

N° d'ordre: 4305

THÈSE
en cotutelle
entre

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
et
L'UNIVERSITÉ DE LA SARRE

présentée à Saarbrücken / Allemagne

par Jennifer Lenz

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie-Physique

Structuration d'électrode contrôlée
pour des applications (bio)électrochimiques

Soutenue le 30 septembre 2011

Après avis de :

M. R. Hempelmann	Rapporteur
M. D. Schlettwein	Rapporteur
M. J.-P. Pereira-Ramos	Rapporteur

Devant la Commission d'examen formée de :

MM.	G. Jung	Professeur, Universität des Saarlandes, Président
	R. Hempelmann	Professeur, Universität des Saarlandes, Rapporteur
	D. Schlettwein	Professeur, Universität Gießen, Rapporteur
	J.-P. Pereira-Ramos	Professeur, Université de Paris Est, Rapporteur
	A. Walcarius	Professeur, Université de Nancy, Examineur
	A. Kuhn	Professeur, ENSCPB, Examineur
	P. Bopp	Professeur, Université de Bordeaux 1, Examineur
	G.-W. Kohring	Maitre de Conférence, Universität des Saarlandes, Examineur

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes ERUDESCP angefertigt, wobei eine bioelektrochemische Durchflusszelle für eine enantiomerenreine Bioelektrosynthese konzipiert wurde. Die durchgeführten Arbeiten beinhalten Zelldesign, Mediatorenscreening und Entwicklung verschiedener elektroorganischer und elektroenzymatischer Reaktionen in einer Batchzelle. Endziel war die Hochskalierung (bio)elektrochemischer Reaktionen in der Durchflusszelle. Die Synthese drei-dimensionaler makroporöser Elektroden wurde mittels der Langmuir-Blodgett-Technik und der kontrollierten Evaporierung mit anschließender Elektroabscheidung von Metallen und Metalloxiden durchgeführt. Die Elektroabscheidung erfolgte in die Zwischenräume des zuvor präparierten kolloidalen Kristalls aus monodispersen Polystyrolpartikeln, welche anschließend chemisch aufgelöst wurden. Die porösen Materialien besitzen eine sehr gute offenporige Interkonnektivität und eine deutlich vergrößerte aktive Oberfläche. Für die direkte NADH-Oxidation wurden poröse Rutheniumoxidelektroden mit signifikant verbesserter Überspannung entwickelt. Basierend auf dem ERUDESCP-Projekt wurde ein erneuerbares makroporöses Elektrodensystem aufgebaut. Des Weiteren wurden makroporöse Mikroelektroden aus Rutheniumoxid für pH-Messungen mit verbessertem thermischem Rauschen und makroporöse Mikroelektroden zur Anwendung als Implantat für die Handprothetik hergestellt. Außerdem wurden makroporöse Multikatalysatorschichten zur in-situ Wasserstofferzeugung mit simultan ablaufender Hydrierungsreaktion entwickelt. Als eine weitere kontrollierte Oberflächenstrukturierung wurden nanoskalige Platininseln mit anschließender Biofunktionalisierung hergestellt, die eine signifikante Verstärkung der Stromdichte zeigten.

Abstract

The present work has been prepared within the framework of the European project ERUDESCP and a bioelectrochemical flow-cell was designed for an enantiopure bioelectrosynthesis. Cell design, mediator screening and development of various electroorganic and electroenzymatic reactions in a batch-cell were performed. The ultimate goal was upscaling of (bio)electrochemical reactions in the flow-cell. The synthesis of three-dimensional macroporous electrodes was carried out by using the Langmuir-Blodgett technique and the controlled evaporation method with subsequent electrodeposition of metals and metal oxides. Electrodeposition was done into the interstices of the previously prepared colloidal crystal of monodisperse polystyrene particles followed by particle dissolution. The porous materials possess very good open porous interconnectivity and a significantly larger active surface area. Porous ruthenium oxide electrodes with significantly improved overvoltage for direct oxidation of NADH were developed. Based on the ERUDESCP project, a renewable macroporous electrode system was established. In addition, macroporous ruthenium oxide microelectrodes for pH measurements with improved thermal noise and macroporous microelectrodes for the application as implants in hand prosthesis were built. Furthermore, macroporous multicatalyst layers were developed for in-situ hydrogen generation with simultaneous hydrogenation reaction. As a further controlled surface patterning, nanoscale platinum islands with subsequent biofunctionalization were made, which showed a significant enhancement of current density.

Meinen Eltern

Resümee

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes ERUDESP angefertigt und beschreibt ausführlich dessen Forschungsverlauf, welcher der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegt. Es wurde ein Bioreaktor in Form einer bioelektrochemischen Durchflusszelle für eine enantiomerenreine Bioelektrosynthese konzipiert. Die Arbeit befasst sich sowohl mit dem Zelldesign und dem Screening verschiedener Mediatoren in Batch- und Mehrfachzellen, als auch mit dem Entwickeln verschiedener elektroorganischer und elektroenzymatischer Reaktionen in einer elektrochemischen Batch- bzw. Durchflusszelle. Die mit der Durchflusszelle verbundene Hochskalierung der elektrochemischen Reaktionen wurde in dieser Arbeit sowohl für elektroorganische als auch für elektroenzymatische Reaktionen im Hinblick auf die Endanwendung durchgeführt. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellt die Synthese von drei-dimensionalen, makroporösen Elektroden dar. Dadurch wurde die aktive Oberfläche signifikant erhöht. Für die Herstellung der porösen Template wurden monodisperse Polystyrolpartikel auf verschiedenen Wegen synthetisiert, die für die Herstellung kolloidaler Kristalle für den Templatprozess verwendet wurden. Zur kontrollierten Herstellung dieser Template wurden die Langmuir-Blodgett-Technik und die kontrollierte Evaporierungsmethode mit anschließender Elektroabscheidung von Metallen und Metalloxiden angewandt. Dabei war der Porendurchmesser der resultierenden makroporösen Materialien genau durch den Durchmesser der eingesetzten Partikel kontrollierbar. Eine Weiterentwicklung der Langmuir-Blodgett-Technik wurde dabei erarbeitet und optimiert. Zum ersten Mal wurde dieses Verfahren mittels Polystyrolpartikeln durchgeführt. Die Materialien zeigten eine sehr gute offenporige Interkonnektivität und eine stark vergrößerte aktive Oberfläche, was sich in der Signalverstärkung elektrochemisch zu erkennen gab und für die (Bio)elektrokatalyse von enormer Bedeutung ist. Die Abscheidung erfolgte in die Zwischenräume des zuvor präparierten kolloidalen Kristalls und im Anschluss wurden die Partikel aufgelöst. Des Weiteren wurden hochskalierte, poröse Elektroden hergestellt ($6 \times 6 \text{ cm}^2$). Die porösen Materialien sind sowohl in der (Bio)elektrosynthese als auch in der (Bio)elektroanalyse von großem Nutzen. In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen des ERUDESP-Projektes ebenfalls die Anwendung von porösem Rutheniumoxid für direkte NADH-Oxidation mit signifikant verbesserter Überspannung erarbeitet. Auch hier wurde die Methode der Oberflächenvergrößerung angewandt und dadurch eine verbesserte Stromdichte erreicht.

Aufbauend auf dem ERUDESP-Projekt wurden die erlernten Verfahren zur Herstellung poröser Elektroden mittels kolloidalen Kristallen für weitere Forschungsideen verwendet. Die methodische Weiterentwicklung der Langmuir-Blodgett-Technik wurde für den Aufbau eines erneuerbaren Elektrodensystems herangezogen. Bei diesem erneuerbaren System wurde durch Anlegen eines positiven Potentials die obere Elektrodenfläche auf Befehl erneuert (Klick-Effekt).

Da während des ERUDESP-Projektes poröse Rutheniumoxidelektroden reproduzierbar hergestellt wurden, ergab sich die Idee zur Miniaturisierung dieses porösen, stabilen Materials in Form von Mikroelektroden. Eine mögliche Anwendung als chemisch und mechanisch stabile pH-Sensoren mit einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Das thermische Rauschen wurde durch die Porosität der Elektrode gesenkt.

Dank dieses erworbenen Fachwissens in Bezug auf die Herstellung poröser Mikroelektroden wurden implantierbare Mikroelektroden für die Handprothetik mit einer makroporösen Schicht modifiziert, um die aktive Oberfläche zu vergrößern und die Übergangsimpedanz herabzusetzen.

Zusätzlich wurde während dieser Arbeit die Idee entwickelt, makroporöse Multikatalysatorschichten aus Platin und Nickel zu synthetisieren, um eine in-situ

Wasserstoffherzeugung und simultan ablaufende Hydrierungsreaktion in einem einzigen Katalysatorsystem durchzuführen.

Als Beispiel einer anderen Art von kontrollierter Oberflächenstrukturierung wurden auch nanoskalige Platininseln in der vorliegenden Arbeit ausführlich untersucht und biofunktionalisiert, was ebenso zu einer signifikanten Stromdichteverstärkung führte.

Summary

The present work has been prepared within the framework of the European project ERUDES and describes the research that has been carried out during this work. A bioreactor as a bioelectrochemical flow-cell was designed and realized with the goal to serve for enantiopure bioelectrosynthesis. The work deals with the cell design and screening of different mediators in a batch-cell and multi-cells, the development of different electroorganic and electroenzymatic reactions in an electrochemical batch- and flow-cell. With respect to the flow-cell, the upscaling of electrochemical reactions was carried out in the present work not only for electroorganic but also for electroenzymatic reactions with regard to the final application. A main focus of the present work represents the synthesis of three-dimensional macroporous electrodes in order to increase significantly the active surface. These macroporous structures were obtained by using the template approach. For the preparation of the templates monodisperse polystyrene particles were synthesized in different ways, and then used for the preparation of colloidal crystals serving as templates. As controlled assembly procedures, the Langmuir-Blodgett technique and the controlled evaporation method with subsequent electrodeposition of metals and metal oxides were chosen. With the present process the pore diameter could be exactly controlled by the diameter of the used particles. The approach of the Langmuir-Blodgett technique has been extended and optimized. For the first time, the Langmuir-Blodgett technique could be used with polystyrene particles. The deposition took place in the interspaces of the prepared colloidal crystals and is followed by the dissolving of the particles. Furthermore, the size of the porous electrodes could be upscaled ($6 \times 6 \text{ cm}^2$). The obtained materials showed a very good interconnectivity with an open porosity and a highly increased active surface, which led to an increased electrochemical signal. The prepared porous materials represent a great benefit not only for (bio)electrosynthesis but also in the field of (bio)electroanalysis. In the framework of this work, the use of porous ruthenium oxide electrodes for direct oxidation of NADH with a significantly improved overvoltage was studied. Also in this context the increase of the surface led to an improved current density. Based on the ERUDES project, the studied techniques for preparing porous electrodes with colloidal crystals were used for further scientific studies. The new variant of the Langmuir-Blodgett technique has also been used for the elaboration of a renewable electrode system where the surface can be simply renewed by applying a positive potential to the porous multilayers (click effect).

The porous ruthenium oxide electrodes have not only been studied with respect to the ERUDES project, but it was also possible to miniaturize this stable porous material as microelectrodes and use them as chemically and mechanically stable pH sensor with an improved signal to noise ratio. In this case the thermal noise decreased due to the porosity of the electrode.

Due to the acquired expertise in the field of the preparation of porous microelectrodes, implantable microelectrodes for hand prosthesis were modified with a porous layer on the surface for increasing the active surface and decreasing their impedance.

In addition, macroporous multilayers of platinum and nickel were synthesized for the simultaneous in-situ generation of hydrogen and hydrogenation reaction in the same catalyst system.

As a final example for controlled surface structuring, nanoscale platinum islands were in detail examined and biofunctionalized. This led also to a significant increase of the current density.

Résumé

Ce mémoire a été préparé dans le cadre du projet européen ERUDESC. Il décrit en détail les études qui ont été réalisées dans ce travail. Un bioréacteur sous forme d'une cellule bioélectrochimique à flux a été développé dans le but de servir pour la bioélectrosynthèse enantiopure. Le mémoire est consacré au design de cellules, screenings de différents médiateurs, au test de différentes réactions électroorganiques et électroenzymatiques à la fois dans une cellule électrochimique classique et dans une cellule électrochimique à flux. Un thème central de ce mémoire représente la synthèse d'électrodes macroporeuses tri-dimensionnelles. Grâce à cela, la surface active de l'électrode est augmentée de manière significative. Pour la préparation de ces électrodes une approche de template a été suivie. Des particules de polystyrène monodisperses ont été synthétisées de différentes manières et sont utilisées pour la synthèse des cristaux colloïdaux qui constituent les templates. Comme procédure de préparation contrôlée de ces templates, la technique de Langmuir-Blodgett et la méthode d'évaporation contrôlée, suivi par l'électrodéposition des métaux et des oxydes métalliques sont appliquées. Les diamètres des pores des matériaux macroporeux résultants sont parfaitement contrôlables par le diamètre des particules utilisées. La méthode de Langmuir-Blodgett a été étendue et appliquée pour la première fois à l'utilisation de particules de polystyrène. Le dépôt est réalisé dans les interstices des cristaux colloïdaux préparés préalablement, suivi par la dissolution des particules. De plus, des électrodes poreuses avec une grande surface de $6 \times 6 \text{ cm}^2$ ont été préparées. Les matériaux obtenus montrent une très bonne interconnectivité avec une porosité ouverte et une surface active fortement augmentée ce qui se traduit électrochimiquement en une augmentation significative de la puissance du signal. Les matériaux poreux représentent un bénéfice non-seulement pour la (bio)électrosynthèse mais aussi dans le cadre de la (bio)électroanalyse. Dans ce mémoire, d'électrodes poreuses d'oxyde de ruthénium pour l'oxydation direct de NADH avec une surtension significativement améliorée ont été élaborée. La méthode de l'agrandissement de la surface est également appliquée et une meilleure densité de courant a été obtenue.

Basé sur le projet ERUDESC, les méthodes apprises pour créer des électrodes poreuses à base de cristaux colloïdaux ont dans la suite aussi été appliquées à d'autres domaines d'investigation. L'évolution méthodique de la technique de Langmuir-Blodgett a été utilisée pour le développement d'un système d'électrode renouvelable. Dans ce système, la surface peut être renouvelée sur commande par application d'un potentiel fixe (effet click).

Les électrodes de l'oxyde de ruthénium ont non seulement été étudié dans le cadre du projet ERUDESC, mais la miniaturisation de ce matériau poreux et stable sous forme de microélectrodes a permis d'étudier une application comme capteur pH chimiquement et mécaniquement stable avec un meilleur ratio signal sur bruit. Dans ce cas le bruit thermique est diminué grâce à la porosité de l'électrode.

Grâce à la technicité acquise par rapport à la synthèse des microélectrodes poreuses, des microélectrodes implantables pour les prothèses de main ont été aussi modifiées avec une couche macroporeuse pour augmenter la surface active et diminuer l'impédance de transition. Nous avons également exploré des couches multicatalyseurs macroporeuses de platine et nickel pour effectuer la génération d'hydrogène in-situ et l'hydrogénation simultanée dans un seul système catalytique.

Comme dernière possibilité pour une structuration de surface contrôlée, des îlots de platine d'une étendue nanométrique furent examinées et biofonctionnalisées, ce qui résulte également en une augmentation significatif de la densité de courant.

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1: Einleitung.....	3
Kapitel 2: Theoretischer Hintergrund.....	6
2.1 Elektrochemie.....	6
2.1.1 Zyklische Voltammetrie.....	6
2.1.2 Chronoamperometrie & Chronopotentiometrie.....	7
2.1.3 Elektroabscheidung.....	8
2.1.4 Gepulste Elektroabscheidung.....	8
2.1.5 Elektrochemische Impedanzspektroskopie.....	9
2.2 Elektroenzymatik.....	9
2.2.1 Enzyme.....	10
2.2.2 Biokatalyse und Enzymkinetik.....	11
2.2.3 Bioelektrochemie und Biosensoren.....	13
Kapitel 3: Resultate und Diskussion.....	16
3.1 EU-Projekt ERUDESP.....	16
3.1.1 Elektrochemische Einzelzelle.....	18
3.1.2 Elektrochemische 16er-Zelle.....	20
3.1.3 Makroporöse Goldelektroden.....	26
3.1.4 Hochskalierung makroporöser Goldelektroden.....	46
3.1.5 Elektrochemisches Screening von Mediatoren.....	48
3.1.6 Direkte Oxidation von NADH an Rutheniumoxidelektroden.....	55
3.1.7 Elektroorganische Reaktion in einer elektrochemischen Batchzelle.....	69
3.1.8 Elektroorganische Reaktion in einer elektrochemischen Durchflusszelle.....	72
3.1.9 Elektroenzymatische Reaktion in einer elektrochemischen Batchzelle.....	80
3.1.10 Elektroenzymatische Reaktion in einer elektrochemischen Durchflusszelle.....	90

3.2 Erneuerbares Elektrodensystem.....	99
3.3 Makroporöse Mikroelektroden aus RuO₂.....	113
3.4 Implantierbare makroporöse Mikroelektroden für Handprothesen.....	126
3.5 Makroporöse Multikatalysatorschichten aus Platin & Nickel.....	137
3.6 Nanostrukturierte Oberflächen für Biofunktionalisierung.....	147
 Kapitel 4: Zusammenfassung & Ausblick.....	 160
 Kapitel 5: Anhang.....	 165
 5.1 Instrumenteller Teil.....	 165
5.2 Veröffentlichungen.....	169
5.3 Danksagung.....	174
5.4 Literaturverzeichnis.....	177

Kapitel 1: Einleitung

Die Elektrochemie durchlief in den letzten Jahren eine derartige Entwicklung, dass sie in vielen verschiedenen Bereichen der Chemie eine Vormachtstellung einnimmt. So entwickelte sich die Elektrochemie zu einem sehr bedeutenden Teilgebiet in der physikalischen Chemie. Nicht nur in der technischen Chemie, wie Brennstoffzellentechnik und Batterieforschung, und in der analytischen Chemie, wie Umweltanalytik und medizinische Diagnostik, sondern auch in der organischen Synthese weckten die elektrochemischen Methoden großes Interesse. Durch erfolgreiche und viel versprechende Forschungen in diesen Bereichen wurden die Elektrokatalyse, Elektroanalytik und auch die Elektrosynthese populär. In allen drei Teilgebieten der Elektrochemie ist das Elektrodenmaterial von höchster Bedeutung. Die Morphologie und die Konstitution einer solchen Oberfläche sind wichtige Parameter. Sowohl bei der Elektrokatalyse und Elektroanalytik als auch bei der Elektrosynthese ist die aktive Oberfläche eine ständig zu verbessernde Eigenschaft. Bei der Elektrokatalyse stellt die Elektrodenoberfläche selbst das katalytisch aktive Material dar. Eine Katalyse ist umso effizienter, je größer die katalytisch aktive Oberfläche ist. Das bedeutet, dass stetig nach Möglichkeiten zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche gesucht wird. Nanostrukturierte Oberflächen brachten daher einen großen Aufschwung im Bereich der Elektrokatalyse. Durch elektrochemische Verfahren, wie zum Beispiel dem Pulsverfahren zur Abscheidung von Metallen, wurden nanokristalline Oberflächen geschaffen, die als Folge der Oberflächenvergrößerung eine Erhöhung der elektrochemischen Signale bewirkten. Dieser Effekt wurde zuvor bei der gängigen heterogenen Katalyse beim Einsatz von nano-Partikeln beobachtet. Oberflächenvergrößerungen können durch so genannte fraktale Strukturen erreicht werden. In unterschiedlicher Form ist es möglich, das Material hoch porös zu gestalten. Mittlerweile ist es sogar möglich, die Porosität eines Materials vollständig zu kontrollieren. Die Kontrolle geht soweit, dass die Anzahl von porösen Schichten, sei es über spezielle Templatverfahren oder über die Dauer der elektrochemischen Abscheidung, genauestens kontrollierbar ist. Die Porendurchmesser sind ebenso kontrollierbar. Nicht nur in der Elektrokatalyse, sondern auch in der Elektroanalytik spielt die Dimension der realen, aktiven Oberfläche eine Rolle. Auf einer nanostrukturierten Oberfläche kann im Vergleich zu einer normal kristallinen Oberfläche bei gleich bleibender makroskopisch geometrischer Oberfläche mehr Substanz detektiert werden. Dadurch wird die Oberfläche sensitiver und die Nachweisgrenze bedeutend verbessert. Das Gleiche gilt für die Elektrosynthese, wo pro Flächeneinheit durch den Einsatz von vergrößerten aktiven Oberflächen mehr

Produktumsetzung erfolgt. Die Umsatzrate einer Synthese kann dadurch enorm gesteigert werden. Organische Synthesen wurden zum Teil von elektroorganischen Synthesen überholt. In der technischen Industrie ist der großtechnische Einsatz von elektrochemischen Methoden mit vergrößerten Elektrodenflächen nicht mehr wegzudenken. Vor allem Elektrolyseanlagen zur großtechnischen Gewinnung von chemischen Substanzen finden verstärkten Anklang in der technischen Industrie.

Viele innovative Ideen waren und sind immer noch von der Natur abzuschauen. Somit wurde der Bereich der Bionik immer weiter ausgebaut. Vor allem Oberflächenstrukturen und -gestaltungen werden dem Vorbild der Natur nachgeahmt. So auch die spongiösen Strukturen, wie sie zum Beispiel bei Korallen und Meeresschwämmen zu finden sind. Diese Strukturen bieten eine enorm große Oberfläche im Vergleich zu Materialien gleicher geometrischer Fläche. Von der Natur lässt sich nicht nur das Gestalten von Strukturen und Oberflächenbeschaffenheiten erlernen, sondern auch natürliche Prozesse, wie zum Beispiel die Biokatalyse mittels des Einsatzes von Enzymen. Dadurch ergab sich der Bereich der weißen Biotechnologie, die sich unter anderem mit dem Einsatz von Enzymen beschäftigt. Aber auch im Bereich der roten Biotechnologie, das heißt, der Einsatz der Biotechnologie in der Medizin, kann die Verwendung von Enzymen für pharmazeutische Produktsynthesen von großem Nutzen sein. Die Biokatalyse bietet einige Vorteile, wie zum Beispiel eine hohe Substratspezifität, sehr saubere und enantiomerenreine Produktkonversionen ohne eine große Anzahl von Nebenprodukten, eine gute Sensitivität und oft auch eine Biokompatibilität. Dadurch werden bereits seit Jahrzehnten komplexe Systeme zur Detektion von Substanzen hergestellt, nämlich die Biosensoren. Diese wurden so konzipiert, dass eine Regenerierung des verwendeten Cofaktors gegeben ist.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich im Rahmen des EU-Projektes ERUDES die Problemstellung, passende elektroorganische und elektroenzymatische Reaktionen zu finden, die in einer elektrochemischen Durchflusszelle durchführbar sind. Ein elektrochemischer Bioreaktor in Form einer Durchflusszelle sollte konzipiert werden. Dabei sollte gegen Ende des Projektes eine mögliche Biofunktionalisierung von kontrolliert hergestellten Oberflächenstrukturierungen durchgeführt werden. Die Aufgabe war, eine vergrößerte katalytisch aktive Oberfläche herzustellen, die für die (bio)elektrochemische Katalyse, Synthese, aber auch Analyse interessant sein soll. Dafür sollten zwei verschiedene Templatverfahren via kolloidaler Kristalle getestet werden: die *Langmuir-Blodgett-Technik* und die *kontrollierte Evaporierungsmethode*. Durch die Herstellung kolloidaler Kristalle und die anschließende Metall- und Metalloxidabscheidungen sollten möglichst hoch poröse, drei-

dimensionale Oberflächenstrukturen, die eine hervorragende Offenporigkeit und Interkonnektivität aufweisen, hergestellt werden. Bezogen auf die kontrollierte, poröse Oberflächenstrukturierung ergab sich in Bezug auf die Anwendung in der elektrochemischen Durchflussszelle die Frage, ob auch makroporöse Metall- und Metalloxidelektroden großer geometrischer Fläche ($6 \times 6 \text{ cm}^2$) via *kontrollierter Evaporierungsmethode* herstellbar sind. Ein weiterer Aufgabenbereich dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener Mediatoren für die Anwendung in einer elektroenzymatischen Kaskadenreaktion. Dabei ergab sich die Idee, ein aktives Elektrodenmaterial, Rutheniumoxid, auf direkte NADH-Oxidation als Alternative zu testen. Eine weitere Problemstellung dieser Arbeit war die Erweiterung der *Langmuir-Blodgett-Technik* unter Verwendung von Polystyrolpartikeln. Mittels dieser methodischen Weiterentwicklung der *LB-Technik* während dieser Arbeit sollte versucht werden, ein erneuerbares Elektrodensystem aufzubauen, welches auf Kommando die obere Elektrodenschicht bei Verschleiß abtrennen kann.

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit der makroporösen Rutheniumoxidelektroden wurde das Material auf pH-Sensitivität getestet. Dabei sollten diese hoch porösen Materialien miniaturisiert werden, um eine Alternative für die gängigen, leicht zerbrechlichen Glasmembranelektroden zu finden. Es stellte sich die Frage, ob durch eine signifikant vergrößerte aktive Oberfläche ein verbessertes Rauschverhalten erhalten wird. Im Einklang mit dem Thema Mikroelektroden wurde auf die Oberfläche von implantierbaren Mikroelektroden für Handprothesen eine poröse Beschichtung aufgebracht. Das Ziel soll die Vergrößerung der aktiven Oberfläche und die damit verbundene Erniedrigung der Übergangsimpedanz sein.

Des Weiteren ergab sich die Möglichkeit, Multikatalysatorschichten herzustellen, um eine in-situ Wasserstoffproduktion mit simultaner Hydrierungsreaktion an einer einzigen Elektrode zu ermöglichen. Zudem wurde eine weitere, nanoskalige Oberflächenstrukturierung in Form von Platininseln angestrebt. Dabei sollte eine Biofunktionalisierung durchgeführt werden, und getestet werden, ob sich bei einer Substratumsetzung dank dieser Oberflächenstrukturierung ein signifikanter Anstieg der Stromdichte beobachten lässt.

Die vorliegende Arbeit wurde in einem binationalen Promotionsverfahren (Cotutelle-Verfahren) angefertigt. Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeitspanne von November 2008 bis Mai 2011 durchgeführt und die Arbeit im Juli 2011 vollständig beendet.

Kapitel 2: Theoretischer Hintergrund

2.1 Elektrochemie

In diesem Kapitel soll kurz auf die in dieser Arbeit angewandten elektrochemischen Methoden eingegangen werden. Es wurden sowohl zyklische Voltammetrie, Chronoamperometrie als auch Chronopotentiometrie angewandt. Des Weiteren wurden Metall und Metalloxide über Elektroabscheidung und mittels gepulster Elektroabscheidung elektrochemisch abgeschieden. Als letzte Methode soll die elektrochemische Impedanzspektroskopie angesprochen werden. Thermisches Rauschen wurde ebenso in dieser Arbeit gemessen, wobei die Methode in Kapitel 3.3 beschrieben wird.

2.1.1 Zyklische Voltammetrie

Die zyklische Voltammetrie (CV) ist eine stark verbreitete elektrochemische Analysenmethode für elektroaktive Reaktionen. Sie wird oft als erste Untersuchungsmethode für mögliche Redoxsubstanzen angewandt, um Aussagen über elektrochemisches und kinetisches Verhalten treffen zu können. Es wird der Stromverlauf in Abhängigkeit von der Spannung aufgezeichnet ^[1]. Der experimentelle Aufbau besteht aus einer Dreielektrodenschaltung, die aus einer Arbeits-, einer Gegen- und einer Bezugs- oder Referenzelektrode besteht. Die Spannung wird zwischen Arbeits- und Referenzelektrode vorgegeben, wobei der resultierende Strom zwischen Arbeits- und Gegenelektrode detektiert wird. Das angelegte Elektrodenpotential wird zeitlich linear mit einer konstanten Vorschub- oder Vorschubgeschwindigkeit zwischen einem Potentialminimum und einem Potentialmaximum, daher auch Dreieckspannungsmethode bezeichnet, geändert. Der dabei entstehende Stromverlauf wird detektiert. Es entsteht eine Strom-Spannungs-Kurve.

Die bei den Messungen erhaltenen Informationen werden in Form eines Zyklovoltammogramms (CV) aufgetragen, welches zur Auswertung des elektrochemischen Verhaltens einer Substanz dient. Nachstehend sind Deckschichtdiagramme von Platin und Gold dargestellt, die experimentell in 0,5 M H₂SO₄ bei 100 mV/s erhalten wurden und an denen sich Oberflächenprozesse analysieren lassen:

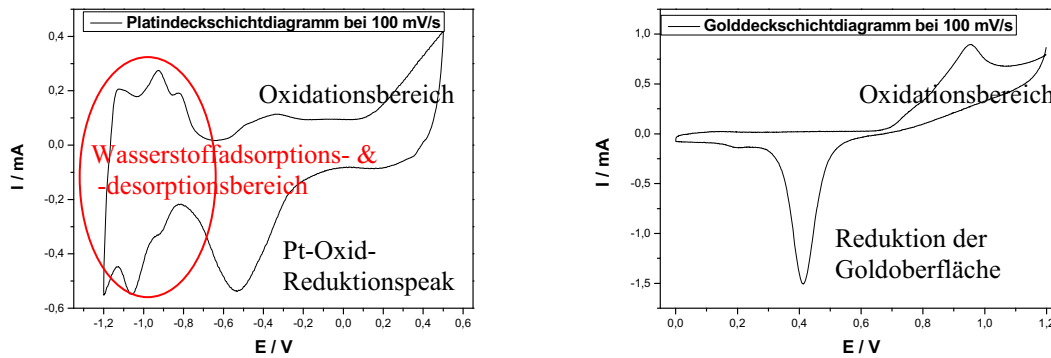


Abbildung 1: Deckschichtdiagramme von Platin und Gold.

Die typischen Bereiche dieser Deckschichtdiagramme sind in den Abbildungen den Reaktionstypen zugeordnet. Die Form des Zykelvoltammogramms hängt hauptsächlich von den Vorgängen an den Elektrodenoberflächen ab. Anhand der Form eines CVs können Aussagen getroffen werden, ob es sich um eine reversible, diffusionskontrollierte, irreversible oder um eine quasireversible Reaktion handelt. Aber auch Adsorptionsprozesse an der Elektrodenoberfläche (Deckschichtdiagramme) und kapazitive Effekte sowie der Lösungswiderstand spielen eine Rolle für den Verlauf eines CVs. Die vor jeder Messung zu wählende Vorschubgeschwindigkeit hat ebenso Einfluss auf die Form, denn je höher die Vorschubgeschwindigkeit, desto ausgeprägter der Peak. Des Weiteren kann die Beteiligung des Elektrodenmaterials selbst zu Peaks führen. Wenn es zu einer Oxidation oder Reduktion des verwendeten Elektrodenmaterials kommt, wird dies durch einen Oxidations- oder Reduktionspeak im CV sichtbar. In den einzelnen Kapiteln in dieser Arbeit wird die CV-Methode an Anwendungsbeispielen weiter erklärt.

2.1.2 Chronoamperometrie & Chronopotentiometrie

Die Chronoamperometrie (CA) ist eine Methode, bei der ein konstantes Elektrodenpotential durch einen Potentiostaten vorgegeben wird und unter Verwendung einer Referenzelektrode zeitlich konstant gehalten wird. Der vorgegebene Potentialsprung von einem Ruhepotential zur Zeit $t=0$ zu einem Arbeitspotential veranlasst ein Antwortsignal in Form eines elektrischen Stroms. Es wird ein Strom-Zeit-Verlauf aufgezeichnet. Bei dem anfänglich angelegten Potential kommt es zu keinem Stoffumsatz. Jedoch bewirkt eine sprunghafte Änderung auf ein zuvor gewähltes, geeignetes Potential den Start einer Oxidations- oder Reduktionsreaktion. Simultan beginnt ein Strom zu fließen, der unmittelbar nach dem Potentialsprung auf einen Maximalwert ansteigt und darauf wieder abfällt. Eine Einstellung

eines konstanten Potentials ruft eine konstante Oberflächenkonzentration hervor ^[1]. Der zeitliche Abfall des Stromes kommt durch die immer weiter eindringende Diffusionsgrenzschicht in das Elektrolytinnere zustande. Das zeitabhängige Verhalten des Stroms bei konstantem Potential wird durch die Cottrell-Gleichung beschrieben. Dabei wird lediglich der Diffusionsstrom beachtet, wobei die Diffusion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt darstellt. Zu Beginn der Messung ist dies nicht der Fall. Dort ist die Durchtrittsreaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ^[1].

Die Chronopotentiometrie (CP) verläuft analog der Chronoamperometrie, nur wird hier der Strom nach einem zeitlichen Sprung auf einen eingestellten Stromwert konstant gehalten und das Potential als Antwortsignal registriert.

2.1.3 Elektroabscheidung

Die klassische Methode der Elektroabscheidung (ED) von Metallen ist die galvanische Abscheidung, bei der eine Zweielektrodenschaltung (Arbeits- und Gegenelektrode) verwendet wird. Dabei wird ein Elektrolytmetallbad als Ionen- und Leitfähigkeitsquelle verwendet. Es wird ein konstanter Strom mittels eines Galvanostaten angelegt. Dadurch kommt es an dem Pluspol, der Anode, zu einer Oxidationsreaktion und an dem Minuspol, der Kathode, zu einer Reduktionsreaktion, also der elektrochemischen Abscheidung des als Ionen vorliegenden Metalls. Dabei gilt, je höher die Ladung ist, desto mehr Material wird abgeschieden.

Neben dem galvanischen Verfahren gibt es noch die Möglichkeit, Materialien potentiostatisch abzuscheiden. Dabei wird im Gegenteil zur galvanischen Abscheidung ein konstantes Abscheidopotential angelegt, welches durch eine eingesetzte Referenzelektrode (Dreielektrodenschaltung) kontrolliert wird.

2.1.4 Gepulste Elektroabscheidung

Durch die gepulste Elektroabscheidung (PED) werden Metalle in fein kristalliner Form kathodisch abgeschieden. Der Aufbau ist analog zur klassischen Elektroabscheidung, jedoch werden bei dem Pulsverfahren An- und Totzeiten der definierten Stromdichte alternierend eingestellt. Je kürzer die Pulsintervalle gewählt werden, desto kleiner werden in der Regel die Partikel der abgeschiedenen Metallschicht ^[1]. Die Metallionenkonzentration nahe der Arbeitselektrode und somit der Aufbau der Metallschicht wird bedeutend durch die Stärke und Dauer des Pulsvorgangs beeinflusst. Eine niedrige Oberflächendiffusionsrate, hohe

Konzentration an adsorbierten Metallatomen und ein hohes Überpotential an der Oberfläche favorisieren die Neubildung von Kristallkeimen ^[2].

Bei der gepulsten Elektroabscheidung hat die Kristallisation einen entscheidenden Einfluss auf das Kristallwachstum und somit auf die Struktur und Eigenschaften der Metallschicht. Die beiden konkurrierenden Prozesse sind zum einen das Wachstum der bestehenden Kristalle, und zum anderen die Neubildung von Kristallkeimen. Die Abscheidung vieler Übergangsmetalle ^[3-6] sowie Legierungen ^[2] ist über dieses Verfahren im Nanometerbereich bereits bekannt.

2.1.5 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Mittels der elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) lassen sich die Größen von Durchtritts-, Diffusions- und Elektrolytwiderstand bestimmen. Kapazitäten und Widerstände einer zu untersuchenden Reaktion lassen sich bestimmen und helfen somit bei der Aufklärung der Reaktion. Die Impedanzspektroskopie nutzt Wechselstrom, um frequenzabhängige kapazitive Widerstände von frequenzunabhängigen ohmschen Widerständen zu separieren. Somit können diese Teilprozesse einzeln detektiert werden. Dabei werden Ersatzschaltbilder analog zur Elektronik angefertigt und ausgewertet. Als Messaufbau wird eine Dreielektroden-schaltung herangezogen, analog zur CV. Der Strom wird hochohmig zwischen Arbeits- und Gegenelektrode detektiert, wobei zuvor das Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode konstant gehalten wird ^[1].

2.2 Elektroenzymatik

Die Modifizierung von Elektrodenoberflächen spielt in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle. Daher soll in den folgenden Unterkapiteln auf die dazu verwendeten Enzyme eingegangen werden. Zudem werden Grundlagen zur Biokatalyse und zur Enzymkinetik angesprochen. Es wird eine kurze Erklärung des Begriffs der Bioelektrochemie folgen und zu guter Letzt das Thema Biosensoren als Anwendungsbereich erläutert.

2.2.1 Enzyme

Enzyme sind Proteine, die für die Katalyse der meisten biochemischen Reaktionen verantwortlich sind. Sie spielen vor allem beim Metabolismus in lebenden Organismen eine entscheidende Rolle. Enzyme, die nur aus Proteinen bestehen, besitzen ein aktives Zentrum, welches lediglich aus Aminosäuren und dem Peptidrückgrat gebildet wird ^[7]. Enzyme, die aus einem Proteinanteil, dem sogenannten Apoenzym, sowie aus einem Cofaktor, einem niedermolekularen Molekül bestehen, werden Holoenzyme genannt. Die gängigsten Vertreter der Coenzyme sind Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und Adenosintriphosphat (ATP). NAD wird von Enzymen, wie Alkoholdehydrogenasen als Elektronenakzeptor verwendet, dagegen ist ATP ein Substrat der Kinasen, phosphatübertragende Enzyme, die im Metabolismus und bei der Stoffwechselregulierung eine herausragende Rolle spielen.

In dieser Arbeit werden unter anderem die Galaktitdehydrogenase (GatDH), D-Sorbitoldehydrogenase (DSDH), Diaphorase (DI) und eine abgewandelte Form der Pyranose-2-Oxidase (P2OxB1H) verwendet. Nachstehend werden die GatDH und die P2OxB1H in ihrer Kristallstruktur dargestellt:

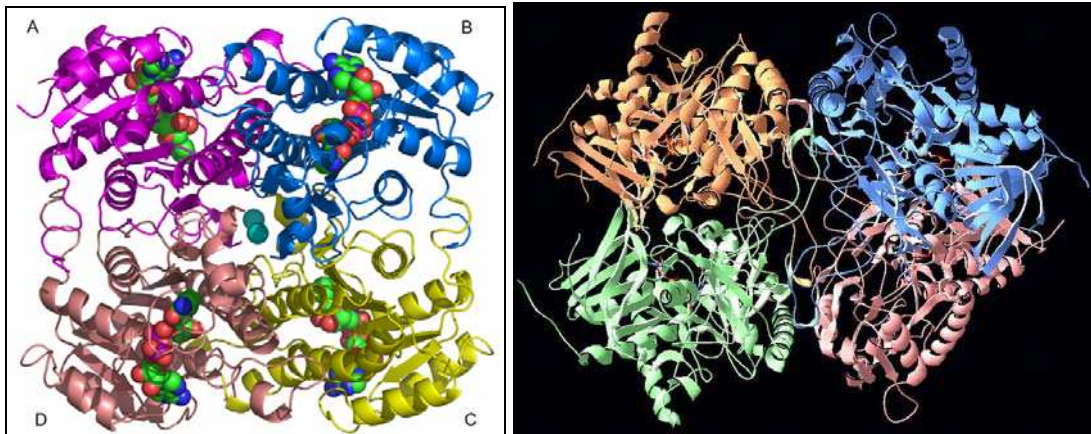


Abbildung 2: Kristallstruktur der GatDH ^[8] und der rekombinanten P2Ox mit angeführten vier Untereinheiten aus *Peniophora* sp. ^[9]

Die GatDH ist ein Homotetramer. Sie besteht aus vier Untereinheiten und hat ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa ^[10]. Sie gehört zu den Oxidoreduktasen, welche den Transfer eines Elektrons von einem Molekül (Reduktant), dem Elektronendonator oder H-Akzeptor zu einem anderen Molekül (Oxidant), dem H-Donator oder Elektroakzeptor katalysiert. Der abgespaltete Wasserstoff wird von den Cofaktoren NAD⁺/NADH oder FAD/FADH₂ aufgenommen bzw. abgegeben, je nach katalysierter Reaktion. Sowohl die Oxidation als auch die Reduktion wird von Dehydrogenasen katalysiert. Welche Reaktion

katalysiert wird, hängt von dem Zustand des vorliegenden Cofaktors ab. Das Homotetramer besitzt im Zentrum zwei zweiwertige Magnesiumionen, welche essentiell für die Enzymaktivität der GatDH verantwortlich sind. Im Allgemeinen hängt die Enzymaktivität von der Präsenz zweiwertiger Kationen ab ^[9, 11]. Das Enzym wird aus dem Organismus *Rhodobacter sphaeroides* isoliert ^[9]. Jedoch um größere Mengen zu gewinnen, wird es heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, weil sich hier die Expression des Enzyms induzieren lässt. Es katalysiert den Abbau von Alkoholen, wie z.B. Zuckeralkohole und sekundäre Alkohole ^[9].

Die Pyranose-2-Oxidase ist ein Flavoenzym, welches kovalent gebundenes Flavinnucleotid als Cofaktor besitzt und als D₂-symmetrisches Homotetramer vorliegt. Dabei sind pro Untereinheit ein FAD gebunden. Dieses Enzym katalysiert durch Sauerstoffverbrauch die Dehydrogenierung einiger Zucker, wobei Wasserstoffperoxid gebildet wird ^[12]. Die P2Ox besitzt die Dimensionen von 90 Å x 90 Å x 130 Å und hat ein Molekulargewicht von 267,7 kDa ^[12-14]. Um zu den aktiven Zentren des Enzyms zu gelangen, besitzt dieses Enzym vier symmetrieverwandte Öffnungen an der Oberfläche. Das Enzym wird von Weißfäulepilzen produziert, unter anderem von *Peniophora gigantea* ^[15] und *Peniophora* sp., wobei es zur Weiterverwendung in dem Bakterium *Escherichia coli* oder in der Hefe *Pichia pastoris*-GS115 exprimiert und angereichert wird ^[8, 16]. Die C2-Oxidation von Aldopyranosen wie D-Glucose und unterschiedlichen Mono- und Disacchariden zu den jeweiligen Dicarbonsäuren wird von der P2Ox regioselektiv katalysiert. Für diesen Katalyseprozess muss Sauerstoff in molekularer Form vorhanden sein, der selbst zu Wasserstoffperoxid bei der Substratoxidation reduziert wird. Es werden Dicarbonsäuren als Produkte erhalten, welche z.B. als Synthesekomponenten für Feinchemikalien zur Verfügung stehen und somit in der pharmazeutischen Industrie Anwendung finden ^[17]. Die in dieser Arbeit verwendete P2OxB1H ist eine abgewandelte Variante der thermostabileren und katalytisch aktiven Form P2OxB1. Um das Enzym P2OxB1H zu erhalten, wird die P2OxB1 via *directed evolution* mit einem carboxyterminalen His(6)-Tag fusioniert ^[8].

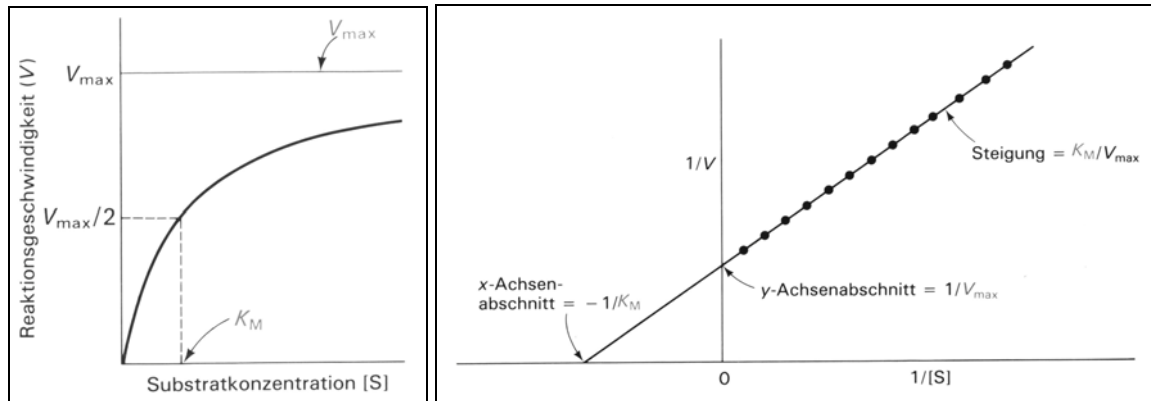
2.2.2 Biokatalyse und Enzymkinetik

Chemische Reaktionen werden auch durch Enzyme katalysiert, indem sie die Aktivierungsenergie der zu katalysierten Reaktion herabsetzen. In diesem Falle wird dann von Biokatalyse gesprochen, da die Enzyme unverändert wieder aus der Reaktion hervorgehen. Die Aktivierungsenergie muss überwunden werden, damit es zu einer Stoffumsetzung

kommen kann. Enzymatische Reaktionen sind reversibel. Im aktiven Zentrum des Enzyms werden die Edukte (Substrate) gebunden und es wird ein Enzym-Substrat-Komplex ausgebildet. Dabei ermöglicht das Enzym die Umwandlung der Substrate zu den jeweiligen Produkten, die nach Umsetzung aus dem Komplex freigesetzt werden. Enzymreaktionen sind hoch interessant, da sie wegen der hohen Substrat- und Reaktionsspezifität der Enzyme sehr reine, enantiomerenreine Produkte liefern. Grundlage für die katalytische Reaktion ist das aktive Zentrum im Inneren des Enzyms. Das umzusetzende Substrat bindet an das aktive Zentrum, welches aus gefalteten Bestandteilen der Polypeptidkette oder aus reaktiven Nicht-Eiweiß-Anteilen besteht ^[7]. Die Enzymspezifität beruht auf der Komplementarität der Raumstruktur des aktiven Zentrums, aber auch auf den Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem entsprechenden Substrat (Enzym-Substrat-Komplex). Diese Wechselwirkungen verlaufen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.

Es lassen sich für enzymkatalysierte Reaktionen wie für alle chemischen Reaktionen kinetische Untersuchungen durchführen. Die Reaktionsgeschwindigkeit spielt bei enzymkinetischen Betrachtungen eine bedeutende Rolle. Diese stellt ein Maß für die Änderung der Substratkonzentration mit der Zeit dar und ist abhängig von Enzymkonzentration, pH-Wert der Lösung, Substrat- und Produktkonzentration, Temperatur, Salzkonzentration der Lösung sowie von sogenannten Effektoren, wie z. B. Inhibitoren oder Aktivatoren. Eine weitere bedeutende Größe ist die Enzymaktivität. Sie stellt die zentrale Kenngröße eines Enzyms dar und bestimmt die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Wissenschaftler L. Michaelis und M. Menten befassten sich mit dem zeitlichen Verlauf enzymatischer Reaktionen. Dadurch entstand die klassische Michaelis-Menten-Theorie, die zur kinetischen Beschreibung einfacher Enzymreaktionen verwendet wird. Hierdurch wird der Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion und der Enzym- und Substratkonzentration deutlich ^[16]. Nach dieser Theorie steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration an, bis eine Maximalgeschwindigkeit $v_{\max}$ erreicht ist, bei der eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration keinerlei Auswirkungen mehr zeigt. Sowohl mittels der Michaeliskonstante K_M als auch der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante lässt sich die Effizienz des Enzyms einschätzen. Wenn der K_M -Wert sehr niedrig ist, erreicht das Enzym schon bei geringer Substratkonzentration seine Maximalgeschwindigkeit und zeichnet sich somit durch eine hohe Effizienz aus. Die Auftragung nach der Michaelis-Menten-Beziehung ergibt die typische Sättigungskurve.

Ein weiteres Verfahren zur Enzymkinetikauswertung ist das Linearisierungsverfahren von Lineweaver-Burk. Dabei wird $1/v$ gegen $1/[S]$ aufgetragen. Damit ergibt sich eine Gerade. Der Ordinatenabschnitt wird durch $1/v_{\max}$ und die Steigung durch $K_M/v_{\max}$ repräsentiert^[7]. Nachfolgend sind die Auftragungen nach Michaelis-Menten und nach Lineweaver-Burk schematisch dargestellt:



$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Abbildung 3: Sättigungskurve nach der Michaelis-Menten-Theorie (links), Auftragung nach Lineweaver-Burk (rechts)^[7] und den dazugehörigen Gleichungen.

Ein weiteres Linearisierungsverfahren stellt die Auftragung nach Hanes dar. Dabei wird $[S]/v$ gegen $[S]$ aufgetragen. Die Steigung wird dabei durch $1/v_{\max}$ und der Ordinatenabschnitt durch $K_M/v_{\max}$ repräsentiert.

2.2.3 Bioelektrochemie und Biosensoren

Die Bioelektrochemie stellt eine interessante Schnittstelle zwischen der klassischen Elektrochemie und der Biochemie dar. Wegen der hohen Substrat- und Reaktionsspezifität der Redoxenzyme zu sehr reinen, enantiomerenreinen Produkten werden seit langem die wertvollen Eigenschaften der Enzyme in der Bioelektrochemie ausgenutzt. Durch Immobilisierung an Elektrodenoberflächen, aber auch durch einfache Präsenz des Enzyms in Lösung können biochemische Reaktionen durchgeführt werden. Diese werden mittels Elektrochemie durch die elektrochemische Cofaktorregenerierung katalysiert. Elektroenzymatische Reaktionen werden durch elektrochemische Messverfahren observiert. Diese Methodik findet seit Jahrzehnten neben dem Bereich der Biobrennstoffzellen unter anderem in der Biosensorik großen Anklang.

Die allgemeine Sensorik findet schon seit Jahrzehnten zum Beispiel in der Blutsauerstoffdiagnostik unter Verwendung von Clark-Elektroden Anwendung. Dabei handelt es sich um membranbedeckte Sauerstoffelektroden. Sowohl Anode als auch Kathode werden von einer nicht leitenden Polyethylenmembran bedeckt. Die Verarmung an Sauerstoff in der Probe wird durch die limitierte Durchlässigkeit von Polyethylen für Sauerstoff reduziert. Somit wird die quantitative Bestimmung des Sauerstoffs mittels Reduktion bei konstantem Potential im Blut oder in anderen Lösungen durchführbar ^[18]. Die daraus resultierenden Clark-Sonden werden zur Sauerstoffbestimmung in der Umweltanalytik und Industrie weit verbreitet angewandt.

Aber auch die Biosensorik findet seit Jahren in vielen Bereichen der Analytik großen Anklang. So zum Beispiel die bekannten Glucosesensoren zur amperometrischen Glucoseüberwachung ^[19-21]. Diese Sensorart wird routinemäßig in klinischen Labors zur Glucosedetektion im Blutserum angewandt. Sie sind im Aufbau dem oben beschriebenen Sauerstoffsensor ähnlich. Jedoch ist die Membran viel komplexer aufgebaut, welche aus drei Schichten besteht. Dabei besteht die äußere Schicht aus Polycarbonat, die Glucose-durchlässig, jedoch für Proteine und andere Bestandteile des Blutes undurchlässig ist. Die mittlere Schicht besteht aus einer immobilisierten Glucoseoxidase und die innere Schicht setzt sich aus Celluloseacetat zusammen, die für kleine Moleküle, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid durchlässig ist. Die Glucose diffundiert beim Eintauchen des Sensors in die Lösung durch die äußere Membran zu dem immobilisierten Enzym. Das bei der dort ablaufenden Reaktion entstandene Wasserstoffperoxid diffundiert anschließend durch die innere Membran zur Elektrodenoberfläche. Es wird detektiert, indem es dort zu Sauerstoff oxidiert wird. Der dabei resultierende elektrische Strom ist der Glucosekonzentration in der zu analysierenden Lösung direkt proportional ^[22]. Ein auf diesem Prinzip aufbauender Glucosesensor, der einen wichtigen Teil dieser Arbeit darstellt, wird in Kapitel 3.6 beschrieben.

Andere Sensoren, die auf der Bestimmung von Wasserstoffperoxid beruhen, sind bereits kommerziell erhältlich. Dies ist zum Beispiel bei Saccharose, Lactose, Ethanol und L-Lactat der Fall, deren Bestimmungen von klinischem Interesse sind. Für die jeweilige Substanz wird ein entsprechendes Enzym verwendet ^[22].

Es soll nun noch kurz die Eingliederung von Biosensoren angesprochen werden, welche sich in Biosensoren erster, zweiter und dritter Generation aufteilen. Bei Biosensoren erster Generation wird z. B. Wasserstoffperoxid an einer Elektrode oxidiert und die dabei

entstehenden Elektronen über die Elektrodenoberfläche abgeführt. Das Wasserstoffperoxid entsteht als Koppelprodukt bei Substratoxidation mittels Oxidasen. Im Falle eines Biosensors zweiter Art werden die entstehenden Elektronen bei der Substratumsetzung über einen Mediator (Mediated Electron Transfer, MET) an die Elektrode abgeführt. Dagegen beruhen Biosensoren dritter Generation auf direktem Elektronentransfer (Direct Electron Transfer, DET) zwischen dem Enzym und der Arbeitselektrode ^[23]. Nachstehend wird die Einteilung von Biosensoren in einem Schema verdeutlicht:

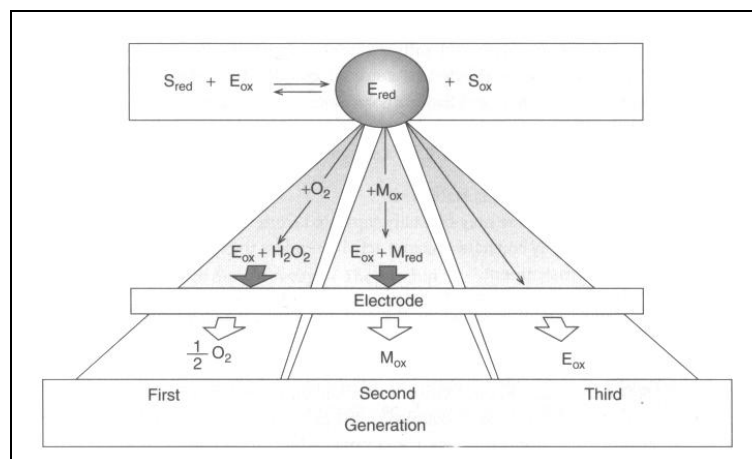


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Einteilung von Biosensoren in erste, zweite und dritte Generation ^[23].

Die bearbeiteten Themen der vorliegenden Arbeit wurden von den Biosensortypen inspiriert. Diese komprimierte theoretische Einführung soll eine einleitende Grundlage für diese Arbeit bieten.

Kapitel 3: Resultate und Diskussion

3.1: EU-Projekt ERUDESP

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des EU-Projektes ERUDESP (Electrochemical Reactors Using Dehydrogenases for Enantiopure Synthon Preparations, no. NMP3-SL-2008-213487) angefertigt. Dieses Projekt stellte den Schwerpunkt der Arbeit dar, wobei es während den Untersuchungen zu weiteren Forschungsideen kam, die in den Kapiteln 3.2 - 3.6 beschrieben werden. Das Projekt befasste sich mit der Entwicklung von elektrochemischen Bioreaktoren, die unter Verwendung von Dehydrogenasen für enantiomerenreine Produktsynthesen verwendet werden sollen.

Das Konsortium dieses Projektes bestand aus folgenden Gruppen:

- 1) Physikalische Chemie der UdS (Universität des Saarlandes): Entwicklung von elektrochemischen Zellen und Bioreaktoren, Screenings und Upscaling der elektrochemischen und elektroenzymatischen Reaktionen für den Durchflusszellenreaktor
- 2) Angewandte Mikrobiologie der UdS: Enzymherstellung und -entwicklung
- 3) Analytische Chemie / NsysA / ENSCBP (École Nationale Supérieure de Chimie, Biologie et Physique) in Bordeaux (Frankreich): Herstellung makroporöser Goldelektroden via *Langmuir-Blodgett-Technik* mit Silicapartikeln als endo-Templat
- 4) CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) / LPCME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement) in Nancy (Frankreich): Entwicklung von Sol-Gel-Filmen zur Einbettung des enzymatischen Systems
- 5) Biophysikalische Chemie der UCPH (University of Copenhagen) in Kopenhagen (Dänemark): Kristallstrukturen von Enzymen
- 6) Bioinformatik der UCPH in Kopenhagen (Dänemark): Enzymdesign
- 7) Bioorganische Chemie der METU (Middle East Technical University) in Ankara (Türkei): Synthese von Redoxmediatoren
- 8) Firma EURICE in Saarbrücken: Management des Projektes
- 9) Firma IEP GmbH in Wiesbaden: Marktforschung und Vertrieb

Innerhalb des Projektes wurden regelmäßige Treffen zur Diskussion der erzielten Forschungsergebnisse und zur Planung der weiteren Zusammenarbeit veranstaltet. Eine direkte Kooperation bestand mit Prof. Dr. Alexander Kuhn der ENSCBP in Bordeaux, da

diese Arbeit als doppelt betreute Doktorarbeit im so genannten Cotutelle-Verfahren durchgeführt und somit längere Forschungsaufenthalte an der ENSCBP gemacht wurden. Das Ziel des von der Europäischen Union finanzierten Projektes bestand in der Entwicklung eines elektrochemischen Bioreaktors in Form einer Durchflusszelle. Folgender allgemeiner Aufbau der Durchflusszelle wurde angestrebt:

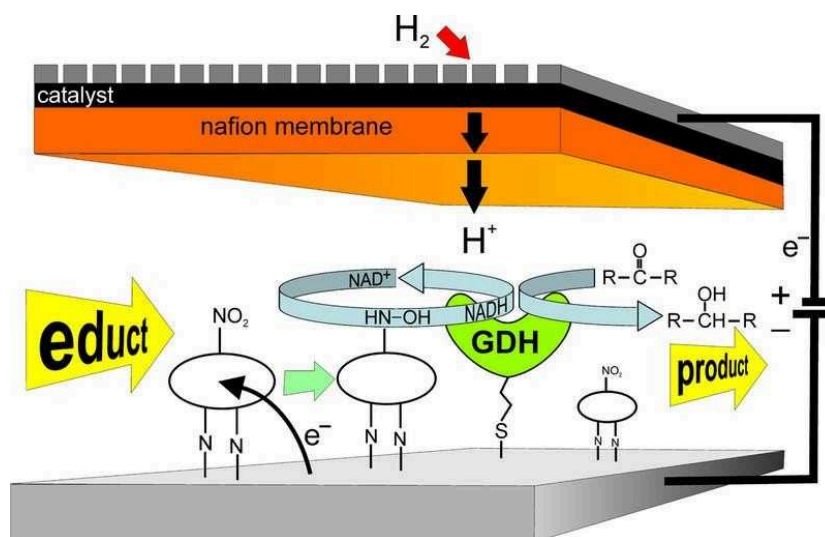


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Durchflusszelle mit vollständig biofunktionalisierter Arbeitselektrode und Produktkonversion.

Das Ziel beim Aufbau dieser elektrochemischen Durchflusszelle lag in der Immobilisierung aller notwendigen Komponenten wie Mediator, Cofaktor und Enzym, aber auch in der Vergrößerung der aktiven Oberfläche durch kontrollierte Porosität der Arbeitselektrode. Dadurch sollte eine enantiomerenreine, selektive Produktsynthese mit gleichzeitiger Cofaktorregenerierung ermöglicht werden. Durch die enzymatische Umsetzung des Eduktes sollte es zu einem einzigen, sehr sauberen Produkt kommen, was im Allgemeinen durch die Selektivität des Enzyms erreicht wird. Dabei wurde das Prinzip der Brennstoffzellenforschung herangezogen und eine Gasdiffusionseinheit als Gegenelektrode verwendet. Die Zelle konnte generell sowohl für Reduktionen als auch für Oxidationen eingesetzt werden. Angestrebtes Endziel dieses Projektes war die Immobilisierung eines dünnen Silicafilms mit eingebettetem Biomolekül, Cofaktor und Redoxmediator in makroporöse Goldelektroden mit einer Fläche von $6 \times 6 \text{ cm}^2$ zur Durchführung elektroenzymatischer Produktsynthesen. Dabei gab es zwei wichtige Arbeitspakete: Zum einen das Design und die Validierung einer Einzelzelle zur anschließenden Multiplikation auf 16 Zellen für elektrochemische Screenings. Zum anderen das Upscaling einer konstruierten und untersuchten Batchzelle zur Durchflusszelle. Alle Zellkonstruktionen, -validierungen und -optimierungen sowie elektroorganische und

elektroenzymatische Reaktionen wurden in der Physikalischen Chemie in Saarbrücken durchgeführt, was auch die einzelnen Arbeitspakete der vorliegenden Arbeit darstellt. Während dieser Arbeit wurden des Weiteren zwei Templatverfahren für die Herstellung makroporöser Elektroden zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche angewandt, wobei die dazu nötige Expertise bei Forschungsaufenthalten an der ENSCBP in Bordeaux erlernt wurde. Ein Teil der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate bezüglich makroporöser Elektroden und der elektroorganischen Umsetzung der Phenylglyoxylsäure in der Durchflusszelle wurden in Bordeaux erarbeitet.

3.1.1 Elektrochemische Einzelzelle

Im ersten Arbeitspaket wurde zunächst eine elektrochemische Einzelzelle entworfen und validiert, die den Vorläufer für eine spätere Mutlizelleneinheit darstellte. Zuerst musste alles an einer einzelnen Zelle getestet werden, bevor 16 Zellen synchronisiert wurden. Das Zellmaterial bestand aus Teflon (PTFE). Die Zelle wurde so konstruiert, dass sie mittels dreier Schrauben pro Part und Dichtungsringen dicht verschlossen werden konnte. Sie bestand aus drei Teilen: dem unteren Teil mit der Kontaktierung für die Arbeitselektrode, dem Mittelteil mit dem Elektrolytraum eines Volumens von 1 mL und dem Deckel mit Bohrungen für die Referenz- und die Gegenelektrode. Alle Kontaktierungen waren aus Gold. In Abbildung 6 sind die drei Teile (Unter-, Mittel-, Oberteil von links nach rechts) nacheinander gestaffelt dargestellt:



Abbildung 6: Unter-, Mittel- und Oberteil der elektrochemischen Batchzelle (von links nach rechts).

Zur Validierung wurde die chronopotentiometrische Abscheidung von nanokristallinem Platin auf Glaskohlenstoff von HTW Hochtemperatur-Werkstoffe (Thierhaupten) als Arbeitselektrodenmaterial gewählt. Anschließend wurde die Oberfläche durch Deckschichtdiagramme von Platin und CVs von Kaliumhexacyanoferrat(III) in 0,5 M K_2SO_4

charakterisiert. Zur Abscheidung des Platins wurde ein Bad aus Kaliumtetrachloroplatinat(II) in 0,5 M H_2SO_4 verwendet und ein Reduktionsstrom von - 1 mA für 10 Minuten angelegt. Zur elektrochemischen Charakterisierung wurden Deckschichtdiagramme dieser Oberfläche in 0,5 M H_2SO_4 aufgenommen. Die erhaltenen zyklischen Voltammogramme zeigten charakteristische Deckschichtdiagramme von Platin. Zwischen einem Potential von 0,0 V und 0,3 V vs. NHE waren die Adsorptions- bzw. Desorptionspeaks von Wasserstoff ausgebildet. Der Doppelschichtkapazitätsbereich und der charakteristische Platinreduktionspeak bei 0,55 V waren zu erkennen. Nach der Aufnahme der Deckschichtdiagramme wurde die reversible Reaktion von Kaliumhexacyanoferrat in 0,5 M K_2SO_4 -Lösung durchgeführt. Auch hier wurde der erwartete Kurvenverlauf erhalten, welcher in der folgenden Abbildung 7 zu sehen ist:

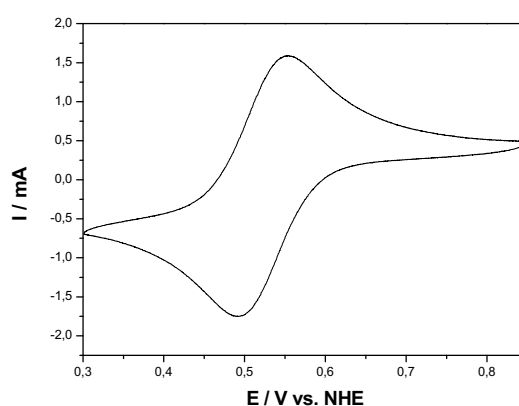


Abbildung 7: CV von Kaliumhexacyanoferrat in 0,5 M K_2SO_4 -Lösung.

Bei einem Potential von ca. 0,55 V und 0,5 V sind jeweils der Oxidations- bzw. Reduktionspeak zu sehen. Das gute reversible Verhalten dieser Reaktion wird an dem Halbstufenpotential von 50 mV sichtbar. Zusätzlich zur elektrochemischen Charakterisierung wurde die Oberfläche mittels REM und XRD charakterisiert. Nachstehend ist eine REM-Aufnahme der nanokristallinen Oberfläche und das dazugehörige XRD mit den charakteristischen Reflexen von Platin aufzeigt:

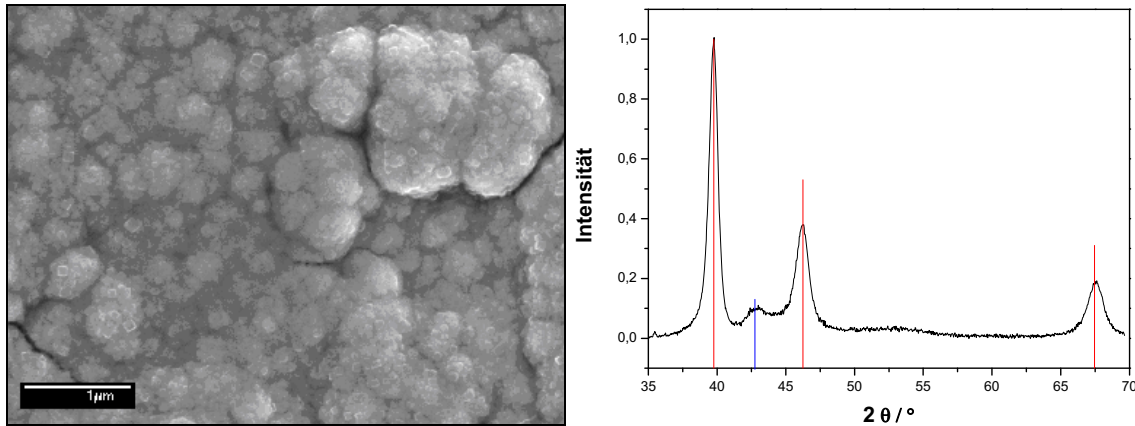


Abbildung 8: REM-Aufnahme einer nanokristallinen Platinoberfläche und dazugehöriges XRD.

Die Abscheidung des nanokristallinen Platins beginnt mit einer kubischen Morphologie, die dann an Ecken und Kanten weiter wächst, bis ein blumenkohlartiges Wachstum der Kristallite eintritt. Durch XRD wurden zusätzlich die kleinen Durchmesser der Kristallite bewiesen. Nach der Berechnung nach Scherrer für die Kristallitgrößenbestimmung wurde eine Kristallitgröße von 8 bis 10 nm erhalten. Die charakteristischen Reflexe von Platin liegen bei $39,76^\circ$, $46,24^\circ$ und $67,46^\circ$. Zusätzlich ist ein breites Maximum bei 43° zu erkennen, der dem Untergrund Glaskohlenstoff zuzuordnen ist.

Diskussion:

Zu diesem Unterkapitel kann zusammenfassend gesagt werden, dass eine elektrochemische Einzelzelle erfolgreich konstruiert und validiert werden konnte, was für die spätere Multizelleneinheit von großer Bedeutung war. Aus dieser Testreihe erfolgte anknüpfend die Validierung einer 16er-Zelle, wobei parallel an 16 Kanälen gemessen werden sollte.

3.1.2 Elektrochemische 16er-Zelle

Um elektrochemische Experimente bei verschiedenen Parametereinstellungen durchführen und auf Reproduzierbarkeit testen zu können, wurde eine 16er-Zelle konstruiert und validiert. Wichtig bei solchen Untersuchungen ist es herauszufinden, inwiefern sich die einzelnen Zellen beeinflussen und wie diese Störfaktoren behoben werden können. Als Zellmaterial wurde Polyvinylidendifluorid (PVDF) verwendet, ein chemisch extrem inertes Material. Um die 16er-Zelle elektrochemisch zu charakterisieren und zu validieren wurden die zwei 8er-Potentiostate des Typs VMP3 der Firma BioLogic gekoppelt. Zusätzlich wurden die

Potentiostate mit Niederstrombereichen ausgestattet und ein Faraday-Käfig für die Abschirmung der Zellen verwendet, um störende parasitäre Ströme zu vermeiden. Die verwendete Software zu dem Gerät (EC Lab) ließ zu, dass die Messungen simultan, aber auch unabhängig voneinander aufgenommen werden konnten. Sowohl die Normalstromkanäle als auch die Niederstromkanäle wurden getestet. Alle Kabel und Kontakte mussten gelegt und gelötet werden. Mittels CV, CA und Pulsen wurde getestet, ob alle Kontaktierungen durchlässig waren und die Apparaturen funktionierten. Nachstehend ist eine elektrochemische 16er-Zelle dargestellt:

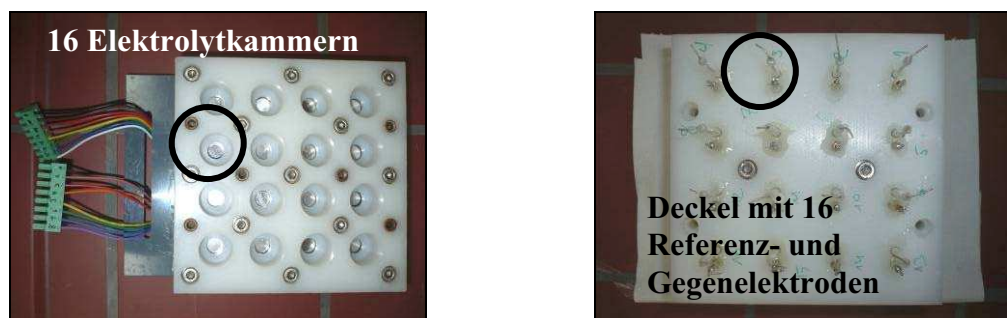


Abbildung 9: 16er-Zelle mit 16 Elektrolytkammern im Bodenteil (links) und 16 Referenz- und Gegenelektroden im Deckel (rechts).

Etliche Optimierungen, wie Zelldichtung durch Einsatz mehrerer Schrauben und bessere Kontaktierung durch Gold- statt Stahlkontaktschrauben, da die elektrische Leitfähigkeit von Gold ca. 30 mal größer ist als die von Stahl ($\sigma_{\text{Au}}=44 \cdot 10^6 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ und $\sigma_{\text{Stahl}}=1,4 \cdot 10^6 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$) wurden durchgeführt. Ferner wurde anfangs mit 16 Referenz- und Gegenelektroden gearbeitet, wobei die 16 Gegenelektroden im späteren Verlauf durch eine einzige Gegenelektrode ersetzt wurde. Des Weiteren wurde das Gegenelektrodenmaterial gewechselt, da sich Glaskohlenstoff während der Messungen teils auflöste und auf die am Boden liegenden Arbeitselektroden fiel. Statt Glaskohlenstoff wurden Titandrähte, die eine Rutheniumoxidbeschichtung hatten, verwendet. Rutheniumoxid wurde auf mit Oxalsäure vorbehandelte Titandrähte elektrochemisch abgeschieden und anschließend getempert. Dieses Material zeigte besonders stabile Eigenschaften. Bevor die eigentliche Validierungsprozedur gestartet wurde, wurde erst mittels einer Testbox geprüft, ob die Software und alle Kanäle funktionierten.

Zur Validierung der 16er-Zelle wurde auf die Herstellung und Charakterisierung zweier nanostrukturierter Materialien zurückgegriffen [5, 24, 25]. Es wurden nanokristalline Oberflächen hergestellt, um neben der zyklischen Voltammetrie auch Messverfahren wie Pulsen und Chronopotentiometrie zur Validierung heranzuziehen. Nanokristallines Platin

wurde auf Glaskohlenstoff durch das Anlegen einer konstanten Stromstärke von - 1 mA für 10 Minuten abgeschieden. An diesen Oberflächen wurde die Wasserstoffentwicklung anhand zyklischer Voltammetrie untersucht. Folgende Abbildung stellt die simultan erhaltenen Abscheidungskurven und das Endergebnis der Abscheidung dar:

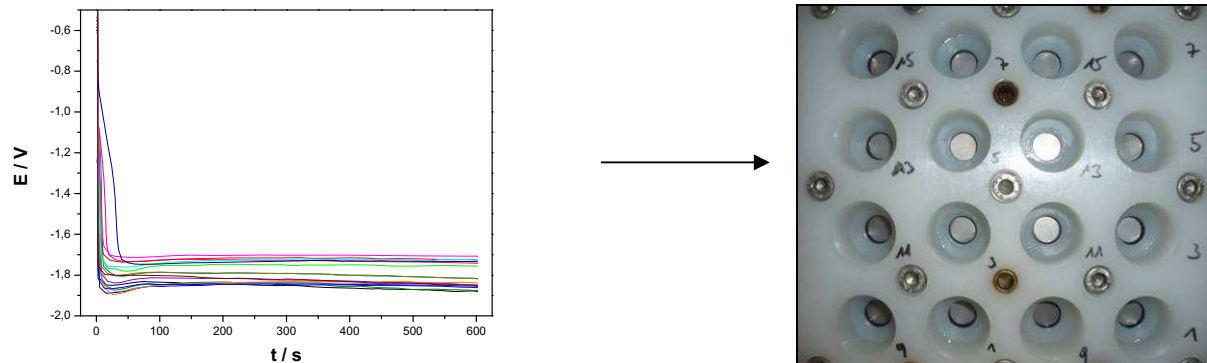


Abbildung 10: 16 simultan detektierte Abscheidungskurven von Platin und das erhaltene Ergebniss der 16-fach-Abscheidung.

Bei dem verwendeten Messprotokoll handelte es sich um das bereits in Kapitel 3.1.1 durchgeführte Messprotokoll. Das Ergebnis der Abscheidung wurde optisch mittels REM und physikalisch mittels XRD charakterisiert. Nachstehend sind die Ergebnisse beider Charakterisierungsvarianten gezeigt:

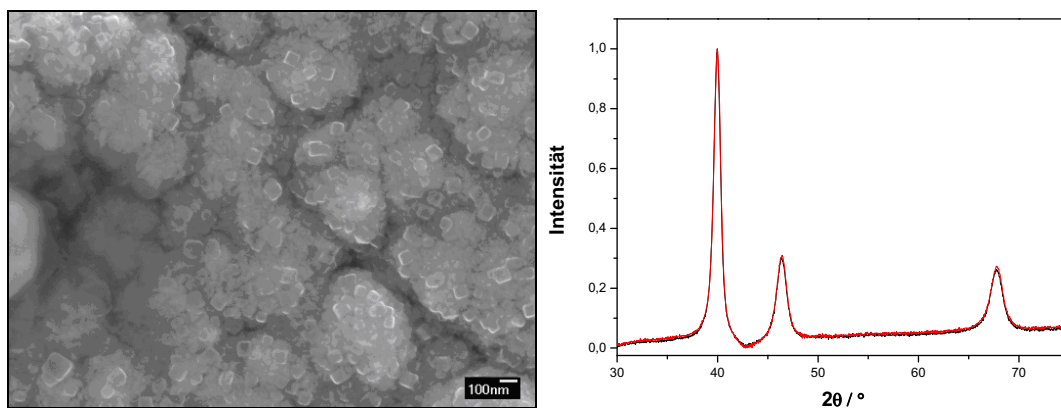


Abbildung 11: REM-Aufnahme einer nanokristallinen Platinoberfläche und dazugehöriges XRD.

Auch hier zeigte die Oberfläche von nanokristallinem Platin die typische Blumenkohlstruktur. Die charakteristischen Reflexe einer Platinoberfläche wurden bei $39,76^\circ$, $46,24^\circ$ und $67,46^\circ$ beobachtet. Die Auswertungen der durch die Charakterisierung mittels XRD erhaltenen Resultate ergaben auch bei 16 simultanen Abscheidungen eine Kristallgröße von $\sim 10 - 14$ nm, was mittels des Scherrerverfahrens errechnet wurde. Nach der Charakterisierung der Morphologie erfolgte nun die elektrochemische Charakterisierung mittels CV, um die Platinoberfläche durch Deckschichtdiagramme zu untersuchen. Die CVs wurden in einer Lösung aus 0,5 M H_2SO_4 bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s aufgenommen.

Des Weiteren wurde die reversible Redoxreaktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) an nanokristalliner Platinoberfläche untersucht. In Abbildung 12 sind die 16 simultan aufgenommenen Deckschichtdiagramme von Platin (links) und die 16 parallel aufgenommenen CVs mit typischem reversiblen Verhalten des Fe(III)/(II) (rechts) dargestellt:

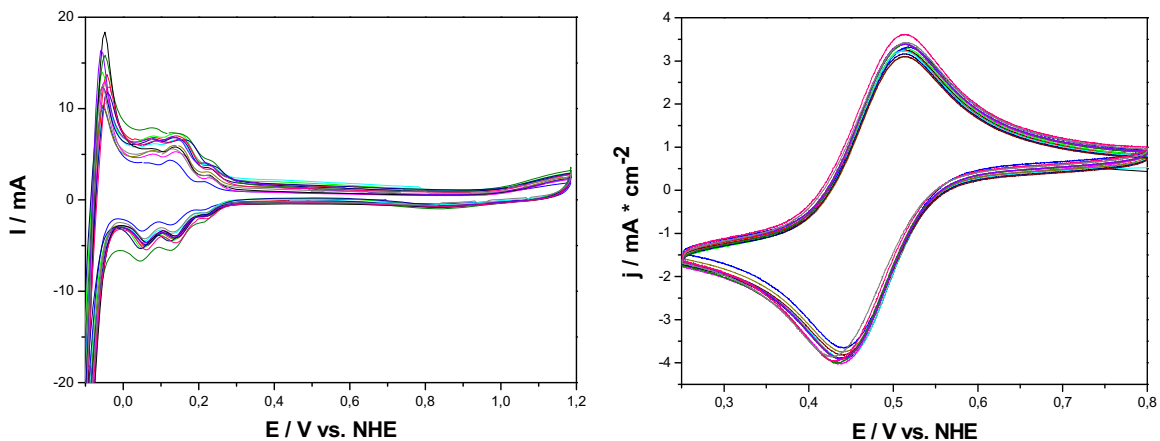


Abbildung 12: 16 simultan aufgenommene Deckschichtdiagramme von Platin (links) und CVs mit typischem reversiblen Verhalten des Fe(III)/(II) (rechts).

In den einzelnen Platindeckschichtdiagrammen sind sowohl die Wasserstoffproduktion als auch die Doppelschichtkapazität jeweils deutlich sichtbar (links). Die Varianz am Ende der Optimierungen bei den CVs mit Hexacyanoferrat betrug für den reduktiven Bereich 3 % und für den oxidativen Bereich 5 %.

Als weiteres Material für eine Nanostrukturierung wurde Gold gewählt ^[26-28]. Dazu wurde die Pulstechnik an dem VMP3-Potentiostaten getestet. Eine Lösung aus 0,5 g $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (Hydrat der Tetrachlorogoldsäure(III)) in 75 mL H_2O , 25 mL NH_4OH (12,5%) und 1,05 g MPS (Natriumsalz der 3-Mercapto-1-Propansulfonsäure, 90%) wurde für die elektrochemische Abscheidung verwendet. Die Pulstechnik wurde gewählt, da dabei besonders kleine Kristallite entstehen. Die Pulseinstellungen wurden auf 4 ms on-Einstellung und 20 ms off-Einstellung gewählt. Es wurde eine Pulsstromdichte von $-50 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ gewählt. Daraus ergibt sich eine mittlere Stromdichte von $-8,33 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$. Abbildung 13 stellt die Abscheidekurve des Pulsens dar und eine Aufnahme der erhaltenen Goldoberflächen:

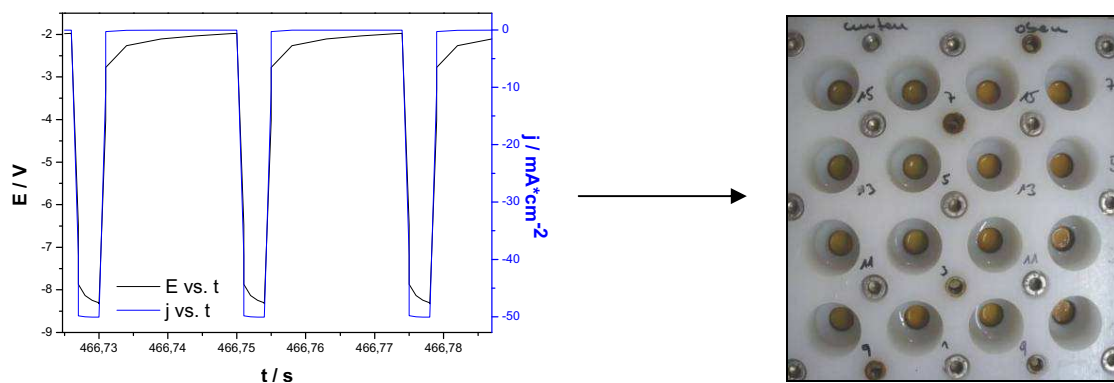


Abbildung 13: Abscheidekurve des Pulsverfahrens (links) und die 16 erhaltenen Goldoberfläche (rechts).

Die optische Charakterisierung mittels REM lieferte wie erwartet eine kubische Morphologie. Die elektrochemische Charakterisierung von nanokristallinem Gold wurde mittels CV durchgeführt. Abbildung 14 zeigt eine REM-Aufnahme des nanokristallinen Goldes und die erhaltenen CVs für die 16 simultan ablaufenden Reaktionen des Hexacyanoferrats(III) an den Goldoberflächen:

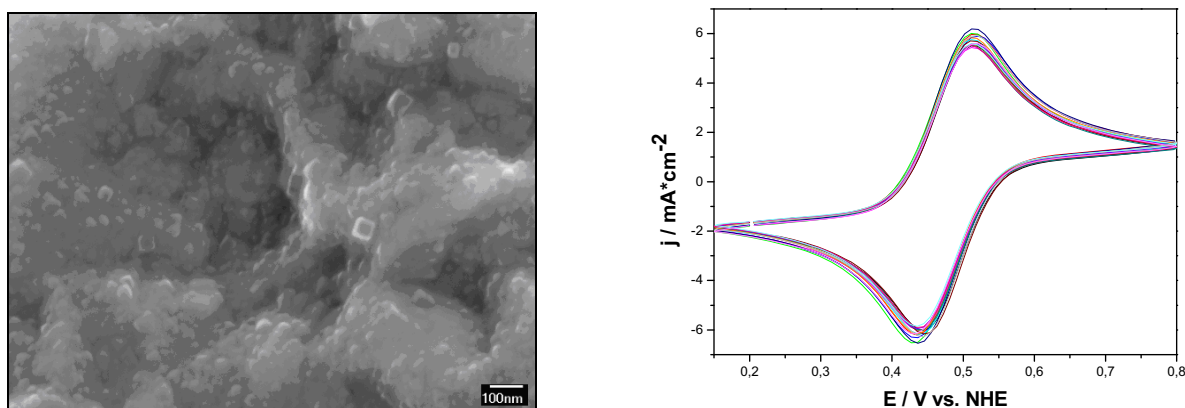


Abbildung 14: REM-Aufnahme einer nanokristallinen Goldoberfläche und 16 simultane CVs des Hexacyanoferrats(III).

Das charakteristische, reversible Redoxverhalten des Fe(III)/Fe(II) ist anhand der CV-Kurven deutlich zu beobachten. Das Hexacyanoferrat(III)-System lieferte ein Redoxverhalten mit einer Varianz von 3% im reduktiven Bereich und 4% im oxidativen Bereich. Jedoch war die nanokristalline Goldbeschichtung wegen der Wasserstoffentwicklung während des Abscheidungsprozesses nicht vollständig stabil. Daher eignet sich die Abscheidung des nanokristallinen Platins besser für wieder verwendbare, nanostrukturierte Elektrodenoberflächen, worauf im späteren Verlauf des Projektes in der elektrochemischen Durchflusszelle zurückgegriffen wurde.

Durch die Validierung einer 16er-Zelle erfolgte ein neues Zelldesign, wobei die Arbeitselektroden von der Seite kontaktiert und mögliche Ablagerungen auf den

Arbeitselektrodenoberflächen durch Ablagerungen verhindert wurden. Dünne Stiftkontakte aus Gold führten zu einer besseren elektrischen Kontaktierung. Das Zellmaterial war Polyvinylidenfluorid (PVDF), welches einen chemisch stabilen und inerten Kunststoff darstellt. Zur Abdichtung wurden O-Ringe verwendet. Die eingesetzten Goldelektroden wurden durch Einschmelzen, Drehen zu einem Zylinder mit 5 mm Durchmesser und Einpressen in die Arbeitselektrodenhalterung selbst hergestellt. Im neuen Zelldesign wurde darauf geachtet, dass der Gebrauch von Schrauben vermieden wurde. Somit wurde eine mögliche Korrosion ausgeschlossen. Ein weiterer großer Vorteil war, dass dank des neuen Zelldesigns auch bei Bedarf gerührt werden konnte, da die Arbeitselektroden an der Seite saßen. Ferner war keine volumenmäßige Limitierung mehr gegeben, da für Kinetikmessungen kontinuierlich Substanz hinzugegeben werden musste. Nachstehend sind technische Skizzen gezeigt, die das Zelldesign beschreiben:

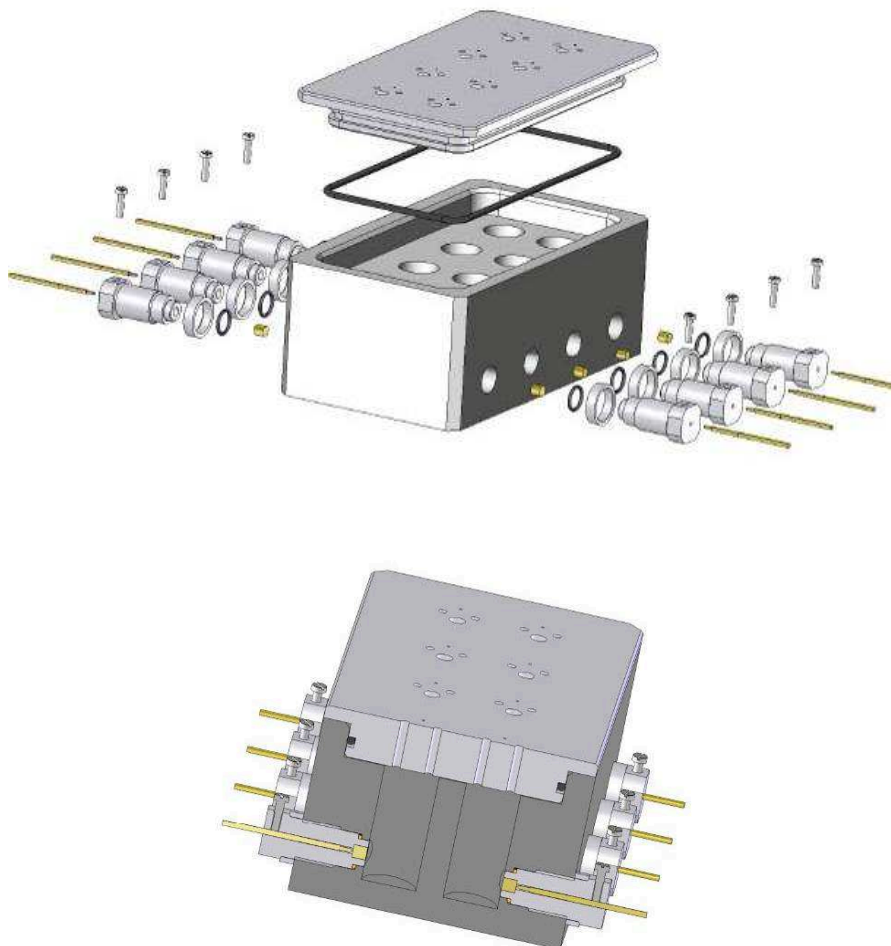


Abbildung 15: Multizellenarray mit 8 Elektrolytkammern; die seitlich sitzenden Arbeitselektroden werden von der Seiten über Tastspitzen kontaktiert.

Wie nach jedem neuen Zelldesign musste dieser neue Multizellenarray validiert werden. Auch hier wurden Gegenelektroden aus auf Titandraht abgeschiedenem Rutheniumoxid verwendet. Alle Gegenelektroden wurden in den Deckel integriert und untereinander verbunden, um Kabel einzusparen. Als Referenzelektroden wurden dünne Ag/AgCl (3,5 M KCl) verwendet. Vor den Messungen wurden die Arbeitselektroden bei $-10 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ für 1 Stunde in 0,5 M H_2SO_4 durch Wasserstoffentwicklung an der Oberfläche gereinigt.

Zur Validierung wurden zunächst Gold-CVs in 0,5 M H_2SO_4 bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s aufgenommen. Bei den ersten Validierungsmessungen wurden zu große Rauschverhältnisse erhalten, die eliminiert werden mussten. Anschließend wurde das reversible Redoxverhalten von Kaliumhexacyanoferrat(III) zur Validierung herangezogen. Es wurde eine Lösung aus 20 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 0,5 M K_2SO_4 verwendet. Nachstehend sind die simultan aufgenommenen Golddeckschichtdiagramme, die durch Kontaktierungs-optimierungen ein gutes Rauschverhältnis aufwiesen und die experimentell erhaltenen CVs mit Hexacyanoferrats(III) dargestellt:

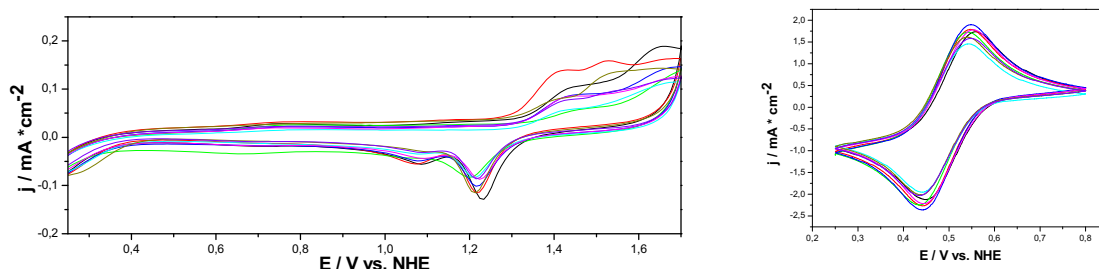


Abbildung 16: 8 simultan aufgenommene Golddeckschichtdiagramme (links) und 8 simultan detektierte CVs mit Hexacyanoferrat(III) (rechts).

Das klassische reversible Verhalten von Fe(III)/Fe(II) wurde bei den Messungen in den acht integrierten Zellen im Multizellenarray erhalten. Es wurde eine Varianz von 7,5 % erzielt.

Diskussion:

Die Validierung mit Herstellung nanostrukturierter Oberflächen und simultanen 16-fach-Messungen wurde erfolgreich abgeschlossen. Dabei ergab sich ein neues Zelldesign mit erfolgreicher Validierung für einen Multizellenarray, der in Kapitel 3.1.5 zum Screenen von Mediatoren gebraucht wird. Es wurde die Expertise erworben, gleichzeitig mit 16 Kanälen zu arbeiten und die Funktionalität der Potentiostate getestet, was für die weitere Entwicklung des Forschungsprojektes essentiell war.

3.1.3 Makroporöse Goldelektroden

Während der Arbeit wurde hinsichtlich des Projektes das Fachwissen erworben, die Goldarbeits Elektrode in ihrer aktiven Oberfläche durch Templatverfahren zu vergrößern. Dadurch sollten geordnete Makroporen erhalten werden. Es wurden zwei verschiedene Templatverfahren herangezogen, wobei beide auf der Herstellung kolloidaler Kristalle, dem endo-Templat basierten. In vorherigen Arbeiten wurden poröse, gut geordnete Goldelektroden unter Verwendung von monodispersen Silica-Partikeln und der *Langmuir-Blodgett-Technik (LB)* hergestellt ^[29-32]. Eine weitere Methode, die *kontrollierte Evaporierung (CE)* ist ebenso verbreitet ^[33, 34]. Diese beiden Verfahren stellen einfache Methoden dar, um gut angeordnete, drei-dimensionale Template zur weiteren elektrochemischen Abscheidung verschiedener Metalle ^[35-37] zu bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die *Langmuir-Blodgett-Technik* als auch die *kontrollierte Evaporierungsmethode* als Templatverfahren verwendet. Die *Langmuir-Blodgett-Technik* wurde mit dem bereits bekannten Verfahren mittels Silicapartikeln erlernt, wobei es aber darauf folgend zu einer Weiterentwicklung dieser Methode unter Verwendung von Polystyrolpartikeln (PS) kam, die im Verlauf dieser Arbeit einige Vorteile geboten hat. Das zweite angewandte Verfahren war die *kontrollierte Evaporierung*, die unter Verwendung von Polystyrolpartikeln durchgeführt wurde. Polystyrolpartikel sind unter sanfteren Bedingungen mittels Tetrahydrofuran (THF) oder Toluol zu entfernen. Im Gegensatz dazu müssen die Silicapartikeln mit Flusssäure (HF) entfernt werden. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil bei der Verwendung von Polystyrolpartikeln dar.

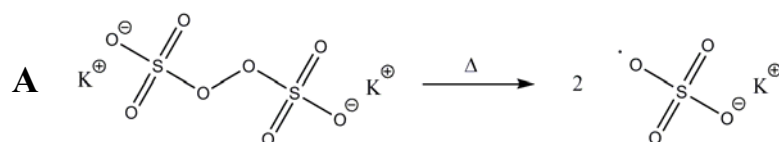
Monodisperse Polystyrolpartikel

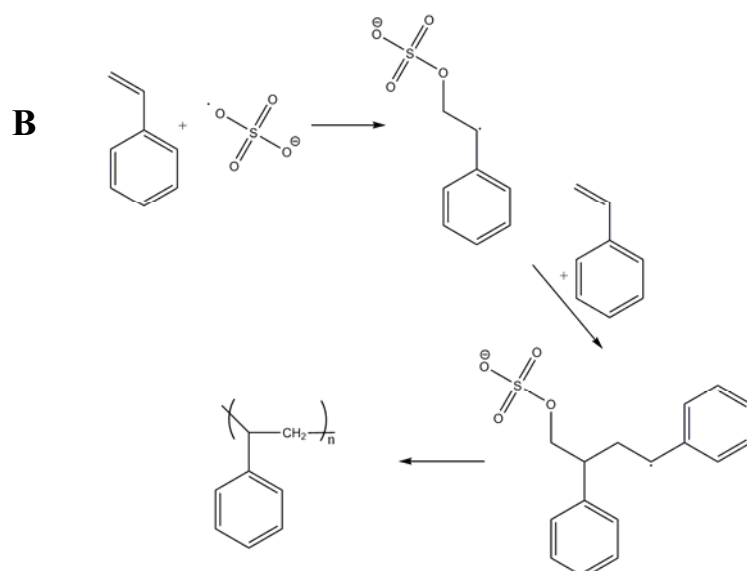
Zur Herstellung geordneter poröser Elektrodenstrukturen mussten monodisperse Polystyrolpartikel synthetisiert werden, die für die Präparierung der endo-Template benötigt wurden. Dazu wurden die Partikel über Emulsionspolymerisation hergestellt. Als Reaktionsmedium wurde destilliertes Wasser gewählt, um das Aufquellen der Partikel bei Verwendung von z.B. Ethanol zu vermeiden. Hierdurch wurde gewährleistet, dass der erhaltene Durchmesser der reale Durchmesser des Polymerknäuels war und nicht durch die Einlagerung von Alkoholmolekülen in die Polystyrolknäuel verändert wurde. Des Weiteren wurde eine Reaktion mit höchster Monodispersität gesucht und das Ziel gesetzt, ausgesuchte Durchmesser der Partikel zu erreichen.

Um die Reaktionstemperatur möglichst gering zu halten und dadurch größere und gleichmäßiger verteilte Durchmesser zu erhalten, wurde eine Standardreaktion in dieser Arbeit modifiziert. Hierzu wurden Studien über das Verhalten des Durchmessers und der Monodispersität bei verschiedenen Temperaturen und Zusätzen durchgeführt. Des Weiteren wurde eine Anpolymerisierung, das heißt eine Zwei-Stufen-Synthese durchgeführt, um größere Partikel im Größenmaßstab von 1 µm zu erhalten. Der Durchmesser ist eine wichtige Größe neben der Monodispersität, um makroporöse Elektroden mit inverser Opalstruktur für spezielle Anwendungen herzustellen. Der Partikeldurchmesser bestimmt die Porengröße und die Partikel besitzen bei hoher Monodispersität einen sehr hohen Drang zur Eigenanordnung, was zu drei-dimensionalen hoch geordneten Strukturen führt. Für die Einkapselung von Enzymen sollte der Porendurchmesser nicht zu gering sein ^[30, 38]. Eine gewisse Mindestgröße einer Pore muss gegeben sein, da sonst die Inkorporation des Biomoleküls wegen der zu kleinen Verbindungskanäle zwischen den Poren nicht funktioniert.

Standardsynthese von monodispersen Polystyrol-Kugeln

Detergentienfreie Emulsionspolymerisationen sind häufig angewandte Reaktionstypen in der Polymersynthese ^[39-41]. Die Standardemulsionspolymerisation, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, hatte als Reaktionskomponenten Styrol und Kaliumperoxodisulfat (KPS) in wässriger Lösung ^[42, 43]. Das Peroxodisulfat fungierte als Radikalstarter, wobei folgende Reaktionen ablaufen (Abbildungen 17a und 17b):





**Abbildung 17: Thermische Spaltung des Radikalstarters (A);
Radikalische Startreaktion und Polymerisierung des Styrols (B).**

Nach der thermischen Spaltung des Radikalstarters Kaliumperoxodisulfat (Abbildung 17a) greift das Radikal ein Styrolmolekül an, wodurch die radikalische Kettenreaktion initiiert wird (Abbildung 17b), bis es zu einem Kettenabbruch kommt und die Polymerisation gestoppt wird. Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre (kontinuierlicher Stickstofffluss) und unter Rückfluss durchgeführt, damit durch das Erhitzen die Reaktionskomponenten nicht entweichen. Stickstoff wurde schon vor der Zugabe aller Komponenten durch den Dreihalskolben gespült, um jeglichen Sauerstoffgehalt in der Apparatur zu vermeiden. Destilliertes Wasser (0,5 L bzw. 1 L) wurde in dem Dreihalskolben vorgegeben und der Stickstofffluss angestellt. Das Styrol (Standard 60 g) wurde hinzugegeben, die Lösung auf 80°C erwärmt und kontinuierlich mittels eines Magnetrührers gerührt. Nach ausreichender Homogenisierung und Erwärmung wurde das Kaliumperoxodisulfat (Standard 0.5 g) zum Start der Polymerisierung hinzugegeben. Im Verlauf der Testsynthesen mit den Standardzusätzen wurden mehrere Mischungsverhältnisse von Monomer und Initiator ausprobiert, um die höchste Monodispersität der Polystyrol dispersion zu erhalten. Die Polymerisierung dauerte 24 h. Eine längere Polymerisierung wurde durchgeführt, um zu sehen, ob der Teilchendurchmesser sich mit der Reaktionszeit vergrößert. Jedoch wurde festgestellt, dass eine maximale Reaktionszeit von 24 h ausreichend ist, um das Ende der Reaktion zu erreichen. Das entstandene Produkt wurde mittels Filterpapier filtriert, um größere Agglomerate abzutrennen und anschließend für 7 Tage in Dialysesschläuchen (12.000 - 14.000 Dalton) dialysiert, um die Lösung von ionischen Verunreinigungen zu befreien. Das Wasser wurde dabei täglich erneuert.

Erweiterte Synthese

Als erste Modifikation der Standardsynthese wurde die Reaktionstemperatur auf 65° C erniedrigt, um größere Partikeldurchmesser zu erhalten, ohne dass die Monodispersität verloren geht. Die Komponentenzusätze wurden zunächst gleich gehalten, um die Resultate mit der unkatalysierten Standardreaktion vergleichen zu können. Die eigentliche, erweiterte Synthese bestand nun darin, einen Katalysator, Natriumhydrogensulfit und Kaliumchlorid hinzuzugeben, um bei niedrigen Temperaturen zu arbeiten und größere Partikeldurchmesser zu erhalten. Die Reaktion fand ebenso in einer wässrigen Lösung aus destilliertem Wasser statt. Zuerst wurden 0,5 L destilliertes Wasser in einen 1 L-Dreihalsrundkolben vorgegeben und 2 g Kaliumchlorid hinzugegeben. Darauffolgend wurden einige Körnchen an FeCl₂ und ~ 100 mg Natriumhydrogensulfit zu der Mischung hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde auf 65° C erwärmt und kontinuierlich unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Dann wurden 60 g Styrol dazugegeben und der Lösung ~ 15 Minuten Zeit gegeben, um weitestgehend zu homogenisieren. Wenn der höchste Homogenitätszustand erreicht wurde und die Reaktionstemperatur konstant war, wurden 0,5 g Kaliumperoxodisulfat als Initiator hinzugegeben. Die Reaktion wurde 24 h unter Schutzgas und konstanten Bedingungen durchgeführt. Nach 24 h wurde das entstandene Produkt durch Filtration über Filterpapier und anschließender Dialyse mit Dialyseschläuchen (12.000 - 14.000 Dalton) - wie bei der Standardreaktion - während sieben Tagen dialysiert. Sowohl die Reaktionstemperatur der Standardreaktion als auch die der modifizierten Variante wurde bis 60° C gesenkt.

Die Standardsynthese wurde sowohl in der Reaktionstemperatur als auch in der Zusammensetzung der Reaktionskomponenten geändert. Das FeCl₂ dient als Redoxkatalysator. Dieser bildet mit dem Startermolekül KPS ein Redox-Starterpaar^[44]:



Durch den Einsatz eines Katalysators wird die Aktivierungsenergie erniedrigt und somit kann unter milderen Bedingungen, also bei niedrigeren Temperaturen, gearbeitet werden. Als weitere Veränderung an der Standardsynthese wurde der Zusatz von Natriumhydrogensulfit gewählt. Dieser ist bekannt für die weitere Bildung von Anionradikalen. Das Hydrogensulfit repräsentiert das Reduktionsmittel, wobei das gebildete Fe³⁺ als Oxidationsmittel fungieren kann. Durch den Zusatz von Kaliumchlorid (KCl) sollte die Aggregation der Partikel durch

ionische Destabilisierung kontrolliert werden ^[45, 46]. Der Zusatz von Ionen fördert die Zusammenlagerung der Partikel, was größere Durchmesser favorisieren soll.

Anpolymerisierung

Bei einer Anpolymerisierung handelt es sich um die Vorlage einer Dispersion bereits polymerisierter Polymerpartikel, die durch erneuten Polymerisationsansatz vergrößert werden ^[47]. Ein Ziel dieser Arbeit war es, Partikel mit einem Durchmesser von 1 μm herzustellen. Um diesen Partikeldurchmesser von 1 μm zu erhalten, wurde mit einem Ansatz der erweiterten, katalysierten Reaktion für eine Anpolymerisierung gearbeitet, da dieser Ansatz größere und auch sehr monodisperse Partikel hervorbrachte. Dabei verlief die Prozedur wie im ersten Schritt, jedoch ohne Zusatz von Katalysator und Hydrogensulfit. Ein Drittel des Syntheseansatzes der erweiterten Synthese (ca. 330 mL) der Partikel mit einem Durchmesser von 380 nm wurde als Vorlage für die Anpolymerisierung in den Kolben gegeben. Die bereits vorhandenen Polystyrolpartikel wirkten als Polymerisationskeime, an denen eine weitere Polymerisierung stattfindet. Auf den vorgelegten Partikelansatz wurden 150 mL entionisiertes Wasser und 1 g Kaliumchlorid dazugegeben. Sobald die Suspension 60° C unter Stickstoffatmosphäre erreicht hatte, wurden 20 g Styrol dazugegeben und die Homogenisierung dieser Suspension ungefähr 15 Minuten abgewartet. Bei Erreichen maximaler Homogenisierung wurden 0,05 g Kaliumperoxodisulfat als Initiator hinzugefügt. Der weitere Reaktionsverlauf, die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches am Ende der Polymerisierung und die Charakterisierung erfolgten analog zu den beiden zuvor durchgeführten Ansätzen (Standardsynthese und katalysierte Reaktion). Die Aufreinigung jedes Reaktionsansatzes bestand aus Dialyse und Filtration. Bei der Anpolymerisierung wurde zusätzlich zentrifugiert. Allen Polystyrolansätzen wurde nach der ganzen Aufreinigungsprozedur ein Mischbettionenaustauscher (Amberlite ®) zugegeben, um restliche ionische Verunreinigungen zu entfernen.

Charakterisierung und Ergebnisse

Die Charakterisierungen der verschiedenen Polystyrolansätze wurden durch TEM, REM, Ramanspektroskopie, Zetapotentialmessungen und Dynamische Lichtstreuung realisiert. Die eingetrockneten Partikel mussten vor der Betrachtung mittels REM bzw. TEM mit einer dünnen Goldschicht besputtert werden, damit eine ausreichende Leitfähigkeit an der Oberfläche gegeben wurde. Die Partikel zeigten eine hohe Selbstanordnung in dichtester Packung in Form eines kolloidalen Kristalls. Das einfallende polychromatische Licht wurde

in seine Spektralfarben zerlegt. Je nach Einfallswinkel des Lichtes wurde eine bestimmte Spektralfarbe emittiert. Durch Bragg-Reflexion wurden die verschiedenen Wellenlängen in unterschiedlichen Winkeln gestreut ^[48, 49]. Dies ist am Beispiel in der nachstehenden Abbildung zu sehen, wobei durch Einfall des Lichtes die Reflexion in einem bestimmten Winkel stattfindet:



Abbildung 18: Zerlegung des polychromatischen Lichtes in die Spektralfarben (links); Einfallendes polychromatisches Licht wird so gebrochen, dass der blaue Lichtanteil gestreut wird (Mitte, links).

Das Opaleszieren des Kristalls tritt nur bei hoch geordneten kolloidalen Kristallen auf, wobei eine Monodispersität der dafür verwendeten PS-Dispersion Voraussetzung ist. Dadurch lässt sich dies als Indiz für hohe Ordnung im Kristall heranziehen. Die Opaleszenz tritt jedoch nur bis zu gewissen Schichtdicken des kolloidalen Kristalls auf. Sobald die Dicke zu groß wird, ist kein opaleszierender Effekt mehr zu beobachten, da die verschiedenen Wellenlängen nicht mehr vollständig reflektiert sondern absorbiert werden.

Es wurden streng monodisperse Polystyrolkugeln erhalten, wobei durch unterschiedliche Mengenanteile und -verhältnisse an Starter und Styrol verschiedene Durchmesser eingestellt werden konnten. Als Beispiel sind nachstehend auf Goldsubstrate eingetrocknete Partikel dargestellt, die zur REM-Untersuchung mit Gold besputtert wurden, um die für diese mikroskopische Untersuchung erforderliche Leitfähigkeit zu bieten:

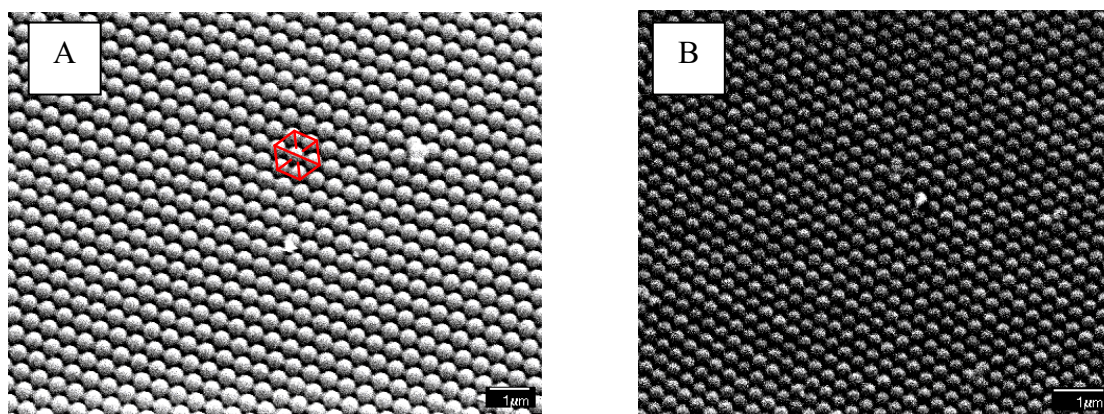


Abbildung 19: Hoch geordnete, in hexagonaler Struktur (siehe Hexagon in A) angeordnete Polystyrolpartikel eines Durchmessers von ~ 535 nm (A) und ~ 420 nm (B).

Die perfekte Selbstanordnung der Polystyrolpartikel zu einer hexagonal dichtesten Kugelpackung ist deutlich zu erkennen. Mit dieser Zusammensetzung der Reaktionslösung wurden Partikel von Durchmessern zwischen ca. 300 nm bis 550 nm erhalten. Partikel mit kleineren Durchmessern können durch Zusatz des Comonomers Natrium-4-vinylbenzolsulfonat (VBS) synthetisiert werden ^[50]. Das VBS liefert eine erhöhte Konzentration an Polymerisationskeimen in dem Polymerisationsansatz, wodurch vermehrt kleinere Partikel gebildet werden.

Durch die Anpolymerisierung wurden 1 µm große Partikel erhalten, wobei dieses Verfahren nicht ganz monodispers verläuft, da noch kleinere Partikel unverbraucht vorliegen. Diese Partikel werden somit nicht zur Anpolymerisierung verwendet bzw. bilden sich durch die Anwesenheit des Monomers und des Radikalstarters automatisch kleinere Polystyrolpartikel. Die kleineren Partikel werden in einem späteren Aufarbeitungsschritt durch Zentrifugieren von den größeren Partikeln abgetrennt. Am Ende der Aufbereitungsprozedur wurde eine monodisperse Partikeldispersion mit Partikeln eines Durchmessers von 1 µm erhalten. Die Trennung verlief zügig und sauber, da eine bimodale Verteilung der Partikelgröße in dem Rohprodukt vorlag. Bereits nach dem zweiten Zentrifugierungsschritt sind monodisperse Verteilungen erhalten worden. Um jegliche Rückstände von Partikeln mit abweichendem Durchmesser zu entfernen wurde die Zentrifugationsprozedur fünf mal mit einer Drehzahl von 3500 RPM (Rounds Per Minute) durchgeführt.

Die Ramanspektroskopie, bekannt als Analysenmethode für Kohlenstoffgerüste in organischen Molekülen durch Detektion der Molekülschwingungen, erwies sich als gute Methode, um den Reaktionsfortschritt der Polymerisierung nach gewünschter Zeit zu kontrollieren. Es lässt sich erkennen, ob das Monomer weitestgehend polymerisiert wurde.

Typische Ramanspektren für Styrol und Polystyrol sind nachstehend gegeben, wobei die wichtigsten Vergleichsbanden vergrößert wurden:

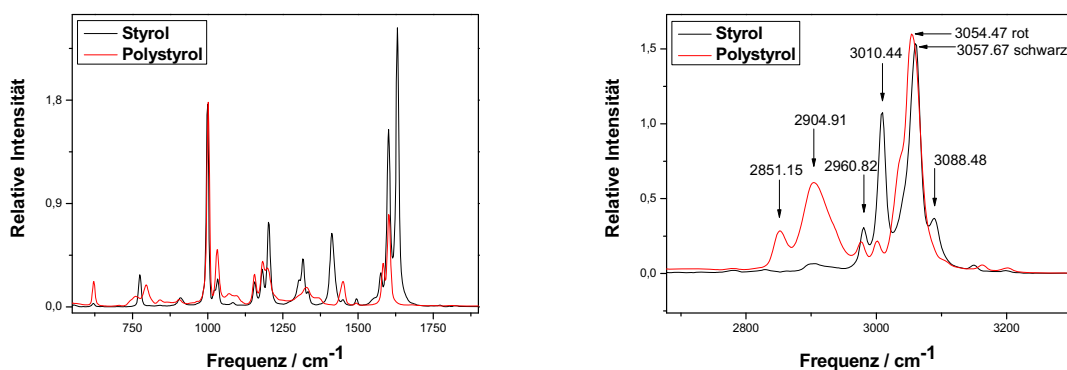


Abbildung 20: Ramanspektrum von Styrol und Polystyrol (links); Vergrößerung der wichtigsten Ramanbanden (rechts).

Die Banden bei 3010 / cm für Styrol und 2904 / cm für Polystyrol eignen sich gut zur Unterscheidung der Spektren dieser beiden Komponenten. Diese Banden kommen durch die Schwingungen der C-H-Bindungen des jeweiligen Moleküls (Styrol bzw. Polystyrol) zustande. Nachstehend sind zur Erläuterung, um welche Bindung es sich in dem jeweiligen Molekül handelt, die Strukturformeln mit markierter Bindung gegeben:

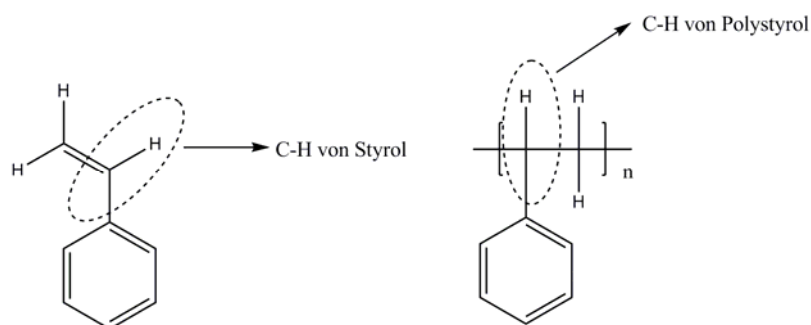


Abbildung 21: C-H-Bindung von Styrol und C-H-Bindung von Polystyrol als beste Vergleichsbindung in der Raman-Spektroskopie.

Die Frequenzen wurden mit Ergebnissen von früheren Arbeiten verglichen ^[51, 52]. Dabei wurden übereinstimmende Spektren ermittelt.

Der Polydispersionsindex (PDI) gibt die Molekülmassenverteilung in einem Polymer an. Dieser wurde in der Arbeit mittels Lichtstreuexperimenten bestimmt, wobei die Auswertung durch die Software implementierte Autokorrelationsfunktion durchgeführt wurde, welche sich auf eine Kumulantenanalyse bezieht. Der hydrodynamische Radius der Partikel sowie der PDI werden dadurch erhalten. Ab einem PDI von < 0,05 wird von einer monodispersen Verteilung gesprochen, das heißt es handelt sich um eine *sehr enge* Verteilung. Eine *enge* Verteilung wird durch einen PDI von 0,05 bis 0,15 charakterisiert und eine *breite* Verteilung geht bis zu

einem Wert von 0,25 ^[53-55]. Der Polydispersionsindex der 380 nm großen PS-Partikel, die durch die katalysierte Reaktion erhalten wurden, betrug $0,034 \pm 0,018$, was für eine gute Monodispersität spricht. Die Monodispersität ist auch essentiell für eine Anpolymerisierung, um nach einem zweiten Syntheseschritt ebenso eine monodisperse Verteilung der gewünschten Partikel zu bekommen.

Mittels Zeta-Potential-Messungen wurde die Oberflächenladung der PS-Partikel bestimmt. Dabei kam wie erwartet heraus, dass die Partikel eine negative Oberflächenladung aufweisen. Denn unter Verwendung von Kaliumperoxodisulfat als Radikalstarter bilden sich Sulfatgruppen an der Oberfläche, die negativ geladen sind. Es wurde zwischen den Partikeln der katalysierten Reaktion und der unkatalysierten Reaktion unterschieden. Die Partikel, die unter Verwendung der Katalysatoren, wie zuvor beschrieben, hergestellt wurden, lieferten ein Zetapotential von $-44,9 \pm 1,4$ mV, wogegen die Partikel hervorgehend aus der unkatalysierten Standardsynthese ein Zetapotential zwischen $-51,3 \pm 0,3$ mV bzw. $-53,6 \pm 1,0$ mV aufwiesen.

Der Vergleich der verschiedenen Syntheseansätze zeigte, dass die Synthese bei niedriger Reaktionstemperatur, aber mit Zusatz von Redoxkatalysator, Hydrogensulfit und KCl monodisperse Partikel mit größeren Durchmessern bei gleichen Mengen der eingesetzten Komponenten entstehen ließ. Es ließen sich Unterschiede in Partikeldurchmessern bis zu ca. 60 nm, bei einer Temperaturdifferenz von 20° C und gleicher Rezeptur der Grundzusätze wie Styrol, destilliertem Wasser und Kaliumperoxodisulfat beobachten. Hoch monodisperse Polystyrol dispersionen, die bei Eintrocknung perfekt geordnete kolloidale Kristalle bildeten, wurden synthetisiert. Im Folgenden sind in Abbildung 22 perfekt geordnete PS-Partikel eines Durchmessers von ~535 nm zu sehen:

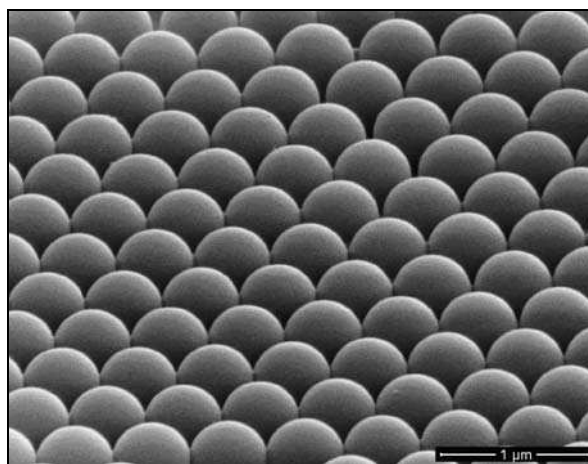


Abbildung 22: Perfekt geordnete PS-Schichten, die sich bei der Evaporierung des Dispersionsmediums selbst angeordnet haben.

Diese Resultate bedeuteten, dass die verwendeten Synthesen vollständig optimiert waren und die höchst mögliche Monodispersität erreicht wurde. Abschließend wird in der nächsten REM-Aufnahme eine PS-Multischichtanordnung aus zwölf hoch geordneten Schichten gezeigt, die durch Selbstanordnung der Partikel entstanden sind:

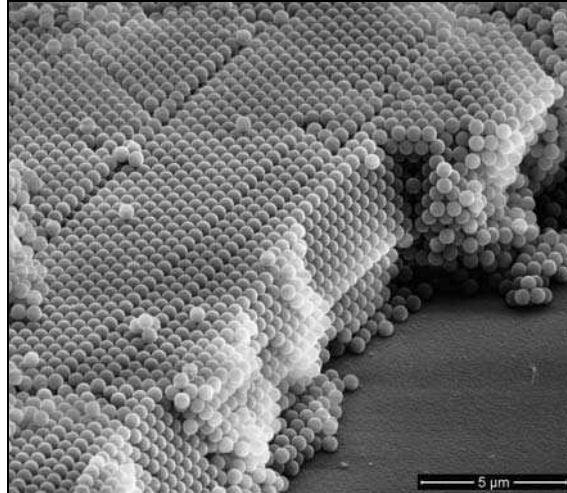


Abbildung 23: Hoch geordneter kolloidaler Kristall aus monodispersen PS-Partikeln.

Durch die Selbstanordnung der Partikel kommt ihre Monodispersität zum Ausdruck, welche in einem solchen Fall mit bloßem Auge an der Opaleszenz der kolloidalen Kristalle zu erkennen ist. Mittels dieser synthetisierten PS-Partikel mit verschiedenen Durchmessern konnten nun geordnete poröse Elektroden hergestellt werden.

Poröse Goldelektroden

Poröse Materialien haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie finden in der Elektrokatalyse ^[56, 57], -analyse ^[57] und -synthese großen Anklang. Poröse Oberflächen stellen wegen der stark vergrößerten aktiven Oberfläche sehr interessante Materialien für viele katalytische Anwendungen dar ^[38, 58-62]. Die aktive Oberfläche hängt von der Porosität, der Poren und der Schichtanzahl des Porensystems ab. Aus katalytischer Sicht muss ein poröses Elektrodenmaterial ein interkonnektierendes Porensystem aufweisen, damit die mögliche aktive Oberfläche auch genutzt werden kann. Ist keine durchgängige Offenporigkeit gegeben, kann auf die aktive Oberfläche nicht zugegriffen werden. Die Erschließung der gesamten Porenschichten bis hin zu der letzten und tiefsten Porenschicht wird durch verschiedene Templatverfahren gewährleistet. Eine strenge Monodispersität der zu verwendeten Partikellösungen für den Templating-Prozess ist von Bedeutung für die Synthese von kolloidalen Kristallen als Grundlage für weitere elektrochemische Abscheidungen. Somit werden poröse Materialien mit einer inversen Opalstruktur erhalten ^[63-68], was an der Opaleszenz der porösen Oberflächen zu erkennen ist. Durch diese Eigenschaft werden sie

ebenfalls für die Anwendung als photonische Kristalle attraktiv. Eine hoch interessante Anwendungsmöglichkeit solcher porösen Strukturen ist die Biofunktionalisierung im Inneren der Poren. Cofaktoren, Mediatoren und Enzyme können in die Poren eingeschlossen werden ^[69]. Der Vorteil einer solchen Einkapselung von chemischen und biologischen Molekülen ist deren dauerhafte bzw. länger anhaltende Immobilisierung. Die Poren dienen als Schutzhülle, wodurch sowohl das Wegspülen von Molekülen an der Oberfläche als auch deren mechanische Entfernung verhindert wird. Des Weiteren können Moleküle in Gele ^[70] oder Polymernetzwerke zur kovalenten Anbindung, zum Beispiel via Peptidbindung ^[71, 72] in Poren verankert werden. Im Falle von Sol-Gel-Filmen werden die Poreninnenwände mit einem Silicagel homogen ausgekleidet, in welches Biomoleküle in aktiver Form eingebettet werden können ^[70]. Poröse Materialien werden nach der Größe des Durchmessers laut IUPAC in mikroporös ($d < 2$ nm), mesoporös (2-50 nm) und makroporös ($d > 50$ nm) eingeteilt ^[73]. Nachstehend werden die beiden Templatverfahren vorgestellt.

Kontrollierte Evaporierung (CE)

Die *kontrollierte Evaporierung* stellt eine simple Methode dar, die poröse 3-dimensionale Strukturen liefert. Bei dieser Methode wurde in der vorliegenden Arbeit eine monodisperse wässrige Dispersion von Polystyrolpartikeln auf eine metallische Trägerfläche getropft. Nachfolgend ist ein Ergebnisbeispiel des Eintrocknungsprozesses gezeigt:

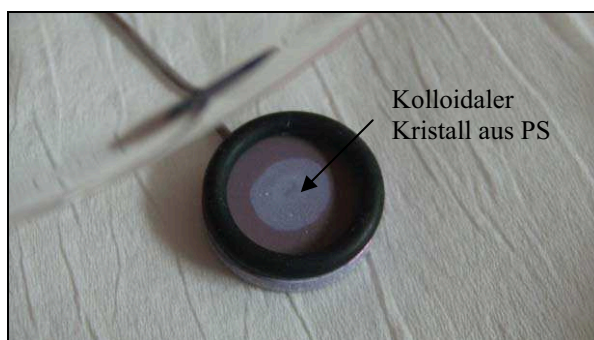


Abbildung 24: Kolloidaler Kristall aus PS-Partikeln auf einem Titanwafer.

Ein Gummiring, angepasst an die Größe der Unterlage, dient zur Vermeidung des Auslaufens der aufgetragenen Dispersion. Nach ein paar Tagen der Eintrocknung in einer mit Wasserdampf gesättigten Umgebung haben sich die Latexpartikel zu einem hoch geordneten, kolloidalen Kristall angeordnet. Bei einer längeren Evaporierungszeit haben die Partikel mehr Zeit, um die energetisch günstigere Position im kolloidalen Kristall zu wählen und somit wird eine bessere Anordnung einer hexagonalen Struktur erreicht. Um den Eintrocknungsprozess

zu beschleunigen, ohne dabei die Partikel bei der Selbstanordnung zu stören, kann das mit Partikeln modifizierte Metallsubstrat bei 80°C in einen Trockenofen gestellt werden, bis der kolloidale Kristall komplett ausgebildet und getrocknet ist. Anschließend kann die Metallabscheidung stattfinden. Die nachstehende Abbildung beschreibt die Herstellung des Templats, angefangen bei der Bildung des endo-Templats bis zur Partikelentfernung nach der Elektroabscheidung eines Metalls:

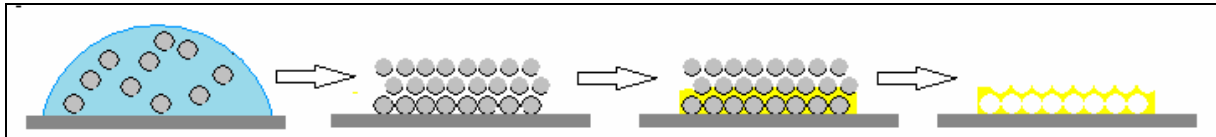


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Evaporierungsverfahrens, anschließender Metallabscheidung und Auflösen der PS-Partikel.

Ein Vorteil dieser Methode ist die Verwendung für jegliche metallische Unterlage, die auch anspruchsvollere Geometrien besitzen. Folgend soll nun die zweite angewandte Methode, die *LB-Technik* erklärt werden.

Langmuir-Blodgett-Technik (LB)

Dieses Templatverfahren wurde während der Forschungsaufenthalte in Bordeaux in dem Labor NsysA der ENSCBP (Universität Bordeaux 1) durch die bereits bekannte Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mittels Silicapartikeln erlernt. Bei der *LB-Technik* handelt es sich um ein Verfahren, um amphiphile Moleküle, das heißt Moleküle mit einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil als Monolagen auf ein Substrat zu transferieren. Dieses Verfahren wurde von I. Langmuir 1918 entwickelt und später von K. Blodgett weitergeführt. Dabei wird ein Trog aus Teflon mit Reinstwasser als Subphase gefüllt und an deren Oberfläche, also der Grenzschicht Wasser / Luft eine Monoschicht (Langmuir-Film) von Molekülen erzeugt ^[74]. An der Wasseroberfläche befinden sich bewegliche Barrieren, die bei Kompression dafür sorgen, dass die Partikel an der Wasseroberfläche einen Langmuir-Film bilden. Das heißt, die Moleküle werden bis zu einem gewissen Oberflächendruck komprimiert und bilden somit eine geordnete Monoschicht. Die Methode funktioniert analog zu amphiphilen Molekülen auch mit amphiphilen Partikeln. Die *LB*-Apparatur ist mit einer Wilhelmy-Vorrichtung ausgerüstet ^[75]. Diese kontrolliert den Oberflächendruck durch ein Kraftmessverfahren mittels eines speziellen Papierplättchens. Dabei wird der Benetzungsgrad zwischen dem Plättchen und der Flüssigkeit im *LB*-Trog ausgenutzt. Durch eine computergesteuerte Einheit wird das Signal weitervermittelt, um die

Barrieren zu komprimieren. Nachstehend sind Abbildungen von dem *LB*-Trog mit Barriere und Wilhelmy-Vorrichtung gezeigt:

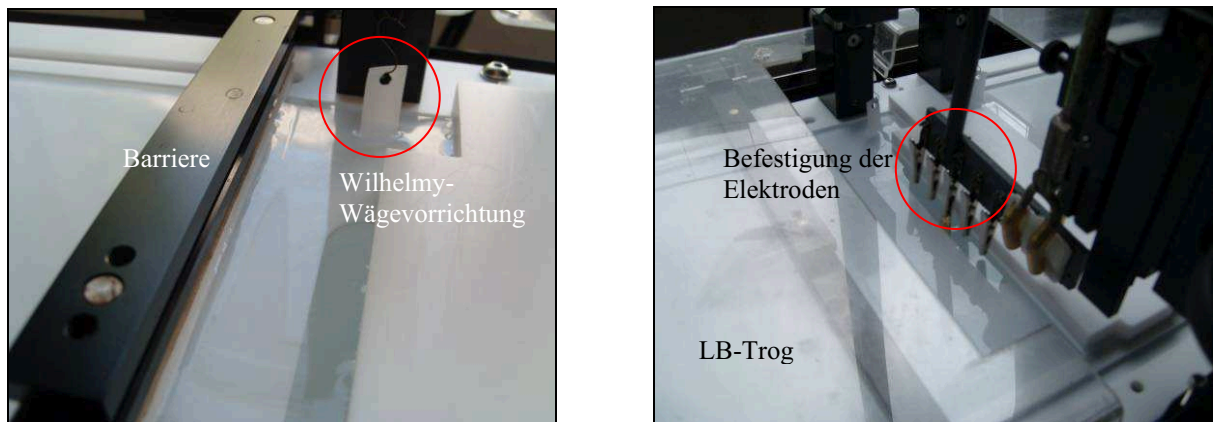


Abbildung 26: *LB*-Trog mit Barriere und Wilhelmy-Waage (links); *LB*-Trog mit Vorrichtung zur Befestigung von Elektroden (rechts).

Bei dem Kompressionsvorgang an der Wasseroberfläche im *LB*-Trog werden so genannte Schub-Flächen-Diagramme aufgezeichnet, die die Änderung des Oberflächendrucks mit der Änderung der Fläche darstellen. Anhand dieser Diagramme wird das Kompressionsverhalten von Monoschichten ^[76-78] graphisch dargestellt. Die Schub-Flächen-Diagramme werden auch als Isotherme bezeichnet, da der Verlauf temperaturabhängig ist und ein *LB*-Experiment stets bei konstanten Temperaturverhältnissen durchgeführt wird ^[79, 80]. Nachstehend ist eine solche *LB*-Isotherme aufgezeigt, wobei sowohl ein theoretischer als auch ein experimentell erhaltener Kurvenverlauf demonstriert wird:

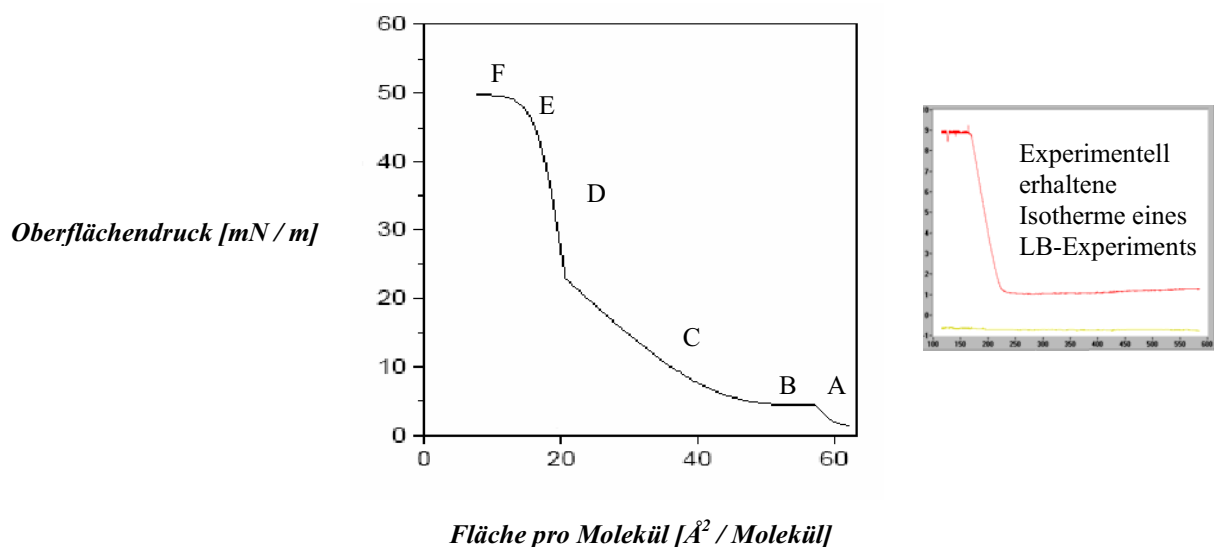


Abbildung 27: Schematische Darstellung eines Schub-Flächendiagramms und den typischen Zuständen während der Kompression (Mitte); Experimentelle *LB*-Kurve zum Vergleich (rechts).

Zu Beginn des Komprimierungsprozesses befinden sich die Moleküle in einem gasähnlichen Zustand (A). Die Moleküle sind auf einer sehr großen Fläche verteilt. Der mittlere Teilchenabstand ist ebenfalls sehr groß, wobei die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen sehr gering sind. Sobald die Isotherme in einen plateauähnlichen Zustand gelangt, ähnelt dieser Zustand dem Phasenübergang von gasförmig zu flüssig (B). Hier ändert sich der Oberflächendruck nicht mit der Änderung der Fläche. Bei weiterer Kompression steigt nun der Oberflächendruck mit der Flächenänderung weiter an. Die Moleküle haben nun eine eingeschränkte Beweglichkeit, da der Film immer dichter wird. Der vorherrschende Zustand ähnelt nun dem Flüssigkeitszustand (C). Bei kontinuierlich weiter durchgeführter Kompression der Barrieren an der Grenzfläche Wasser / Luft werden die Moleküle gezwungen sich immer dichter zu packen. Die Kompressibilität nimmt hier sehr stark ab, was ein Zeichen dafür ist, dass die Moleküle eine starrere Anordnung annehmen (D). Die Moleküle sind nun vollständig gepackt. Bei noch weiterer Kompression gehen die Moleküle erneut einen Phasenwechsel ein von flüssig zu fest (E/F). Bei weiterer Kompression wird riskiert, dass der Langmuir-Film kollabiert, das heißt die Monoschicht geht verloren. Teile der vorherigen Monoschicht schieben sich übereinander.

Zur Durchführung der Experimente wurde nun die Wanne des *LB*-Trops mit Chloroform ausführlich gereinigt und nach dem Trocknen mit Reinstwasser (Micropure) gefüllt. Die Silicapartikel wurden daraufhin in Ethanol dispergiert und fünfmal je 12 Minuten bei 12000 RPM (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Dabei wurde das Ethanol nach jeder Zentrifugation gewechselt und am Ende des fünften Durchgangs das Ethanol abgetrennt und wieder neues Ethanol hinzugegeben, so dass die Partikel gerade so bedeckt waren. Anschließend wurden die Partikel für ca. 10 Minuten im Ultraschallbad re-dispergiert. Für die Enddispersion wurde die Partikeldispersion mit Chloroform im Verhältnis 1: 4 gemischt. Mit einer Pasteurpipette wurden nun die Partikel Tropfen für Tropfen vorsichtig auf die Wasseroberfläche in dem *LB*-Trog getropft und somit auf der Wasseroberfläche gespreitet. Nachdem die Apparatur vorbereitet war, wurde das Substrat in den vorgesehenen Halter der *LB*-Apparatur eingeklemmt und die Computersteuerung des Dippers programmiert. Die Barrieren der Apparatur wurden mit einer Geschwindigkeit von $20 \text{ cm}^2 / \text{min}$ soweit auf der Wasseroberfläche zusammengeführt, bis der gewünschte Oberflächendruck ($9\text{-}12 \text{ mN} / \text{m}$) erreicht war. Vor Beginn der Modifizierung mit den Silicapartikeln mussten die Goldelektroden mit einer Schicht aus Linkermolekülen bedeckt werden, damit die Goldoberfläche hydrophiler wird, um einen ausreichenden Partikeltransfer auf die Elektrodenoberfläche zu gewährleisten, da das Gold eine hydrophobe Oberfläche darstellt.

Als Linker wurde Cysteamin gewählt, welches so genannte chemisorbierte selbstanordnende Monoschichten (SAM) durch Bindung von Schwefel zu Gold auf der Goldoberfläche ausbildet ^[81]. Dazu wurden die mit destilliertem Wasser, Aceton und Ethanol gründlich gereinigten Elektroden in eine Lösung aus 10 mM Cysteamin in Ethanol für 24 h eingelegt. Die Goldelektroden selbst bestanden aus Glasplättchen, die mit einer Haftschrift aus dünner Cr/Ni-Schicht beschichten waren, worauf eine Goldschicht aus 200 nm aufgebracht war. Nach der Modifizierung mit Cysteamin wurde die Elektrode an der Halterung der *LB*-Apparatur befestigt und mit einer Dippgeschwindigkeit von 63 mm / min bei der Abwärtsbewegung und 1 mm / min bei der Aufwärtsbewegung in den *LB*-Trog gedippt. Die Anzahl der Kolloidschichten wird durch die Dippanzahl in den *LB*-Trog kontrolliert. Der Oberflächendruck wird dabei durch die Kompression der Barrieren konstant gehalten. Nachstehend ist der Partikeltransfer in Abbildung 28 schematisch dargestellt:

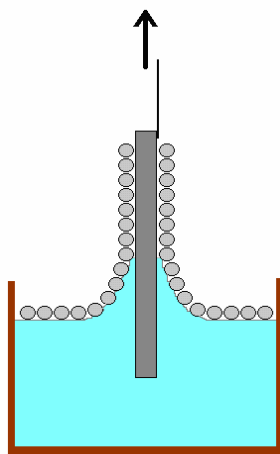


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Partikeltransfers auf die Elektrodenoberfläche bei der Aufwärtsbewegung aus dem LB-Trog.

Bei jedem Dippvorgang wird eine Partikelmonoschicht auf die Oberfläche transferiert. Nach dem Modifizieren der Elektrode mit einem kolloidalen Kristall wurde Gold amperometrisch bei einem Potential von - 0,66 V vs. Ag / AgCl in das Silica-endo-Templat abgeschieden. Als Gegenelektrode wurde eine Platinelektrode verwendet. Die Silicapartikel wurden mittels HF aufgelöst. Die makroporösen Elektroden, die dabei entstehen, weisen eine inverse Opalstruktur auf. Daher lässt sich auch eine Opaleszenz der Elektroden im Licht erkennen. Diese Opaleszenz tritt nur dann auf, wenn die Struktur auch hoch geordnet ist. Im Folgenden sind Bilder einer makroporösen Elektrode dargestellt, die unter Verwendung von Silicapartikeln eines Durchmessers von 440 nm und der *LB-Technik* hergestellt wurde. Sie weist eine Opaleszenz auf, was für ihre gute Ordnung der Poren spricht.



Abbildung 29: Bilder einer opaleszierenden porösen Goldelektrode, hergestellt mittels 440 nm-Silicapartikel und der LB-Technik.

Bei der *LB-Technik* mit Silicapartikel entstehen hoch geordnete Schichten, durch die bei der Abscheidung ein oszillierender Verlauf der Strom-Zeit-Abscheidungskurve zu beobachten ist. Danach ist es möglich, die Schichtanzahl zu kontrollieren, da pro Oszillationsperiode eine Schicht abgeschieden wird und bei dem Maximum der Oszillationswelle die Abscheidung sich an einer Stelle einer halben Schicht befindet. Im Folgenden ist eine REM-Aufnahme einer makroporösen Goldelektrode dargestellt, hergestellt mittels der *LB-Technik* mit Silicapartikeln eines Durchmessers von 440 nm:

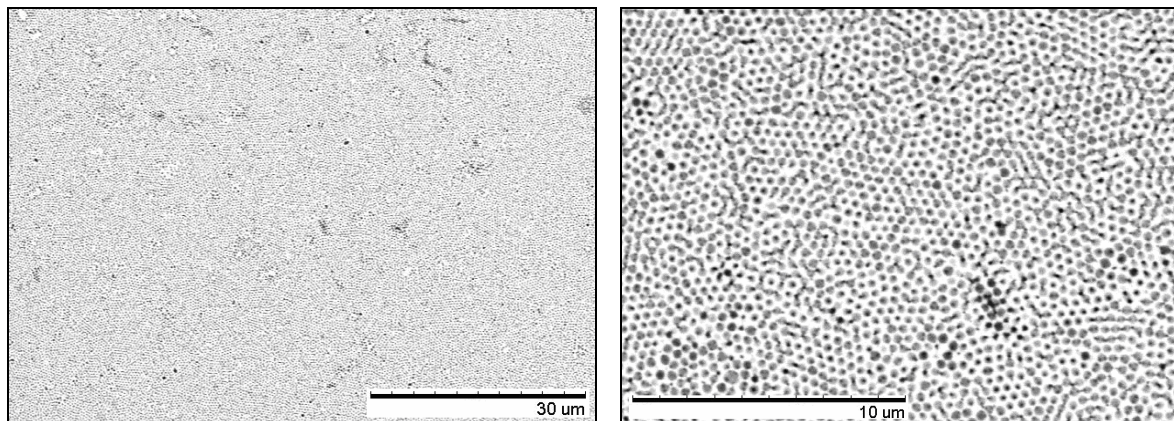


Abbildung 30: REM-Aufnahmen einer porösen Goldelektrode, die unter Anwendung der *LB-Technik* mittels Silicapartikel von 440 nm Durchmesser hergestellt wurde.

Während dieser Arbeit konnte erstmals die *LB-Technik* an den Einsatz von PS-Partikeln angepasst werden. Diese Weiterentwicklung und ihre Vorteile für ein in dieser Arbeit beschriebenes erneuerbares Elektrodensystem werden in Kapitel 3.2 aufgezeigt. An dieser Stelle sollen die Experimente und Ergebnisse dargestellt werden, die dazu geführt haben, die *LB-Technik* an den Gebrauch von PS anzupassen. Nachstehend ist ein Foto gezeigt, das den Transfer der PS-Partikel auf die Elektrodenoberfläche zeigt. Es handelte sich hier um Template aus 10 Schichten an PS-Kügelchen eines Durchmessers von 380 nm, die Schicht für Schicht beim Eindippen der Elektroden transferiert wurden.

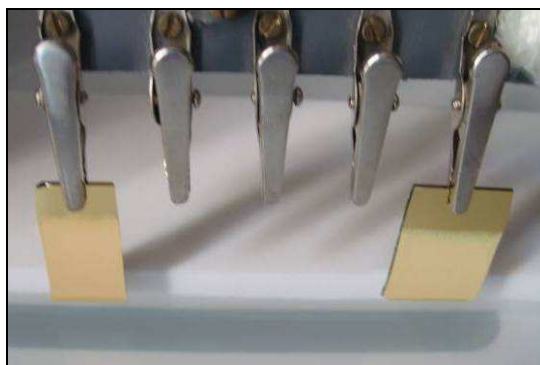
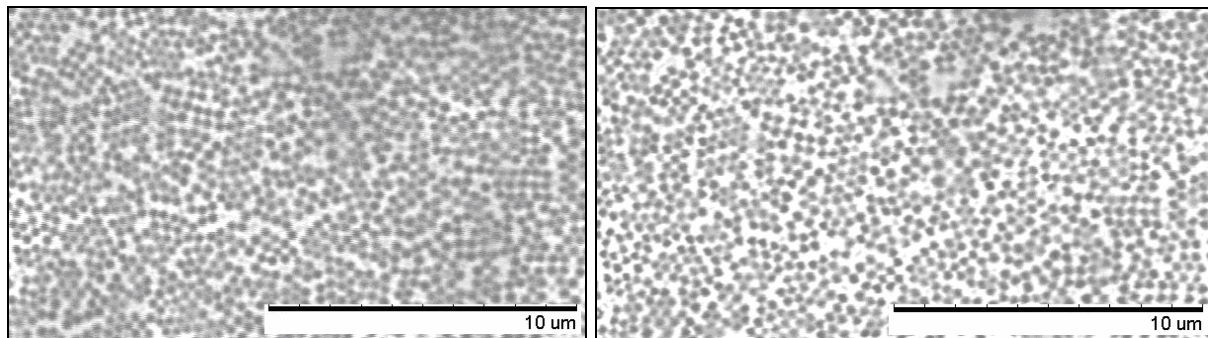


Abbildung 31: Durch die LB-Technik transferierte PS-Partikel auf unbehandelte Goldoberflächen.

Bei den allerersten Experimenten, PS mittels der *LB-Technik* auf eine Elektrodenoberfläche zu transferieren, kam eine Inselbildung zustande, wobei die Inseln aus nach der dichtesten Kugelpackung anordneten Partikelfeldern bestanden. Die Partikel schwammen wie kleine Pakete auf der Wasseroberfläche, die zueinander einen Abstand besaßen, so dass eine Art von Fleckenbildung aus PS-Partikeln auf der Elektrode entstand. Dadurch ließen sich die PS-Partikel auch nur in Inselansammlungen auf die Goldoberfläche transferieren. Die Methode wurde jedoch soweit unter anderem durch Einstellung des passenden Oberflächendrucks optimiert, dass homogen bedeckte, poröse Elektroden entstanden.

Gold ist als Elektrodenmaterial weit bekannt. Es ist ein Edelmetall, welches daher eine sehr gute Leitfähigkeit besitzt, gute Korrosionsbeständigkeit aufweist, und es eignet sich sehr gut zur Oberflächenmodifizierung. Durch die hohe Affinität des Schwefels zu Gold kann die Goldoberfläche mit selbstanordnenden Monoschichten (SAM) von Thiolen leicht modifiziert werden. Aber auch das Immobilisieren von Enzymen per Schwefel-Gold-Bindung ist gut möglich ^[82]. Dies macht Gold als Sensorbasismaterial oder für funktionalisierte Elektroden besonders interessant. In dieser Arbeit wurden poröse Goldelektroden sowohl mittels der *LB-Technik* als auch durch die *CE-Methode* hergestellt. Zur Herstellung des Metalltemplats wurde Gold elektrochemisch bei einem Potential von - 0,66 V vs. Ag/AgCl in die Zwischenräume des endo-Templats abgeschieden. Ein Platinblech wurde als Gegenelektrode verwendet. Als Abscheidebad diente ein kommerzielles Zwei-Komponenten-Goldbad (ECF-60 und ECF-61 von Metalor SAS France). Nachstehend werden Beispiele von Elektrodenoberflächen aus porösem Gold gezeigt, die mittels der *LB-Technik* und PS-Partikel von 380 nm hergestellt wurden:



***Abbildung 32: Poröse Goldoberflächen mittels LB-Technik hergestellt.
Der Porendurchmesser beträgt ~ 380 nm.***

Auch die durch die Anpolymerisierung hergestellten PS-Partikel eines Durchmessers von 1 μm wurden zur Modifizierung der Elektroden verwendet. Nachstehend ist ein Beispiel einer solchen Elektrode mit einem Porendurchmesser von 1 μm gegeben, wobei die Poren schon zu ca. 80 % durch die elektrochemische Abscheidung des Goldes geschlossen sind:

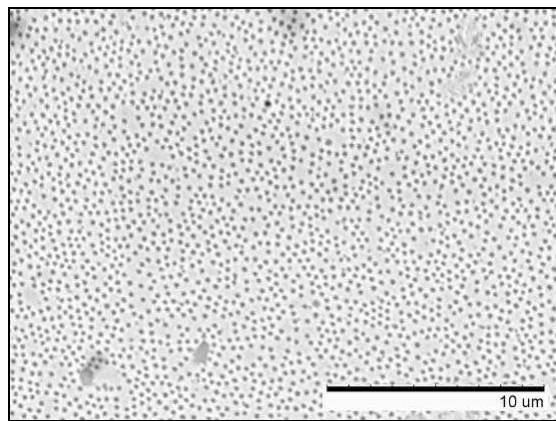


Abbildung 33: Poröse Goldoberfläche mit einem Porendurchmesser von 1 μm .

Da das Templat bereits fast vollständig geschlossen ist, sind die noch erkennbaren Poreneingänge relativ weit auseinander gelegen. Ein solcher Porendurchmesser von 1 μm würde ausreichend Innenraum bieten, um Biomoleküle ins Innere der Poren hinein zu diffundieren. In Abbildung 34 sind REM-Aufnahmen gezeigt, die verschiedene poröse Goldoberflächen darstellen, die mittels PS-Partikel unterschiedlicher Durchmesser und der *CE-Methode* hergestellt wurden:

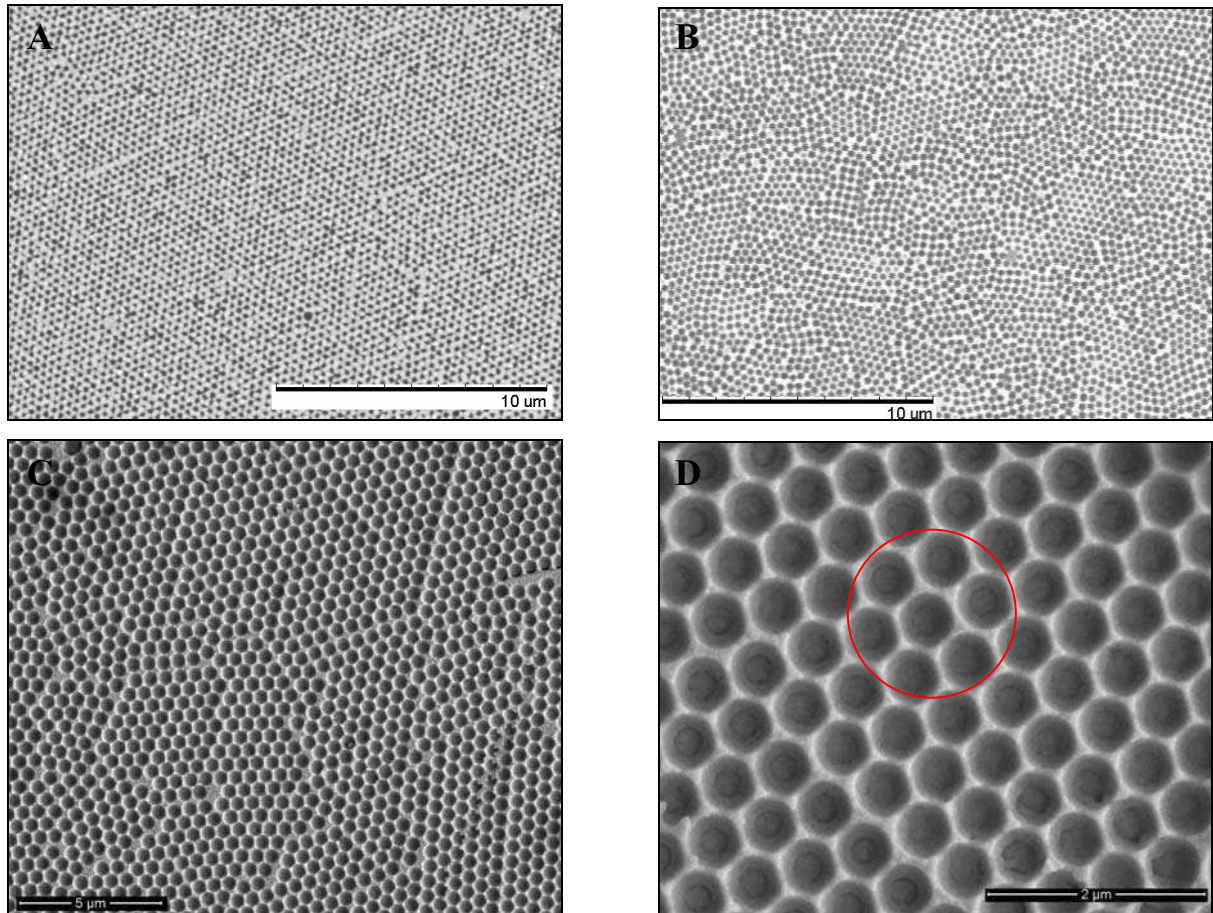


Abbildung 34: Die REM-Aufnahme A stellt eine poröse Goldoberfläche mit einem Porendurchmesser von ~ 300 nm dar; die Aufnahme B hat einen Porendurchmesser von ~ 380 nm und C und D ~ 535 nm. Bei der Aufnahme D wird auf die perfekte hexagonale Struktur hingewiesen.

Eine homogene Verteilung der Poren war über die ganze Elektrodenoberfläche zu beobachten. Die Porengrößen waren durch die Durchmesser der eingesetzten PS-Partikel kontrollierbar. Solche poröse Goldoberflächen stellen eine sehr interessante Art der Vergrößerung der aktiven Oberfläche dar. Nachstehend sind CVs einer unporösen und porösen Goldschicht (via CE) gezeigt, die den Verstärkungsfaktor der aktiven Oberfläche belegen:

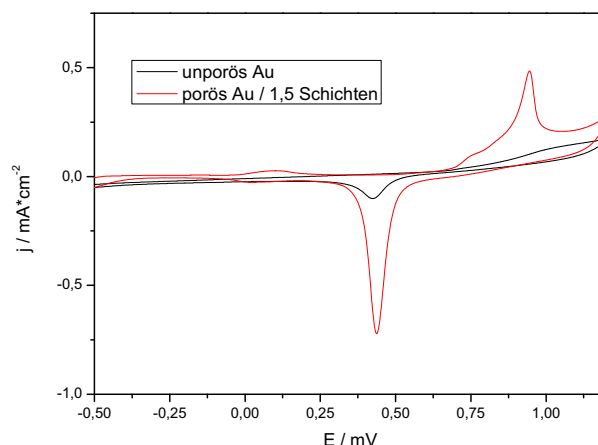


Abbildung 35: CV einer unporösen und einer porösen (1,5 Schichten) Goldschicht im Vergleich; die Vergrößerung der aktiven Oberfläche ist deutlich zu erkennen.

Mit diesem Vergleich wird die Vergrößerung der aktiven Oberfläche elektrochemisch belegt. Diese porösen Flächen bieten zusätzlich die Möglichkeit einer Inkorporation von Biomolekülen in das Porensystem.

In dem von der EU finanzierten Projekt wurden dünne Silicafilme von der Arbeitsgruppe in Nancy in solche Porensysteme eingeschlossen. In diesem Gel soll ein Biosystem mit Enzym eingeschlossen worden ^[70]. Dadurch wurde gezeigt, dass diese Poren sehr gut zur Einbettung der Biosysteme geeignet sind, während eine mechanische Abtragung der Modifizierungsschicht verhindert wird.

Diskussion:

Die Herstellung geordneter makroporöser Goldelektroden konnte erfolgreich durch Anwendung zweier verschiedener Templat-Verfahren durchgeführt werden. Die dazu eingesetzten hoch monodispersen Polystyrolpartikel wurden über drei verschiedene Synthesewege hergestellt. Gut geordnete kolloidale Kristalle wurden erhalten. Die hergestellten makroporösen Goldelektroden zeigten eine gute offenporige Interkonnektierung. Bei der *LB-Technik* war es möglich, die Anzahl der Porenschichten genau zu bestimmen; bei der *kontrollierten Evaporierung* waren dicke Template aus Multischichten möglich. Die teilweise entstandenen Defekte in der Porenstruktur sind für die Anwendung in der Elektrokatalyse nicht störend. Die Vergrößerung der aktiven Oberfläche konnte durch CV-Untersuchungen gezeigt werden.

3.1.4 Hochskalierung makroporöser Goldelektroden

Als Zusatz für das Projekt wurden, aufgrund der erlernten Expertise in dem Gebiet der Templatverfahren, große Flächen mittels der *kontrollierten Evaporierungsmethode* makroporös hergestellt. Die für dieses Projekt vorgesehenen großen makroporösen Elektroden wurden mittels der *LB-Technik* von den Projektpartnern in Bordeaux hergestellt. In der vorliegenden Arbeit gelang es zusätzlich, große Goldflächen von bis zu 24 cm^2 mittels der *CE-Methode* in ihrer Oberfläche porös zu gestalten. Nachstehend ist eine makroporöse Goldoberfläche mit einer geometrischen Oberfläche von 36 cm^2 dargestellt:

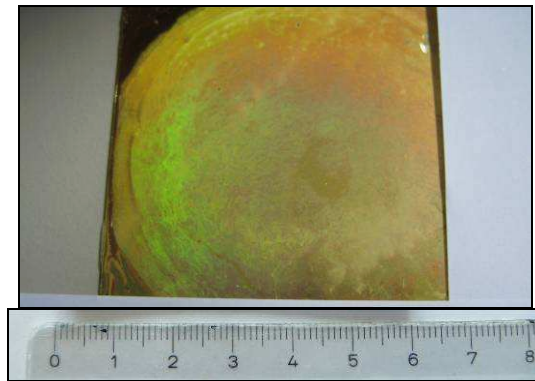


Abbildung 36: Hochskalierte makroporöse Goldelektrode; hergestellt mittels der CE-Methode.

An der Opaleszenz dieser Elektrode ist zu erkennen, dass es sich um ein poröses, geordnetes System handelt. Das eintreffende, polychromatische Licht wird je nach Einfallswinkel in verschiedene Spektralfarben gestreut. Die Makroporen einer dieser Elektroden ist in den folgenden REM-Aufnahmen zu sehen:

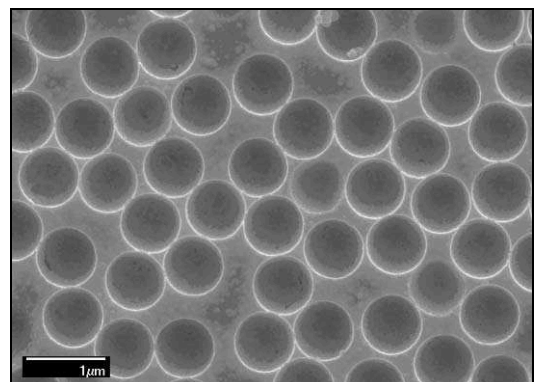
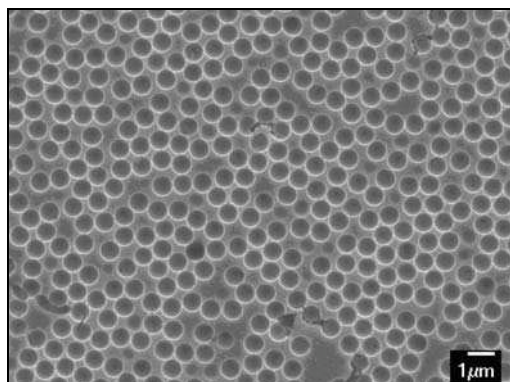


Abbildung 37: Poröse Goldelektrode mit einem Porendurchmesser von 855 nm. Es handelt sich hier um eine hochskalierte, poröse Beschichtung einer geometrischen Fläche von 24 cm^2 .

Es wurden PS-Partikel von 855 nm verwendet. Durch die recht großen Partikel kommt es zu einer weniger guten Anordnung. Denn je größer der Partikeldurchmesser, desto geringer ist die Ordnung der Partikel auf der Elektrodenoberfläche. Die Partikel mit größeren Durchmessern haben wegen des größeren Platzmangels und der eingeschränkten Beweglichkeit weniger die Möglichkeit, sich hexagonal anzuordnen. Die Elektroden wurden auf ihre Oberfläche hin mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert. Im Folgenden sind zyklische Voltammogramme zum Vergleich der elektrochemisch aktiven Oberflächen einer porösen Elektrode mit einer Monoschicht an Poren eines Durchmessers von 855 nm und einer modifizierten, geometrischen Oberfläche von 24 cm^2 mit einer flachen Goldelektrode einer geometrischen Oberfläche von 36 cm^2 (genutzte Fläche in der Durchflusszelle 25 cm^2) dargestellt. Die zyklischen Voltammogramme wurden in $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ aufgenommen.

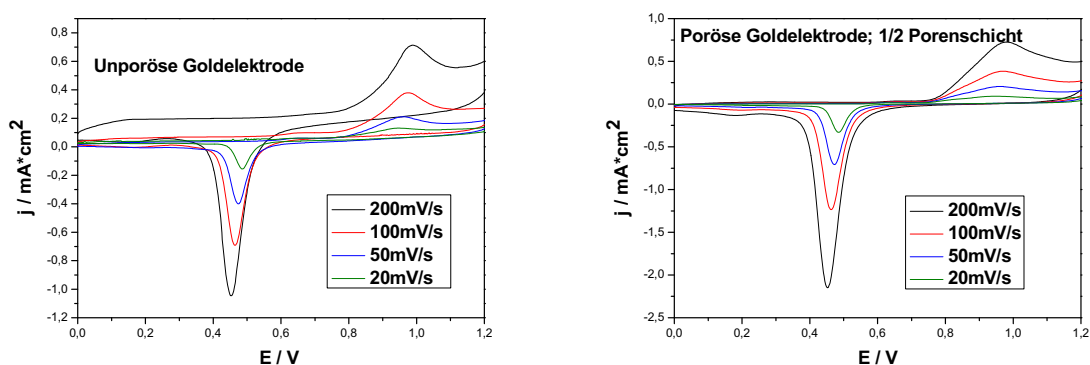


Abbildung 38: CVs bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten: Flache Goldelektrode mit einer geometrischen Fläche von $A=31,5 \text{ cm}^2$ (links); Poröse Goldelektrode (855 nm Poren) mit einer geometrischen Fläche von $A=24 \text{ cm}^2$ (rechts).

Nachstehend wurden die Stromdichten der porösen Elektrode mit den Stromdichten der flachen Elektrode bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten aufgetragen, um jeweils bei gleicher Vorschubgeschwindigkeit die aktive Oberfläche zu vergleichen:

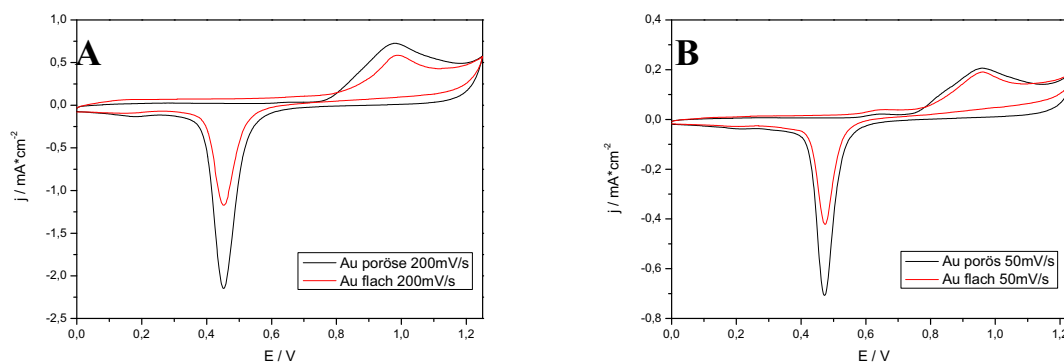


Abbildung 39: CVs einer porösen und einer unporösen Elektroden jeweils im Vergleich bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten: A bei 200 mV/s und B bei 50 mV/s .

Ein Verstärkungsfaktor von ca. 1,5 - 2 wurde hier erreicht. Es handelte sich bei der Porenschicht um eine halbe Hohlkugelschicht. Bei Multischichten ist eine weitere Verstärkung des Signals für die großen Elektroden zu erwarten, wie es bei kleineren geometrischen Flächen der Fall ist ^[50].

Diskussion:

Diese Ergebnisse repräsentieren die ersten Resultate der Anwendung der kontrollierten Evaporierungsmethode auf großen Flächen von 6x6 cm² und stellen die Grundlage für den Einsatz makroporöser Elektroden in der Durchflusszelle dar.

3.1.5 Elektrochemisches Screening von Mediatoren

Für das Projekt wurde nach einem passenden Mediator gesucht, der für eine elektroenzymatische Reduktion einsetzbar ist. In diesem Abschnitt des Forschungsprojekts wurden die von dem Projektpartner der METU synthetisierten Mediatoren auf ihr elektrochemisches, elektrokatalytisches und elektroenzymatisches Verhalten getestet. Auch in diesem Fall wurde nach einem Messprotokoll gearbeitet: a) elektrochemisches Redoxverhalten des Mediators bei verschiedenen pH-Werten, b) Elektrokatalytik der NAD⁺-Reduktion in Gegenwart des entsprechenden Redoxmediators bei verschiedenen pH-Werten und c) die Elektroenzymatik. Die Messungen erfolgten in dem in Kapitel 3.1.2 dargestellten Multizellenarray. Die zu untersuchenden Redoxmediatoren sind nachfolgend aufgelistet:

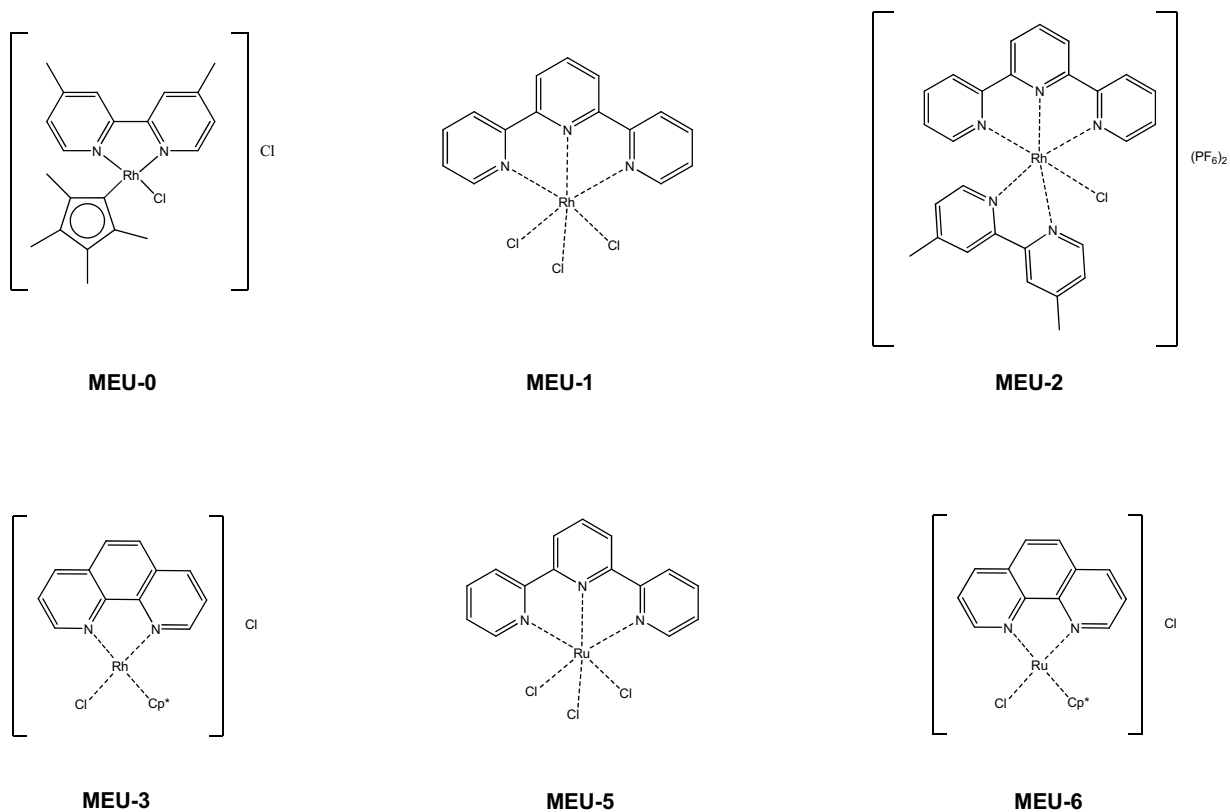


Abbildung 40: In dieser Arbeit elektrochemisch charakterisierte Mediatoren.

Im ersten Schritt wurde das Redoxverhalten der erhaltenen Mediatoren mittels CV bei pH-Werten von 5,5, 7 und 9 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich MEU-0, MEU-2 und MEU-3 gewünschte Aktivität zeigten. Bei MEU-0 wurde anhand der CVs die Zunahme des Reduktionspeaks bei einem Potential von - 0,6 V vs. NHE mit zunehmender Vorschubgeschwindigkeit beobachtet. Somit erschloss sich dieser Mediator als guter Kandidat für die NAD^+ -Kinetiken. MEU-2 ergab positive Resultate in Bezug auf das Redoxverhalten. Dieser Mediator sowie MEU-0 reagieren in einem EC-Mechanismus. Nachstehend ist der komplexe Mechanismus der elektroenzymatischen Kaskadenkette der Reduktion eines Ketons dargestellt. Die Rolle des Rhodiummediators ist in diesem Schaubild verdeutlicht:

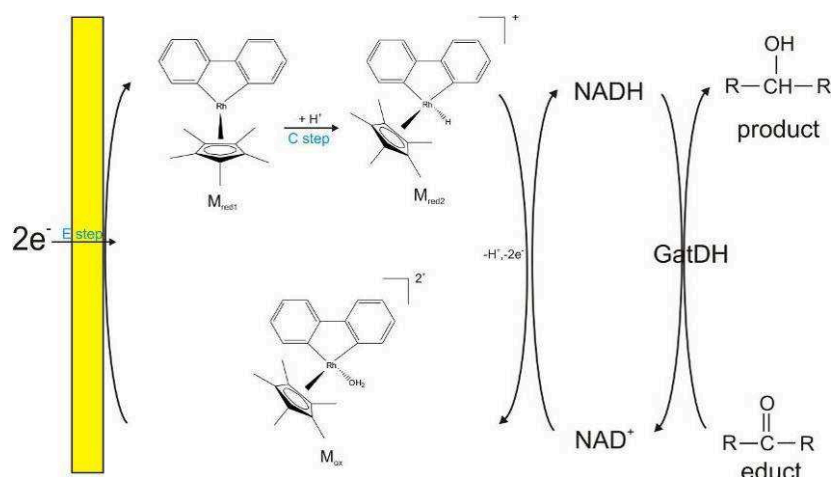


Abbildung 41: Schematische Darstellung der elektroenzymatischen Kaskadenreaktion^[83, 84].

In dieser Abbildung wird deutlich, dass die Reaktion eines solchen Mediators komplexer ist. Die oxidierte Variante des Rhodiumkomplexes wird an der Goldarbeitselektrode elektrochemisch reduziert, indem 2 Elektronen von dem Mediator aufgenommen werden, was den elektrochemischen Schritt (E-Schritt) im Mechanismus darstellt. Darauf folgt ein chemischer Schritt (C-Schritt) im Mechanismus, wobei der Mediator ein Proton aufnimmt, ohne dass dabei die Gesamtladung des Komplexes geändert wird^[85, 86]. Daraus ergibt sich, dass es sich bei der untersuchten Reaktion um einen EC-Mechanismus handelt. Der so entstandene Mediator ist nun in der Lage, NAD^+ zu $NADH$ zu reduzieren, wobei er selbst oxidiert wird, indem er ein Proton und zwei Elektronen an den Cofaktor abgibt. Nachstehend sind in Abbildung 42 die schematischen Reaktionsgleichungen eines EC-Mechanismus gezeigt:

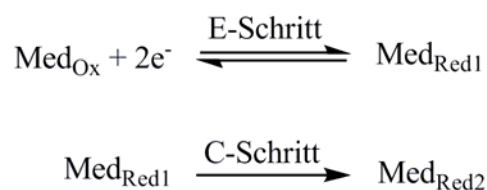


Abbildung 42: Schematische Reaktionsgleichungen eines EC-Mechanismus.

Der C-Schritt des EC-Mechanismus wurde bereits zuvor als limitierender Schritt für die Reduktion des Cofaktors beschrieben^[85]. Was in dieser Arbeit belegt werden konnte, war, dass bei einer Vorschubgeschwindigkeit $v < 100 \text{ mV / s}$ der reduzierte Mediator 1 (Med_{Red1}) genügend Zeit bekommt, um die chemische Reaktion (C-Schritt) zu Med_{Red2} durchzuführen. Es wurde kein Oxidationspeak im anodischen Bereich beobachtet. Weiter konnte belegt

werden, dass bei einer hohen Vorschubgeschwindigkeit $v > 500 \text{ mV/s}$ Med_{Red1} direkt zu M_{ox} reoxidiert wird, was an dem Oxidationspeak im CV zu beobachten war.

Bei MEU-0 wurde der Reduktionspeak bei $\sim -0,6 \text{ V}$, bei MEU-2 bei $\sim -0,5 \text{ V}$ beobachtet. Der kleine Unterschied in der Peaklage wurde auf die verschiedenen Substituenten des Rhodiums zurückgeführt. Die erhaltenen Resultate für das dreistufige Messprotokoll werden im Folgenden am Beispiel von MEU-3 im Detail erläutert. MEU-3 zeigte das gewünschte redoxaktive Verhalten bei allen drei pH-Werten. Nachstehend sind die erhaltenen CVs gezeigt:

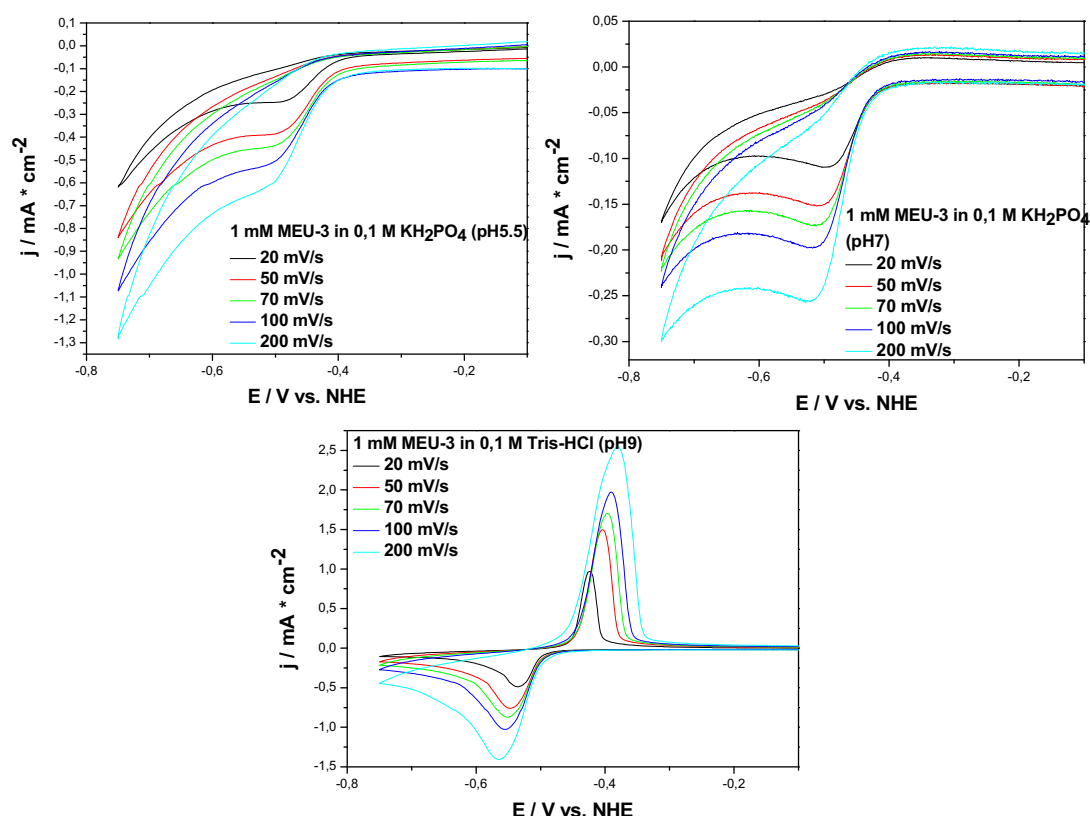


Abbildung 43: CV-Untersuchungen bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten jeweils bei pH 5,5, pH 7 und pH 9.

Der Reduktionspeak wird bei $-0,5 \text{ V vs. NHE}$ sichtbar und nimmt mit steigender Vorschubgeschwindigkeit zu. Das reversible Redoxverhalten wurde bei einem pH von 9 deutlich beobachtet, da hier aufgrund des basischen pH-Wertes ein Protonenverlust zu vermerken ist. Damit erfolgt lediglich der elektrochemische Schritt - der C-Schritt (chemischer Schritt) wird unterbunden. Es findet kein Protonentransfer zu dem Cofaktor bei diesem pH-Wert statt. Dieser Transfer ist jedoch für die Cofaktorregenerierung notwendig.

Nachdem die Testreihe bezüglich des elektrochemischen Redoxverhaltens abgeschlossen waren, wurden die entsprechend positiv getesteten Mediatoren in ihrer NAD^+ -Reduktionskinetik untersucht. Dabei wurde die elektrokatalytische Aktivität durch die Zugabe verschiedener NAD^+ -Konzentrationen getestet. Die Regenerierung des Mediators wurde durch den zunehmenden kathodischen Peakstrom beobachtet. Alle Messungen wurden wiederum unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Es wurde sowohl bei pH 5,5 als auch bei pH 7 eine Zunahme des Reduktionspeaks bei einem Potential von - 0,5 V vs. NHE mit steigender Zugabe an NAD^+ beobachtet. Auch eine Verschiebung des Reduktionspeaks bei beiden pH-Werten zu einem kathodischeren Potential war zu erkennen. Nachstehend sind Beispielmessungen demonstriert, die bei einem pH von 5,5, 7 und 9 durchgeführt wurden:

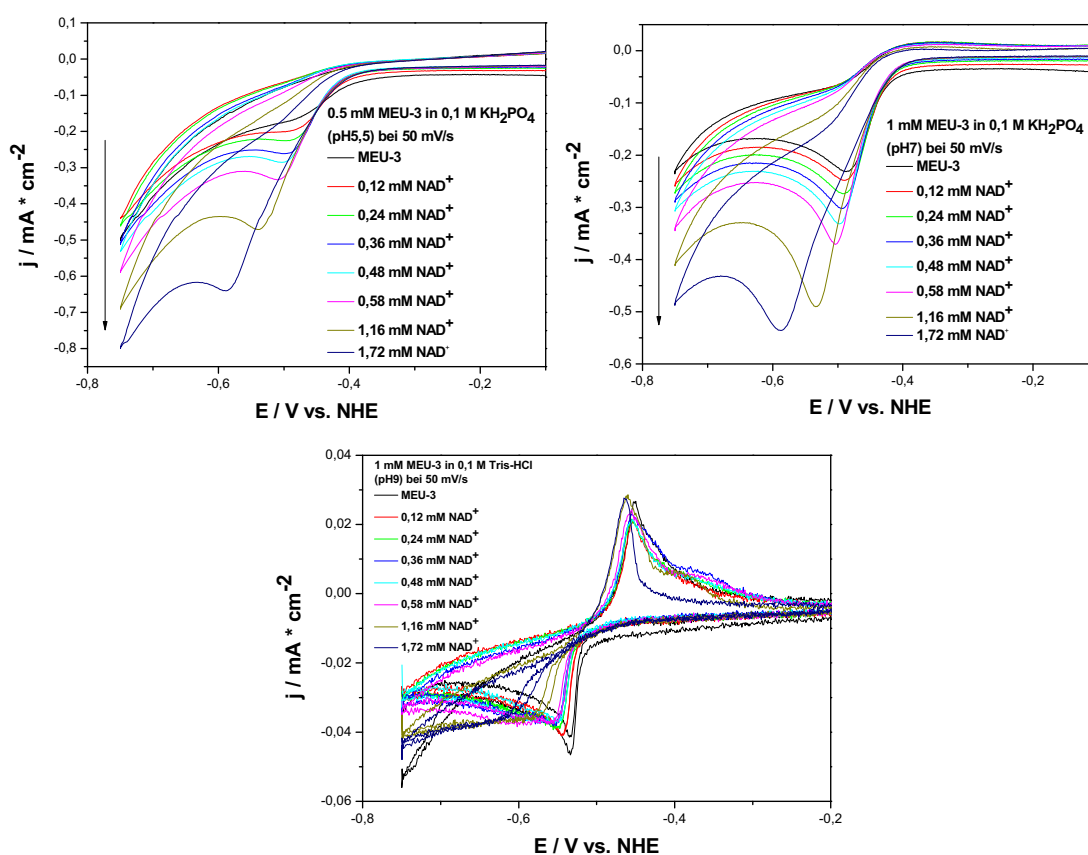


Abbildung 44: CV-Untersuchungen bei sukzessiver Zugabe von NAD^+ bei pH 5,5, pH7 und pH 9.

Bei pH 9 wurde wie erwartet aufgrund des Protonenverlusts keine elektrochemische Antwort auf die Zugabe des Cofaktors beobachtet. Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen an MEU-3 untersucht. Durch die Steigerung der Mediatorkonzentration von 0,5 mM zu 5 mM wurde eine Zunahme des Reduktionsstromes um einen Faktor von drei erhalten. Der Reduktionspeak liegt bei allen Mediatorkonzentrationen bei einem vergleichbaren Wert.

Außerdem wurden die Ablagerungseffekte auf der Arbeitselektrode untersucht, da dies essentiell für reproduzierbare Ergebnisse ist. Es wurden Experimente der NAD^+ -Kinetik mit der gleichen Goldelektrode nach Abwaschen mit destilliertem Wasser wiederholt. Die Messungen wurden jeweils in Pufferlösung und einer Mediatorkonzentration an MEU-3 von 1 mM unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Bei erneuter Messung der zuvor bereits verwendeten Elektrode wurde mit Zunahme der NAD^+ -Konzentration auch hier ein Anstieg des reduktiven Peaks beobachtet. Nachstehend ist eine Vergleichsmessung zweier NAD^+ -Kinetiken bei Erstverwendung und bei nochmaligem Einsatz gezeigt:

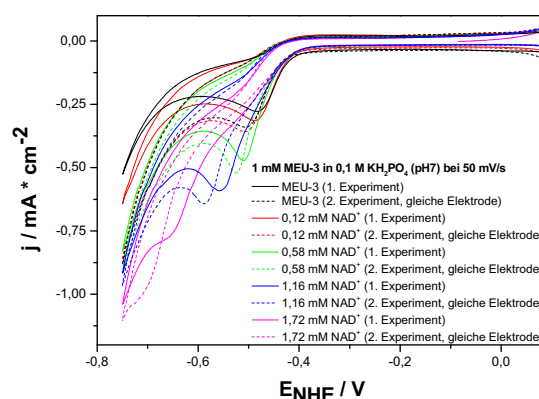


Abbildung 45: Vergleich zweier NAD^+ -Kinetiken bei Erstverwendung einer Goldelektrode und bei Wiederverwendung.

Bei dem Vergleich dieser beiden Messungen stellte sich heraus, dass die Elektroden nach Gebrauch nochmals verwendbar sind. Die leichte Verschiebung der Peaks in den kathodischen Bereich jeweils bei der zweiten Messung könnte auf eventuelle Ablagerungsphänomene auf der Elektrodenoberfläche zurückzuführen sein.

Nach dem elektrochemischen Screening der entsprechenden Redoxmediatoren in Gegenwart von NAD^+ wurde die Enzymkinetik genauer untersucht. Dazu wurden die zuvor selektierten Mediatoren verwendet, Mediator MEU-0 und MEU-3. MEU-2 wurde an dieser Stelle verworfen, da nicht die gewünschten Ergebnisse erhalten wurden. Beide Mediatoren (MEU-0 und MEU-3) wurden auf die elektroenzymatische Reduktion von Fructose untersucht. Als Biokatalysator diente die DSDH (D-Sorbitoldehydrogenase). Zu Beginn wurden CV-Experimente analog der NAD^+ -Kinetiken durchgeführt, um eine Zunahme des Stroms bei kontinuierlicher Zugabe an Substrat zu beobachten. Da die Methode der zyklischen Voltammetrie hier nicht zu den erhofften Resultaten einer Enzymkinetik führte, wurde zur Chronoamperometrie gewechselt mit anschließender Produktanalyse mittels Photometrie und HPLC. Zwei verschiedene Potentiale (- 0,4 V und - 0,5 V vs. NHE) wurden getestet. An dieser Stelle setzt die Reduktion des Mediators in den zuvor durchgeführten CV-

Experimenten ein. Laut Literaturwerten sollte ein Verhältnis von Mediator zu NADH von 1:2 zu besseren Ergebnissen führen ^[87, 88]. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit Stickstoff (12 mL/min) gespült bevor die CV- und CA-Experimente jeweils begonnen wurden. Während der CA-Messungen wurde die Lösung stetig gerührt und die Zelle ebenfalls kontinuierlich mit Stickstoff gespült. Die Messungen lieferten bei beiden Mediatoren eine geringe Zunahme des Reduktionsstromes bei Steigerung der Substratkonzentration. Nachstehend ist ein Messbeispiel unter Verwendung von MEU-3, DSDH, NAD^+ und Fructose als Substrat gezeigt:

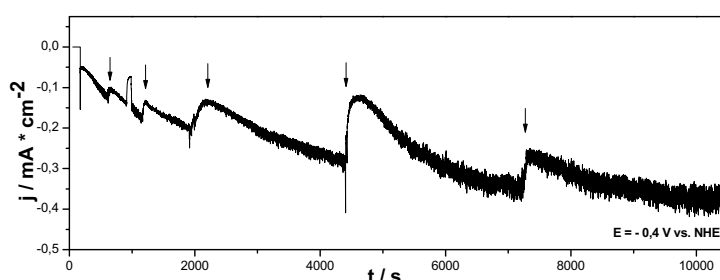


Abbildung 46: Chronoamperometrische Messung unter Einsatz des Mediators MEU-3, des Enzyms DSDH, des Cofaktors NAD^+ und sukzessiver Zugabe von Fructose als Substrat.

Da eine geringe Steigerung des Stroms im reduktiven Bereich beobachtet wurde, wurden von diesen Experimenten Proben für die HPLC-Analytik genommen. Die HPLC-Analysen ergaben nach Abtrennung des Enzyms mittels Zentrifugieren und Aufnahme einer Eichgeraden, dass D-Sorbitol als Produkt durch elektroenzymatische Reaktion synthetisiert wurde. Zu erwähnen ist die mögliche Denaturierung des Enzyms und die daher geringere Konversionsrate des Edukts zum Produkt, da weder die CV- noch die CA-Experimente bei Zugabe des Enzyms die erwarteten Kurvenverläufe zeigten. Daher wurden photometrische Untersuchungen durchgeführt, welche zeigten, dass Enzymaktivität verloren ging.

Diskussion:

In der Literatur wurde bereits eine mögliche Erklärung beschrieben, was bei Zugabe des Enzyms zu der Lösung passieren könnte ^[89]. Durch die verschiedenen Aminosäuregruppen kann es zur Anbindung an den Rhodiummediator kommen, da eine Affinität zu Metallzentren besteht. Vor allem Cysteine und Histidine binden aufgrund ihrer Thiolgruppen mit hoher Affinität an Rhodiumzentren. Somit verliert das Enzym an Aktivität. Durch die photometrischen Messungen stellte sich heraus, dass die Enzymaktivität in Gegenwart eines Redoxmediators extrem gesunken war. Im Falle der DSDH wurde bereits nach einer kurzen Inkubationszeit von ~ 30 Minuten ein fast kompletter Aktivitätsverlust registriert. Es wurde festgestellt, dass lediglich eine kurze Kontaktzeit von ein paar Minuten ausreicht, um das

Enzym durch Adsorption des Rhodiumkomplexes zu deaktivieren. Möglicherweise wurde dadurch die Konformation des Enzyms soweit geändert, dass der Zugang des Cofaktors und des Substrates zu dem Substratkanal des Enzyms nicht mehr gegeben wurde und daher fast keine Reaktion stattfinden konnte. Dies würde den geringen Produktumsatz erläutern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle gelieferten Redoxmediatoren ausführlich sowohl auf ihr elektrochemisches und -katalytisches Verhalten als auch die Enzymkinetiken getestet wurden. Zwei der getesteten Mediatoren zeigten sowohl ein gutes elektrochemisches Verhalten als auch eine gute elektrokatalytische Aktivität für die Reduktion des Cofaktors NAD^+ zu NADH bei allen drei pH-Werten. Jedoch war ein Aktivitätsverlust des Enzyms in Gegenwart von Rhodiumkomplexen zu beobachten, da die Cystein- und Histidingruppen des Enzyms an die Rhodiumzentren adsorbieren. Dennoch konnte eine Substratkonversion mittels Elektroenzymatik zu dem gewünschten Produkt durch HPLC nachgewiesen werden. Eine Alternative wäre hier beispielsweise ein elektrokatalytisch aktives Material, bei dem auf den Einsatz von Mediatoren verzichtet werden könnte. Daher entstand das darauf folgende Kapitel, in dem Rutheniumoxid als neues Material zur direkten Oxidation des Cofaktors NADH herangezogen und erfolgreich getestet werden sollte. Zugleich wurden erstmalig makroporöse Rutheniumoxidelektroden hergestellt, die eine signifikant vergrößerte katalytisch aktive Oberfläche besaßen.

3.1.6 Direkte Oxidation von NADH an Rutheniumoxidoberflächen

Rutheniumoxid wurde auf Eignung als aktives Material zur direkten Oxidation des Cofaktors Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH, $\geq 98\%$) getestet. NADH ist ein wichtiger Bestandteil von Biosensoren, die auf Dehydrogenasen basieren. Um die aktive Oberfläche eines amperometrischen Sensors zu vergrößern, wurden die Rutheniumoxidelektroden als hoch poröses System hergestellt. Da es sich bei der Oxidation von NADH um eine Reaktion mit langsamer Kinetik handelt, wird ein merkbarer Effekt der porösen Strukturen erwartet. Zwei kolloidale Templatmethoden wurden dazu angewandt: die *kontrollierte Evaporierung (CE)* und die *Langmuir-Blodgett-Technik (LB)*. Beide Methoden wurden mit Polystyrol (PS) zur endo-Templat-Synthese durchgeführt, wobei bei der *LB-Technik* die während dieser Arbeit entwickelte Methodik mittels PS-Partikeln verwendet wurde. Die endo-Template bestanden aus sehr gut angeordneten PS-Partikeln, welche leicht durch THF oder Toluol

entfernbar waren. Auf die Herstellung der kolloidalen Kristalle erfolgte die elektrochemische Abscheidung von Rutheniumdioxid. Die porösen Strukturen und die Phasenformation der Rutheniumoxidelektroden wurden durch REM, FIB und XRD charakterisiert.

Die chemisch und mechanisch sehr stabilen porösen Elektroden erwiesen sich als gute Grundlage, die direkte Oxidation mit stark vergrößerter aktiver Oberfläche durchzuführen. Diese vergrößerte aktive Oberfläche der makroporösen Elektroden im Vergleich zur geometrischen Oberfläche macht eine potentiometrische und amperometrische Sensoranwendung dieser Elektroden sowohl für die (Bio)elektrokatalyse^[56] als auch für die Elektroanalytik sehr interessant. Die Vergrößerung der aktiven Oberfläche hängt von dem Charakter der Porosität und der Porenstruktur ab. In der Bioelektrokatalyse stellen die Poren Kavitäten dar, in denen eine Immobilisierung eines Biosystems^[90] chemischer oder physikalischer Art erlaubt wird. Ein besonderes Merkmal von Rutheniumoxid ist seine katalytische Aktivität, was dieses Material zu einem sehr interessanten Kandidaten für analytische Optionen macht. In diesem Kapitel wurde nun diese Eigenschaft in Bezug auf den Cofaktor NADH untersucht, um eine Lösung für die hohe Überspannung der direkten Oxidation von NADH zu finden, die bereits seit Jahren ein Thema in der Biosensorentwicklung ist. Der Cofaktor NADH ist an vielen essentiellen Enzymreaktionen im menschlichen Körper beteiligt. Seine elektrochemische Oxidation ist von starkem Interesse in der Biosensorforschung und macht somit diese Forschungsarbeit zu einem Kapitel von wissenschaftlicher Aktualität. Die direkte Oxidation von NADH ist an vielen Elektrodenmaterialien kinetisch gehemmt, was zu einem hohen Überpotential führt^[91, 92]. Diese Tatsache macht den Einsatz von Redoxmediatoren unerlässlich^[93]. Daher könnten die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse einen Fortschritt in der Biosensorentwicklung mit sich bringen.

Die Präparation der endo-Template verlief wie zuvor beschrieben über zwei Verfahren. Es wurden ausschließlich hoch monodisperse PS-Partikel für die kolloidalen Kristallsynthesen verwendet. Bei der *kontrollierten Evaporierung (CE)* wurde die wässrige, monodisperse PS-Dispersion auf runde Titanwafer (99%, Goodfellow) von 1 cm² geometrischer Oberfläche als Substrat vorsichtig aufgetragen. Dabei diente ein Gummiring zur Eingrenzung der Modifizierungsfläche und verhinderte das Abfließen der PS-Dispersion von dem Titanwafer. Die Herstellung der kolloidalen Kristalle verlief wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Im Anschluss an die Herstellung der endo-Template folgte gleich die Abscheidung des Rutheniumoxidmaterials. Die Metallwafer mussten vor der Modifizierung mit PS-Partikeln

und vor der Elektroabscheidung mit Oxalsäure (10%ig) angeätzt werden, um ein dauerhaftes Haften der Beschichtung zu gewährleisten. Die Metalloxidabscheidung verlief über einen elektrochemischen Schritt unter Verwendung von RuCl_3 . Daraufhin wurden die frisch abgeschiedenen Elektroden in einem Muffelofen 1h auf 450°C aufgeheizt und anschließend bei dieser Temperatur 1h an Luft kalziniert. Die PS-Partikel sollten im Zuge dieses Kalzinierungsprozesses aufgelöst werden. Um sicherzugehen, dass alle Reste an PS entfernt wurden, wurden die Elektroden zusätzlich mit THF behandelt. Damit wurde gewährleistet, dass die Kavitäten des porösen Systems nicht verstopft waren. Die Elektrosynthese der Rutheniumoxid-Beschichtung ist im Einzelnen mit einer nasschemischen Abscheidung vergleichbar. Jedoch wird hierbei der pH lokal an der Elektrodenoberfläche über eine Kathodenreaktion erhöht, wodurch nun die Fällung an der Elektrodenoberfläche hervorgerufen wird. Dieser Vorgang wird von dem Hydroxidionenüberschuss an der Elektrodenoberfläche gesteuert ^[94]. Dieser Prozess verläuft in analoger Weise zu dem, was bei der Elektrosynthese von Silicaschichten zu beobachten ist ^[70]. Die lokale Erhöhung des pH-Werts nahe der Elektrodenoberfläche verursacht die Entstehung von Metallhydroxidfilmen auf der Kathode. Diese Hydroxidschichten werden dann im späteren Kalzinierungsprozess zu dem entsprechenden Oxid umgewandelt ^[95]. Trotz der starken Gasentwicklung wegen der Wasserstoffbildung, die die Hydroxidbildung durch die kathodische Zersetzung des Wassers begleitet, wurde das endo-Templat aus PS nicht von der Oberfläche des Titanwafers abgehoben.

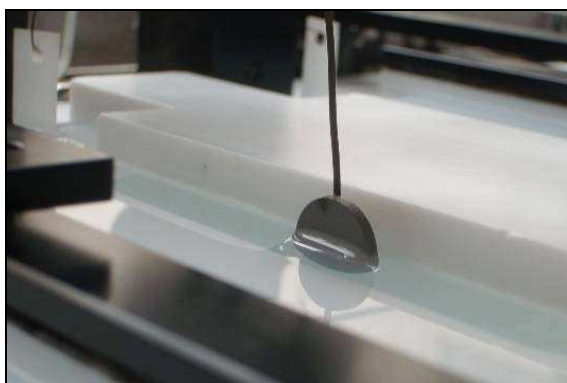
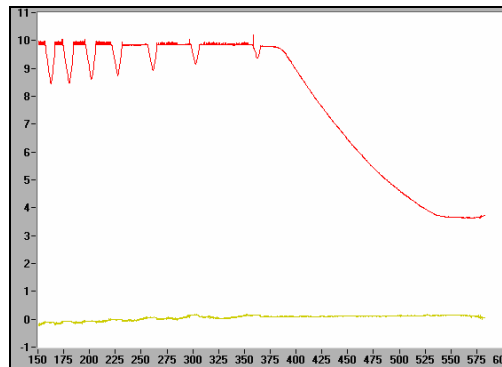


Abbildung 47: LB-Technik angewandt für Titanwafer.

Die *LB-Technik* lieferte ebenso wie die *CE-Methode* geordnete endo-Template aus PS, die durch die gleiche Prozedur zu Metalloxidtemplaten aus Rutheniumoxid führten. Die *LB-Technik* wurde wie zuvor beschrieben mit der angepassten Technik mittels PS-Partikeln realisiert. Folgende Oberflächendruck-Flächen-Isobare wurde bei der Modifizierung eines Titanwafers erhalten:

Oberflächendruck [mN / m]



Fläche pro Molekül [$\text{\AA}^2$ / Molekül]

Abbildung 48: Experimentelle Oberflächendruck-Flächen-Isotherme eines LB-Experiments mit Titanwafer und PS-Partikel.

Die beim Dippen entstandenen Spikes stehen jeweils für eine Monoschicht an PS-Partikeln, die auf die Oberfläche des Titansubstrates transferiert wurden. An der experimentell erhaltenen Isotherme ist zu erkennen, dass der gebildete Langmuir-Film aus PS-Partikeln während des Transferprozesses stabil bleibt.

Die direkte Oxidation wurde durch chronoamperometrische Messungen (CA) bei verschiedenen Potentialen getestet. Es wurden als konstante Potentiale - 0,1 V / 0V / 0,1V / 0,2V / 0,25V / 0,3V / 0,4V / 0,5V ausgewählt, um die Reaktion bei unterschiedlichen Potentialen vergleichen zu können und um zu untersuchen, wo das limitierende Oxidationspotential liegt, bei dem die Reaktion stattfindet. Als Gegenelektrode wurde eine Platinelektrode und als Referenzelektrode eine gesättigte Ag/AgCl-Elektrode verwendet. Die CA-Messungen wurden mittels einer rotierenden Scheibenelektrode (rotating disc electrode - RDE) mit 2000 Umdrehungen pro Minute (RPM) durchgeführt. Somit konnten konstante hydrodynamische Bedingungen geschaffen werden und sichergestellt werden, dass ein konstanter Stofftransport zu der Elektrodenoberfläche stattfindet.

Erhaltene Resultate

Die Abscheidung des Rutheniumoxids brachte bereits ohne Templatingprozess raue, aktive Oberflächen zum Vorschein. Nachstehend ist eine REM-Aufnahme einer solchen Elektrodenoberfläche gezeigt:

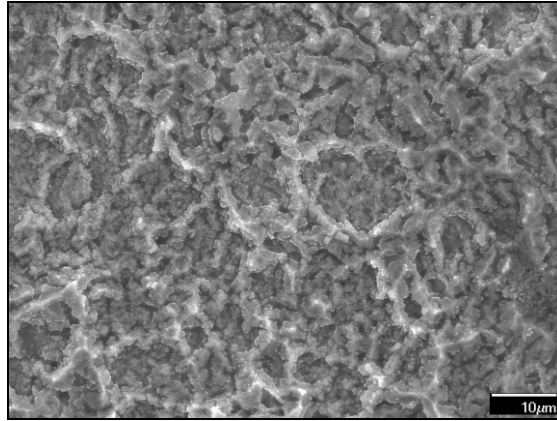


Abbildung 49: Rauigkeit einer Rutheniumoxidoberfläche.

Die abgeschiedenen Schichten wurden mittels XRD untersucht. In der folgenden Abbildung ist ein Diffraktogramm einer Probe mit einer Abscheidezeit von 90 s dargestellt:

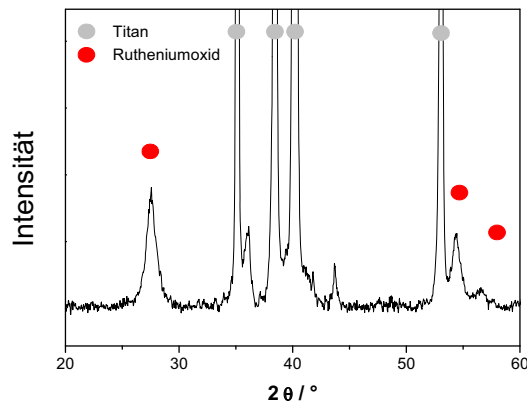


Abbildung 50: XRD-Aufnahme einer abgeschiedenen Rutheniumoxidoberfläche.

Das Diffraktogramm zeigt, dass sich Ruthenium(IV)-Oxid in Rutilstruktur gebildet hat. Dieses Ruthenium(IV)-Oxid ist nicht nur ein chemisch sehr resistentes Material, sondern auch thermisch sehr stabil. Rutheniumoxid zeichnet sich als hoch beständiges Material gegenüber Korrosion aus. Kristalline Ruthenium(IV)-Oxid-Beschichtung stellen sehr feste und mechanisch stabile Oberflächen dar, was sich auch bei den makroporösen RuO_2 -Schichten bemerkbar machte, da während dieser Arbeit nie ein Kollabieren der hoch porösen Struktur beobachtet wurde, was für Anwendungen mit Gasentwicklung an der Elektrodenoberfläche eine sehr wichtige Eigenschaft darstellt. Die Anwendung der *CE-Methode* führte zu sehr gut angeordneten, hoch porösen Strukturen. Das endo-Templat zeigte eine gute Adhäsion zu der Titanoberfläche des Titanwafers. Resultate dieser Methode sind in den folgenden REM-Aufnahmen zu sehen:

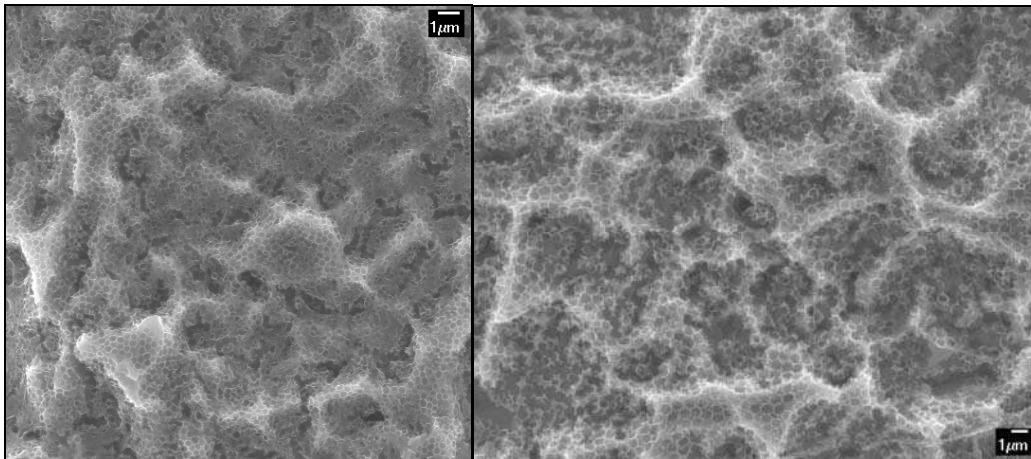


Abbildung 51: REM-Aufnahmen von offenporigen, hoch stabilen Rutheniumoxidoberflächen, hergestellt durch die CE-Methode.

Die raue Oberfläche wurde komplett porös gestaltet, das heißt die geometrische Oberfläche blieb die Gleiche, aber die aktive Oberfläche wurde signifikant vergrößert. Über die ganze Elektrode verteilt wurde eine kontinuierliche und offenporöse Oberfläche erhalten, was an den folgenden REM-Aufnahmen von Querschnitten unter einem geneigten Aufnahmewinkel deutlich wird:

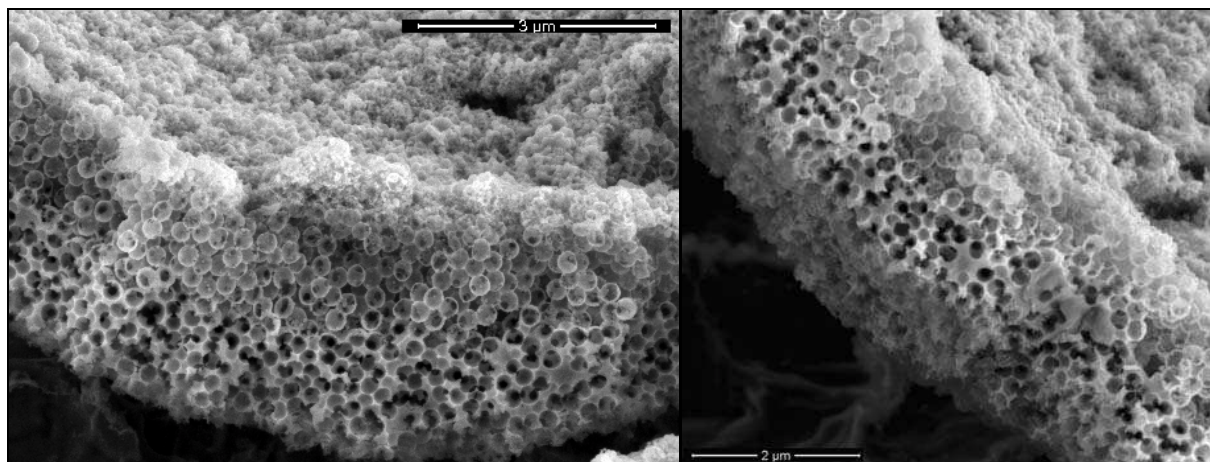


Abbildung 52: REM-Aufnahmen unter geneigtem Winkel von Querschnitten von Rutheniumoxidelektroden.

Nachstehend werden REM-Aufnahmen von spongiösen Rutheniumdioxidstrukturen gezeigt, die eine extreme Vergrößerung der aktiven Oberfläche bieten, und somit eine hohe Einsparung an Ruthenium mit sich bringen:

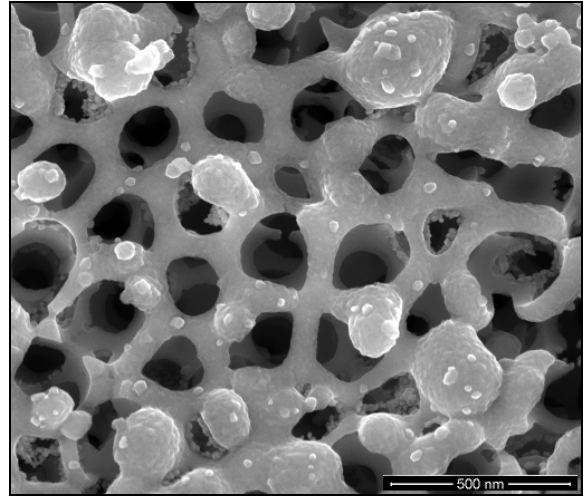
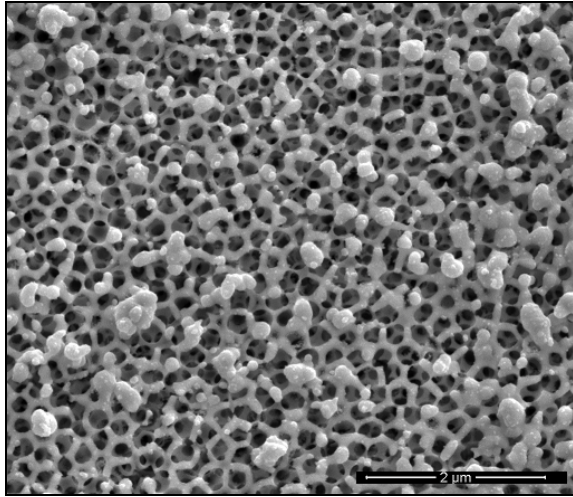


Abbildung 53: REM-Aufnahmen von spongiösen Rutheniumoxideinheiten mit stark vergrößerter aktiver Oberfläche.

Die Aufnahmen erinnern an in der Natur vorkommenden Strukturen, wie zum Beispiel Korallen oder Schwämme, die ebenfalls durch ihre Offenporigkeit eine hohe Oberfläche besitzen. Anhand der Abbildung 54 wird dieser Vergleich mit den in der Natur vorkommenden Strukturen, hier eine Koralle deutlich:

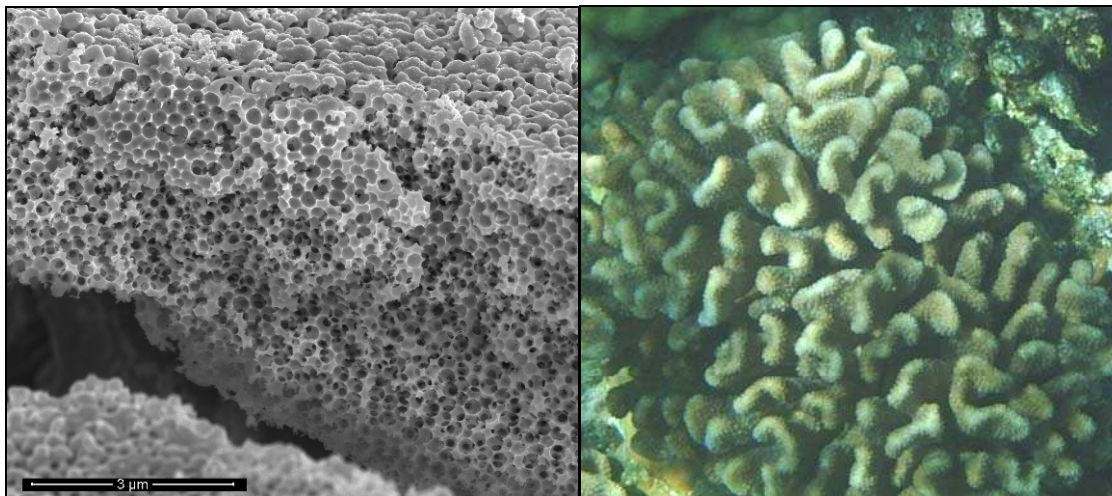


Abbildung 54: Rutheniumoxidschichten von schwammartiger Gestalt und eine natürliche Koralle im Vergleich.

Querschnitte solcher porösen Metalloxidtemplate mittels FIB beweisen die große Dicke und enorme Porosität solcher Elektroden.

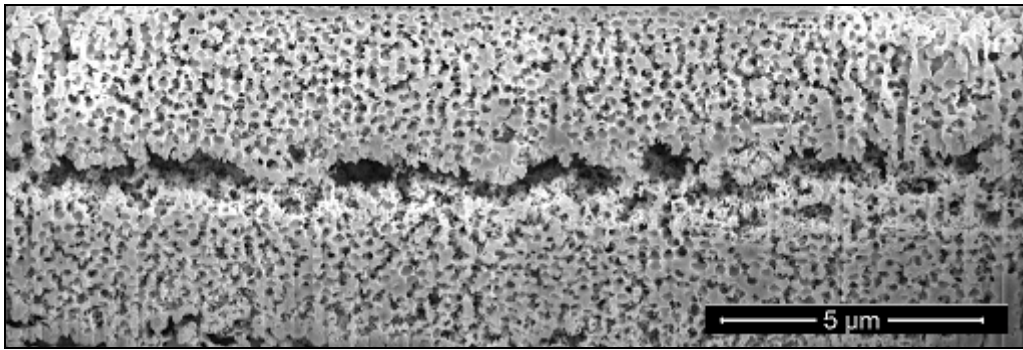


Abbildung 55: FIB-Querschnitte von Rutheniumelektroden höchster Porosität.

Durch diese FIB-Messungen wurde das Ausmaß der Porosität in der Rutheniumoxid-Beschichtung deutlich. Des Weiteren wurde durch den Drang der PS-Partikel zur Selbstanordnung eine nahezu perfekte Anordnung der Poren erzielt. Die Verbindungskanäle sind sehr gut ausgebildet, was anhand der Abbildung 56 ersichtlich wird:

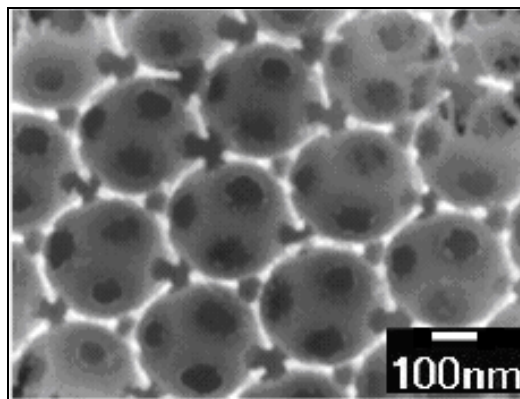


Abbildung 56: Hoch geordnete Poren mit perfekter Interkonnektierung der Poren.

Die Verbindungskanäle haben in der Regel einen ungefähren Durchmesser von einem Viertel des Porendurchmessers. Diese Kanäle sichern die Diffusion des Elektrolyten und der elektroaktiven Substanz in das gesamte Porensystem.

Die *LB-Technik* lieferte ebenso gute Porositäten, wobei die Anzahl der Porenschichten kontrollierbar war. Folgende REM-Aufnahme zeigt eine Elektrodenoberfläche zur Illustration, dass die *LB-Technik* mittels PS-Partikeln ebenso unter Verwendung der Titansubstrate anwendbar ist.

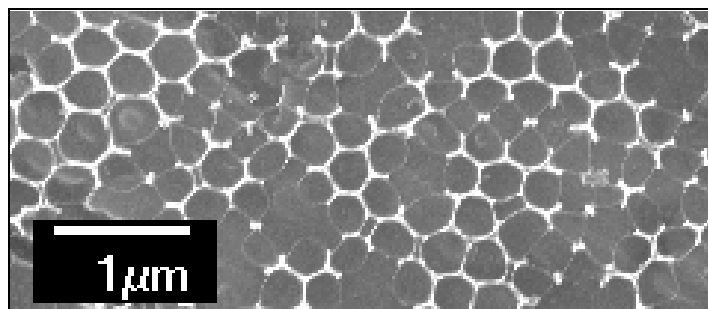


Abbildung 57: Poröse halbe Monoschicht aus Rutheniumoxid, hergestellt durch die LB-Technik.

Diese Methode lieferte ebenso wie die *CE-Methode* eine offene Porosität der Struktur und kontinuierliche Verbindungen innerhalb der Poren. Somit ist auch in diesem Falle die große aktive Oberfläche leicht zugänglich. Ein Massentransport bis in die letzte Porenschicht wurde damit ermöglicht. Insgesamt bieten beide Methoden perfekt poröse Strukturen mit bester Interkonnektivität.

Rutheniumoxidelektroden bieten nicht nur Anwendungspotential für eine Biofunktionalisierung der Oberfläche, sondern auch eine intrinsische katalytische Aktivität, die sich als potentieller Kandidat für eine direkte Oxidation von NADH anbietet. Die Oxidation dieses Cofaktors repräsentiert einen entscheidenden Part in der amperometrischen Sensorentwicklung. Die erste Testreihe dazu ergab viel versprechende Resultate. Zuerst wurden zykvoltammetrische Untersuchungen gemacht. Ein leichter anodischer Oxidationspeak war bei jeder schrittweisen Zugabe von NADH (0,24 mM) zu beobachten. Es wurde vermutet, dass die Oxidation von NADH aktiviert wurde, und somit wurde eine Reihe an Testmessungen gemacht, um diesen Vorgang genauer zu charakterisieren und einen kapazitiven Effekt an der Elektrodenoberfläche auszuschließen. Dazu wurden zahlreiche chronoamperometrische Messungen bei einem konstanten Oxidationspotential unter festen Bedingungen durchgeführt. Um gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten, wurden die ersten Messungen zuerst in einer Zelle mit Magnetrührer durchgeführt und nach ersten vielversprechenden Resultaten wurde eine rotierende Scheibenelektrode (RDE) verwendet. Die CA-Messungen wurden in einer 0,1 M Lösung aus Bis-(2-Hydroxyethyl)-Imino-tris-(Hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris-Puffer) und pH 7 durchgeführt. Nachstehend sind CA-Messungen gezeigt, die eine elektrochemische Verfolgung der schrittweisen Zugabe von NADH (4,6 mM) widerspiegeln:

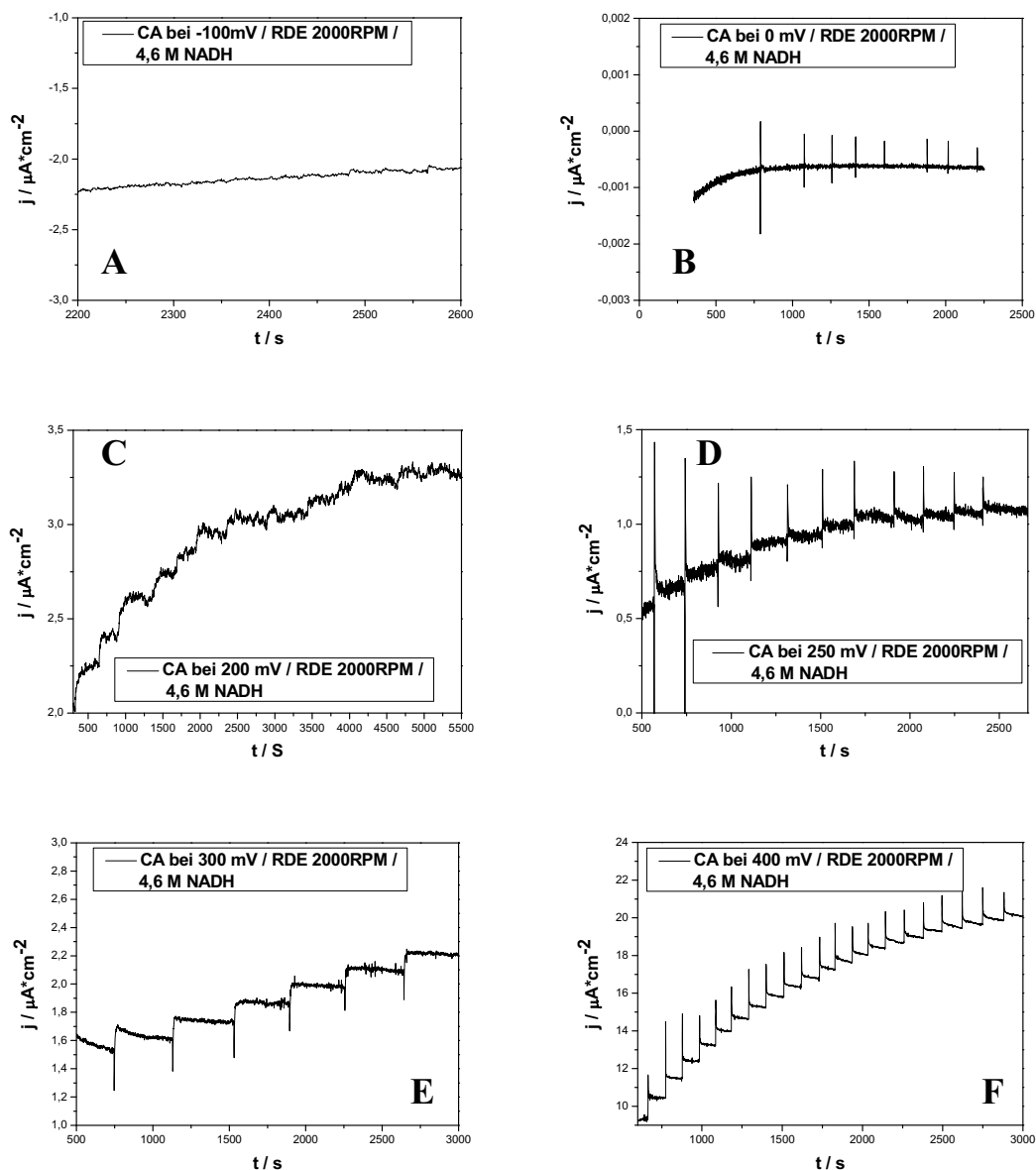


Abbildung 58: Chronoamperometrische Stromdichte-Zeit-Kurven bei Zugabe von NADH in 4,6 mM-Stufen bei - 100 mV (A), 0 mV (B), + 200 mV (C), + 250 mV (D), + 300 mV (E) und 400 mV (F) mit typischen Umsetzungsplateaus ab + 200 mV.

Die schrittweise Zunahme der Stromdichte bei Zugabe von NADH war sichtbar ab einem Oxidationspotential von 200 mV, was eine signifikante Verbesserung im Vergleich mit dem Verhalten auf gängigen Elektrodenmaterialien wie Glaskohlenstoff oder Platin repräsentierte [96]. Einen überzeugenden Vergleich dreier verschiedener chronoamperometrischer Messungen bei 0 V und + 400 mV mit einer flachen Elektrode und mit einer hoch porösen Elektrode zeigt Abbildung 59:

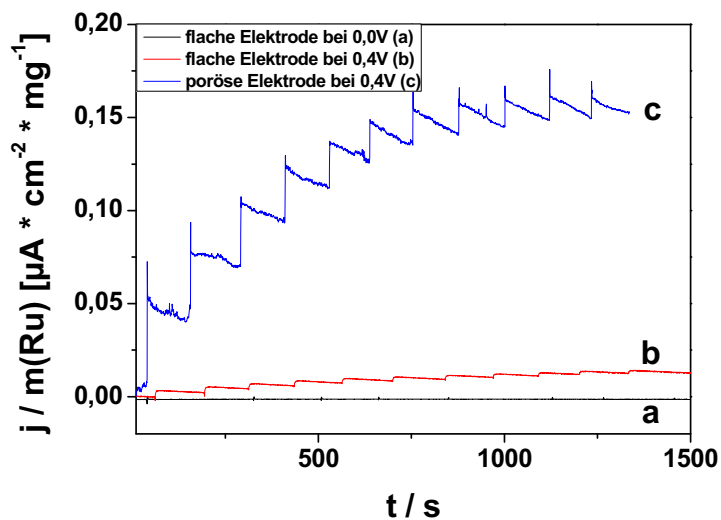


Abbildung 59: Chronoamperometrische Vergleichsmessungen der direkten NADH-Oxidation bei sequenzieller Zugabe des Coenzym:
(a) bei einem Potential von 0 mV vs. Ag/AgCl, wobei keine Aktivität beobachtet wird;
(b) bei einem Potential von + 400 mV vs. Ag/AgCl, wobei die Oxidation aktiviert wurde;
(c) gleiche Messung wie (b) nur mit einer porösen Elektrode.

Bei diesem Vergleich der Stromdichte-Zeit-Kurven wurde auf die Masse von abgeschiedenem Ruthenium (mg Ruthenium) normiert. Damit lässt sich ein besserer Vergleich der aktiven Oberfläche mit eingesetztem katalytisch aktivem Material durchführen. An diesem Vergleich wird die enorme Verbesserung der katalytischen Aktivität durch poröse Oberflächen deutlich. Des Weiteren ist ersichtlich, dass bei einem Potential von 0 mV keinerlei Oxidationsströme bei Zugabe von NADH zu beobachten sind.

Ab einem Potential von + 200 mV zeigten die Stromdichte-Zeit-Kurven der chronoamperometrischen Messungen den typischen Verlauf einer Michaelis-Menten-Kurve. Nach mehreren Zugaben wurde das Erreichen eines Sättigungsstroms beobachtet, was ein Indiz dafür ist, dass jede aktive Oberflächenstelle besetzt vorliegt. Analog zur Auswertung von Enzymkinetiken wurden die Michaelis-Menten-Auftragung und das Linearisierungsverfahren von Lineweaver-Burk gewählt.

In der folgenden Abbildung sind eine CA-Messung einer flachen Rutheniumoxidelektrode bei + 400 mV und deren enzymatische Auswertungsplots dargestellt:

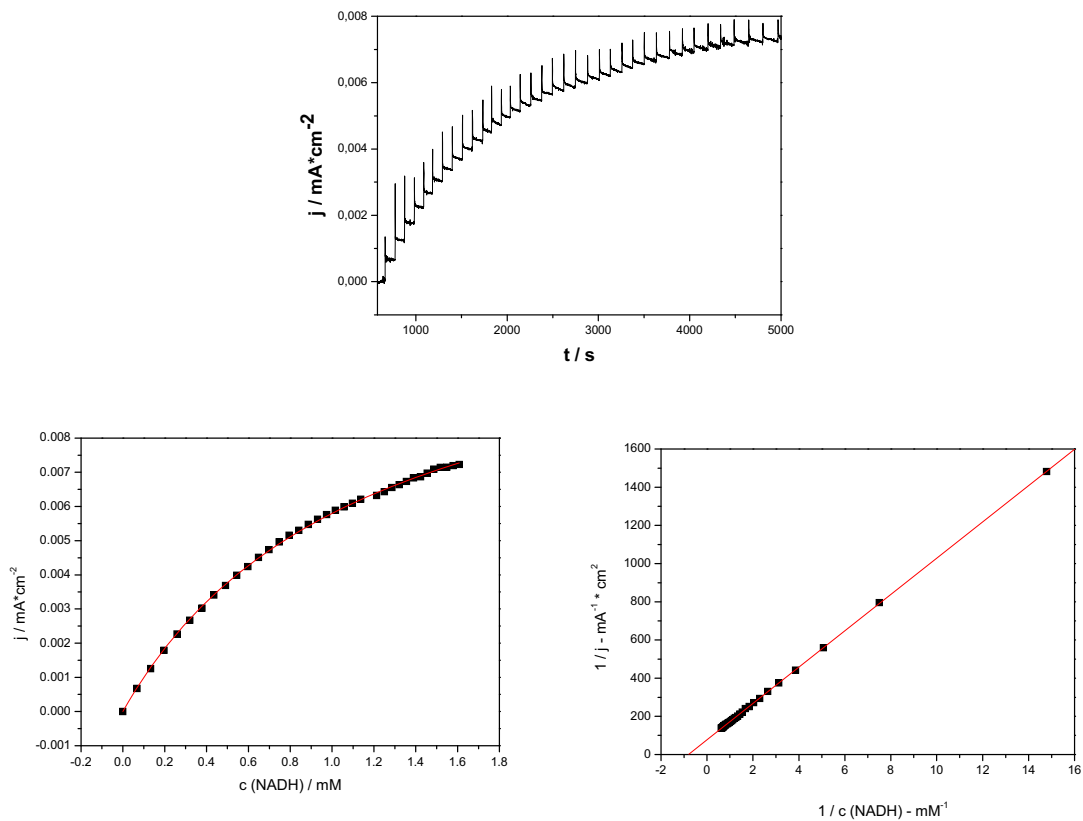


Abbildung 60: Chronoamperometrische Messung bei + 400 mV und deren kinetische Auswertungen nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk. Beide Methoden ergaben einen „ K_M -Wert“ von 1,1 mM für flache RuO_2 -Elektroden.

Abbildung 61 zeigt eine CA-Messung einer porösen Rutheniumoxidelektrode ebenso bei + 400 mV und deren enzymatischen Auswertungsplots als Michaelis-Menten-Plot und als Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt:

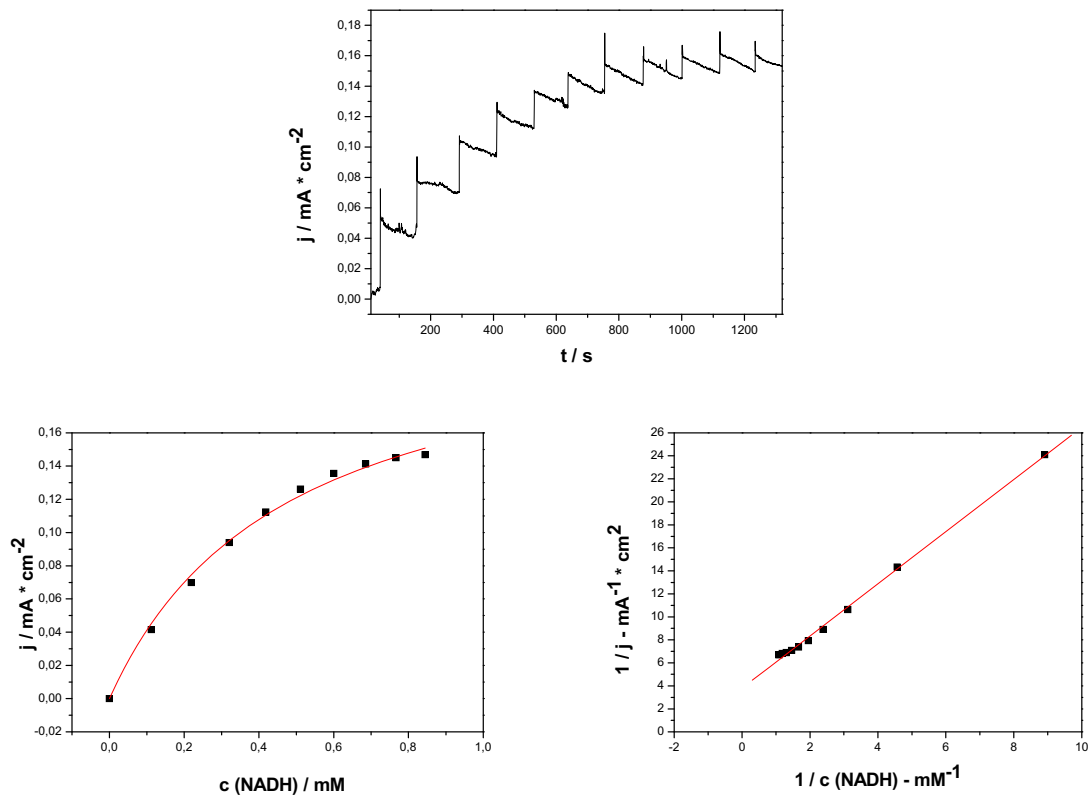


Abbildung 61: Chronoamperometrische Messung bei + 400 mV und deren kinetische Auswertungen nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk. Beide Methoden ergaben einen „ K_M -Wert“ von 0,5 mM für poröse RuO_2 -Elektroden.

Analog zur Michaelis-Menten-Kinetik und zu dem Linearisierungsverfahren von Lineweaver-Burk lassen sich die K_M -Werte ermitteln. Der K_M -Wert stellt die Konzentration dar, die gebraucht wird, um die Hälfte der maximalen Umsatzrate zu erreichen. Diese Auswertungen ergaben je für beide Methoden wie erhofft den gleichen „ K_M -Wert“ von 1,1 mM für flache Elektroden und 0,5 mM für poröse Systeme.

Im Hinblick auf die Durchflusszelle wurden großflächige, makroporöse Rutheniumoxidelektroden hergestellt. Dabei wurde ein Titanblech einer geometrischen Fläche von $6 \times 6 \text{ cm}^2$ verwendet. Dieses wurde wie zuvor beschrieben mit Rutheniumoxid beschichtet. Nachstehend ist eine Aufnahme einer solchen Elektrode mit einer geometrischen Fläche von $6 \times 6 \text{ cm}^2$ und deren Porosität in einer REM-Aufnahme zu sehen:

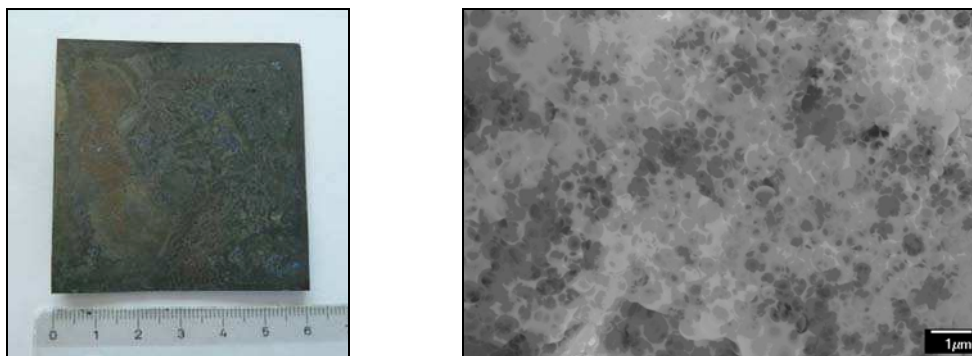


Abbildung 62: Hochskaliertes Titanblech mit einer porösen Rutheniumoxid-Beschichtung (links) und REM-Aufnahme der porösen Struktur.

Diese Ergebnisse zeigten, dass nun auch große, poröse Rutheniumoxidelektroden mit einer geometrischen Fläche von 36 cm^2 herstellbar sind und somit Anwendung in der Durchflusszelle finden können.

Diskussion:

Als Endbetrachtung dieses Kapitels kann gesagt werden, dass diese Arbeiten hilfreich in der Biosensorentwicklung sein könnten. Durch die katalytische Aktivität der Rutheniumoxidoberflächen bei niedrigen Potentialen erschließt sich eine neue Alternative zum Einsatz von Mediatoren und macht ein Biosensorsystem einfacher im Aufbau. Die Langzeitstabilität des hoch stabilen Materials spricht ebenfalls für sich. Ein weiterer wichtiger Punkt dieser Forschungsreihe war die Herstellung poröser Rutheniumoxidelektroden mittels zweierlei Verfahren (*CE* und *LB*) und der Nachweis ihrer verbesserten katalytischen Aktivität. Ein kontrolliertes Wachstum von hoch organisierten porösen Rutheniumoxidelektroden wurde erreicht. Die erhaltenen porösen Strukturen waren von sehr guter Ordnung und Offenporigkeit. Die Interkonnektivität der Poren untereinander war sehr gut ausgebildet. Das Material selbst zeigt viele interessante Eigenschaften wie chemische, mechanische und thermische Langzeitstabilität, aber auch einen niedrigen elektrischen Widerstand, was das poröse Material für zahlreiche elektrochemische Anwendungen wie zum Beispiel in der elektrochemischen Sensorentwicklung und Elektrokatalyse interessant macht. Das Elektrodenmaterial bewirkt eine Aktivierung der Oxidation bei niedrigen Potentialen ab + 200 mV, ohne jeglichen Einsatz von Mediatoren und zugleich wird eine signifikante Verstärkung des Oxidationsstromes im Vergleich zu flachen Elektroden erhalten.

3.1.7 Elektrochemische Batchzelle mit elektroorganischer Reaktion

In diesem Kapitel geht es um den Einsatz einer Batchzelle für elektroorganische Reaktionen, welche die Basis für die Entwicklung einer elektrochemischen Durchflusszelle mit elektrochemischer Reaktion darstellt. Dazu musste zunächst eine entsprechende Zelle geplant und konstruiert werden, aber auch eine passende Reaktion für diese Zelle gefunden werden. Es ging darum zu zeigen, dass die Batchzelle einsatzfähig ist und deren Messergebnisse und Optimierungen als Grundlage für die spätere Planung und Entwicklung der Durchflusszelle dienen sollten. Die Zelle sollte eine Gasdiffusionseinheit (GDE) besitzen, die in diesem Fall als Wasserstoffverzehranode und Gasdiffusionsgegenelektrode dienen sollte. Die kathodische Halbzelle war dafür zuständig, eine elektroorganische Synthese, in diesem Fall eine Reduktion durchzuführen. Die Zelle wurde aus Polytetrafluoroethylen (PTFE, Teflon) gebaut, da dieses Material als inerter und sehr korrosionsbeständiger Kunststoff bekannt ist.

Die zu testende Reaktion war die Reduktion von Aceton mit Hilfe einer GDE als Gegenelektrode. Die Batchzelle aus Teflon wurde in der hauseigenen Werkstatt an der Universität des Saarlandes angefertigt. Gold und Stahl wurden als Materialien für die Kontakte der Arbeitselektrode gewählt. Zwei perforierte Metallplatten aus Edelstahl wurden zur Separierung der halben Membranelektrodeneinheit (Membrane Electrode Assembly / MEA) von dem Elektrolytraum verwendet. Gleichzeitig dienten diese Metallplatten zur Kontaktierung der GDE. Zu weiteren Testreihen wurde eine Metallplatte durch eine Vyonfritte ersetzt. Der Vergleich der Tests folgt später in dem gleichen Kapitel.

Die Batchzelle bestand aus 3 Teilen: ein Bodenteil zur Einbettung der Arbeitselektrode, ein Mittelteil für Elektrolytenkammer und einer Vertiefung für die halbe MEA und Metallplatte und der Deckelteil für Kontaktierung der Gase und Gegenelektrode.

Die Zelle wird durch Anpressen der drei Teile mittels Schrauben zusammengebaut und ergibt eine dichte Batchzelle. Die zusammengebaute (links) und die zerlegte (rechts) Batchzelle ist nachstehend in den Fotos dargestellt:



Abbildung 63: Zusammengebaute und zerlegte Batchzelle.

Für die Herstellung der GDE wurde eine Gasdiffusionsschicht (Gas Diffusion Layer / GDL) vom Forschungszentrum Jülich verwendet. Die GDE bestand aus einem Katalysator und einer Nafionmembran als Protonenaustauschmembran auf einem sogenannten Elektrodenbacking aufgebracht. Prinzipiell existieren zwei Arten von Schichtaufbau für eine GDE. Eine Zwei-Schicht-Elektrode besteht aus einem hydrophoben Trägermaterial aus Kohlenstofffasern (Backing), Katalysatorschicht aus Platin, Polytetrafluoroethylen (PTFE) und Nafion. Dagegen wird eine Drei-Schicht-Elektrode aus einem Backing gleicher Art, einer mikroporösen Diffusionsschicht aus Kohlenstoff und PTFE und einer Katalysatorschicht aus Platin und Nafion aufgebaut. In dieser Arbeit wurden sowohl gewebte als auch ungewebte Backings für die GDEs verwendet, wobei zuerst in der Batchzelle 2-Schicht-Elektroden verwendet wurden, und später dann auch 3-Schicht-Elektroden.

Die Precursorlösung bestand aus Kohlenstoff als Trägermaterial für den Katalysator Platin (nominally 50 % on carbon black, Alfa Aesar im Verhältnis Pt:Kohlenstoff 1:1), Ethanol, Nafion (10 wt% in Wasser, Aldrich) und entionisiertem Wasser. Alle Lösungen für das ERUDES-Projekt wurden mit Millipore-Wasser (Millipore Direct-Q5, 18,2 M Ω ·cm, 25 °C) angesetzt.

Die Beschichtung wurde durch eine Rakel mit konstanter Geschwindigkeit und konstanter Dicke auf das Backing aufgebracht und anschließend trocknen gelassen. Darauf folgend wurde die Katalysatorschicht mit einer Nafionmembran (Typ Nafion 115, Quintech) zu einer halben MEA heiß verpresst. Nachstehend ist ein Beispiel für eine fertige halbe MEA gezeigt:



Abbildung 64: Beispiel einer frisch hergestellten halben MEA-Einheit.

Die zu untersuchende elektroorganische Reaktion war die Reduktion von Aceton. Dafür wurde als Elektrodenmaterial für die Arbeitselektrode mit hoher Wasserstoffüberspannung Blei verwendet. Jedoch fiel während den chronoamperometrischen Messungen bei Potentialen von 0,65 V - 1,85 V vs. NHE auf, dass während der kathodischen Reduktion von Aceton Bleiorganyle an der Elektrodenoberfläche entstanden (Farbänderungen, übler Geruch). Des Weiteren wurde die Nafionmembran durch das Aceton angegriffen und somit von der Katalysatorschicht gelöst. Dies führte dazu, dass eine neue Reaktion für die späteren Untersuchungen in der Durchflusszelle gefunden werden musste. Bei dieser Reaktion sollten keine organischen Lösemittel verwendet werden, damit die Stabilität der GDE gewährleistet wird und diese auch mehrere Male gebraucht werden kann. Dazu fand sich die Umsetzung von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) als eine passende elektroorganische Reaktion. Zu der Reduktion von DTNB wurde als Arbeitselektrode Glaskohlenstoff und als Elektrolyt 50 mM KH_2PO_4 / 50 mM KCl bei einem pH 7 verwendet. Zuerst wurde das Reduktionspotential von DTNB durch zyklische Voltammetrie bestimmt. Nachstehend sind die zyklischen Voltammogramme dargestellt:

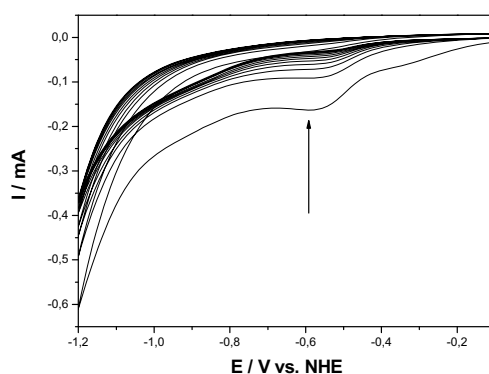


Abbildung 65: CV-Experiment von DTNB in 50 mM KH_2PO_4 / 50 mM KCl (pH 7).

Wie sich an dem CV ablesen lässt, liegt das Reduktionspotential von DTNB bei - 0.6 V vs. NHE. Chronopotentiometrische Messungen wurden daraufhin durchgeführt, um die Funktionsweise der Batchzelle mit GDE zu testen.

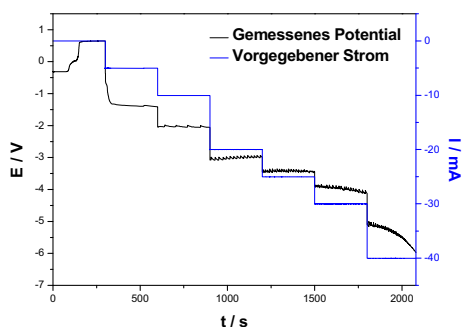


Abbildung 66: Chronoamperometrische Messung in der Batchzelle mit GDE.

Die Produktumsetzung ließ sich durch die Farbreaktion während der elektrochemischen Reduktion beobachten. Nachstehend sind sowohl Edukt als auch Produkt gezeigt:



Abbildung 67: Aufnahmen vom eingesetztem Edukt und erhaltenem Produkt in Lösung.

Diskussion:

Anhand dieser Testreihe konnte gezeigt werden, dass sowohl die Konstruktion der Batchzelle und deren Dichtigkeit gewährleistet waren als auch die elektroorganische Reaktion durchführbar war. Somit stand die Batchzelle der nachfolgenden Elektroenzymatik zur Verfügung.

3.1.8 Elektrochemische Durchflussszelle mit elektroorganischer Reaktion

Basierend auf den erzielten Ergebnissen zum Design der in Kapitel 3.1.7 konstruierten Batchzelle wurde im Folgenden die Durchflussszelle mit Gasdiffusionseinheit angefertigt. Die Durchflussszelle besteht aus einer kathodischen Halbzelle, in der die Reduktion eines eingesetzten Eduktes abläuft und aus einer anodischen Halbzelle, die die Gasdiffusionselektrode im Sinne einer Wasserstoffverzehrano­de darstellt. Die Zelle wurde aus Polyoxymethylen Copolymer (POM-C) hergestellt. Eine V4A-Edelstahlplatte wurde als Deckel der Zelle verwendet. Durch dieses Gewicht wurde die Zelle beim Anziehen der

Schrauben zusätzlich abgedichtet. Die Durchflusszelle bestand wie die zuvor verwendete Batchzelle aus drei Hauptteilen: einem Unterteil für die Arbeitselektrode, einem Mittelteil mit dem Elektrolytraum und einem Deckel aus Edelstahl zur Abdichtung und Kontaktierung der Zelle. Die folgende Explosionszeichnung in Abbildung 68 zeigt den Aufbau der Durchflusszelle:

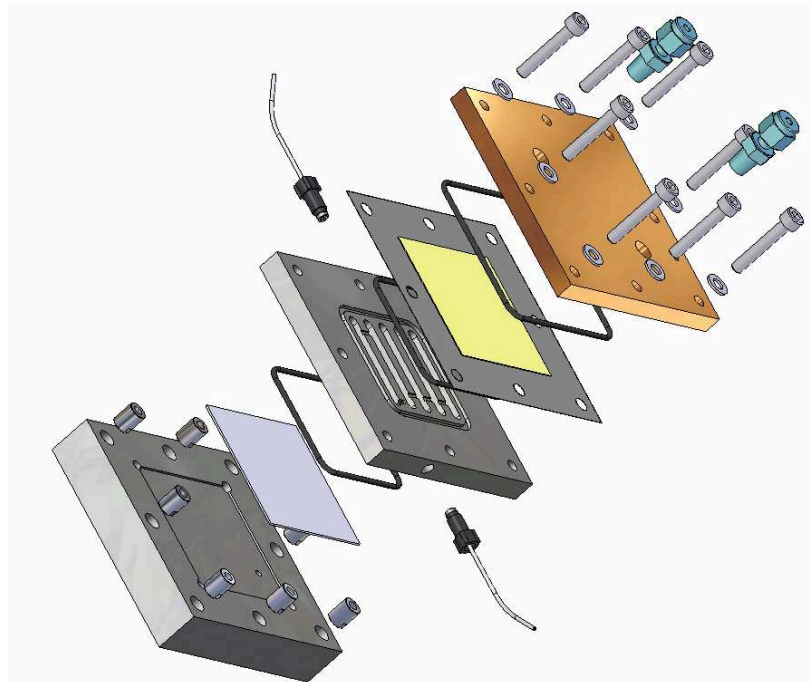


Abbildung 68: Explosionszeichnung der konzipierten elektrochemischen Durchflusszelle.

Die Durchflusszelle ist an jedem Übergangsbereich durch Dichtungsringe dicht verschlossen und wird durch acht Schrauben fest angezogen. Die große Arbeitselektrode von $6 \times 6 \text{ cm}^2$ mit einer Dicke von 1 mm (ACM, France) liegt im Bodenteil in einer Vertiefung. Der Mittelteil dieser Zelle besteht, ähnlich wie die Batchzelle, aus einer GDE, die auf einem Durchflusssystem aus vier Stegen aufliegt. Im mittleren Teil wurden zwei Anschlüsse, einmal für den Eingang und einmal für den Ausgang des Elektrolyten eingeplant. Der Deckel ist aus Edelstahl mit zwei Gasanschlüssen für den Ein- und Auslass sowie einer Anschlussstelle für die Gegenelektrode. Nachstehend ist ein Querschnitt der Durchflusszelle gezeigt:

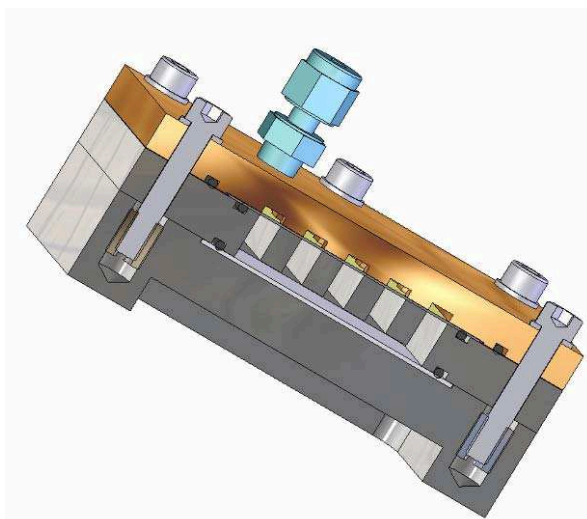


Abbildung 69: Querschnitt der elektrochemischen Durchflusszelle mit Einblick in die Elektrolytenkammer.

Es wird aus dieser technischen Darstellung ersichtlich, dass die im Mittelteil befindlichen Stege nicht auf der Arbeitselektrode aufliegen. Somit wird gewährleistet, dass die ganze Elektrodenfläche als aktive Oberfläche genutzt werden kann. Diese Stege waren zur Stabilisierung der MEA notwendig. Dadurch wurde, aufgrund der Größe der MEA und der bestehenden Durchfeuchtung mit der Zeit, eine Einwölbung verhindert.

Um einen kontrollierten Fluss des Elektrolyten durch die Zelle zu gewährleisten, wurde eine Schlauchpumpe von Ismatec® mit variabler Drehzahl verwendet. Die MEAs wurden wie zuvor beschrieben angefertigt. Als elektroorganische Reaktion wurde die Reduktion von Phenylglyoxylsäure (PGA - phenylglyoxylic acid) gewählt. Das folgende Verfahren soll für eine spätere industriell interessante stereoselektive Reduktion (z. B. eines Ketozuckers zu einem seltenen Zucker) verwendet werden.

PGA wird an der Ketogruppe reduziert, wobei die organische Säuregruppe nicht angegriffen wird. Als Produkt entsteht die Mandelsäure (MA – mandelic acid), die sowohl als (R)- als auch als (S)-Enantiomer entsteht. Sie ist eine aromatische Carboxylsäure, welche ein asymmetrisches α -C-Atom besitzt. Dies ist der Grund für die Entstehung der beiden Enantiomeren, welche Stereomere darstellen, sich also wie Bild und Spiegelbild verhalten. Es entsteht eine Mischung aus beiden Enantiomeren, ein sogenanntes Racemat, wobei (R)- und (S)-Mandelsäure im Verhältnis 1:1 vorliegen. Im folgenden Schema ist die Reaktion der PGA zu (RS)-Mandelsäure dargestellt:

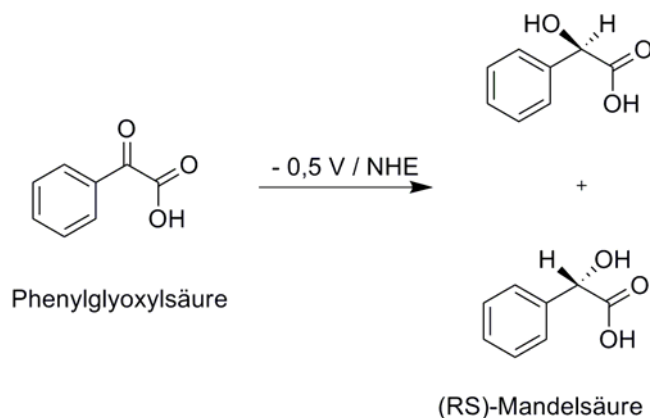


Abbildung 70: Strukturen der eingesetzten und erhaltenen Reagenzien.

Phenylglyoxylsäure und deren Derivate sind bekannte Photoinitiatoren und empfindlich gegenüber UV-Strahlung ^[97]. Daher wurden alle Untersuchungen unter Lichtausschluss durchgeführt.

Durch vorhergehende Untersuchungen wurde die Reaktion sowohl auf Funktionalität als auch auf das entsprechende Reduktionspotential geprüft und anschließend in die Durchflusszelle überführt. Die Durchflusszelle selbst wurde mit Hilfe eines einfachen reversiblen Systems kalibriert, da es sich hierbei lediglich um eine 2-Elektrodenschaltung handelt, bei der die Gegenelektrode gleichzeitig als „Pseudo-Referenzelektrode“ verwendet wird. Für die Kalibrierung wurde die reversible Redoxreaktion von Kaliumhexacyanoferrat(III) gewählt. Die Vorschubgeschwindigkeit wurde auf 100 mV/s eingestellt. Die Konzentration der Hexacyanoferrat(III)-Lösung betrug 20 mM in 0,5 M K₂SO₄-Lösung. Die halbe MEA stellt eine dynamische Wasserstoffelektrode dar, die für die Einstellung des Zellpotentials verantwortlich ist. Die Überspannung von Wasserstoff an einer solchen Elektrode ist vernachlässigbar.

Nach der erfolgreichen Kalibrierung wurde die elektrochemische Reduktion von PGA in der Durchflusszelle untersucht.

Zur elektrochemischen Untersuchung der Reduktion wurden zunächst zyklische Voltammogramme in Acetatpuffer eines pHs von 3,8 - 4 aufgezeichnet. Das Potentialfenster wurde zwischen - 1,5 V und 0 V vs. NHE gewählt, wobei verschiedene Vorschubgeschwindigkeiten untersucht wurden. Nachstehend sind CVs in Pufferlösung bei 5 mV/s und 10 mV/s gezeigt:

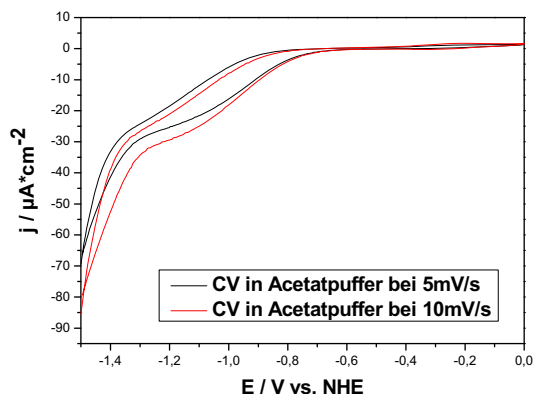


Abbildung 71: CVs in Acetatpuffer gemessen bei 5 mV/s und 10 mV/s.

Wie in Abbildung 71 zu erkennen ist, wurde bei einem Potential von - 0,5 V kein signifikanter Reduktionsstrom beobachtet. Dabei handelt es sich um den Potentialwert, bei dem der spätere Reduktionsstrom der PGA zu beobachten ist. Die Eduktlösung wurde bei der Reaktion kontinuierlich durch die Durchflusszelle gepumpt.

Die Konzentration der PGA wurde auf 100 mM festgelegt. In der folgenden Abbildung werden zum Vergleich ein CV im Acetatpuffer und ein CV mit PGA (100mM) bei - 0,5 V vs. NHE gezeigt:

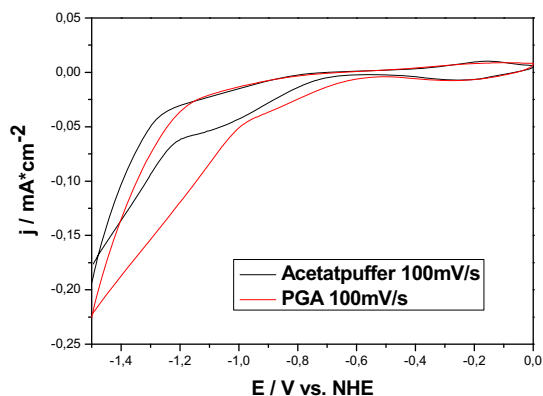


Abbildung 72: CVs von Acetatpufferlösung (pH ~4) und PGA (100 mM) bei 100 mV/s.

Durch den direkten Vergleich der CVs ist deutlich zu sehen, dass die Reduktion des PGA bei weniger negativem Potential anfängt als der Reduktionsstrom des Acetatpuffers. Es folgten chronoamperometrische Messungen, die einen analytisch nachweisbaren Umsatz bringen sollten. Es wurde ein konstantes Reduktionspotential von - 0,5 V gewählt. Die teilweisen Fluktuationen im Strom kommen vermutlich durch die elektrische Kontaktierung zustande. Es wurde anfangs kein stationärer Zustand des Stromes erzielt, jedoch stellte sich nach längeren Messungen ein quasi-stationärer Zustand ein. Nachstehend ist ein Beispiel einer chronoamperometrischen Messung zur PGA-Reduktion gezeigt:

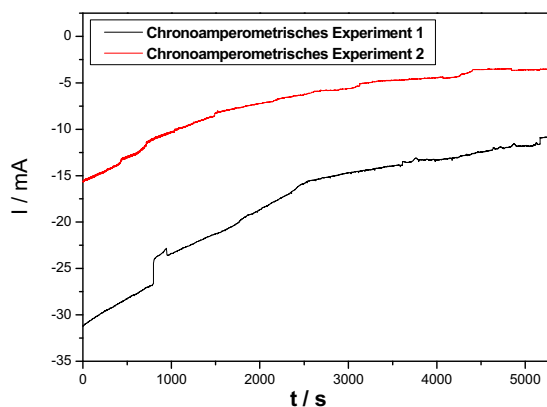


Abbildung 73: Chronoamperometrische Messungen bei - 0,5 V; Reduktion von PGA.

Das erhaltene Produkt wurde mittels eines Rotationsverdampfers eingeeengt. Um den Siedepunkt zu erniedrigen, wurde eine kleine Menge an Toluol zugegeben. Dadurch bildete sich ein Azeotrop. In der folgenden Abbildung sind eingetrocknete Produkte aus den chronoamperometrischen Messungen gezeigt:



Abbildung 74: Aufnahmen des erhaltenen Produkts durch die elektrochemische Umsetzung in der Durchflusszelle.

Das erhaltene Produkt, welches durch die Umsetzung in der Durchflusszelle unter inerten Bedingungen und unter Verwendung einer halben MEA-Einheit als Wasserstoffverzehranode erhalten wurde, wurde nun analytisch charakterisiert. Dazu wurde als Methode die chirale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography / HPLC) gewählt. Als Detektor diente ein UV-Detektor und als chirale Säule Chiralpak® IA (Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilisiert auf 5 µm Silicagel, 250 mm x 4.6 mm ID). Um die Wellenlänge richtig auszuwählen, wurde auf die UV-Vis-Spektroskopie zurückgegriffen. Es wurden 0,5 M Lösungen an Mandelsäure (MA) und PGA angesetzt, um die spektroskopischen Untersuchungen durchzuführen. Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst, daher wurde auch die Basislinie von Wasser aufgenommen. Nachstehend sind die erhaltenen Absorptionsspektren dargestellt:

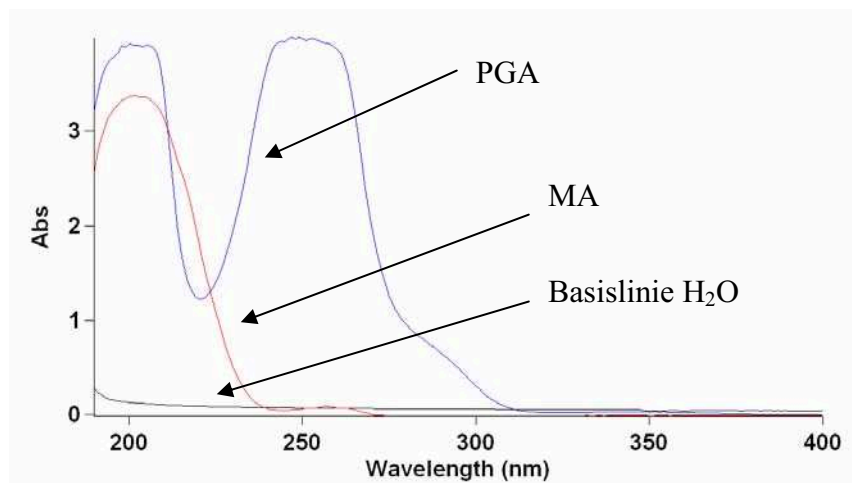
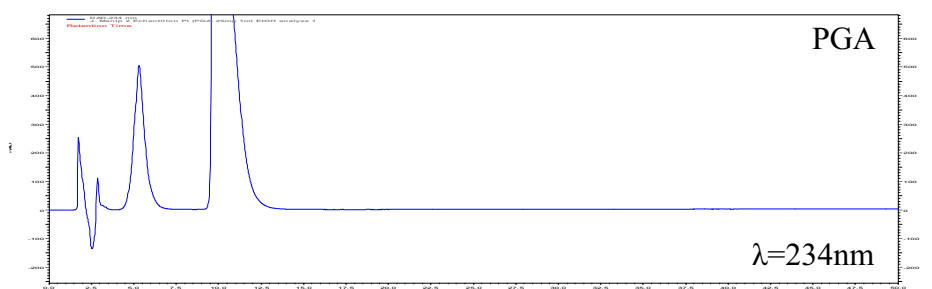


Abbildung 75: UV-VIS-Absorptionskurve von destilliertem Wasser, PGA und Mandelsäure.

Beide Substanzen zeigen einen Absorptionspeak bei ~ 200 nm, wobei die Mandelsäure einen etwas ausgeprägteren Peakverlauf zwischen 220 nm und 230 nm besitzt. Dies bedeutete, dass es bei Anpassung der Wellenlänge des Detektors möglich sein sollte, das Produkt mit einer besseren Sensitivität gegenüber der Mandelsäure zu detektieren. Nachdem die Wellenlänge genauer bestimmt wurde, wurden die Lösungen für die HPLC-Untersuchungen vorbereitet. Das Produkt und die Referenzsubstanzen wurden in Ethanol aufgelöst. Es wurde darauf geachtet, dass die Konzentrationen annähernd die Gleichen waren. Die mobile Phase für die Chromatographie betrug 98,5 % Hexan, 1,5 % Ethanol und 0,1 % Trifluoressigsäure. Um die Trennleistung der Chromatographiesäule abschätzen zu können, wurden folgende Substanzen separat injiziert: PGA, (RS)-Mandelsäure, (R)-Mandelsäure, (S)-Mandelsäure, Produkt der chronoamperometrischen Umsetzung in der Durchflusszelle und dessen Mischung mit (RS)-Mandelsäure. Bei jeder Injektion auf die HPLC-Säule wurden 10 μ l Lösung injiziert. Die erhaltenen Chromatogramme der HPLC-Experimente der verschiedenen Substanzen sind nachstehend im Vergleich untereinander aufgelistet:



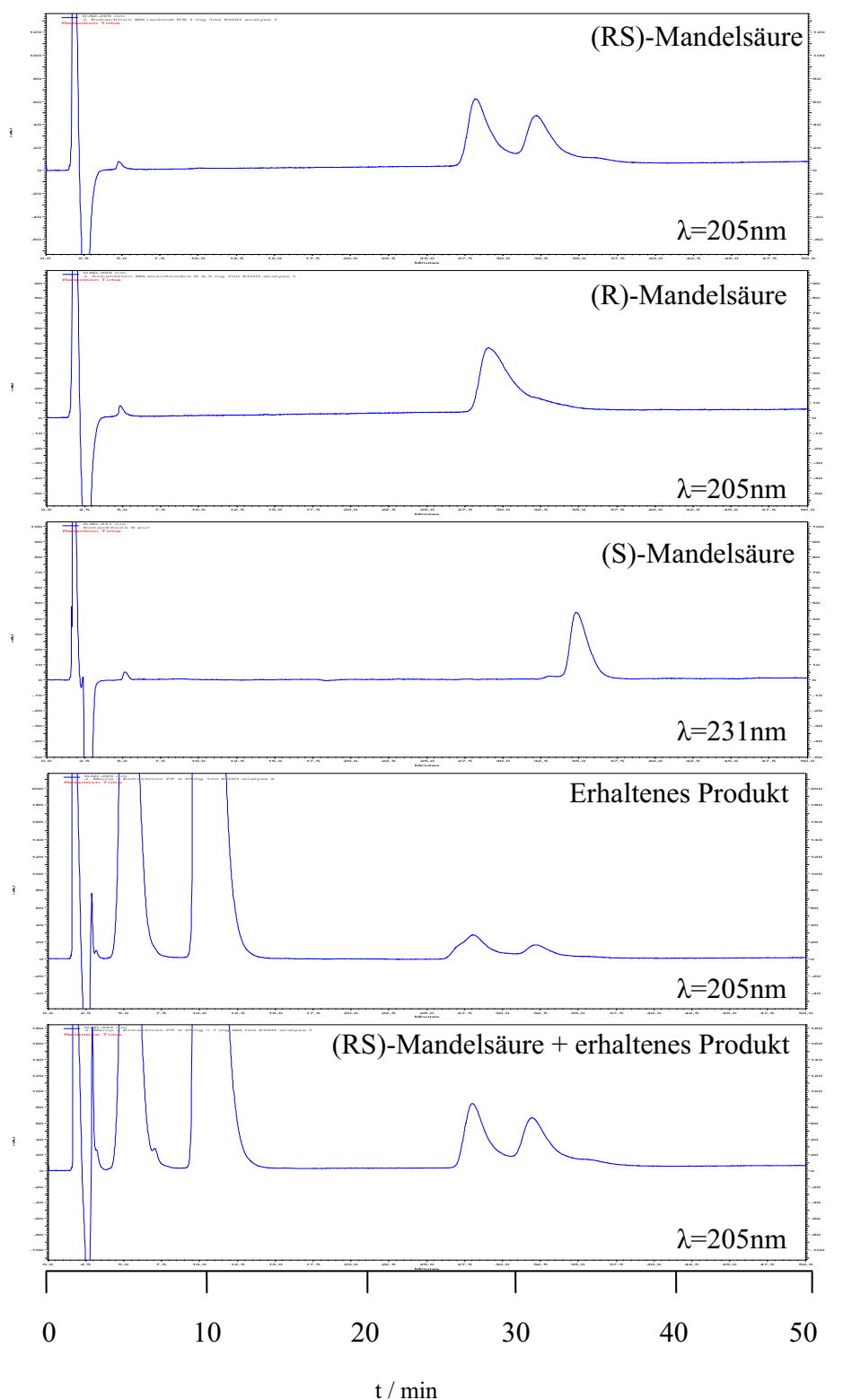


Abbildung 76: Chromatogramme der HPLC-Analyse der verschiedenen Substanzen.

Um zu beweisen, dass es sich bei dem Produkt um die beiden Enantiomere (R)- und (S)-Mandelsäure handelte, wurden diese als Referenzsubstanzen separat injiziert. Somit konnten die jeweiligen Retentionszeiten bestimmt werden. Eine Mischung aus dem erhaltenen Produkt der Durchflusszelle und eines kommerziellen Produkts aus beiden Enantiomeren wurde

ebenso injiziert, um zu testen, ob beide die gleichen Retentionszeiten besitzen. Die (R)-MA hatte die kürzeste Retentionszeit bei 28 Minuten, danach folgte die (S)-MA bei 32 Minuten. Anhand der HPLC-Messungen ist zu erkennen, dass sowohl das erhaltene Produkt der Durchflusszelle als auch das kommerziell erworbene Enantiomerengemisch zu den erhaltenen Retentionszeiten der einzelnen Enantiomeren erscheinen. Wie erwartet, wurde durch die Elektrokatalyse an der Goldoberfläche ein Racemat erhalten. Die Umsetzung lieferte wie erwartet keinen 100%igen Umsatz.

Abschließend kann zu dem Prototyp gesagt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte elektroorganische Reaktion - die Reduktion von PGA in der elektrochemischen Durchflusszelle mit einer Wasserstoffverzehranoide - erfolgreich dokumentiert werden konnte. Die Funktionstüchtigkeit des Prototyps der Durchflusszelle wurde simultan gezeigt. Auch die Analytik des erhaltenen Racemat-Produktes (RS)-Mandelsäure mittels chiraler HPLC wurde demonstriert.

3.1.9 Elektrochemische Batchzelle mit elektroenzymatischer Reaktion

Da sowohl in der Batchzelle als auch in der Durchflusszelle elektroorganische Reaktionen erfolgreich durchgeführt werden konnten, wurde nun im Anschluss die Elektroenzymatik zunächst in der Batchzelle und anschließend in der Durchflusszelle untersucht. In diesem Unterkapitel ging es darum, eine elektroenzymatische Reaktion in der Batchzelle mit halber MEA erfolgreich durchzuführen. Dabei sollten das elektrochemische Verhalten des Redoxmediators, die elektrochemische Reduktion des Cofaktors durch den Redoxmediator und ein komplettes elektroenzymatisches System getestet werden. Zu Beginn wurden Vergleichsmessungen in einer Glaszelle mit konventioneller 3-Elektrodenschaltung durchgeführt. Diese Resultate konnten anschließend mit den Ergebnissen in der Batchzelle verglichen werden.

Flache polykristalline Goldelektroden wurden zur Biofunktionalisierung verwendet. Die bioelektrochemische Batchzelle mit $\frac{1}{2}$ MEA wurde elektrochemisch mittels CV, CA und EIS charakterisiert und im Anschluss die Michaelis-Menten-Kinetiken erstellt.

Das ausgesuchte elektroenzymatische System bestand aus dem Mediator (Pentamethylcyclopentadienyl-2,2'-bipyridin-chloro)rhodium(III) ($[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$), NAD^+ als Cofaktor, dem Enzym Galaktitoldehydrogenase (GatDH) und dem Edukt Hydroxyaceton. Der Mediator wurde von dem Projektpartner der METU synthetisiert und die GatDH von der Angewandten Mikrobiologie der UdS hergestellt. Der EC-Mechanismus, nach welchem dieser

Mediator funktioniert, wurde zuvor in Kapitel 3.1.5 beschrieben. Die ersten Experimente dieser Testreihe wurden in einer Glaszelle durchgeführt bevor die komplette elektroenzymatische Reaktion in die Batchzelle mit 1/2 MEA überführt wurde. Jeder einzelne Schritt des elektroenzymatischen Systems, von der elektrochemischen Reduzierung des Redoxmediators, über die elektrochemische Cofaktorregenerierung bis hin zur gesamten elektroenzymatischen Kette wurde untersucht.

In den Untersuchungen wurden verschiedene Mediatorkonzentrationen ausgetestet. Der Stickstofffluss wurde auf 4 mL / min für 2 h eingestellt. Nachfolgend sind die CVs mit Mediator (4 mM) bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten dargestellt:

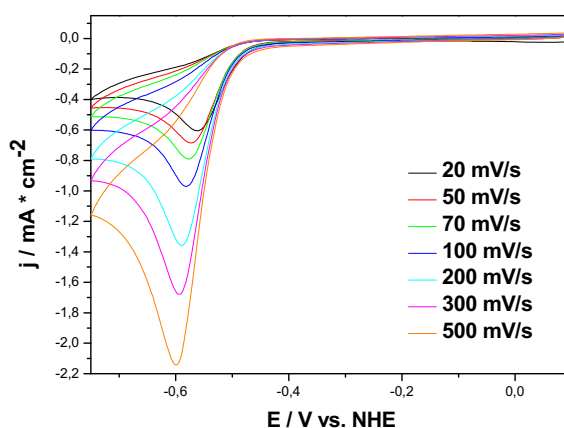


Abbildung 77: CV-Experimente mit dem Mediator (4 mM) bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten.

Der Reduktionspeak des Mediators befindet sich bei - 0,6 V vs. NHE und wurde durch die Messungen als funktionsfähig gewertet. Der Reduktionspeak des Mediators wurde bei Zunahme der Vorschubgeschwindigkeit verschoben. Dies spricht für einen leicht gehinderten Ladungstransport. Der anodische Oxidationspeak bei 500 mV / s, zuvor in der Literatur beschrieben^[83], konnte nicht beobachtet werden. Da die Impedanz eine bedeutende Rolle bei elektrochemischen Prozessen spielt, wurden Messungen zur elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) mit dem Rhodiummediator durchgeführt. Zu den Impedanzmessungen wurden zwei Messreihen durchgeführt: zum einen in reinem Puffer und zum anderen mit 4 mM Rhodiummediator bei jeweils vier Potentialen (- 0,65 V, - 0,5 V, 0 V, 0,2 V vs. NHE). Die Messungen wurden bei Frequenzen von 200 kHz bis 10 mHz mit einer Amplitude von 10 mV durchgeführt. In den nachfolgenden Graphiken sind die Impedanzmessungen bei den verschiedenen Potentialen mit jeweiligem Nyquist- und Bode-Plot gezeigt:

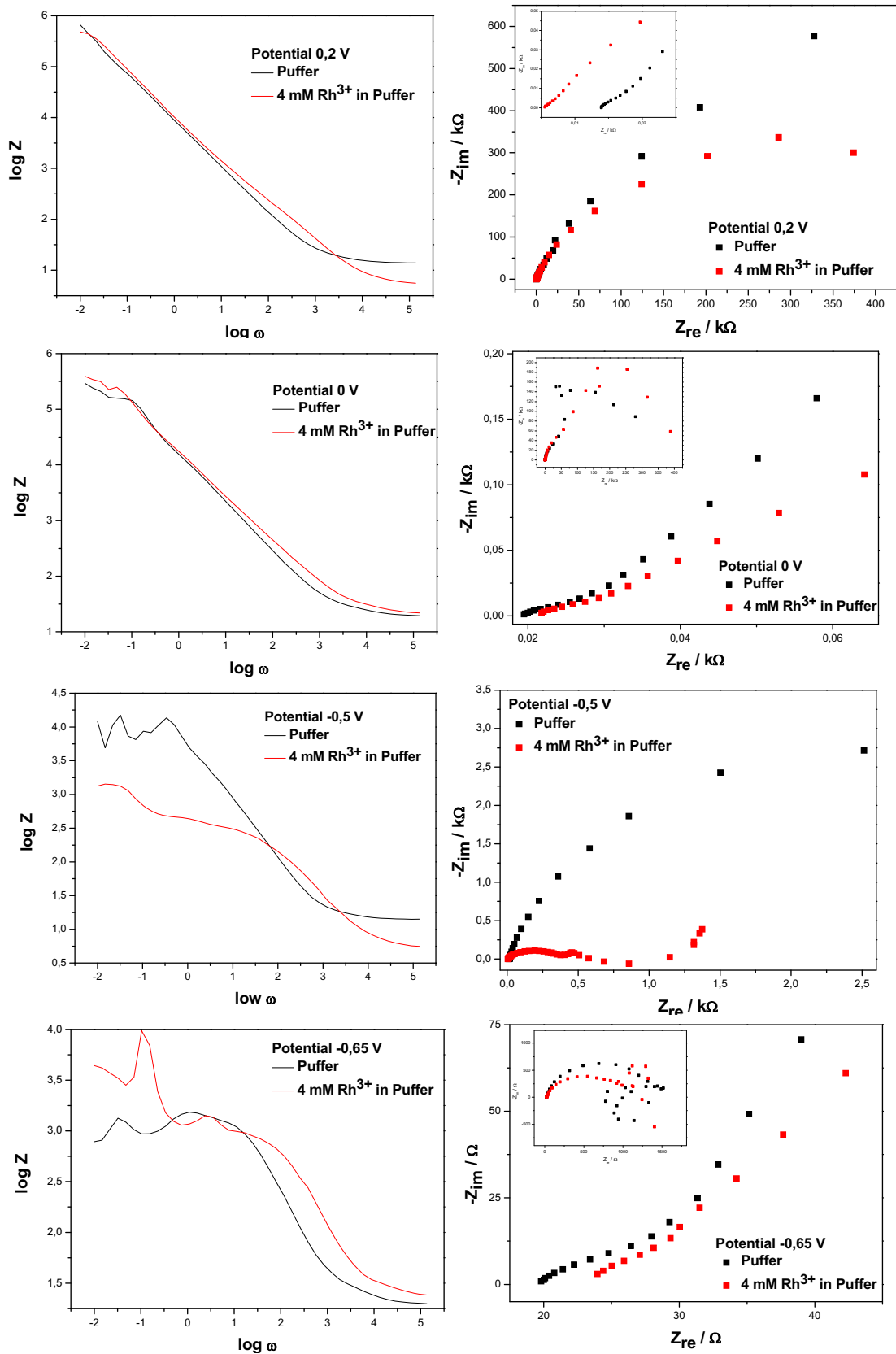


Abbildung 78: Impedanzmessungen (Nyquist- und Bode-Plots) mit Mediator (4 mM) in Puffer bei verschiedenen Potentialen.

Aus den Messungen ergibt sich ein Durchtrittswiderstand R_D von 155 kΩ bis 1.5 kΩ in Pufferlösung und von 450 kΩ bis 980 Ω in Gegenwart von 4 mM Rhodiummediator bei den

vier verschiedenen Potentialen. Die Messergebnisse sind nachstehend tabellarisch zusammengefasst. Es wird zwischen den verschiedenen Widerständen, die durch die verschiedenen Plots ermittelt wurden, differenziert:

<i>In Puffer</i>		$R_E [\Omega]$	$R_D [k\Omega]$	$C_D [F]$
+0,20 V	<i>Bode</i>	13,5		$1 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	14,0		
+0,00 V	<i>Bode</i>	19,5	155,0	$6 \cdot 10^{-5}$
	<i>Nyquist</i>	19,0		
-0,50 V	<i>Bode</i>	14,5	6,9	$2 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	14,0		
-0,65 V	<i>Bode</i>	20,0	1,5	$9 \cdot 10^{-5}$
	<i>Nyquist</i>	20,0		

<i>Mit Rh-Mediator</i>		$R_E [\Omega]$	$R_D [k\Omega]$		$C_{D1} [F]$
			R_{D1}	R_{D2}	
+0,20 V	<i>Bode</i>	5,6	447,0		$9 \cdot 10^{-5}$
	<i>Nyquist</i>	5,6			
+0,00 V	<i>Bode</i>	22,4	257,0		$6 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	22,0			
-0,50 V	<i>Bode</i>	5,6	0,37	1,4	$3 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	6,30			
-0,65 V	<i>Bode</i>	24,5	0,98	4,3	$4 \cdot 10^{-5}$
	<i>Nyquist</i>	24,0			

R_E : Elektrolytwiderstand

R_D : Durchtrittswiderstand

C_D : Doppelschichtkapazität

Bei einem Potential von 0 - 0,2 V ergab sich ein sehr hoher Durchtrittswiderstand, was dafür spricht, dass keine Reaktion bei diesen Potentialen stattfindet. Es ist zu beobachten, dass der Durchtrittswiderstand mit fallendem Potential abnimmt. Dies kommt dadurch zustande, dass die Reduktion des Mediators ab einem Potential von - 500 mV stattfindet. In dem Bereich kommt nun der Ladungstransfer hinzu. Der Elektrolytwiderstand hat einen gemittelten Wert von 16 Ω . Zusätzlich fiel auf, dass zwei Durchtrittswiderstände bei einem Potential von - 0,5 V und - 0,65 V zu beobachten waren.

Nach den Messungen mit dem Mediator folgten nun die Messungen zur Reduzierung des Cofaktors NAD^+ zu NADH . Dazu wurde eine 2,5 mM Mediatorlösung in Puffer angesetzt, die mit Stickstoff für 30 min bei einem Fluss von 4 mL / min gespült wurde. Der eingesetzte Mediator lag in oxidiert Form vor, weshalb dieser erst in einem CV reduziert wurde. Darauf folgend wurden 2 mM NAD^+ hinzugefügt und ein zweiter CV-Zyklus gefahren. In den folgenden CV-Kurven sind die Aktivierung, also Reduzierung des Mediators im den beiden ersten Zyklen und die NAD^+ -Reduktion im darauffolgenden Zyklus als Beispiel bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 200 mV / s dargestellt:

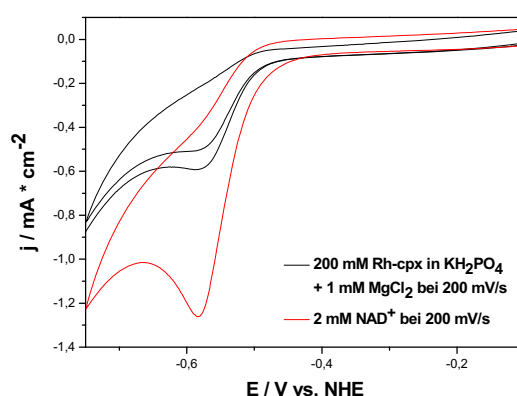


Abbildung 79: Aktivierung des Mediators (schwarz) und Reduktion von NAD^+ (rot).

In den CVs ist zu sehen, dass der Reduktionspeak (rote Linie) bei Zugabe von NAD^+ zunimmt. Da ab einer Vorschubgeschwindigkeit von 100 mV / s vs. NHE die Reduktion des Cofaktors sichtbar wird, wurde die Vorschubgeschwindigkeit von 200 mV / s vs. NHE eingestellt.

Nach der erfolgreichen Cofaktorreduzierung wurden elektroenzymatische Messungen durchgeführt. Es sollte die komplette elektroenzymatische Reaktionskette aus dem Rhodiummediator (2 mM), dem Cofaktor β -Nicotinamadenindinucleotid (NADH) (2 mM), dem Enzym GatDH (2 U) und dem Substrat Hydroxyaceton (45 mM) untersucht werden. Das System wurde ebenso in dem Phosphatpuffer gemessen, wobei 1 mM MgCl_2 für die Aktivität des Enzyms dazugefügt wurde. Die Pufferlösung mit Mediator wurde 30 min mit Stickstoff gespült, bevor die Cofaktor- und Enzymzugabe erfolgten. Im Anschluss an die Reduktion des Mediators wurde nach Zugabe des Substrates Hydroxyaceton der zweite CV-Zyklus gestartet. Es wurde ein Anstieg des kathodischen Stroms im zweiten Zyklus nach Zugabe des Substrates beobachtet. Im folgenden Plot sind beide Zyklen als Beispiel bei 200 mV / s dargestellt:

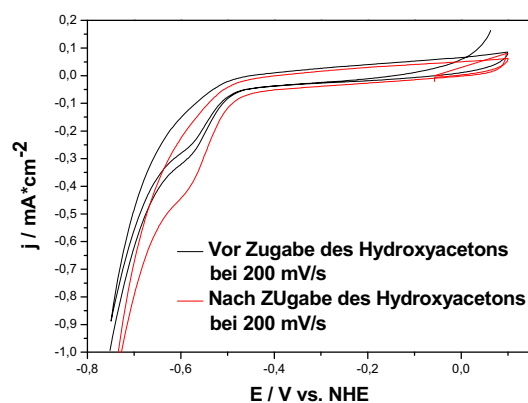


Abbildung 80: CV-Experiment vor und nach Zugabe des Substrates.

Somit war das Funktionieren der elektroenzymatischen Kaskadenreaktion gewährleistet und enzymkinetische Untersuchungen konnten durchgeführt werden. In der Literatur wird ein K_M -Wert für Dihydroxyaceton von 48 mM beschrieben ^[10]. Daher sollte die Konzentrationsspanne von 1 mM bis 60 mM gegeben werden.

Die Testreihe wurde nach Optimierungen erneut durchgeführt. Schließlich wurde eine 2 mM Mediator- und 2 mM NADH-Lösung gewählt. 2 U GatDH wurden darauf folgend dazugegeben und ein CV gefahren, um den Mediator erst zu reduzieren. Schließlich wurde kontinuierlich Hydroxyaceton dazugegeben. Zwischen jeder Zugabe wurde eine Pause von 3 min gemacht, in der erneut mit Stickstoff gespült wurde. Nachstehend wird ein Messbeispiel dargestellt:

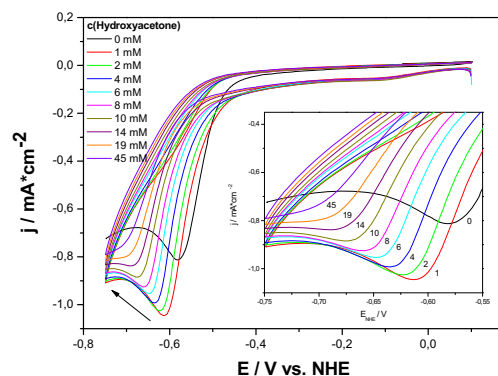


Abbildung 81: CVs der kinetischen Messungen nach Spülen der Zelle mit Stickstoff für 30 min.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass der kathodische Strom mit zunehmender Substratkonzentration abnimmt. Es scheint, als verliere der Redoxmediator an Aktivität oder eventuell drang Sauerstoff in die Zelle ein. Um die Prozedur zu verbessern, wurden andere Spülzeiten mit Stickstoff ausprobiert, aber auch andere Vorschubgeschwindigkeiten wurden getestet. Jedoch führte kein Optimierungsversuch zu einer Änderung der experimentell

erhaltenen Resultate. Dies lag vermutlich daran, dass entweder das Enzym oder aber der Mediator an Aktivität verlor. Dies wird im späteren Verlauf dieser Arbeit genauer untersucht. Schließlich wurde die Durchführung der Experimente in die Batchzelle mit halber MEA überführt. Bevor das komplette System getestet wurde, musste wie im Falle der Glaszelle jeder Schritt separat untersucht werden, damit sichergestellt werden konnte, dass alle Teilschritte auch in der konstruierten Zelle analog verlaufen.

Zuerst wurde der Mediator bei verschiedenen Konzentrationen in der elektrochemischen Batchzelle mit Gasdiffusionseinheit bei einem pH von 6,5 getestet. Die Arbeitselektrode war aus Gold und die halbe MEA repräsentierte wie zuvor die Gegenelektrode. Eine Ag/AgCl-Elektrode wurde als Referenzelektrode eingesetzt. Als Gegenreaktion wurde Wasserstoff in die Zelle gespült, um diesen zu H^+ elektrochemisch zu oxidieren. Die Zelle wurde durch Spülen mit Stickstoff vom Sauerstoff gereinigt. Danach wurden die CV-Experimente durchgeführt. Die nachstehende CV-Messung dokumentiert das Experiment bei einer Mediatorkonzentration von 2 mM und verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten:

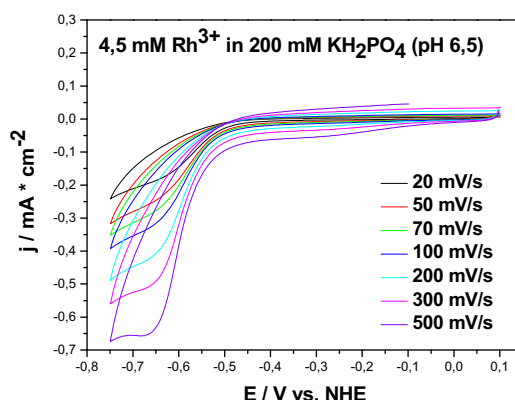


Abbildung 82: CV-Messungen des Mediators (2 mM) bei verschiedenen Vorschubgeschwindigkeiten.

Da die GDE-Batchzelle nicht für den simultanen Einsatz zweier Gase konzipiert war, traten diesbezüglich Probleme auf. Daher wurde mit Stickstoff außerhalb der Zelle gespült und dann die Mediatorlösung in die Batchzelle transferiert. Auch in diesem Fall wurde die elektrochemische Impedanzspektroskopie zur Bestimmung der entsprechenden Widerstände herangezogen. Analog zu den Untersuchungen in der Batchzelle wurde ohne und mit Einsatz des Redoxmediators (4 mM) bei verschiedenen Potentialen gemessen. Der Durchtrittswiderstand (R_{D0}) lag bei $\sim 52 \Omega$ für die Messung in Puffer und mit dem Mediator. Der zweite Widerstand (R_{D1}) verringerte sich von 135 k Ω auf einen Wert von 1.3 k Ω mit zunehmend kathodischem Potential im Puffer, und von 240 k Ω auf einen Wert von 440 Ω für den Mediator, da die Reduktion bei einem Potentialwert von - 0,5 V begann. Diese

Messungen bewiesen ebenso, dass bei Potentialen zwischen 0 und 0,2 V keine Reaktion stattfinden konnte, da die Widerstände zu hoch waren. Nachstehend sind die Ergebnisse der elektrochemischen Impedanzmessungen tabellarisch aufgeführt:

<i>In Puffer</i>		$R_E [\Omega]$	$R_D [k\Omega]$		$C_D [F]$	
			R_{D0}	R_{D1}	C_{D0}	C_{D1}
+0,20 V	<i>Bode</i>	26	0,052	135	$2 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	26				
+0,00 V	<i>Bode</i>	26	0,051	15,8	$2 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	25				
-0,50 V	<i>Bode</i>	26	0,052	3,9	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	30	0,052	4,0		
-0,65 V	<i>Bode</i>	26	0,052	1,3	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	26	0,051	1,3		

<i>Mit Mediator</i>		$R_E [\Omega]$	$R_D [k\Omega]$			$C_D [F]$	
			R_{D0}	R_{D1}	R_{D2}	C_{D0}	C_{D1}
+0,20 V	<i>Bode</i>	26	0,045	240		$2 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	25					
+0,00 V	<i>Bode</i>	26	0,055	5,2		$2 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	26					
-0,50 V	<i>Bode</i>	26	0,049	0,40	0,71	$2 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	30	0,048	0,39			
-0,65 V	<i>Bode</i>	26	0,056	0,44	1,6	$2 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$
	<i>Nyquist</i>	26	0,052	0,51			

Der Vergleich der Impedanzmessungen in der Batchzelle mit denen der Glaszelle zeigte, dass ein vergleichbarer Elektrolytwiderstand gemessen wurde, wobei die Widerstände in der Glaszelle mehr fluktuieren. Aber ein klarer Unterschied im Übergangswiderstand wurde anhand der Bode-Plots deutlich. Die Übergangswiderstände zeigten bei niedrigen Frequenzen (R_{D1} und R_{D2}) ähnliche Werte, jedoch bei höheren Werten variierten diese. Die Experimente in der Glaszelle zeigten nur zwei R_D -Werte bei - 0,5 V und - 0,65 V, wobei in der Batchzelle mit halber MEA drei Übergangswiderstände bei den gleichen, gewählten Potentialen sichtbar wurden. Der erste Wert R_{D0} bei hohen Frequenzen kann der halben MEA zugeordnet werden, da für R_{D0} und C_{D0} die gleichen Werte bei jedem Potential erhalten wurden und dieser Widerstand nicht in der konventionellen Messreihe auftritt. Dies wurde ebenso mit dem dazugehörigen halben Zyklus des Nyquist-Plots erhalten. Die beiden Durchtrittswiderstände

bei niedrigen Frequenzen kamen durch den Ladungstransfer der Rhodiumreduktion zustande, da diese Widerstände auch bei den Experimenten mit der Glaszelle zu sehen und die Werte von vergleichbarer Größenordnung waren.

Allgemein kann gesagt werden, dass die GDE-Batchzelle für die elektrochemischen Untersuchungen des Redoxmediators geeignet war. Nun konnten die Cofaktorkinetiken in der GDE-Batchzelle untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurde die Zelle anfangs mit Mediatorlösung gefüllt und direkt mit Stickstoff gespült. Danach wurde der Mediator in einem ersten CV-Zyklus reduziert und vor dem zweiten Zyklus NAD^+ zugegeben. Der zweite Zyklus beschrieb nun die Reduzierung des NAD^+ zu NADH durch den Redoxmediator. Dabei trat folgendes Problem auf: Die Zelle musste vollständig gefüllt werden, um eine Leitfähigkeit zu gewährleisten. Daher konnte keine weitere Lösung dazuaddiert werden und gleichzeitig musste mit dem zweiten essentiellen Gas gespült werden. Daher wurden nun zwei Alternativen ausprobiert. Erstens wurde der Rhodiummediator direkt in der Zelle mit Stickstoff gespült. NAD^+ wurde dagegen außerhalb gespült und anschließend in die Zelle überführt. Dabei kam es jedoch aufgrund des Überdrucks zu Elektrolytverlust, welcher durch einen Auffangbehälter an der Zelle behoben wurde. Mittels dieser Optimierung wurde zum Teil eine Erhöhung des Reduktionsstroms bei der Reduzierung des NAD^+ zu NADH beobachtet, wie nachstehend gezeigt wird:

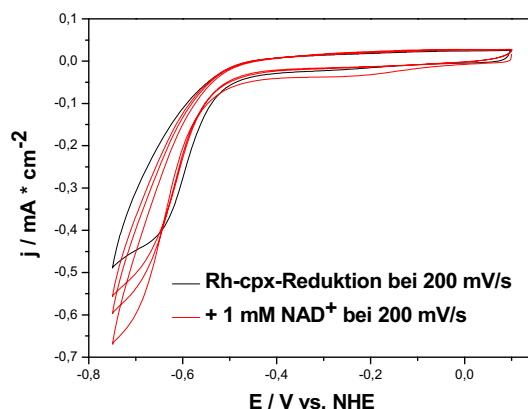


Abbildung 83: Aktivierung des Mediators (schwarz) und Reduktion von NAD^+ (rot).

Im ersten Zyklus wurde der Mediator reduziert. Danach erfolgte die Zugabe von NAD^+ , welches bei gleichzeitiger Oxidierung des Mediators selbst reduziert wurde, wobei im Anschluss der Mediator an der Elektrodenoberfläche wieder reduziert wurde.

Die zweite Alternative bestand darin, sowohl Mediator als auch Cofaktor getrennt voneinander außerhalb der Zelle mit Stickstoff (3h mit 2 mL/min) zu spülen und anschließend

in die Zelle zu überführen. Der Redoxmediator wurde direkt elektrochemisch reduziert und im Anschluss sofort der Cofaktor dazugefüllt. Nun wurde die elektrochemische Reduktion beobachtet, wie in der folgenden Abbildung gezeigt wird:

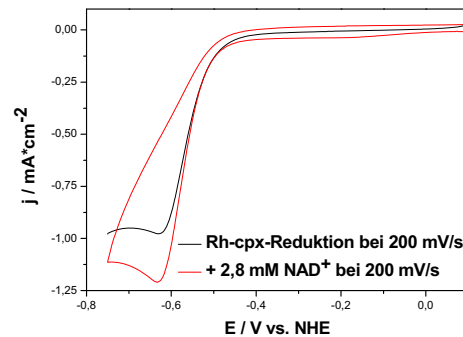


Abbildung 84: Aktivierung des Mediators (schwarz) und Reduktion von NAD^+ (rot).

Dadurch wurden verbesserte Ergebnisse erhalten, wie hier zu sehen ist. Im Gegensatz zu der zuvor gezeigten Messung wurde nun ein ausgeprägter Reduktionspeak bei Zugabe des Cofaktors beobachtet.

Diskussion:

Allgemein soll hier angemerkt werden, dass prinzipiell die Cofaktorkinetiken in der GDE-Batchzelle messbar waren. Elektroenzymatische Messungen waren in dieser Zelle nicht möglich, da die Zelle für simultanen Einsatz zweier Gase nicht aufgebaut war. Es kam zu Überdruck in der Zelle und die Limitierung des Volumens spielte eine entscheidende Rolle. Die Zelle musste bereits anfangs komplett mit Elektrolyt gefüllt werden, um die Leitfähigkeit zwischen Arbeitselektrode und der halben MEA zu gewährleisten. Es konnte somit keine Substratzugabe mehr stattfinden ohne Verlust der Lösung, was zu Verfälschungen der Resultate geführt hätte. Abschließend kann gesagt werden, dass diese Testreihe einen wertvollen Zwischenschritt für die Realisierung des Bioreaktors am Ende des Projektes darstellt. Es konnten sowohl elektroorganische als auch elektroenzymatische Untersuchungen in der Batchzelle durchgeführt werden und die somit erzielten Resultate waren vergleichbar mit den konventionellen Messungen in einer Glaszelle. Die zahlreichen Optimierungen und gewonnenen Erkenntnisse waren für den weiteren Forschungsverlauf des Projektes von Bedeutung - insbesondere in Bezug auf Design und Konstruktion der Durchflusszelle.

3.1.10 Elektrochemische Durchflussszelle mit elektroenzymatischer Reaktion

Im folgenden Kapitel erfolgte das Upscalen einer auf kleineren geometrischen Flächen getesteten elektroenzymatischen Reaktion. Es ist bekannt, dass das Upscalen von bereits funktionierenden Prozessen nicht trivial ist und dass die Reaktionen auf großen geometrischen Flächen nicht zwingend mittels zuvor getesteter Prozedur analog verlaufen müssen. Zunächst wurden die in Kapitel 3.1.7 gefundenen Nachteile des Zelldesigns durch geeignete Optimierungen behoben. Nachstehend ist das neue Zelldesign in einer Explosionszeichnung dargestellt:

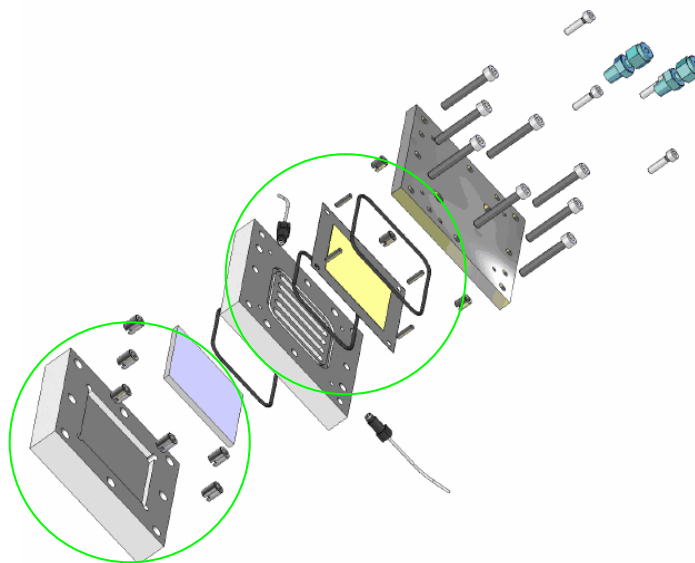


Abbildung 85: Explosionszeichnung der neuen Durchflussszelle.

In der Explosionszeichnung wird auf die optimierten Abschnitte der neu konzipierten Durchflussszelle hingewiesen. Die Arbeitselektroden wurden nun auf eine Dicke von 4 mm gesetzt, um ein mögliches Zerbrechen der Goldelektroden während des Schließens der Zelle zu verhindern. Somit wurde eine bessere Stabilität der Arbeitselektroden gewährleistet. Die elektrische Kontaktierung der Arbeitselektrode wurde ebenso geändert, um Dichtungsprobleme zu vermeiden. In dem Demonstrator wurde die Arbeitselektrode nun von zwei gegenüberliegenden Seiten kontaktiert, um eine bessere Leitfähigkeit und somit größere Stromdichten zu gewährleisten. Ebenso wurde an der Nafionmembran der halben MEA eine Änderung zugunsten der Kosten vorgenommen. Die Größe der Nafionmembran wurde etwas verringert und in der neuen Zelle mit vier Dübeln im Mittelpunkt der Zelle befestigt. Somit wurden eine bessere Stabilität und ein einfacheres Handling der MEA garantiert. Ein weiterer Vorteil dieser Vorrichtung ist die Möglichkeit die MEA mehrmalig verwenden zu können. Nach erfolgter elektroenzymatischer Reaktion wird nun lediglich die Arbeitselektrode

entnommen. Die MEA bleibt wie in der nachfolgenden Zeichnung dargestellt mit dem Deckel durch 4 zusätzliche Schrauben verschlossen. Dadurch wird die MEA weiterhin angepresst und nicht im nassen Zustand aus der Zelle entfernt. Dies führte in dem Prototyp bereits nach kurzer Zeit zu einer Separation von Nafion und GDE.

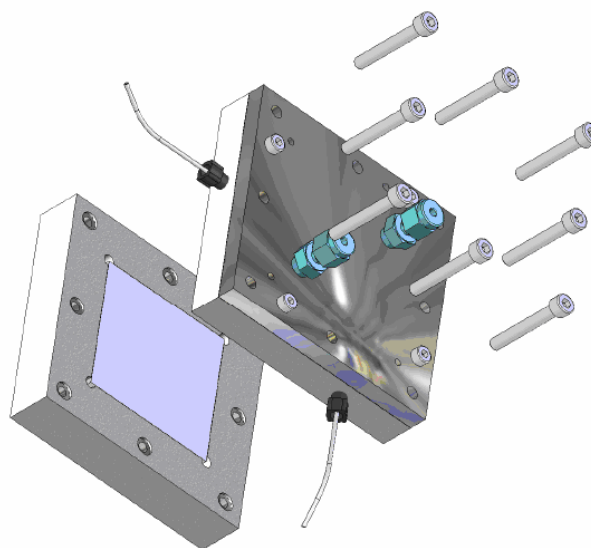


Abbildung 86: Unterteil der neuen Durchflusszelle mit Arbeitselektrode und optimiertem Mittel- und Oberteil zum Verschließen der halben MEA.

Durch diese Änderung im Design wurde die Durchflusszelle in zwei Schritten geschlossen. Zunächst wurde die hergestellte halbe MEA zwischen den Mittel- und Oberteil der Zelle eingebettet und dicht verschlossen. Dann kam es zum Einbau der zuvor biofunktionalisierten Arbeitselektrode. Anschließend wurden diese beiden Teile durch weitere acht große Schrauben dicht verschlossen. Die MEA konnte nun ohne Zerstörung mehrmals eingesetzt werden, indem man die beiden Teile (Mittel- und Oberteil) fest verschlossen hielt.

Nach dem erfolgreichen Design der neuen Durchflusszelle wurde nun an dem Upscalen elektroenzymatischer Reaktionen gearbeitet. Dies sollte durch Charakterisierung der biofunktionalisierten Arbeitselektroden zunächst mittels zyklischer Voltammetrie in einem konventionellen Zellaufbau und dann mittels Chronoamperometrie in der Durchflusszelle stattfinden. Eine anschließende Analytik mittels HPLC sollte Aufschluss über die Produktkonversion bringen.

Auch in diesem Fall erfolgte zunächst eine Kalibrierung der Pumpe und der Nutzung der MEA als Anode bzw. Kathode, um das entsprechende Potential für die anschließende elektroenzymatische Umsetzung zu finden. Beim Einsatz von Enzymen war es wichtig ein

konstantes und vor allem kontrollierbares Potential anlegen zu können, da keine echte Referenzelektrode verwendet wurde. Die Zelle wurde kalibriert, indem die halbe MEA einmal als Kathode ($\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$) und einmal als Anode (H_2/H^+) eingesetzt wurde. Zur Kalibrierung wurden zunächst konventionelle Gold-CVs in 0,5 M K_2SO_4 mit einer Drei-Elektrodenschaltung aufgenommen und gegen NHE umgerechnet. Danach wurden in der Durchflusszelle analog Gold-CVs unter Verwendung der halben MEA sowohl als Kathode als auch als Anode aufgenommen und mit den CVs der Drei-Elektrodenschaltung verglichen. Eine Verschiebung des Goldoxidreduktionspeaks wurde beobachtet. Somit ergaben sich Verschiebungen der Potentiale für die halbe MEA als pseudo-Referenzelektrode zu einem Potential von + 110 mV vs. NHE als Anode und zu - 320 mV vs. NHE als Kathode. Des Weiteren wurde bei einer Erhöhung des Flusses während der Experimente, in denen die MEA als Kathode geschaltet war, eine leichte Verschiebung der Peaks beobachtet.

Die Projektpartner aus Nancy entwickelten ein Verfahren zur Abscheidung eines Sol-Gel-Films, in den die komplette Enzymatik eingebettet wurde. Nun wurde in Saarbrücken das Upscalen dieses Prozesses in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern aus Nancy durchgeführt. Zuerst wurde die elektroenzymatische Reaktion für Oxidationen untersucht. Es wurde die elektroenzymatische Oxidation von D-Sorbitol zu Fructose in Gegenwart des in das Sol-Gel eingebetteten Enzyms D-Sorbitol-Dehydrogenase (DSDH) untersucht. Hierzu mussten die erfolgten Untersuchungen im Miniaturmaßstab zunächst erfolgreich upgescaled werden.

Zur elektrochemischen Abscheidung des Gels wurde zunächst eine Abscheidezelle konstruiert. In einem ersten Schritt wurde das Upscaling des Sol-Gel-Filmes unter potentiostatischer Abscheidung untersucht. Hierzu wurde ein Gemisch aus Tetraethoxysilan (TEOS, 98%) und Poly(diallyldimethylammoniumchloride (PDDA, 20wt% in Wasser) verwendet. Anschließend erfolgte eine Umstellung der Abscheidemethode. Aufgrund des industriellen Gesichtspunktes wurde galvanostatisch abgeschieden und auch dieses Verfahren zunächst erfolgreich upgescaled.

Anschließend wurde das komplette enzymatische System untersucht. Die Abscheidemischung bestand dabei aus 1,062 g TEOS, 1,25 mL HCl (0,01 M) und 1 mL H_2O , die über Nacht gerührt und anschließend bis auf die gewünschte Konzentration von 0,5 M verdünnt wurde. Diese Lösung wurde nun mit der DSDH (10 mg/mL) und dem PDDA (20 % wt) im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Als Arbeitselektroden wurden Glaskohlenstoffelektroden verwendet, die vor jedem Gebrauch mit einer Al_2O_3 -Polierpaste (MasterProp polishing suspension, 0.05 μm , Buehler) poliert und mit destilliertem Wasser gespült wurden.

Bei einer Testreihe wurde festgestellt, dass die optimalen galvanostatischen Abscheidebedingungen bei - 26 mA für 20 s lagen, da damit die höchste Stromdichte von $\sim 60 \text{ mA} \cdot \text{cm}^2$ erreicht wurde. Nach der Abscheidung wurde ein schimmernder Film auf der Elektrodenoberfläche sichtbar, was in der folgenden Abbildung zu erkennen ist:

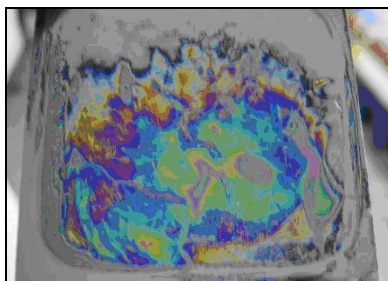


Abbildung 87: Galvanostatisch abgeschiedener Sol-Gel-Film mit DSDH und PDDA.

Nach der Modifizierung der Arbeitselektrode mit dem Sol-Gel-Film wurde mittels zyklischen Voltammetrieuntersuchungen getestet, ob der Film auch elektroenzymatisch aktiv war. Dabei wurde das optimale Potential für die anschließenden Chronoamperometriemessungen herausgefunden. Die modifizierte Elektrode wurde in die Durchflusszelle eingebaut, die Zelle präpariert und der Sauerstofffluss angestellt. Die durchgepumpte Substratlösung mit einem Fluss von 6,7 mL/min hatte eine NAD^+ -Konzentration von 1 mM. Die chronoamperometrische Messung erfolgte über zwei Stunden, wobei alle 30 Minuten eine Probe von 500 μL für die HPLC-Analyse entnommen wurde. Bei der Analytik kam heraus, dass eine Umsetzung zu Fructose stattgefunden hatte. Es wurden jedoch lediglich Produktkonzentrationen zwischen 1,5 und 3 mM detektiert. Eine mögliche Ursache ist die schlechte Haftung des Sol-Gel-Filmes während der Messung im Fluss.

Nach dem Testlauf für die Oxidation wurde nun auch die Reduktion in der Durchflusszelle getestet. Dazu wurde das analoge Sol-Gel-System TEOS/PDDA/DSDH verwendet. Das Reduktionspotential betrug - 1,1 V für die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors NAD^+ . Wasserstoff wurde nun für die Gegenreaktion in die Durchflusszelle eingeleitet und der Zellfluss auf 1,7 mL/min eingestellt. Eine Lösung aus 20 mM Fructose und 1 mM NADH in KH_2PO_4 (0,1 M, pH 6,5) wurde bereits vor Einsatz einige Minuten mit Stickstoff gespült, bevor diese in die Zelle gepumpt wurde und das Spülen mit Stickstoff während der ganzen Messung beibehalten. Als die Zelle komplett gefüllt war und sich ein kontinuierlicher Fluss einstellt hatte, wurde die Chronoamperometrie für zwei Stunden gestartet. Es wurden wieder alle 30 Minuten Proben von 500 μL für HPLC-Untersuchungen entnommen. Die HPLC-

Analysen zeigten auch in diesem Fall einen Umsatz zu dem gewünschten Produkt D-Sorbitol, jedoch wie zuvor nur mit einer Konzentration von $\sim 1,5$ mM.

Trotz des geringen Umsatzes konnten sowohl Oxidation als auch Reduktion bioelektrochemisch in der Durchflusszelle durchgeführt werden. Möglicherweise könnte eine Erhöhung der Umsatzrate durch eine beträchtlich längere Laufzeit der elektrochemischen Messungen erfüllt werden. Jedoch hätte es in diesem Falle wegen der Ablösung des Films zu keiner Steigerung geführt. Daher galt es ein Verfahren zu finden, bei dem der Sol-Gel-Film während der gesamten Messdauer fest auf der Oberfläche haftet.

Als alternative Methode wurde das Spin-coating mit einer neuen Gelzusammensetzung gewählt. Hier konnte bereits neben der DSDH auch der Cofaktor erfolgreich immobilisiert werden. Das Biosystem bestand nun aus DSDH, NAD^+ (im Falle der Oxidationsreaktion) und DI (Diaphorase), wobei diese für die Regenerierung des Cofaktors verantwortlich war. Vorteil dieser Spin-coating-Methode war es, dass nur sehr geringe Mengen ($300\mu\text{L}$) der Lösung für die Herstellung des Films auf einer Elektrode notwendig waren. Die vollständige Zusammensetzung der eingesetzten Lösung bestand nun aus TEOS ($0,25\text{M}$) / NAD^+ / GPS (3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilan) / DI (Diaphorase I, Unitika Ltd., Japan) (5 mg/mL) / DSDH (10 mg/mL) / PEI (Polyethylenimin), wobei das PEI ($\text{pH } 9$) zuletzt zugegeben wurde. Die folgende Rezeptur wurde für die Sol-Gel-Präparation verwendet: $4,248\text{ g TEOS} + 4\text{ mL H}_2\text{O} + 5\text{ mL } 0,01\text{ M HCl}$. Diese Lösung wurde über Nacht gerührt und anschließend auf eine Konzentration von $0,25\text{ M TEOS}$ verdünnt. Zur Präparation der Cofaktorlösung wurden $30\text{ mg NAD}^+ + 187,5\text{ mg GPS}$ in $5\text{ mL } 0,1\text{ M Tris-HCl (pH } 7,5)$ gelöst und über Nacht gerührt. Bevor das komplette System zum Einsatz kam, wurde zunächst ein Film aus TEOS und PEI mittels Spin-coating aufgebracht und erfolgreich auf Funktionalität und Haftbarkeit geprüft. Anschließend wurden $300\text{ }\mu\text{L}$ der Komplettlösung auf eine Glaskohlenstoffelektrode aufgetragen. Verschiedene Rotationen (1000 RPM , 3000 RPM , 8000 RPM) wurden für das Spin-coating ausprobiert, wobei sich 1000 RPM als die beste Rotation herausstellte. Es wurde erwartet, dass mit zunehmender Rotationsgeschwindigkeit, die Schichtdicke und somit die Menge an Enzym auf der Elektrodenoberfläche abnimmt. Dies wurde durch zyklische Voltammetrie-Untersuchungen belegt. Um nun elektroenzymatische Messungen zu testen, wurde eine Lösung aus $0,1\text{ mM Ferrocendimethanol (FcDM)}$ in $0,1\text{ M Tris-HCl-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) (pH } 9,0)$ angesetzt. Eine Stammlösung aus D-Sorbitol mit einer Konzentration von 1M wurde ebenfalls angesetzt. Die durch das Spin-coating modifizierte Elektrode wurde in die Abscheidézelle transferiert und diese mit der

Pufferlösung und dem enthaltenen FcDM gefüllt. CV-Messungen wurden nach jeder Zugabe an Substratlösung aufgenommen. Es wurde beobachtet, dass ohne die Zugabe von Substrat nur das reversible Verhalten des Redoxmediators zu beobachten war. Unterschiede bei den Rotationseinstellungen für das Spin-coating führten zu einer Abnahme des katalytischen Effektes. Bei Rotationen von 8000 RPM war fast nur noch das reversible Verhalten des Redoxmediators zu beobachten, was für eine zu geringe Konzentration an Enzym in dem Film spricht. Nachstehend ist eine Substratzugabe von D-Sorbitol in 2 mM-Schritten gezeigt, wobei die Vorschubgeschwindigkeit auf 50 mV/s und die Umdrehungszahl pro Minute auf 1000 RPM festgelegt wurde:

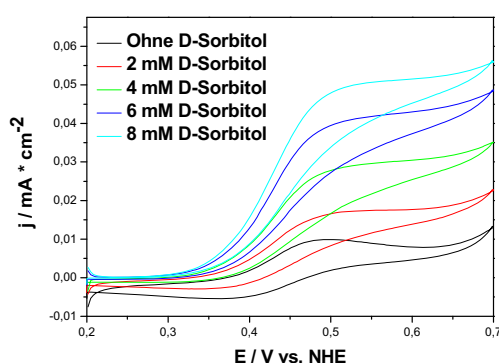


Abbildung 88: CV-Untersuchung bei 50 mV/s mit sukzessiver Zugabe an D-Sorbitol.

Es wurde bei den Experimenten eine Abnahme der Stromdichte mit der Abnahme der Filmdicke beobachtet. Weiterer Vorteil dieser Methode war nun, dass der Film nach den Experimenten immer noch stabil an der Elektrodenoberfläche saß. Nun wurde die elektroenzymatische Messung in der Durchflusszelle durchgeführt. Es wurde die Oxidation von D-Sorbitol (10 mM) zu Fructose gewählt. Die chronoamperometrische Messung wurde bei einem Potential von + 0,85 V durchgeführt. Als pseudo-Referenzelektrode diente wiederum die Sauerstoff-Elektrode. Es wurde ein Sauerstofffluss von 30 mL/min eingestellt und die Pumpe auf einen Fluss von 1,7 mL/min. Nachstehend ist eine Elektrode mit modifizierter Oberfläche durch Spin-coating mit 1000 RPM dargestellt:



Abbildung 89: Spin-coating-Film von TEOS/NAD⁺-GPS/DI/DSDH/PEI bei 1000 RPM nach dem Experiment in der Durchflusszelle.

Nach den chronoamperometrischen Experimenten wurde die Elektrode ausgebaut und gewaschen. Der Film war danach immer noch stabil auf der Elektrodenoberfläche vorhanden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rotation von 1000 RPM zu den höchsten Stromdichten bis zu $0,05 \text{ mA} / \text{cm}^2$ führt, was auf eine statistisch höhere Besetzung der Elektrodenoberfläche mit Enzym zurückzuführen ist. Eine Abnahme der Stromdichte während der chronoamperometrischen Experimente ist wahrscheinlich auf den Aktivitätsverlust des Enzyms mit der Zeit zurückzuführen.

Es wurde nun eine zusätzliche bioelektrochemische Reaktion in der Durchflusszelle ausgearbeitet, die sich im Laufe der Arbeit ergeben hatte. Dazu wurde ein Schichtaufbau gewählt, der die Immobilisierung des Enzyms gewährleisten sollte. Dieser sollte aus elektropolymerisiertem Polytyramin ^[98] einmal auf Goldoberflächen und einmal auf nanokristallinem Platin bestehen. An die freien NH_2 -Gruppen sollte durch Peptidkopplung mittels der Kopplungsreagenzien EDC (N-(3-Dimethyl-aminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid) / NHS (N-Hydroxysuccinimid) das Enzym Pyranose-2-Oxidase (P2OxB1H) durch seine freien Carboxylgruppen gebunden werden. Zur Elektropolymerisierung des Tyramins wurde eine Lösung von 0,15 M in Puffer/Ethanol-Mischung (2:1) angesetzt. Die Elektropolymerisierung wurde durch zyklische Voltammetrie durchgeführt, wobei eine Vorschubgeschwindigkeit von 500 mV/s eingestellt wurde. Dann wurde eine Lösung aus 15 mM EDC und 30 mM NHS präpariert. Anschließend wurde diese im Verhältnis 1:1 mit einer Enzymlösung von 8 U/mL versetzt. Die große Elektrode wurde 1 h mit der Enzymlösung bedeckt. Nach 1 h Modifizierungszeit wurde die Elektrode vorsichtig mit Puffer abgespült und getrocknet. Nach dem Eintrocknen wurde die Elektrode in die Durchflusszelle eingebaut. Als Substratlösung wurde eine 20 mM Glucoselösung verwendet. Die halbe MEA diente in diesem Experiment als Kathode. Nachstehend ist in einem CV-Experiment die Elektropolymerisierung des Tyramins gezeigt:

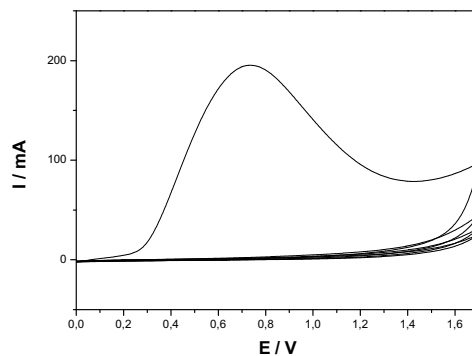


Abbildung 90: Elektropolymerisierung von Tyramin auf Gold durch CV bei 500 mV/s.

Anhand der CVs ist deutlich die anodische Elektropolymerisierung von Tyramin zu erkennen. Der anodische Peak wurde stets im ersten Zyklus beobachtet und verschwand in den darauffolgenden Zyklen, was ein Zeichen für die Polymerisation an der Oberfläche der Elektrode war. Der Polymerfilm war auch mit bloßem Auge auf der Elektrode sichtbar. Nach der Bildung des Polymerfilms und der Biofunktionalisierung wurde die Elektrode in die Durchflusszelle eingebaut und eine Chronoamperometrie bei 1,1 V für zwei Stunden gestartet. Nach der Beendigung der Reaktion wurde die Elektrode aus der Durchflusszelle entfernt. Dabei fiel auf, dass sich die Goldbeschichtung von der Elektrode ablöste. Die gleiche Elektrodenmodifizierung wurde auf einer Goldelektrode durchgeführt, auf welcher zuvor nanokristallines Platin elektrochemisch abgeschieden wurde. Unter Verwendung der beiden Elektrodenoberflächen wurde jeweils kein Umsatz von Glucose zu Glucoson mittels HPLC detektiert. Da es sich hier jedoch um die ersten Experimente handelte, werden diese Versuche in naher Zukunft fortgeführt.

Diskussion:

Zusammenfassend kann zu der neu konzipierten Durchflusszelle gesagt werden, dass diese sowohl für Reduktion als auch für Oxidation geeignet ist. Es konnten elektroenzymatische Messungen während eines Flusses in der Durchflusszelle durchgeführt werden. Zwar wurde eine geringe Umsatzrate des gewünschten Produktes erreicht, aber der Nachweis für die Machbarkeit (proof-of-concept) wurde erbracht. Optimierungen für die Steigerung der Umsatzrate werden in naher Zukunft noch ausgeführt. Als Ausblick wären hier somit weitere Optimierungen der Prozedur zu überlegen, die Analytik durchzuführen und auf Langzeitstabilität zu testen, was wichtig für einen industriellen, großtechnischen Einsatz wäre.

Abschließend kann zu dem ERUDESP-Projekt gesagt werden, dass sowohl die Untersuchungen mittels konstruierter Batchzelle als auch mittels Durchflusszelle erfolgreich durchgeführt werden konnten. Die Konzeption einer geeigneten Zelle zum Screening potentieller Redoxmediatoren für die elektroenzymatische Reduktion konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Die synthetisierten Rhodiumkomplexe erwiesen sich jedoch als nachteilig im Hinblick auf den Aktivitätsverlust der Biomoleküle in Gegenwart der Mediatoren. Jedoch konnte eine Alternative mittels Sol-Gel-Einbettung von Biomolekülen und gleichzeitiger Cofaktorimmobilisierung aufgezeigt werden, bei der der entwickelte Bioreaktor mit GDE-Einheit sowohl für Reduktion als auch für Oxidation verwendet werden konnte. Nach diesem großen Forschungsabschnitt, der zu unterschiedlichsten Zellkonstruktionen und -optimierungen führte, einhergehend mit den jeweiligen Kalibrierungen, Validierungen und Screening von möglichen Mediatoren, stünde nun der Aufbau eines 16-fachen Stacks an, wie es in der Brennstoffzellenforschung bekannt ist. Dabei würden die bisher durchgeführten elektroorganischen und -enzymatischen Messungen zu einer höheren Umsatzrate führen, wenn eine Parallelschaltung von 16 Arbeitselektroden mit dazugehöriger Ausstattung wie Elektrolytenkammer und GDE-Einheit zur Verfügung stünde. Großtechnisch könnte eine solche Multistack-Durchflusszelle als Bioreaktorausführung von großem Interesse sein.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der in diesem Projekt erarbeitet wurde, ist die Vergrößerung der aktiven Oberfläche durch Templatverfahren zur Schaffung geordneter, makroporöser Elektroden. Es konnte eine signifikante Vergrößerung der aktiven Oberfläche erreicht werden. Zugleich wurde die *kontrollierte Evaporierung* auf großer $6 \times 6 \text{ cm}^2$ geometrischer Fläche erfolgreich angewandt. Zugleich wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Alternative für den Einsatz von Mediatoren erarbeitet. Es wurde festgestellt, dass sich Rutheniumoxid zur Aktivierung direkter NADH-Oxidation eignet und eine signifikante Erhöhung der Stromdichte durch makroporöse Gestaltung der Rutheniumoxidbeschichtung erhalten wurde. Diese Expertise, makroporöse Elektroden in geordneter, drei-dimensionaler Form herzustellen, war Anlass für weitere Forschungen auf dem Gebiet der Oberflächenstrukturierung und -vergrößerung, die separat in den nachstehenden Kapiteln aufgeführt werden.

3.2: Erneuerbares Elektrodensystem

Dank der in dem ERUDES-Project erworbenen Expertise der Templatsynthese via kolloidaler Kristalle wurde ein makroporöses, sandwichähnliches Elektrodenschichtsystem für erneuerbare (bio)funktionalisierbare Elektroden entwickelt. Dabei wurde eine methodische Weiterentwicklung erarbeitet, um erneuerbare Elektroden unter Anwendung der *Langmuir-Blodgett-Technik* mit Polystyrol-Partikeln (PS) herzustellen und zusätzlich ein Triggern des Auflösungsprozesses einer intermediären Schicht zur Erneuerung der Oberfläche nachgewiesen. Der Elektrodenaufbau besteht aus alternierenden drei-dimensionalen makroporösen Goldstrukturen und kompakten Zinkschichten. Die Zinkschicht stellte hier eine Zwischenschicht dar, die als Barriere fungiert, um eine poröse katalytisch aktive Schicht von der nächsten porösen katalytisch aktiven Schicht zu trennen. Die porösen Schichten wurden ausschließlich über die *Langmuir-Blodgett-Technik* hergestellt. Für die Herstellung der endo-Template mittels der *LB-Technik* wurden monodisperse PS-Partikel verwendet. Nach der Herstellung der endo-Template wurde Gold potentiostatisch abgeschieden und somit die erste poröse Schicht erstellt. Auf die erste poröse Schicht wurde die Zinkzwischen-schicht ebenso potentiostatisch abgeschieden. Danach folgte die Präparierung der zweiten porösen Goldschicht auf der Zinkschicht. Um den Erneuerungsprozess der kontrolliert strukturierten Elektrodenoberfläche zu zeigen, wurde nach dem Aufbau des Schichtelektrodensystems die Zinkschicht in einem weiteren Schritt elektrochemisch aufgelöst, um den Zugang zu einer neuen katalytisch aktiven Schicht gewährleisten zu können (Klickeffekt).

Solch ein Elektrodenaufbau wurde bereits in vorherigen Arbeiten durchgeführt, jedoch nicht unter Verwendung der *LB-Technik* mit PS-Partikeln als einen essentiellen Bestandteil für die Kontrolle der Schichtanzahl und ohne elektrochemisches Triggern des Erneuerungsprozesses der Elektrodenoberfläche, sondern durch Säurebehandlung ^[32]. In den vorhergegangenen Studien wurden die endo-Template der ersten porösen Schicht mittels *LB-Technik* und Silicapartikeln hergestellt, wobei die Auflösung der Partikel nach der Elektroabscheidung des Metalls durch Flusssäure (HF) vollzogen wurde. Dabei ergab sich aber das Problem, dass sich nicht nur die Silicapartikel, sondern auch gleichzeitig das Zink in den weiteren intermediären Schichten auflösen. Daher wurde bei den folgenden porösen Schichten ein anderes Verfahren in Erwägung gezogen, die so genannte vertikale Deposition (VD) ^[99-101] mit PS-Partikeln, da PS lediglich unter Verwendung von Toluol oder THF aufgelöst werden kann, ohne dabei die Zinkschicht anzugreifen. Diese Methode bietet jedoch nicht die gleiche Kontrolle der Schichtanzahl wie bei der *LB-Technik*. In dieser Arbeit wurden ausschließlich PS-Partikel für

die Herstellung der endo-Template mittels *LB-Technik* verwendet, welche zuvor lediglich mit Silicapartikel angewendet wurde ^[29-31]. Unter Verwendung von Silicapartikeln mussten die Substrate wie zuvor in Kapitel 3.1 beschrieben mit einer selbstorganisierenden Monoschicht (SAM) aus Cysteamin modifiziert werden, damit die Oberfläche hydrophiler wird und ein besserer Partikeltransfer durch verstärkte Wechselwirkung der Silicapartikel mit der NH₂-Gruppen modifizierten Goldoberfläche gegeben ist ^[102]. Die *LB-Technik* ist eine sehr gute Methode für kontrolliertes Elektrodentemplating ^[103, 104]. Die Verwendung von PS-Partikeln war essentiell für diesen Schichtaufbau, um die oberen porösen Schichten ebenso wie die unterste Schicht in ihrer porösen Schichtanzahl genau zu kontrollieren. Zink wurde als Material für die intermediäre Schicht gewählt, da dieses leicht durch ein positives Potential oxidierbar ist und damit rückstandslos aufgelöst wird. Somit wurde in dieser Arbeit ein erneuerbares Elektrodensystem neu entwickelt, welches vielerlei interessante Anwendungen verspricht. Da in der Elektrokatalyse ^[56, 57], -analytik ^[57] und -synthese poröse Materialien großen Anklang finden und diese Materialien wegen der stark vergrößerten aktiven Oberfläche sehr interessant für eine Reihe von Katalysereaktionen sind ^[38, 58-62], könnte dieser Sandwichaufbau als erneuerbares System auch in der (Bio)elektrokatalyse Verbreitung finden. Die aktive Oberfläche hängt von der Porosität ab. Um den Massentransfer in jede Porenschicht zu gewährleisten, müssen die Poren von offener Beschaffenheit sein. Eine hohe Monodispersität der Partikellösung ist für die endo-Template erforderlich, um kolloidale Kristalle zu erhalten, die für eine weitere Elektroabscheidung eines Metalls, mit dem Ziel inverse Opalstrukturen zu bekommen gebraucht werden ^[63-66, 68, 105]. Das poröse Material kann aus verschiedenen Metallen, wie zum Beispiel Platin, Palladium, Rutheniumdioxid oder Kupfer bestehen ^[35-37, 57]. Eine sehr interessante Anwendung solcher porösen Strukturen findet sich in der Elektroanalytik und Elektrosynthese zur Biofunktionalisierung des Inneren der Poren mittels Mediatoren, Cofaktoren und Enzyme ^[69]. Um das Schichtsystem vollständig zu untersuchen und zu optimieren, wurden die verschiedenen Stufen des Elektrodensystems mittels REM, FIB, EDX-Spektroskopie und Element Mapping charakterisiert.

Überblick des Elektrodenaufbaus

Es wird ein Elektrodenaufbau einer Sandwichelektrode angestrebt, welcher aus zwei porösen Goldschichten besteht. Diese werden durch eine intermediäre Zinkschicht getrennt. Ein solcher strukturierter Elektrodenaufbau repräsentiert ein interessantes Basiselektrodensystem für viele verschiedene elektrochemische Anwendungen in der (Bio)elektrokatalyse und der

(Bio)elektrochemischen Sensorik. In dem folgenden Schema sind die Synthese und der Erneuerungsprozess einer solchen Elektrode dargestellt:

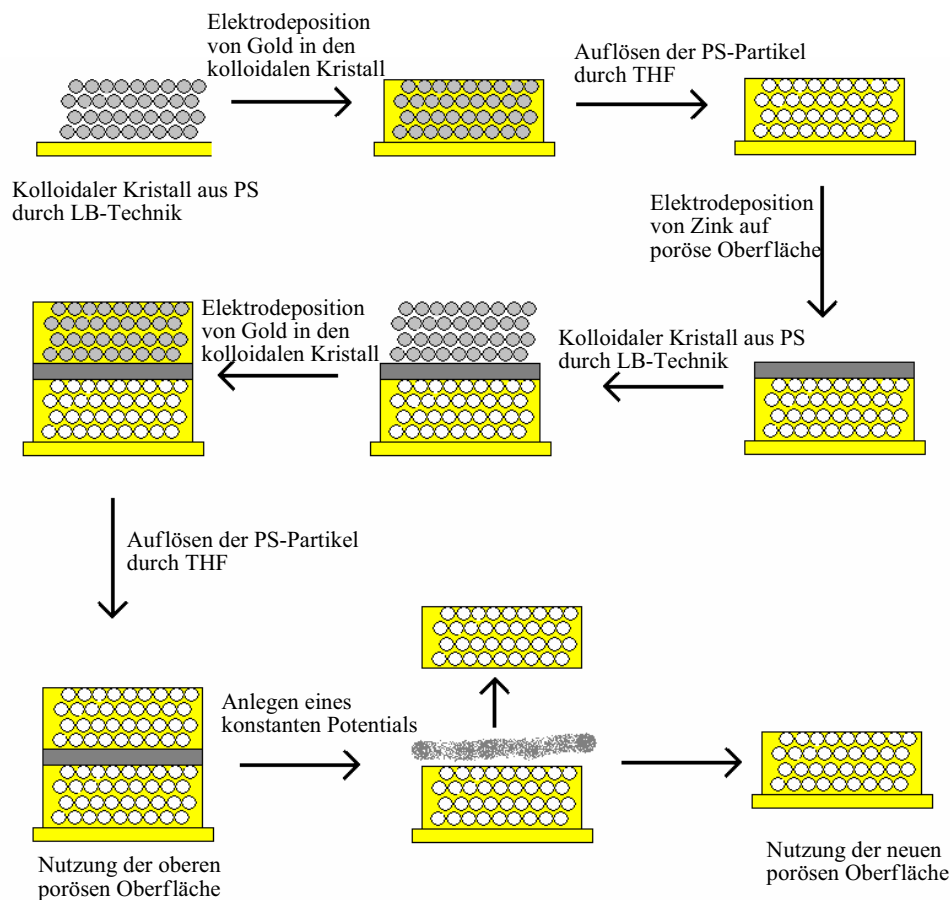


Abbildung 91: Schema des Präparationsprozesses für die Elektrodentemplate und Auflösungsprozess der intermediären Zinkschicht zur Ablösung der obersten Porenschicht.

Die Grundherstellung dieses Elektrodenaufbaus besteht aus drei Hauptstufen: die Herstellung des ersten porösen Goldsystems auf dem polykristallinen Goldsubstrat, die Elektroabscheidung der intermediären Zinkschicht auf die erste Porenschicht und die Herstellung des zweiten Porensystems auf der Zinkzwischen-schicht. Diese Art von sandwichähnlichen Elektroden kann aus mehreren solcher alternierenden Schichten bestehen und kann an die Anforderungen bestimmter katalytischer Reaktionen angepasst werden, wie zum Beispiel die Anpassung des Elektrodenmaterials (verschiedene Metalle oder Metalloxide), Anzahl der porösen Schichten und Porendurchmesser. Nachstehend folgt ein schematisches Modell eines solchen sandwichförmigen Elektrodenaufbaus:

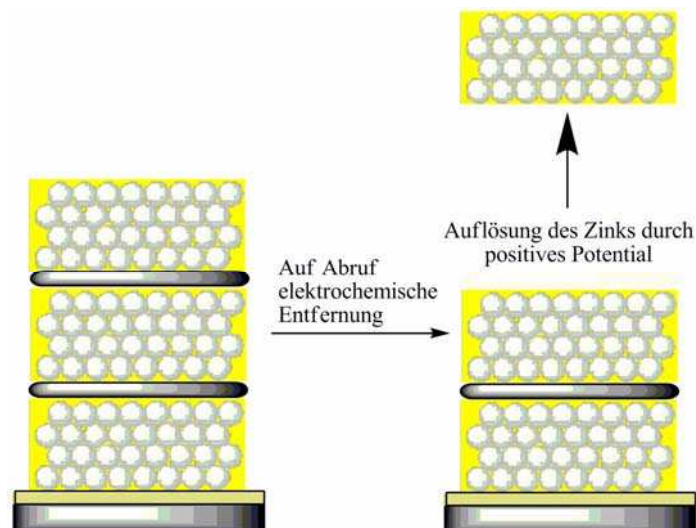


Abbildung 92: Schema der sandwichähnlichen Elektrodenstruktur mit alternierenden porösen Goldschichten und kompakten Zinkzwischen-schichten (links) & Auflösungsprozess durch elektrochemisches Triggern durch Potentialanlegung (rechts).

Abbildung 92 stellt einerseits den schematischen Aufbau der sandwichähnlichen Elektrode dar (links), und andererseits das elektrochemische Triggern durch Anlegen eines konstanten positiven Potentials und die damit verbundene Auflösung der intermediären Zinkschicht (rechts).

Herstellung der endo-Template aus PS-Partikel mittels LB-Technik

Im Rahmen des ERUDES-Projektes ist es gelungen, die *Langmuir-Blodgett-Technik* an die Verwendung von PS-Partikeln anzupassen (s. Kapitel 3.1.3), wobei an dieser Stelle genauer auf das erweiterte Verfahren eingegangen werden soll. Es wurde möglich, kontrollierte Schichten eines PS-endo-Templates herzustellen. Die Schichtanzahl konnte durch die Anzahl des Eintauchens in den *LB*-Trog kontrolliert werden. Die PS-Partikel wurden dazu in einer Mischung aus destilliertem Wasser und Ethanol im Verhältnis 1:3 dispergiert. Zuvor wurde eine Testreihe gestartet, um das beste Dispergiermittel zum Spreiten der Partikel zu finden. Ethanol ist nicht toxisch und hat einen ausreichend hohen Dampfdruck, so dass die Partikel auf der Wasseroberfläche gespreitet werden können. Vorteil hierbei ist, dass das zuvor während der Synthese der PS-Partikel verwendete Lösemittel Wasser nicht entfernt werden muss, bevor die Partikel auf die Wasseroberfläche ausgebreitet werden. Des Weiteren werden die PS-Partikel in Ethanol nicht aufgelöst oder verkleben, sondern sind stabil. Nach dem Mischen der Partikel in der wässrigen Lösung mit dem Ethanol wurden die Partikel vorsichtig auf der Wasseroberfläche im *LB*-Trog gespreitet. Dabei wurde vorsichtig Tropfen für Tropfen die PS-Dispersion auf die Oberfläche getropft. Die Pipette zum Auftragen sollte sehr nahe

über der Wasseroberfläche gehalten werden, damit die Partikel bei einem heftigeren Aufschlag des Tropfens nicht in die Wasserphase abtauchen. Sobald die komplette Partikellösung auf die Oberfläche aufgetragen war, wurde durch das Zusammendrücken der Partikel durch Schiebarrieren an der Oberfläche des Wassers im *LB*-Trog ein Langmuir-Film (geordnete Monoschicht der Partikel) gebildet. Die Geschwindigkeit der zusammendrückenden Barrieren betrug $20 \text{ cm}^2 / \text{min}$. Der Oberflächendruck wurde zwischen $9 - 12 \text{ mN} / \text{m}$ eingestellt. Sobald der gewünschte Langmuir-Film erhalten wurde, wurde eine unmodifizierte polykristalline Goldelektrode (NiCr 80/20/Au; A.C.M.) an einer Halterung mit Eintauchfunktion befestigt und in den *LB*-Trog eingetaucht, wobei der Langmuir-Film aus PS-Partikel durchstoßen wurde. Der Langmuir-Film wurde dabei nicht zerstört. Die Eintauchgeschwindigkeit abwärts betrug 6 mm/min und die Zuggeschwindigkeit 1 mm/min . In der experimentellen Oberflächendruck-Flächen-Isotherme wurden durch das Eintauchen der Elektrode in die Flüssigkeit auftretende Spikes in der Kurve hervorgerufen. Somit ist an der Anzahl dieser Spikes abzählbar, wie viele Schichten transferiert wurden.

Elektroabscheidung von Gold und Zink

Die Elektroabscheidung von Gold in die Zwischenräume des PS-endo-Templats wurde bei einem Potential von $-0,66 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl durchgeführt. Die Goldabscheidung wurde unter Verwendung eines kommerziellen Zwei-Komponenten-Goldbades (ECF-60 und ECF-61 von Metalor SAS France) getätigt. Als Gegenelektrode wurde eine Platinelektrode verwendet, die eine vergleichbare geometrische Oberfläche wie die Arbeitselektrode besaß. Nach der Elektroabscheidung von Gold in die Zwischenräume des endo-Templats wurden die PS-Partikel durch THF oder Toluol aus dem Porensystem herausgelöst. Der Auflösungsprozess der PS-Partikel konnte unter Verwendung eines Ultraschallbades verstärkt werden, wobei die Goldelektroden lediglich wenige Minuten ($\sim 5-10 \text{ min}$) den Ultraschallwellen ausgesetzt werden durften, da sich sonst die kommerzielle Goldschicht mit der Cr/Ni-Haftschrift mitsamt dem Templat abgelöst hat.

Die Elektroabscheidung von Zink wurde sowohl unter Verwendung kommerzieller Bäder (Environzin 120, MacDermid Industrial Solutions und Oklane, Conventya), als auch einer selbst angesetzten Salzlösung ($0,1 \text{ M ZnCl}_2$ in verdünnter HCl) durchgeführt. Beide Oberflächen sind mittels PS-Partikeln unter Anwendung der *LB-Technik* modifizierbar. Das bei der Reduktion von Zink angelegte Potential zur Elektroabscheidung auf die makroporösen Oberflächen betrug konstante $-1,4 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl. Um die abgeschiedenen Oberflächen von

kleinen Rauigkeiten zu befreien, können die Elektroden für einige Sekunden in HCl gehalten werden, um die äußerste Schicht der Zinkoberfläche zu re-oxidieren und somit abzulösen.

Zur Elektroabscheidung des Goldes in die Zwischenräume des sich auf der Zinkschicht befindenden endo-Templats aus PS musste das Reduktionspotential des Goldes angepasst werden. Das optimierte Potential wurde nun auf - 0,9 V vs. Ag/AgCl festgelegt. Nach der Elektroabscheidung wurden die PS-Partikel mittels Toluol oder THF aus dem porösen Goldtemplat herausgelöst.

Um zu beweisen, dass ebene Au-Zn-Au-Schichten aufeinanderfolgend abgeschieden werden konnten, wurde eine Element Mapping-Analyse von kompakt aufeinander abgeschiedenen Schichten durchgeführt. Abbildung 93 zeigt eine REM-Aufnahme einer kompakten Au-Zn-Au-Schicht mit dazugehörigem Element Mapping:

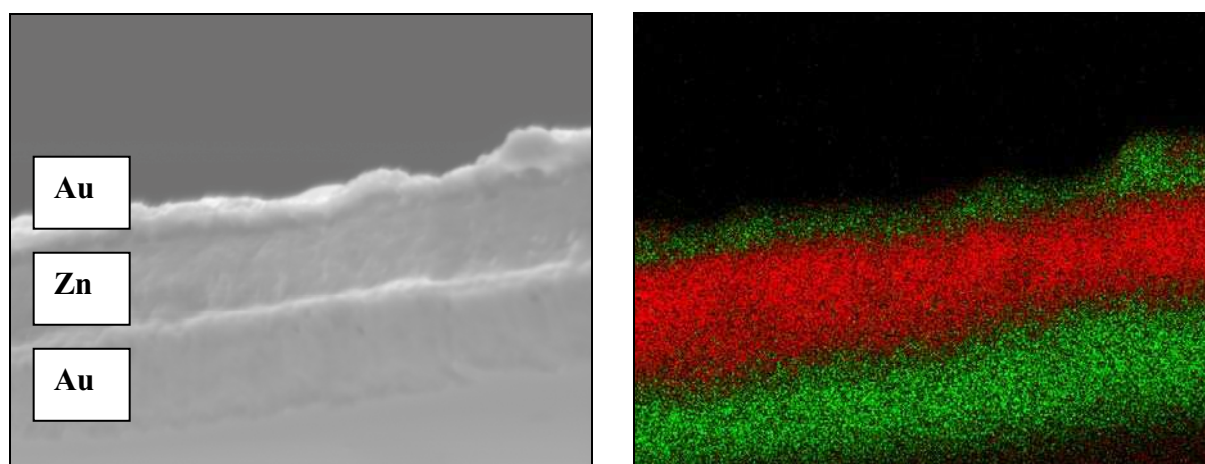


Abbildung 93: REM-Aufnahme eines Querschnittes einer kompakten Au-Zn-Au-Schicht (A); Element Mapping des in A gezeigten Querschnittes.

Durch die Analyse wurde festgestellt, dass eine wohl getrennte Abscheidung der beiden verschiedenen Metalle in alternierender Form möglich ist. Es konnte keine Interdiffusion der Metallschichten bei den Elektroabscheidungen festgestellt werden, da jede separate Abscheidung konstant abläuft und ebene Schichten hervorbringt.

Auflösen des Zinks (Klick-Effekt)

Bei dem Erneuerungsprozess wurde die intermediäre Zinkschicht nicht wie in vorherigen Studien mit Säure aufgelöst ^[32], sondern durch die Anlegung eines konstanten positiven Potentials von $\geq 1,0$ V. Diesen Vorgang haben wir als Klick-Effekt bezeichnet, da durch einfache Veränderung der Potentialeinstellung augenblicklich die Auflösung des Zinks durch Oxidation des unedlen Metalls ausgelöst wird. Dieser Vorgang repräsentiert einen sehr einfachen und kontrollierten Weg, die Zinkschicht zu oxidieren und diese damit aufzulösen.

Während dieser Arbeit ist es gelungen, den Klick-Effekt nachzuweisen, indem die Auflösung ohne jegliche Säureanwesenheit durchgeführt wurde. Als Elektrolyt wurde lediglich ein Bis-(2-Hydroxyethyl)-Imino-Tris-(Hydroxymethyl)-Methan-Puffer (BisTris-Puffer) mit einem pH-Wert von 7 gewählt. KCl wurde dazugegeben, um die Leitfähigkeit des Elektrolyten zu erhöhen.

Ergebnisse der einzelnen Schritte

Der erste Schritt zur Herstellung dieser Art an strukturierten Elektrodenoberflächen war die Präparierung von PS-endo-Templaten durch die Anwendung der *LB-Technik*. Bei der angepassten Variante der *LB-Technik* mit PS-Partikeln werden die PS-Partikel lediglich durch Van-der-Waals-Kräfte auf der Elektrodenoberfläche gehalten. Mit einem Langmuir-Film aus PS-Partikeln lassen sich kolloidale Kristalle mit bis zu zehn Schichten herstellen. In Abbildung 94 wird eine mit 5 PS-Schichten modifizierte Goldelektrode gezeigt, wobei der Partikeldurchmesser 380 nm beträgt:

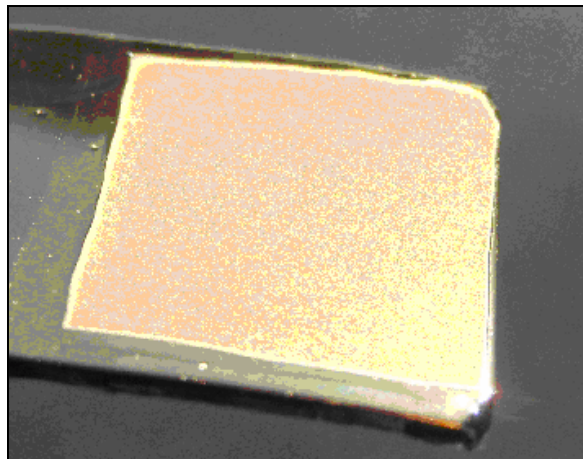


Abbildung 94: Kolloidaler Kristall aus 5 PS-Schichten eines Partikeldurchmessers von 380 nm, hergestellt durch die LB-Technik.

Nach der Herstellung des kolloidalen PS-Kristalls wurde Gold in die Zwischenräume der geordneten Multischichten abgeschieden. Im Falle von dicken endo-Templaten muss der Elektrolyt genügend Zeit bekommen (ca. 10 Minuten), damit er in die Zwischenräume diffundieren kann. In den REM-Aufnahmen von Abbildung 95 sind poröse Goldschichten in der Draufsicht gezeigt, die durch Templating mittels *LB-Technik* mit PS erhalten wurden:

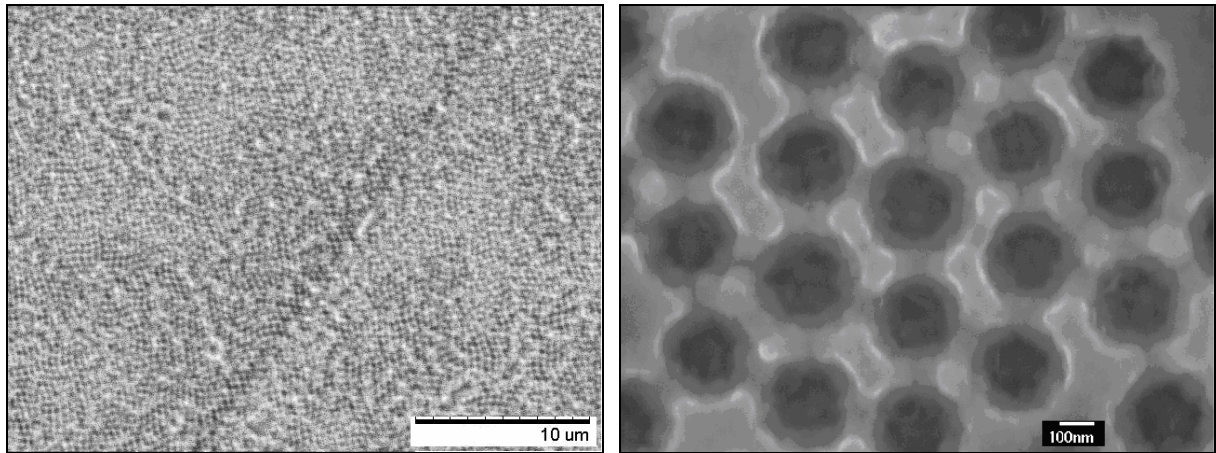


Abbildung 95: Aufsichtsperspektive von makroporösen Goldelektroden (1/2 Hohlkugelschicht), hergestellt durch die LB-Technik unter Anwendung von PS-Partikeln.

Die Schichtanzahl wird durch das Wiederholen des Eintauchens kontrolliert, das heißt, ein Eintauchvorgang in den *LB*-Trog ergibt eine Schicht. Bei dem Eintauchvorgang wird der *LB*-Film durchstoßen, ohne dass er zerstört wird. Um den Film weniger zu belasten, ist die Abwärtsgeschwindigkeit schneller, als die Aufwärtsbewegung. Die Poren weisen eine sehr gute Interkonnektivität auf. Die Porensysteme zeigen eine sehr ausgeprägte Offenporigkeit. Nachstehend folgen REM-Aufnahmen mit hoher Auflösung und starker Vergrößerung einzelner Poren. Die Verbindungen zu den Nachbarporen sind sehr deutlich zuerkennen.

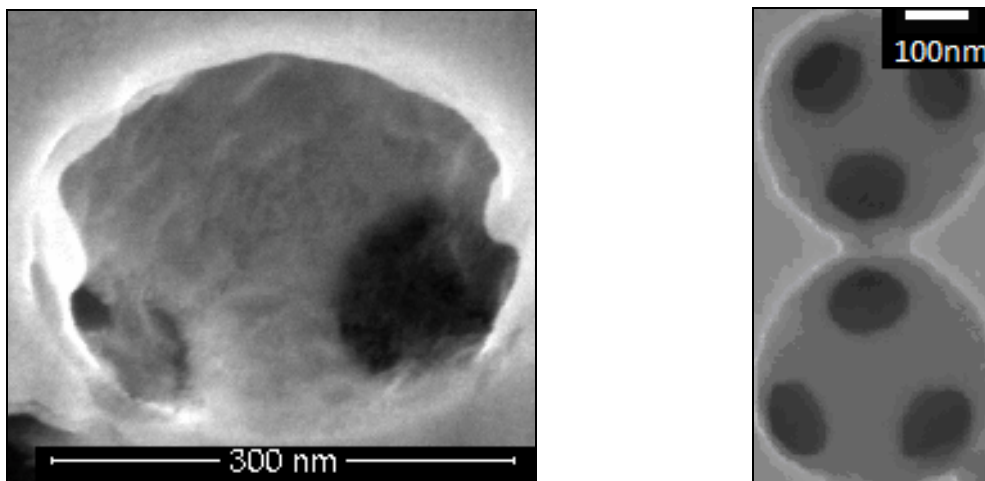


Abbildung 96: Vergrößerung einzelner Goldporen mit deutlichen Verbindungen zu den Nachbarporen.

Die Verbindungskanäle zwischen den einzelnen Poren sind deutlich ausgebildet und der Durchmesser der Verbindungen beträgt ungefähr ein Viertel des Porendurchmessers. Die offene Porosität ist für eine verstärkte katalytische Reaktion Voraussetzung. Die offenen Poren geben dem Elektrolyten und Substanzen die Möglichkeit, bis in die letzte Porenschicht zu diffundieren.

Nach der erfolgreichen Präparierung der ersten makroporösen Schicht, wurde Zink kompakt abgeschieden. Dazu wurde ein konstantes Reduktionspotential von - 1,4 V angelegt. Das Zink wurde lediglich auf die oberste poröse Schicht abgeschieden und nicht in den Poren. Dies gelingt auf Grund der offenen Porosität, wodurch Ecken und Kanten ausgebildet werden. Dort ist die Verteilung des elektrochemischen Stroms ^[106] und der Trend der Feldlinien in dem elektrischen Feld verstärkt zu den Ecken und Kanten hin ausgebildet, wie es für typische Elektroabscheidungen und Nukleationsprozesse bekannt ist ^[2]. Somit führt die Verteilung des elektrochemischen Stroms zu einer verstärkten Elektroabscheidung an Ecken und Kanten der halben, offenporigen Goldschicht als oberste Schicht. Die Porenstruktur unter dieser intermediären Zinkschicht bleibt ungefüllt und offenporig, da die Zinkschicht zuvor zuwächst. Das abgeschiedene Zink sollte eine flache und ebene Oberfläche darstellen, um ein gutes Substrat für die weitere Modifizierung mittels der *LB-Technik* darstellen zu können. Der kolloidale Kristall kann nur schichtweise geordnet aufgebaut sein, wenn das darunterliegende Substrat eben ist. Bei sehr rauen Zinkoberflächen kann das Zink mit verdünnter HCl behandelt werden, um die Oberfläche durch teilweises Abtragen des Zinks einzuebnen. Sobald das Zink elektrochemisch abgeschieden war, war es von Bedeutung, die weitere Modifizierung zügig und gleich im Anschluss durchzuführen, da sich an der Luft zum Teil Zinkoxid bildete. Dieses wurde mittels XRD nachgewiesen, was nachstehend gezeigt wird:

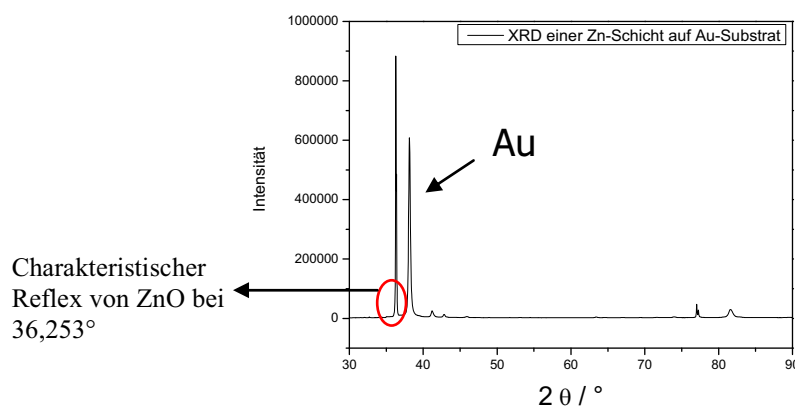


Abbildung 97: XRD-Spektrum einer auf Gold abgeschiedenen Zinkschicht.

Die gelegentliche Entstehung des Zinkoxids an der Zinkoberfläche an Luft ist daher von Relevanz, da die darauf folgende Elektroabscheidung von Gold durch die geringe Leitfähigkeit des Oxides gehemmt wird. Dass es sich bei der kompakten Schicht auch wirklich um Zink handelte, wurde mittels EDX-Untersuchungen an FIB-Querschnitten einer solchen Elektrode wie in Abbildung 98 dargestellt, bewiesen.

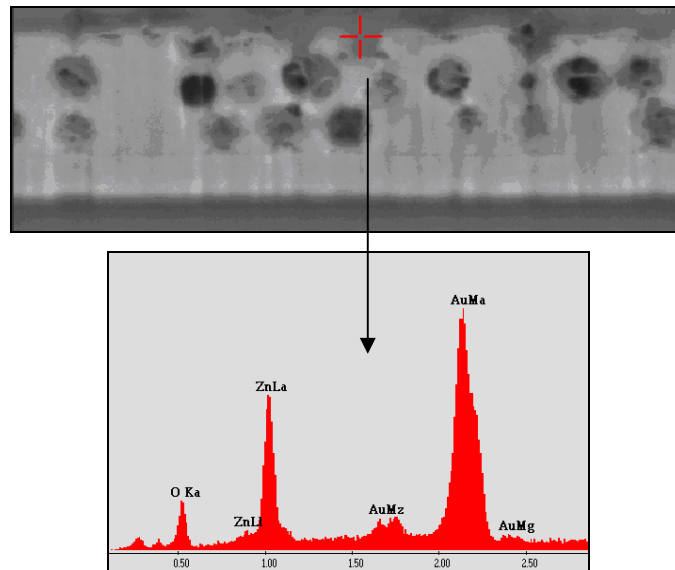


Abbildung 98: Querschnitt einer 2 ¼ - Schicht aus porösem Gold und einer daraufliegenden kompakten Zinkschicht. (oben); dazugehörige EDX-Analyse, wobei Zink neben Gold nachgewiesen wurde (unten).

Neben Zink wurde auch Gold nachgewiesen, da bei einer EDX-Analyse auch in naher Nachbarschaft liegende Elemente nachgewiesen werden können. In diesem Falle hatte sich an der Luft wieder ZnO gebildet, was in dem EDX-Spektrum am Sauerstoffpeak abzulesen ist. Im Folgenden sind gebrochene poröse Strukturen mit einer daraufliegenden Zinkschicht gezeigt:

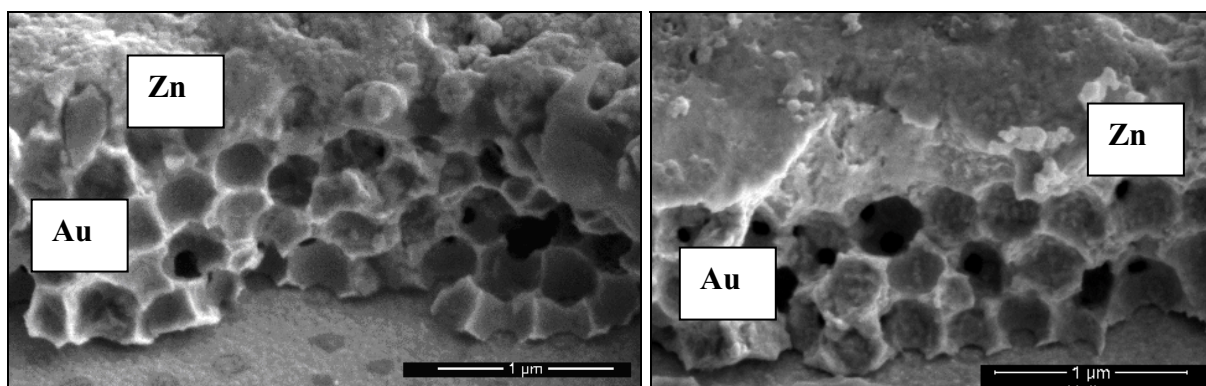


Abbildung 99: Gebrochene poröse Goldelektroden mit kompakten Zinkschichten darauf.

An dieser Stelle wird nun der Vorteil der *LB-Technik* mit PS-Partikeln deutlich. Wie zuvor schon erwähnt wurde in vorherigen Studien die *LB-Technik* mit Silica-Partikeln angewandt, wobei die Silicapartikel mit Flusssäure (HF) aufgelöst wurden. Somit war es nicht möglich die zweite und auch die weiteren porösen Schichten mittels der *LB-Technik* herzustellen, da HF die intermediäre Zinkschicht ebenso aufgelöst hätte. In der vorliegenden Arbeit war es nun möglich, die *LB-Technik* mit PS anzuwenden; auch für die weiteren porösen Schichten. Das heißt die Schichtanzahl ist besser kontrollierbar und die PS-Partikel sind einfach in

Toluol oder THF auflösbar, wobei beide organische Lösemittel die Zinkschicht oder Schichten im Falle anderer unedler Metalle nicht angreifen.

Nun wurde nach der Herstellung des neuen oberen endo-Templats auf der Zinkschicht Gold in gleicher Art und Weise wie zuvor abgeschieden, jedoch mit einem negativeren Reduktionspotential von $-0,9\text{ V}$. Diese Anpassung des Potentials musste wegen der Ausbildung eines galvanischen Elements bei der Abscheidung von Gold auf Zink durchgeführt werden. Wegen des starken Oxidationspotentials der Goldlösung und der unedlen, leicht oxidierbaren Zinkschicht wird beim Eintauchen der Elektrode in das Goldbad automatisch Zink oxidiert und somit aufgelöst, während Gold abgeschieden wird. Dieser Vorgang der Re-oxidation der Zinkschicht musste verhindert werden, da diese als intermediäre Trennschicht der porösen Strukturen dienen sollte. Daher wurde das Potential angepasst und die Elektrode unter Potentialkontrolle in die Goldlösung gehalten. Nachdem die angepasste, potentialkontrollierte Abscheidung stattgefunden hatte, wurde die Elektrode noch unter Potentialkontrolle aus dem Goldbad gezogen, um ein galvanisches Element-Verhalten der Metalle zu vermeiden. Darauffolgend wurde das PS aufgelöst. Eine komplexe Struktur aus Goldporen, separierender Zinkschicht und einer weiteren Goldporenstruktur wurde somit erhalten. Abbildung 100 zeigt einen solchen Sandwichelektrodenaufbau aus porösem Gold - Zink - porösem Gold. Die REM-Aufnahme stellt einen FIB-Querschnitt dar, wo die einzelnen Schichten mit bloßem Auge zu erkennen sind. Jedoch wurde als analytischer Nachweis EDX-Spektroskopie an jeder Elektrodenschicht durchgeführt, um zu zeigen, dass es sich in dem Schichtaufbau jeweils um Gold, Zink und wieder um Gold handelt.

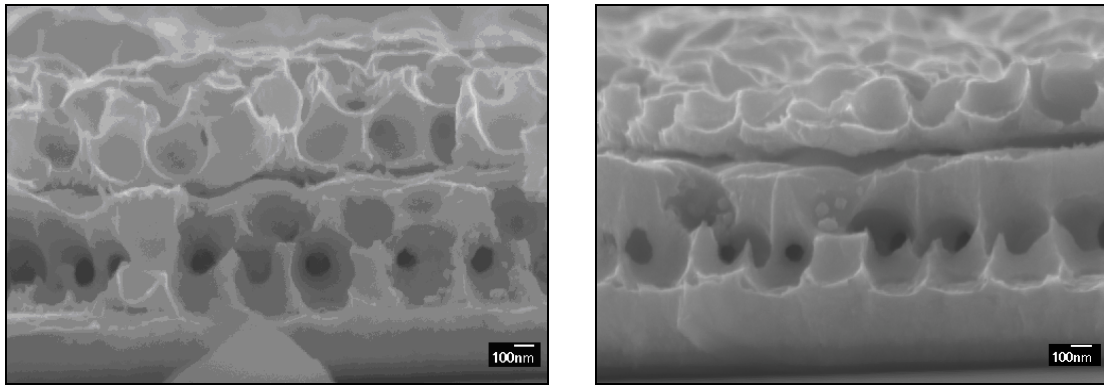


Abbildung 101: Alle zwei REM-Aufnahmen zeigen Doppelschichten zwei poröser Systeme verschiedener Elektroden mit bereits aufgelöster intermediärer Zinkschicht.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, den Klickeffekt durch Filmen des Auflösungsprozesses zu beweisen. Dabei wurde die Auflösung der intermediären Zinkschicht mittels positiven Potentials zwischen zwei Goldschichten unter einem Lichtmikroskop in der Experimentalphysik an der Universität des Saarlandes, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Hartmann gefilmt. Somit konnte die Triggerfunktion während dieser Arbeit nachgewiesen werden. Abbildung 102 zeigt Momentaufnahmen des Auflösungsprozesses, um die Oxidation der Zinkschicht zu illustrieren:



***Abbildung 102: Momentaufnahmen des aufgezeichneten Films des Klickeffekts:
Links: Elektrodenzusammensetzung vor elektrochemischem Triggern
(Gold - Zink - Gold - Sandwich);
Rechts: Elektrodenzusammensetzung nach elektrochemischem Triggern
(Gold - Spalte-Gold).
Die oberste Goldschicht wurde dadurch von der untersten Goldschicht entfernt.***

Während der Auflösung der Zinkschicht wurde die oberste Goldschicht sogar von der unteren katalytischen Schicht getrennt. Somit wurde die unterste katalytisch aktive Schicht zugänglich. Dies stellt einen weiteren großen Vorteil dar, wenn die oberste Schicht ein wenig abgehoben wird, da ein besserer Zugang der untersten Schicht für chemische Substanzen erreicht wird.

Diskussion:

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass die methodische Weiterentwicklung, die Anpassung der *LB-Technik* an PS-Partikeln und das elektrochemische Triggern des Erneuerungsprozesses der Elektrodenoberfläche mehrere Vorteile mit sich bringt. Die Auflösung der intermediären Zinkschicht muss nun nicht mehr im sauren Medium ablaufen, was z.B. einen enormen Vorteil bei Biofunktionalisierungen der Poren mit Enzymen und anderen Biomolekülen darstellen würde. Des Weiteren fällt ein Arbeitsschritt weg, und zwar die Modifizierung der blanken Goldelektrode mittels Linkermolekülen. In erster Hinsicht wird die *LB-Technik* mit PS-Partikeln angewendet, um den Gebrauch von HF zu vermeiden und um die Zinkzwischen-schicht nicht zu zerstören, wie es bei Gebrauch von Silicapartikeln der Fall wäre. Dank dieser Weiterentwicklung wurde es nun möglich, erneuerbare, rezyklierbare makroporöse Elektrodensysteme mit geordneten drei-dimensionalen Goldporen und intermediären Trennschichten aus Zink herzustellen.

Der ökonomisch interessante Aufbau dieser Elektrode besteht aus gut angeordneten sphärischen Poren. Aufgrund der leichten Kontrolle der Porendurchmesser durch den Durchmesser der PS-Partikel kann das Porensystem einfach an weitere Anwendungen angepasst werden, die abhängig vom Porendurchmesser sind. Das System stellt eine neue Alternative für komplexe, rezyklierbare Elektrodensysteme zum Beispiel für die Elektrokatalyse dar.

Diese Arbeiten brachten ein Sandwichschichtsystem zum Vorschein, in dem die Porenstrukturen lediglich mittels der methodischen Weiterentwicklung, der *LB-Technik* mit PS aufgebaut wurden und die katalytisch aktive Elektrodenoberfläche in einem simplen Verfahren regeneriert werden kann, dem Klickeffekt.

3.3: Makroporöse Mikroelektroden aus RuO_2

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die poröse Oberflächenstrukturierung des Rutheniumoxids, die in Kapitel 3.1.6 erarbeitet wurde, in Form von Mikroelektroden miniaturisiert, da poröses Rutheniumoxid während des ERUDESP-Projektes gut reproduzierbar herzustellen war. Im Falle von porösen Mikroelektroden wird ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht, was eine bessere Detektion des zu untersuchenden Signals bedeutet ^[107]. Als Anwendung dieser porösen Mikroelektroden wurden pH-Messungen ausgearbeitet, worauf im späteren Verlauf dieses Kapitels genauer eingegangen wird. In früheren Arbeiten wurden Mikroelektroden in ihrer Oberfläche bereits porös dargestellt ^[90]. Der Stromverlust, hervorgerufen durch die winzige geometrische Oberfläche kann durch die Porösität des Materials kompensiert werden ^[108].

Zur Herstellung der Mikroelektroden in dieser Arbeit wurde ein dünner Titandraht mit einem Durchmesser von 50 μm (Goodfellow, 99,8%) als Elektrodensubstrat für die aufzubringende Beschichtung eingesetzt. Die Titandrähte wurden auf ca. 5 cm Länge geschnitten und in Glaskapillaren eingebunden. Dazu wurden die Drähte vorsichtig mit Präzision in die kleinen Öffnungen der Glaskapillaren geführt und anschließend durch eine Flamme in das Glas eingeschmolzen. Dabei wurde darauf geachtet, dass am unteren Ende der Glaskapillare noch genügend Titandraht zur elektrischen Kontaktierung zur Verfügung stand. Um eine freie Oberfläche an dem oberen Ende der Elektrode zu erhalten, wurde die Mikroelektrode vorsichtig an ihrer zu modifizierenden Fläche poliert. Falls sich durch den Einschmelzprozess eine dünne Glasschicht über der Spitze des Titandrahts gebildet hatte, wurde sie somit entfernt. Zusätzlich wurden die polierten Elektrodenoberflächen mit Oxalsäure (10%ig) angeätzt, um eine dauerhafte Beschichtung zu gewährleisten. Es wurden sowohl unporöse als auch poröse Mikroelektroden zum Vergleich und zur Beurteilung der erhaltenen Resultate hergestellt. Polystyrolpartikel wurden wie zuvor in Kapitel 3.1.3 zur Templatsynthese mittels *kontrollierter Evaporierung* herangezogen. Die *kontrollierte Evaporierung* erwies sich wegen des Designs und der Form der Mikroelektroden als beste und auch experimentell am einfachsten durchführbare Templatsynthese. Nachstehend wird in der Abbildung 103 das Auftragungsverfahren der Partikeldispersion schematisch dargestellt:



Abbildung 103: Aufbringen der PS-Dispersion auf die in eine Pipettenspitze eingebundene Mikroelektrode.

Als Halterung und Templatgefäß wurde eine Plastikspitze einer Eppendorfpipette genommen, da diese von den Proportionen genau passte. Die Übergangsstelle zwischen Glaskapillare und Plastikspitze wurde durch Parafilm abgedichtet. Anschließend wurde die Polymerdispersion mittels einer Spritze, ausgestattet mit einer dünnen Kanüle in die Kavität der Plastikpipette eingefüllt, wo sich die polierte Titanoberfläche für die Modifizierung befand. Die Miniaturisierung der Elektroden ergab stabile und feste Elektroden, die viel versprechende Oberflächen aufwiesen. Die Länge der Elektroden betrug am Ende ca. 3 cm. Es wurden zuerst unporöse Mikroelektroden hergestellt, um das Design und den Abscheideprozess zu untersuchen. Es musste erst sichergestellt werden, dass auch ohne Templat das Prinzip der Mikroelektrode in diesem Fall funktioniert. Nachstehend sind REM-Vergrößerungen eines Mikroelektrodenkopfes dargestellt:

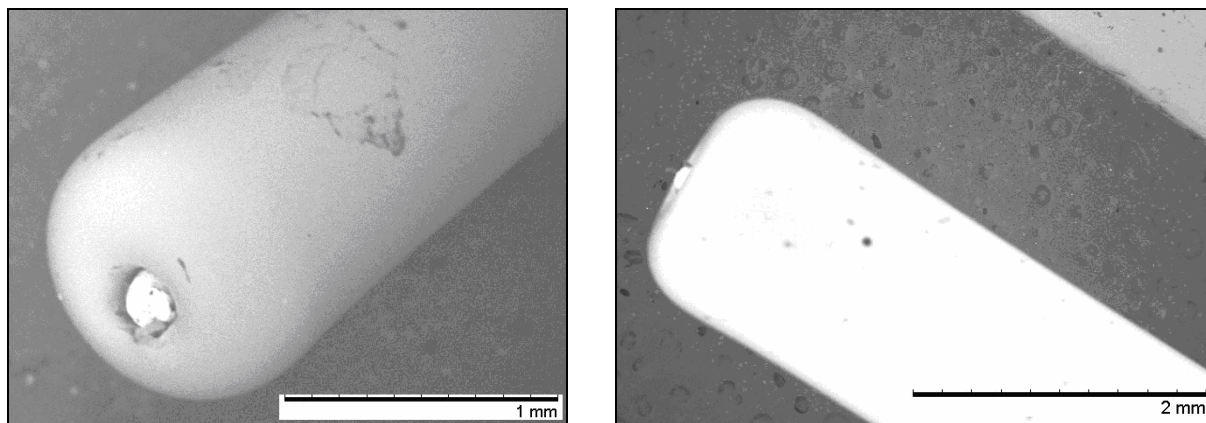


Abbildung 104: Vergrößerungen eines Mikroelektrodenkopfes.

Von den besonderen Eigenschaften der kristallinen Rutheniumoxidoberflächen, wie mechanische Stabilität, Säureresistenz, hohe katalytische Aktivität und auch Stabilität in weiten Potentialfenstern sollte nun auch in miniaturisierter Form profitiert werden.

Nach Optimierungen und Anpassungen des Herstellungsprozesses wurden nun makroporöse Mikroelektroden hergestellt. Nachstehend ist der Aufbau für die Bildung eines kolloidalen Kristalls auf der Mikroelektrodenoberfläche schematisch dargestellt:

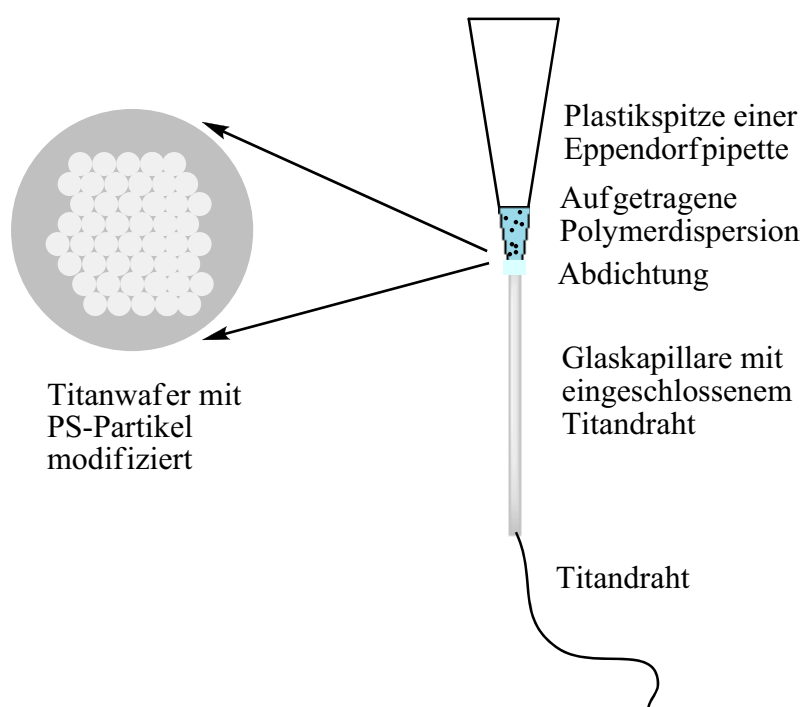


Abbildung 105: Schema der Modifizierung der Mikroelektrodenköpfe mit PS-Partikeln und Vergrößerung des modifizierten Elektrodenkopfes mit selbst angeordneten PS-Partikeln.

Beim langsamen Eintrocknen bildete sich ein kolloidaler Kristall auf der kleinen Oberfläche. Die folgende Abbildung zeigt einen Mikroelektrodenkopf mit einem geometrischen Flächen-

Durchmesser von 50 μm , welche mittels Polystyrolpartikel von 300 nm zuvor modifiziert wurde und anschließend wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben elektrochemisch mit Rutheniumoxid beschichtet wurde.

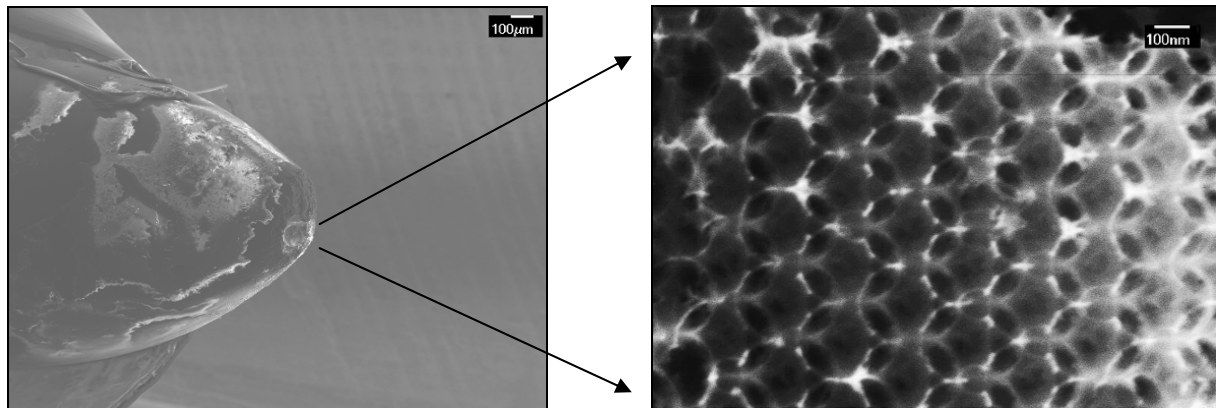


Abbildung 106: Hoch poröse Mikroelektrode aus Rutheniumoxid und perfekte Struktur mit Poren eines Durchmessers von 300 nm.

Wie anhand der Abbildungen zu sehen ist, bestand die Elektrodenoberfläche aus hoch geordneten und interkonnektierten Poren. Es wurde an den Oberflächen der Elektrodenköpfe mit einem Durchmesser von 50 μm eine perfekte Struktur aus Multischichten von hoch geordneten Poren erhalten, die sich gut reproduzieren ließ. Nachstehend folgen Beispiele zu fast perfekt geordneten Porenagglomeraten aus Poren eines Durchmessers von 300 nm. Alle nachfolgenden Porensysteme wurden unter Anlegung einer Stromstärke von 1 μA während des elektrochemischen Abscheidungsprozesses abgeschieden.

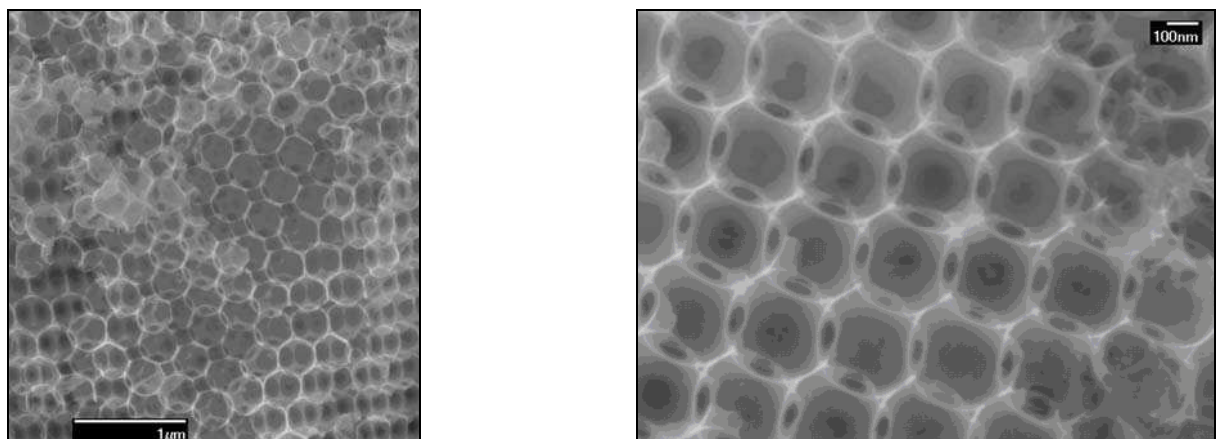


Abbildung 107: Templat aus 300 nm-Poren nach 8 min Abscheidung bei 1 μA .

Bei einem Partikeldurchmesser von 855 nm und einer elektrochemischen Abscheidungszeit von 4 Minuten wurden hoch poröse Template mit guter Ordnung erlangt, wobei die Beschichtung die typischen Risse aufwies, die bei dieser Art von Beschichtung nach Tempern zu beobachten sind. Bei einer Verdopplung der Abscheidungszeit ergaben sich noch dickere

Template. Die Abbildung 108 zeigt Template mit einer Porengröße von 855 nm sowohl nach 4- (links) als auch 8-minütiger Abscheidung (rechts):

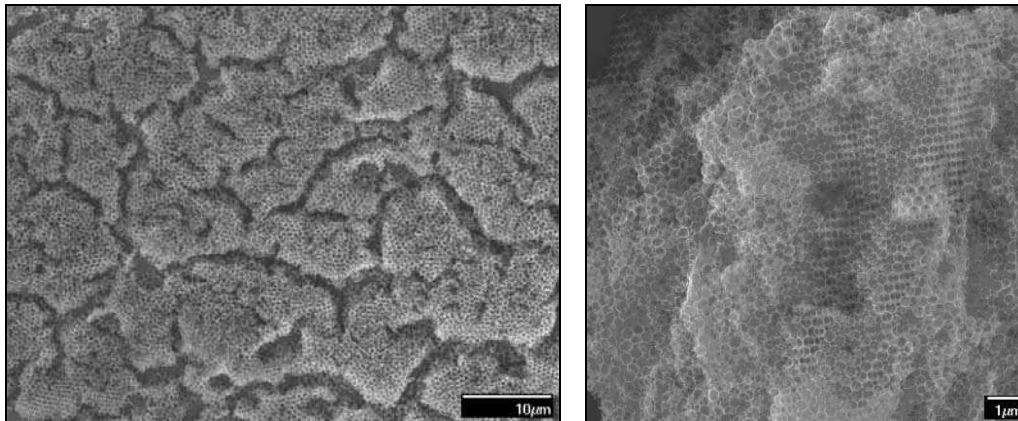


Abbildung 108: Template aus 855 nm-Poren nach 4 min (links) und nach 8 min Abscheidung (rechts) je bei 1 μ A abgeschieden.

Die Poren und die Porenverbindungskanäle wären ausreichend groß, damit die sperrigeren Biomoleküle, wie Enzyme in die Poren diffundieren können. Die Poren bieten zur Immobilisierung oder auch für eine elektrochemische Reaktion in Lösung ausreichend Oberfläche. Nachdem der Templatprozess vollständig optimiert war, wurden makroporöse Mikroelektroden mit Porendurchmessern von 132 nm - 855 nm reproduzierbar hergestellt. Nachstehend ist ein Querschnitt eines Porensystems mit Porendurchmessern von 300 nm gezeigt. Die Monodispersität der verwendeten Partikel macht sich in der Ordnung des porösen Templates bemerkbar:

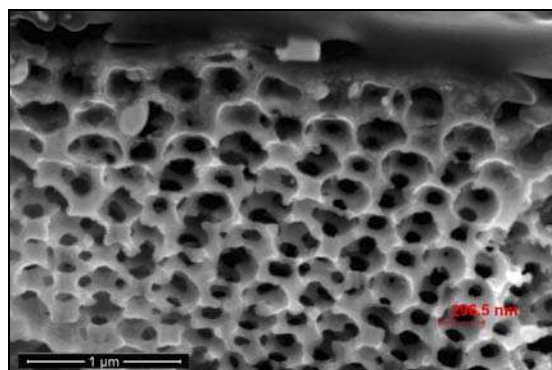


Abbildung 109: Querschnittaufnahme von perfekt geordneten Porensystemen mit einem Porendurchmesser von 300 nm.

Die porösen Wabenstrukturen waren nach oben offen und boten somit gute Diffusionsmöglichkeiten in das Innere der Porenschichten bis hin zur letzten Porenschicht auf dem Titansubstrat. Nachstehend ist eine solche Wabenformation vergrößert dargestellt:

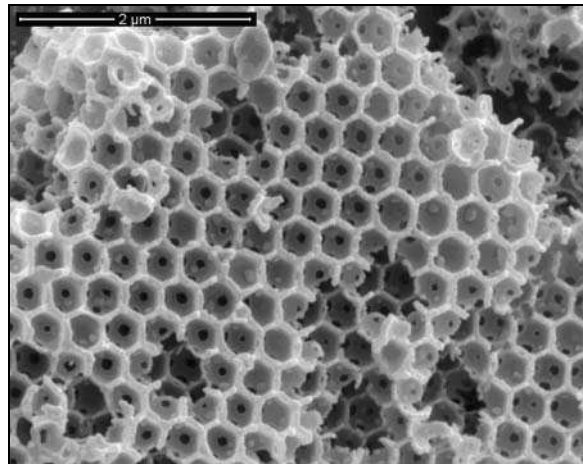


Abbildung 110: Wabenformationen aus hoch geordneten Rutheniumoxidporen.

Diese Porenformationen mit sehr deutlicher Ausbildung der Porenstege boten eine gute Basis zur Abmessungen dieser Porenstege, die zwischen den einzelnen Poren saßen. Damit wurde Aufschluss über die Dicke der Porenwände erhalten, was in Abbildung 111 dokumentiert ist:

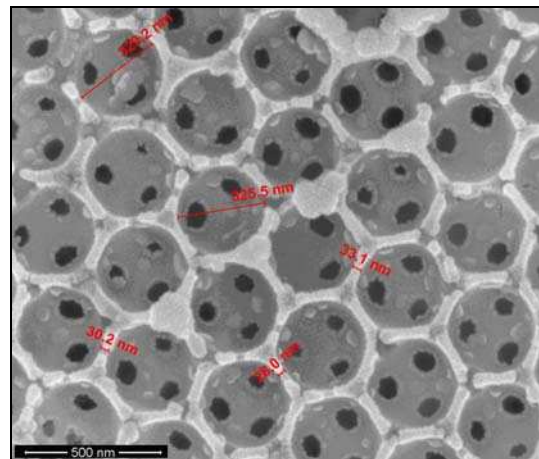
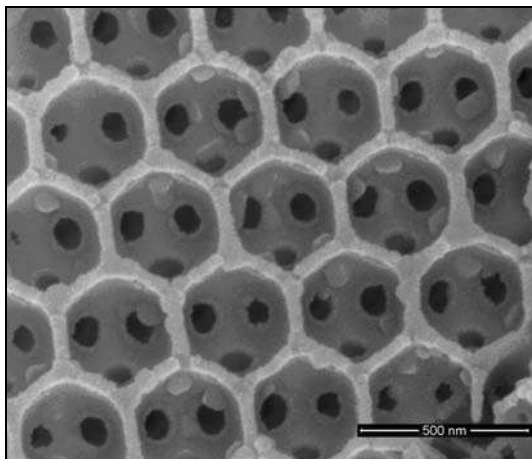


Abbildung 111: Perfekte Interkonnektierung der Poren eines Porendurchmessers von 300 nm und einer Stegbreite von ca. 30 nm.

Die Porenstege und somit die Dicke der Porenwände betrugen im Falle von Porendurchmessern von 300 nm ca. 30 nm. Das heißt die Dicke der Porenwände betrug 1/10 des Porendurchmessers.

Um erste elektrochemische Charakterisierungen durchzuführen, wurde das elektrochemische Verfahren der zyklischen Voltammetrie gewählt. Diese Messungen wurden in 0,5 M H_2SO_4 mit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode durchgeführt. Der Potentialbereich wurde auf 0 V bis 1 V eingestellt. Es wurde in allen Fällen eine Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s gewählt, damit die Experimente, die an verschiedenen Oberflächen durchgeführt wurden, verglichen werden konnten. Bei dem Vergleich von einer Elektrode mit einer geometrischen Fläche von 1 cm^2 mit einer Mikroelektrode des Durchmessers von 50 μm wurde eine interessante Beobachtung gemacht. Die jeweils erhaltene Peakform in den zyklischen Voltammogrammen

war sehr unterschiedlich. Der Oxidations- bzw. Redoxpeak bei der Mikroelektrode war schärfer ausgebildet. Nachstehend sind zwei zyklische Voltammogramme zu sehen, die den deutlichen Unterschied des elektrochemischen Verhaltens der beiden Elektrodenoberflächen aufweisen:

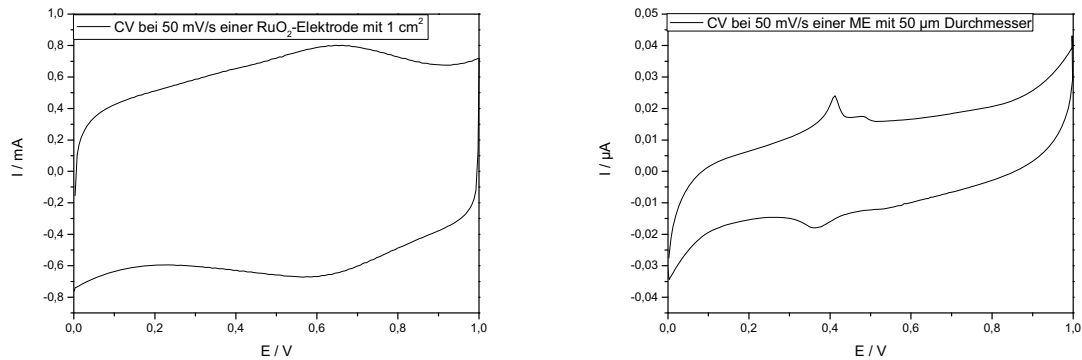


Abbildung 112: Zyklische Voltammogramme von RuO_2 -Oberflächen einmal mit einer geometrischen Oberfläche von 1 cm^2 (links) und $50 \mu\text{m}$ (rechts) in $0,5 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ vs. Ag/AgCl mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 50 mV/s .

Die Möglichkeit diese Art von hoch porösen Elektroden zu miniaturisieren und Mikroelektroden herzustellen, erlaubte es, den Widerstand einer Mikroelektrode zu verkleinern. Bei Mikroelektroden sind üblicherweise völlig verschiedene Eigenschaften der Elektrodenoberflächen zu beobachten. Dies kommt durch das unterschiedliche Diffusionsverhalten an einer Mikroelektrodenoberfläche zu Stande. Ein typisches Diffusionsprofil einer Mikroelektrode im Vergleich zu dem Diffusionsprofil einer gewöhnlichen Oberfläche wird im Folgenden schematisch dargestellt:

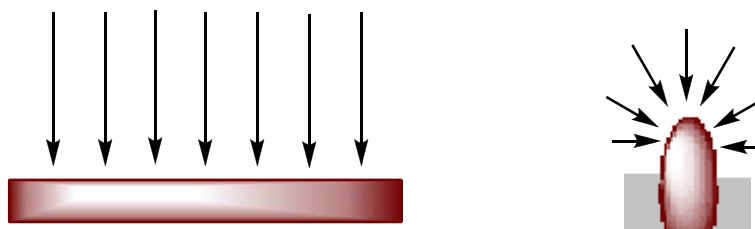


Abbildung 113: Schematische Darstellung der Diffusionsprofile einer planaren Elektrode und einer Mikroelektrode.

Während bei einer gewöhnlichen, flachen Elektrode ein planares Diffusionsprofil zu beobachten ist, besitzt eine Mikroelektrode eine hemisphärische Diffusion ^[109-111]. Diese Eigenschaften machen sich erst dann bemerkbar, wenn der Durchmesser der Mikroelektrode

kleiner wird als die Dicke der Diffusionsschicht. Dadurch ergibt sich ein hemisphärisch zulaufender Stofftransport zur Elektrodenoberfläche hin, der größer ist als der Stofftransport bei einer planaren, größeren Elektrodenoberfläche. Des Weiteren baut sich die Diffusionsschicht schneller auf, was an dem schnell erreichten stationären Zustand erkenntlich wird.

Bei Mikroelektroden vergrößert sich automatisch der Widerstand, da die geometrische Oberfläche stark verkleinert wird. Dem konnte in der vorliegenden Arbeit mittels Vergrößerung der aktiven, realen Oberfläche der Elektroden entgegengewirkt werden. Die Vergrößerung der aktiven Oberfläche wurde durch die kontrollierte Porosität erreicht, wobei eine gute Interkonnektivität zwischen den Poren gegeben sein musste. Diese vergrößerte aktive Oberfläche senkt nicht nur den Elektrodenwiderstand, sondern auch das thermische Rauschen ^[112]. Dazu wurde in dieser Arbeit nun das Rauschverhalten von porösen und unporösen Elektroden untersucht. Das thermische Rauschen wurde in einem open circuit potential mode (OCP) mit einer Niederstromoption gemessen. Die Arbeitselektrode (RuO_2) wurde dabei gegen eine gesättigte Ag/AgCl -Referenzelektrode geschaltet. Die Experimente wurden in einer 0,1 M BisTris-Pufferlösung eines pHs von 7 durchgeführt. Der Messaufbau wurde in einem Faraday-Käfig aufgebaut, um die Messungen vor äußeren parasitären Signalen zu isolieren.

Diese hoch strukturierte Oberfläche hatte eine signifikante Auswirkung auf das thermische Rauschen dieser Elektroden, wie nachfolgend durch Messungen belegt wurde. Es werden Vergleichsmessungen einer flachen Mikroelektrode und einer porösen Mikroelektrode gezeigt, wobei die Abscheidezeit für beide Elektroden jeweils 90 s betrug und das Templat der porösen Elektrode aus 300 nm großen Poren bestand:

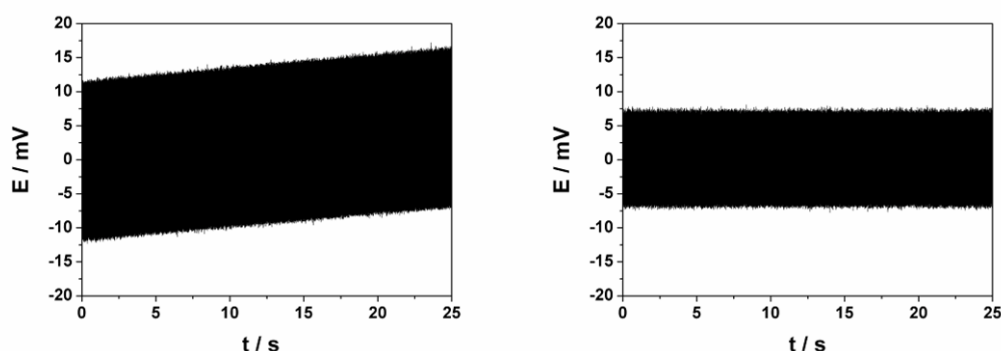


Abbildung 114: Messungen des Rauschens einer flachen Mikroelektrode (links) und einer porösen Mikroelektrode (rechts).

Im Allgemeinen verlangen potentiometrische Präzisionsmessungen stets niedrige thermische Rauschverhältnisse. Je kleiner die Elektrodenoberfläche ist, desto höher ist das thermische Rauschen einer Elektrode wegen der erhöhten Übergangsimpedanz ^[113]. Jedoch kann dabei

durch eine offene Porosität ausgeholfen werden, da das Rauschen durch die vergrößerte aktive Oberfläche verringert wird. Die vergrößerte aktive Oberfläche kompensiert den Verlust der geometrischen Oberfläche bei der Miniaturisierung und dadurch wird eine Erniedrigung der Elektrodenimpedanz hervorgerufen.

Als theoretischer Hintergrund der Rauschmessungen soll hier auf das Signal-Rausch-Verhältnis eingegangen werden. Das Rauschen sollte stets so gering wie möglich gehalten werden, was durch die Vergrößerung der realen, aktiven Oberfläche ohne Vergrößerung der geometrischen Oberfläche geschieht. Ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) wird angestrebt, was zur Folge hat, dass das eigentliche gemessene Signal nicht von dem Rauschsignal überlappt wird ^[107].

$$SRV = \frac{Signal_{gemessen}}{Signal_{Rauschen}}$$

Ziel ist es also auch das gemessene Signal zu verstärken, indem man das Signal des Rauschens verkleinert. Es soll an dieser Stelle auf den physikalischen Hintergrund eingegangen werden, um die Zusammenhänge zwischen Oberfläche und Rauschen zu vertiefen. Nachstehend wird die Formel für das thermische Rauschen gegeben, um den Zusammenhang mit der Übergangsimpedanz zu zeigen ^[49, 112]:

$$U_{therm} = \sqrt{4k_B TR\Delta f} \quad \text{und} \quad I_{therm} = \sqrt{\frac{4k_B T\Delta f}{R}}$$

U_{therm} : Thermische Rauschspannung

I_{therm} : Thermischer Rauschstrom

k_B : Boltzmann-Konstante

T : Temperatur

R : Elektrischer Widerstand

Δf : Zugelassene Bandbreite

Es ist zu erkennen, dass die thermische Rauschspannung mit zunehmendem elektrischen Widerstand zunimmt. Die Geometrie eines Körpers hat großen Einfluss auf den elektrischen Widerstand eines Leitermaterials. Anhand der Formel für die Berechnung des elektrischen Widerstandes eines elektrischen Leiters lässt sich der Zusammenhang zwischen Vergrößerung der realen Oberfläche durch die Porosität und elektrischen Widerstand erkennen ^[49]:

$$R = \rho \cdot \frac{l}{A}$$

R : Elektrischer Widerstand

ρ : Spezifischer Widerstand des Materials (Materialkonstante)

l : Länge des Leiters

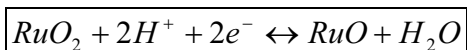
A : Querschnittsfläche des Leiters

Das heißt, je größer der Leiterquerschnitt, desto kleiner wird der elektrische Widerstand, welcher durch den Realteil der Impedanz gegeben wird. Er stellt den frequenzunabhängigen Teil der Gesamtimpedanz dar ^[1]. Der Realteil der Impedanz ist ein ohmscher Widerstand und somit wird die Gesamtimpedanz verkleinert, wenn die reale Oberfläche vergrößert wird.

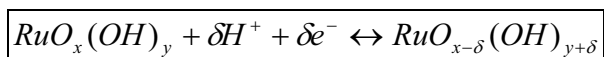
Neben der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Anwendung des Rutheniumoxids für die direkte Oxidation von NADH (s. Kapitel 3.1.6) und der bereits bekannten Anwendung als Superkondensatorenmaterial ^[107] wurde nun eine weitere Anwendung dieses Materials in dieser Arbeit untersucht. Das Material besitzt nicht nur ein interessantes Charakteristikum als katalytisch aktives Material ^[114], sondern auch als pH-sensitives Material ^[115, 116]. Im Allgemeinen werden für pH-Messungen Glasmembranelektroden verwendet. Sie zeichnen sich durch hohe Sensitivität aus, weisen eine Langzeitstabilität und eine gute Linearität in Bezug auf das Nernst-Verhalten auf. Allerdings haben die Glasmembranelektroden auch Nachteile, wie zum Beispiel das Problem der Miniaturisierung, einen hohen elektrischen Widerstand und eine Instabilität in aggressiven Elektrolyten. Daher könnten auf Ruthenium basierende Materialien wegen ihrer besonderen Eigenschaften eine gute Alternative darstellen. Zum Beispiel besitzt Rutheniumdioxid einen niedrigen spezifischen Widerstand ($\sim 35 \mu\Omega \text{ cm}$) und weist eine metallähnliche Leitfähigkeit ^[117] auf. Des Weiteren besitzt dieses Material eine gute Thermostabilität ^[118]. In früheren Arbeiten wurde Rutheniumoxid als pH-sensitives Material verwendet ^[119] und auch Mischoxide wie Ruthenium- und Titanoxid sind bereits als Material für pH-Messungen ^[120] bekannt. Somit ergab sich während dieser Arbeit die Idee, selbst hergestellte Rutheniumdioxidoberflächen auf die pH-Sensibilität zu testen und simultan eine neue Anwendungsmöglichkeit für poröse Mikroelektroden zu finden. Durch die Porosität ergab sich eine große aktive Oberfläche, was einen geringeren Einsatz an Edelmetall erfordert und die Kommerzialisierung ermöglichen könnte. Des Weiteren werden pH-Messungen in kleinen Volumina und zum Beispiel in der nahen Umgebung von biologischen Zellen durch den Einsatz dieser Elektroden erleichtert. Die pH-Elektroden aus Rutheniumoxid

zerbrechen weitaus weniger als die herkömmlichen Glasmembranelektroden. Die Rutheniumoxidoberfläche ist also als potentiometrischer Sensor ^[119] sehr interessant. Analog zu früheren Untersuchungen an porösen Materialien ^[121, 122] sollte im Rahmen dieser Arbeit nun poröses Material zur pH-Messung eingesetzt werden. Die pH-Messungen wurden mit verschiedenen Pufferlösungen und Lösungen aus NaOH und HCl durchgeführt. Dabei wurden die pH-Werte der Lösungen zuvor genau eingestellt. Die Ausgangslösungen hatten eine Konzentration von 0,1 M. Alle Messungen wurden unter ständigem Rühren und Raumtemperatur durchgeführt. Erst nach einigen Minuten, nachdem die detektierten Potentiale konstant waren, wurden die Werte zu dem dazugehörigen pH-Wert notiert.

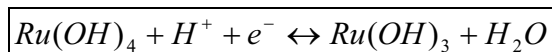
Der theoretische Hintergrund der pH-Sensibilität liegt in den Oberflächenreaktionen des Rutheniumoxids, wobei verschiedene Vorstellungen existieren. Zum Teil wird eine Sauerstoffinterkalation in Erwägung gezogen, um das pH-Verhalten von Rutheniumoxidelektroden zu erklären ^[123]. Ein verallgemeinerter Oberflächenmechanismus ist nachstehend gezeigt:



Ferner wird auch ein Ionenaustausch an der mit OH-besetzten Oberfläche ^[114, 123] für die pH-Antwort in Betracht gezogen. Das allgemeine Gleichgewicht des Protonenaustausches wird wie folgt beschrieben:



Von einer Ein-Elektronen-Reaktion des Rutil-Typs des Rutheniumoxids ausgehend sieht die Gleichgewichtsreaktion folgendermaßen aus:



Es handelt sich demnach um ein reversibles Redoxverhalten von Ru(IV) und Ru(III). Unter Berücksichtigung der elektrochemischen Grundlagen lässt sich der Zusammenhang zwischen dem Potential und dem pH-Wert verdeutlichen. Die allgemeine Nernst-Gleichung lautet ^[1] wie folgt:

$$E = E^0 + \frac{R \cdot T}{z} \cdot \log \frac{c_{Ox}}{c_{Red}}$$

E: Elektrodenpotential

E⁰: Standardelektronenpotential

R: Molare Gaskonstante

T: Absolute Temperatur

z: Übertragene Elektronenanzahl

c_{Ox}: Konzentration an oxidierter Spezies

c_{Red}: Konzentration an reduzierter Spezies

Für die Berechnung des pH-Wertes ^[48] wird die nachstehende Formel in Betracht gezogen:

$$pH = -\log c_{Ox}$$

Unter Berücksichtigung dieser Formel und Umformung der allgemeinen Nernst-Gleichung bei Raumtemperatur resultiert die Nernst-Gleichung in folgender Darstellung:

$$\Delta E = -0,059V \cdot \Delta pH$$

Damit lässt sich folglich die pH-Abhängigkeit des Potentials erklären. Während der Experimente wurde ein konstanter pH vorgegeben und das dazugehörige Potential detektiert. Eine Auftragung beider voneinander abhängiger Parameter ergab eine Gerade, wobei die Steigung das Nernst-Verhalten repräsentierte. Als Ergebnis der experimentellen Arbeiten dieses Kapitels wurde mit diesem hoch stabilen Material ein lineares Verhalten des erhaltenen Nernst-Verhaltens beobachtet, was in Abbildung 115 zu sehen ist:

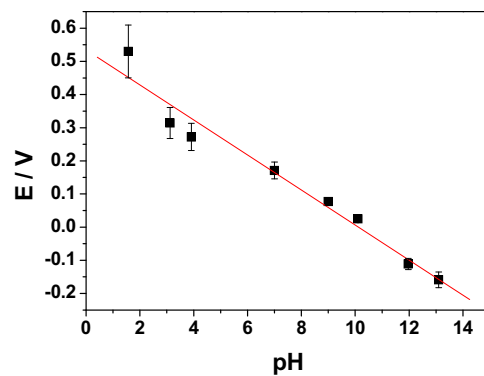


Abbildung 115: Auftragung der gemessenen Potentiale gegen die dazugehörigen pH-Werte, detektiert mit porösen Rutheniumoxidoberflächen.

Dieses lineare Verhalten erwies sich als reproduzierbar in einem pH-Bereich von $2 \leq \text{pH} \leq 13$. Beim Auftragen von dem registrierten Potential E gegen den zuvor eingestellten pH-Wert ergab sich ein Nernst-Verhalten von $-59,7 \text{ mV/pH}$, wobei dieser Wert sehr nahe am theoretischen Wert ist.

Diskussion:

Die hergestellten makroporösen Elektroden weisen eine vergrößerte aktive Oberfläche auf, und benötigen somit nur eine geringe Menge an Ruthenium. Das ist ein sehr wichtiger Punkt, da Ruthenium selbst als Rohmaterial sehr kostspielig ist. Des Weiteren soll hier erwähnt werden, dass es sich um ein einfaches Herstellungsverfahren dieser porösen pH-Elektroden handelt, was ein bedeutender Punkt bei möglichen technischen Anwendungen darstellt.

Als Abschlussbetrachtung kann hier zusammengefasst werden, dass es gelungen ist, hochporöse und fast perfekt strukturierte Mikroelektroden aus Rutheniumoxid herzustellen. Sowohl das Templatverfahren als auch das Verfahren zur Herstellung der Mikroelektroden wurden soweit optimiert, dass reproduzierbar vielseitig einsetzbare Mikroelektroden hergestellt werden konnten. Extrem hoch geordnete Strukturen wurden durch ein einfaches Templatverfahren hergestellt. Des Weiteren wurde die Erniedrigung des thermischen Rauschverhaltens an porösen Rutheniumoxidelektroden demonstriert. Bessere Signal-Rausch-Verhältnisse durch die vergrößerte aktive Oberfläche machen die miniaturisierten, makroporösen Elektroden besonders interessant. Des Weiteren wurde eine interessante Anwendung der hergestellten makroporösen Mikroelektroden aus Rutheniumoxid in dieser Arbeit untersucht. Die porösen Rutheniumoxidelektroden stellen ein gutes pH-sensibles Material im pH-Bereich von ~ 2 bis 13 mit einer guten Reproduzierbarkeit dar.

3.4: Implantierbare makroporöse Mikroelektroden für Handprothesen

Dank des erworbenen Fachwissens auf dem Gebiet der Herstellung poröser Mikroelektroden im Rahmen dieser Arbeit ist ein Projekt mit dem Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert über implantierbare Mikroelektroden entstanden. Zu dieser Kooperation kam es wiederum wegen der erworbenen Kompetenz der Templatverfahren zur Herstellung makroporöser Elektroden während des Verlaufs des ERUDES-Projectes. Es handelt sich um eine Zusammenarbeit mit der Abteilung für Medizintechnik und Neuroprothetik, wobei Aufgabe der vorliegenden Arbeit die Herstellung makroporöser Beschichtungen für die implantierbaren Elektroden des IBMTs war. Es wurden implantierbare Mikroelektroden für Kontaktierungen von Nerven- oder Muskelfasern im menschlichen Körper modifiziert, so dass eine poröse Multischicht aus mehreren makroporösen Schichten auf den Kontaktierungsstellen der Elektroden erhalten wurde. Für das IBMT stellte die poröse Beschichtung der Kontaktstelle eine Möglichkeit zur Reduzierung der Übergangsimpedanz dieser Elektroden dar.

Das IBMT führt die Entwicklung und die Fertigung von invasiven und nicht-invasiven Mikroelektroden durch. Diese stellen elektrische Schnittstellen zu dem lebenden Gewebe dar. Die dazu notwendige Signalübertragung und Signalverarbeitung sind bereits erarbeitet ^[124, 125]. Die Elektroden zur Implantierung sollten idealerweise sehr flexibel sein. Dazu sind einige Materialien bekannt, wie zum Beispiel Polyimid ^[126, 127], welches auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Elektroden als Träger- und Isolationsmaterial vom IBMT verwendet wurde. Es stellt ein biostabiles Material dar ^[128], was eine wichtige Eigenschaft von implantierbaren Elektroden darstellt. Das IBMT hat mehrjährige Erfahrung in der Mikrosystemtechnik, Entwicklung und Herstellung von Mikrosystemen ^[126]. Der von dem IBMT durchgeführte Fertigungsprozess der Elektroden kann sowohl einseitig, als auch beidseitig durchgeführt werden ^[129]. Die hergestellten Mikroelektroden werden als Schnittstelle für die Neuroprothetik verwendet, wobei das Detektieren von Biosignalen und die telemetrische Übertragung dieser Signale ohne Mobilitätsverluste eine bedeutende Rolle spielen ^[130, 131]. Diese können zum Einsatz bei verschiedenen Neuroprothesen kommen, wie zum Beispiel für Retina-Implantate, bidirektionalen Handprothesen ^[132], Blasenstimulatoren oder Cochlea-Implantate (Implantate des Innenohres). Das IBMT entwickelt und fertigt eine Reihe an verschiedenen flexiblen Elektroden im Hinblick auf ihre Anwendungen, wie zum Beispiel implantierbare Mikroelektroden für das periphere Nervensystem (Cuff-, Sieb-, Schaft- und Fadenelektroden), für das Epimysium (Bindegewebehüllen um Gruppen von

Muskelfaserbündeln) ^[133], für den Vestibularapparat (Teil des inneren Ohrs) ^[134], für den Cortex (Rinde) ^[134] und für die Retina (Netzhaut) ^[133]. Bei Störungen oder Ausfall von Funktionen im menschlichen Körper kann Ersatz durch technische Bauteile gewährleistet werden. Dabei lässt sich zwischen Oberflächen Elektroden und implantierbaren Elektroden unterscheiden. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden poröse Oberflächenstrukturen der Kontaktstellen hergestellt, welche zur Optimierung von neuronaler Signalerfassung führen sollen. Aber auch eine verbesserte Stimulation von biologischem Gewebe war Ziel. Die Entwicklung von bioaktiven implantierbaren Systemen soll prinzipiell zu einer optimalen elektrochemischen und biologischen Wechselwirkung im Gewebe selbst führen.

In dieser Arbeit wurden flexible Polyimid-Mikroelektroden für das Epimysium modifiziert, die biokompatibel und auch biostabil sind, was sehr wichtige Eigenschaften für körperfremde, meist alloplastische Materialien sind, die in den menschlichen Körper implantiert werden ^[134]. Nachstehend ist eine Aufnahme einer solchen Mikroelektrode dargestellt:



Abbildung 116: Epimysium-Mikroelektrode mit Polyimidisolierung.

Diese Art von Elektrode wurde nach Modifikation mit einer porösen Schicht optisch, mittels REM und elektrochemisch mittels CV charakterisiert. Wichtig für die spätere Anwendung war, dass die Beschichtung auf der Kontaktstelle eine gute Haftung hatte. Mit solchen Elektroden sollen bewegungskorrelierte myogene, das heißt vom Muskel ausgehende Signale, in naher Zukunft erfasst werden. Der Einsatz wird invasiv durchgeführt. Endziel des Projektes mit dem Fraunhofer Institut in St. Ingbert ist die Steuerung einer bionischen Handprothese, wie dies schon zuvor ohne poröse Elektrodenkontaktstellen von dem IBMT gezeigt wurde ^[127, 131, 132]. Bei sehr kleinen Kontaktstellen kommt es immer zu hohen Übergangs impedanzen. Diese sollten aber so gering wie möglich gehalten werden, was durch die Vergrößerung der realen, aktiven Oberfläche ohne Vergrößerung der geometrischen Oberfläche geschehen kann, wie es in Kapitel 3.3 dieser Arbeit gezeigt wurde. Ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis wird

angestrebt, was zur Folge hat, dass das gemessene Signal nicht von dem Rauschsignal überlappt wird.

Das thermische Rauschen, also das temperaturabhängige Rauschen verursacht durch die Bewegung der Ladungsträger, wird durch eine Vergrößerung der aktiven Oberfläche verkleinert. Der Widerstand der Elektrode wird durch die poröse Struktur verringert, welche auch eine verringernde Auswirkung auf den Effekt des thermischen Rauschens hat ^[112]. Normalerweise wird der Effekt des thermischen Rauschens höher, je kleiner die Elektrodenoberfläche wird, da dadurch die Übergangsimpedanz erhöht wird ^[113]. Dem lässt sich jedoch durch die Porosität der Oberfläche entgegenwirken. Nachfolgend sind Vergrößerungen der Elektrodenköpfe von Epimysium-Mikroelektroden gezeigt, die fünf Kontaktstellen zur Modifizierung zur Verfügung stellen:

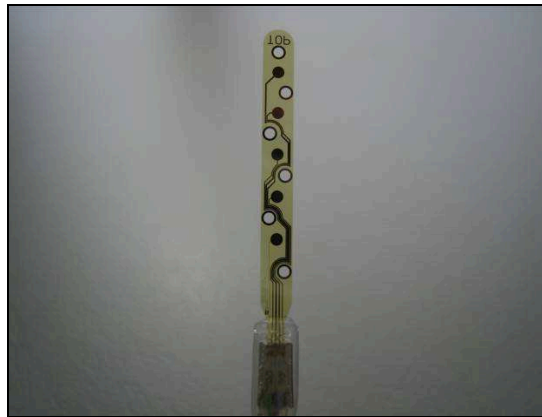


Abbildung 117: Vergrößerung der Elektrodenköpfe mit fünf Kontaktstellen.

Die Modifizierung der Mikroelektroden erfolgte mittels der *kontrollierten Evaporierung* mit Polystyrolpartikeln (PS). Dabei wurde darauf geachtet, dass nur sehr wenig (ca. $\frac{1}{4}$ eines Tropfens) der Partikelemulsion auf die Kontaktstellen aufgebracht wurde, um das Auslaufen der Partikellösung und somit das mögliche Ausbleiben der Bildung kolloidaler Kristalle auf den kleinen Kontaktstellen zu vermeiden. Die folgende Aufnahme zeigt die mit eingetrocknetem PS modifizierten Kontaktstellen einer Polyimid-Mikroelektrode:



Abbildung 118: Elektrodenkopf mit endo-Templat aus PS-Partikeln auf den Kontaktstellen.

Nach der Modifizierung der Elektrodenkontaktstellen mit Polystyrol-Partikeln wurden separiert Gold und Platin jeweils während verschiedener Zeiten abgeschieden. Zur Goldabscheidung in die Zwischenräume des kolloidalen Kristalls aus Polystyrol wurde wie in

den Kapiteln zuvor ein kommerzielles Zwei-Komponentenbad ECF-60 und ECF-61 der Firma Metalor SAS France verwendet. Das optimale Abscheidepotential beträgt -0.66 V vs. Ag/AgCl . Als Abscheidebad für Platin wurde eine schwefelsaure Lösung (0.5 M) von H_2PtCl_6 (50 mM) verwendet. Das am Anfang angelegte Potential für die Elektroabscheidung betrug $+0.142\text{ V}$. Jedoch wurde dieses Abscheidepotential im Laufe der Experimente auf -0.3 V angepasst. In Abbildung 119 sind die Strom-Zeit-Kurven für Gold und Platin bei verschiedenen Zeiten dargestellt:

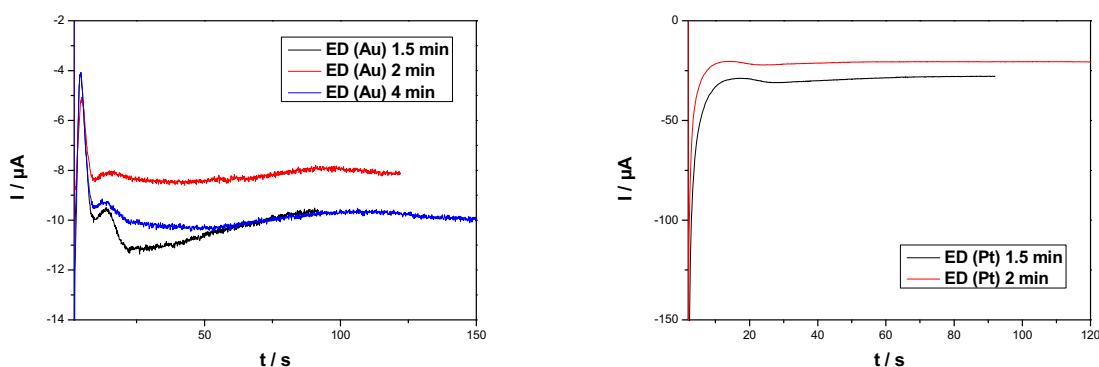


Abbildung 119: Strom-Zeit-Kurven der Elektroabscheidung von Gold (links) und Platin (rechts).

Die unterschiedlichen Stromstärken bei gleichem Potential kommen durch unterschiedliche Untergrundbeschaffenheit der Elektroden zustande. Nach der Elektroabscheidung der Metalle wurden die PS-Partikel mittels Toluol aufgelöst. Das Problem bei der Herstellung kolloidaler Kristalle war, dass sich die PS-Partikel beim Eintrocknen bevorzugt an der Randstelle der Kontaktstelle ansammelten. Dort befand sich ein kleiner Absatz, der durch die Kavität von der Isolierungsschicht (außen) zu der Kontaktstelle (innen) zu beobachten war. Daher wurde mehrmals hintereinander je nach Eintrocknen die Polymerlösung auf die bereits modifizierte Kontaktstelle aufgetragen. Somit wurden dicke und gleichmäßigere kolloidale Kristalle erhalten. Auf die mit einem kolloidalen Kristall modifizierten Kontaktstellen wurde Gold elektrochemisch abgeschieden. Ein Grund für die Schwierigkeit der Beschichtung war die Oberflächenbeschaffenheit des Substrates. Die Elektrode, die zur Modifizierung genommen wurden, besaßen 5 Kontaktstellen, die aus einer mit Platin besputterten Goldzuleitung bestanden. Diese Oberfläche war nicht komplett planar, was die Modifizierung mit haftender und geordneter poröser Beschichtung erschwerte. Abbildung 120 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der zu modifizierenden Kontaktierungsstelle:

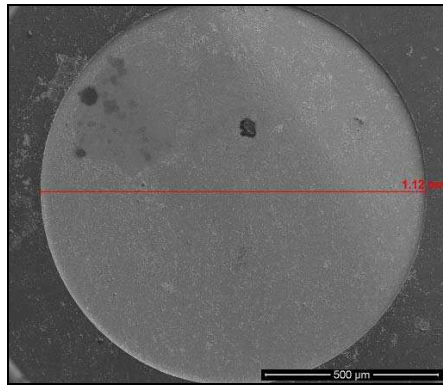


Abbildung 120: Vergrößerung einer mit Pt besputterten Kontaktstelle.

Die Kontaktstelle hat einen Durchmesser von ca. 1,12 mm. Die besputterte Oberfläche aus Platin zeigte keine homogene Oberfläche. Kleine Unebenheiten waren auf der Elektrodenoberfläche zu erkennen. Zur Optimierung der Beschichtungshaftung wurde auf die vom IBMT erhaltene Elektrode vor der Modifizierung eine kompakte Metallschicht elektrochemisch abgeschieden. Abbildung 121 zeigt einen Elektrodenausschnitt einer Elektrode, wobei eine Kontaktstelle (eingekreist) mit kompaktem Gold modifiziert wurde:

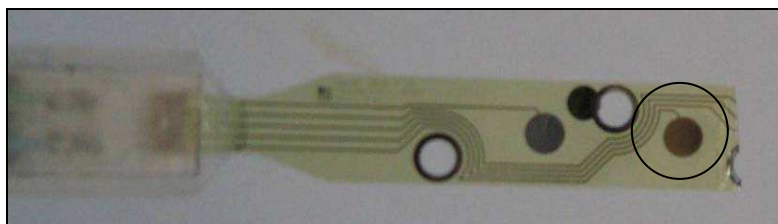


Abbildung 121: Obere Kontaktstelle mit kompaktem Gold modifiziert (rechts); untere Kontaktstelle mit besputtertem Platin (links).

Diese vorangehende Beschichtung bietet eine bessere Haftung der porösen Beschichtung. Nach der Elektroabscheidung des kompakten Metalls wurde wie gehabt die Modifizierung mit PS-Partikeln via *kontrollierte Evaporierung* durchgeführt und nach der Bildung des kolloidalen Kristalls Metall in die Zwischenräume der Partikel elektrochemisch abgeschieden. Im Folgenden ist ein Ausschnitt einer porösen Goldelektrodenoberfläche gezeigt:

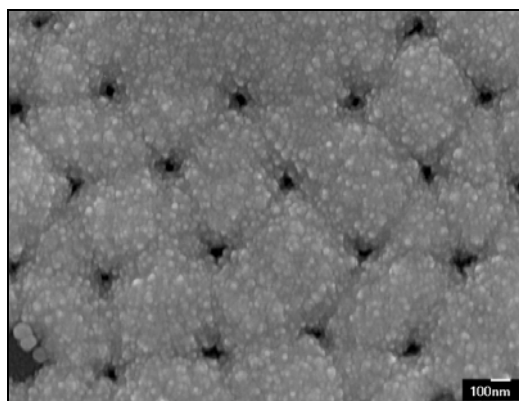


Abbildung 122: Poröse Goldelektrode, wobei die Poren fast zugewachsen sind; zuvor wurde Gold kompakt als Haftvermittler auf die Kontaktstelle abgeschieden.

In der Aufnahme ist zu erkennen, dass diese Goldschicht fast zugewachsen war. Jedoch waren die Poren immer noch offen, so dass auf die vergrößerte aktive Oberfläche zugegriffen werden konnte. Anhand der Anordnung der Porenlöcher lies sich die regelmäßige Anordnung der Poren erkennen.

Das Isolierungsmaterial Polyimid löste sich in Toluol auf, welches zur Auflösung der Polystyrolkugeln diente. Trotz nur sehr kurzer Behandlung mit Toluol legte sich die gelöste Polyimidschicht wie ein Film über die poröse Schicht und versiegelte somit das offenporige System. Der gebildete Polyimidüberzug blockierte die aktive Oberfläche und somit erklärt sich trotz sehr porenreicher Oberfläche die nur doppelte Verstärkung des Stroms bei den aufgenommenen zyklischen Voltammogrammen:

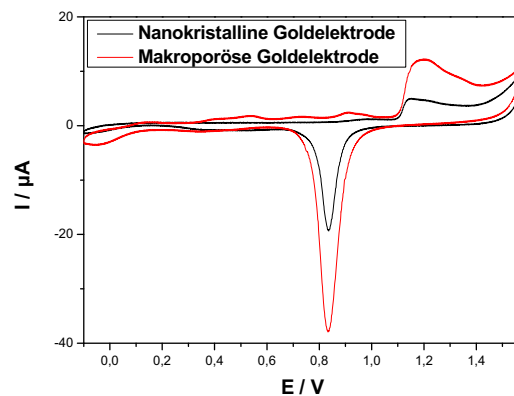


Abbildung 123: Vergleich der zyklischen Voltammogramme einer nanokristallinen Goldoberfläche und einer porösen Goldoberfläche; für die Aufnahmen wurde die gleiche Elektrode vor und nach Modifizierung verwendet.

Die leichte Erhöhung der Ströme kommt dadurch zu Stande, dass noch ein paar Stellen der porösen Beschichtung zugänglich für den Elektrolyten waren und somit eine elektrische Leitfähigkeit gegeben war. An dieser Stelle sei auch zu erwähnen, dass die kompakte Goldschicht nanokristallin ist und somit auch schon eine Erhöhung des Stromes lieferte. Eine elektrochemische Goldabscheidung auf ein endo-Templat aus PS-Partikeln eines Durchmessers von ~ 535 nm und anschließender Toluolbehandlung ergab folgendes Resultat:

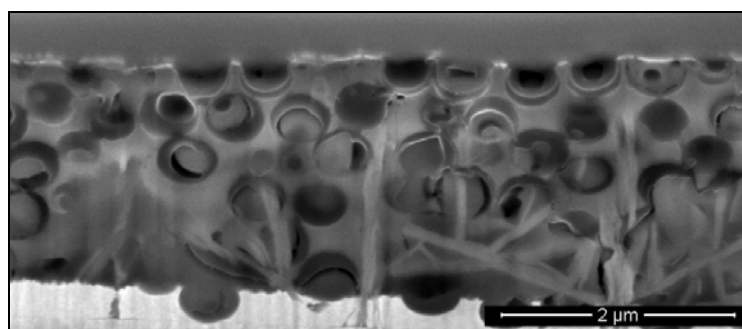


Abbildung 124: Querschnitte einer Goldelektrode mit fünf offenporigen Schichten; Teile von der Polyimidisolierung sind im Querschnitt zu erkennen.

Der Querschnitt wurde mittels FIB-Bearbeitungen (Focused Ion Beam) präpariert und vor dem Schnitt mit einer Platinschicht überzogen, damit die Schicht beim Schneiden erhalten bleibt. Das erhaltene Metalltemplat bestand aus fünf offenporigen Schichten. In der porösen Schicht sind Überreste von dem gelösten Polyimid zu sehen.

Nachdem die Elektroden nur wenige Sekunden mit Toluol behandelt wurden, fiel das Resultat besser aus. Die nachstehend aufgeführte Abbildung zeigt eine poröse Goldoberfläche nach 1.5 Minuten elektrochemischer Abscheidung. Eine halbe Monoschicht an porösem Gold wurde erhalten.

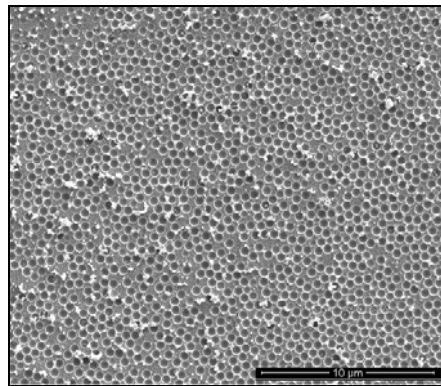
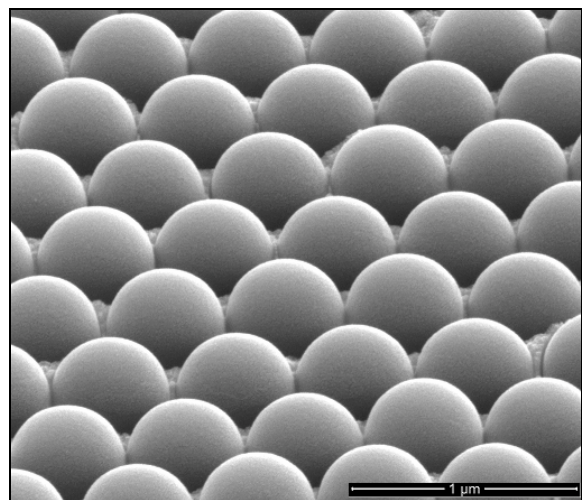
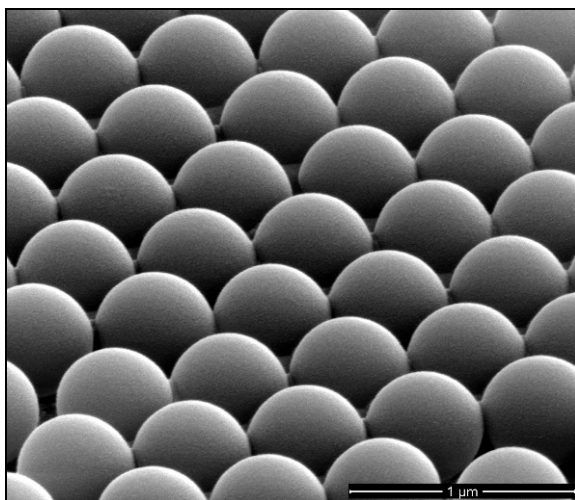


Abbildung 125: Verbesserte offenporige Goldelektrode.

Als weiteres Elektrodenmaterial neben Gold wurde Platin elektrochemisch abgeschieden. Als Abscheidopotential von Platin wurde ein Potential von - 0,3 V gewählt. Die PS-Kugeln wurden bei der neuen Versuchsreihe nicht aufgelöst, um die Auflösung der Polyimidschicht und somit die Verstopfung des Porensystems zu vermeiden. Nachstehend sind REM-Aufnahmen in Abbildung 126 dargestellt, die verschiedene Abscheidestadien des Platins zeigen:



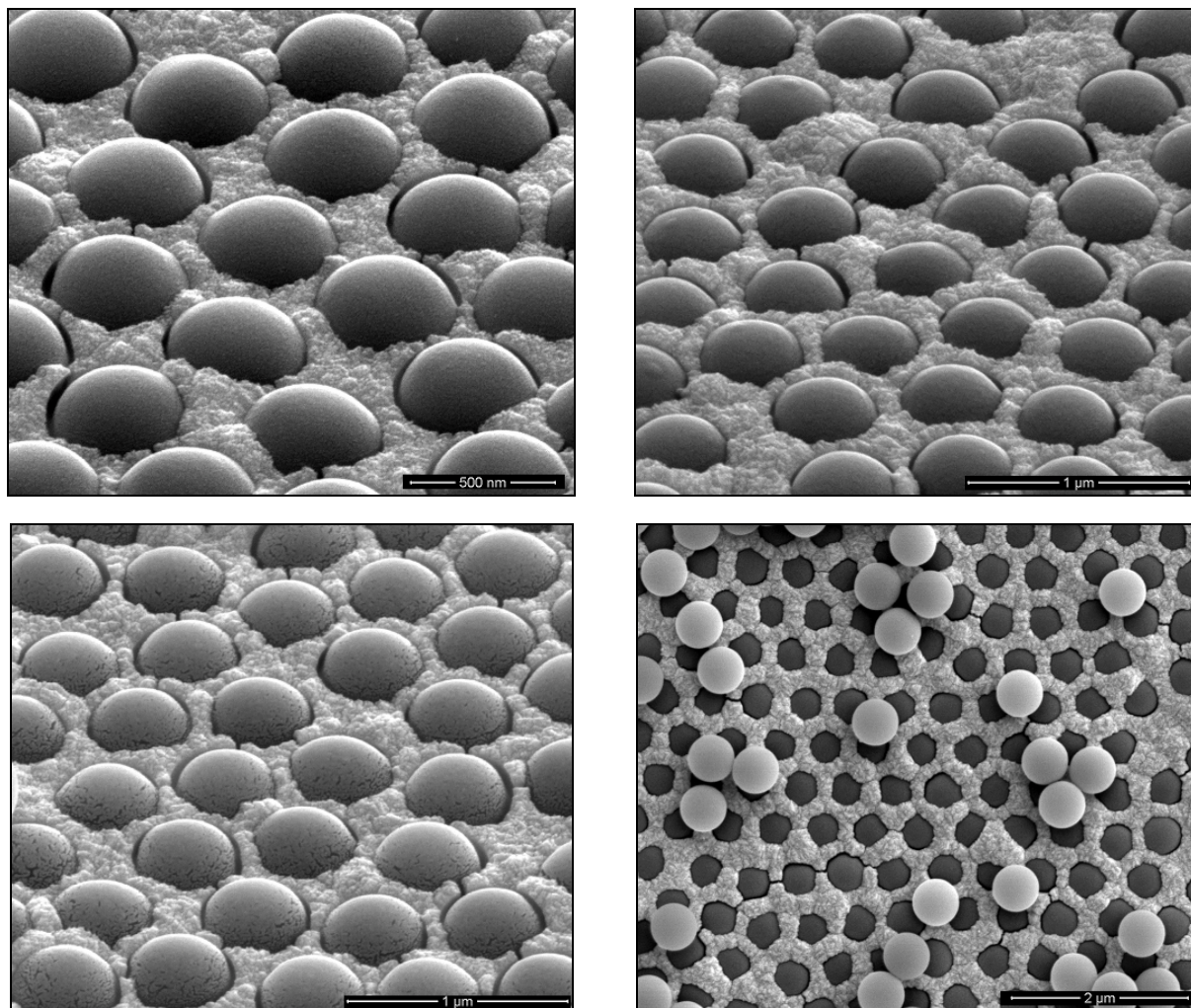
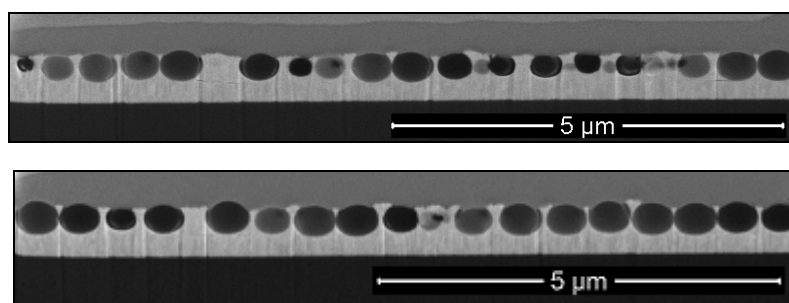


Abbildung 126: Templatelektroden mit noch vorhandenen PS-Partikeln und verschiedenen Schichthöhen des elektrochemisch abgeschiedenen Platins.

Die Aufnahmen zeigen verschiedene Abscheidestufen des Metalls. Daher ragen die PS-Partikel aus dem Metalltemplat in verschiedenen Höhen heraus. Die REM-Aufnahmen zeigen die gute Anordnung der PS-Partikel, woraus geordnete Porensysteme entstanden. Das Platin wurde in die Zwischenräume der kolloidalen Kristalle abgeschieden. Abbildung 127 stellt Querschnitte einer porösen Platinmonolage auf einer Kontaktstelle dar:



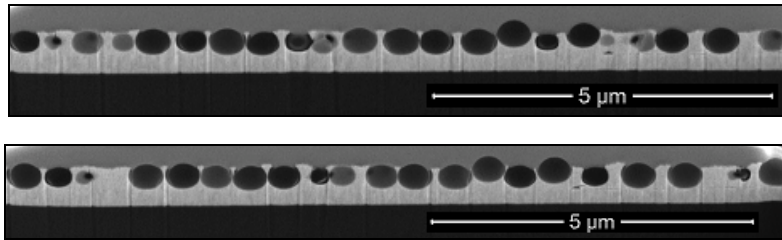


Abbildung 127: REM-Aufnahmen von FIB-Querschnitten einer porösen Platinelektrode mit einer offenporigen Monolage.

An den Querschnitten ist die einheitliche Verteilung der Poren zu erkennen. Die Poren waren nach oben hin offen, da die Templathöhe 457 nm war und die verwendeten Partikel 535 nm groß waren. In Abbildung 128 ist die abgemessene Templathöhe zu sehen:

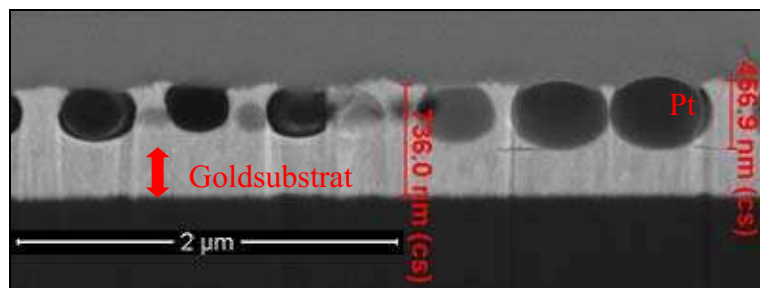


Abbildung 128: FIB-Querschnitt einer porösen Pt-Elektrode mit abgemessenen Schichtdicken.

Die Signalverstärkung, die durch ein makroporöses Multischichtsystem aus Platin erreicht wurde, ist in der folgenden Vergleichsmessung zwischen einer nanokristallinen und makroporösen Elektrodenoberfläche zu sehen:

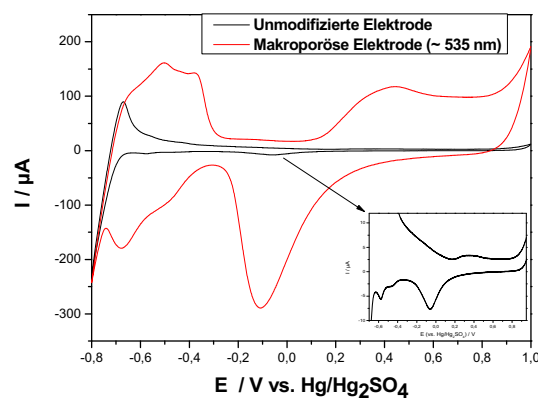


Abbildung 129: Vergleich eines CVs einer nanokristallinen und einer makroporösen Platinelektrode.

Die Charakterisierung der Elektrodenoberfläche mittels zyklischer Voltammetrie zeigte deutlich eine Verstärkung des Stroms, was für eine hoch poröse Elektrode spricht. Somit

wurde eine Vergrößerung der aktiven Oberfläche durch poröse Schichten auf implantierbaren Mikroelektroden erhalten.

Eine Idee, die während dieser Arbeit entstand, ist ein Porenschichtsystem aus zwei verschiedenen biokompatiblen Materialien herzustellen. Dabei sollte die untere poröse Schicht als stabile Kontaktstelle dienen und die obere poröse Schicht als instabiles Wirkstofftransportsystem, welches nach Implantation aufgelöst werden kann. In dem Zusammenhang wäre an Gold und Zink zu denken. Denn Gold eignet sich sehr gut als stabiles biokompatibles Elektrodenmaterial und Zink ist dem Körper ein bekanntes, essentielles Metall. Zink könnte hierbei leicht durch kurze und schwache Potentialanlegung aufgelöst werden (s. Kapitel 3.2), ohne dass die entstandenen Zinkionen den Körper stark schädigen würden. Dies müsste zuvor nach DIN EN 60601 (Sicherheitsanforderung an medizinische elektrische Geräte) und ISO 10993 (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Biokompatibilität) getestet werden. Zink ist ein essentielles Spurenelement, mit einem Bestand im Körper von ca. 3 - 4 g. Ein Mensch hat einen Tagesbedarf an Zink von ca. 20 mg und es ist Bestandteil von verschiedenen Verbindungen im Körper, wie z.B. der Carboanhydrase oder dem Insulin ^[134]. Es wird unter anderem für die Wundheilung, Augenheilkunde und Dermatologie eingesetzt. Aus diesen benannten Gründen könnte Zink ein gut verträgliches, biokompatibles Material darstellen und sich sehr gut eignen, um wirkstoffbeladene Poren herzustellen. Nach dem Auflösen des Systems für die Wirkstoffbeladung würde das untere poröse System als elektrische Schnittstelle zur Verfügung stehen. Nachstehend ist das Modell des Porensystems während der Auflösung der äußeren Porenschicht schematisch dargestellt, wobei der zuvor integrierte Wirkstoff freigesetzt wird:

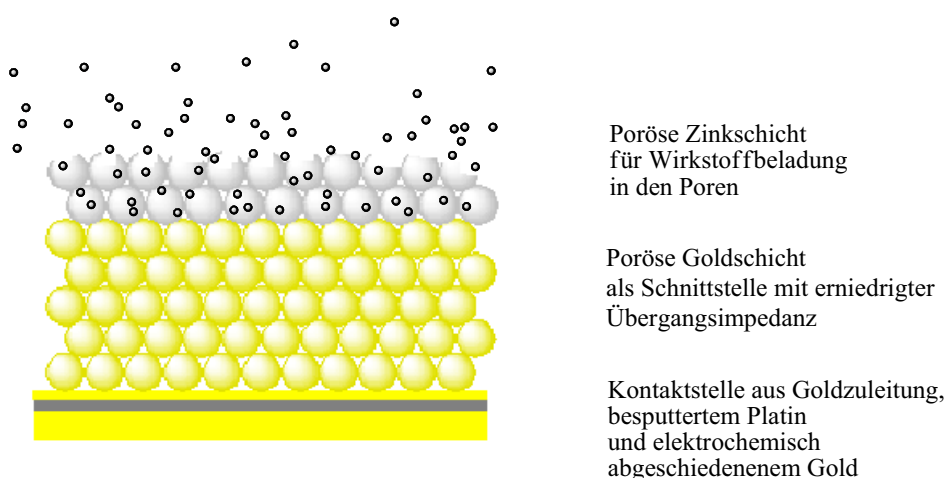


Abbildung 130: Schematische Darstellung des Vorgangs der Wirkstofffreisetzung.

Für diesen Elektrodenaufbau wurden Zinkporen nach der gleichen Herstellungsmethode wie zuvor bei Gold und Platin verwendet. Nachstehend sind REM-Aufnahmen gezeigt, die die Porosität des Zinks nachweisen:

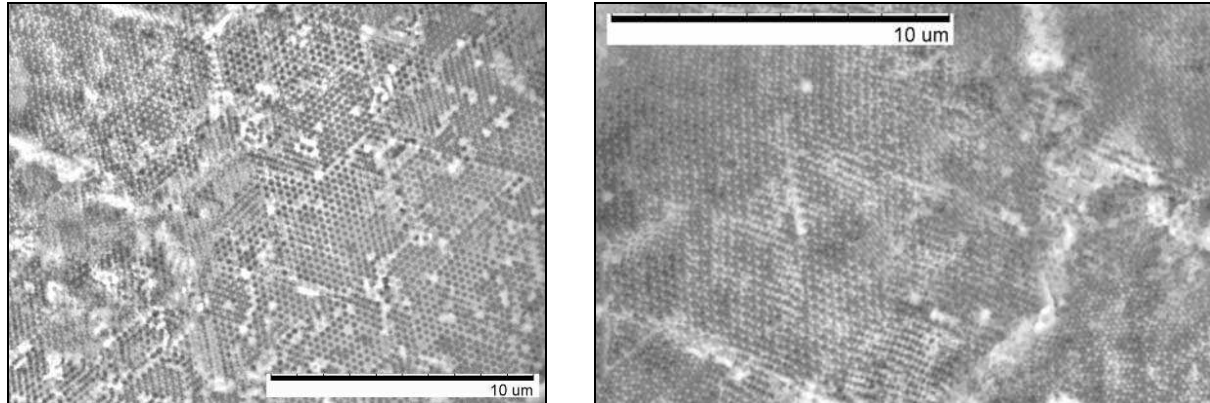


Abbildung 131: REM-Aufnahmen von porösen Zinkschichten.

Diskussion:

Abschließend zu diesem Projekt kann gesagt werden, dass die implantierbaren Mikroelektroden in ihrer aktiven Oberfläche durch die hergestellte Porosität vergrößert wurden. Es eröffnet eine neue Möglichkeit sensitivere Mikroelektroden zur Implantierung herzustellen. Ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis wird durch die Porosität der Kontaktstelle erreicht, da eine Senkung der Übergangsimpedanz durch die Vergrößerung der aktiven Oberfläche stattfindet. Ein interessanter Aspekt der dabei entstanden ist, stellt die Einkapselung von Medikamenten und Wirkstoffen in den Poren dar. Diese könnten durch verschiedene biokompatiblen Materialien eingeschlossen werden und über elektrochemische Steuerung die Substanzen auf Abruf freisetzen (s. Kapitel 3.2). Was hier noch zu lösen ist, wäre die Vermeidung der Auflösung des Isolationsmaterials Polyimid, entweder durch Ersatz der Polystyrolpartikel oder durch Toluol-Ersatz.

3.5: Makroporöse Multikatalysatorschichten aus Platin & Nickel

Vor allem in der Elektrokatalyse ist es von großem Vorteil die aktive Oberfläche zu vergrößern. Mehrere Metalle haben sich für die Elektrokatalyse bewährt. Platin und Nickel zum Beispiel haben in der heterogenen Katalyse einen sehr hohen Stellenwert und sind für eine Reihe von katalytischen Prozessen unerlässlich. Platin stellt wegen seiner niedrigen Wasserstoffüberspannung ^[135] ein sehr interessantes Katalysatormaterial dar. Es findet als Katalysator vor allem Anwendungen in Brennstoffzellen ^[136-138] und in der Automobilindustrie ^[139]. Nickel ist ein sehr gängiges Material für Hydrierungsreaktionen ^[140]. Da somit beide Materialien Wasserstoffreaktionen katalysieren, wurde während der vorliegenden Arbeit die Idee entwickelt, Multikatalysatorschichten aus Platin und Nickel herzustellen. Bei dieser Multikatalysatorschicht war das Katalysatorsystem aus Schichten verschiedener Katalysatormaterialien aufgebaut, die sukzessive verschiedene chemische Reaktionen katalysieren. Dies stellte einen neuen Methodenansatz für die Elektrokatalyse dar und ist zugleich wissenschaftlich aktuell, da immer nach neuen Katalysesystemen gesucht wird, die eine Katalyse optimieren und effizienter gestalten. Erste Ansätze für ein solches System wurden zuvor aus porösen Au-, Pt- und Pd-Schichten realisiert ^[32]. Damit die verschiedenen Schichten für den Elektrolyten auch zugänglich waren, Katalysereaktionen an beiden Materialien stattfinden konnten und diese auch miteinander gekoppelt waren, wurden beide Katalysatorschichten aus porösem Material hergestellt. Somit ergab sich ein poröses Schichtsystem aus zwei Materialien, die beide über die Verbindungskanäle der Poren verbunden waren. Natürlich wurde durch die Porosität der Katalysatorschichten wie in den entsprechenden Kapiteln zuvor beschrieben auch eine signifikante Vergrößerung der aktiven Oberfläche erhalten, wodurch sich die Umsatzrate einer Katalysereaktion stark erhöhen lässt. Im Falle von porösen Platin-Nickel-Multischicht-Katalysatoren war die Idee folgende: Wasserstoff wurde in-situ in den Platinporen generiert. Dieser frisch hergestellte Wasserstoff diffundierte direkt in dem porösen System bis zum porösen Nickel, wo dann der Wasserstoff für eine Hydrierungsreaktion bereitstand. Im nachfolgenden Schema ist das Prinzip dieses porösen Multikatalysatorsystems dargestellt:

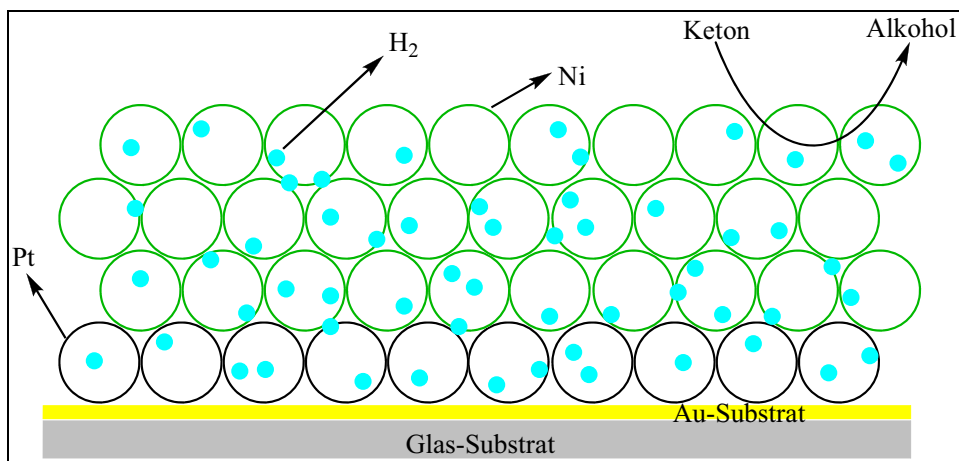
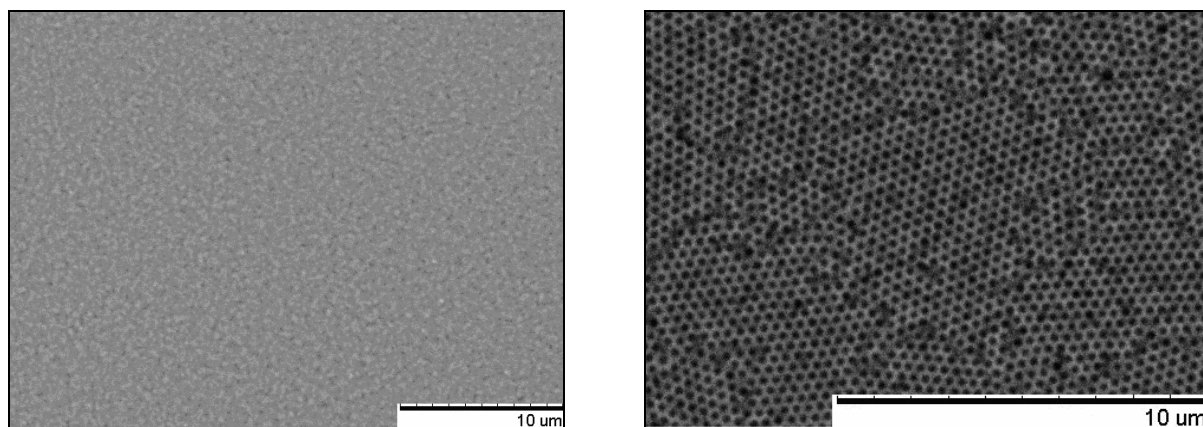


Abbildung 132: Schematische Darstellung des Multikatalysatorsystems mit in-situ Wasserstoffherstellung in den Platinporen und Hydrierungsreaktion in den Nickelporen.

Ein Vorteil dieses Multikomponentenkatalysators ist, dass kein gasförmiger Wasserstoff zugeführt werden musste, da dieser in-situ elektrochemisch hergestellt wurde. Normalerweise muss bei Hydrierungsreaktionen Wasserstoff als Gas vorgelegt werden ^[141]. Somit würde man unter Verwendung eines Multikatalysators die externe Wasserstoffzufuhr einsparen und der experimentelle Part wäre nicht durch das Handling eines Gases limitiert, da für eine Gaszufuhr stets eine spezielle Apparaturvorrichtung gegeben werden muss.

Die Synthese der endo-Template erfolgt wie in Kapitel 3.1 beschrieben mittels Polystyrol-Templating via *kontrollierte Evaporierung*. Zur Abscheidung von Nickel diente das Nickelbad Crystal 501 von Conventya. Das Bad wurde zunächst auf Eignung zur Abscheidung in kolloidale Kristalle getestet. Falls das Bad eine Oberfläche mit zu vielen Unebenheiten produziert hätte, wäre die kontrollierte Abscheidung in die Zwischenräume eines kolloidalen Kristalls erschwert oder sogar unmöglich gewesen. Es wäre zur Abhebung des kolloidalen Kristalls gekommen. Der Punkt, ab dem die Nickelabscheidung aus diesem Bad möglich war, wurde untersucht, da im Hinblick auf spätere Anwendungen vermieden werden sollte, zu hohe positive oder negative Potentiale anzulegen. Ein Potential von - 1,0 V vs. Ag/AgCl wurde als Abscheidopotential gewählt, da es nicht weit entfernt von dem Potential lag, bei dem Nickel abgeschieden werden konnte (- 0,95 V vs. Ag / AgCl). Das Abscheidopotential sollte wegen der Wasserstoffentstehung so positiv wie möglich gewählt werden. In der folgenden Abbildung ist eine unporöse, kompakte und poröse Nickeloberfläche dargestellt, die beide bei - 1,0 V vs. Ag / AgCl jeweils für 120 s abgeschieden wurden:



***Abbildung 133: Kompakte, unporöse Nickelschicht (links);
hoch poröse Nickeloberfläche (rechts).***

Die Aufnahmen zeigen, dass dieses Nickelbad für die Herstellung poröser Nickeloberflächen geeignet war. Für Platin wurde eine schwefelsaure Lösung (0,5 M) von H_2PtCl_6 (50 mM) verwendet ^[33, 69]. Die Elektroabscheidung des Platins erfolgte bei + 0,142 V vs. Ag/AgCl, die Nickelabscheidung bei - 1,0 V vs. Ag/AgCl.

In Abbildung 134 ist zu erkennen, dass die Verbindungskanäle der Poren der hergestellten, porösen Elektrodenoberflächen sehr gut ausgebildet waren. Durchgehende hexagonale Einheiten waren homogen auf der gesamten Elektrodenoberfläche verteilt, wie nachstehend verdeutlicht wird:

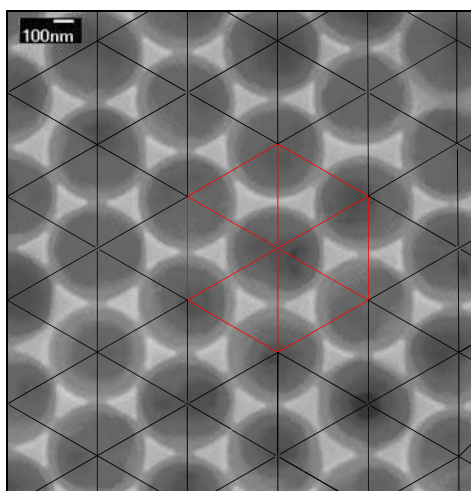


Abbildung 134: Perfekte hexagonale Einheiten einer porösen Nickeloberfläche.

Um die Vergrößerung der aktiven Oberfläche im Falle des Nickels zu untersuchen, wurde der Bereich der Wasserstoffentwicklung untersucht. Die nachstehende Abbildung zeigt den Vergleich von CVs einer unporösen und einer porösen Nickeloberfläche:

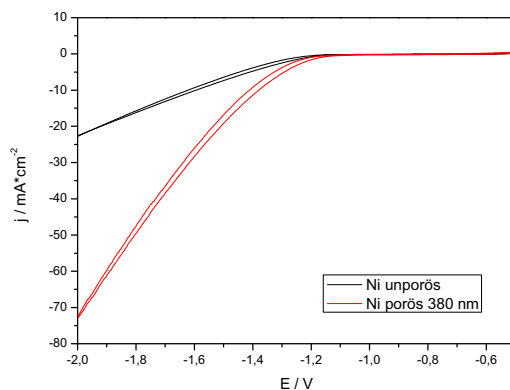


Abbildung 135: Vergleich der CVs einer unporösen und einer porösen Nickeloberfläche im Bereich der Wasserstoffproduktion.

Durch diesen Vergleich der CVs wird die Zunahme der aktiven Oberfläche durch die Porosität deutlich. Nachstehend sind Abscheidungskurven von Platin und Nickel gezeigt, die nacheinander in den gleichen kolloidalen Kristall abgeschieden wurden:

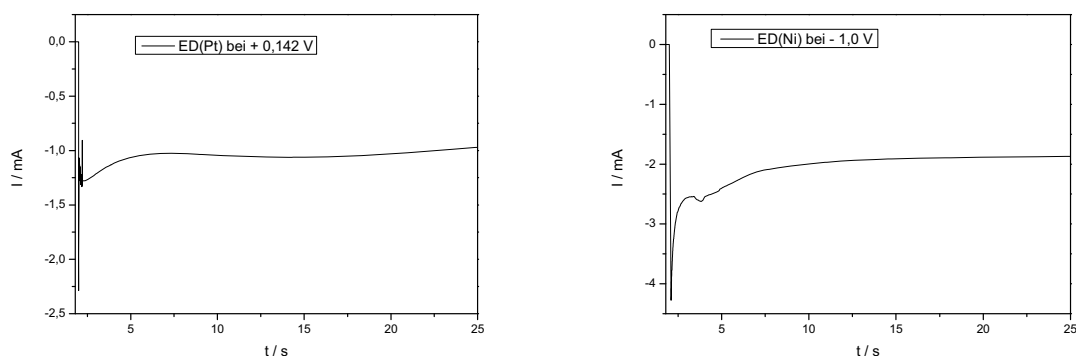


Abbildung 136: Strom-Zeit-Kurven der elektrochemischen Abscheidung von Platin (links) und Nickel (rechts).

An den Abscheidungskurven ist zu erkennen, dass die Abscheidung selbst homogen ohne größere Störungen wie z. B. Gasbildung, die sich störend auf die Abscheidung auswirken könnte, verlief. Die Abscheidung der beiden Metallschichten erfolgte sukzessive. Erst wurde Platin in den kolloidalen Kristall aus PS-Partikeln, dann Nickel auf die zuvor abgeschiedene Platinschicht und noch übrigen Schichten des kolloidalen Kristalls abgeschieden. Bei den Experimenten wurde zunächst das poröse Multischichttemplat aus zwei unabhängigen kolloidalen Kristallen hergestellt, d. h. in die Zwischenräume eines kolloidalen Kristalls wurde erst Platin abgeschieden, die Elektrode nach der Elektroabscheidung mit destilliertem Wasser gespült und das endo-Templat aufgelöst. Direkt im Anschluss erfolgte die Herstellung eines neuen kolloidalen Kristalls auf der bereits vorhandenen, porösen Platinschicht und die elektrochemische Abscheidung von Nickel in den neuen kolloidalen Kristall wurde durchgeführt. Nach der Metallabscheidung wurde die Elektrode mit THF behandelt, um die PS-Partikel zu entfernen. Bei diesen Elektroden war jedoch die untere poröse Platinschicht nicht mit der oberen porösen Nickelschicht verbunden. Bei der elektrochemischen

Abscheidung von Nickel muss sich der zweite hergestellte kolloidale Kristall aus PS-Partikeln abgehoben haben. Demnach wurde der Prozess zur Templatherstellung optimiert, indem zwei verschiedene Porenschichten hergestellt wurden, die beide miteinander offenporig verbunden waren und somit eine ungehinderte Diffusion in das komplette Porensystem ablaufen konnte. Die Optimierung des Herstellungsverfahrens bestand daraus, dass das Multischichtsystem aus einem einzigen kolloidalen Kristall hergestellt und die PS-Partikel erst am Ende der vollständigen Templatsynthese aufgelöst wurden. In der folgenden Abbildung ist der vollständige Templat-Prozess schematisch dargestellt:

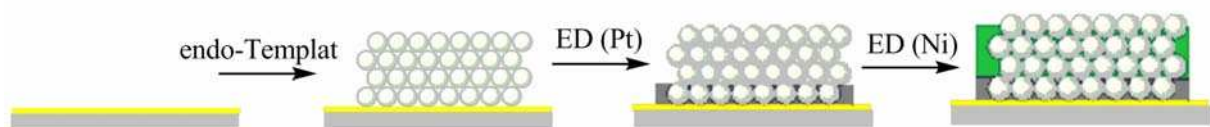
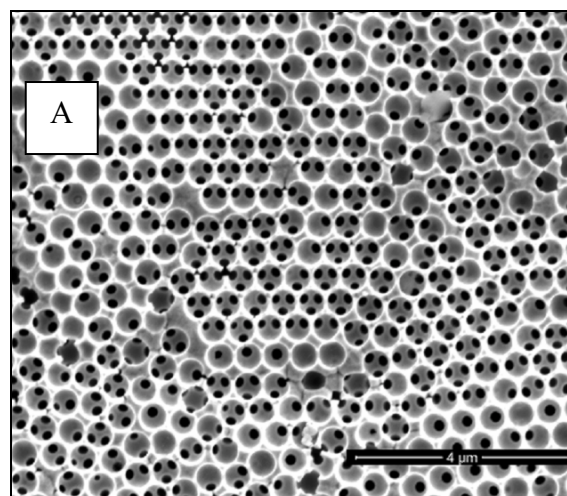
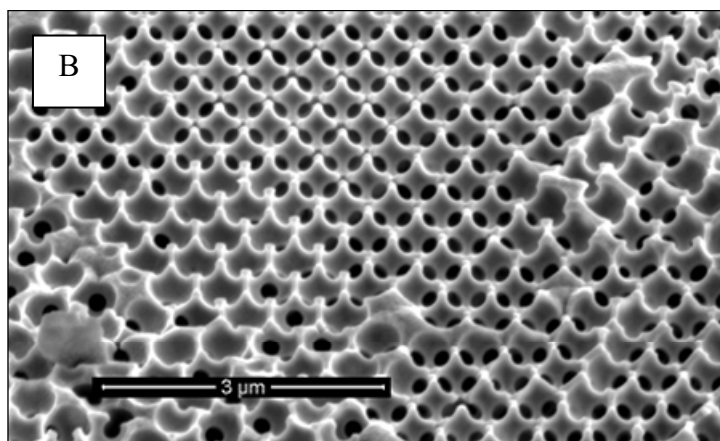


Abbildung 137: Schematische Darstellung des Templat-Prozesses mit einem kolloidalen Kristall.

Es wurde ein kolloidaler Kristall aus PS mit einem gewählten Partikeldurchmesser hergestellt und in diesen anschließend Platin abgeschieden. Danach wurde die Elektrode vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült, um das unreduzierte Platinsalz zu entfernen. Darauf erfolgte in die Zwischenräume des gleichen kolloidalen Kristalls mit der bereits abgeschiedenen Platinschicht die Elektroabscheidung von Nickel. Erst nachdem beide Metalle abgeschieden waren, wurden die PS-Kugeln mit THF gelöst. Nachstehend sind REM-Aufnahmen gezeigt, die hoch geordnete Multikatalysatorschichten aus porösem Platin und Nickel in der Draufsicht darstellen, wobei zu sehen ist, dass die oberste Schicht, das poröse Nickel hoch geordnet ist:





Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach verschiedenen Testreihen sehr gut geordnete Poren erzielt. Abbildung 139 zeigt die Draufsicht auf ein poröses Schichtsystem mit dazugehöriger EDX-Untersuchung als Nachweis beider Metalle. Die untere Schicht bestand aus porösem Platin und die obere Schicht aus porösem Nickel.

Die ganze Elektrodenoberfläche war mit dem Porensystem aus zwei katalytisch aktiven Materialien bedeckt. Eine homogene Verteilung der Poren war auf der gesamten modifizierten Elektrodenoberfläche zu finden. Die obere poröse Nickelschicht war mit der darunterliegenden porösen Platinschicht durch die Offenporigkeit verbunden. In der nachstehenden Abbildung wird eine poröse Ni-Pt-Elektrode als Draufsicht und als Querschnitt dargestellt, die eine Schichtzusammensetzung aus $\frac{1}{4}$ Platin (ca. 100 nm) und $\frac{1}{2}$ Nickel aufweist. Das letzte Viertel der Poren ist offen:

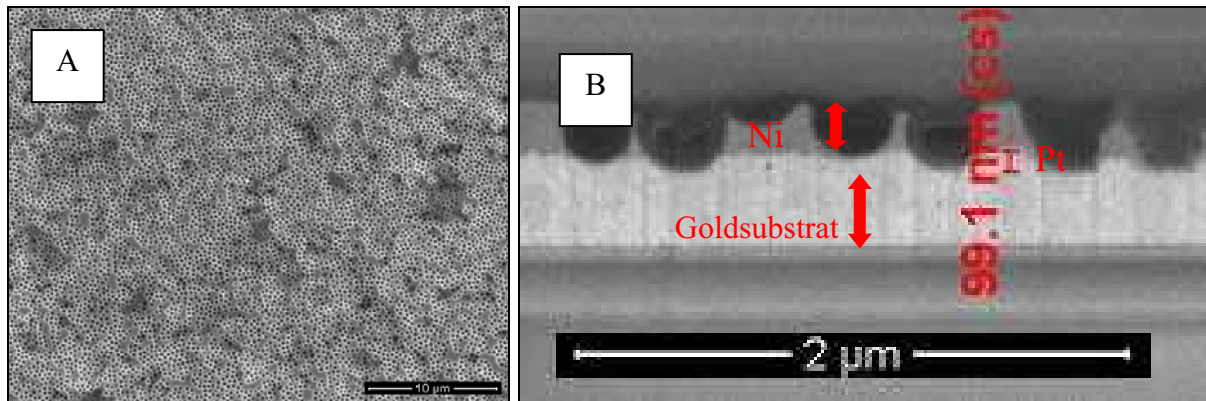


Abbildung 140: (A) Vollständig homogene Porenverteilung über die komplette Golddektrodenoberfläche; (B) Poröse Monolage aus $\frac{1}{4}$ aus Platin (ca. 100 nm) im Bodenbereich, $\frac{1}{2}$ aus Nickel und im letzten $\frac{1}{4}$ oben offenporig.

Diese Probe wurde mittels einer Metallabscheidung in einen kolloidalen Kristall aus PS-Partikel mit einem Partikeldurchmesser von ~ 300 nm erhalten. Die Elektroabscheidungszeit betrug jeweils für Platin und Nickel 120 Sekunden. Durch diese Abscheidezeiten wurde eine Poren-Monolage einer Pt-/Ni-Schicht erhalten. Die Schichtdicke des porösen Platins betrug knapp 100 nm, sodass lediglich der Porenboden aus Platin besteht. Eine Pore besteht somit von unten nach oben aus $\sim 1/5$ Platin und $4/5$ Nickel. Dies würde theoretisch ausreichen, um Wasserstoff herzustellen. Dieser könnte dann gleich in derselben Pore zur Hydrierung an der Nickeloberfläche zur Verfügung stehen.

Die folgende Probe wurde nach dem gleichen Prinzip hergestellt, wobei nun die Elektroabscheidungszeit auf 5 Minuten je Metall erhöht wurde:

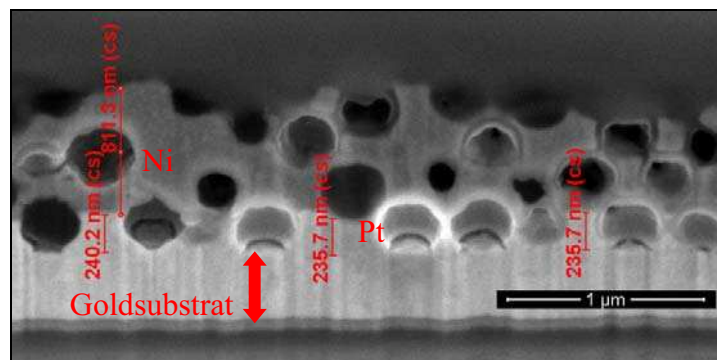


Abbildung 141: (A) Schichtdicken der porösen Pt- (~ 235 - 240 nm) und Ni-Schicht (~ 810 nm).

Die sehr gut geordneten Porenstrukturen und Verbindungskanäle zwischen den Poren sind in den zwei folgenden REM-Aufnahmen vergrößert dargestellt:

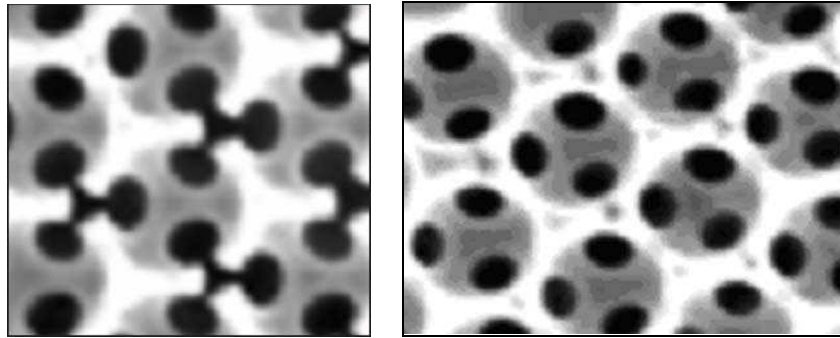


Abbildung 142: Vergrößerungen von Poren mit sehr gleichmäßigen Anordnungen und mit deutlich sichtbaren Verbindungskanälen.

Die Poren zeigten eine perfekte Anordnung. Die Verbindungen in die unteren Schichten waren sehr gut sichtbar und somit wurde die vollständige Verbundenheit der Poren untereinander deutlich. Nachstehend sind FIB-Querschnitte zu sehen, die verschiedene Templatdicken repräsentieren. Im linken Bild war die Metallabscheidung nicht so weit fortgeschritten wie die im rechten Bild. Die verwendeten Partikel für den Templating-Prozess besaßen einen Durchmesser von ~ 535 nm.

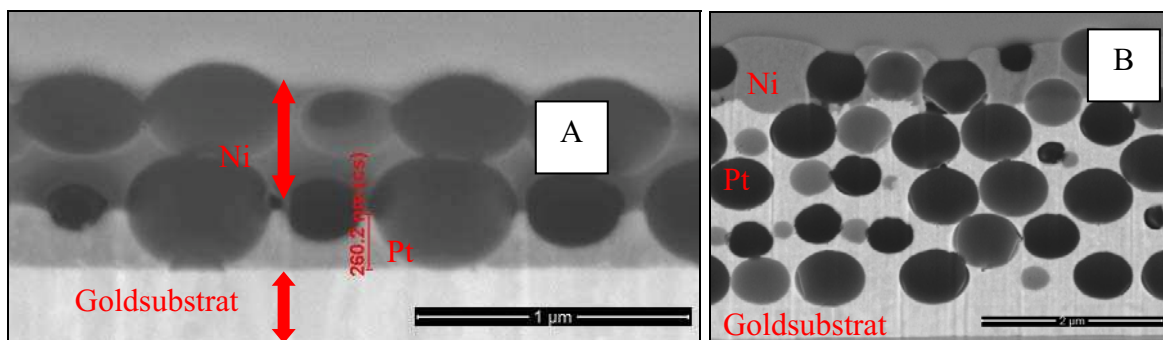


Abbildung 143: FIB-Querschnitte von Elektroden mit (A) einer halben Pt-Porenschicht und einer direkt anschließenden $1 \frac{1}{4}$ Ni-Porenschicht und (B) mit 4 Porenschichten aus Platin und anschließender Nickelmonoschicht.

Anhand der Aufnahmen war sehr gut zu erkennen, dass die Abscheidungen beider Metalle in die Zwischenräume der kolloidalen Kristalle deutlich voneinander separierte Schichten ergaben. In Abbildung 143 (A) war die halbe Monolage aus Platin ca. 260 nm dick und grenzte direkt an die Nickelschicht, die aus $1 \frac{1}{4}$ Porenlage bestand. Das würde bedeuten, dass in der unteren Porenlage, wo der Porenboden aus Platin bestand, Wasserstoff elektrochemisch entwickelt werden konnte und anschließend gleich in derselben Porenlage zur Adsorption an Nickel zur Verfügung stehen konnte. Somit könnte die Hydrierung eines in die Poren diffundierten Edukts ausgelöst werden. Abbildung 143 (B) zeigt dagegen ein dickes Pt-Templat aus 4 Porenlagen, gefolgt von einer Monolage Nickel. Nachstehend sind eine Oberfläche einer hoch porösen Pt/Ni-Katalysatorelektrode und der dazugehörige Querschnitt dargestellt:

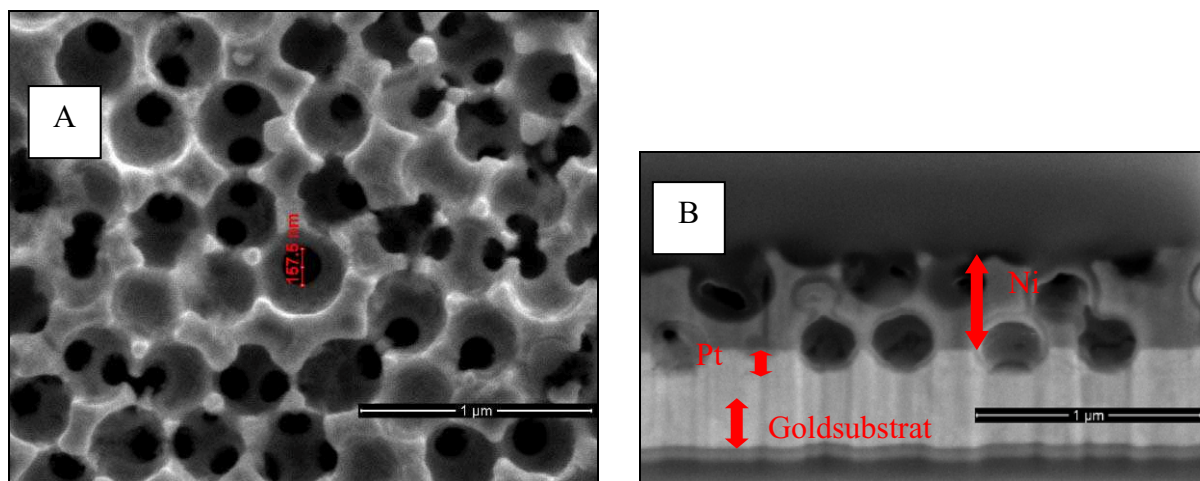


Abbildung 144: Oberfläche eine hoch porösen Pt/Ni-Katalysatorelektrode (A) und (B); Querschnitt durch die Pt/Ni-Schicht (C).

Eine Element-Mapping-Untersuchung war bei der Verwendung von Platin und Nickel nicht nötig, da beide Metalle genügend unterschiedlich große molare Massen besitzen. Somit wurde ein ausreichender Kontrast zwischen den beiden Metallen sichtbar und die verschiedenen Materialien waren in den REM-Abbildungen mit bloßem Auge unterscheidbar. Bei Metallen, die ähnliche Atommassen besitzen, ist eine solche Unterscheidung durch Kontrast nicht möglich.

Es wurden bereits Experimente für eine Anwendung dieser Multikatalysatorschichten durchgeführt. Zuerst wurde eine passende Modellreaktion gefunden, die von den Potentialen her passte. Als einfaches und kleines Molekül wurde Aceton gewählt. Nachstehend sind zyklische Voltammogramme der elektrochemischen Versuche der Elektrodenmaterialien Platin und Nickel von 0,1 M NaCl und mit Zusatz von 1 M Aceton im Vergleich gezeigt:

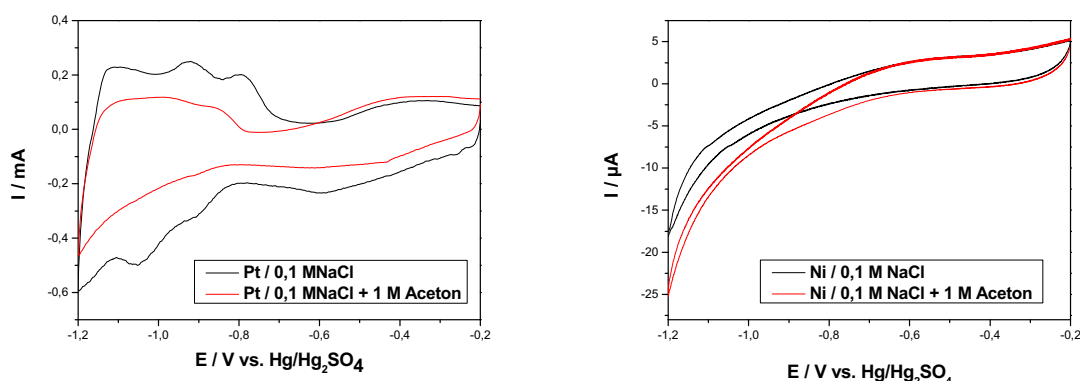


Abbildung 145: Zykl voltammogramme je von Nickel und Platin in 0,1 M NaCl und mit Zusatz an Aceton.

Es wurde jeweils der zweite Zyklus der CVs genommen, um einen experimentell übereinstimmenden Vergleich durchführen zu können. Es sollte herausgefunden werden, wie sich das Deckschichtdiagramm an Platin bei Zugabe von Aceton ändert. Des Weiteren dienen

diese Versuche dazu zu sehen, ob sich diese Nickelschicht für die Hydrierung von Aceton eignet. An Platin sind keine zusätzlichen Reaktionspeaks bei Zugabe von Aceton zu beobachten, was für eine Verwendung des Materials für die in-situ-Wasserstoffherstellung spricht, während Aceton hinzugegeben wird. Der Wasserstoffreduktionsbereich blieb immer noch in dem Platin-Deckschichtdiagramm erhalten. An Nickel scheint ab einem Potential von - 0,6 V eine Reduktion von Aceton möglich. Es wurde anschließend eine Hydrierung von Aceton (0,33 M) in 0,1 M NaCl-Lösung durchgeführt. Das angelegte Potential betrug - 1,0 V. Die zuvor hergestellte Elektrode bestand aus einer porösen Pt-Ni-Schicht, wobei jedes Metall jeweils 300 Sekunden abgeschieden wurde. Nachstehend ist die Chronoamperometrieurve dargestellt:

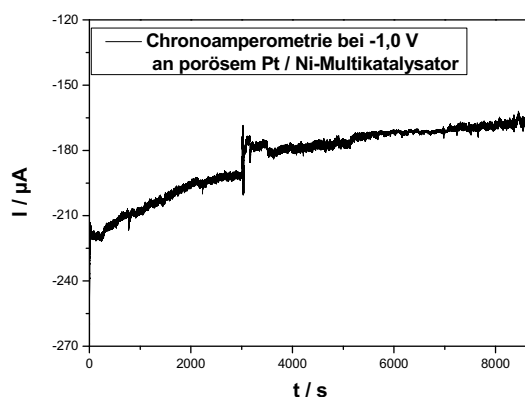


Abbildung 146: Chronoamperometrie bei - 1,0 V an einer porösen Pt/Ni-Katalysatorelektrode, um einen Umsatz von Aceton zu Isopropanol semi-elektrochemisch durchzuführen.

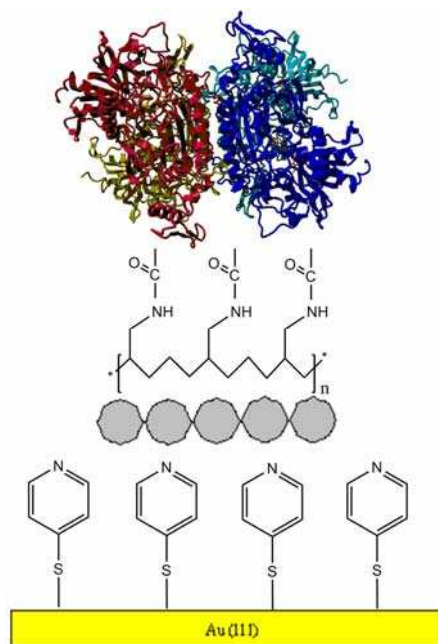
Das deutliche Rauschen und die Schwankungen in der Strom-Zeit-Kurve kommen wahrscheinlich durch die Wasserstoffentwicklung zu Stande. Durch das Ablösen der Gasblasen von der Elektrode entstand eine Diskontinuität im Verlauf der Kurve, was aber keine Auswirkungen auf die eigentliche Reaktion hat.

Abschließend lässt sich sagen, dass ein poröses Mutischichtkatalysatorsystem erfolgreich aufgebaut wurde, wobei die einzelnen Schichtdicken variiert werden konnten. Eine passende Modellreaktion zur Anwendung eines solchen Multikatalysatorsystems wurde gefunden.

3.6: Nanostrukturierte Oberflächen für Biofunktionalisierung

Im abschließenden Kapitel dieser Arbeit soll nun auf eine weitere Möglichkeit eingegangen werden, um Elektrodenoberflächen signifikant zu vergrößern. Es wurden nur wenige Nanometer großen Platin-Inseln mit monoatomarer Schichtdicke hergestellt, die durch Kombination aus stromloser und elektrochemischer Abscheidung ^[142, 143] auf einer SAM (Self-assembled Monolayer/selbstorganisierende Monoschicht) aus Mercaptopyridineinheiten (4-Mercaptopyridin) gebildet wurden ^[144]. Diese Abscheidekombination bietet den Vorteil, dass einerseits die Nachteile der stromlosen Abscheidung wie keine exakte Kontrolle des Abscheidungsprozesses, aber andererseits auch die Nachteile der elektrochemischen Abscheidung wie Zerstörung oder Unterhöhlung der SAM umgangen werden ^[143-145]. Diese nanoskalige Oberflächenstrukturierung bot eine gute Grundlage für eine Biofunktionalisierung, wobei ein Glucosesensor erster Generation entstand. Die hier gezeigten Resultate knüpfen an Vorarbeiten von vorherigen Arbeiten an ^[146] und erbrachten neue Ergebnisse sowohl in Bezug auf die signifikante Erhöhung der Stromdichte als auch bei den STM-Untersuchungen.

Auf die Pt-Inseln wurde eine Polymerschicht von Polyallylamin-Hydrochlorid (PAA) aufgebracht, die zur Immobilisierung des Enzyms Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) ^[147, 148] dient. Folgender Schichtaufbau wurde für die Elektrodenmodifizierung durchgeführt:



**Abbildung 147: Schematischer Elektrodenaufbau:
Au(111) / SAM / Pt-Inseln / PAA / P2OxB1H.**

Als Substrate wurden kommerzielle Au(111)-Elektroden (Firma Arrandee) verwendet, die aus einer dünnen Au(111)-Schicht der Dicke 250 ± 50 nm bestehen. Die Gold-Schicht ist auf dünne Borsilikatglasplatten der Dicke $0,7 \pm 0,1$ mm aufgebracht. Als Haftvermittlungsschicht dient eine Cr-Schicht der Dicke $2,5 \pm 1,5$ nm. Bevor die SAM aus 4-Mercaptopyridineinheiten aufgebracht wurde, wurde die Goldelektrode mit einer Butangasflamme ausgeglüht; dies führt zum Ausbilden von gut definierten Au(111)-Terrassen. Alle Glaszellen und Glasgeräte, sowie jeglicher Zubehör wie Zangen, Rührmäuse und Teflonteile mussten vor den Messungen speziell gereinigt werden, da die Herstellung der Pt-Inseln höchste Sauberkeit verlangte. Dazu wurde eine Mischung aus konzentrierter H_2SO_4 und H_2O_2 (30%) („Piranha-Wasser“) im Verhältnis 3:1 angesetzt. Alle zu reinigende Geräte wurden mindestens 24h in das Piranha-Wasser gestellt. Nach einer genügend langen Behandlung mit der aggressiven Säure-Peroxid-Mischung wurden diese mit entionisiertem Wasser insgesamt mindestens 2,5 h ausgekocht, wobei das Wasser alle 30 min erneuert wurde, um kleinste Verschmutzungen zu entfernen.

Für die elektrochemischen Methoden, wie zyklische Voltammetrie (CV) und Chronoamperometrie (CA) wurde ein Platinblech als Gegenelektrode und eine Kalomelelektrode $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ (SCE) als Bezugselektrode verwendet. Die Versuchsanordnung bediente sich einer Haber-Luggin-Kapillare, um die Bezugselektrode so nahe wie möglich an die Arbeitselektrode heran zu führen. Dadurch wurde der Elektrolytwiderstand, der Ohmsche Spannungsabfall (IR-drop) zwischen den beiden Elektroden minimiert ^[1].

$$E_{\text{AE}} = E_{\text{Potentiostat}} - I(t) R$$

Die Glaszelle, die zur Herstellung der SAM und der Pt-Inseln diente, wurde inklusive der Haber-Luggin-Kapillare während der ganzen Messzeit und mindestens 2 h vor den Messungen mit einem kontinuierlichen Stickstofffluss von 50 mL/min inertisiert. Die Zelle wurde zuvor sorgfältig zusammengesetzt und mit einer hoch reinen H_2SO_4 -Lösung (0,1 M) als Elektrolyt gefüllt.

Die Lösung zur Herstellung der SAM bestand aus einer ~ 20 μM Lösung von 4-Aldrithiol (4,4-Dipyridin-disulfid, Py-S-S-Py), welche mit destilliertem Wasser bereitet wurde, wobei das Wasser vor Zugabe des 4-Adrithiols mindestens 1 h mit Argon gespült werden musste, um die Oxidation des Aldrithiols durch den Luftsauerstoff zu unterbinden ^[144]. 4-Aldrithiol eignet sich sehr gut zu Oberflächenmodifizierung, da die S-S-Bindung des Moleküls spontan durch die Affinität des Schwefels zu Gold gespalten wird und das Molekül ein delokalisiertes

π -Elektronensystem besitzt. Es bietet daher einen guten Elektronentransport zur Elektrodenoberfläche^[149-151]. Bei der Spaltung des Moleküls entstehen zwei adsorbierte Py-S-Moleküle. Der Schwefel ist in diesem Fall kovalent gebunden^[152], wobei die Distanzierung zwischen kovalenter und koordinativer Bindung in den Fällen verschiedener Au-S-Bindungen nicht immer eindeutig ist.

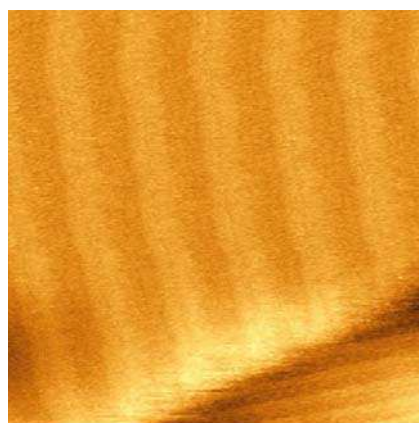
Zur Darstellung 0,1 mM Platinlösung zur Abscheidung der Pt-Inseln wurde K_2PtCl_4 verwendet, welches in 0,1 M H_2SO_4 gelöst wurde^[143]. Zur Herstellung der Polymerlösung wurde eine 500 μM Polyallylamin-Hydrochloridlösung (PAA) benutzt, wobei eine Pufferlösung (pH 7) aus 50 mM KH_2PO_4 / 50 mM KCl als Solvenz wegen der Beständigkeit der SAM und der Pt-Inseln verwendet wurde. Der pH-Wert der präparierten Pufferlösung betrug $\sim 5-6$; dies gewährleistete, dass das PAA protoniert vorlag und somit eine bessere Adsorption auf den Platininseln induziert wurde. Das PAA wurde durch elektrostatische Kräfte an das Metall adsorbiert^[153, 154]. Die Enzymlösung der Pyranose-2-Oxidase hatte eine Enzymkonzentration von 8 U/mL. Als Kopplungsreagenzien wurden 15 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 30 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) verwendet, welche beide in Puffer gelöst wurden. Zur Kopplung wurden die Kopplungsreagenzien mit der Enzymlösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die spätere Glucoseumsetzung wurde eine 1M Glucose-Stammlösung verwendet.

Vor der Modifizierung der Au(111)-Elektrodenoberfläche war zu prüfen, ob die Zelle funktionstüchtig ist. Dafür wurden zyklische Voltammogramme von Au(111) in 0,1 M H_2SO_4 -Lösung aufgenommen. Hierzu wurden die Au(111)-Blättchen 5 min unter Rotglut getempert und - unter einer Potentialkontrolle von - 200 mV - in die Sauerstofffreie Zelle eingetaucht. Es war die Konstanz der Stromstärke abzuwarten, bevor die Aufnahme eines CVs gestartet werden konnte. Auf diesem Wege sollte eine spezifische Adsorption von Sulfatanionen vermieden werden^[155]. Als Elektrolyt diente 0,1 M H_2SO_4 und die Vorschubgeschwindigkeit betrug 10 mV/s, wobei ein Potentialfenster von - 300 mV bis +850 mV vs. SCE gewählt wurde. Der Strom-Spannungs-Verlauf dieses Au(111)-Zyklovoltammogramms zeigte die charakteristischen Spikes für Au(111) bei ca. + 780 mV. Diese Spikes spiegelten den Phasenwechsel von ungeordneter zu geordneter adsorbierter Sulfatschicht wider. Unterhalb eines Potentials von - 100 mV war im STM eine typische Fischgrätenstruktur zu erkennen, welche ab einem Potential von ca. + 320 mV aufgehoben wird^[155].

Für die weitere Modifizierung der Au(111)-Oberfläche wurde nach der gleichen Verfahrensweise vorgegangen. Die Elektrode wurde 5 min bei Rotglut getempert und

anschließend 5 min in die 4-Aldrithiollösung getaucht. Nach Entfernen der Elektrode aus der Thiollösung wurde diese mit entionisiertem Wasser vorsichtig gespült, um ungebundene Thiolmoleküle zu entfernen. Zur Kontrolle wurde ein zyklisches Voltammogramm der adsorbierten SAM-Schicht aufgenommen. Dadurch konnte überprüft werden, ob die Thiollösung intakt war und die Adsorption der 4-Mercaptopyridineinheiten auf die Elektrodenoberfläche stattfand ^[144, 145]. Die modifizierte Elektrode wurde erneut unter Potentialkontrolle von - 200 mV in die Zelle eingetaucht. Im Folgenden ist ein CV einer solchen SAM-modifizierten Au(111)-Elektrode in 0,1 M H₂SO₄-Lösung bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 mV/s gezeigt. Das CV wurde bei + 200 mV gestartet, bis zu dem Umkehrpunkt von - 200 mV und dann in den Oxidationsbereich von + 750 mV gefahren. Als Referenzelektrode diente wieder eine Kalomelelektrode.

Die CV-Experimente ließen unschwer erkennen, dass keine charakteristischen Goldpeaks mehr auftreten. Ein reversibler Peakverlauf eines Oxidations- und Reduktionspeak war deutlich bei ~ + 380 mV und + 340 mV zu erkennen. Diese Peaks stellen den Übergang von geordneter zu ungeordneter SAM-Struktur dar. Bei einem Potential oberhalb + 380 mV geht die geordnete Struktur verloren ^[155]. Die in diesem Kapitel folgenden STM-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Mila Manolova am Institut für Elektrochemie in Ulm in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kolb während eines Forschungsaufenthalts aufgenommen. Nachfolgend ist ein STM-Bild einer SAM gegeben, welches bei einem Potential von 0,0 V vs. SCE in 0,1 M H₂SO₄ aufgenommen wurde. Die Elektrode wurde zuvor 5 min mit der 4-Aldrithiollösung behandelt.



15 x 15 nm²

Abbildung 148: STM-Bild einer SAM in 0,1 M H₂SO₄ bei 0,0 V vs. SCE aufgenommen.

Das STM-Bild illustriert einen geordneten Ausschnitt einer SAM. Im unteren Abschnitt des Bildes ist eine Stufe zu erkennen, welche den Übergang zu der nächsten geordneten, um 60° gedrehten PyS-Domäne darstellt. Das 4-PyS bildet große geordnete Bereiche aus; dies spricht

für eine gute Basis für die weitere Modifizierung der Elektrode. Die STM-Messungen wurden mit Pt-Ir-Spitzen im Verhältnis 80 : 20 durchgeführt. Die Spitzen wurden aus einem in einer 3,4 M NaCN-Lösung elektrochemisch angeätztem Draht (0,25 mm dick) gefertigt, wobei der Draht flachgedrückt und die Spitze abgeschnitten wird. Danach werden die Spitzen mit einem Tauchlack überzogen und für ca. 10 min im Ofen bei $\sim 190^\circ \text{C}$ getempert. Dabei wird die Spitze nach oben positioniert, sodass der geschmolzene Lack nach unten laufen kann und die Spitze freigelegt.

Die mit dem Thiol modifizierte Elektrode wurde anschließend für 15 min mit der Platinlösung behandelt und danach wieder mit destilliertem Wasser vorsichtig gespült. Beim Eintauchen der Elektrode in die Pt(II)-Lösung wurden die Pt(II)-Ionen am Pyridin-Stickstoff der SAM komplexiert und im Folgeschritt elektrochemisch zu Pt(0) reduziert ^[143]. Daraufhin wurde die modifizierte Goldelektrode unter Potentialkontrolle bei + 150 mV vs. SCE in die vorbereitete, mit Stickstoff gespülte elektrochemische Glaszelle eingetaucht. Eine Konstanz der Stromstärke wurde wiederum abgewartet, bevor CV-Messungen gestartet wurden. Die CVs wurden bei einem Potential von + 700 mV begonnen, in den kathodischen Bereich bis zu einem Umkehrpotential von - 200 mV gefahren und der Rückweg bei + 200 mV gestoppt. Die eingestellte Vorschubgeschwindigkeit betrug 5 mV / s. Nach dem ersten CV wurden nun weitere CVs gefahren, nun jedoch beginnend bei + 200 mV mit den Umkehrpunkten - 200 mV im kathodischen Bereich und + 700 mV im anodischen Bereich. Der Reduktionspeak des Pt(II) sollte nach dem ersten CV nicht mehr zu beobachten sein, da die Reduktionsreaktion irreversibel ist. Der erste Zyklus steht für die elektrochemische Reduktion des komplexierten Pt(II) zu Pt(0). Im Idealfall entsteht bei ca. + 250 mV der Reduktionspeak des Platins, dessen Erscheinung von der Kristallqualität und dem Abstand Kristall - Haber-Luggin-Kapillare abhängt. Ob der Reduktionspeak vorhanden ist oder nicht gibt keinerlei Auskunft, ob Platininseln auf der SAM gebildet wurden. In vorangegangenen Untersuchungen wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kolb aus Ulm nachgewiesen, dass die Platininseln auch vorhanden sind, wenn der Reduktionspeak zuvor nicht sichtbar war. Der zweite und dritte Zyklus weist keinen Reduktionspeak mehr auf, falls dieser zuvor sichtbar wurde, wegen der Irreversibilität der Reduktion. Der Belegungsgrad der Elektrode mit Pt-Inseln kann durch Verkürzung bzw. Verlängerung der Komplexierungszeit variiert werden, wie durch die Arbeitsgruppe von Prof. Kolb gezeigt wurde ^[143, 156]. In dieser Arbeit wurde normalerweise eine optimale Komplexierungszeit von 15 min gewählt, manchmal auch 2 min.

Zur Visualisierung werden anschließend STM-Aufnahmen verschiedener Vergrößerungen ($200 \times 200 \text{ nm}^2$, $100 \times 100 \text{ nm}^2$, $25 \times 25 \text{ nm}^2$) einer mit Pt-Inseln modifizierte Elektrode

gezeigt. Die Aufnahmen wurden in 0,1 M schwefelsauren Lösung aufgenommen. Das Potential betrug 0,0 V vs. SCE.

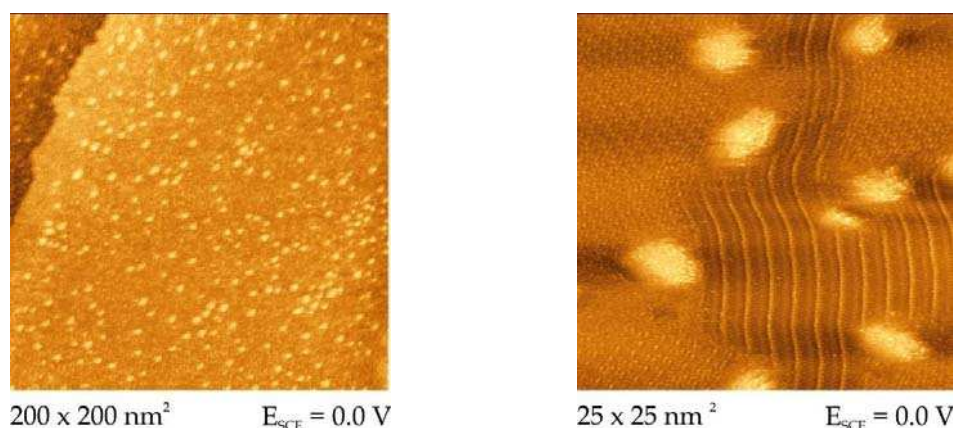


Abbildung 149: STM-Bilder von mit Pt-Inseln modifizierten Elektroden in 0,1 M H₂SO₄ bei 0,0 V vs. SCE aufgenommen; links Modifikationszeit von 15 min, rechts 2 min).

Die Aufnahmen wurden in 0,1 M schwefelsauren Lösung aufgenommen. Das Potential betrug 0,0 V vs. SCE. Die Pt-Inseln zerstören lokal die geordnete SAM. Die Inseln scheinen wie Defekte auf die SAM zu wirken. Bei dem linken Bild bei einer Modifikationszeit mit Platinlösung von 2 min war die Anzahl der Pt-Inseln auf der Oberfläche geringer als im Falle einer Modifikationszeit von 15 min). Daher ließen sich links in der Abbildung geordnete PyS-Strukturen beobachten. Sobald die Inseln dargestellt waren, wurde die Elektrode für 5 min mit PAA-Lösung modifiziert, um somit eine Adsorption des positiv geladenen Polymers auf den Inseln zu erreichen. Anschließend erfolgte eine erneute Waschung mit destilliertem Wasser und die Elektrode wurde gleich im Anschluss für 1 h bei Raumtemperatur in die Mischung einer Enzymlösung mit Kopplungsreagenzien EDC / NHS^[157] getaucht. Folgende Reaktionen laufen bei der Prozedur ab:

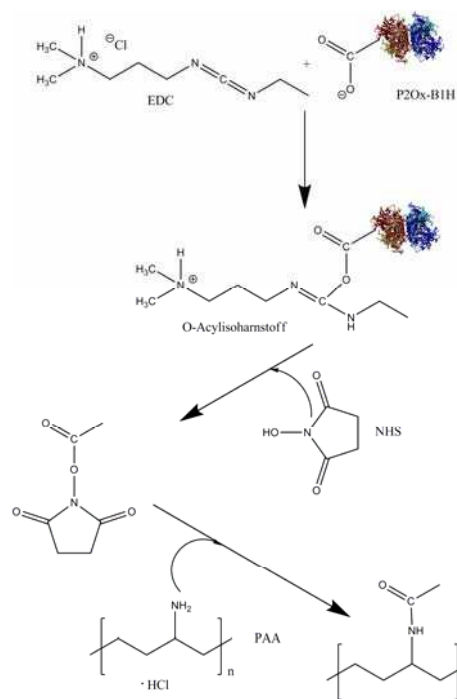


Abbildung 150: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen Enzym, PAA und EDC/NHS.

Es handelt sich um eine Amidierungsreaktion, wobei eine Peptidbindung ausgebildet wird. Dabei dient das EDC als Aktivator der COO^- -Gruppe des Enzyms. Nach Aktivierung der Carboxylgruppe bildet das NHS mit selbiger Carboxylgruppe einen NHS-Ester, der dazu dient, das PAA am Stickstoffatom anzugreifen. Es kommt zu einer Ausbildung einer Peptidbindung. Somit ist das Enzym kovalent an das PAA gebunden.

Es wurden STM-Aufnahmen von vollständig modifizierten Elektroden gemacht. Dazu wurden die Elektroden 5 min mit dem 4-Aldrithiol, 2 min mit Platin, 5 min mit dem PAA und 1 h mit der P2Ox-B1H modifiziert. Die Aufnahmen wurden bei 0,5 V vs. SCE aufgenommen. Nachstehend wird eine STM-Aufnahme einer vollständig modifizierten Elektrode der Schichtzusammensetzung Au(111) / SAM / Pt-Inseln / PAA / P2Ox-B1H gezeigt. Die Aufnahmen wurden wegen des Enzyms in Kaliumphosphatpuffer bei pH 7 gemacht.

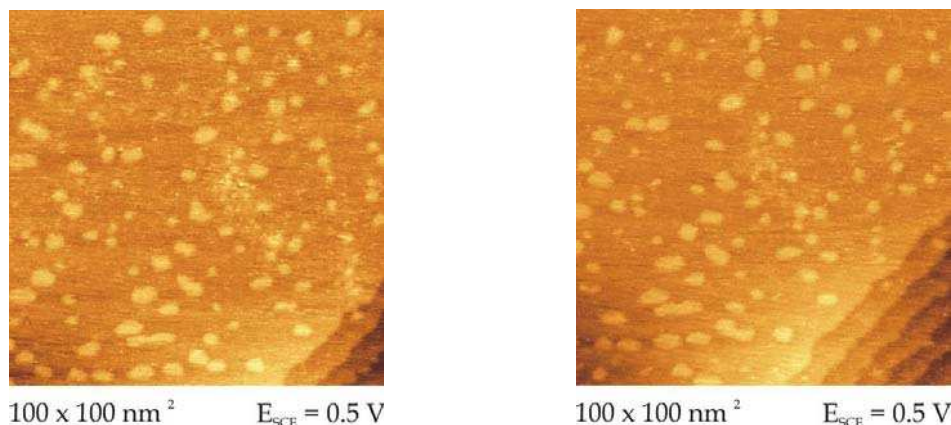


Abbildung 151: STM-Aufnahmen mit einer Vergrößerung von $100 \times 100 \text{ nm}^2$ einer vollständig modifizierten Elektrode. Die STM-Bilder wurden bei 0,5 V in Kaliumphosphatpuffer aufgenommen.

Unten rechts in den Bildern sind die Stufenkanten der Goldterrassen zu sehen. Während des Abrasterns der Elektrodenoberfläche wurden die nun mit PAA und Enzym mit modifizierten Platin-Inseln verschoben. Nachstehend ist eine STM-Aufnahme gezeigt, bei der die Platin-Inseln durch Abrastern mit der STM-Spitze komplett verschoben wurden:

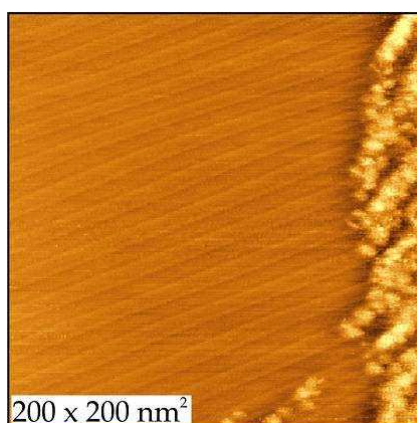


Abbildung 152: STM-Aufnahme einer vollständig modifizierten Elektrode (5 min PyS, 2 min Pt, 5 min PAA, 1 h P2OxB1H) bei + 0,5 V vs. SCE. Die Aufnahme zeigt, dass die Inseln durch das Abrastern vollständig verschoben wurden.

Normalerweise sind die unmodifizierten Platin-Inseln bei diesem Potential nicht durch das Abrastern verschiebbar, sondern stabil und bleiben auf ihren Plätzen lokalisiert. Die Tatsache, dass die modifizierten Platin-Inseln nun verschiebbar sind, ist ein Hinweis, dass eine feste Platin-Polymer-Enzym-Bindung vorherrscht, und somit eine Modifizierung der Inseln stattgefunden hat. Die unmodifizierten Inseln sind bei gleichen Bedingungen nicht verschiebbar. Nachstehend sind die Vorgänge des mehrmaligen Abrasterns mit der STM-Spitze und der von der mehrmals abgefahrenen Oberfläche danebenliegende Oberflächenstelle gezeigt:

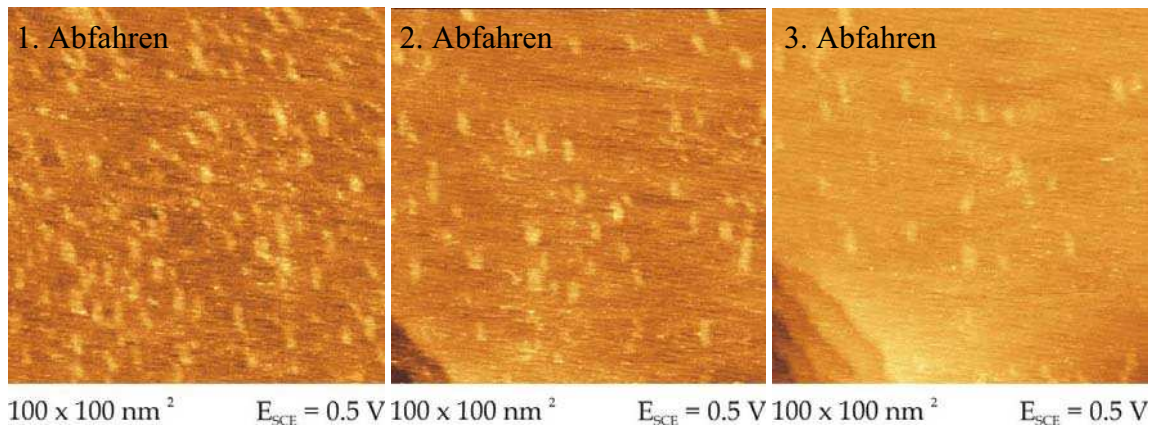


Abbildung 153: Visualisierung des Abfahrvorgangs (Abfahren 1-3) und die damit verbundene Verschiebung der Inseln. Die drei STM-Aufnahmen zeigen nacheinander die Oberfläche nach erneutem Abfahren. Die Inseln werden nach und nach vollständig verschoben.

Die in Abbildung 153 dargestellte Stelle weist eine komplette Verschiebung der Inseln auf, die theoretisch auf einer Stelle neben der abgefahrenen Stelle liegen müssten. Daher wurde rechts von der in Abbildung 153 gezeigten Stelle untersucht, ob die Inseln dort aufzufinden waren. In der Tat wurden drei akkumulierte Inselstreifen gefunden, welche nach erneutem Abbilden ebenso verschwanden. Dieser Prozess wird in Abbildung 154 visualisiert:

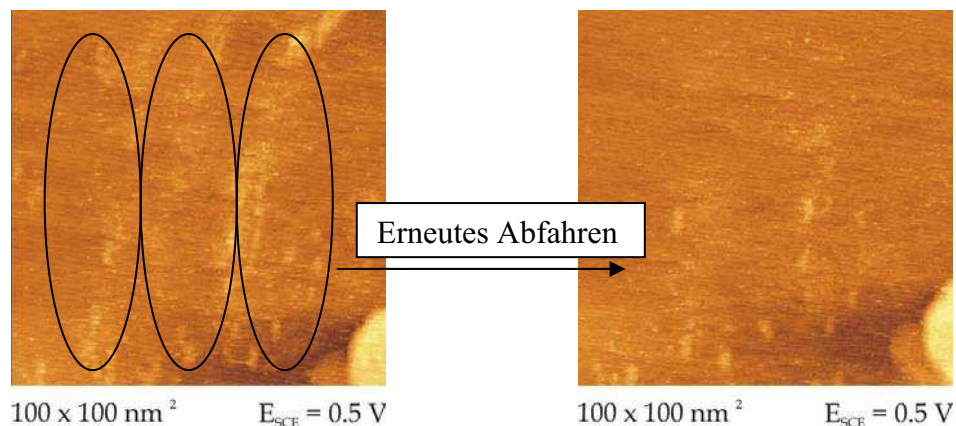


Abbildung 154: STM-Aufnahmen von einer Stelle, die rechts neben der in Abbildung 161 gezeigten Stelle liegt. In der linken Aufnahme sieht man drei von oben nach unten verlaufende Streifen, die die zuvor verschobenen, akkumulierten Inseln darstellen. In der linken Aufnahme wurde die gleiche Stelle erneut untersucht, wobei die Inseln erneut verschoben wurden.

Nun wurde die Modifizierung elektrochemisch getestet. Die fertig modifizierte Elektrode wurde in eine zweite Glaszelle transferiert, um nun mittels Chronoamperometrie die Umsetzung von D-Glucose zu D-Glucoson zu verfolgen. Es handelt sich um eine unten konisch zulaufende Zelle, um optimalen Umsatz zu gewährleisten. Ein Spülen der Zelle mit Stickstoff oder Argon wurde nicht durchgeführt, da der Luftsauerstoff der katalytischen

Enzymreaktion diene. Der Elektrolyt war ein Phosphat-Puffer aus 50 mM KH_2PO_4 / 50 mM KCl. Die Lösung wurde sehr langsam gerührt und es wurde ein sehr kleines Volumen ausgewählt. Die Beobachtung der Substratumsetzung mittels Chronoamperometrie wurde bei einem Potential von + 560 mV vs. SCE unter leichtem Rühren verfolgt. Die Zugabe der Glucose (1M) erfolgte in zeitlich konstanten Zugabeschritten mittels eines automatischen Titrators, der eine exakt definierte Zugabemenge gewährleistet. Die Glucose wurde dabei von der P2Ox-B1H umgesetzt und gleichzeitig vom Enzym H_2O_2 - als Nebenprodukt - produziert. Das gebildete Wasserstoffperoxid wird elektrochemisch an der Goldelektrodenoberfläche detektiert; dies bedingt einen Stromanstieg im Chronoamperogramm. Im Folgenden ist der Prozessablauf an der Elektrodenoberfläche des Biosensorsystems erster Generation dargestellt:

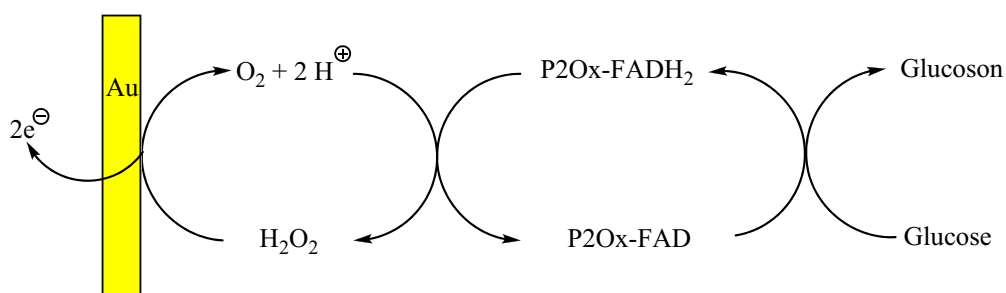


Abbildung 155: Reaktionsablauf an der Elektrodenoberfläche.

Abbildung 155 beschreibt den Elektrodenaufbau. Bei der Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) handelt es sich, wie zuvor in Kapitel 2.2.1 beschrieben, um ein Flavoenzym; selbiges hat demnach ein Flavinnucleotid (FAD) als Cofaktor pro Untereinheit gebunden. Die P2Ox katalysiert die Dehydrogenierung der Glucose unter Sauerstoffverbrauch, wobei sich Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt bildet. Der kovalent gebundene Cofaktor FAD im Inneren des Moleküls wird simultan zur Substratumsetzung reduziert und im Anschluss daran durch den Sauerstoff wieder oxidiert. Das Produkt, ein Dicarbonyl-Zucker zeigt sich für verschiedene Synthesen - z.B. von Feinchemikalien und seltenen Zuckern - von Interesse ^[158]. An diesem Punkt wäre die Tatsache der signifikant verbesserten Produktausbeute mit diesem neuen Schichtaufbau sehr erforschenswert.

Das Wasserstoffperoxid wurde während der chronoamperometrischen Experimente elektrochemisch erfasst. Dieses aufgebaute Schichtsystem repräsentiert einen Biosensor, bei dem die Pyranose-2-Oxidase mit seinem kovalent gebundenen FAD den biologischen Part übernimmt und Glucose detektiert werden kann. Da bei der Zuckersetzung

Wasserstoffperoxid entsteht und dieses elektrochemisch detektiert wird, handelt es sich bei diesem System um einen Sensor erster Generation.

Die Glucose wurde bei den chronoamperometrischen Experimenten schrittweise kontinuierlich addiert. Der bei gleicher Stoffmengenzugabe stufenweise angestiegene Strom ist ein Indiz, dass pro Stromplateau keine 100%ige Stoffkonversion der Glucose stattfand. Dies wurde auch durch Testberechnung mittels des 2. Faradayschen Gesetzes bestätigt.

Warum die aufwendigere Prozedur der Platininselherstellung von Bedeutung ist und auf eine einfache Platinelektrodenoberfläche zur Biofunktionalisierung verzichtet wurde, das sollen folgende Untersuchungen und Ergebnisse demonstrieren. Die Experimente wurden mit einem polykristallinen Platinblech durchgeführt, wobei gleiche Prozedur und gleiche Modifizierungszeiten eingehalten wurden, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Hierzu wurde ein polykristallines Platinblech 5 min mit PAA und 1 h mit P2Ox-B1H modifiziert und im Anschluss die Glucoseumsetzung elektrochemisch detektiert. Es war zu beobachten, dass im Falle des biofunktionalisierten Platinbleches eine deutlich niedrigere Stromdichte bei Substratzugabe detektiert wurde und ein schnelleres Eintreten des Sättigungsstroms zu beobachten war. In Abbildung 156 sind Vergleichsmessungen dargestellt, die während der vorliegenden Arbeit erhalten wurden. Sie unterstreichen den Vorteil der Modifizierung der Platin-Inseln.

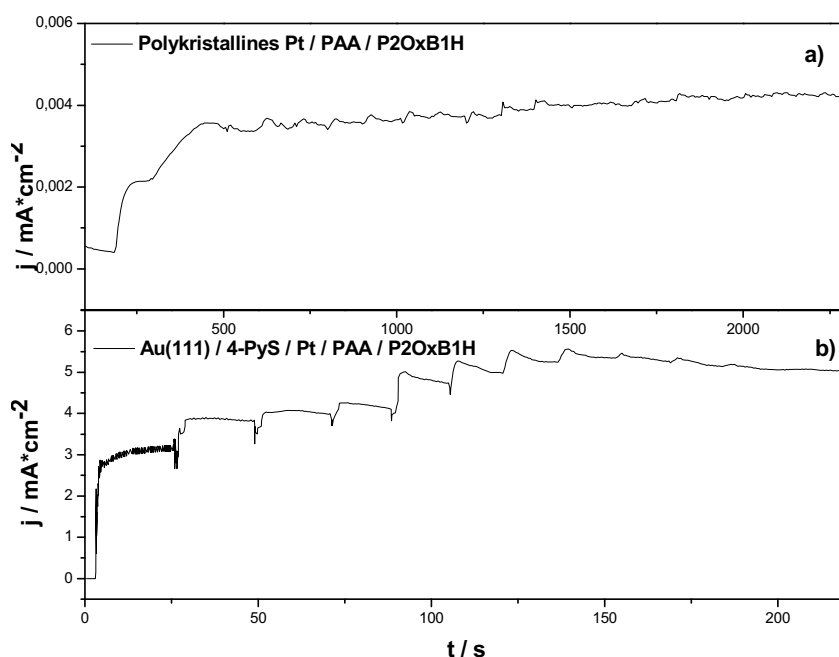


Abbildung 156: Vergleich zweier chronoamperometrischen Messungen nach sukzessiver Zugabe von D-Glucose bei + 560 mV vs. SCE:

- a) mit polykristallinem Pt / PAA / P2OxB1H**
- b) mit Au(111) / 4-PyS / Pt / PAA / P2OxB1H.**

Beide Messungen zeigen, dass unter Verwendung eines biofunktionalisierten, polykristallinen Platinblechs (a: polykristallines Pt / PAA / P2Ox-B1H) eine deutlich niedrigere Stromdichte erreicht wurde, wobei unter der Verwendung der modifizierten Platinblechs (b: Au(111) / SAM / Pt-Inseln / PAA / P2Ox-B1H) eine enorm erhöhte Stromdichte detektiert wurde. Der Unterschied der gemessenen Stromdichten erreicht nahezu einen Faktor von 1000; dies manifestiert eine enorme Steigerung. Die beiden Kurven spiegeln den positiven Effekt der Verwendung der Platininseln wieder. Als Erklärung bietet sich die bessere Oberflächenstrukturierung der Elektrode und die somit bessere Zugänglichkeit der aktiven Zentren des Enzyms an. Eine Ein-Enzym-eine-Insel-Bindung könnte hier der Grund für den deutlichen Stromanstieg verantwortlich sein. Weil die in diesem Schichtsystem hergestellten Inseln ~ 6 nm groß sind und das immobilisierte Enzym ~ 8 nm, ist es gut möglich, dass diese Strukturierungsvorstellung vorliegt. Auf jeden Fall muss es eine bessere Anordnung geben, die eine bessere Enzymorientierung favorisiert als bei Gebrauch von polykristallinem Platin. Durch diese Art von Strukturierung bekommt ein einzelnes Enzymmolekül eine verbesserte Konformationsfreiheit, wodurch eine Verstärkung der Diffusionsprozesse der Glucosemoleküle zu den aktiven Zentren des Enzyms stattfindet. Durch die bessere Zugänglichkeit der Enzymkanäle, die zu den aktiven Zentren führen, kommt es zu einem verstärkten Massentransport zu den aktiven Zentren, wodurch eine höhere Umsatzrate bewirkt wird.

Um zu demonstrieren, dass das Platin allgemein der essentielle Part des Biosensorsystems ist, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Testreihe durchgeführt, wobei die Glucoseumsetzung ohne jeglichen Platinanteil in dem Schichtaufbau durchgeführt und elektrochemisch detektiert wurde. Folgender Schichtaufbau wurde zur Realisierung der Messungen gewählt: Au(111) / SAM / PAA / P2Ox-B1H. Dabei wurde folgendes chronoamperometrisches Ergebnis erhalten:

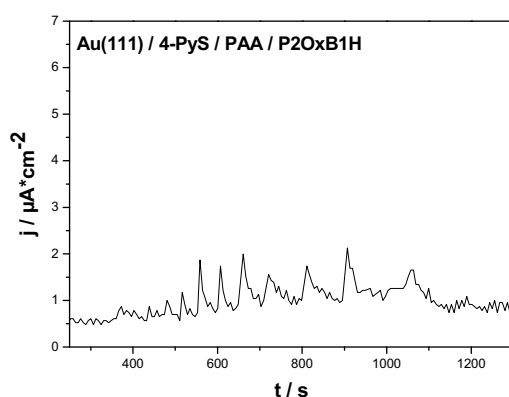


Abbildung 157: CA-Messung an dem Schichtaufbau Au(111) / SAM / PAA / P2Ox-B1H ohne Platin; keine Reaktion ist zu beobachten.

In der chronoamperometrischen Messung ist zu erkennen, dass bei Substratzugabe keine signifikante Erhöhung des Stroms zu erkennen ist. Lediglich die Zugabepeaks sind deutlich zu sehen. Somit wurde gezeigt, dass ohne Anwesenheit des Platins in jeglicher Form, sei es als Platin-Inseln oder auch als polykristallines Platinblech, keine elektrochemische Detektierung möglich ist. Des Weiteren wurde jede Schicht des Schichtsystems auf elektrochemische Aktivität getestet, um zu demonstrieren, dass keine Reaktion abläuft, ohne dass Enzym überhaupt vorhanden ist.

Nach den Messungen war es möglich, die Au(111)-Elektroden wiederzuverwenden. Dafür mussten diese zuvor bei 10 V für ein paar Sekunden elektropoliert werden. Als Elektrolyt wurde hierzu eine 0,1 M H_2SO_4 -Lösung und als Kathode eine Glaskohlenstoffelektrode verwendet. Durch diese Vorgehensweise wurden die Modifizierungsschichten von der Elektrodenoberfläche abgetragen. Anschließend wurden die Elektroden für ~ 2-3 Minuten in 1 M HCl getaucht, um die gebildeten Goldoxide zu entfernen. Im letzten Schritt wurden die Elektroden mit destilliertem Wasser gespült.

Diskussion:

Es konnte eine signifikante Erhöhung der Stromdichte durch die Oberflächenstrukturierung mittels nanoskaligen Platininseln erreicht werden, und es wurde gezeigt, dass die Platininseln den essentiellen Teil dieses Schichtaufbaus darstellen. Insgesamt lieferte dieser komplexe, durch einfaches Eintauchen hergestellte Schichtaufbau eine Grundlage für einen Biosensor erster Generation, der eine erhöhte Sensibilität besitzt, da bei der Modifizierung mit Platininseln im Vergleich zu polykristallinem Platin ein extrem erhöhter Stromumsatz bei der Glucosekonversion detektiert wurde. Neue Erkenntnisse mittels STM-Untersuchungen des komplett modifizierten Systems wurden ebenso erhalten.

Kapitel 4: Zusammenfassung & Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte im Rahmen des EU-Projektes ERUDESP eine elektrochemische Durchflusszelle erfolgreich entwickelt und in Gebrauch genommen werden. Durch zahlreiche Testreihen in Batchzellen, Mehrfachzellen und in einem Prototyp der Durchflusszelle konnte als Endziel eine elektrochemische Durchflusszelle entwickelt werden, die mittels einer halben MEA-Einheit sowohl für Oxidation als auch für Reduktion eingesetzt werden konnte. Diese Durchflusszelle steht für eine effizientere Produktumsetzung. Es konnten verschiedene elektroorganische und elektroenzymatische Reaktionen durchgeführt werden, die zuvor in Batchzellen getestet und im späteren Verlauf des Projektes auf das Format $6 \times 6 \text{ cm}^2$ der Durchflusszelle hochskaliert wurden. In der vorliegenden Arbeit konnte die elektroorganische Reduktion der Phenylglyoxylsäure mit anschließender Analytik erfolgreich durchgeführt werden. Auch die Oxidation von D-Sorbitol und die Reduktion von Fructose mit entsprechender Cofaktorregenerierung unter Verwendung von D-Sorbitol-Dehydrogenase und Diaphorase wurden in der elektrochemischen Durchflusszelle demonstriert. Durch die einzelnen Testphasen dieses Projektes konnte eine gut funktionierende Durchflusszelle aufgebaut werden, die für eine Weiterentwicklung als Elektrodenstack, wie es bei den Brennstoffzellen bekannt ist, verwendbar wäre. Das ERUDESP-Projekt stellte sich in der vorliegenden Arbeit als multidisziplinär heraus, wobei ein wichtiger Aspekt die zu verwendeten Elektroden darstellten. Die Vergrößerung der aktiven Oberfläche der Arbeitselektroden wurde ausführlich in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Oberflächenvergrößerung der Elektrode wurde erfolgreich durch die Herstellung makroporöser Elektroden erreicht. Dazu wurden zwei Templatverfahren über kolloidale Kristalle angewandt, die *Langmuir-Blodgett-Technik* und die *kontrollierte Evaporierung*. Die *kontrollierte Evaporierung* lieferte dicke, hoch poröse Template aus Multischichten, wobei die *Langmuir-Blodgett-Technik* die schichtweise Herstellung von porösen Systemen erlaubte. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die *Langmuir-Blodgett-Technik* zum ersten Mal unter Verwendung von Polystyrolpartikeln anzuwenden. Hierfür wurden monodisperse Polystyrolpartikel auf drei verschiedenen Synthesewegen synthetisiert und verschiedene Partikeldurchmesser erreicht. Hoch monodisperse Partikeldispersionen mit verschiedenen, gewünschten Durchmessern konnten synthetisiert werden. Um dieses Ziel zu erreichen wurde eine Standardreaktion weiterentwickelt und modifiziert. Die monodispersen Polystyrolpartikel waren Voraussetzung für die Herstellung makroporöser Elektrodensysteme mit kontrollierbarem Porendurchmesser, einheitlicher

Porenverteilung und hexagonaler Anordnung. Durch die hoch monodispersen Polystyrolpartikel erhaltenen kolloidalen Kristalle dienten in beiden Templatverfahren zur Herstellung der porösen Elektroden. Die Elektroden besaßen eine perfekte Interkonnektivität und zeigten eine gute Offenporigkeit. Es konnten drei-dimensionale poröse Template hergestellt werden, die aus verschiedenen Materialien aufgebaut waren und für unterschiedlichste Anwendungen zur Verfügung standen. Weitere Anwendungen im Bezug auf Oberflächenstrukturierung erlaubt die *kontrollierte Evaporierungsmethode* auf großen Elektroden von $6 \times 6 \text{ cm}^2$. Diese wurden im Hinblick auf die Durchflusszelle des ERUDESC-Projektes aus Gold und auch aus Rutheniumoxid hergestellt und ihre vergrößerte aktive Oberfläche elektrochemisch charakterisiert. Zur Hochskalierung des Elektrodenmaterials Rutheniumoxid kam es, da in der vorliegenden Arbeit die wichtige Entdeckung der möglichen Aktivierung der direkten Oxidation des Cofaktors NADH an Rutheniumoxidoberflächen gemacht wurde. Durch die Forschungen auf diesem Gebiet konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des oxidativen Prozesses an Rutheniumoxidelektroden bei verbesserten Überspannungen abläuft. Schon bei Potentialen ab $+ 200 \text{ mV}$ findet dieser Aktivierungsprozess der Oxidation von NADH statt, was sich als sehr hilfreich in der Biosensorentwicklung herausstellt, da es eine Alternative zum Einsatz von Mediatoren darstellt. Zusätzlich konnte durch die Herstellung hoch poröser Rutheniumoxidelektroden die aktive Oberfläche normiert auf den Rutheniumgehalt enorm gesteigert werden. Die Herstellung wurde sowohl durch die *kontrollierte Evaporierung* als auch durch die *Langmuir-Blodgett-Technik* realisiert. Durch die Porosität werden Kosten durch geringeren Einsatz des Edelmetalls gespart, was ein wichtiger Punkt für die industrielle Anwendung darstellt. Mit dieser neuen Oberfläche erschließt sich eine Alternative, um den Einsatz von Mediatoren zu umgehen, was den Aufbau eines Sensorsystems bedeutend einfacher machen würde. Das Rutheniumoxid erweist sich als chemisch, thermisch und mechanisch sehr stabiles, katalytisch aktives Material. Es würde sich nun anbieten, das entstandene Produkt auf enzymatische Aktivität zu testen, das heißt, ob es sich bei dem entstandenen Produkt um das enzymatisch aktive NAD^+ handelt.

Die erworbene Expertise während des ERUDESC-Projektes zur Herstellung makroporöser Elektrodenoberflächen stellte sich darüber hinaus als interessant für weitere Einsatzmöglichkeiten dar. Durch die Weiterentwicklung der *Langmuir-Blodgett-Technik* unter Anwendung von Polystyrolpartikeln im Rahmen des ERUDESC-Projektes wurde anschließend ein erneuerbares Elektrodensystem mit alternierenden porösen Schichten hergestellt. Diese repräsentieren die aktive Oberfläche, welche bei Verschleiß oder

Deaktivierung einfach und sauber entfernt werden könnten, ohne jeglichen Einsatz von aggressiven Chemikalien. Zusätzlich wurde es nun möglich, den Erneuerungsprozess auf Kommando auszulösen. Dies geschah durch Anlegen eines konstanten Oxidationspotentials, des von uns benannten Klick-Effekts, wodurch die intermediäre Zinkschicht oxidiert wurde. Dabei erschloss sich die untere poröse Elektrodenoberfläche.

Aufbauend auf den Fachkenntnissen zur gut reproduzierbaren Herstellung makroporöser Rutheniumoxidelektroden wurden in der vorliegenden Arbeit poröse Mikroelektroden aus Rutheniumoxid hergestellt. Es wurden perfekt strukturierte, hoch poröse Rutheniumoxid-Mikroelektroden mit einem hohen, vielseitigem Anwendungspotential hergestellt. Dabei stellte sich das komplette Verfahren inklusive des Templat-Prozesses als sehr gut reproduzierbar dar. Im Zuge der Herstellung der Mikroelektroden wurde das verbesserte thermische Rauschverhalten durch die poröse, geordnete Struktur der Rutheniumoxidelektroden demonstriert. Durch die erfolgreiche Untersuchung des hergestellten Rutheniumoxids auf pH-Sensibilität erwies sich die Miniaturisierung der porösen Rutheniumoxidstrukturen als besonders interessant, da dadurch pH-Messungen in kleinen Volumina oder in der Umgebung von lebenden Zellen durchgeführt werden könnten. Ein gutes pH-sensibles Verhalten wurde im pH-Bereich von ~ 2 bis 13 mit einer guten Reproduzierbarkeit entdeckt. Dabei ergab sich ein Nernst-Verhalten von $-59,7 \text{ mV/pH}$, was sehr nahe an den theoretischen Wert herankommt. Die Herstellung von Mikroelektroden stellt somit eine technische Weiterentwicklung des porösen Rutheniumoxids dar, die großen Anklang als miniaturisierte, hoch stabile pH-Sensoren haben könnte.

Im Anschluss an die Miniaturisierung der porösen Elektroden aus Rutheniumoxid wurde die Elektrodenfläche von implantierbaren Mikroelektroden für Handprothesen ebenso erfolgreich in poröser Oberflächenstrukturierung hergestellt. Dies führte zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche, was elektrochemisch durch zyklische Voltammetrie belegt wurde. Sensiblere Mikroelektroden mit verringerter Übergangsimpedanz und verbessertem Signal-Rausch-Verhältnis werden somit möglich. Weitere Optimierungen vor allem in Bezug auf die Isolierung werden angestrebt.

Als Ausblick bietet sich ein weiterer interessanter Aspekt für ein zukünftiges Projekt auf dem Gebiet der zeitlich gesteuerten und lokal gezielten Wirkstofffreisetzung an. Dabei soll hier die Anregung zur Einkapselung von Medikamenten in Porensystemen gegeben werden. Es wird ein Material angestrebt, welches aus zwei verschiedenen, biokompatiblen Materialien besteht. Zum Beispiel könnte die untere poröse Schicht aus Platin oder Gold bestehen und die obere Schicht, die eingekapselte Arzneien mit sich trägt, aus einem leicht oxidierbaren Material wie

Zink, welches auch zusätzlich biokompatibel ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass poröse Systeme aus Zink herstellbar sind. Die oxidative Auflösung des Zinks als Triggerfunktion würde die gezielte und lokal exakt bestimmte Freisetzung des Wirkstoffs bewirken.

Auch für Implantate könnte die Herstellung poröser Oberflächen, wie poröse Titandioxidoberflächen von Interesse sein. Erstens könnten Implantate durch die Porosität besser mit dem biologischen Gewebe verwachsen und zweitens könnte eine gleichzeitige Abgabe von Arzneien an der Oberfläche des Implantats direkt im Anschluss nach Implantierung stattfinden und somit eine bessere Wundheilung hervorrufen und das Infektionsrisiko senken.

Der Forschungsbereich von porösen Multikatalysatorschichten brachte einen guten separierten Schichtaufbau poröser Platin- und Nickelschichten. Die in-situ Wasserstoffgewinnung in den Platinporen liefert Wasserstoff, der anschließend in die Nickelporen diffundiert, um dort für die dort ablaufende Hydrierungsreaktion zur Verfügung zu stehen. Diese realisierte Idee beschreibt ein wertvolles Katalysekonzept, welches zwei katalysierte Reaktionen auf einer einzigen katalytisch aktiven Elektrode erlaubt. Als Ausblick wäre hier die Charakterisierung des Reaktionsmechanismus der Hydrierungsreaktion zu erwähnen. Als weiteren möglichen Aufbau wäre an eine Katalysatorenschicht zu denken, die als eine Komponente poröses Kupfer besitzt, um als katalytisch aktives Material für eine Oxidationsreaktion zur Verfügung zu stehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits poröse Kupfermaterialien hergestellt, welche in einem solchen System Anwendung finden könnten. Die Multikatalysatorschichten öffnen eine interessante Alternative nicht nur für elektroorganische Synthesen, sondern auch für die Elektroenzymatik, da es möglich wäre, mehrere Reaktionen simultan oder nacheinander als Kaskadenreaktionen ablaufen zu lassen. Es würde Zeit und Kosten gespart. Da es in dieser Arbeit möglich war, hoch poröse und interkonnektierte Porensysteme aus verschiedensten Materialien herzustellen, ist die Diffusion in die tiefsten Poren möglich. Die Poren stellen eine Möglichkeit zur Einkapselung von Biomolekülen dar, wodurch die mechanische Entfernung der immobilisierten Schicht verhindert wird. Im Allgemeinen erweisen sich solche Materialien, wie sie während dieser Arbeit hergestellt werden konnten, für verschiedene technische Anwendungen als nützlich und bieten durch eine einfache und saubere Elektrokatalyse eine Möglichkeit zur Produktverbesserung.

Zu dem zusätzlichen Forschungsbereich der kontrollierten Oberflächenstrukturierung durch Platininseln kann zusammengefasst werden, dass ein erfolgreicher Aufbau eines Glucose-Biosensors erster Generation mit nanostrukturierter Oberfläche erreicht werden konnte. Das

System konnte ausführlich untersucht werden und es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die atomar hohen Platininseln der essentielle Part dieses Elektrodenaufbaus darstellt. In dieser Arbeit wurde eine enorme Steigerung der Stromdichte durch die Oberflächenmodifizierung erhalten. Zugleich erschließt sich anknüpfend an dieses Projekt ein Folgeprojekt mit der Idee, den Polymerfilm im Schichtaufbau durch ein Molekül zu ersetzen, welches gezielt an der Oberfläche der Platininseln gebunden werden kann.

Abschließend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Arbeit viel versprechende Ergebnisse im Bereich der Materialneuentwicklung mit zahlreichen Anwendungen, als auch abgerundete Themen mit bereits gezeigtem ‚proof-of-principle‘ erarbeitet wurden. Neue Ansätze mit neuen Methoden wurden erarbeitet, die von wissenschaftlicher Aktualität sind und daher einen Fortschritt für technische Anwendungen darstellen könnten.

Kapitel 5: Anhang

5.1 Instrumenteller Teil

Die elektrochemischen Messungen wurden unter Anwendung von Geräten der Firma Bio Logic Science Instruments durchgeführt. Es wurde ein Einkanalpotentiostat des Typs SP-150 und zwei Achtfachpotentiostate des Typs VMP3 verwendet. Die beiden Achterkanalgeräte wurden miteinander gekoppelt, um 16fach-Messungen simultan gesteuert durchzuführen. Nachstehend ist dieser gekoppelte Geräteaufbau dargestellt:

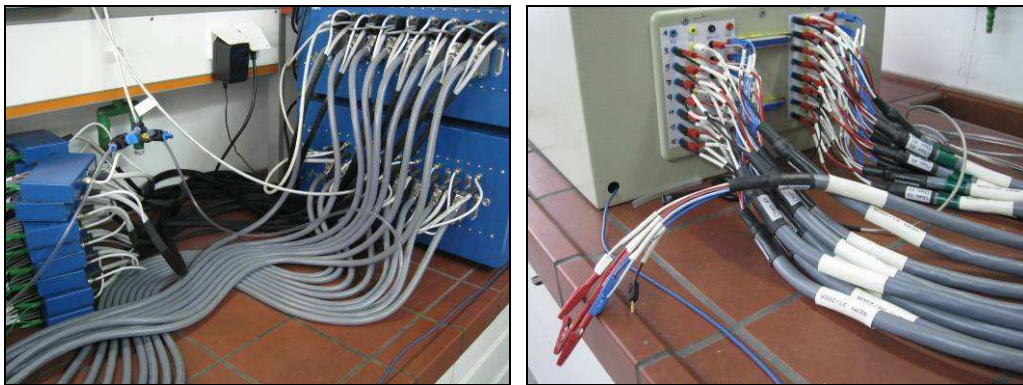


Abbildung 158: Zwei 8fach-Potentiostate VMP3 der Firma Bio Logic Science Instruments.

Die Potentiostaten sind mit Niederstromanschlüssen ausgestattet und konnten bei Bedarf durch einfachen Kabel austausch umgerüstet werden. Im Folgenden sind 16 Niederstrommessfunktionen in verkabelter Lage dargestellt:



Abbildung 159: Mit den zwei 8fach-Potentiostaten verbundenen 16 Niederstrommessfunktionen.

Die dazugehörige Software EC-Lab wurde stets über online-updates erneuert.

Während der Forschungsaufenthalte an der ENSCBP in Bordeaux wurden Geräten von Autolab, Typ III potentiostat/galvanostat mit dem dazugehörigen Programm GPES für elektrochemische Messungen verwendet. Für Messungen mit einer rotierenden Scheibenelektrode (rotating disc electrode, RDE) wurde ein Gerät der Firma Princeton Applied Research, Model 616 verwendet.

Für optische Charakterisierungen von Oberflächen wie Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden Geräte der Firma JEOL eingesetzt. Dazu wurden die Modelle JEOL JXA-840A, JEOL JSM-7500F und JEOL 2010 verwendet.

Um Querschnitte von Elektroden sauber durchführen zu können, um sich die Porosität anzuschauen und diese zu charakterisieren, wurden Messungen mittels Focused Ion Beam (FIB) durchgeführt. Dazu diente das Gerät FEI Helios NanoLab600.

Zur Bestimmung von Morphologien und zur Strukturanalyse von elektrochemisch abgeschiedenen Elektrodenoberflächen wurden Röntgendiffraktogramme mit einem XRD-Gerät von PANalytical, Modell X'Pert Pro MPD aufgenommen.



Abbildung 160: XRD-Gerät von PANalytical, Modell X'Pert Pro MPD

Chirale HPLC-Messungen wurden zur Produktanalyse mit Enantiomerenunterscheidung nach elektroorganischer Synthese angewandt. Dazu wurde die chirale Säule Chiralpak[®] IA (Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilisiert auf 5 µm Silica-Gel, 250 mm x 4.6 mm ID) in die HPLC-Apparatur eingebaut. Die für die Messungen verwendete Pumpe (L-7100), der programmierbare Autosampler (L-7250), das Interface (D-7000) und der Diodenarraydetektor (L-7455) waren von der Firma Merck Hitachi. Das für die Datenanalyse verwendete Programm war EZ Chrom Elite (Version 3.1).

Raman-Messungen für die Kontrolle des Fortschritts der Polystyrolsynthese wurden mit einem Multiram Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Der Germaniumdetektor musste kontinuierlich mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden. Der Anregungslaser war ein Nd:YAG-Laser der Wellenlänge 1064 nm. Nachstehend sind Fotos dieses Gerätes dargestellt:

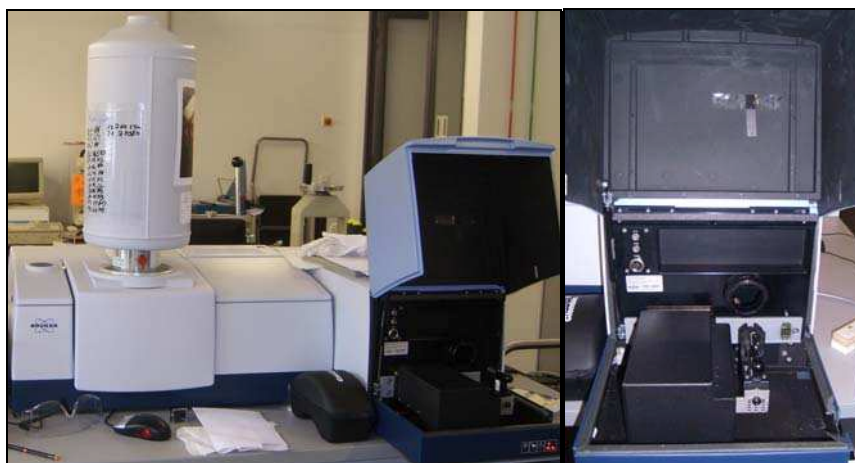


Abbildung 161: Multiram Spektrometer der Firma Bruker.

UV-VIS-Messungen wurden mit einem Varian-Gerät, Modell CARY 50 BIO und einem UV-visible spectrophotometer Cary 100 Scan mit zugehörigem Programm Cary WinUV program durchgeführt.

Zur Bestimmung der Oberflächenladung der synthetisierten Polystyrolpartikel wurde ein Zetasizer von Malvern Instruments, Modell Zetasizer 3000 HS_A herangezogen. Um die Größe der Polystyrolpartikel und deren Dispersität zu bestimmen, wurden dynamische Lichtstreuversuche durchgeführt. Dazu diente das Gerät Spektrometer-Goniometer-System ALV-5000E mit einem Helium-Neon-Laser ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$).

Für die STM-Untersuchungen (Rastertunnelmikroskopie, Scanning Tunneling Microscopy) der in Kapitel 3.6 beschriebenen Elektrodenoberflächen eines Glucosesensors wurde das Gerät TopoMatrix TMX2010 eingesetzt. Die speziell angefertigte elektrochemische Glaszelle, die für die Oberflächenmodifizierung dieses Glucosesensors verwendet wurde, ist nachstehend gezeigt:

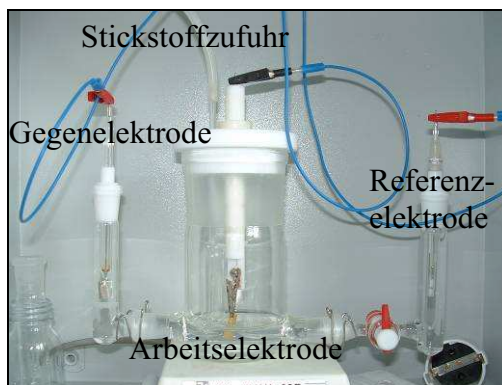


Abbildung 162: Speziell angefertigte elektrochemische Glaszelle zur Herstellung der Platininseln.

Als letztes ist die ebenso speziell angefertigte, konisch zulaufende Glaszelle dargestellt, die zur chronoamperometrisch durchgeführten und elektrochemisch detektierten Glucoseumsetzung diente:

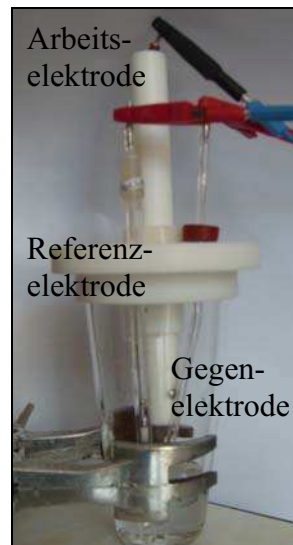


Abbildung 163: Konisch zulaufende Glaszelle zur Glucoseumsetzung mittels Chronoamperometrie.

Es handelte sich dabei um Messungen mittels eines in dieser Arbeit aufgebauten und getesteten Glucosesensors erster Generation. Um eine kontinuierliche und exakt dosierte Quantität an Glucose addieren zu können, wurde folgender automatischer Titrator Titronic Universal der Firma Schott Instruments verwendet:



Abbildung 164: Titrator Titronic Universal der Firma Schott Instruments zur sukzessiven Glucosezugabe.

5.3 Veröffentlichungen

Preis:

Best Poster Award, J. Lenz, V. Trieu, A. Kuhn, R. Hempelmann, "*Macroporous ruthenium and ruthenium oxide electrodes with controlled surface morphology*", Poster, 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC Gijón, Spain 2011

Publikationsliste:

- 1) J. Lenz, B. Campo, M. Alvarez, M. A. Volpe, "*Liquid Phase Hydrogenation of α,β -Unsaturated Aldehydes over Gold Supported on Iron Oxides*", J. Catal. 267 (2009) 50-56
- 2) J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, R. Hempelmann, G.-W. Kohring, F. Giffhorn, M. Manolova, D. M. Kolb, "*Enzyme immobilisation on self-organised nanopatterned electrode surfaces*", Phys. Chem. Chem. Phys. (2010), 12, 12604-12607
- 3) F. Qu, R. Nasraoui, M. Etienne, Y. Bon Saint Côme, A. Kuhn, J. Lenz, J. Gajdzik, R. Hempelmann, A. Walcarius, "*Electrogeneration of ultra-thin silica films for the functionalization of macroporous electrodes*", Electrochem. Comm. 13 (2011) 138-142
- 4) J. Lenz, V. Trieu, R. Hempelmann, A. Kuhn, "*Ordered macroporous ruthenium oxide electrodes for potentiometric and amperometric sensor applications*", Electroanalysis 23 (2011) 5, 1186-1192
- 5) J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, A. Walcarius, G. W. Kohring, F. Giffhorn, A. Demir, R. Hempelmann, "*Electrochemical Screening of redox mediators for electrochemical regeneration of NADH*", submitted 2011
- 6) J. Lenz, S. Ravaine, R. Hempelmann, A. Kuhn, "*Macroporous sandwich layer system for renewable electrodes on command*", submitted 2011

- 7) J. Gajdzik, J. Lenz, V. Urbanova, Z. Wang, M. Ethienne, A. Walcarius, A. Kuhn, H. Natter, “*Construction of a (bio)electrochemical reactor using thin silica-films with immobilized DSDH and cofactor for enantiopure synthon preparations*”, in preparation 2011

Proceedings:

- 1) J. Lenz, Y. Moglie, C. Vitale, G. Radivoy, M. A. Volpe, “*Hidrogenación selectiva de 4-fenil-3-buten-2-ona en fase líquida. Estudio comparativo de la reacción realizada con catalizadores heterogéneos de Au y promovida por metales activados*”, Proceedings, 992-1000 (2008), 40th Ibero-American Symposium of Catalysis, XXI SICAT Málaga-Benalmádena-Costa
- 2) J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, G. W. Kohring, F. Giffhorn, G. Wenz, R. Hempelmann, “*Directed immobilisation of modified galactitol-dehydrogenase on gold electrodes for electrochemical cofactor regeneration*”, ECS Trans., 25 (28) 13-20 (2010)
- 3) J. Lenz, V. Trieu, A. Kuhn, R. Hempelmann, “*Macroporous ruthenium and ruthenium oxide electrodes for electrochemical applications*”, ECS Trans. 33 (32), 19 (2011)
- 4) J. Lenz, J. Gajdzik, H. Natter, R. Hempelmann, G.-W. Kohring, F. Giffhorn, M. Manolova, D.M. Kolb, “*Platinum Islands on SAMs as Template for Enzyme-Catalyzed Glucose Oxidation*”, ECS Trans. 33 (37) 35-40 (2011)

Konferenzbeiträge:

- 1) J. Lenz, Y. Moglie, C. Vitale, G. Radivoy, M. A. Volpe, “*Hidrogenación selectiva de 4-fenil-3-buten-2-ona en fase líquida. Estudio comparativo de la reacción realizada con catalizadores heterogéneos de Au y promovida por metales activados*”, Poster, 40th Ibero-American Symposium of Catalysis, XXI SICAT Málaga-Benalmádena-Costa, Spain 2008

- 2) J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, P. Kornberger, G. W. Kohring, F. Giffhorn, R. Hempelmann, "*Electroenzymatic reactions with GatDH, GatDH-Cys and P2OxB1H on poly- and nanocrystalline gold and platinum electrodes*", Poster, 12th International Conference on Electroanalysis, ESEAC Prag, Czech Republic 2008

- 3) R. Hempelmann, J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, G. W. Kohring, F. Giffhorn, M. Manolova, D.M. Kolb, "*A new method for enzyme immobilization on nanostructured electrode surfaces*", Poster, 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, ISE Sevilla, Spain 2008

- 4) J. Lenz, J. Gajdzik, H. Natter, R. Hempelmann, G. W. Kohring, F. Giffhorn, M. Manolova, D.M. Kolb, "*First generation sensor for glucose oxidation obtaining a high current density by nanostructured Au(111)*", Poster, 216th Electrochemical Society meeting, ECS Vienna, Austria 2009

- 5) J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, G. W. Kohring, F. Giffhorn, G. Wenz, R. Hempelmann, "*Directed immobilisation of modified galactitol-dehydrogenase on gold electrodes for electrochemical cofactor regeneration*", Vortrag, 216th Electrochemical Society meeting, ECS Vienna, Austria 2009

- 6) J. Lenz, R. Hempelmann, A. Kuhn, "*Système multicouche d'or macroporeux pour l'application comme électrode renouvelable*", Vortrag, XII^{ème} colloque du Groupe Français de Bioélectrochimie, Lacanau, France 2010

- 7) J. Lenz, R. Hempelmann, S. Ravaine, A. Kuhn, "*Multilayer metal system of macroporous gold for applications as renewable biofunctionalized electrode*", Poster, 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC Gijón, Spain 2010

- 8) J. Lenz, V. Trieu, A. Kuhn, R. Hempelmann, "*Macroporous ruthenium and ruthenium oxide electrodes with controlled surface morphology*", Poster, 13th International Conference on Electroanalysis, ESEAC Gijón, Spain 2011
(Best Poster Award)

- 9) J. Lenz, R. Hempelmann, S. Ravaine, A. Kuhn, "*Multilayer metal system of macroporous gold for applications as renewable biofunctionalized electrode*", Poster, Journée Scientifique de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM), Bordeaux, France 2010

- 10) J. Lenz, R. Hempelmann, S. Ravaine, A. Kuhn, "*Renewable gold nanopores as support for (bio)functionalized electrodes*", Vortrag, 218th Electrochemical Society meeting, ECS Las Vegas, Nevada, USA 2010

- 11) J. Lenz, J. Gajdzik, H. Natter, R. Hempelmann, G.-W. Kohring, F. Giffhorn, Y. Schmitt, K. Jacobs, M. Manolova, D.M. Kolb, "*Platinum Islands on SAMs as Template for Enzyme-Catalyzed Glucose Oxidation*", Vortrag, 218th Electrochemical Society meeting, ECS Las Vegas, Nevada, USA 2010

- 12) J. Lenz, V. Trieu, A. Kuhn, R. Hempelmann, "*Macroporous ruthenium and ruthenium oxide electrodes for electrochemical applications*", Poster, 218th Electrochemical Society meeting, ECS Las Vegas, Nevada, USA 2010

- 13) J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, A. Walcarius, G.-W. Kohring, F. Giffhorn, A. Demir, R. Hempelmann, "*Electroenzymatic Oxidation and Reduction of Directed Immobilized Dehydrogenases for Electrochemical Cofactor Regeneration*", Vortrag, 218th Electrochemical Society meeting, ECS Las Vegas, Nevada, USA 2010

- 14) H. Natter, J. Gajdzik, J. Lenz, M. Manolova, D.M. Kolb, "*Elektroenzymatische Glucoseoxidation mit immobilisierter Pyranose-2-Oxidase*", Vortrag, Bunsentagung, Berlin, Germany 2011

- 15) J. Lenz, J. Gajdzik, V. Urbanová, H. Natter, M. Etienne, A. Walcarius, A. Kuhn, R. Hempelmann, "*Flow-cell reactor for (bio)electrochemical applications*", Poster, Bunsentagung, Berlin, Germany 2011

- 16) A. Eberhardt, V. Trieu, J. Lenz, M. Schmitt, R. Hempelmann, "Enhanced photoelectrochemical water splitting", Poster, Bunsenkolloquium, 5th Gerischer Symposium, Berlin, Germany 2011

Workshop-Beiträge:

1) UdG workshop Biotechnology 25.09.2010:

a) J. Lenz, J. Gajdzik, H. Natter, R. Hempelmann, G. W. Kohring, F. Giffhorn, M. Manolova, D.M. Kolb, *“First generation sensor for glucose oxidation obtaining a high current density by nanostructured Au(111)”*, Poster

b) J. Lenz, R. Hempelmann, S. Ravaine, A. Kuhn, *“Multilayer metal system of macroporous gold for applications as renewable biofunctionalized electrode”*, Poster

c) J. Lenz, V. Trieu, A. Kuhn, R. Hempelmann, *“Macroporous ruthenium and ruthenium oxide electrodes with controlled surface morphology”*, Poster

5.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich während der Durchführung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. Rolf Hempelmann und Herrn Prof. Dr. Alexander Kuhn für die Bereitstellung des interessanten und aktuellen Themas. Ohne die exzellenten Laborausstattungen und die Möglichkeit zahlreicher physikochemischer Messmethoden wäre die Durchführung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Des Weiteren möchte ich mich für die Möglichkeit einer doppelt betreuten Doktorarbeit (cotutelle-Verfahren) und die Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen herzlich bedanken, wodurch ich sowohl internationale Erfahrungen sammeln konnte als auch Teile meiner Arbeit öffentlich präsentieren konnte.
- Allen Projektpartnern des EU-Projektes ERUDES (der Angewandten Mikrobiologie der UdS, der Gruppe NsysA der ENSCBP in Bordeaux, der Gruppe LPCME / CNRS in Nancy, der Bioorganischen Chemie der METU in Ankara, der Biophysikalischen Chemie der UCOH in Kopenhagen, der Bioinformatik der UCPH in Kopenhagen, EURICE in Saarbrücken und IEP GmbH in Wiesbaden) für die exzellente Zusammenarbeit in unserem gemeinsamen Projekt; besonders der Gruppe aus Nancy in Bezug auf die Sol-Gel-Beschichtungen, der Mikrobiologie aus Saarbrücken für die Bereitstellung der verwendeten Enzyme und die durchgeführte Analytik und der Gruppe der METU in Ankara für die Synthese der verwendeten Mediatoren.
- Frau Dr. Janine Gajdzik und Herrn Dr. Harald Natter für die sehr gute Zusammenarbeit und die zahlreichen wissenschaftlichen Gespräche während des EU-Projektes ERUDES.
- Herrn Prof. Dr. Dieter Kolb und Frau Dr. Mila Manolova für die Einladung als wissenschaftlicher Gast an die Universität Ulm und die dortige hervorragende Zusammenarbeit und die STM-Messungen.
- Dem Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) in St. Ingbert, insbesondere Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Hoffmann, Herrn Roman Ruff und Herrn Dr. Wigand Poppendieck für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der implantierbaren Mikroelektroden.

- Herrn Dr. Rafael Szamocki für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen während dieser Arbeit.
- Herrn Vinh Trieu für die Elektroabscheidungen des Rutheniumoxids.
- Frau Sylvia Kuhn für die zahlreichen REM- und TEM-Aufnahmen.
- Herrn Prof. Dr. Joachim Wagner für die Unterstützung bei den Polystyrolsynthesen.
- Herrn Dr. Michael Schmitt und Herrn Walid Amin für die Lichtstreuexperimente.
- Frau Anja Eberhardt, Frau Patricia Triassi und Herrn Dr. Thorsten Voigt für Unterstützungen bei den Korrekturen dieser Arbeit.
- Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr.-Ing. Mücklich, Institut für Funktionswerkstoffe, für die Durchführung der FIB-Experimente, insbesondere Herrn Christoph Pauly und Herrn Michael Engstler.
- Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Uwe Hartmann, Institut für Experimentalphysik an der Universität des Saarlandes, für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Visualisierung des Klick-Effektes, insbesondere Herrn Dr. Haibin Gao und Herrn Matthäus J. Langosch.
- Frau Elfi Jungblut, Herrn Dieter Münch und Herrn Josef Wilhelm für die Unterstützung bei technischen Problemen und Beschaffungen von Laborutensilien.
- Der hauseigenen Werkstatt für die Anfertigungen der elektrochemischen Zellen.
- Herrn Rudolf Richter für das Zelldesign der gesamten verwendeten elektrochemischen Zellen.
- Frau Petra Theobald für die Bewältigung administrativer Angelegenheiten.
- Der gesamten Arbeitsgruppe in Saarbrücken für das freundliche Arbeitsklima und für die zahlreichen themenübergreifenden, wissenschaftlichen Diskussionen.

Je remercie chaleureusement tous les membres du Groupe Nanosystèmes Analytiques qui m'ont souhaité la bienvenue d'une manière très affectueuse. Particulièrement Aline Simone-Lalande pour les rapports administratifs et Dr. Véronica Urbanová, Matthias Heim et Gabriel Loget pour les nombreuses discussions scientifiques.

Außerdem möchte ich den Folgenden für die finanzielle Unterstützungen dieser Arbeit danken, welche in einem großen Maße dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit durchgeführt werden konnte. Im Einzelnen:

- Der Europäischen Union für die Förderung des wissenschaftlichen EU-Projektes ERUDESP.
- Der Deutsch-Französischen Hochschule (DFH) für ein Stipendium für die cotutelle-Promotion.
- Der Ewald Wicke-Stiftung für ein Stipendium, um die Teilnahme an der Konferenz der ECS in Las Vegas 2010 zu realisieren.

Auf privater Ebene möchte ich meiner gesamten Familie danken, die mich in meiner akademischen Laufbahn stets unterstützt hat, vor allem seien Frau Franziska Kistner und Herrn Robert Kistner an dieser Stelle gedankt.

Ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern Petra und Lothar Lenz, ohne deren stete Unterstützungen meine ganze Ausbildung inklusive der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herzlichen Dank!

5.4 Literaturverzeichnis

- [1] C. H. Haman, W. Vielstich, *Elektrochemie*, 4. Auflage, Wiley-VCH, **2005**.
- [2] N. Kanani, *Galvanotechnik – Grundlagen, Verfahren, Praxis* Carl Hanser Verlag, **2000**.
- [3] H. Natter, M. S. Löffler, C. E. Krill, R. Hempelmann, *Scripta Materialia* **2001**, 44, 2321.
- [4] R. Przenioslo, J. Wagner, H. Natter, R. Hempelmann, W. Wagner, *Journal of Alloys and Compounds* **2001**, 328, 259.
- [5] H. Natter, R. Hempelmann, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19525.
- [6] H. Natter, R. Hempelmann, *Electrochim. Acta* **2003**, 49, 51.
- [7] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akad. Verlag, **2003**.
- [8] C. Zimmer, *Identifizierung von zwei biotechnologisch interessanten Enzymen und ihrer Gene zur stereo- und regioselektiven Modifikation von Kohlenhydraten: Benzoyl-esterase und Galaktitol-Dehydrogenase*, **2006**, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [9] S. Bastian, *Herstellung von Pyranose-2-Oxidase Enzymvarianten mit erhöhter Stabilität und Reaktivität* **2005**, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [10] K.-H. Schneider, G. Jäckel, R. Hoffmann, F. Giffhorn, *Microbiology* **1995**, 141, 1865.
- [11] M. W. J. Jeworski, *Untersuchungen zur Reduktion von α -Dicarbonylverbindungen mit der Galaktit-Dehydrogenase aus Rhodobacter spaeroides D* **1997**, Diplomarbeit, Universität Saarbrücken/Stuttgart.
- [12] M. Bannwarth, S. Bastian, D. Heckmann-Pohl, F. Giffhorn, G. E. Schulz, *Biochemistry (Mosc)*. **2004**, 43, 11683.
- [13] A. Schäfer, S. Bieg, A. Huwig, G. W. Kohring, F. Giffhorn, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 2586.
- [14] C. Leitner, J. Volc, D. Haltrich, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 3636.
- [15] H. J. Danneel, E. Rössner, A. Zeeck, F. Giffhorn, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214(3) 795.
- [16] H. Dellweg, *Biotechnologie verständlich*, Springer-Verlag, **1994**.
- [17] S. Bastian, M. J. Rekowski, K. Witte, D. M. Heckmann-Pohl, F. Giffhorn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 67, 654.
- [18] J. W. Severinghaus, P. B. Astrup, *J. Clin. Monit.* **1986**, 2, 125.
- [19] E. Csoregi, C. P. Quinn, D. W. Schmidtke, S. E. Lindquist, M. V. Pishko, L. Ye, I. Katakis, J. A. Hubbell, A. Heller, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 3131.
- [20] A. Heller, *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 3579.
- [21] J. G. Wagner, D. W. Schmidtke, C. P. Quinn, T. F. Fleming, B. Bernacky, A. Heller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, 6379.
- [22] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik*, Springer, **1996**.
- [23] E. Katz, I. Willner, *Bioelectronics*, VCH, **2005**.
- [24] K. Tomantschger, G. Palumbo, F. Gonzalez, H. Natter, R. Hempelmann, F. Endres, K. T. Aust, *Jahrbuch Oberflächentechnik*, Eugen G. Leuze Verlag, Bad Saulgau, Editor Dr. R. Suchentrunk, **2004**.
- [25] H. Natter, M. Schmelzer, R. Hempelmann, *J. Mater. Res.* **1998**, 13, 1186.
- [26] O. Yevtushenko, *Electrocrystallization and characterization of nanostructured gold and gold alloys* **2007**, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [27] O. Yevtushenko, H. Natter, R. Hempelmann, *J. Thin Solid Films* **2006**, 515, 353.
- [28] O. Yevtushenko, H. Natter, R. Hempelmann, *J. of Solid State Electrochem.* **2007**, 11, 138.
- [29] P. Masse, S. Ravaine, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2005**, 270, 148.

- [30] R. Szamocki, S. Reculosa, S. Ravaine, P. N. Bartlett, A. Kuhn, R. Hempelmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1340.
- [31] M. Bardosova, F. C. Dillon, M. E. Pemble, I. M. Povey, R. H. Tredgold, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *333*, 816.
- [32] R. Szamocki, P. Masse, S. Ravaine, V. Ravaine, R. Hempelmann, A. Kuhn, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 409.
- [33] P. N. Bartlett, J. J. Baumberg, P. R. Birkin, M. A. Ghanem, M. C. Netti, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2199.
- [34] M. E. Abdelsalam, P. N. Bartlett, J. J. Baumberg, S. Coyle, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 90.
- [35] P. N. Bartlett, P. R. Birkin, M. A. Ghanem, *Chemical Communications* **2000**, 1671.
- [36] V. Urbanová, M. Bartos, K. Vytrás, A. Kuhn, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1524.
- [37] V. Urbanová, K. Vytrás, A. Kuhn, *Electrochem. Comm.* **2010**, *12*, 114.
- [38] R. Szamocki, S. Reculosa, S. Ravaine, P. N. Bartlett, A. Kuhn, R. Hempelmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1317.
- [39] W. Luck, M. Klier, H. Wesslau, *Ber. Bunsen Phys. Chem.* **1963**, *67*, 75.
- [40] M. Egen, R. Zentel, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2176.
- [41] J. W. Goodwin, R. H. Ottewill, R. Pelton, G. Vianello, D. E. Yates, *Br. Polym. J.* **1978**, *10*, 173.
- [42] H. M. Ni, Y. Z. Du, G. H. Ma, M. Nagai, S. Omi, *Macromolecules* **2001**, *34*, 6577.
- [43] J. W. Goodwin, J. Hearn, C. C. Ho, R. H. Ottewill, *Colloid Polym. Sci.* **1974**, *252*, 464.
- [44] H. Warson, *Acs Symposium Series* **1976**, 228.
- [45] S. C. Gu, T. Mogi, M. Konno, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *207*, 113.
- [46] A. J. Turner, S. Nair, Z. Lai, C.-M. Cheng, S. R. Bhatia, *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, DOI: 10.1002/app.34018.
- [47] S. E. Shim, Y. J. Cha, J. M. Byun, S. Choe, *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *71*, 2259.
- [48] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH, **1987**.
- [49] D. Meschede, *Gerthsen Physik*, 21., völlig neubearbeitete Auflage, Springer, **2002**.
- [50] R. Szamocki, **2006**, *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- [51] R. Signer, J. Weiler, *Helv. Chim. Acta* **1932**, *15*, 649.
- [52] A. Simon, *Colloid Polym. Sci.* **1941**, Vol. 96, 169.
- [53] U. Nobbmann, M. Connah, B. Fish, P. Varley, C. Gee, S. Mulot, J. Chen, L. Zhou, Y. Lu, F. Sheng, J. Yi, S. E. Harding, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2007**, *24*, 117.
- [54] R. H. Muller, S. Heinemann, *Int. J. Pharm.* **1994**, *101*, 175.
- [55] R. H. Muller, S. Heinemann, *Int. J. Pharm.* **1994**, *107*, 121.
- [56] A. Walcarius, A. Kuhn, *Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 593.
- [57] J. Lenz, V. Trieu, R. Hempelmann, A. Kuhn, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 1186.
- [58] T. Cassagneau, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 34.
- [59] R. C. Schroden, C. F. Blanford, B. J. Melde, B. J. S. Johnson, A. Stein, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 1074.
- [60] T. S. Eagleton, P. C. Searson, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 5027.
- [61] T. Sumida, Y. Wada, T. Kitamura, S. Yanagida, *Langmuir* **2002**, *18*, 3886.
- [62] D. Hung, Z. Liu, N. Shah, Y. Hao, P. C. Searson, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 3308.
- [63] O. D. Velev, T. A. Jede, R. F. Lobo, A. M. Lenhoff, *Nature* **1997**, *389*, 447.
- [64] O. D. Velev, T. A. Jede, R. F. Lobo, A. M. Lenhoff, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 3597.
- [65] L. K. Wang, Q. F. Yan, X. S. Zhao, *Langmuir* **2006**, *22*, 3481.
- [66] G. S. Attard, P. N. Bartlett, N. R. B. Coleman, J. M. Elliott, J. R. Owen, J. H. Wang, *Science* **1997**, *278*, 838.
- [67] M. E. Turner, T. J. Trendler, V. L. Colvin, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 180.
- [68] A. M. Yu, F. Meiser, T. Cassagneau, F. Caruso, *Nano Letters* **2004**, *4*, 177.

- [69] R. Szamocki, A. Velichko, F. Muecklich, S. Reculosa, S. Ravaine, S. Neugebauer, W. Schuhmann, R. Hempelmann, A. Kuhn, *Electrochem. Comm.* **2007**, 9, 2121.
- [70] F. Qu, R. Nasraoui, M. Etienne, Y. B. Saint Come, A. Kuhn, J. Lenz, J. Gajdzik, R. Hempelmann, A. Walcarius, *Electrochem. Comm.* **2011**, 13, 138.
- [71] L. Sartore, P. Caliceti, O. Schiavon, F. M. Veronese, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1990**, 27 (1), 45.
- [72] M. D. Trevan, *Methods in Molecular Biology: New Protein Techniques, Vol. 3*, **1988**.
- [73] K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 603.
- [74] I. Langmuir, *J. Chem. Phys.* **1933**, 756.
- [75] L. Wilhelmy, *Ann. Physik* **1863**, 119, 177.
- [76] A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, Wiley, New York, **1990**.
- [77] G. L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Wiley, New York, **1966**.
- [78] G. Brezesinski, H.-J. Mögel, *Grenzflächen und Kolloide*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1993**.
- [79] D. G. Derivichian, *J. Chem. Phys* **1939**, 7, 931.
- [80] D. Vollhardt, *Adv. Coll. Int. Sci.* **1996**, 64, 143.
- [81] M. Wirde, U. Gelius, *Langmuir* **1999**, 15 (19), 6370.
- [82] P. Kornberger, J. Gajdzik, H. Natter, G. Wenz, F. Giffhorn, G. W. Kohring, R. Hempelmann, *Langmuir* **2009**, 25, 12380.
- [83] H.-K. Song, S. H. Lee, K. Won, J. H. Park, J. K. Kim, H. Lee, S.-J. Moon, D. K. Kim, C. B. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1749.
- [84] F. Hollmann, A. Schmid, E. Steckhan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 169.
- [85] A. Salimi, M. Izadi, R. Hallaj, S. Soltanian, H. Hadadzadeh, *J Solid State Electrochem* **2009**, 13, 485.
- [86] E. Steckhan, S. Hermann, R. Ruppert, E. Dietz, M. Frede, E. Spika, *Organometallics* **1982**, 10, 1568.
- [87] R. Ruppert, S. Herrmann, E. Steckhan, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28 (52), 6583.
- [88] K. Délécouls-Servat, A. Bergel, R. Basséguy, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2004**, 26, 205.
- [89] F. Hildebrand, S. Lütz, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 4998.
- [90] R. Szamocki, A. Velichko, C. Holzapfel, F. Mücklich, S. Ravaine, P. Garrigue, N. Sojic, R. Hempelmann, A. Kuhn, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 533.
- [91] J. Moiroux, P. J. Elving, *Anal. Chem.* **1978**, 50, 1056.
- [92] H. Jaegfeldt, *J. Electroanal. Chem.* **1980**, 110, 295.
- [93] L. Gorton, G. Johansson, A. Torstensson, *J. Electroanal. Chem.* **1985**, 196, 81.
- [94] C. D. Lokhande, B.-O. Park, H.-S. Park, K.-D. Jung, O.-S. Joo, *Ultramicroscopy* **2005**, 105, 267.
- [95] I. Zhitomirsky, L. Gal-Or, A. Kohn, H. W. Hennicke, *J. Mater. Sci.* **1995**, 30, 5307.
- [96] N. Mano, A. Kuhn, *Electrochem. Comm.* **1999**, 1, 497.
- [97] R. Schwalm, R. Königer, **2000**, DE19913353A1 28.09.2000.
- [98] D. Losic, J. G. Shapter, J. J. Gooding, *J. Solid State Electrochem.* **2005**, 9, 512.
- [99] P. Jiang, J. F. Bertone, K. S. Hwang, V. L. Colvin, *Chem. Mater.* **1999**, 11, 2132.
- [100] S.-L. Kuai, X.-F. Hu, A. Hache, V.-V. Truong, *Journal of Crystal Growth* **2004**, 267, 317.
- [101] Y. H. Ye, F. LeBlanc, V.-V. Truong, *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 78, 52.
- [102] E. A. Mamdouh, P. N. Bartlett, J. J. Baumberg, S. Coyle, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 90.
- [103] S. Reculosa, P. Massé, S. Ravaine, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 279, 471.
- [104] S. Reculosa, S. Ravaine, *Chem. Mater.* **2003**, 15, 598.
- [105] M. E. Turner, T. J. Trentler, V. L. Colvin, *Adv. Mater.* **2001**, 13, 180.
- [106] F. Argoul, E. Freysz, A. Kuhn, C. Leger, L. Potin, *Phys. Rev. E* **1996**, 53, 1777.

- [107] A. Schulte, W. Schuhmann, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8914.
- [108] S. Reculosa, M. Heim, F. Gao, N. Mano, S. Ravaine, A. Kuhn, *Adv.Funct.Mater.* **2011**, *21* (4), 691.
- [109] T. Watanate, Y. Einaga, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24* (8), 2684.
- [110] G. Henze, *Polarographie und Voltammetrie, Grundlagen und analytische Praxis*, Springer-Verlag, **2011**.
- [111] S. D. Collyer, F. Davis, S. P. J. Higson, *Sensors* **2010**, *10*, 5090.
- [112] V.Urbanová, Y.Li, K.Vytřas, B.Yvert, A.Kuhn, *J. Electroanal. Chem.* **2011**, 656, 91.
- [113] C. Moulin, A. Glière, D. Barbier, S. Joucla, B. Yvert, P. Mailley, R. Guillemaud, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2008**, *55*, 683.
- [114] S. Trasatti, *Electrochim. Acta* **1991**, *36*, 225.
- [115] Y.-H. Liao, J.-C. Chou, *Sensors and Actuators B* **2008**, *128*, 603.
- [116] B. Xu, W.-D. Zhang, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 2859.
- [117] D. Susanti, D.-S. Tsai, Y.-S. Huang, A. Korotcov, W.-H. Chung, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 9530.
- [118] G.-R. Bai, A. Wang, C. M. Foster, J. Vetrone, *Thin Solid Films* **1997**, *310*, 75.
- [119] C. Colombo, T. Kappes, P. C. Hauser, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *412*, 69.
- [120] L. A. Pocrifka, C. Goncalves, P. Grossi, P. C. Colpa, E. C. Pereira, *Sensors and Actuators B* **2006**, *113*, 1012.
- [121] T. Imokawa, K.-J. Williams, G. Denuault, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 265.
- [122] S.A.G.Evans, J.M.Elliott, L.M.Andrews, P.N.Bartlett, P.J.Doyle, G.Denuault, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1322.
- [123] A. Fog, R. Buck, *Sensors and Actuators* **1984**, *5*, 137.
- [124] C. P. Figueiredo, J. Cardona, K.-P. Hoffmann, P. M. Mendes, *IFMBE Proceedings 25/VII* **2009**, 461.
- [125] L. Citi, J. Carpaneto, K. Yoshida, K.-P. Hoffmann, K. P. Koch, P. Dario, S. Micera, *J. Neurosci. Methods* **2008**, *172*, 294.
- [126] K.-P. Hoffmann, K. P. Koch, T. Dörge, S. Micera, *BioRob, Pisa, Proceedings* **2006**, 414.
- [127] S. Micera, X. Navarro, J. Carpaneto, L. Citi, M. P. Rossini, M. C. Carozza, K.-P. Hoffmann, M. Vivo, K. Yoshida, P. Dario, *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* **2008**, *16*, 453.
- [128] T. Stieglitz, H. Beutel, M. Schüttler, J.-U. Meyer, *Biomed. Microdevices* **2000**, *2*, 283.
- [129] T. Dörge, S. Kammer, M. Hanauer, A. Sossalla, S. Steltenkamp, *SPIE Europe Microtechnologies* **2009**, 7365.
- [130] K.-P. Hoffmann, R. Ruff, K. Becher, *VDE-Kongress „E-Mobility“ Proceedings VDE Kongress Band 1 Leipzig 2010* **2010**, 109.
- [131] R. Ruff, W. Poppendieck, A. Gail, S. Westendorf, M. Russold, S. Lewis, T. Meiners, K.-P. Hoffmann, *Proceedings 32nd Annual IEEE EMBS Conference, Buenos Aires 2010* **2010**, 5070.
- [132] P. M. Rossini, S. Micera, A. Benvenuto, J. Carpaneto, G. Cavallo, L. Citi, C. Cipriani, L. Denaro, V. Denaro, G. D. Pino, F. Ferreri, E. Guglielmelli, K.-P. Hoffmann, S. Raspopovic, J. Rigosa, L. Rossini, M. Tombini, P. Dario, *Clin. Neurophysiol.* **2010**, *121*, 777.
- [133] H. Lippert, *Anatomie: Text und Atlas, 6. Auflage*, Urban und Schwarzenberg, **1995**.
- [134] *Pschyrembel Medizinisches Wörterbuch, Sonderausgabe Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage*, **1993**.
- [135] J. Heitbaum, W. Vielstich, *Electrochim. Acta* **1973**, *18*, 967.
- [136] T. Yoshitake, Y. Shimakawa, S. Kuroshima, H. Kimura, T. Ichihashi, Y. Kubo, D. Kasuya, K. Takahashi, F. Kokai, M. Yudasaka, S. Iijima, *Physica B: Condensed Matter* **2002**, *323*, 124.

- [137] E. Antolini, *J. Mater. Sci.*, **38**, 2995.
- [138] Z. Q. Tian, S. P. Jiang, Y. M. Jiang, P. K. Shen, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (11), 5343.
- [139] R. Merget, G. Rosner, *Sci. Total Environ.* **2001**, *270*, 165.
- [140] L. Marosi, G. Benczúr-Ürmösy, H. J. Becher, *Z. anorg. allg. Chem.* **1971**, *886*, 47.
- [141] J. Lenz, B. C. Campo, M. Alvarez, M. A. Volpe, *J. Catal.* **2009**, *267*, 50.
- [142] H.-G. Boyen, P. Ziemann, U. Wiedwald, V. Ivanova, D. M. Kolb, S. Sakong, A. Gross, A. Romanyuk, M. Büttner, P. Oelhafen, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 394.
- [143] V. Ivanova, T. Baunach, D. M. Kolb, *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 4283.
- [144] M. Manolova, V. Ivanova, D. M. Kolb, H.-G. Boyen, P. Ziemann, M. Büttner, A. Romanyuk, P. Oelhafen, *Surface Science* **2005**, *590*, 146.
- [145] T. Baunach, V. Ivanova, D. A. Scherson, D. M. Kolb, *Langmuir* **2004**, *20*, 2797.
- [146] J. Gajdzik, *Immobilisierung von Redoxenzymen auf nano- und polykristallinen Metalloberflächen* **2007**, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [147] M. Bannwarth, D. Heckmann-Pohl, S. Bastian, F. Giffhorn, G. E. Schulz, *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45*, 6587.
- [148] B. M. Hallberg, C. Leitner, D. Haltrich, C. Divn, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 197.
- [149] W. Jin, U. Wollenberger, E. Kärger, W.-H. Schunck, F. W. Scheller, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, *433*, 135.
- [150] A. M. Bond, H. A. O. Hill, S. Komorsky-Lovric, M. E. M. M. Lovric, I. S. M. Psalti, N. J. Walton, *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 8100.
- [151] W. Jin, *Redox reactions of proteins at functionalized electrode* **1998**, Dissertation, Universität Berlin.
- [152] A. Ulman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533.
- [153] D. Trau, R. Renneberg, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1491.
- [154] I. M. Weidinger, D. H. Murgida, W. F. Dong, H. Möhwald, P. Hildebrandt, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 522.
- [155] M. G. Manolova, *Struktur von und Metallabscheidung auf mit aromatischen Thiofilmen bedeckten Au(111) Oberflächen* **2006**, Dissertation, Universität Ulm.
- [156] T. Baunach, V. Ivanova, D. M. Kolb, H.-G. Boyen, P. Ziemann, M. Büttner, P. Oelhafen, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2024.
- [157] S. C. Sinha, S. Das, L.-S. Li, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Nature Protocols* **2007**, *2*, 449.
- [158] F. Giffhorn, S. Köpper, A. Huwig, S. Freimund, *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 734.