

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM TÜBINGEN 2001

Trends bei elektrochemischen Sensor-Arrays (Tutorial)

Gunther Wittstock

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, FB Chemie und Institut für Chemie und Biologie des Meeres, PF 2503, D-26111 Oldenburg

gunther.wittstock@uni-oldenburg.de www.chemie.uni-oldenburg.de/pc/wittstock

Zusammenfassung

Der Tutorial-Vortrag berücksichtigt amperometrische und voltammetrische Sensor-Arrays. Dabei liegt ein Augenmerk auf den neuen Wirkprinzipien, die sich bei einer Miniaturisierung der Komponenten verwirklichen lassen.

Einführung

Elektrochemische Sensoren können auf potentiometrischen, impedimetrischen, kapazitiven, amperometrischen und voltammetrischen Transducern beruhen. Der Beitrag widmet sich den Transducern mit amperometrischen und voltammetrischen Detektionsprinzipien. Im Unterschied zu den anderen Detektionsprinzipien findet an der Grenzfläche Transducer/Lösung eine fortlaufende heterogene Umsetzung des detektierten Teilchen statt. Dadurch ergeben sich besondere Möglichkeiten und Herausforderungen bei der Miniaturisierung solcher Transducer. Bei Array-Anordnungen lassen sich verschiedene Ansätze und Zielrichtungen erkennen. Zum einen setzt man parallel geschaltete Elektroden eines Arrays zur Detektion *eines Analyten* ein. Weiterhin kann *ein* Analyt an einem Array aus einzeln ansprechbaren Elektroden nachgewiesen werden. Das bekannteste Beispiel hierfür sind die Interdigitalstrukturen. Schließlich existieren Arrays aus einzeln auslesebaren Sensoren für *verschiedene* Analyten.

Allgemein bezeichnet man Elektroden, die in mindestens einer Dimension kleiner als die Diffusionsweglänge $[(2Dt)^{1/2}]$, D - Diffusionskoeffizient, t - kritische Zeit, typisch einige Sekunden) der gelösten Reaktanten sind, als Ultramikroelektroden (UME) [1]. Ihre besonderen Eigenschaften ergeben sich aus (a) der *erhöhten Massentransportgeschwindigkeit* (radiale Diffusion), (b) der *verringerten Doppelschichtkapazität* (kleine Fläche) und (c) dem *verringerten ohmschen Spannungsabfall* (kleine Ströme).

Parallel geschaltete Ultramikroelektroden

Der effektive Massentransport verringert den Einfluß der Lösungskonvektion auf das Signal und bewirkt eine schnelle Einstellung stationärer Ströme auch in ruhenden Lösungen. Wegen den unterschiedlichen Abhängigkeiten des faradayschen Stroms und des Doppelschichtladestroms erlaubt eine Miniaturisierung eine Verbesserung des Verhältnis von Nutz- zu Störsignal bei der amperometrischen und voltammetrischen Detektion (Abb. 1). Isolierte Mikroelektroden konnten sich jedoch

bisher nicht als Basistransducer für Biosensoren durchsetzen, die außerhalb von Forschungslabors zum Einsatz kommen sollen. Vor diesem Hintergrund erfolgen intensive Bemühungen zur Herstellung parallel geschalteter Ultramikroelektroden-Arrays (UMEA) aus verschiedenen Materialien [2, 3].

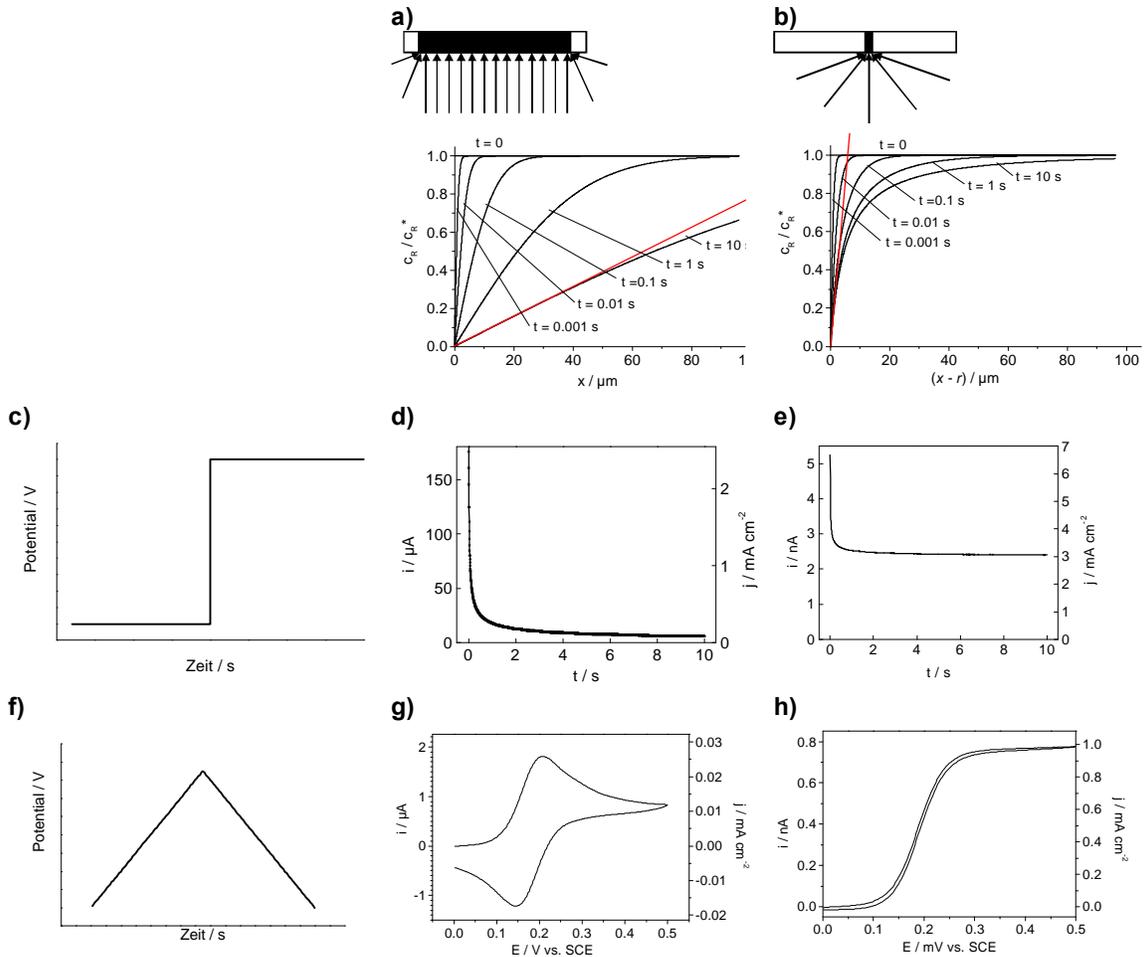
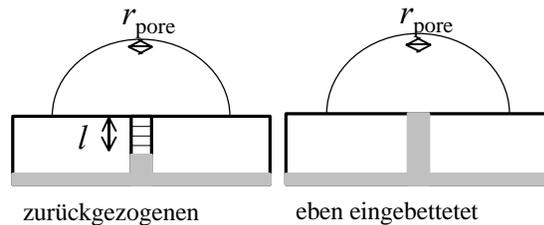


Abb. 1: Vergleich der lokalen Konzentration während der Umsetzung an **a)** konventionellen Elektroden (\bar{r} 3 mm) und **b)** UME (\bar{r} 10 μm). Unter diffusionskontrollierten Bedingungen ist der Strom proportional zum Konzentrationsgradienten $(\partial c/\partial x)_{x=0}$ an der Elektrodenoberfläche ($x = 0$, rote Linien). In einem Potentialsprungexperiment **(c)** äußert sich die planare Diffusion an den konventionellen Elektroden **(d)** durch einen monotonen Abfall des Reaktionsstromes durch Ausdehnung der Diffusionsschicht während sich an der UME **(e)** schnell ein stationärer Diffusionsgrenzstrom einstellt, der bei kleinen Gesamtströmen viel größere Stromdichte aufweist als die Makroelektrode. Im zykl voltammetrischen Experiment $v = 0,01 \text{ V s}^{-1}$ **(f)** mit einem reversiblen Redoxsystem entsprechen dieser Situation wellenförmige **(g)** bzw. stufenförmige Kurven **(h)**.

Ein UMEA verhält sich nur dann wie die Summe der sie bildenden UME, wenn der Inter-elektrodenabstand größer als die Ausdehnung der Diffusionsschicht ist. Als Faustregel mag gelten, daß der Interelektrodenabstand mindestens größer als der 10-fache Radius der einzelnen UME sein

muß. In diesen Fällen ergeben sich Ströme, die genauso groß wie an makroskopischen Elektroden sind, gleichzeitig aber wichtige Vorteile isolierter UME aufweisen. Komplizierter stellt sich das Layout von UMEA dar, wenn sie auch in der vertikalen Dimension strukturiert sind, wie es zum Beispiel bei verschiedenen Herstellungsverfahren unter Nutzung eines "Resists" der Fall ist [4]. In diesen Fällen verringert sich die Empfindlichkeit eines Sensors um den Faktor

$$y = \left(1 + \frac{4l}{P r_{pore}} \right)^{-1}$$



Experimentell bestätigt sich diese Vorhersage sehr genau [4]. Für quadratische Elektroden ($r_{pore} = a \pi^{1/2}$) mit einer Kantenlänge von $a = 50 \mu\text{m}$ und einer "Resist"-Dicke $l = 15 \mu\text{m}$ beträgt die Empfindlichkeit nur noch 57 %, bei $a = 10 \mu\text{m}$ und $l = 15 \mu\text{m}$ sind es lediglich 23 % der Empfindlichkeit einer analogen Anordnung mit planarer Einbettung! Wichtigste Anwendungsgebiete sind die Bestimmung von Schwermetallen mit Stripping-Methoden (effektive Anreicherung) [2] und handgehaltene amperometrische Sensoren sowie Detektoren in Fließsystemen [5]. Gegenwärtig noch bestehende Herausforderungen liegen in der Etablierung allgemein zugänglicher, kostengünstiger Arrays, die auch in Elektrolytlösungen und beim Ablauf einer elektrochemischen Reaktion stabil sind. Optimierungen zielen auf die Anwendung neuer dünnschichttechnologischer Prozedurvarianten und den Einsatz neuer Materialkombinationen [3]. In diesem Zusammenhang sind auch die kommerziell verfügbaren RAMTM-Elektroden einzuordnen (*Random Assemblies of Microelectrodes*) [6]. In einer scheibenförmigen Elektrode ($\varnothing 6 \text{ mm}$) sind 3200 Kohlefasern ($\varnothing 3,5 \mu\text{m}$) eingebettet, von denen 20-40 % extern kontaktiert sind, so daß der mittlere Interelektrodenabstand $70 \mu\text{m}$ beträgt, so daß sich diese Anordnungen wie Arrays unabhängiger Mikroelektroden verhalten.

Mikrokompartimentalisierte Elektroden

Aber auch parallel geschaltete Elektroden-Arrays mit kleinen Interelektrodenabständen erfahren als mikrokompartimentalisierte Elektroden eine verstärkte Aufmerksamkeit [7]. Dabei erfolgen die biochemische Analyterkennung und die elektrochemische Transduktion an verschiedenen Mikroregionen einer makroskopischen Elektrode. Da nur ein kleiner Teil der Oberfläche für die Transduktion benötigt wird, kann der zwischenliegende Teil als reiner Träger für die biochemischen Erkennungselemente dienen. Damit erhöhen sich die Gestaltungsspielräume erheblich. Da die immobilisierten Biomoleküle in diesem Design nicht als Diffusionsbarriere wirken, lassen sich Sensoren mit sehr schnellen Ansprechzeiten realisieren [8]. Die in den 90er Jahren in der Breite wirksam gewordenen neuen mikroskopischen Verfahren gestatten es, die laterale Funktionsverteilung auf den Elektrodenoberflächen zu untersuchen und damit auf rationaler Basis zu optimieren (Fig. 2).

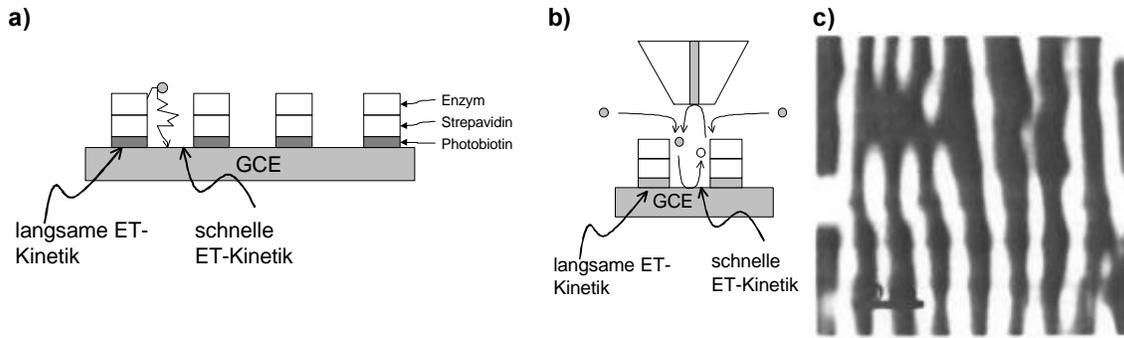


Abb. 2: Prinzip eines mikrokompartimentierten Sensors (a) und Untersuchung der Funktionsverteilung auf der Elektrode mit der elektrochemischen Rastermikroskopie (SECM), schematisch (b) und Messung (c) eines $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ Ausschnitts (hell entspricht hohen Strömen). Abb. 2c reprinted from *Biosensors Bioelectronics*, vol. 13, W.B. Nowall, N. Dontha, W.G. Kuhr, *Electron transfer kinetics at a biotin/avidin patterned glassy carbon electrode*, p. 1243, Copyright (1998), with permission from Elsevier Science.

Ein andere Weg zu parallel geschalteten Elektroden-Arrays mit überlappenden Diffusionsschichten besteht in Templatsynthesen. Ausgehend von Kernspurmembranen können die Poren durch stromlose Abscheidung von Gold aufgefüllt werden und mittels eines Klebefilms die Querschnitte als annähernd mikroscheibenförmige Elektroden freigelegt werden [9]. Solche Arrays besitzen eine extrem verringerte Doppelschichtkapazität, die bis zu einem Faktor von 10^3 verbesserte Nachweisgrenzen erlaubt [10]. Elektrochemische Templatsynthesen bilden auch die Grundlage für den Aufbau neuartiger nanostrukturierter Biosensoren. Dabei werden die beiden äußeren Oberflächen der Kernspurmembran mit Gold beschichtet. Diese beiden Goldschichten werden über die Poren durch leitfähiges Polyanilin verbrückt, in das Enzyme eingebettet sind. Deren Metabolismus führt über eine pH-Änderung zu einer Änderung der Leitfähigkeit der Einbettungsmatrix [11]. Durch Strukturierung der aufgedampften Goldschichten und sequentielle Abscheidung des Polyanilins mit den einzubettenden Enzymen lassen sich verschiedener Sensoren, z.B. für Glucose, Harnstoff und Triglyceride auf einer Membran vereinigen, ohne daß Interferenzen auftreten.

Empfindlichkeitssteigerung durch Redoxrecycling an Interdigitalstrukturen

Arrays aus individuell ansprechbaren elektrochemischen Sensoren eröffnen eine Reihe neuer Perspektiven. Hier sind zunächst die verzahnten kammartigen Mikrobandelektroden (IDA, *interdigitated arrays*) zu nennen, die aus einem Generator und einem Kollektor bestehen, an dem ein reversibles oder quasi-reversibles Redoxsystem mehrfache Redoxreaktionen eingeht. Ein Kamm wird so polarisiert, daß eine Oxidation stattfindet, an dem anderen Kamm erfolgt die Reduktion. Die Teilchen gelangen durch Diffusion von einem Band zu den benachbarten Bändern. Dieses als Redoxrecycling bezeichnete Prinzip findet außer in IDAs auch in elektrochemischen Dünnschichtzellen und im Feedback-Modus des elektrochemischen Rastermikroskops (SECM) Anwendung. Die Verstärkungsfaktoren sind bei gegebener Gesamtfläche des Arrays um so größer, je größer die Zahl m der Elektrodenpaare und je kleiner der Interelektrodenabstand w_g ist Gl. (1) [12].

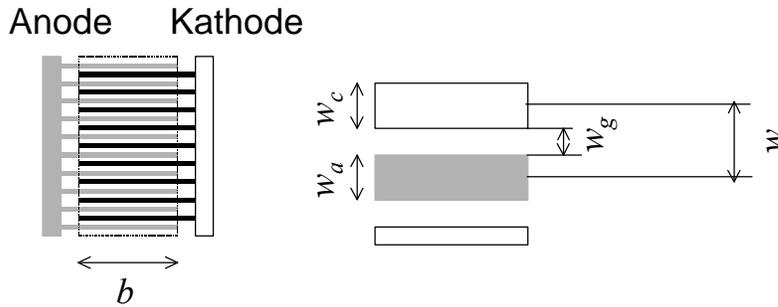


Abb. 3: Definition der Parameter eines Interelektrodenarrays.

$$i = m b n F c * D \left[0,637 \ln \left(2,55 \frac{w}{w_g} \right) - 0,19 \frac{w_g^2}{w^2} \right] \quad (1)$$

Die Miniaturisierung unter Verwendung der Dünnschichttechnik deutlich unter 1 μm und die Testung der Zuverlässigkeit der so erhaltenen Elektroden stellt daher weiterhin einen wichtige Arbeitsrichtung dar [2]. Die Integration von biologischen Erkennungsprinzipien wurde vor allem von Hintsche et al. [13, 14] vorangetrieben. Dabei werden in Affinitätssensoren durch Markierungsenzyme (z.B. alkalische Phosphatase) niedermolekulare Verbindungen gebildet, die sich mehrfach oxidieren und reduzieren lassen (z.B. p-Aminophenol, Abb. 4) Diese Verbindungen werden dann über Mikrokanäle auf das IDA gespült. Neuere Ergebnisse zur direkten Integration der biochemischen Erkennungselemente auf den Chips und zur Parallelisierung der Messungen [15] werden auch in Beiträgen auf diesem Symposium vorgestellt [16].

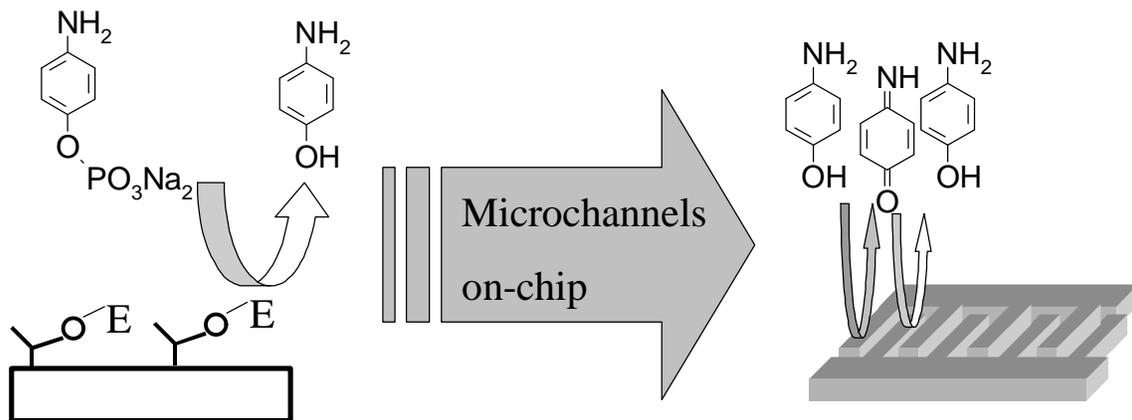


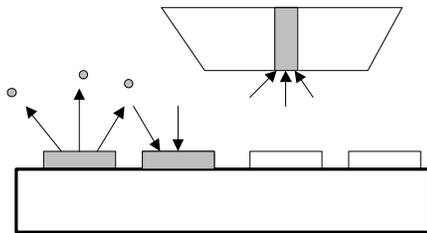
Abb. 4: Auslesung eines elektrochemischen Bioaffinitätsassay an einem IDA mit alkalischer Phosphatase als Markierungsenzym.

Arrays aus einzeln ansprechbaren Biosensoren

Schließlich stellen Arrays aus mehreren unabhängig ansprechbaren Biosensoren eine aktive Arbeitsrichtung dar. Diese Sensoren sollen entweder verschiedene Analyte erfassen [17] oder orts aufgelöste Konzentrationsangaben [18] liefern. Neben schon länger verfügbaren, makroskopischen modularen Anordnungen erlaubt die Miniaturisierung auf der Basis von mikroskopischen

Transducern portable Sensor-Arrays für Multianalytbestimmungen zu entwickeln [19], die auch im Rahmen dieses Kolloquiums vorgestellt werden [20]. Für Forschungszwecke eröffnet der Anschliff von Bonding-Drähten auf recycelten Mikroelektronikbausteinen einen einfachen und kostengünstigen Zugang zu unabhängig adressierbaren Elektroden-Arrays [21].

Neben dem Transducer-Array müssen für die Herstellung elektrochemischer Biosensor-Arrays die biologischen Erkennungselemente ortsgerichtet und mikrostrukturiert aufgebracht werden. Dies stellt insofern eine technologische Herausforderung dar, als proteinbasierte Erkennungsreagenzien in Lösung appliziert werden müssen und selbst kleinste Lösungstropfen Flächen benetzen, die größer als die typischer Mikroelektroden sind. Lösungsansätze stellen die lokale Elektropolymerisation unter Einbettung des Enzyms, lokale Photoaktivierung, Aufbringen mit "Tintenstrahlverfahren" und Siebdruck dar [22]. Einen neuen Ansatz stellt C. Kurzawa im Rahmen dieses Symposiums vor [23]. Da der Rückhalt von Enzymen und Antikörpern auf Verkapselungen [24] bei Multianalytsensoren zu Interferenzen führen kann, müssen besondere Verfahren zur lateral begrenzten Immobilisierung von Antikörpern und Enzymen zum Einsatz kommen. Eigene Entwicklungen galten der Ausnutzung von Selbstorganisationsprozessen für die mikroskopische Immobilisierung [25-31]. Neben der ortsgerichteten Agglomeration von oberflächenmodifizierten magnetischen Partikeln auf der Transduceroberfläche [29-31] kamen gemusterte selbstorganisierte Monolagen [25-28] zum Einsatz. Diese lassen sich durch Mikrokontaktdruck und durch lokale elektrochemische Desorption [26, 28] erzeugen und zu komplexen lateral strukturierten biochemischen Funktionsschichten derivatisieren [32]. Dabei erwies sich die elektrochemische Rastermikroskopie als ein ideales Werkzeug sowohl zu Strukturierung von Prototypen als auch zur lokalen Reaktivitätsanalyse enzymatischer Reaktionen [33].



Erzeuger Kollektor

Abb. 5: Unterdrückung von Querempfindlichkeiten durch Umsetzung der interferierenden Verbindungen an lateral angeordneten Zwischenschichten durch elektrochemische Reaktionen [34] oder immobilisierte Enzyme [32]. Die Wirkung kann mit einer positionierbaren Mikroelektrode in einem elektrochemischen Rastermikroskop analysiert werden.

Ein weiteres Problem stellt die Layout-Optimierung dar. Da vielfach verschiedene Analyte über einen gemeinsamen Metaboliten (z.B. H_2O_2) erfaßt werden, besteht die Möglichkeit, daß die enzymatische Umsetzung an einem Array-Element auch zu Signalbeiträgen an den benachbarten Array-Elementen führt. Bei makroskopischen Sensor-Arrays läßt sich diese Problem durch die vertikale Schichtung von

interferenzunterdrückenden Zwischenschichten (z.B. mit Katalase für H_2O_2) lösen [19]. Bei weiterer Miniaturisierung ist diese Strategie jedoch problematisch, da die zweite Schicht exakt über den mikroskopischen Transducern zu positionieren ist. Interferenzunterdrückende Zwischenschichten, die lateral neben den sensitiven Regionen angeordnet sind, könnten sich in Zukunft als vorteilhaft erweisen. Mögliche Realisierungen ergeben sich durch die Elektrolyse der interferenzverursachenden Verbindung an Abgrenzelektroden [34] oder durch eine Umsetzung an interferenzunterdrückenden Zwischenschichten (z.B. aus Katalase für H_2O_2) [32] (Abb. 5).

Hybridsysteme

Eine weitere generelle Tendenz besteht im Aufbau von Hybridsystemen. Dabei werden z.B. verschiedene Erkennungselemente auf einem isolierenden Träger mikrostrukturiert immobilisiert und mit einer beweglichen Mikroelektrode lateral aufgelöst ausgelesen [30, 31, 35]. Abbildung 6 zeigt die Auslesung der Aktivität von Nitratreduktase, die an magnetischen Mikropartikeln gebunden ist.

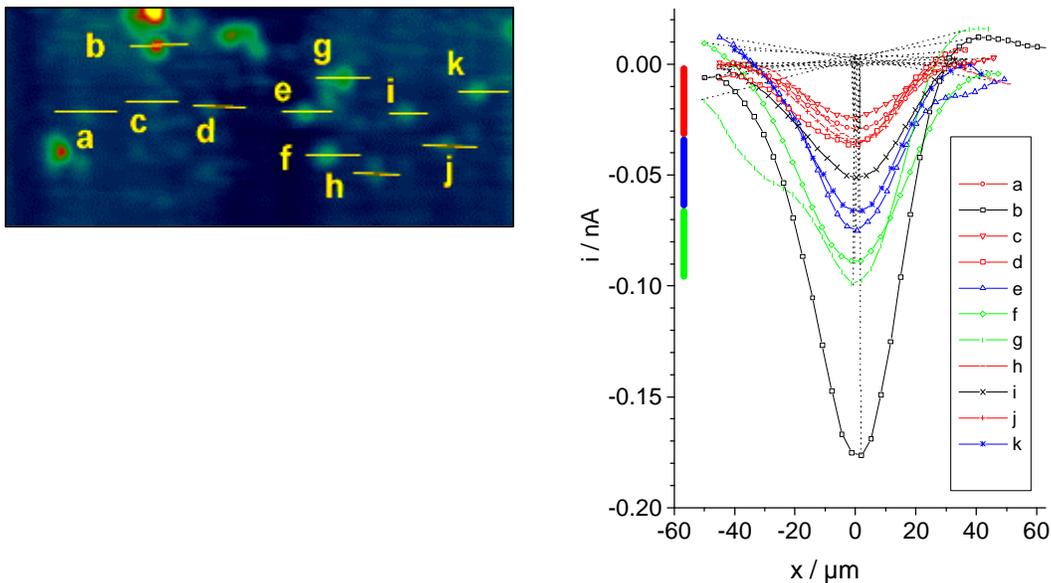


Abb. 6: Detektion von Enzymaktivitäten (Nitratreduktase) auf funktionalisierten magnetischen Mikropartikeln im Feedback-Modus des SECM. Die im rechten Bildteil rot, blau und grün dargestellten Profile aus der 2D-Messung (links) entsprechen den Signalen von ein, zwei und drei agglomerierten Partikeln (nach [31]).

Literatur

- [1] Michael, A.C. und Wightman, R.M. (1996) in *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2. Aufl. (Hrsg. Kissinger, P.T. und Heineman, W.R.). Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong, S. 367.
- [2] Feeney, R. und Kounaves, S.P. (2000) *Electroanalysis*, **12**, 677.
- [3] Suzuki, H. (2000) *Electroanalysis*, **12**, 703.
- [4] Wittstock, G., Gründig, B., Strehlitz, B. und Zimmer, K. (1998) *Electroanalysis*, **10**, 526.
- [5] Schiewe, J., Bond, A.M. und Henze, G. (1999) in *Umweltdiagnostik mit Mikrosystemen* (Hrsg. Henze, G., Köhler, M. und Lay, J.P.). Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichster, Brisbane, Singapore, Toronto, S. 121.
- [6] Fletcher, S. und Horn, M.D. (1999) *Electrochem. Comm.*, **1**, 502.
- [7] Ratcliff, B.B., Klancke, J.W., Koppang, M.D., Engstrom, R.C. (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 2010.
- [8] Nowall, W., Dontha, N. und Kuhr, W.G. (1998) *Biosensor & Bioelectronics*, **13**, 1237.

- [9] Martin, C.R. und Mitchell, D.T. (1999) in *Electroanalytical Chemistry*, Bd. 21 (Hrsg. Bard, A.J. und Rubinstein, I.), Marcel Dekker, New York, S. 1.
- [10] Menon, V. P. und Martin, C.R. (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 1920
- [11] Sukeerthi, S. und Contractor, A.Q. (1999) *Anal. Chem.*, **71**, 2331.
- [12] Aoki, K., Morita, M., Niwa, O. und Tabei, H. (1988) *J. Electroanal. Chem.*, **256**, 269.
- [13] Wollenberger, U., Paeschke, M. und Hintsche, R. (1994) *Analyst*, **119**, 1245,
- [14] Hintsche, R., Paeschke, M., Uhlig, A., Seitz, R. (1997) in *Frontiers in Biosensorics*, Bd. 1 (Hrsg. Scheller, F.W., Schubert F. und Fedrowitz, J.) Birkhäuser, Basel 1997, S. 267.
- [15] Hintsche, R., Albers, J., Bernt, H. und Eder, A. (2000) *Electroanalysis*, **12**, 666.
- [16] Nebling, E., Grunwald, T., Albers, J. und Hintsche, R. (2001) *Tagungsband 2. Biosensor-Symposium* (Hrsg. Gauglitz, G.), Tübingen, S. 38.
- [17] Kasai, N., Jimbo, Y., Niwo, O., Matsue, T. und Torimitsu, K. (2000) *Electrochemistry*, **68**, 886.
- [18] Meyer, H., Drewer, H., Gründing, B., Camman, K., Kakerow, R., Manioli, Y., Mokwa, W. und Rospert, M. (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 1164.
- [19] Urban, G.A., und Jobst, G. (1997) in *Frontiers in Biosensorics*, Bd. 2 (Hrsg. Scheller, F.W., Schubert F. und Fedrowitz, J.) Birkhäuser, Basel, S. 161.
- [20] Moser, I., Jobst, G. und Enderle, B. (2001) *Tagungsband 2. Biosensor-Symposium* (Hrsg. Gauglitz, G.), Tübingen, S. 40.
- [21] Matos, R.C., Augelli, M.A., Lago, C.L. und Angnes, L. (2000) *Anal. Chim. Acta*, **404**, 151.
- [22] Habermüller, K., Kranz, C. und Schuhmann, W. (1999) in *Umweltdiagnostik mit Mikrosystemen* (Hrsg. Henze, G., Köhler, M. und Lay, J.P.). Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichster, Brisbane, Singapore, Toronto, S. 304.
- [23] Kurzawa, C, Hengstenberg, A. und Schuhmann, W. (2001) *Tagungsband 2. Biosensor-Symposium* (Hrsg. Gauglitz, G.), Tübingen, S. 35.
- [24] Wilhelm, T., Szargan, R., und Wittstock, G (1999) *Fresenius J. Anal. Chem.*, **365**, 163.
- [25] Wittstock, G., Hesse, R. und Schuhmann, W. (1997) *Electroanalysis*, **9**, 746.
- [26] Wittstock, G. und Schuhmann, W. (1997) *Anal. Chem.*, **69**, 5059.
- [27] Wilhelm, T. und Wittstock, G. (2000) *Mikrochim. Acta*, **133**, 1.
- [28] Wilhelm, T. und Wittstock, G. (2001) *Electrochim. Acta*, **47**, 275.
- [29] Wijayawardhana, A.C., Wittstock, G., Halsall, B.H. und Heineman, W.R. (2000) *Anal. Chem.*, **72**, 333.
- [30] Wijayawardhana, A.C., Wittstock, G., Halsall, B.H. und Heineman, W.R. (2000) *Electroanalysis*, **9**, 640.
- [31] Wittstock, G., Wilhelm, T., Bahrs, S. und Steinrücke, P. (2001) *Electroanalysis*, **13**, 669.
- [32] Wilhelm, T. und Wittstock, G. in Vorbereitung.
- [33] Horrocks, B.R. und Wittstock, G. (2001) in *Scanning Electrochemical Microscopy* (Hrsg. Bard, A.J. und Mirkin, M.V.) Marcel Dekker, New York, S. 445.
- [34] Strike, D.J., Hengstenberg, A., Quinto, M., Kurzawa, C., Koudelka-Hep, M. und Schuhmann, W. (1999) *Mikrochim. Acta*, **131**, 47.
- [35] Shiku, H. und Matsue, T. (2000) *Sensors Update*, Bd. 6 (Hrsg. Baltes, H., Göpel, W. und Hesse, J.), Wiley-VCH, Weinheim, S. 231.