

„Mikrofluidische Strukturen für biochemische Analysen“

Von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Physiker
Michael Schlüter
aus Marl, NRW

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. W. Mokwa
 Universitätsprofessor Dr.-Ing. J. Büchs

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Grundlagen	4
2.1	Grundlagen Immunoassay	4
2.2	Mikrofluidik	8
2.2.1	Vorteile der Mikrofluidik für biochemische Analysen	8
3	Zielsetzung	10
3.1	Anforderungen	10
3.2	Immunoassay zur Herzinfarktdiagnose	11
4	Funktionsgrundlagen	14
4.1	Der Flüssigkeitstransport	14
4.2	Dosierung	16
4.3	Auswertung	17
5	Fertigungsgrundlagen	20
5.1	Materialwahl	20
5.2	Fertigungsmethoden	21
5.2.1	Strukturierung von Glas	21
5.2.2	Prototyp Masken	23
5.2.3	Strukturierung von Kunststoffen	23
5.3	Verschließen der Kanäle	26
5.4	Oberflächenmodifizierung der Materialien	28
5.4.1	Wozu Oberflächenmodifizierung?	28
5.4.2	Modifizierungsverfahren	29
6	Entwicklung des Immunoassay-Chips	31
6.1	Mikrofluidische Reaktionskammern	31
6.1.1	Anbringen der Antikörper auf Adhäsionsfolien	32
6.1.2	Immunoassays in Glasstrukturen	34
6.1.3	Kunststoffstrukturen, Antikörper auf Nitrozellulosefolie	37
6.1.4	Auswertung durch Fluoreszenz	38
6.2	Entwicklung einer integrierbaren Pumpe	40
6.2.1	Aufbau	46
6.2.2	Die Ventile	48
6.2.3	Die Pumpe (dynamischer Messaufbau)	57
6.2.4	Förderrate / Frequenzverhalten	58
6.3	Optimierung der Pumpe durch Computersimulation	62
6.3.1	Simulation der Ventile	64
6.3.2	Optimierung der Ventile	71
6.3.3	Dynamische (transiente) Simulation der Pumpe	75
6.4	Ergebnisse der Pumpensimulation	77
6.5	Technologie zur Herstellung der Prototypen aus SU-8 Photoresist	80
6.6	Die optimierte Pumpe	82
6.7	Prozessführung auf dem Chip	84
6.7.1	Integration von Mikropumpe und Reaktionskammer	84
6.7.2	Automatische PC-Steuerung des Prozessablaufs	88
6.7.3	Integration von Flüssigkeitsreservoirs	91
6.8	Optimierung der Systemkomponenten durch Computersimulation	94
6.8.1	Simulation der Kanalkreuzung	94

6.8.2	Simulation der Reaktionskammern	97
6.9	Der optimierte SU-8 Chip	101
6.10	Fluoreszenzmessung auf dem Chip	104
6.10.1	Auswertung im LRE-Reader	105
6.10.2	Aufbau eines neuen Fluoreszenzdetektors.....	106
7	Der Prototyp (Funktionstests und Messergebnisse).....	110
7.1	PMMA Chip mit integrierten Pumpkammern.....	110
7.2	Messergebnisse des Immunoassaychips	111
8	Ausblick.....	114
8.1	Weitere Messaufgaben / Herstellung in Spritzguss	114
8.2	Aufbau eines Fluoreszenzdetektors, „On-Chip“-Detektion	114
8.3	Integration einer Kalibrationsmessung.....	114
8.4	Erweiterung auf andere Zielmoleküle	114
9	Zusammenfassung.....	115
10	Literaturverzeichnis.....	117
11	Abbildungsverzeichnis	123
12	Danksagung	127
13	Lebenslauf	128

1 Einleitung

Die Mikroelektronik hat in den letzten Jahrzehnten durch zunehmende Integration und Verkleinerung von elektronischen Systemen einen enormen Fortschritt erreicht. Dieser setzte sich in der Mikrosystemtechnik fort, die sich zunächst der Methoden der Mikroelektronik bediente, um Systeme mit weiterführenden Eigenschaften zu entwickeln. So wurden, insbesondere durch die aus der Mikroelektronik gut erforschte Siliziumtechnologie, mikroelektronische Systeme um integrierte Sensoren erweitert. Auf diese Weise konnte eine immer preisgünstigere Fertigung von Sensorsystemen in immer größeren Stückzahlen erreicht werden. Die moderne Automobiltechnik wäre ohne mikrosystemtechnische Sensoren nicht mehr denkbar. So wäre der Beschleunigungssensor, der den Airbag eines Autos auslöst, in klassischer mechanischer Bauweise deutlich teurer und weniger zuverlässig. Auch das elektronische Stabilitätsprogramm ESP hätte keinen Einzug in die automobilen Mittelklasse und in Kleinwagen gehalten, ohne preisgünstige, zuverlässige Drehratensensoren der Mikrosystemtechnik. Die Entwicklung der Mikrosystemtechnik beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Weiterführung der Methoden der Mikroelektronik. Durch die Entwicklung vieler neuer Herstellungsprozesse, wie z.B. Dicklackprozesse oder LIGA (**L**ithographie und **G**alvanische **A**bformung), wurden der Mikrosystemtechnik neue Möglichkeiten eröffnet. So werden beispielsweise in der chemischen Analyse und Synthese, wie auch in der medizinischen Diagnostik, immer mehr Systeme entwickelt, die die klassische Laboranalyse durch Integration der einzelnen Prozessschritte in mikrofluidische Systeme ersetzen und erweitern. Diese Systeme werden als Lab-chips, Lab-on-Chip oder μ TAS (**μ** icro-**T**otal-**A**nalysis-**S**ystems) bezeichnet. Durch eine Verkleinerung der Analysesysteme kann z.B. eine Vor-Ort-Anwendung realisiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollen die fluidischen Grundlagen für die Durchführung biochemischer Analysen am Beispiel eines Immunoassays in einem solchen μ TAS entwickelt werden. Bei einem Immunoassay handelt es sich um eine in der medizinischen Diagnostik häufig gebrauchte Nachweismethode für biologisch aktive Substanzen (Antigene / Antikörper). Die Arbeitsschritte, die in einem klassischen Labor zur Durchführung eines Immunoassays notwendig sind, sollen in dieser Arbeit durch die Entwicklung geeigneter mikrofluidischer Strukturen auf einen Fluidikchip integriert werden. Die einzelnen Komponenten des Chips sollen dabei die Funktionen der klassischen Laborgeräte übernehmen. So soll das klassische Reagenzglas durch eine mikrofluidische Reaktionskammer sowie die Pipette durch mikrofluidische Pumpsysteme ersetzt werden. Durch Integration dieser Komponenten mit Flüssigkeitsreservoirs und geeigneten Verbindungskanälen auf einen Chip soll eine automatisierte Durchführung eines Immunoassays auf einem Fluidikchip möglich werden. Bei der Entwicklung dieses Fluidikchips soll durch möglichst einfache Herstellung des Gesamtsystems die spätere Herstellung als Einwegprodukt ermöglicht werden. Eine abschließende Durchführung von Immunoassays mit verschiedenen Konzentrationen und Vergleich der Messergebnisse zu bestehenden Immunoassays soll die Funktionsweise dieses Fluidikchips sowie die Nachweisgenauigkeit aufzeigen.

2 Grundlagen

In der modernen Diagnostik übernehmen mikrofluidische Analysesysteme, sogenannte Labchips oder μ TAS (**m**icro-**T**otal-**A**nalys**S**ystems), immer öfter die Aufgaben von klassischen Laboranalysen. Dies liegt zum einen an der meist preisgünstigeren Durchführung solcher Analysen aufgrund von verringertem Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand, zum anderen an der oft geringeren Fehleranfälligkeit, da das Risiko von Querkontamination und Probenverwechslungen minimiert wird. Diese neuartigen Analyseverfahren stecken jedoch größtenteils noch in den Kinderschuhen. In der klassischen Laboranalyse lassen sich verschiedene Analysemethoden dadurch variieren, dass man die Analysegeräte, wie Pipetten, Reagenzgläser und ähnliches, anders zusammenstellt und verwendet. In der Mikrofluidik werden diese Arbeitsschritte auf einem Chip integriert, wodurch diese Flexibilität weitestgehend eingebüßt wird.

In der vorliegenden Arbeit soll ein mikrofluidischer Chip vorgestellt werden, der preiswert herzustellen ist und in dem sowohl die Pumpkammern mit Ventilen als auch alle anderen wesentlichen Komponenten und Chemikalien für die jeweilige Analyse enthalten und steril verschlossen sind. Dabei wird der Chip komponentenweise entwickelt und diese Einzelkomponenten dann zu einem Gesamtkonzept verknüpft, so dass eine Variation des Aufbaus ähnlich wie im klassischen Laborverfahren möglich ist. Durch diese Bauweise soll eine Verwendung des Immunoassaychips auch für andere Einsatzgebiete ermöglicht werden. Die Auswertung der Analyse sowie die Antriebe der Pumpen sollen auch extern wiederverwendbar aufgebaut werden können, da diese den komplexesten und teuersten Teil des Systems darstellen werden und deren Herstellung mit den vorgesehenen Fertigungsprozessen (Heißprägen, Spritzgießen, Laserbearbeiten, photolithographische Strukturierung) und Materialien (Kunststoffe und Glas) nicht durchzuführen ist. Um eine preiswerte Fertigung der mikrofluidischen Chips zu erreichen, ist ein mikrofluidischer Aufbau mit wenigen Ebenen (möglichst nur eine) vorgesehen, der eine Serienherstellung über möglichst viele Strukturierungsprozesse, wie Mikrospritzguss, Mikroheißprägen, Laserstrukturierung, präzisions-Fräsbearbeitung oder photolithographische Herstellung, in verschiedenen Materialien ermöglicht.

2.1 Grundlagen Immunoassay

Immunoassay ist eine aus dem Englischen (assay = Probe, Test) übernommene Sammelbezeichnung für verschiedenartige Nachweismethoden zur Bestimmung biologisch aktiver Substanzen. Der Immunoassay gehört zu den serologischen Nachweismethoden für bestimmte Stoffe (Antigene / Antikörper). [ROKE94] Serologische Methoden sind Antigen-Antikörper-Reaktionen, mit deren Hilfe sich Antigene über einen bekannten Antikörper bzw. Antikörper über ein bekanntes Antigen in-vitro nachweisen lassen. Diese serologischen Reaktionen sind also beidseitig anwendbar. Mit Hilfe eines bekannten Reaktionspartners wird der jeweils andere unbekannte Partner gesucht.

Die wichtigsten serologischen Methoden sind:

- Präzipitation
- Agglutination
- lytische Reaktion inkl. Komplementbindungsreaktion (KBR)
- Neutralisationsreaktion
- Markierungsmethoden: Immunofluoreszenz (IF)
 Radioimmunoassay (RIE)
 Enzymimmunoassay (EIA oder ELISA)

An dieser Stelle soll nur auf die Markierungsmethoden näher eingegangen werden. Für weitergehende Erläuterungen sei auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen (z.B. [PRNE97] [ROKE94] [PSCH02] [RÖMPP]).

Markierungsmethoden werden meist als sogenannte Solidphasentests konzipiert, d.h. Antigen oder Antikörper sind auf einem Träger (z.B. Objektträger, Plastikkugel, Mikrotiterplatte,...) fixiert. Die Suchkomponente, als **Konjugat**, **Marker** oder **Tracer** bezeichnet, besteht aus dem bekannten Antigen oder Antikörper, der markiert ist. Zur Markierung werden verwendet:

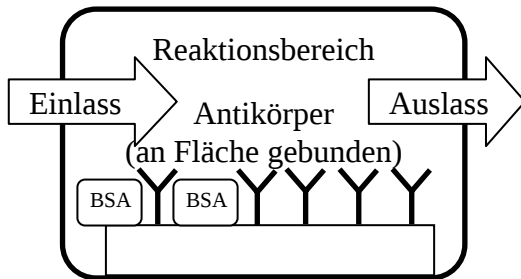
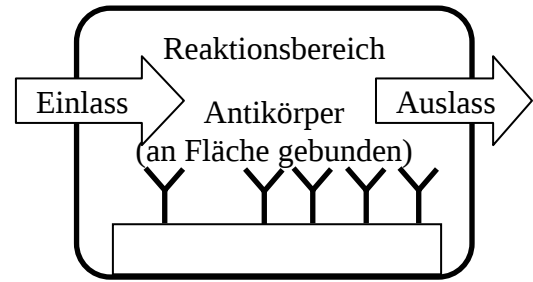
- Chemolumineszente Reaktionen
- Fluoreszierende Farbstoffe bei der Immunfluoreszenz (**IF**)
- Radioaktive Moleküle wie z.B. ^{125}I beim Radioimmunoassay (**RIA**)
- Enzyme beim Enzymimmunoassay (**EIA**) oder enzyme-linked immunosorbent assay (**ELISA**)
- Magnetische Partikel

Es gibt zahlreiche Varianten und Anwendungsmöglichkeiten der Markierungsmethoden, die sich im Wesentlichen von vier Grundtypen ableiten: direkter Test, indirekter Test, Sandwich-Methode und kompetitive Hemmung. Der Sandwichassay stellt die dieser Arbeit zugrunde liegende Form des Immunoassays dar. Am Beispiel dieses Assaytyps soll daher die Funktionsweise eines Immunoassays im Folgenden erklärt werden. Für die anderen Verfahren sei wiederum auf die Literatur verwiesen.

Durchführung (Prozessprotokoll)

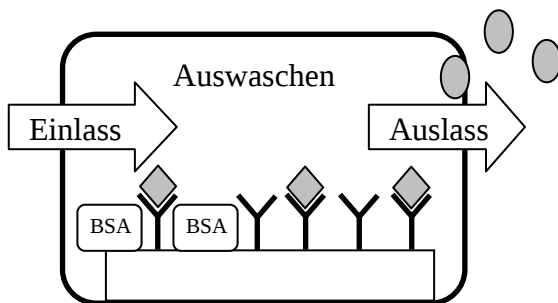
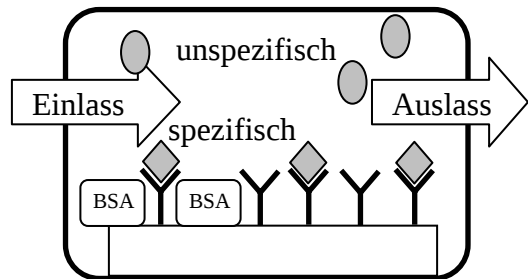
Immunoassay-Tests nach der Sandwichmethode beruhen darauf, dass ein spezifischer Antikörper (vergleichbar mit einem Schlüssel) mit dem Zielmolekül (dem dazu passenden Schloss) reagiert und die Anzahl der Zielmoleküle (Schlüssel-Schloss-Kombinationen), z.B. mit Hilfe eines Farbstoffs registriert wird.

In einem Reaktionsbereich (Reagenzglas, Titerplatte, Reaktionskammer,...) wird eine definierte Trägeroberfläche mit für die nachzuweisenden Antigene spezifischen Antikörpern beschichtet. Dies geschieht am einfachsten durch Adsorption an der Trägeroberfläche.



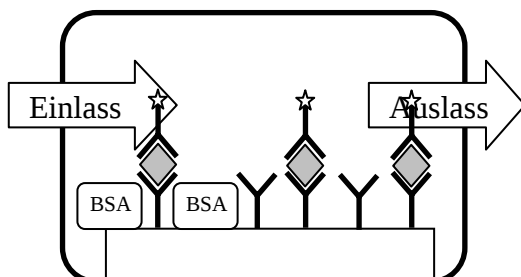
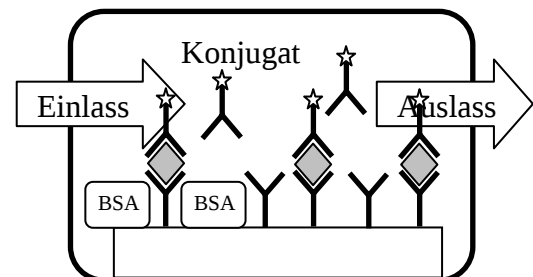
Um zu verhindern, dass auf der nicht mit Antikörpern belegten Trägeroberfläche Antigene unspezifisch binden, wird diese dort mit einem nicht interferierenden Protein (z.B. Albumin oder BSA) beschichtet.

Im nächsten Schritt wird die zu untersuchende Probe mit dem darin enthaltenen Zielmolekül (Antigen) über diese Fläche gespült. Dabei bindet das Zielmolekül spezifisch an die Antikörper. Abhängig von der Konzentration binden mehr oder weniger Antigene.



Ein Spülschritt (mit Pufferlösung) entfernt die nicht spezifisch gebundenen Stoffe (dieser Spülschritt kann auch bereits mit der im nächsten Schritt verwendeten Lösung erfolgen).

Eine Lösung markierter Antikörper (Konjugat) wird durch die Reaktionskammer gespült. Dabei bindet das Konjugat an die Antigene (Sandwich).



Es folgt ein letzter Waschschritt, in dem der ungebundene Rest des Konjugats entfernt wird.

Die Vorgehensweise bei der Durchführung einer quantitativen chemischen Analyse nach dem Prinzip dieses Immunoassays kann also grob aufgeteilt werden in:

- Vorbereitung des Immunoassays
 - o Adsorption der Antikörper an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes
 - o Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper
 - o Abdeckung der unspezifischen Bindungsstellen durch z.B. BSA
 - o Auswaschen des überschüssigen BSA
- Durchführung des Immunoassays
 - o Probenentnahme und Vorbereitung der Probe
 - o Quantifizierung der Probe (Dosierschritt)
 - o Vermischung der Probe mit einer oder mehrerer Reagenzien
 - o Reaktions- oder Inkubationszeit bei konstanter Temperatur
 - o Spülvorgang
 - o Zugabe von Konjugat
 - o Reaktions- oder Inkubationszeit bei konstanter Temperatur
 - o Spülvorgang
- Auswertung der Reaktion
 - o über Fluoreszenz
 - Bestrahlung mit Licht der Anregungswellenlänge
 - Auswertung des dabei emittierten Lichtes
 - o über Lumineszenz
 - Zugabe von Triggerlösungen
 - Auswertung der dabei emittierten Photonen mit Photomultiplier
 - o über andere Verfahren.....

Auswertung (Detektionsvarianten)

Die Markierung des zur quantitativen Auswertung des Immunoassays verwendeten Antikörpers erfolgt z.B. durch:

- Fluoreszenzmarker
 - o Im Fluoreszenzfarbstoff werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge Elektronenübergänge auf ein höheres Energieniveau induziert. Beim Rückfall dieser Elektronen über Zwischenniveaus in den Grundzustand wird Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. Die Intensität des emittierten Lichtes hängt bei festgelegter Anregungsintensität von der Anzahl der vorhandenen Fluoreszenzmoleküle ab und ist somit ein Maß für die Antikörperkonzentration im Immunoassay.
- radioaktive Substanzen
 - o Beim sogenannten Radioimmunoassay wird eine radioaktive Substanz, wie z.B. ^{125}I , an den Antikörper gebunden. Über die Aktivität der an das

Trägermaterial gebundenen Antikörpermoleküle lässt sich somit deren Anzahl bestimmen.

- lumineszente Marker
 - o Bei lumineszent markierten Antikörpern besteht der Tracer aus einer Substanz, die bei Auslösung (Triggerung des Tracers) Licht freisetzt. Diese Auslösung kann beispielsweise durch Reaktion mit anderen Chemikalien erreicht werden (Chemolumineszenz). Es gibt jedoch auch andere Mechanismen, wie z.B. Elektrolumineszenz, wo das Aussenden von Licht durch Anlegen eines elektrischen Feldes geschieht. Die Anzahl der ausgesandten Photonen kann mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt werden und ist proportional zur Anzahl der gebundenen Tracermoleküle.

2.2 Mikrofluidik

Die Mikrofluidik als Teilbereich der Mikrosystemtechnik befasst sich mit der Physik von Flüssigkeits- und Gastransport in mikrotechnisch gefertigten Strukturen. Durch die dabei auftretenden Dimensionen im Mikrometerbereich bietet die Mikrofluidik wie auch die Mikrosystemtechnik eine Reihe von physikalischen Vorteilen.

2.2.1 Vorteile der Mikrofluidik für biochemische Analysen

Einer der offensichtlichsten Vorteile der Mikrofluidik ist, dass sich durch die im Vergleich zu klassischen Methoden stark reduzierten Dimensionen auch der Verbrauch an Reagenzien oft um mehrere Größenordnungen [SSHB99] reduzieren lässt. Jedoch bietet die Mikrofluidik noch eine ganze Menge weiterer Vorteile. Bei einer Verkleinerung der Strukturen nimmt das Volumen kubisch, die Oberfläche jedoch nur quadratisch mit der Strukturgröße ab. Durch die daraus resultierende im Verhältnis zum Volumen stark vergrößerte Oberfläche und durch die kurzen Weglängen ergeben sich eine Reihe von Konsequenzen:

In Mikrostrukturen stellt sich sehr schnell thermisches Gleichgewicht ein. Dadurch lässt sich die Temperatur einer Reaktion optimal kontrollieren, da Wärme sehr gut zu- oder abgeführt werden kann.

Aufgrund der kurzen Wege ist ein schneller Konzentrationsausgleich durch Diffusion möglich, was wiederum zu kürzeren Analysezeiten führt.

Oberflächeneffekte, wie z.B. die Adhäsion, werden im Gegensatz zu Volumeneffekten dominanter. Ein Beispiel ist die Kapillarkraft, die in kleinen Kanälen die Gewichtskraft einer Flüssigkeitssäule übersteigt und somit Flüssigkeiten in einen Kanal hineinziehen kann.

Schnell: Zu den physikalischen Vorteilen der Mikrofluidik kommen weitere Vorteile bei deren Anwendung. Da die mikrofluidischen Systeme sehr viel kleiner sind als die

klassischen Systeme, lassen sich vor Ort Anwendungen realisieren. Im klassischen Fall müssen zu untersuchende Proben oft in Labors gebracht und dort analysiert werden. Durch den Transport entstehen dabei nicht nur Kosten und Wartezeiten, sondern auch Risiken von Kontamination, Verlust oder Verwechslung der Proben. Aus Analysen in mikrofluidischen Systemen am Ort der Probennahme resultieren eine verkürzte Wartezeit auf das Ergebnis, ein geringerer logistischer Aufwand und durch eine Integration aller Arbeitsschritte in ein Gerät oft eine einfachere und fehlerreduzierte Durchführung der Analysen.

Kosteneffektiv: Durch die oben genannte Reduktion an Reagenzien, welche für bestimmte Analysen sehr teuer sein können, und durch die Verringerung des logistischen und personellen Aufwands ist oft eine Kostenreduzierung zu erzielen. Aber auch durch eine kostengünstige Fertigung der einzelnen Chips als Einwegprodukte können Reinigungskosten, die bei einer Mehrfachverwendung von Analysegeräten entstehen, reduziert werden.

Einweg: Durch diese Konzeption von mikrofluidischen Systemen als Einwegprodukte ergeben sich weitere Vorteile. Die Systeme lassen sich steril fertigen und verpacken, so dass sich beim Einsatz keine Kontaminationen oder Memoryeffekte aus vorherigen Einsätzen ergeben.

Alle Chemie enthalten: Durch die kleinen Chemikalienmengen, welche benötigt werden, ist es möglich, die Reagenzien direkt in einem Einwegchip zu integrieren. Dies vermindert wiederum die Möglichkeiten zur Querkontamination und erleichtert das Handling weiter.

Da keine größeren Mengen Chemikalien gelagert werden müssen, reduziert sich die Gefahr und die Kosten, die von diesen Chemikalien ausgehen können. Bei Überlagerung der Chemikalien müssen auch keine größeren Mengen entsorgt werden, sondern nur die einzelnen überalterten Chips.

3 Zielsetzung

3.1 Anforderungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Basistechnologien für eine mikrofluidische Durchführung biochemischer Analysen am Beispiel eines Immunoassays bereitgestellt werden. Die Anforderungen, die an einen solchen Chip zu stellen sind, sollen im Folgenden umrissen werden.

Vielseitig: Der Grundbaustein für den mikrofluidischen Immunoassay soll ein mikrofluidischer Chip sein, der alle für die Durchführung eines Immunoassays notwendigen Komponenten enthält. Durch eine Variation des Chipdesigns und eine eventuelle Umorganisation der Einzelkomponenten soll eine Herstellung von Chips für unterschiedliche Anwendungsgebiete möglich sein. Auf dem Chip sollen auch mehrere Immunoassays parallel durchgeführt werden können. Durch Verwendung anderer Antikörper („Software“) sollen im gleichen Chipdesign („Hardware“) andere Nachweise ermöglicht werden.

Schnell: Durch die Verkleinerung und Integration aller nötigen Arbeitsschritte auf einen Chip sollen die Analysezeiten im Vergleich zu einem herkömmlichen Immunoassay verkürzt werden.

Vor Ort Assay: Mit Hilfe eines mikrofluidischen Systems soll es möglich sein, Immunoassays vor Ort, z.B. beim Patienten, im Krankenwagen oder im Operationssaal durchzuführen.

Preiswerter Einwegchip + Auswertegerät: Die Plattform soll aus einem kostengünstigen Einwegchip bestehen. Auf diesem soll in Kombination mit einem tragbaren Auswertegerät ein Immunoassay durchgeführt werden können. Der Einwegchip muss dabei alle zur Analyse benötigten Chemikalien enthalten. Das Auswertegerät soll die Steuerung des Labchips sowie die Auswertung der Reaktion beinhalten. Die Kosten für einen Immunoassay sollen mit denen eines Labor-Immunoassays konkurrieren können.

Einfach zu bedienen („goofproof“): Das Auswertegerät soll zusammen mit dem Einwegchip so leicht zu bedienen sein, dass es ohne große Vorkenntnisse, z.B. von der Besatzung eines Krankenwagens oder vom Patienten selbst, bedient werden kann.

Einfache Fertigungsmethoden: Bei der Konstruktion des Chips ist bereits eine kostengünstige Produktionsmethode für die Serienfertigung im Auge zu behalten. Dies bedeutet insbesondere, dass es keine zu komplexen Funktionselemente, wie aktiv

gesteuerte Pumpen, enthalten soll und mit serientauglichen Produktionsmethoden herstellbar ist.

Auswertegerät soll Antriebe enthalten: Bei Einsatz von Pumpen sollten auf dem Chip nur simple Strukturen zum Einsatz kommen. Werden komplexere Strukturen, wie Piezoantriebe benötigt, so sollten sich diese in das Auswertegerät integrieren lassen.

Chemikalien im Chip um Querkontamination zu vermeiden: Die für die Durchführung des Immunoassays benötigten Chemikalien sollten komplett auf dem Chip enthalten sein, um Querkontamination bei verschiedenen Proben zu vermeiden und einen geringen Wartungsaufwand des Auswertegerätes zu ermöglichen.

3.2 Immunoassay zur Herzinfarktdiagnose

Die Entwicklung der mikrofluidischen Strukturen soll am Beispiel eines sogenannten Cardiacmarkers erfolgen. Ein Cardiacmarker weist durch eine Quantifizierung bestimmter Faktoren im Blut einen Herzinfarkt (Myokardinfarkt) nach. Einer dieser Faktoren ist das **C-reaktive Protein (CRP)**. [INT2] CRP ist ein Eiweiß (Protein), das in der Leber gebildet wird und einen Entzündungsparameter darstellt. CRP reagiert bei Entzündungen infektiöser und nichtinfektiöser Art, und zwar schneller und deutlicher (innerhalb weniger Stunden) als andere Parameter (verstärkt bis 2000-fach!). Deswegen gehört das CRP auch zu den sogenannten Akute-Phase-Proteinen. Da die Halbwertszeit mit 24 Stunden relativ kurz ist, machen sich Veränderungen im entzündlichen Geschehen direkt in der CRP-Konzentration bemerkbar. Neue Studien haben gezeigt, dass ein erhöhtes CRP neben hohen Blutcholesterinwerten oder Rauchen auch ein Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose ist. In den meisten Fällen ist die Arteriosklerose Ursache von Herzinfarkt, Schlaganfall oder peripherer, arterieller Verschlusskrankheit.

Nicht infarktbedingte Konzentrationserhöhungen des CRP-Wertes können bei Meningitis, Lungenentzündung, Pyelonephritis, akute Bronchitis, Tuberkulose, Sepsis und akuter Pankreatitis, postoperativen Komplikationen, rheumatischen Erkrankungen, Tumoren und Arteriosklerose auftreten.

[INT4] Gemäß Physicians' Health Study ist das Risiko für Herzinfarkt abhängig von der basalen CRP-Konzentration:

CRP: <0,56 mg/l	relatives Risiko:	1,0 (1,0)
CRP: 0,56 - 1,14 mg/l	relatives Risiko:	1,7 (1,7)
CRP: 1,15 – 2,10 mg/l	relatives Risiko:	2,6 (1,9)
CRP: >2,10 mg/l	relatives Risiko:	2,9 (1,9)

Durch eine genaue Bestimmung und Beobachtung des CRP-Spiegels im Blut kann also eine Risikoabschätzung für einen Herzinfarkt erfolgen. Für die Diagnose eines bereits eingetretenen Herzinfarktes ist CRP ein wichtiger Marker, da bei einem Herzinfarkt der CRP Wert bis auf das 1000-fache ansteigen kann und so gut nachzuweisen ist. Jedoch

müssen die zahlreichen anderen Umstände, unter denen eine Erhöhung des CRP-Spiegels eintritt, ausgeschlossen werden. Dies kann geschehen über eine Kombination des CRP-Nachweises mit anderen Nachweisen, wie z.B. der Creatinkinase (CK), dem Myoglobin oder dem cardialen Troponin. Die **Creatinkinase (CK)** [INT8] ist ein Leitenzym für die Diagnose von Schädigungen der Herz- und Skelettmuskulatur. Dabei kann von der Höhe des CK-Anstiegs auf die Größe der Schädigung geschlossen werden. Die Gesamt-CK im Blutserum ist die Summe von vier Untertypen:

- CK-MB (Myokardtyp = Herzmuskeltyp)
- CK-MM (Skelettmuskeltyp)
- CK-BB (Hirntyp)
- CK-MiMi (Mitochondrientyp).

Entscheidend für die Diagnose eines Herzinfarkts oder einer Herzmuskelentzündung bei einer Erhöhung der Gesamt-CK ist die Bestimmung des Untertyps CK-MB. Liegt der Anteil der CK-MB an der Gesamt-CK zwischen sechs und 20 Prozent, spricht das für eine Enzymfreisetzung aus der Herzmuskulatur. Ein Anteil unter sechs Prozent spricht für eine Enzymfreisetzung aus der Skelettmuskulatur. Ein Anteil der CK-MB von über 20 Prozent findet sich bei Störungen durch die anderen Enzym-Untertypen. Der Gesamt-CK-Wert steigt bei einem Herzinfarkt nach vier bis sechs Stunden an und erreicht nach 16 bis 36 Stunden seinen höchsten Wert. Der CK-MB-Wert steigt ebenfalls nach ca. vier Stunden an, erreicht sein Maximum jedoch bereits nach zwölf bis 18 Stunden.

Nicht infarktbedingte Konzentrationserhöhungen der Creatinkinase können bei Herzmuskelentzündung (Myokarditis), intramuskulären Spritzen, Operationen, Unfällen, körperlicher Anstrengung, epileptischen Anfällen, arteriellen Gefäßverschlüssen, Muskelerkrankungen, Vergiftungen, zu niedrigem Serumkaliumspiegel (Hypokaliämie), erhöhter Körpertemperatur (Hyperthermie), Tumorerkrankungen, Schilddrüsenerkrankungen, Schlafmittelvergiftung, Meningitis, Enzephalitis, spezieller Medikamenteneinnahme (z.B.: Lithium) auftreten.

Auch das **cardiale Troponin T** sowie das **cardiale Troponin I** [INT5] sind typisch für die Muskulatur des Herzens. Kommt es, zum Beispiel auf Grund einer mangelnden Durchblutung des Herzmuskels, zu einer Unterversorgung der Muskulatur mit Sauerstoff, stirbt ein Teil des Herzmuskelgewebes ab. Es kommt zu einem Herzinfarkt. Aus diesem abgestorbenen Gewebe entweichen die darin enthaltenen Eiweiße und gelangen in die Blutbahn, darunter auch das cardiale Troponin T und das cardiale Troponin I. In einer Blutprobe können nun beide bereits kurz nach einem Herzinfarkt nachgewiesen werden. Ab dem dritten bis vierten Tag nach dem Ereignis ist es auch möglich, Rückschlüsse auf die ungefähre Größe des Herzinfarkts zu treffen. Cardiales Troponin T und cardiales Troponin I kommen bei einem gesunden Menschen im Blut nicht vor! Allerdings können Werte bis 0,1 µg/l (bei T) und 0,1-0,2 µg/l (bei I) messtechnisch bedingt gefunden werden. Die Konzentration des cardialen Troponin T und des cardialen Troponin I sind schon bei kleinsten Schäden des Herzmuskels erhöht. Die Bestimmung dieser Konzentration liefert einen sehr aussagekräftigen Wert bei der Beurteilung von Schäden des Herzmuskels. Bei

Nachweis der Werte im Blut kann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Schädigung des Herzmuskels geschlossen werden.

Ein weiterer Faktor für die Diagnose eines Herzinfarktes ist der rote Muskelfarbstoff **Myoglobin**. [INT3] Myoglobin kommt vorwiegend in der quergestreiften Muskulatur (Skelett- und Herzmuskulatur) vor. Bei Herzmuskelschädigungen, wie bei einem akuten Herzinfarkt, wird Myoglobin aus zerstörten Herzmuskelzellen freigesetzt. Normalwerte liegen bei Frauen zwischen ca. 7-64 ng/ml Blut und bei Männern bei ca. 16-76 ng/ml Blut [INT8]. Typische Nachweisbereiche eines Cardiomarkers mit Myoglobin (z.B. der Firma Roche [INT8]) liegen in der Größenordnung 30-700 ng/ml. Ein Anstieg der Myoglobinkonzentration im Blut ist in der Regel 2-4 Stunden nach Schmerzbeginn und damit früher als andere Herzmarker, wie CK, CK-MB oder Troponin, festzustellen. Die Myoglobinkonzentration erreicht den Maximalwert zwischen 4 und 12 Stunden nach dem Infarkt und fällt danach relativ rasch wieder auf Normalniveau ab (biologische Halbwertszeit ca. 15 Minuten). Nicht infarktbedingte Konzentrationserhöhungen von Myoglobin können nach Muskeltrauma, Crush-Syndrom, Myopathie, Muskelüberbeanspruchung und -streß, Schockzustand, Rhabdomyolyse oder durch verminderte Elimination bei Niereninsuffizienz auftreten.

4 Funktionsgrundlagen

4.1 Der Flüssigkeitstransport

In dem zu entwickelnden Immunoassay-Chip, wie auch in mikrofluidischen Systemen im Allgemeinen, spielt bei Transport und Dosierung, Reinigung und Vermischung von Chemikalien und Reagenzien eine geeignete Wahl der Transportmechanismen für diese Flüssigkeiten eine entscheidende Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Transportmechanismen untersucht und bezüglich ihrer Eignung für dieses Projekt bewertet. Die grundlegenden Mechanismen, die für den zu entwickelnden Immunoassaychip in Frage kommen, werden im Folgenden vorgestellt.

Pumpe: Der Flüssigkeitstransport über eine im Labchip integrierte Pumpe ist eine Möglichkeit, Flüssigkeiten kontrolliert in den Kanälen zu bewegen. Bedingt durch das vorgesehene Einsatzgebiet in planar aufgebauten, kostengünstig zu fertigenden Mikroanalysegeräten ergeben sich bestimmte Anforderungen an die Pumpen: Sie sollten mit planar aufgebauten Fertigungsprozessen, wie nasschemischer Strukturierung, Photolithografie, Heißprägen, Spritzguss, kompatibel sein. Sie müssen möglichst einfach und kostengünstig zu fertigen sowie einfach in der Handhabung sein. Dies bedeutet unter anderem, dass die Strukturen so beschaffen sind, dass eine Vermeidung von Luftblasen im System vereinfacht wird. Es sollen verschiedene Fertigungsprozesse für unterschiedliche Materialien bereitgestellt werden. Die Pumpen müssen an die Anforderungen der entsprechenden Medien und Pumpcharakteristiken (Druck, Durchfluss, Partikeltoleranz) angepasst sein. Eine in dieser Form geeignete Pumpe spielt für die Konzeption mikrofluidischer Systeme eine entscheidende Schlüsselrolle.

Elektroosmose: Der Flüssigkeitstransport durch den Elektroosmotischen Fluss (EOF) gehört zu den elektrohydrodynamischen Pumpprinzipien. In Glas- oder Siliziumkanälen sind die Silanol-Gruppen an der Oberfläche der Kapillarinnenseite aufgrund ihrer Dissoziation (teilweise Deprotonierungen schon bei pH-Werten über 2,5) negativ geladen. Daher können sich die als Gegenionen fungierenden Puffermoleküle anlagern und somit eine Doppelschicht erzeugen, die wie ein Schlauch diese Zonen umhüllt. Im elektrischen Feld wandert dieser "Schlauch", durch die positive Ladung der Gegenionen in Richtung Kathode. Dieser "Schlauch" zieht die im Kanal weiter innen befindlichen Flüssigkeitsteilchen durch Kohäsionskräfte mit sich. Ein Vorteil dieses Transportmechanismus liegt in der geringeren Bandenverbreiterung als es bei hydrodynamischen Flüssen der Fall ist, denn es bildet sich durch die Elektroosmose ein flaches Strömungsprofil aus. Entscheidend für den elektroosmotischen Fluss sind die Konzentration des Elektrolyten und dessen pH-Wert. Steigt die Konzentration, so sinkt der EOF, steigt jedoch der pH (mehr Oberflächen-Silanolgruppen sind dissoziiert), erhöht er sich. Die Abhängigkeit der Mobilität vom pH ähnelt dabei einem Hystereseverhalten. Mit

steigendem pH vergrößert sich die Mobilität, sinkt jedoch bei fallendem pH nicht in gleicher Weise ab. Das kann zu Problemen bezüglich der Reproduzierbarkeit führen. Zusätzlich wird die Elektroosmose von der Elektrophorese überlagert. Dabei gilt für die kationischen Bestandteile eine in jedem Falle erhöhte Geschwindigkeit in Richtung der Kathode, für die neutralen Moleküle, dass überhaupt eine gerichtete Bewegung erfolgt, und für die negativen Substanzen, je nach Stärke der elektrophoretischen Bewegung, eine Bewegung in Richtung Anode oder Kathode. In den meisten Fällen jedoch wird der elektroosmotische Fluss die Richtung bestimmen. Ein weiteres Problem der Elektroosmose ist die Joule-Erwärmung und die daraus resultierende Bandenverbreiterung und im Extremfall auch Blasenbildung durch Aufkochen der Flüssigkeiten.

Statischer Druck: Eine der einfachsten Möglichkeiten, Flüssigkeiten durch ein Kanalsystem zu transportieren, ist, sie mit einem statischen Druck von außen durch die Kanäle zu pressen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass durch den Kontakt zur Außenwelt die Flüssigkeiten nicht kontaminiert werden und auch beim Transport nicht aus dem Chip auslaufen dürfen. Eine Möglichkeit, dies zu realisieren, ist, einen Druck auf eine Membran auszuüben, die mit einem im Chip integrierten Flüssigkeitsreservoir verbunden ist. Eine solche Membran muss jedoch so konstruiert sein, dass sie bei Lagerung und Transport des befüllten Chips nicht gedrückt werden kann und eine unkontrollierte Bewegung der Flüssigkeiten verhindert wird. Des Weiteren darf die in dem Membranreservoir enthaltene Flüssigkeit weder durch Beschleunigungskräfte (Fallenlassen des Chips) noch durch Luftdruckschwankungen unbeabsichtigt transportiert werden. Alternativ kann der Druck auch auf einen in den Chip integrierten Kolben erfolgen, der die Flüssigkeit dann durch die Kanalstrukturen presst. Die Realisierung eines solchen Transportmechanismus wird in Patent DE10057895A [ICB 02] beschrieben. Ein Flüssigkeitstransport durch integrierte (Spritzen-) Kolben sowie die Integration von bewegten Einzelteilen im Allgemeinen bedeutet jedoch in der Regel einen zusätzlichen Herstellungsaufwand und damit verbundene Kosten. Der auf den ersten Blick sehr einfach zu realisierende Flüssigkeitstransport durch den Druck auf eine Membran oder einen (Spritzen-)Kolben ist daher als technologisch problematisch einzuschätzen.

Kapillar: Ein weiterer Mechanismus, der Flüssigkeiten durch Kanäle befördern kann, ist die Kapillarkraft. Diese Kraft ist abhängig vom Durchmesser des Kanals, von der verwendeten Flüssigkeit und der Benetzbarkeit der Kanaloberfläche. Bei Verwendung von Wasser wird durch eine hydrophile Oberfläche ein Sog in den Kanal und bei einer hydrophoben Oberfläche ein Druck aus dem Kanal ausgeübt. Die Affinität der Oberfläche ist vom Material, von der verwendeten Flüssigkeit und von der Vorbehandlung abhängig. Dieser Pumpmechanismus ist jedoch nur einmal in einer Richtung anwendbar. Wenn die Kanäle erst einmal befüllt (hydrophiler Fall) oder entleert (hydrophober Fall) sind, kommt die Bewegung der Flüssigkeit zum Stillstand. Für einen Prozessablauf, bei dem

verschiedene Flüssigkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten befördert werden sollen, ist die Kontrolle des Transportes ausschließlich über die Kapillarität der Flüssigkeiten schlecht zu realisieren. Die Stärke der Kapillarkraft ist stark von der verwendeten Flüssigkeit abhängig und kann sich bereits bei einer Zugabe von kleinen Mengen bestimmter Stoffe (z.B. Tenside) dramatisch ändern. Der Vorteil dieses Transportmechanismus ist allerdings der simple Aufbau ohne bewegte Teile oder sonstige Funktionselemente. Die Kapillarkraft kann allerdings gezielt eingesetzt werden, um Flüssigkeiten in bestimmten Kanalbereichen festzuhalten.

Zentrifugalkraft: Eine elegante Möglichkeit, Kräfte auf eine in einem Chip befindliche Flüssigkeit auszuüben, ohne bewegte Strukturen in den Chip zu integrieren, ist, den Chip in eine Zentrifuge zu bringen und die Flüssigkeiten durch die Zentrifugalkraft zu steuern. Dabei ist die auf das Flüssigkeitsvolumen wirkende Zentrifugalkraft $F_z = m \cdot \omega^2 \cdot r$ von der Umdrehungsgeschwindigkeit ω der Zentrifuge und dem Abstand r des Flüssigkeitsvolumens von der Drehachse abhängig. Auf diese Weise kann durch eine



Abbildung 4-1: Flüssigkeitssteuerung durch Zentrifugalkraft (Lab on a CD) [INT1]

geschickte Wahl des Kanallayouts die Flüssigkeitssteuerung in einem Mikrokanalsystem durch die Drehzahlsteuerung einer Zentrifuge kontrolliert werden. Ein solcher Ansatz zum Aufbau eines Immunoassays, Lab on a CD genannt, wird beispielsweise in [INT1] gezeigt. Der Aufbau einer solchen Flüssigkeitssteuerung ist in Abbildung 4-1 zu erkennen. Der Nachteil bei dieser Art der Flüssigkeitssteuerung ist, dass man für eine gute Reproduzierbarkeit der Kräfte einen

relativ großen Radius benötigt. Daher wird ein solches System nur mit hohem Aufwand auf eine Größe, kleiner als eine herkömmliche Compact Disc, zu verkleinern sein. Da sich der gesamte Chip dreht, muss nach der Durchführung der Prozessschritte die Reaktionskammer wieder exakt zum Auswertegerät ausgerichtet werden.

4.2 Dosierung

Die Dosierung der Flüssigkeiten, insbesondere die der Probe, erfordert eine möglichst hohe Präzision, da die Genauigkeit der Probendosierung direkt in die Genauigkeit des Immunoassays eingeht. Bei einer konstanten Strömung im Kanal bietet sich eine Dosierung der Flüssigkeiten über die Zeit an. Dabei stellt das Dosiersystem nach der allgemeinen Definition eine bestimmte Flüssigkeitsmenge (Dosierate V_F) über die Zeit bereit, wobei der momentane Durchfluss $Q_V(t)$ als Dosierate bezeichnet wird [FRAN98]. Hierbei würden sich jedoch Unterschiede in der Strömungsgeschwindigkeit, verursacht

z.B. von Schwankungen in der Viskosität der verwendeten Flüssigkeiten (z.B. durch Temperaturänderungen), direkt als Fehler in der Dosierung auswirken. Viskositätsschwankungen durch Temperaturänderungen lassen sich evtl. durch eine gute Temperierung des Aufbaus reduzieren. Unterschiede in der Viskosität der verwendeten (Blut-) Proben lassen sich jedoch nicht ausschließen, so dass eine Dosierung über die Strömungsgeschwindigkeit und die Zeit problematisch erscheint. Im klassischen Laborassay wird die Dosierung der Probe mit Hilfe einer Pipette erreicht. Eine pipettenähnliche Struktur auf dem Chip, also ein Kanal, der bis zu einem definierten Punkt befüllt und anschließend ab einer definierten Stelle wieder entleert wird, ist eine Möglichkeit, die Flüssigkeit über einen diskontinuierlichen Prozess zu dosieren. Der Vorteil dabei ist, dass der Dosiervorgang (bei konstanter Temperatur) nur vom Volumen der verwendeten „Pipettenstruktur“ abhängt. Eine andere Möglichkeit der Flüssigkeitsdosierung ist, die Reaktionskammer in sehr kurzer Zeit mit der (Blut-) Probe zu befüllen und dann eine im Verhältnis zu dieser Befüllzeit lange Zeit inkubieren zu lassen. Dabei werden nur die im Volumen der Reaktionskammer vorhandenen Antikörper gebunden. Die (weiter von der Reaktionskammer entfernt) in den Kapillaren vorhandenen Antikörper können die Reaktionskammer aufgrund ihrer geringen Diffusionsgeschwindigkeiten nicht erreichen.

4.3 Auswertung

Die Auswertung des Immunoassays erfolgt bei dem hier verwendeten Sandwichassay über einen markierten Antikörper, das sogenannte Konjugat. Die Anzahl der aus einer bestimmten Probenmenge gebundenen Antikörper ist dabei abhängig von der Konzentration der Targetmoleküle in der Probe. Um die gebundenen Antikörper zu „zählen“, werden diese mit einem makroskopisch auswertbaren Tracer markiert. Diese Auswertung stellt verschiedene Anforderungen an den Auswertemechanismus.

Radioaktiv: Bei den radioaktiven Immunoassays (RIA) wird das Konjugat mit einem radioaktiven Marker versehen, so dass über die Aktivität der Probe die Anzahl der gebundenen Moleküle bestimmt werden kann. Dieses Verfahren ist zwar sehr empfindlich, wird jedoch durch den problematischen Umgang mit den radioaktiven Substanzen in der Praxis nur noch selten verwendet. Es ist dadurch auch für die Anwendung in einem einfach zu verwendenden Labchip ungeeignet.

Lumineszent: Bei lumineszent markierten Antikörpern besteht der Tracer aus einer Substanz, die bei Auslösung (Triggerung des Tracers) Licht freisetzt. Für diesen Zweck wird z.B. Isoluminol verwendet. Die Auslösung wird dabei durch Reaktion mit anderen Chemikalien (bei Isoluminol 2 Triggerlösungen) erreicht (Chemolumineszenz). Die Anzahl der ausgesandten Photonen wird mit Hilfe eines Photomultipliers gezählt und ist proportional zur Anzahl der gebundenen Tracermoleküle. Die Auswertung eines

Immunoassays mit Hilfe einer Chemolumineszenzreaktion ist eines der wichtigsten Standardverfahren. Die notwendigen Reagenzien sind leicht verfügbar. Dieser Auswertemechanismus bietet ein geringes Untergrundsignal und eine gute Sensitivität. Dieses Verfahren ist zwar im klassischen Immunoassay das empfindlichste. Problematisch ist jedoch bei einer Auswertung auf dem Chip, dass die Triggerlösungen zugeführt werden müssen. Dies bedeutet, es müssen 2 zusätzliche Flüssigkeiten samt Transportmechanismen auf dem Chip integriert werden. Dadurch würde der Chip größer, komplexer und teurer. Des Weiteren neigen die Triggerlösungen dazu, nach einiger Zeit zu kristallisieren. Eine Aufmischung im Chip ist schwierig, so dass der fertig befüllte Chip nur eine geringe Aufbewahrungszeit zulassen würde. Eine der Triggerlösungen (4 % NaOH) hat zudem aufgrund ihres hohen pH-Wertes einen denaturierenden Effekt auf das an der Wand befestigte Immunsandwich. Dadurch werden bei Zugabe der Triggerlösungen die markierten Antikörper von der Wand gelöst. Die frei in der Reaktionskammer vorliegenden Antikörper können so durch eine Bewegung der Flüssigkeit aus der Reaktionskammer herausgespült werden. So kann ein Teil des Signals in der Ablaufleitung aus der Probenkammer verloren gehen. Die lumineszente Auswertung mit Lumi-Phos 530 stellt eine Alternative zur Auswertung mit Isoluminol dar. Bei dieser Methode wird nur eine Triggerlösung benötigt, was den Aufwand zur Integration der Triggerlösungen in den Chip halbieren würde. Dieser Auswertemechanismus bietet im herkömmlichen Immunoassay ebenfalls einen geringen Signaluntergrund. Die Triggerlösung muss dunkel aufbewahrt werden, da sie durch Licht zerstört wird. Außerdem sind für diesen Auswertemechanismus sterile Arbeitsbedingungen zwingend erforderlich, da die Triggerlösung schnell verunreinigt werden kann. Bei richtiger Anwendung hat diese Triggerlösung jedoch eine gute Stabilität. Eine Alternative zur Chemolumineszenz stellt die Elektrolumineszenz dar. Hier wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes der Tracer zum Aussenden von Licht angeregt. Im Falle der Elektrolumineszenz müssen zusätzliche Elektroden im Bereich der Reaktionskammer angebracht werden.

Fluoreszent: Bei fluoreszent markierten Antikörpern wird der Tracer mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Das bedeutet, dass der Tracer das Licht der Anregungswellenlänge absorbiert (und damit in der Elektronenkonfiguration des Tracers Elektronen auf höhere Energieniveaus angehoben werden) und Licht einer anderen Wellenlänge emittiert (durch Rückfall der Elektronen über ein Zwischenniveau in das Grundniveau). Die Differenz zwischen absorbierter und emittierter Wellenlänge wird als Stokesshift bezeichnet. Die gemessene Lichtintensität ist abhängig von der Intensität des anregenden Lichtes und von der Anzahl der vorhandenen Fluoreszenzmoleküle. Ein möglichst hoher Stokesshift erleichtert die Auswertung bzw. steigert die Messgenauigkeit, da sich das emittierte Licht über optische Filter besser vom anregenden Licht trennen lässt. Der Vorteil bei dieser Methode besteht darin, dass die Auswertung auf dem Chip sehr einfach ist und die Empfindlichkeit durch Aufintegration des Signals über eine

längere Messzeit gesteigert werden kann. Der große Vorteil der Fluoreszenz ist, dass keine Triggerlösungen benötigt werden. Da die verwendeten Kunststoffsubstrate jedoch größtenteils auch eine Eigenfluoreszenz zeigen, wird bei dieser Methode ein höheres Untergrundsignal erwartet als bei der Chemolumineszenz. Durch eine Fluoreszenz im nahen Infrarot (**Near Infra Red Fluoreszenz**) sollte dieses Problem vermieden werden, da die Eigenfluoreszenz der Kunststoffe eher im UV-Bereich liegt. Die Sensitivität dieses Auswertemechanismus sollte etwa an die Größenordnung von Chemolumineszenz reichen. Versuche haben gezeigt, dass bei dieser Auswertemethode die Eigenschaft des Untergrundes, an den die Antikörper angebunden sind, einen starken Effekt auf die Qualität des Signals hat, da das Immunsandwich an deren Oberfläche angebunden bleibt und nicht, wie bei der Chemolumineszenz, durch die Denaturierung frei in der Lösung vorliegt. Das NIR-Label (NIR-isothiocyanat indotricarbocyanin) zeigte in Vorversuchen Probleme bei der Ankopplung an den Antikörper, da nach Inkubation des Labels mit dem Antikörper das ungebundene Label sich nicht von dem mit Label markierten Antikörper trennen lässt. Als besser geeignet erscheint der Fluoreszenzmarker Streptavidin mit Alexa Fluor® 750. Dieses Label hat einen zweistufigen Fluoreszenzprozess, welcher einen breiteren Stokesshift (Unterschied zwischen adsorbierter und emittierter Wellenlänge) bewirkt. Die Anregungswellenlänge für dieses Label wird mit $\lambda = 650 \text{ nm}$ angegeben, die emittierte Wellenlänge mit $\lambda = 775 \text{ nm}$. Die Auswertung eines Fluoreszenzlabels kann beispielsweise in einem Fluoreszenzscanner erfolgen.

Zeitaufgelöste Fluoreszenz (TRF Time Resolved Fluorescence): Dies ist eine weitere sehr sensitive Methode, bei der das Fluoreszenzsignal über einen kurzen Lichtpuls angeregt und erst kurz nach Erlöschen dieses Pulses gemessen wird. Durch diese Methode kann der Hintergrund durch die anregende Wellenlänge vermieden werden. Die Label, die dafür verwendet werden, haben einen großen Stokesshift. Des Weiteren könnte man den Filterprozess für die Blutprobe vereinfachen, da der Hintergrund der Probe theoretisch sehr klein ist. Bei dieser Methode wird jedoch wieder ein Trigger benötigt (Enhancement solution genannt). Dieser Trigger enthält Triton X-100 und Essigsäure, um das Lanthanidion vom Sandwich zu trennen. Dies ist ein sehr kritischer Prozess, da auch hier das Signal wie bei der Chemolumineszenz aus der Probenkammer herausgespült werden kann.

Magnetisch: Magnetische Partikel als physikalische Label benötigen keine Triggerlösungen. Es ist jedoch schwer zu kontrollieren, ob die magnetischen Partikel gebunden werden. Es ist zwar möglich, einzelne Partikel nachzuweisen, jedoch kann man nicht sicher sagen, ob dieser gebunden ist. Diese Methode sollte eine hohe Sensitivität besitzen und ein geringes Untergrundsignal aufweisen. Ein großes Problem ist jedoch, dass sich die magnetischen Partikel im Chip nicht in Emulsion halten lassen (besonders bei äußeren magnetischen Feldern) und bei Verwendung des Chips aufemulgiert werden

müssen. Bei der Fa. Quantum Design wird der Magnetic Assay Reader (MAR) entwickelt, welcher die Nutzbarkeit der magnetischen Partikel als Label zeigt.

5 Fertigungsgrundlagen

5.1 Materialwahl

Bei der Auswahl des geeigneten Materials für eine Fertigung des mikrofluidischen Immunoassays gilt es, eine Vielzahl von Randbedingungen zu beachten, die sich auf die spätere Produzierbarkeit sowie auch auf die Funktionalität des Immunoassays auswirken. So sollten für das Material ein adäquater Fertigungsprozess für eine schnelle Prototypenfertigung der ersten Chips sowie ein wirtschaftlicher Fertigungsprozess für eine spätere Serienfertigung verfügbar sein.

Glas: Glas ist preisgünstig und weitgehend chemisch inert. Somit sind keine Probleme mit den zu verwendenden Reagenzien zu erwarten, da die klassischen Immunoassays ebenfalls unter Verwendung von Glasgeräten durchgeführt werden können. Durch die Wahl eines transparenten Materials lässt sich der Durchfluss der Reagenzien durch die Kanäle gut kontrollieren, und es wird kein separates Auswertefenster für die optische Auswertung benötigt.

Kunststoff: Kunststoff bietet die Vorteile, dass eine Vielzahl von verschiedenen Kunststoffen verfügbar ist, deren Eigenschaften sich auf die Anforderungen der Anwendung anpassen lassen. Kunststoffe können ebenfalls preisgünstig und inert bezüglich der zu verwendenden Reagenzien gewählt werden. Eine gute Serienproduzierbarkeit durch Spritzguss oder Heißprägen findet bereits in vielen Bereichen Verwendung. Durch die Auswahl eines transparenten Kunststoffes ergeben sich die oben genannten Vorteile wie bei der Verwendung von Glas.

Silizium: Silizium ist das klassische Material der Mikrotechnik und das wahrscheinlich am besten erforschte Material der Welt. Es lässt sich gut nasschemisch strukturieren (anisotropes Ätzen) und ist chemisch sehr beständig. Durch anodische Bondprozesse lassen sich Siliziumkanalstrukturen gut mit Glas verdeckeln. Problematisch sind jedoch der hohe Preis und die hohen Fertigungskosten (bezogen auf die benötigte Fläche). Da Silizium nicht transparent ist, ist eine optische Prozesskontrolle und Auswertung nur in Verbindung mit einer transparenten Deckelschicht (z.B. anodisch gebondete Glasschicht) möglich.

Sonstige: Diverse andere Materialien, wie z.B. die meisten Metalle, sind aufgrund von Korrosion oder Reaktion mit den verwendeten Chemikalien problematisch. Viele Materialien sind außerdem nicht gut mikrotechnisch zu strukturieren, teuer und bieten bei nicht transparenten Materialien den Nachteil der schlechteren Kontrollierbarkeit des

Prozessverlaufs bzw. der optischen Auswertung. Jedoch eignen sich metallbasierte mikrotechnische Verfahren, wie z.B. der LIGA Prozess, für eine Herstellung der Präge- oder Spritzgusswerkzeuge für die Herstellung von Kunststoffstrukturen.

5.2 Fertigungsmethoden

Die für die Herstellung von Kunststoff- oder Glasstrukturen am besten geeigneten und in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden im Folgenden vorgestellt.

5.2.1 Strukturierung von Glas

Ein Verfahren zur Herstellung von Kanalstrukturen in Glassubstraten ist die nasschemische Strukturierung mit Flusssäure. Bei der nasschemischen Strukturierung werden auf das Glassubstrat zunächst eine dünne Haftschrift aus Chrom (oder Titan) und dann eine Maskierungsschicht aus Gold aufgebracht, die anschließend mit Photolack beschichtet wird. Dieser Photolack wird durch eine Maske hindurch belichtet, so dass die Stellen, an denen die Kanäle entstehen sollen, in einer Entwicklerlösung und anschließender Metallätzung freigelegt werden können. Auf das so behandelte Substrat wird Flusssäure geträufelt, die das Glas anätzt, die Schutzschicht aus Metall und Photolack jedoch nicht angreift. Durch das Aufträufeln der Säure ist, im Gegensatz zum Eintauchen des Substrates in die Säure, keine Rückseitenmaskierung notwendig. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass aufgrund der geringen verwendeten Säuremenge und der nicht vorhandenen Bewegung der Flüssigkeit im Ätzbereich die Säure schnell gesättigt ist. Dies bewirkt eine mit der Zeit abnehmende Ätzgeschwindigkeit. Es wurden Substrate aus Borsilikatglas (Pyrex / Borofloat) und aus normalem „Fensterglas“ (Natriumglas) verwendet. Die Ätzraten für die beiden verwendeten Glassorten sind in Abbildung 5-1 aufgetragen. Durch eine Kontrolle der Ätzzeit wird die Kanaltiefe kontrolliert. Aus Abbildung 5-1 ist ersichtlich, dass Borsilikatglas deutlich geringere Ätzraten aufweist. Die großen Fehlerindikatoren bei der Ätzrate für Natriumglas beruhen auf der sehr rauhen geätzten Oberfläche, die eine genaue Bestimmung der Ätzrate stark erschweren.

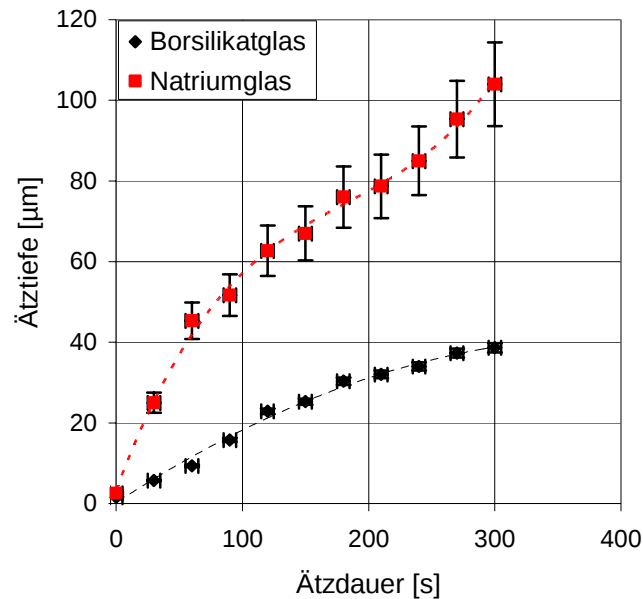


Abbildung 5-1: Messwerte der Ätzzraten für Borsilikatglas und Natriumglas mit 48% Flusssäure
(die Linien stellen einen polynomischen Trend dar)

Die Substrate aus Natriumglas sind deutlich preisgünstiger, liefern aber bei den geätzten Strukturen eine raue Oberfläche, so dass sie nur für Versuche, bei denen es nicht auf glatte Oberflächen ankommt, verwendet wurden. Die Substrate aus Borsilikatglas sind zwar teurer, liefern aber sehr homogene Ätzergebnisse und sind zudem auch noch anodisch bondbar, so dass im Wesentlichen diese Substrate zur Anwendung kamen. Die Vergleiche der Ätzergebnisse sind in Abbildung 5-2 dargestellt.

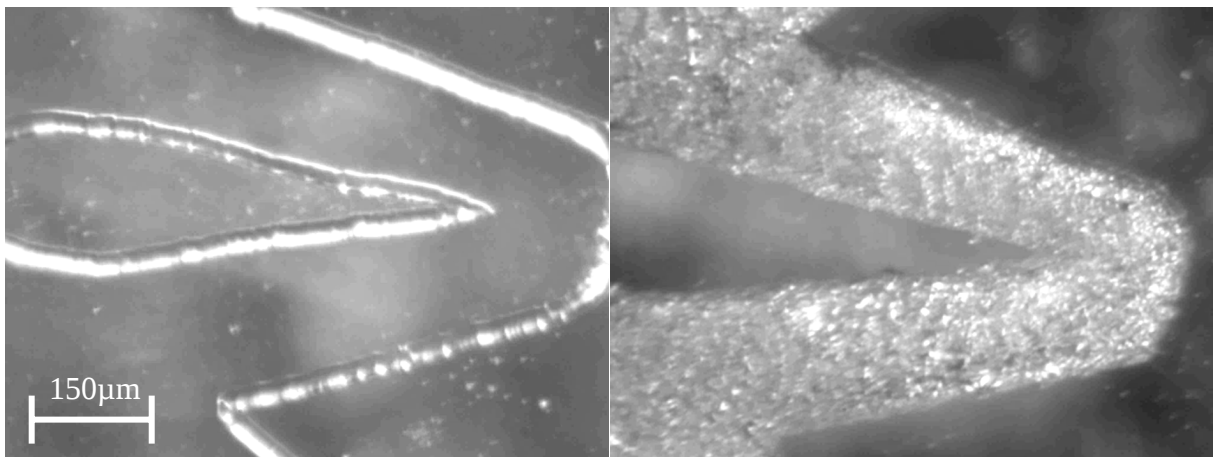


Abbildung 5-2: Ätzergebnisse für Borsilikatglas (links) und Natriumglas (rechts)

Da das Glas als amorpher Werkstoff nasschemisch nur isotrop geätzt werden kann, wird der Kanal durch Unterätzung der Maskierung um die doppelte Ätztiefe verbreitert und es lassen sich somit nur abgerundete Kanalquerschnitte herstellen.

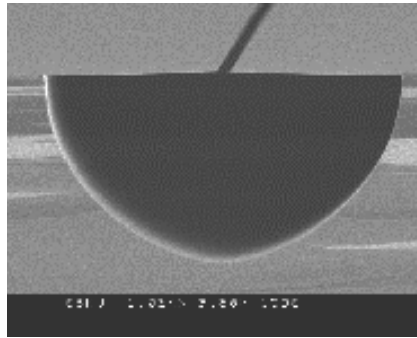


Abbildung 5-3: Ätzprofil bei isotroper Ätzung [TWEN02]

Eine unabhängige Steuerung von Strukturbreite und -tiefe ist somit nicht möglich. (Weiteres dazu z.B. in [KÖHL98]) Die Dauer für einen Strukturierungsprozess liegt bei manueller Fertigung, unabhängig von der Größe der Struktur, im Bereich einer Stunde, was für eine Prototypenfertigung durchaus akzeptabel ist.

5.2.2 Prototyp Masken

Um Prototypen der Glasstrukturen herstellen zu können, wird ein Verfahren benötigt, das eine kostengünstige Fertigung dieser Glas-Kanalstrukturen in kurzer Zeit ermöglicht. In der herkömmlichen Photolithographie ist die Herstellung der Photomaske einer der teuersten und zeitaufwendigsten Schritte. Um eine schnellere und kostengünstigere Strukturierung zu erreichen, wird ein Verfahren zur Maskenherstellung mittels Reproduktionsfotografie verwendet. Dabei werden die zu fertigenden Strukturen am Rechner mittels CAD-Programmen oder bei weniger komplexen Geometrien mit einfachen Mal- oder Zeichenprogrammen entworfen und in stark vergrößerten Maßstab ausgedruckt, so dass die kleinsten Strukturen noch gut im Drucker wiedergegeben werden können. Diese Vorlagen werden dann mittels einer Reprokamera auf einen Kunststofffilm verkleinert abfotografiert. Der so entstandene Film dient als Maske für die Fotolithografie. Dieses Verfahren eignet sich vor allem bei Prozessen mit nur einer Strukturierungsebene und Strukturgrößen mit mehr als ca. 20 µm.

5.2.3 Strukturierung von Kunststoffen

Kunststoffstrukturen lassen sich aufgrund Ihrer vielfältig variierbaren Eigenschaften auch mit einer Vielzahl von Prozessen fertigen. Die in dieser Arbeit verwendeten Prozesse werden im Folgenden näher beschrieben.

Laserstrukturierung: Eine Möglichkeit, Kunststoffe zu strukturieren, ist die Abtragung des Materials mittels Excimerlaserstrukturierung. Der Begriff Excimer entstand aus der Bezeichnung „excited dimer“ und beschreibt zweiatomige Verbindungen, die nur im angeregten Zustand stabil sind (z.B. Edelgas-Halogenide) [BURH94]. Die Pulsleistung

dieser Ultraviolett-Laser liegt typischerweise bei einigen 10 MW bei Pulsdauern von 10 ns bis 500 ns und einem Puls-Pausen-Verhältnis von kleiner 10^{-4} [SCHU93][WEHN91]. Der zu erwartende Wirkungsgrad eines Excimerlasers liegt bei unter ca. 1-2 % [SCHU93]. Für die Bearbeitung von Polymeren werden Energien von ca. 10-100 mJ/cm² benötigt. Die mit einem Excimerlaser erreichbare Leistungsdichte ermöglicht dabei eine Strukturierung relativ großer Oberflächen (ca. 2 cm²) in einem Arbeitsschritt [LIPP93]. Durch die Energie des Excimerlasers werden die langen Polymerketten aufgebrochen und gezwungen, sich neue Bindungspartner zu suchen. Dieses passiert vornehmlich mit Teilen der umgebenden Atmosphäre (Wasser, Sauerstoff) oder mit einem zugeführten Gas. Dabei werden diese neuen Verbindungen aus dem Bearbeitungsbereich herausgeschleudert und nehmen die übertragene Wärmemenge mit. Die herausgeschleuderten Polymerreste lagern sich dann in der Umgebung ab [PFLE97] oder werden aus der Umgebungsluft abgesaugt. Im Gegensatz zur klassischen Laserstrukturierung, die auch das Material in der näheren Umgebung des auftreffenden Laserstrahls verdampft, wird bei der Polymerbearbeitung mit Excimerlasern nur der vom Laser getroffene Bereich abgetragen. Durch einen fein fokussierten Laser lassen sich dabei Strukturierungen bis in den sub - µm Bereich realisieren. Die Strukturen lassen sich entweder über eine genaue Steuerung des Lasers oder über Schattenmasken herstellen. Die Steuerung des Lasers und die damit resultierende serielle Fertigung der einzelnen Strukturen nacheinander ist sehr zeitintensiv und damit teuer. Durch Verwendung von Schattenmasken kann ein größerer Bereich in einem Arbeitsschritt strukturiert werden. Das spart zwar Zeit in der Fertigung, jedoch ist die Herstellung der Masken aufwendig und entsprechend teuer. Dieses Verfahren ist geeignet für eine Herstellung von Prototypen, da sich Strukturen mit hoher Genauigkeit in kurzer Zeit fertigen lassen. Für eine Serienfertigung von großflächigen Strukturen ist dieses Verfahren aufgrund der hohen Betriebskosten des Lasers jedoch als zu teuer einzuschätzen. Der für die Laserstrukturierung der ersten Ventilstrukturen verwendete Excimerlaser LPX305 der Firma Lambda-Physik kann durch verschiedene Gasfüllungen bei Wellenlängen von 193 nm (ArF) oder 248 nm (KrF) genutzt werden. Bei einer Wiederholungsrate von 50 Hz und einer Pulsdauer von 30 ns liegt die durchschnittliche Energie pro Puls bei 1 J.

Spritzguss: Die Herstellung der Strukturen mittels Mikrospritzguss erfordert geeignete Spritzgussmaschinen, die Wahl des richtigen Kunststoffes, sowie eine Fertigung des Spritzgusswerkzeuges. Die geometrischen Bedingungen der Struktur müssen so beschaffen sein, dass die hergestellte Struktur problemlos aus dem Spritzgusswerkzeug ausgeworfen werden kann. Insbesondere darf es keine Hinterschneidungen geben. Kanäle sollten sich nach unten leicht verengen, so dass das Werkzeug einfach entfernt werden kann. Da die Herstellung eines Spritzgusswerkzeuges sehr aufwendig ist, eignet sich dieses Verfahren kaum zur Prototypenfertigung. Die Mikrostrukturen im Spritzgusswerkzeug können sich über eine mikrogalvanische Strukturierung generativ oder über ablative Verfahren wie Elektroerosion oder Mikrofräsbearbeitung herstellen

lassen. Durch die Strukturierungszeiten im Sekundenbereich und die bei großen Stückzahlen sehr geringen Kosten ist dieses Verfahren sehr gut für eine Serienfertigung geeignet.

Heißprägen: Eine Möglichkeit ist die Fertigung der Mikrostrukturen durch Heißprägen. Bei diesem Prozess wird der Kunststoff auf eine Temperatur kurz oberhalb der Glassübergangstemperatur erhitzt. Bei dieser Temperatur wird der Kunststoff weich und verformbar. In den erhitzten Kunststoff wird ein Stempel mit negativen Kanalstrukturen gepresst und anschließend auf eine Temperatur unterhalb der Glastemperatur gekühlt und somit verfestigt. Die Dauer dieses Fertigungsprozesses ist im Wesentlichen von der Dauer für das Aufheizen und Abkühlen bestimmt. Jedoch ist für eine Produktion einzelner Prototypen auch der Aufwand für die Fertigung des Prägestempels einzubeziehen. Die Herstellung dieses Prägestempels kann analog zum oben genannten Prägewerkzeug für den Mikrospritzguss erfolgen. Auch hier sind nur Strukturen ohne Hinterschneidungen zulässig.

Lichthärtende Polymere: Eine weitere Möglichkeit, Kanalstrukturen in Kunststoff zu erhalten, ist die direkte Strukturierung in einem lichthärtenden Polymer, wie z.B. SU-8-Photolack oder MMA. Bei SU-8 Photolack handelt es sich um einen flüssigen Epoxy-Monomer, der durch Belichtung mit ultraviolettem Licht polymerisiert und so beständig gegen die meisten Lösungsmittel wird. Für diesen Strukturierungsprozess wird der Lack in der gewünschten Dicke auf einen Träger aus Glas oder Kunststoff aufgeschleudert und durch eine Maske hindurch belichtet. Die unbelichteten Stellen können mit einem Lösungsmittel entfernt werden, so dass man die gewünschten Kanalstrukturen erhält. Durch diese Art der Strukturierung lassen sich Kanalstrukturen mit sehr hohem Aspektverhältnis erzeugen. Die Dicke der herzustellenden Lackschicht lässt sich über die Drehgeschwindigkeit beim Aufschleudern des Photolackes (Spinkurve) und über die Viskosität des Lackes variieren. Sehr dicke Schichten können aus mehreren Lackschichten übereinander hergestellt werden. Der große Vorteil dieses Prozesses ist, dass sich nahezu rechtwinklige Kanalquerschnitte ergeben, wobei sich die Strukturhöhe (durch die Lackschicht vorgegeben) unabhängig von der Strukturbreite (durch die Maske vorgegeben) variieren lässt. Die Masken können für diesen Prozess ebenfalls mit dem weiter oben beschriebenen Reprokamera-Prozess angefertigt werden, so dass diese Strukturierungsvariante ebenfalls sehr schnell durchführbar ist. Bei der Photopolymerisation handelt es sich im Gegensatz zur oben erwähnten nasschemischen Strukturierung jedoch um einen Negativprozess. Daher müssen die Masken entweder schon im Rechner beim Ausdruck ins Negativ invertiert oder beim Abfotografieren mit der Reprokamera muss ein Negativfilm benutzt werden. Probleme bereiten allerdings die mit zunehmender Lackdicke zunehmenden Spannungen innerhalb der Lackschicht. Diese entstehen durch die unterschiedlichen thermischen Ausdehnungskoeffizienten des Photoresists und des Substratmaterials. Um ein Durchbiegen des Substrates zu

vermeiden, bietet sich die Verwendung von dicken Substratwafern an (z.B. Glaswafer, 100 mm Durchmesser, 2 mm Dicke). Die Spannungen in der Schicht lassen sich durch geeignete Relaxations- und Temperierungsprozesse stark reduzieren. Um reine Kunststoffstrukturen ohne Substratmaterial zu bekommen, wird auf das Substratmaterial zunächst eine Opferschicht aus z.B. Kupfer aufgebracht. Auf diese Opferschicht wird eine erste Schicht SU-8-Photoresist aufgebracht, vollständig belichtet und somit komplett gehärtet. Diese Unterschicht bildet später den Boden der Strukturen. Auf diese Unterschicht wird dann die eigentliche SU-8-Schicht aufgebracht und strukturiert. Sind die SU-8 Strukturen gefertigt und die Schichtspannungen durch Relaxations- und Temperierungsprozesse reduziert, kann die Opferschicht in einem (ultraschallunterstütztem, geheiztem) Ätzbad entfernt und damit die SU-8 Struktur vom Substrat gelöst werden. Aufgrund der hohen Preise des SU-8 Lackes ist dies jedoch für eine Serienfertigung sehr teuer, und das Material kann nicht variiert werden. Der Strukturierungsprozess mit SU-8-Resist benötigt relativ viel Zeit, da diverse Ruhezeiten zum Abbau von Spannungen innerhalb des Lackes einzuhalten sind.

Präzisions-Fräsbearbeitung: Die klassische Materialbearbeitung durch CNC-Fräsmaschinen ermöglicht durch die immer präziser werdenden Geräte und ständig verkleinerte Werkzeuge einen Vorstoß zu immer kleineren Dimensionen. So lassen sich durch Fräser mit Durchmessern im Bereich von 30 µm und Positioniergenauigkeiten im unteren Mikrometerbereich mittlerweile auch Strukturen mit Abmessungen von wenigen Mikrometern reproduzierbar herstellen. Durch solche Präzisions 5-Achsen Fräsmaschinen ist eine automatisierte Fertigung von Mikrostrukturen möglich.

5.3 Verschließen der Kanäle

Bei allen oben beschriebenen Strukturierungsprozessen entstehen Kanäle, die zu einer Seite (der Bearbeitungsseite) hin geöffnet sind. Dies ist auch nötig, um die Oberfläche der Kanäle an bestimmten Stellen gezielt zu modifizieren und mit den benötigten Reagenzien zu belegen. Um die Strukturen zu verschließen, wurden verschiedene Methoden untersucht.

Kleben: Das Verkleben von Mikrostrukturen stellt besondere Ansprüche an das Aufbringen, die Dosierung und Verteilung der Klebstoffe. Ein Problem beim Kleben von Mikrokanälen ist, das Eindringen von Klebstoff in die Kanäle zu vermeiden. Um dies zu erreichen, kann z.B. ein lichthärtender Klebstoff auf die Deckelseite dünn aufgeschleudert, anschließend auf die strukturierte Kanalplatte gelegt und mittels UV-Licht ausgehärtet werden. Ist die aufgeschleuderte Klebstoffschicht deutlich dünner als die Kanaldimensionen, kann ein guter Verschluss der Strukturen erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit, den Kleber aufzubringen, ist, die Kanalplatte und den Deckel aufeinander zu legen und einen sehr dünnflüssigen (lichthärtenden) Kapillarkleber (z.B.

DELO Photobond 4302 UV-härtend) an den Rand zu tropfen. Da die Kapillarkraft mit zunehmendem Kapillardurchmesser kleiner wird, zieht sich der Kleber schnell zwischen Kanalplatte und Deckel, dringt jedoch nur sehr langsam in die Kanäle ein. Der Kleber kann nachdem er gleichmäßig zwischen den zu verklebenden Strukturen verteilt ist, unter UV-Licht ausgehärtet werden.

Adhäsionsfolie: Eine sehr einfache Methode zur Verdeckelung der Kanäle ist das Verkleben der Kanalplatte mit Adhäsionsfolie („Klebeband“). Für die verwendeten Klebefolien gelten jedoch dann dieselben Grundanforderungen wie für das Kanalplattenmaterial. Die Folien müssen eine ausreichende Klebkraft haben, um den im Prozess auftretenden Drücken standzuhalten, sie dürfen nicht mit den benötigten Chemikalien reagieren und müssen auch in ihren mechanischen Eigenschaften den Anforderungen genügen.

Anodisches Bonden: Das anodische Bonden ist eine Methode, um eine Glasplatte aus einem natriumoxidhaltigen Glas mit einer Siliziumscheibe zu verbinden. Bei diesem Prozess werden eine Siliziumscheibe auf eine geheizte Elektrode, die Glasplatte auf die Siliziumscheibe und eine zweite Elektrode auf die Glasplatte gelegt. Ab einer Grenztemperatur in der Größenordnung von 200° C-300° C wird die Glasscheibe zum Ionenleiter, da sich die im Glas enthaltenen positiven Natriumionen sowie die negativen Oxidionen frei bewegen können. Wird an die Siliziumscheibe eine positive- und an die Glasscheibe eine negative Spannung der Größenordnung 1 KV angelegt, so bewegen sich die Natriumionen von der Grenzschicht weg, die Oxidionen zur Grenzschicht hin und es fließt ein Strom durch dieses „Sandwich“. Durch eine Verbindung der Oxidionen mit den Siliziumatomen des Substratwafers wird eine feste Siliziumoxidbrücke zwischen Glas und Siliziumwafer aufgebaut und verbindet die beiden Scheiben an der Grenzschicht miteinander. Näheres zu diesem Prozess findet sich in der Literatur. Ein leicht abgewandelter Prozess kann auch verwendet werden, um 2 Glasscheiben miteinander zu verbinden. Dabei ist eine der Glasscheiben sehr dünn mit Silizium beschichtet und tritt anstelle der Siliziumscheibe. Gute Bondergebnisse konnten ebenso mit einer mit Siliziumnitrid beschichteten Glasscheibe erzielt werden. Die im Immunoassay verwendeten Chemikalien denaturieren allerdings bereits bei Temperaturen von mehr als ca. 36° C und werden damit unbrauchbar. Da für den anodischen Bondprozess jedoch Temperaturen von über 100° C nötig sind, kann ein mit Immunchemie beschichtetes Substrat nicht anodisch gebondet werden. Ein gezieltes Aufbringen der Antikörper in verschlossenen Kanälen ist jedoch kaum (bzw. nur mit großem Aufwand) möglich. Eine Möglichkeit des Aufbringens von temperaturempfindlicher Biochemie wird in [ZIMM02] vorgestellt. Die Biochemie wird dabei in eine Matrix eines lichthärtenden wasserlöslichen Polymers eingebettet. Dieses Polymergemisch kann dann in die (z.B. durch anodisches Bonden) bereits verschlossenen Mikrostrukturen gefüllt und über eine Photomaske an den Stellen, an denen die Biochemie lokalisiert werden soll, belichtet werden. Dabei

vernetzt die Polymerlösung an den belichteten Stellen. Die unbelichtete Lösung kann anschließend durch Spülen mit Pufferlösung ausgewaschen werden. Der Auswaschprozess dauert jedoch mehrere Stunden. Dieser Zeitaufwand ist für eine Serienfertigung zu hoch. Außerdem ist der gesamte Prozess für eine Serienfertigung sehr aufwendig und voraussichtlich in der gegenwärtigen Form zu teuer.

Lösungsmittelbonden: Bestehen sowohl Deckel als auch Kanalplatte aus Kunststoffen, so können diese durch das Lösungsmittelbonden verbunden werden. Dabei werden beide Seiten durch Aufbringen eines Lösungsmittels leicht angelöst und anschließend unter erhöhter Temperatur zusammengepresst, bis das Lösungsmittel verdampft ist und die Teile sich verbunden haben. Durch den Kontakt mit Lösungsmitteln können die Chemikalien allerdings denaturiert werden.

Thermisches Bonden: Beim thermischen Bonden werden die Kanalplatte und die Deckelplatte zusammengepresst und kurzzeitig soweit erhitzt, dass die Materialien leicht aufweichen und sich verbinden können, ohne die Strukturen stark zu verformen. Für die Verwendung des thermischen Bondens ergeben sich für die Immunchemie jedoch analoge Probleme wie bei anodischem Bonden (hohe Temperatur).

Ultraschallschweißen: Kanalplatte und Deckel aus Kunststoff lassen sich auch durch einen Ultraschallschweißprozess verbinden. Bei diesem Prozess wird das Material an den gewünschten Stellen durch Einleitung von Ultraschallenergie lokal aufgeschmolzen und verschweißt, wohingegen die Stellen, an denen das Material nicht verformt werden soll, kalt bleiben. Damit kann ein Schweißprozess entwickelt werden, der in die Bereiche der Biochemie keine Wärme einbringt. Der Schweißprozess verlangt jedoch eine speziell geformte Struktur der Schweißkante und ist für eine Prototypfertigung schwer zu realisieren.

5.4 Oberflächenmodifizierung der Materialien

5.4.1 Wozu Oberflächenmodifizierung?

Durch eine Modifikation der Kanalstrukturoberflächen ist es möglich, die Eigenschaften dieser Strukturen im Hinblick auf die Benetzbarkeit und somit auf die Kapillarkräfte zu modifizieren (siehe Kapitel 4.1). So lässt sich die Strömung durch die Kanäle aufgrund von Benetzungskräften gezielt kontrollieren. Durch hydrophile Bereiche wird eine Befüllung der Kanäle ohne Verwendung von Pumpen erreicht. Durch hydrophobe Teilbereiche ist es möglich, ein Einströmen von Flüssigkeiten in bestimmte Teilbereiche der Kanalstrukturen zu verhindern. Durch die Affinität der Oberflächen (hydrophob/hydrophil) kann auch die Anbindung von Antikörpern an die Oberfläche des

Auswertebereiches kontrolliert werden. Üblicherweise werden die Antikörper an hydrophoben Oberflächen am besten angebunden.

5.4.2 Modifizierungsverfahren

Abscheiden von dünnen Schichten: Durch Abscheiden von dünnen Schichten auf den Oberflächen der Strukturen werden die Oberflächeneigenschaften der abgeschiedenen Schicht ausgenutzt. Dabei können durch Maskierungen an verschiedenen Stellen unterschiedliche Schichten aufgebracht und die Oberflächeneigenschaften gezielt lokal variiert werden. Die Schichten werden dabei so dünn abgeschieden, dass die geometrische Veränderung der Kanäle zu vernachlässigen ist. Die für diese Art der Oberflächenmodifikation benutzten Materialien sind im Wesentlichen Metalle (durch Kathodenzerstäubung oder Aufdampfverfahren aufgebracht). Nichtmetallische Schichten, wie Siliziumnitrid und -oxid, lassen sich mit einem CVD-Prozess abscheiden. Die dabei benötigten Temperaturen liegen jedoch im Bereich von einigen 100° C, was ein Aufbringen auf die meisten Kunststoffe verhindert.

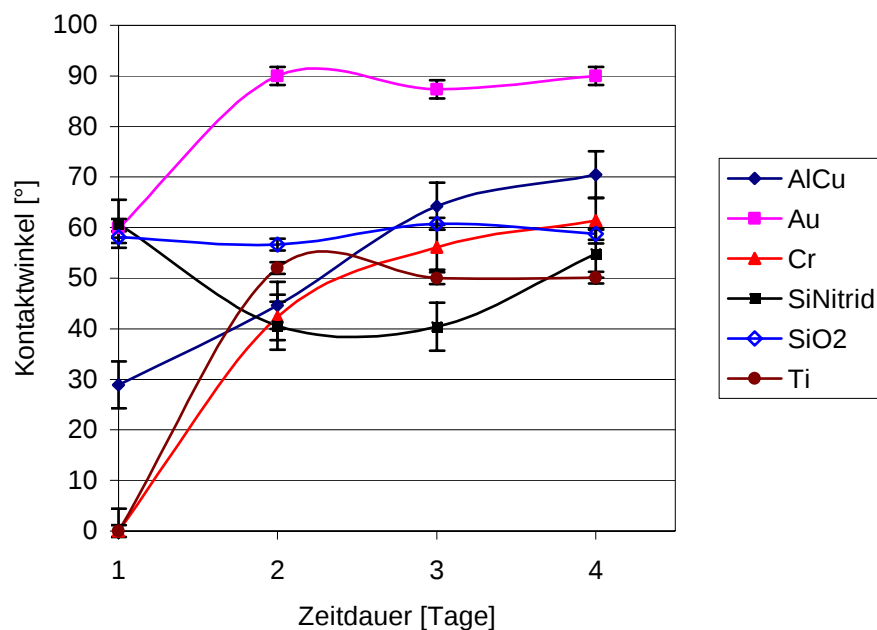


Abbildung 5-4: Messwerte der Benetzungswinkel von Wasser auf verschiedenen Oberflächen und dessen Änderung mit der Zeit (u.a. durch Oxidation)

Plasmabehandlung: Durch eine Behandlung der Oberflächen im Plasma lassen sich die Oberflächeneigenschaften gezielt verändern, die Oberflächen reinigen und teilweise aufrauen. Dazu werden die Oberflächen im Barreletcher bzw. in der PECVD-Anlage einer Plasmabehandlung in einer Gasatmosphäre des gewünschten Gases ausgesetzt. Die hierbei verwendeten Gase sind im Wesentlichen Sauerstoff [O₂], Argon [Ar], Freon [CF₄]. Die Einflüsse einer solchen Gasplasma-Behandlung auf die

Oberflächeneigenschaften werden in [PUNT02] beschrieben. So lässt sich über eine Plasmabehandlung sowohl der Kontaktwinkel von Flüssigkeiten zur Oberfläche in einem breiten Spektrum verändern als auch die Bondstärke für bestimmte Bondprozesse, wie z.B. thermoplastisches Fusionsbonds, optimieren. Die in [PUNT02] beschriebenen Kontaktwinkel reichen bei einer Plasmabehandlung eines COC-Polymers (Cyclic Olefin-Copolymer), welches zu Wasser normalerweise einen Kontaktwinkel von 92° hat, von ca. 5° bis 136°. Siehe Tabelle 5-1

Case #	Ar flow rate (sccm)	O2 flow		Power (Watts)	Duration (seconds)	Contact angle (degree)
		rate (sccm)	CF4 flow rate (sccm)			
1	20	0	0	200	120	~5°
2	10	0	0	150	120	21°
3	10	0	0	100	120	48°
4	10	0	0	25	120	78°
5	0	0	10	100	120	100°
6	0	2	10	150	120	109°
7	0	3	10	150	120	122°
8	0	4	10	200	120	136°

Tabelle 5-1: Plasmaprozessbedingungen für die Oberflächenmodifikation [PUNT02]

6 Entwicklung des Immunoassay-Chips

6.1 Mikrofluidische Reaktionskammern

Für die Durchführung eines Immunoassays wird ein Reaktionsbereich benötigt, in dem die als Fängermoleküle verwendeten Antikörper an der Wand befestigt sind (**biologisch aktiver Bereich**). Diesen Reaktionsbereich kann man mit dem Reagenzglas oder mit den Titerplatten in der klassischen Laboranalytik vergleichen. Um die Durchführbarkeit eines Immunoassays in einem mikrofluidischen Kanalsystem zu untersuchen, werden mikrofluidische Reaktionskammern aus Glas oder Kunststoff hergestellt. Diese Reaktionskammern können zunächst über externe peristaltische Schlauchpumpen mit den Reaktionsflüssigkeiten durchspült werden. Das Einbringen der Antikörper in die Reaktionsbereiche soll vor dem Verschließen der Strukturen erfolgen, da ein späteres gezieltes Einbringen der Antikörper zu aufwendig ist. Deshalb muss der Verdeckelungsprozess so beschaffen sein, dass die Antikörper nicht durch Hitze oder chemische Einwirkung denaturieren und somit zerstört werden. Eine einfache Methode ist das Verschließen der Kanäle mit Adhäsionsfolie („Klebeband“). Das Klebeband muss so beschaffen sein, dass es durch seine chemischen und physikalischen Eigenschaften die Durchführung des Immunoassays in den Mikrostrukturen nicht negativ beeinflusst. Das Anbringen der Antikörper in den Reaktionskammern vor dem Verdeckeln der Kanäle bietet im Wesentlichen 3 Möglichkeiten, die Antikörper zu immobilisieren. Die erste Möglichkeit ist, die Antikörper auf dem Boden der Reaktionskammer zu verankern. Anschließend werden die Strukturen verschlossen (Abbildung 6-1).

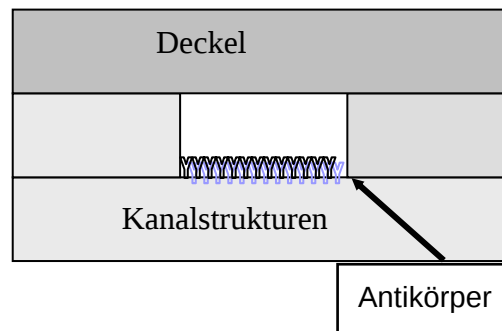


Abbildung 6-1: Verdeckelte Kanalstrukturen. (Antikörper am Kanalboden angebracht)

Eine Alternative zur Methode 1 ist das Anbringen der Antikörper am Deckel der Reaktionsbereiche: Auf die Adhäsionsfolie werden die für den Immunoassay benötigten Antikörper im Bereich der Reaktionskammern direkt aufgebracht und mittels z.B. BSA die unspezifischen Bindungen reduziert (Abbildung 6-2).

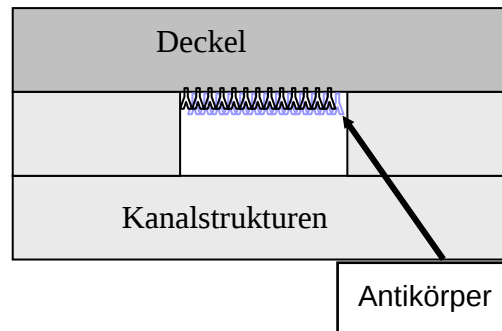


Abbildung 6-2: Verdeckelte Kanalstrukturen. (Antikörper am Deckel angebracht)

Die dritte Alternative ist, die Antikörper zunächst auf ein Trägermaterial aufzubringen und Stücke von diesem Trägermaterial in die Reaktionskammer einzukleben. Bei dieser Variante besteht der Vorteil, dass große Stücke des Trägermaterials mit Antikörpern beschichtet werden können, aus denen dann die Reaktionsbereiche ausgeschnitten und auf die Adhäsionsfolie im Bereich der Reaktionskammern aufgeklebt werden. Mit dieser Adhäsionsfolie werden die Kanalsysteme dann verschlossen (Abbildung 6-3).

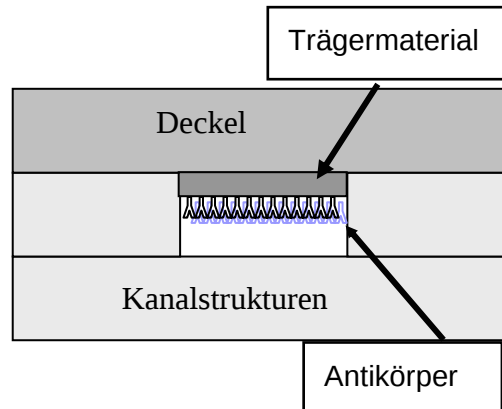


Abbildung 6-3: Verdeckelte Kanalstrukturen. (Antikörper auf Trägermaterial am Deckel angebracht)

Durch diese Methode lässt sich die Eigenschaft des biologisch aktiven Bereiches, an denen die Antikörper befestigt sind, unabhängig von den Oberflächeneigenschaften der Adhäsionsfolie wählen. Neben der daraus resultierenden größeren Freiheit in der Materialwahl reduzieren die eingeklebten Trägermaterialstücke die Höhe und damit das Totvolumen der Reaktionskammern. Zudem besteht die Möglichkeit, die biologisch aktiven Bereiche nach der Durchführung des Immunoassays wieder aus den fluidischen Strukturen zu entnehmen und einzeln extern auszuwerten.

6.1.1 Anbringen der Antikörper auf Adhäsionsfolien

Erste Immunoassay-Versuche sollten Aufschluss über die Durchführbarkeit eines Immunoassays in mikrofluidischen Küvetten geben. Dazu wurden Immunoassays zunächst auf der Oberfläche verschiedener Adhäsionsfolien durchgeführt. Die jeweiligen

Reaktionschemikalien wurden mit einer Pipette auf kleine Stücke der Adhäsionsfolie aufgetropft und inkubiert. Anschließend wurden die Folienstücke in einer Waschlösung gewaschen. Das Signal der zunächst mit Chemolumineszenz markierten Antikörper wurde in einem Luminometer (Berthold Tubeluminometer LB953) ausgewertet. Die Auswertungen in diesem Luminometer erfolgen in 96-Well-Titerplatten, in die die Folienstücke eingelegt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Folienstücke flach auf den Böden der Wells aufliegen, um eine reproduzierbare Anzahl an Photonen im Detektor (Photomultiplier) nachzuweisen. Die Ergebnisse dieser Tests zeigten, dass sich die Antikörper prinzipiell an der Oberfläche der Adhäsionsfolien anbringen lassen, dies jedoch stark abhängig von der jeweils verwendeten Folie ist. Abbildung 6-4 zeigt in der linken Spalte die CRP-Immunoassay-Versuche, bei denen keine CRP-Moleküle in der Probe vorhanden waren (Blindversuche). Das Signal der Blindversuche ist ein Maß für die Anzahl der unspezifisch an die Folie gebundenen Tracermoleküle und damit für den zu erwartenden Signaluntergrund. In der rechten Spalte sind die Ergebnisse von CRP-Immunoassay-Versuchen aufgetragen, bei denen eine CRP-Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml als Probe diente. Das Diagramm zeigt den direkten Vergleich zwischen Signal und Untergrund für die jeweilige Folie. Diese Ergebnisse zeigen somit die Stärke des Signals bei Vorhandensein des Zielmoleküls an.

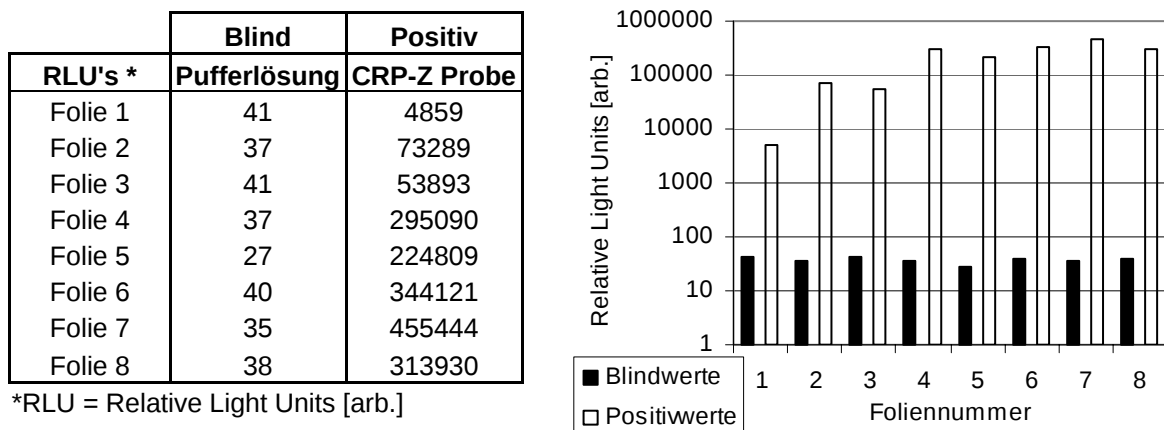


Abbildung 6-4: Ergebnisse von Immunoassays auf verschiedenen Folien¹.

¹ Folie 1: Wafer-Sägefolie, UV-Curable, Ultron Systems, Inc. Adhesive Plastic Film 1042R
 Folie 2: Wafer-Sägefolie, UV-Curable, Ultron Systems, Inc. Adhesive Plastic Film 1043R
 Folie 3: Wafer-Sägefolie, UV-Curable, Ultron Systems, Inc. Adhesive Plastic Film 1044R
 Folie 4: schwarze Folieprobe, Fa. Nitto, Dicke 90-100 µm
 Folie 5: rote PVC Folieprobe, Fa. Nitto, Dicke 90-100 µm
 Folie 6: gelbe Folie, PVC21, Fa. Nitto, Dicke 190-200 µm
 Folie 7: hellgelbe Folienprobe, (Baumarkt)
 Folie 8: Mikrotiter-Klebeband, Permacel, NeoLab Migge Laborbedarf, Art.-Nr.: 20005082
 Auswertung: Berthold tubeluminometer LB953
 Fängermolekül: CRP-Z Antikörper, Fa. Future Diagnostics, Wijchen (NL)
 Tracer: CRP-Isoluminol-markierte Antikörper, Fa. Future Diagnostics, Wijchen (NL)
 Waschlösung: IO-System 2C-UVL-00

6.1.2 Immunoassays in Glasstrukturen

Als nächste Versuche wurden Immunoassays in mikrofluidischen Küvetten durchgeführt. Die mikrofluidischen Küvetten wurden zunächst nasschemisch in Glas geätzt und mit Schlauchanschlüssen versehen (siehe Abbildung 6-5).

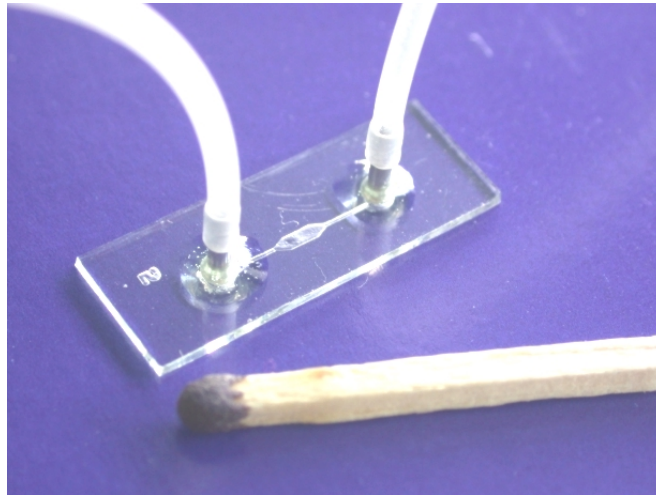


Abbildung 6-5: geätzte Glasküvetten, Kammerlänge 4mm Kammerbreite 1mm Kammertiefe 38µm

Die Küvetten wurden mit einer Adhäsionsfolie (Folie 7 Abbildung 6-4) verschlossen, auf die im Bereich der Pumpkammer vorher die Antikörper aufgebracht wurden. Nachdem die Reaktionschemikalien durch externe peristaltische Schlauchpumpen durch die Kammern gedrückt wurden, wurde die Adhäsionsfolie von den mikrofluidischen Küvetten abgezogen und der biologisch aktive Bereich wieder im Luminometer ausgewertet. Der Vorteil der direkten Aufbringung der Antikörper auf die Adhäsionsfolie besteht in der einfachen Durchführung. Der Nachteil ist jedoch, dass die auf die Folie aufgetragenen Chemikalien für eine gute Reproduzierbarkeit stets den gleichen Tropfendurchmesser und somit die gleiche Fläche des biologisch aktiven Bereiches haben müssen. Dies ist unter Laborbedingungen bei manuellem Auftropfen der Flüssigkeiten schwierig, da eine leichte Bewegung beim Auftropfen bereits einen größeren Tropfendurchmesser und damit eine geringere Flächendichte der Antikörper zur Folge hat. Des Weiteren sind die Folien so auf die Reaktionskammern aufzukleben, dass die aufgetragenen Antikörper sich genau in der Reaktionskammer befinden. Ein Überlappen über den Rand der Reaktionskammer hat eine durch die Chemikalien verringerte Haftkraft der Folie und damit oft ein Ablösen der Folie im Experiment zur Folge. Zudem ergibt sich eine veränderte Reaktionsfläche in der Kammer. Das Ergebnis dieser Tests mit einem CRP-Immunoassay zeigt, dass der Immunoassay im Mittel eine lineare Abhängigkeit des Signals von der Antikörperkonzentration in der Probe aufweist (Abbildung 6-6).

RLU's	0	1	3	30	300	3000
40 µg/ml	687	1490	2135	7246	15712	21331
40 µg/ml	518	2127	1957	10837	13005	18269
Mittelw.	602,5	1808,5	2046,0	9041,5	14358,5	19800,0
Stabw.	119,5	450,4	125,9	2539,2	1914,1	2165,2
CV (%)	19,8	24,9	6,2	28,1	13,3	10,9

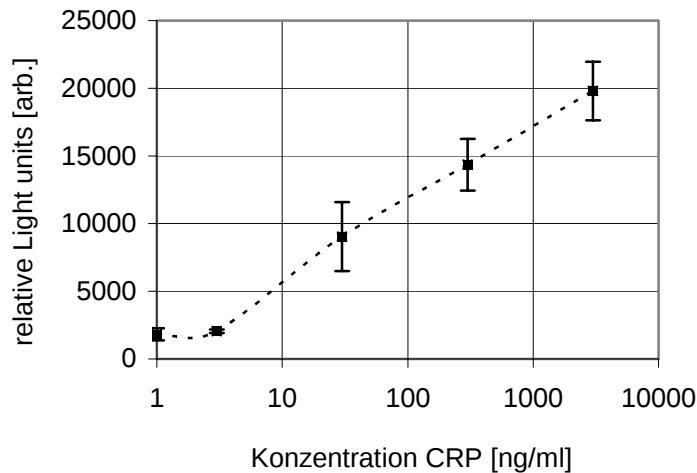


Abbildung 6-6: Ergebnis einer Durchführung von CRP-Immunoassays in mikrofluidischen Glasküvetten²

Die Durchführung eines Immunoassays mit isoluminolmarkierten Antikörpern (Chemolumineszenz) funktioniert also prinzipiell in den mikrofluidischen Küvetten und zeigt die Realisierbarkeit eines Immunoassays im Chipformat. Jedoch haben die Ergebnisse noch eine große statistische Schwankung, die auf die oben erwähnten Einflüsse bei der Durchführung des Assays (sowie beispielsweise auch auf Luftblasen in der Reaktionskammer) zurückzuführen ist. Bei höheren Konzentrationen der Probe tritt zudem teilweise eine Art Sättigungseffekt auf, das bedeutet, dass das Signal bei einer Erhöhung der Konzentration nur noch wenig ansteigt. Als gut geeignete Geometrie stellte sich eine Kammer mit einer Kanalbreite von 1 mm und einer Länge von 4 mm heraus. Bei dieser Geometrie kann die Probe bzw. die Tracerflüssigkeit leicht wieder ausgewaschen werden. Luftblasen können die Kammer passieren. Anhand eines Myoglobinimmunoassays mit dem Lumineszenzlabel Lumiphos 530 wurde der Unterschied zwischen der Durchführung eines Immunoassays in den mikrofluidischen Glasküvetten und auf der Folie untersucht. Bei Durchführung des Immunoassays durch Auftropfen der einzelnen Reagenzien auf die Folie zeigte sich das in Abbildung 6-7 dargestellte Verhalten.

² Fängermolekül: CRP-Z Antikörper 40 µg/ml, Fa. Future Diagnostics, Wijchen (NL)
Waschlösung: IO-System 2C-UVL-00
Tracer: CRP-Isoluminol-markierte Antikörper, Fa. Future Diagnostics, Wijchen (NL)
Auswertung im Berthold Tubeluminometer LB953
Küvetten aus Abbildung 6-5

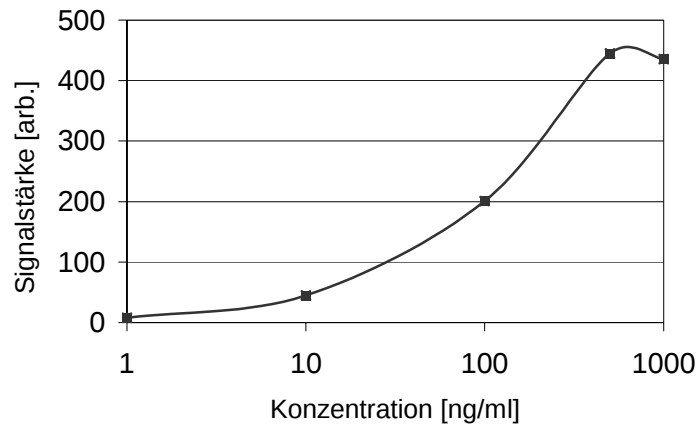


Abbildung 6-7: Myoglobinassay auf Adhäsionsfolie (*Immunchemie direkt aufpipettiert*)³

Die Nachweisgrenze eines auf diese Weise durchgeführten Immunoassays ist besser als ca. 1 ng Myoglobin pro ml Probenflüssigkeit. Bei einer Durchführung eines Immunoassays in mikrofluidischen Küvetten verschlechterte sich das Signal in der in Abbildung 6-8 gezeigten Weise.

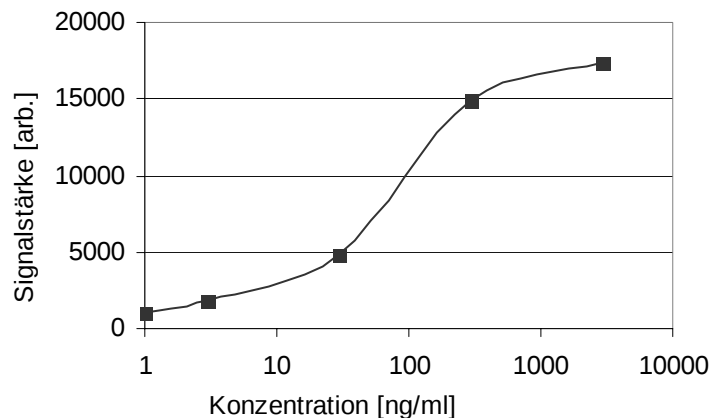


Abbildung 6-8: Myoglobinassay auf Adhäsionsfolie in mikrofluidischen Küvetten (*Chemikalien mit peristaltischer Pumpe von außen zugeführt*)⁴

Die Nachweisgrenze für Myoglobin ist in den Küvetten etwa um den Faktor 10 schlechter. Bei hohen Konzentrationen zeigt der Immunoassay sowohl auf den Folien (Abbildung 6-7) als auch in den Küvetten (Abbildung 6-8) den bereits erwähnten Sättigungseffekt. Grund für diesen Sättigungseffekt könnte die durch die kleine Folienfläche begrenzte Anzahl von Fängermolekülen auf der Oberfläche sein. Um die Oberfläche, an der die Fängermoleküle befestigt sind, zu vergrößern, wurde ein Myoglobinassay auf einer mit Nitrozellulose beschichteten Kunststoffolie durchgeführt (Abbildung 6-9).

³ Folie 6: gelbe Folie, PVC21, Fa. Nitto, Dicke 190-200 µm
 Marker: Lumiphos 530,
 Myoglobin Antikörper, Fa. Medix Biochemica, Kauniainen Finnland
 Auswertung im Lucie Plate Luminometer

⁴ Wie in ³, Küvetten aus Abbildung 6-5

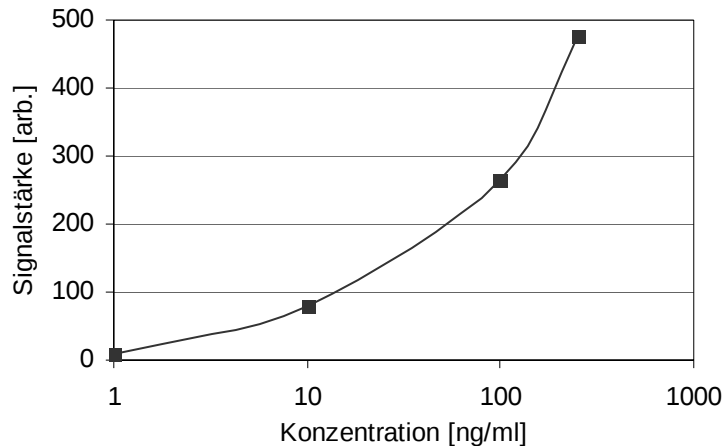


Abbildung 6-9: Myoglobinassay auf Nitrozellulosefolie (*Immunchemie direkt aufpipettiert*)⁵

Die Nitrozellulose hat eine faserartige Struktur und dadurch eine sehr große Oberfläche. Die Nachweisgrenze des auf der Nitrozellulosefolie durchgeführten Immunoassays ist, ähnlich wie bei dem auf der Folie durchgeführten Immunoassay besser als ca. 1 ng Myoglobin pro ml Probenflüssigkeit. Die Ergebnisse sind bei allen Konzentrationen gut reproduzierbar und zeigen keinen Sättigungseffekt. Die Durchführung der Immunoassays auf der Nitrozellulosefolie bietet neben den Vorteilen des besseren Signals auch noch die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Vorteile beim Einbringen der Antikörper in die Reaktionsbereiche.

6.1.3 Kunststoffstrukturen, Antikörper auf Nitrozellulosefolie

Durch das Aufbringen der Antikörper auf eine mit Nitrozellulose beschichtete Kunststoffolie als Trägermaterial lassen sich, wie bereits gezeigt, viele Probleme vermeiden. Die homogene Beschichtung dieses Trägers mit Antikörpern kann, unabhängig von anderen Fertigungsprozessen, durch Eintauchen großer Nitrozellulosestücke in eine Antikörperlösung erfolgen. Aus dieser Folie werden gleich große Stücke ausgeschnitten und auf die Klebefolie in den Bereichen der Reaktionskammern aufgebracht. Durch die Tauchbeschichtung mit den Antikörpern wird eine Variation der Flächendichte der Antikörper vermieden. Ein Überlappen über die Randbereiche der Reaktionskammern kann durch die Dicke der Nitrozellulosefolie ebenfalls verhindert werden. Um die Nitrozellulosefolie möglichst einfach ausschneiden zu können und ein Einpassen in die Reaktionskammern zu vereinfachen, ist eine runde Geometrie der Reaktionskammer von Vorteil. Die runden Nitrozellulosestücke können einfach mit einer Lochstanze zugeschnitten und in die Reaktionskammern eingelegt werden. Senkrechte Kammerwände erleichtern dabei das reproduzierbare Einlegen der Nitrozellulose. Solche runden Reaktionskammern mit ausreichender Kammerhöhe und senkrechten Kammerwänden lassen sich photolithografisch gut aus SU-8 Photoresist fertigen.

⁵ Wie in ³, Nitrocellulose: Fa. Whatman (5 µm supported)

6.1.4 Auswertung durch Fluoreszenz

Die Auswertung der Immunreaktion durch Chemolumineszenz bietet in den bisherigen Versuchen nur die Möglichkeit, die Folien von den Kammerstrukturen abzuziehen und „Off-Line“ im Luminometer auszuwerten. Eine „On-Line“-Auswertung der Lumineszenzreaktion würde für den späteren Assaychip eine Integration der zusätzlichen Flüssigkeitsreservoirs für die Triggerlösungen sowie der damit verbundenen Flüssigkeitssteuerung in den Chip bedeuten. Eine wesentlich einfachere „On-line“-Auswertung auf dem Chip ist durch Markierung des Tracers mit einem Fluoreszenzlabel besser zu realisieren, da auf dem Chip keine zusätzlichen Komponenten integriert werden müssen. Die Möglichkeit ein Fluoreszenzlabel zu verwenden wurde durch die Durchführung von Immunoassay-Versuchen auf Nitrozellulosefolien untersucht. Als Fluoreszenzlabel dient dabei der Fluoreszenzmarker Streptavidin mit Alexa Fluor® 750. Durch die Streptavidinbindung dieses Fluoreszenzlabels ist es relativ einfach, dieses an einem biotinierten Antikörper anzubringen. Dieses Fluoreszenzlabel besitzt durch einen 2-stufigen Fluoreszenzprozess einen sehr breiten Stokesshift und scheint daher für eine Messung mit hoher Genauigkeit gut geeignet. Das Anregungs- und Emissionsverhalten dieses Markers wurde in einem Spektrometer vermessen. Dazu wurde der Farbstoff mit Wellenlängen zwischen 550 nm und 650 nm angeregt und die entsprechende Emission aufgenommen. Abbildung 6-10 zeigt die Intensität der Emission, aufgetragen über der Anregungswellenlänge.

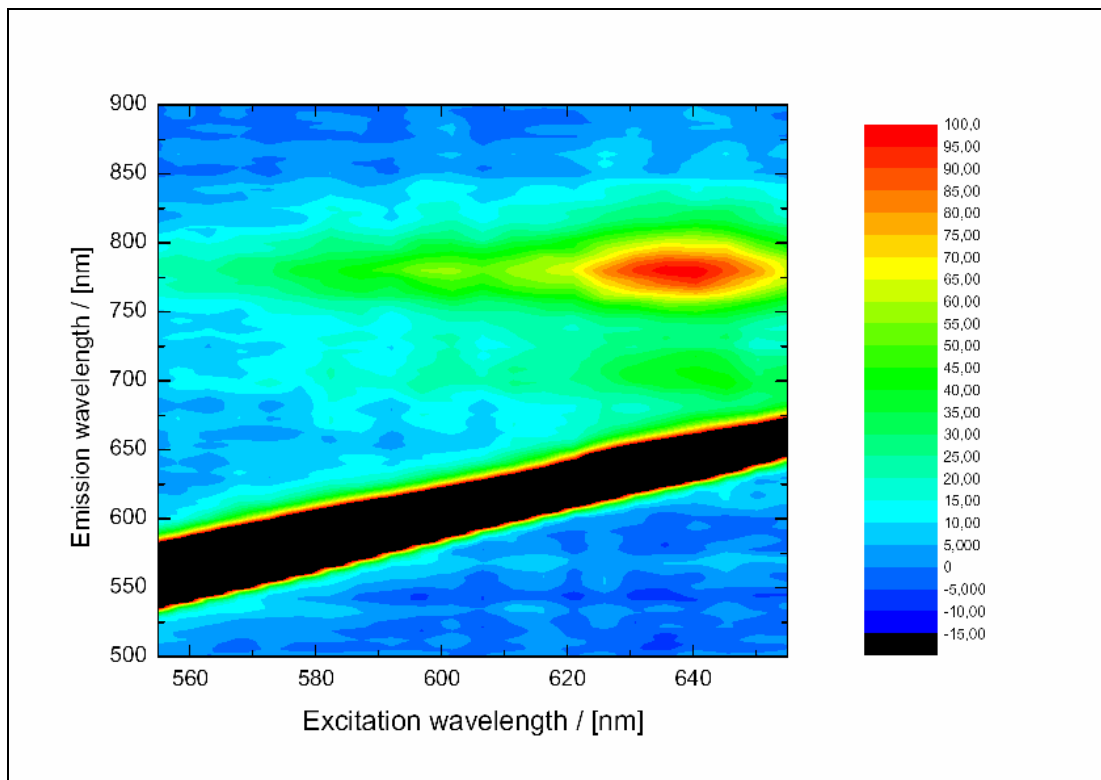


Abbildung 6-10: Darstellung der Fluoreszenz-Emission abhängig von der Anregung [LRE 03]

Der dunkle Bereich in Abbildung 6-10 demonstriert die Detektion des anregenden Signals. Der rote Bereich der maximalen Emission zeigt, dass der Farbstoff bei einer Anregung mit Wellenlängen von etwa 630-640 nm ein Fluoreszenzsignal um 775 nm hat. Um eine quantitative Auswertung eines Immunoassays mit diesem Fluoreszenzfarbstoff durchführen zu können, wurde ein Fluoreszenzdetektor **PROFIParaMeter** der Firma LRE (im Folgenden nur noch kurz **LRE-Reader** genannt) verwendet. Dieser LRE-Reader dient normalerweise der Auswertung von Streifentests (z.B. Schwangerschaftstests). Ein auszuwertender Teststreifen wird in einen Halter (im folgenden **LRE-Slide** genannt) eingelegt, der in den LRE-Reader eingezogen und in einer Richtung abgescannt wird. Ausgegeben wird die Signalhöhe des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom Ort auf dem LRE-Slide. Dieser Reader wurde durch die Firma LRE mit geeigneten Filtern (IR1013 Abbildung 6-11) und einem geeigneten Anregungslaser (642nm Abbildung 6-11) für die Detektion des Fluoreszenzlabels Alexa Fluor® 750 ausgerüstet.

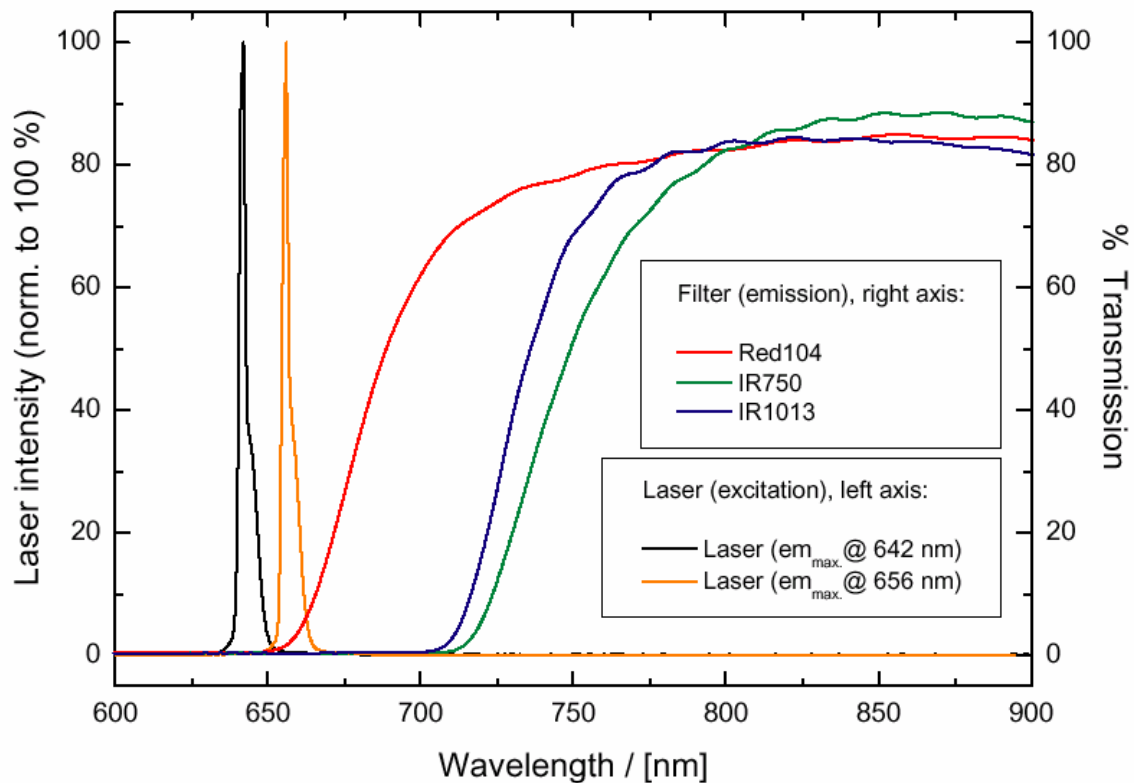


Abbildung 6-11: Absorptions- bzw. Emissionskurven verschiedener Filter und Laser [LRE 03]

Auf runden Nitrozellulosestücken wurden Immunoassays mit verschiedenen Myoglobinkonzentrationen durchgeführt und im modifizierten LRE-Reader abgescannt. Die Signalhöhe des Fluoreszenzsignals der einzelnen Nitrozellulosestücke zeigt Abbildung 6-12 (links). Durch Mittelung der Peakhöhe dieser Fluoreszenzsignale und nach Abzug des Mittelwertes des Untergrundsignals ergibt sich für die Signale die in Abbildung 6-12 rechts gezeigte Abhängigkeit des Signals von der Myoglobin-Konzentration. Die Werte zeigen noch relativ hohe statistische Schwankungen.

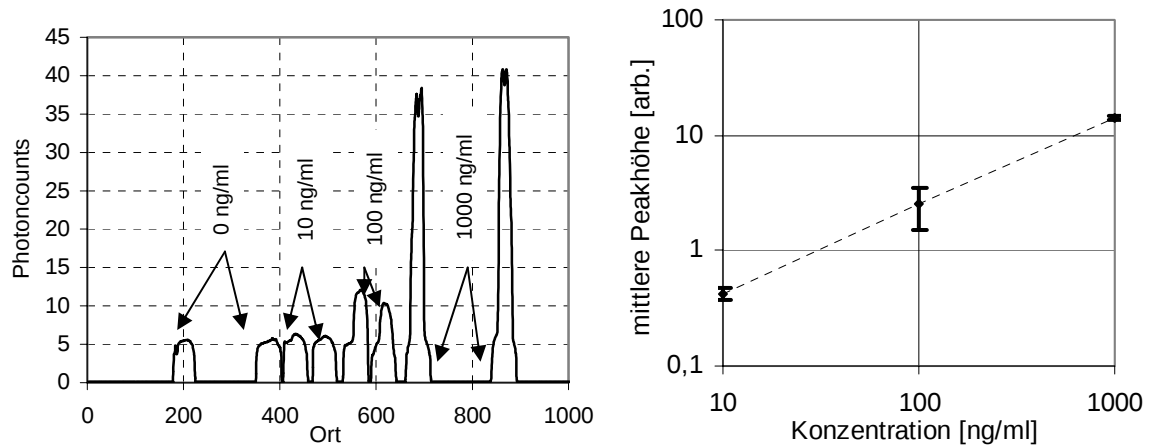


Abbildung 6-12: Myoglobinassay mit Fluoreszenzlabel auf Nitrozellulose⁶
(Konzentrationen je 2-mal 0, 10, 100 und 1000 ng Myoglobin/ml). Rechts: aus dem Diagramm errechnete mittlere Peakhöhe über der Konzentration aufgetragen.

6.2 Entwicklung einer integrierbaren Pumpe

Im vorherigen Abschnitt wurden für die Steuerung der Reaktionsflüssigkeiten durch die mikrofluidischen Küvetten externe peristaltische Schlauchpumpen verwendet. Geeignete Pumpen sollen im nächsten Arbeitsschritt in einen Chip mit den Küvettenstrukturen integriert werden. Die Reaktionsflüssigkeiten können dabei noch aus externen Flüssigkeitsreservoirs zu den Pumpen geführt werden. Eine geeignete in den Chip integrierbare Pumpe stellt eines der entscheidenden Konstruktionselemente des mikrofluidischen Immunoassays dar.

Stand der Technik

Die ersten Mikropumpen basierten oft auf der Nachahmung der Konzepte von vorhandenen Großpumpen. Dabei stellt die Förderung von Flüssigkeiten oder Gasen im Wesentlichen eine Umwandlung von mechanischer in hydraulische Energie dar. Dies kann auf unterschiedliche Arten geschehen. So wird das Fördergut durch Verdrängung (z.B. oszillierende oder kontinuierlich-periodisch Pumpen) mechano-dynamisch (z.B. durch rotierende und Strahlpumpen) oder über elektrohydrodynamische und magnetohydrodynamische Prinzipien in einen bestimmten Volumenabschnitt verdrängt. Die mechanischen Pumpen enthalten dabei zum Transport von Flüssigkeiten meistens ein oder mehrere bewegliche Teile, wie z.B. Ventile, oszillierende Membranen oder Turbinen. Die Verkleinerung makroskopischer Pumpen hat jedoch physikalische Grenzen, da bei fortschreitender Miniaturisierung Oberflächeneffekte an Bedeutung gewinnen, während volumenbedingte Eigenschaften an Bedeutung verlieren. Eine Übersicht über die zur Anwendung kommenden Pumpprinzipien findet sich in Abbildung 6-13.

⁶ Marker: Alexa Fluor® 750
Myoglobin Antikörper, Fa. Medix Biochemica, Kauniainen Finnland
Nitrocellulose: Fa. Whatman (5 µm supported) (Immunchemie direkt aufpipettiert)

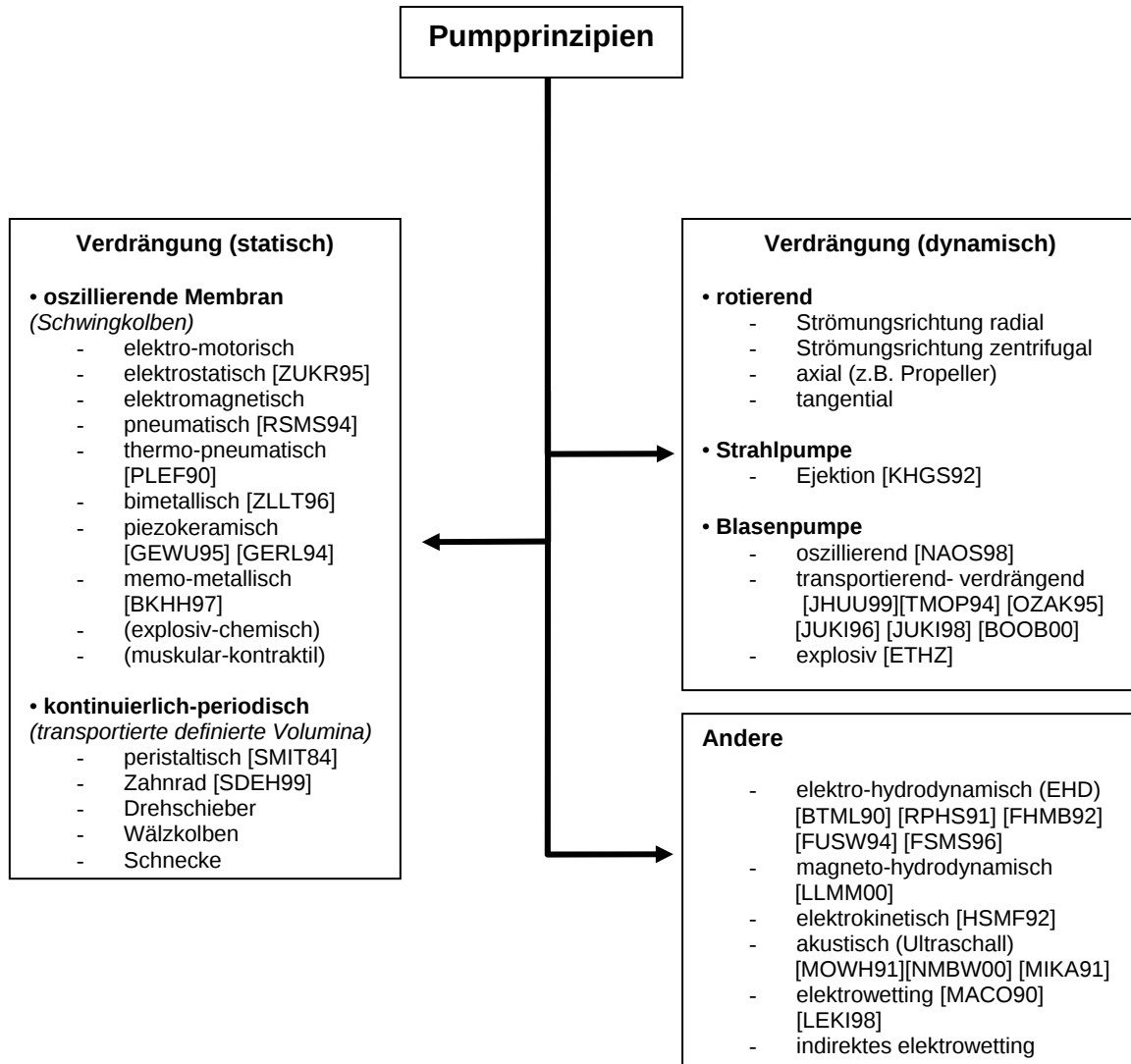


Abbildung 6-13: Übersicht über dokumentierte Pumpprinzipien [KAMP01]

Beispiel für eine mechanische Pumpe stellt eine piezoelektrisch angetriebene Pumpe mit Rückschlagventil dar, die bereits 1978 vorgestellt wurde [SPEN78]. 1980 folgte eine weitere (peristaltische) Mikropumpe [SMIT83], die aus drei piezoelektrisch betriebenen Ventilen besteht. Diese Mikropumpe erreichte Pumpleistungen von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und eine Pumphöhe von 60 cm.

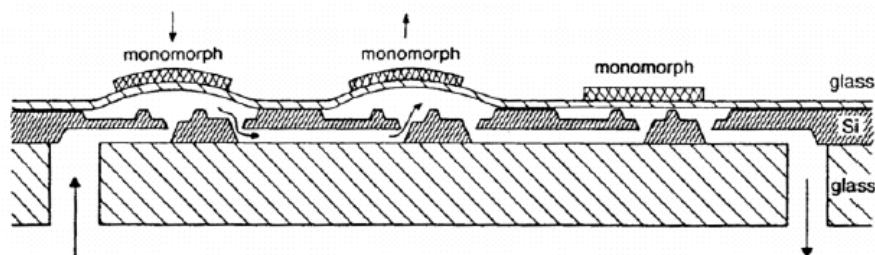


Abbildung 6-14: eine der ersten Mikropumpen [SMIT83]

Weiterentwicklungen führten 1988 zu einer Mikropumpe [LIPB88] aus einem piezoelektrischen Verdränger und zwei passiven Rückschlagventilen, die in einem Si-Wafer durch zweiseitige Lithographie- und Ätzprozesse hergestellt wurden.

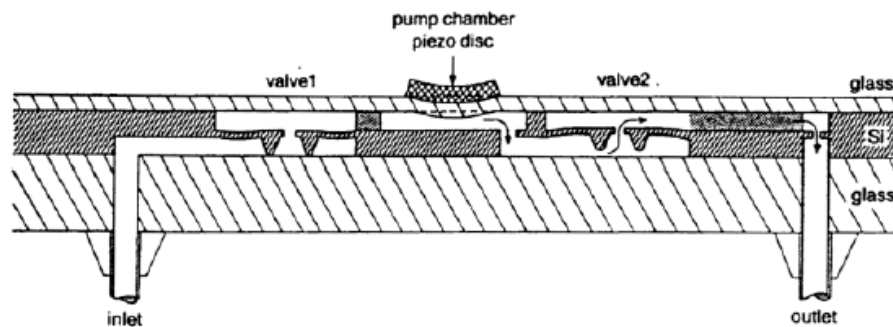


Abbildung 6-15: Mikropumpe mit zwei passiven Ventilen [LIPB88]

Bei dieser Ausführung besteht der Verdränger aus einer 190 μm starken Glasmembran, welche von außen mit einer Piezokeramik beklebt ist. Wird die Piezokeramik mit einer elektrischen Spannung betrieben, verbiegt sich die Glasmembran. Dadurch wird das inkompressible flüssige Medium verdrängt, das Pumpvolumen vergrößert sich und das Einlassventil des Pumpmediums wird angesaugt. Infolge der Verbiegung wird das Pumpkammervolumen verkleinert und bewirkt das Ausströmen des Mediums durch das Auslassventil. Wird ein periodisches Signal an den Aktor angelegt, erhält man eine zyklische Änderung des Pumpkammervolumens, wobei die Pumprichtung durch die passiven Rückschlagventile vorgegeben ist. Die Abmessungen der Pumpe betragen 30 mm x 15 mm. 1994 wurde eine Mikropumpe mit elektrostatischem Antrieb und passiven Rückschlagventilen vorgestellt, die erstmals eine Pumprichtungsumkehr erlaubt [ZENG94]. Dabei arbeitet die Pumpe bei einer Antriebsfrequenz von 800 Hz im Vorwärtsmodus und kehrt die Pumprichtung im Bereich von 2-6 kHz um. Die Pumpen werden oberhalb der Resonanzfrequenz der Ventile in ihrem Medium betrieben, wobei es zu einer Phasenverschiebung zwischen Ventil- und Pumpkammerdruck kommt, der das Pumpmedium und die Ventile bewegt. Somit ist das Einlassventil noch geöffnet, während das Medium aufgrund der hohen Frequenz bereits einen Druckanstieg hat. Das Auslassventil öffnet durch Resonanz bei negativer Amplitude des Mediumdruckes. Die Phasenverschiebung zwischen Resonanzfrequenz der Ventile sowie des Mediums bewirken die Rückströmung.

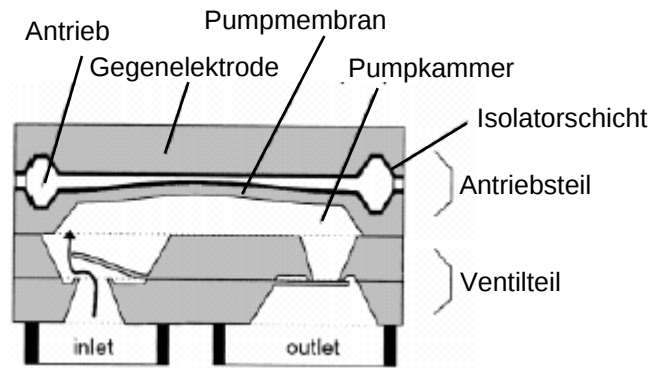


Abbildung 6-16: Mikropumpe mit Möglichkeit der Pumprichtungsumkehr [ZUKR95]

Die in Silizium gefertigte Pumpe wurde durch einen anisotropen Ätzprozess strukturiert und ist dreilagig aufgebaut. Die unteren beiden Wafer enthalten die Ventilstrukturen und in den oberen ist die Pumpkammer geätzt. Durch den kompakten Aufbau besitzt die Pumpe Abmessungen von 7 mm x 7 mm x 2 mm. Um eine selbstbefüllende Mikropumpe zu erhalten, wurde das Kompressionsverhältnis der Pumpe so gestaltet, dass ein Druck aufgebaut wird, welcher auf einen kritischen Wert von 70 hPa steigt und somit eine Selbstbefüllung der Pumpe erreicht [RICH97]. Eine Optimierungsmöglichkeit stellt die Verwendung von anderen Materialien dar, wie z.B. Polyimid, Polyester und Polymethylmetacrylat. Peristaltische Pumpen benötigen keine Rückschlagventile und basieren auf dem Prinzip der Verdrängung. Die darauf aufgebauten Pumpen besitzen jedoch mindestens 3 Pumpkammern, um eine Druckwelle zu erzeugen, welche das Pumpmedium durch die Kanäle vor sich herschiebt. Der Aufbau einer peristaltischen Mikropumpe besteht aus drei hintereinander geschalteten Ventilen, die durch Steuerung von außen geöffnet oder geschlossen werden. Werden die Ventile mit einem Dreiphasentakt angesteuert, entsteht eine Druckwelle, deren Richtung durch die Änderung des Taktregimes umkehrt werden kann. Bei einer Größe von 30 mm x 15 mm x 2 mm beträgt die Pumprate 100 ml/min. Ein gut miniaturisierbares Funktionsprinzip stellt die elektrohydrodynamische Pumpe dar. Bei dieser Pumpenart werden keine beweglichen Elemente benötigt, da die Fluidmoleküle in einem elektrischen Feld beschleunigt werden [RPHS91]. Die Pumpe besteht aus zwei sich gegenüber stehenden Gitterelektroden, die in Silizium hergestellt sind. An die Elektroden wird eine Antriebsspannung angelegt, und es tritt eine Strömung des Mediums durch die Gitter ein. Für die Bewegung der Ionen zwischen den Elektroden ist die Coulombsche Kraft verantwortlich. Die Ionen werden durch elektrochemische Reaktionen an den Elektroden freigesetzt. Ein wesentlicher Nachteil besteht in der Verwendung des Pumpmediums, da es sich dabei um eine hochisolierende Flüssigkeit handeln muss. Der beachtlichen Pumprate von 14 ml/min liegt eine Pumpengröße von 4 mm x 4 mm x 0,7 mm zu Grunde. In einer elektrisch leitenden Lösung kann man mit Hilfe der Lorenz-Kraft eine magnetohydrodynamische Pumpwirkung erzielen. Ebenso werden elektrokinetische Mikropumpen zum Transport von elektrisch leitenden Flüssigkeiten genutzt. Dabei kommen zwei Effekte in Betracht, zum einen Elektrophorese und zum anderen Elektroosmose (siehe Kapitel 4.1).

Eine weitere Mikropumpenentwicklung wurde 1993 vorgestellt [STEM93]. Dabei handelt es sich um eine ventillose Pumpe, die durch einen piezoelektrischen Aktor angetrieben wird. Durch die Kombination der Strömungselemente Diffusor und Düse lässt sich eine Durchflussvorzugsrichtung erzeugen.

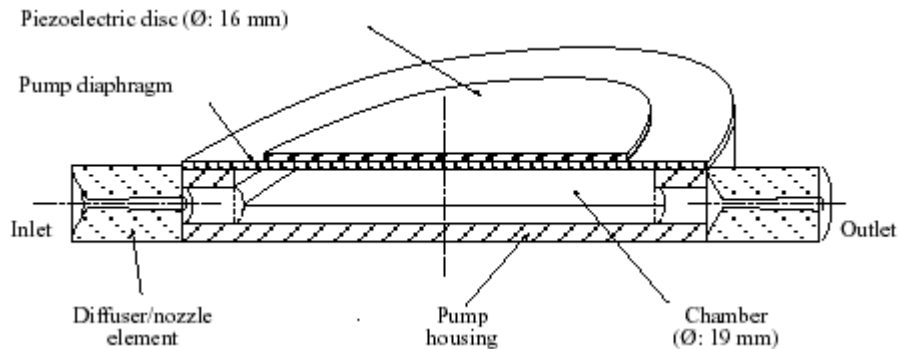


Abbildung 6-17: Mikropumpe mit Diffusor und Düse [STEM93]

Der Diffusor stellt dabei eine sich öffnende und die Düse eine sich verjüngende Röhre dar. Infolge der geometrischen Gestaltung wird bei gleicher Fließgeschwindigkeit ein geringerer Druckabfall in Richtung des Diffusors als in Richtung der Düse erzeugt. Vergrößert sich das Pumpkammervolumen, arbeitet das Einlassventil als Diffusor, wodurch bei kleinerem Fließwiderstand das Auslassventil als Düse wirkt. Der größere Volumenstrom findet somit durch den Einlass statt. Wird das Pumpvolumen verkleinert und das Auslassventil arbeitet jetzt als Diffusor, ist ein größerer Volumenstrom am Auslass zu verzeichnen. Der erste Prototyp erreichte somit einen Maximaldruck von 100 hPa und einen Durchfluss von 3,3 ml/min bei einer Pumpkammergröße von 19 mm Durchmesser. Eine verbesserte Version wurde in der Silizium-Technologie realisiert, wobei die Strömungselemente weiter optimiert und eine Pumprate von 2,3 ml/min und ein Druck von 740 hPa erreicht wurden. Dynamische passive Ventile finden eine breite Anwendung in Mikropumpen. Durch die einfachen Strukturen der Strömungselemente können neben Flüssigkeiten auch Gase transportiert werden. Ein Beispiel dafür ist auch eine Mikropumpe mit pyramidenförmigen Mikrokanälen aus Silizium (siehe Abbildung 6-18), die einen Strömungswiderstand besitzt, welcher von der Strömungsrichtung abhängig ist [GERL93].

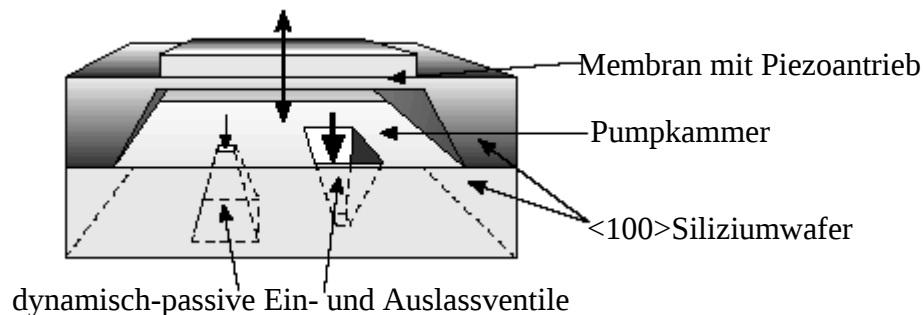


Abbildung 6-18: Skizze einer Silizium-Mikropumpe mit dynamisch-passiven Ventilen [GERL96]

Der Öffnungswinkel der Ventile beträgt ca. 70° , wodurch sich eine Strömungsgrenzschicht in der negativen Strömungsrichtung ausbildet. Die Abmaße dieses Prototypen erreichen 5 mm x 5 mm x 1 mm bei einer Pumprate von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$. Diese Übersicht über bisher konstruierte Mikropumpen kann natürlich noch endlos fortgesetzt werden und zeigt die Vielfalt der bisher entwickelten Mikropumpen für die verschiedensten Anwendungsgebiete.

Die meisten dieser bisher vorgestellten Mikropumpen sind durch einen relativ komplizierten Aufbau (oft in mehreren Ebenen) gekennzeichnet, der einen hohen Fertigungs- und Montageaufwand erfordert. Die vorgesehene Verwendung der Pumpe in einem preiswert herzustellenden (Einweg-) Produkt schließt eine Verwendung der klassischen Ventilmikropumpen sowie auch der anderen vorgestellten Pumpen für diese Anwendung aus.

Es soll daher eine Pumpe entwickelt werden, die einen für die Serienfertigung günstigen und einfachen Aufbau in nur einer Ebene hat und durch eine Optimierung der dynamischen Eigenschaften der Pumpe eine hohe Pumpleistung ermöglicht. Dass sich viele dieser geforderten Eigenschaften mit einer Mikropumpe mit hydrodynamischen Ventilen erfüllen lassen, ist z.B. in der Dissertation von Thorsten Gerlach 1996 [GERL96] anhand einer in Silizium hergestellten Mikropumpe gezeigt worden. Jedoch wird diese Pumpe durch ihren dreidimensionalen Aufbau und durch die Einschränkung der Materialwahl auf Silizium den oben erwähnten Anforderungen für die Integrierbarkeit in einen Einwegchip nicht gerecht.

Mikropumpen im Vergleich

Abbildung 6-19 fasst die Daten einiger aktueller Mikropumpen zusammen:

Pumpe	Antrieb	Ventilart	Pumprate bei Frequenz	maximaler Gegendruck	Abmessungen (LxBxH) [mm]
[SDEH99]	Piezo-monomorph	passiv-dynamisch	500µl 0-70Hz	200000Pa	12x12x3
[STEH99]	pneumatisch	passiv-dynamisch	2000µl/min -	17000Pa	-
[STEH99]	Piezofolien-aktor	passiv-dynamisch	14µl/min -	17000Pa	7x7x7
[GERL96]	Piezo-monomorph	passiv-statisch	100-500µl/min 100Hz	2000-7000Pa	(13-7) ² x1
[ZUKR95]	elektrostatisch	passiv-dynamisch	250-850µl/min ca. 1kHz	31000Pa	7x7x2
[AWNE01]	Piezo-monomorph	passiv-statisch	2,3µl/min 700Hz	-	-
[KIJG]	indirektes elektrowetting	passiv-dynamisch	60µl/min 15Hz	600Pa -	-
[OLHÖ98]	Piezo-monomorph	passiv-statisch	170-1900µl/min 0,41-2,02kHz	1100-7700Pa	D3-5x0,2
[NGHU00]	Piezo-monomorph	passiv-statisch	3000µl/min 100Hz	-	D15x8

Abbildung 6-19: Übersicht der Daten von Mikropumpen mit oszillierendem Antrieb [KAMP01]

6.2.1 Aufbau

Die Pumpe soll in den Chip integrierbar sein. Die dabei verwendeten Ventile sollten robust und tolerant gegenüber Durchfluss von Partikeln sein, so dass sie zum Transport von partikelbeladenen Fluiden, wie z.B. Blutproben, geeignet sind. Sie sollten nach Möglichkeit keine bewegten Teile enthalten. Dies kann beispielsweise durch eine Funktionsweise realisiert werden, deren Grundprinzip auf einem Patent von Nikola Tesla [TESL20] von 1920 beruht. Die sogenannte Tesladiode stellt ein fluidisches Kanalsystem dar, dessen Fluidikwiderstand sich bei Umkehr der Strömungsrichtung ändert. Dies wird durch eine Kanalgeometrie erreicht, welche in der einen Durchflussrichtung mehr Verwirbelungen als in der anderen erzeugt und somit in der einen Richtung mehr Energie dissipiert als in der anderen (Grundlagen dazu in [KOEB00]). Eine Pumpe mit einem ähnlichen Pumpprinzip wird in [GERL94] [GEWU95] [GERL96] beschrieben. Jedoch ist die dort beschriebene Pumpe nur in Siliziumtechnik zu fertigen, da die Ventile dieser Pumpe durch anisotropes Ätzen von Diffusorstrukturen in Silizium hergestellt werden. Für

eine Integration in einen Chip soll eine Pumpe mit hydrodynamischen Ventilen, möglichst als planarer Aufbau, bei flexibler Materialwahl (z.B. verschiedene Kunststoffe oder Glas) mit strömungstechnisch optimiertem Aufbau entwickelt werden. Die Funktionsweise einer solchen hydrodynamischen Pumpe beruht darauf, dass einer durch eine schwingende Antriebsvorrichtung erzeugten, alternierenden Strömung, mit Hilfe von richtungsabhängigen Strömungswiderständen, eine Richtung aufgeprägt wird.

Die grundlegenden Funktionselemente dieser Pumpen sind im Wesentlichen:

- Die Ventile
 - o das Einlassventil
 - o das Auslassventil
- die Pumpkammer
- der Pumpenantrieb

Das Einlass- und das Auslassventil sollen durch Strömungskanäle mit richtungsabhängigen Strömungswiderständen realisiert werden. In der einen Strömungsrichtung soll sich eine laminare Strömung ausbilden und somit einen geringen Strömungswiderstand verursachen, wohingegen in der anderen Strömungsrichtung aufgrund von Verwirbelungen ein möglichst großer Strömungswiderstand erreicht werden soll. Dies kann zum Beispiel durch Diffusoren oder Düsen erfolgen. Daher muss zunächst durch die Entwicklung und Charakterisierung verschiedener hydrodynamischer Ventilstrukturen ein Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Pumpe mit diesen Strukturen gefunden werden. Basierend auf diesen Grundlagen soll eine in den Chip integrierbare Pumpe entwickelt und optimiert werden. Dazu wurden die Ventilstrukturen sowohl in ihrem statischen als auch in ihrem dynamischen Verhalten mit der Computersimulationssoftware Ansys CFX-5 simuliert. Mit Hilfe dieser Simulation(en) sollen optimierte Ventilstrukturen entwickelt werden. Da die Ausbildung von Wirbeln in der Strömung neben der geometrischen Struktur der Kanäle stark von den viskosen Eigenschaften der verwendeten Flüssigkeit und deren Fließgeschwindigkeiten abhängt, ist ein Vergleich der Funktionsweise verschiedener Strukturen bei unterschiedlichen Drücken zu untersuchen. Für die ersten Voruntersuchungen wurde ein Prüfstand aufgebaut, auf dem die Ventile bezüglich ihres statischen Sperr- / Durchlassverhaltens untersucht werden konnten. Die Strukturen sollten mit verschiedenen Fertigungsverfahren (nasschemisch, laserstrukturiert, heißgeprägt,...) in verschiedenen Materialien (Glas, verschiedene Kunststoffe) hergestellt werden, um möglichst flexibel für die spätere Integration in den Chip zu sein. An die Entwicklung der Ventile schließt sich dann die Entwicklung der Pumpkammer an. Die Pumpkammer soll ein Flüssigkeitsvolumen mit Hilfe einer Membran einschließen. Auf diese Membran soll durch einen Piezoaktor oder einem externen Antrieb eine Druckschwingung auf die Flüssigkeit übertragen werden. Durch die dynamischen Ventile wird diese Druckschwingung in einen gerichteten Flüssigkeitsstrom durch die Kammer umgewandelt. Solche Pumpkammern sollen hergestellt und mit den Ventilen verbunden werden, um die dynamischen Eigenschaften

der Ventile zu untersuchen. Eine Optimierung der Strukturen soll durch Computersimulation erfolgen, wobei die Ergebnisse aus den ersten praktischen Versuchen die Eingangsbedingungen für die Simulation festlegen sollen. Die mit der Simulation entwickelten und optimierten Strukturen sollen wieder hergestellt und die praktischen Ergebnisse anschließend mit den Ergebnissen der Simulation verglichen werden. Für Anwendungen, bei denen sich der Pumpenantrieb aus oben genannten Fertigungs- und Kostengründen nicht wirtschaftlich in die Pumpstruktur integrieren lässt, sollte die Möglichkeit bestehen, eine Standardschnittstelle zwischen Antrieb und Pumpenmembran definieren zu können, um einen geeigneten externen Antrieb, z.B. piezoelektrisch, zu entwickeln.

6.2.2 Die Ventile

Energiebetrachtung und Fluidwiderstand

Da die Ventile sich möglichst dicht an die Pumpkammer anschließen sollen, werden ihre pumpkammerseitigen Eingangsdrücke P_{12} und P_{21} durch die in der Pumpkammer erzeugte periodische Druckschwankung P_- bestimmt. Die Gesamtenergie des strömenden Fluids ist:

$$E_{\text{Gesamt}} = m \cdot g \cdot h + \frac{m}{\rho} \cdot p + m \cdot \frac{v^2}{2} + m \cdot u$$

Gleichung 6-1: Gesamtenergie des strömenden Fluids [SIGL96]

Die Aufstellung des Energieerhaltungssatzes für das Ventil als ein Element der Mikropumpe führt zu $E_1 = E_2 + E_v$ (Bernoulli-Gleichung), mit E_1 , E_2 als Eingangs- bzw. Ausgangsenergie und E_v als die im Ventil „verbrauchte“ Verlustenergie. Einsetzen von Gleichung 6-1 mit Indizes für die Einzelterme, umstellen auf E_v und um die Masse kürzen bringt:

$$\frac{E_v}{m} = g \cdot h_1 + \frac{p_1}{\rho} + \frac{v_1^2}{2} + u_1 - \left(g \cdot h_2 + \frac{p_2}{\rho} + \frac{v_2^2}{2} + u_2 \right)$$

Gleichung 6-2: Energieverlust pro Masse innerhalb eines Ventils

Aufgrund der geringen Abmessungen der Ventile kann die Höhendifferenz vernachlässigt werden ($h_1 = h_2$). Weil ferner kein Volumen innerhalb des Ventils gestaut oder gespeichert werden kann und Ein- und Ausgangsöffnung des Ventils gleich groß sind (Kontinuitätsgleichung: $v_1 \cdot A_1 = v_2 \cdot A_2$), können v_1 und v_2 gleichgesetzt werden. Weiterhin können die thermischen Anteile bei Annahme eines adiabatischen Systems

unbeachtet bleiben. Damit ergibt sich die Verlustenergie eines bestimmten Flüssigkeitsvolumens bei Durchströmen des Ventils aus:

$$E_v = \frac{m}{\rho} \cdot (p_1 - p_2) \quad \text{oder} \quad E_v = V \cdot (p_1 - p_2)$$

Gleichung 6-3: Vereinfachter Energieverlust innerhalb eines Ventils

Damit das Ventil bei einer Druckschwankung in der Pumpenkammer zwischen positiven und negativen Werten unterschiedliche Energieverluste verursacht, müssen die Energieverluste des Ventils richtungsabhängig sein. Damit sind die Druckverluste bei einer Druckschwankung in der Pumpenkammer zwischen positiven und negativen Werten unterschiedlich. Somit ergibt sich ein Netto-Volumentransport von V_1 nach V_2 und damit ein Pumpeffekt. Anstelle der Angabe der Verlustenergie für die Ventile kann als anschaulichere Interpretation der Begriff des fluidischen Widerstandes, analog zur Elektrotechnik, verwendet werden. Der fluidische Widerstand wird dabei in Abbildung 6-20 analog zum Ohmschen Gesetz gesehen.

**Analogie zwischen elektrischem
und fluidischem Widerstand**

elektrisch	fluidisch
Spannung U	Druckunterschied Δp
Strom I	Volumenstrom Φ
$\Rightarrow R = \frac{U}{I}$	$\Rightarrow R_F = \frac{\Delta p}{\Phi}$

Abbildung 6-20: Analogie zwischen elektrischen und fluidischen Widerständen

Der Energieverlust bzw. der Widerstand kann damit als ein elektrischer Schaltplan veranschaulicht werden. Die Veranschaulichung der Ventile in einem solchen Schaltplan beinhaltet jeweils eine Diode und je einen ohmschen Widerstand parallel und in Reihe geschaltet. Der Widerstand R_{parallel} stellt den „Grund“-Fluidwiderstand bei minimaler Strömung in beiden Richtungen dar. Die Diode D zusammen mit dem Widerstand R_{reihe} repräsentiert den richtungsabhängigen Widerstand. Abbildung 6-21 zeigt diesen Schaltplan.

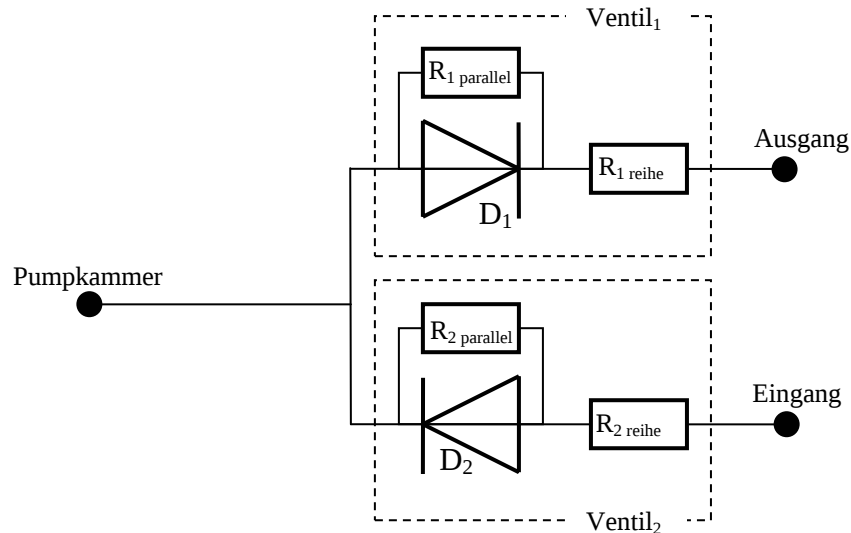


Abbildung 6-21: Ersatzschaltbild der Ventilkonstellation

Der „Grund“-Fluidwiderstand des Ventils tritt in beiden Richtungen auf. Der richtungsabhängige Widerstand der Diode erhöht den Gesamtwiderstand des Ventils gegen die Strömung. Damit kann das Ventil in Analogie zu einer elektrischen Diode betrachtet werden.

Statisches Verhalten der Ventile

Erste Versuche zum Verhalten der Ventile wurden mit excimerlaserstrukturierten Ventilstrukturen aus Polycarbonat durchgeführt. Die ersten Experimente zum statischen Verhalten sollten dabei Werte für den Volumenstrom je Durchflussrichtung bringen. Durch einen einfachen experimentellen Aufbau wurde die Messung des Volumenstroms auf eine reine Volumen- bzw. Zeitmessung reduziert. In der ersten Variante wurden die Drücke dabei hydrostatisch durch Variation der Höhe eines Flüssigkeitsbehälters erzeugt. Der unter Laborbedingungen praktikable maximale Eingangsdruck lag mit diesem Aufbau bei 0,22 bar. Um die Strukturen auch bei höheren Drücken zu vermessen, wurde ein Spritzenkörper verwendet, aus dem die Testflüssigkeit mittels Luftdruck durch die Kanalstrukturen gepresst wurde. Bei Messungen über 1,4 bar begann das Schlauchsystem undicht zu werden. Alle mit dem Laser strukturierten Ventilstrukturen wurden unter Verwendung einer Maske hergestellt. Mit der Maske für den Laserprozess waren alle Größen bis auf die Tiefe der Strukturen festgelegt. Der experimentelle Aufbau sah die Messung der Zeit bei der Füllung eines Messkolbens vor. Die dabei auftretenden Messunsicherheiten

- bei der Zeitmessung ca. 0,2 s
- bei der Volumenmessung ca. 0,2 ml
- bei der Druckmessung ca. 0,1 bar

bewirken bei den kleinsten Messwerten einen maximalen relativen Fehler der Durchflussmessungen von ca. 50 %. Der typische relative Fehler liegt bei ca. 12 %.

Messergebnisse:

Die Ventilstrukturen, mit denen die besten Ergebnisse erreicht wurden, sind in Abbildung 6-22 dargestellt.

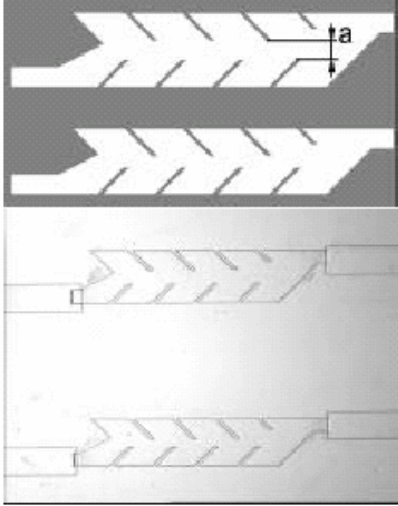
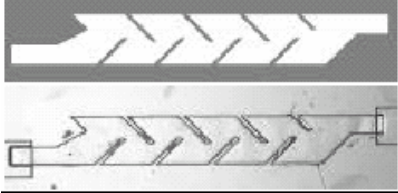
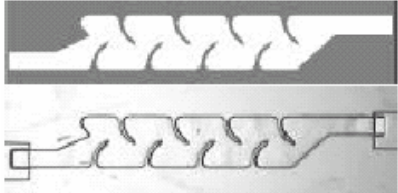
Nummer	Bezeichnung	Abbildung der Struktur	Beschreibung
1	BD_a_z		Borstendiode: Dünne, von den Seiten in den Strömungsweg hineinreichenden Stege sollen dem Fluid ein richtungsabhängiges Strömungsbild aufzwingen. Dabei ist die gegenüberliegende Stegreihe um den halben Abstand in Strömungsrichtung versetzt. Von den einfachen Borstendioden gibt es zwei Versionen mit $a = 250 \mu\text{m}$ und $a = 140 \mu\text{m}$.
2	BDÜ_a_z		Borstendiode, überlappend: Variante von BD. Die Stegenden reichen übereinander, der Abstand $a = 50 \mu\text{m}$
3	BDRÜ_a_z		Borstendiode, rund, überlappend: Variante von BD. Die Stege sind gebogen und reichen wie bei BDÜ übereinander.

Abbildung 6-22: Die wichtigsten vermessenen Ventilvarianten⁷ und ihre Bezeichnungen (z=Tiefe der Strukturen; bei den BD-Versionen: a= senkrechter Abstand der gegenüberliegenden Borstenenden) [KAMP01]

Neben den in Abbildung 6-22 dargestellten Strukturen wurden noch verschiedene andere Varianten untersucht. Diese Varianten zeigten jedoch entweder geringere Differenzen der Strömungswiderstände beider Durchlassrichtungen oder erwiesen sich anderweitig als unbrauchbar. Es zeigte sich, dass Strukturen mit parallel verlaufenden Kanälen oder großen eingeschlossenen Volumina kaum blasenfrei zu befüllen sind. Einige dieser weiteren untersuchten Diodenvarianten sind in Abbildung 6-23 dargestellt.

⁷ Laserstrukturiert (Fa. Bartels, Dortmund) mit Excimerlaser LPX305 (Lambda-Physik)

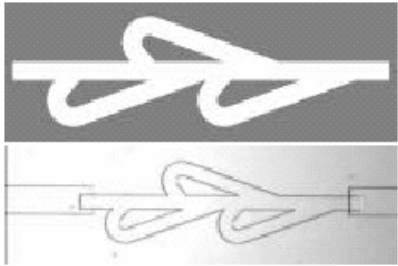
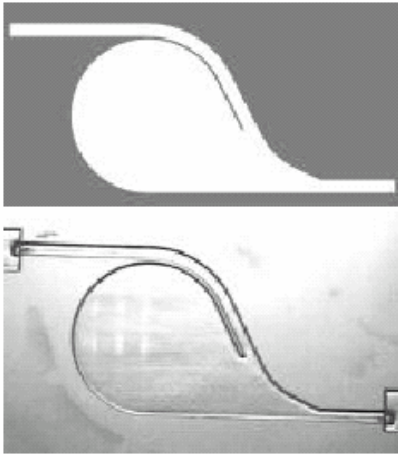
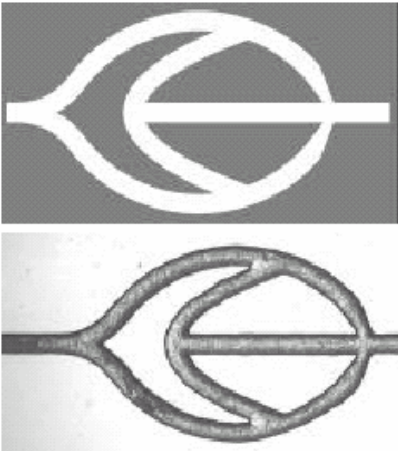
Nummer	Bezeichnung	Abbildung der Struktur	Beschreibung
4	TD_z		Tesladiode: Die klassische Tesladiode [TESL20] sollte der Vergleichsmessung dienen.
5	SD_z		Schneckendiode: Eine Abwandlung der Tesladiode.
6	KD_z		Käferdiode: Eine weitere Variante der Tesladiode, mit weit voneinander getrennten Strömungspfaden. Die hier zu sehende Version ist nicht wie die anderen Ventile mit dem Excimerlaser erstellt worden, sondern lithografisch nass-chemisch in Glas geätzt

Abbildung 6-23: Weitere vermessene Ventilvarianten und ihre Bezeichnungen⁸ [KAMP01]

Die statische Messung der Volumenströme sollte bei einem funktionierenden Ventil unterschiedliche Werte für beide Durchflussrichtungen ergeben. Die gemessenen Strömungswiderstände in Sperr- und Durchlassrichtung für die verschiedenen Diodenvarianten der Form Borstendiode (BD) sind in Abbildung 6-24 dargestellt.

⁸ Strukturen 4 und 5 laserstrukturiert (wie in ⁷), Struktur 6 nasschemisch in Borsilikatglas strukturiert

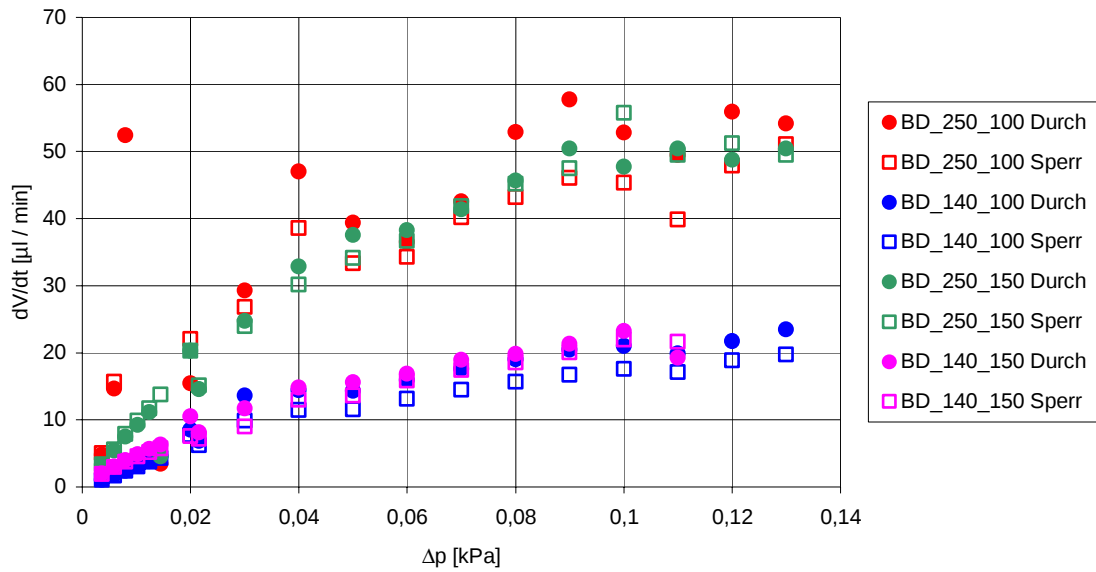


Abbildung 6-24: Vergleich der Strömungswiderstände der BD_a_z Ventile.

(Dargestellt sind Messwerte für den statischen Volumenstrom der BD-Dioden bei Druckänderung.)

Das Verhältnis des Volumenstroms in Durchlassrichtung zum Volumenstrom in Sperrichtung (im Folgenden **Diodizität** oder **Sperr-Durchlass-Verhältnis** genannt) wurde aus den Volumenströmen ermittelt (Abbildung 6-25). Bei Ventilen gleicher Strukturtiefe, bewirkt ein engerer Borstenabstand a eine größere Differenz der Volumenströme beider Richtungen.

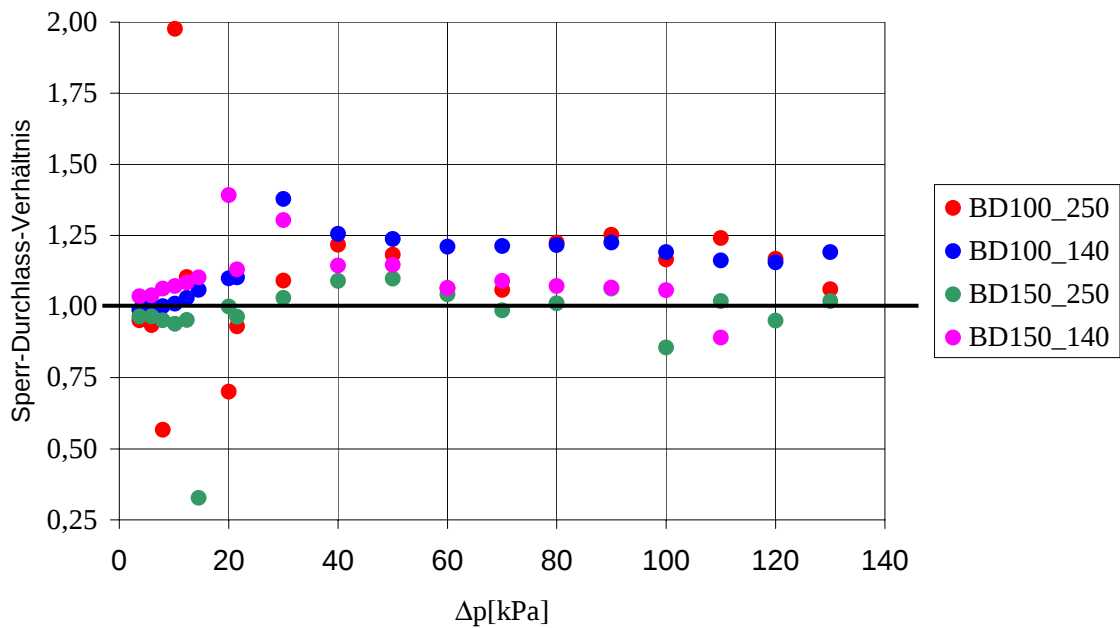


Abbildung 6-25: Vergleich der Sperr-Durchlass-Verhältnisse der BD_a_z Ventile bei Druckänderung

Der in Abbildung 6-26 gezeigte Vergleich der Diodenvarianten mit geraden überlappenden Borsten (BDÜ → $a = -50$) zu den mit runden überlappenden Borsten zeigt ein erstaunliches Verhalten: Die Strömungswiderstände der runden Borstenvariante (BDRÜ → $a = -50$) sind in der angenommenen Sperrrichtung (entgegen der Borsten) geringer als in der angenommenen Durchlassrichtung (mit den Borsten).

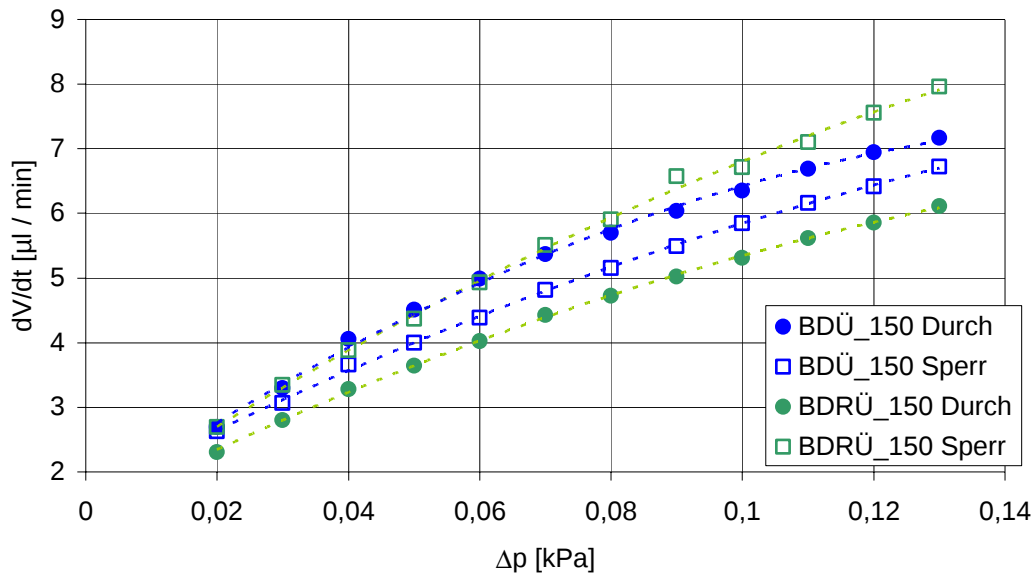


Abbildung 6-26: Vergleich der Strömungswiderstände der Ventilversionen BDÜ_z und BDRÜ_z.
(Dargestellt sind Messwerte für den statischen Volumenstrom.)

Noch deutlicher wird dieses **inverse Strömungsverhalten** im Vergleich der Diodizitäten der beiden Diodenvarianten und spiegelt sich in Diodizitätswerten kleiner als 1 wieder (siehe Abbildung 6-27: BDRÜ150), die zeigen, dass der Volumenstrom entgegen der in den anderen Dioden vorherrschenden Strömungsrichtung läuft. Eine Invertierung der Diodizitätswerte (siehe Abbildung 6-27: $1 / \text{BDRÜ150}$) ermöglicht den direkten Vergleich zu den Dioden mit geraden Borsten und zeigt ein deutlich besseres Sperr-Durchlass-Verhältnis.

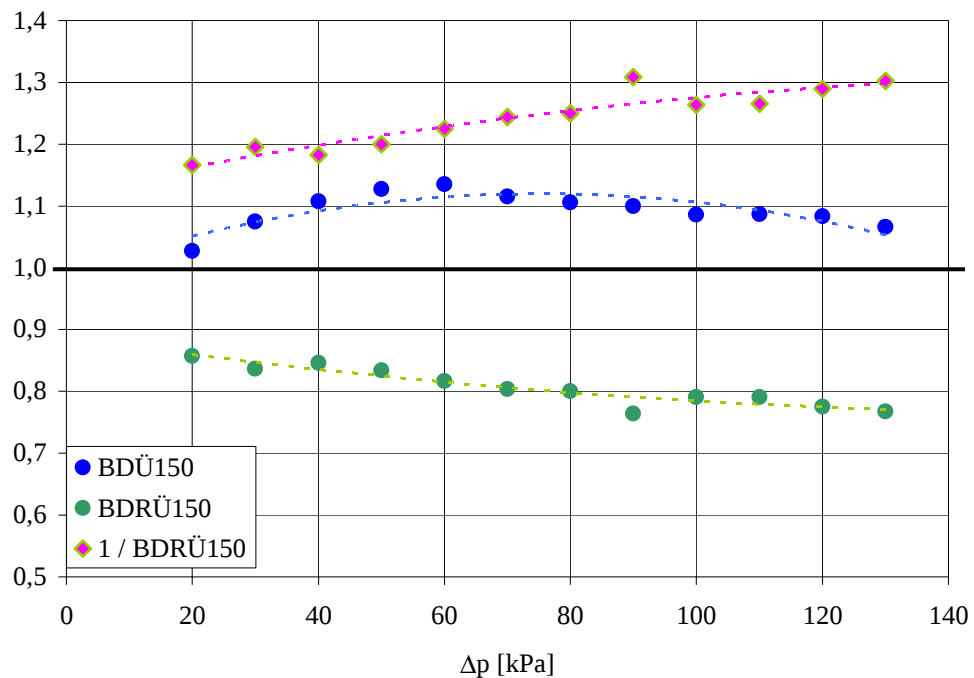


Abbildung 6-27: Vergleich der Sperr-Durchlass-Verhältnisse der Ventilversionen BDÜ und BDRÜ.
(Dargestellt sind Messwerte für das Sperr Durchlass-Verhältnis bei Druckänderung. Für den direkten Vergleich sind zudem die invertierten Werte der BDRÜ-Diode ($1/BDRÜ$) aufgetragen)

Obwohl alle sonstigen Parameter gleich blieben, änderte die bloße Form der Borsten das komplette Verhalten.

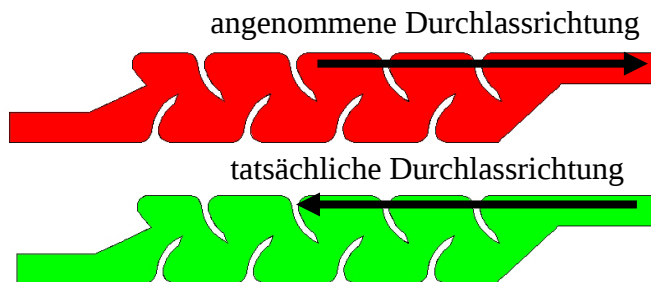


Abbildung 6-28: Strömungsrichtung der Diode BDRÜ150

Das Modell der fluidischen Diode kann sehr gut anhand des in Abbildung 6-29 dargestellten Kennlinienverlaufs überprüft werden. Beide Volumenströme entwickeln sich unterschiedlich stark und lassen auch einen Grundwiderstand erkennen. Eine Untersuchung bei kleinen Druckwerten müsste den „Sprung“ auf diesen Widerstand besser erkennbar machen.

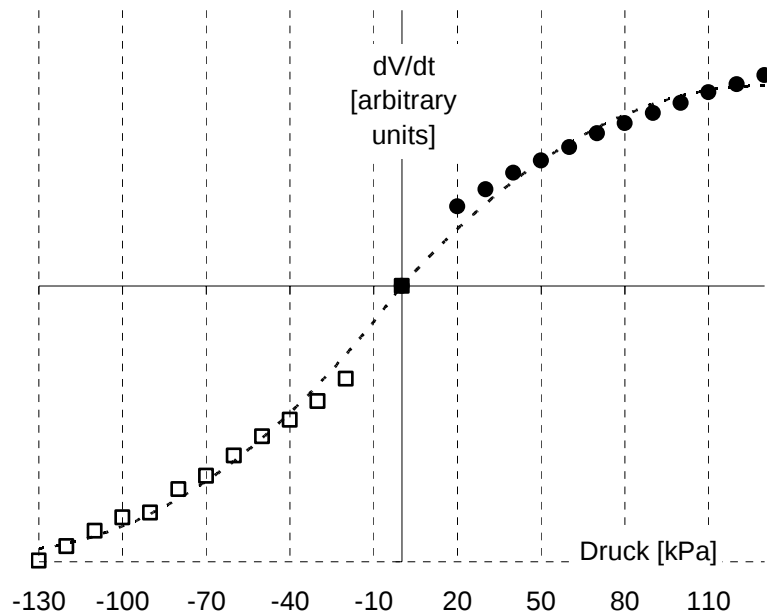


Abbildung 6-29: Darstellung der gemessenen Volumenströme des Ventils BDRÜ150 in der Form eines Kennlinienfeldes einer elektrischen Diode (die Linien stellen einen polynomischen Trend dar).

In Abbildung 6-30 ist eine Aufstellung aller untersuchten Ventile mit den gemessenen Extremwerten aufgeführt.

Bezeichnung	Sperr-Durchlass-Verhältnis (i) bei Druckwert		Volumenstrom [$\mu\text{l}/\text{min}$] bei			Bemerkung
	$i_{\min}$	$i_{\max}$	20 kPa	80 kPa	130 kPa	
BD_250_150	0,939 10,2 kPa	1,098 50 kPa	~ 20	~ 45	~ 50	i relativ konstant um 1
BD_140_150	1,036 3,7 kPa	1,146 50 kPa	~ 9	~ 19	~ 25	i relativ konstant etwas über 1
BD_250_100	0,931 21,9 kPa	1,253 90 kPa	~ 20	~ 48	~ 53	i schwankend über 1
BD_140_100	0,988 3,7 kPa	1,225 90 kPa	~ 9	~ 18	~ 22	i relativ konstant unter 1,25
BDA_150	1,006 120 kPa	1,079 20 kPa	~ 3,3	~ 6,6	~ 8,7	i sehr linear mit leicht fallender Tendenz
BDÜ_150	1,027 20 kPa	1,135 60 kPa	~ 2,7	~ 5,4	~ 6,9	i relativ konstant über 1
BDRÜ_150	0,858 20 kPa	0,768 130 kPa	~ 2,5	~ 5,3	~ 7,1	invertierte Richtung linear ansteigend
TD_100	1,012 20 kPa	1,499 110 kPa	~ 12	~ 43	~ 53	relativ konstant steigendes i, mit Spitze bei 110 kPa
TD_150	1,005 20 kPa	1,178 110 kPa	~ 4	~ 16	~ 19	relativ konstant steigendes i, mit Spitze bei 110 kPa
SD_150	1,064 20 kPa	1,250 130 kPa	~ 3	~ 9	~ 12	linear steigendes i

Abbildung 6-30: Übersicht der Messwerte (Extremwerte) der Ventilversionen aus den Experimenten zum statischen Verhalten der Ventile

6.2.3 Die Pumpe (dynamischer Messaufbau)

Aus den Ergebnissen der Tests zum statischen Verhalten der Ventile wurden die Versionen, die sich gut befüllen ließen und gute Sperr-Durchlass-Verhältnisse aufwiesen (Borstendiode BD_100_140, Borstendiode überlappend BDÜ_150, Borstendiode rund überlappend BDRÜ_150), für einen Aufbau einer Pumpe ausgewählt. Um bei der Vermessung des dynamischen Verhaltens der Ventile einen reproduzierbaren Einfluss der Pumpkammer zu gewährleisten, wurde eine wieder verwendbare Pumpkammerkonstruktion mit Piezoaktoren aufgebaut. Die Piezoaktoren wurden aus einer dünnen Glasscheibe und einer Piezokeramik aufgebaut. Durch Variation der Durchmesser von Piezokeramik und Glasscheibe konnte der Hub des Piezoaktors maximiert werden. In Trägern aus Polycarbonat wurden mit dem Laser die zu untersuchenden Ventile strukturiert. Der Anschluss der Flüssigkeiten geschah über Schlauchanschlüsse, die über vorbereitete Bohrungen eine Verbindung zu den Zu- bzw. Rückleitungen der Ventilstrukturen herstellten. Eine Deckelfolie, mit einem Zugang zur Pumpkammer über den pumpkammerseitigen Anschlusskanal der Ventilstrukturen, zwingt die Strömung durch die Ventile. Beide Träger wurden verschraubt, somit konnten Pumpenkammer und Ventile über die Verschraubung getauscht werden. Für jedes Ventil wurde ein solcher Träger vorbereitet. Eine Skizze dieser Hilfskonstruktion ist in Abbildung 6-31 zu sehen.

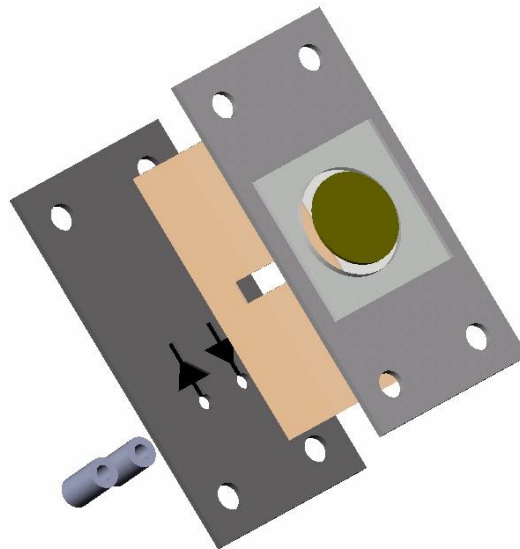


Abbildung 6-31: Skizze der Hilfskonstruktion für den Tausch der Einzelteile

Um mit diesem Aufbau das dynamische Verhalten der Ventilstrukturen bzw. die Förderrate der Pumpe zu bestimmen, wurden je eine dünne Glaskapillare über einen kurzen Schlauch mit den Zuleitungsanschlüssen der Hilfskonstruktion verbunden. Um das Pumpverhalten ohne Gegendruck zu ermitteln, wurden beide Kapillaren waagrecht auf einer Höhe angebracht. Mit einer späteren senkrechten Aufstellung der Ausgangskapillare

konnte die maximale Pumphöhe, d.h. der maximale Gegendruck, erfasst werden. Die Ansteuerung des Piezoaktors bewirkte bei funktionierenden Ventilen eine Wanderung des Flüssigkeitsstandes innerhalb der Kapillaren. Aus der zurückgelegten Strecke pro Zeit ließ sich damit ein Volumen pro Zeit ermitteln. Um eventuelle Flüssigkeitsverluste zu bemerken, wurde die Wanderung in beiden Kapillaren gemessen und daraus der Mittelwert genommen. Eine Prinzipskizze dieses Aufbaus ist in Abbildung 6-32 dargestellt.

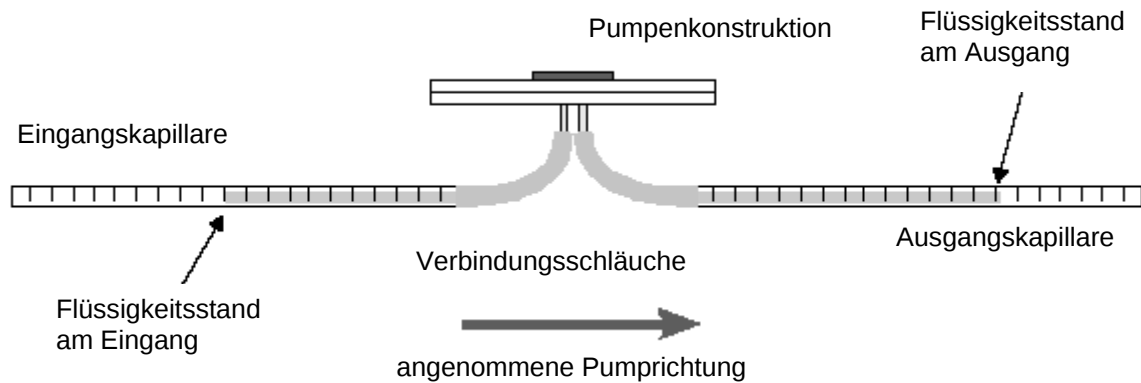


Abbildung 6-32: Messaufbau zum dynamischen Verhalten der Ventile (Pumpentest)

6.2.4 Förderrate / Frequenzverhalten

Überlegung zur Pumpfrequenz

Der Piezoaktor wandelt eine elektrische Spannung in eine mechanische Spannung im Piezomaterial um. Durch diese mechanische Spannung wird in der Pumpkammer durch den Piezoaktor ein Druck auf das Flüssigkeitsvolumen ausgeübt. Durch diesen Druck entweicht das Flüssigkeitsvolumen durch die mit der Kammer verbundenen Kanäle. Diese Bewegung kommt zum Erliegen, wenn die mechanische Spannung des Piezoaktors abgebaut ist und eine neue Ruhelage erreicht wurde. Bei Anregung des Piezoaktors mit einer Rechteckspannung ergibt sich damit für jede Periode eine Strömung aus der Kammer bzw. in die Kammer mit exponentiell abnehmender Strömungsgeschwindigkeit. Die optimale Arbeitsfrequenz ist dann erreicht, wenn der Piezo mit einer Frequenz angeregt wird, die nahezu ein gesamtes Ausströmen der Flüssigkeit aus der Kammer ermöglicht. Bei kleineren Frequenzen entstehen Totzeiten, in denen keine Bewegung der Flüssigkeiten stattfindet. Bei höheren Frequenzen kann der Piezoaktor seinen maximalen Hub nicht erreichen. Damit hängt die optimale Arbeitsfrequenz f direkt mit der Ausströmzeit T_a des Flüssigkeitsvolumens aus der Pumpkammer zusammen $f \sim 1/T_a$. Der Piezoaktor kann bei einer bestimmten angelegten Spannung eine bestimmte Kraft und damit, bezogen auf den Durchmesser der Pumpkammer, einen bestimmten maximalen Druck auf die Flüssigkeit ausüben. Die Geschwindigkeit dieses Druckabbaues ist eine Konstante für einen gegebenen Pumpenaufbau.

Für einen gegebenen Pumpaufbau hängt die Ausströmgeschwindigkeit T_a ab von

- der maximalen Kraft $F(U,X)$ des Piezoaktors (und damit vom maximalen Druck)
 - o abhängig von der angelegten (elektrischen) Spannung U

- abhängig von den Eigenschaften X des Piezoaktors (Durchmesser, Dicke, Materialkombination, Materialkonstanten)
- dem zu verdrängenden Flüssigkeitsvolumen $V(U, X)$
 - abhängig von der Auslenkung des Piezoaktors und damit von der angelegten (elektrischen) Spannung U
 - abhängig von den Eigenschaften X des Piezoaktors (Durchmesser, Dicken, Materialkombination, Materialkonstanten)
- dem gesamten Strömungswiderstand der Ein- und Auslasskanäle
$$R_{\text{ges}}(G_{\text{ventil}}, G_{\text{kanal}}) = [1/(R_{\text{ein}}(G_{\text{ventil1}}, G_{\text{kanal1}}) + R_{\text{aus}}(G_{\text{ventil2}}, G_{\text{kanal2}}))]^{-1}$$
 - abhängig von der Geometrie G_{ventil} der Ventile
 - abhängig vom gesamten Kanalsystem an der Pumpe G_{kanal}

Die Strömungsgeschwindigkeit v_s ist in erster Näherung proportional zum Druck P und damit zur Kraft F

$$v_s \sim F.$$

Für ein bestimmtes Volumen V ist die Ausströmzeit $T_a \sim 1/v_s$ und damit

$$T_a \sim 1/F$$

Des Weiteren ist bei einer bestimmten Kraft die Ausströmzeit für dieses Volumen

$$T_a \sim V.$$

Weiterhin sind die Ausströmzeiten in erster Näherung proportional zum gesamten Strömungswiderstand $R_{\text{ges}} = [1/(R_{\text{ein}} + R_{\text{aus}})]^{-1}$ der an die Kammer angeschlossenen Kanäle

$$T_a \sim R_{\text{ges}}$$

Damit stellt sich die Gesamtabhängigkeit der Ausströmzeit dar als

$$T_a \sim V \cdot R_{\text{ges}} / F$$

Die optimale Arbeitsfrequenz ändert sich damit bei jeder Änderung des verwendeten Kanalsystems, der verwendeten Piezoaktoren und der angelegten Spannungen. Die Gesamtwiderstände sind dabei durch den jeweiligen Aufbau des Kanalsystems festgelegt. Die maximale Amplitude der angelegten Spannung wird durch die maximale Belastbarkeit des Piezoaktors vorgegeben. Damit ist die maximale Pumpleistung der Pumpe bei einem bestimmten Aufbau nur noch abhängig von der verwendeten Frequenz. In den Experimenten zum dynamischen Verhalten der Ventile wurden die Piezoaktoren mit einer Rechteckspannung mit fester Amplitude angetrieben. Die Frequenz der Rechteckspannung wurde schrittweise erhöht und der jeweilige Volumentransport gemessen. Die Werte der Förderrate ergeben mit den zugeordneten Frequenzen das Frequenzverhalten dieser Pumpenkonstellation. Die dynamischen Tests zeigten, dass nur die Ventile mit hohem Sperr-Durchlass-Verhältnis in den unteren Druckbereichen einen Pumpeffekt erzielten. Von allen getesteten Ventilversionen zeigten nur die Versionen Borstendiode überlappend BDÜ_150, und Borstendiode rund überlappend BDRÜ_150 gute Pumpeigenschaften. Die Diagramme des Frequenzverhaltens der funktionstüchtigen Pumpkonstellationen sind in Abbildung 6-33 und Abbildung 6-34 dargestellt. Die Bezeichnungen einer Konstellation beinhaltet den Namen des verwendeten Ventils, den

Durchmesser der Piezoscheibe [mm], deren Dicke [μm] und den Durchmesser der Pumpenkammer [mm].

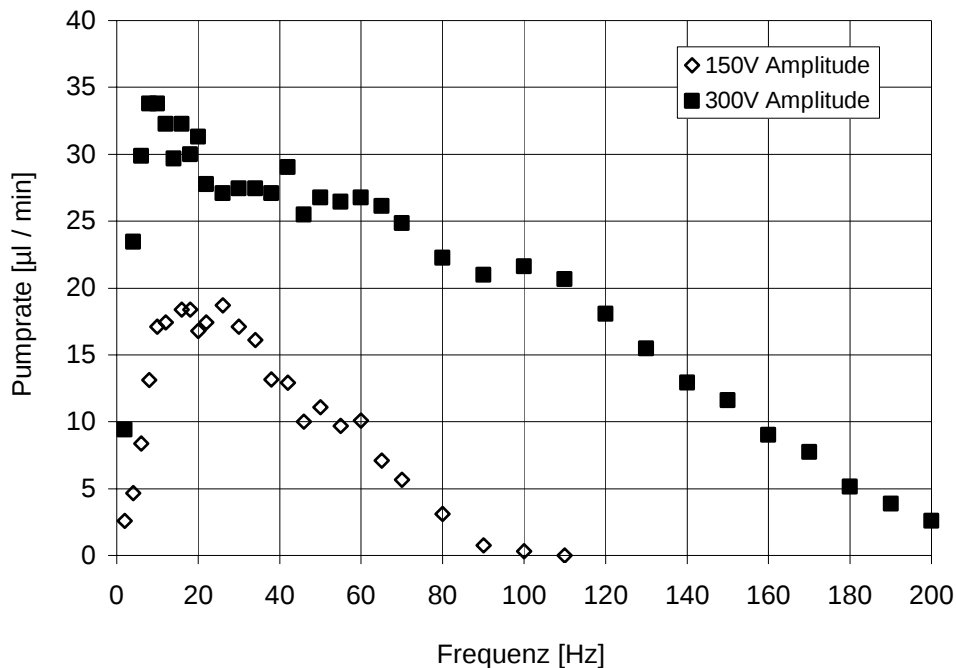


Abbildung 6-33: Frequenzverhalten der Pumpenkonstellation BDÜ_150 16-025_18
 (→Strukturtiefe der Ventile 150 μm , Durchmesser der Piezokeramik 16 mm, Dicke der Glasmembran 25 μm , Durchmesser der Pumpkammer 18 mm, Rechtecksignal, 0 bar Gegendruck).
 (Aufgetragen sind Messwerte der Förderrate über der Frequenz)

Die Konstellation BDÜ_150 16-025_18 hatte bei einer Ansteuerung von 300 V und einer Frequenz von ca. 10 Hz die maximale Förderrate von ca. 34 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Ansteuerung mit einer 150 V Amplitude erbrachte nur ca. 19 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei einer Frequenz um die 20 Hz. Damit spiegelt sich die Halbierung der Amplitude auch in der Halbierung der Förderrate wieder. Ab einer Frequenz von 90 Hz begann bei beiden Amplituden eine starke Geräuschentwicklung, die wahrscheinlich auf Resonanzeffekten beruht. Dieses ist an der 300 V Kurve auch an der leichten Erhöhung der Förderrate zu erkennen. Die stärker werdenden Geräusche sind auch der Grund dafür, dass die Frequenz nur bis 200 Hz erhöht worden ist. Ein vorhergehender Test mit höheren Frequenzen führte zu noch mehr Geräuschen und wahrscheinlich zu einem Haarriss in der Glasschicht des Piezoaktors. Dieser machte sich durch eine Abnahme der Förderrate und der Undichtigkeit an der Aktorseite des Trägers bemerkbar. Die Kurve der 150 V Ansteuerung wurde nicht bis 200 Hz untersucht, da schon mit 110 Hz kein Pumpeffekt mehr in Erscheinung trat.

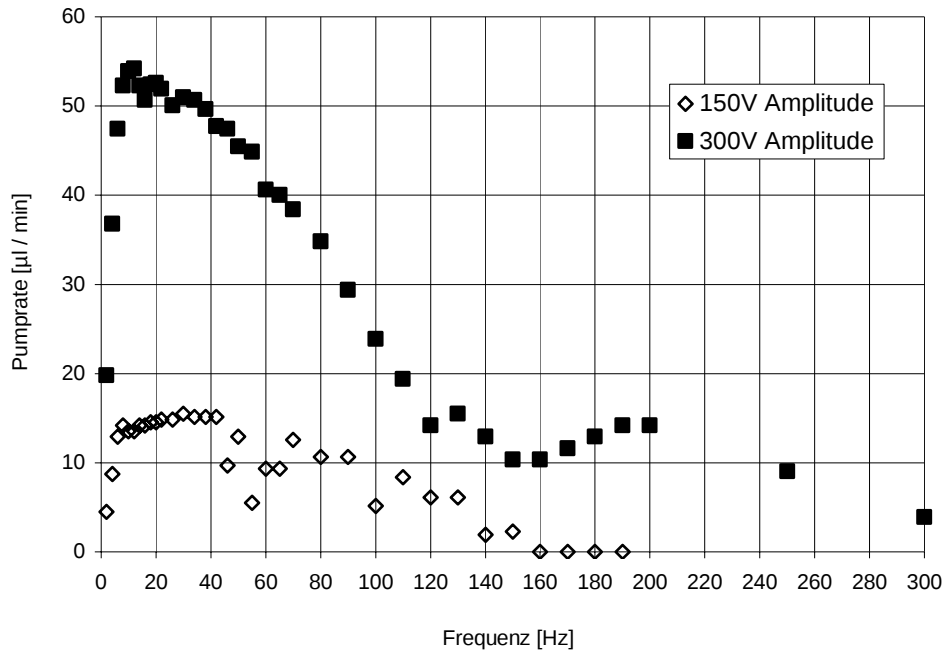


Abbildung 6-34: Frequenzverhalten der Pumpenkonstellation BDRÜ_150 16-025_18 (Rechtecksignal, 0 bar Gegendruck). (Aufgetragen sind Messwerte der Förderrate über der Frequenz)

Das in den statischen Experimenten bereits beobachtete inverse Strömungsverhalten der Ventilvarianten BDRÜ_150 (Borstendiode rund überlappend) zeigte sich auch bei den dynamischen Tests. Die Amplitude von 300 V führte zu einer Förderrate von fast 55 µl/min bei einer Frequenz von 12 Hz. Geräuschentwicklung ab 110 Hz führte wie bisher zu einer leichten Erhöhung der Förderrate bei 130 Hz und einer weiteren Erhöhung bei 190 Hz. Um eventuelle stärkere Erhöhungen zu erfassen, wurde kurzzeitig mit Frequenzen über 200 Hz gearbeitet. Mit einer Amplitude von 150 V wurde die maximale Förderrate bei 30 Hz mit 15 µl/min festgestellt. Während der Variation der Frequenz war es sehr schwierig, kontinuierliche Werte zu erhalten, was auch anhand der Kurve ersichtlich wird.

Gegendruck

Nachdem für die Pumpenkonstellationen die optimale Frequenz herausgefunden war, wurde der Messaufbau etwas verändert. Die Ausgangskapillare wurde senkrecht aufgestellt, um bei der folgenden Ansteuerung mit der optimalen Frequenz die maximal erreichbare Pumphöhe bzw. den höchsten noch zu pumpenden Gegendruck herauszufinden. Die erreichten Gegendrücke sind in der Abbildung 6-35 zusammengefasst. Alle Gegendrücke wurden mit einem Rechtecksignal erzeugt. Ein Wechsel der Signalform auf Sinus oder Dreieck führte zu einem sofortigen Verlust an Steighöhe, da die maximal erreichten Strömungsgeschwindigkeiten bei diesen Signalformen niedriger sind.

Pumpenkonstellation	Amplitude	erreichte Pumphöhe	Erreichter Gegendruck
BDÜ_150 16-025_18	150V	2,9 cm	284,5Pa
	300V	9,1 cm	892,7Pa
BDRÜ_150 16-025_18	150V	2,1 cm	206,0Pa
	300V	13,8 cm	1353,8Pa

Abbildung 6-35: Maximal erreichte Steighöhen und Gegendrucke der Pumpenkonstellationen

Um den Aufwand bei der Optimierung der Diodenstrukturen zu reduzieren, soll die weitere Optimierung nur noch mit einer Diodenstruktur durchgeführt werden. Die Diodenstruktur mit den besten Voraussetzungen ist dabei die Diode BDRÜ150

Sie besitzt:

- eine gute Diodizität
- beste Pumpleistungen (siehe Abbildung 6-34)
- höchste erreichbare Gegendrucke (siehe Abbildung 6-35)
- gute Parametrisierbarkeit für die Optimierung mittels Computersimulation
- einfache Befüllbarkeit (da keine parallel verlaufenden Kanäle vorhanden sind, in denen sich Luftblasen fangen)

6.3 Optimierung der Pumpe durch Computersimulation

Da eine Optimierung der Pumpen auf experimentellem Wege äußerst zeitaufwändig und kostenintensiv ist, sollen die einzelnen Strukturen auf mathematischem Weg optimiert werden. Betrachtet man das Ventil analog zu einer elektrischen Diode, so entspricht der elektrische Strom dem Volumenstrom, und die Spannung entspricht dem Druckunterschied. [KAMP01] Damit sollte (mit den Gleichungen aus Abbildung 6-20) der Volumenstrom Φ aus den Parametern des Ventils bei gegebenem Druck berechnet werden können. Der Volumenstrom innerhalb einer Leitung wird durch das Gesetz von Hagen- Poiseuille beschrieben:

$$(\Phi =) \dot{V} = \frac{r^4 \cdot \pi \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l}$$

Gleichung 6-4: Hagen-Poiseuille Gesetz für Rohrströmung [SIGL96].

Das Gesetz gilt für kreisförmige Querschnitte mit dem Radius r und muss in der Herleitung auf die tatsächlich vorliegenden Querschnitte verändert werden. Da die Gleichung von der Annahme einer rotationssymmetrischen Geschwindigkeitsverteilung

innerhalb der Leitung ausgeht, scheitert dies bereits bei rechteckigen Durchmessern. Hier ist die Geschwindigkeitsverteilung nur je Richtung symmetrisch (siehe Abbildung 6-36)

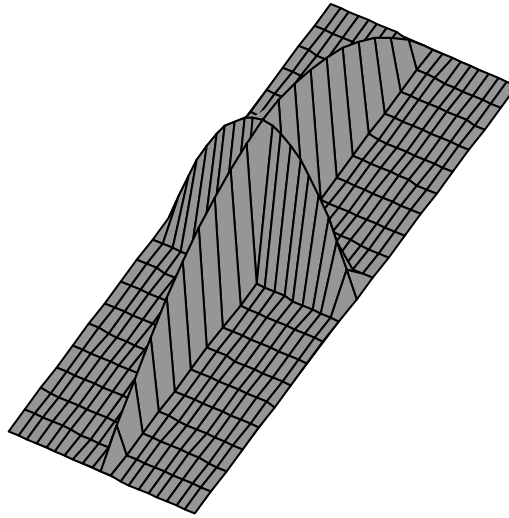


Abbildung 6-36: Geschwindigkeitsverteilung innerhalb eines fluiddurchströmten rechteckigen Kanals

Eine einfache Berechnung des fluidischen Widerstandes über das „fluidische Ohmsche Gesetz“ ist also nicht möglich. Dies liegt unter anderem auch daran, dass Fluide ein wesentlich komplexeres Verhalten aufweisen als der elektrische Strom. In der Fluidik ändern z.B. Viskosität sowie Strömungseffekte bei unterschiedlichen Reynoldszahlen deutlich das Verhalten. Die geometrischen Maße des Ventils erzeugen lokal begrenzte Verwirbelungen, Rückströmungen und/oder Ruhezonen, die eine Bestimmung der Reynoldszahl für die einzelnen Abschnitte notwendig machen würde. Dadurch ist auch der Durchmesser an jeder Stelle des Ventils neu zu bestimmen. Somit sind die meisten Geometrien, die von einer reinen Kanalforn abweichen, kaum auf klassische Weise rechnerisch erfassbar. Eine rechnerische Erfassung komplexerer Probleme wird erst durch Computersimulationen möglich. In diesen Computersimulationen werden die Geometrien durch Generation eines Gitters in kleine Zellen unterteilt, in denen die Navier-Stokes-Gleichungen mittels eines iterativen Verfahrens gelöst werden können. Diese Gleichungen beschreiben mathematisch die durch alle Kräfte verursachte allgemeine Bewegung realer Fluide.

$$\rho \cdot \left(\frac{\partial c_i}{\partial t} + c_x \frac{\partial c_i}{\partial x} + c_y \frac{\partial c_i}{\partial y} + c_z \frac{\partial c_i}{\partial z} \right) = f_i - \frac{\partial p}{\partial i} + \eta \cdot \left(\frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c_i}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} \right)$$

Abkürzungen: i = x; y; z

Gleichung 6-5: Navier-Stokes-Gleichungen (Kurzform-Indexschreibweise) [SIGL96]

Die Änderung einer Zelle beeinflusst dann alle Nachbarzellen, die daraufhin ihrerseits alle weiteren Nachbarzellen beeinflussen. Auf diese Weise werden die oben genannten geometrischen Einflüsse mit einbezogen. Bei mehrkomponentigen Systemen lässt sich der Rechenaufwand reduzieren, indem man zunächst die Einzelkomponenten untersucht und optimiert. Im Fall der Pumpe sind das im Wesentlichen die Dioden, da sich hier das Strömungsverhalten der Pumpe ausbildet. Die Diodenstrukturen sollen zunächst, analog zu den statischen Durchflussversuchen (siehe Kapitel 6.2.2 Statisches Verhalten der Ventile), mit einer stationären Simulation abgebildet werden. Die Simulation der Pumpkammer sowie der gesamten Pumpe, in Analogie zu den dynamischen Versuchen aus Kapitel 6.2.3 stellt ein transientes (zeitabhängiges) Problem dar und erfolgt im Anschluss daran.

6.3.1 Simulation der Ventile

Für die Simulation der Strukturen wurde die CFD-Software (CFD = Computational Fluid Dynamics = rechenbare Fluidodynamik) CFX-5 der Firma Ansys verwendet. Um die Eignung der Software CFX-5 in Bezug auf die Simulation von Strömungen in mikrofluidischen Systemen zu untersuchen, wurden zunächst die bereits vorhandenen experimentellen Ergebnisse für die Diode BDRÜ150 (aus Abbildung 6-26 und Abbildung 6-27 auf Seite 55) simuliert. Der Vergleich zwischen experimentellen und simulierten Werten sollte zudem als Basis für die Fehlerabschätzung der Simulation dienen. Die Wahl des Rechenmodells spielt eine wesentliche Rolle bei der Simulation von Strömungen. Vor jeder Strömungsberechnung ist es nötig, bzw. vorteilhaft, sich Gedanken über die vorliegende Strömungsart zu machen. Hierbei sind hauptsächlich turbulente, laminare oder Grenzschichtströmungen zu unterscheiden [SCGE97]. Auch spielen die erwünschte Rechengenauigkeit und die Rechenzeit eine große Rolle. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte sollte das zu verwendende Rechenmodell gewählt werden. Aufgrund der kleinen Strömungsgeometrien in der Mikrofluidik üben die Begrenzungswände der Geometrie einen erheblichen Einfluss auf das Strömungsprofil aus. Das Strömungsbild wird also stark von der Grenzschichtströmung mitbestimmt [SCHW96]. Aus diesen Gründen wurde für die Simulation der Strömungsdioden BDRÜ sowie für die weiteren Simulationen das Shear-Stress-Transport-Modell gewählt, da dieses die Einflüsse der Begrenzungswände am besten berücksichtigt. Um eine möglichst gute und trotzdem schnelle Simulation der Strukturen zu erreichen, muss ein optimales Rechenetz über die Strukturen gelegt werden. Die Anzahl der finiten Elemente dieses Netzes sollte möglichst gering gehalten werden, denn je mehr Elemente vorhanden sind, desto mehr Werte müssen vom Rechner ermittelt werden. Ein zu feines Netz kann zudem durch Rundungsfehler wieder zu schlechteren Ergebnissen führen. Boundary-Inflation (strukturiertes Netz an der Strukturbegrenzung, siehe Abbildung 6-38) und Mesh-Control (Verfeinerung des Netzes an kritischen Bereichen) bieten die Möglichkeit, das Netz zu verbessern. Aufgrund der geringen Abmessungen der Diodenstrukturen wurde auf die

Option Mesh Control verzichtet, da ein komplett fein strukturiertes Rechnetz erforderlich war. Bei einem grob strukturierten Netz (z.B. 75 μm Maschen) wären aufgrund der Strukturtiefe von 150 μm nur eine Stützstelle in der Mitte sowie jeweils eine Stützstelle auf der oberen und unteren Berandung entstanden. Um gute Ergebnisse zu erzielen, sollten aber mehr als drei Stützstellen im Strömungsfeld liegen (s. Abbildung 6-37). Wie angenommen, verbesserte die Nutzung von Boundary Inflation das Simulationsergebnis erheblich. Dabei reichte ein 20 μm dicker Bereich über der Berandung, in der fünf Inflationlayers vorhanden waren. Eine Schicht vergrößerte sich hierbei um einen Faktor von 1,2 zur vorangegangenen Schicht (s. Abbildung 6-38).

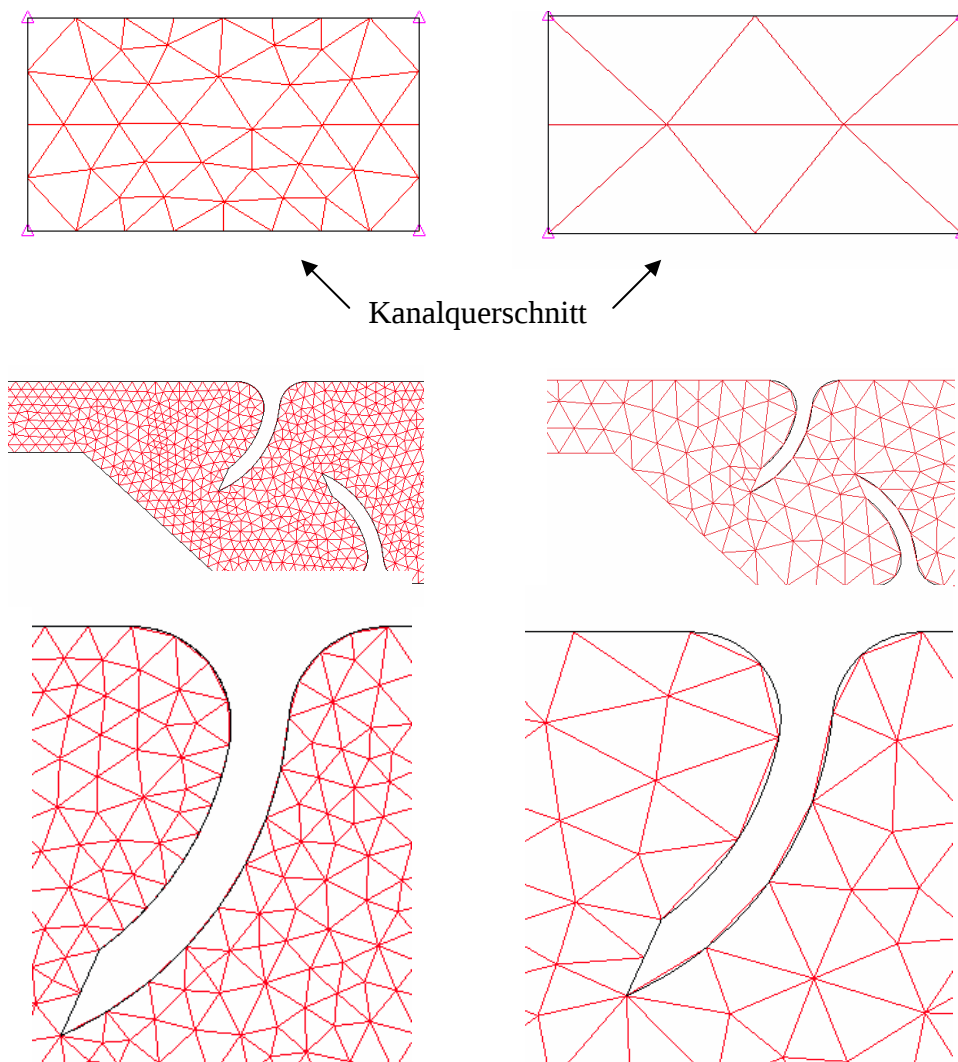
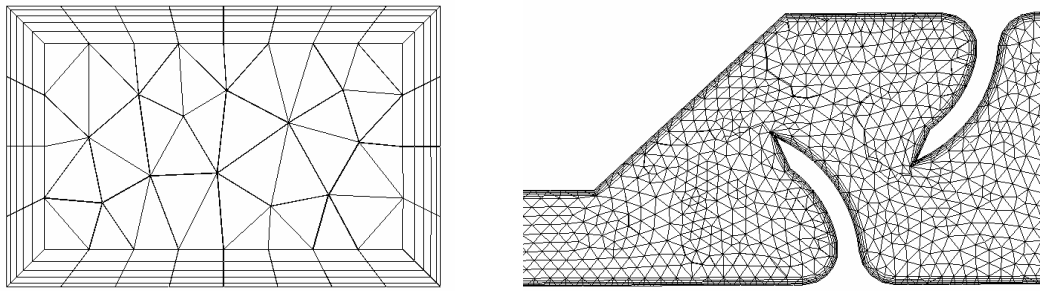


Abbildung 6-37: Unterschied zwischen fein und grob strukturiertem Netz bei der Diode BDRÜ150
(Bei grob strukturiertem Netz (rechts) ist zu erkennen, dass die Anzahl der Netzknoten im Kanalquerschnitt nicht ausreicht)



Kanalquerschnitt

Abbildung 6-38: Inflation in den Randgebieten (Boundary-Inflation). Das strukturierte Netz an der Strukturbegrenzung und das unstrukturierte Netz sind zu erkennen

Ein unstrukturiertes Rechennetz besteht aus tetraederförmigen Elementen. Die Größe dieser Elemente wird von der Länge der einzelnen Kanten bestimmt. In CFX-5 wird die maximale Kantenlänge, die ein Element haben darf, vorgegeben. Diese maximale Kantenlänge bestimmt die Elementanzahl und wird zur Optimierung des Netzes variiert. Ausgehend von einer stabilen Rechnung mit einem relativ groben Netz wird die Netzstruktur iterativ verkleinert, bis sich die Ergebnisse der Rechnung mit feinerem Netz nur noch um einige wenige Prozent von denen mit größerem Netz unterscheiden. Die Auswahl des Netzes erfolgt aus dem Kompromiss zwischen Rechengenauigkeit und Rechenzeit. Das Ergebnis dieser Netzoptimierung ist in Abbildung 6-39 dargestellt. Als quantitativer Wert wird der Massenfluss durch den Kanalquerschnitt am Ein- bzw. Auslass der Diode in Abhängigkeit der Elementanzahl des Rechennetzes dargestellt, welche über die maximale Kantenlänge der einzelnen Elemente variiert wurde. Als Grundlage diente die Diode BDRÜ150 in Durchlassrichtung bei einer Druckdifferenz von 50 kPa. Als Kompromiss zwischen Genauigkeit und Elementanzahl (→ Rechenzeit) wurde als Resultat für spätere Simulationsreihen eine maximale Kantenlänge von 32 μm gewählt, die einer Elementanzahl von ca. 135.000 entspricht. Bei einer Simulation der doppelten Anzahl an Elementen ändert sich der Simulationswert nur noch um ca. 1 % zum vorherigen. Aus diesen Gründen kann das gewählte Rechennetz für diese Problemstellung als geeignet angesehen werden.

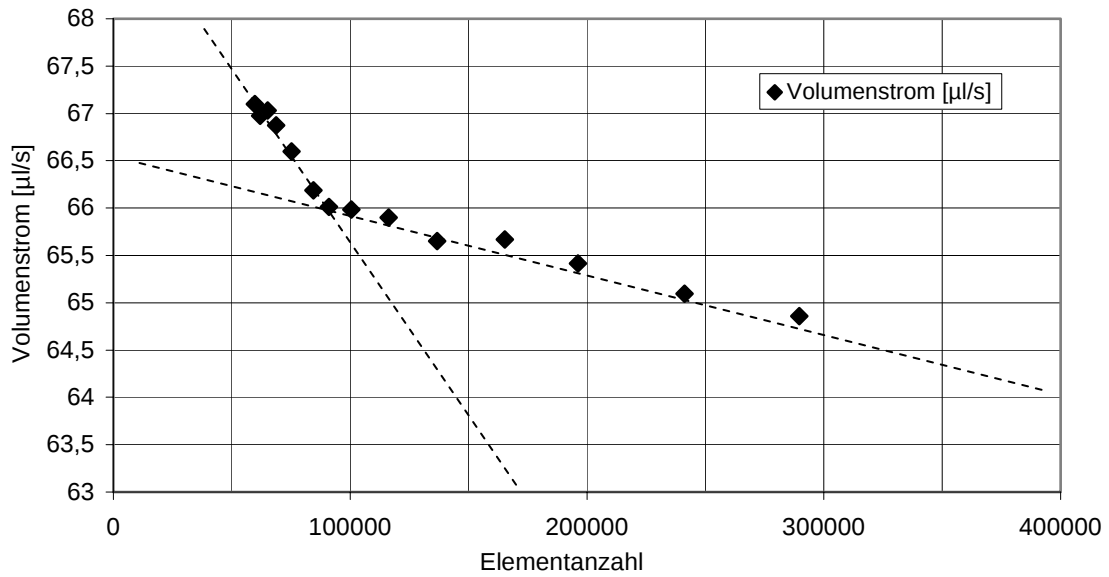


Abbildung 6-39: Ergebnis der Netzoptimierung (Volumenstrom gegen Elementanzahl).
(Aufgetragen sind Simulationsergebnisse für den Volumenstrom in Abhängigkeit der Elementanzahl. Die Linien sind zur Verdeutlichung des Trends durch die Punkte gelegt. Es ist zu erkennen, dass sich das Ergebnis bei einer Elementanzahl von über 100000 nur noch wenig verändert.)

Mit dem optimierten Rechnetz wurde nun die Messreihe „statischer Volumenstrom der Diode BDRÜ150“ analog zu den experimentellen Ergebnissen aus Kapitel 6.2.2 (Statisches Verhalten der Ventile) simuliert. Die Geschwindigkeitsverteilungen die sich in der Diode ergeben sind in Abbildung 6-40 und Abbildung 6-41 dargestellt.

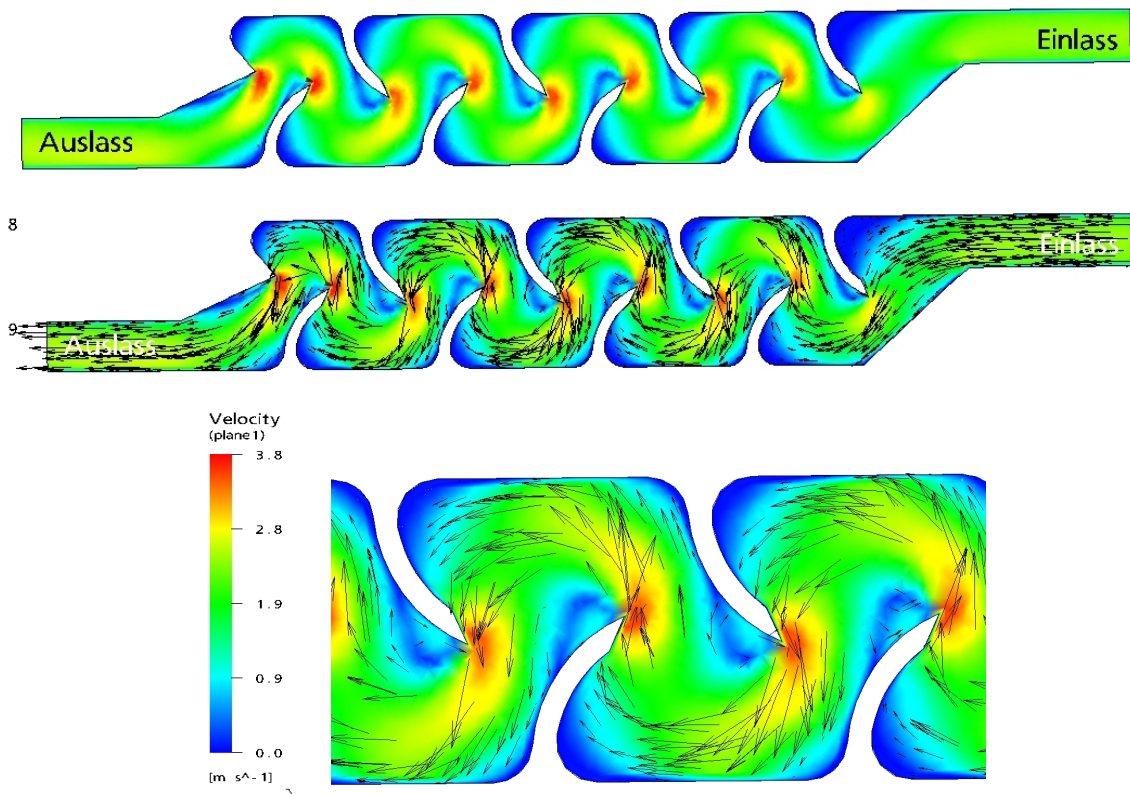


Abbildung 6-40: Geschwindigkeitsverteilung in der Diode BDRÜ150 in Durchlassrichtung

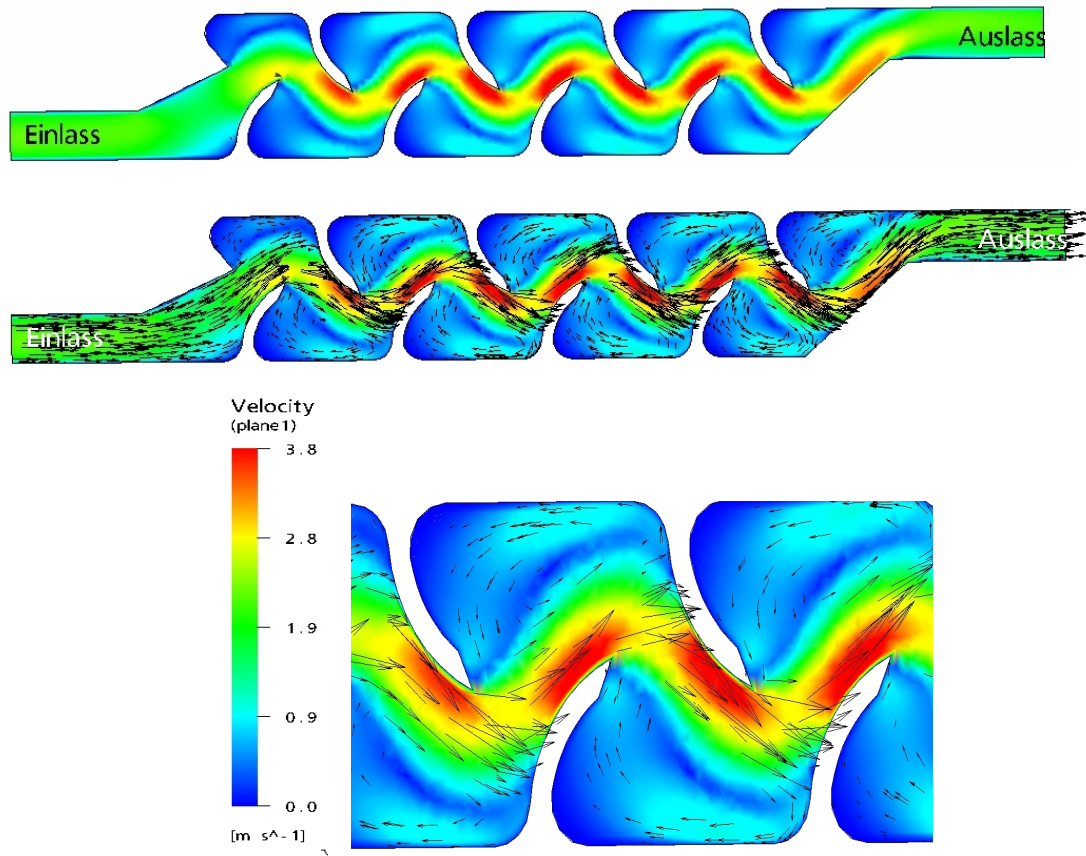


Abbildung 6-41: Geschwindigkeitsverteilung in der Diode BDRÜ150 in Sperrrichtung

In Abbildung 6-42 und Abbildung 6-43 sind die Ergebnisse der Simulationsreihe für die Volumenströme und Diodizitäten im Vergleich zu den experimentell ermittelten Werten dargestellt. Aus den Simulationen ergibt sich ein Massenstrom, der für den Vergleich mit den experimentellen Werten in einen Volumenstrom umgerechnet wurde.

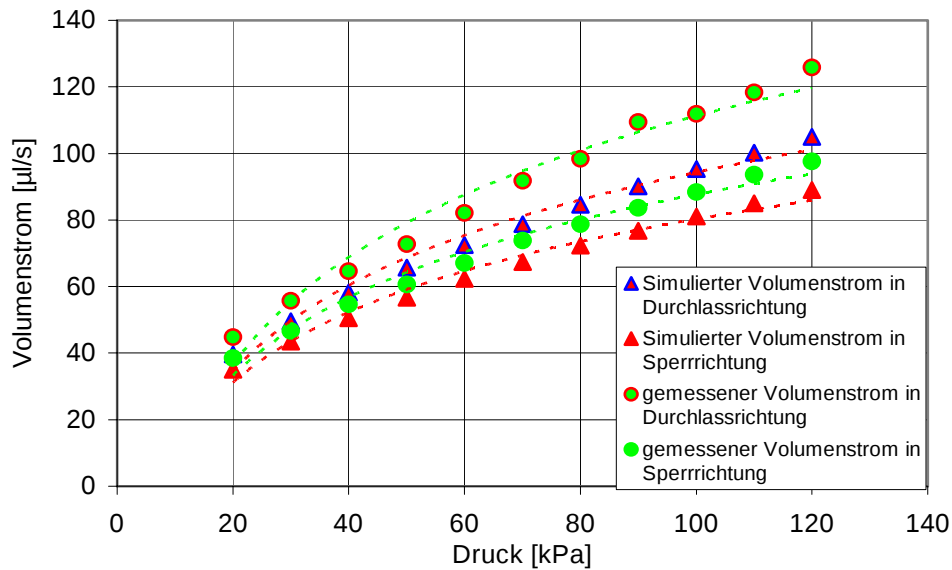


Abbildung 6-42: Vergleich zwischen simulierten und gemessenen Volumenströme
(Die Punkte sind die jeweils gemessenen, die Dreiecke die simulierten Werte, die Linien stellen einen logarithmischen Trend dar)

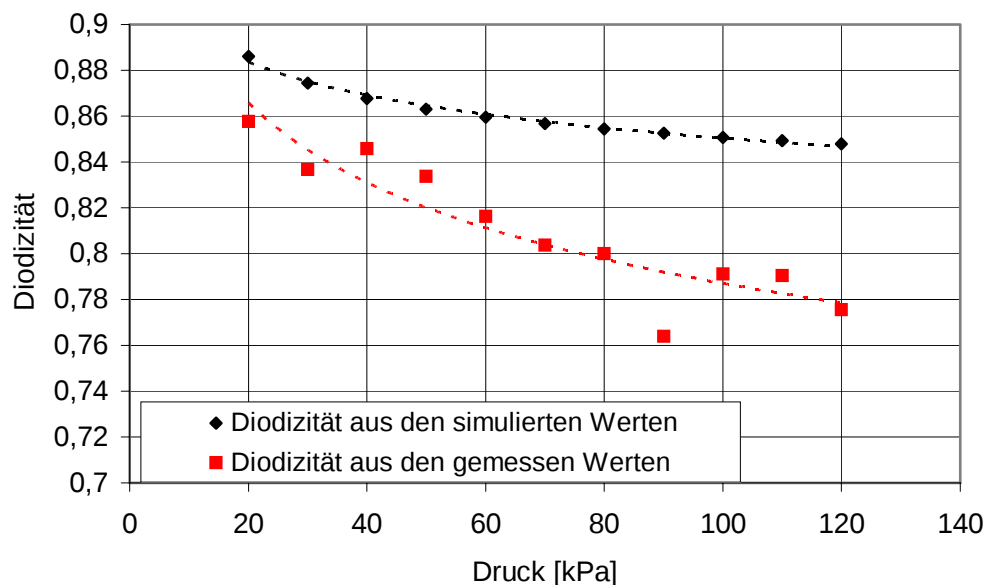


Abbildung 6-43: Vergleich zwischen simulierter und gemessener Diodizität
(Die Punkte sind aus den jeweils gemessenen, bzw. simulierten Werte errechnet, die Linien stellen einen potenziellen Trend dar)

Die Ergebnisse der Simulation in Abbildung 6-42 und Abbildung 6-43 geben das experimentell ermittelte Verhalten der Dioden recht gut wieder. Sie sind im Durchschnitt um ca. 10 Prozent kleiner und liegen damit in der Größenordnung der statistischen Fehler des Experimentes. Die Abweichung von den experimentellen Werten wird bei zunehmendem Differenzdruck am Ein- und Ausgang größer. Diese Druckabhängigkeit der Abweichung zwischen experimentellen und simulierten Werten könnte darin begründet

sein, dass im Experiment zwar die Strömungswiderstände der Zuleitungen berücksichtigt wurden, aber nicht deren Druckabhängigkeit aufgrund von Ausdehnung bei höheren Drücken. Auch die Diodizitätswerte sind etwas schlechter als die messtechnisch ermittelten. Insbesondere wird jedoch das inverse Diodizitätsverhalten der runden Borsten (BDRÜ) wiedergegeben. Dieses Strömungsverhalten scheint durch die Borstenform und die damit zusammenhängenden Strömungsablösungen und die daraus resultierenden Totwassergebiete hervorgerufen zu werden. Die Größe und Form dieser Totwassergebiete definieren in beiden Durchflussrichtungen der Diode einen Strömungskanal (Strömungsweg). Dieser Kanal ist in Durchlassrichtung zwar länger als in Sperrrichtung, dazu aber relativ breit. Durch diese Breite und der relativ konstanten Strömungsgeschwindigkeit entsteht ein größerer Massenstrom in Durchlassrichtung, obwohl in Sperrrichtung der Strömungsweg kürzer und die maximale Geschwindigkeit größer ist. Zudem gibt es in Sperrrichtung der Diode eine Art Prallplattenprinzip. Da die Enden einer Borste jeweils senkrecht auf die nächste Borste zeigen, wird die Strömung entlang einer Borste beschleunigt und bei senkrechtem Auftreffen auf die nächste Borste wieder abgebremst. Durch die ständige Beschleunigung und Abbremsung der Flüssigkeiten entstehen die großen Geschwindigkeitsunterschiede im Strömungskanal. Durch die daraus resultierenden Druckschwankungen und den Impulsübertrag auf die Borsten wird viel Energie dissipiert. In Durchlassrichtung tritt dieser Effekt nicht auf, so dass die Strömung um die Borsten herumgeführt wird.

Die numerische Simulation stellt keine exakte Lösung des jeweiligen Problems dar. Daher ist auch die numerische Simulation, wie jede physikalische Messung, fehlerbehaftet. Abweichungen zwischen experimentellen Werten und simulierten Werten entstehen sowohl aus den numerischen Fehlern der Simulation als auch aus dem Unterschied zwischen eingegebenen Randbedingungen und realen Bedingungen. Diese Randbedingungen sind z.B. die Fluidichte, die Diodengeometrie, die Wandbeschaffenheit und die Viskosität. Um den Einfluss der jeweiligen Randbedingungen auf das Simulationsergebnis einschätzen zu können, wurden die Eingangsbedingungen leicht variiert. Bei Variation der Werte für die Dichte und die Viskosität (um 1 %) waren die Abweichungen der Simulationsergebnisse zu vernachlässigen ($\ll 1\%$). Es zeigte sich, dass die Geometrieabweichungen zwischen realer und modellierter Diode das Simulationsergebnis am deutlichsten beeinflussen. Eine Änderung der Strukturtiefe von $150\text{ }\mu\text{m}$ auf $140\text{ }\mu\text{m}$ (ca. 6,5 %) veränderte das Simulationsergebnis um ca. 10 %. Anhand von Querschnittsbildern der laserstrukturierten Dioden wurden die Abweichungen von der vorgegebenen Geometrie vermessen. Durch die Strukturierung mit dem Excimerlaser zeigte sich das charakteristische Profil eines laserstrukturierten Kanals. Dieser Kanal hat ein leicht W-förmiges Profil und ist unten schmaler als oben. Durch diese Abweichungen von dem der Simulation angenommenen rechtwinkligen Kanalquerschnitt und die durch die Abschrägung der Strukturwände bedingte Volumenänderung kann die 10 %-ige Abweichung der simulierten Werte stammen.

6.3.2 Optimierung der Ventile

Basierend auf den Simulationsergebnissen für die experimentell vermessenen Diodenstrukturen soll durch Variation einzelner Abmessungen eine Optimierung der Strukturen erreicht werden. Die Abhängigkeit der Diodizität von der Strukturhöhe und der Anzahl der Borsten soll einen ersten Schritt zur Optimierung bringen. Weiterhin sollten der Borstenradius, der Borstenwinkel und die Überlappung der Borsten verändert werden, da diese das Prallplattenprinzip beeinflussen. Alle drei Parameter bestimmen den Aufprallort der Strömung an der nächsten Borste. Es ist zu erwarten, dass es zwischen diesen Einstellungen ein Optimum gibt. Basierend auf der experimentell bereits bekannten Diode BDRÜ150 soll der Einfluss der jeweiligen Parameter untersucht werden. Aus den Optima soll anschließend eine optimierte Diode modelliert werden.

Durch eine weitere leichte Variation der Parameter an der optimierten Diode soll untersucht werden, ob sich die Parameter im Zusammenspiel ergänzen. Da das Diodizitätsverhalten der BDRÜ Strukturen in der bisherigen Simulation (siehe Abbildung 6-42) eine streng monoton fallende Abhängigkeit der Diodizität vom Druck gezeigt hat, soll eine Simulation bei nur einem Differenzdruckwert von 50 kPa zwischen Ein- und Ausgang die Anzahl der Simulationsläufe reduzieren. In den nachfolgenden Abbildungen werden die Abhängigkeiten der Diodizität von den jeweiligen Optimierungsparametern dargestellt.

Strukturtiefe: Über die Strukturtiefe lässt sich bei gleich bleibendem Differenzdruck der Volumenstrom durch die Diode vergrößern und die Diodizität verbessern. Je größer der Strömungsquerschnitt ist, desto größer muss auch der Volumenstrom sein. Im Diagramm ist zu erkennen, dass der Wert für die Diodizität bei hinreichend großer Strukturtiefe ein konvergentes Verhalten zeigt. Eine beliebig tiefe Struktur bringt also nur eine unwesentliche Verbesserung. Eine tiefere Struktur als ca. 500 μm erscheint daher wenig sinnvoll.

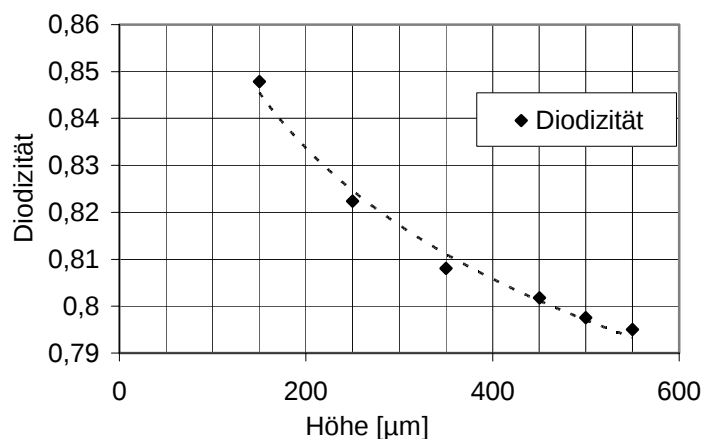


Abbildung 6-44: Diodizität in Abhängigkeit der Strukturtiefe (Die Punkte sind die jeweils simulierten Werte, die Linie stellt einen potenziellen Trend dar)

Borstenanzahl: Der Volumenstrom durch die Diode wird bei zunehmender Zahl der Borsten und damit zunehmender Länge der Diode kleiner, da der Strömungswiderstand größer wird. Es gibt ein Optimum der Diodizität bei sechs Borstenpaaren. Bei weniger Paaren wird der Strömungswiderstand der Diode zwar geringer, jedoch fehlt der richtende Einfluss der Borsten. Bei einer höheren Anzahl an Borsten wird der Strömungswiderstand größer und der Durchfluss durch die Diode damit so gering, dass die Diodizität abnimmt.

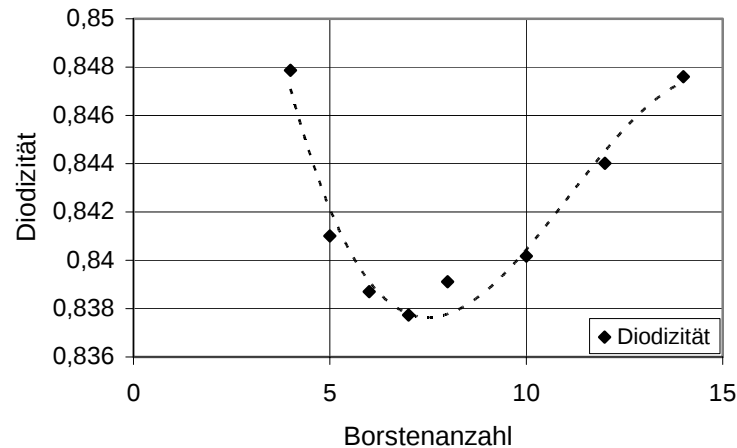


Abbildung 6-45: Diodizität in Abhängigkeit der Borstenanzahl

(Die Punkte sind die jeweils simulierten Werte, die Linie stellt einen polynomischen Trend dar)

Borstenradius: Der Borstenradius bestimmt, speziell in Sperrichtung, den Auftreffwinkel der Strömung auf die nachfolgende Borste. Bei kleineren Radien wird der Winkel flacher, die Strömung wird an der nächsten Borste vorbeigeführt und verschlechtert somit die Diodizität. Größere Radien haben den Effekt, dass der Strömungskanal in Durchlassrichtung verkleinert wird. Geht der Radius gegen unendlich, so geht die Diode mit der runden Form in eine Diode mit geraden Borsten über und zeigt damit wieder das „normale“ Verhalten der BDÜ-Diodenform.

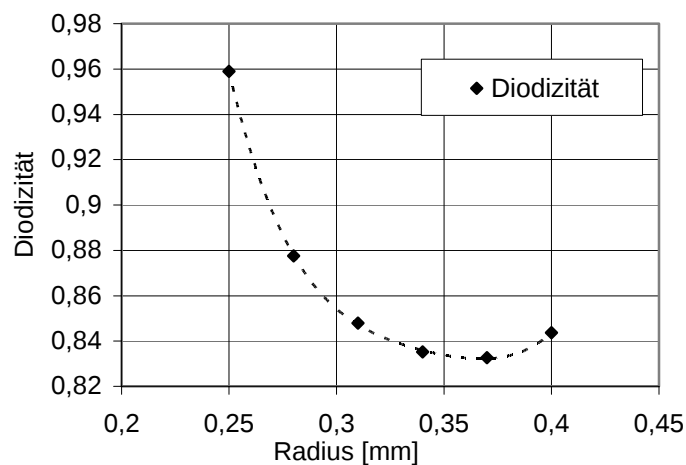


Abbildung 6-46: Diodizität in Abhängigkeit des Borstenradius

(Die Punkte sind die jeweils simulierten Werte, die Linie stellt einen polynomischen Trend dar)

Überlappung: Die Änderung der Überlappung bewirkt, wie auch die Änderung des Radius, eine Änderung des Auftreffwinkels auf die nächste Diode in Sperrrichtung. In Durchlassrichtung wird mit zunehmender Überlappung der Strömungskanal verkleinert. Daher gibt es auch hier ein Optimum.

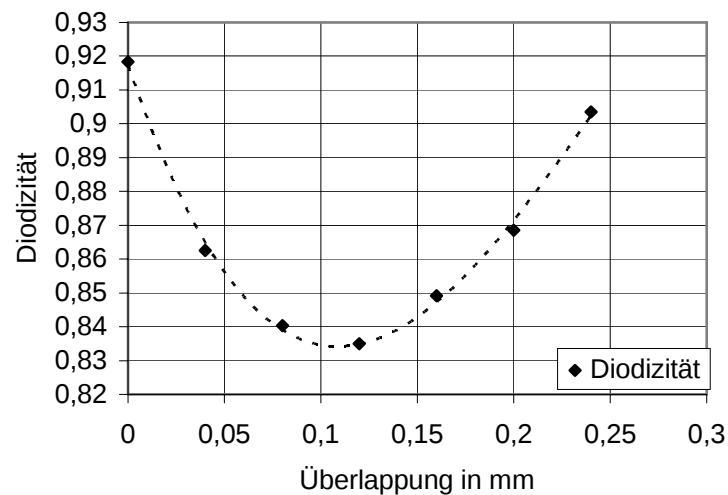


Abbildung 6-47: Diodizität in Abhängigkeit der Überlappung
(Die Punkte sind die jeweils simulierten Werte, die Linie stellt einen polynomischen Trend dar)

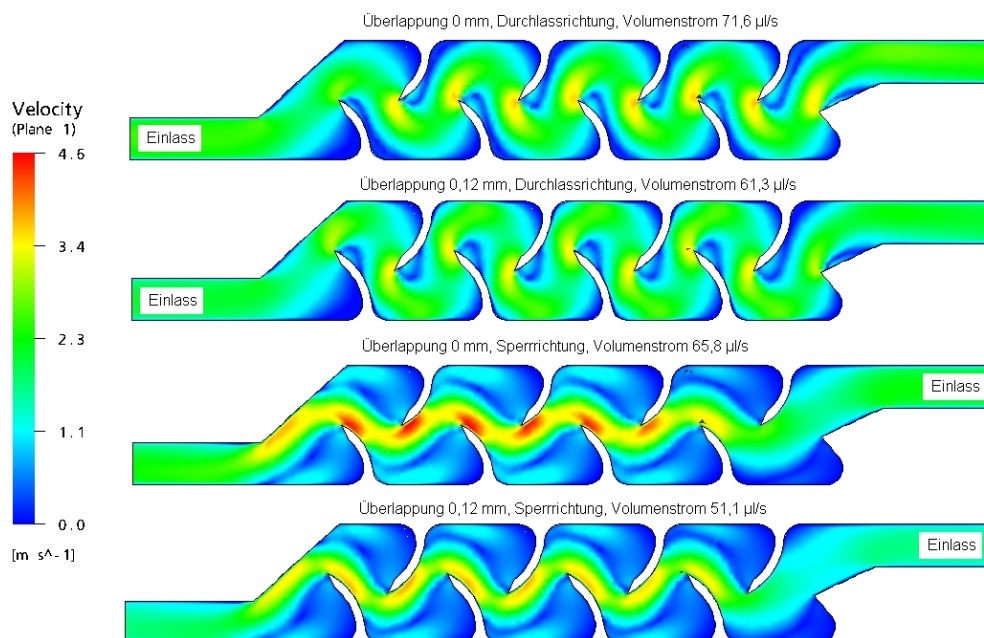


Abbildung 6-48: Diodizität in Abhängigkeit der Überlappung (qualitativ)

Borstenwinkel: Auch bei der Variation des Borstenwinkels zeigen die Ergebnisse ein Optimum. Spitzere Winkel verkleinern den Strömungskanal in Durchflussrichtung, stumpfere Winkel verschlechtern das Strömungsprofil in Sperrrichtung.

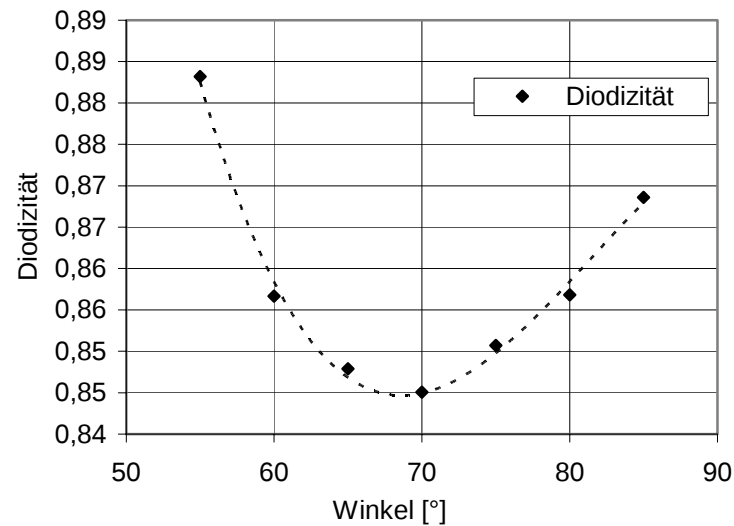


Abbildung 6-49: Diodizität in Abhängigkeit des Borstenwinkels
(Die Punkte sind die jeweils simulierten Werte, die Linie stellt einen polynomischen Trend dar)

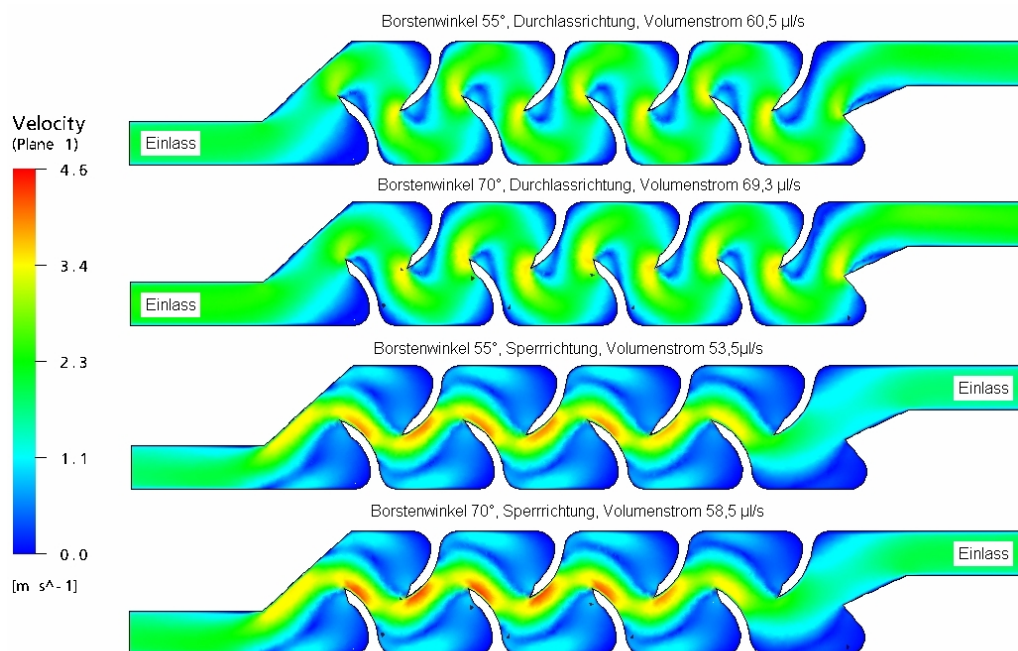


Abbildung 6-50: Diodizität und qualitative Änderung des Strömungsverhaltens in Abhängigkeit des Borstenwinkels (qualitativ)

Aus den Ergebnissen dieser Simulationsläufe wurde eine Diode mit folgenden optimierten Parametern modelliert.

Höhe:	ca. 500µm
Borstenanzahl:	6
Radius:	0,36 mm
Überlappung:	0,12 mm
Winkel:	70°

Zur Überprüfung des Optimums werden diese Werte nochmals leicht variiert. Da die Änderung der Strukturtiefe kein Maximum, sondern ein konvergentes Verhalten zeigt, wird die Rechenzeit für diese Simulationsläufe durch Verwendung einer Strukturtiefe von nur 150 µm reduziert. Durch eine Variation der Borstenanzahl lässt sich hierbei keine weitere Verbesserung mehr erreichen. Eine nur geringe Verbesserung der Diodizitätswerte im Bereich von einem Prozent lässt sich durch Variation der Parameter Borstenradius, Überlappung und Borstenwinkel erzielen. Der Wert für den Borstenradius der optimierten Diode wird zu 0,4 mm geändert. Durch die Optimierung anhand der Computersimulation wurde der Wert für die Diodizität der Borstendiode BDRÜ von 0,87 auf 0,77 verbessert (~10 %). Wichtig für die Fertigung der Strukturen ist die Erkenntnis, dass kleine Änderungen der Parameter Borstenradius, Überlappung und Borstenwinkel keinen großen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben und sich geringe Fertigungstoleranzen damit als unkritisch erweisen.

6.3.3 Dynamische (transiente) Simulation der Pumpe

Die gesamte Pumpe besteht aus einem Einlassventil, einem Auslassventil, den in der Pumpkammerplatte befindlichen Pumpkammern mit Piezoaktoren sowie den Verbindungskanälen. Eine komplette Computersimulation dieses komplexen Aufbaus mit mechanischer Simulation der Piezoaktoren und strömungstechnischer Erfassung der gesamten Anordnung ist aufgrund der Größe des Systems und der damit verbundenen Größe des Rechnernetzes mit der vorhandenen Rechnerleistung nicht zu bewerkstelligen. Daher geht die dynamische Simulation des Systems unter der Annahme, dass die Strömungswiderstände der Kanäle verhältnismäßig klein gegenüber denen der Ventile sind, von einem vereinfachten Aufbau aus. Die Geometrie, die sich aus der Anordnung der Einzelkomponenten der Pumpe ergibt, wird dabei vernachlässigt (Abbildung 6-51). Analog zum Vorgehen bei der statischen Simulation der Ventilstrukturen soll auch in der dynamischen Simulation zunächst die experimentell gut vermessene Diodenvariante BDRÜ150 nachsimuliert werden. Durch die geringe Höhe von 150 µm ergeben sich verhältnismäßig kurze Rechenzeiten für diese erste dynamische Simulation. Für weitergehende Simulationen können die Dioden und die Pumpkammer durch andere ersetzt werden. Hierbei wird sich dann aber der Rechenaufwand vervielfachen.

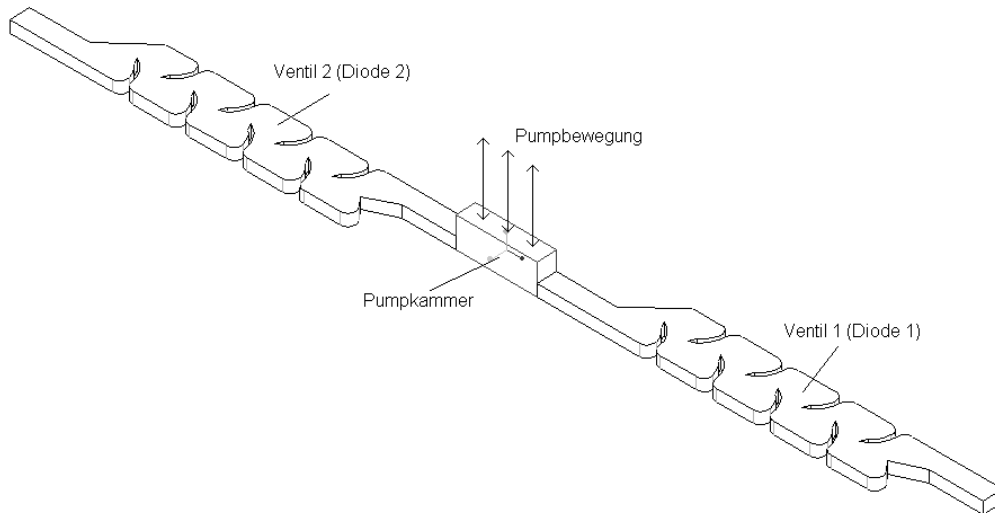


Abbildung 6-51: Vereinfachte Pumpgeometrie für die Simulation

Die Bewegung der Flüssigkeit durch den Piezoaktor wird durch viele Randbedingungen (Aufbau des Piezoaktors, angelegte elektrische Spannung, Pumpkammergeometrie,...) beeinflusst. Aus den Überlegungen zur Pumpfrequenz (Kapitel 6.2.4) folgt, dass die Membran der an den Piezoaktor angelegten Rechteckspannung aufgrund der Dämpfung durch die Flüssigkeit nur langsam folgen kann. Die Übertragung der Membranbewegung in die Simulationssoftware erfolgt durch Vorgabe einer Geschwindigkeitsfunktion in entsprechender Koordinatenrichtung. Die komplizierte reale Bewegung wird dabei (vereinfacht) durch eine sinusförmige Kolbenbewegung mit gleichem Hub ersetzt. Dabei wurde der typische Hub von 1 mm^3 der experimentellen Ergebnisse in eine Geschwindigkeitsamplitude der Sinusfunktion umgerechnet. Für eine Sinusbewegung des Kolbens lautet die Funktion für den Kolbenweg $s(t)$:

$$s(t) = \hat{s} \cdot \sin \omega t$$

durch Ableitung dieser Funktion ergibt sich für die Geschwindigkeit:

$$v(t) = \frac{ds}{dt} = \hat{s} \cdot \sin \omega t \cdot \frac{d}{dt}$$

$$\text{mit } \hat{s} = \frac{1 \text{ mm}^3}{2A} \text{ folgt:}$$

$$v(t) = \frac{\omega \cdot 1 \text{ mm}^3}{2A} \cos \omega t$$

Diese Funktion wird als Geschwindigkeitsfunktion für die Membran verwendet. Da die aus dem Experiment ermittelten optimalen Arbeitsfrequenzen bei 30 Hz lagen, soll diese Frequenz als Ausgangspunkt für die Computersimulation dienen. Um der theoretischen Erhöhung dieser Frequenz in höheren Strukturen Rechnung zu tragen, wird die $450 \text{ }\mu\text{m}$ hohe Pumpstruktur auch bei einer Frequenz von 200 Hz simuliert. Die Simulation der

Pumpe stellt ein transientes Rechenproblem dar, das aufgrund der vielen Vereinfachungen (insbesondere der Pumpkammer) im Wesentlichen den Charakter einer Abschätzung des Pumpverhaltens hat. Die Qualität dieser Abschätzung kann durch Vergleich der Simulationsergebnisse mit den experimentellen Ergebnissen der BDRÜ gezeigt werden. Eine anschließende Simulation einer Pumpe mit den optimierten Dioden (BDRÜ450-optimiert) soll die Verbesserung der Pumpleistungen zeigen. In einer ersten Simulation wird die optimierte Pumpe mit einer Frequenz von 30 Hz simuliert, was der Realität mit der durch die Spannungsversorgung vorgegebenen Arbeitsfrequenz entspricht. In einer zweiten Simulation wird die Frequenz auf 200 Hz erhöht. Hier ist eine wesentlich bessere Pumprate zu erwarten, welche sich aus der Erhöhung der Anzahl der Hübe und der verbesserten Diodizität zusammensetzt.

6.4 Ergebnisse der Pumpensimulation

In Abbildung 6-52 sind die Ergebnisse der Pumpensimulation mit der Diode BDRÜ150 anhand eines Diagramms dargestellt. Negative Werte für die Massenströme beschreiben das Ausströmen und positive Werte das Einströmen der Flüssigkeit. Es ist zu erkennen, dass der durch die Membran erzeugte Massenstrom gleich der Summe der Massenströme an Ein- und Auslass ist. Diese unterscheiden sich aufgrund der verschiedenen Strömungswiderstände der Dioden geringfügig. Die Werte der ersten Rechenschritte der Simulation weisen, durch das konvergente Verhalten der Rechnungen, einen größeren Fehler als die darauf folgenden auf. Daher ist es sinnvoll die Kurve zunächst anzupassen, indem nur die zweite Hälfte der Periode, die anschließend im Mittelpunkt gespiegelt wird, verwendet wird. Eine weitere Möglichkeit wäre die Simulation zweier Perioden, wodurch aber eine zu lange Rechenzeit in Kauf genommen werden müsste. Die durch die Pumpe erzeugte Pumprate kann durch Integration der Massenströme entweder am Ein- oder Auslass und durch Umrechnung in einen Volumenstrom berechnet werden. Für die Pumpe mit der Diode BDRÜ150 ergibt sich ein Massenstrom von 177 $\mu\text{l}/\text{min}$. Gemessene Werte liegen bei etwa 60-100 $\mu\text{l}/\text{min}$ d.h. die simulierten Werte liegen in der Größenordnung der gemessenen Werte.

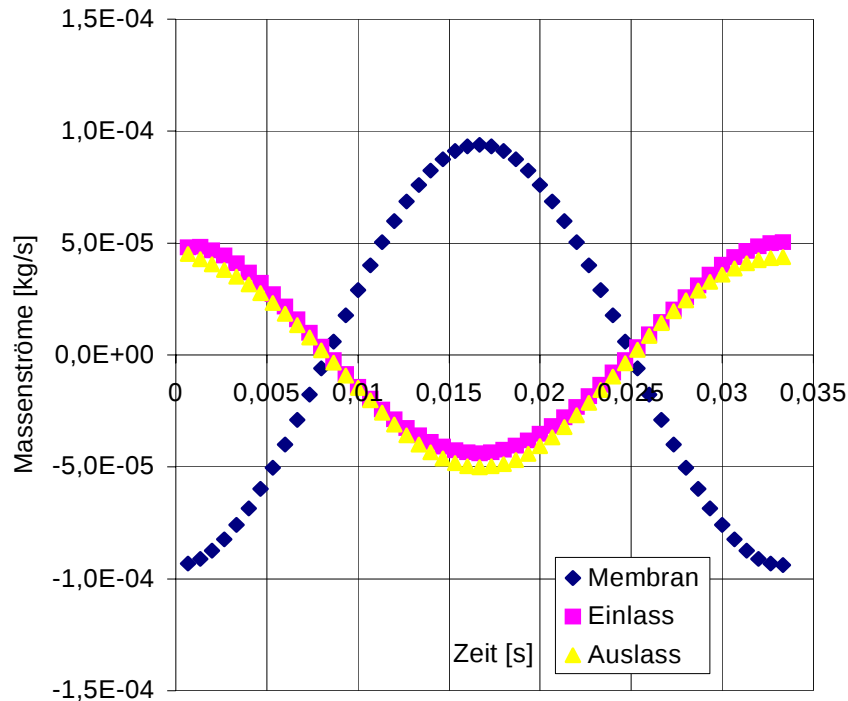


Abbildung 6-52: Ergebnisse der Pumpensimulation mit der Diode BDRÜ150. Aufgetragen sind die simulierten Massenströme in Abhängigkeit von der Zeit.

(Durch die Trägheit der Membran und durch die Ladekurve des als Kondensator wirkenden Piezoaktors, kann die Membran dem rechteckigen Verlauf der anregenden Spannung nicht folgen. Daher ergibt sich ein sinusförmiger Verlauf der Massenströme)

Die Ergebnisse der beiden weiteren Simulationen sind in Abbildung 6-53 und Abbildung 6-54 dargestellt. Die Pumprate bei der Strukturhöhe von 450 μm und einer Eingangsfrequenz von 30 Hz zeigt eine leichte Verbesserung auf 198,3 $\mu\text{l}/\text{min}$. Bei Erhöhung der Frequenz auf 200 Hz steigt die Pumprate allerdings auf 2,29 ml/min. Ein Teil dieser Steigerung ist auf die Erhöhung der Frequenz zurückzuführen, da statt 30 nun 200 Hübe pro Sekunde ausgeführt werden. Der andere Teil resultiert aus der Optimierung der Diodizität mit zunehmendem Druck. Ein qualitativer Geschwindigkeitsverlauf in Abhängigkeit von der Zeit kann aus Abbildung 6-55 entnommen werden.

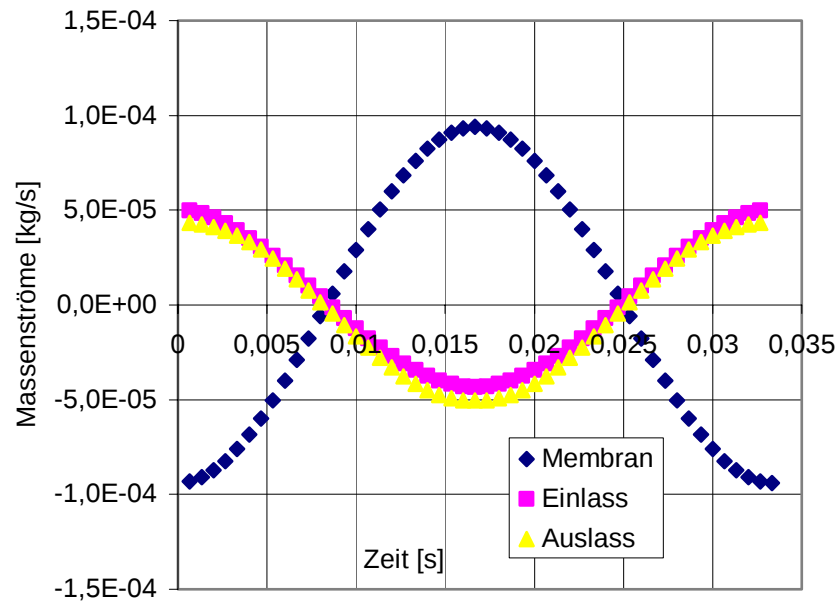


Abbildung 6-53: Ergebnisse der Pumpensimulation mit der Diode BDRÜ450 bei 30 Hz. Aufgetragen sind die simulierten Massenströme in Abhängigkeit von der Zeit.

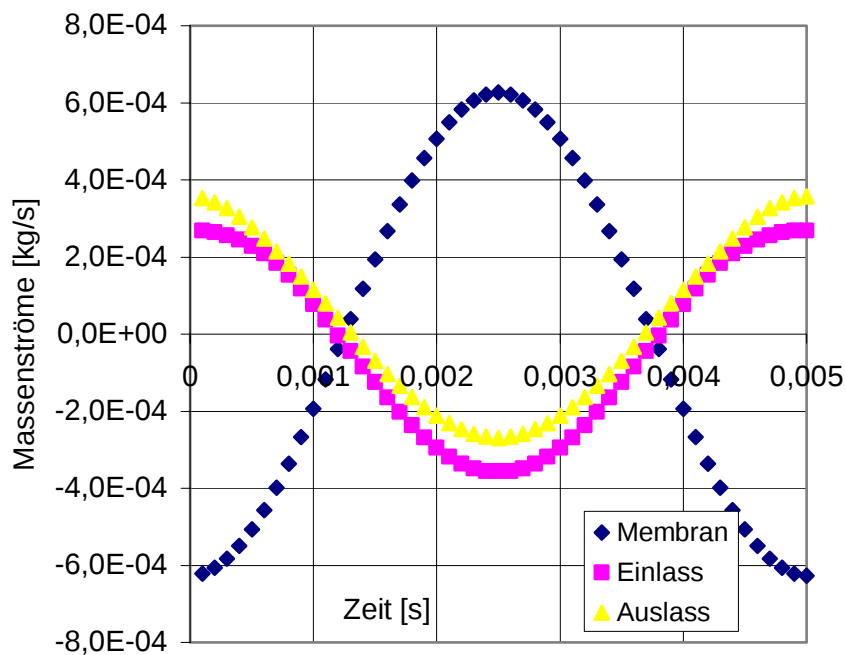


Abbildung 6-54: Ergebnisse der Pumpensimulation mit der Diode BDRÜ450 bei 200 Hz. Aufgetragen sind die simulierten Massenströme in Abhängigkeit von der Zeit.

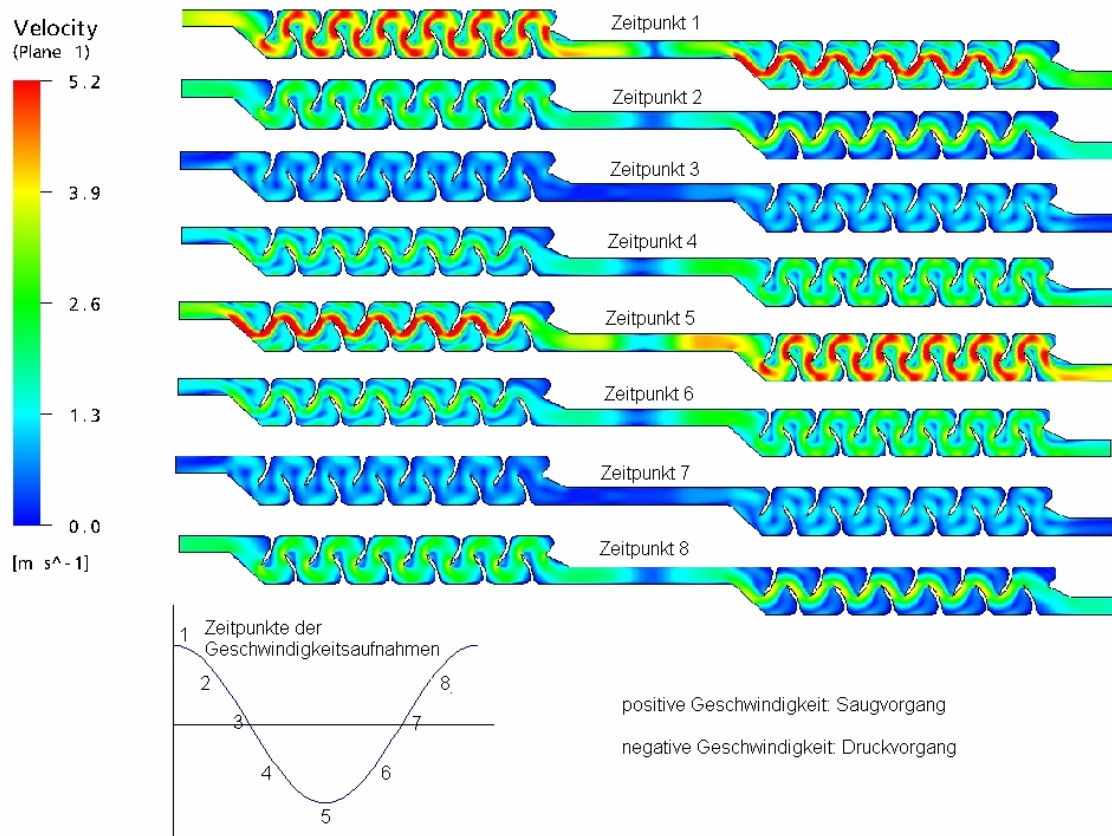


Abbildung 6-55: Geschwindigkeitsverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten

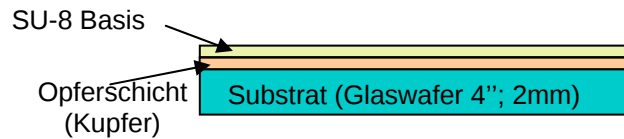
6.5 Technologie zur Herstellung der Prototypen aus SU-8 Photoresist

Da die lasergefertigten Strukturen sehr aufwendig herzustellen sind und die Ergebnisse der Computersimulation darauf hindeuten, dass sich die Diodizität der Strukturen bei höheren Kanälen verbessern könnte, sollten die nächsten Strukturen aus SU-8 Photoresist hergestellt werden. Durch die Herstellung in SU-8 Photoresist wird die Geometrie der Strukturen wie bei der Laserstrukturierung durch eine Maske vorgegeben. Die Herstellung dieser Maske ist jedoch deutlich schneller und kostengünstiger möglich als die Herstellung der Lasermasken. Eine Variation der Strukturhöhe ist bei den SU-8 Strukturen leicht durch eine Variation der Drehzahl beim Aufschleudern der Lackschicht möglich.

Die Herstellung von Polymerstrukturen aus SU-8 Photoresist baut auf einem 4" Substratwafer aus Glas auf. Die Dicke dieses Substratwafers beträgt mindestens 2 mm. Dünnere Substratwafer wölben sich durch die während des Fertigungsprozesses auftretenden mechanischen Spannungen und erschweren dadurch ein gleichmäßiges Aufbringen der SU-8 Schichten. Der Substratwafer wird zunächst in einem Ultraschallbad gründlich gereinigt und anschließend im Barreletcher durch ein Sauerstoffplasma (300 W, 5 min) oberflächenaktiviert, um eine gute Haftung der nächsten Schicht zu ermöglichen. Auf den so vorbereiteten Wafer wird durch einen Sputterprozess eine ca. 1 µm dicke

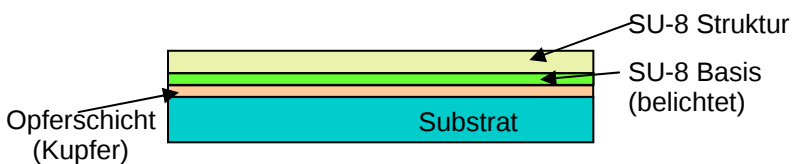
Opferschicht aus Kupfer aufgebracht, die ein späteres Ablösen der SU-8 Strukturen vom Substratwafer möglich macht. Auf diese Opferschicht wird eine erste, als Boden dienende SU-8 Basisschicht, aufgeschleudert.

Um eine Oxidation der Kupferschicht zu vermeiden, sollte das Aufschleudern dieser Basisschicht möglichst schnell nach Aufputtern der Kupferschicht



erfolgen. Die Basisschicht aus SU-8 wird im Ofen langsam auf 65°C aufgeheizt und 30 Minuten gebacken. Anschließend wird die Temperatur langsam auf 95°C erhöht und 90 Minuten gebacken. Im Anschluss an diesen Vorbackprozess wird der Ofen wieder langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die so aufgebrachte SU-8 Bodenschicht wird komplett durchbelichtet und anschließend einem weiteren Backprozess (40 min bei 95°C, langsames Aufheizen und Abkühlen) unterzogen.

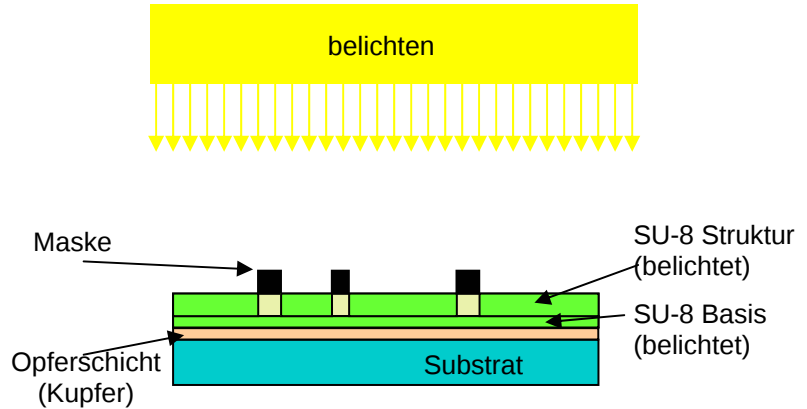
Auf die so entstandene Bodenschicht aus SU-8, wird die Strukturschicht in einem



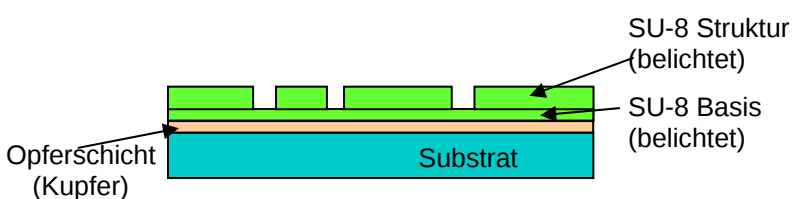
zweistufigen Prozess aufgebracht. In einem ersten Schleuderprozess wird eine SU-8

Schicht aufgeschleudert und in Analogie zur Basisschicht vorgebacken. Auf diese vorgebackene Schicht wird eine zweite Schicht aufgeschleudert, um die Höhe der Strukturen auf ca. 450 µm zu erhöhen. Diese Schicht wird ebenfalls vorgebacken.

Nach Abkühlen dieses Schichtaufbaus wird die Strukturschicht durch eine Maske belichtet. Die belichteten Stellen im SU-8 Resist werden dabei aktiviert, so dass sie im



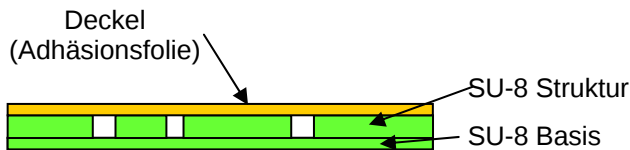
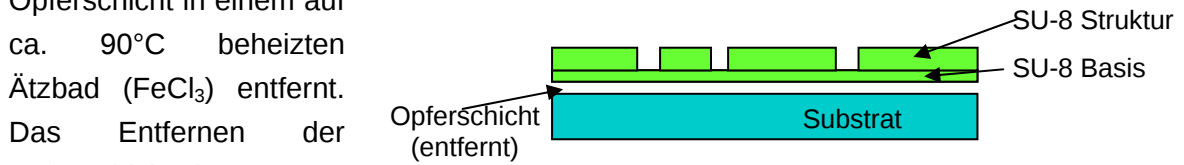
anschließenden Backprozess (post exposure bake, 1 min 65°C, 20 min 95°C) polymerisieren können. Ein anschließender mindestens 1-stündiger Ruheprozess ermöglicht die mechanischen Spannungen innerhalb der SU-8 Schichten zu reduzieren. In einem Entwicklungsschritt werden die unbelichteten SU-8 Bereiche mit dem SU-8



Entwickler EC-Solvent entfernt. Die Entwicklung erfolgt zunächst in einem Tauchbad, in dem

der größte Teil des unbelichteten SU-8 entfernt wird. Durch eine anschließende

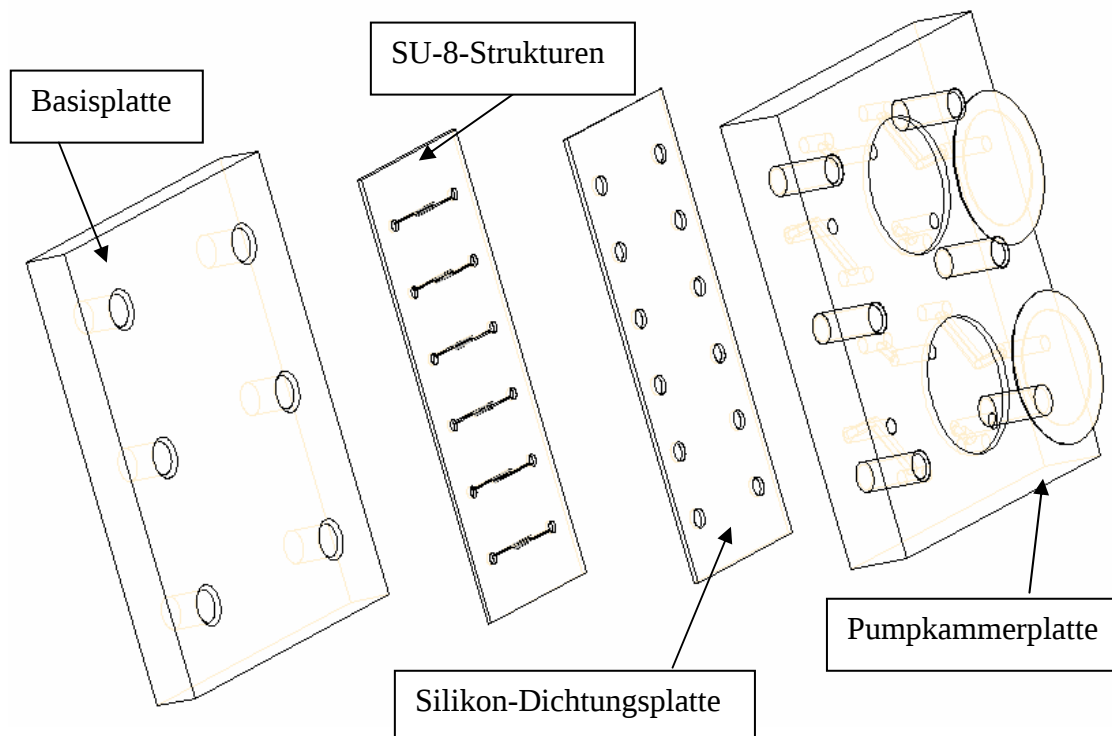
Sprühentwicklung werden auch die an der Oberfläche der Strukturen haftenden Lackreste entfernt. Anschließend werden die Strukturen noch mit Isopropanol und mit DI-Wasser gereinigt und getrocknet. Um die SU-8 Strukturen vom Substratwafer zu lösen wird die Opferschicht in einem auf ca. 90°C beheizten Ätzbad (FeCl_3) entfernt. Das Entfernen der Opferschicht dauert ca. 3 Tage.



Nach einer abschließenden Reinigung der SU-8 Strukturen können diese mit Adhäsionsfolie verschlossen werden.

6.6 Die optimierte Pumpe

Weiterhin wurde die Pumpkammerkonstruktion (siehe Abbildung 6-31 auf Seite 57), wie sie bisher verwendet wurde, für die Strukturoptimierung grundlegend verändert. Es wurde ein Aufbau entworfen, bei dem die Ventilstrukturen zwischen zwei PMMA-Platten geschraubt werden können. Eine dieser beiden Platten enthält die Pumpkammern (im Folgenden **Pumpkammerplatte** genannt), während die andere nur als Gegendruckplatte (Basisplatte) fungiert. Die Ventilstrukturen werden mit einer Silikondichtmatte zwischen den beiden Platten eingepresst, so dass die Silikondichtung die Ventilstrukturen zur Pumpkammer hin abdichtet.



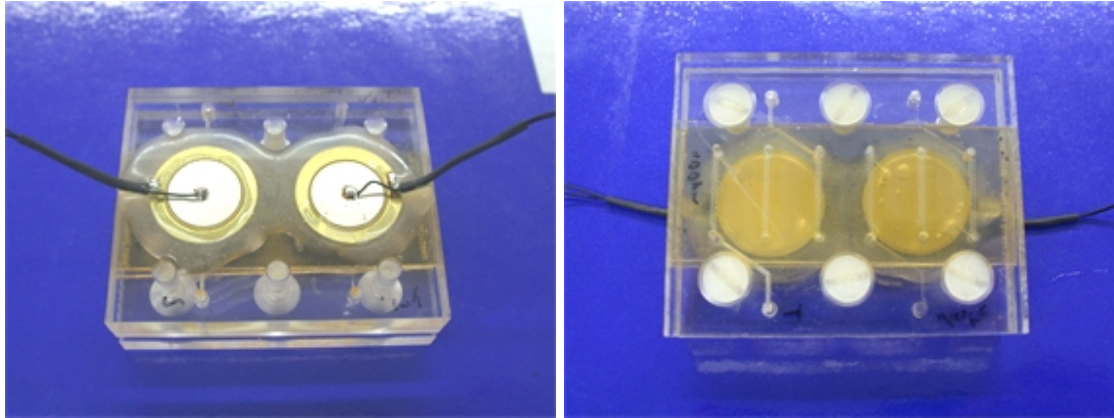


Abbildung 6-56: Pumpkammerplatten mit eingebauten Ventilstrukturen

Die Pumpkammerplatte besteht wiederum aus zwei PMMA-Platten. In die obere PMMA-Platte sind zwei Pumpkammern gefräst. Die untere Platte enthält gefräste Kanäle, die die Flüssigkeit von der Pumpkammer zu den Anschlussstellen der Ventilstrukturen weiterleiten. Beide Platten sind durch einen Lösungsmittelbondprozess miteinander verbunden. An der Oberseite der Pumpkammerplatte sind Steckanschlüsse vorhanden, an die Zuleitungsschläuche, Spritzen oder Messkapillaren angeschlossen und so mit den Ventilstrukturen verbunden werden können. Durch einen direkten Anschluss von Messkapillaren an die Pumpkammerplatte kann die Pumpe ohne flexible Zuleitungsschläuche betrieben werden. Durch den Wegfall dieser hydraulischen Kapazitäten ist eine direktere Messung der Pumpleistung möglich. Zudem ermöglicht dieser Aufbau ein einfacheres Austauschen der Ventilstrukturen. Durch eine Normierung der Anschlussabstände für Pumpkammereinlass und -auslass auf dem Chip besteht später die Möglichkeit, auch komplexere Kanalstrukturen an diese Pumpkammerplatten anzuschließen. Die Pumpkammern werden durch Piezoaktoren, die auf die Pumpkammern aufgeklebt werden, verschlossen. Die bisher verwendeten Piezoaktoren hatten nur eine begrenzte Lebensdauer und sind durch das Verkleben mit einer dünnen Glasscheibe sehr aufwendig herzustellen. Daher wurde für die weiteren Versuche auf fertig aufgebaute Piezoaktoren, wie sie als Schallwandler, z.B. in Armbanduhren, verwendet werden, zurückgegriffen. Diese Piezoaktoren bestehen aus einer dünnen Messingplatte, die mit der Piezokeramik verbunden ist. Trotz der Nennspannung von 1,5 V vertragen diese Piezoaktoren deutlich höhere Spannungen (einige 100 V). Die Lebensdauer der Aktoren wird durch die hohen Spannungen zwar deutlich reduziert, ist für die Experimente jedoch ausreichend.

In Abbildung 6-57 ist zu erkennen, dass die Pumpe mit der neuen Pumpkammerplatte und 400 μm hohen (SU-8) Diodenstrukturen eine Pumpleistung von mehr als 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ erreicht. Die großen Fehlerbalken stammen aus der Standardabweichung mehrerer Messungen und zeigen, dass die einzelnen Werte der Pumpleistung deutlich variieren. Dies kann zum einen an kleinen Luftblasen liegen, die im System vorhanden sind. Zum anderen verändern sich die Piezoaktoren bei längerer Betriebsdauer durch Verschleiß

und Depolarisation. Das Maximum der Pumpleistung liegt wie bei den anderen bisherigen Messungen bei einer Frequenz von ca. 30 Hz. Die durch den deutlich geringeren Flusswiderstand erwartete Erhöhung der Resonanzfrequenz der Ventile tritt in den Messungen nicht auf, da die Spannung des verwendeten Hochspannungsverstärkers durch dessen geringe Leistung bei Frequenzen über 30 Hz deutlich absinkt und der Piezoaktor damit nicht mehr seinen maximalen Hub erreichen kann. Die Resonanzfrequenz ist in diesem Fall durch die Leistung des Hochspannungsverstärkers vorgegeben.

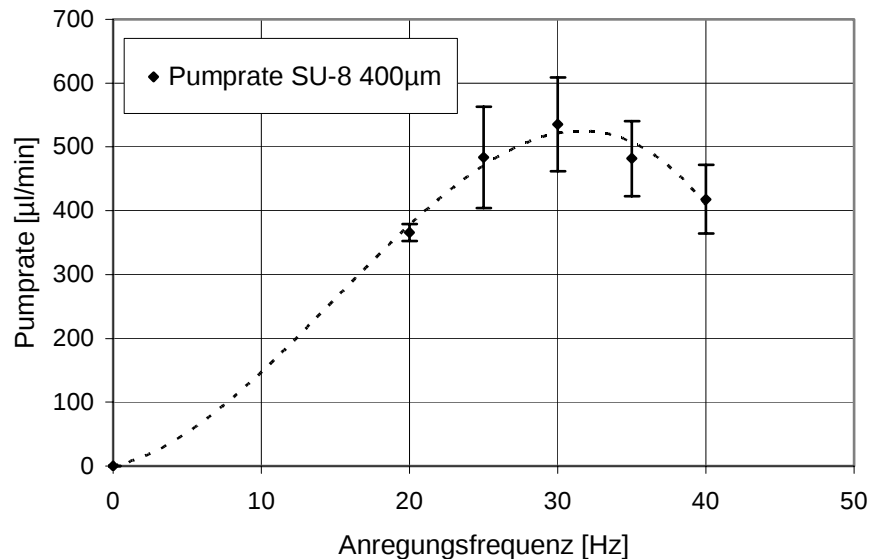


Abbildung 6-57: Pumprate gegen Frequenz bei 400 µm hohe SU-8-Diodenstrukturen.
(Die Linie stellt einen polynomischen Trend dar)

6.7 Prozessführung auf dem Chip

6.7.1 Integration von Mikropumpe und Reaktionskammer

Der nächste Entwicklungsschritt des Immunoassaychips ist die Integration der Pumpe. Um die Kanalstrukturen analog zu den bisher verwendeten Ventilstrukturen unabhängig von den Pumpkammerstrukturen herstellen zu können, wurde das Design der Strukturen so ausgelegt, dass die Pumpkammerplatten, die schon bei der Entwicklung der Ventilstrukturen zum Einsatz gekommen sind, weiterhin verwendet werden können. Dieser an die bestehenden Pumpkammern angepasste Aufbau ermöglicht es, die Kanalstrukturen mit den Ventilen und Reaktionskammern in SU-8 Photoresist herzustellen und die Pumpkammern wie bisher aus PMMA zu fertigen. Die SU-8 Strukturen werden dabei wieder durch den in Kapitel 6.5 beschriebenen SU-8 Fertigungsprozess hergestellt. Die Reaktionskammerstrukturen mit den integrierten Ventilen sind in Abbildung 6-58 dargestellt.

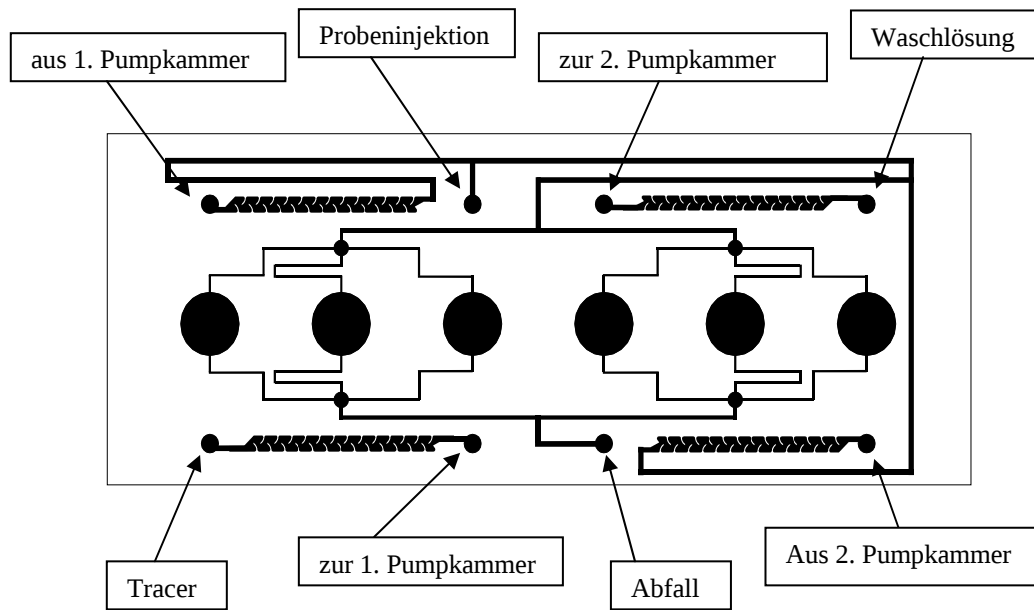


Abbildung 6-58: Reaktionskammerstrukturen mit integrierten Ventilen

In diesen Strukturen wurden 6 Reaktionskammern integriert, um gleichzeitig 6 Versuche durchführen zu können und somit einen Vergleich über die Reproduzierbarkeit zu erhalten. Die Zuleitungen zu den jeweiligen Reaktionskammern sind so ausgelegt, dass sie alle die gleiche Länge und die gleiche Anzahl an Abwinkelungen haben, um einen möglichst gleichen Strömungswiderstand der Zuleitungen zu erreichen. Die Abstände der Reaktionskammern sind auf den Standardabstand der Kammern in 96-Well-Titerplatten angepasst, um möglichst gute Kompatibilität zu den bestehenden Auswertesystemen zu gewährleisten. Für die Auswertung der Reaktionen durch Chemolumineszenz lassen sich so beispielsweise die Adhäsionsfolien, auf denen die Immunchemie aufgebracht ist, nach der Reaktion von den Fluidikstrukturen abziehen, auf eine 96-Well-Titerplatte mit durchbohrten Böden aufkleben und im Lumineszenzreader auswerten (vgl. Kapitel 6.1 Mikrofluidische Reaktionskammern). Eine Auswertung durch Fluoreszenz kann durch Einlegen der biologisch aktiven Bereiche in den LRE-Reader erfolgen. Durch den schmalen Chipaufbau ist (mit einem modifizierten LRE-Slide) auch ein Einlegen des gesamten Chips in den LRE Reader und damit eine einfache „On-Board“-Auswertung auf dem Chip möglich. Den Aufbau der Testanordnung aus Pumpkammerplatte und SU-8 Chip zeigt Abbildung 6-59.

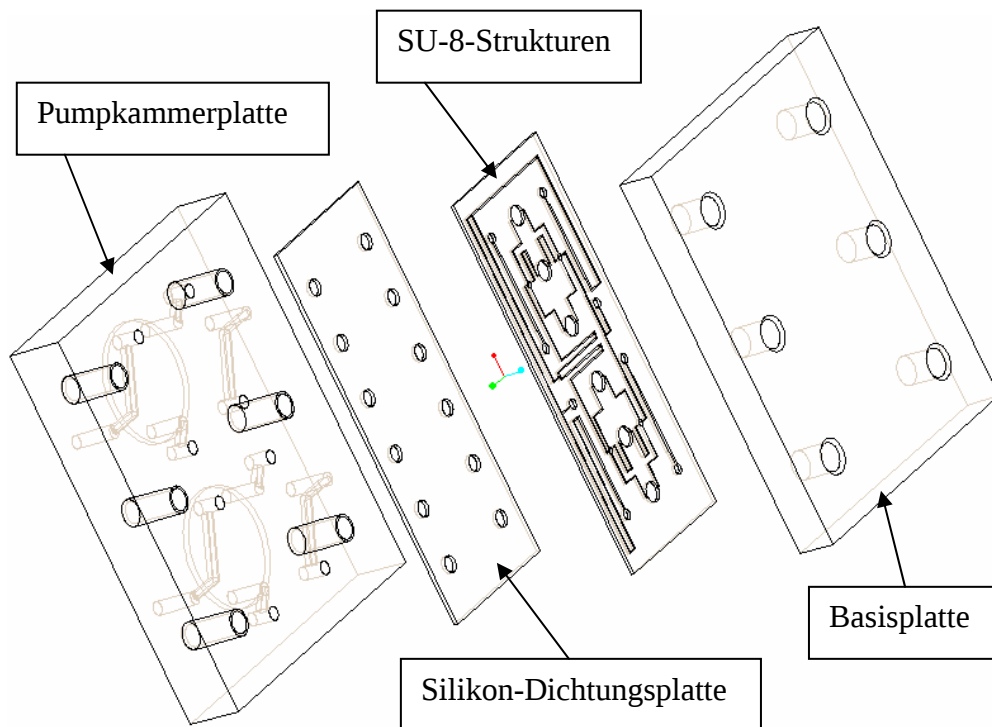


Abbildung 6-59: Aufbau der Testanordnung

Die Probe wird mit einer Spritze dosiert und durch die Pumpkammerplatte in die Strukturen injiziert. Die Reaktionschemikalien werden durch Silikonschläuche, die von außen an die Pumpkammerplatten angeschlossen werden, aus kleinen Vorratsgläsern in die Strukturen geleitet. Da die Pumpen nicht selbstbefüllend arbeiten, müssen die Pumpkammern sowie die Zuleitungsschläuche zunächst blasenfrei mit den jeweiligen Reaktionslösungen befüllt sein. Der gesamte Aufbau ist in Abbildung 6-60 skizziert.

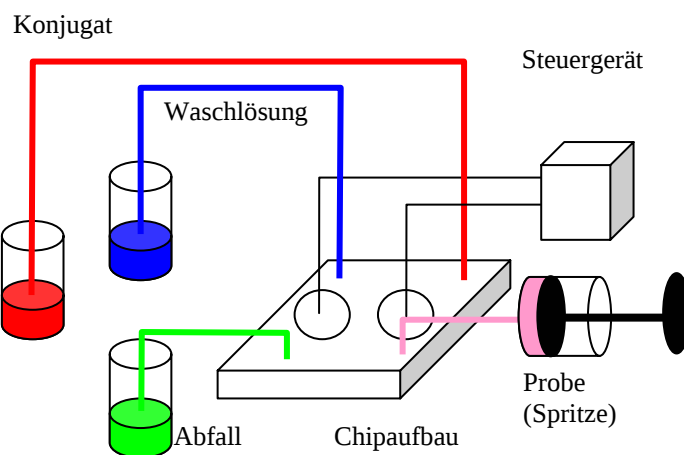


Abbildung 6-60: Schematische Skizze der Testanordnung

Als Testflüssigkeit für Strömungsuntersuchungen in diesen neuen Strukturen dient mit Lebensmittelfarben eingefärbtes DI-Wasser. So kann ein Befüllen und Ausspülen der Reaktionskammern mit den verschiedenen Reaktionslösungen sowie die Wirkungsweise der Pumpen optisch qualitativ verfolgt werden. Durch ein Aufzeichnen der Versuche mit einer Videokamera kann jeder Schritt des Experimentes ausgewertet und optimiert werden. Der mit den farbigen Lösungen befüllte Aufbau ist in Abbildung 6-61 dargestellt.

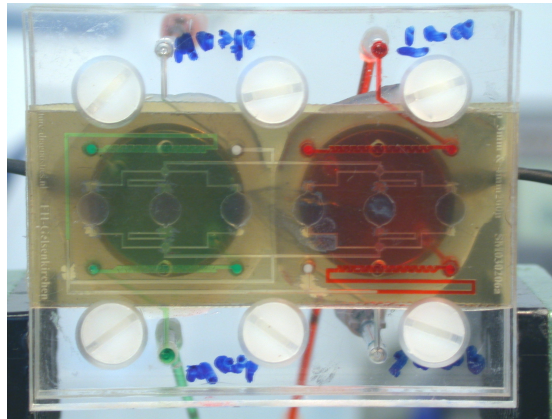


Abbildung 6-61: Aufbau der Testanordnung mit farbigen Flüssigkeiten

Die Kanalkreuzung, an der der Probeneinlasskanal auf die Zuleitungen der Tracer- und Waschlösung trifft, stellte sich bei den Versuchen als ein wichtiges konstruktives Element heraus. Das Einströmen der Flüssigkeiten in die jeweils ungewünschten Richtungen lässt sich vermeiden, indem die Belüftungen der ungewünschten Kanäle an deren Ende verschlossen werden, so dass sich in ihnen ein Gegendruck aufbauen kann. Ein reproduzierbarer Prozessablauf ist so nur schlecht zu erreichen, da nach jedem Pumpschritt erst die gewünschten Kanalbelüftungen von Hand geöffnet bzw. wieder verschlossen werden müssen. Ein Eindringen der Flüssigkeiten in die ungewünschten Kanalbereiche sollte auch durch ein gezieltes Gegensteuern mit den jeweils in diesen Kanalbereichen vorhandenen Pumpen möglich sein. Da jedoch die Injektionsgeschwindigkeit der Probe mit einer Spritze sowie die Steuerung der Pumpen dann genau aufeinander abgestimmt sein müssen, ist eine manuelle Durchführung dieser einzelnen Arbeitsschritte schwierig und nur schlecht reproduzierbar. Werden die Kanalbelüftungen an den jeweils ungewünschten Kanälen verschlossen, um eine Strömung in diesen Kanälen zu verhindern, ist eine Steuerung der Flüssigkeiten durch die integrierten Pumpen unproblematisch und funktioniert prinzipiell ebenso gut wie die Steuerung der Flüssigkeiten mit den externen peristaltischen (Schlauch-) Pumpen. Als großes Problem stellte sich der Aufbau mit 6 parallelen Reaktionskammern heraus. Durch geringe fertigungsbedingte Abweichungen im Strömungsverhalten der jeweiligen Zuleitungen kann ein gleichmäßiges Durchströmen aller 6 Reaktionskammern praktisch nicht erreicht werden. Zudem fingen sich in den einzelnen Reaktionskammern unterschiedlich viele Luftblasen, so dass keine reproduzierbare Durchströmung erzielt

werden konnte. Diese Probleme treten bei Verwendung von nur einer Reaktionskammer nicht auf, da dann alle Flüssigkeiten die Reaktionskammer zwangsweise passieren müssen.

6.7.2 Automatische PC-Steuerung des Prozessablaufs

Um eine reproduzierbare Steuerung der Probeninjektion sowie der einzelnen Pumpschritte zu ermöglichen, wurde eine PC-basierte Steuerung für diese Schritte aufgebaut. Diese Steuerung basiert auf einer Messkarte (16-Kanal-Messkarte PCI-MIO-16E-4 der Firma National Instruments) sowie einer Schrittmotorsteuerung (Schrittmotorkarte SMC 800 an Parallelschnittstelle), die durch eine in der Programmiersprache LabVIEW® der Firma National Instruments programmierte grafische Bedienoberfläche (Abbildung 6-62) angesteuert wird.

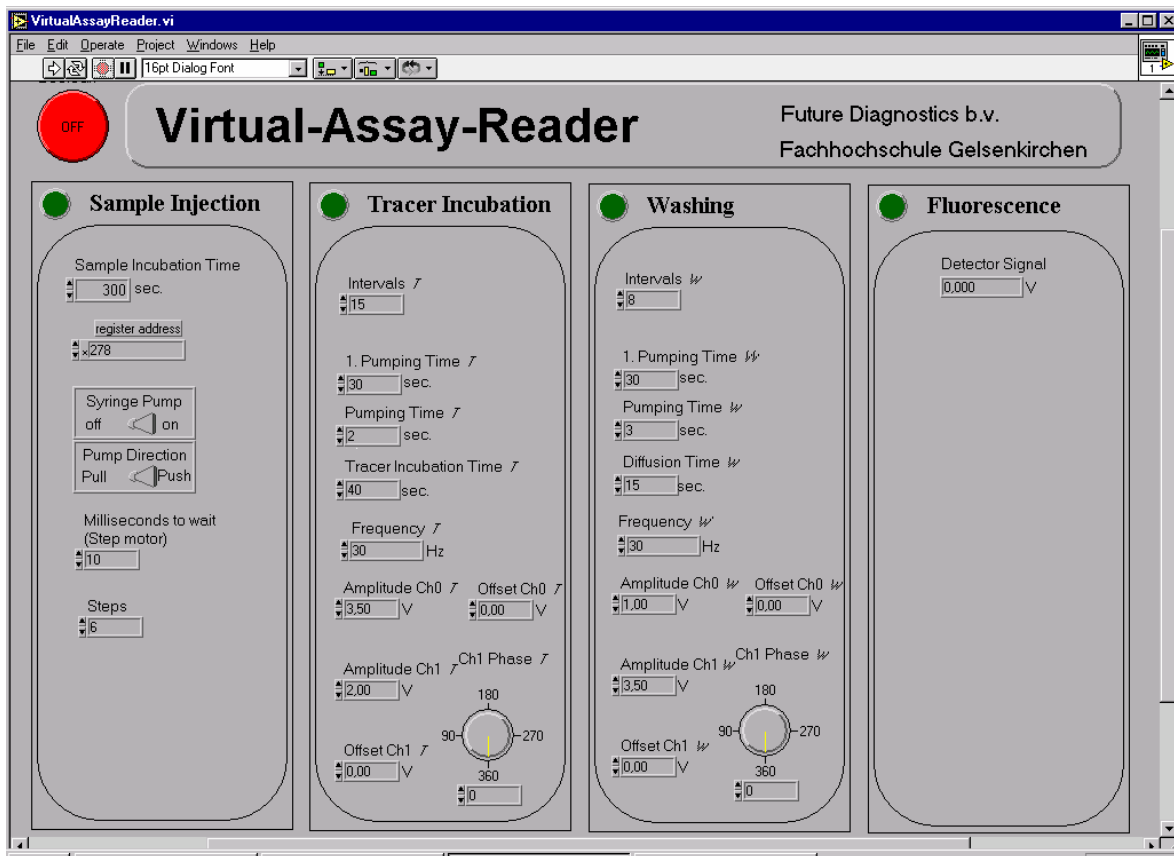


Abbildung 6-62: Grafische Bedienoberfläche der PC-Steuerung

Die grafische Bedienoberfläche enthält Eingabemöglichkeiten für alle prozessrelevanten Steuergrößen. Die Eingabefenster für diese Steuergrößen sind in vier Eingabebereiche aufgeteilt, die den einzelnen Prozessschritten bei der Durchführung eines Immunoassays zugeordnet sind.

Der **erste Eingabebereich** (Sample Injektion) steuert die **Injektion der Probe** in den Chip. Die Injektion in den Chip erfolgt durch eine (1 ml-) Spritzenpumpe, die über einen Schrittmotor angesteuert wird. Dazu kann im **ersten Eingabefenster** für die Probeninjektion zunächst die **Probeninkubationszeit** eingestellt werden. Die Probeninkubationszeit ist die Zeit, die nach Abarbeitung des ersten Eingabefensters (nach der Probeninjektion) abgewartet wird, bevor das nächste Programmfenster ausgeführt wird. Diese Zeit entspricht damit der Inkubationszeit für die (Blut-) Probe. Das **zweite Eingabefenster** der Probeninjektion steuert die **Adresse des Parallelports**, an den die Schrittmotorkarte für die Motorsteuerung angeschlossen ist. Im **dritten und vierten Eingabefenster** der Probeninjektion kann die **Pumpe manuell** bedient werden. So kann beispielsweise im laufenden Injektionsprozess die Pumpe mit dem dritten Eingabefenster angehalten und neu gestartet werden. Mit dem vierten Eingabefenster kann die Pumprichtung umgekehrt werden. Dieser manuelle Zugriff kann für das Befüllen der Probenspritze verwendet werden. Bei richtiger Programmierung des Prozessablaufs sollte ein Eingreifen in die Prozesssteuerung nicht notwendig sein. Im **fünften Eingabefenster** der Probeninjektion wird eine Wartezeit nach jedem einzelnen Schrittmotorimpuls eingestellt. Dieses Eingabefenster steuert damit die **Injektionsgeschwindigkeit** der Spritzenpumpe. Im **sechsten Eingabefenster** der Probeninjektion wird die **Gesamtzahl der Injektionsschritte** und damit indirekt auch das zu **injizierende Flüssigkeitsvolumen** eingestellt. Erfolgt kein manueller Eingriff in die Pumpensteuerung, so wird immer das eingestellte Probenvolumen injiziert, die Inkubationszeit abgewartet und zum nächsten Programmschritt (Tracerinkubation) gewechselt.

Der **zweite Eingabebereich** (Tracer Incubation) steuert den Transport der **Tracerflüssigkeit** sowie die Tracerinkubation. Im **ersten Eingabefenster** dieses Eingabebereiches wird die **Anzahl der Pumpschritte** für die Tracerinkubation eingestellt. Dabei ist der erste Pumpschritt immer der, durch den die (Blut-) Probe von der Tracerflüssigkeit aus der Reaktionskammer verdrängt wird. Die **Dauer dieses Pumpschrittes** wird im **zweiten Eingabefenster** eingestellt. Die weiteren Pumpschritte dienen dazu, während der Inkubationszeit des Tracers, kurzzeitig Pumpbewegungen zu erzeugen, um die Tracerlösung in der Kammer leicht vorwärts zu bewegen. Damit vermeidet man eine Verarmung der Tracerlösung an der Oberfläche der Reaktionskammer. Nach einem solchen Bewegungsintervall folgt wieder ein Ruheintervall, in dem die Flüssigkeit statisch inkubiert wird. Die Pumpzeit dieser **weiteren Pumpschritte** wird im **dritten Eingabefenster** der Tracerinkubation gesteuert. Das **vierte Eingabefenster** steuert die **statische Verweildauer der Tracerlösung** in der Reaktionskammer während eines Ruheintervalls und startet nach Ablauf der eingestellten Intervallzahl den Programmablauf des nächsten Fensters. Die weiteren Eingabefenster des Eingabebereiches für die Tracerinkubation sind für die Ansteuerung der in den Chip integrierten Pumpen verantwortlich. Beide Pumpen werden mit einem Rechtecksignal mit der im **fünften Eingabefenster** eingestellten **Frequenz** angesteuert. Die Ansteuerung der Tracerpumpe (Kanal 0) dient der eigentlichen Injektion der Tracerflüssigkeit. Die

gewünschte **Amplitude und der Offset** des Rechtecksignals für die Pumpe können im **sechsten bzw. siebten Eingabefenster** dieses Eingabebereichs gewählt werden. Die Ansteuerung der Pumpe für die Waschlösung soll durch Aufbauen eines entsprechenden Gegendruckes ein Einströmen der Tracerflüssigkeit in den Bereich der Waschlösungspumpe vermeiden. Dazu können die **Amplitude und der Offset** des Rechtecksignals für diese Pumpe im **achten bzw. neunten Eingabefenster** dieses Eingabebereiches separat eingestellt werden. Um das Gegeneinanderarbeiten der Pumpen zu optimieren, kann zusätzlich am **Drehregler dieses Eingabebereiches** noch eine **Phasenverschiebung der Pumpbewegungen** eingestellt werden. Eine unabhängige Kontrolle der Pumpfrequenzen erschien nicht sinnvoll, da bei verschiedenen Pumpfrequenzen aufgrund von Schwebungen der Pumpen zueinander keine gleichmäßige, gut kontrollierbare Strömung der Flüssigkeiten in den Kanälen zu erwarten ist. Nach Ablauf der Inkubationszeit (viertes Eingabefensters) wird die Steuerung dem dritten Eingabebereich, der für die Steuerung des Waschschrilles zuständig ist, übergeben.

Der **dritte Eingabebereich** (Washing) steuert den **Transport der Waschflüssigkeit**. Der Waschschrille ist eine Kopie des zweiten Eingabebereiches und funktioniert analog. In diesem Fenster können ebenfalls beide Pumpen angesteuert werden. Hier ist darauf zu achten, dass die für diesen Schrille entscheidende Pumpe über die unteren Eingabebereiche angesteuert wird. Es sollte also im Gegensatz zum zweiten Eingabebereich nun in dem unteren Fenster die höhere Amplitude eingestellt werden (siehe Abbildung 6-62).

Der **vierte und letzte Bereich** (Fluorescence) der Steuersoftware ist eine Vorbereitung für einen späteren Ausbau der Software zur **Signalerfassung des Fluoreszenzdetektors**. In diesem Bereich wird das Ausgangssignal des Fluoreszenzdetektors in mV angezeigt.

Da die Steuerkarte für die Pumpen nur Signale mit einer Amplitude von maximal 10 V ausgeben kann, für die Ansteuerung der Piezoaktoren jedoch eine deutlich höhere Amplitude benötigt wird, wird das Ausgangssignal der Messkarte über einen dreikanaligen Hochspannungsverstärker der Firma PI (PI E-463 HVPZT) um den Faktor -150 verstärkt. Die Ausgangssignale des Hochspannungsverstärkers können direkt an die Piezoaktoren angeschlossen werden.

Durch die PC-Steuerung wird auch der Forderung nach einem einfach zu bedienenden Gesamtsystem Rechnung getragen. Zählt man das Befüllen des Chips mit den Reaktionslösungen zur Herstellung des Chips, so besteht die eigentliche Durchführung eines Immunoassays nur noch im Anschließen der Spritzenpumpe mit der (Blut-) Probe und dem Drücken des Startknopfes der LabVIEW®-Steuerung (in der oberen Menüleiste links). Anschließend wird der eingestellte Prozessablauf komplett automatisch durchgeführt.

6.7.3 Integration von Flüssigkeitsreservoirs

Der bisher vorgestellte Aufbau mit den flexiblen Zuleitungsschläuchen lässt eine reproduzierbare Computersteuerung nicht zu, da die Strömungswiderstände der Verbindungsschläuche durch veränderte Biegeradien schlecht reproduzierbar sind. Aufbauend auf dem in Kapitel 6.7.1 vorgestellten Chipdesign mit integrierten Pumpen und Reaktionskammern sollen daher auch die Reservoirs für die Tracer- und die Waschlösung integriert werden. Durch die Integration dieser Flüssigkeitsreservoirs werden auch die Strömungswiderstände zwischen Reservoir und Reaktionskammer reproduzierbar. Die hydraulischen Kapazitäten der elastischen Zuleitungen fallen ebenso weg. Dadurch wird eine besser reproduzierbare Steuerung der Flüssigkeiten möglich.

Die Flüssigkeitsreservoirs sollen:

- restlos entleert werden können, um keine Flüssigkeit zu verschwenden
- mit Adhäsionsfolie zu verschließen sein
- keine Luftblasen in die Kanäle gelangen lassen
- die Flüssigkeiten gegen Auslaufen sichern
- flexibel in die bestehenden Strukturen integrierbar sein

Ein restloses Entleeren der Flüssigkeitsreservoirs wird durch lange, mäanderförmig gewundene Kanalstrukturen möglich. Durch diese Reservoirstruktur wird auch ein Festhalten der Flüssigkeiten in den Reservoirs über Kapillarkräfte möglich. Dabei laufen die Flüssigkeiten bei Erschütterungen oder Bewegungen des Fluidikchips nicht aus, da sich die Kräfte aus verschiedenen Bereichen der Reservoirkanäle gegenseitig kompensieren. Ein Verschließen der Kanäle mit Adhäsionsfolie ist in gleicher Weise möglich wie bei den restliche Strukturen.

Für die Integration der Flüssigkeitsreservoirs ergeben sich mit dem Aufbau in Kapitel 6.7.1 2 Möglichkeiten:

1. Integration der Reservoirkanäle in die SU-8 Strukturen
 - Vorteil:
 - enge mäanderförmige Kanalstrukturen sind sehr genau herstellbar
 - alle Strukturen mit Ausnahme der Pumpkammern sind bereits in einem Bauteil integriert
 - Nachteil:
 - für eine Integration der Kanalstrukturen wird eine größere (doppelt so große) Chipfläche benötigt, so dass in einem Fertigungsschritt weniger SU-8 Strukturen (eine anstelle von zwei) hergestellt werden können.
 - eine „On-Board“-Auswertung eines größeren Chips im LRE-Reader ist nicht möglich, da die Chipbreite größer als die Breite des LRE-Slides sein müsste.

2. Integration der Reservoirkanäle in die Pumpkammerplatte

- Vorteil:
 - kleine Chipfläche für den SU-8 Prozess → Herstellung von zwei Chipstrukturen in einem Arbeitsgang
 - Chip passt mit einem modifizierten LRE-Slide in den LRE-Reader
- Nachteil:
 - Mäanderstrukturen müssen in die Pumpkammerplatte gefräst und anschließend durch Lösungsmittelbonden verdeckelt werden → Es sind keine so feinen Kanalstrukturen wie in SU-8 Lack herstellbar.
 - die Wände zwischen den Kanälen müssen breiter sein, um einen stabilen Bondprozess zu erreichen → geringeres Volumen der Kanäle bei vorgegebener Fläche
 - keine feste Verbindung zwischen Flüssigkeitsreservoirs und Reaktionskammer

Da eine Integration der Reservoirkanäle in die SU-8 Strukturen auf dem Weg zu einem komplett integrierten Aufbau aller Systemkomponenten sinnvoll erschien, wurde zunächst diese Variante untersucht. Die Integration der Flüssigkeitsreservoirs in die Pumpkammerplatte wird später (in Kapitel 6.10) noch einmal aufgegriffen. Aufbauend auf dem in Kapitel 6.7.1 Abbildung 6-58 dargestellten Chipdesign ist das um die Reservoirkanäle erweiterte Design des Chips in Abbildung 6-63 dargestellt.

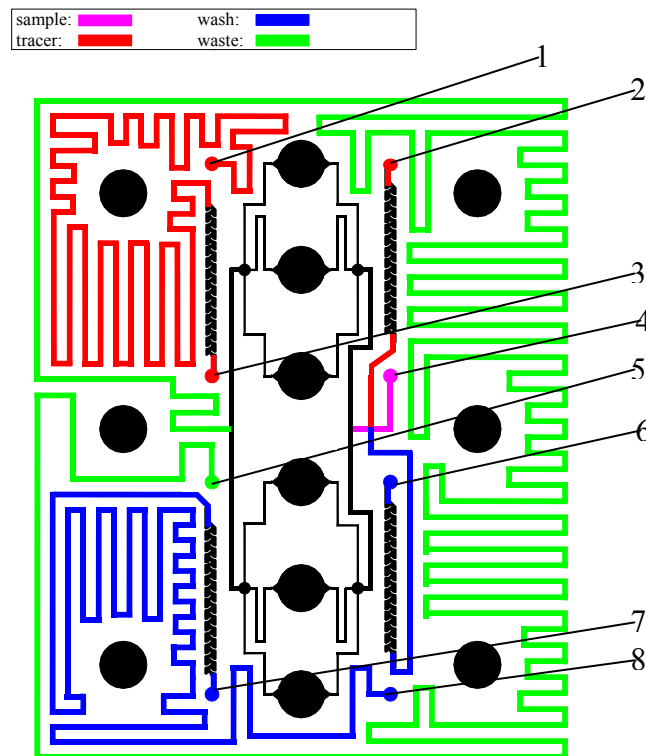


Abbildung 6-63: Reaktionskammerstrukturen mit integrierten Ventilen und Reservoirs

In den Chip sind mäanderförmig integriert: ein Reservoir für die **Tracerflüssigkeit** mit einem Volumen von ca. **140 µl** (in der Zeichnung rot), ein weiteres Reservoir mit einem Volumen von ca. **150 µl** für die **Waschlösung** (in der Zeichnung blau) und ein größeres Reservoir mit einem Volumen von ca. **320 µl** für die **verbrauchten Flüssigkeiten** (in der Zeichnung grün). Zusammen mit den Volumina der Pumpkammern in der Pumpkammerplatte ergibt sich für den fertigen Aufbau eine **Gesamtfüllmenge** von ca. **420 µl Tracerlösung** und ca. **440 µl Waschlösung**. Die (Blut-) Probe wird von außen durch die Öffnung Nummer **4** durch den (lila) Kanal in die Reaktionskammern injiziert. Am Ausgang der Reaktionskammern kann die (Blut-) Probe in das (grüne) Abfallreservoir strömen, welches über Öffnung **5** entlüftet ist. Durch die Öffnung Nummer **1** wird das (rote) Tracerreservoir befüllt. Aus diesem Reservoir kann die Tracerlösung durch das erste Einlassventil und durch Öffnung **3** in die erste Pumpkammer auf der Rückseite gelangen. Aus der Pumpkammer gelangt die Tracerlösung über Öffnung **2** in das erste Auslassventil und wird durch die erste Pumpe durch die Reaktionskammern gedrückt, wo sie die (Blut-) Probe verdrängt. Am Ausgang der Reaktionskammern kann die Tracerlösung in das (grüne) Abfallreservoir strömen. Durch die Öffnung Nummer **8** wird das (blaue) Waschreservoir befüllt. Aus diesem Reservoir kann die Waschlösung durch das zweite Einlassventil und durch Öffnung **7** in die zweite Pumpkammer auf der Rückseite gelangen.

Aus der Pumpkammer gelangt die Waschlösung über Öffnung **6** in das zweite Auslassventil und wird durch die zweite Pumpe durch die Reaktionskammern gedrückt, wo sie die Tracerlösung auswäscht. Am Ausgang der Reaktionskammern kann die Waschlösung in das (grüne) Abfallreservoir strömen. Durch die Integration der Flüssigkeitsreservoirs fallen die hydraulischen Kapazitäten der Zuleitungsschläuche weg. Dadurch sollte eine besser reproduzierbare Steuerung der Flüssigkeiten ermöglicht werden. Der mit den Pumpkammern zusammengebaute Chip kann bei diesem Aufbau durch die Entlüftungslöcher der Reservoirs mit den Prozessflüssigkeiten befüllt werden. Bei der Befüllung ist auf ein blasenfreies Auffüllen der Pumpkammern zu achten, da Luftblasen die Leistungsfähigkeit der Pumpen stark beeinträchtigen. Ist die Pumpkammer mit den Reservoirkanälen erst einmal blasenfrei befüllt, so kann durch die lang gezogenen Reservoirkanäle keine Luftblase mehr in die Pumpkammer gelangen. Weil sich in den ersten Versuchen das Chipdesign mit den 6 Reaktionskammern als ebenso problematisch wie bei der vorhergehenden Integrationsstufe erwies, wurde für die weiteren Versuche ein Design mit nur noch einer Reaktionskammer verwendet (ansonsten jedoch analog Abbildung 6-63). Die Durchführung eines durch das Rechnerprogramm gesteuerten Prozessablaufs zeigt die Bildserie in Abbildung 6-64. In der Abbildung ist die Probeninjektion (blaue Testflüssigkeit) in den Chip zu erkennen. Die blaue Flüssigkeit wird in den Reaktionsbereich injiziert. Dabei dringt die Flüssigkeit nicht bis zu den Ventilstrukturen in Bereiche der Tracerlösung (rote Ersatzflüssigkeit) und der Waschlösung (grüne Ersatzflüssigkeit) vor. In der zweiten Bildreihe der Bildserie ist das Auswaschen der blauen Probenflüssigkeit durch die rote Tracerlösung zu erkennen. Auch

hier dringt kaum Flüssigkeit in den Bereich der Probeninjektion oder der Waschlösung vor. Als letzter Prozessschritt erfolgt die Ansteuerung der Waschpumpe. Der Auswaschschritt der roten Tracerflüssigkeit durch die grüne Waschflüssigkeit ist in der letzten Bildreihe zu erkennen. Durch einen relativ kurzen Auswaschschritt ist jedoch kein vollständiges Auswaschen der roten Tracerlösung erreicht worden (letztes Bild). Durch einen längeren Waschprozess ist ein Auswaschen der Tracerlösung aus der Pumpkammer zwar möglich, aber um einen optimalen Waschschritt zu erreichen, sollte das Kammerlayout so beschaffen sein, dass ein schnelleres Auswaschen mit minimalen Flüssigkeitsmengen möglich ist.

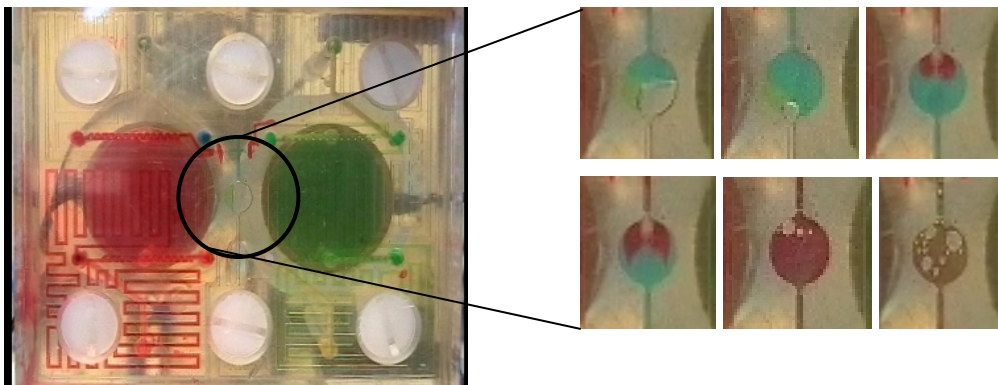


Abbildung 6-64: Durchführung eines rechnergesteuerten Testprozesses

6.8 Optimierung der Systemkomponenten durch Computersimulation

6.8.1 Simulation der Kanalkreuzung

Analog zu der Optimierung der Pumpe durch Computersimulation soll auch der Bereich auf dem Chip, an dem die Kanäle für Probenzuführung, Tracer- und Waschflüssigkeit zusammentreffen und in die Reaktionskammer weiterführen, optimiert werden. Dieser Bereich hat sich deshalb als besonders kritisch erwiesen, weil bei der Probeninjektion in den Chip die Probenflüssigkeit nur in Richtung der Reaktionskammer strömen darf. Ein Einlaufen der Probe in die Diodenstrukturen und Pumpkammern der Tracer- und Waschlösung würde zu einer Kontamination der Reservoirs mit der Probensubstanz führen. Dies kann einerseits erreicht werden, indem die Pumpen bei der Probeninjektion eingeschaltet werden, um einen Gegendruck aufzubauen, andererseits lässt sich durch eine geeignete Form der Kreuzung eine Art Venturidüseneffekt erreichen, der ein Einströmen in die Seitenkanäle reduziert. Der Unterschied zwischen einer einfachen rechtwinkligen Kreuzung zu ypsilonförmigen Kreuzungen mit verschiedenen Winkeln sowie Kreuzungen mit venturidüsenartigen Strukturen wurde im Rahmen einer Computersimulation untersucht. Um den Aufwand für die Strömungssimulation zu reduzieren, wurde die Optimierung der Kanalkreuzung nicht auf eine Optimierung der

Absolutwerte der Strömung ausgelegt, sondern es wurde im Wesentlichen eine qualitative Verbesserung des Strömungsverhaltens an der Kanalkreuzung angestrebt. Dabei wurde am Probeneinlass eine Einstromung von Wasser mit einem bestimmten relativen Druck angenommen. Am Auslass der Kreuzung in Richtung Reaktionskammer wurde ein relativer Auslassdruck von 0 bar relativ angenommen. Die beiden Kanäle zu Tracer- und Waschreservoir wurden als geschlossene Kanäle ohne Durchströmung angenommen, was der Strömungssituation im ersten Moment der Injektion entspricht. Der Über- oder Unterdruck an den Enden dieser Kanäle gegenüber dem Auslassdruck von 0 bar relativ wird dann als qualitatives Maß für die Strömungsrichtung und -stärke angenommen. In der Simulation einer rechtwinkligen Kreuzung (Abbildung 6-65) ist zu erkennen, dass der Druck an den Enden der Seitenkanäle, wie erwartet, genau zwischen Einlass- und dem Auslassdruck liegt. Dies ändert sich auch bei Variation des Einlassdruckes nicht. Aus diesen Druckverhältnissen folgt, dass die Probe an einer rechtwinkligen Kreuzung stets auch in Richtung der Seitenkanäle fließt.

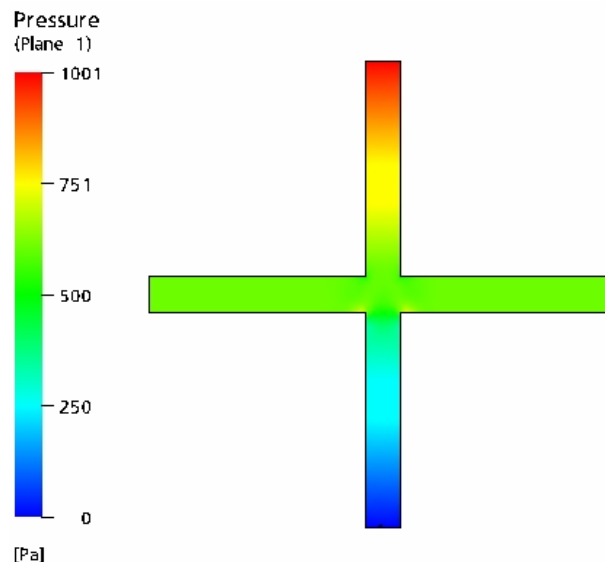


Abbildung 6-65: Druckverteilung an einer rechtwinkligen Kanalkreuzung. (Einstromung von oben, Einstromdruck 1000 Pa)

Um bei der Probeninjektion ein Einstömen in diese Seitenkanäle zu vermeiden, müssen die Pumpen in den Seitenkanälen also stets einen Gegendruck aufbauen. Die Injektionsgeschwindigkeit muss dabei so langsam gewählt werden, dass der Injektionsdruck in den Seitenkanälen den erreichbaren Pumpdruck nicht übersteigt. Eine Variation der Kanalkreuzung zu einer Ypsilonform sollte zeigen, ob ein Rückströmen in die Seitenkanäle durch diese Form reduziert werden kann. Als „Normalrichtung“ für die Durchströmung der ypsilonförmigen Kreuzungen soll die Strömungsrichtung in Abbildung 6-66 im Bild von oben nach unten angenommen werden.

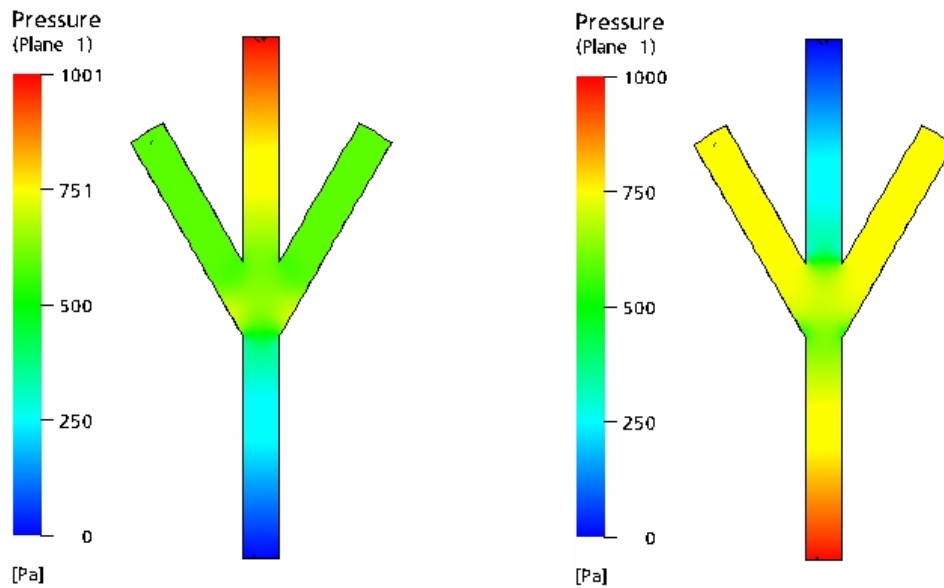


Abbildung 6-66: Druckverteilung an einer ypsilonförmigen Kanalkreuzung mit 30° Einmündung. (linkes Bild Einstromung von oben, rechtes Bild Einstromung von unten, Einstromdruck jeweils 1000 Pa)

Die Simulationen dieser Kreuzungen mit Winkeln von 30° und 45° zeigten, dass der Einlaufwinkel bei Durchströmung in „Normalrichtung“ nahezu keinen Einfluss auf die Druckverteilung in den Seitenkanälen hat. Genau wie bei der rechtwinkligen Kreuzung liegt der Druck an den Seitenkanälen zwischen Einlass- und Auslassdruck. Auch dieses Ergebnis ändert sich bei einer Variation des Einlassdruckes nicht. Bei einer Durchströmung der ypsilonförmigen Kanäle gegen die „Normalrichtung“ (von unten nach oben) ist der Druck an den Seitenkanälen höher als in der „Normalrichtung“. Wird vor der Kreuzung eine Verengung in den Einlassweg der Probe eingebracht, so entsteht an dieser Stelle eine Beschleunigung der Strömung. Daraus resultiert bei einem relativen Einstromdruck von 1000 Pa an der Probenseite und einem relativen Auslassdruck von 0 bar bereits ein Unterdruck von -0,21 Pa an den Seitenkanälen (Abbildung 6-67 links).

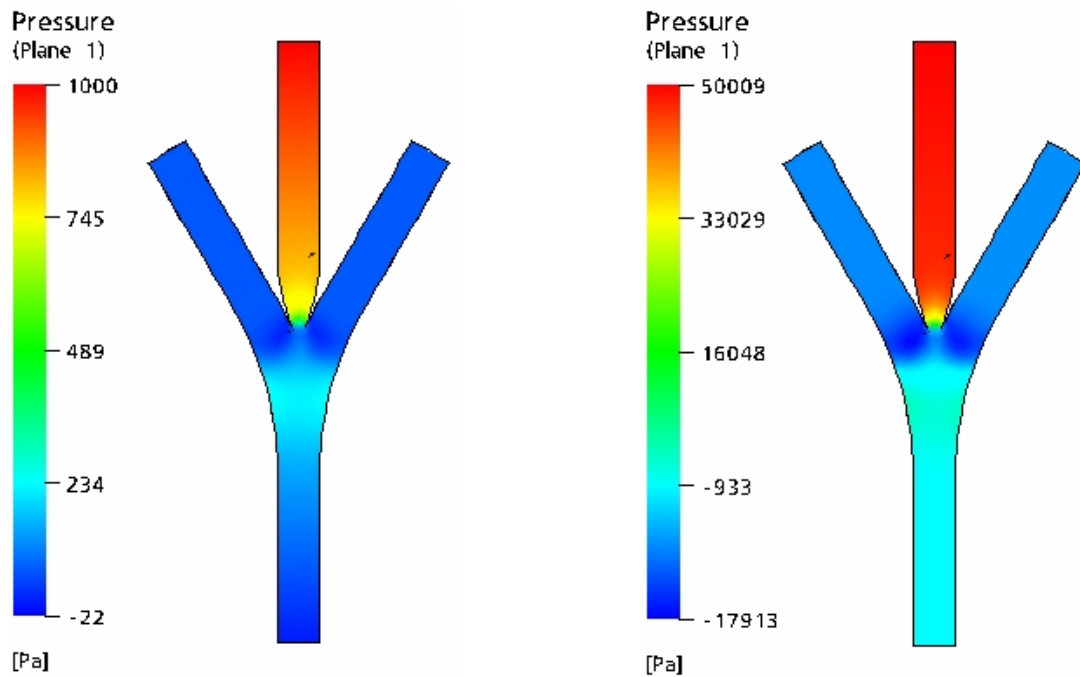


Abbildung 6-67: Druckverteilung an einer ypsilonförmigen Kanalkreuzung mit düsenförmiger 30° Einmündung. (Einströmung von oben, links Einströmdruck 1000 Pa, rechts Einströmdruck 50 kPa)

Dieser Effekt wird mit einer Steigerung des Einlassdruckes auf der Probenseite (auf 50 kPa, Abbildung 6-67 rechts) verstärkt, so dass der relative Druck an den Seitenkanälen bereits -17913 Pa beträgt. Diese Ergebnisse bestärken, dass durch eine geeignete Wahl der Probeninjektionsgeschwindigkeit in einer venturidüsenartigen Kreuzung eine Strömung in den Seitenkanälen unterdrückt werden kann.

6.8.2 Simulation der Reaktionskammern

Analog zu der Optimierung der Pumpe und der Kanalkreuzung durch die Computersimulation soll auch der Bereich der Reaktionskammer als weiteres konstruktives Element des Immunoassaychips optimiert werden. Um eine größtmögliche Reproduzierbarkeit und Sensitivität des Immunoassays zu erreichen, muss ein optimaler Stofftransport und damit ein möglichst schneller und gründlicher Austausch der Flüssigkeiten innerhalb der Reaktionskammern sichergestellt werden. Da dieses Verhalten im Wesentlichen eine qualitative Eigenschaft der Reaktionskammer darstellt, wurde hier, um den Aufwand und die Rechenzeiten für die Strömungssimulation zu reduzieren, zunächst ebenfalls nur eine qualitative Verbesserung des Strömungsverhaltens in der Reaktionskammer angestrebt. Mit Hilfe der CFX Simulationssoftware wurde versucht, die Reaktionskammer so zu modellieren, dass ein homogenes Strömungsprofil über dem biochemisch aktiven Bereich entsteht. Aufgrund der Falschfarben- bzw. Vektordarstellung können Stellen mit sehr niedriger Strömungsgeschwindigkeit und Wirbel einfach ausgemacht werden (dunkelblaue Gebiete bzw. kreisförmige Anordnung der Vektorpfeile). An diesen Stellen bleiben Luftblasen leicht

hängen oder Reagenzien werden nicht vollständig ausgespült, was z.B. in Falle des Tracers zu einem fehlerhaft erhöhten Messsignal führen kann. Als optimal wird die Strömung dann angesehen, wenn alle Bereiche der Reaktionskammer gleichmäßig mit möglichst hoher Strömungsgeschwindigkeit durchspült werden. Allen simulierten Reaktionskammern liegt die Form eines Kreises mit einem Durchmesser von 3,6 mm zu Grunde. Diese Geometrie ermöglicht ein einfaches Einbringen von ausgestanzten Nitrozellulosescheiben als biologisch aktive Bereiche. Alle Kammern wurden mit einer Basishöhe von 450 μm simuliert, da sich diese Höhe in den bisherigen Versuchen als gut geeignete Strukturhöhe sowohl für die fluidischen Dioden als auch für die restlichen Strukturen erwiesen hat. Die Höhe der Pumpkammer über der Nitrozellulosefolie kann durch Variation der Dicke der verwendeten Nitrozellulosestücke verringert werden. Die Simulation der einfachen runden Reaktionskammergeometrie (ohne eingelegte Nitrozellulosestücke) zeigt, dass die Kammer im mittleren Bereich mit hoher Geschwindigkeit durchströmt wird (Abbildung 6-68 links), während in den Randbereichen nahezu keine Bewegung der Flüssigkeiten stattfindet. Dieses Verhalten ändert sich auch durch Aufweitung der Ein- und Ausströmbereiche nur wenig (Abbildung 6-68 rechts).

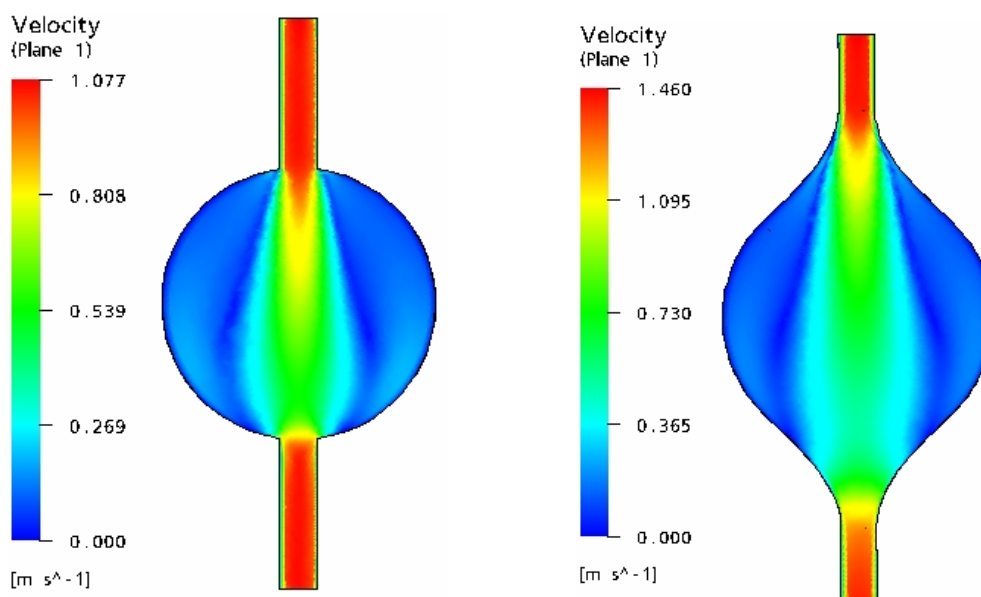


Abbildung 6-68: links: runde 3,6 mm Reaktionskammer, rechts: mit abgerundete Anschlusskanäle

Durch Aufspalten der Strömung im Eingangsbereich über eine in der Kanalmitte angeordnete Säulenstruktur kann zwar ein besseres Durchströmen der Randbereiche erreicht werden, jedoch sind solche Säulenstrukturen sehr zerbrechlich und insbesondere für eine spätere Serienfertigung schwierig herzustellen. Weiterhin wird die Strömungsgeschwindigkeit in der Kammer aufgrund des vergrößerten Strömungswiderstandes stark reduziert.

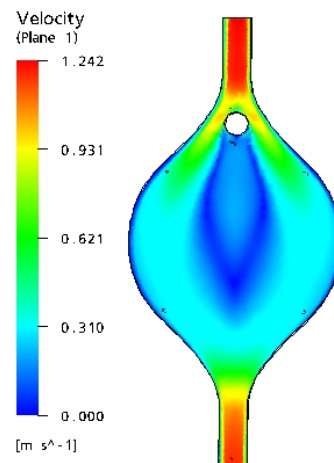


Abbildung 6-69: 3,6 mm Reaktionskammern, mit 400 µm Pin

Eine sinnvolle Optimierung des Strömungsverhaltens wird erst bei einer Reduktion der Kammerhöhe durch eingelegte Nitrozellulosestücke erreicht (Abbildung 6-70 und Abbildung 6-71). Eine Streckung der Reaktionskammer in Fließrichtung ermöglicht dabei eine gleichmäßige Strömungsverteilung vor dem Überströmen der Nitrozellulose.

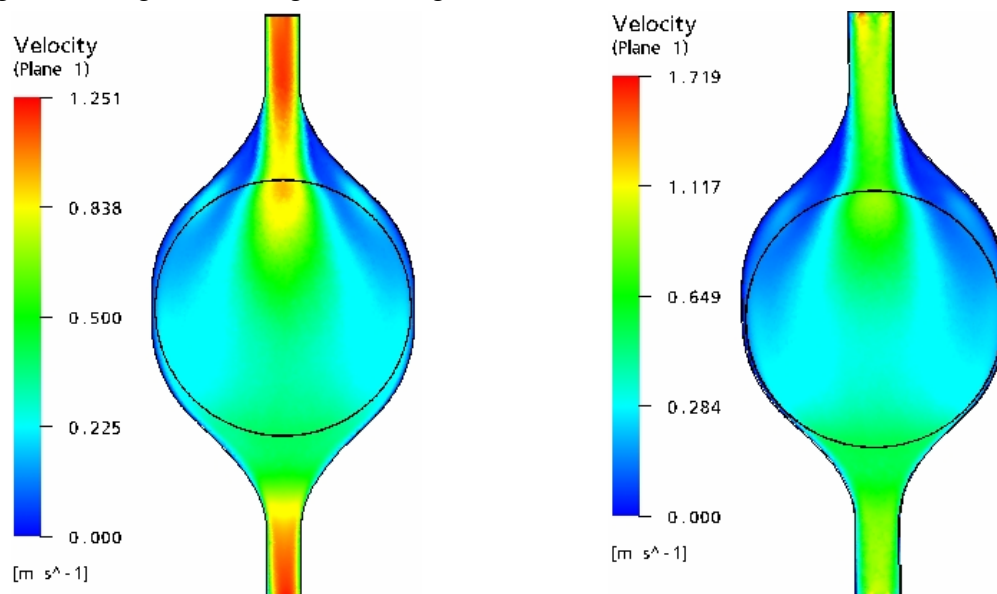


Abbildung 6-70: 3,6 mm Reaktionskammer, 400 µm gestreckt, mit 200 µm NC, Anschluss (480 µm) linkes Bild: Nitrozellulose mittig eingelegt rechtes Bild Nitrozellulose am Ausgang eingelegt

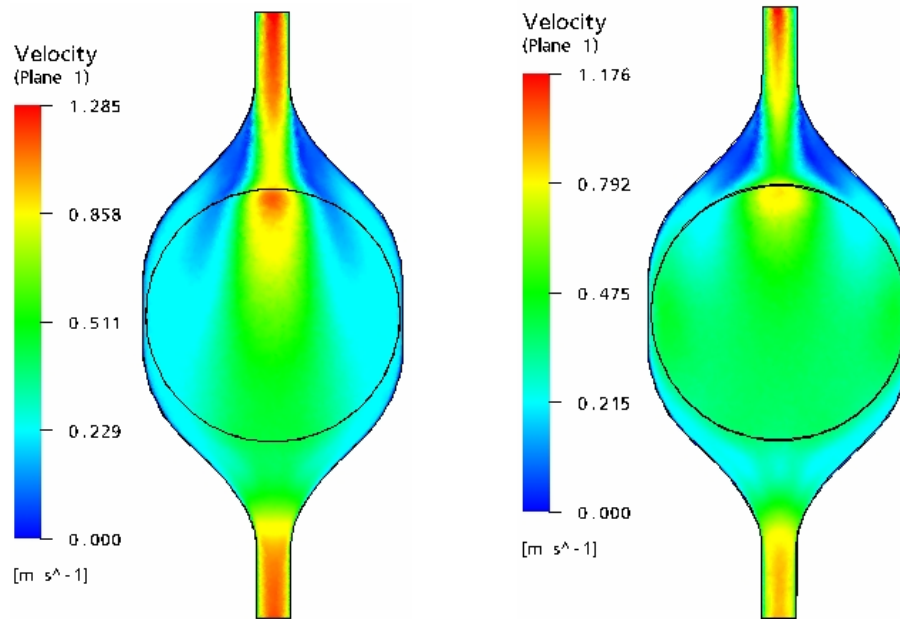


Abbildung 6-71: 3,6 mm Reaktionskammer, 800 µm gestreckt, Nitrozellulose mittig eingelegt, linkes Bild Nitrozellulose 250 µm, rechtes Bild: **optimal!**, Nitrozellulose 300 µm

6.9 Der optimierte SU-8 Chip

Basierend auf den Ergebnissen der Computersimulation wurde das bisherige Chipdesign aus Abbildung 6-63 (Kapitel 6.7.3) um die optimierte Kanalkreuzung und die verbesserte Reaktionskammer erweitert.

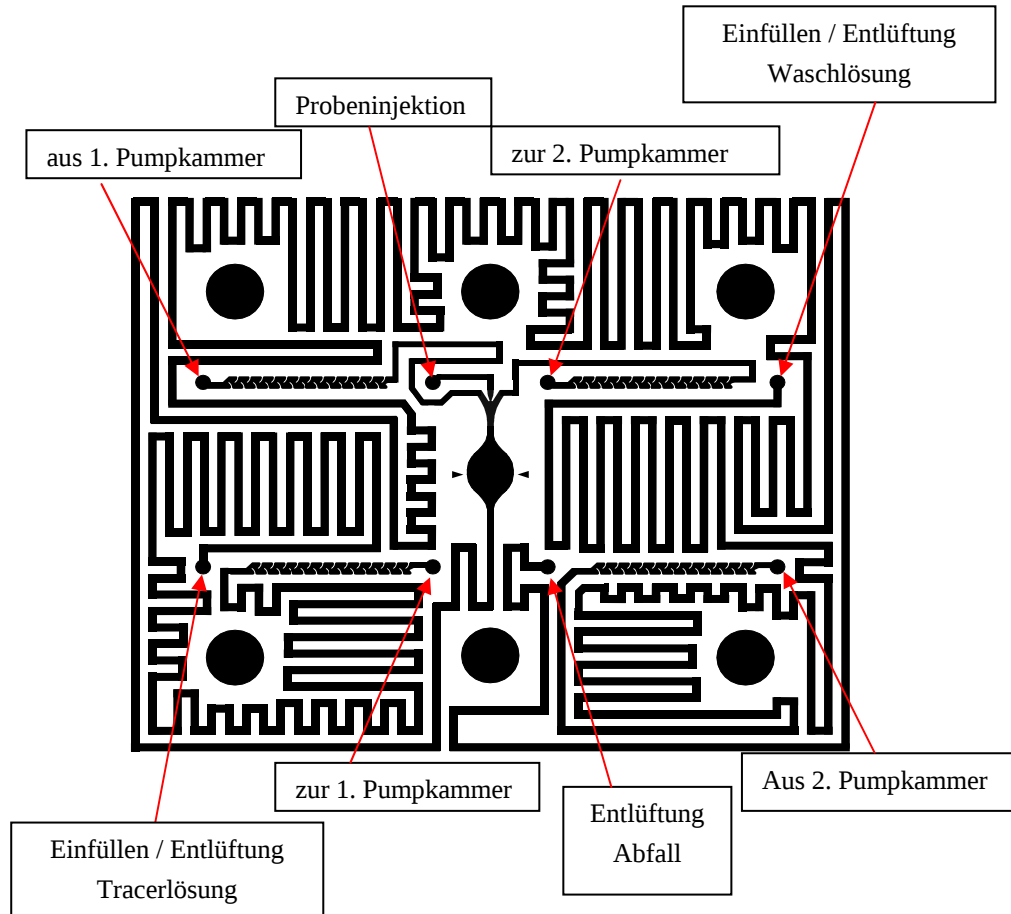


Abbildung 6-72: optimiertes Chipdesign

Dieses Layout wurde mit der in Kapitel 6.5 beschriebenen SU-8 Technologie in einem SU-8 Prozess umgesetzt. In diesem optimierten Chipdesign wurden Versuchsprozesse mit farbigen Testflüssigkeiten rechnergesteuert durchgeführt. Die Parameter für die PC-Steuerung wurden durch Aufzeichnung der Versuchsprozesse mit einer Videokamera ausgewertet und optimiert. Die Ergebnisse der optimierten Prozesssteuerung zeigt Abbildung 6-73. In diesen Strukturen war die Injektion der Probe in den Chip sehr gut reproduzierbar. Durch die richtige Wahl der Injektionsgeschwindigkeit konnte aufgrund der Venturidüsenstruktur ein Einstromen der Probe in die Seitenkanäle der Kanalkreuzung praktisch vollständig vermieden werden. Das Auswaschen der Probe durch die Tracerlösung und anschließend das Auswaschen der Tracerlösung durch die Waschlösung funktionieren in den optimierten Reaktionskammerstrukturen augenscheinlich einwandfrei.

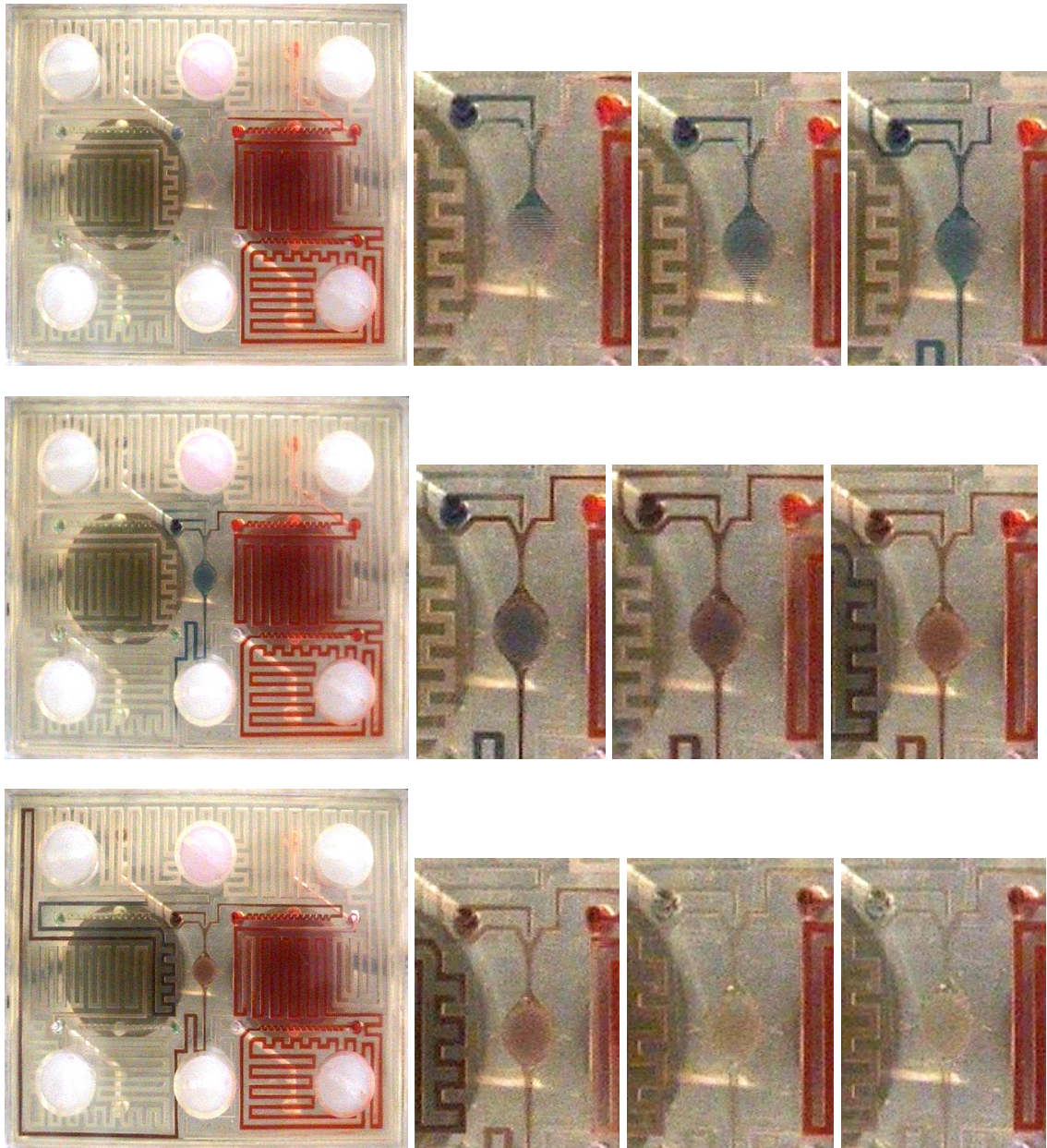


Abbildung 6-73: Durchführung des optimierten Testprozesses
(1. Reihe: Probeninkubation, 2. Reihe: Tracerinkubation, 3. Reihe: Waschschrift)

Um die Qualität des optimierten Prozessprotokolls objektiv zu untersuchen, sollte ein Immunoassay mit einer Blindprobe (ohne Zielsubstanz) durchgeführt werden. Die Durchführung eines solchen Blindversuchs zeigt, ob die Steuerung des Prozesses auch mit den Reaktionsflüssigkeiten funktioniert. Weiterhin kann durch die Auswertung des Fluoreszenzsignals eines solchen Blindversuchs eine Aussage über die Qualität der Waschschriffe getroffen werden. Idealerweise sollte ein solcher Immunoassay das gleiche Signal liefern wie die reine Nitrozellulosefolie. Eine starke Erhöhung des Signals kann durch unzureichendes Auswaschen der Reaktionskammer oder durch Rückströmung von Tracerlösung nach Abschluss des Prozesses auftreten. Die Ergebnisse des Blindversuchs

zeigen, dass die Steuerung des Prozesses auch mit den Reaktionsflüssigkeiten gut funktioniert. Das Fluoreszenzsignal wurde nach Abschluss des Prozesses im LRE-Reader ausgewertet. Da die Abmessungen des SU-8 Chips ein Einlegen der kompletten Fluidikstrukturen in den LRE-Reader verhinderten, wurde die Verdeckelungsfolie im Bereich der Reaktionskammer mit der aufgeklebten Nitrozellulosefolie von den SU-8 Strukturen abgezogen und extern im LRE-Reader ausgewertet. Das Ergebnis dieses Blindversuchs im Vergleich zu den früheren Messungen in den mikrofluidischen Küvetten (vgl. Abbildung 6-12, Kapitel 6.1.4) zeigt Abbildung 6-74.

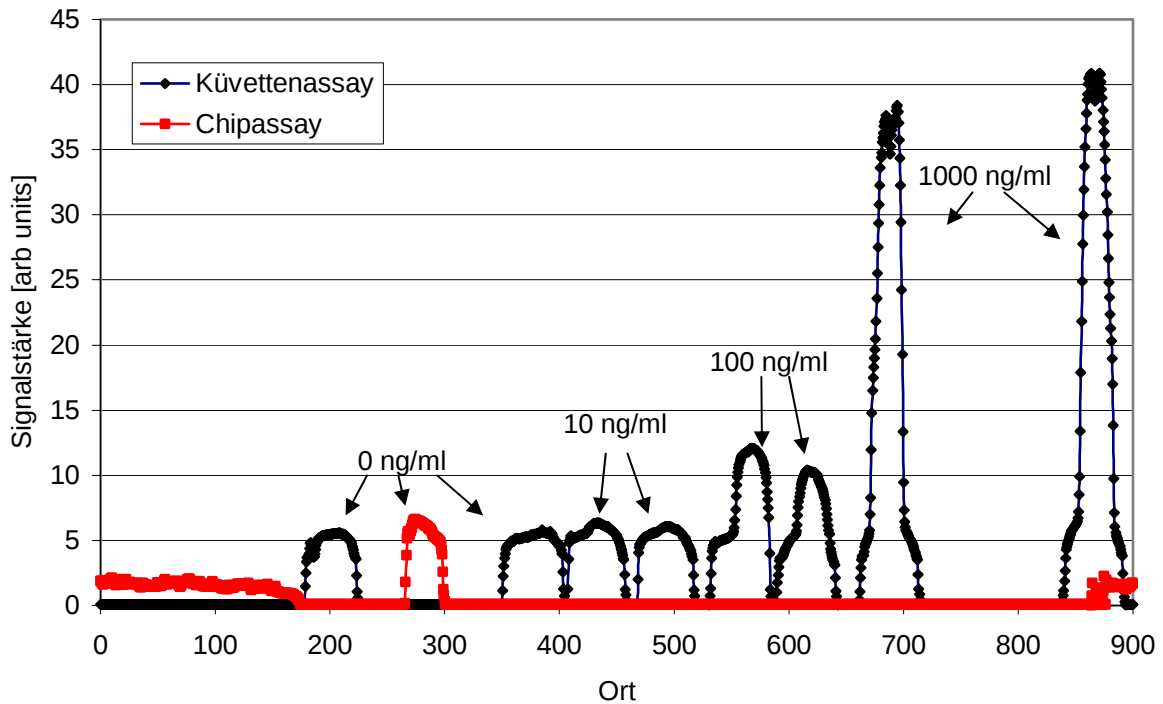


Abbildung 6-74 Fluoreszenzsignal eines Blindversuches (Untergrundsignal) (rote Kurve) im Vergleich mit Messungen in den Küvetten mit externer peristaltischer Pumpe (aus Kapitel 6.1.1) (schwarze Kurve) [Zielmolekül: Myoglobin]⁹

Das Signal dieses Blindversuches liegt etwas über der Größenordnung der 10 ng/ml Versuche in den mikrofluidischen Küvetten (Kapitel 6.1.1). Damit können die Auswaschschritte auf dem Chip als geeignet für die Durchführung eines Immunoassays mit einer Nachweisgrenze von ca. >20 ng/ml angesehen werden (Abbildung 6-75).

⁹ Marker: Alexa Fluor® 750
Myoglobin Antikörper, Fa. Medix Biochemica, Kauniainen Finnland
Nitrocellulose: Fa. Whatman (5 µm supported) (*Immunchemie direkt aufpipettiert*)

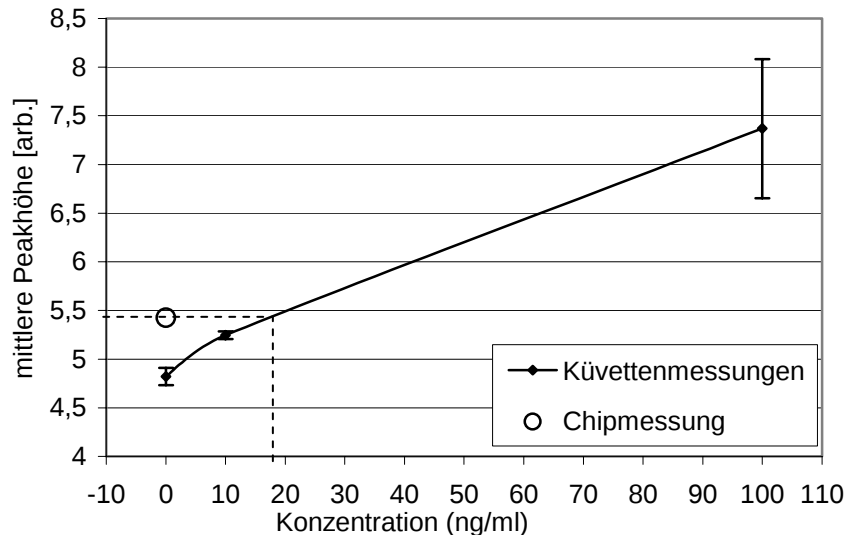


Abbildung 6-75: Aus den Werten aus Abbildung 6-74 gegen die Konzentration aufgetragene mittlere Peakhöhen der Signale (ohne Messwert für 1000 ng/ml)

Das Befüllen der Strukturen für den Immunoassay erfordert noch viel Übung, sollte jedoch später automatisiert möglich sein. Ist der Aufbau erst einmal befüllt, besteht die Durchführung eines Immunoassays nur noch im Einsetzen der Probenspritze und dem Starten des Rechnerprogramms. Die Durchführung dieses Prozesses zeigt, dass eine vollständige Steuerung durch den Rechner und damit ein anwenderfreundlicher, einfach zu bedienender Immunoassay in den mikrofluidischen Strukturen realisiert wurde. Lediglich der Auswerteprozess erfordert in diesen Strukturen noch ein Entfernen der Nitrozellulosefolie aus den Reaktionskammern und ein externes Auswerten im Fluoreszenzdetektor.

6.10 Fluoreszenzmessung auf dem Chip

Um die Auswertung des Prozesses im Chip durchführen zu können, bestehen zwei Möglichkeiten:

1. Der Chip muss so beschaffen sein, dass er komplett in den LRE-Reader eingelegt und ausgewertet werden kann. Diese Forderung kann durch die bereits weiter oben erwähnte Integration der Reservoirkanäle in die Pumpkammerplatte erfüllt werden. Durch diese Auslagerung der Flüssigkeitsreservoirs lässt sich die Chipfläche so weit verkleinern, dass ein Einlegen des gesamten Chips in den LRE-Reader möglich ist.
 - Vorteil: der vorhandene LRE-Reader kann verwendet werden
 - Nachteil:
 - durch Auslagerung der Reservoirkanäle in die Pumpkammerplatte ergeben sich die bereits weiter oben angesprochenen Probleme

(kleine Reservoirs, keine feste Verbindung zu den Reaktionskammern,...)

- der Prozess muss für die neuen Strukturen neu optimiert werden.
- der Chip muss weiterhin nach Durchführung des Prozesses von Hand in den Reader eingelegt und ausgelesen werden.

2. Es muss ein neuer Reader entwickelt werden, in dem sich der Chip möglichst schon während der Prozessdurchführung befinden kann, so dass eine automatisierte Auswertung im Anschluss an den Prozess möglich wird.

- Diese Variante ist für eine spätere komplett automatisierte Durchführung des Immunoassays unumgänglich.

6.10.1 Auswertung im LRE-Reader

Um mit dem vorhandenen LRE-Reader eine On-Board-Auswertung zu realisieren (Variante 1.), wurde ein verändertes Chipdesign ohne Reservoirkanäle entworfen (im Folgenden **kleiner Chip** genannt) und eine Pumpkammerplatte mit integrierten Flüssigkeitsreservoirkanälen (Tracerreservoir mit einem Volumen von 80 μl , Waschreservoir mit einem Volumen von 100 μl und Abfallreservoir mit einem Volumen von 120 μl) hergestellt. Die Steuerung der Flüssigkeiten in diesem kleinen Chip erwies sich als wesentlich kritischer als in den Strukturen mit integrierten Reservoirkanälen (im Folgenden **grosser Chip** genannt). Durch die verringerten Reservoirvolumina mussten die Pumpschritte, um Reaktionsflüssigkeit zu sparen, wesentlich genauer gesteuert werden. Durch die größeren Durchmesser der kürzeren Reservoirkanäle wurden verringerte Strömungswiderstände und damit höhere Fließgeschwindigkeiten der Flüssigkeiten in den Strukturen erreicht. Für diesen kleinen Chip konnte durch Optimierung der Prozesssteuerung anhand von farbigen Testflüssigkeiten in Analogie zum großen Chip ein optimierter Prozessablauf gefunden werden. Die Ergebnisse dieses Prozessablaufs zeigt Abbildung 6-76.

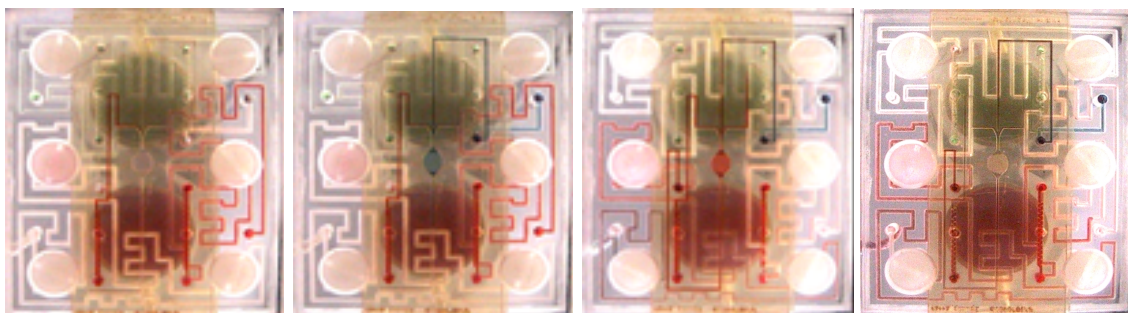


Abbildung 6-76: Durchführung eines Testprozesses im kleinen Chip

Für die Auswertung im LRE Reader muss der SU-8 Chip aus dem Pumpkammeraufbau entnommen werden. Dabei stellte sich jedoch bereits in den Versuchen mit farbigen

Ersatzflüssigkeiten heraus, dass ein Rücklaufen von Tracerlösung in die Reaktionskammer beim Öffnen des Pumpkammeraufbaus nicht zu vermeiden war. Bei einer Auswertung im LRE-Reader würde somit das Signal des Immunoassays vom Fluoreszenzsignal der zurückgelaufenen Tracerlösung vollkommen überdeckt werden. Für eine On-Chip-Auswertung des Signals ist daher ein neu entwickelter Fluoreszenzdetektor notwendig.

6.10.2 Aufbau eines neuen Fluoreszenzdetektors

Die Entwicklung eines geeigneten Fluoreszenzdetektors wird derzeit an der Fachhochschule Gelsenkirchen durchgeführt [KAED03]. Die Signalauswertung im Fluoreszenzdetektor besteht hauptsächlich aus einer anregenden Lichtquelle (üblicherweise ein Laser), aus einem Photodetektor (z.B. Photowiderstand, Photodiode, Photomultiplier,...) und aus einem optischen Filter, der das Fluoreszenzlicht aus der Probe in den Detektor gelangen lässt, aber das Licht der anregenden Wellenlänge herausfiltert. Um das Signal in einem Fluoreszenzdetektor exakt auszuwerten, muss der Detektor eine hohe Empfindlichkeit besitzen. Restlicht aus der anregenden Lichtquelle, welches in den Detektor gelangt, bildet dabei einen Untergrund, der das Signal verschlechtert. Um diesen Untergrund zu reduzieren, muss der optische Filter möglichst gut zwischen anregender und emittierter Wellenlänge diskriminieren. Dies lässt sich beispielsweise durch einen engbandigen Interferenzfilter erreichen. Diese Interferenzfilter besitzen zwar in der Regel eine gute Selektivität, lassen jedoch im Maximum selten mehr als 50 % der emittierten Wellenlänge durch. Ein Kantenfilter hat im Durchlassbereich eine deutlich höhere Transmission, besitzt jedoch keine so scharfe Grenzwellenlänge. Um eine gute Diskriminierung zwischen anregendem und emittiertem Licht zu erreichen, sollte der so genannte Stokesshift, also der Unterschied zwischen anregender und vom Fluoreszenzmarker emittierten Wellenlänge, möglichst groß sein. Das anregende Laserlicht ist stark gerichtet, im Unterschied zum emittierten Licht, welches statistisch verteilt in alle Raumrichtungen abgegeben wird. Damit kann durch eine Einkopplung des anregenden Lichts unter einem flachen Winkel, ähnlich der Dunkelfeldmikroskopie, vermieden werden, dass reflektiertes Licht der Anregungswellenlänge in den Detektor gelangt. Das in alle Raumrichtungen abgestrahlte Fluoreszenzlicht gelangt größtenteils in den Detektor. Eine hohe Sensitivität bedeutet auch, dass möglichst viele der emittierten Fluoreszenzphotonen zum Detektor gelangen. Daher muss der vom Detektor abgedeckte Raumwinkel möglichst groß sein. Dies kann erreicht werden, indem der Detektor sehr nah an den Fluoreszenzbereich herangebracht wird. Damit steht er aber in der Regel der Einkopplung des anregenden Lichtes im Weg. Eine Alternative ist es, eine optische Linse möglichst dicht auf die Oberfläche des Fluoreszenzbereiches aufzulegen. Durch diese Linse kann das anregende Licht zum Marker gelangen, das emittierte Licht wird gesammelt und in Richtung des Detektors gelenkt.

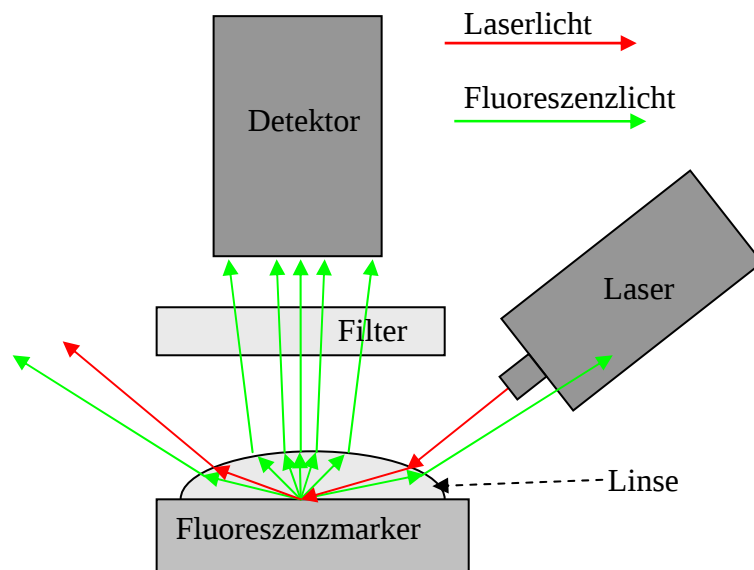


Abbildung 6-77: Aufbau der Fluoreszenzdetektion

Durch einen Spiegel hinter dem Fluoreszenzbereich kann der durch den Detektor abgedeckte Raumwinkel (zumindest rechnerisch) fast verdoppelt werden. Um dabei möglichst wenig Licht im Trägermaterial (z.B. Nitrozellulose) der Fluoreszenzstoffe zu absorbieren, sollte das Trägermaterial möglichst transparent sein. Eine Transparenz von Nitrozellulose lässt sich beispielsweise durch eine Durchtränkung mit Ethylenglycol erreichen. Erste Versuchsmessungen wurden mit einem 650 nm-Laser durchgeführt. Als Detektor diente eine Photodiode (BPX 90). Vor diese Photodiode wurde ein optischer Filter der Firma Schott angebracht (Typ RG 715, siehe Abbildung 6-78).

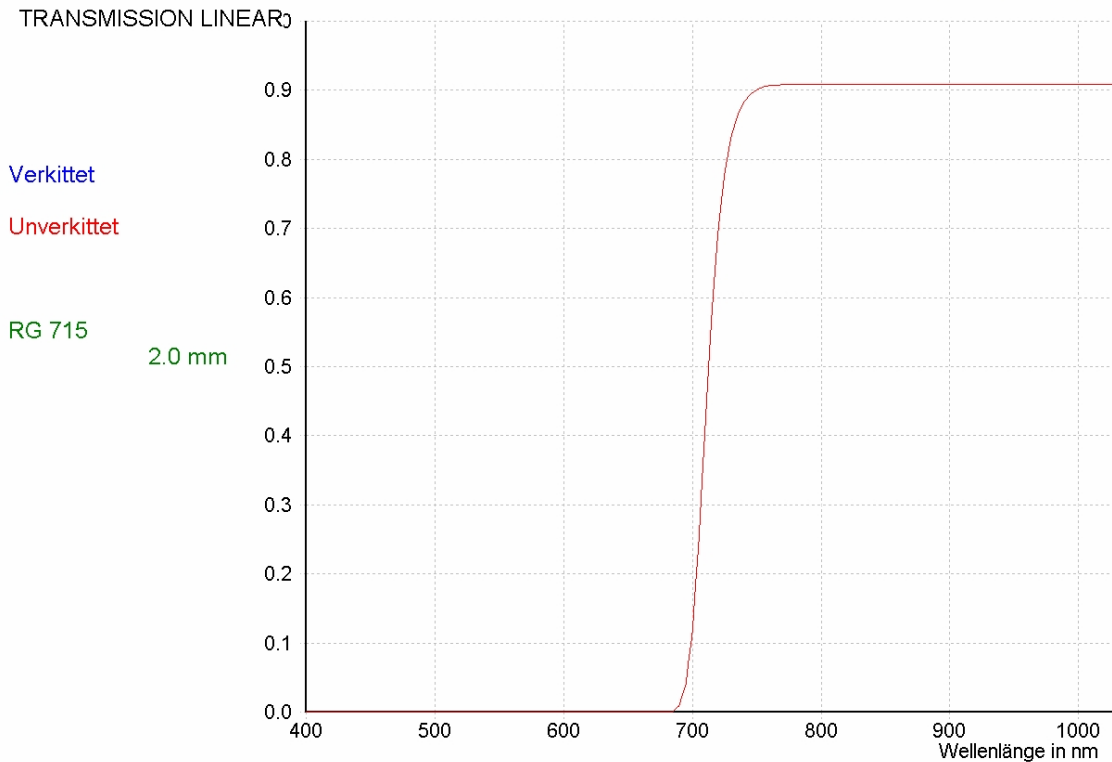


Abbildung 6-78: Absorptionskurve des optischen Filters [SCHO99]

Um die Funktionsweise eines solchen Detektors zu untersuchen, wurden Nitrozellulosestreifen mit dem Fluoreszenzmarker Alexa Fluor® 750 in verschiedenen Verdünnungen getränkt und mit dem improvisierten Detektor gemessen. Die Streifen mit den verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils 20 mal gemessen.

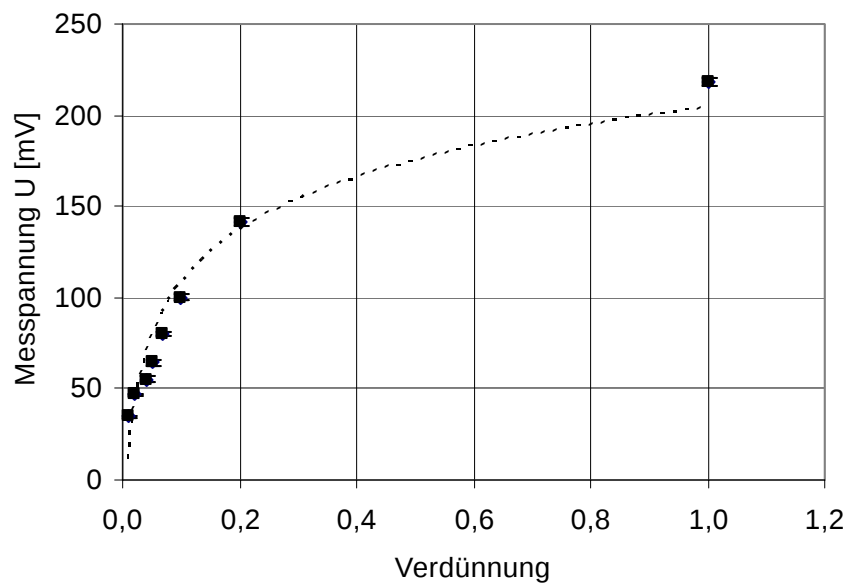


Abbildung 6-79: Messwerte der Ausgangsspannung der Photodiode in Abhängigkeit von der Verdünnung des Fluoreszenzlabels
(Die Linie stellt einen logarithmischen Trend dar)

Abbildung 6-79 zeigt die Ausgangsspannungen der Photodiode in Abhängigkeit der Konzentration des Fluoreszenzlabels. Bei niedrigeren Konzentrationen ist ein linearer Zusammenhang zwischen Spannung und Konzentration zu erkennen, bei höheren Konzentrationen ist dieser Zusammenhang nicht mehr gegeben. Dies ist durch die Charakteristik der Photodiode zu erklären. Bei Bestrahlung mit Tageslicht liefert diese einen Wert von etwa 350 mV (Vollausschlag). Daher wurden in Abbildung 6-80 nur die Messspannungen für die geringeren Konzentrationen (1:10 bis 1:100) aufgetragen. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang mit gutem Korrelationskoeffizienten. Die Fehlerindikatoren betragen jeweils dreifache Standardabweichung, so dass 99,5% der Werte innerhalb dieser Grenzen liegen.

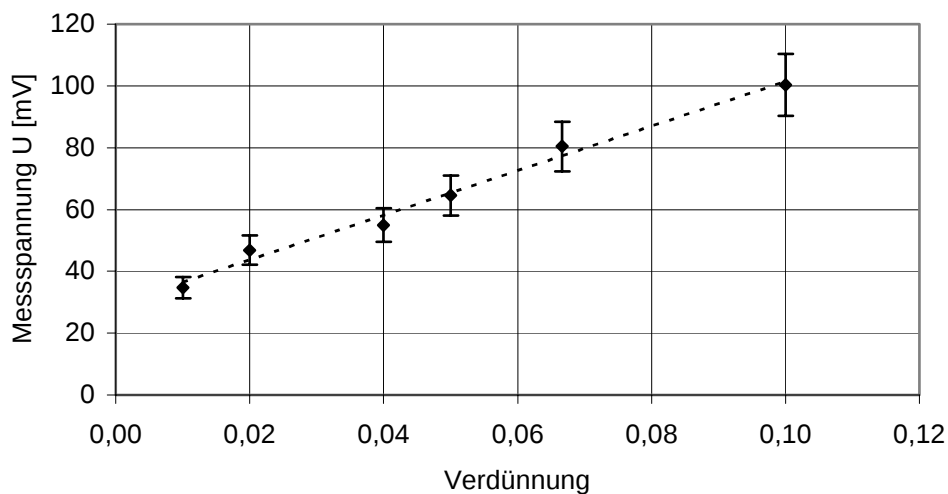


Abbildung 6-80: Messwerte der Ausgangsspannung der Photodiode in Abhängigkeit von der Verdünnung des Fluoreszenzlabels (geringeren Konzentrationen)
(Die Linie stellt einen linearen Trend dar)

Die Messung des Nullsignals (auf reiner Nitrozellulose) ergab einen Wert von etwa 30 mV. Dieses Nullsignal ist nicht gut reproduzierbar und schwankt um mehrere Millivolt. Da das Signal der 1:100-Konzentration schon nahe an diesem Nullsignal liegt, lassen sich kleinere Konzentrationen aufgrund der großen Schwankungen des Nullsignals nicht mehr reproduzierbar nachweisen. Weil das Signal der Verdünnung 1:100 in etwa der Signalstärke eines Signals von einem Immunoassay mit einer Myoglobinkonzentration von 1000 ng/ml entspricht, ist der Detektor im gegenwärtigen Zustand für eine Auswertung des Immunoassays noch nicht brauchbar. Die prinzipielle Funktionsweise des Detektors wird jedoch durch die Ergebnisse der Messungen gezeigt. Eine Optimierung des Aufbaus, z.B. durch Verwendung anderer Filter, sollte eine Reduzierung des Untergrundes zulassen. So sollte eine für die Auswertung des Immunoassays ausreichende Genauigkeit erreichbar sein.

7 Der Prototyp (Funktionstests und Messergebnisse)

7.1 PMMA Chip mit integrierten Pumpkammern

Den letzten Integrationsschritt für die Entwicklung eines Prototypen stellt die Integration der Pumpkammern in das Chipdesign dar. Dieser Prototyp soll ein aus einem Stück gefertigter mikrofluidischer Kunststoffchip sein. Eine Herstellung eines solchen integrierten Chips ist allein durch photolithographische Strukturierung nur unter großem Aufwand möglich. Es ist zwar möglich, die Mikrostrukturen aus SU-8 direkt auf der Rückseite der Pumpkammerplatten herzustellen, damit würde sich jedoch der Aufwand eines einzelnen Chips noch um die Fertigung einer individuellen Pumpkammerplatte für jeden Chip erweitern. Die bisher verwendeten SU-8 Chips sind alle sehr zerbrechlich und können schlecht gereinigt werden. Das Layout des Prototypen soll eine Fertigung mit Massenfertigungsprozessen, wie Spritzguss, ermöglichen. Um einen solchen Chip mit mikrofluidischen Kanalstrukturen auf der einen und integrierten Pumpkammern auf der anderen Seite herzustellen, ist der SU-8 Prozess auch deshalb schlecht geeignet, da in diesem Prozess nur eine Seite strukturiert wird. Für die auf der Rückseite der Kanalstrukturen integrierten Pumpkammern müsste ein zweiseitiger SU-8 Prozess entwickelt werden. Weil der Entwicklungsaufwand für einen solchen Prozess sehr hoch und die Reproduzierbarkeit der Schichtdicke der SU-8 Strukturen nur schwer zu gewährleisten ist, wurde als Fertigungsmethode für einen Prototypen die Fräsbearbeitung von PMMA mit einer Hochpräzisions-5-Achsen-Fräsmaschine der Firma KERN¹⁰ gewählt. Mit dieser 5-Achsen-Fräse konnten die optimierten Fluidikstrukturen hergestellt werden. Ein CAD-Modell des fertigen Immunoassaychips ist in Abbildung 7-1 dargestellt.

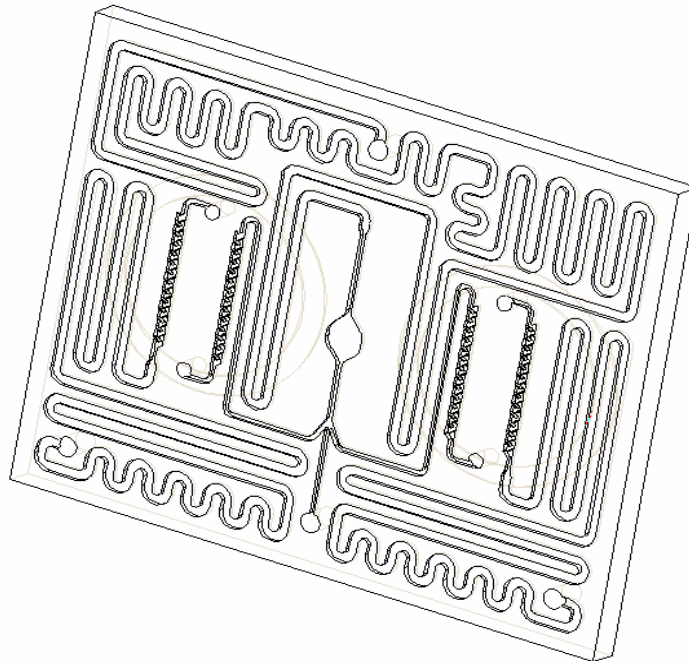


Abbildung 7-1: Immunoassaychip mit integrierten Pumpkammern

¹⁰ Kern HSPC 2216 (High Speed Precision Cutting)

7.2 Messergebnisse des Immunoassaychips

Um die Funktionsweise des aus einem Teil gefertigten PMMA-Chips zu untersuchen wurden zunächst analog zu den Tests der SU-8 Strukturen Versuchsprozesse mit farbigen Flüssigkeiten durchgeführt. Diese zeigten auch bei Verwendung verschiedener Chips eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Eine Bildserie der Durchführung eines Testprozesses mit farbigen Flüssigkeiten ist in Abbildung 7-2 dargestellt. Die farbige Abfolge der Testflüssigkeiten in der Reaktionskammer zeigt deutlich den Erfolg der einzelnen Pumpschritte.

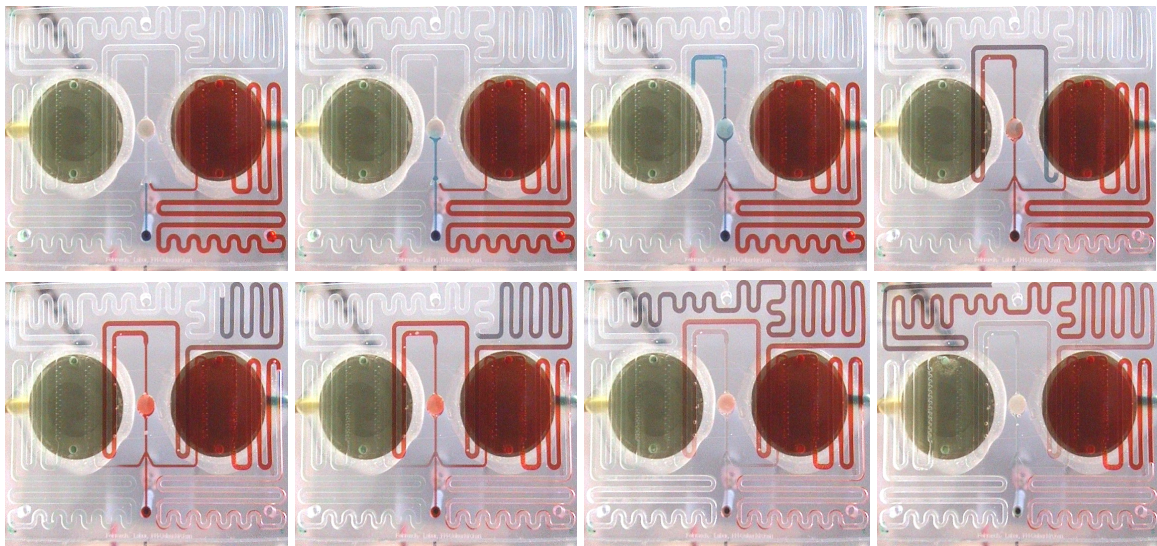


Abbildung 7-2: Testprozess im fertigen Chip

Am Beispiel eines Myoglobin-Immunoassays sollte abschließend die Funktionsfähigkeit dieses Chips untersucht werden. Die Nachweisgrenze sollte möglichst in der Größenordnung vorhandener myoglobinbasierter Cardiacmarker (wie z.B. der Firma Roche [INT8]) liegen (siehe Abbildung 7-3).

<i>Referenzbereich (CARDIAC M Myoglobin)</i>	
Männer	Frauen
7 - 64 ng/ml	16 - 76 ng/ml
<i>Vom Cardiac Reader angezeigte Ergebnisse</i>	
Myoglobin concentration	Cardiac reader display
< 30 ng/ml	Myoglobin LOW
30 - 700 ng/ml	Myoglobin = "x" ng/ml (quantitatives Ergebnis)
> 700 ng/ml	Myoglobin HIGH
<i>Hinweis:</i>	
- Die Myoglobinkonzentration ist abhängig von Alter, Körpergewicht und Geschlecht. Für eine Bewertung der gemessenen Myoglobinkonzentration ist eine individuelle Patientenbeurteilung erforderlich. - Diagnostisches Fenster: 1-2 bis 12 Stunden. - Myoglobin wird 1 bis 2 Stunden nach einem kardialen Ereignis in das Blut freigesetzt. Nach 6 bis 8 Stunden wird ein Pik erreicht. Nach etwa 24 Stunden kehrt es auf Normalwerte zurück. - Ein negatives Ergebnis 6 Stunden nach Einsetzen der Symptome schließt einen Myokardinfarkt aus.	
Interpretation	
<i>Erhöhtes Myoglobin</i>	
- Myokardschädigungen wie Myokardinfarkt - Schädigung der Skelettmuskeln	

Abbildung 7-3: myoglobinbasierter Cardiacmarker der Firma Roche [INT8]

Dazu wurden Immunoassays mit verschiedenen Konzentrationen in 2 verschiedenen Fluidikchips durchgeführt. Beginnend mit einer Konzentration von 0 ng/ml Myoglobin (Blindprobe) sollte das Untergrundsignal beider Chips festgestellt werden. Im Anschluss daran wurden auf jedem Chip Immunoassays zunächst mit einer Konzentration von 1000 ng/ml und anschließend mit 100 ng/ml durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Tests zeigten eine gut erkennbare Abhängigkeit der Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals von der in der Probe vorliegenden Myoglobinkonzentration (siehe Abbildung 7-4). Die jeweils ersten Messreihen in der Abbildung (dunkelgrau und dunkelblau) zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Signalstärke von der verwendeten Myoglobinkonzentration auf den beiden verwendeten Immunoassaychips. Der Unterschied zwischen den Signalstärken der beiden Chips deutet bereits darauf hin, dass eine Kalibration der Signalstärke für jeden Chip notwendig ist.

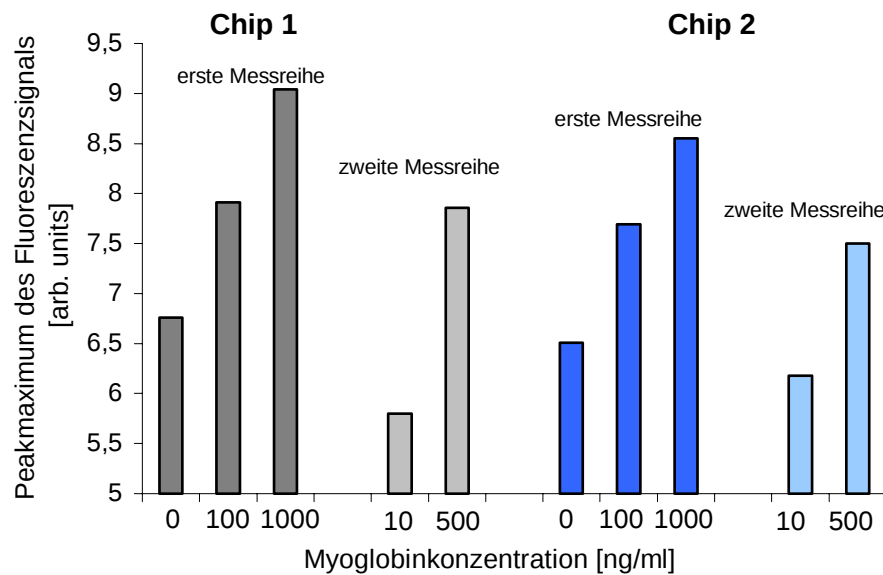


Abbildung 7-4: Messergebnisse von Myoglobin-Immunoassays in 2 PMMA-Chips

In späteren Versuchen wurden die Signalstärken für Myoglobinkonzentrationen von 10 ng/ml und 500 ng/ml gemessen. Die Signale dieser zweiten Messreihe (Abbildung 7-4 hellgraue und hellblaue Messwerte) zeigten zwar einen deutlichen Unterschied zwischen diesen beiden Konzentrationen, lagen jedoch niedriger, als im Vergleich zur ersten Messreihe erwartet wurde. Diese Abnahme der Stärke des Fluoreszenzsignals könnte auf einer Alterung der Piezoaktoren durch deren wiederholten Gebrauch beruhen. Eine andere Erklärung für die Abnahme des Signals der späteren Messungen wäre eine Veränderung der Chemikalien. Diese wurden bei der ersten Messreihe frisch angesetzt und könnten bei der späteren Messreihe (einige Stunden später) mit Konzentrationen von 10 ng/ml und 500 ng/ml durch äußere Einflüsse verändert sein. Für eine weitere Optimierung des Fluidikchips muss dieses Verhalten in einer umfangreichen Versuchsreihe mit einer größeren Anzahl verschiedener Fluidikchips untersucht werden. Eine Möglichkeit zur Vermeidung von Messfehlern durch die Veränderung der Signalstärke wäre die Integration einer Kalibrationsmessung in den Fluidikchip. Durch die Integration einer Kontrollsubstanz, die in einer zusätzlichen Reaktionskammer des Chips eine Referenzmessung darstellt, könnte die Signalstärke des Fluoreszenzsignals stets auf dieses Referenzsignal bezogen werden.

8 Ausblick

8.1 Weitere Messaufgaben / Herstellung in Spritzguss

In weiteren Experimenten sollte durch die Durchführung einer grossen Anzahl von Versuchen die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse und die Veränderung der Signalstärken mit der Zeit untersucht werden. Durch verschiedene Versuche muss die Ursache für die Veränderung der Signalstärke des Fluoreszenzsignals gefunden werden. Dazu sollte ein Spritzgusswerkzeug hergestellt werden, welches die Fertigung einer großen Anzahl von Fluidikchips ermöglicht. Mit diesen Chips könnten dann Vergleichsmessungen mit Einwegchips durchgeführt und die Variation der Signalstärke zwischen den einzelnen Chips untersucht werden. Weiterhin muss die Stabilität der Reaktionschemikalien genauer untersucht und gegebenenfalls optimiert werden.

8.2 Aufbau eines Fluoreszenzdetektors, „On-Chip“-Detektion

Basierend auf den Grundlagen des Fluoreszenzdetektors soll ein Detektor entwickelt werden, der eine Auswertung des Fluoreszenzsignals direkt auf dem Chip mit ausreichender Genauigkeit ermöglicht. Durch eine Detektion des Fluoreszenzsignals während der Durchführung eines Immunoassays könnte das Ansteigen des Fluoreszenzsignals beim Spülen der Reaktionskammer mit der Tracerlösung beobachtet werden. Durch eine Beobachtung der Abnahme des Fluoreszenzsignals während des Waschprozesses könnte die Qualität des Waschprozesses überwacht und an die Prozesssteuerung zurückgemeldet werden. Dadurch wäre eine bessere Kontrolle des Prozessverlaufs möglich.

8.3 Integration einer Kalibrationsmessung

Für eine Weiterentwicklung des Immunoassaychips sollte eine Kalibrationsstrecke in den Chip integriert werden, die durch eine Referenzmessung eine Kalibration des Chips für jede Einzelmessung ermöglicht. Durch eine solche „On-Chip-Kalibration“ kann zum einen die Messgenauigkeit des Immunoassays verbessert werden, zum anderen wird eine Veränderung der Biochemie durch falsche Lagerung oder falsche Behandlung des befüllten Chips erkannt.

8.4 Erweiterung auf andere Zielmoleküle

Für eine Verwendung des Immunoassachips zur Herzinfarktdiagnose ist eine Erweiterung auf andere herzinfarktspezifische Zielsubstanzen, wie z.B. Troponin, CK-MB oder CRP, notwendig. Durch eine Integration weiterer Reaktionskammern (parallel oder seriell) sollte ein Ausbau des Immunoassaychips zum „Multianalytassaychip“ erfolgen. Eine darüber hinausgehende Erweiterung auf andere Zielmoleküle kann den Einsatzbereich des Fluidikchips deutlich erweitern.

9 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mikrofluidische Strukturen entwickelt werden, die eine Durchführung biochemischer Analysen auf einem „Lab-Chip“ ermöglichen. Am Beispiel eines mikrofluidischen Immunoassays konnte die Funktionsweise und das Zusammenspiel der Einzelkomponenten gezeigt werden. Die Durchführung biochemischer Reaktionen erfolgt dabei in einer mikrofluidischen Reaktionskammer, die von den an der Reaktion beteiligten Chemikalien durchströmt wird. Der Antrieb der Flüssigkeitsbewegung erfolgt über Mikropumpen, die aufgrund ihrer Bauweise auch für eine Integration in Einwegsysteme geeignet sind. Die für die Reaktion benötigten Chemikalien werden in mikrofluidischen Kanälen auf dem Chip integriert. Durch eine Durchführung von Immunoassay-Tests auf Adhäsionsfolien konnte eine Eignung dieser Folien für biochemische Analysen gezeigt werden. Diese auf den Adhäsionsfolien durchgeführten Immunoassays konnten sowohl durch Fluoreszenz als auch durch Chemolumineszenz ausgewertet werden. Die Eignung der Adhäsionsfolie als preisgünstige und einfache Möglichkeit für das Verschließen der mikrofluidischen Kanalstrukturen wurde durch die Durchführung von Immunoassays in mikrofluidischen Küvetten bekräftigt. Diese Versuche zeigten auch, dass in mikrofluidischen Reaktionskammern Immunoassay-Tests mit ausreichender Genauigkeit für z.B. die Diagnose eines Herzinfarkts durchgeführt werden können. Die Auflösung und der Messbereich der Immunoassays konnte durch Verwendung von Nitrozellulosestücken als biologisch aktive Bereiche in den Reaktionskammern gesteigert werden. Eine Massenfertigung wird durch die Verwendung der Nitrozellulose ebenfalls erleichtert, da die Belegung der Reaktionsbereiche mit der Biochemie unabhängig von der Herstellung der fluidischen Strukturen erfolgen kann. Für die Steuerung der Flüssigkeiten auf einem mikrofluidischen Chip wurde eine Mikropumpe entwickelt, deren Ventilstrukturen mit 2-dimensional strukturierten Aufbau ohne bewegte Teile auskommen. Eine Herstellung dieser Pumpe ist mittels photolithografischen Techniken für die Prototypenfertigung und auch mittels Massenfertigungsprozessen, wie Heißprägen und Spritzgießen, möglich. Die Integration dieser Mikropumpe in einen aus SU-8 Photoresist gefertigten Fluidikchip zeigte die Eignung dieser Pumpe für die Herstellung von mikrofluidischen Analysesystemen. Es wurde eine Computersteuerung entwickelt, die den kompletten Prozessablauf für einen mikrofluidischen Immunoassay ohne äußere Eingriffe steuert. Die Möglichkeit, einen Immunoassay im fertig befüllten Chip ohne Vorkenntnisse („goof-proof“) durchzuführen, wurde damit gezeigt. Durch Computersimulationen konnten sowohl die Funktionsweise der Mikropumpe als auch die Kanalkreuzung und die Reaktionskammer optimiert werden. Die strömungsoptimierte Kanalkreuzung lässt eine Injektion der Probe in die Reaktionskammer ohne Rückströmungen der Probe in das Tracer- oder Waschreservoir zu. Die Durchführung eines Immunoassays als Blindversuch zeigte, dass die in der optimierten Reaktionskammer durchgeführten Waschprozesse, die Probe bzw. die Tracerlösung ausreichend auswaschen. Durch Herstellung eines komplett

integrierten Fluidikchips aus PMMA (durch Präzisions-Fräsbearbeitung auf einer KERN-5-Achsen-Fräsmaschine) konnte ein Prototyp eines spritzgussfähigen Immunoassaychips gefertigt werden. Die Durchführung von Myoglobin-Immunoassays zeigte, dass in diesem Immunoassaychip ein Nachweis von Myoglobinkonzentrationen von weniger als 100 ng/ml möglich ist. Der Vergleich zu vorhandenen myoglobinbasierten Cardiacmarkern mit einem Nachweisbereich zwischen 30 und 700 ng/ml (z.B. der Firma Roche [INT8]) zeigt die prinzipielle Eignung dieses Fluidikchips für die Herzinfarktdiagnose. Eine Auswertung der Immunreaktionen über Fluoreszenz wurde durch die Verwendung geeigneter Biochemie realisiert und macht eine „On Board“-Auswertung mit einem geeigneten Fluoreszenzdetektor ohne Integration zusätzlicher Komponenten auf dem Chip möglich.

10 Literaturverzeichnis

- [AWNE01] Andersson, H.; van der Wijngaat, Wouter; Nilsson, Peter; Enolsson, Peter; Stemme, Göran „A valve-less diffuser micropump for microfluidic analytical systems“, *Sensors and Actuators B* 72 (2001), Vol. 72 Nr. 3, 259-265
- [BKHH97] Benard, W. L.; Kahn, H.; Heuer, A.H.; Huff, M. A. „A titanium-nickel shape memory alloy actuated micropump“, *Proceedings Transducers 1997*, p. 361-364, Chicago USA 1997
- [BOOB00] Böhm, S.; Olthuis W.; Bergveld, P. „A bi-directional electrochemically driven micro liquid dosing system with integrated sensor/actuator electrodes“, *Proceedings of IEEE 13th Int. Workshop on MEMS (MEMS'00)*, 2000, p. 92-95
- [BTML90] Bart, S. F.; Tavrow, L.S.; Mehregany, M.; Lang, J.H. „Microfabricated electrohydrodynamic pumps“, *Sensors and Actuators A* (1990), Vol. 21-23, p.193-197
- [BURH94] Burhop, C. „Glasbearbeitung mit Hochleistungslasern“, Universität Erlangen-Nürnberg 1994
- [ETHZ] ETH Zürich: www.etnt.ethz.ch/thermal/explosive_vapor.html, zuletzt besucht am 02.06.2001
- [FHMB92] Fuhr, G.; Hagedorn, R.; Müller, T.; Benecke, W.; Wagner, B. „Microfabricated electrohydrodynamic (EHD) pumps for liquids of higher conductivity“, *Journal of MEMS* (1992), Vol. 1, No. 3, p. 141-145
- [FRAN98] Franz J. „Monolithisch integriertes Silizium-Mikrodosiersystem mit thermomechanischem Mikroventil und kalorimetrischen Massenflusssensor“ Dissertation, Uni Karlsruhe, Shaker Verlag 1998, ISBN 3-8265-4587-7
- [FSMS96] Furuya, A.; Shimokawa, F.; Matsuura, T., Sawada, R. „Fabrication of fluorinated polyimide microgrids using magnetically controlled reactive ion-etching (MCRIE) and their applications to an ion-drag integrated micropump“ *J. Micromech. Microeng.* (1996), Vol. 6, p. 310-319
- [FUSW94] Fuhr, G.; Schnelle, T.; Wagner, B. „Travelling wave-driven microfabricated electrohydrodynamic pumps for liquids“, *J. Micromech. Microeng.* (1994), Vol. 4, p. 217-226
- [GERL93] Gerlach, T. „A simple micropump employing dynamic passive valves made in silicon“, *Proc. Transducer 93*; Yokohama Japan; 1993; pp. 1048-1051
- [GERL94] Gerlach, T. „Mikropumpe“, Patent DE 44 22 743 A1, 1994

- [GERL96] Gerlach, T. „Ein neues Mikropumpen-Prinzip mit dynamischen passiven Ventilen“, Dissertation, Shaker Verlag, Aachen 1996
- [GEWU95] Gerlach, T.; Wurmus, H. „Working principle and performance of the dynamic micropump“, Sensors and Actuators A, Vol. 50 (1995), p. 135-140
- [HSMF92] Harrison, D.J.; Seiler, K.; Manz, A.; Fan, Z. „Electroosmotic pumping within a chemical sensor system integrated on silicon“, Tech. Dig. Solid-State Sensor and Actuator Workshop, Hilton Head (1992), p. 110-113
- [ICB 02] Keller, T.; Rohde, N.; Jonas, R.; Blum, U.; Katerkamp, A.; Schmitz, M.; Grawe, F.; Meusel, M.; Rauch, P. „Vorrichtung und Verfahren zur Probenvorbereitung flüssiger Proben“ Inst. Chemo Biosensorik; PES Diagnosesysteme; Patent DE10057895 A; 2002
- [INT1] http://www.acdlabs.com/webzine/18/18_4.html zuletzt besucht am 21.08.2003
- [INT2] <http://www.netdokter.de/laborwerte/fakten/immunsystem/crp.htm>, zuletzt besucht am 4.8.2003
- [INT3] http://www.combiscreeen.de/pack_beilagend/BD-D-H62010-01.doc.pdf; zuletzt besucht am 4.8.2003
- [INT4] http://www.almeda.de/home/print/article/0,2605,CmpdArticle3953_Cat43_8_2_0,00.html; zuletzt besucht am 4.8.2003
- [INT5] http://www.netdokter.de/laborwerte/fakten/herz/cardiales_troponin_t.htm, zuletzt besucht am 4.8.2003
- [INT6] <http://www.netdokter.de/laborwerte/fakten/herz/ck.htm>, zuletzt besucht am 27.08.2003:
- [INT7] <http://www.nyhallsci.org/whataboutaids/protect/test/content.html> zuletzt besucht am 11.09.02
- [INT8] <http://www.diavant.de/diavant/CMSFront.html?pgid=1,1,1,1> zuletzt besucht am 08.11.02
- [JHUU99] John Hopkins Universität, USA:
www.jhu.edu/news_info/news/home99/jun99/bubble.html
- [JUKI96] Jun, T.K.; Kim, C.J. „Microscale pumping with traversing bubbles in microchannels“, Tech. Dig. Solid-State Sensor and Actuator Workshop, Hilton Head (1996), p. 144-147

- [JUK198] Jun, T.K.; Kim, C.J. „Valveless pumping using traversing vapor bubbles in microchannels“, J. Applied Physics (1998), Vol. 83, No. 11, p. 5658-5664
- [KAED03] Kaeding, F. „Entwicklung einer Auswerteeinheit für Fluoreszenzanalyse von Biochips“, Studienarbeit, Fachhochschule Gelsenkirchen (2003) (unveröffentlicht)
- [KAMP01] Kampmeyer, U. „Konzept und Aufbau einer Mikropumpe“, Diplomarbeit, Fachhochschule Gelsenkirchen (2001) (unveröffentlicht)
- [KHGS92] Klein, A.; Huck, E.; Gerlach, G.; Schwarz, P. „Verhaltens- und strukturorientiertes Modellierung einer Mikroejektionspumpe“, 3. Fachtagung Mikrosystemtechnik, Mikromechanik & Mikroelektronik Chemnitz, 13/14.10.1992, p. 50-99
- [KIJG] Kwang-Seok, Y.; Il-Joo, C.; Jong-Uk B.; Geun-Ho K.; Young-Sam J.; Chang-Jin K.; Euisik Y. „A micropump driven by continuous electrowetting actuation for low voltage and low power operation“, Dept. of Electrical Engineering and Computer Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Korea
- [KOEB00] Koch, M.; Evans, A.; Brunnschweiler, A. „Microfluidic Technology and Applications“, Research Studies Press Ltd., England 2000 ISBN 0-86380-244-3
- [KÖHL98] Köhler, M. „Ätzverfahren für die Mikrotechnik“, Wiley-VCH, 1998, ISBN 3-527-28869-4
- [LEK198] Lee, J.; Kim, C.J. „Liquid micromotor driven by continuous electrowetting“, Proceedings of IEEE 11th Int. Workshop on MEMS (MEMS'98), 1998, p. 538-543
- [LIPB88] van Lintel, T.G.; van de Pol, F.C.M.; Bouwstra; S. „A piezoelectric micropump based on micromachining of silicon“, Sensors & Actuators; 15; 1988; pp. 153-167
- [LIPP93] Lippert, T. „Excimer-Laser induzierte Ablation von Polymeren und dotierten Polymeren: Charakterisierung der Dotiermaterialien“, Universität Bayreuth (Biologie, Chemie und Geowissenschaften) 1993
- [LLMM00] Lemoff, A.V.; Lee, A.P.; Miles, R.R.; McConaghy, C. F. „An AC magnetohydrodynamic micropump: towards a true integrated microfluidic system“, Sensors and Actuators B, (2000), Vol. 63, p.178-185
- [LRE 03] Interne Messung Fa. LRE Technologie Partner GmbH, München
- [MACO90] Matsumoto, H.; Colgate, J.E. „Preliminary investigation of micropumping based on electrical control of interfacial tension“, Proceedings of IEEE 3th Int. Workshop on MEMS (MEMS'90), 1990, p. 105-110

- [MIKA91] Miyazaki, S.; Kawai, T.; Araragi, M. „A piezoelectric pump driven by a flexural progressive wave“, Proceedings of IEEE 4th Int. Workshop on MEMS (MEMS'91), 1991, p. 283-288
- [MOWH91] Moroney, R. M.; White, R. M.; Howe, R. T. „Ultrasonically induced microtransport“, Proceedings of IEEE 4th Int. Workshop on MEMS (MEMS'91), 1991, p. 277-282
- [NAOS98] Nakabeppu, O. „Development of dynamic valvetype micropumps driven by vapor bubble oscillation“, Dept. of Mechano-Aerospace Engineering Tokyo Institute of Technology, Research Reports 1998, p. 8
- [NGHU00] Nguyen, N.-T.; Huang, Xiaoyang „High performance micropumps based on printed circuit board technology“, Microfluidic Devices and Systems III, Proceedings of SPIE vol. 4177 (2000), 263-270
- [NMBW00] Nguyen, N.T.; Meng, A.; Black, J.; White, R.M. „Integrated flow sensor for in-situ measurement and control of acoustic streaming in flexural plate wave micropumps“, Sensors and Actuators A (2000), Vol. 79, p. 115-121
- [OFRB90] Ohnstein, T.; Fukiura, T.; Ridley, V.; Bonne, U. „Micromachined silicon microvalve“, Proc. IEEE-MEMS Workshop, 95-98 (1990)
- [OLHÖ98] Olsson, A.; Larsson, O.; Holm, J.; Öhman, O.; Stemme, G. „Valve-less diffuser micropumps fabricated using thermoplastic replication“, Sensors and Actuators A 64 (1998), Vol.64 Nr. 1, 63-68
- [OZAK95] Ozaki, K. „Pumping mechanism using periodic phase changes of a fluid“, Proceedings of IEEE 8th Int. Workshop on MEMS (MEMS'95), 1995, p. 31-36
- [PELZ03] Pelz, C. „Untersuchung und Optimierung eines mikrofluidischen Pumpsystems mittels numerischer Verfahren“, Diplomarbeit, Fachhochschule Gelsenkirchen, Fachbereich Physikalische Technik, (2003) (unveröffentlicht)
- [PFLE97] Pfleging, W. „Mechanismen des laserunterstützten Trockenätzens mit Excimer-Laserstrahlung“, Shaker-Verlag 1997
- [PLEF90] van de Pol, F.C.M.; van Lintel, H.T.G.; Elwenspoek, M.; Fluitman, J.H.J. „Thermopneumatic micropump based on micro-engineering techniques“, Sensors and Actuators A, Vol. 21 Nr.1-3 (1990), p. 198-202
- [PRNE97] Price C.P.; Newman D.J. „Principles and Practice of Immunoassay 2nd edition“ Palgrave Macmillan; May 1997; ISBN 0 333 62504 8
- [PSCH02] Pschyrembel, W. „Pscyhyrembel Klinisches Wörterbuch“, de Gruyter Verlag, 2002. CD-ROM-Ausg. Version 2002 ISBN 3-11-016522-8

- [PUNT02] Puntambekar, A.; et al. „Effect of Surface Modification on Thermoplastic Fusion Bonding for 3-D Microfluidics“, Proceedings of the μ TAS 2002 Symposium, Nara, Japan, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1009-5
- [RICH97] Richter, M. „Design methodology for gas and liquid micro pumps“, Proc. Eurosensors XI; Warsaw, Poland; 1997; pp. 785-788
- [ROKE94] Keller, R.; „Immunologie und Immunpathologie, Eine Einführung“, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1994
- [RÖMPP] Römpp, H. „Römpp-Lexikon Chemie“ Elektronische Ausg. 9. Aufl. ISBN 3-13-107830-8
- [RPHS91] Richter, A.; Plettner, A.; Hoffmann, K. A.; Sandmaier, H. „A micromachined electrodynamic (EHD) pump“, Sensors and Actuators A (1991), Vol. 29, p. 159-168
- [RSMS94] Rapp, R.; Schomburg, W.K.; Maas, D.; Schulz, J.; Stark, W. „LIGA micropump for gases and liquids“, Sensors and Actuators A, Vol. 40 Nr.1 (1994), p. 57-61
- [SCGE97] Schlichting, H.; Gersten, K.; „Grenzschicht-Theorie“, Springer Verlag, Berlin u.a. 1997
- [SCHO99] Schott Filterkatalog 99
- [SCHU93] Schutte, K. „Prozessdiagnostik und technologische Untersuchungen zur Materialbearbeitung mit Excimer-Lasern“, Universität Erlangen-Nürnberg 1993
- [SCHW96] Schwuger, M. J. „Lehrbuch der Grenzflächenchemie“, Georg Thiemen Verlag New York; 1996; ISBN 3-13-137501-9
- [SDEH99] Soerensen, O.; Drese, K. S.; Ehrfeld, W.; Hartman, H.-J. „Micromachined flow handling components – micropumps“, Proceedings SPIE the international society of optical engineering, Vol. 3857 (1999), p.52-60, ISSN 03610748
- [SIGL96] Sigloch, H.; „technische Fluidmechanik“, VDI Verlag Düsseldorf, ISBN 3 18 401523 8
- [SMIT83] Smits, J.G. „Piezoelectric micropump for peristaltic fluid displacements“, NL patent 8302860; MESA 1983
- [SMIT84] Smits, J.G. „Piezo-electrical micropump“, EP 01 34 614 A1, 1984
- [SPEN78] Spencer, W.J. „An electronically controlled piezoelectric insulin pump and valves“, IEEE Trans. Sonics Ultrason.; SU-25; pp. 153-156

- [SSHB99] Schasfoort, R.B.M.; Schlautmann, S.; Hendrikse, J.; van den Berg, A. „Field-Effect Flow Control for Microfabricated Fluidic Networks”; SCIENCE, OCTOBER 1999, VOL 286
- [STEH99] Stehr, M. „Bidirektionale Mikropumpe für Flüssigkeiten und Gase mit Ventilmodus“, Shaker Verlag, Aachen 1999
- [STEM93] Stemme, E. „A valveless diffuser/nozzel-based fluid pump”; Sensor & Actuators; A39;1993; pp. 159-167
- [TESL20] Tesla, N. „Valvular conduit“, US 13 29 559, 1920
- [TMOP94] Takagi, H.; Maeda, R.; Ozaki, K.; Parameswaran, M.; Mehta, M. „Phase transformation type micropump“, Proceedings of Micro Mechatronics and Human Sciences (1994), p. 199-202
- [TRUC96] E. Truckenbrodt, „Fluidmechanik“, Springer Verlag, Berlin u.a. 1996
- [TWEN02] <http://www.el.utwente.nl/tt/education/d-opdrachten/powder/Isotroop.gif> zuletzt besucht am 30.08.2003
- [ULMA96] Ulman, A.; Chem. Rev. 1996, p. 96, 1533
- [WEHN91] Wehner, M. „Werkstoffbearbeitung mit Excimer-Laserstrahlung“, Verlag der Augustinus Buchhandlung, Aachen 1991
- [WEIM03] Weimert, J. „Modifizierung von hydrophoben und hydrophilen Grenzschichten und deren Charakterisierung“ Studienarbeit, Fachhochschule Gelsenkirchen, Fachbereich Physikalische Technik, Januar 2003 (unveröffentlicht)
- [ZENG94] Zengerle, R. „Mikro-Membranpumpen als Komponenten für Mikro-Fluidsysteme“; Verlag Shaker; Aachen;1994
- [ZIMM02] Zimmermann, S; Fienbork, D.; Wasilik, M.; Flounders, B.; Liepmann, D. „A Novel In-Device Enzyme Immobilization Method for Biomems, Demonstrated for a Continuous Glucose Monitor“, Proceedings of the μ TAS 2002 Symposium, Nara, Japan, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1009-5
- [ZLLT96] Zhan, G.; Lo, T.; Liu, L.; Tsien, P. „A silicon membrane micropump with integrated bimetallic actuator“, Chinese Journal of Electronics 1996, Vol. 5 Nr.2, p. 29-35
- [ZUKR95] Zengerle, R.; Ulrich, J.; Kluge, S.; Richter, M.; Richter, A. „A bidirectional micropump“, Sensors and Actuators A, Vol. 50 Nr.1-2 (1995), p. 81-86, ISSN 09244247

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 5-1: Messwerte der Ätzzraten für Borsilikatglas und Natriumglas mit 48% Flusssäure ...	22
Abbildung 5-2: Ätzergebnisse für Borsilikatglas (links) und Natriumglas (rechts)	22
Abbildung 5-3: Ätzprofil bei isotroper Ätzung [TWEN02]	23
Abbildung 5-4: Messwerte der Benetzungswinkel von Wasser auf verschiedenen Oberflächen und dessen Änderung mit der Zeit (u.a. durch Oxidation).....	29
Abbildung 6-1: Verdeckelte Kanalstrukturen. (Antikörper am Kanalboden angebracht)	31
Abbildung 6-2: Verdeckelte Kanalstrukturen. (Antikörper am Deckel angebracht).....	32
Abbildung 6-3: Verdeckelte Kanalstrukturen. (Antikörper auf Trägermaterial am Deckel angebracht)	32
Abbildung 6-4: Ergebnisse von Immunoassays auf verschiedenen Folien.	33
Abbildung 6-5: geätzte Glasküvetten, Kammerlänge 4mm Kammerbreite 1mm Kammertiefe 38µm	34
Abbildung 6-6: Ergebnis einer Durchführung von CRP-Immunoassays in mikrofluidischen Glasküvetten	35
Abbildung 6-7: Myoglobinassay auf Adhäsionsfolie (<i>Immunchemie direkt aufpipettiert</i>)	36
Abbildung 6-8: Myoglobinassay auf Adhäsionsfolie in mikrofluidischen Küvetten (<i>Chemikalien mit peristaltischer Pumpe von außen zugeführt</i>)	36
Abbildung 6-9: Myoglobinassay auf Nitrozellulosefolie (<i>Immunchemie direkt aufpipettiert</i>)	37
Abbildung 6-10: Darstellung der Fluoreszenz-Emission abhängig von der Anregung [LRE 03]	38
Abbildung 6-11: Absorptions- bzw. Emissionskurven verschiedener Filter und Laser [LRE 03]	39
Abbildung 6-12: Myoglobinassay mit Fluoreszenzlabel auf Nitrozellulose	40
Abbildung 6-13: Übersicht über dokumentierte Pumpprinzipien [KAMP01]	41
Abbildung 6-14: eine der ersten Mikropumpen [SMIT83]	41
Abbildung 6-15: Mikropumpe mit zwei passiven Ventilen [LIPB88]	42
Abbildung 6-16: Mikropumpe mit Möglichkeit der Pumprichtungsumkehr [ZUKR95]	43
Abbildung 6-17: Mikropumpe mit Diffusor und Düse [STEM93]	44
Abbildung 6-18: Skizze einer Silizium-Mikropumpe mit dynamisch-passiven Ventilen [GERL96] ..	44
Abbildung 6-19: Übersicht der Daten von Mikropumpen mit oszillierendem Antrieb [KAMP01]	46
Abbildung 6-20: Analogie zwischen elektrischen und fluidischen Widerständen	49

Abbildung 6-21: Ersatzschaltbild der Ventilkonstellation	50
Abbildung 6-22: Die wichtigsten vermessenen Ventilvarianten und ihre Bezeichnungen (z=Tiefe der Strukturen; bei den BD-Versionen: a= senkrechter Abstand der gegenüberliegenden Borstenenden) [KAMP01].....	51
Abbildung 6-23: Weitere vermessene Ventilvarianten und ihre Bezeichnungen [KAMP01].....	52
Abbildung 6-24: Vergleich der Strömungswiderstände der BD_a_z Ventile.....	53
Abbildung 6-25: Vergleich der Sperr-Durchlass-Verhältnisse der BD_a_z Ventile bei Druckänderung	53
Abbildung 6-26: Vergleich der Strömungswiderstände der Ventilversionen BDÜ_z und BDRÜ_z.	54
Abbildung 6-27: Vergleich der Sperr-Durchlass-Verhältnisse der Ventilversionen BDÜ und BDRÜ.	55
Abbildung 6-28: Strömungsrichtung der Diode BDRÜ150.....	55
Abbildung 6-29: Darstellung der gemessenen Volumenströme des Ventils BDRÜ150 in der Form eines Kennlinienfeldes einer elektrischen Diode (<i>die Linien stellen einen polynomischen Trend dar</i>).	56
Abbildung 6-30: Übersicht der Messwerte (Extremwerte) der Ventilversionen aus den Experimenten zum statischen Verhalten der Ventile.....	56
Abbildung 6-31: Skizze der Hilfskonstruktion für den Tausch der Einzelteile.....	57
Abbildung 6-32: Messaufbau zum dynamischen Verhalten der Ventile (Pumpentest).....	58
Abbildung 6-33: Frequenzverhalten der Pumpenkonstellation BDÜ_150 16-025_18 (→Strukturtiefe der Ventile 150 µm, Durchmesser der Piezokeramik 16 mm, Dicke der Glasmembran 25 µm, Durchmesser der Pumpkammer 18 mm, Rechtecksignal, 0 bar Gegendruck).....	60
Abbildung 6-34: Frequenzverhalten der Pumpenkonstellation BDRÜ_150 16-025_18.....	61
Abbildung 6-35: Maximal erreichte Steighöhen und Gegendrucke der Pumpenkonstellationen.....	62
Abbildung 6-36: Geschwindigkeitsverteilung innerhalb eines fluiddurchströmten rechteckigen Kanals.....	63
Abbildung 6-37: Unterschied zwischen fein und grob strukturiertem Netz bei der Diode BDRÜ150	65
Abbildung 6-38: Inflation in den Randgebieten (Boundary-Inflation). Das strukturierte Netz an der Strukturbegrenzung und das unstrukturierte Netz sind zu erkennen	66
Abbildung 6-39: Ergebnis der Netzoptimierung (Volumenstrom gegen Elementanzahl).	67
Abbildung 6-40: Geschwindigkeitsverteilung in der Diode BDRÜ150 in Durchlassrichtung.....	67
Abbildung 6-41: Geschwindigkeitsverteilung in der Diode BDRÜ150 in Sperrrichtung	68

Abbildung 6-42: Vergleich zwischen simulierten und gemessenen Volumenströme.....	69
Abbildung 6-43: Vergleich zwischen simulierter und gemessener Diodizität.....	69
Abbildung 6-44: Diodizität in Abhängigkeit der Strukturtiefe (<i>Die Punkte sind die jeweils simulierten Werte, die Linie stellt einen potenziellen Trend dar</i>)	71
Abbildung 6-45: Diodizität in Abhängigkeit der Borstenanzahl	72
Abbildung 6-46: Diodizität in Abhängigkeit des Borstenradius	72
Abbildung 6-47: Diodizität in Abhängigkeit der Überlappung.....	73
Abbildung 6-48: Diodizität in Abhängigkeit der Überlappung (qualitativ).....	73
Abbildung 6-49: Diodizität in Abhängigkeit des Borstenwinkels	74
Abbildung 6-50: Diodizität und qualitative Änderung des Strömungsverhaltens in Abhängigkeit des Borstenwinkels (qualitativ)	74
Abbildung 6-51: Vereinfachte Pumpgeometrie für die Simulation	76
Abbildung 6-52: Ergebnisse der Pumpensimulation mit der Diode BDRÜ150. Aufgetragen sind die simulierten Massenströme in Abhängigkeit von der Zeit.....	78
Abbildung 6-53: Ergebnisse der Pumpensimulation mit der Diode BDRÜ450 bei 30 Hz.....	79
Abbildung 6-54: Ergebnisse der Pumpensimulation mit der Diode BDRÜ450 bei 200 Hz.....	79
Abbildung 6-55: Geschwindigkeitsverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten	80
Abbildung 6-56: Pumpkammerplatten mit eingebauten Ventilstrukturen.....	83
Abbildung 6-57: Pumprate gegen Frequenz bei 400 µm hohe SU-8-Diodenstrukturen.	84
Abbildung 6-58: Reaktionskammerstrukturen mit integrierten Ventilen.....	85
Abbildung 6-59: Aufbau der Testanordnung	86
Abbildung 6-60: Schematische Skizze der Testanordnung	86
Abbildung 6-61: Aufbau der Testanordnung mit farbigen Flüssigkeiten	87
Abbildung 6-62: Grafische Bedienoberfläche der PC-Steuerung	88
Abbildung 6-63: Reaktionskammerstrukturen mit integrierten Ventilen und Reservoirs.....	92
Abbildung 6-64: Durchführung eines rechnergesteuerten Testprozesses.....	94
Abbildung 6-65: Druckverteilung an einer rechtwinkligen Kanalkreuzung. (Einströmung von oben, Einströmdruck 1000 Pa)	95
Abbildung 6-66: Druckverteilung an einer ypsilonförmigen Kanalkreuzung mit 30° Einmündung. (linkes Bild Einströmung von oben, rechtes Bild Einströmung von unten, Einströmdruck jeweils 1000 Pa)	96

Abbildung 6-67: Druckverteilung an einer ypsilonförmigen Kanalkreuzung mit düsenförmiger 30° Einmündung. (Einströmung von oben, links Einstromdruck 1000 Pa, rechts Einstromdruck 50 kPa)	97
Abbildung 6-68: links: runde 3,6 mm Reaktionskammer, rechts: mit abgerundete Anschlusskanäle	98
Abbildung 6-69: 3,6 mm Reaktionskammern, mit 400 µm Pin.....	99
Abbildung 6-70: 3,6 mm Reaktionskammer, 400 µm gestreckt, mit 200 µm NC, Anschluss (480 µm) linkes Bild: Nitrozellulose mittig eingelegt rechtes Bild Nitrozellulose am Ausgang eingelegt	99
Abbildung 6-71: 3,6 mm Reaktionskammer, 800 µm gestreckt, Nitrozellulose mittig eingelegt, linkes Bild Nitrozellulose 250 µm, rechtes Bild: optimal!, Nitrozellulose 300 µm	100
Abbildung 6-72: optimiertes Chipdesign	101
Abbildung 6-73: Durchführung des optimierten Testprozesses	102
Abbildung 6-74 Fluoreszenzsignal eines Blindversuches (Untergrundsignal) (rote Kurve) im Vergleich mit Messungen in den Küvetten mit externer peristaltischer Pumpe (aus Kapitel 6.1.1) (schwarze Kurve) [Zielmolekül: Myoglobin]	103
Abbildung 6-75: Aus den Werten aus Abbildung 6-74 gegen die Konzentration aufgetragene mittlere Peakhöhen der Signale (ohne Messwert für 1000 ng/ml)	104
Abbildung 6-76: Durchführung eines Testprozesses im kleinen Chip	105
Abbildung 6-77: Aufbau der Fluoreszenzdetektion	107
Abbildung 6-78: Absorptionskurve des optischen Filters [SCHO99].....	108
Abbildung 6-79: Messwerte der Ausgangsspannung der Photodiode in Abhängigkeit von der Verdünnung des Fluoreszenzlabels	108
Abbildung 6-80: Messwerte der Ausgangsspannung der Photodiode in Abhängigkeit von der Verdünnung des Fluoreszenzlabels (geringeren Konzentrationen)	109
Abbildung 7-1: Immunoassaychip mit integrierten Pumpkammern.....	110
Abbildung 7-2: Testprozess im fertigen Chip	111
Abbildung 7-3: myoglobinbasierter Cardiacmarker der Firma Roche [INT8]	112
Abbildung 7-4: Messergebnisse von Myoglobin-Immunoassays in 2 PMMA-Chips.....	113

12 Danksagung

Diese Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter des Fachbereichs Physikalische Technik der Fachhochschule Gelsenkirchen in Kooperation mit dem Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen. Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Mokwa möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für die Übernahme des Referats dieser Arbeit danken. Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Büchs danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr.-Ing H.-J. Lilienhof von der Fachhochschule Gelsenkirchen danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und für die fachliche und persönliche Unterstützung sowie für die zahlreichen fruchtbaren und interessanten Diskussionen. Weiterhin gilt mein Dank der Firma Future Diagnostics für die Unterstützung dieser Arbeit durch die Entwicklung der Biochemie. Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dipl.-Ing. Sebastian Mammitzsch von der Firma Future Diagnostics aussprechen für die unermüdliche Unterstützung bei der Lösung der technologischen Probleme. Durch unsere zahllosen wertvollen Diskussionen und seine vielen guten Ideen konnte er einen maßgeblichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beitragen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Mike Martens von der Firma Future Diagnostics für die vielen Diskussionen über die Lösungen der biochemischen Problemstellungen und Herrn Dr. Sergi Gasso Pons von der Firma Future Diagnostics für die großartige Unterstützung bei der Entwicklung der geeigneten Biochemie bedanken. Bei allen Kolleginnen und Kollegen, Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Fachbereichs Physikalische Technik der Fachhochschule Gelsenkirchen möchte ich mich für ihre fachliche Unterstützung und für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein besonderer Dank geht natürlich an alle „meine“ Studenten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meinen Eltern, meinen Freunden und ganz besonders meiner Lebensgefährtin Vera danke ich ganz herzlich für die immerwährende Unterstützung, Motivation und Zuversicht, mit der sie mir über viele Probleme während der Erstellung dieser Arbeit hinweggeholfen haben.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Schlüter
Geburtsdatum: 12.07.1971
Geburtsort: Marl, NRW
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1978 – 1982 Grundschohle
1982 – 1991 Städt. Gymnasium Herten, Abschluss: Abitur

Bundeswehr:

1991-1992 Bundeswehrdienst beim 3./Jägerbataillon 522
in Fürstenau als Ordonnanz im Offiziersheim

Hochschulstudium

1992-1998 Studium der Physik
an der Ruhr-Universität-Bochum
Abschluß als Diplom-Physiker

Diplomarbeit:

1998 Diplomarbeit zum Thema
„Bau und Test eines ^3He Kryostaten“
am Lehrstuhl für
experimentelle Kern- und Teilchenphysik
der Ruhr-Universität-Bochum

Berufliches:

1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Lehrstuhl für
experimentelle Kern- und Teilchenphysik
der Ruhr-Universität-Bochum

seit 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter
im Bereich Mikrosystemtechnik
im Fachbereich Physikalische Technik
der Fachhochschule Gelsenkirchen