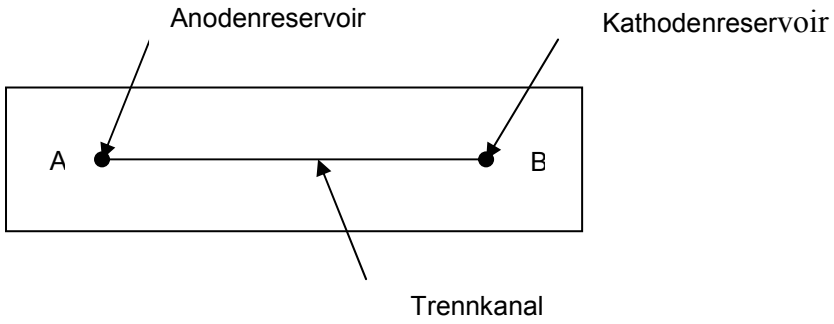


Abb.3-.60 Polycarbonat-Chip für Kapillarelektrophorese (Hersteller Fa. Bartels Mikrotechnik)

Es wurde beim Einfüllen der Probe streng darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden und die Füllhöhen der Reservoirs jeweils gleich bleiben. Eine Veränderung des Füllstandes

im Anodenreservoir A kann unter diesen Umständen einen großen Einfluss auf den Transport der Probelösung nehmen. Am Ende der Messung und nach der Abschaltung des Hochspannungsgeräts wurden die Reservoire entleert und dreimal mit jeweils 100 µl Wasser ausgespült.

Der in (Abb. 3-61) dargestellte Verlauf zeigt eine Detektion von Dopamin (10 mM).

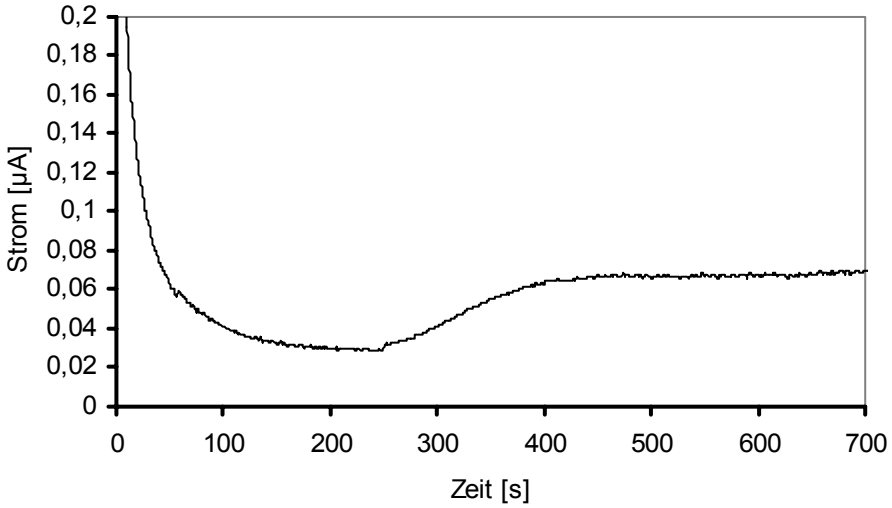


Abb. 3-61 Kurvenverlauf einer 10 mM Dopamin-Lösung bei einem Potential von E_{pot}= 1100 mV und einer Trennspannung von 500 V

Nach ca. 240 s erfolgte eine Zunahme des Stroms auf etwa 70 nA. Wie bei allen mit dieser Apparatur durchgeführten Versuchen bildete sich anschließend nach 400 s ein Plateau aus. Die Probe wurde direkt in das Anoden-Reservoir gegeben; dadurch entstand kein scharfer Peak sondern ein Plateau. Desweiteren befindet sich die Arbeitselektrode konstruktionsbedingt nicht direkt in der Kapillare, so dass der Analyt vor Erreichen der Arbeitselektrode Diffusionsvorgängen unterworfen war. Der Abstand zwischen Kapillarende und Arbeitselektrode betrug ca. 50 µm.

Hydrochinon konnte ebenfalls detektiert werden. Die Konzentration der Probe zeigte deutlichen Einfluss auf die Größe des Detektorsignals. Eine 10 mM Hydrochinon-Lösung wurde nach ca. 190 s detektiert, wobei die Standardabweichung 10,4 s betrug. Die Höhe der Signale nahm mit der Konzentrationerhöhung stetig zu, wobei keine lineare Proportionalität vorlag (Abb.3-62).

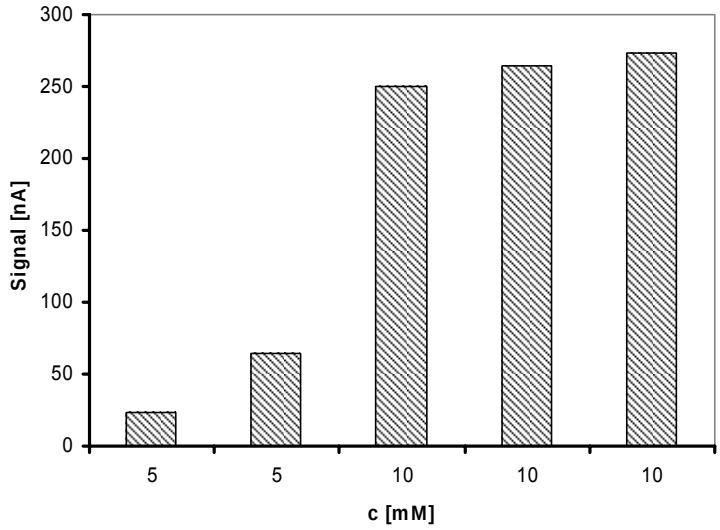


Abb. 3-62 Vergleich der Detektorsignale für verschiedene Hydrochinon-Konzentrationen mit E_{pot}=1100 mV und HS= 500 V

Auch die detektion von Pyrogallol bereitete keine Schwierigkeiten. Nach einer etwas längeren Zeit als im Falle von Hydrochinon stieg die Stromstärke an, was die Ankunft der Substanz an der Elektrode signalisierte (Abb. 3-63). Hier betrug die durchschnittliche Migrationszeit 262 s bei einer Standardabweichung von 13,0 s.

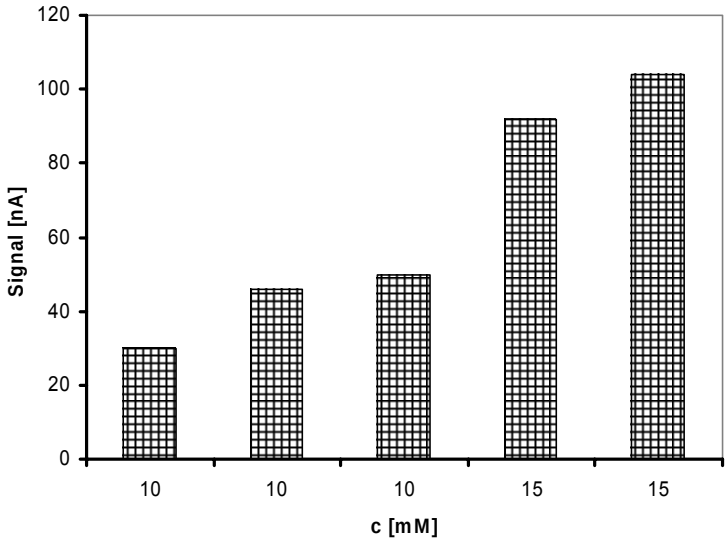


Abb. 3-63 Unterschied der Signalhöhe bei einer 10 mM und 15 mM Pyrogallol-Lösung. Die Messungen wurden bei einem Detektionspotential von 1100 mV und einer Trennspannung von 500 V durchgeführt

Gallussäure war insgesamt sehr gut zu detektieren. Im Mittelwert betrug die Migrationszeit 408 s bei einer Standardabweichung von 13,0 s. Der Stromverlauf verzeichnete am Anfang

einen starken Abfall, stabilisierte sich um den Wert von 16 nA, stieg nach ungefähr 450 s auf 100 nA stark an und blieb dann für den Rest der Zeit (in diesem Falle bis zur 800 s) konstant. In Abbildung 3-64 kann man deutlich den Anstieg der Messkurve erkennen.

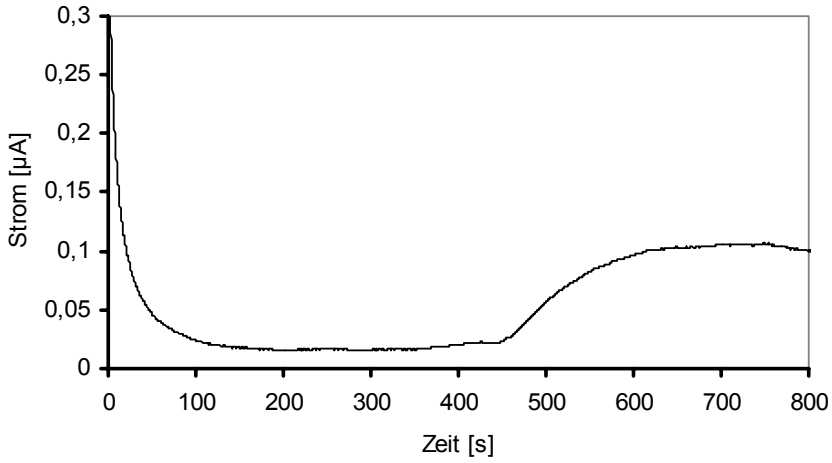


Abb. 3-64 Darstellung der Strom/Zeit-Kurve bei der Detektion von Gallussäure (30 mM) unter den Trennbedingungen: Detektionspotential 1100 mV; Trennspannung 500 V; Puffer: 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3

Das Sensogramm für Gallussäure zeigt eine deutliche Zunahme des Stroms mit der Erhöhung der Konzentration (Abb. 3-65). Im dargestellten Diagramm ist ein linearer Zusammenfang zwischen Konzentration und Signalhöhe zu erkennen. Während die Standardabweichung des Signals einer 20 mM Lösung einen Wert von 7,6 nA hatte, ergab eine 40 mM Lösung eine Standardabweichung von 10,2 nA. Ergebnisse dazu sind der Tabelle 3-3 zu entnehmen.

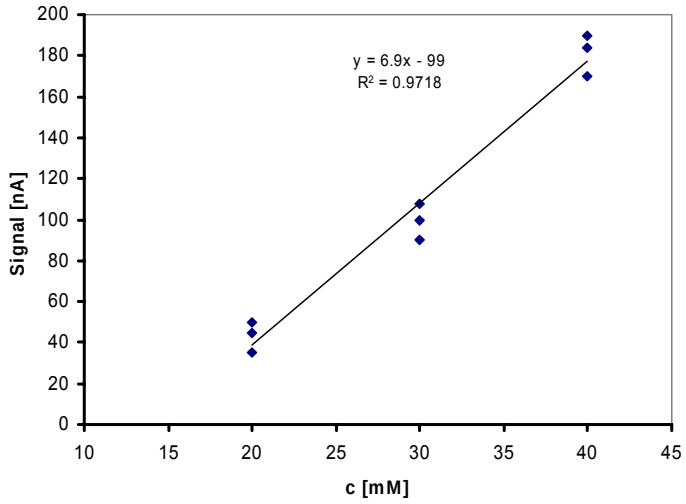


Abb. 3-65 Linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Stromsignal bei der Detektion von Gallussäure

Die relativ hohen Werte der Standardabweichung sind auf die schwierige Wiederholbarkeit der Messungen zurückzuführen. Den gleichen Abstand zwischen Kapillarausgang und der Elektrode stellte für jede Messung ein Problem dar. Auf einem Chip konnten im Schnitt nur drei bis vier Messungen durchgeführt werden, ohne dass die Kapillare verstopfte. Dadurch mussten für einen Vorgang manchmal mehrere Chips verwendet werden.

Tabelle 3-3 Analysenergebnisse für verschiedene Phenole bei unterschiedlichen Konzentrationen.

Probe	Konzentration [mM]	Migrationszeit [s]	Stabw [s]	Signal [nA]	Stabw [nA]
Hydrochinon	5	184	11.1	65	*
	10	190	10.4	250	11.6
Dopamin	10	239	6.3	70	8
	15	253	7.5	106	10
Pyrogallol	10	274	11.6	50	10.5
	15	262	13	104	*
Gallussäure	20	416	12.2	45	7.6
	30	408	12.9	100	9
	40	421	13.3	170	10.2

* nur zwei Messwerte

Die Chips, die bereits vor ihrer Verwendung einem Auswahlverfahren unterzogen wurden, ergaben nur selten gleiche Werte, da insbesondere die Kapillarende ungenau positioniert waren (Abb. 3-66). Dies führte dazu, dass der für die Messung relevante Abstand zwischen der Elektrode und dem Kapillarende nicht gleich blieb. Dadurch ergab sich zu den bekannten Schwankungen des EOF ein zusätzliches Problem für die Reproduzierbarkeitder Messungen, bedingt durch den variablen Abstand zwischen Kapillarende und Arbeitselektrode.

Abb.3-66 Positionierung der Kapillare

Die Berücksichtigung der bereits erwähnten Fehlerquellen und die dabei gesammelten Erfahrungen trugen dazu bei, dass es mit vielen Versuchen doch möglich war, die Elektrode

an das Kapillarende relativ präzise zu positionieren und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

3.4.2 Amperometrische Messung von Phenole mit einer Kapillare, die mit Trimethylsylil-methanol behandelt wurde

Vor ihrem erstmaligen Gebrauch wurde die neue Kapillare für eine Stunde mit einer 500 mM KOH Lösung gereinigt, dann mit Trimethylsylil-methanol für 15 Minuten behandelt. Die Silanlösung lässt sich an die Kapillarwand (Polycarbonatoberfläche) adsorptiv binden, so dass sich die Hydroxylgruppe zum Inneren der Kapillare ausrichten (Abb.3-67).

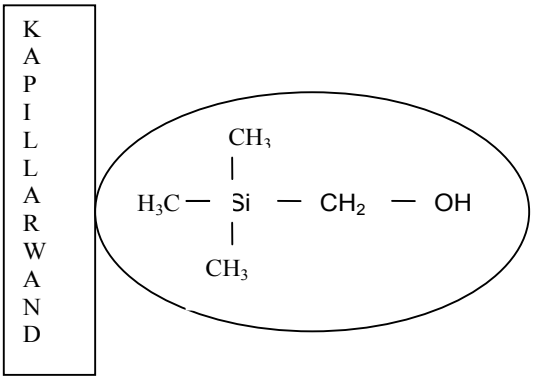


Abb. 3-67 Schematische Darstellung der Anbindung von Silanlösung an die Kapillarwand

Anschließlich wurde die Kapillare mit Wasser und dann mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 gespült. Es wurde mit einer Trennspannung von 500V gearbeitet und ein Detektionspotential von 1100 mV angelegt. Im Folgenden wurden die Kapillare und die Reservoirs optisch auf Luftblasen untersucht und diese gegebenenfalls entfernt. Danach wurde der Chip in die Halterung eingesetzt. Beide Resorvoirs wurden mit Pufferlösung gefüllt.

Das dargestellte Diagramm zeigt der Stromverlauf von Resorcin bei verschiedenen Konzentrationen. Das Sensogramm offenbart einen deutlichen Einfluss der Konzentration auf die Stromstärke, jedoch auch auf die Geometrie der Kurven (Abb.3-68).

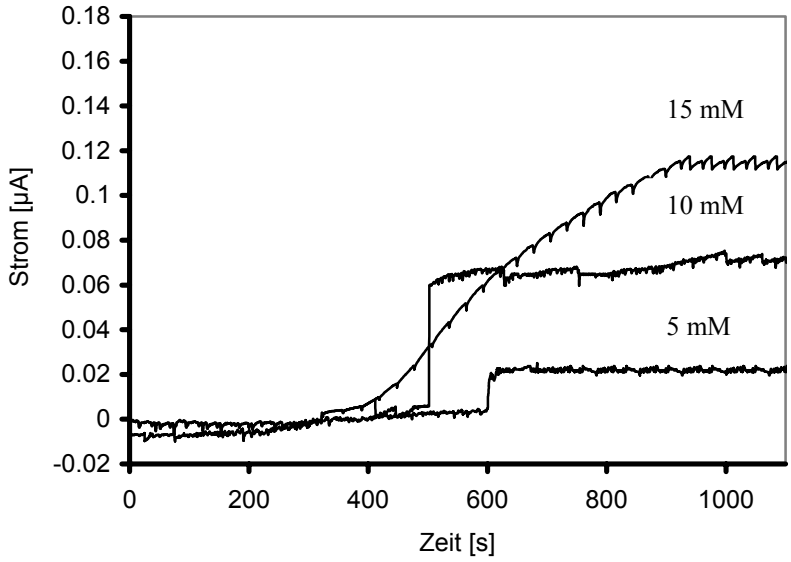


Abb. 3-68 Darstellung der Strom/Zeit-Kurve bei der Detektion von Resorcin bei verschiedenen Konzentrationen unter den Trennbedingungen: Detektionspotential 1100 mV; Trennspannung 500 V; Puffer: 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3

Die Erhöhung der Konzentration führte zu einer Zunahme der Signalhöhe mit einen linearer Zusammenhang zwischen Konzentrationerhöhung und Stromstärke (Abb. 3-69).

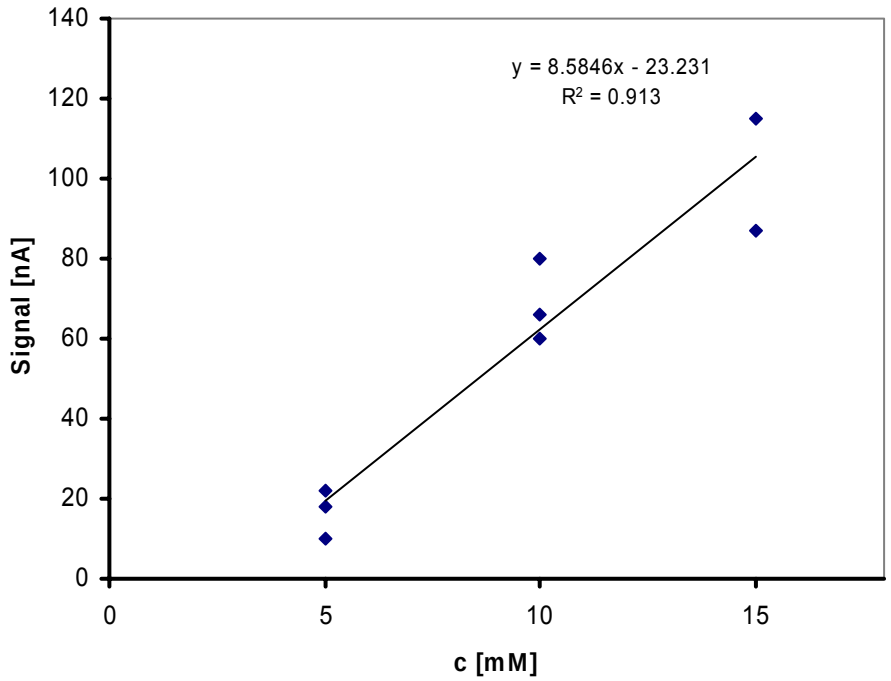


Abb. 3-69 Abhängigkeit der Signalhöhe von der Konzentration bei der Detektion von Resorcin. Es wurde mit Epot=1100 mV und HS=500 V gearbeitet

Je größer die Konzentration war, desto kleinere Migrationszeiten wurden beobachtet (Abb 3-70). Offensichtlich kommt es zu sehr komplexen Vorgängen an der Kapillarinnenwandung. Die Standardabweichung für Resorcin war relativ groß und ist in Tabelle 3-4 dargestellt.

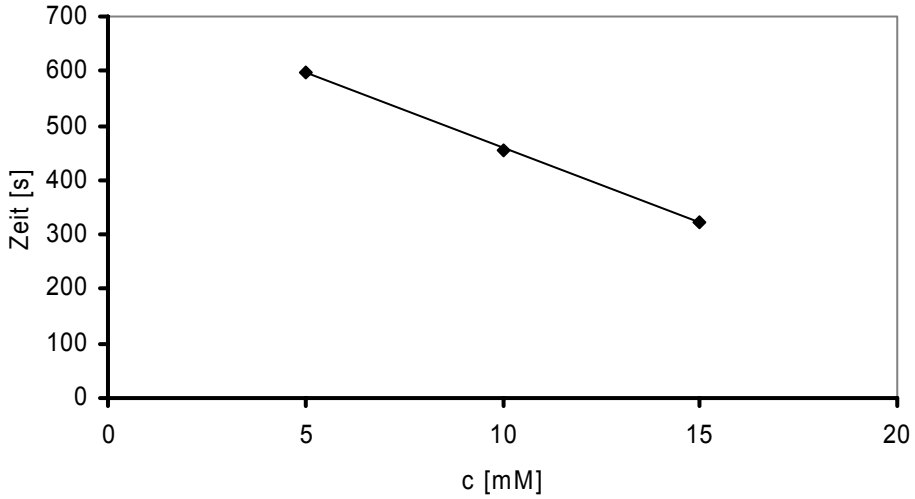


Abb. 3-70 Abhängigkeit der Migrationszeit von der Konzentration bei der Detektion von Resorcin

Es wurden ebenfalls Versuche mit Dopamin durchgeführt. Während 15mM Dopamin bei 393 s detektiert werden konnte, zeigte eine 10 mM Lösung eine durchschnittliche Migrationzeit von 475s. Im Vergleich zu einer 15 mM Lösung, bei der Strom einen Wert von 140 nA zeigte, betrug die Stromstärke bei einer 10 mM Lösung 105 nA (Abb. 3-71). Darüber hinaus wies das Sensogramm ein atypisch hohes Rauschen auf.

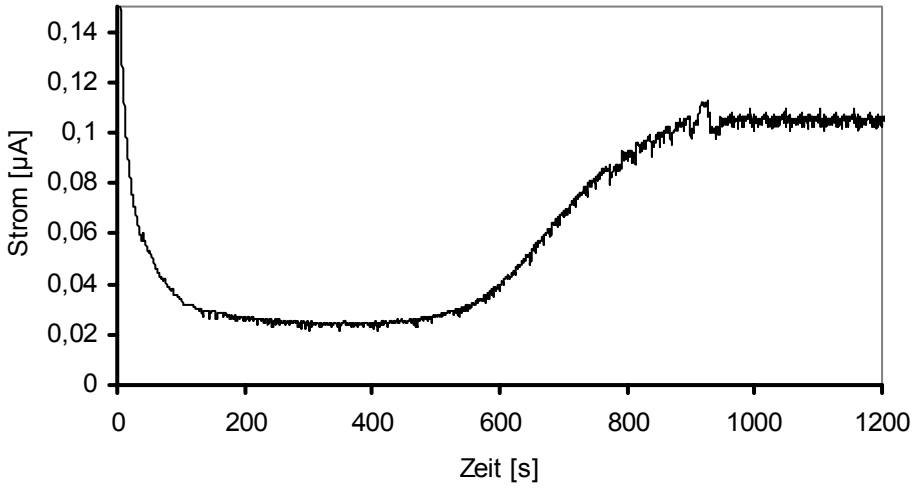


Abb. 3-71 Kurvenverlauf einer 10 mM Dopamin–Lösung bei einem E_{pot} von 1100 mV und einer Trennspannung von 500 V

Das Sensogramm einer 15 mM Dopamin-Lösung zeigte einen steileren Verlauf als das mit 10 mM Lösung aufgenommene Sensogramm (Abb.3-72). Dies erklärt sich dadurch, dass mit der Erhöhung der Dopamin-Konzentration die Signalhöhe zunimmt. Diese Detektion wird durch den zeitlichen Verlauf des Stroms beschrieben. Nachdem der Strom kontinuerlich bis auf einen Wert von – 6 nA abfiel (Stabilisierungsphase), stieg er bei 470 s wieder auf 140 nA an (Detektionsphase).

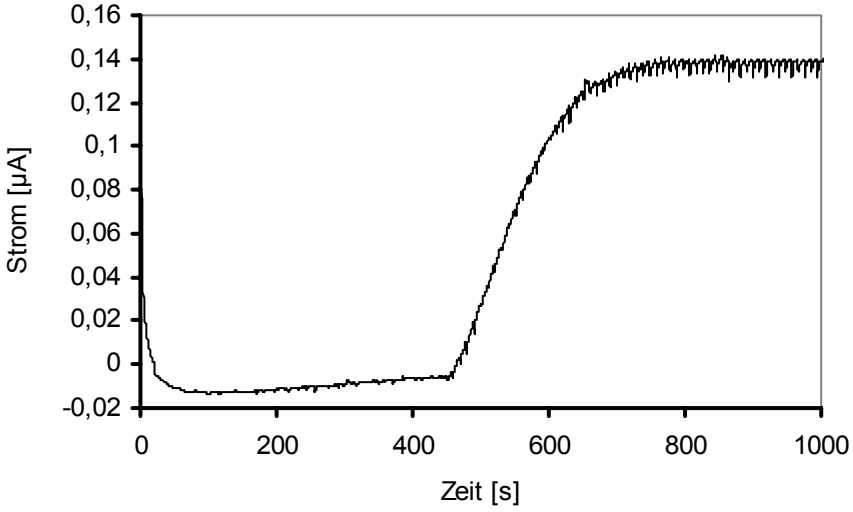


Abb. 3-72 Sensogramm einer 15 mM Dopamin–Lösung. Die Messung wurde bei einem Detektionspotential von 1100 mV und einer Trennspannung von 500 V durchgeführt

Alle durchgeführten Messungen wiesen den unten dargestellten Kurvenverlauf auf. Nicht dabei zu vernachlässigen ist ebenfalls das sowohl von der Substanz als auch von der Konzentration abhängige Rauschen, das nach der Stabilisierung des Signals auftritt (siehe Abb.3-69 bis 3-71).

Weitere Versuche wurden mit Pyrogallol durchgeführt. Der in Abbildung 3-73 dargestellte Verlauf stellt die Detektionkurve einer 15 mM Pyrogallol-Lösung dar. Die Stromwerte steigen bis 440 s nur langsamen. Nach insgesamt 1100 s wird ein Detektionssignal von 110 nA erreicht. Die messbaren Ströme waren im Vergleich zu Dopamin geringer und rauschten deutlich stärker. Mehrfach durchgeführte Versuche ergaben gleiche Ergebnisse.

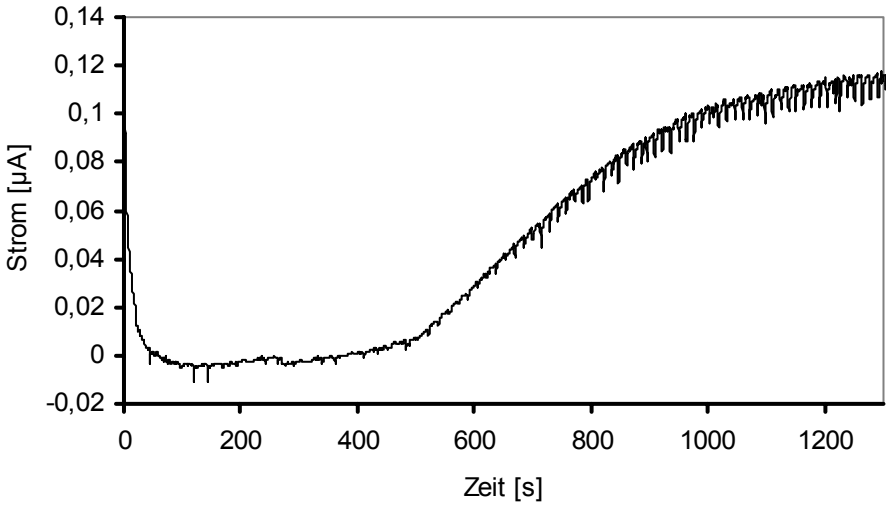


Abb. 3-73 Sensogramm einer Probe, die 15 mM Pyrogallol enthielt. Die Messung wurde mit 10 mM Phosphatpuffern pH 7,3 bei einem Potential von 1100 mV und einer Trennspannung von 500 V durchgeführt

Je geringer die Konzentration war, desto länger dauerte es, bis die Analysenlösung die Detektionselektrode erreichte.

Auch Hydrochinon zeigte ein deutliches Detektionssignal. Wie sich aus dem Graph in Abbildung 3-74 zu erkennen lässt, zeigte dies jedoch ein starkes „Fronting“ (200-500 Sekunden) und bildete bei 1200 Sekunden wie Dopamin ein Plateau aus. Eine mögliche Erklärung für das Fronting wäre die Überladung des Systems. Bei Hydrochinon ist die Signalhöhe um den Faktor drei größer als bei Pyrogallol.

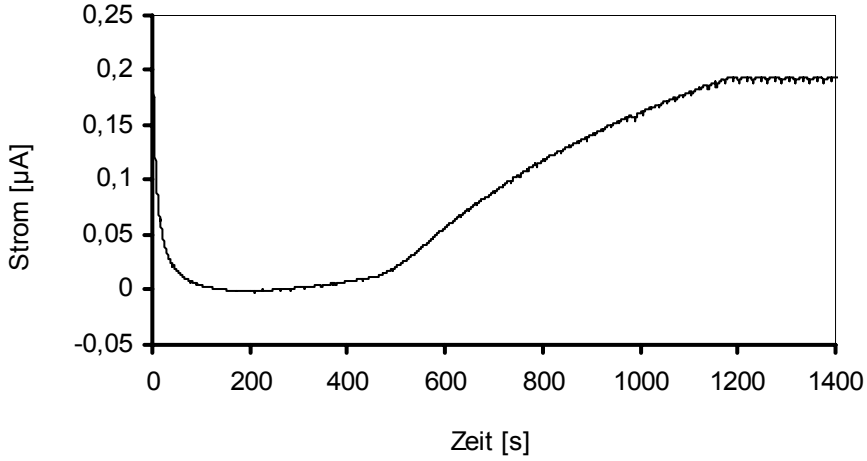


Abb. 3-74 Strom/Zeitdiagramm von 10 mM Hydrochinon bei einem Potential von 1100 mV und einerTrennspannung von 500 V

Der Versuch, die Mikrokapillare mit (Trimethylsylil)-methanol zu beschichten, führte zu keinem verwertbaren Erfolg. Nach ungefähr drei Messungen musste der Silanisierungsvorgang wiederholt werden, da sich die Silanschicht ablöste.
In Tabelle 3-4 wurden die Detektionszeiten für verschiedenen Phenole zusammengefasst, sowie die Signalhöhe und Standardabweichungen.

Tabelle 3-4

Probe	Konzentration [mM]	Migrationszeit [s]	Stabw [s]	Signal [nA]	Stabw [nA]
Hydrochinon	5	521	14.2	18	4.2
	10	443	13.5	190	11
Resorcin	5	567	16.1	22	6.1
	10	456	17.3	66	10.2
	15	323	18	115	*
Dopamin	10	475	9.7	105	10.4
	15	393	10.6	140	11
Pyrogallol	10	540	12.4	70	10.7
	15	433	13.8	110	12.5

* nur zwei Messwerte

Da die Kapillare öfter verstopfte, wurden die Messungen nicht mit der gleichen Kapillare durchgeführt. Bei den verwendeten Chips handelte es sich um Prototypen und zwischen den einzelnen Kapillaren bestanden möglicherweise relativ große Schwankungen bei ansonsten gleichen Parametern. Das wäre eine Erklärung für die größeren Standardabweichungen. Ein Indiz dafür war die deutliche Abhängigkeit der Migrationszeiten von der Analytkonzentration.

3.4.3 Amperometrische Messung von Phenole mit einer Kapillare, die mit Glycidoxypropyltriethoxisilan behandelt wurde

Für den nächsten Versuch wurden ausschließlich Oberflächen verwendet, die mit Glycidyloxypropyltrimethoxysilan silanisiert wurden. Über das Reagenz 3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) lassen sich Oxirangruppen an einer Polycarbonatoberfläche einführen, die in sauren Medien zu einem vicinalen Diol hydrolysiert wurden (Abb. 3-75).

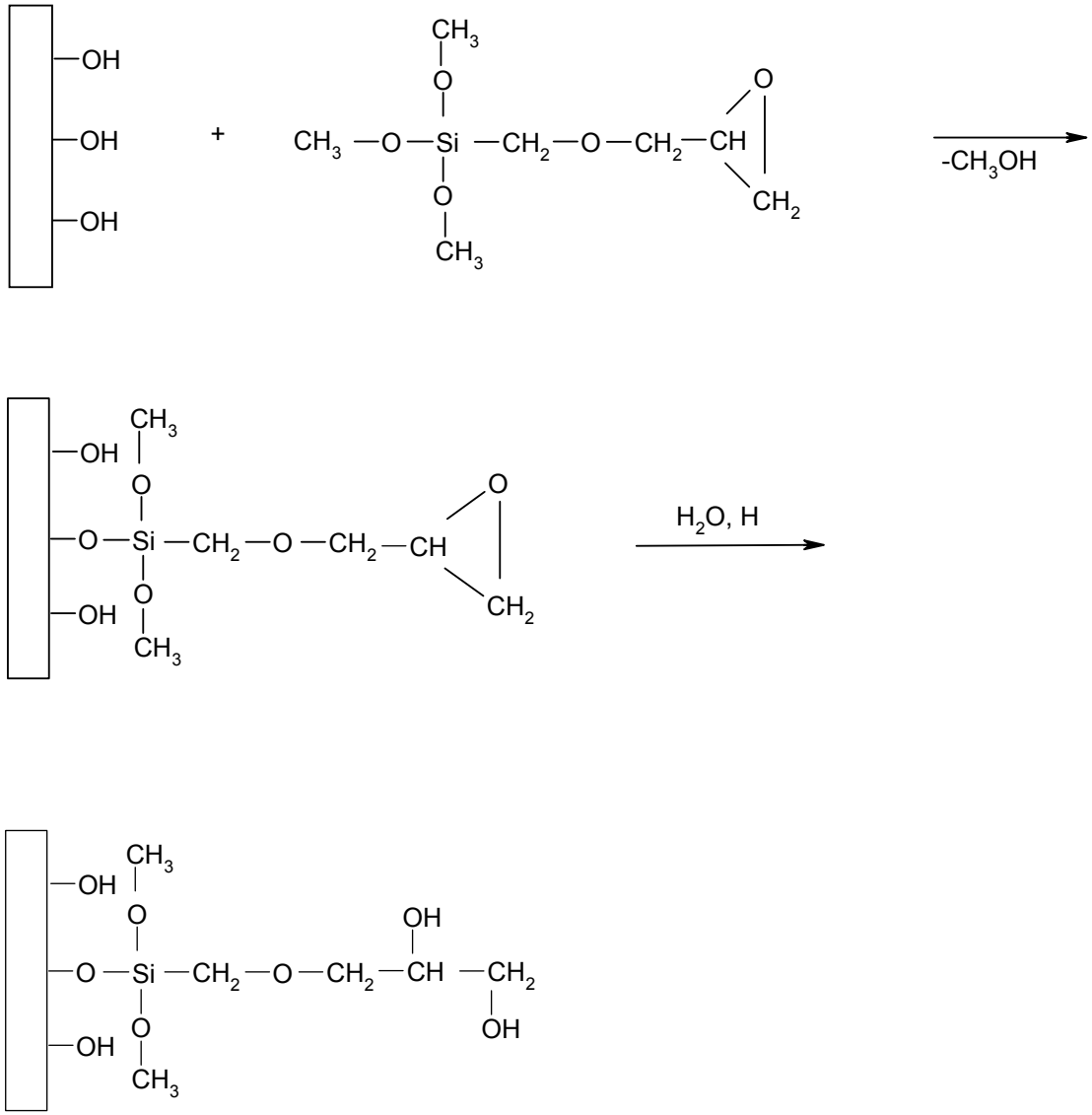


Abb. 3-75 Aktivierung der Polycarbonatoberfläche mit Glycidyloxypropyltrimethoxysilan

Die Kapillare wurde zuerst für eine Stunde mit einer Lösung aus 500 mM KOH gespült; dann wurde die Kapillare für 15 Minuten mit einer Lösung aus 0,3% GOPTS in Hexan behandelt. Danach wurde die Kapillare 15 Minuten mit Wasser gespült, um das überschüssiges Silanisierungsreagenz zu entfernen. Der auf der Oberfläche der Träger eingeführte Oxiranring wurde durch halbstündiges Spülen in 80%iger Essigsäure zum Diol hydrolysiert. Die GOPTS-modifizierten Träger wurden direkt nach ihrer Herstellung eingesetzt. Es wurden die gleichen Phenole wie in der vorangegangenen Kapiteln getestet.

Dopamin ließ sich im allgemein sehr gut detektieren. Das aufgenommene Elektropherogramm für eine 20 mM Dopamin–Lösung ist in der folgenden Abbildung 3-76 dargestellt. Es kam zu einem deutlichen Anstieg der Stromkurven nach ca. 170 s. Darüber hinaus zeigte das Sensogramm einen steileren Anstieg (300-400 s) gefolgt von der Stabilisierung des Signalniveaus um den Wert von 180 nA.

Auch eine Dopamin-Konzentration von 10 mM war mit einer Signalhöhe von 40 nA in einem weiteren Versuch noch deutlich nachweisbar.

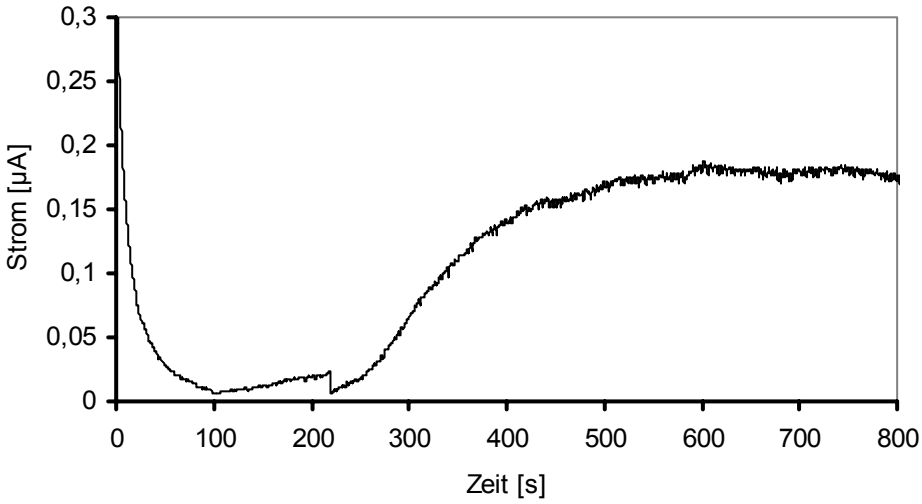


Abb.3-76 Kurvenverlauf einer 20 mM Dopamin - Lösung bei einem Potential von Epot=1,1 V und einer Trennspannung von 500 V

Um eine bessere Analyse über das Verhältnis des Signalniveaus zu der Konzentration der Dopamin-Lösung zu erhalten, wurde die lineare Abhängigkeit der beiden Parameter abgebildet (Abb. 3-77).

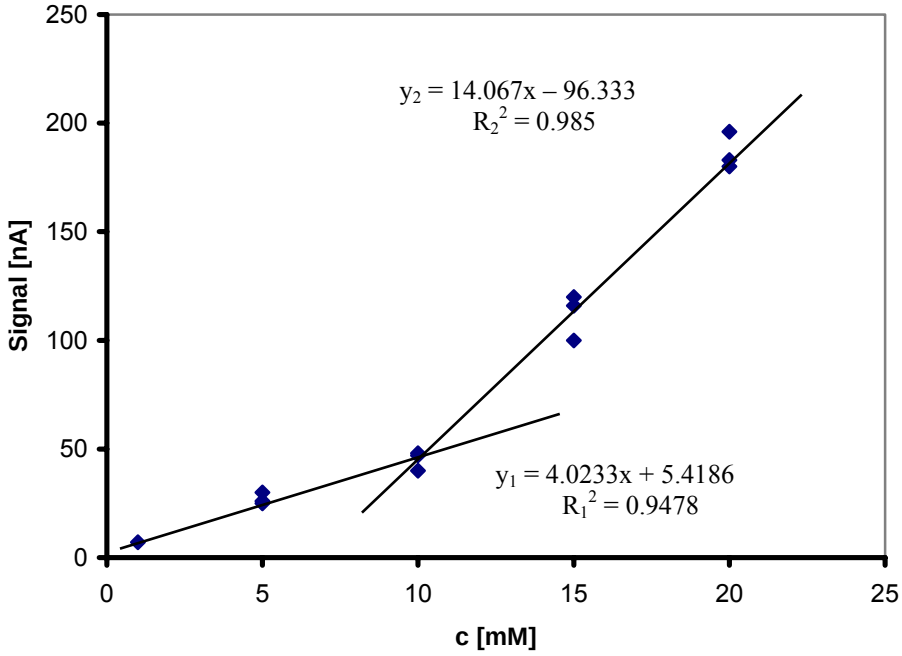


Abb.3-77 Lineare Regression für Dopamin im Bereich von 1 mM bis 20 mM. Die Messungen wurden bei einem Potential von E_{pot}=1100mV und einer Trennspannung von 500 V durchgeführt

Die Signalhöhe zeigte in Konzentrationsbereich von 1 mM bis 10 mM und von 10 mM bis 20 mM einen linearen Verlauf. Dabei ist zu beobachten, dass keinen linearen Verlauf über den ganzen Konzentrationsbereich gab. Eine Erhöhung der Konzentration auf 15 mM führte jedoch zu einem nicht-linearen Anstieg der Stromstärke. Es wurde jedoch beobachtet, dass im Konzentrationsbereich von 10 mM bis 20 mM auch ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und der Signalhöhe besteht.

Analog zu dem Versuch zur Detektion von Dopamin wurde mit Gallussäure bei verschiedenen Konzentrationen verfahren (Abb.3-78). Der erste Versuch wurde mit einer 30 mM Gallussäure-Lösung durchgeführt. Die Detektion erfolgte dabei nach ca. 270s. Bei der Wiederholung der Messung mit der gleichen Lösung lag das Signal um knapp 10 nA höher als im ersten Durchgang. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass am Anfang der Messung in der Kapillare Adsorptionsvorgänge stattgefunden hatten. Die Untersuchung einer 40 mM Gallussäure-Lösung ergab einen Anstieg des Detektionsstroms um 7 nA.

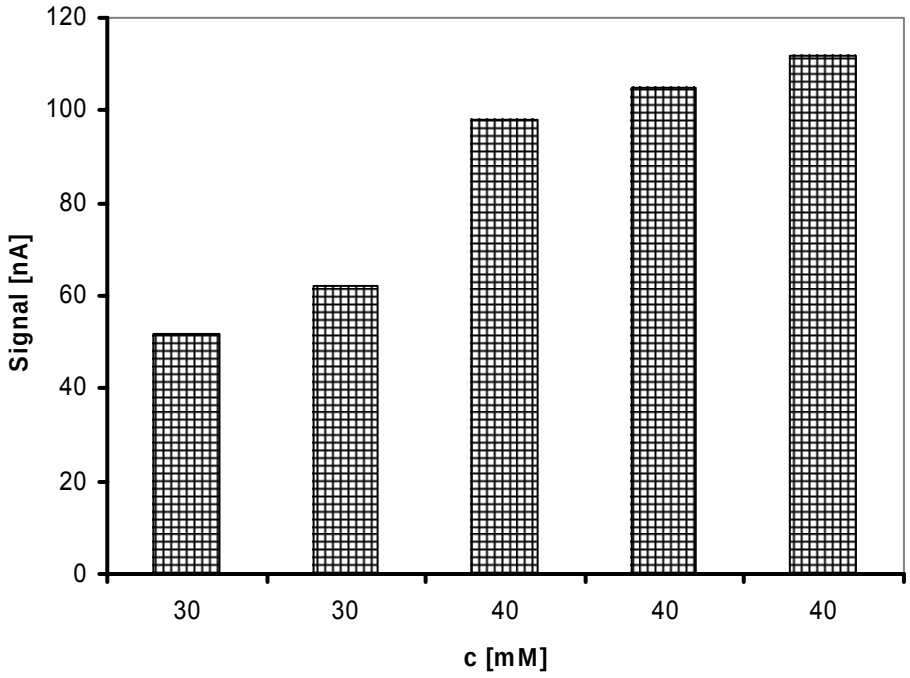


Abb.3-78 Abhängigkeit der Signalhöhe von der Gallussäure-Konzentration. Es wurde bei einem Potential von Epot 1100 mV und einer Hochspannung von 500 V gearbeitet

Bei der amperometrischen Detektion für eine 10 mM Hydrochinon-Lösung wurde eine Migrationszeit von 156 s ermittelt (Abb.3-79). Die messbaren Ströme waren im Vergleich zu Dopamin und Pyrogallol höher. So zeigte der Stromverlauf von 10 mM Hydrochinon zunächst einen flachen Anstieg (250-600 s) und die Stabilisierung bei ca. 63 nA. Es ergab sich eine Standardabweichung von 10 nA.

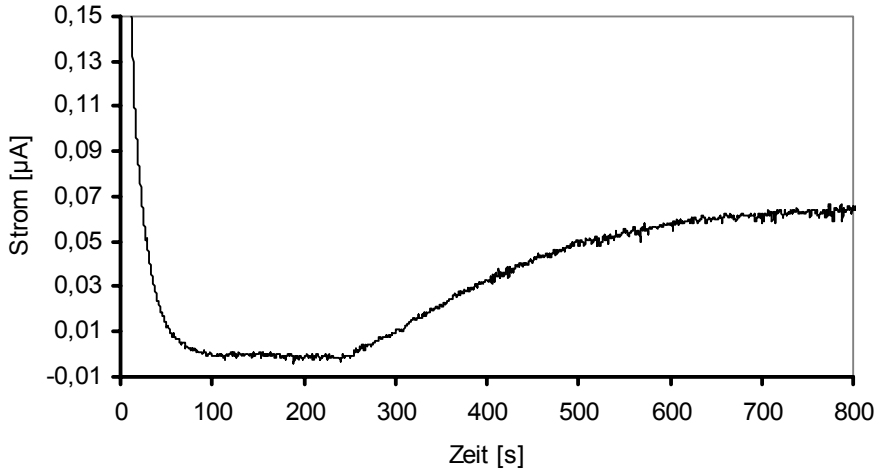


Abb. 3-79 Elektropherogramm von 10 mM Hydrochinon in pH 7,3 Phosphatpuffer mit amperometrischer Detektion. Detektionspotential: 1,1 V, Trennspannung: 500 V

Eine Zusammenfassung der Abhängigheit von Signal und Konzentration für die Hydrochinon-Lösung wurde in der Abbildung 3-80 dargestellt. Das Signal zeigte einen linearen Verlauf über den gesamten Untersuchungsbereich. Die durchschnittliche Standardabweichung betrug 8 nA.

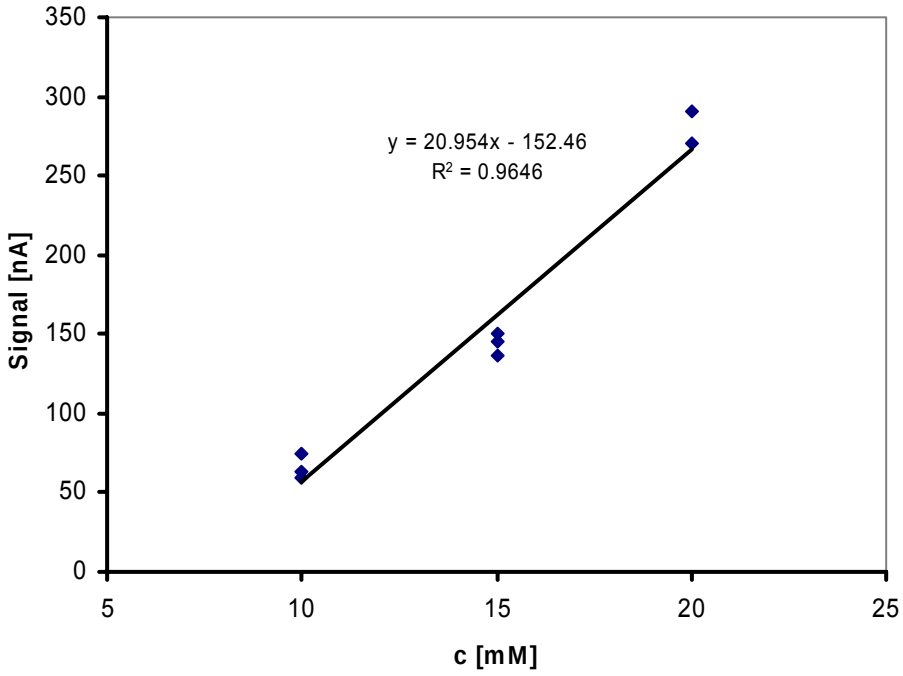


Abb. 3-80 Abhängigkeit des Signals von der Konzentration des Hydrochinons im Bereich von 10 mM bis 20 mM. Versuchsparameter siehe Abbildung 3-76

Analog zu Dopamin wurde auch im Falle von Pyrogallol verfahren. Für zwei verschiedene Konzentrationswerte wurden jeweils drei Messungen vorgenommen (10 mM bzw. 20 mM). Abbildung 3-81 stellt die Ergebnisse dieser Messung dar bzw. die Signalhöhe für zwei Konzentrationen der Pyrogallol-Lösung. Wie zu erwarten, nimmt der Strom mit zunehmender Pyrogallol-Konzentration zu.

Ähnlich wie bei den Experimenten mit Dopamin zeigte eine Wiederholung der Messung für eine 10 mM Lösung eine Erhöhung des Signals um max. 14 nA. Das Resultat ist darauf zurückzuführen, dass mit der niedrigeren Konzentration die Messreihe begonnen wurde, jedoch wahrscheinlich ein gewisser Teil der Phenole an der Kapillarwandung absorbiert wurde. Nach einer Absättigung aller Bindungsstellen kam es dann zu höheren Signalströmen.

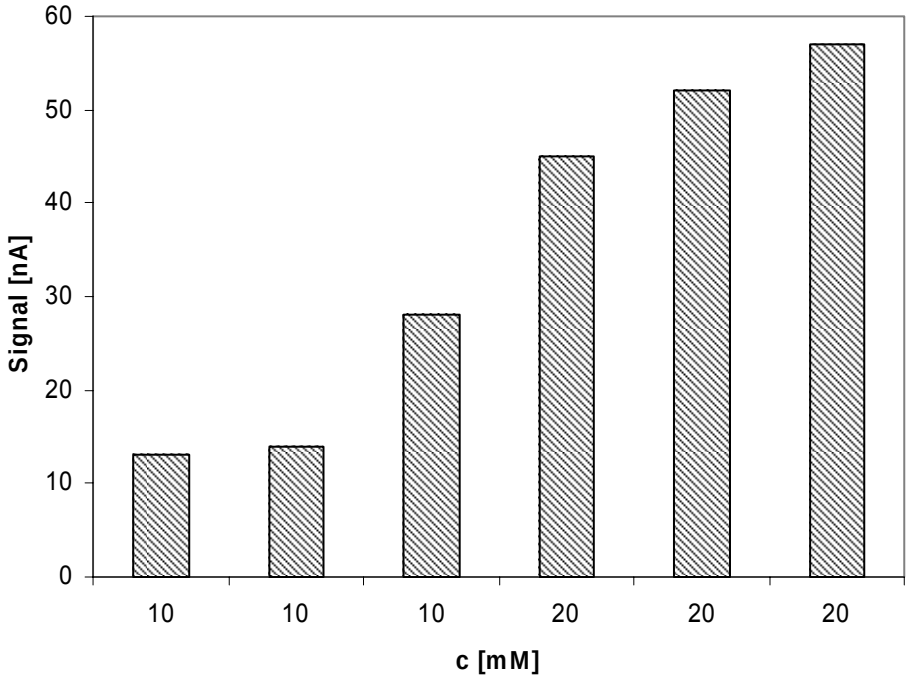


Abb. 3-81 Abhängigkeit der Signalhöhe von der Pyrogallol–Konzentration. Die Messungen wurden bei einem Potential von Epot=1100 mV und einer Trennspannung von 500 V durchgeführt

Die Detektionszeiten, Signalhöhe und berechneten Standardabweichungen für die einzelnen Phenole sind nachfolgend in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Tabelle 3-5 Migrationszeiten und zugehörige Standardabweichungen für die untersuchten Phenole.

Probe	Konzentration [mM]	Migrationszeit [s]	Stabw [s]	Signal [nA]	Stabw [nA]
Hydrochinon	10	156	7.9	63	8
	15	161	9.6	137	11
	20	145	8.2	290	*
Dopamin	1	174	6,5	7,5	6,4
	5	178	7,0	26	5,5
	10	170	5.6	40	5.1
	15	184	7.3	110	10.5
	20	172	6.8	180	8.5
Pyrogallol	10	256	9.5	14	8.3
	20	241	10.7	55	6
Gallussäure	30	279	10.1	60	*
	40	282	11.7	105	7

* nur zwei Messwerte

Die mit GOPTS silanisierte Kapillaren wiesen im Vergleich zu den anderen eine deutlich verbesserte Stabilität auf. In den durchgeführten Experimenten konnte trotz stundenlanger Messungen keinerlei Anzeichen dafür gefunden werden, dass sich die gebundene Silanschicht wieder ablöst. Durch die Epoxidöffnung entstand eine Diol–Gruppe, die zu niedrigen Migrationszeiten führte im Vergleich zu der Methode, bei der die Kapillare mit Trimethylsylil-methanol behandelt wurde. Bei allen Untersuchungen war eindeutig eine tendentielle Abhängigkeit der Signalhöhe von eingesetzter Konzentration zu erkennen.
Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Phenole nach kapillarelektrophoretischer Trennung amperometrisch an Pt-Elektroden zu detektieren. Dabei kann die Kapillar-Innenwandung nach unterschiedlichen Verfahren funktionalisiert werden.

3.5 Trennversuche von Mischungen

Im nächsten Schritt wurden mit den gewonnenen Ergebnissen Versuche zur selektiven Erfassung von Polyphenolmischungen durchgeführt. Mit Hilfe von Migrationszeiten der einzelnen Phenole, die bereits in Kapitel 3.4 ermittelt wurden, sollte jetzt die Identifizierung der Phenole aus Mischungen ermöglicht werden. Die Untersuchungen zur amperometrischen Polyphenol-Detektion in einem mikrofluidischen System wurden auf dem bereits in Kap. 3.4 beschriebenen Polycarbonat-Chip durchgeführt. Alle nachfolgenden Untersuchungen zur amperometrischen Detektion von Polyphenolen mit Hilfe der Platinelektroden wurden in 10

mM Phosphatpuffer pH 7,3 bei einem Potential von 1100 V durchgeführt. Die Proben wurden, wie bereits beschrieben, an der Anoden-Seite der Kapillare aufgegeben.

Daher wurde zunächst an einer mit Natriumsilikatlösung silanisierte Polycarbonatkapillare untersucht, welchen Einfluss die Injektion von zwei Phenolen auf das elektrochemische Signal hatte. Die Kapillare wurde mit Elektrolytlösung gefüllt und die Trennspannung (500 V) angelegt. Nach Einstellung einer stabilen Basislinie des Stroms erfolgte die Probezugabe. Für diese Untersuchung wurde als Probe eine Lösung aus Dopamin (10 mM) und Pyrogallol (15 mM) injiziert und der resultierende Stromverlauf über 15 Minuten beobachtet. Der Strom sank zunächst bis zu einer konstanten Basislinie, nach 242 s wurde eine Zunahme des Signals bis zu 65 nA festgestellt (Abb.3-82).

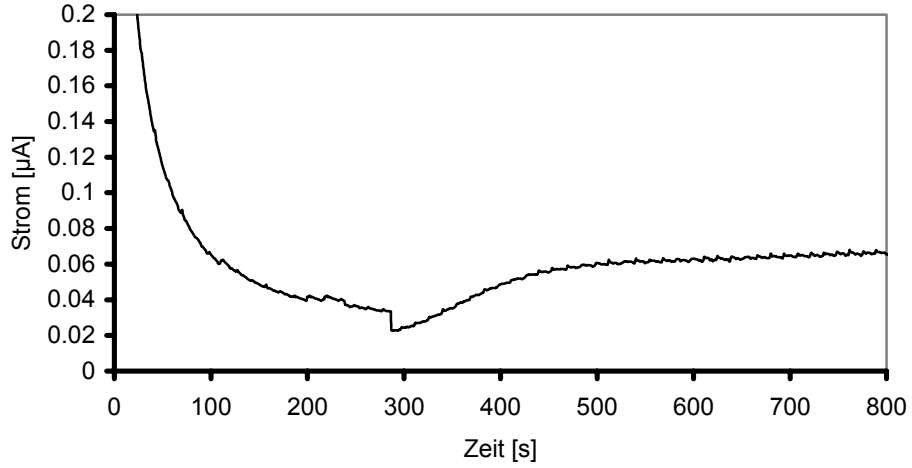


Abb.3-82 Das Sensogramm von 10 mM Dopamin und 15 mM Pyrogallol nach amperometrischer Detektion mit einer Trennspannung von 500 V sowie einem Potential E_{pot} von 1100 mV

Das in Abb.3-82 dargestellte Diagramm zeigt keinen stufenförmigen Verlauf des Stromsignals, was eine Trennung von beiden Phenolen indizieren würde. Die Migrazionszeit von 242 s entspricht der zu erwartenden Migrationszeit einer 10 mM Dopamin-Lösung.

Ein zweiter Versuch wurde mit Dopamin (15 mM) und Gallussäure (40 mM) gearbeitet. Ähnlich wie bei ersten Versuch wurde keine Trennung der Phenole erzielt. Die amperometrische Detektion (Abb.3-83) führte zu einer Stromzunahme von 130 nA bei 257 s, was einer alleinigen Detektion von Dopamin (15 mM) entspricht.

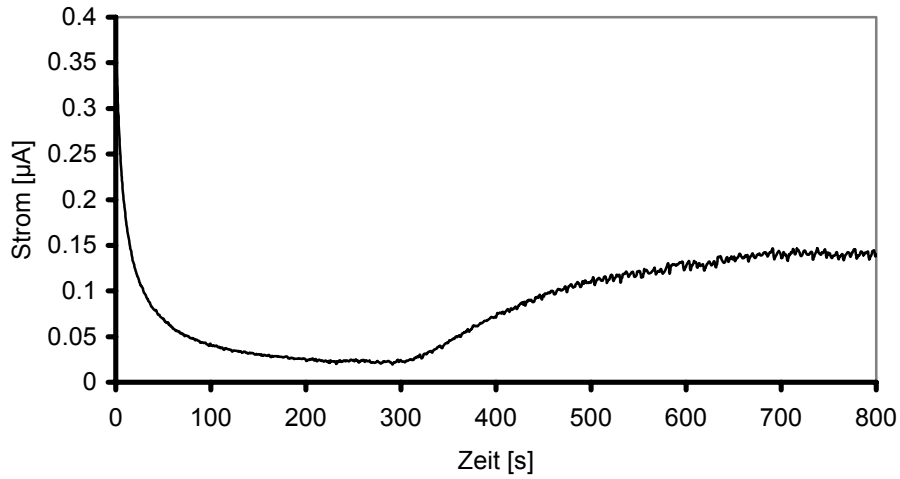


Abb.3-83 Das Sensogramm eines Gemisches aus 15 mM Dopamin und 40 mM Gallussäure bei der amperometrische Detektion mit einer Trennspannung von 500 V sowie einem Potential E_{pot} von 1100 mV

Fernerhin wurde eine Mischung aus Pyrogallol (10 mM) und Gallussäure (30 mM) untersucht.

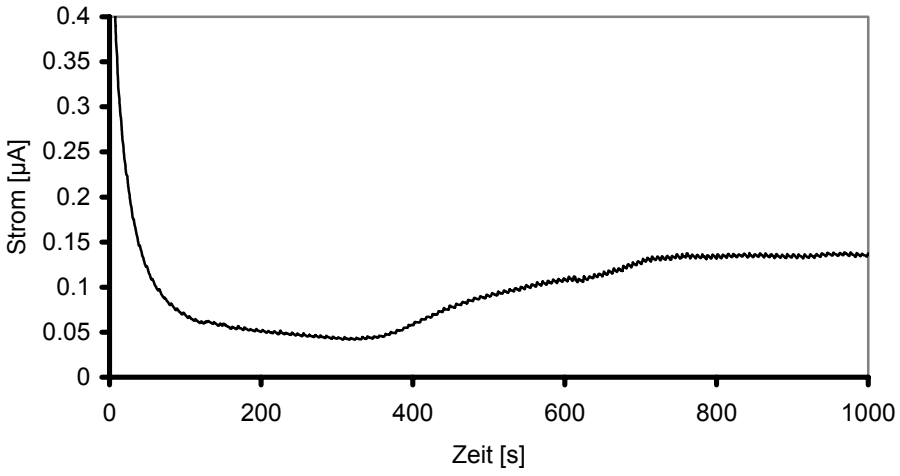


Abb. 3-84 Das Sensogramm eines Gemisches aus 10 mM Pyrogallol und 30 mM Gallussäure bei der amperometrische Detektion mit einer Trennspannung von 500 V sowie einem Potential E_{pot} von 1100 mV

In diesem Fall entstand bei 376 s ein Stromsignal von 135 nA, das sich keinem der Phenole eindeutig zuordnen lässt (Abb.3-84). Vermutlich führte das Gemisch aus Pyrogallol und Gallussäure zur Bildung eines Polymer, der langsamer zu der Arbeitselektrode wanderte.

Interessant ist jedoch ein leichter Stromanstieg bei ca. 620 s, für den es aber auch keine Erklärung gibt.

Eine weitere Erhöhung der Probe-Konzentration führte auch zur keine Trennung dieser Phenole. Nachdem eine Mischung aus 15 mM Pyrogallol und 40 mM Gallussäure injiziert wurde, wurde nach 388 s ein langsamer Anstieg des Signals beobachtet, das erneut bei ca. 620s einen Sprung aufwies.

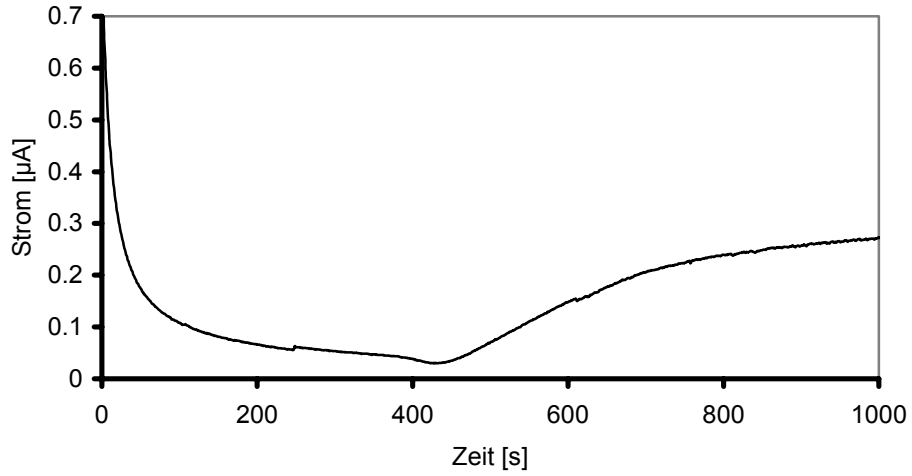


Abb. 3-85 Das Sensogramm eines Gemisches aus 15 mM Pyrogallol und 40 mM Gallussäure bei der amperometrische Detektion mit einer Trennspannung von 500 V sowie einem Potential E_{pot} von 1100 mV

Das Elektropherogramm (Abb.3-85) zeigte eine Stromzunahme bis auf 270 nA. Die Erklärung für die Entstehung eines einziges Signals wäre, dass die beiden Phenolen miteinander reagiert haben und ein größerer Molekül entstanden ist. Es wurde mit ansteigender Phenol-Konzentration aus den bereits zuvor diskutierten Gründen ein höheres Stromsignal beobachtet. Bereits eine zugesetzte Menge von 5 mM Pyrogallol und 10 mM Gallussäure führte zu einem Anstieg des Stromsignals auf 270 nA.

Ein ähnliches Verhalten wurde bei der Modifizierung der Polycarbonatkapillare mit GOPTS erhalten. Zunächst wurde ein Gemisch aus 20 mM Pyrogallol und 40 mM Gallussäure untersucht. Die Kapillare, die mit GOPTS modifiziert wurde, zeigte einen analogen Kurvenverlauf zu den bereits oben beschriebenen Experimenten.

Der Strom sank zunächst, stabilisierte sich und nach 284 s wurde einen Anstieg auf 123 nA beobachtet (Abb.3-86).

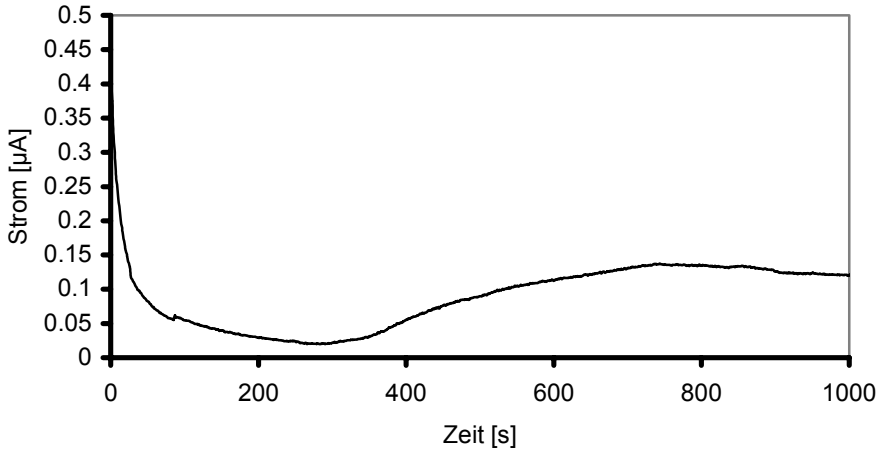


Abb.3-86 Das Sensogramm eines Gemisches aus 20 mM Pyrogallol und 40 mM Gallussäure bei der amperometrische Detektion mit einer Trennspannung von 500 V sowie einem Potential E_{pot} von 1100 mV

Diese Zeit von 284 s entspricht der Migrationszeit von Gallussäure. Eine Änderung der Phenol-Konzentration führte auch zu keine Separation von Phenolen.

Das Elektropherogramm eines Gemisches aus 10 mM Dopamin und 20 mM Pyrogallol führte zu einem Anstieg des Signals nach 370 s (Abb.3-87). Eine Migrationszeit von 370 s und einem Strom von 110 nA sind keinem der untersuchten Phenole eindeutig zuzuordnen.

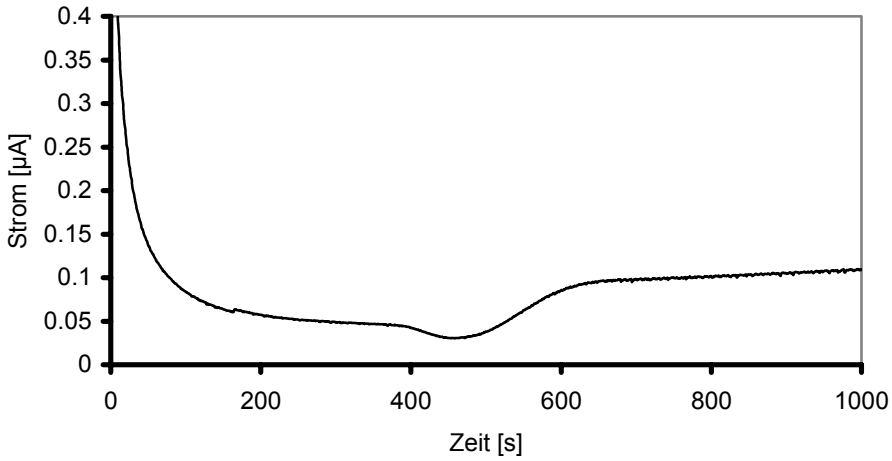


Abb.3-87 Das Sensogramm eines Gemisches aus 10 mM Dopamin und 20 mM Pyrogallol bei der amperometrische Detektion mit einer Trennspannung von 500 V sowie einem Potential E_{pot} von 1100 mV

Ähnlich wie bei der Kapillare, die mit Natriumsilikatlösung modifiziert wurden, ist hier eine Reaktion denkbar, die zur Bildung einer polymeren Struktur führte. Deswegen wurde auch nur eine einmalig auftretende Zunahme des Stroms beobachtet.

Ein weiterer Versuch wurde mit 10 mM Dopamin und 40 mM Gallussäure durchgeführt. Es wurde ein Stromanstieg auf 40 nA (168 s) und 108 nA (278 s) gemessen. Abbildung 3-88 zeigt die erhaltenen Signalverläufe bei der amperometrischen Detektion.

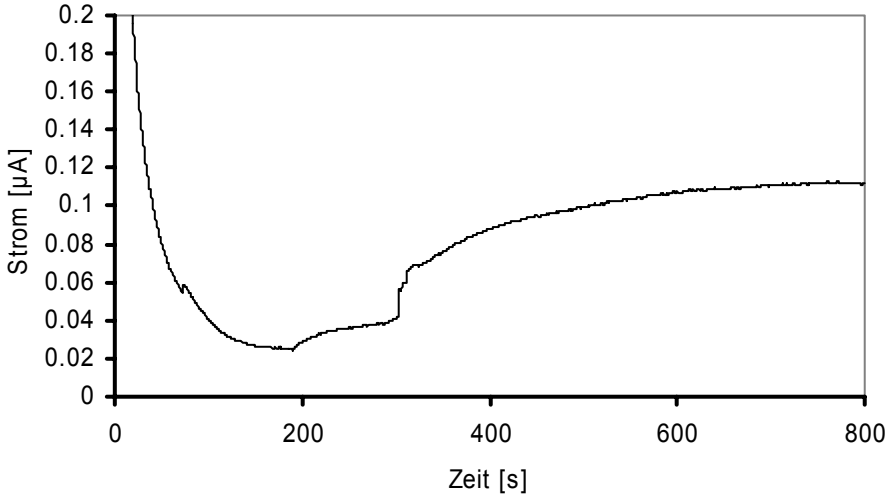


Abb.3-88 Amperometrische Detektion von 10 mM Dopamin und 40 mM Gallussäure in 10 mM Puffer pH 7,3 an Pt-Elektroden. Kapillarelektrophoretische Separation auf einem Polycarbobat-Chip (Trennspannung = 500 V; E_{pot}= 1100 mV)

Die Detektionszeit von 168 s stimmt mit der Migrationszeit von Dopamin überein, während die Detektionszeit von 278 s der Migrationszeit von Gallussäure entspricht. Das in Abb. 3-86 dargestellte Elektropherogramm wies im Gegensatz zu den vorherigen Messungen von angesetzten Proben zwei Stufen auf. Die Wiederholung dieser amperometrischen Messung führen zu gleichen Ergebnissen.

Da eine Trennung von Gemischen aus zwei Phenolen gelang, wurde weiter versucht, ein Gemisch aus drei Phenolen zu detektieren. Als Probe wurde ein Gemisch aus Dopamin (10 mM), Gallussäure (40 mM) und Pyrogallol (20 mM) in die Kapillare injiziert (Abb.3-89).

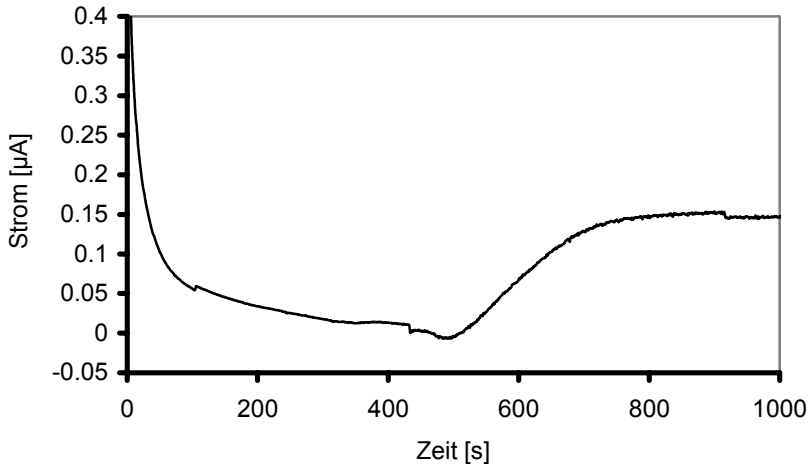


Abb.3-89 Das Sensogramm eines Gemisches aus 10 mM Dopamin, 20 mM Pyrogallol und 40 mM Gallussäure mit amperometrischer Detektion bei einer Trennspannung von 500 V und einem Potential E_{pot} von 1100 mV

Nach ca. 407 s wurde eine Zunahme des Stroms auf 150 nA gemessen. Offensichtlich findet hier auch eine Reaktion zwischen den Phenolen statt, die zur Entstehung eines größeren Moleküls führte. Die relativ hohe Intensität des Stroms sowie die Migrationszeit zeigen, dass die Reaktion bevorzugt in Richtung der Bildung von höhermolekularen Reaktionsprodukte abgelaufen ist. Denkbar sind Oxidationsprodukte, die dimerisieren und weiter in Polymere Strukturen übergehen können.

Problematisch blieb jedoch weiterhin die geringe Stabilität der mit TMS modifizierten Kapillare, so dass in diesem Fall nach einigen Messungen so stark deaktiviert wurde, dass die Kapillare wieder silanisiert werden musste. Für einen besseren Vergleich sollten jedoch alle Messungen auf einem Chip erfolgen. Da bei diesem Kapillartyp höhere Migrationszeiten und eine deutliche Abhängigkeit der Migrationszeit von der Analytkonzentration festgestellt wurden, wurden keine weiteren Messungen in Bezug auf die Trennung eines Polyphenolgemischs durchgeführt.

4. Diskussion

4.1 Bindungsverhalten verschiedener Materialoberfläche

In der modernen Analytik ist die Identifizierung von einzelnen Substanzen aus komplexen Mischungen immer noch eine große Herausforderung. Der Anwendungsbereich von innovativen Trennmethoden wird immer größer und erstreckt sich neben der Chemie auch auf die Medizin, Pharmazie, Biochemie und Biologie. Daher wird von modernen Trennmethoden neben einer hohen Reproduzierbarkeit und einer kurzen Analysenzeit auch ein möglichst geringer Probenverbrauch gefordert. Diesen Anforderungen können Systeme auf der Basis von Mikrochips gerecht werden.

Viele Mikrokapillarelektrophorese-Systeme wurden in Glas als Trägermaterial angefertigt. In den letzten Jahren wurden neuen Materialien untersucht, wie z.B. Polymethylmetacrylat (PMMA), Polydimethylsiloxan (PDMS), Polycarbonat (PC), Polyethyleneterephthalat-Glycol (PETG), die sich in Heißprägeverfahren gut verarbeiten lassen und vielfach kostengünstiger sind (Abb.4-1). Das Ziel sind preiswerte Einweg-Produkte.

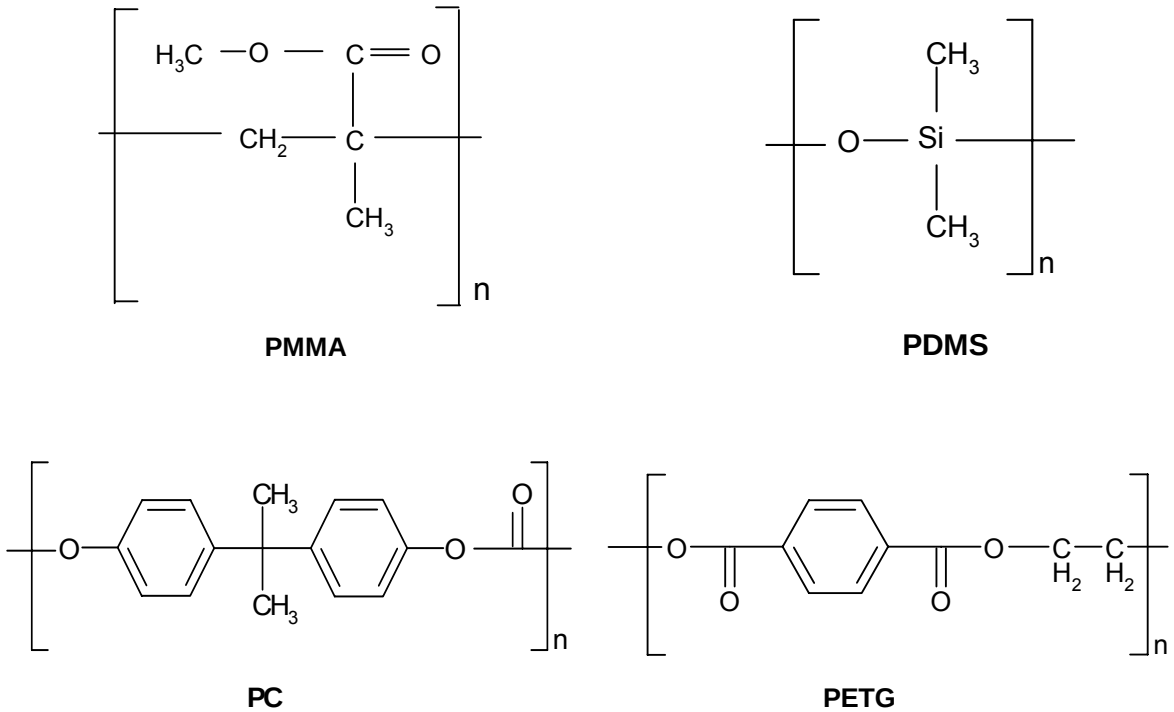


Abb.4-1 Chemische Struktur von Polymeren, die für Mikrofluidic-Chips verwendet werden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zuerst verschiedene Substrate auf ihr Bindungsverhalten hin untersucht. Dabei wurde hauptsächlich mit einem indirekten Verfahren gearbeitet, nämlich Aktivitätsmessungen an einem immobilisierten Enzym.

In vielen Fällen brauchen die Oberflächen von Substratmaterialien, die für spezielle Zwecke eingesetzt werden, gewisse Eigenschaften. Neben der Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften ist aber auch die Charakterisierung einzelner Schritte von großer Bedeutung, wie z.B. die Silanisierung, als zentraler Schritt der Anbindung des Enzyms auf die Trägeroberflächen. Keramik, Polycarbonat und Polystyrol wurden in dieser Arbeit als Substrate zur selektiven Bindung von Meerretichperoxidase (HRP) untersucht. Hierzu musste ein einfach zu handhabendes Modellsystem entwickelt werden. Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen auf ebene Oberflächen durchgeführt. Die Immobilisierung von Biomolekülen auf Glas ist schon etabliert, für Keramik und Kunststoffe sollten alternative Konzepte ausgearbeitet werden.

4.2 Aktivierung und Silanisierung der Oberflächen

Die Silanisierung von Festkörperoberflächen als wichtigster Schritt zur Oberflächenmodifizierung und Oberflächenfunktionalisierung findet in vielen unterschiedlichen Bereichen Verwendung [Enescu, C. et al. 2004]. Obwohl viele Untersuchungen zur Reaktivität verschiedener Silane bzw. zum Einfluss unterschiedlicher Reaktionsbedingungen durchgeführt wurden, befinden sich in der Literatur zum Teil gegensätzliche Angaben bezüglich dieser Parameter. Die in der Literatur angegebenen Silanisierungsdauern für Alkoxysilane variieren von wenigen Minuten [Silberzahn, P. et al 1991] bis zu mehreren Stunden [Rye, R.R. et al 1997]. In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedlichen Einflussgrößen auf die Oberflächenmodifizierung durch Silanisierung untersucht.

Die Aktivierung von Substraten ist eine Voraussetzung für die Präparation von Silanschichten. Die Reinigungsprozedur/Oberflächenaktivierung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden die Oberflächen mit verschiedenen Lösungen gespült: mit einer Mischung 3M Kaliumhydroxid und Ethanol, einer Mischung aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 1:1 bzw. mit 3M Kaliumhydroxid. Im Gegensatz zu Keramikproben, die weiter mit einer Lösung aus 96% Schwefelsäure und 30%Wasserstoffperoxid behandelt wurden, erfolgte bei den Polymeroberflächen in einem zweiten Schritt die Einführung von Hydroxygruppen durch Behandlung mit Wasserstoffperoxid unter UV-Licht (254 nm).

Eine weitere Methode zur Funktionalisierung von Kunststoffoberflächen ist die Plasmabehandlung. Dieses Verfahren ist eine effektive Methode, mit der ohne starkes Erwärmen der Kunststoffoberflächen funktionelle Gruppen eingebracht werden können. Im Vakuum wird über eine Hochspannung ein Plasma erzeugt. Diese Reaktion kann man dazu

benutzen, um Oberflächen mit sauerstoffhaltigen oder stickstoffhaltigen Funktionen zu versehen. Eine Kohlenstoffbeschichtung ist durch Plasmaverfahren ebenfalls möglich. Wie weiter unter erläutert, war eine Beurteilung der Proben jedoch erst nach einer Silanisierung und anschließender Enzymimmobilisierung möglich.

Die weitere Funktionalisierung dieser aktivierten Oberflächen erfolgte ebenfalls durch Silanisierung. Die verwendeten Silane sind hybride Verbindungen, welche die Funktionalität einer reaktiven organischen Gruppe mit der anorganischen Funktionalität eines Alkylsilikats verbinden, und zwar in einem einzigen Molekül. Organofunktionelle Silane verbessern die Kompatibilität und ermöglichen die chemische Anbindung anorganischer Substrate an organische Komponenten. Die bekannten und etablierten organofunktionellen Silane sind zumeist Trialkoxysilane mit einem Propylenspacer zwischen dem Si-Atom und der funktionellen Gruppe X (Abb.4-2). Als funktionelle Gruppe X sind Amino-, Glycidoxy- und Schwefelfunktionen am bedeutsamsten.

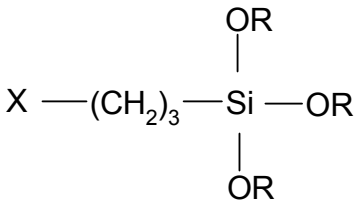


Abb.4-2 Allgemeine Struktur von organofunktionellen Silane mit X: -NH2, -S

Die Anbindung an das anorganische Material erfolgt über die hydrolisierbaren funktionellen Gruppen OR. Als hydrolisierbare funktionelle Gruppen OR verwendet man hauptsächlich Methoxy- und Ethoxy-Substituenten. Die Alkoxygruppen des Silans hydrolisieren bei Feuchtigkeit. Dabei entstehen reaktive Silanole, die mit dem anorganischen Substrat reagieren. Da auf den Substratoberflächen Hydroxylgruppen vorhanden sind, kommt es zu einer kovalenten Anbindung des Silans an das Substrat in der Art einer Kondensationsreaktion.

Neben der Reinigung der Oberflächen vor der Silanisierung kann auch eine entsprechende Behandlung der silanisierten Oberflächen Vorteile auf das erhaltene Ergebnis haben. Nach Halliwell (2001) können unterschiedliche thermische Prozesse zur Nachbehandlung der silanisierten Oberflächen eine große Rolle spielen. Wie in Abbildung 4-3 dargestellt, sind bei trifunktionellen Silanen mehrere Anbindungsmöglichkeiten vorstellbar, bei denen auch eine Vernetzung der Silane an der Oberfläche entstehen kann.

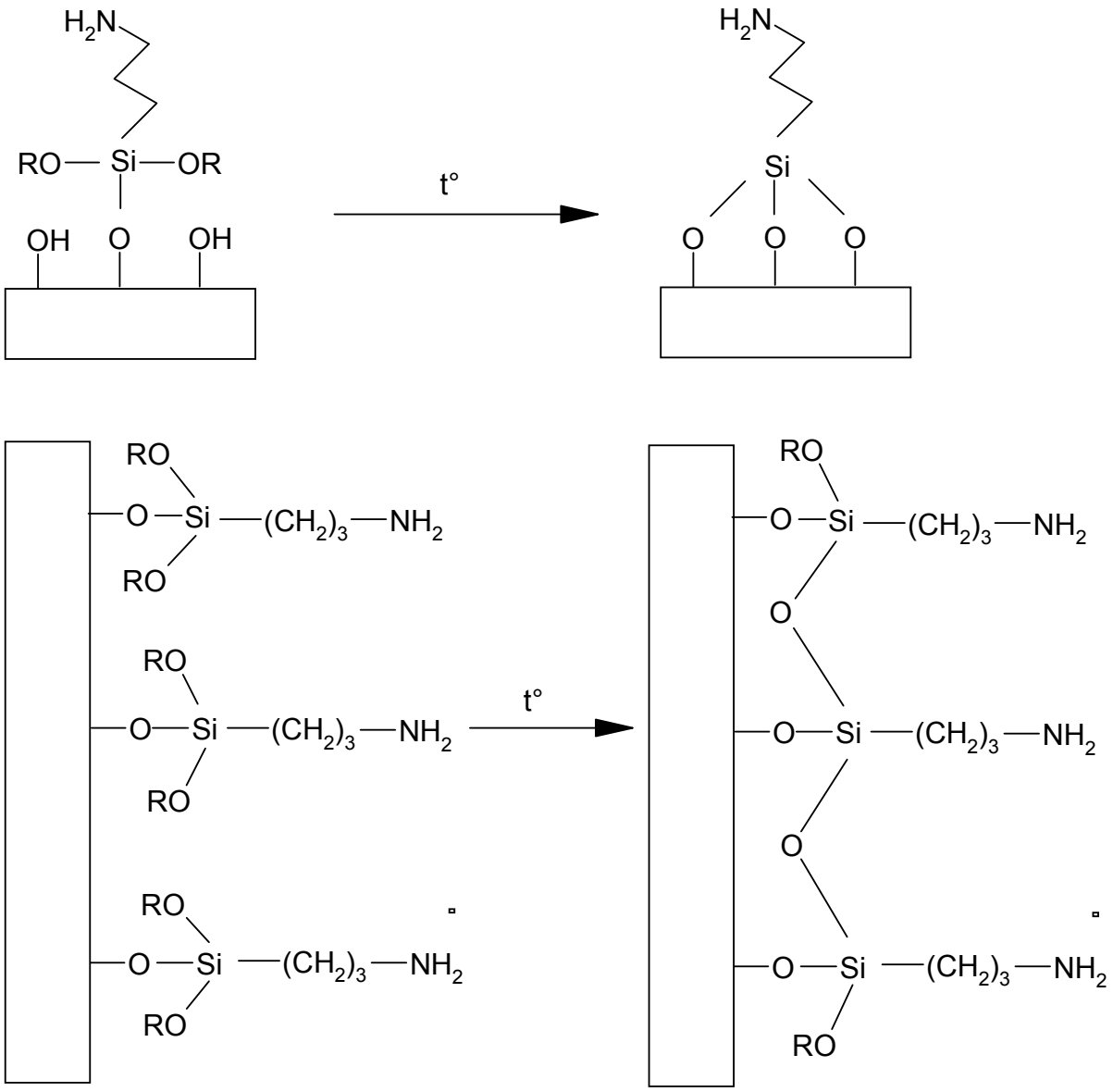


Abb.4-3 Vernetzung der Silane an der Festkörperoberfläche über eine silylether-Bindung

In dieser Arbeit erfolgte die Funktionalisierung von Substraten mit Aminosilanen, um an der freien Aminogruppe über funktionelle Reagenzien, wie z.B. Hydroxysuccinimid (NHS) oder Glutardyaldehyd (GDA), Proteine immobilisieren zu können. Die frisch gereinigten Substrate wurden mit einer Lösung aus Aminopropyltriethoxysilan (APTS) in Hexan bei Raumtemperatur beschichtet. Da bei allen Messungen dieselbe Konzentration der HRP-Lösung (20 µg/ml) als Modellprotein verwendet wurde, konnten die Unterschiede bei der anschließenden Aktivitätsmessung auf die bereits erwähnten Vorbehandlungen der Oberflächen zurückgeführt werden.

Durch die Silanisierung der Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus EtOH/KOH vorbehandelt wurden, wurde nach 14 Tagen eine Beladung von 0,14 ng/cm^2 an aktivem Enzym ermittelt. Die Oberflächen, die entweder mit KOH oder mit EtOH/H_2O vorbehandelt

wurden, führten nach der Silanisierung nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Im Gegensatz dazu zeigten die mit EtOH/H_2O behandelten Polycarbonatoberflächen nach 21 Tagen noch eine messbare Menge an aktivem Enzym. Sowohl die Keramik- als auch die Polycarbonatproben, die nicht mit Silan beschichtet wurden, wiesen schon nach 14 Tagen kein aktives Enzym mehr auf.

Bei den plasmabehandelten Oberflächen wurde der niedrige Verlust an aktivem Enzym über die Zeit festgestellt. Die Polycarbonatoberflächen, die mit Kohlenstoff- und Stickstoff-Plasma beschichtet wurden, eigneten sich am besten für die Immobilisierung des Enzyms. Außerdem zeigten diese Oberflächen eine relativ gute Stabilität.

Durch weitere chemische Modifikationen sollte eine Abgangsgruppe in den Silan-Linker eingeführt werden, die sich unter kontrollierten Bedingungen gegen Proteine austauschen lässt. Eine geeignete Immobilisierungsmethode muss zum einen den Erhalt der katalitischen Aktivität des Enzyms und zum anderen eine langzeitstabile Fixierung dieses Enzyms an das Trägermaterial gewährleisten. Diese hängt von der Lebensdauer des verwendeten Enzyms selbst und von der Art der Fixierung des Enzyms auf der Oberfläche ab. Für eine langzeitstabile Fixierung eignen sich nur solche Immobilisierungsverfahren, bei denen das Enzym kovalent auf der Substratoberfläche angebunden wird. Der Vorteil einer kovalenten Bindung von aktiven Komponenten an das Trägermaterial wird darin gesehen, dass das Protein nicht aus der Oberfläche ausgewaschen und somit langzeitstabil auf der Substratoberfläche immobilisiert werden kann. Darunter leidet aber häufig die Aktivität von Enzymen.

Die Proteinmenge, die an eine Oberfläche fixiert ist, ist von vielen Faktoren abhängig, z.B. von Beschaffenheit und Ladung der Oberfläche und von Art und Ladung des Proteins. Enzyme enthalten an der Oberfläche polare Aminosäuren, welche je nach pH-Wert protoniert oder deprotoniert vorliegen können. Der pH-Wert hat einen großen Einfluss auf die Enzymaktivität und Stabilität. Enzyme werden als „immobilisiert“ bezeichnet, wenn sie chemisch oder durch Adsorption an ein Trägermaterial gebunden sind. Reproduzierbare Werte für die Enzymaktivität erhält man nur dann, wenn die Bedingungen von Lagerform und Testsystem so gewählt sind, dass die Stabilität der katalitischen Aktivität gewährleistet ist (Lagerung in der Kälte, optimaler pH und Puffer, Zusatz von Stabilisatoren). Dies muss im Einzelfall für jedes Enzym überprüft werden [Lippard, S., Berg, J. 1998]. Die Oberflächenmodifikationen sollten eine Auskunft über die Beschaffenheit der Proteinschicht geben. Wichtig ist vor allem der Nachweis der funktionellen Eigenschaften, also das Bindeverhalten.

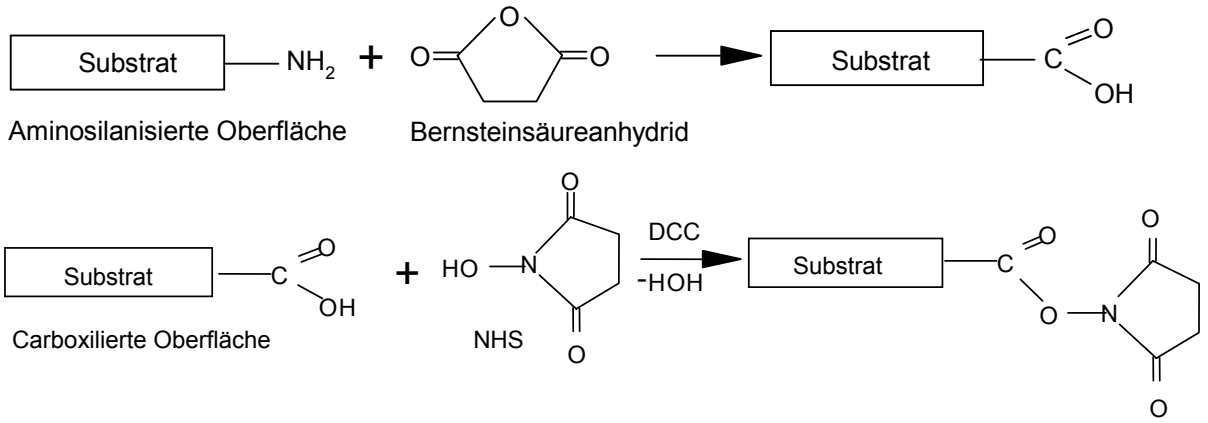
Zur kovalenten Anbindung des Enzyms an die Substratoberfläche wurden funktionelle Gruppen eingebracht, ohne dass sich die Form verändert. Die funktionelle Gruppe dient als Kopplungsstelle für die Biomoleküle, die letztendlich immobilisiert werden sollten. Für die kovalente Anbindung an Trägermaterialien wurden drei Methoden verwendet, mit denen das Enzym kovalent gebunden wurde. Diese drei Methoden wurden im Kapitel 3.1.5 vorgestellt.

4.3 HRP als Modellprotein zur Charakterisierung der Trägermaterialien

4.3.1 Immobilisierung von HRP an aminofunktionalisierten Oberflächen mittels NHS-DCC Methode

Proteine enthalten primäre Aminogruppen, die an die aktivierte Substratoberfläche kovalent gebunden werden können. Um eine biologische Schicht auf Trägeroberflächen aufzubauen, muss die Oberflächenchemie biokompatibel sein. Das einfachste ist, Carboxygruppen mit Aminogruppen zu einer Peptidbindung zu verknüpfen. Dazu werden die aminofunktionalisierten Oberflächen vielfach mit Carboxylgruppen modifiziert (Abb.4-4). Zur Kopplung an Aminogruppen wird N-Hydroxysuccinimid verwendet, das in Anwesenheit von Carbodiimiden zu einem NHS-Aktivester reagiert. Da man in einem wässrigen Medium arbeitet, wird als Kopplungsreagenz ein wasserlösliches Carbodiimid (DCC) verwendet.

Derartig präparierte Oberflächen können direkt zur Proteinimmobilisierung verwendet werden, da das Enzym (die Meerretichperoxidase) genügend frei zugängliche Aminofunktionen hat [Zaitsu, K. et al. 1992]. Dabei können verschiedene Parameter, wie der pH-Wert der Lösung, Lösungsmittel oder Temperatur die Aktivität des Enzyms vermindern, da dadurch die schwachen Wechselwirkungen zwischen den Polypeptidketten (van der Waals-, Wasserstoffbrückenbindungen) aufgehoben werden können, was zur Denaturierung des Enzyms führen kann [Privalov, P.L. 1979].



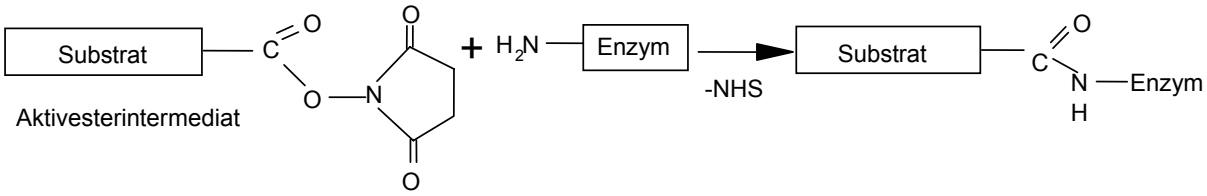


Abb.4-4. Schema der Immobilisierung von HRP mittels NHS-DCC. Auf den aminoimmobilisierten Oberflächen wurden Carboxygruppen eingeführt, die weiter mit NHS aktiviert wurden. Anschließend erfolgte die Immobilisierung des Enzyms unter Ausbildung einer Peptidbindung.

Nach der Zugabe von NHS/DCC in wässriger Lösung auf eine Carboxylgruppen tragende Materialoberfläche wurde eine Konzentration von 20 µg/ml Protein zur Immobilisierung eingesetzt. Die Meerrettichperoxidase ist ein Glykoprotein mit einem isoelektrischem Punkt (pI 7,2) im neutralen Milieu [Maehly, A. 1955]. Die Enzymkonzentration spielt eine wichtige Rolle, da die Aminogruppen, welche spontan unter Bildung einer Amidbindung reagieren, in Konkurrenz zur Hydrolyse des Aktivesters stehen. Zudem sollte das Protein eine leicht positive Gesamtladung tragen, damit die Proteinkonzentration in der Nähe der negativen geladenen Carboxyoberfläche sehr hoch ist. Der pH-Wert hat einen großen Einfluss auf die Enzymaktivität und Stabilität. Daher wurde einen optimalen pH-Wert des Puffersystems ausgewählt.

Um sicherzustellen, dass die enzymatische Aktivität tatsächlich von kovalent gebundener HRP und nicht von unspezifisch adsorbiertem Enzym abhängt, erfolgten nach Entnahme der Proben aus der Proteinlösung fünf Spülschritte mit Phosphatpuffer pH 7,0.

Als Testmaterial für die Funktionalisierung der Oberfläche dienten die Keramik- und Polycarbonatproben. Eine Vergleichmessung wurde mit APTS-Lösung beschichteten Proben durchgeführt, die für die gleiche Zeit in eine HRP-Lösung, aber in Abwesenheit von NHS-DCC, eingetaucht wurde. Die Methode, um die Menge des aktiven Enzyms zu bestimmen, wurde bereits im Kapitel 3.1.4 beschrieben.

Untersuchungen zur Stabilität des Enzyms wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt. Die Proben wurden bei 4°C in 150 mM Aufbewahrungspuffer pH 7,0 gelagert, wobei die Enzymaktivität in regelmäßigen Zeitabständen bestimmt worden ist. Aus den Untersuchungen ergaben sich zunächst Unterschiede im Bindungsverhalten des Enzyms.

Zu beachten ist, dass eine verbesserte Immobilisierung erreicht wird, wenn aktive funktionelle Gruppen zur gezielten Enzymbindung eingebracht worden sind [Srere, P. et al. 1976]. Die

Autoren vermuten, dass die kovalente Bindung über Lysinreste entstand. In der Meerretichperoxidase sind sechs primäre Aminogruppen aus Lysinresten vorhanden, die Kopplungsreaktionen zugänglich sind. Untersuchungen von Zaitsu (1992) zufolge sind zwei dieser Gruppen gegenüber NHS-Estern reaktiv.

Die Untersuchungen zeigten, dass bereits ein geringer Anteil an NHS in der Schicht die Anbindung des Enzyms drastisch beeinflusst. Durch Zugabe von NHS an Keramikoberflächen, die mit einer Mischung aus EtOH/H_2O vorbehandelt wurden, wurde direkt nach der Immobilisierung eine Beladung von 2,58 ng/cm^2 aktives Enzym ermittelt. Die Polycarbonatproben wiesen direkt nach der Immobilisierung einen ähnlichen Wert an aktives Enzym (2,63 ng/cm^2) auf. Nach 21 Tagen konnte bei den Keramikproben einen Wert von noch 0,15 ng/cm^2 beobachtet werden, während die Polycarbonatproben eine dreifach größere Menge an aktivem Enzym aufwiesen. Die Keramikproben, die nur mit APTS behandelt wurden, zeigten einen Ausgangswert von 0,42 ng/cm^2 und nach 21 Tagen kein aktives Enzym mehr im Gegensatz zu Polycarbobatproben, die direkt nach der Immobilisierung einen Wert von 1,47 ng/cm^2 aufwiesen. Eine Aktivitätsabnahme während der ersten Messungen wurde auch von anderen Autoren bei der Verwendung von Alkyltriethoxysilanen beobachtet [Künzelmann, U. et al. 1997]. Eine deutlich geringere Bindungskapazität besitzen die Oberflächen, die nicht mit Aminosilan behandelt wurden. Im Gegensatz zu den APTS-modifizierten Oberflächen zeigten die unbeschichteten Proben, die in die 20 µg/ml HRP-Lösung eingetaucht wurden, im gleichen Experiment nach 14 Tagen fast keine Aktivität mehr.

Desweiteren konnten Unterschiede aufgrund des verschiedenen Reinigungsschritts demonstriert werden. Die mit KOH gereinigten Oberflächen hatten nur einen geringeren Einfluss auf die Menge des immobilisierten, aktiven Enzyms. Im Vergleich zu Polycarbonatplättchen, bei denen nach 21 Tagen einen Wert von 0,28 ng/cm^2 an aktivem Enzyms ermittelt werden konnte, zeigten die Keramikproben nach 21 Tagen kein aktives Enzym mehr. Nach Nazari (2005) können sich das während der Substratentwicklung verwendete Wasserstoffperoxid sowie Intermediate der enzymatischen Reaktion sehr negativ auf die Enzymaktivität der HRP auswirken, was wiederum zur Inaktivierung des aktiven Zentrums führt. Das wäre eine Erklärung für die geringe Menge des immobilisierten aktiven Enzyms, angenommen, da die Proben in zyklischen Zeitabständen vermessen worden waren. Zusätzlich zu dem unter 3.1.1.1 beschriebenen Versuchsablauf wurde der KOH-Lösung EtOH hinzugefügt. Dies führt nach 21 Tagen zu einer stärkeren Bindung des Enzyms (0,22 ng/cm^2)

an der Keramikoberfläche. Mit dieser NHS/DCC-Methode wurde die höhere Menge von Meerrettichperoxidase (HRP) an den untersuchten Polycarbonatoberflächen immobilisiert.

4.3.2 Immobilisierung von HRP an aminofunktionalisierten Oberflächen mittels Glutardialdehyd

In einem weiteren Versuch wurden die Keramik- und Polycarbonatproben mit Glutardialdehyd (GDA) behandelt. Während die Polycarbonatproben, die mit EtOH/HOH vorbehandelt wurden, nach 21 Tagen eine Menge an aktives Enzym von 0,22 ng/cm^2 zeigten, wiesen die Keramikproben, die gleich behandelt wurden, kein aktives Enzym mehr auf. Bei den nicht funktionalisierten Oberflächen erfolgte die Immobilisierung des Enzyms vorwiegend adsoptiv und das erklärt die geringere aktive Enzymmenge im Gegensatz zu den aktivierten APTS Oberflächen.

In allen Versuchen, bei denen die Oberfläche mit Glutardialdehyd behandelt wurde, wurde die geringste gebundene Enzymmenge beobachtet. Die Keramikoberflächen, die mit KOH vorbehandelt wurden, ergaben eine geringere Menge an aktives Enzym (0,47 ng/cm^2) im Vergleich zu Polycarbonatoberfläche (1,16 ng/cm^2). Diese Polycarbonatproben wiesen nach 21 Tagen für alle durchgeführten Messungen eine um die Hälfte geringere aktive Enzymmenge als die mit NHS-DCC behandelten Proben auf. Bei all diesen Versuchen wurde beobachtet, dass die Proben, die nur mit APTS behandelt wurden, ähnliche Werte an immobilisiertem Protein wie bei den mit Glutardialdehyd modifizierten Proben zeigten. Die geringere Menge an gebundenem Protein ist vermutlich durch eine vorwiegend adsorptive Kopplung des Enzyms erklärbar. Die Adsorption ist häufig durch schwache Bindungen, wie z.B. elektrostatische Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte, bedingt, die deren Einsatz auf einen kurzen Zeitraum beschränken, d.h. eine geringere Langzeitstabilität haben [Sadana, A. 1992]. Proteinmoleküle reagieren oft mit Konformationsänderungen. Die Adsorption auf festen Oberfläche ist daher mit einer Teilentfaltung bzw. Deformation der Proteinstruktur verbunden [Wittemann, A. et al. 2001]. Auch dieser Effekt kann die geringen Werte für das aktive, immobilisierte Enzym bedingen.

4.3.3 Immobilisierung der oxidierten HRP an aminofunktionalisierten Oberflächen

Auch reduktive Aminierungen wurden eingesetzt; so wurde in einer ersten Stufe der Kohlenhydratteil von HRP mit Natriumperiodat zu Aldehyden oxidiert und anschließend immobilisiert. In einem zweiten Schritt wurden mit Hilfe von Natriumborhydrid die

erhaltenen Iminfunktionen reduktiv aminiert. Nach Zaborsky (1976) kann ein Glykoprotein über seinen Zuckeranteil an feste Substratoberflächen immobilisiert werden. Der Kohlenhydratteil, der an der Immobilisierung teilnimmt, spielt keine wesentliche Rolle für die katalytische Aktivität von Proteinen, d.h. dass die Kopplung von Protein über die Zuckerreste keinen Einfluss auf dessen Aktivität haben sollte.

Mit 14,8 ng/cm^2 wurde die höchste Menge aktives Enzym an Keramikoberflächen über diese Methode gebunden. Bei den Keramikoberflächen, die entweder mit Kaliumhydroxid oder mit einer Mischung aus Kaliumhydroxid und Ethanol im Verhältnis 1:1 vorbehandelt wurden, sank nach 28 Tagen die immobilisierte Proteinmenge (aktives Enzym) um 90% des Ausgangswertes. Auffällig war, dass die immobilisierte Enzymmenge schon nach 7 Tagen drastisch abnahm. Für dieses Verhalten wäre eine adsorptive Kopplung des Enzyms denkbar. Die Immobilisierung von HRP an nicht silanisierten Oberflächen zeigte nach 7 Tagen keine messbare Enzymmenge.

Unter Voraussetzung der Richtigkeit unserer Vermutung, dass die Bindungsaffinität des Enzyms zu den Funktionalisierung der Oberfläche korreliert, kann man aus den vorgestellten Ergebnissen schließen, dass die Bindungsstärke des Enzyms in der Reihenfolge KOH, EtOH/H_2O, KOH/EtOH (Vorbehandlung der Materialoberflächen) zunimmt.

Neben der Abhängigkeit von der Art des verwendeten Reinigungsschritts konnte auch eine Abhängigkeit von der eingesetzten Silankonzentration festgestellt werden. Bei Verwendung von oxidiertem Enzym wurde eine signifikante Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration an APTS beobachtet. Die Messungen ergaben eine Verringerung der Menge an aktivem Enzym nach 28 Tagen bei jeder getesteten Konzentration. In Abbildung 3-22 ist der berechnete Mittelwert des aktiven Enzyms in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Es konnte festgestellt werden, dass bei niedrigen Silankonzentrationen das Enzym nicht für längere Zeit an die Proben gebunden werden kann. Ursache ist möglicherweise die Schichtdicke, die zu gering ist. Die durchgeführten Messungen zeigen nach 7 Tagen einen deutlichen Aktivitätsverlust an immobilisiertem Enzym. Ab einer 0,5%-igen APTS-Lösung trat ein Maximum auf, bei der eine Erhöhung der APTS-Konzentration keine größere Menge an gebundenem Enzym mehr zu Folge hatte.

Wie bei den Keramikproben wurden die besten Ergebnisse bei den Polycarbonatproben erzielt, die mit Ethanol/Wasser vorbehandelt wurden. An die Polycarbonatoberfläche konnte nach 28 Tagen mehr aktives Enzym nachgewiesen werden (1,81 ng/cm^2) als an die Keramikproben (0,15 ng/cm^2). Es wurde auch hier die Abhängigkeit an gebundenem Enzym von der Konzentration der eingesetzten APTS-Lösung untersucht. So wurde festgestellt, dass

eine optimale APTS-Konzentration bei 0,5% liegt und eine Erhöhung der Konzentration keinen Anstieg an immobilisierter Proteinmenge liefert.

In einem weiteren Ansatz wurde die Langzeitstabilität des gebundenen Enzyms untersucht. Die hier immobilisierten Polycarbonatoberflächen sind bei der Lagerung im Kühlschrank über ein Jahr stabil geblieben (Abb.3-34). Proben, bei denen wie bei den Kurzzeitmessungen die Enzymaktivität in zyklischen Abständen immer wieder bestimmt wurde, wiesen deshalb nach einem gewissen Zeitraum eine geringere Aktivität auf als solche, die nach dem gleichen Zeitraum nur einmal untersucht worden sind. Beispielweise wiesen die Proben, die erst nach einem Monat getestet wurden, eine Menge an aktivem Enzym von noch 11,24 ng/cm^2 auf, während bei denjenigen, die in regelmäßigen Zeitabständen vermessen wurden, nur noch 1,81 ng/cm^2 Enzym ermittelt werden konnte. Eine Erklärung dafür wäre laut Nazari (2005), dass bei der Substratentwicklung verwendetes Wasserstoffperoxid sowie die Intermediate der enzymatischen Reaktion einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität der HRP nehmen könnten. Demzufolge kann bei dieser Versuchsreihe (nur Einmalmessung) keine Inaktivierung des aktiven Enzymzentrums stattfinden. Nach 8 Monaten konnte einen Wert von 2,8 ng/cm^2 an immobilisiertem Enzym ermittelt werden, der anschließend konstant blieb. Nach Abschluss der bereits erwähnten Messungen (12 Monaten) konnte beobachtet werden, dass der Verlust an aktivem Enzym einen nahezu exponentialen Verlauf hatte. Es kann aus den Versuchen geschlossen werden, dass die Stabilisierung für eine langfristige Lagerung im Kühlschrank immer noch hoch genug ist. Die Bindung ist also relativ stabil, so dass die notwendigen Waschschritte vor der Messung keinen Nachteil darstellen.

4.3.4 Immobilisierung der oxidierten HRP an Polymeroberflächen, die mit Plasma vorbehandelt wurden

Für die Immobilisierung von Biomolekülen auf Kunststoffoberflächen wurde der Einsatz von plasmabehandelten Oberflächen untersucht. Plasmabehandlungen werden zunehmend für Oberflächenbehandlungen von Polymerstrukturen, die in der biomedizinischen Diagnostik, der Biomedizintechnik und der Zellkulturtechnik Verwendung finden, eingesetzt. Aus diesem Grund fordert der Markt die Verfügbarkeit von modifizierten Oberflächen mit klar definierten Bereichen unterschiedlicher Benetzbarkeit oder speziellen chemischen Funktionalitäten. Die modifizierten Bereiche bilden den Ausgangspunkt für die Immobilisierung von bioaktiven Molekülen, wie z.B. Proteine. Bei der Plasmabehandlung der Polymeroberfläche finden verschiedene Prozesse statt. Diese bewirken eine Bildung von chemisch aktiven Gruppen an der Polymeroberfläche, die aus dem Aufbrechen von C-C π–Bindungen entstehen [Friedrich,

J. et al. 1995]. Im Rahmen dieses Projektes wurden verschiedene Plasmabehandlungen für die Modifizierung von Oberflächen untersucht. Die Kunststoffmateriallien wurden mit Kohlenstoff-, Kohlenstoff–Stickstoff- und Sauerstoff-Plasma vorbehandelt.

Die modifizierten Oberflächen eigneten sich sowohl für die kovalente Immobilisierung von Enzym auf Polycarbonat, als auch für die Immobilisierung von Enzym auf Polystyrol. Polystyrol wurde ergänzend als Trägermaterial eingesetzt, da derartige mit Plasma beschichteten Oberflächen routinemäßig von der Firma NTTF hergestellt werden. Die Firma NTTF -new technologies in thin films- aus Rheinbreitbach stellt ultradünne Beschichtungen aus Kohlenstoff her, etwa 35 nm dick. Diese Beschichtungen verhindern, dass Substanzen aus dem beschichteten Material an die Oberfläche gelangen, beispielsweise Weichmacher aus Kunststoffen.

Aus den Experimenten zur Verfolgung der Immobilisierung von Meerretichperoxidase auf Polystyrol- und Polycarbonatplatten erkennt man, dass die unterschiedliche Plasmabehandlung der Oberflächen eine wichtige Rolle spielt.

An diesen beiden Trägermaterialien verlief die Immobilisierung von Meerretichperoxidase (HRP) erfolgreich. Bereits unbehandeltes Polystyrol hat sich als ein geeignetes Material erwiesen, Proteine kovalent zu binden. Die hydrophoben Bestandteile der Proteine interagieren über van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen mit den Kunststoffoberflächen. Es bindet maximal eine Protein-Monolage an die Oberfläche. Die Bindekapazität hängt hauptsächlich vom pI-Wert der Proteine ab. Dieser Wert gibt den isoelektrischen Punkt an, bei dem sich die ionischen Ladungen ausgleichen. Jedoch kann es bei dieser Art adsorptiver Immobilisierung zur Inaktivierung der Proteine kommen. Dieser Nachteil soll durch die Plasmabehandlung behoben werden, welche hier mit einem kovalenten Immobilisierungsverfahren kombiniert wurde.

Die immobilisierte Proteinmenge an Polystyroloberflächen befindet sich nach 28 Tagen bei allen behandelten Oberflächen unabhängig von der Art des verwendeten Plasmas im Bereich von bis zu 2,7 ng/cm^2. Zum Vergleich dazu wurden auch Messungen für nicht behandelten Oberflächen durchgeführt. Das zeigte insbesondere, dass das Enzym sich in die wesentlich geringere Mengen immobilisieren lässt als im Vergleich zu den plasmabehandelten Oberflächen. Von Bedeutung erscheint in diesem Fall der niedrige Verlust an aktivem Enzym mit der Zeit zu sein, d.h. eine sehr gute Stabilität des Enzyms. Es konnte festgestellt werden, dass innerhalb von 28 Tagen die Enzymaktivität für die Polystyrolproben, die mit Sauerstoff beschichtet wurden, etwa konstant blieb (~1,8 ng/cm^2). In einer Arbeit zur Stabilisierung von Reagenzien für die Verwendung in Biosensoren wurde gezeigt, dass mit dem Ausschluss von

Sauerstoff die Aktivität von HRP langfristig erhalten werden kann [Schütz, A.J. et al. 1997]. Fest gebundene Sauerstoff-Funktionen scheinen offensichtlich keinen negativen Einfluss zu haben.

Daher haben wir uns mehr auf die Stabilität konzentriert. Bei den Polystyrolproben, die mit Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff behandelt wurden, wurden direkt nach der Immobilisierung 1,3 ng/cm^2 aktives Enzym ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass die immobilisierte Proteinmenge (aktives Enzym) an Polystyroloberflächen, die neben den üblichen kohlenstoff- und stickstoff- auch sauerstoffhaltigen Gruppe tragen, in einem Zeitraum von 7 bis 28 Tagen annähernd konstant bleibt (2,4 ng/cm^2). Ausnahme macht nur die mit Kohlenstoff behandelte Oberfläche, derer Stabilität nicht überzeugt.

Auffällig bei der mit Plasma behandelten Polystyroloberfläche war, dass sich die Menge an immobilisiertem, aktivem Enzym nach 7 Tagen verdoppelt hat. Das Phänomen lässt sich erklären, da sich wahrscheinlich das Enzym nach einiger Zeit regeneriert. Die biologische Aktivität ist oft unter verschiedenen Umgebungsbedingungen unterschiedlich ausgeprägt. Zu hohe oder zu niedrige Pufferkonzentrationen, Temperaturextreme, Kontakte zu unphysiologischen Oberflächen wie Glas oder Kunststoff können biologische Charakteristika von Proteinen verändern. Manche dieser Veränderungen sind reversibel: Vor allem kleine Proteine sind auch nach Denaturierung und Verlust der Aktivität häufig in der Lage, unter bestimmten Bedingungen zu renaturieren, d.h. ihre biologisch aktive Form wiederzugewinnen. Offensichtlich führt der Immobilisierungsvorgang zu einer reversiblen Denaturierung der HRP. Eine Ausnahme waren die Polystyrolproben, die mit Sauerstoff behandelt wurden und deren aktive Enzymmenge konstant blieb.

In einem weiteren Versuch wurden die mit Plasma behandelten Polystyrolproben auf ihre Langzeitstabilität hinuntersucht. Die Enzymaktivität wurde erst nach 8 Monaten überprüft (Abb.3-44). Während die Menge an immobilisiertem, aktivem Enzym nach einem Monat um den Faktor 2 größer ist, nimmt die aktive Enzymmenge nach 8 Monaten bei den kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Beschichtungen um den Faktor 3 zu. Die Polystyrolproben, die entweder mit Kohlenstoff- oder mit Sauerstoff-Plasma behandelt wurden, zeigten nach 8 Monaten einen konstanten Wert an immmobilisiertem Enzym. Plasmaverfahren sind also geeignet, die Polymeroberfläche so zu modifizieren, dass eine stabile Enzymimmobilisierung erreicht werden kann.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die Polycarbonatoberflächen untersucht, die mit verschiedenen Plasmen behandelt wurden. Die durchgeführten Messungen zeigen mit der Zeit einen bemerkbaren Aktivitätsverlust. Zu beachten ist jedoch, dass die freien

Aldehydfunktionen der oxidierten HRP direkt mit den Aminogruppen, die durch Plasmabehandlung erzeugt wurden, auf der Polycarbonatoberfläche reagieren können und damit die relativ hohen Werte für den Kontrollversuch erklärt werden können. Während bei den sauerstoffhaltigen Oberflächen die immobilisierte aktive Proteinmenge nach 28 Tagen auf 36% des Ausgangswertes sank, fiel die aktive Enzymmenge bei den kohlenstoffhaltigen Oberflächen an irrelevante 4% zurück. Bemerkenswert ist, dass die höchsten Werte an aktivem Enzym (11,1 ng/cm^2) im Falle der mit Kohlenstoff- und Stickstoff-Plasma behandelten Polycarbonatplatten erreicht wurden. Bei dieser Polycarbonatoberfläche ist die Menge an aktivem Enzym nach 28 Tagen vierfach höher als bei der Oberfläche, die nicht mit Plasma behandelt wurde. Der Aktivitätsverlust beträgt nach 28 Tage 35% des Anfangswertes. Die höheren Werte des aktiven Enzyms wären durch die Plasmafunktionalisierung erklärbar, da mehr Aminogruppen auf den Polycarbonatoberflächen erzeugt werden als durch die APTS-Funktionalisierung.

Im Vergleich zu NHS/DCC Methode, bei der nach 28 Tagen kein aktives Enzym mehr nachgewiesen werden konnte, zeigten die plasmabehandelten Polycarbonatproben nach 8 Monaten signifikante Werte an gebundenem Enzym (Abb.3-48). Die Proben, die mit Kohlenstoff- und Stickstoff-Plasma behandelt wurden, zeigten nach 8 Monaten einen Wert an aktivem Enzym von 19,48 ng/cm^2, d.h. ~20% mehr gebundenes Enzym als bei der Messung, die direkt nach der Immobilisierung durchgeführt wurde. Bei den mit Kohlenstoff- oder Sauerstoff-Plasma behandelten Polycarbonatoberflächen wurden nach 8 Monaten fast identische Werte an immobilisierter Enzymmenge ermittelt wie bei den Messungen, die direkt nach der Immobilisierung stattgefunden hatten

Mit diesen Versuchen wurde eine optimale Oberfläche für die Proteinimmobilisierung gefunden, mit der sich nach längerer Zeit eine ausreichend hohe aktive Enzymmenge erzielen ließ. Die Plasmabehandlung erweist damit einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten der Polycarbonatplatten. Leider ließen sich derartige Oberflächen bei der Chipherstellung nur schlecht bonden, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt werden konnte.

Nachteil dieser Immobilisierung an Polystyrol- und Polycarbonatoberflächen sind die großen Werte für die Standardabweichungen. Eine mögliche Ursache wäre, dass die Beschichtung mit Stickstoff-, Kohlenstoff- und Sauerstoff-Plasma nicht homogen verlief.

Trotzdem lassen sich mit einfachen Beschichtungsverfahren reproduzierbare Enzymschichten auf festen Oberflächen herstellen. Die Anbindung über Aminopropyltriethoxysilan bietet neben schonenden Reaktionsbedingungen den Vorteil, dass diese gleichzeitig als „Spacer“ fungieren und so den Proteinen nach Anbindung einen gewissen Schutz vor konformellen

Änderungen (Adsorption) bieten [Nanci et al. 1998]. Als geeignet hat sich auch das mit $NaIO_4$ –Verfahren zur Oxidation der HRP erwiesen, weil damit relativ homogene Oberflächen mit einer höheren Beladung an aktivem Enzym erzeugt werden konnten. Da in diesem Fall die größte Menge an gebundenem aktivem Enzym und eine relativ gute Stabilität erzielt wurden, erscheint diese Immobilisierungsmethode geeignet für die Entwicklung von Mikrosystemkomponenten mit einer biologisch aktiven Beschichtung.

In den oben beschriebenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Funktionalisierung der Oberfläche die enzymatische Aktivität entscheidend beeinflussen kann. Mit diesen Methoden konnte die Funktionalität derartiger Oberflächen untersucht werden, die eine Voraussetzung zur kovalenten Bindung des Enzyms war. Somit konnte festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit entwickelte Immobilisierungsmethode eine Modifizierung von auch schlecht zugänglichen Kapillarenwandungen ermöglicht.

Nachdem durch die vorherigen Experimente gezeigt werden konnte, dass sich die Immobilisierungsverfahren generell für die Herstellung von Enzym-enthaltenden Schichten auf Polymeroberflächen verwenden lassen, soll im weiteren Verlauf der Arbeit die Fähigkeit eines Polycarbonatchips zur Trennung und Detektion von Phenolen mittels Amperometrie untersucht werden. Als elektrochemisches Messverfahren wurde die Amperometrie verwendet, da sie eine hohe Selektivität bei geringer Nachweisgrenze aufweist.

4.4 Amperometrische Detektion

Wie schon in Kapitel 3.5 erwähnt, erfordert der Einsatz der Kapillarelektrophorese in Verbindung mit der amperometrischen Detektion von Phenolen eine Funktionalisierung der Kapillaroberfläche. Um zu beweisen, dass eine solche Funktionalisierung erfolgreich verlaufen kann, sollte in dieser Arbeit ein Detektionssystem entwickelt werden. Generell besitzt eine amperometrische Konfiguration drei Elektroden, bestehend aus einer Arbeitselektrode, an der der primäre Redox-Prozess abläuft, der Referenzelektrode, die das Potential an der Arbeitselektrode kontrolliert und einer Gegenelektrode, durch die der weitaus größte Teil des Stroms fließt. Da der Strom über eine Gegenelektrode abgeführt wird, bleibt die Referenzelektrode stromlos und Potentialschwankungen können vermieden werden [Hauser, P. et al.1999].

Das hier verwendete Zwei-Elektroden System wird über einen Potentiostaten kontrolliert. Die Elektroden wurden aus Platin hergestellt, wobei jede Elektrodenfläche einen Durchmesser von 250 µm hat. An Pt-Elektroden fließen auf Grund der kleinen Elektrodenoberflächen nur geringe Ströme im nA-Bereich. Da Gegen- und Referenzelektrode zusammengeschaltet wurden, konnte das exakte Potential innerhalb der Detektionseinheit nicht genau bestimmt

werden. Die Elektroden können für eine amperometrische Detektion genutzt werden, da viele biologisch relevante Substanzen elektroaktiv sind. Die Amperometrie gehört zu den elektrochemischen Analyseverfahren. Somit eröffnet sich die Möglichkeit, sowohl die Trennung der Analyten als auch deren Detektion im Chipformat zu vereinen. Abbildung 4-5 zeigt das Muster eines aufgebauten Kapillarelektrophorese-Chips mit elektroschemischer Detektion.

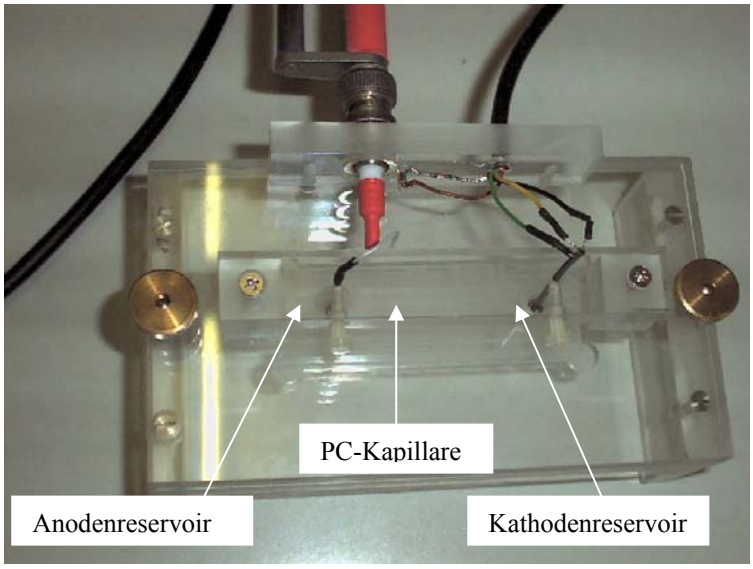


Abb.4-5 Ansicht der Messelektroden am Eingang und Ausgang des Trennkanals.

Der Chip ist auf einer Substratplatte aus Polycarbonat aufgebaut, den uns die Fa. Bartels Mikrotechnik Dortmund zur Verfügung gestellt hat. Darauf befindet sich als Deckplatte ein Polymer (Polycarbonat) mit einer einfachen Mikrokanalstruktur. Der Querschnitt der Kanäle beträgt 50 µm, die Strecke zwischen A und B beträgt 50 mm. Minireservoirs dienen der Aufnahme von Puffer- und Analytlösung für die elektrophoretische Trennung. Durch die Injektion der Analytlösung im Anodenreservoir erfolgen der Transport der Analytlösung und die Trennung der Proben im elektrischen Feld sowie anschließendund die Detektion durch Messung des konzentrationsabhängigen Stromes an der Arbeitselektrode am Ausgang des Trennkanals. Die Charakterisierung der so erhaltenen Kapillaren erfolgte mittels Amperometrie beim konstanten Potential. Zur einfacheren Ausrichtung von Elektrode und Kapillare wurde eine Chiphalterung angefertigt. Da Probeninjektionskanale fehlen, konnten die Testsubstanzen jedoch nur unvollständig voneinander getrennt werden.

4.4.1 Konditionierung der Polycarbonat-Kapillare

Zu Beginn der Untersuchungen sollten die Chips zunächst gereinigt und konditioniert werden. Da die Kapillare aus Polycarbonat chemisch innert ist, musste zunächst die Oberfläche

funktionalisiert werden, um eine negativ geladene Oberfläche zu erzeugen und somit die Migration der Analyten durch den elektroosmotischen Fluss (EOF) zu ermöglichen. Wie im Kapitel 3.5 bereits erwähnt, könnte man durch Funktionalisierung der Kapillare mit verschiedenen Lösungen die Hydrophilie der Oberfläche erhöhen. Eine höhere Hydrophilie der Kapillaroberfläche führt zu einem größeren EOF. Die Hydrophilie verursacht ein gerades, stabiles Profil des elektroosmotischen Flusses (Abb. 1-6).

Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe wurden die benötigten Lösungen zur Derivatisierung durch den Trennkanal gepumpt. Sehr wichtig bei der Befüllung der Kapillaren war, dass sich keine Luftblasen im Trennkanal bilden. Luftblasen können Störungen des elektroosmotischen Flusses hervorrufen und zur Änderung des fließenden Stroms führen [Xue, Y. und Yeung, E.S. 1994]. Wenn das passiert, muss die Messung neu gestartet werden, d.h. neuer Elektrolyt eingefüllt und die Arbeitselektrode gereinigt werden. Um diesen unerwünschten Effekt zu verhindern, wurde der Elektrolyt nach der Herstellung entgast. Für die einzelnen Konditionierungsschritte wurden die benötigten Konzentrationen der verwendeten Lösungen sowie die zur Derivatisierung benötigten Zeiten untersucht. Um den Fließverhalten in den Mikrokanälen zu prüfen, wurde Methylenblau als Farbstoff verwendet. Bei einer Flussrate von 1,0 ml/min sind die Lösungen nach ca. 10 Sekunden komplett durch die Trennkapillare gelaufen.

Die anschließenden amperometrischen Messungen von Phenolen wurden mit drei unterschiedlichen Silan-Lösungen durchgeführt und zwar mit Natriumsilikatlösung, Trimethylsylil-methanol (TMS) und Glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPTS). Die so entstandenen Silanolgruppen können im Kontakt mit der Elektrolytlösung in Abhängigkeit vom pH-Wert dissoziiren. Dadurch entsteht eine negativ geladene Oberfläche, wodurch einerseits ein EOF in Richtung Kathode resultiert, anderseits aber auch elektrostatische Wechselwirkungen mit entgegengesetzt geladenen Analytionen auftreten können. Da ein Puffer mit kleiner Ionenstärke und bei einem pH-Wert von 7-8 einen konstanten EOF erzeugt, wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ein 10 mM Phosphatpuffer pH 7,3 verwendet. Der elektroosmotische Fluss ist vom Zeta-Potential abhängig. Wie Engelhardt (1994) ermittelte, führt eine höhere Pufferkonzentration zu einer Verringerung des EOF.

Da das Detektionspotential (E_{pot}) der Arbeitselektrode von der Trennspannung (HS), dem Kapillarinnendurchmesser und dem Puffersystem abhängig ist, wurde zunächst das optimale Detektionspotential bestimmt. Mit einer 50 µm Polycarbonatkapillare, befüllt mit 10mM Phosphatpuffer pH 7,3, und bei einer Trennspannung von 500 V wurde ein optimales Detektionspotential von 1,1 V festgestellt. Niedrigere Detektionspotentiale führten zu

negativen Grundströmen und stärkeres Basislinienrauschen. Eine elektrochemische Reaktion der Phenole ist bei diesem Potential möglich.

Nachdem die Trennspannung angelegt und eine stabile Grundlinie eingestellt wurde, wurde der zu testenden Analyt direkt in das Anodenreservoir pipettiert. Auffällig bei allen durchgeführten Versuchen mit Phenolen ist der flache Anstieg des Stroms bis zu einem Signalplateau. Eine Erklärung der langsamen Stromzunahme ist die Positionierung der Messelektrode. Konstruktionsbedingt befindet sich die Arbeitselektrode nicht direkt in der Kapillare, so dass der Analyt vor Erreichen der Messelektrode Diffusionsvorgängen unterworfen war. Um reproduzierbare Ergebnissen zu erhalten, war es notwendig, die Kapillare vor jedem Analysenlauf 10 Minuten mit Wasser und 5 Minuten mit dem Elektrolyt zu spülen. Außerdem wurden vor jeder einzelnen Messung die Platinelektroden gereinigt. Zuerst wurden eventuell vorhandene Spuren von Phenolen mit Glasfasern sorgfältig entfernt, danach die Elektroden mit HNO_3 behandelt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült.

4.4.2 Detektion von Phenolen

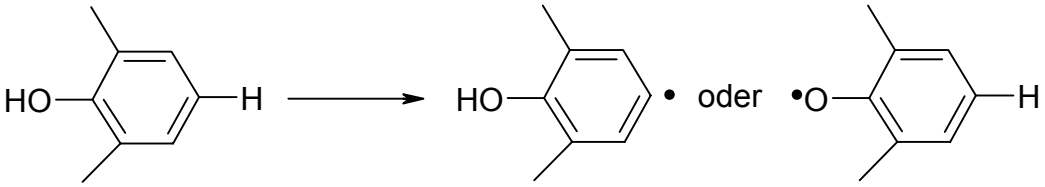
Phenole sind in der Natur weit verbreitet. Anwendungen finden Phenole als Kresole in der Herstellung von Lösungsmitteln und Desinfektionsmitteln, von denen 60% Phenole als wirksame Komponente enthalten. Hydrochinon wird zur Herstellung von Stabilisatoren, Antioxidationsmittel und in der Gummiverarbeitung verwendet. Als Styrole kommen sie in der Kunststoffproduktion zur Anwendung. Phenole sind ringförmige Kohlenstoffverbindungen mit Hydroxyl-Gruppen, die zur Klasse der Antioxidantien zählen. Seit einiger Zeit gewinnen Phenole immer mehr an Bedeutung im Lebensmittelbereich und der Phytomedizin. Phenolen haben eine antioxidative Wirkung, sie sind Radikalfänger im Körper, wirken antiviral (gegen Viren) und sie hemmen die Oxidation von Cholesterol.

Phenole sind durch Hydroxylgruppen substituierte Derivate des Benzols. Sie stellen schwache organische Säuren mit hoher Wasserlöslichkeit dar [Dunnivant, F.M., Schwarzenbach, R.P. 1992]. Ihre relativ hohe Reaktivität führt leicht zur Oxidation. Phenolische Verbindungen besitzen Schadstoffcharakter. Sie sind ab Konzentrationen von 1 mg toxisch gegenüber wasserlebenden Organismen [Hancock, P., Dean, J.R. 1997]. Ihre toxische Wirkung auf den menschlichen Organismus liegt in der Depression der Funktionen des zentralen Nervensystems. Die Aufnahme von 1 g Phenol wirkt bei Menschen tödlich [Koch, R. 1995]. Zahlreiche mono-, di- und trihydroxy-substituierte Phenole, wie Hydrochinon und Pyrogallol, können leicht unter der Bildung von Chinonen oxidieren. Diese können miteinander oder mit

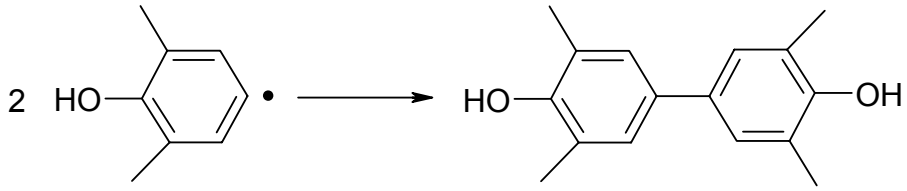
anderen organischen Molekülen (Amine) zu Polymeren kondensieren. Es kommt zur Entstehung braun bis schwarz gefärbter Produkte.

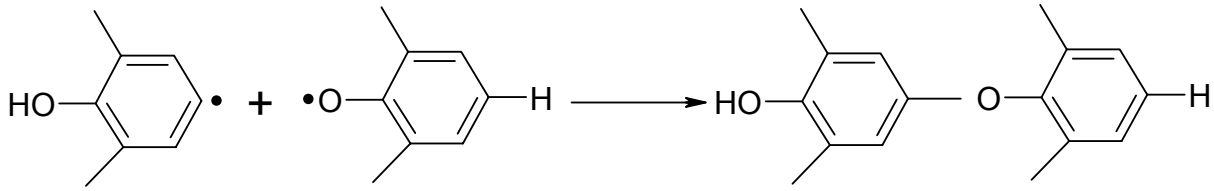
In einem ersten Schritt werden organische Verbindungen zu instabilen freien Radikalen oxidiert (Abb.4-6).

1) Schritt 1



2) Radikalkopplung





Polymerization

3) Schritt 2

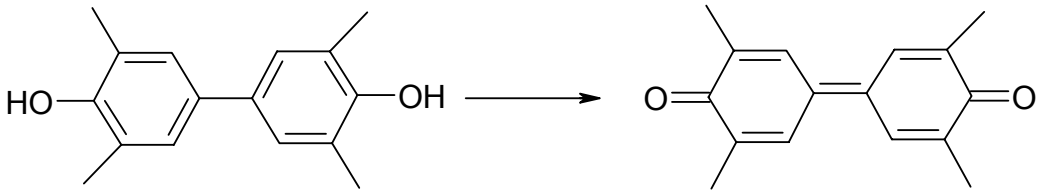


Abb.4-6 Oxidation und Polymerization von Phenolen [Araki, T. et al. 1992]

Diese reagieren mit anderen Molekülen zu radikalischen Intermediären, die dann weiter reagieren können. Derartige Reaktionen können auch in dem verwendeten Versuchsaufbau auftreten. Dadurch wären beobachtete Unregelmäßigkeiten bei den Messungen erklärbar.

In dieser Arbeit wurden als phenolische Komponenten Dopamin, Hydrochinon, Pyrogallol, Resorcin und Gallussäure verwendet. Sie dienen als Testsubstanzen für das Mikrochip-System.

4.4.2.1 Dopamin 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-ethylamin

Die Rolle von Dopamin als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem ist seit längerer Zeit bekannt. Goldberg veröffentliche im Jahr 1972, dass spezifische Dopamin-Rezeptoren sowohl im ZNS als auch in der Peripherie, an Herz und Niere, vorkommen. Die Bedeutung des zentral gebildeten und freigesetzten Dopamins wurde schon in Zusammenhang mit Morbus Parkinson und der Schizophrenie gebracht.

Die Elektropherogramm (Abb.3-61) bei der Detektion von Dopamin (10 mM) zeigte eine Stromzunahme bis auf 70 nA bei ca. 240 s. Ein ähnlicher Verlauf wurde für eine 15 mM Dopamin-Lösung beobachtet, wobei das Stromsignal auf 106 nA stieg. Die Kapillare wurde für diese Versuche mit Natriumsilikatlösung vorbehandelt.

Als die Kapillaroberfläche mit Trimethylsylil-methanol (TMS) behandelt wurde, stieg das Signal für eine 10 mM Dopamin-Lösung (Abb.3-69) auf 105 nA bei 475 s an. Eine 15 mM Dopamin-Lösung zeigte eine Stromzunahme auf 140 nA bei 393s. Auffällig war in diesem Fall, dass bei höheren Konzentrationen die Probe schneller die Messelektrode erreichte. Offensichtlich kommt es zu sehr komplexen Vorgängen an der Kapillarinnenwandung.

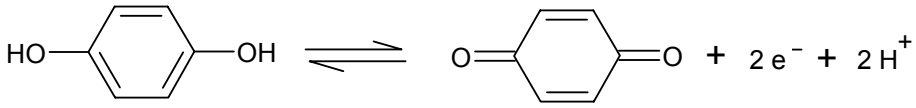
Der Vergleich der Signalhöhen für eine Dopamin-Lösung (10 mM) bei den oben genannten Versuchen zeigt, dass die Behandlung der Kapillaroberfläche mit Trimethylsylil-methanol zu einer Steigerung der Signalhöhe von 50% führt. Da die Elektropherogramme ein starkes Grundrauschen zeigten, liegen hier vermutlich komplexe Vorgänge vor, derer detaillierten Untersuchung jedoch nicht möglich war. Ein anderer Grund dafür wäre, dass Luftblasen in der Kapillare entstanden sind und somit zu Schwankungen des Messsignals führten. Bemerkenswert ist die starke Verschiebung der Migrationszeiten. Denkbar wären hier Kondensationsvorgänge des Dopamins, wofür durch die höhere Signalintensität im Vergleich zur ersten Versuchsreihe spricht.

Die mit GOPTS-modifizierten Kapillare weist im Vergleich zu der mit Trimethylsylil-methanol (TMS) bei Zugabe von Dopamin ein um Faktor 2,5 geringeres Detektorsignal auf. Während an der TMS-modifizierten Oberfläche bei einer Dopaminkonzentration von 10 mM ein Strom von 105 nA detektiert wird, wird bei der mit GOPTS-modifizierten Kapillare bei gleicher Konzentration nur einen Strom von 40 nA gemessen.

Bei der amperometrischen Detektion auf einer mit Glycidoxypropyltriethoxysilan (GOPTS) beschichteten Kapillare konnte Dopamin im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 20 mM detektiert werden. Die an den Elektroden detektierten Ströme stiegen, abgesehen von einem Knick bei ca. 10 mM, linear (R_1^2 = 0,9478 und R_2^2 = 0.985) mit zunehmender Dopamin-Konzentration (von 1 mM bis 10 mM und von 10 mM bis 20 mM) an. Des Weiteren zeigen die Elektropherogrammen der mit GOPTS modifizierten Kapillaren den gleichen Stromverlauf wie das in Abbildung 3-61 dargestellte Diagramm, bei dem die Kapillare mit Natriumsilikatlösung modifiziert wurde. Bei der amperometrischen Detektion von Dopamin wurde eine gute Stabilität der Messung beobachtet (Standardabweichung der Migrationszeit = 7,3 s).

4.4.2.2 Hydrochinon (1,4-Dihydroxybenzol)

Hydrochinone sind gute Reduktionsmittel. Das bekannteste Hydrochinonderivat ist das fettlösliche Vitamin E (α-Tocopherol), das eine wichtige Rolle als Antioxidant in lipophilen Geweben einnimmt. Der Redoxprozess Hydrochinon-Chinon kann als Folge von Protonen- und Elektronenübertragungen angesehen werden. 1,4-Benzochinone haben je nach Substituenten ein Redoxpotential von ca. 0,6-0,7 V.



Bei der Oxidation von Hydrochinon werden nicht nur zwei Elektronen, sondern auch Protonen abgegeben. Daher ist das Potential dieser Redox-Reaktion vom pH-Wert abhängig:

$$E = E_0 + \frac{0{,}059}{2} \cdot \log \frac{[Chinon] \cdot [H_3O^+]^2}{[Hydroch]}$$

Bei der zuerst erfolgten Deprotonierung entsteht ein Phenoxid-Ion, das durch Ein-Elektronen-Oxidation in ein Phenoxy-Radikal überführt wird. Die phenolischen OH-Gruppen reagieren wie schwache Säuren und mit steigendem pH-Wert dissoziiren sie zu Anionen. Bei der Oxidation werden die Anionen in Semichinone mit O- und C-Radikale umgewandelt. Der Sauerstoff fungiert als Elektronenakzeptor und es kommt zur Bildung mesomerer Radikale des Hydrochinons (Abb.4-7).

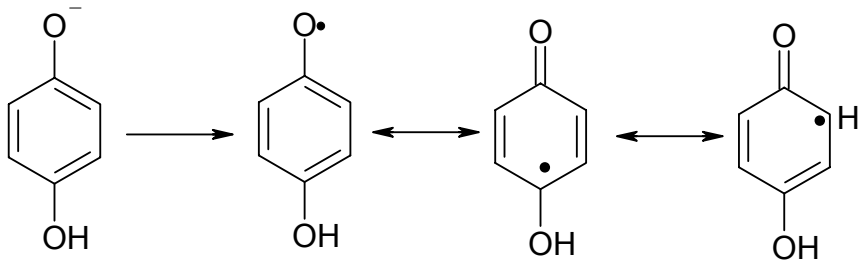


Abb.4-7 Radikalbildung bei Hydrochinon [Wang, T.S.C. et al. 1987]

Die Dissoziation der zweiten OH-Gruppe ergibt ein Semichinon-Radikalanion; eine zweite Ein-Elektronen-Oxidation führt zum Benzochinon (Abb.4-8). Alle Zwischenprodukte sind resonanzstabilisiert. Ähnliche Redoxprozesse treten häufig in der Natur auf.

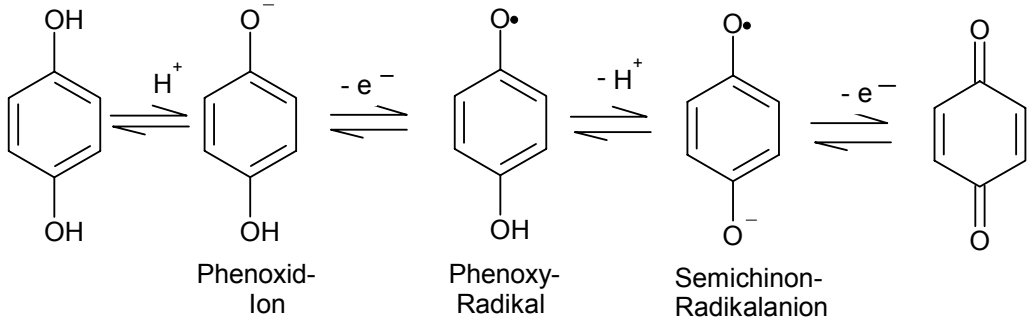


Abb.4-8 Oxidation vom Hydrochinon zum p-Chinon

Das Semichinon-Radikal ist paramagnetisch. Dieses Radikal ist durch verschiedene Methoden zugänglich, so dass im alkalischen Milieu Semichinon-Anionradikale, im neutralen gepufferten Medien Neutralradikale und im stark sauren Milieu Semichinon-Kationradikale erzeugt werden können. Das Redoxpotential des Chinon/Hydrochinon-Systems ist hauptsächlich dafür verantwortlich, dass Chinone bzw. Hydrochinone im protischen Lösungsmittel unbeständig sind. Chinone sind zudem lichtempfindlich. So können sie im Kontakt mit starkem Licht leicht zum Semichinon-Radikal oxidiert werden [Foster, T. et al. 1977].

Bei den Versuchen mit einer Natriumsilikat-beschichteten Kapillare zeigte Hydrochinon einen ähnlichen Stromverlauf wie Dopamin. Bei der amperometrischen Detektion von Hydrochinon (10 mM) wurde nach 190 s einen Strom von 250 nA gemessen. Eine Abnahme der Signalhöhe auf etwa 65 nA wurde bei der amperometrischen Detektion einer 5 mM Hydrochinon-Lösung beobachtet. Erwartungsgemäß sollte bei einer 5 mM Lösung einen Stromanstieg auf ungefähr 125 nA gemessen werden. Dieser Unterschied ist dadurch zu erklären, dass ein Teil des zugegebenen Hydrochinons wahrscheinlich an der Kapillare adsorbiert wurde und nur geringe Menge der aktiven Substanz zur Elektroden gelang und dort

detektiert wurde. Die Adsorption von Probenkomponenten an die Kapillarwand führte zu Substanzverlust und Änderungen im EOF, wodurch sich die Reprodurzierbarkeit drastisch verschlechterte [Engelhardt et al. 1994].

Bei einer amperometrische Detektion von Hydrochinon (10 mM) mit einer Kapillare, die mit TMS behandelt wurde, kam es nur zu einem langsamen Signalanstieg (Abb.3-74). Unter Berücksichtigung der eingesetzten Konzentration wurde ein doppelter Stromanstieg erwartet als im Vergleich zu einer 5 mM Hydrochinon-Lösung. Bei ca. 1200 s bildete sich erst ein Plateau mit einer Signalhöhe von 190 nA aus. Das Ergebnis könnte an die Positionierung der Arbeitselektrode liegen, die relativ weit vor dem Kapillarende positioniert war. Dadurch, dass die Kapillarenden durch Herstellungsprozesse ungenau positioniert waren, wurde der Abstand zwischen der Kapillarmündung und Arbeitselektrode nicht immer gleich beibehalten (Abb. 3-66). Bei der amperometrischen Detektion sollte der Messelektrode möglichst nah vor dem Kapillarende positioniert werden. Wenn die Arbeitselektrode weit vom Kapillarausgang positioniert ist, muss man in Kauf nehmen, dass Diffusionsprozesse auftreten und das Trennverfahren an Effizienz verlieren kann [Martin, R.S. et al. 2002]. Mit zunehmender Distanz zwischen Kapillarausgang und Elektrode verlängert sich außerdem die Laufstrecke des Analytes, was eine Verlängerung der Migrationszeit zur Folge hat.

Wie bei Dopamin wurde auch bei Hydrochinon eine Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der Migrationszeit beobachtet. Eine 5 mM Hydrochinon-Lösung zeigte eine Stromzunahme nach 521 s, während eine 10 mM Lösung einen Stromanstieg nach nur 443 s verursachte. Die Migrationszeiten für Hydrochinon bei einer mit GOPTS modifizierten Kapillare waren kürzer im Vergleich zu den anderen zwei modifizierten Kapillaren. Auch die messbaren Ströme waren kleiner. Für eine 10 mM Hydrochinon-Lösung wurde nach 156 s einen Strom von 63 nA gemessen. Für Hydrochinon wurde die Kalibriergerade im linearen Konzentrationsbereich zwischen 10 mM und 20 mM aufgezeichnet (Abbildung 3-78).

4.4.2.3 Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol)

Da Resorcin kein chinoides System ausbilden kann, hat es im Vergleich zu Hydrochinon eine schwache Reduktionswirkung. Dadurch verhält sich Resorcin, ein m-Dihydroxybenzol, sehr unterschiedlich im Vergleich zu anderen orto- und para-Diphenolen. Dennoch war eine elektrochemische Detektion von Resorcin möglich. Die Elektropherogramme wurden bei einer Kapillare aufgenommen, die mit TMS modifiziert wurde. Um einen stabilen elektroosmotischen Fluss zu erzeugen, ist es notwendig, eine gleichmäßig negativ geladene Oberfläche zu schaffen. Eine Modifikation der Ladungsdichte auf der Kapillarwand könnte

eine Abnahme der elektrischen Doppelschicht und dadurch eine Änderung des EOF verursachen.

In Abbildung 3-68 wurde der Einfluss der Resorcin-Konzentration auf die Stromhöhe des Detektionssignals dargestellt. Das gleiche Verhalten wie bei Dopamin und Hydrochinon wurde auch bei Resorcin im Bereich von 5 mM bis 15 mM festgestellt. Eine 5 mM Lösung ergab eine Migrationszeit nach 567 s, während eine 15 mM Lösung nach 323 s eluierte. Auffällig in diesem Fall war eine relativ große Standardabweichung. Bei der Kapillarelektrophorese ist die Mobilität der Probe wesentlich von ihrer Ladung und nicht von der Konzentration abhängig [Engelhardt, H. et al. 1994]. Das häufig auftauchende Problem bei mit TMS modifizierter Kapillare kommt wahrscheinlich durch wenig stabile Silanschichten zustande und ist stark von den Spülschritten vor einem Analysenlauf abhängig. Nach ca. drei Messungen musste die Kapillare wieder silanisiert werden, da sich die Silanschicht ablöste. Da die Kapillare öfter verstopfte, wurden die Messungen nicht mit der gleichen Kapillare durchgeführt. Es konnten deswegen nur Dreifachmessungen durchgeführt werden, allerdings für jede einzelne Phenolprobe. Bei Wiederholung auf einer neuen Kapillare ergab sich prinzipiell das gleiche Bild. Wie in Kapitel 2.5.1 erwähnt wurde, soll die Polycarbonatkapillare manuell zur Messelektrode positioniert werden. Die exakte Positionierung zwischen Kapillarende und Elektrode war schwierig, so dass sich die Abstandstoleranzen direkt auf die Signalstärke und somit auf die Reproduzierbarkeit des Analysensignals auswirkten. Da die verwendeten Chips Prototypen waren und zwischen den einzelnen Kapillaren relativ große Schwankungen bezüglich der Positionierung der Kapillare auftraten, wäre dies ein Grund für die größeren Standardabweichungen.

4.4.2.4 Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol)

Pyrogallol war auch sehr gut zu detektieren. Mit einer Kapillare, die mit Natriumsilikatlösung modifiziert wurde, wurde bei einer 10 mM Pyrogallol-Lösung einen Stromanstieg von 50 nA nach 274 s beobachtet. Im Vergleich zu Hydrochinon wanderte Pyrogallol um etwa 80 s langsamer in Richtung Kathode, was durch die zusätzliche phenolische Funktion erklärt werden kann. Die mit TMS behandelte Kapillare zeigte ähnliche messbare Ströme bei einer 10 mM Konzentration. Dabei stieg aber die Migrationszeit bei ca. 540 s, fast doppelt so lang wie bei einer mit Natriumsilikatlösung modifizierten Kapillare. Während eine 10 mM Pyrogallol-Lösung einen Strom von 70 nA verursachte, zeigte eine Erhöhung der Konzentration auf 15 mM einen Stromanstieg auf 110 nA (Abb.3-71). Das Elektropherogramm zeigte eine deutlich stärkere Schwankung des messbaren Stroms. Eine

mögliche Erklärung für die höheren Standardabweichungen wäre, dass Adsorptionsprozesse an der Kapillarwand stattfinden.
Die kleinsten Detektionszeiten wurden bei einer mit GOPTS modifizierten Kapillare beobachtet. Bei der amperometrischen Detektion von Pyrogallol wurden für verschiedene Konzentrationen nur kleine Unterschiede in den ermittelten Migrationszeiten beobachtet. Ebenso für Pyrogallol (10 mM) konnte nach 256 s einen Strom von 14 nA gemessen werden. Eine Wiederholung der Messung für eine 10 mM Lösung führte zu einer Erhöhung des Signals auf max. 28 nA. Erwartungsgemäß nahm der Strom mit zunehmender Pyrogallol-Konzentration zu. Eine Verdoppelung der Pyrogallol-Konzentration führte aber zu einer 200%igen Zunahme der Signalhöhe. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die amperometrische Messung mit den niedrigeren Konzentrationen begonnen wurde, wobei Adsorptionsvorgänge an die Kapillarwandung auftraten und somit eine geringere Signalhöhe erklärbar machen.

4.4.2.5 Gallussäure (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure)

Gallussäure ist der Trivialname für 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure, einer aromatischen Hydroxycarbonsäure. Die amperometrischen Elektropherogramme für Gallussäure waren durch einen plateauähnlichen Verlauf gezeichnet. Wie erwartet, wurden höhere Migrationszeiten bei der amperometrischen Detektion von Gallussäure im Vergleich zu Pyrogallol festgestellt. Die Begründung ist, dass Gallussäure eine zusätzliche Carboxyl-Gruppe am Phenolring besitzt und damit eine geringere Mobilität zur Kathode aufweist. Gallussäure ist als Molekül negativ geladen und wandert im elektrischen Feld relativ langsam, da sie vom elektroosmotischen Fluss zur Kathode hinbewegt wird (siehe Kap. 1.1). Der elektroosmotische Fluss ermöglicht zwar die Detektion von Anionen an der Kathode, nur in diesem Fall wandern die Anionen mit einer längeren Migrationszeit.
Bei einer mit Natriumsilikatlösung modifizierten Kapillare wurde im Bereich von 20 mM bis 40 mM eine lineare Regression des Detektorsignals zur Konzentration festgestellt (Abb.3-65). Auffällig war bei diesen Versuchen der große Unterschied in der Mobilität von Gallussäure bei einer 30 mM (408 s) und 40 mM Lösung (421 s). Vermutlich wurde ein Teil der konzentrierten Gallussäure-Lösung an der Kapillarwand reversibel adsorbiert. Durch Adsorption an der Kapillaroberfläche wird die Menge detektierbarer Proben verkleinert und führt dementsprechend zu unregelmäßigen Migrationszeiten. Eine Adsorption der Probe kann auch eine Beeinträchtigung des elektroosmotischen Flusses verursachen, die zu einer Verringerung des Zeta-Potentials führen kann.

Eine Erhöhung der Gallussäure-Konzentration in einer mit GOPTS modifizierten Kapillare zeigte mehr als ein doppelt so großes Detektorsignal. Wie oben erwähnt wäre ein Grund dafür, dass die Messung mit den niedrigeren Konzentrationen begonnen wurde, was mit möglichen Adsorptionsvorgängen verbunden war und damit ein niedrigeres Detektorsignal bewirkte.

Vergleicht man die Ergebnisse der Tabellen 3-2 und 3-4, ergeben sich deutliche Unterschiede in der Höhe des Signals. Bei einer mit Natriumsilikatlösung behandelten Kapillare und bei einer Konzentration von 30 mM (Abb**.** 4-9 b) wird ein Stromanstieg von 100 nA gemessen, während bei einer mit GOPTS modifizierten Kapillare der Stromanstieg nur 60 nA betrug (Abb.4-9 a).

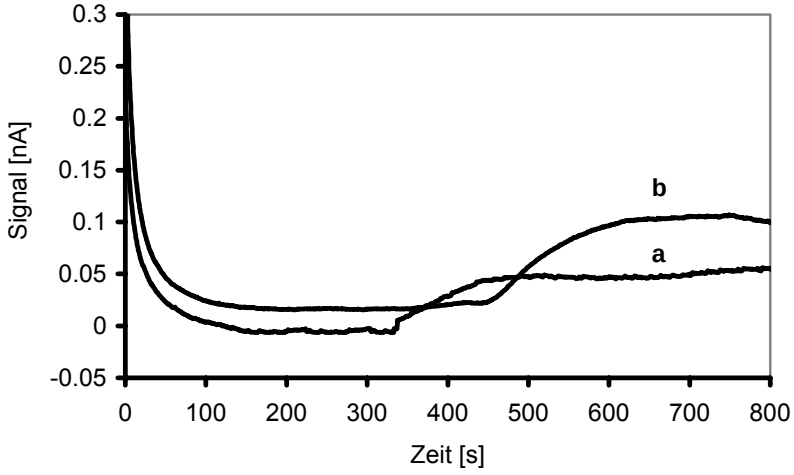


Abb.4-9 Stromverlauf bei der amperometrischen Detektion von Gallussäure (30 mM) auf einer Kapillare, die mit Silan modifiziert wurde: a-mit GOPTS; b-mit Natriumsilikat.

Vergleichende Daten zu Migrationszeiten der Polyphenolen auf einem Polycarbonat-Chip liegen leider nicht vor.

4.4.3 Trennung von Polyphenolmischungen

Nachdem im vorherigen Kapitel grundlegende Untersuchungen zur amperometrischen Detektion im Vordergrund standen, soll in diesem Kapitel die kapillarelektrophoretische Separation zweier chemisch verwandter Verbindungen in den Polycarbonat-Kapillaren untersucht werden. Es wurde zuerst versucht, Mischungen aus zwei Phenolen auf Grund ihrer

Migrationszeiten zu trennen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer der gleiche Stromverlauf beim Detektorsignal für die einzelnen Phenole beobachtet. Konstruktionsbedingt ist bei einer Mischung von mehreren Phenolen mit einem treppenförmigen Sensogramm zu rechnen.
Eine Trennung von Dopamin und Pyrogallol mit einer Kapillare, die mit Natriumsilikat-Lösung modifiziert wurde, war nicht erfolgreich (Abb.3-80). Es sollte bei der Zugabe des Polyphenolgemisches ein treppenförmiges Sensogramm entstehen. In diesem Fall wurde nach 242 s eine Stromzunahme von 65 nA beobachtet, ein Wert, der nur mit der Migrationszeit von Dopamin übereinstimmt. Bei Dopamin, das positiv geladen ist, ist die Mobilität größer als bei einem schwach negativ geladenem Molekül. Da Dopamin eine Aminogruppe enthält, wird es schneller als Pyrogallol an die Kathode detektiert.
In einem anderen Versuch, in dem die Kapillare mit GOPTS behandelt wurde, führte ein Gemisch aus Dopamin und Pyrogallol zu einem anderen Ergebnis (Abb.3-85). Eine Migrationszeit von 370 s entspricht einem größeren Molekül mit mehr negativen Ladungen. Pyrogallol wird unter Bildung eines Chinons oxidiert, das weiter mit Aminoverbindungen Kondensationsreaktionen eingehen könnte. Es bildet sich möglicherweise Makromoleküle, die langsamer zur Arbeitselektrode wandern und detektiert werden.
Bei der amperometrischen Detektion von Pyrogallol und Gallussäure auf einer mit GOPTS modifizierten Kapillare war eine Trennung nicht möglich (Abb.3-84). Die Detektionszeit von 284 s stimmt mit der Migrationszeit von Gallussäure überein. Aufgrund der relativ geringen Differenz zwischen Migrationszeiten beider Phenole treten wahrscheinlich Überlagerungseffekte auf. Vermutlich wird sowohl Gallussäure als auch Pyrogallol fast gleichzeitig an der Arbeitselektrode detektiert. Eine andere Erklärung wäre, dass eine Oxidation des Pyrogallols zu Chinonen führt, oder eine Polymerisation des Phenols stattfindet (Abb.5-6). Daher entstehen höhermolekulare Verbindungen, die sehr langsam in Richtung Kathode wandern, so dass nur Gallussäure detektiert werden konnte. Eine Änderung der Konzentration führte zu keiner Besserung der Trenneffizienz. Eine Trennung von beiden Phenolen auf eine Kapillare, die mit Natriumsilikat-Lösung modifiziert wurde, war nicht möglich (Abb.3-82 und 3-83). Das Gemisch führte möglicherweise zur Bildung von den großen Reaktionsprodukten, die nach 388 s eine Zunahme des Stroms auf 270 nA bewirkten. Das Molekül (Abb.4-10) könnte eine Polyhydroxybenzoesäure, z.B. m-Galloylgallussäure, sein.

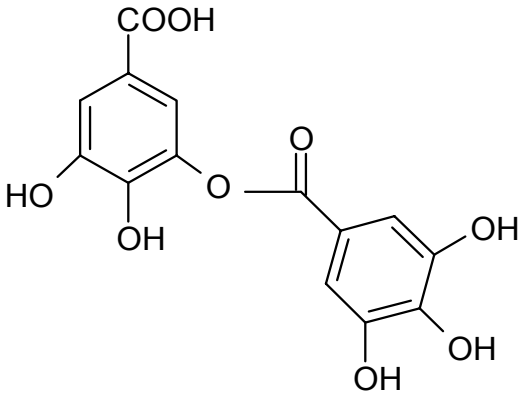


Abb.4-10 Struktur von m-Galloylgallussäure

Ein Austauschen von Pyrogallol mit Dopamin führte ebenfalls zu keiner Trennung der beiden Phenole. Es wurde nach 257 s ein einziger Stromanstieg beobachtet (Abb.3-81). Die Migrationszeit entspricht einer Detektion von Dopamin, nur in diesem Fall stieg der Detektorstrom um 25% im Vergleich zu einzelnen Versuchsreihen mit Reinsubstanzen. Dopamin, ein positiv geladenes Molekül, wandert schneller in Richtung Kathode als Gallussäure und wird dort detektiert. Auffallend bei diesen Messungen waren die größeren Schwankungen des Stromsignals. Vermutlich waren unterschiedliche pH-Werte und Ionenstärke zwischen Proben- und Kapillarpuffer die Ursache.

Die mittels GOPTS funktionalisierten Kapillaroberflächen zeigten weiter besonders gute Eigenschaften und erwiesen sich für die Trennung von Phenolen geeignet. In nur wenigen Minuten gelang die Trennung und der amperometrische Nachweis des Neurotransmiters Dopamin und Gallussäure.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten wurde die Messung einige male wiederholt. Eine Lösung mit 10 mM Dopamin und 40 mM Gallussäure wurde unter dem Einfluss des elektrischen Feldes (500 V) getrennt und amperometrisch an einer Pt-Elektrode detektiert. Die Standardabweichung der Migrationszeiten für Dopamin wurde mit 172 ± 5,3 s und für Gallussäure mit 286 ± 7,2 s bestimmt.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen Modifikationen der Kapillaroberfläche einen deutlichen Einfluss auf den elektroosmotischen Fluss haben.

Auf Grund der oben genannten Ergebnisse wurde weiter versucht, ein Gemisch aus drei Phenolen zu trennen. Als Phenole wurden Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure ausgewählt.

Statt eines stufenförmigen Sensogramms erschien in diesem Versuch nach 407 s ein einziger Stromanstieg von 150 nA (Abb. 3-87). Wie schon erwähnt, finden wahrscheinlich zwischen Phenolen Reaktionen statt, die zur Bildung größerer Verbindungen führen [Bollag et. al 1998]. Die im Vergleich zur Ausgangssubstanzen relativ lange Detektionszeit von 407 s kann

darauf hinweisen, dass es durch die Kombination mehrerer Phenolmoleküle zur Bildung von Kondensationsprodukten kommen könnte. Eine Änderung der Proben-Konzentration für die getesteten Phenolen ermöglicht keine Trennung der Komponenten.

Die mit GOPTS funktionalisierte Kapillare hat sich als am besten geeignet erwiesen, da kleinere Detektionszeiten und die Trennung von Phenolen möglich waren. Außerdem war die silanisierte Kapillaroberfläche stabiler als die anderen, die mit Natriumsilikat-Lösung oder Trimethylsylil-methanol behandelt wurden.

Die dargestellten Ergebnisse an Polyphenolen konnten zeigen, dass sich diese mit der amperometrischen Detektion auf Grund ihrer unterschiedlichen Migrationszeiten identifizieren und möglicherweise trennen lassen.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die angewandte Analysenmethode trotz der erwähnten Nachteile zu eindeutigen Ergebnissen geführt hat.

5. Zusammenfassung

Mikrofluidische Systeme finden in den “Life Sciences“ ein sich rasant entwickelndes Anwendungsfeld. Sie werden als miniaturisierte biochemische Analysesysteme (μ-TAS, Miniaturized Total Analysis System) eingesetzt. Unter dem Begriff “Life Sciences“ werden die Bereiche medizinische Diagnostik, Biotechnik, Gentechnik sowie Lebensmittel- und Umwelttechnik zusammengefasst. Der Nutzen der Miniaturisierung liegt in der Kostenreduktion durch Verringerung von Probenvolumen und Reagenzienverbrauch.

Bei den mikrofluidischen Systemen steht der Transport sehr kleiner Flüssigkeitsmengen in einem Kanalsystem im Fokus der Forschungsaktivitäten. So wird z.B. bei der Kapillarelektrophorese die zu analysierende Probe in einer dünnen Kapillare (Durchmesser im Bereich zwischen 20 und 100 μm) unter Einfluss eines elektrischen Feldes in ihre verschiedenen Komponenten aufgetrennt. Mit derartigen Systemen können Lebensmittel untersucht oder DNA-Analysen durchgeführt werden. Mit den DNA-Chips kann man vielen Proben gleichzeitig untersuchen und das bei geringem Material- und Arbeitsaufwand. Da viele Chips als Wegwerfartikel konzipiert sind, ist die Verwendung von allzu aufwendigen Materialien nicht ökonomisch. Kunststoff eignet sich besonders aufgrund der Vielfalt der Substrate und Materialeigenschaften sowie der niedrigen Kosten für die Herstellung von Einweg-Mikrofluidikkomponenten. So war ein wesentliches Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines kapillarelektrophoretischen Trennsystems auf Basis eines Polycarbonat-Chips von Phenolen sowie deren elektrochemische Detektion.

Im ersten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Modifizierung der Oberflächeneigenschaften neuer kostengünstigen Trägermaterialien in Bezug auf deren Anwendung in miniaturisierten Trennsystemen. Deshalb war im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Oberflächen von größerer Bedeutung. Dabei wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt, von denen die wichtigste auf einer indirekten Charakterisierung immobilisierter Meerrettichperoxidase (HRP) basierte. Dieses Modellsystem zur Beschreibung der Funktionalisierung von Materialoberflächen auf die in einem späteren Entwicklungsschritt auch enzymatische Biosensoren aufgebaut werden sollen, begründet die Verwendung dieses Enzyms.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Materialien sollten eine effiziente Enzymimmobilisierung erlauben. Dazu mussten die Materialoberflächen modifiziert werden. Als Trägermaterialien wurden Polycarbonat, Polystyrol und LTCC- Keramik („Low Temperature Cofired Ceramic“) getestet. Eine sehr häufig eingesetzte Methode zur

Immobilisierung besteht in einer Aktivierung der Oberfläche und einer nachfolgenden Silanisierung. Um eine möglichst dauerhafte Funktionalisierung zu erzielen, die dann eine einfach zu handhabende Grundlage für weitere Derivatisierungsschritte darstellen, wurden die Oberflächen zunächst mit oxidierenden Agentien, UV-Strahlung oder mit verschiedenen Plasmen (Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff) vorbehandelt. Die Aminogruppen wurden über Silanchemie eingebracht. Die Immobilisierung der HRP an die Trägeroberfläche erfolgte über verschiedenen Methoden, wie z.B. Immobilisierung über Glutardialdehyd (GDA), N-Hydroxysuccinimid (NHS) oder mittels Natriumperiodat (Oxidation der Zuckerseitenkette des Enzyms). Die enzymatische Aktivität der immobilisierten HRP wurde photometrisch bestimmt.

Mit diesen Methoden konnte das Enzym bei den unterschiedlichen Trägeroberflächen kovalent gekoppelt werden. Durch Berücksichtigung von Reinigungsschritten und chemischer Modifizierungsreaktionen konnten Unterschiede bei den verwendeten Trägermaterialien beobachtet werden. Im Falle der Immobilisierung von oxidiertem Enzym mittels der Natriumperiodat-Methode war der Verlust an aktivem gebundenem Enzym über einen längeren Zeitraum am Geringsten.

Bei Verwendung von 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS) wird eine signifikante Abhängigkeit des gebundenen Enzyms von der Konzentration des Silans erhalten. Die optimale APTS-Konzentration lag bei 0,5%. Die Untersuchung verwendeter Immobilisierungsmethoden zeigte, dass HRP am effektivsten über mit Plasma behandelte Polycarbonatoberfläche gekoppelt werden konnte. Mit der Plasmabehandlung wurden sauerstoff- oder stickstoffhaltigen Funktionen auf die Polymeroberfläche erzeugt, die weiter für die kovalente Immobilisierung des Enzyms benutzt werden konnten. Eine gute Langzeitstabilität des Enzyms von bis zu 8 Monaten wurde bei der Verwendung einer mit Kohlenstoff und Stickstoff behandelte Polycarbonatoberfläche erreicht.

Während im ersten Teil der Arbeit die Charakterisierung unterschiedlichen Trägermaterialien im Mittelpunkt stand, wurde mit der Methodenweiterentwicklung im zweiten Teil der Arbeit die grundlegende Problemstellung eines mikrofluidischem Systems bearbeitet, die eine Detektion und Trennung von Polyphenolen ermöglicht. Die Funktionalitäten von Mikrofluidiksystemen setzen definierte Benetzungseigenschaften ihrer Komponenten voraus. So muss die Kapillare eine hydrophile Oberfläche aufweisen. Durch eine Oberflächenfunktionalisierung z.B. durch Silane entsteht eine negativ geladene Kapillaroberfläche. Als Silane wurden Natriumsilikat-, Trimethylsylilmethanol- und Glycidoxypropyltrimethoxysilan-Lösung verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit

wurde ein mikrofluidisches System verwendet, in dem ausschließlich elektroosmotische Effekte zum Flüssigkeitstransport ausgenutzt wurden. Im Gegensatz zu anderen Forschungsarbeiten wurden Kapillarelektrophorese-Chips mit einer einfacheren Modell-Kapillare verwendet, jedoch ohne integrierte Detektionselektroden. Um die Funktionalität der Chips testen zu können, sollte zuerst ein mikrofluidischer Messplatz aufgebaut werden. Hauptziel unserer Untersuchungen zu den Phenolen bestanden darin, einen elektroosmotischen Fluss (EOF) zu erzeugen und dann die Phenole mittels Kapillarelektrophorese zu trennen und zu detektieren.

Die verwendete amperometrische Detektion stellt im Vergleich zu anderen Verfahren eine empfindliche Methode für die direkte Detektion von Phenolen dar. Mit dem Modell eines miniaturisierten Verfahrens zum Nachwies von Phenolen durch amperometrischen Messungen steht ein modernes Prinzip zur Verfügung, das den Nachweis von Polyphenolen im mM-Bereich ermöglicht. Fernerhin ist von Vorteil, dass eine große Zahl gleichartiger Untersuchungen in möglichst kurzer Zeit durchgeführt werden kann. Hier besteht auch die Möglichkeit, das erforderliche Probenvolumen zu reduzieren. Eine Realisierung von mobilen Geräten für den Pharma-, Umwelt- und Lebensmittelbereich erscheint möglich.

Einige Modellsysteme mit integrierter amperometrischer Detektion für den Nachweis von Phenolen konnten entwickelt werden. Zur elektrophoretischen Trennung wurden Polycarbonat-Kapillaren (effektive Länge: 50 mm, 50 µm Innendurchmesser) von der Firma Bartels Mikrotechnik, Dortmund eingesetzt. Für die Untersuchung dieses Verfahrens wurden folgenden Phenolen ausgewählt: Hydrochinon, Resorcin, Dopamin, Pyrogallol und Gallussäure.

Eine wesentliche Schwierigkeit ist die Befüllung der Kapillare. Fernerhin ist es für reproduzierbares Arbeiten wichtig, die Hochspannung konstant zu halten. Außerdem muss die Reproduzierbarkeit der Probeninjektion gewährleistet sein.

Die Nachweisgrenze für die elektrochemische Detektion in Verbindung mit der Kapillarelektrophorese lag im unteren mM-Bereich. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Phenole mittels Kapillarelektrophorese getrennt und auf einem Polycarbonat-Chip detektiert werden konnten. Die Modifizierung der Polycarbonatkapillare mit Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) führte zur gewünschten Erhöhung der Hydrophilie der Kapillarwandung und dementsprechend zur Verbesserung des Messsignals und zu einer Verkürzung der Migrationszeit der Probe. Mit dieser Beschichtung gelang es, die unerwünschten Adsorptionen der Probe an der Kapillaroberfläche zu reduzieren und reproduzierbare Migrationszeiten zu ermöglichen. Die deutlich gesteigerte Reproduzierbarkeit

für die Migrazionszeiten bei der mit GOPTS modifizierten Kapillare gegenüber den anderen Beschichtungsvarianten könnte auch in der exakteren Positionierung der Messelektrode zum Kapillarausgang liegen. Die anderen getesteten Methoden zur Kapillarsilanisierung, wie mit Natriumsilikat- und Trimethylsylilmethanol-Lösung, brachten weniger gute Ergebnisse.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Gemische aus zwei Polyphenolen auf Grund ihrer Migrationszeit mittels Kapillarelektrophorese auf einem Polycarbonat-Chip getrennt werden konnten. Somit erscheint es möglich, Kapillarelektrophorese-Chips aus Polycarbonat mit integrierter elektrochemischer Detektion auch für den Routineeinsatz herzustellen.

Durch die durchgeführten Untersuchungen zur Trennung und Detektion von Phenolen konnten die Ziele der Arbeit weitgehend erreicht werden, jedoch muss der elektrochemische Detektor noch verbessert werden. Insgesamt verdeutlichen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente das große Potential von miniaturisierten Trennverfahren. Mit den durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass die Kapillarelektrophorese in der industriellen Forschung, Entwicklung und Analytik ihre Anwendung finden könnte. Die zunehmende Zahl an Veröffentlichungen weist auf das wachsende Interesse an einer derartigen Miniaturisierung hin.

6. Literaturverzeichnis

Affymetrix, Santa Clara: www.molecularlab.it/images/varie/dna_chip150x145.jpg

Araki, T., Tanaka, N., Hinokimori, T., Hotta, K., Tateishi, K. "Non-classical urea polymers, Part XIV, Some new properties of Cu(II) ion encircled by bis-branched oligomeric urea ligand: properties associated with catalysis for oxidative coupling of phenols" *Journal of Molecular Catalysis* **75**, 21-40 (1992)

Bächmann, K. "Grenzen und Möglichkeiten der KE" *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* **46**, 77-329 (1995)

Becker, H., Gärtner, C. "Mikrosystemtechnik in den Life Sciences" *Physikalische Blätter* **55**, 51-53 (1999)

Becker, H., Locascio, L. "Polymeric microfluidic devices", Talanta **56**, 267-287 (2002)

Becker, H., Gärtner, C. "Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications" *Electrophoresis* **21**, 12-26 (2000)

Bollag, J, Dec, J., Huang, P.M. "Formation mechanism of complex organic structures in soil habitats" *Advances in Agronomy* **63**, 337-266 (1998)

Bos, E.S., van der Doelen, A.A., van Rooy, N. und Schuurs, A.H.W.M. "3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as an Ames test negative chromogen for horseradish peroxidase in enzyme-immunoassay" *Journal of Immunoassay* **2**, 187-204 (1981)

Cammann, K. "Instrumentelle Analytische Chemie" *Spektrum Akademischer Verlag*, *Heidelberg* (2001)

Carraway, K.L., Koshland Jr., D.E. "Carbodiimide Modification of proteins" *Methods Enzym* **25**, 616 (1972)

Chang, S.I., Hammes, G.G. “Interaction of spin labelled nicotinamide adenine dinucleotide phosphate with chicken liver fatty acid synthase” *Biochemistry* **25**, 4661 (1986)

Dong, Y. ”Capillaryelectrophoresis in food analysis”, *Trends in Food Science & Technology* **10**, 87-93 (1999)

Dreosti, I.E. “Bioactive ingredients: Antioxidants and Polyphenols in tea” *Nutrition Reviews* **54**, 51-58 (1996)

Dunnivant, F.M., Schwarzenbach, R.P. “Reduction of substituted nitrobenzenes in aqueous solutions containing natural organic matter” *Environmental Science & Technology* **26**, 2133-2141 (1992)

Effenhauser, C.S., Manz, A. and Widmer, H.M. ”Glas Chips for High-Speed Capillary Electrophoresis Separation with Submicrometer Plate Heights” *Analytical Chemistry* **65**, 2637-2642 (1993)

Enescu, C., Shoichet, M., Molly, S. “Controlling modulus and morphology of hydrogel tubes through surface modification” *Journal of Biomaterials Science* **15**, 215-227 (2004)

Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T. ”Kapillarelektrophorese” *Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden* (1994)

Fagain,C.O. “Immobilization, Stabilizing Protein Function“ *Springer-Verlag Berlin and Heidelberg* (1997)

Foster, T., Elliot, A.J., Adeleke, B.B., Wan, J.K.S.”An electron spin resonance and CIDEP study of the photoreduction of tert-butyl-p-benzoquinones” *Canadian Journal of Chemistry* **56**, 869 (1977)

Friedrich, J.F., Geng, S., Unger, W., Lippitz, A., Erdmann, J., Gorsler, H.V., Woell, C., Schertel, A., Bierbaum, K. “Plasma functionalization and reorientation of macromolecules at polymer surfaces” *Surfaces and Coatings Techn.* **74-75**, 664-669 (1995)

Friedrich, J., Loeschkle, I., Gähde, J. "Untersuchungen zur Plasmaätzung von Polymeren " *Acta Polymerica* **32**, 337-343 (1981)

Gebauer, P. and Bocek, P. "Recent progress in capillary isotachophoresis", *Electrophoresis* **23**, 3858-3864 (2002)

Goldberg, L.I. "Cardiovascular and renal actions of dopamine potential clinical applications" *Pharmacological Reviews* **24**, 1-23 (1972)

Gründler, P. "Chemische Sensoren: eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingeniuere" *Springer Verlag Berlin* (2004)

Hall, E.A.H. "Biosensoren" *Springer-Verlag Berlin und Heidelberg* (1995)

Hallberg, L., Hulthen, L. "Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron" *American Journal of Clinical Nutrition* **71**, 147-1160 (2000)

Halliwell, C., Cass, A. "A factorial analysis of silanisation for the immobilisation of oligonucleotides on glass surfaces" *Analytical Chemistry* **73,** 2476-2483 (2001)

Hanckock, P.,Dean, J.R. "Extraction and fate of phenols in soil" *Analytical Communications* 34, 377-379 (1997)

Harborne, J., Gould**,** H.J.,Cowling, G.J. "An examination of models for chromatin transcription" *Nucleic Acids* **8**, 5255-5266 (1980)

Harris, J.M. "Synthesis of polyethylene glycol derivates" *Macromolecular Chemistry and Physics* **25**, 325-373 (1985)

Harrison, D.J., Manz, A., Fan, Z., Luedi, H., Widmer, H.M. "Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip" *Analytical Chemistry* **64**, 1926-1932 (1992)

Hartmeier, W. “Immobilisierte Biokatalysatoren“ *Springer-Verlag Berlin* (1986)

Hauser, P., Kappes, T. “Electrochemical detection methods in capillary electrophoresis and application to inorganic species” *Journal of Chromatography* **834**, 89-101 (1999)

Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. “Spektroskopische Methoden in der organische Chemie“, 5. Auflage, *Georg Thieme Verlag Stuttgart* (1995)

Hjerten, S. „High Performance Electrophoresis“ *Journal of Chromatography* **347,** 191-198 (1985)

Hofer P., Fringeli U.P. “Structural Investigation of Biological Material in Aqueous Environment by Means of Infrared-ATR Spectroscopy” *European Journal of Biological Physics* **6**, 67-80 (1979)

Huang, X., Zare, R.N., Sloss, S., Ewing, A.G. “End-Column Detection for Capillary Zone Electrophoresis” *Analytical Chemistry* **63**, 189-192 (1991)

Jones, G.L., Edmunson, H.M., Spencer, L., Gale, J., Saul, A. “The use of maleinimidocaproyloxysucinimide to prepare malarial peptide carrier immunogens” *Journal of Immunological Methods* **123**, 211-216 (1989)

Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. ”Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries“*Analytical Chemistry* **53**, 1298-302 (1981)

Josephy, P.D., Eling, T. und Mason, R.P. “The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3’,5’-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates” *Journal of Biological Chemistry* **257**, 3669-3675 (1982)

Kennedy, J.F., Melo, E.H.M. “Immobilized enzymes and cells” *Chemical Engineering Progress* **86**, 81-89 (1990)

Keusgen, M. “Biosensors: new approaches in drug discovery” *Naturwissenschaften* **89**, 433-444 (2002)

Kirby, B.J. and Hasselbrink, E.F. ”Zeta potential of microfluidic substrates: 1.Theory, experimental techniques and effects on separation” *Electrophoresis* **25**, 187-202 (2004)

Koch, R. “Umweltchemikalien: physikalisch-chemische Daten, Toxizität, Grenz- und Richtwerte“ *VCH Verlagsgesellschaft Weinheim* (1995)

Kroll, J., Rawel, H.M., Rohn, S. “Enzyme activity of alpha-chymotrypsin after derivatization with phenolic compounds“ *Nahrung* **47**, 325-329, (2003)

Kuhn, R., Steinmetz, C., Berenter, T., Haas, P. “Enantiomeric separations in capillary zone electrophoresis using a chiral crown ethere“ *Journal of Chromatography* **666**, 367-373 (1994)

Künzelmann, U., Böttcher, H., "Biosensor Properties of Glucose Oxidase Immobilized within $Si0_2$ Gels" *Sensors Actuators* **38-39**, 222-228 (1997)

Kurzer, F., Douraghi-Zadeh, K. “Advances in the chemistry of carbodiimides” *Chemical Reviews* **67**, 107 (1967)

Liliput-Chip: www.vdi.de/vdi/organisation/schnellauswahl/fgkf/k/04756/index.php

Lippard, Stephen J., Berg, Jeremy M. “Bioanorganische Chemie“ *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg* (1995)

Liu, Y. “Microfabricated Polycarbonate CE Devices for DNA Analysis” *Analytical Chemistry* **73**, 4196-4201 (2001)

Lucy, C.A., Underhill, R.S. “Characterization of the cationic surfactant induced reversal of electroosmotic flow in capillary electrophoresis” *Analytical Chemistry* **68**,300-305 (1998)

Maehly, A. “Plant peroxidase” *Methods in Enzymology* **2**, Academic Press, New York, 807 (1955)

Martin, R.S., Ratzlaff, K.L., Huynh, B.H., Lunte, S.M. "In-Channel Electrochemical Detection for Microchip Capillary Electrophoresis Using an Electrically Isolated Potentiostat" *Analytical Chemistry* **74**, 1136-1143 (2002)

Matysik, F. „Improved end column amperometric detection for capillary electrophoresis" *Journal of Chromatography* **742**, 229-234 (1996)

Meißner, T. "Isotachophorese, Zonenelektrophorese: Grundlage und Anwendungs-möglichkeiten" *J&M Analytische Mess- und Regeltechnik* (2002)
Internetdokument:http://www.j-m.de/downloads/itpkompendium.pdf

Moran, J.F., Klucas, R.V., Grayer, R.J., Abian, J., Becana, M. "Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues prooxidant and antioxidant properties" *Free Radical Biology and Medicine* **2**, 861-870 (1997)

Mukhtar, H., Ahmad, N. "Tea Polyphenols: prevention of cancer and optimizing health" *Journal of Clinical Nutrition* **71**, 1698-1702 (2000)

Nanci, A., Wuest, J.D., Peru, L., Brunet, P., Sharma, V., Zalzal, S. und McKee, M.D. "Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules" *Journal of Biomedical Materials Research* **40**, 324-335 (1998)

Nazari, K., Mahmoudi, A., Khodafarin, R., Moosavi-Movahedi, A.A. and Mohebi, A. "Stabilizing and Suicide-Peroxide Protecting Effect of Ni^{2+} on Horseradish Peroxidase" *International Journal of Chemical Society* **2**, 232-237 (2005)

Ozawa, H. "Bridging reagent for protein. The reaction of Diisocyanates with lysine and enzyme proteins" *Journal of Biochemistry* **62**, 419 (1967)

Patramani, I., Katsivi, K., Pisteron, E., Kalogerakos, T., Pawlatos, M., Evangelopoulos, A.E. "Glutamic-aspartic transaminase-antitransaminase interaction" *Journal of Biochemistry* **11**, 28 (1969)

Privalov, P.L. "Stability of Proteins" *Advances in Protein Chemistry* **33**, 167-241 (1979)

Rawel, H., Kroll, J., Seidelmann, N. “Physicochemical properties and susceptibility to proteolytic digestion of mioglobin-phenol derivates“ *Food Chemistry* **48**, 1580-1587 (2000)

Righetti, P.G. “Preparative isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Theory, Methodology and Applications” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (1983)

Righetti, P.G. “Immobilized pH gradients: Theory and Methodology” *Elsevier, Amsterdam* (1990)

Roberts, M.A., Rossier, J.S., Bercier, P., Girault, H. “UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems” *Analytical Chemistry* **69**, 2035-2042 (1997)

Rye, R.R., Nelson, G.C., Dugger, M.T. “Mechanistic Aspects of Alkylchlorosilane Coupling Reactions” *Langmuir* **13,** 2965-2972 (1997)

Sadana, A. “Protein Adsorption and Inactivation of Surfaces. Influence and Heterogeneities”, *Chemical Reviews* **92**, 1799-1818 (1992)

Schütz, A.J., Winklmair, M., Weller M.G. and Niessner „Stabilization of horseradish peroxidase (HRP) fort he use in immunochemical sensors” *SPIE Proc.,*332-340 (1997)

Silberzahn, P., Leger, L., Ausserre, D. Benatter, J.J. “Silanation of silica surfaces, a new method of constructing pure or mixed monolayers“ *Langmuir* **7**, 1647-1651 (1991)

Soyez, H., Schacht, E., Vanderkerken, S. “The crucial role of spacer groups in macromolecular prodrug design” *Advanced Drug Delivery Reviews* **21**, 81-106 (1996)

Srere, P.A., Uyeda, K. “Functional groups of Enzymes suitable for Binding to Matrices” *Methods in Enzymology* **44**, 11-19 (1976)

Stevenson, F.J. “Humus Chemistry: genesis, composition, reactions” *Toronto, Singapore* (1994)

Strege, M., Lagu, A. “Separation of DNA Restriction Fragments by Capillary Electrophoresis Using Coated Fused Silica Capillaries“ *Analytical Chemistry* **63**, 1233-1236 (1991)

Suri, C.R., Mishra, G.C. “Activating Piezoelectric Crystal Surface by Silanization for Microgravimetric Immunobiosensor Application” *Biosensors and Bioelectronics* **11**, 1199-1205 (1996)

Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, A.“Elektrokinetik separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries“ *Analytical Chemistry* **56**, 111-113 (1984)

Voegel, P., Baldwin, R.P. “Electrochemical detection in capillary electrophoresis” *Electrophoresis* **18**, 2267-2278 (2005)

Wallenborg, S., Markides, K., Nyholm, L. “A microelectrochemical detector for use at low linear velocities in capillary column systems*” Analytica Chimica Acta* **344**, 77-85 (1997)

Wang, T.S.C., Huang, P.M. “Catalytic polymerisation of hydrochinone by nontronite” *Canadian Journal of Soil Science* **67**, 867-875 (1987)

Wang, J. “Electrochemical detection for microscale analytical systems” *Talanta* **56**, 223-231 (2002)

Welinder, K.G. “Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7)” *FEBS Lett* **72**, 19-23 (1976)

Winter, R., Noll, F. “Methoden der Biophysikalischen Chemie“ *B.G. Teubner Stuttgart* (1998)

Wittemann, A., Haupt, B., Guo, X., Ballauff, M. “Fixation of proteins onto the surface of functionalized polymer particles“ DECHEMA Monigraphien 137, *VCH Verlag GmbH Weinheim* (2001)

Wollenberger, U., Mak, K.K., Renneberg, R.“An amperometric bi-enzyme sensor for determination of formate using cofactor regeneration” *Biosens Bioelectron* **18**, 1095-1100 (2003)

Xue, Y., Yeung, E.S. “Characterization of Band Broadening in Capillary Electrophoresis due to Nonuniform Capillary Geometries” *Analytical Chemistry* **64**, 3575-3580 (1994)

Zaborsky, O.R. “Immobilized Enzymes-Miscellanous Methods and general Classification” *Methods in Enzymology* **44**, 317-332 (1976)

Zaitsu, K., Ohnishi, M., Nanami, M., Ohkura, Y. “Evaluation of the numbers of functional groups introduced into horseradish peroxidase in reaction with four heterobifunctional reagents” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **40**, 2205-2207 (1992)

Zalypsky, S., Barany, G. “Synthesis of an End-Group Functionalized Polyethylene” *Bioconjugate Chemistry* **4**, 296-297 (1993)

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name:	Georgeta Vornicescu (geb. Costea)
Geboren:	am 26. August 1968 in Traian (RO)
Staatsangehörigkeit	rumänisch

Schulbildung:

1976-1983	Grundschule Alexandria (RO)
1983-1987	Lyzeum für Mathematik und Physik „Al.Ghica“ Alexandria (RO)

Studium:

1990-1995	Polytechnische Universität Bukarest-Fakultät für Chemie

Praktische Ausbildung als Chemieingenieurin:

1996-1997	Institut für Forschung von Elastomeren Bukarest (RO)
1997-2000	„SINTOFARM A.G.“ Bukarest (RO)

Promotionsstudium:

seit Dezember 2002	unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg