

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

**Geheizte elektrochemische Sensoren mit neuartigen
Arbeitselektroden und Heizgeneratoren**

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Rostock**

von:

Dipl.-Chem. Falko Wachholz

geb. am 07.07.1978 in Malchin

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Gerd-Uwe Flechsig

Rostock, April 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0123-8

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2006 bis April 2009 am Institut für Chemie in der Abteilung Technische, Analytische und Umweltchemie an der Universität Rostock.

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. habil. Gerd-Uwe Flechsig, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Fred Lisdat, Technische Fachhochschule Wildau

Datum des Rigorosums: 16. Juni 2009

Datum der Verteidigung: 23. Juni 2009

*Die Theorie an und für sich ist nichts nütze,
als insofern sie uns den Zusammenhang der
Erscheinungen glauben macht.*

(J. W. Goethe, Wilhelm Meisters Wanderjahre)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Privatdozent Dr. Gerd-Uwe Flechsig*, der mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm, durch interessante und herausfordernde Aufgabenstellungen unterstützte und mir die nötige wissenschaftliche Freiheit gewährte.

Herzlichen Dank möchte ich auch an *Heiko Duwensee* richten. Der Gedankenaustausch sowie unsere vielen fachlichen Diskussionen bereicherten meine wissenschaftliche Arbeit. Unsere unkomplizierte und stets freundschaftliche Zusammenarbeit im Fachlichen wie im Privaten, waren mir eine wertvolle Unterstützung.

Herrn *Harald Grabow* danke ich für die vielen lehrreichen Exkurse in die Elektrotechnik/Elektronik, die zahlreichen technischen Zuarbeiten und „Geräte-Noteinsätze“.

Großer Dank gebührt außerdem allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Elektrochemie, die mich begleitet haben, namentlich *Dr. Miriam Adamovski, Dr. Annette-Enrica Surkus, Thomas Reske, Dr. Jörg Peter, Maren Mix, Martin Jacobsen, Hanna Sophia, Anne Walther, Sven Ehlert, Hilal Diab* und *Nick Hartmann* für das freundschaftliche Arbeitsklima, die Unterstützung und vor allem die zumeist fröhliche Zeit, im Labor und auch außerhalb.

Insbesondere Frau *Dr. S. Haack*, aber auch Frau *Sattler* und Frau *Bartenwerfer* danke ich für die reibungslose Zu- und Zusammenarbeit nicht nur während der zu betreuenden Praktika.

Unseren ausländischen Austauschstudentinnen *Katarzyna Biala* und *Magdalena Piekarz* danke ich herzlich für den interessanten kulturellen Austausch und die vielfachen Messungen zur Temperatur-Puls-Amperometrie.

Dank gebührt ebenso der Arbeitsgruppe um Frau *Prof. U. van Rienen*, im Besonderen den Herren *Aleksandar Markovic* und *Nico Mahnke* für die großartige Zusammenarbeit im Zuge der Simulationsrechnungen.

Den Herren *Dr. S. Fiedler*, *R. Schmidt* und *M. Zwanzig* vom IZM Fraunhofer in Berlin danke ich für die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit während der kurzen, jedoch sehr erfolgreichen Aufenthalte an ihrem Institut.

Ebenso möchte ich Herrn *Prof. J. Gimsa* für die wertvolle Zusammenarbeit und Kooperation hinsichtlich der gemeinsamen Publikationen danken.

Meiner Freundin *Simone*, die gleichzeitig eine tolle Kollegin war, möchte ich für ihr Vertrauen, ihre Aufmunterung, die Ablenkung aber auch für das Ertragen meiner Launen, nicht nur während des Schreibens der Arbeit, danken.

Meiner Familie, ganz besonders aber meinen Eltern *Ditmar* und *Elke Wachholz* danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Ohne Euren Rückhalt und Euer Vertrauen wäre so vieles nicht möglich gewesen vielen Dank!

Publikationsliste

Diese Dissertation ist eine Zusammenfassung verschiedener Untersuchungen zur Weiterentwicklung der Technik geheizter Elektroden und ihrer Anwendung auf elektro- und bioanalytische Fragestellungen, die im Zeitraum von Januar 2006 bis April 2009 durchgeführt und veröffentlicht bzw. eingereicht sind:

- I. Wachholz, F., Gimsa, J., Duwensee, H., Grabow, H., Gründler, P., Flechsig, G.-U.; A Compact and Versatile Instrument for Radio Frequency Heating in Nonisothermal Electrochemical Studies; *Electroanalysis* 5, **2007**, 535-540.
- II. Mahnke, N., Markovic, A., Duwensee, H., Wachholz, F., Flechsig, G.-U., van Rienen, U.; Numerically optimized shape of directly heated electrodes for minimal temperature gradients, *Sensors and Actuators B: Chemical* 137, **2009**, 363-369.
- III. Wachholz, F., Biała, K., Piekarz, M., Flechsig, G.-U., Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors, *Electrochemistry Communications* 9, **2007**, 2346-2352.
- IV. Wachholz, F., Duwensee, H., Schmidt, R., Zwanzig, M., Gimsa, J., Fiedler, S., Flechsig, G.-U., Template-free nano-structuring of gold electrodes for sensitive electrochemical biosensors, *Electroanalysis*, **2009** akzeptiert.
- V. Sopha, H., Wachholz, F., Flechsig, G.-U., Cathodic adsorptive stripping voltammetric detection of tRNA by labeling with osmium tetroxide, *Electrochemistry Communications* 10, **2008**, 1614-1616.

Publikation	Beiträge
I	<ul style="list-style-type: none">- Herstellung und Vorbereitung der verschiedenen genutzten symmetrischen und asymmetrischen Elektroden- Durchführung und Auswertung von Experimenten- Mitwirkung beim Verfassen der Schrift, Erstellung ergänzender Materialien
II	<ul style="list-style-type: none">- Vornehmliche Kontaktperson bzgl. chemischer Parametrisierung- Mitwirkung bei zahlreichen Diskussionen während der gesamten Zeit der Simulationen verschiedener Szenarien- Mitwirkung beim Verfassen der Schrift, Erstellung ergänzender Materialien
III	<ul style="list-style-type: none">- Planung, Aufbau und Auswertung der Experimente- Vorbereitung der genutzten Elektroden- Erstellung zugehöriger Abbildungen- Mitwirkung bei Diskussionen und beim Verfassen des Manuskriptes
IV	<ul style="list-style-type: none">- Vorbereitung der benutzten Elektroden- Kooperative Durchführung von Messungen zur Größenbestimmung galvanisch erzeugter Oberflächen und nachfolgender Hybridisierungen- Mitwirkung bei kontextbezogenen Diskussionen und der Erstellung ergänzender Grafiken- Mitverfasser des Manuskripts
V	<ul style="list-style-type: none">- Anleitung von Hanna Sopha während ihrer Diplomarbeit- Betreuung während des Schreibprozesses und der Erstellung wissenschaftlicher Grafiken- Literaturarbeit

Inhaltsverzeichnis

1. ZIELSETZUNG	1
2. EINLEITUNG	3
3. THEORETISCHER TEIL	7
3.1 Das symmetrische Elektrodendesign	8
3.2 Temperaturkalibrierung	11
3.2.1 Temperaturbestimmung mittels des Temperaturkoeffizienten eines reversiblen Redoxpaares	12
3.2.2 Thermographie	14
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	18
4.1 Die symmetrische Drosselschaltung (Publikation 8.1)	18
4.2 Temperaturverteilung an geheizten Elektroden (Publikation 8.2)	21
4.3 Anwendung gepulsten Heizens auf amperometrische Messungen (Publikation 8.3)	23
4.4 Steigerung der Leistungsfähigkeit elektrochemischer Sensoren durch Oberflächenvergrößerung (Publikation 8.4)	24
4.5 Untersuchungen zu den Temperaturkoeffizienten von $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ und $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$	27
4.5.1 Abhängigkeit des Temperaturkoeffizienten von $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ vom Elektrodenmaterial	27
4.5.2 $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ als alternatives Redoxpaar für Temperaturkalibrierungen.....	29
5. AUSBLICK	33
5.1 Detektion redox-markierter tRNA – Voruntersuchungen (Publikation 8.5)	33
6. ZUSAMMENFASSUNG	35
7. LITERATUR	37
8. PUBLIKATIONEN	42

8.1	A Compact and Versatile Instrument for Radio Frequency Heating in Nonisothermal Electrochemical Studies.....	42
8.2	Numerically optimized shape of directly heated electrodes for minimal temperature gradients.....	49
8.3	Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors	57
8.4	Template-free galvanic nano-structuring of gold electrodes for sensitive electrochemical biosensors.....	65
8.5	Cathodic adsorptive stripping voltammetric detection of tRNA by labelling with osmium tetroxide	84

Abkürzungsverzeichnis & Symbole

(ds; ss)DNA	(Doppelstrang-; Einzelstrang-) DNA
(t)RNA	(Transfer)-RNA
μA	Mikroampere
$\mu\text{mol/l}$	Mikromol pro Liter
A	Querschnittsfläche; Arrhenius-Faktor
a(ox),(red)	Aktivität des Oxidationsmittels, Reduktionsmittels
AC / DC	Wechselstrom / Gleichstrom
ASV	Adsorptive Stripping-Voltammetrie
C	Kapazität
CE	Gegenelektrode
CV	Zyklovoltammetrie
D(o), (r)	Diffusionskoeffizient (oxidierte Form), (reduzierte Form)
DPAdSV	Differenz-Puls Adsorptive Stripping Voltammetrie
DPV	Differenz-Puls Voltammetrie
E, E°	Redoxpotential, Standardredoxpotential, Formalpotential
E _{1/2}	Halbstufenpotential
E _A	Aktivierungsenergie
E _p	Peakpotential
F	Faraday-Konstante
Gl.	Gleichung
H	Henry
HMDE	Hängende Quecksilbertropfen-Elektrode
I	Strom
J	Stromdichte
k	Geschwindigkeitskonstante / Boltzmann-Konstante
kHz	Kilohertz

$l / l_{(s)}$	Länge / Länge der Spule
L	Induktivität
LTCC	low temperature co-fired ceramics
M	Mol pro Liter
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
N	Anzahl Windungen
p	Druck
P	Elektrische Leistung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Q	Wärme
R	Ohmscher Widerstand / Universelle Gaskonstante
r	Radius
R^2	Korrelationsfaktor
RE	Referenzelektrode
T	Temperatur
t	Zeit
TPA	Temperatur-Puls Amperometrie
TPV	Temperatur-Puls Voltammetrie
U	Spannung
V	Volt
WE	Arbeitselektrode
X_C	Kapazitiver Widerstand
X_L	Induktiver Widerstand
z, n	Anzahl übergender Elektroden
$\Delta_R G$	Freie Reaktionsenthalpie
$\Delta_R S$	Freie Reaktionsentropie
η	Viskosität
μ_0	Magnetische Feldkonstante
μ_r	Permeabilitätszahl

ρ	Dichte
ω	Kreisfrequenz
Ω	Ohm
ΔE	Potentialdifferenz
ΔT	Temperaturdifferenz
β	Temperaturkoeffizient des Standardelektrodenpotentials

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Grundlegender Aufbau für das direkte elektrische Heizen von Elektroden.	8
Abb. 3.2: Zellenanordnung mit a) asymmetrisch und b) symmetrisch angeschlossener Konfiguration.....	9
Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Wechselspannungsverhältnisse einer elektrisch wechselstromgeheizten symmetrischen Elektrode.	10
Abb. 3.4: Open-circuit Potentiometrie: Temperaturkalibrierung einer Golddrahtelektrode	12
Abb. 3.5: Wärmebild einer symmetrischen, an Luft direkt geheizten LTCC-Elektrode.	15
Abb. 3.6: Idealisierte schematische Darstellung für das Entstehen eines TPV-Voltammogramms.	16
Abb. 4.1: Schematische Zeichnung des Heizstromkreises inklusive der symmetrischen Drosselschaltung.....	18
Abb. 4.2: Vergleich von Methoden für die numerische Berechnung des Temperaturprofils eines geheizten Platindrahtes	21
Abb. 4.3: Zyklovoltammogramme zur Elektrodenoberflächenbestimmung.	26
Abb. 4.4: Untersuchung des Einflusses des Elektrodenmaterials auf den Temperaturkoeffizienten.....	28
Abb. 4.5: Bestimmung des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (gelöst in Wasser) in 0.1 M KClO_4	30
Abb. 4.6: Bestimmung des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (gelöst in 1 M KCl) in 0.1 M KClO_4	30
Abb. 4.7: Bestimmung des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ gelöst und vermessen in NH_3 -Puffer pH 8.2.	31
Abb. 4.8: Original DPV-Graphen der Temperaturkoeffizienten-Bestimmung von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$	32
Abb. 5.1: Signale der DPAdSV von $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -modifizierten Nukleinsäuren in Acetatpuffer.	34

1. Zielsetzung

Die Temperatur, als einer der Freiheitsgrade, hat großen Einfluss auf viele verschiedene chemische Prozesse und spielt deshalb eine wichtige Rolle im Ensemble der Parameter chemischer Reaktionen. Dies gilt ebenso für die Elektrochemie. Zum Beispiel führen erhöhte Temperaturen durch die Beschleunigung von Elektronen-Transferprozessen an der Elektrodenoberfläche oftmals zu höheren Signalen. Eine elegante Methode, höhere Temperaturen an Elektrodenoberflächen zu erzeugen, ist es, diese selbst zu heizen. Dabei gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze: direktes oder indirektes Heizen. Zusätzlich kann das Heizen der Elektroden in zwei Modi erfolgen: kontinuierlich oder gepulst.

Der genetische Code eines Lebewesens ist in dessen DNA gespeichert und identifiziert es individuell. Damit ist die DNA eines der wichtigsten, wenn nicht das wichtigste, Biomolekül überhaupt. Der Nachweis von DNA kann Krankheiten aufgrund von Mutationen offenbaren oder in Form des genetischen Fingerabdruckes zum Beispiel Straftäter überführen. Dabei kommt in zunehmendem Maße auch elektrochemischen Nachweisverfahren Bedeutung zu.

Um effizient und elektrochemisch einwandfrei DNA-Nachweise führen zu können, war es das Ziel die Vorteile bekannter DNA-Analyseverfahren mit den Vorteilen geheizter Elektroden, wie zum Beispiel der thermischen Diskriminierung von Basenfehlpaarungen, zu verknüpfen. Fernziel war es, die Mehrfach-DNA-Detektion auf einem selektiv heizbaren Elektrodenarray zu verwirklichen. Die damit verbundenen Probleme zu lösen, war Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit.

Zunächst musste eine Möglichkeit entwickelt werden, mehrere Elektroden auf engstem Raum selektiv direkt heizen zu können. Die in der Vergangenheit praktizierte Verwendung einer Dreifachkontaktierung der Elektroden zur Verringerung störender Heizwechselstromeinflüsse schied wegen Platzmangels aus und bedurfte der Weiterentwicklung.

Ein Problem bei geheizten Elektroden, die auf einem Array dicht aneinander angeordnet sind, ist die Wärmeverteilung. Um das Aufheizen desselben so gering wie möglich zu

halten, sollte nur so viel Heizleistung wie nötig aufgewendet werden müssen. Deshalb war die Form der auf dem Array angeordneten Elektroden entsprechend zu optimieren.

Einhergehend mit der gewünschten Kleinheit eines Arrays ist, dass auch die Elektroden eine makroskopisch kleine Fläche besitzen, was aber eine Verringerung analytischer Signale zur Folge hat. Deshalb war es wichtig, trotz relativ geringer makroskopischer Fläche der Elektroden eine möglichst große elektrochemisch aktive Fläche zu erzeugen. Sub- oder Mikrostrukturen sollten in diesem Zusammenhang als Mittel der Wahl untersucht werden.

Die bereits erwähnte Möglichkeit des gepulsten Heizens wurde in Form der Temperatur-Puls Voltammetrie in der Arbeitsgruppe Gründler entwickelt. Gepulstes Heizen erlaubt es, kurzzeitig Temperaturen oberhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels zu erreichen und damit dramatische Signalerhöhungen hervorzurufen. Diese Methode ist jedoch aufgrund ihrer Anforderungen an die Geräteeigenschaften relativ komplex. Daher galt es zu untersuchen, ob Temperaturpulse in weniger komplexe Weise auf amperometrische Fragestellungen angewendet werden können. Die spätere Verwendung der Ergebnisse dieser Untersuchungen auf Mehrfachelektroden-Systeme stand hier nicht zwingend im Vordergrund.

Neben DNA ist RNA, als weiteres Biomolekül, ein sehr interessanter Gegenstand der gegenwärtigen Forschung. Als Bestandteil der Replikation und Transkription in Zellen kann es, ebenso wie DNA, Aufschluss über genetisch veranlagte Krankheiten oder Defekte geben. Es sollte daher im Verlaufe dieser Arbeit in Vorversuchen untersucht werden, ob RNA in gleicher Weise wie DNA elektrochemisch markiert und nachgewiesen werden kann.

2. Einleitung

“Die Aufgaben der Analytischen Chemie haben sich im letzten Jahrzehnt stark verändert und erweitert. So ist die Analytische Chemie von einer lediglich retrospektiv betrachtenden zu einer diagnostizierend gestaltenden Wissenschaft geworden und spielt eine immer wichtigere Rolle bei der Charakterisierung und Beschreibung sich ändernder chemischer und biologischer Systeme. Durch diese Aufgaben ist die Analytische Chemie ein gleichberechtigter Partner der Synthetischen Chemie. Die Gesellschaft und die ihr dienende Technik benötigt analytische Aussagen in allen Bereichen der Naturwissenschaften, im Umweltschutz, in der Biologie, Medizin, Pharmazie, Pharmakokinetik, in den Geowissenschaften, in der chemischen und biologischen Prozesskontrolle, den Nahrungswissenschaften, der Forensik und den Materialwissenschaften. Das ganze Gebiet, vor allem das der instrumentellen Analytik, hat sich seit Mitte der 50er Jahre dramatisch verändert. So lösten sich in den letzten ca. 30 Jahren die Instrumentengenerationen in Zyklen von nur 3-4 Jahren ab, und die Fortschritte in der analytischen Forschung, insbesondere Senkung der Nachweisgrenzen, Verkürzung der Analysezeiten z. B. durch Automation, Verbesserung der Analysenqualität, Vereinfachung und Miniaturisierung der Instrumentation brachten technische Verbesserungen im Ausmaß von mindestens einer Größenordnung pro Jahrzehnt.“¹

Dabei kommt der Elektrochemie innerhalb der analytischen Chemie eine nicht zu vernachlässigende Rolle zu. Insbesondere klinische, aber auch prozesskontrollierende Sensoren wären ohne elektrochemische Signalwandlung bzw. Erzeugung undenkbar. Neben Konzentration, Zeit, Potential und Strom ist auch die Temperatur ein wichtiger und fast frei wählbarer Parameter in elektrochemischen Anwendungen und Experimenten.

Üblicherweise werden für die Arbeit bei definierten Temperaturen thermostatierte Messzellen verwendet, in denen die gesamte Analysenlösung inklusive der benötigten Elektroden erhitzt wird. Dies kann zur Zerstörung thermodynamisch instabiler Analyten führen. Die Trennung der Gegen- (CE) und Referenz- (RE) von der Arbeitselektrode

(WE) und ausschließliches Heizen letzterer, kann dem jedoch entgegenwirken. Ein sehr wichtiger Vorteil des Heizens von Elektroden ist kinetischer Natur. Die Erhöhung der Elektrodentemperatur führt nach Arrhenius (vgl. Gl. 2.1) zur Beschleunigung von Elektronenaustauschprozessen und auch zur Erhöhung der Diffusion hin zur und weg von der Elektrodenoberfläche (vgl. Gl. 2.2). Insbesondere die Beschleunigung der Elektrodenreaktion macht es möglich, kinetisch gehemmte Substanzen zu detektieren^{2,3}.

$$(2.1) \text{ Arrhenius-Gleichung: } k = A e^{\frac{E_A}{RT}},$$

mit der Geschwindigkeitskonstanten k , A dem Arrhenius-Faktor, E_A der Aktivierungsenergie und R der universellen Gaskonstanten.

$$(2.2) \text{ Stokes-Einstein Beziehung: } D = \frac{kT}{6\pi\eta r},$$

mit dem Diffusionskoeffizienten D , der Boltzmann-Konstante k , der Viskosität η und dem Radius r der als Kugeln angesehenen Teilchen.

Die Technik geheizter Elektroden hat eine etwa 30-jährige Entwicklungsgeschichte. Erste Anwendungen wurden von Harima et al.⁴ und Gabrielli et al.⁵ etabliert. Störungen im Messsystem beim notwendigen Heizen mit Wechselstrom erforderten jedoch die Weiterentwicklung der benutzten Elektroden. Unter den verschiedenen Ansätzen erscheint die Technik von Gründler et al. am brauchbarsten für das direkte Heizen von Elektroden⁶. Seine Gruppe entwickelte ein symmetrisches Design zum Heizen dünner Drähte (25 μm Durchmesser) und später auch in LTCC-Technik produzierte Elektroden⁷. Details zu den entwickelten Elektroden und ihrer technischen Verwendung, sind in verschiedenen Journalen veröffentlicht^{2,3,8 10}. Die Weiterentwicklung der Heiztechnik durch Hinzufügen oder Modifizieren einzelner Komponenten, die zum Heizen unterschiedlicher Elektrodentypen erforderlich sind, wird Teil dieser Arbeit sein. So wird zum Beispiel eine neuartige Konstruktion, die sogenannte „Drosselschaltung“ eingeführt werden (siehe Kap. 4.1). Des Weiteren wird eine Simulation zur Optimierung der Elektrodenform mit dem Ziel des Erreichens einer homogenen Temperaturverteilung entlang der gesamten Elektrodenoberfläche präsentiert werden (siehe Kap. 4.2).

Der praktische Nutzen geheizter Elektroden ergibt sich aus der Vielzahl der Anwendungsmöglichkeiten zu analytischen Zwecken. Geheizte Elektroden wurden

beispielsweise für ASV-Analysen¹¹ an Bismutfilmelektroden^{12,13}, für amperometrische Messungen in Fließsystemen¹⁴ und in neuester Zeit mit immobilisierten Kohlenstoff-Nanoröhren (carbon nanotubes)^{15,16} als Oberflächenmodifikation für verschiedenste Zwecke verwendet. Eine spezielle Anwendung temperaturabhängiger Messungen ist die Modulation kurzer Heizpulse mit voltammetrischen Messungen, die Voss et al. als Temperatur-Puls Voltammetrie (TPV)^{17,18} einführen. Auf diese Technik wird in Kapitel 3.3 näher eingegangen, da sie als Grundlage für eine in dieser Arbeit neu entwickelte Anwendung Heizpuls-modulierter amperometrischer Messungen fungierte (siehe Kapitel 4.3).

Die Variabilität der Temperatur ist auch in biologischen, mikrobiologischen und biochemischen Systemen von großer Bedeutung. So zeigen zum Beispiel enzymkatalysierte Reaktionen eine sehr starke Temperaturabhängigkeit^{19,21}. Die Funktion oder besser Reaktivität von Enzymen in biologischen aber auch chemischen Systemen erreicht ein Maximum bei definierten und von Enzym zu Enzym unterschiedlichen Temperaturen²². So ist es denkbar, durch definierte Temperaturen und deren Kontrolle enzymkatalysierte Reaktionen nach Wunsch ein- und auszuschalten²³. Auch Hybridisierungs- und Dehybridisierungsereignisse zweier komplementärer DNA-Einzelstränge (ssDNA) zu doppelsträngiger DNA (dsDNA) und zurück sind temperaturabhängig²⁴. Die Funktion der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)²⁵ basiert genau auf dieser Eigenschaft von ssDNA. Die elektrochemische Detektion der Hybridisierung immobilisierter DNA-Sonden mit komplementären redoxaktiven ssDNA-Targetsträngen wurde, auch bei höherer Temperatur, erfolgreich durchgeführt^{26,27}.

Messungen zur Detektion von redoxmarkierten Target-Biomolekülen mittels immobilisierter Sondenmoleküle liefern mit „gewöhnlichen“ Makroelektroden oftmals unzureichend große Signale. Bei gewünschter Miniaturisierung der benutzten Elektroden verschlechtert sich die Situation zusätzlich. Insbesondere bei Nutzung langer DNA-Stränge wie auch Aptamere, um relativ große Biomoleküle wie Enzyme zu detektieren, wirkt sich die kleine Fläche und damit auch geringe Anzahl immobilisierter Sondenmoleküle nachteilig aus. Die Vergrößerung der makroskopischen Oberfläche durch Mikrostrukturen kann hier Abhilfe schaffen. Dieses wurde unter anderem durch Kohlenstoff-Nanoröhren dispergiert in Pastelektroden oder durch Deposition von Kohlenstoff-Nanoröhren Dispersionen erreicht^{28,30}. Gute Ergebnisse bei der

Vergrößerung der aktiven Elektrodenoberfläche wurden durch lithographische Modifikation erzielt³¹⁻³⁴. Der von uns gewählte Ansatz der direkten galvanischen Deposition von Gold auf gewöhnlichen Goldscheibenelektroden zur Vergrößerung der aktiven Elektrodenoberfläche wird in Kapitel 4.4 vorgestellt.

Die direkte Detektion markierter und unmarkierter DNA mittels AdSV ist wohlbekannt. Bis heute ist die Forschung zu diesem Thema nicht abgeschlossen³⁵⁻³⁷. Palecek et al. berichteten bereits im Jahr 1960 über die direkte Detektion von DNA an Quecksilberelektroden³⁸. Sehr vielversprechende Resultate bezüglich der Detektion [OsO₄(bipy)]-markierter DNA-Stränge^{24,39-44} legen die Nutzung dieser redoxaktiven Markierung auch für RNA – einem der wichtigsten biologischen Moleküle – nahe. Als ein richtungsweisender erster Schritt zur Entwicklung eines geheizten elektrochemischen RNA-Sensors wird in dieser Arbeit die Detektion markierter und unmarkierter tRNA in Kapitel 5 vorgestellt.

3. Theoretischer Teil

In den letzten 40-45 Jahren sind verschiedene Techniken zum Heizen von Elektroden entwickelt worden. Beim Einsatz geheizter Elektroden in der Chemie unterscheidet man grundsätzlich 2 Heizmethoden:

Zunächst kann die Arbeitselektrode *indirekt* geheizt werden wie beispielsweise bei Goldfilm- und im Siebdruckverfahren produzierten Platinelektroden^{4,45,46}. Bei dieser Art des Heizens ist der Heizstromkreis galvanisch von der polarisierbaren elektrochemisch aktiven Elektrodenoberfläche getrennt. Das ermöglicht den Einsatz sowohl von Gleichstrom als auch Wechselstrom zum Heizen der Elektrode, da eine zusätzliche Polarisierung der Elektrode durch Gleichstrom nicht stattfinden kann.

Ein weiterer Ansatz des indirekten Heizens von Elektroden ist die Verwendung von Mikrowellen.

So aktivierten unter anderen Compton et al. Elektrodenoberflächen mit Hilfe von Mikrowellenstrahlung^{47,49}. Baranski beschreibt das Heizen der elektrodennahen Lösungsschicht mittels Hochfrequenz (bis zu 2 GHz) mit geringer Intensität. Er erreichte mit üblichen, polierbaren Mikroelektroden Temperaturen weit oberhalb des Siedepunktes (225°C), die über lange Zeit (> 15 min) gehalten werden konnten, ohne dass Blasenentwicklung einsetzte⁵⁰. Zusätzlich zu diesen etablierten Methoden des indirekten Heizens der Elektroden selbst, ihrer Oberflächen oder der sie umgebenden Lösung, ist schließlich die Aktivierung von Elektrodenoberflächen mittels Laserstrahlung, zum Beispiel bei Glaskohle-Elektroden, zu erwähnen⁵¹

Elektroden können aber wie im Folgenden beschrieben - auch *direkt* geheizt werden. Bereits 1966 führten Ducret et al. Experimente zum Heizen von Platindrähten mittel Wechselstrom im Radiofrequenzbereich durch⁵². Erste Versuche der Anwendung von Heizpulsen nahmen Gabrielli et al. an Platindrähten mit einer AC-Frequenz von 250 kHz vor^{5,53}.

3.1 Das symmetrische Elektrodendesign

Eine direkt geheizte Elektrode ist Teil zweier Stromkreise: dem Messstromkreis und dem Heizstromkreis. Eine schematische Darstellung der Anordnung zum direkten Heizen zeigt Abbildung 3.1.

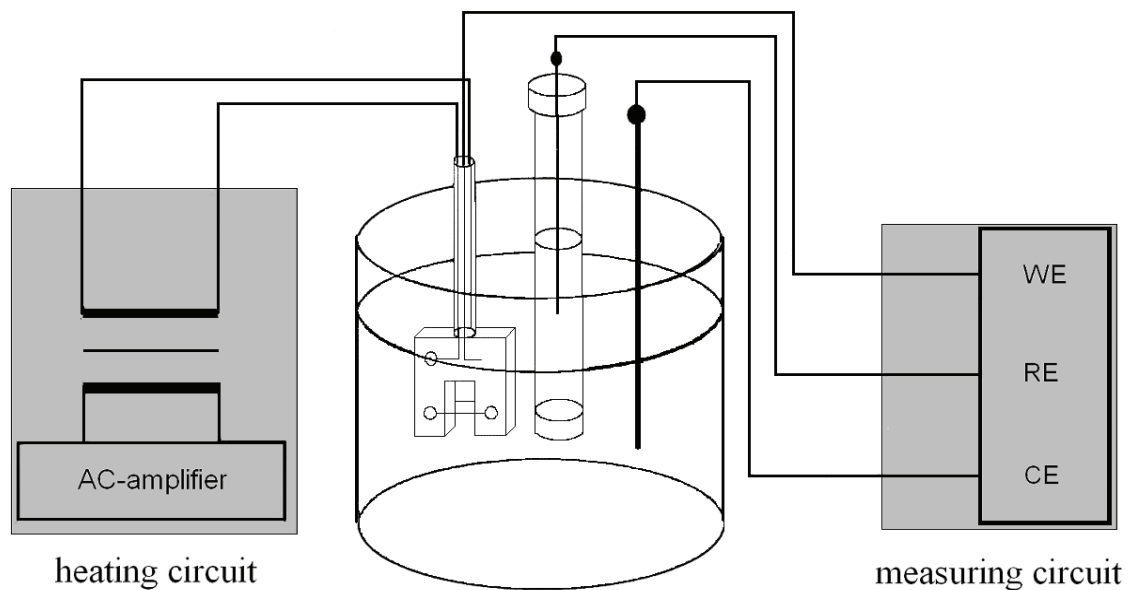


Abb. 3.1: Grundlegender Aufbau für das direkte elektrische Heizen von Elektroden. (basierend auf Jasinski)⁵⁴

Für das direkte Heizen ist der Einsatz von Wechselstrom erforderlich, denn Gleichstrom würde zu einer unerwünschten Polarisierung der Arbeitselektrode führen. Diese wiederum hätte einen elektrochemischen Stoffumsatz zur Folge⁹, welcher letztlich das analytische Ergebnis verfälscht. Allerdings rufen der zwingend einzusetzende Wechselstrom und die notwendige Verbindung beider Stromkreise starke Störungen der Messwertaufnahme hervor. Grund dafür ist die Induktion des Heizwechselstroms, mit Werten im Bereich einiger Ampere und hoher Frequenz, in den elektrochemischen, analytischen Gleichstrom, mit Werten im Bereich weniger μA .

Bedingt durch den Wechselstrom treten entlang der geheizten Elektrode, im einfachsten Fall ein einfacher Draht, sich periodisch ändernde Amplituden auf⁵⁵. Diese wiederum führen zu einer Irritation des sensitiven potentiostatischen Regelkreises. Der Regelkreis interpretiert die Amplituden des Wechselstroms als Störung und damit als Abweichung vom vorgegebenen Wert des Elektrodenpotentials. Daher versucht der Messregelkreis ständig, diese Diskrepanz zu kompensieren, was in einem „overload“ des Potentiostaten endet⁶.

Das symmetrische Kontaktieren der Elektroden, zum Beispiel im Zentrum eines Drahtes wie von Gründler et al. vorgeschlagen, löste das Problem des übersteuernden Potentiostaten^{6,9}. Es musste jedoch eine Bedingung erfüllt sein: der ohmsche Widerstand der zu heizenden Elektrode durfte lediglich im Bereich weniger Ohm liegen⁵⁶. Die Grafik in Abbildung 3.2 zeigt, wie die symmetrische Anordnung der zu heizenden Elektrode in den Gesamtaufbau implementiert wurde.

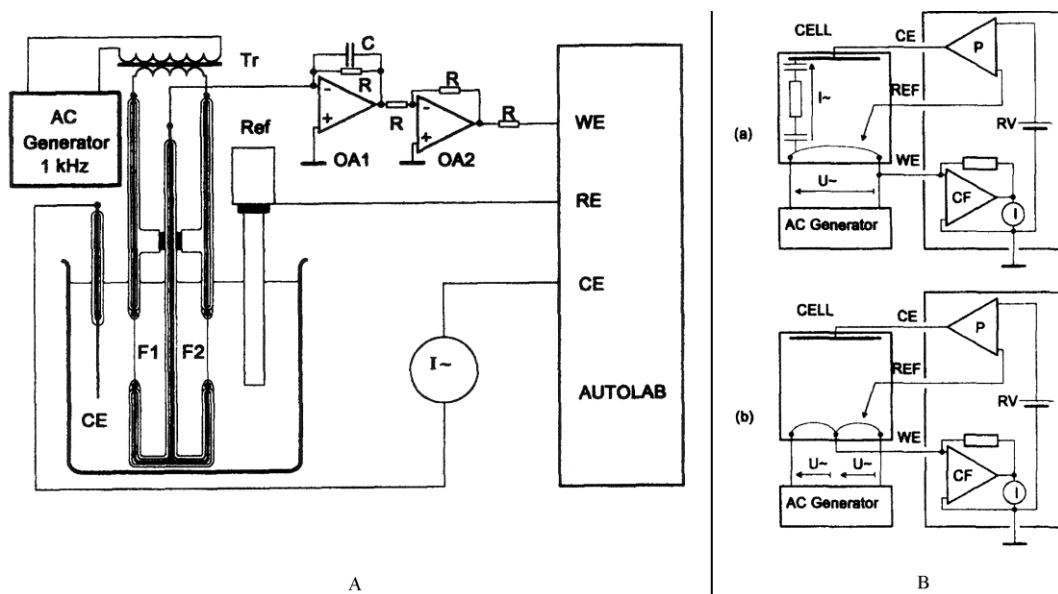


Abb. 3.2: A Zellenanordnung. F1 und F2 WE Hälften. OA1 und OA2 Stromfolger. Tr Übertrager; B Stromkreisdiagramm mit a) asymmetrisch und b) symmetrisch angeschlossene Konfiguration. CF: Stromfolger, P: Potentiostat, RV: Referenzspannung. (entnommen aus Gründler et al.)⁶

Wenn die Elektrode asymmetrisch angeordnet wird, d. h. an einem Ende eines Drahtes kontaktiert ist, so werden alle Punkte des Drahtes durch den Wechselstrom polarisiert; je größer die Entfernung vom Punkt des Anschlusses, desto höher wird die Polarisationsamplitude. Dies führt zu der schon angesprochenen Überlastung des Potentiostaten. Derselbe Effekt mit einer wichtigen Ausnahme tritt bei symmetrischer Anordnung der Elektrode auf.

Dabei wird der Potentiostat im Zentrum des Drahtes angeschlossen und jeder Punkt des Drahtes auf der einen Seite des Mittelanschlusses hat einen Gegenpart auf der anderen Seite des Drahtes – allerdings mit entgegengesetztem Vorzeichen. Das bedeutet, dass sich beide Seiten gegeneinander aufheben und der Wechselstrom an der Elektrodenoberfläche durch Auslöschung nahezu komplett eliminiert wird. Die folgende Graphik 3.3 verdeutlicht dies schematisch.

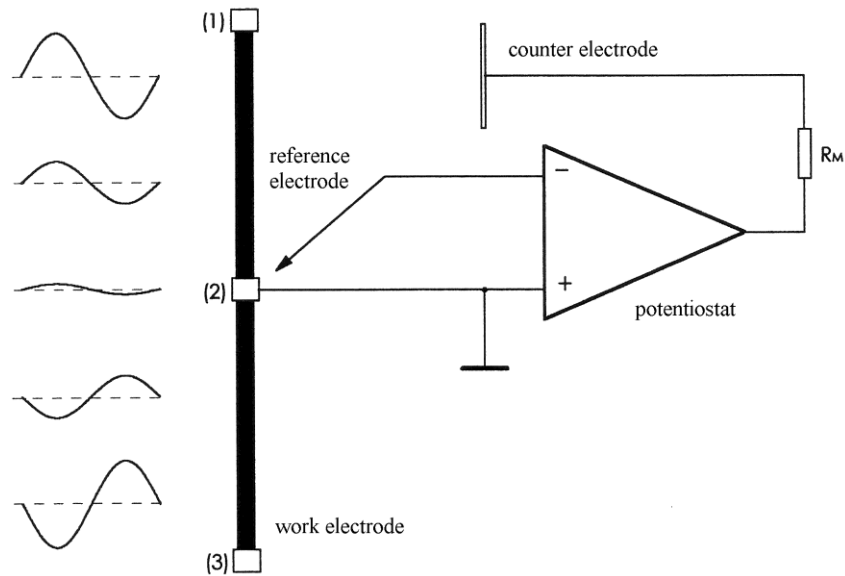


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Wechselspannungsverhältnisse einer elektrisch wechselstromgeheizten symmetrischen Elektrode. (entnommen aus Kirbs)⁵⁵

Das mögliche symmetrische Design der zu heizenden Elektroden führt dazu, dass diese nunmehr nicht ausschließlich vor dem eigentlichen Analyseschritt geheizt werden können, wie zum Beispiel in der Stripping Voltammetrie während des Anreicherungsschrittes. Vielmehr können die Elektroden unmittelbar während des tatsächlich wichtigen Schrittes, der analytischen Messung, auf die gewünschte Temperatur erhitzt werden, sei es kontinuierlich oder gepulst.

Die Erfindung des symmetrischen Elektrodendesigns ist deshalb ein großer Erfolg. Die Anordnung hat allerdings einen erheblichen Nachteil. Die Herstellung jeder einzelnen symmetrischen Elektrode ist ein zeitaufwändiger Prozess und verlangt ein hohes Maß an Fingerfertigkeit. Außerdem können nicht alle Elektroden symmetrisch aufgebaut werden. Das symmetrische Design kann insofern nur als ein wenn auch wichtiger Zwischenschritt in der Entwicklung direkt heizbarer Elektroden angesehen werden. Insbesondere bei der Entwicklung von Elektrodenarrays, die eine mehrfache Detektion von Analyten zulassen und möglichst klein gestaltet werden sollen, ist die symmetrische Konstruktion mit drei Kontaktmöglichkeiten einer jeden Elektrode schwer realisierbar.

3.2 Temperaturkalibrierung

Für die Durchführung von Experimenten bei erhöhten Temperaturen ist es unabdingbar, die exakte Temperatur zumindest in der nächsten Umgebung der Elektrode zu kennen. Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung dieser Temperatur.

Beim konventionellen Heizen, d. h. in einer Messzelle, in der die gesamte Lösung geheizt wird, kann ein gewöhnliches Thermometer verwendet werden. Sobald aber nur die Arbeitselektrode geheizt wird, ist ein Thermometer kein brauchbares Instrument. Dieser Umstand liegt darin begründet, dass beim Heizen nur einer Elektrode lediglich eine dünne Schicht an der Elektrodenoberfläche erhitzt wird. Somit ist die Elektrodentemperatur selbst zu bestimmen, was mit einem Thermometer schwer realisierbar ist.

Als Möglichkeit, die Elektrodentemperatur zu bestimmen, ist zunächst die Nutzung des spezifischen Widerstandes des Elektrodenmaterials in Betracht zu ziehen. Für Drahtelektroden ist jedoch zu beachten, dass die gesamte Elektrodenlänge in die Widerstandsmessung einbezogen werden muss. Da Drähte aber an Lötunkten befestigt und dort isoliert sein müssen, kommt es hierdurch zu einer Verfälschung der berechneten Temperaturwerte. Für Elektroden in denen der isolierte Bereich klein gegen die gesamte geheizte Länge ist, ist die Methode aber brauchbar⁵⁷. Auf die in diesen Studien genutzten Drahtelektroden trifft letzteres zu.

Eine zweite Möglichkeit, die Temperatur einer Elektrode zu bestimmen, ist die numerische Berechnung der Wärmeverteilung. Dieses Verfahren wird in Kapitel 4.2 näher beschrieben. Zur Elektrodentemperaturbestimmung kann weiterhin die Temperaturabhängigkeit des elektrochemischen Potentials eines reversiblen Redoxpaares ausgenutzt werden. Dafür hat sich das Redoxpaar Kaliumhexacyanoferrat-(II)/(III) als sehr brauchbar erwiesen, dessen Nutzung im folgenden Kapitel 3.2.1 näher dargestellt wird. Als vierte Methode zur Temperaturbestimmung der Elektrodenoberfläche ist das direkte Messen der Infrarotstrahlung einer geheizten Elektrode mittels einer Infrarotkamera zu nennen^{58,59}, was in Kapitel 3.2.2 kurz erläutert wird.

3.2.1 Temperaturbestimmung mittels des Temperaturkoeffizienten eines reversiblen Redoxpaares

Die verlässlichste Methode, die Temperatur an einer geheizten Elektrode zu bestimmen, ist es, eine stromlose Potentiometrie (open-circuit potentiometry; zero-current potentiometry) unter Zuhilfenahme eines reversiblen Redoxpaares mit genau bekanntem Temperaturkoeffizienten durchzuführen. Eines der am meisten studierten Redoxpaare ist hierbei das bereits erwähnte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, Kaliumhexacyanoferrat-(II)/(III)^{3,60 69}. Dieses Redoxpaar besitzt äquimolar in 0.1 M KCl gelöst einen Temperaturkoeffizienten von $-1,56 \text{ mV/K}$ ^{56,60,70}. Abbildung 3.4 zeigt eine resultierende Graphik für die Temperaturkalibrierung eines im Durchmesser 25 μm dünnen Platindrahtes unter Benutzung des beschriebenen Redoxpaares.

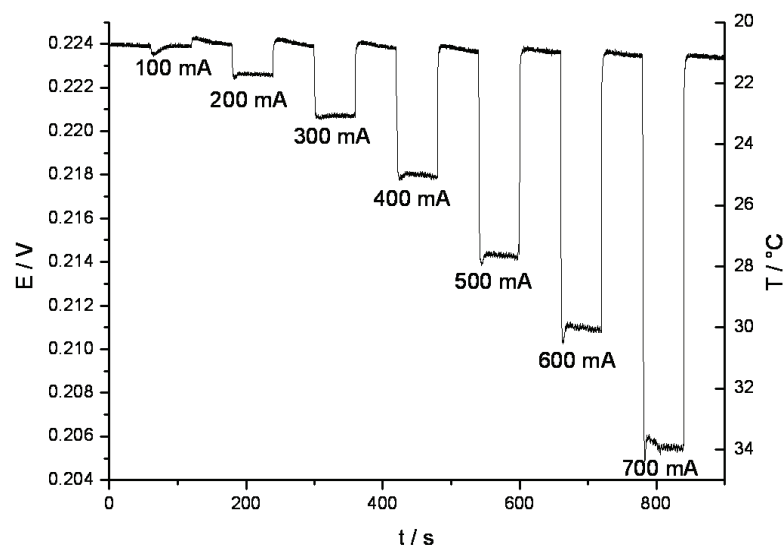


Abb. 3.4: Open circuit Potentiometrie: Temperaturkalibrierung einer Golddrahtelektrode in äquimolar gelösten 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ in 0.1 M KCl vs. Ag/AgCl (3 M KCl) bei 21°C Lösungstemperatur.⁵⁶

Wie die Bezeichnung der genutzten Methode andeutet, findet die Messung des temperaturabhängigen Potentials stromlos statt. Das heißt, dass außer dem für die Potentialeinstellung nach dem Nernst'schen Gleichgewicht auftretenden Strom, keine weiteren faraday'schen Ströme fließen. Das sich für bei einer gegebenen Temperatur einstellende, charakteristische Potential beider Redoxpartner an der WE wird lediglich gegen das feststehende Potential der RE gemessen. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Gleichgewichtes beider Redoxpartner an der WE, beschrieben durch den Temperaturkoeffizienten, kommt es bei Änderung der Temperatur an der WE zu einer Änderung des Arbeitselektrodenpotentials. Diese

Potentialverschiebung ΔE kann dann mittels des Temperaturkoeffizienten β in eine Temperaturverschiebung ΔT umgeformt werden und somit die Temperatur der Elektrode bestimmt werden (siehe Gl. 3.4 & 3.5). Die Temperaturabhängigkeit des elektrochemischen Gleichgewichtes kann wie folgt beschrieben werden:

Das Elektrodenpotential im Gleichgewicht ist gegeben durch Gleichung 3.1.

$$(3.1) \quad \Delta_R G = zFE$$

Die Temperaturabhängigkeit der freien Reaktionsenthalpie ist über die freie Reaktionsentropie gegeben und in Gleichung 3.2 dargestellt.

$$(3.2) \quad \left(\frac{\delta \Delta_R G}{\delta T} \right)_p = \Delta_R S$$

Für den Temperaturkoeffizienten β ergibt sich bei konstantem Druck p durch Einsetzen von Gl. 3.1 in 3.2 und Umformen Gleichung 3.3.

$$(3.3) \quad \beta = \left(\frac{\delta E}{\delta T} \right) = \frac{\Delta_R S}{zF}$$

Integration unter der Voraussetzung der Temperaturunabhängigkeit der freien Reaktionsentropie und Umstellen nach ΔT ergibt Gleichung 3.4.

$$(3.4) \quad \Delta T = \frac{E_{\text{Temperatur } 1} - E_{\text{Temperatur } 2}}{\beta}$$

$$(3.5) \quad T = T_{\text{Lösung}} + \Delta T$$

Die Technik der Temperaturbestimmung mittels des Temperaturkoeffizienten eines reversiblen Redoxpaares in Verbindung mit dem gewählten Redoxpaar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4/3}$ ist hinreichend schnell, liefert gute bis sehr gute Resultate für milli-⁴, mikro-⁶¹ sowie nanosekunden⁷¹-aufgelöste Experimente und kann für fast alle geheizten Elektroden angewandt werden.

Die folgenden Beziehungen verdeutlichen die Zusammenhänge zwischen charakteristischen Größen der Voltammetrie⁷². Sie begründen das Verfahren zur Ermittlung des Temperaturkoeffizienten eines reversiblen Redoxpaares in der in Kapitel 4.5 vorgenommenen Weise. Das Potential, an dem der Strom die Hälfte seines limitierenden Wertes annimmt, ist das Halbstufenpotential $E_{1/2}$, welches in Gleichung

3.6 bezüglich des Formalpotentials E° für elektrochemisch reversible Redoxpaare angegeben ist:

$$(3.6) \quad E_{1/2} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \log \left(\frac{D_r}{D_o} \right)^{1/2}$$

D_r und D_o sind hierbei die Diffusionskoeffizienten der reduzierten und oxidierten Formen des elektroaktiven Redoxpaares. Da beide Diffusionskoeffizienten nicht sehr unterschiedlich voneinander sind, ist das Halbstufenpotential gewöhnlich gleich dem Formalpotential. Das Formalpotential für ein reversibles Redoxpaar ist in Gleichung 3.7 beschrieben,

$$(3.7) \quad E^\circ = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2}$$

mit $E_{p,a}$ als anodischem Peakpotential und $E_{p,c}$ als kathodischem Peakpotential. Beide Peakpotentiale sind mittels Zyklovoltammetrie bestimmbar und damit die Änderung des Formalpotentials für sich ändernde Temperaturen.

Bezüglich der Differenz-Puls Voltammetrie kann das Peakpotential zusammen mit der Annahme der Gleichheit des Halbstufenpotentials und des Formalpotential nach einer in Gleichung 3.8 gegebenen Beziehung genutzt werden,

$$(3.8) \quad E_p = E_{1/2} + \Delta E / 2$$

mit ΔE als Pulsamplitude.

3.2.2 Thermographie

Die Thermographie ist eine mehr oder weniger direkte Methode der Temperaturbestimmung. Sie nutzt die Eigenschaft aus, dass alle Gegenstände, die eine Temperatur oberhalb des absoluten Nullpunktes haben Wärmestrahlung aussenden. Diese Strahlung liegt größtenteils im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums mit Wellenlängen von etwa 780 nm bis 1 mm und ist für das menschliche Auge nicht sichtbar, aber über die Haut in Form von Wärme wahrnehmbar.

Mit speziellen Infrarotkameras kann Wärmestrahlung visualisiert werden. Abhängig von der Temperatur des betrachteten Objektes wird die Infrarotstrahlung in verschiedene Farben konvertiert und ein Wärmebild erstellt. Abbildung 3.5 zeigt ein solches Wärmebild einer direkt geheizten LTCC-Elektrode, welche allerdings an Luft geheizt wurde, da mit dem genutzten System leider keine Aufnahmen in Flüssigkeiten möglich sind. Das macht einen direkten Vergleich der thermographischen Temperaturbestimmung mit einer Temperaturkalibrierung via Open-Circuit Potentiometrie nur bedingt möglich. Eine Näherung könnte durch Aufbringen von ein paar Millilitern Wasser auf die Elektrodenoberfläche erreicht werden. Näheres dazu ist in der Dissertation von Voss nachzulesen⁵⁸.

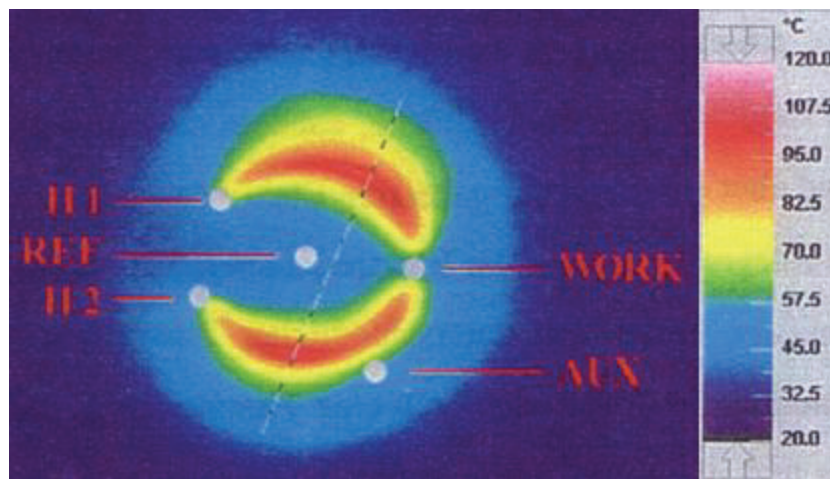


Abb. 3.5: Wärmebild einer, von Voss et al. entwickelten, symmetrischen, an Luft direkt geheizten LTCC Elektrode. (entnommen aus Dissertation von Voss)⁵⁸

Gleichwohl können auch Wärmebilder an Luft geheizter Elektroden wertvolle Informationen über die Wärmeverteilung entlang der Elektrodenoberfläche geben. So ist in Abbildung 3.5 sehr gut zu erkennen, dass sich an den drei Kontaktstellen der Arbeitselektrode Wärmesenken befinden, die eine homogene Wärmeentwicklung entlang der gesamten elektrochemisch aktiven Oberfläche verhindern.

3.3 Anwendung gepulsten Heizens auf voltammetrische Messungen

Temperaturmodulierte Voltammetrie wurde im Jahr 1983 von Miller eingeführt⁷³. Valdes et al. nutzten diese voltammetrische Methode, um das Verhalten reversibler Redoxsysteme zu untersuchen⁶⁶. Rotenberg et al. bestimmten mit ihrer Hilfe Aktivierungsenergien für Elektrodenprozesse⁷⁴. Eine Variante der temperaturmodulierten Voltammetrie, die Temperatur-Puls Voltammetrie (TPV), wurde von Voss et al. entwickelt^{7,18}.

Die TPV kann als eine Potentialtreppe, überlagert von Heizpulsen, angesehen werden. Das bei der TPV entstehende Voltammogramm ist somit die Überlagerung eines gewöhnlichen Voltammogramms mit einem temperaturabhängigen Anteil. Eine idealisierte Erklärung für das Entstehen eines TPV-Voltammogramms ist in Abbildung 3.6 gezeigt.

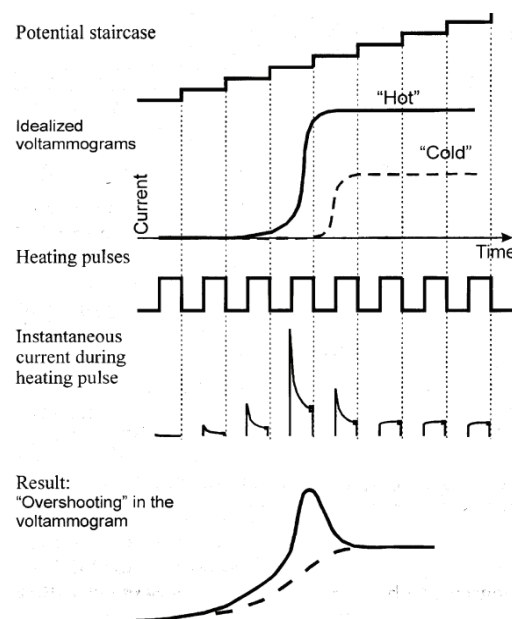


Abb. 3.6: Idealisierte schematische Darstellung für das Entstehen eines TPV Voltammogramms. (entnommen aus Voss et al.)⁷

Es wird eine Potentialtreppe vorgegeben. Der Messwert wird kurz vor Ende jeder Stufe aufgenommen, da der kapazitive Strom zu diesem Zeitpunkt ein Minimum aufweist⁷⁵. Bei kontinuierlichem Heizen würde nun eine „heiße“ Kurve, wie im mittleren Teil der Abbildung dargestellt, entstehen. Das Besondere an der TPV ist aber, dass mit der

Potentialtreppe synchronisierte Heizpulse auf das System gegeben werden. Es werden bei dieser Methode zwei Messwerte aufgenommen. Der erste Wert wird kurz vor Beginn des Heizpulses und der zweite kurz vor dem Ende desselben gemessen. Die Differenz zweier zusammengehöriger Werte ist das eigentlich aufzutragende Signal. In der Nähe des Halbstufenpotentials des betrachteten Analyten ist der Temperatureffekt am deutlichsten ausgeprägt. Bei Beachtung der Peakform, die beim Pulsheizen entsteht (vorletzter Teil der Abb. 3.6) resultiert ein Voltammogramm, welches einer DPV ähnelt und im untersten Teil der Abb. 3.6 dargestellt ist.

Die Technik der TPV benötigt ein relativ komplexes Equipment. Die Komplexität ergibt sich nicht, wie man erwägen könnte, aus der Synchronisation der Potentialrampe mit den angelegten Heizpulsen. Vielmehr besteht die Schwierigkeit darin, die für die kurzen Impulse benötigte Heizleistung zu generieren. Zum Erreichen der gewünschten Temperaturen innerhalb von etwa 100 ms ist natürlich in Abhängigkeit vom Widerstand der genutzten Elektrode eine hohe Heizleistung im Bereich einiger Ampere nötig.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die symmetrische Drosselschaltung (Publikation 8.1)

Wie in Kapitel 3.1 angedeutet, war die Erfindung des symmetrischen Elektrodendesigns lediglich ein - wenn auch wichtiger - Zwischenschritt in der Entwicklung geheizter Elektroden. Die Konstruktion geeigneter symmetrischer Elektroden war zeitaufwendig und abhängig von der Geschicklichkeit des Experimentators. Die Lösung dieser Probleme, auch im Hinblick auf die Konstruktion von Mehrelektrodenarrays, wurde in einer bereits patentierten symmetrischen Drosselschaltung gefunden. Diese Schaltung macht die Konstruktion symmetrischer Elektroden unnötig, da die gewünschte Symmetrie durch die Schaltung selbst in die Anordnung eingebracht wird. Das heißt, dass jede heizbare Elektrode genutzt werden kann als wäre sie symmetrisch.

Die Drosselschaltung wird über den beiden Heizanschlüssen parallel angeschlossen und anhand eines symmetrischen Mittelabgriffs mit dem Arbeitselektroden-Anschluss des Potentiostaten verbunden. In Abbildung 4.1 ist diese Schaltung schematisch dargestellt.

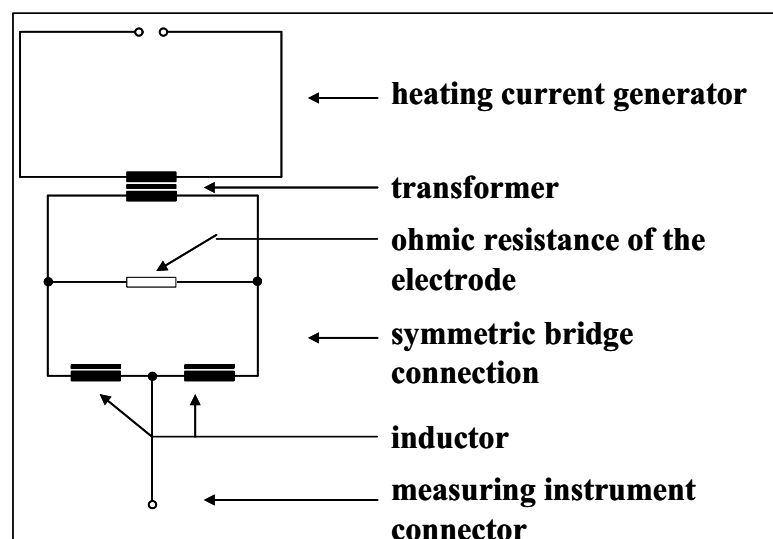


Abb. 4.1: Schematische Zeichnung des Heizstromkreises inklusive der symmetrischen Drosselschaltung.

Eine gut funktionierende Drosselschaltung muss jedoch einige Anforderungen erfüllen, die mit Hilfe einiger Gleichungen verdeutlicht werden können.

Die Drosselschaltung kann wie in Abb. 4.1. durch zwei Spulen symbolisiert bzw. abgebildet werden. Bei Verwendung von Wechselstrom weisen diese Spulen drei verschiedene Widerstände auf. Der ohmsche Widerstand R existiert für jeden stromdurchflossenen Leiter. Gleichung 4.1 gibt diesen für einen metallischen Leiter bei konstanter Temperatur an. Daneben treten in einer Spule ein induktiver Widerstand X_L , und ein kapazitiver Widerstand X_C , beschrieben in den Gleichungen 4.2. und 4.3, auf.

$$(4.1) \quad R = \frac{\rho \cdot l}{A}$$

$$(4.2) \quad X_L = \omega \cdot L$$

$$(4.3) \quad X_C = \frac{1}{\omega \cdot C}$$

Wie Gleichung 4.3 zeigt, wird der kapazitive Widerstand für hinreichend hohe Kreisfrequenzen ω und dichte Wicklungen (führen zu kleinen Kapazitäten C) relativ klein. Er wird deshalb in der folgenden Betrachtung vernachlässigt.

Gleichung 4.2 enthält den Parameter L , die Induktivität einer Spule, welcher wie in Gleichung 4.4 für eine lange Spule beschrieben werden kann.

$$(4.4) \quad L = \frac{\mu_0 \cdot \mu_r \cdot N^2 \cdot A}{l_S}$$

Bei Betrachtung der Gleichungen 4.1, 4.2 sowie 4.4 fällt auf, dass eine möglichst hohe Induktivität durch eine kurze Spule erreicht wird. Die Zahl der Windungen N geht quadratisch in Gl. 4.4 ein und sollte daher möglichst groß sein. Eine hohe Windungszahl wiederum verlangt eine gewisse Länge der Spule und geht zusätzlich mit einer Erhöhung des ohmschen Widerstandes einher, denn je höher die Wicklungsanzahl, desto länger ist der Leiter und somit steigt sein ohmscher Widerstand. Das bedeutet, dass hinsichtlich der Länge und Windungszahl der einzusetzenden Spulen ein Kompromiss zwischen ohmschem Widerstand und Induktivität zu suchen ist. Ein zu hoher ohmscher Widerstand führt zu einer unverhältnismäßig starken Verringerung des analytischen Signals, welches ein Gleichstrom ist; ein zu kurzer Leiter führt hingegen zu einer unzureichenden Filterung des Heizwechselstroms, welche wiederum durch eine möglichst hohe Induktivität begünstigt wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der bezüglich der Länge des Leiters zum Aufbau der Spulen ebenfalls beachtet werden muss ist, dass die Anzahl der Windungen N im Quadrat in Gleichung 4.4 eingeht. Durch eine sorgfältige Materialauswahl aber kann die Anzahl der erforderlichen Spulenwicklungen verringert werden, ohne dass sich dies nachteilig auf die Induktivität niederschlagen muss. Kupfer, beispielsweise, bietet zusammen mit speziellen Ferritkernen sehr gute magnetische Eigenschaften, die sich auf die Permeabilitätszahl μ_r auswirken (μ_0 ist eine Konstante und kann daher nicht beeinflusst werden).

Wie Gleichung 4.2 verdeutlicht, arbeitet eine Spule umso besser, je höher die angelegte Frequenz der Wechselspannung ist, denn die Frequenz ist proportional zum induktiven Widerstand X_L . Der ohmsche Widerstand wird weder durch hohe noch durch niedrige Frequenzen beeinflusst, woraus sich eine weitere Möglichkeit ergibt, die Funktion der Filterung des Heizstromes zu verbessern. Allerdings gibt es Gründe, die Frequenz des Heizstromes zu fixieren. Die Heizströme sollten wenigstens eine Frequenz von 10 kHz aufweisen, um die geheizte Elektrode so kurz wie möglich zu polarisieren und somit faraday'sche Effekte in Form chemischer Reaktionen zu verhindern. Andererseits sind Frequenzen oberhalb 1 Mhz mit Hochfrequenz-Verstärkungsproblemen verbunden.

Unter Berücksichtigung aller angeführten Aspekte wurde eine Drosselschaltung mit einer exzellenten Induktivität von 2,6 H bei nur 9,1 Ω Widerstand mit einem speziellen Ferritkern konstruiert. Verschiedene vergleichende Messungen an asymmetrischen und symmetrischen Gold- und Glaskohleelektroden bestätigten das angenommene Verhalten der Schaltung. Der zum Heizen der Elektroden angelegte Wechselstrom wurde nahezu komplett gefiltert, wobei der analytische Gleichstrom unbeeinflusst blieb. Der Potentialfehler bei einem Strom von 10 μ A und den erwähnten 9,1 Ω Widerstand der Drosselschaltung beträgt unter Berücksichtigung von Gleichung 4.5 nur 45,5 μ V und ist vernachlässigbar.

$$(4.5) \quad \Delta U = I \frac{R}{2}$$

Es konnte kein unterschiedliches Verhalten der symmetrischen und der mittels der Drosselschaltung kontaktierten asymmetrischen Elektroden bei zykl voltammetrischen Messungen von $K_3/K_4[Fe(CN)_6]$ beobachtet werden (Abb. 6 und 7 in Publikation 8.1).

4.2 Temperaturverteilung an geheizten Elektroden (Publikation 8.2)

Wie bereits in Kapitel 3.2 erwähnt, können Simulationsrechnungen Auskunft über die an einer geheizten Elektrode existierenden Temperaturen und deren Wärmeverteilung in die umgebende Lösung geben⁷⁶. Verschiedene Ansätze sind bekannt, wie zum Beispiel die „Box-Methode“ für geheizte Platindrähte⁵⁵, digitale Berechnungen für gepulst geheizte „hot-wire“-Elektroden⁷⁷ sowie grundlegende Berechnungen bezüglich der Temperaturentwicklung an geheizten zylindrischen Elektroden^{78,79}. Diese letztgenannten Berechnungen sind zum Teil theoretisch sehr anspruchsvoll. Eine übersichtliche Visualisierung der Zustände an geheizten Elektroden ist daher äußerst wünschenswert⁸⁰ und dank neuer „high performance“ Software nicht sehr zeitintensiv. Mit diesen Programmen lässt sich in einem so genannten „mesh“ die Umgebung einer geheizten Elektrode fast originalgetreu nachbilden. Der Vergleich einer „Box-Methode“⁵⁵ und einem „mesh“ neuerer Art⁸¹ ist in Abbildung 4.2 gezeigt.

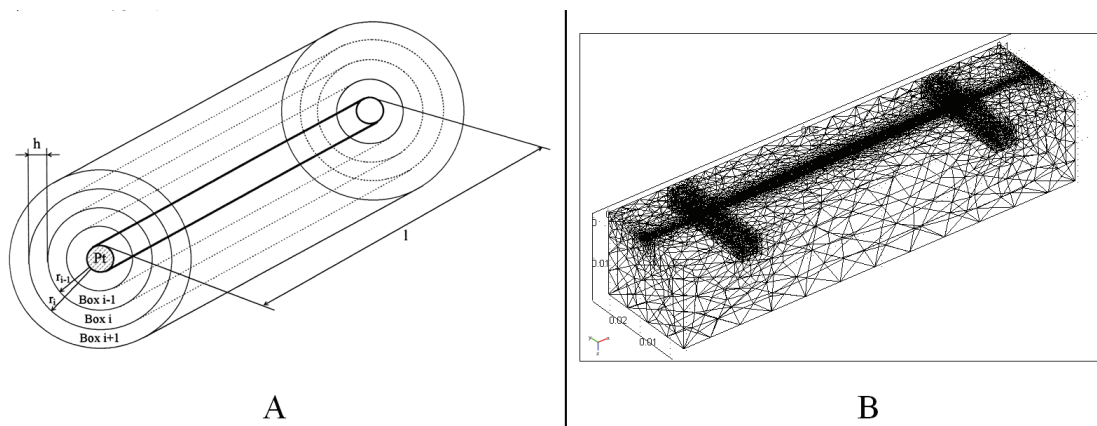


Abb. 4.2: Vergleich von A: "box method" für die numerische Berechnung des Temperaturprofils eines geheizten Platindrahtes; B: "mesh" für die COMSOL Multiphysics© Berechnung der Temperaturverteilung eines geheizten Golddrahtes.⁸¹

Die Joule'sche Wärme ist abhängig vom ohmschen Widerstand R der Elektrode. R wiederum ist abhängig vom Querschnitt A des Leiters und von der Stromdichte J . Eine homogene Temperaturverteilung entlang einer geheizten Elektrode lässt sich also dadurch erreichen, dass die Form des Leiters hinsichtlich seines Querschnitts optimiert wird.

Die abgegebene Wärmeleistung P ist proportional zum Quadrat des zum Heizen der Elektrode aufzuwendenden Stromes I und kann als das Zeitintegral der abgegebenen Wärmeenergie Q eines Widerstandes R ausgedrückt werden. Ein veränderter Querschnitt würde daher zu einer hiervon direkt abhängigen, nicht-konstanten Stromdichte und somit zu einer angepassten Wärmeentwicklung entlang der geheizten Elektrode führen. In den Gleichungen 4.6 und 4.7 sind diese Zusammenhänge erkennbar.

$$(4.6) \quad P = U \cdot I = I^2 \cdot R = \frac{\Delta Q}{\Delta t}$$

$$(4.7) \quad J = \frac{I}{A}$$

Es wurde angenommen, dass eher eine ovale denn lineare Form der Elektrode zu einer homogenen Wärmeverteilung entlang des Leiters führt. Mit Hilfe des wissenschaftlichen Simulationsprogramms COMSOL Multiphysics[®] und der in Gleichung 4.8 angegebenen Funktion zur Anpassung der Elektrodenform wurden unter Variation des Parameters b sehr vielversprechende Ergebnisse erzielt. Die Parametrisierung der Gleichung 4.8 ist in Abbildung 2 der Publikation 8.2 verdeutlicht.

$$(4.8) \quad y = bx^2 + d + \left(\frac{L}{2}\right)^2 \cdot b$$

Abhängig von der Heizdauer und unter Vernachlässigung eventueller Konvektion der die Elektrode umgebenden Lösung konnte durch Variation des Parameters b eine weitestgehend homogene Temperaturverteilung ermittelt werden. Dieses Ergebnis belegt ein Vergleich der Abbildungen 3 und 4 (vor bzw. nach der Optimierung) in Publikation 8.2 für eine Heizdauer von 100 ms. Frühere Berechnungen hinsichtlich der Wärmeverteilung in der Lösung deuten darauf hin, dass sich die Wärme nur in einer sehr elektrodennahen Schicht ausbreitet⁸¹. Die nunmehr durchgeführten Simulationen lassen diesbezüglich leider keine Aussage zu. Sie bieten aber im Ergebnis wichtige neue Ansätze zur Gestaltung der Form von Elektroden zur Erzielung einer homogenen Wärmeverteilung.

4.3 Anwendung gepulsten Heizens auf amperometrische Messungen (Publikation 8.3)

Thermische Modulation ist nicht auf voltammetrische Messungen beschränkt. Auch amperometrische Bestimmungen können durch beschleunigte Elektrodenreaktionen positiv beeinflusst werden. Wie in Zusammenhang mit der TPV beschrieben wird der größte Temperatureinfluss auf das Potential eines elektrochemisch aktiven Analyten in der Nähe seines Halbstufenpotentials beobachtet. Dies gilt gleichermaßen für amperometrische Bestimmungen, was in den Abbildungen 4 und 5 in Publikation 8.3 dargestellt ist. Es muss jedoch beachtet werden, dass sich das Halbstufenpotential durch das Anlegen eines Heizpulses verschieben kann. Um mit Sicherheit im diffusionskontrollierten Bereich zu arbeiten, sollte die Messung nicht genau am Halbstufenpotential, sondern um wenige Millivolt in Richtung des Grenzstromes verschoben, durchgeführt werden. Als analytisches Signal wird dann die maximale Differenz zwischen dem „heißen“ Peakstrom und der verwendet.

Die Durchführung thermisch modulierter Amperometrie ist nicht sehr aufwändig. Es werden nur ein Potentiostat, ein kommerziell erhältliches, manuelles oder besser programmierbares Schaltrelay und ein Heizgenerator benötigt⁸². In Anlehnung an die Temperatur-Puls Voltammetrie (TPV) wurde diese Methode Temperatur-Puls Amperometrie (TPA) genannt.

Der größte Vorteil der TPA ist, dass durch die Art der Signalgewinnung, der Differenzbildung aus Peakstrom und Basislinie, die gesamte Hintergrundstörung eliminiert wird. Ein weiterer Vorteil, jedenfalls gegenüber der TPV, besteht darin, dass eine Synchronisation von Heizpuls und Messwertnahme nicht nötig ist. Zudem kann im Gegensatz zu „normalen“ amperometrischen Messungen auf einen Rührer verzichtet werden, da der erhaltene Strom eher kinetisch oder diffusions- denn konvektionskontrolliert ist (vgl. Abb. 7 in Publikation 8.3). Diese Vorteile könnten die TPA für Fließsysteme, in denen unkontrollierte oder durch Pumpen verursachte Pulsationen auftreten, interessant werden lassen.

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der TPA wurde neben dem bereits intensiv untersuchten Kalium-hexacyanoferrat-(II) außerdem Pikrinsäure verwendet. Bei der Bestimmung der Pikrinsäure fiel auf, dass die erhaltenen Peaks im Vergleich zu zyκλο-

voltammetrischen Messungen desselben Analyten, ausgesprochen scharf ausgebildet waren. Bei einem Potential von $-0,7$ V und einer Elektrodentemperatur von 96°C konnten Signale von über $50\ \mu\text{A}$ für $1\ \text{mM}$ Pikrinsäure gelöst in $0,1\ \text{M}$ Phosphatbuffer erhalten werden. Im Gegensatz dazu wurde für $1\ \text{mM}$ Ferrocyanid „lediglich“ ein Signal von etwa $10\ \mu\text{A}$ erhalten, was auf eine immens beschleunigte Elektrodenreaktion der Pikrinsäure bei erhöhter Temperatur schließen lässt. In den Graphiken 3, 5a und 6 der Publikation 8.3 ist dies dargestellt. Unterhalb der maximalen Elektrodentemperatur konnten für $200\ \mu\text{M}$ Pikrinsäure noch sehr gut ausgebildete und auswertbare Peaks erhalten werden (siehe Graphik 8 in Publikation 8.3), was die Nutzbarkeit der TPA für die Detektion geringster Mengen Pikrinsäure unterstreicht.

4.4 Steigerung der Leistungsfähigkeit elektrochemischer Sensoren durch Oberflächenvergrößerung (Publikation 8.4)

Die Miniaturisierung elektrochemischer Sensoren steht bei deren Entwicklung neben anderen Faktoren immer im Mittelpunkt. Die in heutiger Zeit gewünschte Mobilität und möglichst geringer Kostenaufwand für die jeweilige Analyse sind als Gründe dafür anzuführen. Allerdings sollte eine Miniaturisierung nicht zu Lasten der Leistungsfähigkeit gehen. Das bedeutet, dass ein Kompromiss zwischen makroskopischer Größe und der verfügbaren aktiven Oberfläche geschaffen werden muss. Die Modifikation der Elektrodenoberflächen mit Substrukturen ist dafür ein geeignetes Mittel. Verschiedene Ansätze zur Erzeugung dieser Substrukturen, z. B. mittels Kohlenstoff-Nanoröhren oder lithographischer Verfahren, sind in der Einleitung (Kap. 1) bereits genannt worden.

Daneben kommen auch elektrochemische Modifikationen zur Anwendung. Geordnete Makroporen in Goldsubstraten wurden von Wijnhoven et al. erzeugt⁸³. Qing et al. beschreiben die Generierung von Nano-Zwischenräumen, so genannten nanogaps, durch elektrochemische Abscheidung unter hochfrequenter Impedanzkontrolle⁸⁴. Die bipotentiostatische Erzeugung von Zwischenräumen (gaps) zwischen zwei galvanisch erzeugten Goldelektroden zur Bestimmung von Nitrosyl-Kationen, NO^+ , wurde

erfolgreich durchgeführt. NO^+ wird in Wasser extrem schnell hydrolysiert und wird wie seine korrespondierende reduzierte Form NO als biologisch relevant angenommen⁸⁵. Szamocki et al. generierten Strukturen anhand makroporösem Goldes und erhielten eine bis zu 30-fach vergrößerte Oberfläche, welche durch Zyklovoltammetrie in 0,5 M Schwefelsäure bestimmt wurde. Biofunktionalisierung dieser Strukturen mit Glukosedehydrogenase und die Durchführung voltammetrischer Zyklen mit Glukose als Substrat in Anwesenheit von NAD^+/NADH als Kofaktor ergaben eine 25-fache Erhöhung des Glukose-Oxidationsstroms⁸⁶. Weitere Entwicklungen unter Kombination der Vorteile makroporöser Goldmodifikationen und Ultramikroelektroden folgten⁸⁷.

Doch nahezu alle genannten Ansätze benötigen Template zum Aufbau der Substrukturen. Ein Verzicht auf Template wäre wünschenswert und würde den Aufbau diverser Strukturen nebenbei auch weniger aufwendig gestalten. In Publikation 8.4. wird ein entsprechender Ansatz zur templatfreien galvanischen Nanostrukturierung gewöhnlicher Goldscheiben-Elektroden dargestellt.

Es wurden Experimente zur direkten galvanischen Goldabscheidung durchgeführt. Dabei konnten Haizahn-ähnliche Strukturen durch einfaches Goldabscheiden innerhalb von 15 min erzeugt werden. Im Fall der aufeinanderfolgenden Abscheidung von Silber und Gold in insgesamt 23 min wurden Kohlkopf-ähnliche Strukturen erhalten. Beide Strukturen sind in verschiedenen Vergrößerungsstufen in Abbildung 1 der Publikation gezeigt. Die Bestimmung der Größe der Elektrodenoberflächen wurde mittels Zyklovoltammetrie in 0,5 M Schwefelsäure durchgeführt^{26,86 88}. Allein durch galvanisches Goldabscheiden konnte eine etwa 7-fache (A), bei aufeinanderfolgendem Silber/Goldabscheiden sogar eine bis zu 15-fache (B) Vergrößerung der aktiven Elektrodenoberfläche im Vergleich zur reinen Goldscheibenelektrode erreicht werden. Abbildung 4.3 zeigt dieses Ergebnis, wobei die Größe des Goldoxid-Reduktionspeaks bei etwa +0,85 V das entscheidende Kriterium ist.

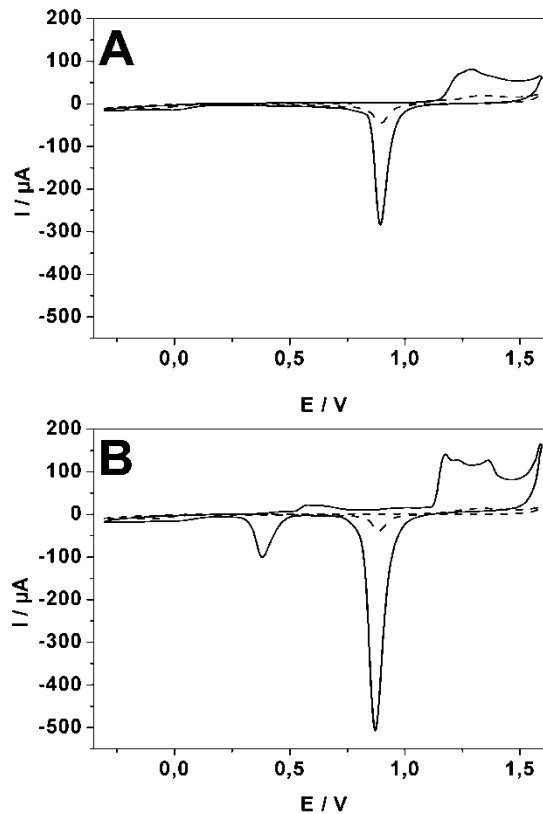


Abb. 4.3: Zyklovoltammogramme in 0.5 M H₂SO₄; Stufenpotential 5 mV, Scanrate 0.1 V/s; gestrichelte Linie vor der Modifikation, durchgezogene Linie mit (A) Gold Modifikation und (B) aufeinanderfolgende Silber/Gold Modifikation.

Um die Verwendbarkeit der aktiven Oberfläche für bioanalytische Zwecke zu prüfen, wurden Experimente zur Hybridisierung und Dehybridisierung [OsO₄(bipy)]-markierter ssDNA an vollkomplementärer, immobilisierter einzelsträngiger Sonden-DNA durchgeführt. Dabei konnte eine beeindruckende Vergrößerung des Hybridisierungssignals festgestellt werden; im Fall der Ag/Au-Modifikation um das 9-fache gegenüber der unmodifizierten Goldscheibenelektrode. Zudem konnte die Verringerung des Hybridisierungs/Dehybridisierungsverhältnisses von üblichen 10%²⁶ auf bis zu 5%, im Fall der Ag/Au-Modifikation, beobachtet werden. Konzentrationsreihen im Bereich von 0,001 bis 1 μM Target offenbarten ein lineares Verhalten der modifizierten Elektroden. Die unmodifizierte Goldscheibenelektrode zeigte bereits ab einer Targetkonzentration von 0,2 M gesättigtes Verhalten. Es konnten Nachweisgrenzen von 83 nM für die unmodifizierte Goldscheibenelektrode, 89 nM für die goldmodifizierte und 64 nM für die Silber/Gold-modifizierte Elektroden graphisch ermittelt werden. Kontrollexperimente mit einem nicht komplementären Target zeigten keine zur Vergrößerung der Oberfläche proportionale Zunahme unspezifischer Hybridisierungen.

4.5. Untersuchungen zu den Temperaturkoeffizienten von $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ und $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$

4.5.1 Abhängigkeit des Temperaturkoeffizienten von $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ vom Elektrodenmaterial

In Kapitel 3.2. wurde bereits behandelt, dass sich die Temperaturabhängigkeit des Temperaturkoeffizienten eines reversiblen Redoxpaares zur Temperaturkalibrierung geheizter Elektroden nutzen lässt. In der Vergangenheit wurde dabei für alle Elektrodentypen und unabhängig von ihrem Material oftmals das Redoxpaar $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ verwendet. Daher lag es nahe, zu überprüfen, ob möglicherweise eine Abhängigkeit des Temperaturkoeffizienten vom Elektrodenmaterial besteht.

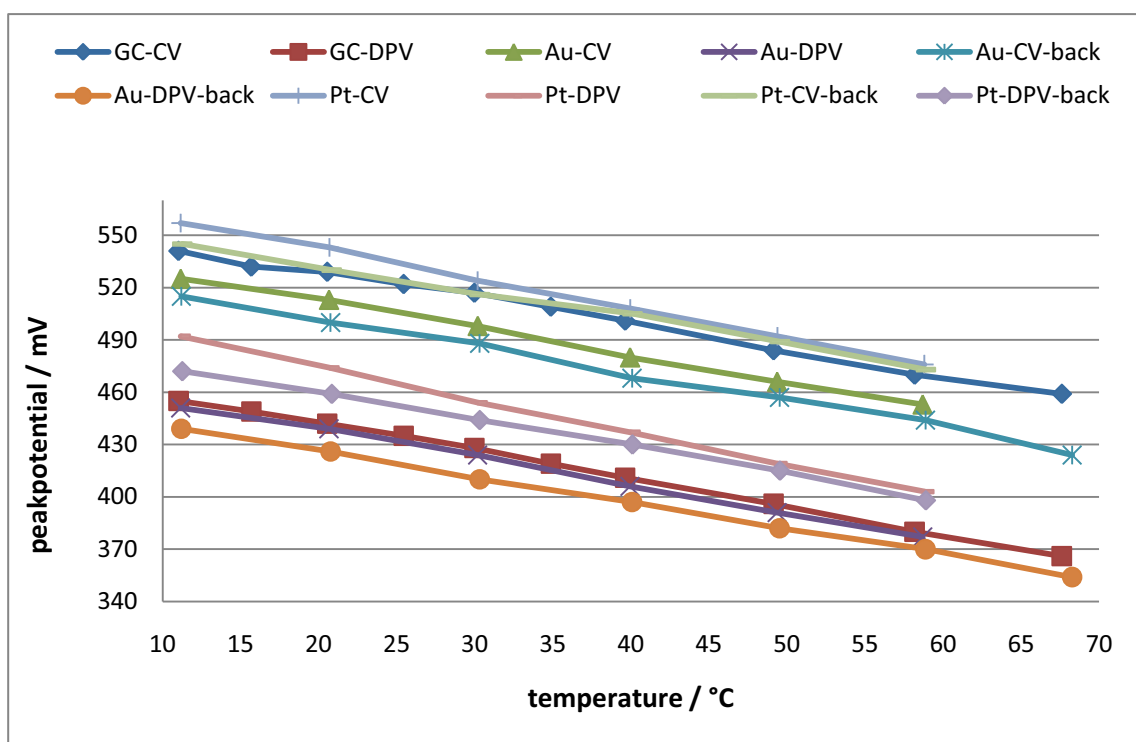
Theoretisch sollte eine derartige Abhängigkeit nicht bestehen, denn die Nernst'sche Gleichung enthält keinen materialabhängigen Parameter (siehe Gl. 4.9).

$$(4.9) \quad E = E^\circ + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a(ox)}{a(red)}$$

Zur Überprüfung dieser theoretischen Vermutung wurden DPV- und CV-Messungen in äquimolarer 5 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ in 0,1 M KCl mittels eines 797 VA Computrace der Firma Metrohm durchgeführt. Es wurden Goldscheiben- (Au), Platinscheiben- (Pt) und Glaskohlelektroden (GC) genutzt. Folgende Parameter wurden verwendet: für CV-Messungen Potentialbereich von -0,2 bis +1V; Stufenpotential 1 mV; Scangeschwindigkeit 100 mV/s und für die DPV-Messungen Potentialbereich von 0 bis +0,95 V (+0,75 mV für Au & Pt); Pulsamplitude 50 mV; Pulszeit 40 ms (20 ms für Au & Pt); Stufenpotential 1 mV; Stufenzeit 50 ms (40 ms für Au & Pt); Scangeschwindigkeit 20 mV/s.

Alle Elektroden wurden vor den Messungen bei der jeweiligen Temperatur mittels 0.05 Micropolish II (Buehler)-Suspension poliert. Die Temperatur der Messzelle wurde durch einen Kryostaten kontrolliert. Für die Bestimmung des Temperaturkoeffizienten des Redoxpaares $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ wurden die Peakpotentiale für jeden Elektrodentyp und jede Messmethode gegen die jeweiligen Temperaturen aufgetragen. Die Anstiege der einzelnen Graphen, oder besser der korrespondierenden Ausgleichsgeraden, gaben den Temperaturkoeffizienten in mV/K an.

In Abbildung 4.4 sind die Graphen für jede Elektrode und Messmethode zusammen mit der Richtung der Temperaturänderungen dargestellt (beginnend bei hoher oder niedriger Temperatur). In der darunterliegenden Tabelle sind die zugehörigen Anstiege und Korrelationsfaktoren angegeben.



	GC CV	GC DPV	Au CV	Au DPV	Au CV back	Au DPV back	Pt CV	Pt DPV	Pt CV back	Pt DPV back
B / mV/K	1,48	1,60	1,55	1,59	1,56	1,48	1,71	1,87	1,47	1,54
R ²	0,9945	0,9988	0,9977	0,9978	0,9955	0,9992	0,9991	0,9991	0,9968	0,9981

Abb. 4.4: Untersuchung des Einflusses des Elektrodenmaterials auf den Temperaturkoeffizienten für Glaskohle Scheiben (GC), Goldscheiben (Au) und Platinscheibenelektroden (Pt); Zyklus- und Differenz-Puls-Voltammetrie in äquimolar gelösten 5 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ in 0.1 M KCl; Messungen sowohl von hoher als auch von niedriger Temperatur aus begonnen.

Es ist zu erkennen, dass die Anstiege und damit die Temperaturkoeffizienten für alle Materialien relativ gleich sind. Lediglich an der Platinelektrode scheint der Koeffizient etwas außerhalb des Bereiches, zumindest in Richtung von niedriger zu hoher Temperatur. Daraus lässt sich schließen, dass eine Abhängigkeit des Temperaturkoeffizienten des Redoxpaares $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ vom Elektrodenmaterial nicht besteht. Inwiefern dieses Verhalten auf andere Redoxpaare bzw. deren Temperaturkoeffizienten zutrifft, ist durch diese Voruntersuchung nicht zu belegen.

4.5.2 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ als alternatives Redoxpaar für Temperaturkalibrierungen

Ein anderes Redoxpaar, das sich für Temperaturkalibrierungen eignen könnte, ist der Komplex Hexamminruthenium-(III)-chlorid, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$. Er reagiert zwischen den Oxidationsstufen +2 und +3, besitzt aber einen wesentlich geringeren Temperaturkoeffizienten als das $\text{K}_{3/4}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Neben anderen Redoxpaaren wurde $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ von Akkermans et al. für laseraktivierte Voltammetrie benutzt⁸⁹. Mithilfe dieser Technik wurde der Temperaturkoeffizient des $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ mit einem Wert von +0,46 mV/K bestimmt.

Zur Verifizierung dieses Wertes wurden DPV-Messungen an der hängenden Quecksilbertropfen-Elektrode durchgeführt. 10 μM Lösungen von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ wurden in Wasser, in wässrigem 0,1 M Ammoniak-Puffer pH 8,2 und 1 M Kaliumchlorid-Lösung angesetzt. Die Lösungen in Wasser und KCl wurden in 0,1 M Kaliumperchlorat-Lösung vermessen. Der in Ammoniak-Puffer gelöste Komplex wurde im Lösungsmittel selbst vermessen. Alle Messungen wurden, durch einen Kryostaten temperaturkontrolliert, mit einem 797 VA Computrace der Firma Metrohm durchgeführt. Folgende Messparameter wurden genutzt: Pulsamplitude 50 mV; Pulszeit 40 ms; Spannungsschritte 4 mV; Stufenzeit 400 ms; Scangeschwindigkeit 10 mV/s. Der Potentialbereich variierte von +0,15 bis -0,4 V. In den Abbildungen 4.5 bis 4.7 sind die Resultate, mit den Ausgleichsgeraden für die Peakpotentiale über der Temperatur aufgetragen, für die verschiedenen Lösungen dargestellt. Jedes Diagramm repräsentiert ein Lösungssystem. Es sind jeweils drei Messungen, welche an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, abgebildet. Innerhalb der Diagramme gehören jeweils Linien, Messwerte und Ausgleichsgeraden-Gleichungen gleicher Farben zusammen.

Die jeweiligen Temperaturkoeffizienten ergeben sich aus den Mittelwerten der Anstiege der Ausgleichsgeraden. Für den in Wasser gelösten und in KClO_4 vermessenen Komplex wurde ein Wert von +0,65 mV/K ermittelt. Dieser Wert sollte jedoch im Hinblick auf die relativ verschiedenen Einzelanstiege kritisch betrachtet werden.

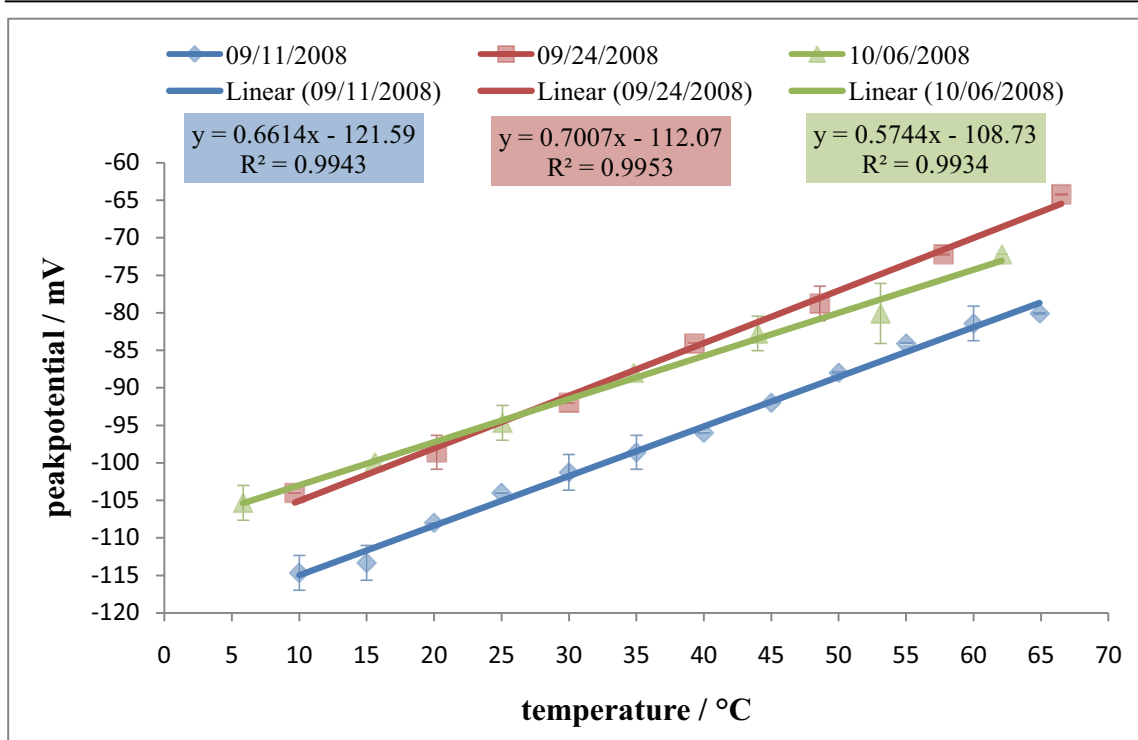


Abb. 4.5: Bestimmung des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (gelöst in Wasser) in 0.1 M KClO_4 .

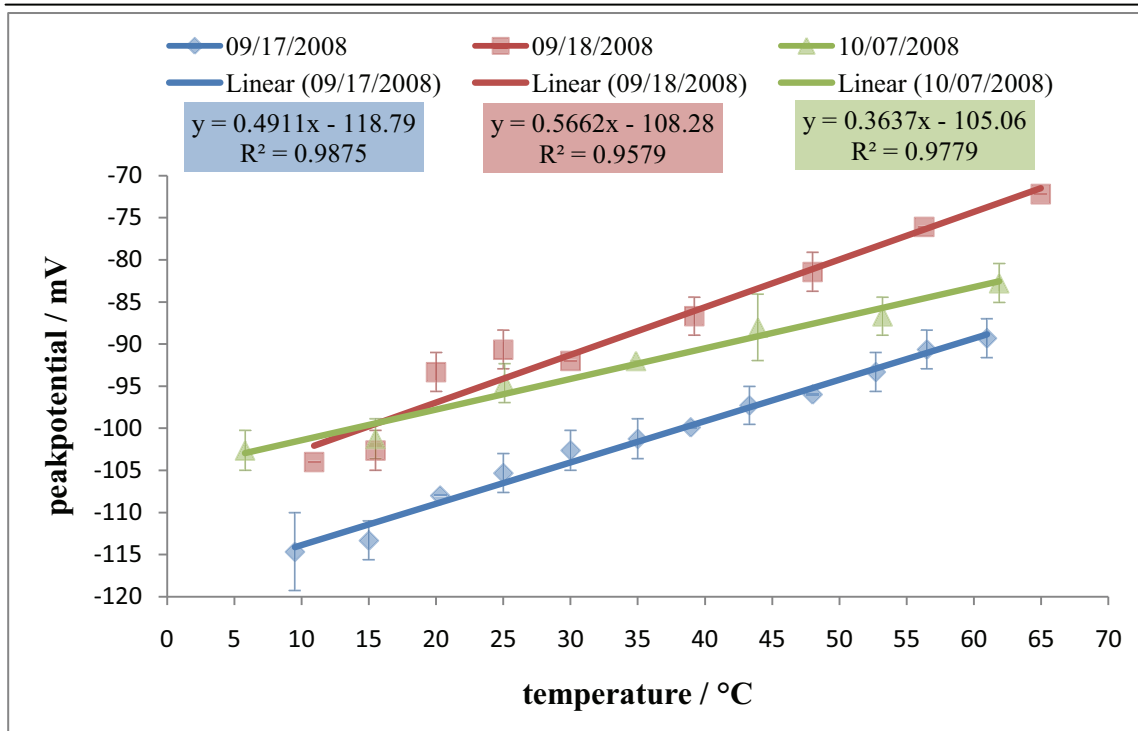


Abb. 4.6: Bestimmung des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (gelöst in 1 M KCl) in 0.1 M KClO_4 .

Für die Messungen des in 1 M KCl gelösten Komplexes ergibt sich ein Wert des Temperaturkoeffizienten von +0,47 mV/K. Dieser ist nahezu identisch mit dem Wert den Akkermans et al. bestimmten⁸⁹. Die originalen Messkurven sind in Abbildung 4.8 (A) dargestellt.

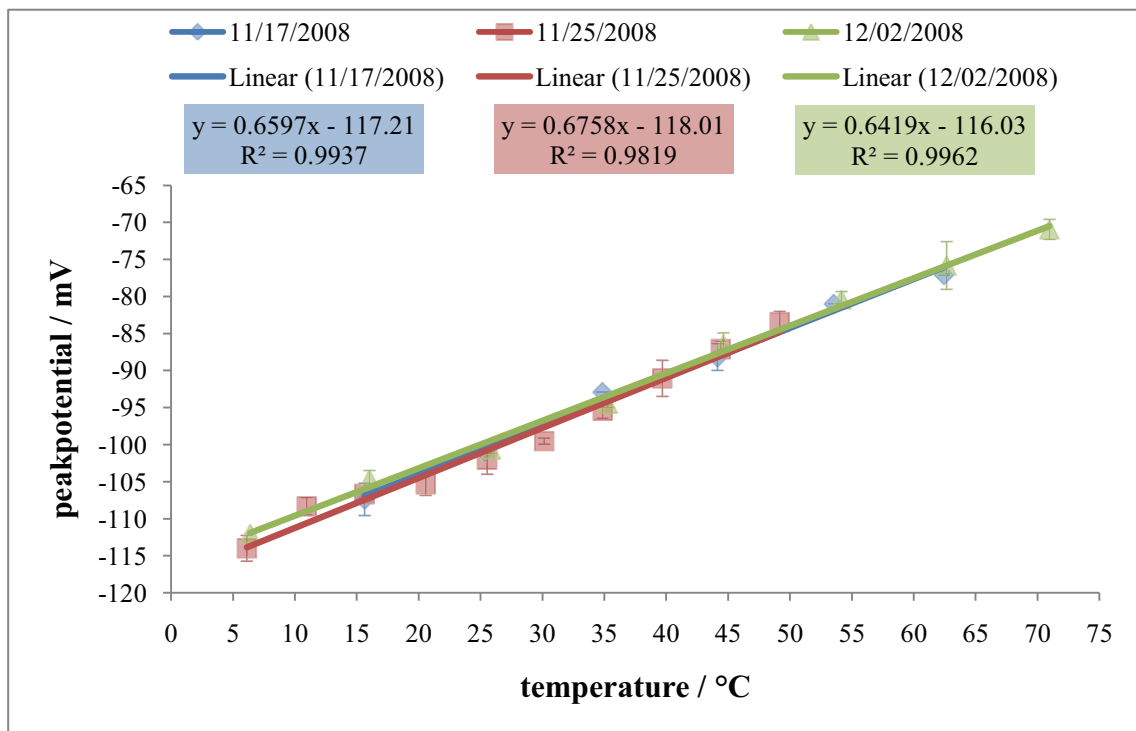


Abb. 4.7: Bestimmung des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ gelöst und vermessen in NH_3 Puffer pH 8.2.

Es ist anzunehmen, dass insbesondere im Fall des in 1 M KCl gelösten Komplexes Liganden-Transferprozesse auftreten. So dürfte es bei der relativ hohen Konzentration an Chloridionen in der Stammlösung zu einem Austausch von NH_3 gegen Cl kommen. Bei der darauffolgenden Messung in wässriger KClO_4 kommt es dann zum Austausch von Cl gegen Wasser oder ebenfalls eingetragenes NH_3 , was bei erhöhter Temperatur, aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Komplexstabilitäts-konstanten⁹⁰, sogar noch beschleunigt wird. Dieser mögliche Effekt des Ligandenaustausches wurde auch von Compton angemerkt⁹¹. Die am ehesten reproduzierbaren Ergebnisse der Bestimmung des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ wurden für die Stammlösung in Ammoniak-Puffer pH 8,2 erhalten. Der Wert des Koeffizienten als Mittelwert der einzelnen Anstiege wurde mit +0,66 mV/K ermittelt. Abbildung 4.8 (B) zeigt die originalen Kurven für diese Messungen. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist festzustellen, dass der von Akkermans et al. ermittelte Wert des Temperaturkoeffizienten von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, nur für das System in 1 M KCl verifiziert werden konnte. Weitere Versuche hinsichtlich der Bestimmung des Temperaturkoeffizienten des $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ -Komplexes sind somit zwingend erforderlich, um verlässliche Aussagen über die Eignung des Redoxsystems für Temperaturkalibrierungen machen zu können.

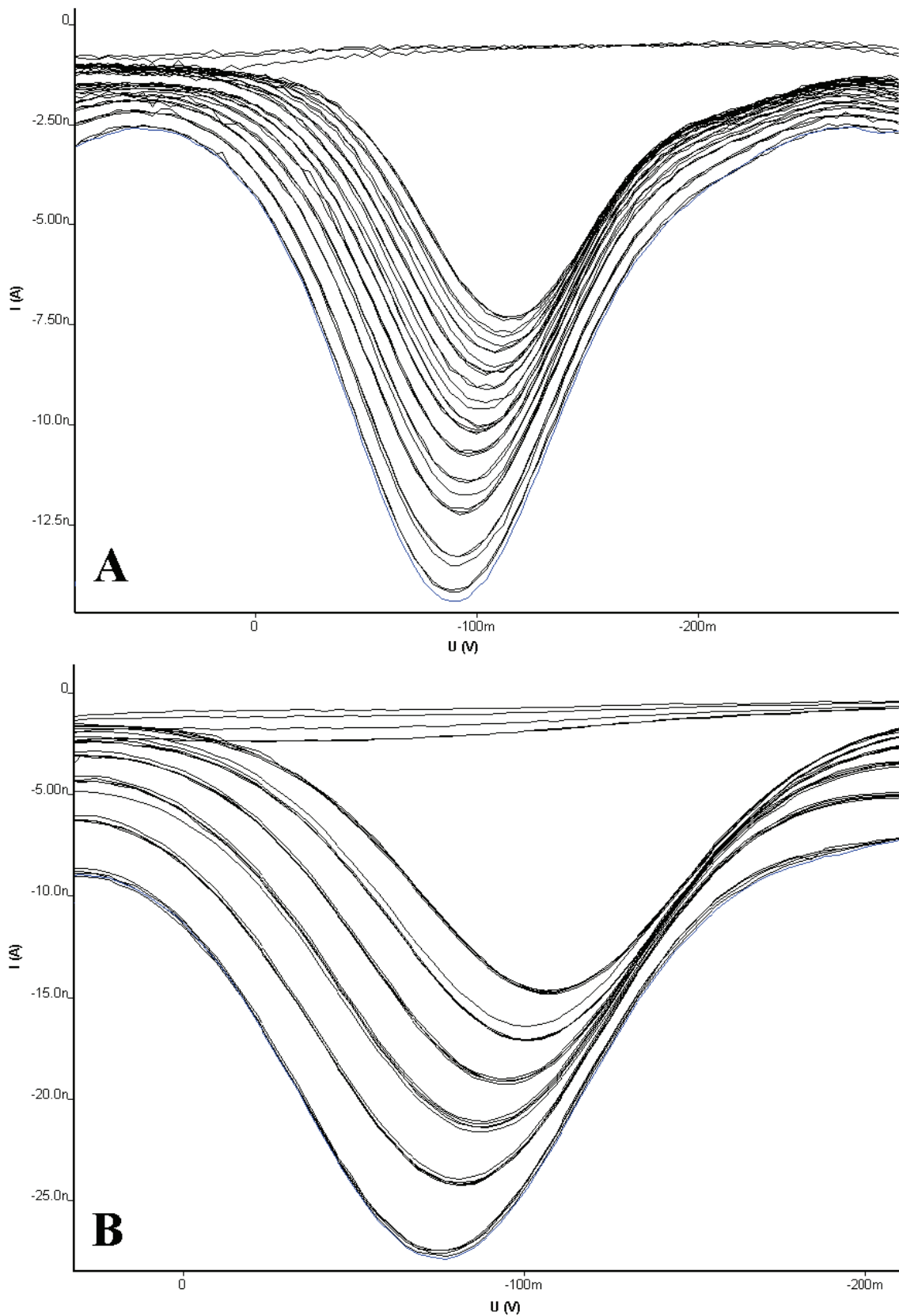


Abb. 4.8: Original DPV Graphen der Temperaturkoeffizienten Bestimmung von $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (A) gelöst in 1 M KCl, (B) in NH_3 Pufferlösung pH 8.2. A: aufsteigend in 5°C Schritten von 10 bis 60°C Lösungstemperatur; B: aufsteigend in 10°C Schritten von 15 bis 65°C Lösungstemperatur

5. Ausblick

5.1 Detektion redox-markierter tRNA Voruntersuchungen (Publikation 8.5)

Die Detektion [OsO₄(bipy)]-markierter ssDNA, auch bei erhöhten Hybridisierungstemperaturen, ist erfolgreich durchgeführt worden²⁴. Gerade im Hinblick auf die Detektion von Fehlpaarungen durch thermische Diskriminierung sind insbesondere geheizte DNA-Sensoren von entscheidender Bedeutung. Die Markierung einzelsträngiger DNA mit dem Komplex [OsO₄(bipy)] erweist sich als gut geeignet^{26,27}. Der nächste Schritt ist der Einsatz dieser redoxaktiven Markierung für andere Biomoleküle.

Ein höchstinteressantes Molekül stellt in diesem Zusammenhang RNA dar, denn RNA ist in verschiedenen Formen, wie messenger-RNA oder tRNA, ein essentieller Bestandteil jeder Zelle. Sie ist zum Beispiel an Enzymsynthesen und der Transkription des genetischen Codes beteiligt und könnte demnach als Reportermolekül für genetische Krankheiten genutzt werden. Auch würden sich Viren, die nur RNA enthalten auf diese Weise einfach identifizieren lassen⁷⁵.

Die Bestimmung von RNA sollte auf dieselbe Weise gelingen, wie die von [OsO₄(bipy)]-markierter DNA. Palecek et al. berichteten, dass die Markierung von RNA mit [OsO₄(bipy)] möglich ist. Sie zeigten, dass Uracil, welches Thymin in der RNA ersetzt, in ähnlicher Weise mit [OsO₄(bipy)] reagiert, wie Thymin in der DNA. Auch die Base Cytosin reagiert mit dem Komplex [OsO₄(bipy)], jedoch etwa 10-mal langsamer als Thymin. Die Detektion [OsO₄(bipy)]-markierter RNA an der Quecksilberelektrode basiert auf dem katalytischen Wasserstoffpeak^{40,92-94}. Zusätzlich ließe sich RNA auch direkt über die Oxidation des Guanins detektieren⁹⁵⁻⁹⁷. Hierzu wurden aber keine Untersuchungen durchgeführt.

Als Modellschubstanz wurde tRNA der Bäckerhefe mit [OsO₄(bipy)] markiert, in der Hoffnung, ähnlich hohe Signale wie bei der Verwendung [OsO₄(bipy)]-markierter DNA zu erhalten. Es wurden verschiedene Versuche, wie z. B. Konzentrationskalibrierungen

oder Untersuchungen zur Abhängigkeit der Signale von Anreicherungszeit und Anreicherungspotential mittels AdSV an der HMDE durchgeführt.

Das beeindruckendste Ergebnis ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Die Graphen zeigen die Abhängigkeit der Signalhöhe von der Konzentration $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierter DNA (A) und $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierter RNA (B) im Vergleich. Die aufgetragenen Konzentrationen beziehen sich auf die Massenkonzentrationen der unmodifizierten Nucleinsäuren, wobei die unterschiedliche Skalierung in den Graphen A und B zu beachten ist.

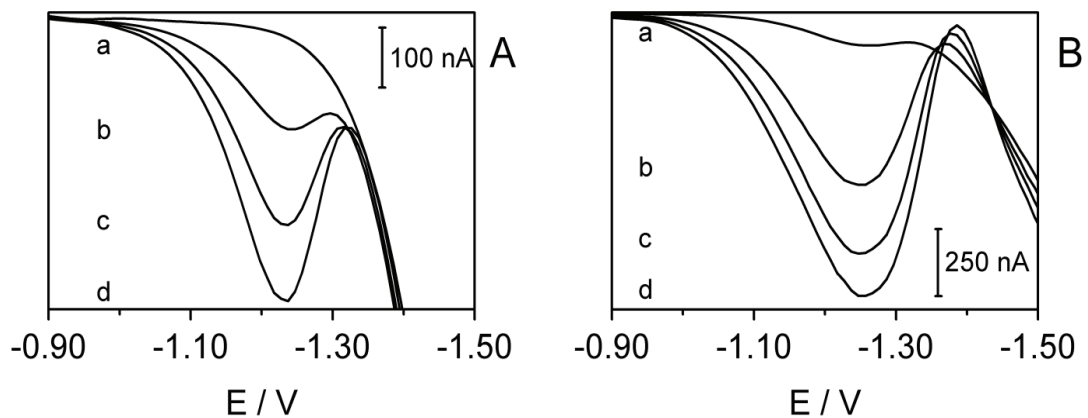


Abb. 5.1: Signale der DPAdSV von $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ modifizierten Nucleinsäuren in Acetatpuffer; (A) ssDNA, a) blank, b) 122, c) 244, d) 366 $\mu\text{g/l}$; (B) tRNA, a) blank, b) 7,14, c) 14,3, d) 21,4 $\mu\text{g/l}$; Konditionen wie in 8.5 publiziert.

Es konnte ein bis zu 42-fach höheres AdSV-Signal $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierter RNA im Vergleich zur $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierten DNA festgestellt werden⁹⁴. Mit diesem Vorversuch der Detektion $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierter RNA ist ein wichtiger Schritt in Richtung der Entwicklung elektrochemischer RNA-Sensoren gelungen.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Entwicklung eines selektiv heizbaren DNA-Arrays voranzutreiben und dabei auftretende Probleme zu lösen. Dabei lag der Fokus auf der Weiterentwicklung der einzusetzenden Heiztechnik und der Elektroden hinsichtlich ihrer Form und der Größe ihrer elektrochemisch aktiven Oberfläche.

Um der Frage nachzugehen, ob RNA mit Hilfe der redoxaktiven $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ Markierung analog zu markierter DNA nachweisbar ist, war eine weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit, Voruntersuchungen zur elektrochemischen Markierung von tRNA als Modellsubstanz durchzuführen. Des Weiteren sollte die Anwendbarkeit von Temperatur-Pulsen auf amperometrische Problemstellungen untersucht werden. Ausgangspunkt dafür war die eher komplexe technische Umsetzung der TPV.

Es wurde eine Drosselschaltung vorgestellt, die durch Auskopplung des elektrochemischen Signals Wechselstromeinflüsse und damit verbundene Störungen beim Heizen von Elektroden unterdrückt. Durch ihren symmetrischen Aufbau ist es nunmehr unnötig, die Elektroden selbst symmetrisch, das heißt mit drei Kontaktierungen, zu konstruieren. Dies ist erstens zeitsparend und zweitens im Hinblick auf ein Mehrelektrodenarray deutlich praktikabler. Die Funktionsweise und Anwendung der Drosselschaltung wurde in der Publikation 8.1 beschrieben.

Anhand einer Simulationsrechnung wurde in einem nächsten Schritt untersucht, wie die Form einer heizbaren Elektrode verändert werden muss, um eine möglichst homogene Temperaturverteilung entlang ihrer Oberfläche zu erzielen. Für kurze Heizpulse konnte die Simulation erfolgreich durchgeführt werden. Ihre Ergebnisse sind in Publikation 8.2 dargestellt und veröffentlicht worden.

Aus Mobilitäts- und Kostengründen besteht gerade für Mehrelektrodenarrays die große praktische Notwendigkeit, diese möglichst klein zu gestalten. Da die erwünschte Miniaturisierung dieser Arrays aber nicht zur Verringerung ihrer Leistungsfähigkeit führen darf, war nach einer Methode zu suchen, bei einer vorgegebenen makroskopischen Elektrodenoberfläche eine möglichst große elektrochemisch aktive

und vor allem für die Bildung von Monolagen verfügbare Oberfläche zu generieren. Hier wurde die Technik der direkten galvanischen Abscheidung von Mikrostrukturen favorisiert. Durch Gold- und aufeinanderfolgende Silber/Gold-Abscheidungen konnten beeindruckende Oberflächenvergrößerungen und damit verbundene Erhöhungen analytischer Signale erreicht werden. Die angewandte Methode sowie die Verifizierung hinsichtlich der verfügbaren Elektrodenoberfläche zur Bildung immobilisierter Monolagen sind in Publikation 8.4 beschrieben.

Weiterhin galt es die Vorteile gepulsten Heizens, ausgehend von der TPV, in weniger komplexer Weise auf amperometrische Verfahren auszudehnen. Denn durch gepulstes Heizen können beispielsweise kurzzeitig Temperaturen oberhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels erreicht und damit stark erhöhte analytische Signale erzielt werden. Dies führte zur Entwicklung der Temperatur-Puls-Amperometrie TPA, deren Nutzung sich für spätere Arrayanwendungen empfiehlt. Mittels der TPA konnte Pikrinsäure im Spurenbereich bestimmt werden. Dank der einfachen Durchführbarkeit von TPA-Messungen und den wenig komplexen Geräteanforderungen könnte die Temperatur-Puls-Amperometrie zu neuartigen Detektoren z. B. in der HPLC führen. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur TPA wurden in Publikation 8.3 veröffentlicht.

Letztlich war die Möglichkeit der Detektion redoxmarkierter RNA, vergleichbar zur Detektion redoxmarkierter DNA, war mittels einfacher Vorversuche zu ermitteln. Als Modellsubstanz kam tRNA der Bäckerhefe zur Anwendung, die mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ markiert und mittels AdSV vermessen wurde. Im Vergleich zu Messungen $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierter DNA konnten wesentlich höhere voltammetrische Signale $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierter tRNA erhalten werden. Diese Ergebnisse, als großer Schritt in Richtung elektrochemischer RNA-Detektion, sollen zur Entwicklung von RNA-Biosensoren in Form eines selektiv heizbaren Elektrodenarrays führen und wurden in Publikation 8.5 veröffentlicht.

7. Literatur

- (1) Schwedt, G. *Wiley-VCH* **2008**, 2. vollständig überarbeitete Auflage, Seite 2.
- (2) Wildgoose, G. G.; Giovanelli, D.; Lawrence, N. S.; Compton, R. G. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 421-433.
- (3) Gründler, P.; Flechsig, G.-U. *Microchimica Acta* **2006**, *154*, 175-189.
- (4) Harima, Y.; Aoyagui, S. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1976**, *69*, 419-422.
- (5) Gabrielli, C.; Keddam, M.; Lizee, J. F. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1983**, *148*, 293-297.
- (6) Gründler, P.; Zerihun, T.; Kirbs, A. *Analytica Chimica Acta* **1995**, 232-240.
- (7) Voß, T.; Gründler, P.; Kirbs, A.; Flechsig, G. U. *Electrochemistry Communications* **1999**, *1*, 383-388.
- (8) Gründler, P.; Kirbs, A. *Electroanalysis* **1994**, *11*, 223-228.
- (9) Gründler, P. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1998**, 180-183.
- (10) Gründler, P.; Zerihun, T.; Möller, A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, 309-314.
- (11) Gründler, P. *Current Analytical Chemistry* **2008**, *4*, 263-270.
- (12) Flechsig, G.-U.; Korbout, O.; Hocevar, S. B.; Thongngamdee, S.; Ogorevc, B.; Gründler, P.; Wang, J. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 192-196.
- (13) Wang, J. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1341-1346.
- (14) Wang, J.; Jasinski, M.; Flechsig, G. U.; Gründler, P.; Tian, B. *Talanta* **2000**, *50*, 1205-1210.
- (15) Gründler, P.; Frank, O.; Kavan, L.; Dunsch, L. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 559-563.
- (16) Guo, D.; Zheng, D.; Mo, G.; Ye, J. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 762-766.
- (17) Gründler, P., Kirbs, A., Zerihun, T. *Analyst* **1996**, *121*, 1805-1810.
- (18) Voß, T., Kirbs, A., Gründler, P. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, *367*, 320-323.
- (19) Walter, A. *Diplomarbeit Universität Rostock* **2008**, Seite 56.

- (20) Lau, C.; Borgmann, S.; Maciejewska, M.; Ngounou, B.; Gründler, P.; Schuhmann, W. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *22*, 3014-3020.
- (21) Demkiv, O.; Smutok, O.; Paryzhak, S.; Gayda, G.; Sultanov, Y.; Guschin, D.; Shkil, H.; Schuhmann, W.; Gonchar, M. *Talanta* **2008**, *76*, 837-846.
- (22) Lau, C. *Dissertation Universität Rostock* **2006**, Seite 7.
- (23) Duwensee, H. *Diplomarbeit Universität Rostock* **2005**, Seite 78.
- (24) Reske, T.; Mix, M.; Bahl, H.; Flechsig, G. U. *Talanta* **2007**, *74*, 393-397.
- (25) Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. *Science* **1988**, *239*, 487-491.
- (26) Peter, J.; Reske, T.; Flechsig, G. U. *Electroanalysis* **2007**, 1-6.
- (27) Flechsig, G. U.; Reske, T. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 2125-2130.
- (28) Valentini, F.; Amine, A.; Orlanducci, S.; Terranova, M. L.; Palleschi, G. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 5413-5421.
- (29) Gooding, J. J. *Electrochimica Acta* **2005**, *50*, 3049-3060.
- (30) Viry, L.; Derré, A.; Garrigue, P.; Sojic, N.; Poulin, P.; Kuhn, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 499-505.
- (31) Juodkazis, S.; Mizeikis, V.; Matsuo, S.; Ueno, K.; Misawa, H. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2008**, *81*, 411-448.
- (32) Hoa, X. D.; Martin, M.; Jimenez, A.; Beauvais, J.; Charette, P.; Kirk, A.; Tabrizian, M. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 970-975.
- (33) Zhou, Y.; Hong, M. H.; Fuh, J. Y. H.; Lu, L.; Lukiyanchuk, B. S. *Physica Scripta* **2007**, *T129*, 35-37.
- (34) Zheng, M.; Yu, M.; Liu, Y.; Skomski, R.; Liou, S. H.; Sellmyer, D. J.; Petryakov, V. N.; Verevkin, Y. K.; Polushkin, N. I.; Salashchenko, N. N. *Applied Physics Letters* **2001**, *79*, 2606-2608.
- (35) Fojta, M.; Jelen, F.; Havran, L.; Palecek, E. *Current Analytical Chemistry* **2008**, *4*, 250-262.
- (36) Palecek, E.; Jelen, F. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2002**, *32*, 261-270.
- (37) Palecek, E.; Billova, S.; Havran, L.; Kizek, R.; Miculkova, A.; Jelen, F. *Talanta* **2002**, *56*, 919-930.
- (38) Palecek, E. *Nature* **1960**, *188*, 656-657.
- (39) Palek, E.; Fojta, M. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 74 A-83 A.

- (40) Palecek, E.; David, M. J.; Dahlberg, L.; Dahlberg, J. E. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: 1992; Vol. Volume 212, p 139-155.
- (41) Palecek, E.; Lukášová, E.; Jelen, F.; Vojtísková, M. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1981**, 8, 497-506.
- (42) Reske, T. *Diplomarbeit Universität Rostock* **2005**, diverse Seiten, da Thema der Arbeit.
- (43) Mix, M.; Reske, T.; Duwensee, H.; Flechsig, G. U. *Electroanalysis* **2009**, 21, 826-830.
- (44) Duwensee, H.; Jacobsen, M.; Flechsig, G. U. *The Analyst* **2009**, 134, 899-903.
- (45) Lau, C.; Flechsig, G.-U.; Gründler, P.; Wang, J. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 554, 74-78.
- (46) Lau, C.; Reiter, S.; Schuhmann, W.; Gründler, P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, 379, 255-260.
- (47) Ghanem, M. A., Compton, R. G., Coles, B. A., Psillakis, E., Kulandainathan, M. A., Marken, F. *Electrochimia Acta* **2007**, 53, 1092-1099.
- (48) Compton, R. G.; Coles, B. A.; Marken, F. *Chemical Communications* **1998**, 2595-2596.
- (49) Marken, F. *Annual Reports on the Progress of Chemistry, Sect. C* **2008**, 104, 124-141.
- (50) Baranski, A. S. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 1294-1301.
- (51) Chen, P.; McCreery, R. L. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, 3958-3965.
- (52) Ducret, L.; Cornet, C. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1966**, 11, 317-339.
- (53) Gabrielli, C.; Keddám, M.; Lizee, J. F. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, 359, 1-20.
- (54) Jasinski, M. *Dissertation Universität Rostock* **2000**, diverse Seiten.
- (55) Kirbs, A. *Dissertation Universität Rostock* **1999**, diverse Seiten.
- (56) Wachholz, F.; Gimsa, J.; Duwensee, H.; Grabow, H.; Gründler, P.; Flechsig, G. U. *Electroanalysis* **2007**, 19, 535-540.
- (57) Flechsig, G. U. *Dissertation Universität Rostock* **2000**, Seite 21.
- (58) Voß, T. *Dissertation Universität Rostock* **2000**, diverse Seiten.
- (59) Schneider, A.; Flechsig, G. U.; Gründler, P. *Journal of The Electrochemical Society* **2000**, 147, 3768-3770.

- (60) Zerihun, T.; Gründler, P. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1996**, *404*, 243-248.
- (61) Smalley, J. F.; Krishnan, C. V.; Goldman, M.; Feldberg, S. W.; Ruzic, I. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1988**, *248*, 255-282.
- (62) Olivier, A.; Merienne, E.; Chopart, J. P.; Aaboubi, O. *Electrochimica Acta* **1992**, *37*, 1945-1950.
- (63) Rotenberg, Z. A. *Electrochimica Acta* **1997**, *42*, 793-799.
- (64) Valdes, J. L.; Miller, B. *The Journal of Physical Chemistry* **1988**, *92*, 4483-4490.
- (65) Valdes, J. L.; Miller, B. *The Journal of Physical Chemistry* **1988**, *92*, 525-532.
- (66) Valdes, J. L.; Miller, B. *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 7275-7280.
- (67) Smalley, J. F.; MacFarquhar, R. A.; Feldberg, S. W. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1988**, *256*, 21-32.
- (68) Valdes, J. L.; Miller, B. *Journal of The Electrochemical Society* **1988**, *135*, 2223-2231.
- (69) Koller, K. B.; Hawkrigde, F. M. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*, 7412-7417.
- (70) Zerihun, T. *Dissertation Universität Rostock* **1997**, Seite 45.
- (71) Smalley, J. F.; Geng, L.; Feldberg, S. W.; Rogers, L. C.; Leddy, J. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, *356*, 181-200.
- (72) Wang, J. *Wiley-VCH, Third Edition* **2006**, Kapitel 2 und 3.
- (73) Miller, B. *Journal of The Electrochemical Society* **1983**, *130*, 1639-1640.
- (74) Rotenberg, Z. A. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, *345*, 469-474.
- (75) Sopha, H. *Diplomarbeit Universität Rostock* **2008**, diverse Seiten.
- (76) Degenring, D. *Diplomarbeit Universität Rostock* **2000**, diverse Seiten.
- (77) Gründler, P.; Degenring, D. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *512*, 74-82.
- (78) Frischmuth, K.; Visocky, P.; Gründler, P. *International Journal of Engineering Science* **1996**, *34*, 523-530.
- (79) Schneider, A.; Flechsig, G.-U.; Grundler, P. *Journal of The Electrochemical Society* **2000**, *147*, 3768-3770.
- (80) Beckmann, A. *Dissertation Universität Rostock* **2005**, Seite 50.

- (81) Mahnke, N.; Markovic, A.; Duwensee, H.; Wachholz, F.; Flechsig, G.-U.; van Rienen, U. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *137*, 363-369.
- (82) <http://www.hot-wire-electrochemistry.com>.
- (83) Wijnhoven, J. E. G. J.; Zevenhuizen, S. J. M.; Hendriks, M. A.; Vanmaekelbergh, D.; Kelly, J. J.; Vos, W. L. *Advanced Materials* **2000**, *12*, 888-890.
- (84) Qing, Q.; Chen, F.; Li, P.; Tang, W.; Wu, Z.; Liu, Z. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 7771-7775.
- (85) French, R. W.; Collins, A. M.; Marken, F. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 2403-2409.
- (86) Szamocki, R.; Reculosa, S.; Ravaine, S.; Bartlett, P. N.; Kuhn, A.; Hempelmann, R. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1317-1321.
- (87) Szamocki, R.; Velichko, A.; Holzapfel, C.; Mucklich, F.; Ravaine, S.; Garrigue, P.; Sojic, N.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 533-539.
- (88) Huang, J.-F.; Sun, I. W. *Advanced Functional Materials* **2005**, *15*, 989-994.
- (89) Akkermans, R. P.; Suárez, M. F.; Roberts, S. L.; Fulian, Q.; Compton, R. G. *Electroanalysis* **1999**, *11*, 1191-1202.
- (90) Riedel, E. *Anorganische Chemie* **1999**, de Gruyter, 4. Auflage, Seite 665.
- (91) Compton, R. G. *E-Mail Korrespondenz mit PD. Dr. G.-U. Flechsig* **2008**.
- (92) Chang, C. H.; Ford, H.; Behrman, E. J. *Inorganica Chimica Acta* **1981**, *55*, 77-80.
- (93) Lukasova, E.; Jelen, F.; Palecek, E. *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, *1*, 53.
- (94) Sopa, H.; Wachholz, F.; Flechsig, G.-U. *Electrochemistry Communications* **2008**, *10*, 1614-1616.
- (95) Anderson, J. L.; Coury, L. A.; Leddy, J. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 519-590.
- (96) Palecek, E.; Fojta, M. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 1566-1571.
- (97) Wang, J.; Grundler, P.; Flechsig, G.-U.; Jasinski, M.; Rivas, G.; Sahlin, E.; Lopez Paz, J. L. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3752-3756.

8. Publikationen

8.1 A Compact and Versatile Instrument for Radio Frequency Heating in Nonisothermal Electrochemical Studies

Electroanalysis 19, 2007, (5), 535-540.

Falko Wachholz, Jan Gimsa, Heiko Duwensee, Harald Grabow, Peter Gründler, Gerd-Uwe Flechsig*

Falko Wachholz bereitete die verschiedenen benutzten symmetrischen und asymmetrischen Gold- und Platinelektroden vor und führte die Experimente zur Untersuchung des Einflusses der symmetrischen Drosselschaltung durch. Weiterhin analysierte er die Ergebnisse bezüglich der Brauchbarkeit dieser Schaltung. Falko Wachholz wirkte beim Verfassen des Manuskripts und beim Erstellen zugehöriger Materialien mit.

Full Paper

A Compact and Versatile Instrument for Radio Frequency Heating in Nonisothermal Electrochemical Studies

Falko Wachholz,^a Jan Gimsa,^b Heiko Duwensee,^a Harald Grabow,^a Peter Gründler,^a Gerd-Uwe Flechsig^{a*}

^a Department of Chemistry, University of Rostock, Dr. Lorenz Weg 1, 18051 Rostock, Germany

*e mail: gerd.uwe.flechsig@uni-rostock.de

^b Department of Biological Sciences, University of Rostock, Gertrudenstraße 11A, 18051 Rostock, Germany

Received: November 1, 2006

Accepted: December 15, 2006

Abstract

We describe a novel instrument and electrical circuit for sensitive electrochemical measurements at simultaneous direct electrode heating. The new measuring principle can be applied to working electrodes of various designs featuring two end contacts. In our experiments, the contacts were connected to a 100 kHz AC heating power supply and the potentiostat via the new inductor bridge circuit. A compact heating generator housing contains all components necessary for sine wave generation as well as amplification and transformation of the heating power. The new arrangement yields high temperature cyclovoltammetric signals for the $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ redox system with a noise level superior to the earlier symmetrically branched wire electrode designs. Noise and disturbances are dramatically suppressed especially for high resistance electrodes such as glassy carbon electrodes. Without a center contact, the working electrode design is greatly simplified. This opens new opportunities for the design of a great variety of heated electrodes that may be arranged in arrays or consist of materials with relatively high resistivity such as carbon and conducting polymers.

Keywords: Heated electrodes, Glassy carbon, Gold, Hot wire electrochemistry, Inductor Bridge, Cyclic voltammetry

DOI: 10.1002/elan.200603757

1. Introduction

Temperature is an important adjustable parameter in electrochemical experiments apart from concentration, time, potential and current. Commonly, thermostated cells are employed to adjust the temperature in electrochemical experiments. Nevertheless, this approach brings about some problems. The whole cell including all electrodes and the bulk electrolyte must be heated. Delicate substances may decompose, purgeable compounds may vanish. The potential of the reference electrode shifts with changing temperature even though this effect may be prevented by separating the reference electrode from the bulk electrolyte by a salt bridge. Also, much energy is needed to reach and keep a high medium temperature or to adjust a defined temperature by heating or cooling, a process requiring a relatively long time. For these reasons, the above approach makes it hard to put “thermoelectrochemistry” into practice. Burstein and Moloney presented a technique for corrosion studies that they called “thermammetry”, where the bulk solution is heated and cooled slowly by an external supply, while recording current vs. temperature at a constant potential [1]. Electrically heated electrodes have been proven to add great benefit to the analyses of different kinds of substances. Firstly, mass transport is generally enhanced by the micro-stirring effect caused by the thermal convection in the vicinity of the electrode surface. Secondly,

kinetically sluggish reactions are accelerated. Thirdly, experiments at different temperatures can be conducted to distinguish different substances, and hence to increase the selectivity of the measurement. Several techniques with electrically heated electrodes have been developed during the last 40 years. In early experiments, the electrodes were heated indirectly, leaving the bulk solution temperature unaffected. In 1976 Harima et al. developed an indirectly heated gold film electrode [2]. Indirectly heated platinum electrodes have been applied to detect NADH while preventing electrode fouling [3], as well as to construct a heated glucoseoxidase biosensor [4]. Compton et al. employed microwave radiation to activate the electrode surface [5–7]. Even carbon electrodes can be heated by microwaves [8]. Baranski has demonstrated that a high frequency electrical heating current (0.1 to 2 GHz) can be applied to heat a thin solution layer close to the electrode surface without disturbing the electroanalytical signal detection [9].

Direct electrode heating in an electrolyte solution was first described by Ducret and Cornet in 1966 [10]. These authors used a thin platinum wire heated by AC in the audio-frequency range. Already at that time, it was evident that AC-heating is superior over DC-heating since the former avoids electrode polarization due to the iR -voltage drop along the length of the electrode. Nevertheless, even AC can generate an undesired polarization, causing a strong dis-

tortion of the voltammetric signals at lower frequencies. However, AC-heating avoids faradic processes. Gabrielli et al. [11, 12] presented preliminary results of 6 °C-temperature jump experiments with Pt wire electrodes in the ferro-/ferricyanide system using 250 kHz-AC heating. Adequate electrical filtering allowed to discriminate against AC contributions to the measuring signal. A similar arrangement was used in a preliminary experiment by Gründler et al. [13]. These authors used a 25 µm Pt wire with asymmetric contacting, i.e., the potentiostat was connected to one end of the wire. The results obtained by this simple setup were not satisfactory with the ferro-/ferricyanide redox couple. Even electrical filtering could not prevent an erroneous behavior of the cell.

Modern potentiostats show a fast reaction and may also correct for AC distortion from the heating currents. Generally, the magnitudes of the heating currents are much stronger than the measuring signal and may lead to a complete overmodulation of the potentiostat. Up to now, this problem was overcome by a symmetric electrode design [14, 15]. In this case, the potentiostat is connected to a symmetric center contact of the electrode. This approach allows for good results as long as the resistance of the electrode is not too high.

Calculations and IR-images show that both soldering end contacts of a directly heated electrode cause a temperature drop resulting in a gradient along the electrode axis [16]. In symmetric electrodes the center contact represents an additional heat sink making the design of temperature-gradient free electrodes even more difficult. In general, the gradients can be reduced in electrode shapes with narrowing ends or by partial coverage of the electrode surface [17]. Although experiments with carbon fibers were not successful [13], directly heated carbon paste electrodes could be successfully applied for DNA analysis [18, 19] and heavy metal detection [20] when the heating current was applied only during the accumulation step. For similar applications, Svancara et al. developed an indirectly heated "Groove Electrode" (EH-GrE) filled with carbon paste [21].

Applications of continuously heated wire electrodes include the voltammetric determination of dissolved oxygen [22] and organic substances that are characterized by a sluggish electrochemical response and/or sensitivity against long term exposure to increased temperature [23]. Stripping analysis has been performed for arsenic(V) at gold [24], copper, mercury and arsenic(III) at gold [25] and lead as PbO₂ at platinum [26] electrodes while heating the electrodes during both steps, the accumulation and the stripping steps. Moreover, heated wire electrodes were applied in non-aqueous solvents like THF [27] and for monitoring flow streams [28]. Cytochrome *c* was detected by a directly heated LTCC-electrode [29]. Recently, Lin et al. described electroluminescence at a directly heated symmetric wire electrode [30].

The term "Temperature Pulse Voltammetry" (in analogy to differential pulse voltammetry) [31–34] designates experiments where short heat pulses are applied to the electrode during a voltammetric scan. Also in these experi-

ments, the current is measured before and at the end of each pulse. The detected signal is the difference of the two currents. In any case, this technique requires simultaneous measurements of the imposed temperature changes and the electrochemical signal.

General principles and applications of high-temperature electrochemistry have recently been reviewed [35] with a focus on heated electrodes [36]. Briefly, different approaches exist for heating the working electrode while leaving the bulk electrolyte (including reference and counter electrode) at ambient temperature. The following techniques attained the highest attention: 1) direct joule heating of the electrode body, 2) indirect joule heating by a separate heater inside the electrode substrate and 3) microwave activation.

Here we describe a novel instrument and electrical circuit allowing for simultaneous sensitive electrochemical measurements and direct electrical heating of a working electrode with only two end contacts. The 100 kHz AC heating power is applied to both contacts that are also connected to the potentiostat via an inductor bridge. The compact heating generator housing contains all components necessary for the sine wave generation as well as the amplification and transformation of the heating power [37, 38]. We present measurements with a novel directly heated glassy carbon electrode.

2. Experimental

2.1. Materials

All measurements were carried out in 0.1 M KCl-solution containing 5 mM K₃[Fe(CN)₆] vs. a Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode and a glassy carbon counter electrode (both from Metrohm AG, Herisau, Switzerland) at a constant bulk solution temperature of 21 °C. The cyclic voltammogram parameters were: start potential 0.6 V, 1st vertex potential 0.6 V, 2nd vertex potential –0.2 V; step potential 0.008 V; and scan rate 100 mV/s.

Potassium chloride, potassium hexacyanoferrate(III) and potassium hexacyanoferrate(II) were delivered by Fluka. The construction of the symmetrically connected 25 µm diameter gold wire electrode has been described elsewhere [24]. Briefly, 5 mm long gold wires were soldered to both sides of a 20 × 20 mm² double-side printed circuit board. The two wires were bridging a 5 × 10 mm² cut out section. The soldering contacts and copper tracks were isolated by means of a paraffin/polyethylene mixture. The new directly heated glassy carbon electrode is depicted in Figure 1.

2.2. Instrumentation

Potentiometry and cyclic voltammetry were performed by means of an AUTOLAB potentiostat PGSTAT20 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands). The heating generator was assembled from parts delivered by Conrad Electronic SE (Hirschau, Germany).

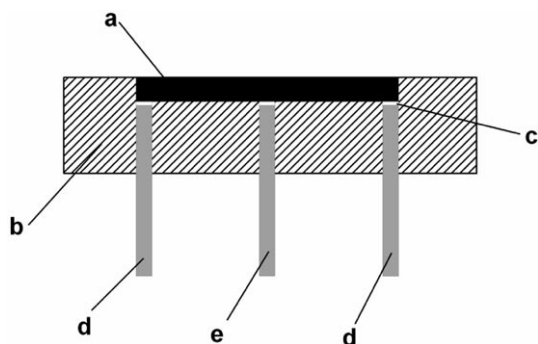


Fig. 1. Schematic representation of the new directly heated glassy carbon electrode, a) glassy carbon rod, b) epoxy resin body, c) silver epoxy glue, d) copper wire connection to the heating device and the optional inductor bridge, e) optional center contact for a direct connection to the potentiostat.

The heating generator (Fig. 2) comprises the necessary circuitry such as the power supply, the waveform generator and the amplifier. It allows for a precise adjustment of the electrode temperature and features meters for heating current and frequency. The new component is a novel patent pending inductor/resistor bridge enabling the operation of symmetric and asymmetric electrodes (Fig. 3) [38]. We used inductors with 2.6 H and 9.2 Ω . The circuit blocks the AC heating current, while the measuring signal may pass undisturbed.

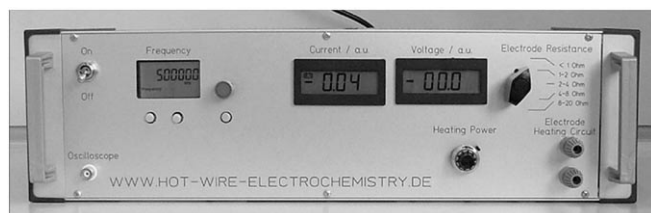


Fig. 2. The novel compact and easy to handle heating system.

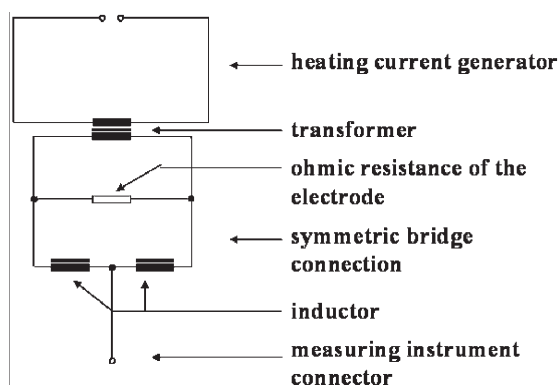


Fig. 3. Schematic drawing of the heating circuit including the novel symmetric inductor bridge connection used to block the AC heating current while leaving the measuring signal current undisturbed.

3. Results and Discussion

3.1. Temperature Calibration and Control

To adjust the temperature we performed temperature calibration experiments as described earlier [22, 36]. Briefly, the stationary temperature of all heated electrodes was measured by open circuit potentiometry using a 5 mM equimolar ferro-/ferricyanide solution in 0.1 M KCl. The temperature coefficient (-1.56 mV/K) of this redox couple was used to calculate the temperature difference from the potential difference (vs. a reference electrode). Figure 4 displays an open circuit potentiogram of a temperature calibration experiment with a heated gold wire electrode. By adjusting various heating currents and plotting the temperature difference vs. current, we obtained temperature calibration functions. In the actual experiments the desired temperature was adjusted by adjusting the heating current.

Figure 5 exhibits the temperature calibration plot for the heated glassy carbon electrode. The maximum temperature

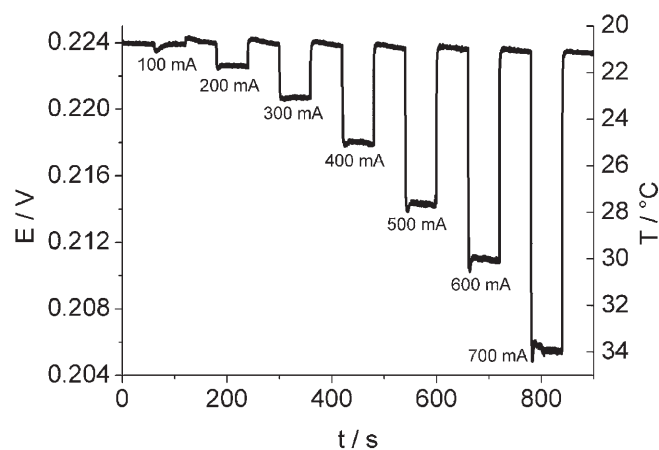


Fig. 4. Open circuit potentiometry temperature calibration of a gold wire electrode in a solution containing 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ and 0.1 M KCl vs. Ag/AgCl (3 M KCl) at 21° bulk solution temperature with the inductor bridge connection.

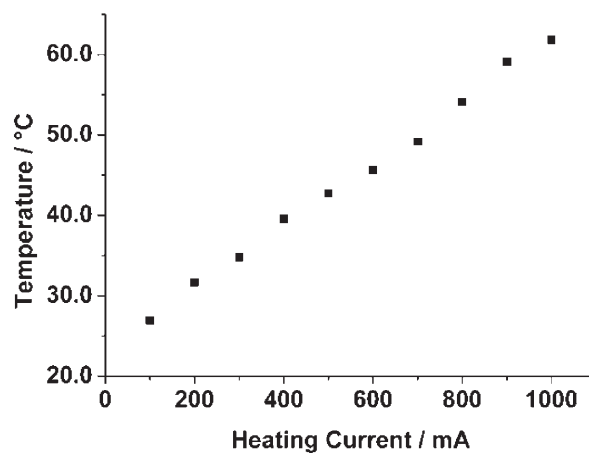


Fig. 5. Temperature calibration plot for the heated glassy carbon electrode measured under the same conditions as in Figure 4.

for this design is approx. 60 °C. At higher temperatures, the electrode center contacts were damaged.

3.2. Comparison of Asymmetric, Symmetric and Bridge Connection of the Working Electrode

3.2.1. Gold Wire Electrode

Starting in the early 1990s, Gründler et al. [13] used 25 μm Pt wire for an asymmetric heated electrode. The contacts at both ends of the wire were isolated from the electrolyte by silicon rubber. The potentiostat was connected to one end of the Pt-wire electrode. This simple asymmetric setup was tested with the ferro-/ferricyanide redox couple. Nevertheless, the results were unsatisfactory. Even with an efficient electrical filtering (low pass), the cell displayed an incorrect electrochemical behavior. The earlier used electro-mechanic plotters often were too slow to follow the disturbances caused by the heating AC (For a comparison of asymmetric with symmetric Pt wire electrodes see also [15, 22]).

Figure 6A depicts cyclic voltammograms (CVs) measured with an asymmetrically connected gold wire electrode at different heating currents representing different temperatures. Low heating currents up to 200 mA generating electrode temperatures up to 22 °C did not disturb the potentiostat-signal. However, a slightly higher heating current (300 mA) caused a faulty response. The expected signal increase at higher temperatures was not observed. Instead we observed a strong disturbing influence of the heating current and a complete failure of the electrochemical instrument at temperatures that were increased even further. In contrast, an almost full compensation of distortions caused by the AC heating current could be achieved when the voltammetric working electrode was equipped with a center contact connected to the working electrode input of the potentiostat [14, 15]. In this setup the AC generator was coupled to the electrode via a transformer floating vs. ground. The heating current generated an iR drop as before. However, with respect to the potentiostat's working electrode input, i.e., the symmetrical contact of the electrode, the two polarization voltages are equal in quantity and opposite in polarity at every moment. This has been explained earlier in more detail [14, 15]. Figure 6B depicts results of the same experiment as in Figure 6A for a symmetric connection of the heated Au-wire via a center contact. Here, the potentiostat is not affected by the heating current. We observed the advantageous effects that have been described earlier [13, 15, 22, 36]: briefly, due to enhanced mass transport (thermal convection and accelerated diffusion), the signal level is increasing with elevating electrode temperature. However, some visible noise could not be compensated. This effect illustrates the difficulties to construct an electrode with two perfectly symmetric branches. Even small disparities in length and, hence, ohmic resistance will cause the observed remnant signal noise. To demonstrate the ability of the novel inductor bridge

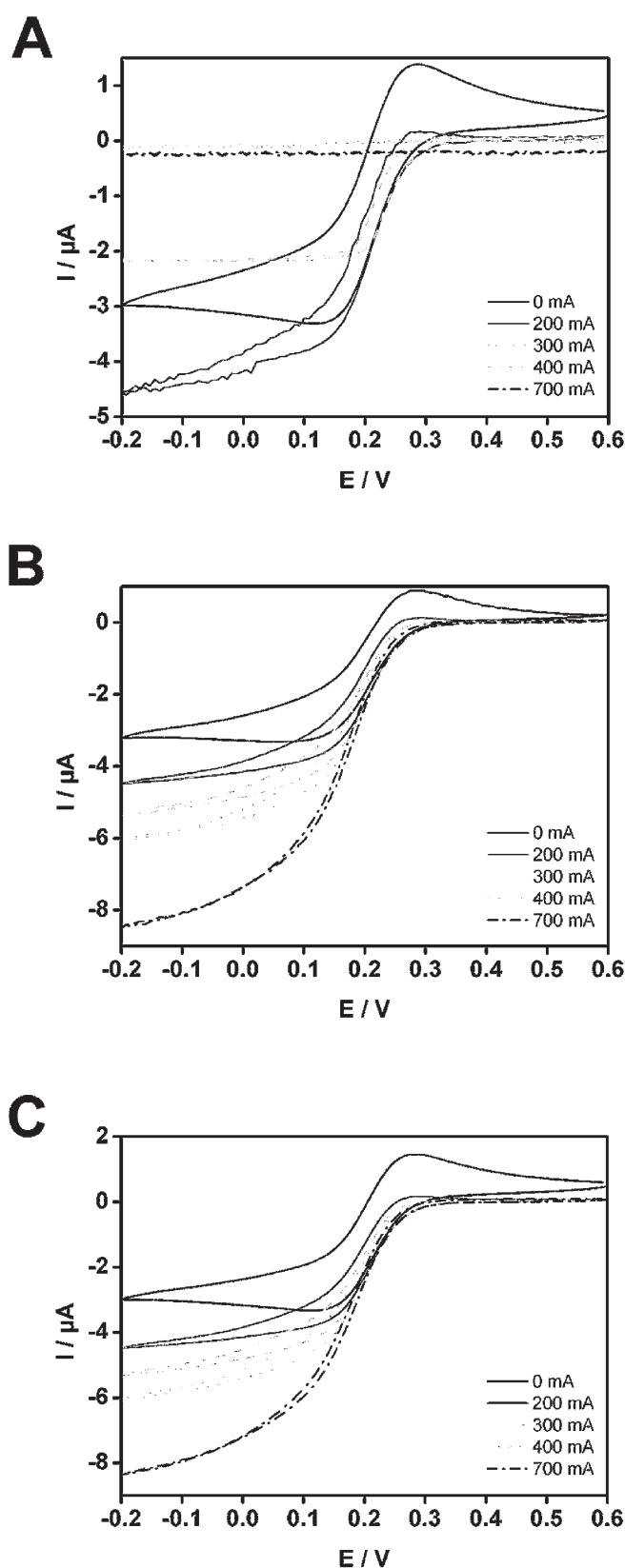


Fig. 6. Heating current effect during cyclic voltammetry for A) an asymmetrically connected one piece gold wire, B) a symmetric two piece gold wire electrode, and C) a one piece gold wire electrode connected via the inductor bridge. All measurements were performed in a solution containing 0.1 M KCl and 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ vs. Ag/AgCl (3 M KCl) at 21 °C bulk solution temperature.

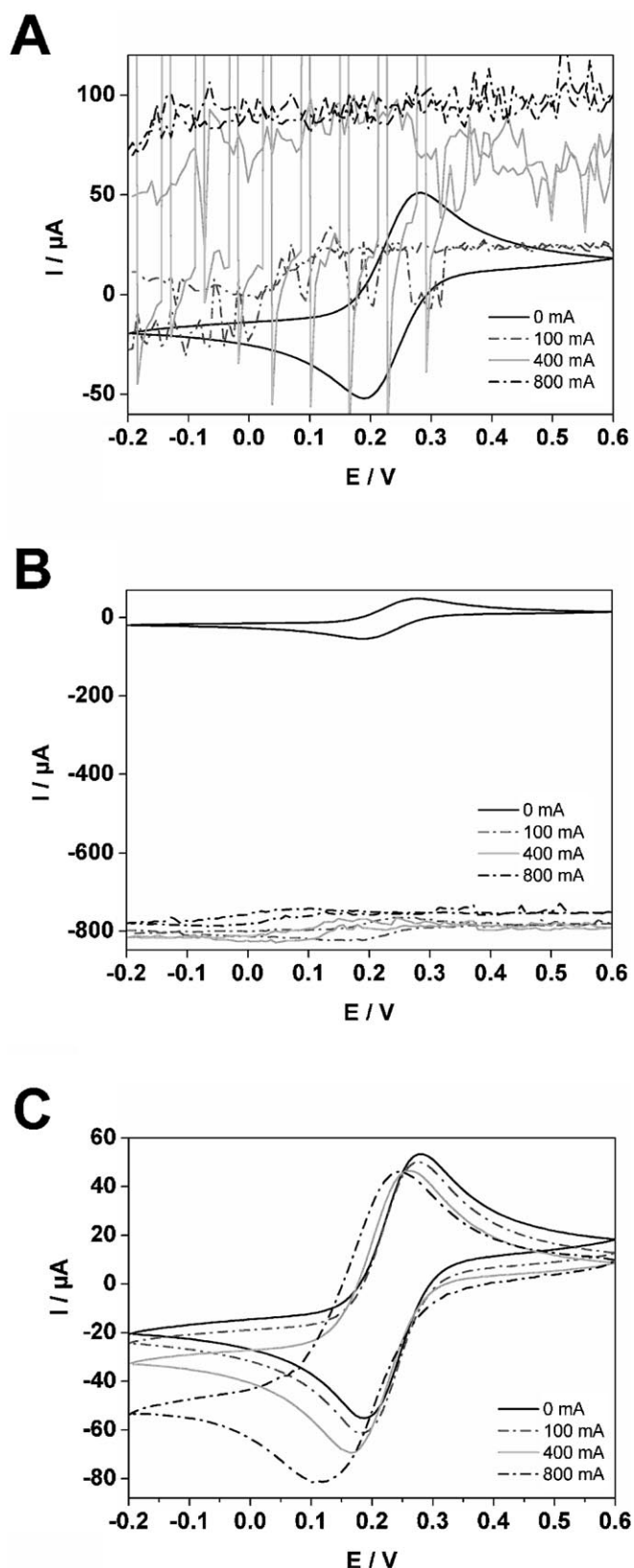


Fig. 7. The new inductor bridge drastically suppresses noise effects for a heated glassy carbon electrode. A) Asymmetric connection, B) symmetric connection, C) connection via the new inductor bridge. Conditions as in Figure 6.

connection to fully suppress the heating current disturbances in the electrochemical signals, we connected the potentiostat via the bridge to both ends of the working electrode. Figure 6C indicates that all disturbing effects of the heating current can be eliminated by our new inductor bridge. A third center contact of the heated electrode is no longer required, significantly simplifying the electrode design.

3.2.2. Glassy Carbon Electrode

The efficiency of our new inductor bridge in suppressing noise and disturbances caused by the heating current is especially impressive for electrodes with high ohmic resistance such as glassy carbon electrodes. In these high resistance electrodes the voltage drop along the carbon rod generally causes serious problems with the potentiostat for both the asymmetric and the symmetric connection type. Figure 7A illustrates the disturbing effects of the heating current for the potentiostat being connected to one end of the glassy carbon rod only. The high voltage drop leads to severe overload and false readings of the electrochemical signals. This is also true in case of the symmetric connection as demonstrated in Figure 7B. The heavy noise and large off-sets of the “hot” CVs arise from problems with the imperfect symmetry of the center contact of the glassy carbon rod electrode. In the experiment the electrode had resistances of 30 Ohm and 35 Ohm between the center and the two end contacts. Figure 7C demonstrates the dramatic effect of the inductor bridge in eliminating noise and disturbances. Noise and off-sets fully vanished from the voltammetric signals. Due to the large electrode surface, the CVs are peak-shaped, even at high temperatures where convection leads to an accelerated mass transport. To reduce the convection effect we used a face-down arrangement of the glassy carbon electrode inside the measuring cell.

4. Conclusions

We could show that a simple inductor bridge can eliminate disturbing contributions of the heating current to the electrochemical signals in directly heated one-piece Au-wire or glassy carbon electrode setups. The new circuit yields cyclic voltammograms of ferric cyanide with a noise level superior to the earlier symmetrically branched electrode designs. This is especially true for heated glassy carbon electrodes and can be attributed to the ability of the inductor bridge to completely block high frequency signals, i.e., the heating current (100 kHz). Our simple circuit may open new opportunities to construct new types of heated electrodes or electrode arrays even with materials of high resistance.

5. Acknowledgements

The project was granted by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; FL 384/3-1). The technical assistance provided

by Carolin Lau in preparation of the heated glassy carbon electrode is gratefully acknowledged.

6. References

- [1] G. T. Burstein, J. J. Moloney, *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 1037.
- [2] Y. Harima, S. Aoyagui, *J. Electroanal. Chem.* **1976**, *69*, 419.
- [3] C. Lau, G. U. Flechsig, P. Gründler, J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 74.
- [4] C. Lau, S. Reiter, W. Schuhmann, P. Gründler, *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 255.
- [5] R. G. Compton, B. A. Coles, F. Marken, *Chem. Commun.* **1998**, 2595.
- [6] F. Marken, S. L. Matthews, R. G. Compton, B. A. Coles, *Electroanalysis* **2000**, *12*, 267.
- [7] Y. C. Tsai, B. A. Coles, R. G. Compton, F. Marken, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 639.
- [8] U. K. Sur, F. Marken, R. Seager, J. S. Foord, A. Chatterjee, B. A. Coles, R. G. Compton, *Electroanalysis* **2005**, *17*, 385.
- [9] A. Baranski, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1294.
- [10] L. Ducret, C. Cornet, *J. Electroanal. Chem.* **1966**, *11*, 317.
- [11] C. Gabrielli, M. Keddiam, J. F. Lizee, *J. Electroanal. Chem.* **1983**, *148*, 293.
- [12] C. Gabrielli, M. Keddiam, J. F. Lizee, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *359*, 1.
- [13] P. Gründler, Tadesse Zerihun, A. Möller, A. Kirbs, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *360*, 309.
- [14] P. Gründler, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1998**, *362*, 180.
- [15] P. Gründler, Tadesse Zerihun, A. Kirbs, H. Grabow, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *305*, 232.
- [16] A. Schneider, G. U. Flechsig, P. Gründler, *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 3768.
- [17] G. U. Flechsig, P. Gründler, J. Wang, *DE patent 102004017750B4, WO 2005/098438*.
- [18] J. Wang, P. Gründler, G. U. Flechsig, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, J. L. L. Paz, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3752.
- [19] J. Wang, G. U. Flechsig, A. Erdem, O. Korbut, P. Gründler, *Electroanalysis*, **2004**, *16*, 928.
- [20] G. U. Flechsig, O. Korbut, S. B. Hocevar, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, P. Gründler, J. Wang, *Electroanalysis* **2002**, *14*, 192.
- [21] I. Svancara, P. Kotzian, R. Metelka, M. Bartos, P. Foret, K. Vytras, *Monitoring of Pollutants in the Environment*, Vol. IV, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic, **2002**, 145–158 (in Czech).
- [22] Tadesse Zerihun, P. Gründler, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *404*, 243.
- [23] Tadesse Zerihun, P. Gründler, *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *441*, 57.
- [24] P. Gründler, G. U. Flechsig, *Electrochim. Acta* **1998**, *23*, 3451.
- [25] G. U. Flechsig, O. Korbut, P. Gründler, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 786.
- [26] Tadesse Zerihun, P. Gründler, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *415*, 85.
- [27] A. Beckmann, A. Schneider, P. Gründler, *Electrochem. Commun.* **1999**, *1*, 46.
- [28] J. Wang, M. Jasinski, G. U. Flechsig, P. Gründler, B. Tian, *Talanta* **2000**, *50*, 1205.
- [29] T. Voss, P. Gründler, C. M. A. Brett, A. M. O. Brett, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 127.
- [30] Z. Y. Lin, J. J. Sun, J. H. Chen, L. Guo, G. N. Chen, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 226.
- [31] T. Voss, P. Gründler, A. Kirbs, G. U. Flechsig, *Electrochem. Commun.* **1999**, *1*, 383.
- [32] P. Gründler, A. Kirbs, T. Zerihun, *Analyst* **1996**, *121*, 1805.
- [33] T. Voss, A. Kirbs, P. Gründler, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 320.
- [34] P. Gründler, D. Degenring, *Electroanalysis* **2001**, *13*, 755.
- [35] G. G. Wildgoose, D. Giovanelli, N. S. Lawrence, R. G. Compton, *Electroanalysis* **2004**, *16*, 421.
- [36] P. Gründler, G. U. Flechsig, *Microchim. Acta* **2006**, *154*, 175.
- [37] www.hot wire electrochemistry.de
- [38] G. U. Flechsig, J. Gimsa, P. Gründler, H. Grabow, *patent application DE 102005039726*.

8.2 Numerically optimized shape of directly heated electrodes for minimal temperature gradients

Sensors and Actuators B: Chemical 137, 2009, 363-369.

Nico Mahnke, Aleksandar Markovic, Heiko Duwensee, Falko Wachholz, Gerd-Uwe Flechsig*, Ursula van Rienen*

Falko Wachholz fungierte als die vornehmliche Kontaktperson bezüglich des benötigten chemischen Hintergrundes und der chemischen Parametrisierung der durchgeführten Simulationen. Er war an zahlreichen Diskussionen während der gesamten Zeit der verschiedenen Simulationsszenarien beteiligt und wirkte mit beim Verfassen des Manuskripts sowie beim Erstellen ergänzenden Materials.



Numerically optimized shape of directly heated electrodes for minimal temperature gradients

Nico Mahnke^b, Aleksandar Markovic^b, Heiko Duwensee^a,
Falko Wachholz^a, Gerd-Uwe Flechsig^{a,*}, Ursula van Rienen^{b,**}

^a University of Rostock, Department of Chemistry, Albert-Einstein-Str. 3a, 18051 Rostock, Germany

^b University of Rostock, Institute of General Electrical Engineering, Albert-Einstein-Str. 2, 18051 Rostock, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2008

Received in revised form 17 November 2008

Accepted 19 November 2008

Available online 6 December 2008

Keywords:

Heated electrode

Numerical calculation

Thermal simulation

Temperature allocation

ABSTRACT

For electrochemical investigations at heated electrodes especially in the bioanalytical area a precise control of the surface temperature is necessary. Due to the problem of non-homogenous temperature allocation over the length of a directly heated electrode/conductor in electrochemical applications the possibility of changing its design in order to avoid such inhomogeneous effects was investigated. By mathematical simulations with the program Comsol Multiphysics®, concerning the temperature development along a conducting wire for different oval shapes depending on changing heating durations and current densities, the temperature gradient could be minimized. We could show the possibility to achieve an almost homogenous surface temperature by creating a special oval-shaped design for the electrode. The convection of surrounding media in the proximity of the conductor was not taken into account for the thermal simulation, which applies in particular for short-term pulse heating.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last 15 years directly heated electrodes have attained considerable attention. They have been applied for a variety of analytical purposes. Gabrielli et al. [1,2] presented preliminary results of 6 °C temperature jump experiments performed at Pt wire electrodes using 250 kHz heating current and ferro/ferricyanide as a model analyte. Gründler et al. used electrically heated micro-wire electrodes [3] for the determination of lead [4], oxygen [5], and organic substances [6]. Later we detected mercury [7] by means of anodic stripping voltammetry. Hot-wire detectors can also be used in flow systems [8]. Experiments with carbon fibers were not successful [3]. However, directly heated carbon paste electrodes could be successfully applied for DNA analysis [9,10] and trace detection of cadmium, lead and zinc [11]. We further proposed to control DNA hybridization at heated gold wire electrodes that had been modified with a thiol-linked DNA probe layer [12].

Chen and co-workers described electroluminescence measurements at directly heated wire [13–15] and carbon paste electrodes [16–18]. Another interesting approach of Chen and co-workers is directly heated graphite electrodes and their application for the determination of trace riboflavin [19,20].

Gründler et al. introduced an electrochemical technique that they called “temperature pulse voltammetry (TPV)” [21,22]. Sampled voltammograms can be recorded on directly heated electrodes at temperatures far above the boiling point of the electrolyte; however, the critical state of that liquid can probably not be reached [23,24]. We proposed “temperature pulse amperometry” as simplified variant. Here, an amperometric measurement is conducted while short temperature pulses are being applied. The resulting peaks can be used as a concentration proportional signal. The detection of trace picric acid is possible this way [25].

Publications in the field of high-temperature electrochemistry have been reviewed [26–28]. In the recent years, investigations with electrically heated electrodes became more and more convenient due to improved instrumentation [29]. By using a filtering inductor bridge, the heating current (AC between 50 and 100 kHz, and ca. 1 A) can be separated from the electrochemical signal (1 nA to 10 μA) which leads to clear signals without any major disturbances [30,31].

However, most of the used electrodes (metal wires) still have the problem of a temperature gradient at the electrode surface due to different heat sinks in the middle and at the ends of an electrode. This temperature gradient is especially steep during short heat pulses. It is diminished during long-term heating in water, because of the cooling effect due to thermal convection [32]. In contrast to electrochemical experiments which usually provide only information about the average temperature of the surface, mathematical simulations give information about each point of the electrode surface. As could be assumed, it was evaluated that there is a signif-

* Corresponding author. Tel.: +49 381 4986470; fax: +49 381 4986461.

** Corresponding author. Tel.: +49 381 4987070; fax: +49 381 4987081.

E-mail addresses: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de (G.-U. Flechsig), ursula.van-rienen@uni-rostock.de (U. van Rienen).

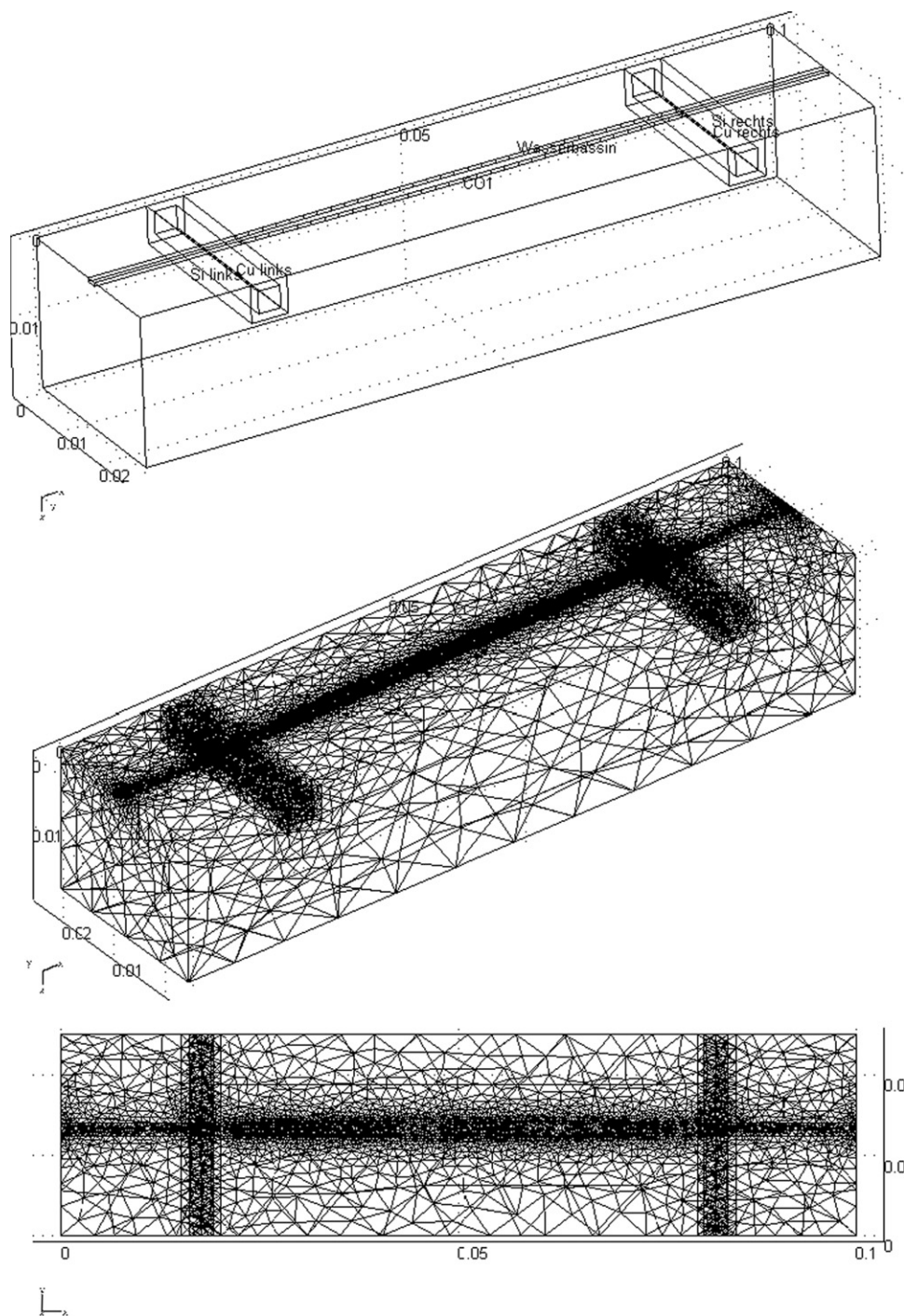


Fig. 1. Model of the electrode geometry (above) and the appropriate FEM discretization mesh (middle and below).

icant temperature gradient at electrodes of uniform cross-section. However, especially for the application of heated electrodes in bioanalysis a constant temperature at the electrode surface is absolutely necessary. Only in this way a precise control of the electrode reactions at the surface (e.g. the hybridization of two DNA-single strands) can be realized under stringent conditions. Immobilized enzymes are another important topic. There is only a small interval for the temperature optimum. If the temperature is too low, the enzyme reactivity is not that high and so the sensitivity of the sensor is low. But if the temperature is too high the denaturation process of the enzyme starts and the sensor cannot be used for long-term applications.

During the last decades the numerical simulations of temperature distribution advanced rapidly [33,34]. Here, we describe a simulation approach to design a directly heated electrode that almost completely eliminates the temperature gradient. This could lead to much more reliable and sensitive hot-wire sensors.

2. Simulation model

The main idea is to find the geometry of the electrode that compensates the difference in the heat sinks along the electrode. This optimization of the wire electrode design was done by numeri-

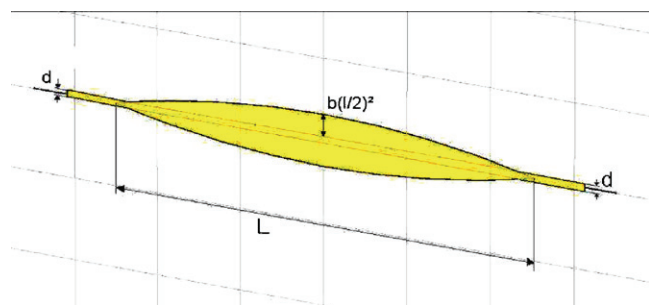


Fig. 2. Longitudinal profile of the sputtered gold conductor (x - y plane). The shape-coefficient b had to be optimized.

cal simulation experiments. For the simulation of the temperature development on the surface of the electrode we used the program Comsol Multiphysics©[35] which employs the finite element method (FEM) for discretization and solution of various differential equations on 3D geometries (Fig. 1).

The temperature development along the electrode is caused by the Joule or resistive heating which is described by the following simple expression:

$$P = UI = I^2R = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \quad (1)$$

The amount of Joule power P dissipated by a resistor R is, with the use of the ohmic law ($U=RI$; U —voltage, I —current), depending on the square of the current I flowing through. The time integral of the Joule power defines the amount of thermal energy Q dissipated by the resistor over the time t .

If the cross-section of the wire A is not constant, the current density J ($I=JA$) will also not be constant and so the heat development over the length of the wire should also not be constant. This simple assumption motivated the effort for numerical optimization of the electrode form in order to have as uniform as possible temperature distribution over the whole length of the electrode wire.

The whole set-up of the electrode around the wire including the wire itself and the surrounding material have been modeled with their electrical and thermal properties (Table 1).

It has been assumed that the electrode is made of gold wire and copper contacts sputtered on a silicon surface. Everything except the gold wire is encapsulated under a wax coating. The gold wire shown in Fig. 2 is in contact with the solution, for the simulation purposes we assumed water as a medium around the wire.

The simulation is a coupled electromagnetic and thermal simulation. The input source in the electromagnetic simulation is the applied current of 1 A. The pre-computed electric field components E_x , E_y and E_z from the electromagnetic simulation are the input for the thermal simulation. The appropriate boundary conditions for both types of simulations were applied. In the thermal simulation, movement of the surrounding medium around the wire, and therefore convective heat transport is neglected. This applies especially for short-term heating up to 200 ms [21,36]. At longer periods, thermal convection occurs and causes a negative feedback due to

its cooling effect. This means the temperature gradients along the heated wire will decrease [32].

Since the conduction is the main mechanism for heat transportation in our model, the boundary condition of the gold wire is defined as “heat flux” given by the following equation:

$$n(k\Delta T) = h(T_{\text{inf}} - T) \quad (2)$$

The initial temperature of the surrounding in the thermal simulation is $T_{\text{inf}}=293$ K and the heat conductivity of the gold amounts to $h=317$ W/(mK). In order to get information for the temperature development on the wire surface over the time, the thermal simulation is discretized in time.

3. Results and discussion

First the temperature development along the electrode was simulated with a constant cross-section for a total time of 0.5 s, discretized in steps of 20 ms. Fig. 3 shows the temperature allocation change along a linear conductor within 0.5 s (B). A corresponding 3D plot for the time of 100 ms (A) as well as a 2D plot for the same time (C) is also shown in the same figure. A huge temperature gradient from the middle to both ends of the conductor was obtained for a constant cross-section wire. While heat is produced from electric energy evenly along the heated conductor, contact sites at both ends are effective heat sinks. Thus we tried to minimize the temperature gradient by using different shapes for the electrode. According to Eq. (1), the local heat development along the conductor $\Delta Q/\Delta t$ is a consequence of the electric current I flowing through the cross-section of the electrode. The change of the electrode cross-section is effectively changing the local resistivity along the current path. Hence, if a constant current applied, changing the resistivity along the current path enables the control of the heat development in different sections along the electrode. This eventually results in a control of the temperature gradient along the electrode. Having a locally larger cross-section, the resistivity and the heat development will be locally lower. To compensate for the heat sinks at both ends of the wire, we introduced small cross-section here, and bigger cross-section in the middle of the wire. As a result of such a consideration, an oval shape of the electrode seemed to be the best way to get more homogeneous temperature allocation along the whole lengths of the wire or screen-printed layer.

For the optimization of the electrode's geometry a model equation:

$$y = -bx^2 + d + \left(\frac{L}{2}\right)^2 b \quad (3)$$

was adopted. By varying the coefficient b , the shape in the x - y plane could be adjusted which had an effect on the temperature allocation along the heated wire. Now, less heat is produced in the middle which compensates for the effect of the heat sinks.

As shown in Fig. 4A–C, the conductor is more or less at the same temperature over its whole lengths. This becomes especially apparent by comparing the calculated graphs for the temperature gradients in Figs. 3B and 4B. The maximal temperature difference between the coolest and the hottest point could be diminished from

Table 1
Relevant material parameters for the materials used in the simulation model.

Physical properties	Gold	Copper	Silicon	Water
Density (kg/m ³)	19,320	8920	2330	0.001 ^a
Specific heat capacity (J/(kg K))	128	385	700 ^a	4187
Electric conductivity (S/m)	45.2×10^6	58×10^6	2.54×10^{-4}	^b
Thermal conductivity (W/(mK))	317	401	148	0.597 ^c

^a Applies for $T=25^\circ\text{C}$.

^b Electric conductivity of water was not considered.

^c Applies for $T=20^\circ\text{C}$.

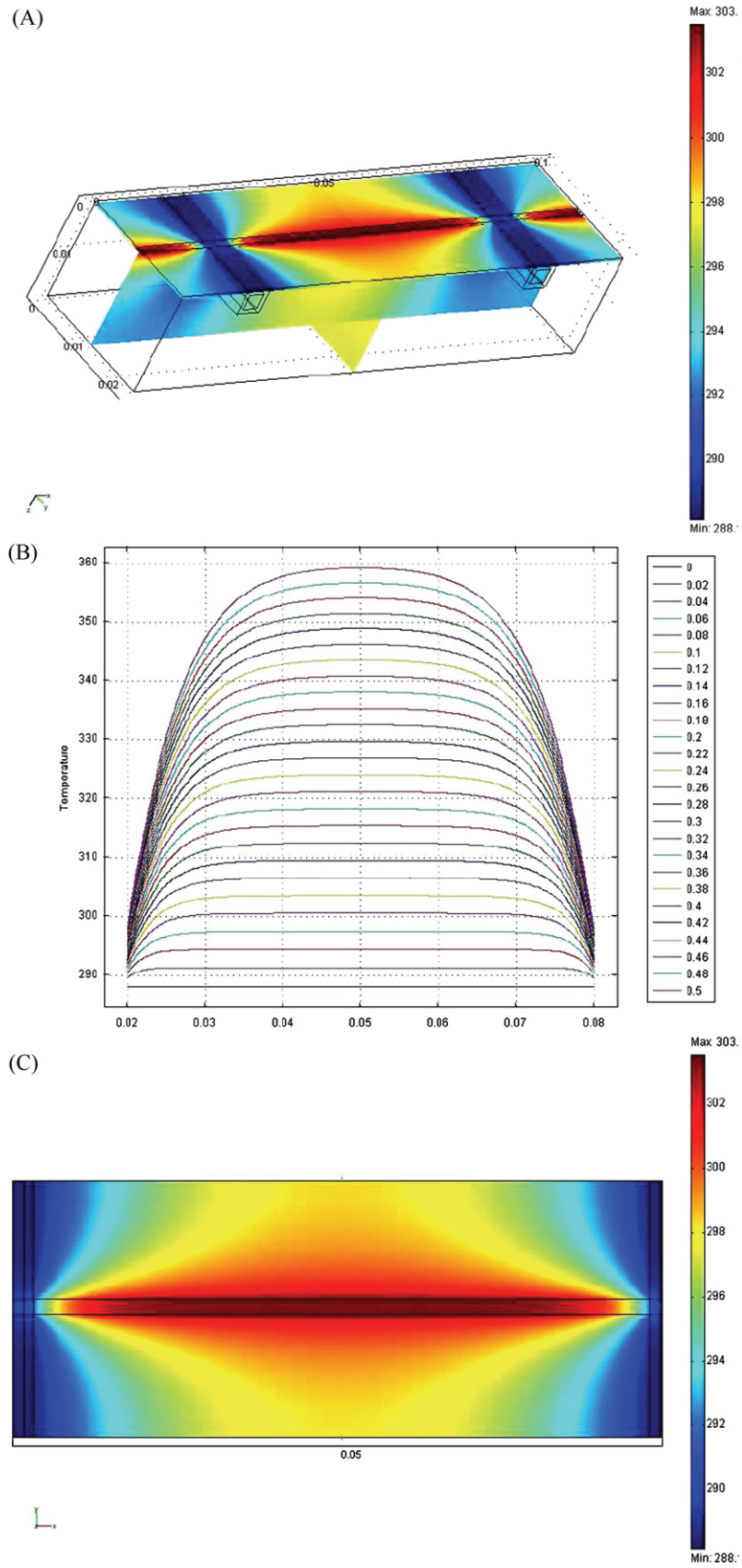


Fig. 3. (A–C) Temperature allocation along a linear sputtered conductor on an insulating substrate; huge temperature gradient between both ends; (A/C) 3D/2D-plot for 100 ms heating duration, (B) plot of the temperature development for the duration of at least 500 ms.

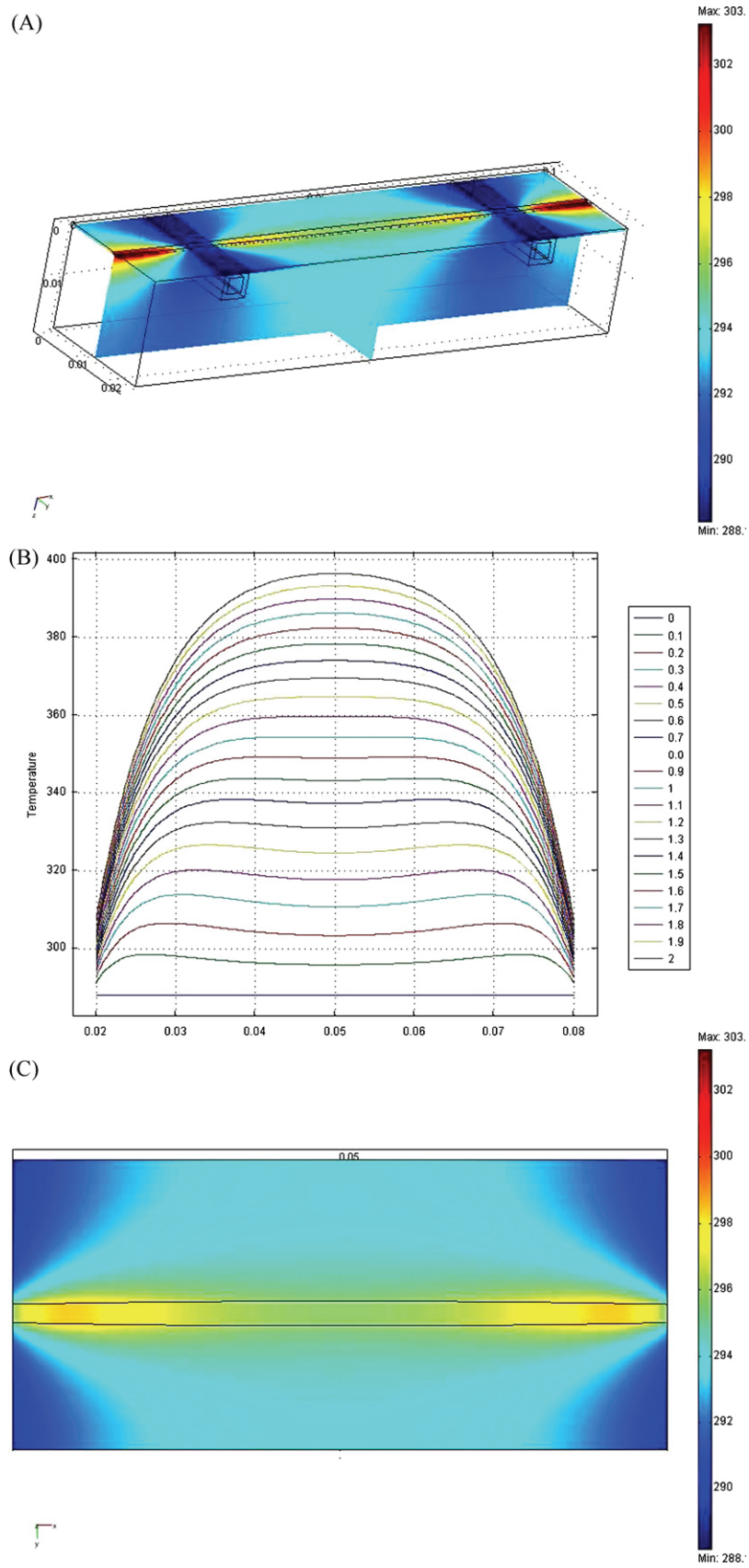


Fig. 4. (A–C) Nearly constant temperature allocation along the conductor after optimizing the “wire” by fitting the shape-coefficient b ; (A/C) 3D/2D-plot for 100 ms heating duration and (B) plot of the temperature development for the duration of at least 2 s.

ca. 62 to 30 K at a heating time of 0.5 s. For a certain temperature of such as 360 K, this means an enhancement of uniformity (± 1 K) from ca. 30% (Fig. 3B) to 50% (Fig. 4B) of the whole length of the heated wire or layer. The longer heating time results from the lower overall resistance of the oval wire or layer and can be compensated by higher heating current.

Concerning a uniform temperature allocation along the wire for the time period of 100 ms (e.g. for temperature pulse voltammetry), the optimal value of b was found to be 0.05.

These results of the calculated temperature allocation along sputtered conductors led us to an optimized shape for a completely new designed electrode type.

4. Conclusions

The mathematical simulations proved our estimation of a non-constant temperature at the surface of directly heated electrodes. To minimize the temperature gradient, an oval shape (rather than cylindrical or other shapes with a constant cross-section) would be indeed a significant improvement. Further improvement of the oval shape considering more complicated functions would require considerably more computing resources and will be performed in the future.

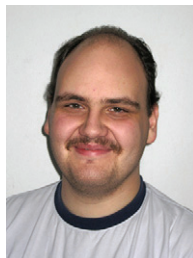
Acknowledgements

The authors want to thank the Federal State of Mecklenburg-Vorpommern (Landesexzellenzförderung) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support.

References

- [1] C. Gabrielli, M. Keddam, J.F. Lizee, A temperature perturbation method for electrochemical kinetics investigation, *J. Electroanal. Chem.* 148 (1983) 293–297.
- [2] C. Gabrielli, M. Keddam, J.F. Lizee, Frequency analysis of a temperature perturbation technique in electrochemistry. Part I. Theoretical aspects, *J. Electroanal. Chem.* 359 (1993) 1–20.
- [3] P. Gründler, T. Zerihun, A. Möller, A. Kirbs, A simple method for heating micro electrodes in-situ, *J. Electroanal. Chem.* 360 (1993) 309–314.
- [4] T. Zerihun, P. Gründler, Electrically heated cylindrical microelectrodes. Determination of lead on Pt by cyclic voltammetry and cathodic stripping analysis, *J. Electroanal. Chem.* 415 (1996) 85–88.
- [5] T. Zerihun, P. Gründler, Electrically heated cylindrical microelectrodes. The reduction of dissolved oxygen on Pt, *J. Electroanal. Chem.* 404 (1996) 243–248.
- [6] T. Zerihun, P. Gründler, Oxidation of formaldehyde, methanol, formic acid and glucose at ac heated cylindrical Pt microelectrodes, *J. Electroanal. Chem.* 441 (1998) 57–63.
- [7] J. Wang, P. Gründler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, J. Lu, J. Wang, Z. Zhao, B. Tian, Hot-wire stripping potentiometric measurements of trace mercury, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 33–37.
- [8] J. Wang, M. Jasinski, G.-U. Flechsig, P. Gründler, B. Tian, Hot-wire amperometric monitoring of flowing streams, *Talanta* 50 (2000) 1205–1210.
- [9] J. Wang, P. Gründler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, J.L.L. Paz, DNA-analysis at heated carbon paste electrodes, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3752–3756.
- [10] J. Wang, G.-U. Flechsig, A. Erdem, O. Korbut, P. Gründler, Label-free DNA hybridization based on coupling of a heated carbon paste electrode with magnetic separations, *Electroanalysis* 16 (2004) 928–931.
- [11] G.-U. Flechsig, O. Korbut, S.B. Hocesvar, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, P. Gründler, J. Wang, Electrically heated bismuth-film electrode for voltammetric stripping measurements of trace metals, *Electroanalysis* 14 (2002) 192–196.
- [12] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, DNA hybridization detection at heated electrodes, *Langmuir* 21 (2005) 7848–7853.
- [13] Z.Y. Lin, J.J. Sun, J.H. Chen, L. Guo, G.N. Chen, A new electrochemiluminescent detection system equipped with an electrically controlled heating cylindrical microelectrode, *Anal. Chim. Acta* 564 (2006) 226–230.
- [14] Z.Y. Lin, J.J. Sun, J.H. Chen, L. Guo, G.N. Chen, Enhanced electrochemiluminescent of lucigenin at an electrically heated cylindrical microelectrode, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 269–274.
- [15] Z. Lin, J. Sun, J. Chen, L. Guo, G. Chen, The electrochemiluminescent behavior of luminol on an electrically heating controlled microelectrode at cathodic potential, *Electrochim. Acta* 53 (2007) 1708–1712.
- [16] Z.Y. Lin, J.J. Sun, J.H. Chen, L. Guo, Y.T. Chen, G.N. Chen, Electrochemiluminescent biosensor for hypoxanthine based on the electrically heated carbon paste electrode modified with xanthine oxidase, *Anal. Chem.* 80 (2008) 2826–2831.
- [17] Y.T. Chen, Z.Y. Lin, J.J. Sun, G.N. Chen, A new electrochemiluminescent detection system equipped with an electrically heated carbon paste electrode for CE, *Electrophoresis* 28 (2007) 3250–3259.
- [18] Y. Chen, Z. Lin, J. Chen, J. Sun, L. Zhang, G. Chen, New capillary electrophoresis–electrochemiluminescence detection system equipped with an electrically heated Ru(bpy)³2+/multi-wall-carbon-nanotube paste electrode, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 84–91.
- [19] J.J. Sun, L. Guo, D.F. Zhang, W.H. Yin, G.N. Chen, Heated graphite cylinder electrodes, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 283–288.
- [20] S.H. Wu, J.J. Sun, Z.B. Lin, A.H. Wu, Y.M. Zeng, L. Guo, D.F. Zhang, H.M. Dai, G.N. Chen, Adsorptive stripping analysis of riboflavin at electrically heated graphite cylindrical electrodes, *Electroanalysis* 19 (2007) 2251–2257.
- [21] P. Gründler, A. Kirbs, T. Zerihun, Hot-wire electrodes: voltammetry above the boiling point, *Analyst* 121 (1996) 1805–1810.
- [22] T. Voss, P. Gründler, A. Kirbs, G.-U. Flechsig, Temperature pulse voltammetry: hot layer electrodes made by LTCC technology, *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 383–388.
- [23] P. Gründler, D. Degenring, Temperature calculation for pulse-heated hot-wire electrodes, *J. Electroanal. Chem.* 512 (2001) 74–82.
- [24] P. Gründler, D. Degenring, The limits of aqueous hot-wire electrochemistry: near-critical and supercritical fluids in electrochemical sensors? *Electroanalysis* 13 (2001) 755–759.
- [25] F. Wachholz, K. Biela, M. Piekarz, G.-U. Flechsig, Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 2346–2352.
- [26] G.G. Wildgoose, D. Giovanelli, N.S. Lawrence, R.G. Compton, High-temperature electrochemistry: a review, *Electroanalysis* 16 (2004) 421–433.
- [27] P. Gründler, G.-U. Flechsig, Principles analytical applications of heated electrodes, *Microchim. Acta* 154 (2006) 175–189.
- [28] P. Gründler, Stripping analysis enhanced by ultrasound, electrode heating and magnetic fields, *Curr. Anal. Chem.* 4 (2008) 263–270.
- [29] www.hot-wire-electrochemistry.de.
- [30] G.-U. Flechsig, J. Gimsa, P. Gründler, H. Grabow, Patent DE 10 2006 006 347 B3.
- [31] F. Wachholz, J. Gimsa, H. Duwensee, H. Grabow, P. Gründler, G.-U. Flechsig, A compact and versatile instrument for radio frequency heating in nonisothermal electrochemical studies, *Electroanalysis* 19 (2007) 535–540.
- [32] A. Schneider, G.-U. Flechsig, P. Gründler, Electrically heated cylindrical micro-electrodes comparison of temperature profiles obtained by IR photography and digital simulation, *J. Electrochem. Soc.* 147 (2000) 3768–3770.
- [33] U. van Rienen, P. Pinder, T. Weiland, Consistent finite integration approach for coupled calculation of electromagnetic fields and stationary temperature distributions, in: *Proceedings of the 7th Biennial IEEE Conference on Electromagnetic Field Computation (CEFC)*, 1996, p. 294.
- [34] U. van Rienen, T. Weiland, Coupled calculation of electromagnetic fields and stationary temperature distributions, in: *Proceedings of the European Particle Accelerator Conference*, vol. 1, 1996, pp. 1295–1297.
- [35] © 1997–2008 COMSOL AB. COMSOL, COMSOL Multiphysics, COMSOL Reaction Engineering Lab, COMSOL Script and FEMLAB are registered trademarks of COMSOL AB.
- [36] A. Beckmann, B.A. Coles, R.G. Compton, P. Gründler, F. Marken, A. Neudeck, Modeling hot wire electrochemistry. coupled heat and mass transport at a directly and continuously heated wire, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 764–769.

Biographies



Nico Mahnke is a student at the Institute of General Electrical Engineering at the Rostock University in Germany. Currently, he works on his diploma thesis in cooperation with a German wind turbine producer. His research focuses on thermal development (e.g. energy cable for multi-megawatt wind turbines).



Aleksandar Markovic graduated as electrical power engineer at the University of Skopje, Macedonia. Later he received his master in computational engineering at the Rostock University, where he currently works on his Ph.D. thesis at the field of numerical simulation of charged particle dynamics in particle accelerators.



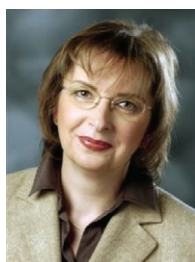
Heiko Duwensee received his diploma in chemistry in 2005 from the University of Rostock. He is currently pursuing a Ph.D. in chemistry at the University of Rostock. His current focus of research is the electrochemical detection of biomolecules especially at heated electrodes.



Falko Wachholz received his diploma in chemistry in 2005 from Rostock University. He is currently working on his Ph.D. thesis in analytical chemistry at Rostock University, Germany. His research work is focused on heated electrode applications and its technology mainly.



Gerd-Uwe Flechsig graduated in 1997 as a Diplom-chemiker (M.Sc. in chemistry) at Rostock University. He was awarded Dr. rer. nat. (Ph.D.) in 2001 and Dr. rer. nat. habil. (Habilitation, D.Sc.) in 2006, both in the field of analytical chemistry with theses regarding heated electrodes. His adviser for many years has been Prof. Dr. Peter Gründler. Gerd-Uwe Flechsig's research focuses mainly on heated electrochemical detectors and biosensors for DNA and proteins. He received the Metrohm-Award in 2003 and a Heisenberg fellowship of the German Research Foundation (DFG) in 2008. Currently, he serves as a private lecturer in the Department of Chemistry at the University of Rostock.



Ursula van Rienen received her diploma in mathematics in 1983 from the Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, her Ph.D. degree in mathematics and scientific computing in 1989 from the Darmstadt University of Technology (TUD). In 1997, she finished her Habilitation (the "second book") and received the *venia legendi* for the fields "Theoretical Electrical Engineering" and "Scientific Computing" from the Faculty of Electrical Engineering and Information Technology at the TUD. In 1999, She received an Award of the Vereinigung von Freunden der Technischen Universität zu Darmstadt e.V. (Ernst-Ludwigs-Hochschulgesellschaft) for the postdoctoral thesis (Habilitationsschrift). Since October 1997 she holds the chair in "Theoretical Electrical Engineering" at Rostock University. Her research work is focused on computational electromagnetics with various applications, ranging from biomedical engineering to accelerator physics.

8.3 Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors

Electrochemistry Communications, 9, 2007, 2346-2352.

Falko Wachholz, Katarzyna Biała, Magdalena Piekarz, Gerd-Uwe Flechsig*

Falko Wachholz plante, entwickelte und analysierte die Experimente zur Entwicklung der Temperatur-Puls Amperometrie. Weiterhin bereitete er die genutzten Typen der Elektroden nach Plänen von Voss et al. vor. Falko Wachholz entwarf und erstellte zugehörige Graphiken und war beteiligt an Diskussionen und der Vorbereitung des Manuskripts.



Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors

Falko Wachholz^a, Katarzyna Biała^b, Magdalena Piekarcz^b, Gerd-Uwe Flechsig^{a,*}

^a University of Rostock, Department of Chemistry, Dr. Lorenz Weg 1, D 18051 Rostock, Germany

^b Maria Curie Skłodowska University Lublin, Faculty of Chemistry, Maria Curie Skłodowska sq. 2, 20 031 Lublin, Poland

Received 14 June 2007; received in revised form 28 June 2007; accepted 29 June 2007

Available online 12 July 2007

Abstract

This communication reports about thermal modulation of amperometric signals by short heat pulses applied at directly heated gold electrodes. A gold layer together with a pseudo reference and counter electrode has been printed onto a low temperature cofired ceramic (LTCC) substrate. We chose hexacyanoferrate(II) and picric acid as model analytes in this preliminary study. Peak shaped amperometric signals were formed upon such thermal modulation. The peak current has been taken as the analytical information. Thermal modulation in amperometric measurements activates kinetically inhibited analytes such as picric acid. A linear calibration plot has been obtained ranging from 0.2 to 1 mmol/l. The background contribution was effectively suppressed, even at 0.7 V applied potential at the gold electrode. Convection did not significantly affect the analytical signal. This will be important for applications where convection is pulsating or is otherwise not under control and thus induces disturbances. Future applications include environmental monitoring, flow injection analysis, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: LTCC; Amperometry; Temperature pulse; Heated electrode; Picric acid

1. Introduction

Amperometric sensors are widely used detectors in analytical flow systems, high performance liquid chromatography [1,2] and capillary electrophoresis [3–5]. However, such detectors often suffer from electrode fouling and background contribution. Due to the constant potential, not only the analyte but also the substances that can be oxidized or reduced are reacting. The products can cause severe electrode blocking. Pulsed electrochemical detection is a common method to clean electrode surfaces while the detection is running [6]. Heated platinum electrodes can prevent electrode fouling during the amperometric and voltammetric detection of NADH [7]. Discrimination against major components of the background current is often accomplished by means of hydrodynamic modulation

[8,9]. Thermo-hydrodynamic modulation has been demonstrated at directly heated electrodes, which have been used as amperometric detectors in flow systems [10]. Continuous microwave activation of capillary electrophoresis detectors results in improved signal-to-background ratios [4].

Using ferrocene-modified targets, we found a dramatic effect of elevated temperature during DNA hybridization at a directly heated probe-modified gold electrode [11].

In 1996 Gründler et al. introduced an electrochemical technique known as “temperature pulse voltammetry (TPV)” [12–14]. This way, complete, sampled voltammograms can be recorded at temperatures far above the boiling point of the electrolyte used. However, due to practical limitations, the critical state of that liquid can probably not be reached [15,16]. Baranski described a method how to obtain high steady state electrode temperature above the boiling point by high frequency (0.1–2 GHz) Joule-heating of a thin electrolyte layer in the nearest vicinity of the electrode surface [17]. Both methods require a sophisticated

* Corresponding author. Fax: +49 381 4986461.

E-mail address: gerd.uwe.flechsig@uni-rostock.de (G. U. Flechsig).

apparatus including synchronized heat pulse generator and potentiostat or (in the case of continuous electric heating of a thin electrolyte layer) an expensive high frequency power generator. The latter approach is limited to the use of micro disk electrodes.

Recently, we introduced a compact heating instrument and a filtering inductor bridge which allow direct electric heating of many kinds of electrodes while performing undisturbed electrochemical measurements. By these means, a simple electrode design with two rather than three contacts is sufficient [18]. Lin et al. investigated electroluminescence at electrically heated platinum wire electrodes [19,20]. Sun et al. reported recently about heated graphite cylinder electrodes [21]. Basic principles and analytical applications of elevated temperature in electrochemistry have been recently reviewed [22,23].

Here we describe how thermal modulation in amperometric measurements can be achieved by applying short heat pulses which elevate the temperature of the working electrode within a 100 ms period. In this method that we call “temperature pulse amperometry (TPA)”, the maximum current difference between cold and hot state is taken as the analytical signal. This technique can be performed by very simple means including a potentiostat and a programmable relay, both commercially available, and a heating generator [24].

2. Experimental

2.1. Apparatus

Working, counter and reference electrodes were screen-printed metallic layers on a low-temperature cofired ceramics (LTCC) substrate (Fig. 1). The working electrode was a circular arc-shaped gold layer 4.4 mm in diameter and 0.13 mm in width. A platinum-layer circular ring counter electrode surrounded both the working and the reference electrodes. The latter was a printed Ag|AgCl circle in the

centre. More information about the structure of the electrode and its production is given in [13].

Because of disturbing chloride anions that had to be added to the solution when measuring with the internal reference electrode, we used an external Ag|AgCl (3 M KCl) reference electrode from Metrohm. The potentiometric and amperometric experiments have been conducted by means of an AUTOLAB instrument equipped with a PSTAT 10 potentiostat (ECO CHEMIE, Utrecht, The Netherlands). The instrument was controlled by a PC using the GPES 4.8 software. A FARADAY cage with a stand and a glass cell was utilized during these measurements (all from Metrohm AG, Herisau, Switzerland). The measuring cell was temperature-controlled (15 °C) by means of cryostat model #9105 from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). The peak current was determined using the GPES 4.8 Software. The heating AC was generated by means of a laboratory-made 100 kHz power generator. A LOGO! 230RC logic module (Siemens AG, Berlin, Germany) has been used as a programmable relay to excite the 100 ms temperature pulses.

2.2. Material

All chemicals were of analytical grade and were used as received. Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and the saturated aqueous solution of picric acid (2,4,6-trinitrophenol, 13 g/L) were purchased from Fluka. Potassium chloride was purchased from Merck. All solutions were prepared with ultra pure water (18 M Ω , TOC < 2 ppb) obtained by means of an SG Ultra Clear water system (SG Water GmbH, Barsbüttel, Germany). Argon 4.8 was delivered by Air Liquide.

2.3. Temperature calibration

Following earlier procedures [12,13], the temperature calibration by open circuit potentiometry was performed in a 50 mM equimolar potassium ferro-/ferricyanide solution in 0.1 M KCl. The electrode temperature has been calculated from the potential difference between working and reference electrode for each stationary heating current using the well known temperature coefficient (−1.56 mV/K) of the utilised redox couple.

2.4. Temperature pulse amperometric experiments

The amperometric measurements with ferrocyanide were all carried out in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0 at a constant electrode potential of 0.2 V. The amperometric as well as the cyclic voltammetry measurements of picric acid were all carried out in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0 and an electrode potential of −0.7 V. All measurements were performed in a thermostated cell at 15 °C bulk solution temperature. The resulting graphs of the amperometric measurements were all Savitzky/Golay smoothed at level 4.

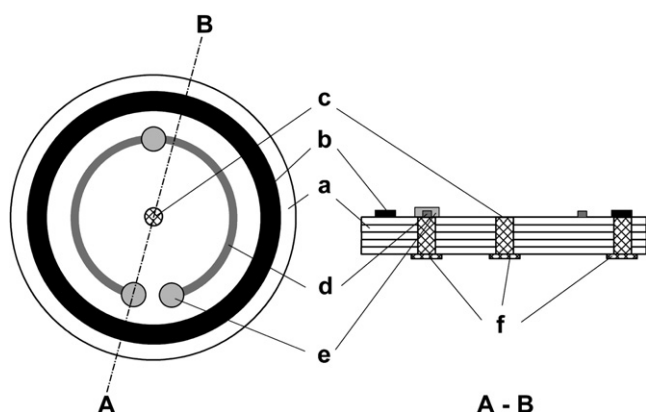


Fig. 1. Scheme of the “all in one” LTCC sensor. Left: front view, right: cross section A–B, (a) LTCC tapes, (b) Pt counter electrode, (c) Ag/AgCl reference electrode, (d) Au working electrode, (e) glass isolation and (f) Ag through contacts and solder contact pads.

3. Results and Discussion

3.1. Open circuit Potentiometry thermal behaviour of the Au electrode

To characterise the thermal behaviour of the LTCC gold electrode, we performed open circuit potentiometry (zero current) in a 0.1 M KCl solution containing an equimolar amount of both hexacyanoferrate(II) and hexacyanoferrate(III) while applying short heat pulses caused by 100 ms constant heating current pulses. The EMF of the cell depends on the applied electrode temperature and has been used to calculate the changes of the electrode temperature. This result is displayed in Fig. 2. Our heating generator allowed for a maximum temperature difference of 89 K. Hence, the electrode temperature could be elevated to 104 °C for a very short period at the end of each 100 ms heat pulse.

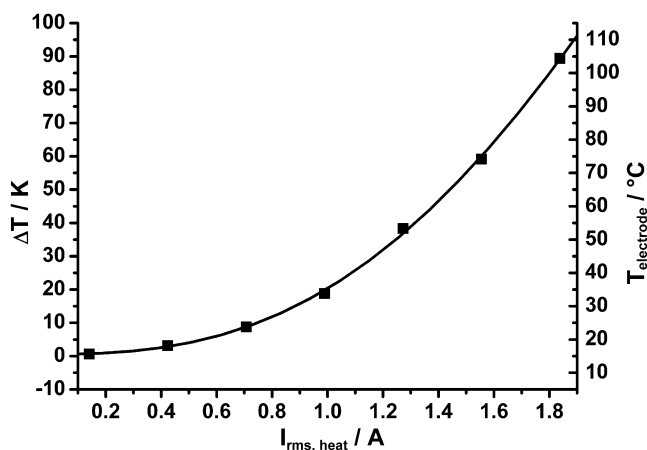


Fig. 2. Temperature calibration of the LTCC gold electrode by open circuit potentiometry in 0.1 M KCl + 50 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4-}$. Calculated temperature difference and electrode temperature depending on the applied heating current.

Following a general rule and according to earlier results, the temperature difference rises with the square of the heating current, i.e. it is proportional to the electric power, which is transformed into heat. We found a linear function when we plotted the temperature difference versus the square of the current (plot not shown): $\Delta T = 26.52 \text{ K/A}^2 * I^2 - 3.317 \text{ K}$; $R^2 = 0.9932$.

3.2. Thermal modulation by means of short heat pulses

Differential pulse amperometry (DPA) has been introduced to remove the baseline from amperometric response. The principle is similar to differential pulse voltammetry (DPV), yet the applied potential is not changed (except for the pulses themselves). Measuring the current prior to the start and the end of one potential pulse, the difference is taken as the analytical signal. In analogy, we simplified temperature pulse voltammetry introduced by Gründler et al. in 1996 [12]. We used a simple automatic programmable relay to apply short heat pulses while the amperometric experiment was running. Fig. 3 displays the resulting signals for different maximum electrode temperatures reached at the end of each 100 ms heat pulse. Such thermal modulated amperometric response can be quantified taking the peak current as the analytical signal.

Upon elevation of the applied heating current, a rising oxidation signal of ferrocyanide was observed. Raising temperature causes an increasing mass transport towards the electrode surface due to enforced diffusion of the analyte. In general, mass transport by thermal convection had also to be considered; however, earlier results confirmed that a 100 ms heating period is too short to establish significant convection [12].

3.3. Effect of the applied potential

In amperometric experiments, the electrode potential is adjusted to allow for the oxidation or reduction of the

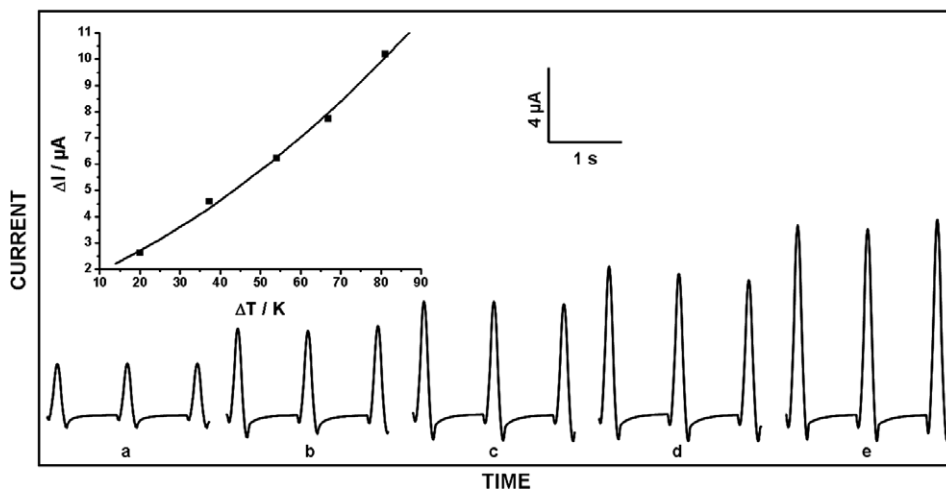


Fig. 3. Amperometric response of 1 mM ferrocyanide in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0 and an applied electrode potential of 0.2 V upon application of 100 ms heat pulses; (a) 35, (b) 52, (c) 69, (d) 82 and (e) 96 °C maximal electrode temperature.

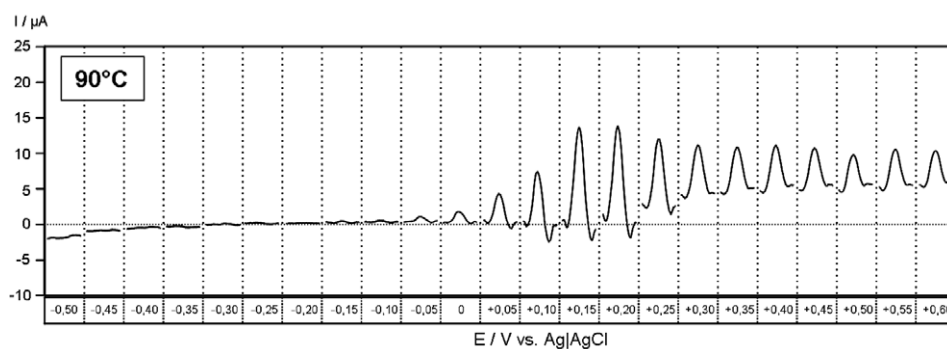


Fig. 4. Effect of the applied potential upon the 100 ms TPA signals of 50 mM ferrocyanide in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0 and a maximal electrode temperature of 90 °C.

substances to be analysed. On the other hand, appropriate potential can exclude undesired electrode reactions of interfering substances. Therefore we recorded temperature pulse amperograms of our model analyte ferrocyanide at varying electrode potentials.

By plotting the currents at an LTCC gold electrode in ferrocyanide recorded during various 100 ms temperature

pulses versus different applied potentials, a kind of sampled voltammogram could be obtained as depicted in Fig. 4. In a similar manner, by taking the differences of the currents prior to the beginning and close to the end of each temperature pulse, Gründler et al. had introduced the technique called temperature pulse voltammetry (TPV). For temperature pulse amperometry it is important to be aware about

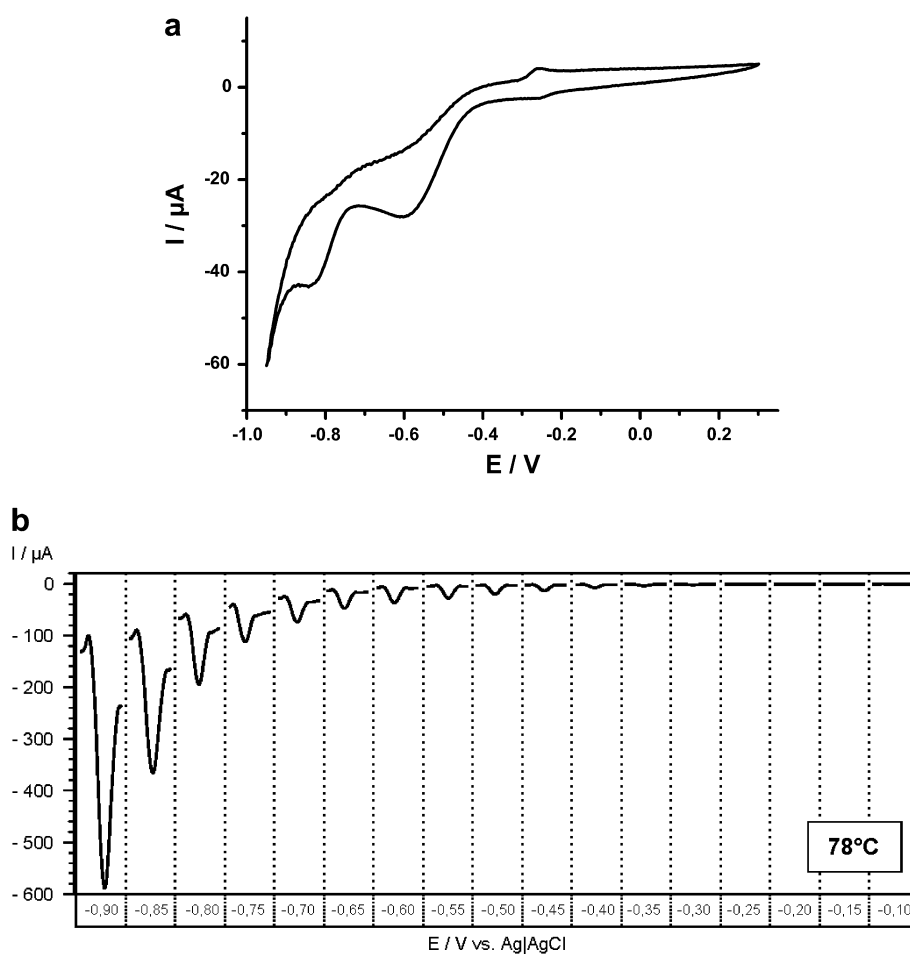


Fig. 5. (a) Cyclic voltammogram of 1 mM picric acid in 50 mM phosphate buffer solution at pH 7.0 in the potential range from -0.95 to 0.3 V; scan rate 0.1 V; step potential 3 mV. (b) Effect of the applied potential upon the 100 ms TPA signals of 1 mM picric acid in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0 and a maximal electrode temperature of 78 °C.

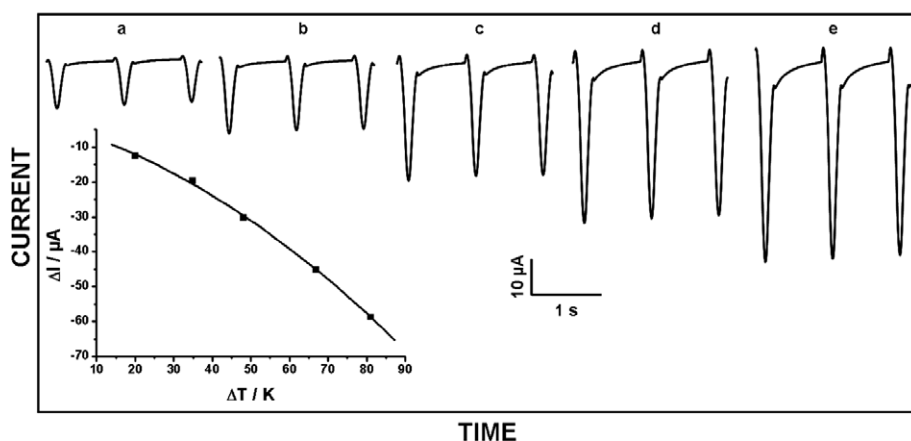


Fig. 6. Effect of the maximal working electrode temperature (a) 35, (b) 50, (c) 63, (d) 82 and (e) 96 °C upon TPA signals of 1 mM picric acid in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0 and an applied electrode potential of -0.7 V.

the temperature coefficient of the redox potential of the considered substance. In the vicinity of the half wave potential, a large current increase coupled with an over swing in the opposite direction shortly after the heat pulse can be observed, which has to be addressed to the shift of the redox potential due to temperature changes. This effect can be compared with the application of a potential pulse. In the region of the diffusion limited current, we observed a smaller increase of the current caused only by the temperature depending diffusion coefficient.

3.4. Detection of picric acid

Kinetically slow reactions can be presumed to show larger temperature response even in the region of the diffusion limited current.

Fig. 5a exhibits a cyclic voltammogram of picric acid. Two significant reduction signals can be observed at -0.58 and -0.83 V. They can be addressed to the reduction of the nitro groups. Picric acid is known to yield three polarographic waves (ca. -0.36 , -0.56 , -0.96 V) at moderate basic pH [25]. Four reduction signals have been found at neutral pH on platinum and glassy carbon electrodes [26]. The reduction mechanism has also been studied in aprotic media [27]. In general, the complex reduction of aromatic nitro groups occurs in various steps involving stable radical anions, hydroxyl amino groups and nitroso groups. Therefore, the different reduction signals have to be addressed to the different reduction steps of one or more nitro groups together rather than to successive one-step reductions of different nitro groups. Both significant reduction peaks in Fig. 5a are superimposed by the large background of the gold electrode at negative potentials which is caused by low hydrogen overvoltage. The least negative signal seems reversible; yet, these peaks are very small. Here the potential fairly corresponds to the first polarographic reduction wave. Both other signals although of considerable height (10 and 5 μ A) are irreversible.

Fig. 5b depicts a sampled voltammogram of picric acid consisting of single temperature pulse amperometric signals obtained at various electrode potentials ranging from -0.9 to -0.1 V. In contrast to the sampled voltammogram of ferrocyanide (Fig. 4), over swinging peaks or constant peak level could not be observed. Instead the signals were rapidly rising upon application of more negative potentials. This behaviour can probably be attributed to the irreversible character of the reduction processes and the large background at the most negative potentials. However, future studies will reveal, whether such background contribution can be effectively eliminated. Compared to the cyclic voltammetric response, the signals obtained with our new technique TPA, being displayed in Fig. 6, are well shaped and much more suitable for quantitative analysis of picric acid. Very large signals up to 31 μ A are obtained when applying 48 K temperature pulses at a constant potential of -0.7 V. The effect of the temperature pulse is significantly larger in case of 1 mM picric acid compared with 1 mM ferrocyanide (5.5 μ A), indicating a dramatic acceleration of a kinetically inhibited electrode reaction. Due to

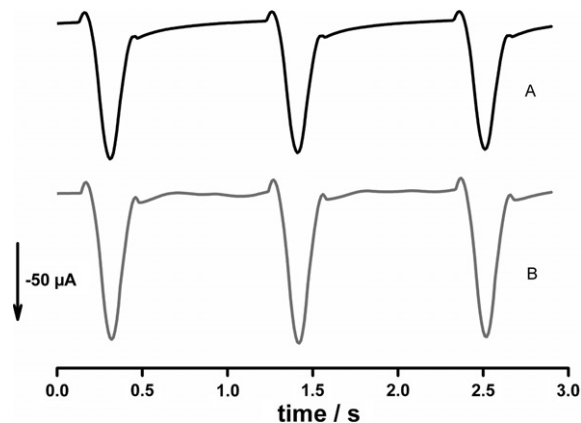


Fig. 7. TPA signals of picric acid in (A) unstirred and (B) stirred solution. Maximal electrode temperature 96 °C; 1 mM picric acid in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0; electrode potential -0.7 V.

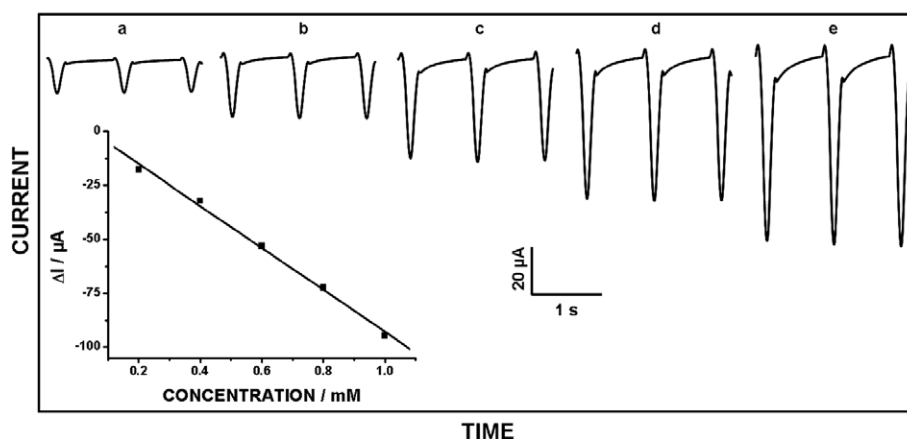


Fig. 8. TPA signals of (a) 0.2, (b) 0.4, (c) 0.6, (d) 0.8 and (e) 1 mM picric acid in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.0 and 82 °C maximal electrode temperature at an applied electrode potential of -0.7 V. The inset displays the regarding calibration plot.

the constant potential, the baseline keeps always the same level of current and does not change following an applied potential ramp as in voltammetry.

As demonstrated in Fig. 7, stirring of the solution has almost no effect upon the TPA signals. Such hydrodynamically independent response indicates that kinetics or diffusion rather than convection controls the current. This behaviour is highly desirable for environmental monitoring as well as in flow systems where uncontrolled or pulsating convection can disturb the signals. Full independence of the signals upon hydrodynamic disturbances will be achieved if even shorter heat pulses are applied.

3.5. Calibration experiments

Fig. 8 depicts an amperometric calibration experiment of picric acid at an applied potential of -700 mV and a temperature pulse of $\Delta T = 67$ K. We found a linear range between 0.2 and 1 mmol/L. The well shaped peaks at the lowest concentration 200 $\mu\text{mol/L}$ indicate that even trace amounts of picric acid are detectable. We expect that at even higher temperature pulses, the sensitivity will further increase while the noise level should not rise significantly. Gründler et al. achieved temperatures above 200 °C at 10 ms heat pulses. To obtain such values we have to use more powerful heating devices as we could apply in this preliminary study.

4. Conclusions

We demonstrated how temperature pulse amperometry can be performed by very simple means. All what is needed is a heating generator coupled with a programmable relay. Short heat pulses generated by directly heated electrodes can elevate the temperature above the boiling point of the electrolyte solution for a short time. Peak shaped amperometric signals are formed upon such thermal modulation. The peak current can be taken as the analytical information. Thermal modulation in amperometric mea-

surements activates kinetically inhibited analytes such as picric acid. The background contribution is effectively suppressed, even at very negative potentials at a gold electrode. Convection does not significantly affect the analytical signal. This will be important for applications where convection is pulsating or is otherwise not under control and thus induces disturbances. We encourage other electrochemists to explore the possibilities of this new technique in the fields of environmental monitoring, flow analysis, high performance chromatography and capillary electrophoresis.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dipl.-Ing. Harald Grabow (University of Rostock) for technical assistance, as well as to the ERASMUS program of the European Union and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support.

References

- [1] J. Cvačka, F. Opekar, J. Barek, J. Zima, *Electroanalysis* 12 (2000) 39.
- [2] K. Peckova, V. Mocko, F. Opekar, G.M. Swain, J. Zima, J. Barek, *Chem. Listy* 100 (2006) 124.
- [3] F. M. Matysik, *Electroanalysis* 12 (2000) 1349.
- [4] S. Forster, F. M. Matysik, M.A. Ghanem, F. Marken, *Analyst* 131 (2006) 1210.
- [5] J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 1133.
- [6] C.D. Garcia, C.S. Henry, *Electroanalysis* 17 (2005) 1125.
- [7] C. Lau, G. U. Flechsig, P. Grundler, J. Wang, *Anal. Chim. Acta* 554 (2005) 74.
- [8] J. Wang, *Talanta* 28 (1981) 369.
- [9] W.J. Blaedel, D. Iverson, *Anal. Chem.* 49 (1979) 1563.
- [10] J. Wang, M. Jasinski, G. U. Flechsig, P. Grundler, B. Tian, *Talanta* 50 (2000) 1205.
- [11] G. U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Grundler, *Langmuir* 21 (2005) 7848.
- [12] P. Grundler, A. Kirbs, Tadesse Zerihun, *Analyst* 121 (1996) 1805.
- [13] T. Voss, P. Grundler, A. Kirbs, G. U. Flechsig, *Electrochem. Commun.* 1 (1999) 383.
- [14] T. Voss, A. Kirbs, P. Grundler, *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 320.
- [15] P. Grundler, D. Degenring, *J. Electroanal. Chem.* 512 (2001) 74.
- [16] P. Grundler, D. Degenring, *Electroanalysis* 13 (2001) 755.

- [17] A.S. Baranski, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1294.
- [18] F. Wachholz, J. Gimsa, H. Duwensee, H. Grabow, P. Grundler, G.U. Flechsig, *Electroanalysis* 19 (2007) 535.
- [19] Z.Y. Lin, J.J. Sun, J.H. Chen, L. Guo, G.N. Chen, *Anal. Chim. Acta* 564 (2006) 226.
- [20] Z.Y. Lin, J.J. Sun, J.H. Chen, L. Guo, G.N. Chen, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 269.
- [21] J.J. Sun, L. Guo, D.F. Zhang, W.H. Yin, G.N. Chen, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 283.
- [22] G.G. Wildgoose, D. Giovanelli, N.S. Lawrence, R.G. Compton, *Electroanalysis* 16 (2004) 421.
- [23] P. Grundler, G. U. Flechsig, *Microchim. Acta* 154 (2006) 175.
- [24] www.hot-wire-electrochemistry.de.
- [25] J. Heyrovský, J. Kůta, *Grundlagen der Polarographie*, Akademie Verlag, Berlin, 1965.
- [26] Z. Adamcova, B. Dolezal, R. Volf, *Fyzikalni Chemie* 10 (1990) 185.
- [27] P. Janderka, O. Fischer, E. Fischerova, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 62 (1997) 581.

8.4 Template-free galvanic nano-structuring of gold electrodes for sensitive electrochemical biosensors

Electroanalysis, 2009, akzeptiert.

Falko Wachholz, Heiko Duwensee, Ralf Schmidt, Michael Zwanzig, Jan Gimsa, Stefan Fiedler*, Gerd-Uwe Flechsig*

Falko Wachholz bereitete die benutzten Goldscheiben-Elektroden vor und führte Oberflächenbestimmungs- und Hybridisierungsmessungen in Kooperation durch. Er nahm an themenbezogenen Diskussionen und der Erstellung von zugehörigen Abbildungen teil, und er schrieb größere Teile des Manuskripts.



**Template-free galvanic nano-structuring of gold electrodes
for sensitive electrochemical biosensors**



Journal:	<i>Electroanalysis</i>
Manuscript ID:	elsc.200900132.R1
Wiley - Manuscript type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	<p>Wachholz, Falko; University of Rostock, Dept. of Chemistry Duwensee, Heiko; University of Rostock, Dept. of Chemistry Schmidt, Ralf; Fraunhofer Institute for Reliability and Micro Integration (IZM), Module Integration & Board Interconnection Technologies Zwanzig, Michael; Fraunhofer Institute for Reliability and Micro Integration (IZM), Module Integration & Board Interconnection Technologies Gimsa, Jan; University of Rostock, Dept. of Biology Fiedler, Stefan; Fraunhofer Institute for Reliability and Micro Integration (IZM), Module Integration & Board Interconnection Technologies Flechsig, Gerd-Uwe; University of Rostock, Dept. of Chemistry</p>
Keywords:	Nano-structuring, Osmium tetroxide bipyridine, DNA hybridization, Gold electrode, Voltammetry



Template-free galvanic nano-structuring of gold electrodes for sensitive electrochemical biosensors

Falko Wachholz^a, Heiko Duwensee^a, Ralf Schmidt^b, Michael Zwanzig^b, Jan Gimsa^{c,*}, Stefan Fiedler^{b,*}, Gerd-Uwe Flechsig^{a,*}

^a University of Rostock, Department of Chemistry, D-18051 Rostock, Germany

^b Fraunhofer Institute for Reliability and Micro Integration (IZM) D-13 Berlin, Germany

^c University of Rostock, Department of Biology, D-18051 Rostock, Germany

* Corresponding authors: jan.gimsa@uni-rostock.de, stefan.fiedler@izm.fraunhofer.de, gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de

Abstract

Gold nano-structuring of smooth gold disk-electrodes has been performed by electrodeposition. FE-SEM images indicate a strongly enlarged electrochemically active surface of the modified electrodes. This could be approved by the gold oxide reduction peak in cyclic voltammetry. The electrodes were also applied for sequence-specific DNA detection. For this, complementary single stranded capture probes were immobilized on the electrodes and consecutively hybridized with complementary and non-complementary [OsO₄(bipy)]-labelled DNA targets. We found that intermediate dehybridization steps did not decrease the sensitivity for the specific target. Moreover, the surface modification increased the voltammetric signal by an approx. factor of 9. Further, an enhanced linear calibration range was observed. The presented simple nano-structuring process holds great promise for many electrochemical sensor applications.

Keywords

Nano-structuring, Osmium tetroxide bipyridine, DNA hybridization, Gold electrode, FE-SEM, Voltammetry

1 Introduction

Biosensors on the basis of self-assembled monolayers (SAMs) are widely used. Especially gold as a substrate for SAMs shows very strong affinity to thiol-modified probe molecules. While miniaturised electrodes provide many advantages such as parallelization and microelectrode behaviour, the smaller active surface leads to lower analytical signals, which are prone to electronic interferences. Therefore, the enlargement of the electrochemically active electrode surface is desirable. Several approaches for micro- or nano-structuring of electrode surfaces have been proposed during the last couple of years.

Carbon nanotubes are reported to greatly increase voltammetric signals of carbon paste electrodes [1]. Also metal electrode surfaces can be modified by depositing carbon nanotubes, which is useful for many analytical purposes [2]. Carbon nanotube fibre microelectrodes were prepared and characterized due to their performance regarding electroanalytic oxidation of analytes via dehydrogenase-mediated reactions using NAD^+ as a mediator [3]. The enhancement of the active electrode area by modifying the surface with cell imprints in polyurethanes or porous gold with latex imprints was also reported [4,5]. A very efficient method to enhance the performance of cell-based diagnostic assays is the lithographic modification with focused laser radiation and interference lithography creating magnetic nano-dots or regular structures [6-9]. Direct electrochemical deposition of gold or gold containing particles is an elegant possibility to obtain well defined and highly ordered structures with a tremendous effect on the electroactive surface. Common techniques often require the use of nano-structured templates when using three-electrode arrangements [10], high-frequency impedance [11] or direct electrodeposition methods [12,13]. Template-free electrochemical deposition was carried out by French et al. using bipotentiostatic growing of gold on self-made platinum disc electrodes [14,15].

Capture probe-modified electrodes can be used to detect the hybridization with complementary DNA target strands. Some reported procedures for the electrochemical

1
2
3 recognition can be performed using indicator molecules that are (a) covalently attached to the
4 target, (b) covalently attached to a signalling/ reporter probe, (c) interacting with the
5 negatively charged phosphate groups, or (d) intercalating into the base stack. Another
6 possibility is to take advantage of the intrinsic electrochemical activity of the DNA, e.g. the
7 oxidation of guanine [16–18]. The capture probe strands can be immobilized on magnetic
8 beads [19,20] or as self-assembled monolayers on metal surfaces [21–27]. Methods of
9 electrochemical hybridization detection were reviewed a number of times [28–32]. We
10 already reported the application of covalently attached redox markers together with thiol-
11 linked probe oligonucleotides on heated gold electrodes [33,34]. For this purpose the complex
12 [OsO₄(bipy)] can be utilized as an electrochemically reversible covalent DNA-label [35]. It
13 reacts with the pyrimidine bases thymine, uracil and cytosine [36]. In this way, labelling of
14 DNA-strands of any length can be easily performed in the laboratory which is an important
15 advantage of this approach. Palecek et al. demonstrated that osmium tetroxide complexes can
16 be used as sensitive and selective probes for single stranded and damaged DNA [37–40]. The
17 "two surface strategy" allows to conduct the steps of Os(VIII)-labelling and probe
18 hybridization on magnetic beads, while the detection can be performed on mercury or carbon
19 electrodes [41–43]. As known from earlier biochemical applications [44], also protective
20 oligonucleotides can be used to label target strands with [OsO₄(bipy)] without affecting their
21 ability for hybridization reactions [45–47]. Fojta et al. reported the use of protective
22 oligonucleotides for the preparation of osmium tetroxide-labelled reporter strands by
23 magnetic separation [48]. Recently, Havran et al. and Bartosik et al. demonstrated the ability
24 of [OsO₄(bipy)] to detect DNA damage as well as unpaired thymine residues [49,50].
25
26 In this work, we present one possibility for a dramatic increase in active electrode area by
27 direct template-free galvanic electroplating of gold and silver with a minimum of complexity.
28
29 The modified electrodes were characterised using cyclic voltammetry in sulphuric acid and
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 performing hybridization experiments with [OsO₄(bipy)]-labelled DNA target strands on
4
5 thiol-linked probe SAMs.
6
7

8 9 **2 Experimental**

10 11 **2.1 Materials**

12
13
14 2,2'-Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide as a 2 % aqueous solution by
15
16 Fluka. TRIS buffer (10 mM tris(hydroxymethyl)-aminomethane, 0.5 M Na₂SO₄ both from
17
18 Fluka) was adjusted to pH 7.5 using sulphuric acid. Single stranded 20-mer DNA (ssDNA)
19
20 was purchased from FRIZ Biochem GmbH (Munich, Germany). Ultrapure water (>18 MΩ
21
22 cm, TOC < 2 ppb) was prepared with an Ultra Clear TOC system (SG Water Systems,
23
24 Germany) comprising ultra filtration and UV oxidizing modules. All chemicals were of
25
26 analytical grade. Buffer solutions, beakers and pipette tips were autoclaved prior to use.
27
28
29 Chemicals and solutions used for silver and gold plating were of technical grade [51].
30
31
32

33 34 35 **2.2 Galvanic deposition method**

36
37 The deposition of gold nano-structures was performed with a potentiostat / galvanostat
38
39 PGSTAT 12 from Metrohm (Switzerland), silver plating with a HP 6177c DC (Hewlett
40
41 Packard, Germany) current source. The PGSTAT 12 was used in its galvanostatic mode
42
43 together with a platinum anode in a two-electrode setup. Electroplating of both silver and gold
44
45 was performed using cyanide-based plating solution with a magnetic stirrer at 100 rpm at
46
47 room temperature. Current densities in the range of 15 - 30 mA/cm² in a strong alkaline
48
49 solution were applied for the silver plating process. Gold plating was performed with 1 – 5
50
51 mA/cm² in neutral pH range [51]. The active surface and consequently the real current density
52
53 depends basically on the surface profile and changes after 3D-nano-structure plating. The
54
55 electroplating was performed directly on polished gold disc electrodes with 3 mm diameter,
56
57
58
59
60

1
2
3 preplated with a 2 μm grain refined gold layer from a commercially available soft gold bath
4
5 (Puramet; Doduco company).
6
7
8
9

10 11 **2.3 Electrode surface evaluation**

12
13 The surface profiles of all galvanic layers were documented in a FE-SEM (Zeiss CrossBeam
14
15 1540 XB) in the secondary electron mode and the inlens mode at magnifications 1000x and
16
17 5000x with a view angle of 45 degree. The electrical contact was provided by the backside
18
19 connector. An aluminium foil was used to protect the electrode body.
20
21
22

23 24 **2.4 Gold surface determination experiments**

25
26 The accessible active gold surface was determined with a PalmSens potentiostat (Palm
27
28 Instruments BV, The Netherlands) by cyclic voltammetry (CV) in 0.5 M sulphuric acid
29
30 [13,47,52]. The 20 ml electrochemical cell comprised an Ag/AgCl (3 M KCl) reference and a
31
32 platinum counter electrode (Metrohm). The measurements were carried out at room
33
34 temperature (22 °C) and analysed using the PalmSens software.
35
36
37
38
39

40 41 **2.5 Electrochemical detection of [OsO₄(bipy)]-labelled** 42 **oligonucleotides**

43
44 A 27-mer thiol-linked DNA-oligonucleotide with a 15 thymine bases spacer between linker
45
46 and detection sequence (5'-
47
48 AAGTCCTTGAGCTGATTTTACTGTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[Dithio]3-3') was
49
50 immobilized on the freshly plated electrodes overnight. After a mercaptohexanol treatment
51
52 (1 h in 100 mM aqueous solution), the voltammetric baselines were recorded. A 5 μl droplet
53
54 of [OsO₄(bipy)]-labelled target solution of a given concentration was placed at the electrode
55
56 surface to allow for hybridization in a water saturated atmosphere for one hour. The
57
58 modification and hybridization procedure has been described earlier in full detail [46,47].
59
60

1
2
3 Dehybridization was performed by incubation in deionised water at 50 °C for 60 s. The
4
5 sequence MON 810 (5'-TTTTTGTTGTCCATGGCCGCTTGGTATCT-3') was used as a
6
7 noncomplementary target. This strand was labelled with [OsO₄(bipy)] after hybridization with
8
9 the protective strand (5'-AGATAGCAAGCGGCCATGCAGAAGAA-3'). All square-wave
10
11 voltammetric (SWV) experiments were performed with a PGSTAT 12 (Metrohm,
12
13 Switzerland). The 20 ml electrochemical cell comprised an Ag/AgCl (3 M KCl) reference
14
15 (Sensortechnik Meinsberg GmbH, Germany) and a self-made platinum counter electrode. All
16
17 voltammetric experiments were performed at room temperature (22 °C). All peak values were
18
19 determined using a GPES 4.9 software and graphically plotted with Origin 8 software.
20
21
22
23
24
25
26

27 **3 Results and Discussion**

28
29 Polished gold electrodes used in our experiments did not show a completely flat surface at the
30
31 micrometer scale (data not shown). The main reason for this could be the ductility and the low
32
33 hardness (less than 100 HV) of gold. Since silver disk electrodes As shown below, the active
34
35 surface of the used gold electrodes is dramatically enlarged by template-free gold
36
37 electroplating. This effect can be further enhanced by consecutive Ag/Au plating. Figure 1, I-
38
39 A and B show FE-SEM images of fine-gold nano-structure crystals plated on smooth gold
40
41 surfaces. In contrast, images II-A and B show structures obtained by consecutive silver/gold
42
43 electroplating. Fine, regular structures, with a shape reminding on shark teeth, were obtained
44
45 by plating gold galvanically onto the gold disk electrode. We designate these electrodes as
46
47 "ST-AuE" in the following sections. Consecutive silver/gold electroplating leads to relatively
48
49 large microstructures of silver covered by crystallized gold nano-particles. The resulting
50
51 structures bear a striking resemblance to cabbage and were designated "CAB-AgAuE" in the
52
53 following.
54
55
56
57
58
59
60

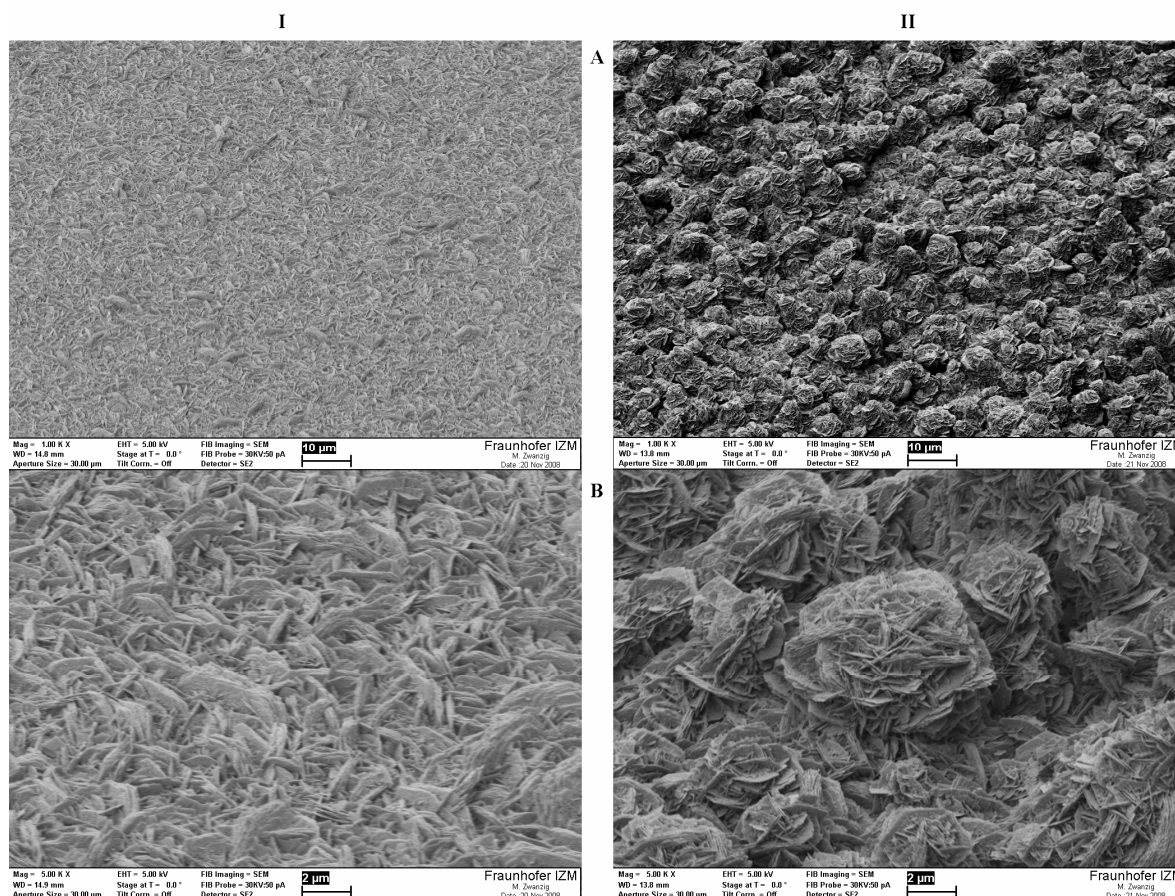


Fig. 1. FE-SEM micrographs of I) a ST-AuE and II) CAB-AgAuE in (A) thousand fold and (B) five thousand fold magnification; The shown nano-crystals of gold with their definite orientation cause a dramatic enhancement of the available active gold surface. A completely different base-structure can be achieved if the electrode is first plated with silver followed by galvanic gold nano-structuring (II-A; II-B).

Figure 2 displays cyclic voltammetric measurements in 0.5 M sulphuric acid using either an ST-AuE (A) or a CAB-AgAuE (B). As can be seen, the integrated gold oxide reduction peak at 0.88 V, and hence, the active area of the electrode, increases dramatically. The average increases are approx. 7-fold for the ST-AuE and 15-fold for the CAB-AgAuE with respect to the “normal” gold disk electrode,

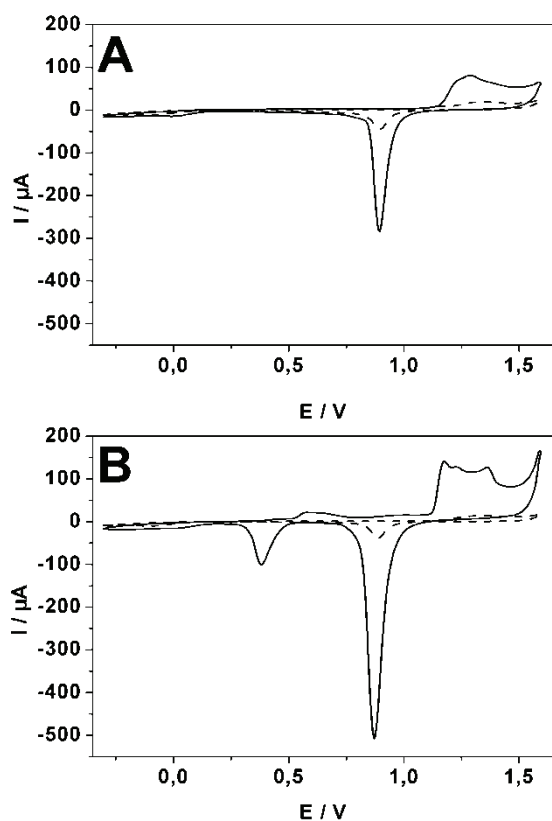


Fig. 2. Cyclic voltammograms in 0.5 M H₂SO₄; step potential 5 mV, scan rate 0.1 V s⁻¹; dashed line – before modification, full line – with (A) ST-AuE and (B) CAB-AgAuE.

A small reduction peak can be observed at 0.38 V in Fig. 2B which is related to silver. The silver oxidation (presumably at approx. 1.17 V) can be hardly distinguished from the gold oxidation signals. These findings indicate pinholes in the gold layer covering the silver structures. Also areas with uncovered silver crystals may exist between the cabbage-like structures as depicted in figure 1 (II-A and B). However, this will not be a problem for electrochemical scans in the negative potential range as demonstrated below. Szamocki et al. achieved an about 30 times greater surface by depositing 7½ layers of hollow spheres of macroporous gold within about 25 minutes [13]. Considering the shorter deposition time of 15 minutes and the lower complexity of the ingredients, our simple electroplating method is a good compromise of cost and usability. Further optimization of the electroplating parameters current density and deposition time may provide even better results in the enlargement of the electrochemically active surface.

For an independent confirmation of the tremendous increase in the active electrode area, DNA-hybridization experiments with surface-confined capture probes were performed.

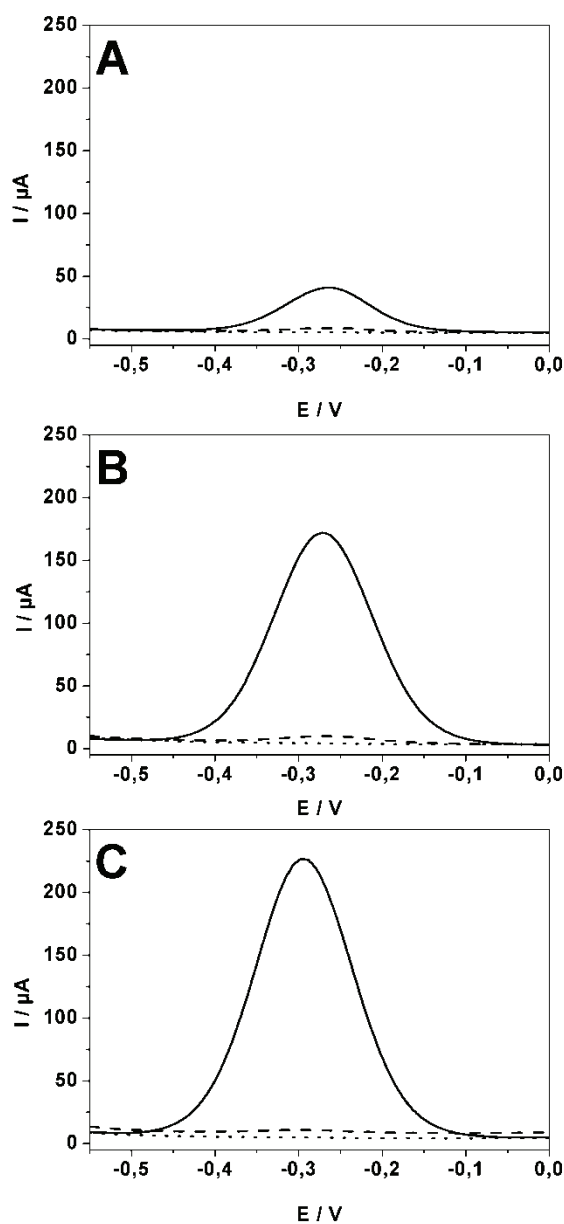


Fig. 3. Square-wave voltammograms of DNA-hybridization events; step potential 1.95 mV, amplitude 40 mV, frequency 200 Hz; dotted – baseline, solid – hybridization, dashed – dehybridization; hybridization with 625 nM [OsO₄(bipy)]-labelled target for 1 h; A) plain gold disk electrode, B) ST-AuE, C) CAB-AgAuE.

Figure 3 shows square-wave voltammetric signals of the osmium labelled target strands. An electrochemical peak current of 40 μA was obtained with the plain gold disk electrode only

1
2
3 modified with the thiol-linked capture probes (Fig. 3A). Dehybridizing in 50 °C warm water
4 gave a signal of about 5 μ A. This indicates good regeneration capability and corresponds with
5
6 former observations reporting a remaining signal height of about 10% on this type of probe-
7
8 modified gold electrodes after dehybridization [47].
9
10

11
12 In contrast, an ST-AuE yields an approx. 4-fold enhanced hybridization signal (Fig. 3B).
13
14 Moreover, the thermal dehybridization step is strongly improved as indicated by a remaining
15
16 6% SWV signal. These effects are even more pronounced for the CAB-AgAuE. These
17
18 nanostructures result in a 9-fold increase (Fig. 3C) compared with the plain probe-modified
19
20 gold disk electrode. The hybridization/dehybridization signal ratio further decreased below
21
22 5%. This can possibly be explained by an improved contact of the hot water with the upper
23
24 layers of the nanostructured electrodes. The nanostructures are almost completely surrounded
25
26 by hot water diminishing the cooling effect of the gold disk beneath.
27
28

29
30 The greatly improved hybridization signals can be explained by an enlarged active electrode
31
32 surface able to carry more capture probes. The enlarged surface also results in a larger linear
33
34 calibration range as illustrated in Figure 4.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

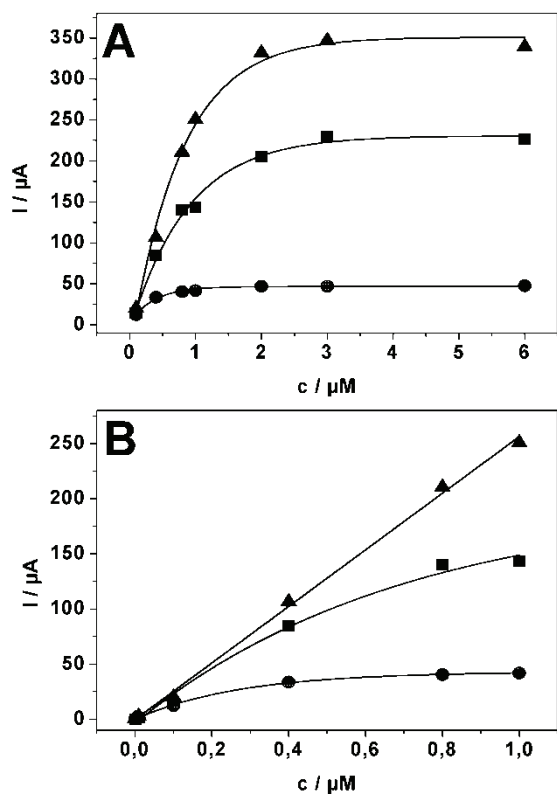


Fig. 4. Concentration calibration of [OsO₄(bipy)]-labelled ssDNA on plain Au disk (circles), ST-AuE (squares), and CAB-AgAuE (triangle) for concentration ranges of A) 0.1 to 6 μM and B) 0.001 to 1 μM .

The target concentration was varied between 0.1 and 6 μM (Fig. 4A). For the CAB-AgAuE (triangle), a linear relation could be observed up to a target concentration of 1 μM . The ST-AuE (squares) and plain Au disk electrode (circles) were already saturated at target concentrations of 2 and 1 μM , respectively. This is a further indication for a tremendous surface increase achieved by the consecutive silver/gold plating method. Even at lower concentrations between 0.001 and 1.0 μM (Fig. 4B), the CAB-AgAuE shows an almost linear behaviour, whereas the calibration range of the plain Au disk is limited to approx. 0.2 μM target concentrations.

The detection limit improved from 83 nM for the plain gold disk electrode and 89 nM for the ST-AuE to 64 nM for the CAB-AgAuE (graphically determined following DIN 32645; see figure 5).

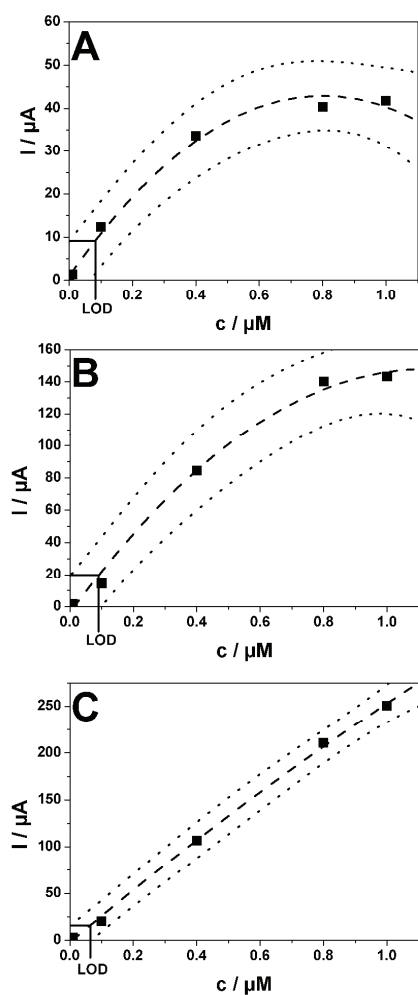


Fig. 5. Determination of the limit of detection (LOD) following DIN 32645 for the bare gold electrode (A), St-AuE (B) and CAB-AgAuE (C).

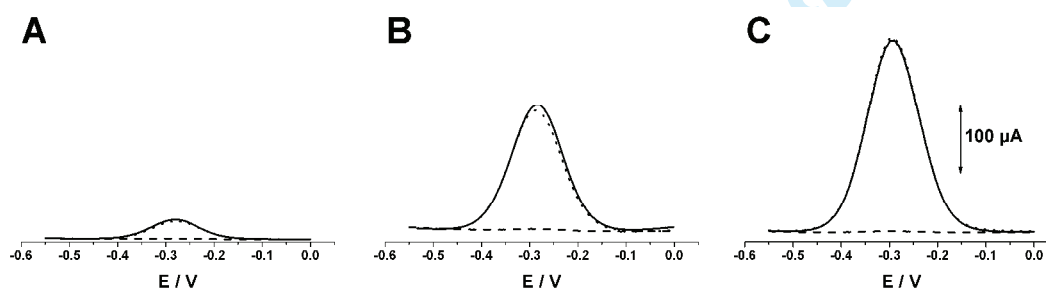


Fig. 6. Selectivity of 30 min-hybridizations of three differently structured electrodes in 1 $\mu\text{mol/l}$ target solutions. Measured signals were recorded for the hybridization with a complementary $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labelled target (solid), followed by the hybridization with a non-complementary target MON 810 (dashed), and another hybridization with the complementary target (dotted) on a smooth Au disk electrode (A), ST-AuE (B), and CAB-AgAuE (C), respectively.

1
2
3 Hybridization experiments were performed with labelled complementary and non-
4 complementary targets to verify the selectivity of the nanostructured probe-modified
5 electrodes. As a first step, the immobilized capture probe was hybridized for 30 min with a 1
6 μM complementary target (solid line). After a dehybridization step, the non-complementary
7 target MON 810 (1 μM) was allowed to hybridize for 30 min with the capture probe (dashed
8 line). Almost no nonspecific response was observed. To assure that the immobilized capture
9 probe was still able to selectively detect the complementary single strand, we allowed the
10 dehybridized electrode to again hybridize with the 1 μM complementary target solution for 30
11 min. The experiments verified the high selectivity of the immobilized capture probe. Two
12 dehybridization steps and hence, thermal treatment did not result in a decrease of the
13 sensitivity. The surface modification resulting in the increase of the voltammetric signals did
14 obviously not affect the selectivity. Even the more complex CAB-AgAuE did not suffer from
15 unspecific binding.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **4 Conclusions**

35 We conducted template-free galvanic formation experiments of nanostructures on gold disk
36 electrodes. A high increase in the electrochemically active surface was observed as verified
37 by cyclic voltammetry of gold oxide reduction. The highest increase was achieved by
38 consecutive plating of silver and gold. The active electrode area increased up to 15-fold
39 compared with the plain Au disk.
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Experiments with $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -labelled ssDNA targets confirmed the great increase in the
50 accessible gold surface. A higher coverage with capture probe strands (with respect to the
51 geometric area), and hence, higher sensitivity of electrochemical DNA hybridization could be
52 achieved. The LOD obtained with the silver/gold modified disk electrode is significantly
53 enhanced. Selectivity and reproducibility are very good for all three types of working
54 electrodes.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Our template-free formation of nanostructured electrode surfaces holds great promise for
4 future electrochemical biosensor applications and in particular for the parallel detection of
5 multiple analytes on microelectrode arrays.
6
7
8
9

10 11 **Acknowledgement**

12 The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant # FL 384/4-2, 7-1, 8-
13 1) and to the State of Mecklenburg-Vorpommern (Excellence Funding Programme) for
14 financial support.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

5 References

- [1] F. Valentini, A. Amine, S. Orlanducci, M.L. Terranova, G. Palleschi, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5413.
- [2] J.J. Gooding, *Electrochim. Acta* **2004**, 50, 3049.
- [3] L. Viry, A. Derré, P. Garrigue, N. Sojic, P. Poulin, A. Kuhn, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 499.
- [4] F.L. Dickert, O. Hayden, P. Lieberzeit, C. Haderspoeck, R. Bindeus, C. Palfinger, B. Wirl, *Synthetic Metals* **2003**, 138, 65.
- [5] O.D. Velev, P.M. Tessier, A.M. Lenhoff, E.W. Kaler, *Nature* **1999**, 401, 548.
- [6] S. Juodkazis, V. Mizeikis, S. Matsuo, K. Ueno, H. Misawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2008**, 81, 411.
- [7] X.D. Hoa, M. Martin, A. Jimenez, J. Beauvais, P. Charette, A. Kirk, M. Tabrizian, *Biosens. Bioelectronics* **2008**, 24, 970.
- [8] Y. Zhou, M.H. Hong, J.Y.H. Fuh, L. Hu, B.S. Lukiyanchuk, *Phys. Scr.* **2007**, 129, 35.
- [9] M. Zheng, M. Liu, R. Skomski, S.H. Liou, D.J. Sellmyer, V.N. Petryakov, Y.K. Verevkin, N.I. Polushkin, N.N. Salashchenko, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 79, 2606.
- [10] J.E.G.J. Wijnhoven, S.J.M. Zevenhuizen, M.A. Hendriks, D. Vanmaekelbergh, J.J. Kelly, W.L. Vos, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 888.
- [11] Q. Qing, F. Chen, P. Li, W. Tang, Z. Wu, Z. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7771.
- [12] R. Szamocki, S. Reculosa, S. Ravaine, P.N. Bartlett, A. Kuhn, R. Hempelmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1317.
- [13] R. Szamocki, A. Velichko, C. Holzapfel, F. Mcklich, S. Ravaine, P. Garrigue, N. Sojic, R. Hempelmann, A. Kuhn, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 533.
- [14] R.W. French, A.M. Collins, F. Marken, *Electroanalysis* **2008**, 20, 2403.
- [15] L. Rassaei, R.W. French, R.G. Compton, F. Marken, *Analyst* (2009) online 4 March, DOI: 10.1039/b900292h.

- 1
2
3 [16] J.Wang, G. Rivas, J.R. Fernandes, J.L.L. Paz, M. Jiang, R.Waymire, *Anal. Chim. Acta*
4
5 **1998**, 375, 197.
6
7
8 [17] J. Wang, A.N. Kawde, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 431, 219.
9
10 [18] J. Wang, A.N. Kawde, A. Erdem, M. Salazar, *Analyst* **2001**, 126, 2020.
11
12 [19] J. Wang, R. Polsky, D.K. Xu, *Langmuir* **2001**, 17, 5739.
13
14 [20] J. Wang, D.K. Xu, A.N. Kawde, R. Polsky, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5576.
15
16 [21] T.M. Herne, M.J. Tarlov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8916.
17
18 [22] S.O. Kelley, N.M. Jackson, M.G. Hill, J.K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1999**, 38,
19
20 941.
21
22 [23] S.O. Kelley, E.M. Boon, J.K. Barton, N.M. Jackson, M.G. Hill, *Nucleic Acids Res.* **1999**,
23
24 27, 4830.
25
26 [24] E.M. Boon, D.M. Ceres, T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2000**,
27
28 18, 1096.
29
30 [25] E.M. Boon, J.K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 320.
31
32 [26] E.L.S. Wong, F.J. Mearns, J.J. Gooding, *Sens. Actuator B: Chem.* **2005**, 111, 515.
33
34 [27] E.L.S. Wong, J.J. Gooding, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2138.
35
36 [28] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* **2002**, 469, 63.
37
38 [29] E. Palecek, F. Jelen, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2002**, 32, 261.
39
40 [30] J.J. Gooding, *Electroanalysis* **2002**, 14, 1149.
41
42 [31] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1192.
43
44 [32] P. de-los-Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, P. Tuñón-Blanco,
45
46 *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 104.
47
48 [33] G.-U. Flechsig, J. Peter, G. Hartwich, J. Wang, P. Gründler, *Langmuir* **2005**, 21, 7848.
49
50 [34] G.-U. Flechsig, J. Peter, K. Voss, P. Gründler, *Electrochem. Commun.* **2005**, 7, 1059.
51
52 [35] E. Palecek, M. Fojta, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 74A.
53
54 [36] E. Palecek, *Methods Enzymol.* **1992**, 212, 139.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 [37] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1981**, 8,
4
5 497.
6
7
8 [38] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.* **1982**, 1, 53.
9
10 [39] E. Palecek, M.A. Hung, *Anal. Biochem.* **1983**, 132, 236.
11
12 [40] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, *Gen. Physiol. Biophys.*
13
14 **1984**, 3, 175.
15
16 [41] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, *Bioelectrochemistry* **2002**, 56, 85.
17
18 [42] P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova, M. Fojta, *Bioelectrochemistry* **2004**, 63, 245.
19
20 [43] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, *Electroanalysis* **2006**,
21
22 18, 186.
23
24 [44] G.Wang, L.Wu, X.Wang, J. Cheng, W. Yang, *Int. Patent Application* **2002**, WO
25
26 02/16647 A1.
27
28 [45] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Patent* **2005**, DE 10 2005 039 726 B3.
29
30 [46] G.-U. Flechsig, T. Reske, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2125.
31
32 [47] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1356.
33
34 [48] M. Fojta, P. Kostecka, M. Trefulka, L. Havran, E. Palecek, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 1022.
35
36 [49] L. Havran, J. Vacek, K. Cahova, M. Fojta, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1751.
37
38 [50] M. Bartosik, V. Gajdos, P. Kostecka, M. Fojta, E. Palecek, E. Volkov, T. Oretskaya, T.
39
40 Hianik, *Electroanalysis* **2009**, 21, 295.
41
42 [51] S. Fiedler et al., *DE Patent application* **10 2008 025 833.4-33**.
43
44 [52] J.-F. Huang, I.-W. Sun, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 989-994.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

8.5 Cathodic adsorptive stripping voltammetric detection of tRNA by labelling with osmium tetroxide

Electrochemistry Communications, 10, 2008, 1614-1616.

Hanna Sopha, Falko Wachholz, Gerd-Uwe Flechsig*

Falko Wachholz war Ansprechpartner während der gesamten Zeit der Diplomarbeit von Fr. Dipl.-Chem. Hanna Sopha, deren Thema Gegenstand der folgenden Publikation ist. Er nahm an Diskussionen bezüglich des Themas redox-markierter RNA Spezies teil und assistierte während des Verfassens der Diplomarbeit und der Erstellung zugehöriger Abbildungen.



Contents lists available at ScienceDirect

Electrochemistry Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/elecom

Cathodic adsorptive stripping voltammetric detection of tRNA by labelling with osmium tetroxide

Hanna Sopha, Falko Wachholz, Gerd-Uwe Flechsig*

Department of Chemistry, University of Rostock, Dr.-Lorenz-Weg 1, D-18051 Rostock, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2008

Received in revised form 10 August 2008

Accepted 12 August 2008

Available online xxxx

Keywords:

tRNA

ssDNA

Osmium tetroxide bipyridine

Adsorptive stripping voltammetry, AdSV

Hanging mercury drop electrode, HMDE

ABSTRACT

This communication reports about adsorptive stripping voltammetric determination of baker's yeast tRNA that was modified with the complex osmium tetroxide bipyridine. The uracil and cytosine bases are able to react with $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ within 2 h. We observed a 42 fold higher sensitivity for the catalytic Os peak on the hanging mercury drop electrode (HMDE) compared with an $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ modified 20 base ssDNA. We found a 0.27 $\mu\text{g/l}$ detection limit for $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ tRNA. A linear calibration function was observed up to 3 $\mu\text{g/l}$. The effect of accumulation potential was very small. These findings possibly indicate a strong adsorption on the HMDE. Such labelling of tRNA with $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ holds great promise for future biosensor application regarding the detection of other RNA species.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nucleic acids can be detected electrochemically in several ways. The electrochemical activity of DNA on mercury electrodes had been discovered by Palecek 50 years ago [1]. Most of the electrode reactions of nucleic acids are irreversible. Fortunately nucleic acids can be modified with labels such as osmium tetroxide complexes and ferrocene that deliver large reversible electrochemical signals. Palecek et al. showed that osmium tetroxide complexes with organic ligands such as bipyridine can be utilized as versatile tools for studying the structure of double strands as well as sensitive detection of nucleic acids [2–5]. The complex $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ attacks the C=C double bond in the pyrimidine bases thymine, uracil and cytosine forming a substituted glycol diester of osmium(VI) acid [6,7]. Labelling of DNA strands of any length can be easily performed in the laboratory, which is an important advantage of this approach. However, such Os modified DNA strands are unable to form double strands. Sequence specific DNA detection by means of osmium tetroxide labels has been conducted at separate surfaces, including magnetic beads and mercury, carbon or amalgam electrodes ("two surface strategy") [8–12].

Recently, we reported on how protective oligonucleotide strands can be utilized for labelling thymine containing nucleic acids with $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ without losing their ability for hybridization with immobilized probes [13,14]. Fojta et al. have reported about the use of protective oligonucleotides for the preparation

of osmium tetroxide labelled reporter strands by means of magnetic separation [15]. We have recently demonstrated that protective strands can also be applied to detect the products of polymerase chain reactions (PCR) [16].

To our knowledge, considerably less has been reported about the electrochemical detection of osmium tetroxide modified RNA. As Palecek et al. reported, artificial RNA consisting of either poly(rU) or poly(rC) is able to react with osmium tetroxide complexes and yields large polarographic signals. The catalytic signals at 1.2 V in the case of osmium tetroxide modified cytosine are twice as high in comparison with the uracil product [3]. Uracil replaces thymine in all RNA variants. Besides this, also the cytosine in RNA reacts with osmium tetroxide complexes. However, the reaction rate of cytosine is 10 times slower compared with thymine [7]. The reaction products of cytosine, thymine and uracil with several osmium(VIII) reagents have already been isolated [17]. The resulting cytosine glycol osmates(VI) can be transformed by deamination to the regarding uracil product. Terminal ribose in RNA can react with osmate(VI) forming sugar esters [7]. This reaction has been used for the stripping voltammetric detection and discrimination of thymine deoxyriboside and (artificial) thymine riboside as well as for end labelling of RNA [18]. Osmium tetroxide bipyridine has been utilized to perform X ray diffraction analysis of tRNA [19,20]. Besides cathodic voltammetric studies at mercury electrodes, there are several reports on anodic tRNA stripping detection by guanine oxidation on carbon electrodes [21–23]. Electrochemistry of nucleic acids has been reviewed [24].

Here, we demonstrate how ppt traces of yeast tRNA can be determined by labelling with osmium tetroxide bipyridine

* Corresponding author. Tel.: +49 381 4986470; fax: +49 381 4986461.

E-mail address: gerd-uwe.flechsig@uni-rostock.de (G.-U. Flechsig).

followed by adsorptive stripping voltammetry (AdSV) on hanging mercury drop electrodes (HMDE).

2. Experimental

2.1. Materials

2,2' Bipyridine was delivered by Merck and osmium tetroxide as a 2% aqueous solution by Fluka. Tris buffer (10 mM tris(hydroxy methyl) aminomethane ("Tris"), 0.5 M Na₂SO₄) was adjusted to pH 7.5. Transfer ribonucleic acid from baker's yeast (tRNA) catalogue no. R 8759 has been delivered by Sigma Aldrich. Single stranded 20 mer DNA (ssDNA) was delivered by FRIZ Biochem GmbH (Munich, Germany) and had the following sequence: 5' CGA TTT TGT CGA CTC TCA TC 3'. Stock solutions (444 mg/l) were prepared in acetate buffer (0.1 M, pH 4.8). Tris and sodium sulphate were obtained from Fluka and Riedel de Haën. Ultra pure water (18 MΩ cm, <2 ppb TOC) was prepared by means of an ultra clear TOC system (SG Water Systems, Germany) comprising ultra filtration and UV oxidizing modules. All chemicals were of analytical grade. Buffer solutions, beakers and pipette tips were autoclaved twice prior to use.

2.2. Labelling with osmium tetroxide bipyridine

We dissolved 2 mg tRNA in 1 ml acetate buffer (pH 4.8). Then we added to 50 μl of this solution 27.5 μl 10 mM [OsO₄(bipy)] and left the mixture for 8 h at 4 °C. In the next step we removed excess osmium tetroxide bipyridine by dialysis against Tris buffer (pH 7.5) [16]. The purified solution of [OsO₄(bipy)] tRNA was divided in 10 μl aliquots. For enhanced purification, we repeated the dialysis step with fresh Tris buffer for another 16 h.

2.3. Electrochemical detection of [OsO₄(bipy)] tRNA and [OsO₄(bipy)] ssDNA

All adsorptive stripping voltammetric (AdSV) experiments have been performed at a HMDE by means of a 797 VA Computrace polarograph from Metrohm (Switzerland). The 20 ml electrochemical cell comprised also an Ag/AgCl (3 M KCl) reference and a platinum counter electrode (Metrohm).

The AdSV experiments were conducted by adsorptive accumulation of the [OsO₄(bipy)] tRNA or [OsO₄(bipy)] ssDNA at the given potential and for the given time, followed by a differential pulse voltammetric stripping step. All voltammetric experiments were performed at room temperature (22 °C). All concentration values relate to the unmodified nucleic acid. The limit of detection was

determined graphically from the calibration plot and its prediction band using Origin 7.5 software.

3. Results and discussion

We compared the AdSV response of [OsO₄(bipy)] tRNA and ssDNA. Fig. 1B displays adsorptive DPV stripping signals of [OsO₄(bipy)] tRNA in the concentration range between 0 and 21.4 μg/l (curves a–d). The complete modification and AdSV protocol was conducted with a blank buffer (a) to control, whether excess osmium tetroxide was still present after the dialysis step. We found that a single dialysis effectively removed the excess reagent; however, a change of dialysis buffer in between significantly enhanced the removal of excess osmium tetroxide complexes. Adsorptive stripping voltammetry of [OsO₄(bipy)] tRNA on the HMDE was some 42 fold more sensitive compared with [OsO₄(bipy)] ssDNA (Fig. 1A). We relate here to the mass concentration of the unmodified nucleic acids and compare the DPV response of 366 μg/l ssDNA with 21.4 μg/l tRNA in Fig. 1A d and B d, respectively. Note also the different scales. Although we chose a 20 mer oligo ssDNA for comparison with tRNA, which has 80 bases in average, these preliminary results clearly show, that RNA can be modified with osmium(VIII) complexes (in analogy to DNA). It can be assumed that all pyrimidine bases of a single stranded nucleic acid are modified at longer modification time.

Fig. 2 exhibits the effect of the deposition time upon AdSV signals at different concentrations of [OsO₄(bipy)] tRNA. We found an optimal deposition time of 45 s. At longer deposition time, the signals started to decrease significantly. This effect was very similar at three different analyte concentrations between 7.14 and 21.4 μg/l. Palecek et al. observed similar behaviour for osmium tetroxide modified ssDNA only at much higher analyte concentration [4,12]. It can be assumed that the AdSV signals of osmium tetroxide modified ssDNA and tRNA decrease at high concentrations or deposition times due to the high coverage. The reason for this complex behaviour is still unclear. One possibility is stronger adsorption of tRNA perhaps due to the ribose, which has one more hydroxyl group than deoxyribose in DNA. Fig. 3 exhibits the effect of accumulation potential upon the AdSV signals of [OsO₄(bipy)] tRNA at two different concentrations. The effect was slightly higher at 14.3 compared with 7.14 μg/l. In general, the AdSV signals decrease upon increasing negative potentials. This can probably be addressed to the rising electrostatic repulsion of the negatively charged phosphate groups in the nucleic acids. Also Palecek et al. observed such an effect for osmium tetroxide modified ssDNA, which was, however, considerably stronger [4,12]. Besides the higher sensitivity, the small effect of accumulation potential upon

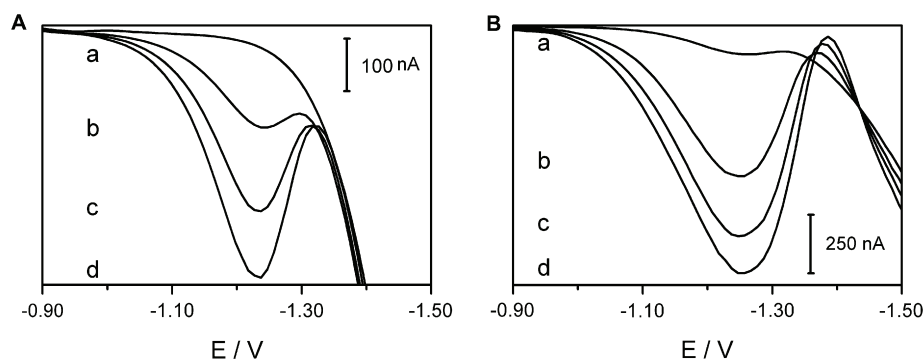


Fig. 1. Differential pulse voltammetric stripping signals of [OsO₄(bipy)]-modified nucleic acids in acetate buffer: (A) ssDNA, (a) blank, (b) 122, (c) 244, (d) 366 μg/l; and (B) tRNA, (a) blank, (b) 7.14, (c) 14.3, (d) 21.4 μg/l; deposition time 60 s, deposition potential –0.9 V, pulse amplitude 50 mV, pulse time 40 ms, potential step 10 mV, sweep rate 20 mV/s.

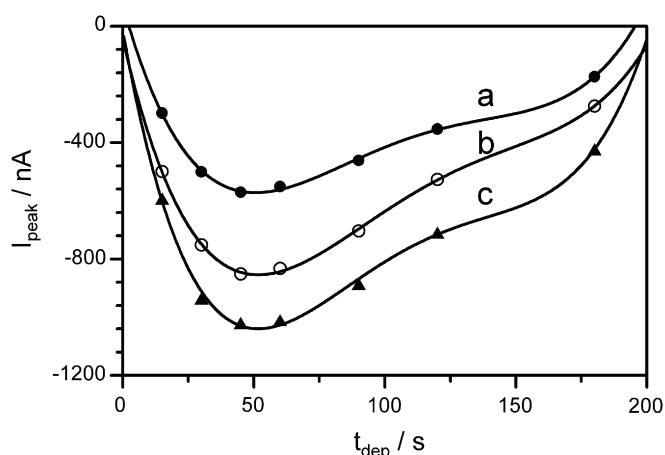


Fig. 2. Effect of the deposition time upon the DPV stripping signals of [OsO₄(bipy)]-tRNA at (a) 7.14, (b) 14.3, (c) 21.4 µg/l; the other conditions have been the same as in Fig. 1.

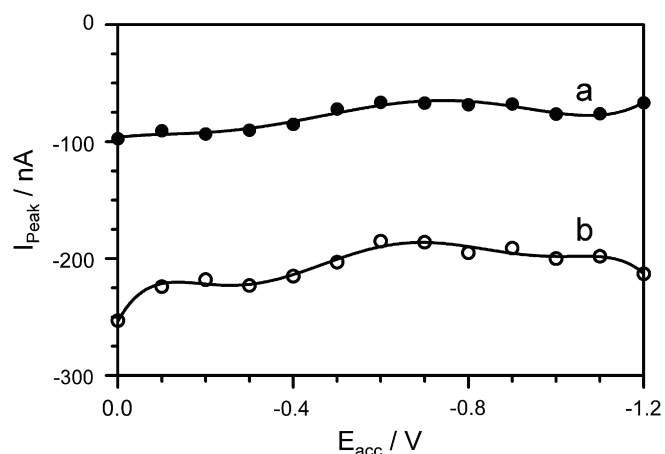


Fig. 3. Effect of the deposition potential upon the adsorptive stripping voltammetric response of [OsO₄(bipy)]-tRNA at (a) 7.14 and (b) 14.3 µg/l tRNA; deposition time 15 s; the other conditions have been the same as in Fig. 1.

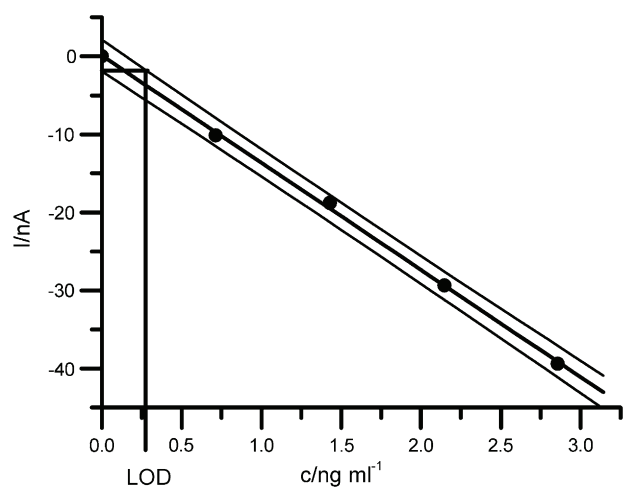


Fig. 4. Calibration plot of [OsO₄(bipy)]-tRNA at 45 s deposition time; The LOD of 0.27 µg/l has been obtained using the prediction band of the calibration plot. Deposition potential -0.2 V, pulse amplitude 40 mV, pulse time 30 ms, potential step 10 mV, sweep rate 20 mV/s.

the tRNA signals is perhaps another hint for strong tRNA adsorption on the HMDE. Further study is needed to answer this question.

Fig. 4 depicts a linear calibration plot in the lowest possible concentration range (0–3 µg/l) for [OsO₄(bipy)] modified tRNA at 45 s deposition time. A 0.27 µg/l limit of detection (LOD) could be graphically estimated from the calibration plot and its prediction band ($p = 95\%$). Palecek and Hung found a 5 µg/l LOD for a long chained [OsO₄(bipy)] ssDNA at 120 s deposition time [4]. The calibration functions at 15, 45 and 180 s deposition time were not linear in the range between 7 and 36 µg/l (data not shown). Also these findings possibly indicate a stronger adsorption of [OsO₄(bipy)] tRNA on mercury in comparison with [OsO₄(bipy)] ssDNA.

4. Conclusions

We have demonstrated that tRNA from yeast can be easily modified with the electroactive complex [OsO₄(bipy)]. This allows for highly sensitive adsorptive stripping voltammetric determination of tRNA on the HMDE with a 0.27 µg/l limit of detection using the catalytic osmium peak at -1.2 V. The linear calibration plot ranges up to 3 µg/l. In comparison with a [OsO₄(bipy)] modified 20 base ssDNA, we suppose a much stronger adsorption for [OsO₄(bipy)] tRNA on the HMDE.

Such covalent labelling of native RNA holds great promise for future electrochemical biosensor applications regarding other RNA species such as mRNA and miRNA.

Acknowledgement

The authors are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for financial support (projects FL 384/7-1 and 8-1).

References

- [1] E. Palecek, Nature 188 (1960) 656.
- [2] E. Palecek, E. Lukasova, F. Jelen, M. Vojtiskova, Bioelectrochem. Bioenerg. 8 (1981) 497.
- [3] E. Lukasova, F. Jelen, E. Palecek, Gen. Physiol. Biophys. 1 (1982) 53.
- [4] E. Palecek, M.A. Hung, Anal. Biochem. 132 (1983) 236.
- [5] E. Lukasova, M. Vojtiskova, F. Jelen, T. Sticzay, E. Palecek, Gen. Physiol. Biophys. 3 (1984) 175.
- [6] E. Palecek, M. Fojta, Anal. Chem. 73 (2001) 74A.
- [7] E. Palecek, Methods Enzymol. 212 (1992) 139.
- [8] E. Palecek, M. Fojta, F. Jelen, Bioelectrochemistry 56 (2002) 85.
- [9] M. Fojta, L. Havran, S. Billova, P. Kostecka, M. Masarik, R. Kizek, Electroanalysis 15 (2003) 431.
- [10] M. Fojta, L. Havran, M. Vojtiskova, E. Palecek, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 6532.
- [11] P. Kostecka, L. Havran, H. Pivonkova, M. Fojta, Bioelectrochemistry 63 (2004) 245.
- [12] B. Yosypchuk, M. Fojta, L. Havran, M. Heyrovsky, E. Palecek, Electroanalysis 18 (2006) 186.
- [13] G.-U. Flechsig, T. Reske, Anal. Chem. 79 (2007) 2125.
- [14] J. Peter, T. Reske, G.-U. Flechsig, Electroanalysis 19 (2007) 1356.
- [15] M. Fojta, P. Kostecka, M. Trefulka, L. Havran, E. Palecek, Anal. Chem. 79 (2007) 1022.
- [16] T. Reske, M. Mix, H. Bahl, G.-U. Flechsig, Talanta 74 (2007) 393.
- [17] C.H. Chang, H. Ford, E.J. Behrman, Inorg. Chim. Acta 55 (1981) 77.
- [18] M. Trefulka, V. Ostana, L. Havran, M. Fojta, E. Palecek, Electroanalysis 19 (2007) 1281.
- [19] R.W. Schevitz, M.A. Navia, D.A. Bantz, G. Cornick, J.J. Rosa, P.B. Sigler, Science 177 (1972) 429.
- [20] J.D. Robertus, J.E. Ladner, J.T. Finch, D. Rhodes, R.S. Brown, B.F.C. Clark, A. Klug, Nature 250 (1974) 546.
- [21] E. Palecek, M. Fojta, Anal. Chem. 66 (1994) 1566.
- [22] J.L. Anderson, L.A. Coury, J. Leddy, Anal. Chem. 70 (1998) 560R.
- [23] J. Wang, P. Gründler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin, J.L.L. Paz, Anal. Chem. 72 (2000) 3752.
- [24] E. Palecek, Talanta 56 (2002) 809.

Lebenslauf

Ausbildung

- 01/2006 06/2009 **Doktorand, Universität Rostock, Institut für Chemie, Rostock (D)**
Geheizte elektrochemische Sensoren mit neuartigen Arbeitselektroden und Heizgeneratoren
- 03/2008 04/2008 **Aufenthalt am National Institute of Chemistry of Slovenia, Ljubljana (SLO)**
Studien zu geheizten Bismut- und Antimonfilmelektroden in der Arbeitsgruppe von Prof. Bozidar Ogorevc
- 02/2007 **Aufenthalt an der Arizona State University, Biodesign Institute, Tempe, AZ (USA)**
Studien zur Elektrodenreinigung mit Hilfe von Wärme in der Arbeitsgruppe von Prof. Joseph Wang
- 11/2004 11/2005 **Diplomarbeit, Leibniz-Institut für Ostseeforschung Warnemünde, Rostock-Warnemünde, (D)**
Optimierung der O₂ Equilibrierungszeit in einer Messvorrichtung zur Bestimmung des pO₂ von Meerwasser
- 10/2000 11/2004 **Grund- und Hauptstudium der Chemie, Universität Rostock, Rostock (D)**
Spezialisierung Umweltchemie in der Abteilung Analytische, Technische und Umweltchemie des Instituts für Chemie
- 10/1998 09/2000 **Grundstudium der Physik, Universität Rostock, Rostock (D)**

Rostock, 29. April 2009

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Falko Wachholz, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 29. April 2009

Falko Wachholz