

Induzierte pH-Wert-Änderungen innerhalb mikrofluidischer Kanäle mittels licht-adressierbarer Elektroden

Rene Welden^{1,2}, Michael J. Schöning^{1,3}, Patrick H. Wagner² und Torsten Wagner^{1,3}

¹Institut für Nano- und Biotechnologien (INB), FH Aachen, Jülich, Deutschland

²Laboratory for Soft Matter and Biophysics, KU Leuven, Leuven, Belgien

³Institut für Biologische Informationsprozesse (IBI-3), Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Deutschland
Kontakt: welden@fh-aachen.de

Einleitung

Elektrochemische Elektroden in mikrofluidischen Kanälen können zur Manipulation von biologischen oder chemischen Proben verwendet werden, z.B. zur Anpassung des lokalen pH-Wertes. Ergänzend zu einer integrierten Sensorik zur Messung des pH-Wertes können mittels dieser Elektroden, z.B. durch eine örtlich-induzierte pH-Wert-Änderung, Proteine isoelektrisch fokussiert (IEF) [1] oder die Zell- und Enzymreaktion abhängig vom lokalen pH-Wert untersucht werden [2,3].

Für diese Art von Manipulation werden meist Edelmetallelektroden (Pt, Au) innerhalb eines „Lab-on-a-Chip“-Systems in Mikrokanälen integriert, wobei Elektrolyse [4], feldverstärkte Wasserdissoziation [5] oder Faraday'sche Wechselstromreaktionen [6] zur Anwendung kommen, um eine solche pH-Wert-Änderung zu induzieren. Zur Herstellung werden häufig die Elektrodengeometrie und die Position innerhalb des Kanals zu Beginn des Fertigungsprozesses festgelegt. Diese starre Anordnung kann in Kombination mit biologischen Systemen nachteilig sein, da die Elektrodenposition oft nicht genau mit der Lage der zu untersuchenden Probe, wie beispielsweise adhären Zellen, übereinstimmt. Dies hat zur Folge, dass im ungünstigsten Fall für unterschiedliche Versuche zeit- und kostenintensive Neuauslegungen des Systems notwendig sind.

Eine alternative Herangehensweise ist die Verwendung von Halbleitern als Elektrodenmaterial, welche mittels Licht angeregt werden. Seit der Entdeckung der photoelektrokatalytischen Wasserspaltung durch Honda und Fujishima im Jahr 1972 [7] wurde dieser Effekt für eine Vielzahl von Technologien, wie z.B. Farbstoffsolarzellen [8] oder den photokatalytischen Abbau von organischen Schadstoffen [9], verwendet.

Wird nicht die gesamte, sondern nur ein Teil der Elektrodenoberfläche beleuchtet, spricht man von einer licht-adressierbaren Elektrode (LAE). Hierdurch wird die gering-leitfähige Elektrode durch lokal erzeugte Ladungsträger im beleuchteten Bereich örtlich-begrenzt leitfähig. Dies kann u.a. zur strukturierten Materialabscheidung [10], lokalen Stimulation von Zellen [11] oder der bereits beschriebenen pH-Wert-Änderung genutzt werden [12].

Für diese Anwendungen werden häufig Halbleitermaterialien mit einer breiten Bandlücke ($E_{\text{Bandlücke}} > 2-3$ eV) verwendet, wie z.B. Fe_2O_3 , WO_3 , ZnO oder TiO_2 . Als eines der besten in der Literatur beschriebenen Materialien bietet TiO_2 den Vorteil, dass es nicht toxisch und chemisch stabil in wässrigen Lösungen ist und sich zudem vielseitig abscheiden lässt [13].

Als LAE wurde in dieser Arbeit daher eine Heterostruktur bestehend aus Glas/ $\text{SnO}_2\text{:F}$ / TiO_2 verwendet. $\text{SnO}_2\text{:F}$ (FTO) ist ein transparent-leitfähiges Oxid, welches zur elektrischen Kontaktierung bei gleichzeitig rückseitiger Beleuchtung der TiO_2 -Schicht verwendet wird. Der System-Aufbau ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

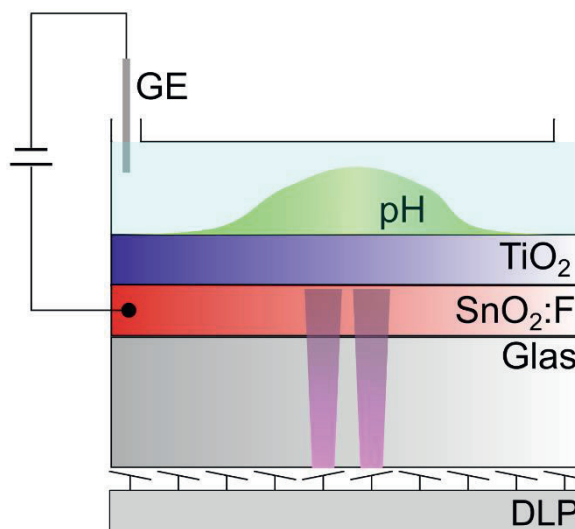


Abb. 1: Schematische Zeichnung der Glas/ $\text{SnO}_2\text{:F}$ / TiO_2 -Heterostruktur, wobei TiO_2 das halbleitende Material darstellt und $\text{SnO}_2\text{:F}$ als transparent-leitfähiges Oxid zur elektrischen Kontaktierung dient. GE bezeichnet die Gegenelektrode in Lösung. Die Rückseite wird mittels eines digital light processing (DLP)-Projektor beleuchtet.

Ziel dieser Arbeit ist es, die pH-Wert-Änderung in mikrofluidischen Kanälen für verschieden hergestellte TiO_2 -Schichten zu vergleichen. Hierfür wurde die LAE mit einer Mikrofluidik kombiniert. Um den Einfluss der Herstellungsmethode der Titandioxidschicht-

ten auf die induzierte pH-Wert-Änderung zu untersuchen, wurden Schichten mittels Sol-Gel-Verfahren und Laserstrahlverdampfen (*pulsed laser deposition*, PLD) hergestellt. Während das Laserstrahlverdampfen als *physical vapour deposition*-Methode eine stöchiometrisch genaue Abscheidung ermöglicht, bietet die Sol-Gel-Technik die Möglichkeit, TiO_2 aus einer einfachen kolloidalen Dispersion herzustellen. Die induzierten pH-Wert-Änderungen wurden über einen pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert.

Methoden und Materialien

Herstellung der TiO_2 -Schicht mittels Sol-Gel-Verfahren:

Zur Herstellung der TiO_2 -Schicht wurde ein modifiziertes nicht-wässriges Verfahren verwendet. Titan(IV)isopropoxide (97%, Sigma-Aldrich) wurde in eine Acetylaceton-Isopropanol-Lösung gegeben. Nach 30 Minuten wurden 686 μL Essigsäure hinzugegeben und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Vor der Herstellung der Dünnschichten wurde zunächst das FTO-Glas (7 Ω/sq , Sigma-Aldrich) mit Aceton, Isopropanol und DI-Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Zur Abscheidung der dünnen TiO_2 -Schichten wurde die Sol-Gel-Dispersion auf das FTO-Glas pipettiert und mittels Rotationsbeschichtung homogen abgeschieden. Darauf folgend wurde die Struktur zur Kristallausbildung in einem Muffelofen aufgeheizt (550 $^{\circ}\text{C}$). Diese Beschichtung wurde gegebenenfalls wiederholt, bis die gewünschte Schichtdicke erreicht wurde. Details zu den Prozessparametern finden sich in [14].

Herstellung der TiO_2 -Schicht mittels Laserstrahlverdampfung:

Zur Herstellung der TiO_2 -Schicht wurde zuerst das FTO-Glas, wie beim Sol-Gel-Verfahren, gereinigt. Für die Abscheidung wurde ein TiO_2 -Substrat (MaTeck Material-Technologie & Kristalle GmbH) verwendet. Während der Abscheidung wurde das FTO-Glas auf ca. 400 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Das TiO_2 -Substrat wurde mit einem KrF-Excimerlaser ($\lambda=248\text{ nm}$) für 700 Sekunden verdampft. Die Herstellungsdetails finden sich in [15].

Fluoreszenzmessungen:

Für die Fluoreszenzmessungen wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axio Image A1m, Carl Zeiss AG) verwendet. Der Objektivtisch wurde durch einen eigenen optischen Aufbau ersetzt. Der zur Beleuchtung der LAE verwendete *digital light processing* (DLP)-Projektor ($\lambda=248\text{ nm}$, STAR-07, Vialux GmbH) projiziert über einen optischen Spiegel den Lichtstrahl auf die Rückseite der LAE. Als Fluoreszenzfarbstoff wurden 5 μM Fluorescein (Natriumsalz, NaFI, Sigma-Aldrich) verwendet. Für die Kalibrierung wurden die 5 μM NaFI in 0.33 mM phosphatgepufferte Salzlösung

(PBS) mittels HCl und NaOH auf pH-Werte zwischen pH 4 und pH 8 eingestellt und die jeweilige Fluoreszenzintensität bestimmt. Als Messkammer wurde ein Mikrofluidikkanal (Länge x Breite x Höhe = 17 mm x 3,8 mm x 4 mm, sticky-Slide VI 0.4, ibidi GmbH) auf der Vorderseite der LAE befestigt. Die Fluidik mit LAE wurde daraufhin im Fokus zwischen DLP-Projektor (Rückseitenfokus) und Mikroskop (Frontfokus) platziert. Eine Platin-Gegenelektrode wurde in den Ablasskanal der Fluidik eingebracht. Zur elektrischen Kontaktierung wurde die LAE und die Platin-Gegenelektrode an eine *source measurement unit* (SMU, 2601B, Keithley Instruments) angeschlossen.

Messprotokoll:

Zu Beginn jeder Messung wurde eine Spannung mittels SMU angelegt. Die angegebene Spannung bezieht sich auf die Gegenelektrode. Vor dem Einschalten der Lichtquelle wurde 20-30 Sekunden gewartet, bis der Leckstrom einen konstanten Wert erreicht und das System somit einen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Zunächst wurde vor der eigentlichen Beleuchtung eine Fluoreszenzaufnahme als Referenzbild erstellt. Darauf folgend wurde alle 10 Sekunden eine neue Aufnahme angefertigt. Zwischen den Aufnahmen wurde die LAE durch den DLP-Projektor mit einer definierten Lichtfeld-Geometrie und Intensität von der Rückseite beleuchtet. Während der Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurde der DLP-Projektor ausgeschaltet, um die Fluoreszenzintensität detektieren zu können. Zur Bestimmung der Differenz zwischen den einzelnen Bildern wurde von den späteren Aufnahmen jeweils das Referenzbild subtrahiert. Aus dem Mittelwert von 100 Pixeln (1 pixel = 0,46 μm) aus dem Zentrum des beleuchteten Bildbereiches des Differenzbildes wurde das pH-Maximum, basierend auf der vorangegangenen Kalibrierung, bestimmt. Anschließend wurde die transferierte Ladung aus der Integration des gemessenen Photostroms über die Beleuchtungszeit berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Die unterschiedlich hergestellten Elektroden wurden anhand der jeweiligen pH-Wert-Änderungen für verschieden angelegte Spannungen miteinander verglichen. Aus früheren Arbeiten geht hervor, dass die Elektroden, welche mittels Sol-Gel und PLD hergestellt wurden, eine TiO_2 -Schichtdicke von 100-150 nm besitzen und eine ähnliche Oberflächenmorphologie aufweisen, sodass beide LAEs in ihrer Oberflächenbeschaffenheit miteinander vergleichbar sind [14,15]. Die pH-Wert-Differenz der Lösung nach der Beleuchtung mittels LAE kann aus der Änderung der Fluoreszenzintensität berechnet werden, wobei eine pH-Wert-Kalibrierung der Intensität vor der Messung durchgeführt wurde. In Abb. 2 ist beispielhaft eine

orts aufgelöste pH-Wert-Änderung der mittels Sol-Gel-Verfahren hergestellten LAE gezeigt.

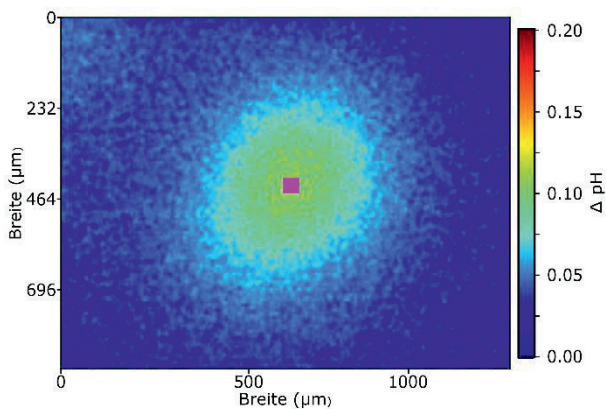
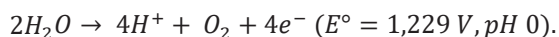


Abb. 2: Beispiel für eine Falschfarbendarstellung der pH-Wert-Änderung nach 30 s Beleuchtung mit 20% Helligkeit, einer Beleuchtungsfläche von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ und einer angelegten Spannung von 0.3 V. Die pH-Änderungen zeigen einen gaußförmigen Gradienten vom Beleuchtungszentrum mit den höchsten pH-Wert-Änderungen bis zu geringen Änderungen an den Rändern der Abbildung. Das lila Quadrat zeigt den beleuchteten Bereich.

Die LAE wurde hierzu für 30 Sekunden mittels DLP-Projektor im Zentrum der Abbildung beleuchtet (eingezeichneter Bereich). Die Aufnahme zeigt, dass sich dort der pH-Wert von pH 7 zu niedrigeren pH-Werten verschoben hat. Dies kann auf die Photoelektrolyse und die dabei entstehenden H^+ -Ionen zurückgeführt werden. Allgemein gilt:



Die größten pH-Wert-Änderungen erfolgen in der Mitte des beleuchteten Bereichs, mit einer Differenz von $\Delta\text{pH} = 0.1$. Die Gaußverteilung ergibt sich aus der Überlagerung des Profils der Ionendiffusion auf der einen Seite und dem Gaußförmigen Belichtungsprofil des DLP-Projektors auf der anderen Seite [15].

In Abb. 3 sind die pH-Wert-Änderungen in Abhängigkeit der Ladung für verschieden angelegte Spannung gezeigt. Die Messung erfolgte jeweils nach 10, 20 und 30 Sekunden Beleuchtung. Die Ergebnisse der Sol-Gel-Elektrode sind in Abb. 3a) und für die PLD-Elektrode in Abb. 3b) dargestellt. Wird die LAE beleuchtet, fließt ein zusätzlicher Photostrom, der von der angelegten Spannung abhängt. Integriert man diesen Strom über die Beleuchtungszeit auf, ist zu erkennen, dass die Ladung mit der angelegten Spannung zunimmt. Für die Sol-Gel-Elektrode wurde z.B. nach 30 Sekunden bei einer Spannung von 0.3 V eine Ladung von ca. 52 nC transferiert, während bei 0.9 V diese auf 80 nC anstieg. Bei transferierten Ladungen von 16 bis 52 nC kommt es dabei zu einer Änderung

des pH-Wertes zwischen ΔpH 0.04 und ΔpH 0.1, wobei für höhere Ladungen bis 80 nC eine Sättigung erreicht wird.

Für die PLD-Elektrode ergibt sich nach 30 Sekunden Beleuchtung eine maximal transferierte Ladung von ca. 100 nC, wobei der pH-Wert um ΔpH 0.27 von pH 7 auf pH 6.73 absinkt. Im direkten Vergleich der beiden Elektroden zeigt sich, dass z.B. für eine transferierte Ladung von 60 nC eine pH-Differenz von 0.08 für die Sol-Gel-Elektrode auftritt, während der Wert für die PLD-Elektrode um ΔpH 0.2 sinkt.

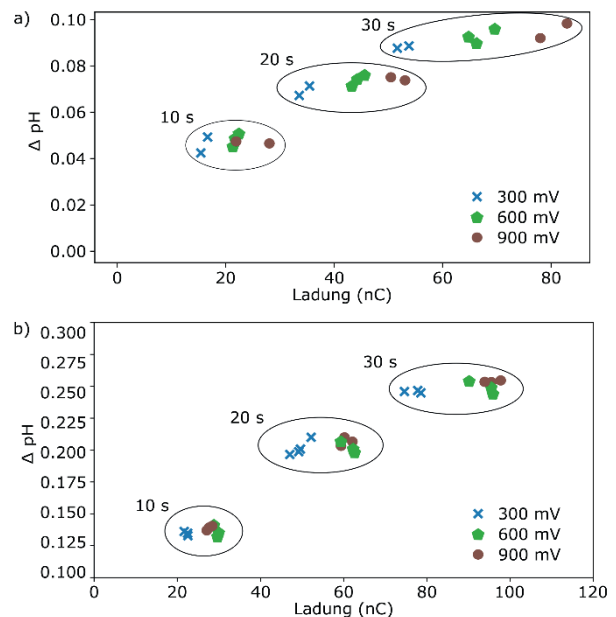


Abb. 3: pH-Wert-Änderung in Abhängigkeit von der Ladung für 20% Beleuchtung, einer beleuchteten Fläche von $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ und verschieden angelegten Spannungen für die mittels Sol-Gel- (a) und PLD-Technik (b) hergestellte Elektrode.

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, dass beide Herstellungsverfahren eine photoelektrolytische Umsetzung ermöglichen: Die PLD-Elektroden weisen gegenüber den mittels Sol-Gel-Prozess hergestellten Elektroden jedoch eine höhere orts aufgelöste pH-Wert-Änderung auf. In zukünftigen Arbeiten sollen daher die Oberflächen- und Kristallstrukturen, sowie das photoelektrochemische Impedanzverhalten eingehend studiert werden, um Differenzen in der Reaktionskinetik zu bestimmen.

Literatur

- [1] BJELLQVIST, B.; EK, K.; GIRGIO RIGHETTI, P.; GIANAZZA, E.; WESTERMEIER, R.; POSTEL, W.: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. In: *J BIOCHEM BIOPHYS METHODS* 6 (1982), Nr. 4, S. 317–339
- [2] MUNTEANU, R.-E.; STANICA, L.; GHEORGHIU, M.; GASPAR, S.: Water electrolysis carried out on microelectrodes to obtain new insights into the regulation of

cytosolic pH. In: *ChemElectroChem* 6 (2019), Nr. 6, S. 1800–1807

- [3] WELDEN, R.; JABLONSKI, M.; WEGE, C.; KEUSGEN, M.; WAGNER, P.-H.; WAGNER, T.; SCHÖNING, M.-J.: Light-addressable actuator-sensor platform for monitoring and manipulation of pH gradients in microfluidics: A case study with the enzyme penicillinase. In: *Biosensors* 11 (2021), Nr. 6, S. 171
- [4] MACOUNOVA, K.; CABRERA, C.-R.; HOLL M.-R.; YAGER, P.: Generation of natural pH gradients in microfluidic channels for use in isoelectric focusing. In: *Anal. Chem.* 72 (2000), Nr. 16, S. 3745–3751
- [5] CHENG, L.-J.; CHANG, H.-C.: Switchable pH actuators and 3D integrated salt bridges as new strategies for reconfigurable microfluidic free-flow electrophoretic separation. In: *Lab on a chip* 14 (2014), Nr. 5, S. 979–987
- [6] AN, R.; MASSA, K.; WIPF, D. O.; MINERICK, A. R.: Solution pH change in non-uniform alternating current electric fields at frequencies above the electrode charging frequency. In: *Biomicrofluidics* 8 (2014), Nr. 6, S. 064126
- [7] FUJISHIMA, A.; HONDA, K.: Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. In: *Nature* 238 (1972), Nr. 5358, S. 37–38
- [8] SUGATHAN, V.; ELSA, J.; SUDHAKAR, K.: Recent improvements in dye sensitized solar cells: A review. In: *Renew. Sust. Energ. Rev.* 52 (2015), S. 54–64
- [9] SUQING, W.; HU, Y.-H.: A comprehensive review on catalysts for electrocatalytic and photoelectrocatalytic degradation of antibiotics. In: *Chem. Eng. J.* 409 (2021), S. 127739
- [10] VOGEL, Y. B.; GONCALES, V. R.; AL-OBAIDI, L.; GOODING, J.; DARWISH, N.; CIAMPI, S.: Nanocrystal inks: Photoelectrochemical printing of Cu₂O nanocrystals on silicon with 2D control on polyhedral shapes. In: *Adv. Funct. Mater.* 28 (2021), Nr. 51, S. 1804791
- [11] SUZURIKAWA, J.; NAKAO, M.; JIMBO, N.; KANZAKI, R.; TAKAHASHI, H.: A light addressable electrode with TiO₂ nanocrystalline film for localized electrical stimulation of cultured neurons. In: *Sens. Actuators B Chem.* 192 (2014), S. 393–398
- [12] SUZURIKAWA, J.; NAKAO, M.; KANZAKI, R.; TAKAHASHI, H.: Microscale pH gradient generation by electrolysis on a light-addressable planar electrode. In: *Sens. Actuators B Chem.* 149 (2014), Nr.1, S. 205–211
- [13] JOY, J.; MATHEW, J.; GEORGE, S. C.: Nanomaterials for photoelectrochemical water splitting – review. In: *Int. J. Hydrog* 43 (2018), Nr. 10, S. 4804–4817
- [14] WELDEN, R.; SCHEJA, S.; SCHÖNING, M. J.; WAGNER, P.; WAGNER, T.: Electrochemical evaluation of light-addressable electrodes based on TiO₂ for the integration in lab-on-chip systems. In: *PHYS STATUS SOLIDI A* 215 (2018), Nr. 15, S. 1800150
- [15] WELDEN, R.; GOTTSCHALK, C.; MADAREVIC, I.; VAN BAELE, M. J.; IKEN, H.; SCHUBERT, J.; SCHÖNING, M. J.; WAGNER, P. H.; WAGNER, T.: Formation of controllable pH gradients inside microchannels by using light-addressable electrodes. In: *Sens. Actuators B Chem.* 346 (2021), S. 130422

Danksagung

Die Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen von „NanoMatFutur“ (13N12585) unterstützt.