

Technische Universität München
Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

**Sensorchips für die multiparametrische zelluläre Bioanalytik
und für biohybride Bauelemente**

Johann Christoph Reßler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
der Technischen Universität München zu Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. H.-G. Herzog

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. B. Wolf
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing. F. Puente León

Die Dissertation wurde am 17. Januar 2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
am 21. Oktober 2008 angenommen.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Optimierung von elektrischen Sensoren für den Einsatz in der multiparametrischen biomedizinischen Analytik. Ausgangspunkt waren bestehende Sensorchips mit Sensoren für pH, Sauerstoffpartialdruck, Impedanz, elektrische Potentiale und Temperatur. Diese werden für die simultane in-vitro Messung von metabolischen, morphologischen und elektrophysiologischen Parametern von lebenden Zellen und Geweben eingesetzt. Aufgrund der als ionensensitiven Feldeffekttransistoren ausgeführten pH-Sensoren wurden diese Sensorchips bisher mit Siliziumhalbleitertechnologie hergestellt und zum Teil mit Hilfe einer aufwendigen Hybridtechnik mit Glaschips verbunden. Ziel der Arbeit war es, die pH-Messung mit ionensensitiven Feldeffekttransistoren durch pH-Sensoren auf der Basis von Metalloxid-Elektroden zu ersetzen. Hierfür wurde durch Voruntersuchungen Rutheniumoxid aus einer Reihe von geeigneten Metalloxiden ausgewählt. Dieses Material wurde dann umfassend für die Verwendung als Elektrodenmaterial für pH-Sensoren in biomedizinischen Anwendungen charakterisiert. Darüberhinaus wurde die Ausführung der Elektroden optimiert und die notwendige Meßelektronik entwickelt. Unter Verwendung dieser optimierten pH-Sensoren wurde eine Reihe neuer multiparametrischer Sensorchips auf Keramik- und Glassubstrat für verschiedene Anwendungsgebiete entworfen und in Zusammenarbeit mit Industriepartnern mit Hilfe mikrosystemtechnischer Produktionsverfahren hergestellt. Im Zuge des Neuentwurfs entstanden neben den multiparametrischen Sensorchips für Einzelmessungen auch erstmals Sensorchips mit denselben Sensoren für 24-Well-Platten, die die Parallelisierung von bis zu 24 multiparametrischen Messungen ermöglichen. Um den technischen Aufwand bei der Parallelisierung von bis zu 24 Sensoren zu minimieren wurden hierfür insbesondere die Impedanzsensoren für die Messung von morphologischen Parametern angepaßt und hierfür neue Meßelektronik entworfen und aufgebaut. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Sensorchips wurden, zum Teil unter Änderung und Optimierung vorhandener Chipgehäuse, mit lebenden Zellen zur Anwendung gebracht und zeigen vielversprechende Ergebnisse für den Einsatz in vielen Anwendungsbereichen auf den Gebieten der Biochemie, Medizin, Pharmazie und Biotechnologie. Die Arbeit enthält darüberhinaus eine umfassende Darstellung der wichtigsten biologischen, elektrochemischen und sensortechnologischen Grundlagen für alle Sensortypen, die beim Neuentwurf der Sensorchips zum Einsatz kamen.

Abstract

This thesis addresses the optimization of electric sensors for multi-parametric biomedical applications. The work is based on existing sensorchips containing sensors for pH, oxygen-pressure, impedance, electric potentials and temperature. These have been used for the simultaneously in-vitro measurement of metabolic, morphologic and electrophysiologic parameters of living cells and tissue. Due to the pH-sensors, which are performed as ion sensitive field effect transistors, the sensorchips have been fabricated using silicon semiconductor technologies and partly spliced with glass-based sensorchips applying a hybrid technology. The goal of this work was the substitution of the field effect transistor-based pH-measurement with metal-oxide based electrodes. Therefore rutheniumoxide was selected from a range of appropriate materials by preselection. Within this work, rutheniumoxide as electrode material were widespreadly characterized for biomedical applications. Accordingly the electrode-configuration was optimized and the required measurement electronics was developed. Using this optimized pH-electrode, a range of new multiparametric sensorchips based on ceramic- and glass-substrates for various applications were designed and fabricated by microsystems-production-techniques in collaboration with industrial partners. Beside the multiparametric sensorchips for single measurements, newly sensorchips for 24-well-plates were developed allowing 24 simultaneous measurements. These sensorchips contain the same sensors as the chips for single measurements. To reduce the technical complexity, the configuration of the impedance-sensors for morphologic measurements were optimized and the measurement electronics was adapted. All sensorchips developed in this work were applied to measuring living cells or tissue, partly with modified packagings. Promising results were achieved for the applying to various fields of applications as biochemistry, medicine, pharmacy and biotechnology. Furthermore, this thesis contains a widespread description of the fundamental biological, electrochemical and technological basics related to the used sensor-types.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

- Herrn Prof. Dr. Bernhard Wolf danke ich für die Möglichkeit zur Promotion und der Vergabe und Betreuung des Themas, sowie für die nunmehr fast siebenjährige gute Zusammenarbeit an seinem Lehrstuhl
- Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Herzog für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und Herrn Prof. Dr. Fernando Puente León für die Erstellung des zweiten Gutachtens
- Herrn Dr. Helmut Grothe danke ich für die Betreuung der technischen und technologischen Aspekte der Arbeit und die vielen hilfreichen Ratschläge und Anregungen zur Sensortechnik und zur Herstellungstechnologie
- Für die Betreuung der biologischen und elektrochemischen Aspekte der Arbeit sei Herrn Dr. Martin Brischwein gedankt, der auf diesen Gebieten immer mit Rat und Tat zur Seite stand
- Frau PD Dr. Angela Otto danke ich für die viele Hilfe im Bereich Zellbiologie und der unermüdlichen Hilfestellung bei Veröffentlichungen
- Herrn PD Dr. Thomas Weyh und Herrn Dr. Bernhard Gleich danke ich für viele Diskussionen und Fachgespräche bezüglich elektronischen und impedanztechnischen Belangen
- Frau Margarete Remm sei für Rat and Tat in technologischen Fragestellungen und der Herstellung unzähliger Sensorchips gedankt
- Meinem Studenten Daniel Schiopu gilt besonderer Dank für die gemeinsame Arbeit an der Charakterisierung der Rutheniumoxid-Sensoren im Rahmen seiner Bachelor- und Diplomarbeit sowie mehreren Projektpraktika
- Meinen Kollegen Herrn Wiest, Herrn Lob, Herrn Ilchmann und Herrn Meyer gilt mein Dank für die langjährige Zusammenarbeit auf unserem interdisziplinären Fachgebiet
- Dem Werkstattpersonal Herrn Robert Arbogast und Herrn Wolfgang Ruppert danke ich für die hervorragende Herstellung unzähliger Geräte und Baugruppen, die für die vorliegende Arbeit unerlässlich waren
- Der Dank für Laborassistenz gilt Herrn Alfred Michelfelder und Frau Gudrun Teschner
- Unserer Sekretärin Frau Ingrid Franz danke ich besonders für die Hilfe in allen nur erdenklichen Lagen
- Mein besonderer Dank gilt der Fa. Heraeus Sensor Technology GmbH in Kleinostheim, Herrn Dr. Wienand und Herrn Dr. Asmus für die finanzielle Unterstützung, der Herstellung der Sensorchips und die gute Zusammenarbeit während der letzten Jahre

- Der Stiftung Industrieforschung danke ich für die Finanzierung der Arbeit
- Der Fa. RAWE Electronic GmbH in Weiler im Allgäu, Herrn Schröder und Herrn Pfaff danke ich für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Impedanzelektronik

Peißenberg, den 17. Januar 2008

Johann Christoph Reßler

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Kurzfassung | iii |
| Abstract | v |
| Danksagung | vii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Technische Möglichkeiten und Grenzen der Untersuchung von lebenden Zellen und Geweben | 1 |
| 1.2 Untersuchung von lebenden Zellen mit Hilfe von Biosensoren | 3 |
| 1.3 Stand der Technik | 6 |
| 1.3.1 Biosensoren allgemein | 6 |
| 1.3.2 Messung des pH-Wertes | 6 |
| 1.3.3 Messung des Sauerstoffpartialdrucks | 7 |
| 1.3.4 Messung der Zelladhäsion und der Zellmorphologie | 7 |
| 1.3.5 Messung der elektrischen Aktivität von Zellen | 8 |
| 1.3.6 Multiparametrische Sensorchips | 8 |
| 1.3.7 Parallelisierung von multiparametrischen Messungen | 8 |
| 1.4 Aufgabenstellung und Aufbau der Arbeit | 9 |
| 2 Grundlagen der Zellbiologie | 11 |
| 2.1 Die Zelle | 11 |
| 2.2 Zellmetabolismus | 14 |
| 2.2.1 Grundlagen | 14 |
| 2.2.2 Aktivierte Transportermoleküle | 15 |
| 2.2.3 Überblick über die Stoffwechselwege in der Zelle | 16 |
| 2.2.4 Die Glykolyse | 17 |
| 2.2.5 Der Citratzyklus | 20 |
| 2.2.6 Die oxidative Phosphorylierung | 21 |
| 2.2.7 Die Photosynthese | 23 |
| 2.2.8 Zusammenfassung | 26 |
| 2.3 Zelloberfläche und extrazelluläre Matrix | 28 |
| 2.3.1 Grundlagen | 28 |
| 2.3.2 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen | 29 |
| 2.4 Elektrische Aktivität | 30 |
| 2.4.1 Grundlagen | 30 |
| 2.4.2 Das Aktionspotential | 33 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Grundlagen der Sensortechnologie | 37 |
| 3.1 | Elektrochemische Grundlagen | 37 |
| 3.1.1 | Elektrolytlösungen | 37 |
| 3.1.2 | Leitfähigkeit von Elektrolytlösungen | 41 |
| 3.2 | Elektrodentheorie | 46 |
| 3.2.1 | Grundlagen | 46 |
| 3.2.2 | Vorgänge an Elektrodenoberflächen | 46 |
| 3.2.3 | Die elektromotorische Kraft | 49 |
| 3.2.4 | Redoxpotential und Nernst-Gleichung | 50 |
| 3.3 | Referenzelektroden | 52 |
| 3.3.1 | Grundlagen | 52 |
| 3.3.2 | Die Normal-Wasserstoff-Elektrode | 52 |
| 3.3.3 | Die Ag/AgCl-Elektrode | 52 |
| 3.4 | pH-Sensoren | 55 |
| 3.4.1 | Grundlagen | 55 |
| 3.4.2 | Glaselektrode | 57 |
| 3.4.3 | Ion Sensitive Field-Effect Transistor, ISFET | 60 |
| 3.4.4 | Light Addressable Potentiometric Sensor, LAPS | 64 |
| 3.4.5 | pH-Sensoren auf Metalloxidbasis | 66 |
| 3.5 | Sauerstoff-Sensoren | 66 |
| 3.5.1 | Grundlagen | 66 |
| 3.5.2 | Clark-Sensor | 67 |
| 3.5.3 | Elektrische Eigenschaften | 68 |
| 3.6 | Impedanz-Sensoren | 70 |
| 3.7 | Elektrodenstrukturen zur Ableitung von Potentialen | 71 |
| 3.8 | Pt-Temperatursensoren | 72 |
| 4 | pH-Sensoren auf der Basis von Metalloxiden | 75 |
| 4.1 | Stand der Technik | 75 |
| 4.1.1 | Materialbetrachtungen | 75 |
| 4.1.2 | Grundlegende Herstellungsverfahren | 78 |
| 4.1.3 | Spezielle Herstellungsverfahren | 79 |
| 4.2 | Theorie der Potentialentstehung | 80 |
| 4.2.1 | Das Site-Binding-Modell für Oxide | 80 |
| 4.2.2 | Zusammenfassung | 84 |
| 4.2.3 | Einfluß weiterer Elektrolyt-Ionen auf das Site-Binding-Modell | 85 |
| 4.2.4 | Störeffekte | 85 |
| 4.2.5 | Weitere Theorien zur Potentialentstehung | 88 |
| 5 | Charakterisierung von Rutheniumoxid als pH-Sensor | 91 |
| 5.1 | Meßaufbau und Methoden | 91 |
| 5.1.1 | Meßstand | 91 |
| 5.1.2 | Meßelektronik | 92 |
| 5.1.3 | Meßsoftware | 94 |
| 5.1.4 | Einspannvorrichtungen | 95 |
| 5.1.5 | Referenzelektrode | 96 |
| 5.1.6 | Fluidik und Gesamtsetup | 98 |
| 5.1.7 | Pufferlösungen | 99 |
| 5.2 | Versuche | 101 |
| 5.2.1 | Meßreihe 1 | 102 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.2 | Meßreihen 2 bis 7 | 103 |
| 5.2.3 | Meßreihen 8 bis 12 | 104 |
| 5.2.4 | Meßreihen 13 bis 15 | 105 |
| 5.3 | Ergebnisse | 107 |
| 5.3.1 | pH-Empfindlichkeit und Ansprechzeit von RuO_2 | 107 |
| 5.3.2 | Rauschverhalten von RuO_2 -Sensoren bei der pH-Messung | 109 |
| 5.3.3 | Einschwingverhalten bei erstem Kontakt mit Flüssigkeiten und Driftverhalten in Langzeitmessungen | 111 |
| 5.3.4 | Beeinflußbarkeit des Einschwingverhaltens durch Anlegen von äußeren Spannungen | 113 |
| 5.3.5 | Querempfindlichkeit zum Sauerstoffpartialdruck und anderen Ionen | 116 |
| 5.3.6 | Querempfindlichkeit zur Temperatur | 117 |
| 5.3.7 | Messungen zur Untersuchung der Lichtempfindlichkeit | 117 |
| 5.3.8 | Abhängigkeit der Charakteristika von der aktiven Sensorfläche | 118 |
| 5.3.9 | Abhängigkeit der Charakteristika von der Dicke der Oxidschicht | 119 |
| 5.3.10 | Hysterese | 121 |
| 5.3.11 | Biokompatibilität | 121 |
| 5.3.12 | Weitere Ergebnisse | 122 |
| 5.4 | Zusammenfassung und Diskussion | 122 |
| 5.4.1 | Zusammenfassung | 122 |
| 5.4.2 | Vergleich der Ergebnisse mit den substituierten ISFETs | 124 |
| 5.4.3 | Vergleich der Ergebnisse mit dem Stand der Literatur | 126 |
| 6 | Impedanzsensoren | 127 |
| 6.1 | Grundlagen | 127 |
| 6.1.1 | Zelladhäsion | 127 |
| 6.1.2 | Anwendung der elektrischen Impedanz in zellulären Messungen | 128 |
| 6.2 | Interdigitale Elektrodenstrukturen für biologische Messungen | 137 |
| 6.3 | Konzepte für die Parallelisierung von Impedanzmessungen | 138 |
| 6.3.1 | Serielle Schaltung der Interdigitalkondensatoren | 138 |
| 6.3.2 | Interdigitalkondensatoren mit gemeinsamer Masse | 138 |
| 6.4 | Meßschaltung für parallelisierte Impedanzmessungen mit IDES | 139 |
| 6.5 | Feldsimulationen von interdigitalen Elektrodenstrukturen | 142 |
| 7 | Sensorchips | 143 |
| 7.1 | Chipdesigns für morphologische und metabolische Parameter | 143 |
| 7.1.1 | Multiparametrischer Sensorchip auf Glassubstrat | 143 |
| 7.1.2 | Multiparametrischer Sensorchip auf Keramiks substrat | 147 |
| 7.1.3 | Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme | 149 |
| 7.1.4 | Sensorplatten für Multiwellplatten-Systeme | 151 |
| 7.2 | Chipdesigns für metabolische Parameter und elektrischer Aktivität | 154 |
| 7.2.1 | Neurochip mit Sensoren für metabolische Parameter | 154 |
| 7.2.2 | Einzelchip für Multiwellplatten-Systeme für elektrophysiologische und metabolische Parameter | 155 |
| 7.3 | Weitere Chipvarianten | 157 |
| 7.3.1 | Multiparametrischer Sensorchip auf Glassubstrat im Teststreifenformat | 157 |
| 7.3.2 | Testchip für Versuche an Sensoren für die Messung des Sauerstoffpartialdruckes | 157 |
| 7.3.3 | Testchip für Versuche an Sensoren für die Messung der Impedanz | 160 |
| 7.4 | Herstellungsprozesse | 163 |
| 7.4.1 | Prozeßfolge der am Lehrstuhl hergestellten Sensorchips | 163 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 7.4.2 | Prozeßfolge der bei Industriepartnern hergestellten Sensorchips | 165 |
| 8 | Chipgehäuse | 167 |
| 8.1 | Gehäuse und Verkapselung für Sensorchips auf Keramiksubstrat | 167 |
| 8.1.1 | Anforderungen | 167 |
| 8.1.2 | Aufbau | 168 |
| 8.1.3 | Trägerplatine | 168 |
| 8.1.4 | Zellkulturaufsatz | 170 |
| 8.2 | Gehäuse für Neurochips | 171 |
| 9 | Anwendungen | 173 |
| 9.1 | Meßsysteme für die entworfenen Sensorchips | 173 |
| 9.1.1 | Meßplatz für den multiparametrischen Sensorchip auf Glassubstrat | 174 |
| 9.1.2 | Meßplatz für den multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat | 175 |
| 9.1.3 | Meßsystem für Multiwellplatten-Systeme | 176 |
| 9.1.4 | Meßplatz für den Neurochip | 177 |
| 9.2 | Messungen mit dem multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat | 177 |
| 9.2.1 | Versuch mit MCF-7 Zellen | 177 |
| 9.2.2 | Versuch mit Primärtumorzellen | 180 |
| 9.3 | Messungen mit dem multiparametrischen Neurochip auf Glassubstrat | 181 |
| 9.4 | Impedanzmessungen mit Multiwellplatten-Systemen | 183 |
| 10 | Zusammenfassung und Ausblick | 185 |
| 10.1 | Zusammenfassung | 185 |
| 10.2 | Ausblick | 190 |
| A | Meßsoftware | 193 |
| B | Einzelergebnisse der Versuche | 195 |
| | Abbildungsverzeichnis | 203 |
| | Tabellenverzeichnis | 209 |
| | Verwendete Symbole und Abkürzungen | 211 |
| | Literaturverzeichnis | 215 |
| | Publikationen und Preise | 229 |

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Technische Möglichkeiten und Grenzen der Untersuchung von lebenden Zellen und Geweben

Seit den Anfängen der Zellforschung haben sich die Arbeitsmethoden zum Studium von Zellen und Geweben stetig weiterentwickelt. Das Verständnis der Funktionsweise von Zellen ist dabei nicht nur für die Biologie von größter Bedeutung, sondern auch für eine Vielzahl weiterer Forschungs- und Anwendungsbereichen auf den Gebieten der Biochemie, Medizin, Pharmazie und Biotechnologie. Die größten Herausforderungen bei der Untersuchung von Zellen stellen dabei zwei Punkte dar. Einerseits besitzen Zellen einen enorm komplizierten molekularen Aufbau und ihre Funktion ist ein äußerst komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von inneren wie äußeren Komponenten und Faktoren. Andererseits macht die geringe Größe von Zellen eine Untersuchung dieses Aufbaus und der Funktionen zu einer schwierigen Aufgabe. Eine tierische Zelle besitzt beispielsweise einen Durchmesser von nur 10 bis $20\mu\text{m}$, also etwa fünfmal kleiner als das Auflösungsvermögen des menschlichen Auges in der Lage ist zu erkennen [1]. Daher ist es nicht verwunderlich, daß erst Anfang des 19. Jahrhunderts mit Hilfe des Lichtmikroskops erkannt wurde, daß Gewebe aus einzelnen Zellen besteht. Darüberhinaus sind tierische Zellen farblos und durchsichtig, wodurch erst Ende des 19. Jahrhunderts, durch die Entwicklung geeigneter Farbstoffe zur Kontrastverbesserung, auch die wichtigsten inneren Merkmale des Zellaufbaus entdeckt wurden [2]. Seit der Erfindung des Lichtmikroskops und seiner Anwendung in der Zellbiologie sind wesentliche Fortschritte in der Erforschung der Funktionsweise von Zellen eine Folge von neuen technischen Verfahren [3].

Die technische Entwicklung brachte auf dem Gebiet der Lichtmikroskopie eine Vielzahl von Methoden zur Untersuchung von Zellen hervor. Neben normalen optischen Systemen mit denen sich gefärbte und fixierte Zellen beobachten lassen [4, 5], können mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper eingesetzt werden, um spezifische Moleküle, wie z.B. Proteine, in der Zelle mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen [6–8]. Für die dreidimensionale Darstellung von Zellen bedient man sich der konfokalen Rastermikroskopie [9, 10], für die Beobachtung von lebenden Zellen werden optische Verfahren wie Phasenkontrast-, Interferenz- oder Dunkelfeldtechnik eingesetzt [11, 12].

Für die Untersuchung der Ultrastruktur von Zellorganellen und Zellmembranen reicht die Auflösung von Lichtmikroskopen bei weitem nicht aus. Hier stellte die Elektronenmikroskopie einen großen Fortschritt dar, die im Jahr 1931 mit der Konstruktion des ersten Transmissionselektronenmikroskops erstmals zum Einsatz kam. Für biologische Objekte sind bei Elektronenmikroskopen Auflösungen bis 2nm möglich, die damit 100mal höher sind als bei Lichtmikroskopen [13]. Neben dem Transmissions-Elektronenmikroskop stehen zur Darstellung von dreidimensionalen Zell- oder Gewebeoberflächen das Rasterelektronenmikroskop [14, 15] und zur Untersuchung des Inneren von Membranen und Zellen die Gefrierbruch- oder Gefrierätz-Elektronenmikroskopie [16] zur Verfügung. Abbildung 1.1 zeigt die transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme einer gut differenzierten

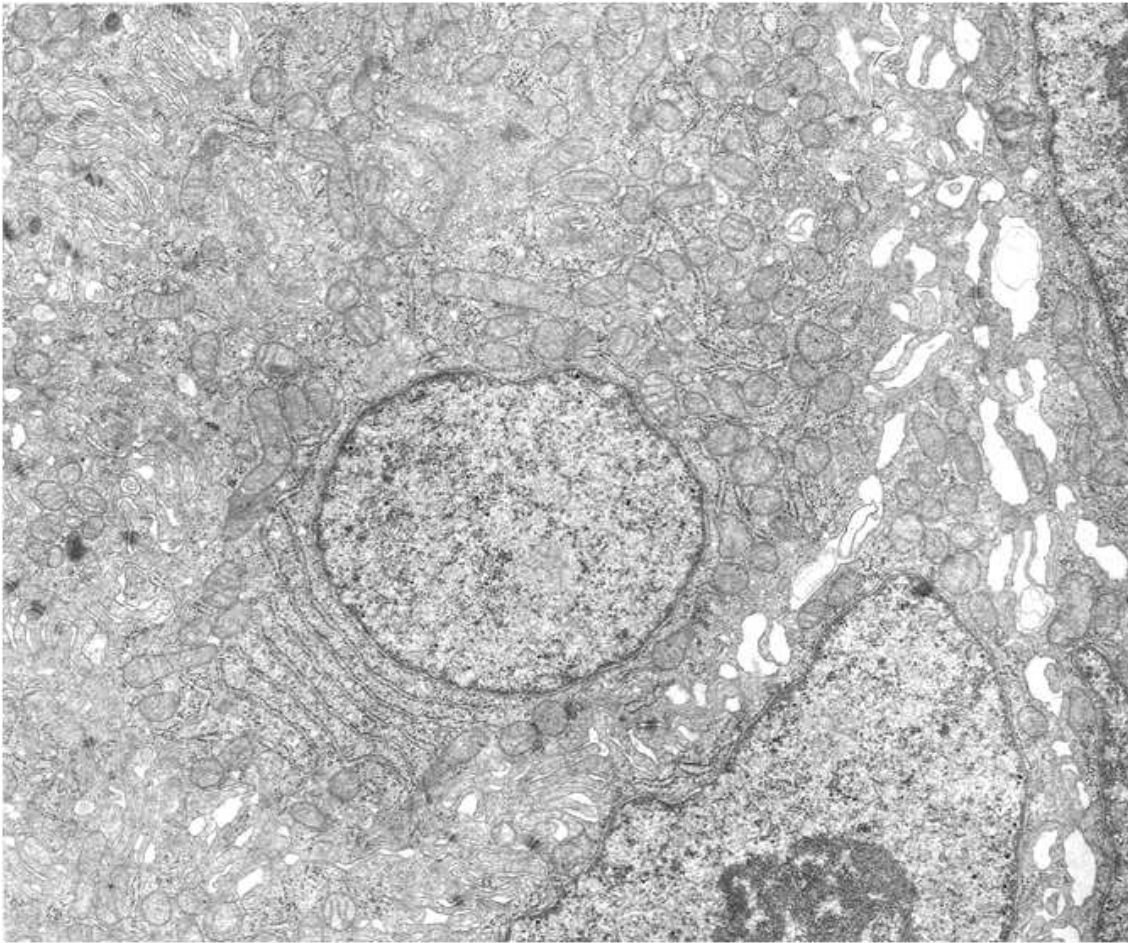


Abbildung 1.1: Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme einer gut differenzierten Zelle aus einem auf einer Nacktmaus gewachsenen Dickdarmkarzinom bei einer 13.950-fachen Vergrößerung (Aufnahme: B. Wolf)

Zelle aus einem auf einer Nacktmaus gewachsenen Dickdarmkarzinom bei einer 13.950-fachen Vergrößerung und verdeutlicht den komplexen Feinaufbau einer Zelle.

Neben den mikroskopischen Verfahren zur Sichtbarmachung der Zelle und ihrer Feinstruktur existieren zur Untersuchung der molekularen Bestandteile eine Reihe von biochemischen Analysemethoden. Nach einer geeigneten Isolierung und Kultivierung der Zellen [17, 18], können die Zellen aufgebrochen [19] und ihr Inhalt mit Hilfe von Ultrazentrifugation fraktioniert werden [20, 21]. Die dadurch entstehenden, zum Teil funktionstüchtigen zellfreien Systeme [22] können zur Untersuchung von molekularen zellinternen Vorgängen wie Proteinsynthese, DNA-Replikation, Zellzyklus und verschiedene intrazelluläre Transportmechanismen genutzt werden [23]. Weitere Verfahren zur biochemischen Analyse, insbesondere von Zellproteinen, sind Chromatographie [24, 25], Elektrophorese [26–29] und Kernresonanzspektroskopie (NMR) [30–32].

Für die Messung von Konzentrationen spezifischer Moleküle in der Zelle wurden ebenfalls Techniken entwickelt. So können Zellmoleküle einerseits mit Hilfe von Radioisotopen markiert und durch geeignete Verfahren sichtbar gemacht werden [33]. Andererseits ist es möglich, Konzentrationen bestimmter Ionen durch fluoreszierende Indikatoren die in die Zelle eingeschleust werden zu messen. Diese Fluoreszenz-Farbstoffe sind für eine Vielzahl an Ionen erhältlich, z.B. Ca^{2+} oder H^+ . Sie werden mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht [34]. Eine, auf Mikroelektroden-Technik ba-

sierende Methode um Ionenkonzentrationen in der Zelle zu messen, ist das so genannte Patch-Clamp-Verfahren, bei der insbesondere Ionenkanäle in der Zellmembran untersucht werden können [35–37].

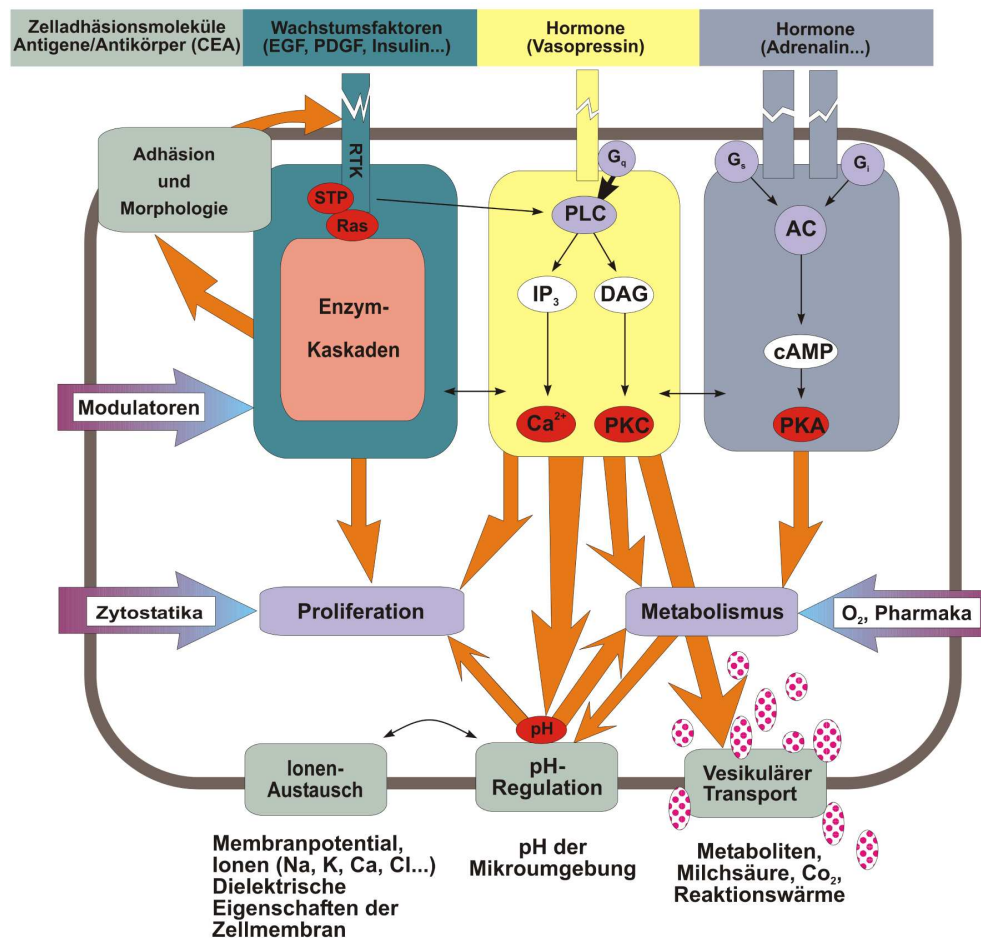
Alle genannten Verfahren und Techniken werden, in der Regel *in vitro*, in der biologischen Grundlagenforschung erfolgreich eingesetzt. Insbesondere bei der Untersuchung von schnellen dynamischen Vorgängen oder sehr langen Beobachtungszeiten weisen aber nahezu alle Verfahren systembedingte Grenzen auf. Einerseits ist keines der Verfahren vollständig frei von einer Beeinflussung des Zellverhaltens. So wird die Zelle bei der Untersuchung entweder zerstört oder durch die notwendige Zugabe von Zusatzstoffen in ihrer natürlichen Funktion beeinträchtigt. Andererseits ist der Meßvorgang zum Teil nicht dynamisch genug, um die Kinetik der zellulären Reaktion in Echtzeit zu erfassen. So sind mit Hilfe von lichtmikroskopischen Methoden nur Messungen bis in den Sekundenbereich möglich und bedingen auch meistens den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, Kontrastmitteln oder radioaktiven Markern. Diese wirken zum Teil toxisch und beeinflussen, insbesondere über lange Beobachtungszeiten, die Zelle in ihrer Funktion in der Regel erheblich [6, 8, 38]. Bei den wenigen elektronenmikroskopischen Verfahren bei denen die Zelle nicht zerstört wird ist die Beobachtungsdauer von Zellvorgängen ebenfalls begrenzt. Diese liegt hier im Idealfall im Minutenbereich [39]. Schnelle Verfahren, wie die Patch-Clamp-Methode für intrazelluläre elektrophysiologische Messungen, ermöglichen zwar Auflösungen bis in den Bereich von Millisekunden, zerstören aber systembedingt punktuell die Zellmembran und verhindern so lange Meßzeiten [40, 41].

1.2 Untersuchung von lebenden Zellen mit Hilfe von Biosensoren

Die in Kapitel 1.1 aufgezeigten systembedingten Grenzen herkömmlicher Untersuchungsverfahren sind insbesondere bei der Erforschung der intrazellulären Signalkommunikation ein Hindernis. Diese Kommunikation verbindet die funktionalen Einheiten der Zellen untereinander mit Hilfe komplexer, zum überwiegenden Teil paralleler, Signalketten und stellt einen wichtigen Bestandteil zur Steuerung der Zellfunktionen dar [42, 43]. Die Signalwege sind dabei vielfältig ausgeprägt. Als Beispiel sei an dieser Stelle das wohl am genauesten untersuchte System der Calciumregulation genannt, das mit Hilfe von Oszillationen der Ca^{2+} -Konzentration [44, 45] und wellenförmiger Ausbreitung von Konzentrationsänderungen [46, 47] intrazelluläre Signale überträgt. Dieser Signalweg spielt beispielsweise eine wichtige Rolle beim Zellzyklus. Neben Ca^{2+} stellt auch der Austausch von anderen Ionen wie zum Beispiel H^+ einen zellulären Signalweg dar. Außer Ionen tragen im komplexen Netzwerk der Signalkommunikation auch Hormone [48] und Wachstumsfaktoren [49] bei. Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung der zellulären Signalverarbeitung.

Die Erforschung dieser intrazellulären Signalkommunikation ist ein wichtiger Baustein zum Verständnis der Funktionsweise von Zellen und Geweben und eröffnet breite Anwendungsmöglichkeiten in der medizinischen Diagnostik, der Entwicklung von Pharmaka und biotechnologischen Prozessen. So lassen sich beispielsweise unter anderem Krankheiten wie Krebs auf eine Störung der intrazellulären Signalkommunikation zurückführen [51]. Beachtet man, daß Krebs nach den Herz-Kreislaufkrankheiten die zweithäufigste Todesursache ist [52], unterstreicht dies die Notwendigkeit diesen Aspekt der Funktionsweise von Zellen zu untersuchen und zu verstehen. In der Vergangenheit wurden dazu systemanalytische Ansätze verfolgt, theoretisch strukturierte Regelkreise mit Hilfe von Daten aus molekularbiologischen Methoden zu modellieren [50, 53]. Ein Ansatz die Funktion der intrazellulären Signalkommunikation zu untersuchen stellt der Vergleich der zellinternen Regelmechanismen mit technischen Systemen dar. Die Zelle übersetzt pharmakologische Input-Signale in charakteristische Output-Signale. Allerdings läßt sich das System Zelle nicht ohne weiteres mit Hilfe einer Sprungantwort charakterisieren wie dies bei technischen Systemen der Fall ist. Das System Zelle ist zu komplex und reagiert mit seinem biologischen Erkennungssystem auf eine zu große Anzahl an verschiedenen Eingangs-Signalen, als das es mit Hilfe einer einfachen Übertragungsfunktion, wie es

Eingangssignale



Ausgangssignale

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der zellulären Signalverarbeitung, nach [50]

in den meisten technischen Systemen vorzufinden ist, charakterisiert werden kann. Das biologische Erkennungssystem besteht im Allgemeinen aus Enzymen, Antikörpern, Membran-Rezeptor-Proteinen und Organellen, kann aber auch Bakterien oder ganze Zellen und Gewebe umfassen. Damit ist die Zelle in der Lage biomolekulare und pharmakologische Signale zu empfangen und mit ihren zahlreichen stark vernetzten Signalwegen und Rückkopplungsmechanismen in entsprechende Ausgangssignale umzuwandeln [1, 42]. Diese Ausgangssignale äußern sich in charakteristische Reaktionsmustern, die chemischer, physikalischer oder morphologischer Natur sein können [42, 50]. Derartige Reaktionsmuster wurden mit Hilfe von quantitativen ultrastrukturellen Bildanalysen belegt [39, 54, 55]. Diese haben zwar eine hohe räumliche Auflösung, erlauben aber aufgrund der Eingangs erwähnten systembedingten Grenzen keine rückwirkungsfreien und dynamischen Messungen, so daß nur eine Untersuchung in Momentaufnahmen möglich ist. An dieser Stelle versprechen Messungen mit Biosensoren bessere und genauere Ergebnisse, auch über längere Meßzeiten, als die elektronenoptischen oder fluoreszenzmikroskopischen Analysen und wurden bereits erfolgreich für diese Art von Untersuchungen eingesetzt [56]. Die Optimierung dieser Biosensoren für Messungen an lebenden Zellen und Geweben zur Detektion der zellulären Reaktionsmuster in Form von chemischen, physikalischen und morphologischen Aus-

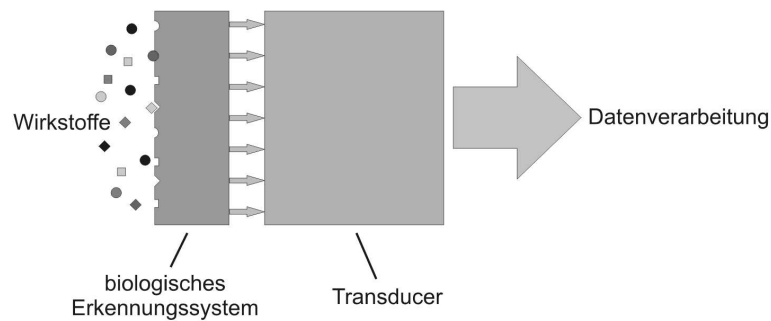


Abbildung 1.3: Vereinfachtes Funktionsprinzip eines Biosensors mit biologischem Erkennungssystem, Signalwandler und Signalverarbeitung, nach [57]

gangssignalen ist der Kern der vorliegenden Arbeit.

Mit klassischer Sichtweise betrachtet bestehen Biosensoren üblicherweise aus drei Komponenten. Das biologische Erkennungssystem, auch Diskriminator genannt, wirkt als Signalgeber. Mit Hilfe eines Signalwandlers, dem Transducer, werden die physikalischen-chemischen Parameter des biologischen Erkennungssystems in ein meßbares elektrisches oder optisches Signal umgewandelt. Die dritte Komponente stellt ein geeigneter, in der Regel elektronischer Verstärker dar, der die Meßsignale verarbeitet und aufbereitet [57]. Abbildung 1.3 zeigt das vereinfachte Funktionsprinzip eines Biosensors. Als Transducer gibt es eine Vielzahl an Sensoren. Sie basieren in der Regel auf resistometrischen, amperometrischen, potentiometrischen, piezo-elektrischen oder thermischen Methoden. Technisch ausgeführt werden sie unter anderem als Feldeffekt-Transistoren [58], ionenselektive potentiometrische oder amperometrische Elektroden [59,60], Thermistoren [61] oder auch als Masse-sensitive Piezokristallsensoren [62]. Neben diesen elektrischen und elektronischen Sensoren existieren eine Reihe von Sensoren auf optischer Basis [58,63]. Vergleicht man die Biosensoren hinsichtlich ihrer Leistung und ihrer Vielseitigkeit, stellen sie eine kostengünstige und in vielen Anwendungsgebieten einsetzbare Alternative zu den herkömmlichen Analysestrategien dar. Insbesondere die chipgestützte flexible Zusammenstellung der Sensoren macht eine individuelle und anwendungsspezifische Herstellung und damit auch preisoptimierte Analysen möglich. Dieser Punkt ist von besonderer Bedeutung, da die Leistungskriterien der Biosensoren eng mit den Herstellungskosten verknüpft sind. Aus diesem Grund entwickelte sich in den letzten Jahren ein reges Interesse an der Erschließung der Biosensortechnologie [56,64,65].

Für die Analyse der oben ausgeführten intrazellulären Signalkommunikation eignen sich Biosensoren besonders gut. Die zu untersuchenden Zellen dienen hierbei als biologisches Erkennungssystem. Wird nun dieser Diskriminator einer biologisch aktiven Substanz ausgesetzt, setzt sich eine Signalkaskade in Gang, deren Auswirkungen in Form von Änderungen der metabolischen und morphologischen, sowie bei geeigneten Zellen der elektrophysiologischen Reaktionen von geeigneten Transducern als Signale aufgenommen, verstärkt und verarbeitet werden können. Für die Biosensoren sprechen dabei insbesondere drei Faktoren [66]:

- Der Meßvorgang der Biosensoren ist weitgehend rückwirkungsfrei. Dies bedeutet, daß die Zellen in ihrem Verhalten nicht oder nur sehr gering beeinflußt werden. Es werden keine Analyten oder Fremdstoffe benötigt, die die Signalkommunikation der Zelle stören könnten. Dies ist insbesondere für längere Meßzeiten von Bedeutung.
- Der Meßvorgang ist dynamisch. Dieses dynamische Verhalten ermöglicht eine Online-Untersuchung der Kinetik der zellulären Reaktionen und liefert wichtige Informationen über beteiligte Wirkmechanismen.

- Im Gegensatz zu den meisten anderen gängigen Methoden erlauben Biosensoren die direkte Messung zellulärer Reaktionen, ohne auf indirekte Methoden wie Farb- oder Radiomarker zurückgreifen zu müssen.

Kombiniert man verschiedene Sensoren, sowie gleiche Sensoren unterschiedlicher Spezifität, ist eine kontinuierliche und simultane Detektion der Auswirkungen verschiedener Substanzen und damit eine Analyse spezifischer Signalwege möglich. Dabei können Biosensoren in vielen Fällen teure und zeitaufwendige Analysen im Labor ersetzen [53].

1.3 Stand der Technik

1.3.1 Biosensoren allgemein

Zur Charakterisierung der zellulären Mikroumgebung stehen ein Vielzahl an Sensoren zur Verfügung. Mit ihnen können einzelne Proteine und Ionen in unterschiedlichsten Konzentrationen nachgewiesen werden. Um einen generellen Überblick zu erhalten, steht eine große Menge an Literatur zum Thema Biosensoren im Allgemeinen zur Verfügung. Als nennenswerte Auswahl sei an dieser Stelle [58, 61–63, 67–71] genannt. Sie alle geben Auskunft über Grundlagen, Konzepte, Technologien, Tendenzen und Entwicklungen auf diesem Gebiet. Die Sensoren lassen sich dabei grob in zwei Kategorien einteilen. Einerseits diskrete Mikrosonden, die die Anfänge auf diesem Gebiet darstellten, aber bauartbedingt nicht oder nur sehr schwer miniaturisierbar sind und sich deshalb nur für diskrete Messungen an Zellkulturflüssigkeiten eignen. Klassische Vertreter sind hier die Glaselektrode oder herkömmliche Clark-Sonden. Die zweite Kategorie sind planare mikrostrukturierte Sensoren, deren Entwicklung insbesondere in den letzten zehn Jahren viele Fortschritte gemacht haben. Diese Art von Sensoren kann direkt mit Zellen oder Geweben bewachsen werden und bieten durch den engen Kontakt zwischen Sensor und Zellmaterial eine hohe Empfindlichkeit und Ansprechzeit [66]. Im weiteren Verlauf wird schwerpunktmäßig der Stand der Technik dieser Art von Sensoren dargestellt.

Biosensoren die nicht die Untersuchung von Zellen direkt zum Ziel haben, sondern, wie oben ausgeführt, Zellen nur als biologisches Erkennungssystem benutzen und mit geeigneten Transducern die Detektion von Substanzen und Umwelteinflüssen als Anwendungsgebiet haben sind in der Literatur ebenfalls zahlreich beschrieben. Als Beispiel sollen hier [72–76] dienen.

1.3.2 Messung des pH-Wertes

Die pH-Messung stellt den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar und ihre theoretischen Grundlagen werden aus diesem Grund ausführlich in Kapitel 3.4 dargestellt. Klassischer Vertreter der Messung des pH-Wertes ist die Glaselektrode (Kapitel 3.4.2), die allerdings nur schwer miniaturisierbar ist. Ein Versuch mit miniaturisierten Glaselektroden den zellulären Metabolismus zu bestimmen wurde von Brand 1994 in [77] beschrieben.

1970 erstmals von Bergveld beschrieben und in [78–80] veröffentlicht ist der so genannte “ion sensitive field effect transistor“ (ISFET). Hierbei handelt es sich um einen, auf einen Feldeffekttransistor basierenden planaren pH-Sensor. Da der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit Sensorchips mit ISFETs sind und die Hauptaufgabe die Substitution dieses Sensors ist, ist diese Art von pH-Sensor ausführlich in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Zum Thema ISFET existieren in der Literatur unzählige Veröffentlichungen. Stellvertretend seien an dieser Stelle [81–88] als für den Einsatz als Biosensor relevante Literatur genannt. Für die Messung des Protonenaustosses von Zellen und Geweben wurde dieser Sensortyp erstmals in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt und unter anderem in [89–92] veröffentlicht.

Ein weiterer planar ausgeführter pH-Sensor stellt der so genannte “light addressable potentiometric sensor“ (LAPS) dar. Er basiert wie der ISFET auf einem potentiometrischen Meßverfahren und benutzt eine Abhängigkeit der Einsatzspannung des Photostromes einer Siliziumscheibe von ihrem

Oberflächenpotential das sich in Kontakt mit einem Elektrolyten ausbildet. Die genaue Funktionsweise ist in Kapitel 3.4.4 beschrieben. Nennenswerte Publikationen zu dieser Art von pH-Sensor sind [93–96]. Für die Untersuchung des katabolen Stoffwechsel erlangte diese Art von Sensor Bedeutung durch eine Arbeitsgruppe um McConnel, die in Zusammenarbeit mit der Firma Molecular Devices in Palo Alto ein Gerät für diese Art von Untersuchung entwickelte. Dieses “Cytosensor Microphysiometer“ war am Markt einige Zeit eingeführt und in [97–99] beschrieben. Dieses Gerät hatte allerdings den Nachteil, daß es nur in der Lage war, einen Parameter zu messen und somit, wie eingangs ausgeführt, viele biologische Fragestellungen nicht beantworten konnte.

Eine weitere Methode zur Messung des pH-Werts ist die Verwendung von Elektroden aus geeigneten Metalloxiden. Diese lassen sich ebenfalls planar ausführen. Mit dieser Art von Sensoren sollen die ISFETs der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Siliziumsensorchips substituiert werden und stellen den Kern der vorliegenden Arbeit dar. Aus diesem Grund ist der Stand der Technik in Bezug auf die zur Verfügung stehenden Materialien und Herstellungstechnologien auf dem Gebiet der Metalloxide in Kapitel 4.1 ausführlich dargestellt.

1.3.3 Messung des Sauerstoffpartialdrucks

Der zelluläre Sauerstoffverbrauch läßt sich mit Hilfe von Sensoren bestimmen, die die Änderung des Sauerstoffpartialdrucks in unmittelbarer Umgebung der Zellen messen können. Für zelluläre Anwendungen werden hier neben fluoreszenzoptischen Verfahren [100, 101] hauptsächlich amperometrische Meßverfahren eingesetzt. Hierbei spielt der von Clark ursprünglich für die Messung von Blutsauerstoff entwickelte und nach ihm benannte Clark-Sensor eine herausragende Rolle [102]. Die Grundlagen zum gelösten Sauerstoff und die Funktionsweise der amperometrischen Sensoren ist in Kapitel 3.5 dargestellt. Mit amperometrischen Meßverfahren durchgeführte Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch von Zellen wurden unter anderem in [103–106] beschrieben.

Neben den amperometrischen Sensoren werden in der vorliegenden Arbeit insbesondere bei einigen Sensorchips für Multiwellplatten vereinzelt auch fluoreszenzoptische Sensoren verwendet, die auf Arbeiten der Gruppe Heinzle beruhen. Diese wurden speziell für die Verwendung in Multiwellplatten entwickelt und unter anderem in [107–109] veröffentlicht.

1.3.4 Messung der Zelladhäsion und der Zellmorphologie

Messungen der Zelladhäsion und der Dynamik der Morphologie sowie der Grad des Bewuchses des Zellkulturbereiches wurden mit nichtoptischen Verfahren bisher nur mit Impedanzmessungen realisiert. Dabei werden die dielektrischen Eigenschaften von biologischen Materialien benutzt, die weitgehend in einem großen Frequenzbereich von unter 1 Hz bis einigen GHz bekannt sind [110–113]. Impedanzmessungen mit Elektroden unterschiedlichster Konfiguration können dabei für verschiedenste Anwendungsgebiete eingesetzt werden. So wurden von Pliquett [114] und Metanguihan [115] Impedanztechniken zur Untersuchung von Änderungen der Membran von biologischen Zellen eingesetzt. Die Gruppe Giaever untersuchte unter anderem mit Impedanzsensoren die Beweglichkeit adhären wachsender Zellen [116, 117] und schon früh wurden von Harris mikrobielle Biomassen abgeschätzt [118]. Später wurde von Palmquist damit der mikrobielle Metabolismus detektiert [119]. Um die Mortalität von Zellen zu bestimmen, beschrieb Hagedorn einen, auf zwei Elektroden basierenden Siliziummembransensor [120].

In unserer Arbeitsgruppe wurden Impedanzsensoren mit Interdigitalelektrodenstrukturen für Messungen an lebenden Zellen entwickelt und optimiert. Im Vordergrund stehen dabei Parameter wie Zell-Zell- und Zell-Substrat-Abstand. Die Interdigitalelektroden eignen sich aufgrund ihrer planaren Bauweise besonders für die Integration in multiparametrische Sensorchips und wurden bereits weitgehend für verschiedene Anwendungsgebiete erprobt [121–123].

Speziell zur Untersuchung der Zell-Zell- und Zell-Substrat-Abstände stehen neben den Impedanz-techniken elektronenoptische Verfahren wie Röntgenstrahl-Mikroanalyse und Elektronenenergieverlustspektroskopie zur Verfügung [124]. Weiter existieren optische Verfahren wie Interferenz-Reflexions-Mikroskopie und Totalen-Internen-Reflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie [125] zur Verfügung. Allerdings sind alle diese Verfahren größtenteils mit den oben genannten Nachteilen verbunden [6, 126].

1.3.5 Messung der elektrischen Aktivität von Zellen

Für die Messung der elektrischen Aktivität von Zellen wie Transmembranpotential oder Aktionspotentiale bei Nervenzellen gab es lange Zeit nur die Möglichkeit mit optischen Indikatoren [127, 128] oder invasiven Mikroelektroden [129, 130] zu arbeiten. Um diese Parameter mit nichtinvasiven Methoden zugänglich zu machen eignen sich unter anderem Feldeffekttransistoren, um die entstehenden Potentiale abzuleiten und zu verstärken. Die Arbeitsgruppe um Fromherz hat diese Methode am Beispiel der Aktionspotentiale von Nervenzellen gezeigt und unter anderem in [131] veröffentlicht. In unserer Arbeitsgruppe wurden ebenfalls Feldeffekttransistoren zur Ableitung von Potentialen eingesetzt und auch in multiparametrische Sensorchips integriert [89].

Eine einfachere Methode Aktionspotentiale abzuleiten ohne auf aufwendige Siliziumhalbleitersensoren zurückzugreifen stellen Mikroelektrodenarrays dar. Erste Versuche wurden hier von der Arbeitsgruppe Gross bereits 1977 durchgeführt und bis heute weiterentwickelt [132, 133]. Parallel dazu wird diese Art von Sensorarray heute von vielen Arbeitsgruppen, z.B. Hämmerle [134], verwendet.

1.3.6 Multiparametrische Sensorchips

Da, wie bereits erwähnt, die Bestimmung nur eines zellulären Parameters für eine Vielzahl an Untersuchungen nicht ausreichend ist bietet es sich an, die oben beschriebenen Sensoren auf einem Sensorchip zu integrieren und somit multiparametrische Messungen zu ermöglichen. Hier ist das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte "Physiocontrol Microsystem" (PCM) und "Cell Monitoring System" (CMS) zu nennen. Diese basieren auf multiparametrischen Sensorchips, die ganz oder zum Teil in Siliziumhalbleitertechnik gefertigt sind und Sensoren für pH, Sauerstoffpartialdruck, Impedanz und Temperatur integrieren. Diese Sensorchips sind in temperierbaren Perfusionssystemen eingebettet und ermöglichen so Messungen dynamischer Vorgänge bei lebenden Zellen über lange Beobachtungszeiträume. Diese Systeme wurden in verschiedensten Anwendungen eingesetzt und unter anderem in [135–138] veröffentlicht. Mit diesen Sensorsystemen gelang es erstmals, verschiedene Tumorzellen vital auf Feldeffekttransistoren zu immobilisieren und deren Signalantworten auf äußere Stimuli zu messen [139]. Um zusätzliche optische Kontrolle mittels Lichtmikroskopie zu ermöglichen, wurde neben dem multiparametrischen Siliziumsensorchip auch ein Chip mit derselben Sensorik auf Glassubstrat entwickelt [140]. Diese beiden Arten von multiparametrischen Sensorchips dienen als Ausgangsbasis für die vorliegende Arbeit.

1.3.7 Parallelisierung von multiparametrischen Messungen

Für viele biologische oder pharmazeutische Fragestellungen ist es notwendig, nicht nur eine, sondern eine große Anzahl an Messungen durchzuführen. Um hier eine Zeit- und damit eine Kostenersparnis zu erreichen ist es sinnvoll, multiparametrische Messungen zu parallelisieren. Eine Möglichkeit ist hierbei mehrere der oben beschriebenen Sensorchips parallel zu betreiben [141]. In vielen Fällen reicht dies aber bei weitem nicht aus. Da in der biologischen Forschung die Anwendung der Multiwellplatte gängige Praxis ist, bietet es sich an, Multiwellplatten verschiedenster Wellanzahl mit Sensoren für die verschiedenen zellulären Parameter auszustatten. Unsere Arbeitsgruppe hat verschiedene Konzepte für sensorgestützte Multiwellplatten erarbeitet und diese als weltweit erste in [142] veröffentlicht. In den nachfolgenden Jahren wurden von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls Multiwellplatten mit verschiedensten elektrischen Sensoren kombiniert und publiziert [143–145].

1.4 Aufgabenstellung und Aufbau der Arbeit

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit sind zwei multiparametrische Sensorchips aus unserer Arbeitsgruppe. Einer dieser Chips ist ein, auf Siliziumsubstrat in Halbleitertechnik hergestellter Sensorchip mit Sensoren für pH, Sauerstoffpartialdruck, Impedanz und Temperatur [146]. Der pH-Sensor ist hierbei als ISFET ausgeführt, der Temperatursensor als Diode. Sauerstoff- und Impedanzsensor sind Metallstrukturen aus Palladium oder Platin. Der zweite Sensorchip ist für multiparametrische Messungen und zusätzlicher optischer Kontrolle mittels Lichtmikroskopie vorgesehen. Er trägt dieselbe Sensorik wie der Siliziumchip. Die Sauerstoff-, Impedanz- und Temperatursensoren, hier als Pt100 ausgeführt, sind dabei auf einem Glassubstrat aufgebracht und aus Platin. Die ISFETs für die pH-Messung befinden sich auf einem Silizium-Inlet, das durch eine aufwendige Verbindungs- und Kontaktiertechnik in das Glassubstrat eingefügt ist [140]. Abbildung 1.4 zeigt die beiden Sensorchips die in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt und optimiert werden sollen.

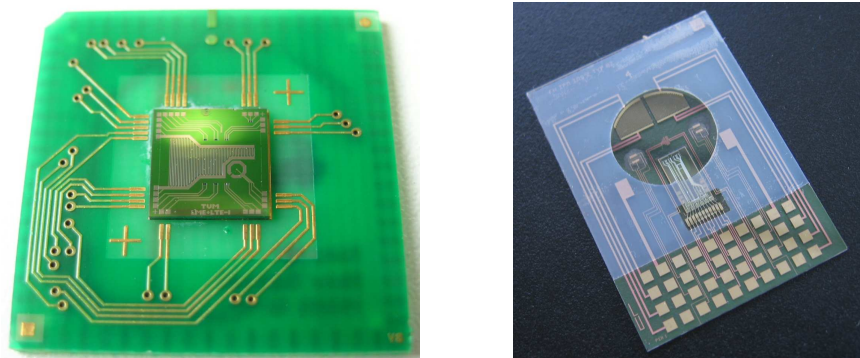


Abbildung 1.4: Links: Multiparametrischer Siliziumchip, aufgeklebt auf eine Trägerplatine für die elektrischen Anschlüsse [146]. Rechts: Multiparametrischer Glaschip mit Siliziuminlet [140]

Mit Ausnahme der pH-Sensoren auf ISFET-Basis können alle Strukturen auf den beiden Sensorchips mit Hilfe von Planarprozessen in einem einzigen Prozessschritt und damit kostengünstig mit Platindünnschichttechnologie hergestellt werden. Einzig die pH-Sensoren werden bisher funktionsbedingt in Halbleitertechnik gefertigt. Abbildung 1.5 zeigt die mikroskopische Aufnahme von ISFETs, Sauerstoffsensor und Impedanzsensor, jeweils mit Zellbewuchs auf einem multiparametrischen Siliziumchip.

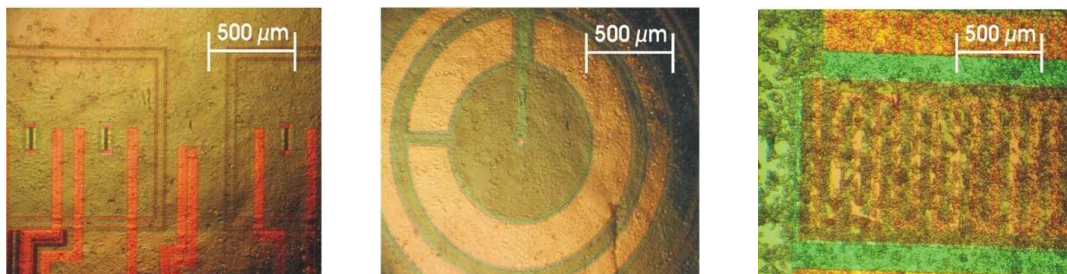


Abbildung 1.5: Von links nach rechts: ISFETs, Sauerstoff- und Interdigitalelektroden-Impedanzsensor auf einem multiparametrischen Siliziumsensorchip, jeweils mit Zellen bewachsen (Aufnahmen: M. Brischwein)

Obwohl die Halbleitertechnologie prinzipiell eine kostengünstige Herstellung der pH-Sensoren bietet, ist einerseits beim Siliziumchip die für die zellbasierten Untersuchungen notwendige Chipfläche

im Vergleich zur benötigten Sensorgröße viel zu groß. Dies hat zur Folge, daß die Herstellungskosten unnötig hoch sind, da sie maßgeblich von der zu bearbeitenden Fläche abhängen. Andererseits ist die Kombination von Glas- und Siliziumchip relativ aufwendig. Die Verbindung zwischen Glas und Silizium erfordert einen aufwendigen Klebevorgang, wobei insbesondere die Dichtheit der Verbindung sichergestellt werden muß. Weiter müssen stabile elektrische Kontaktierungen zwischen Silizium- und Glaschip hergestellt werden. Zusätzlich müssen die dabei verwendeten Materialien und Verfahren hohe Anforderungen an die Biokompatibilität erfüllen.

Es erscheint daher sinnvoll, auf die Siliziumtechnik und die Glas-Silizium-Hybridtechnologie zu verzichten und die Sensorchips mit nur einer Technologie herzustellen. Daher sollen die multiparametrischen Sensorchips für zellbasierte Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit grundlegend überarbeitet werden. Die umfangreichsten Änderungen der Sensorchips betreffen die pH-Sensoren. In der Weiterentwicklung der Sensorchips sollen auf Rutheniumoxid (RuO_2) basierende planare pH-Sensoren eingesetzt werden. Diese Sensoren sollen, zusammen mit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode, eine potentiometrische Bestimmung des pH-Werts und dessen Änderungen ermöglichen.

Um dies zu erreichen, soll in der vorliegenden Arbeit eine genaue Charakterisierung des RuO_2 für die Verwendung als pH-Sensor in biomedizinischen Anwendungen erfolgen. Neben dem Wegfall der Halbleitertechnologie bieten die Metalloxidsensoren den Vorteil einer höheren Standfestigkeit als die ISFETs. Ebenfalls ist eine hohe Empfindlichkeit gegen elektrostatische Entladungen, denen die Halbleitersensoren unterliegen, bei den neu eingesetzten RuO_2 -Sensoren nicht zu erwarten. Zusätzlich zu den geringeren Herstellungskosten, soll dies zu erheblich geringeren Anforderungen an Lagerung, Transport und Handhabung der multiparametrischen Sensorchips führen. Die bei ISFETs deutlich ausgeprägte Querempfindlichkeit gegenüber Ionen wie K^+ und Na^+ , die in den meisten Zellkulturmedien zu finden sind, soll bei den Metalloxidelektroden ebenfalls geringer ausfallen.

Nach der Charakterisierung des Sensormaterials und Optimierung der Elektrodenkonfiguration sollen unter Verwendung der RuO_2 -pH-Sensoren neue Sensorchips auf Keramik- und Glassubstrat entworfen und hergestellt werden. Darüberhinaus sollen auch weitere bestehende Sensorchips, wie z.B. ein, aus der Arbeitsgruppe Gross vorhandener Neurochip [147], mit der neuen Sensorik erweitert werden, sowie auch vollkommen neue Sensorchips für den Einsatz in Verbindung mit Multiwellplatten konzipiert werden.

Die vorliegende Arbeit ist dabei wie folgt aufgebaut. In den ersten beiden Kapiteln nach der Einleitung werden ausführlich die biologischen und die elektrochemischen Grundlagen, sowie die Technologie der verwendeten Sensoren betrachtet. Hierbei wird insbesondere dargestellt, welche zellbiologischen Prozesse für die Entstehung der Zellparameter verantwortlich sind, die mit Hilfe der verwendeten Sensorik erfaßt werden sowie insbesondere die elektrochemischen Grundlagen der pH-Messung eingehend dargestellt. In Kapitel 4 wird der Stand der Technik und die theoretischen Grundlagen der pH-Messung speziell mit Metalloxiden behandelt. Der Charakterisierung von RuO_2 und der Optimierung der Elektrodenkonfiguration ist Kapitel 5 gewidmet. In Kapitel 6 werden Optimierungen der Impedanzsensoren und der zugehörigen Meßelektronik für den Einsatz in Multiwellplatten dargestellt. Kapitel 7 stellt alle im Rahmen dieser Arbeit neu entworfenen und hergestellten Sensorchips dar. In den letzten beiden Kapiteln werden notwendige Änderungen an den Chipgehäusen ausgeführt, sowie Systeme dargestellt, in denen die neu entwickelten Sensorchips eingesetzt werden können. Daran anschließend werden Anwendungsbeispiele und ihre Ergebnisse vorgestellt.

Kapitel 2

Grundlagen der Zellbiologie

Obwohl der Kern der vorliegenden Arbeit einen technischen Inhalt behandelt, sollen an dieser Stelle einige Grundlagen der Zellbiologie erläutert werden. Diese sollen dem Verständnis der biologischen Vorgänge dienen, die den zu erfassenden Zellparametern zu Grunde liegen.

2.1 Die Zelle

Nach aktuellem Wissensstand kennt die Natur ca. 1,2 Millionen Tierarten, 320000 Pflanzenarten, 80000 Pilz- und Flechtenarten und ca. 500 verschiedene Bakterien [148]. Betrachtet man allerdings den Aufbau dieser an Organismen auf mikroskopischer Ebene, so ist diese Vielfalt nicht mehr zu erkennen. Die oben genannten Organismen sind alle aus einzelnen Zellen aufgebaut, die weitestgehend in ihren Grundstrukturen identisch sind. Dabei wird zwischen zwei Grundformen, den eukaryotischen und den prokaryotischen Zellen unterschieden. Der Hauptunterschied zwischen beiden Formen ist die Existenz eines, von einer Doppelmembran begrenzten Zellkerns. Dieser Zellkern enthält die DNS der Chromosomen und damit die vollständigen Erbinformationen der Zelle. Bei Vorhandensein eines Zellkerns spricht man von eukaryotischen Zellen. Dies trifft auf alle Zellen aus dem Pflanzen- und Tierreich zu. Bei einfacheren Formen lebender Zellen, z.B. Bakterien, ist die DNS zwar in bestimmten Bereichen der Zelle konzentriert, aber nicht von einer Membranhülle umschlossen. Derart aufgebaute Formen zählen zu den prokaryotischen Zellen und werden ihrerseits nochmals in Bacteria und Archaea unterschieden. Darüberhinaus handelt es sich bei Protocysten ausschließlich um einzellige Organismen [148].

Da die in dieser Arbeit behandelten Biosensoren für den Einsatz mit Zellverbänden oder Geweben vorgesehen sind, wird im Folgendem nur die Gruppe der Eucyten näher betrachtet. Die Evolution führte bei diesen Zelltypen über Millionen von Jahren von einzelligen zu vielzelligen Organismen. Die Folge dieser Entwicklung zu Vielzellern war eine Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen, d.h. verschiedene Zellen nehmen in einem Organismus unterschiedliche Aufgaben wahr. So besteht ein erwachsener Mensch aus ca. 10^{13} Gewebezellen, die in mehrere hundert verschiedene Zelltypen unterschieden werden. Der dieser Differenzierung zugrunde liegende Mechanismus ist eine Exprimierung spezieller Teile des sonst für alle Zelltypen in einem Organismus einheitlichen Genoms. Die Entwicklung zu vielzelligen Organismen und die Differenzierung zu unterschiedlichen Zelltypen wurde durch Zellteilung vorangetrieben. Allerdings unterliegen einzelne Zellen in einem Vielzeller wesentlichen Einschränkungen hinsichtlich ihrer Teilungsmöglichkeiten. Um eine übergeordnete Ordnung differenzierter Zellen in einem vielzelligen Organismus zu erreichen und beizubehalten sind die Zellteilungen in der Regel streng reguliert. Diese Regulierung wird als Proliferationskontrolle bezeichnet. Ist die Funktion dieser Proliferationskontrolle gestört, führt dies zur Entstehung von Krebszellen und damit zu Tumoren. Bei diesen Zellen ist meistens auch eine weitere Eigenschaft der Zellen gestört, die ihre Lebensdauer in einem vielzelligen Organismus beschränkt. Die sogenannte Apoptose, die durch ein

genetisches Programm eingeleiteter Zelltod, sorgt einerseits für eine Kontrolle der Proliferation beim normalen Zellersatz. Andererseits führt er zur "Entsorgung" von nicht mehr korrekt funktionierenden oder für den Organismus eine Gefahr darstellenden Zellen. Im Gegensatz zur Nekrose, dem Sterben von Zellen durch pathologische Beschädigung, ist die Apoptose eine durch Phagozytose durchgeführte physiologische Auflösung von Zellen, ohne daß es zu Entzündungen durch Zellrückstände kommt [148].

Obwohl sich bei der Entwicklung von vielzelligen Organismen zwei grundlegende Organisationen, die tierischen und die pflanzlichen Zellen herausbildeten, besitzen alle eukaryotischen Zellen annähernd die gleiche Ausstattung an membranumschlossenen Organellen. In Abbildung 2.1 sind die wichtigsten intrazellulären Kompartimente einer idealisierten tierischen Zelle dargestellt. Für Eucyten sind dabei folgende Zellkompartimente definiert [149]:

- Die **Zellmembran** oder **Plasmamembran** trennt das Innere der Zelle von der Umgebung. Durch diese Membran findet der Transport von Nährstoffen und anderen Substanzen in das Zellinnere sowie Abfallstoffe und Zellprodukte aus der Zelle in die Umgebung statt. Sie spielt ebenfalls eine wichtige Rolle beim Kontakt und der Signalaufnahme zur Zellumgebung, sowie bei Erkennungsvorgängen.
- Im Inneren der Zelle befindet sich das **Cytoplasma**. Dieses ist eine komplexe Mischung aus verschiedenen Substanzen und Strukturen. Im Cytoplasma findet der lösliche Stoffwechsel der Zelle und intrazelluläre Bewegungsvorgänge statt. Neben Wasser als Hauptbestandteil besteht es aus Makromolekülen, kleinen organischen Moleküle, anorganische Ionen und Ribosomen. Die Ribosomen sind die Proteinsyntheseeinheiten der Zelle.
- Der **Zellkern** oder **Nucleus** enthält die DNS der Zelle und somit das zelluläre Genom. Hier finden die DNS-Replikation, die Transkription und RNA-Prozesse statt. Er ist von einer eigenen Doppelmembran umschlossen.
- Durchgehend mit der Kernmembran verbunden ist das **endoplasmatische Reticulum (ER)**. Hierbei wird zwischen zwei Arten unterschieden: Das raue und das glatte endoplasmatische Reticulum. An das raue ER sind die Ribosomen geheftet. Mit deren Aktivität produziert es hauptsächlich Glykoproteine und Membranmaterial. Das glatte ER ist an der Lipidsynthese sowie an Teilen des Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt.
- Der **Golgi-Apparat** ist als Membranstapel ausgeführt und arbeitet zusammen mit dem endoplasmatischen Reticulum. In ihm werden Produkte des ER wie Membrankomponenten und Exportproteine chemisch modifiziert und sortiert. Der Golgi-Apparat, das ER, sowie beteiligte Vesikel werden zusammenfassend auch als Endomembransystem bezeichnet.
- Die **Vakuolen** sind von einer Elementarmembran, der Tonoplast, umschlossene Zellsafträume. Sie enthalten eine wäßrige Lösung verschiedener Zucker, Salze und anderen Substanzen. Die Vakuolen sind am Abbau von Makromolekülen beteiligt und bringen die Abbauprodukte wieder in den Stoffwechsel der Zelle ein.
- Die **Lysosomen**, membranbegrenzte Vesikel, enthalten verschiedene Verdauungsenzyme. Diese werden zum Abbau von Makromolekülen, u.a. Proteine, Fette und Polysaccharide, mittels Hydrolyse verwendet. Die Abbauprodukte, im wesentlichen Monomere, werden in das Cytoplasma transportiert und dort als Nährstoffe verwendet. Zusammen mit Vakuolen werden die Lysosomen auch als lytisches Kompartiment bezeichnet.
- Die **Peroxisomen**, bestehend aus verschiedenen membranumhüllten Strukturen haben in der Zelle verschiedene Spezialaufgaben. Neben der Synthese von Substanzen zur Absorption und Verdauung von Fetten, sind sie hauptsächlich für die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

durch die Reduktion von O_2 mit verschiedenen Wasserstoffdonatoren verantwortlich. Das entstandene (H_2O_2) wird mit Hilfe des Enzyms Katalase zu H_2O und O_2 umgesetzt.

- Für die Zellatmung und den Energiestoffwechsel der Zelle sind die **Mitochondrien** zuständig. In diesen membranumschlossenen Organellen wird durch oxidative Phosphorylierung ATP synthetisiert und findet Elektronentransport statt (siehe Kapitel 2.2). Sie besitzen etwa die Größe von Protocyten und haben eine eigene kleine DNS.

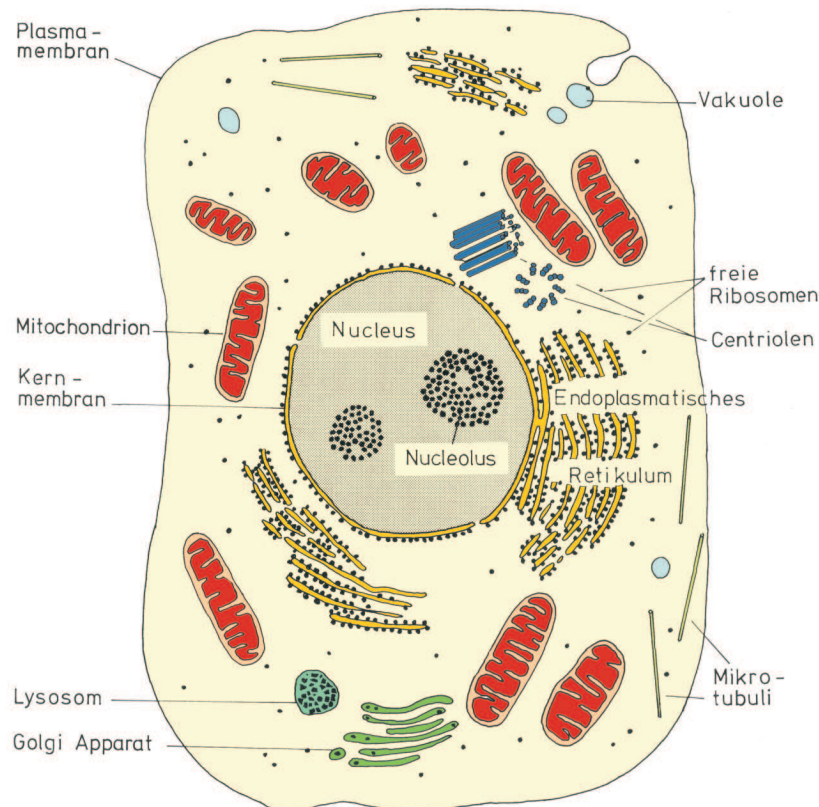


Abbildung 2.1: Die wichtigsten intrazellulären Kompartimente einer idealisierten tierischen Zelle, nach [150]

Die Gruppe der Pflanzenzellen unterscheidet sich in einigen Punkten von tierischen Zellen. Das hervorstechendste Merkmal von Pflanzenzellen ist die Fähigkeit zur Photosynthese. Grüne Pflanzen und Algen sind in der Lage, Energiegewinnung mit Hilfe von Lichtenergie und Assimilation von CO_2 zu betreiben. Weiteres Unterscheidungskriterium von Pflanzenzellen ist die Ausbildung einer rigiden Zellwand. Deren Vorhandensein führte zu einer im Vergleich zu tierischen Zellen unterschiedlichen Entwicklung in der Vielzelligkeit von Pflanzenzellen. Bedingt durch die Zellwände ist hier ein direkter Zellkontakt über die Plasmamembran nicht möglich. Durch diese Einschränkung ist auch die Art des Zellersatzes anders als bei Tierzellen. Entweder können die Zellwände der absterbenden Zellen erhalten bleiben und der Festigung der Pflanzen dienen (z.B. die Ausbildung von Rinde bei Bäumen) oder es werden vielzellige Teile als Ganzes abgeworfen (z.B. Blattabwurf) [148].

Betrachtet man die Größe der Zellen, so ist in der Regel die Pflanzenzelle zum Teil erheblich größer als eine Tierzelle. Dies ist auf das Vorhandensein von einigen Zellkompartimenten zurückzuführen, die die Pflanzenzelle zusätzlich zur tierischen Zelle besitzt, bzw. anders ausgebildet sind [151]:

- Die **Plastiden** sind durch zwei Elementarmembranen umhüllte und für Pflanzenzellen charakteristische Zellkompartimente. Sie enthalten ein Membransystem und eine mehr oder weniger homogene Grundsubstanz, das Stroma. Es gibt drei verschiedene Arten von Plastiden, die in der Regel nach ihren Pigmenten eingeteilt sind:
 - In den **Chloroplasten** findet die Photosynthese, also die Energiegewinnung durch Licht und CO_2 -Assimilation statt (siehe Kapitel 2.2). Aus diesem Grund liegen sie frei beweglich im Cytoplasma und richten ihre Oberfläche nach dem Licht aus. Sie enthalten Chlorophyll und Carotinoide. Die Feinstruktur ist gekennzeichnet durch Stapel scheibenförmiger Thylakoide, die sogenannte Grana. Die Chloroplasten enthalten auch kleine Ribosomen und besitzen wie die Mitochondrien eine kleine DNS.
 - **Chromoplasten** sind farbige Plastiden. Ihre Aufgabe ist die Synthetisierung und Speicherung von gelben, orangefarbenen oder roten Carotinoide.
 - **Leukoplasten** sind farblose Plastiden. Sie besitzen Speicherorgane, in denen sie aus Zucker Stärke bilden. Unter dem Einfluß von Licht, können aus Leukoplasten Chloroplasten entstehen.
- In der pflanzlichen Zelle sind die **Vakuolen** erheblich größer ausgebildet als in der tierischen Zelle. Sie können bis zu 90% des gesamten Zellvolumens ausmachen. Für das Zellwachstum spielen sie hier eine besondere Rolle, da es hauptsächlich auf einer Vergrößerung der Vakuolen beruht.
- Die **Zellwand** befindet sich außerhalb des lebenden Teils der Zelle, dem sogenannten Protoplasten. Sie verhindert ein Platzen der Zelle durch zu hohe Wasseraufnahme und kann aus bis zu 3 Schichten bestehen: Mittellamelle, Primärwand und Sekundärwand. Die Zellwand schottet benachbarte Zellen nicht vollständig voneinander ab. Vielmehr sind die Protoplasten benachbarter Zellen durch die die Zellwände durchquerenden Plasmodesmen miteinander verbunden.

Nach der obigen Einführung in den grundlegenden Aufbau der Zellen, folgt im weiteren Verlauf eine Betrachtung einiger zellinterner Vorgänge, die maßgeblich für die Ausbildung und Veränderung der extrazellulären Parameter verantwortlich sind, die mit den in dieser Arbeit behandelten Sensoren und Sensorchips detektiert werden.

2.2 Zellmetabolismus

2.2.1 Grundlagen

Lebende Zellen sind in allen Zuständen auf ständige Energiezufuhr angewiesen. Diese Energie wird angewendet, um ihre innere Ordnung aufzubauen und beizubehalten. Die Zellen halten sich damit am Leben und synthetisieren neue Zellbestandteile. Die dafür notwendige Energie erhält die Zelle durch ihren Stoffwechsel oder auch Metabolismus genannt. Die Energiequellen die diesen Stoffwechsel aufrechterhalten sind Nahrungsstoffe, die aus der Umgebung stammen und von der Zelle aufgenommen werden [152]. Diese werden dann in der Zelle in unzähligen chemischen Reaktionen zerlegt oder verändert um die entsprechenden, von der Zelle benötigten Proteine, Nucleinsäuren und andere Makromoleküle zur Verfügung zu stellen. Dabei laufen in den Zellen zwei grundlegende Arten chemischer Umsetzung ab: Der Abbau von Nahrungsstoffen zu kleinen Molekülen wird von *katabolen* Reaktionen durchgeführt. Dabei werden auch spezielle Energieformen produziert, die die Zelle benötigt und verarbeiten kann. Über *anabole* Reaktionen, die auch *Biosynthese* genannt werden, werden mit Hilfe der über die katabolen Reaktionen gebundene Energie die Moleküle synthetisiert, die die Zelle für ihre Funktion benötigt. Diese beiden Arten von entgegengesetzt ablaufenden chemischen Umsetzungen stellen den Stoffwechsel der Zelle dar [1]. Abbildung 2.2 stellt einen vereinfachten Überblick dar.

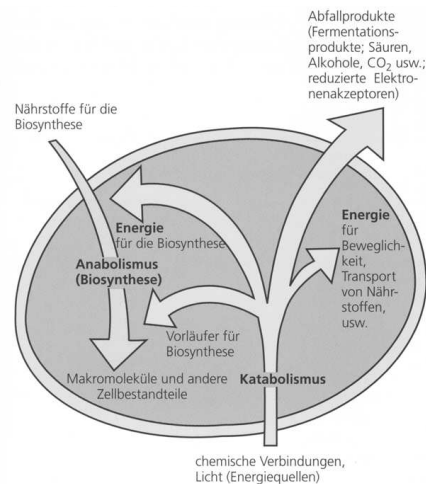


Abbildung 2.2: Vereinfachter Überblick über den Zellstoffwechsel, aus [149]

Normalerweise wäre die Temperatur, bei der die meisten dieser Umsetzungen ablaufen viel zu hoch. Die Zelle würde sich durch ihren Stoffwechsel selbst verbrennen. Damit dies nicht geschieht werden nahezu alle chemischen Reaktionen in der Zelle mit Hilfe von Katalyse durchgeführt. Diese verringert die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion, ohne daß der entsprechende Katalysator die Energiebilanz oder das Gleichgewicht der Reaktion nennenswert beeinflußt und sorgt somit dafür, daß die Zelle jede chemische Reaktion kontrollieren kann. In biologischen Systemen übernehmen die Aufgabe des Katalysators spezielle Proteine, sogenannte Enzyme. Die Enzyme sind dabei sehr spezifisch für bestimmte Reaktionen. Ein Enzym katalysiert in der Regel nur eine bestimmte Reaktion oder eine Menge von chemisch eng verwandten Reaktionen. Die katalytische Kraft ist dabei zum Teil enorm hoch. Enzyme können die Geschwindigkeit von chemischen Reaktionen um das 10^8 - bis 10^{20} -fache ihrer normalen, spontan ablaufenden Geschwindigkeit erhöhen [149].

Mit Hilfe von Enzymen gewinnen sowohl pflanzliche als auch tierische Zellen ihre Energie aus aufgenommenen Nahrungsmolekülen über den Vorgang der stufenweisen Oxidation. Dies bedeutet, daß im Gegensatz zur Verbrennung von organischem Material in einem Feuer, der Zellmetabolismus die Moleküle in einer Reihe von Reaktionen verarbeitet. Dabei gibt es nur wenige Reaktionen, die mit Hilfe einer direkten Anlagerung von Sauerstoff ablaufen. Vielmehr kommt es bei der Energiegewinnung in lebenden Organismen zu Oxidations- und Reduktionsreaktionen, sogenannte Redox-Reaktionen. Dabei bedeutet Oxidation und Reduktion nicht nur die Addition bzw. Wegnahme von Sauerstoffatomen, sondern bezieht sich auf jede Reaktion, bei der Elektronen zwischen Atomen übertragen werden. Oxidation stellt eine Elektronen-Abgabe und Reduktion, als Umkehr der Oxidation, somit eine Elektronen-Aufnahme dar. Da bei jeder chemischen Reaktion die Summe der Elektronen erhalten bleiben muß, laufen Oxidation und Reduktion immer gleichzeitig als Redox-Reaktion ab. In der Biochemie kommt es allerdings häufig vor, daß bei der Oxidation und Reduktion anstelle von Elektronen ganze Wasserstoffatome übertragen werden [1].

2.2.2 Aktivierte Transportermoleküle

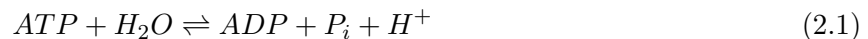
Elektronencarrier NADH und NADPH

Bei den oben angesprochenen Redox-Reaktionen sind in der Regel ein oder mehrere Intermediärprodukte beteiligt. Diese aktivierten Transporter, sogenannte Elektronenüberträger oder Elektronencarrier, haben die Aufgabe hochenergetische Elektronen und Wasserstoffatome zu übertragen. Diese Elektronenüberträger werden in zwei generelle Gruppen eingeteilt. Einerseits Überträger, die in der Cyto-

plasmamembran fest an Enzyme gebunden sind, andererseits Überträger die frei in in der Zelle diffundieren können. Zu den wichtigsten dieser Elektronencarrier gehören die frei diffundierenden Coenzyme Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) und das nahe verwandte Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP^+). NAD^+ und NADP^+ sind Wasserstoffatom-Überträger und übertragen zwei Elektronen und zwei Protonen, wobei ein H^+ in Lösung freigesetzt wird. Diese Übertragung wird als Dehydrierung bezeichnet. Dabei werden diese Coenzyme zu reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) bzw. reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) umgewandelt, die somit Elektronendonatoren sind. Obwohl beide NAD^+/NADH - und $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Paare etwa gleiche Redoxpotentiale von ca. $-0,32\text{V}$ aufweisen, sind sie in der Zelle auf unterschiedliche Weise aktiv. NAD^+/NADH ist hauptsächlich an energiereicheren, also katabolen Reaktionen beteiligt, wohingegen $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ in der Regel an biosynthetischen und damit anabolen Reaktionen in Aktion tritt [149].

ATP

Damit die Zelle die bei Redox-Reaktionen freigesetzte Energie für ihre Funktion nutzen kann, muß diese Energie in geeigneter Form zwischengespeichert werden. In der Regel findet diese Zwischenspeicherung in Form von energiereichen Phosphatverbindungen statt. Diese Verbindungen werden von der Zelle als Energiequelle benutzt, um für ihre Funktion endotherme Reaktionen ablaufen zu lassen. In lebenden Organismen ist Adenosintriphosphat (ATP) die wichtigste energiereiche Phosphatverbindung. Es besteht aus dem Ribonucleosid Adenosin und drei in Folge gekoppelten Phosphatresten [149]. ATP wird unter Aufwendung von Energie in einer Phosphorylierungsreaktion erzeugt (siehe Kapitel 2.2.4), bei der eine Phosphatgruppe an Adenosindiphosphat (ADP) ankondensiert wird [1]. Wird dann diese Energie benötigt, kann ATP durch Hydrolyse zu ADP und anorganischem Phosphat zurückgewandelt werden. Die dabei freiwerdende Energie ΔG° (die Änderung der freien Standardenergie bei pH 7) hängt dabei unter anderem von der Ionenstärke des entsprechenden Mediums ab und beträgt bei typischen zellulären Bedingungen ca. $-30,5\text{kJ/mol}$ [153]:



ATP ist der wichtigste Energieüberträger in der Zelle. Es wird u.a. benutzt, um Pumpen und Ionenkanäle anzutreiben, die den Transport von Molekülen und Ionen in die Zelle hinein und aus ihr heraus bewerkstelligen. Darüberhinaus stellt es Energie für Muskelkontraktionen und die elektrische Aktivität der Nervenzellen zur Verfügung [1]. (siehe Kapitel 2.4)

Weitere aktivierte Transportermoleküle

Neben den wichtigen Transportermolekülen ATP bzw. NADPH, die Phosphat bzw. Elektronen und Wasserstoff transferieren, gibt es noch eine Reihe von weiteren Transportmetaboliten, die bei Übertragungsreaktionen der Biosynthese Methyl-, Carboxyl- oder Glucosegruppen übertragen. Üblicherweise sind die dabei verwendeten Transportermoleküle Sekundärprodukte der bei der Hydrolyse von ATP stattfindenden Reaktionen. Die Energie für die Funktion dieser Transportermoleküle stammt somit letztendlich ebenfalls aus Stoffwechselreaktionen bei denen ATP erzeugt wird und unterstreicht dessen Bedeutung für Funktion zellulären Lebens [1]. Tabelle 2.1 zeigt eine Auswahl weiterer aktivierter Transportermoleküle und jeweils übertragenen Gruppen, die an Stoffwechselreaktionen teilnehmen.

2.2.3 Überblick über die Stoffwechselwege in der Zelle

Die Aneinanderreihung von oben beschriebenen Reaktionen und der daran beteiligten Moleküle bietet der Zelle die Möglichkeit eine Unzahl an enzymatischen Wegen für den Abbau von Nahrungsstoffen zu benutzen. Zusammen bilden sie eine äußerst komplizierte Vernetzung, die den gesamten Stoffwechsel

| Aktivierter Transportmetabolit | Übertragene Gruppe |
|--|--|
| ATP NADH, NADPH, FADH ₂ Acetyl-CoA Carboxyliertes Biotin S-Adenosylmethionin C ₁ -Tetrahydrofolsäure Uridindiphosphatglucose | Phosphat (HPO ₄ ²⁻) Elektronen und Wasserstoffe (e ⁻ , -HH ⁺) Acetylgruppe (-COCH ₃) Carboxylgruppen (-COOH) Methylgruppe (-CH ₃) C ₁ -Gruppen (-CH ₃ , -CHO, -COOH) Glucose |

Tabelle 2.1: Auswahl von wichtigen Transportermolekülen und den jeweils übertragenen Gruppen [1]

einer Zelle darstellt. Um die Vielfalt der möglichen Stoffwechselwege, oder auch metabolische Pfade genannt, zu verdeutlichen, sind in Abbildung 2.3 mehrere hundert Stoffwechselreaktionen einer Musterzelle abgebildet. Diese "Karte" des Zellstoffwechsels hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit, gibt aber einen grundlegenden Überblick über die Komplexität der Vorgänge, die für das Leben der Zellen notwendig sind. Alle Einzelreaktionen benötigen in der Regel ein anderes Enzym um abzulaufen. Die Vielfalt ist aber daran zu erkennen, daß sowohl die ablaufende Reaktion meistens an mehreren Stoffwechselwegen beteiligt ist, als auch, daß ein Ausgangsmolekül, das sogenannte Substrat, von verschiedenen Enzymen zu verschiedenen Zwischenprodukten umgewandelt wird. In einem vielzelligen Organismus ist die Verflechtung der Stoffwechselwege nochmals komplizierter. Bei verschiedenen Zelltypen sind die Konzentrationen der Enzyme zum Teil unterschiedlich. Daraus folgt, daß verschiedene Gewebe auf unterschiedliche Art und Weise zum Stoffwechsel des Gesamtorganismus beitragen [1].

Betrachtet man die Vielfalt der Stoffwechselreaktionen genauer, erkennt man zentrale Stoffwechselwege. Die der Glykolyse, dem Citratzyklus und der nachgeschalteten oxidativen Phosphorylierung. Diese werden nachfolgend in ihren Grundzügen skizziert. Viele andere Stoffwechselwege führen in diese zentralen Wege oder haben ihren Anfang in diesen, d.h. die Zwischenprodukte der Glykolyse oder des Citratzyklus bilden die Ausgangsstoffe für weitere Stoffwechselreaktionen um z.B. Aminosäuren, Nucleotide, Lipide und weitere organische Moleküle für die Zelle zu synthetisieren. Am Anfang dieser zentralen Stoffwechselwege stehen bei tierischen Zellen als grundlegende Nahrungsmoleküle Proteine, Lipide und Polysaccharide zur Verfügung. Diese polymeren Moleküle werden zuerst in einem Verdauungsschritt zu monomeren Einheiten wie Aminosäuren, Zuckern und Fettsäuren oder Glycerin aufgespalten. Diese Verdauung findet zum überwiegenden Teil außerhalb der Zelle statt, zum Teil aber auch in der Zelle in den Lysosomen. Für den weiteren Verlauf wird exemplarisch der Weg der Zucker verfolgt. Nach diesem Abbau gelangen diese Moleküle in das Cytosol und werden dort stufenweise während der Glykolyse und dem Citratzyklus weiter umgewandelt und die oben betrachteten aktivierten Transportermoleküle ATP und NADH gebildet [1].

2.2.4 Die Glykolyse

Die Energieerzeugung im Stoffwechsel einer Zelle beginnt in der Regel mit der Glykolyse oder auch Embden-Meyerhof-Weg genannt. Diese Verkettung von Reaktionen findet in nahezu allen Zellen statt. Innerhalb dieser Reaktionskette wird Glucose zu Pyruvat (Brenztraubensäure) umgewandelt und dabei eine geringe Menge an ATP produziert. In den hier betrachteten aeroben Organismen geht die Glykolyse dem Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung voraus. Sie findet dabei ausschließlich im Cytosol der Zelle statt [153]. Die Glykolyse besteht aus einer Aneinanderreihung von

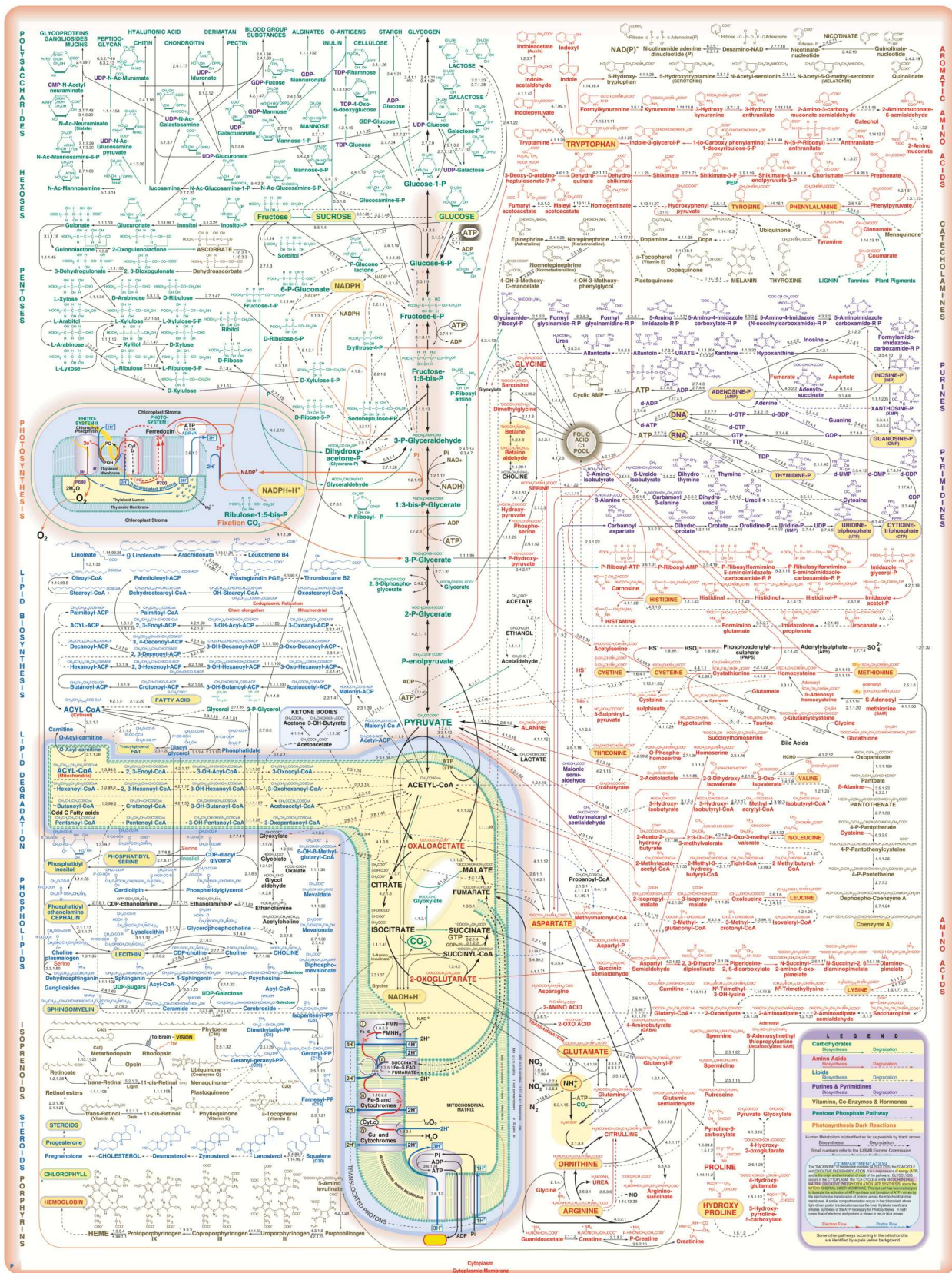


Abbildung 2.3: Übersicht über eine Auswahl der komplexen Pfade des Zellmetabolismus [154]

10 enzymkatalysierten Einzelreaktionen, deren Reaktionsprodukte als Ausgangsstoffe für die jeweils nächste Reaktion dienen [1]. Betrachtet man die Gesamtbilanz der Glykolyse, gewinnt man bei der Überführung von Glucose in Pyruvat insgesamt zwei ATP- und zwei NADH-Moleküle. Die gesamte Bilanz ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

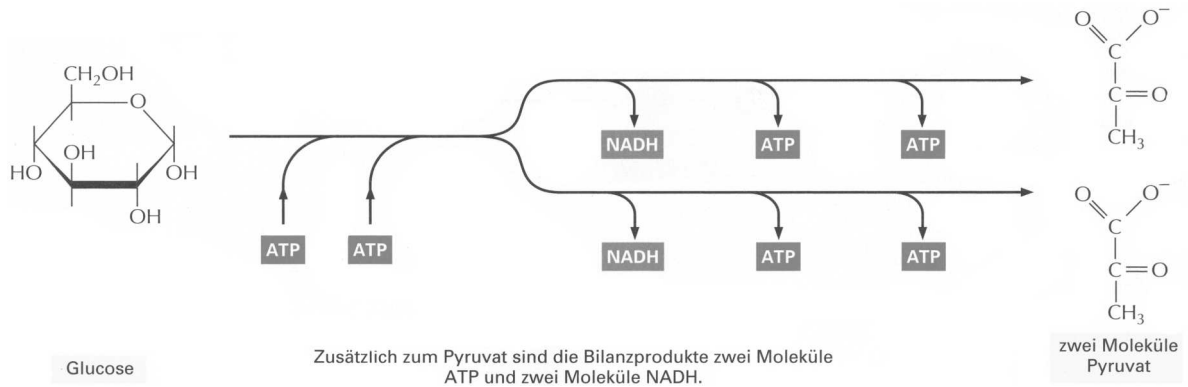
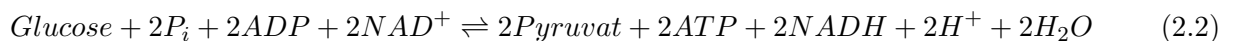


Abbildung 2.4: Nettobilanz der Glykolyse, aus [1]

Die Gesamtreaktion lautet [153]:



Die während der Glykolyse gebildeten NADH-Moleküle werden bei aeroben Organismen in der oxidativen Phosphorylierung (siehe Kapitel 2.2.6) weiter verarbeitet. Dort werden durch Elektronenübertragung die NADH-Moleküle zu NAD^+ zurückgebildet. Diese stehen dann wieder als Ausgangsprodukte für die Glykolyse zur Verfügung und unterstreichen so den Kreislaufcharakter der hier aufgezeigten Stoffwechselwege [1].

Obwohl die Reaktionen der Glykolyse in nahezu allen Zelltypen sehr ähnlich sind, unterscheidet sich die weitere Verwertung des erzeugten Pyruvats. Grundsätzlich kann diese Verwertung mit Hilfe dreier Reaktionen stattfinden. Unter anaeroben Bedingungen sind dies die alkoholische Gärung und die Lactat-Dehydrogenase.

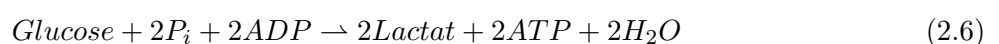
Bei der alkoholischen Gärung entsteht aus Pyruvat Ethanol. Diese Umwandlung geschieht in zwei Schritten und tritt vor allem bei Hefe und wenigen anderen Mikroorganismen auf. Die durch die Pyruvat-Decarboxylase und die Alkohol-Dehydrogenase katalysierten Reaktionen dieses anaerob ablaufenden Prozesses lauten [153]:



Die anaerobe Nettoreaktion der Umwandlung von Glucose in Ethanol lautet [153]:



Die zweite Reaktion unter anaeroben Bedingungen ist die Umwandlung von Pyruvat in Lactat durch die Lactat-Dehydrogenase. Während die alkoholische Gärung ausschließlich bei niederen Organismen auftritt, findet diese durch Lactat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion auch in höheren Organismen statt, wenn nur begrenzt Sauerstoff zur Verfügung steht. Ein Beispiel hierfür wäre die intensive Beanspruchung eines Muskels. Die Gesamtbilanz dieser Umwandlung von Glykolyse in Lactat lautet [153]:



Durch diese beiden, unter anaeroben Bedingungen stattfindenden Reaktionen wird nur ein geringer Teil der in der Glucose enthaltenen Energie freigesetzt. Erheblich mehr Energie entsteht unter aeroben Bedingungen mit Hilfe des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung, die nachfolgend näher betrachtet werden. Hierbei wird das Pyruvat in Acetyl-CoA umgewandelt. Abbildung 2.5 zeigt die drei möglichen Verwertungen des, durch die Glykolyse aus Glucose erzeugten Pyruvats zur Energiegewinnung.

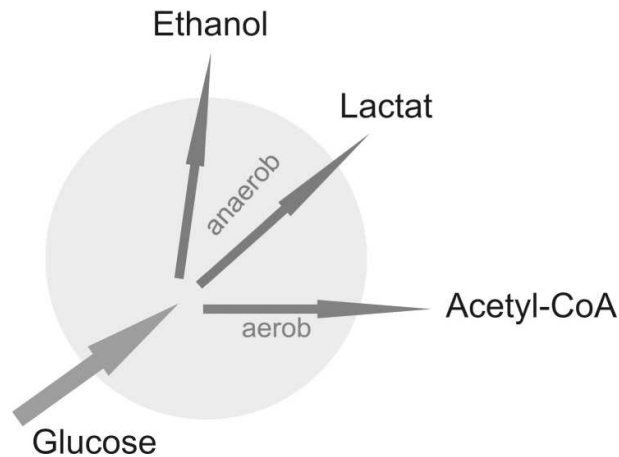


Abbildung 2.5: Anaerobe und aerobe Verwertungswege von Glucose

2.2.5 Der Citratzyklus

Bei aeroben Organismen ist der nächste Schritt im Stoffwechselweg die weitere Umsetzung des in der Glykolyse entstandenen Pyruvats. Im Gegensatz zur vorangehend betrachteten Glykolyse, die im Cytosol der Zelle stattfindet, finden die weiteren hier betrachteten Stoffwechselreaktionen in den Mitochondrien der Zelle statt. Das Pyruvat muß somit zur weiteren Umsetzung in die Matrix der Mitochondrien transportiert werden. Bei dieser weiteren Umsetzung handelt es sich um die vollständige Oxidation des Pyruvat zu CO_2 . Dies geschieht im sogenannten Citratzyklus. Diese Abfolge von Reaktionen wird auch Zitronensäure-, Tricarbonsäure- oder Krebszyklus genannt [153].

Das Pyruvat aus der Glykolyse ist allerdings nicht das direkte Ausgangsprodukt für den Citratzyklus. Zuerst wird das Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung und gleichzeitiger Dehydrogenierung zu Acetyl-CoA umgewandelt. Dabei entsteht ein Molekül NADH und als Abfallprodukt ein Molekül CO_2 . Treibender Katalysator dieser Reaktion ist ein Multienzymkomplex aus drei Teilen von Enzymprotein-Untereinheiten, dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex [1]. Die Gleichung der ablaufenden Reaktion, die auch als Fettsäureoxidation bezeichnet wird, lautet [153]:

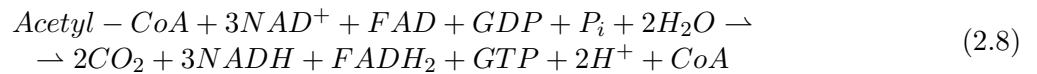


Das entstandene Molekül CO_2 wird im weiteren Verlauf des Stoffwechsels nicht weiter verwendet und aus der Zelle ausgeschleust. Für die vorliegende Arbeit ist dieses und weitere im Citratzyklus entstehende Moleküle aber von weitgehender Bedeutung, da es eine im extrazellulären Umfeld meßbare Veränderung des pH-Werts verursacht (siehe Kapitel 2.2.8).

Die Kohlenstoffatome der Acetylgruppe des, in oben beschriebener Reaktion entstandenem Acetyl-CoA, werden nun im Citratzyklus vollständig oxidiert und in CO_2 umgewandelt. Die Oxidation findet allerdings nicht direkt statt, sondern unter Bildung von C_6 -Tricarbonsäure (Zitronensäure), das der Namensgeber dieser Abfolge von Reaktionen ist. Der Citratzyklus ist eine Aneinanderreihung von acht Einzelreaktionen, die im Kreis ablaufen. Während dieser Reaktionen sind neben den, aus Kapitel 2.2.2

betrachteten NAD^+/NADH -Paare zwei weitere Transportmetabolite beteiligt. Diese sind die Moleküle FADH_2 (reduziertes Flavin-Adenin-Dinucleotid), das aus FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) entsteht und das Ribonucleotid GTP (Guanosintriphosphat), das aus GDP (Guanosindiphosphat) entsteht. Dabei ist GTP nahe mit dem Molekül ATP verwandt. Durch Übertragung der Phosphatgruppe von GTP auf das Molekül ADP ist es möglich ATP zu erzeugen. Dies geschieht auch im Verlauf des Citratzyklus. Das FADH_2 -Molekül stellt ebenso wie das NADH einen Transporter für energiereiche Elektronen und Wasserstoff dar [1].

Betrachtet man die Bilanz des Citratzyklus sind die Haupt-Endprodukte CO_2 , hochenergetische Elektronen in Form von NADH und FADH_2 . Das CO_2 ist ein Abfallprodukt und wird aus der Zelle ausgeschieden. Ebenso wie das CO_2 aus der Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA, trägt es einen maßgeblichen Beitrag zur Änderung des extrazellulären pH-Werts bei und wird in Kapitel 2.2.8 noch näher betrachtet. Die energiereichen Elektronen des NADH und des FADH_2 werden in der, dem Citratzyklus nachgeschalteten, oxidativen Phosphorylierung benötigt und weiter verarbeitet [1]. Die Nettoreaktion des Citratzyklus lautet [153]:



Die während des Citratzyklus benötigten Sauerstoffatome zur Bildung von CO_2 aus den in den Zyklus eintretenden Acetylgruppen stammen nicht aus molekularem Sauerstoff, sondern aus Wasser. Dabei werden während des Zyklus drei H_2O -Moleküle gespalten.

Viele Zwischenprodukte des Citratzyklus, wie Oxalacetat oder α -Ketoglutarat, sind Ausgangsprodukte für viele wichtige Biosynthesereaktionen. Sie werden daher zum Teil aus dem Mitochondrium in das Cytosol der Zelle zurücktransportiert, wo sie als Vorläufersubstrate vieler Moleküle wie Aminosäuren oder Nucleobasen dienen. In eukaryotischen Zellen ist somit das Mitochondrium mit seinem Citratzyklus das Zentrum aller Energie liefernden Vorgänge der Zelle [1].

2.2.6 Die oxidative Phosphorylierung

Der letzte Schritt des zellulären Abbaus von Nahrungsmolekülen zur Energiegewinnung findet vollständig in den Mitochondrien statt. Dabei werden neben molekularem Sauerstoff, die während der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus erzeugten NADH - und FADH_2 -Moleküle umgewandelt. NADH - und FADH_2 -Moleküle sind energiereiche Verbindungen, die jeweils ein Elektronenpaar mit hohem Übertragungspotential besitzen. Diese Elektronen werden auf molekularem Sauerstoff übertragen. Dabei werden enorme Mengen an Energie freigesetzt, die überwiegend zur Erzeugung von ATP genutzt wird. Bei aeroben Organismen wird erst an dieser Stelle der größte Teil der chemischen Bindungsenergie eines Nahrungsmoleküls freigesetzt und stellt den hauptsächlichen Ursprung für ATP dar. Dieser Vorgang, der ATP in dem Maße liefert, in der Elektronen von NADH und FADH_2 über eine Reihe von Elektronen-Carriern auf molekularem Sauerstoff übertragen wird, wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet [153].

Diese Elektronenübertragung von NADH und FADH_2 auf O_2 findet durch eine Reihe von Proteinkomplexen an der inneren Mitochondrienmembran statt. Diese Kette an hintereinander geschalteten spezialisierter Elektronenakzeptor- und Elektronendonatormolekülen bewirkt eine stufenweise Verringerung der Elektronenenergie. Dies wird als Elektronentransportkette bezeichnet. Die dabei freiwerdende Energie wird dazu verwendet, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix herauszutransportieren. Der dadurch entstehende Protonen-Gradient liefert hauptsächlich Energie für die Erzeugung von ATP durch die Phosphorylierung von ADP mit anorganischem Phosphat unter Ausfall von Wasser, auch ATP -Synthese genannt [1]. Diese Reaktion findet statt, wenn Protonen, getrieben von dem Protonen-Gradienten, in die mitochondriale Matrix zurückfließen. Die Kopplung von Oxidation und Phosphorylierung durch den entstehenden Protonen-Gradienten ist in Abbildung 2.6 dargestellt [153].

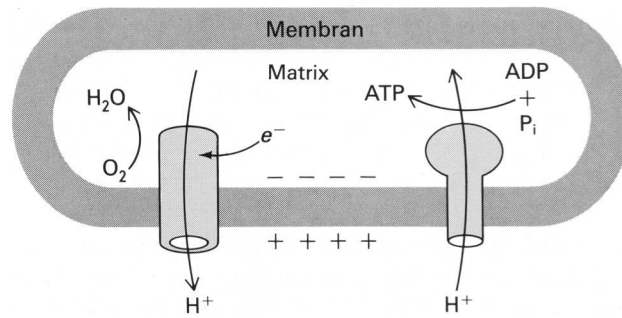


Abbildung 2.6: Prinzip der oxidativen Phosphorylierung, bestehend aus Elektronentransportkette und ATP-Synthese, aus [153]

Zum Ende des Elektronentransfers werden die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen und erreichen so ihr niedrigstes Energieniveau. Dieser Sauerstoff geht gleichzeitig eine Verbindung mit freien Protonen ein und bildet Wasser [1]. Diese Reaktion ist der hauptsächliche Verbraucher von Sauerstoff in einem lebenden Organismus. Der Sauerstoff stammt aus der extrazellulären Umgebung und verringert so die Sauerstoffkonzentration in dieser. Neben der pH-Änderung durch Abfallprodukte der Zelle, ist diese Änderung der Sauerstoffkonzentration der zweite wichtige Parameter, der durch die in dieser Arbeit verwendeten Sensoren nachgewiesen werden kann. (siehe Kapitel 2.2.8)

Das Grundprinzip der oxidativen Phosphorylierung ist die Umwandlung einer elektronenmotorischen in eine protonenmotorische Kraft und anschließend weiter in ein Phosphorylgruppenübertragungspotential. Dabei wird die erste Umwandlung mit Hilfe von drei Protonenpumpen, die durch Elektronen betrieben werden, durchgeführt. Die Protonenpumpen bestehen aus je einem Transmembran-komplex: Der NADH-Q-Reduktase, der Cytochrom-Reduktase und der Cytochrom-Oxidase. Durch Verkettung dieser Proteinkomplexe werden Elektronen vom NADH auf den molekularen Sauerstoff übertragen. Die relevanten Teilreaktionen lauten [153]:



E'_0 beschreibt dabei das Redoxpotential. Zieht man Reaktion 2.10 von 2.9 ab, erhält man



Die $+1,14V$ stellen hier die Potentialdifferenz zwischen NADH und O_2 dar. Diese Potentialdifferenz treibt die Elektronentransportkette an. Dieses Redoxpotential von $E'_0 = +1,14V$ entspricht dabei einer freien Energie von $\Delta G^{o'} = -220kJ/mol$. Diese frei werdende Energie aus Reaktion 2.11 wird für die ATP-Synthese benutzt [153]:

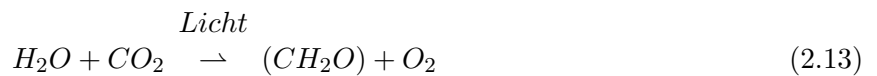


Einen ähnlichen Weg beschreiten auch die $FADH_2$ -Moleküle, der an dieser Stelle aber nicht näher betrachtet wird [153].

2.2.7 Die Photosynthese

Da die in der vorliegenden Arbeit behandelten Sensorchips auch für Anwendungen mit Pflanzenzellen, z.B. Grünalgen, geeignet sind, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die Stoffwechselfvorgänge grüner Pflanzenzellen und deren Unterschiede zu den bisher betrachteten Tierzellen gegeben werden.

Der Hauptunterschied liegt in der Fähigkeit zu einem der wichtigsten biologischen Prozesse, der Photosynthese. Die Photosynthese ist ein Prozeß, bei dem Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt wird. Alle grünen Pflanzen sind in der Lage Photosynthese zu betreiben und werden daher zu den so genannten phototrophen Organismen gezählt. Außerdem sind nahezu alle dieser Organismen autotroph, d.h. sie sind in der Lage CO_2 als einzige Kohlenstoffquelle zu verwenden. Die Energie des Lichtes wird dabei verwendet, um CO_2 zu organischen Verbindungen zu reduzieren [149]. Die Grundgleichung der Photosynthese ist dabei relativ einfach [153]:



(CH_2O) steht in dieser Gleichung allgemein für Kohlehydrate, vor allem Saccharose und Stärke. Gleichung 2.13 stellt den Vorgang der Photosynthese sehr vereinfacht dar. Der tatsächliche Mechanismus der Photosynthese unter Beteiligung von vielen Proteinen und kleineren Molekülen ist sehr komplex [153]. Tatsächlich gliedert sich der Stoffwechsel von photoautotrophen Pflanzen in zwei getrennte Reaktionsfolgen: Der Lichtreaktionen oder auch als photosynthetischen Elektronentransfer-Reaktionen bekannt, bei der durch Umwandlung Lichtenergie in chemische Energie in Form von ATP überführt wird und der Dunkelreaktionen oder auch Kohlenstoff fixierenden Reaktionen genannt, in der mit Hilfe der gewonnenen Energie CO_2 zu organischen Verbindungen umgewandelt wird. Dabei wird zwischen der oxygenen Photosynthese und der anoxygenen Photosynthese unterschieden. Bei ersterem wird H_2O verwendet, um NADP^+ zu NADPH zu reduzieren. Als Nebenprodukt entsteht hierbei molekularer Sauerstoff. Bei der anoxygenen Photosynthese entsteht dieser molekulare Sauerstoff nicht [149]. Im weiteren Verlauf beschränkt sich die Darstellung auf die Lichtreaktionen der oxygenen Photosynthese, da sich der hier produzierte Sauerstoff, von den in dieser Arbeit behandelten Sensorchips in Form einer Änderung der Sauerstoffkonzentration im extrazellulären Milieus nachweisen läßt.

In den grünen Pflanzen findet die Energieumwandlung der Photosynthese in dem Thylakoidmembransystem der Chloroplasten, einer spezialisierten Form von intrazellulärer Organellen, die zur Familie der Plastiden zählen, statt. Mit Ausnahme der gesamten Größe und der Thylakoidmembran, in der die Elektronentransportketten, das System des Photosyntheseapparats und die ATP-Synthase lokalisiert sind, sind die Chloroplasten nach den gleichen Grundsätzen organisiert wie die Mitochondrien. Auch ihre Energieumwandlungen führen sie in ähnlicher Weise durch. Die Photosynthese beginnt mit der Absorption von Licht in Photonenrezeptoren wie Chlorophyll. Chlorophyll ist ein Porphyrin mit einem koordinierten Magnesiumion und kommt in Pflanzen, Algen und auch bei einigen Bakterien vor. Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Chlorophyll, das Chlorophyll a und das Chlorophyll b, die sich neben ihrer Absorptionsspektren chemisch durch eine Gruppe an einem der Pyrrolringe unterscheiden. Der wichtigste Photorezeptor in höheren Pflanzen ist das Chlorophyll a [153]. Abbildung 2.7 zeigt die Struktur und das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a. Neben Chlorophyll, das für die Photosynthese von entscheidender Bedeutung ist, existieren in phototrophe Organismen noch weitere Pigmente wie Carotinoide und Phycobiline, die an der Verarbeitung von Lichtenergie als Hilfspigmente beteiligt sind [149].

Wie in tierischen Zellen auch, benötigt die Pflanzenzelle ATP und NADPH um Stoffwechsel und Wachstum zu bewerkstelligen. Diese Transportmetabolite werden in photosynthetischen Elektronentransportreaktionen erzeugt. Die dafür notwendige Energie liefert das Sonnenlicht, das von Chlo-

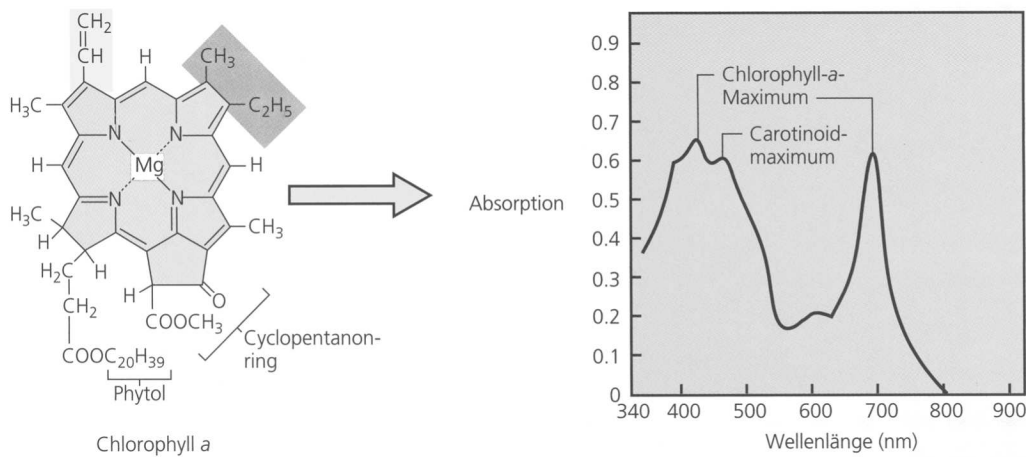
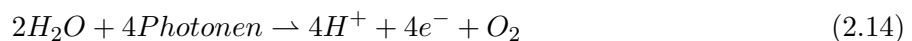


Abbildung 2.7: Struktur und Absorptionsspektrum von Chlorophyll a, aus [149]

rophyllmolekülen absorbiert wird. Dieses Molekül wird durch ein Photon angeregt und eines seiner Elektronen wird auf ein höheres Energielevel gehoben. Dieser angeregte Zustand ist nicht stabil und das Molekül ist gezwungen zu seinem Grundzustand zurückzukehren. Diese Rückkehr geschieht neben der Umsetzung in Wärme oder Fluoreszenz, auf zwei, für die Photosynthese relevanten Wege. Einerseits kann die Energie durch einen so genannten Resonanzenergietransfer auf ein benachbartes Chlorophyllmolekül übertragen werden. Andererseits ist es möglich, das energiereiche Elektron auf einen Elektronenakzeptor, z.B. ein räumlich nahes Molekül, zu übertragen. Das weitere Molekül kehrt dann in den Grundzustand durch Aufnahme eines niederenergetischen Elektrons von einem Elektronendonator zurück [1].

Bei oxygenen Phototrophen besteht der Elektronentransport aus zwei getrennten, aber dennoch sich ergänzenden photochemischen Reaktionen. Diese beiden Reaktionen werden als Photosystem I und Photosystem II bezeichnet. Beide benutzen Chlorophyll a, das sich allerdings spektral unterscheidet [149]. Das Photosystem I wird durch Licht der Wellenlänge unterhalb 700nm angeregt und erzeugt zur Bildung von NADPH ein starkes Reduktionsmittel. Das Photosystem II benötigt Licht von Wellenlängen unter 680nm . Zur Bildung von O_2 produziert es ein starkes Oxidationsmittel. Sowohl der Elektronenfluß von Photosystem II auf Photosystem I, als auch innerhalb jedes Photosystems erzeugt zur Synthese von ATP einen transmembranalen Protonengradienten. Diese Reaktionen werden als photosynthetische Phosphorylierung oder Photophosphorylierung bezeichnet [153].

Die Erzeugung von ATP und NADPH in Pflanzen erfolgt bei der Photosynthese durch einen Zwei-Stufen-Prozeß, der so genannten nicht zyklischen Photophosphorylierung. Dazu werden die Photosysteme II und I hintereinander geschaltet. Das Photosystem II entzieht in einem ersten Schritt H_2O Elektronen. Die Sauerstoffatome von zwei Wassermolekülen binden dabei an ein Cluster von Manganatomen eines Enzyms. Dieser Vorgang erleichtert den schrittweisen Abzug von Elektronen aus dem Wasser. Die Elektronen werden zu dem Zeitpunkt übertragen, in dem Photonen im Reaktionszentrum der Chlorophyllmoleküle Elektronenlücken erzeugen. In dem Moment, da den beiden Wassermolekülen durch vier Photonen vier Elektronen entzogen worden sind, entsteht ein O_2 . Das Photosystem II realisiert dabei folgende Reaktion [1]:



Dieser Mechanismus stellt sicher, daß keine Wassermoleküle nur teilweise oxidiert werden und dadurch Sauerstoffradikale entstehen, die hoch toxisch und hoch reaktiv wären. Das Reaktionszentrum des Photosystems II erzeugt starke Elektronendonatoren wie Plastochinol (QH_2). Diese reduzierten

Chinone übertragen ihre Elektronen auf den so genannten Cytochrom-bf-Komplex oder Cytochrom- b_6f -Komplex. Dieser Komplex ist eine H^+ -Pumpe, die H^+ aus dem Stroma in den Thylakoidraum pumpt. Der sich dadurch ausbildende Protonengradient treibt wie in den Mitochondrien der Tierzelle die Synthese von ATP an.

Die letzte Phase in dieser Elektronentransportkette wird vom Photosystem I durchgeführt. Das Photosystem I stellt einen Elektronenakzeptor dar und nimmt ein Elektron in ein Elektronloch auf, das von einem Lichtquant im Chlorophyllmolekül seines Reaktionszentrums erzeugt worden ist. Dieses Elektron wird auf ein sehr hohes Energieniveau angehoben und benutzt diese Energie, um $NADP^+$ zu NADPH zu reduzieren.

Abbildung 2.8 zeigt die Änderung des Redoxpotentials und den Weg des Elektronenflusses während der Photosynthese [1].

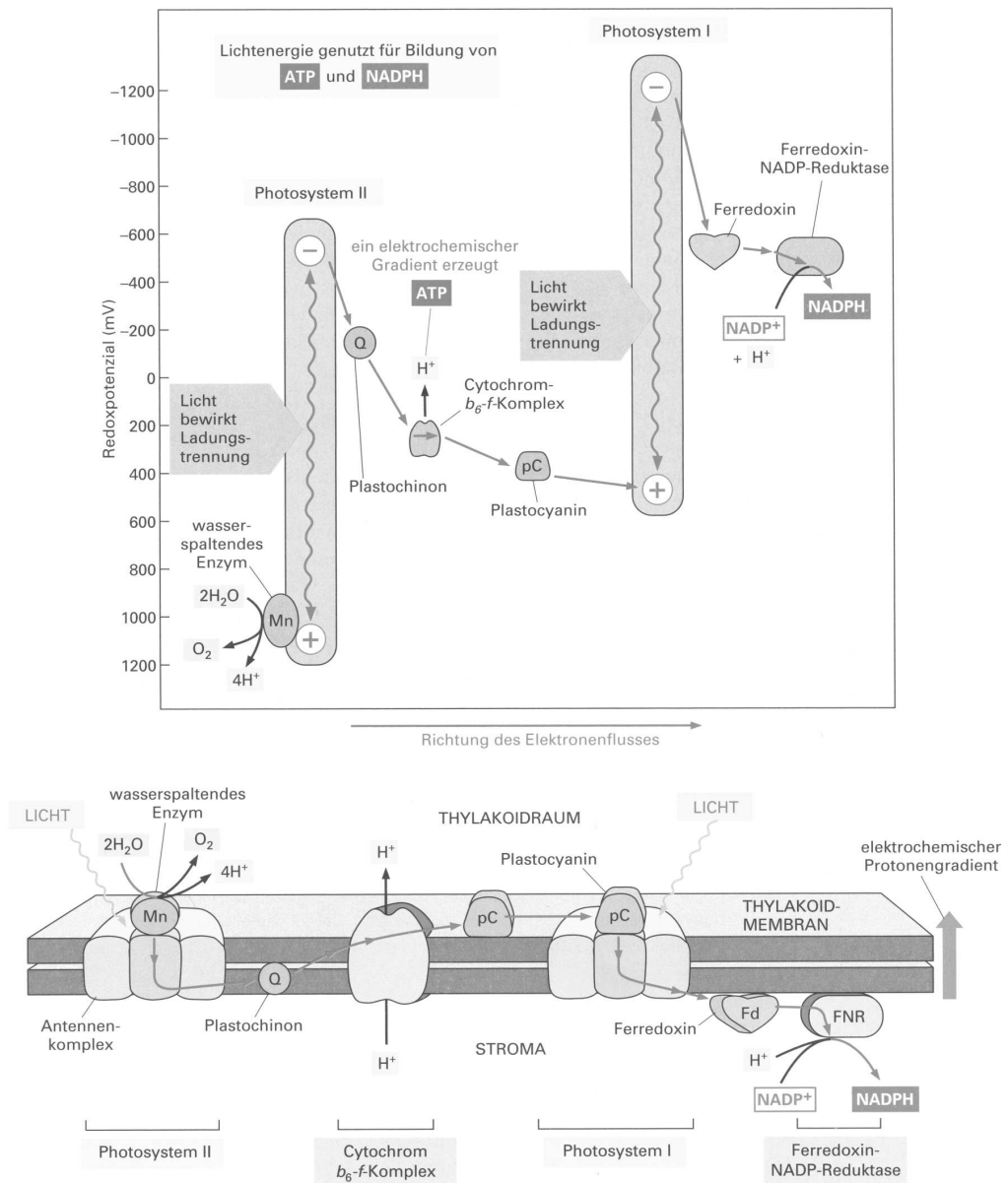


Abbildung 2.8: Oben: Änderung des Redoxpotentials während der Photosynthese, Unten: Der Elektronenfluß durch die Thylakoidmembran während der Photosynthese, aus [1]

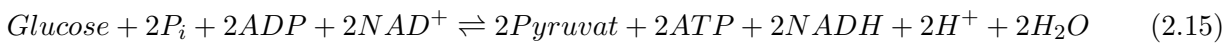
2.2.8 Zusammenfassung

In den Kapiteln 2.2.1 bis 2.2.7 wurden die wichtigsten grundlegenden Mechanismen des Zellstoffwechsels betrachtet. Diese stellen nur einen kleinen Teil, aller in einer Zelle ablaufenden enzymatischen Reaktionen dar. Die Gesamtheit des Zellstoffwechsels ist, wie in Kapitel 2.2.3 dargestellt, ein kompliziertes Gebilde, in dem die verschiedenen Stoffwechselwege ineinandergreifen. Der gesamte Stoffwechsel der Zelle spielt dabei eine große Rolle für das Verhalten der Zelle, wie Zellteilung, Zellaktivität und Zelltod. Insbesondere in einem vielzelligen Organismus ist die Verflechtung der Stoffwechselwege weitaus komplizierter als bei einer einzelnen Zelle. Bei verschiedenen Zelltypen sind die Konzentrationen der Stoffwechselenzyme zum Teil unterschiedlich. Daraus folgt, daß verschiedene Gewebe auf unterschiedliche Art und Weise zum Stoffwechsel des Gesamtorganismus beitragen [1].

Will man Untersuchungen durchführen, welche Auswirkungen Wirkstoffe, wie z.B. Medikamente oder Substanzen, auf Zellen oder Gewebe haben, ist die Beobachtung des Zellstoffwechsels ein wichtiges Hilfsmittel. So wirken beispielsweise Kommunikationsmechanismen, die die Zelle befähigen, Einfluß auf ihr Verhalten zu nehmen, sich unter anderem auf den Zellstoffwechsel aus. Die genauen Mechanismen inter- sowie intrazellulärer Kommunikationswege sollen an dieser Stelle nicht näher betrachtet werden.

Für die vorliegende Arbeit ist der qualitative und quantitative Nachweis des Zellstoffwechsels von großem Interesse. Um zu verstehen, wie dieser Nachweis des Stoffwechsels der Zelle in seinen Grundzügen technisch bewerkstelligt wird, sind nachfolgend die Nettogleichungen der in den vorangegangenen Kapiteln betrachteten zentralen Stoffwechselreaktionen aufgeführt [153]:

Glykolyse:



Fettsäureoxidation:



Citratzyklus:



Oxidative Phosphorylierung:



Betrachtet man die Ausgangs- und Endprodukte, so erkennt man, daß bei der oxidativen Phosphorylierung molekularer Sauerstoff als Ausgangsstoff benötigt wird. Dieser Sauerstoff stammt aus dem extrazellulären Umfeld und führt so zu einer Änderung der Sauerstoffkonzentration im extrazellulären Milieu der Zelle. Die Sauerstoff-Aufnahmerate der Zelle läßt sich somit aus der Sauerstoff-Konzentrationsänderung des extrazellulären Milieus direkt bestimmen, die mit entsprechenden Sensoren nachweisbar ist. Untersuchungen, die eine Beeinflussung von Wirkstoffen auf die Zellreaktionen mit Hilfe des Parameters Sauerstoff-Aufnahme der Zellen zum Thema hat, wurden z.B. von Ruffieux et al. durchgeführt und in [155] dokumentiert. Handelt es sich bei dem zu untersuchenden Gewebe um Zellen grüner Pflanzen, z.B. Grünalgen, so ist aus Gleichung 2.13 zu erkennen, daß molekularer Sauerstoff nicht verbraucht, sondern durch den Zellstoffwechsel produziert wird. Auch in diesem Fall läßt der Nachweis einer Änderung der Sauerstoffkonzentration im extrazellulären Umfeld Rückschlüsse auf den Zellstoffwechsel und somit der Zellaktivität zu.

Ein weiterer wichtiger Parameter der eine Untersuchung des Zellstoffwechsels erlaubt ist die Rate der Ansäuerung des extrazellulären Umfeldes, die sich in einer Änderung des pH-Werts des Umfelds

ausdrückt. Betrachtet man oben die Gleichungen, so erkennt man, daß bei der Fettsäureoxidation und dem Citratzyklus mehrere CO_2 -Moleküle entstehen, die nicht weiter verarbeitet werden und somit von der Zelle ausgeschieden werden. Gelangen CO_2 -Moleküle in Wasser, werden sie auf folgende Weise zerlegt [156]:



Die so entstehenden H_3O^+ -Ionen bewirken eine meßbare Veränderung des pH-Werts (siehe Kapitel 3.4.1). Damit läßt die Änderung des pH-Werts im extrazellulären Milieu, ebenso wie die Änderung der Sauerstoffkonzentration, Aussagen über die Aktivität des Zellstoffwechsels zu. Untersuchungen hierzu wurden unter anderem von Owicki et al. durchgeführt und sind in [157] nachzulesen.

Abbildung 2.9 zeigt schematisch die stoffliche Interaktion der Zelle mit der Zellumgebung aufgrund des Zellstoffwechsels. In Kapitel 3 werden geeignete Technologien betrachtet, die die Möglichkeit bieten, Änderungen in den betreffenden Parametern Sauerstoffkonzentration und pH-Wert zu erfassen.

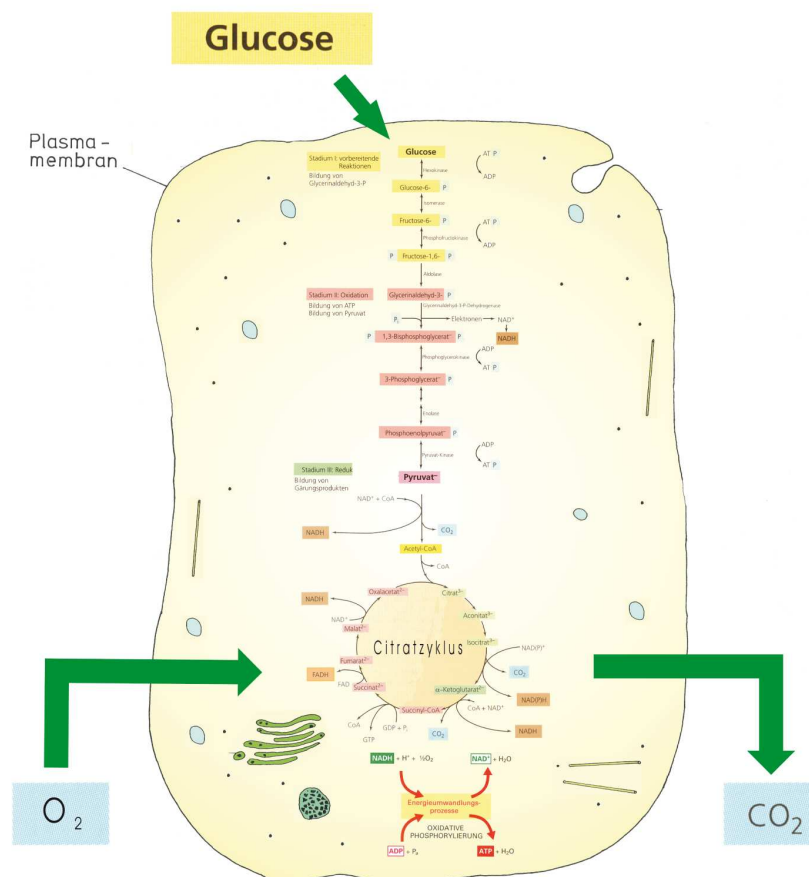


Abbildung 2.9: Vereinfachte schematische Darstellung der stofflichen Interaktion der Zelle mit der Zellumgebung aufgrund des Zellstoffwechsels, nach [1, 149, 150]

2.3 Zelloberfläche und extrazelluläre Matrix

2.3.1 Grundlagen

Eine wichtige Aufgabe übernimmt für die Zelle ihre Zellmembran, auch Plasmamembran genannt. Sie ist einerseits ihre Schnittstelle zur Zellumgebung, als auch eine Barriere, die alle Stoffe auf dem Weg in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus durchtreten müssen. Aus diesem Grund hat die Zellmembran eine Vielzahl an wichtigen Aufgaben zu erfüllen [148]:

- Insbesondere bei tierischen Zellen, die im Gegensatz zu pflanzlichen Zellen keine Zellwände besitzen, besitzt die Außenseite der Zellmembran bestimmte, in der Zelle nicht vorkommende Moleküle zum Schutz der Zelle.
- Die Ionenkonzentration in der Zelle ist in der Regel anders als außerhalb der Zelle. Dies führt zur Ausbildung eines Membranpotentials an der Zellmembran. Dieses Membranpotential spielt u.a. bei spezialisierten Zellen wie z.B. Nervenzellen (siehe Kapitel 2.4) eine große Rolle bei der Leitung von elektrischen Erregungen.
- Die Zellen sind in der Lage sich gegenseitig zu erkennen. Dies wird als Zell-Zell-Erkennung bezeichnet. Dazu besitzt die Plasmamembran an ihrer Außenseite einerseits bestimmte Merkmale, die von anderen Zellen oder Molekülen erkannt werden können. Andererseits trägt die Plasmamembran Rezeptoren die in der Lage sind ihrerseits andere Zellen zu erkennen.
- Über die Plasmamembran werden Verbindungen zu anderen Zellen aufgenommen. Diese Zell-Zell-Verbindungen, auch Junctions genannt, werden über Kontakte realisiert, die in begrenzten Bereichen ausgebildet werden und spezielle Funktionen haben.
- Zwischen der Plasmamembran und dem Cytoskelett bestehen Wechselwirkungen, die vielfältige Funktionen besitzen.
- Signale von außen werden von der Zelle unter anderem über die Plasmamembran aufgenommen. Die für die Signalübertragung verantwortlichen Signalmoleküle, z.B. Hormone und Neurotransmitter, werden mit Hilfe von Rezeptoren an der Plasmamembran aufgenommen und in das Cytoplasma weitergeleitet.
- Die Plasmamembran stellt in der Regel für die meisten Moleküle und Ionen eine nicht passierbare Barriere dar. Nimmt die Zelle wichtige Stoffe auf oder gibt sie nach außen ab, geschieht dies durch spezifische Transporteinrichtungen oder auch Translokatoren genannt.
- Neben Translokatoren findet der Stofftransport durch die Plasmamembran auch durch die so genannte Endocytose statt. Hierbei handelt es sich um einen Vesikelweg, der Moleküle direkt in die Lysosomen transportiert.
- Die Plasmamembran besitzt die Fähigkeit zur Regeneration durch einen Vesikelfluß aus dem Endomembransystem. Dieser Vorgang wird als Exocytose bezeichnet und bietet auch die Möglichkeit, Exportproteine und Makromoleküle aus der Zelle zu transportieren.

Die Plasmamembran selbst ist eine dünne Struktur mit in der Regel etwa 8nm Dicke. Die meisten bei Zellen vorkommenden Membranen bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht, die aus stark hydrophoben Anteilen wie Fettsäuren und hydrophilen Anteilen wie Glycerin bestehen. Diese bilden in wässrigen Umgebungen eine Doppelschicht, die in dieser Umgebung die stabilste Konfiguration der Phospholipide darstellt [149]. Abbildung 2.10 zeigt schematisch den Aufbau einer Plasmamembran.

Bei vielzelligen Organismen sind die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Zellen stark ausgeprägt. Dabei ist der Zwischenraum zumindest bei tierischen Zellen durch die so genannte extrazelluläre

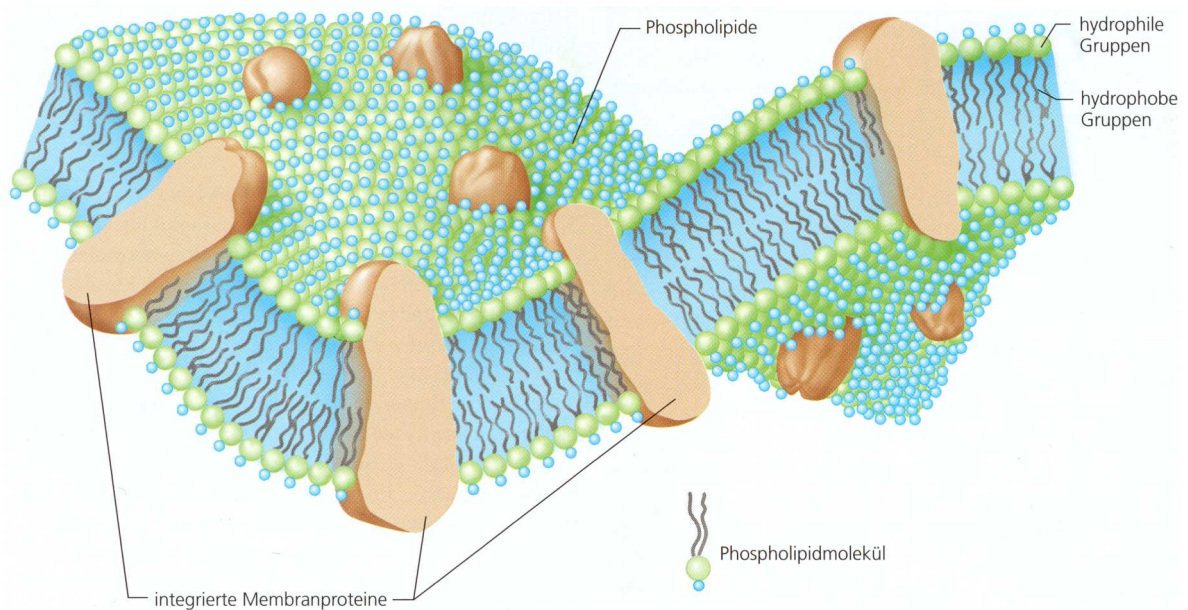


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Plasmamembran, aus [149]

Matrix ausgefüllt. Die Größe der Zwischenräume hängt stark von der Art des Gewebes ab. So sind z.B. Zellen der Hautepidermis sehr dicht gepackt und der Zwischenraum entsprechend extrem klein. Bei Bindegeweben andererseits sind die Zellen eher zerstreut und die extrazelluläre Matrix nimmt einen großen Raum ein. Die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Hyaluronsäure, Proteoglykane, Kollagene und verschiedenen Proteine und Glykoproteine, darunter auch eine Reihe von adhäsiver Proteine. Diese fungieren als Bindungssequenzen für Rezeptoren an Plasmamembranen. Komponenten der extrazellulären Matrix werden auch durch Adhäsionsmoleküle wie Integrine, Syndecan und ähnliche Verbindungen gebunden. Interzelluläre Wechselwirkungen werden durch Cadherine, N-CAM (neural cell adhesion molecule), sowie Selectine realisiert [148].

2.3.2 Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen

Im Gegensatz zu den Adhäsionsmolekülen, die eher dynamische Kontakte darstellen, sind die, durch Multiproteinkomplexe ausgebildeten speziellen Verbindungen zwischen tierischen Zellen erheblich stabiler. Diese Verbindungen, auch Junctions genannt, finden in begrenzten Bereichen der Plasmamembran statt und unterstreichen die Notwendigkeit, Zellen von diskreten Bereichen eines Organismus, wie z.B. Organe oder Epithel, nicht als Einzelzellen, sondern als integrierten Zellverband zu betrachten. Dabei werden grundsätzlich drei verschiedene Arten von Verbindungen unterschieden: Adhering Junctions, Tight Junctions und Gap Junctions.

Adhering Junctions sind für den mechanischen Zusammenhalt innerhalb eines Zellverbundes verantwortlich. Zu dieser Art von Zellverbindungen zählen die Zonula adhaerens, die den Zusammenhalt von Epi- und Endothelzellen durch Cadherine mechanisch stabilisieren. Weiter zählen Desmosomen und Hemidesmosomen zu dieser Art. Sie kommen als Verbindungen von Epithelzellen mit besonders großen mechanischen Beanspruchungen, wie z.B. bei Herzmuskelzellen zum Einsatz. Als letzter Vertreter der Adhering Junctions sind an dieser Stelle die fokalen Adhäsionen genannt. Diese eng begrenzten Verbindungen an die extrazelluläre Matrix werden beim Anwachsen bzw. der Wanderung von Zellen auf einem Substrat ausgebildet. Auch werden diese sehr dynamisch auf- und abgebaut. Diese Verbindungen sind für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung, da sie ein Anwachsen auf einer

festen Unterlage, wie z.B. die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Sensorchips ermöglichen [148].

Charakteristisch für Zell-Zell-Verbindungen zwischen Epithelzellen sind Tight Junctions. Sie umgeben jede Epithelzelle und erfüllen zwei wichtige Aufgaben. Einerseits verhindern sie die freie Diffusion von Substanzen zwischen den Epithelzellen hindurch. Andererseits trennen sie Bereich der Plasmamembranen der Zellen. Dies hat zur Folge, daß diese Membranbereiche mit unterschiedlichen Translokatoren ausgestattet werden können. Erreicht werden diese Tight Junctions durch eine Art Reißverschlußmechanismus durch integrale Membranproteine wie Occludin. Dadurch liegen die Membranen benachbarter Zellen sehr eng beieinander. Mechanisch verstärkt werden Tight Junctions oft durch die oben genannten Zonulae adhaerentes und sind dadurch auch bei Beschädigungen sehr stabil [148].

Elektrische Kopplung und interzelluläre Kommunikation durch das Cytoplasma ermöglichen Gap Junctions. Diese bilden in den Plasmamembranen hexagonal angeordnete Kanäle, die Connexonen. Die so direkt miteinander verbundenen Zellmembranen realisieren damit eine Art plasmatischer Brücke und spielen beim Zusammenwirken eines Zellverbundes eine große Rolle [148].

Viele der oben aufgeführten Arten der Zellverbindungen sind gesteuert durch geeignete Signalwege in der Zelle. Dies bedeutet, daß Änderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen unter anderem durch äußere Gegebenheiten, die Auswirkungen auf die entsprechenden Signalwege haben, beeinflußt werden. Dies macht die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion zu einem wichtigen Parameter bei der Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen auf die Funktion der Zellen. Insbesondere das Absterben von Zellen, das die Auflösung aller Adhäsion der Zellen bewirkt, läßt sich über diesen Parameter gut beobachten. Um den Parameter Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, besonders bei adhären wachsenden Zellen, technisch erfaßbar zu machen, eignen sich Impedanzmethoden (siehe Kapitel 3.6 und Kapitel 6). Diese lassen Zellen und Gewebe auf geeigneten Elektrodenstrukturen wachsen und untersuchen Änderungen in der resultierenden Impedanz der Elektroden-Zell-Verbindung. Abbildung 2.11 zeigt als Beispiel eine Rasterelektronenmikroskopaufnahme von adhären auf einem Sensorsubstrat wachsenden Colon-Carcinom-Zellen. Untersuchungen über Impedanzmessungen an biologischen Materialien wurden unter anderem von Giaever und Keese in [116] und Palmqvist et al. in [119] durchgeführt. Den in dieser Arbeit zugrunde gelegten Sensoren gehen die Arbeiten von Ehret et al. zu Impedanzmessungen zur Untersuchung der Zelladhäsion voraus, die in [121] und [122] veröffentlicht wurden.

An dieser Stelle sei der Vollständigkeit wegen erwähnt, daß mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Elektrodenstrukturen für Impedanzmessungen die Zellvermehrung ebenfalls erfaßt wird. Die der Zellvermehrung zugrunde liegenden Effekte der Zellteilung werden hier nicht näher betrachtet.

2.4 Elektrische Aktivität

2.4.1 Grundlagen

Eine hoch spezialisierte Form der Zellen sind sogenannte Nervenzellen oder Neuronen. Ihre Hauptaufgabe ist die Aufnahme und Verarbeitung von Signalen. Im Gegensatz zu allen übrigen Zellen, die auch in der Lage sind, Signale zu verarbeiten, realisieren Nervenzellen die Weiterleitung von Signalen mit Hilfe einer kurzfristigen Änderung des Membranpotentials. Die Signale werden somit elektrisch weitergeleitet und können über besondere Kontaktstellen, den so genannten Synapsen, auf andere Neuronen oder Zellen übertragen werden. Die Nervenzellen besitzen dafür einen definierten Signaleingang, die Dendriten, und einen Signalausgang, das Axon. Die Signale stammen in der Regel von anderen Nervenzellen oder von Sinneszellen, die Umweltsignale aufnehmen. Diese Umweltsignale können z.B. Lichtreize, chemische oder mechanische Reize sein [148].

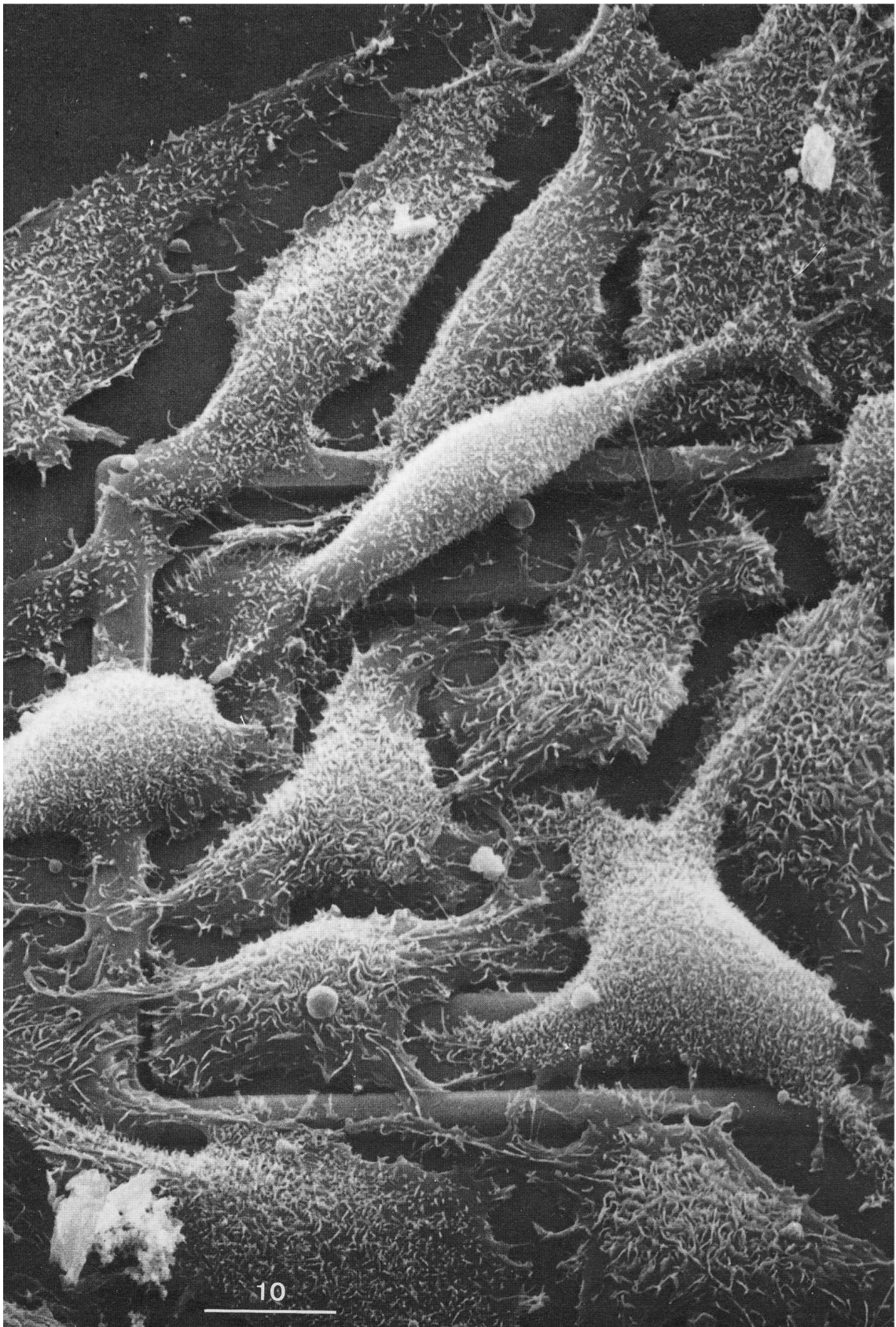


Abbildung 2.11: Adhärenz wachsende Colon-Carcinom-Zellen auf einem Sensorsubstrat (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme: B. Wolf)

Nervenzellen haben die Eigenschaft Netzwerke zu bilden, die je nach Entwicklungsstand des jeweiligen Organismus in der Komplexität sehr unterschiedlich ausfallen können. Bei niederen Tieren sind die Netzwerke sehr einfach ausgebildet. Bei höher entwickelten Organismen sammeln sich die Nervenzellen in einzelnen Zentren. Diese Zentren werden als Ganglien bezeichnet. Bei höchst entwickelten Organismen, wie z.B. dem Menschen, bilden sie das so genannte zentrale Nervensystem (ZNS). Beim Menschen umfaßt das ZNS das Gehirn und das Rückenmark. Es ist hier mit ca. 10^{12} Neuronen ausgestattet, wobei jedes Neuron mehr als 1000 synaptische Kontakte, in Teilen des Gehirns wie dem cerebralen Cortex sogar mehr als 5000 synaptische Kontakte zu anderen Neuronen besitzt. Dieses zelluläre Netzwerk hat weitreichende Bedeutung für alle neuronalen Funktionen im Organismus [148].

Die Morphologie der Nervenzellen ist sehr unterschiedlich ausgeprägt und vielfältig. Neben der Morphologie werden Nervenzellen im Allgemeinen anhand ihrer Lage im ZNS, dem Auftreten ihrer synaptischen Kontakte und nach ihren Neurotransmittern unterschieden. Eine typische Nervenzelle besitzt in der Regel vier definierte Bereiche: Den Zellkörper, die Dendriten, das Axon und die Synapsen. Der Zellkörper, auch Perikaryon oder Soma genannt, ist das biosynthetische Zentrum der Nervenzelle. Es enthält den Zellkern, das endoplasmatische Reticulum, die Ribosomen und weitere für Zellen typische Organellen. In ihm findet die Produktion von allen wichtigen Stoffen, u.a. der Neurotransmitter statt. An den Zellkörper angelagert sind die Dendriten. Diese sind röhrenförmige Zellfortsätze, die sich vom Zellkörper weg stark verzweigen. Sie haben die Aufgabe elektrische Signale anderer Zellen aufzufangen und an den Zellkörper weiterzuleiten. Das Axon ist ein meist einzelner Fortsatz von größerer Länge. Es hat die Aufgabe, Signale über große Entfernungen an andere Nervenzellen weiterzuleiten. Die Schnittstelle zwischen Zellkörper und Axon ist der so genannte Axonhügel, der für die Sicherstellung einer gerichteten Signalweiterleitung von großer Bedeutung ist. Das Ende des Axons kann zum Teil verzweigt sein. An diesen Endstellen sitzen die Synapsen, die die Kontaktstellen zwischen den Nervenzellen darstellen. Die Signalübertragung findet an dieser Stelle fast ausschließlich auf chemischen Wege, im so genannten synaptischen Spalt über Neurotransmitter statt [158]. Abbildung 2.12 zeigt den schematischen Aufbau einer Nervenzelle. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu, da das Axon je nach Organismus bis zu einem Meter lang werden kann.

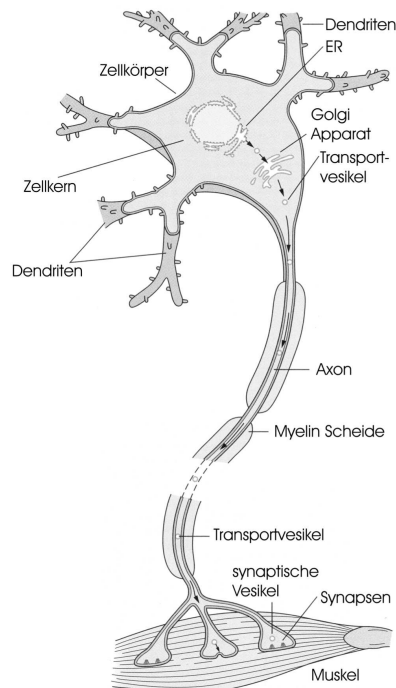


Abbildung 2.12: Schema einer Nervenzelle am Beispiel eines Motorneurons, nach [158]

2.4.2 Das Aktionspotential

Wie in Kapitel 2.4.1 bereits erwähnt basiert die Signalübermittlung bei Nervenzellen auf einer kurzfristigen Änderung des Membranpotentials. Im Folgenden soll die Entstehung dieses so genannten Aktionspotentials näher betrachtet werden.

In der Regel unterscheidet sich das elektrische Potential φ_i des Zellinneren vom Potential φ_a des Zelläußeren. Der Potentialunterschied

$$V_m = \varphi_i - \varphi_a \quad (2.23)$$

wird als Membranpotential oder Membranspannung bezeichnet. Um das Membranpotential genauer zu beschreiben wird die Nernst-Gleichung in allgemeiner Form herangezogen [1]:

$$V = \frac{RT}{nF} \ln \frac{c^a}{c^i} \quad (2.24)$$

| | | |
|-------|---|---|
| V | = | das Gleichgewichtspotential |
| c^a | = | äußere Ionenkonzentration |
| c^i | = | innere Ionenkonzentration |
| R | = | die Gaskonstante ($8,4 \frac{mJ}{molK}$) |
| T | = | absolute Temperatur |
| F | = | Faraday-Konstante ($9,6 \cdot 10^4 \frac{As}{mol}$) |
| z | = | die Valenz (Ladung) des Ions |

Ist in einer vereinfachten Annahme die Membran nur für K^+ -Ionen permeabel, gilt für das sich ausbildende Membranpotential im Gleichgewichtszustand:

$$V_m = \varphi_i - \varphi_a = \frac{RT}{F} \ln \frac{c_K^a}{c_K^i} \approx (59,2mV) \log \frac{c_K^a}{c_K^i} \equiv E_K \quad (2.25)$$

Die Membranspannung V_m wird in diesem Fall als Kalium-Gleichgewichtspotential E_K bezeichnet. In den meisten Fällen ist die Membran allerdings für K^+ -, Na^+ - und Cl^- -Ionen permeabel. Dabei unterscheiden sich die Konzentrationsverhältnisse $\frac{c^a}{c^i}$ der jeweiligen Ionen. In diesem Fall ist ein Gleichgewichtszustand an der Membran nicht mehr möglich. Um nun das Membranpotential V_m zu berechnen, muß die Goldman-Gleichung herangezogen werden:

$$V_m = \varphi_i - \varphi_a = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K c_K^a + P_{Na} c_{Na}^a + P_{Cl} c_{Cl}^a}{P_K c_K^i + P_{Na} c_{Na}^i + P_{Cl} c_{Cl}^i} \quad (2.26)$$

P_v = Permeabilitätskoeffizient

Diese Gleichung stellt im Prinzip eine verallgemeinerte Nernst-Gleichung dar, bei der die Konzentrationen mit dem Permeabilitätskoeffizienten P_v gewichtet sind. Ist im Grenzfall die Membran überwiegend K^+ -permeabel, geht Gleichung 2.26 in die Nernst-Gleichung 2.25 über.

Bei den Nervenzellen ist das Membranpotential hauptsächlich von den drei Ionen K^+ , Na^+ und Cl^- abhängig. Treten mehr Ionensorten auf, läßt sich das Membranpotential über eine allgemeine Form der Goldman-Gleichung für beliebig viele Ionensorten berechnen:

$$V_m = \varphi_i - \varphi_a = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_\nu c_\nu^a + P_\mu c_\mu^i}{P_\nu c_\nu^i + P_\mu c_\mu^a} \quad (2.27)$$

Index ν steht hierbei für Kationen, Index μ für Anionen [159].

Der Erregungsvorgang für Aktionspotentiale findet hauptsächlich an der Nervenmembran des Axons

ab. Genau untersucht wurde dies am Beispiel von Tintenfischaxonen, weswegen sich die folgenden Betrachtungen auf dieses Beispiel beziehen. Die Grundstruktur des Axonplasmas und der Axonmembran sind dabei anderen Zellplasma und Zellmembranen sehr ähnlich. Tabelle 2.2 zeigt die Ionenkonzentrationen beim Tintenfischaxon.

Tabelle 2.2 läßt ebenfalls erkennen, daß die Konzentrationsbedingungen, hohe K^+ -Konzentration und niedrige Na^+ -Konzentration im Zellinneren, niedrige K^+ -Konzentration und hohe Na^+ -Konzentration im extrazellulären Medium, ähnlich wie in den meisten tierischen Zellen ist. Diese Konzentrationsunterschiede werden durch ATP-getriebene Ionenpumpen, die in Kapitel 2.2.6 betrachtet wurden, verursacht.

Setzt man die Werte aus Tabelle 2.2 in Gleichung 2.27 ein erhält man:

$$V_m = \varphi_i - \varphi_a \approx -60mV \quad (2.28)$$

Dies entspricht dem Ruhepotential im unerregten Zustand des Axons. Dieses Potential ist hauptsächlich durch die K^+ -Konzentration bestimmt und nur gering von der Na^+ -Konzentration abhängig.

| | [Na ⁺] | [K ⁺] | [Cl ⁻] |
|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Axonplasma | 50 | 400 | 70 |
| extrazelluläres Medium | 460 | 10 | 540 |

Tabelle 2.2: Ionenkonzentrationen beim Tintenfischaxon in mM [159]

Wird nun die Nervenfasern an einem Ende elektrisch gereizt, z.B. durch das Anheben des Membranpotentials von seinem Ruhewert von $-60mV$ auf einen geringer negativen Wert, z.B. $-30mV$, bildet sich ein wenige Millisekunden andauerndes Aktionspotential, d.h. eine Veränderung der Membranspannung auf einen positiven Wert. Dieses Aktionspotential breitet sich entlang der Nervenfasern aus. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Dicke der Nervenfasern ab und kann Werte bis $50\frac{m}{s}$ annehmen [159]. Abbildung 2.13 zeigt verschiedene Beispiele von Aktionspotentialen.

Die Ausbreitung entlang der Nervenfasern ist in einer Depolarisation der Membran und der Ausbildung von lokalen Stromschleifen in der Membran begründet. Diese passive Art der Signalweiterleitung findet bei Dendriten und dem Zellkörper der Nervenzellen statt. Die Ausbreitung ebbt hier bereits nach wenigen Millimetern ab. In den Axonen, die Signale über große Entfernungen übertragen, gibt es einen speziellen Mechanismus, der während der Signalausbreitung ein konstant hohes Aktionspotential gewährleistet. Dieser Mechanismus kann elektrisch gut modelliert werden. Die Theorie zur Entstehung und Ausbreitung von Aktionspotentialen wurde 1952 erstmals von Hodgkin und Huxley aufgestellt und mathematisch beschrieben. Die Theorie bezieht die Na^+ - und K^+ -Kanäle in der Nervenmembran mit in die Betrachtung ein [160]. Eine tiefere Darstellung dieser Mechanismen soll an dieser Stelle nicht erfolgen.

Die elektrische Aktivität von Zellen kann stark von äußeren Umweltfaktoren und Substanzen beeinflusst werden. Im einem Netzwerk von Nervenzellen folgt diese elektrische Aktivität geregelten Mustern. Diese Aktivität kann durch geeignete Elektrodenstrukturen elektronisch erfaßt werden. Untersuchungen hierzu wurden unter anderem von Gross seit 1977 durchgeführt erstmals in [132]

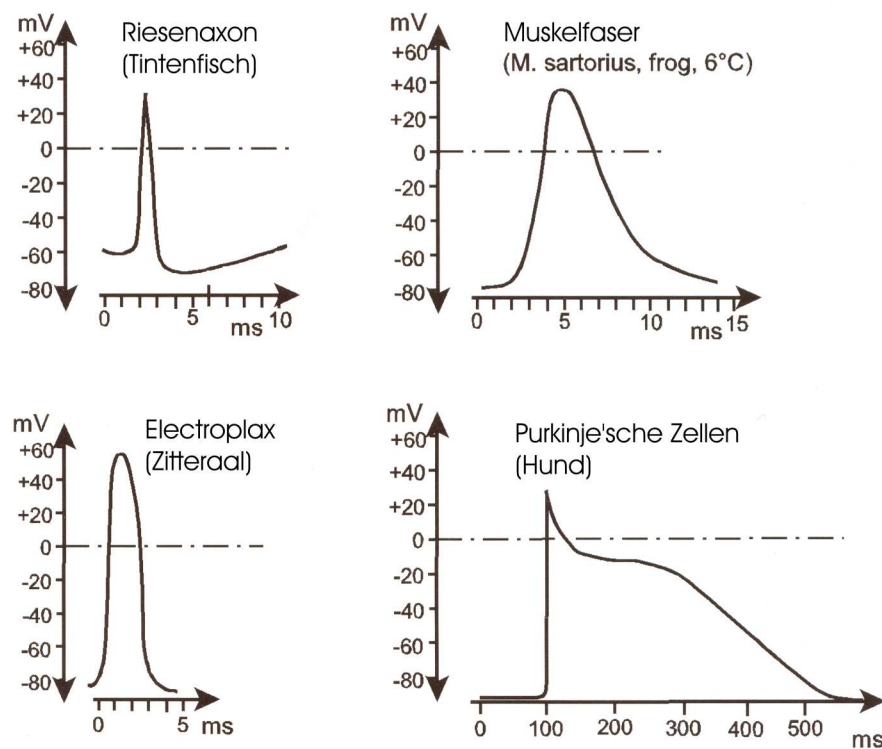


Abbildung 2.13: Beispiele für Aktionspotentiale und ihr zeitlicher Verlauf, aus [161]

veröffentlicht. Wird Nervenzellgewebe durch Neurotoxine beeinflusst, läßt sich das an der Änderung der elektrischen Aktivität erfassen. In Kapitel 3.7 werden geeignete Sensorstrukturen zur extrazellulären Aufnahme von Aktionspotentialen vorgestellt.

Kapitel 3

Grundlagen der Sensortechnologie

Im vorangegangenen Kapitel wurden einige Grundlagen der Zellbiologie behandelt. Diese Grundlagen erbrachten einen Einblick in die Entstehung wichtiger zellulärer Parameter, die mit den in dieser Arbeit entwickelten Sensorchips erfaßt werden können. Die Parameter umfassen den extrazellulären pH-Wert, die extrazelluläre Sauerstoffkonzentration, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, sowie die elektrische Aktivität von Zellen. In diesem Kapitel sollen nun die technologischen Grundlagen betrachtet werden, mit denen diese wichtigen Zellparameter technisch erfaßt werden können. Praktikable Sensormethoden sind dabei auf den in Kapitel 7 vorgestellten Sensorchips verwendet.

3.1 Elektrochemische Grundlagen

3.1.1 Elektrolytlösungen

Für In-Vitro-Untersuchungen von lebenden Zellen müssen diese in Zellkulturmedien kultiviert werden. Das heißt, daß sie in einer geeigneten flüssigen Umgebung wachsen und ihre Zellfunktionen aufrechterhalten können. Diese Zellkulturmedien bestehen aus isotonen Lösungen, denen geeignete Nährstoffe hinzugefügt werden. Diese Nährstoffe liefern den Zellen die für ihr Leben erforderlichen Substanzen. Neben organischen oder anorganischen Substanzen, die als Energiequelle für die Zellen dienen, enthalten Zellkulturmedien in der Regel auch eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Man unterscheidet bei Zellkulturmedien zwischen zwei Varianten. Einerseits werden Medien verwendet, deren chemische Zusammensetzung exakt bekannt ist. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Makronährstoffe in Zellkulturmedien. Andererseits gibt es Medien, deren chemische Zusammensetzung nicht definiert ist. Diese werden auch als komplexe Medien bezeichnet [149]. Relevant wird diese Unterscheidung im weiteren Verlauf, da viele Elemente in einem Medium Querempfindlichkeiten bei den, in dieser Arbeit verwendeten Sensoren verursachen. Ist die genaue Zusammensetzung des Zellkulturmediums nicht bekannt, wird es schwierig, Sensorreaktionen richtig zu deuten. Für den Einsatz der in dieser Arbeit verwendeten Sensoren werden daher fast ausschließlich Zellkulturmedien mit bekannter und über die Versuchsdauer weitgehend konstanter Zusammensetzung verwendet.

Da die zu untersuchenden Zellen und Gewebekulturen in flüssigen Zellkulturmedium leben, findet die komplette Sensorik in Flüssigkeit statt. Das heißt, alle relevanten Zellparameter, wie extrazellulärer pH-Wert, extrazelluläre Sauerstoffkonzentration, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, sowie die elektrische Aktivität von Zellen, werden von Sensoren erfaßt, die in Flüssigkeit betrieben werden. Dies stellt hohe Anforderungen an die Sensoren, deren Betrieb komplexe elektrochemische Betrachtungen erfordern.

Das Zellkulturmedium mit seinen Nährstoffen stellt chemisch eine so genannte Elektrolytlösung dar. Als Elektrolyt bezeichnet man chemische Verbindungen, die im flüssigen oder gelösten Zustand zu Ionen dissoziiert sind. Beispielsweise sei hier ein NaCl-Kristall genannt, daß in seinem dissoziierten,

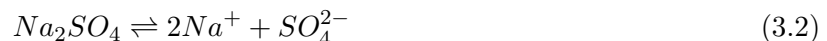
| Element | normale Form in der Umwelt | chemische Form in Zellkulturmedien |
|-----------------|---|---|
| Kohlenstoff (C) | CO ₂ , org. Verbindungen | Glucose, Malat, Acetat, Pyruvat, andere Verbindungen oder komplexe Mischungen |
| Wasserstoff (H) | H ₂ O, org. Verbindungen | H ₂ O, organische Verbindungen |
| Sauerstoff (O) | H ₂ O, O ₂ , org. Verbindungen | H ₂ O, O ₂ , organische Verbindungen |
| Stickstoff (N) | NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , organische Stickstoffverbindungen | <i>anorganisch</i> : NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ <i>organisch</i> : Aminosäuren, Stickstoffbasen von Nucleotiden, andere Stickstoffhaltige organische Verbindungen |
| Phosphor (P) | PO ₄ ³⁻ | KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ |
| Schwefel (S) | H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , org. Schwefelverbindungen | Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, Cystein o. organische Schwefelverbindungen |
| Kalium (K) | K ⁺ in Lösung oder als Kaliumsalze | KCL, KH ₂ PO ₄ |
| Magnesium (Mg) | Mg ²⁺ in Lösung oder als Magnesiumsalze | MgCl ₂ , MgSO ₄ |
| Natrium (Na) | Na ⁺ in Lösung, als NaCl oder als Natriumsalze | NaCl |
| Calcium (Ca) | Ca ²⁺ in Lösung, als CaSO ₄ oder Calciumsalze | CaCl ₂ |
| Eisen (Fe) | Fe ²⁺ oder Fe ³⁺ in Lösung, als FeS, Fe(OH) ₃ oder als Eisensalze | FeCl ₃ , FeSO ₄ , weitere gebundene Eisenlösungen |

Tabelle 3.1: Vorkommende Makronährstoffe in der Natur und in Zellkulturmedien [149]

im Wasser gelösten Zustand die zwei Ionen Na⁺ und Cl⁻ bildet:



Es können aber bei mehrwertigen Elektrolyten auch mehr als zwei Ionen, bzw. Ionen mit mehr als einer Elementarladung entstehen. Als Beispiel hierfür läßt sich die Dissoziation von Na₂SO₄ nennen [162]:



Allgemein gilt für die thermodynamische Beschreibung von Lösungsgleichgewichten bei einem Salz mit der Zusammensetzung A_rB_s das in Lösung teilweise dissoziiert ist:



Die Gleichgewichtskonstante oder auch Dissoziationskonstante von Gleichung 3.3 ist gegeben durch:

$$K = \frac{c_A^r \cdot c_B^s}{c_{A_rB_s}} \quad (3.4)$$

Dabei beschreiben c_A , c_B und $c_{A_rB_s}$ die gelösten Konzentrationen von A , B , und A_rB_s . Für den Fall, daß die Lösung von A_rB_s gesättigt ist, d.h. $c_{A_rB_s} = konst.$, erhält man durch Umformen der Gleichung 3.4:

$$c_A^r \cdot c_B^s = K \cdot c_{A_rB_s} = K_L \quad (3.5)$$

Dies ergibt das so genannte Löslichkeitsprodukt K_L eines Salzes A_rB_s . Vereinfacht ausgedrückt heißt dies, daß unabhängig von den Einzelkonzentrationen von A und B das Produkt von $c_A^r \cdot c_B^s$ den Wert K_L besitzt, solange A_rB_s gesättigt ist. K_L ist im Allgemeinen Temperaturabhängig [159].

Als Beispiel für das Löslichkeitsprodukt sei an dieser Stelle das, in Kapitel 3.3.3 noch relevante, Silber(I)chlorid $AgCl$ bei einer Temperatur von $25^\circ C$ genannt [159]:

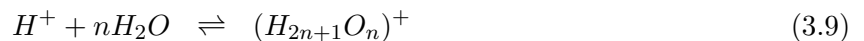
$$K_L = c_{Ag^+} \cdot c_{Cl^-} = 1,77 \cdot 10^{-10} \quad (3.6)$$

Das Ionengitter des Feststoffes wird im Allgemeinen beim Lösen von Elektrolyten zerstört. Dies geschieht dadurch, daß Lösungsmittelmoleküle, in der Regel Wassermoleküle, zwischen die Ionen treten und die chemischen Bindungen im Kristallgitter schwächen. Dazu müssen die Lösungsmittelmoleküle bestimmte Eigenschaften aufweisen. Sie müssen neben einer geeigneten Molekülgröße, ein großes elektrisches Dipolmoment μ und eine große relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r besitzen. Wasser besitzt alle drei, dieser Eigenschaften. Die hohe relative Dielektrizitätskonstante ($\epsilon_r = 80,5$ bei $20^\circ C$) verursacht eine starke Schwächung der Anziehungskräfte zwischen den Kristallgitterionen. Das große elektrische Dipolmoment ($\mu = 6,13 \cdot 10^{30} Cm$) läßt hydratisierte Ionen durch Ionen-Dipol-Wechselwirkungen entstehen [156]. Hydratisiert bedeutet dabei, daß die Ionen von polarisierten Wassermolekülen umgeben sind.

Neben den hydratisierten Ionen der Elektrolytlösung und eventuell vorhandener undissoziierter Elektrolytmolekülen befinden sich in der Elektrolytlösung auch Ionen des Lösungsmittels. Im Falle von Wasser führt dies zu folgender Dissoziation:



Allerdings existieren die entstehenden H^+ (Protonen) nicht im freien Zustand. Sie treten in der Regel mit den Wassermolekülen in Wechselwirkung und bilden verschiedene Hydratationsstufen:



H_3O^+ wird dabei als Oxonium-Ion, $(H_{2n+1}O_n)^+$ als Hydronium-Ion bezeichnet [156]. Der Vorgang der Dissoziation von Wasser wird auch als Autoprotolyse bezeichnet. Die Gleichgewichtskonstante K der Reaktion 3.7 ist definiert durch:

$$K = \frac{c_{H^+} \cdot c_{OH^-}}{c_{H_2O}} \quad (3.10)$$

Da die Konzentration c_{H_2O} in verdünnten wässrigen Lösungen weitgehend konstant ist kann das Produkt $K \cdot c_{H_2O}$ zur Konstante K_W zusammengefaßt werden:

$$c_{H^+} \cdot c_{OH^-} = K \cdot c_{H_2O} = K_W \quad (3.11)$$

Die Konstante K_W wird als Ionenprodukt des Wassers bezeichnet und beträgt bei $25^\circ C$ $1,0 \cdot 10^{-14} M^2$ [159].

Oben genannte Gesetze zur Dissoziation von Elektrolyten sind nur für den gesonderten Fall einer ideal verdünnten Lösung gültig. Ideal verdünnt bedeutet, daß die Ionen in Lösung ausschließlich von Lösungsmittelmolekülen umgeben sind und Wechselwirkungen mit anderen Ionen ausgeschlossen

sind. Diese Wechselwirkungen können z.B. elektromagnetische Anziehung bzw. Abstoßung zwischen den Ionen sein. Die Wechselwirkungen zwischen den Ionen bedingen zwei Gruppen von Elektrolyten. Schwache Elektrolyte haben nur in sehr stark verdünnten Lösungen einen hohen Dissoziationsgrad. Der Dissoziationsgrad α ist definiert durch

$$\alpha = \frac{\text{Stoffmenge des dissoziierten Teilchen}}{\text{Stoffmenge vor der Dissoziation}} \leq 1 \quad (3.12)$$

Schwache Elektrolyte erreichen den Wert $\alpha \approx 1$ erst in ideal verdünnten Lösungen. Bei hohen Konzentrationen geht α gegen 0. Starke Elektrolyte sind in der Regel unabhängig von ihrer Konzentration in Lösung praktisch vollständig dissoziiert. Ihr Dissoziationsgrad α beträgt konzentrationsunabhängig meist 1 [156].

Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen einzelnen Ionen ist in Lösungen starker Elektrolyte nicht die gesamte vorhandene Ionenkonzentration c_i vollständig wirksam. Um derartige Lösungen dennoch hinsichtlich ihrer chemischen Potentiale beurteilen zu können, ist die Aktivität a_i definiert:

$$a_i = f_{\pm,i} \frac{c_i}{c_0} \quad (3.13)$$

- c_i Konzentration der Komponente i
 c_0 Bezugskonzentration ($c_0 = 1 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$)
 $f_{\pm,i}$ mittlerer Aktivitätskoeffizient der Komponente i ,
normiert auf unendliche Verdünnung

Dabei lassen sich die individuellen Aktivitätskoeffizienten von verschiedenen Ionen in der Regel experimentell nicht getrennt bestimmen. An ihrer Stelle wird im Allgemeinen der mittlere Aktivitätskoeffizient f_{\pm} angegeben. Zwischen mittleren und den individuellen Aktivitätskoeffizienten besteht folgender Zusammenhang:

$$f_{\pm} = \sqrt[x+y]{f_+^x f_-^y} \quad (3.14)$$

Nimmt die Ionenkonzentration ab, d.h. die Lösung wird weiter verdünnt, vergrößert sich der mittlere Ionenabstand. Dadurch steigt die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle zwischen den Ionen und die Wechselwirkung zwischen ihnen nimmt ab. Dies wiederum führt zu einem Anstieg des mittleren Aktivitätskoeffizienten, der sich in ideal verdünnten Lösungen dem Wert $f_{\pm} = 1$ nähert [156].

Bei gleicher Konzentration nimmt mit Zunahme der Ladungszahlen der Ionen der mittlere Aktivitätskoeffizient ab. 1921 wurde von G. N. Lewis und M. Randall die Ionenstärke J zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen dem mittleren Aktivitätskoeffizienten und der wirksamen Gesamtladung aller in der Lösung vorkommenden Ionen definiert [156]:

$$J = \frac{1}{2} \sum c_K z_K^2 \quad (3.15)$$

Der Zusammenhang zwischen mittlerem Aktivitätskoeffizienten und der Ionenstärke wird durch die so genannte Debye/Hückel-Gleichung definiert:

$$\log f_{\pm} = -Az_+|z_-|\sqrt{J} \quad (3.16)$$

Diese Beziehung gilt für Ionenstärken von $J < 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$, dem so genannten Debye-Hückel-Gebiet. Die Konstante A hängt neben der Temperatur, von den chemischen Eigenschaften des Lösungsmittels ab. Bei 25°C beträgt $A = 0,5091$. Außerhalb des Debye-Hückel-Gebiets läßt sich näherungsweise die Gleichung 3.16 wie folgt erweitern [162]:

$$\log f_{\pm,i} \approx \frac{-Az_+|z_-|\sqrt{J}}{1 + \sqrt{J}} \quad (3.17)$$

3.1.2 Leitfähigkeit von Elektrolytlösungen

Ionenwanderung im elektrischen Feld

Im Gegensatz zu anderen elektrischen Leitern, wie z.B. Metallen, findet der Ladungstransport in der Elektrolytlösung mit Hilfe von dissoziierten Ionen statt. Diese Ionen können sich im elektrischen Feld frei bewegen [163]. Werden in die Elektrolytlösung zwei Elektroden aus geeignetem inertem Metall, z.B. Platin, eingebracht und eine Potentialdifferenz $V = \varphi_1 - \varphi_2$ angelegt, bildet sich in der Lösung zwischen diesen Elektroden ein elektrisches Feld der Stärke E , das entlang der Verbindungslinie der beiden Elektroden, hier in x-Richtung, gerichtet ist. Aufgrund des linearen Zusammenhangs des elektrischen Potentials von der Ortskoordinate x , ergibt sich

$$\varphi(x) = \varphi_1 + (\varphi_2 - \varphi_1)\left(\frac{x}{l}\right) \quad (3.18)$$

und somit

$$\frac{d\varphi}{dx} = \frac{\varphi_2 - \varphi_1}{l} \quad (3.19)$$

Der Betrag des elektrischen Feldes berechnet sich somit zu:

$$E = -\frac{d\varphi}{dx} = \frac{\varphi_1 - \varphi_2}{l} = \frac{V}{l} \quad (3.20)$$

Hierbei wird angenommen, daß φ_1 und φ_2 die elektrischen Potentiale der Elektroden 1 und 2 sind, sowie l der Abstand der Elektroden ist [159]. Abbildung 3.1 beschreibt schematisch den Aufbau der Betrachtungen, der auch als elektrochemische Zelle bezeichnet wird.

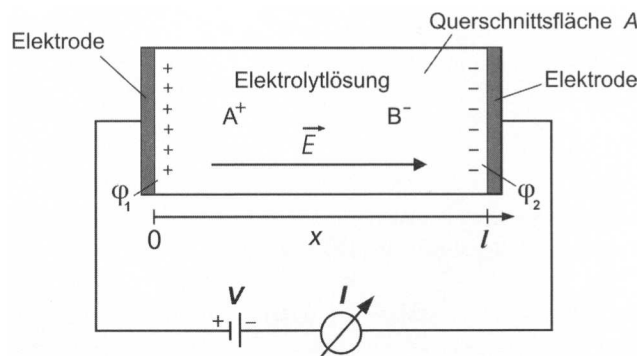
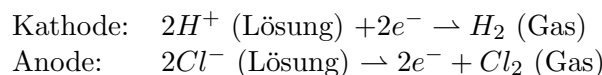


Abbildung 3.1: Anordnung zur Betrachtung der elektrolytischen Leitfähigkeit (elektrochemische Zelle), aus [159]

Die Elektroden werden dabei als Platten angenommen und Randeffekte des elektrischen Feldes vernachlässigt. Die Elektrode mit negativem elektrischen Potential wird als Kathode bezeichnet, die mit positivem elektrischen Potential als Anode. Im Inneren dieser metallenen Elektroden findet der Ladungstransport mit Hilfe von Elektronen statt. An der Grenzfläche von Elektrode und elektrolytischer Lösung findet daher ein Übergang von elektronischer zu ionischer Leitung statt. Dieser Übergang wird durch chemische Reaktionen realisiert. Diese Reaktionen werden auch als Elektrolyse bezeichnet. Am Beispiel einer Lösung von HCl in Wasser lassen sich diese Reaktionen wie folgt beschreiben:



Die Kathode ist somit ein Elektronendonator und die Anode ein Elektronenakzeptor. Diese Betrachtungen berücksichtigen nicht eine mögliche Polarisation an der Elektrodenoberfläche und ist daher

nur als vereinfachte Darstellung aufzufassen. Eine genauere Betrachtung der Elektroden/Elektrolyt-Schnittstelle findet in Kapitel 3.2 statt. Die an den Elektroden umgesetzte Stoffmenge ist proportional zur transportierten elektrischen Ladung Q . Den Zusammenhang von transportierter Ladung und abgesetzter Stoffmenge beschreibt das Faradaysche Gesetz, das besagt, daß für die Abscheidung von n mol einer Ionensorte der Wertigkeit z , die elektrische Ladung

$$Q = nzF \quad (3.21)$$

benötigt wird. $F = e_0 N_A = 96485 \frac{C}{mol}$ wird als Faraday-Konstante bezeichnet mit $N_A = 6,02214 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol}$ als Avogadro-Konstante [159]. Abbildung 3.2 zeigt die chemischen Reaktionen an einer inerten Metallelektrode.

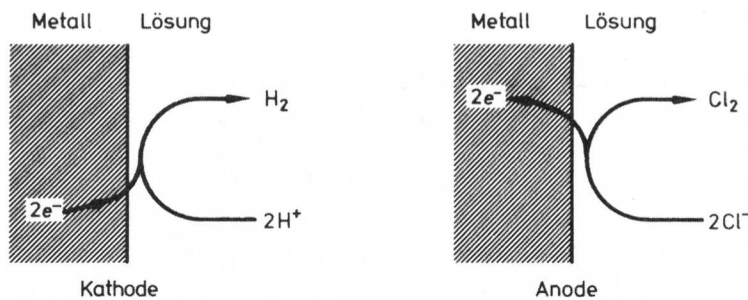


Abbildung 3.2: Chemische Reaktionen an einer inerten Metallelektrode, aus [159]

Werden nun die in der Elektrolytlösung lokalisierten Ionen dem oben betrachteten elektrischen Feld der Feldstärke E ausgesetzt, wirkt auf sie die Kraft

$$F_{Ion} = z_{\pm} e_0 E \quad (3.22)$$

und führt je nach Vorzeichen der Ladung zu einer Bewegung in Richtung oder in Gegenrichtung des elektrischen Feldes. e_0 steht dabei für die Elementarladung, deren Wert 1910 von R. A. Millikan experimentell zu $1,60210^{-19} As$ bestimmt wurde. Die positive oder negative Ladungszahl z_{\pm} gibt für jede Ionart an, wie viele Elementarladungen vorhanden sind und ist immer ein ganzzahliges Vielfaches der Elementarladung. Diese Bewegung der Ionen hin zu den Elektroden, auch Ionenwanderung oder Migration genannt, ist gleichzusetzen mit einem Transport von Ladung und bedeutet somit den Fluß von Strom durch die Elektrolytlösung. Die Ionen bewegen sich dabei mit der Wanderungsgeschwindigkeit v_{\pm} . Da die Ionen in der Lösung nicht geradlinig zu den Elektroden wandern, sondern ungeordnete Bewegungen in deren Richtung ausführen, ist die Wanderungsgeschwindigkeit erheblich kleiner als die Geschwindigkeit der Ionen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von elektrischer Feldstärke. Aus diesem Grund definiert man eine, von der elektrischen Feldstärke unabhängige Größe der Ionenbeweglichkeit u_{\pm} :

$$u_{\pm} = \frac{v_{\pm}}{E} \quad (3.23)$$

Dabei wird entweder zwischen der Ionenbeweglichkeit des Kations u_+ und der des Anions u_- unterschieden oder die mittlere Ionenbeweglichkeit u_{\pm} verwendet [156].

Zusammenhang zwischen Ionenwanderung und elektrischer Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit elektrolytischer Lösungen hängt von der Ionenbeweglichkeit ab. Um die Leitfähigkeit zu bestimmen wird angenommen, daß sich ein starker Elektrolyt der Konzentration c

vollständig in wässriger Lösung in jeweils einwertige Kationen und Anionen der Konzentrationen c_+ und c_- dissoziiert hat. In Anlehnung an Abbildung 3.1 befindet sich die Elektrolytlösung in einem elektrischen Feld der Stärke E mit dem Querschnitt A . In der Elektrolytlösung bewegen sich Ionen mit ihren Wanderungsgeschwindigkeiten v_+ und v_- in Richtung der Elektroden. In der Zeit t durchqueren dabei den senkrecht zur Bewegungsrichtung orientierten Querschnitt A insgesamt $N_A c_+ v_+ A t$ Kationen und $N_A c_- v_- A t$ Anionen. Bei einer angenommenen Ladungszahl von $z_{\pm} = 1$ transportiert jedes Ionen dabei die Elementarladung e_0 . Die Ladung, die in der Zeit t transportiert wurde beträgt dann für Kationen $Q_+(t) = N_A c_+ v_+ A t e_0$ und für Anionen $Q_-(t) = N_A c_- v_- A t e_0$. Die gesamte transportierte elektrische Ladung Q bestimmt sich unter der Beachtung der Neutralität $c_+ = c_- = c$ zu

$$Q = c N_A A t e_0 (v_+ + v_-) \quad (3.24)$$

mit der Definition des Stromes als Quotient von Ladung pro Zeit $I = \frac{Q}{t}$, ergibt dies eine gesamte Stromstärke von

$$I = c N_A A e_0 (v_+ + v_-) \quad (3.25)$$

Schreibt man Gleichung 3.25 mit der Faraday-Konstante $F = e_0 N_A$ ergibt sich

$$I = c A F (v_+ + v_-) \quad (3.26)$$

oder unter Verwendung der Ionenbeweglichkeiten u_+ und u_-

$$I = c E A F (u_+ + u_-) \quad (3.27)$$

Der elektrische Strom I ist somit proportional zur elektrischen Feldstärke E [156].

Anders als bei metallischen Leitern, bei denen mit der Größe "Widerstand" gerechnet wird, wird bei elektrolytischen Lösungen die Ionenleitung mit dem Leitwert beschrieben. Bei metallischen Leitern gilt für den elektrischen Widerstand R eines stromdurchflossenen Leiters nach dem Ohmschen Gesetz:

$$R = \frac{V}{I} = \varrho \frac{l}{A} \quad (3.28)$$

ϱ stellt dabei den spezifischen elektrischen Widerstand, auch Resistivität genannt dar. In elektrolytischen Lösungen wird anstelle des spezifischen elektrischen Widerstands die elektrische Leitfähigkeit oder Konduktivität σ verwendet. Sie ist der Kehrwert des spezifischen elektrischen Widerstands:

$$\sigma = \frac{1}{\varrho} \quad (3.29)$$

Setzt man Gleichung 3.28 ein erhält man

$$\sigma = \frac{l}{R A} \quad (3.30)$$

Mit der Definition des elektrischen Leitwerts G

$$G = \frac{l}{R} = \frac{I}{V} \quad (3.31)$$

erhält man somit:

$$\sigma = G \frac{l}{A} \quad (3.32)$$

Wird nun der aus Gleichung 3.27 gewonnene Zusammenhang zwischen elektrischem Strom I in der Elektrolytlösung und der elektrischen Feldstärke E herangezogen um die spezifische elektrische Leitfähigkeit σ der Elektrolytlösung auszudrücken, erhält man:

$$\sigma = c F (u_+ + u_-) \quad (3.33)$$

Damit ist die spezifische Leitfähigkeit von elektrolytischen Lösungen direkt proportional zur Konzentration c und zu den Ionenbeweglichkeiten u_+ und u_- . Um diese Gleichung für nicht vollständig dissoziierte Lösungen zu verallgemeinern, wird die Wertigkeit z und der Dissoziationsgrad α eingeführt [156]:

$$\sigma = zc\alpha F(u_+ + u_-) \quad (3.34)$$

Um eine, von der Konzentration c möglichst unabhängige Größe zu erhalten, wird die Äquivalentleitfähigkeit Λ eingeführt:

$$\Lambda = \frac{\sigma}{c} \quad (3.35)$$

Damit gilt im oben beschriebenen Fall eines 1:1-wertigen Elektrolyten ($\alpha \approx 1$) [159]:

$$\Lambda = F(u_+ + u_-) \quad (3.36)$$

Abhängigkeiten der elektrischen Leitfähigkeit

Die oben gemachten Annahmen sind nur eingeschränkt gültig. Sie bedingen große mittlere Abstände zwischen den Ionen und damit eine weitgehend unabhängige Wanderung der Ionen durch die Elektrolytlösung, z.B. bei sehr hoch verdünnten Lösungen. Bei konzentrierteren Lösungen führt die gegenseitige Beeinflussung der Ionen zu Abweichungen der oben aufgeführten Gleichungen und letztendlich zu geringeren spezifischen Leitfähigkeiten. Thermodynamische Betrachtungen führen dazu, daß die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Kations in der Nähe eines Anions größer ist, als es eine regelmäßige Verteilung erwarten läßt. Daraus resultierend, stören sich Kationen und Anionen gegenseitig bei ihrer Wanderung in der Elektrolytlösung. Dies führt zu einer Abhängigkeit der Äquivalentleitfähigkeit Λ von der Konzentration c :

$$\Lambda(c) = \Lambda_0 - a\sqrt{c} \quad (3.37)$$

Dabei stellt Λ_0 den Grenzwert von Λ bei unendlicher Verdünnung ($c \rightarrow 0$) und a die Aktivität dar [159].

Neben den Wechselwirkungen zwischen den Ionen spielt bei den Betrachtungen auch der Ionenradius eine Rolle. Die oben eingeführte Größe der Ionenbeweglichkeit ist von diesem abhängig. Betrachtet man den Zustand gleichförmiger Bewegung eines Ions durch die Elektrolytlösung, so läßt sich diese Gleichförmigkeit auf das sich Aufheben der elektrischen Kraft F_{Ion} auf das Ion und der Reibungskraft F_r des Ions aufgrund des Gesetzes von Stokes zurückführen. Unter Verwendung des Ionenradius r und der Bewegungsgeschwindigkeit v läßt sich die Reibungskraft F_r angeben als:

$$F_r = -6\pi\eta r v \quad (3.38)$$

η beschreibt dabei die Viskosität der Elektrolytlösung. Anwendung auf das Kation ergibt:

$$F_r^+ = -6\pi\eta r_+ v_+ \quad (3.39)$$

Im Falle der Wertigkeit z des Kations, beträgt die elektrische Kraft F_+ :

$$F_+ = z_+ e_0 E \quad (3.40)$$

Setzt man $F_r = -F_+$ ergibt sich nach Umformen der Beziehung $z_+ e_0 E = 6\pi\eta r_+ v_+ = 6\pi\eta r_+ u_+ E$:

$$u_+ = \frac{z_+ e_0}{6\pi\eta r_+} \quad (3.41)$$

Komplementär läßt sich für das Anion folgende Beziehung angeben:

$$u_- = -\frac{z_- e_0}{6\pi\eta r_-} \quad (3.42)$$

Eigentlich gilt das Stokes'sche Gesetz nur für makroskopische Kugeln. Da hier dieses Gesetz für mikroskopische Teilchen angewendet wurde, gelten die Gleichungen nur in Näherung [159].

In Elektrolytlösungen nimmt die Leitfähigkeit bei steigender Temperatur zu. Dieser Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit und Temperatur ist in der Regel zwischen $291K$ und $363K$ linear. Der Temperaturkoeffizient k für diesen Bereich läßt sich wie folgt angeben:

$$k = \frac{1}{\Lambda_{291K}} \left(\frac{\delta\Lambda}{\delta T} \right) \quad (3.43)$$

Für bestimmte Stoffgruppen ist der Temperaturkoeffizient k annähernd konstant [156]. Tabelle 3.2 zeigt Temperaturkoeffizienten für ausgewählte Lösungen.

| | |
|---------------|-------------------------------|
| starke Säuren | $k \approx 0,016 \frac{1}{K}$ |
| starke Basen | $k \approx 0,019 \frac{1}{K}$ |
| Salzlösungen | $k \approx 0,022 \frac{1}{K}$ |
| Wasser | $k \approx 0,058 \frac{1}{K}$ |

Tabelle 3.2: Temperaturkoeffizienten für ausgewählte Lösungen [156]

Die prozentuale Zunahme der Äquivalentleitfähigkeit erhält man durch Multiplikation des Temperaturkoeffizienten mit 100. Die Temperaturabhängigkeit ist für die vorliegende Arbeit von zentralen Interesse, da die, durch Temperaturschwankungen hervorgerufenen Änderungen des elektrischen Widerstandes der Elektrolytlösung die Messungen mit Elektroden beeinflussen können.

In der Regel besitzen Kationen und Anionen unterschiedliche Ionenbeweglichkeiten. Dies führt dazu, daß sie unterschiedliche Beiträge I_+ und I_- zum Gesamtstrom $I = I_+ + I_-$ liefern. Aus diesem Grund sind so genannte Überführungszahlen t_+ und t_- definiert:

$$t_+ = \frac{I_+}{I}: \text{ Überführungszahl des Kations}$$

$$t_- = \frac{I_-}{I}: \text{ Überführungszahl des Anions}$$

t_+ und t_- stellen also die relativen Anteile des Kations und des Anions am Gesamtstrom dar. Aus oben aufgeführten Gleichungen läßt sich folgende Relation ableiten:

$$t_+ + t_- = 1 \quad (3.44)$$

und

$$t_+ = \frac{u_+}{u_+ + u_-} \quad (3.45)$$

Damit lassen sich die Überführungszahlen mit Hilfe der Ionenbeweglichkeiten ausdrücken [159].

3.2 Elektrodentheorie

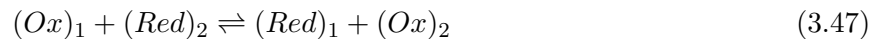
Außer den Temperatursensoren üben alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sensoren ihre Funktionsweise über Metall- oder Halbleiterelektroden in elektrolytischen Umgebungen aus. Im vorangegangenen Kapitel wurden die elektrochemischen Eigenschaften einer Elektrolytlösung betrachtet. Dort wurden zur Beschreibung der elektrolytischen Leitfähigkeit bereits vereinfachte Annahmen zu den Prozessen an Metallelektrodenoberflächen gemacht. Die tatsächlichen Vorgänge und Reaktionen, die sich an dieser Oberfläche abspielen sind weitaus komplexer und sollen an dieser Stelle näher dargestellt werden.

3.2.1 Grundlagen

Elektroden stellen die Verbindung zwischen der Elektrotechnik und der Chemie dar. Die Elektroden haben bei chemischen und biochemischen Sensoren die Aufgabe, Ladung zwischen dem Elektrolyten und metallischen Leitern auszutauschen. Dieser Austausch kann in die eine, wie auch in die andere Richtung erfolgen [164]. Die beiden Schnittstellenseiten werden als Phasen bezeichnet. Analog zu freien Protonen finden sich in flüssigen Phasen auch keine freien Elektronen. Der Ladungstransport findet dort über Ionen statt. An der Grenze zwischen flüssiger Phase der Elektrolytlösung und metallischer Phase des Leiters findet daher ein Ladungsübergang mit Hilfe von chemischen Reaktionen statt. Die Reaktionen werden als Redoxreaktionen bezeichnet [163]. Redoxreaktionen sind Reaktionen folgender Form:



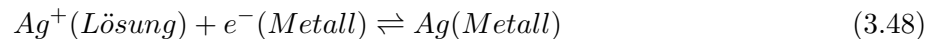
Dabei gehen, durch Aufnahme oder Abgabe von Elektronen, Ionen mit zwei oder mehr Wertigkeitsstufen ineinander über. Da aber Elektronen in freier Form nicht auftreten, finden derartige Reaktionen in gekoppelter Form statt:



Bei der Reaktion wirkt (Ox) als Elektronenakzeptor oder Oxidationsmittel und (Red) als Elektronendonator oder Reduktionsmittel. Oxidations- und Reduktionsmittel treten dabei immer als konjugierte Paare auf [159].

3.2.2 Vorgänge an Elektrodenoberflächen

Ein Sonderfall eines konjugierten Redoxpaares stellt eine Metallelektrode in Kontakt mit einer Elektrolytlösung dar. Als Beispiel soll hier der Kontakt von Silber Ag mit einer Ag^+ -Lösung dienen:



Die Ag^+ -Lösung stellt hierbei das Oxidationsmittel, das Ag das Reduktionsmittel dar. Abhängig von der Ag^+ -Konzentration können dabei an der Metall/Lösung-Grenzfläche zwei verschiedene Vorgänge stattfinden. Einerseits kann sich die Elektrode durch Anlagerung von Ag^+ an ihre Oberfläche positiv aufladen, andererseits kann sich das Ag zu Ag^+ auflösen und dabei durch Zurücklassen von Elektronen die Elektrode negativ aufladen. Beide Fälle führen zu einem Aufbau eines elektrischen Potentials zwischen Metall und Lösung:

$$\Delta\varphi = \varphi_M - \varphi_L \quad (3.49)$$

Dabei ist φ_M das elektrische Potential des Metalls und φ_L das elektrische Potential der Lösung. Durch den Aufbau dieses Potentials stoppt die weitere Auflösung des Metalls oder die weitere Abscheidung von Ionen [159].

Der Ladungsaustausch direkt an der Phasengrenze, der so genannten Durchtrittsreaktion, bewirkt einen elektrischen Stromfluß mit der Austauschstromstärke i_0 . Betrachtet man den Ladungsaustausch

direkt an der Phasengrenze genauer, ergibt sich wie oben bereits beschrieben, daß aus dem festen Metall Ionen in die Elektrolytlösung übergehen und dabei freiwerdende Elektronen im Metall direkt an der Elektrodenoberfläche zurückbleiben. Diese negative Ladung an der Phasengrenze führt zu einer Zurückhaltung der gerade entstandenen Ionen durch elektrostatische Anziehungskräfte. Nur ein geringer Teil der Ionen gelangt durch thermische Bewegung weiter ins Innere der Elektrolytlösung. Dies hat zur Folge, daß sich eine, für Phasengrenzen zwischen kristallinen Stoffen und Elektrolytlösungen typische, elektrische Doppelschicht bildet. Abbildung 3.3 zeigt die Entstehung und den Potentialverlauf der elektrischen Doppelschicht.

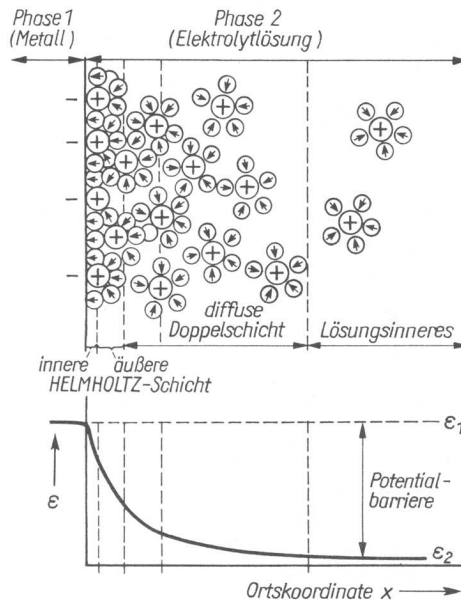


Abbildung 3.3: Entstehung der elektrischen Doppelschicht an Phasengrenzen und ihr Potentialverlauf, aus [156]

Innerhalb der sich ausbildenden elektrischen Doppelschicht kann zwischen verschiedenen Bereichen unterschieden werden. In direktem Kontakt zur metallischen Phase befinden sich adsorbierte Moleküle (polarisierte Lösungsmittelmoleküle und schwach solvatisierte Ionen). Diese bilden die so genannte innere Helmholtz-Schicht. Im direkten Anschluß folgt eine Schicht solvatisierter Ionen, die äußere Helmholtz-Schicht. Die beiden Schichten unterscheiden sich in der Weise, daß die innere Helmholtz-Schicht durch direkte chemische Wechselwirkungen an der Elektrodenoberfläche festgehalten wird, die äußere Helmholtz-Schicht nur durch zwischenmolekulare Wechselwirkungen an die Oberfläche gebunden wird. In diesen Schichten sind alle Teilchen zur festen Phase hin orientiert. An diese Schichten schließt ein Bereich an, in dem die meisten Moleküle frei beweglich sind, aber noch in höherer Konzentration auftreten als im Inneren der Elektrolytlösung. Dieser Bereich wird als diffuse Doppelschicht bezeichnet. Außerhalb der diffusen Doppelschicht ist der Bereich, in dem der Ladungseinfluß der Elektrode durch die drei angrenzenden Schichten ausgeglichen ist. Das Potential der Elektrode läßt sich durch das Ausbilden der elektrischen Doppelschicht unter zu Hilfenahme von Abbildung 3.4 erklären. Jede der beiden Phasen besitzt ihr eigenes Potential φ_M und φ_L . Für die metallische Phase entsteht beispielsweise am Punkt P_1 das Potential φ_{P_1} , wenn von einem unendlich entfernten Punkt P_∞ eine Ladung bis an die Phasengrenze herangeführt wird. Für die Heranführung einer Ladung muß die Arbeit W_1 aufgebracht werden. Diese Arbeit entspricht dem äußeren Elektrodenpotential φ_ψ , das auch als Volta-Potential bezeichnet wird. Danach muß von der Oberfläche in das Innere der metallischen Phase die Potentialbarriere überwunden werden. Dazu ist die Aufbringung der Arbeit W_2 erforderlich, die das elektrische Oberflächenpotential φ_χ darstellt. Das gesamte innere Elektrodenpotential φ_M ,

auch Galvani-Potential genannt, ist gleichzusetzen mit der gesamten aufzubringenden elektrischen Arbeit $W_{el} = W_1 + W_2$:

$$\varphi_M = \varphi_\psi + \varphi_\chi \tag{3.50}$$

In analoger Weise läßt sich für die flüssige Phase das innere Elektrodenpotential φ_L angeben. Die Potentialdifferenz

$$\Delta\varphi = \varphi_M - \varphi_L \tag{3.51}$$

stellt das Elektrodenpotential dar. Dieses Potential wird elektrotechnisch etwas ungenau auch als Einzelelektrodenspannung oder Galvani-Spannung bezeichnet [156].

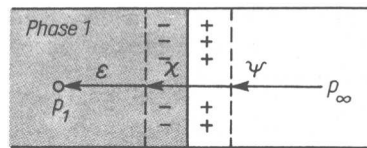


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung zweier Phasen zur Erklärung der Entstehung des Elektrodenpotentials, aus [156]

Um die Potentialdifferenz $\Delta\varphi$ zwischen Elektrode und Elektrolytlösung technisch zu bestimmen, müßte über ein Spannungsmessgerät Metall und Lösung kontaktiert werden. Während die Kontaktierung des Metalls keinerlei Hindernis darstellt, tritt bei der elektrischen Kontaktierung der Elektrolytlösung ein entscheidendes Problem auf, das für die Sensorik in Flüssigkeiten von weitreichender Bedeutung ist. Der Kontakt für die Lösung kann nur mit Hilfe einer zweiten Metallelektrode hergestellt werden, die aber wiederum eine Potentialdifferenz gegenüber der Lösung ausbilden wird. Das Spannungsmessgerät würde in diesem Fall die Differenz zweier Potentialdifferenzen anzeigen. Stellvertretend für dieses Problem ist in Abbildung 3.5 eine Anordnung dargestellt, die als elektrochemische Zelle oder auch Daniell-Zelle bezeichnet wird.

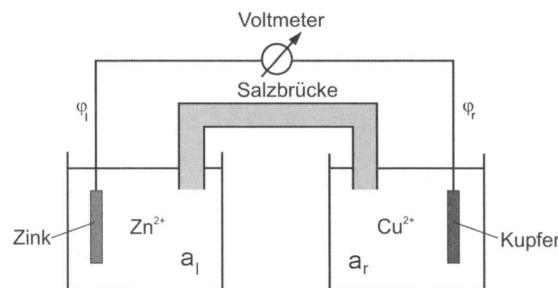


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung einer elektrochemischen Zelle zur Messung der Potentialdifferenz zwischen zwei Metallelektroden, aus [159]

Hier haben zwei unterschiedliche Metallelektroden Kontakt mit zwei Elektrolytlösungen. Die Lösungen können aus gleichen oder unterschiedlichen Elektrolyten zusammengesetzt sein. Verbunden sind die beiden Lösungen über eine so genannte Salzbrücke die häufig aus konzentrierter KCL-Lösung besteht und einen elektrischen Kontakt herstellt. Bei einer KCL-Lösung sind die auftretenden Diffusionspotentiale am Übergang Salzbrücke zu Lösung sehr gering. Für die sich ausbildende Differenz E der elektrischen Potentiale zwischen der linken und der rechten Elektrode gilt:

$$E = \varphi_M^r - \varphi_M^l \tag{3.52}$$

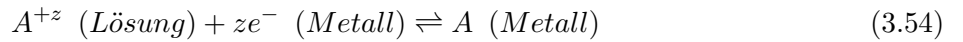
Unter Vernachlässigung möglicher Störpotentiale sind bei genügend hoher Leitfähigkeit die elektrischen Potentiale der Lösungen identisch, d.h. $\varphi_L^l = \varphi_L^r = \varphi_L$, und es folgt zusammen mit Gleichung 3.49:

$$E = \varphi_M^r - \varphi_M^l = (\varphi_M^r - \varphi_L) - (\varphi_M^l - \varphi_L) = \Delta\varphi_r - \Delta\varphi_l \quad (3.53)$$

Die so ausgebildete Spannung E wird aus historischen Gründen als elektromotorische Kraft (EMK) bezeichnet. Auch die einzelnen Potentialdifferenzen an den Elektroden, $\Delta\varphi_r$ und $\Delta\varphi_l$, werden im Allgemeinen EMK genannt. Die Hälfte dieser Anordnung, eine Elektrode taucht in eine Lösung, wird als so genannte Halbzelle definiert [159].

3.2.3 Die elektromotorische Kraft

Folgende Betrachtungen zur elektromotorischen Kraft beziehen sich auf die, im vorangegangenen Unterkapitel definierte Halbzelle mit dem Elektrodenmetall A , das unter Bildung von z -wertigen Kationen in Lösung geht:



Will man nun den Zusammenhang zwischen EMK und der Ionenkonzentration c herstellen, werden folgende beiden Definitionen aus der Elektrochemie benötigt:

- Die Definition des so genannten elektrochemisches Potential $\tilde{\mu}_i$ der Ionensorte i [159]:

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i F \varphi = \mu_i^0 + RT \ln a_i + z_i F \varphi \quad (3.55)$$

| | |
|-----------|---|
| μ_i | chemisches Potential der Ionensorte i |
| z_i | Wertigkeit der Ionensorte i |
| a_i | Aktivität der Ionensorte i |
| F | Faraday-Konstante |
| φ | elektrisches Potential der Phase |

- Die Änderung der freien Enthalpie pro Formelumsatz der Reaktion $n_A A + n_B B \rightleftharpoons n_P P + n_Q Q$ [159]:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{(c_P^{n_P}) \cdot (c_Q)^{n_Q}}{(c_A^{n_A}) \cdot (c_B)^{n_B}} \quad (3.56)$$

Daraus ergibt sich für Reaktion 3.54 eine Änderung der freien Enthalpie pro Formelumsatz:

$$\Delta G = \tilde{\mu}_A - (\tilde{\mu}_{A^{+z}} + z\tilde{\mu}_{e^-}) \quad (3.57)$$

Mit $\tilde{\mu}_{e^-} = \mu_{e^-} - F\varphi_M$ und aufgrund der Neutralität von A (f.h. $z_A = 0$ geltendes $\tilde{\mu}_A = \mu_A$) ergibt sich für ΔG :

$$\Delta G = \mu_A - (\mu_{A^{+z}}^0 + RT \ln a_{A^{+z}} + zF\varphi_L) - z(\mu_{e^-} - F\varphi_M) \quad (3.58)$$

Nimmt man nun den Gleichgewichtsfall an, d.h. $\Delta G = 0$ erhält man durch Umformen der Gleichung 3.58:

$$\Delta\varphi = \varphi_M - \varphi_L = \frac{\mu_{A^{+z}}^0 + z\mu_{e^-} - \mu_A}{zF} + \frac{RT}{zF} \ln a_{A^{+z}} \quad (3.59)$$

Durch Ersetzen des ersten, von der Aktivität $a_{A^{+z}}$ und damit von der Konzentration unabhängigen Terms der Gleichung, durch das Potential φ_0 erhält man:

$$\Delta\varphi = \varphi_M - \varphi_L = \varphi_0 + \frac{RT}{zF} \ln a_{A^{+z}} \quad (3.60)$$

$$\text{mit } \varphi_0 = \frac{\mu_{A^{+z}}^0 + z\mu_e - \mu_A}{zF}$$

Somit ist ersichtlich, daß $\Delta\varphi$ mit dem natürlichen Logarithmus der Ionenaktivität im Wasser ansteigt. Anschaulich betrachtet bedeutet dies einen Anstieg des elektrischen Potentials im Metall durch eine Erhöhung der Ionenkonzentration [159].

Will man die sich einstellende Spannung im Aufbau von Abbildung 3.5 in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration der Lösung in der rechten Halbzelle betrachten, müssen die Verhältnisse in der linken Halbzelle als konstant vorausgesetzt werden. Die linke Halbzelle wird dann zur Referenz für das gesamte System. Aus Gleichungen 3.53 und 3.60 ergibt sich somit:

$$E = (\varphi_r^0 + \frac{RT}{zF} \ln a_{A^{+z}}^r) - \Delta\varphi_l \quad (3.61)$$

Setzt man $E_0 = \varphi_r^0 - \Delta\varphi_l$, wobei $\Delta\varphi_l = \text{konst.}$ angenommen wird, läßt sich vereinfacht schreiben:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln a_{A^{+z}}^r \quad (3.62)$$

Wählt man als Referenzelektrode die so genannte Normal-Wasserstoffelektrode (siehe Kapitel 3.3), so wird E_0 als Standard-Elektrodenpotential E_H^0 des Systems A/A^{+z} bezeichnet [159].

Der Aufbau in Abbildung 3.6 wird als so genannte Konzentrationskette bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine elektrochemische Zelle bei der in beiden Halbzellen dasselbe Elektrodenmetall und die selbe Lösung des entsprechenden Kations verwendet wird. Einzig die Konzentrationen c_l , c_r und damit die Aktivitäten a_l , a_r der Lösungen unterscheiden sich. In diesem Fall vereinfacht sich die Berechnung der Spannung zu:

$$E = \varphi_r - \varphi_l = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{A^{+z}}^l}{a_{A^{+z}}^r} \quad (3.63)$$

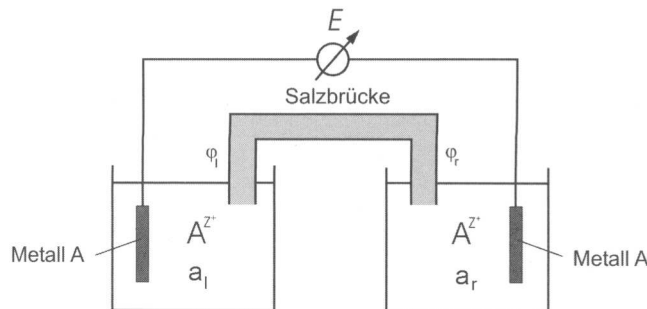


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung einer Konzentrationskette, aus [159]

3.2.4 Redoxpotential und Nernst-Gleichung

Bisher wurden Elektroden aus einfachen Metallen betrachtet. Werden für Messungen aber Elektroden aus Edelmetall, z.B. Platin, verwendet, laufen die bisher behandelten Reaktion auf andere Weise ab. Dies ist darin begründet, daß sich Edelmetallelektroden in Flüssigkeiten praktisch nicht lösen. Allerdings wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln betrachtet, daß Edelmetalle in der Lage sind, mit Ionen anderer chemischer Elemente Elektronen auszutauschen. Sie stellen vor allem Partner in Redoxreaktionen dar. Die freien Elektronen im metallischen Leiter dienen quasi als Vorrat, der Elektronen an Oxidationsmittel abgeben, bzw. Elektronen von Reduktionsmitteln aufnehmen kann. An

der Meßelektrode können sich dabei je nach Stärke des Oxidationsmittels oder Reduktionsmittels zwei verschiedene Reaktionen abspielen. Ist das Oxidationsmittel stark oxidierend, das Reduktionsmittel nur schwach reduzierend so spielt sich bei Stromfluß folgende Reaktion ab:



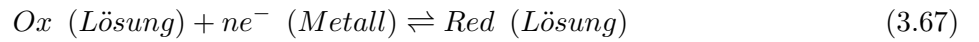
Ist im umgekehrten Fall *Red* ein starkes Reduktionsmittel und *Ox* nur ein schwaches Oxidationsmittel, läuft ein inverser Prozeß ab:



Im Fall von Redoxreaktionen an Edelmetallelektroden, wird die sich ausbildende Spannung E in der Regel als Redoxpotential bezeichnet. Im stationären Fall, d.h. ohne Stromfluß wird per Konvention das Vorzeichen folgendermaßen definiert:

$$E = \varphi_{Me} - \varphi_{Re} \quad (3.66)$$

φ_{Me} stellt dabei das Potential der Meßelektrode, φ_{Re} das Potential der Referenzelektrode dar. Zur Berechnung des Redoxpotentials betrachten wir allgemein folgende Reaktion in einer elektrochemischen Zelle:



Bei dieser Reaktion sollen n mol Elektronen beim Umsatz von 1 mol *Ox* in 1 mol *Red* ausgetauscht werden. Analog zu Gleichung 3.57 gilt:

$$\Delta G_{Me} = \tilde{\mu}_{Red} - (\tilde{\mu}_{Ox} + n\tilde{\mu}_{e^-}) \quad (3.68)$$

Einsetzen der Konzentrations- und Potentialabhängigkeit der elektrochemischen Potentiale ergibt unter Berücksichtigung von $z_{Ox}=z_{Red}+n$:

$$\Delta G_{Me} = (\mu_{Red}^0 + RT \ln a_{Red} + z_{Red}F\varphi_L) - (\mu_{Ox}^0 + RT \ln a_{Ox} + (z_{Red} - n)F\varphi_L) - n(\mu_{e^-} - F\varphi_M) \quad (3.69)$$

Im Gleichgewichtsfall ($\Delta G_{Me} = 0$) folgt für die Differenz $\Delta\varphi_{Me}$:

$$\Delta\varphi_{Me} = \varphi_M - \varphi_L = \frac{(\mu_{Ox}^0 + n\mu_{e^-} - \mu_{Red}^0)}{nF} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (3.70)$$

oder

$$\Delta\varphi_{Me} = \varphi_M - \varphi_L = \varphi_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (3.71)$$

$$\text{mit } \varphi_0 = \frac{(\mu_{Ox}^0 + n\mu_{e^-} - \mu_{Red}^0)}{nF}$$

Mit Gleichung 3.66 folgt unter Beachtung von $(\varphi_L)_{Me} = (\varphi_L)_{Re}$ direkt:

$$E = \varphi_{Me} - \varphi_{Re} = \Delta\varphi_{Me} - \Delta\varphi_{Re} = \varphi_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} - \Delta\varphi_{Re} \quad (3.72)$$

Setzt man $E_0 = \varphi_0 - \Delta\varphi_{Re}$ und beachtet man die Konstanz von $\Delta\varphi_{Re}$ kann man ebenso schreiben:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (3.73)$$

Diese Gleichung wird als Nernst-Gleichung für das Redoxpotential E bezeichnet und stellt eine der wichtigsten Beziehungen in der elektrochemischen Sensorik dar. Sie charakterisiert einen Gleichgewichtszustand und beschreibt die Abhängigkeit des Redoxpotentials von den Konzentrationen der

oxidierten und reduzierten Form des Redoxpaares. Anschaulich bedeutet sie, daß E umso stärker positiv ist, je größer die Aktivität a_{Ox} des Oxidationsmittels und je kleiner die Aktivität a_{Red} des dazu konjugierten Reduktionsmittels ist [159]. Bei einer Temperatur von $25^\circ C$ gilt:

$$\frac{RT}{nF} = 0,0257V \quad (3.74)$$

Verwendet man anstatt des natürlichen Logarithmus den Zehnerlogarithmus, erhält die Nernst-Gleichung bei $25^\circ C$ die Form [159]:

$$E = E_0 + \left(\frac{0,0592V}{n}\right) \log_{10} \frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \quad (3.75)$$

3.3 Referenzelektroden

3.3.1 Grundlagen

Wie in Kapitel 3.2 bereits betrachtet, ist es nicht möglich, Potentialdifferenzen zwischen Elektrode und Elektrolytlösung technisch zu bestimmen. Es macht daher keinen Sinn das Potential φ_L einer Elektrolytlösung als Bezugspotential für das abzuleitende Potential einer Meßelektrode zu verwenden. Aus diesem Grund wird für die meisten elektrochemischen Messungen eine so genannte Referenzelektrode verwendet, gegen deren Potential die sich ausbildende Potentialdifferenz gemessen wird. Das Elektrodenpotential φ_{Re} dieser Bezugslektrode wird dann gleich 0 gesetzt [162]. Bedingung für geeignete Referenzelektroden ist, daß ihr Elektrodenpotential möglichst unabhängig von der Konzentration der Elektrolytlösung ist.

3.3.2 Die Normal-Wasserstoff-Elektrode

Als Ursprung für die Skala der Potentiale für elektrochemische Zellen wurde die so genannte Normal-Wasserstoff-Elektrode (NHE) bestimmt. Ihr Aufbau ist relativ aufwendig. Sie besteht aus einer Platin-Elektrode in wässriger, saurer Lösung der Protonenaktivität $a_{H_3O^+} = 1$. Diese Pt-Elektrode wird mit Wasserstoff bei einem Druck von $p_{H_2} = 1013,25\text{mbar}$ umspült. Abbildung 3.7 zeigt den schematischen Aufbau der Normal-Wasserstoff-Elektrode. Das Potential der Normal-Wasserstoff-Elektrode wird über folgende Reaktion eingestellt:



Für das Potential der Normal-Wasserstoff-Elektrode E_{NHE} gilt:

$$E_{NHE} = E_{NHE,0} + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H_3O^+}}{\sqrt{p_{H_2}}} \quad (3.77)$$

Dabei gilt definitionsgemäß, daß das Standardpotential $E_{NHE,0}$ gleich null ist. Die Normal-Wasserstoff-Elektrode hat darüberhinaus gegenüber anderen Elektrodensystemen den Vorteil, daß sich ihr Elektrodenpotential schnell, reproduzierbar und zeitkonstant einstellt. Durch die Verwendung der Normal-Wasserstoff-Elektrode ist es möglich, die Standardpotentiale $E_{i,0}$ verschiedenster Elektrodensysteme bezüglich dem Standardpotential der Normal-Wasserstoff-Elektrode $E_{NHE,0}$ anzugeben. Die Aufstellung dieser Standardbezugspotentiale wird als Spannungsreihe bezeichnet [162]. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die Standardbezugspotentiale verschiedener Metallionen-, Gas- und Redoxelektroden.

3.3.3 Die Ag/AgCl-Elektrode

Die oben dargestellte Normal-Wasserstoff-Elektrode besitzt zwar sehr gute Eigenschaften als Referenzelektrode, jedoch ist ihr Aufbau und ihre Handhabung sehr aufwendig. Neben der Vorgabe einer

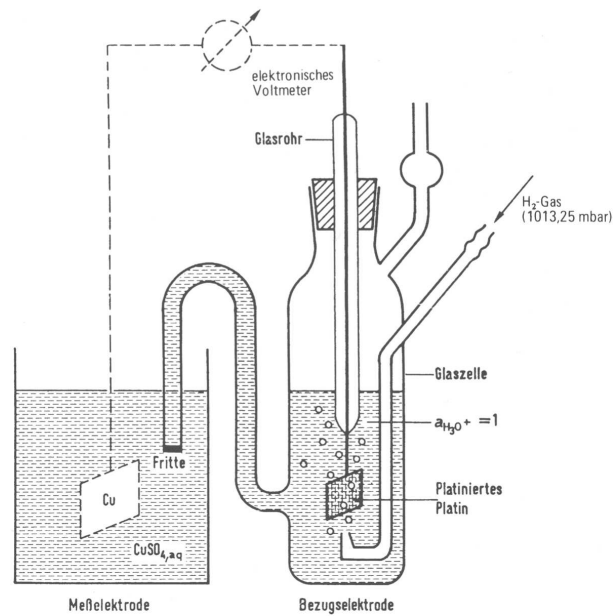


Abbildung 3.7: Schematischer Aufbau einer Normal-Wasserstoff-Elektrode. Die Ankopplung an eine Meßelektrode ist gestrichelt eingezeichnet, aus [162]

| Halbzelle | Elektrodenvorgang | Volt |
|---|---|---------|
| Li/Li ⁺ | Li ⁺ + e ⁻ ⇌ Li | -3,045 |
| Rb/Rb ⁺ | Rb ⁺ + e ⁻ ⇌ Rb | -2,925 |
| K/K ⁺ | K ⁺ + e ⁻ ⇌ K | -2,924 |
| Ca/Ca ²⁺ | Ca ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Ca | -2,76 |
| Na/Na ⁺ | Na ⁺ + e ⁻ ⇌ Na | -2,7109 |
| Mg/Mg ⁺ | Mg ⁺ + e ⁻ ⇌ Mg | -2,375 |
| Al/Al ³⁺ | Al ³⁺ + 3 e ⁻ ⇌ Al | -1,706 |
| Zn/Zn ²⁺ | Zn ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Zn | -0,7628 |
| Fe/Fe ²⁺ | Fe ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Fe | -0,409 |
| Cd/Cd ²⁺ | Cd ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Cd | -0,4026 |
| Ni/Ni ²⁺ | Ni ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Ni | -0,23 |
| Pb/Pb ²⁺ | Pb ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Pb | -0,1263 |
| Cu/Cu ²⁺ | Cu ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Cu | +0,3402 |
| Ag/Ag ⁺ | Ag ⁺ + e ⁻ ⇌ Ag | +0,7996 |
| 2 Hg/Hg ₂ ²⁺ | Hg ₂ ²⁺ + 2 e ⁻ ⇌ 2 Hg | +0,7961 |
| Au/Au ⁺ | Au ⁺ + e ⁻ ⇌ Au | +1,42 |
| Pt/H ₂ , H _{aq} ⁺ | 2 H ⁺ + 2 e ⁻ ⇌ H ₂ | 0 |
| Pt/H ₂ , OH ⁻ | 2 H ₂ O + 2 e ⁻ ⇌ H ₂ + 2 OH ⁻ | -0,8277 |
| Pt/Cl ₂ , Cl ⁻ | Cl ₂ + 2 e ⁻ ⇌ 2 Cl ⁻ | +1,36 |
| Pt/O ₂ , H ⁺ | $\frac{1}{2}$ O ₂ + 2 H ⁺ + 2 e ⁻ ⇌ H ₂ O | +1,229 |
| Pt/O ₂ , OH ⁻ | $\frac{1}{2}$ O ₂ + H ₂ O + 2 e ⁻ ⇌ 2 OH ⁻ | +0,401 |
| Pt/F ₂ , F ⁻ | F ₂ + 2 e ⁻ ⇌ 2 F ⁻ | +2,85 |
| Pt/Co(CN) ₆ ³⁻ , Co(CN) ₆ ⁴⁻ | Co(CN) ₆ ³⁻ + e ⁻ ⇌ Co(CN) ₆ ⁴⁻ | -0,83 |
| Pt/Cr ³⁺ , Cr ²⁺ | Cr ³⁺ + e ⁻ ⇌ Cr ²⁺ | -0,41 |
| Pt/Cu ²⁺ , Cu ⁺ | Cu ²⁺ + e ⁻ ⇌ Cu ⁺ | +0,167 |
| Pt/Fe(CN) ₆ ³⁻ , Fe(CN) ₆ ⁴⁻ | Fe(CN) ₆ ³⁻ + e ⁻ ⇌ Fe(CN) ₆ ⁴⁻ | +0,356 |
| Pt/Fe ³⁺ , Fe ²⁺ | Fe ³⁺ + e ⁻ ⇌ Fe ²⁺ | +0,771 |
| Pt/Au ³⁺ , Au ⁺ | Au ³⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Au ⁺ | +1,29 |
| Pt/Mn ³⁺ , Mn ²⁺ | Mn ³⁺ + e ⁻ ⇌ Mn ²⁺ | +1,51 |
| Pt/Pb ⁴⁺ , Pb ²⁺ | Pb ⁴⁺ + 2 e ⁻ ⇌ Pb ²⁺ | +1,69 |
| Pt/MnO ₄ ⁻ , Mn ²⁺ , H ⁺ | MnO ₄ ⁻ + 8 H ⁺ + 5 e ⁻ ⇌ Mn ²⁺ + 4 H ₂ O | +1,491 |
| Pt/Cr ₂ O ₇ ²⁻ , Cr ³⁺ , H ⁺ | Cr ₂ O ₇ ²⁻ + 14 H ⁺ + 6 e ⁻ ⇌ 2 Cr ³⁺ + 7 H ₂ O | +1,36 |
| Pt/ClO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , H ⁺ | ClO ₃ ⁻ + 6 H ⁺ + 6 e ⁻ ⇌ Cl ⁻ + 3 H ₂ O | +1,45 |

Tabelle 3.3: Standardbezugspotentiale verschiedener Metallionen-, Gas- und Redoxelektroden gegenüber der Normal-Wasserstoff-Elektrode [162]

genau definierten Protonenaktivität, muß gereinigtes, vor allem sauerstoffreies Wasserstoffgas bereitgestellt werden. Darüber hinaus adsorbiert die Platinelektrode relativ schnell Verunreinigungen aus der Lösung und wird somit quasi vergiftet. In der Regel werden daher meist einfacher handhabbare Referenzelektroden verwendet. Solche Elektroden stellen so genannte Elektroden zweiter Art dar. Der am häufigsten verwendete Vertreter ist dabei die Silber-Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl-Elektrode) [162]. Abbildung 3.8 zeigt den gebräuchlichsten Aufbau, der in dieser Form auch für die Messungen in Kapitel 5 verwendet wird. Sie besteht aus einem Silberdraht, der mit Silberchlorid (AgCl) überzogen ist. Dieser Ag/AgCl-Draht taucht in eine KCl-Lösung hoher Konzentration, die vollständig in K^+ und Cl^- dissoziiert ist. Die KCl-Lösung ist dann über eine Membran mit dem Elektrolyten der Meßzelle verbunden [159].

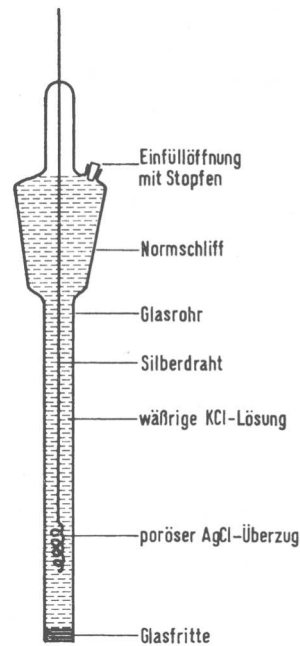


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau einer Silber-Silberchlorid-Elektrode, aus [162]

Das Verhalten der Silber-Silberchlorid-Elektrode ist folgenden Elektrodenreaktionen unterworfen:



Das Elektrodenpotential der Silber-Silberchlorid-Elektrode läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken [165]:

$$E_{Ag/AgCl} = E_{Ag/AgCl,0} + \frac{RT}{F} \ln a_{Ag^+} \quad (3.80)$$

Wären keine Cl^- -Ionen in der Lösung, wären die Konzentration c_{Ag^+} und somit das Elektrodenpotential großen Schwankungen unterworfen. Das Vorhandensein einer hohen Konzentration von Chloridionen und dem festen $AgCl$ bewirkt eine Stabilisierung der Silberionen-Konzentration. Einführen des Löslichkeitsprodukt K_L ergibt an dieser Stelle:

$$K_L = c_{Ag^+} \cdot c_{Cl^-}; \quad c_{Ag^+} = \frac{K_L}{c_{Cl^-}} \quad (3.81)$$

Einsetzen in Gleichung 3.80 ergibt:

$$E_{Ag/AgCl} = E_{Ag/AgCl,0} + \frac{RT}{F} \ln K_L - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-} \quad (3.82)$$

Daraus ergibt sich, daß das Elektrodenpotential von der Aktivität und damit von der Konzentration der Chloridionen abhängt. Die Elektrode verhält sich somit wie eine Chloridelektrode. Dies ist in der Verknüpfung der Ag^+ - und Cl^- -Konzentrationen über das feste $AgCl$ begründet. Das Standardpotential $E_{Ag/AgCl,0}$ der Silber-Silberchlorid-Elektrode gegenüber der Normal-Wasserstoff-Elektrode beträgt bei $25^\circ C$ $E_{Ag/AgCl,0} = 0,222V$ [159].

3.4 pH-Sensoren

3.4.1 Grundlagen

1923 definierte J. N. Brönsted eine Säure als Verbindung, die in der Lage ist, Protonen, also Wasserstoffionen, abzugeben. Komplementär hierzu ist eine Base eine Verbindung, die Protonen binden kann. Säure ist also ein Protonendonator, eine Base ein Protonenakzeptor. Säuren und Basen treten stets als korrespondierende Paare auf, auch konjugierte Paare genannt. Der Protonenübergang erfolgt in der Reaktion eines korrespondierenden Säure-Base-Paares, auch protolytisches System genannt, gemäß der Gleichung [159]:



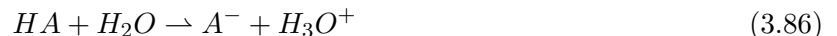
Auch wenn in der schriftlichen Darstellung der Reaktion die vereinfachte Darstellung mit H^+ üblich ist, tritt in der Natur bei oben angeführter Reaktion H^+ in freier Form nicht auf. Grund hierfür ist die Sonderstellung von H^+ unter den Ionen. H^+ ist ein Proton und damit ein Elementarteilchen. Vergleicht man beispielsweise den Radius eines H^+ -Ions mit dem eines Na^+ -Ions mit ca. $0,1nm$, so ist der Radius des H^+ aufgrund einer fehlenden Elektronenhülle ca. um den Faktor 10^5 kleiner [159]. Legt man das Coulombsche Gesetz der Elektrostatik zugrunde, ist die elektrische Feldstärke E einer Kugelladung definiert als [166]:

$$E = \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad (3.84)$$

Daraus ist ersichtlich, daß die Feldstärke umgekehrt proportional zum Quadrat des Abstandes ist. Dementsprechend herrscht auf der Oberfläche eines Protons eine, im Vergleich zum Na^+ -Ion, um den Faktor 10^{10} höhere Feldstärke. Dadurch hat das freie Proton die Tendenz, sich an die Elektronenhülle eines in der Nähe befindlichen Moleküls anzulagern. In wäßriger Lösung bietet sich hierbei das Wassermolekül an und das Proton liegt in der Form eines Hydronium-Ions H_3O^+ vor. Die Dissoziation einer allgemeinen Säure HA ist definiert durch:



Tatsächlich spielt sich diese Reaktion in wäßriger Umgebung so ab, daß das Molekül HA sein Proton direkt auf ein in der Nähe befindliches H_2O -Molekül abgibt:



Diese Art der Reaktion wird auch als protolytische Reaktion bezeichnet. Komplementär reagiert eine allgemeine Base B , indem das Proton vom Wassermolekül auf die Base übertragen wird:



Für das Säure-Base-Gleichgewicht ist der Unterschied zwischen der eigentlichen Reaktion in der Natur und der verwendeten vereinfachten Schreibweise nicht von Bedeutung [159].

Im Allgemeinen laufen protolytische Reaktionen nach folgendem Schema ab:



Protolyse im eigentlichen Sinn bedeutet die Zusammenfassung aller Reaktionen, bei denen sich Ausgangs- und Endprodukte in der Anzahl der elektrischen Ladungen unterscheiden [159].

Um Aussagen über den Gehalt an Säuren und Basen in Wasser zu treffen, genügt es aufgrund der in Kapitel 3.1.1 definierten Gleichung

$$c_{H^+} \cdot c_{OH^-} = K \cdot c_{H_2O} = K_W = 1,0 \cdot 10^{-14} M^2 \quad (3.89)$$

nur eine Konzentration, entweder c_{H^+} oder c_{OH^-} , zu betrachten [163]. Da in wässriger Lösung Wasserstoffionenkonzentrationen oft über viele Größenordnungen schwanken können, wird zur Betrachtung eine logarithmische Skala verwendet. Der so genannte pH-Wert einer Lösung ist definiert als der negative Zehnerlogarithmus der Wasserstoffionenaktivität a_{H^+} (siehe Kapitel 3.1.1):

$$pH = -\log a_{H^+} \quad \text{oder} \quad a_{H^+} = a_{H_3O^+} = 10^{-pH} \quad (3.90)$$

Der pH-Wert wurde 1909 von S. P. L. Sørensen eingeführt und durch G. N. Lewis definiert [156]. pH bedeutet ursprünglich pondus hydrogenii und heißt wörtlich übersetzt "Gewicht des Wasserstoffes". Aufgrund der schwierigen Definition von Einzelaktivitäten wird in der Praxis die Aktivität von H^+ der H^+ -Ionenkonzentration gleichgesetzt. Dies führt bei verdünnten Lösungen zu einer guten Näherung [159]:

$$pH \approx -\log c_{H^+} \quad (3.91)$$

Anzumerken ist, daß aufgrund der Betrachtungen in Kapitel 3.1.1 die Verwendung von H^+ mit der Verwendung von H_3O^+ gleichzusetzen ist. Eine Änderung des pH-Werts um $\Delta pH = 1$ stellt die Änderung der H^+ -Ionenaktivität um eine Zehnerpotenz dar. Laut Definition ist der pH-Wert von sauren Lösungen $pH < 7$ und in alkalischen Lösungen $pH > 7$.

Es ist komplementär zum pH-Wert auch ein pOH-Wert definiert. Logarithmiert man Gleichung 3.89 erhält man:

$$pK_W = pH + pOH \quad (3.92)$$

Dabei bedeuten $pOH = -\log a_{OH^-}$ und $pK_W = -\log K_W$. Legt man einen Wert von $pK_W = 14$ bei $25^\circ C$ zugrunde und beachtet die Temperaturabhängigkeit von K_W , läßt sich der pOH-Wert einfach berechnen [156].

In Kapitel 3.1.1 wurde bereits die Autoprotolyse von Wasser betrachtet und die Gleichgewichtskonstante K für die Dissoziation von Elektrolyten definiert. Diese Betrachtung kann für Säuren die mit Wasser als Lösungsmittel reagieren verallgemeinert werden:



Dabei stellt S/B ein konjugiertes Säure-Base-Paar dar. Berechnet man die Gleichgewichtskonstante dieser Reaktion, erhält man bei konstanter Temperatur:

$$K = \frac{a_{H_3O^+} a_B}{a_S a_{H_2O}} \quad (3.94)$$

Da in verdünnten Lösungen die Aktivität von Wasser $a_{H_2O} \approx 1$ gesetzt werden kann erhält man:

$$K = \frac{a_{H_3O^+} a_B}{a_S} = K_S \quad (3.95)$$

K_S wird als Säurekonstante der Säure S bezeichnet. Da die Säurekonstante je nach chemischer Struktur der Säure wie die Aktivität um mehrere Größenordnungen schwanken kann, wird auch hier im

Allgemeinen eine logarithmische Skala verwendet [156]. Der negative Zehnerlogarithmus der Säurekonstante wird als pK_S -Wert der entsprechenden Säure bezeichnet:

$$pK_S = -\log K_S \quad (3.96)$$

Mit Hilfe der so genannten Henderson-Hasselbach-Gleichung ist es möglich, bei bekannten pH-Wert einer Lösung, das Konzentrationsverhältnis eines Säure-Base-Paares zu berechnen [159]:

$$pH = pK_S + \log \frac{c_B}{c_S} \quad (3.97)$$

Sind die chemischen Verhältnisse so eingestellt, daß der pH -Wert gleich dem pK_S -Wert ist, so ergibt sich $\log \frac{c_B}{c_S} = 0$ oder $c_B = c_S$. Anschaulich betrachtet bedeutet dies, daß der pK_S -Wert derjenige pH -Wert ist, bei dem die Konzentrationen von Säure und konjugierter Base gleich groß sind [159].

Komplementär zu diesen Betrachtungen, läßt sich auch bei einem Protolysegleichgewicht einer Base mit Wasser eine Basenkonstante K_B definieren:



$$K_B = \frac{a_{OH^-} a_S}{a_B} \quad (3.99)$$

Zwischen Säure- und Basenkonstante besteht ein direkter Zusammenhang. Das Produkt aus Säure- und Basenkonstante im Protolysegleichgewicht ist das in Kapitel 3.1.1 definierte Ionenprodukt des Wassers bei gegebener Temperatur [156]:

$$K_S \cdot K_B = K_W \quad (3.100)$$

oder logarithmisch ausgedrückt:

$$pK_S + pK_B = K_W = 14 \quad (\text{bei } 25^\circ C) \quad (3.101)$$

Nach dieser grundlegenden Einführung zur Bedeutung des pH-Wertes sollen nun im folgenden Sensoranordnungen betrachtet werden, mit deren Hilfe der pH-Wert in Lösungen bestimmt werden kann.

3.4.2 Glaselektrode

Eine Möglichkeit zur Bestimmung des pH-Wertes bietet die so genannte Glaselektrode. Hierbei wird eine besondere Eigenschaft von Glas, in der Regel eine erstarrte $SiO_2-CaO-Na_2O$ -Schmelze, ausgenutzt. Kommt deren Oberfläche in Kontakt mit Wasser, so bildet sich eine dünne Oberflächenschicht, in der im SiO_2 -Netzwerk gebundene Kationen gegen H_3O^+ -Ionen ausgetauscht werden. Dieser Vorgang, auch Quellvorgang genannt, dauert etwa 24–48 Stunden. Die so entstandene, 5 bis 500nm dicke, Quellschicht wird als Haber-Haugaard-Schicht (HHS) bezeichnet. Abbildung 3.9 beschreibt schematisch diesen Vorgang. Bringt man die sich ausgebildete Haber-Haugaard-Schicht in Kontakt mit einer protonenhaltigen Lösung, ergeben sich unterschiedliche Aktivitäten $a_{H^+,HHS}$, $a_{H^+,L}$ und damit unterschiedliche chemische Potentiale $\mu_{H^+,HHS}$, $\mu_{H^+,L}$ in der Haber-Haugaard-Schicht und der Lösung. Dies hat zur Folge, daß zwischen Quellschicht und Lösung solange Wasserstoff-Ionen ausgetauscht werden, bis das chemische Gleichgewicht erfüllt ist. Es gilt daher:

$$\tilde{\mu}_{H^+,HHS} = \tilde{\mu}_{H^+,L} = \mu_{H^+}^0 + RT \ln a_{H^+,HHS} + F\varphi_{HHS} = \mu_{H^+}^0 + RT \ln a_{H^+,L} + F\varphi_L \quad (3.102)$$

Damit folgt für die Potentialdifferenz $\Delta\varphi_0$ zwischen Quellschicht und Lösung:

$$\Delta\varphi_0 = \varphi_L - \varphi_{HHS} = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H^+,HHS}}{a_{H^+,L}} \quad (3.103)$$

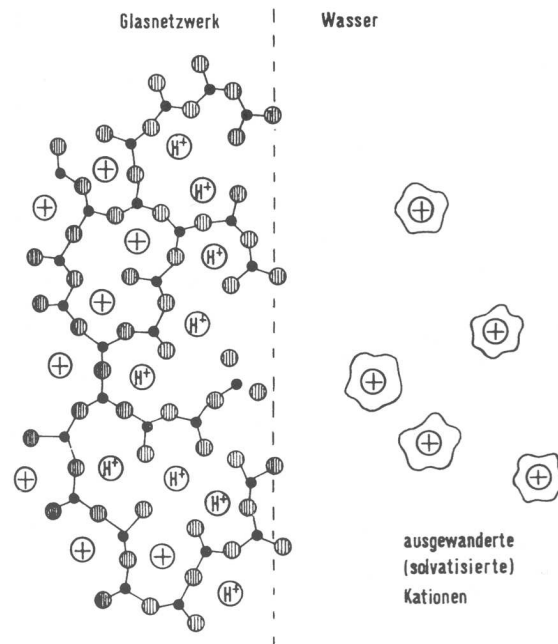


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Austausches von Kationen durch Wasserstoff-Ionen an einer Glasoberfläche, aus [162]

Verändert sich bei $25^\circ C$ die Protonenaktivität der Lösung um eine Dekade, d.h. der pH-Wert ändert sich um eine Stufe, erhält man eine Änderung von $\Delta\varphi_0$ von $59,1mV$. Dieser Effekt kann dazu verwendet werden, um einen unbekanntem pH-Wert zu bestimmen. Dazu wird eine dünne Glasmembran mit einer Dicke von in der Regel $0,5mm$ als Trennung zwischen einer Lösung I mit bekanntem pH-Wert und einer Lösung II mit unbekanntem pH-Wert verwendet. Die Glasmembran ist an beiden Seiten obig beschriebenen Quellvorgang unterworfen. In diesem Fall besteht nach Gleichung 3.103 zwischen den Lösungen folgende Potentialdifferenz:

$$\Delta\varphi_0(I - II) = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H^+}(HHS I)}{a_{H^+}(I)} - \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H^+}(HHS II)}{a_{H^+}(II)} \quad (3.104)$$

Wird $-\lg a_{H^+}(I) = pH$ und $-\lg a_{H^+}(II) = pH_x$ gesetzt, kann man schreiben:

$$\Delta\varphi_0(I - II) = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H^+}(HHS I)}{a_{H^+}(HHS II)} + 0,0591(pH - pH_x) \quad (3.105)$$

In Abbildung 3.10 ist schematisch die Wirkungsweise der Glaselektrode dargestellt. Werden nun an beiden Seiten geeignete Ableitelektroden, z.B. Ag/AgCl-Elektroden, an die Lösungen gekoppelt, gilt für das sich einstellende Meßpotential φ_0^M :

$$\varphi_0^M = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H^+}(HHS I)}{a_{H^+}(HHS II)} + \Delta\varphi_{diff} + 0,0591(pH - pH_x) \quad (3.106)$$

wobei $\Delta\varphi_{diff} = \Delta\varphi_{diff}(I) + \Delta\varphi_{diff}(II)$ gilt. Dies kann vereinfacht geschrieben werden als:

$$\varphi_0^M = \Delta\varphi_{As} + \Delta\varphi_{diff} + 0,0591(pH - pH_x) \quad (3.107)$$

$$\text{mit } \Delta\varphi_{As} = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H^+}(HHS I)}{a_{H^+}(HHS II)}$$

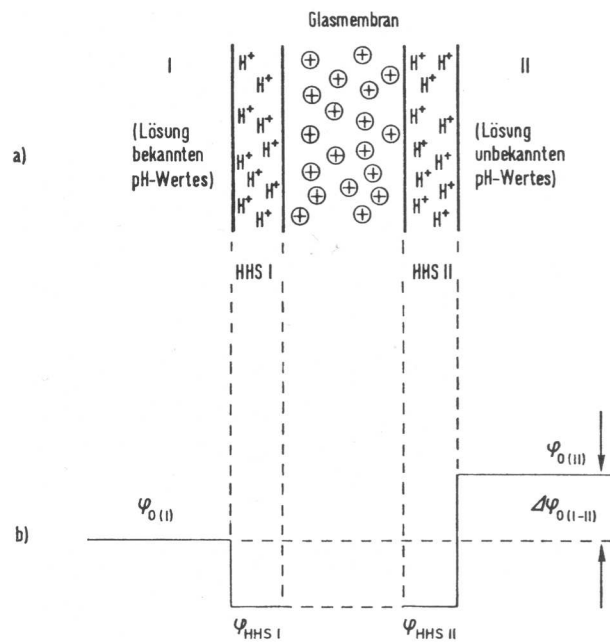


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Glaselektrode: a. Anordnung der Glasmembran; b. Potentialverlauf durch die Membran, aus [162]

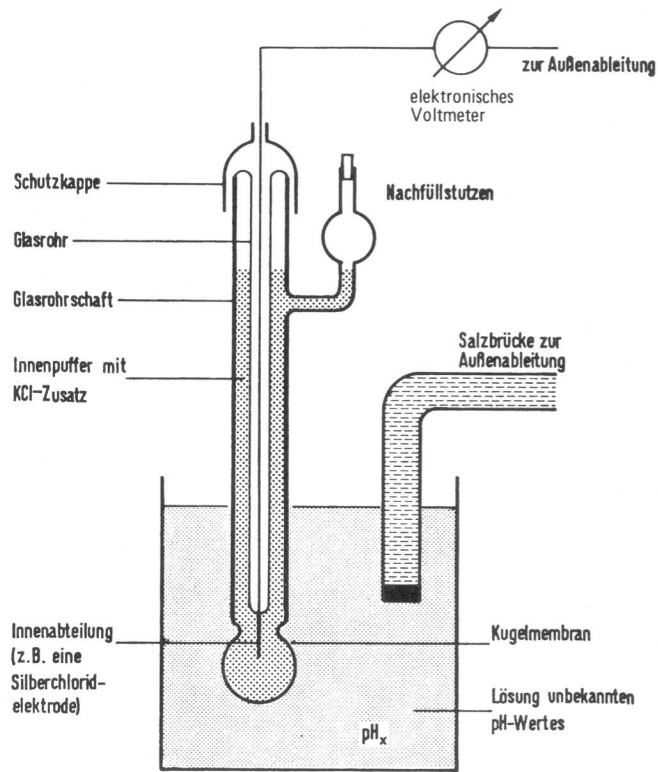


Abbildung 3.11: Meßaufbau zur pH-Messung mit der Glaselektrode, aus [162]

$\Delta\varphi_{As}$ wird als Asymmetriepotential bezeichnet. Dies ist die Potentialdifferenz, die sich einstellt, wenn $pH = pH_x$ gewählt wird. Sie hat ihren Ursprung in unterschiedlichen Aktivitäten in den beiden Haber-Haugaard-Schichten. Zur praktischen Durchführung einer Messung wird in der Regel eine Glaselektrode mit einer Kugelmembran am unteren Ende eines Glasrohres verwendet. Dieses Glasrohr ist mit einer Pufferlösung mit bekanntem pH-Wert, meistens KCL-Lösung mit pH 7,0, gefüllt. Als Ableitungselektroden verwendet man im Allgemeinen Ag/AgCl-Elektroden. Diese Glaselektrode ist im gesamten pH-Bereich verwendbar. Abbildung 3.11 zeigt den schematischen Meßaufbau. Zu beachten ist die Temperaturabhängigkeit des Meßpotentials. In handelsüblichen Geräten wird der Temperaturgang automatisch mit Hilfe eines Temperaturfühlers kompensiert.

3.4.3 Ion Sensitive Field-Effect Transistor, ISFET

Obwohl die Glaselektrode unter den pH-Sensoren wohl die beste Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Zeitkonstanz bietet, hat sie jedoch einen erheblichen Nachteil. Ihre Ausführung ist an aufwendigen und großen Glasmembranen gebunden. Diese Art von pH-Sensor läßt sich nicht miniaturisieren oder als planaren Sensor ausführen, wie er für den Einsatz auf Mikrosensorchips für Untersuchungen an lebenden Zellen benötigt wird. Ein Sensortyp, der diese Nachteile nicht aufweist, ist der so genannte "ion sensitive field effect transistor" (ISFET). Dieser basiert auf einem, in Silizium-Halbleitertechnik hergestellten, Feldeffekttransistor, der statt einer Gate-Metallisierung eine mit dem Elektrolyten in Kontakt stehende pH-sensitive Schicht über dem leitenden Kanal besitzt. Das Funktionsprinzip wurde 1970 erstmals von Bergveld beschrieben und in [78–80] veröffentlicht. Zusammen mit dem "gas sensitive field effect transistor" (GASFET) bildet dieses Feldeffektbauelement die Gruppe der "chemically sensitive field effect transistor" (CHEMFET) für die Detektion von Ionen und Gasmolekülen [167].

Die Funktionsweise ist prinzipiell die eines herkömmlichen Feldeffekttransistors in MOS(Metal Oxide Semiconductor)-Technik. Abbildung 3.12 zeigt den schematischen Aufbau eines n-Kanal MOSFET im Schnitt. Die Anordnung von Gate (G) und dem Kanal zwischen Source (S) und Drain (D) entspricht in etwa der eines Kondensators. Zwischen Gate und dem Kanal befindet sich eine isolierende Schicht, die in der Regel aus Siliziumdioxid (SiO_2) besteht. Wird nun an diesen kondensatorähnlichen Aufbau eine Spannung angelegt, so bilden sich an beiden Grenzschichten zum Isolator Ladungen. Die Ladungsmenge ist dabei proportional zur angelegten Spannung. Die Leitfähigkeit des aus dotiertem Silizium bestehenden Kanals hängt maßgeblich von der Ladungsträgerdichte ab [168]. Dadurch wird der Widerstand der Schicht aus dotiertem Halbleitermaterial zwischen Source und Drain durch die sich bildenden Ladungsträger und damit durch die angelegte Spannung zwischen Gate und dem Kanal gesteuert. Ist die Spannungsdifferenz zwischen der Source-Elektrode und dem angrenzenden Halbleiterkanal nur gering, kann die Spannungsdifferenz zwischen Gate und dem Kanal gleich der Spannungsdifferenz zwischen Gate und Source angenommen werden, der so genannten Gate-Source-Spannung V_{GS} . Durch die Gate-Source-Spannung sind zwei prinzipielle Betriebsarten möglich.

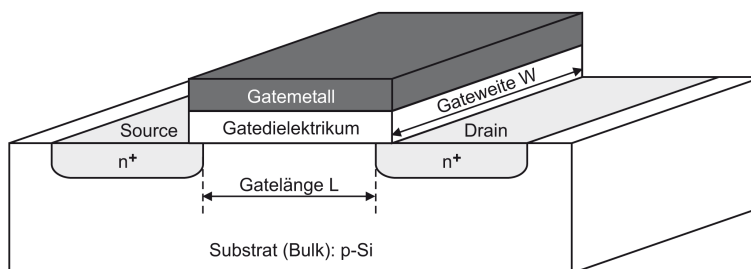


Abbildung 3.12: Schematischer Aufbau eines n-Kanal MOSFET, aus [169]

Durch das Anlegen einer negativen Gate-Source-Spannung bei einem n-Kanal-MOSFET kann die Ladungsträgerdichte verringert werden. Voraussetzung dabei ist ein genügend dünner Kanal. Es wird hierbei von Verarmungsbetrieb gesprochen. Source und Drain sind dabei stark n-dotiert. Dies hat zur Folge, daß Ladungsträger nahezu ungehindert in den n-Kanal übertreten können. Ist $V_{GS} = 0$, kann ein Transistorstrom I zwischen Source und Drain fließen, der Transistor wird somit als selbstleitend bezeichnet. Wird nun eine Spannung $V_{GS} < 0$ angelegt, bildet sich unter dem Gate eine Raumladungszone (RL), die eine Verschmälerung des leitenden Kanals zwischen Source und Drain und damit einen Anstieg des Widerstandes bzw. eine Verringerung des Source-Drain-Stromes I_{DS} bewirkt. Erhöht man die Drain-Source-Spannung V_{DS} , so nimmt I_{DS} zu. Diese Zunahme ist allerdings nicht proportional zu V_{DS} , da mit zunehmendem Abstand von Source die Spannungsdifferenz zwischen Gate und Kanal zunimmt und es dadurch zu einer Einschnürung des leitenden Kanals kommt. Ab einem bestimmten V_{GS} berührt die Raumladungszone die p-Zone unter dem Kanal und es kommt zu einer Stromsättigung. In der Regel wird zur Verstärkung dieses Effekts bei dieser Transistorart das Gate nicht symmetrisch zwischen Source und Drain angeordnet, sondern in Richtung Source verschoben [170].

Bei einem Aufbau, bei der das Gate symmetrisch zwischen Source und Drain angeordnet ist, ist bei der Anlage einer positiven Gate-Source-Spannung (n-Kanal-MOSFET) auch ein so genannter Anreicherungsbetrieb möglich. Bei diesem Aufbau ist der Kanal zwischen Source und Drain nicht dotiert, d.h. bei einem n-Kanal-MOSFET reicht die p-Zone des Substrats bis an den Isolator heran. Wird nun eine Spannung $V_{GS} > 0$ angelegt sammeln sich Elektronen aus dem Leitungsband an der Grenzschicht zwischen Isolator und Halbleiter. Dies hat zur Folge, daß die Trägerdichte im Kanal weitgehend unabhängig von der Dotierung wird. Ist die Gate-Spannung groß genug, entsteht trotz negativer Ladung der ionisierten Akzeptoren an der Grenzschicht ein leitender n-Kanal. Diese leitende Schicht wird als Inversionsschicht bezeichnet. Die Gatespannung, die notwendig ist, um aus der Inversionsschicht einen leitfähigen Kanal zwischen Source und Drain zu bilden wird als Schwellenspannung V_T bezeichnet [170].

Unter der Annahme, daß die materialabhängigen Größen wie Kanallänge L , Kanalweite W und die Schwellenspannung V_T , sowie die Temperatur T konstant sind und daß die Bulk-Spannung V_B gleich V_S ist, wird das elektrische Verhalten des MOSFET nur durch V_{GS} und V_{DS} bestimmt. Im leitenden Bereich des MOSFET, d.h. bei $V_{GS} > V_T$ wird zwischen 3 Bereichen unterschieden [89]:

Linearer Bereich: $V_{GS} > V_T$ und $0 < V_{DS} \ll (V_{GS} - V_T)$

Ist V_{GS} größer als die Schwellenspannung, bildet sich ein leitender Kanal zwischen Source und Drain, in dem abhängig von V_{DS} ein Strom I_{DS} fließt. Ist die Drain-Source-Spannung sehr klein, fällt im Bereich des Kanals kaum Spannung ab und der fließende Strom I_{DS} berechnet sich aus der Ladung q_n im n-Kanal und der Transitzeit t_{tr} , die eine Ladung benötigt, um von Source zu Drain zu gelangen. Daraus folgt für I_{DS} :

$$I_{DS} = -\frac{q_n}{t_{tr}} \quad (3.108)$$

Die Transitzeit läßt sich aus der Elektronendriftgeschwindigkeit ν_d im elektrischen Feld V_{DS}/L berechnen.

$$\nu_d = \mu_n \frac{V_{DS}}{L} \quad (3.109)$$

Wobei μ_n die Elektronenbeweglichkeit im n-Kanal beschreibt. Damit ergibt sich für die Transitzeit:

$$t_{tr} = \frac{L^2}{\mu_n V_{DS}} \quad (3.110)$$

Unter Verwendung der Kapazität pro Isolatorfläche C_{ox} gilt für die Ladung q_n im Kanal:

$$q_n = -C_{ox}(V_{GS} - V_T)WL \quad (3.111)$$

Der Strom I_{DS} des MOSFET im linearen Bereich ergibt sich aus Einsetzen von Gleichung 3.110 und 3.111 in Gleichung 3.108:

$$I_{DS} = -\frac{q_n}{t_{tr}} = \frac{\mu_n W C_{ox}}{L} (V_{GS} - V_T) V_{DS} \quad (3.112)$$

Triodenbereich: $V_{GS} > V_T$ und $0 < V_{DS} < (V_{GS} - V_T) = V_{sat}$

Wird die Drain-Source-Spannung V_{DS} erhöht, ist ihr Einfluß gegenüber der Gate-Source-Spannung V_{GS} nicht mehr vernachlässigbar. In diesem Bereich bildet sich kein homogener Kanal zwischen Source und Drain. Der Inversionskanal ist in diesem Betriebszustand zum Drain hin verengt, da die Drain-Source-Spannung über dem Kanal abfällt. In der Nähe des Drains liegt die kleinste Spannung über der Gate-Isolation. Die effektive Gatespannung beträgt hier $V_{GS} - V_{DS}$ über der Isolation. Bei einer Spannung von $V_{sat} = V_{GS} - V_T$, der Sättigungsspannung, steht der Kanal kurz vor der Abschnürung. Dies wird als Pinch-off-Punkt bezeichnet. Der Spannungsabfall über dem Gate-Isolator muß bei der Berechnung des Drain-Source-Stromes I_{DS} im Kanal berücksichtigt werden. Wird ein linearer Spannungsabfall zwischen Drain und Source angenommen, läßt sich I_{DS} im Fall $V_{DS} = V_{sat}$ dadurch berechnen, daß der Gate-Isolator in Kondensatoren der Fläche $dy \cdot W$ unterteilt wird:

$$I_{DS} dy = \frac{\mu_n W C_{ox}}{L} ((V_{GS} - V_T) - V(y)) \frac{dV(y)}{dy} dy = \frac{\mu_n W C_{ox}}{L} ((V_{GS} - V_T) - V(y)) dV(y) \quad (3.113)$$

Den Drain-Source-Strom I_{DS} erhält man näherungsweise durch Integration über die gesamte Kanallänge L von $y = 0$ bis $y = L$ mit $V(0) = 0V$ und $V(L) = V_{DS}$:

$$I_{DS} = \frac{\mu_n W C_{ox}}{L} ((V_{GS} - V_T) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2}) \quad (3.114)$$

Sättigungsbereich: $V_{GS} > V_T$ und $0 < V_{DS} > (V_{GS} - V_T) = V_{sat}$

Wird der MOSFET im Sättigungsbereich betrieben, bilden sich zwei Bereiche im Kanal. Der Bereich zwischen Source und Pinch-off-Punkt und den Abschnürungsbereich zwischen Pinch-off-Punkt und Drain. Im letzteren Bereich findet der Elektronentransport durch Diffusion und ein starkes elektrisches Feld zwischen Pinch-off-Punkt und Drain statt. Ausschlaggebend ist hierfür die sich bildende Raumladungszone. Diese Raumladungszone wird durch eine Erhöhung von V_{DS} zunehmend verbreitert. Der Drain-Source-Strom I_{DS} nimmt allerdings nicht mehr zu. Es herrschen annähernd dieselben Verhältnisse wie im Betrieb bei $V_{DS} = V_{sat}$. Dadurch ergibt sich folgende Gleichung für I_{DS} :

$$I_{DS} = \frac{\mu_n W C_{ox}}{2L} (V_{GS} - V_T)^2 \quad (3.115)$$

Abbildung 3.13 zeigt eine Ausgangskennlinienschar eines n-Kanal MOSFET mit Triodenbereich, Sättigungsbereich und Pinch-off-Parabel.

Wie oben bereits erwähnt unterscheidet sich der ISFET für pH-Messungen vom MOSFET durch das Fehlen der Gate-Metallisierung. Anstelle der Gate-Metallisierung tritt ein System aus Referenzelektrode und elektrolytischer Lösung. Der elektrisch leitende Inversionskanal des FET wird hierbei nicht wie beim MOSFET durch die Anordnung Metall/Gate-Isolator/Halbleiter, sondern durch die Anordnung Metall/Referenzelektrode/Elektrolyt/Gate-Isolator/Halbleiter gesteuert. An der Grenzfläche zwischen Gate-Isolator und Elektrolyt entstehen dabei Oxidladungen in Form einer Doppelschicht. Dieser Effekt ist die charakteristisch für ionensensitive Schichten und ist der Kern des Meßeffekts vieler pH-Sensoren. Da er auch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sensoren auf Metalloxidbasis maßgeblich ist, wird er in Kapitel 4.2 näher betrachtet. Abbildung 3.14 zeigt einen Querschnitt durch den typischen ISFET-Aufbau.

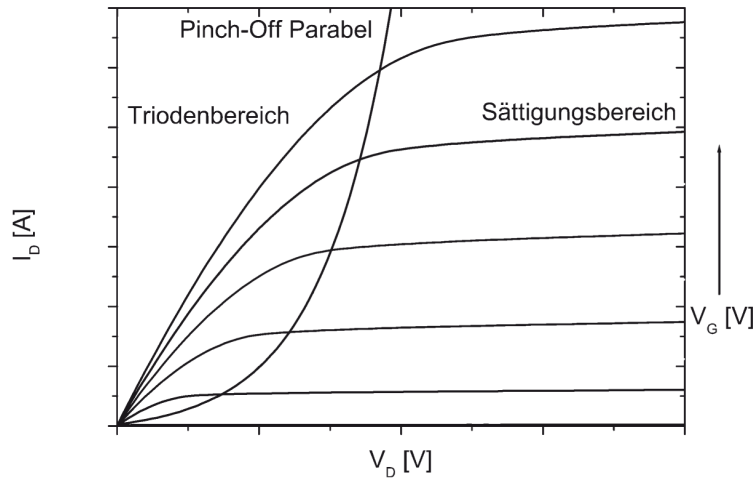


Abbildung 3.13: Ausgangskennlinienschar eines n-Kanal MOSFET mit Triodenbereich, Sättigungsbereich und Pinch-off-Parabel [146]

Prinzipiell ist ein ISFET mit einem SiO_2 -Gate-Isolator als pH-sensitive Schicht realisierbar, hat dadurch aber erhebliche Nachteile durch geringe und nichtlineare pH-Empfindlichkeit, hohe Drift und geringe Stabilität in Flüssigkeiten. In der Praxis werden meist Doppelschichtsysteme realisiert, die auf SiO_2 abgeschiedene, pH-sensitive Schichten aus Si_3N_4 , Al_2O_3 oder Ta_2O_5 verwenden [171].

An der äußeren elektrischen Beschaltung und Ansteuerung des ISFET ändert sich bezüglich des MOSFET nichts. Allerdings berechnet sich die Schwellenspannung V_T beim ISFET durch die Faktoren Referenzelektrode und Elektrolyt in der Anordnung anders als beim MOSFET. Beim MOSFET gilt für V_T [172–174]:

$$V_T = 2\varphi_F + \phi_{MH} - \frac{1}{C_{ox}}(\sigma_{RLZ} + \sigma_{I/H} + \int_0^{d_{ox}} \frac{x}{d_{ox}} \rho(x) dx) \quad (3.116)$$

| | |
|-------------------------|--|
| $\varphi_F = E_i - E_F$ | intrinsisches Energieniveau - Fermi-Niveau |
| ϕ_{MH} | Austrittsarbeit Metall und Halbleiter |
| σ_{RLZ} | Flächenladungsdichte in der Raumladungszone |
| $\sigma_{I/H}$ | Flächenladungsdichte an der Grenzschicht Isolator/Halbleiter |
| $\rho(x)$ | Ladungsdichte als Funktion von x |
| x | Abstand von der Metall/Isolator-Grenzfläche |
| d_{ox} | Dicke des Gate-Isolators |

Im Falle des ISFET muß der Term der Austrittsarbeit ϕ_{MH} durch die Austrittsarbeiten und elektrochemischen Potentiale der zusätzlichen Komponenten der Anordnung ersetzt werden [175, 176]. Dadurch ergibt sich für die Schwellenspannung des ISFET bei Verwendung einer Ag/AgCl-Referenzelektrode [177, 178]:

$$V_T = E_{Ag/AgCl} - \psi_{IE} + \chi_E - \phi_H + 2\varphi_F - \frac{1}{C_{ox}}(\sigma_{RLZ} + \sigma_{I/H} + \int_0^{d_{ox}} \frac{x}{d_{ox}} \rho(x) dx) \quad (3.117)$$

| | |
|---------------|---|
| $E_{Ag/AgCl}$ | Elektrodenpotential der Referenzelektrode (s. Gleichung 3.80) |
| ψ_{IE} | Oberflächenpotential (s. Kapitel 3.2.2) |
| χ_E | Grenzflächendipolpotential |

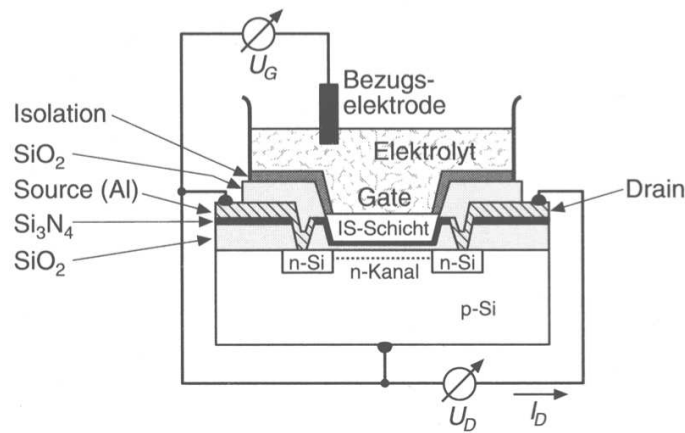


Abbildung 3.14: Aufbau eines ISFET zur Messung spezifischer Ionenkonzentrationen im Elektrolyten. Die ionensensitive Schicht (IS-Schicht) begünstigt Ionenreaktionen, aus [167]

3.4.4 Light Addressable Potentiometric Sensor, LAPS

Ein weiterer planarer pH-Sensor ist der "light addressable potentiometric sensor" (LAPS). Wie der ISFET basiert auch er auf einem potentiometrischen Meßverfahren. Der Aufbau des Sensors ist relativ einfach. Der Sensorchip selbst besteht nur aus einer Scheibe aus dotiertem Halbleitermaterial, in der Regel Silizium. Auf der Oberseite des Chips ist eine dünne Isolationsschicht aus SiO_2 aufgebracht, die das Silizium vom Elektrolyten trennt. Auf dieser Schicht wird wie beim ISFET eine ionensensitive Schicht, meist Si_3N_4 abgeschieden. Die Rückseite des Si-Chips ist mit Gold beschichtet, wobei ein geeigneter Bereich freigelassen ist. Diese Metallisierung dient als Kontaktierung der Rückseite. Für den Betrieb des LAPS wird neben einer Referenzelektrode auch eine Gegenelektrode benötigt. Mit Hilfe eines Potentiostaten kann über die Anordnung aus Rückseitenkontakt, Gegen- und Referenzelektrode das Potential zwischen Elektrolyt und Silizium, die so genannte Biasspannung V_{Bias} , eingestellt werden [93]. Abbildung 3.15 zeigt den schematischen Aufbau des Sensors mit äußerer elektrischer Beschaltung.

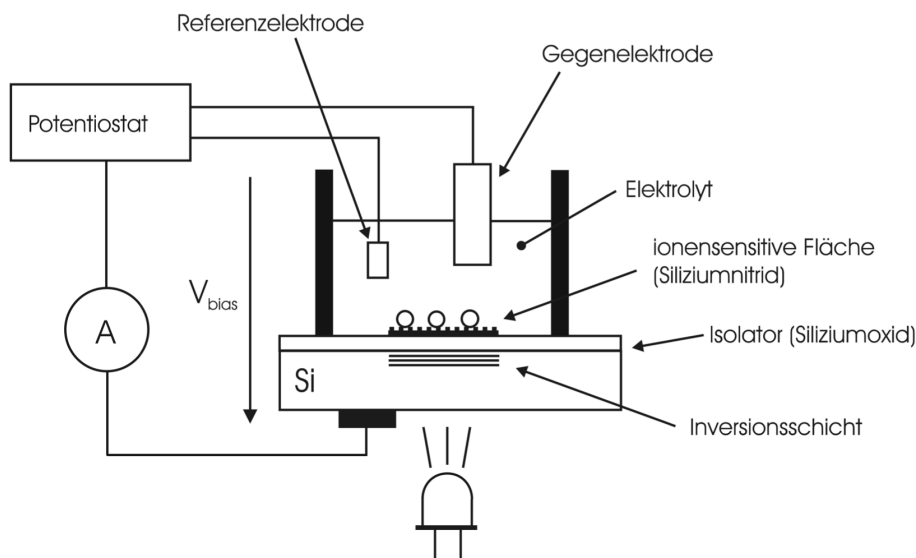


Abbildung 3.15: Schematischer Aufbau eines LAPS mit äußerer elektrischer Beschaltung

Wird mit Hilfe des Potentiostaten dieses Biaspotential entsprechend gepolt, so kommt es im Halbleiter an der Grenzfläche zum Isolator auf Grund des sich bildenden elektrischen Feldes zu einer Verarmung der Majoritätsladungsträgerdichte bis hin zur Inversion. Dieser Vorgang ist ähnlich zu den Vorgängen eines pn-Übergangs in einer Diode [168]. Wird nun der LAPS von der Rückseite an einer freien Stelle mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt, in der Regel mit einer LED oder einem Diodenlaser, so wird analog zu einer Photodiode im Halbleiter ein Photostrom generiert [170]. Dieser Photostrom kann beim LAPS zwischen Rückseitenkontakt und Gegenelektrode gemessen werden. Da die Isolationsschicht aus SiO_2 einen konstanten Stromfluß verhindert, kann nur ein, von der Gesamtkapazität der Anordnung abhängiger Ladestrom fließen. Der Sensor wird daher mit gepulstem Licht bestrahlt, was in einem alternierenden, sinusähnlichen Photostrom resultiert. Die Amplitude dieses Photostromes ist einerseits von der Lichtleistung der Bestrahlung, andererseits von der Lage und Dicke der Inversionsschicht abhängig. Die Inversionsschicht selbst wird bestimmt durch den Potentialunterschied zwischen Isolator und Halbleiter $\Delta\phi_{Is,HL}$. Das Potential im Isolator ergibt sich aus der Summe vom Potential im Elektrolyten ϕ_{El} und dem bereits beim ISFET betrachteten pH-abhängigen Oberflächenpotential ψ_{IE} zwischen Isolator und Elektrolyten. Die über die äußere elektrische Beschaltung eingestellte Biasspannung V_{Bias} ist die Potentialdifferenz zwischen Si-Halbleiter und Referenzelektrode, die bis auf eine additive Konstante $\Delta\phi_{El,Ref}$ mit der Potentialdifferenz zwischen Si-Halbleiter und Elektrolyt identisch ist. Für die, den Photostrom bestimmende Potentialdifferenz $\Delta\phi_{Is,HL}$, ergibt sich demnach folgender Zusammenhang:

$$\Delta\phi_{Is,HL} = \Delta\phi_{Is,El} - V_{Bias} + \Delta\phi_{El,Ref} \quad (3.118)$$

Bei konstanter Biasspannung ist $\Delta\phi_{Is,HL}$ abhängig von der im Elektrolyten vorherrschenden Ionenkonzentration und somit vom pH-Wert [94, 95]. Abbildung 3.16 zeigt eine typische Kennlinienschar eines LAPS für verschiedene pH-Werte, die den Zusammenhang zwischen der Biasspannung und der Amplitude des Photostrom beschreibt.

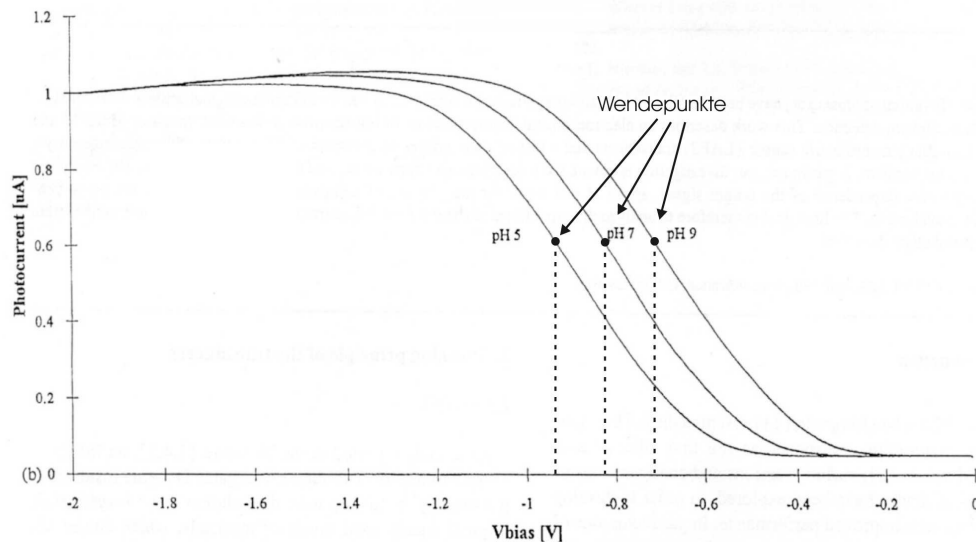


Abbildung 3.16: Kennlinienschar eines LAPS für verschiedene pH-Werte

In der Regel wird der Sensor während einer Messung mit gepulstem Licht konstanter Intensitätsamplitude bestrahlt und die Biasspannung variiert. Der Verlauf der Stromamplitude fällt dabei monoton von einem Maximum, das bei maximaler Inversion erreicht wird, bis auf 0 ab, wo praktisch keine Inversion vorliegt. Für verschiedene pH-Werte ergibt sich eine Verschiebung der Kennlinie entlang der V_{Bias} -Achse. Dies entspricht einer Änderung der Einsatzspannung des Photostromes.

Für die Durchführung einer pH-Messung gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Einerseits läßt sich pro Messung die gesamte Kennlinie aufnehmen und als charakteristischen Punkt für die Lage der Kurve der Wendepunkt bestimmen. Dies macht eine zeitaufwendige Variation der Biasspannung notwendig. Andererseits läßt sich die Messung auch bei einer fest vorgegebenen Biasspannung und Bestimmung der Stromamplitude durchführen. Dieses Verfahren ist schneller, schränkt aber den Meßbereich erheblich ein, da die Änderung der Amplitude nur in einem sehr engen Intervall um den gewählten Arbeitspunkt linear ist.

Beide Verfahren liefern nur gute Ergebnisse, falls der Photostrom selbst die Vorspannung nur geringfügig stört. Werden solche Störungen unzureichend durch den Potentiostaten unterdrückt, führt dies zu chemischen Wechselwirkungen am Sensor, die die Genauigkeit der Messung stören. Daher sind beim LAPS hohe Anforderungen an die elektrischen Eigenschaften des Potentiostaten zu stellen [93].

Ein Vorteil des LAPS ist die Möglichkeit räumlich hochaufgelöste pH-Messungen vorzunehmen. Dies wird dadurch ermöglicht, daß die pH-Messung nur in unmittelbarer Nähe der bestrahlten Fläche durchgeführt wird, da der Photostrom nur an dieser Stelle generiert wird. Diese Methode wird unter anderem von Gaub angewendet und wurde in [96] beschrieben.

3.4.5 pH-Sensoren auf Metalloxidbasis

Eine weitere Methode der pH-Messung die ebenfalls planar ausgeführt werden kann, stellen Sorelektroden auf Metalloxidbasis dar. Dieser Sensortyp hat im Vergleich zu einem ionensensitiven Feldeffekttransistor einen erheblich einfacheren Aufbau und stellt neben den Sensorchips für Messungen an lebenden Zellen den Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit dar. Aus diesem Grund sind dieser Art der pH-Sensoren die Kapitel 4 und 5 gewidmet.

3.5 Sauerstoff-Sensoren

In Kapitel 2.2 wurde unter anderem die Bedeutung des zellulären Sauerstoffverbrauches und die dadurch verursachte Konzentrationsänderung des Gelöst-Sauerstoffanteils im extrazellulären Umfeld der Zellen betrachtet. An dieser Stelle sollen nun einige technische Verfahren zur Messung der Sauerstoffkonzentration in flüssigen Medien behandelt werden.

3.5.1 Grundlagen

Der zu messende Parameter ist Sauerstoff, der, wie jedes Gas, in Flüssigkeiten lösbar ist. Der Umfang der Lösung ist maßgeblich vom Partialdruck p in der Gasphase abhängig. Für den Fall des thermodynamischen Gleichgewichts bildet sich eine stabile Sättigungskonzentration c , bzw. eine Sättigungsaktivität a . Der Zusammenhang dieses Lösungsgleichgewichts zwischen flüssiger Phase und Gasphase wird durch das Gesetz von Henry (1803) beschrieben:

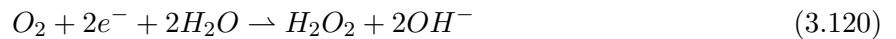
$$a(O_2) = \gamma(T, p, n_i) \cdot \frac{c(O_2)}{c^o(O_2)} = k \cdot \frac{p(O_2)}{p^o(O_2)} \quad (3.119)$$

| | |
|---------------------|---|
| $\gamma(T, p, n_i)$ | Aktivitätskoeffizient (abhängig von Temperatur T , Druck p und der Menge n_i anderer gelöster Stoffe) |
| $c(O_2)$ | Sauerstoffkonzentration |
| $c^o(O_2)$ | Sauerstoffkonzentration im Standardzustand |
| $p(O_2)$ | Sauerstoff-Partialdruck |
| $p^o(O_2)$ | Sauerstoff-Partialdruck im Standardzustand |
| k | Proportionalitätsfaktor |

Aktivität und Partialdruck sind dabei aus thermodynamischer Sicht äquivalent, hängen aber nicht direkt mit der Konzentration zusammen. Bei nachfolgend betrachteten amperometrischen Sauerstoffsensoren ist der Stromfluß vom chemischen Potential des gelösten Sauerstoffs abhängig. Dieses Potential ist eine Funktion des Partialdrucks, bzw. der Aktivität. Konzentration und Partialdruck des gelösten Sauerstoffs können sich durchaus unabhängig voneinander verhalten. Amperometrische Messungen zeigen, daß wasserdampfgesättigte Luft und luftgesättigtes Wasser bei ausreichender Konvektion zu gleichen Meßwerten führen, obwohl die Konzentrationen deutlich unterschiedlich sind (ca. 280mg/l bzw. 9mg/l) [66]. Werte der Sauerstoff-Sättigungskonzentration haben ausschließlich Bedeutung bei der Kalibration der Sensoren. Sauerstoff-Sättigungskonzentrationen finden sich beispielsweise in [179].

3.5.2 Clark-Sensor

Stand der Technik bei amperometrischen Sauerstoffmeßverfahren ist der Sensor nach dem Clark-Prinzip. Ursprünglich entwickelt für die Messung von Blutsauerstoff [102], handelt es sich hierbei um ein 2-Elektrodensystem bestehend aus einer Edelmetall-Kathode als Arbeitselektrode und einer Ag/AgCl-Anode, die gleichzeitig als Gegen- und Referenzelektrode dient. Beide Elektroden befinden sich in einem Elektrolyten, in der Regel KCL, der von der Meßlösung durch eine dünne gaspermeable Membran getrennt ist. Diese gaspermeable Membran verhindert die Querempfindlichkeit gegenüber anderen oxidierbaren oder reduzierbaren Stoffen erheblich. Das Funktionsprinzip amperometrischer Sensoren basiert auf einem Oxidations- bzw. Reduktionsstrom. Sauerstoff wird in einer elektrochemischen Zelle an der Oberfläche der Arbeitselektrode aus Edelmetall reduziert (siehe Kapitel 3.2.4). Der Meßeffect beruht dabei auf der Halbzellenreaktion an der Arbeitselektrode. Zusammen mit der Halbzellenreaktion an der Gegenelektrode bilden beide einen Stromkreis. Der daraus resultierende Reduktionsstrom, auch als Faraday-Strom bezeichnet, ist direkt proportional zum Anteil des in der Meßlösung befindlichen Sauerstoffs und dient als Meßsignal [180]. Das Reduktionsergebnis an der Arbeitselektrode sind dabei immer Hydroxid-Ionen. Der Sauerstoff kann dabei in zwei 2-Elektronenschritten mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Zwischenprodukt reduziert werden:



Das intermediär entstehende Wasserstoffperoxid kann neben der Reduktion auch zu Wasser und Sauerstoff disproportionieren:



Neben den 2-Elektronenschritten sind auch Reduktionen mittels 4-Elektronenschritten möglich:



Alle Reaktionen werden durch eine von außen angelegte Spannung hervorgerufen. Aufgrund der Reaktionen an der Gegenelektrode, fällt in diesem 2-Elektrodensystem die Konzentration des Chlorid-Anions im KCL-Elektrolytreservoir kontinuierlich ab und das Anodenmaterial wird langsam verbraucht [181].

Eine Weiterentwicklung dieses Meßprinzips ist die Verwendung einer elektrochemischen Zelle mit einer 3-Elektrodenanordnung, bestehend aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode. Der durch o.g. Reaktionen hervorgerufene Meßstrom an der Arbeitselektrode nimmt hier die Gegenelektrode auf, während die Referenzelektrode stromlos bleibt und mit Hilfe eines Potentiostaten benutzt wird, das Potential der Arbeitselektrode auf einen vorgegebenen Sollwert einzustellen. Die Gegenelektrode wird

dabei so polarisiert, daß an ihr eine anodische Rückreaktion, also die umgekehrte Reaktion der Arbeitselektrode, abläuft. Wählt man für die Gegenelektrode geeignete Materialien, bedeutet dies, daß der, an der Arbeitselektrode verbrauchte Sauerstoff, durch die Rückreaktion regeneriert wird. Dadurch verbrauchen sich Elektrolyt und Referenzelektrode nicht und der Sensor erhält eine erheblich längere Standzeit.

Während die von Clark verwendeten Sensoren für die Messung von Blutsauerstoff diskrete und zum Teil schwer handhabbare Anordnungen waren, sind für Messungen mit Sensorchips planare Sensoren notwendig. Erste mikrostrukturierte Sauerstoffsensoren wurden erstmals von Butler 1974 verwendet und in [182] beschrieben. Photolithographische Herstellungstechnologie macht dabei eine starke Miniaturisierung möglich. Diese ist allerdings zum Teil durch die Elektrodenanordnung und -geometrie beschränkt, deren Optimierung eine Verringerung von Störanfälligkeiten und Querempfindlichkeiten ermöglichen. Auf diesem Gebiet wurden viele Arbeiten veröffentlicht, um den planaren Sensor möglichst klein auszuführen und mit etablierten Dünnschichtverfahren herzustellen [183–186]. Abbildung 3.17 zeigt einen Querschnitt durch den prinzipiellen Aufbau eines planaren, membranbedeckten Sauerstoffsensors.

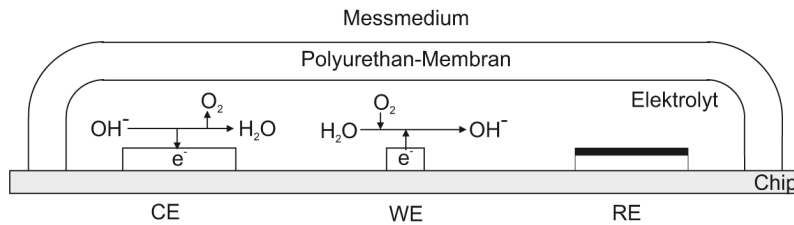


Abbildung 3.17: Prinzipieller Aufbau eines planaren, membranbedeckten Sauerstoffsensors, aus [187]

3.5.3 Elektrische Eigenschaften

Abbildung 3.18 zeigt die charakteristische Strom-Spannungskennlinie eines amperometrischen Sensors. Diese Kennlinie läßt sich mit Hilfe von cyclovoltammetrischen Verfahren bestimmen. Die angelegte Polarisationsspannung E_{app} ist bezogen auf eine Normal-Wasserstoff-Elektrode (siehe Kapitel 3.3.2). Der durch die Polarisationsspannung hervorgerufene Meßstrom läßt sich in vier Bereiche einteilen [188]:

Ruhestrombereich

Im Spannungsbereich bis zum Gleichgewichtspotential E_{eq} von Arbeits- zu Gegenelektrode fließt ein, von der Sauerstoffreduktion unabhängiger, Ruhestrom oder auch Nullstrom genannt. Dieser ist in reduzierbaren Verunreinigungen im Elektrolyten und der Kathodenoberfläche, sowie durch Elektrodenkurzschlüsse, verursacht durch Wasser absorbierende Isolatoren, begründet. Dieser Ruhestrom beträgt etwa 0,01% bis 1% des Meßsignals.

Durchtrittsbestimmter Bereich

Ist die Reduktionsspannung erreicht, steigt die Stromkurve steil an. Dieser Teil der Kurve wird durch die Butler-Vollmer-Gleichung beschrieben [189]. In diesem Bereich bestimmt die Rate des Ladungsdurchtritts die Elektrodenreaktion. Die Menge des an die Elektrodenoberfläche transportierten Sauerstoffs spielt hierbei keine limitierende Rolle. Aufgrund des relativ kleinen Potentials läuft die Reaktion relativ langsam ab. Erreicht die Polarisationsspannung das Standardredoxpotential, wird genau die

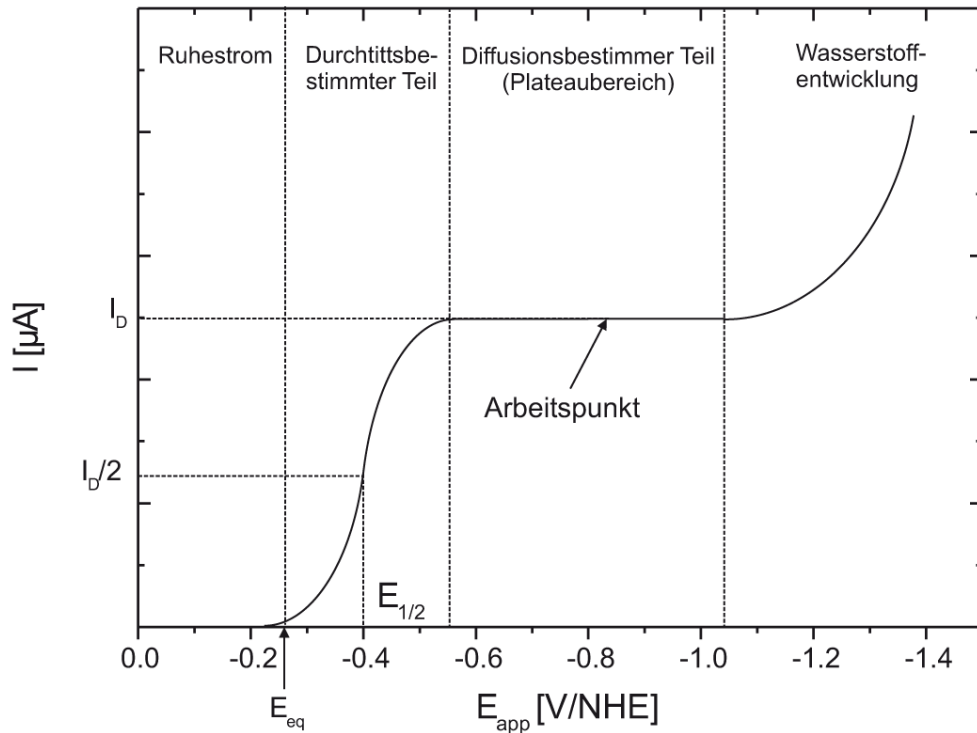


Abbildung 3.18: Charakteristische Strom-Spannungskennlinie eines amperometrischen Sensors, aus [187]

Hälfte des Diffusionsgrenzstromes erzeugt. Dieses Potential wird daher als Halbstufenpotential $E_{1/2}$ bezeichnet.

Diffusionsbestimmter Bereich

Erhöht man die Spannung weiter, erreicht man einen Bereich, in der der Meßstrom nicht weiter ansteigt. Dieser Plateau-Bereich liegt in der Regel zwischen -600mV und -800mV . Hier ist der Ladungsdurchtritt derart schnell, daß die Konzentration des Sauerstoffs an der Kathodenoberfläche bis auf 0 absinkt. Der Meßstrom wird nun durch die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs begrenzt, daher der Name diffusionsbestimmter Bereich, und hängt ausschließlich vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck ab.

Wasserstoffentwicklung

Wird die Zersetzungsspannung des Elektrolyten erreicht, steigt der Strom, bedingt durch die einsetzende Dissoziation des Wassers, erneut steil an.

Der ideale Arbeitspunkt für den Sauerstoff-Sensor ist eine Spannung im Plateau-Bereich der Strom-Spannungskennlinie. Diese sollte noch nicht zur Wasserstoffentwicklung führen, aber negativ genug sein, um eine ausreichend schnelle Reduktion des intermediär entstehenden Wasserstoffperoxids zu ermöglichen. In diesem Plateau-Bereich stellt sich ein, zur Menge des herandiffundierenden Sauerstoffs proportionaler, Diffusionsgrenzstrom I_D ein. Dieser errechnet sich aus dem 2. Fick'schen Gesetz

und des Farady'schen Gesetzes bei einem Abstand von $x = 0$ von der Kathode zu [189]:

$$I_D = nFAD \frac{da(O_2)}{dx} \quad (3.125)$$

| | |
|----------|---|
| n | Stöchiometrischer Koeffizient |
| F | Faraday-Konstante |
| A | Kathodenoberfläche |
| D | Diffusionskoeffizient für gelösten Sauerstoff |
| $a(O_2)$ | Sauerstoffaktivität |
| x | Abstand von der Kathode |

Diese Beziehung läßt sich im stationären Zustand für den Fall, daß nur die Membran ein Diffusionshindernis darstellt, wie folgt vereinfachen [180]:

$$I_D = nFAP_m \frac{p(O_2)}{b} \quad (3.126)$$

$p(O_2)$ beschreibt den Sauerstoffpartialdruck, P_m die Permeabilitätskonstante der Membran und b die Dicke der Membran. Die Permeabilitätskonstante läßt sich darstellen als:

$$P_m = P_{m,0} \cdot e^{-E/RT} = K_m \cdot D_m \quad (3.127)$$

| | |
|-----------|---|
| $P_{m,0}$ | Permeabilität des Standardzustandes |
| E | Aktivierungsenergie |
| K_m | Nernst'scher Verteilungskoeffizient für Sauerstoff |
| D_m | Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in der Membran |

Für den praktischen Betrieb von Sauerstoffsensoren ist dabei Gleichung 3.127 sehr relevant. Aus ihr ist zu entnehmen, daß die Löslichkeit von Sauerstoff in flüssigen Medien von der Temperatur abhängt. Die Löslichkeit nimmt mit zunehmender Temperatur ab, da die Lösungsenthalpie für Wasser einen negativen Wert besitzt. Damit ist das Sensorsignal abhängig von der Temperatur. Der wichtigste Faktor in dieser Abhängigkeit ist der, mit steigender Temperatur sich erhöhende, Diffusionskoeffizient D :

$$D \sim e^{-(E/RT)} \quad (3.128)$$

Abbildung 3.19 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser und die Temperaturabhängigkeit des Sensorsignals. In der Regel nimmt das Sensorsignal um 1% bis 6% pro °C bei konstanter Sauerstoffaktivität zu [180]. Für die in dieser Arbeit verwendeten Sauerstoffsensoren ist daher eine genaue Überwachung der Temperatur notwendig. Geeignete Verfahren hierfür sind in Kapitel 3.8 beschrieben.

3.6 Impedanz-Sensoren

Für die Erfassung der, in Kapitel 2.3 beschriebenen, Änderungen in den Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Verbindungen, sowie zur Überwachung und Bestimmung der Zellproliferation eignen sich Impedanzsensoren. In der vorliegenden Arbeit werden in Dünnschichttechnik hergestellte Interdigitalstrukturen, so genannte IDES (interdigital electrode structure) verwendet. Ihrer Ausführung und Anwendung ist das Kapitel 6 gewidmet.

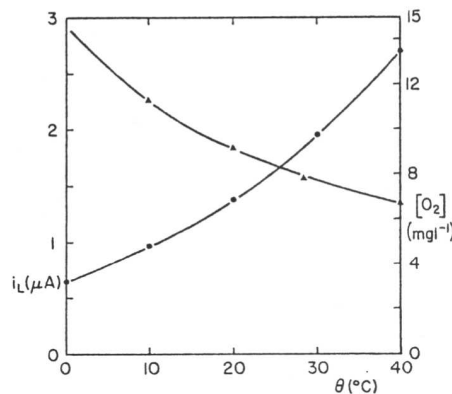


Abbildung 3.19: Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser und die Temperaturabhängigkeit des Sensorsignals, aus [180]

3.7 Elektrodenstrukturen zur Ableitung von Potentialen

In Kapitel 2.4 wurden elektrisch aktive Zelltypen betrachtet. Diese haben die Fähigkeit durch Veränderung ihres Membranpotentials Signalübermittlung zu realisieren. Dies geschieht mit Hilfe von Aktionspotentialen. Diese Aktionspotentiale, die bis zu $100mV$ betragen können, werden im Allgemeinen über Arrays von Mikroelektroden (MEA) aufgenommen, elektrisch verstärkt und weiter verarbeitet [134]. Im Gegensatz zu Sensor-Systemen die Elektroden direkt in die Zelle einführen und die Zellmembran dabei beschädigen, z.B. Patch-Clamp [190], ist die Verwendung von Mikroelektrodenarrays nicht invasiv. Ausgeführt sind Mikroelektrodenarrays aus einer Anordnung von Metallelektroden aus Platin oder Indium-Zinn-Oxid (ITO), die mit Hilfe von Dünnschichtprozessen auf geeignete Chipsubstrate aufgebracht sind. Eine der häufigst verwendeten Elektrodenkonfigurationen ist die von Gross unter anderem in [133] beschriebene Verwendung von 64 Einzelelektroden angeordnet in 4 Reihen zu je 16 Elektroden. Die Elektroden besitzen dabei einen Durchmesser von $8\mu m$, bei einem Reihenabstand von $200\mu m$ und einem Elektrodenabstand von $40\mu m$ in der Reihe. Die Elektroden sind aus Indium-Zinn-Oxid mit einer dünnen Goldbeschichtung. Das Chipsubstrat bildet eine $1mm$ starke Glasplatte. Abbildung 3.20 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme einer Nervenzellkultur, eines so genannten neuronalen Netzwerkes, das auf dem beschriebenen Elektrodenarray kultiviert wurde.

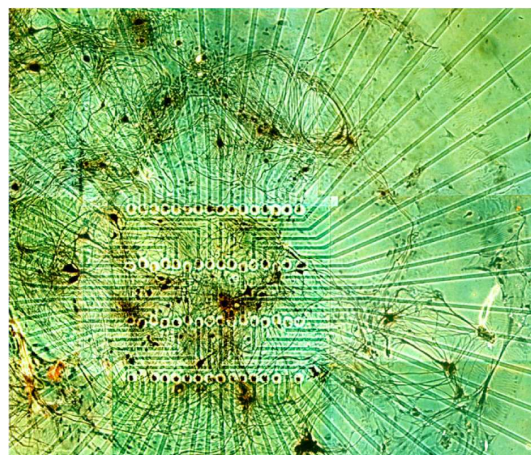


Abbildung 3.20: Nervenzellkultur auf einem 4 x 16 Array aus Ableitelektroden, aus [133]

Auch andere Anordnungen der Elektroden auf Glassubstrate, wie 64 Elektroden angeordnet zu 8 Reihen und 8 Spalten mit einem horizontalen wie vertikalen Elektrodenabstand von $150\mu\text{m}$ wurden von Gross verwendet [147].

3.8 Pt-Temperatursensoren

Aus den vorangegangenen Kapiteln geht deutlich der Einfluß der Temperatur auf wichtige elektrochemische Parameter hervor. Sowohl durch elektrochemische Reaktionen hervorgerufene Elektrodenpotentiale, insbesondere der Referenzelektroden, Potentiale an ionensensitiven Schichten und Parameter wie Sauerstoffpartialdruck sind Funktionen der Temperatur. Für stabile und reproduzierbare Messungen gibt es daher zwei Möglichkeiten. Einerseits kann die Temperatur der Meßumgebung sehr genau konstant gehalten werden, andererseits können Änderungen in der Temperatur in die Verarbeitung der Meßsignale einbezogen werden. Beide Möglichkeiten erfordern eine exakte Erfassung der Temperatur während der Messung.

Für diesen Zweck werden Temperatursensoren auf den Sensorchips integriert. Die häufigste Art dieser Sensoren sind Widerstandsthermometer [191, 192]. Grundlegendes Funktionsprinzip ist dabei die Ausnutzung der Temperaturabhängigkeit des elektrischen Widerstandes von Metallen. Diese Abhängigkeit ist in der Bewegung der frei beweglichen Elektronen begründet. Die frei beweglichen Elektronen der äußeren Atomschale von Metallatome bilden ein Elektronengas. Wird eine elektrische Spannung angelegt, so werden die Elektronen durch den Leiter als Strom bewegt. Diese Bewegung ist weitestgehend ungeordnet. Wird die Temperatur erhöht, so steigt die Wahrscheinlichkeit von Zusammenstößen der Elektronen untereinander und mit den Metallionen, die aufgrund der höheren Temperatur stärkere Schwingungen ausführen. Dadurch wird die Bewegung der Elektronen zunehmend behindert. Dies äußert sich in einem Anstieg des ohmschen Widerstandes im Metall [193].

Den Zusammenhang zwischen der Temperatur T und des ohmschen Widerstandes $R(T)$ beschreibt für den Fall, daß ein metallischer Leiter bei der Temperatur T_0 den Widerstand R_0 besitzt, folgende Beziehung [194]:

$$R(T) = R_0[1 + \alpha(T - T_0) + \beta(T - T_0)^2] \quad (3.129)$$

α , bzw. β mit den Einheiten $[K^{-1}]$, bzw. $[K^{-2}]$ sind Materialkonstanten. Dabei ist der Zahlenwert von β in der Regel drei Zehnerpotenzen kleiner als der von α . Dies führt dazu, daß bei einem ausreichend kleinen Temperaturintervall der letzte Term der Gleichung 3.129 vernachlässigt werden kann. Soll die Temperatur anstatt in Kelvin in Grad Celsius angegeben werden und wird eine Temperatur von 0°C als Bezugspunkt verwendet läßt sich die Gleichung wie folgt vereinfachen:

$$R(\vartheta) = R_0[1 + \alpha(\vartheta - \vartheta_0)] = R_0(1 + \alpha\vartheta) \quad (3.130)$$

Der Temperaturkoeffizient α läßt sich aus der Empfindlichkeit E des metallischen Leiters bestimmen:

$$E = \frac{dR}{d\vartheta} = R_0\alpha \quad (3.131)$$

Nach der Division durch den Widerstand R_0 erhält man für den Temperaturkoeffizienten α :

$$\alpha = \frac{1}{R_0} \frac{dR}{d\vartheta} \quad (3.132)$$

In der technischen Anwendung kommen in der Regel Nickel- und Platinthermometer zum Einsatz. Für die Sensorchips in der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der Biokompatibilität und der Konsistenz

der Herstellungsprozesse der übrigen Elektrodenstrukturen für Sauerstoff-, Impedanz- und pH-Sensor auf Platin-Temperatur Sensoren zurückgegriffen. Die Widerstandswerte sind genormt und betragen je nach Ausführung als Pt100 oder Pt1000 100Ω oder 1000Ω bei 0°C . Nach DIN EN 60751 haben Platin-Temperatur Sensoren folgende Temperaturkoeffizienten:

$$\alpha = 3,9083 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$$

$$\beta = -5,775 \cdot 10^{-7} \text{ }^\circ\text{C}^{-2}$$

Durch das sehr kleine β kann, wie oben bereits erwähnt, von einem linearem Zusammenhang zwischen $R(T)$ und T ausgegangen werden. Unter der Berücksichtigung der linearen Näherung zwischen 0°C und 100°C ist der Temperaturkoeffizient α nach DIN EN 60751 wie folgt definiert:

$$\alpha = 3,850 \cdot 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$$

Abbildung 3.21 zeigt die Temperaturabhängigkeit des Widerstandes und des Temperaturkoeffizienten von Platin.

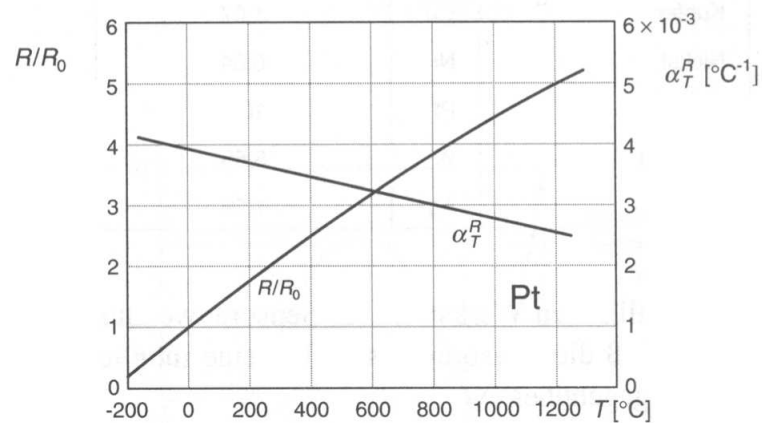


Abbildung 3.21: Temperaturabhängigkeit des Widerstandes und des Temperaturkoeffizienten von Platin, nach [167, 195]

Kapitel 4

pH-Sensoren auf der Basis von Metalloxiden

In Kapitel 2.2 wurden die Grundlagen des Metabolismus von Zellen und Geweben betrachtet. Dabei wurde bereits erläutert, daß die Aktivität des Zellstoffwechsels über die Änderungen des in Kapitel 3.4.1 behandelten pH-Werts im extrazellulären Umfeld bestimmt werden kann. Um diese Änderungen meßtechnisch zu erfassen, wurden in Kapitel 3.4.2 bis 3.4.4 gängige Sensoren und ihre Funktionsweisen vorgestellt. Da sich für die in dieser Arbeit verwendeten multiparametrischen Sensorchips nur planar ausführbare Sensoren eignen, ist die Glaselektrode ungeeignet. Die beiden anderen Sensorarten ISFET und LAPS haben, wie in der Einleitung bereits beschrieben, konzeptionelle und konstruktive Nachteile. Dies kommt insbesondere bei auf Glassubstraten aufbauenden Sensorchips zum Tragen.

Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit für multiparametrische Messungen an Zellen und Geweben auf eine einfachere Methode der pH-Messung zurückgegriffen und diese auf ihre Eignung hin untersucht. Betrachtet man die Funktionsweisen von ISFET und LAPS, so ist zu erkennen, daß ihr Meßeffect auf einer Potentialentstehung an ionensensitiven Schichten beruht. Dieses Potential wird beim ISFET durch den Feldeffekt und beim LAPS durch photoelektrische Mechanismen verstärkt und in ein technisch nutzbares Signal umgewandelt. Als ionensensitive Schichten dienen hier neben Si_3N_4 in der Regel Metalloxide. Prinzipiell spricht nichts dagegen, das durch elektrochemische Reaktionen entstehende Potential an Metalloxiden durch geeignete, hochohmige Meßaufnehmer direkt zu erfassen. Dazu ist als Gegenpol eine geeignete Referenzelektrode notwendig. Eine derartige Meßanordnung verzichtet auf einen aufwendigen Schichtaufbau der Sensoren, sowie die zum Teil aufwendige äußere elektronische Beschaltung zum Betrieb der Sensoren. In diesem Kapitel soll der Stand der Technik bei Metalloxiden als pH-Sensoren und deren Herstellungsverfahren betrachtet und soweit möglich ein Einblick in die Funktionsweise der Potentialentstehung gegeben werden.

4.1 Stand der Technik

4.1.1 Materialbetrachtungen

In der Literatur sind für pH-Meßzwecke eine Vielzahl von Metalloxiden bekannt und ihre technische Verwendung beschrieben. Viele von ihnen sind in Verbindung mit ISFETs oder anderen Sensorarten charakterisiert worden. Nachfolgende Auflistung gibt einen Überblick über den Stand der Technik im Bereich Metalloxide für pH-Sensorik.

Zirkoniumoxid

Relativ früh wurde Zirkoniumoxid (ZrO_2) für die pH-Messung untersucht. Ein annähernd ideales Nernst'sches Verhalten unter hohen Temperaturen schien anfangs vielversprechend zu sein, aber die

hohe Impedanz von ZrO_2 -Elektroden bei Temperaturen von unter $150^\circ C$ dämpften die Erfolgsaussichten [196]. Stabilisiert durch Yttrium wurde der Temperaturbereich auf $100 - 200^\circ C$ erweitert, Zirkoniumoxid blieb dennoch nur Wegbereiter für pH-Messungen mit Metalloxidelektroden [197].

Wismutoxid

Elektroden aus Wismutoxid (Bi_2O_3) wurden für den Einsatz in konzentrierten KOH -Lösungen entwickelt, wo herkömmliche Glaselektroden versagten. Genauere Untersuchungen außerhalb dieses speziellen Einsatzgebietes für Wismutoxide wurden allerdings nicht durchgeführt [198].

Molybdänoxide

Molybdänoxide, zum Teil durch Natrium stabilisiert, zeigen annähernd Nernst'sches Verhalten für die Bereiche pH 3 bis pH 9 [196], bzw. pH 4 bis pH 9 [197]. Molybdänoxide zeichnen sich durch sehr kurze Antwortzeiten aus. Es wurden zum Teil Zeiten von unter 5 Sekunden für das Erreichen von 90% des Endwertes beobachtet.

Wolframoxide

Wolframoxide zeigen nichtlineares, Super-Nernst'sches Verhalten bei Raumtemperatur. Bei $25^\circ C$ wurden Empfindlichkeiten von $76,3mV/pH$ gemessen. Somit kommen Wolframoxide höchstens für spezielle Anwendungen in Frage [60, 196].

Ceroxide

Auch bei Ceroxiden sind Nichtlinearitäten zu beobachten. Werden Ceroxide mit Samarium- oder Yttrium-Substitutionen behandelt, sind Antwortzeiten der Sensoren von 10s möglich. Allerdings ist das Nernst'sche Verhalten und die Linearität stark von der Temperatur abhängig. Es wurden Empfindlichkeiten von $23,8mV/pH$ bei $25^\circ C$ über einen Bereich von pH 3 bis pH 10 beobachtet. Bei $60^\circ C$ betrug die Empfindlichkeit bereits $39,9mV/pH$. Höchste Ionenkonduktivität wurde mit $Ce_{0,80}Sm_{0,20}O_{1,9-x}$ erreicht. Derartige Oxide können problemlos in Säure-Basen-Titrationen verwendet werden [196].

Antimonoxid

Vor allem in Anwendungen die gute HF-Eigenschaften benötigen wurde bisher am häufigsten Antimonoxid (Sb_2O_3) eingesetzt. Dieses Material ist allerdings von starkem Driften gekennzeichnet und daher insbesondere bei Langzeitmessungen sehr ungenau. Somit ist Antimonoxid nicht für präzise und schnelle Messungen geeignet [198].

Zinnoxid

Bei der Verwendung von Zinnoxid (SnO_2) wurde bei ISFETs, bedingt durch die Transparenz von SnO_2 , eine Lichtempfindlichkeit festgestellt. Insbesondere bei open-gate-ISFET Anwendungen kann Licht, welches durch das Metalloxid dringt, in der Siliziumschicht des ISFET Ladungsträger generieren und damit die Elektrodynamik der Anordnung erheblich beeinträchtigen [199]. Aus diesem Grund wurde erfolgreich versucht, die Anordnung mit einer Metallisierung gegen Licht abzuschirmen. Nachdem sich für diesen Zweck Platin als ungeeignet herausstellte, wurde die Abschirmung mit Hilfe von Aluminium realisiert. Das Aluminium wird direkt zwischen dem SiO_2 -Isolator und der ionensensitiven Schicht aus SnO_2 plaziert. Dies führte im Versuch zu einem deutlich stabileren Verhalten und zu einer linearen pH-Empfindlichkeit von ca. $56mV/pH$ bis $68mV/pH$ für den großen Bereich von $pH2$

bis $pH10$. Dieses Verhalten gilt für Lichtleistungen unter $15mW$ (zum Vergleich: bei durchschnittlicher Raumbeleuchtung beträgt die Lichtleistung ca. $0,3mW$). Ein nicht besonders vielversprechendes Metalloxid wurde somit aufgewertet und für verlässliche Messungen tauglich gemacht [199, 200].

Tantalpentoxid

Tantalpentoxid (Ta_2O_5) zeigt ein fast perfekt lineares Verhalten bei der pH-Messung. Seine Empfindlichkeit liegt bei $58mV/pH$ bis maximal $59.3mV/pH$ bei einer Temperatur von $25^\circ C$ und einem Einsatzbereich von $pH2$ bis $pH10$. Es ist nahezu unabhängig von der Elektrolytkonzentration der zu messenden Lösung. Allerdings wurden bei Tantalpentoxid eine Beeinflussung des Potentials durch Lichteinstrahlung festgestellt. Diese Eigenschaft von Ta_2O_5 ist für den breiten Einsatz von Nachteil [60, 199–201].

Aluminiumoxid

Aluminiumoxid (Al_2O_3) besitzt eine nahezu Nernst'sche pH-Empfindlichkeit von $58mV/pH$ über einen Einsatzbereich von $pH2$ bis $pH10$. Allerdings ändern sich seine Eigenschaften stark mit der Elektrolytkonzentration der zu messenden Lösung und liefert daher generell schlechte Meßergebnisse [60, 200]. Al_2O_3 zeigt eine besonders starke Beeinflussung durch Lichteinstrahlung. Dafür ist die Abhängigkeit des Meßergebnisses von der Temperatur weitgehend linear [202, 203].

Titanoxid

Titanoxid (TiO_2) ist weitgehend frei von Beeinflussung durch Lichteinstrahlung. Es deckt einen pH-Bereich von $pH3$ bis $pH11$ ab und ist vor allem bei sehr hohen Temperaturen um $900^\circ C$ langzeitstabil. Die Empfindlichkeit ist sehr linear und beträgt zwischen $57,4mV/pH$ und $62,3mV/pH$. Shin beschreibt ausführlich die Herstellung, aber leider nur eine sehr einfache Charakterisierung der grundlegendsten Eigenschaften von TiO_2 . Dieses Material ist zwar häufig in der Literatur erwähnt, jedoch ist es nie eingehend analysiert worden [201].

Palladiumoxid

Palladiumoxid PdO weist laut Literatur sehr gute Eigenschaften als Material für die pH-Messung auf [198, 204]. PdO war zunächst eigens für die pH-Messung von Blut erforscht worden und bot eine sehr lange Lebensdauer. Es muss dafür aber speziell beschichtet werden, um sich in Cl -haltigen Lösungen nicht aufzulösen. Darüber hinaus treten aber immer noch störende Redoxinterferenzen auf [198]. Aktuell wird aber dieses Material dennoch eingehend untersucht [197].

Rutheniumoxid

Rutheniumoxid-Elektroden (RuO_2) zeigen ein annähernd Nernst'sches Verhalten in einem großen pH Bereich. RuO_2 ist allerdings Alterungserscheinungen unterworfen und zeigt insbesondere bei Dickschicht-Ausführung ein leichtes Driften [205]. Wird es allerdings in Dünnschicht-Verfahren hergestellt, zeigt es sehr gute Eigenschaften. Es wurde eine Empfindlichkeit von $61,5mV/pH$ über einen Bereich von $pH2$ bis $pH12$ beobachtet [206].

Iridiumoxid

Iridiumoxid (IrO_2) ist in der Literatur als Material mit den besten Eigenschaften für die pH-Messung erwiesen. Es ermöglicht eine sehr genaue, schnelle und stabile Messung über einen sehr großen pH-Bereich von $pH1$ bis $pH13$. Diese Eigenschaften besitzt es auch bei höheren Temperaturen bis etwa $250^\circ C$ und unter hohem Druck bis $270bar$, sowie in aggressiven Medien. Die Meßergebnisse sind sehr

stabil und weitgehend kalibrierungsfrei. Die Standzeit beträgt einige Jahre. Außerdem gewähren Elektroden bzw. ISFETs auf *Ir*-Basis schnelle Messungen auch bei sehr kleinen pH-Änderungen, sind vergleichsweise robust und können gut in Proben geringer Mengen angewendet werden [198,200,207–209]. Obwohl die Eigenschaften von Iridiumoxid sehr vielversprechend aussehen, hängen seine besonderen Qualitäten von den genauen Herstellungsprozessen ab. Insbesondere die Art der Oxidation spielt eine große Rolle [198]. Da pH-Elektroden auf der Basis von Iridiumoxid Gegenstand der überwiegenden Forschungen in diesem Gebiet sind, ist auch der Versuch zur Erklärung der Wirkungsweise der Potentialentstehung meist auf das Material Iridiumoxid beschränkt.

Die obige Auflistung gibt einen Überblick über die wichtigsten und in der Literatur am häufigsten aufgeführten Metalloxide für den Einsatz in pH-Sensoren. Bis auf wenige Ausnahmen, die grundlegende ionensensitive Materialien beschreiben, ist der überwiegende Teil der Literatur nach dem Jahr 2000 angefertigt. Dies unterstreicht den aktuellen Charakter der Thematik und die Bedeutung für die heutige pH-Sensorik.

4.1.2 Grundlegende Herstellungsverfahren

Die Ausführungen von Metalloxiden für die pH-Messung werden in der Literatur weitgehend mit zwei verschiedenen Vorgehensweisen beschrieben:

- Aufbringen des Metalloxids auf geeignete Träger wie zum Beispiel Karbonfasern, Iridium- oder Golddraht, zur Herstellung von Elektroden bzw. Meßsonden. Mit diesem Prinzip lassen sich relativ kleine Elektroden bis zur minimalen Abmessung von etwa 770nm herstellen [210].
- Nutzung von Feldeffekttransistor-Technologie zur Herstellung von ISFETs. Auf dem Silizium-Gate werden als ionensensitive Schichten Metalloxide aufgebracht. ISFETs finden vor allem Anwendung in der lab-on-chip-Technologie und sind durch den aktuellen Stand der Halbleiterherstellung bereits heute höchst miniaturisierbar [60, 83, 209]

Das erstere Prinzip wird bei diskreten Sensoren oder bei Meßsonden für so genannte elektrochemische Rasterelektronenmikroskope (SECM) angewandt und besteht aus der Abfolge folgender Prozeßschritte: Es werden Karbonfasern von $7,5\mu\text{m}$ Durchmesser mit Iridiumoxid beschichtet und in eine ausgezogene Glaskapillare eingefast um eine Optimierung hinsichtlich ihrer Schwingungseigenschaften zu erreichen. Die Karbonfaser wird mit einem Elektrottauchlack isoliert und eine Stelle freigemacht, die die aktive Sonde darstellt. Die Karbonfaser ragt aus ihrer Glasummantelung heraus, damit die Eigenfrequenz der Faser eingestellt werden kann. Nur durch mikroskopisch genaue Positionierung im SECM mit Scherkraft-abhängiger Höhenkontrolle kann die Sonde an die Probe geführt werden. Dieses Verfahren ermöglicht eine sehr genaue räumliche Auflösung der pH-Messung [207].

Eine weitere Möglichkeit ähnlichen Prinzips besteht in der Herstellung von Iridiumdrähten mit einer aufgewachsenen, dichten und homogenen Ceroxidschicht. Wang und Yao beschreiben den Vorgang mit folgenden Prozeßschritten: Der Draht wird in geschmolzenes alkalisches Metall-Carbonat unter hohen Temperaturen gegeben. Dort dringen Ionen aus dem Alkalimetall in das Oxid. Das resultierende Oxid ist äußerst stabil und wird anschließend in einem Säurebad behandelt, um die Oxidschicht zu hydratisieren. Es entsteht demnach $\text{Li}_{0,86}\text{IrO}_{2,34}(\text{OH})_{0,76} \cdot 0,39\text{H}_2\text{O}$. Diese Verbindung weist alle positiven Eigenschaften von Iridiumoxiden auf. Vor allem ist das Ergebnis frei von Drift [208,210].

Entscheidend für die Genauigkeit der pH-Messung ist die genaue Herstellungstechnologie und die damit verbundenen Umwelteinflüsse. Diese Faktoren spielen auch beim zweiten Verfahren, dem Aufbringen von Metalloxiden als ionensensitive Schichten bei ISFETs, eine große Rolle. Letztendlich ist hier besonders die genaue chemische Zusammensetzung, der Hydratisierungs- und Oxidationsgrad,

die chemische Stabilität sowie die Art der Mikrostrukturierung ausschlaggebend. Dem genauen Ablauf der Oxidation kommt im Herstellungsprozeß also eine Schlüsselrolle zu [198, 200, 211]. Zunächst seien hier verschiedene Arten der Herstellung bzw. Aufbringung von Metalloxiden gezeigt, die direkt auf dem Träger hergestellt werden, oder auch in Form von vorgefertigten Metalloxidschichten befestigt werden können. Für das Beispiel Iridium lassen sich so genannte iridium oxide films (IROF) generell folgendermaßen herstellen [198, 200, 211]:

- Elektrochemische Deposition (AIROF = anodic IROF): häufigstes Verfahren, bei dem Iridiumoxid aus Iridiumelektroden oxidiert wird.
- Deposition durch reaktive Sputterprozesse (SIROF) auf verschiedene Substrate unter Verwendung von Sauerstoff-Plasma
- Elektrodeposition
- Thermische Dekomposition und Deposition
- Einmischen von IrO_2 in eine bestehende Inertialmatrix

Da es aber für alle der oben genannten Verfahren keine universellen Methoden gibt, sondern in der Literatur nur von jeweils sehr speziellen Versuchen und Anwendungen berichtet wird, wird im Folgenden ein Überblick über einige ausgewählte Verfahren und Versuche gegeben.

4.1.3 Spezielle Herstellungsverfahren

1995 zeigten Kreider et al. ein Verfahren zum Sputtern von Pt-, Pd-, Ru- und Ir-Oxiden. Das Oxid wurde von 5cm starken Metallplatten reaktiv aufgesputtert. Die hochreinen Metalle wurden beim Sputtern unter bestimmten Sauerstoff/Argon-Atmosphären gehalten und der Druck von zunächst 0,35Pa auf $2 - 4 \cdot 10^{-4} Pa$ reduziert. Einkristalline Siliziumwafer sowie hochreines Al_2O_3 wurden als Trägersubstrate verwendet. Auf die Dicke der Oxidschicht wurde über den Zugewinn an Gewicht der Oxidschicht rückgeschlossen. Die auf diese Weise hergestellten Oxide wurden mit diversen Meßverfahren genauer untersucht. Bei der Herstellung von Meßsonden für das SECM hat dieses Verfahren allerdings den Nachteil, daß das Sputtern nicht auf die Meßsondenspitze beschränkt werden kann und somit eine größere Elektrode entsteht als gewünscht [197, 211].

Wang, Yao und Madou beschrieben 2002 die Entwicklung einer langzeitstabilen, mit Iridiumoxid beschichteten Iridiumdraht-Elektrode durch chemische Oxidation. Sie benutzten hochreinen Iridiumdraht mit 0,127mm bzw. 0,25mm, sowie Golddraht mit 0,10mm bzw. 0,25mm Durchmesser. Für die Salzlösung, in der die Drähte oxidiert wurden, verwendeten sie Li_2CO_3 . Vorher wurden sämtliche Drähte in 6M HCl ultraschallgereinigt und in entionisiertes Wasser gegeben. Die so gereinigten Drähte wurden in einen Aluminiumtiegel gebracht, welcher mit Goldfolie ausgekleidet wurde und mit Li_2CO_3 -Puder bedeckt. Fünf Stunden lang wurde bei 870°C und Luftatmosphäre der Oxidationsvorgang durchgeführt. Die Li_2CO_3 -Schmelze dekomponierte bei dieser Temperatur zunächst nur schlecht. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur löste sich dann der feste Kohlenstoff im Schmelztiegel in verdünnter HCl-Lösung auf. Die oxidierten Drähte wurden anschließend erneut mit entionisiertem Wasser abgespült und schließlich bei 120°C mehrere Stunden getrocknet. So entstand eine gleichmäßige, dicke, tiefschwarze Oxidschicht auf dem Iridiumdraht mit den entsprechenden Eigenschaften [208].

Wang, Yao und Madou beschreiben ebenfalls in einer früheren Veröffentlichung von 2001 eine Methode für AIROF, bei der der IROF auf eine Iridiumelektrode aufgewachsen wird. Dies geschieht, indem das Elektrodenpotential zyklisch zwischen den entsprechenden Potentialen für die H_2 - und O_2 -Abspaltung gewechselt wird. Dies entspricht dem Verfahren der zyklischen Voltammetrie. Die

verwendeten Potentiale liegen typischer Weise zwischen $-0,25V$ und $+1,25V$ gegenüber der Referenzelektrode in $0,5M H_2SO_4$. Auf diese Weise entsteht ebenfalls ein dicker Iridiumoxidfilm. Im Gegensatz zu Metallen wie Pt, Ru, Ni und Fe, ist bei Ir zwingende Voraussetzung für das Wachsen des Oxids, daß bestimmte Schwellenspannungen nach unten und oben überschritten werden. Dieses Verfahren wird als AIROF bezeichnet und wird sehr detailliert geschildert [198].

Ein Versuchsbericht zur zyklischen Voltammetrie wurde auch 1998 von Baur und Spaine veröffentlicht. Darin wurde dieses Verfahren verwendet, um Iridiumoxid auf gläserne Karbon-Elektroden aufzubringen. Zur Herstellung von Iridiumoxidfilmen wird unter anderem $IrCl_3$ an Titan bei $400-500^\circ C$ thermisch dekomponiert. Die Elektrode wurde in gelöstes $IrCl_3$ oder Isopropanol getaucht bevor die Hitzebehandlung erfolgte. Eine hellblaue Ablagerung von Iridiumoxid entsteht nach ca. 10 bis 20 Zyklen des Potentialwechsels von $-0,3V$ nach $+1,0V$. Die Elektroden, welche mit diesem kostengünstigen Verfahren hergestellt wurden, haben eine Größe von $10m$ und kleiner [211]. Auch wurden in der gleichen Veröffentlichung Sputterprozesse auf verschiedene Substrate beschrieben. Weiter wurde die Möglichkeit betrachtet, IrO_2 in eine bestehende Inertialmatrix einzubetten. Dieses Verfahren hat sich offensichtlich nicht bewährt [206].

1997 wurde von Cané et al. eine Zusammenfassung der Technologien zur ISFET-Herstellung veröffentlicht. Unter anderem sind hier die Kompatibilität verschiedener Prozesse, Mittel und Materialien, auch ionensensitiver Schichten, mit der Standard CMOS-Technologie aufgeführt [212].

Hendrikse et al. veröffentlichte 1998 eine Methode, die Auswirkungen von Sauerstoff-bedingten Driften in ISFETs einzuschränken. Sie stellten die Driftabhängigkeit zunächst wie folgt dar: Elektrochemisch aktive Substanzen, z.B. Sauerstoff, die sich in einer Lösung befinden, beeinflussen die Konzentrationen des Metalloxids und des hydratisierten Metalloxids. Dies wiederum führt zu einer Veränderung der elektrochemischen Verhältnisse. Diese Veränderung äußert sich in einer Drift des Potentials. Dies wurde als eine von zwei möglichen Arten von Drift beschrieben. Die zweite scheint bisher noch nicht ganz klar zu sein, es könnte sich aber laut Literatur um eine Folge von langsam reagierenden Verunreinigungen kleinster Mengen handeln [209].

4.2 Theorie der Potentialentstehung

In Kapitel 3.4.3 und 3.4.4 wurde bereits betrachtet, daß der Meßeffect bei ISFET und LAPS auf einer pH-abhängigen Potentialentstehung an ionensensitiven Schichten beruht. Diese Potentialausbildung soll bei den in dieser Arbeit betrachteten Metalloxiden direkt durch hochohmige Meßaufnehmer erfaßt werden. Der genaue Mechanismus oder sehr viel wahrscheinlicher die Mechanismen der Potentialentstehung sind bis zum heutigen Tage nicht exakt geklärt. Jedoch wurden zum besseren Verständnis Modelle der Potentialentstehung an der Grenzschicht zwischen Elektrolyt und ionensensitiver Schicht entwickelt [175, 213, 214]. Zwar wurden diese Modelle meist für Anwendungen mit dem ISFET erstellt, soweit sie aber elektrochemische Reaktionen mit Oxiden behandeln, können sie für Metalloxide uneingeschränkt übernommen werden und werden im Folgenden genauer betrachtet.

4.2.1 Das Site-Binding-Modell für Oxide

Das am häufigsten zur Erklärung der Mechanismen des pH-abhängigen Potentials verwendete Modell ist das so genannte Site-Binding-Modell. Speziell für die Oxide SiO_2 und Al_2O_3 wurde es erstmals entwickelt [175, 214]. Die Gültigkeit des Modells läßt sich prinzipiell aber auf alle Oxide erweitern.

Nahezu alle Metalloxide haben isolierenden Charakter. Es entspricht also einem Dielektrikum im Elektrolyten. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich bei der Potentialentstehung um Wechselwirkungen von Ionen im Elektrolyten mit der Oberfläche des Metalloxids handeln muß. Es wird angenommen,

daß sich an der Oberfläche des Metalloxids eine diskrete Anzahl von amphoteren $Me - OH$ -Gruppen befindet. Dieser Bindungszustand kann also als Protonen-Donator oder -Akzeptor wirken. Me steht hierbei für die Metallatome des jeweiligen Metalloxids. Die amphoteren $Me - OH$ -Gruppen stehen in einem Reaktionsgleichgewicht mit den H^+ -Ionen im Elektrolyten. Die H^+ -Ionen selbst stehen mit den OH^- -Ionen in Beziehung. Diese Beziehung ist gekennzeichnet durch das Ionenprodukt des Wassers $K_W = c_{H^+} \cdot c_{OH^-}$ (siehe Kapitel 3.1.1). Neben den amphoteren $Me - OH$ -Gruppen befinden sich weitere zwei Oberflächenverbindungen, $Me - O^-$ und $Me - OH_2^+$ an der Metalloxydoberfläche. Diese Oberflächenverbindungen entsprechen den Zuständen basisch, sauer und neutral, also amphoter. Je nach pH-Wert des Elektrolyten können diese Oberflächenverbindungen protoniert oder deprotoniert vorliegen und somit unterschiedliche Ladungszustände auftreten. Abbildung 4.1 zeigt die schematische Darstellung der drei möglichen Oberflächenverbindungen an der Elektrolyt-Metalloxid-Grenzfläche.

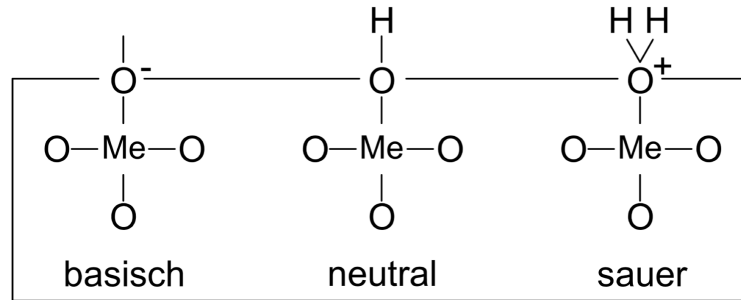


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der möglichen Oberflächenverbindungen an der Metalloxydoberfläche

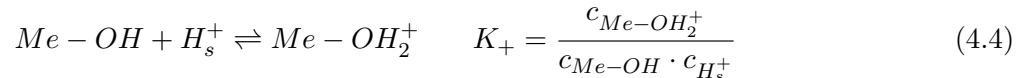
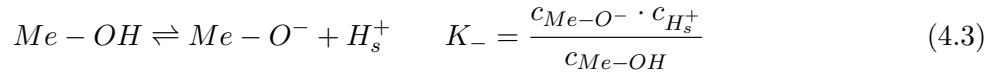
Die Gesamtdichte der Verbindungen an der Oberfläche des Metalloxids ist gekennzeichnet durch die materialabhängige Konstante N_{MeOx} :

$$N_{MeOx} = c_{Me-O^-} + c_{Me-OH} + c_{Me-OH_2^+} \quad (4.1)$$

Für die Ladungsdichte an der Metalloxydoberfläche gilt:

$$\sigma_{MeOx} = q(-c_{Me-O^-} + c_{Me-OH_2^+}) \quad (4.2)$$

An der Grenzfläche zwischen Metalloxid und Elektrolyt stellen sich nun zwei Reaktionsgleichgewichte ein [171]:



Dabei entspricht $c_{H_s^+}$ der H^+ -Ionenkonzentration direkt an der Grenzfläche Metalloxid-Elektrolyt. Der basische oder saure Charakter der neutralen $Me - OH$ -Gruppe wird durch die Gleichgewichtskonstanten K_+ und K_- ausgedrückt.

Wird für den Zusammenhang zwischen $c_{H_s^+}$ und der H^+ -Konzentration im Elektrolyten c_{H^+} eine Boltzmannverteilung angenommen, so ergibt sich:

$$c_{H^+} = c_{H_s^+} e^{-\frac{q}{kT}(\psi_{MeOx} - \psi_{El})} = c_{H_s^+} e^{-\frac{q}{kT}(\psi_{MeOxEl})} \quad (4.5)$$

ψ_{MeOx} und ψ_{El} entsprechen dabei dem Potential an der Metalloxydoberfläche und dem Potential des Elektrolyten.

Die Beziehung zwischen dem pH-Wert der Elektrolytlösung und den Parametern Potential an der Metalloxid-Isolator-Schnittstelle ψ_{MeOxEl} und Oberflächenladungsdichte σ_{MeOx} kann aus den Gleichungen 4.1 bis 4.5 hergeleitet werden. Dazu werden aus Gründen der Vereinfachung die Exponentialfunktionen mit Hilfe der Umkehrfunktionen der hyperbolischen Sinus- und Kosinusfunktion ausgedrückt. Dadurch ergibt sich [215]:

$$-2,303pH = \frac{q\psi_{MeOxEl}}{kT} + \coth^{-1}\left(\frac{qN_{MeOx}}{\sigma_{MeOx}}\right) + \operatorname{arsinh}\left(\frac{1}{4K_-K_+ \left(\left(\frac{qN_{MeOx}}{\sigma_{MeOx}}\right)^2 - 1\right)}\right) \quad (4.6)$$

Die Oberflächenladungsdichte σ_{MeOx} ist abhängig vom Potential an der Metalloxidoberfläche ψ_{MeOx} . Dabei werden vorerst Ladungen innerhalb des Metalloxids und Reaktionen an der Grenzfläche zwischen Metalloxid und zur Potentialableitung benötigtem Metallkontakt vernachlässigt, da ihr Einfluß auf die pH-Empfindlichkeit im Vergleich zur Ladungsdichte σ_{MeOx} sehr gering ist.

Im Elektrolyten bildet sich an der Elektrolyt-Metalloxid-Grenzfläche eine Doppelschicht aus. Dieser Effekt wurde für Metalle bereits in Kapitel 3.2.2 betrachtet. Sie besteht aus einer starren Schicht, die sich von der Metalloxidoberfläche bis zur äußeren Helmholtzfläche (ÄHS) ausdehnt. Innerhalb dieser Schicht kann man zwei Schichten unterscheiden. An der Metalloxidoberfläche sind die amphoteren Gruppen von $Me - OH$ mit der Ladungsdichte σ_{MeOx} und dem Potential ψ_{MeOx} lokalisiert. Dabei wird die Ladungsdichte σ_{MeOx} durch die chemischen Wechselwirkungen der amphoteren $Me - OH$ Gruppen an der Metalloxidoberfläche mit den potentialbestimmenden H^+ -Ionen beeinflusst. Direkt an diese Schicht anschließend folgt die so genannte innere Helmholtzschicht (IHS). Diese besteht aus adsorbierten Gegenionen aus dem Elektrolyten in dichtem Abstand an der Oberfläche. Diese können z.B. Na^+ - oder Cl^- -Ionen sein. Ihr Einfluß auf das Potential ψ_{MeOx} wird im weiteren Verlauf noch in das Site-Binding-Modell mit einbezogen. Die äußere Helmholtzschicht entspricht somit dem minimalen Abstand hydratisierter Ionen aus dem Elektrolyten zur Metalloxidoberfläche. Sie beträgt in der Regel etwa $0,5nm$ [216]. An die ÄHS schließt sich ein diffuser Teil der Doppelschicht an. Dieser diffuse Teil besteht aus hydratisierten Ionen der Ladungsdichte σ_d und dem Potential ψ_d . Seine Ausdehnung wird durch die so genannte Debyelänge l_D charakterisiert. Der Potentialverlauf in dieser diffusen Schicht kann mit Hilfe der von Gouy und Chapman entwickelten Theorie beschrieben werden [159, 178, 215]. Für den Fall, daß $\psi_{Eld} = \psi_{El} - \psi_d \ll \frac{RT}{F}$ nur kleine Werte annimmt, läßt sich vereinfacht schreiben:

$$\psi_{Ex}(x) = \psi_{Eld}(0)e^{-\frac{x}{l_D}} \quad \text{mit} \quad l_D = \frac{1}{F} \sqrt{\frac{\epsilon_{El}RT}{2c_{El}}} \quad (4.7)$$

$\psi_{Ex}(x)$ entspricht dabei dem Potential bezüglich des Elektrolytpotentials im Abstand x . ψ_{Eld} beschreibt den Spannungsabfall über die gesamte diffuse Schicht. ψ_{Eld} wird auch als Zetapotential bezeichnet. ϵ_{El} und c_{El} stellen die Dielektrizitätskonstante und die Ionenkonzentration des Elektrolyten dar. Mit Hilfe der Debyelänge l_D kann bestimmt werden, in welcher Entfernung zum Ursprung des Potentials das elektrostatische Potential auf $\frac{1}{e}$ des Ursprungswertes abgefallen ist. Für die Debyelänge l_D kann bei einer Temperatur von $25^\circ C$ und einer Elektrolytkonzentration von $0,1M$ etwa der Wert 1 angenommen werden.

Die Flächenladungsdichte σ_d läßt sich nach der Theorie von Gouy und Chapman zur diffusen Doppelschicht eines 1:1-wertigen Elektrolyten berechnen [214, 215, 217]:

$$\sigma_d = -\sqrt{8\epsilon_{El}kTc_{El}} \sinh\left(\frac{q\psi_{Eld}}{2kT}\right) \quad (4.8)$$

Ist σ_M die Flächenladungsdichte des Metallkontakts, gilt für die Gesamtladungsbilanz:

$$\sigma_d + \sigma_{MeOx} + \sigma_M = 0 \quad (4.9)$$

Wird die starre Doppelschicht als Kondensator mit der Kapazität C_{sD} angesehen, so folgt weiter:

$$\psi_{MeOxd} = \psi_{MeOx} - \psi_d = -\frac{\sigma_d}{C_{sD}} \quad (4.10)$$

Somit erhält man für ψ_{MeOxEl} durch gegenseitiges Einsetzen:

$$\begin{aligned} \psi_{MeOxEl} = \psi_{MeOxd} + \psi_{Eld} &= -\frac{\sigma_d}{C_{sD}} + 2\frac{kT}{q} \operatorname{arsinh}\left(\frac{-\sigma_d}{\sqrt{8\epsilon_{El}kTc_{El}}}\right) = \\ &= \frac{\sigma_{MeOx} + \sigma_M}{C_{sD}} + 2\frac{kT}{q} \operatorname{arsinh}\left(\frac{\sigma_{MeOx} + \sigma_M}{\sqrt{8\epsilon_{El}kTc_{El}}}\right) \end{aligned} \quad (4.11)$$

Die Sensitivitätsfunktion $\psi_{MeOxEl}(pH)$ kann nun aus den Gleichungen 4.8 und 4.11 abgeleitet werden. Unter Berücksichtigung, daß $q^{-1}\sigma_M$ und $q^{-1}\sigma_{MeOx}$ in der Regel viel kleiner als N_{MeOx} sind, läßt sich die Sensitivitätsfunktion vereinfachen. In der Regel ist σ_M kleiner als $5 \cdot 10^{-8} C/cm^2$. Dies entspricht einer Teilchendichte von kleiner $3 \cdot 10^{11}/cm^2$ [178]. σ_{MeOx} liegt etwa bei $2 \cdot 10^{-7} C/cm^2$ pro $10mV$ -Änderung von ψ_{MeOxEl} . In der Nähe des so genannten "Point of Zero Charge" pH-Wertes (pH_{pzc}) ist σ_{MeOx} relativ zu qN_{MeOx} sehr klein. Dadurch ist es möglich, die arsinh -Funktion durch das Argument zu ersetzen [218]. Am pH_{pzc} ist die Flächenladung $\sigma_{MeOx} = 0$. Wird in Meßlösungen die Ionenkonzentration c_{El} größer als $0,1M$, so wird die diffuse Schicht derart schmal, daß der Spannungsabfall ψ_{Eld} angenähert wie bei einem Plattenkondensator berechnet werden kann. Damit läßt sich Gleichung 4.11 in vereinfachter Form schreiben:

$$\psi_{MeOxEl} = \psi_{MeOxd} + \psi_{Eld} \approx \frac{\sigma_{MeOx} + \sigma_M}{C_{sD}} + 2\frac{kT}{q} \left(\frac{\sigma_{MeOx} + \sigma_M}{\sqrt{8\epsilon_{El}kTc_{El}}}\right) = \frac{\sigma_{MeOx} + \sigma_M}{C_{DL}} \quad (4.12)$$

$$\frac{1}{C_{DL}} = \frac{1}{C_d} + \frac{1}{C_{sD}} \quad (4.13)$$

$$C_d = \frac{q\sqrt{2\epsilon_{El}kTc_{El}}}{kT} \quad (4.14)$$

Für Gleichung 4.6 ergibt sich nun [215]:

$$-2,303pH = \frac{q\psi_{MeOxEl}}{kT} + \operatorname{arsinh} \frac{\psi_{MeOxEl}C_{DL} - \sigma_M}{qN_{MeOx}\sqrt{4K_-K_+}} \quad (4.15)$$

Gleichung 4.15 stellt einen analytischen Ausdruck für die Sensitivitätsfunktion $\psi_{MeOxEl}(pH)$ dar. Ihr Anstieg $\frac{d\psi_{MeOxEl}}{dpH}$ ist nichtlinear und kleiner als die Nernst'sche Sensitivitätsfunktion.

Stellt sich ein Oberflächenpotential von $\psi_{MeOxEl} = 0$ und die Oberflächenladung $\sigma_{MeOx} = 0$ ein, wird die Wasserstoffionenkonzentration im Elektrolyten zu $c_{H^+} = \sqrt{\frac{K_-}{K_+}}$. Diese Konzentration entspricht einen bestimmten pH-Wert. Dieser Wert wird wie oben bereits erwähnt als pH_{pzc} bezeichnet. Er berechnet sich aus den Gleichgewichtskonstanten [219]:

$$pH_{pzc} = \frac{1}{2}(pK_- - pK_+) \quad (4.16)$$

$$pK^- = -\log K_- \quad (4.17)$$

$$pK^+ = -\log K_+ \quad (4.18)$$

Da bei diesem pH-Wert $\sigma_{MeOx} = 0$ ist, ist folglich der Ausdruck $\psi_{MeOxEl}C_{DL} - \sigma_M = \sigma_{MeOx} \ll 1$ bei Werten um pH_{pzc} . Für diesen Bereich läßt sich Gleichung 4.15 schreiben als:

$$\psi_{MeOxEl} = -2,303pH \frac{kT}{q} \frac{\beta}{\beta + 1} + \frac{\sigma_M}{C_{DL}(\beta + 1)} \quad (4.19)$$

β wird als Sensitivitätsparameter bezeichnet [220]:

$$\frac{1}{\beta} = \frac{kT}{q} \frac{C_{DL}}{N_{MeOx} \sqrt{4K_- K_+}} \quad (4.20)$$

Die Parameter N_{MeOx} , K_- und K_+ sind dabei Materialkonstanten [221]. Die pH-Sensitivität des Metalloxids ist abhängig von dem Sensitivitätsparameter β . Je größer β ist, desto besser zeigt das Metalloxid Nernst'sches Verhalten. β hängt direkt mit dem Produkt $K_- K_+$ zusammen. Je größer das Produkt $K_- K_+$ ist, also je kleiner die Summe $\Delta pK = pK_- + pK_+$ ist, desto größer ist β . Abbildung 4.2 zeigt den theoretischen Verlauf von ψ_{MeOxEI} für verschiedene ΔpK .

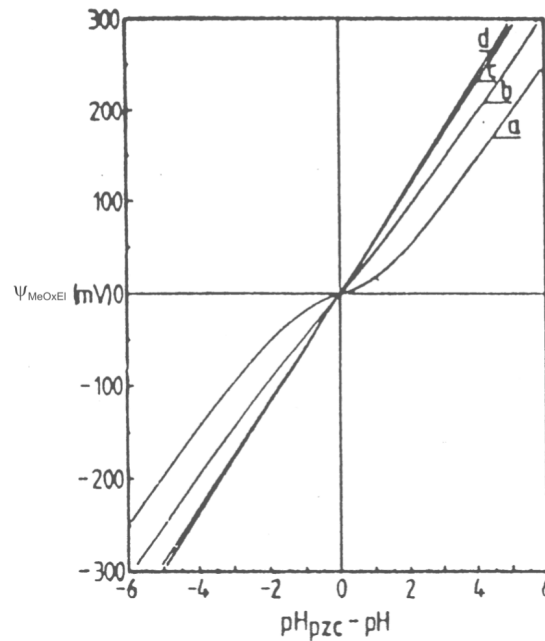


Abbildung 4.2: Theoretischer Verlauf von ψ_{MeOxEI} als Funktion von $pH_{pzc} - pH$ für verschiedene ΔpK (Parameter: $N_{MeOx} = 8 \cdot 10^{14} \text{cm}^{-2}$; $C_{DL} = 20 \mu\text{Fcm}^{-2}$; $T = 300\text{K}$; a: $\Delta pK = 6$, $\beta = 0,49$; b: $\Delta pK = 4$, $\beta = 4,9$; c: $\Delta pK = 2$, $\beta = 49$; d: ideales Nernst'sches Verhalten, nach [220])

4.2.2 Zusammenfassung

Der Sensitivitätsparameter β ist wie bereits K ein Maß für die Reaktivität. Für $\beta \gg 1$ geht Gleichung 4.19 in die Nernst-Gleichung über. Damit sagt das Site-Binding-Modell aus, daß je höher die Reaktivität eines Metalloxids ist, desto mehr erhält man ein Nernst'sches Verhalten. Für Metalloxide geringerer Reaktivität erhält man Abweichungen vom Nernst'schen Verhalten. Bei der Herleitung des Site-Binding-Modells wurden dabei folgende Vereinfachungen angenommen:

- Die Doppelschichtkapazität C_{DL} wurde durch das Kondensatormodell linearisiert. Der dadurch resultierende Fehler ist nur bei geringer Elektrolytkonzentration relevant. Für standardmäßig verwendete Pufferlösungen und Zellkulturmedien kann dieser Fehler vernachlässigt werden [177].
- Die im Metalloxid vorhandenen Ladungen wurden bei der aufgestellten Ladungsbilanz vernachlässigt. Der prozentuale Anteil dieser, im Metalloxid befindlichen Ladungen, beträgt weniger als 1% der Ladungen an der Metalloxidoberfläche. Dadurch sind die Auswirkungen dieses Fehlers auf das Meßergebnis zu vernachlässigen [222, 223].

Zusammenfassend läßt sich für die Güte eines Metalloxids sagen, daß die pH-Sensitivität umso besser ist,

- je größer die Dichte der amphoteren Oberflächengruppen N_{MeOx}
- je kleiner die Ionenkonzentration des Elektrolyten
- je größer das Produkt K_-K_+ , bzw. je kleiner die Summe $\Delta pK = pK_- + pK_+$, ist.

4.2.3 Einfluß weiterer Elektrolyt-Ionen auf das Site-Binding-Modell

Bisher wurden nur Wechselwirkungen der Metalloxydoberfläche mit H^+ - bzw. OH^- -Ionen als potentialbestimmende Faktoren betrachtet. Anlagerung und chemische Reaktionen mit anderen Ionen aus dem Elektrolyten wurden bisher vernachlässigt. Diese müssen für eine genaue Betrachtung berücksichtigt werden [176, 178].

Ist der Elektrolyt z.B. eine $NaCl$ -Lösung, lagern sich Na^+ -Ionen an die $Me - O^-$ -Gruppen und entsprechend die Cl^- -Ionen an die $Me - OH_2^+$ an. Der Abstand zwischen diesen adsorbierten Ionen und der Metalloxydoberfläche in der inneren Helmholtzschicht beträgt zwischen 0,1 und 0,15 nm [176, 216]. Die hydratisierten Ionen des $NaCl$ liegen in der äußeren Helmholtzschicht. Dadurch läßt sich die starre Doppelschicht in zwei Teile aufspalten. Diese Teile haben die Kapazitäten C_1 und C_2 , sowie die zusätzliche Ladungsdichte σ_β . Abbildung 4.3 zeigt die Ladungsverteilung und den Potentialverlauf an einer Elektrolyt/Metalloxyd/Metall-Grenzschicht für die pH-Bereiche $pH < pH_{pzc}$ und $pH > pH_{pzc}$. Die Anlagerung der Ionen ist dabei vom pH-Wert abhängig. Für den pH-Bereich $pH > pH_{pzc}$ ist $\sigma_{MeOx} < 0$ und für die Ladungsdichte σ_β gilt aufgrund der Anlagerung der Gegenionen an der Metalloxydoberfläche entsprechend $\sigma_\beta > 0$.

Nach Bousse wird zwischen dem Abstand der Cl^- - und dem Abstand der Na^+ -Ionen von der Metalloxydoberfläche unterschieden [224]. Für andere Arten von Ionen, wie z.B. Li^+ oder K^+ , kommen nach Davis ebenfalls unterschiedliche Kapazitäten zum tragen [217]. Werte für C_1 liegen zwischen 50–140 $\mu F/cm^2$ und für C_2 bei etwa 20 $\mu F/cm^2$ [176, 214, 217]. Für die jeweiligen Gleichgewichtskonstanten der Wechselwirkung von Na^+ und Cl^- mit der Metalloxydoberfläche gelten folgende Beziehungen:

$$K_- = \frac{c_{Me-O^-} \cdot c_{Na_s^+}}{c_{MeO^- - Na^+}} \quad (4.21)$$

$$K_+ = \frac{c_{Me-OH_2^+} \cdot c_{Cl_s^-}}{c_{MeOH_2^+ - Cl^-}} \quad (4.22)$$

Bei sehr kleinen Elektrolytkonzentrationen haben unterschiedliche Werte von C_1 keinen Einfluß auf das Potential ψ_{MeOxEl} . Die Herleitung des Potentials über die Boltzmannverteilung mit Hilfe der Verbindung von Oberflächenkonzentration mit den Konzentrationen im Elektrolyten erfolgt analog zum Vorgehen in Kapitel 4.2.1. Hierbei läßt sich allerdings kein geschlossener analytischer Ausdruck mehr angeben. Die Berechnung erfolgt in der Regel mit Hilfe numerischer Methoden [176, 222, 224].

4.2.4 Störeffekte

Das in Kapitel 4.2.1 betrachtete Verhalten von Metalloxiden ist im Site-Binding-Modell idealisiert. In der Praxis führen nichtideale Eigenschaften der Metalloxide zu Störeffekten. Einige Effekte lassen sich durch entsprechende Verfahren minimieren. Andere führen unweigerlich zu Fehlern in den Meßergebnissen. Nachfolgend sind die wichtigsten Effekte näher erläutert.

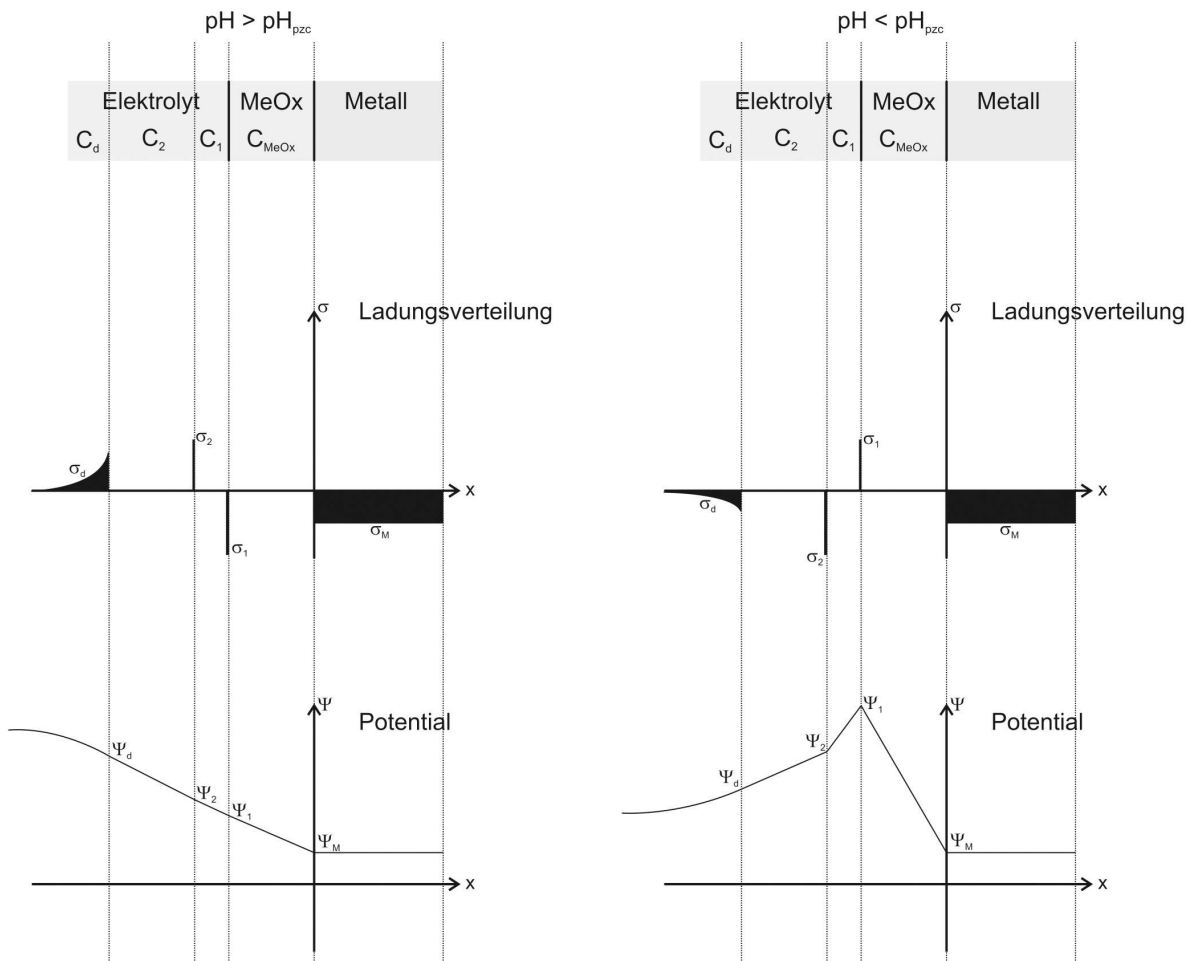


Abbildung 4.3: Ladungsverteilung und die Potentialverlauf an einer Elektrolyt/Metalloxid/Metall-Grenzschicht für die pH-Werte $pH > pH_{pzc}$ und $pH < pH_{pzc}$

Drift

Ein Störeffekt auf den Sensor ist die zeitliche Änderung des Sensorsignals ohne das sich der zu messende Parameter, hier der pH-Wert, ändert. Dieser Effekt wird als Drift bezeichnet. Dabei werden Drift-raten, die pH-Änderungen durch den Meßaufbau, z.B. durch teilweise Verdunstung der Meßlösung erzeugen, hier nicht betrachtet. Vielmehr sind pH-unabhängige Veränderungen des Sensorsignals von Bedeutung. Die Signaldrift läßt sich in der Regel in mehrere Phasen unterteilen. Für den ordnungsgemäßen Betrieb des Sensors sind dabei die Phase nach dem ersten Kontakt mit dem flüssigen Meßmedium und die Drift bei sehr langen Meßzeiten, die so genannte Langzeitdrift, von Bedeutung. Die Ursachen der Drift bei Metalloxiden sind vielfältig und bis zum heutigen Tage nicht genau erklärt. Eine der Ursachen ist sicherlich die Hydratisierung des Metalloxids, die in den verschiedenen Phasen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Aber auch die Bildung von Buried States und die Auflösung des Metalloxids durch elektrochemische Reaktionen spielen eine Rolle [225].

Ein weiterer, der Drift nicht unähnlicher Effekt, ist die endliche Geschwindigkeit von Signalantworten auf Änderungen des zu messenden Parameters. Hier wird zwischen zwei Zeitspannen unterschieden.

Die Ansprechzeit beschreibt die Zeit, in der das Sensorsignal 90% des theoretischen Wertes erreicht. Dieses schnelle Ansprechverhalten wird im Site-Binding-Modell mit der Reaktionsgeschwindigkeit der

Oberflächengruppen des Metalloxids mit den Wasserstoffionen erklärt [226].

Als Einschwingzeit wird die Zeit bezeichnet, in der das Sensorsignal 100% des theoretischen Werts erreicht. Diese Zeit ist in der Regel bedeutend länger als die Ansprechzeit. Diese langsamere Signaländerung kann mit reaktiven Gruppen nahe der Metalloxydoberfläche erklärt werden. Die Einschwingzeit ist in der Regel vom pH-Wert der Meßlösung und von der Temperatur abhängig [227].

Hydratisierung des Metalloxids

Die Hydratisierung der Oberfläche des Metalloxids ist zurückzuführen auf einen Transport von Ionen des Elektrolyten durch Fehlstellen und Versetzungen. Dies wird auch als dispersiver Transport bezeichnet und in [228] für Siliziumnitrid erklärt. Prinzipiell läßt sich diese Erklärung auch auf Metalloxide anwenden. Der dispersive Transport kann durch das zeitabhängige Diffusionsgesetz beschrieben werden:

$$D(t) = D_{hl}(\omega_0 t)^{\beta-1} \quad (4.23)$$

D_{hl} ist ein temperaturabhängiger Diffusionskoeffizient, ω_0 die Sprungfrequenz und β der Dispersionsparameter. Die Hydratisierung der Metalloxydoberfläche führt zu einer Änderung der Kapazität der Elektrolyt/Metalloxyd/Metall-Anordnung und somit des entstehenden Potentials. Dabei spielt die Dicke, bzw. die zeitliche Änderung der Dicke der hydratisierten Schicht eine wesentliche Rolle. Aufgrund des, für lange Zeiten zu Null gehenden Diffusionskoeffizienten, ergibt sich für die Dicke der hydratisierten Schicht:

$$d_{hl}(t) = d_{hl}(\infty) \cdot (1 - e^{(-\frac{t}{\tau})^\beta}) \quad (4.24)$$

Die Dicke $d_{hl}(\infty)$ der hydratisierten Schicht und die Zeitkonstante τ sind von den Herstellungsparametern des Metalloxids abhängig.

Buried Sites im Metalloxyd

Die oben erläuterte Bildung der hydratisierten Schicht führt in der Regel zur Bildung von so genannten Buried Sites. Diese reagieren auf pH-Änderungen wesentlich langsamer als die Oberflächengruppen. Dieser Effekt wurde ebenfalls für Siliziumnitrid erklärt, läßt sich aber auch hier weitgehend für Metalloxide übernehmen. Zur Vereinfachung werden diese vergrabenen Verbindungen zu einer, in der Tiefe T_{hl} unter der Metalloxydoberfläche liegenden Schicht zusammengefaßt [229]. Maßgeblich sind hierbei die H^+ - und OH^- -Ionen, die vom Elektrolyten zur hydratisierten Schicht diffundieren. Da die Konzentration $c_{H_S^+}(t)$ der H^+ -Ionen an der Metalloxydoberfläche durch das Oberflächenpotential festgelegt ist, läßt sich die Ionenkonzentration $c_{H_{hl}^+}(t)$ an der vergrabenen Schicht unter Annahme einer Diffusion aus einer unerschöpflichen Quelle berechnen:

$$c_{H_{hl}^+}(t) = c_{H_{hl}^+}(t_0) \cdot \operatorname{erf}\left(\frac{T_{hl}}{2\sqrt{D_{hl}(t-t_0)}}\right) + c_{H_S^+}(t) \cdot \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{T_{hl}}{2\sqrt{D_{hl}(t-t_0)}}\right)\right) \quad (4.25)$$

$c_{H_{hl}^+}(t_0)$ ist dabei die Konzentration der Wasserstoffionen zum Zeitpunkt t_0 . Die derart eindiffundierten Ionen bilden nun eigene Gruppen und es entsteht ein zusätzliches Potential, das maßgeblich von der Anzahl der vergrabenen Verbindungen abhängt [230].

Hysterese

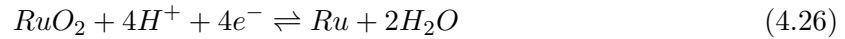
Werden bei einer Messung zwei Meßlösungen mit eindeutigen, aber unterschiedlichen pH-Werten verwendet und zwischen beiden Lösungen gewechselt, stellt sich nach dem Meßzyklus

eine Abweichung vom Ausgangssignal ein. Dieser Effekt wird als Hysterese bezeichnet und ist bis heute nicht genau geklärt. Als mögliche Ursachen finden sich in der Literatur irreversible oder langsam reagierende Einflüsse aufgrund von Wechselwirkungen der Elektrolytlösung mit der Metalloxydoberfläche [171, 231–233]. Durch die oben beschriebenen Drift und Einschwingzeiten mit großen Zeitkonstanten, ist eine driftunabhängige Beobachtung der Hysterese in der Praxis oft schwierig. Die Hysterese ist demnach abhängig von den Zeitkonstanten des Einschwingvorgangs und den Zeitkonstanten der Hystereseschleifen [234].

4.2.5 Weitere Theorien zur Potentialentstehung

Neben dem Site-Binding-Modell existieren in der Literatur noch weitere Theorien zur Potentialentstehung an der Grenzfläche zwischen Metalloxyd und Elektrolyt. Fog und Buck formulieren 1984 in einer Veröffentlichung fünf Erklärungen für die pH-abhängigen Elektrodenvorgänge, die sich für RuO_2 übertragen lassen [206]:

- Ein einfacher Ionenaustausch an der hydratisierten Oberfläche des Metalloxyds. Diese Grenzschicht enthält, wie beim Site-Binding-Modell ausführlicher erklärt, OH -Gruppen. Die stattfindenden Prozesse sind denen bei der Glaselektrode ähnlich, die in Kapitel 3.10 ausführlich dargelegt wurden.
- Ein Redoxgleichgewicht zwischen den Phasen der oxidierten und nichtoxidierten Metalle oder zwischen den Phasen von verschiedenen Oxidationsstufen des entsprechenden Metalls:



Mit μ als chemisches Potential der einzelnen Phasen läßt sich das entstehende Potential dann berechnen als:

$$\phi^s - \phi^l = \frac{1}{F}(\mu_{H^+}^l + \frac{1}{4}\mu_{RuO_2}^s - \frac{1}{4}\mu_{Ru}^s - \frac{1}{2}\mu_{H_2O}^l) = \text{Konstante} + 4\frac{RT}{F} \ln a_{H^+}^l \quad (4.27)$$

- Ein Redoxgleichgewicht zwischen Vertretern nur einer festen Phase des Oxids, deren Wasserstoffeinlagerung aufgrund eines Stromflusses durch die Elektrode variiert werden kann. Dies wird als Interkalationsreaktion bezeichnet [235] und kann allgemein beschrieben werden als:

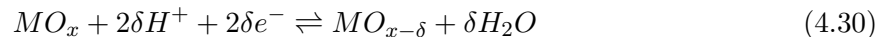


Bezogen auf H_xMO_n als einen Eintrag von H^+ -Ionen in das Metalloxyd, errechnet sich das Elektrodenpotential zu:

$$\phi^s - \phi^l = \frac{1}{F}(\mu_{H^+}^l + \mu_{e^-}^s - \mu_H^s) = \text{Konstante} + \frac{RT}{F} \ln a_{H^+}^l - \frac{RT}{F} \ln a_H^s \quad (4.29)$$

Diese Gleichung sagt voraus, daß die Elektrodenreaktion ein Nernst'sches Verhalten sowohl für H^+ -Ionen im Elektrolyten, als auch für die Aktivität der H^+ -Ionen die im Metall eingetragen sind aufweist.

- Es kann auch in ähnlicher Weise eine Interkalationsreaktion mit Sauerstoff an der Elektrode vorausgesagt werden. Unter Vernachlässigung der H^+ -Einlagerung kann daher auch geschrieben werden:



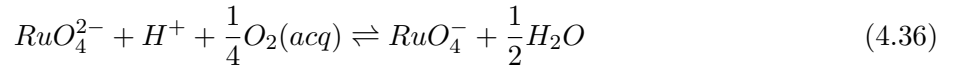
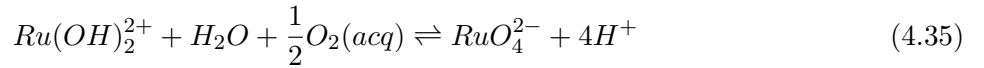
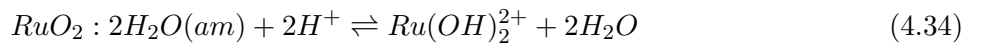
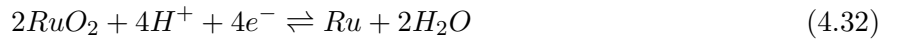
In diesem Fall errechnet sich das Elektrodenpotential zu:

$$\phi^s - \phi^l = \frac{1}{F}(\mu_{H^+}^l + \mu_{e^-}^s + \frac{1}{2}\mu_O^s - \frac{1}{2}\mu_{H_2O}^l) = \text{Konstante} + \frac{RT}{F} \ln a_{H^+}^l - \frac{RT}{2F} \ln a_O^s \quad (4.31)$$

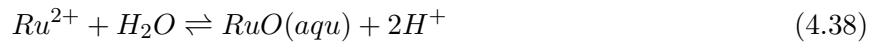
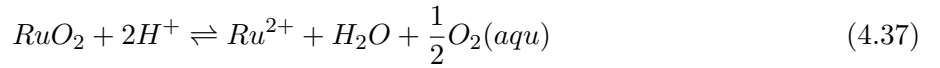
Wobei μ_{O}^s und a_{O}^s das chemische Potential und die Aktivität des, in die feste Phase eingelagerten Sauerstoffs darstellen.

- Eine stationäre Korrosionsreaktion an der Metalloxydelektrode kann neben den oben genannten Reaktionen ebenfalls ein pH-abhängiges Potential hervorrufen. Wobei hier theoretisch kein Nernst'sches Verhalten erklärbar wäre.

Bei der Betrachtung der Redoxgleichgewichte muß beachtet werden, daß das Ruthenium in verschiedenen Oxidationsstufen auftreten kann oder amorph vorliegt. Hierbei können Teilprozesse zur Entstehung und Adsorption von zusätzlichen H^+ -Ionen beitragen:



sowie:



Kapitel 5

Charakterisierung von Rutheniumoxid als pH-Sensor

In Kapitel 4 wurden theoretische Aspekte von Metalloxiden für Anwendungen als pH-Sensoren behandelt. In diesem Kapitel soll nun das Material Rutheniumoxid eingehend charakterisiert und auf seine Eignung als Material für pH-Sensoren in biomedizinischen Anwendungen überprüft werden.

5.1 Meßaufbau und Methoden

5.1.1 Meßstand

Für die, zur Charakterisierung von Rutheniumoxid, durchgeführten Meßreihen wurden zwei weitgehend identische Meßstände verwendet. Um optimale Meßbedingungen für die im Rahmen der Charakterisierung jeweilig untersuchten Parameter zu gewährleisten, lassen diese Meßstände verschiedene Setups zu. Prinzipiell besteht ein Meßstand aus einem Metallgehäuse (siehe Abbildung 5.1), das vollständig geerdet ist oder auf dem Bezugspotential der Meßelektronik liegt und somit die Messungen vor äußeren elektromagnetischen Einflüssen schützt. Neben der elektromagnetischen Abschirmung schützt das Gehäuse auch vor dem Einfall von Streu- und Umgebungslicht, welches die Messungen beeinflussen können. Darüberhinaus ist vor allem bei Kurzzeitmessungen ein wirksamer Schutz vor raschen Temperaturwechseln in der Umgebung gegeben.



Abbildung 5.1: Für die zur Charakterisierung von Rutheniumoxid durchgeführten Meßreihen verwendeter Meßstand

In dieses Gehäuse lassen sich Einspannvorrichtungen für die verwendeten Sensorträger integrieren. Für Einspannvorrichtungen die keine Aufnahme der Referenzelektrode besitzen, ist eine geeignete Halterung für diese vorhanden. Ebenfalls integriert ist die Meßelektronik, die Steuerelektronik für das Fluidsystem und ggf. das Fluidsystem selbst, bestehend aus Pumpen und Ventilen, um verschiedene pH-Pufferlösungen automatisiert an die Sensorträger zu bringen. Aus Gründen der elektromagnetischen Abschirmung sind diese in entsprechend abgetrennten Bereichen lokalisiert. Um den Einfluß

von Licht auf das Sensorverhalten zu untersuchen ist die Möglichkeit gegeben, die Sensorträger mit LEDs verschiedener Wellenlänge und Intensität zu bestrahlen.

5.1.2 Meßelektronik

Wie bereits in Kapitel 4 betrachtet, beruht der Sensoreffekt auf einer Potentialentstehung zwischen Rutheniumoxid und der Referenzelektrode. Um dieses Potential zu erfassen, besteht das Kernelement der Meßelektronik aus einem hochohmigen Instrumentenverstärker, der ohne vorherige Filterung oder Verstärkung direkt an die Rutheniumoxid- und die Referenzelektrode kontaktiert ist. Die Kontaktierung wurde mit Hilfe von doppelt geschirmten Koaxkabeln vorgenommen. Um die elektrochemischen Reaktionen an den Elektroden so wenig wie möglich zu beeinflussen, wurde ein Instrumentenverstärker mit möglichst geringen Eingangsruhestrom verwendet. In der verwendeten Meßelektronik kam das Bauteil INA116 der Firma Burr-Brown zum Einsatz. Es bietet einen Eingangsruhestrom von 3 fA bei einer Temperatur von 25°C und einen einstellbaren Verstärkungsfaktor G von 1 bis 1000. Dieser Verstärkungsfaktor läßt sich über einen externen Widerstand R_G nach folgender Beziehung einstellen [236]:

$$G = 1 + \frac{50\text{ k}\Omega}{R_G} \quad (5.1)$$

Zusätzlich ist der Baustein mit Buffered Guard Drive Anschlüssen ausgestattet, die über Operationsverstärker vom Typ OPA604 (ebenfalls Burr-Brown) als Impedanzwandler an die Schirmung der zur Kontaktierung verwendeten Koaxkabeln gekoppelt sind. Dies dient als zusätzliche Abschirmung der durch die hochohmigen Eingänge sehr störanfälligen Meßschaltung vor elektromagnetischen Einflüssen. Die Meßelektronik wurde mit einer Betriebsspannung von $\pm 5\text{ V}$ betrieben, was eine maximale Ausgangsspannung von ca. $4,4\text{ V}$ ermöglicht. Der verwendete Instrumentenverstärker ist laut Datenblatt ausdrücklich für den Einsatz bei pH-Messungen vorgesehen und sein Datenblatt enthält Anwendungsbeispiele. Abbildung 5.2 zeigt den schematischen Aufbau des verwendeten Instrumentenverstärkers, sowie einen Beschaltungsvorschlag, der mit geringen Änderungen auch für die hier beschriebene Meßelektronik verwendet wurde. Aus Stabilitätsgründen wurde bei den Messungen die

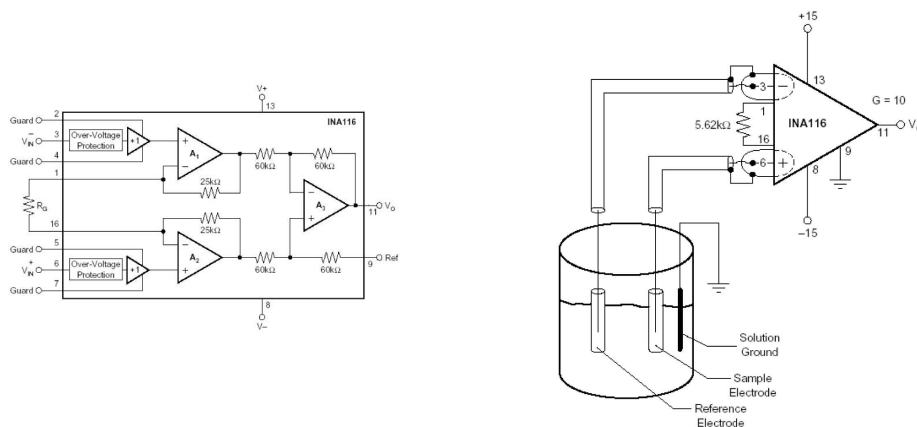


Abbildung 5.2: Schematischer Aufbau des Instrumentenverstärkers INA116 und ein Beschaltungsvorschlag für den Einsatz bei pH-Messungen [236]

Referenzelektrode auf das Bezugspotential der Meßschaltung gelegt. Die Meßelektronik wurde so ausgelegt, daß insgesamt vier Rutheniumoxidelektroden gleichzeitig gemessen werden können, wobei je zwei gegen eine gemeinsame Referenzelektrode betrieben werden können. Bei den Meßreihen wurde allerdings überwiegend nur eine Meßelektrode gegenüber einer Referenzelektrode untersucht. Im Gegensatz zum späteren praktischen Betrieb der Rutheniumoxidsensoren in der Anwendung, wird bei

den Meßreihen zur Charakterisierung der Sensoreigenschaften auf eine geeignete elektronische Filterung der Ausgangssignale verzichtet. Dies stellt sicher, daß eine Abschwächung oder Verfälschung von Effekten durch Filterung verhindert wird. Abbildung 5.3 zeigt den Schaltplan der Meßelektronik für maximal zwei Rutheniumoxidelektroden, die gegen eine gemeinsame Referenzelektrode betrieben werden. Die von den Instrumentenverstärkern gelieferte Ausgangsspannung wird direkt von einer PC-

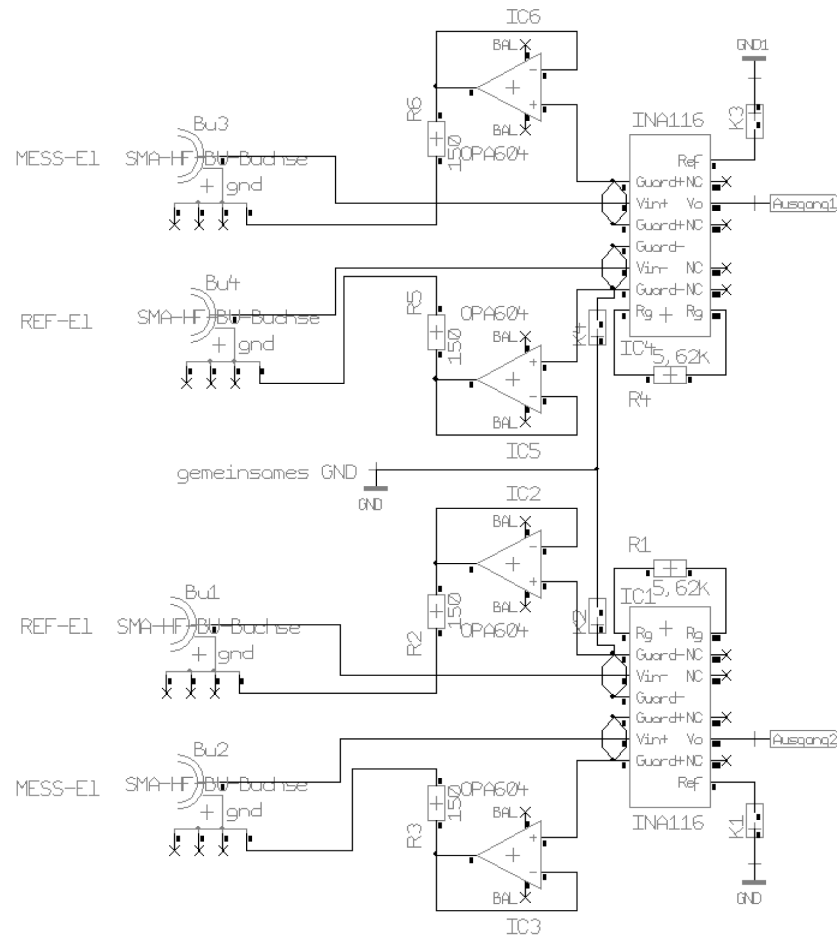


Abbildung 5.3: Meßschaltung zum Betrieb von maximal zwei Rutheniumoxidelektroden gegen eine gemeinsame Referenzelektrode

gestützten A/D-Wandlerkarte vom Typ PCI-6013 der Firma National Instruments aufgenommen. Diese Karte bietet eine Auflösung von 16bit bei einer maximal möglichen Abtastrate von 200kSPS . Die Eingangsspannung ist dabei von $\pm 0,05\text{V}$ bis $\pm 10,0\text{V}$ einstellbar.

Um Untersuchungen durchzuführen, inwieweit das Sensorverhalten durch äußere elektrische Begebenheiten beeinflusst werden kann, ist ein Meßstand mit einer zusätzlichen elektronischen Baugruppe zur aktiven Ansteuerung der Sensorelektroden ausgestattet. Dieser Elektronikteil ermöglicht es, eine Spannung an die Sensorelektrode anzulegen. Polarität und Betrag der Spannung ist dabei frei wählbar. Realisiert wird dies über einen per Relais in die bestehende Meßschaltung zuschaltbaren Spannungsteiler. Um zu verhindern, daß durch die angelegte Spannung die Referenzelektrode durch elektrochemische Reaktionen beeinflusst wird, wird diese ebenfalls über das Relais für die Zeit der angelegten Spannung vom Meßsystem getrennt. Abbildung 5.4 zeigt die realisierte Schaltlogik.

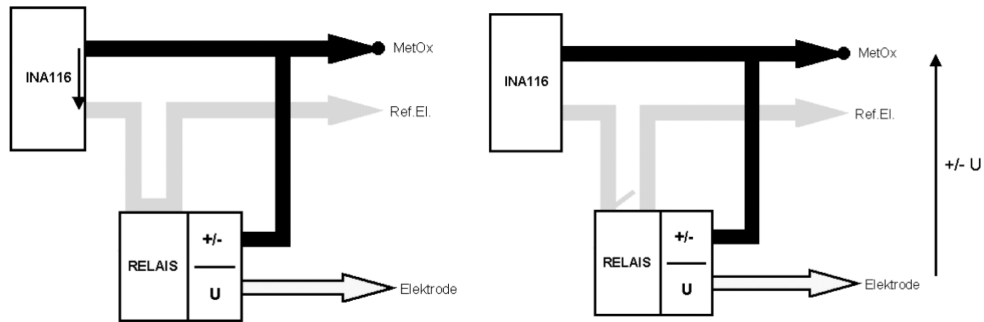


Abbildung 5.4: Prinzipschaltbild der Meßelektrode und der Referenzelektrode durch das Relais im Meßzustand (links) und im Zustand aktiv von außen angelegter Spannung (rechts)

Abbildung 5.5 zeigt den Teil-Schaltplan zur relaisgestützten äußeren Vorgabe von Spannung an die Sensorelektrode.

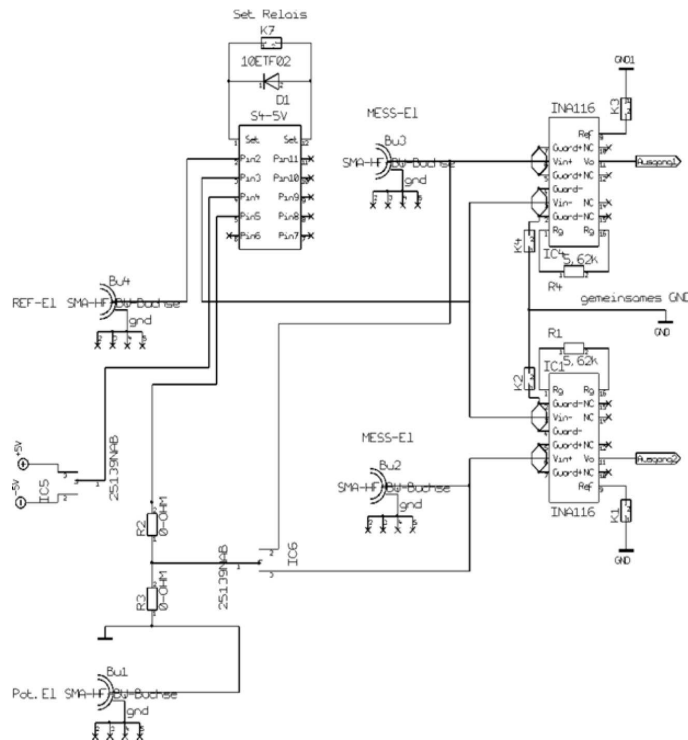


Abbildung 5.5: Teil-Schaltplan zur relaisgestützten äußeren Vorgabe von Spannung an die Sensorelektrode

5.1.3 Meßsoftware

Wie oben bereits erwähnt erfolgt die Aufnahme der Meßsignale mit Hilfe einer PC-gestützten A/D-Wandlerkarte. Die Steuerung des Meßablaufs, sowie die Visualisierung und Speicherung der Meßdaten wird von einem Meßprogramm übernommen, das mit Hilfe der Entwicklungsplattform LabView der

Firma National Instruments erstellt wurde. Abbildung 5.6 zeigt das Aufgabenschema dieses Meßprogramms.

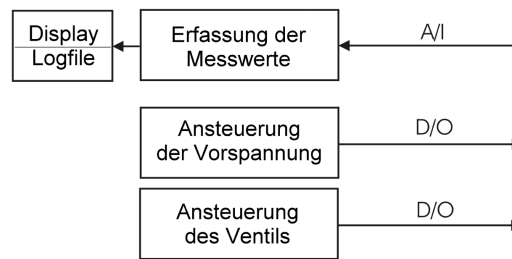


Abbildung 5.6: Aufgabenschema der verwendeten Meßsoftware

Die Meßsoftware wurde im Rahmen der vorliegende Arbeit ständig weiterentwickelt und wird auch in leicht modifizierter Form für einige der multiparametrischen Beispielmessungen in Kapitel 9 verwendet. Sie ermöglicht grundlegende Einstellungen für die Messung vorzunehmen. Dies beinhaltet zum Beispiel Einstellungen der Pumpzyklen, pH-Wechsel und allgemeine Angaben zur Messung. Die Meßdaten werden für die Auswertung in einem Standardformat als ASCII-Datei gespeichert, das von verbreiteten Programmen zur Analyse importiert werden kann. Der Quellcode zu dem verwendeten Programm findet sich in Anhang A.

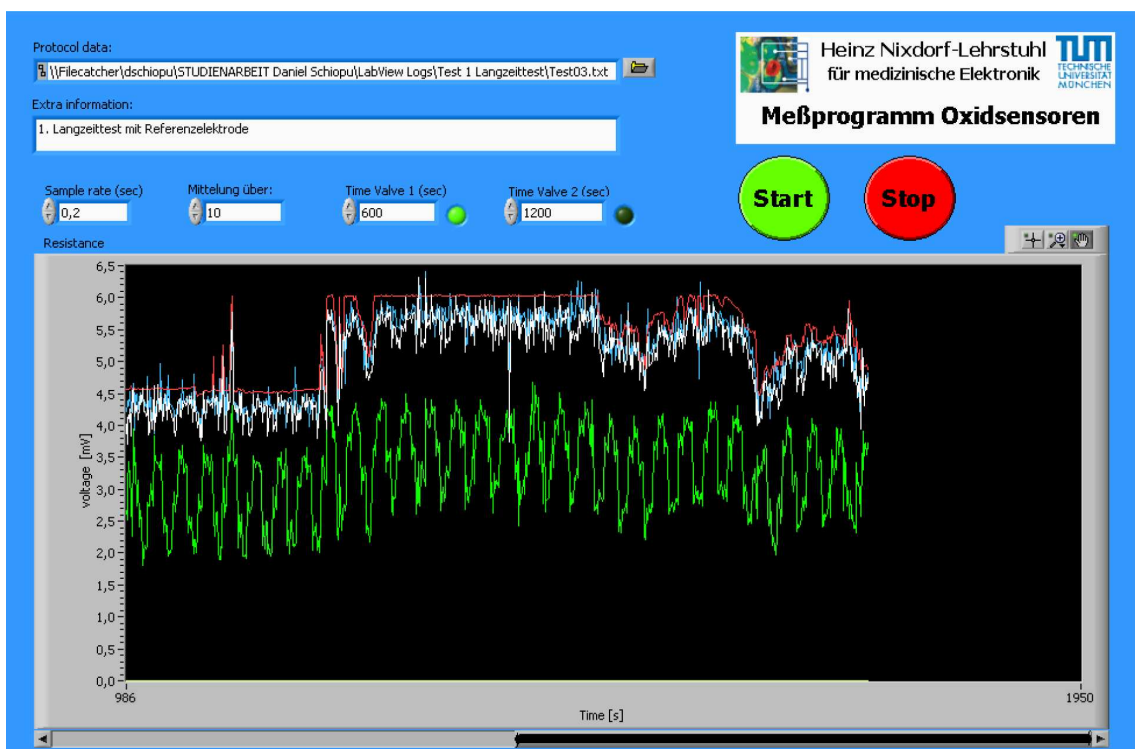


Abbildung 5.7: Bedienungsfläche der verwendeten Meßsoftware

5.1.4 Einspannvorrichtungen

Die Charakterisierung von Rutheniumoxid wurde anhand von Meßreihen mit verschiedenen Sensorausführungen durchgeführt, die in Kapitel 5.2 näher betrachtet werden. Die Sensorelektroden sind

dabei auf drei unterschiedlichen Trägersubstraten aufgebracht. Um die Sensoren geeignet zu betreiben, wurde daher auf vorhandene Einspannvorrichtungen zurückgegriffen oder neue Vorrichtungen entsprechend konstruiert. Alle Vorrichtungen bieten die Möglichkeit die Sensorelektrode in einer Meßkammer mit pH-Pufferlösung zu betreiben. Einige können darüberhinaus durch die Verwendung von Fluidikaufsätzen mit Hilfe eines Systems aus Pumpe und Ventilen automatisiert mit unterschiedlichen pH-Puffern bedient werden.

Die in Abbildung 5.8 dargestellte Doppelkammer ist für den Betrieb von Glas- und Keramiksubstraten der Größe $24\text{mm} \times 33,8\text{mm}$ vorgesehen. Auf Chips dieses Formats sind ein oder zwei Rutheniumoxidelektroden aufgebracht. Kontaktiert sind die Elektroden mit auf den Chips befindlichen Platinelektroden, die mit geeigneten Materialien isoliert sind. Diese Glas- oder Keramikchips sind mit Hilfe von Federkontaktstiften an die Koaxzuleitungen der Meßelektronik gekoppelt. Die verwendete Doppelkammer läßt sich einerseits im offenen Zustand betreiben, wobei die Referenzelektrode direkt in die Meßkammer eintaucht. Die pH-Pufferlösung wird dabei mit Hilfe einer Pipette direkt in die Meßkammer eingebracht bzw. gewechselt. Andererseits besteht die Möglichkeit mit Hilfe eines Fluidikaufsatzes die pH-Pufferlösung über ein Pumpensystem direkt in die Meßkammer zu pumpen. Hierbei ist die Referenzelektrode in das Sachlauchsysteem integriert und ist entweder direkt vor oder nach der Meßkammer lokalisiert.

Neben oben genannten Glas- oder Keramiksubstraten standen auch Glas- und Keramikplättchen der Größe $8,5\text{mm} \times 8,5\text{mm}$ zur Verfügung. Auf diesen Plättchen ist ganzflächig Rutheniumoxid aufgebracht. Zum Zwecke der Kontaktierung wurde bei diesen Plättchen an einer Kante ein schmaler Streifen Platin aufgebracht. Zum Betrieb wurden zwei Methoden verwendet. Einerseits wurden diese Plättchen mit Hilfe von Klammern kontaktiert und wieder an die Koaxzuleitung der Meßelektronik gekoppelt. Freie Platinstellen und die Klammer selbst wurden dabei mit einem photoresistiven inerten Lack isoliert. Diese Methode wurde auch verwendet, um Abhängigkeiten des Sensorpotentials von der Sensorfläche zu bestimmen, indem die Sensorfläche schrittweise weiter isoliert wurde. Derart präparierte Plättchen können direkt in die Meßkammer eingetaucht werden. Andererseits wurden diese Plättchen auf oben genannte Keramiksubstrate geklebt und der Platinstreifen mit Hilfe von Leitlack auf die Platinelektroden auf dem Keramiksubstrat kontaktiert. Anschließend wurden alle offenen Zuleitungen wieder mit einem photoresistiven inerten Lack isoliert. Die auf diese Weise präparierten Substrate können dann wieder in die Doppelkammer eingelegt und im Gegensatz zu den mit Klemmen kontaktierten Plättchen auch automatisiert mit Fluidiksystem betrieben werden. Abbildung 5.9 zeigt beide Varianten.

Die dritte Vorrichtung ist eine Aufnahme für Keramikchips der Größe $7,55\text{mm} \times 7,55\text{mm}$ die neben anderen Sensoren mit zwei Rutheniumoxidelektroden ausgestattet sind. Diese Chips wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von Rutheniumoxidelektroden als pH-Sensoren entwickelt und werden in Kapitel 7 näher vorgestellt. Bei dieser Vorrichtung wird ein Chip zwischen einer Bodenplatte aus Aluminium und einem Aufsatz aus Plexiglas eingespannt. Der Aufsatz ist mit einem Loch ausgestattet, in das später die pH-Pufferlösung eingebracht werden kann. Direkt neben dem Loch ist eine Aussparung lokalisiert, in der die Referenzelektrode eingeschoben werden kann. Abbildung 5.10 zeigt diesen Einspannblock. Um die Sensorelektroden an die Meßelektronik zu koppeln sind zwei Federkontaktstifte eingepreßt, die die Zuleitungen, die eigentlich als Bondpads ausgeführt sind, auf dem Keramikchip kontaktieren.

5.1.5 Referenzelektrode

Als Referenzelektrode wurde für die Meßreihen eine Ag/AgCl-Elektrode verwendet. Die theoretischen Grundlagen für Ag/AgCl-Referenzelektroden wurden bereits in Kapitel 3.3.3 eingehend betrachtet. Zum Einsatz kam eine Long Life Referenzelektrode der Firma Metrohm, die in Abbildung 5.11 dargestellt ist. Diese Elektrode bietet eine besonders gute Stabilität auch in Langzeitversuchen über mehrere Tage. Da, wie in Kapitel 3 an mehreren Stellen verdeutlicht wurde, die Referenzelektrode

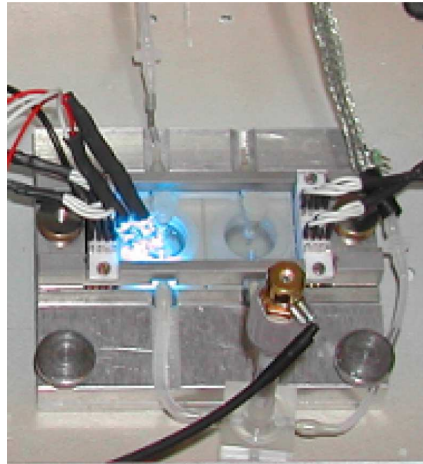


Abbildung 5.8: Doppelkammer mit Fluidikaufsatz und extern über Schläuche angeschlossener Referenzelektrode (hier mit Vorrichtung zur Bestrahlung der Meßkammer mittels LED)

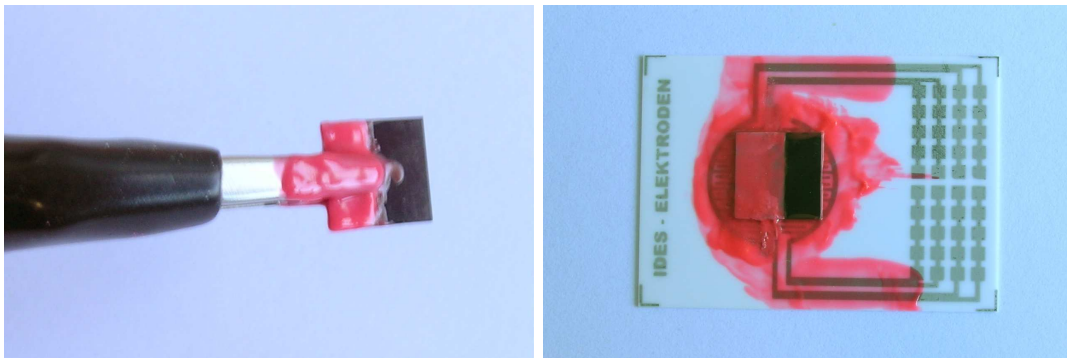


Abbildung 5.9: Ganzflächig mit Rutheniumoxid beschichtete Glasplättchen kontaktiert mit einer Klammer (links) und aufgebracht auf einem Keramiksubstrat (rechts)

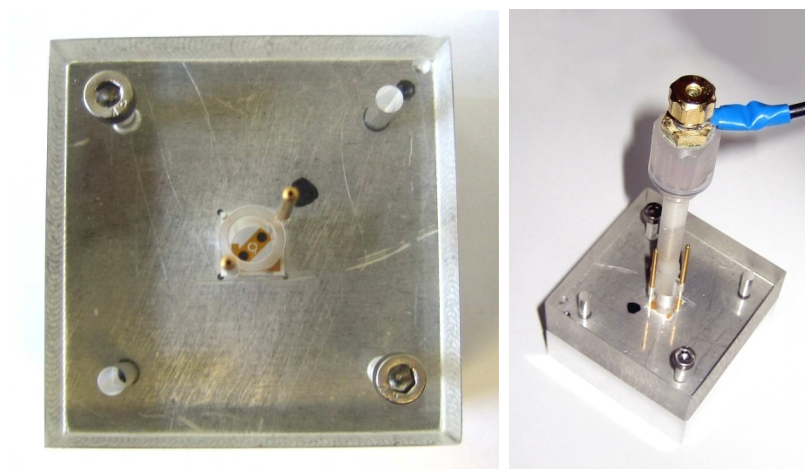


Abbildung 5.10: Einspannblock für Keramikchips der Größe $7,55\text{mm} \times 7,55\text{mm}$

einen großen Einfluß auf die Funktion des pH-Sensors hat, ist es wichtig, daß die Referenzelektrode auch über große Einsatzzeitspannen reproduzierbare Ergebnisse liefert, so daß Charakterisierungsfehler aufgrund der Referenzelektrode nur minimal ins Gewicht fallen.



Abbildung 5.11: Verwendete Referenzelektrode der Firma Metrohm

Die verwendete Elektrode entspricht einer Ag/AgCl-Elektrode mit einem Plastikmantel, in dem sich KCl mit einer Konzentration von 3mol/l befindet. An der Unterseite des Mantels befindet sich ein Diaphragma, das den Ionenaustausch mit der Meßlösung ermöglicht. Das Diaphragma verhindert den Austausch von Flüssigkeiten, ist aber für Ionen durchlässig. Dies ist wichtig, um die chemischen Eigenschaften der Testlösungen nicht zu beeinflussen. Es hält aber auch parasitäre Einwirkungen, wie z.B. stark basische Medien, von der Referenzelektrode ab. Darüber hinaus kann die Elektrode in eine weitere Plastikummantelung eingesetzt werden, die wiederum mit KCl (3mol/l) gefüllt ist und ebenfalls ein Diaphragma an der Unterseite besitzt. Diese Anordnung wird als Doppelbrücken-Elektrode (Double Junction Electrode) bezeichnet und verstärkt die Trennung von Flüssigkeiten und Fremdionen. Ein weiterer Vorteil dieser Referenzelektrode, insbesondere in Verbindung mit ihrer Ummantelung, ist die geringere Lichtempfindlichkeit des Silberdrahts. Auf Dauer bewirkt Lichteinfall die Zersetzung des AgCl, was sich in einer Schwarzfärbung und nicht mehr reproduzierbaren Verhalten bemerkbar macht. Die verwendete Metrohm Referenzelektrode erwies sich als sehr stabil und rauscharm.

5.1.6 Fluidik und Gesamtsetup

Die Meßreihen für die Charakterisierung wurden prinzipiell auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Einerseits wurde im statischen Zustand gemessen. D.h. die Testlösung mit einem bestimmten pH-Wert wurde in der Meßkammer nicht nachgefüllt oder umgewälzt. Die Referenzelektrode tauchte in diesem Fall direkt in die Meßkammer ein. Bei derartigen Versuchen ist zu beachten, daß aufgrund von Verdunstung die Pufferkonzentration steigt und damit der pH-Wert der Lösung einer Veränderung unterworfen ist. Dies ist vor allem bei Langzeittests zu berücksichtigen. Bei Kurzzeittests von weniger als zwei bis drei Stunden wird dieser Effekt vernachlässigt. Andererseits wurden dynamische Tests durchgeführt, bei denen über eine Pumpe ständig frische Pufferlösung in die Meßkammer gepumpt wurde. pH-Wert und Volumen der Testlösung in der Meßkammer blieben hier konstant. Die Referenzelektrode ist hierbei möglichst nah hinter der Meßkammer in einer zusätzlichen Vorrichtung eingespannt und über Schläuche direkt in das Fluidiksystem integriert. Ein luftblasenfreier kontinuierlicher Fluß der Testlösung gewährleistet dabei immer einen elektrochemischen Kontakt der Referenzelektrode über diese Brücke zur Meßkammer und somit zur Meßelektrode.

Für die Charakterisierung des Rutheniumoxids ist es notwendig, daß die Sensorelektrode Pufferlösungen unterschiedlicher pH-Werte ausgesetzt wird. Dazu wurden prinzipiell zwei Verfahren angewandt. Einerseits wurde die Testlösung manuell mit Hilfe einer Pipette ausgetauscht. Der vorhandene Puffer wurde dabei sehr schnell entfernt und der neue ebenso schnell zugegeben, so daß in der Regel

der Wechsel des pH-Puffers durchschnittlich weniger als zwei Sekunden dauerte. Bei einer Abtastrate der Meßelektronik von 1s entspricht dies maximal zwei bis drei Meßpunkten und ist bei der Auswertung zu vernachlässigen. Dieses Verfahren wurde vor allem bei Kurzzeitmessungen angewandt. Bei Langzeitmessungen über mehrere Stunden oder Tage war es notwendig, den Wechsel der Testlösungen zu automatisieren. Hierbei kamen eine Peristaltikpumpe der Firma IPC IsmaTec, sowie je nach Setup ein 2-Wege-Ventil der Firma N-Research oder ein 6-Wege-Ventil der Firma Besta zum Einsatz, alle in Abbildung 5.12 dargestellt.

Mit diesen Komponenten können zwei Setups für unterschiedliche Versuche verwendet werden. Beide Setups verwenden die Peristaltikpumpe, die aus Gründen der elektromagnetischen Beeinflussung außerhalb des Meßstandes betrieben wird. Der Unterschied beider Setups liegt in der Art, Ansteuerung und Anordnung der Ventile. Im ersten Setup wird je eine von zwei verschiedenen Meßlösungen über das 2-Wege-Ventil in die Meßkammer gebracht. Optional wird die Lösung aus der Meßkammer wieder über die Peristaltikpumpe abgepumpt und in einen Abfallbehälter geleitet, um die Bildung von Druck im Fluidsystem zu verhindern. Mit diesem Aufbau ist es möglich, über einen längeren Zeitraum abwechselnd zwei Meßlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten über die Sensorelektrode zu führen. Abbildung 5.13 zeigt den schematischen Aufbau. Dabei ist der optionale Pumpenweg zum Absaugen der Testlösung aus der Meßkammer gestrichelt eingezeichnet.

Beim zweiten möglichen Setup kommt das 6-Wege-Ventil, das wie die Peristaltikpumpe außerhalb des Meßstandes aufgebaut wird, zum Einsatz. Dieses Ventil besitzt sechs Eingänge und einen Ausgang, der die ausgewählte Testlösung in die Meßkammer führt. Dies hat den Vorteil, daß nur ein Kanal der Peristaltikpumpe benötigt wird. Allerdings befindet sich dann das Ventil vor der Pumpe. Dies verlängert die Totzeit, so daß diese Anordnung sinnvoller Weise nur für längere Taktzeiten je Lösung verwendet wird. Abbildung 5.14 zeigt den schematischen Aufbau dieses zweiten Setups. Mit diesem Aufbau ist es möglich, Versuche mit bis zu 6 Testlösungen verschiedener pH-Werte durchzuführen.

5.1.7 Pufferlösungen

Für die Charakterisierung der Sensoren wurden überwiegend selbst hergestellte pH-Pufferlösungen verwendet. Um die verschiedenen pH-Werte zu erreichen wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Herstellung verwendet. Einerseits wurden Pufferlösungen zwischen pH 5 und pH 9 durch Mischen von je einer basischen und einer sauren, in der Regel in ausreichenden Mengen vorrätigen, Lösung hergestellt. Verwendet wurden hierfür Pufferlösungen mit pH 9,5 und pH 4,5, die aus destilliertem Wasser und je folgender Salzkonzentrationen bestehen:



Um den Salzgehalt und damit die Leitfähigkeit für die durchgeführten Versuche konstant zu halten, wurden zusätzlich entsprechende Mengen *NaCl* zugegeben.

Neben der Mischung von vorhandenen Pufferlösungen wurden Lösungen auch gezielt hergestellt. Die Tabellen 5.1 und 5.2 zeigen exemplarisch die Zusammensetzung von Lösungen mit pH 6,0 und pH 7,8. Auch hier wurde mit Hilfe von *NaCl* der Salzgehalt und damit die Leitfähigkeit eingestellt.

| Salz | Molekulargewicht | Konzentration | g/1000ml |
|---|------------------|---------------|----------|
| <i>NaCl</i> | 58,44 | 150mM | 8,766 |
| <i>Na₂HPO₄ · 12H₂O</i> | 358,1 | 1,0mM | 0,358 |
| <i>NaH₂PO₄ · H₂O</i> | 138 | 10mM | 1,380 |

Tabelle 5.1: Zusammensetzung für pH-Puffer mit pH 6,0

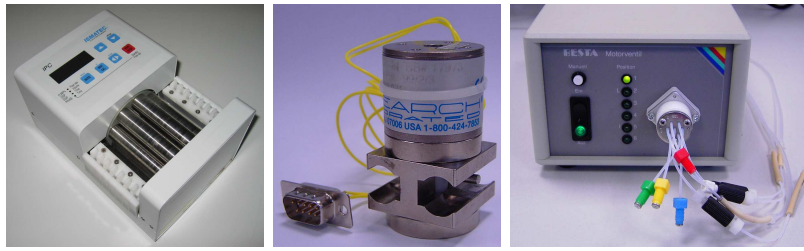


Abbildung 5.12: Verwendete Peristaltikpumpe und Ventile der Firmen IPC IsmaTec, N-Research u. Besta

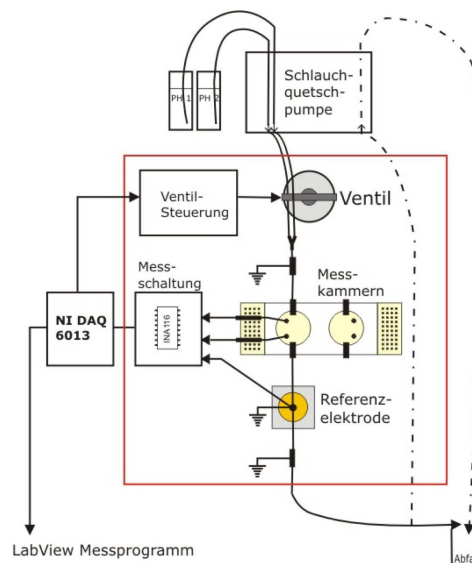


Abbildung 5.13: Setup mit internem 2-Wege-Ventil zum Betrieb mit zwei unterschiedlichen Testlösungen

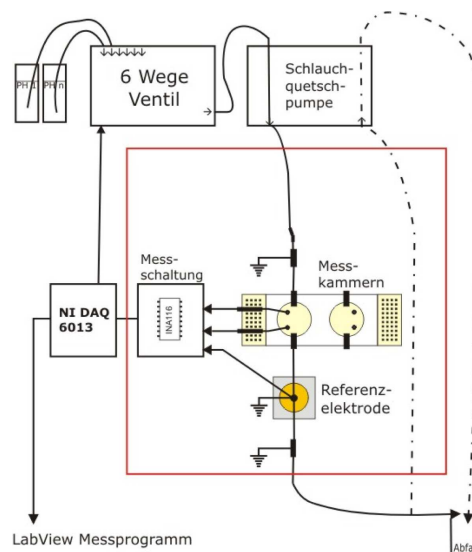


Abbildung 5.14: Setup mit externem 6-Wege-Ventil zum Betrieb mit bis zu 6 unterschiedlichen Testlösungen

| Salz | Molekulargewicht | Konzentration | g/1000ml |
|--------------------------|------------------|---------------|----------|
| $NaCl$ | 58,44 | 150mM | 8,766 |
| $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ | 358,1 | 10mM | 3,580 |
| $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | 138 | 1,0mM | 0,138 |

Tabelle 5.2: Zusammensetzung für pH-Puffer mit pH 7,8

Vor jeder Verwendung wurden die entsprechenden Pufferlösungen mit einer Glaselektrode (siehe Kapitel 3.4.2) vom Typ inoLab pH 720 der Firma WTW überprüft.

5.2 Versuche

Für die Charakterisierung von Rutheniumoxid als pH-Sensor in biomedizinischen Anwendungen wurden insgesamt 15 Meßreihen durchgeführt. Dabei kamen verschiedene Sensorausführungen bzw. verschiedene Sensorträger zum Einsatz. Zum Teil wurden innerhalb einer Meßreihe verschiedene Parameter der RuO_2 -Sensorelektroden untersucht. Daher lassen sich die in Kapitel 5.3 dargestellten Ergebnisse chronologisch nicht den Meßreihen zuordnen. Nachfolgend werden die durchgeführten Meßreihen mit ihrem Inhalt und Ablauf vorgestellt, ohne ihre Ergebnisse an dieser Stelle vorwegzunehmen.

Alle verwendeten Sensorträger und die RuO_2 -Elektroden wurden von der Heraeus Sensor Technology GmbH in Kleinostheim zur Verfügung gestellt. Das Rutheniumoxid selbst wurde mit Hilfe von Sputterprozessen auf die jeweiligen Sensorträger aufgebracht. Dabei wurde zuerst eine dünne Schicht aus reinem Ruthenium als Unterlage und Haftvermittler auf eine Platinelektrode gesputtert. Anschließend wurde reaktiv unter Sauerstoffatmosphäre Rutheniumoxid aufgebracht. Die Prozeßparameter sind bei allen untersuchten Sensoren hinsichtlich der Stöchiometrie identisch. Verschiedene Dicken wurden mit unterschiedlich langen Sputterzeiten realisiert. Eine etwaige Strukturierung der Sensoren wurde mit Hilfe von Schattenmasken direkt beim Sputterprozeß durchgeführt. Die Abbildung 5.15 zeigt zwei rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberflächenbeschaffenheit des Rutheniumoxids auf Glas- und Keramiksubstrat bei einer 450-fachen Vergrößerung. Aufgrund der höheren Oberflächenrauigkeit des Keramiksubstrats, ist auch die Oberfläche des RuO_2 auf der Al_2O_3 -Keramik deutlich rauer. Einflüsse auf die Meßcharakteristik wurden dadurch allerdings nicht beobachtet.

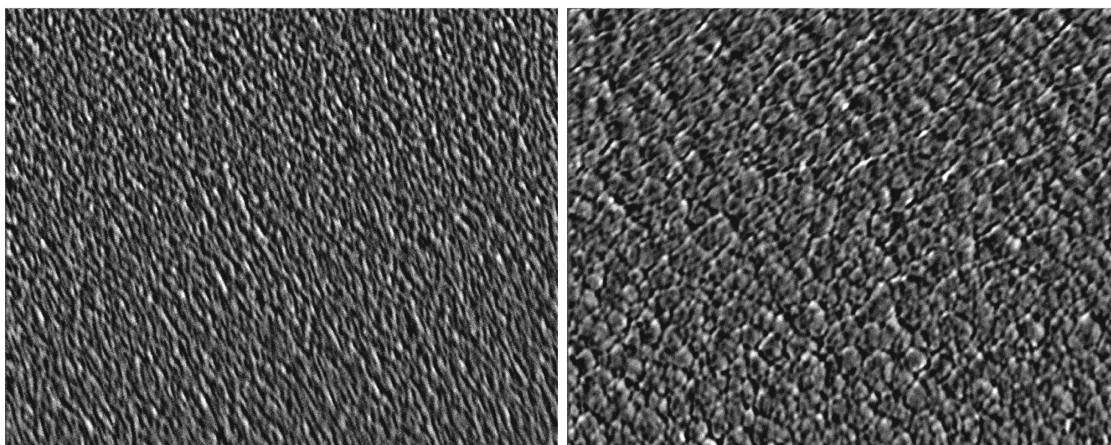


Abbildung 5.15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche des verwendeten Rutheniumoxids auf Glas- (li.) und Keramiksubstrat (re.) bei 450-facher Vergrößerung

5.2.1 Meßreihe 1

Die erste Charge der gemessenen Sensoren bestand aus insgesamt 16 Glaschips mit je 2 Sensorelektroden. Die Glaschips unterscheiden sich untereinander durch verschiedene Schichtdicken der Sensorelektroden. Der Sensorträger war hier ein Glaschip der Größe $24\text{mm} \times 33,8\text{mm}$ mit multiparametrischen Sensorelektroden aus Platin, die jedoch für die Messungen nicht verwendet wurden. Die RuO_2 -Elektroden wurden hier auf den zwei Sauerstoffsensoren aufgebracht, wobei die Platinstrukturen dieser Sauerstoffsensoren als Kontaktelektroden für das RuO_2 dienen. Die aktive, d.h. für Pufferlösungen sichtbare Fläche der Sensoren wurde über einen photoresistiven Lack als eine runde Öffnung mit 1mm Durchmesser ausgeführt. Dieser Lack dient gleichzeitig als Isolation für die elektrischen Platinzuleitungen. Die Schichtdicke variiert zwischen $0,5\mu\text{m}$ und $2,0\mu\text{m}$. Abbildung 5.16 zeigt den verwendeten Glaschip mit den beiden RuO_2 -Sensorelektroden.

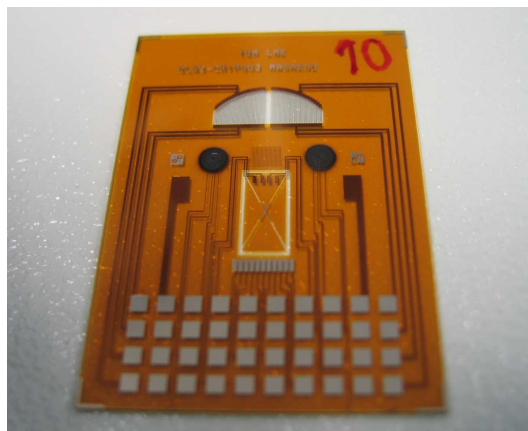


Abbildung 5.16: Zwei RuO_2 -Sensorelektroden auf einem Glaschip der Größe $24\text{mm} \times 33,8\text{mm}$

Die 16 Glaschips wurden nummeriert. Tabelle 5.3 zeigt die Numerierung, die Herstellerbezeichnung, die Dicke der Oxidschicht, sowie die durchgeführten Messungen.

| Chip # | Bezeichnung | Oxiddicke | Verwendung |
|--------|-------------|----------------------|---|
| 0 | L521 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Testmessungen |
| 1 | L521 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Testmessungen |
| 2 | L522 T741b | $1\mu\text{m RuO}_2$ | Testmessungen |
| 3 | L522 T741b | $1\mu\text{m RuO}_2$ | Testmessungen |
| 4 | L522 T741b | $1\mu\text{m RuO}_2$ | Kurzzeitmessungen mit unterschiedlichen pH-Pufferlösungen |
| 5 | L522 T741b | $1\mu\text{m RuO}_2$ | Kurzzeitmessungen mit unterschiedlichen pH-Pufferlösungen |
| 6 | L523 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Lang- und Kurzzeitmessungen mit unterschiedlichen pH-Pufferlösungen, sowie unter Lichteinfluß |
| 7 | L524 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Kurzzeitmessungen mit verschiedenen Temperaturen |
| 8 | L524 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Lang- und Kurzzeitmessungen mit unterschiedlichen pH-Pufferlösungen |

| Chip # | Bezeichnung | Oxiddicke | Verwendung |
|--------|-------------|------------------------|--|
| 9 | L524 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Lang- und Kurzzeitmessungen mit unterschiedlichen pH-Pufferlösungen, Kurzzeitmessungen mit verschiedenen Temperaturen und unter Lichteinfluß |
| 10 | L525 T741b | $0,5\mu\text{m RuO}_2$ | Langzeitmessungen mit unterschiedlichen pH-Pufferlösungen |
| 11 | L525 T741b | $0,5\mu\text{m RuO}_2$ | Lang- und Kurzzeitmessungen mit einer pH-Pufferlösung |
| 12 | L525 T741b | $0,5\mu\text{m RuO}_2$ | Langzeitmessungen mit einer pH-Pufferlösung, Kurzzeitmessungen zur Sauerstoffquerempfindlichkeit |
| 13 | L525 T741b | $0,5\mu\text{m RuO}_2$ | Lang- und Kurzzeitmessungen mit unterschiedlichen pH-Pufferlösungen |
| 14 | L521 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Langzeitmessung mit einer pH-Pufferlösung |
| 15 | L521 T741b | $2\mu\text{m RuO}_2$ | Langzeitmessung mit einer pH-Pufferlösung |

Tabelle 5.3: Glaschips der Meßreihe 1

5.2.2 Meßreihen 2 bis 7

In den Meßreihen 2 bis 7 wurden ganzflächig besputterte Glas- und Keramikplatten verwendet. Diese Platten wurden zu Plättchen der Größe $8,5\text{mm} \times 8,5\text{mm}$ vereinzelt, wie sie in Abbildung 5.17 gezeigt werden.

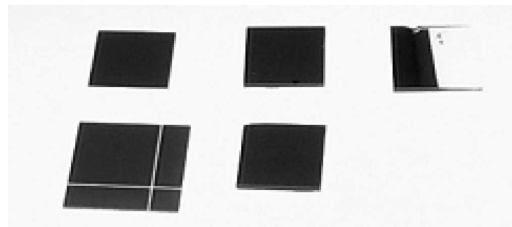


Abbildung 5.17: Ganzflächig mit RuO_2 beschichtete Glas- und Keramikplättchen der Größe $8,5\text{mm} \times 8,5\text{mm}$

Nach der Vereinzelnung wurde an einer Kante ein schmaler Streifen aus Platin mittels Sputterverfahren aufgebracht. Dieser Streifen dient als Kontaktierung. Für die Messungen wurden die Plättchen mit Hilfe von Klemmen eingespannt und in die Pufferlösungen eingetaucht. Neben der Charakterisierung der Sauerstoffquerempfindlichkeit der Sensoren, wurden diese Plättchen hauptsächlich zur Untersuchung des Einflusses der Sensorfläche auf das entstehende Potential verwendet. Hierzu wurden die Plättchen im Verlauf einer Meßreihe schrittweise mit einem inerten Lack abgedeckt. Dieser Lack dient ebenfalls als Isolierung der zur Kontaktierung verwendeten Klemmen. In Tabelle 5.4 sind die für die Meßreihen 2 bis 7 verwendeten Plättchen mit ihrer Grundfläche und den, für die Messungen durchgeführten Flächenabstufungen aufgeführt. Die uneinheitliche Grundfläche resultiert aus der nicht einheitlichen Abdeckung der Plättchen mit der Platinelektrode, die beim Aufputtern mit Hilfe von Schattenmasken per Hand justiert wurden. Einige der Plättchen wurden auch auf Keramiksubstrate der Größe $24\text{mm} \times 33,8\text{mm}$ geklebt und der Platinstreifen mit Hilfe von Leitlack auf

die Platinelektroden des Keramiksubstrats kontaktiert. Anschließend wurden alle offenen Zuleitungen mit einem photoresistiven inerten Lack isoliert.

| Chip # | Grundfläche | Flächenabstufungen | Verwendung |
|--------|----------------------|-------------------------------------|---|
| P1 | 67,76mm ² | 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 0 | Schrittweise Abdeckung der Sensorfläche |
| P2 | 68,66mm ² | 1/1, 1/2, 0 | Schrittweise Abdeckung der Sensorfläche |
| P3 | 69,40mm ² | 1/1, 3/4, 1/2, 1/4, 0 | Schrittweise Abdeckung der Sensorfläche |
| P4 | 68,40mm ² | 1/1, 1/2 | Schrittweise Abdeckung der Sensorfläche |
| P5 | 68,40mm ² | 1/1, 3/4, 1/2, 1/4, 0 | Schrittweise Abdeckung der Sensorfläche |
| P6 | 40,20mm ² | 1/1, 3/4, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 0 | Schrittweise Abdeckung der Sensorfläche |
| P6K | 67,76mm ² | 1/1 | Test der Sauerstoffquerempfindlichkeit |
| P7 | 67,76mm ² | 1/1 | Test des Meßaufbaus u. der Sauerstoff- querempfindlichkeit |
| P8 | 67,76mm ² | 1/1 | Test der Sauerstoffquerempfindlichkeit |

Tabelle 5.4: Glas- und Keramikplättchen der Meßreihen 2 bis 7

5.2.3 Meßreihen 8 bis 12

Für die Meßreihen 8 bis 12 wurden zwei unterschiedliche Ausführungen verwendet. Einerseits kamen erneut auf Glaschips der Größe 24mm x 33,8mm aufgebrachte Sensorelektroden zum Einsatz. Andererseits einige ganzflächig mit RuO_2 bedeckte Keramikplättchen. Der Schwerpunkt in diesen Meßreihen lag in der Untersuchung des Einflusses der Dicke der Elektroden auf die Sensorfunktion. Hierfür standen Elektrodendicken von 0,5µm bis 6,5µm zur Verfügung. In Tabelle 5.5 sind die verwendeten Sensoren aufgeführt.

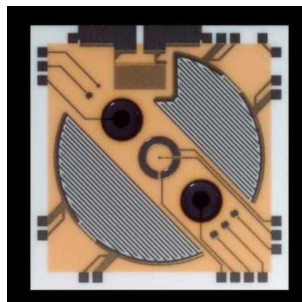
| Chip # | Bezeichnung | Substrat | Oxiddicke | Verwendung |
|--------|---------------------|----------|-----------|---|
| S1#1 | L572 T792b Platte 1 | Glas | 0,5µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S1#2 | L572 T792b Platte 1 | Glas | 0,5µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S1#3 | L572 T792b Platte 2 | Glas | 0,5µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S1#4 | L572 T792b Platte 2 | Glas | 0,5µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S2#1 | L573 T792b Platte 1 | Glas | 1,0µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S2#2 | L573 T792b Platte 1 | Glas | 1,0µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S2#3 | L573 T792b Platte 2 | Glas | 1,0µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S2#4 | L573 T792b Platte 2 | Glas | 1,0µm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |

| Chip # | Bezeichnung | Substrat | Oxiddicke | Verwendung |
|--------|--------------------------------|----------|-------------------|--|
| S3#1 | L574 T792b Platte 1 | Glas | 2,0 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S3#2 | L574 T792b Platte 1 | Glas | 2,0 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S3#3 | L574 T792b Platte 2 | Glas | 2,0 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S3#4 | L574 T792b Platte 2 | Glas | 2,0 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S4#1 | Run 449 (72,25 mm^2) | Keramik | 3,5 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S4#2 | Run 449 (72,25 mm^2) | Keramik | 3,5 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S5#1 | Run 450 (72,25 mm^2) | Keramik | 6,5 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |
| S5#2 | Run 450 (72,25 mm^2) | Keramik | 6,5 μm | Kurzzeitmessungen mit einer oder mehreren Pufferlösungen |

Tabelle 5.5: Glaschips und Keramikplättchen der Meßreihen 8 bis 12

5.2.4 Meßreihen 13 bis 15

Diese Meßreihen wurden chronologisch als letzte durchgeführt. Die auf Keramiksubstrat aufbauenden Sensorchips, die für diese Meßreihen verwendet wurden, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der bis dahin erworbenen Kenntnisse entwickelt. Es handelt sich um einen multiparametrischen Sensorchip der Größe 7,55 mm x 7,55 mm mit zwei RuO_2 -Sensorelektroden mit 1 mm Durchmesser und einer Oxiddicke von 1,0 μm . Dieser Chip, in Abbildung 5.18 dargestellt, wird in Kapitel 7 noch eingehender vorgestellt.

Abbildung 5.18: Keramikchip der Größe 7,55 mm x 7,55 mm mit zwei RuO_2 -Elektroden

In den Meßreihen 13 bis 15 wurde er überwiegend zur Charakterisierung des Einschwingverhaltens bei erstem Kontakt mit Flüssigkeiten verwendet. Darüberhinaus wurde untersucht, inwieweit sich dieses Einschwingverhalten durch Anlegen von äußeren Spannungen beeinflussen läßt. In Tabelle 5.6 sind die für die Meßreihen verwendeten Keramikchips und ihre Verwendung aufgeführt.

| Chip # | Oxiddicke | Verwendung |
|--------|-------------|---|
| K1#1 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#1 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#2 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#3 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#4 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#5 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#6 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#7 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#8 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#9 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#10 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#11 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#12 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#13 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#14 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#15 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#16 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#17 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#18 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |
| K2#19 | 1,0 μ m | Langzeitmessungen mit einer Pufferlösung zur Untersuchung des Einschwingverhaltens und dessen Beeinflussung |

Tabelle 5.6: Keramikchips der Meßreihen 13 bis 15

5.3 Ergebnisse

Die Einzelergebnisse der in Kapitel 5.2 aufgeführten Versuche sind aufgrund ihres Umfangs in Anhang B tabellarisch dargestellt. Auf diesen Einzelergebnissen basieren die nachfolgend aufgeführten Charakterisierungen für den Einsatz von Rutheniumoxid als pH-Sensor in biomedizinischen Anwendungen. Die RuO_2 -Sensoren wurden dabei nach folgenden Gesichtspunkten charakterisiert:

- pH-Empfindlichkeit und Ansprechzeit von RuO_2
- Rauschverhalten von RuO_2 -Sensoren bei der pH-Messung
- Einschwingverhalten bei erstem Kontakt mit Flüssigkeiten und Driftverhalten in Langzeitmessungen
- Beeinflussbarkeit des Einschwingverhaltens durch Anlegen von äußeren Spannungen
- Querempfindlichkeit zum Sauerstoffpartialdruck und anderen Ionen
- Querempfindlichkeit zur Temperatur
- Auswirkung der Bestrahlung mit Licht
- Abhängigkeit der Charakteristika von der aktiven Sensorfläche
- Abhängigkeit der Charakteristika von der Dicke der Oxidschicht
- Hysterese
- Biokompatibilität

5.3.1 pH-Empfindlichkeit und Ansprechzeit von RuO_2

Wie bereits in Kapitel 4.2 theoretisch betrachtet, beruht der technische Meßeffect der pH-Messung mit Metalloxiden auf einer Erhöhung des sich bildenden Potentials des Sensormaterials gegen eine Referenzelektrode bei einer Verringerung des pH-Werts der Meßlösung. Analog dazu führt die Erhöhung des pH-Werts zu einer Verringerung des Meßpotentials. Als representative Beispiele für die pH-Empfindlichkeit des entstehenden Potentials sind nachfolgend zwei Messungen bei Betrieb in Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten dargestellt.

Abbildung 5.19 zeigt den Verlauf des Meßpotentials von Chip P6 beim Wechsel zwischen Pufferlösungen mit den Werten pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0, sowie die statistische Häufigkeit der Meßpotentiale pro verwendeten pH-Wert betrachtet für 5 Wechsel. Der pH-Sprung ist dabei immer eine pH-Dekade. Die Reproduzierbarkeit der ca. 60min dauernden Messung ist sehr konstant. Nach einem pH-Wechsel zeigt sich ein leichtes Überschwingen des Meßsignals, das typisch ist und qualitativ bei allen durchgeführten Messungen auftrat.

Abbildung 5.20 zeigt den Verlauf des Meßpotentials bei demselben Chip bei Wechsel des Meßmediums mit 7 verschiedenen Werten von pH 5,0 bis pH 11,0. Der Unterschied zwischen den Pufferlösungen beträgt genau eine pH-Dekade. Gewechselt wurde dabei von pH 5,0 beginnend mit aufsteigenden pH-Werten bis pH 11,0. Anschließend wurde von pH 11,0 direkt wieder auf pH 5,0 gewechselt und dieses Verfahren über eine Meßzeit von ca. 84min 4 mal wiederholt. Außerdem ist für diese 4 Wiederholungen in Abbildung 5.20 die statistische Häufigkeit der Meßpotentiale pro verwendeten pH-Wert dargestellt.

Diese beiden repräsentativen Versuche zeigen eine pH-Empfindlichkeit von $52mV/pH$ bis $58mV/pH$, wobei im Mittel beim überwiegenden Teil der Messungen ein Wert von $55mV/pH$ über einen pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 11,0 erreicht wurde. Damit liegen die praktisch ermittelten Werte minimal

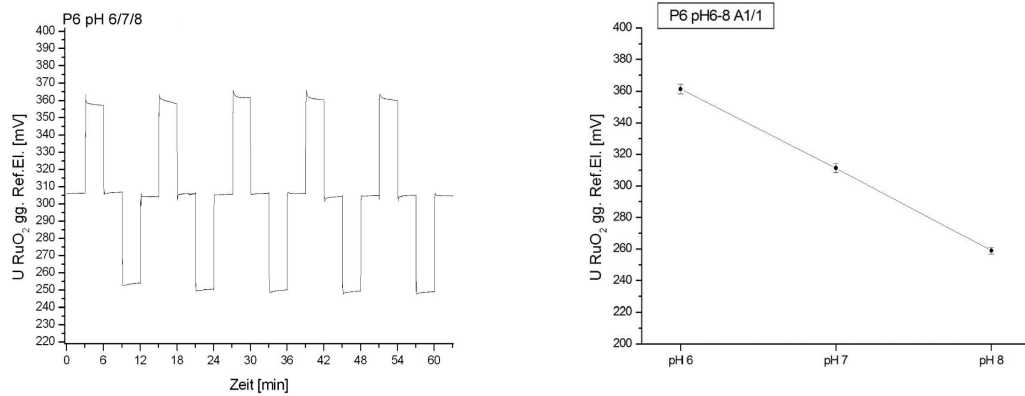


Abbildung 5.19: Verlauf des Meßpotentials beim Wechsel zwischen Pufferlösungen mit pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 und die statistische Verteilung der Meßpotentiale pro verwendeten pH-Wert.

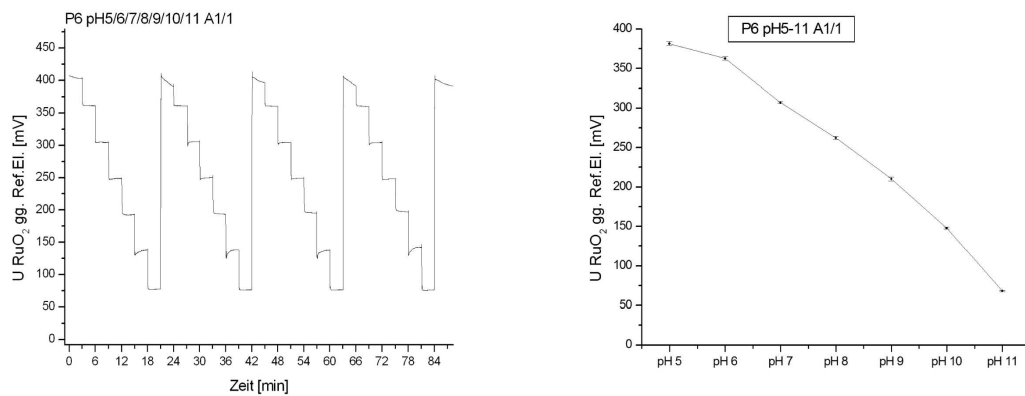


Abbildung 5.20: Verlauf des Meßpotentials beim Wechsel zwischen Pufferlösungen von pH 5,0 bis pH 11,0 und die statistische Verteilung der Meßpotentiale pro verwendeten pH-Wert.

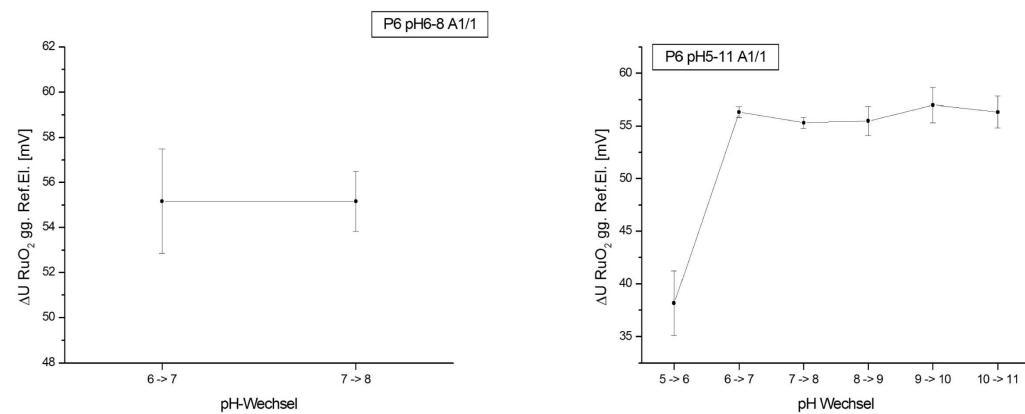


Abbildung 5.21: Links: Statistische Verteilung der Potentialdifferenzen bei Wechsel der Pufferlösung von pH 6,0 auf pH 7,0 und von pH 7,0 auf pH 8,0; Rechts: Statistische Verteilung bei Wechsel von pH 5,0 auf pH 6,0 bis pH 10,0 auf pH 11,0

unter dem theoretisch bestimmbareren Nernst'schen Wert von $59,2\text{mV}/\text{pH}$. Bei Pufferlösungen unter pH 5,5 zeigte sich eine, zum Teil deutlich niedrigere pH-Empfindlichkeit. Im Bereich zwischen pH 5,5 bis pH 11,0 ist die pH-Empfindlichkeit nahezu linear, wie aus Abbildung 5.21 zu entnehmen ist. Da der vorgesehene Einsatzzweck biomedizinische Messungen an lebenden Zellen ist und damit die Rahmenbedingungen meist im Bereich pH 6,0 bis pH 9,0 sind, zeigen die Ergebnisse, daß Rutheniumoxid gut für diese Art von Messungen geeignet ist.

Bemerkenswert ist die hohe Ansprechzeit der RuO_2 -Sensoren. Die typische Reaktionszeit für einen Wechsel um eine pH-Dekade liegt in der Regel bei unter 2s. Aufgrund dem, bei pH-Wechsel charakteristisch auftretenden Überschwingen des Meßpotentials, kann es allerdings 10s bis 30s dauern, bis sich ein stabiles Endergebnis eingestellt hat. Unterschiede aufgrund der Richtung des pH-Wechsels wurden nicht festgestellt. Bei Wechseln über mehrere pH-Dekaden zeigte sich ebenfalls eine sehr kurze Ansprechzeit. In Abbildung 5.22 ist ein typischer Potentialverlauf beim Wechsel von pH 6,0 auf pH 7,0, sowie ein Wechsel von pH 11,0 auf pH 5,0 dargestellt.

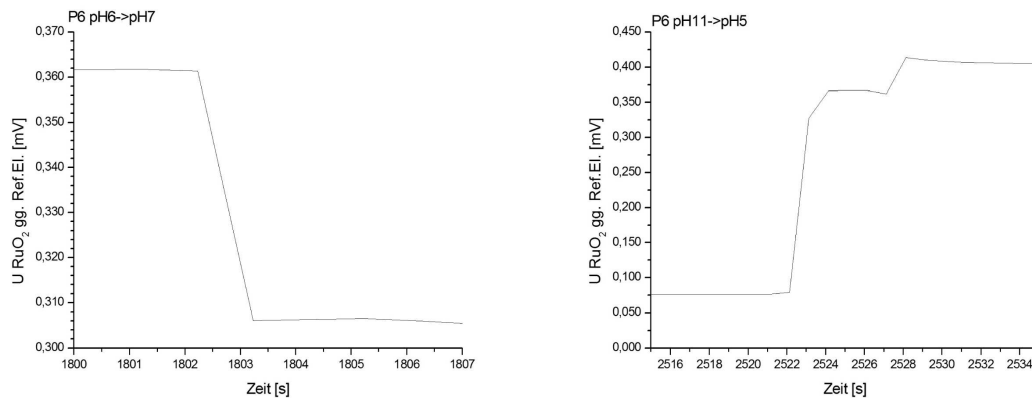


Abbildung 5.22: Links: Potentialverlauf bei einem Wechsel der Pufferlösung von pH 6,0 auf pH 7,0; Rechts: Potentialverlauf bei einem Wechsel der Pufferlösung von pH 11,0 auf pH 5,0

5.3.2 Rauschverhalten von RuO_2 -Sensoren bei der pH-Messung

Das Rauschverhalten von elektrochemischen Sensoren ist reproduzierbar nur unter Schwierigkeiten meßtechnisch erfassbar, da wie in Kapitel 3 bereits betrachtet, hierbei parasitäre elektrochemische Reaktionen und die Güte der Referenzelektroden eine große Rolle spielen. Darüberhinaus macht die Verwendung der sehr hochohmigen Meßelektronik das Meßsignal sehr anfällig gegenüber äußeren elektromagnetischen Störungen. Aus diesem Grund wurde für die Bewertung des Rauschverhaltens Meßergebnisse herangezogen, bei denen der Meßaufbau bereits einen weitreichenden Lern- und Optimierungsprozeß durchlaufen hat, so daß Störungen und Rauschen aufgrund des Meßaufbaus weitgehend eliminiert wurden. Abbildung 5.23 zeigt zwei representative Beispiele für das Rauschen der Sensoren.

Die Meßreihen zeigen durchgehend ein äußerst geringes Rauschen ΔU_{p-p} der RuO_2 -Sensoren. Dieses liegt bei allen Messungen im Mittel bei 0,15mV bis 0,20mV unabhängig vom jeweiligen Level des Nutzsignals. Am Beispiel des, in Abbildung 5.23 links dargestellten Verhaltens, entspricht dies bei einem Nutzsignallevel von ca. 400mV einem Signal-Rausch-Abstand (SNR) von ca. 76dB. Bei einer Empfindlichkeit von $55\text{mV}/\text{pH}$ zeigen die Sensoren somit im Mittel ein Rauschen von 0,27% bis 0,37% vom gemessenen pH-Wert oder bezogen auf die Potentialänderung von $55\text{mV}/\text{pH}$ ein SNR von ca. 51dB.

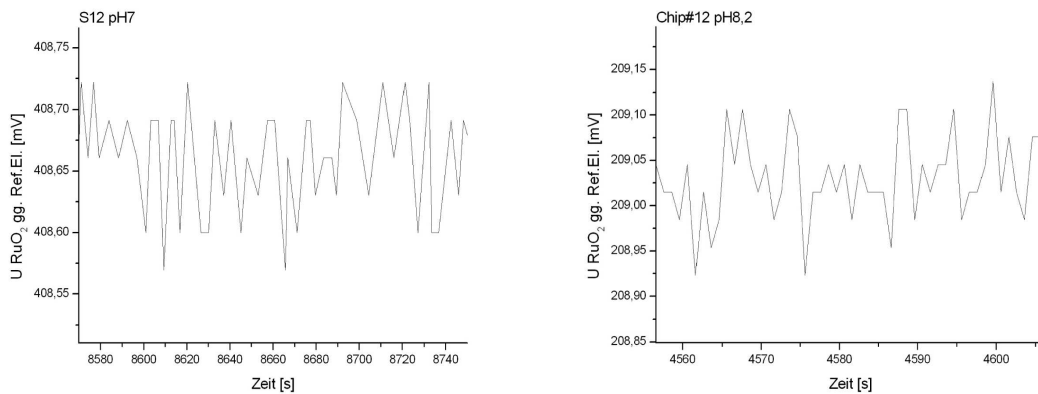


Abbildung 5.23: Links: Rauschen des Chips S1#2 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 7,0; Rechts: Rauschen des Chips #12 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 8,2

Diese Ergebnisse beziehen sich auf einem weitestgehend optimal abgeschirmten Meßaufbau. Welche Auswirkungen ein nicht optimal gestalteter Meßaufbaus mit sich bringt verdeutlicht die in Abbildung 5.24 dargestellte Messung mit einem RuO_2 -Sensor. Die in der biomedizinischen Meßtechnik oft verwendete Fluidik mittels Plastik- oder Silikonschläuche ist bei unsachgemäßer Handhabung oft eine starke Störquelle. Während der Meßaufbau noch meistens gegen äußere elektromagnetische Einflüsse ausreichend geschirmt ist, zeigen ungeschirmte flüssigkeitsführende Schläuche deutliche Antenneneffekte und leiten elektromagnetische Störungen, oft direkt durch die Pumpe verursacht, über die leitfähige Flüssigkeit bis an die Sensoren in der Meßkammer.

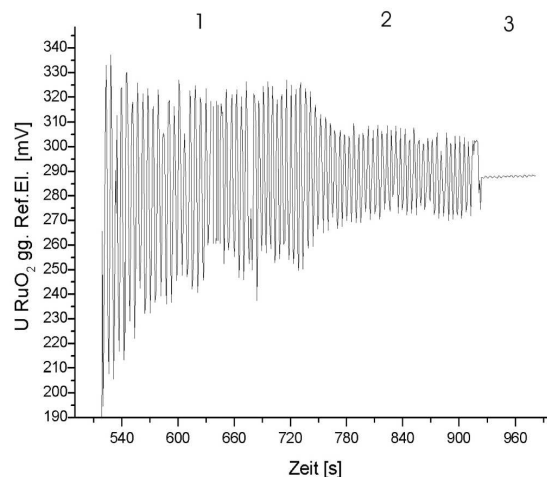


Abbildung 5.24: Reduzierung der Störungen, bedingt durch äußere elektromagnetischen Einflüsse mit Hilfe von Erdung

In Bereich 1 der Abbildung ist das Schlauchsystem in eine Metallabschirmung gehüllt, die aber nicht geerdet ist. Wird diese Metallabschirmung durch Verbindung mit dem Meßaufbau geerdet, ergibt sich eine Verringerung der Störungen um bis zu 50%, als Bereich 2 in der Abbildung bezeichnet. Im Bereich 3 der Abbildung wurde zusätzlich die Flüssigkeit selbst, gemäß Abbildung 5.25, kurz vor

und kurz nach der Meßkammer geerdet. Dies wurde mit Hilfe von Edelstahlröhrchen, die als Verbindungsstücke in das Schlauchsystem eingesteckt werden, durchgeführt. Bei Meßmedien mit einem hohen Anteil an verschiedenen, zum Teil unbekanntenen Ionen ist diese Maßnahme jedoch nicht geeignet, da es zu unreproduzierbaren elektrochemischen Reaktionen an den Edelstahlröhrchen kommen kann, die die Messung stark beeinflussen können. Bei den verwendeten Meßmedien mit bekannten Ionenkonzentrationen führte dies allerdings nicht zu Problemen.

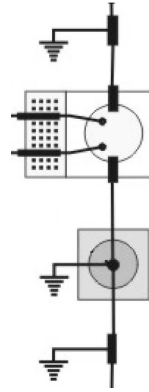


Abbildung 5.25: Schematische Darstellung der Erdung des Meßmediums

5.3.3 Einschwingverhalten bei erstem Kontakt mit Flüssigkeiten und Driftverhalten in Langzeitmessungen

Die RuO_2 -Sensoren sind beim ersten Kontakt mit flüssigen Medien einem ausgeprägten und komplexen Einschwingverhalten unterworfen. Dies hat zur Folge, daß mit den Sensoren während dieser Einschwingzeit keine reproduzierbaren Messungen möglich sind. Für einen ordnungsgemäßen Betrieb muß diese Einschwingzeit berücksichtigt oder die Sensoren müssen in geeigneter Flüssigkeit bereits gelagert werden. Diese Einschwingcharakteristik, die in ähnlicher Form auch bei anderen Typen von pH-Sensoren, wie z.B. den ISFET, auftritt, ist zeitlich und qualitativ nicht vorhersagbar. Sie hängt unter anderem von der chemischen Beschaffenheit des Sensormaterials und von äußeren Einflüssen wie z.B. Lichteinfall und Temperatur ab. In dieser Einschwingphase wurden sowohl positive als auch negative Potentiale beobachtet. Der Einschwingvorgang dauert unterschiedlich lange. Als Richtwert für den Großteil der untersuchten Sensoren wurde in der Praxis minimal 1,5h bis 2h ermittelt. Allerdings wurden auch bis zu 5h beobachtet. Abbildung 5.26 zeigt einen repräsentativen Einschwingvorgang, bei dem das Potential ausschließlich positiv war.

Bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Sensoren läßt sich der Einschwingvorgang in drei Phasen unterteilen. Nach dem ersten Kontakt mit Flüssigkeiten (1) ist der Verlauf des Potentials vollkommen unreproduzierbar. Es wurden bis zu 4 Wechsel von fallendem zu steigendem Potential beobachtet. Bei etwa 65% der untersuchten Sensoren war das Anfangspotential stark positiv. Bei den restlichen 35% lag das Anfangspotential im negativen Bereich oder nahe bei 0V. Im dargestellten Beispiel geht diese Phase ab etwas mehr als 2,5h in eine Phase über, in der sich das Potential weitgehend stabilisiert (2). Die zeitlichen Änderungen des Potentials sind dabei gering gegenüber den in biomedizinischen Anwendungen auftretenden pH-Änderungen. Somit sind ab diesem Zeitpunkt reproduzierbare Messungen möglich. Die Dauer dieser zweiten Phase ist zeitlich nicht exakt festzulegen. Ab einer gewissen Zeit, geht das Verhalten über in eine konstante Drift des Meßsignals (3).

Die Drift tritt bei allen Sensoren auf, insbesondere wenn sie über lange Zeiträume betrieben wer-

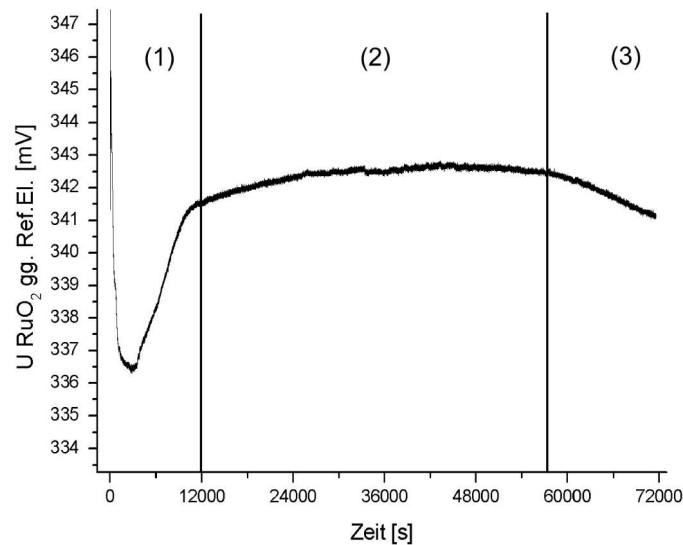


Abbildung 5.26: Beispiel eines Einschwingvorgangs mit rein positiven Potential (Chip #6)

den. In der Praxis ergaben sich Driftraten im Betrieb der Sensoren von $0,5\text{mV}/h$ bis $3,5\text{mV}/h$. Wobei der überwiegende Teil im Mittel Raten von $1,0\text{mV}/h$ bis $2,0\text{mV}/h$ aufwies. Abbildung 5.27 zeigt zwei representative Beispiele über den Zeitraum von $2h$. Prozentual betrachtet entsprechen diese Driftraten bei einer pH-Empfindlichkeit von $55\text{mV}/pH$ eine Änderung des absoluten pH-Wertes von $0,9\%/h$ bis $6,4\%/h$. Da in der vorgesehenen Anwendung nur relative Änderungen des pH-Wertes über Zeiträume von maximal 10min gemessen werden, sind diese Driftraten ohne wesentlichen Einfluß auf das Meßergebnis. Will man tatsächlich absolute Werte messen, so macht dies eine fortlaufende Kalibrierung der Sensoren während des Betriebs notwendig. Da in der Praxis beobachtet wurde, daß die Driftraten bei sehr langen Meßzeiten über mehrere Tage bei gleich bleibenden Umgebungsbedingungen sehr konstant sind, können die Abstände der fortlaufenden Kalibrierung sehr groß gewählt werden.

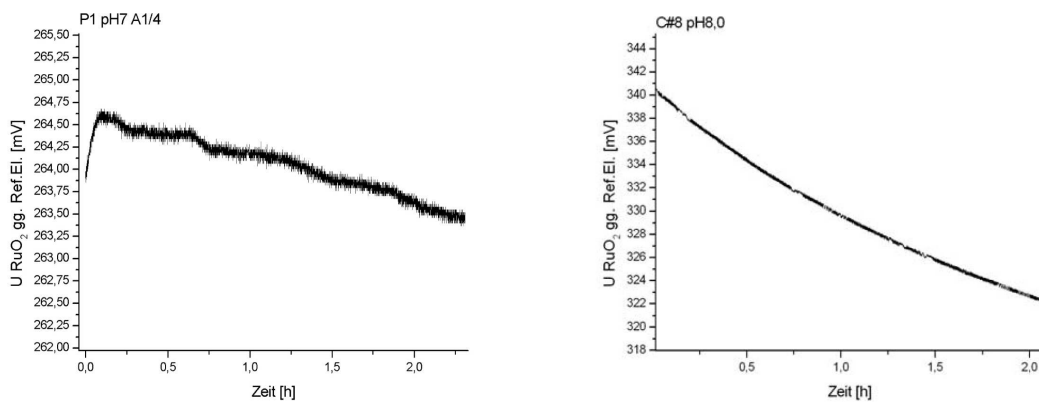


Abbildung 5.27: Links: Drift des Chips P1 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 7,0; Rechts: Drift des Chips #8 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 8,0

Die pH-Empfindlichkeit selbst bleibt sowohl von der Drift, als auch von der Lage des Potentiallevels nach dem Einschwingvorgang vollkommen unbeeinflusst. Die in Kapitel 5.3.1 dargestellten Werte für die Empfindlichkeit gelten auch nach längeren Driftvorgängen. In Abbildung 5.28 sind Beispiele für pH-Wechsel mit überlagerter Drift dargestellt. Für diese Messungen wurden Sensoren mit einer abnormal hohen Drift, aufgrund nicht optimaler Herstellungsparameter verwendet. Die Abbildung zeigt Wechsel der Pufferlösung mit den Werten pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0. Deutlich zu erkennen ist der reproduzierbare Potentialunterschied zwischen den pH-Werten, obwohl der Ausgangslevel des Potentials einer deutlichen Drift unterworfen ist.

Ist ein RuO_2 -Sensor einmal eingeschwungen und eine längere Zeit betrieben worden, so ergab sich in der Praxis, daß die Einschwingdauer nach einer Trocknung und Lagerung deutlich kürzer ist oder gar nicht auftritt. Die deutlichen Einschwingvorgänge bei Erstbetrieb in Flüssigkeiten stellen eine Einschränkung für die Verwendung der Sensoren dar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht, inwieweit sich dieser Einschwingvorgang beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse sind in Kapitel 5.3.4 zusammengefaßt.

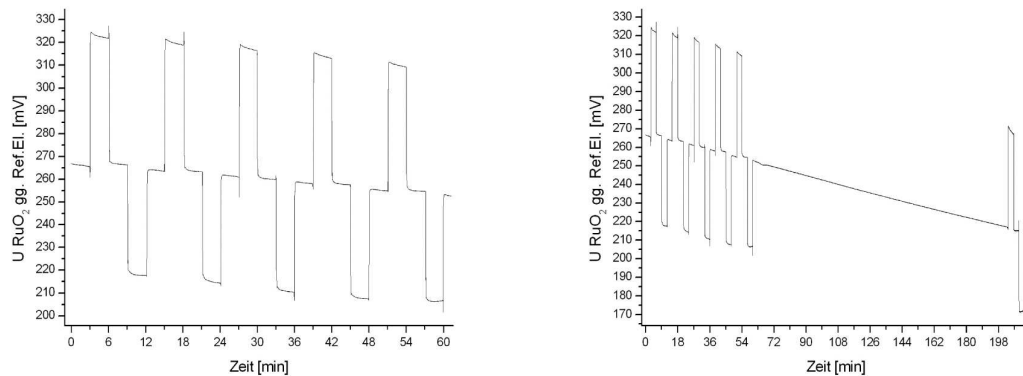


Abbildung 5.28: pH-Wechsel mit überlagerter starker Drift

Die hier betrachteten Veränderungen des Meßsignals über die Zeit zeigen die Drift des Sensors selbst bei gleichbleibenden pH-Wert der Meßlösung. In der Praxis treten, insbesondere bei Langzeitbetrieb, auch Effekte auf, die leicht mit Sensordrift zu verwechseln sind, aber andere Gründe haben. Zum einen handelt es sich hierbei um eine Veränderung des pH-Werts des Meßmediums durch Verdunstung im Medium oder eine Veränderung durch die Diffusion von CO_2 aus der Umgebungsatmosphäre in das Medium. Die Mechanismen, die durch letzteres zu einer Änderung des pH-Werts führen, wurden bereits in Kapitel 2.2.8 eingehend betrachtet, da sie einen wesentlichen Bestandteil des Anwendungsgebiets darstellen.

Einhergehend mit dem Eintrag von CO_2 beeinflusst auch der Sauerstoffpartialdruck der Meßlösung das entstehende Potential. Die Querempfindlichkeit des Sensors gegenüber Sauerstoff wird in Kapitel 5.3.5 noch eingehender betrachtet.

5.3.4 Beeinflussbarkeit des Einschwingverhaltens durch Anlegen von äußeren Spannungen

Die im vorhergehenden Kapitel dargestellten ausgeprägten Einschwingvorgänge bei Erstbetrieb in Flüssigkeiten stellen eine Einschränkung für die Verwendung der Sensoren dar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit sich dieser Einschwingvorgang beeinflusst

werden kann. Hierzu wurden Versuchsreihen durchgeführt, bei denen nach dem ersten Kontakt mit Flüssigkeiten aktiv Potentiale an die RuO_2 -Elektrode angelegt wurden. Dabei kam die in Kapitel 5.1.2 vorgestellte Schaltelektronik zum Einsatz. Bei den durchgeführten Versuchsreihen wurden ausschließlich Keramikchips der Größe $7,55\text{mm} \times 7,55\text{mm}$ verglichen, die auf einem gemeinsamen Substrat hergestellt wurden. Dadurch wurde sichergestellt, daß sich die RuO_2 -Elektroden nicht aufgrund des Herstellungsprozesses oder der geometrischen Parameter unterscheiden. Es konnte dadurch aus den Erfahrungen der vorausgehenden Versuche davon ausgegangen werden, daß sich die Sensorelektroden weitgehend identisch verhalten. Abbildung 5.29 zeigt das Einschwingverhalten der beiden Sensorelektroden S1 und S2 auf Chip K2#6 bei erstem Kontakt mit einer Pufferlösung mit pH 7,0, ohne daß aktiv eine Spannung von außen angelegt wurde. Nach ca. 120min ist ein Zustand erreicht, bei dem reproduzierbares Messen möglich ist. Der Unterschied der Ausgangsspannung zwischen den beiden Sensorelektroden ist dabei von Chip zu Chip verschieden und auch nicht vorhersagbar. Die Signaländerungen während des Einschwingvorgangs und im Betrieb sind allerdings, wie deutlich zu erkennen, sehr reproduzierbar und untermauern die Annahme, daß sich alle Chips einer Substratplatte qualitativ identisch verhalten. Aus Gründen der speziellen elektronischen Schaltung für die Versuche zur Beeinflussung der Einschwingcharakteristik, sind die Ergebnisse, abweichend von den übrigen Darstellungen in dieser Arbeit, als Signal Referenzelektrode gegen RuO_2 -Elektrode dargestellt. Die Messung in Abbildung 5.29 dient als Vergleich zu den folgenden Messungen, die alle mit Chips des Substrats K2 durchgeführt wurden und die Auswirkungen einer elektrischen Vorspannung der Sensorelektroden zeigen. Wie bereits im vorherigen Kapitel dargestellt, läßt sich keine reproduzierbaren Aussagen über die beim Einschwingvorgang auftretenden Sensorsignale treffen. Bei allen Einschwingvorgängen der Chips von Substrat K2 sank das Potential auf sehr geringe Werte ab.

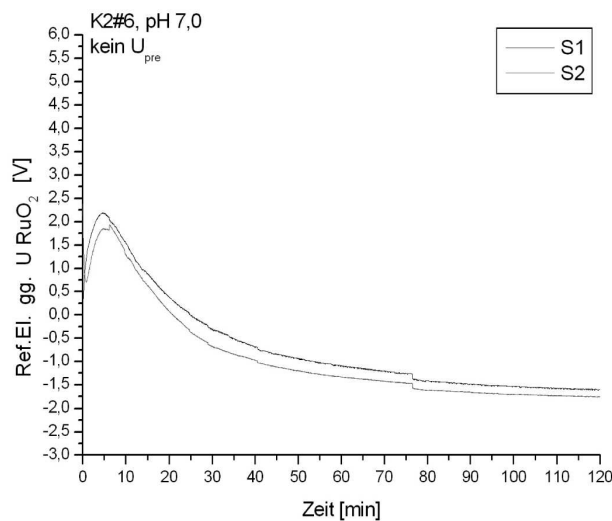


Abbildung 5.29: Einschwingverhalten von Chip K2#6 in Pufferlösung mit pH 7,0; S1 und S2 bezeichnen die beiden Sensorelektroden

In mehreren Versuchen, in denen eine Spannung unterschiedlicher Höhe, Polarität und Dauer an die Sensorelektroden angelegt wurde, konnte empirisch eine Optimierung dieser Parameter vorgenommen werden. Die besten Resultate konnten mit einer Spannung von $+3,0\text{V}$ über 50s erzielt werden. Derart betriebene Sensoren zeigten eine deutliche Verkürzung der Einschwingzeit. Abbildung 5.30 zeigt ein repräsentatives Beispiel mit Chip K2#14.

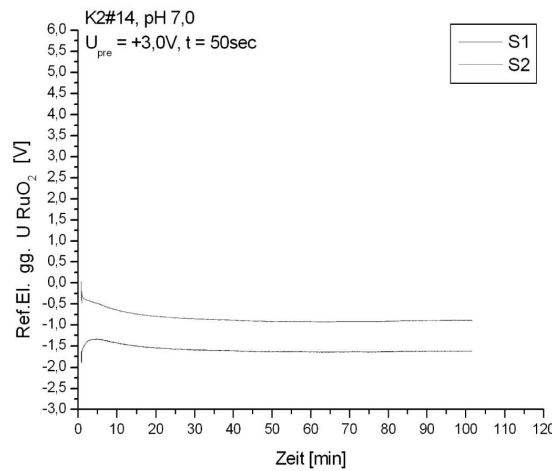


Abbildung 5.30: Einschwingverhalten von Chip K2#14 in Pufferlösung mit pH 7,0, mit einer Vorspannung von +3,0V über 50s

Die deutlich verkürzte Einschwingzeit beträgt hier etwa 20min bis 30min. Negativer Effekt der Vorspannung ist allerdings ein sehr hoher Unterschied in der Ausgangsspannung der Sensorelektroden der in dieser Messung bei etwa 750mV liegt. Werden die Sensoren nur für die Messung von relativen pH-Änderungen verwendet, ist dieser Effekt von untergeordneter Rolle. Der positive Einfluß auf das Einschwingverhalten war weitgehend unabhängig von der Höhe und der Polarität des Sensorsignals nach dem Abschalten der Vorspannung. Es ist also nicht nötig, Sensoren mit positiven Potentialen beim Einschwingvorgang mit positiven Vorspannungen, bzw. Sensoren mit negativen Potentialen beim Einschwingvorgang mit negativen Vorspannungen zu betreiben. Als representative Beispiele sind in Abbildung 5.31 zwei Messungen mit positiven und negativen Einschwingverhalten dargestellt, bei denen je eine Vorspannung mit +3,0V über 50s durchgeführt wurde.

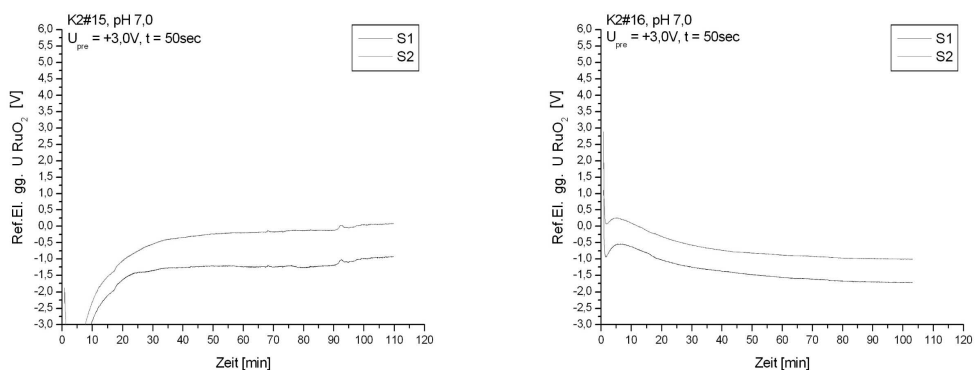


Abbildung 5.31: Einschwingverhalten von Sensoren in Pufferlösung mit pH 7,0 nach einer Vorspannung mit +3,0V über 50s; Links: Chip K2#15 mit positivem Anfangspotential; Rechts: Chip K2#16 mit negativem, bzw. neutralem Anfangspotential

Zusammenfassend wurde eine Reduzierung der Einschwingzeit im Mittel von etwa 120min auf etwa 30min nach dem ersten Kontakt mit Flüssigkeiten erreicht. Einschränkend muß angegeben werden, daß nicht bei allen Versuchen mit einer Vorspannung von $+3,0\text{V}$ über 50s dieses Ergebnis reproduzierbar erreicht wurde. Der Erfolg stellte sich bei etwa 70% der untersuchten Chips ein. Prinzipiell wurde aber gezeigt, daß sich die Einschwingcharakteristik positiv beeinflussen läßt. Bei den für diese Arbeit relevanten Anwendungsgebiete der Sensorchips, bei denen auf den Sensorchips lebende biologische Proben erst kultiviert werden müssen, ist diese Art der Beeinflussung nicht von Bedeutung, da einerseits die verwendeten Spannungen für die biologischen Proben zu hoch sind, andererseits durch die Kultivierung die Sensoren bereits eine ausreichende Zeit flüssiger Umgebung ausgesetzt sind.

5.3.5 Querempfindlichkeit zum Sauerstoffpartialdruck und anderen Ionen

In den Versuchen zeigte sich eine Querempfindlichkeit des Sensorsignals zum Sauerstoffpartialdruck des Meßmediums. Diese Querempfindlichkeit ist auch in der Literatur beschrieben. Abbildung 5.32 zeigt eine Messung mit Chip S5#2, bei der zwischen zwei Meßmedien mit pH 7,0 gewechselt wurde. Bei einem Medium wurde eine Sauerstoffverarmung mit Hilfe von Stickstoff, beim anderen Medium eine Sauerstoffübersättigung mit Hilfe von reinem Sauerstoff herbeigeführt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Temperatur bei beiden Medien weitgehend identisch ist. Der Unterschied im Sensorsignal lag bei ca. 200mV für den Wechsel zwischen den beiden Medien. Bei einer pH-Empfindlichkeit von 55mV/pH entspricht dies einem pH Unterschied von ca. $3,6$ pH-Dekaden. Postuliert man bei dem durch Stickstoff verarmten Medium einen Sauerstoffpartialdruck von etwa 0% pO_2 und bei dem durch reinen Sauerstoff übersättigten Medium einen Sauerstoffpartialdruck von etwa 130% pO_2 entspricht dies einer Querempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff von $0,28\text{pH}/\%pO_2$. Auffällig ist dabei das lineare Abfallen des Sensorsignals bei Wechsel auf sauerstoffverarmten Medium. Die Reaktion des Sensors auf den Wechsel zu sauerstoffübersättigten Medium ist erheblich schneller. Die Querempfindlichkeit der RuO_2 -Sensoren gegenüber Sauerstoff ist also sehr hoch und muß deshalb bei Messungen berücksichtigt und geeignet korrigiert werden. Da bei den in dieser Arbeit weiterentwickelten Sensorchips Sauerstoffsensoren integriert sind, ist dies allerdings bei Kenntnis der Querempfindlichkeit kein großer Nachteil. Eine Querempfindlichkeit zu anderen Ionen wie Na^+ und K^+ konnte nicht festgestellt werden.

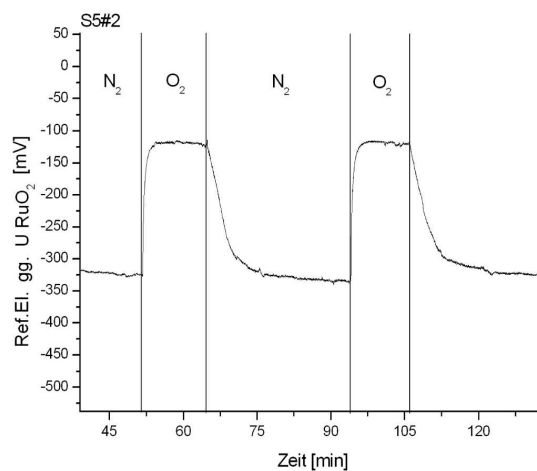


Abbildung 5.32: Einfluß des Sauerstoffpartialdrucks auf das Sensorsignal

5.3.6 Querempfindlichkeit zur Temperatur

Für die Untersuchung der Querempfindlichkeit der RuO_2 -Sensoren gegenüber der Temperatur wurde zwischen zwei Pufferlösungen mit pH 7,02 gewechselt. Die Pufferlösungen haben dabei die Temperatur $1,0^\circ C$ und $33,1^\circ C$. Abbildung 5.33 zeigt den Versuch.

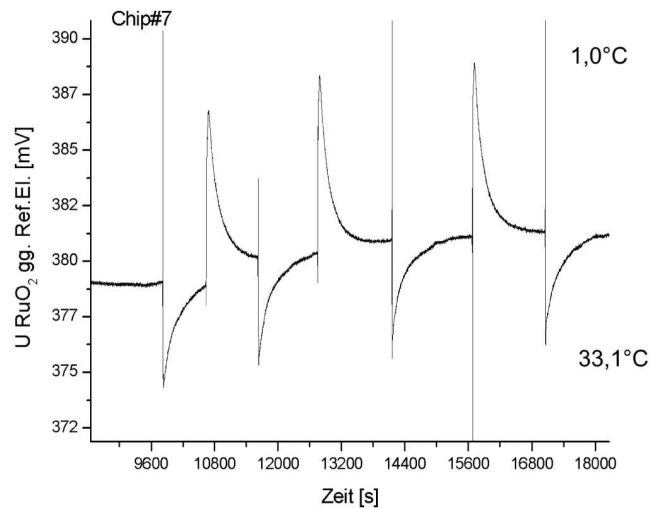


Abbildung 5.33: Einfluß der Temperatur auf das Sensorsignal bei Wechsel von Pufferlösungen (pH 7,02) mit $1,0^\circ C$ und $33,1^\circ C$

Der Verlauf der Messung zeigt ein deutlich höheres Meßpotential bei kälterer Lösung. Dieses klingt schnell ab, da sich die Lösung auf Zimmertemperatur erwärmt. Ebenso erhöht sich das niedrigere Meßpotential bei der warmen Lösung mit dem Abkühlen auf Raumtemperatur. Die nicht einheitlichen Meßpotentiale nach dem Wechsel der Pufferlösung, vor allem bei der warmen Lösung, werden darauf zurückgeführt, daß die Temperatur beim Einbringen in die Meßkammer nicht immer absolut reproduzierbar war. Der gesamte Temperaturunterschied von $32,1^\circ C$ führt zu einem maximalen Potentialunterschied von $14,2mV$ und entspricht bei einer pH-Empfindlichkeit von $55mV/pH$ einer Querempfindlichkeit von $7,9 \cdot 10^{-3} pH/^\circ C$. Die bezüglich der Raumtemperatur von $21,5^\circ C$ um $20,5^\circ C$ kältere Lösung bewirkt einen Potentialunterschied von $5,2mV$. Dagegen ergibt eine bezüglich der Raumtemperatur um $11,6^\circ C$ wärmere Lösung einen Potentialunterschied von $9mV$. Diese Größenordnungen wurden in weiteren Versuchen bestätigt. Die typische Querempfindlichkeit gegenüber der Temperatur liegt somit im Bereich $4,6 \cdot 10^{-3} pH/^\circ C$ bis $1,4 \cdot 10^{-2} pH/^\circ C$. Abbildung 5.33 zeigt außerdem, daß die Werte beim Einschwingen nach der jeweiligen Temperaturänderung höher liegen, wenn sie von den temperaturbedingt erniedrigten Spannungen ausgehen. Dieser Sachverhalt tritt in allen Versuchen dieses Typs auf. Es ist daher wahrscheinlich, daß hier ein Memory-Effekt auftritt.

5.3.7 Messungen zur Untersuchung der Lichtempfindlichkeit

Die RuO_2 -Sensoren zeigten bei den Versuchen eine Empfindlichkeit gegenüber Licht. Dabei beeinflusst die Bestrahlung mit Licht keine funktionsrelevanten Parameter wie Empfindlichkeit oder Ansprechverhalten. Bestrahlung mit Licht wirkt sich ausschließlich auf die Drift aus. Für die Untersuchung dieses Phänomens wurden LEDs mit verschiedenen Wellenlängen verwendet. Abbildung 5.34 zeigt Versuche mit LEDs der Wellenlänge $464nm$ und einer Lichtleistung von $1150mcd$ bei einer Stromstärke von

20mA.

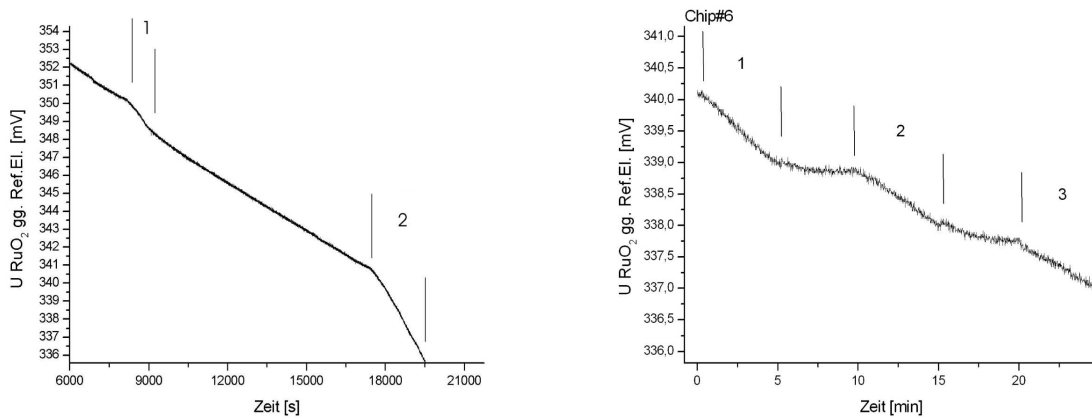


Abbildung 5.34: Einfluß von Licht auf die Drift der Sensorelektroden in einer Pufferlösung mit pH 7,0, in den markierten Bereichen wurde mit einer LED beleuchtet; Links: Chip #9; Rechts: Chip #6

In der linken Kurve wurde eine Drift in dunkler Umgebung von $3,27mV/h$ beobachtet, die sich unter Einfluß der LED auf $8,95mV/h$ erhöhte. Die rechte Kurve zeigt eine erheblich höheren Einfluß des Lichts auf die Driftrate. Die Drift erhöhte sich hier von einer vernachlässigbar kleinen Drift in dunkler Umgebung auf $8,6mV/h$ bei Bestrahlung mit Licht. Aus den durchgeführten Versuchen läßt sich dabei kein Einfluß der Wellenlänge ableiten. Tendenziell ist die Drift umso höher, je größer die Lichtleistung ist.

5.3.8 Abhängigkeit der Charakteristika von der aktiven Sensorfläche

Zur Charakterisierung der Abhängigkeit der Charakteristika von der aktiven Sensorfläche wurden RuO_2 -beschichtete Glasplättchen verwendet, die in den Versuchen schrittweise mit einem inerten Lack abgedeckt wurden, um deren aktive Sensorfläche zu verringern. Hierbei erfolgt die Charakterisierung wie in den oben beschriebenen Versuchsreihen hauptsächlich über die Potentialänderungen beim Wechsel von Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten.

Repräsentativ für die Untersuchungen der Flächenabhängigkeit sollen hier die Ergebnisse des Substrates P6 dargestellt werden. Die Ausgangsfläche $A = 1/1$ beträgt $40,2mm^2$, für $A = 3/4$ $30,15mm^2$, für $A = 1/2$ $20,1mm^2$ und für $A = 1/4$ $15,1mm^2$. Es wurde festgestellt, daß die absolut gemessenen Potentiale bei Flächen von $1/1$, $3/4$ und $1/2$ der Ausgangsfläche sehr nahe beieinander liegen. Für pH 6,0 stets im Bereich von $350mV$ bis $375mV$, für pH 7,0 um $300mV$ und für pH 8,0 bei $225mV$ bis $275mV$. Abbildung 5.35 zeigt die Empfindlichkeit und die Drift bei verschiedenen Sensorflächen.

Auffällig ist eine erhöhte Drift bei einer Sensorfläche von $3/4$ und noch deutlicher bei $1/4$ der Ausgangsfläche. Die Driftraten sind allerdings mit ca. $1,75mV/h$ relativ klein zur Potentialänderung bei pH-Wechsel und bewegen sich in der Größenordnung der Langzeitdrift. Die Potentialunterschiede beim Wechsel der Pufferlösungen mit einem pH-Unterschied von einer Dekade liegen im Bereich um $55mV/pH$ und sind von der aktiven Fläche der Sensorelektrode weitgehend unabhängig. Bei sehr kleinen Sensorflächen zeigte sich eine deutliche Abnahme des Ausgangslevels der sich ausbildenden Potentiale. Die pH-Empfindlichkeit bleibt allerdings auch hier weitgehend unbeeinflusst. Abbildung 5.36 zeigt die Potentiale für verschiedene pH-Werte aufgetragen über die aktive Sensorfläche.

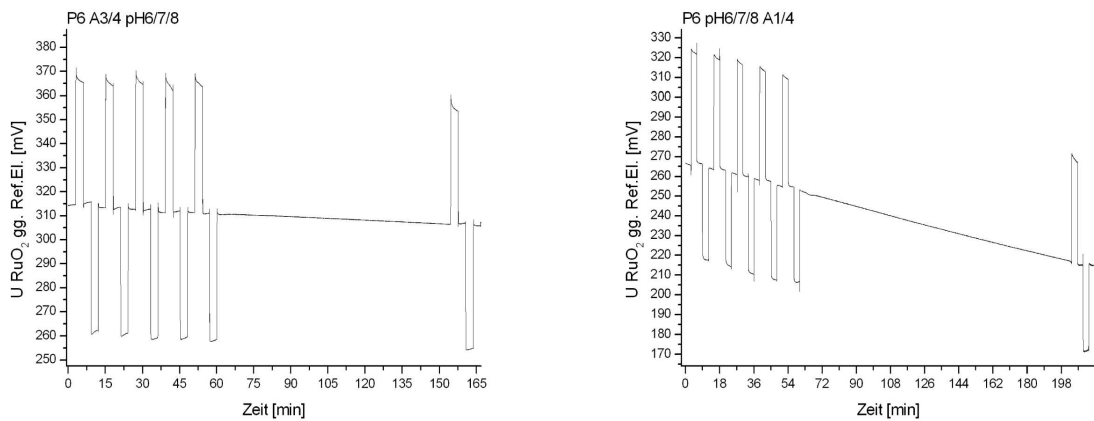


Abbildung 5.35: Verhalten des Substrates P6 bei verschiedenen pH-Werten (pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0); Links: 3/4 der Ausgangsfläche; Rechts: 1/4 der Ausgangsfläche

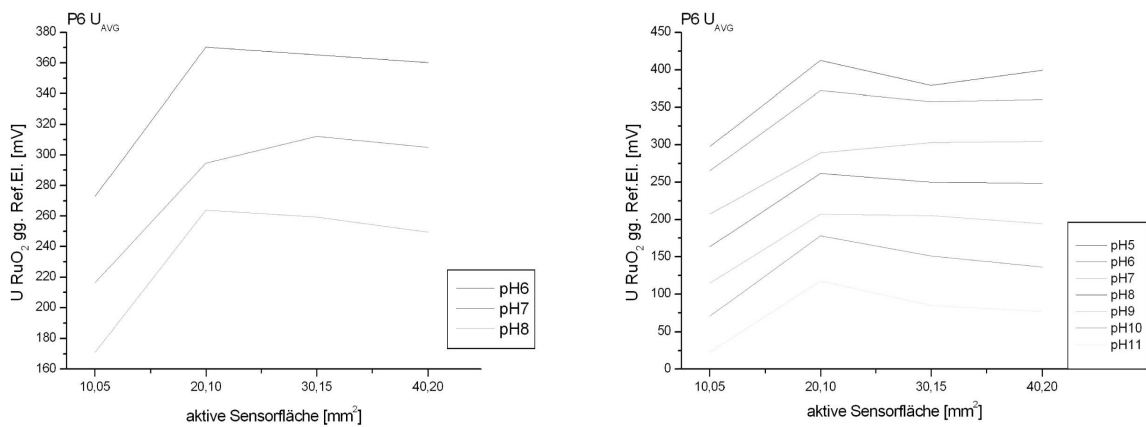


Abbildung 5.36: Meßpotentiale für verschiedene pH-Werte aufgetragen über die aktive Sensorfläche; Links: pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0; Rechts: pH 5,0 bis pH 11,0

Zusammenfassend lassen sich drei Punkte für die Abhängigkeit der Charakteristika der RuO_2 -Sensoren von der aktiven Sensorfläche feststellen:

- Die pH-Empfindlichkeit im Bereich von pH 6,0 bis pH 11,0 ist von der aktiven Sensorfläche weitgehend unabhängig
- In Pufferlösungen mit pH-Wert 5,0 treten bei sehr kleinen Flächen Unregelmäßigkeiten auf
- Je kleiner die aktive Sensorfläche wird, desto größer wird die Drift des Sensorsignals

5.3.9 Abhängigkeit der Charakteristika von der Dicke der Oxidschicht

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der von der Dicke der Oxidschicht standen mehrere Glas-Chips mit verschiedenen RuO_2 -Schichtdicken von $0,5\mu m$, $1,0\mu m$ und $2,0\mu m$, sowie mehrere Keramikssubstrate mit Schichtdicken von $3,5\mu m$ und $6,5\mu m$ zur Verfügung. Die Sensorelektroden wurden nach dem Einschwingen wieder abwechselnd in pH 6,0, 7,0 und 8,0 betrieben.

Bei einer Schichtdicke von $0,5\mu\text{m}$ zeigte sich kein auffälliges Verhalten beim Einschwingvorgang oder der Drift. Auffällig war hier zum einen die hohe Trägheit und zum Teil die Unreproduzierbarkeit der Einstellung des Meßpotentials beim pH-Wechsel (Abbildung 5.37). Zum anderen war die pH-Empfindlichkeit nicht einheitlich, sondern schwankte unreproduzierbar zwischen den verschiedenen pH-Werten. Die Potentialunterschiede für die Wechsel zwischen den pH-Werten waren unterschiedlich hoch, teilweise nur wenige mV und in ihrer Höhe und Einstellzeit nicht reproduzierbar.

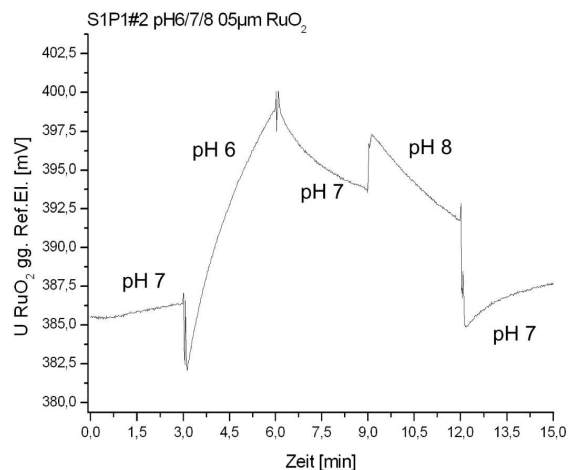


Abbildung 5.37: Verhalten von Substrat S1/Platte1/ChipNr2 in pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0

Die Schichtdicke $1,0\mu\text{m}$ führte zu den in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnissen in Bezug auf pH-Empfindlichkeit, Drift und Ansprechverhalten.

Bei einer Schichtdicke von $2,0\mu\text{m}$ wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei Sensoren mit $1,0\mu\text{m}$ Dicke. Allerdings wurde hierbei eine leicht erhöhte Trägheit im Ansprechverhalten und in der Einstellzeit nach einem Pufferwechsel beobachtet. Dieses Verhalten geht aber einher mit einem leicht besseren Langzeitverhalten. Bei dieser Schichtdicke wurden die niedrigsten Driftraten aller Versuche beobachtet. Sie lag bei Substrat S3/P2/Chip#3 bei nur $140\mu\text{V}/h$. Bei einer pH-Empfindlichkeit von $55\text{mV}/h$ kann hier quasi von Driftfreiheit gesprochen werden.

Bei den Schichtdicken $3,5\mu\text{m}$ und $6,5\mu\text{m}$ wurden sehr hohe Reaktionszeiten auf Wechsel der Pufferlösungen beobachtet. Die pH-Empfindlichkeit war nicht sehr reproduzierbar und lag durchgehend deutlich über den sonst festgestellten $55\text{mV}/pH$. Das Verhalten bei Langzeitbetrieb war ebenfalls sehr instabil. Aufgrund diesen Ergebnissen können Schichtdicken in diesem Bereich als ungeeignet bezeichnet werden und wurden somit auch nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend läßt sich für die Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke des RuO_2 folgendes festhalten:

- In den durchgeführten Meßreihen ergab sich, daß bei einer Schichtdicke von $0,5\mu\text{m}$ des Rutheniumoxids zwar kein auffälliges Verhalten beim Einschwingvorgang oder der Drift beobachtbar ist, das Verhalten beim Wechsel des pH-Wertes allerdings träge und nicht vorhersagbar ist
- Bei Schichtdicken von $1,0\mu\text{m}$ und $2,0\mu\text{m}$ sind geringe Langzeitdriften zu verzeichnen und die Ansprechzeiten beim pH-Wechsel sind geringer als bei $0,5\mu\text{m}$. Dies gilt insbesondere für $1,0\mu\text{m}$.

- Die Langzeitstabilität ist für $2,0\mu\text{m}$ am besten. Demnach sind Schichtdicken zwischen $1,0\mu\text{m}$ und $2,0\mu\text{m}$ als Kompromiß zwischen Ansprechzeit und Langzeitstabilität am besten für den Betrieb als pH-Sensor geeignet

5.3.10 Hysterese

Eine quantitative Einschätzung der Hysterese ist aufgrund des Ansprechverhaltens der Sensoren relativ schwierig. Abbildung 5.38 zeigt einen, bereits in Kapitel 5.3.1 betrachteten Meßverlauf von Chip P6 in dem am Beispiel des Wechsels von pH 8,0 auf pH 7,0 und zurück zu pH 8,0, sowie dem Wechsel von pH 6,0 auf pH 7,0 und zurück zu pH 6,0 keinerlei meßbare Hysterese auftritt.

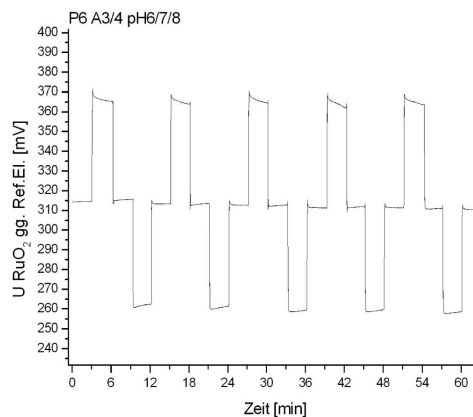


Abbildung 5.38: Meßverlauf von Chip P6 für die pH-Werte pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0

Bei dem überwiegenden Teil der durchgeführten Versuche zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Zu beobachten war durchgehend eine, bereits in Kapitel 5.3.1 dargestellte, langsame Annäherung an den Endwert.

5.3.11 Biokompatibilität

Die Sensoren wurden einem Biokompatibilitätstest nach ISO 10993-5 unterzogen und diesbezüglich für geeignet befunden. Abbildung 5.39 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit L929-Zellen (Mausfibroblasten) bewachsenen Sensorelektrode auf einem Keramikchip der Größe $7,55\text{mm} \times 7,55\text{mm}$. Es zeigte sich kein Unterschied in der Zellverteilung auf oder neben dem Sensor.

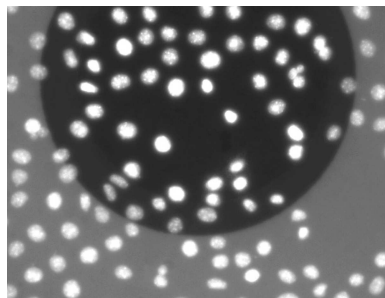


Abbildung 5.39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von L929-Zellen auf einer Rutheniumoxidelektrode eines Keramikchips

5.3.12 Weitere Ergebnisse

Im Laufe der Meßreihen zur Untersuchung des Einflusses der Sensordicke auf die Charakteristika der Sensoren wurden bei einigen Proben Anomalien festgestellt, die in ihrer Ausbildung reproduzierbar waren. Statt bei der Erhöhung des pH-Werts ein geringeres Meßpotential zu zeigen, stieg das Meßpotential bei Sensoren einer bestimmten Charge an. Das sich einstellende Potential blieb konstant und stellte eine genaue Inversion des erwarteten Verhaltens dar. Das Ansprechverhalten war darüberhinaus ebenfalls reproduzierbar etwa doppelt so lange wie sonst üblich. Abbildung 5.40 zeigt die Reaktion des Substrats S1P2#3 auf die pH-Werte pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0.

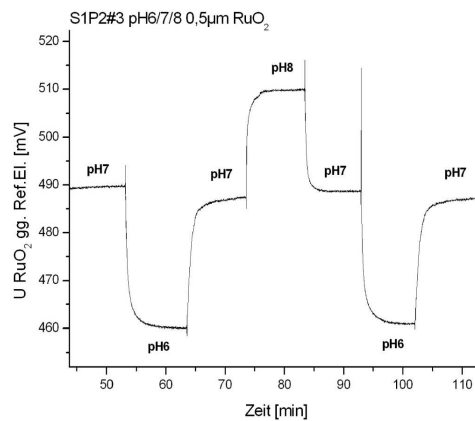


Abbildung 5.40: Inversion der Reaktionen des Substrats S1P2#3 auf die pH-Werte pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0

Diese Anomalien waren wie bereits erwähnt reproduzierbar. Ihre Ursache könnte mit der Verunreinigung des Rutheniumoxids durch Fremdstoffe während des Herstellungsprozesses erklärt werden. Da die genaue Art dieser Verunreinigung nicht bekannt ist, kann hierzu keine genaue Aussage getroffen werden.

5.4 Zusammenfassung und Diskussion

5.4.1 Zusammenfassung

Die Messungen an den RuO_2 -Sensoren zeigen, daß sie zur Messung des pH-Werts in biomedizinischen Anwendungen geeignet sind. Die Ergebnisse der durchgeführten Charakterisierungen lassen auf die Machbarkeit extrazellulärer, zellphysiologischer Messungen schließen. Die Sensorelektroden sind biokompatibel und werden gut mit Zellen bewachsen. Die Sensoren wurden hinsichtlich der relevanten Parameter getestet. Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

Die Versuche zeigen eine pH-Empfindlichkeit zwischen $52mV/pH$ und $58mV/pH$, wobei im Mittel beim überwiegenden Teil der Messungen ein Wert von $55mV/pH$ über einen pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 11,0 erreicht wird. Im Bereich zwischen pH 5,5 bis pH 11,0 ist die pH-Empfindlichkeit nahezu linear. Lediglich bei pH-Werten unter pH 5,5 zeigen die Sensoren ein nichtlineares Verhalten und die Empfindlichkeit liegt unter $55mV/pH$. Der für den Einsatzzweck in biomedizinische Anwendungen mit lebenden Zellen relevante Bereich pH 6,0 bis pH 9,0 läßt sich somit mit den RuO_2 -Sensoren ohne Einschränkungen abdecken.

Die Ansprechzeit der RuO_2 -Sensoren bei einem Wechsel um eine pH-Dekade liegt im Mittel bei unter $2s$, um 90% des Endwertes zu erreichen. Unterschiede aufgrund der Richtung des pH-Wechsels wurden nicht festgestellt.

Die Ergebnisse zeigen durchgehend ein äußerst geringes Rauschen der RuO_2 -Sensoren. Dieses liegt bei allen Messungen im Mittel bei $0,15mV$ bis $0,20mV$ unabhängig vom jeweiligen Level des Nutzsignals. Dies entspricht bei einem Nutzsignallevel von beispielsweise $400mV$ einem SNR von ca. $76dB$. Bei einer Empfindlichkeit von $55mV/pH$ zeigen die Sensoren somit im Mittel ein Rauschen von $0,27\%$ bis $0,37\%$ vom gemessenen pH-Wert oder bezogen auf die Potentialänderung von $55mV/pH$ ein SNR von ca. $51dB$.

Die RuO_2 -Sensoren sind beim ersten Kontakt mit flüssigen Medien einem ausgeprägten Einschwingverhalten unterworfen. Als Richtwert für den Großteil der untersuchten Sensoren wurde in der Praxis minimal $1,5h$ bis $2h$ ermittelt. Allerdings wurden auch bis zu $5h$ beobachtet. Bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Sensoren läßt sich der Einschwingvorgang in drei Phasen unterteilen. Nach dem ersten Kontakt mit Flüssigkeiten ist der Verlauf des Potentials vollkommen unreproduzierbar. In Phase 2 stabilisiert sich das Potential weitgehend. Die zeitlichen Änderungen des Potentials sind dabei gering gegenüber die in biomedizinischen Anwendungen auftretenden pH-Änderungen. Die dritte Phase zeigt eine konstante Drift des Meßsignals.

Um dieses Einschwingverhalten beim ersten Kontakt mit flüssigen Medien zu optimieren wurden Versuche unternommen, durch das Anlegen einer äußeren Spannung eine Verbesserung herbeizuführen. Zusammenfassend wurde eine Reduzierung der Einschwingzeit im Mittel von etwa $120min$ auf etwa $30min$ nach dem ersten Kontakt mit Flüssigkeiten erreicht. Einschränkend muß angegeben werden, daß nicht bei allen Versuchen dieses Ergebnis reproduzierbar erreicht wurde. Der Erfolg stellte sich bei etwa 70% der untersuchten Chips ein. Prinzipiell wurde aber gezeigt, daß sich die Einschwingcharakteristik positiv beeinflussen läßt.

Die Driftraten im Betrieb der Sensoren liegen zwischen $0,5mV/h$ und $3,5mV/h$. Der überwiegende Teil weist im Mittel Raten von $1,0mV/h$ bis $2,0mV/h$ auf. Prozentual betrachtet entsprechen diese Driftraten bei einer pH-Empfindlichkeit von $55mV/pH$ einer Änderung des absoluten pH-Wertes von $0,9\%/h$ bis $6,4\%/h$. Die pH-Empfindlichkeit selbst bleibt sowohl von der Drift, als auch von der Lage des Potentiallevels nach dem Einschwingvorgang vollkommen unbeeinflusst. Ist ein RuO_2 -Sensor einmal eingeschwungen und eine längere Zeit betrieben worden, so ergab sich in der Praxis, daß die Einschwingdauer nach einer Trocknung und Lagerung deutlich kürzer ist oder gar nicht auftritt.

Die Sensoren zeigen eine Querempfindlichkeit zum Sauerstoffpartialdruck des Meßmediums. Die Querempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff wurde im Mittel mit $0,28pH/\%pO_2$ bestimmt. Sie ist also sehr hoch und muß deshalb bei Messungen berücksichtigt und geeignet korrigiert werden.

Die Sensoren zeigen eine Querempfindlichkeit von $4,6 \cdot 10^{-3}pH/^\circ C$ bis $1,4 \cdot 10^{-2}pH/^\circ C$. Es zeigt sich außerdem, daß die Werte beim Einschwingen nach der jeweiligen Temperaturänderung höher liegen, wenn sie von den temperaturbedingt erniedrigten Spannungen ausgehen. Dieser Sachverhalt läßt auf einen Memory-Effekt schließen.

Die RuO_2 -Sensoren zeigen eine Empfindlichkeit gegenüber Licht. Die Bestrahlung mit Licht hat keine Auswirkungen auf funktionsrelevante Parameter wie Empfindlichkeit oder Ansprechverhalten, sondern wirkt sich ausschließlich negativ auf die Drift aus. Aus den durchgeführten Versuchen läßt sich dabei kein Einfluß der Wellenlänge ableiten. Tendenziell ist die Drift umso höher, je größer die die Sensoren treffende Lichtleistung ist.

Die Abhängigkeit der Charakteristika der RuO_2 -Sensoren von der aktiven Sensorfläche lassen sich in drei Punkte zusammenfassen:

- Die pH-Empfindlichkeit im Bereich von pH 6,0 bis pH 11,0 sind von der aktiven Sensorfläche weitgehend unabhängig
- In Pufferlösungen mit pH-Wert 5,0 treten bei sehr kleinen Flächen Unregelmäßigkeiten auf

- Je kleiner die aktive Sensorfläche wird, desto größer wird die Drift des Sensorsignals

Aufgrund dieser Ergebnisse werden die Sensoren als runde Elektrodenspots mit einem Durchmesser von $1,0\text{mm}$ ausgeführt, was einer Sensorfläche von $0,785\text{mm}^2$ entspricht.

Zusammenfassend läßt sich für die Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke des RuO_2 folgendes festhalten:

- In den durchgeführten Meßreihen ergab sich, daß bei einer Schichtdicke von $0,5\mu\text{m}$ das Rutheniumoxid zwar kein auffälliges Verhalten beim Einschwingvorgang oder der Drift beobachtbar ist, das Verhalten beim Wechsel des pH-Wertes allerdings träge und nicht vorhersagbar ist
- Bei Schichtdicken von $1,0\mu\text{m}$ und $2,0\mu\text{m}$ sind geringe Langzeitdriften zu verzeichnen und die Ansprechzeiten beim pH-Wechsel sind geringer als bei $0,5\mu\text{m}$. Dies gilt insbesondere für $1,0\mu\text{m}$.
- Die Langzeitstabilität ist für $2,0\mu\text{m}$ am besten. Demnach sind Schichtdicken zwischen $1,0\mu\text{m}$ und $2,0\mu\text{m}$ als Kompromiß zwischen Ansprechzeit und Langzeitstabilität am besten für den Betrieb als pH-Sensor geeignet

Die Elektrodenspots werden aufgrund dieser Erkenntnisse mit einer RuO_2 -Schichtdicke von $1,5\mu\text{m}$ gefertigt.

Die Sensoren zeigen im Mittel keinerlei meßbare Hysterese. Wobei hierfür aufgrund des Ansprechverhaltens der Sensoren eine eindeutige Aussage schwierig zu treffen ist.

Die Sensoren wurden einem Biokompatibilitätstest nach ISO 10993-5 unterzogen und diesbezüglich für geeignet befunden. Es zeigt sich kein Unterschied in der Zellverteilung auf oder neben dem Sensor.

5.4.2 Vergleich der Ergebnisse mit den substituierten ISFETs

Neben dem Nachweis der Eignung der auf RuO_2 basierenden pH-Sensorelektroden für die Bestimmung von pH-Änderungen, die durch Ansäuerungsleistung von lebenden Zellen verursacht werden, soll an dieser Stelle ihre Leistungsfähigkeit im Vergleich zu den, für diese Art von Messungen ursprünglich verwendeten ISFETs diskutiert werden. Als Vergleichsbasis dienen die Ergebnisse die Baumann in [89] erarbeitet hat. Diese wurden mit ISFETs auf CMOS-Basis erzielt und entsprechen den Sensoren, die auf den ursprünglich verwendeten multiparametrischen Sensorchips unserer Arbeitsgruppe integriert sind und als Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit dienten.

In [89] wurden insgesamt 8 Chargen untersucht. Die ISFETs zeigten eine durchweg geringere Empfindlichkeit als die RuO_2 -Sensoren, im Mittel ca. $40\text{mV}/\text{pH}$. Während der überwiegende Teil der RuO_2 -Sensoren eine Empfindlichkeitsbandbreite von $52\text{mV}/\text{pH}$ bis $58\text{mV}/\text{pH}$ zeigen, liegt die Bandbreite der ISFET-Chargen bei ca. $19\text{mV}/\text{pH}$ bis $46\text{mV}/\text{pH}$. Diese hohen Unterschiede zwischen einzelnen ISFET-Chargen ist auf den komplexen elektronischen Aufbau der ISFETs zurückzuführen, der durch eine deutlich größere Anzahl an Prozeßparameter beeinflusst werden kann als dies bei den einfach aufgebauten Metalloxidelektroden der Fall ist. Bei diesen ist neben den offensichtlichen Parametern wie Schichtdicke und Sensorfläche die Güte der Sensoren prinzipiell nur durch die Stöchiometrie des Sputterprozesses beeinflusst. Diese Stöchiometrie läßt sich aber erheblich genauer einstellen und reproduzieren, als die Parameter der vielen Prozeßschritte bei der ISFET-Herstellung.

Die Linearität der Empfindlichkeit ist bei den RuO_2 -Elektroden erheblich größer als bei den ISFETs. Sieht man von dem beschriebenen Verhalten bei pH-Werten unter pH 5,5 ab, liegt die Linearität hier bei unter $0,5\text{mV}/\text{pH}$, also bei weniger als 1%. Im Gegensatz dazu schwankt die Linearität der ISFETs am Beispiel einer Charge mit einer mittleren Empfindlichkeit von $26,53\text{mV}/\text{pH}$ zwischen $17,35\text{mV}/\text{pH}$ und $29,52\text{mV}/\text{pH}$, also einer Abweichung um bis zu 35% von der mittleren Empfindlichkeit.

Beim sich einstellenden Ausgangspotential zeigen beide Sensorarten ein nicht reproduzierbares Verhalten. Das Ausgangspotential ist bei beiden Arten von Sensor zu Sensor verschieden. Aufgrund

des Einsatzzweckes, der Messung von relativen Änderungen, ist dieses Verhalten aber von untergeordnetem Interesse. Das nutzbare Ausgangssignal ist bei den ISFETs erheblich höher, da es sich um ein aktives elektronisches Bauteil handelt und als Nutzsignal das Sourcepotential U_{GS} verwendet wird. Betragsmäßig ist es bei ISFETs in der Regel über einem Volt, während es bei den RuO_2 -Elektroden unverstärkt in der Regel bei pH 7 um ca. $400mV$ liegt. Dieser Bereich ist aber meßtechnisch unproblematisch zu verarbeiten.

Die Standfestigkeit der Sensoren wurde bei den RuO_2 -Elektroden nicht explizit untersucht. Bei den Charakterisierungen für die vorliegende Arbeit ist allerdings kein einziger Sensor aufgrund seiner Sensorfunktion während der Messung ausgefallen. Sind Ausfälle aufgetreten, waren sie auf Defekte an der Isolation der elektrischen Kontakte zurückzuführen. Die längsten Messungen dauerten mehrere Tage. Im Vergleich dazu sind in [89] deutliche Schwierigkeiten bezüglich der Standfestigkeit der ISFETs dokumentiert. Viele ISFETs hatten eine Lebensdauer von weniger als 6 Stunden und eine genaue Vorhersage ihrer Lebensdauer war unmöglich. Aus diesem Grund waren bei den multiparametrischen Sensorchips immer mehrere ISFETs integriert. Die unreproduzierbare Standfestigkeit bei den ISFETs ist ebenfalls auf ihren komplexen Aufbau zurückzuführen, der eine Vielzahl an Ausfallursachen bietet, angefangen von elektrostatischer Zerstörung des Bauteils bis hin zu Stabilitätsproblemen bei den Passivierungsschichten von nur wenigen nm Dicke.

Das Rauschverhalten der ISFETs wurde in [89] nicht explizit untersucht. Es wurde nur ein theoretisch berechneter Wert von $0,15mV$ angegeben. Berücksichtigt man die geringere Empfindlichkeit der ISFETs so liegt das Rauschen etwa auf dem gleichen Niveau wie bei den RuO_2 -Elektroden, die im Mittel mit $0,15mV$ bis $0,20mV$ gemessen wurden. Bei den ISFETs ist allerdings eine hohe Empfindlichkeit gegenüber elektromagnetischen Einstrahlungen angegeben, die Auswirkungen auf die notwendige aktive Ansteuerelektronik hat. Die Ansteuerelektronik bei den RuO_2 -Elektroden ist weitgehend einfacher aufgebaut und besteht im Prinzip nur aus einem Instrumentenverstärker. Da dieser aber vergleichsweise eine enorm hohe Eingangsimpedanz aufweist, die ihrerseits die Messung ebenfalls sehr anfällig gegenüber elektromagnetischen Störungen macht, läßt sich hierfür keinerlei nennenswerte Unterschiede zwischen den beiden Sensorarten anführen.

Bezüglich dem Einschwingverhalten zeigen die ISFETs leichte Vorteile gegenüber den RuO_2 -Elektroden. Zwar sind für die ISFETs in [89] ebenfalls Einschwingzeiten von mehreren Stunden angegeben, allerdings ist aus den dargestellten Diagrammen zu erkennen, daß der Verlauf der ISFETs während dieser Einschwingphase erheblich reproduzierbarer ist, als bei den Verläufen der RuO_2 -Elektroden. Langzeitdrift ist in [89] nicht explizit betrachtet und auch kein Mittelwert angegeben. Allerdings läßt sich aus den Diagrammen eine Drift von ca. $5mV/h$ bis $8mV/h$ ablesen. Bei einer mittleren pH-Empfindlichkeit von $40mV/pH$ entspricht dies einer Änderung des absoluten pH-Wertes von $12,5\%/h$ bis $20\%/h$. Diese Werte liegen mehr als dreimal höher als bei den RuO_2 -Elektroden.

Eine Charakterisierung der ISFETs bezüglich der Sauerstoffquerempfindlichkeit wurde in [89] nicht durchgeführt. Da die Sauerstoffquerempfindlichkeit ein Problem aller Metalloxide ist und die ISFETs als ionensensitive Schichten ebenfalls Metalloxide verwenden, ist hierbei ein ähnliches Verhalten beider Sensorarten anzunehmen.

Die Querempfindlichkeit gegenüber der Temperatur ist bei ISFETs erheblich höher als bei den RuO_2 -Elektroden. In [89] sind Querempfindlichkeiten bis zu $0,1pH/^\circ C$ angegeben. Die RuO_2 -Elektroden zeigen dagegen nur Querempfindlichkeiten bis $1,4 \cdot 10^{-2}pH/^\circ C$, die damit mehr als 7-mal niedriger liegen. Dies ist nicht verwunderlich, da neben der, bei beiden Sensorarten auftretende Temperaturabhängigkeit der Elektrolyt-Oxid-Grenzschicht, beim ISFET eine starke Temperaturempfindlichkeit der physikalischen Vorgänge im Halbleiter hinzukommt. Da bei Messungen mit lebenden Zellen die Temperatur bei $37^\circ C$ vorgegeben ist, spielt die Temperaturquerempfindlichkeit bei beiden Sensorarten keine große Rolle.

In Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber auf den Sensor auftreffendes Licht, zeigen beide Sensorarten deutliche Unterschiede. Während die RuO_2 -Elektroden in Abhängigkeit der Lichtleistung lediglich einen negativen Einfluß auf die Drift zeigen, sind die Auswirkungen auf die ISFETs erheb-

lich größer. Hier zeigt sich eine deutliche Verschiebung des Sensorsignals, wenn Licht auf die Sensoroberfläche fällt. In [89] ist dieser Effekt nur qualitativ beschrieben. Diese Empfindlichkeit ist bei den ISFETs ebenfalls auf die physikalischen Vorgänge im Halbleiter zurückzuführen. Da bei Messungen mit pflanzlichen Zellen eine Lichtbestrahlung notwendig ist, ist dieser Nachteil der ISFETs durchaus von Bedeutung.

Hysteresis bei den ISFETs ist in [89] ebenfalls nur qualitativ beschrieben. Die ISFETs zeigen demnach ein geringes aber deutlich beobachtbares Hystereseverhalten. Dieses Verhalten wurde bei den RuO_2 -Elektroden nicht beobachtet.

Betrachtet man diese Ergebnisse kann zusammenfassend in vielen Bereichen von einer deutlichen Überlegenheit der RuO_2 -Elektroden gegenüber den ISFETs gesprochen werden. Insbesondere hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die geringere und deutlich unreproduzierbarere Empfindlichkeit, die geringere Standfestigkeit und die enorme Empfindlichkeit gegenüber Lichteinfall. Demgegenüber zeigen die ISFETs ein reproduzierbareres Verhalten bei erstem Kontakt mit einer Flüssigkeit. In Verbindung mit der erheblich einfacheren und kostengünstigeren Herstellung macht dies die RuO_2 -Elektroden zu einer vielversprechenden Alternative zu den ISFETs.

5.4.3 Vergleich der Ergebnisse mit dem Stand der Literatur

Neben dem Vergleich mit den ISFETs sollen nachfolgend die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse soweit möglich mit dem Stand der Literatur verglichen werden. Dieser Vergleich gestaltet sich schwierig, da die Eigenschaften des RuO_2 stark von der Art der Herstellung abhängen. Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die Eignung als Sensormaterial für biomedizinische Anwendungen in Verbindung mit lebenden Zellen und Geweben gesetzt. Für diese spezielle Anwendung gibt es für RuO_2 keine Publikation. Als Vergleichsbasis dient die 1984 veröffentlichte Arbeit von Fog und Buck, die die umfangreichste Charakterisierung von RuO_2 als Sensormaterial für pH-Sensoren enthält [206]. Sie enthält ebenfalls Daten für die Metalloxide TiO_2 , RhO_2 , SnO_2 , Ta_2O_5 , OsO_2 , IrO_2 und PtO_2 .

Die pH-Empfindlichkeit ist in [206] mit $61mV/pH$ angegeben und liegt deutlich über dem in der vorliegenden Arbeit bestimmten Wert. Die Abweichungen der Linearität im Bereich zwischen pH 2 und pH 12 liegt bei maximal $2mV$ und ist somit etwas schlechter als die hier beobachteten. Eine Verschlechterung der Empfindlichkeit bei pH-Werten unter pH 5,5 ist in [206] nicht beschrieben. Das Ausgangspotential bei pH 7 liegt in [206] etwa auf demselben Niveau wie hier charakterisiert. Als Hysterese geben Fog und Buck maximal $9mV$ bei einem Wechsel von pH 2 auf pH 12 an. Vergleicht man die anderen Metalloxide in dieser Veröffentlichung, die mit einer Hysterese von $25mV$ bis $100mV$ angegeben sind, verdeutlicht dies das äußerst geringe Hystereseverhalten dieses Materials und geht mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit einher. Fog und Buck geben für RuO_2 an, daß nur äußerst geringe Querempfindlichkeiten gegenüber Na^+ und K^+ existieren und bestätigen die Ergebnisse aus der vorliegenden Charakterisierung. Dies unterstreicht die Überlegenheit diesbezüglich gegenüber den ISFETs. Nur für I^- sind leichte Querempfindlichkeiten zu verzeichnen, was aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde.

In den wichtigsten Parametern konnte in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse von Fog und Buck bestätigt werden. Abweichungen lassen sich auf die unterschiedlichen Herstellungsmethoden des RuO_2 zurückführen.

Kapitel 6

Impedanzsensoren

In Kapitel 2.3 wurde ausführlich die Bedeutung der Zelloberfläche und der Plasmamembran für die Zellfunktion dargestellt. Für viele zellbiologische Fragestellungen sind die Eigenschaften der Zellmembran von großer Bedeutung. Änderungen wirken sich unter anderem auf die Zelladhäsion, die Zellmorphologie und auf die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und ihrer extrazellulären Matrix aus. Diese Änderungen lassen sich an zellulären Systemen mit Hilfe von Impedanzmessungen detektieren. In unserer Arbeitsgruppe werden hierfür Interdigitalelektrodenstrukturen verwendet, die bereits erfolgreich in multiparametrischen Sensorchips integriert und zum Einsatz gebracht wurden [122]. In der vorliegenden Arbeit werden diese Sensoren ebenfalls für multiparametrische Sensorchips verwendet. Für ihre Integration in Chipsystemen für eine hohe Anzahl an parallelen Messungen, wie zum Beispiel für den Einsatz in Multiwellplatten, bietet es sich allerdings an, die Konfiguration der Elektroden zu optimieren um effiziente Chiplayouts zu ermöglichen. In diesem Kapitel werden neben den Grundlagen der Impedanzsensoren die Optimierungen an den Sensorkonfigurationen und die dadurch notwendigen neu entwickelten Konzepte bezüglich der Meßelektronik näher betrachtet.

6.1 Grundlagen

6.1.1 Zelladhäsion

Die Zelladhäsion ist ein komplexes Phänomen und umfaßt mehrere wichtige Parameter wie Bindungsstärke, Bindungsaffinität, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Abstand. Für die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen mit Interdigitalelektrodenstrukturen, die Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit sind, steht die Messung des Zell-Zell- und Zell-Matrix-Abstands im Vordergrund. Parameter wie Adhäsionsstärke und Bindungsaffinität sind nur soweit von Bedeutung, daß sie eine sichere Anhaftung an die Sensorchipoberfläche und an die Sensorstrukturen selbst gewährleisten.

Die Anhaftung an der Sensorchipoberfläche ist dabei von verschiedenen Kräften hervorgerufen. Diese werden in zwei Gruppen eingeteilt, die spezifischen und unspezifischen Kräfte. Die spezifischen Kräfte sind durch verschiedene Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche verursacht und rein biologischer Natur. Sie können in drei Ausprägungen mit jeweils spezifischen Abstandsbereichen eingeteilt werden [237]:

Kontakte der extrazellulären Matrix sind relativ groß und liegen in einem Bereich von $50nm$ bis $100nm$. Die Verbindung stellen hier filamentöse Bestandteile der Matrix her, die nur sehr sporadisch auftreten. Ihre Anzahl variiert mit dem zeitlichen Fortschritt der Zellkultur.

Den Kontakten der extrazellulären Matrix ähnliche Verbindungen, sind die so genannten Close Contacts, die in einem Abstandsbereich von $30nm$ bis $50nm$ auftreten. Sie bestehen hauptsächlich aus einem Netz von Actinfilamenten, α -Actinin und Fibronectin. Ihr Anteil verringert sich in der Regel bei fortschreitender Zellkultur.

Die engsten Verbindungen sind die Fokalkontakte, die einen Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Abstand von 10nm bis 15nm aufweisen. Bezüglich der Adhäsionsstärke sind diese Art von Verbindungen am stärksten ausgeprägt.

Unspezifische Kräfte sind überwiegend physikalischer Natur und wirken, im Gegensatz zu den unspezifischen, nur zwischen Zelle und Substrat. Vertreter hiervon sind unter anderem Coulomb-Kräfte, van-der-Waals-Kräfte und Gravitationskräfte. Letztere bewirken zum Beispiel ein Absinken von Zellen geringeren Auftriebs in einem Medium. Diese physikalischen Kräfte sind allerdings im Vergleich zu den biologischen nur schwach ausgeprägt und spielen im Prinzip nur in der Anfangsphase einer sich aufbauenden Zelladhäsion eine Rolle.

6.1.2 Anwendung der elektrischen Impedanz in zellulären Messungen

Da der Stromfluß durch lebende Organismen bei vielen Untersuchungen wie zum Beispiel von physiologischen Parametern, biologischen Effekten von elektromagnetischer Felder, Muskelkontraktionen und Nervenleitung eine große Rolle spielt, sind die elektrischen Eigenschaften von Zellen und Geweben weithin bekannt [238]. In der Elektrophysiologie und der Biophysik ist die biologische Impedanzmessung daher weit verbreitet. Einen Überblick hierüber gibt [110–112]. Nachfolgend sollen die wichtigsten Grundlagen näher betrachtet werden.

Impedanz

Messungen werden in diesem Zusammenhang mit Wechselspannung oder Wechselstrom durchgeführt. Mathematisch ausgedrückt ergibt sich für die Spannung $U(t)$ in Abhängigkeit von der Zeit t folgender Ausdruck:

$$U(t) = U_0 \sin \omega t \quad (6.1)$$

U_0 beschreibt dabei die Amplitude, ω die Winkelfrequenz der Wechselspannung, die durch eine Probe den Wechselstrom mit der Phasenverschiebung φ erzeugt:

$$i(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (6.2)$$

Die Impedanz \underline{Z} , auch Wechselstromwiderstand genannt, ist eine komplexe Größe und errechnet sich aus dem Quotienten der komplexen Wechselspannung $\underline{u}(t)$ und dem komplexen Wechselstrom $\underline{i}(t)$:

$$\underline{Z} = \frac{\underline{u}(t)}{\underline{i}(t)} \quad (6.3)$$

In Polarkoordinaten dargestellt gilt dabei für den Betrag von \underline{Z} (Scheinwiderstand):

$$|\underline{Z}| = \frac{U_0}{I_0} \quad (6.4)$$

wobei φ das Argument darstellt. Abbildung 6.1 zeigt die Darstellung der Impedanz als Zeigerdiagramm.

In kartesischen Koordinaten dargestellt, besteht die komplexe Impedanz aus einem Realteil R , auch Wirkwiderstand genannt, und einem, als Blindwiderstand bezeichneten Imaginärteil X , wobei beide Parameter oft auch als Z' und Z'' geschrieben werden:

$$\underline{Z} = R + jX = Z' + jZ'' \quad \text{mit } j = \sqrt{-1} \quad (6.5)$$

Da bei biologischen Proben fast ausschließlich kapazitive Effekte auftreten, wird die Impedanz an dieser Stelle nur in Abhängigkeit der Kapazität betrachtet. Damit gilt für den Imaginärteil:

$$X = -\frac{1}{\omega C} \quad (6.6)$$

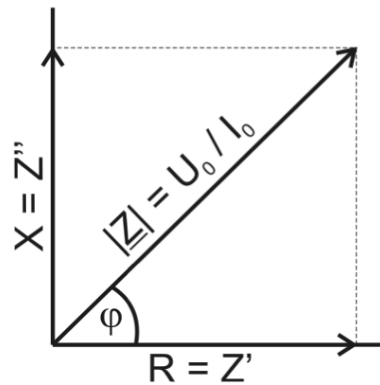


Abbildung 6.1: Impedanz, dargestellt als komplexe Größe mit Real- und Imaginärteil

Äquivalente Darstellungen existieren selbstverständlich auch für induktive Proben. In der Biologie wäre hierfür das Riesenaxon eines Tintenfisches ein Beispiel. Da induktive Effekte aber die Ausnahme sind und Impedanzmessungen in der vorliegenden Arbeit nur ein Randthema sind, wird auf eine Darstellung verzichtet.

In der Regel wird die Impedanz mit Hilfe eines Ersatzschaltbildes dargestellt. Hierfür gibt es zwei grundlegende Modelle. Einerseits läßt sich die Impedanz anhand einer seriellen Schaltung eines Widerstandes R und einer Kapazität C beschreiben, andererseits mit einer Parallelschaltung des Widerstandes R' und der Kapazität C' (Abbildung 6.2).

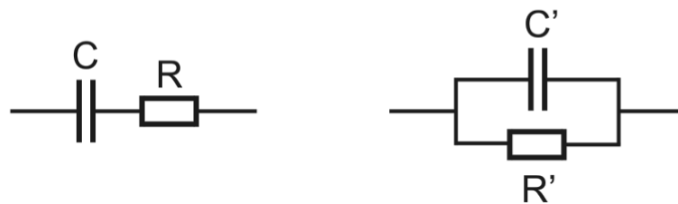


Abbildung 6.2: Serielles und paralleles Ersatzschaltbild der Induktivität

Für das parallele Ersatzschaltbild läßt sich als Kehrwert der Impedanz mit der Konduktanz G und der Suszeptanz B die Admittanz \underline{Y} angeben:

$$\underline{Y} = \frac{1}{\underline{Z}} = G + jB = Y' + jY'' \quad (6.7)$$

Bei einer bestimmten Frequenz ω sind beide Darstellungen äquivalent und Resistanz, Reaktanz, Konduktanz und Suszeptanz können ineinander umgerechnet werden:

$$R = \frac{G}{G^2 + (\omega C')^2} \quad (6.8)$$

$$X = -\frac{1}{\omega C} = -\frac{\omega C'}{G^2 + (\omega C')^2} \quad (6.9)$$

$$G = \frac{1}{R'} = \frac{R}{R^2 + X^2} \quad (6.10)$$

$$B = \omega C' = -\frac{X}{R^2 + X^2} \quad (6.11)$$

Bei einer eindeutigen Frequenz ω lassen sich seriell und parallel Ersatzschaltbild nicht unterscheiden. Erst die Betrachtung eines Frequenzverlaufes läßt eine Unterscheidung zu. So geht beispielsweise bei sehr niedrigen Frequenzen der Betrag der Impedanz bei der seriellen Schaltung gegen Unendlich, bei der parallelen Schaltung gegen R' . Bei hohen Frequenzen geht der Betrag der Impedanz bei der seriellen Schaltung gegen R , bei der parallelen Schaltung gegen 0. Für viele biologische Fragestellungen wird daher die Impedanz mit der Impedanzspektroskopie gemessen [239]. Für die in dieser Arbeit angestrebte Anwendung reicht allerdings die Bestimmung der Impedanz bei einer bestimmten Frequenz.

Kapazität

Der Begriff der Kapazität wird nachfolgend anhand eines idealen Plattenkondensators mit Plattenfläche A und Plattenabstand d beschrieben. Unter Verwendung der Dielektrizitätskonstante ε_0 und der Annahme, daß sich zwischen den Platten ein Vakuum befindet, ergibt sich für die Oberflächenladungsdichte D des Plattenkondensators in Abhängigkeit der angelegten Spannung U :

$$D = \frac{\varepsilon_0 U}{d} \quad (6.12)$$

Die Kapazität C des Plattenkondensators errechnet sich nun aus dem Verhältnis der induzierten Ladung Q und der angelegten Spannung U :

$$C = \frac{Q}{U} = \frac{DA}{U} = \frac{\varepsilon_0 A}{d} \quad (6.13)$$

Wird nun anstelle des Vakuums ein Material zwischen die Platten eingebracht, so wird durch Polarisation eine zusätzliche Ladungsdichte erzeugt und die Kapazität C ergibt sich unter Verwendung der materialspezifischen relativen Dielektrizitätskonstante ε_r zu:

$$C = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 A}{d} \quad (6.14)$$

Bei realen Materialien tritt in der Regel eine Leitfähigkeit G auf, die sich parallel zur Kapazität auswirkt:

$$G = \frac{\sigma A}{d} \quad (6.15)$$

wobei σ die Leitfähigkeit des Materials darstellt. Die betrachteten Gleichungen gelten für den stationären Fall. Wird nun mit Wechselspannung gearbeitet, finden Relaxationsprozesse statt und das Verhalten wird durch frequenzabhängige Eigenschaften der Dielektrizitätskonstanten und Leitfähigkeiten bestimmt. Für sinusförmige Wechselspannungen treten sinusförmige Felder auf. Damit wird Gleichung 6.7 für die Admittanz zu:

$$\underline{Y} = G + j\omega C = \frac{A}{d}(\sigma + j\omega\varepsilon'\varepsilon_0) \quad (6.16)$$

Aus dieser Gleichung läßt sich die komplexe Leitfähigkeit definieren:

$$\underline{\sigma}^* = \sigma + j\omega\varepsilon'\varepsilon_0 \quad (6.17)$$

Äquivalent kann die komplexe Kapazität ausgedrückt werden durch:

$$\underline{C} = \frac{\underline{Y}}{j\omega} \quad (6.18)$$

und die komplexe Dielektrizitätskonstante $\underline{\varepsilon}^*$ durch:

$$\underline{\varepsilon}^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' = \varepsilon' - \frac{j\sigma}{\omega\varepsilon_0} \quad (6.19)$$

Die komplexe Impedanz errechnet sich dadurch zu:

$$\underline{Z} = \frac{1}{\underline{Y}} = R + jX = \frac{G + j\omega C}{G^2 + (\omega C)^2} \quad (6.20)$$

Polarisation

Wird wie oben beschrieben ein Material zwischen die Platten des Plattenkondensators eingebracht, erhöht sich die Kapazität. Dies ist in der Polarisation des Materials begründet, die durch Ladungsverschiebung im elektrischen Feld eine Erhöhung der Oberflächenladung bewirkt. Die relative Dielektrizitätskonstante verhält sich dabei proportional zur Polarisierbarkeit der Molekularstruktur des Materials. Dabei wird zwischen polaren und nichtpolaren Materialien unterschieden. Bei nichtpolaren Materialien setzt sich die Polarisation aus einer elektrischen und atomaren Polarisation zusammen. Bei polaren Materialien kommt noch das elektrische Dipolmoment hinzu. Damit folgt die totale Polarisierbarkeit α_T folgender Beziehung:

$$\alpha_T = \alpha_e + \alpha_a + \alpha_O \quad (6.21)$$

α_e , α_a und α_O werden dabei als elektrische, atomare und Orientierungs-Polarisation bezeichnet. Dabei sind die drei Arten der Polarisation in ihrer Ausprägung frequenzabhängig. Die Dipolorientierung ist dabei der langsamste Prozeß und wird folglich bei steigenden Frequenzen als erster verschwinden. Dies geschieht, da die Dipolmomente ihre Ausrichtung nicht mehr schnell genug mit dem elektrischen Feld erreichen. Die totale Polarisierbarkeit sinkt dabei auf einen Wert von $\alpha_T - \alpha_O$ ab. Dieses Absinken erzwingt dadurch auch eine Abnahme der relativen Dielektrizitätskonstante. Dieser Prozeß wird als dielektrische Relaxation bezeichnet [111].

Allgemeine Relaxations-Theorie

Dielektrische Relaxationsprozesse können zu Materialantworten mit einer oder mehreren Zeitkonstanten führen und werden in der Regel mit Hilfe von Differentialgleichungen beschrieben [110]. An dieser Stelle soll die dielektrische Antwort eines Materials mit einer Zeitkonstanten auf die Anregung mit einem elektrischen Wechselfeld betrachtet werden. Bei einem solchen Material wird die Polarisation mit einem Prozeß erster Ordnung gegen einen statischen Zustand relaxieren. Dieser Prozeß ist durch die Zeitkonstante τ charakterisiert:

$$D = D_\infty + (D_0 - D_\infty)(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (6.22)$$

Dabei ist D_∞ die sofortige Antwort des Materials, die durch die elektrische und atomare Polarisation hervorgerufen wird. Diese beiden Arten der Polarisation haben Zeitkonstanten, die um Größenordnungen kleiner sind als die Orientierungs-Polarisation und sich somit sofort einstellen. Diese Annahmen gelten für hohe Frequenzen. D_0 ist die Antwort, die sich auf eine sprunghafte Anregung nach langer Zeit einstellt. Die Zeitkonstante τ ist materialspezifisch und beschreibt die Zeit, die notwendig ist um $\frac{1}{e}$ von D_0 zu erreichen. Sie kann je nach Material von wenigen Picosekunden bis einigen Sekunden betragen. Durch Laplace-Transformation erhält man aus dem System erster Ordnung eine Frequenzdarstellung der dielektrischen Antwort [110, 111]:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_r - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (6.23)$$

Dabei beschreibt ε_∞ die Dielektrizitätskonstante bei sehr hohen Frequenzen, bedingt durch die elektrische und atomare Polarisation. Da diese Gleichung keinen Stromfluß aufgrund beweglicher Ionen vorsieht, wird das Modell um eine statische Leitfähigkeit erweitert:

$$\varepsilon^* = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_r - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} - \frac{j\sigma}{\omega\varepsilon_0} \quad (6.24)$$

Durch Trennung von Real- und Imaginärteil erhält man:

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \quad (6.25)$$

$$\varepsilon' = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_r - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (6.26)$$

$$\varepsilon'' = \frac{\sigma}{\omega\varepsilon_0} + \frac{(\varepsilon_r - \varepsilon_\infty)\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (6.27)$$

Mit Hilfe der komplexen Leitfähigkeit

$$\sigma^* = j\omega\varepsilon^*\varepsilon_0 \quad (6.28)$$

ergibt sich als Grenzwert folgende Gleichung:

$$\frac{(\varepsilon_r - \varepsilon_\infty)\varepsilon_0}{\tau} = \sigma_\infty - \sigma \quad (6.29)$$

Hieraus ist ersichtlich, daß sich die Dielektrizitätskonstante nicht unabhängig von der Leitfähigkeit einstellen kann. Durch die Phasenverschiebung zwischen Polarisation und dem anregenden elektrischen Feld kommt es zur Absorption von Energie und dadurch zu Joule'scher Wärme. Dabei beschreibt ε'' die Umwandlungsrate von elektrischer Energie in Wärme und wird aus diesem Grund auch Verlustfaktor genannt.

In der Regel wird das dielektrische Relaxationsverhalten in der komplexen Ebene dargestellt. Umformen der Gleichungen 6.25 bis 6.27 ergibt in der komplexen Dielektrizitätsebene:

$$\left[\varepsilon' - \frac{(\varepsilon_r + \varepsilon_\infty)}{2}\right]^2 + \left(\varepsilon'' - \frac{\sigma}{\omega\varepsilon_0}\right)^2 = \left(\frac{\varepsilon_r - \varepsilon_\infty}{2}\right)^2 \quad (6.30)$$

Aufgrund dieser Gleichung ergibt ein Graph von $(\varepsilon'' - \frac{\sigma}{\omega\varepsilon_0})$ gegen ε'' für eine Zeitkonstante τ einen Halbkreis.

Kramers-Krönig-Beziehungen

Die oben betrachtete komplexe Dielektrizitätskonstante beschreibt die lineare und kausale Antwort eines Materials auf ein anregendes elektrisches Feld. Aus der Relaxationstheorie folgen direkt die so genannten Kramers-Krönig-Beziehungen, die eine Verknüpfung der elektrischen Leitfähigkeit und der elektrischen Dielektrizitätskonstante bei der Frequenz f charakterisieren:

$$\varepsilon'(f) - \varepsilon_\infty = \frac{2}{\Pi} \int_0^\infty \frac{x\varepsilon''(x)}{x^2 - f^2} dx \quad (6.31)$$

$$\varepsilon''(f) - \frac{\sigma}{\omega\varepsilon_0} = -\frac{2f}{\Pi} \int_0^\infty \frac{\varepsilon'(x) - \varepsilon_\infty}{x^2 - f^2} dx \quad (6.32)$$

x stellt dabei die Integrationsvariable dar. Die Gleichungen zeigen, daß jede Abnahme der Dielektrizitätskonstante bei steigender Frequenz von einer Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit begleitet wird. Dabei gilt die Kramers-Krönig-Beziehung für jede Verteilung der Relaxationszeiten [110].

Spezielle dielektrische Polarisationsmechanismen

Für die in der vorliegenden Arbeit relevante dielektrische Relaxation in biologischen Geweben sind hauptsächlich drei Relaxationsprozesse maßgeblich: Die Oberflächenpolarisation, die Dipolorientierung und die Ionendiffusion.

Die Oberflächenpolarisation, der so genannte Maxwell-Wagner-Effekt, tritt an der Grenzfläche zwischen zwei Phasen auf. Biologische Materialien sind elektrisch nicht homogen, sondern teilen sich in verschiedene Phasen auf. Dies hat zur Folge, daß durch das Aufladen der Materialoberfläche innerhalb des inhomogenen Materials eine Dispersion erzeugt wird. Diese ist nicht das Resultat der elektrischen Relaxation der separaten Phasen, sondern durch Vorgänge der elektrischen Felder an

den Grenzflächen zwischen den einzelnen Phasen verursacht. In der Regel zeigt ein nicht homogenes Material frequenzabhängige dielektrische Eigenschaften, die sich von den Eigenschaften der enthaltenen Komponenten unterscheidet. Diese dielektrische Dispersion wird als Maxwell-Wagner- oder Oberflächen-Polarisation bezeichnet [110, 111].

Für den Maxwell-Wagner-Effekt wurden verschiedene Modelle entwickelt. Für die Betrachtung bei Zellmessungen eignet sich das Modell von Pauly, das für das dielektrische Verhalten von Zellsuspensionen und Proteinlösungen entwickelt wurde [240]. Es betrachtet einen Aufbau, wie er in Abbildung 6.3 dargestellt ist.

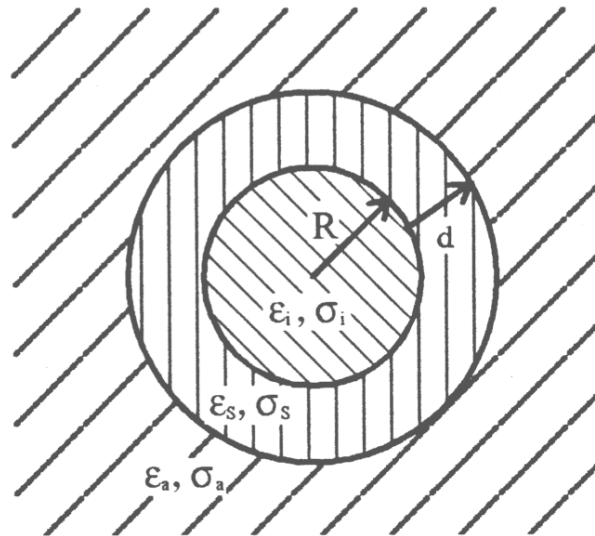


Abbildung 6.3: Kugelförmiges Teilchen mit einer Membran, aus [123]

Dieser Aufbau ähnelt einer Zelle mit Zellmembran und Zellinneren. Die Impedanz dieses Aufbaus läßt sich analytisch berechnen und beinhaltet zwei Zeitkonstanten der zwei Dispersionsbereiche. Für Suspensionen biologischer Zellen werden dabei zwei Vereinfachungen angenommen:

- Die komplexe Leitfähigkeit der Zellmembran ist sehr klein im Vergleich zum Innen- und Außenmedium
- Die Membrandicke ist klein im Vergleich zum Teilchenradius

Bezüglich der Leitfähigkeiten besteht eine lebende Zelle aus einem relativ leitfähigem Zellinhalt und der ihn umgebenden Zellmembran mit einem relativ hohen elektrischen Widerstand, der in der Regel größer als $100\Omega\text{cm}^2$ ist, also einer spezifischen Leitfähigkeit kleiner als $10^{-8}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Leitfähigkeit der Zellmembran ist damit um den Faktor 10^6 kleiner als die des Zellinneren. Als angenäherte Durchmesser für die Zellmembran bzw. der Zelle wird 5nm bis 10nm bzw. ca. $10\mu\text{m}$ angenommen. Mit diesen Angaben erhält man für die erste Zeitkonstante τ_1 einen Ausdruck der unabhängig von der Membrankapazität und der Membranleitfähigkeit ist. τ_1 charakterisiert die Dispersion einer Vollkugel mit σ_i und ε_i in einem Außenmedium mit σ_a und ε_a und entspricht den Bedingungen ohne einer Membran. Für biologische Materialien lassen sich Werte von $\varepsilon_i \approx 50$ und $\sigma_i = \sigma_a \approx 10^{-2}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ angeben. Damit ergibt sich eine Dispersionsfrequenz von etwa 100MHz .

Die zweite Zeitkonstante τ_2 ist nahezu unabhängig von den elektrischen Dielektrizitätskonstanten des Innen- und Außenmediums. Diese charakterisiert die Dispersion der Zellmembran in einem Medium mit vorwiegend ohmscher Leitfähigkeit. Die daraus resultierende Dispersionsfrequenz errechnet

sich zu etwa 1MHz und ist damit ungefähr um den Faktor 100 kleiner als bei der oben betrachteten. Dieses Verhalten wird als β -Dispersion bezeichnet und im weiteren Verlauf noch eingehender betrachtet.

Eine weitere Art der Polarisierung ist der Dipol-Relaxations-Mechanismus. Hierbei bewirkt ein von außen angelegtes elektrisches Feld auf jeden einzelnen einer Gruppe von unabhängigen Dipolen ein Drehmoment in Abhängigkeit von der Feldstärke und der Ausrichtung relativ zum Dipol. Die Dipolgruppe wird nach einiger Zeit eine Gleichgewichtsorientierung einnehmen, wobei die zufällige thermische Bewegung diesem Gleichgewicht entgegenwirkt. Dies ist ein Vorgang erster Ordnung und führt zu einem dielektrischen Relaxationsverhalten. Die Relaxationszeit für diesen Vorgang ist die Diffusionszeit τ der Rotation. Diese kann nach dem Stockes'schen Gesetz bestimmt werden:

$$\tau = \frac{4\pi\eta a^3}{kT} \quad (6.33)$$

Hierbei ist a der Radius des Dipols und η die Viskosität des Mediums. Die Zeitkonstanten variieren je nach Material von Picosekunden für Wasser bis einigen Mikrosekunden für große Proteine. Bei den dipolaren Mechanismen bei biologischen Zellsuspensionen und Geweben ist insbesondere die Dipolrelaxation von Wasser im Mikrowellenbereich dominant. Dabei zeigt reines Wasser ein Relaxationsverhalten mit einer Frequenz von etwa 25MHz bei einer, für Messungen an lebenden Material relevanten Temperatur von 37°C . Ist Wasser einem elektrischen Wechselfeld von weniger als 1GHz ausgesetzt, besitzt es eine relative Dielektrizitätskonstante von etwa 80. Ist Wasser mit Proteinoberflächen assoziiert, erniedrigt sich die Relaxationsfrequenz, da die Rotation der Dipole durch das Protein behindert ist. Ähnliche Vorgänge finden bei gebundenen Wasser statt. Da Wasser in der Zellmembran nur sehr stark gebunden vorkommt, erklärt dies die niedrige Dielektrizitätskonstante der Zellmembran von etwa 2,5 [111].

Die dritte Klasse von Polarisierungen bei biologischen Material ist die Gegenionenpolarisation. Diese Art hat ihren Ursprung in der ionischen Diffusion in elektrischen Doppelschichten nahe geladener Oberflächen wie Festkörper, Zellmembranen und Proteine. Die Zeitkonstanten dieser Phänomene sind proportional zu $\frac{L^2}{D}$, wobei L die Länge beschreibt, über der die Diffusion stattfindet und D der Diffusionskoeffizient ist [240]. Die Gegenionenpolarisation liegt in biologischen Materialien im kHz -Bereich. Sie trägt zur so genannten α -Dispersion bei, die noch näher betrachtet wird.

Für die Gegenionenpolarisation gibt es ebenfalls eine Vielzahl an Modellen. Eine der ersten theoretischen Erklärungen stammt von Schwarz und betrachtet elektrisch isolierende Teilchen, die durch Anziehungskräfte von einer dünnen Schicht von Gegenionen umgeben sind. Die Bewegung dieser Gegenionen ist durch die Diffusion und der tangentialen Komponente des elektrischen Feldes bestimmt. Mit diesen Annahmen erhält man [241]:

$$\tau = \frac{R^2}{2D_{surface}} \quad (6.34)$$

$$\epsilon'_r - \epsilon'_\infty = \frac{9\nu}{(2 + \nu)^2} \frac{\lambda R}{\epsilon_0 D_{surface}} \quad (6.35)$$

Dabei beschreibt R den Teilchenradius, $D_{surface}$ den Diffusionskoeffizienten der Gegenionen entlang der Teilchenoberfläche, ν den Volumenanteil der Teilchen in der Suspension und λ die Oberflächenleitfähigkeit der Gegenionen. Die Relaxationszeit wird damit durch die Diffusion der Gegenionen entlang der Teilchenoberfläche bestimmt. Im Gegensatz dazu hängt die Erhöhung der Dielektrizitätskonstanten nicht direkt von der Leitfähigkeit des Elektrolyten ab. Dieses Modell wurde im Laufe der Zeit immer weiter verfeinert und weitere Prozesse wie diffuse Doppelschichten und Konvektion mit berücksichtigt [242, 243].

Dielektrische Eigenschaften von Geweben und biologischen Materialien

Obwohl wie oben ausgeführt die elektrische Leitfähigkeit und die Dielektrizitätskonstante über die Kramers-Krönig-Beziehung zusammenhängen ist es vorteilhaft, sie getrennt zu betrachten. Abbildung 6.4 zeigt den typischen Verlauf dieser beiden Parameter in Abhängigkeit zur Frequenz.

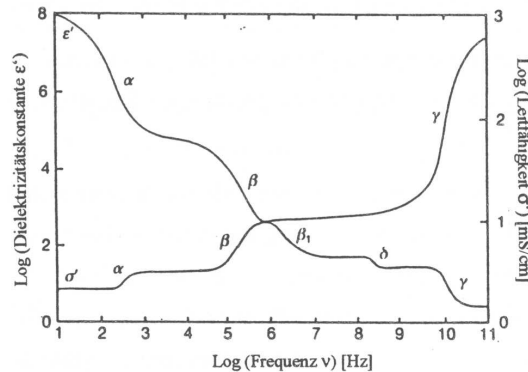


Abbildung 6.4: Typische dielektrische Dispersion eines biologischen Gewebes, getrennt nach Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit, aus [244]

Die Zunahme der Leitfähigkeit mit steigender Frequenz resultiert zum überwiegenden Teil aus den Maxwell-Wagner-Effekten. Dabei ist die Zelle bei Gleichströmen und Wechselströmen unterhalb der entsprechenden Relaxationsfrequenz als schlecht leitend im Vergleich zum umliegenden Elektrolyten anzusehen. In diesem Bereich ist also keine zusätzliche Information aus der Leitfähigkeit zu erwarten [110]. Für Frequenzen oberhalb der β -Relaxationsfrequenz stellt die Zellmembran keinen nennenswerten Widerstand für den Stromfluß dar. In diesem Bereich verhält sich das Gewebe wie eine Suspension von nichtleitenden Festkörpern im Elektrolyten.

Während die Leitfähigkeit mit steigender Frequenz monoton zunimmt, nimmt gleichzeitig, entsprechend der Kramers-Krönig-Beziehung, die Dielektrizitätskonstante ab. Für niedrige Frequenzen kann diese sehr hoch sein (10^5 bis 10^6). Dabei existieren drei Hauptdispersionsregionen, die als α -, β - und γ -Dispersion bezeichnet werden. Wenn die betrachteten Ansätze von Schwarz und Grosse bei niedrigen Frequenzen auf Gewebe angewendet werden, liegen die berechneten Dielektrizitätskonstanten bei 10^6 bis $50 \cdot 10^6$, die gemessenen aber bei 10^6 bis 10^7 , was auf einen erheblichen Anteil der Gegenioneneffekte zur α -Dispersion hindeutet.

Die β -Dispersion tritt im Frequenzbereich von einigen 100kHz auf und ist hauptsächlich durch eine kapazitive Aufladung der Zellmembran verursacht. Für Gewebe beträgt die Änderung der Dielektrizitätskonstante relativ zum freien Raum etwa 10^3 bis 10^4 bei einer Relaxationsfrequenz von 500kHz . Die γ -Dispersion tritt bei einer Temperatur von 37°C bei etwa 25GHz auf und wird überwiegend von der Dipolrelaxation des Wassers bedingt, das bei weichen Gewebe einen Anteil von etwa 80% ausmacht.

Neben den eben betrachteten Dispersionen existieren noch eine Reihe von weiteren Dispersionen wie die δ - und die β_1 -Dispersion, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

Elektrodenprozesse

Die elektrischen Eigenschaften von Elektroden, speziell die Schnittstellenimpedanz in Kontakt mit Elektrolytlösungen oder biologischen Komponenten wurden z.B. von Geddes in [238], von Cobbold in [245], von Ferris in [246] und von Schwan in [247] charakterisiert. Ein Großteil der relevanten elektrochemischen Prozesse an Elektroden, wie faraday'sche Prozesse und elektrische Doppelschichten, wurde bereits in Kapitel 3 ausführlich betrachtet. An dieser Stelle soll noch ein kurzer Überblick über

die Ersatzschaltbilder der Grenzflächenimpedanz hinzugefügt werden, die für das Verständnis von Impedanzmessungen an Elektroden im Elektrolyten wichtig sind.

Zur Grenzflächenimpedanz wirken eine Vielzahl an Prozessen, die unter anderem von der Elektrodenform, der Oberflächenbeschaffenheit, des Materials, der Elektrolytzusammensetzung, der Meßfrequenz und äußeren Bedingungen abhängen. Abbildung 6.5 zeigt das gängige Ersatzschaltbild, das als Randles-Ersatzschaltbild bezeichnet wird. Dieses Ersatzschaltbild besteht aus den Komponenten Kapazität der elektrischen Doppelschicht, Ladungstransferwiderstand, Warburg-Impedanz und Lösungswiderstand.

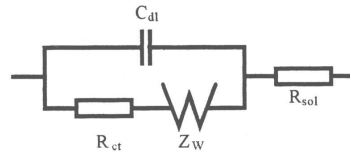


Abbildung 6.5: Randles-Ersatzschaltbild für die Elektrodenimpedanz, nach [248]

Entstehung und Zusammensetzung der Doppelschichtkapazität C_{dl} wurde bereits in Kapitel 3.2 betrachtet. Sie berechnet sich zu:

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_D} \quad (6.36)$$

C_H entspricht dabei der Kapazität der Ladungen, die sich im Bereich der äußeren Helmholtzschicht befinden, während C_D der Kapazität der diffusen Schicht entspricht. Der Wert von C_H ist dabei unabhängig von Parametern wie Elektrodenpotential und der Elektrolytkonzentration. C_D hingegen steigt bei steigendem Elektrodenpotential und steigender Elektrolytkonzentration an und trägt somit bei sehr hohen Werten so gut wie nicht zur Kapazität C_{dl} bei.

Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} stellt den Widerstand des Stromflusses dar, der sich durch die Faraday'schen elektrochemischen Reaktionen an den Elektroden ergibt. Dabei wird R_{ct} theoretisch bei ideal polarisierbaren Elektroden unendlich groß. Bei einer idealen nicht-polarisierbaren Elektrode geht R_{ct} dagegen theoretisch gegen 0 [244].

Die so genannte Warburg-Impedanz Z_W modelliert die lineare Diffusion von elektroaktiven Substanzen zur Reaktionsschicht. Eine Verarmung dieser elektroaktiven Substanzen kann bei elektrochemischen Reaktionen an der Elektrode entstehen. In diesem Fall können sie nur durch Diffusion nachgeliefert werden. Dies führt zu einer zusätzlichen Impedanz für Wechselströme, deren Frequenz unter der Rückdiffusionszeit liegt. Derartige Effekte treten nur bei geringen Frequenzen unterhalb 1kHz auf, da bei höheren Frequenzen der überwiegende Anteil am Stromfluß durch nicht-faraday'sche Ströme verursacht werden, die nicht zur Verarmung beitragen [189, 244]. Die Warburg-Impedanz kann mit σ als Diffusionskoeffizienten beschrieben werden durch [248]:

$$Z_W = \frac{(1-j)\sigma}{\omega} \quad (6.37)$$

Da aus dem Inneren der Elektrolytlösung weitere Ladungsträger zu den Elektroden transportiert werden, ist zuletzt noch der Lösungswiderstand R_{sol} zu überwinden, der als einfacher ohmscher Widerstand verstanden werden kann.

Die an der Elektrode gemessene Impedanz kann nach Abbildung 6.5 somit als serielle Schaltung des Lösungswiderstandes und der Oberflächenimpedanz Z_I , die aus dem Netzwerk Doppelschichtkapazität, Ladungstransferwiderstand und Warburg-Impedanz besteht verstanden werden. Z_I errechnet sich nach McAdams zu [248]:

$$Z_I = K(j\omega)^{-\beta} \quad (6.38)$$

K stellt dabei den Betrag von Z_I dar und β eine Konstante mit einem Wert zwischen 0 und 1. Für viele biomedizinische Elektroden hat β einen Wert von 0,8. Darüber hinaus wurde aus Beobachtungen festgestellt, daß die Phasenverschiebung φ zwischen Strom und Spannung über den Parameter β nach folgender Beziehung zusammenhängt:

$$\varphi = \beta \cdot 90^\circ \quad (6.39)$$

6.2 Interdigitale Elektrodenstrukturen für biologische Messungen

Biologische Gewebe und Zellrasen, wie sie als Untersuchungsobjekte für die in dieser Arbeit verwendeten Sensoren vorgesehen sind, sind eine komplexe Kombination von untereinander verbundenen und konzentrierten Zellen. Sie haben daher viele charakteristische Eigenschaften von konzentrierten Zellsuspensionen, wie sie hinsichtlich ihrer Impedanz in Kapitel 6.1 betrachtet wurden. Man erhält auch hier drei Dispersionsbereiche (α , β und γ). Ihr Betrag und ihre Relaxationsfrequenzen können sich aber unterscheiden.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind für die Anwendung der interdigitalen Elektrodenstrukturen mit adhärent wachsenden Zellen vor allem die Zell-Zell- und die Zell-Substrat-Adhäsion von entscheidender Bedeutung. Die von Ehret dafür vorgesehene Meßfrequenz liegt mit 10kHz im Bereich der α -Dispersion und deutlich unterhalb der β - und γ -Dispersion. In diesem Frequenzbereich können die Zellmembranen noch als isolierend betrachtet werden. Dabei stellen Änderungen des Stromflusses aufgrund der Anwesenheit von isolierenden Zellmembranen den Hauptbestandteil des Sensorsignals dar. Das Sensorsignal wird maßgeblich durch die Adhäsion und deren Änderung von isolierenden Zellen beeinflusst. Das Elektrodenverhalten wird dabei noch zusätzlich durch das direkte Wachsen der Zellen auf ihnen beeinflusst.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten interdigitalen Elektrodenstrukturen für Impedanzmessungen an biologischen Material basieren auf Arbeiten von Ehret, der in unserer Arbeitsgruppe diese Art von Sensoren entwickelt und getestet hat [123]. Die Sensoren wurden hier ohne Änderungen an den relevanten Geometrieparametern, die für die elektrische Feldstärke und Feldverteilung verantwortlich sind, übernommen. Einzig die äußeren Umrisse und damit die Sensorfläche und die Grundimpedanz wurden für die hier verwendeten Chipflächen angepaßt. Die meßtechnischen Parameter wie Meßfrequenz und Meßspannung wurden ebenso aus den Arbeiten von Ehret übernommen.

Abbildung 6.6 zeigt die schematische Darstellung der verwendeten interdigitalen Elektrodenstrukturen. Es handelt sich hierbei prinzipiell um einen Fingerkondensator, der pro Elektrode zwei Anschlußleitungen besitzt und somit eine 4-Punkt-Messung realisiert. Die Breite der Elektroden und der Abstand zwischen den Elektroden beträgt jeweils $50\mu\text{m}$. Die Höhe je nach Herstellungsprozeß um die $0,5\mu\text{m}$

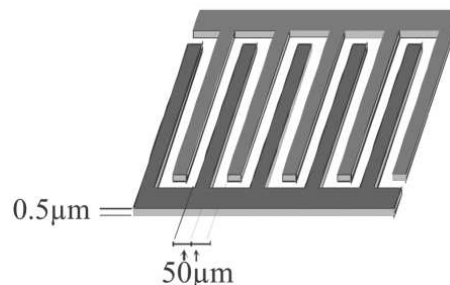


Abbildung 6.6: Schematische Darstellung der verwendeten interdigitalen Elektrodenstrukturen, nach [123]

6.3 Konzepte für die Parallelisierung von Impedanzmessungen

Wie oben bereits erwähnt wird der Interdigitalkondensator in den Arbeiten von Ehret mit Hilfe eines 4-Punkt-Meßverfahrens betrieben. Dies führt bei der Parallelisierung der Messungen zu Nachteilen bei der Kontaktierung. Ziel der Parallelisierung ist der Einsatz in 24-Well-Plattensystemen. Hierfür wurden zwei Konzepte erarbeitet, um eine Optimierung der Anschlüsse zu erreichen.

6.3.1 Serielle Schaltung der Interdigitalkondensatoren

Um die Anzahl der Meßleitungen zu reduzieren, werden im ersten Konzept die Interdigitalkondensatoren seriell verbunden und mit einem definierten sinusförmigen Wechselstrom $i(t)$ mit konstanter Amplitude und Frequenz betrieben. Abbildung 6.7 links zeigt die Anordnung der seriellen Schaltung. Treten keine Leckströme auf, fließt durch die Anordnung der Strom $i(t)$. Zur Bestimmung der Impedanz werden die Amplituden von $i(t)$ und den, an den IDEs abfallenden Spannungen $u_x(t)$, sowie die Phasenverschiebung φ zwischen $i(t)$ und $u_x(t)$ herangezogen. Damit wird zwischen zwei IDEs nur eine Meßleitung zur Potentialmessung benötigt und die Anzahl der Kontaktierungen für 24 Interdigitalkondensatoren wird reduziert.

6.3.2 Interdigitalkondensatoren mit gemeinsamer Masse

Das zweite Konzept zur Optimierung der Meßleitungsanzahl sieht eine 2-Punkt-Messung vor, bei der es eine gemeinsame Elektrode für alle Interdigitalkondensatoren gibt. Abbildung 6.7 rechts zeigt diese Anordnung der Sensoren. Auch hier wird die Anzahl der Kontaktierungen im Vergleich zur diskreten Kontaktierung jedes einzelnen Sensors drastisch reduziert.

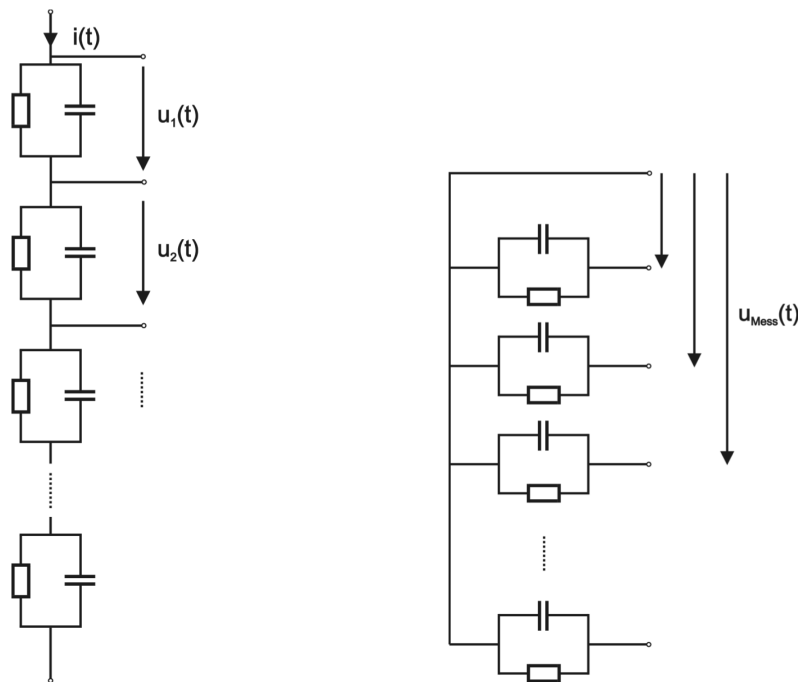


Abbildung 6.7: Links: Schematische Anordnung der seriellen Schaltung der Interdigitalkondensatoren; Rechts: Schematische Anordnung der Schaltung der Interdigitalkondensatoren mit gemeinsamer Zuleitung zu einer Elektrode

Für beide Varianten wurden Sensorchips für Multiwellplattensysteme entworfen und realisiert. Ihre Ausführung ist in Kapitel 7 dargestellt.

6.4 Meßschaltung für parallelisierte Impedanzmessungen mit IDES

Für das in Kapitel 6.3.2 vorgestellte Konzept einer gemeinsamen Kontaktierung einer Elektrode wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner eine Meßschaltung entworfen und aufgebaut. Nachfolgend soll das Meßprinzip skizziert werden.

Die einzelnen Sensoren sind über einen Multiplexer an die Meßschaltung angekoppelt. Jeder Sensor wird hintereinander einzeln gemessen. Dabei ist die Meßzeit pro Sensor gering genug, um alle 24 Sensoren auf einer 24-Well-Platte in einer Zeit zu vermessen, die gering im Vergleich zu den zu erwartenden biologischen Reaktionen ist. Es kann also weitestgehend von einer parallelen Messung gesprochen werden. Gemessen wird mit einer sinusförmigen Wechselspannung, die mit Hilfe eines Sinusgenerators erzeugt wird und über den Multiplexer auf die Sensoren gegeben wird. Abbildung 6.8 zeigt den Verlauf der Meßspannung und des sich einstellenden Stromes. Es ergeben sich mehrere Meßpunkte, die sich aus der angelegten Spannung an den Sensor ableiten. Tabelle 6.1 zeigt die Bedeutung der Meßpunkte. Um den Sensor gleichspannungsfrei zu halten, wird der Ein- und Ausschaltzeitpunkt der sinusförmigen Wechselspannung immer an der gleichen Stelle im Sinus gewählt. Theoretisch ist es nicht relevant, wann dieser Zeitpunkt ist. Da aber beim Einschalten unter Umständen eine kapazitive Last getrieben wird, kann es hierbei bei einer willkürlichen Wahl zu großen Stromimpulsen kommen. Aus diesem Grund wird der Ein- und Ausschaltzeitpunkt immer auf die Nulldurchgänge gelegt. Die Meßfrequenz ist mit $10kHz$ vorgegeben.

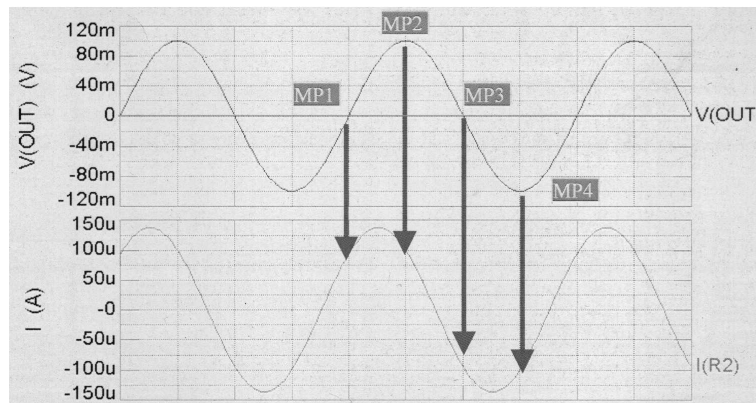


Abbildung 6.8: Verlauf der Meßspannung und des Meßstromes, sowie die relevanten Meßpunkte innerhalb einer Sinusschwingung

| | | |
|------------|-----|--|
| Meßpunkt 1 | MP1 | Nulldurchgang der Spannung am Sensor von negativer zu positiver Spannung |
| Meßpunkt 2 | MP2 | Positiver Scheitelwert der Spannung am Sensor |
| Meßpunkt 3 | MP3 | Nulldurchgang der Spannung am Sensor von positiver zu negativer Spannung |
| Meßpunkt 4 | MP4 | Negativer Scheitelwert der Spannung am Sensor |

Tabelle 6.1: Bedeutung der Meßpunkte

An den Sensoren ergibt sich folgende Spannung:

$$u(t) = \hat{U} \sin(\omega t) \quad (6.40)$$

Nach einem UI-Wandler ergibt sich:

$$u_{a1}(t) = -R_{11} \cdot i_{Sense}(t) \quad (6.41)$$

Nach einem Levelshifter unter Berücksichtigung diverser schaltungsbedingter Offsets ergibt sich:

$$u_{aLS}(t) = -u_e + \frac{U_{Ref}}{2} + U_{Offset} \quad (6.42)$$

Unter Verwendung von Gleichung 6.41 errechnet sich:

$$u_{aLS}(t) = -(-R_{11} \cdot i_{Sense}(t)) + \frac{U_{Ref}}{2} + U_{Offset} \quad (6.43)$$

$$u_{aLS}(t) = R_{11} \cdot i_{Sense}(t) + \frac{U_{Ref}}{2} + U_{Offset} = u_{Me\beta wert}(t) \quad (6.44)$$

Nach U_{Offset} umgestellt ergibt sich:

$$U_{Offset} = u_{Me\beta wert}(t) - R_{11} \cdot i_{Sense}(t) - \frac{U_{Ref}}{2} \quad (6.45)$$

Bei 2 Meßpunkten im gleichen System ergibt sich:

$$U_{Offset} = u_{Me\beta wert_1}(t) - R_{11} \cdot i_{Sense_1}(t) - \frac{U_{Ref}}{2} \quad (6.46)$$

$$U_{Offset} = u_{Me\beta wert_2}(t) - R_{11} \cdot i_{Sense_2}(t) - \frac{U_{Ref}}{2} \quad (6.47)$$

Gleichsetzen beider Gleichungen ergibt nun:

$$u_{Me\beta wert_1}(t) - R_{11} \cdot i_{Sense_1}(t) = u_{Me\beta wert_2}(t) - R_{11} \cdot i_{Sense_2}(t) \quad (6.48)$$

Die Ergebnisse der Messungen sollen als R und C bezogen auf ein paralleles Ersatzschaltbild, wie in Kapitel 6.1.2 beschrieben, bestimmt werden. Um den Widerstand R zu bestimmen, wird immer bei den Scheitelwerten von u_{Sensor} gemessen. Dies entspricht den Meßpunkten MP2 und MP4. Nach dem ohmschen Gesetz ergibt sich der Widerstand zu:

$$R_{MP2} = \frac{u_{Sensor}}{i_{Sense}(t)} = \frac{\hat{U} \cdot \sin(\omega t)}{i_{Sense}(t)} \quad (6.49)$$

$$R_{MP4} = \frac{u_{Sensor}}{i_{Sense}(t)} = \frac{\hat{U} \cdot \sin(\omega t)}{i_{Sense}(t)} \quad (6.50)$$

Zum Zeitpunkt MP2 ist $\sin(\omega t) = 1$ und zum Zeitpunkt MP4 ist $\sin(\omega t) = -1$. Daraus folgt:

$$R_{MP2} = \frac{u_{Sensor}}{i_{Sense_{MP2}}} = \frac{\hat{U}_{Sensor}}{i_{Sense_{MP2}}} \quad (6.51)$$

$$R_{MP4} = \frac{u_{Sensor}}{i_{Sense_{MP4}}} = -\frac{\hat{U}_{Sensor}}{i_{Sense_{MP4}}} \quad (6.52)$$

oder:

$$i_{Sense_{MP2}} = \frac{\hat{u}_{Sensor}}{R_{MP2}} \quad (6.53)$$

$$i_{Sense_{MP4}} = -\frac{\hat{u}_{Sensor}}{R_{MP4}} \quad (6.54)$$

Einsetzen in Gleichung 6.48 ergibt:

$$u_{Me\beta wert_{MP2}} - R_{11} \cdot i_{Sense_{MP2}} = u_{Me\beta wert_{MP4}} - R_{11} \cdot i_{Sense_{MP4}} \quad (6.55)$$

$$u_{\text{Meßwert}_{MP2}} - u_{\text{Meßwert}_{MP4}} = R_{11} \cdot (i_{\text{Sense}_{MP2}} - i_{\text{Sense}_{MP4}}) \quad (6.56)$$

$$u_{\text{Meßwert}_{MP2}} - u_{\text{Meßwert}_{MP4}} = R_{11} \cdot \left(\frac{\widehat{U}_{\text{Probe}}}{R_{MP2}} + \frac{\widehat{U}_{\text{Probe}}}{R_{MP4}} \right) \quad (6.57)$$

Mit $R_{MP2} = R_{MP4} = R$ folgt für den Widerstand:

$$R = \frac{R_{11} \cdot \widehat{U}_{\text{Sensor}} \cdot 2}{u_{\text{Meßwert}_{MP2}} - u_{\text{Meßwert}_{MP4}}} \quad (6.58)$$

Um die Kapazität C zu bestimmen wird immer in den Nulldurchgängen von u_{Sensor} gemessen. Dies entspricht den Meßpunkten MP1 und MP3. Prinzipiell gilt:

$$C = i \cdot \frac{\Delta t}{\Delta u} \quad (6.59)$$

$$C = i \frac{1}{\frac{du}{dt}} \quad (6.60)$$

$$i = C \cdot \frac{\Delta u}{\Delta t} \quad (6.61)$$

$$i = C \cdot \frac{du}{dt} \quad (6.62)$$

Dabei ist $\frac{du}{dt}$ die erste Ableitung der Spannung, die an den Sensor angelegt wird. Mit Gleichung 6.40 gilt:

$$\frac{du}{dt} = \frac{d(\widehat{U} \cdot \sin(\omega t))}{dt} = \widehat{U} \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \quad (6.63)$$

Zum Zeitpunkt MP1 ist $\cos(\omega t) = 1$ und zum Zeitpunkt MP3 ist $\cos(\omega t) = -1$. Damit gilt:

$$i_{\text{Sense}_{MP1}} = C \cdot \widehat{U} \cdot \omega \quad (6.64)$$

$$i_{\text{Sense}_{MP3}} = -C \cdot \widehat{U} \cdot \omega \quad (6.65)$$

Einsetzen in Gleichung 6.48 ergibt:

$$u_{\text{Meßwert}_{MP1}} - R_{11} \cdot i_{\text{Sense}_{MP1}} = u_{\text{Meßwert}_{MP3}} - R_{11} \cdot i_{\text{Sense}_{MP3}} \quad (6.66)$$

$$u_{\text{Meßwert}_{MP1}} - u_{\text{Meßwert}_{MP3}} = R_{11} \cdot (i_{\text{Sense}_{MP1}} - i_{\text{Sense}_{MP3}}) \quad (6.67)$$

$$u_{\text{Meßwert}_{MP1}} - u_{\text{Meßwert}_{MP3}} = R_{11} \cdot (C \cdot \widehat{U} \cdot \omega - (-C \cdot \widehat{U} \cdot \omega)) \quad (6.68)$$

$$u_{\text{Meßwert}_{MP1}} - u_{\text{Meßwert}_{MP3}} = R_{11} \cdot 2 \cdot C \cdot \widehat{U} \cdot \omega \quad (6.69)$$

Daraus ergibt sich für die Kapazität C :

$$C = \frac{u_{\text{Meßwert}_{MP1}} - u_{\text{Meßwert}_{MP3}}}{R_{11} \cdot 2 \cdot \widehat{U}_{\text{Sensor}} \cdot \omega} \quad (6.70)$$

Dieses Meßprinzip wurde mit einer elektronischen Meßschaltung realisiert und aufgebaut. Diese wird erfolgreich in weiteren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe unter anderem für Multiwellplattensysteme verwendet.

6.5 Feldsimulationen von interdigitalen Elektrodenstrukturen

Um Angaben über die Feldverteilung der interdigitalen Elektrodenstrukturen zu erhalten, wurde mit Hilfe des Feldrechenprogrammes COMSOL FemLab mehrere Simulationen durchgeführt. Den Rechnungen wurde eine Meßfrequenz von 10kHz und einer anregenden Spannungsamplitude von 100mV zugrunde gelegt. Die Geometrie der simulierten Strukturen sind ebenfalls wie die technisch realisierten Strukturen bei einem Elektrodenabstand und einer Elektrodenbreite von je $50\mu\text{m}$. Abbildungen 6.9 bis 6.10 zeigen die Ergebnisse. Es wurden zwei Substrate aus Glas und Al_2O_3 -Keramik jeweils mit Wasser und mit Zellen simuliert. Die Zellen wurden dabei als Kugeln mit $10\mu\text{m}$ Durchmesser und mit den oben betrachteten Werten für ε und σ modelliert.

Glas- und Keramiksubstrat unterscheiden sich nur unwesentlich. Man kann deutlich die Ausdehnung des elektrischen Feldes in das Substrat erkennen. Die Ausdehnung in den Zellkulturbereich umfaßt nur etwa $20\mu\text{m}$ bis $30\mu\text{m}$, so daß maximal drei Zellschichten erreicht werden.

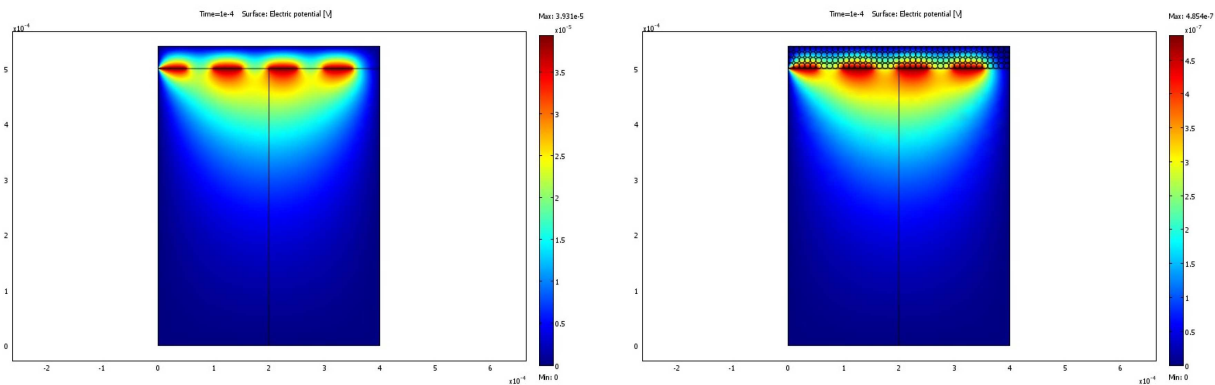


Abbildung 6.9: Links: Feldverteilung bei einem Keramiksubstrat mit Wasser; Rechts: Feldverteilung bei einem Keramiksubstrat mit als Kugeln modellierte Zellen

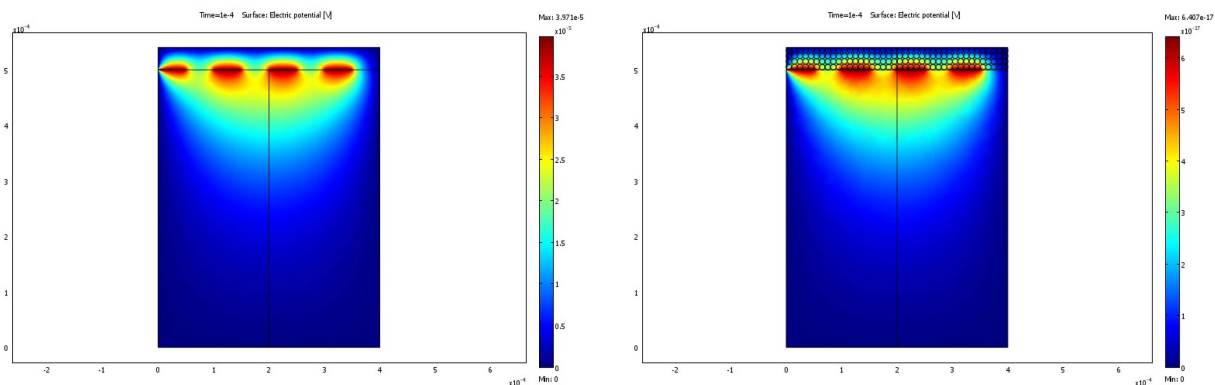


Abbildung 6.10: Links: Feldverteilung bei einem Glassubstrat mit Wasser; Rechts: Feldverteilung bei einem Glassubstrat mit als Kugeln modellierte Zellen

Kapitel 7

Sensorchips

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue multiparametrische Sensorchips auf Keramik- und Glas-Substrat entworfen. Diese besitzen Sensoren für pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Impedanz und Temperatur. Sie decken also dieselben Parameter ab, wie die in der Einleitung beschriebenen Sensorchips auf Silizium- und Glas-Silizium-Hybrid-Substrat, die als Ausgangspunkt für die Arbeit verwendet wurden und unter den beschriebenen Nachteilen litten. Die hier entworfenen Sensorchips sind nun für die Messung des pH-Wertes mit Rutheniumoxid-Elektroden ausgestattet, die mit Hilfe der in Kapitel 5 erzielten Ergebnisse erarbeitet wurden und gegenüber den vormals verwendeten ISFETs die dort diskutierten Vorteile aufweisen. Ferner wurde die Temperaturmessung einheitlich mit Pt1000-Sensoren realisiert.

Unter Verwendung dieser neuen pH-Sensorik und Sensoren für den Sauerstoffpartialdruck wurden auch bestehende Sensorchips für Messungen an Nervengewebe oder elektrisch aktiven Zellen um die Möglichkeit der Beobachtung metabolischer Parameter erweitert. Diese neu entworfenen Neurochips bieten weltweit zum ersten Mal die Möglichkeit, elektrophysiologische und metabolische Messungen an elektrisch aktiven biologischen Material vereint auf einem Sensorchip durchzuführen.

Als dritter Themenkomplex wurden neue Sensorchips für parallele metabolische, morphologische und elektrophysiologische Messungen auf Multiwellplatten-Systemen erarbeitet. Diese besitzen in unterschiedlichen Varianten zusammengestellt, dieselbe Sensorik wie die Sensorchips für Einzelmessungen.

Alle entworfenen Sensorchips wurden zum Teil mit Hilfe von Industriepartnern hergestellt und erfolgreich zur Anwendung gebracht. Einen Überblick über die wichtigsten Ergebnisse gibt Kapitel 9. Nachfolgend sind alle im Rahmen dieser Arbeit entstanden Sensorchips aufgeführt und ihr Einsatzzweck skizziert.

Während der Entwicklung der Sensorchips entstanden auch eine Reihe von Chips für Test- und Optimierungszwecke der eingesetzten Sensorik, die vorwiegend in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Anwendung kamen. Der Vollständigkeit halber sind diese Testträger ebenfalls nachfolgend aufgeführt.

7.1 Chipdesigns für morphologische und metabolische Parameter

7.1.1 Multiparametrischer Sensorchip auf Glassubstrat

Für biologische, medizinische oder pharmazeutische Anwendungsbereiche, bei denen die Möglichkeit zur optischen Kontrolle der Zell- oder Gewebeproben verlangt wird, wurde ein auf Glassubstrat aufbauender Sensorchip entworfen, der mit Sensorik zur Messung der metabolischen Aktivität adhärent wachsender Zellkulturen ausgestattet ist. Er besitzt Sensoren für die Messung des Sauerstoffpartialdrucks, des pH-Werts, der Impedanz und der Temperatur. Abbildung 7.1 zeigt das Layout der Platinmetallisierung des Chips, der die Abmessungen $24\text{mm} \times 33\text{mm}$ besitzt, bei einer Glasdicke von

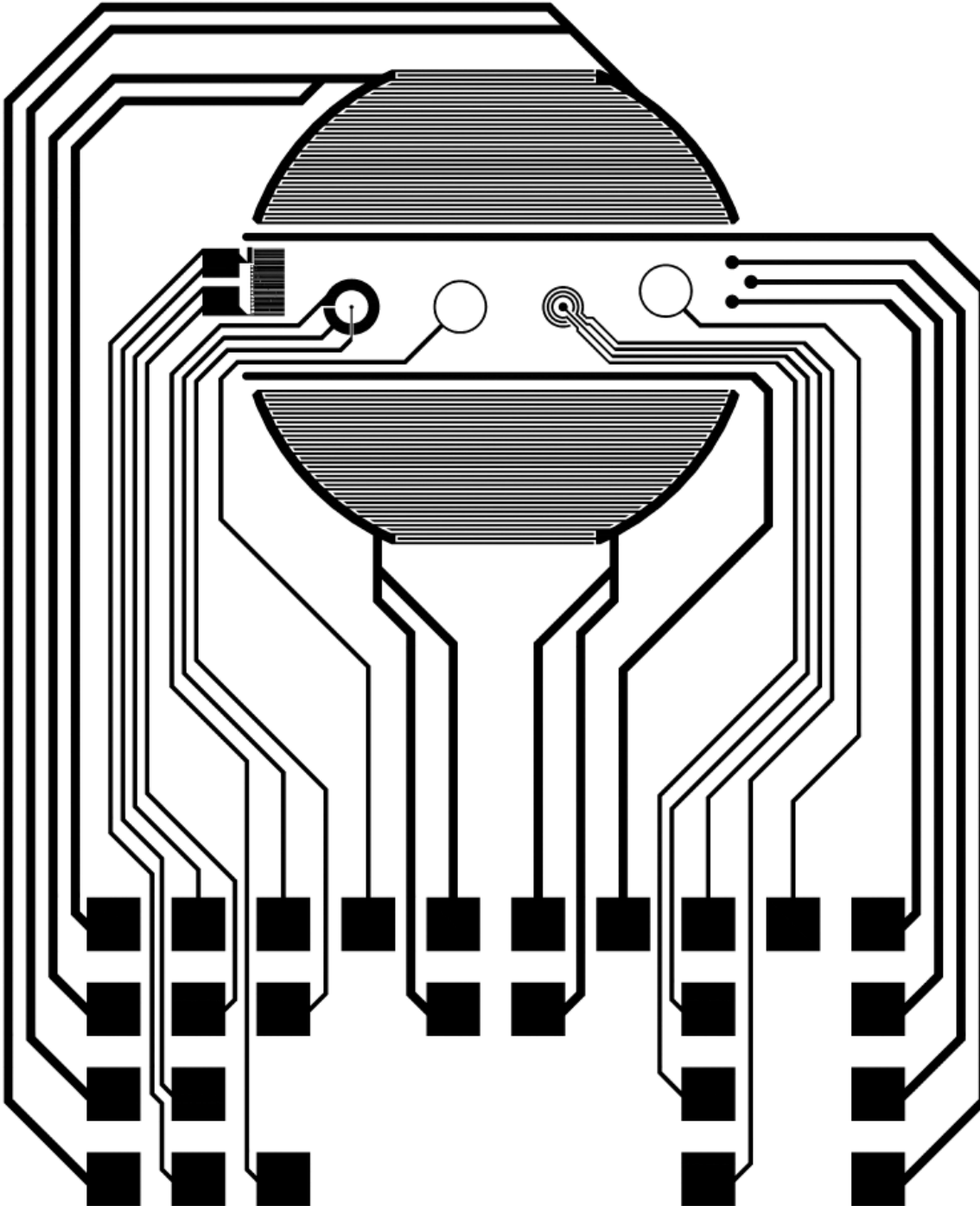


Abbildung 7.1: Layout des multiparametrischen Glaschips

0,5mm. Das Glassubstrat besteht aus Schott D263T. Auf die beim Vorgängermodell, von dem für die vorliegende Arbeit ausgegangen wurde, notwendige Verbindung mit einem Siliziuminlet mit IS-FETs konnte vollständig verzichtet werden. Im einzelnen kommen zwei Sauerstoffsensoren nach dem in Kapitel 3.5 betrachteten Clark-Prinzip zum Einsatz. Diese haben zwei unterschiedliche Elektrodenkonfigurationen, die aufgrund der dadurch möglichen unterschiedlichen Sensitivitäten gemeinsam einen breiteren Anwendungsbereich abdecken, als dies bei nur einer Elektrodenkonfiguration der Fall wäre. Abbildungen 7.2 und 7.3 zeigen die Konfigurationen 1 und 2 der beiden Sensoren. Dabei sind in der Konfiguration 1 die Elektroden größer ausgelegt, als die rot eingerahmten Flächen, die in der Isolationsschicht geöffnet sind. Dies erhöht die Toleranz gegenüber Positionierungsungenauigkeiten der Belichtungsmasken bei der Herstellung. Dies ist bei der Konfiguration 2 nicht nötig, da hier alle ringförmigen Elektroden frei liegen. Konfiguration 2 bietet darüberhinaus die Möglichkeit, Gegen- und Referenzelektrode aus den drei zur Verfügung stehenden Ringelektroden frei auszuwählen. Die aktive Arbeitselektrodenfläche ist bei beiden Konfigurationen mit Hilfe der Isolationsschicht durch eine Öffnung mit $35\mu\text{m}$ Durchmesser festgelegt.

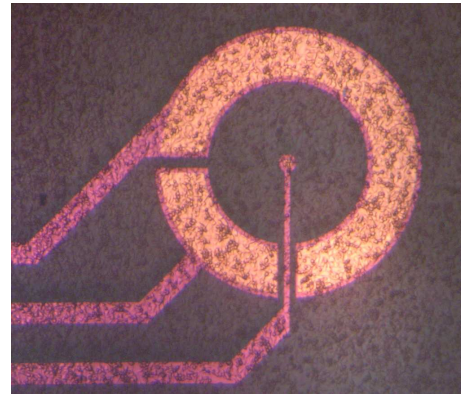
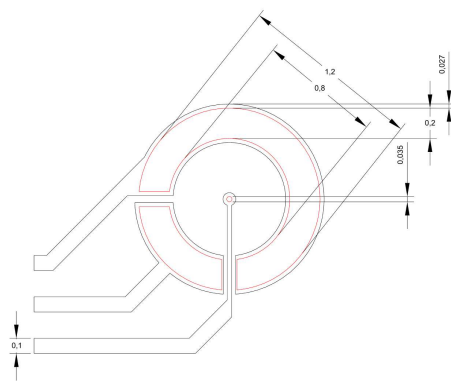


Abbildung 7.2: Links: Konfiguration 1 der auf dem multiparametrischen Glaschip verwendeten Clark'schen Sauerstoffsensoren; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der Struktur mit Zellbewuchs. Die Isolation ist an den rötlich erscheinenden Bereichen zu erkennen.

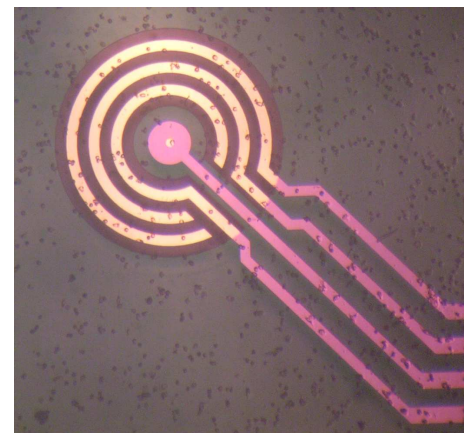
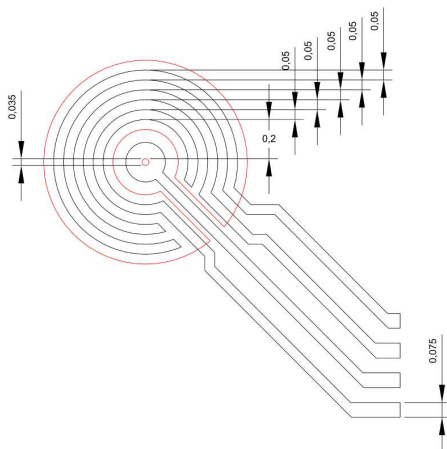


Abbildung 7.3: Links: Konfiguration 2 der auf dem multiparametrischen Glaschip verwendeten Clark'schen Sauerstoffsensoren; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der Struktur mit Zellbewuchs. Die Isolation ist an den rötlich erscheinenden Bereichen zu erkennen.

Auf dem Sensorchips sind zwei Rutheniumoxid-Elektroden als pH-Sensoren plaziert. Diese werden mit Hilfe von Sputterprozessen mittels einer Schattenmaske aufgebracht und haben daher eine Schwankungsbreite im Durchmesser von 1.3mm bis 1.5mm . Sie werden rückseitig mit einer ringförmigen Platinstruktur mit einem Durchmesser von 1.2mm und einer Ringbreite von $50\mu\text{m}$ kontaktiert. Den in Kapitel 5 als optimalen Elektrodendurchmesser erarbeiteten Wert von 1mm für die aktive Sensorfläche wird mit Hilfe der Isolationschicht eingestellt, die an der Elektrodenstelle eine runde Öffnung aufweist. Dies führt ebenso zu einer Toleranz gegenüber der Fertigungsgenauigkeit. Abbildung 7.4 zeigt die Platinstruktur zur Kontaktierung der Rutheniumoxid-Elektrode und die rot gezeichnete Aussparung in der Isolationschicht, sowie drei kreisförmige Platinelektroden. In Abbildung 7.5 ist schematisch ein Querschnitt durch den Aufbau der Rutheniumoxid-Elektrode dargestellt.

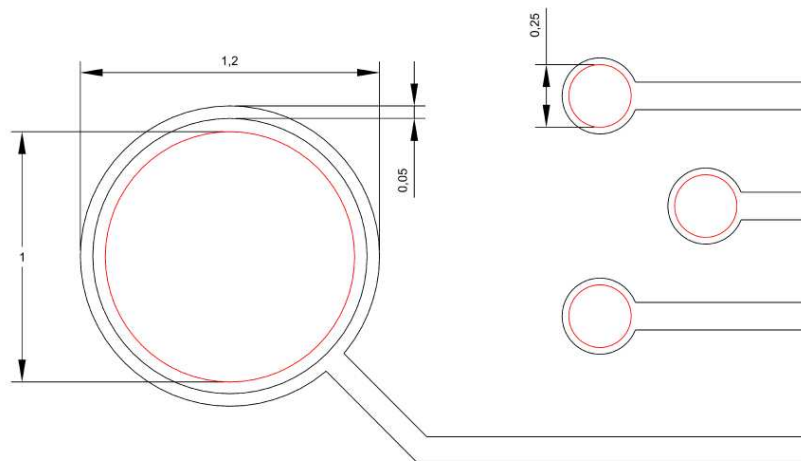


Abbildung 7.4: Ringförmige Platinstruktur zur Kontaktierung der Rutheniumoxid-Elektrode

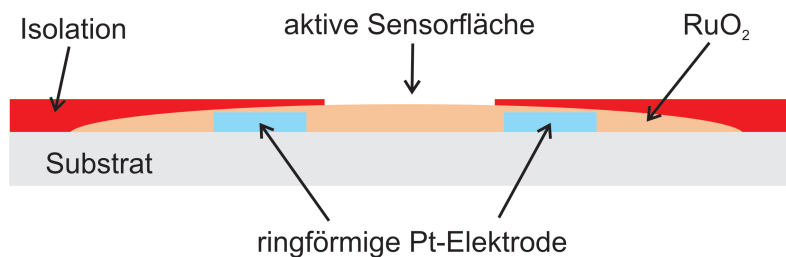


Abbildung 7.5: Schematische Darstellung eines Querschnitts der Rutheniumoxid-Elektroden

Weitere Sensoren auf diesem Sensorchip sind ein Pt1000-Temperatursensor und zwei interdigitale Elektrodenstrukturen mit einer Elektrodenbreite und einem Elektrodenabstand von je $50\mu\text{m}$ für Impedanzmessungen, wie in Kapitel 6 behandelt. Für zukünftige Anwendungen sind darüberhinaus fünf kreisförmige Platinelektroden und zwei, die Sauerstoff- und pH-Sensoren flankierende Platinleitungen integriert. Letztere können unter anderem als Abschirmung gegen die Impedanzsensoren verwendet werden. Abbildung 7.6 zeigt einen Ausschnitt der Zellkulturfläche des multiparametrischen Glaschips mit Zellen bewachsen.

Aufgrund des transparenten Glassubstrats ist neben den sensorischen Meßverfahren eine gleichzeitige Anwendung aller üblichen lichtmikroskopischen Analyseverfahren möglich. Dies eröffnet breit gefächerte Anwendungsmöglichkeiten in Forschung und Diagnose unter Korrelation von sensorischen und lichtmikroskopischen Daten. Abbildung 7.7 zeigt ein Exemplar der hergestellten multiparametri-

schen Sensorchips auf Glassubstrat.

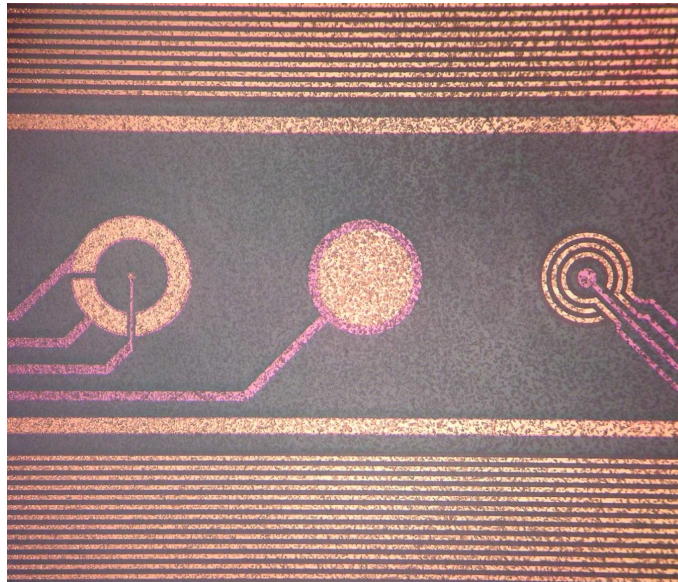


Abbildung 7.6: Ausschnitt einer mit Zellen bewachten Zellkulturfläche des multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat

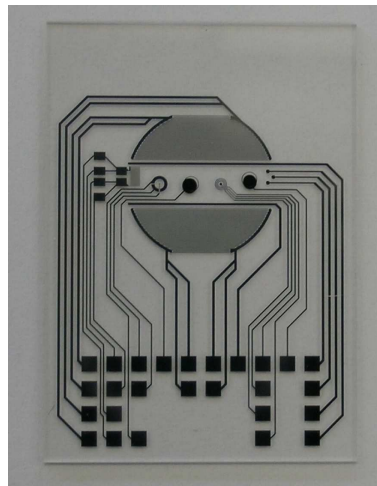


Abbildung 7.7: Multiparametrischer Sensorchip auf Glassubstrat der Größe $24\text{mm} \times 33\text{mm}$

7.1.2 Multiparametrischer Sensorchip auf Keramiksubstrat

Ist aufgrund der vorgesehenen Anwendung eine lichtmikroskopische Kontrolle des Zellmaterials nicht notwendig, bietet sich die Verwendung eines multiparametrischen Sensorchips auf Keramiksubstrat an. Dieser trägt dieselbe Sensorik für zellbasierte Untersuchungen wie der multiparametrische Sensorchip auf Glassubstrat. Abbildung 7.8 zeigt das Layout der Platinmetallisierung des Chips. Der Chip hat

die Dimensionen $8,5\text{mm} \times 8,5\text{mm}$, bei einer Substratdicke von $0,5\text{mm}$. Das Substrat besteht aus Al_2O_3 -Keramik.

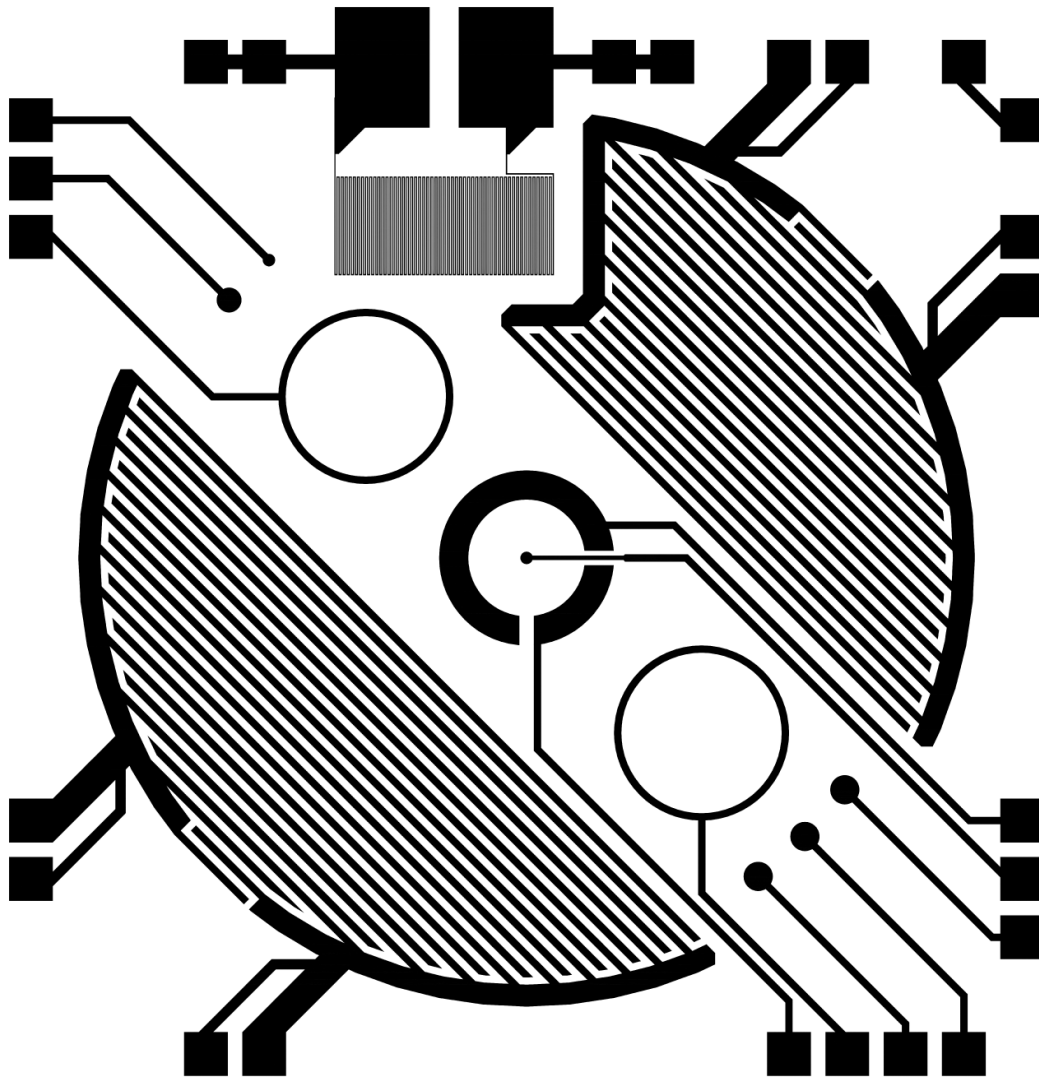


Abbildung 7.8: Layout des multiparametrischen Sensorchips auf Keramiksubstrat

Integriert ist im Gegensatz zum multiparametrischen Glaschip nur ein Sauerstoffsensor, der der Konfiguration 1 in Abbildung 7.2 entspricht. Die beiden Rutheniumoxid-Elektroden haben dieselbe Konfiguration wie auf dem Glaschip. Es sind ebenso zwei interdigitale Elektrodenstrukturen zur Impedanzmessung, sowie ein Pt1000 zur Temperaturmessung integriert. An den Rändern sind deutlich die Bondpads für Bondkontaktierung des Chips zu erkennen. Diese haben eine Abmessung von je $0,3\text{mm} \times 0,3\text{mm}$. Die Kontaktierung dieses Chips wird in Kapitel 8 noch ausführlicher betrachtet. Abbildung 7.9 zeigt ein Exemplar der hergestellten multiparametrischen Sensorchips auf Keramiksubstrat. Dieser Chip ist deutlich kleiner als ein multiparametrischer Glaschip. Das verwendete Keramiksubstrat läßt darüberhinaus in der Herstellung des Sensorchips erheblich höhere Prozeßtemperaturen zu, als das D263T-Glas des Glaschips. Diese Vorteile führen zu einer erheblich kostengünstigeren Herstellung als der multiparametrische Glaschip, allerdings auf Kosten der Mikroskopierbarkeit. Je 36 Sensorchips werden auf einem 2 Zoll Keramiksubstrat hergestellt (Abbildung 7.10). Durch diese kostengünstige Herstellung eignet sich dieser Chip besonders für den Masseneinsatz in Anwendun-

gen wie Wirkstoffuntersuchungen und Medikamentenentwicklung in der pharmakologischen Industrie.

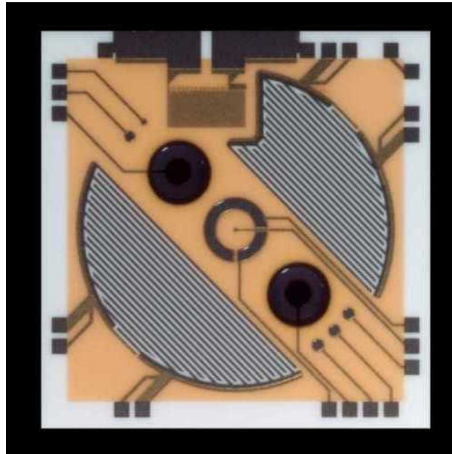


Abbildung 7.9: Multiparametrischer Sensorchip auf Keramiksubstrat der Größe $8,5\text{mm} \times 8,5\text{mm}$

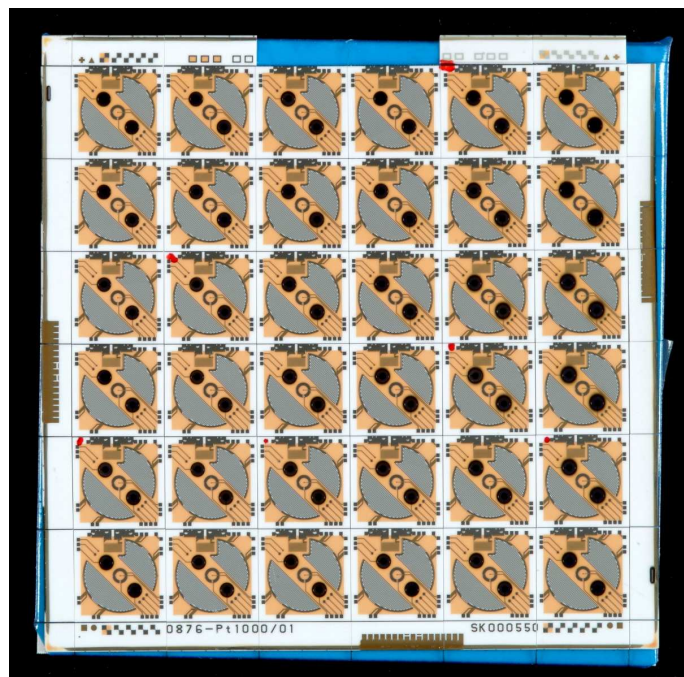


Abbildung 7.10: Je 36 multiparametrische Sensorchips auf einem 2 Zoll Keramiksubstrat

7.1.3 Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme

Für den Einsatz in Multiwellplattensystemen zur Untersuchung von metabolischen und morphologischen Parametern, im Speziellen für 24-Well-Platten mit einem Welldurchmesser von $7,7\text{mm}$, wurden mehrere Sensorchips entworfen. Alle bauen auf Glassubstrate auf, da eine Anforderung die zusätzliche Möglichkeit zur Mikroskopie war. Ebenso wie der in Kapitel 7.1.1 vorgestellte multiparametrische Gla-

chip bieten die Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme so die Möglichkeit optische und sensorische Daten zu kombinieren. Variante 1 besitzt eine interdigitale Elektrodenstruktur zur Impedanzmessung mit den bekannten Strukturgrößen. In der Mitte des Chips ist beim Impedanzsensor eine viereckige Fläche der Größe $1,4\text{mm} \times 0,9\text{mm}$ ausgespart, um somit ein "optisches" Fenster für die Mikroskopie zu erhalten. Der Chip selbst hat eine Größe von $8,1\text{mm} \times 8,1\text{mm}$. Für die Messung des Sauerstoffpartialdrucks und des pH-Werts ist bei diesem Chip der Einsatz von optischen Sensoren vorgesehen, die ober- und unterhalb des optischen Fensters platziert werden. Da diese Art von Sensoren nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, wird auf eine genauere Darstellung dieser Sensoren verzichtet. Abbildung 7.11 zeigt das Layout des Chips. In zwei gegenüberliegenden Ecken des Chips sind die elektrischen Kontakte für den Impedanzsensor platziert. Diese werden über geeignete leitfähige Pasten an eine Kontaktplatine gekoppelt. Eine kurzen Überblick über diese Art von Kontaktierung gibt Kapitel 8. Der Chip ist vorgesehen, von unten an einen 24-Well-Rahmen aufgeklebt zu werden.

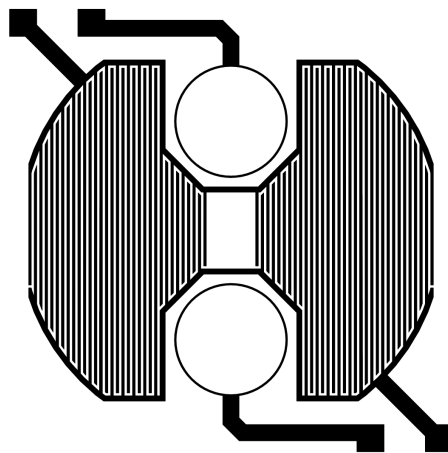


Abbildung 7.11: Variante 1 des Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten

Die Variante 2 des Chips entspricht der Variante 1 mit einer kleineren Interdigitalelektrodenstruktur. Dies hat den Zweck den Chip auch für kleinere Wellendurchmesser als $7,7\text{mm}$ einsetzbar zu machen. Abbildung 7.12 zeigt das Layout der Variante 2.

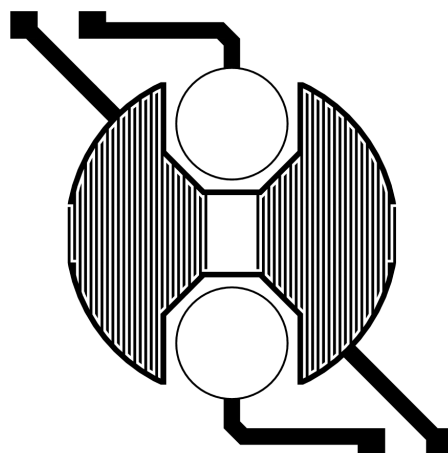


Abbildung 7.12: Variante 2 des Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten mit kleinerer Interdigitalelektrodenstruktur

In einer dritten Variante sind nun die Aussparungen für optische Sensoren der Varianten 1 und 2 durch die von den Sensorchips auf Glas- und Keramiksubstrat her bekannten Sauerstoff- und pH-Sensoren ersetzt. Abbildung 7.13 zeigt das Layout dieser dritten Variante.

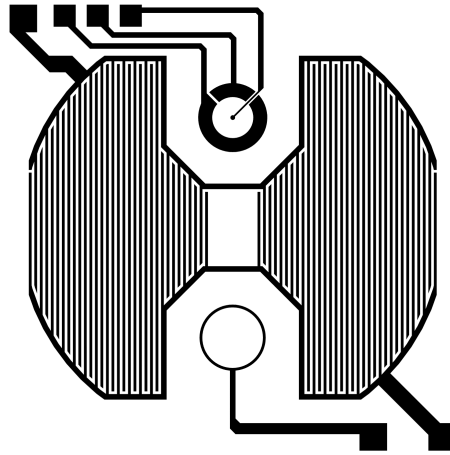


Abbildung 7.13: Variante 3 des Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten mit Sensor für Sauerstoffpartialdruck und Rutheniumoxid-Elektrode für pH-Messungen

Es wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit alle drei Varianten dieser Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme hergestellt. Abbildung 7.14 zeigt alle hergestellten Einzelchips. Da aus Handhabungsgründen aber sehr schnell auf nachfolgend beschriebenen Sensorplatten ausgewichen wurde, wurde nur die Variante 1 praktisch erprobt.

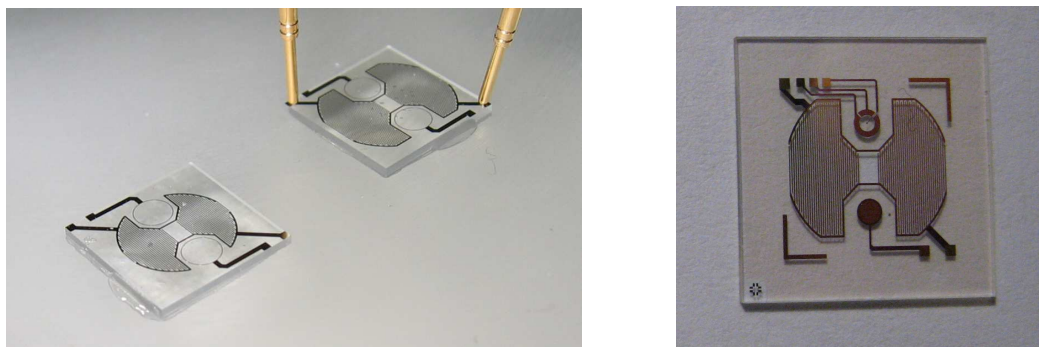


Abbildung 7.14: Hergestellte Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten: Links: Aufgeklebte Variante 1 und 2, zu Testzwecken mit Federkontaktstiften kontaktiert; Rechts: Variante 3 vor dem Zuschnitt auf die Größe $8,1\text{mm} \times 8,1\text{mm}$

7.1.4 Sensorplatten für Multiwellplatten-Systeme

In Kapitel 6 wurden zwei Konzepte vorgestellt, um die Kontaktierung der interdigitalen Elektrodenstrukturen zur Impedanzmessung auf Multiwellplatten zu vereinfachen. Diese beiden Konzepte wurden praktisch realisiert und werden nachfolgend vorgestellt. Für metabolische Parameter der Zellkulturen sind ebenfalls die bei den Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme verwendeten optischen Sauerstoff- und pH-Sensoren vorgesehen.

Konzept mit seriell geschalteten Impedanzsensoren

Für das Konzept mit seriell geschalteten Interdigitalelektrodenstrukturen wurden Sensorplatten mit je 12 IDES entworfen. Dabei werden zwei dieser Sensorplatten unter eine 24-Well-Platte geklebt. Abbildung 7.15 zeigt das Layout und Abbildung 7.16 zwei hergestellte Exemplare, die auf die Rückseite einer 24-Well-Platte geklebt sind. Da beim folgend dargestellten Konzept der Impedanzsensoren mit gemeinsamer Masse alle 24 Sensoren auf einer Platte untergebracht werden, wurde dieses Konzept nicht weiter verfolgt.

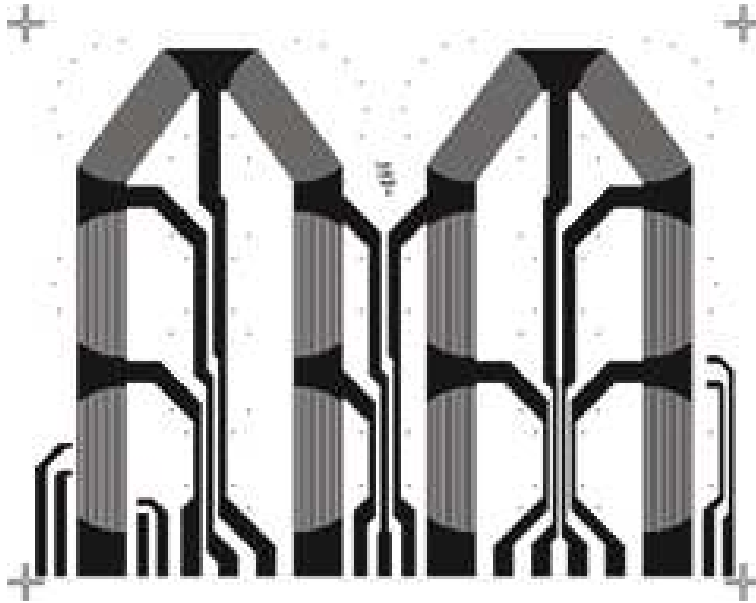


Abbildung 7.15: Layout der Sensorplatte mit 12 seriell geschalteten interdigitalen Elektrodenstrukturen



Abbildung 7.16: Zwei Exemplare der hergestellten Sensorplatten für Multiwellplatten-Systeme mit seriell geschalteten Impedanzsensoren die rückseitig auf eine 24-Well-Platte aufgeklebt sind

Konzept für Impedanzsensoren mit gemeinsamer Masse

Um das Konzept der Impedanzsensoren mit gemeinsamer Masse umzusetzen, wurde eine Sensorplatte der Größe $10,16\text{cm} \times 7,55\text{cm}$ entworfen, auf der alle 24 Sensoren integriert sind. Auch hier ist für die Messung metabolischer Parameter der Einsatz von optischen Sensoren vorgesehen, da die Verwendung elektrischer Sensoren zu diesem Zeitpunkt hinsichtlich ihrer Kontaktierung und Ankopplung an die Meßelektronik noch nicht abschließend gelöst ist. In Abbildung 7.17 und Abbildung 7.18 ist das Layout und ein Exemplar der hergestellten Sensorplatte dargestellt.

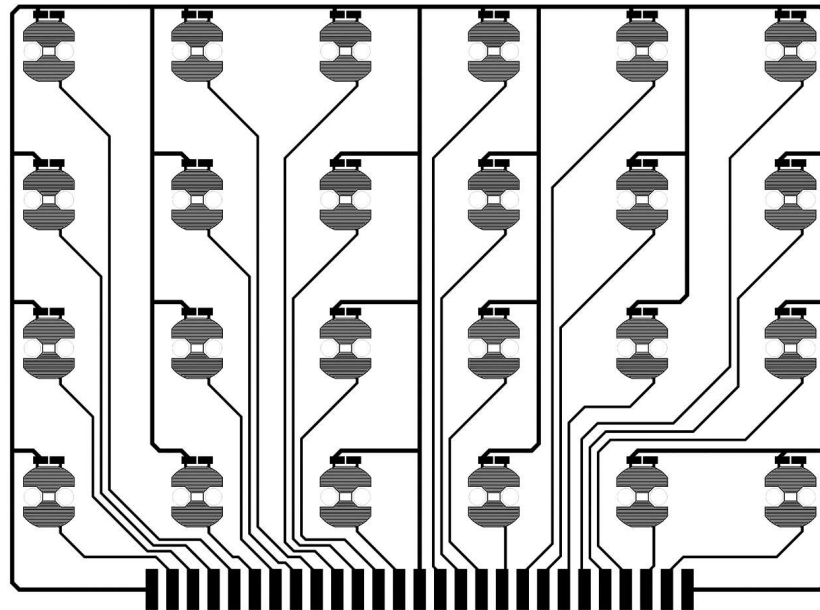


Abbildung 7.17: Layout der Sensorplatte mit 24 interdigitalen Elektrodenstrukturen mit gemeinsamer Masse

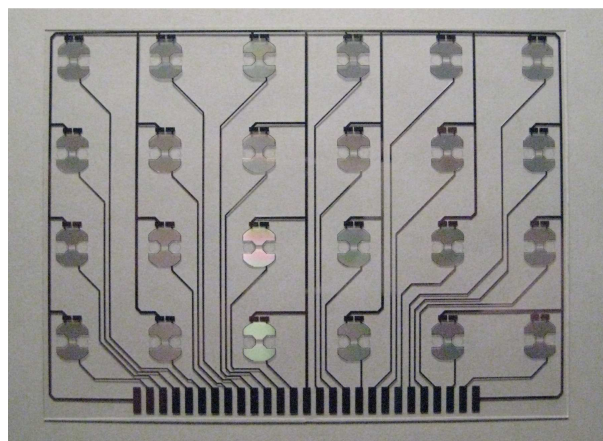


Abbildung 7.18: Exemplar der hergestellten Sensorplatte für Multiwellplatten-Systeme mit Impedanzsensoren mit gemeinsamer Masse

7.2 Chipdesigns für metabolische Parameter und elektrischer Aktivität

Ausgehend von den in Kapitel 3.7 beschriebenen Sensorchips der Arbeitsgruppe Gross wurden neue Sensorchips entworfen, die die Möglichkeit bieten, Messungen von elektrophysiologische Parametern mit Messungen metabolischer Parameter zu kombinieren. Dazu besitzen die Sensorchips sowohl die Sensorik für pH-, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur, als auch ein Array von 64 Ableitelektroden. Nachfolgend werden die erarbeiteten Designs vorgestellt.

7.2.1 Neurochip mit Sensoren für metabolische Parameter

Von der Arbeitsgruppe Gross wurde für diesen Sensorchip das Format von $5,0\text{cm} \times 5,0\text{cm}$, sowie die Kontaktierung der 64 Ableitelektroden zu je 32 Kontaktpads an der linken und rechten Kante des Chips übernommen. Das Ableitelektrodenarray aus 8×8 Elektroden mit einem horizontalen und vertikalen Elektrodenabstand von $150\mu\text{m}$ wurde ebenfalls weitgehend übernommen. Hier wurde nur die Lage der Zuleitungen verändert, um die zur Mikroskopie verfügbare freie Fläche zu optimieren. Der Chip selbst basiert auf einem Glassubstrat aus Schott D263T mit einer Dicke von $0,5\text{mm}$ und damit nur halb so dick wie der von Gross ursprünglich verwendete Chip. Neu hinzugefügt wurden ein Sauerstoff- und ein Rutheniumoxid-pH-Sensor der bekannten Konfiguration. Zusätzlich besitzt dieser Chip nun auch einen Pt1000-Temperatursensor, der bei der vorgesehenen Anwendung mit Nervenzellen von besonderer Bedeutung ist, da diese Art von Zellen enorm empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren. Abbildung 7.19 zeigt das Layout des Chips. In Abbildung 7.20 ist das Layout der Ableitelektroden mit ihren Maßen, in Abbildung 7.21 ein Exemplar der hergestellten Neurochips und eine mikroskopische Vergrößerung des Elektrodenarray dargestellt.

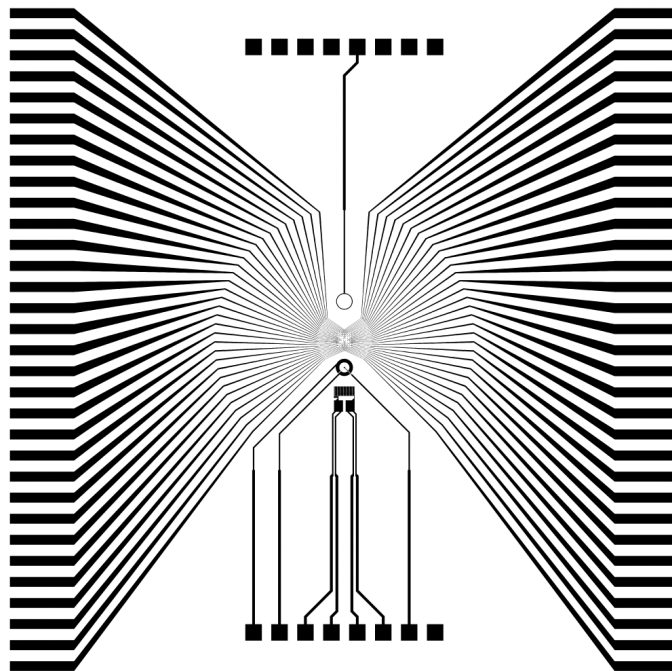


Abbildung 7.19: Layout des Sensorchips zur Messung elektrophysiologischer und metabolischer Parameter elektrisch aktiver Zellen und Geweben

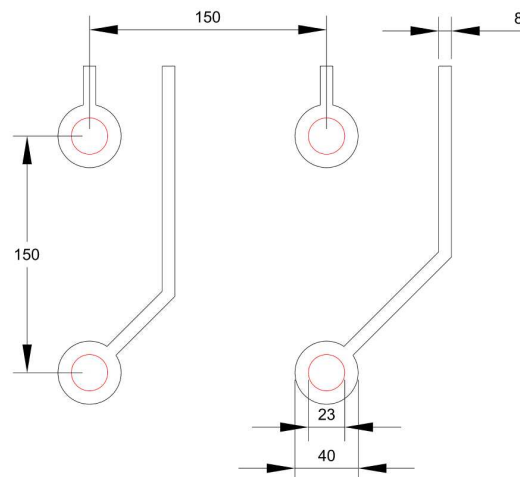


Abbildung 7.20: Ausschnittsvergrößerung der Sensorfläche

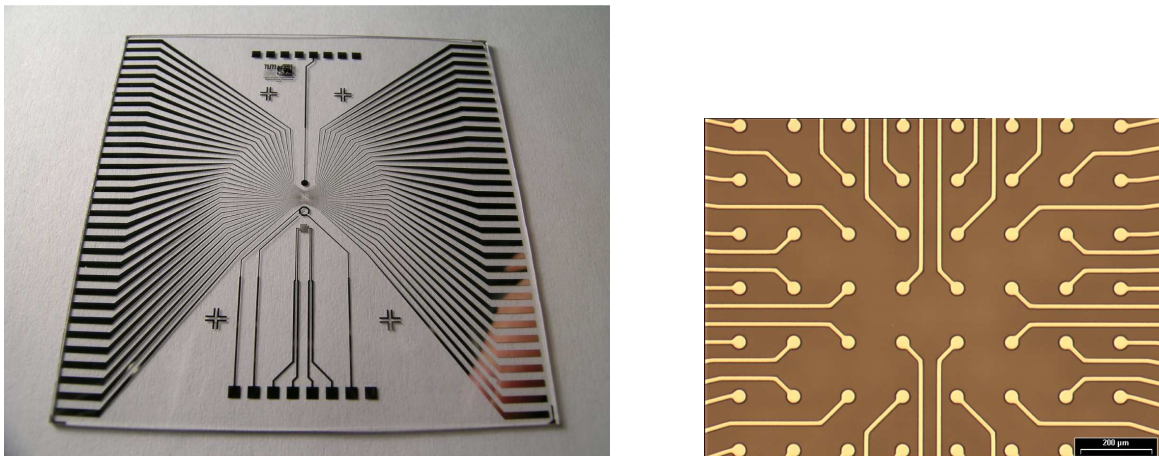


Abbildung 7.21: Links: Hergestelltes Exemplar des Sensorchips; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der Ableitelektroden

7.2.2 Einzelchip für Multiwellplatten-Systeme für electrophysiologische und metabolische Parameter

Für die Parallelisierung von Messungen von electrophysiologischen und metabolischen Parametern an lebenden Zellen wurde ein Einzelchip für Multiwellplatten-Systeme entworfen und hergestellt. Dieser Chip hat mit $8,1\text{mm} \times 8,1\text{mm}$ dieselben Dimensionen, wie die bereits vorgestellten Multiwellplat-teneinzelchips für metabolische und morphologische Parameter. Integriert ist das oben beschriebene Elektrodenarray mit 64 Ableitelektroden, sowie ein Sauerstoff- und ein pH-Sensor. Abbildungen 7.22 und 7.23 zeigen das Layout und ein hergestelltes Exemplar. Der Chip besitzt insgesamt 68 Kontaktpads. Aufgrund dieser hohen Kontaktierungsdichte ist es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, eine 24-Well-Platte komplett mit diesen Einzelchips auszustatten. Für zukünftige Anwendung ist aber eine Mischbestückung von diesen Chips und den in Kapitel 7.1.3 dargestellten Chips denkbar, um auf einer Multiwellplatte eine breite Palette an Aufgabenspektren abzudecken.

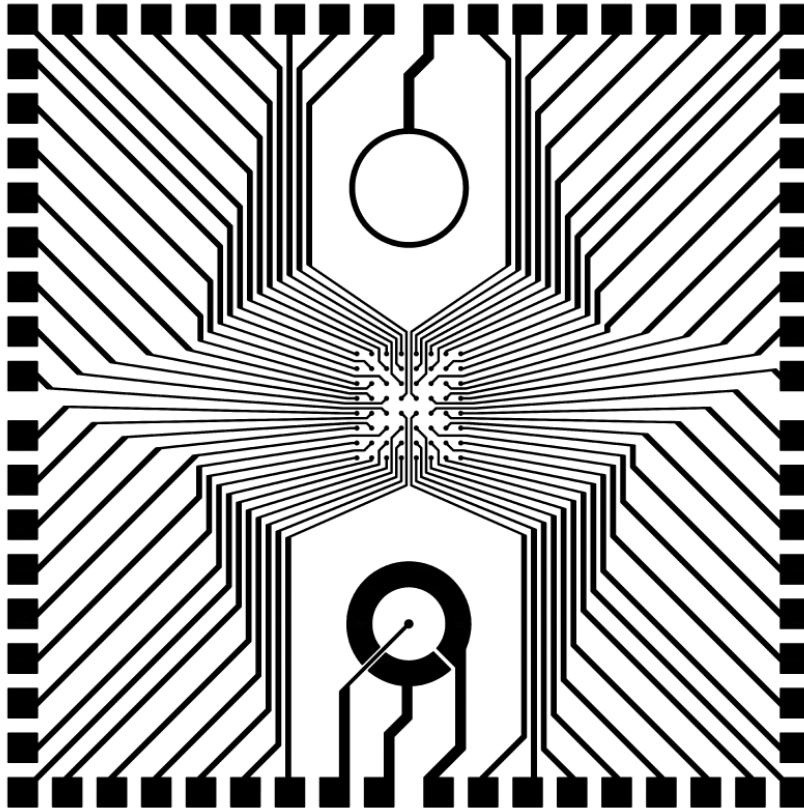


Abbildung 7.22: Layout des Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme zur Messung elektrophysiologischer und metabolischer Parameter lebender Zellen

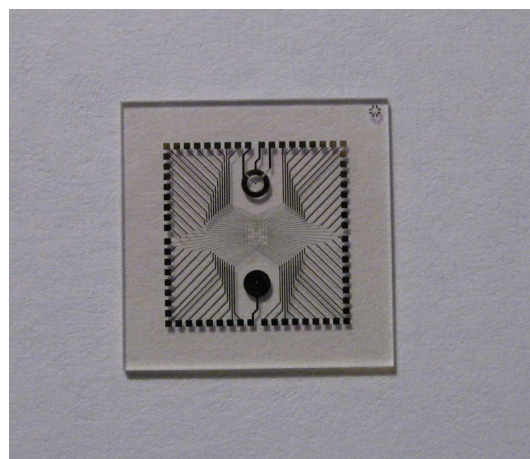


Abbildung 7.23: Exemplar der hergestellten Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme zur Messung elektrophysiologischer und metabolischer Parameter lebender Zellen (hier vor dem Zuschnitt auf die Maße $8,1\text{mm} \times 8,1\text{mm}$)

7.3 Weitere Chipvarianten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden zusätzlich zu den oben angeführten Sensorchips für Messungen an lebenden Zellen und Geweben weitere Chiplayouts, die für Sonderzwecke oder zum Test der verwendeten Sensorik für Sauerstoffpartialdruck oder der Impedanz gedacht sind. Nachfolgend sind die wichtigsten Vertreter dargestellt.

7.3.1 Multiparametrischer Sensorchip auf Glassubstrat im Teststreifenformat

Die vorangehend ausgeführten multiparametrischen Sensorchips sind für den Einsatz in Testsystemen gedacht, bei denen der Chip stationär in Testsysteme eingelegt wird und die zu untersuchenden Proben direkt auf den Chips kultiviert werden. Um mobile Messungen in beliebigen Flüssigkeiten zu ermöglichen, wurde ein Sensorchip entworfen, der in den Abmessungen einen herkömmlichen Teststreifen ähnelt, wie sie z.B. mit Indikatoren für die Bestimmung des pH-Wertes verwendet werden. Dieser Chip hat die Maße $48,2\text{mm} \times 8\text{mm}$ und besitzt je einen Sensor für Sauerstoff, pH-Wert und Temperatur, sowie zwei Elektroden um Impedanz- oder Leitfähigkeitsmessungen durchzuführen. Der Sauerstoff-, pH-Sensor und Temperatursensor entspricht den bekannten Konfigurationen. Der Chip bietet die Möglichkeit in Testflüssigkeiten eingetaucht zu werden und Messungen durchzuführen. Abbildungen 7.24 und 7.25 zeigen das Layout und ein Exemplar des hergestellten Chips.

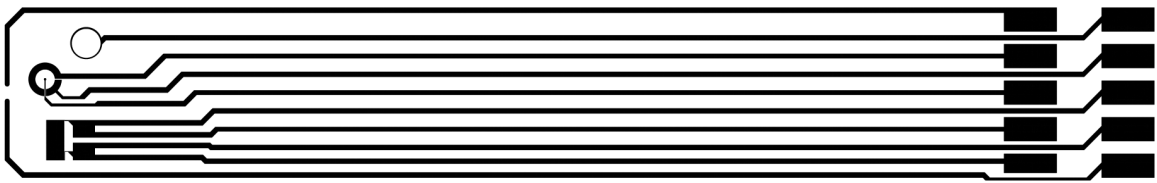


Abbildung 7.24: Layout des multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat der Maße $48,2\text{mm} \times 8\text{mm}$ für Messungen in Flüssigkeiten

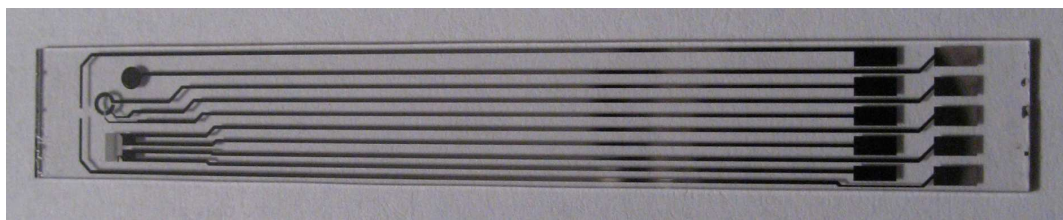


Abbildung 7.25: Exemplar eines hergestellten multiparametrischen Sensorchips im Format eines Teststreifens für Messungen in Flüssigkeiten.

7.3.2 Testchip für Versuche an Sensoren für die Messung des Sauerstoffpartialdruckes

Zur Untersuchung und Optimierung von Elektrodenstrukturen, die für die Messung des Sauerstoffpartialdruckes nach dem in Kapitel 3.5 gedacht sind, wurde ein Chip entworfen, der in den Abmessungen und der Kontaktierung mit dem Sensorchip auf Glassubstrat für multiparametrische Messungen aus Kapitel 7.1.1 identisch ist, also die Maße $24\text{mm} \times 33\text{mm}$ besitzt. Abbildung 7.26 zeigt das Layout des Chips. Er besitzt fünf Elektrodenstrukturen für die Messung des Sauerstoffpartialdruckes, die bis auf den Durchmesser der Arbeitselektrode, die durch eine runde Öffnung in der Isolierung realisiert

ist, identisch mit der in Kapitel 7.1.1 in Abbildung 7.3 dargestellten Struktur. Anstelle des dort verwendeten Arbeitselektroden durchmessers von $35\mu\text{m}$ besitzen die fünf Strukturen Arbeitselektroden durchmesser von $5\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$, $20\mu\text{m}$, $50\mu\text{m}$ und $100\mu\text{m}$. Dies dient der Untersuchung des Einflusses der Arbeitselektrodenfläche auf die Leistungsparameter der Sauerstoffmessung.

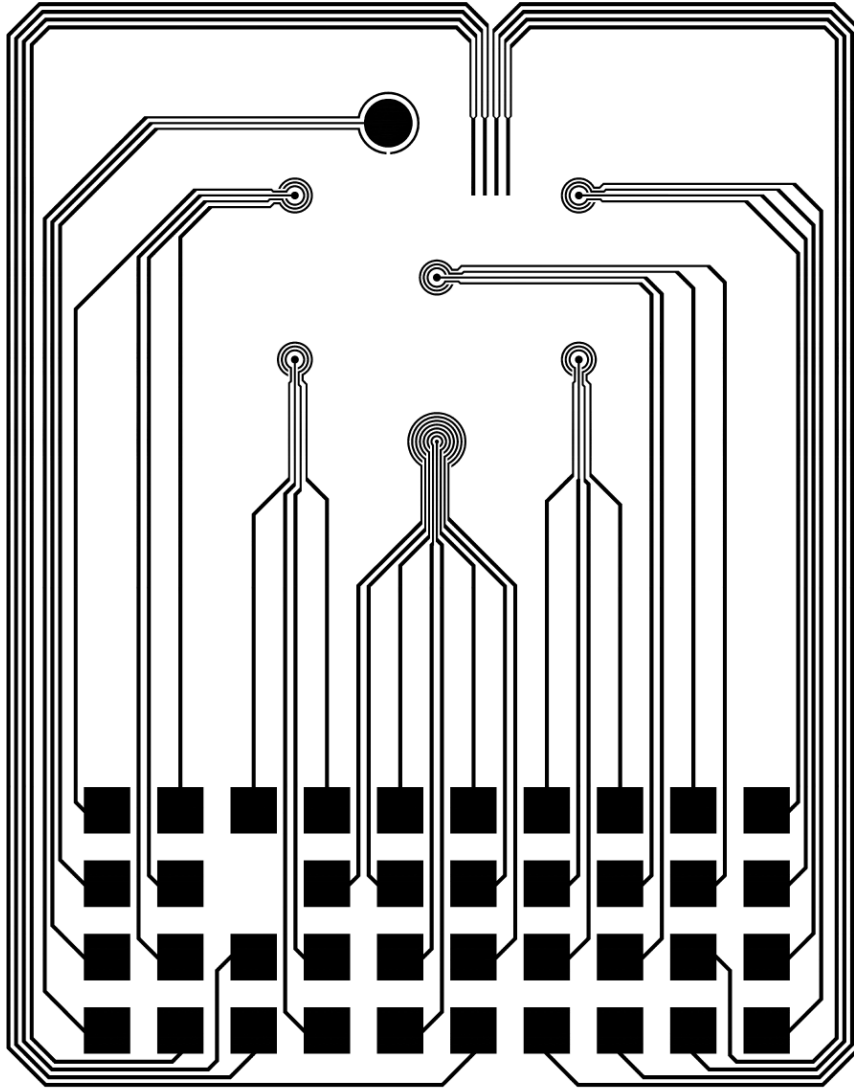


Abbildung 7.26: Layout eines Testchips zur Untersuchung von Elektroden zur Messung des Sauerstoffpartialdruckes

Zusätzlich zu den fünf Strukturen ist eine weitere Struktur mit einem Arbeitselektroden durchmesser von $30\mu\text{m}$ vorhanden, die, angefangen im Abstand von $120\mu\text{m}$ zum Mittelpunkt der Arbeitselektrode insgesamt 7 Ringelektroden mit $50\mu\text{m}$ Breite besitzt. Die Ringelektroden haben untereinander einen Abstand von $50\mu\text{m}$. Mit Hilfe dieser Struktur ist es möglich, den Einfluß des Abstandes der Gegenelektrode und der Referenzelektrode zur Arbeitselektrode auf die Sensorfunktion zu untersuchen. Abbildung 7.27 zeigt die Konfiguration und die Maße dieser Struktur.

Ebenfalls integriert ist eine weitere Elektrodenstruktur zur Sauerstoffmessung die in Abbildung 7.28 dargestellt ist. Auf ihre Funktionsweise wird an dieser Stelle nicht eingegangen. Weiter sind vier Elektroden mit einer Breite von $100\mu\text{m}$, einer Länge von 2mm und einen Abstand untereinander

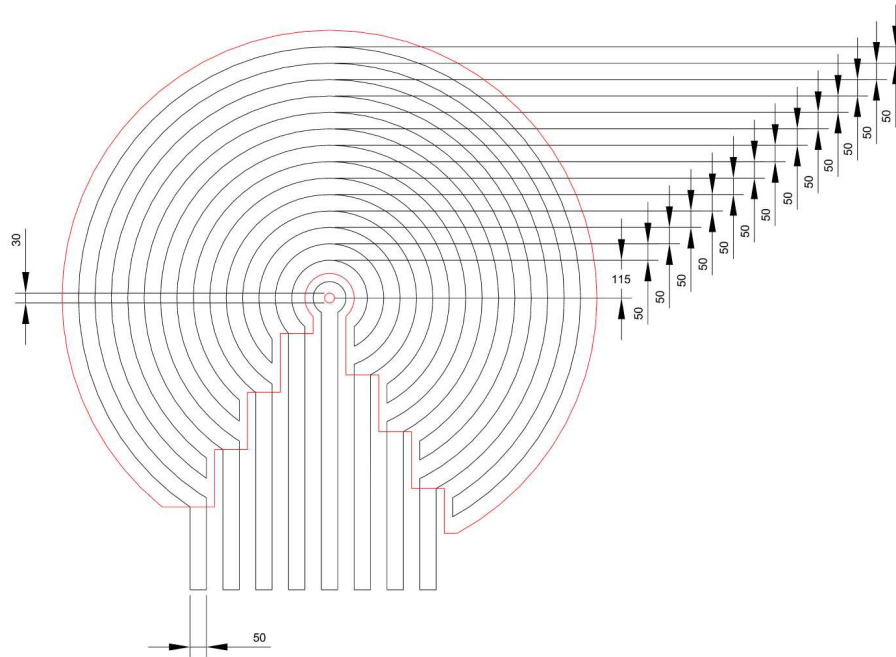


Abbildung 7.27: Konfiguration der Elektrodenstruktur zur Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Gegen- und Referenzelektrode von der Arbeitselektrode auf die Messung des Sauerstoffpartialdruckes

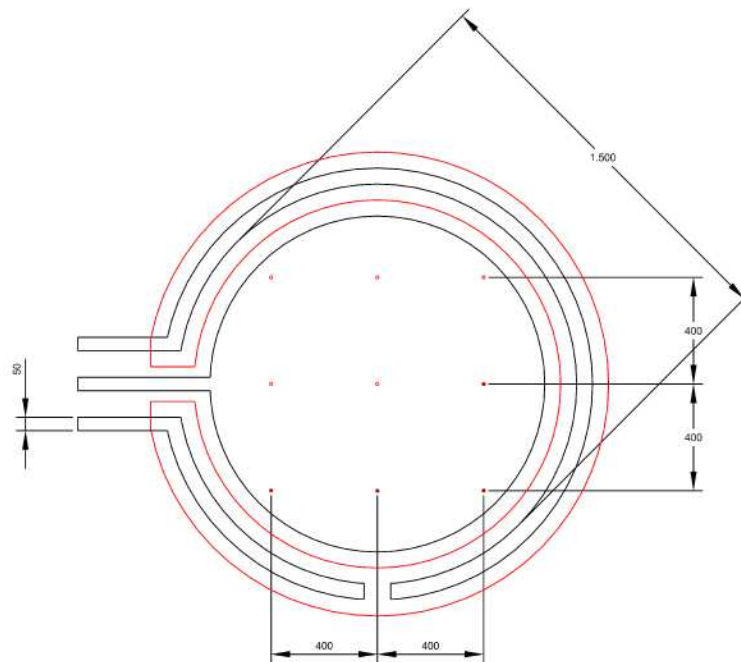


Abbildung 7.28: Elektrodenkonfiguration eines weiteren Sensors zur Untersuchung des Sauerstoffpartialdruckes

von $200\mu\text{m}$ vorhanden, mit denen Leitfähigkeits- oder Impedanzuntersuchungen durchgeführt werden können. Abbildung 7.29 zeigt ein hergestelltes Exemplar dieses Chips.

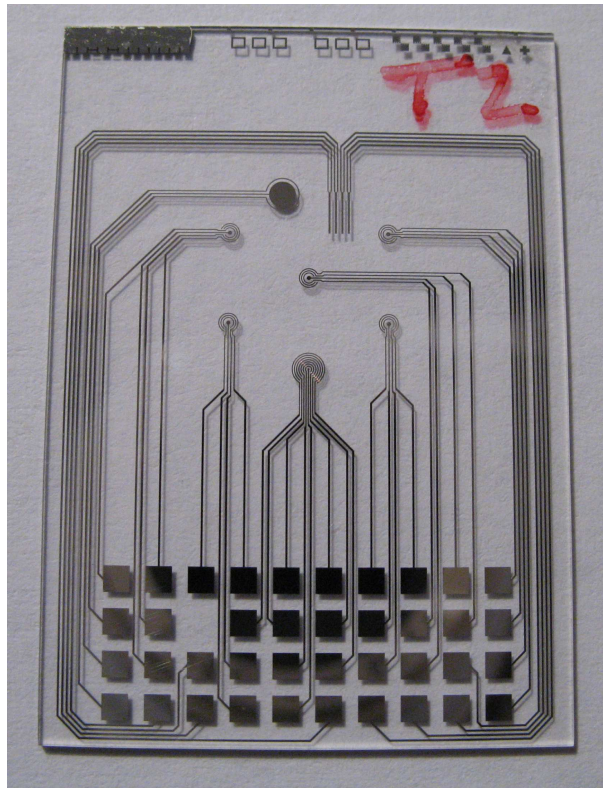


Abbildung 7.29: Hergestelltes Exemplar des Testchips zur Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Gegen- und Referenzelektrode von der Arbeitselektrode auf die Messung des Sauerstoffpartialdruckes

7.3.3 Testchip für Versuche an Sensoren für die Messung der Impedanz

Ein weiterer Testchip wurde für Untersuchungen an Elektrodenstrukturen für Impedanzmessungen entworfen. Abbildung 7.30 zeigt das Layout des Chips. Dieser Chip besitzt drei Ausführungen von interdigitale Elektrodenstrukturen mit einer Elektrodenbreite von $50\mu\text{m}$ und einem Elektrodenabstand von $50\mu\text{m}$. Während die erste Ausführung parallele gerade laufende Elektroden besitzt, sind die Elektroden in einer gezackten Anordnung ausgeführt, die in der Ausführung 2 einen Winkel von 60° und bei Ausführung 3 einen Winkel von 90° besitzen. Zusätzlich dazu ist ein Ring aus Einzelelektroden integriert, der mit Zellen bewachsen werden kann und richtungsabhängige Impedanzmessungen ermöglicht. Die Abbildungen 7.31 und 7.32 zeigen jeweils die Konfigurationen und die wichtigsten Dimensionen der Strukturen.

Zusätzlich zu den Impedanzstrukturen sind auf diesem Testchip weitere zwei Konfigurationen von Sauerstoffsensoren integriert. Diese besitzen von ihren äußeren Dimensionen die Maße der in Kapitel 7.1.1 in Abbildung 7.3 dargestellten Strukturen. Die Arbeitselektrode ist bei diesen Sensoren allerdings als viereckiger und als runder Ring ausgeführt. Diese Sensoren dienen zur Untersuchung der Sauerstoffempfindlichkeit unterschiedlicher Arbeitselektrodenkonfigurationen. Abbildung 7.33 zeigt das Layout und die Maße dieser Strukturen.

In Abbildung 7.34 ist ein hergestelltes Exemplar dieses Testchips für Versuche an Sensoren für die Messung der Impedanz dargestellt.

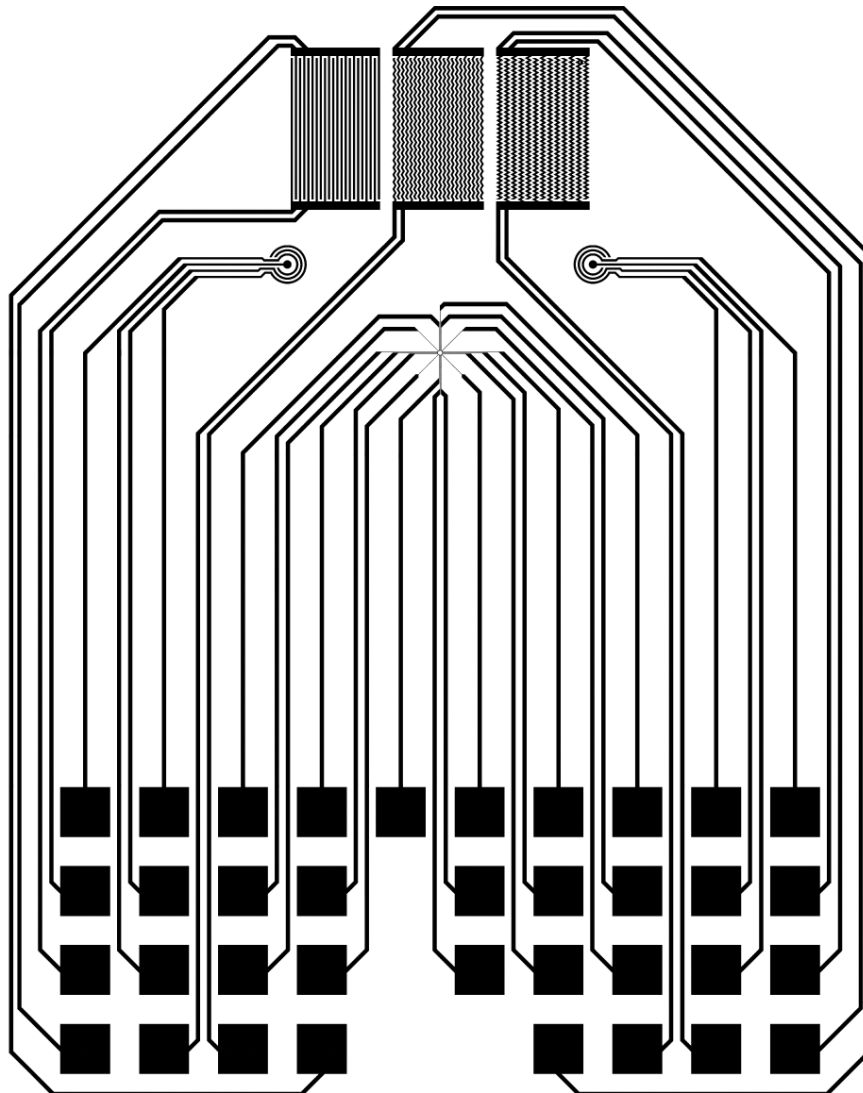


Abbildung 7.30: Layout eines Testchips zur Untersuchung von Elektroden zur Messung der Impedanz

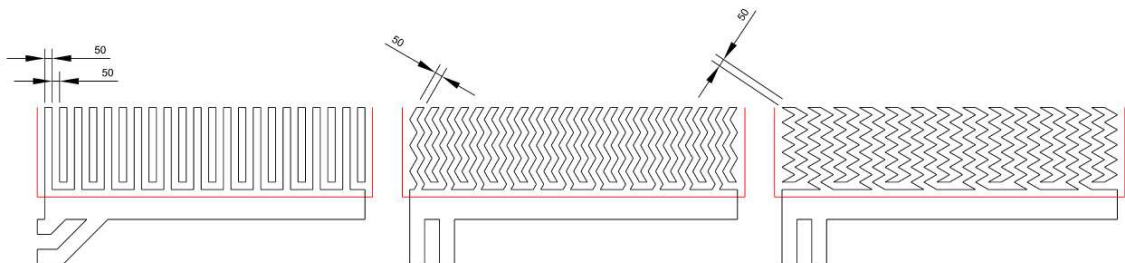


Abbildung 7.31: Konfiguration der drei Ausführungen von interdigitalen Elektrodenstrukturen für Impedanzmessungen

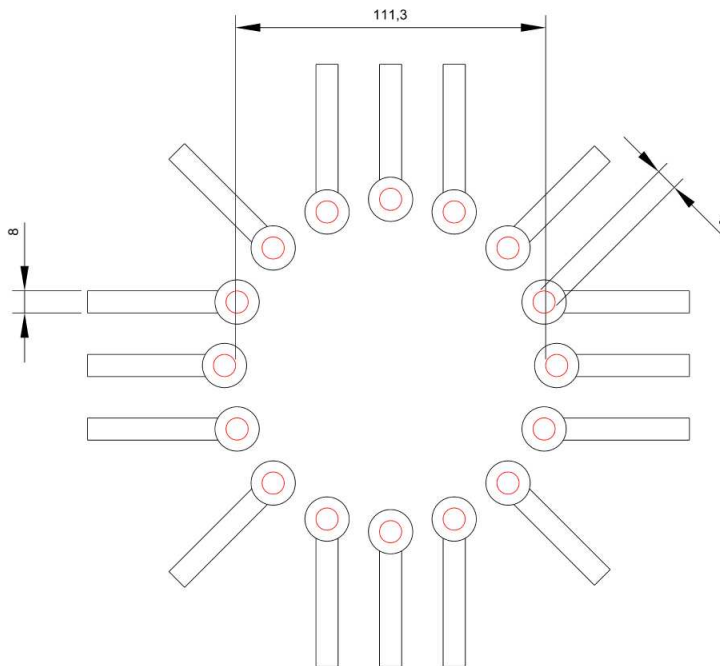


Abbildung 7.32: Konfiguration des Rings aus Einzelelektroden für richtungsabhängige Impedanzmessungen

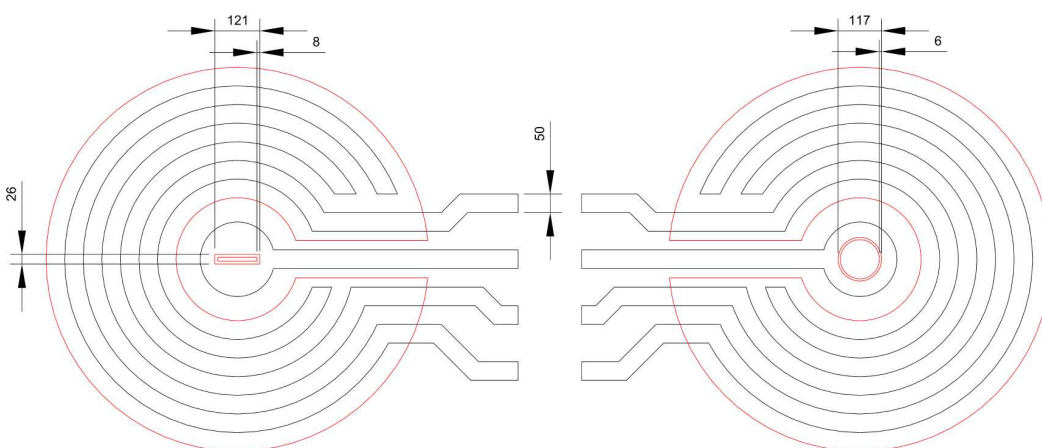


Abbildung 7.33: Konfiguration von zwei Strukturen zur Sauerstoffmessung mit ringförmigen Arbeitselektroden

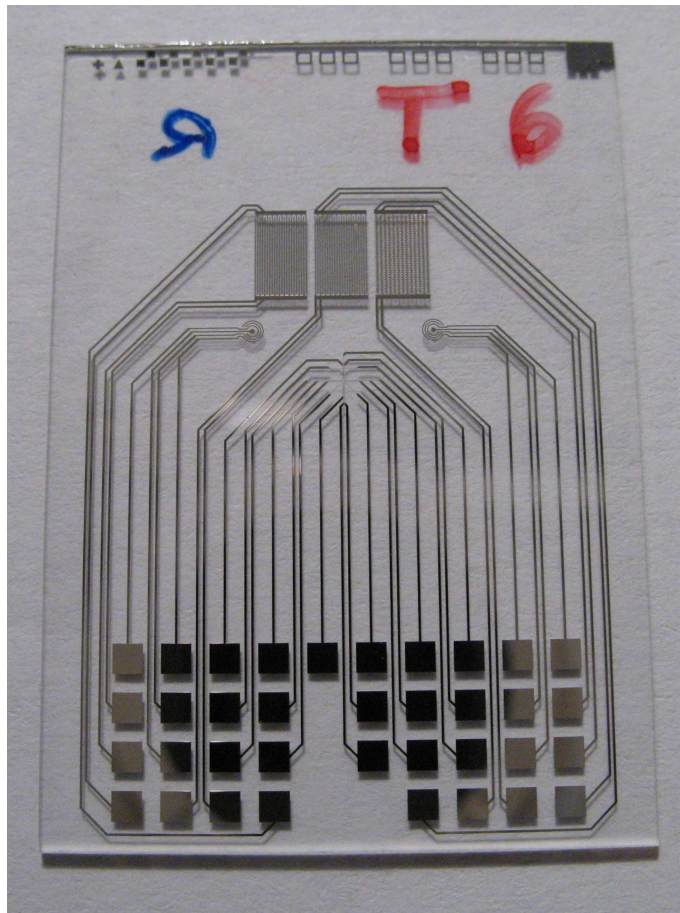


Abbildung 7.34: Hergestelltes Exemplar des Testchips für Versuche an Sensoren für die Messung der Impedanz

7.4 Herstellungsprozesse

Die in diesem Kapitel vorgestellten Sensorchips wurden entweder am Lehrstuhl oder von Industriepartnern hergestellt. Alle verwendeten Prozesse sind Standardverfahren, die auch in der Halbleiterproduktion und der Mikrosystemtechnik Anwendung finden. Einen Überblick über die angewandten Verfahren gibt unter anderem [249].

7.4.1 Prozeßfolge der am Lehrstuhl hergestellten Sensorchips

Nachfolgend ist die Prozeßfolge der am Lehrstuhl hergestellten Sensorchips dargestellt. Als Ausgangsmaterial wird ein 2 Zoll Glassubstrat Schott D263T mit einer Dicke von $0,5\text{mm}$ verwendet. Dieses wird nacheinander mit Deconex, Methylpyrrolidon, Aceton und Propanol gereinigt.

Substrat (Glas)

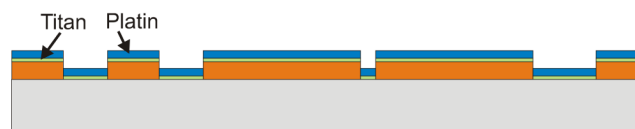
Die Metallisierung der Sensorstrukturen wird mittels eines Lift-Off-Verfahrens strukturiert, da diese aus Platin bestehen und Edelmetalle mit den am Lehrstuhl verfügbaren Techniken nicht naßchemisch strukturierbar sind. Nach einem Pre-Bake bei 160°C wird hierfür zunächst ein Photolack vom Typ ma-N 1420 auf das Substrat mittels Spin-On-Verfahren aufgeschleudert. Der Prozeß besteht aus Primer und dem Photolack selbst. Die Drehzahlen sind jeweils 2s mit 500 U/min und anschließend 30s mit 3000 U/min. Zum Abschluß wird der Photolack per Heizplatte bei 98°C 120s ausgehärtet.



Anschließend wird der Photolack mit Hilfe einer Chrom-Maske, die die Strukturen enthält, durch UV-Licht 15s belichtet und im Tauchverfahren mit dem Entwickler ma-D 533 S 60s entwickelt. Dadurch entsteht auf dem Substrat eine Lackmaske mit der inversen Abbildung der gewünschten Strukturen. Mit einem Negativlack und speziellen Prozeßparametern ist es dabei möglich, die Flanken des Lackes leicht schräg auszuführen und dadurch leicht überhängende Kanten zu erzeugen. Dies erleichtert ein Abreißen der Metallisierung in einem späteren Prozeßschritt des Lift-Off-Verfahrens.



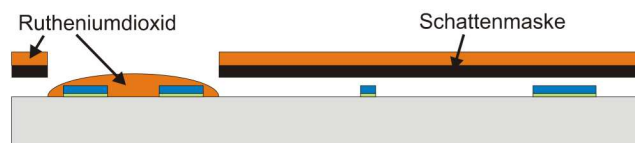
Danach wird die Metallisierung mit Hilfe von Sputterverfahren ganzflächig abgeschieden. Da das als Elektrodenmaterial gewünschte Platin schlecht auf der glatten Glasoberfläche haftet, wird dazu zuerst etwa 10nm Titan als Haftvermittler und anschließend auf das Titan eine ca. 300nm bis 500nm dicke Platinschicht aufgebracht. Die Sputterparameter sind dabei 1min bei 50W für die Titanschicht und 10min bei 50W für die Platinschicht.



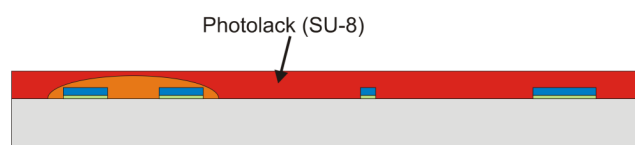
Nach dem Aufbringen der Metallisierung wird der Photolack mit Hilfe eines Acetonbads 1h abgelöst. Die auf dem Lack befindlichen Metallschichten werden dabei ebenfalls entfernt. Zurück bleibt die strukturierte Metallisierung, die die Sensorelektroden bildet. Anschließend wird das Substrat nochmals auf die oben beschriebene Weise gereinigt und 1h bei 160°C ausgeheizt.



Um die pH-Sensoren auf Metalloxidbasis herzustellen wird mit Hilfe einer Schattenmaske auf den dafür vorgesehenen Ringelektroden Rutheniumoxid mit einer Dicke von etwa 1,5µm aufgesputtert.



Um die Elektrodenstrukturen und ihre Kontaktleitungen zu isolieren wird ein Photolack vom Typ SU-8 ganzflächig mit Spin-On-Verfahren mit einer Dicke von etwa 2µm aufgebracht. Die Drehzahlen sind dabei vorgesehen zu 500 U/min für 5s und 2000 U/min für 30s. Nach dem Aufschleudern werden zwei Soft-Bake-Schritte bei 65°C und 95°C jeweils für 60s durchgeführt.



Dieser Lack wird ebenfalls mit Hilfe einer Chrom-Maske durch UV-Licht mit 95mJ/cm² bis 115mJ/cm² belichtet und nach einem Post-Exposure-Bake im Tauchverfahren 60s entwickelt. Die dadurch vom Lack entfernten Stellen bilden dann die Öffnungen in der Isolation und definieren die aktive Sensorfläche der entsprechenden Sensoren.

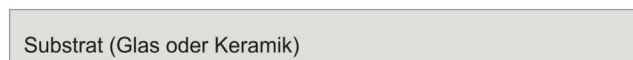


Anschließend werden die Einzelchips aus dem Substrat mit Hilfe einer Wafersäge gesägt. Damit ist die Chipherstellung abgeschlossen und die Einzelchips werden je nach Chiptyp anschließend in entsprechende Gehäuse verpackt. Dieser Schritt ist in Kapitel 8 näher dargestellt.

7.4.2 Prozeßfolge der bei Industriepartnern hergestellten Sensorchips

Teile der Chipherstellung, insbesondere die Herstellung der Sensorchips auf Keramiksubstrat wurde an Industriepartner vergeben. Diese haben erheblich weitgehendere Herstellungsmöglichkeiten, so daß sich die Herstellungsschritte etwas von den am Lehrstuhl unterscheiden. Die wesentlichen Unterschiede werden nachfolgend skizziert.

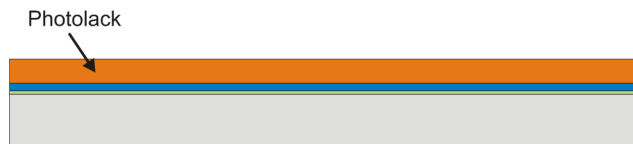
Als Ausgangsmaterial wird je nach Chiptyp ein 2 Zoll Glassubstrat Schott D263T oder ein 2 Zoll Keramiksubstrat aus Al_2O_3 -Keramik mit einer Dicke von jeweils $0,5mm$ verwendet.



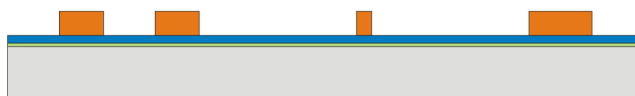
Nach der Reinigung wird mit Hilfe von Aufdampfprozessen ganzflächig zuerst eine dünne Titanschicht als Haftvermittler und anschließend eine Platinschicht mit einer Dicke von etwa $700nm$ aufgebracht.



Anschließend wird ein Photolack mit Spin-On-Verfahren aufgebracht.



Dieser Photolack wird mit Hilfe einer Chrom-Maske durch UV-Licht belichtet und im Tauchverfahren entwickelt.



Um die Metallschichten zu strukturieren wird hier ein auf Ozon basierendes chemisches Ätzverfahren verwendet.



Da der Photolack enorm stabil ist, um dem Ozon-Ätzverfahren standzuhalten, wird er anschließend mit Hilfe eines Strip-Verfahrens entfernt.



Die weitere Prozeßfolge ist weitgehend identisch mit der in Kapitel 7.4.1 dargestellten Prozeßfolge, wie sie am Lehrstuhl durchgeführt wird.

Kapitel 8

Chipgehäuse

8.1 Gehäuse und Verkapselung für Sensorchips auf Keramiksubstrat

Während der multiparametrische Sensorchips auf Glassubstrat ohne Gehäuse oder Verkapselung direkt in entsprechende Meßkammern eingelegt wird, muß der multiparametrische Sensorchip auf Keramiksubstrat verpackt werden, um in die Sockel der Meßsysteme eingelegt werden zu können. Hierfür wurde bei den Silizium-Sensorchips, die als Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, Trägersysteme im PLCC68-Format verwendet. Aus Kompatibilitätsgründen wurde dieses Format für die hier entworfenen und hergestellten Sensorchips übernommen.

8.1.1 Anforderungen

Für die Verkapselung kann zum Teil nicht auf die von der IC-Herstellung bekannten Standardverfahren zurückgegriffen werden, da auf den Sensorflächen lebendes biologische Material unter genau definierten Umgebungsbedingungen kultiviert werden. Dies führt zu Anforderungen an Material und Verkapselungsprozessen, die sich von den Standardanforderungen unterscheiden und zum Teil erheblich höher sind. An die Verkapselung sind dabei maßgeblich folgende Anforderungen zu stellen:

- Die Verkapselung muß hohen Ansprüchen hinsichtlich der elektrischen Isolierung gegenüber der Umwelt und den elektrischen Anschlüssen untereinander, sowie nach außen genügen. Dies spielt insofern eine besondere Rolle, da die Sensorchips in klimatisierten Inkubatoren kultiviert werden, die in der Regel kulturbedingt eine hohe Luftfeuchtigkeit besitzen.
- Da das Gehäusematerial in direkten Kontakt mit Zellkulturflüssigkeiten und Meßlösungen kommt, ist es von großer Bedeutung, daß sich keine Stoffe aus dem Material lösen. Selbst wenn diese nicht toxisch wirken, würde dennoch die Gefahr bestehen, daß diese die Untersuchungen und ihre Ergebnisse beeinflussen.
- Ebenfalls zu vermeiden sind Gehäusematerialien, die chemische Reaktionen mit Substanzen aus dem Zellkulturmedium oder Meßlösungen zeigen. Dies könnte die Medien und Meßlösungen verändern und somit die Untersuchungen und Ergebnisse beeinflussen.
- Ähnliche Anforderungen sind an Verbindungsmaterialien, Füllmaterialien oder Klebstoffe zu stellen. Es dürfen sich keine Stoffe auslösen, die das Zellkulturmedium beeinflussen. Dies ist hier von besonderer Bedeutung, da der überwiegende Teil dieser Materialien Lösungsmittel enthält, die in der Regel toxisch wirken.
- Es muß eine sehr gute Haftung zwischen Gehäuse und Chip gewährleistet sein, um ein Eindringen von Zellkulturmedium oder Meßlösung durch die Verbindungsstelle zu verhindern.

- Alle Prozeßschritte insbesondere das Aushärten des Verkapselungsklebers dürfen eine Temperatur von 180°C nicht überschreiten, da sonst die Isolationsschicht des Sensorchips aus SU-8 beschädigt werden könnte. Sind hohe Prozeßtemperaturen notwendig muß sichergestellt sein, daß das Aufheizen und Abkühlen nicht sprunghaft sondern mit Temeperaturrampe durchgeführt wird.
- Um ein zu hohes Temperaturdifferential des verkapselten Chips zu vermeiden, sollten alle verwendeten Materialien gut wärmeleitend sein.

8.1.2 Aufbau

Der verkapselte Chip besteht prinzipiell aus drei Teilen. Der Sensorchip selbst mit einer Abmessung von $8,1\text{mm} \times 8,1\text{mm} \times 0,5\text{mm}$, einer Trägerplatine mit elektrischen Kontakten die kompatibel zu einem Sockel im PLCC68-Format sind und einem Gehäuse, das die Bondverbindungen zwischen Sensorchip und Trägerplatine schützt und auf der Sensorfläche einen Zellkulturtopf bildet, in dem die biologischen Proben kultiviert werden und das Meßmedium zugefügt wird. Abbildung 8.1 zeigt den schematischen Aufbau des verkapselten Sensorchips.

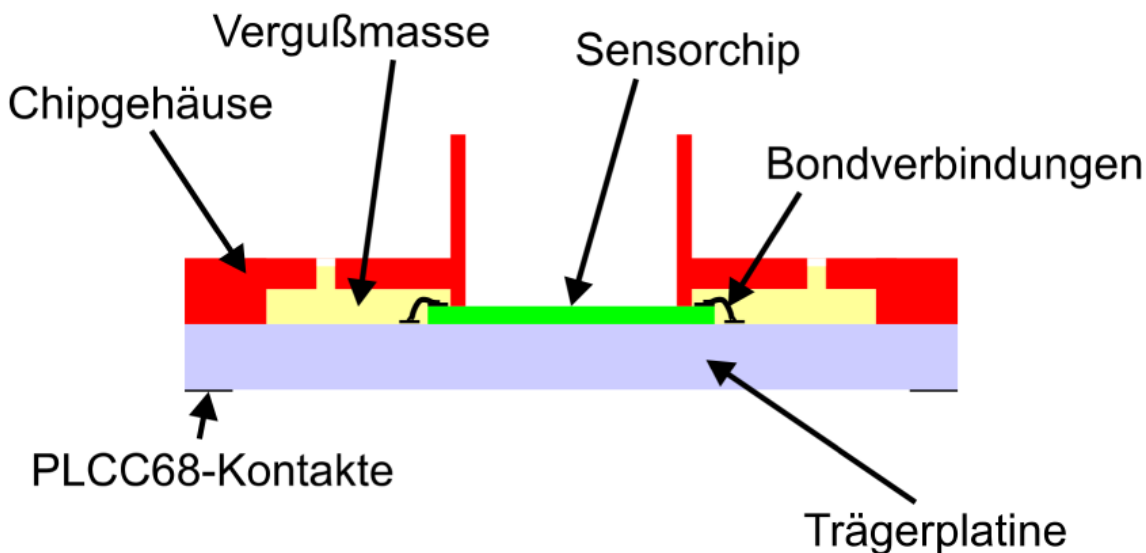


Abbildung 8.1: Schematischer Aufbau des verkapselten Sensorchips

8.1.3 Trägerplatine

Nach der Herstellung des Sensorchips wird er in einem ersten Schritt der Verkapselung zentriert auf einer Trägerplatine aufgeklebt. Da die Rückseite und die Schnittstellen zwischen Sensor und Trägerplatine nicht mit biologischen Material und dem Zellkulturmedium in Kontakt kommen ist hier die Anforderung nach Biokompatibilität des Klebers nicht vorhanden. Aus diesem Grund kommt hier ein Sekundenkleber vom Typ UHU 45565 zum Einsatz. Die Trägerplatine hat die Maße des PLCC68-Format mit $24\text{mm} \times 24\text{mm}$. An der linken oberen Ecke ist eine Phase mit $1,5\text{mm}$ ausgeführt. Die Trägerplatine selbst ist aus dem Platinenmaterial FR4 mit einer Dicke von 1mm und ihre Leitungen sind aus $35\mu\text{m}$ Kupferauflage deren Oberfläche chemisch mit Nickel/Gold beschichtet ist. Sie ist mit

einem Standard-Lötstopplack isoliert. Die Platine besitzt auf der Oberseite in der Mitte eine rechteckige Fläche der Größe $8,1\text{ mm} \times 8,1\text{ mm}$ auf die der Sensorchip geklebt wird. An allen vier Seiten dieser Fläche sind entsprechend der Bondpunkte des Sensorchips Bondpads lokalisiert. Die elektrische Verbindung wird mit Hilfe von Standard-Drahtbond-Verfahren hergestellt. Die Anschlußleitungen sind mit Hilfe von so genannten Burried Vias auf die Rückseite kontaktiert, die dort in Kontaktpads im PLCC68-Format enden. Diese Burried Vias sind für die Verkapselung von entscheidender Bedeutung, da sie im Gegensatz zu normalen Vias mit Lötstopplack aufgefüllt sind und somit die Vergußmasse beim Einfüllen nicht an der Unterseite austreten kann. Auf der Rückseite ist ganzflächig eine Massefläche integriert, die auf die Masse der Meßelektronik gelegt, elektrische Störungen abschirmen soll. Abbildungen 8.2 und 8.3 zeigen das Layout der Trägerplatine, eine Trägerplatine mit aufgeklebten und gebondeten Sensorchip und ein Exemplar der hergestellten Nutzen.

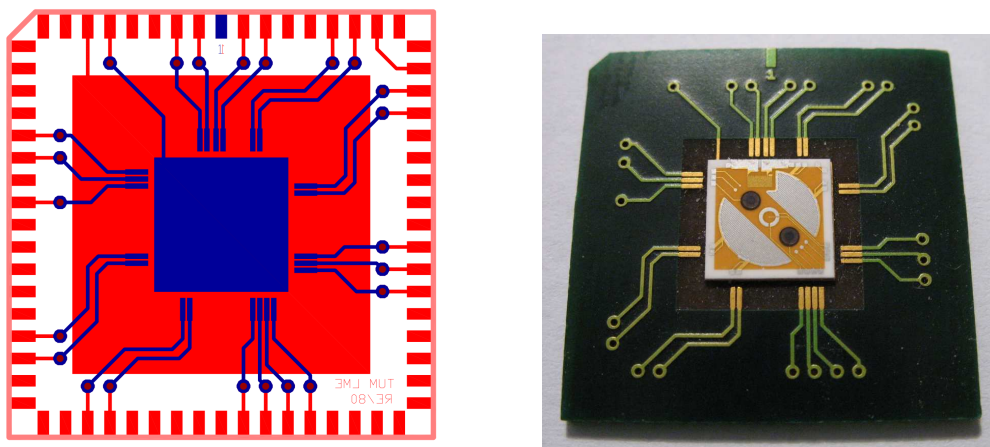


Abbildung 8.2: Links: Layout der elektrischen Anschlußleitungen und Bondpads der Trägerplatine im PLCC68-Format; Rechts: Exemplar einer Trägerplatine mit aufgeklebten Sensorchip

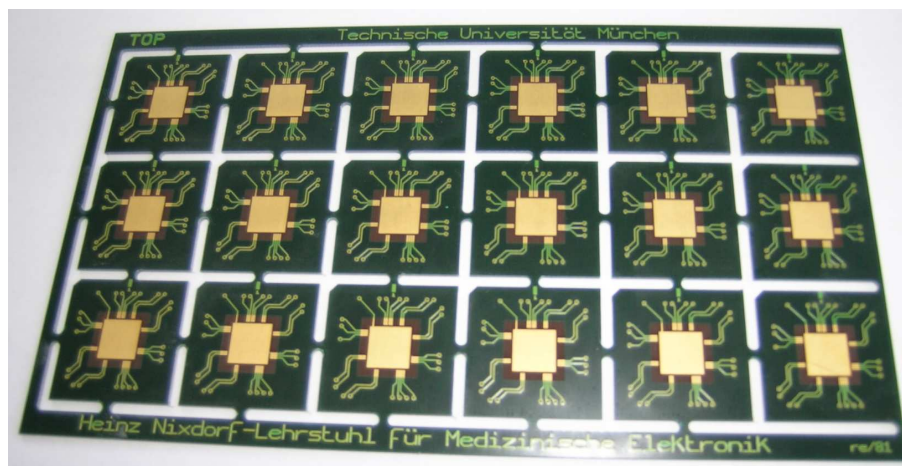


Abbildung 8.3: Exemplar eines hergestellten Nutzens mit 12 Trägerplatten

8.1.4 Zellkulturaufsatz

Auf die präparierten Trägerplatinen wird ein Zellkulturaufsatz aufgesetzt und die Hohlräume mit einer klebenden Vergußmasse ausgespritzt. Der Zellkulturaufsatz ist für die Prototypen und Kleinserien, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden aus dem biokompatiblen Kunststoff PEEK gefertigt. Für größere Serien oder Massenproduktion bietet es sich aber aus Kostengründen an, diesen Aufsatz als Spritzgußteil aus Polycarbonat oder ähnlichen Materialien herzustellen. Dieses Gehäuse schützt und isoliert die Bondverbindungen und bildet einen runden Zellkulturtopf mit 7mm Durchmesser direkt an der Sensoroberfläche für die biologischen Proben und 15mm Durchmesser oberhalb der Sensorfläche für das Zellkulturmedium. Um das biologische Material kontinuierlich während einer Messung mit frischem Medium zu versorgen kann in diesen Zellkulturtopf ein Fluidikinsert eingesteckt werden, auf das an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird. Abbildung 8.4 zeigt den Querschnitt des Zellkulturaufsatzes.

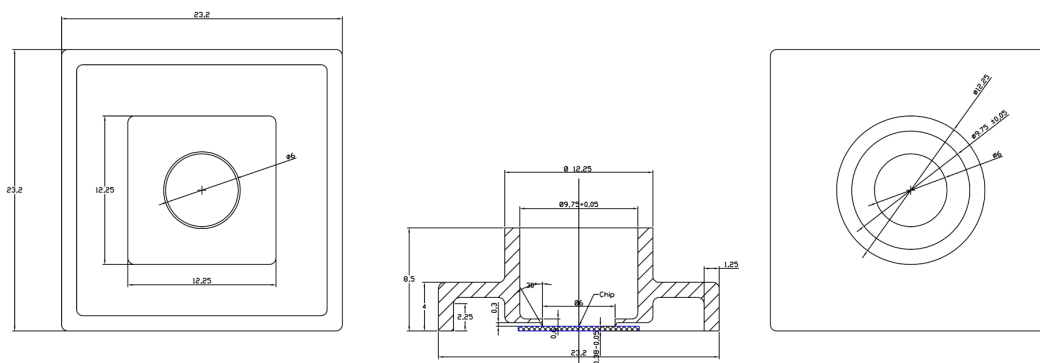


Abbildung 8.4: Ausführung des verwendeten Zellkulturaufsatzes

Für die Auswahl der Vergußmasse wurden umfangreiche Versuche durchgeführt um sicherzustellen, daß das Material biokompatibel ist. Hier kam ein, aus der Halbleiterproduktion bekanntes Material 50300HT für GlobTop-Abdeckungen zum Einsatz. Dieses wird nach dem Einspritzen bei einer Temperatur von 130°C ca. 30min. ausgehärtet. Beim Verguß wird durch ein entsprechendes Werkzeug der Zellkulturaufsatz auf die Oberfläche des Sensorchips gepreßt um zu verhindern, daß die Vergußmasse durch die Schnittstelle von Sensorchip und Aufsatz austritt und somit die Sensorchipoberfläche verunreinigt. Abbildung 8.5 zeigt den fertig aufgebauten Chip für multiparametrische Messungen an lebenden Zellen und Geweben.

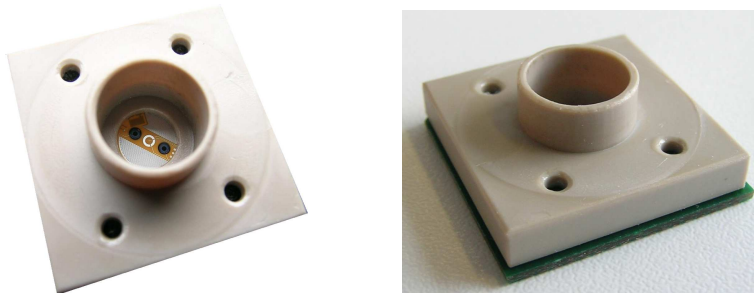


Abbildung 8.5: Exemplar eines fertig aufgebauten Chips

8.2 Gehäuse für Neurochips

Für den in Kapitel 7.2.1 beschriebenen Neurochip wurde im Rahmen der Arbeit ebenfalls eine Kammer entwickelt, die die Möglichkeit bietet, daß die Sensorfläche vollständig mikroskopierbar ist und an dieser Stelle nur kurz beschrieben werden soll. Für diesen Aufbau gelten prinzipiell dieselben Anforderungen wie sie in Kapitel 8.1.1 ausgeführt sind. Die Kammer besteht aus zwei Teilen, zwischen denen der Neurochip mechanisch eingespannt wird. Der untere Teil besteht aus einer 4 mm starke Aluminiumplatte, in die mittig der Glaschip eingesetzt wird. Hierbei wurde vor allem auf eine flache Bauweise in der Mitte der Platte geachtet, damit der Chip so tief wie möglich zu liegen kommt. Dies ist notwendig, um eine sichere Fokussierbarkeit bei der Betrachtung unter dem Mikroskop zu gewährleisten. Die Unterseite des Glaschips kommt dabei 0,6mm über der Höhe Null zu liegen. Abbildung 8.6 zeigt ein Exemplar dieser Bodenplatte.

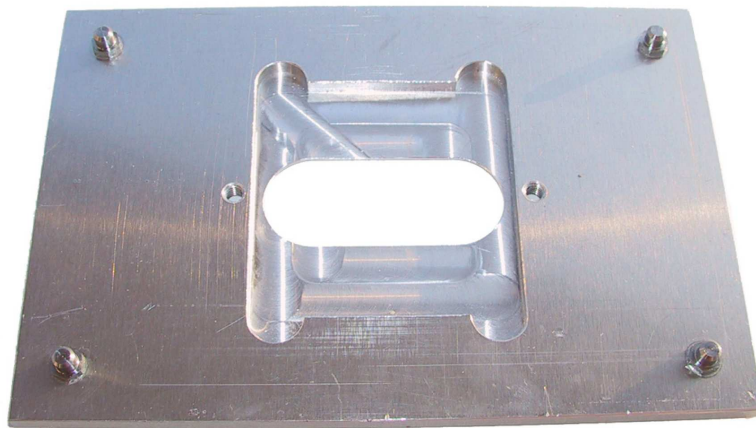


Abbildung 8.6: Exemplar der Bodenplatte der Kammer für Neurochips

Das Oberteil läßt sich über zwei Verschraubungen auf die Bodenplatte stecken, wobei der Neurochip dazwischen eingespannt wird. In das Oberteil ist eine runde Aussparung ausgefräst, die einen Zellkulturtopf mit einem Durchmesser von 4cm bildet. Diese wird mit Hilfe eines Dichtungsringes abgedichtet. Das Oberteil besteht komplett aus dem biokompatiblen Kunststoff PEEK. Die Kontaktierung an den Neurochip wird über 72 vergoldete Federkontaktstifte realisiert. Abbildung 8.7 zeigt die Unterseite des Oberteils mit den Federkontaktstifeten.

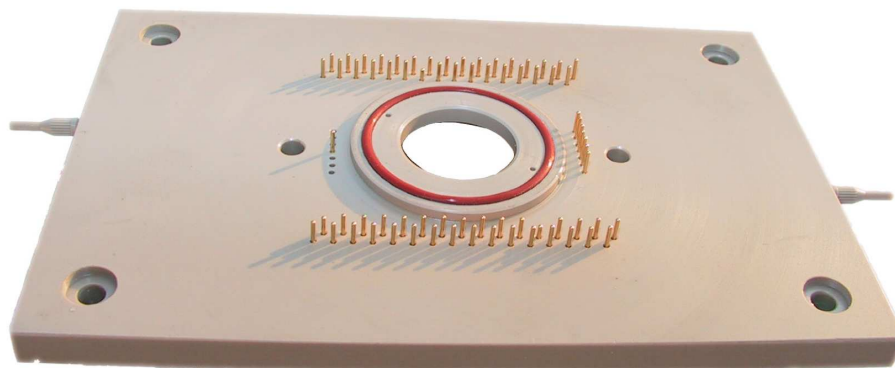


Abbildung 8.7: Exemplar des Oberteils der Kammer für Neurochips (Unterseite)

Für die Versorgung der Zellen mit Zellkulturmedium sind in das Oberteil zwei Fluidikkanäle integriert, die den Zu- und Abfluß eines Mediums ermöglichen. Die Besonderheit an dieser Kammer ist die komplette Integration der Meßelektronik für die metabolischen Sensoren. Diese ist auf einer Platine, die direkt auf die Oberseite des Oberteils befestigt ist. Abbildung 8.8 zeigt die gesamte Kammer für Neurochips um simultane Messungen von elektrophysiologischen und metabolischen Parametern von elektrisch aktiven Zellen durchzuführen.

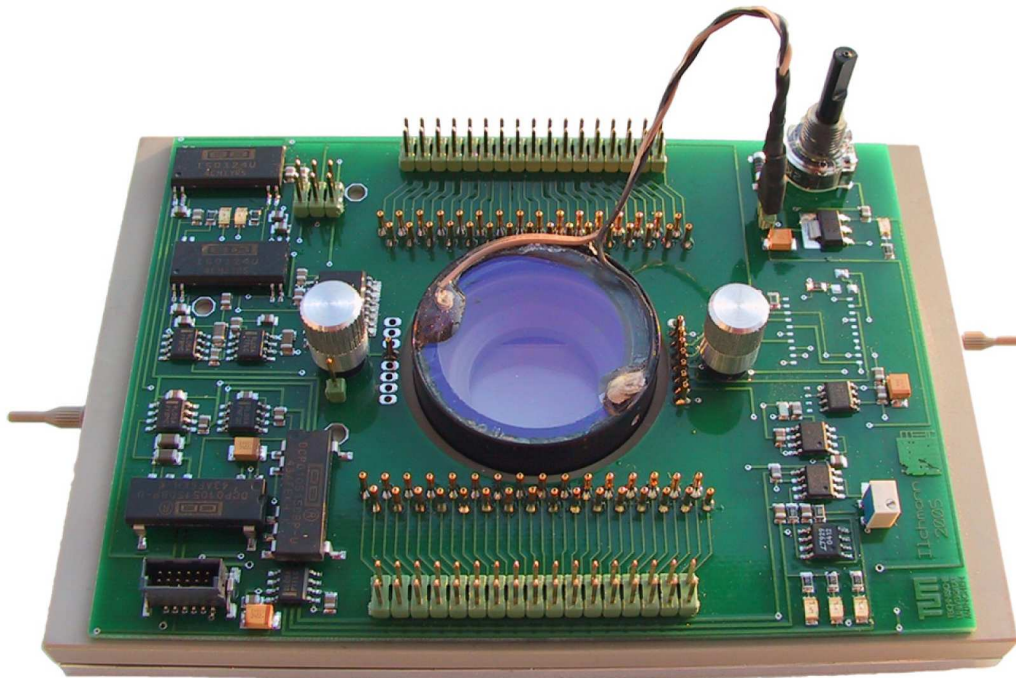


Abbildung 8.8: Exemplar der Kammer für Neurochips um simultane Messungen von elektrophysiologischen und metabolischen Parametern von elektrisch aktiven Zellen durchzuführen

Kapitel 9

Anwendungen

Die in Kapitel 7 dargestellten multiparametrischen Sensorchips, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entworfen und hergestellt wurden, wurden bereits in vielen Anwendungsgebieten eingesetzt und für weiterführende Forschungsvorhaben verwendet. Nachfolgend sind die Meßsysteme, in denen die Sensorchips betrieben werden dargestellt und einige Ergebnisse von Versuchen ausgeführt, die unter Anwendung dieser Sensorchips mit den jeweiligen Meßsystemen durchgeführt wurden. Teile der Versuche wurden dabei nicht vom Autor dieser Arbeit durchgeführt. Aus diesem Grund sei an dieser Stelle meinen Kolleginnen und Kollegen Brückl, Wiest, Lob und Meyer aus unserer Arbeitsgruppe für die freundliche zur Verfügungstellung ihrer Ergebnisse gedankt.

9.1 Meßsysteme für die entworfenen Sensorchips

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entworfenen und hergestellten Sensorchips sind für den Einsatz in bestehenden, sowie im Zuge der Sensoroptimierung weiterentwickelten Meßsystemen und Meßaufbauten vorgesehen. Nachfolgend sollen diese Systeme kurz vorgestellt und ein Überblick über ihre Funktionsweise gegeben werden. Der schematische Aufbau dieser Zellchip-Systeme, dargestellt in Abbildung 9.1, ist dabei prinzipiell identisch.

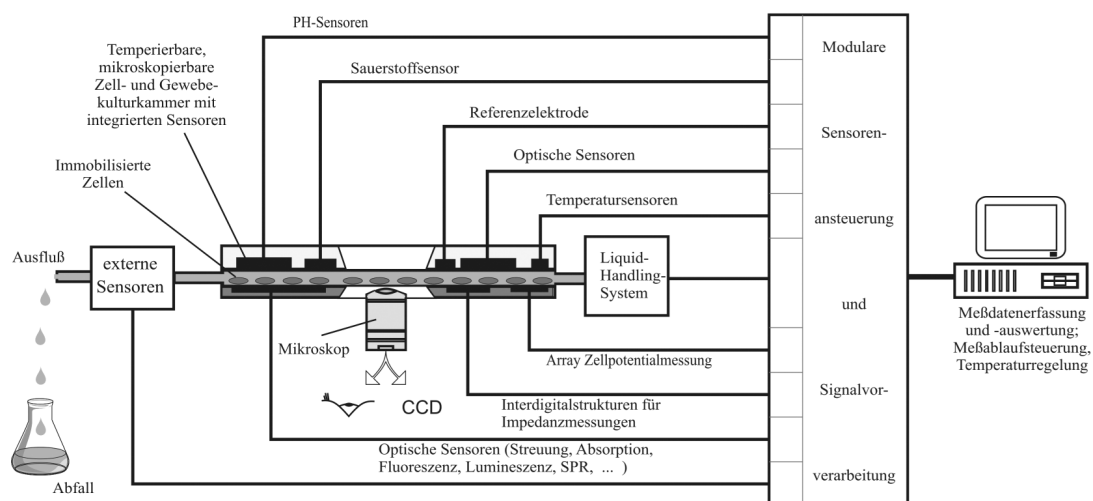


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung eines Meßsystems für multiparametrische Messungen an lebenden Zellen und Geweben mit Mikrofluidik und optionaler lichtmikroskopischer Beobachtung, nach [136, 137]

Da es sich beim Meßobjekt um lebende Zellen oder lebendes Gewebe handelt, ist es notwendig, die zu untersuchenden Proben mit Kulturmedium zu versorgen. Hierfür wird in den Meßsystemen mit Hilfe einer geeigneten Mikrofluidik das Kulturmedium über die Chipoberfläche mit der biologischen Probe gepumpt. Für die Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs und der extrazellulären Ansäuerungsleistung der Zellen und Geweben wird dabei ein Stop-und-Go-Verfahren verwendet, bei der die Pumpe zyklisch frisches Kulturmedium auf den Sensorchip pumpt. Für eine Messung wird die Pumpe gestoppt, so daß sich ein definiertes Medienvolumen auf dem Sensorchip und der biologischen Probe ergibt, das die Zellen durch Sauerstoffverbrauch und Ansäuerung verändern können. Diese Veränderung wird während eines Meßzyklus meßtechnisch erfaßt.

Zusätzlich zur Meßhardware und zur Mikrofluidik stellen die meisten verwendeten Meßaufbauten auch kontrollierte Umweltbedingungen hinsichtlich Temperatur und Luftfeuchtigkeit zur Verfügung oder bieten die Möglichkeit die Messung unter bestimmten Atmosphären, wie z.B. CO_2 -Umgebung, durchzuführen.

9.1.1 Meßplatz für den multiparametrischen Sensorchip auf Glassubstrat

Für den Einsatz des multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat wird ein Meßgerät im 19"-Format verwendet. Das Gerät ermöglicht parallele Temperatur-, Impedanz-, Sauerstoff- und pH-Messungen auf zwei Glaschips. Darüber hinaus ist eine Elektronik für externe Sauerstoff-, pH-, Lactat- und Glucoseelektroden integriert. Diese ermöglichen durch entsprechend eingesetzte Elektroden die Untersuchung von Abbauprodukten im verbrauchten Zellkulturmedium. Ebenfalls integriert ist eine Steuerung für je zwei Pumpen und Ventile. Dabei können Schaltzeiten und Pumpenzyklen frei programmiert werden. Somit bietet dieser Meßstand die Möglichkeit, zellbasierte Tests mit Hilfe multiparametrischer Sensorchips im vollen Umfang durchzuführen.

Die Sensorchips auf Glassubstrat selbst können je nach Anwendung in verschiedene Kammern eingelegt werden, die, auf den Mikroskopisch eines Lichtmikroskops plaziert, eine zusätzliche optische Kontrolle der Proben ermöglichen. Um eine Versorgung mit Kulturmedien zu ermöglichen werden in die Kammern geeignete Fluidikinlets eingesetzt, die je einen Zu- und Ablauf enthalten. Abbildungen 9.2 bis 9.4 zeigen den Meßstand und verschiedene Kammern für den multiparametrischen Sensorchip auf Glassubstrat.

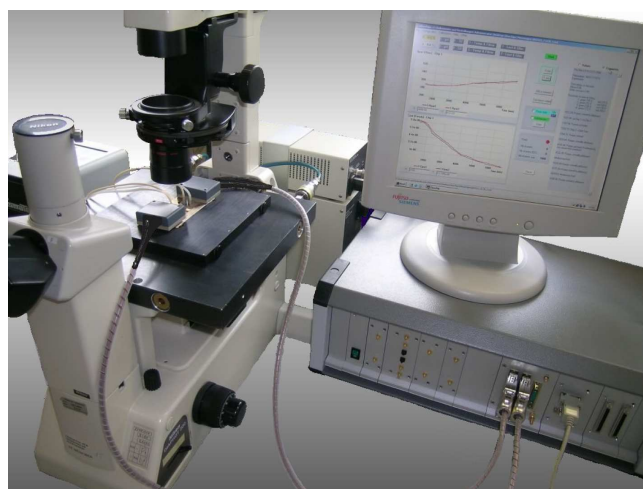


Abbildung 9.2: Meßsystem für multiparametrische Sensorchips auf Glassubstrat. Die Kammer mit zwei Sensorchips ist für zusätzliche optische Kontrolle auf den X-Y-Tisch eines Lichtmikroskops montiert

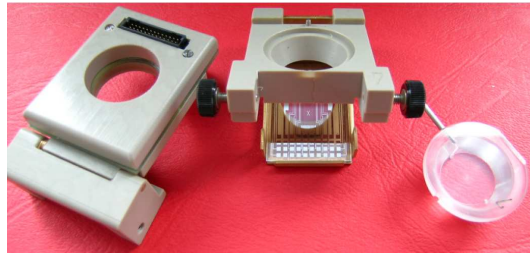


Abbildung 9.3: Einzelkammer für einen multiparametrischen Sensorchip auf Glassubstrat

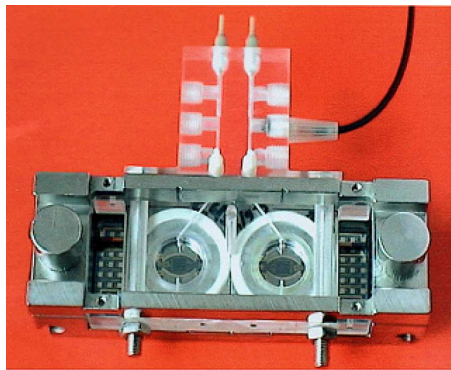


Abbildung 9.4: Doppelkammer für den Einsatz von zwei multiparametrischen Sensorchips auf Glas-substrat

9.1.2 Meßplatz für den multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat

Für Anwendungen, bei denen eine optische Kontrolle der Probe nicht notwendig ist, kann auf den multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat zurückgegriffen werden. Dieser wird in einem Meßsystem verwendet, das die Meßhardware und die Mikrofluidik integriert. Dieses Meßsystem ist mobil einsetzbar und seine Abmessungen ermöglicht es, es direkt in einem Inkubator zu betreiben [250]. Abbildung 9.5 zeigt den Aufbau des Meßsystems für multiparametrische Sensorchips auf Keramiksubstrat.



Abbildung 9.5: Mobiles Meßsystem zum Betrieb des multiparametrischen Sensorchips auf Keramik-substrat [250]

9.1.3 Meßsystem für Multiwellplatten-Systeme

Um Messungen mit Hilfe der Multiwellplatten-Systeme durchzuführen ist es notwendig, Kulturmedien von oben in die einzelnen Wells der Platte zuzugeben. Dies wird nicht wie bei den anderen Meßsystemen und Aufbauten mit Hilfe einer Mikrofluidik durchgeführt, sondern durch einen geeigneten Pipettier-Roboter. Um die entsprechenden Umweltbedingungen für die Messung herzustellen, sind sowohl der Pipettier-Roboter als auch die Multiwellplatte in einer Klimakammer integriert [251]. Abbildung 9.6 zeigt den Aufbau dieses Meßsystems. Um eine zusätzliche optische Kontrolle der Proben zu ermöglichen, ist dieses Meßsystem mit einem automatisierten Mikroskop der Firma Till Photonics GmbH ausgestattet. Dieses befindet sich direkt unterhalb der sensorgestützten Multiwellplatte. Die Aufnahme für die Platte im Meßsystem ist in Abbildung 9.7 dargestellt.



Abbildung 9.6: Meßsystem zum Betrieb von sensorgestützten Multiwellplatten mit Beprobungsroboter und Klimakammer [251]

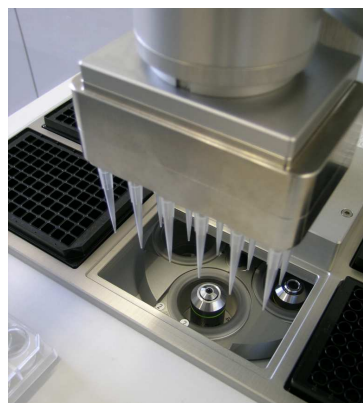


Abbildung 9.7: Aufnahme für die sensorgestützte Multiwellplatte direkt oberhalb der Optik des automatisierten Mikroskops [251]

9.1.4 Meßplatz für den Neurochip

Der in Kapitel 7.2.1 vorgestellte Neurochip und sein in Kapitel 8.2 dargestelltes Gehäuse mit integrierter Meßelektronik und Mikrofluidik hat im Betrieb besondere Anforderungen an Störungsfreiheit durch äußere elektromagnetische Einflüsse. Aus diesem Grund wird der Neurochip in einem gesondert abgeschirmten Meßaufbau betrieben. Abbildung 9.8 zeigt diesen Aufbau. Die Meßkammer mit dem Neurochip liegt dabei auf einem Lichtmikroskop und bietet dadurch ebenfalls die Möglichkeit zur optischen Kontrolle der Nervenzellkultur.

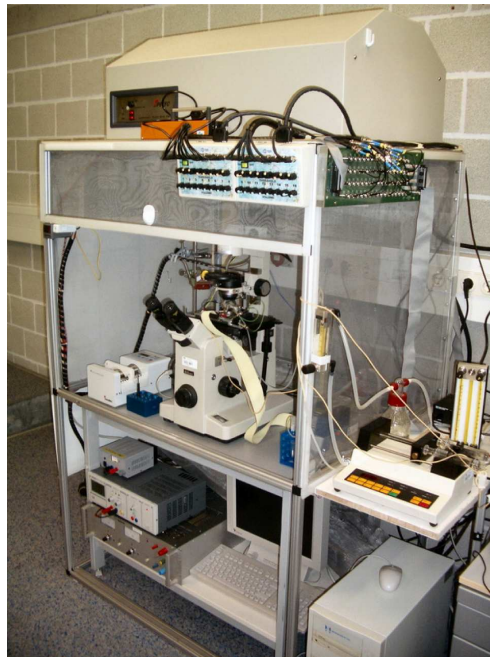


Abbildung 9.8: Meßaufbau zum Betrieb der Sensorchips für elektrische und metabolische Parameter von Nervenzellkulturen

9.2 Messungen mit dem multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat

9.2.1 Versuch mit MCF-7 Zellen

In diesem Versuch sind Zellen einer MCF-7 Zelllinie auf einem multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat kultiviert worden. Die Zellanzahl für diesen Versuch betrug $4 \cdot 10^4$ in einem Volumen von $300\mu\text{l}$. Die Inkubationszeit betrug 2 Tage. Als Kulturmedium wurde DME mit Bicarbonat und 5% FCS (fötale Kälberserum) verwendet. Zu Beginn der Messung wurde $50\mu\text{g/ml}$ Gentamycin zum Meßmedium hinzugegeben. Im weiteren Verlauf sah das Meßprotokoll die Zugabe von 0,2% Triton X-100, 1% Triton X-100 und $2\mu\text{M}$ Cytochalasin B vor. Die gesamte Meßdauer betrug etwa 50 Stunden, wobei zur Versorgung der Zellen für den Pumpzyklus die Pumpe 7min. gestoppt und 3min. gestartet wurde. Die Messungen wurden während der Stop-Zeiten der Pumpe durchgeführt. Der gesamte Versuchsaufbau befand sich in einem Inkubator bei 37°C bei normaler Luftfeuchtigkeit. Ziel des Versuches war die Beobachtung der Reaktionen des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsleistung der Zellen auf die Zugabe der oben genannten Substanzen. Abbildung 9.9 zeigt die mit Zellen bewachsene Sensoroberfläche. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Sauerstoffpartialdruck-, pH-Wert- und Temperaturmessung dargestellt.

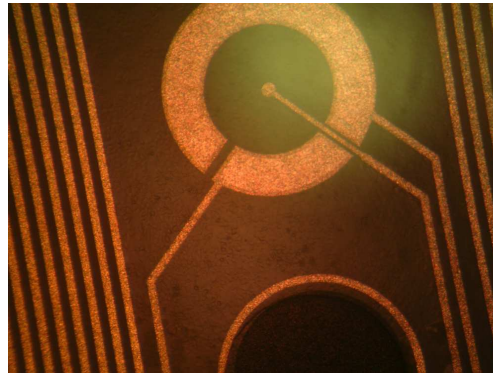


Abbildung 9.9: MCF-7 Zellen auf der Sensoroberfläche eines Chips auf Keramiksubstrat

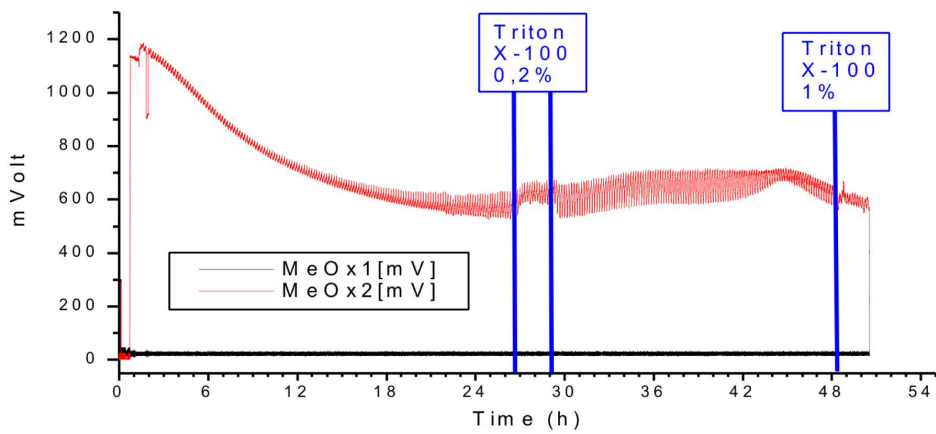


Abbildung 9.10: Entwicklung des pH-Werts über dem gesamten Meßverlauf

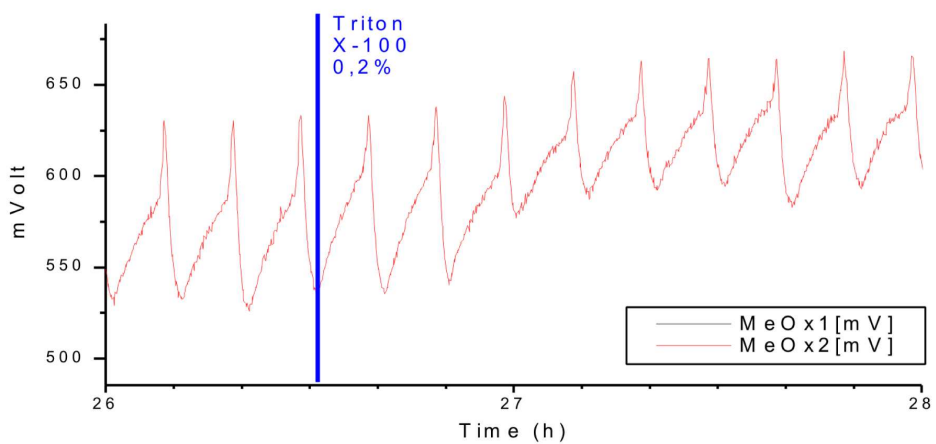


Abbildung 9.11: Ausschnittsvergrößerung des pH-Wertes zwischen 26h und 28h

9.2. MESSUNGEN MIT DEM MULTIPARAMETRISCHEN SENSORCHIP AUF KERAMIKSUBSTRAT17

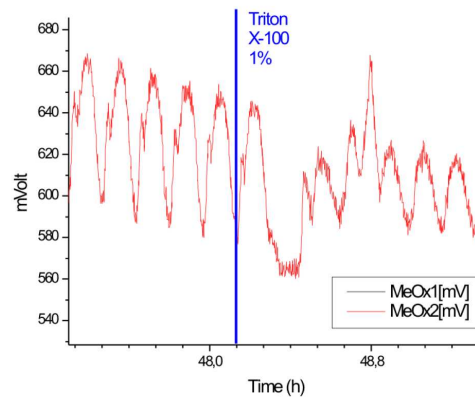


Abbildung 9.12: Reaktion der Ansauerungsleistung auf die Zugabe von 1% Triton X-100

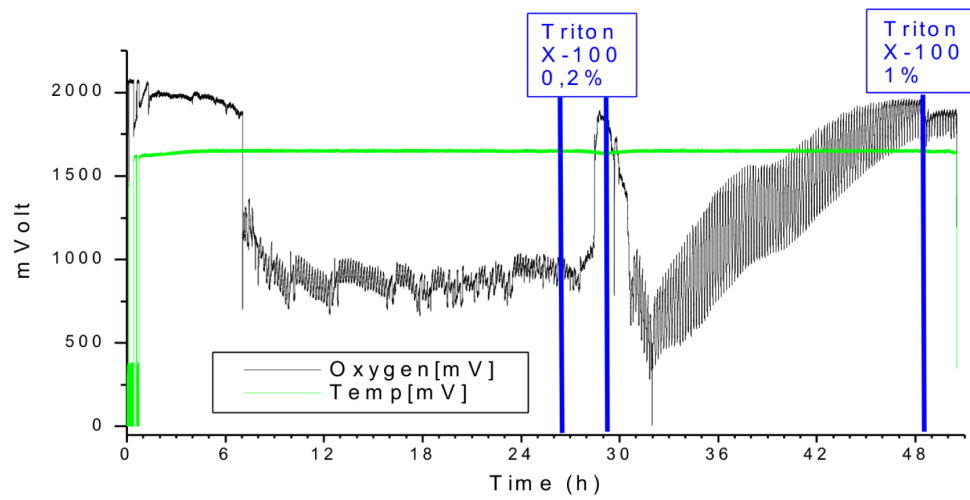


Abbildung 9.13: Entwicklung des Sauerstoffpartialdruckes und der Temperatur über dem gesamten Meßverlauf

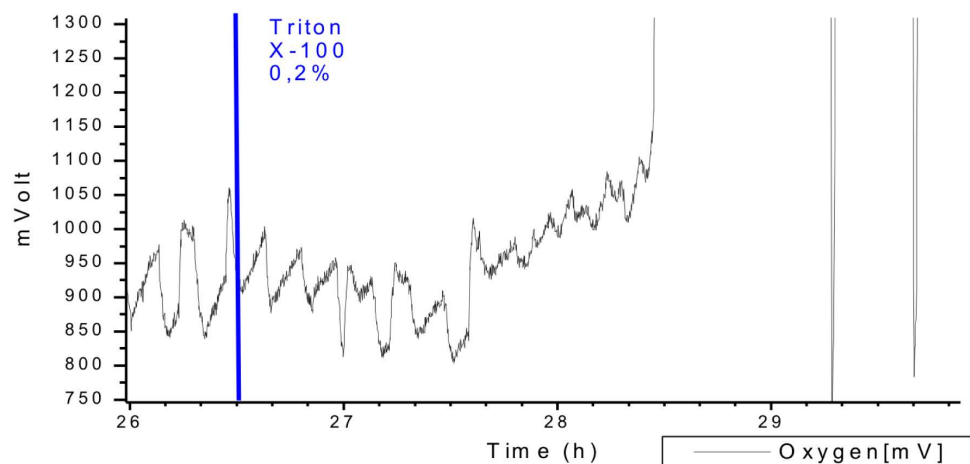


Abbildung 9.14: Reaktion des Sauerstoffverbrauches auf die Zugabe von 0,2% Triton X-100

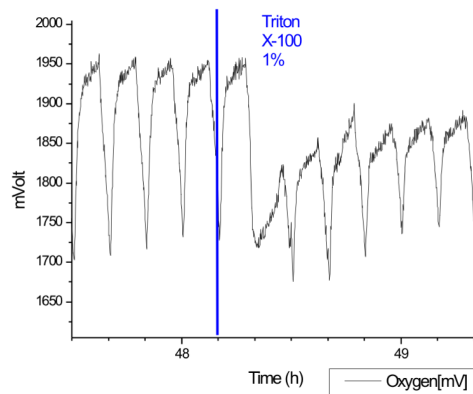


Abbildung 9.15: Reaktion des Sauerstoffverbrauchs auf die Zugabe von 1% Triton X-100

9.2.2 Versuch mit Primärtumorzellen

In diesem Versuch sind Primärtumorzellen eines Kehlkopfkarcinoms auf einem multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat kultiviert worden. Die anfängliche Zellanzahl für diesen Versuch betrug $6 \cdot 10^4$. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Als Kulturmedium wurde DMEM mit $50 \mu\text{g}$ pro ml Gentamycin und 5% FCS verwendet. Die gesamte Meßdauer betrug etwa 5 Stunden, wobei zur Versorgung der Zellen für den Pumpzyklus die Pumpe 7min. gestoppt und 3min. gestartet wurde. Die Messungen wurden während der Stop-Zeiten der Pumpe durchgeführt. Der gesamte Versuchsaufbau befand sich in einem Inkubator bei 37°C bei normaler Luftfeuchtigkeit. Beim Versuch wurde nur die extrazelluläre Ansäuerung der Zellen mit Hilfe des pH-Wertes beobachtet. Abbildung 9.16 zeigt den Ausschnitt der extrazellulären Ansäuerung von Meßzeit 3h bis 4h.

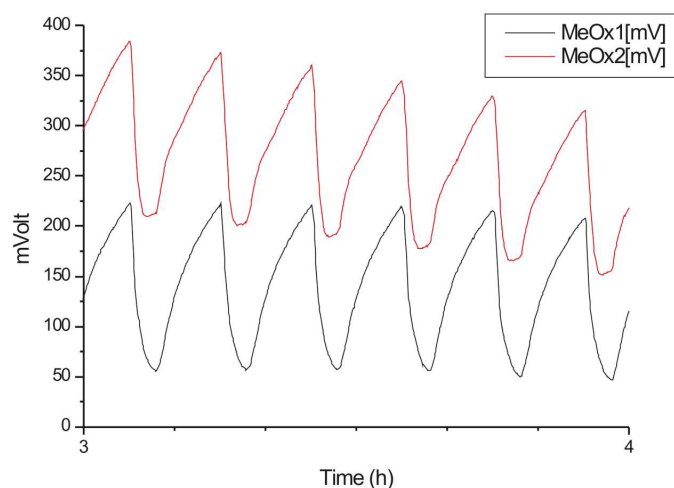


Abbildung 9.16: Ansäuerungsleistung einer Primärtumorzellkultur

9.3 Messungen mit dem multiparametrischen Neurochip auf Glassubstrat

In diesem Versuch sind Nervenzellen auf einem Neurochip auf Glassubstrat inkubiert. Die Zellen stammen aus dem frontalen Mäuseembryonenkortex. Die Inkubationszeit betrug etwa 5 Wochen. Abbildung 9.17 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der Nervenzellkultur, die direkt auf dem Array von Ableitelektroden wächst.

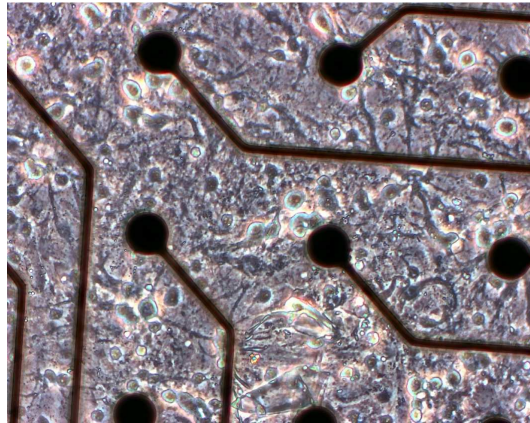


Abbildung 9.17: Nervenzellen aus dem frontalen Mäuseembryonenkortex auf dem Neurochip nach einer Inkubationszeit von 5 Wochen

Abbildung 9.18 zeigt ein Livebild der Aktionspotentiale die mit einer Ableitelektrode des Neurochips aufgenommen werden, dargestellt mit einer Software der Firma Plexon.

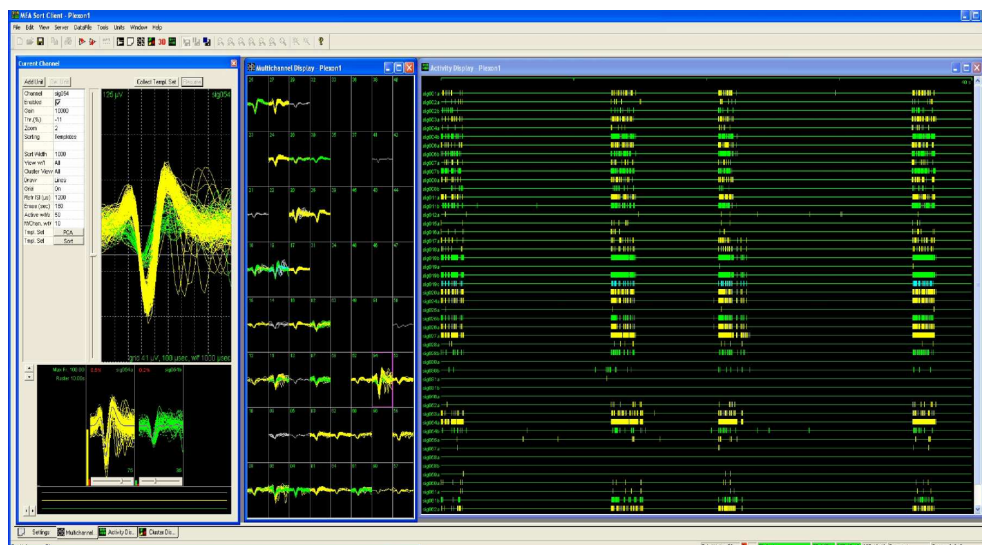


Abbildung 9.18: Livebild aus einer Software der Firma Plexon der Aktionspotentiale der Nervenzellkultur, die mit einer Ableitelektrode des Neurochips aufgenommen werden

In Abbildung 9.19 ist die mittlere Aktivität der Nervenzellkultur (Aktionspotentiale pro Zeiteinheit) für alle 64 Ableitelektroden dargestellt. Der Mittelungszeitraum betrug hier 4 Minuten. Insgesamt sind etwa 200 Minuten Aktivität aufgezeichnet. Unten rechts dargestellt ist der so genannte "population vector", der den Durchschnitt aller Kanäle zeigt.

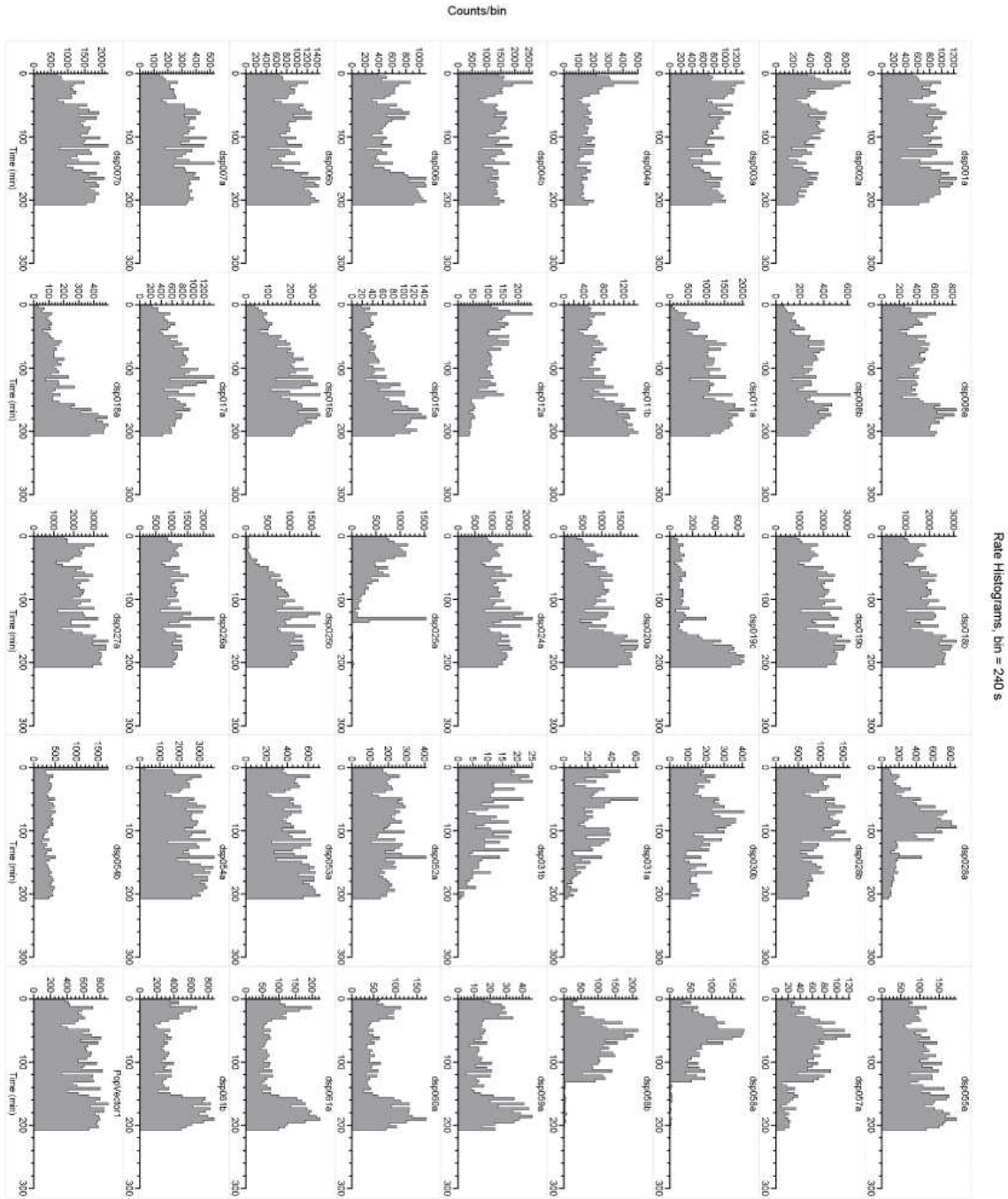


Abbildung 9.19: Mittlere Aktivität der Nervenzellkultur an allen 64 Ableitelektroden für einen Meßzeitraum von etwa 200 Minuten

9.4 Impedanzmessungen mit Multiwellplatten-Systemen

Dieser Versuch wurde mit der in Kapitel 7.1.4 vorgestellten 24-Well-Platte durchgeführt. Ziel des Versuches waren Reaktionen der Zelladhäsion auf Zugabe von Wirkstoffen mit Hilfe von Impedanzmessungen an MCF-7 Zellen. Verwendet wurden Zellen aus einer MCF-7-Zelllinie mit einer Animpfkonzentration pro Well von $1,1 \cdot 10^5$ Zellen in $300\mu\text{l}$ Mediumvolumen. Es wurden insgesamt 4 von den 24 zur Verfügung stehenden Wells angeimpft. Während des Versuches wurde zwischen zwei Meßmedien gewechselt. Meßmedium 1 wurde mit $47,5\text{ml}$ DME, $250\mu\text{l}$ Gentamycin (10mg/ml) und $2,5\text{ml}$ FCS (5%) angesetzt. Meßmedium 2 entspricht dem Meßmedium 1 mit zusätzlich 0,2% Triton X-100. Der Versuch wurde im Inkubator bei 37°C durchgeführt. Ein Meßintervall dauerte 15 Sekunden, die gesamte Meßzeit etwa 5 Stunden. Abbildung 9.20 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen auf der Sensoroberfläche.

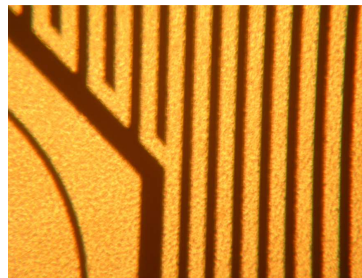


Abbildung 9.20: MCF-7 Zellen auf der Sensoroberfläche einer 24-Well-Platte mit Impedanzsensoren

In Abbildung 9.21 ist das Ergebnis der 4 Wells nach Widerstand und Kapazität bezogen auf das, in Kapitel 6.1 betrachtete, parallele Ersatzschaltbild dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die Signaländerung bei einer Meßzeit von etwa 4,25 Stunden, bei der die Zellen durch Zugabe des Meßmediums 2 zum Absterben gebracht wurden. Durch das Triton X-100 werden die Zellwände beschädigt und die Zelle verliert die Haftung auf dem Substrat.

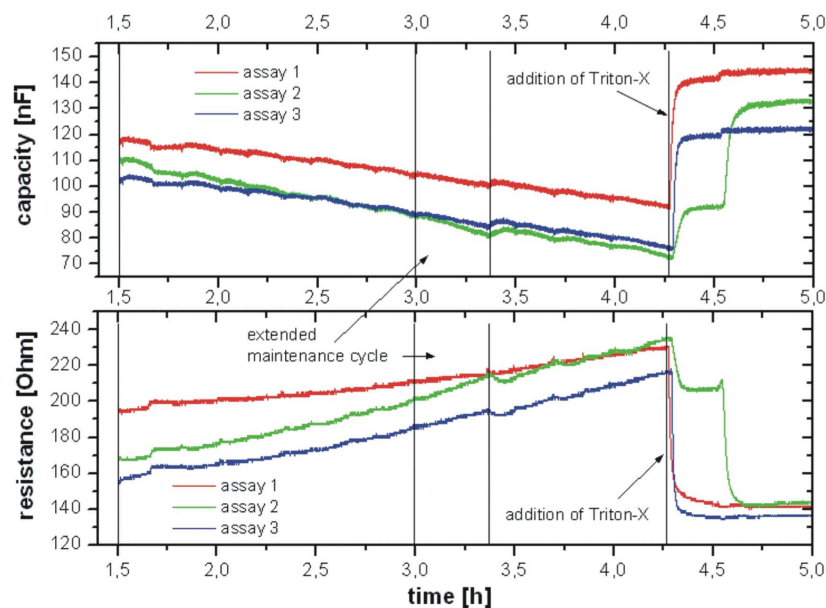


Abbildung 9.21: Entwicklung der Impedanz, dargestellt nach R und C über die gesamte Versuchszeit

Kapitel 10

Zusammenfassung und Ausblick

10.1 Zusammenfassung

Herkömmliche Arbeitsmethoden zur Untersuchung von biologischen Zellen und Geweben sind technischen Grenzen unterworfen, wenn sie zur Untersuchung von dynamischen biologischen Mechanismen oder zur Untersuchung über sehr lange Beobachtungszeiträumen eingesetzt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Untersuchung der intrazellulären und interzellulären Signalkommunikation. Eine Möglichkeit diese Art von Untersuchungen ohne die Zerstörung oder Beeinträchtigung der Zellen durchzuführen, ist der Einsatz von Biosensoren. Eine Zusammenstellung von verschiedenen Biosensoren auf Sensorchips, auf denen Zellkulturen oder biologische Gewebe *in vitro* kultiviert werden können, ermöglicht multiparametrische Messungen in Echtzeit, ohne daß die Zellen in ihrer Entwicklung und ihrem Verhalten beeinflusst werden. Für den Einsatz von Biosensoren sprechen dabei insbesondere folgende drei Faktoren:

- Der Meßvorgang der Biosensoren ist weitgehend rückwirkungsfrei. Dies bedeutet, daß die Zellen in ihrem Verhalten nicht oder nur sehr gering beeinflusst werden. Es werden keine Analyten oder Fremdstoffe benötigt, die die Signalkommunikation der Zelle stören könnten. Dies ist insbesondere für längere Meßzeiten von Bedeutung.
- Der Meßvorgang ist dynamisch. Dieses dynamische Verhalten ermöglicht eine Online-Untersuchung der Kinetik der zellulären Reaktionen und liefert wichtige Informationen über beteiligte Wirkmechanismen.
- Im Gegensatz zu den meisten anderen gängigen Methoden erlauben Biosensoren die direkte Messung zellulärer Reaktionen, ohne auf indirekte Methoden wie Farb- oder Radiomarker zurückgreifen zu müssen.

Um die Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden zu nutzen, wurden daher in unserer Arbeitsgruppe in der Vergangenheit Sensorchips mit Sensoren für wichtige zelluläre Parameter entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Diese Parameter sind dabei der extrazelluläre pH-Wert, der Sauerstoffpartialdruck, die Impedanz und die Temperatur. Die Sensorchips wurden mit Siliziumhalbleitertechnologie hergestellt und zum Teil mit aufwendigen Verfahren mit Glassubstraten verbunden, um zusätzlich zu den sensorischen Daten auch eine lichtmikroskopische Beobachtung zu ermöglichen. Die vorliegende Arbeit befaßte sich nun mit der Optimierung dieser Sensorchips. Ziel war es, die aufwendige Halbleitertechnologie, die zuletzt für die Herstellung eines Wafers 70 Prozeßschritte erforderte, durch einen einfacheren Chipaufbau zu ersetzen. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Austausch der Sensoren zur Messung des pH-Werts. Diese waren bei den ursprünglichen Versionen als ionensensitive Feldeffekttransistoren (ISFETs) ausgeführt und der Hauptgrund für die Chipherstellung mit Hilfe der Siliziumhalbleitertechnologie. Neben der aufwendigen Herstellung waren mit der Verwendung von

ISFETs als pH-Sensoren noch weitere Nachteile, wie die hohe Empfindlichkeit gegen elektrostatische Entladungen und eine ausgeprägte Sensor-Querempfindlichkeit gegenüber K^+ - und Na^+ -Ionen im Zellkulturmedium verbunden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die ISFETs durch Sensorelektroden aus Rutheniumoxid ersetzt, die in Verbindung mit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode ebenfalls die Bestimmung des pH-Werts ermöglichen. Diese besitzen einen erheblich einfacheren Aufbau und können mit mikrosystemtechnischen Methoden hergestellt werden. Darüberhinaus sind sie praktisch unempfindlich gegenüber elektrostatischen Entladungen, wodurch eine erheblich einfachere und dadurch auch kostengünstigere Lagerung und Verwendung möglich ist. Die Querempfindlichkeiten gegenüber Ionen in der Meßlösung sind zwar auch bei diesen Sensoren vorhanden, jedoch erheblich geringer ausgeprägt als bei den ISFETs. Da die Herstellung der Elektroden auch auf Glassubstraten möglich ist, entfällt eine vorher notwendige aufwendige Verbindung von Siliziumchips mit Glaschips vollständig. Im Verlauf der Arbeit wurden diese Art von pH-Sensoren umfassend für den Einsatz in bioanalytischen Anwendungen charakterisiert, optimiert und mit diesen Ergebnissen eine Reihe von multiparametrischen Sensorchips neu entworfen und hergestellt. Dabei entstanden erstmals auch Chipsysteme, die eine Parallelisierung von bis zu 24 Messungen auf Multiwellplatten-Systemen ermöglichen. Zusätzlich zu den in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Sensorchips für metabolische und morphologische Parameter, wurden auch Sensorchips für elektrophysiologische Parameter aus der Arbeitsgruppe Gross mit den pH- und Sauerstoff-Sensoren ausgerüstet und somit erstmals um die Möglichkeit erweitert, simultan elektrophysiologische und metabolische Parameter von elektrisch aktiven Zellen und Geweben zu beobachten.

Die Arbeit ist wie folgt aufgebaut. In Kapitel 1 ist eine ausführliche Darstellung der in der Zellbiologie gebräuchlichen Arbeitsmethoden und ihrer systembedingten Grenzen beschrieben, gefolgt von einer Beschreibung, in welchen Anwendungsgebieten diese Grenzen mit Hilfe von Biosensoren überwunden werden können. Im Anschluß daran ist ein umfassender Stand der Technik auf dem Gebiet der Biosensoren für lebende Zellen und Gewebe aufgeführt und die Aufgabenstellung im Detail beschrieben.

In Kapitel 2 werden die wichtigsten zellbiologischen Vorgänge dargestellt, die den mit Hilfe der auf den Sensorchips integrierten Sensorik erfaßten Parameter zugrunde liegen. Hier wurde insbesondere der Stand der Wissenschaft über Vorgänge des Zellmetabolismus betrachtet, der für den Sauerstoffverbrauch und die extrazelluläre Ansäuerung verantwortlich ist und mit Hilfe von Sensoren für den Sauerstoffpartialdruck und des pH-Werts erfaßt werden kann. Ebenfalls betrachtet werden zellbiologische Vorgänge an der Zellmembran und der extrazellulären Matrix, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion verursachen und mit Hilfe von Impedanzsensoren zugänglich gemacht werden. Zum Abschluß werden noch die biologischen Grundlagen der Potentialentstehung bei elektrisch aktiven Zellen betrachtet.

Kapitel 3 enthält eine ausführliche Beschreibung der Grundlagen der Elektrochemie und Elektrodentheorie, die für das Verständnis der Funktionsweise der pH-Sensoren auf Metalloxidbasis notwendig sind. Im Anschluß daran sind die technischen Grundlagen aller verwendeter Sensortypen auf den in dieser Arbeit entwickelten Sensorchips beschrieben. Um eine Vergleichsbasis für die Leistungsfähigkeit der charakterisierten und optimierten pH-Sensorelektroden aus Rutheniumoxid zu geben sind darüberhinaus die Grundlagen der bisher verwendeten ISFETs und weiterer elektrischer Sensoren zur Messung des pH-Werts dargestellt.

Kapitel 4 befaßt sich ausführlich mit dem Stand der Technik von Metalloxiden als Sensormaterial für pH-Messungen. Es werden dabei umfassend alle in der Literatur bekannten Materialien und Herstellungsverfahren aufgeführt. Im Anschluß daran werden Theorien zur Potentialentstehung ausgeführt. Hier wurde dabei das ursprünglich für Si_3N_4 bei ISFETs entwickelte Site-Binding-Modell

so formuliert, daß es für die Erklärung der pH-abhängigen Potentialentstehung bei Metalloxiden verwendet werden kann.

In Kapitel 5 wird die durchgeführte Charakterisierung und Optimierung von Rutheniumoxid als Sensormaterial für bioanalytische Anwendungen dargestellt. Die Messungen an den RuO_2 -Sensoren zeigen, daß sie zur Messung des pH-Werts in biomedizinischen Anwendungen geeignet sind. Die Ergebnisse der durchgeführten Charakterisierungen lassen auf die Machbarkeit extrazellulärer, zellphysiologischer Messungen schließen. Die Sensorelektroden sind biokompatibel und werden gut mit Zellen bewachsen. Zusammenfassend können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

- Die Versuche zeigen eine pH-Empfindlichkeit zwischen $52mV/pH$ und $58mV/pH$, wobei im Mittel beim überwiegenden Teil der Messungen ein Wert von $55mV/pH$ über einen pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 11,0 erreicht wird. Im Bereich zwischen pH 5,5 bis pH 11,0 ist die pH-Empfindlichkeit nahezu linear. Lediglich bei pH-Werten unter pH 5,5 zeigen die Sensoren ein nichtlineares Verhalten und die Empfindlichkeit liegt unter $55mV/pH$. Der für den Einsatzzweck in biomedizinischen Anwendungen mit lebenden Zellen relevante Bereich pH 6,0 bis pH 9,0 läßt sich somit mit den RuO_2 -Sensoren ohne Einschränkungen abdecken.
- Die Ansprechzeit der RuO_2 -Sensoren bei einem Wechsel um eine pH-Dekade liegt im Mittel bei unter $2s$ um 90% des Endwertes zu erreichen. Unterschiede aufgrund der Richtung des pH-Wechsels wurden nicht festgestellt.
- Die Ergebnisse zeigen durchgehend ein äußerst geringes Rauschen der RuO_2 -Sensoren. Dieses liegt bei allen Messungen im Mittel bei $0,15mV$ bis $0,20mV$ unabhängig vom jeweiligen Level des Nutzsignals. Dies entspricht bei einem Nutzsignallevel von beispielsweise $400mV$ einem SNR von ca. $76dB$. Bei einer Empfindlichkeit von $55mV/pH$ zeigen die Sensoren somit im Mittel ein Rauschen von $0,27\%$ bis $0,37\%$ vom gemessenen pH-Wert oder bezogen auf die Potentialänderung von $55mV/pH$ ein SNR von ca. $51dB$.
- Die RuO_2 -Sensoren sind beim ersten Kontakt mit flüssigen Medien einem ausgeprägten Einschwingverhalten unterworfen. Als Richtwert für den Großteil der untersuchten Sensoren wurde in der Praxis minimal $1,5h$ bis $2h$ ermittelt. Allerdings wurden auch bis zu $5h$ beobachtet. Bei dem überwiegenden Teil der untersuchten Sensoren läßt sich der Einschwingvorgang in drei Phasen unterteilen. Nach dem ersten Kontakt mit Flüssigkeiten ist der Verlauf des Potentials vollkommen unreproduzierbar. In Phase 2 stabilisiert sich das Potential weitgehend. Die zeitlichen Änderungen des Potentials sind dabei gering gegenüber den in biomedizinischen Anwendungen auftretenden pH-Änderungen. Die dritte Phase zeigt eine konstante Drift des Meßsignals.
- Um dieses Einschwingverhalten beim ersten Kontakt mit flüssigen Medien zu optimieren, wurden Versuche unternommen, durch das Anlegen einer äußeren Spannung eine Verbesserung herbeizuführen. Zusammenfassend wurde eine Reduzierung der Einschwingzeit im Mittel von etwa $120min$ auf etwa $30min$ nach dem ersten Kontakt mit Flüssigkeiten erreicht. Einschränkend muß angegeben werden, daß nicht bei allen Versuchen dieses Ergebnis reproduzierbar erreicht wurde. Der Erfolg stellte sich bei etwa 70% der untersuchten Chips ein. Prinzipiell wurde aber gezeigt, daß sich die Einschwingcharakteristik positiv beeinflussen läßt.
- Die Driftraten im Betrieb der Sensoren liegen zwischen $0,5mV/h$ und $3,5mV/h$. Der überwiegende Teil weist im Mittel Raten von $1,0mV/h$ bis $2,0mV/h$ auf. Prozentual betrachtet entsprechen diese Driftraten bei einer pH-Empfindlichkeit von $55mV/pH$ einer Änderung des absoluten pH-Wertes von $0,9\%/h$ bis $6,4\%/h$. Die pH-Empfindlichkeit selbst bleibt sowohl von der Drift, als auch von der Lage des Potentiallevels nach dem Einschwingvorgang vollkommen

unbeeinflusst. Ist ein RuO_2 -Sensor einmal eingeschwungen und eine längere Zeit betrieben worden, so ergab sich in der Praxis, daß die Einschwingdauer nach einer Trocknung und Lagerung deutlich kürzer ist oder gar nicht auftritt.

- Die Sensoren zeigen eine Querempfindlichkeit zum Sauerstoffpartialdruck des Meßmediums. Die Querempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff wurde im Mittel mit $0,28pH/\%pO_2$ bestimmt. Sie ist also sehr hoch und muß deshalb bei Messungen berücksichtigt und geeignet korrigiert werden.
- Die Sensoren zeigen eine Querempfindlichkeit von $4,6 \cdot 10^{-3}pH/^\circ C$ bis $1,4 \cdot 10^{-2}pH/^\circ C$. Es zeigt sich außerdem, daß die Werte beim Einschwingen nach der jeweiligen Temperaturänderung höher liegen, wenn sie von den temperaturbedingt erniedrigten Spannungen ausgehen. Dieser Sachverhalt läßt auf einen Memory-Effekt schließen.
- Die RuO_2 -Sensoren zeigen eine Empfindlichkeit gegenüber Licht. Die Bestrahlung mit Licht hat keine Auswirkungen auf funktionsrelevante Parameter wie Empfindlichkeit oder Ansprechverhalten, sondern wirkt sich ausschließlich negativ auf die Drift aus. Aus den durchgeführten Versuchen läßt sich dabei kein Einfluß der Wellenlänge ableiten. Tendenziell ist die Drift umso höher, je größer die die Sensoren treffende Lichtleistung ist.
- Die Abhängigkeit der Charakteristika der RuO_2 -Sensoren von der aktiven Sensorfläche lassen sich in drei Punkte zusammenfassen:
 - Die pH-Empfindlichkeit im Bereich von pH 6,0 bis pH 11,0 ist von der aktiven Sensorfläche weitgehend unabhängig
 - In Pufferlösungen mit pH-Wert 5,0 treten bei sehr kleinen Flächen Unregelmäßigkeiten auf
 - Je kleiner die aktive Sensorfläche wird, desto größer wird die Drift des Sensorsignals

Aufgrund dieser Ergebnisse werden die Sensoren als runde Elektrodenspots mit einem Durchmesser von $1,0mm$ ausgeführt, was einer Sensorfläche von $0,785mm^2$ entspricht.

- Zusammenfassend läßt sich für die Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke des RuO_2 folgendes festhalten:
 - In den durchgeführten Meßreihen ergab sich, daß bei einer Schichtdicke von $0,5\mu m$ des Rutheniumoxids zwar kein auffälliges Verhalten beim Einschwingvorgang oder der Drift beobachtbar ist, das Verhalten beim Wechsel des pH-Wertes allerdings träge und nicht vorhersagbar ist
 - Bei Schichtdicken von $1,0\mu m$ und $2,0\mu m$ sind geringe Langzeitdriften zu verzeichnen und die Ansprechzeiten beim pH-Wechsel sind geringer als bei $0,5\mu m$. Dies gilt insbesondere für $1,0\mu m$.
 - Die Langzeitstabilität ist für $2,0\mu m$ am besten. Demnach sind Schichtdicken zwischen $1,0\mu m$ und $2,0\mu m$ als Kompromiß zwischen Ansprechzeit und Langzeitstabilität am besten für den Betrieb als pH-Sensor geeignet

Die Elektrodenspots werden aufgrund dieser Erkenntnisse mit einer RuO_2 -Schichtdicke von $1,5\mu m$ gefertigt.

- Die Sensoren zeigen im Mittel keinerlei meßbare Hysterese. Wobei hierfür, aufgrund des Ansprechverhaltens der Sensoren eine eindeutige Aussage schwierig zu treffen ist.
- Die Sensoren wurden einem Biokompatibilitätstest nach ISO 10993-5 unterzogen und diesbezüglich für geeignet befunden. Es zeigt sich kein Unterschied in der Zellverteilung auf oder neben dem Sensor.

Am Ende von Kapitel 5 werden diese Ergebnisse im Rahmen der Diskussion mit Leistungsdaten der ISFETs sowie die für Rutheniumoxid verfügbaren Ergebnisse aus der Literatur verglichen.

Die ebenfalls aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannten interdigitalen Elektrodenstrukturen zur Messung von Zelladhäsion wurden in dieser Arbeit im Hinblick auf die Parallelisierung der Messungen optimiert. In Kapitel 6 sind mehrere Konzepte für diese Parallelisierung beschrieben.

Mit Hilfe der in Kapitel 5 gewonnen Ergebnisse, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit neue multiparametrische Sensorchips auf Keramik- und Glas-Substrat entworfen. Diese besitzen Sensoren für pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Impedanz und Temperatur. Sie decken also dieselben Parameter ab, wie die Sensorchips auf Silizium- und Glas-Silizium-Hybrid-Substrat, die als Ausgangspunkt für die Arbeit verwendet wurden. Die entworfenen Sensorchips sind nun für die Messung des pH-Wertes mit Rutheniumoxid-Elektroden ausgestattet. Ferner wurde die Temperaturmessung einheitlich mit Pt1000-Sensoren realisiert. Abbildungen 10.1 und 10.2 zeigen eine Gegenüberstellung der bei Beginn der Arbeit vorhandenen Sensorchips mit den neu entworfenen Sensorchips auf Keramik- und Glassubstrat.

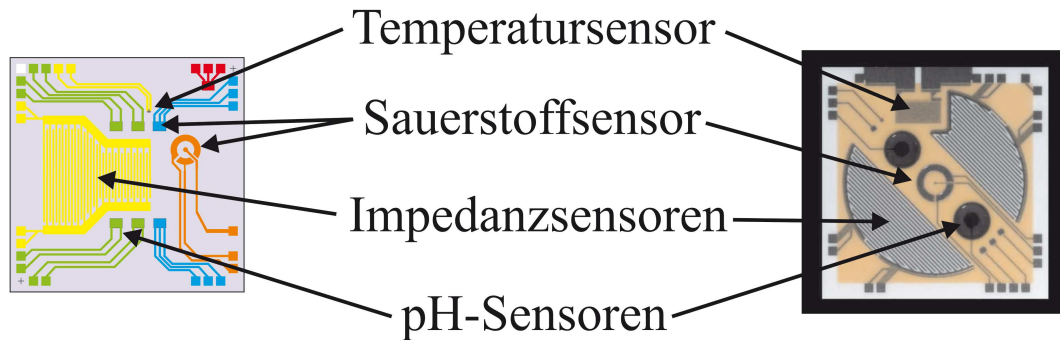


Abbildung 10.1: Gegenüberstellung des zu Beginn der Arbeit vorhandenen multiparametrischen Sensorchips auf Siliziumsubstrat mit dem neu entworfenen multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat

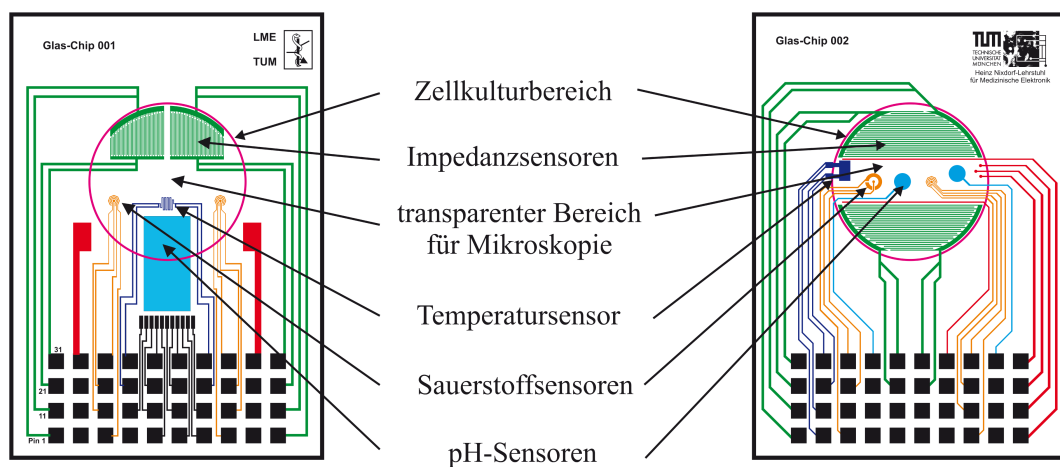


Abbildung 10.2: Gegenüberstellung des zu Beginn der Arbeit vorhandenen multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat mit Siliziuminlet für die pH-Sensoren mit dem neu entworfenen multiparametrischen Sensorchip auf Glassubstrat mit pH-Sensoren auf Rutheniumoxidbasis

Unter Verwendung dieser neuen pH-Sensorik und Sensoren für den Sauerstoffpartialdruck wurden auch bestehende Sensorchips für Messungen an Nervengewebe oder elektrisch aktiven Zellen um die Möglichkeit der Beobachtung metabolischer Parameter erweitert. Diese neu entworfenen Neurochips bieten zum ersten Mal die Möglichkeit, elektrophysiologische und metabolische Messungen an elektrisch aktiven biologischen Material vereint auf einem Sensorchip zu kombinieren.

Darüberhinaus wurden neue Sensorchips für parallele metabolische, morphologische und elektrophysiologische Messungen auf Multiwellplatten-Systemen erarbeitet. Diese besitzen, in unterschiedlichen Varianten zusammengestellt, dieselbe Sensorik wie die Sensorchips für Einzelmessungen. Verwendet wurden hierbei die in Kapitel 6 entwickelten Konzepte zur Parallelisierung der Impedanzmessungen. Auch diese Sensorsysteme wurden bisher noch nicht beschrieben und bieten erstmals die Möglichkeit metabolische, morphologische und elektrophysiologische Messungen mit elektrischen Sensoren parallel auf Multiwellplatten-Systemen durchzuführen.

Alle entworfenen Sensorchips wurden, zum Teil mit Hilfe von Industriepartnern, hergestellt und erfolgreich zur Anwendung gebracht.

In Zuge der Neuentwicklung des multiparametrischen Sensorchips auf Keramiks substrat wurde auch die bisher verwendete Verkapselungstechnik weiterentwickelt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 8 zusammengefaßt. Ebenfalls entworfen wurden Gehäuse für die multiparametrischen Neurochips die ebenfalls in Kapitel 8 kurz vorgestellt werden.

Alle in dieser Arbeit entworfenen und hergestellten Sensorchips wurden bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe eingesetzt. Eine kurze Übersicht über repräsentative Experimente befindet sich in Kapitel 9.

10.2 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Sensorchips sind bereits in vielen Experimenten unserer Arbeitsgruppe zum Einsatz gekommen und sind auch Ausgangspunkt für weitere Forschungsvorhaben und Doktorarbeiten. Die bisher durchgeführten Experimente mit lebenden Zellen hatten in der Regel nur Testcharakter. Die Ergebnisse versprechen aber ein hohes Potential für eine Vielzahl an Anwendungsbereichen. So sind im Rahmen von Drug Targeting, Anwendungen für die pharmazeutische Industrie ebenso denkbar wie der Einsatz zur Untersuchung von Chemotherapeutika und der Tumordiagnose in der Medizin, sowie Anwendungsgebiete in der Biotechnologie und des Umweltengineering.

Von der technischen Seite her gibt es eine Vielzahl an Weiterentwicklungs- und Optimierungsmöglichkeiten, sowohl im Bereich der Metalloxid-pH-Sensoren, als auch bei den Sensorchips. Die Rutheniumoxid-Schichten wurden mit Hilfe von Sputterprozessen hergestellt. Für zukünftige Entwicklungen wäre eine Untersuchung von Iridiumoxid als Sensormaterial für pH-Sensoren in biomedizinischen Anwendungen denkbar. Dieses Material sollte ähnliche Eigenschaften aufweisen wie Rutheniumoxid. Vorteil diese Materials wäre die Möglichkeit der Herstellung mittels elektrochemischer Deposition, was eine weitere Optimierung der Herstellungskosten bedeuten würde.

Die Ergebnisse der Versuche zur Verringerung des Einschwingverhaltens von Rutheniumoxid bei erstem Kontakt mit flüssigen Medien zeigten, daß die angewandten Methoden ein vielversprechender Ansatz sind. Allerdings sind die erzielten Ergebnisse noch nicht reproduzierbar genug, um an einen routinemäßigen Einsatz zu denken. Hier würden umfangreichere Untersuchungen zu weiteren Erkenntnissen und zu weiterer Optimierung der Methoden führen.

Die umfangreichsten Weiterentwicklungspotentiale bieten die Sensorchips, insbesondere die Chipsysteme für die Multiwellplatten. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Einzelchips für die Multiwellplatte mit elektrischen Sensoren für pH, Sauerstoffpartialdruck und Impedanz ausgestattet. Um

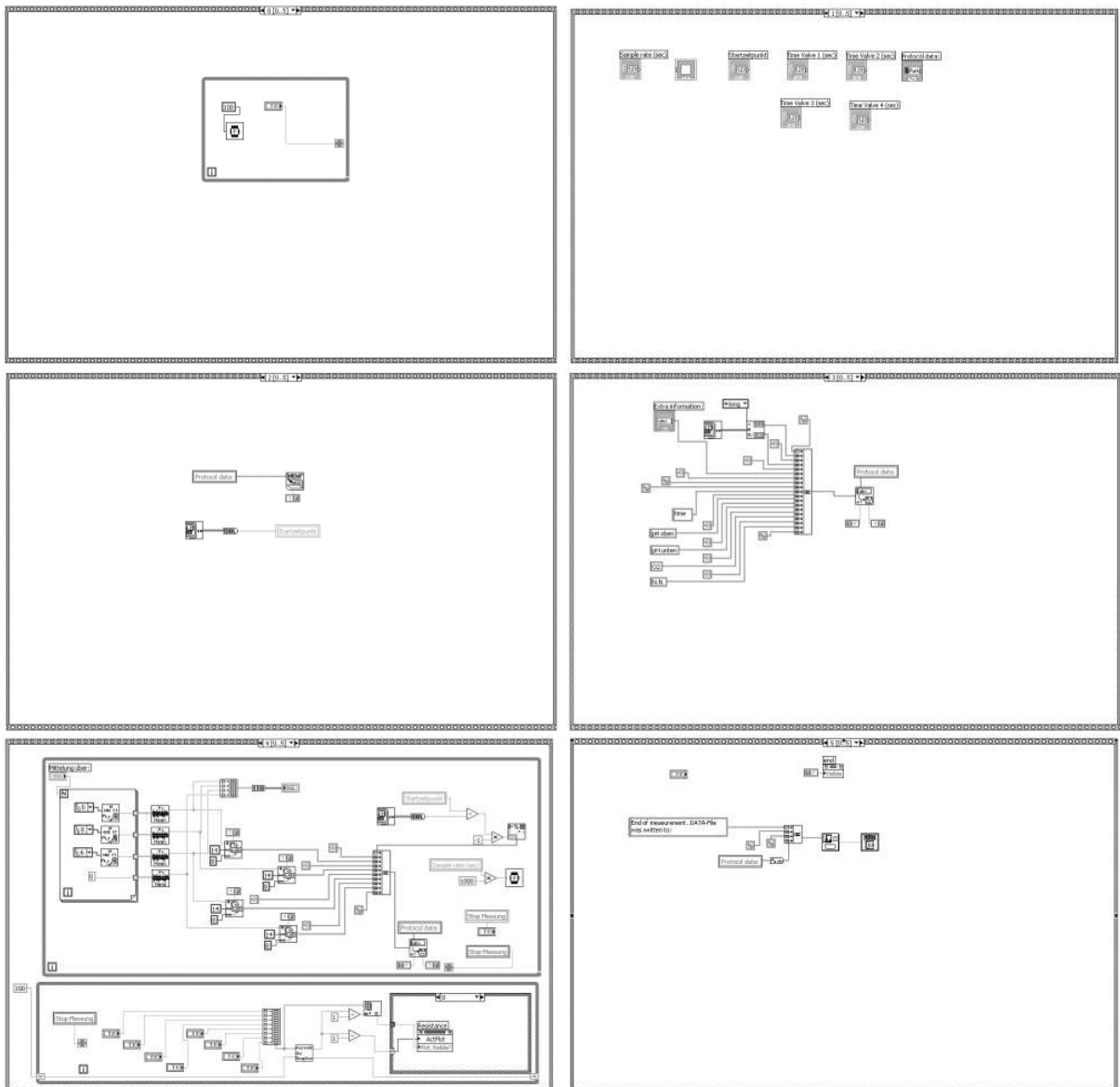
die Komplexität der Kontaktierung gering zu halten, wurde bei der Entwicklung von Sensorplatten vorerst auf die Integration von elektrischen pH- und Sauerstoffsensoren verzichtet und hier auf optische Verfahren zurückgegriffen. In weiteren Entwicklungen ist eine Sensorplatte mit je 24 elektrischen Sensoren für pH, Sauerstoffpartialdruck und Impedanz denkbar. Hierfür sind darüberhinaus weitere Arbeiten am Packaging und der Kontaktierung notwendig, insbesondere wenn die Verwendung von Elektrodenarrays für die Messung elektrophysiologischer Parameter vorgesehen ist.

Bei den Sensorchips auf Keramik- und Glassubstrat bietet das Packaging ebenfalls viele Ansatzpunkte für Optimierungen. Denkbar wäre der Ersatz der starren Trägerplatine im PLCC68-Format mit flexiblen Leiterplatten und die Kontaktierung mit Hilfe von Nullkraftsteckern.

Anhang A

Meßsoftware

Nachfolgend sind die Programmteile des in LabVIEW programmierten Meßprogramms zur Charakterisierung der Rutheniumoxidsensoren dargestellt.



Anhang B

Einzelergebnisse der Versuche

Nachfolgend eine Auswahl der, zur Charakterisierung von Rutheniumoxid durchgeführten Messungen. Die tabellarische Auflistung ist nicht chronologisch, sondern nach Testträgern sortiert. Aufgeführt sind ausschließlich Messungen, die zur Charakterisierung herangezogen wurden.

| Chip # | Verwendung | Beobachtung |
|--------|--|--|
| 0 | Testmessungen zur Beurteilung des Meßaufbaus, Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 1 | Testmessungen zur Beurteilung des Meßaufbaus, Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 2 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 3 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 4 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 5 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 6 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 7 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel, Potentialerhöhung bei Abkühlen des Mediums |
| 8 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel, Drifterhöhung bei Lichtbestrahlung |

| Chip # | Verwendung | Beobachtung |
|----------|--|--|
| 9 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel, Drifterhöhung bei Lichtbestrahlung |
| 10 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 11 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 12 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 13 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 14 | Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | Betrachtung der Einschwingcharakteristik und des Potentialverhaltens im Langzeitbetrieb und bei pH-Wechsel |
| 15 | Testmessungen zur Beurteilung des Meßaufbaus | |
| P1 A=1/1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Sensorfläche | Einschwingcharakteristik und Potential wie bei der vorherigen Meßreihe |
| P1 A=1/2 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | erhöhtes Potential, erhöhte Drift |
| P1 A=1/4 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | erhöhtes Potential, erhöhte Drift im Vergleich zu P1 A=1/2 |
| P1 A=1/8 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | erhöhtes Potential, erhöhte Drift im Vergleich zu P1 A=1/4 |
| P2 A=1/1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Sensorfläche, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | normales Verhalten beim Einschwingvorgang und des Potentials bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel |
| P2 A=0 | Untersuchung der Eignung des Lacks zur Abdeckung, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | Messung bei vollständiger Abdeckung mit Lack nicht möglich |
| P3 A=1/1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Sensorfläche, Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | normales Verhalten beim Einschwingvorgang und des Potentials bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel ΔU ca. 50 bis 60mV / pH |
| P3 A=3/4 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | normales Verhalten des Potentials bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel, ΔU ca. 50 bis 60mV / pH |
| P3 A=1/2 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | normales Verhalten des Potentials bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel, ΔU ca. 50 bis 60mV / pH |

| Chip # | Verwendung | Beobachtung |
|-----------|---|--|
| P3 A=1/4 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 11,0 | normales Verhalten des Potentials bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel, ΔU ca. 50 bis 60mV / pH |
| P3 A=0 | Untersuchung der Eignung des Lacks zur Abdeckung, Betrieb in pH 7,0 | Messung bei vollständiger Abdeckung mit Lack nicht möglich |
| P4 A=1/1 | Betrieb in pH 8,0 | Potential normal |
| P4 A=0 | Untersuchung der Eignung des Lacks zur Abdeckung, Betrieb in pH 8,0 | Messung bei vollständiger Abdeckung mit Lack nicht möglich |
| P5 A=1/1 | Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | Verhalten der Potentialänderung bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel träge und instabil, starke Drift (RuO_2 -Schicht beschädigt) |
| P5 A=3/4 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | Verhalten der Potentialänderung bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel träge und instabil, starke Drift (RuO_2 -Schicht beschädigt) |
| P5 A=1/2 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | Verhalten der Potentialänderung bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel träge und instabil, starke Drift (RuO_2 -Schicht beschädigt) |
| P5 A=1/4 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | Verhalten der Potentialänderung bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel träge und instabil, starke Drift (RuO_2 -Schicht beschädigt) |
| P5 A=0 | Untersuchung der Eignung des Lacks zur Abdeckung, Betrieb in pH 7,0 | Messung bei vollständiger Abdeckung mit Lack nicht möglich |
| P6 A=1/1 | Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | Verhalten der Potentialänderung bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel normal, pH 6,0: 350-375mV; pH7,0: ca. 300mV; pH 8,0: 225-275mV |
| P6 A=3/4 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | Verhalten der Potentialänderung bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel normal, pH 6,0: 350-375mV; pH7,0: ca. 300mV; pH 8,0: 225-275mV |
| P6 A=1/2 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | Verhalten der Potentialänderung bei Langzeitbetrieb und pH-Wechsel normal, pH 6,0: 350-375mV; pH7,0: ca. 300mV; pH 8,0: 225-275mV |
| P6 A=1/4 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | geringere Potentiale als bei P6 A=1/2, jedoch gleiche Potentialdifferenz pro pH, globale Drift |
| P6 A=1/8 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | gleiches Verhalten wie P6 A=1/4, keine globale Drift, erhöhte Trägheit, erhöhtes Überschwingen des Potentials bei pH-Wechsel |
| P6 A=1/16 | Teilabdeckung mit Lack, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | gleiches Verhalten wie P6 A=1/8 |
| P6 A=0 | Totale Abdeckung mit Lack, Betrieb in pH 7,0 | Messung bei vollständiger Abdeckung mit Lack nicht möglich |

| Chip # | Verwendung | Beobachtung |
|--------|--|---|
| P7 | Testmessung zur Beurteilung des Meßaufbaus | |
| P8 | Untersuchung der Sauerstoffquerempfindlichkeit, Betrieb in pH 6,0 bis 8,0 | eindeutige Sauerstoffquerempfindlichkeit |
| S1#1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | außergewöhnlich lange Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit, Potentialänderungen wie erwartet |
| S1#2 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | außergewöhnlich lange Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit, Potentialänderungen sehr träge, instabil |
| S1#3 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | außergewöhnlich lange Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit, Potentialänderungen sehr träge, instabil |
| S1#4 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | relativ lange Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit, Inversion der Potentiale für die verschiedenen pH-Stufen |
| S2#1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit wie gewohnt, Potentialänderungen bei pH-Wechsel wie gewohnt |
| S2#2 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit wie gewohnt, Potentialänderungen bei pH-Wechsel wie gewohnt |
| S2#3 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke und Untersuchung der Sauerstoffquerempfindlichkeit, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | Potentialänderungen träge, eindeutige Sauerstoffquerempfindlichkeit |
| S2#4 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 5,0 bis 11,0 | relativ lange Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit, Inversion der Potentiale bei pH-Wechsel |
| S3#1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit wie gewohnt, Potentialänderungen bei pH-Wechsel wie gewohnt |
| S3#2 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit wie gewohnt, Potentialänderungen bei pH-Wechsel wie gewohnt |

| Chip # | Verwendung | Beobachtung |
|--------|--|--|
| S3#3 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | Potentialänderungen träge |
| S3#4 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | relativ lange Einschwingzeit bei erstem Kontakt mit Flüssigkeit, Inversion der Potentialänderungen bei pH-Wechsel |
| S4#1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | instabiles Verhalten, aufgrund des unterschiedlichen Substrates und der nicht absolut gleichen Sensorflächen kein Vergleich mit S1-S3 sinnvoll |
| S4#2 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | instabiles Verhalten, aufgrund des unterschiedlichen Substrates und der nicht absolut gleichen Sensorflächen kein Vergleich mit S1-S3 sinnvoll |
| S4#3 | Untersuchung der Sauerstoffquerempfindlichkeit, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | eindeutige Sauerstoffquerempfindlichkeit |
| S4#4 | Untersuchung der Sauerstoffquerempfindlichkeit, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | eindeutige Sauerstoffquerempfindlichkeit |
| S5#1 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke, Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | instabiles Verhalten, aufgrund des unterschiedlichen Substrates und der nicht absolut gleichen Sensorflächen kein Vergleich mit S1-S3 sinnvoll |
| S5#2 | Untersuchung der Abhängigkeit der Charakteristika von der Oxiddicke und Untersuchung der Sauerstoffquerempfindlichkeit Betrieb in pH 6,0 bis 9,0 | instabiles Verhalten, aufgrund des unterschiedlichen Substrates und der nicht absolut gleichen Sensorflächen kein Vergleich mit S1-S3 sinnvoll, eindeutige Sauerstoffquerempfindlichkeit |
| K1#1 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S2 5s mit +1,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik |
| K2#1 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S1 und S2 10s mit +/-1,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik |
| K2#2 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S1 10s mit -1,0V | Einschwingvorgang nur ca. 60min, $U_{S1} > U_{S2}$ Einsatzspannung ca. +0,5V, Endwert ca. -1,75V |
| K2#3 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, ohne Spannung | Einschwingvorgang nur ca. 60min, $U_{S1} > U_{S2}$ Einsatzspannung ca. -1,5V, Endwert ca. -1,25V |

| Chip # | Verwendung | Beobachtung |
|--------|---|--|
| K2#4 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, ohne Spannung | Einschwingvorgang ca. 70min, $U_{S1} > U_{S2}$ Einsatzspannung +1,5V, Endwert ca. -1,25V |
| K2#5 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, ohne Spannung | Einschwingvorgang ca. 60min, $U_{S1} > U_{S2}$ Inversion U_{S1} und U_{S2} nach 50min Einsatzspannung ca. -0,25V, Endwert ca. -1,5V |
| K2#6 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, ohne Spannung | normales Einschwingverhalten (ca. 120min), $U_{S1} > U_{S2}$ Einsatzspannung ca. +1,0V, Endwert ca. -1,5V |
| K2#7 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, ohne Spannung und 10s mit -1,0V | normales Einschwingverhalten (ca. 120min) ohne Spannung, $U_{S1} > U_{S2}$, Einsatzspannung ca. +1,0V, mit Spannung $U_{S1} = U_{S2}$, Einsatzspannung ca. +2,25V, Endwert ca. -1,5V, |
| K2#8 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, 10s mit +1,0V | normales Einschwingverhalten (ca. 120min), $U_{S1} > U_{S2}$ Einsatzspannung ca. +3,25V, Endwert ca. -1,5V |
| K2#9 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, 10s mit +1,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets zw. U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} < U_{S2}$, Einsatzspannung ca. +2,75V, Endwert ca. +0,25V |
| K2#10 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S2 60s mit -3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets zw. U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} > U_{S2}$ Einsatzspannung ca. +2,0V, Endwert ca. -1,25V |
| K2#11 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S2 60s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets zw. U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} < U_{S2}$, Einsatzspannung unter -5,0V, Überschwingen, Einschwingdauer reduziert, Endwert ca. -1,25V |
| K2#12 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S2 15s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets zw. U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} < U_{S2}$, Überschwingen, Einschwingdauer reduziert, Endwert ca. -1,25V |
| K2#13 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S2 60s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets zw. U_{S1} und U_{S2} Anfangspotential nahe Endpotential, leichtes Überschwingen, Einschwingdauer deutlich reduziert, $U_{S1} < U_{S2}$, Einsatzspannung ca. -1,0V, Endwert ca. -1,5V |
| K2#14 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, S2 50s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets zw. U_{S1} und U_{S2} , $U_{S2}, U_{S1} < U_{S2}$, Anfangspotential nahe Endpotential, Einschwingdauer ca. 20-30min, Einsatzspannung ca. -1,0V, Endwert ca. -1,25V |

| Chip # | Verwendung | Beobachtung |
|--------|---|---|
| K2#15 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, 50s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} < U_{S2}$, Einsatzspannung ca. -2,25V, Endwert ca. -0,75V |
| K2#16 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, 50s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} < U_{S2}$, Einsatzspannung ca. +1,5V, Endwert ca. -1,25V |
| K2#17 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, 50s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} > U_{S2}$, Einsatzspannung ca. +2,5V, Endwert ca. -1,6V |
| K2#18 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, 50s mit -3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} < U_{S2}$, Einsatzspannung ca. +2,0V, Endwert ca. 0V |
| K2#19 | Untersuchung der Einschwingcharakteristik, Erstbetrieb in pH 7,0, 50s mit +3,0V | Beeinflussung der Einschwingcharakteristik und des Spannungs-Offsets U_{S1} und U_{S2} , $U_{S1} > U_{S2}$, Einsatzspannung ca. +4,3V, Endwert ca. -1,6V |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme einer gut differenzierten Zelle aus einem auf einer Nacktmaus gewachsenen Dickdarmkarzinom bei einer 13.950-fachen Vergrößerung (Aufnahme: B. Wolf) | 2 |
| 1.2 | Schematische Darstellung der zellulären Signalverarbeitung, nach [50] | 4 |
| 1.3 | Vereinfachtes Funktionsprinzip eines Biosensors mit biologischem Erkennungssystem, Signalwandler und Signalverarbeitung, nach [57] | 5 |
| 1.4 | Links: Multiparametrischer Siliziumchip, aufgeklebt auf eine Trägerplatine für die elektrischen Anschlüsse [146]. Rechts: Multiparametrischer Glaschip mit Siliziuminlet [140] | 9 |
| 1.5 | Von links nach rechts: ISFETs, Sauerstoff- und Interdigitalelektroden-Impedanzsensor auf einem multiparametrischen Siliziumsensorschip, jeweils mit Zellen bewachsen (Aufnahmen: M. Brischwein) | 9 |
| 2.1 | Die wichtigsten intrazellulären Kompartimente einer idealisierten tierischen Zelle, nach [150] | 13 |
| 2.2 | Vereinfachter Überblick über den Zellstoffwechsel, aus [149] | 15 |
| 2.3 | Übersicht über eine Auswahl der komplexen Pfade des Zellmetabolismus [154] | 18 |
| 2.4 | Nettobilanz der Glykolyse, aus [1] | 19 |
| 2.5 | Anaerobe und aerobe Verwertungswege von Glucose | 20 |
| 2.6 | Prinzip der oxidativen Phosphorylierung, bestehend aus Elektronentransportkette und ATP-Synthese, aus [153] | 22 |
| 2.7 | Struktur und Absorptionsspektrum von Chlorophyll a, aus [149] | 24 |
| 2.8 | Oben: Änderung des Redoxpotentials während der Photosynthese, Unten: Der Elektronenfluß durch die Thylakoidmembran während der Photosynthese, aus [1] | 25 |
| 2.9 | Vereinfachte schematische Darstellung der stofflichen Interaktion der Zelle mit der Zelumgebung aufgrund des Zellstoffwechsels, nach [1, 149, 150] | 27 |
| 2.10 | Schematische Darstellung der Plasmamembran, aus [149] | 29 |
| 2.11 | Adhärenent wachsende Colon-Carcinom-Zellen auf einem Sensorsubstrat (Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme: B. Wolf) | 31 |
| 2.12 | Schema einer Nervenzelle am Beispiel eines Motorneurons, nach [158] | 32 |
| 2.13 | Beispiele für Aktionspotentiale und ihr zeitlicher Verlauf, aus [161] | 35 |
| 3.1 | Anordnung zur Betrachtung der elektrolytischen Leitfähigkeit (elektrochemische Zelle), aus [159] | 41 |
| 3.2 | Chemische Reaktionen an einer inerten Metallelektrode, aus [159] | 42 |
| 3.3 | Entstehung der elektrischen Doppelschicht an Phasengrenzen und ihr Potentialverlauf, aus [156] | 47 |
| 3.4 | Schematische Darstellung zweier Phasen zur Erklärung der Entstehung des Elektrodenpotentials, aus [156] | 48 |
| 3.5 | Schematische Darstellung einer elektrochemischen Zelle zur Messung der Potentialdifferenz zwischen zwei Metallelektroden, aus [159] | 48 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.6 | Schematische Darstellung einer Konzentrationskette, aus [159] | 50 |
| 3.7 | Schematischer Aufbau einer Normal-Wasserstoff-Elektrode. Die Ankopplung an eine Meßelektrode ist gestrichelt eingezeichnet, aus [162] | 53 |
| 3.8 | Schematischer Aufbau einer Silber-Silberchlorid-Elektrode, aus [162] | 54 |
| 3.9 | Schematische Darstellung des Austausches von Kationen durch Wasserstoff-Ionen an einer Glasoberfläche, aus [162] | 58 |
| 3.10 | Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Glaselektrode: a. Anordnung der Glasmembran; b. Potentialverlauf durch die Membran, aus [162] | 59 |
| 3.11 | Meßaufbau zur pH-Messung mit der Glaselektrode, aus [162] | 59 |
| 3.12 | Schematischer Aufbau eines n-Kanal MOSFET, aus [169] | 60 |
| 3.13 | Ausgangskennlinienschar eines n-Kanal MOSFET mit Triodenbereich, Sättigungsbereich und Pinch-off-Parabel [146] | 63 |
| 3.14 | Aufbau eines ISFET zur Messung spezifischer Ionenkonzentrationen im Elektrolyten. Die ionensensitive Schicht (IS-Schicht) begünstigt Ionenreaktionen, aus [167] | 64 |
| 3.15 | Schematischer Aufbau eines LAPS mit äußerer elektrischer Beschaltung | 64 |
| 3.16 | Kennlinienschar eines LAPS für verschiedene pH-Werte | 65 |
| 3.17 | Prinzipieller Aufbau eines planaren, membranbedeckten Sauerstoffsensors, aus [187] | 68 |
| 3.18 | Charakteristische Strom-Spannungskennlinie eines amperometrischen Sensors, aus [187] | 69 |
| 3.19 | Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser und die Temperaturabhängigkeit des Sensorsignals, aus [180] | 71 |
| 3.20 | Nervenzellkultur auf einem 4 x 16 Array aus Ableitelektroden, aus [133] | 71 |
| 3.21 | Temperaturabhängigkeit des Widerstandes und des Temperaturkoeffizienten von Platin, nach [167, 195] | 73 |
| | | |
| 4.1 | Schematische Darstellung der möglichen Oberflächenverbindungen an der Metalloxid-Oberfläche | 81 |
| 4.2 | Theoretischer Verlauf von $\psi_{MeOx/El}$ als Funktion von $pH_{pzc} - pH$ für verschiedene ΔpK (Parameter: $N_{MeOx} = 8 \cdot 10^{14} cm^{-2}$; $C_{DL} = 20 \mu F cm^{-2}$; $T = 300 K$; a: $\Delta pK = 6$, $\beta = 0, 49$; b: $\Delta pK = 4$, $\beta = 4, 9$; c: $\Delta pK = 2$, $\beta = 49$; d: ideales Nernst'sches Verhalten, nach [220] | 84 |
| 4.3 | Ladungsverteilung und die Potentialverlauf an einer Elektrolyt/Metalloxid/Metall-Grenzschicht für die pH-Werte $pH > pH_{pzc}$ und $pH < pH_{pzc}$ | 86 |
| | | |
| 5.1 | Für die zur Charakterisierung von Rutheniumoxid durchgeführten Meßreihen verwendeter Meßstand | 91 |
| 5.2 | Schematischer Aufbau des Instrumentenverstärkers INA116 und ein Beschaltungsvorschlag für den Einsatz bei pH-Messungen [236] | 92 |
| 5.3 | Meßschaltung zum Betrieb von maximal zwei Rutheniumoxidelektroden gegen eine gemeinsame Referenzelektrode | 93 |
| 5.4 | Prinzipialschaltbild der Meßelektrode und der Referenzelektrode durch das Relais im Meßzustand (links) und im Zustand aktiv von außen angelegter Spannung (rechts) | 94 |
| 5.5 | Teil-Schaltplan zur relaisgestützten äußeren Vorgabe von Spannung an die Sensorelektrode | 94 |
| 5.6 | Aufgabenschema der verwendeten Meßsoftware | 95 |
| 5.7 | Bedienungsoberfläche der verwendeten Meßsoftware | 95 |
| 5.8 | Doppelkammer mit Fluidikaufsatz und extern über Schläuche angeschlossener Referenzelektrode (hier mit Vorrichtung zur Bestrahlung der Meßkammer mittels LED) | 97 |
| 5.9 | Ganzflächig mit Rutheniumoxid beschichtete Glasplättchen kontaktiert mit einer Klammer (links) und aufgebracht auf einem Keramiksubstrat (rechts) | 97 |
| 5.10 | Einspannblock für Keramikchips der Größe 7, 55mm x 7, 55mm | 97 |

| | | |
|------|---|-----|
| 5.11 | Verwendete Referenzelektrode der Firma Metrohm | 98 |
| 5.12 | Verwendete Peristaltikpumpe und Ventile der Firmen IPC IsmaTec, N-Research u. Besta100 | |
| 5.13 | Setup mit internem 2-Wege-Ventil zum Betrieb mit zwei unterschiedlichen Testlösungen | 100 |
| 5.14 | Setup mit externem 6-Wege-Ventil zum Betrieb mit bis zu 6 unterschiedlichen Testlösungen | 100 |
| 5.15 | Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche des verwendeten Rutheniumoxids auf Glas- (li.) und Keramiksubstrat (re.) bei 450-facher Vergrößerung | 101 |
| 5.16 | Zwei RuO_2 -Sensorelektroden auf einem Glaschip der Größe $24mm \times 33,8mm$ | 102 |
| 5.17 | Ganzflächig mit RuO_2 beschichtete Glas- und Keramikplättchen der Größe $8,5mm \times 8,5mm$ | 103 |
| 5.18 | Keramikchip der Größe $7,55mm \times 7,55mm$ mit zwei RuO_2 -Elektroden | 105 |
| 5.19 | Verlauf des Meßpotentials beim Wechsel zwischen Pufferlösungen mit pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 und die statistische Verteilung der Meßpotentiale pro verwendeten pH-Wert. | 108 |
| 5.20 | Verlauf des Meßpotentials beim Wechsel zwischen Pufferlösungen von pH 5,0 bis pH 11,0 und die statistische Verteilung der Meßpotentiale pro verwendeten pH-Wert. | 108 |
| 5.21 | Links: Statistische Verteilung der Potentialdifferenzen bei Wechsel der Pufferlösung von pH 6,0 auf pH 7,0 und von pH 7,0 auf pH 8,0; Rechts: Statistische Verteilung bei Wechsel von pH 5,0 auf pH 6,0 bis pH 10,0 auf pH 11,0 | 108 |
| 5.22 | Links: Potentialverlauf bei einem Wechsel der Pufferlösung von pH 6,0 auf pH 7,0; Rechts: Potentialverlauf bei einem Wechsel der Pufferlösung von pH 11,0 auf pH 5,0 | 109 |
| 5.23 | Links: Rauschen des Chips S1#2 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 7,0; Rechts: Rauschen des Chips #12 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 8,2 | 110 |
| 5.24 | Reduzierung der Störungen, bedingt durch äußere elektromagnetischen Einflüsse mit Hilfe von Erdung | 110 |
| 5.25 | Schematische Darstellung der Erdung des Meßmediums | 111 |
| 5.26 | Beispiel eines Einschwingvorgangs mit rein positiven Potential (Chip #6) | 112 |
| 5.27 | Links: Drift des Chips P1 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 7,0; Rechts: Drift des Chips #8 bei Betrieb in Pufferlösung mit pH 8,0 | 112 |
| 5.28 | pH-Wechsel mit überlagerter starker Drift | 113 |
| 5.29 | Einschwingverhalten von Chip K2#6 in Pufferlösung mit pH 7,0; S1 und S2 bezeichnen die beiden Sensorelektroden | 114 |
| 5.30 | Einschwingverhalten von Chip K2#14 in Pufferlösung mit pH 7,0, mit einer Vorspannung von $+3,0V$ über $50s$ | 115 |
| 5.31 | Einschwingverhalten von Sensoren in Pufferlösung mit pH 7,0 nach einer Vorspannung mit $+3,0V$ über $50s$; Links: Chip K2#15 mit positivem Anfangspotential; Rechts: Chip K2#16 mit negativem, bzw. neutralem Anfangspotential | 115 |
| 5.32 | Einfluß des Sauerstoffpartialdrucks auf das Sensorsignal | 116 |
| 5.33 | Einfluß der Temperatur auf das Sensorsignal bei Wechsel von Pufferlösungen (pH 7,02) mit $1,0^\circ C$ und $33,1^\circ C$ | 117 |
| 5.34 | Einfluß von Licht auf die Drift der Sensorelektroden in einer Pufferlösung mit pH 7,0, in den markierten Bereichen wurde mit einer LED beleuchtet; Links: Chip #9; Rechts: Chip #6 | 118 |
| 5.35 | Verhalten des Substrates P6 bei verschiedenen pH-Werten (pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0); Links: 3/4 der Ausgangsfläche; Rechts: 1/4 der Ausgangsfläche | 119 |
| 5.36 | Meßpotentiale für verschiedene pH-Werte aufgetragen über die aktive Sensorfläche; Links: pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0; Rechts: pH 5,0 bis pH 11,0 | 119 |
| 5.37 | Verhalten von Substrat S1/Platte1/ChipNr2 in pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 | 120 |
| 5.38 | Meßverlauf von Chip P6 für die pH-Werte pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 | 121 |
| 5.39 | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von L929-Zellen auf einer Rutheniumoxidelektrode eines Keramikchips | 121 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5.40 | Inversion der Reaktionen des Substrats S1P2#3 auf die pH-Werte pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0 | 122 |
| 6.1 | Impedanz, dargestellt als komplexe Größe mit Real- und Imaginärteil | 129 |
| 6.2 | Seriell und paralleles Ersatzschaltbild der Induktivität | 129 |
| 6.3 | Kugelförmiges Teilchen mit einer Membran, aus [123] | 133 |
| 6.4 | Typische dielektrische Dispersion eines biologischen Gewebes, getrennt nach Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit, aus [244] | 135 |
| 6.5 | Randles-Ersatzschaltbild für die Elektrodenimpedanz, nach [248] | 136 |
| 6.6 | Schematische Darstellung der verwendeten interdigitalen Elektrodenstrukturen, nach [123] | 137 |
| 6.7 | Links: Schematische Anordnung der seriellen Schaltung der Interdigitalkondensatoren; Rechts: Schematische Anordnung der Schaltung der Interdigitalkondensatoren mit gemeinsamer Zuleitung zu einer Elektrode | 138 |
| 6.8 | Verlauf der Meßspannung und des Meßstromes, sowie die relevanten Meßpunkte innerhalb einer Sinusschwingung | 139 |
| 6.9 | Links: Feldverteilung bei einem Keramiksubstrat mit Wasser; Rechts: Feldverteilung bei einem Keramiksubstrat mit als Kugeln modellierte Zellen | 142 |
| 6.10 | Links: Feldverteilung bei einem Glassubstrat mit Wasser; Rechts: Feldverteilung bei einem Glassubstrat mit als Kugeln modellierte Zellen | 142 |
| 7.1 | Layout des multiparametrischen Glaschips | 144 |
| 7.2 | Links: Konfiguration 1 der auf dem multiparametrischen Glaschip verwendeten Clark'schen Sauerstoffsensoren; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der Struktur mit Zellbewuchs. Die Isolation ist an den rötlich erscheinenden Bereichen zu erkennen. | 145 |
| 7.3 | Links: Konfiguration 2 der auf dem multiparametrischen Glaschip verwendeten Clark'schen Sauerstoffsensoren; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der Struktur mit Zellbewuchs. Die Isolation ist an den rötlich erscheinenden Bereichen zu erkennen. | 145 |
| 7.4 | Ringförmige Platinstruktur zur Kontaktierung der Rutheniumoxid-Elektrode | 146 |
| 7.5 | Schematische Darstellung eines Querschnitts der Rutheniumoxid-Elektroden | 146 |
| 7.6 | Ausschnitt einer mit Zellen bewachsenen Zellkulturfläche des multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat | 147 |
| 7.7 | Multiparametrischer Sensorchip auf Glassubstrat der Größe 24mm x 33mm | 147 |
| 7.8 | Layout des multiparametrischen Sensorchips auf Keramiksubstrat | 148 |
| 7.9 | Multiparametrischer Sensorchip auf Keramiksubstrat der Größe 8,5mm x 8,5mm | 149 |
| 7.10 | Je 36 multiparametrische Sensorchips auf einem 2 Zoll Keramiksubstrat | 149 |
| 7.11 | Variante 1 des Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten | 150 |
| 7.12 | Variante 2 des Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten mit kleinerer Interdigitalelektrodenstruktur | 150 |
| 7.13 | Variante 3 des Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten mit Sensor für Sauerstoffpartialdruck und Rutheniumoxid-Elektrode für pH-Messungen | 151 |
| 7.14 | Hergestellte Einzelchips auf Glassubstrat für 24-Well-Platten: Links: Aufgeklebte Variante 1 und 2, zu Testzwecken mit Federkontaktstiften kontaktiert; Rechts: Variante 3 vor dem Zuschnitt auf die Größe 8,1mm x 8,1mm | 151 |
| 7.15 | Layout der Sensorplatte mit 12 seriell geschalteten interdigitalen Elektrodenstrukturen | 152 |
| 7.16 | Zwei Exemplare der hergestellten Sensorplatten für Multiwellplatten-Systeme mit seriell geschalteten Impedanzsensoren die rückseitig auf eine 24-Well-Platte aufgeklebt sind | 152 |
| 7.17 | Layout der Sensorplatte mit 24 interdigitalen Elektrodenstrukturen mit gemeinsamer Masse | 153 |

| | | |
|------|---|-----|
| 7.18 | Exemplar der hergestellten Sensorplatte für Multiwellplatten-Systeme mit Impedanzsensoren mit gemeinsamer Masse | 153 |
| 7.19 | Layout des Sensorchips zur Messung elektrophysiologischer und metabolischer Parameter elektrisch aktiver Zellen und Geweben | 154 |
| 7.20 | Ausschnittsvergrößerung der Sensorfläche | 155 |
| 7.21 | Links: Hergestelltes Exemplar des Sensorchips; Rechts: Lichtmikroskopische Aufnahme der Ableitelektroden | 155 |
| 7.22 | Layout des Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme zur Messung elektrophysiologischer und metabolischer Parameter lebender Zellen | 156 |
| 7.23 | Exemplar der hergestellten Einzelchips für Multiwellplatten-Systeme zur Messung elektrophysiologischer und metabolischer Parameter lebender Zellen (hier vor dem Zugschnitt auf die Maße 8,1mm x 8,1mm) | 156 |
| 7.24 | Layout des multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat der Maße 48,2mm x 8mm für Messungen in Flüssigkeiten | 157 |
| 7.25 | Exemplar eines hergestellten multiparametrischen Sensorchips im Format eines Teststreifens für Messungen in Flüssigkeiten. | 157 |
| 7.26 | Layout eines Testchips zur Untersuchung von Elektroden zur Messung des Sauerstoffpartialdruckes | 158 |
| 7.27 | Konfiguration der Elektrodenstruktur zur Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Gegen- und Referenzelektrode von der Arbeitselektrode auf die Messung des Sauerstoffpartialdruckes | 159 |
| 7.28 | Elektrodenkonfiguration eines weiteren Sensors zur Untersuchung des Sauerstoffpartialdruckes | 159 |
| 7.29 | Hergestelltes Exemplar des Testchips zur Untersuchung des Einflusses des Abstandes der Gegen- und Referenzelektrode von der Arbeitselektrode auf die Messung des Sauerstoffpartialdruckes | 160 |
| 7.30 | Layout eines Testchips zur Untersuchung von Elektroden zur Messung der Impedanz . | 161 |
| 7.31 | Konfiguration der drei Ausführungen von interdigitalen Elektrodenstrukturen für Impedanzmessungen | 161 |
| 7.32 | Konfiguration des Rings aus Einzelelektroden für richtungsabhängige Impedanzmessungen | 162 |
| 7.33 | Konfiguration von zwei Strukturen zur Sauerstoffmessung mit ringförmigen Arbeitselektroden | 162 |
| 7.34 | Hergestelltes Exemplar des Testchips für Versuche an Sensoren für die Messung der Impedanz | 163 |
| 8.1 | Schematischer Aufbau des verkapselten Sensorchips | 168 |
| 8.2 | Links: Layout der elektrischen Anschlußleitungen und Bondpads der Trägerplatine im PLCC68-Format; Rechts: Exemplar einer Trägerplatine mit aufgeklebten Sensorchip . | 169 |
| 8.3 | Exemplar eines hergestellten Nutzens mit 12 Trägerplatinen | 169 |
| 8.4 | Ausführung des verwendeten Zellkulturaufsatzes | 170 |
| 8.5 | Exemplar eines fertig aufgebauten Chips | 170 |
| 8.6 | Exemplar der Bodenplatte der Kammer für Neurochips | 171 |
| 8.7 | Exemplar des Oberteils der Kammer für Neurochips (Unterseite) | 171 |
| 8.8 | Exemplar der Kammer für Neurochips um simultane Messungen von elektrophysiologischen und metabolischen Parametern von elektrisch aktiven Zellen durchzuführen . . | 172 |
| 9.1 | Schematische Darstellung eines Meßsystems für multiparametrische Messungen an lebenden Zellen und Geweben mit Mikrofluidik und optionaler lichtmikroskopischer Beobachtung, nach [136, 137] | 173 |

| | | |
|------|--|-----|
| 9.2 | Meßsystem für multiparametrische Sensorchips auf Glassubstrat. Die Kammer mit zwei Sensorchips ist für zusätzliche optische Kontrolle auf den X-Y-Tisch eines Lichtmikroskops montiert | 174 |
| 9.3 | Einzelkammer für einen multiparametrischen Sensorchip auf Glassubstrat | 175 |
| 9.4 | Doppelkammer für den Einsatz von zwei multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat | 175 |
| 9.5 | Mobiles Meßsystem zum Betrieb des multiparametrischen Sensorchips auf Keramiksubstrat [250] | 175 |
| 9.6 | Meßsystem zum Betrieb von sensorgestützten Multiwellplatten mit Beprobungsroboter und Klimakammer [251] | 176 |
| 9.7 | Aufnahme für die sensorgestützte Multiwellplatte direkt oberhalb der Optik des automatisierten Mikroskops [251] | 176 |
| 9.8 | Meßaufbau zum Betrieb der Sensorchips für elektrische und metabolische Parameter von Nervenzellkulturen | 177 |
| 9.9 | MCF-7 Zellen auf der Sensoroberfläche eines Chips auf Keramiksubstrat | 178 |
| 9.10 | Entwicklung des pH-Werts über dem gesamten Meßverlauf | 178 |
| 9.11 | Ausschnittsvergrößerung des pH-Wertes zwischen 26h und 28h | 178 |
| 9.12 | Reaktion der Ansäuerungsleistung auf die Zugabe von 1% Triton X-100 | 179 |
| 9.13 | Entwicklung des Sauerstoffpartialdruckes und der Temperatur über dem gesamten Meßverlauf | 179 |
| 9.14 | Reaktion des Sauerstoffverbrauchs auf die Zugabe von 0,2% Triton X-100 | 179 |
| 9.15 | Reaktion des Sauerstoffverbrauchs auf die Zugabe von 1% Triton X-100 | 180 |
| 9.16 | Ansäuerungsleistung einer Primärtumorzellkultur | 180 |
| 9.17 | Nervenzellen aus dem frontalen Mäuseembryonenkortex auf dem Neurochip nach einer Inkubationszeit von 5 Wochen | 181 |
| 9.18 | Livebild aus einer Software der Firma Plexon der Aktionspotentiale der Nervenzellkultur, die mit einer Ableitelektrode des Neurochips aufgenommen werden | 181 |
| 9.19 | Mittlere Aktivität der Nervenzellkultur an allen 64 Ableitelektroden für einen Meßzeitraum von etwa 200 Minuten | 182 |
| 9.20 | MCF-7 Zellen auf der Sensoroberfläche einer 24-Well-Platte mit Impedanzsensoren | 183 |
| 9.21 | Entwicklung der Impedanz, dargestellt nach R und C über die gesamte Versuchszeit | 183 |
| 10.1 | Gegenüberstellung des zu Beginn der Arbeit vorhandenen multiparametrischen Sensorchips auf Siliziumsubstrat mit dem neu entworfenen multiparametrischen Sensorchip auf Keramiksubstrat | 189 |
| 10.2 | Gegenüberstellung des zu Beginn der Arbeit vorhandenen multiparametrischen Sensorchips auf Glassubstrat mit Siliziuminlet für die pH-Sensoren mit dem neu entworfenen multiparametrischen Sensorchip auf Glassubstrat mit pH-Sensoren auf Rutheniumoxidbasis | 189 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|-----|
| 2.1 | Auswahl von wichtigen Transportermolekülen und den jeweils übertragenen Gruppen [1] | 17 |
| 2.2 | Ionenkonzentrationen beim Tintenfischaxon in mM [159] | 34 |
| 3.1 | Vorkommende Makronährstoffe in der Natur und in Zellkulturmedien [149] | 38 |
| 3.2 | Temperaturkoeffizienten für ausgewählte Lösungen [156] | 45 |
| 3.3 | Standardbezugspotentiale verschiedener Metallionen-, Gas- und Redoxelektroden gegenüber der Normal-Wasserstoff-Elektrode [162] | 53 |
| 5.1 | Zusammensetzung für pH-Puffer mit pH 6,0 | 99 |
| 5.2 | Zusammensetzung für pH-Puffer mit pH 7,8 | 101 |
| 5.3 | Glaschips der Meßreihe 1 | 103 |
| 5.4 | Glas- und Keramikplättchen der Meßreihen 2 bis 7 | 104 |
| 5.5 | Glaschips und Keramikplättchen der Meßreihen 8 bis 12 | 105 |
| 5.6 | Keramikchips der Meßreihen 13 bis 15 | 106 |
| 6.1 | Bedeutung der Meßpunkte | 139 |

Verwendete Symbole und Abkürzungen

| | |
|--------------------|---|
| α | Dissoziationsgrad |
| α | Temperaturkoeffizient |
| α_T | totale Polarisierbarkeit |
| α_e | elektrische Polarisierbarkeit |
| α_a | atomare Polarisierbarkeit |
| α_O | Orientierungs-Polarisierbarkeit |
| β | Temperaturkoeffizient |
| γ | Aktivitätskoeffizient |
| ε_0 | elektrische Feldkonstante ($8,8542 \cdot 10^{-12} \frac{As}{Vm}$) |
| ε_r | relative Dielektrizitätskonstante |
| η | Viskosität |
| ϑ | Temperatur |
| ϑ_0 | Bezugstemperatur |
| μ | elektrisches Dipolmoment |
| μ_n | Elektronenbeweglichkeit im n-Kanal |
| $\tilde{\mu}_i$ | elektrochemisches Potential der Ionensorte i |
| ν_d | Elektronendriftgeschwindigkeit |
| π | Kreiszahl Pi 3.142 |
| ϱ | spezifischer elektrischer Widerstand |
| σ | spezifische elektrische Leitfähigkeit |
| σ_{RLZ} | Flächenladungsdichte in der Raumladungszone |
| $\sigma_{I/H}$ | Flächenladungsdichte an der Grenzschicht Isolator/Halbleiter |
| τ | Zeitkonstante |
| φ | elektrisches Potential |
| φ_a | Potential des Zelläußeren |
| φ_F | $E_i - E_F$ |
| φ_i | Potential des Zellinneren |
| φ_{Metall} | Galvani-Potential |
| φ_χ | elektrisches Oberflächenpotential |
| φ_ψ | Volta-Potential |
| ψ_{IE} | Oberflächenpotential |
| ϕ_{MH} | Austrittsarbeit Metall und Halbleiter |
| $\rho(x)$ | Ladungsdichte als Funktion von x |
| Λ | Äquivalenleitfähigkeit |
| χ_E | Grenzflächendipolpotential |
| ω | Winkelfrequenz |
| A | Querschnittsfläche |
| a | Aktivität |

| | |
|-------------------|---|
| $a_{H_3O^+}$ | Protonenaktivität |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Ag | Silber |
| AgCl | Silberchlorid |
| Al_2O_3 | Aluminiumoxid |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ÄHS | äußere Helmholtzschicht |
| b | Dicke |
| B | Suszeptanz |
| C | Kohlenstoff |
| C_{ox} | Kapazität pro Gate-Isolatorfläche |
| C_{dl} | Doppelschichtkapazität |
| c | Sättigungskonzentration |
| c_i | Konzentration der Komponente i |
| c_0 | Bezugskonzentration ($1 \frac{mol}{l}$) |
| c_ν^a | äußere Konzentration des Kation ν |
| c_ν^i | innere Konzentration des Kation ν |
| $c(O_2)$ | Sauerstoffkonzentration |
| $c^o(O_2)$ | Sauerstoffkonzentration im Standardzustand |
| Ca | Calcium |
| CHEMFET | Chemically Sensitive Field Effect Transistor |
| CO_2 | Kohlenstoffdioxid |
| CoA | Coenzym A |
| CO_3^{2-} | Carbonat-Ion |
| d | Dicke |
| d_{ox} | Dicke des Gate-Isolators |
| D | Drain |
| D | Materialantwort |
| D | Diffusionskoeffizient |
| D_m | Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in der Membran |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| E | elektrische Feldstärke |
| e_0 | Elementarladung ($1,602 \cdot 10^{-19} As$) |
| E_0' | Redoxpotential |
| $E_{1/2}$ | Halbstufenpotential |
| E_{app} | Potential bezogen auf eine Normal-Wasserstoff-Elektrode |
| E_{eq} | Gleichgewichtspotential |
| E_F | Fermi-Niveau |
| E_H^0 | Standard-Elektrodenpotential |
| E_i | intrinsisches Energieniveau |
| E_K | Kalium-Gleichgewichtspotential |
| EMK | elektromotorische Kraft |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| F | Faraday-Konstante ($96485 \frac{As}{mol}$) |
| F_{Ion} | Kraft auf ein Ion im elektrischen Feld |
| $f_{\pm,i}$ | normierter mittlerer Aktivitätskoeffizient der Komponente i , |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| FADH ₂ | reduziertes Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| Fe | Eisen |
| G | Gate |

| | |
|---------------------|--|
| G | elektrischer Leitwert |
| G | Verstärkungsfaktor |
| G | Konduktanz |
| ΔG | Änderung der freien Enthalpie pro Formelumsatz |
| $\Delta G^{\circ'}$ | Änderung der freien Standardenergie bei pH 7 |
| GASFET | GAS Sensitiv Field Effect Transistor |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| H | Wasserstoff |
| H^+ | Proton |
| HHS | Haber-Haugaard-Schicht |
| H_2O | Wasser |
| H_2O_2 | Wasserstoffperoxid |
| H_3O^+ | Oxonium-Ion |
| $(H_{2n+1}O_n)^+$ | Hydronium-Ion |
| HCO_3^- | Bicarbonat-Ion |
| i | Strom |
| i_0 | Austauschstromstärke |
| I | elektrischer Strom |
| I_{DS} | Source-Drain-Strom |
| IHS | innere Helmholtzschicht |
| ISFET | Ion Sensitive Field-Effect Transistor |
| ITO | Indium-Zinn-Oxid |
| j | imaginäre Zahl $j = \sqrt{-1}$ |
| k | Temperaturkoeffizient |
| k | Proportionalitätsfaktor |
| K | Kalium |
| K_m | Nernst'scher Verteilungskoeffizient für Sauerstoff |
| KCL | Kaliumchlorid |
| L | Kanallänge |
| LAPS | Light Addressable Potentiometric Sensor |
| MEA | Micro-Elektrode-Array |
| Mg | Magnesium |
| MOS | Metal Oxide Semiconductor |
| n | Stöchiometrischer Koeffizient |
| N | Stickstoff |
| N_A | Avogadro-Konstante ($6,02214 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol}$) |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid (Kochsalz) |
| NAD^+ | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid |
| NADH | reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid |
| $NADP^+$ | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |
| NADPH | reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |
| NHE | Normal-Wasserstoff-Elektrode |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| O | Sauerstoff |
| O_2 | molekularer Sauerstoff |
| OH^- | Hydroxid-Ion |
| p | Partialdruck |
| $p(O_2)$ | Sauerstoff-Partialdruck |

| | |
|------------------|--|
| $p^{\circ}(O_2)$ | Sauerstoff-Partialdruck im Standardzustand |
| P | Phosphor |
| P_m | Membran-Permeabilitätskonstante |
| $P_{m,0}$ | Permeabilität des Standardzustandes |
| P_i | Orthophosphat |
| P_{ν} | Permeabilitätskoeffizient für das Kation ν |
| PCM | Physiocontrol Microsystem |
| pH | pH-Wert |
| Pt | Platin |
| Q | Plastoquinon (oxidiert) |
| Q | elektrische Ladung |
| q_n | Ladung im n-Kanal |
| QH ₂ | Plastoquinol (reduziertes Plastoquinon) |
| R | elektrischer Widerstand |
| R_0 | Bezugswiderstand |
| R | Gaskonstante ($8,4 \frac{mJ}{molK}$) |
| r | Radius |
| RL | Raumladungszone |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RuO ₂ | Rutheniumoxid |
| S | Schwefel |
| S | Source |
| SiO_2 | Siliziumdioxid |
| Si_3N_4 | Siliziumnitrid |
| t | Zeit |
| t_{tr} | Transitzeit |
| T | absolute Temperatur |
| T_0 | Bezugstemperatur ($0^{\circ}C$ bei Pt-Temperatursensoren) |
| Ta_2O_5 | Tantalpentoxid |
| U | Spannung |
| UV | Ultraviolett |
| v | Geschwindigkeit |
| V | Spannung |
| V | Gleichgewichtspotential |
| V_B | Bulk-Spannung |
| V_{DS} | Drain-Source-Spannung |
| V_{GS} | Gate-Source-Spannung |
| V_m | Membranpotential oder Membranspannung |
| V_{sat} | Sättigungsspannung |
| V_T | Schwellenspannung |
| W | Kanalweite |
| W | Arbeit |
| x | Abstand |
| \underline{Y} | Admittanz |
| z | Valenz (Ladung) eines Ions |
| \underline{Z} | komplexe Impedanz |
| Z' | Realteil von \underline{Z} |
| Z'' | Imaginärteil von \underline{Z} |
| Z_W | Warburg-Impedanz |

Literaturverzeichnis

- [1] ALBERTS, B. ; JOHNSON, A. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WALTER, P.: *Molekularbiologie der Zelle*. 4th. Wiley-VHC Verlag, 2004
- [2] J.LACEY, A.: *Light Microscopy in Biology. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1989
- [3] CANTOR, C. R. ; SCHIMMEL, P. R.: *Biophysical Chemistry*. 3rd. W. H. Freeman, New York, 1980
- [4] SPENCER, M.: *Fundamentals of Light Microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge, 1982
- [5] HECHT, E.: *Optics*. 2nd. Addison-Wesley, Reading, 1987
- [6] HAUGLAND, R. P.: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. 5th. Molecular Probes Inc., Eugene, 1992
- [7] PLOEM, J. S. ; TANKE, H. J.: Introduction to Fluorescence Microscopy. In: *Royal Microscopical Society Handbook No.10* (1987)
- [8] WANG, Y.-L. ; TAYLOR, D. L.: *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part A & B*. Academic Press, San Diego, 1989
- [9] MINSKY, M.: Memoir on inventing the confocal scanning microscope. In: *Scanning* 10 (1988), S. 128–138
- [10] PAWLEY, J. B.: *Handbook of Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York, 1990
- [11] SLAYTER, E. M. ; SLAYTER, H. S.: *Light and Electron Microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge, 1992
- [12] ZERNIKE, F.: How I discovered phase contrast. In: *Science* 121 (1955), S. 345–349
- [13] PEASE, D. C. ; PORTER, K. R.: Electron microscopy and ultramicrotomy. In: *Journal of Cell Biology* 91 (1981), S. 287–292
- [14] EVERHART, T. E. ; HAYES, T. L.: The scanning electron microscope. In: *Scientific American* 226 (1972), S. 54–69
- [15] HAYAT, M. A.: *Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy*. University Park Press, Baltimore, 1978
- [16] HEUSER, J.: Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy. In: *Trends in Biochemical Science* 6 (1981), S. 64–68
- [17] FRESHNEY, R. I.: *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*. Liss, New York, 1987

- [18] HERZENBERG, L. A. ; SWEET, R. G.: Fluorescence-activated cell sorting. In: *Scientific American* 243 (1976), S. 108–116
- [19] COOPER, T. G.: *The Tools of Biochemistry*. Wiley, New York, 1977
- [20] DUVE, C. de ; BEAUFAY, H.: A short history of tissue fractionation. In: *Journal of Cell Biology* 91 (1981), S. 293–299
- [21] SHEELER, P.: *Centrifugation in Biology and Medicine Science*. Wiley, New York, 1981
- [22] MORRE, D. J. ; HOWELL, K. E. ; COOK, G. M. W. ; EWANS, W. H.: *Cell free Analysis of Membrane Traffic*. Liss, New York, 1986
- [23] RACKER, E.: *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*. Academic Press, New York, 1976
- [24] DEAN, P. D. G. ; JOHNSON, W. S. ; MIDDLE, F. A.: *Affinity Chromatography: A Practical Approach*. IRL Press, Arlington, 1985
- [25] GILBERT, M. T.: *High Performance Liquid Chromatography*. John Wright–PSG, Littleton, 1987
- [26] ANDREWS, A. T.: *Electrophoreses*. 2nd. Clarendon Press, Oxford, 1986
- [27] HAMES, B. D. ; RICKWOOD, D.: *Gel Electrophoreses of Proteins: A Practical Approach*. 2nd. Oxford University Press, New York, 1990
- [28] CELIS, J. E. ; BRAVO, R.: *Two-Dimensional Gel Electrophoreses of Proteins*. Academic Press, New York, 1984
- [29] O'FARRELL, P. H.: High-resolution two-dimensional electrophoreses of proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 250 (1975), S. 4007–4021
- [30] COOKE, R. M. ; CAMBELL, I. D.: Protein structure determination by nuclear magnetic resonance. In: *Bioessays* 8 (1988), S. 52–56
- [31] SHULMAN, R. G.: NMR spectroscopy of living cells. In: *Scientific American* 248 (1983), S. 86–93
- [32] WÜTHRICH, K.: Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Science* 243 (1989), S. 45–50
- [33] SLATER, R. J.: *Radioisotopes in Biology: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 1990
- [34] TSIEN, R. Y.: Fluorescent probes of cell signalling. In: *Annual Review of Neuroscience* 12 (1989), S. 227–253
- [35] NEHER, E. ; CAHALAN, M.: Patch Clamp Techniques: An Overview. In: *Methods in Enzymology* 207 (1992), S. 3ff.
- [36] NEHER, E.: Ion channels for communications between and within cells. In: *Science* 256 (1992), S. 498–502
- [37] AUERBACH, A. ; SACHS, F.: Patch clamp studies of single ionic channels. In: *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 13 (1984), S. 269–302
- [38] BASHFORD, C. L.: The measurement of membrane potential using optical indicators. In: *Bioscience Reports* 1 (1981), S. 183–196

- [39] UHL, B.: Rapid alterations in the plasma membrane structure of macrophages stimulated with bacterial lipopeptides. In: *European Journal of Cell Biology* 58 (1992), S. 90–98
- [40] SAKMANN, B. ; HAMILL, O. P. ; MARTY, A. ; SIGWORTH, F. J.: Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membranes Patches. In: *Pflügers Archiv* 391 (1981), S. 85–100
- [41] NEHER, E. ; SAKMANN, B.: Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik. In: *Spektrum der Wissenschaft* 5 (1992), S. 48
- [42] BRAY, D.: Intracellular signalling as a parallel distributed process. In: *Journal of Theoretical Biology* 143 (1990), S. 215–231
- [43] KRAUS, M. ; BAUMANN, W. ; BRISCHWEIN, M. ; EHRET, R. ; LEROUX, C. ; WOLF, B.: Biosensoren mit zellulären Systemen. In: *Bioscope I* (1993), S. 24–33
- [44] BERRIDGE, M. J.: Minireview: Calcium oscillations. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (1990), S. 9583–9586
- [45] DUPONT, G. ; GOLDBETER, A.: Oscillations and waves of cytosolic calcium: Insights of theoretical models. In: *BioEssays* 14 (1992), S. 485–493
- [46] BERRIDGE, M. J. ; IRVINE, R. F.: Inositol phosphates and cell signalling. In: *Nature* 341 (1989), S. 197–205
- [47] MEYER, T. ; STRYKER, L.: Calcium Spiking. In: *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 20 (1991), S. 153–174
- [48] NISHIZUKA, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. In: *Nature* 308 (1984), S. 693–698
- [49] DEUEL, T. F.: Polypeptide growth factors: Roles in normal and abnormal cell growth. In: *Annual Review of Cellular Biology* 3 (1987), S. 443–492
- [50] KRAUS, M. ; WOLF, B.: *Structured Biological Modelling: A new Approach to Biophysical Cell Biology*. CRC Press, Boca Raton, 1995
- [51] CANTLEY, L. C. ; AUGER, K. R. ; CARPENTER, C. ; DUCKWORTH, B. ; GRAZIANI, A. ; KAPPELLER, R. ; SOLTOFF, S.: Oncogenes and signal transduction. In: *Cell* 64 (1991), S. 281–302
- [52] BUNDESAMT, Statistisches: *Todesursachen 2006 Deutschland*. Pressemitteilung Nr. 385 vom 21.09.2007
- [53] KRAUS, M.: *Strukturierte Biologische Modellierung: Eine systematische Methode zur strukturierten Analyse, Modellierung und Simulation zellbiologischer Systeme*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., Diss., 1993
- [54] WOLF, B. ; THOMPSON, J. ; KLEIST, S. von: Ultrastructural localisation of carcinoembryonic antigen in a continuous human tumour cell line (LS 174T) in relation to morphometric investigations. In: *Anticancer Research* 4 (1984), S. 213–220
- [55] WOLF, B. ; HAUSCHILDT, S. ; DINGER, V. ; LÄMMLIN, C.: Histochemical applications of electron energy loss spectroscopy on ultrathin cryosections. In: *European Journal of Microscopy and Analysis* 1 (1991), S. 17–20
- [56] LOWE, C. R.: Biosensors. In: *Journal of Chromatography* 22 (1990), S. 347–354

- [57] HALL, E. A. H.: *Biosensoren*. Springer Verlag, Berlin, 1995
- [58] C.HUGHES, R. ; RICCO, A. J. ; BUTLER, M. A. ; MARTIN, S. J.: Chemical Microsensors. In: *Science* 254 (1991), S. 74–80
- [59] SUZUKI, H. ; SUGAMA, A. ; KOJIMA, N.: Miniature Clark-type Oxygen Electrode with a Three-electrode Configuration. In: *Sensors and Actuators B* 2 (1990), S. 297–301
- [60] BERGFELD, P. ; HAL, R. E. G. ; EIJKEL, J. C. T.: The remarkable similarity between the acid-base properties of ISFETs and proteins and the consequence for the design of ISFET biosensors. In: *Biosensors & Bioelectronics* 10 (1994), S. 405–414
- [61] SCHMIDT, H. L. ; KITSTEINER-EBERLE, R.: Biosensoren. In: *Naturwissenschaften* 73 (1986), S. 314–321
- [62] NYLANDER, C.: Chemical and biological sensors. In: *Journal of Physics E: Scientific Instruments* 18 (1985), S. 736–750
- [63] SCHULTZ, J. S.: Biosensoren. In: *Spektrum der Wissenschaft* 10/1991 (1991), S. 100–106
- [64] SETHI, R. S.: Transducer aspects of biosensors. In: *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994), S. 243–264
- [65] BYFIELD, M. P. ; ABUKNESHA, R. A.: Biochemical aspects of biosensors. In: *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994), S. 373–400
- [66] BRISCHWEIN, M. H.: *Entwicklung und Charakterisierung von Biosensor-Systemen mit immobilisierten Zellen und Geweben*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., Diss., 1997
- [67] JAIN, K. K.: *Biochips and Microarrays: Technology and commercial potential*. Pharmaceuticals Industry Report, Informa Pharmaceuticals, London, 2000
- [68] HALL, E. A. H.: Minireview: recent Progress in biosensor development. In: *International Journal of Biochemistry* 20 (1988), S. 357–362
- [69] LOWE, C. R.: An introduction to the concepts and technology of biosensors. In: *Biosensors* 1 (1985), S. 3–16
- [70] SCHELLER, F. ; SCHUBERT, F.: *Biosensoren*. Birkhäuser Verlag, Basel, 1989
- [71] SCHMIDT, R. D. ; BILITEWSKI, U.: Biosensoren. In: *Chemie in unserer Zeit* 26 (1992), S. 163–173
- [72] GRUBER, D. S. ; DIAMOND, J. M.: *Automated biomonitoring. Living sensors as environmental monitors*. Ellis Horwood, Chichester, 1988
- [73] WIJESURIYA, D. C. ; RECHNITZ, G. A.: Biosensor based on plant and animal tissues. In: *Biosensors & Bioelectronics* 8 (1993), S. 155–160
- [74] BUCH, R. M. ; RECHNITZ, G. A.: Intact chemoreceptor-based biosensors: Responses and analytical limits. In: *Biosensors & Bioelectronics* 4 (1989), S. 215–230
- [75] FISHMAN, H. A. ; ORWAR, O. ; SCHELLER, R. H. ; ZARE, R. N.: Identification of receptor ligands and receptor subtypes using antagonists in capillary electrophoresis single-cell biosensor separation system. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (1995), S. 7877–7881

- [76] PIZZICONI, V. B. ; PAGE, D. L.: A cell-based immunobiosensor with engineered molecular recognition. In: *Biosensors & Bioelectronics* 12 (1997), S. 287–299 and 457–466
- [77] BRAND, R. ; GHAZZI, M. N. ; ROLFES-CURL, A. ; CANTOR, H. C. ; MIDGLEY, R.: Continuous on-line hydrogen ion monitoring to study flow dynamics of perfusion systems and cellular metabolism. In: *American Journal of Physiology* 266 (1994), S. 739–749
- [78] BERGVELD, P.: Development of an Ion-Sensitive Solid State Device for Neurophysiological Measurements. In: *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-17 (1970), S. 70–71
- [79] BERGVELD, P.: The Operation of an ISFET as an Electronic Device. In: *Sensors and Actuators* 1 (1981), S. 17–29
- [80] BERGVELD, P. ; ROOIJ, N.F. D.: The History of Chemically Sensitive Semiconductor Devices. In: *Sensors and Actuators* 1 (1981), S. 5–15
- [81] BERGVELD, P.: Thirty years of ISFETOLOGY - What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. In: *Sensors and Actuators B* 88 (2003), S. 1–20
- [82] BERGVELD, P. ; SIBBALD, A.: *Analytical and Biomedical Applications of Ion-Selective Field-Effect Transistors*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1988
- [83] CANE, C. ; GÖTZ, A. ; A.MERLOS ; GRACIA, I. ; ERRACHIDV, A. ; LOSANTOS, P. ; LORATAMAYO, E.: Multilayer ISFET membranes for microsystems applications. In: *Sensors and Actuators B* 35-36 (1996), S. 136–140
- [84] MÜLLER, E.: *Ionensensitive Feldeffekttransistoren mit integrierten CMOS-Schaltungskomponenten zur Signalaufbereitung*, TU-München, Diss., 1993
- [85] NÄHBAUER, A.: *Biosensoren auf Basis von Feldeffekttransistoren*, TU-München, Diss., 1988
- [86] P., Schroth: *Biosensoren Auf der Basis Von Halbleiter-Feldeffektstrukturen mit Angekoppelten Isektenantennen*, Hochschule Aachen, Diss., 2000
- [87] LEHMANN, M.: *Halbleitersensoren für multiparametrische Zellanalysen*, Universität Rostock, Diss., 2002
- [88] MIKOLAJICK, T.: *Feldeffektsensoren zur pH-Wert-Messung und als Transducer für Biosensoren*, Universität Erlangen-Nürnberg, Technische Fakultät, Diss., 1996
- [89] BAUMANN, W. H.: *Entwicklung eines Meßsystems zur zellulären Signalanalyse auf der Basis von Feldeffekttransistoren*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Diss., 1996
- [90] BAUMANN, W.H. ; LEHMANN, M. ; SCHWINDE, A. ; EHRET, R. ; BRISCHWEIN, M. ; WOLF, B.: Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. In: *Sensors and Actuators B* 55 (1999), S. 77–79
- [91] LEHMANN, M. ; BAUMANN, W. ; BRISCHWEIN, M. ; EHRET, R. ; KRAUS, M. ; SCHWINDE, A. ; BITZENHOFER, M. ; FREUND, I. ; WOLF, B.: Non-invasive measurement of cell membrane associated proton gradients by ion-sensitive field effect transistor arrays for microphysiological and bioelectrical applications. In: *Biosensors & Bioelectronics* 15 (2000), S. 117–124
- [92] LEHMANN, M. ; BAUMANN, W. ; BRISCHWEIN, M. ; GAHLE, H.J. ; FREUND, I. ; EHRET, R. ; DRECHSLER, S. ; PALZER, H. ; KLEINTGES, M. ; SIEBEN, U. ; WOLF, B.: Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET. In: *Sensors and Actuators B* 16 (2001), S. 195–203

- [93] HAFEMANN, D. G. ; PARCE, J. W. ; MCCONNELL, H. M.: Light-Addressable Potentiometric Sensor for Biochemical Systems. In: *Science* 240 (1988), S. 1182–1185
- [94] VERZELLESI, G. ; COLALONGO, L. ; PASSERI, D. ; MARGESIN, B. ; RUDAN, M. ; SONCINI, G. ; CIAMPOLINI, P.: Numerical analysis of ISFET and LAPS devices. In: *Sensors and Actuators B* 44 (1997), S. 402–408
- [95] ENGSTRÖM, O. ; CARLSSON, A.: Scanned light pulse technique for the investigation of insulator-semiconductor interfaces. In: *Journal of Applied Physics* 54 (1983), S. 5245–5251
- [96] STEIN, B. ; GEORGE, M. ; GAUB, H. E. ; BEHREND, J. C. ; PARAK, W. J.: Spatially resolved monitoring of cellular metabolic activity with a semiconductor-based biosensor. In: *Biosensors & Bioelectronics* 18 (2003), S. 31–41
- [97] MCCONNELL, H. M. ; OWICKI, J. C. ; PARCE, J. W. ; MILLER, D. L. ; BAXTER, G. T. ; WADA, H. G. ; PITCHFORD, S.: The Cytosensor Microphysiometer: Biological applications of silicon technology. In: *Science* 257 (1992), S. 1906–1912
- [98] OWICKI, J. C. ; BOUSSE, L. J. ; HAFEMAN, D. G. ; KIRK, G. L. ; OLSEN, J. D. ; WADA, H. G. ; PARCE, J. W.: The light-addressable potentiometric sensor: principles and biological applications. In: *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structures* 23 (1994), S. 87–113
- [99] METZGER, R. ; HAWLITSCHKE, G.: Das Cytosensor-Microphysiometer. In: *BioTec* 1 (1993), S. 30–33
- [100] ROBIOLIO, M. ; RUMSEY, W. L. ; WILSON, D. F.: Oxygen diffusion and mitochondrial respiration in neuroblastoma cells. In: *American Journal of Physiology* 256 (1993), S. 1207–1213
- [101] WILSON, D. F. ; VINOGRADOV, S. ; LO, L. W. ; HUANG, L.: Oxygen dependent quenching of phosphorescence: A status report. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 388 (1996), S. 101–107
- [102] CLARK, L. C. ; WOLF, R. ; GRANGER, D. ; TAYLOR, Z.: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. In: *Journal of Applied Physiology* 6 (1953), S. 189–193
- [103] SCHLAGE, W. K. ; BEREITER-HAHN, J.: A microscope perfusion respirometer for continuous respiration measurement of cultured cells during microscopic observation. In: *Microscopica Acta* 87 (1983), S. 19–34
- [104] PETERSON, A. ; WALUM, E.: Use of a perfusion technique for measurements of respiratory activity in cultured cells. In: *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 21 (1985), S. 622–626
- [105] YAMADA, T. ; YANG, J. J. ; RICCHIUTI, N. V. ; SERAYDARIAN, M. W.: Oxygen consumption of mammalian myocardial cells in culture: Measurements in beating cells attached to the substrate of the culture dish. In: *Analytical Biochemistry* 145 (1985), S. 302–307
- [106] WOLFF, M. ; FANDREY, J. ; JELKMANN, W.: Microelectrode measurements of pericellular pO₂ in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures. In: *American Journal of Physiology* 265 (1993), S. 1266–1270
- [107] WEISS, S. ; JOHN, G. T. ; KLIMANT, I. ; HEINZLE, E.: Modeling of Mixing in 96-Well Microplates Observed with Fluorescence Indicators. In: *Biotechnology Progress* 18 (2002), S. 821–830

- [108] JOHN, G. T. ; HEINZLE, E.: Quantitative Screening Method for Hydrolases in Microplates Using pH Indicators: Determination of Kinetic Parameters by Dynamic pH Monitoring. In: *Biotechnology and Bioengineering* 72 (2001), S. 620–627
- [109] JOHN, G. T. ; GOELLING, D. ; KLIMANT, I. ; SCHNEIDER, H. ; HEINZLE, E.: pH-Sensing 96-well microtitre plates for the characterization of acid production by dairy starter cultures. In: *Journal of Dairy Research* 70 (2003), S. 327–333
- [110] FOSTER, K. R. ; SCHWAN, H. P.: Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review. In: *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 17 (1989), S. 25–104
- [111] PETHIG, R.: *Dielectric and electronic properties of biological materials*. J. Wiley & Sons, New York, 1979
- [112] COLE, K. S.: Membranes, Ions and Impulses: A Chapter of Classical Biophysics. (1968)
- [113] HÖBER, R.: Eine Methode, die elektrische Leitfähigkeit im Inneren von Zellen zu messen. In: *Pflügers Archiv für Physiologie* 133 (1910), S. 237–253
- [114] PLIQUETT, F. ; WUNDERLICH, S.: Investigations of changes in membranes of erythrocytes by impedance spectroscopy. In: *Studia Biophysica* 134 (1989), S. 73–76
- [115] METANGUIHAN, R. M. ; KONSTANTINOV, K. B. ; YOSHIDA, T.: Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells. In: *Bioprocess Engineering* 11 (1994), S. 213–222
- [116] GIAEVER, I. ; KEESE, C. R.: A morphological biosensor for mammalian cells. In: *Nature* 366 (1993), S. 591–592
- [117] GIAEVER, I. ; KEESE, C. R.: Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electrical field. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (1984), S. 3761–3764
- [118] HARRIS, C. M. ; KELL, D. B.: The estimation of microbial biomass. In: *Biosensors* 1 (1985), S. 17–84
- [119] PALMQVIST, E. ; KRITZ, C. B. ; KHAYYAMI, M. ; DANIELSSON, B. ; LARSSON, P.-O. ; MOSBACH, K. ; KRIZ, D.: Development of a simple detector for microbial metabolism, based on a polypyrrole dc resistometric device. In: *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994), S. 551–556
- [120] HAGEDORN, R. ; FUHR, G. ; LICHTWARDT-ZINKE, K. ; RICHTER, E. ; HORNUNG, J. ; VOIGHT, A.: Characterization of cell movement by impedance measurement on fibroblasts grown on perforated Si-membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1269 (1995), S. 211–232
- [121] EHRET, R. ; BAUMANN, W. ; BRISCHWEIN, M. ; SCHWINDE, A. ; STEGBAUER, K. ; WOLF, B.: Monitoring of cellular behaviour by impedance measurement on interdigitated electrode structures. In: *Biosensors & Bioelectronics* 12 (1997), Nr. 1, S. 29–41
- [122] EHRET, R. ; BAUMANN, W. ; BRISCHWEIN, M. ; SCHWINDE, A. ; WOLF, B.: On-Line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. In: *Medical & Biological Engineering & Computing* 36 (1998), S. 365–370
- [123] EHRET, R.: *Zelluläre Sensorik mit Interdigitalen Elektrodenstrukturen für die biomedizinische Forschung*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Diss., 1996
- [124] FOA, C.: Electron microscopical analysis of cell adhesion. In: *Studying cell adhesion; Springer Verlag, Berlin* (1994), S. 219–250

- [125] CURTIS, A. S. G.: Interference reflection microscopy and related microscopies and cell adhesion. In: *Studying cell adhesion; Springer Verlag, Berlin* (1994), S. 185–193
- [126] GINGELL, D.: Advances towards the measurement of cell contacts with surfaces at near nanometer vertical resolution by means of total internal reflection fluorescence. In: *Studying cell adhesion; Springer Verlag, Berlin* (1994), S. 195–218
- [127] FROMHERZ, P. ; VETTER, T.: Cable properties of arborized retzius cells in the leech in culture as probed by a voltage-sensitive dye. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (1992), S. 2041–2045
- [128] BEACH, M. J. ; MCGAHREN, E. D. ; XIA, J. ; DULING, B. R.: Ratiometric measurement of endothelial depolarization in arterioles with a potential-sensitive dye. In: *American Journal of Physiology* 270 (1996), S. 2216–2227
- [129] BRÄUNER, T. ; HÜLSER, D. F. ; STRASSER, R. J.: Comparative measurements of membrane-potential with microelectrodes and voltage-sensitive dyes. In: *Biochimica et Biophysica acta* 771 (1984), S. 208–216
- [130] CHARPENTIER, F. ; LEGATO, M. J. ; STEINBERG, S. F. ; COHEN, I. S. ; ROSEN, M. R.: Beta-adrenergic modulation of Na-K-pump activity in young and adult canine cardiac purkinje fibers. In: *American Journal of Physiology* 271 (1996), S. 706–712
- [131] FROMHERZ, P. ; STETT, A.: Silicon-neuron junction: Capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip. In: *Physical Review Letters* 71 (1995), S. 1670–1673
- [132] GROSS, G. W. ; RIESKE, E. ; KREUTZBERG, G. W. ; MEYER, A.: A new fixed-array multi-electrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. In: *Neuroscience Letters* 6 (1977), S. 101–105
- [133] GROSS, G. W. ; RHOADES, G. K. ; AZZAZY, H. M. E. ; WU, M.-C.: The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors. In: *Biosensors & Bioelectronics* 10 (1995), S. 553–567
- [134] STETT, A. ; EGERT, U. ; GUENTHER, E. ; HOFMANN, F. ; MEYER, T. ; NISCH, W. ; HAEMMERLE, H.: Biological application of multielectrode arrays in drug discovery and basic research. In: *Anal Bioanal Chem* 377 (2003), S. 486–495
- [135] WOLF, B. ; BRISCHWEIN, M. ; OTTO, A. ; WEYH, T. ; KOCH, M. ; MOTRESCU, E. ; GROTHE, H.: Mikrophysiologische Zell-Chip-Systeme für medizinische Diagnostik und pharmazeutische Forschung. In: *Innovationsforum Biosystemtechnik* (2001), S. 127–131
- [136] WOLF, B. ; BRISCHWEIN, M. ; BAUMANN, W. ; EHRET, R. ; KRAUS, M.: Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM). In: *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1997), S. 501–509
- [137] WOLF, B. ; BRISCHWEIN, M. ; BAUMANN, W. ; EHRET, R. ; KRAUS, M.: Microsensor-Aided Measurements of Cellular Signalling and Metabolism on Tumor Cells. The Cell Monitoring System (CMS). In: *Tumor Biology* 19 (1998), S. 374–383
- [138] EHRET, R. ; BAUMANN, W. ; BRISCHWEIN, M. ; LEHMANN, M. ; HENNING, T. ; FREUND, I. ; DRECHSLER, S. ; FRIEDRICH, U. ; HUBERT, M.L. ; MOTRESCU, E. ; KOB, A. ; PALZER, H. ; GROTHE, H. ; WOLF, B.: Multiparametric microsensor chips for screening applications. In: *Fresenius J Anal Chem* 369 (2001), S. 30–35

- [139] WOLF, B. ; KRAUS, M.: pH-abhängige Selbstorganisation von Tumorwachstum und Invasion. In: *Journal of Oncology* 27 (1995), S. 57–71
- [140] HENNING, T. ; BRISCHWEIN, M. ; BAUMANN, W. ; EHRET, R. ; FREUND, I. ; KAMMERER, R. ; LEHMANN, M. ; SCHWINDE, A. ; WOLF, B.: Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay. In: *Anti-Cancer Drugs* 12 (2001), S. 21–32
- [141] BRISCHWEIN, M. ; MOTRESCU, E. R. ; OTTO, A. M. ; CABALA, E. ; GROTHE, H. ; WOLF, B.: Functional Cellular Assays with Multiparametric Silicon Sensor Chips. In: *Lab on a Chip* 3 (2003), S. 234–240
- [142] RESSLER, J. ; GROTHE, H. ; BRISCHWEIN, M. ; WOLF, B.: Impedanzsensorgestützte 24-Well-Platte für zellbasierte Diagnostik und zelluläres Screening. In: *Dresdner Beiträge zur Sensorik* 20 (2003), S. 243–246
- [143] CHANGA, S.-Ch. ; PEREIRA-RODRIGUES, N. ; HENDERSON, J. R. ; COLE, A. ; BEDIQUI, F. ; MCNEIL, C. J.: An electrochemical sensor array system for the direct, simultaneous in vitro monitoring of nitric oxide and superoxide production by cultured cells. In: *Biosensors & Bioelectronics* 21 (2005), S. 917–922
- [144] SOLLY, K. ; WANG, X. ; XU, X. ; STRULOVICI, B. ; ZHENG, W.: Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays. In: *Assay and Drug Development Technologies* 2 (2004), S. 363–372
- [145] ABASSI, Y. A. ; JACKSON, J. A. ; ZHU, J. ; OCONNEL, J. ; WANG, X. ; XU, X.: Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectrode cell sensor arrays. In: *Journal of Immunological Methods* 292 (2004), S. 195–205
- [146] STEPPER, Ch.: *Entwurf, Herstellung und Charakterisierung von Biosensorchips*, Technische Universität München, Diss., 2005
- [147] *Homepage des Center for Network Neuroscience, University of North Texas. : Homepage des Center for Network Neuroscience, University of North Texas.* www.cnms.org, 2007
- [148] KLEINIG, H. ; SITTE, P.: *Zellbiologie*. 4. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1999
- [149] MADIGAN, M. T. ; MARTINKO, J. M. ; PARKER, J.: *BROCK Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001
- [150] SENGBUSCH, P. v.: *Einführung in die Allgemeine Biologie*. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin, 1977
- [151] RAVEN, P. H. ; EVERT, R. F. ; CURTIS, H.: *Biologie der Pflanzen*. 2. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin, 1987
- [152] SCHLEGEL, H. G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1985
- [153] STRYER, L.: *Biochemie*. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996
- [154] *IUBMB / Nicholson Metabolic Pathway Chart. : IUBMB / Nicholson Metabolic Pathway Chart.* http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/4202/MetabolicPathways_updated.4.19.05.pdf, 2003
- [155] RUFFIEUX, P.-A. ; STOCKAR, U. ; MARISON, I. A.: Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO₂) oxygen uptake rates in animal cell cultures. In: *Journal of Biotechnology* 63 (1998), S. 85–95

- [156] NÄSER, K.-H. ; LEMPE, D. ; REGEN, O.: *Physikalische Chemie für Techniker und Ingenieure*. 19. Auflage. VEB Deutscher Verlag, 1990
- [157] OWICKI, J. C. ; PARCE, J. W.: Biosensors based on the energy metabolism of living cells: The physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. In: *Biosensors & Bioelectronics* 7 (1992), S. 225–272
- [158] KANDEL, E. R. ; SCHWARTZ, J. H. ; JESSEL, T. M.: *Principles of Neural Science*. 4th. McGraw-Hill, New York, 2000
- [159] ADAM, G. ; LÄUGER, P. ; STARK, G.: *Physikalische Chemie und Biophysik*. 4. Auflage. Springer Verlag, Berlin, 2003
- [160] PFÜTZNER, H.: *Angewandte Biophysik*. Springer Verlag, Wien, 2003
- [161] GLASER, R.: *Biophysics*. 4. Auflage. Springer Verlag, Berlin, 2001
- [162] HAMANN, C.H. ; VIELSTICH, W.: *Elektrochemie*. 4. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim, 2005
- [163] GRÜNDLER, P.: *Chemische Sensoren - Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure*. Springer Verlag, Berlin, 2004
- [164] TOGAWA, T. ; TAMURA, T. ; ÖBERG, P. A.: *Biomedical Transducers and Instruments*. CRC Press, Boca Raton, 1997
- [165] WEBSTER, J. G.: *Medical Instrumentation - Application and Design*. 3rd. John Wiley & Sons, 1998
- [166] HAMMER, A. ; HAMMER, K.: *Physikalische Formeln und Tabellen*. 5. Auflage. J. Lindauer Verlag, München, 1992
- [167] SCHAUMBURG, H.: *Werkstoffe und Bauelemente der Elektrotechnik: 3 Sensoren*. Teubner, Stuttgart, 1992
- [168] MÜLLER, R.: *Grundlagen der Halbleiter-Elektronik*. Springer Verlag, Berlin, 1971
- [169] SCHMITT-LANDSIEDEL, D.: *Skript Technische Bauelemente*. Technische Universität München, Lehrstuhl für technische Elektronik, 2003
- [170] MÜLLER, R.: *Bauelemente der Halbleiter-Elektronik*. Springer Verlag, Berlin, 1973
- [171] MATSUA, T. ; ESASHI, M.: Methods of ISFET Fabrication. In: *Sensors and Actuators* 1 (1981), S. 77–96
- [172] SZE, S. M.: *Physics of Semiconductor Devices*. 2nd. John Wiley & Sons, New York, 1981
- [173] NICOLLIAN, E. H. ; BREWS, J. R.: *MOS (Metal Oxide Semiconductor) Physics and Technology*. John Wiley & Sons, New York, 1982
- [174] BLACKBURN, G. F.: Chemically sensitive field effect transistors. In: *A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson (Hrsg.): Biosensors* (1987), S. 481–530
- [175] COBBOLD, R. S. C. ; SIU, W. M.: Basic Properties of the Electrolyte-SiO₂-Si System: Physical and Theoretical Aspects. In: *IEEE Transactions on Electron Devices* 26 (1979), S. 1805–1815
- [176] FUNG, C. D. ; CHEUNG, P. W. ; KO, W. H.: A Generalized Theory of an Electrolyte-Insulator-Semiconductor Field-Effect Transistor. In: *IEEE Transactions on Electron Devices* 33 (1986), S. 8–18

- [177] BOUSSE, L. ; ROOIJ, N. F. ; BERGVELD, P.: Operation of Chemically Sensitive Field-Effect Sensors as a Function of the Insulator-Electrolyte Interface. In: *IEEE Transactions on Electron Devices* 30 (1983), S. 1263–1269
- [178] BOUSSE, L. J.: *The chemical sensitivity of electrolyte/insulator/silicon structures - Fundamentals of ISFET Operation*, Universität Twente, Diss., 1982
- [179] OEHME, F. ; SCHULTER, P.: *Gelöst-Sauerstoff-Sensoren*. Hüthig Verlag, Heidelberg, 1983
- [180] HITCHMAN, M. L.: *Measurement of dissolved oxygen*. John Wiley & Sons, New York, 1978
- [181] LINEK, V. ; VACEK, V. ; SINKULE, J. ; BENES, P.: *Measurement of oxygen by membrane-covered probes*. Ellis Horwood, Chichester, 1988
- [182] BUTLER, J. ; COBBOLD, R.: A multicathode oxygen sensor fabricated using integrated circuit techniques. In: *Digest of papers of the 5th CMBEC, Montreal* (1974)
- [183] SARGENT, B. J. ; GOUGH, D. A.: Design and validation of the transparent oxygen sensor array. In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 38 (1991), S. 476–482
- [184] ROSS, B. ; CAMMANN, K. ; MOKAWA, W. ; ROSPERT, M.: Ultramicroelectrode arrays as transducers for new amperometric oxygen sensors. In: *Sensors and Actuators B* 7 (1992), S. 758–762
- [185] JOBST, G. ; URBAN, G. ; JACHIMOWICZ, A. ; KOHL, F. ; TILADO, O.: Thin-film clark-type oxygen sensor based on novel polymer membrane systems for in vivo and biosensor applications. In: *Biosensors & Bioelectronics* 8 (1993), S. 123–128
- [186] ARQUINT, P.: *Integrated blood gas sensor for pO₂, pCO₂ and pH based on silicon technology*, University of Neuchetal, Switzerland, Diss., 1995
- [187] BAHR, L.: *Evaluierung planarer Sensorstrukturen zur Messung der zellulären Respiration*, Technische Universität München, Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, Diplomarbeit, 2002
- [188] GNAIGER, E. ; FORSTNER, H.: *Polarographic oxygen sensors*. Springer Verlag, Berlin, 1983
- [189] BARD, A. J. ; FAULKNER, L. R.: *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. zweite. John Wiley & Sons, 2001
- [190] NEHER, E. ; SAKMANN, B.: Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. In: *Nature* 260 (1976), S. 799–802
- [191] LIENEWEG, F.: *Handbuch Technische Temperaturmessung*. Vieweg Verlag, Braunschweig, 1976
- [192] WEICHERT, L.: *Temperaturmessung in der Technik - Grundlagen und Praxis*. Lexika-Verlag, Grafenau/Württ, 1976
- [193] SCHRÜFER, E.: Temperaturmessung mit elektrischen Berührungsthermometern. In: *Parat Jahrbuch Meßtechnik, VCH Verlag, Weinheim* (1987), S. 1–46
- [194] SCHRÜFER, E.: *Elektrische Meßtechnik*. 6. Carl Hanser Verlag, München, 1995
- [195] MÜNCH, W. von: *Werkstoffe der Elektrotechnik*. Teubner Verlag, Stuttgart, 1989
- [196] SHUK, P. ; RAMANUJACHARY, K. V. ; GREENBLATT, M.: New metal-oxide-type pH sensors. In: *Solid State Ionics* 86–88 (1996), S. 1115–1120

- [197] KREIDER, K. G. ; TARLOV, M. J. ; CLINE, J. P.: Sputtered thin-film pH electrodes of platinum, palladium, ruthenium and iridium oxides. In: *Sensors and Actuators B* 28 (1995), S. 167–172
- [198] YAO, S. ; WANG, M. ; MADOU, M.: A pH Electrode Based on Melt-Oxidized Iridium Oxide. In: *ECS Journal of The Electrochemical Society* 148 (2001), S. H29–H36
- [199] WU, C. L. ; CHOU, J. C. ; CHUNG, W. Y. ; SUN, T. P. ; HSIUNG, S. K.: Study on SnO₂/Al/SiO₂/Si ISFET with a metal light shield. In: *Materials Chemistry and Physics* 63 (2000), S. 153–156
- [200] BASHIR, R.: Micromechanical cantilever as ultrasensitive pH microsensor. In: *Applied Physics Letters* 81 (2002), S. 16
- [201] SHIN, P. K.: The pH-sensing and light-induced drift properties of titanium dioxide thin films deposited by MOCVD. In: *Applied Surface Science* 214 (2003), S. 214–221
- [202] CHOU, J. C. ; WENG, C. Y.: Sensitivity and hysteresis effect in Al₂O₃ gate pH-ISFET. In: *Materials Chemistry and Physics* 71 (2001), S. 120–124
- [203] CHOU, J. C. ; WENG, C. Y. ; TSAI, H. M.: Study on the temperature effects of Al₂O₃ gate pH-ISFET. In: *Sensors and Actuators B* 81 (2003), S. 152–157
- [204] WIEGRANARQUINT, K.: *Entwicklung elektrochemischer Sensoren zur Bestimmung von Carbonatspezies in Meerwasser*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Diss., 2000
- [205] McMURRAY, H. N. ; DOUGLAS, P. ; ABBOT, D.: Novel thick-film pH sensors based on ruthenium dioxide-glass composites. In: *Sensors and Actuators B* 28 (1995), S. 9–15
- [206] FOG, A. ; BUCK, R. P.: Elektronische semiconducting oxides als pH-Sensoren. In: *Sensors and Actuators* 5 (1984), S. 137–146
- [207] BELGER, S. ; SCHULTE, A. ; SCHUHMAN, W.: pH-Messung mit hoher lateraler Auflösung zur Visualisierung von pH-Modulationen auf Sensoroberflächen mittels SECM. In: *Tagungsband BioSensor Symposium Tübingen* (2001), S. Reg.-Nr. 145
- [208] WANG, M. ; YAO, S. ; MADOU, M.: A long-term stable iridium oxide pH electrode. In: *Sensors and Actuators B* 81 (2002), S. 313–315
- [209] HENDRIKSE, J. ; OLTHUIS, W. ; BERGFELD, P.: A method of reducing oxygen induced drift in iridium oxide pH sensors. In: *Sensors and Actuators B* 53 (1998), S. 97–103
- [210] WANG, M. ; YAO, S.: Carbonate-Melt Oxidized Iridium Wire for pH Sensing. In: *Electroanalysis* 15 (2003)
- [211] BAUR, J. ; SPAINE, T.: Electrochemical deposition of iridium(IV) oxide from alkaline solutions of iridium(III) oxide. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 443 (1998), S. 208–216
- [212] CANE, C. ; GRACIA, I. ; MERLOS, A.: Microtechnologies for pH ISFET chemical sensors. In: *Microelectronics Journal* 28 (1997), S. 389–405
- [213] YATES, D. E. ; HEALY, T. W. ; CHAN, D. ; WHITE, L. R.: Nernstian and Non-Nernstian Potential Differences at Aqueous Interfaces. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry* 80 (1977), S. 57–66
- [214] YATES, D. E. ; LEVINE, S. ; HEALY, T. W.: Site-binding Model of the Electrical Double Layer at the Oxide/Water Interface. In: *Journal of the Chemical Society* 70 (1974), S. 1807–1818

- [215] REDLIN, H.: *Physikalische Untersuchung und technologische Beeinflussung der Langzeitstabilität ionensensitiver Feldeffekttransistoren*, Humboldt-Universität Berlin, Diss., 1987
- [216] GIMMEL, P.: *Ionensensitive Ta₂O₅-Feldeffekttransistoren: Aufbau, Optimierung und Einsatz in der Biosensorik*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Diss., 1991
- [217] DAVIS, J. A. ; JAMES, R. D. ; LECKIE, J. D.: Surface ionization and Complexation at the Oxide/Water Interface. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 63 (1977), S. 481–499
- [218] BRONSTEIN, I. N. ; SEMENDJAJEW, K. A. ; MUSIOL, G. ; MÜHLIG, H.: *Taschenbuch der Mathematik*. 4. Harri Deutsch Verlag, Frankfurt a. M., 1999
- [219] BOOTSMA, G. A. ; ROOIJ, N. F. D. ; SILFHOUT, A. V.: The Solid/Liquid Interface. In: *Sensors and Actuators* 1 (1981), S. 111–136
- [220] ROOIJ, N. F. ; HAEMMERLI, A.: Miniaturized silicon sensor for biomedical applications. In: *Proceedings of VI. Conference of the European Physical Society, Prag* (1984), S. 597–605
- [221] KÖHLER, M.: *pH-ISFET-Strukturen: Herstellung und Untersuchung physikalisch-chemischer Eigenschaften*, Technische Universität Chemnitz, Diss., 1990
- [222] BARABASH, P. R.: *Static and dynamic models of electrolyte/insulator/semiconductor field effect transistors*, University of Toronto, Diss., 1987
- [223] HARAME, D.L. ; BOUSSE, L.J. ; SHOTT, J.D. ; MEINDL, J.D.: Ion-Sensing Devices with Silicon Nitride and Borosilicate Glass Insulators. In: *IEEE Transactions on Electron Devices* 34 (1987), S. 1700–1707
- [224] BOUSSE, L. ; ROOIJ, N. F. ; BERGVELD, P.: The influence of counter-ion adsorption on the ψ_0/pH characteristics of insulator surfaces. In: *Surface Science* 135 (1983), S. 479–496
- [225] DUN, Y. ; YA-DONG, W. ; GUI-HUA, W.: Time-dependent response characteristics of pH-sensitive ISFET. In: *Sensors and Actuators B* 3 (1991), S. 279–285
- [226] WOIAS, P. ; MEIXNER, L. ; AMANDI, D. ; SCHÖNBERGER, M.: Modeling the short time-response of ISFET sensors. In: *Sensors and Actuators B* 24 (1995), S. 211–217
- [227] HEIN, P.: *Ionensensitive Feldeffekttransistoren - Halbleitertechnologie, Entwurf und Verifikation*, Technische Universität München, Diss., 1993
- [228] JAMASB, S. ; COLLINS, S.D. ; SMITH, R.L.: A Physical Model for Threshold Voltage Instability in Si₃N₄-Gate H⁺-Sensitive FET's (pHISFET's). In: *IEEE Transactions on Electron Devices* 45 (1998), S. 1239–1245
- [229] KÜHNHOLD, R. ; RYSSEL, H.: Modeling the pH response of silicon nitride ISFET devices. In: *Sensors and Actuators B* 68 (2000), S. 307–312
- [230] KÜHNHOLD, R.: *Entwurf und Herstellung von integrierten ionensensitiven Feldeffekttransistoren in CMOS-Technologie*, Universität Erlangen-Nürnberg, Diss., 2002
- [231] BOUSSE, L. ; BERGVELD, P.: The role of buried OH-sites in the response mechanism of inorganic-gate-pH-sensitive ISFETs. In: *Sensors and Actuators* 6 (1984), S. 65–78
- [232] LEIMBROCK, W.: *Ionensensitive Feldeffekttransistoren - Untersuchung der Membran- und Sensoreigenschaften*, Technische Universität Karl-Marx-Stadt, Diss., 1990

- [233] NÄHBAUER, A.: *Biosensoren auf der Basis von Feldeffekttransistoren*, Technische Universität München, Diss., 1988
- [234] BOUSSE, L.: Hysteresis in Al₂O₃-gate ISFETs. In: *Sensors and Actuators B 2* (1990), S. 103–110
- [235] MURPHY, D. W. ; CHRISTIAN, P. A.: Solid state electrodes for high energy batteries. In: *Science* 205 (1979), S. 651
- [236] *INA116 Ultra Low Input Bias Current Instrumentation Amplifier. : INA116 Ultra Low Input Bias Current Instrumentation Amplifier.* <http://focus.ti.com/lit/ds/symlink/ina116.pdf>, 1995
- [237] KOLLER, M. R. ; PAPOUTSAKIS, E. T.: Cell adhesion in animal cell culture: Physiological and fluidmechanical implications. In: *Cell adhesion: Fundamentals and Biotechnological Applications, New York* (1995), S. 61–110
- [238] GEDDES, L. A.: *Electrodes and the Measurement of Bioelectric Events*. Wiley, New York, 1972
- [239] BARSOUKOV, E. ; MACDONALD, J. R.: *Impedance Spectroscopy – Theory, Experiment and Applications*. 2nd. Wiley–Interscience, Hoboken, New Jersey, 2005
- [240] PAULY, H. ; SCHWAN, H. P.: Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. In: *Naturforschung* 14b (1959), S. 125–131
- [241] SCHWARZ, G.: A theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution. In: *Journal of Physical Chemistry* 66 (1962), S. 2636–2641
- [242] GROSSE, C. ; FOSTER, K. R.: Permittivity of a suspension of charged spherical particles in electrolyte solution. In: *Journal of Physical Chemistry* 91 (1987), S. 3073–3076
- [243] GROSSE, C. ; FOSTER, K. R.: Influence of the bulk diffusion on the counterion polarisation in a condensed counterion model. In: *Journal of Physical Chemistry* 91 (1987), S. 6415–6417
- [244] KELL, D. B. ; DAVEY, C. R.: Conductimetric and impedimetric devices. In: *Biosensors: A practical approach, Oxford University Press, Oxford* (1990), S. 125–154
- [245] COBBOLD, R. S. C.: *Transducers for Biomedical Measurements: Principles and Applications*. Wiley, New York, 1974
- [246] FERRIS, C. D.: *Introduction to Bioelectrodes*. Plenum, New York, 1974
- [247] SCHWAN, H. P. ; NASTUK, W. L. (Hrsg.): *Physical Techniques in Biological Research: Special Methods. Determination of biological impedances*. Academic Press, New York, 2003. – 323–407 S.
- [248] MCADAMS, E. T. ; LACKERMEIER, A. ; MCLAUGHLIN, J. A. ; MACKEN, D. ; JOISSINET, J.: The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface. In: *Biosensors & Bioelectronics* 10 (1995), S. 67–74
- [249] HILLERINGMANN, U.: *Silizium-Halbleitertechnologie*. Teubner Studienbücher, Leipzig, 1999
- [250] WIEST, J. ; SCHMIDHUBER, M. ; CABALA, E. ; BRISCHWEIN, M. ; GROTHE, H. ; WOLF, B.: Modular, Wireless Bioelectronic Cell Chip System. In: *IFMBE Proceedings* 11 (2005)
- [251] LOB, V. ; GEISLER, T. ; BRISCHWEIN, M. ; UHL, R. ; WOLF, B.: Automated live cell screening system based on a 24-well-microplate with integrated micro fluidics. In: *Medical and Biological Engineering and Computing* (2007)

Publikationen und Preise

Preise:

- **IFMBE Young Investigators's Award**

Die Präsentation des Beitrags mit dem Titel "*24-Well-Microplate with sensors for metabolic, morphologic and electrophysiologic parameters of living cells or tissue*" wurde von der International Federation for Medical and Biological Engineering (IFMBE) am 9. September 2005 auf der 7th International Conference on Cellular Engineering in Seoul mit dem IFMBE Young Investigators's Award ausgezeichnet.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Publikationen:

1. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Impedanzsensorgestützte 24-Well-Platte für zellbasierte Diagnostik und zelluläres Screening
Dresdner Beiträge zur Sensorik, Band 20, 6. Dresdner Sensor-Symposium, 2003, S. 243-246
2. B. Wolf, A. Otto, C. Stepper, C. Amaral, **J. Ressler**:
Tutorial Short Course Bioelectronics: Applications of microstructures in diagnostic and pharmascreening
Fourth IEEE Conference on Nanotechnology, Technische Universität München - Institute for Nanoelectronics, München, 2004
3. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
24-well-plate with integrated multi-parametric bioelectronic sensors for functional cellular screening and automated microscope-aided cell-based assays
Conference Guide 7th MipTec 2004, 2004, p. 98
4. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, M. Remm, B. Wolf:
24-well-plate with integrated multiparametric bioelectronic sensors for functional cellular screening
Abstract Book of The Eight World Congress on Biosensors 2004, 2.5.10
5. **J. Ressler**, H. Grothe, E. R. Motrescu, B. Wolf:
New concepts for chip-supported multi-well-plates: Realization of a 24-well-plate with integrated impedance-sensors for functional cellular screening applications and automated microscope aided cell-based assays
Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, San Francisco, 2004, pp. 2074-2077

6. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Sensor-supported 24-well-plates: Multifunctional tools for biological and biomedical HTS applications
Drug Plus International Magazine, Volume 03, No. 3, September 2004, pp. 19-21
7. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
New Concepts for Chip-Supported Multi-Well-Plates: Realization of a 24-Well-Plate With Integrated Multiparametric Bioelectronic Sensors
Biomedizinische Technik, Band 49, Ergänzungsband 2, Teil 2, 2004, S. 648-649
8. M. Brischwein, B. Wolf, A. Otto, H. Grothe, **J. Ressler**, L.D. Sprague:
Möglichkeiten und Grenzen der Mikrosensortechnologie in zellulärer Diagnostik und Pharmascreening
Tagungsband zum 12. Heiligenstädter Kolloquium Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt 27.9.-29.9.2004, S. 179-186
9. **J. Ressler**, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
24-Well-Microplate with Multi-Parametric Sensors for Functional Cell-Based Assays
Conference Guide 8th MipTec 2005, 2005, p. 54
10. J. Wiest, M. Brischwein, **J. Ressler**, A. M. Otto, H. Grothe, B. Wolf:
Cellular Assays with Multiparametric Bioelectronic Sensor Chips
CHIMIA, Vol. 59, No. 5, 2005, pp. 243-246
11. V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, **J. Ressler**, K. Kaufmann, B. Wolf:
Cell-based assays: Mikrosensorarray-basiertes Screening an lebenden Zellen und Geweben
BioSpektrum Sonderheft Chiptechnologie & RNA in Forschung und Anwendung, 2005, S. 511-512
12. **J. Ressler**, J. Wiest, H. Grothe, M. Brischwein, T. Asmus, K. Wienand, B. Wolf:
Ceramic-Based Multi-Parametric Sensorchip For Cost-Effective Monitoring Of Living Cells Or Tissue
IFMBE Proceedings Volume 10, 2005, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, pp. 37-41
13. **J. Ressler**, J. Wiest, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
24-Well-Microplate With Sensors For Metabolic, Morphologic And Electrophysiologic Parameters Of Living Cells Or Tissue
IFMBE Proceedings Volume 10, 2005, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, pp. 54-58
14. J. Wiest, M. Schmidhuber, **J. Ressler**, A. Scholz, M. Brischwein, B. Wolf:
Cell Based Assays For Diagnostic And Therapy On Multiparametric Biosensor Chips With An Intelligent Mobile Lab
IFMBE Proceedings Volume 10, 2005, 7th International Conference on Cellular Engineering 2005, pp. 29-32
15. **J. Ressler**, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
24-Well-Microplate which is custom-selectable equipped with sensors for metabolic, morphological and electrophysiological parameters of living cells or tissue
Biomedizinische Technik, Volume 50, Supplementary vol. 1, Part 1, 2005, pp. 523-524

16. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Low-cost biosensors: ceramic-based multi-parametric sensorchip for functional screening
Biomedizinische Technik, Volume 50, Supplementary vol. 1, Part 1, 2005, pp. 531-532
17. V. Lob, **J. Ressler**, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
Multiparametric automated screening system for living cells and tissues for measuring cell metabolism and cell morphology in long term studies
Biomedizinische Technik, Volume 50, Supplementary vol. 1, Part 2, 2005, pp. 1601-1602
18. J. Wiest, **J. Ressler**, M. Schmidhuber, A. Scholz, M. Brischwein, B. Wolf:
Intelligent mobile lab for environmental analysis with multiparametric biosensor chips
Conference Guide Medical Biological Defence Conference 2005 by the Bundeswehr Institute of Microbiology, 2005, p. 129
19. **J. Ressler**, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
24-Well-Microplate with sensors for metabolic, morphologic and electrophysiologic parameters of living cells or tissues
IFMBE Proceedings Volume 11, 2005, EMBEC'05, 3rd European Medical and Biological Engineering Conference, IFMBE European Conference on Biomedical Engineering, No. 2030F
20. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Low-cost biosensors: Ceramic-based multi-parametric sensorchip for functional screening
IFMBE Proceedings Volume 11, 2005, EMBEC'05, 3rd European Medical and Biological Engineering Conference, IFMBE European Conference on Biomedical Engineering, No. 2029F
21. M. Brischwein, H. Grothe, A. M. Otto, **J. Ressler**, V. Lob, J. Wiest, B. Wolf:
Möglichkeiten und Grenzen der Mikrosensortechnologie in zellulärer Diagnostik und Pharmascreening
Chemie Ingenieur Technik, Volume 77, Issue 12, 2005, pp. 1975-1979
22. **J. Ressler**, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
24-Well-Microplate mit Sensoren für metabolische und morphologische Parameter von lebenden Zellen
Dresdner Beiträge zur Sensorik, Band 24, 7. Dresdner Sensor-Symposium, 2005, S. 203-206
23. M. Brischwein, T. Geisler, V. Lob, **J. Ressler**, J. Wiest, B. Wolf:
Chip statt Maus: Mikrosensorarrays zur Chemikalienüberprüfung
Nachrichten aus der Chemie, Band 54, Februar 2006, 2006, S. 115-120
24. T. Geisler, **J. Ressler**, H. Harz, B. Wolf, R. Uhl:
Automated Multiparametric Platform for High-Content and High-Throughput Analytical Screening on Living Cells
IEEE Transactions on Automation Science and Engineering, Volume 3, Issue 2, 2006, pp. 169-176
25. B. Wolf, M. Brischwein, H. Grothe, C. Stepper, **J. Ressler**, T. Weyh:
Lab-on-a-chip Systems for Cellular Assays
In: G. Urban (ed.) *BioMEMS*, Springer-Verlag, Dordrecht (NL), 2006, pp. 269-308
26. **J. Ressler**, F. Ilchmann, H. Grothe, M. Brischwein, G. W. Gross, B. Wolf:
Recording of neuronal activity and metabolic parameters with glass-based sensorchips for high content screening
Conference Guide 9th MipTec 2006, 2006, p. 132

27. V. Lob, T. Geisler, **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Multiparametric automated screening system based on a bioelectronic 24-Well-Microplate for living cells and tissues
Conference Guide 9th MipTec 2006, 2006, p. 72
28. J. Wiest, **J. Ressler**, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
Multiparametric electrochemical microsensor chips for measurement of pH, pO₂, impedance and temperature
28th International Exhibition - Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and BiotechnologyACHEMA 2006, 2006, p. 244
29. J. Wiest, T. Stadthagen, M. Schmidhuber, M. Brischwein, **J. Ressler**, U. Raeder, H. Grothe, A. Melzer, B. Wolf:
Intelligent Mobile Lab for Metabolics in Environmental Monitoring
Analytical Letters, Volume 39, Issue 8, 2006, pp. 1759-1771
30. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, T. Asmus, K. Wienand, G. W. Gross, B. Wolf:
Combining the recording of neuronal activity with metabolic parameters: Sensorchips with MEA and integrated sensors for oxygen, pH and temperature
Proceedings MEA Meeting 2006, 5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays, 2006, pp. 157-160
31. F. Ilchmann, **J. Ressler**, J. Meyer, H. Grothe, B. Wolf:
Recording chamber for glass-based sensorchips with MEA and integrated oxygen-, pH- and temperature-sensors
Proceedings MEA Meeting 2006, 5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays, 2006, pp. 222-223
32. **J. Ressler**, H. Grothe, B. Wolf:
The use of Digital Signal Processors (DSPs) in real-time processing of multi-parametric bioelectronic signals
VDE Workshop Biosignalverarbeitung - Impulsgeber der Biomedizinischen Technik, 2006, S. 11
33. V. Lob, T. Geisler, M. Brischwein, **J. Ressler**, B. Wolf:
Multiparametric automated screening system based on a 24-well-microplate for living cells or tissues
IFMBE Proceedings Volume 14, 2006, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, pp. 557-560
34. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Monitoring of Living Cells or Tissue: Multiparametric Sensorchips for High-Content Screening
Biomedizinische Technik - Proceedings Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, 2006
35. **J. Ressler**, H. Grothe, B. Wolf:
Einsatz Digitaler Signalprozessoren (DSPs) in der Echtzeit-Verarbeitung bioanalytischer Signale
Biomedizinische Technik - Proceedings Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, 2006
36. H. Grothe, J. Freyer, M.-C. Amann, B. Wolf, **J. Ressler**:
Single-Chip Tumor-Monitoring System für die radiotherapeutische Intervention
Biomedizinische Technik - Proceedings Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Biomedizinische Technik, 2006

37. M. Brischwein, **J. Ressler**, H. Grothe, D. Schiopu, J. Wiest, B. Wolf:
Mikroelektrodenstrukturen in Dünnschichttechnik für das Monitoring von Stoffwechselaktivitäten
7. Vortragstagung des Arbeitskreises Elektrochemische Analysemethoden der Fachgruppe Analytische Chemie (ELACH 7), 2006, S. 29-32
38. **J. Ressler**, A. Dirscherl, H. Grothe, B. Wolf:
The use of Digital Signal Processors (DSPs) in real-time processing of multi-parametric bioelectronic signals
Biomedizinische Technik, Volume 52, Issue 1, 2007, pp. 143-148
39. B. Wolf, M. Brischwein, V. Lob, **J. Ressler**, J. Wiest:
Cellular Signalling: Aspects for Tumor Diagnosis and Therapy
Biomedizinische Technik, Volume 52, Issue 1, 2007, pp. 164-168
40. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Technologische Entwicklungen im Bereich multiparametrischer Sensorchips für biomedizinische Anwendungen
Proceedings BMT 2007, 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik (DGBMT) im VDE, 2007, No. 48073
41. D. Dill, **J. Ressler**, B. Wolf:
Methoden zur Zell-Zählung mittels digitaler Bildverarbeitung
Proceedings BMT 2007, 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik (DGBMT) im VDE, 2007, No. 48071
42. D. Grundl, J. Wiest, M. Schmidhuber, **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Zellchip-Systeme zur biologischen Grundlagenforschung
Proceedings BMT 2007, 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik (DGBMT) im VDE, 2007, No. 48033

Fachvorträge:

1. Bioelectronics Tutorial: *Applications of microstructures in diagnostic and pharmanalysis*
Fourth IEEE Conference on Nanotechnology 2004, München, 16.08.2004
2. *New concepts for chip-supported multi-well-plates: Realization of a 24-well-plate with integrated multi-parametric bioelectronic sensors*
38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE - BMT 2004, Ilmenau, 24.09.2004
3. *24-Well-Microplate with Multi-Parametric Sensors for Functional Cell-Based Assays*
MipTec 2005, Basel (Schweiz), 11.05.2005
4. *Ceramic-Based Multi-Parametric Sensorchip For Cost-Effective Monitoring Of Living Cells Or Tissue*
7th International Conference on Cellular Engineering 2005, Seoul (Korea), 06.09.2005
5. *Cell Based Assays For Diagnostic And Therapy On Multiparametric Biosensor Chips With An Intelligent Mobile Lab*
7th International Conference on Cellular Engineering 2005, Seoul (Korea), 07.09.2005
6. *24-Well-Microplate which is custom-selectable equipped with sensors for metabolic, morphological and electrophysiological parameters of living cells or tissue*

39th Annual Congress of the German Society for Biomedical Engineering and 14th International Conference of Medical Physics, Nürnberg, 15.09.2005

7. *Low-cost biosensors: ceramic-based multi-parametric sensorchip for functional screening*
39th Annual Congress of the German Society for Biomedical Engineering and 14th International Conference of Medical Physics, Nürnberg, 15.09.2005
8. *24-Well-Microplate with sensors for metabolic, morphologic and electrophysiologic parameters of living cells or tissues*
EMBEC'05, 3rd European Medical and Biological Engineering Conference and IFMBE European Conference on Biomedical Engineering, Prag (Tschechische Republik), 24.11.2005
9. *The use of Digital Signal Processors (DSPs) in real-time processing of multi-parametric bioelectronic signals*
VDE Workshop Biosignalverarbeitung - Impulsgeber der Biomedizinischen Technik, Potsdam, 13.07.2006
10. *Monitoring of Living Cells or Tissue: Multiparametric Sensorchips for High-Content Screening*
Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2006, Zürich (Schweiz), 08.09.2006
11. *Mikroelektrodenstrukturen in Dünnschichttechnik für das Monitoring von Stoffwechselaktivitäten*
7. Vortragstagung des Arbeitskreises Elektrochemische Analysemethoden der Fachgruppe Analytische Chemie (ELACH 7), Waldheim, 18.09.2006

Wissenschaftliche Poster:

1. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, M. Remm, B. Wolf:
Impedanzsensorgestützte 24-Well-Platte für zellbasierte Diagnostik und zelluläres Screening
6. Dresdner Sensor-Symposium 2003, Dresden, 08.-10.12.03
2. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
24-well-plate with integrated multi-parametric bioelectronic sensors for functional cellular screening and automated microscope-aided cell-based assays
MipTec 2004, Basel (Schweiz), 03.-06.05.04
3. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, M. Remm, B. Wolf:
24-well-plate with integrated multiparametric bioelectronic sensors for functional cellular screening
The Eight World Congress on Biosensors 2004, Granada (Spanien), 25.05.2004
4. **J. Ressler**, H. Grothe, E. R. Motrescu, B. Wolf:
New concepts for chip-supported multi-well-plates: Realization of a 24-well-plate with integrated multiparametric sensors for functional cellular screening applications and automated microscope-aided cell-based assays
26th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 2004, SanFrancisco (USA), 05.09.2004
5. M. Brischwein, **J. Ressler**, V. Lob:
Cell-Based Assays with Multiparametric Sensor Arrays
Screening Europe 2005, Genf (Schweiz), 14.-16.02.05

6. **J. Ressler**, J. Wiest, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe and B. Wolf:
24-Well-Microplate With Sensors For Metabolic, Morphologic And Electrophysiologic Parameters Of Living Cells Or Tissue
7th International Conference on Cellular Engineering 2005, Seoul (Korea), 06.-09.09.2005
7. V. Lob, **J. Ressler**, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
Multiparametric automated screening system for living cells and tissues for measuring cell metabolism and cell morphology in long term studies
39th Annual Congress of the German Society for Biomedical Engineering and 14th International Conference of Medical Physics, Nürnberg, 14.-17.09.05
8. V. Lob, **J. Ressler**, J. Wiest:
Live Cell Screening with Ceramic Based Multiwell Microsensor Chips
Mikrosystemtechnik Kongress 2005, Freiburg, 10.-12.10.05
9. J. Wiest, **J. Ressler**, M. Schmidhuber, A. Scholz, M. Brischwein, B. Wolf:
Intelligent mobile lab for environmental analysis with multiparametric biosensor chips
Medical Biological Defence Conference 2005 by the Bundeswehr Institute of Microbiology, München, 26.-27.10.05
10. **J. Ressler**, J. Wiest, H. Grothe, M. Brischwein, T. Asmus, K. Wienand and B. Wolf:
Low-cost biosensors: Ceramic-based multi-parametric sensorchip for functional screening
EMBEC'05, 3rd European Medical and Biological Engineering Conference and IFMBE European Conference on Biomedical Engineering, Prag (Tschechische Republik), 24.11.2005
11. **J. Ressler**, V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, B. Wolf:
24-Well-Microplate mit Sensoren für metabolische und morphologische Parameter von lebenden Zellen
7. Dresdner Sensor-Symposium 2005, Dresden, 12.-14.12.05
12. **J. Ressler**, F. Ilchmann, H. Grothe, M. Brischwein, G. W. Gross, B. Wolf:
Recording of neuronal activity and metabolic parameters with glass-based sensorchips for high content screening
9th MipTec 2006, Basel (Schweiz), 08.-11.05.06
13. V. Lob, T. Geisler, **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Multiparametric automated screening system based on a bioelectronic 24-Well-Microplate for living cells and tissues
9th MipTec 2006, Basel (Schweiz), 09.-11.05.06
14. F. Ilchmann, **J. Ressler**, J. Meyer, H. Grothe, B. Wolf:
Recording chamber for glass-based sensorchips with MEA and integrated oxygen-, pH- and temperature-sensors
MEA Meeting 2006, 5th International Meeting on Substrate-Integrated Micro Electrode Arrays, 2006, Reutlingen, 04.-07.07.06
15. V. Lob, M. Brischwein, H. Grothe, **J. Ressler**, Wolf, B.:
Cell-based assays: Mikrosensorarray-basiertes Screening an lebenden Zellen und Geweben
AK Mikrosysteme für Biotechnologie und Life Sciences, Bremen, 21.-23.06.06
16. **J. Ressler**, H. Grothe, B. Wolf:
Einsatz Digitaler Signalprozessoren (DSPs) in der Echtzeit-Verarbeitung bioanalytischer Signale
Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2006, Zürich (Schweiz), 06.-09.09.06

17. H. Grothe, J. Freyer, M.-C. Amann, B. Wolf, **J. Ressler**:
Single-Chip Tumor-Monitoring System für die radiotherapeutische Intervention
Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik 2006, Zürich (Schweiz), 06.-09.09.06
18. **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Technologische Entwicklungen im Bereich multiparametrischer Sensorchips für biomedizinische Anwendungen
41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE - BMT 2007, Aachen, 26.-29.9.07
19. D. Dill, **J. Ressler**, B. Wolf:
Methoden zur Zell-Zählung mittels digitaler Bildverarbeitung
41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE - BMT 2007, Aachen, 26.-29.9.07
20. D. Grundl, J. Wiest, M. Schmidhuber, **J. Ressler**, H. Grothe, M. Brischwein, B. Wolf:
Zellchip-Systeme zur biologischen Grundlagenforschung
41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE - BMT 2007, Aachen, 26.-29.9.07