

Beiträge zur Mikrochip – Elektrophorese

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der



vorgelegt von Dipl.-Chem.

PHILIPP SCHULZE

Regensburg

2009

Diese Arbeit entstand im Zeitraum vom

1.9.2004 bis zum 1.6.2006 in der Abteilung für Chromatographie des Max-Planck-Instituts für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr,

1.7.2006 bis zum 1.9.2007 am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg, sowie vom

1.10.2007 bis zum 1.5.2009 am Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig.

Die wissenschaftliche Anleitung der vorliegenden Dissertation oblag Prof. Dr. Detlev Belder.

Promotionsgesuch eingereicht am: 5.06.2009

Kolloquiumstermin: 26.06.2009

Prüfungsausschuss

Vorsitzender: Prof. Dr. Frank-Michael Matysik

Erstgutachter: Prof. Dr. Detlev Belder

Zweitgutachter: Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis

Drittprüfer: Prof. Dr. Achim Göpferich

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt **Prof. Dr. Detlev Belder** für die kompetente und sehr persönliche Führung, seine stetige Diskussionsbereitschaft, sowie die Gewährung von Promotionsstipendien.

Weiterhin gebührt mein Dank **Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis** für die Begutachtung dieser Doktorarbeit und **Prof. Dr. Achim Göpferich** als Drittprüfer in Regensburg.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Chromatographie des MPI Mülheim danke ich für die mannigfaltige Unterstützung und ein optimales Arbeitsumfeld, insbesondere **Ulrich Häusig, Alfred Deege, Georg Breitenbruch** und **Frank Kohler**.

Weiterhin danke ich der Feinmechanik des MPI in Mülheim, besonders **Sebastian Plankert**, für die Anfertigung vieler Spezialteile.

Den Mitarbeitern der feinmechanischen und elektronischen Werkstätten der Uni Regensburg bin ich für die unkomplizierte und hilfreiche Unterstützung dankbar.

Die XPS-Messungen an der Uni Leipzig nahmen **Herr Dr. Hesse** und **Herr Dr. Streubel** unter **Prof. Denecke** vor, welchen ich für ihren kurzfristigen Einsatz besonders danken möchte.

Meinen Arbeitskollegen **Stefan Ohla, Leonid Gitlin, Martin Link** und **Dr. Stefan Nagl** danke ich für viele anregende Diskussionen bzw. experimentelle Hilfestellung. Ganz besonderer Dank gebührt **Peter Hoffmann**, mit dem ich eine in jeder Hinsicht bereichernde Doktorandenzeit erlebt habe, sowie **Dr. Martin Ludwig**, der mich ins spannende Gebiet der Chip-Elektrophorese einführte und mich darüber hinaus vielfältig experimentell unterstützte. Ebenso danke ich allen Korrektoren dieser Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich von Herzen meinen Eltern **Nora und Arnold Schulze** für Ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre stete Unterstützung zum richtigen Zeitpunkt während meiner Promotionszeit.

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.“

Justus von Liebig, 1803-1873.

meinem Großvater Harald Schulze gewidmet

Publikationen

- 1) P. Schulze, M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder (2005) *Anal. Chem.* 77: 1325-1329
- 2) P. Schulze, M. Schüttpelz, M. Sauer, D. Belder (2007) *Lab Chip* 7: 1841-1844
- 3) P. Hoffmann, U. Häusig, P. Schulze, D. Belder (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 4913-4916
- 4) D. Belder, P. Hoffmann, P. Schulze, U. Häusig (2008) *WO 2008/052515 A3* (patent pending)
- 5) P. Schulze, M. Ludwig, D. Belder (2008) *Electrophoresis* 29: 4894-4899
- 6) P. Schulze, D. Belder (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 515-525 (Review)
- 7) S. Nagl, P. Schulze, M. Ludwig, D. Belder (2009) *accepted in Electrophoresis* (Review)
- 8) M. Link, P. Schulze, D. Belder, O.S. Wolfbeis (2009) *accepted in Microchimica Acta*
- 9) L. Gitlin, P. Schulze, D. Belder (2009) *accepted in Lab Chip*
- 10) P. Schulze, M. Link, M. Schulze, S. Thuermann, O.S. Wolfbeis, D. Belder (2009) *in preparation*

Inhalt

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | ZIELSETZUNG UND MOTIVATION | 8 |
| 2 | GRUNDLAGEN | 11 |
| 2.1 | ELEKTROPHORETISCHER TEIL | 11 |
| 2.1.1 | Grundlagen elektrokinetischer Erscheinungen | 14 |
| 2.2 | BESTIMMUNG DER OBERFLÄCHENHYDROPHILIE | 21 |
| 2.3 | DETEKTION | 23 |
| 2.3.1 | Grundlagen zur einzelphotoneninduzierten Fluoreszenz | 23 |
| 2.3.2 | Grundlagen zur zweiphotoneninduzierten Fluoreszenz | 26 |
| 2.3.3 | Detektionstechniken in der Mikrofluidik | 29 |
| 3 | ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN | 34 |
| 3.1 | NATIVE FLUORESZENZDETEKTION MIT EINZELPHOTONEN-ANREGUNG | 34 |
| 3.1.1 | Einfluss der Anregungsleistung auf die Detektionsempfindlichkeit | 34 |
| 3.1.2 | Applikationen | 42 |
| 3.2 | NATIVE FLUORESZENZDETEKTION MITTELS ZWEIFHOTONENANREGUNG | 48 |
| 3.3 | SYSTEMIMMANENTE FUNKTIONALE POLYMERE FÜR DIE CHIP-HERSTELLUNG | 58 |
| 3.3.1 | Vollmaterial-Chips | 59 |
| 3.3.2 | Fertigung von Sandwich-Chips | 83 |
| 4 | EXPERIMENTELLER TEIL | 96 |
| 4.1 | ELEKTROPHORESE-SYSTEME | 96 |
| 4.1.1 | MCE-System für die Fluoreszenzdetektion im visuellen Bereich | 96 |
| 4.1.2 | MCE-System für die intrinsische OPE-Fluoreszenzdetektion | 97 |
| 4.1.3 | MCE-System für die intrinsische TPE-Fluoreszenzdetektion | 98 |
| 4.2 | EIGENBAU-PLASMAANLAGE MIT KAPAZITIVER EINKOPPLUNG | 100 |
| 4.3 | HYDROPHILIEREN VON POLYMEREN | 103 |
| 4.4 | BESTIMMUNG VON KONTAKTWINKELN | 103 |
| 4.5 | RAKELTISCH | 106 |
| 4.6 | HEIßPRÄGEEINRICHTUNG | 106 |
| 4.7 | PROTOKOLLE | 106 |
| 4.7.1 | Ansetzen von Pufferlösungen | 106 |
| 4.7.2 | Elektrophoretische Trennungen auf einem Chip | 107 |
| 4.7.3 | Durchführung einer Trennung mittels MCE | 108 |
| 4.7.4 | Probenpräparation für die intrinsische Fluoreszenzdetektion | 108 |
| 4.7.5 | Herstellung von Prägewerkzeugen | 109 |
| 4.7.6 | Herstellung von Sandwich-Chips | 110 |
| 4.7.7 | Nasschemisches Hydrophilieren der Chipkanäle | 112 |
| 4.7.8 | Vorbereiten der Proben für die Röntgeninduzierte Photonenspektroskopie (XPS) | 113 |
| 4.8 | BEZUGSQUELLEN FÜR CHEMIKALIEN | 114 |

| | | |
|----------|-----------------------------|------------|
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 115 |
| 6 | LITERATUR | 117 |

1 Zielsetzung und Motivation

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit wissenschaftlichen Weiter- und Neuentwicklungen für die Mikrochip-Elektrophorese (MCE) welche durch Miniaturisierung aus der Kapillarelektrophorese hervorgegangen ist.

Der Trend der Miniaturisierung von Geräten für die chemische Analyse und Synthese ist seit einiger Zeit ungebrochen, da die Verwendung geschrumpfter Analysesysteme interessante Eigenschaften mit sich bringt. Auf der einen Seite sind das stark verkürzte Analysenzeiten, typischerweise im Bereich von einigen Minuten bis hinab zu Millisekunden und ein extrem niedriger Chemikalienverbrauch. Andererseits ist der höhere Einfluss von Oberflächeneigenschaften auf die Trennleistung, wie auch die verminderte Trenneffizienz im Vergleich zur Kapillarelektrophorese (CE) zu nennen. Weiterhin eröffnet die MCE die Möglichkeit, hochintegrierte Systeme, welche eine Vielzahl von Prozessschritten und Systemkomponenten (wie Probenaufbereitung, Derivatisierungsreaktionen, Halbleiterlichtquellen oder optische Detektoren) auf einem wenige Zentimeter großen Bauteil vereinen, zu entwickeln. Netzspannungsunabhängige Systeme können zur Vorort-Analyse pharmazeutischer oder umweltchemischer Fragestellungen, zur Erforschung des Weltalls, oder einfach parallelisiert und für das Hochdurchsatz-Screening genutzt werden. Heutzutage werden mikrofluidische Chips als Systeme mit hohem Potenzial für die Proteomanalytik angesehen^{1,2}.

Mikrofluidische Kanäle für die MCE haben typischerweise Dimensionen zwischen zehn und einigen hundert Mikrometern. Im Bereich der Mikrofluidik treten zwei Punkte in den Vordergrund, welche in makroskopischen Systemen geringere Priorität haben:

A) die Detektion kleinster Probemengen bei geringen Schichtdicken sowie
B) die Oberflächenchemie der verwendeten Materialien durch ein hohes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis.

A) In der instrumentellen Analytik steht das Auftrennen, Qualifizieren und Quantifizieren von Stoffgemischen mittels Analysegeräten im Vordergrund. Hierfür ist die Detektion – die Generierung eines zur vorhandenen Analytmenge proportionalen elektrischen Signals – ein wesentlicher Bestandteil. Besondere Anforderungen an die Detektion der aufgetrennten

Probezonen stellen das kleine Probenvolumen im Nanoliter-Bereich, die Kanalgeometrie sowie der zweidimensionale Aufbau der Chips dar.

Die Fluoreszenzdetektion hat sich als optische Detektionstechnik in der Mikrofluidik vornehmlich aufgrund ihrer hohen Sensitivität durchgesetzt. Dabei wird üblicherweise mit Anregungswellenlängen im spektralen Bereich zwischen 330 und 900 nm gearbeitet. Hierfür ist eine Fluoreszenzmarkierung der Analyten die Regel. Diese Markierungsreaktionen sind insbesondere für Biopolymere wie Proteine problematisch, da letztere selten stöchiometrisch derivatisierbar sind, sie ihre biologische Funktion durch die Fluoreszenzmarkierung verlieren können und sich ihre isoelektrischen Eigenschaften (z.B. die Löslichkeit) ändern³. Die Senkung der Anregungsstrahlung zu Wellenlängen zwischen 200-280 nm (UVC-Bereich) bzw. 280-330 nm (UVB-Bereich) stimuliert bei einigen Analyten die intrinsische oder native Fluoreszenz. In der HPLC wie auch in der klassischen Kapillarelektrophorese (CE) wird die native Fluoreszenz bereits als Detektionsmethode genutzt. Für die MCE ist dies bisher nicht der Fall, da Mikrofluidikchips vornehmlich aus Materialien gefertigt werden, die im tiefen UV intransparent sind (Glas, Kunststoffe) und sich zudem kommerzielle Fluoreszenzmikroskope mit Borosilikatglas-Optiken als Arbeitsplattformen etabliert haben.

Eine Möglichkeit zur Steigerung der Sensitivität in der Fluoreszenzdetektion ist die Variation der Exzitationsintensität. Im tiefen UV-Bereich muss dieser besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden, da die eingestrahlten Wellenlängen energetisch im Bereich der Bindungsenergien liegen. Studien zur Auswirkung der Anregungsintensität bei 266 nm auf die individuelle Nachweisempfindlichkeit einzelner Analyte in der MCE sind bislang nicht durchgeführt worden. Ähnlich verhält es sich mit der Detektion von Neurotransmittern oder Proteinen mit Hilfe der intrinsischen Fluoreszenz. Eine Ausnahme sind die *fingerprint*-Elektropherogramme lysierter Zellen von Hellmich et al., wobei nicht klar ist, ob ganze Zellorganellen, einzelne Proteine oder andere Zellkomponenten detektiert wurden⁴.

Die zweiphotoneninduzierte Fluoreszenz ist eine Technik, für die bei der jeweils doppelten Wellenlänge der konventionellen Anregung mit sehr hohen Intensitäten gearbeitet wird. Daraus ergeben sich im Bezug auf die Detektion in mikrofluidischen Kanälen eine quasi-zweidimensionale Anregung sowie die Möglichkeit in UVC-intransparenten Chipmaterialien beispielsweise Proteine zu detektieren. Die Arbeit von Zugel et al. beschreibt einen *on chip* - Enzymassay⁵, welcher mit der nativen zweiphotoneninduzierten Fluoreszenz in Quarzchips

detektiert wird. Hier kommt ein sehr komplexer Detektionsaufbau zur Verwendung, allerdings findet eine effiziente elektrophoretische Trennung von Proteinen nicht statt.

B) In makroskopischen Systemen ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen klein, daher können die Adsorption von Molekülen oder die Katalyse von Reaktionen an Oberflächen oft vernachlässigt werden. Mit zunehmender Miniaturisierung nimmt das Oberfläche / Volumenverhältnis zu, weshalb der Oberflächenchemie in mikrofluidischen Systemen größte Aufmerksamkeit gewidmet werden muss. Einerseits können Analyten an den Oberflächen adsorbieren und andererseits beeinflusst die chemische Oberflächenbeschaffenheit die Trenneffizienz.

Gegenwärtig werden mikrofluidische Chips aus fertigungstechnischen Gründen überwiegend aus wie Glas oder vergleichsweise hydrophoben Kunststoffen hergestellt. Diese sind aus oberflächenchemischer Sicht kaum für die effiziente elektrophoretische Trennungen stark adsorbierender Analyte geeignet. So zeigen Proteine oftmals irreversible Wechselwirkungen, weshalb in der CE wie auch in der MCE Oberflächenbeschichtung zur Steigerung der Hydrophilie eingesetzt werden. Unter Verwendung hydrophiler Polymere wie Polyethylenglycol⁶, Polyacrylamid⁷ und insbesondere Polyvinylalkohol⁸ als Beschichtungsmittel lässt sich die Wandadsorption minimieren und zusätzlich der elektroosmotische Fluss reduzieren. Beide Punkte haben höhere Trenneffizienzen zur Folge. Der direkten Fertigung mikrofluidischer Chips aus diesen stark hydrophilen Polymeren steht deren Quellverhalten bzw. deren Wasserlöslichkeit im Wege, welches die Zerstörung mikrofluidischer Strukturen mit sich bringt. Die Wasserlöslichkeit von Polyvinylalkohol wurde bereits zur Herstellung von Transfertemplaten zum Kopieren von mikrofluidischen Strukturen mittels Heißprägen genutzt⁹.

Interessante Polymere, welche wasserunlösliche Vorstufen von Polyvinylalkohol darstellen sind das Polyvinylacetat und das Polyvinylbutyral. Diese sollten sich oberflächlich zu Polyvinylalkohol umsetzen lassen und aufgrund der kovalenten Bindung zum Polymersubstrat eine wasserunlösliche, permanent-hydrophile Oberfläche ergeben. Über die Mikrostrukturierung dieser Polymere wurde in der Literatur bisher nichts veröffentlicht. Im Zuge dieser Arbeit soll die Verwendbarkeit und Eignung von Polyvinylacetat und Polyvinylbutyral zur Herstellung mikrofluidischer Chips und deren anschließender Hydrophilierung im Hinblick auf den Einsatz in der MCE untersucht werden.

2 Grundlagen

2.1 Elektrophoretischer Teil

Unter dem Begriff Elektrophorese werden analytische Verfahren zur Auftrennung gelöster oder dispergierter Analyten aufgrund der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld zusammengefasst. Diese Geschwindigkeit hängt von der Ladung des betrachteten Teilchens, seiner Größe und Form, seiner Umgebung, der Temperatur und – nicht zuletzt – von der elektrischen Feldstärke ab.

Geladene Teilchen bewegen sich in Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Gleichspannungsfeldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, weshalb sie sich über eine definierte Trennstrecke in einzelne Zonen aufteilen. Zwischen den Elektroden ist eine Elektrolytlösung, welche die Grundleitfähigkeit über die Trennstrecke gewährleistet und weiterhin das elektrische Feld räumlich und zeitlich möglichst konstant hält. Normalerweise besteht diese aus Puffersystemen, um eine pH-Wert-Änderung durch Elektrolysereaktionen zu unterbinden und damit die Ladung der Analyten konstant zu halten.

Für die Elektrophorese werden verschiedene Plattformen benutzt, dabei unterscheidet man zwischen trägerhaltigen Verfahren und trägerlosen Verfahren:

Trägerhaltig (früher Elektropherographie):

- **Papierelektrophorese:** Diese älteste Methode benutzt angefeuchtete Papierstreifen als Trägermaterial für die eigentliche Trennung.
- **Gelelektrophorese (GE):** Hier wird ein Gel (Polyacrylamid, Stärke, Agarose o.ä.) als Medium für die Trennung der Analyten eingesetzt.
- **Kapillargelelektrophorese (CGE):** Eine gelgefüllte Kapillare mit einem Innendurchmesser von 20-200 µm dient als Trennmedium.

Trägerfrei:

- **Kapillarzonenlektrophorese (CZE):** Wiederum findet die Trennung in einer Kapillare statt, diesmal ist sie jedoch ohne Trägermedium nur mit Elektrolytlösung gefüllt.

- Mikrochipelektrophorese (MCE): Bei diesem hochminiaturisierten Verfahren sind mikrofluidische Kanäle in einem quasi-zweidimensionalen Chip integriert. Übliche Dimensionen sind 20-50 μm Kanalbreite und 5-40 μm Kanalhöhe.

Vorteile der trägerbasierten Elektrophorese sind sehr hohe zu erreichende Effizienzen sowie das Erhalten diskreter Banden, welche vereinzelt weiteranalysiert werden können. Nachteilig sind die relativ geringen nutzbaren Trennpotentiale, da bei hohen Potentialen bedingt durch den Ohmschen Widerstand übermäßige Joulesche Wärme entsteht, welche Temperaturgradienten und damit konvektive Strömungen zur Folge hat. Diese Strömungen wirken dem Trennprozess entgegen und verringern die Trenneffizienz.

Die Detektion in der Elektropherographie erfolgt meistens in einem getrennten Arbeitsschritt. Nach der Auftrennung durchlaufen die Analyten einen Anfärbeprozess und werden anschließend durch Remissionsmessungen der gebildeten Farbzonen quantifiziert. Dabei wird die Probe beleuchtet und das diffus reflektierte Licht detektiert. Neben dem erhöhten operativen Aufwand stellt der Anfärbeprozess eine große Herausforderung für die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung dar¹⁰.

In trägerfreien Systemen ist die Messung hingegen bei höheren Feldstärken möglich, was die Analysenzeiten stark verkürzt. Eine Voraussetzung hierfür ist jedoch die Zonenstabilität. Ehemals wurde diese durch antikonvektive Zusätze im Trennsystem gewährleistet, im Laufe der Miniaturisierung und dem Einsatz von Kapillaren mit Innendurchmessern im μm -Bereich wurde diese Funktion durch Kapillarkräfte übernommen¹¹. Eine weitere Folge der Miniaturisierung ist ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, welches eine effiziente Abführung der Jouleschen Wärme und damit höhere Feldstärken ermöglicht, gleichzeitig aber den Einfluss von Oberflächeneffekten (z.B. adsorptive Wechselwirkungen) in den Vordergrund treten lässt. Seit Beginn der achtziger Jahre wurde die Elektrophorese in noch kleineren Quarzkapillaren^{12,13} und seit Beginn der Neunziger schließlich in mikrofluidischen Chips entwickelt¹⁴⁻¹⁷.

Als Detektionsmethoden kommen in der Kapillarelektrophorese überwiegend (*on column*-) Techniken aus der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie zum Einsatz, wie die UV-Absorptionsdetektion¹⁸, die Leitfähigkeitsdetektion¹⁹, die Fluoreszenzdetektion²⁰ sowie *off-column*-Techniken wie z.B. die Massenspektrometrie^{21,22}.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Kapillarzonelektrophorese (CZE bzw. CE) und Mikrochip(zonen)elektrophorese (MCE) gearbeitet. Der apparative Aufbau der beiden Techniken unterscheidet sich nur geringfügig, aus praktischen Gründen ist aber die technische Realisierung (z.B. der optischen Detektion) unterschiedlich. Die schematische Darstellung eines klassischen Kapillarelektrophorese-Systems ist in Abb. 1 gezeigt.

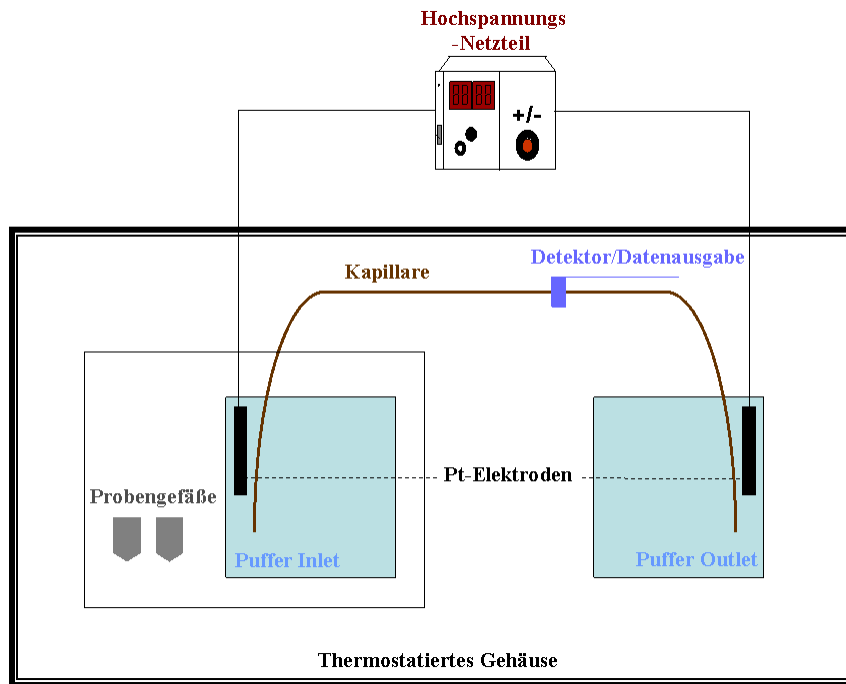


Abb. 1 Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Systems

Für die Chip-Elektrophorese wird die Kapillare durch einen zweidimensionalen Chip ersetzt, der zwei sich kreuzende Kanäle trägt. In Abb. 2 ist die Fotografie eines mikrofluidischen Chips aus Glas dargestellt. Die Bohrungen in der Deckplatte dienen als Puffer- bzw. Probengefäße und als Kontaktstellen zur mikrofluidischen Struktur. Die Trennstrecke dieses Chips ist verglichen mit der Kapillare um ca. eine Größenordnung kleiner²³. Ferner ist eine rasterartige Hilfsstruktur sichtbar, welche dem Hersteller ein Zusammenfügen (*bonding*) beider Glasplatten ohne Lufteinschlüsse erleichtert.

Weiterhin wird in der MCE die Probe im Kreuzungsbereich elektrokinetisch aus einem zum Trennkanal orthogonalen Analytfluss injiziert, während in der CE ein schlichter Tausch der Inlet-Lösungen erfolgt. Für die Probeninjektion wird in der MCE daher ein Mehrkanal-Netzteil oder ein schaltbares Hochspannungs-Widerstandsnetzwerk benötigt.

Drittens kann aufgrund der größeren Wärmekapazität des Mikrofluidik-Chips auf das thermostatisierte Gehäuse verzichtet werden, welches als Senke für die entstehende Joulesche Wärme dient.

Viertens gibt es Unterschiede in den Detektorlayouts. Auf mögliche Detektionstechniken für die MCE und deren Aufbau wird in Kap. 2.3.3 auf Seite 29 näher eingegangen.

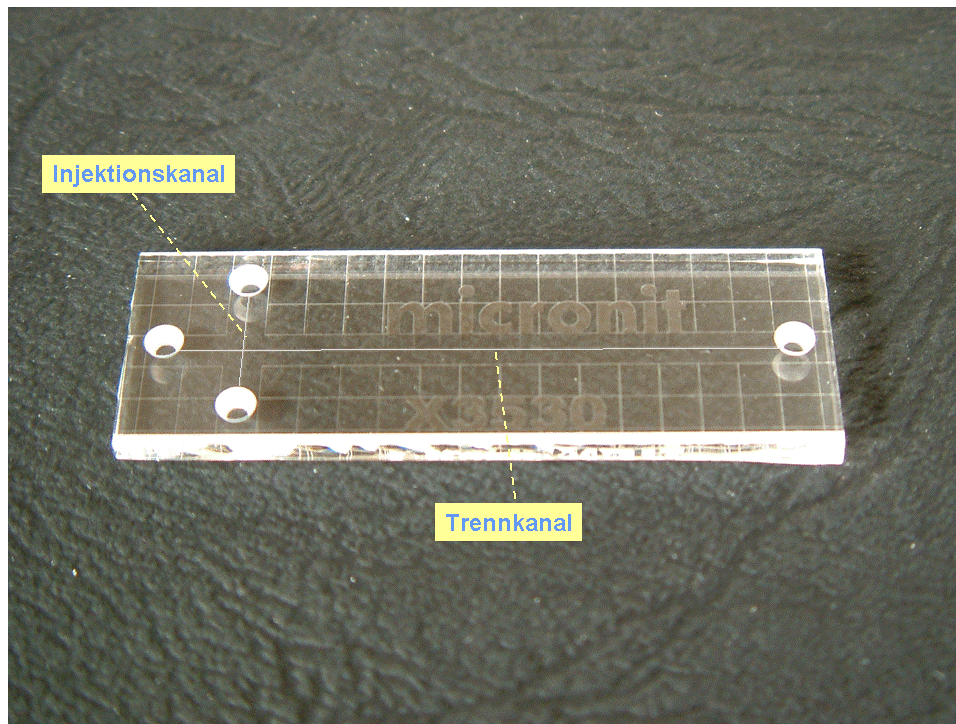


Abb. 2 Fotografie eines mikrofluidischen Glaschips für die Elektrophorese

Wichtige Vorteile mikrofluidischer Bausteine im Gegensatz zu Kapillaren sind kürzere Analysezeiten²⁴, geringere benötigte Probemengen²⁵, ein hohes Integrationspotenzial²⁶ und die einfach zu realisierende Parallelisierbarkeit²⁷⁻²⁹ (*Multiplexing*). Dem stehen eine ungünstigere Detektionsgeometrie, sowie bedingt durch die kürzere Trennstrecke, geringere Trenneffizienzen und kleinere Peakkapazitäten, gegenüber.

2.1.1 Grundlagen elektrokinetischer Erscheinungen

Die Zeit, die ein Ion zur Bewegung über eine definierte Strecke im elektrischen Feld benötigt, nennt man Migrationszeit t_m . Diese Größe wird analog zu der aus chromatographischen Methoden bekannten Retentionszeit t_r verwendet und dient unter definierten Bedingungen als charakteristische Größe für ein bestimmtes Ion.

Die Wanderungs- oder Migrationsgeschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Feld ist abhängig von

1. Teilcheneigenschaften: Ladung, Größe, Geometrie, pK-Werte

2. Lösungsmiteleigenschaften: Viskosität, Ionenkonzentration, pH-Wert, Dielektrizitätskonstante
3. äußeren Eigenschaften: Feldstärke, Temperatur

Im Normalfall ist die Migrationsgeschwindigkeit unabhängig von der Analytkonzentration im Puffer. Eine Ausnahme stellt die Überladung von elektrophoretischen Trennsystemen dar, die es aus diesem Grund zu verhindern gilt.

Beim Anlegen eines elektrischen Feldes über eine Kapillare treten zwei sich überlagernde Effekte auf, die eine Bewegung der Ionen bewirken: Die Elektrophorese und die Elektroosmose.

2.1.1.1 Elektrophorese

Die Elektrophorese bewirkt eine Bewegung der ionischen Bestandteile zum Pol der entgegengesetzten Ladung. Befindet sich ein geladener Analyt im elektrischen Feld, so wirkt auf ihn die Beschleunigungskraft F_{el} :

$$F_{el} = z * e_0 * \vec{E} \quad \text{[Gleichung 1] ;}$$

wobei z = Ladungszahl des Ions
 e_0 = Elementarladung ($1,6 * 10^{-19}$ [A*s])
 E = Betrag der elektrischen Feldstärke [V/m]

Die Stokes'sche Reibungskraft wirkt der elektrischen Beschleunigungskraft entgegen. Unter der Annahme einer sphärisch symmetrischen Ladungsverteilung des Ions gilt:

$$F_{Stokes} = 6 * \pi * \eta * r_a * v_{ep} \quad \text{[Gleichung 2] ;}$$

wobei $\pi \approx 3,14159$
 r_a = Radius des Teilchens [m]
 η = dynamische Viskosität [Pa*s]
 v_{ep} = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [$m*s^{-1}$]

Nach einer Induktionsphase stellt sich zwischen diesen beiden Kräften ein Gleichgewichtszustand ein. Es gilt:

$$F_{Stokes} = F_{el} \Leftrightarrow z * e_0 * E = 6 * \pi * \eta * r_a * v_{ep} \Leftrightarrow v_{ep} = \frac{ze}{6\pi\eta r_a} * E \equiv k * E \quad \text{[Gleichung 3] ;}$$

wobei z = Ladung des Teilchens
 e = Elementarladung Elektron [C]
 E = Betrag der elektrischen Feldstärke [V/m]

η = dynamische Viskosität [Pa*s]

r = Teilchenradius [m]

v_{ep} = elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit [$m \cdot s^{-1}$]

k = elektrophoretische Mobilität [$m^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$]

Dabei ist der Koeffizient k als elektrophoretische Mobilität μ_{ep} definiert. Diese Gleichung entspricht dem ersten Kohlrausch'schen Gesetz.

In realen Trennsystemen wirken neben der Reibungskraft noch weitere Kräfte auf die zu trennenden Analyten ein. Beispielsweise liegt ein Analyt-Anion nicht isoliert vor, vielmehr ist es von einer positiv geladenen Kationenwolke umgeben (Debye-Hückel-Theorie). Diese Wechselwirkung verringert die effektive Ladung des Anions durch Abschirmung und somit die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Weiterhin wird genähert, indem eine sphärisch-symmetrische Ladungsverteilung angenommen wird. Diese liegt streng genommen nur im Gleichgewichtszustand ohne externes elektrisches Feld vor. Die durch ein angelegtes elektrisches Feld getrennten Ladungszentren von Zentral-Ion und Solvathülle streben wiederum einen Gleichgewichtszustand an, was letztlich in der Abbremsung des migrierenden Zentralions durch die Ionenwolke resultiert. In der Theorie wird der Ladungszustand eines gegebenen Ions durch das Zetapotenzial der elektrischen Doppelschicht beschrieben.

Die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung gibt eine quantitative Beschreibung der elektrophoretischen Mobilität des solvatisierten Zentralions und dem Zetapotenzial.

$$\mu_{ep} = -\frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{\eta} \zeta_{ep}$$

[Gleichung 4] ;

wobei ϵ_0 = Dielektrizitätskonstante des Vakuums ($8,854 [A \cdot s / (V \cdot m)]$)

ϵ_r = Dielektrizitätskonstante des Elektrolyts [$A \cdot s / (V \cdot m)$]

η = dynamische Viskosität der Lösung [Pa*s]

ζ_{ep} = Zetapotenzial [V]

2.1.1.2 Elektroosmose

Die Elektroosmose ist ein Phänomen, das parallel zu elektrophoretischen Effekten auftritt. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes, dessen Vektor in Richtung des Kapillarverlaufs zeigt, wird eine Strömung induziert, die einer Nettobewegung aller Moleküle entlang der Kapillare entspricht.

Generell treten an Fest-zu-Flüssig-Phasenübergängen Wechselwirkungen zwischen beiden Phasen auf. Dabei lagern sich gelöste Stoffe oder Lösungsmittelmoleküle selbst an der festen Phase an. Die Silanolgruppen der Oberfläche einer Quarzkapillare liegen bei pH-Werten ungleich des isoelektrischen Punktes teilweise geladen vor. Daraus resultiert für einen pH-Wert > 2 eine negative Nettoladung der Kapillaroberfläche. Kationen sowie dipolare Lösungsmittelmoleküle lagern sich durch Coulomb-Kräfte an diese Festkörperoberfläche an und bedecken diese mit einer starren Schicht. Zusammengenommen wird die geladene Kapillaroberfläche mit angelagerten Gegenionen als elektrische Doppelschicht bezeichnet. Mit steigendem Abstand zur Wand vergrößert sich die mittlere Entfernung der Kationen (diffuse Schicht), bis sie den, für eine gegebene Ionenkonzentration charakteristischen Wert, erreicht hat.

Legt man ein elektrisches Feld an, so bewegt sich die mobile wandnahe Ionenschicht, im Falle von Quarzkapillaren und pH-Werten oberhalb des isoelektrischen Punktes, in Richtung der Kathode. Dabei werden umliegende Lösungsmittelmoleküle mitgerissen, was letztlich eine Flüssigkeitsströmung in Kathodenrichtung zur Folge hat. Dieser elektroosmotische Fluss (EOF) kann als elektrisch angetriebene Pumpe angesehen werden, die den elektrophoretischen Massetransport der Analyten durch eine Kapillare überlagert.

Der EOF kann quantitativ durch die Helmholtz-Gleichung beschrieben werden.

$$EOF = \frac{\varepsilon * E * \xi}{4 * \pi * \eta}$$

[Gleichung 5] ;

wobei ε = Dielektrizitätskonstante [A*s / (V*m)]
 E = Betrag der elektrischen Feldstärke [V/m]
 ξ = Zeta-Potenzial [V]
 $\pi \approx 3,14159$
 η = dynamische Viskosität [Pa*s]

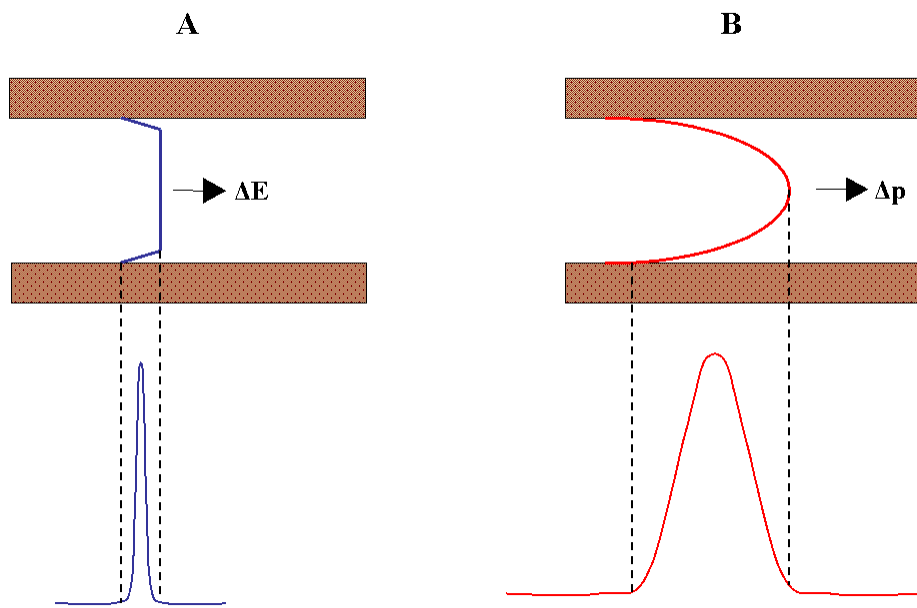


Abb. 3 Vergleich von elektrokinetischem und hydrodynamischem Strömungsprofil

In Quarzkapillaren nimmt der EOF sowohl mit steigendem pH-Wert, als auch mit abnehmender Pufferkonzentration zu. Experimentell ist der Betrag des EOFs z.B. durch den Zusatz von Neutralmarkern zur Probe bestimmbar.

Das resultierende Strömungsprofil des EOF ist stempelförmig (Abb. 3A). Dieses trägt im Gegensatz zum druckinduzierten Hagen-Poiseuille'schen-Strömungsprofil (Abb. 3 B) weniger stark zur Zonenverbreiterung bei.

Einer quantitativen Beschreibung des Grenzflächenpotenzials zwischen Puffer und Kapillarwand wird das Modell von Stern³⁰ gerecht. Das Potenzial sinkt in der starren Schicht (Stern-Schicht) linear mit dem Abstand zur Phasengrenze, wie in Abb. 4 gezeigt. Diese dünne Ionenschicht kann als stationär betrachtet werden.

Das Potenzial an der Scherfläche von starrer und diffuser Schicht wird ξ -Potenzial genannt. Durch Strömungspotenzialmessungen ist es eine experimentell zugängliche Größe.

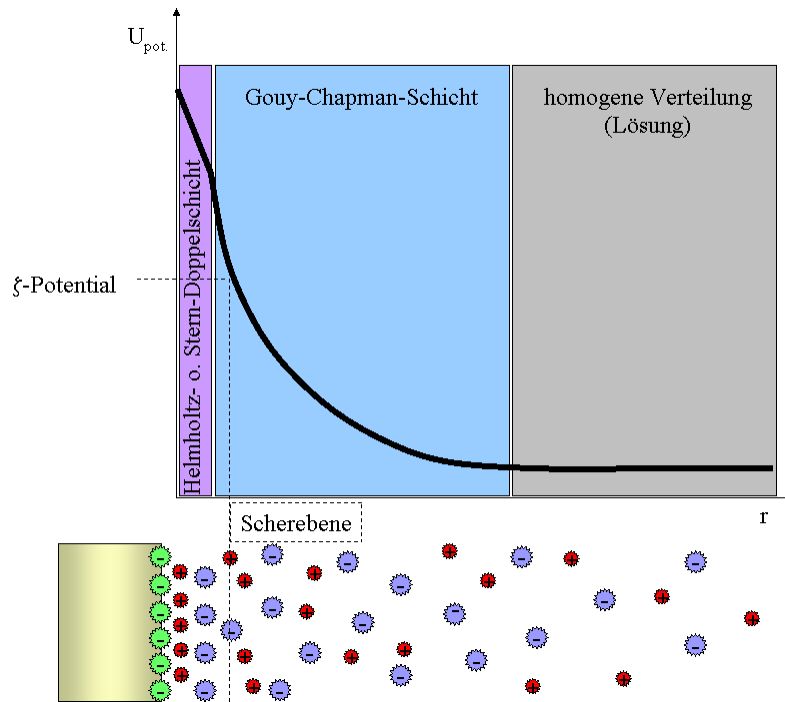


Abb. 4 Phasengrenze Feststoff - Elektrolyt nach dem kombinierten Gouy-Chapman-Stern-Modell

Von der diffusen Schicht findet ein Ionenaustausch mit der Elektrolytlösung statt, wobei das Potenzial quer zum Kapillarverlauf exponentiell sinkt. Dieser exponentielle Teil kann angenähert werden durch die folgende Gleichung:

$$U_{Pot} = \xi * e^{-\kappa * x}$$

[Gleichung 6] ;

wobei U_{Pot} = Potenzial an der Grenzfläche
 ξ = Zeta-Potenzial
 κ = Debye-Länge (ein Maß für die Doppelschichtdicke)
 x = Entfernung von der Wand

Im Folgenden wird der Einfluss des EOF auf elektrophoretische Trennungen diskutiert.

Bei der Trennung von kationischen Analyten verkürzt der EOF in Quarzkapillaren (kathodenseitige Detektion) bei pH-Werten > 2 die Analysenzeiten. Bei anionischen Analyten hingegen erlaubt er überhaupt erst deren kathodische Detektion, sofern der EOF größer ist als die elektrophoretische Mobilität (welche in Gegenrichtung wirkt). Ist der EOF kleiner, als die elektrophoretische Mobilität der Analyten kann durch Umpolung der Spannungsquelle auf der Anodenseite detektiert werden.

Der EOF trägt zwar zum Massetransport in der Kapillare, nicht jedoch zur Auftrennung des Analytgemisches bei. Daher ist die gezielte Unterdrückung des EOF besonders wünschenswert, wenn bei Kationen-Trennungen auf kurzen Trennstrecken hohe Auflösungen erzielt werden sollen.

Ein weiterer Grund für die Unterdrückung des EOFs ist die bessere Reproduzierbarkeit der absoluten Migrationszeiten. Diese resultieren zum einen aus Analytadsorption an den Kapillarwänden, welche das ξ -Potenzial ändert. Zum anderen kommt es in unbehandelten Kapillaren nach pH-Wert-Wechseln an fused-silica Oberflächen durch unterschiedliche Protonierungsgrade der Silanolgruppen zu Hystereseerscheinungen³¹. Diese bewirken, dass die absoluten Analyt-Migrationszeiten von der Vorkonditionierung der Oberflächen abhängig sind, weshalb üblicherweise mit internen Standards gearbeitet wird, auf deren Migrationszeit normiert wird.

Besser als diese Korrektur in der Datenauswertung wäre die Sicherstellung eines reproduzierbaren EOFs, was zudem auch einen positiven Einfluss im Hinblick auf die Injektionen in der MCE hätte. Das lässt sich durch Oberflächenmodifikation, also der Beschichtung der Kapillarwände erreichen. Dabei unterscheidet man die dynamische und die permanente Desaktivierung⁸ der Oberfläche. Bei ersterer werden stark wechselwirkende Substanzen als Pufferadditive verwendet, welche an der Kapillarwand adsorbieren und die Silanolgruppen zeitlich begrenzt blockieren³². Aufgrund des dynamischen Gleichgewichts von Adsorption und Resorption hat sich der Begriff der dynamischen Belegungen durchgesetzt. Dynamische Beschichtungen machen vor allem für Elektrophorese-Chips aus organischen polymeren Materialien Sinn, da Oberflächenreaktionen (analog der Silanisierung von Glas) aufgrund der chemischen Variabilität schwierig anzuwenden sind und weiterhin mehrstufige Reaktionsprozesse der kostengünstigen Massenfertigung entgegenstünden.

Für die permanente Oberflächenmodifikation von Glas-Chips können die Silanolgruppen derivatisiert³³⁻³⁵, die Glasoberfläche kovalent an Polymere geknüpft^{36,37} oder mit einem Polymerfilm beschichtet werden. Bei der Beschichtung gibt es zwei Strategien: Entweder es werden von vorneherein Elektrolyt-unlösliche Polymere verwendet, oder nach der Beschichtungsprozedur mit wasserlöslichen Polymeren werden die Schichten thermisch, bzw. durch chemische Vernetzung³⁸ immobilisiert.

Die räumliche Trennung von Kapillaroberfläche und Elektrolyt durch die Beschichtung führt zu einer verminderten Dissoziation oberflächennaher Silanolgruppen und damit zu einer Reduzierung des EOFs. Ein positiver Nebeneffekt ist das Verringern von Analyt-Wand-

Wechselwirkungen, die insbesondere bei Proteinen auftreten. Diese multifunktionellen Biopolymere treten leicht in Wechselwirkung mit der hydrophilen, meist anionischen Kapillaroberfläche. Die Unterbindung von Analyt-Wand-Wechselwirkungen erhöht besonders bei der Trennung basischer Proteine die Trenneffizienz drastisch^{38,39}.

2.2 Bestimmung der Oberflächenhydrophilie

Die Benetzungsfähigkeit eines planaren Körpers mit einer Flüssigkeit lässt sich quantitativ durch Bestimmung des Kontaktwinkels charakterisieren. Als Modell diene eine Substratoberfläche mit darauf befindlichen Flüssigkeitstropfen⁴⁰. Dieser ist nicht kugelförmig (wie es in der Schwerelosigkeit der Fall wäre), sondern durch die Summe von Gewichtskraft, Oberflächenspannung und Grenzflächenkraft zu einer mehr oder minder abgeflachten Kugelkalotte verformt. Der Kontaktwinkel (unexakt oft auch als Randwinkel bezeichnet) liegt – nach der *Methode des liegenden Tropfens* – zwischen dem Rand des Flüssigkeitstropfens und der Oberfläche. Er wird definitionsgemäß zur Tropfenmitte hin bestimmt (gemäß Abb. 5). Die Begriffsbestimmungen und die Methode sind in einer Europäischen Norm⁴¹ zusammengefasst.

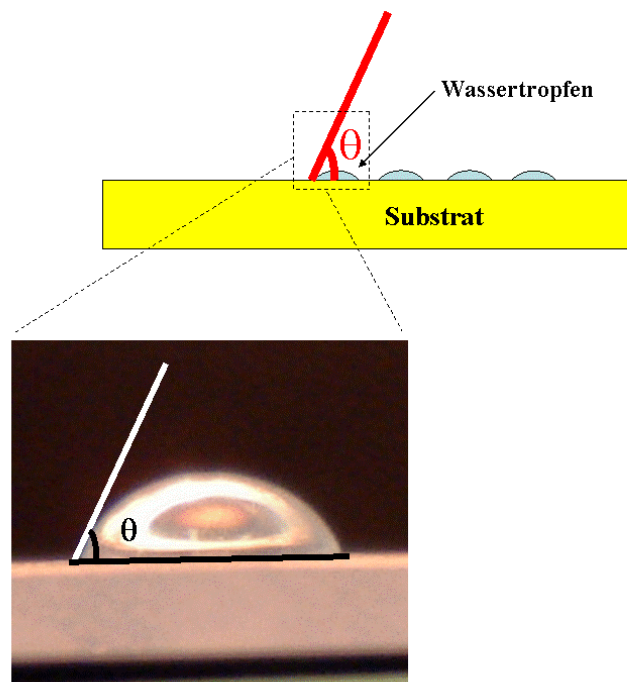


Abb. 5 Bestimmung des Kontaktwinkels nach der *Methode des liegenden Tropfens* (statisch)

Die Größe des Kontaktwinkels hängt u. a. von den Wechselwirkungen des Stoffes mit der Oberfläche ab. Mittels der Youngschen Gleichung bzw. der Young-Laplace-Gleichung lässt sich bei bekannter Oberflächenspannung der Flüssigkeit aus den Kontaktwinkeln die Oberflächenenergie eines Substrates bestimmen:

$$\theta = \arccos \frac{\sigma_O - \sigma_{OF}}{\sigma_F} \Leftrightarrow \cos(\theta) = \frac{\sigma_O - \sigma_{OF}}{\sigma_F} \Leftrightarrow \sigma_O = \sigma_F \times \cos(\theta) + \sigma_{OF}$$

θ Kontaktwinkel

σ_O Grenzflächenenergie der Oberfläche

σ_{OF} Grenzflächenenergie zwischen Festkörper und Oberfläche

σ_F Grenzflächenenergie der Flüssigkeit

Es gilt: Je kleiner der Kontaktwinkel, desto besser ist die Benetzung des Substrates, desto höher seine Hydrophilie – sofern Wasser als Testflüssigkeit verwendet wird. Das völlige Zerlaufen der Flüssigkeit auf der Oberfläche wird als Spreiten bezeichnet.

Die freie Oberflächenenergie ist definiert als reversible Arbeit, die isochor und isotherm aufgewendet werden muss, um eine gegebene Flüssigkeitsoberfläche zu vergrößern. Es gibt zahlreiche mathematische Verfahren zur Bestimmung der freien Oberflächenenergie aus den Kontaktwinkeln, wie z.B.

- a) das Verfahren nach Schultz^{42,43}
- b) das Verfahren nach Oss, Good und Chaudhury
- c) das Verfahren nach Owens, Wendt, Rabel und Kaelble⁴⁴
- d) das Verfahren nach Wu⁴⁵
- e) das Verfahren nach Zisman⁴⁶.

Zur Vereinfachung wurden im Zuge dieser Arbeit nicht die freien Oberflächenenergien selbst, sondern lediglich die erhaltenen Kontaktwinkel im Rahmen ihrer Fehlertoleranzen verglichen. Hierdurch können relative Aussagen bezüglich der Benetzbarkeit, also der Hydrophilie der Oberfläche, erhalten werden.

2.3 Detektion

Die Fluoreszenz zur Analytdetektion hat in den letzten Jahrzehnten vor allem in der Chemie, Biologie und den Lebenswissenschaften ein breites Anwendungsspektrum gefunden. Ausschlaggebend dafür sind die hohe Sensitivität einerseits und die hohe Selektivität andererseits.

Erstmals publiziert wurde das Phänomen der Fluoreszenz im Jahre 1845 von Sir John Frederick William Herschel. Als Fluorophor diente eine Chininsulfatlösung in weinsaurer Lösung⁴⁷. Die einseitige Bestrahlung dieser farblosen Lösung mittels Sonnenlicht offenbarte eine bläuliches Schimmern, die Fluoreszenz. Die erste nutzbare Anwendung gab es ungefähr ein Jahrhundert später als vom US-Verteidigungsministerium die Quantifizierung von Malariamitteln (wie z.B. Chinin) in menschlichen Körperflüssigkeiten vorgenommen wurde⁴⁸.

Die Anzahl an fluoreszenz-basierten Applikationen wie auch die Vielzahl und Qualität der Instrumentierung wachsen stetig. Fluoreszenzmessungen haben andere hochempfindliche Techniken wie beispielsweise die radioaktive Markierung zunehmend verdrängt. Heutzutage wird die Fluoreszenzdetektion in der Praxis als leistungsfähige Detektionstechnik mit einer Vielzahl von analytischen Trennverfahren gekoppelt. Im chemischen Laboratorium gehört sie als hochselektive und -sensitive Methode gegenwärtig zu den Standardverfahren.

2.3.1 Grundlagen zur einzelphotoneninduzierten Fluoreszenz

Das Phänomen der Lumineszenz beruht auf der Relaxation eines Elektrons aus einem angeregten elektronischen Energieniveau in den elektronischen Grundzustand unter Abstrahlung eines Photons. Typische Emissionswellenlängen liegen zwischen dem ultravioletten und dem nahen infraroten Spektralbereich⁴⁹. Tritt diese spinerlaubte Relaxation innerhalb von 10^{-10} - 10^{-7} s nach der Anregung ein, so spricht man von Fluoreszenz, ist die Zeitverzögerung länger und spinverboten von Phosphoreszenz. Der Quantensprung des Elektrons ins höhere Energieniveau erfolgt üblicherweise durch Absorption elektromagnetischer Wellen.

In den folgenden Betrachtungen wird ausschließlich die Stokes'sche Fluoreszenz diskutiert, welche in kondensierter Materie dominiert. Zur Verdeutlichung des Fluoreszenzphänomens sind die valenzelektronischen Energieniveaus zu betrachtender Moleküle in Abb. 6 dargestellt.

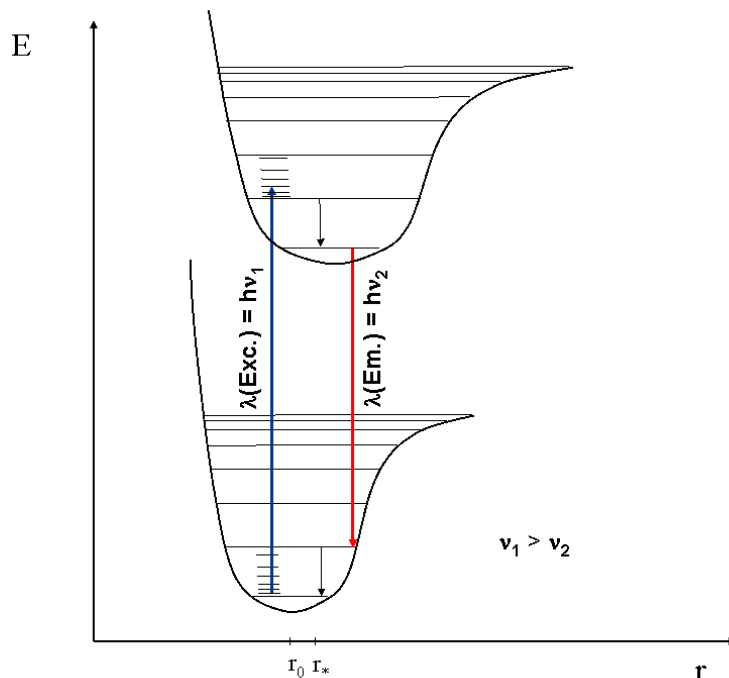


Abb. 6 Potenzialdiagramm eines Fluorophors mit Fluoreszenzübergang

Gemäß dem Frank-Condon-Prinzip, welches auf der Annahme basiert, dass die Elektronen aufgrund geringerer Masse ein im Vergleich zu den Atomrümpfen vernachlässigbares Trägheitsmoment besitzen, kann die Promotion von Elektronen in energetisch höhere Orbitale nur streng vertikal erfolgen. Der Vorgang der Photonenabsorption läuft innerhalb weniger Femtosekunden ab. Das elektrische Kraftfeld der promovierten Elektronen ist nicht mehr mit den trägen Atomrümpfen im Gleichgewichtszustand, dementsprechend setzt eine Rotations- / Schwingungsrelaxation bis zum Gleichgewichtsabstand des angeregten Teilchens ein. Diese Thermalisierung nimmt einige Picosekunden in Anspruch. Aufgrund der geringen Abstände beteiligter Energieniveaus werden keine elektromagnetischen Wellen im sichtbaren Bereich emittiert.

Typischerweise liegt die Fluoreszenzlebensdauer elektronisch angeregter Fluorophore im Nanosekundenbereich. Durch die Relaxation des angeregten Fluorophors in den elektronischen Grundzustand wird sichtbare elektromagnetische Strahlung emittiert. Dieses Emissionslicht ist somit zu größeren Wellenlängen, also niedrigerer Energie als das Anregungslicht verschoben. Die Relaxation in den elektronischen Grundzustand gehorcht

analog der Anregung dem Frank-Condon-Prinzip. Als Folge eines vertikalen Überganges vollzieht sich die Lichtemission mit größerer Wahrscheinlichkeit in ein schwingungsangeregtes Niveau des elektronischen Grundzustands. Gewöhnlich tritt anschließend eine Rotations- / Schwingungsrelaxation in die thermische Gleichgewichtslage der betrachteten Atome ein. Der gesamte Prozess kann nun von vorne beginnen.

In der Praxis sind Fluoreszenzspektren meist spiegelbildlich zu den jeweiligen Absorptionsspektren. Dieser Sachverhalt ist eine Folge des Fluoreszenzüberganges in ein angeregtes Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes.

Die strahlungslosen Rotations- / Schwingungsrelaxationen, die pro durchlaufenem Fluoreszenzprozess stattfinden, wandeln einen Teil der Anregungsenergie in thermische Energie um. Gemäß dem 1. Hauptsatz der Thermodynamik ist der Energieverlust der Emissionsstrahlung gleich der thermischen Energie, sofern andere Prozesse vernachlässigt werden. Die Differenz zwischen $\lambda_{Em.}$ und $\lambda_{Exc.}$ heißt Stokes'sche Verschiebung nach ihrem Entdecker Sir George Gabriel Stokes⁵⁰.

Laut der Regel von Kasha⁵¹ ist die Struktur eines Fluoreszenzspektrums von der Anregungswellenlänge unabhängig, sofern es nur ein angeregtes Energieniveau gibt. Die effektivste Fluoreszenzanregung eines Moleküls lässt sich bei einer Wellenlänge erzielen, die kleiner ist als die des Fluoreszenzlichtes, und bei der der Absorptionsquerschnitt für die Anregungswellenlänge maximal ist.

Eine wichtige Größe für die Fluoreszenzdetektion ist die Effizienz eines Fluorophors, Lichtquanten abzugeben. Die Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{Fl.}$ ist definiert als Verhältnis aus der Anzahl emittierter und absorbierter Photonen. Sie kann beschrieben werden durch die folgende Gleichung:

$$\Phi_{Fl.} = \frac{n_{Em.}}{n_{Abs.}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{dunkel}} = \tau * \Gamma$$

[Gleichung 7] ;

wobei Γ = Ratenkonstante der Emission

k_{dunkel} = Löschrage = Summe aller Ratenkonstanten strahlungsloser Prozesse

τ = Lebensdauer

Sowohl Fluoreszenzwellenlänge, als auch Intensität sind abhängig von äußeren Parametern wie pH-Wert, Ionenstärke des Puffers und Polarität des Lösungsmittels.

Die Fluoreszenzintensität als Funktion von der Fluorophorkonzentration kann analog zum Boguer-Lambert-Beerschen Gesetz durch den folgenden Zusammenhang beschrieben werden (Gesetz von Parker):

$$FI = I_0 * k * \phi * (\varepsilon * c * d)$$

[Gleichung 8]

wobei FI = Fluoreszenzintensität
 I_0 = Intensität des eingestrahnten Lichts
 K = geometrischer Faktor
 ϕ = Fluoreszenzquantenausbeute
 ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
 c = Fluorophorkonzentration
 d = optische Schichtdicke

Als Maß für die Empfindlichkeit einer Messung wird das Signal-/Rauschverhältnis (SNR) angegeben. Dieses ist definiert als Quotient der mittleren Höhe des Nutzsignals (Analytsignal) und der mittleren Höhe des Störsignals (Rauschen) der selben Quelle. Das Rauschen entspricht der Standardabweichung des Nullsignals und wurde in der vorliegenden Arbeit per Auswertesoftware bestimmt.

Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) eines Stoffes ist die Konzentration, bei der dieser Stoff reproduzierbar qualitativ nachgewiesen werden kann. In der analytischen Chemie gilt ein Stoff als zuverlässig nachgewiesen, wenn die Ungenauigkeit des Messwerts kleiner als die dreifache Standardabweichung des Untergrundsignals ($SNR \geq 3$) ist.

2.3.2 Grundlagen zur zweiphotoneninduzierten Fluoreszenz

Die praktisch zeitgleiche Absorption zweier Photonen durch ein Molekül wurde 1931 theoretisch beschrieben⁵², allerdings erst viel später (durch Entwicklung intensivster Lichtquellen) experimentell bestätigt⁵³. Die Anwendungsbereiche der zweiphotoneninduzierten Fluoreszenz reichen von mikroskopischen Techniken, über 3-D optische Datenspeicher⁵⁴ bis hin zur Photoaktivierung bzw. den Transport pharmazeutischer Wirkstoffe⁵⁵⁻⁵⁷.

Der Mechanismus der zweiphotoneninduzierten Fluoreszenz (*two photon excited* TPE) unterscheidet sich vom „klassischen“ Fluoreszenzmechanismus mit Einzelphotonenanregung durch die Methode mit der das fluoreszierende Molekül in den angeregten Zustand gehoben wird. Während bei der Einphotonenanregung (*one photon excitation* OPE) ein Photon zur

Promotion des Elektrons erforderlich ist, sind es bei der TPE zwei Photonen, die zeitgleich absorbiert werden (Abb. 7). Somit verteilt sich die für den Übergang benötigte Energie auf zwei Photonen. Es existiert kein stabiler Übergangszustand, die gestrichelte Linie stellt einen virtuellen Zustand dar.

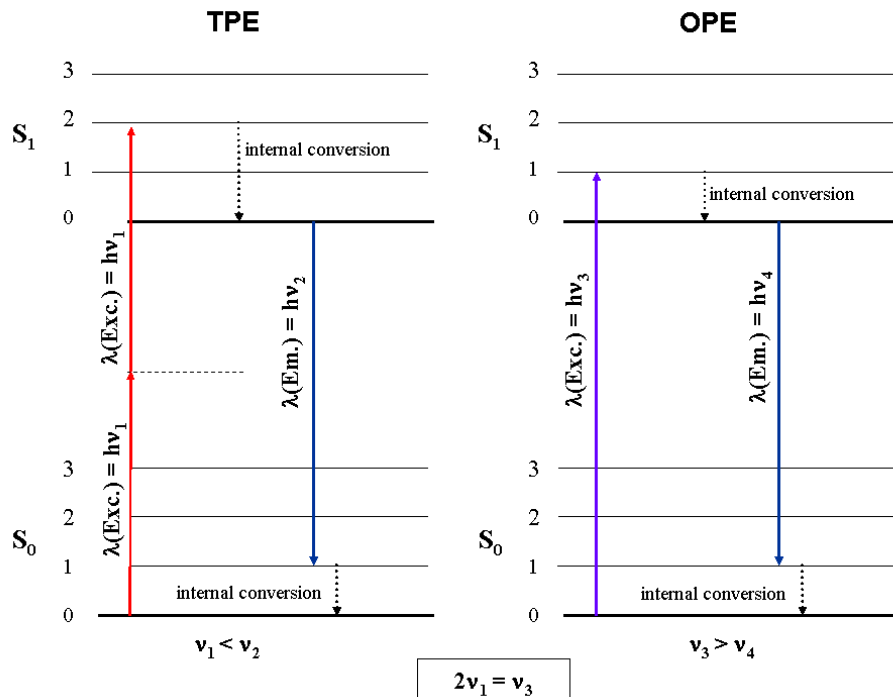


Abb. 7 Gegenüberstellung der Jablonski-Termschemen von TPE und OPE

Betrachtet man einen konkreten elektronischen Übergang, der sich bspw. bei 280 nm mittels OPE optimal zur Fluoreszenz stimulieren lässt, so wird dieser durch Absorption zweier Photonen bei 560 nm mittels TPE anregbar sein (Randbedingung: es werden nur Photonen gleicher Energie betrachtet).

Die Übergangswahrscheinlichkeit für das Elektron durch Absorption von zwei Photonen in den angeregten Zustand zu gelangen ist relativ gering, zumal beide Photonen nahezu zeitgleich absorbiert werden müssen, da andernfalls die absorbierte Energie eines Photons in Schwingung und Rotation konvertiert wird und keine Promotion des Elektrons in den angeregten Zustand erfolgen kann⁵⁸. Um dennoch die sehr unwahrscheinliche Absorption zweier Photonen zu forcieren werden enorme Photonendichten benötigt, die sich durch eine Fokussierung gepulster Laser auf einen sehr kleinen Punkt erreichen lassen⁵⁹. Nur in der Brennebene des Objektivs kann die TPE bedingt durch die hohe Photonendichte entstehen, weshalb dieses Anregungsverfahren prinzipbedingt als quasi-zweidimensional anzusehen ist^{60,61} (die „Höhe“ der Fokalebene variiert je nach Aufbau in nm- μ m Dimensionen). Im Gegensatz zur TPE-Fluoreszenz wird bei der klassischen Fluoreszenzanregung mit

fokussiertem Licht die Emission im gesamten Doppelkegel induziert, auch wenn in der Fokusebene die höchste Anregungsintensität herrscht. Dieser Sachverhalt ist schematisch in Abb. 8 gegenübergestellt, die Photographien realer Anregungsvolumina finden sich in der Literatur.

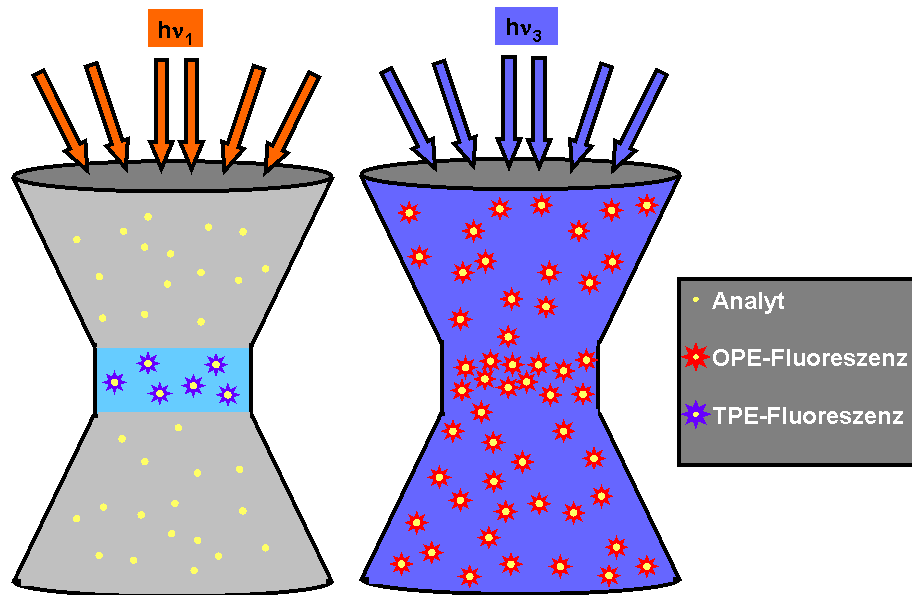


Abb. 8 Doppelkegel bei der TPE-Fluoreszenz (links) und der OPE-Fluoreszenz (rechts)

Ein wesentlicher Unterschied der TPE im Vergleich zur OPE ist das Verhalten gegenüber variierenden Anregungsintensitäten. Die Absorptionswahrscheinlichkeit zweier Photonen ist vom Quadrat der eingestrahlichten Lichtintensität abhängig. Dementsprechend folgt auch die Emissionsintensität dieser Abhängigkeit.

Die Fluoreszenzemission eines Moleküls erfolgt vom selben energetischen Zustand aus, egal ob mittels TPE oder der korrespondierenden OPE angeregt wird. Daher ist anhand des Emissionsspektrums nicht zu unterscheiden, welche Anregungsart gewählt wurde. Andererseits sind die Auswahlregeln für Einzelphotonen- und Zweiphotonenabsorption unterschiedlich, was in verschiedenen Einzelphotonabsorptions- und Zweiphotonenabsorptionsspektren und unterschiedlichen Zweiphotonen-Anregungsquerschnitten verschiedener Moleküle (Göppert-Mayer-Koeffizienten) resultiert. Obwohl bereits für die TPE optimierte Laserfarbstoffe verfügbar sind⁶², wird in dieser Arbeit zur Umgehung der Fluoreszenzmarkierung die Detektion nativer Analyten durchgeführt.

Als bildgebendes Verfahren wurde die TPE in der Fluoreszenzmikroskopie erstmals in den neunziger Jahren eingeführt⁶³ und eignet sich hervorragend zum Imaging zellulärer Prozesse⁶⁴⁻⁶⁶. Der Grund ist die lokal begrenzte Anregung biologischer Proben und ein geringeres Photobleichen als bei der OPE-Fluoreszenz. Es ist daher prädestiniert für 3D-Aufnahmen von Objekten^{67,68} die beispielsweise mit tomographischen Algorithmen ausgewertet werden können⁶⁹.

2.3.3 Detektionstechniken in der Mikrofluidik

Die Detektion in mikrofluidischen Bausteinen ist insbesondere im Hinblick auf geringste Analytmengen und optische Schichtdicken im Bereich von 10-50 μm eine Herausforderung. Bislang sind Methoden optischer⁷⁰⁻⁷² massenspektrometrischer⁷³⁻⁷⁸ oder elektrochemischer⁷⁹⁻⁸² Natur entwickelt worden, wobei bis heute für hochsensitive Anwendungen wie Einzelmoleküldetektion die Fluoreszenz dominiert⁸³. Auch exotischere Techniken, wie z.B. Raman-, Infrarot- oder die NMR-Spektroskopie sind gekoppelt mit der Mikrofluidik eingesetzt worden⁸⁴.

Verbreitete elektrochemische Methoden sind die Amperometrie, die Voltammetrie und die Konduktometrie. Während in der Amperometrie der notwendige Strom zur Elektrolyse redoxaktiver Spezies betrachtet wird, ist es in der Konduktometrie der elektrische Widerstand, welcher sich beim Eintritt von Analytmolekülen ins Detektionsvolumen ändert. Beide Techniken sind aufgrund des geringen instrumentellen Aufwands sehr ökonomisch, benötigen allerdings Elektroden im oder nahe des mikrofluidischen Kanals^{85,86}. Diese Elektroden lassen sich verhältnismäßig einfach in die Chipfertigung integrieren, was deren exakte Positionierung vor jeder Messung zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit^{79,87} hinfällig macht. Der Raumvorteil und die Robustheit dieser integrierten Elektroden sind zwei Gründe, weswegen portable oder integrierte Analysensysteme häufig mit elektrochemischen Detektoren ausgestattet sind⁸⁸⁻⁹¹. Herausgestellt werden soll hier die steigende Popularität der kapazitiv gekoppelten Leitfähigkeitsdetektion^{92,93} (*capacitively coupled contactless conductivity detection*). Dabei liegt zwischen Elektroden und mikrofluidischem Kanal ein Dielektrikum. Die wesentlichen Vorteile sind ein einfaches Detektorlayout, ein kleinerer Messhintergrund, die Verwendbarkeit verschiedenster Chipmaterialien als auch von *narrow-bore* Kapillaren⁹⁴. Für Biopolymere mit niedriger elektrischer Leitfähigkeit ist die Empfindlichkeit der Leitfähigkeitsdetektion prinzipbedingt begrenzt, dieses Phänomen wurde durch die indirekte

Detektion, bei denen die Leitfähigkeit mit Eintritt des Analyten ins Detektorvolumen sinkt, gezielt genutzt^{95,96}.

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine universell einsetzbare, destruktive Analysentechnik, welche Strukturinformationen über den Analyten liefert. Sie wird standardmäßig in der Flüssigkeitschromatographie zur Detektion genutzt, aber die Kopplung mit der CE ist ebenso möglich. Dabei wird meistens ein Elektrospray-Interface verwendet, welches bei Atmosphärendruck die Analyten versprüht und ionisiert⁹⁷. Weil die erforderlichen Flussraten für das Elektrospray höher liegen als der EOF, wird üblicherweise mit Hilfsfluss- Aufbauten („*sheath flow*“) gearbeitet. Diese bieten darüber hinaus die Vorteile einer höheren Ionisierungseffizienz (durch Zugabe von Methanol oder Acetonitril) und einer einfachen Spraykontaktierung. Die miniaturisierte Variante des Elektrosprays, ist das Nanoelektrospray⁹⁸, welches mit Flussraten im Bereich von 25-50 nL/min arbeitet. Dieses kann zur Kopplung mikrofluidischer Chips an die MS verwendet werden⁹⁹. Der Aufbau unterschiedlicher Nanoelektrospray-Schnittstellen reicht vom Sprühen von der Chipkante^{100,101}, über externe Emitter¹⁰²⁻¹⁰⁶ bis hin zu monolithischen Spitzen. Letztere lassen sich nahezu totvolumenfrei mit extrem kleiner Emitterfläche fertigen und können durch lithographische Methoden^{107,108}, Mikroabrasion durch Honen¹⁰⁹ bzw. Fräsen¹¹⁰, durch Ausziehen⁹⁹ oder durch Laserablation¹¹¹ hergestellt werden. Das elektrische Spraypotenzial wird entweder seriell über den Trennkanal^{99,112}, oder extern bspw. über *liquid junctions*¹¹³, ionenpermeable Membranen¹¹⁴ oder elektrisch leitfähige Beschichtungen an der Spitze¹¹⁵⁻¹¹⁷ angelegt. Die Kopplung der Mikrofluidik mit der MS wird oft als unelegant angesehen, weil die *Benchtop*-Massenspektrometer verglichen mit Mikrofluidikchips vergleichsweise groß sind und wenig Miniaturisierungspotential haben. Trotzdem ist die MS eine sensitive Detektionsmethode für die Mikrofluidik, die darüber hinaus wertvolle Strukturinformationen über die Analyten liefert.

Optische Detektionstechniken punkten gegenüber den anderen Methoden in Bezug auf die berührungslose und zerstörungsfreie Detektion aufgetrennter Analyten. In dieser Kategorie müssen absorptionsspektroskopische und emissionsspektroskopische Methoden unterschieden werden. Ersteren, beispielsweise der UV-Absorptionsdetektion, mangelt es derzeit für optische Schichtdicken im Bereich von 10-50 µm an Sensitivität^{118,119} weshalb die Senkung der Nachweisgrenze in der Absorptionsdetektion Gegenstand aktueller Veröffentlichungen ist¹²⁰⁻¹²². Ein verwandtes photothermisches Verfahren, bei dem nicht die Extinktion sondern

die Wärmezunahme in der Probe registriert wird, ist die *thermal lens detection*. Auch dieser Ansatz wurde bereits mit mikrofluidischen Bausteinen gekoppelt¹²³⁻¹²⁵.

Unter die emissionsspektroskopischen Verfahren fallen die Fluoreszenz, die Phosphoreszenz¹²⁶ und die (Elektro)-chemilumineszenz¹²⁷⁻¹²⁹. Der wesentliche Vorteil dieser Techniken liegt in der hohen Empfindlichkeit, da keine Relativmessung (wie in der Absorptionsdetektion), sondern eine Absolutmessung des Emissionslichtes stattfinden kann. Der Einsatz zur Detektion nanolitergroßer Probezonen in der MCE ist daher naheliegend.

Weiträumig durchgesetzt hat sich die Fluoreszenzdetektion. Für die Anregung der Fluoreszenz kommen als Lichtquellen Lampen¹³⁰⁻¹³², Laser^{133,134} oder lichtemittierende Dioden (LEDs)^{135,136} häufig zum Einsatz. Lampen bieten den Vorteil der flexibleren Wellenlängenwahl, mit Lasern lassen sich sehr hohe Sensitivitäten erreichen und LEDs sind sehr kompakte, stromsparende Lichtquellen. Als Detektoren werden meistens Sekundärelektronenvervielfacher (*photomultiplier tubes* PMTs), Photodioden(arrays) oder auch CCDs (*charged-coupled devices*) verwendet. Während der Vorteil von PMTs deren hoher Verstärkungsgrad ist, bieten CCDs die Möglichkeit einer orts aufgelösten Detektion (*Imaging*) oder können hinter einem Monochromator zum Erhalt des Emissionsspektrums genutzt werden. Bestrebungen LEDs zur Fluoreszenzanregung¹³⁷, Photodioden zur Detektion^{138,139} oder beides¹⁴⁰ auf einem Mikrofluidik-Baustein zu integrieren sind Gegenstand aktueller Veröffentlichungen. Miniaturisierte Alternativen zu PMTs auf Halbleiterbasis mit enorm hohen Verstärkungsfaktoren stellen Lawineneffekt-Photodioden¹⁴¹ (APDs) bzw. Silizium-Photomultiplier¹⁴² (Sipm) dar. Diese sind besonders interessant im Hinblick auf integrierte, portable Analysengeräte, den Mikrototalanalyse-Systemen¹⁴³ (μ -TAS).

Um in der Fluoreszenzdetektion möglichst hohe Empfindlichkeiten zu erzielen, sollte man neben einem maximierten Fluoreszenzsignal einen minimierten Untergrund anstreben. Dieser summiert sich überwiegend aus reflektiertem und zurückgestreutem Anregungslicht des Chips, Rayleigh-Streuung der Elektrolyten, Ramanstreuung des Lösungsmittels, der Autolumineszenz von Chips, Elektrolyten und optischen Bauteilen sowie dem elektrischen Rauschen auf¹⁴⁴. Die Diskriminierung von Streulicht kann durch die Wahl hochwertiger optischer Filter erfolgen.

Zur Maximierung des Fluoreszenzsignals sollten die Fluorophore einen großen Absorptionsquerschnitt bei der Anregungswellenlänge, eine hohe Quantenausbeute für die Emission sowie unter den Messbedingungen minimale Löschräte aufweisen. In der Praxis

treffen diese Eigenschaften sehr selten auf relevante Analyten, wie z.B. Proteine zu (eine der wenigen Ausnahmen ist das *green fluorescent protein*)¹⁴⁵. Daher werden Fluoreszenzfarbstoffe auf die gewünschten Eigenschaften hin optimiert und über Kupplungsgruppen kovalent¹⁴⁶⁻¹⁴⁹ oder nicht-kovalent (z.B. interkalierend an DNA)¹⁵⁰ an die Analyten gekoppelt. Der zusätzliche Derivatisierungsschritt wird aufgrund der hohen erreichbaren Empfindlichkeiten der Fluoreszenzdetektion in Kauf genommen. Fluoreszenzfarbstoffe werden auf hohe Quantenausbeuten und Emission vorzugsweise im roten visuellen Bereich, hohe Photostabilitäten und möglichst pH-unabhängige Fluoreszenz optimiert. Außerdem sind die Absorptionsmaxima oft auf die Emission gängiger Laserwellenlängen abgestimmt. Hierdurch kann eine extrem hohe Sensitivität bis hin zur Einzelmoleküldetektion erreicht werden¹⁵¹.

Die Fluoreszenzmarkierung von Analyten ist mit einigen Nachteilen verbunden. So sind neben dem erhöhten Zeit- und Arbeitsaufwand nicht alle Moleküle stöchiometrisch derivatisierbar, wie z.B. polyfunktionelle Proteine oder Moleküle ohne geeignete Kupplungsgruppe. Weiterhin ist der Umsatz der Markierungsreaktion substratspezifisch, was Quantifizierungsprobleme bei Stoffgemischen mit sich bringen kann. Als Drittes sei die Veränderung der biologischen Eigenschaften und der elektrophoretischen Eigenschaften (z.B. von Proteinen) durch die Fluoreszenzmarkierung erwähnt.

Eine Möglichkeit, die Derivatisierung von Analyten zu umgehen ist die intrinsische Fluoreszenzdetektion. Während im sichtbaren Spektralbereich nur wenige Analyten von Natur aus fluoreszieren, nimmt die Anzahl nativer Fluorophore bei Senkung der Anregungswellenlänge in den UV-Bereich zu. Im nahen UV können z.B. schon einige polyaromatischen Kohlenwasserstoffe zur nativen Fluoreszenz angeregt werden. Im tieferen UV kann die Fluoreszenz von Tryptophan und weiterhin einiger kleiner Aromaten angeregt werden. Somit wird für die OPE häufig im Bereich zwischen 200-330 nm bzw. für die TPE von 400 und 660 nm gearbeitet¹⁵² um die native oder intrinsische Fluoreszenzemission zu stimulieren. Erste Arbeiten auf dem Gebiet der OPE in der CE veröffentlichte Swaile et. al.¹⁵³. Neben den Absorptionskoeffizienten sind meist auch die Quantenausbeuten nativer Chromophore, verglichen mit kommerziellen Fluoreszenzmarkern geringer¹⁵⁴. Eine Ausnahme stellt das Tryptophan dar: Liegt es frei in Lösung vor so beträgt seine Quantenausbeute $\sim 0,15$. Sofern das Tryptophan proteingebunden ist, steigt sie sogar bis $\sim 0,5$ an. Die native Fluoreszenzemission von, im fernen UV angeregten Molekülen findet üblicherweise ebenfalls im UV-Bereich statt.

Zur Steigerung der Detektionsempfindlichkeit ist es nahe liegend, Laser als Anregungsquellen zu nutzen, da deren hohe Strahlungsintensität die kleinen Absorptionskoeffizienten und Quantenausbeuten nativer Fluorophore teilweise kompensieren kann. Erste Publikationen mit UV-LIF-Systemen in der CE gehen dabei auf Publikationen von Blaschke und Andresen zurück^{155,156}. Weitere Vorteile bei der Benutzung von Lasern für die Anregung sind der kollimierte Strahlenverlauf, der die Fokussierung des Anregungslichts auf die haarfeinen Mikrokanäle vereinfacht, und die hohe Monochromatizität des Anregungslichtes gegenüber lampengestützten oder LED-basierten Systemen.

Als kommerzielle Lasersysteme mit Emissionswellenlängen im tiefen UV-Bereich für die OPE in der Elektrophorese sind unter anderem (teilweise frequenzvervielfachte) Gaslaser (Ar-Ionen 305 nm¹⁵⁷, 275 nm¹⁵⁸, 257 nm¹⁵⁹, NeCu 249 nm¹⁶⁰, HeAg 224 nm¹⁶¹), Excimerlaser (z.B. KrF 248 nm¹⁶², ArF 193 nm) oder Festkörper-Laser (z.B. Nd:YAG-Laser 266 nm) eingesetzt worden. Für die TPE werden ausschließlich gepulste Laser mit hohen Pulsleistungen verwendet, das sind z.B. Ti:Saphir-, Farbstoff- oder Festkörperlaser.

Je tiefer die Anregungswellenlänge gewählt wird, desto mehr unterschiedliche Verbindungsklassen können zur nativen Fluoreszenz angeregt werden (sinkende Selektivität). Eine wesentliche Herausforderung liegt daher in der Verfügbarkeit UV-transparenter und nicht lumineszenter Werkstoffe für alle Bauteile, welche im optischen Strahlengang liegen (z.B. Linsen, Filter und Mikrofluidik-Chips). Je tiefer die Wellenlänge gesenkt wird, desto mehr steigt also auch die parasitäre Fluoreszenz, die es im Hinblick auf ein hohes SNR zu unterdrücken gilt.

3 Ergebnisse und Diskussionen

3.1 Native Fluoreszenzdetektion mit Einzelphotonen-Anregung

3.1.1 Einfluss der Anregungsleistung auf die Detektionsempfindlichkeit

Zum Test, in welchen Grenzen das Gesetz von Parker auch bei der Fluoreszenzanregung mit tiefer UV-Strahlung seine Gültigkeit hat, wird in diesem Kapitel die Anregungsleistung für diverse Analyten in weiten Bereichen variiert und die erreichbaren Empfindlichkeiten werden betrachtet. Weiterhin wird die Detektionsperformanz eines Dauerstrich (cw-) und eines gepulsten Lasers bei gleicher gemittelter Ausgangsleistung verglichen.

Hierfür wird ein leistungsstarker 266 nm Laser benötigt, den die Firma Sony freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Der cw-Laser war ursprünglich zur ablativen Materialbearbeitung kleiner Strukturen entwickelt worden (bspw. zur Herstellung von Glasmastern für die DVD-Herstellung) und liefert bis zu 120 mW cw-Ausgangsleistung¹⁶³. Über eine optische Faser ist der Laser mit einem modularen Filterkubus ins Fluoreszenzmikroskop eingekoppelt. Alle optischen Elemente des Aufbaus sind aus Quarz gefertigt. Durch die suboptimale Fasereinkopplung und begrenzte Transmission der Faser beträgt die maximal zur Verfügung stehende Anregungsleistung am Mikroskop-Objektiv ($P_{\text{eff.}}$) weniger als 10 % der Laserausgangsleistung, namentlich 7400 μW .

Die Performanz dieses Aufbaus wird zunächst an einem Analyt-Standardgemisch bestehend aus dem biogenen Amin Serotonin, dem β -Blocker Propranolol, einem Diol und der Aminosäure Tryptophan erprobt. Dazu ist jeder Analyt bis zum LOD verdünnt worden. Das zugehörige Elektropherogramm in Abb. 9 zeigt, dass alle Verbindungen bis hinunter zum nanomolaren Bereich detektiert werden können. Die Detektionslimits lauten 24 ng/mL für Propranolol, 24 ng/mL (113 nM) für Serotonin, 80 ng/mL (475 nM) für das Diol und 80 ng/mL (392 nM) für Tryptophan.

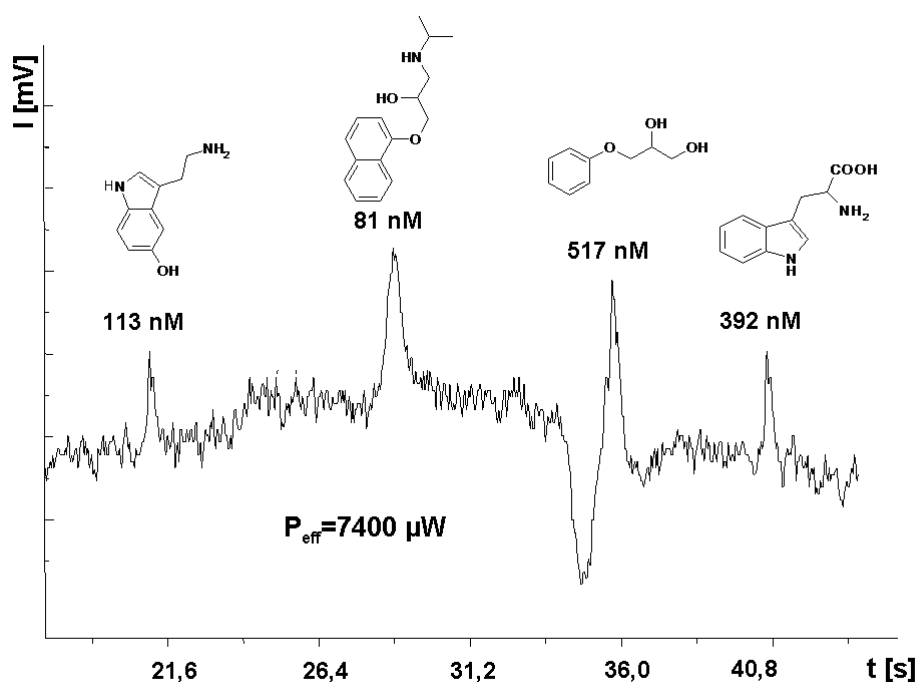


Abb. 9 Trennung und Detektion kleiner Aromaten am Detektionslimit: 113 nM Serotonin, 81 nM Propranolol, 517 nM 3-Phenoxy-1,2-propandiol und 392 nM Tryptophan

Verglichen mit vorher publizierten Ergebnissen¹⁶⁴, bei denen ein gepulster 4 mW Laser zum Einsatz gekommen war, entspricht das einer Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 17 für Propranolol. Für die anderen Analyten liegt dieser Faktor niedriger, insbesondere für die proteinogene Aminosäure Tryptophan. Obwohl die Anregungsleistung 18-fach erhöht ist, nimmt die Sensitivität für Tryptophan nur um den Faktor 5 zu. Offensichtlich verliert das Gesetz von Parker bei 266 nm und hohen Anregungsleistungen für Tryptophan seine Gültigkeit.

Um diesen Effekt zu verstehen, ist das System mit einem mechanischen Shutter zur graduellen Abschwächung der Anregungsintensität nachgerüstet worden. Die Konzentration der Analyten wird dabei auf je 10 $\mu\text{g/mL}$, für das Diol auf 20 $\mu\text{g/mL}$ erhöht, um eine sichere Peakzuordnung zu gewährleisten. Im Anschluss wird dieselbe Trennung bei diversen Anregungsleistungen als Dreifachbestimmung durchgeführt.

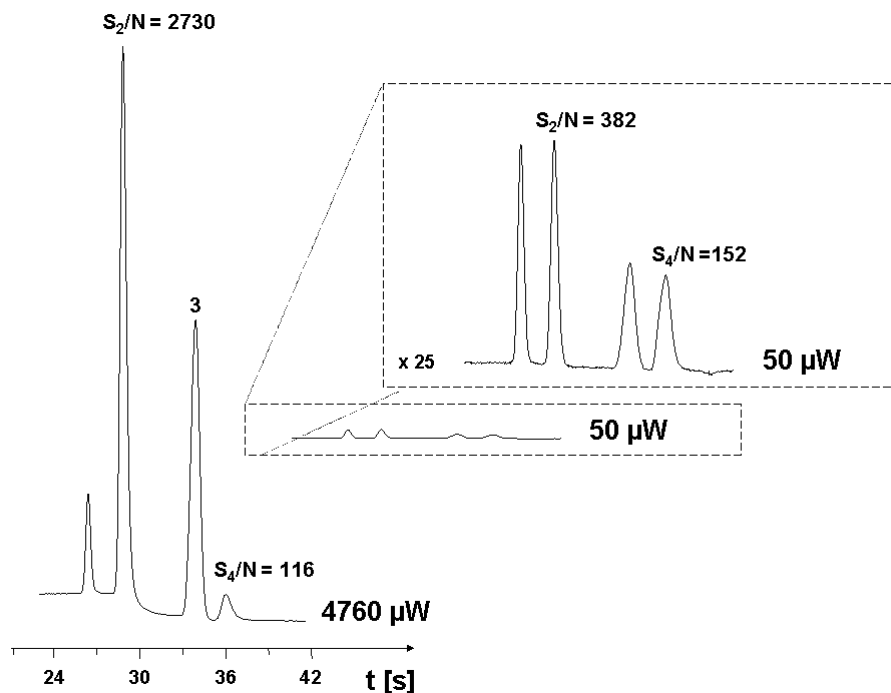


Abb. 10 Detektion kleiner Aromaten bei verschiedenen Anregungsintensitäten

Der Vergleich der erhaltenen Elektropherogramme des aromatischen Testgemischs (Abb. 10) zeigt unterschiedliche Effekte auf die Detektierbarkeit einzelner Verbindungen. Zur besseren Visualisierung ist das Elektropherogramm bei 50 μW um den Faktor 25 vergrößert. Während für Propranolol das SNR bei reduzierter Anregungsleistung wie erwartet sinkt (von 2730 auf 382) ist der Effekt für Tryptophan gegenteilig: Hier steigt die Nachweisempfindlichkeit bei reduzierter Anregungsleistung um den Faktor 1,3.

Zum genauen Studium der Effekte ist für die jeweiligen Analyten das SNR als Funktion der Anregungsleistung aufgetragen (Abb. 11). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen aus drei Einzelmessungen. Die resultierenden Kurven zeigen für kleine Leistungen einen linearen Bereich in dem Parkers Gesetz Gültigkeit hat. Bei höheren Anregungsintensitäten ist der Anstieg der SNRs nicht mehr linear, was sich in dem Abflachen der Kurve äußert. Für Tryptophan und Serotonin geht dieses Plateau sogar wieder in eine negative Steigung über, was einer Abnahme der Detektionsempfindlichkeit entspricht. Die Abflachung der Graphen ist auf Fluoreszenzsättigung und / oder Photobleaching – das sind photochemische Reaktionen mit Zerstörung des chromophoren Systems – zurückzuführen.

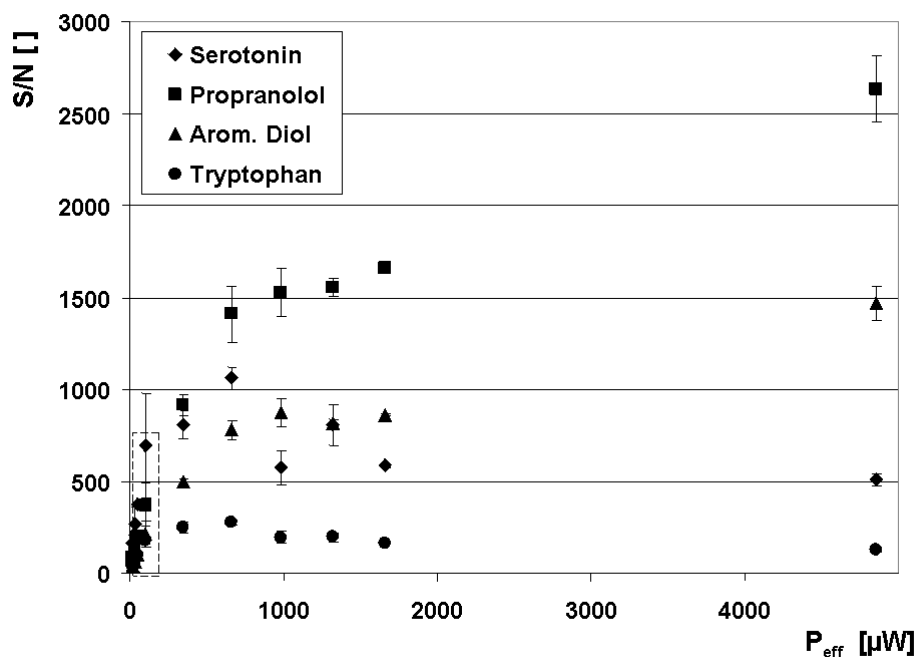


Abb. 11 Signal-zu-Rauschverhältnis kleiner Aromaten als Funktion der Anregungsintensität

Der lineare Bereich ist in Abb. 12 vergrößert dargestellt. Für alle Verbindungen ist einsetzendes Bleaching oberhalb von 100 μW Anregungsleistung ersichtlich. Die unterschiedlichen Steigungen der Geraden zeigen den Gewinn an Detektionsempfindlichkeit bei zunehmender Laserleistung an. Bringt man die Stärke des Photobleachings mit der chemischen Struktur der Analyten in Korrelation, so scheinen die heterocyclischen Indolsysteme anfälliger für Photobleaching zu sein als die homocyclischen Aromaten Propranolol und 3-Phenoxy-1,2-propandiol. Insbesondere über Tryptophan, welches in zahlreichen Peptiden und Proteinen als nativer Chromophor enthalten ist, gibt es weiterführende Studien zu photoneninduzierten chemischen Reaktionen. Diese bewirken oft die Zerstörung des chromophoren Systems, was die Fluoreszenzintensität stark verringert^{165,166}.

Diese Daten zeigen die Notwendigkeit für die Optimierung der Anregungsintensität für jeden Analyten individuell, damit eine sensitive Detektion mittels intrinsischer OPE-Fluoreszenzdetektion möglich ist.

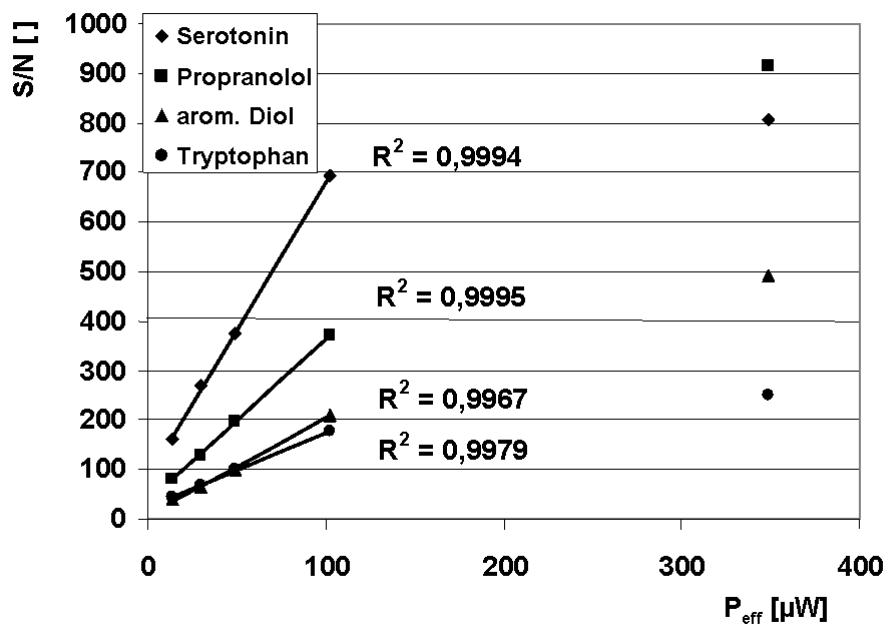


Abb. 12 Signal-zu-Rauschverhältnis kleiner Aromaten als Funktion der Anregungsintensität
(Vergrößerung)

Gepulste Laser unterscheiden sich von Dauerstrichlasern gleicher gemittelter Ausgangsstärke neben der zeitlichen Diskontinuität der Anregungsstrahlung durch eine wesentlich höhere Energie pro Zeiteinheit während des Pulses, ferner durch eine höhere Band- oder Linienbreite. Während letztere in diesem Experiment mit relativ langen Pulsdauern im ns-Bereich für die sensitive Detektion eher zweitrangig ist, kann die hohe Intensität während eines Pulses ebenfalls zum Photobleaching und damit zu verminderter Detektionsleistung führen.

Der direkte Vergleich zwischen cw- und gepulstem Laser bei gleicher gemittelter Anregungsleistung von 334 μW zeigt, dass die erreichbare Detektionsempfindlichkeit mit dem gepulsten Laser um den Faktor 2,5 für Serotonin und 1,9 für Tryptophan geringer ist (Abb. 13). Das Verhältnis „Laser aus / Laser ein“ ist für diesen experimentellen Aufbau aufgrund einer Pulsdauer im Nanosekundenbereich sehr groß. Daher liegen die Pulsenergien so hoch, dass ein *Photobleaching* bereits stattfindet. Folglich scheint ein cw-Laser für diesen Mess-Aufbau für die sensitive Detektion als geeignetere Anregungsquelle.

Hingegen bietet die Verwendung gepulster Laser vielfältigste Möglichkeiten in Bezug auf Optimierung bzw. Erweiterung des Aufbaus. So öffnet die gepulste Anregungsstrahlung die Tore zur Multiphotonenanregung (siehe Kapitel 3.2, Seite 48), zu *gated detection* Techniken (Hintergrunddiskriminierung) oder auch zur zeitkorrelierten Detektion mittels *time-correlated-single-photon-counting* (TCSPC). Letzteres verspricht sowohl eine

Empfindlichkeitssteigerung als auch die vereinfachte Signalidentifizierung komplexer Stoffgemische durch die Zuordnung von Fluoreszenzlebensdauern zum jeweiligen Signal. Diese Erweiterungen sind mit cw-Lasern nicht ohne Weiteres implementierbar.

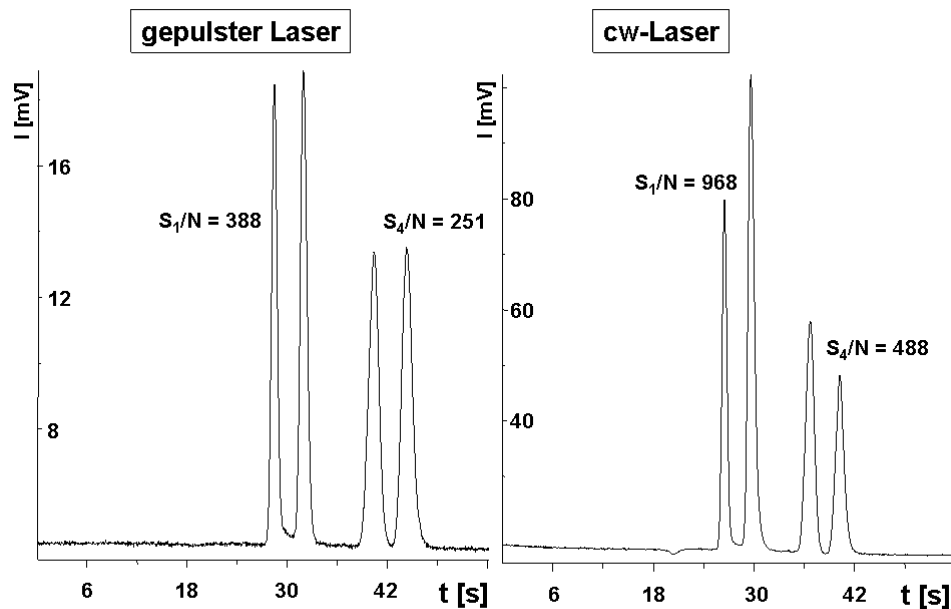


Abb. 13 Vergleich der Detektionsperformanz des cw- und des gepulsten Lasers

Eine wichtige Anwendung der intrinsischen Fluoreszenz ist die Detektion von Proteinen in deren nativem Zustand¹⁶⁷⁻¹⁷⁰. Erstens möchte man oft die Faltung bzw. die biologische Aktivität der Analyt-Proteine erhalten, welche durch anhängende Fluorophore gestört werden kann. Zweitens ist das stöchiometrische Labeling multifunktionaler Biopolymere nicht trivial, denn oft entstehen Produktgemische. Diese unterschiedlich häufig derivatisierten Proteine weisen im Falle geladener Fluoreszenzfarbstoffe eine Verteilung über verschiedene Nettoladungen auf, was sich in verbreiterten Probezonen und letztlich in einer verminderten Trenneffizienz äußert¹⁷¹. Durch native Fluoreszenzdetektion wird die Diskussion des Multilabelings überflüssig gemacht.

Oft ist die Konzentration von Proteinen in Realproben relativ gering, weshalb Methoden mit niedrigen Nachweisgrenzen in der Proteinanalytik von immenser Bedeutung sind. Daher ist es naheliegend, auch im Bereich der Proteine mit höheren Anregungsleistungen zu arbeiten, um eine maximale Sensitivität zu erhalten. Hierzu werden jeweils 500 µg/mL der proteolytischen Enzyme Lysozym, Trypsinogen und Chymotrypsinogen (entsprechend 34, 21 und 19 µM) in einem Quarzchip aufgetrennt und detektiert. Das Cytochrom C wurde dabei aus dem

ursprünglichen Testgemisch³⁸ entfernt, da es nur einen Tryptophanrest enthält, der zudem durch die sterische Nähe zum zentralen Eisenatom im nativen Zustand nahezu vollständig gequencht wird¹⁷². Zur Unterdrückung von signalverbreiternden Protein- / Wand- Wechselwirkungen ist eine dynamische Kapillarbeschichtung mit HPMC zum Einsatz gekommen¹⁷³. Analog zu den Experimenten mit den Aromaten wird der Proteinstandard bei variierender Anregungsleistung vermessen, die erhaltenen Elektropherogramme bei 44 μW und 5700 μW Anregungsleistung sind in Abb. 14 dargestellt. Die Steigerung der Anregungsleistung um den Faktor 130 bewirkt ein 6,5 fach höheres SNR für Lysozym. Im Gegensatz zum freiem Tryptophan oben (vgl. Abb. 10), lässt sich für proteingebundenes Tryptophan durch Erhöhung der Anregungsleistung die Nachweisempfindlichkeit steigern. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die unterschiedliche chemische Umgebung von freiem und proteingebundenem Tryptophan, welche photochemische Reaktionen beeinflusst¹⁷⁴. Weiterhin können die unterschiedlichen pH-Werte der Puffer¹⁶⁵ Auswirkungen auf das Photobleaching haben und / oder photostabilere native Fluorophoren wie Tyrosin oder Phenylalanin tragen einen Teil zur Proteinfluoreszenz bei.

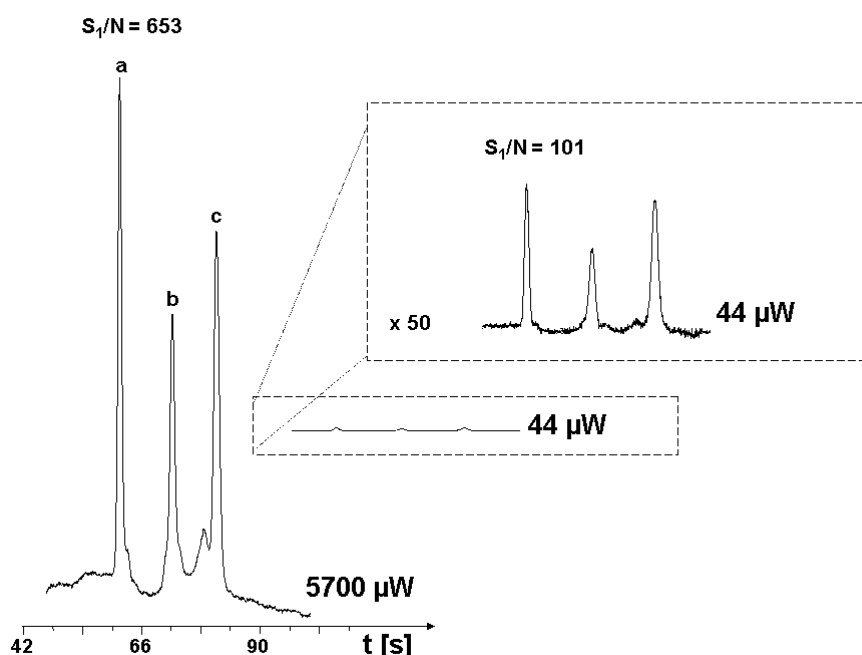


Abb. 14 Detektion von Proteinen bei verschiedenen Anregungsintensitäten. a) 34 μM Lysozym, b) 21 μM Trypsinogen, c) 19 μM Chymotrypsinogen.

Eine genauere Betrachtung der SNRs zeigt auch im Falle der Proteine eine Anregungsleistung, oberhalb derer keine weitere Steigerung der Sensitivität stattfindet. Diese lässt sich am lokalen Maximum in Abb. 15 zu ca. 1200 μW ablesen.

Bei dieser Leistung wird mittels einer Verdünnungsreihe die Detektionsgrenze der Proteine bestimmt. Das entsprechende Elektropherogramm ist in Abb. 16 gezeigt. Die kleinste nachweisbare Konzentration (SNR 3) liegt bei jeweils 5 $\mu\text{g/mL}$, was 340 nM für Lysozym, 208 nM für Trypsinogen und 195 nM für Chymotrypsinogen entspricht. Damit kann das Detektionslimit für Proteine im Vergleich zu früheren Daten, welche mit einem gepulsten Laser erhoben wurden¹⁶⁴, durch die Verwendung des stärkeren cw-UV-Lasers um den Faktor 2,5 verbessert werden.

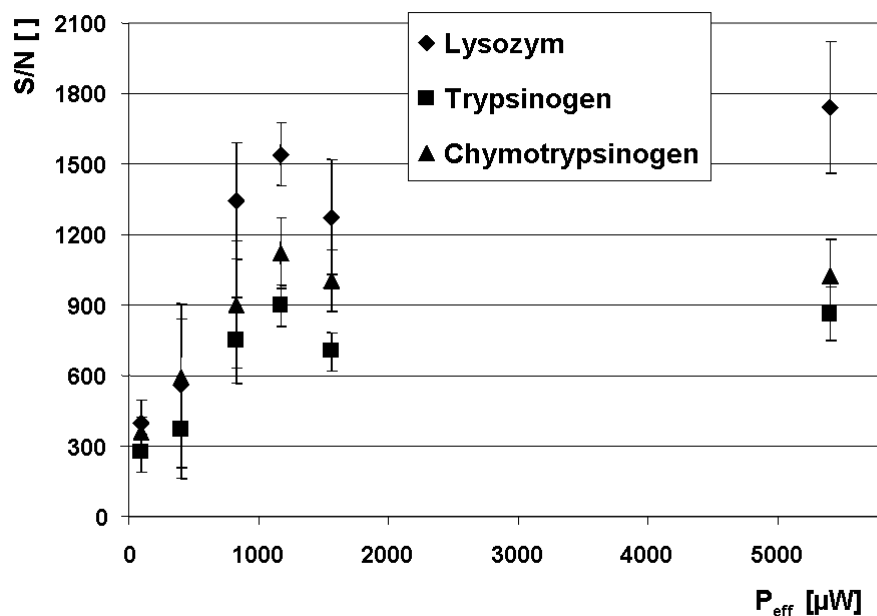


Abb. 15 Signal-zu-Rauschverhältnis der Proteine als Funktion der Anregungsintensität

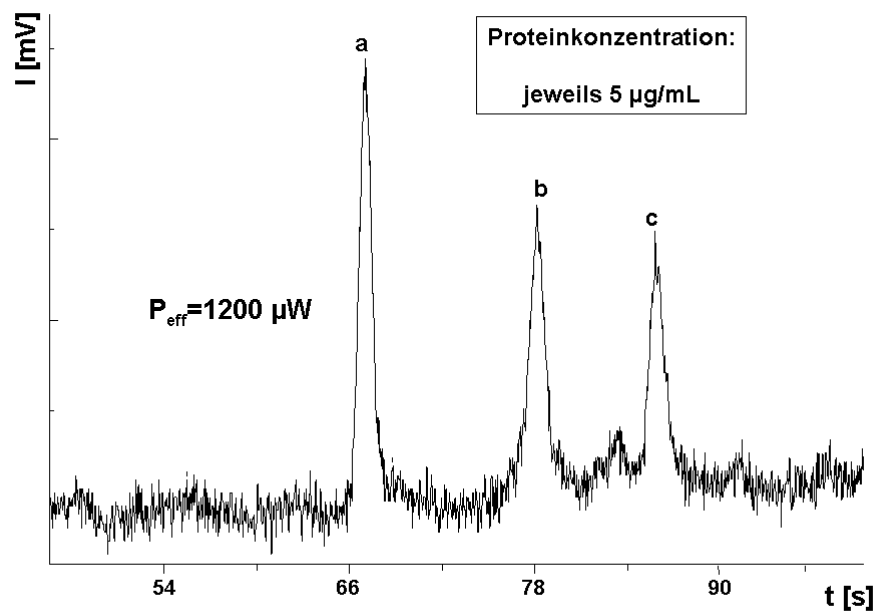


Abb. 16 Trennung und Detektion der Proteine am Detektionslimit

3.1.2 Applikationen

Um das Feld der akademischen Stofftrennungen zu verlassen und praxisrelevante Proben zu analysieren, werden in diesem Kapitel zwei Applikationen von elektrophoretischen Chiptrennungen mit nativer Fluoreszenzdetektion vorgestellt. Dazu werden Realproben aufgetrennt und die Signalzuordnung mittels Standardaddition käuflicher Reinstoffe vorgenommen. An dieser Stelle soll eine qualitative Bestimmung genügen, denn die quantitative Elektrophorese und ihre Eigenheiten wurden bereits in einer Vielzahl von Arbeiten ausführlich diskutiert¹⁷⁵⁻¹⁷⁸.

3.1.2.1 Cavendish-Bananenextrakt

Neben Schokoladensorten mit hohem Kakaoanteil sind Dessertbananen im Volksmund weitläufig als „Muntermacher“ bekannt. Der Ruf dieser klimakterischen Staudenfrüchte ist auf deren hohen Gehalt an Neurotransmittern zurückzuführen¹⁷⁹. Zu den psychoaktiven Substanzen gehören unter anderem die biogenen Amine Serotonin (11,7 mg/kg Frischgewicht), Dopamin (bis zu 100 mg/kg Frischgewicht), die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie das neurotoxische Isochinolin-Alkaloid Salsolinol (bis zu 30 mg/kg

Trockengewicht)¹⁸⁰. Letzteres hemmt das Enzym Monoamin-Oxidase, verlangsamt dadurch den Abbau der biogenen Amine und erhöht folglich deren Wirkstärke und -dauer¹⁸¹.

Für die schnelle Bestimmung der in höheren Dosen toxischen Substanzen ist es angebracht, Nachweisverfahren für besagte Stoffe zu entwickeln. Die Strukturen der analysierten Inhaltstoffe sind in Abb. 17 gezeigt.

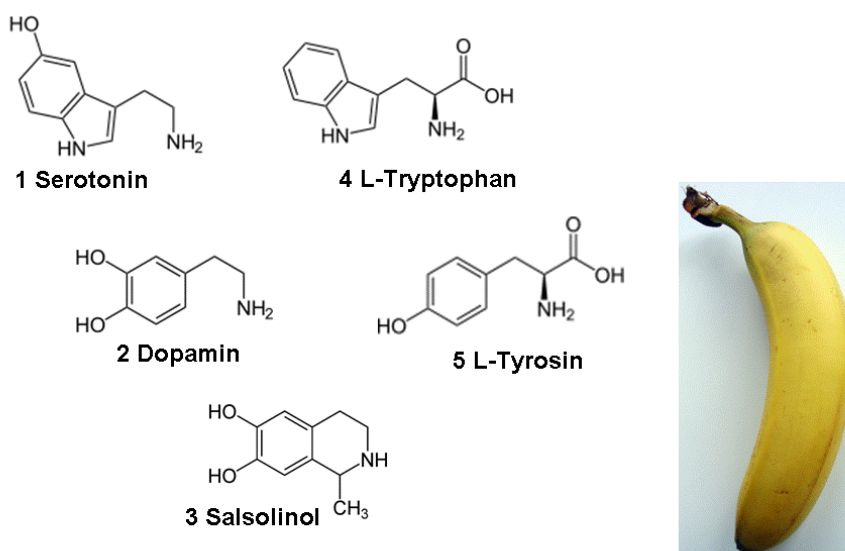


Abb. 17 Strukturformeln psychoaktiver Inhaltsstoffe einer Cavendish-Dessertbanane

Eine Extraktion ist aufgrund der komplexen Probenmatrix, welche Proteine, Kohlenhydrate und Fette enthält, unumgänglich. Zur Verbesserung der Nachweisgrenze kann dieser Schritt zusätzlich mit einer Festphasenextraktion kombiniert werden¹⁸². Da die Sensitivität des aufgebauten Systems zur direkten Bestimmung aus den Erstextrakten ausreicht, wird zur qualitativen Bestimmung auf eine Aufkonzentrierung verzichtet. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich allein mit der Analytik; Informationen zur Probenpräparation können in Kapitel 4.7.4.1 auf Seite 108 eingesehen werden.

Sowohl das Salsolinol als auch die biogenen Amine enthalten Indol- bzw Catechol-Funktionalitäten und weisen deshalb eine intrinsische Fluoreszenz bei Anregung im tiefen UV-Bereich auf. Das macht sie geeignet für die native Fluoreszenzdetektion.

Die elektrophoretische Trennung wird in Boratpuffer durchgeführt, welcher eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz bei 266 nm aufweist und damit eine ausreichende Empfindlichkeit ermöglicht. Im Elektropherogramm in **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden**

werden. lassen sich fünf Signale durch Standardaddition eindeutig zuordnen, wobei bei den verwendeten Elektrophorese-Parametern für Dopamin und Salsolinol lediglich eine Antrennung erzielt werden kann.

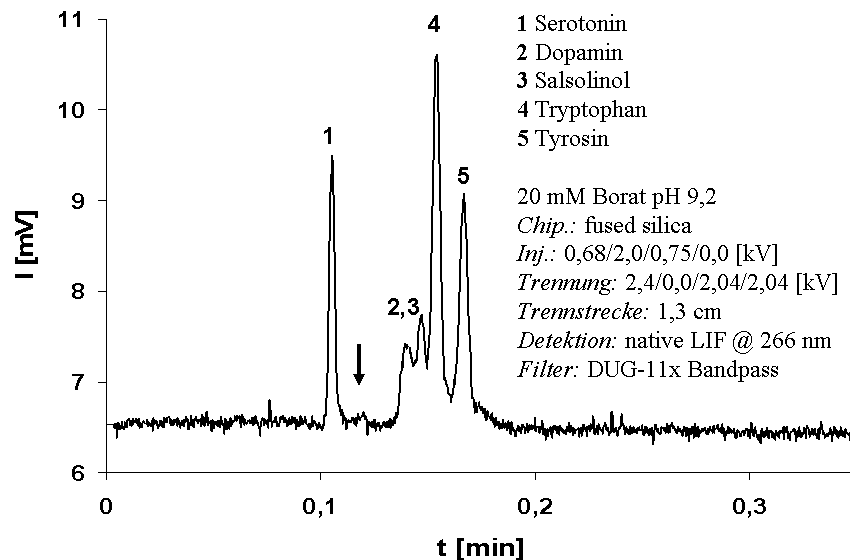


Abb. 18 Elektropherogramm der Bananeninhaltsstoffe extrahiert bei pH 5

Ein reproduzierbares, jedoch äußerst schwaches Signal ist durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Konzentration dieses Stoffes in der Probe nimmt zu, wenn die Probenextraktion bei pH 3, anstelle von pH 5 durchgeführt wird (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Vermutlich lässt sich das Molekül bei der Extraktion verschieden stark protonieren und reichert sich dementsprechend unterschiedlich in den wässrigen Phasen an. Mangels geeigneter Standards konnte dieses Signal nicht eindeutig zugeordnet werden. Es könnte sich jedoch um Noradrenalin handeln, welches bis zu 104 mg / kg Frischgewicht in Bananen enthalten ist¹⁸³ und aufgrund des Katecholgerüsts ebenfalls eine intrinsische Fluoreszenz aufzeigen sollte.

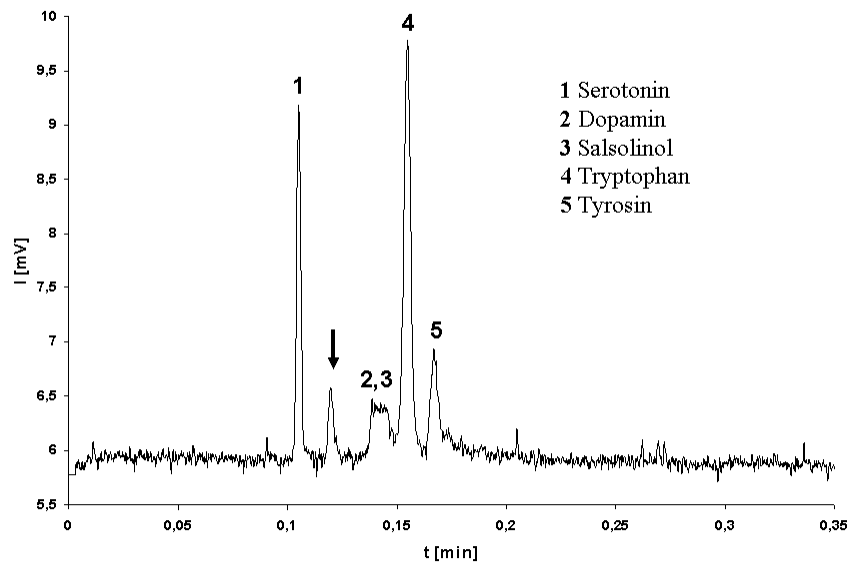


Abb. 19 Elektropherogramm der Bananeninhaltsstoffe extrahiert bei pH 3

In der bei pH 3 extrahierten Probe können das Dopamin (2) und das Salsolinol (3) unter gleichen Bedingungen nicht mehr angetrennt werden. Ein möglicher Grund ist die verstärkte Extraktion von Matrixbestandteilen analog zur Anreicherung der unbekannten Verbindung, welche die Trennung negativ beeinflussen. Daher muss die Trennstrecke erhöht werden (von 1,3 auf 6,7 cm), um eine Basislinientrennung zu erreichen. Es wird versucht, die höhere Trennzeit durch die Erhöhung der Rückspülspannung auf 2,13 kV zu kompensieren, was aber nur teilweise gelang. Es resultiert eine Trennung innerhalb von 50 Sekunden (Abb. 20). Die schlechtere Detektionsempfindlichkeit ist auf die kleinere Injektionsmenge bei erhöhter Rückspülspannung zurückzuführen.

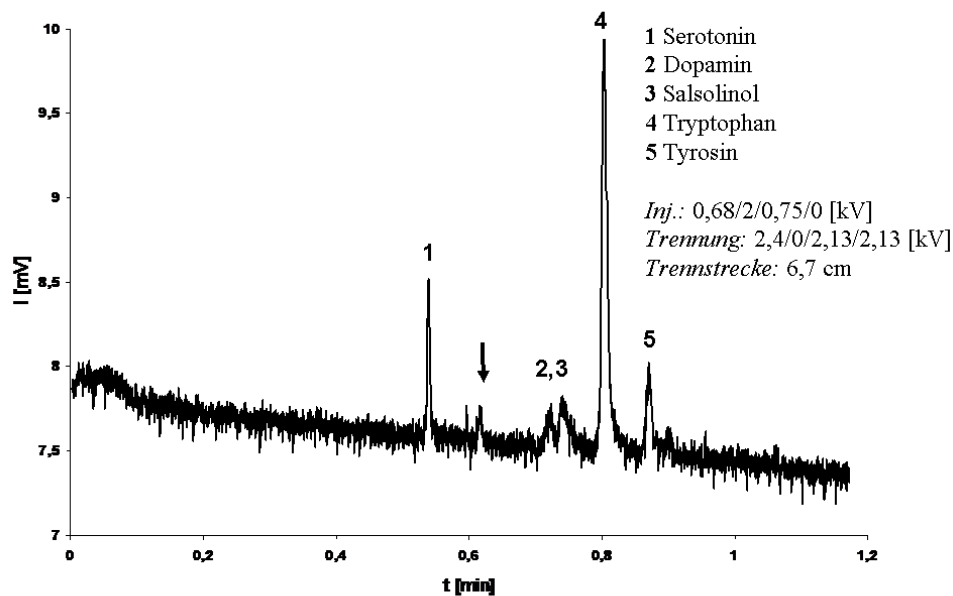


Abb. 20 Optimierte Trennung der Bananeninhaltsstoffe (pH3)

3.1.2.2 Basische Proteine des Eiklars

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen ist eine hervorragende Methode zu deren Auftrennung, Qualifizierung und Quantifizierung¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Komplexe Protein-Realproben finden sich beispielsweise in Zelllysaten. Diese beinhalten neben einer Vielzahl von Proteinen chemisch äußerst vielseitige Probematrizes (Kohlenhydrate, Lipide, DNA etc.), welche ohne Aufreinigung, Anwendung zweidimensionaler Trenntechniken oder hochselektive Detektion¹⁸⁷ bis dato nicht qualifiziert bzw. quantifiziert werden können.

Eine einfachere proteinhaltige Realprobe ist das Eiklar des Hühnereis, es besteht neben 90% Wasser überwiegend aus verschiedenen Proteinen, Kohlenhydraten und Mineralstoffen. Die sehr einfach gehaltene Probenvorbereitung ist in Kap. 4.7.4.2 auf Seite 109 beschrieben und besteht im Wesentlichen aus dem Verdünnen von Eiklar mit Messpuffer. Im sauren pH-Bereich wird eine elektrophoretische Trennung von basischen Proteinen eines Hühnereiklars im Mikrofluidik-Chip durchgeführt, analog zu der bereits von Gilges et al. in der CE publizierten⁸. Für diese Trennung (Abb. 21) ist eine thermisch immobilisierte Polyvinylalkoholbeschichtung zum Einsatz gekommen, die Protein-Wand-Wechselwirkungen auf ein Minimum reduziert¹⁸⁸. Die einzelnen Signale bzw. Signalgruppen können mittels der Addition käuflicher Standards (Lysozym, Conalbumin bzw. Ovalbumin) zugeordnet werden.

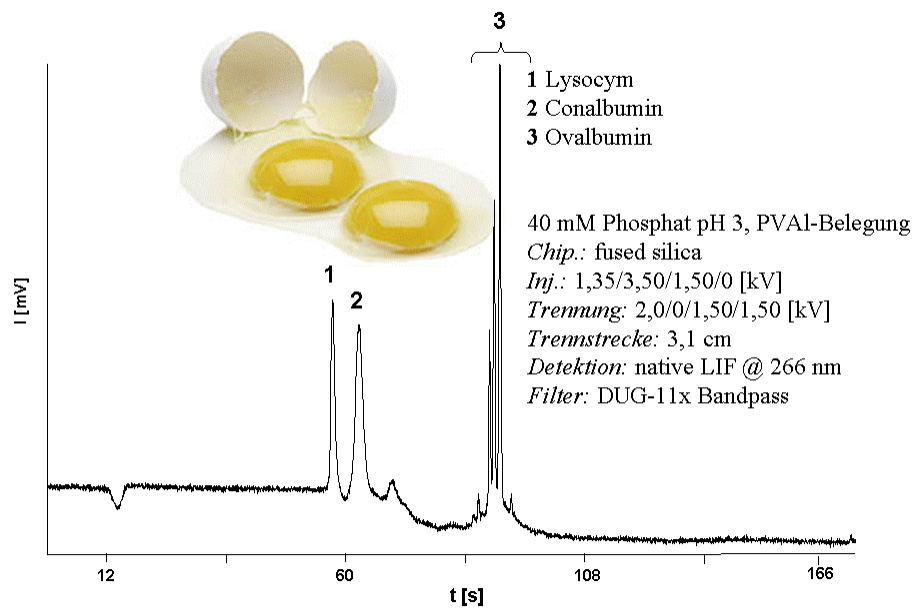


Abb. 21 Trennung von basischen Proteinen des Hühnereiklars

Dabei ist es bemerkenswert, dass die Trennung des Ovalbumins in einer ganzen Signalgruppe resultiert. Dies ist durch die unterschiedlichen Glykoformen des Proteins zu erklären, bei denen ein oder mehrere Zuckerbausteine kovalent an den Proteingrunderkörper gebunden sind. Über elektrophoretische Auftrennung von Eiklarproteinen – im leicht basischen pH-Bereich und unter Verwendung von polysiloxanbelegten Kapillaren – wurde bereits in den neunziger Jahren berichtet¹⁸⁹.

3.2 Native Fluoreszenzdetektion mittels Zweiphotonenanregung

Neben der klassischen Fluoreszenzanregung mit einem absorbierten Photon (OPE = one-photon-excitation) gibt es auch die Möglichkeit, durch Absorption von zwei oder mehr Photonen einen elektronisch angeregten Zustand zu erreichen, aus dem eine Fluoreszenzrelaxation eintreten kann. Die Wahrscheinlichkeit für diese praktisch zeitgleiche Absorption der Photonen ist gering und nimmt mit x^n ab (n = Anzahl zu absorbierender Photonen). Daher beschränken sich die folgenden Betrachtungen ausschließlich auf die Zweiphotonenanregung (TPE = two-photon-excitation). Als zusätzliche Vereinfachung werden nur Photonen gleicher Energie betrachtet, da ansonsten der apparative Aufwand zur Triggerung von Laserpulsen unterschiedlicher Wellenlänge größer ist.

Ein wesentliches Merkmal der zweiphotonenangeregten Fluoreszenz verglichen mit der OPE für die native Detektion biologisch relevanter Analyten sind höhere Anregungswellenlängen bei höheren Intensitäten. Diese entsprechen – vorausgesetzt der gleiche elektronische Übergang wird betrachtet – genau dem doppelten der Wellenlänge, die für die entsprechende OPE-Fluoreszenzanregung nötig wäre. Dadurch ergeben sich für die TPE geringere Anforderungen an die spektralen Eigenschaften der Werkstoffe für Filter, Chips und Objektive.

In Abb. 22 sind die Transmissionsspektren gängiger Chipmaterialien gegenübergestellt. Und zusätzlich zwei Emissionswellenlängen gängiger Laser (OPE: frequenzvervierfacher Nd:YAG bei 266 nm; TPE: frequenzverdoppelter Titan-Saphir-Laser bei 420 nm) eingezeichnet.

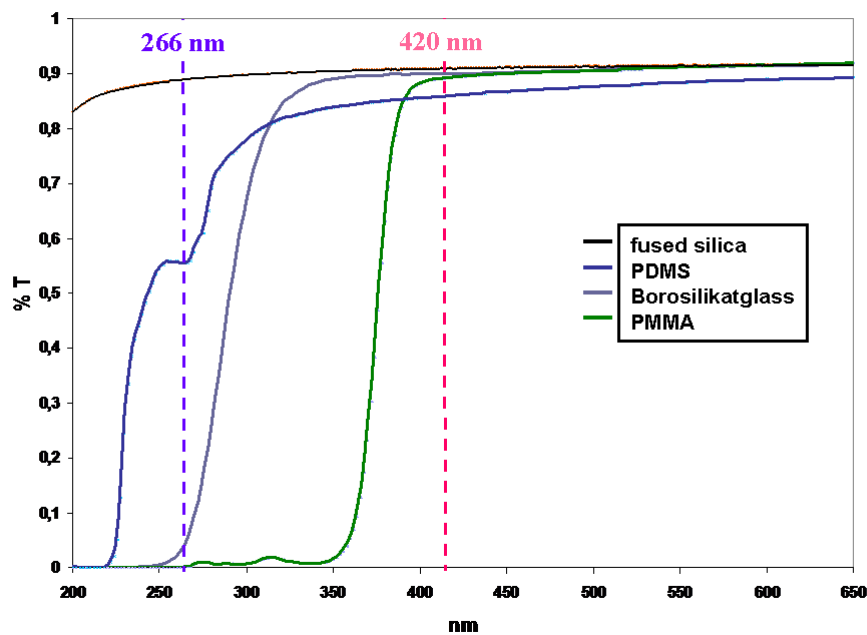


Abb. 22 Transmissionsspektren gängiger Chipmaterialien

Diese Chipwerkstoffe sind offensichtlich bei Wellenlängen im optischen Bereich transparenter als im tiefen UV Spektralbereich. Geht man allein nach der Transmission, so ist bei 266 nm praktisch nur *fused silica* und allenfalls PDMS verwendbar, wohingegen bei 420 nm alle Materialien für das Anregungslicht transparent sind. Da absorbierte Photonen (unter anderem) in Fluoreszenzlicht konvertiert werden können, spielt dieser Sachverhalt bezogen auf die Eigenfluoreszenz eine Rolle.

Ein 3-dimensionales Fluoreszenzspektrum eines *fused silica*-Chips ist in Abb. 23 (oben) gezeigt. Es besteht aus nebeneinander liegenden Emissionsspektren der jeweiligen Anregungswellenlänge (mit 5 nm Bandbreite). Bei den mit einem * versehenen Signalgruppen handelt es sich um Licht höherer Ordnung des Beugungsgitters – sie sind durch das Spektrometer bauartbedingt und müssen ignoriert werden. Beim Betrachten der Abbildung wird der Zusammenhang zwischen sinkender Anregungswellenlänge und steigender Autofluoreszenz besonders deutlich. Die Draufsicht im unteren Teil der Abbildung zeigt die maximale Fluoreszenzintensität in einem Emissionsbereich zwischen 410 und 450 nm.

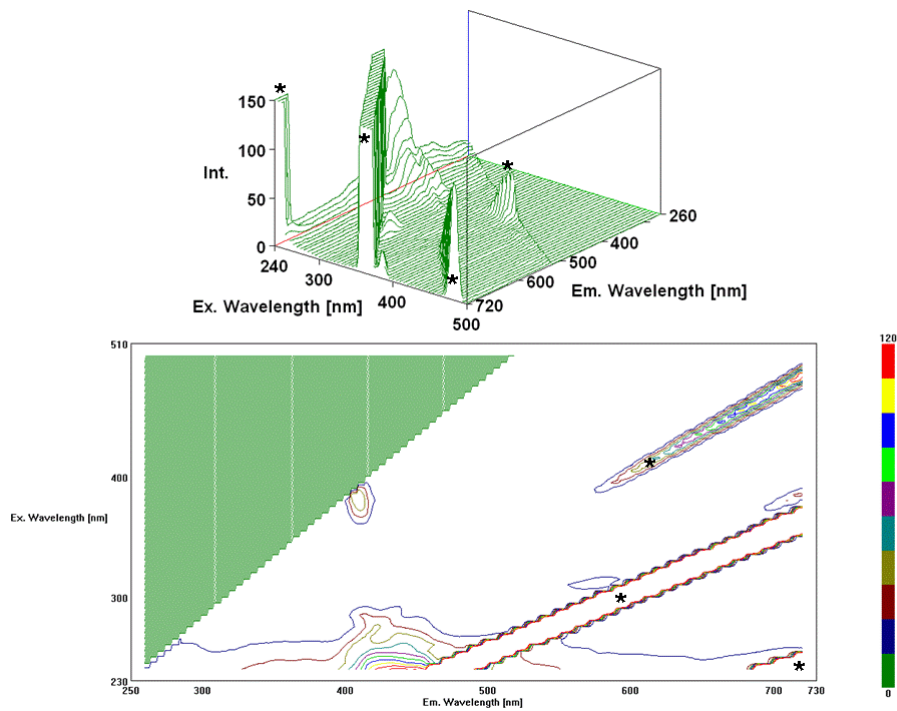


Abb. 23 3d-Fluoreszenzspektrum eines *fused silica*-Mikrofluidikchips

In Abb. 24 sind die Emissionsspektren gängiger Chipmaterialien bei 265 nm Anregungsstrahlung übereinandergelegt. Eine Anregung bei 210 nm anstelle von 265 nm verändert geringfügig die Intensität der Spektren, jedoch nicht ihr Erscheinungsbild. Daher können die bei 265 nm gewonnenen Daten auf die TPE (entsprechend 210 nm) übertragen werden. Die Signale bei 420 sowie 450 nm sind systembedingt und können ignoriert werden. Das PDMS weist eine so hohe Fluoreszenz auf, dass durch Verminderung der Photomultiplier-Beschleunigungsspannung um den Faktor 12 herunterskaliert werden musste. Das liegt an der deutlich höheren Probendicke, verglichen mit den anderen Materialien. Das Emissionsmaximum von PDMS liegt bei 294 nm. PMMA weist eine hohe Emission bei 307 nm auf, ein kleineres lokales Maximum liegt bei 393 nm. Ursache für diese Fluoreszenz sind technische Additive, wie bspw. Radikalinitiatoren. Die Emission von *fused silica* ist wiederum am geringsten.

Eine OPE-Detektion in einem PMMA, PDMS oder Borosilikat-Chip ist nicht möglich, da PMMA das Anregungslicht absorbieren würde und die Fluoreszenz der anderen Chipmaterialien um ein Vielfaches höher ist als die native Fluoreszenz der zu betrachtenden Analyten. Durch die ungünstigen Verhältnisse der optischen Schichtdicken (30 μm Kanalhöhe zu 2000 μm Materialdicke) werden die optischen Anforderungen an Chipmaterialien zudem weiter erhöht.

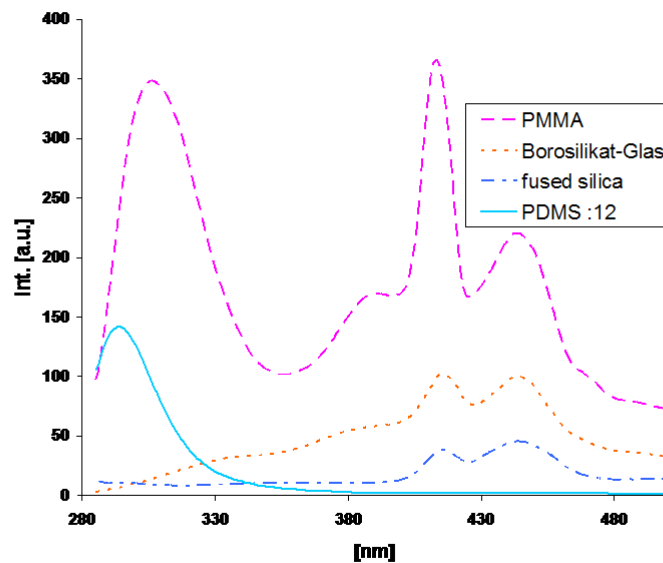


Abb. 24 Eigenfluoreszenz verschiedener Materialien bei 265 nm Anregungsstrahlung

Ein anderer Vorteil der TPE gegenüber der OPE ist die zweidimensionale Emissionsanregung, welche unter Verzicht konfokaler Mikroskopelemente prinzipbedingt erfolgt. Aufgrund der geringen Übergangswahrscheinlichkeit für Zweiphotonenübergänge ist die benötigte hohe Photonendichte nur in der Brennebene des Objektivs gewährleistet. Diese quasi-zweidimensionale Anregung reduziert abermals den Fluoreszenzhintergrund des Chipmaterials und etwaiger Verunreinigungen auf den Chip-Oberflächen, setzt jedoch eine sorgfältige Justierung der Fokalebene auf dem Chipkanal in z-Richtung voraus. Im kegelförmigen Fokus des Objektivs wurde die Höhe der Brennebene experimentell auf $< 4 \mu\text{m}$ bestimmt.

Der Epifluoreszenz-Aufbau des verwendeten Systems (im Kap. 4.1.3 beschrieben) ist verglichen mit dem OPE-Aufbau durch einen Graufilter zur Abschwächung des Anregungslichtes (anstelle der variablen Lochblende) und einen grünen Laser zur Ausleuchtung des Mikrokanals anstelle der Lampe(n) modifiziert. Die Detektion erfolgt bildgebend mit Hilfe einer CCD-Kamera statt einer Sekundärelektronenvervielfacher-Röhre. Der zur Verfügung stehende Titan-Saphirlaser wird auf 840 nm justiert und frequenzverdoppelt, was in 420 nm Anregungsstrahlung für die TPE resultiert. Eine alternative Möglichkeit wäre die Dreiphotonenanregung mittels 840 nm Anregungsstrahlung,

diese wurde bereits zur Tryptophandetektion, allerdings nicht in einem Mikrofluidik-Kanal, genutzt^{190,191}.

Zum grundlegenden Test der TPE wird ein *fused silica*-Chip verwendet, dessen Mikrokanal mit konzentrierter Tryptophanlösung gefüllt wird. Im Anschluss wird der Kanal mittels des grünen Lasers auf den CCD justiert abgebildet, um danach mit 420 nm Licht zur Fluoreszenz stimuliert zu werden (Abb. 25). Links ist der illuminierte Kanal für die Justierung und rechts das Emissionslicht des Tryptophans deutlich als heller Punkt erkennbar. Um die TPE über den Zeitraum einer elektrophoretischen Chip-Trennung (ca. 200 Sekunden) stabil zu halten, ist es nötig, die Anregungsleistung des 420 nm Lasers durch einen Graufilter zu reduzieren, da sich andernfalls die Flüssigkeit in der Fokalebene zu stark erhitzt und störende Gasblasen bilden kann.

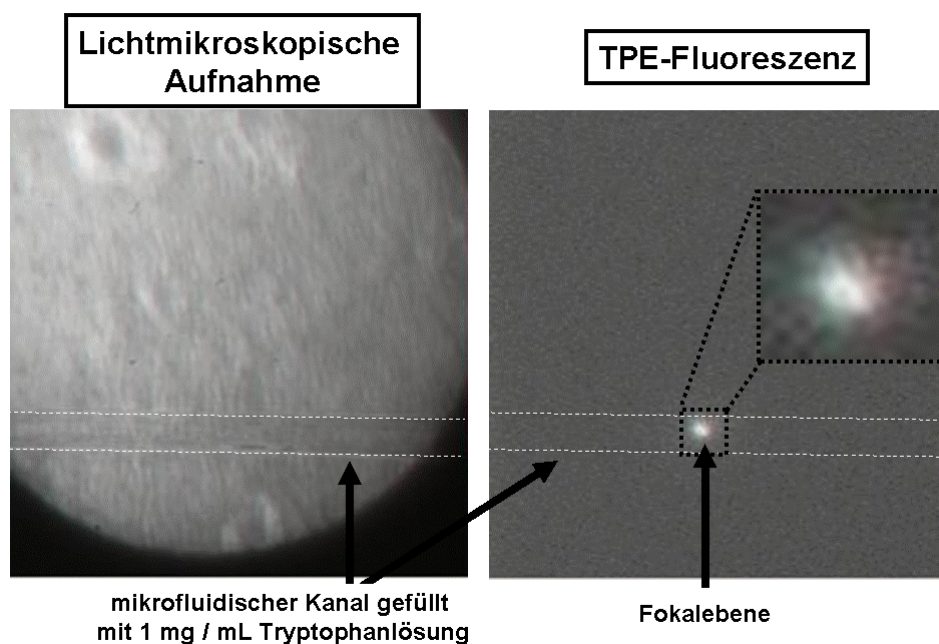


Abb. 25 Links: Lichtmikroskopische Aufnahme eines, mit Tryptophanlösung gefüllten Kanals. Rechts: Zweiphotoneninduzierte Fluoreszenz in der Fokalebene

Zur Realisierung des nächsten Schrittes, einer elektrophoretischen Trennung mit anschließender TPE-Detektion tryptophanhaltiger Proteine, muss eine dynamische Kanalbelegung zur Unterdrückung adsorptiver Protein-Wand-Wechselwirkungen verwendet werden. Aus diesem Grund wurde dem Puffer vor der Trennung Hydroxypropylmethylcellulose als dynamisches Belegungsmittel beigegeben.

Die schnelle Trennung und TPE-Detektion der Proteine im FS-Chip ist in Abb. 26 dargestellt. Alle Proteine sind bei je 333 $\mu\text{g} / \text{mL}$ mit zufriedenstellendem Signal / Rausch- Verhältnis detektierbar. Die Detektionsempfindlichkeit kann durch Verwendung eines sensitiveren Detektors, bspw. eines PMT, weiter gesteigert werden. Wie bereits im Kapitel 3.1.1 (Seite 34) gezeigt, sind die getrennten Proteine mit niedrigeren Nachweisgrenzen (jeweils 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) auch mittels OPE detektierbar. Eine prinzipiell höhere Detektionsempfindlichkeit der OPE gegenüber der TPE lässt sich daraus aber nicht ableiten, da erstens das TPE-Setup nicht auf Sensitivität optimiert wurde und zweitens die zur TPE korrespondierende Wellenlänge bei 210 nm fernab vom Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm liegt.

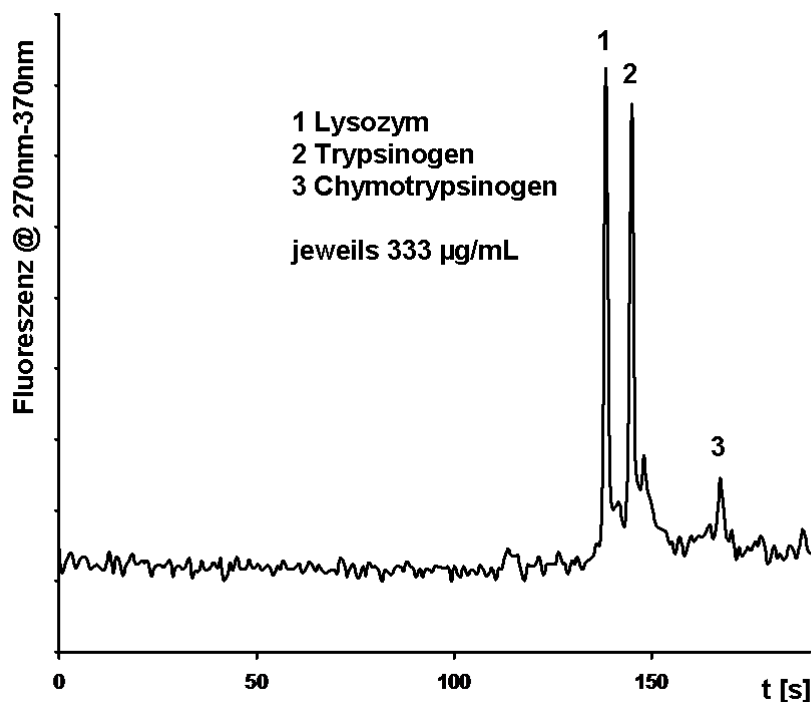


Abb. 26 Trennung und TPE-Detektion von drei proteolytischen Enzymen in einem *fused silica* Chip

Um die Möglichkeiten der TPE-Fluoreszenzdetektion weiter auszuschöpfen ist der nächste logische Schritt eine Trennung in ökonomischeren Alternativen zu teuren FS-Chips. Naheliegend ist dabei eine Trennung in Borosilikatglas-Chips, welche unterhalb von 300 nm intransparent sind, jedoch das Stokes-verschobene Emissionslicht der Analyten passieren lassen. Optimal wären native Chromophore, die mittels OPE nur unterhalb von 300 nm angeregt werden können und ein Fluoreszenzmaximum oberhalb von 300 nm haben. Glücklicherweise fallen eine Vielzahl kleinerer, intrinsischer Fluorophore in diese Gruppe. Ein Testgemisch bestehend aus Serotonin, einem chiralen Diol und der Aminosäure Tryptophan ist in einem herkömmlichen Glas-Chip elektrophoretisch getrennt worden, somit war erstmals die Detektion der TPE-Fluoreszenz unmarkierter, kleiner Aromaten in einem

kommerziellen Borosilikatglas-Chip möglich (Abb. 27). Die gesamte Trenndauer liegt unterhalb von 50 s. Aufgrund der Datenaufnahmerate von 1,25 Hz bedingt durch die langsame Samplinggeschwindigkeit der CCD-Kamera erscheint die Basislinie etwas verrauscht. Um hier Abhilfe zu schaffen, wäre ein schnellerer Detektor (z.B. ein Photomultiplier, eine Avalanche-Photodiode oder – bildgebend – eine *intensified* bzw. *electron-multiplying* CCD) von Vorteil. Dennoch konnten Nachweisempfindlichkeiten im Bereich von 10-50 µg/mL erzielt werden. Zur weiteren Optimierung der Empfindlichkeit sollte in Zukunft die halbierte Wellenlänge des Anregungslichtes auf das Absorptionsmaximum der Analyten abgestimmt werden.

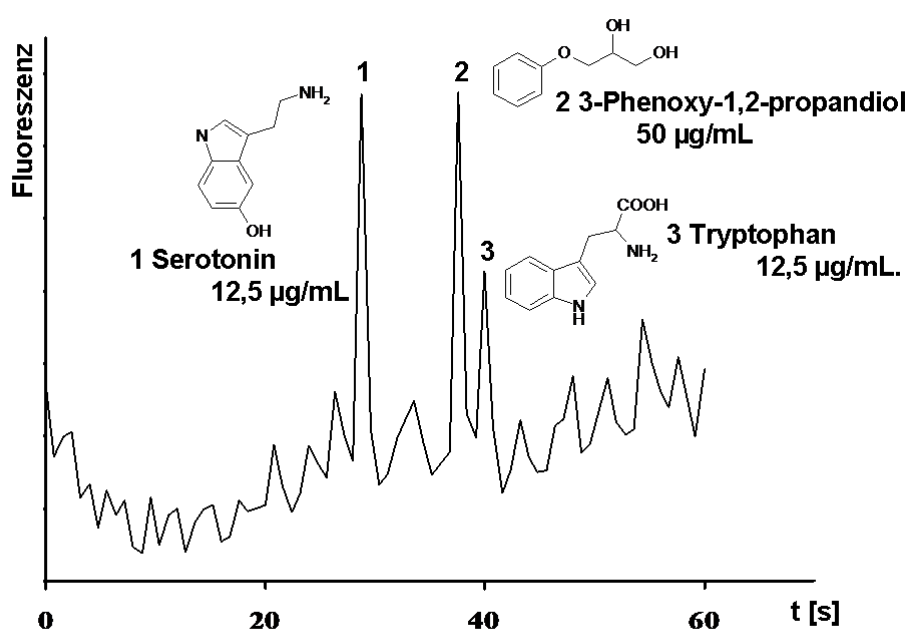


Abb. 27 Trennung und Detektion kleiner Aromaten in einem Borosilikatglas-Chip

Um einen direkten Vergleich zwischen der Detektionsperformanz in Borofloat- bzw. *fused silica*-Chips ziehen zu können, sind in Abb. 29 die entsprechenden Elektropherogramme gezeigt. Die leichten Unterschiede der Migrationszeiten in beiden vermessenen Chips sind auf unterschiedliche Oberflächeneigenschaften und daher abweichende elektroosmotische Flüsse zurückzuführen.

Das SNR ist in *fused silica*-Chips um einiges höher. Das liegt darin begründet, dass das Borosilikatglas oberhalb 300 nm wie ein Hochpassfilter für das Emissionslicht agiert. Folglich werden von der nativen Fluoreszenz kleiner Chromophore, wie dem Diol, alle Wellenlängen < 300 nm absorbiert, was dessen Emissionsintensität vermindert. Die Fluoreszenz der Analyten mit (größerem) Indolgrundgerüst, welches erst oberhalb 300 nm

emittiert, wird weniger durch Absorption des Chipmaterials abgeschwächt, als die des Diols mit phenolischem Fluorophor.

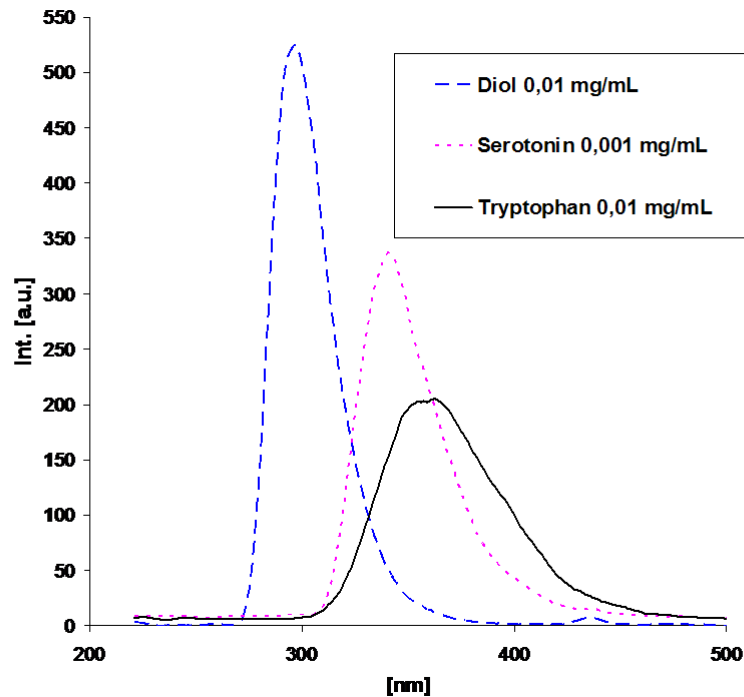


Abb. 28 Native Fluoreszenzspektren aromatischer Analyten bei 220 nm Anregungsstrahlung

Die Emissionsspektren der drei Analyten in Messpuffer sind in Abb. 28 dargestellt. Da eine Anregung mit dem Fluorometer bei 210 nm gerätebedingt nicht möglich ist, wurde das Spektrum bei 220 nm aufgenommen. Die Emissionsmaxima liegen für das Diol bei 296 nm, für Serotonin bei 340 nm und für Tryptophan bei 357 nm. Der verwendete Emissionsfilter transmittiert im Bereich von 265-385 nm.

Der Messuntergrund in Abb. 29 setzt sich aus der Summe von Autofluoreszenz und zurückgestreutem Anregungslicht zusammen. Besonders der Fluoreszenzhintergrund ist beim Borosilikatglas im direkten Vergleich zu *fused silica* erhöht. Durch die Anwendung einer *gated detection*, das ist eine Technik mit der die Fluoreszenzquanten erst nach Abklingen der Hintergrundfluoreszenz akquiriert werden, könnte die Sensitivität gesteigert werden. Eine weitere interessante Möglichkeit zur Signalidentifizierung bietet die zeitaufgelöste Fluoreszenz. Durch die Zuordnung der jeweiligen Abklingzeit zu einzelnen Analytsignalen könnte das System um eine zusätzliche Dimension erweitert werden.

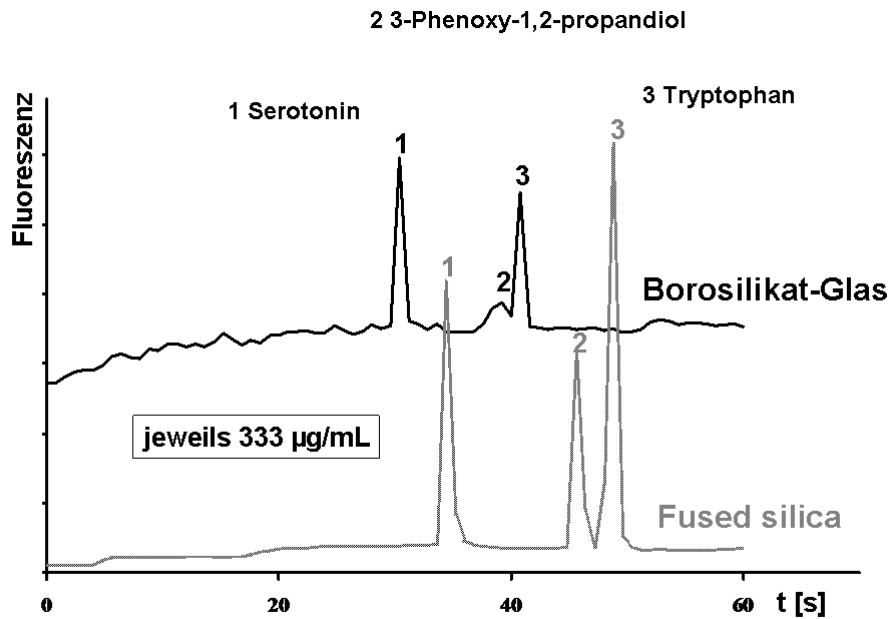


Abb. 29 Vergleich der Detektion kleiner Aromaten in fused silica und Borosilikatglas-Chip

Ein zusätzlicher Schritt in Richtung ökonomischer Chipmaterialien zielt auf die native TPE-Fluoreszenz in polymeren Mikrofluidik-Chips ab. Polymerchips lassen sich in kleinen Stückzahlen mittels Softlithographie oder Heißprägen, wie auch in sehr großen Stückzahlen mittels Spritzguss, deutlich ökonomischer herstellen als Flusssäure-geätzte Glas-Chips.

Da die oben gezeigten Testgemische zu einem nennenswerten Teil unterhalb von 360 nm emittieren, konnten sie nicht in einem PMMA-Chip gemessen werden (Absorptionsspektrum PMMA s. Abb. 22, S.49). Das Tryptophan mit der längsten Emissionswellenlänge ergibt ein detektierbares Signal. Um dennoch das Prinzip zu demonstrieren, wird anstelle einer elektrophoretischen Trennung der Kanal eines PMMA-Mikrofluidik-Chips mit konzentrierter Tryptophanlösung gefüllt und die Datenaufnahme gestartet. Nun wird der Kanal mittels eines Mikromanipulators mehrmals durch den Brennpunkt bewegt, wo die TPE stattfindet. Das resultierende Signal ist als Funktion der Zeit in Abb. 30 zu sehen.

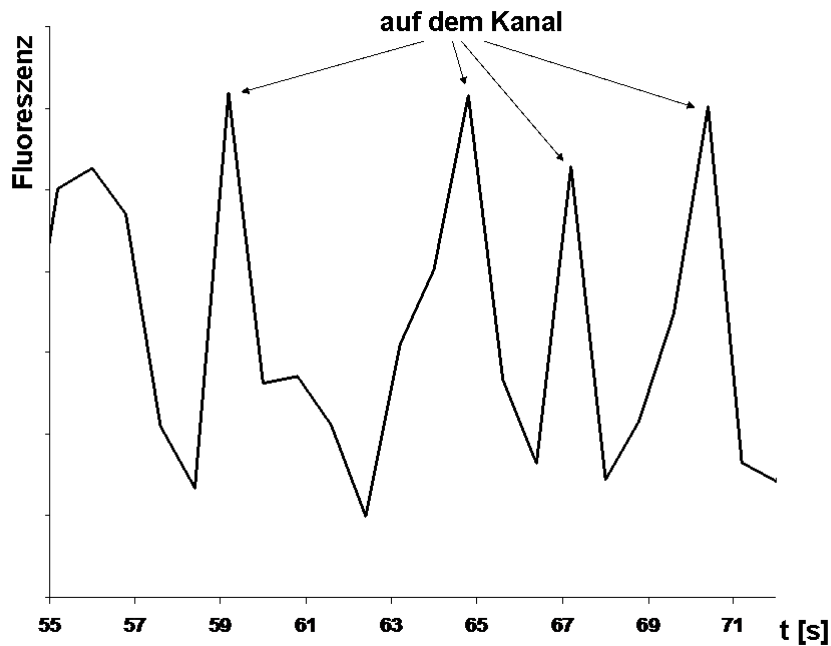


Abb. 30 TPE-Fluoreszenzsignal eines tryptophangefüllten PMMA-Chips beim Herüberfahren über den Kanal

Die Signalzunahme der PMT-Spannung, wenn der Lichtstrahl auf den Kanal trifft, ist deutlich zu erkennen. Dieses Experiment zeigt die Grenzen verwendbarer Materialien für die native TPE- Fluoreszenzdetektion. TPE ermöglicht zwar die Detektion in Chips, welche für das OPE-Anregungslicht intransparent sind, jedoch ist die Transparenz der Chipwerkstoffe im Emissionsbereich der Verbindungen eine notwendige Bedingung. Daher ist die Detektion intrinsisch fluoreszierender Analyten in einem gegebenen Polymer auf native Chromophore mit Emissionswellenlängen im transmittierenden Bereich des jeweiligen Polymers begrenzt. Folglich könnten Polymere verwendet werden, die neben dem sichtbaren auch im gesamten UVA-Bereich (315-380 nm) transparent sind. Hier würden sich hochreines PMMA, Cycloolefin-Copolymere¹⁹², Perfluoropolymere^{193,194}, Polyvinylalkohol (Abb. 58, S. 88) oder siloxanbasierte Polymere¹⁹⁵ anbieten.

3.3 Systemimmanente funktionale Polymere für die Chip-Herstellung

Mikrofluidische Bausteine lassen sich aus sehr unterschiedlichen Materialien, wie Glas, organischen Polymeren, Silicium oder Keramiken herstellen. Polymere Materialien haben gegenüber Glas als Chipsubstrat einige Vorteile. Zum einen sind die Materialkosten für Polymere geringer als die für Glas und die chemische Vielfalt an kommerziell verfügbaren Polymeren mit unterschiedlichen Eigenschaften ist deutlich höher. Zum anderen ist die Mikrostrukturierung von Polymeren einfacher zu vollziehen als die von Glas, da auf zeit- und kostenintensive Ätzprozeduren mit gasförmigem, gelöstem oder in situ gebildetem Fluorwasserstoff verzichtet werden kann und eine Vielzahl alternativer Bonding- und Strukturierungstechniken, wie z.B. die Softlithographie, das Heißprägen, das Spritzgießen, das Thermoformen oder die Laserablation zur Verfügung stehen¹⁹⁶.

Die Chipherstellung aus industriell verfügbaren Polymeren¹⁹⁷, wie z.B. Polydimethylsiloxan (PDMS), Cycloolefincopolymer (COC) oder Polymethylmethacrylat (PMMA) hat sich in Verbindung mit schnellen, einfach zu realisierenden Strukturierungstechniken für die Herstellung geringer Stückzahlen für Versuchszwecke durchgesetzt (*rapid prototyping*). Die Zeit- und Kostenersparnis für die Kleinserien-Fertigung von Polymer-Chips liegt gegenwärtig etwa eine Größenordnung niedriger als die für Glas. Weiterhin sind bereits kommerzielle Einweg-Mikrofluidik-Chips für Spezialanwendungen auf dem Markt.

Polymere haben zwei erhebliche Nachteile gegenüber Glas, nämlich deren geringere chemische Inertheit und deren Hydrophobizität. Während Glas bedingt hydrophile Oberflächeneigenschaften aufweist und nur für anspruchsvolle elektrophoretische Trennungen (von z.B. Proteinen) durch Derivatisierung oder Beschichtung hydrophiliert werden muss, ist eine Oberflächenmodifikation nahezu aller für die Chipfertigung genutzten Polymere unabdingbar¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Diese modifizierten Kanaloberflächen erleichtern das Befüllen mikrofluidischer Kanäle mit wässrigen Lösungen und verringern Analyt-Wand-Wechselwirkungen, welche der Trenneffizienz abträglich sind. Die Oberflächenmodifikation kann auf physikalischem²⁰¹⁻²⁰⁴ oder chemischem Wege²⁰⁵⁻²⁰⁷ erfolgen und ist insbesondere für effiziente Trennungen in der Mikrochipelektrophorese von Bedeutung²⁰⁸⁻²¹⁰.

Als dynamische Beschichtungsmittel werden stark hydrophile Polymere wie Polyethylenglycole (PEGs), hydroxylierte Cellulosederivate oder Polyvinylalkohol (PVAL) eingesetzt, welcher sich in der Kapillarelektrophorese als ideales Material zur Beschichtung

von Kapillarinnenwänden etabliert hat. Es liegt auf der Hand, Mikrofluidik-Bausteine direkt aus diesen hydrophilen Polymeren herzustellen. Weil stark hydrophile Polymere jedoch ein ausgeprägtes Quellverhalten und oft eine gute Löslichkeit in wässrigen Medien zeigen, sind bisher keine derartigen Arbeiten publiziert worden.

In diesem zweigeteilten Kapitel werden zunächst funktionale Polymere zur Chipherstellung untersucht, deren Oberfläche sich durch die Spaltung funktioneller Gruppen zu PVAI konvertieren lässt. Die PVAI-Oberfläche sollte eine permanente Hydrophilie aufzeigen und aufgrund der kovalenten Bindung an das Polymersubstrat wasserunlöslich sein. Die Eigenschaften dieser hydrophilierten Mikrofluidik-Bausteine werden im Hinblick auf die Mikrochip-Elektrophorese evaluiert.

Einen Schritt weiter geht der zweite Teil des Kapitels, in dem ein Verfahren zur Fertigung von Chips in Schichtbauweise vorgestellt wird. Diese „Sandwich-Chips“ bestehen aus einer, mittels Heißprägen oder Softlithographie strukturierten Polymerschicht, die zwischen zwei Glassubstraten liegt und erlauben die direkte Herstellung hydrophiler Chips aus PVAI.

3.3.1 Vollmaterial-Chips

3.3.1.1 Hydrophilieren der Oberflächen

Als funktionale hydrophile Polymere finden Polyvinylacetat (PVAc) sowie Polyvinylbutyral (PVBu) der Firma Wacker Anwendung. Diese wasserunlöslichen Polymere sollten sich durch Spaltung des Esters, bzw. der Acetal-Funktionalität gemäß Abb. 31 zu hydrophilem PVAI umsetzen lassen.

Zur relativen Bestimmung der Hydrophilie der Materialien werden Kontaktwinkelmessungen auf der Substratoberfläche von Polymerstücken durchgeführt. Zu diesem Zweck wird ein System zur Aufnahme der Kontaktwinkel aufgebaut und an einem kommerziellen Kontaktwinkelmessgerät validiert (Kap. 4.4 auf S. 103).

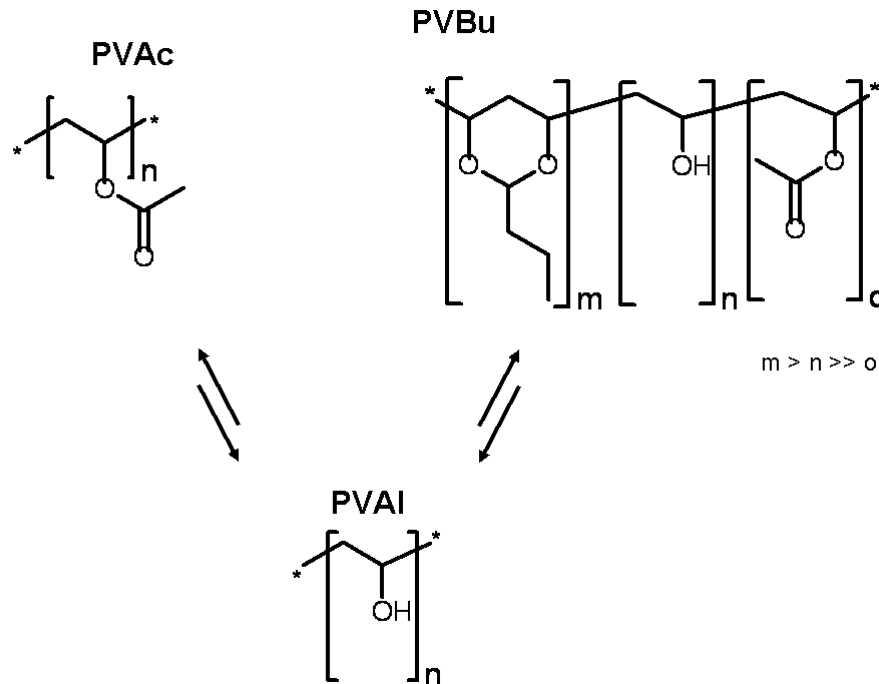


Abb. 31 Strukturen der Polyvinylester

Generell kann die Esterspaltung säurekatalysiert (reversibel) als auch durch Basen (irreversibel) erfolgen. Die irreversible Variante erscheint im Hinblick auf eine höhere Ausbeute an Hydroxylgruppen sinnvoller. Dafür werden Alkalimetallhydroxide, Ammoniak oder tertiäre Ammoniumhydroxide verwendet. Weiterhin werden zwei plasmabasierte Verfahren zur Spaltung oberflächennaher Gruppen getestet, die zunächst diskutiert werden sollen.

Da Plasmen eine Vielzahl geladener Teilchen mit hohen Überschussenergien enthalten, könnten im Plasma oberflächennahe funktionelle Gruppen des Polymers zu polaren Gruppen, wie z.B. Carbonsäuren, Hydroxylgruppen, Aldehyden, Ketonen oder Aminogruppen umgewandelt werden²¹¹. Es sind zwei Varianten im Einsatz: Ein Niederdruckplasma und die Behandlung mit einem Plasma-Jet eines kapazitiv gekoppelten Atmosphärendruck-Plasmas. Die Behandlung im induktiv gekoppelten Niederdruck-Plasma erfolgt in einer kommerziellen Plasmaanlage der FH Regensburg. Ein Vergleich von Plasmen der zur Verfügung stehenden Prozessgase (N_2 , O_2 , Ar) zeigt, dass Stickstoff die größte Kontaktwinkelabnahme bewirkt. In Abhängigkeit der eingekoppelten Leistung werden nach 10 Minuten Behandlungszeit im Stickstoff-Plasma die jeweiligen Kontaktwinkel bestimmt und aufgetragen (Abb. 32). Die Fehlerbalken entsprechen dabei der Standardabweichung.

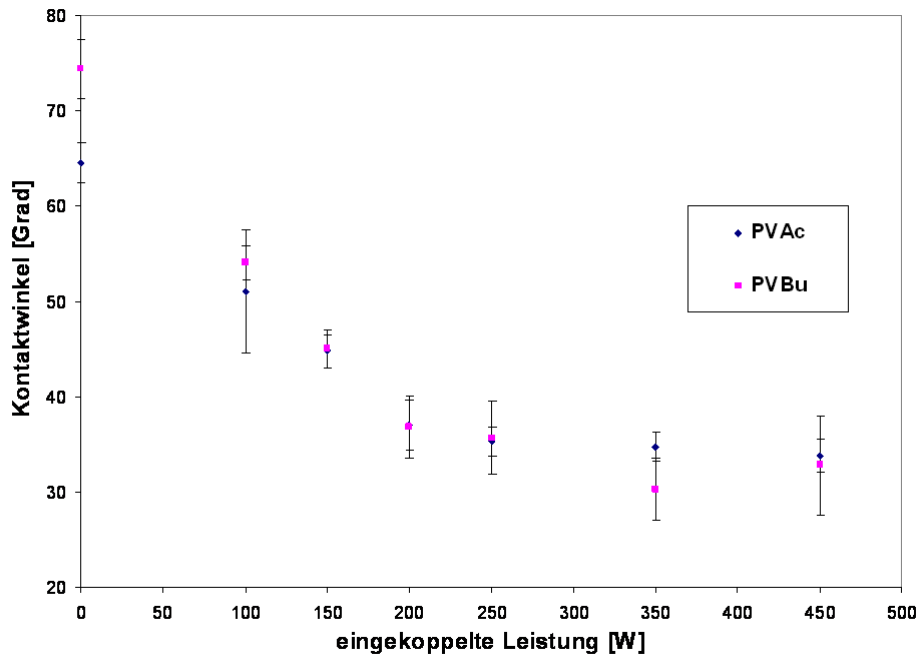


Abb. 32 Abnahme der Kontaktwinkel in Abhängigkeit der induktiv eingekopplten Leistung der Niederdruck-Plasmabehandlung mit N₂

Die Abnahme der Kontaktwinkel durch die Plasmabehandlung von $74,3^\circ \pm 3,1$ auf $30^\circ \pm 3,2$ für PVBu und von $65,0^\circ \pm 2,1$ auf $33,8^\circ \pm 1,7$ für PVAc ist offensichtlich. Der Hydrophilierungseffekt ist bei hohen Plasmaleistungen am größten, jedoch begrenzt die als Begleiterscheinung auftretende Erwärmung der Polymere die verwendbare Maximalleistung auf 450 Watt. Unmittelbar nach der Behandlung bei dieser Leistung ist das PVAc bereits plastisch verformbar, d. h. die Temperatur der Chips kommt in den Bereich des Glasübergangspunktes.

Die temporäre Abnahme des Kontaktwinkels geht mit der Zunahme der Hydrophilie der Oberfläche einher und beruht auf der Ionenimplantation, dem Absputtern oberflächlicher Verunreinigungen sowie in geringem Maße der Generierung polarer funktioneller Gruppen (z.B. Amino-, Carbonyl- oder Carboxylfunktionen). Die Erzeugung einer hohen Hydroxylgruppendichte an der Oberfläche, welche eine permanente Hydrophilie bewirken sollte, erfolgt offensichtlich nicht. Das Ansteigen der Kontaktwinkel bei Radiofrequenzleistungen oberhalb von 350 Watt ist auf die Aufrauung der Oberfläche durch Plasmaätzen zurückzuführen und tritt insbesondere im Sauerstoff-Plasma in den Vordergrund. Die Kontaktwinkelmessung zur Bestimmung der Hydrophilie büßt beim Vergleich von Oberflächen mit stark unterschiedlicher Rauigkeit an Aussagekraft ein, da das Benetzungsverhalten auch durch die Oberflächentopologie beeinflusst wird.

Die zweite Plasma-Variante, mit der eine hydrophile Oberfläche erzeugt wird, ist die Behandlung der Polymere mit einem kapazitiv-gekoppelten Gleichspannungs-Plasma. Die unter Atmosphärendruck arbeitende Plasma-Quelle²¹² ist schematisch sowie als Fotografie in Abb. 33 a bzw. b dargestellt. Der Plasmastrahl wird durch Feldüberhöhung an einer Wolframspitze, über die ein Gasfluss laminar strömt, erzeugt. Im Bereich der Spitze entsteht eine Glimmentladung in der durch Elektronenstoßionisation Stickstoffmoleküle ionisiert werden. Diese Ionen werden mit dem Gasstrom aus der Quelle geführt, was in einem nahezu potenzialfreien und kalten Plasma-Jet resultiert. Mit dem Plasma-Strahl werden PVAc, PVBu und zum Vergleich ein elastomeres Silikon (PDMS), welches ebenfalls zur Herstellung mikrofluidischer Chips verwendet wird, für jeweils 10 Sekunden behandelt. Auch in diesem Experiment kann eine Verringerung der Kontaktwinkel von $65,0^\circ \pm 2,1$ auf $45,5^\circ \pm 2,1$ für PVAc bzw. von $74,3^\circ \pm 3,1$ auf $45,8^\circ \pm 2,2$ für PVBu erreicht werden, allerdings nimmt diese Hydrophilie nach kurzer Zeit wieder ab, was auf einen nicht-permanenten Oberflächeneffekt hinweist (Abb. 33 c). Diese Abnahme ist unter dem Namen *hydrophobic recovery* insbesondere für PDMS, aber auch für andere Polymere bekannt, und ist bis heute nicht komplett verstanden. Eine Teilerklärung liefert die vorhandene Kettenmobilität der Polymermoleküle, durch die polare Gruppen teilweise ins Innere des Polymersubstrates diffundieren können.

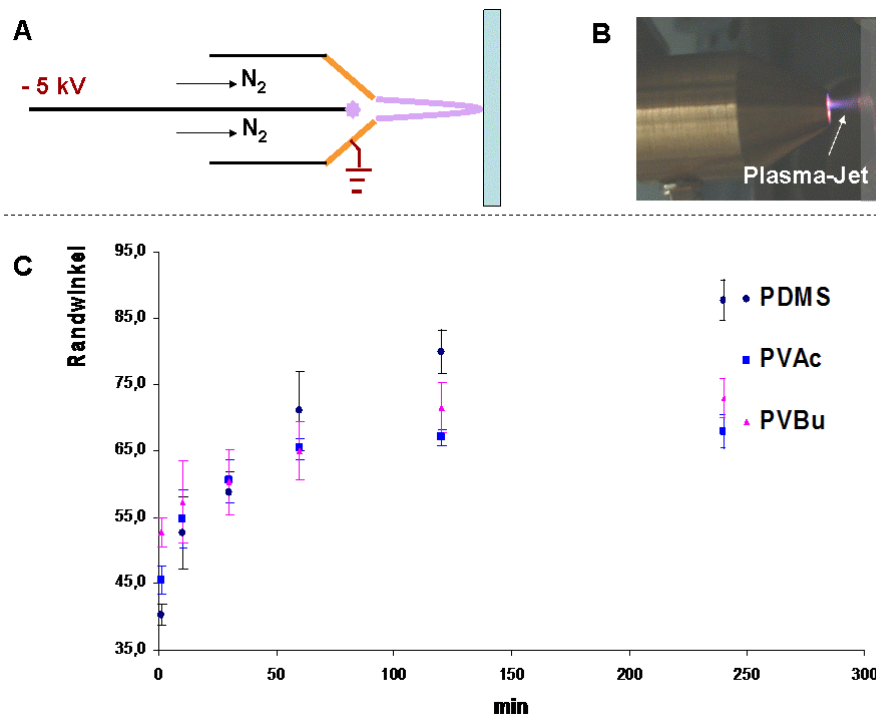


Abb. 33 Hydrophilierungsversuch mit einer kapazitiv gekoppelten Atmosphärendruck-DC-Plasmaquelle. A Schematischer Aufbau; B Photographie des Plasma Jets; C Kontaktwinkelzunahme im Zeitraum nach der Behandlung

Mit beiden Plasma-basierten Verfahren erfolgt eine kurzzeitige Aktivierung der Polymeroberflächen, jedoch keine permanente Hydrophilierung. Da eine permanente Hydrophilie im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit für elektrophoretische Messungen wesentlich ist, sind sowohl das induktiv gekoppelte Niederdruckplasma, als auch das kapazitiv gekoppelte Atmosphärendruckplasma als Vorbehandlungsschritt für die MCE kaum geeignet.

Als nasschemische Hydrophilierungsmittel für PVAc kommen eine Esterhydrolase, Ammoniak sowie Alkalilaugen zum Einsatz. Die enzymatische Spaltung mittels einer Esterase aus Schweineleber führt nach 24-stündiger Inkubation nicht zu einer hydrophileren Oberfläche. Die zu spaltenden Estergruppen des Polymers kommen aufgrund der kovalenten Bindung zur Substratoberfläche offensichtlich nicht in die katalytisch aktive Kavität des Proteins. So zeigt die Behandlung des Polymers mit Enzym keinen Effekt. Ammoniaklösungen und noch mehr flüssiges Ammoniak unter erhöhtem Druck wirken als Weichmacher für PVAc. Sie diffundieren in das Polymer hinein und erhöhen dessen plastische Verformbarkeit, dieser Prozess geht mit einer leichten Trübung des Materials

einher. Bei der Behandlung mit flüssigem Ammoniak verdampft zudem beim Entspannen des Autoklaven das Ammoniak schlagartig und schäumt das erweichte Polymer auf.

Die Behandlung mit jeweils 10 M KOH bzw. NaOH bewirkt schlussendlich eine signifikante Abnahme der Benetzungswinkel (Abb. 34 A). Nach 46 Stunden Behandlungszeit ist die Reaktion beendet. Die Behandlung ist von einer leichten Trübung der Oberfläche begleitet (Abb. 34 B, C).

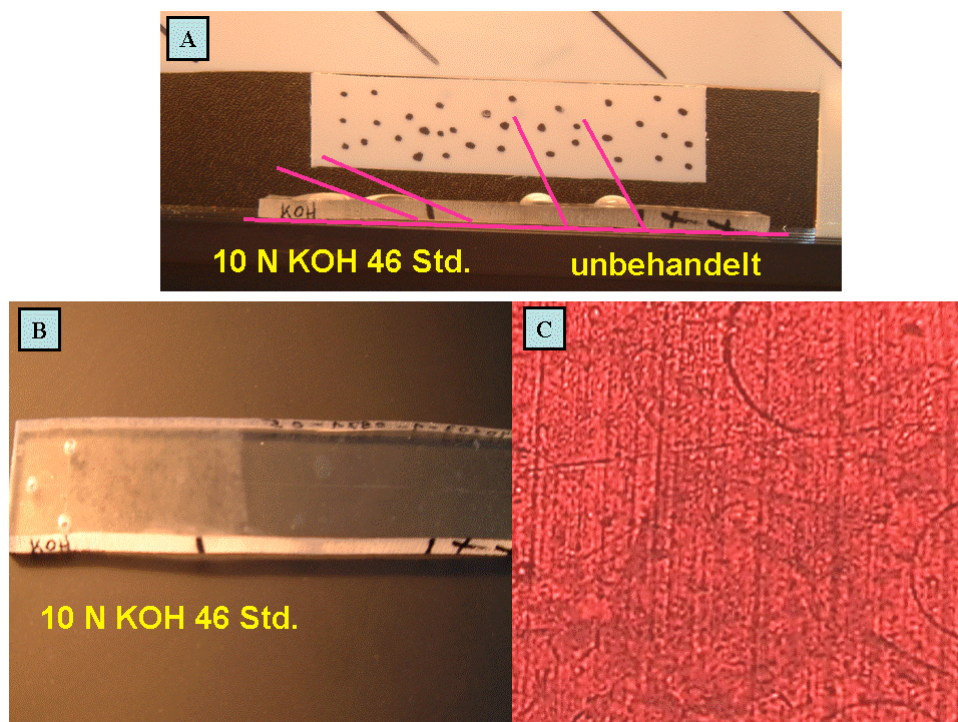


Abb. 34 Behandlung von PVAc mit konzentrierter Alkalilauge: **A** Kontaktwinkeländerung; **B** Trübung der behandelten Seite; **C** 40x Vergrößerung der behandelten Oberfläche durch einen Rotfilter

Diese Trübung geht nur mit einem minimalen Anstieg der Autofluoreszenz des Polymers einher (Abb. 35) und sollte nach dem Übertragen der nasschemischen Hydrophilierung in den Kanal die Detektion kaum nachteilig (durch Streuung) beeinflussen. Die basisch behandelten PVAc-Oberflächen sind langzeitstabil (keine Kontaktwinkelzunahme binnen 6 Monaten), eine *hydrophobic recovery* wie bei den plasmenbasierten Verfahren ist nicht zu beobachten. Eine mögliche Erklärung ist eine hohe Hydroxylgruppendichte, die die Ausbildung von H-Brückenbindungen der Polymerstränge untereinander ermöglicht und so den erzeugten PVAl-Film stabilisiert. Zur weiteren Klärung der Oberflächenchemie werden XP-Spektren der Polymere in Kap. 3.3.1.2 auf S. 66 diskutiert.

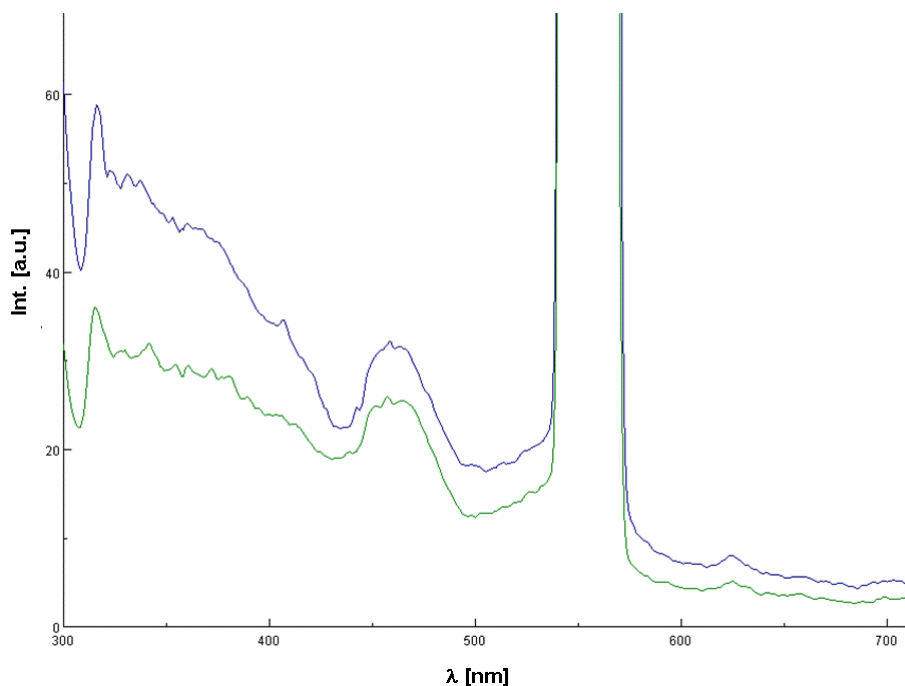


Abb. 35 Vergleich der Eigenfluoreszenz bei 266 nm von unbehandeltem PVAc (grün) und basenbehandeltem PVAc (blau)

Zur Hydrophilierung des PVBu müssen zyklischen Acetalgruppen abgespalten werden. Da Acetale als Schutzgruppen für Alkanole in der organischen Synthese in homogener Lösung üblicherweise säurekatalysiert gespalten werden²¹³, ist auch die Spaltung auf der Polymeroberfläche im sauren Milieu naheliegend. Es werden konzentrierte und halbkonzentrierte Säuren, wie Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Essigsäure, Ameisensäure und Perchlorsäure getestet. Das PVBu löst sich in den Mineralsäuren zu stark viskosen Lösungen. Ameisen- und Essigsäure verursachen eine starke Quellung und damit ein Aufweichen der Polymeroberfläche. Einzig 23 %ige Perchlorsäure greift das Polymer nicht sichtbar an und erwirkt eine Kontaktwinkeländerung von $74,3^\circ \pm 3,1$ auf $40,0^\circ \pm 1,4$.

In Abb. 36 ist die Übersicht der verschiedene Hydrophilierungsmethoden gegeben. Unbehandeltes Polyvinylbutyral ist weniger hydrophil als unbehandeltes PVAc, was im Einklang mit der längeren apolaren Kohlenwasserstoffkette der Butyralgruppe steht. Als Erwartungswert einer kompletten Konversion zu Hydroxylgruppen ist ein dünner, thermisch immobilisierter PVAI-Film mit einem Kontaktwinkel von $21,0^\circ$ ebenfalls dargestellt.

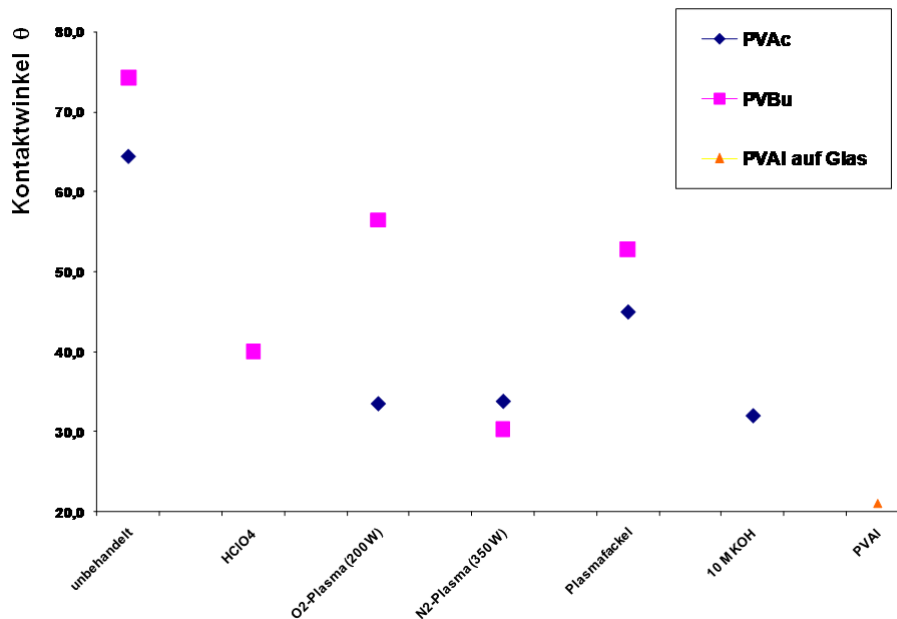


Abb. 36 Übersicht über einige Hydrophilisierungsmethoden für PVAc und PVBu

3.3.1.2 Charakterisierung der Oberflächen mittels XPS

Als analytische Methode zur Untersuchung der chemischen Reaktionen beim Hydrophilieren der Polymeroberflächen ist die röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie (XPS) das Mittel der Wahl. Diese oberflächensensitive Methode erlaubt einen empfindlichen Nachweis spezifischer chemischer Bindungen durch deren charakteristische Bindungsenergien.

Wichtig für eine sinnvolle Diskussion dieser Spektren ist, dass man sich die Herstellungsprozesse der Polymere vergegenwärtigt: Das PVAc wird industriell direkt durch radikalische Polymerisation von Vinylacetat synthetisiert, demnach enthält es ausschließlich Estergruppen. Demgegenüber steht das PVBu, dessen Produktion dreistufig durch Umsetzung von PVAc zu PVAI (Esterspaltung) und Acetalisierung der Hydroxylgruppen mit Butyraldehyd in homogener Phase erfolgt. Folglich sind neben Acetalgruppen zusätzlich nicht umgesetzte Hydroxyl- bzw. Acetatanteile vorhanden (vgl. Abb. 31 auf S.60).

Im Folgenden werden die XP-Spektren der mit Kohlenstoff bzw. Sauerstoff korrespondierenden Energien diskutiert, zunächst von PVAc und im Anschluss die von PVBu.

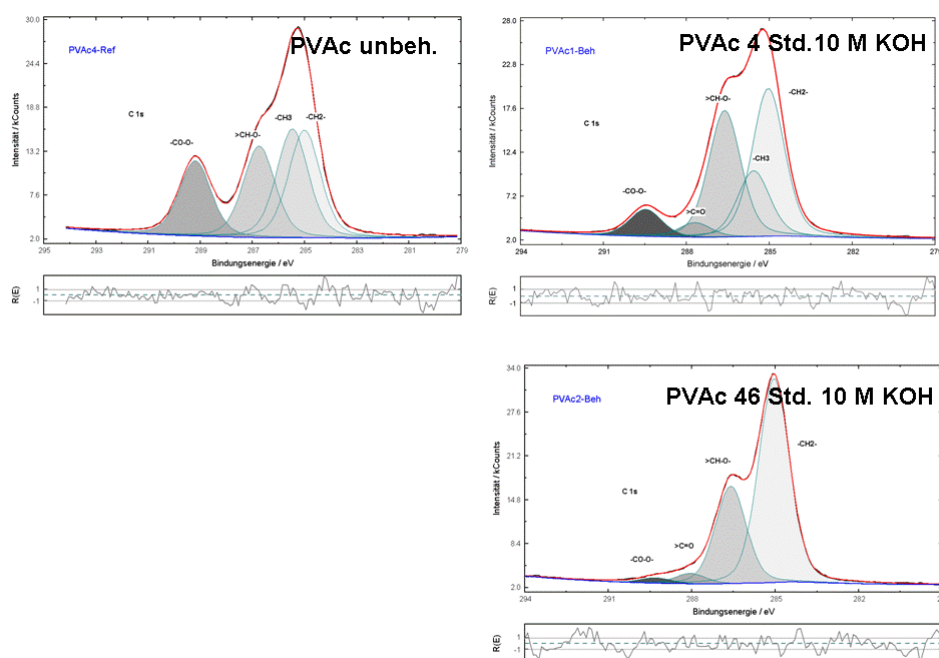


Abb. 37 XP-Spektrum der Kohlenstoff-Bindungsenergien von unbehandeltem PVAc und mit KOH hydrophiliertem PVAc

Für PVAc ist in Abb. 37 der für Kohlenstoffatome relevante Energiebereich des XP-Spektrums vergrößert dargestellt. Dabei wird unbehandeltes, 4-stündig und 46-stündig behandeltes Material gegenübergestellt. Die Intensität des Signals bei 289,2 eV, welche der Kohlenstoff-Energie der funktionellen Estergruppe (-CO-O-) entspricht, nimmt mit zunehmender Behandlungsdauer ab (19,6 : 7,1 : 1,8 % relative Peakfläche). Da im Zuge der Esterhydrolyse Essigsäure abgespalten wird, nimmt analog auch die Anzahl an Methylgruppen ab, welche ausschließlich als Acetylreste im Polymer enthalten sind (285,5 eV). Betrachtet man das Spektrum der O1s-Energien von Sauerstoff (Abb. 38), so ist durch die Hydrophilierung eine Verringerung der Signalbreite von 6 eV auf 5 eV festzustellen (534,4 eV). Diese Reduzierung ist auf die Abspaltung des Carbonylsauerstoffs und die Konversion des Brückensauerstoffs der Carboxylgruppe zu einheitlich gebundenen Hydroxylsauerstoffen zurückzuführen. Die gezeigten XP-Daten bestätigen die These, dass oberflächennahe Estergruppen des PVAc basenkatalysiert in Hydroxylgruppen umgewandelt werden, was auch die beobachtete Kontaktwinkelabnahme erklärt.

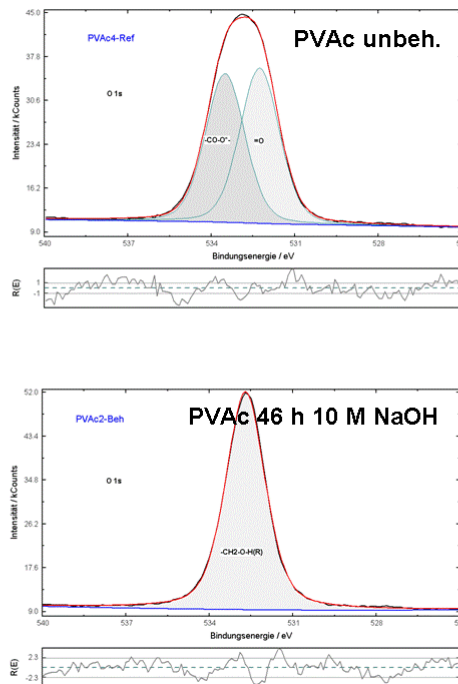


Abb. 38 XP-Spektrum der Sauerstoff-Bindungsenergien von unbehandeltem und hydrophiliertem PVAc

Für das PVBu ist die Aussagekraft der XP-Spektren weniger eindeutig und zudem ist die Auswertung komplexer, da schon das Ausgangsmaterial herstellungsbedingt Acetyl-, Hydroxyl- und Acetal-Gruppen enthält. Die Konversion des Acetals zu Hydroxylgruppen sollte mit der Abspaltung von Butyraldehyd einhergehen und zur Abnahme von Methyl- und Methylengruppen sowie der Zunahme von Hydroxylresten führen. Die zugehörigen XP-Spektren sind in Abb. 39 dargestellt.

Die quantitative Auswertung der Daten in Abb. 40 zeigt durch die Behandlung mit Perchlorsäure eine signifikante Abnahme von Methylgruppen sowie eine Zunahme von Methylengruppen. Stünde die Methylgruppenabnahme im Einklang mit der Abspaltung des Acetals, dann wäre ebenso eine Abnahme von Methylengruppen zu erwarten. Offensichtlich findet keine (entropisch ungünstige) Spaltung des zyklischen Acetals statt, vielmehr ist die Spaltung vorhandener Acetatreste im Polymer eine mögliche Schlussfolgerung.

Für die beobachtete Zunahme an Methylengruppen fehlt demgegenüber eine schlüssige Erklärung. Die Abnahme der Signalbreite im Sauerstoff-Spektrum analog dem PVAc ist nicht zu beobachten, was auf keine Hydroxylgruppen-Bildung hindeutet. Die makroskopisch beobachtete Abnahme der Kontaktwinkel des PVBu, welche durch die Perchlorsäurebehandlung erzielt werden kann, ist dem Anschein nach auf die Diffusion der Säure in das Material zurückzuführen (Quellung).

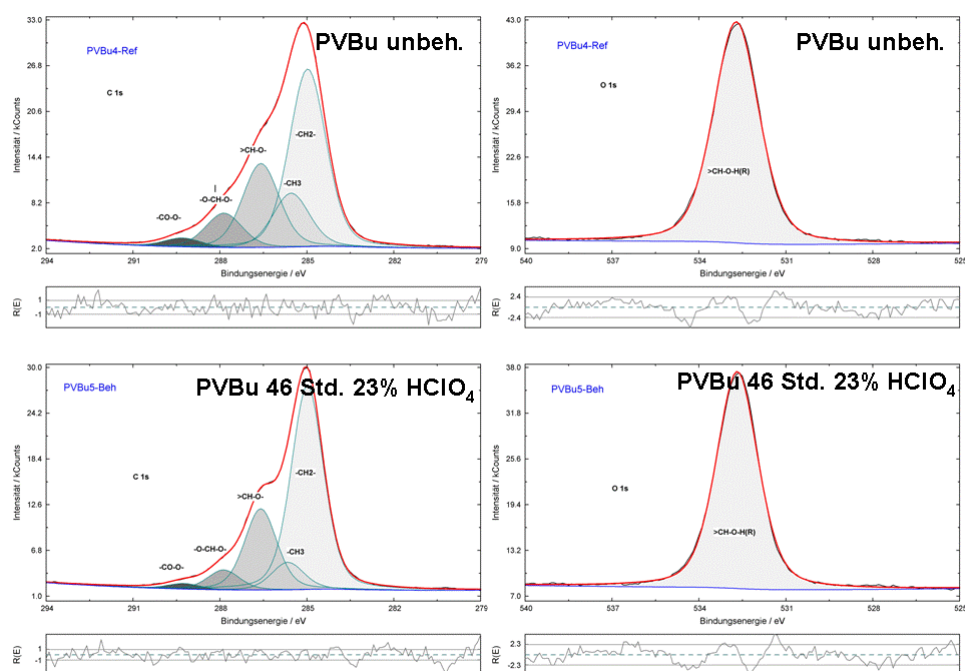


Abb. 39 Gegenüberstellung der XP-Spektren von unbehandeltem und mit HClO_4 -behandeltem PVBu

| | funkt. Gruppe | Lage [eV] | rel. Peakfläche [%] |
|---------------------------------|--------------------|-----------|---------------------|
| unbehandelt | | | |
| | -CH ₂ - | 285,0 | 49,5 |
| | -CH ₃ | 284,4 | 15,0 |
| | >CH-O- | 283,4 | 23,4 |
| | -O-CH-O- | 282,1 | 9,6 |
| | -CO-O- | 280,7 | 2,5 |
| 46 Std. HClO₄ | | | |
| | -CH ₂ - | 285,0 | 60,3 |
| | -CH ₃ | 284,3 | 8,2 |
| | >CH-O- | 283,4 | 24,0 |
| | -O-CH-O- | 282,1 | 5,9 |
| | -CO-O- | 280,7 | 1,7 |

Abb. 40 Quantitative Auswertung der Kohlenstoffspektren aus Abb. 39

Zusätzliche Signale im XP-Übersichtsspektrum, die auf HClO_4 als Quellmittel hindeuten sind nicht zu identifizieren. Eine mögliche Erklärung ist, dass XP-Spektren im Hochvakuum aufgenommen werden und die HClO_4 vor der Datenaufnahme aus dem Polymer desorbiert wird.

3.3.1.3 Chips und Befüllung

Die Herstellung von Vollmaterial-Chips wurde in Kooperation mit dem Microfluidic ChipShop in Jena aus pulverförmigem Polymermaterial durchgeführt. Erste PVAc-Chips hatten fertigungsbedingt opake Deckelplatten (Abb. 41 A, B), welche die Fluoreszenzdetektion durch Lichtstreuung stark behinderten. Weiterhin hatten die Vialbohrungen durch Unterschneidungen extrem große Totvolumina. Eine lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die schlechte optische Qualität und stark deformierte Kanäle im Kreuzungsbereich (Abb. 41 C). Diese Nachteile wurden durch Modifikation der Herstellungsschritte beseitigt, so dass letztlich Chips mit transparenten Deckelplatten, totvolumenfreien Vials und geraden Kanälen zur Verfügung stehen (Abb. 41 C-F). Der Einschluss von Partikeln und Luftblasen konnte ebenfalls verringert, aber nicht gänzlich beseitigt werden.

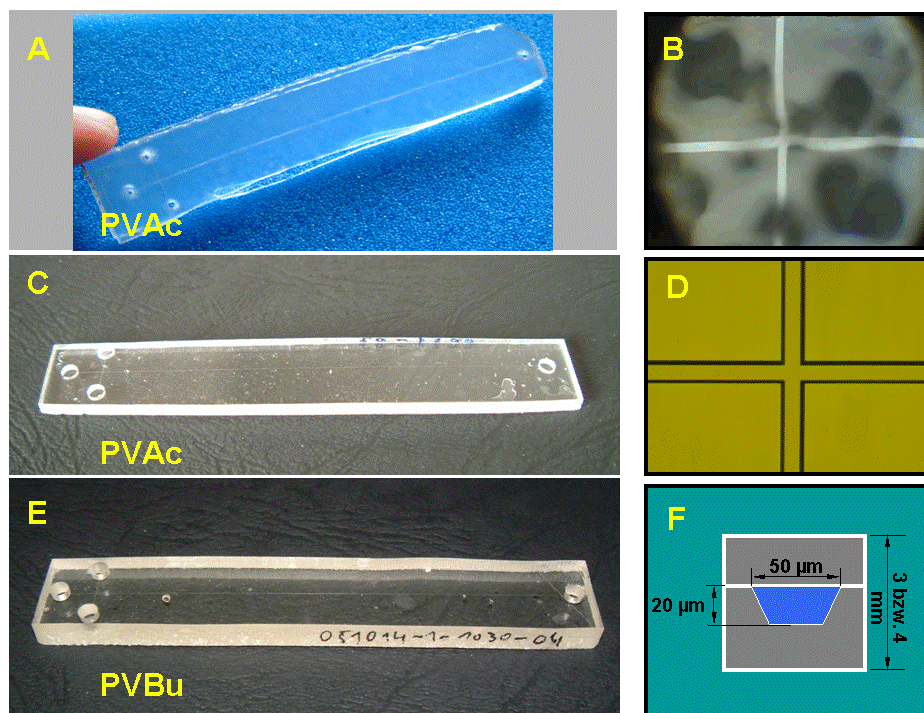


Abb. 41 A,C PVAc-Chip der ersten bzw. letzten Generation; B,D Zugehörige Aufnahmen des Kreuzungsbereichs; E PVBu-Chip; F Dimensionszeichnung des Kanalprofils

Weiterhin ist auf den Fotografien deutlich der Einschluss von Luftblasen bzw. Partikeln erkennbar. Eine lichtmikroskopische Inspektion der Chips sowie das wässrige Befüllen der Mikrokanäle mittels Unterdruck bestätigen diese Beobachtung. In jedem verfügbaren Chip sind fehlerhafte Stellen. Diese werden in 3 Gruppen kategorisiert, vgl. Abb. 42:

- A sich von den Wänden ablösende Partikel
Dieser treten insbesondere im Bereich der Probegefäße (Vials) auf und können durch sorgfältiges Spülen weitgehend minimiert werden. Dennoch ist komplettes Entfernen nicht immer möglich, so dass einige Chips verstopfen und unbrauchbar werden.
- B eingebondete Partikel
Sofern Partikel zwischen beiden Platten ohne Kontakt zu einem der Kanäle eingeschlossen sind, erhöht sich lediglich durch Autofluoreszenz der Detektionshintergrund. Partikel mit direktem Kontakt zum Kanal resultieren in kleinen Totvolumina und erschweren das blasenfreie Befüllen der Chips.
- C Luftblasen mit Öffnung zum Mikrofluidikkanal
Diese erschweren die blasenfreie Befüllung der Chips erheblich und vermindern weiterhin durch große Totvolumina die Trenneffizienz. Zudem erhöht sich aufgrund von Streueffekten der Detektionshintergrund. Je nach Größe des Totvolumens machen diese Fehlstellen den Chip unbrauchbar (mittleres Bild, unten).

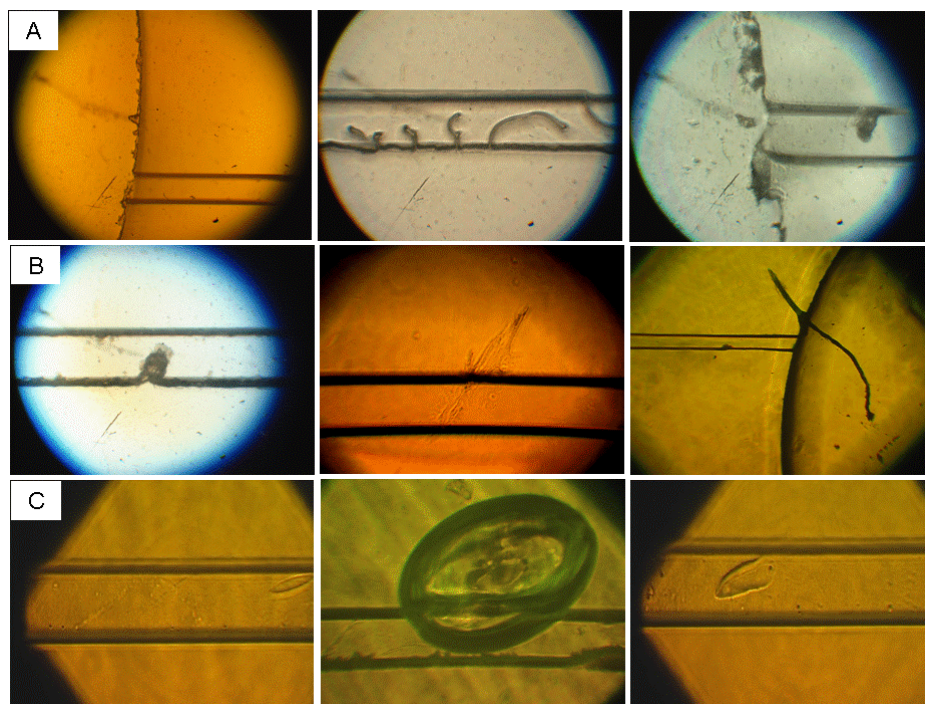


Abb. 42 Fehlerhafte Stellen der Mikrofluidik-Chips: A sich lösende Partikel; B eingebondete Partikel; C Luftblasen (Totvolumina)

Der nächste Schritt ist die Übertragung der nasschemischen Hydrophilierung in die mikrofluidischen Kanäle der Chips (HClO_4 -Behandlung für PVBu und Basenbehandlung für PVAc). Dazu wird die Hydrophilierflüssigkeit mittels Überdruck durch das Vial am Ende des Trennkanals gespült, bis in jedem der übrigen Vials ein kleiner Flüssigkeitstropfen sichtbar wird. Anschließend werden eventuell vorhandene Luftblasen im Kanal mittels der Durchlichtmikroskopie ausfindig gemacht und mittels Überdruck aus dem Kanal gespült. Die aufgefüllten Vials werden mit Tesa-Film als Staub- und Verdampfungsschutz für die gesamte Hydrophilierdauer verschlossen. Das permanente Hydrophilieren von PVBu innerhalb des mikrofluidischen Kanals gelingt nicht, da sich die mit Perchlorsäure befüllten Kanäle nach kurzer Zeit von selbst verschließen. Anscheinend tritt hier eine leichte Quellung des Materials auf, die ausreicht um den Mikrokanal zu blockieren. Dementsprechend können die in Kapitel 3.3.1.5 durchgeführten elektrophoretischen Trennungen nur in unbehandeltem PVBu durchgeführt werden.

Für die Hydrophilierung von PVAc mittels Base wird nach Ablauf der gewünschten Zeitdauer die Lauge mittels Überdrucks aus dem Kanal gespült und dieser im Stickstoffstrom getrocknet. Bei der folgenden Erstbefüllung des Kanals mit Wasser ist kein Überdruck notwendig, da die hydrophilen Kanalwände eine Befüllung durch Kapillarkraft ermöglichen. Da sich zunächst der Kanal nur einige Zentimeter befüllte, bis er komplett verstopft war, wird die Erstbefüllung videomikroskopisch unter Phasenkontrastbeleuchtung dokumentiert. In Abb. 43 A-C sind Momentaufnahmen von der Erstbefüllung eines 46 Std. Stunden mit Base behandelten Chips gezeigt. Dabei sind die Photos in chronologischer Reihenfolge sortiert. In A sieht man bereits hell erscheinende Partikel in der Flüssigkeit, welche sich hinter dem Meniskus sammeln. Mit fortschreitender Befüllung nimmt die Anzahl der Partikel nach C hin zu. Bild D zeigt schließlich die lichtmikroskopische Aufnahme der verstopften Stelle, an der die Partikel aggregiert sind und irreversibel den Kanal verstopfen. Um dieses Verstopfung zu verhindern, muss die Erstbefüllung sequentiell geschehen. Dazu wird zwischendurch die Flüssigkeit mit darin enthaltenen Partikeln immer wieder abgesaugt, ehe es zur Aggregation kommen kann. Dafür werden 4 μL Wasser in das Vial am Ende des Trennkanals gegeben, welches in den Kanal läuft und sofort wieder abgesaugt wird. Dieser Vorgang wird wiederholt, wobei die Zeit bis zum Absaugen nach und nach verlängert wird. Sobald das Kreuz erreicht ist, kann dieses aufgrund der kürzeren Kanallänge komplett gespült werden. Die Erstbefüllung eines 46 Stunden behandelten PVAc-Chips (starke Partikelbildung bei langer Behandlungsdauer) beansprucht über 1 Stunde. Im Anschluss kann der Chip getrocknet und gelagert werden.

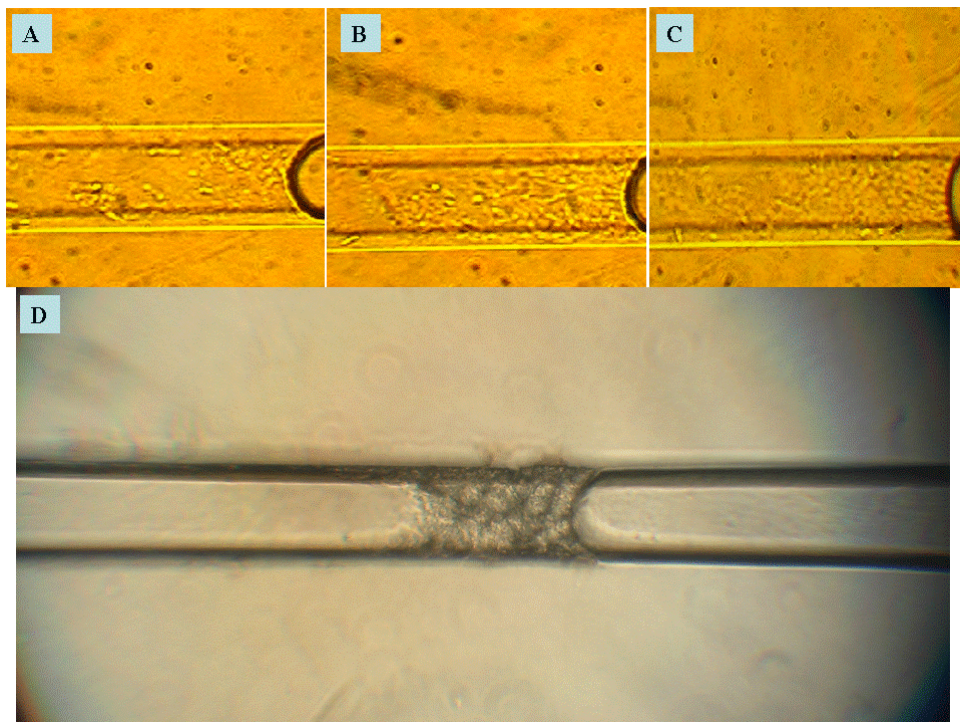


Abb. 43 Erstbefüllung eines 9 Std. mit KOH hydrophilierten Mikrokanals

Zur Vorbereitung elektrophoretischer Messungen muss der Chip mit Puffer befüllt werden. Grundsätzlich lassen sich die hydrophilen Kanäle einfacher und schneller mit wässrigen Lösungen befüllen als die hydrophoben. Die Menisken, welche sich während der Befüllung

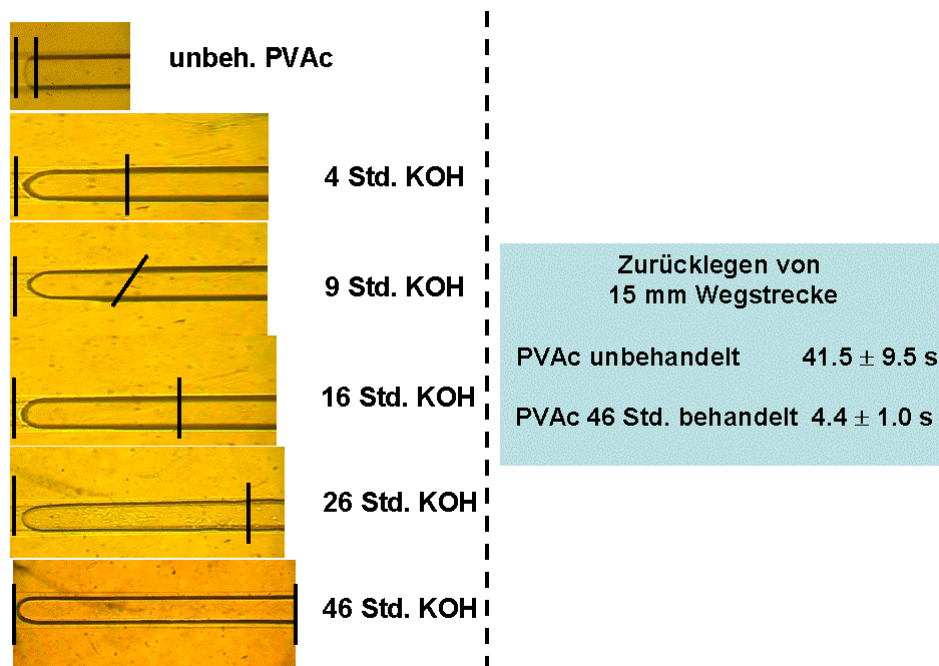


Abb. 44 Benetzung unterschiedlich lang hydrophiler PVAc-Mikrokanalwände

herausbildenden, sind in Abhängigkeit der Behandlungsdauer mit Base in Abb. 44 dargestellt (markiert durch schwarze Linien).

Wie schon bei den Kontaktwinkelmessungen im Makroskopischen zeigen sich auch auf der mikroskopischen Skala starke Adhäsionskräfte an der hydrophilierten Oberfläche. Je länger die Behandlungsdauer ist, desto höher ist die Affinität wässriger Lösungen zur Wandung. Auch die Zeitdauer zum Zurücklegen einer bestimmten Wegstrecke nimmt mit der Hydrophilierzeit ab, wie in der rechten Abbildungshälfte gezeigt ist (5-fach Bestimmung; als Fehlertoleranz ist die Standardabweichung angegeben).

Sofern während der Hydrophilierung ungewollte Luftblasen im Kanal auftreten, sind dort weniger hydrophile Bereiche des Polymers vorhanden. Es ist eine besondere Herausforderung, zur Vorbereitung einer Messung diese noch hydrophoben Stellen blasenfrei mit Puffer zu benetzen. Dies gilt im Speziellen für die in Abb. 42 gezeigten Problemstellen.

Zusammenfassend kann die basische Esterhydrolyse von PVAc als oberflächennahe Grenzflächenreaktion des Systems fest / flüssig in den mikrofluidischen Kanal transferiert werden. Dabei ist der Erstbefüllung aufgrund sich von den Wänden ablösender Partikel besonderer Beachtung zu schenken, was einmalig intensive Spülschritte notwendig macht.

3.3.1.4 Optische Charakterisierung

Um herauszufinden, in welchen Wellenlängenbereichen die Polymerchips für die Fluoreszenzdetektion nutzbar sind, werden UV/Vis-Transmissionsspektren aufgenommen, welche im Vergleich zu *fused silica* und PMMA in Abb. 45 dargestellt sind.

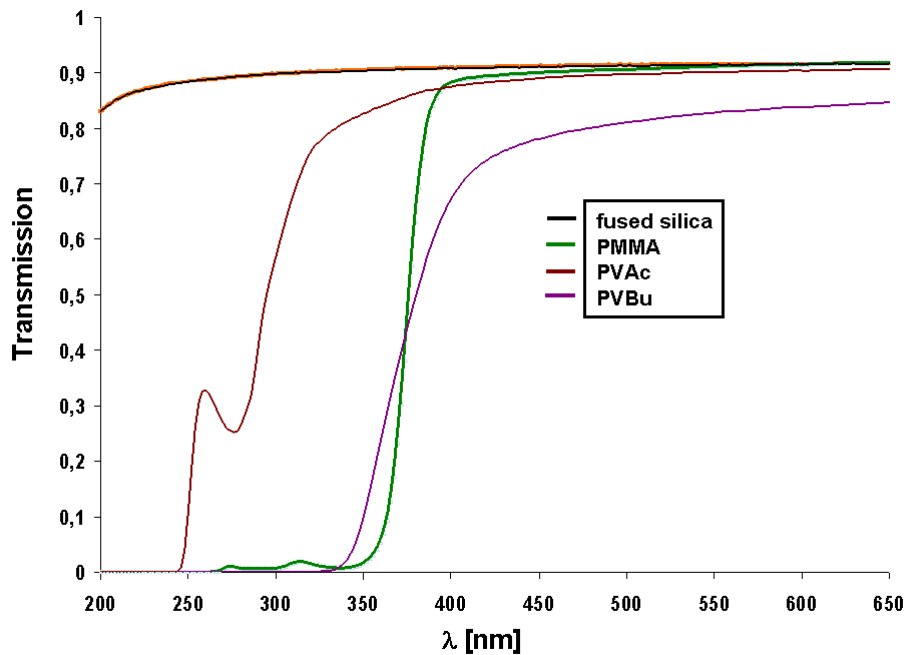


Abb. 45 Transmissionsspektren einiger Mikrofluidik-Chips aus unterschiedlichen Materialien

Das Polyvinylbutyral ist von der Transmission her in etwa mit PMMA vergleichbar, wenn auch die relative Transmission aufgrund einer schwachen bräunlichen Verfärbung geringer ist. Diese beiden Polymere können im visuellen Bereich eingesetzt werden. Im nahen UV sind sie nur eingeschränkt nutzbar. Unterhalb von 340 nm geht die Transmission gegen Null, so dass eine Verwendung im tiefen UV nicht möglich ist, da sämtliche Anregungsstrahlung absorbiert wird. Das Polyvinylacetat ist bei kleinen Wellenlängen durchlässiger, jedoch liegt auch hier die Transmission < 300 nm unterhalb von 50 %.

Die Transmissionsspektren geben Auskunft über die theoretische Verwendbarkeit der Polymere, jedoch wird die praktische Nutzbarkeit durch die Autofluoreszenz der Materialien weiter eingeschränkt. Zu deren Charakterisierung sind für PVAc und PVBu die 3-D Fluoreszenzspektren in Abb. 46 dargestellt (die mit einem * markierten Signalgruppen sind systembedingt und können ignoriert werden). Für beide Polymere ist eine hohe Autofluoreszenz bei einer Anregungsstrahlung im UV-Bereich ersichtlich (400 Intensitätseinheiten für PVAc; 800 Intensitätseinheiten für PVBu). Die zugehörigen Emissionsmaxima liegen bei 350 bzw. 400 nm. Unter gleichen Bedingungen liegt die Autofluoreszenz von *fused silica* Chips unterhalb von 20 Einheiten. Folglich sind die Polyvinylester für die klassische Fluoreszenzdetektion im tiefen UV überhaupt nicht – und im nahen UV allenfalls das PVAc – verwendbar.

Betrachtet man die chemischen Strukturen der Polymere (vgl. Abb. 31 auf S.60), so ist die Eigenfluoreszenz erst bei niedrigeren Anregungswellenlängen zu erwarten, da keine $-C=C-$ Doppelbindungen enthalten sind. Zur Herstellung von Polymeren werden jedoch Additive, wie Radikalstarter, Massenregler etc. zugesetzt, welche vermutlich die Ursache für die hohe Autofluoreszenz sind. Eine wesentliche Abnahme der Eigenfluoreszenz und damit die Anwendbarkeit bis in den UV-Spektralbereich ist durch die Verwendung hochreiner Polymermaterialien zu erwarten.

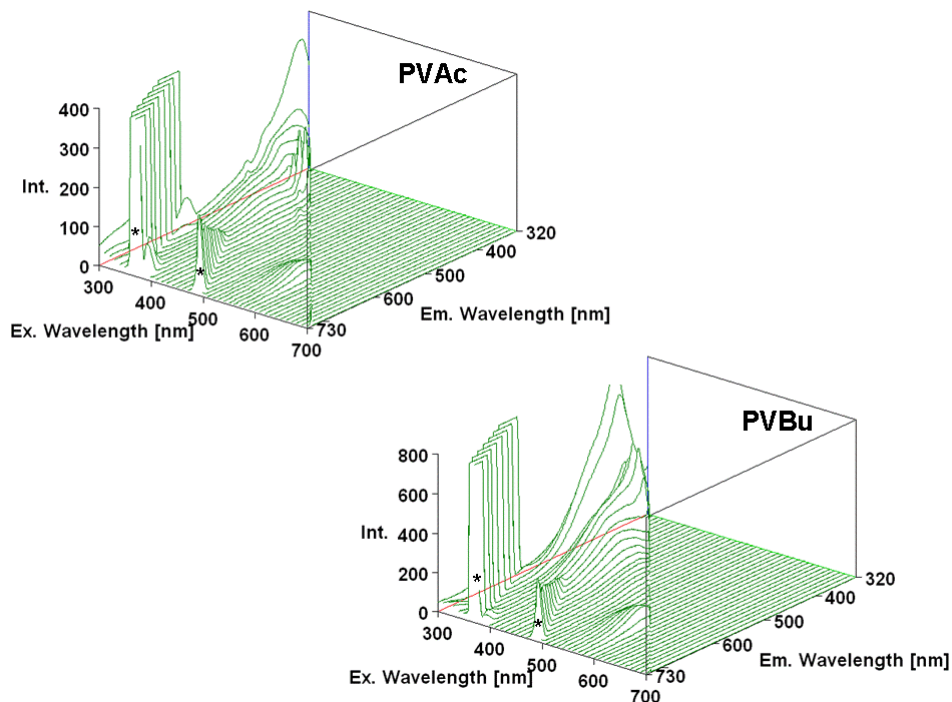


Abb. 46 3-D Fluoreszenzspektren von PVAc und PVBu

3.3.1.5 Experimente in hydrophilen Kanälen

Zur Charakterisierung der Eigenschaften für die MCE werden hydrophilierte und unbehandelte Chips miteinander verglichen. Geeignete Testgemische dafür sollten sowohl eine hohe Trenneffizienz als auch eine empfindliche Detektion ermöglichen und darüber hinaus eine hohe Langzeitstabilität aufweisen. Die Zusammenstellung solcher Testgemische ist aufgrund der enormen Temperaturempfindlichkeit von PVAc (Glasübergangstemperatur ca. 44 °C) sowie der marginalen Lösemittelbeständigkeit eine besondere Herausforderung.

Die hohe Temperaturempfindlichkeit des PVAc äußert sich im schnellen Verstopfen der Mikrokanäle, sofern die Joulesche Wärmeentwicklung zu hoch ist. Um zu sehen wie sich die thermische Schädigung im Detail äußert werden rasterelektronenmikroskopische

Querschnittsaufnahmen eines intakten (Abb. 47 oben) und eines thermisch geschädigten Chips (unten) gemacht. Bei dem defekten Chip ist offensichtlich das Polymermaterial der Deckelplatte mit dem Kanalboden verklebt, was zur Verstopfung des Chips führt. Die Kanäle, welche mittels Heißprägen mit einem Si-Master hergestellt wurden, tragen an der Oberfläche vermehrt Si-Atome welche durch den Prägeprozess auf die Polymer-Oberfläche gebracht wurden. Die Dichte der Si-Atome ist an der Berührungsfläche erhöht, was in der EDX-Aufnahme unten rechts gut ersichtlich ist.

Aufgrund der Temperaturempfindlichkeit des PVAc muss die Joulesche Wärmeentwicklung auf ein Minimum reduziert werden. Das gelingt durch Senken der Ionenstärke des Puffers und durch die Reduzierung der elektrischen Potenziale. In den vorhandenen PVAc-Chips sind bei Ionenstärken unterhalb von 10 mM und Strömen unter von 3 μA reproduzierbare Messungen ohne Schädigung der Kanäle möglich. Solch geringe Ionenstärken vermindern jedoch die elektrophoretische Trennleistung. Weiterhin zeigt das PVAc-Material eine enorme Empfindlichkeit gegenüber organischen Solventien, welche ein Aufquellen des Materials hervorrufen. Dies hat wiederum die Verstopfung der Kanäle zur Folge. Organische Lösungsmittel sind in geringem Maße in den Testgemischen enthalten, da die Farbstoffe für die Fluoreszenzderivatisierung in Dimethylsulfoxid bzw. Aceton gelöst werden müssen. Die Analyten werden nach der Derivatisierung im Vakuum eingeeengt und in Wasser resolvatisiert, um eine längere Verwendbarkeit der Chips sicherzustellen.

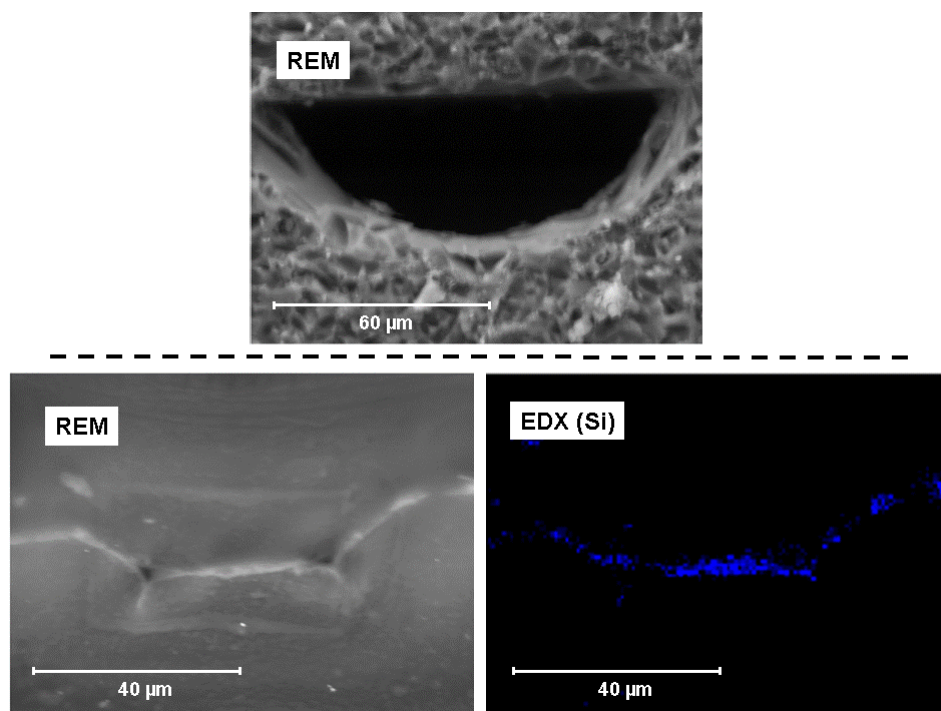


Abb. 47 Querschnittsaufnahmen eines intakten (oben) und eines thermisch geschädigten Mikrokanals

Im Zuge dieser Arbeit werden zwei Testgemische eingesetzt. Das erste besteht aus einfach fluoreszenzmarkierten Diaminen und einem Rhodaminfarbstoff und ist in Abb. 48 dargestellt. Die rot markierten Gruppen sind an 4-Fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol als Fluorophor gebunden. Die Fluoreszenzanregung des Gemischs erfolgt bei 450-480 nm, dabei liegt das Emissionsmaximum etwa bei 520 nm. Diese Analyten werden im sauren Milieu bei pH 3 getrennt. Aufgrund der aliphatischen Aminogruppen bzw. des positiv geladenen Stickstoffs in der Rhodaminstruktur liegen alle Analyten als Kationen vor, was mittels eines Neutralmarkers experimentell bestätigt werden konnte.

Die elektrophoretische Trennung des Testgemischs in einem Glaschip weist gute Trenneffizienzen und Signalhöhen auf (Abb. 49, links oben). Die Peakzuordnung erfolgt dabei durch Standardaddition. Eine Messung mit gleichen Parametern in einem unbehandelten PVAc-Chip offenbart eine leicht verminderte elektrophoretische Auflösung. Hier zeigt insbesondere das Rhodaminsignal ein sichtbares Tailing. Die Hydrophilierung des PVAc bewirkt eine weitere Reduzierung der Auflösung und nicht – wie erwartet – eine Erhöhung der Trennleistung. Ferner bringt die Hydrophilierung der Chips ein stärkeres Tailing des Rhodaminssignals mit sich. Offenbar tritt eine erhöhte Wechselwirkung zwischen Rhodamin und der behandelten Kanalwand ein.

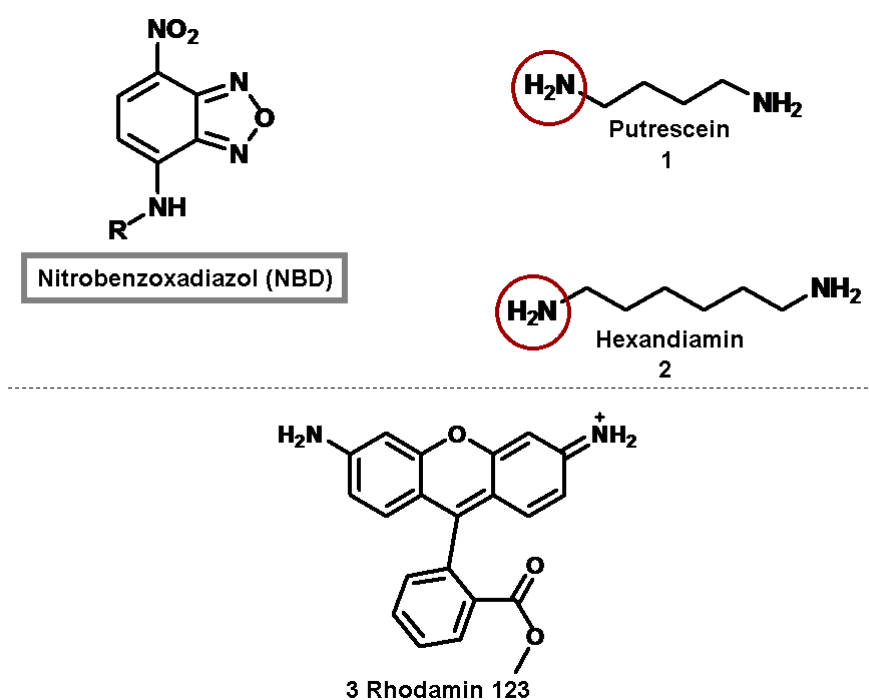


Abb. 48 Inhaltsstoffe des kationischen Testgemisches mit Fluoreszenz im gelb-grünen Spektralbereich

Nach jeder Messung fluoreszieren die Kanalwände schwach, was auf an der Wand adsorbierte bzw. ins Polymermaterial diffundierte Analyten hindeutet. Bei länger als vier Stunden hydrophilierten Chips nimmt die Stabilität der Kanäle während der Messung so stark ab, dass keine reproduzierbare Probeninjektion und damit auch keine elektrophoretische Trennung mehr möglich ist.

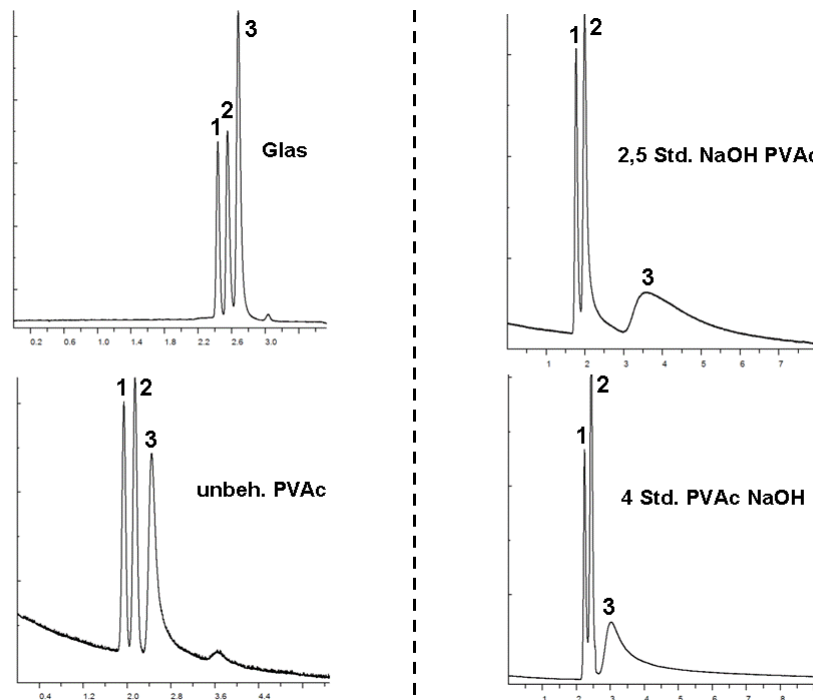


Abb. 49 Elektropherogramme des kationischen Testgemisches in Glas, unbehandeltem und behandeltem PVAc

Dieses Ergebnis soll mit einem weiteren, anionischen Testgemisch abgesichert werden. Das Testgemisch besteht aus zwei Cy5-markierten Monoaminen und einem Alexa Fluor 647-markierten Peptid. Die Strukturformeln der Analyten sind in Abb. 50 dargestellt, wobei die Strukturformel von AF-647 im Detail nicht bekannt ist.

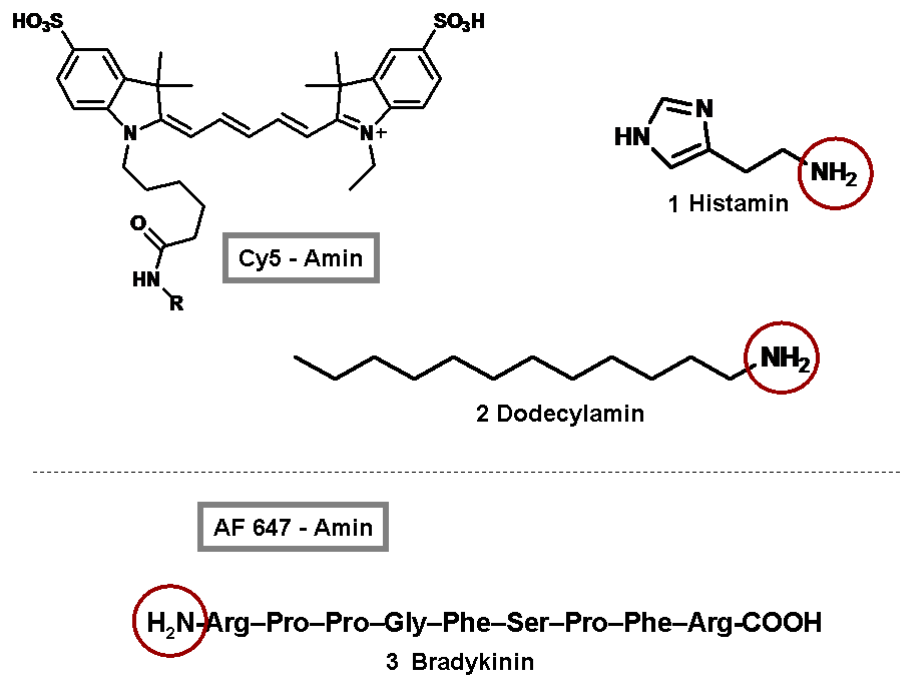


Abb. 50 Anionisches Testgemisch mit Fluoreszenzmission im roten Spektralbereich

Sicher ist aber, dass beide Fluoreszenzfarbstoffe des Testgemischs zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit mehrere, stark saure Sulfonylgruppen enthalten. Aus diesem Grund sind alle derivatisierten Analyten anionisch. Die Emissionswellenlängen der Fluorophore liegen im roten Spektralbereich. Das Elektropherogramm auf einem Glaschip ist in Abb. 51 dargestellt. Die Hauptsignale sind nahezu basisliniengetrennt, allerdings ist neben dem großen Dodecylamin-Signal (**3**) eine Verunreinigung (**1**) erkennbar, die vom Histamin lediglich angetrennt werden kann.

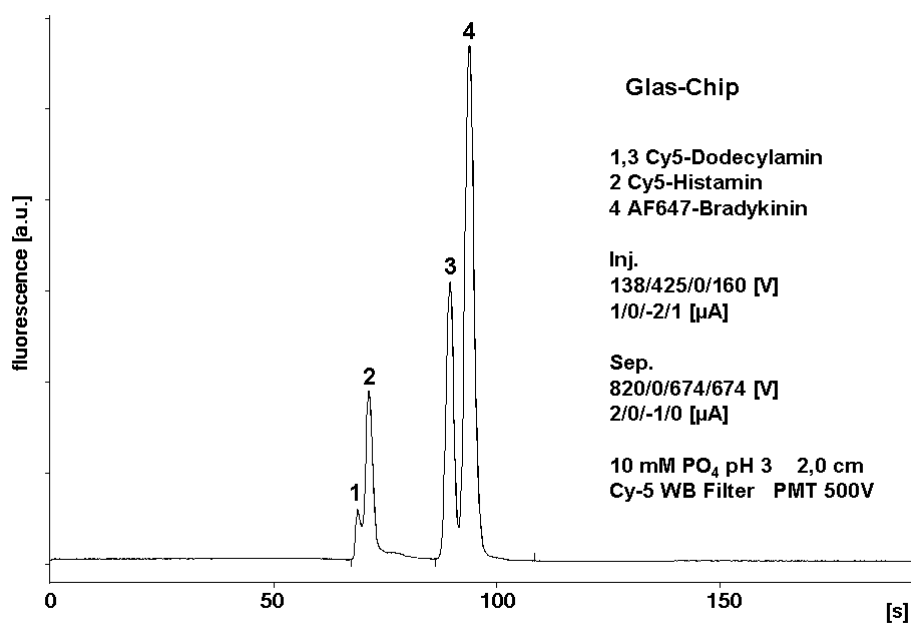


Abb. 51 Elektropherogramm des anionischen Testgemischs auf einem Glas-Chip

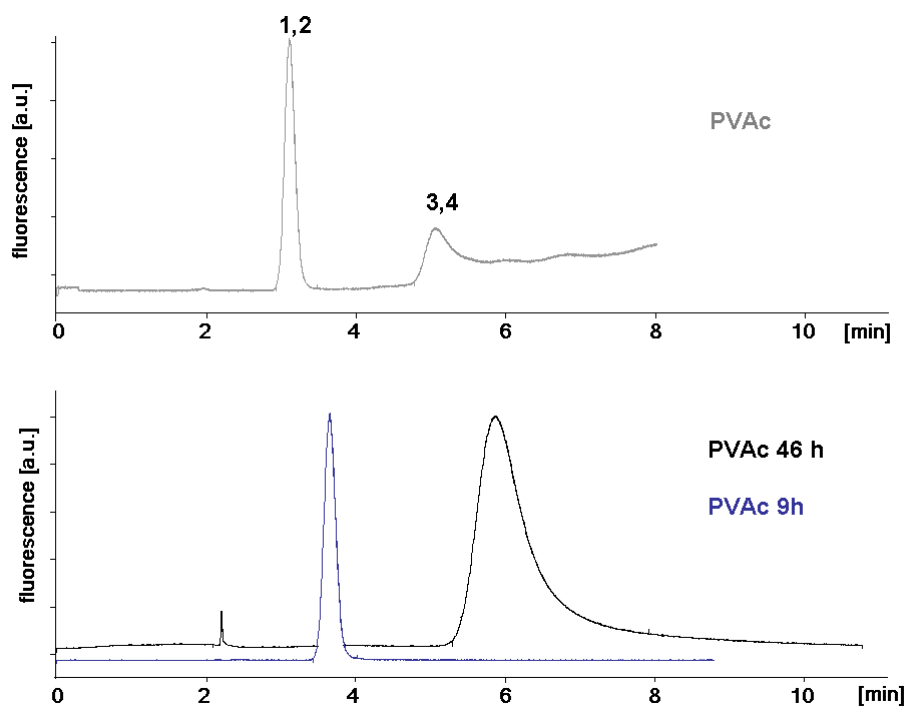


Abb. 52 Elektropherogramm des anionischen Testgemischs auf unbehandeltem und behandeltem PVAc

Die in unbehandelten bzw. hydrophilierten PVAc-Chips erhaltenen Elektropherogramme sind in Abb. 52 dargestellt. Die elektrophoretische Auflösung ist in unbehandeltem PVAc gegenüber Glas deutlich vermindert, so dass nur zwei Signalgruppen erkennbar sind. Im dargestellten Elektropherogramm ist ein leichtes Nachlaufen von Probe in den Trennkanal

ersichtlich, welches sich im Anstieg der Basislinie gegen Ende der Messung äußert. Durch die Hydrophilierung von PVAc nimmt die Signalbreite verglichen mit unbehandeltem PVAc weiter zu. Hier kann jeweils nur eine Signalgruppe detektiert werden, die im Falle von 46 Stunden behandeltem PVAc eine deutlich erhöhte Migrationszeit zeigt und zudem stark verbreitert ist. Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um die Signale 1 und 2, was jedoch aufgrund der mangelnden Stabilität der Kanäle nicht sicher durch Standardaddition bestätigt werden kann. Die Substanzen 3 und 4 werden entweder durch ihren anionischen Charakter bei der elektrokinetischen Injektion diskriminiert oder sie haben eine sehr geringe Mobilität und migrieren nicht innerhalb der 9-minütigen Messzeit bis zum Detektor.

In Abb. 53 sind die Migrationszeiten bis zur ersten Signalgruppe in unterschiedlich lang hydrophilierten PVAc-Chips dargestellt. In Rahmen der Fehlertoleranzen kann hier ein linearer Anstieg angenommen werden.

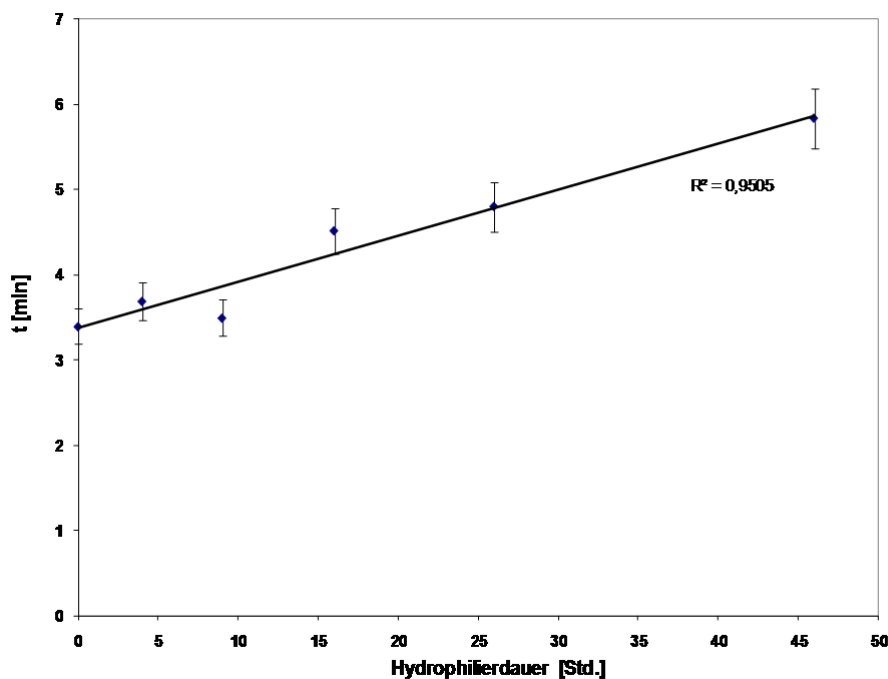


Abb. 53 Auftragung der Migrationszeiten bis zur 1. Signalgruppe gegen die Hydrophilierdauer des jeweiligen PVAc-Chips

Die steigenden Migrationszeiten können im Wesentlichen zwei Ursachen haben: Die Reduzierung des elektroosmotischen Flusses oder chromatografische Effekte.

Für eine Abnahme des elektroosmotischen Flusses in den hydrophilierten Kanälen spricht die folgende These: Das Verschwinden der Signale 3 und 4 zeigt, dass die elektrophoretische Mobilität, welche vom Injektionskreuz / Detektor weggerichtet ist, gegenüber der

elektroosmotischen Mobilität in Richtung Kreuz / Detektor an Einfluss gewinnt. Weiterhin deutet auch die Tendenz steigender Migrationszeiten der Signalgruppe 1-2 auf eine Abnahme des elektroosmotischen Flusses hin.

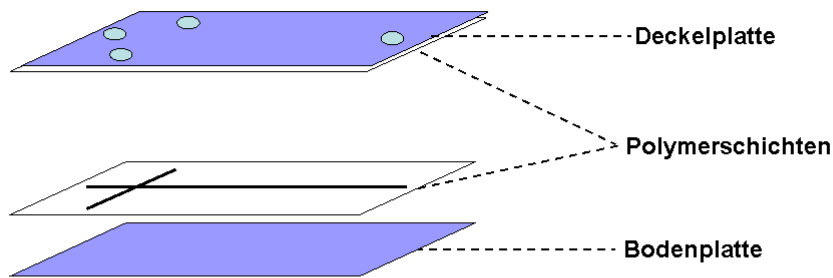
Eine weitere Ursache könnten chromatografische Effekte sein, bei denen die Analyten an den Wänden retardiert werden. Chromatografische Wechselwirkungen stehen im Einklang mit der beobachteten Signalverbreiterung durch die Hydrophilierung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Verwendung von hydrophilierten PVAc-Chips die elektrophoretische Auflösung nicht wie erwartet gesteigert werden kann. Vielmehr verändert sich das Material aus elektrophoretischer Sicht zum Nachteil: Verlängerte Migrationszeiten, die Nicht-Detektierbarkeit der stark anionischer Verbindungen und verbreiterte Probezonen legen einen reduzierten elektroosmotischen Fluss und das Auftreten chromatografischer Wechselwirkungen nahe.

3.3.2 Fertigung von Sandwich-Chips

Dieses Kapitel beschreibt die Fertigung mikrofluidischer Chips in Schichtbauweise. Damit sollen einige Nachteile polymerer Vollmaterial-Chips, wie z.B. der langsame Wärmeabtransport während der Messung, der hohe Autofluoreszenzhintergrund und die schlechte mechanische Stabilität beseitigt werden. Mikrofluidik-Chips in Sandwichbauweise bestehen aus einer dünnen Polymerschicht, die zwischen zwei Substratplatten, z.B. aus Glas oder *fused silica*, sitzt (Abb. 54).

Schrägansicht



Querschnitt

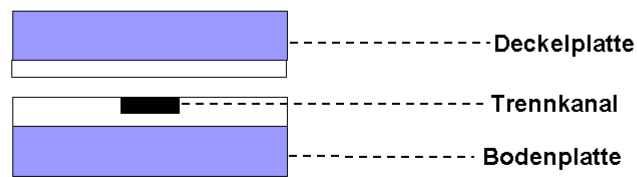


Abb. 54 Schematischer Aufbau eines Sandwich-Chips

Die Strukturierung des mikrofluidischen Kanals erfolgt in eine polymerbeschichtete Bodenplatte. Darauf wird eine ebenfalls beschichtete Deckelplatte gelegt und beide Platten miteinander verbunden (Bonding). Durch diesen Aufbau wird im Gegensatz zu Vollmaterial-Chips die Dicke der Polymerschicht um ein bis zwei Größenordnungen reduziert, was sich günstig auf den Detektionshintergrund und die Ableitung Joulescher Wärme auswirken soll. Die Wärmeleitfähigkeit von Polymeren ist deutlich geringer als die von Glas²¹⁴ ($0,3 - 0,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ bzw. $1,5 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$).

Ein weiterer positiver Aspekt des Sandwich-Aufbaus ist die Möglichkeit, quervernetzbare, stark hydrophile Polymere wie PVAI oder PEG zur direkten Chipfertigung zu verwenden. Diese sind aufgrund ungünstiger fertigungstechnischer Eigenschaften nicht für klassische Herstellungsverfahren von Vollmaterial-Chips zugänglich.

In Abb. 55 sind die Arbeitsschritte zur Fertigung heißgeprägter Sandwich-Chips mit unbeschichteter Deckelplatte dargestellt: das Herstellen eines gleichmäßig dicken Polymerfilms, dessen Trocknung und Strukturierung sowie das Bonding von Boden- und Deckelplatte. Diese werden im Folgenden diskutiert.

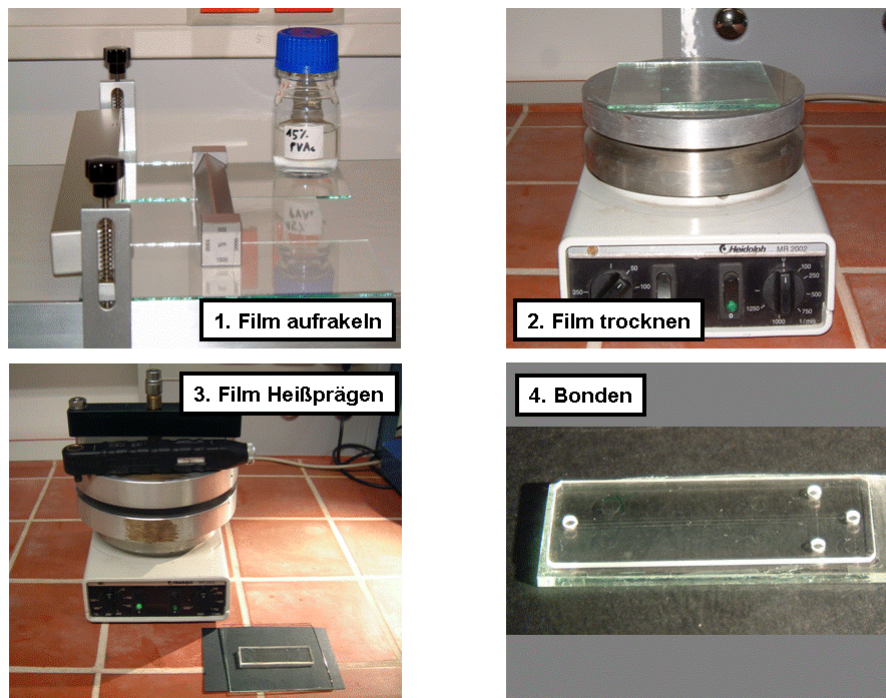


Abb. 55 Arbeitsschritte zur Herstellung heißgeprägter Sandwich-Chips

3.3.2.1 Erzeugung dünner Schichten

Zur Erzeugung der Polymerschichten werden zwei unterschiedliche Techniken getestet: Das *spin coating*, welches überwiegend in der Halbleiterindustrie angewandt wird, und das Rakeln, welches aus der Lackierungstechnik stammt. In Kooperation mit dem Arbeitskreis Scheer der Bergischen Universität Wuppertal wird zunächst die Schichterzeugung mittels *spin coating* durchgeführt. Bei diesem Verfahren befindet sich eine drehbare Scheibe unterhalb des zu beschichtenden Substrats. Auf das schnell rotierende Substrat wird Polymerlösung getropft, die durch die Zentrifugalkraft abgeschleudert wird und einen gleichmäßig dünnen Polymerfilm zurücklässt. Üblicherweise werden so wenige μm dicke Schichten erzeugt. Das *spin coating* ist nicht zur Herstellung gleichmäßiger Schichten mit der von uns benötigten Schichtdicken von $> 200 \mu\text{m}$ geeignet. Diese sind erforderlich, da durch den Trocknungsprozess eine Material schrumpfung²¹⁵ auftritt und der trockene Polymerfilm mindestens $50 \mu\text{m}$ Stärke für die Strukturierung aufweisen muss.

Das Aufziehen mit einem Edelstahlraket liefert hier deutlich bessere Ergebnisse. Mit diesem Verfahren können homogene Schichten mit Dicken bis $1500 \mu\text{m}$ auf DIN A4 Blatt große Substrate aufgebracht werden. Der Wahl von Lösungsmittel und Trocknungsparametern muss bei Schichten dieser Dicken große Beachtung geschenkt werden, da sonst die Ausbildung einer homogenen, spiegelglatten Polymerschicht durch Entnetzungsphänomene,

Oberflächenverwerfung oder Hautbildung gestört wird. Gängige Lösemittel wie Aceton, Ethanol, Ethylacetat, oder Diethylether verdampfen unter Standardbedingungen viel zu schnell und bilden so ungleichmäßige Polymerbeschichtungen. Daher wird auf Lösungsmittel mit höherem Dampfdruck wie Dimethylformamid (für PVAc) und Octanol (für PVBu) zurückgegriffen, welchen etwas Diacetonalkohol zur Verhinderung des zu schnellen Antrocknens der Filmoberfläche zugesetzt ist²¹⁶. Da auch die Geschwindigkeit der Trocknung einen Einfluss auf die Filmqualität hat, wird die sehr langsam mit stufenweiser Temperaturerhöhung getrocknet. Exemplarisch ist in Abb. 56 A die Photographie einer binnen weniger Stunden getrockneten PVAc-Schicht gezeigt. Darauf bilden sich während der Trocknungsphase unvermeidliche Differenzen der Oberflächenspannung, welche in Oberflächenstrukturen ähnlich einer Orangenschale resultieren (sog. *orange peel effect*). Die Ausweitung der Trocknungsdauer auf mehrere Tage bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen resultiert hingegen in einer spiegelglatten Polymerschicht (Abb. 56 B).

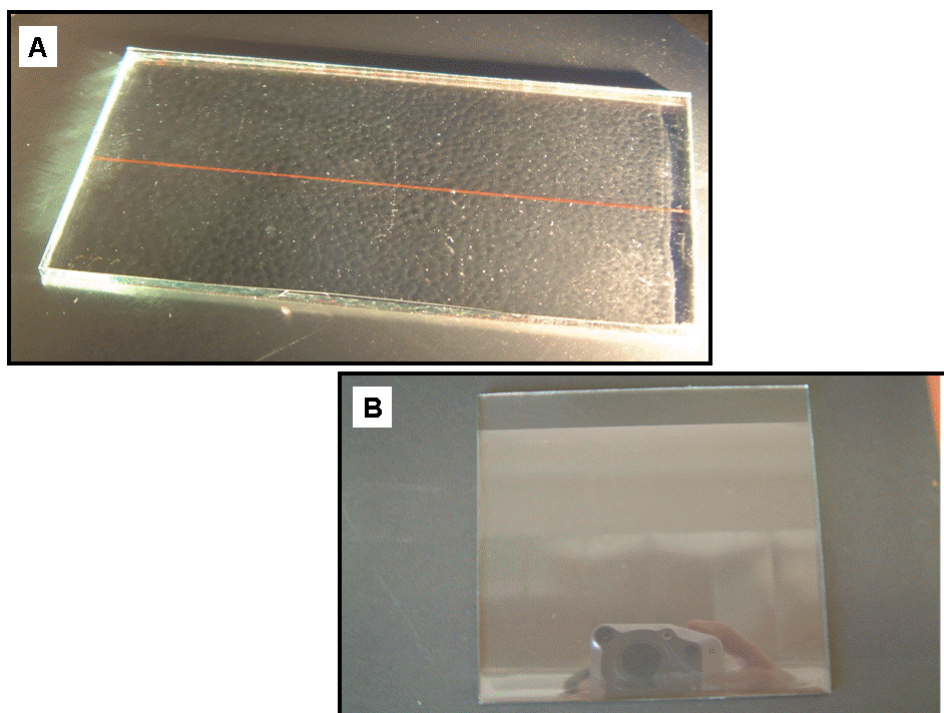


Abb. 56 Effekt der Trocknungsgeschwindigkeit auf die Oberflächentopologie eines PVAc-Films; A zu schnelle Trocknung; B adäquate Trocknungsgeschwindigkeit

Die getrockneten Polymerfilme sollen mittels Heißprägen mikrostrukturiert werden. Für dieses Verfahren wird eine invertierte Struktur des gewünschten Chiplayouts benötigt, die üblicherweise durch photolithographische Mikrostrukturierung aus Si-Wafern erhalten wird. Si-Master können zwar direkt zum Prägen der Polymer-Schichten mit einer Presse eingesetzt werden, dies ist jedoch aufgrund der kurzen Lebensdauer der Master extrem unwirtschaftlich.

Zur Erhöhung der Standzeit des Prägemasters wird daher üblicherweise die galvanische Abscheidung von Chrom oder Nickel auf dem strukturierten Silicium oder auch auf Mastern aus Photolack durchgeführt (sog. LIGA-Verfahren²¹⁷: (Tiefen-) **L**ithographie, **G**alvanik und **M**ikro**A**bformung). Um das kosten- und zeitintensive LIGA-Verfahren zu umgehen, wird mittels der zweifachen softlithografischen Abformung der Si-Struktur mit PDMS eine exakte Kopie erstellt (*soft double inversion*)²¹⁸. Diese PDMS-Kopien mit invertierten Kanalstrukturen eignen sich hervorragend als Heißprägemaster, sind schnell und ökonomisch herzustellen und aufgrund elastomerer Materialeigenschaften unzerbrechlich.

Mittels einer selbstgebauten Spindelpresse kann der PDMS-Master in das auf Glasübergangstemperatur erwärmte Polymer gedrückt werden. Dabei prägt sich die Mikrostruktur in die Polymerschicht ein. Entscheidend für ein exaktes Abformergebnis des PDMS-Prägewerkzeugs sind die Parameter Temperatur und Druck, welche separat auf ein gutes Prägebild hin optimiert werden müssen. Bei zu hoher Temperatur oder zu hohem Druck entsteht durch die Deformierung der Polymerschicht bzw. des PDMS-Masters ein verzerrtes Abbild der Struktur. Daher wird die Glasübergangstemperatur nur um wenige °C überschritten und mit 10 Nm ein moderates Anzugsdrehmoment auf die Spindelpresse gebracht. Das Entfernen des PDMS-Masters nach dem Erkalten des Presslings ist auch bei komplexeren Strukturen absolut unproblematisch, was die Abformung eines Reaktionschip-Layouts in PVBu, das neben einfachen Kanälen aus zwei Mikromischern besteht, zeigt (Abb. 57).

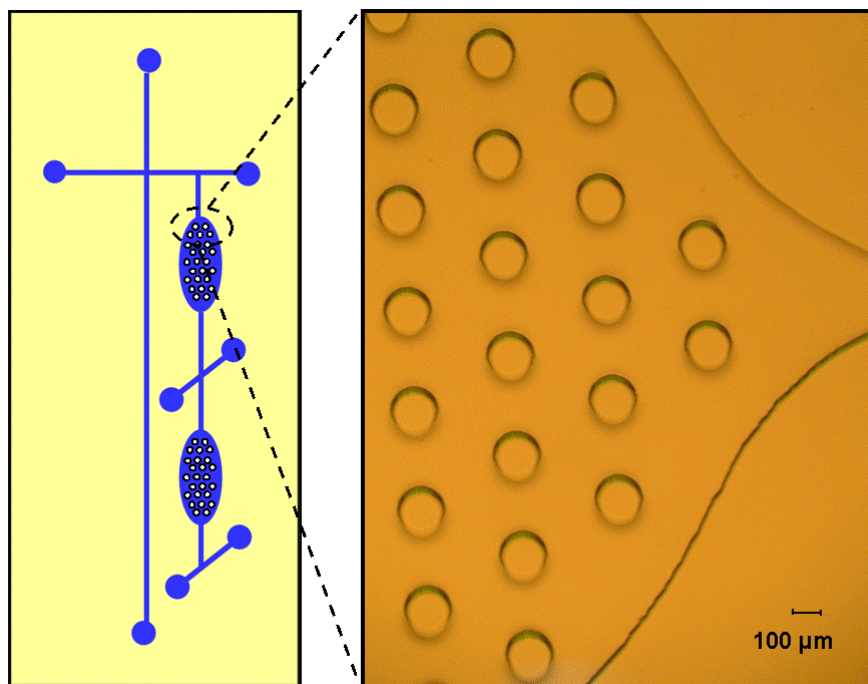


Abb. 57 Reaktionschip-Layout (links) und Abformung durch Heißprägen (rechts) in einem ca. 100 μm dicken PVBu-Film

Die Dicke des Polymerfilms beträgt in diesem Beispiel etwa 100 μm , die Strukturhöhe ca. 20 μm . Die saubere Abformung der versetzt stehenden Säulen am Eingang des Mikromischers ist offensichtlich. Diese Säulenmischer sind im Hinblick auf abreißende PDMS-Rückstände aufgrund der hohen Oberfläche die kritischsten Bereiche. Ähnlich gute Abformergebnisse lassen sich auch in PVAc-Schichten erzielen.

Das Heißprägen von PVAI erfordert Temperaturen knapp unterhalb von 200 °C. Diese führen zu einer honigfarbenen bis bräunlichen Verfärbung des Polymerfilms (s. Abb. 61 A, S. 93), die insbesondere bei Zutritt von Sauerstoff eintritt. Die zugehörigen Transmissionsspektren in Abb. 58 zeigen bei den thermisch behandelten PVAI-Schichten die Abnahme der Transmission im UV-Bereich um bis zu 30 %. Der Grad der Verfärbung hängt dabei von Temperatur und Dauer des Erhitzens ab. Potenziell sind die nicht immobilisierten PVAI-Schichten bis 250 nm transparent, was sie im Gegensatz zu PVAc oder PVBu für die native Fluoreszenzdetektion interessant macht (vgl. Abb. 45 auf S. 75).

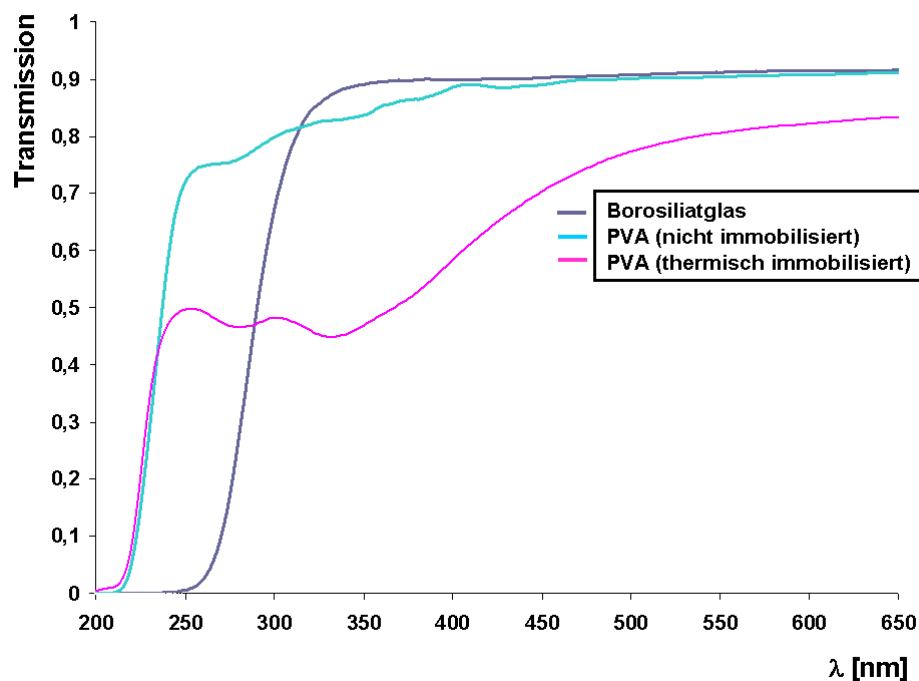


Abb. 58 Transmissionsspektren von PVAI-Schichten

3.3.2.2 Softlithografische Mikrostrukturierung (nur PVAI)

Um die Problematik der Transmissionssenkung von heißgeprägtem PVAI zu umgehen muss eine alternative Strukturierungsmethode, angewandt werden. Die Softlithografie, wie sie üblicherweise zum Strukturieren von Silikonen oder Acrylaten angewendet wird, wäre eine gute Alternative. Voraussetzung dafür ist allerdings das Aushärten flüssiger Edukte, welches üblicherweise durch Polymerisation oder Polykondensation vollzogen wird.

Hier wird das Eintrocknen einer PVAI-Lösung zum Aushärten während der Strukturierung genutzt. Bestehende Arbeiten über das Mikrostrukturieren von PVAI nutzten das Polymer als wasserlösliches Templat. Hier wurde mittels Spin-Coating ein Si-Master mit PVAI beschichtet und der Film nach einem Trocknungsschritt abgezogen, wiederum als Softlithographie-Master genutzt anschließend mit Wasser abgelöst. So konnten mikromechanische Strukturen⁹, Mikro-Nadeln²¹⁹ und auch Nanostrukturen aus Metall²²⁰ gefertigt werden.

Durch Modifikation dieses Verfahrens kann sowohl auf den Spin-Coating Schritt als auch auf die Verwendung des Si-Wafers verzichtet werden: etwas PVAI-Lösung wird auf einer Glasplatte verteilt und darauf ein PDMS-Master gelegt. Durch langsames Trocknen kann das DMSO durch den PDMS-Master diffundieren, welcher für das Lösungsmittel schwach permeabel ist²²¹. Es resultiert ein strukturierter, fest mit der Glasplatte verbundener PVAI-Film, dessen Mikrofotografie in Abb. 59 zu sehen ist. Anfangs blieben beim Abziehen des PDMS-Masters in den Kanalstrukturen PDMS-Reste hängen, was zur Zerstörung des Masters führte. Diese PDMS-Rückstände wurden mit Toluol aufgequollen (PVAI ist Toluol unlöslich) und so vom PVAI entfernt. Das Erhöhen der Trocknungsdauer und das vorsichtige Abziehen des PDMS-Masters erlaubt jedoch dessen mehrfache Verwendung und macht das Ablösen mit Toluol unnötig.



Abb. 59 Mikrophotographie einer softlithografisch abgeformten PVAI-Struktur

Auch die softlithographische Abformung eines komplexeren Reaktionslayouts ist mit dieser Methode möglich. Wie oben beschrieben, ist in diesem Experiment ebenfalls der PDMS-Master einfach und rückstandsfrei vom getrockneten PVAI zu entfernen (Abb. 60).

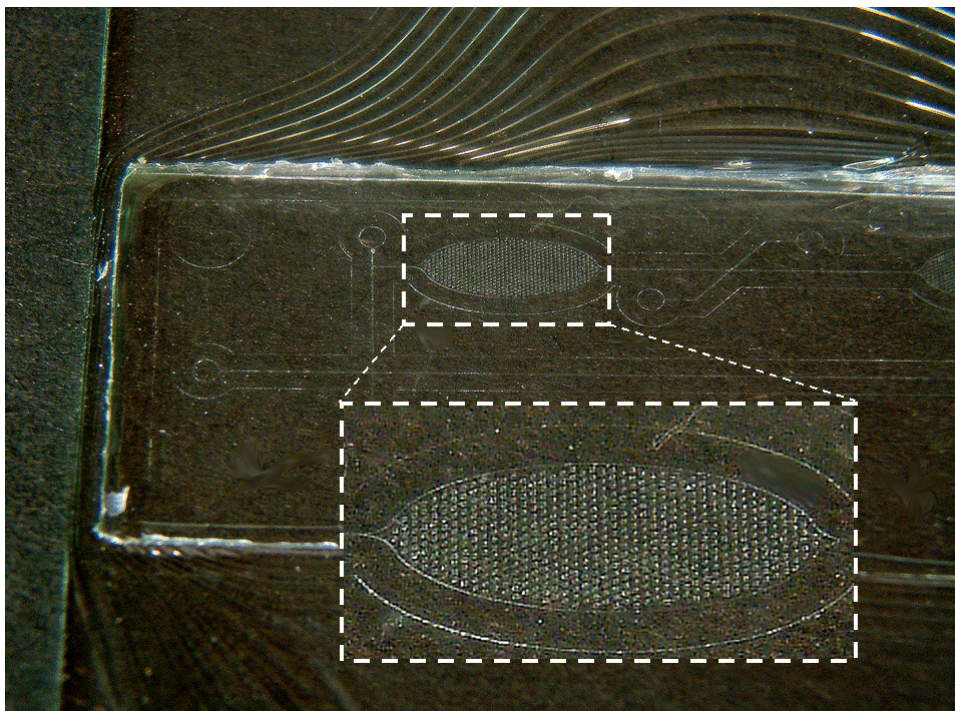


Abb. 60 Softlithografisch strukturiertes Reaktionslayout in PVAI

Die softlithografisch strukturierten PVAI-Filme sind hochtransparent aber noch wasserlöslich.

Diese müssen durch einen weiteren Schritt immobilisiert werden, um die Struktur vor dem Aufquellen in wässrigen Elektrolyten zu schützen.

Das physikalische Immobilisieren von PVAI durch Tempern ist seit längerer Zeit bekannt, durch die Entstehung kristalliner Bereiche im Polymer wird die Wasserlöslichkeit signifikant herabgesetzt^{222,223}. Die thermische Immobilisierung wird für die permanente PVAI-Beschichtungen von CE-Kapillaren und Mikrofluidik-Chips genutzt⁸.

Alternative Immobilisierungsverfahren sind chemischer Natur, und basieren auf der Umsetzung des PVAI mit einem niedermolekularen, bifunktionellen Bindungspartner. Dabei kann entweder eine intramolekulare Ringbildung eines Makromoleküls, oder aber eine intermolekulare Verknüpfung – die Quervernetzung – eintreten²²⁴. Für PVAI bieten sich zur chemischen Quervernetzung Terephtaldehyd, Glutaraldehyd, Epi-Chlorhydrin, 1,3-Butadiendioxiran oder Glutarsäuredichlorid an. Bis auf Terephtaldehyd werden alle genannten Substanzen getestet, sowohl durch Zugabe des Quervernetzers zur PVAI-Lösung vor dem Auflegen des PDMS-Masters als auch durch ein nachträgliches in Kontakt bringen des bereits getrockneten PVAI-Films mit dem Quervernetzer. Die direkte Zugabe der Quervernetzer zur PVAI-Lösung kann nur in mäßigen Konzentrationen erfolgen, damit die Lösung nicht augenblicklich geliert und so eine vollkommene Abformung unmöglich macht. Am Ende der Trocknungsphase wird durch Aufquellversuche mit Wasser getestet, ob eine Immobilisierung stattgefunden hat. Dies ist leider nicht im zufriedenstellenden Maß der Fall. Entweder ist durch die Zugabe der Reagenzien die Abformung gestört, es ist keine sichtbare Quervernetzung erfolgt oder der PDMS-Master wird irreversibel mit dem PVAI-Film verbunden und kann nicht zerstörungsfrei abgelöst werden.

Auch die nachträgliche Immobilisierung der fertig strukturierten PVAI-Filme mittels Quervernetzer-Dämpfen, oder dem Eintauchen des strukturierten PVAI-Films in den Quervernetzer ergibt keine zufriedenstellenden Immobilisierungsergebnisse.

Daher wird eine physikalische Immobilisierung verwendet, die durch Erhitzen des PVAI-Films erfolgt. Um die unerwünschte Verfärbung des Polymers während des Erhitzens zu verhindern (vgl. Abb. 61 A1), wird das Substrat in der auf 140-160 °C geheizten, offenen Spindelpresse in einem evakuierten Exsikkator abgekühlt. Der Ausschluss von Luftsauerstoff im Rezipienten unterbindet die Gelb- bzw. Braunfärbung der PVAI-Filme. Durch diesen Immobilisierungsschritt werden hydrophile, wasserunlösliche PVAI-Schichten von hoher Transparenz erhalten.

Die beschriebene Strukturierungsmethode liefert hochtransparente PVAI-Filme, die fest mit einem Glassubstrat verbunden sind. Damit lässt sich die Verfärbung der PVAI-Schichten, welche beim Heißprägen aufgrund der hohen Temperaturen eintritt, verhindern. Allerdings ist ein weiterer Arbeitsschritt – die thermische Immobilisierung – erforderlich, um ein Aufquellen des Polymers in wässrigen Elektrolyten zu verhindern. Diese Immobilisierung erfolgt bei niedrigeren Temperaturen als der Heißprägevorgang und kann unter Sauerstoffausschluss ohne Verfärbung des Materials durchgeführt werden.

3.3.2.3 Deckelplattenfertigung & Bonding

Zum Verschließen der Mikrostrukturen muss eine Deckelplatte, welche die Zugangsbohrungen trägt, fest mit der Bodenplatte verbunden werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Bonding. Das Bonding kann durch verschiedene Verfahren, beispielsweise thermisch oder durch das Kleben mit Adhäsiven erfolgen. Im Optimalfall erhält man nach der Prozedur fest miteinander verbundene Platten unter Erhalt der Mikrostrukturen.

Dafür müssen beide Polymerfilme jeweils eine gleichmäßige Dicke, wie auch eine extrem planare Oberfläche ohne Partikeleinschlüsse haben. In der Theorie des Thermobondings werden die zu bondenden Substrate aufeinandergelegt, positioniert, in einer Heißpresse bis knapp unter den Glasübergangspunkt erhitzt und langsam abgekühlt²²⁵. Wichtig ist hierbei eine homogene Druckverteilung auf das Substrat, welche durch die exakt parallele Anordnung der Pressplatten erreicht werden kann.

Für erste thermische Bondingversuche der Sandwich-Chips kommt eine Eigenbau-Spindelpresse zum Einsatz. Diese ist beheizbar und kann mit einem auslösenden Drehmomentschlüssel auf einen reproduzierbaren Pressdruck eingestellt werden. Die Optimierung des Drucks erfolgt bei einer Bondingtemperatur 10 °C unterhalb des Glasübergangspunktes. Zu niedrige Anpressdrücke führen nicht zu einer stabilen Verbindung beider Polymerschichten, wogegen zu hohe Anpressdrücke die Mikrostrukturen verschließen können. Dieser Effekt ist in Abb. 61 A1 sichtbar, wo ein mit 25 Nm gebondeter PVAI-Chip zu sehen ist. Unverschlossene Bereiche der Mikrokanäle sind als horizontale Linien in der Ausschnittvergrößerung erkennbar. Ferner ist wieder eine Dunkelfärbung des Filmes besonders in den Randbereichen zu ersichtlich.

Die Eigenbau-Spindelpresse hat eine freischwingend hängende, obere Pressenplatte, die zur homogenen Druckverteilung wenig geeignet ist. Legt man das zu pressende Substrat nicht absolut mittig in die Presse, kann sich die obere Pressplatte schräg stellen. Die Fotografie des Bondingexperiments (Abb. 61 A2) zeigt deutlich, dass die Schichten nur im oberen Bereich des Chips gebondet sind (zur Visualisierung ungebondeter Bereiche Hohlräume mit grüner Fluoresceinlösung gefüllt). Die Schwingachse der Pressplatte war bei diesem Experiment parallel zum Chip positioniert.

Neben der ungeeigneten Presse ist die Herstellung gleichmäßig beschichteter Deckelplatten keineswegs trivial. Das Honen oder das Wasserstrahlschneiden der Zugangslöcher in eine polymerbeschichtete Deckelplatte bringt eine beträchtliche Partikelfracht mit sich. Diese Partikel setzen sich in der Polymerschicht fest und können unmöglich wieder rückstandslos entfernt werden. In der Schicht verbleibende Partikel verhindern aber den Bondingprozess. Die umgekehrte Fertigungsreihenfolge, das Bohren der Löcher vor dem Beschichten, ist eine andere Möglichkeit. Das Beschichten der durchbohrten Platte durch Aufrakeln bringt kein gutes Ergebnis, da die Löcher als Fehlstellen wirken. So entstehen Verwerfungen um die

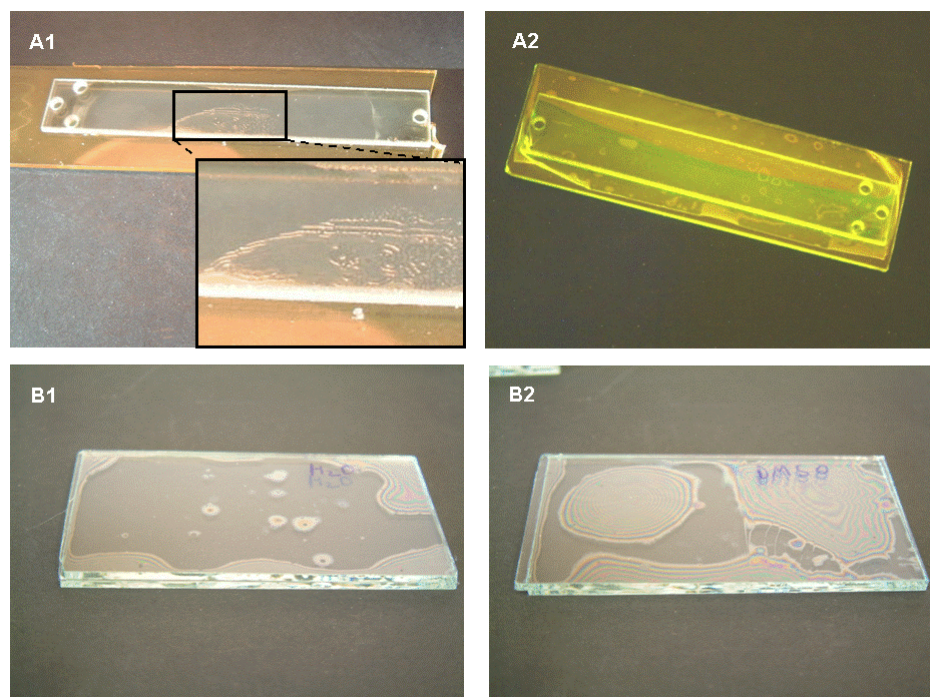


Abb. 61 Bondingversuche an softlithographisch strukturierten PVAI-Chips (A) bzw. 100 μm dicken Testschichten (B)

Bohrungen aufgrund der Kantenflucht²²⁶, was letztlich in ungleichmäßigen Schichtdicken resultiert. Eine homogene Schichtdicke ist aber für ein gelungenes Bonding besonders wichtig, da Bondingfehler um die Vials ein flächiges Verbinden beider Substrate verhindern und somit keine funktionstüchtigen Chips erhalten werden. Eine Alternative, die durchbohrten Deckelplatten mit dünneren Polymerfilmen zu beschichten, ist das *spray coating*. Bei diesem Verfahren werden verdünnte Polymerlösungen mit einer Airbrush-Pistole auf die durchbohrten Deckelplatten gesprüht. Unter optimalen Bedingungen bilden die mikroskopisch feinen Tröpfchen beim Trocknen einen geschlossenen Polymerfilm. Auch hier kann während der Trocknung die Kantenflucht auftreten, diese sollte aber aufgrund der deutlich geringeren Filmdicke kaum ins Gewicht fallen. Das *spray coating* kann im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr detailliert behandelt werden, erste Ergebnisse zeigen aber, dass die Konzentration der Polymerlösung, die Lösungsmittelzusammensetzung und die Einstellung des Zerstäubungsgrades einen großen Einfluss auf die Filmqualität haben.

Um eine Dunkelfärbung des PVAI beim Bonding zu verhindern, wird anstelle des thermischen Bondings das *solvent-assisted bonding* angewendet, welches bei Raumtemperatur an nicht immobilisierten PVAI-Schichten durchgeführt werden kann. Es funktioniert mit einem Wasser- oder DMSO-Film, welcher die PVAI-Schicht oberflächlich aufweicht und klebrig macht. Damit die nur 20 µm tiefen Mikrostrukturen nicht verschlossen werden ist es unabdingbar, diesen Lösungsmittel-Film so dünn wie möglich zu halten und weiterhin homogen auf das strukturierte Substrat aufzutragen. Dies kann in einfacher Weise durch Kondensation von Luftfeuchtigkeit bzw. DMSO-Dämpfen auf gekühlte Substrate geschehen. Das Verfahren wird auf unstrukturierten Substraten (10 x 10 cm) getestet. Die Verwendung einer kommerziellen, hydraulischen Presse mit absolut parallelen Pressplatten sowie das Anlegen eines Anpressdrucks von 15 kN führt zu fest verbundenen Glasplatten bei Raumtemperatur. In Abb. 61 B1 bzw. B2 ist das Verfahren mit Wasser, bzw. DMSO als Weichmacher gezeigt. Prinzipiell läßt sich mit dieser Methode ein flächiges Bonding durchführen, wenn auch eingebondete Partikel lokale Bondingfehler zurücklassen. Diese sind gut an den Newtonschen Interferenzringen erkennbar, welche konzentrisch um die eingebondeten Fehlstellen liegen. Diese Interferenzringe entstehen in ungebondeten Bereichen durch die Interferenz des Lichts mit einem Spalt zwischen beiden Platten, dessen Höhe in der Größenordnung der Lichtwellenlängen liegt. Offensichtlich ist Wasser besser als DMSO für dieses Bondingverfahren geeignet, was durch den höheren Dampfdruck und damit eine dickere aufkondensierte Schicht erklärt werden kann. Somit steht ein taugliches

Bondingverfahren für nicht immobilisierte PVAI-Filme zur Verfügung. Erste Bondingtests mit strukturierten Substraten stehen noch aus, wobei der Pressdruck auf kleinere Substratoberflächen in Chipgröße angepasst werden muss.

Wenn es zukünftig gelingt, durchbohrte und gleichmäßig mit PVAI beschichtete Deckelplatten herzustellen kann im Anschluss das wasserunterstützte Bonding und eine thermische Immobilisierung der PVAI-Chips durchgeführt werden. Damit könnten erstmals funktionsfähige Mikrofluidik-Chips aus PVAI erhalten werden. Verwendet man *fused silica* statt gewöhnlichem Glas als Trägermaterial, so könnten diese Bausteine die native Fluoreszenzdetektion hocheffizient getrennter Proteine in hydrophilen Polymerchips ermöglichen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Elektrophorese-Systeme

4.1.1 MCE-System für die Fluoreszenzdetektion im visuellen Bereich

Das verwendete Messsystem basiert auf einem inversen Fluoreszenzmikroskop (IX-50, Olympus, Hamburg). Als Lichtquelle ist ein Hg-Hochdruck-Brenner installiert, bei dem Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Fluoreszenzdetektion mittels Filterkuben eingestellt werden können. Am seitlichen Optik-Port sitzt eine variable Apertur (Viewfinder, Till Photonics, Gräfeling) sowie ein Photomultiplier-Modul (7711-03, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee). Die Apertur dient zur Definition eines Viereckigen Detektionsbereichs, der mit einer am *viewfinder* befindlichen, IR-sensitiven CCD-Kamera auf den Kanal justiert wird. Ein Durchlichttubus und eine weitere CCD-Kamera mit Videoaufzeichnung gehören ebenso zur Ausstattung. Die Mikrofluidik-Chips werden in eine Platte aus fräsbarer Keramik (Vitronit, Vitron GmbH, Jena) auf den x/y-Verschiebetisch des Mikroskops gelegt. Die Keramik hat einen hohen Ohmschen Widerstand, und eine sehr geringe Eigenfluoreszenz oberhalb 400 nm. An einer Seite der Keramik ist ein Reed-Relais als Sicherheitsschalter aufgeklebt. Eine Elektrodenplatte aus geschwärztem PMMA mit eingelassenem IR-Hochpassfilter über dem Kanal wird mittels zweier Führungsstifte auf den Chip gelegt, so dass die Elektroden aus Platindraht mit den Probengefäßen einen elektrischen Kontakt herstellen. Ein Magnet, der am Rand dieser Elektrodenplatte befestigt ist, schaltet das Relais der Vitronit-Platte, welches mit dem Interlock-Schaltkreis der bipolaren 2x4-Kanal Spannungsquelle (HCV 40M-10000, FuG, Rosenheim) verbunden ist.

Es wurden Borosilikatglas-Chips des Typs X-8030 (Micronit, Enschede, Niederlande) im einfachen Kreuzdesign verwendet. Die Gesamtlänge des Trennkanals beträgt 85 mm, die des Injektionskanals 8 mm. Die Kanalhöhe ist 30 µm, die Kanalbreite 50 µm. Die Dicke eines Chips beträgt 1,8 mm. Der Aufbau des Systems ist schematisch in Abb. 62 skizziert.

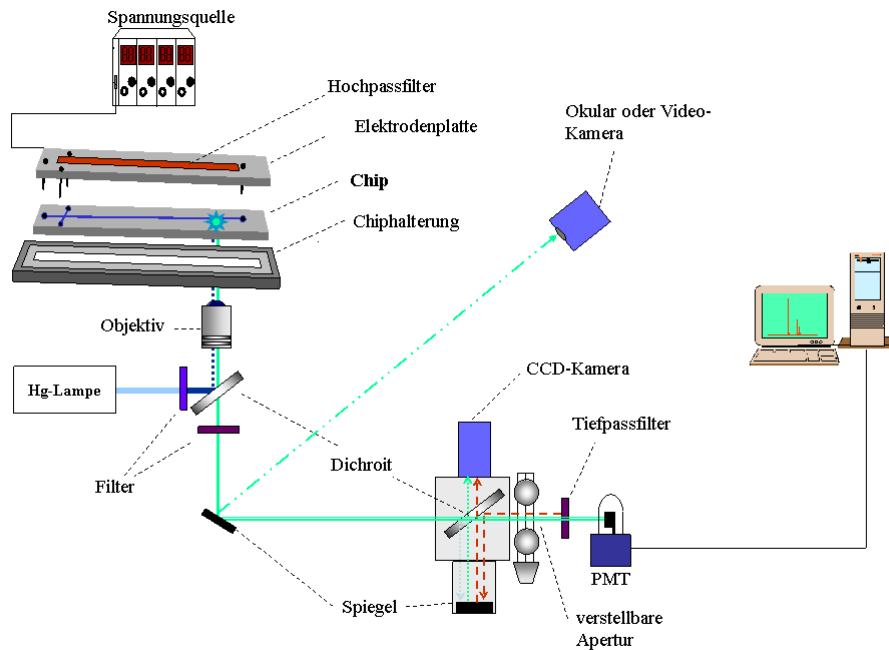


Abb. 62 Aufbau des IX-50 basierten MCE-Systems mit Viewfinder

4.1.2 MCE-System für die intrinsische OPE-Fluoreszenzdetektion

Dieses System basiert auf einem kommerziellen Fluoreszenzmikroskop der neueren Generation (IX-71, Olympus, Hamburg). Zur Implementierung der Fluoreszenzdetektion mit Anregung im tiefen UV-Spektralbereich wurde es in Kooperation mit der Firma Thalheim Spezialoptik (Pulsnitz) modifiziert (Abb. 63). Hierzu ist ein Kubus anstelle eines herkömmlichen Mikroskopobjektivs installiert, welcher einen dichroitischen Spiegel, je einen Anregungs- und Emissionsfilter sowie ein Quarzobjektiv für die Epi-Fluoreszenzdetektion enthält. Ein weiterer optischer Filter (DUG 11x, Itos, Mainz) kann bei Bedarf in den Emissionsstrahlengang eingeschwenkt werden. Unter Umgehung weiterer Mikroskopkomponenten – wie Standard-Filterkuben oder Linsen – wird das Fluoreszenzlicht über einen Spiegel im Hauptgehäuse des Mikroskops auf den unteren, hinteren Port reflektiert und durch eine zylindrische Quarzlinse auf die Photokathode des Photomultiplier-Moduls (H 7711-03, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee) fokussiert. Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren kann hier alternativ auch ein fasergekoppeltes USB-Spektrometer (USB-2000, Sentronic, Dortmund) angebracht werden. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, das Fluoreszenzlicht durch die Mikroskopokulare (mit eingebautem UV-Sperrfilter) oder mit Hilfe einer CCD-Kamera (GR-DV 3000, JVC, Friedberg) zu visualisieren. Als Anregungsquellen stehen ein gepulster 8 mW Laser (FQSS266-Q, CryLas GmbH, Berlin)

sowie ein *continuous-wave* 120 mW Laser (Cobalt SUW-1100A, Sony, Stuttgart) mit 266 nm Emissionswellenlänge zur Verfügung, die mittels einer optischen Quarzfaser (FC-UV200-2-ME, Getspec.com, Dortmund) in den modularen Kubus eingekoppelt werden. Eine graduierte Einstellung der Anregungsintensität erfolgt mittels eines mechanischen Shutters (FHSA-TTL, Getspec.com, Dortmund).

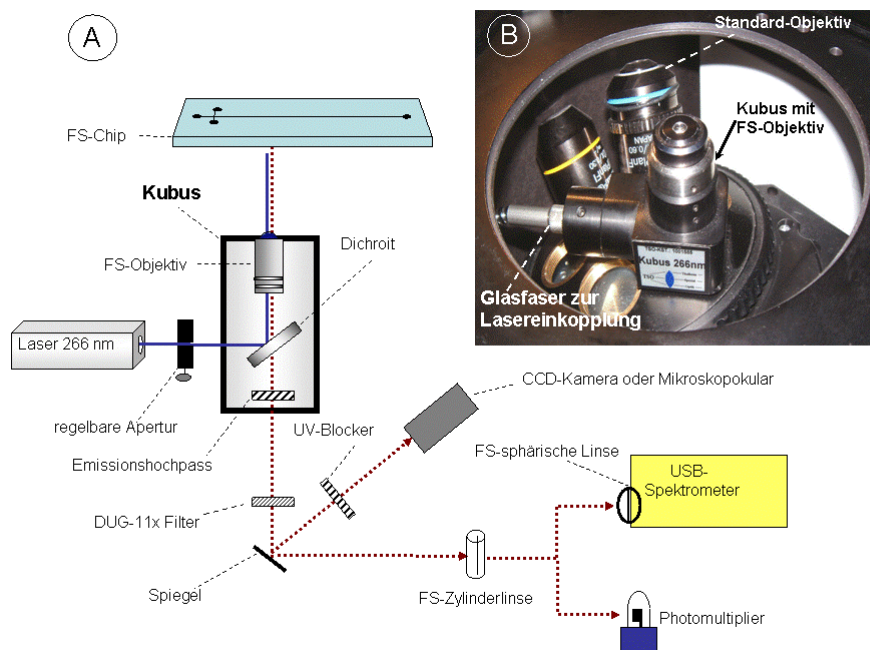


Abb. 63 Aufbau des MCE-Systems mit LIF-Anregung im tiefen UV-Spektralbereich

Die Datenerfassung und Auswertung bei diesen Systemen wurde durch die Verwendung von Chromatografiesoftware (ColaChrom 8.1, MPI Mülheim, Mülheim a. d. Ruhr sowie Clarity Version 2.6, Dataapex, Prag) realisiert.

Es wurden Borosilikatglas und Quarz-Chips des Typs X-8030 (Micronit, Enschede, Niederlande) verwendet. Die Hochspannung im Bereich -10 bis +10 kV lieferte eine bipolare 2x4-Kanal Spannungsquelle (HCV 40M-10000, FuG, Rosenheim).

4.1.3 MCE-System für die intrinsische TPE-Fluoreszenzdetektion

Für die TPE ist das System auf einem Optiktisch mit orthogonaler optischer Bank anstelle eines inversen Fluoreszenzmikroskops aufgebaut (Abb. 64). Ein auf 840 nm getunter Titan-Saphirlaser (Tsunami Series, SpectraPhysics, Darmstadt) pumpt einen frequenzverdoppelten Nd:YAG-Laser (Millenia, SpectraPhysics, Darmstadt) bei 532 nm. Die 840 nm wurden durch einen optisch-parametrischen Oszillator (GWU-Lasertechnik, Erfstadt) frequenzverdoppelt,

was eine emittierte Wellenlänge von 420 nm zur Folge hat. Die gemittelte Leistung beträgt 320 mW bei einer Pulslänge von ~ 100 fs und einer Repetitionsrate von 80 MHz. Die Strahlungsintensität kann durch einen logarithmischen Graufilter (NT-54-082, Edmund-Optics, Karlsruhe) im Strahlengang justiert werden. Als 40x Objektiv kommt ein achromatisches Quarzobjektiv (OFR LMU 40x UV-B, Laser 2000, Wessling) mit einer numerischen Apertur von 0,5 zum Einsatz. Das Fluoreszenzlicht wird bildgebend durch zwei UV-Objektive (UV Nikkor $f = 105$ mm; Nikon $f = 4,5$ mm) auf ein -55°C gekühltes, UV-sensitives CCD (DV434-BU2, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland) fokussiert. Als Emissionsfilter wird ein 320 / 80 nm Bandpassfilter (DUG-11x, Itos, Mainz) verwendet, ferner dient ein frequenzverdoppelter Nd:YAG- Laser (Nanolase, Meylan, Frankreich) zur Visualisierung des mikrofluidischen Kanals. Ein mechanischer Shutter, der bei 2 Hz (500 ms *exposure time*) betrieben wird, reduziert mögliches Photobleichen auf ein Minimum. Die Belichtungszeit zum sammeln der Fluoreszenzquanten (*sampling time*) beträgt 800 ms. Die Datenaufnahme erfolgt mittels einer Akquisitionsoftware (DaVis 6.2, DaVision, Göttingen) mit einem *hardware binning* von 8x8 Pixeln.

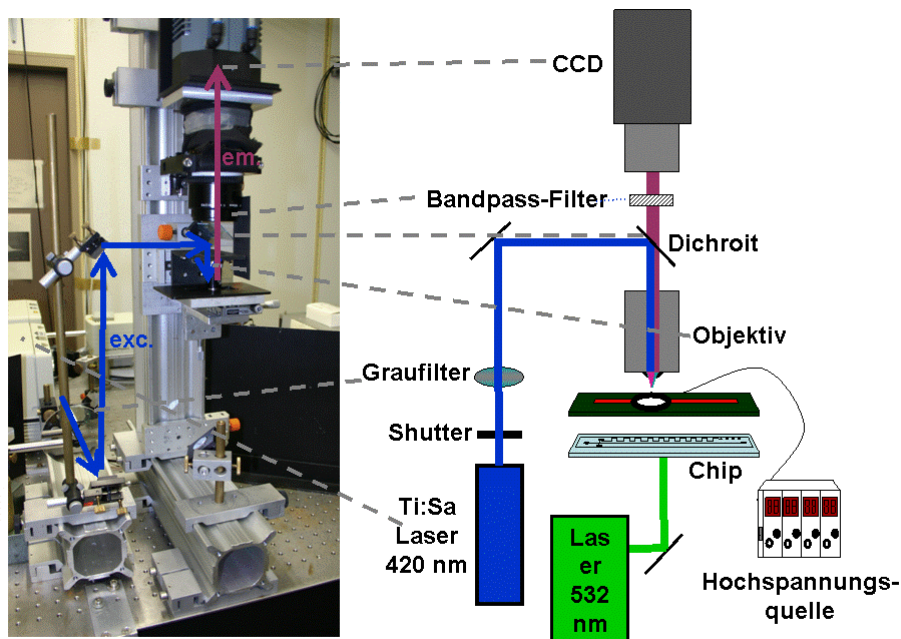


Abb. 64 Aufbau des MCE-Systems für die TPE bei 420 nm

Für diese Experimente werden Borosilikatglas und Quarz-Chips (X-8030, Micronit, Enschede, Niederlande) verwendet, sowie ein baugleicher PMMA Chip mit 3 mm Dicke (Microfluidic Chip-Shop, Jena). Als Spannungsquelle dient eine 4-Kanal-Spannungsquelle analog zu den anderen verwendeten MCE-Systemen (HCV-40M-10000, FuG, Rosenheim).

4.2 Eigenbau-Plasmaanlage mit kapazitiver Einkopplung

Zur präparativen Reinigung und Hydrophilierung von Probenoberflächen wurde im Zuge dieser Arbeit eine Plasmaanlage verwendet. Die Kosten für ein kommerzielles System würden 7000 Euro überschreiten. Daher wurde eine kapazitiv gekoppelte Plasmakammer mit regelbarer Hochspannungsquelle in Kooperation mit der Feinmechanischen Werkstatt, Elektronik und Glasbläserei der Universität Regensburg entworfen und realisiert. Diese Eigenbau-Plasmaanlage ermöglicht die Behandlung von Festproben mit Plasmen einfacher Gase (wie He, Ar, N₂, Luft und eingeschränkt O₂).

Die Behandlungskammer besteht aus einem modifizierten Glasexsikkator, in den ein PTFE-Tisch eingepasst ist. Auf diesem ist eine polierte Edelstahl-Tellerelektrode montiert, die mit dem Nullleiter verbunden ist. Die Gegenelektrode hängt an einem PE-Passteil im Exsikkatordeckel. Eine Skizze des Aufbaus ist in Abb. 65 dargestellt.

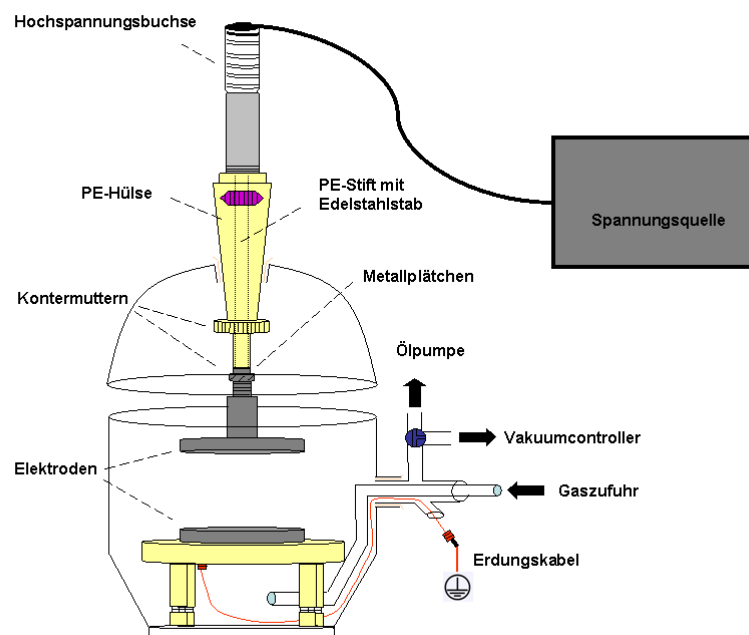


Abb. 65 Schematischer Aufbau der Plasmakammer

Mittels einer Höhenverstellung an der oberen Elektrode kann der Elektrodenabstand zwischen 0 und 60 mm variiert werden. Ein isolierter Stahlstift kontaktiert die obere Tellerelektrode mit einer Hochspannungsbuchse, welche mit der Hochspannungsquelle verbunden ist. Durch den Seiteneinlass des Exsikkators werden die Gaszufuhr, ein Stutzen zur Doppeldrehschieber-Vakuumpumpe (RZ 6, Vacuubrand, Wertheim) sowie der Nullleiter für die untere Elektrode

geführt. Das Prozessgas kann über einen Vakuumcontroller (VAP 5, Vacuubrand, Wertheim) bis zum Erreichen des gewünschten Enddruckes (< 1 mbar) aus der Behandlungskammer abgesaugt werden.

Die Speisespannung zum Zünden und Aufrechterhalten des Plasmas wird von einer bipolaren Spannungsquelle bereitgestellt. Herzstück dieses Gerätes ist ein Zeilentransformator (Typ TCE 33, Oppermann, Steyerberg, Deutschland), wie er in Kathodenstrahlröhrenbildschirmen zur Hochspannungsgenerierung eingesetzt wird. Dieser wird mit einem IC-Multivibrator, welcher einen Leistungstransistor schaltet, primärseitig angesteuert. Die Pulsweite (PWM), die Frequenz im Bereich von 4,8-39,0 kHz sowie die Spannung im Bereich von 0 kV-24 kV sind durch 10-gängige Wendelpotentiometer regelbar. Weiterhin ist die gewünschte Polarität einstellbar. Die Wellenform des Ausgangssignals der Spannungsquelle folgt aufgrund nicht idealer Zeilentratfoeigenschaften nur bedingt der primärseitig eingespeisten Rechteckswelle. So werden die steilen Anstiegs- und Abstiegsflanken der Rechteck-Steuerspannung laut Oszilloskop leicht abgeflacht. Ebenfalls in das Gerät integriert wurden sicherheitsrelevante Teile, wie beispielsweise eine Interlock-Schaltsperr für den Hochspannungsausgang sowie eine Überlastschaltung. Die Parameter zur Plasmaprozessierung wurden so gewählt, das ein über die Fläche homogenes und möglichst helles Plasma zündete (4,8 kHz, 24 kV, längste Pulsweite).

Da die o. g. Eigenbau-Spannungsquelle nicht für alle Experimente verfügbar war, wurde zeitweise eine alternative Spannungsversorgung benutzt. Diese besteht aus einem 250 Volt Stelltransformator ohne galvanische Netztrennung (Reo AC-S, Reo Components, Solingen), der einen Hochspannungs-Streufeldtransformator (SRM 80/8, Hansen Neon, Berlin) ansteuert. Dieser Aufbau arbeitet mit der Netzfrequenz von ~ 50 Hz, die Speisespannung des Streufeld-Trafos wird auf 15-20 V eingestellt. Der Eisenkern des Streufeld-Trafos ist dabei ganz herausgedreht, was den Sekundärstrom auf ca. 80 mA begrenzt. Verglichen mit der Eigenbau-Spannungsquelle besitzt das Plasma also eine um den Faktor 100 geringere Speisefrequenz aber einen höheren Speisestrom. Der wesentliche Vorteil dieses Aufbaus verglichen mit der Eigenbau-Spannungsquelle ist die höhere Robustheit. Ein Photo dieser Spannungsversorgung ist in Abb. 66 dargestellt.

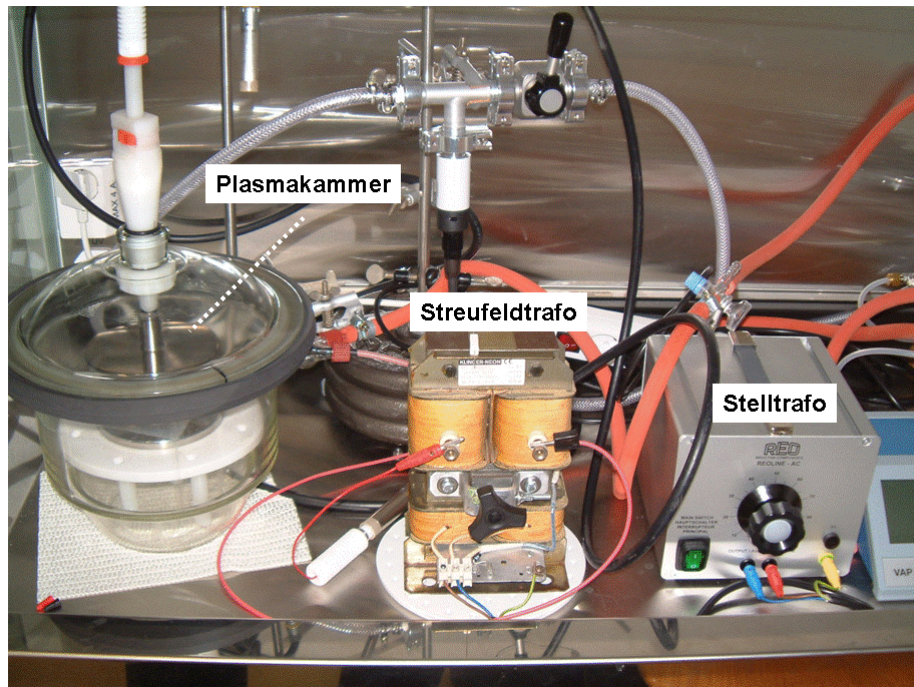


Abb. 66 Alternative Spannungsversorgung für die Plasmaanlage

4.3 Hydrophilieren von Polymeren

Diese Versuchsreihe wurde auf der Oberfläche von Vollmaterialsubstraten durchgeführt. Dazu werden die Substrate mit Wasser und SDS-Lösung gereinigt, ausgiebig mit VE-Wasser abgespült und im N₂-Strom getrocknet. Dann werden die Substrate mit einem Seitenschneider vereinzelt und in Weithalsflaschen für eine definierte Zeit in die Behandlungslösung getaucht. Dabei ist die Weithalsflasche verschlossen. Im Anschluss wird das Substrat kurz mit VE Wasser gereinigt und im N₂-Strom getrocknet. Damit kann das Substrat direkt für die Kontaktwinkelmessungen verwendet werden.

4.4 Bestimmung von Kontaktwinkeln

Im Zuge dieser Arbeit kam als Benetzungsflüssigkeit Wasser zum Einsatz, um die Hydrophilie der Oberfläche direkt zu bestimmen. Dementsprechend zeigt ein kleiner Kontaktwinkel eine hydrophile Oberfläche, ein großer Kontaktwinkel eine hydrophobe Oberfläche an. Es wurde eine statische Messung nach der Methode des liegenden Tropfens durchgeführt.

Dazu dient ein Aluminium-Kühlkörper dient als Tisch für die zu untersuchende Probe. Rechtwinklig davon befindet sich in einem definierten Abstand von 25 cm eine Digitalkamera (FinePix 6800Zoom, Fujifilm, Düsseldorf) mit Stativ. Diese ist mit dem Objektiv genau auf die Höhe des Tisches plus die Probendicke justiert. Eine Wolframfadenlampe dient zur Ausleuchtung des Tisches. Oberhalb des Proben-tisches befindet sich ein Schirm aus Pappe, der die Fokusebene für die Digitalkamera festlegt. Die Kamera wird im Betriebsmodus „Auto“ mit Makro-einstellung und maximalem optischen Zoom betrieben (Bildqualität 3 Megapixel; „Fine“). Eine Skizze der Apparatur ist Abb. 67 zu entnehmen.

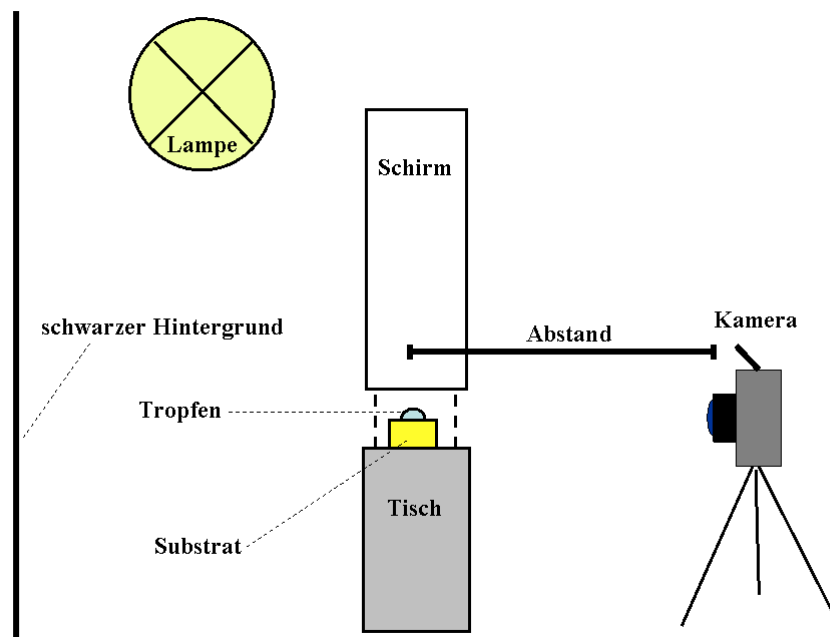


Abb. 67 Seitenansicht des Messaufbaus für Kontaktwinkelbestimmungen

Das zu vermessende Substrat wird sorgfältig mit entionisiertem Wasser gereinigt, mit Stickstoff trocken geblasen und zusammen mit der Messflüssigkeit mehrere Stunden bei 20 ± 2 °C temperiert. Anschließend werden wenigstens 3 Tropfen mit einer Pipette auf das Substrat geträufelt und mit der Kamera abgelichtet. Zwischen dem Auftropfen der Flüssigkeit und dem Ablichten des Tropfens sollten maximal 15 s vergehen. Je kleiner die Tropfengröße ist, desto kleiner ist der Fehler durch das Eigengewicht der Flüssigkeit. Allerdings ist die Vergrößerung des Kameraobjektivs begrenzt. Ein Flüssigkeitsvolumen von 20 µL wurde experimentell als Kompromiss zwischen einer geringen Tropfengröße und einer brauchbaren Vergrößerung zum Anlegen der Tangente gewählt.

Letztere wird nach Augenmaß nach softwarebasierter Bildvergrößerung angelegt. Dabei werden mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt, die jeweilige Standardabweichung wird als Fehlertoleranz angegeben.

Die oben beschriebene Mess- und Auswertemethode zur Kontaktwinkelbestimmung wurde mit einem kommerziellen System (G-40, Krüss, Hamburg) verglichen, welches nur für kurze Zeit zur Verfügung stand. Dieses arbeitet ebenfalls nach der statischen Methode des liegenden Tropfens, allerdings wird hier die Tangente automatisch durch die zugehörige Software angelegt und ausgewertet. Als Testmenge wurden Wassertropfen von 1 µL Volumen verwendet. Es wurden 6-fach-Bestimmungen vorgenommen. Als Teststücke fanden mit

Ethanol gereinigte Materialien, namentlich Teflon, poliertes Titan, Borosilikatglas und Quarzglas Verwendung. Die unterschiedlichen Auswertergebnisse sind mit Standardabweichungen in Tab. 1 zusammengestellt, wobei die automatisch bestimmten Kontaktwinkel mit „kom.“ gekennzeichnet sind.

| | θ | σ | $\theta_{\text{kom.}}$ | $\sigma_{\text{kom.}}$ |
|---------------------|----------|----------|------------------------|------------------------|
| Teflon | 102,5 | 8,1 | 97,8 | 1,5 |
| Ti (poliert) | 59,8 | 5,9 | 58,7 | 2,6 |
| Glas | 55,2 | 3,4 | 51,1 | 1,9 |
| Quarz | 30,7 | 6,0 | 33,1 | 1,4 |

Tab. 1 Vergleich gemessener Kontaktwinkeln einiger Referenzmaterialien

Es fällt auf, dass die Streuung der von Hand bestimmten Winkel deutlich größer ist als die der Auswertesoftware. Dennoch können anhand der manuellen Methode gute Werte abgeschätzt werden, die bis auf eine Ausnahme (Glas) innerhalb der Fehlertoleranz liegt.

4.5 Rakeltisch

Zum Aufziehen von Filmen auf glatten Oberflächen wurde ein kommerzieller Aufziehtisch verwendet (Elcometer 4340, TQC Simex, Haan). Dieser besteht aus einem linearangetriebenen Schieber mit variablem Vorschub, welcher über einem beheizbaren Vakuumtisch angebracht ist. Zugehörige, kundenspezifisch angefertigte Rakel nach Bird ermöglichen Filmdicken von 250 bis 2000 μm in 250 μm Schritten. Das Rakelwerkzeug wird auf das zu beschichtende Substrat aufgesetzt und durch einen Schieber in Richtung der Auffangwanne geschoben. Der Vakuumtisch fixiert dabei das Substrat. Sofern nicht anders angegeben, wird der Tisch bei allen Aufziehprozessen auf eine Aufziehtemperatur von 30°C temperiert.

4.6 Heißprägeeinrichtung

Um Polymere mittels Heißprägens zu strukturieren wurde eine rudimentäre Spindelpresse entwickelt. Diese besteht aus zwei Aluminiumtellern, welche geführt an zwei Schienen mittels einer Schraube aufeinander gepresst werden können. Ferner lässt sich die Presse mit einer handelsüblichen Laborheizplatte temperieren. Die Temperatur wird mit Hilfe eines Multimeter-Temperaturfühlers (Fluke 77 IV, Everett, USA) sowohl in der oberen als auch in der unteren Platte bestimmt. Im geschlossenen Zustand können beide Platten auf die gewünschte Prozesstemperatur gebracht werden. Sobald Pressgut eingelegt ist, kann bei Bedarf die Temperatur der unteren Platte weiter erhöht werden.

Um einen reproduzierbaren Pressdruck zu erzielen, wird mit auslösenden Drehmomentschlüsseln (Drehmeter, Gedore, Remscheid) ein definiertes Drehmoment im Bereich von 0-80 Nm angelegt. Ein Schwachpunkt der Pressenkonstruktion ist der freischwiegend hängende obere Teller, welcher sich bei nicht zentriert eingelegtem Pressgut schräg stellt und eine inhomogene Druckverteilung bewirkt.

4.7 Protokolle

4.7.1 Ansetzen von Pufferlösungen

Die berechnete Menge an Puffersubstanz wird im Wägeschiffchen eingewogen und in ca. vier Fünfteln des Endvolumens an Reinstwasser unter leichtem Rühren gelöst. Anschließend wird

mit einer zuvor kalibrierten pH-Messkette der pH-Wert der Lösung bestimmt. Das Einstellen auf den Zielwert erfolgt je nach Pufferkapazität durch Zugabe von 3 M, 1M oder 0,1 M HCl, Trifluoressigsäure (TFA) bzw. Natriumhydroxid-Lösung. Die Verwendung von TFA anstelle von HCl hat den Vorteil, durch seine geringe spezifische Leitfähigkeit die Gesamtleitfähigkeit des Puffers nur minimal zu erhöhen und nebenbei im Puffer konservierend zu wirken. Die Lösung wird in einen Messkolben überführt und mit Reinstwasser aufgefüllt. Sämtliche Puffer werden im Kühlschrank aufbewahrt und unmittelbar vor der Verwendung durch 0,45 µm Einweg-Spritzenfilter aus regenerierter Cellulose von Partikeln befreit.

4.7.2 Elektrophoretische Trennungen auf einem Chip

4.7.2.1 Konditionierung von Glaschips

Ein neuer Mikrofluidik-Chip wird zunächst mit frisch angesetzter Caroscher Säure (Peroxomonoschwefelsäure), hergestellt aus einem Teil 30 % H_2O_2 und 2 Teilen H_2SO_4) gefüllt. Hierfür werden die Vials am Kreuz mit Säure bestückt und diese durch am BO angelegten Unterdruck in den Mikrofluidik-Kanal gesaugt. Der gefüllte Chip wird über Nacht gereinigt, anschließend geleert und die Kanäle werden 2 Minuten mit Wasser gespült. Vorbereitend für die Messung wird der Chip mit Puffer gefüllt und für 10 Minuten belassen, damit sich die Oberfläche an den pH-Wert äquilibrieren (anpassen) kann. Der Puffer im Chip wird erneuert und optisch auf Blasenfreiheit kontrolliert. Nun ist der Chip einsatzbereit. Zwischen den Messungen wird der Chip 30 s mit NaOH 1 Minute mit Wasser und 1 Minute mit Puffer gespült, um eventuell vorhandene Kontaminationen zu beseitigen.

4.7.2.2 Konditionierung von Polymerchips

Polymerchips sind empfindlicher gegenüber starkem Unterdruck als Glaschips und werden vorzugsweise mit Überdruck befüllt. Hierzu wird in einem Reservoir Flüssigkeit vorgelegt und diese mit einer Hamilton-Spritze mit Silikonkautschukdichtung in die Kanäle gedrückt. Gespült wird jeweils 3 Minuten mit Wasser und Puffer, um die Polymeroberflächen chemisch nicht zu verändern. Eine mikroskopische Kontrolle der blasenfreien Befüllung der Kanäle ist unabdingbar.

4.7.3 Durchführung einer Trennung mittels MCE

4.7.3.1 Glas-Chips

Das Probenreservoir des Chips wird mittels einer Pipettenspitze, an der Unterdruck anliegt, entleert und mit einem μL -Dispenser mit einem Probenvolumen von 2 μL gefüllt. Nun wird die Elektrodenplatte aufgesetzt und der Trennkanal unter Zuhilfenahme des Viewfinders²²⁷ auf das Detektionsfenster positioniert. Die Beschleunigungsspannung des Photomultipliers wird auf 500 V eingestellt. Durch Anlegen geeigneter *pinched injection* Potentiale wird die Probe im Kreuzungsbereich fokussiert und kann durch Umschalten der Spannungsquelle auf die Trennpotentiale injiziert werden. Zeitgleich mit dem Umschalten erfolgt manuell der Start der Datenakquisition.

4.7.3.2 Polymer-Chips

Die Durchführung einer Trennung erfolgt prinzipiell wie bei den Glaschips, allerdings sollte bei der Verwendung von Polymer-Chips zusätzlich Folgendes beachtet werden:

- Spannungsüberschläge können zum thermischen Veröden der Kanäle führen
- der höhere Autofluoreszenzuntergrund erfordert häufig ein Herunterregeln der Beschleunigungsspannung am Photomultiplier (insbesondere bei Anregungswellenlängen unterhalb 500 nm)
- Joulesche Wärme sollte auf ein Minimum reduziert werden, was durch die Verwendung von *low-conductivity*-Puffern und kleinen Potentialen erfolgen kann
- einige Lösungsmittel sind zum Spülen des Polymers ungeeignet, da das Material diesen gegenüber chemisch unbeständig ist.

4.7.4 Probenpräparation für die intrinsische Fluoreszenzdetektion

4.7.4.1 Extraktion einer Banane

Aus einer Dessertbanane der Hauptsorte Cavendish (Reifestadium: erste braune Punkte auf der Schale) werden zwei 3,4 g wiegende Stücke herausgeschnitten, in je einen Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Glasstab zerdrückt. Anschließend wird jeweils

1 mL Phosphat-Puffer (pH 3, 5 mM) bzw. MES-Puffer (pH 4,7, 40 mM) zugegeben und für 20 Minuten im Ultraschallbad sonoriert (Zellaufschluss). Der zähflüssige Brei wird 15 Minuten bei 750g zentrifugiert und der Überstand in Reaktionscups pipettiert. Diese werden erneut für 10 Minuten bei 13000g zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionscups portioniert und eingefroren. Die unverdünnte Stammprobe ist im Eisfach maximal zwei Wochen zu lagern. Unmittelbar vor der Messung wird die Probe im Verhältnis 1:1 in Trennpuffer (20 mM Borat pH 9,2) verdünnt.

4.7.4.2 Probenpräparation des Hühnereiklars

Von einem handelsüblichen Hühnerei werden Eigelb und Eiklar getrennt. Das Eiklar wird mit einem Spatel von Hagelschnurresten befreit und danach durch Rühren homogenisiert. Anschließend wird von einer Einweg-Pipettenspitze das vordere Stück abgeschnitten, um das Pipettieren des dickflüssigen Eiklars zu erleichtern. Das Eiklar wird im Verhältnis 1:10 in Trennpuffer verdünnt, geschüttelt und kurz anzentrifugiert. Der Überstand wird durch einen 0,45 µm Spritzenfilter in neue Reaktionscups portioniert und eingefroren. Die Probe ist im Eisfach maximal eine Woche zu lagern und unverdünnt zu vermessen.

4.7.5 Herstellung von Prägewerkzeugen

4.7.5.1 Vorbereiten der PDMS- Abgießform

Das mikrostrukturierte Unterteil eines PDMS-Chips dient als Abgießform zur Herstellung eines PDMS-Heißprägewerkzeugs. Dieses wird mit der strukturierten Seite nach unten für 30 min in 5 mM Phosphatpuffer pH 3, dem als Trennmittel 0,1% HPMC beigefügt wurde, gelegt, mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Hierdurch ist eine HPMC-Schicht auf das PDMS aufgebracht worden. Die beschichtete Abgießform wird in einem passgenauen Teflonrahmen fixiert, wobei die Struktur nach oben weist.

Alternativ kann ein mit 20 µm tiefen Strukturen versehener, mit Teflon beschichteter Si-Master verwendet werden (Gesim GmbH, Dresden). Dieser ist mit 2-Komponenten-Epoxidharz auf eine Aluminium-Kalotte geklebt worden und wird in der zugehörigen Teflon-Gießstation mit Schrauben fixiert.

4.7.5.2 Softlithografischer Abguss von PDMS

6g PDMS-Präpolymer werden mit 0,6 g des Härters (Sylgard 184 Kit, Dow Corning GmbH, Wiesbaden) verrührt und im Exsikkator unter Vakuum für 30 min entgast. Die entgaste Mischung wird auf die Struktur im Teflonrahmen gegossen und anschließend in einem möglichst horizontal ausgerichteten Muffelofen für 1 Stunde bei 100 °C gehärtet. Nach dem Abkühlen wird der Abguss aus der Gießform vorsichtig herausgelöst und mit einer Schere bzw. einem Skalpell auf die gewünschte Größe zurechtgeschnitten.

4.7.6 Herstellung von Sandwich-Chips

4.7.6.1 Ansetzen einer 24,1 %igen PVAc-Rakellösung

23,7 g Polyvinylacetat werden in 74 g N,N-Dimethylformamid bei Raumtemperatur unter Rühren gelöst (48 Stunden) und anschließend wird 4,1 g 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon (Diacetonalkohol) hinzugegeben. Um die Partikelzahl zu reduzieren, wird die Lösung kurz zentrifugiert.

4.7.6.2 Ansetzen einer 14,9 % igen PVBu-Rakellösung

14,9 g Polyvinylbutyral werden in 80,9 g Octanol bei Raumtemperatur unter Rühren gelöst (48 Std.) und anschließend wird 4,1 g 4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon (Diacetonalkohol) hinzugegeben. Um die Partikelzahl zu reduzieren, wird die Lösung kurz zentrifugiert.

4.7.6.3 Ansetzen einer 15 % igen PVAI-Rakellösung

15,0 g Polyvinylalkohol werden in 85,0 g DMSO unter Rühren bei ca. 80°C gelöst. Auf die Zugabe von Diacetonalkohol kann aufgrund der hervorragenden filmbildenden Eigenschaften von PVAI verzichtet werden. Um die Partikelzahl zu reduzieren, wird die Lösung kurz zentrifugiert.

4.7.6.4 Aufziehen des Polymerfilms

Mit einem 1000 µm-Rakelwerkzeug nach Bird wird ein Film auf zuvor sorgfältig gereinigte 10x10 cm Fensterglasplatten aufgebracht (Geschwindigkeitsstufe 3, Ausziehtisch auf 30°C temperiert). Anschließend wird der Film im Abzug auf Heizplatten 24 Std. bei 40°C, 24 Std.

bei 50°C, 12 Std. bei 60°C und 12h bei 70°C (PVBu zusätzlich 12 Std. bei 80°C; PVA zusätzlich 2h bei 110°C) stufenweise getrocknet. Durch diese Prozedur wird ein glatter Film auf der Glasoberfläche erhalten. Die Dicke wurde mit einer Mikrometer-Messschraube bestimmt (PVAc: ~100 µm, PVBu: ~60 µm, PVA ~ 65 µm).

4.7.6.5 Schneiden der beschichteten Glasplatten

Zum Schneiden der Glasplatten werden selbige unter Zuhilfenahme eines Lineals und eines Glasschneiders (Penett, MDI-Schott, Mainz) auf der unbeschichteten Seite angeritzt und (mit der Polymerseite nach unten) über eine Kante gebrochen. Anschließend wird mit einem Skalpell der Polymerfilm entlang der Bruchkante durchtrennt.

4.7.6.6 Heißprägen der Polymerschichten

Das gereinigte PDMS-Heißprägewerkzeug wird mit der strukturierten Seite auf den Polymerfilm gelegt und die beiden Materialien werden im Exsikkator unter Vakuum adhäsiv verbunden. Der Werkstoffstapel wird schließlich mit einem Objektträger abgedeckt und mittig in die vortemperierte Presse gelegt (PVAc ca. 35°C, PVBu ca. 75°C, PVA ca. 182°C). Mittels eines auslösenden Drehmomentschlüssels (Drehmeter, Gedore, Remscheid) wird ein Drehmoment von ca. 10 Nm an der Spindelpresse eingestellt und diese mit einem Laborheizrührer auf die Zieltemperatur geheizt (PVAc 50°C, PVBu 92°C, PVA 195°C). Auf dieser Temperatur wird die Presse für 1 min belassen und anschließend abgekühlt. Nach dem Entfernen des Objektträgers vom PDMS und vorsichtigem Abziehen des Prägewerkzeugs von der Polymerschicht erhält man eine sauber geprägte Mikrostruktur.

4.7.6.7 Bohren der Deckelplatten

Auf herkömmliche Borosilikatglas-Mikroskop-Objektträger wird die gewünschte Position der Vials beidseitig mit einem Filzstift markiert. Anschließend wird der Objektträger mit einem konischen Siliciumcarbid-Schleifkopf (3 mm Durchmesser), welcher in einen Feinbohrschleifer eingespannt wird, unter Wasserkühlung bis zur halben Materialdicke gehont. Das Durchschleifen der Löcher von der Rückseite des Objektträgers verringert die Gefahr von Muschelbrüchen im Glas auf ein Minimum. Alternativ können die Löcher auch durch einen diamantbesetzten Hohlbohrer mit konzentrischer Wasserkühlung eingebracht

werden. Dabei ist es hilfreich, vorher einen Haftklebestreifen auf beide Seiten des Glases zu kleben, dieser Schritt minimiert das Risiko eines Zerbrechens des Objektträgers. Nach dem Honen bzw. Bohren wird das Deckelglas gründlich gereinigt und getrocknet.

4.7.6.8 Bonden von PVAc und PVBu Chips

Für das Bonden der Chips wird die trockene Deckelplatte mit der beschichteten Seite nach unten auf die mikrostrukturierte Polymerschicht gelegt und so positioniert, dass die Bohrung der Deckelplatte mittig auf den Enden der Kanäle sitzt. Der ungebondete Chip wird in die Spindelpresse überführt und auf die Zieltemperatur aufgeheizt (PVAc: ca. 35°C, 10 Nm; PVBu ca. 75 °C, 10 Nm). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur kann das gebondete Stück entnommen werden.

4.7.6.9 Softlithographisches Strukturieren von PVAI

Ein Heißprägemaster aus PDMS (siehe 4.7.5, S.109) kann auch als Softlithographie-Master für PVAI verwendet werden. Zu diesem Zweck wird etwas PVAI-Lösung (10 Gew.% in DMSO) auf eine sorgfältig gereinigte Glasplatte gegossen, durch Schwenken der Platte verteilt und im Anschluss der PDMS-Master auf den Flüssigkeitsfilm gelegt. Bei beiden Schritten ist zu beachten, dass sich keine Luftblasen im Flüssigkeitsfilm, bzw. zwischen Lösung und PDMS-Master bilden. Dieser Ansatz wird zwei Tage bei Raumtemperatur, zwei Tage bei 40 °C und einen Tag bei 60°C getrocknet und das PDMS vorsichtig abgezogen.

4.7.6.10 Bonden von PVAI-beschichteten Glasplatten

Mit PVAI beschichtete Glasplatten werden mit Wasser leicht aufgeweicht und dann kräftig zusammengepresst. Dazu legt man die zu bondenen Platten für 10 min in den Kühlschrank, nach dem Herausnehmen beschlagen diese durch kondensierende Luftfeuchtigkeit. Nun werden die beschlagenen Substrate schnell aufeinandergelegt und mit 15 kN Presskraft in einer hydraulischen Laborpresse (PW2 PH, P/O/Weber GmbH, Remshalden) für 1 Stunde bei Raumtemperatur aufeinandergedrückt.

4.7.7 Nasschemisches Hydrophilieren der Chipkanäle

Der zu behandelnde Chip wird im BO-Vial am Ende des Trennkanals mit 3 µL 10 M NaOH-Lösung gefüllt und in eine Belegungsklammer eingespannt. Zu beachten ist, dass die

Silikonkautschukdichtung der Belegungsklammer nicht mit der Lauge in Berührung kommt. Anschließend wird ein Druck von 5 bar angelegt, um die Lösung durch die Mikrokanäle zu drücken, bis in den 3 übrigen Vials jeweils ein kleiner Flüssigkeitstropfen sichtbar wird. Nach dem Entspannen der Apparatur wird der Chip entnommen und alle Vials werden mit einem Klebebandstreifen als Dampfsperre verschlossen. Nach der gewünschten Einwirkzeit (1-46 Std.) werden die Klebestreifen entfernt, die Vials geleert und kurz mit Wasser ausgespült. Die Mikrokanäle werden mit 2 bar Stickstoffüberdruck, welcher am BO-Vial angelegt wird, für 60 Minuten getrocknet und die Vials erneut mit Wasser gespült. Anschließend wird das BO-Vial wiederholt mit Wasser befüllt und wieder geleert, wobei die Pausen zwischen den beiden Schritten immer länger werden. Dies dient dazu, die sich von den Wänden lösenden Partikel nach und nach mit der hineinkriechenden Lösung abzutragen. Dieser Vorgang wird optisch mit dem Mikroskop verfolgt. Wenn die Kanäle einmal komplett mit Wasser gefüllt waren, kann entweder direkt gemessen oder der Chip nach einer weiteren Trocknungsprozedur gelagert werden.

4.7.8 Vorbereiten der Proben für die Röntgeninduzierte Photonenspektroskopie (XPS)

Um dünne Polymerfilme auf einen elektrisch halbleitende Si-Wafer aufzubringen, werden 5 %ige Polymerlösungen in flüchtigen Lösungsmitteln (PVBu: Aceton, PVAc: Isopropanol) mit einer Pasteurpipette auf Bruchstücke des Wafers getropft. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels hat sich, abhängig von der aufgetropften Menge, ein geschlossener Polymerfilm von 1-50 µm Dicke gebildet. Diese Filme werden 30 Minuten bei 50°C auf einer Heizplatte nachgetrocknet. Für die nass-chemische Oberflächenmodifikation werden an zuvor markierten Stellen Flüssigkeitstropfen aufgebracht und in einer verschließbaren PE-Dose zusammen mit einem befeuchteten Tuch (zum Sättigen der Atmosphäre mit Wasserdampf) für die benötigte Dauer belassen. Dabei ist darauf zu achten, dass die basische Lösung nicht mit dem unbeschichteten Silicium in Berührung kommt. Alternativ werden die beschichteten Wafer 15 Minuten im N₂-Plasma bei negativer Polarität und maximalem Pulsweitenverhältnis behandelt. Durch rückseitiges Anritzen mit einem Glasschneider, dem Brechen entlang der Rille und dem Zerteilen des Polymerfilms mit einem Skalpell werden 10x10 mm große Quadrate erhalten. Zu Beachten ist hierbei, dass sämtliche Randbereiche der Ausgangsbruchstücke verworfen werden, da dort die Polymerfilmdicke, bedingt durch die rudimentäre Beschichtungsmethode, inhomogen ist. Alle Proben werden in einer verschließbaren PE-Dose unter Stickstoff bis zur Aufnahme der XP-Spektren gelagert.

4.8 Bezugsquellen für Chemikalien

Der Alexafluor-Farbstoff stammt von Invitrogen (Karlsruhe, Germany), der Cy5-Farbstoff von GE Healthcare (München). Das 3-Phenoxy-propandiol wurde von der AG um Prof. Reetz des MPI Mülheim zur Verfügung gestellt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden weitere in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) bezogen und hatten einen Reinheitsgrad von „rein“ oder höher. Mit Ausnahme der Lösungsmittel für die Fluoreszenzmarkierung, welche über ca. 5 Gew.% Molekularsieb getrocknet wurden, erfolgte keine weitere Aufreinigung der Chemikalien.

Die PVAc- und PVBu-Polymere wurden freundlicherweise von der Wacker GmbH (Burghausen) zur Verfügung gestellt.

5 Zusammenfassung

Der breiten Anwendung der Mikrochipelektrophorese für das Hochdurchsatz-Screening, dem Nachweis pharmazeutischer Moleküle oder in der Proteomforschung stehen derzeit der Mangel geeigneter Detektionstechniken wie auch die ökonomische Fertigung von Mikrofluidik-Chips mit günstigen Oberflächeneigenschaften für Proteintrennungen entgegen. Die vorliegende Arbeit liefert innovative Beiträge zur intrinsischen Fluoreszenzdetektion von Biomolekülen sowie der Entwicklung von Mikrofluidik-Bausteinen aus funktionalen bzw. hydrophilen Polymeren.

Detektionsseitig wird die intrinsische Fluoreszenz von kleinen Aromaten und Proteinen untersucht. Diese ermöglicht die empfindliche Detektion ohne vorherige Fluoreszenzmarkierung und kann mittels einzelphotoneninduzierter Fluoreszenz mit Anregung im tiefen UV-Spektralbereich, oder alternativ als zweiphotoneninduzierte Variante mit Anregung im sichtbaren Bereich erfolgen.

Die Auswirkung der Anregungsintensität im Hinblick auf die erreichbare Empfindlichkeit bei 266 nm ist sehr analytischspezifisch. Während für die untersuchten homozyklischen Aromaten die Nachweisempfindlichkeit mit steigender Anregungsintensität zunimmt, sinkt die Sensitivität für indolhaltige Moleküle oberhalb von 100 μW Anregungsleistung durch Photobleichen wieder ab. Die Photostabilität von proteingebundenem Tryptophan ist deutlich höher als die von freiem Tryptophan. So konnte für elektrophoretisch getrennte Proteine ein Detektionslimit von jeweils 5 $\mu\text{g/mL}$ erreicht werden.

Potentielle Anwendungen der intrinsischen Fluoreszenzdetektion werden am Beispiel der Analyse psychoaktiver Wirkstoffe aus einer Banane sowie an der effizienten Trennung und Detektion von Eiklar-Proteinen demonstriert.

Für die zweiphotoneninduzierte native Fluoreszenz wird das Potenzial im Hinblick auf die Verwendung kostengünstiger Chipmaterialien evaluiert. Zu diesem Zweck wird ein Mikrochipelektrophorese-System mit Anregung bei 420 nm vorgestellt. Die Detektion kleiner Aromaten ist sowohl in UVC-transparentem Quarz- wie auch in UVC-intransparentem Glas-Chips möglich. Im direkten Vergleich der Daten ist der Messuntergrund im Glas leicht erhöht. Sogar in UVB-intransparenten PMMA-Chips ist die Detektion potenziell möglich, allerdings wirkt der Chip wie ein Hochpassfilter, so dass Emissionslicht unterhalb von 360 nm durch das

Polymermaterial absorbiert wird. Von den Modellanalyten weist das Tryptophan die größte Emission im UVA-Bereich auf, daher wird Tryptophanlösung in PMMA detektiert.

Durch die Miniaturisierung leistungsstarker Laser bzw. die bessere Verfügbarkeit von LEDs im UVC-Bereich werden Detektoren für die native Fluoreszenzdetektion von Proteinen mehr Bedeutung erlangen. Die Implementierung zeitkorrelierter und wellenlängenselektiver Datenakquisitionstechniken würde die Signalidentifizierung in komplexen Realproben erleichtern und die Sensitivität durch Diskriminierung des Hintergrundes weiter steigern.

Im Bereich der **funktionalen Polymere** liefert diese Arbeit tiefere Einblicke zum Verständnis der Oberflächenhydrophilierung von Polyvinylacetat, welches sich an der Oberfläche in kovalent gebundenen Polyvinylalkohol konvertieren lässt. Da eine direkte Fertigung von Polyvinylalkohol-Chips bis heute nicht möglich war, sollten so die vorteilhaften Eigenschaften von Polyvinylalkohol-Oberflächen für die MCE genutzt werden. Die Eignung der hydrophilierten Chips liegt jedoch aufgrund schlechter physikalischer Eigenschaften des Materials deutlich hinter den Erwartungen.

Aus diesem Grund wird die softlithographische Strukturierung und Fertigung mikrofluidischer Chips in Schichtbauweise erprobt („Sandwich“-Chips). Dieses Verfahren ermöglicht erstmals die direkte Herstellung von Chips mit strukturierter Polyvinylalkohol-Schicht, welche thermisch immobilisiert werden kann. Vorteile dieser Sandwich-Chips sind gute Transmissionseigenschaften bis 250 nm sowie die effiziente Ableitung Joulescher Wärme im Vergleich zum Polymer-Vollmaterial.

Das direkte Herstellen hydrophiler Polymerchips für die Analyse biologischer Makromoleküle ist ein Novum, welches mit bestehender Infrastruktur in vielen Forschungslabors durchgeführt werden kann. Damit eignet es sich zum *rapid prototyping* und ist eine ökonomische Alternative zu nachträglich oberflächenmodifizierten Glas-Chips. Die Messung von Applikationen in diesen Bausteinen steht noch aus.

Die Substituierung von konventionellem Glas zu *fused silica* als Trägermaterial sollte die Detektion von Proteinen mittels nativer Fluoreszenzdetektion mit Anregung im tiefen UV in Sandwich-Chips ermöglichen.

6 Literatur

- ¹ Lion N, Rohner CT, Dayon L, Arnaud IL, Damoc E, Youhovski N, Wu ZY, Roussel C, Josserand J, Jensen H, Rossier JS, Girault HH (2003) *Electrophoresis* 24: 3533-3562
- ² Figeys D, Pinto D (2001) *Electrophoresis* 22: 208-216.
- ³ Bingaman S, Huxley VH, Rumbaut RE (2003) *Microcirculation* 10: 221-231
- ⁴ Hellmich W, Greif D, Pelargus C, Anselmetti D, Ros A (2006) *J. Chromatogr. A* 1130: 195-200
- ⁵ Zugel SA, Burke BJ, Regnier FE Lytle FE (2000) *Anal. Chem.* 72: 5731-5735.
- ⁶ Hayes JD, Malik A (1997) *J. Chromatogr. B* 695: 3-13
- ⁷ Hjerten S (1985) *J. Chromatogr.* 347: 191-198
- ⁸ Gilges M, Kleemiß H, Schomburg G (1994) *Anal. Chem.* 66: 2038-2046
- ⁹ Pérennès F (2006) *J. Microlith., Microfab., Microsyst.* 5: 011700-1 - 011700-6
- ¹⁰ Syrový I, Hodný Z (1991) *J. Chromatogr. – Biomed. Appl.* 569: 175-196
- ¹¹ Verheggen TPEM, Mikkers FEP, Everaerts FM (1977) *J. Chromatogr.* 132: 205-215
- ¹² Jorgenson JW, Lukacs KD (1981) *Anal. Chem.* 53: 1298-1302
- ¹³ Jorgenson JW, Lukacs KD (1983) *Science* 198, 222: 266-272
- ¹⁴ Manz A, Harrison DJ, Verpoorte EMJ, Fettingner JC, Paulus A, Ludi H, Widmer HM (1992) *J. Chromatogr.* 593: 253-258
- ¹⁵ Harrison DJ, Fluri K, Seiler K, Fan ZH, Effenhauser CS, Manz A (1993) *Science* 261: 895-897
- ¹⁶ Harrison DJ, Manz A, Fan ZH, Ludi H, Widmer HM (1992) *Anal. Chem.* 64: 1926-1932
- ¹⁷ Effenhauser CS, Manz A, Widmer HM (1993) *Anal. Chem.* 65: 2637-2642
- ¹⁸ Mogensen KB, Petersen NJ, Hubner J, Kutter JP (2001) *Electrophoresis* 22: 3930-3938
- ¹⁹ Bodor E, Kaniansky D, Masar M (2001) *J. Chromatogr.* 916: 31-40
- ²⁰ Bruin GJM, Chang JP, Kuhlman RH, Zegers K, Kraak JC (1989) *J. Chromatogr.* 471: 429-436
- ²¹ Smith RD, Udseth HR (1988) *Nature* 331: 639-640
- ²² Figeys D, Aebersold R (1998) *Anal. Chem.* 70: 3721-3727
- ²³ Nagl S, Schulze P, Ludwig M, Belder D (2009) *Electrophoresis* *accepted*
- ²⁴ Piehl N, Ludwig M, Belder D (2004) *Electrophoresis* 25: 3848-3852
- ²⁵ Götz S, Revermann T, Karst U (2007) *Lab Chip* 7: 93-97
- ²⁶ Whitesides GM (2006) *Nature* 442: 368-372
- ²⁷ Gao Y, Luo Y, Qin J, Lin B (2008) *Electrophoresis* 29: 1918-1923
- ²⁸ Liu CN, Torinello NM, Mathies RA (2006) 78: 5474-5479
- ²⁹ Ko YK, Maeng JH, Ahn Y, Hwang SY, Cho NG, Lee SH (2008) *Electrophoresis* 29: 3466-3476
- ³⁰ Adamson AW (1982) "Physical Chemistry on surfaces", Wiley, 4th Edition
- ³¹ Lambert WJ, Middleton DL (1990) *Anal. Chem.* 62: 1585-1587
- ³² Lindner H, Helliger W, Dirschlmaier A, Jaquemar M, Puschendorf B (1992) *Biochem. J.* 283: 467-471
- ³³ Jorgenson JW, Lukacs KD (1981) *Science* 222: 266-272
- ³⁴ Maa YF, Hyver KJ, Swedberg SA (1991) *HRC J. High. Res. Chrom.* 14: 65-67
- ³⁵ Gilges M, Husmann H, Kleemiß MH, Motsch SR, Schomburg G (1992) *HRC J. High. Res. Chrom.*

-
- 1992, 15: 452-457
- ³⁶ Smith JT, El Rassi Z (1992) HRC J. High. Res. Chrom. 15: 573-578
- ³⁷ Schmalzing D, Piggee CA, Foret F, Carrilho E, Karger BL (1993) J. Chromatogr. A 652: 149-159
- ³⁸ Belder D, Deege A, Husmann H, Kohler F, Ludwig M (2001) Electrophoresis 22: 3813-3818
- ³⁹ Lu HJ, Kang JW, Yang YT, Ou QY Chinese J. Anal. Chem. 27: 585-588
- ⁴⁰ Mischke P (2007) „Filmbildung“, Vincentz Verlag Hannover
- ⁴¹ Deutsches Institut für Normung e.V. (1998) DIN EN 828
- ⁴² Schultz J, Tsutsumi K, Donnet JB (1977) J. Colloid. Interface Sci. 59 (2): 272-276
- ⁴³ Schultz J, Tsutsumi K, Donnet JB (1977) J. Colloid. Interface Sci. 59 (2): 277-282
- ⁴⁴ Owens DK, Wendt RC (1969) J. Appl. Pol. Sci. 13: 1741-1747
- ⁴⁵ Wu S (1973) J. Adhesion 5: 39-55
- ⁴⁶ Zisman WA (1964) Adv. Chem. 43: 1-51
- ⁴⁷ Herschel JFW (1845) Phil. Trans. R. Soc. London 135: 143-145
- ⁴⁸ Udenfriend S (1995) Protein Sci. 4: 542-551
- ⁴⁹ Atkins PW (2001) „Physikalische Chemie“, Wiley-VCH, 3. Auflage
- ⁵⁰ Stokes GG, (1852) Phil. Trans. R. Soc. London 142: 463-562
- ⁵¹ Kasha M (1950) Disc. Faraday Soc. 9: 14-19
- ⁵² Göppert-Mayer M, Ann. Phys. (1931) 401: 273-294
- ⁵³ Kaiser W, Garret CGB (1961) Phys. Rev. Lett. 7: 229-231
- ⁵⁴ Walker E, Rentzepis PM (2008) Nature Photonics 2: 406-408
- ⁵⁵ Gug S, Charon S, Specht A, Alarcon K, Ogden D, Zietz JL, Haacke S, Bolze F, Nicoud JF, Goeldner M (2008) ChemBioChem 9: 1303-1307
- ⁵⁶ Weeksler S, Mikhailovsky A, Ford PC (2004) J. Am. Chem. Soc. 126: 13566-13567
- ⁵⁷ Furuta T, Wang SSH, Dantzker JL, Dore TM, Bybee WJ, Callaway EM, Denk W, Tsien RY (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1193-1200
- ⁵⁸ Xu C, Webb WW (1997) Topics in fluorescence spectroscopy, Plenum Press, New York, Volume 5: 471-540
- ⁵⁹ Fischer WG, Wachter EA, Lytle FE, Armas M, Seaton C (1998) Appl. Spectr. 52: 536-545
- ⁶⁰ Lakowicz JR (1999) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, “Principles of fluorescence spectroscopy”, 57-59
- ⁶¹ Overway KS, Lytle FE, Appl. Spec. 1998, 52, 928-932
- ⁶² Pawlicki M, Collins HA, Denning RG, Anderson HL (2009) Angew. Chem. Intern. Ed. 121: 3292-3316
- ⁶³ Denk W, Strickler J, Webb W, (1990) Science 248: 73-76
- ⁶⁴ Svoboda K, Helmchen F, Denk W, Tank TW (1999) Nature Neurosci. 2: 65-73
- ⁶⁵ Zipfel WR, Williams RM, Webb WW (2003) Nature Biotechnol. 21: 1369-1377
- ⁶⁶ Helmchen F, Denk W (2005) Nature Methods 2: 932-940
- ⁶⁷ Bewersdorf J, Hell SW (1998) J. Microsc. 191: 28-38
- ⁶⁸ Diaspro A, Annunziata S, Raimondo M, Robello M (1999) Microscop. Res. Tech. 45: 130-131
- ⁶⁹ König K, (2008) J. Biophotonics 1: 13-23
- ⁷⁰ Kuswandi B, Nuriman, Huskens J, Verboom W (2007) Anal. Chim. Acta 601: 141-155
- ⁷¹ Yamauchi M, Mawatari K, Hibara A, Tokeshi M, Kitamori T (2006) Anal. Chem. 78: 2646-2650

-
- ⁷² Tamaki E, Hibara A, Tokeshi M, Kitamori T (2004) *Lab Chip* 5: 129-131
- ⁷³ Lazar LM, Grym J, Foret F (2005) *Mass Spectrom. Rev.* 25: 573-594
- ⁷⁴ Wu YT, Chen YC (2005) *Anal. Chem.* 77: 2071-2077
- ⁷⁵ Foret F, Kusy P (2006) *Electrophoresis* 27: 4877-4887
- ⁷⁶ Klampfl CW (2006) *Electrophoresis* 27: 3-34
- ⁷⁷ Campa C, Coslovi A, Flamigni A, Rossi M (2006) *Electrophoresis* 27: 2027-2050
- ⁷⁸ Koster S, Verpoorte E (2007) *Lab Chip* 7: 1394-1412
- ⁷⁹ Matysik FM (2008) *Microchim. Acta* 160: 1-14
- ⁸⁰ Du Y, Wang EK (2007) *J. Sep. Sci.* 30: 875-890
- ⁸¹ Pumera M (2007) *Talanta* 74: 358-364
- ⁸² Kuban P, Hauser PC (2008) *Anal. Chem. Acta* 607: 15-29
- ⁸³ Krogmeier JR, Schaefer I, Seward G, Yantza GR, Larsona JW (2007) *Lab Chip* 7: 1767-1774
- ⁸⁴ Viskari PJ, Landers JP (2006) *Electrophoresis* 27: 1797-1810
- ⁸⁵ Yi CQ, Zhang Q, Li CW, Yang J, Zhao JL, Yang MS (2006) *Anal. Bioanal. Chem.* 384: 1259-1268
- ⁸⁶ Ertl P, Emrich CA, Singhal P, Mathies RA (2004) *Anal. Chem.* 76: 3749-3755
- ⁸⁷ Wang J (2002) *Talanta* 56: 223-231.
- ⁸⁸ Nyholm L (2005) *Analyst* 130: 599-605
- ⁸⁹ Crevillen AG, Pumera M, Gonzalez MC, Escarpa A (2009) *Lab Chip* 9: 345-353
- ⁹⁰ Jackson DJ, Naber JF, Roussel TJ, Crain MM, Walsh KM, Keynton RS, Baldwin RP (2003) *Anal. Chem.* 75: 3643-3649.
- ⁹¹ Wang J, Pumera M, Chatrathi MP, Escarpa A, Konrad R, Griebel A, Dorner W, Lowe H (2002) *Electrophoresis* 23: 596-601
- ⁹² Zemann AJ, Schnell E, Volgger D, Bonn GK (1998) *Anal. Chem.* 70: 563-567.
- ⁹³ Fracassi da Silva JA, do Lago CL (1998) *Anal. Chem.* 70: 4339-4343
- ⁹⁴ Zemann AJ, *Electrophoresis* (2003), 24: 2125-2137
- ⁹⁵ McWhorter S, Soper SA (2000) *J. Chromatogr. A* 883: 1-9
- ⁹⁶ Galloway M, Stryjewski W, Henry A, Ford SM, Llopis S, McCarley RL, Soper SA (2002) *Anal. Chem.* 74: 2407-2415
- ⁹⁷ Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) *Science* 246: 64-71
- ⁹⁸ Wilm MS, Mann M (1994) *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 136: 167-180
- ⁹⁹ Hoffmann P, Häusig U, Schulze P, Belder D (2007) *Angew. Chem. Intern. Ed.* 46: 4913-4916
- ¹⁰⁰ Xue QF, Foret F, Dunayevskiy YM, Zavracky PM, McGruer NE, Karger BL (1997) *Anal. Chem.* 69: 426-430
- ¹⁰¹ Ramsey RS, Ramsey JM (1997) *Anal. Chem.* 69: 1174-1178
- ¹⁰² Figeys D, Ning YB, Aebersold R (1997) *Anal. Chem.* 69: 3153-3160
- ¹⁰³ Deng YZ, Zhang NW, Henion J (2001) *Anal. Chem.* 73: 1432-1439
- ¹⁰⁴ Meng ZJ, Qi SZ, Soper SA, Limbach PA (2001) *Anal. Chem.* 73: 1286-1291
- ¹⁰⁵ Yang YN, Li C, Kameoka J, Lee KH, Craighead HG (2005) *Lab Chip* 5: 869-876
- ¹⁰⁶ Chan JH, Timperman AT, Qin D, Aebersold R (1999) *Anal. Chem.* 71: 4437-4444
- ¹⁰⁷ Tuomikoski S, Sikanen T, Ketola RA, Kostianen R, Kotiaho T, Franssila S (2005) *Electrophoresis* 26: 4691-

-
- ¹⁰⁸ Iannacone JM, Jakubowski JA, Bohn PW, Sweedler JV (2005) *Electrophoresis* 26: 4684-4690
- ¹⁰⁹ Yue GE, Roper MG, Jeffery ED, Easley CJ, Balchunas C, Landers JP, Ferrance JP (2005) *Lab Chip* 5: 619-627
- ¹¹⁰ Schilling M, Nigge W, Rudzinski A, Neyer A, Hergenröder R (2004) *Lab Chip* 4: 220-224
- ¹¹¹ Yin NF, Killeen K, Brennen R, Sobek D, Werlich M, van de Goor TV (2005) *Anal. Chem.* 77: 527-533
- ¹¹² Zhang B, Liu H, Karger BL, Foret F (1999) *Anal. Chem.* 71: 3258-3264
- ¹¹³ Kelly RT, Tang K, Irimia D, Toner M, Smith RD (2008) *Anal. Chem.* 80: 3824-3831
- ¹¹⁴ Gao J, Xu JD, Locascio LE, Lee CS (2001) *Anal. Chem.* 73: 2648-2655
- ¹¹⁵ Smith DR, Wood TD (2003) *Anal. Chem.* 75: 7015-7019
- ¹¹⁶ Trapp O, Pearce EW, Kimmel JR, Yoon OK, Zuleta IA, Zare RN (2005) *Electrophoresis* 26: 1358-1365
- ¹¹⁷ White TP, Wood TD (2003) *Anal. Chem.* 75: 3660-3665
- ¹¹⁸ Schwarz MA, Hauser PC (2001) *Lab Chip* 1: 1-6
- ¹¹⁹ Wakida S-I, Fujimoto K, Nagai H, Miyado T, Shibutani Y, Takeda S (2006) *J. Chromatogr. A* 1109: 179-182
- ¹²⁰ Ro KW, Lim K, Shim BC, Hahn JH (2005) *Anal. Chem.* 77: 5160-5166
- ¹²¹ Jinda R, Cramer SM (2004) *J Chromatogr. A* 1044: 277-285
- ¹²² Guihen E, Glennon JD (2005) *J. Chromatogr. A* 1071: 223-228
- ¹²³ Yamauchi M, Mawatari, K, Hibara A, Tokeshi M, Kitamori T (2006) *Anal. Chem.* 78: 2646-2650
- ¹²⁴ Tamaki E, Hibara A, Tokeshi M, Kitamori T (2004) *Lab Chip* 5: 129-131
- ¹²⁵ Hiki S, Mawatari K, Hibara A, Tokeshi M, Kitamori T (2006) *Anal. Chem.* 78: 2859-2863
- ¹²⁶ Kuijt J, Ariese F, Brinkman UAT, Gooijer C (2003) *Electrophoresis* 24: 1193-1199
- ¹²⁷ Liu B-F, Ozaki M, Utsumi Y, Hattori T, Terabe S (2003) *Anal. Chem.* 75: 36-41
- ¹²⁸ Su R, Lin J-M, Qu F, Chen Z, Gao Y, Yamada M (2004) *Anal. Chim. Acta* 508: 11-15
- ¹²⁹ Huang X, Ren J (2005) *Electrophoresis* 26: 3595-3601
- ¹³⁰ Götz S, Karst U (2007) *Sens. Actuators B* 123: 622-627
- ¹³¹ Varjo SJO, Ludwig M, Belder D, Riekkola ML (2004) *Electrophoresis* 25: 1901-1906
- ¹³² Gong M, Wehmeyer KR, Limbach PA, Arias F, Heineman WR (2006) *Anal. Chem.* 78: 3730-3737
- ¹³³ Giordano BC, Jin L, Couch AJ, Ferrance JP, Landers JP (2004) *Anal. Chem.* 76: 4705-4714
- ¹³⁴ Foote RS, Khandurina J, Jacobson SC, Ramsey JM (2005) *Anal. Chem.* 77: 57-63
- ¹³⁵ Guo Y, Uchiyama K, Nakagama T, Shimosaka T, Hobo T (2005) *Electrophoresis* 26: 1843-1848
- ¹³⁶ Yao B, Luo G, Wang L, Gao Y, Lei G, Ren K, Chen L, Wang Y, Hu Y, Qiu Y (2005) *Lab Chip* 5: 1041-1047
- ¹³⁷ Guo YL, Uchiyama K, Nakagama T, Shimosaka T, Hobo T (2005) *Electrophoresis* 26: 1843-1848
- ¹³⁸ Kamei T, Paegel BM, Scherer JR, Skelley AM, Street RA, Mathies RA (2003) *Anal. Chem.* 75: 5300-5305
- ¹³⁹ Kamei T, Paegel BM, Scherer JR, Skelley AM, Street RA, Mathies RA (2004) *J. Non-Cryst. Solids* 338-340: 715-719
- ¹⁴⁰ Pais A, Banerjee A, Klotzkin D, Papautsky I (2008) *Lab Chip* 8: 794-800
- ¹⁴¹ Li LQ, Davis LM (1993) *Rev. Sci. Instrum.* 64: 1524-1529
- ¹⁴² Buzhan P, Dolgoshein B, Ilyin A, Kantserov V, Kaplin V, Karakash A, Pleshko A, Popova E, Smirnov S, Volkov Y, Filatov L, Klemin S, Kayumov F (2002) *Adv. Tech. Particle Phys. Proc.*: 717-728
- ¹⁴³ Misiakos K, Petrou P, Kakabakos SE, Vlachopoulou M, Tserepi A, Gogolides E (2006) *Proc. SPIE*, Vol.

-
- ¹⁴⁴ Johnson ME, Landers JP (2004) *Electrophoresis* 25: 3513-3527
- ¹⁴⁵ Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962) *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-239
- ¹⁴⁶ Hermanson GT, *Bioconjugate Techniques*, Volume 1, Academic Press, San Diego and New York, 1996
- ¹⁴⁷ Mader H, Li X, Saleh S, Link M, Kele P, Wolfbeis OS (2008) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1130: 218-223
- ¹⁴⁸ Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H (2005) *Nature Materials* 4: 435-446
- ¹⁴⁹ Wetzl BK, Yarmoluk SM, Craig DB, Wolfbeis OS (2004) *Angew. Chemie Int. Ed.* 43: 5400-5402
- ¹⁵⁰ Browning Ch, Morgan GT, Robb JVM, Walls LP (1938) *J. Pathol. Bacteriol.* 46: 203-204
- ¹⁵¹ Dittrich PS, Manz A (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 1771-1782
- ¹⁵² Schulze P, Belder D (2009) *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 515-525
- ¹⁵³ Swaile DF, Sepaniak MJ (1991) *J. Liq. Chromatogr.* 14: 869-893
- ¹⁵⁴ Tan WH, Haydon PG, Yeung ES (1997) *Appl. Spect.* 51: 1139-1143
- ¹⁵⁵ Soetebeer UB, Schierenberg H, Schulz G, Grünefeld P, Andresen P, Blaschke G (2000) *J. Chromatogr.* 745: 271-278
- ¹⁵⁶ Soetebeer UB, Schierenberg H, Schulz G, Hempel G, Andresen P, Blaschke G (2001) *Anal. Chem.* 73: 2178-2182
- ¹⁵⁷ Parpura V, Tong W, Yeung ES, Haydon PG (1998) *J. Neurosci. Methods* 82: 151-158
- ¹⁵⁸ Kok SJ, Hoornweg GP, de Ridder T, Brinkman UAT, Velthorst NH, Gooijer, C (1998) *J. Chromatogr. A* 806: 355-360
- ¹⁵⁹ Kok SJ, Isberg ICK, Gooijer C, Brinkman UAT Velthorst NH (1998) *Anal. Chim. Acta* 360: 109-118
- ¹⁶⁰ Zhang X, Sweedler JV (2001) 73: 5620-5624
- ¹⁶¹ Lapainis T, Scanlan C, Rubakhin SS, Sweedler JV (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 97-105
- ¹⁶² Chan KC, Muschik GM, Issaq HJ (1995) *J. Chromatogr. A* 718: 203-210
- ¹⁶³ Saito M, Oka M, Kubota S (2000) *Optronics* 217: 94-98
- ¹⁶⁴ Schulze P, Ludwig M, Belder D (2005) *Anal. Chem* 77: 1325-1329
- ¹⁶⁵ Davies MJ, Truscott JW (2001) *J. Photochem. Photobiol.* 63: 114-125
- ¹⁶⁶ Caldwell CR (1993) *Plant Physiol.* 101: 947-953
- ¹⁶⁷ Hellmich W, Pelargus C, Leffhalm K, Ros A, Anselmetti D (2005) *Electrophoresis* 26: 3689-3696
- ¹⁶⁸ Greif D, Galla L, Ros A, Anselmetti D (2008) *J. Chrom. A* 1206: 83-88
- ¹⁶⁹ Okerberg E, Shear JB (2001) *Anal. Biochem.* 292: 311-313
- ¹⁷⁰ Chan C, Muschik GM, Issaq HJ (2000) *Electrophoresis* 21: 2062-2066
- ¹⁷¹ Craig DB, Wetzl BK, Duerkopp A, Wolfbeis OS (2005) *Electrophoresis* 26: 2208-2213
- ¹⁷² J.P. Linge, Diplomarbeit „Zeitaufgelöste UV/Vis-, FTIR- und ESR-spektroskopische Untersuchung der Faltung von Cytochrom C“, Bochum 1997, S. 7 ff.
- ¹⁷³ Lindner H, Helliger W, Sarg B, Meraner C (1995) *Electrophoresis* 16: 604-610
- ¹⁷⁴ Barron BC, Yu NT, Kuck JFR (1987) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 815-821
- ¹⁷⁵ Altria KD (1993) *J. Chromatogr.* 646: 245-257
- ¹⁷⁶ Revermann T, Götz S, Künemeyer J, Karst U (2008) *Analyst* 133: 167-174
- ¹⁷⁷ Tolba K, Belder D (2007) *Electrophoresis* 28: 2934-2941
- ¹⁷⁸ Revermann T, Götz S, Karst U (2007) *Electrophoresis* 28: 1154-1160

-
- ¹⁷⁹ Stachelberger H, Bancher E, Washuttl J, Riederer P, Gold A (1977) *Plant Foods Hum. Nutr.* 27: 287-291
- ¹⁸⁰ Liu YM, Gordon P, Green S, Sweedler JV (2000) *Anal. Chim. Acta* 420: 81-88
- ¹⁸¹ Melzig MF, Putscher I, Henklein P, Haber H (2000) *J. Ethnopharm.* 73: 153-159
- ¹⁸² Raynie DE (2006) *Anal. Chem.* 78: 3997-4003
- ¹⁸³ www.roempp.com; Stichwort „Banane“, 12.4.2009
- ¹⁸⁴ Grossmann PD, Colburn JC, Lauer HH (1989) *Anal. Chem.* 61: 1186-1194
- ¹⁸⁵ Liu J, Lee ML (2006) *Electrophoresis* 27: 3533-3546
- ¹⁸⁶ Dolnik V (2008) *Electrophoresis* 29: 143-156
- ¹⁸⁷ McClain MA, Culbertson CT, Jacobson SC, Allbritton NL, Sims CE, Ramsey JM (2003) *Anal. Chem.* 75: 5646-5655
- ¹⁸⁸ Belder D, Deege A, Kohler F, Ludwig M (2002) *Electrophoresis* 23: 3567-3573
- ¹⁸⁹ McCulloch JD, *J. Liq. Chromatogr.* (1993): 2025-2038
- ¹⁹⁰ Gryczynski I, Malak H, Lakowicz JR, (1996) *Biospectroscopy* 2: 9-15
- ¹⁹¹ Gryczynski I, Malak H, Lakowicz JR, Cheung HC, Robinson J, Umeda PK (1996) *Biophys. J.* 71: 3448-3453
- ¹⁹² Ou CF, Hsu MC (2007) *J. Polym. Res.* 14: 373-378
- ¹⁹³ Anolick C, Hrivnak JA, Wheland RC, (1998) *Adv. Mater.* 10, 1211-1214
- ¹⁹⁴ Obata K, Sugioka K, Shimazawa N, Midorikawa K (2006) *Appl. Phys. A* 84, 251-255
- ¹⁹⁵ McDonald JC, Whitesides GM, (2002) *Acc. Chem. Res.* 35: 491-499
- ¹⁹⁶ Becker H, Gärtner C (2000) *Electrophoresis* 21: 12-26
- ¹⁹⁷ Soper SA, Ford SM, Qi S, McCarley RL, Kelly K, Murphy MC (2000) *Anal. Chem.* 72: 642A-651A
- ¹⁹⁸ Dolnik V (2004) *Electrophoresis* 25: 3589-3601
- ¹⁹⁹ Roman GT, Hlaus T, Bass KJ, Seelhammer TG, Culbertson CT (2005) *Anal. Chem.* 77: 1414-1422
- ²⁰⁰ Shah JJ, Geist J, Locascio LE, Gaitan M, Rao MV, Vreeland WN (2006) *Electrophoresis* 27: 3788-3796
- ²⁰¹ Kim J, Chaudhury MK, Owen MJ, Orbeck T (2001) *J. Colloid Interface Sci.* 244: 200-207
- ²⁰² Thorslund S, Nikolajeff F (2007) *J. Micromech. Microeng.* 17: N16-N21
- ²⁰³ Xiao Y, Yu XD, Wang K, Xu JJ, Huang J, Chen HY (2007) *Talanta* 71: 2048-2055
- ²⁰⁴ Eddington DT, Puccinelli JP, Beebe DJ (2006) *Sens. Actuators B* 114: 170-172
- ²⁰⁵ Belder D, Ludwig M (2003) *Electrophoresis* 24: 3595-3606
- ²⁰⁶ Muck A, Svatos A (2007) *Talanta* 74: 333-341
- ²⁰⁷ Long S, Prakash TM, Shannon MA, Moore JS (2006) *Langmuir* 22: 4104-4109
- ²⁰⁸ Makamba H, Kim JH, Lim K, Park JN, Hahn JH (2003) *Electrophoresis* 24: 3607-3619
- ²⁰⁹ Bi H, Meng S, Li Y, Guo K, Chen YP, Kong JL, Yang PY, Zhong W, Liu BH (2006) *Lab Chip* 6: 769-775
- ²¹⁰ Mellors JS, Gorbounov V, Ramsey RS, Ramsey JM (2008) *Anal. Chem.* 80: 6881-6887
- ²¹¹ Rabel W (1971) *Farbe und Lack* 77: 997-1005
- ²¹² Bibinov N, Dudek D, Awakowicz P, Engemann J (2007) *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40: 7372-7378
- ²¹³ Cordes EH, Bull HG (1974) *Chem. Rev.* 74: 581-603
- ²¹⁴ Peterson NJ, Nikolajsen RPH, Mogensen KB, Kutter JP (2004) *Electrophoresis* 25: 253-269
- ²¹⁵ Mischke P (2007) *Filmbildung*, Vincentz Verlag: 100
- ²¹⁶ Mischke P (2007) *Filmbildung*, Vincentz Verlag: 41-43

-
- ²¹⁷ Saile V, Wallrabe U, Tabata O, Korvink JG (2009) *Advanced Micro & Nanosystems* 7, Wiley-VCH
- ²¹⁸ Gitlin L, Schulze P, Belder D (2009) *accepted*
- ²¹⁹ Pérennès F, Marmioli B, Matteucci M, Tormen M, Vaccari L, Di Fabrizio E (2006) *J. Micromech. Microeng.* 16: 473-479
- ²²⁰ Schaper CD (2003) *Nanolett.* 3, 1305-1309
- ²²¹ Lee JN, Park C, Whitesides GM (2003) *Anal. Chem.* 75, 6544-6554
- ²²² *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* (1989) J. Wiley & Sons, Vol. 17: 167-198
- ²²³ Kenney JF, Willcockson GW (1966) *J. Polymer Science A-I* ,4: 679-698.
- ²²⁴ Braun D, Walter E (1976) *Colloid & Polymer Sci.* 254: 396-399
- ²²⁵ Tsao CW, DeVoe DL (2009) *Microfluid. Nanofluid.* 6: 1-6
- ²²⁶ Mischke P (2007) *Filmbildung*, Vincentz Verlag: 45 ff.
- ²²⁷ Belder D, Deege A, Maass M, Ludwig M (2002) *Electrophoresis* 23: 2355-2361