



Katharina Maria Winkler, BSc

Elektrochemische Detektion von freiem Hämoglobin zur Hämolysekontrolle

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Masterstudium Biomedical Engineering

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuer

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter

Institut für Medizintechnik
Stremayrgasse 16/3, A - 8010 Graz

Diese Masterarbeit wurde erstellt in Zusammenarbeit mit:



HEALTH - Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften
JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH
Neue Stiftingtalstraße 2, A - 8010 Graz

Betreuer:
DI Dr. Martin Hajsek
Mag.^a pharm. Dr.ⁱⁿ Bruna Pekec

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

AFFIDAVIT

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources/resources, and that I have explicitly indicated all material which has been quoted either literally or by content from the sources used. The text document uploaded to TUGRAZonline is identical to the present master's thesis.

Datum/date

Unterschrift/signature

KURZFASSUNG

Die Abhängigkeit zwischen diagnostischen Parametern und hämolytischen Prozessen resultiert in einer verminderten Genauigkeit und Zuverlässigkeit von Laboranalysen. Die Entwicklung eines Hämolyse-Teststreifens basierend auf der elektrochemischen Detektion von freiem Hämoglobin im Blutplasma ermöglicht die Ausschaltung dieser Fehlerquelle. Das sensorische Element des Systems bildet ein Hexacyanoferrat-Film auf der Arbeitselektrode des Sensors. Vier verschiedene Hexacyanoferrat-Verbindungen wurden als mögliche Modifikatoren für die Arbeitselektrode des Teststreifens untersucht. Die modifizierten Sensoren wurden mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und ihre Signalintensität, Reproduzierbarkeit sowie Signalstabilität analysiert. Die Ergebnisse weisen Eisen-Hexacyanoferrat, welches in Glutaraldehydmembranen angereichert wurde, als geeigneten Modifikator aus. Diese Membranen sind charakterisiert durch ein ausgeprägtes elektrochemisches Verhalten, hohe Signalstabilität und gute Reproduzierbarkeit. Die Durchführung weiterer Studien mit Hämoglobin ist für eine Validierung des vorliegenden Messprinzips notwendig.

Schlagwörter: Hämoglobin, Hämolyse, Hexacyanoferrat, Sensorik, Voltammetrie

ABSTRACT

Hemolytic processes affect diagnostic parameters, resulting in a reduction of reliability and accuracy of lab analysis. The detection of free hemoglobin in blood plasma is used for the development of a haemolysis test strip, eliminating this source of error. The sensoric element of the system is formed by a hexacyanoferrate film on the working electrode. Four different hexacyanoferrate compounds were examined as possible modifying agents for the working electrode of the test strip. All modified sensors were characterized using cyclic voltammetry and analysis of the parameters signal intensity, reproducibility and signal stability has been performed. The results confirm ferric hexacyanoferrate, which has been enriched on glutaraldehyd membranes, as a suitable modifier. These membranes show a pronounced electrochemical behaviour, high signal stability as well as an excellent reproducibility. However, further studies applying hemoglobin are required in order to validate the present measuring principle.

Key words: Hemoglobin, Hemolysis, Hexacyanoferrate, Sensors, Voltammetry

***Für meine Eltern,
Anita und Johann Winkler***

<In jede hohe Freude mischt sich eine Empfindung der Dankbarkeit>
Marie von Ebner-Eschenbach

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Hämolyse	3
1.1.1	Hämolyse und ihre Ursachen	3
1.1.2	Hämolyse als Störfaktor medizinischer Labordiagnostik	5
1.1.3	Hämolyse und Hämoglobin	7
1.2	Hämoglobin	8
1.2.1	Einführung	8
1.2.2	Detektion von freiem Hämoglobin im Blutplasma	10
1.2.3	Bestimmung von Hämoglobin mittels Hexacyanoferrat	16
1.2.4	Hämoglobin und Kalium	16
1.3	Elektrochemische Analytik	17
1.3.1	Überblick über die Elektrochemische Analytik und ihre Techniken	17
1.3.2	Voltammetrie	19
1.4	Ziele dieser Arbeit	30
2	Materialien und Methoden	31
2.1	Fertigung der Sensoren mittels Siebdrucktechnologie	31
2.1.1	Chemikalien und Geräte	31
2.1.2	Schritte des Siebdruckvorganges	32
2.2	Fertigung der Cl ⁻ -Reservoirmembran für die Referenzelektrode	34
2.2.1	Chemikalien und Geräte	34
2.2.2	Fertigung und Aufbringung der Cl ⁻ -Reservoirmembran	34
2.3	Fertigung der Testlösungen	35
2.3.1	Chemikalien und Geräte	35
2.3.2	Herstellung der Kaliumchlorid-Reinigungslösung	35

2.3.3	Herstellung der Hexacyanoferrat-Lösungen für die elektrochemische Deposition	36
2.3.4	Herstellung der Arbeitslösung (Phosphatpuffer)	37
2.3.5	Herstellung der Hexacyanoferrat-Lösungen für die Nafion- und Glutaraldehydmembranen	37
2.4	Modifizierung der Arbeitselektrode	39
2.4.1	Modifizierung mittels elektrochemischer Deposition	39
2.4.2	Modifizierung mittels hexacyanoferrathältigen Membranen	41
2.5	Apparativer Aufbau der Versuche	43
2.6	Auswertung der zyklischen Voltammogramme	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Kupfer-Hexacyanoferrat(III).....	44
3.2	Kalium-Hexacyanoferrat(II)	53
3.3	Kalium-Hexacyanoferrat(III)	61
3.4	Eisen-Hexacyanoferrat(II)	66
4	Diskussion	74
4.1	Hämolyse detektion mittels Hexacyanoferrat modifizierter Elektroden: Relevanz und Problematik	74
4.2	Kupfer-Hexacyanoferrat(III) modifizierte Sensoren	74
4.3	Kalium-Hexacyanoferrat(II) modifizierte Sensoren	77
4.4	Kalium-Hexacyanoferrat(III) modifizierte Sensoren	79
4.5	Eisen-Hexacyanoferrat(II) modifizierte Sensoren	80
4.6	Zusammenfassung und Ausblick	83
	Literaturverzeichnis.....	86
	Abbildungsverzeichnis.....	92
	Tabellenverzeichnis.....	97

1 EINLEITUNG

Die Arbeitsgruppe Sensorik der Abteilung HEALTH des Joanneum Research beschäftigt sich mit der Entwicklung eines Home-Monitoring Systems für die Erfassung von Kaliumplasmakonzentrationen für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Dieses System bildet die Grundlage der hier vorliegenden Arbeit. Basierend auf einem potentiometrischen Messprinzip wird ein Einmalteststreifen entwickelt, welcher, ähnlich der Blutzucker-Messung von Diabetikern, mit Hilfe eines Tropfen Kapillarbluts aus der Fingerbeere den Kaliumspiegel im Blutplasma bestimmt. Besonders für Patienten mit chronischer Herz- oder Niereninsuffizienz stellen Entgleisungen des Kaliumhaushaltes eine schwerwiegende Komplikation dar, die einerseits durch die Krankheit selbst, vor allem aber durch deren medikamentöse Therapie ausgelöst werden kann. Das momentane Standardprozedere zur Überwachung des Kaliumspiegels erfordert die Abnahme venösen Blutes bei einem Arzt oder in einem Krankenhaus. Dieser Umstand impliziert einen zeitintensiven Prozess für den Patienten, sowie einen logistischen und finanziellen Aufwand auf Seiten der Gesundheitsdienstleister. Durch die Entwicklung eines Kalium Home-Monitoring Systems soll dem Patienten eine komfortable, engmaschige Kaliumüberwachung von zu Hause aus ermöglicht und Kaliumentgleisungen frühestmöglich erkannt werden. Die Probenentnahme aus der Fingerbeere erfolgt dabei selbstständig durch den Patienten.

Durch mechanische Belastung und Scherkräfte während der Blutabnahme können Erythrozyten zerstört und Hämoglobin sowie andere zytoplasmatische Bestandteile in das Plasma freigesetzt werden. Dieser Vorgang wird als Hämolyse bezeichnet. Da Erythrozyten in ihrem Zellinneren eine circa 25-fach höhere Kaliumkonzentration besitzen als das Blutplasma, kann schon eine geringgradige Hämolyse einen Anstieg des Plasmakaliumspiegels bewirken und so zu falsch hohen Messergebnissen führen. Wichtiger Bestandteil eines Home-Monitoring Systems ist daher die Integration einer Hämolyse-Detektion, die das mögliche Auftreten einer Hämolyse überwacht und den Patienten vor Fehlmessungen warnt.

Diese Masterarbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer Hämolyse-detektion auf Einmalteststreifen, welche später in das bestehende Kalium Home-Monitoring System integriert werden kann. Grundlage des Systems ist die elektrochemische Bestimmung des freien Hä-

moglobins im Blutplasma. Unter physiologischen Bedingungen enthält Blutplasma keine oder nur geringe Spuren von Hämoglobin. Kommt es durch Hämolyse zu einer Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten, kann über die Konzentration an freiem Hämoglobin im Blutplasma direkt auf den Grad der Hämolyse zurückgeschlossen und somit Fehlinterpretationen der Kaliumkonzentration vermieden werden. Der Hämolyse-Teststreifen wird von einem Drei-Elektrodensystem bestehend aus Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode aufgebaut. Die Arbeitselektrode des Sensors wird mit einem Hexacyanoferrat-Film modifiziert. Dieser Hexacyanoferrat-Film reagiert mit dem Hämoglobin in der Probenlösung und bildet das sensorische Element des Teststreifens.

Im Zuge dieser Arbeit wurden vier verschiedene Hexacyanoferrat-Verbindungen als mögliche Modifikatoren für die Arbeitselektrode des Hämolyse-Teststreifens untersucht. Betrachtet wurden folgende vier Hexacyanoferrat-Verbindungen:

- Kupfer-Hexacyanoferrat(III) ($\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$)
- Kalium-Hexacyanoferrat(II) ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- Kalium-Hexacyanoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- Eisen-Hexacyanoferrat(II) ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$)

Für das Aufbringen der Filme auf die Arbeitselektrode wurden zwei Techniken validiert:

- Modifizierung mittels elektrochemischer Deposition
- Modifizierung mittels hexacyanoferrathältigen Membranen

In nachfolgenden Abschnitt wird kurz auf die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit eingegangen. Im Methodenteil werden die Fertigung der Teststreifen, die Herstellung der benötigten Testlösungen sowie die Modifizierung der Arbeitselektrode mit Hexacyanoferrat näher beschrieben. Die Resultate der durchgeführten Messreihen werden im Ergebnisteil dargestellt und im Diskussionsteil erörtert. Abschließend gibt es eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse sowie einen Ausblick auf die nächsten Entwicklungsschritte.

1.1 Hämolyse

1.1.1 Hämolyse und ihre Ursachen

Hämolyse bezeichnet den Abbau von Erythrozyten mit der Freisetzung von Hämoglobin und anderen zytoplasmatischen Bestandteilen in das Blutplasma. Hämolyse kann innerhalb des Körpers (in vivo) oder außerhalb des Körpers (ex vivo) im Bereich der Labordiagnostik auftreten. Im nachfolgenden Abschnitt werden die wichtigsten Ursachen für eine in vivo bzw. ex vivo Hämolyse aufgeführt, welche in Abbildung 1 noch einmal übersichtlich zusammengefasst werden.

in vivo Hämolyse: Grundsätzlich kann zwischen natürlicher, physiologisch auftretender Hämolyse aufgrund des überschrittenen Erythrozytenalters von >120 Tagen und einer gesteigerten, pathologischen Hämolyse mit verkürzter Lebensdauer der Erythrozyten unterschieden werden. Eine gesteigerte Hämolyse kann durch verschiedene Erkrankungen, durch mechanische Prozesse oder durch die Einwirkung externer Faktoren entstehen. Der Abbau der Erythrozyten kann extravasal (außerhalb des Gefäßsystems, z.B. durch Phagozyten) oder intravasal (innerhalb des Gefäßsystems) erfolgen. Zu den Hauptursachen für eine gesteigerte Hämolyse in vivo zählen [1]:

- Erkrankungen
 - Immunhämolyse
 - Hereditäre Membrandefekte der Erythrozyten
 - Lipidstoffwechselstörungen
 - Hereditäre Enzymdefekte
 - Störungen der Hämoglobinsynthese
- Mechanische Prozesse
 - Veränderungen an Gefäßen oder Herzklappen
 - Mechanische Herzklappen
- Hämolyse durch Toxine
 - Schlangengifte
 - Bakterientoxine
 - Vergiftungen
- Parasitenbefall der Erythrozyten

- Malaria
- Babesiose (durch Zeckenbiss übertragene, intrazelluläre Parasiten)
- Bartonellose

ex vivo Hämolyse: Hämolyse kann nicht nur durch zelluläre Vorgänge im Körper ausgelöst werden, sondern ist auch im Bereich der Labordiagnostik bei venösen und kapillaren Blutabnahmen ein kritischer Faktor. Durch gesteigerte mechanische Belastung der Erythrozyten während der Blutabnahme (v.a. durch Scherkräfte [2]) oder durch falsche Lagerung und Handhabung der Blutproben kann es zur Beschädigung von Erythrozyten und folglich zu einer Hämolyse kommen. Die häufigsten Ursachen für eine ex-vivo Hämolyse sind:

- Fehler während der Blutabnahme
 - Zu lange (>1min) oder zu feste Venenstauung
 - Zu kleiner Nadeldurchmesser
 - Falsche oder komplizierte Venenpunktion
 - Nicht trocknen lassen des Sterilisationsmittels
 - Falsches Blutentnahmeröhrchen oder Röhrchenunterfüllung
 - Fehlendes oder zu starkes Schwenken des Blutröhrchens nach Abnahme
 - ‚Herausquetschen‘ des Blutes bei kapillarer Blutabnahme
 - Zu große Einstichtiefe bei kapillarer Blutabnahme
- Probenlagerung und Probentransport
 - Zu lange Transportwege
 - Zu lange Probenlagerung
 - Falsche Lagerungsbedingungen
 - Temperatureinflüsse
 - Sonneneinstrahlung
 - Temperaturschwankungen während des Transports
 - Falsche Lagerungstemperatur
- Probenvorbereitung
 - Zu langes oder starkes Zentrifugieren
 - Zu lange Wartezeit zwischen Probenentnahme und Zentrifugation
 - Wiederholtes Zentrifugieren

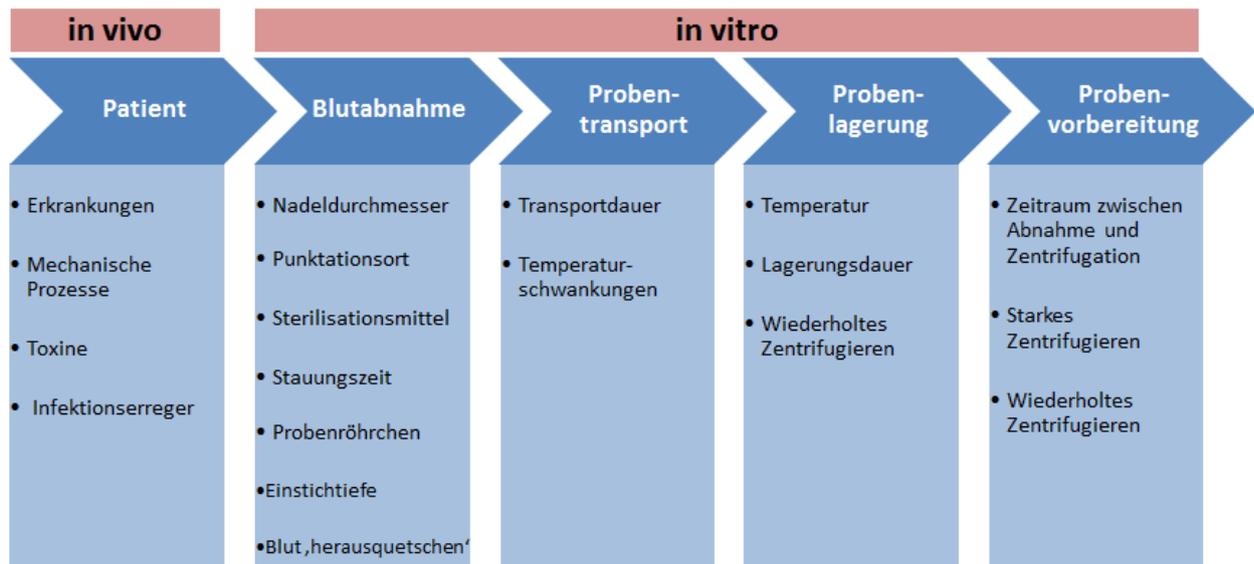


Abbildung 1: Ursachen für Hämolyse in vivo und in vitro [3].

1.1.2 Hämolyse als Störfaktor medizinischer Labordiagnostik

Hämolyse stellt eine Fehlerquelle für die diagnostische Aussage von Laborparametern dar. Abhängig von der intrazellulären Konzentration des gemessenen Analyten und der angewandten Messmethodik können die aus den Erythrozyten freigesetzten zellulären Inhaltsstoffe die Genauigkeit und Zuverlässigkeit von Laboranalysen auf verschiedene Art und Weise beeinflussen [4]: (i) Herrscht für einen Analyten ein Konzentrationsgefälle zwischen Intra- und Extrazellularraum, können die austretenden intrazellulären Bestandteile zu Verdünnungseffekten oder falschen Erhöhungen des gemessenen Analyten im Blutplasma führen. (ii) Aus den Erythrozyten freigesetztes Hämoglobin kann mit spektrophotometrischen Analysemethoden interferieren und zu einer Veränderung des optischen Absorptionsverhalten oder des Blindwertes führen. Ebenso können (iii) Hämoglobin und andere ins Plasma freigesetzte Zellinhaltsstoffe chemische Messreaktionen stören und mit Messreagenzien wechselwirken.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht von Laborparametern, welche durch Hämolyse beeinflusst werden können. Die Stärke des Einflusses ist vor allem vom Grad der Hämolyse und der verwendeten Messmethode abhängig. Hervorzuheben sind vor allem die Analyten Aspartat-Aminotransferase (AST), Laktatdehydrogenase (LDH), Kalium, Chlorid und Natrium. Diese reagieren besonders sensitiv auf Hämolyse und zeigen schon bei niedrigen, für das menschliche Auge nicht sichtbaren, Hämolysegraden klinisch relevante Abweichungen ihrer Mess-

werte [4]. Bei ausgeprägter Hämolyse kann bei jedem in der Tabelle aufgeführten Analyten eine klinisch relevanten Messabweichungen auftreten.

Tabelle 1: Durch Hämolyse beeinflusste Laborparameter und ihre Ursachen. Ein positiver Fehler weist auf eine Überschätzung des Analyten durch Hämolyse hin, während es bei einem negativen Fehler zu falsch niedrigen Messwerten kommt [5].

Parameter	Fehler	Ursache
Antithrombin	Negativ	Analytische Interferenzen
Aspartat-Aminotransferase	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
Alanin-Aminotransferase	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
Albumin	Negativ	Verdünnung
Alkalische Phosphatase	Negativ	Analytische Interferenzen
Bilirubin	Negativ	Analytische Interferenzen
Chlorid	Negativ	Verdünnung
Cortisol	Negativ	Analytische Interferenzen
Kreatininkinase	Positiv	Analytische Interferenzen
Kreatinin	Positiv	Analytische Interferenzen
Folsäure	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
γ-Glutamyltransferase	Negativ	Analytische Interferenzen
Glukose	Negativ	Verdünnung
Haptoglobin	Negativ	Analytische Interferenzen
Homocystein	Negativ	Analytische Interferenzen
Eisen	Positiv	Analytische Interferenzen
Laktatdehydrogenase	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
Lipase	Positiv	Analytische Interferenzen
Magnesium	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
Phosphor	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
Kalium	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
Prostata-spezifisches Antigen	Positiv	Analytische Interferenzen
Natrium	Negativ	Verdünnung
Urea	Positiv	Zellulärer Konzentrationsgradient
Testosteron	Negativ	Analytische Interferenzen
Troponin I	Positiv	Analytische Interferenzen
Troponin T	Negativ	Analytische Interferenzen
Vitamin B12	Negativ	Analytische Interferenzen

1.1.3 Hämolyse und Hämoglobin

Blutplasma enthält unter physiologischen Bedingungen nur geringe Spuren an freiem Hämoglobin. Durch den Abbau von gealterten Erythrozyten in Knochenmark, Leber und Milz können zwar geringe Mengen an Hämoglobin in das Plasma freigesetzt werden, diese werden in-vivo jedoch sofort vom Plasmaprotein Haptoglobin gebunden und abtransportiert [1] [6]. Der physiologische Referenzbereich für freies Hämoglobin im Blutplasma liegt bei <20 mg/l [7].

Hämolyse führt zu einer zusätzlichen Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten. Übersteigt die Menge des freigesetzten Hämoglobins die Bindungskapazität des Haptoglobins oder findet die Hämolyse ex vivo statt, kommt es zu einem Anstieg der Hämoglobinkonzentration im Blutplasma. Je stärker die Hämolyse, desto höher die Hämoglobinkonzentration. Die Messung des freien Hämoglobins im Blutplasma stellt somit einen direkten Indikator für die Bestimmung des Hämolysegrades dar [6] [7] [8].

1.2 Hämoglobin

1.2.1 Einführung

Als Hämoglobin wird der rote Blutfarbstoff in den Erythrozyten bezeichnet, welcher für den Sauerstoff-Transport im Körper zuständig ist. Abhängig von seiner Sauerstoffbeladung kann zwischen unbeladenem, desoxygeniertem Hämoglobin (=Desoxyhämoglobin), sowie sauerstoffreichem, oxygeniertem Hämoglobin (=Oxyhämoglobin) unterschieden werden. Das Verhältnis von Oxihämoglobin zum Gesamthämoglobin wird als Sauerstoffsättigung bezeichnet.

a.) Molekulare Struktur

Das Hämoglobin-Molekül ist ein globuläres Protein mit einem molekularen Gewicht von 64,5kDA, welches von insgesamt vier Untereinheiten aufgebaut wird. Jede dieser Untereinheiten besteht aus einem Protein, dem sogenannten Globin, sowie einer prosthetischen Hämgruppe (siehe Abbildung 2). Die Globinketten können von unterschiedlichen Aminosäureketten aufgebaut werden, die sich in ihrer Affinität für Sauerstoff unterscheiden. Jeweils zwei der vier Globine in einem Hämoglobinmolekül sind ident. Bei erwachsenen Menschen werden rund 98% des Gesamthämoglobins von Hämoglobin A (HbA) gebildet, welches aus 2 α -Ketten sowie 2 β -Ketten besteht. Fötales Hämoglobin besteht hauptsächlich aus Hämoglobin F (HbF), welches von 2 α -Ketten sowie 2 γ -Ketten aufgebaut wird [6] [9].

Die Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobin erfolgt mit Hilfe des Häms. Ein Häm-Komplex besteht aus 4 Pyrrolen, die über Methinbrücken zu einem Porphyrinring verbunden sind. Die typisch rote Farbe des Hämoglobins wird durch konjugierte Doppelbindungen innerhalb des Porphyrinrings hervorgerufen. In der Mitte des Porphyrinrings befindet sich ein zweiwertiges Eisenatom, an welches molekularer Sauerstoff reversibel gebunden werden kann. Da jede Hämgruppe jeweils einen Sauerstoff binden kann, liegt die maximale Transportfähigkeit eines Hämoglobinmoleküls bei 4 Sauerstoffmolekülen. Diese vier Sauerstoffbindungsstellen besitzen ein sogenanntes kooperatives Bindungsverhalten: Lagert sich Sauerstoff an eine der Bindungsstellen an, kommt es zu Konformationsänderungen innerhalb des Hämoglobins, welche die Bindung weiterer Sauerstoffmoleküle begünstigen. Die Sauerstoff-Affinität eines Hämoglobin-Moleküls steigt also mit der Anzahl der bereits gebundenen Sauerstoff-Moleküle [6] [9].

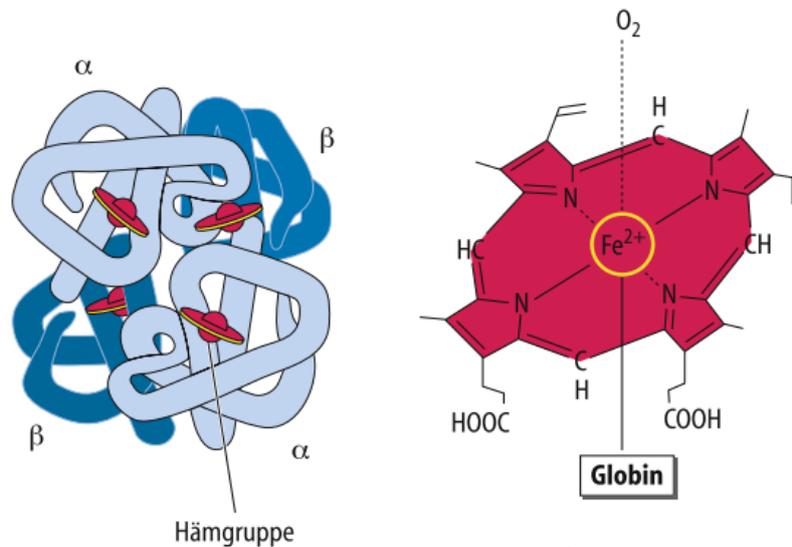


Abbildung 2: Links: Aufbau des Hämoglobins aus 4 Untereinheiten, bestehend aus je einer Globinkette sowie einer Hämgruppe. Rechts: Molekulare Struktur einer Hämgruppe. In der Mitte des Porphyrinrings befindet sich ein zweiwertiges Eisenatom, an welches Sauerstoff reversibel gebunden werden kann [6].

b.) Funktion

Die zentrale Aufgabe von Hämoglobin besteht in der Bindung sowie im Transport von Sauerstoff. Da unter physiologischen Bedingungen die Löslichkeit von molekularem Sauerstoff im Blut zu gering ist, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung von Geweben und Organen zu gewährleisten, werden rund 98% des Sauerstoffs an Hämoglobin gebunden transportiert. Die Beladung des Hämoglobins erfolgt über Diffusionsvorgänge in den Alveolen der Lunge, von wo aus der Sauerstoff über das Blutgefäßsystem zu peripheren Gewebe und Organen transportiert wird. Die Sauerstoffabgabe in den Kapillaren des Zielgewebes erfolgt ebenfalls über Diffusionsvorgänge. Wie viel Sauerstoff an das Hämoglobin gebunden wird, wird vom Teildruck des im Blut gelösten Sauerstoffs, dem sogenannten Sauerstoff-Partialdruck (pO_2), bestimmt [6]. Mit steigendem pO_2 nimmt auch die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins zu. Graphisch wird dieser Zusammenhang mit Hilfe der Sauerstoffbindungskurve dargestellt, welche in Abbildung 3 zu sehen ist. Aufgrund des kooperativen Bindungsverhaltens des Hämoglobins besitzt die Bindungskurve einen charakteristischen sigmoiden Verlauf, welcher eine optimale Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff gewährleistet. Da der Sauerstoffpartialdruck in den Lungenalveolen am höchsten ist, garantiert der flache Verlauf der Bindungskurve im oberen pO_2 -Bereich selbst bei verringerter Ventilation eine maximale Sauerstoffaufnahme in der Lunge. Die Bindungsaffinität des Hämoglobins nimmt mit sinkendem pO_2

immer stärker ab und die Bindungskurve wird steiler. Dadurch wird die Sauerstoffabgabe in peripheren Geweben mit niedrigem pO_2 begünstigt [6] [9].

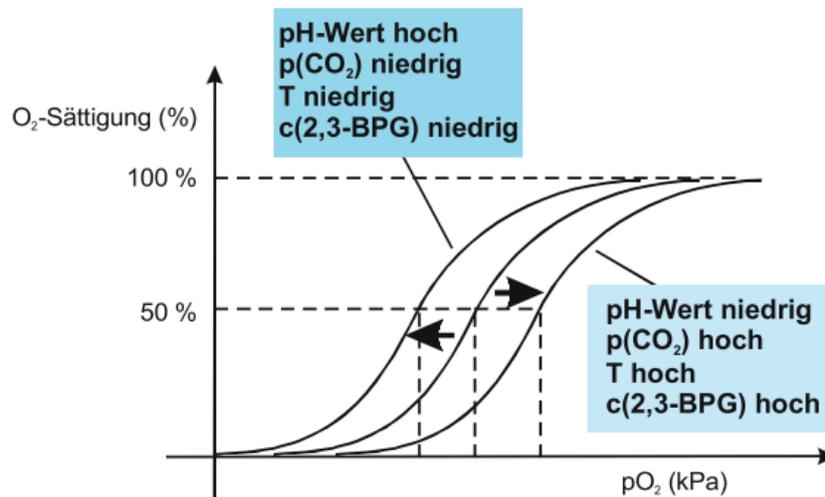


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Sauerstoffbindungskurve von Hämoglobin. Effektoren wie pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck ($p(CO_2)$), Temperatur (T) und erythrozytäres Biphosphoglyzerat (2,3-BPG) können zu einer Rechts- oder Linksverschiebung der Kurve führen und so eine Veränderung der Bindungsaffinität von Hämoglobin für Sauerstoff bewirken [10].

Da die Lage und der Verlauf der Sauerstoffbindungskurve durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden kann, wird als wichtige Kenngröße zur Beurteilung der Bindungsaffinität des Hämoglobins der Sauerstoffhalbsättigungsdruck (p_{50}) herangezogen, d.h. jener pO_2 bei dem 50% des Hämoglobins mit Sauerstoff gesättigt sind. Unter physiologischen Bedingungen liegt der p_{50} eines Erwachsenen bei circa 27mmHg. Veränderungen des p_{50} -Wertes sind ein Maß für eine Rechts- oder Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, wie sie z.B. durch Effektoren wie CO_2 -Partialdruck, Temperatur, pH-Wert sowie das im Rahmen der Glykolyse im Erythrozyten anfallende Biphosphoglyzerat (2,3-BPG) ausgelöst werden kann (siehe Abbildung 3). Eine Linksverlagerung der Kurve führt zu einer Zunahme der Sauerstoff-Affinität von Hämoglobin, während eine Rechtsverschiebung den gegenteiligen Effekt auslöst [6].

1.2.2 Detektion von freiem Hämoglobin im Blutplasma

Freies Hämoglobin im Blutplasma stellt einen empfindlichen Indikator für die Beurteilung einer Hämolyse dar (vgl. Kapitel 1.1.3). In der klinischen Diagnostik kann die Bestimmung von freiem Hämoglobin in einer Blutprobe mittels verschiedener Verfahren durchgeführt wer-

den. Zu den gebräuchlichsten zählen spektralphotometrische Methoden, bei welchen die Hämoglobinbestimmung über das charakteristische Absorptionsverhalten von Hämoglobin erfolgt. Ebenso verwendet werden Verfahren, die auf der Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins oder auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen. Einen relativ jungen Ansatz stellt die Detektion von Hämoglobin mittels Impedanzspektroskopie dar. Im Folgenden werden die genannten Detektionsverfahren näher erklärt und ihre Vor- und Nachteile erläutert.

1.2.2.1 Spektralphotometrische Bestimmung

Grundlage photometrischer Bestimmungen ist das charakteristische Absorptionsverhalten von Hämoglobin im Blutplasma. Wird an einer hämolysierten Probe eine Extinktionsmessung mit Licht definierter Wellenlänge durchgeführt, ergibt sich eine messbare Abschwächung des eingestrahnten Lichts. Über die Extinktion kann gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz auf die Hämoglobinkonzentration in der Probe zurückgeschlossen werden [6]. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch im Blut vorhandene Zellkomponenten entgegenzuwirken, muss vor der eigentlichen Extinktionsmessung eine Plasmaseparation durchgeführt werden. Da photometrische Messungen die klassische Methode zur Bestimmung von Hämoglobin im Blutplasma darstellen, findet sich in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher photometrischer Messansätze. Diese unterscheiden sich durch die verwendeten Wellenlängen, den Messreagenzien sowie der Auswertungsmethodik [11][12]. Auf Grund ihrer breiten Verwendung im analytischen Bereich werden im nachfolgenden Abschnitt zwei wichtige photometrische Messverfahren, die Cyanmethämoglobinmethode sowie die Direktphotometrie nach Harboe, näher beschrieben [13].

a) Cyanmethämoglobinmethode

Als internationale Standard- und Referenzmethode zur Messung der Hämoglobinkonzentration wird vom ICSH (International Council for Standardization in Haematology) die sogenannte Cyanmethämoglobinmethode empfohlen [14]. Bei diesem Verfahren wird der Probe eine Transformationslösung hinzugefügt, welche verschiedene, in der Probe vorliegende, Hämoglobinderivate (Oxyhämoglobin, Desoxyhämoglobin, Carboxyhämoglobin, Methämoglobin) mittels Kalium-Hexacyanoferrat(III) zunächst zu Methämoglobin oxidiert. Anschließend wird das Methämoglobin durch Kaliumcyanid in Cyanmethämoglobin überführt. Cyanomethämo-

globin ist ein stabiles und spektral eindeutiges Hämoglobin-Derivat, welches durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 540nm bestimmt werden kann [15] [16]. Die Vor- und Nachteile sowie die Nachweisgrenze der Cyanmethämoglobinmethode sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Da Cyanide in größeren Mengen toxisch wirken, werden in den heutigen verwendeten Hämatologiesystemen oft modifizierte Formen der Cyanmethhämoglobinmethode angewandt, die nichttoxische Reagenzien verwenden.

Tabelle 2: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Cyanmethämoglobinmethode zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.

Cyanmethämoglobinmethode	
Nachweisgrenze	<5mg/dl in Plasma
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Internationale Referenzmethode • Misst verschiedene Hämoglobin-Derivate (Oxy-, Desoxy-, Carboxy- und Methämoglobin) gleichzeitig • Hohe Präzision und Reproduzierbarkeit
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitintensive Messung • Störungen durch Probenentrübung • Störungen durch Bilirubin • Großes Probenvolumen notwendig • Keine Messung im Vollblut möglich • Transformationslösung enthält giftige Cyanidverbindungen

b) Direktphotometrie nach Harboe

Eine weitere gebräuchliche Methode zur Bestimmung von freiem Hämoglobin im Blutplasma stellt der direktphotometrische Ansatz nach Harboe dar. Die Messung wird dabei direkt an der verdünnten Plasmaprobe ohne die Zugabe zusätzlicher Messreagenzien durchgeführt. Die Bestimmung des Hämoglobins erfolgt durch Extinktionsmessungen bei der Wellenlänge $\lambda_1=415\text{nm}$, welche dem Absorptionsmaximum von Oxyhämoglobin entspricht (Soret-Bande). Um Messverfälschungen durch Probenentrübung oder Verunreinigungen zu kompensieren, werden zwei zusätzliche Extinktionsmessungen bei den Wellenlängen $\lambda_2=380\text{nm}$ sowie $\lambda_3=450\text{nm}$ durchgeführt und als mathematischer Korrekturfaktor in die Berechnung der Hämoglobinkonzentration miteinbezogen [17] [18]. Tabelle 3 bietet eine Übersicht der Vor-

und Nachteile sowie der Nachweisgrenze direktphotometrischer Bestimmungen nach Harboe.

Tabelle 3: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Direktphotometrie nach Harboe zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.

Direktphotometrie nach Harboe	
Nachweisgrenze	2mg/dl in Heparin-Plasma
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Korrekturfaktor für Trübungen und Verunreinigungen • Einfache Anwendung • Direkte Bestimmung des freien Hämoglobins • Sehr gute Präzision und Reproduzierbarkeit
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitintensive Messung • Störung durch Bilirubin • Keine Messung im Vollblut möglich • Misst nur Oxihämoglobin

1.2.2.2 Pseudoperoxidase-Verfahren

Das Pseudoperoxidase-Verfahren stellt eine der historisch ältesten Nachweismöglichkeiten für Hämoglobin dar. Die Nachweisreaktion beruht auf der Oxidierung und folglich Aktivierung eines Chromogens durch Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion wird durch die Pseudoperoxidase-Aktivität des Hämoglobins katalysiert. Dabei entsteht ein färbiges Reaktionsprodukt, dessen Farbintensität proportional zu der in der Probe vorhandenen Hämoglobinmenge ist. Die Auswertung kann kolorimetrisch oder spektralphotometrisch erfolgen [19]. Die Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile des Pseudoperoxidase-Verfahren sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Ursprünglich wurde als Chromogen eine Benzidinlösung verwendet, welche in Kombination mit Hämoglobin und Wasserstoffperoxid Benzidinblau bildet [20]. Da Benzidin karzinogen ist [21], wird heute zumeist der Pseudoperoxidasenachweis mittels dem ungiftigem Benzidin-Derivat Tetramethylbenzidin durchgeführt, welches auch in Kit-Form erhältlich ist [13] [22] [23]. Weitere verwendete Chromogene sind unter anderem o-Tolidine [24], Chlorpromazin [25] oder 4-Aminophenazone [26].

Tabelle 4: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile von Pseudoperoxidase-Verfahren zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.

Pseudoperoxidase-Verfahren	
Nachweisgrenze	5mg/dl in Plasma
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Erhältlich in Kit-Form • Keine Störung durch Probentrübung • Messung aller Hämoglobin-Derivate im Plasma
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • kleiner linearer Messbereich • Störungen durch andere Proteine mit Pseudoperoxidaseaktivität wie z.B. Myoglobin • Großes Probenvolumen notwendig • Keine Messung im Vollblut möglich • Probenverdünnung kann die Farbreaktion beeinflussen

1.2.2.3 Immunnephelometrie

Eine weitere Methode zur Detektion von freiem Hämoglobin ist die Immunnephelometrie. Bei diesem Verfahren wird der Probe ein Anti-Human-Hämoglobin-Antikörper vom Hasen hinzugefügt, der sich spezifisch an das freie Hämoglobin in der Probe bindet. Dabei entstehen Licht absorbierende und streuende Antigen-Antikörper-Komplexe. Zur Quantifizierung werden mit Hilfe eines Nephelometers Lichtstrahlen durch die Probe geschickt und das Streusignal der Antigen-Antikörper-Komplexe vermessen [27] [28].

Tabelle 5: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Immunnephelometrie zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.

Immunnephelometrie	
Nachweisgrenze	9mg/dl
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Spezifische Antigen-Antikörperreaktion
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Messung im Vollblut möglich • Störungen durch Plasmaproteine • Störungen bei sichtbar lipämischen Proben

1.2.2.4 Impedanzspektroskopie

Ein junges Verfahren stellt die Bestimmung von Hämoglobin mittels Impedanzspektroskopie dar. Bei dieser Methode werden an die Blutprobe sinusförmige Wechselspannungen niedriger Frequenz angelegt und die komplexe Impedanz des Systems beobachtet. Die Zellmembrane gesunder, nicht lysierter Zellen fungieren bei niedrigen Frequenzen als elektrische Isola-

toren, welche die Zellinhalte vor Strömen schützen. Die Leitfähigkeit einer Blutprobe wird dann hauptsächlich von der Leitfähigkeit des Blutplasmas bestimmt [29]. Die kaputten Zellmembranen lysierter Zellen jedoch verhalten sich wie Kondensatoren, welche von einem durch die Probe fließenden Strom niedriger Frequenz ge- oder entladen werden können und die Impedanzwerte des Systems verändern [30]. Durch Messung der elektrischen Impedanz kann daher auf den Prozentsatz der in der Probe vorhandenen lysierten Zellen rückgeschlossen werden. Um eine Verfälschung durch im Blutplasma enthaltene Elektrolyte entgegenzuwirken, erfolgt die Messung der Impedanzwerte bei mindestens drei verschiedenen Frequenzen. Der mathematische Zusammenhang zwischen den gemessenen Impedanzwerten (Magnitude+Phase) und dem Grad der Zellyse kann analytisch oder empirisch über Kalibrationskurven erfolgen. Über den Prozentsatz der in der Probe vorhandenen lysierten Zellen kann schließlich auf die Konzentration an freiem Hämoglobin im Blutplasma rückgerechnet werden [31].

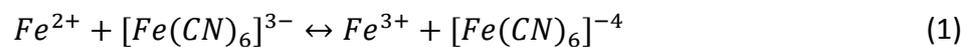
Tabelle 6: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Impedanzspektroskopie zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.

Impedanzspektroskopie	
Nachweisgrenze	k.A.
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • Messung im Vollblut möglich • Keine Störungen durch Plasmaproteine • kurze Messzeiten
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • Störungen durch Blutelektrolyte • Störungen durch Erythrozytensedimentierung

1.2.3 Bestimmung von Hämoglobin mittels Hexacyanoferrat

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Messmethode beruht auf der elektrochemischen Detektion von freiem Hämoglobin mittels Hexacyanoferraten. Der Begriff Hexacyanoferrat bezeichnet eine Gruppe chemischer Komplexverbindungen, welche aus einem zentralen Eisenatom umgeben von sechs Cyanid-Anionen bestehen. Das Eisenatom kann dabei in zweiwertiger (Hexacyanoferrat(II), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) oder dreiwertiger (Hexacyanoferrat(III), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) Oxidationsstufe vorliegen. In Verbindung mit Kationen bilden Hexacyanoferrate Salze. Bekannte Vertreter der Hexacyanoferrat-Salze sind das als Berliner Blau bezeichnete Eisen-Hexacyanoferrat(II) oder auch Kalium-Hexacyanoferrat(II) sowie Kalium-Hexacyanoferrat(III).

Hexacyanoferratverbindungen zeichnen sich durch ihre chemische Stabilität und ihre einfache sowie kostengünstige Herstellung aus. Zusätzlich agieren sie als Elektronentransfer-Mediatoren, welche die Oxidation von anderen Substanzen katalysieren können [32]. Diese Eigenschaft als Oxidationsmittel kann für die elektrochemische Bestimmung von Hämoglobin ausgenutzt werden. Das zweiwertige Eisenion des Hämoglobins wird durch das Hexacyanoferrat oxidiert und das Hämoglobin dadurch in Methämoglobin umgewandelt. Das Hexacyanoferrat selbst wird dabei reduziert. Die Reaktion folgt der Gleichung:



Über die Messung des Stromes, der bei der elektrochemischen Reoxidation des Hexacyanoferrates entsteht, ist es möglich, auf die in der Probe vorhandenen Menge an Hämoglobin rückzuschließen.

1.2.4 Hämoglobin und Kalium

Eine mögliche Komplikation bei der Bestimmung der Kaliumkonzentration von Blutplasma ist das Auftreten von Hämolyse im Zuge der Blutabnahme. Rund 98% des im Körper befindlichen Kaliums befindet sich im Intrazellularraum. Schon eine geringe Freisetzung von Kalium aus den Erythrozyten auf Grund von Hämolyse kann einen signifikanten Anstieg der Plasmakaliumkonzentration nach sich ziehen. Bei der Bestimmung der Kaliumkonzentration kann es dadurch zu falsch hohen Messwerten (sog. „Pseudohyperkaliämie“) kommen [33].

Hämolyse führt zur Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten (vgl. Kapitel 1.1.3). Eine Korrektur des gemessenen Plasmakaliumwertes basierend auf dem freigesetzten Hä-

moglobin wird in der Literatur gegensätzlich diskutiert. Einige Forschungsgruppen konnten einen linearen Zusammenhang zwischen Kaliumerhöhung und Hämolysegrad identifizieren und mathematische Korrekturfaktoren erstellen. Eine Pseudohyperkaliämie kann aber von einer Vielzahl verschiedenener Faktoren beeinflusst werden, wodurch eine nachträgliche mathematische Korrektur der Kaliumkonzentration erschwert und fehleranfällig wird. Des Weiteren können interindividuelle Unterschiede oder heterogene Interferenzen zu falschen Korrekturwerten führen. Von einer automatischen Korrektur falscher Kaliumkonzentrationen bei bestätigtem Hämolysebefund ist daher abzuraten [4] [33].

1.3 Elektrochemische Analytik

1.3.1 Überblick über die Elektrochemische Analytik und ihre Techniken

Die elektrochemische Analytik bezeichnet ein Teilgebiet der analytischen Chemie, welches sich mit der „Umwandlung von chemischer Energie in elektrische Energie und umgekehrt beschäftigt“ [34]. Sie umfasst eine Vielzahl verschiedener Methoden, mit welchen sowohl quantitative als auch qualitative Analysen durchgeführt werden können. Auf Grund ihrer leichten Anwendbarkeit, niedrigen Fertigungskosten und hohen Empfindlichkeit finden elektroanalytische Verfahren breite Anwendung in der Analytik und Diagnostik sowie bei Studien zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen [35]. Vor allem im Bereich der Umweltanalytik, Prozesskontrolle sowie in der Lebensmitteltechnologie und Medizintechnik spielen elektrochemisch betriebene Sensoren eine große Rolle [36].

Grundlage für elektrochemische Untersuchungen sind elektrochemische Zellen, welche aus einem Elektrolyten und mindestens zwei Elektroden bestehen. An der Grenzfläche zwischen Elektrode und Elektrolyt kommt es zu chemischen und physikalischen Vorgängen, wodurch verschiedene elektrische Parameter wie Stromstärke, Zellspannung, elektrische Ladung oder elektrischer Widerstand induziert und erfasst werden können [37]. Abbildung 4 zeigt einen Überblick über unterschiedliche elektrochemische Verfahren, gegliedert in Methoden mit und ohne Elektrodenreaktion bzw. in Techniken mit und ohne Strominduktion.

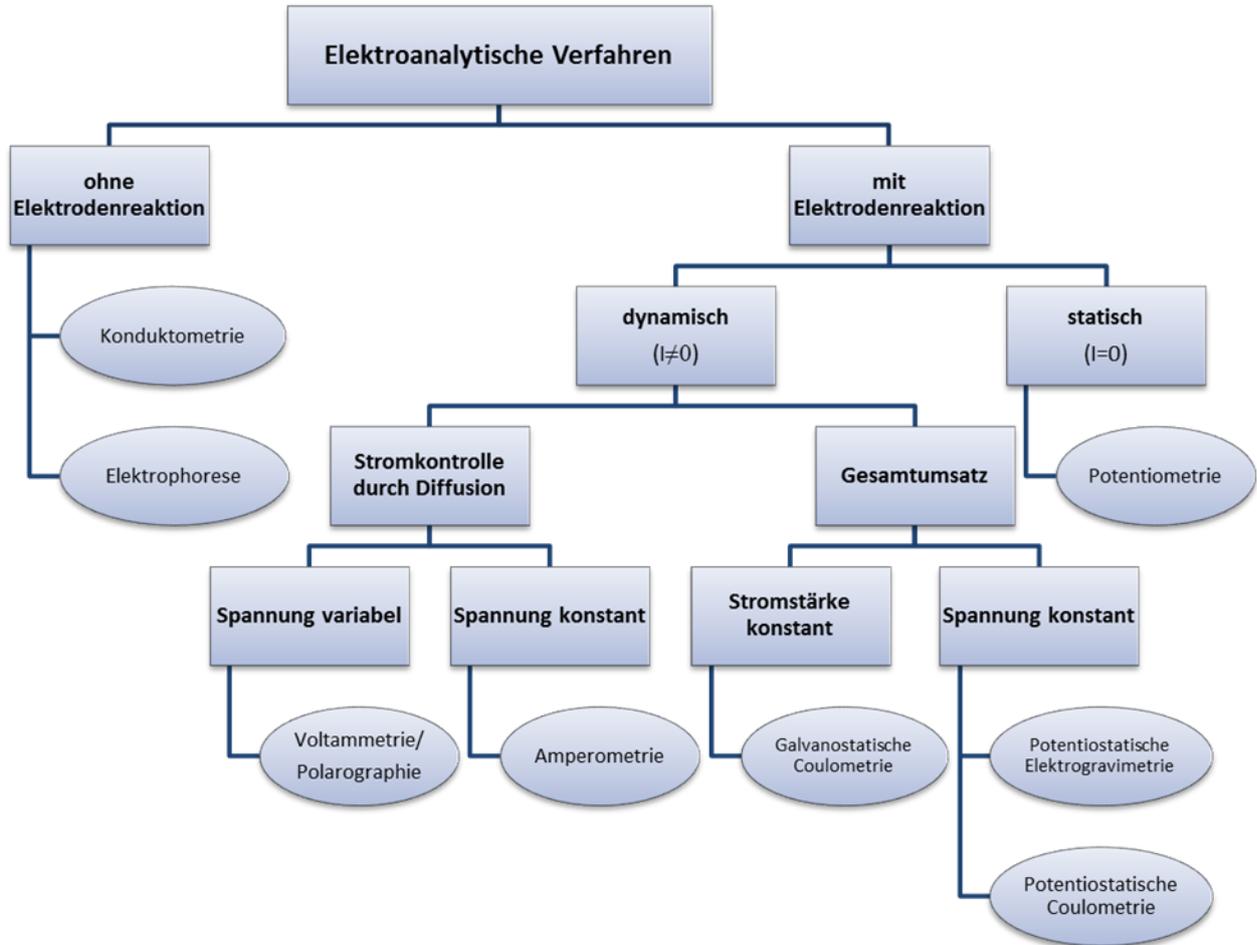


Abbildung 4: Schematische Darstellung etablierter elektrochemischer Verfahren. [38]

Da im Zuge dieser Masterarbeit voltammetrische Untersuchungen an Hexacyanoferrat-Filmen durchgeführt wurden, wird im nachfolgenden Abschnitt auf die theoretischen Grundlagen dieses Verfahrens näher eingegangen.

1.3.2 Voltammetrie

1.3.2.1 Definition

Der Begriff Voltammetrie bezeichnet eine Reihe elektrochemischer Techniken, bei welchen der Zusammenhang zwischen einer angelegten, zeitlich variierenden Spannung und den daraus resultierenden Stromfluss in einer elektrochemischen Zelle betrachtet wird [37]. Trägt man den gemessenen Strom als Funktion der Spannung zwischen Referenz- und Arbeitselektrode auf, erhält man eine graphische Darstellung des Strom-Spannungsverlaufs, das sogenannte Voltammogramm. Über den Verlauf und die Form des Voltammogrammes können quantitative und qualitative Aussagen über die in der untersuchten Lösung vorhandenen elektroaktiven Spezies getroffen werden [39].

1.3.2.2 Aufbau einer voltammetrischen Messzelle

Die einfachste Möglichkeit eine voltammetrische Messung durchzuführen ist mittels eines Zweielektrodensystems aus Arbeits- und Referenzelektrode, welche in einen flüssigen Elektrolyt getaucht sind. Der Elektrolyt enthält die zu analysierende Substanz. Mit Hilfe eines Potentiostaten wird die Arbeitsspannung geregelt und der Analysenstrom gemessen. Zwischen Arbeits- und Referenzelektrode wird ein definiertes Potentialfenster eingestellt und so lange in Richtung positiver oder negativer Weite verändert, bis es zu einer Reduktion oder Oxidation des Analyten kommt. Durch den Elektronenaustausch des Analyten an der Arbeitselektrode wird ein Strom induziert und messtechnisch erfasst. Während das Redox-Potential Aufschluss über die Qualität der Probe gibt (Redox-Potentiale sind unter Standardbedingungen stoffcharakteristisch), erlaubt die Intensität des induzierten Stromes Aufschluss über die Quantität des Analyten. Bedingt durch den Widerstand des Elektrolyten verursacht der Messstrom einen unerwünschten Ohmschen Spannungsabfall an der Referenzelektrode, wodurch die mittels Potentiostat angelegte Klemmenspannung nicht mehr mit der tatsächlichen Zellspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode übereinstimmt. Aus diesem Grund wird in der Praxis daher üblicherweise eine Dreielektrodenanordnung aus Referenz-, Arbeits- und einer Gegenelektrode verwendet. Bei dieser Messanordnung fließt der Strom zwischen Arbeits- und Gegenelektrode. Die mit einem großen Eingangswiderstand versehene Referenzelektrode bleibt stromlos und dient als unabhängiger Bezugspunkt für die Einstellung der Zellspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode. Der Potentiostat liefert

die gewünschte Klemmenspannung zwischen Arbeits- und Gegenelektrode. Zusätzlich wird mittels eines integrierten Voltmeters die Zellspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode kontrolliert und bei Abweichungen die Klemmenspannung korrigiert [40]. Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau einer voltammetrischen Messzelle bestehend aus einem Dreielektrodensystem sowie einem Potentiostaten zur Spannungsregelung.

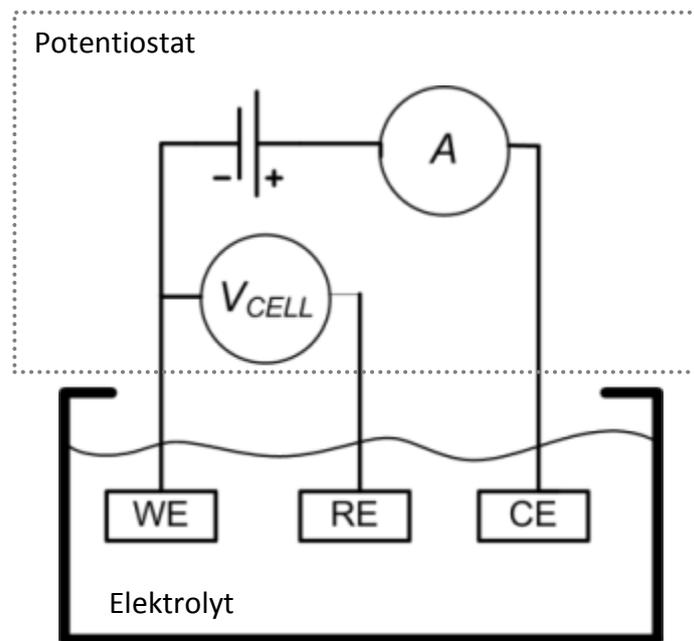


Abbildung 5: Dreielektrodenanordnung zur Durchführung von voltammetrischen Messungen (WE: Arbeitselektrode, RE: Referenzelektrode, CE: Gegenelektrode). Die gewünschte Klemmenspannung wird von einem Potentiostaten geliefert, in sich einstellender Messstrom fließt zwischen Arbeits- und Gegenelektrode. Die Referenzelektrode bleibt stromlos und dient als unabhängiger Bezugspunkt für die Einstellung der Zellspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode [41].

1.3.2.3 Arten von Elektroden

In der Voltammetrie kann im Wesentlichen zwischen drei verschiedenen Arten von Elektroden unterschieden werden: Elektroden erster Art, Elektroden zweiter Art und Redoxelektroden.

Elektroden 1. Art: Als Elektroden erster Art werden Elektroden bezeichnet, deren Potential direkt von der Konzentration der umgebenden Elektrolytlösung abhängig ist. Die einfachste Möglichkeit, eine Elektrode erster Art zu realisieren, ist, ein Metall in eine Lösung seiner Metallionen (Elektrolytlösung) einzutauchen [37]. An der Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt kommt es zur Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen dem Lösungsdruck des Metalls und

dem osmotischen Druck der Metallionen [42]. Das sich einstellende Gleichgewichtspotential ergibt sich über die Nernst Gleichung:

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a(\text{Me}^{z+})}{a(\text{Me})} \quad (2)$$

E... Elektrodenpotential

E₀... Standard-Elektrodenpotential [V]

R... Gaskonstante [8,314 J K⁻¹ mol⁻¹]

T... Temperatur [K]

z... Äquivalenzahl

F... Faraday-Konstante [96485 C mol⁻¹]

a... Aktivität

Eine Elektrode erster Art von besonderer Bedeutung ist die Standardwasserstoff-Elektrode. Da ihr Potential unter standardisierten Bedingungen definitionsgemäß den Nullpunkt der Potentialskala festlegt, stellt sie eine wichtige Referenzelektrode für die Bestimmung von Standardpotentialen anderer Elektroden dar [43].

Elektroden 2. Art: Als Elektroden zweiter Art werden Elektroden bezeichnet, deren Potential nur indirekt von der Aktivität ihres Metallions abhängt [7]. Sie bestehen aus einem Metall im Gleichgewicht mit einem schwerlöslichen Salz, welches das Kation des Metalls besitzt. Der Elektrolyt enthält zusätzlich ein leicht lösliches Alkalisalz definierter Konzentration, welches dasselbe Anion wie das schwer lösliche Salz enthält. Das Gleichgewichtspotential der Elektrode ist nicht mehr vom Metall und seinen Ionen, sondern über das Löslichkeitsprodukt von dem Anion der schwerlöslichen Metallverbindung abhängig [43]. Wird die Konzentration des Anions durch Sättigung des Elektrolyten mit dem Salz konstant gehalten, bleibt auch das Potential der Elektrode konstant. Auf Grund ihrer einfachen Herstellung und Potentialstabilität werden Elektroden zweiter Art als Referenzelektrode für elektrochemische Analysen eingesetzt. Zu den wichtigsten zählen hierbei die Silber/Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl-Elektrode) sowie die Kalomelektrode [37].

Redoxelektroden: Als Redoxelektroden bezeichnet man Elektroden, bei denen Elektronen und nicht Ionen als Ladungsträger an der Grenzfläche diffundieren [37]. Sie bestehen aus einer inerten Elektrode, welche selber nicht an der elektrochemischen Reaktion (Oxidation und Reduktion) teilnimmt, sondern nur als Elektronendonator bzw. -akzeptor dient [43]. Das zu untersuchende Redoxpaar liegt zumeist in gelöster Form im Elektrolyten vor. Um sicher-

zustellen, dass die Elektrode mit dem Messmedium chemisch nicht reagiert, werden als Elektrodenmaterial Edelmetalle wie Gold oder Platin verwendet [36].

1.3.2.4 Aufbau des Hämolyse-sensors

Der dieser Arbeit zu Grunde liegende Hämolyse-Sensor ist als Dreielektrodensystem mit Referenz-, Arbeits- und Gegenelektrode aufgebaut. Die einzelnen Elektroden werden im nachfolgenden Abschnitt näher beschrieben. Die Fertigung des Sensors erfolgt mittels Siebdruck-technologie. Dieses Verfahren ermöglicht eine schnelle und kostengünstige Herstellung der Sensoren mit hoher Reproduzierbarkeit und hohem Durchsatz. Die genaue Vorgehensweise zur Herstellung der Sensoren wird in Kapitel 2.1 näher beschrieben. Abbildung 6 zeigt einen Teststreifen.

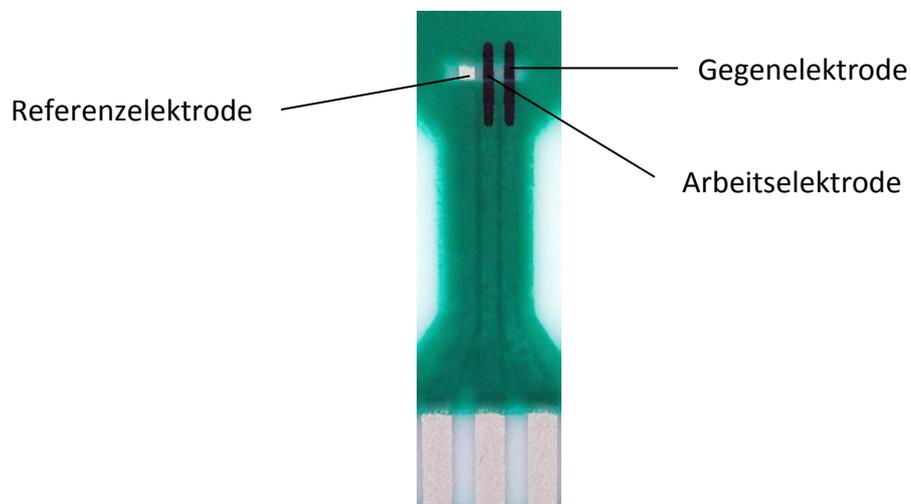


Abbildung 6: Aufbau des Hämolyse-Sensors, bestehend aus einem Dreielektrodensystem mit Referenz-, Arbeits- und Gegenelektrode

Arbeitselektrode: An der Grenzfläche zwischen Arbeitselektrode und Elektrolyt laufen die elektrochemischen Prozesse ab, welche zur Ausbildung des Messsignals führen. Bei der Auswahl ihres Materials werden daher hohe Anforderungen an Handhabbarkeit, Robustheit und Arbeitsbereich gestellt. Zu den häufig verwendeten Materialien für voltammetrische Arbeitselektroden zählen kohlenstoffbasierte Elektroden wie Graphit- oder Diamantelektroden sowie die Edelmetalle Gold und Platin. Neben dem Material haben auch Elektrodengeometrie und Oberflächenbeschaffenheit einen Einfluss auf die Leistung der Elektrode [44].

Für die Realisierung der Arbeitselektrode des Hämolyse-Sensors wurde eine Elektrode aus Kohlenstoffpaste gewählt. Kohlepaste-Elektroden bestehen aus einer Mischung von Graphitpulver mit einem organischen Bindemittel und zeichnen sich durch niedrige Herstellungskosten, einem breiten Potentialfenster sowie ihre gute chemische Inertheit für viele elektrochemische Anwendungen aus [45]. An das verwendete Graphitmaterial werden verschiedene Anforderungen gestellt: Die Partikelgröße sollte im Mikrometerbereich sein und eine einheitliche Verteilung der Partikel aufweisen. Zusätzlich soll das Material eine hohe chemische Reinheit sowie niedrige Adsorptionseigenschaften besitzen. In der Praxis findet zumeist spektroskopischer Graphit mit Partikelgrößen von 5-20µm Verwendung [46]. Die Vernetzung der einzelnen Graphitpartikel zu einer homogenen Masse geschieht mit Hilfe des organischen Bindemittels. Um die elektrochemischen Eigenschaften des Graphits nicht zu beeinflussen und eine gute Bindung der Partikel zu gewährleisten, sollte das verwendete Bindemittel chemisch inert und elektroinaktiv sein, eine hohe Viskosität und niedrige Flüchtigkeit besitzen, sich in wässrigen Lösungen nur schwer lösen und sich mit organischen Lösungsmitteln nicht vermischen. Am gebräuchlichsten sind Bindemittel aus mineralischen Ölen wie Nujol oder Uvasol® [46].

Referenzelektrode: Zur Bestimmung des Elektrodenpotentials der Arbeitselektrode wird eine zweite Elektrode, die sogenannte Referenzelektrode, benötigt. Die Referenzelektrode besitzt ein bekanntes und konstantes Gleichgewichtspotential, welches sich schnell und reproduzierbar einstellt [47].

Als Referenzelektrode für den Hämolyse-Sensors wurde eine Ag/AgCl-Elektrode verwendet. Der potentialbestimmende Schritt dieser Elektrode zweiter Art erfolgt über die Oxidation von Silber mit anschließender Bildung von schwer löslichem Silberchlorid [47]:



Da die Aktivität der Silberionen über das Löslichkeitsprodukt des Silberchlorids mit der Aktivität der Chloridionen (Cl^-) verbunden ist, stellt sich an der Elektrode ein konstantes Potential ein, welches nur von der Cl^- -Konzentration in der Lösung abhängig ist [34]:

$$E = E_{0,Ag/Ag^+} + \frac{RT}{F} \ln(a_{Ag^+}) = E_{0,Ag/Ag^+} + \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{K_L}{a_{Cl^-}}\right) = E_{0,AgCl} - \frac{RT}{F} \ln(a_{Cl^-}) \quad (4)$$

E... Elektrodenpotential

E₀... Standard-Elektrodenpotential einer Ag/Ag⁺-Elektrode

E_{0, AgCl}... Standard-Elektrodenpotential der Ag/AgCl-Elektrode [V]

K_L... Löslichkeitsprodukt

R... Gaskonstante [8,314 J K⁻¹ mol⁻¹]

T... Temperatur [K]

F... Faraday-Konstante [96485 C mol⁻¹]

a... Aktivität

Da die Ag/AgCl Referenzelektrode des Hämolyseteststreifens mittels Siebdrucktechnologie gefertigt wird, kann eine definierte Konzentration an Cl⁻ durch das Aufbringen einer zusätzlichen Cl⁻-Reservoirmembran gewährleistet werden (siehe Kapitel 2.2). Dadurch wird die Referenzelektrode unabhängig von der Messlösung mit einer konstanten Menge an Cl⁻ versorgt und das Elektrodenpotential stabilisiert.

Gegenelektrode: Um sicherzustellen, dass über die Referenzelektrode kein Strom fließt, wird eine dritte Elektrode, die sogenannte Gegenelektrode, in die Messschaltung eingebracht. Ein sich einstellender Messstrom fließt zwischen Arbeits- und Gegenelektrode, während die Referenzelektrode stromlos bleibt und ihr definiertes Potential halten kann. Da es zwischen Arbeits- und Gegenelektrode zu einem Ohmschen Spannungsabfall über den Elektrolyten kommt, sollte die Gegenelektrode möglichst nahe an der Arbeitselektrode platziert werden [43] [48].

Die Gegenelektrode des Hämolyse-Teststreifens wird analog zur Arbeitselektrode von einer Kohlepaste-Elektrode gebildet.

1.3.2.5 Verschiedene voltammetrische Techniken im Überblick

a.) Zyklische Voltammetrie

Bei der zyklischen Voltammetrie wird zwischen Arbeits- und Referenzelektrode ein definiertes Potentialfenster eingestellt und die angelegte Spannung mit konstanter Geschwindigkeit zyklisch zwischen den beiden Potentialumkehrpunkten schrittweise variiert. Das resultierende Spannungssignal besitzt einen dreieckförmigen Verlauf. Da die Arbeitselektrode dabei

abwechselnd als Anode bzw. Kathode fungiert, werden die beiden Potentialumkehrpunkte auch als anodisches und kathodisches Grenzpotential bezeichnet. Liegt in der Messlösung eine elektroaktive Substanz vor, kommt es auf Grund von Oxidations- und Reduktionsvorgängen zur Ausbildung von Strompeaks im Voltammogramm, deren Position charakteristisch für das betrachtete Redoxsystem ist [12] [13]. In Abbildung 7 ist ein zyklisches Voltammogramm sowie der typisch dreieckförmige Spannungsverlauf des angelegten Spannungssignals dargestellt.

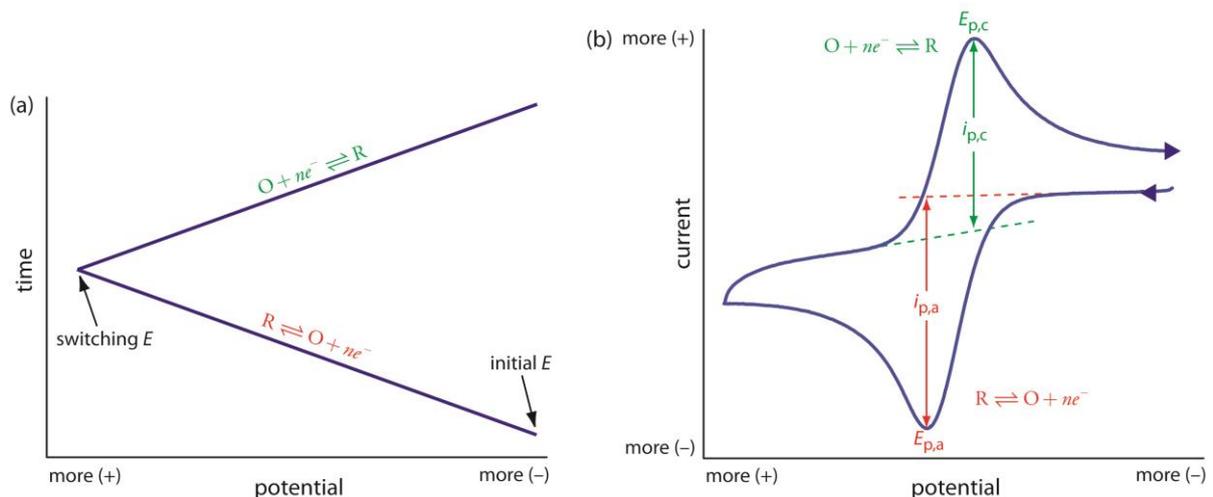


Abbildung 7: Prinzip der zyklischen Voltammetrie. Links: Angelegtes, dreieckförmiges Spannungssignal. Rechts: Im zyklischen Voltammogramm kommt es zur Ausbildung von Strompeaks, deren Position und Höhe das Redox-Verhalten der untersuchten elektroaktiven Substanz widerspiegeln [49]. ($E_{p,a}$ und $E_{p,c}$ = Position des anodischen bzw. kathodischen Strompeaks; $i_{p,a}$ und $i_{p,c}$ = Höhe des anodischen bzw. kathodischen Strompeaks)

Zyklische Voltammogramme werden häufig zur Erstcharakterisierung des elektrochemischen Verhaltens einer zu analysierenden Spezies verwendet. Sie geben Auskunft über thermodynamische und kinetische Eigenschaften des Systems und liefern Informationen zu Reaktionsmechanismen und der Reversibilität von Elektrodenreaktionen [9][14].

b.) Normal-Puls-Voltammetrie

Bei der Normal-Puls-Voltammetrie wird zwischen Arbeits- und Referenzelektrode eine konstante Eingangsspannung angelegt, welche in periodischen Zeitintervallen mit rechteckigen Spannungsimpulsen zunehmender Amplitude überlagert wird. Die Messung des Stromsignals erfolgt immer am Ende eines Spannungsimpulses [9] [12]. Wird der gemessene Strom

gegen die Spannungsänderung der Pulse aufgetragen, erhält man ein stufenförmiges Voltammogramm wie es in Abbildung 8 zu sehen ist.

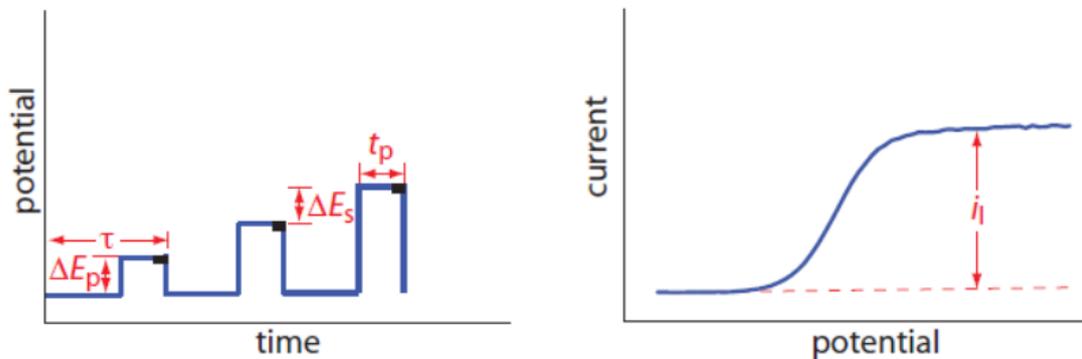


Abbildung 8: Prinzip der Normal-Puls Voltammetrie. Links: Die konstante Eingangsspannung wird mit rechteckigen Spannungsimpulsen zunehmender Amplitude überlagert. Die Strommessung erfolgt am Ende eines Spannungsimpulses. Rechts: Stufenförmiges Normal-Puls Voltammogramm [49]. (T = Periodendauer, ΔE_p = Pulspotential, ΔE_s = Amplitudenveränderung des Pulses, t_p = Pulsdauer, i_l = Stufenhöhe)

Die Normal-Puls Voltammetrie bietet gegenüber der klassischen Gleichstromvoltammetrie den Vorteil einer bis um den Faktor 10 höheren Empfindlichkeit. Da sie gut für Durchflussanwendungen in stationären Elektroden eignet, findet sie bei kontinuierlichen Messungen sowie im Bereich der Prozesskontrolle häufig Anwendung [12].

c.) Differential-Puls-Voltammetrie

Noch niedrigere Nachweisgrenzen können mit Hilfe der Differential-Puls-Voltammetrie erreicht werden. Die Eingangsspannung besteht hier aus einer linear ansteigenden Gleichspannung, welche in periodischen Abständen mit Rechteckimpulsen konstanter Amplitude überlagert wird. Das Stromsignal wird immer kurz vor Beginn sowie kurz vor Ende eines Impulses gemessen. Wird jeweils die Stromdifferenz der beiden Messwerte gegen die Eingangsspannung aufgetragen, ergibt sich ein peakförmiges Voltammogramm wie es in Abbildung 9 zu sehen ist [9] [12].

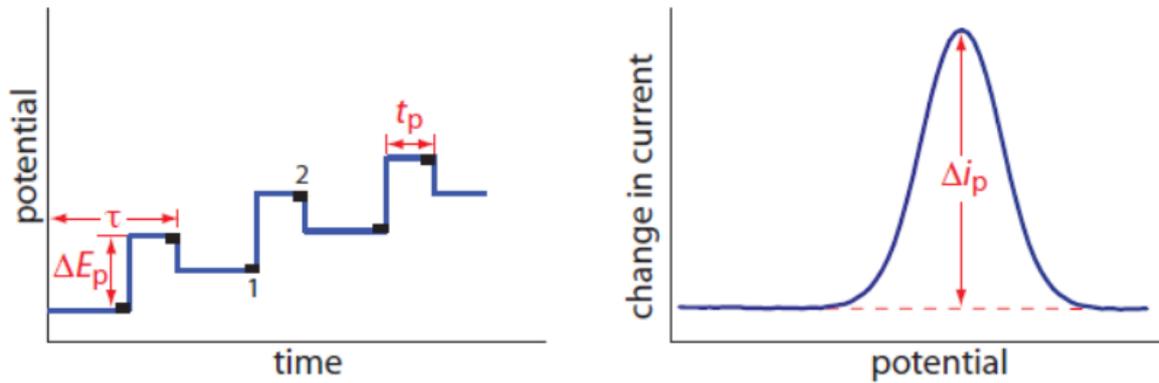


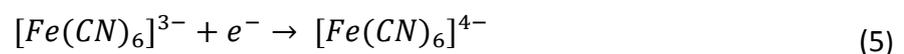
Abbildung 9: Prinzip der Differential-Puls Voltammetrie. Links: Die linear ansteigende Eingangsspannung wird mit rechteckigen Spannungsimpulsen konstanter Amplitude überlagert. Die Messung des Stromsignals erfolgt kurz vor dem Beginn (Punkt 1) und vor dem Ende (Punkt 2) eines Spannungsimpulses. Rechts: Durch Auftragung der Stromdifferenz Δi_p der beiden Messpunkte gegen die Eingangsspannung entsteht ein peakförmiges Voltammogramm [49]. (T = Periodendauer, ΔE_p = Pulspotential, t_p = Pulsdauer)

Auf Grund ihrer niedrigen Nachweisgrenze eignet sich die Differential-Puls-Voltammetrie besonders für die elektrochemische Analyse von Lösungen mit niedrigen Analytkonzentrationen.

1.3.2.6 Voltammetrisches Redoxverhalten von Hexacyanoferraten

Voltammetrische Untersuchungen eignen sich besonders zur Charakterisierung von elektrochemischen Redoxvorgängen. Zwischen Arbeits- und Referenzelektrode wird ein definiertes Potentialfenster eingestellt und in negative oder positive Richtung schrittweise verändert. Befindet sich in der Lösung eine redoxaktive Spezies, kommt es beim Durchlaufen des Redoxpotentials zu einem Ladungstransfer an der Arbeitselektrode, welcher als Stromsignal registriert werden kann. Wird die Spezies oxidiert, fungiert die Elektrode als Elektronenakzeptor, der Vorgang wird auch als anodische Oxidation bezeichnet. Umgekehrt führt eine Reduktionsreaktion zu einem Elektronentransfer von der Elektrode zur redoxaktiven Spezies, man spricht von einer kathodischen Reduktion [37] [39].

Hexacyanoferrate zeichnen sich durch ein ausgeprägtes Redoxverhalten aus, welches zur Ausbildung von charakteristischen Stromkurven im Voltammogramm führt. Ursache für dieses Verhalten ist das reversible Redoxpaar Hexacyanoferrat(II) und Hexacyanoferrat(III), welches beim Durchlaufen des entsprechenden Redoxpotentials elektrochemisch oxidiert bzw. reduziert wird. Untersucht man dieses Redoxsystem mit Hilfe der zyklischen Voltammetrie, ergibt sich ein Voltammogramm mit zwei Strompeaks: Im ersten Halbzyklus (Veränderung der Spannung in positive Richtung) erfolgt die anodische Oxidation von Hexacyanoferrat(III), wodurch es zur Ausbildung eines positiven Oxidationspeaks kommt. Im Rücklauf wird dieses wieder zu Hexacyanoferrat(II) reduziert, wodurch sich ein negativer Reduktionspeak ausbildet [43]. Das Redoxsystem kann durch folgende Gleichungen beschrieben werden:



$[Fe(CN)_6]^{3-}$... Hexacyanoferrat(III)

$[Fe(CN)_6]^{4-}$... Hexacyanoferrat(II)

Neben ihrem charakteristischen elektrochemischen Verhalten fungieren Hexacyanoferrate auch als Elektronenmediatoren, welche die Oxidation anderer Substanzen katalysieren. Aus diesem Grund finden sie im Bereich der elektrochemischen Sensorik immer breitere Anwendung in Form elektroaktiver Filme auf Elektroden, welche den Elektronentransfer zwischen dem Analyten und der Elektrode katalysieren [32] [50]. Hexacyanoferrat modifizierte Elektroden konnten unter anderem schon erfolgreich für den elektrochemische Nachweis von

Ascorbinsäure [51], Nitrit [52], Schwefeldioxid [53], Pyridoxin [54], Stickstoffmonoxid [55] oder auch Wasserstoffperoxid [56] [57] eingesetzt werden.

Im Zuge dieser Arbeit werden Hexacyanoferrat-Filme als sensorisches Element eines Hämolyse-Testsystems untersucht. Das Messprinzip beruht dabei auf der elektrochemischen Detektion des freien Hämoglobin im Blutplasma über die oxidative Umsetzung von Hämoglobin zu Methämoglobin durch den Hexacyanoferrat-Film auf der Arbeitselektrode (siehe Kapitel 1.2.3). Da Blutplasma im Normalfall so gut wie kein Hämoglobin enthält, kann über die Konzentration an freiem Hämoglobin im Blutplasma direkt auf den Grad der Hämolyse zurückgeschlossen werden (vgl. Kapitel 1.1.3).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, vier verschiedene Hexacyanoferrat-Verbindungen als mögliche Modifikatoren für die Kohlenstoff-Arbeits Elektrode des Hämolyse-Teststreifens zu untersuchen.

Untersucht werden folgende vier Hexacyanoferrat-Verbindungen:

- Kupfer-Hexacyanoferrat(III)
- Kalium-Hexacyanoferrat(II)
- Kalium-Hexacyanoferrat(III)
- Eisen-Hexacyanoferrat(II)

Die Hexacyanoferrate sollen möglichst homogen und stabil auf der Arbeitselektrode immobilisiert werden. Für die Aufbringung der Hexacyanoferrate auf die Arbeitselektrode werden zwei verschiedene Techniken validiert:

- Modifizierung mittels elektrochemischer Deposition
- Modifizierung mittels hexacyanoferrathaltigen Membranen

Die modifizierten Sensoren sind mittels zyklischer Voltammetrie zu charakterisieren und auf ihre Eignung für die Anwendung am Hämolyse-Teststreifen zu untersuchen. Hierfür wird mittels Mehrfachmessungen (n=6) eine statistische Beurteilung der Qualität der Modifikationen anhand der Signalintensität und ihrer Messwertstreuung durchgeführt. Zusätzlich erfolgt eine Beurteilung der Signalstabilität basierend auf Wiederholungsmessungen mittels zyklischer Voltammetrie.

2 MATERIALEN UND METHODEN

Für die Experimentreihen dieser Diplomarbeit wurden Sensoren mittels Siebdrucktechnologie gefertigt. Der einzelne Sensor wurde von einem Dreielektrodensystem bestehend aus Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode aufgebaut. Die Arbeits- sowie die Gegenelektrode bestanden aus Kohlenstoff. Die Arbeitselektrode wurde zusätzlich mittels unterschiedlicher Techniken mit Hexacyanoferraten modifiziert, um sie für Hämoglobin empfindlich zu machen. Die Ag/AgCl-Referenzelektrode wurde mit einer Cl⁻-haltigen Membran versehen, um ein konstantes Potential zu gewährleisten. Die einzelnen Schritte der Sensorfertigung, die Herstellung der Testlösungen sowie die verwendeten Chemikalien und Geräte werden nun im Folgenden genau beschrieben.

2.1 Fertigung der Sensoren mittels Siebdrucktechnologie

Die Fertigung der Sensoren erfolgte mit Hilfe der Siebdrucktechnologie. Grundlage dieses Verfahrens ist ein feinmaschiges Sieb aus einem straff gespannten Polyester-Gewebe, auf welchem sich lochartige Aussparungen für das gewünschte Druckdesign befinden. Das Bedrucken der Trägerfolie erfolgt mit Rakeln, welche die Druckpaste auf dem Sieb verteilen und durch das Sieb auf das Trägermaterial drucken.

2.1.1 Chemikalien und Geräte

Für den Druck der Sensoren wurden folgende Chemikalien und Geräte verwendet:

- Siebdruckmaschine DEK248 (ASM Assembly Systems, Zürich, Schweiz)
- Präzisionswaage KERN PLS 720-3A (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland)
- Trockenschrank Binder FD53 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Ag/AgCl-Paste LOCTITE EDAG 6037E SS E&C (Henkel AG & Company, Düsseldorf, Deutschland)
- Kohlenstoff-Paste LOCTITE EDAG PF 407A E&C (Henkel AG & Company, Düsseldorf, Deutschland)
- Lötstopplack SD 2462 NB-M, Komponenten A/B (Peters GmbH & Co. KG, Kempen, Deutschland)
- Aceton ROTIPURAN[®] ≥ 99.8% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

- 1-Methoxy-2-propanol $\geq 99\%$ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Mylar[®] Elektroisolierfolie (Dr. Dietrich Müller GmbH, Ahlhorn, Deutschland)

2.1.2 Schritte des Siebdruckvorganges

Als Trägermaterial für den Druck wurde eine Elektroisolierfolie der Firma Dr. Dietrich Müller GmbH (Ahlhorn, Deutschland) verwendet. Die für den Druck verwendeten Siebe besitzen ein Basissensordesign von sechs mal 20 Sensoren, wodurch insgesamt 120 Sensoren auf eine Trägerfolie gedrückt werden können. Die Fertigung der Sensoren erfolgte in mehreren Druckschritten, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

a) Vorbereitung der Trägerfolien: Um thermischen Verformungen und Schrumpfen bei späteren Arbeitsschritten entgegenzuwirken, wurden die Trägerfolien vor dem eigentlichen Druckvorgang mit einem N-methoxy-2-propanol und Aceton-Gemisch (1:1 (V/V)) gereinigt und für 60min bei 90°C im Trockenschrank erhitzt.

b) Druck der Ag/AgCl-Paste: Für den Druck der Leiterbahnen sowie der Referenzelektrode wurde eine Ag/AgCl-Paste der Firma Henkel AG (Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Das für diesen Druckschritt verwendete Sieb ist in Abbildung 10A ersichtlich. Nach Beendigung des Druckvorganges wurden die bedruckten Trägerfolien für 60min bei 85°C im Trockenschrank ausgehärtet.

c) Druck der Kohlenstoffpaste: Im nächsten Schritt erfolgte der Druck der Arbeits- und Gegenelektrode mittels einer Kohlenstoffpaste der Firma Henkel AG (Düsseldorf, Deutschland). Abbildung 10B zeigt das verwendete Sieb. Anschließend wurden die Trägerfolien bei 85°C für 30min im Trockenschrank ausgehärtet.

d) Druck der Elektroisolierschicht: Nach dem Drucken der Elektroden wurde eine Elektroisolierschicht aufgebracht. Diese hat die Aufgabe, die ablaufenden elektrochemischen Reaktionen auf ein kleines, aktives Fenster im Bereich der Elektroden zu begrenzen. Die Elektroisolierschicht wurde aus einer Zwei-Komponenten-Paste der Firma Peters GmbH & Co. KG (Kempen, Deutschland) im Verhältnis 5:1 (m/m) zusammengemischt und im letzten Druckschritt durch das Sieb in Abbildung 10C auf die Trägerfolien aufgebracht. Anschließend wurden die Folien für 30min bei 90°C im Trockenschrank ausgehärtet.

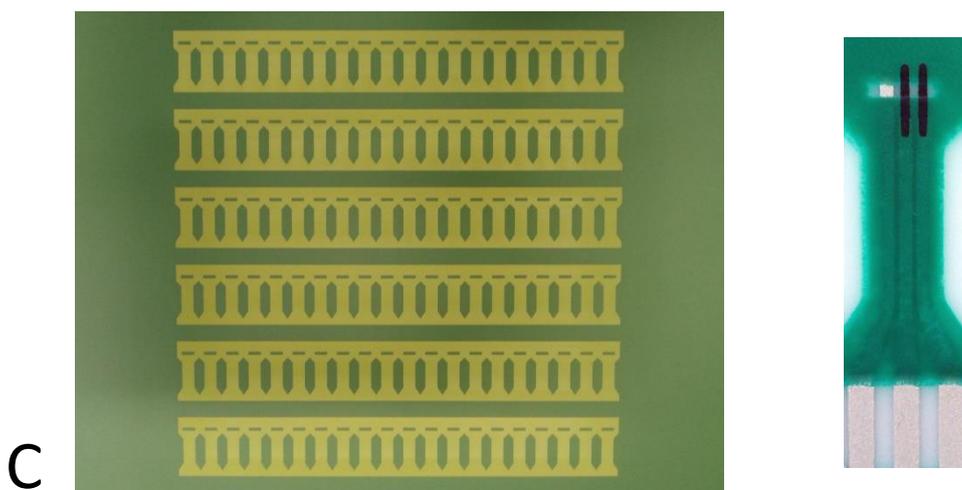
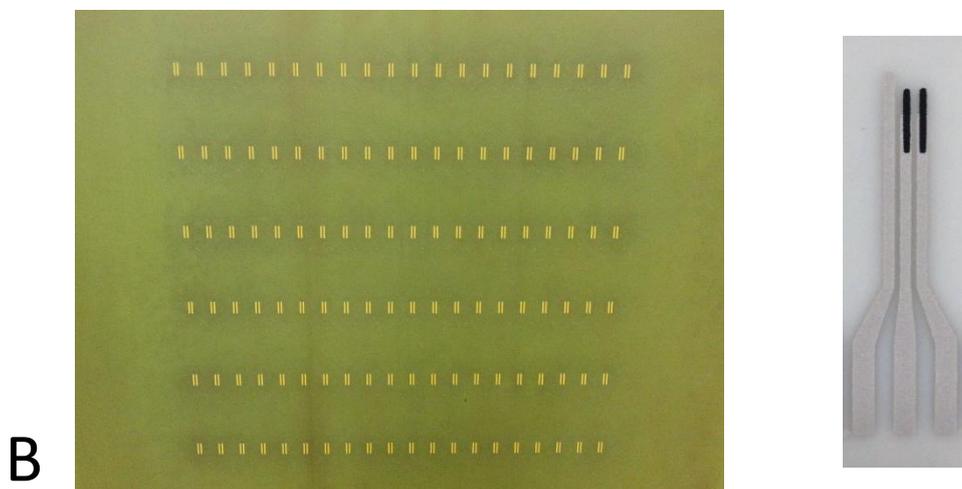
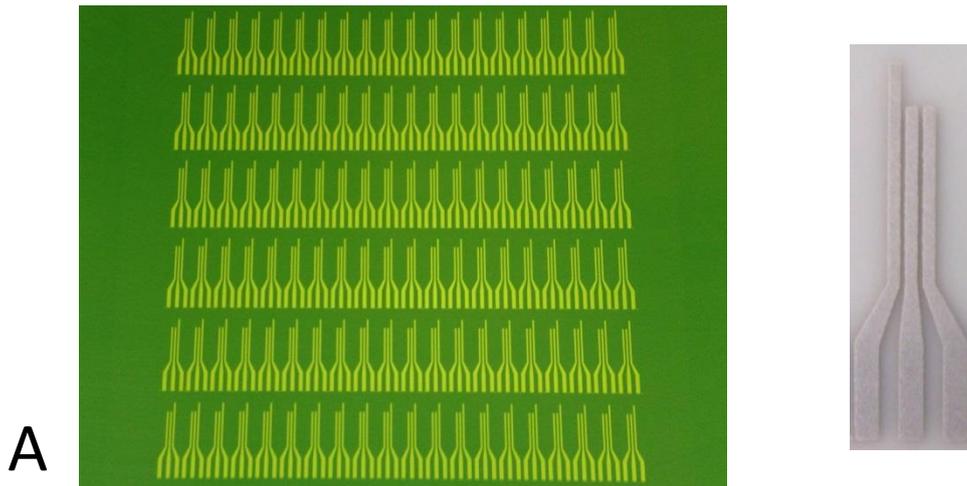


Abbildung 10: Druckschritte für die Fertigung der Sensoren. Links: Verwendetes Sieb. Rechts: Trägerfolie nach dem Druck. (A: Druck der Ag/AgCl-Paste. B: Druck der Kohlenstoffpaste. C: Druck der Elektroisolierschicht.)

2.2 Fertigung der Cl⁻-Reservoirmembran für die Referenzelektrode

2.2.1 Chemikalien und Geräte

Für die Herstellung der Cl⁻-Reservoirmembran wurden folgende Chemikalien und Geräte verwendet:

- Mikrodosiergerät Performus IV (Nordson EFD GmbH, Oberhaching, Deutschland)
- Präzisionswaage KERN PLS 720-3A (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland)
- Trockenschrank Binder FD53 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- EMSURE[®] Zinkchlorid ZnCl₂ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 5036 Dielectric Paste (DuPont Corporation, Wilmington, USA)
- N-Methyl-2-pyrrolidone ≥ 99.8% (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

2.2.2 Fertigung und Aufbringung der Cl⁻-Reservoirmembran

Das Aufbringen der Membran auf die Referenzelektrode erfolgte mit Hilfe eines Mikrodosiergerätes. Dies ermöglichte eine genaue Dosierung der Membranen mit hoher Präzision und Reproduzierbarkeit. Für die Herstellung der Membran wurden 2g der Elektroisolierpaste 5036 von DuPont mit 0.4g ZnCl₂ (gemörsert) vermischt und unter Beimengung von 0.2ml Pyrrolidon zu einer homogenen Masse verrührt. Anschließend wurde die Paste in die Dosiernadel des Mikrodosiergerätes gefüllt und über eine Kartusche am Kartuschenadapter befestigt. Über Dosierdruck und Dosierzeit wurde die gewünschte Fließrate am Gerät eingestellt. Die Dispensierung auf die Referenzelektroden der Sensoren erfolgte mittels Druckluft. Anschließend wurden die Membranen für 6min bei 90°C im Trockenschrank ausgehärtet.

2.3 Fertigung der Testlösungen

Im nachfolgenden Abschnitt wird der Herstellungsprozess für die Fertigung der Testlösungen beschrieben sowie die verwendeten Chemikalien und Geräte aufgelistet. Hergestellt wurden die Kaliumchlorid-Lösung sowie die Depositions-Flüssigkeiten für die elektrochemische Deposition, die Hexacyanoferrat-Lösungen für die Fertigung der Membranen sowie der Phosphatpuffer für die Vermessung der Hexacyanoferrat-Filme.

2.3.1 Chemikalien und Geräte

Für die Herstellung der Testlösungen wurden folgende Chemikalien und Geräte verwendet:

- Präzisionswaage KERN PLS 720-3A (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland)
- pH-Meter HI 98128 (Hanna instruments, Rhode Island, USA)
- Sodium phosphate dibasic $\geq 99.0\%$, KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Potassium phosphate monobasic $\geq 99.0\%$, Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Potassium chloride $\geq 99.0\%$, KCl (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Kupfer(II)-chlorid Dihydrat $\geq 99\%$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Potassium hexacyanoferrate(II) ReagentPlus[®] $\geq 98.5\%$, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Kaliumhexacyanoferrat(III) $\geq 99.0\%$, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Iron(III) ferrocyanide, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Nitric Acid Solution 1:1 (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

2.3.2 Herstellung der Kaliumchlorid-Reinigungslösung

Die elektrochemische Reinigung der Arbeitselektrode erfolgte in einer 0.05M Kaliumchlorid-Lösung. Um die Lösung herzustellen, wurden 0,932g Kaliumchlorid (KCl) eingewogen, in einen Messkolben überführt und mit 250ml destillierten Wasser (H_2O) aufgefüllt.

2.3.3 Herstellung der Hexacyanoferrat-Lösungen für die elektrochemische Deposition

Für die Herstellung der Depositionslösungen von Kalium-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(III) sowie Eisen-Hexacyanoferrat(II) wurden 10mM des entsprechenden Hexacyanoferrates sowie 100mM Kaliumchlorid eingewogen, in einen Messkolben überführt und mit 250ml destillierten Wasser aufgefüllt. Die eingewogenen Reagenzmengen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Für die Depositionslösung von Kupfer-Hexacyanoferrat(III) wurden 10mM Kalium-Hexacyanoferrat(III), 10mM Kupferchlorid (CuCl_2) sowie 100mM Kaliumchlorid eingewogen. Die eingewogenen Chemikalien wurden in einen Messkolben überführt und mit 250ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Kupfer-Hexacyanoferrat(III) fiel über die Fällungsreaktion von Kalium-Hexacyanoferrat(III) und Kupferchlorid als Niederschlag aus. Die eingewogenen Reagenzmengen sind in Tabelle 7 ersichtlich.

Nach Fertigstellung der Lösungen erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf etwa 2,75. Hierfür wurde der pH-Wert mit Hilfe eines pH-Meters kontrolliert und bis zum gewünschten pH-Wert tropfenweise Schwefelsäure zur Lösung hinzugefügt.

Tabelle 7: Eingewogene Stoffmengen für die Herstellung der Depositionslösung von Kalium-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(III), Eisen-Hexacyanoferrat(II) sowie Kupfer-Hexacyanoferrat(III). Die Einwaage erfolgte in g pro 250ml destilliertem H_2O .

	Einwaage [g]*				
	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	$\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$	KCl	CuCl_2
Depositionslösung $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	0,823	-	-	1,863	-
Depositionslösung $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	-	1,056	-	1,863	-
Depositionslösung $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$	-	-	2,148	1,863	-
Depositionslösung $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$	0,823	-	-	1,863	0,665

*Einwaage in g / 250ml H_2O dest.

2.3.4 Herstellung der Arbeitslösung (Phosphatpuffer)

Als Leitelektrolyt für die Durchführung der voltammetrischen Messungen wurde Phosphatpuffer verwendet. Für die Herstellung des Puffers wurden 1,388g Kaliumdihydrogenphosphat sowie 1,152g Dinatriumhydrogenphosphat eingewogen, in einen Messkolben überführt und mit 250ml destilliertem Wasser aufgefüllt.

2.3.5 Herstellung der Hexacyanoferrat-Lösungen für die Nafion- und Glutaraldehydmembranen

Neben der elektrochemischen Deposition wurden auch Sensoren hergestellt, welche mit hexacyanoferrathältigen Membranen modifiziert wurden. Dazu wurden wässrige Lösungen der vier verschiedenen Hexacyanoferrate hergestellt, welche in die Membran-Matrix eingebracht wurden (siehe Kapitel 2.4.2). Die eingewogenen Stoffmengen für die Herstellung der Lösungen sind in Tabelle 8 sowie Tabelle 9 aufgeführt. Die Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung wurde aus zwei unterschiedlichen Kupferquellen hergestellt. Es wurde einmal die Fällung aus Kalium-Hexacyanoferrat(III) mittels Kupferchlorid durchgeführt, des Weiteren die Fällung mittels Kupfersulfat (CuSO_4). Dafür wurde eine 0,2M Kalium-Hexacyanoferrat(III) Lösung jeweils im Verhältnis 1:1 (V/V) mit einer 0,3M Kupferchlorid- bzw. Kupfersulfat-Lösung gemischt und für die Membranfertigung verwendet.

Tabelle 8: Eingewogene Stoffmengen für die Herstellung der Einzellösungen von Kalium-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(III) sowie Eisen-Hexacyanoferrat(II). Die Einwaage erfolgte in g pro 20ml destilliertem H_2O .

	Konzentration [M]	Einwaage [g]*		
		$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	$\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - Lösung	0,2	1,317	-	-
	0,5	3,293	-	-
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - Lösung	0,5	-	4,224	-
$\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ - Lösung	0,3	-	-	5,155
	0,5	-	-	8,592

*Einwaage in g / 20ml H_2O dest.

Tabelle 9: Eingewogene Stoffmengen für die Herstellung der Einzellösungen für die Fällungsreaktion von Kuper-Hexacyanoferrat(III). Hierfür wurde eine 0.2M Kalium-Hexacyanoferratlösung im Verhältnis 1:1 (V/V) mit einer 0.3M Kupferchlorid- bzw. mit einer 0.3M Kupfersulfat-Lösung vermischt, so dass Kuper-Hexacyanoferrat(III) als Niederschlag ausfiel. Die Einwaage erfolgte in g pro 20ml destilliertem H₂O.

	Konzentration [M]	Einwaage [g]*		
		K ₃ [Fe(CN) ₆]	CuCl ₂	CuSO ₄
K ₃ [Fe(CN) ₆] – Lösung	0,2	1,317	-	-
CuCl ₂ - Lösung	0,3	-	1,023	-
CuSO ₄ – Lösung	0,3	-	-	0,958

*Einwaage in g / 20ml H₂O dest.

2.4 Modifizierung der Arbeitselektrode

Die Aufbringung der Hexacyanoferrat-Filme auf die Arbeitselektrode erfolgte mittels zwei unterschiedlicher Methoden: (1) Modifizierung mittels elektrochemischer Deposition sowie (2) Modifizierung mittels hexacyanoferrathältigen Membranen. Für die Modifikation wurden vier unterschiedliche Hexacyanoferrat-Lösungen verwendet: Eisen-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(III) sowie Kupfer-Hexacyanoferrat(III). Auf die Herstellung der verwendeten Lösungen wird in Kapitel 2.3 näher eingegangen. In nachfolgenden Abschnitt werden die beiden Techniken zur Modifizierung der Arbeitselektrode sowie die verwendeten Chemikalien und Geräte näher beschrieben.

2.4.1 Modifizierung mittels elektrochemischer Deposition

2.4.1.1 Chemikalien und Geräte

Für die elektrochemische Deposition der Hexacyanoferrat-Filme wurden folgende Chemikalien und Geräte verwendet:

- Potentiostat EmStat (Palm Instruments BV, Houten, Niederlande)
- Trockenschrank Binder FD53 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Kaliumchlorid-Lösung, Herstellung siehe Kapitel 2.3
- Depositionslösung Kalium-Hexacyanoferrat(II), Herstellung siehe Kapitel 2.3
- Depositionslösung Kalium-Hexacyanoferrat(III), Herstellung siehe Kapitel 2.3
- Depositionslösung Eisen-Hexacyanoferrat(II), Herstellung siehe Kapitel 2.3
- Depositionslösung Kupfer-Hexacyanoferrat(III), Herstellung siehe Kapitel 2.3
- Phosphatpuffer, Herstellung siehe Kapitel 2.3

2.4.1.2 Vorgangsweise

Für die elektrochemische Deposition des jeweiligen Hexacyanoferrat-Filmes auf die Arbeitselektrode wurde ein potentiodynamischer Ansatz mittels zyklischer Voltammetrie gewählt. Das Depositionsverfahren umfasste drei Schritte:

a) Reinigung der Arbeitselektrode: Vor dem eigentlichen Depositionsschritt wurde eine elektrochemische Reinigung der Arbeitselektrode durchgeführt. Hierfür wurden die siebge-

druckten Sensoren in eine 0.05M Kaliumchlorid-Lösung getaucht und an einen Potentiostaten geschlossen. Als Technik wurde zyklische Voltammetrie mit einem Potentialfenster von -0.5V bis 1.5V eingestellt, welches für 10 Zyklen durchlaufen wurde. In Tabelle 10 ist eine genaue Auflistung der eingestellten Parameter für den Reinigungsschritt zu sehen.

Tabelle 10: Voltammetrische Parameter für die Reinigung der Elektrode. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E_{start} = Startpotential, E_{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E_{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E_{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl)

Pretreatment Settings	E_{start}	E_{vtx1}	E_{vtx2}	Scan rate	E_{step}	n scans
None	0 V	-0,5 V	1,5 V	0,05 V/s	0,005 V	10

b) Elektrochemische Deposition: In diesem Schritt erfolgte die eigentliche Deposition des Hexacyanoferrat-Filmes auf die Arbeitselektrode. Die Sensoren wurden in eine der vier Depositionslösungen getaucht, welche das entsprechende Hexacyanoferrat sowie ein Leitsalz enthielt. Mittels zyklischer Voltammetrie wurde eine Schicht aus Hexacyanoferrat auf der Arbeitselektrode abgeschieden. Um den Einfluss des für die Deposition verwendeten Potentialfensters auf die Abscheidung des Hexacyanoferrat-Filmes zu evaluieren, wurden Messreihen mit zwei unterschiedlichen Potentialfenstern durchgeführt: (1) 0,2 - 0,9 V sowie (2) -0,5 - 1,0 V. Zusätzlich wurden für jedes Potentialfenster drei verschiedene Zyklusintensitäten untersucht: (1) 10 Zyklen, (2) 20 Zyklen sowie (3) 30 Zyklen. Tabelle 11 bietet eine Übersicht über die voltammetrischen Parameter für die elektrochemische Deposition.

Tabelle 11: Voltammetrische Parameter für die elektrochemische Deposition der Hexacyanoferrat-Filme. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E_{start} = Startpotential, E_{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E_{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E_{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl)

	Pretreatment Settings	E_{start}	E_{vtx1}	E_{vtx2}	Scan rate	E_{step}	n scans
1.	None	0 V	-0,5 V	1,0 V	0,05 V/s	0,005 V	10 / 20 / 30
2.	None	0 V	0,2 V	0,9 V	0,05 V/s	0,005 V	10 / 20 / 30

Nach Beendigung des Depositionsvorganges wurden die Elektroden getrocknet. Um den Einfluss des Trocknungsvorganges auf die Qualität des Hexacyanoferrat-Filmes zu evaluieren,

wurden vier verschiedene Trocknungsmethoden erprobt: (1) 24h lufttrocknen, (2) 48h lufttrocknen, (3) 1h bei 50°C im Ofen sowie (4) 1h bei 90°C im Ofen trocknen.

c) Vermessung des mit Hexacyanoferrat modifizierten Sensors: Nach Beendigung des Trockenvorganges wurden die mit Hexacyanoferrat modifizierten Sensoren in Phosphatpuffer getaucht und der Hexacyanoferrat-Film mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert. Tabelle 12 bietet eine Auflistung der eingestellten Parameter für die zyklische Voltammetrie.

Tabelle 12: Voltammetrische Parameter für die Charakterisierung des Hexacyanoferrat-Filmes in Phosphatpuffer. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E_{start} = Startpotential, E_{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E_{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E_{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl)

Pretreatment Settings	E_{start}	E_{vtx1}	E_{vtx2}	Scan rate	E_{step}	n scans
None	-0,5 V	-0,5 V	1,0 V	0,05 V/s	0,005 V	15

2.4.2 Modifizierung mittels hexacyanoferrathältigen Membranen

2.4.2.1 Geräte und Chemikalien

Für die Dispensierung der Hexacyanoferrat-Membranen wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet:

- Mikrodosiergerät Performus IV (Nordson EFD GmbH, Oberhaching, Deutschland)
- Präzisionswaage KERN PLS 720-3A (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland)
- Trockenschrank Binder FD53 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Potentiostat EmStat (Palm Instruments BV, Houten, Niederlande)
- Nafion[®] perfluorinated resin solution, 5wt. % in lower aliphatic alcohols and water (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Glutaraldehyd solution, 25% in H₂O (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Potassium hexacyanoferrate(II) ReagentPlus[®] ≥ 98.5%, K₄[Fe(CN)₆] (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)
- Kaliumhexacyanoferrat(III) ≥ 99.0%, K₃[Fe(CN)₆] (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Iron(III) ferrocyanide, Fe₄[Fe(CN)₆]₃ (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA)

- Phosphatpuffer, Herstellung siehe Kapitel 2.3

2.4.2.2 Vorgangsweise

Um die Membranen herzustellen, wurde das zu untersuchende Hexacyanoferrat sowohl in gelöster als auch in fester Form in eine Membran-Matrix eingebracht und auf die Arbeitselektrode aufgetragen. Als Membran-Matrix wurden das ionenpermeable Polymer Nafion sowie das Quervernetzungsmittel Glutaraldehyd untersucht.

Für die Herstellung der Membranen aus gelöstem Hexacyanoferrat wurden 50µl Nafion bzw. Glutaraldehyd mit 50µl bzw. 25µl einer Hexacyanoferrat-Lösung (Fertigung siehe Kapitel 2.3.5) vermischt und am Vortexer gut durchgemischt. Daraus ergaben sich 1:1 (V/V) bzw. 1:2 (V/V) Mischungen.

Um die Membranen aus festem Hexacyanoferrat herzustellen, wurden auf der Präzisionswaage 50mg Nafion bzw. Glutaraldehyd eingewogen und mit 5mg bzw. 15mg des jeweiligen Hexacyanoferrats verrieben. Die damit gefertigten 10%wt und 30%wt Anreicherungen wurden ebenso wie die gelösten Anreicherungen mittels Mikrodosiergerät auf die Arbeitselektroden dispensiert und anschließend für 1h bei 50°C in Trockenschrank getrocknet.

Nach dem Trocknen der Membranen erfolgte die voltammetrische Charakterisierung der modifizierten Sensoren in Phosphatpuffer. Hierfür wurden die Elektroden vollständig mit Phosphatpuffer bedeckt und an einen Potentiostaten angeschlossen. In Tabelle 13 ist eine Auflistung der eingestellten Parameter für die voltammetrische Charakterisierung zu sehen.

Tabelle 13: Voltammetrische Parameter für die Charakterisierung der dispensierten Hexacyanoferrat-Membrane in Phosphatpuffer. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E_{start} = Startpotential, E_{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E_{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E_{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl)

Pretreatment Settings	E_{start}	E_{vtx1}	E_{vtx2}	Scan rate	E_{step}	n scans
None	-0,5 V	-0,5 V	1,0 V	0,05 V/s	0,005 V	15

2.5 Apparativer Aufbau der Versuche

Die voltammetrischen Messungen wurden mit einem Potentiostaten der Marke EmStat (Palm Instruments BV, Houten, Niederlande) durchgeführt. Um eine Messung durchzuführen, wurde der Teststreifen über seine Leiterkontakte mit dem Potentiostaten verbunden und seine Elektroden in die Messlösung eingetaucht. Die Ansteuerung des Potentiostaten sowie die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Software PSTrace 2.4.2.0 (Palm Instruments BV, Houten, Niederlande).

2.6 Auswertung der zyklischen Voltammogramme

Um aus den zyklischen Voltammogrammen die Signalintensität der modifizierten Sensoren zu bestimmen, wurde die Höhe des Oxidationspeaks im ersten Zyklusdurchlauf vermessen. Die Kurvenauswertung der Voltammogramme wurde nach der Drei-Punkt-Tangentialmethode durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden jeweils der Anfangs- und Endpunkt des zu vermessenden Peaks ermittelt und mit einer Tangente verbunden. Die so entstehende Gerade legt die Basislinie der Stromkurve fest. Als dritter Punkt wird das Peakmaximum der Stromkurve herangezogen. Die gesuchte Peakhöhe entspricht dem Abstand zwischen dem Peakmaximum und der Basislinie an der Position der Peakspannung [39].

3 ERGEBNISSE

Diese Masterarbeit beschäftigte sich mit der voltammetrischen Charakterisierung von Hexacyanoferrat-Filmen auf siebgedruckten Kohlenstoffelektroden. Für die Modifizierung der Arbeitselektrode mit Hexacyanoferrat wurden zwei Techniken validiert: i) Modifizierung mittels elektrochemischer Deposition sowie ii) Modifizierung mittels hexacyanoferrathältigen Membranen. Zusätzlich wurden vier unterschiedliche Hexacyanoferrat-Verbindungen als mögliche Modifikatoren für die Arbeitselektrode untersucht: 1) Kupfer-Hexacyanoferrat(III), 2) Kalium-Hexacyanoferrat(II), 3) Kalium-Hexacyanoferrat(III) sowie 4) Eisen-Hexacyanoferrat(II). Für eine genaue Beschreibung der durchgeführten Modifizierungen sowie der verwendeten Testlösungen siehe Kapitel 2.3 und Kapitel 2.4.

Alle modifizierten Sensoren wurden mittels zyklischer Voltammetrie in Phosphatbuffer charakterisiert. Im nachfolgenden Abschnitt sind die Voltammogramme der modifizierten Sensoren ersichtlich und es wird eine statistische Beurteilung der Qualität der Modifikationen anhand der Signalintensität und ihrer Messwertstreuung durchgeführt. Des Weiteren erfolgt eine Beurteilung der Signalstabilität basierend auf Signalveränderungen und Potentialverschiebungen in den zyklischen Voltammogrammen der modifizierten Sensoren.

3.1 Kupfer-Hexacyanoferrat(III)

a) Depositionsfilme

Wie anhand des Voltammogrammes in Abbildung 11 zu erkennen ist, besaßen die untersuchten Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme ein ausgeprägtes elektrochemisches Verhalten. Die modifizierten Sensoren zeigten bei den voltammetrischen Messungen ein klar definiertes Peakpaar mit der Peakposition V_{ox} des Oxidationspeaks bei $0,66 V_{ox}$ und der Peakposition V_{red} des Reduktionspeaks bei $0,56 V_{red}$.

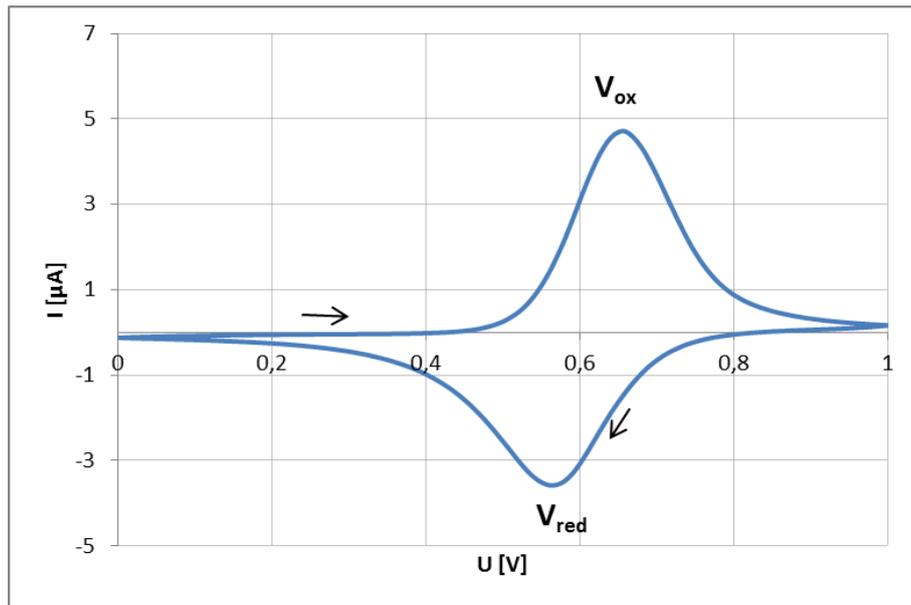


Abbildung 11: Elektrochemisches Verhalten der Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Bei den zyklischen Wiederholungsmessungen zeigten die Depositionsfilme abhängig vom verwendeten Trocknungsverfahren wesentliche Unterschiede in ihrer Signalstabilität. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, besaßen sowohl 24h als auch 48h luftgetrocknete Filme eine schlechte Signalstabilität. Die modifizierten Sensoren zeigten nach jedem Messzyklus eine Abnahme der Signalintensität sowie eine Verschiebung der Redoxpotentiale hin zu höheren Potentialen.

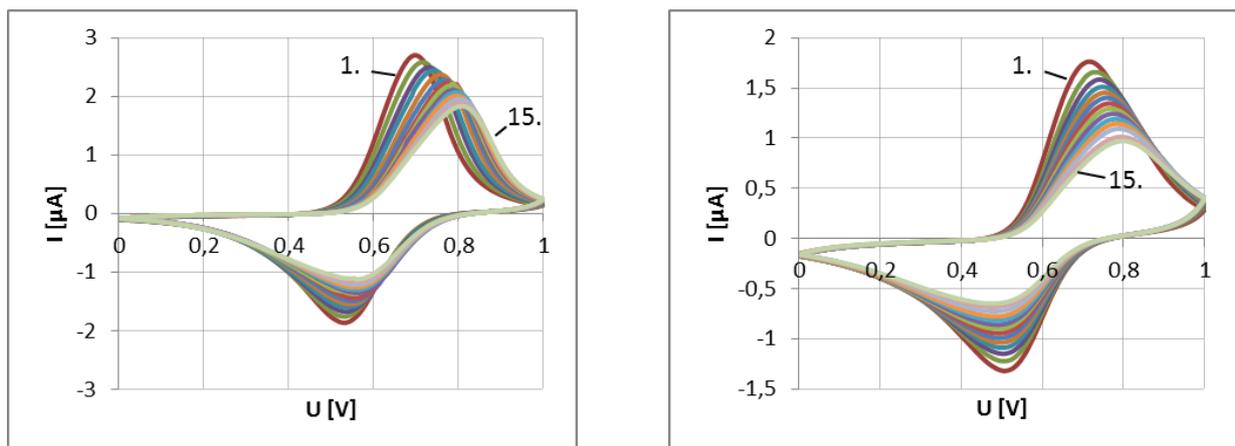


Abbildung 12: Zyklische Voltammogramme luftgetrockneter Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 24h luftgetrocknet, rechts: 48h luftgetrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Depositionsfilme, welche im Ofen bei 50°C oder 90°C getrocknet wurden, besaßen im Vergleich zu den luftgetrockneten Filmen eine wesentlich bessere Signalstabilität. Wie in den zyklischen Voltammogrammen in Abbildung 13 zu sehen ist, kam es während den ersten Zyklen zu einem Verlust an Signalintensität mit leichter Peakverschiebung. Nach etwa fünf Zyklen stabilisierte sich das Signal und die Peakhöhe sowie die Peakposition blieben über die restlichen Zyklen konstant.

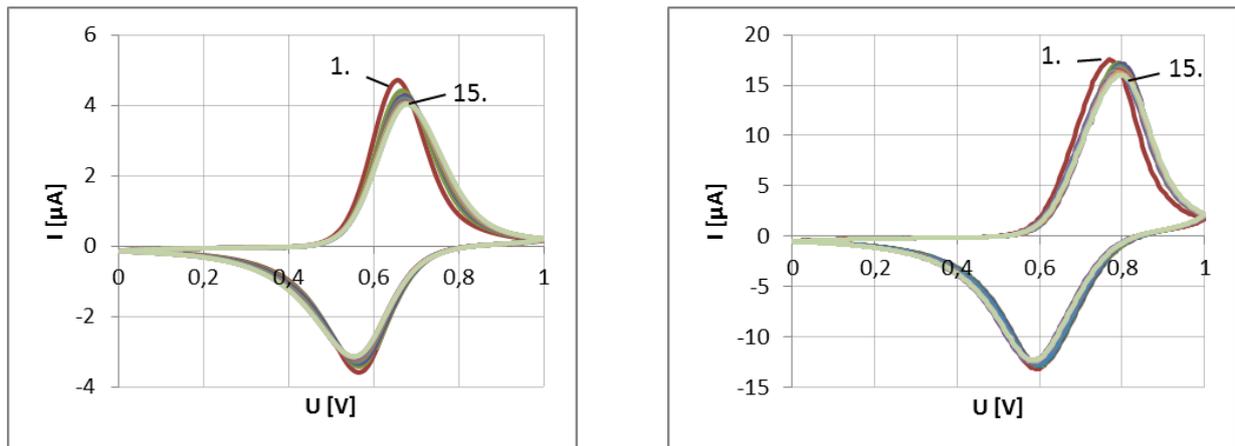


Abbildung 13: Zyklische Voltammogramme ofengetrockneter Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1h im Ofen bei 50°C getrocknet, rechts: 1h im Ofen bei 90°C getrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um den Einfluss von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknungsverfahren auf die Qualität des Kupfer-Hexacyanoferrat-Filmes zu evaluieren, wurden für jede Kombination aus Potentialfenster/Zyklusintensität/Trocknungsverfahren sechs Sensoren hergestellt, voltammetrisch charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, ergab sich für alle Depositionsfilme trotz standardisierter Herstellungsbedingungen eine hohe Messwertstreuung. Die höchsten Signalintensitäten konnten mit Kupfer-Hexacyanoferrat-Filmen erreicht werden, welche mittels des Potentialfenster -0,5 V bis 1,0 V aufgebracht wurden.

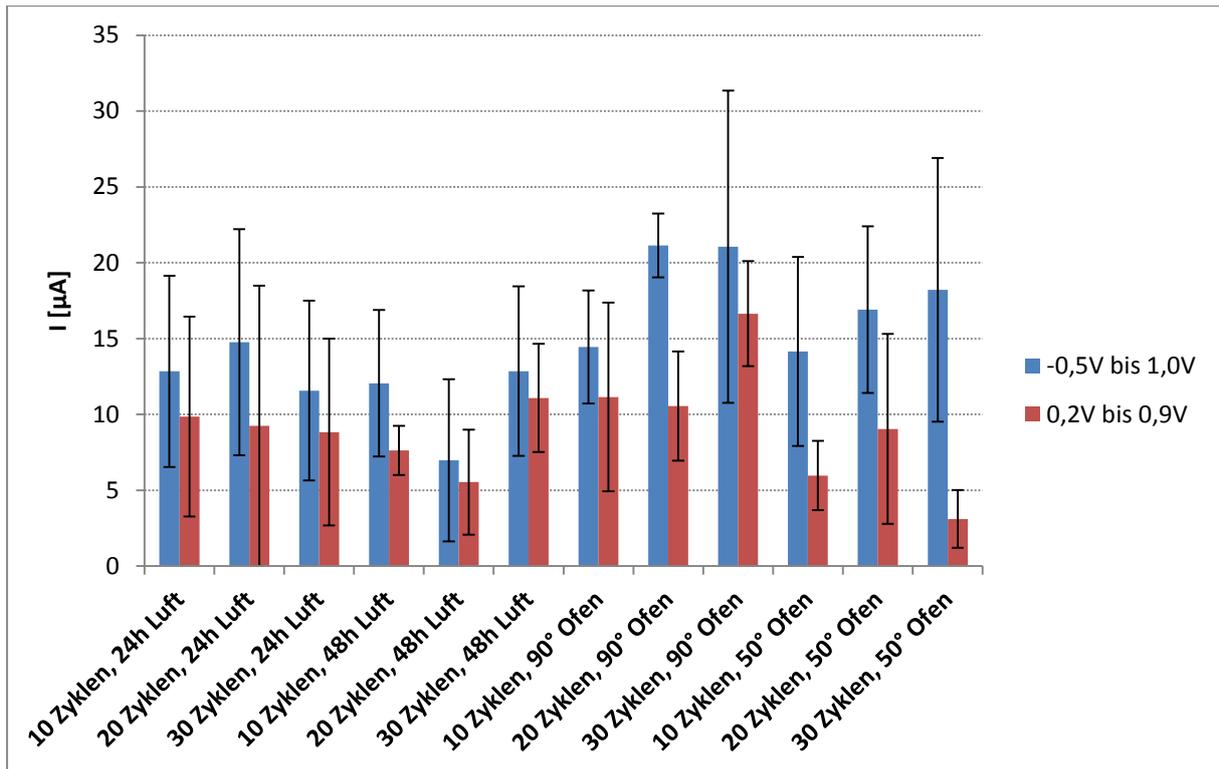


Abbildung 14: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilmes (n=6).

b) Nafionmembranen

Für die Herstellung der Nafionmembranen wurde Kupfer-Hexacyanoferrat aus zwei verschiedenen Fällungsreaktionen untersucht: Kalium-Hexacyanoferrat(III) mit Kupfersulfat sowie Kalium-Hexacyanoferrat(III) mit Kupferchlorid. Das ausgefällte Kupfer-Hexacyanoferrat wurde in fester Form in 10%wt bzw. 30%wt Anreicherungen sowie in gelöster Form als 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung in 1:1 (V/V) bzw. 1:2 (V/V) Mischungen mit Nafion vermengt.

Die modifizierten Sensoren zeigten bei der voltammetrischen Charakterisierung ein ausgeprägtes elektrochemisches Verhalten mit deutlich definierten Redoxpeaks im Bereich $0,72 V_{ox} / 0,53 V_{red}$ (siehe Abbildung 15).

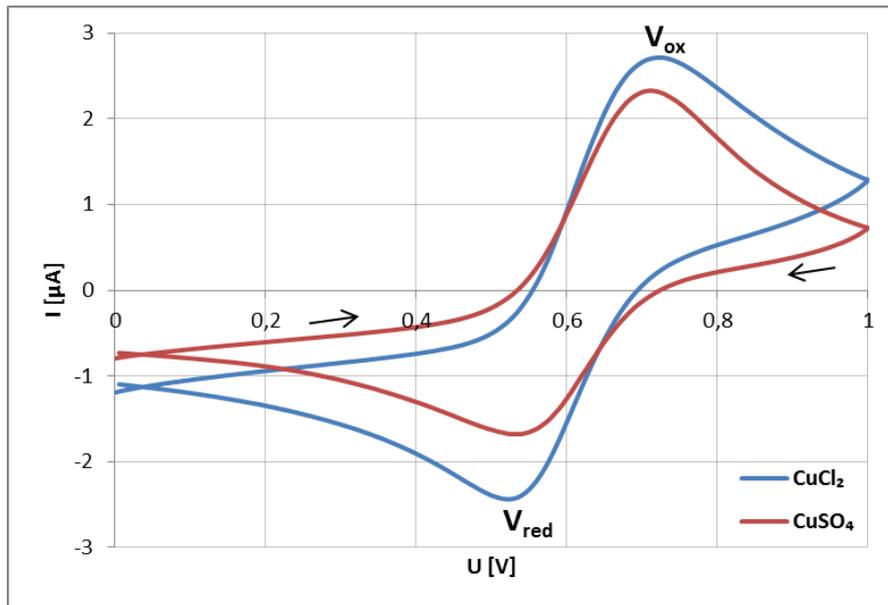


Abbildung 15: Elektrochemisches Verhalten der Kupfer-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Bezüglich der Signalstabilität konnte zwischen Kupferchlorid und Kupfersulfat kein Unterschied festgestellt werden. Die Anreicherungsform (gelöst oder fest) des Hexacyanoferrates hatte jedoch einen Einfluss auf die Filmstabilität. In Abbildung 16 sind zyklische Voltammogramme von Nafionmembranen dargestellt, welche aus festem Kupfer-Hexacyanoferrat hergestellt wurden. Die Membranen zeigten bei den Wiederholungsmessungen eine gute Signalstabilität sowie konstante Peakpositionen. Im Vergleich dazu wiesen die Membranen aus gelöstem Kupfer-Hexacyanoferrat eine geringere Signalstabilität auf (vgl. Abbildung 17). Vor allem im Bereich des Oxidationspeaks kam es mit jedem Zyklus zu einer Zunahme der Signalintensität sowie zu einer Verschiebung des Oxidationspotentials hin zu höheren Potentialen.

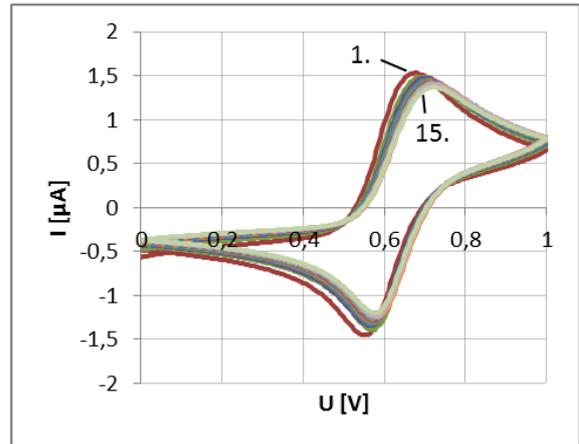
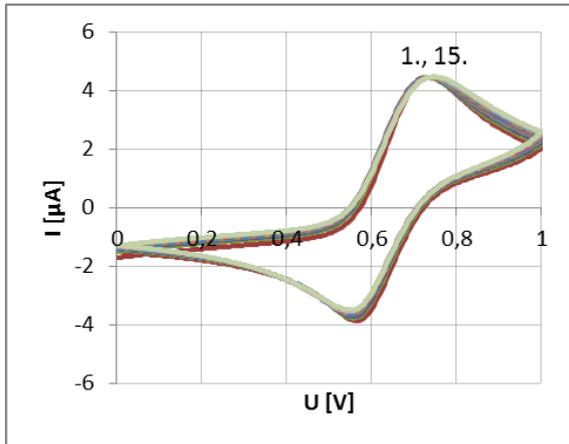


Abbildung 16: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathaltiger Nafionmembranen, hergestellt aus festem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl_2 , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO_4 . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

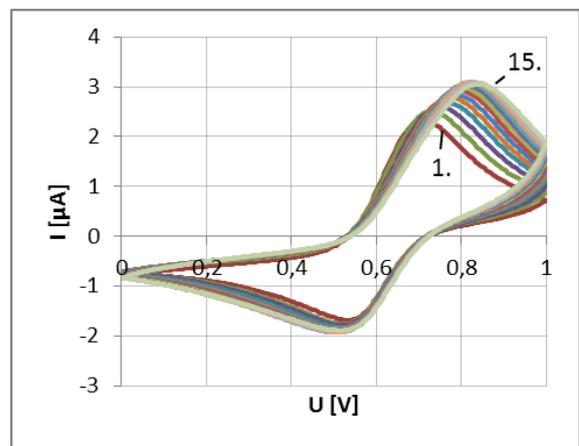
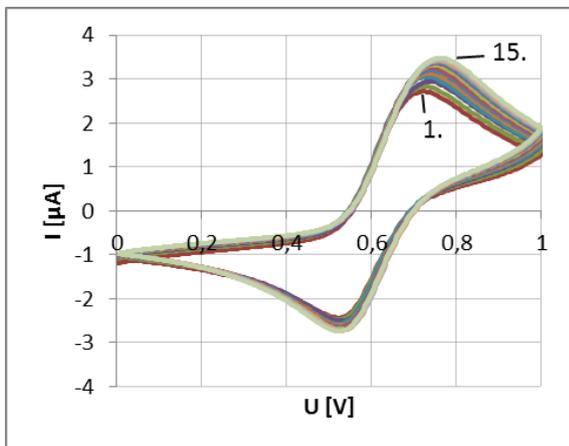


Abbildung 17: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathaltiger Nafionmembranen, hergestellt aus gelöstem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl_2 , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO_4 . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um den Einfluss der Anreicherungsform und der Kupferquelle auf die Qualität der Nafionmembranen zu evaluieren, wurden für das als 0,1M Lösung (1:1 (V/V) sowie 1:2 (V/V)) und das in fester Form (10%wt sowie 30%wt) verarbeitete Kupfer-Hexacyanoferrat jeweils sechs Sensoren hergestellt, mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

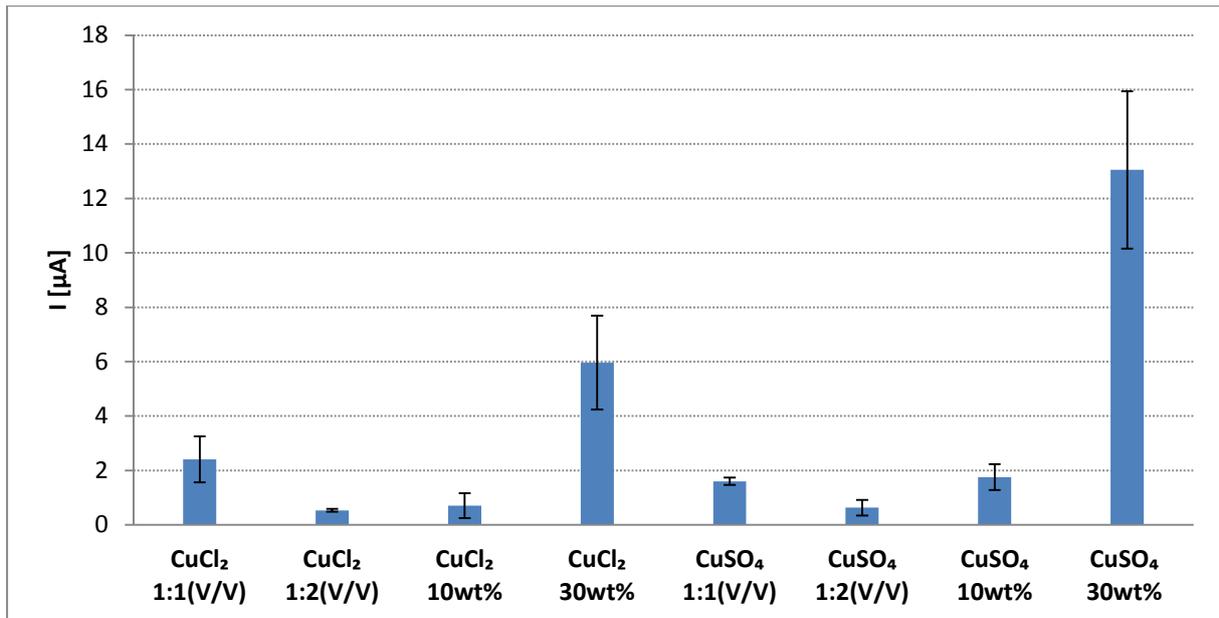


Abbildung 18: Signalintensität der Kupfer-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupferchlorid bzw. Kupfersulfat gefällt und in gelöster sowie fester Form mit Nafion vermischt ($n=6$).

c) Glutaraldehydmembranen

Analog zu den Nafionmembranen wurde für die Herstellung der Glutaraldehydmembranen aus Kupfersulfat bzw. Kupferchlorid gefälltes Kupfer-Hexacyanoferrat sowohl in fester (10%wt bzw. 30%wt Anreicherungen) Form als auch als 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung (1:1 (V/V) bzw. 1:2 (V/V) Anreicherungen) mit Glutaraldehyd vermischt.

Die modifizierten Sensoren zeigten bei der voltammetrischen Charakterisierung ein ausgeprägtes elektrochemisches Verhalten mit einem deutlich definierten Peakpaar im Bereich $0,65 V_{\text{ox}} / 0,55 V_{\text{red}}$ (siehe Abbildung 19).

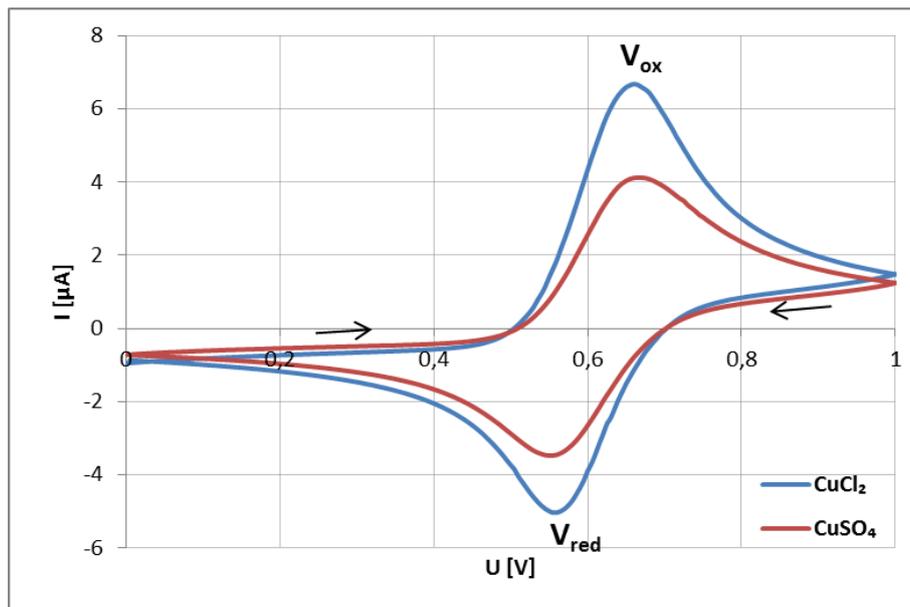


Abbildung 19: Elektrochemisches Verhalten der Kupfer-Hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Die hergestellten Glutaraldehydmembranen zeigten bei den voltammetrischen Wiederholungsmessungen unterschiedliche Signalstabilitäten. Die besten Ergebnisse konnten mit Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupfersulfat erreicht werden, welches als 0,1M Lösung im Verhältnis 1:1 (V/V) oder 1:2 (V/V) mit Glutaraldehyd vermischt wurde. Diese Membranen besaßen eine gute Signalstabilität mit konstanten Peakpositionen wie in Abbildung 21 rechts zu erkennen ist. Die schlechteste Membranqualität zeigten Membranen, welche aus gelöstem Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupferchlorid hergestellt wurden. Wie in dem zyklischen Voltammogramm in Abbildung 21 links zu erkennen ist, kam es bei diesen Membranen mit jedem Zyklus zu einer deutlichen Abnahme des Stromsignals von Oxidations- und Reduktionspeak. Ähnliche Ergebnisse lieferten Membranen, welche mit festem Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupferchlorid hergestellt wurden. Auch diese Membranen zeigten mit jedem Zyklusdurchlauf eine Abnahme der Signalintensität von Oxidations- und Reduktionspeak (siehe Abbildung 20 links). Ein gegenteiliges Verhalten zeigten jene Glutaraldehydmembranen, welche mit festem Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupfersulfat hergestellt wurden. Hier konnte mit jedem voltammetrischen Zyklus ein Anstieg der Signalintensität der Redoxpeaks verzeichnet werden. Zusätzlich kam es auch zu einer Verschiebung der Peakpositionen hin zu höheren Redox-Potentialen (siehe Abbildung 20 rechts).

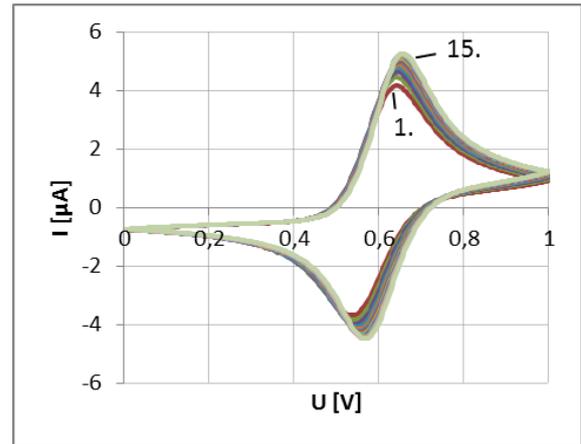
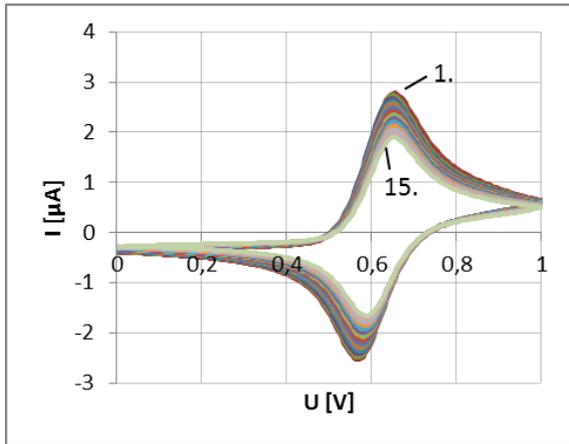


Abbildung 20: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathaltiger Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus festem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl_2 , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO_4 . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

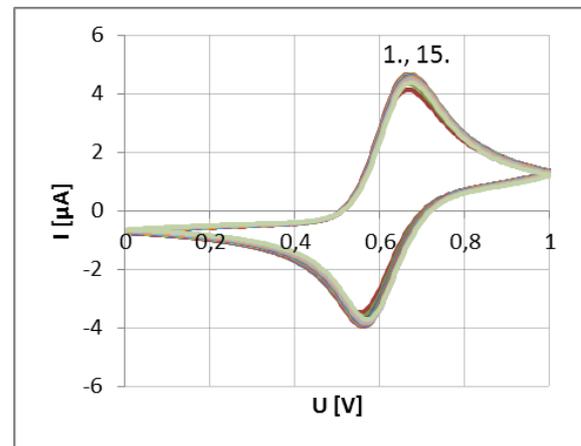
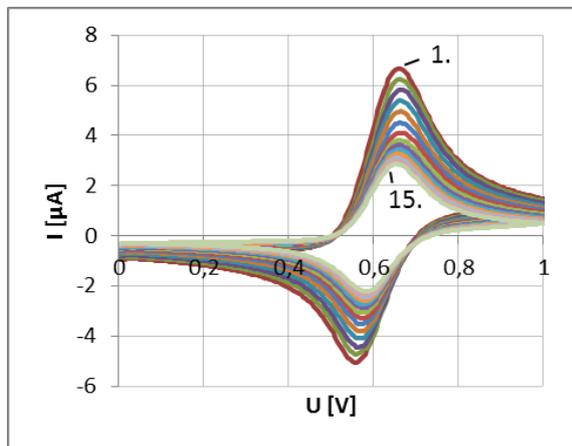


Abbildung 21: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathaltiger Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus gelöstem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl_2 , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO_4 . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um den Einfluss der Anreicherungsform und der Kupferquelle auf die Qualität der Glutaraldehydmembranen zu evaluieren, wurden sowohl für das als 0,1M Lösung (1:1 (V/V) sowie 1:2 (V/V)) als auch für das in fester Form (10%wt sowie 30%wt) verarbeitete Kupfer-Hexacyanoferrat jeweils sechs Sensoren hergestellt, voltammetrisch charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet. Die Ergebnisse der durchgeführten Messreihe sind in Abbildung 22 dargestellt.

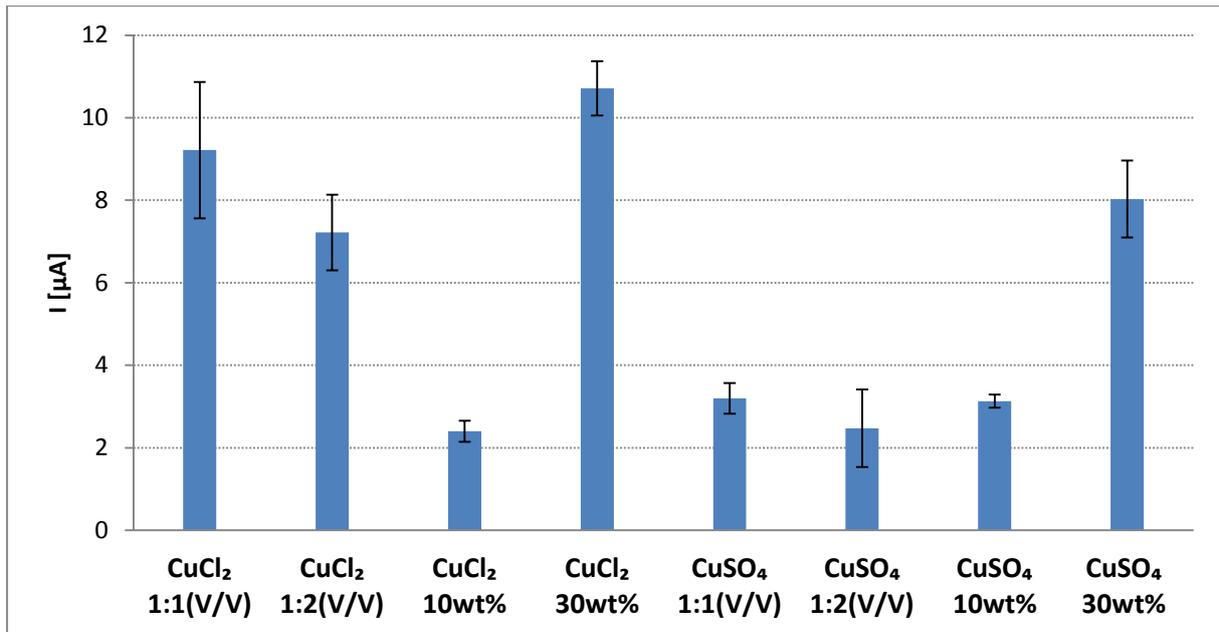


Abbildung 22: Signalintensität der Kupfer-Hexacyanoferrathaltigen Glutaraldehydmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupferchlorid bzw. Kupfersulfat gefällt und in gelöster sowie fester Form mit Glutaraldehyd vermengt (n=6).

3.2 Kalium-Hexacyanoferrat(II)

a) Depositionsfilme

Die mittels elektrochemischer Deposition auf die Arbeitselektrode aufgetragenen Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Filme bildeten bei der voltammetrischen Charakterisierung einen Redoxpeak im Bereich $0,17 V_{ox} / 0,14 V_{red}$ aus (siehe Abbildung 23). Trotz standardisierter Herstellungsbedingungen zeigten nicht alle modifizierten Sensoren ein elektrochemisches Verhalten während der voltammetrischen Messungen. Dadurch erklären sich die fehlenden Messwerte in der Validierungsgraphik (Abbildung 25).

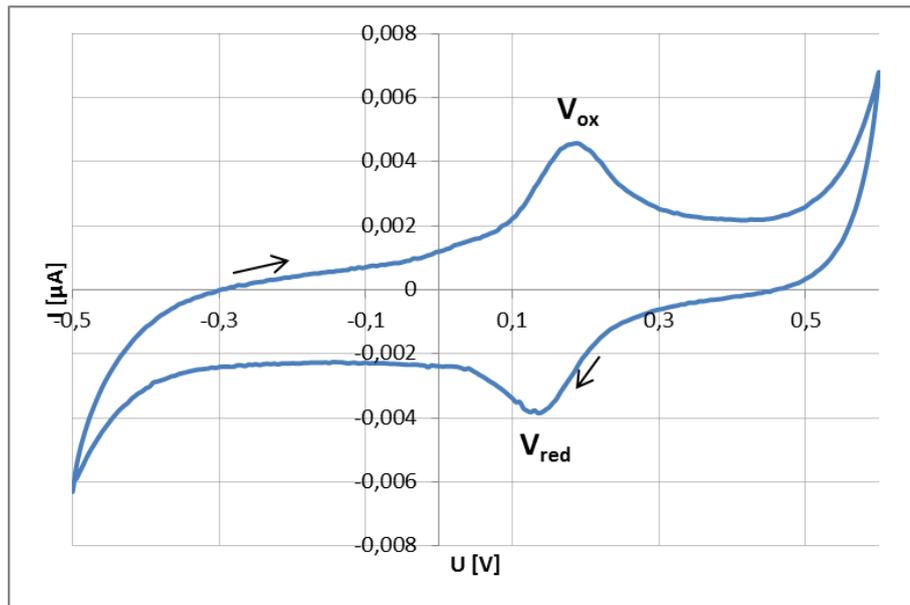


Abbildung 23: Elektrochemisches Verhalten der Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Wie in den zyklischen Voltammogrammen in Abbildung 24 zu erkennen ist, besaßen sowohl luft- als auch ofengetrocknete Depositionsfilme eine gute Signalstabilität.

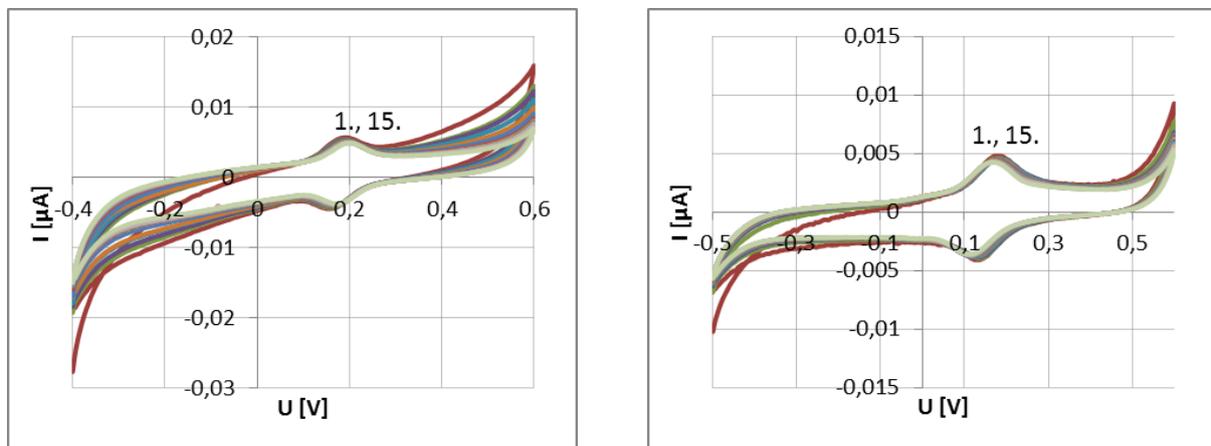


Abbildung 24: Zyklische Voltammogramme von Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Depositionsfilmen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: luftgetrocknet, rechts: im Ofen getrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um eine statistische Beurteilung der Depositionsfilme durchzuführen, wurde für jede Kombination aus Potentialfenster/Zyklusintensität/Trocknungsverfahren sechs Sensoren hergestellt und voltammetrisch in Phosphatbuffer vermessen. Aus den Voltammogrammen wurden Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität ermittelt. Wie in Abbildung 25 ersichtlich ist, führte die elektrochemische Deposition von Kalium-Hexacyanoferrat(II) zu

schlecht reproduzierbaren Depositionsfilmen mit hoher Messwertstreuung. Für jene Sensoren, welche innerhalb des Potentialfensters 0,2 V bis 0,9 V für 30 bzw. 10 Zyklen modifiziert und anschließend für 48h luftgetrocknet bzw. bei 50°C im Ofen getrocknet wurden, konnte bei keinem der modifizierten Sensoren ein Redoxverhalten registriert werden. Das gleiche Verhalten zeigten jene Sensoren, welche innerhalb des Potentialfensters -0,5 V bis 1,0 V für 10 Zyklen modifiziert und anschließend für 48h luftgetrocknet wurden.

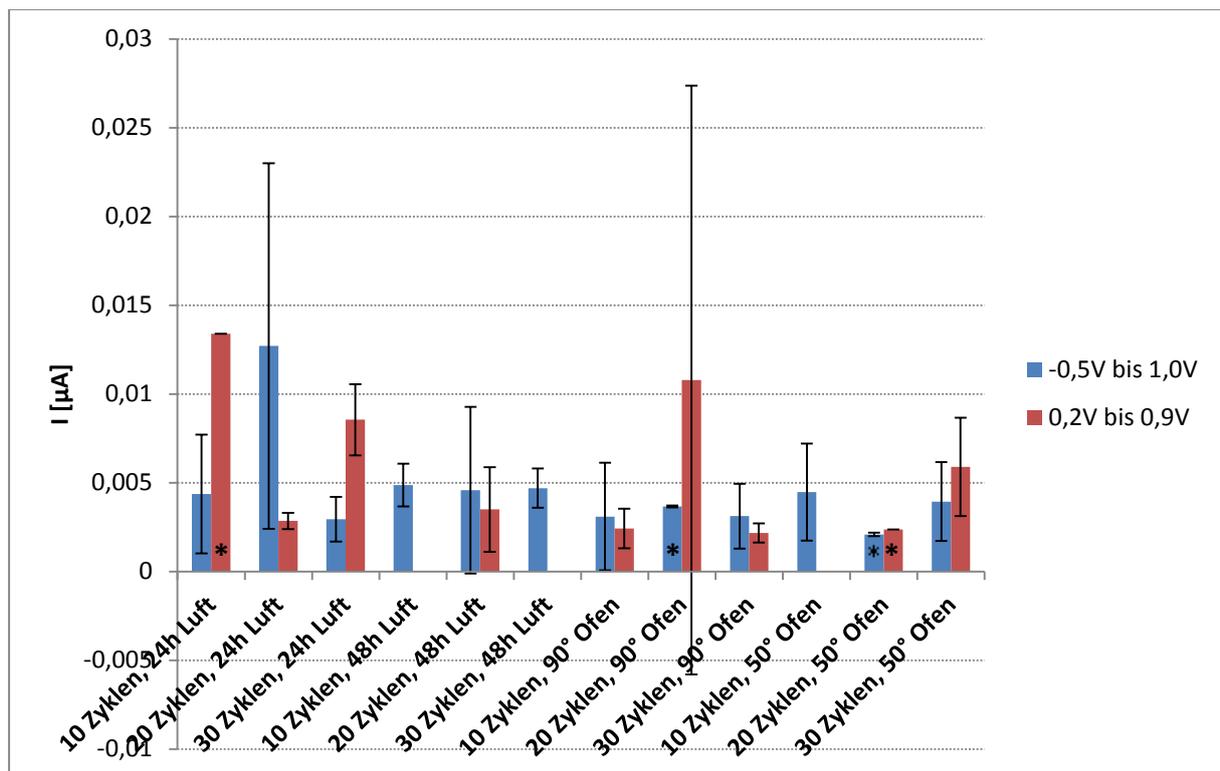


Abbildung 25: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Depositionsfilmes (n=6), *(n=1).

b) Nafionmembranen

Für die Herstellung der Nafionmembranen wurde festes Kalium-Hexacyanoferrat(II) in 10%wt und 30%wt Anreicherungen sowie eine 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung in 1:1 (V/V) und 1:2 (V/V) Mischungen mit Nafion vermengt.

Die hergestellten Nafionmembranen wiesen abhängig von der Anreicherungsform (fest/gelöst) des Hexacyanoferrates ein unterschiedliches elektrochemisches Verhalten auf. Bei der Anreicherung der Membran mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(II) kam es im

Voltammogramm zur Ausbildung von zwei Peakpaaren im Bereich $0,15 V_{ox1} / 0,12 V_{red1}$ sowie $0,43 V_{ox2} / 0,4 V_{red2}$ (siehe Abbildung 26). Bei Mischung von Nafion mit gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(II) wurde im Voltammogramm nur ein Peakpaar im Bereich $0,23 V_{ox} / 0,18 V_{red}$ ausgebildet (vgl. Abbildung 27).

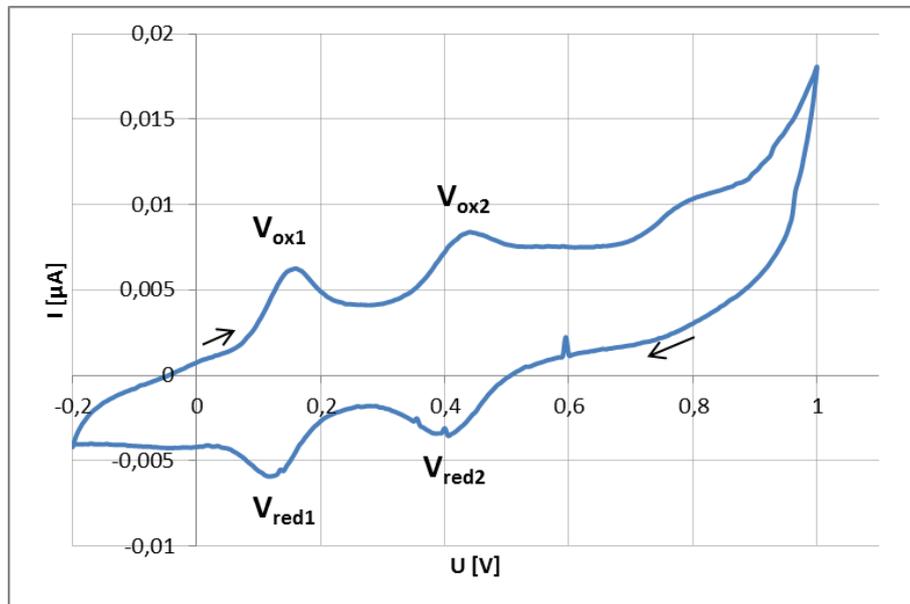


Abbildung 26: Elektrochemisches Verhalten der Nafionmembranen, welche mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(II) angereichert wurden. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

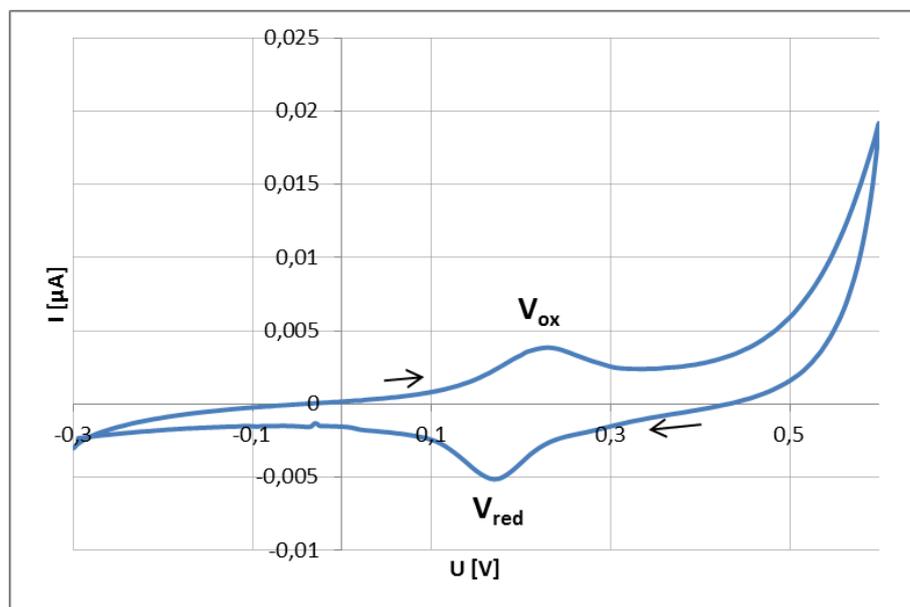


Abbildung 27: Elektrochemisches Verhalten der Nafionmembranen, welche mit gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(II) angereichert wurden. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Alle hergestellten Nafionmembranen zeigten bei den zyklischen Wiederholungsmessungen eine schlechte Signalstabilität. Dies äußerte sich durch einen Verlust an Peakhöhe mit jedem Zyklus (vgl. Abbildung 28 und Abbildung 29). Bei den Anreicherungen mit festem Hexacyanoferrat verschwand im Laufe der Wiederholungsmessungen das Peakpaar im Bereich $0,43 V_{ox2} / 0,4 V_{red2}$ vollständig, während das Peakpaar im Bereich $0,15 V_{ox1} / 0,12 V_{red1}$ über 50% an Signalintensität verlor (siehe Abbildung 28). Für die Bestimmung der Signalintensität der modifizierten Sensoren wurde die Peakhöhe des ersten Oxidationspeaks (V_{ox1}) herangezogen.

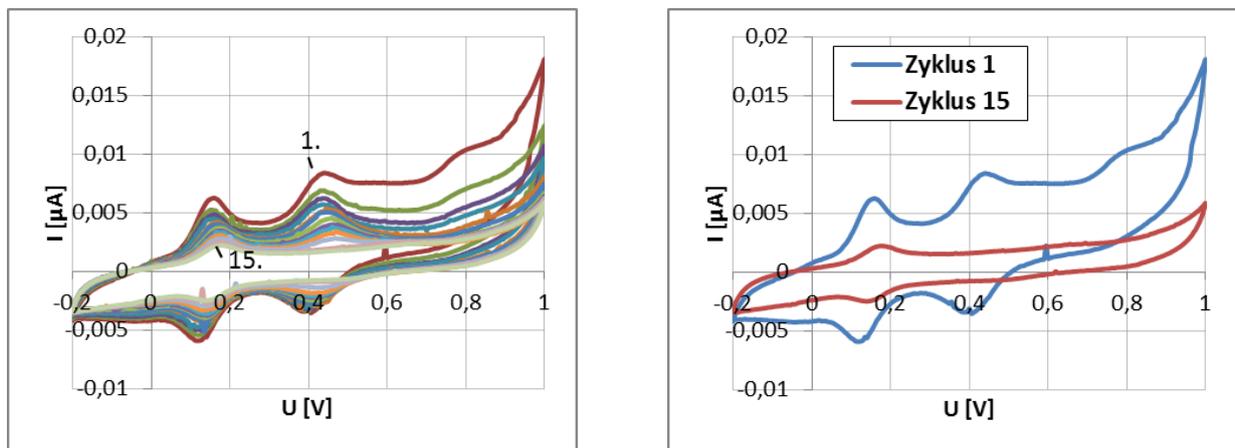


Abbildung 28: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathältigen Nafionmembran, hergestellt aus festem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

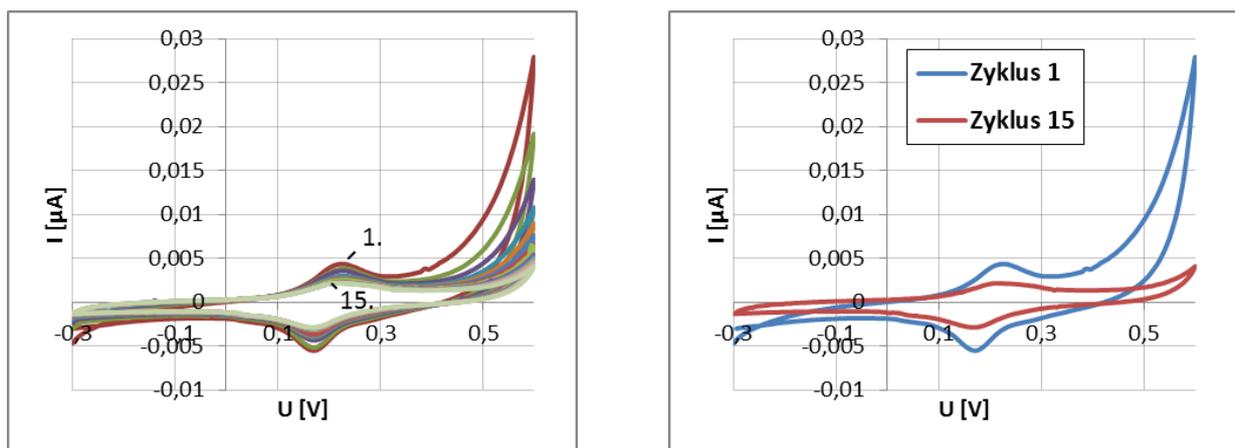


Abbildung 29: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathältigen Nafionmembran, hergestellt aus gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um eine statistische Beurteilung der Modifikationen durchzuführen, wurden sowohl für die Mischungen mit einer 0,5M Hexacyanoferrat-Lösung (1:1 (V/V) und 1:2 (V/V)) als auch für die Anreicherung mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(II) (10%wt sowie 30%wt) jeweils sechs Sensoren hergestellt, mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 30 graphisch dargestellt.

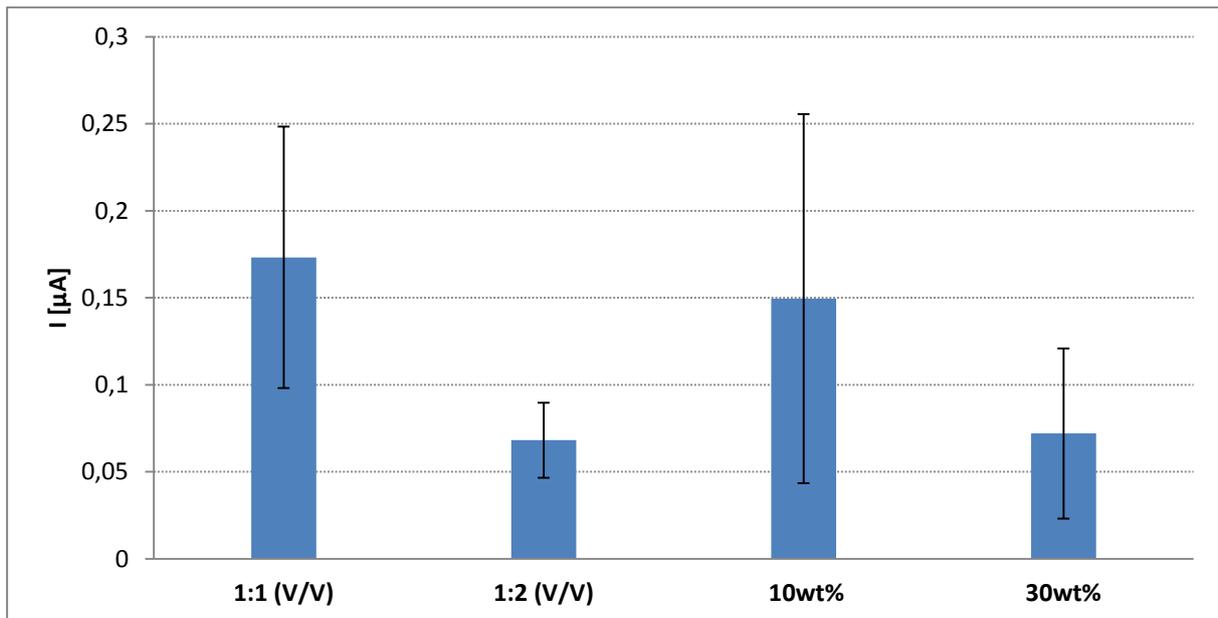


Abbildung 30: Signalintensität der Kalium-Hexacyanoferrat(II)-haltigen Nafionmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde eine 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung bzw. festes Kalium-Hexacyanoferrat(II) mit Nafion vermischt ($n=6$).

c) Glutaraldehydmembranen

Glutaraldehyd wurde mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(II) bzw. einer 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung angereichert, auf die Arbeitselektrode aufgetropft und mittels zyklischer Voltammetrie vermessen. Die hergestellten Membranen bildeten bei der voltammetrischen Charakterisierung ein einzelnes, schwach ausgeprägtes Peakpaar im Bereich $0,18 V_{\text{ox}} / 0,09 V_{\text{red}}$ aus (siehe Abbildung 31).

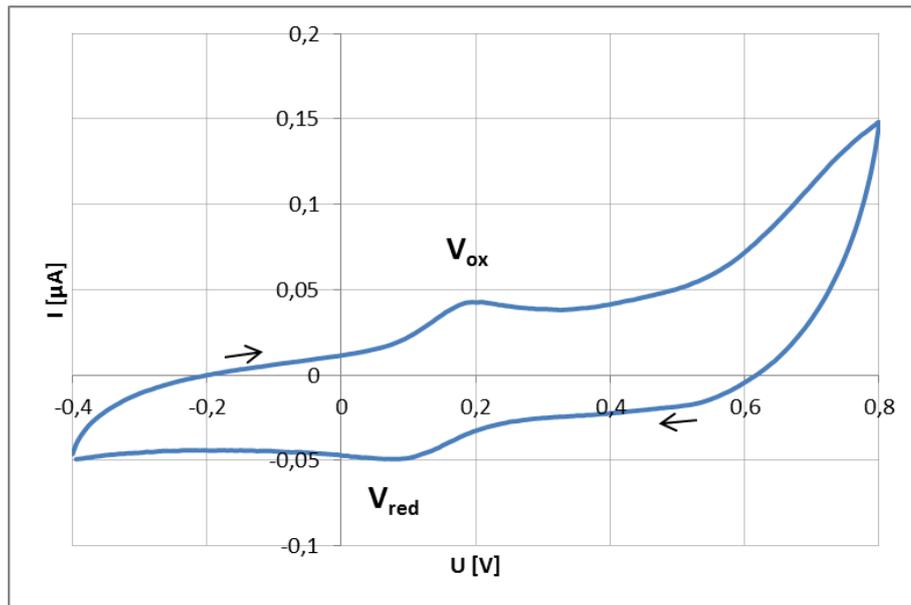


Abbildung 31: Elektrochemisches Verhalten der Kalium-Hexacyanoferrat(II)-haltigen Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Die untersuchten Glutaraldehydmembranen zeigten während den zyklischen Wiederholungsmessungen eine schlechte Signalstabilität (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33). Bei jedem voltametrischen Zyklus konnte eine Abnahme der Signalintensität beobachtet werden. Am Ende der Messung konnte kein definiertes Redoxpeakpaar mehr unterschieden werden.

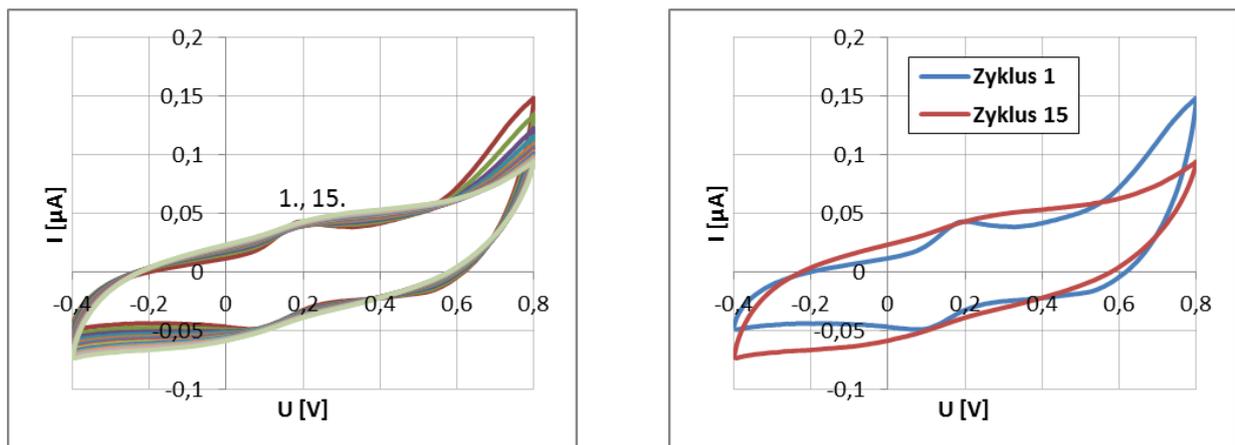


Abbildung 32: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathaltigen Glutaraldehydmembran, hergestellt aus festem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

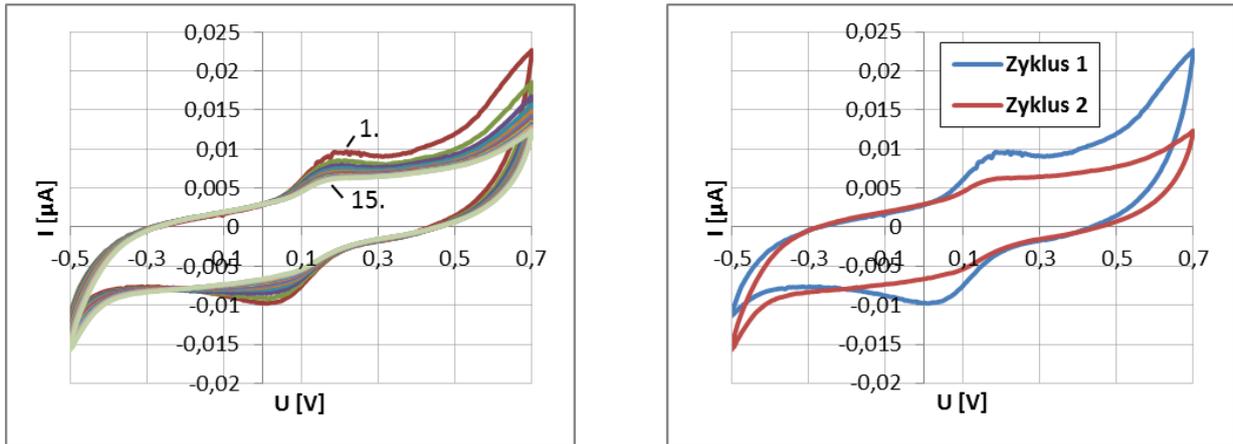


Abbildung 33: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathaltigen Glutaraldehydmembran, hergestellt aus gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Sowohl für die 1:1 (V/V) und die 1:2 (V/V) Mischungen mit der 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung als auch für die 10%wt bzw. 30%wt Anreicherungen mit festem Hexacyanoferrat wurden jeweils sechs Sensoren hergestellt, mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 34 graphisch dargestellt.

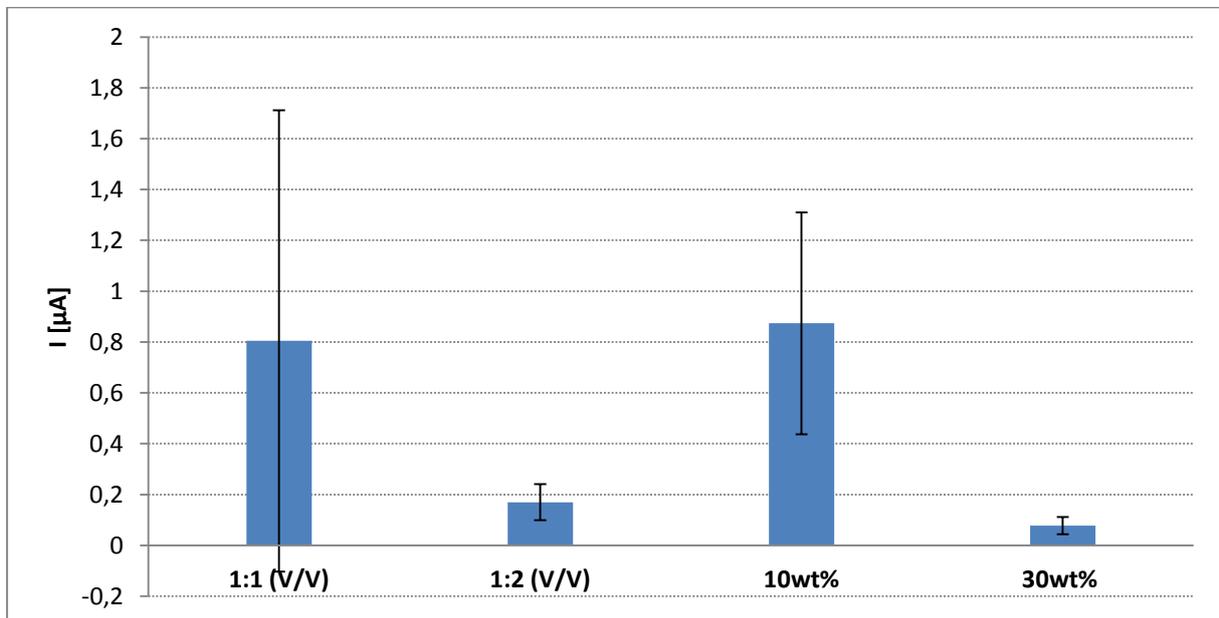


Abbildung 34: Signalintensität der Kalium-Hexacyanoferrat(II)-haltigen Glutaraldehydmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde eine 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung bzw. festes Kalium-Hexacyanoferrat(II) mit Glutaraldehyd vermischt (n=6).

3.3 Kalium-Hexacyanoferrat(III)

a) Depositionsfilme

Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, bildeten die untersuchten Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilme im Voltammogramm ein einzelnes Peakpaar im Bereich $0,21 V_{ox} / 0,18 V_{red}$ aus. Das Trocknungsverfahren übte einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität des Hexacyanoferrat-Filmes aus. Die besten Ergebnisse lieferten jene Filme, welche im Ofen bei $90^{\circ}C$ getrocknet wurden. Diese Depositionsfilme zeigten über alle Wiederholungszyklen eine gute Signalstabilität mit konstanten Peakhöhen und Peakpositionen (siehe Abbildung 36 rechts).

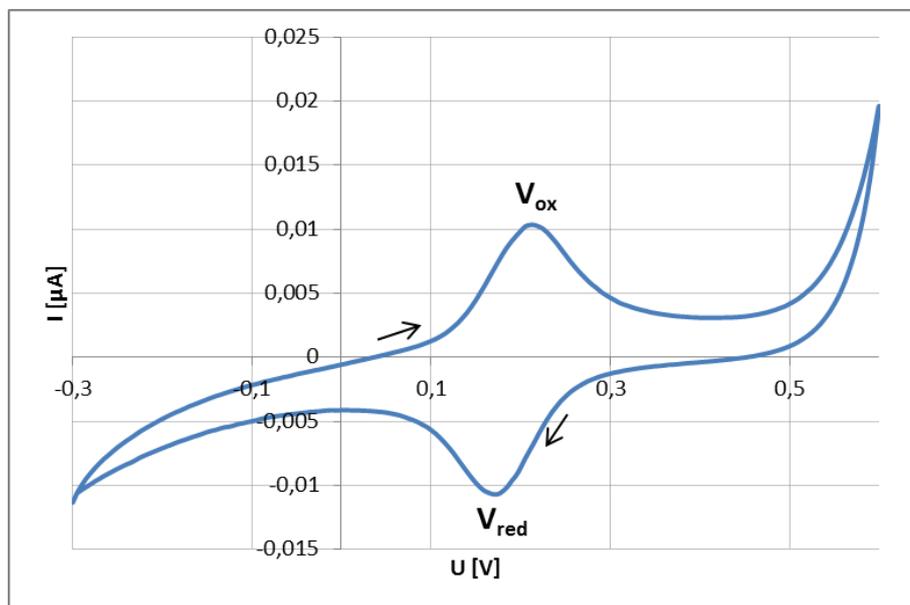


Abbildung 35: Elektrochemisches Verhalten der Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

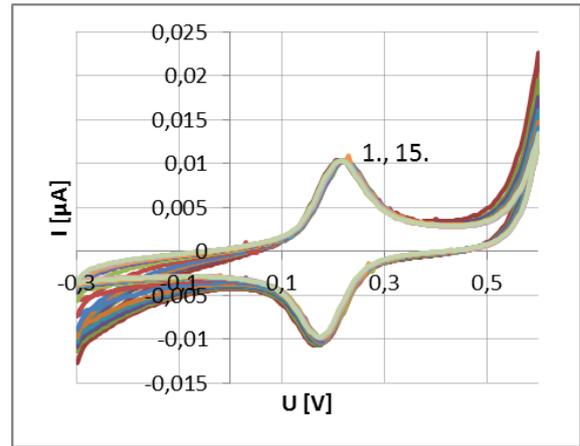
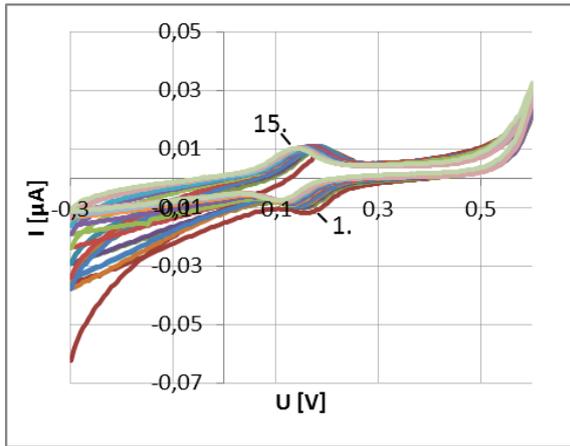


Abbildung 36: Zyklische Voltammogramme von Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilme, welche im Ofen getrocknet wurden. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1h im Ofen bei 50°C getrocknet, rechts: 1h im Ofen bei 90°C getrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Alle anderen untersuchten Trocknungsverfahren (24h Luft, 48h Luft sowie 50°C Ofen) lieferten instabile Filmresultate. Die modifizierten Sensoren zeigten bei den zyklischen Wiederholungsmessungen eine geringe Signalstabilität mit sinkender Peakhöhe und Verschiebungen der Peakpositionen hin zu niedrigeren Potentialen (vgl. Abbildung 36 rechts und Abbildung 37 links). Des Weiteren konnte bei diesen Trocknungsverfahren trotz vorangegangener elektrochemischer Deposition nicht bei allen modifizierten Sensoren voltammetrisch eine Redoxaktivität registriert werden (vgl. Abbildung 37 links).

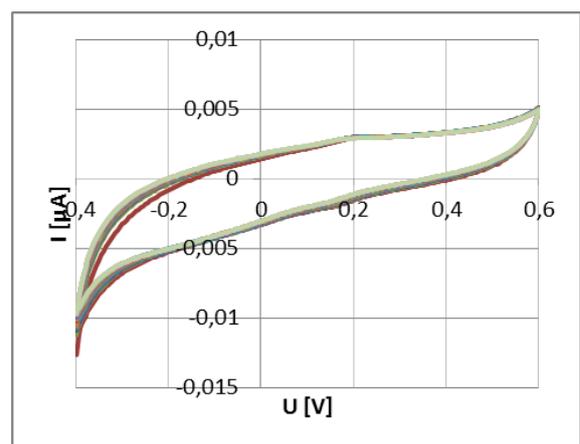
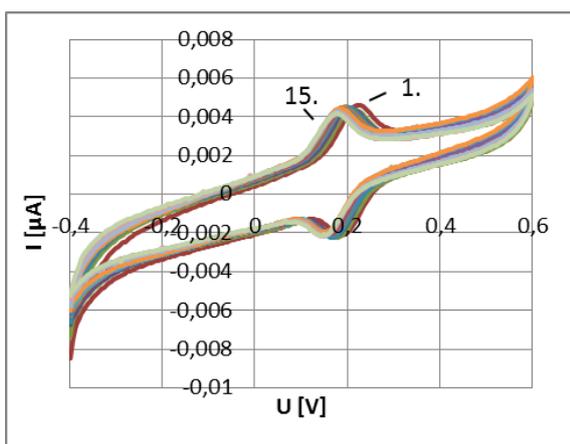


Abbildung 37: Zyklische Voltammogramme von Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilmen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: luftgetrocknet, rechts: Depositionsfilm ohne messbare Redoxaktivität. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um eine statistische Beurteilung der elektrochemischen Deposition von Kalium-Hexacyanoferrat(III) durchzuführen, wurden für jede Kombination aus Potentialfenster/Zyklusintensität/Trocknungsverfahren sechs modifizierte Sensoren hergestellt, mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität ermittelt. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 38 graphisch zusammengefasst. Sensoren mit fehlender Redoxaktivität wurden von der Auswertung ausgeschlossen und verursachen die Lücken in der Validierungstabelle. Für jene Sensoren, welche innerhalb des Potentialfensters 0,2 V bis 0,9 V für 10 Zyklen modifiziert und anschließend für 24h luftgetrocknet wurden sowie die Sensoren, welche für 30 Zyklen modifiziert wurden und anschließend entweder für 48h luftgetrocknet oder bei 50°C im Ofen getrocknet wurden, konnte keine Redoxaktivität registriert werden.

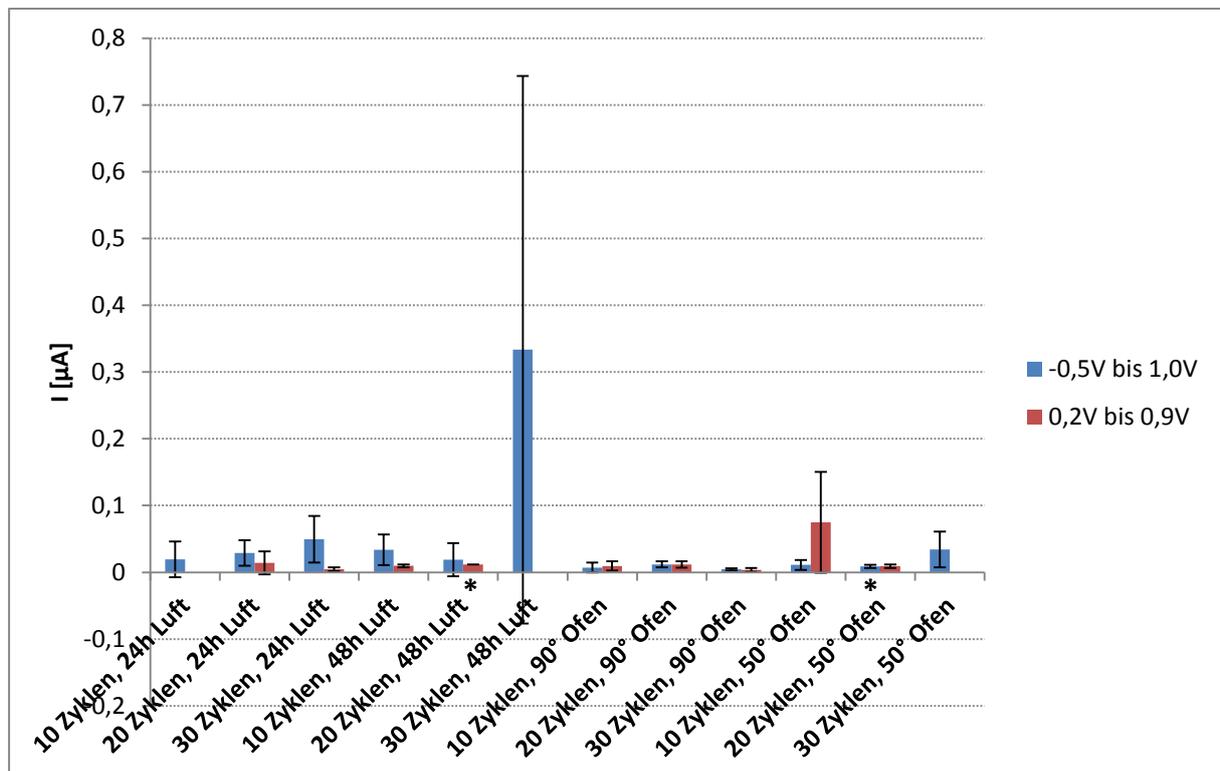


Abbildung 38: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilmes (n=6), *(n=1).

b) Nafionmembranen

Für die Herstellung der Nafionmembranen wurde festes Kalium-Hexacyanoferrat(III) in 10%wt und 30%wt Anreicherungen sowie gelöstes Kalium-Hexacyanoferrat(III) in 1:1 (V/V) und 1:2 (V/V) Mischungen mit Nafion vermischt.

Jene Nafionmembranen, die mit gelöstem Hexacyanoferrat hergestellt wurden, zeigten im Voltammogramm weder bei Mischung mit einer 0,2M noch bei Mischung mit einer 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat-Lösung eine messbare Redoxaktivität (siehe Abbildung 39).

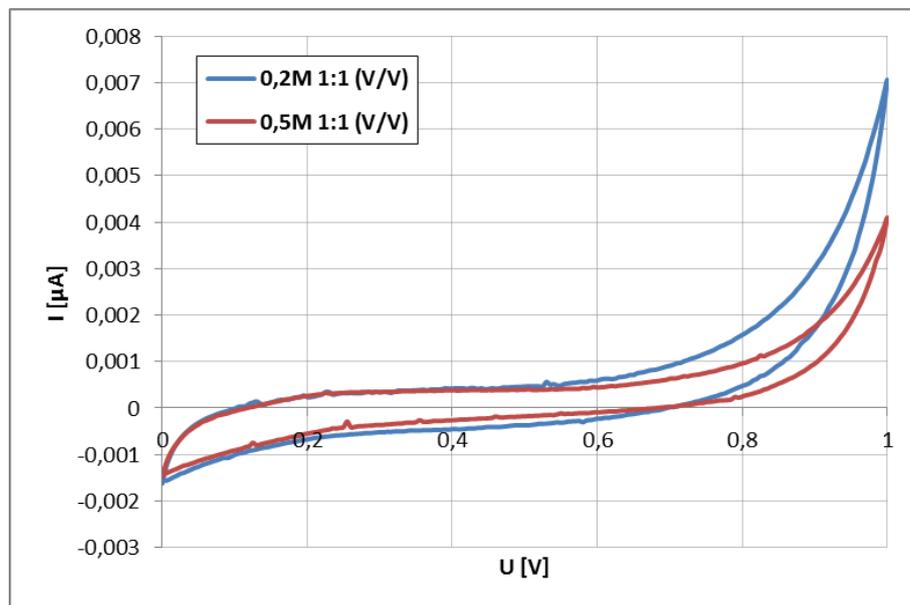


Abbildung 39: Elektrochemisches Verhalten von mit gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(III) angereicherten Nafionmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Die Anreicherung der Nafionmembran mit festem Hexacyanoferrat führte zu einem schlechten elektrochemischen Signal mit starken Signalrauschen (vgl. Abbildung 40). Daher wurden diese Membranen von der Auswertung ausgeschlossen, weshalb eine Validierungstabelle hier fehlt.

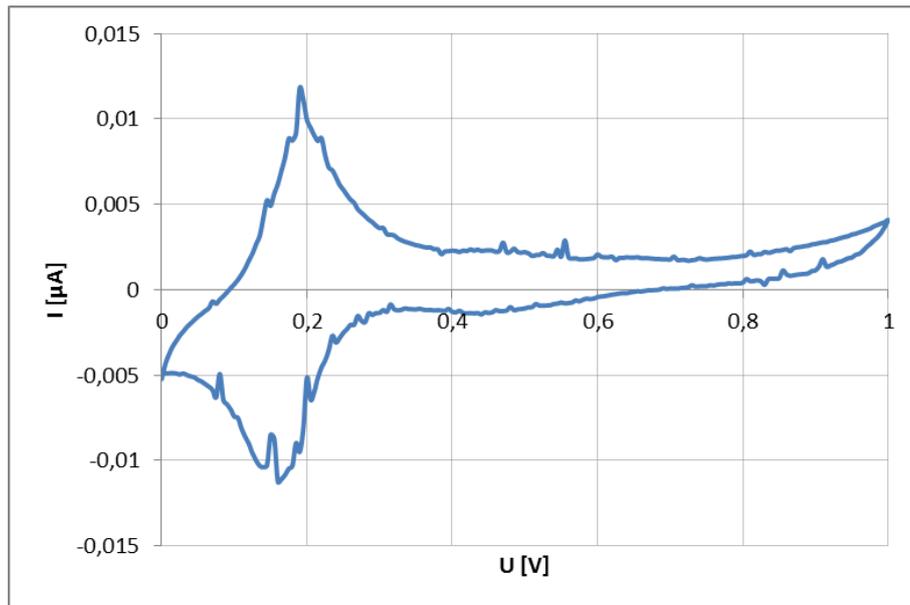


Abbildung 40: Verrauschtes elektrochemisches Signal einer mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(III) angereicherten Nafionmembran. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

c) Glutaraldehydmembranen

Für die Herstellung der Glutaraldehydmembranen wurde festes Kalium-Hexacyanoferrat(III) in 10%wt und 30%wt Anreicherungen sowie eine 0,2M bzw. 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Lösung in 1:1 (V/V) und 1:2 (V/V) Mischungen mit Glutaraldehyd vermengt.

Für keine der untersuchten Membranen konnte voltammetrisch ein Redoxsignal registriert werden (vgl. Abbildung 41)

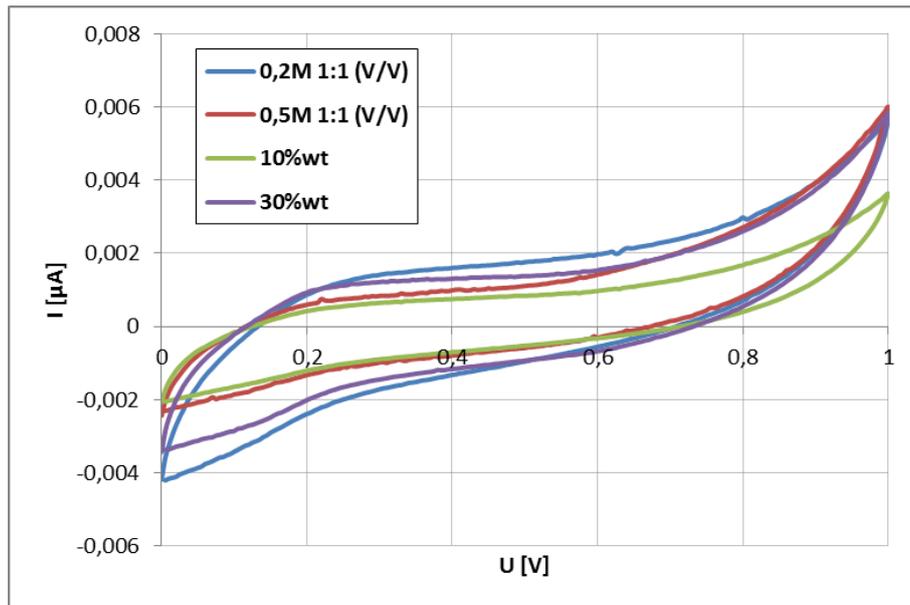


Abbildung 41: Elektrochemisches Verhalten von mit gelöstem sowie festem Kalium-Hexacyanoferrat(III) angereicherten Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

3.4 Eisen-Hexacyanoferrat(II)

a) Depositionsfilme

Wie anhand des Voltammogrammes in Abbildung 11 zu erkennen ist, besaßen die untersuchten Eisen-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme ein ausgeprägtes elektrochemisches Verhalten. Für die Charakterisierung mittels zyklischer Voltammetrie wurde ein Potentialfenster $-0,5\text{ V}$ bis $0,6\text{ V}$ ausgewählt, innerhalb welchen die modifizierten Sensoren ein klar definiertes Peakpaar im Bereich $0,19\text{ V}_{\text{ox}}$ / $-0,05\text{ V}_{\text{red}}$ zeigten.

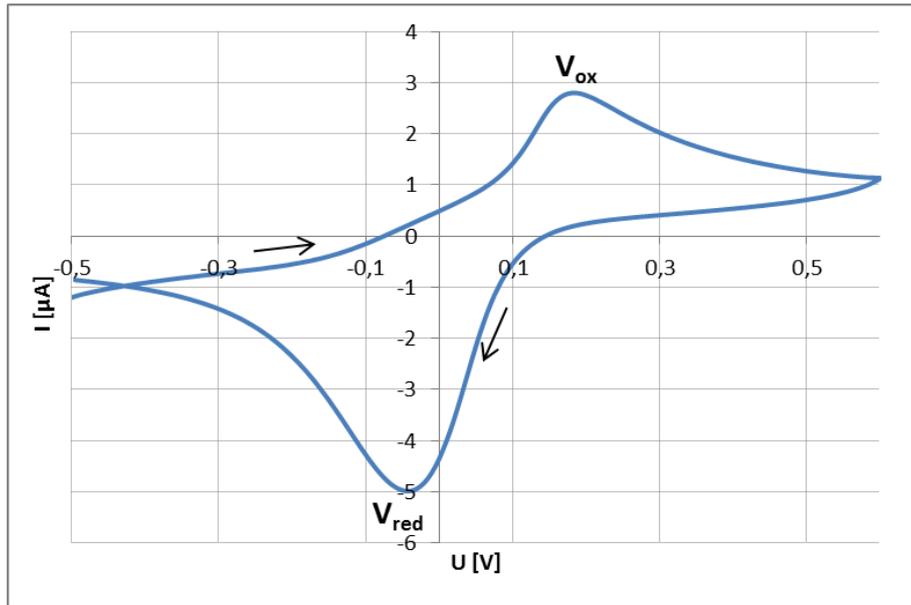


Abbildung 42: Elektrochemisches Verhalten der Eisen-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Die untersuchten Depositionsfilme zeigten bei den zyklischen Wiederholungsmessungen eine geringe Signalstabilität (siehe Abbildung 43 und Abbildung 44). Sowohl bei den luftgetrockneten als auch bei den ofengetrockneten Filmen kam es mit jedem Zyklus zu einer Abnahme der Signalintensität. Die Lufttrocknungsdauer (24h bzw. 48h) sowie die Ofentemperatur (50°C bzw. 90°C) hatten keinen Einfluss auf die Qualität des Depositionsfilmes.

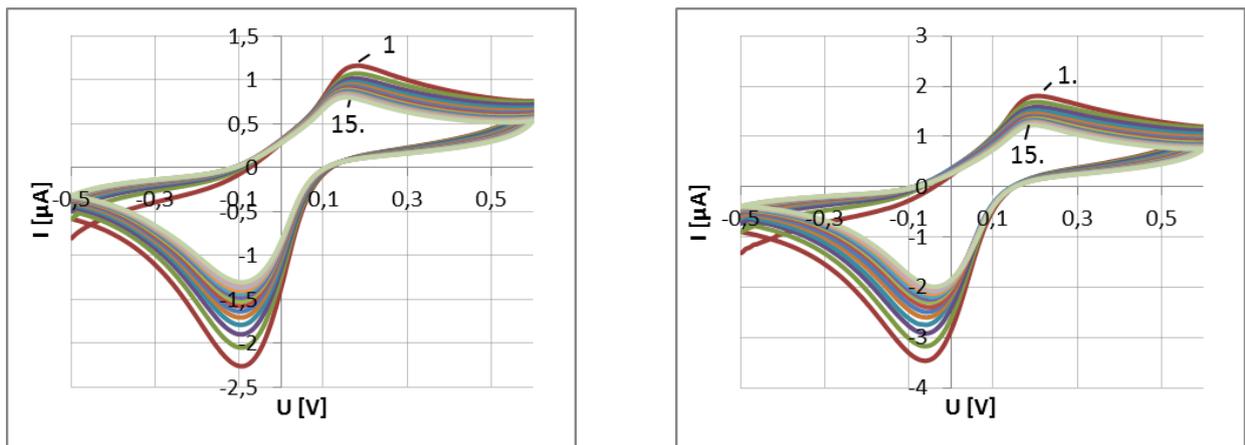


Abbildung 43: Zyklische Voltammogramme luftgetrockneter Eisen-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 24h luftgetrocknet, rechts: 48h luftgetrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

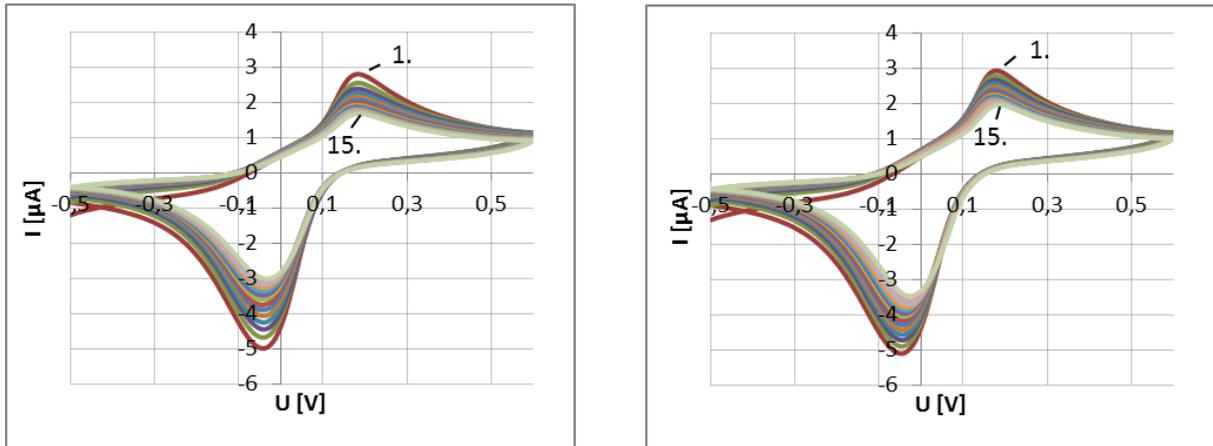


Abbildung 44: Zyklische Voltammogramme ofengetrockneter Eisen-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1h im Ofen bei 50°C getrocknet, rechts: 1h im Ofen bei 90°C getrocknet. (1 = erster Zyklus, 15 = letzter Zyklus)

In Abbildung 45 sind die Ergebnisse der elektrochemischen Deposition von Eisen-Hexacyanoferrat dargestellt. Untersucht wurde der Einfluss des Potentialfenster, der Zyklusintensität sowie des Trocknungsverfahren auf die Signalintensität des Oxidationspeaks. Pro Depositionsfilm wurden sechs Sensoren hergestellt, voltammetrisch charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet.

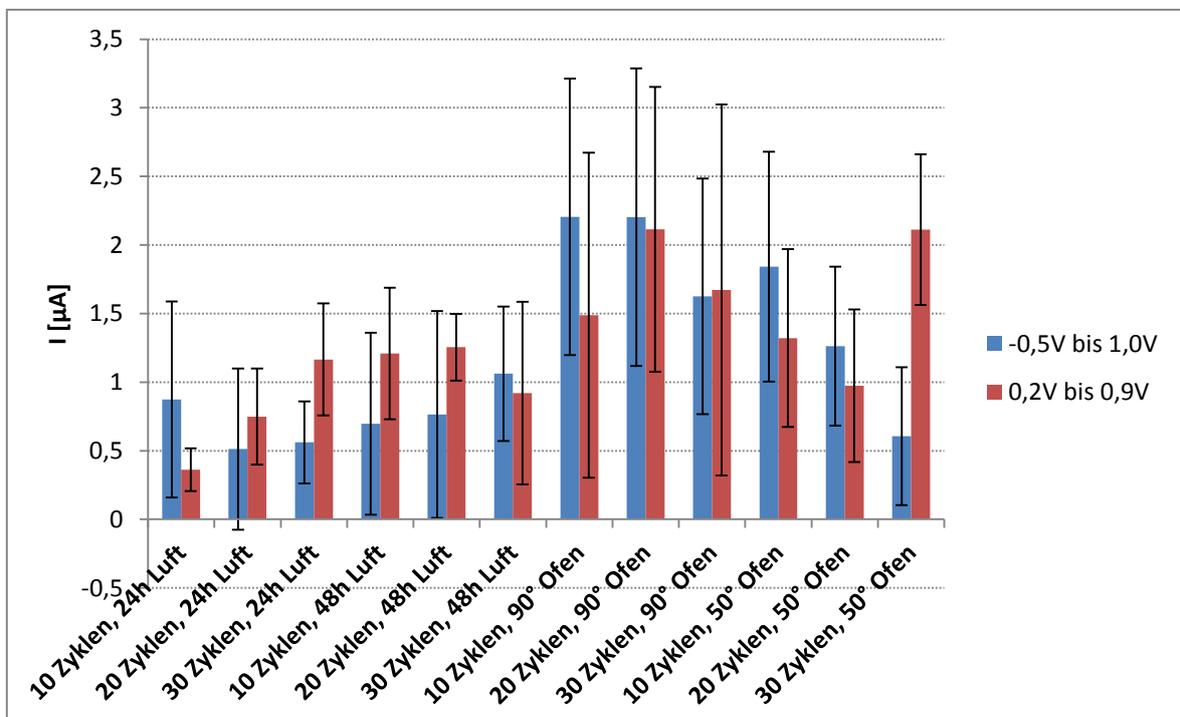


Abbildung 45: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Eisen-Hexacyanoferrat Depositionsfilms (n=6).

b) Nafionmembranen

Für die Fertigung der Nafionmembranen wurden Anreicherungen von Nafion mit festem Eisen-Hexacyanoferrat bzw. Mischungen mit einer 0,3 M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung hergestellt. Alle untersuchten Membranen zeigten bei der Charakterisierung mittels zyklischer Voltammetrie innerhalb des Potentialfenster -0,5 V bis 0,7 V ein klar definiertes Redoxpeakpaar im Bereich $0,17 \text{ V}_{\text{ox}} / -0,02 \text{ V}_{\text{red}}$.

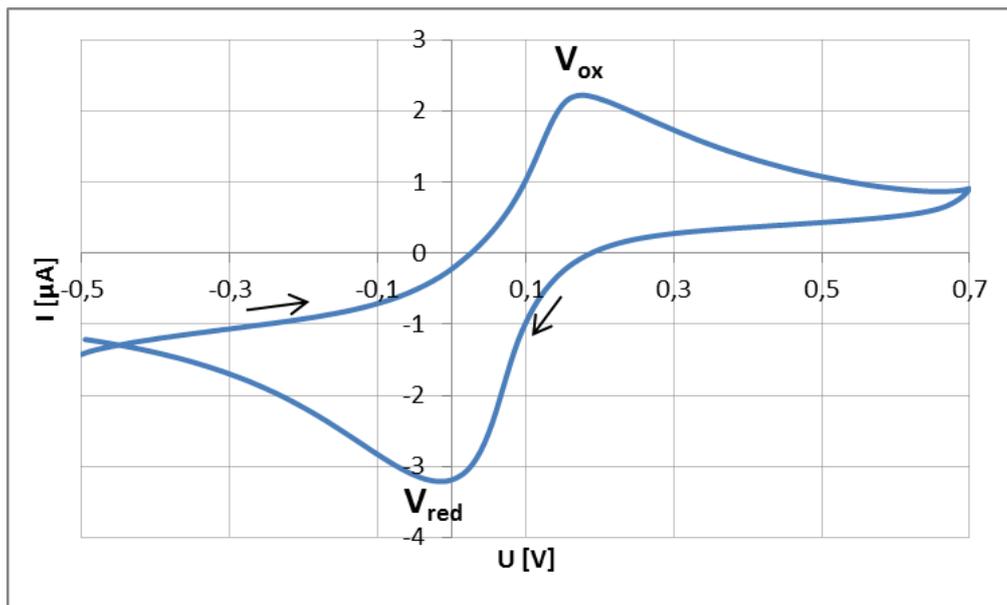


Abbildung 46: Elektrochemisches Verhalten der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Wie in Abbildung 47 zu erkennen ist, zeigten die Nafionmembranen bei den zyklischen Wiederholungsmessungen eine geringe Signalstabilität. Sowohl bei Anreicherung mit festem als auch bei Mischung mit der 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung konnte mit jedem Zyklus einer Abnahme der Signalintensität verzeichnet werden.

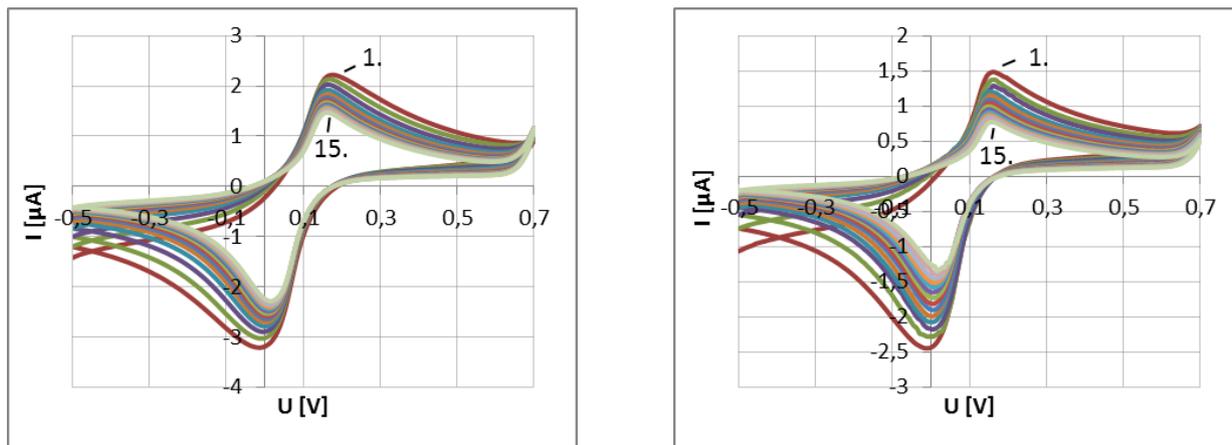


Abbildung 47: Zyklisches Voltammogramm von hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen, hergestellt aus Eisen-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Anreicherung mit festem Eisen-Hexacyanoferrat rechts: Mischung mit gelöstem Eisen-Hexacyanoferrat. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um den Einfluss der Anreicherungsform auf die Qualität der Nafionmembranen zu evaluieren, wurden sowohl für die 1:1 (V/V) und die 1:2 (V/V) Mischungen mit der 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung als auch für die 10%wt bzw. 30%wt Anreicherungen mit festem Hexacyanoferrat jeweils sechs Sensoren hergestellt, mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 48 graphisch dargestellt.

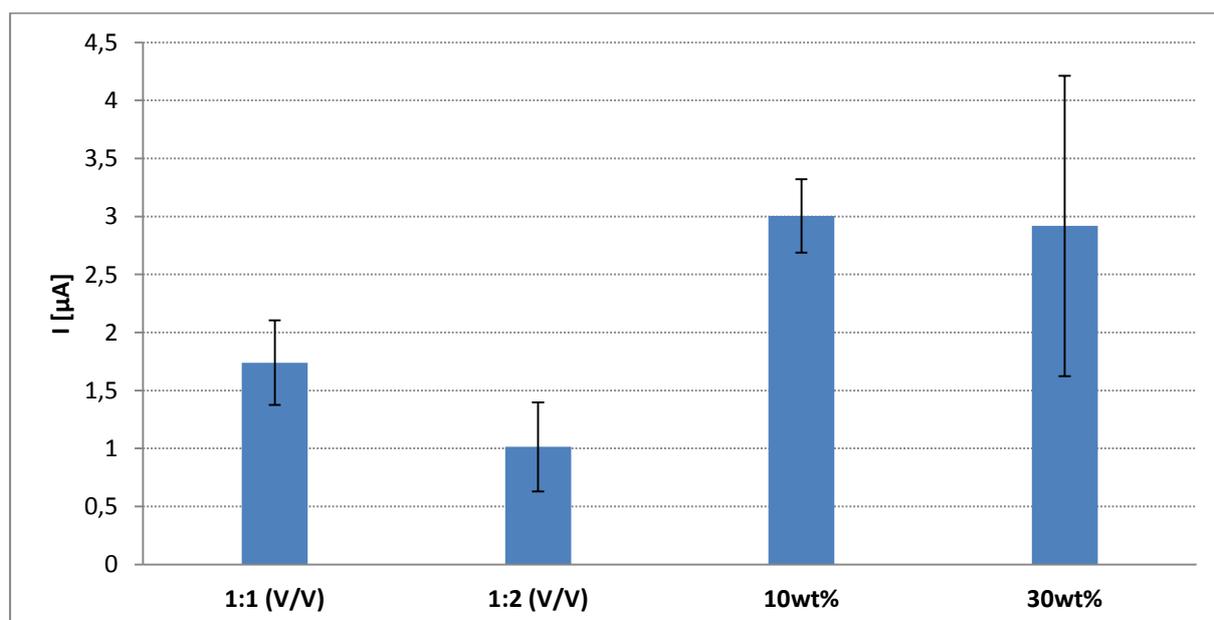


Abbildung 48: Signalintensität der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde eine 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung bzw. festes Eisen-Hexacyanoferrat mit Nafion vermengt (n=6).

c) Glutaraldehydmembranen

Für die Herstellung der Glutaraldehydmembranen wurden 10%wt bzw. 30%wt Anreicherungen mit festem Eisen-Hexacyanoferrat sowie 1:1 (V/V) und 1:2 (V/V) Mischungen mit einer 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung untersucht. Für die voltammetrische Charakterisierung der Sensoren wurde ein Potentialfenster von -0,5 V bis 0,7 V ausgewählt. Die modifizierten Sensoren bildeten im Voltammogramm ein klar definiertes Redoxpeakpaar im Bereich 0,15 V_{ox} / 0,01 V_{red} .

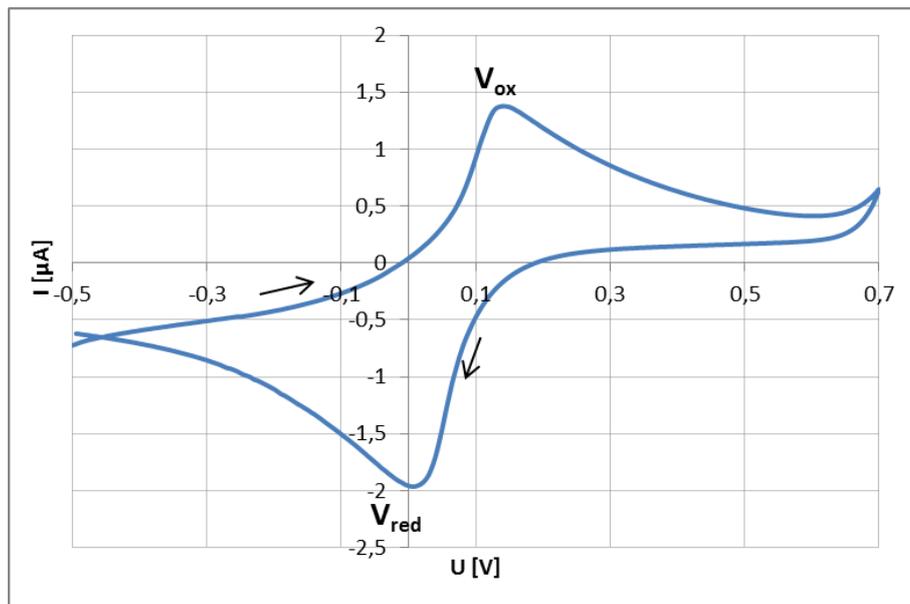


Abbildung 49: : Elektrochemisches Verhalten der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.

Membranen, die aus gelöstem Eisen-Hexacyanoferrat hergestellt wurden, zeigten bei den zyklischen Wiederholungsmessungen sowohl bei 1:1 (V/V) Mischung als auch bei 1:2 (V/V) Mischung eine gute Signalstabilität und konstante Peakpositionen über alle Zyklen (vgl. Abbildung 50). Eine ebenso gute Signalstabilität konnte bei 10%wt Anreicherungen mit festem Eisen-Hexacyanoferrat erreicht werden (siehe Abbildung 51 links). Membranen mit 30%wt Anreicherung an festem Hexacyanoferrat benötigten eine Zeit von 5-7 Zyklen, bis sich Peakposition und Signalintensität stabilisierten und konstant verliefen (siehe Abbildung 51 rechts).

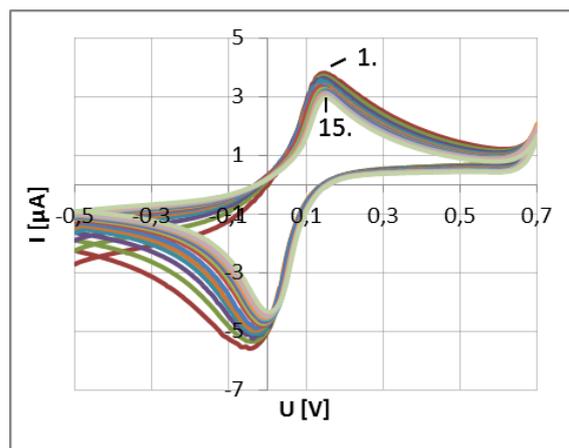
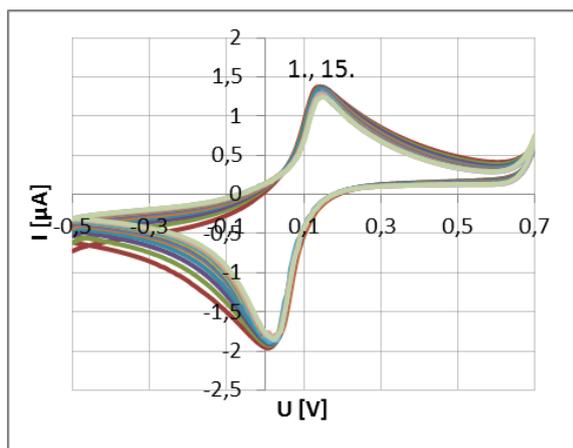


Abbildung 50: Zyklisches Voltammogramm von hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus festem Eisen-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Anreicherung mit 10%wt Eisen-Hexacyanoferrat. Rechts: Anreicherung mit 30%wt Eisen-Hexacyanoferrat. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

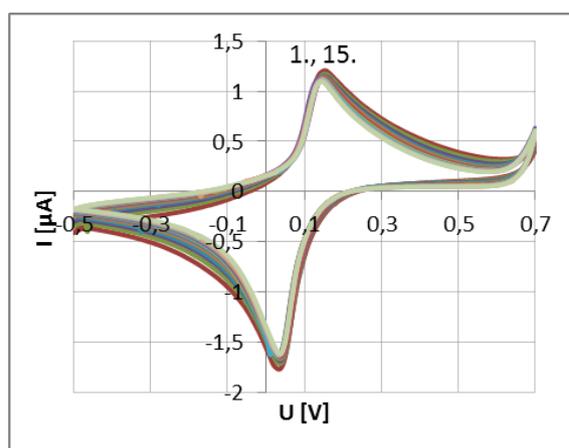
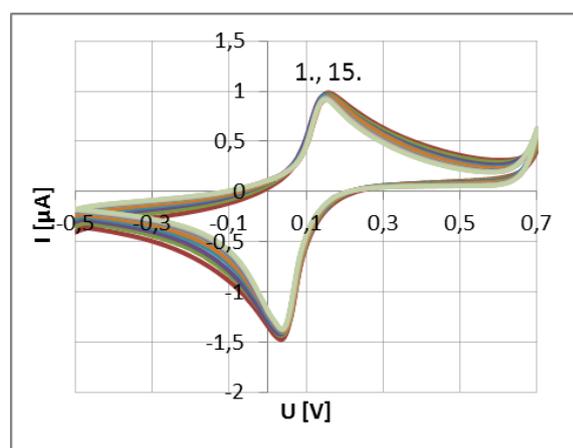


Abbildung 51: Zyklisches Voltammogramm von hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus gelöstem Eisen-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1:1 (V/V) Mischung mit 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat. Rechts: 1:2 (V/V) Mischung mit 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)

Um den Einfluss der Anreicherungsform auf die Qualität der Glutaraldehydmembrane zu evaluieren, wurden sowohl für die 1:1 (V/V) und die 1:2 (V/V) Mischungen mit der 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung als auch für die 10%wt bzw. 30%wt Anreicherungen mit festem Hexacyanoferrat jeweils sechs Sensoren hergestellt. Die modifizierten Sensoren wurden mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und Mittelwert sowie Standardabweichung der Signalintensität berechnet. Die Ergebnisse dieser Messreihe sind in Abbildung 52 graphisch dargestellt.

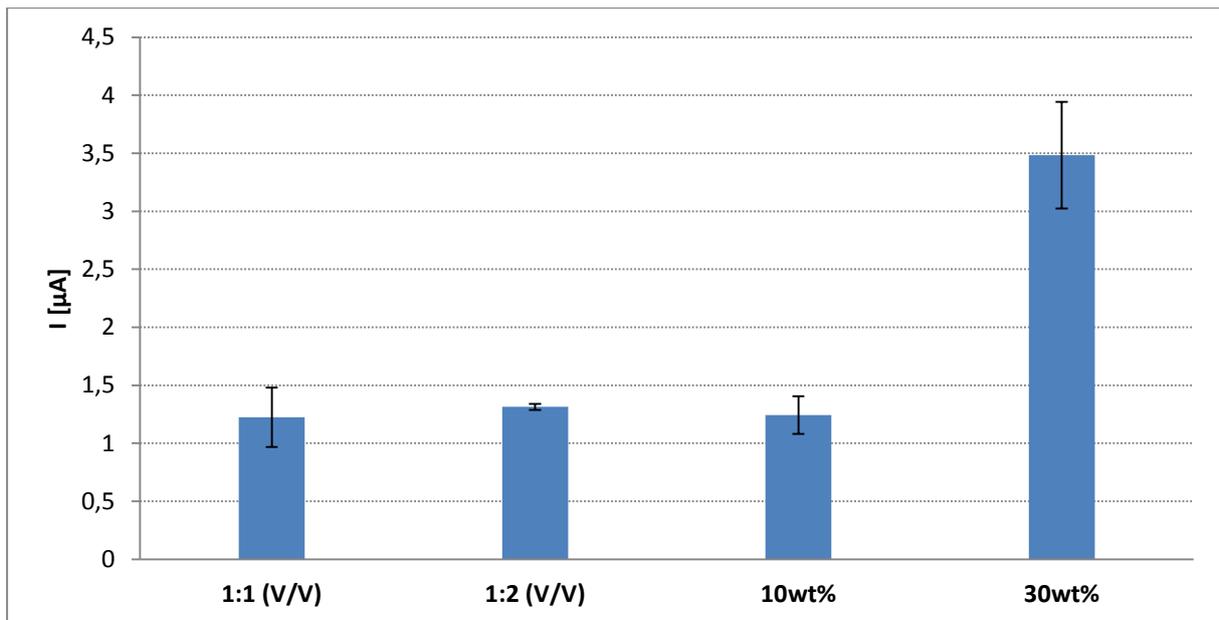


Abbildung 52: Signalintensität der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen. Für die Fertigung der Membrane wurde eine 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung bzw. festes Eisen-Hexacyanoferrat mit Glutaraldehyd vermengt (n=6).

4 DISKUSSION

4.1 Hämolyse-detektion mittels Hexacyanoferrat modifizierter Elektroden: Relevanz und Problematik

Die klassische Methode zur Bestimmung von freiem Hämoglobin im Blutplasma ist die photometrische Messung basierend auf dem charakteristischen Absorptionsverhalten des Hämoglobins. Abhängig vom verwendeten Messverfahren sind photometrische Ansätze jedoch zeitintensiv, störanfällig oder erfordern die Zugabe von toxischen Messreagenzien. Des Weiteren ist für die Quantifizierung ein relativ großes Probenvolumen (mehrere ml) notwendig.

Im Zuge dieser Arbeit wurde an der Entwicklung eines elektrochemischen Hämolyse-Teststreifens basierend auf der oxidativen Umsetzung des in der Probe befindlichen Hämoglobins durch einen Hexacyanoferrat-Film auf der Arbeitselektrode des Sensors gearbeitet. Vorteil einer elektrochemischen Hämolyse-detektion ist, dass sie kostengünstig und platzsparend in das bereits bestehende potentiometrische Kalium-Home-Monitoring System integriert werden kann. Außerdem ist für die Quantifizierung des Hämoglobins ein geringes Probenvolumen von wenigen μl ausreichend und die Quantifizierung erfolgt schneller als bei einem optischen System.

Die Qualität der Hexacyanoferrat-Filme hängt wesentlich von der verwendeten Auftragungstechnik ab. Das Hexacyanoferrat soll stabil auf der Elektrode immobilisiert werden und einen möglichst homogenen Film bilden. Der gewünschte Elektronentransport zur Elektrodenoberfläche darf dabei nicht gehemmt werden. Um ein stabiles Messsignal zu gewährleisten, sollte der Hexacyanoferrat-Film fest an der Elektrode haften und sich während der Messung nicht von der Elektrode ablösen.

4.2 Kupfer-Hexacyanoferrat(III) modifizierte Sensoren

a) Depositionsfilme

Jene Hexacyanoferrat-Filme, welche mittels elektrochemischer Deposition gefertigt wurden, zeigten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Dies ist ersichtlich an der großen Messwertstreuung (siehe Abbildung 14). Im Allgemeinen zeigten jene modifizierten Elektroden, wel-

che innerhalb des Potentialfensters -0,5 V bis 1,0 V gefertigt wurden, ein höheres Hexacyanoferratsignal als jene Elektroden, bei welchen die elektrochemische Deposition innerhalb des Potentialfensters 0,2 V bis 0,9 V durchgeführt wurde.

Das Trocknungsverfahren betreffend zeigten die bei 90°C getrocknete Depositionsfilme des Potentialfensters -0,5 V bis 1,0 V die höchsten Hexacyanoferrat-Signale (siehe Abbildung 14). Des Weiteren hatte das Trocknungsverfahren einen wesentlichen Einfluss auf die Stabilität der Depositionsfilme. Während die luftgetrockneten Filme mit jeder Zykluswiederholung eine Abnahme der Signalintensität sowie einer Verschiebung der Redoxpotentiale zeigten, wiesen die ofengetrockneten Filme einen stabilen Kurvenverlauf mit gleichbleibender Signalintensität auf (vgl. Abbildung 12 sowie Abbildung 13). Ursache für die bessere Filmstabilität der ofengetrockneten Filme könnte die bessere Entfernung von Wasserresten aus dem Depositionsfilm sein. Durch den Einschluss von Wasser in die polykristalline Struktur des Hexacyanoferrates wird die Leitfähigkeit des Komplexes verändert und die Stabilität der modifizierten Sensoren beeinflusst. Ein ähnliches, trocknungsabhängiges Verhalten wird in der Literatur für Eisen-Hexacyanoferrat modifizierte Sensoren beschrieben [58] [59].

b) Nafionmembranen

Da Kupfer-Hexacyanoferrat kommerziell nicht erhältlich ist, wurde es im Labor durch Fällung eines Kupfersalzes mit Hexacyanoferrat gefertigt. Um zu evaluieren, ob die Kupferquelle einen Einfluss auf das elektrochemische Verhalten der Membran hat, wurde das Kupfer-Hexacyanoferrat aus zwei verschiedenen Fällungsreaktionen gewonnen: Einerseits durch die Fällung aus Kalium-Hexacyanoferrat(III) und Kupferchlorid nach der Formel:



Des Weiteren wurde Kupfer-Hexacyanoferrat untersucht, welches aus Kalium-Hexacyanoferrat(III) und Kupfersulfat ausgefällt wurde. Die Fällungsreaktion folgt der Formel:



Das hergestellte Kupfer-Hexacyanoferrat wurde dann in fester sowie gelöster Form mit Nafion vermengt und auf die Arbeitselektrode getropft.

Zwischen den beiden Kupferquellen konnte bei den voltammetrischen Untersuchungen kein wesentlicher Unterschied im elektrochemischen Verhalten oder der Signalstabilität der Membranen festgestellt werden. Die Anreicherungsform des Kupfer-Hexacyanoferrates hatte jedoch einen wesentlichen Einfluss auf die Signalqualität. Die besten Ergebnisse zeigten jene Nafionmembranen, welche mit festem Kupfer-Hexacyanoferrat angereichert wurden. Sowohl bei 10%wt als auch bei 30%wt Anreicherung konnten bei den zyklischen Wiederholungsmessungen stabile Kurvenverläufe mit konstanter Signalintensität und gleichbleibenden Peakpositionen beobachtet werden (vgl. Abbildung 16). Die höchste Signalintensität (13,05 μA , Mittelwert aus $n=6$) konnte mit der 30%wt Anreicherung an Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupfersulfat erreicht werden (siehe Abbildung 18). Alle hergestellten Membranen wiesen jedoch eine geringe Reproduzierbarkeit mit Variationskoeffizienten $>20\%$ auf. Ursache hierfür könnte die geringe Löslichkeit des festen Kupfer-Hexacyanoferrates in Nafion gewesen sein. Die beiden Membranbestandteile bildeten eine schnell sedimentierende Suspension, welche eine gleichmäßige Aufbringung der Membran auf die Arbeitselektrode erschwerte.

Nafionmembranen, welche aus einer 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung hergestellt wurden, zeigten bei den voltammetrischen Wiederholungszyklen eine geringe Signalstabilität. Sowohl bei 1:1 (V/V) als auch bei 1:2 (V/V) Mischung konnte in den zyklischen Voltammogrammen kein stabiler Signalverlauf beobachtet werden. Vor allem im Bereich des Oxidationspeaks kam es im Verlauf der Messung zu einer Zunahme der Peakhöhe sowie einer Verschiebung des Oxidationspotentials (siehe Abbildung 17). Die höchste Signalintensität (2,4 μA , Mittelwert aus $n=6$) konnte mit einer 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung gefällt aus Kupferchlorid in einer 1:1 (V/V) Mischung mit Nafion erreicht werden (vgl. Abbildung 18). Diese Membranen wiesen eine große Messwertstreuung auf (Variationskoeffizient von 35,12%). Eine niedrigere Signalintensität, aber eine wesentlich bessere Reproduzierbarkeit ($0,53 \mu\text{A} \pm 9,64\%$) besaßen Membranen aus einer 1:2 (V/V) Mischung von Nafion mit einer 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung aus Kupferchlorid. Eine ähnlich gute Reproduzierbarkeit zeigten die Membranen aus einer 1:1 (V/V) Mischung von Nafion mit einer 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung aus Kupfersulfat ($1,6 \mu\text{A} \pm 8,39\%$). Ähnlich festem Kupfer-Hexacyanoferrat besaß gelöstes Kupfer-Hexacyanoferrat eine geringe Mischbarkeit mit Nafion und bildete mit der Membranmatrix eine Emulsion.

c) Glutaraldehydmembranen

Analog zu den Nafionmembranen wurde auch bei den Glutaraldehydmembranen Anreicherungen mit Kupfer-Hexacyanoferrat gefällt aus Kupferchlorid und aus Kupfersulfat untersucht. Die besten Ergebnisse wurden mit Hexacyanoferrat aus Kupfersulfat erzielt, welches als 0,1M Lösung im Verhältnis 1:1 (V/V) mit Glutaraldehyd vermischt wurde. Diese Membranen hatten eine im Verhältnis zu den andere Membranen niedrige Signalintensität ($3,19 \mu\text{A} \pm 11,6\%$, $n=6$), zeigten aber eine gute Signalstabilität während der zyklischen Wiederholungsmessungen (vgl. Abbildung 21 rechts). Eine ähnlich gute Signalstabilität zeigten jene Membranen, die im Verhältnis 1:2 (V/V) mit einer 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung aus Kupfersulfat gemischt wurden. Diese Glutaraldehydmembranen zeigten jedoch eine hohe Messwertstreuung der Signalintensität ($2,47 \mu\text{A} \pm 38,1\%$, $n=6$).

Alle anderen getesteten Glutaraldehydmembranen wiesen eine geringe Signalstabilität auf. Jene Glutaraldehydmembranen, welche mit einer 0,1M Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösung aus Kupferchlorid hergestellt wurden, zeigten bei den zyklisch voltammetrischen Wiederholungsmessungen eine kontinuierliche Abnahme der Peakhöhe (siehe Abbildung 21 links). Ein ähnliches Verhalten zeigten die 10%wt bzw. 30%wt Anreicherungen mit festem Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupferchlorid, wenngleich der Intensitätsverlust zwischen den Zyklen hier weniger stark ausgeprägt war vgl. Abbildung 20 links). Genau das gegenteilige Filmverhalten zeigten Glutaraldehydmembranen aus festem Kupfer-Hexacyanoferrat, welche aus Kupfersulfat hergestellt wurden. Hier kam es mit jedem Zyklus zu einem Anstieg der Signalintensität und einer Verschiebung der Peakpositionen hin zu positiveren Werten (vgl. Abbildung 20 rechts).

Festes Kupfer-Hexacyanoferrat besaß in Glutaraldehyd eine gute Löslichkeit. Die Kupfer-Hexacyanoferrat-Lösungen ließen sich ebenfalls mit Glutaraldehyd gut mischen.

4.3 Kalium-Hexacyanoferrat(II) modifizierte Sensoren

a) Depositionsfilme

Die Depositionsfilme aus Kalium-Hexacyanoferrat(II) zeigten wenig reproduzierbare Signale. Dies äußerte sich durch die hohe Messwertstreuung der untersuchten Depositionsfilme so-

wie ihrer niedrigen Signalintensitäten (vgl. Abbildung 25). Bei einigen Sensoren trotz standardisierter Herstellungsbedingungen kein Redoxsignal auf.

Modifizierte Sensoren, welche trotz elektrochemischer Deposition kein messbares Redoxverhalten zeigten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Bei jenen modifizierten Sensoren, welche innerhalb des Potentialfenster 0,2 V bis 0,9 V mit 10 bzw. mit 30 Zyklusdurchläufen hergestellt und anschließend bei 50°C im Ofen bzw. 48h an der Luft getrocknet wurden, konnte bei keinem der untersuchten Sensoren voltammetrisch ein Redoxsignal registriert werden. Das gleiche Verhalten zeigten jene Sensoren, welche innerhalb des Potentialfensters -0,5 V bis 1,0 V mit 10 Zyklusdurchläufen hergestellt und anschließend für 48h luftgetrocknet wurden.

b) Nafionmembranen

Anreicherungen aus Nafion und festem Kalium-Hexacyanoferrat(II) zeigten ebenso wie Membranzmischungen mit einer 0,5M Hexacyanoferrat(II)-Lösung eine hohe Messwertstreuung (Variationskoeffizienten > 30%) und Signalabnahmen während den zyklischen Messungen (vgl. Abbildung 28 bis Abbildung 30). Zusätzlich konnte während den Messungen beobachtet werden, wie sich die untersuchten Membranen von der Arbeitselektrode ablösten. Dies deutet auf eine geringe Haftfähigkeit der Membranen hin und könnte die Ursache für das instabile Verhalten während den voltammetrischen Messungen gewesen sein.

Nafionmembranen, welche mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(II) angereichert wurden, zeigten im Voltammogramm zwei Redoxpeaks im Bereich 0,15 V_{ox} / 0,12 V_{red} sowie 0,43 V_{ox} / 0,4 V_{red} (siehe Abbildung 26). Membranen, welche mit einer 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung hergestellt wurden, zeigten im Voltammogramm einen Redoxpeak im Bereich 0,23 V_{ox} / 0,18 V_{red} (vgl. Abbildung 27). Dies deutet darauf hin, dass die Anreicherungsform von Kalium-Hexacyanoferrat(II) ein Einflussfaktor für das elektrochemische Verhalten der Membran ist. Die genauen chemischen Abläufe müssen jedoch in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Aufgrund ihrer niedrigen Signalstabilität und hohen Messwertstreuung eignet sich keine der untersuchten Nafionmembranen als Modifikator für die Arbeitselektrode.

c) Glutaraldehydmembranen

Die hergestellten Glutaraldehydmembranen bildeten sowohl bei Anreicherung mit festem als auch bei Mischung mit einer 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung einen schlecht definierten Redoxpeak im Bereich $0,18 V_{ox} / 0,09 V_{red}$. Wie schon bei den Nafionmembranen konnte auch bei den Glutaraldehydmembranen während den Messungen ein Ablösen der Membranen von der Arbeitselektrode beobachtet werden. Dies deutet auf eine geringe Haftfähigkeit der Membranen hin. Dies könnte auch die Ursache für die hohe Messwertstreuung der Membranen (Variationskoeffizienten $> 40\%$) und den Verlust an Signalintensität während den voltametrischen Wiederholungszyklen gewesen sein (vgl. Abbildung 32 bis Abbildung 34).

Aufgrund ihrer niedrigen Signalstabilität und hohen Messwertstreuung sind die untersuchten Kalium-Hexacyanoferrat(II)haltigen Glutaraldehydmembranen als Modifikator für die Hämoglobinmessung nicht geeignet.

4.4 Kalium-Hexacyanoferrat(III) modifizierte Sensoren

a) Depositionsfilme

Sensoren, welche mittels elektrochemischer Deposition mit Kalium-Hexacyanoferrat(III) modifiziert wurden, zeigten in Abhängigkeit von dem verwendeten Trocknungsverfahren unterschiedliche Ergebnisse. Die besten Ergebnisse zeigten jene Depositionsfilme, welche bei 90°C im Ofen getrocknet wurden. Diese bildeten klar abgegrenzte und definierte Redoxkurven mit guter Signalstabilität (vgl. Abbildung 36). Für alle anderen Trocknungsverfahren (24h Luft, 48h Luft sowie 50°C Ofen) konnten keine stabilen Signale erzielt werden. Diese Sensoren zeigten mit jeder Zykluswiederholung Signalabnahmen und eine Verschiebung der Peakpositionen hin zu niedrigeren Redoxpotentialen. Des Weiteren zeigten nicht alle der modifizierten Sensoren ein Redoxverhalten im Voltammogramm.

Alle untersuchten Depositionsfilme wiesen eine geringe Reproduzierbarkeit ihrer Redoxaktivität mit hoher Messwertstreuung der Signalintensität auf (vgl. Abbildung 38). Für das Potentialfenster 0,2 V bis 0,9 V konnte für eine Zyklusanzahl von 10 Zyklen bei 24h lufttrocknen, 30 Zyklen bei 48h lufttrocknen sowie 30 Zyklen bei 50°C Ofen bei keinem der modifi-

zierten Sensoren voltammetrisch ein Redoxverhalten beobachtet werden. Die Sensoren wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

b) Nafionmembranen

Die Mischung von Nafion mit gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(III) bildet eine zähflüssige Membranflüssigkeit, welche schwer auf die Arbeitselektrode dispensiert werden konnte. Es wurden sowohl Mischungen mit einer 0,2M als auch Mischungen mit einer 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(III) Lösung untersucht. Für beide Konzentrationen konnte sowohl bei 1:1 (V/V) als auch bei 1:2 (V/V) Mischung mit Nafion kein messbares Redoxsignal bei der voltammetrischen Validierung der Membranen festgestellt werden. Eine höhere molare Konzentration (>0,5M) der Hexacyanoferrat-Lösung konnte nicht verwendet werden, da diese in Kombination mit Nafion eine dickflüssige, nicht dispensierbare Membranflüssigkeit bildet. Aufgrund der problematischen Verarbeitung und der fehlenden Redoxaktivität eignet sich diese Membranart nicht als Modifikator für die Hämolysemessung.

Die Nafionmembranen mit 10%wt bzw. 30%wt Anreicherung an festem Kalium-Hexacyanoferrat(III) zeigten in ihren Voltammogrammen eine Redoxaktivität. Die Membranen zeigten jedoch ein schlechtes elektrochemisches Signal mit hohem Signalrauschen und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

c) Glutaraldehydmembranen

Die Mischung von Glutaraldehyd mit gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(III) zeigte ein ähnliches elektrochemisches Verhalten wie die zuvor beschriebenen Nafionmembranen. Weder bei Mischung mit einer 0,2M noch bei Mischung mit einer 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(III) Lösung konnte voltammetrisch ein Redoxverhalten der Membranen beobachtet werden.

Ein ähnliches elektrochemisches Verhalten zeigt die Anreicherung von Glutaraldehyd mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(III). Die vermessenen Membranen zeigten sowohl bei 10%wt als auch bei 30%wt Anreicherung kein voltammetrisch erfassbares Redoxsignal.

4.5 Eisen-Hexacyanoferrat(II) modifizierte Sensoren

Die im Zuge dieser Arbeit charakterisierten Eisen-Hexacyanoferrat modifizierten Sensoren zeigten bei Wahl eines breiten voltammetrischen Potentialfensters (-0,5 V bis 1,5 V) zwei

Redoxpeaks. Beide Peakpaare zeigten bei den zyklischen Wiederholungsmessungen eine geringe Signalstabilität mit sinkender Peakhöhe und Verschiebung der Peakpositionen (vgl. Abbildung 53). Ein analoges Verhalten wird in der Literatur für Eisen-Hexacyanoferrat modifizierte Goldelektroden beschrieben [60]. Ursache für dieses Verhalten ist vermutlich die bei höheren Potentialen stattfindende Oxidation des Hexacyanoferrates in einen wasserlöslichen Komplex, wodurch es während der zyklischen Scans zu einer kontinuierlichen Auflösung des Eisen-Hexacyanoferrat-Filmes kommt [60].

Aus diesem Grund wurde das Potentialfenster für die voltammetrische Charakterisierung der mit Eisen-Hexacyanoferrat modifizierten Elektroden verkleinert und so ausgewählt, dass die Redoxaktivität des Peakpaares im Bereich $0,15 \text{ V}_{\text{ox}} / -0,2 \text{ V}_{\text{red}}$ erfasst wurde. Alle nachfolgend aufgeführten Beobachtungen und Messresultate beziehen sich auf dieses Peakpaar.

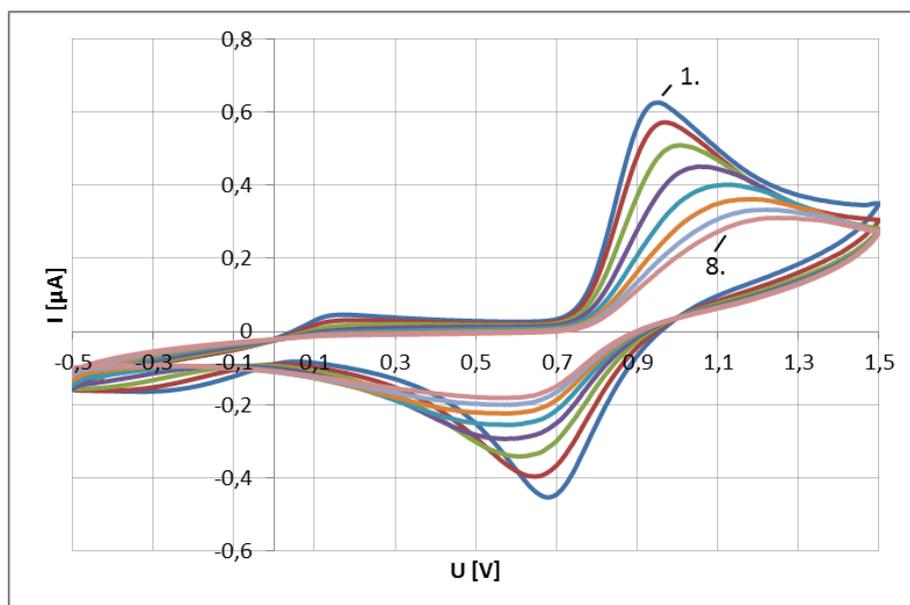


Abbildung 53: Elektrochemisches Verhalten von Eisen-Hexacyanoferrat modifizierten Sensoren. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl bei einem Potentialfenster von -0,5 V bis 1,5 V für 8 Zyklen. (1. = erster Zyklus, 8. = letzter Zyklus)

a) Depositionsfilme

Trotz standardisierter Herstellungsbedingungen zeigten die Depositionsfilme mit Eisen-Hexacyanoferrat eine große Messwertstreuung ihrer Signalintensität (vgl. Abbildung 45). Des Weiteren besaßen die untersuchten Depositionsfilme eine geringe Signalstabilität, welche sich durch Verluste der Peakhöhe während den voltammetrischen Wiederholungszyklen bemerkbar machte. Anders als in der Literatur für Eisen-Hexacyanoferrat modifizierte Senso-

ren beschrieben [58] [59], konnte für die untersuchten Sensoren kein Einfluss der Trocknungstemperatur auf die Signalstabilität festgestellt werden.

b) Nafionmembranen

Im Zuge der voltammetrischen Charakterisierung von Eisen-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen wurde Nafion mit festem bzw. suspendiertem Eisen-Hexacyanoferrat angereichert. Für die Fertigung der Nafionmembranen wurde zunächst eine wässrige 0,5M Eisen-Hexacyanoferrat-Suspension hergestellt. Diese besaß eine pastenartige Konsistenz und verhinderte eine kontrollierte Dosierung der Membranmenge. Daher wurde die Konzentration reduziert und die Membranen aus einer besser handhabbaren 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Suspension hergestellt. Sowohl die 1:1 (V/V) als auch die 1:2 (V/V) Membranmischungen mit der Hexacyanoferrat-Suspension zeigten eine niedrige Signalstabilität mit sinkender Peakhöhe bei jeder Zykluswiederholung (vgl. Abbildung 47). Zudem zeigten die Membranen eine geringe Reproduzierbarkeit bei durchschnittlichen Signalintensitäten von $1,74 \mu\text{A} \pm 20,94\%$ bei 1:1 (V/V) Mischung bzw. $1,01 \mu\text{A} \pm 37,89\%$ bei 1:2 (V/V) Mischung (n=6).

Nafionmembranen mit 10%wt Anreicherung an festem Eisen-Hexacyanoferrat besaßen eine gute Signalintensität mit guter Reproduzierbarkeit ($3\mu\text{A} \pm 10,5\%$, n=6). Bei den zyklischen Wiederholungsmessungen zeigten die Membranen eine geringe Signalstabilität, welche sich in der Abnahme der Peakhöhen äußerte (siehe Abbildung 47). Die Anreicherung von 30%wt festem Hexacyanoferrat resultierte in einer dickflüssigen, inhomogenen Membranlösung. Verglichen mit der 10%wt Membran führte die 30%wt Anreicherung zu keinem Signalgewinn ($2,92\mu\text{A}$, n=6), während die Messwertstreuung aufgrund der schlechteren Dispensierbarkeit der Membran zunahm (Variationskoeffizient von 44,35%) (vgl. Abbildung 48).

c) Glutaraldehydmembranen

Analog zu den Nafionmembranen wurden für die voltammetrische Charakterisierung der Glutaraldehydmembranen verschiedene Membrananreicherungen mit festem Eisen-Hexacyanoferrat sowie Mischungen mit einer 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Suspension hergestellt. Alle untersuchten Glutaraldehydmembranen zeichneten sich durch ihre gute Signalstabilität mit stabiler Peakhöhe während den zyklischen Messungen aus (siehe Abbildung 50 und Abbildung 51). Die 1:1 (V/V) Mischung von Glutaraldehyd mit der Eisen-

Hexacyanoferrat-Suspension zeigte eine durchschnittliche Signalintensität von $1,22\mu\text{A} \pm 20,82\%$ ($n=6$). Die Reduktion der Membrankonzentration auf 1:2 (V/V) führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit bei gleicher Signalintensität ($1,31\mu\text{A} \pm 1,99\%$). Die Membranlösung war im Vergleich zur 1:1 (V/V) Mischung dünnflüssiger und konnte gleichmäßiger auf die Arbeitselektrode dispensiert werden. Beide Membranarten zeigten bei den zyklischen Wiederholungsmessungen eine gute Signalstabilität mit konstanten Peakhöhen und Peakpositionen (vgl. Abbildung 51).

Eine ebenso gute Signalstabilität besaßen die Membranen mit 10%wt Anreicherung an festem Eisen-Hexacyanoferrat. Ihre Signalintensität betrug $1,24\mu\text{A} \pm 13,09\%$ ($n=6$). Die höchste Signalintensität ($3,49\mu\text{A} \pm 13,19\%$, $n=6$) aller untersuchten Glutaraldehydmembranen konnte mit einer 30%wt Anreicherung an festem Hexacyanoferrat erreicht werden. Im Vergleich zu der 10%wt Anreicherung besaßen diese Membranen jedoch eine geringere Signalstabilität. Die Membranen zeigten über die ersten 5-7 Wiederholungszyklen einen leichten Signalverlust, bevor sich der Kurvenverlauf stabilisierte und die Signalintensität konstant blieb (siehe Abbildung 50).

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Freies Hämoglobin im Blutplasma stellt einen direkten Indikator für das Auftreten von Hämolyse während Blutabnahmen dar. Hexacyanoferrat oxidiert das Eisen des Hämoglobins und ermöglicht so eine elektrochemische Quantifizierung des Hämoglobins in der Probe. Ziel dieser Arbeit war es, unterschiedliche Hexacyanoferrat-Filme als mögliche Modifikatoren für die Arbeitselektrode eines Hämolyse-Teststreifens zu untersuchen. Die Analysen wurden mit vier verschiedenen Hexacyanoferraten durchgeführt: Kupfer-Hexacyanoferrat(III), Kalium-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(III) sowie Eisen-Hexacyanoferrat(II). Für die Aufbringung der Hexacyanoferrate auf die Arbeitselektrode wurden zwei Techniken validiert: Einerseits die elektrochemische Deposition des Hexacyanoferrates mittels zyklischer Voltammetrie. Ferner wurde die Modifizierung der Arbeitselektrode mittels hexacyanoferrathaltigen Membranen mit Nafion bzw. Glutaraldehyd als Membranmatrix untersucht. Die modifizierten Sensoren wurden mittels zyklischer Voltammetrie charakterisiert und Mittelwert sowie Messwertstreuung ($n = 6$) der Signalintensität berechnet. Zusätzlich wurde die Qualität der Modifikationstechnik anhand der Signalstabilität beurteilt.

Die Aufbringungstechnik und das verwendete Hexacyanoferrat sind zwei wesentliche Einflussfaktoren auf das elektrochemische Verhalten der modifizierten Sensoren. Die beste Modifikation konnte mit Eisen-Hexacyanoferrat erreicht werden, welches in fester bzw. gelöster Form in Glutaraldehydmembranen angereichert wurde. Diese Membranen zeichnen sich durch ihre hohe Signalstabilität und gute Reproduzierbarkeit aus und eignen sich als Modifikator für die Arbeitselektrode. Ähnlich gute Ergebnisse bezüglich Signalstabilität und Reproduzierbarkeit zeigte Kupfer-Hexacyanoferrat, welches aus Kupfersulfat ausgefällt wurde und in gelöster Form im Verhältnis 1:1 (V/V) in Glutaraldehydmembranen angereichert wurde. Auch diese Membran eignet sich als möglicher Modifikator für die Arbeitselektrode des Teststreifens. Eine gute Signalstabilität zeigten Nafionmembranen, welche mit festem Kupfer-Hexacyanoferrat angereichert wurden. Diese Membranen wiesen jedoch eine niedrige Reproduzierbarkeit mit Variationskoeffizienten >20% auf. Kupfer-Hexacyanoferrat bildet mit Nafion eine schnell sedimentierende Suspension, wodurch eine kontrollierte Dosierung der Membran auf die Arbeitselektrode erschwert wird. Möglicherweise könnte hier eine Optimierung des Auftragsprozesses eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit mit sich bringen.

Für Kalium-Hexacyanoferrat(II) sowie Kalium-Hexacyanoferrat(III) konnte keine der untersuchten Nafion- bzw. Glutaraldehydmembranen zufriedenstellende Ergebnisse erzielen. Diese Membranen waren entweder problematisch in ihrer Verarbeitung oder zeigten ein instabiles oder fehlendes Redoxverhalten. Möglicherweise könnte bei diesen Sensoren eine Verbesserung der Membranperformance erreicht werden, wenn die Verarbeitung der Membran in zwei Schritten erfolgt: Im ersten Schritt wird das gelöste Kalium-Hexacyanoferrat auf die Arbeitselektrode dispensiert. Nach Trocknung des Hexacyanoferrat-Filmes wird im zweiten Schritt die Membranmatrix (Nafion oder Glutaraldehyd) auf die Elektrode dispensiert und ebenfalls getrocknet. Dadurch entsteht eine aus zwei Schichten bestehende Membran, deren Homogenität nicht mehr von der Löslichkeit des Hexacyanoferrats in der Membranmatrix abhängig ist.

Die elektrochemische Deposition der Hexacyanoferrate ist aufgrund der unzureichenden Reproduzierbarkeit nicht für die Anwendung am Hämolyse-Teststreifen geeignet. Die Depositionsfilme aller vier untersuchten Hexacyanoferrate zeigten trotz standardisierter Depositionsbedingungen eine hohe Messwertstreuung ihrer Signalintensität. Grund hierfür könnte

die Oberflächenbeschaffenheit der siebgedruckten Kohlenstoff-Arbeits Elektrode sein. Durch Rauheit ist die Oberfläche der Arbeitselektroden nicht gleich groß, wodurch eine einheitliche Abscheidung des Hexacyanoferrats nicht möglich ist.

Um die Reaktion der modifizierten Sensoren mit Hämoglobin zu validieren, sollte im nächsten Entwicklungsschritt eine voltammetrische Charakterisierung unter Zugabe von Hämoglobin durchgeführt werden. Auf Basis dieser Ergebnisse ist schließlich die Umsetzung einer amperometrischen Messung des freien Hämoglobins im Blutplasma geplant.

Um eine Bestimmung des Hämolysegrads auf Basis des freien Hämoglobins im Blutplasma zu ermöglichen, ist eine Abtrennung von Erythrozyten und anderen Blutbestandteilen aus der Blutprobe notwendig. Ein zukünftiger Entwicklungsschritt umfasst die Systemintegration des im Zuge der Masterarbeit von DI Daniel Machold („Mikrofluidik Design auf Einmalteststreifen für ein Kalium Home Monitoring System“) entwickelten Plasmaseparationsverfahren auf Einmalteststreifen.

Nach erfolgreicher Umsetzung der elektrochemischen Hämolyse detektion ist die Systemintegration in das vorhandene, potentiometrische Kalium-Home-Monitoring System vorgesehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Schrezenmeier H, Heimpel H. : Hämolyse diagnostik und Differentialdiagnose hämolytischer Anämien. *Internist (Berl)*. 12: 1273–1289 (1998)
- [2] Sharp MK, Mohammad SF. : Scaling of hemolysis in needles and catheters. *Ann. Biomed. Eng.* 26: 788–797 (1998)
- [3] Global Preanalytical Scientific Committee. : Factors affecting haemolysis. URL: <http://www.specimencare.com/main.aspx?cat=711&id=3031>
- [4] Lippi G, Salvagno GL, et al. : Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44: 311–316 (2006)
- [5] Lippi G, Blanckaert N, et al. : Haemolysis: An overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46: 764–772 (2008)
- [6] Schmidt R, Lang F, et al. : Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 29. Auflag. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Medizin Verlag; (2005).
- [7] Lothar T. : Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 8. Auflage. TH-Books; (2012).
- [8] Barcellini W, Fattizzo B. : Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis. Markers* 2015: 1–7 (2015)
- [9] Lang F, Lang P. : Basiswissen Physiologie. 2. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; (2007).
- [10] Linnemann M, Kühl M. : Biochemie für Mediziner. 7. Auflage. Berlin - Heidelberg: Springer Verlag; (2005).
- [11] Malinauskas R a. : Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artif. Organs* 21: 1255–1267

(1997)

- [12] Fairbanks VF, Ziesmer SC, et al. : Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clin. Chem.* 38: 132–140 (1992)
- [13] Tapernon K, Zander R, et al. : -- Qualitätskontrolle der Hämolyserate von Erythrozytenkonzentraten: Ringversuch zur Bestimmung von freiem Hämoglobin. *Fachzeitschrift für Anästhesiologie, Intensivmed. Notfallmedizin und Schmerztherapie* 36: 45–50 (2001)
- [14] Zwart A, van Assendelft OW, et al. : Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J. Clin. Pathol.* 49: 271–274 (1996)
- [15] Bain BJ, Huhn D. : Roche Grundkurs hämatologische Morphologie. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag; (1997).
- [16] Moore GL, Ledford ME, et al. : A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl. *Biochem. Med.* 26: 167–173 (1981)
- [17] Harboe M. : A Method for Determination of Hemoglobin in Plasma by Near-Ultraviolet Spectrophotometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 11: 66–70 (1959)
- [18] Chan CHH, Hilton A, et al. : Reevaluation of the harboe assay as a standardized method of assessment for the hemolytic performance of ventricular assist devices. *Artif. Organs* 36: 724–730 (2012)
- [19] Wu H. : STUDIES ON HEMOGLOBIN: An Ultra-Micro-method for the Determination of Hemoglobin as a Peroxidase. *J. Biochem.* Oxford University Press; 2: 189–194 (1923)
- [20] Vanzetti G, Valente D. : A sensitive method for the determination of hemoglobin in plasma. *Clin. Chim. Acta* 11: 442–446 (1965)
- [21] International Agency for Research on Cancer (IARC). : Benzidine. (2012) [aufgerufen

am 2016 Oct 13]. URL:
<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-7.pdf>

- [22] Liem HH, Cardenas F, et al. : Quantitative determination of hemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, a safe substitute for benzidine. *Anal. Biochem.* 98: 388–393 (1979)
- [23] Levinson SS, Goldman J. : Measuring hemoglobin in plasma by reaction with tetramethylbenzidine. *Clin. Chem.* 28: 471–474 (1982)
- [24] Goyal MM, Basak A. : Estimation of plasma haemoglobin by a modified kinetic method using o-tolidine. *Indian J. Clin. Biochem.* 24: 36–41 (2009)
- [25] Kristiina B, Penttil M. : Plasma Haemoglobin Determination Using Chlorpromazine as a Non-Carcinogenic Reagent. 26: 219–222 (1988)
- [26] Bauer K. : Determination of Free Haemoglobin in Serum by an Automated Assay Using 4-Aminophenazone and the Cobas Bio System. *Clin. Chem. Lab. Med.* 19: 971–976 (1981)
- [27] Lammers M, Gresser AM. : Immunonephelometric Quantification of Free Haemoglobin. *Clin. Chem. Lab. Med.* 25: 363–368 (1987)
- [28] Gressner AM, Arndt Teditors: . : Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; (2013).
- [29] Zhao T, Jacobson B, et al. : Triple-frequency method for measuring blood impedance. *Physiol. Meas.* 14: 145–156 (1993)
- [30] Asami K. : Dielectric dispersion of erythrocyte ghosts. *Phys. Rev. E* 73: 52903 (2006)
- [31] Nova Biomedical Corporation. : Hemolysis detection method and system. (2014) [aufgerufen am 2016 Oct 13].
- [32] Tian F, Dale N. : Microelectrode Biosensors: Hexacyanoferrates as Mediators for Microelectrode Biosensors. Marinesco, S.; Dale, N., editors. Totowa, NJ: Humana Press; (2013).

- [33] Asirvatham J, Bjornson L, et al. : Errors in potassium measurement: A laboratory perspective for the clinician. *N. Am. J. Med. Sci.* 5: 255 (2013)
- [34] Bechmann W, Schmidt J. : Einstieg in die Physikalische Chemie für Nebenfächler. 4. Auflage. Wiesbaden: Vieweg + Teubner, GWV Fachverlage GmbH; (2010).
- [35] Holze R. : Elektrochemisches Praktikum. 1. Auflage. Teubner Stud. Chemie Stuttgart - Leipzig - Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag; (2001).
- [36] Hering E, Schönfelder G. : Sensoren in Wissenschaft und Technik. Hering, E.; Schönfelder, G., editors. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag; (2012).
- [37] Otto M. : Analytische Chemie. 3. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH-Verlagsgesellschaft; (2006).
- [38] Lahl H. : Überblick über elektroanalytische Verfahren im PIA-Praktikum. URL: https://www.uni-muenster.de/imperia/md/content/pharmaz_und_med_chemie/studieren/semester/4_semester/poster.pdf
- [39] Henze G. : Polarographie und Voltammetrie. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag; (2001).
- [40] Harris DC. : Lehrbuch der quantitativen Analyse. 8. Auflage. Berlin - Heidelberg: Springer Verlag; (2014).
- [41] Punter-Villagrasa J, Colomer-Farrarons J, et al. : Bioelectronics for Amperometric Biosensors. (2013) [aufgerufen am 2017 Jan 31]. URL: <http://www.intechopen.com/books/state-of-the-art-in-biosensors-general-aspects/bioelectronics-for-amperometric-biosensors>
- [42] : Potentiometrie. Ruhr Uni Bochum [aufgerufen am 2016 Jun 10]. URL: https://www.ruhr-uni-bochum.de/prak-ncdf05/UTRM/versuche/beschreibungen/5_Potentiometrie.pdf
- [43] Holze R. : Leitfaden der Elektrochemie. Stuttgart, Leipzig: Vieweg+Teubner Verlag;

(1998).

- [44] Henze G, Neeb R. : Elektrochemische Analytik. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag; (1986).
- [45] McCreery RL. : Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chem. Rev.* 108: 2646–2687 (2008)
- [46] Švancara I, Vytřas K, et al. : Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis* 21: 7–28 (2009)
- [47] Unruh J. : Lehrbuch der Elektrochemie. 1. Auflage. Bad Saulgau: Leuze Verlag; (2013).
- [48] TU Clausthal. : Fortgeschrittenpraktikum Cyclovoltammetrie. [aufgerufen am 2016 Jun 22]. URL: <http://www2.pc.tu-clausthal.de/edu/05-CYCLOVOLTAMMETRIE.pdf>
- [49] : 11.4: Voltammetric Methods. LibreTexts.org (2016) [aufgerufen am 2016 Aug 7]. URL: [http://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%253A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/11_Electrochemical_Methods/11.4%253A_Voltammetric_Methods](http://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%253A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/11_Electrochemical_Methods/11.4%253A_Voltammetric_Methods)
- [50] De Tacconi NR, Rajeshwar K, et al. : Metal hexacyanoferrates: Electrosynthesis, in situ Characterization and Applications. *Chem. Mater.* 15: 3046–3062 (2003)
- [51] Pauliukaite R, Ghica ME, et al. : A new, improved sensor for ascorbate determination at copper hexacyanoferrate modified carbon film electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* 381: 972–978 (2005)
- [52] Ojani R, Raof JB, et al. : Cu(II) hexacyanoferrate(III) modified carbon paste electrode; application for electrocatalytic detection of nitrite. *Electroanalysis* 20: 1996–2002 (2008)
- [53] Ravi Shankaran D, Sriman Narayanan S. : Chemically modified sensor for amperometric determination of sulphur dioxide. *Sensors Actuators, B Chem.* 55: 191–

194 (1999)

- [54] Teixeira MFS, Segnini A, et al. : Determination of vitamin B6 (pyridoxine) in pharmaceutical preparations by cyclic voltammetry at a copper(II) hexacyanoferrate(III) modified carbon paste electrode. *J. Braz. Chem. Soc.* 14: 316–321 (2003)
- [55] Berisha L, Maloku A, et al. : Electrochemical Properties of Modified Carbon Paste with Copper Hexacyanoferrate Film on Nitric Oxide Reduction. *Am. J. Anal. Chem.* 5: 308–315 (2014)
- [56] Fiorito PA, De Torresi SIC. : Hybrid nickel hexacyanoferrate/polypyrrole composite as mediator for hydrogen peroxide detection and its application in oxidase-based biosensors. *J. Electroanal. Chem.* 581: 31–37 (2005)
- [57] Ricci F, Palleschi G. : Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 21: 389–407 (2005)
- [58] Attos ILDM, Orton LG, et al. : Sensor for Hydrogen Peroxide Based on Prussian Blue Modified Electrode : Improvement of the Operational Stability. 16: 795–798 (2000)
- [59] Karyakin AA, Karyakina EE, et al. : On the mechanism of H₂O₂ reduction at Prussian Blue modified electrodes. *Electrochem. commun.* 1: 78–82 (1999)
- [60] Abbaspour A, Kamyabi MA. : Electrochemical formation of Prussian blue films with a single ferricyanide solution on gold electrode. *J. Electroanal. Chem.* 584: 117–123 (2005)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ursachen für Hämolyse in vivo und in vitro [3].....	5
Abbildung 2: Links: Aufbau des Hämoglobins aus 4 Untereinheiten, bestehend aus je einer Globinkette sowie einer Hämgruppe. Rechts: Molekulare Struktur einer Hämgruppe. In der Mitte des Porphyrinrings befindet sich ein zweiwertiges Eisenatom, an welches Sauerstoff reversibel gebunden werden kann [6].	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Sauerstoffbindungskurve von Hämoglobin. Effektoren wie pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck ($p(\text{CO}_2)$), Temperatur (T) und erythrozytäres Biphosphoglyzerat (2,3-BPG) können zu einer Rechts- oder Linksverschiebung der Kurve führen und so eine Veränderung der Bindungsaffinität von Hämoglobin für Sauerstoff bewirken [10].	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung etablierter elektrochemischer Verfahren. [38]	18
Abbildung 5: Dreielektrodenanordnung zur Durchführung von voltammetrischen Messungen (WE: Arbeitselektrode, RE: Referenzelektrode, CE: Gegenelektrode). Die gewünschte Klemmenspannung wird von einem Potentiostaten geliefert, ein sich einstellender Messstrom fließt zwischen Arbeits- und Gegenelektrode. Die Referenzelektrode bleibt stromlos und dient als unabhängiger Bezugspunkt für die Einstellung der Zellspannung zwischen Arbeits- und Referenzelektrode [41].	20
Abbildung 6: Aufbau des Hämolyse-Sensors, bestehend aus einem Dreielektrodensystem mit Referenz-, Arbeits- und Gegenelektrode	22
Abbildung 7: Prinzip der zyklischen Voltammetrie. Links: Angelegtes, dreieckförmiges Spannungssignal. Rechts: Im zyklischen Voltammogramm kommt es zur Ausbildung von Strompeaks, deren Position und Höhe das Redox-Verhalten der untersuchten elektroaktiven Substanz widerspiegeln [49]. ($E_{p,a}$ und $E_{p,c}$ = Position des anodischen bzw. kathodischen Strompeaks; $i_{p,a}$ und $i_{p,c}$ = Höhe des anodischen bzw. kathodischen Strompeaks)	25
Abbildung 8: Prinzip der Normal-Puls Voltammetrie. Links: Die konstante Eingangsspannung wird mit rechteckigen Spannungsimpulsen zunehmender Amplitude überlagert. Die Strommessung erfolgt am Ende eines Spannungsimpulses. Rechts: Stufenförmiges Normal-Puls Voltammogramm [49]. (T = Periodendauer, ΔE_p = Pulspotential, ΔE_s = Amplitudenveränderung des Pulses, t_p = Pulsdauer, i_i = Stufenhöhe)	26
Abbildung 9: Prinzip der Differential-Puls Voltammetrie. Links: Die linear ansteigende Eingangsspannung wird mit rechteckigen Spannungsimpulsen konstanter Amplitude überlagert. Die Messung des Stromsignales erfolgt kurz vor dem Beginn (Punkt 1) und vor dem Ende (Punkt 2) eines Spannungsimpulses. Rechts: Durch Auftragung der Stromdifferenz Δi_p der beiden Messpunkte gegen die Eingangsspannung entsteht ein peakförmiges Voltammogramm [49]. (T = Periodendauer, ΔE_p = Pulspotential, t_p = Pulsdauer)	27

Abbildung 10: Druckschritte für die Fertigung der Sensoren. Links: Verwendetes Sieb. Rechts: Trägerfolie nach dem Druck. (A: Druck der Ag/AgCl-Paste. B: Druck der Kohlenstoffpaste. C: Druck der Elektroisolierschicht.).....	33
Abbildung 11: Elektrochemisches Verhalten der Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	45
Abbildung 12: Zyklische Voltammogramme luftgetrockneter Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 24h luftgetrocknet, rechts: 48h luftgetrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	45
Abbildung 13: Zyklische Voltammogramme ofengetrockneter Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1h im Ofen bei 50°C getrocknet, rechts: 1h im Ofen bei 90°C getrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	46
Abbildung 14: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Kupfer-Hexacyanoferrat-Depositionsfilmes (n=6).....	47
Abbildung 15: Elektrochemisches Verhalten der Kupfer-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	48
Abbildung 16: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathältiger Nafionmembranen, hergestellt aus festem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl ₂ , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO ₄ . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	49
Abbildung 17: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathältiger Nafionmembranen, hergestellt aus gelöstem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl ₂ , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO ₄ . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	49
Abbildung 18: Signalintensität der Kupfer-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupferchlorid bzw. Kupfersulfat gefällt und in gelöster sowie fester Form mit Nafion vermengt (n=6).....	50
Abbildung 19: Elektrochemisches Verhalten der Kupfer-Hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	51
Abbildung 20: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathältiger Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus festem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl ₂ , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO ₄ . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	52
Abbildung 21: Zyklische Voltammogramme hexacyanoferrathältiger Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus gelöstem Kupfer-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuCl ₂ , rechts: Kupfer-Hexacyanoferrat ausgefällt aus CuSO ₄ . (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	52

Abbildung 22: Signalintensität der Kupfer-Hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde Kupfer-Hexacyanoferrat aus Kupferchlorid bzw. Kupfersulfat gefällt und in gelöster sowie fester Form mit Glutaraldehyd vermengt (n=6).	53
Abbildung 23: Elektrochemisches Verhalten der Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	54
Abbildung 24: Zyklische Voltammogramme von Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Depositionsfilmen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: luftgetrocknet, rechts: im Ofen getrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	54
Abbildung 25: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Depositionsfilmes (n=6), *(n=1).	55
Abbildung 26: Elektrochemisches Verhalten der Nafionmembranen, welche mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(II) angereichert wurden. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	56
Abbildung 27: Elektrochemisches Verhalten der Nafionmembranen, welche mit gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(II) angereichert wurden. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	56
Abbildung 28: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathältigen Nafionmembran, hergestellt aus festem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	57
Abbildung 29: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathältigen Nafionmembran, hergestellt aus gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	57
Abbildung 30: Signalintensität der Kalium-Hexacyanoferrat(II)haltigen Nafionmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde eine 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung bzw. festes Kalium-Hexacyanoferrat(II) mit Nafion vermengt (n=6).	58
Abbildung 31: Elektrochemisches Verhalten der Kalium-Hexacyanoferrat(II)haltigen Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	59
Abbildung 32: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembran, hergestellt aus festem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	59
Abbildung 33: Zyklisches Voltammogramm einer hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembran, hergestellt aus gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(II). Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Alle 15 Zyklen, rechts: Zyklus 1 verglichen mit Zyklus 15. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	60
Abbildung 34: Signalintensität der Kalium-Hexacyanoferrat(II)haltigen Glutaraldehydmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde eine 0,5M Kalium-Hexacyanoferrat(II)-Lösung bzw. festes Kalium-Hexacyanoferrat(II) mit Glutaraldehyd vermengt (n=6).	60
Abbildung 35: Elektrochemisches Verhalten der Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	61

Abbildung 36: Zyklische Voltammogramme von Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilme, welche im Ofen getrocknet wurden. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1h im Ofen bei 50°C getrocknet, rechts: 1h im Ofen bei 90°C getrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus) ..	62
Abbildung 37: Zyklische Voltammogramme von Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilmen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: luftgetrocknet, rechts: Depositionsfilm ohne messbare Redoxaktivität. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	62
Abbildung 38: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Kalium-Hexacyanoferrat(III)-Depositionsfilmes (n=6), *(n=1).	63
Abbildung 39: Elektrochemisches Verhalten von mit gelöstem Kalium-Hexacyanoferrat(III) angereicherten Nafionmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	64
Abbildung 40: Verrauschtes elektrochemisches Signal einer mit festem Kalium-Hexacyanoferrat(III) angereicherten Nafionmembran. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	65
Abbildung 41: Elektrochemisches Verhalten von mit gelöstem sowie festem Kalium-Hexacyanoferrat(III) angereicherten Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	66
Abbildung 42: Elektrochemisches Verhalten der Eisen-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	67
Abbildung 43: Zyklische Voltammogramme luftgetrockneter Eisen-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 24h luftgetrocknet, rechts: 48h luftgetrocknet. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	67
Abbildung 44: Zyklische Voltammogramme ofengetrockneter Eisen-Hexacyanoferrat-Depositionsfilme. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1h im Ofen bei 50°C getrocknet, rechts: 1h im Ofen bei 90°C getrocknet. (1 = erster Zyklus, 15 = letzter Zyklus)	68
Abbildung 45: Evaluierung des Einflusses von Potentialfenster, Zyklusintensität sowie Trocknung auf die Signalintensität des Eisen-Hexacyanoferrat Depositionsfilms (n=6).	68
Abbildung 46: Elektrochemisches Verhalten der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	69
Abbildung 47: Zyklisches Voltammogramm von hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen, hergestellt aus Eisen-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: Anreicherung mit festem Eisen-Hexacyanoferrat rechts: Mischung mit gelöstem Eisen-Hexacyanoferrat. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	70
Abbildung 48: Signalintensität der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Nafionmembranen. Für die Fertigung der Membranen wurde eine 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung bzw. festes Eisen-Hexacyanoferrat mit Nafion vermengt (n=6).	70
Abbildung 49: : Elektrochemisches Verhalten der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl.	71
Abbildung 50: Zyklisches Voltammogramm von hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus festem Eisen-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15	

Zyklen. Links: Anreicherung mit 10%wt Eisen-Hexacyanoferrat. Rechts: Anreicherung mit 30%wt Eisen-Hexacyanoferrat. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	72
Abbildung 51: Zyklisches Voltammogramm von hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen, hergestellt aus gelöstem Eisen-Hexacyanoferrat. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl für 15 Zyklen. Links: 1:1 (V/V) Mischung mit 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat. Rechts: 1:2 (V/V) Mischung mit 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat. (1. = erster Zyklus, 15. = letzter Zyklus)	72
Abbildung 52: Signalintensität der Eisen-Hexacyanoferrathältigen Glutaraldehydmembranen. Für die Fertigung der Membrane wurde eine 0,3M Eisen-Hexacyanoferrat-Lösung bzw. festes Eisen-Hexacyanoferrat mit Glutaraldehyd vermengt (n=6).....	73
Abbildung 53: Elektrochemisches Verhalten von Eisen-Hexacyanoferrat modifizierten Sensoren. Aufgenommen in Phosphatpuffer vs. Ag/AgCl bei einem Potentialfenster von -0,5 V bis 1,5 V für 8 Zyklen. (1. = erster Zyklus, 8. = letzter Zyklus)	81

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Durch Hämolyse beeinflusste Laborparameter und ihre Ursachen. Ein positiver Fehler weist auf eine Überschätzung des Analyten durch Hämolyse hin, während es bei einem negativen Fehler zu falsch niedrigen Messwerten kommt [5].....	6
Tabelle 2: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Cyanmethämoglobinmethode zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.	12
Tabelle 3: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Direktphotometrie nach Harboe zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.	13
Tabelle 4: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile von Pseudoperoxidase-Verfahren zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.	14
Tabelle 5: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Immunnephelometrie zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.	14
Tabelle 6: Nachweisgrenze sowie Vor- und Nachteile der Impedanzspektroskopie zur Bestimmung von freiem Hämoglobin.	15
Tabelle 7: Eingewogene Stoffmengen für die Herstellung der Depositionslösung von Kalium-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(III), Eisen-Hexacyanoferrat(II) sowie Kupfer-Hexacyanoferrat(III). Die Einwaage erfolgte in g pro 250ml destilliertem H ₂ O.	36
Tabelle 8: Eingewogene Stoffmengen für die Herstellung der Einzellösungen von Kalium-Hexacyanoferrat(II), Kalium-Hexacyanoferrat(III) sowie Eisen-Hexacyanoferrat(II). Die Einwaage erfolgte in g pro 20ml destilliertem H ₂ O.	37
Tabelle 9: Eingewogene Stoffmengen für die Herstellung der Einzellösungen für die Fällungsreaktion von Kupfer-Hexacyanoferrat(III). Hierfür wurde eine 0.2M Kalium-Hexacyanoferratlösung im Verhältnis 1:1 (V/V) mit einer 0.3M Kupferchlorid- bzw. mit einer 0.3M Kupfersulfat-Lösung vermischt, so dass Kupfer-Hexacyanoferrat(III) als Niederschlag ausfiel. Die Einwaage erfolgte in g pro 20ml destilliertem H ₂ O...	38
Tabelle 10: Voltammetrische Parameter für die Reinigung der Elektrode. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E _{start} = Startpotential, E _{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E _{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E _{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl)	40
Tabelle 11: Voltammetrische Parameter für die elektrochemische Deposition der Hexacyanoferrat-Filme. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E _{start} = Startpotential, E _{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E _{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E _{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl)	40
Tabelle 12: Voltammetrische Parameter für die Charakterisierung des Hexacyanoferrat-Filmes in Phosphatpuffer. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E _{start} = Startpotential, E _{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E _{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E _{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl)	41

Tabelle 13: Voltammetrische Parameter für die Charakterisierung der dispensierten Hexacyanoferrat-Membrane in Phosphatpuffer. (Pretreatment Settings = Einstellungen für Vorkonditionierung, E_{start} = Startpotential, E_{vtx1} = unterer Potentialumkehrpunkt, E_{vtx2} = oberer Potentialumkehrpunkt, Scan rate = Potentialvorschubgeschwindigkeit, E_{step} = Schrittweite, n scans = Zyklusanzahl) 42