



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7290

# **Mikrofluidische CE-Systeme aus Polymeren mit elektrischer Detektion für Life-Science-Anwendungen**

**H. Mühlberger, W. Hoffmann, A. E. Guber,  
V. Saile**

**Institut für Mikrostrukturtechnik**

**April 2007**



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7290

Mikrofluidische CE-Systeme aus Polymeren  
mit elektrischer Detektion  
für Life-Science-Anwendungen

H. Mühlberger<sup>\*</sup>, W. Hoffmann, A. E. Guber, V. Saile  
Institut für Mikrostrukturtechnik

<sup>\*</sup> von der Fakultät für Maschinenbau der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2007

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft  
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-072909

Mikrofluidische CE-Systeme aus Polymeren  
mit elektrischer Detektion  
für Life-Science-Anwendungen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Ingenieurwissenschaften**

von der Fakultät für Maschinenbau der  
Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

**Dissertation**

von

Dipl.-Ing. Holger Mühlberger

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2006

Hauptreferent: Prof. Dr. rer. nat. V. Saile

Korreferenten: Prof. Dr. rer. nat. B. Wolf

PD Dr.-Ing. A. E. Guber



## Kurzfassung

Als Beitrag zur Entwicklung innovativer mikrofluidischer Lab-on-a-Chip-Systeme liefert diese Arbeit wichtige Ergebnisse zur Praxiseinführung der Kapillarelektrophorese (CE) im Chipformat - insbesondere mit dem Ziel einer drastischen Kostenreduzierung. Schlüssel dazu sind die Substituierung des konventionellen Substratmaterials Glas durch Polymere und die Einführung der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung zur Detektion anstelle teurer optischer Methoden.

In dieser Arbeit konnten CE-Chips aus den in der Massenproduktion bewährten kostengünstigen Polymeren PMMA, Polystyrol und Polycarbonat und auch aus den chemisch sehr inerten und biokompatiblen Hochleistungsmaterialien COC und PEEK hergestellt und charakterisiert werden. Durch einen neuen Verbindungsprozess konnte PEEK erstmals als nahezu ideales Material für mikrofluidische CE-Systeme eingesetzt werden. Das Prinzip der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung wurde in die Chipebene übertragen und unter Verwendung von gesputterten Dünnschichtelektroden auf ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis hin optimiert.

Das für das chemische Analysenergebnis wesentlich mitverantwortliche Fluidtransportverhalten im Injektionskreuzungsbereich wurde fluoreszenzmikroskopisch an verschiedenen Kreuzgeometrien untersucht. Dabei konnten störende hydrostatische Effekte und methodenbedingte Instabilitäten aufgezeigt werden. Alternativ zur aufwendigen Fluoreszenzmikroskopie konnte der Fluidtransport optimal mit Leitfähigkeitsmessungen beobachtet werden. Im Injektionskreuz angeordnete Messelektroden erlaubten quantitative Aussagen in Echtzeit. Störungen und methodenbedingte Instabilitäten können somit erfasst und ggf. korrigiert werden.

Für grundlegende experimentelle Untersuchungen wurde ein komplexer und flexibel einsetzbarer Messplatz realisiert. Im Hinblick auf die praktische Anwendung, für die einfach zu bedienende, portable und kostengünstige Geräte erforderlich sind, wurde darüber hinaus ein vollständig miniaturisiertes Meßsystem, die „MinCE“, entwickelt.

Potentielle Anwendungen wurden an ausgewählten typischen Beispielen demonstriert: für die vor-Ort-Lebensmittelanalytik die Bestimmung der organischen Säuren und Zucker in Getränken, für die medizinische Point-of-Care-Diagnostik die quantitative Bestimmung des Antidepressivums Lithium im Blutserum und für die Bioanalytik der Nachweis proteinogener Aminosäuren.

Biologische Makromoleküle - und insbesondere die in den Life-Sciences wichtige DNA - waren bisher nicht im Fokus der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung. Nach umfangreichen impedanzspektroskopischen Studien gelang es in dieser Arbeit erstmals, DNA hochempfindlich mittels elektrischer Leitfähigkeitsmessung zu detektieren. Die dabei erzielten äußerst kleinen Nachweisgrenzen können mit der laserinduzierten Fluoreszenz bei kommerziellen CE-Chip-Geräten gut konkurrieren und somit eine sehr kostengünstige Alternative darstellen.

## **Microfluidic Polymer CE-Systems with Electrical Detection for Life Science Applications**

### **Abstract**

As a contribution to the development of innovative microfluidic lab-on-chip systems, this work presents important results for the practical introduction of capillary electrophoresis (CE) in chip format – in particular with the objective of significant cost reduction. Key contributions are the substitution of conventional substrate glass by polymers and the introduction of contactless conductivity measurement for detection instead of expensive optical methods.

In this work CE chips were fabricated and characterized using cost effective polymers such as PMMA, polystyrene and polycarbonate, which are already established in mass production processes, as well as chemically inert and biocompatible high-performance polymers COC and PEEK. By using a new bonding process, PEEK as a near-ideal material, could be used for the first time for microfluidic CE-systems. The principle of contactless conductivity measurement was transferred to chip level and optimized to a high signal-to-noise ratio using sputtered thin film electrodes.

Chemical analysis results depend significantly on fluid transport behaviour at the fluid injection cross area. This was investigated by fluorescence microscopy on several different cross geometries. Hydrostatic interfering effects and method based instabilities were shown. As a simple alternative to complex fluorescence microscopy, fluid transport could be optimally observed by conductivity measurement. Measurement electrodes placed at the injection cross area allowed real time quantitative analyses. Thus, interferences and method based instabilities can be acquired and compensated for.

For basic experimental investigations, a comprehensive and flexible test setup was developed. In practical application however ease of use, portability and low-priced devices are required. To this end, a completely miniaturized measuring device, the „MinCE“, was developed.

Potential applications were demonstrated on selected typical examples: for in-situ food analysis the determination of organic acids and saccharide in beverages, for medical point-of-care diagnostics the quantitative determination of antidepressant lithium in blood serum and for bio analytics the detection of proteinogenic amino acids.

Biological macro molecules - in particular for life sciences fundamental DNA - have not been in focus of contactless conductivity measurements until now. After substantial impedance spectroscopy studies it was possible for the first time to detect DNA highly sensitive by conductivity measurement in this work. The extremely low detection limits achieved are very competitive with laser induced fluorescence in commercial CE-chip-devices and can provide a highly cost-efficient alternative.



## INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	1
2	Grundlagen .....	4
2.1	Kapillarelektrophorese (CE) .....	4
2.1.1	Historische Entwicklung .....	4
2.1.2	Traditioneller Aufbau .....	4
2.1.3	Kapillarelektrophorese im Chip-Format .....	5
2.1.4	Elektrophoretische Mobilität .....	6
2.1.5	Elektroosmotischer Fluss .....	7
2.1.6	Injektion .....	10
2.2	Polymere als Kapillarmaterial für die Kapillarelektrophorese .....	12
2.2.1	Polymethylmethacrylat .....	12
2.2.2	Polycarbonat .....	13
2.2.3	Polystyrol .....	13
2.2.4	Polyimide .....	14
2.2.5	Polypropylen .....	14
2.2.6	Cycloolefin-Copolymer .....	15
2.2.7	Polyether-Ether-Keton .....	16
2.2.8	Elektrische Eigenschaften .....	17
2.2.9	Chemische Eigenschaften .....	18
2.2.10	Thermische Eigenschaften .....	19
2.3	Mikrofertigung .....	20
2.3.1	Herstellung von Formeinsätzen .....	20
2.3.1.1	Mikrozerspanen .....	20
2.3.1.2	LIGA-Verfahren .....	20
2.3.2	Replikationstechniken .....	21
2.3.2.1	Heißprägen .....	21
2.3.2.2	Spritzgießen .....	21
2.4	Detektion in Kapillaren .....	22
2.4.1	Optische Detektion .....	22
2.4.2	Elektrochemische Detektion .....	23
2.4.3	Kontaktlose Leitfähigkeitsmessung (CCD) .....	26
2.4.4	Impedanzspektroskopie .....	29
2.5	DNA .....	31
2.5.1	Struktur und Funktion .....	31
2.5.2	Elektrische Eigenschaften .....	32
2.5.3	Detektion .....	33
3	Experimentelles .....	35
3.1	Polymercharakterisierung .....	35
3.1.1	Verwendete Polymere .....	35

---

3.1.2	Kontaktwinkelmessungen .....	36
3.1.3	Oberflächenladungsdichtemessung.....	36
3.2	Chipherstellung .....	37
3.2.1	Herstellung von Formeinsätzen .....	37
3.2.2	Abformung durch Heißprägen .....	41
3.2.3	Verbindungstechnik .....	42
3.2.4	Aufbringen der CCD-Elektroden .....	42
3.2.5	Charakterisierung durch mikroskopische Untersuchungen.....	43
3.2.6	Aufbringen der Reservoirstrukturen.....	44
3.2.7	Laserstrukturierte Polyimid-Chips .....	44
3.3	Aufbau eines CE-CCD-Messplatzes .....	46
3.3.1	Flexible Hochspannungssteuereinheit mit Prozessdatendarstellung und -aufzeichnung .....	46
3.3.2	CCD-Messplatz.....	48
3.3.3	CCD-Elektronik.....	49
3.4	Miniaturisierte CE-Einheit „MinCE“ .....	50
3.5	Fluoreszenzmikroskopie .....	53
3.6	Impedanzspektroskopie .....	54
3.7	Chemikalien .....	55
4	Ergebnisse .....	59
4.1	Polymercharakterisierung .....	59
4.1.1	Kontaktwinkel .....	59
4.1.2	Oberflächenladungsdichte .....	60
4.2	Verbindungstechnik .....	61
4.2.1	Thermisches Bonden.....	61
4.2.2	Plasmaunterstütztes thermisches Bonden.....	63
4.3	Chipherstellung / Chipgeometrie .....	66
4.4	Charakterisierung der CE-Chips aus verschiedenen Polymeren .....	68
4.4.1	Elektroosmotischer Fluss (EOF).....	68
4.4.2	Einsatz von EOF-Modifiern.....	69
4.4.3	Adsorption von DNA .....	70
4.5	Optimierung der CCD.....	72
4.6	Optimierung der Injektion.....	76
4.6.1	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im Injektionskreuzungs- bereich.....	76
4.6.2	Injektion bei Mehrfachanalysezyklen .....	81
4.6.3	CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich .....	83
4.7	Anwendung zur Analytik kleiner Ionen .....	92
4.7.1	Lebensmittelanalytik .....	92
4.7.2	Medizinische Diagnostik .....	98
4.7.3	Bioanalytik .....	101
4.7.4	Messungen mit MinCE.....	103

4.8	Voruntersuchungen zur DNA-Detektion.....	104
4.8.1	Impedanzspektroskopische Untersuchungen .....	104
4.8.1.1	Messung im direkten Kontakt mit großem Messzellenvolumen.....	104
4.8.1.2	Charakterisierung der CCD-Messzelle bei Variation der Leitfähigkeit	105
4.8.1.3	Charakterisierung des DNA-Puffers .....	108
4.8.1.4	Charakterisierung von DNA-Lösungen in Wasser .....	109
4.8.1.5	Charakterisierung von DNA in Puffer.....	111
4.8.1.6	Charakterisierung von Trenngelen .....	112
4.8.1.7	Charakterisierung von DNA in Trenngel.....	113
4.8.2	CCD-Detektion für die CE von DNA-Fragmenten .....	114
4.8.3	Diskussion der Ergebnisse .....	117
4.8.3.1	Generelle Charakterisierung der Messzelle und der Messlösungen ..	117
4.8.3.2	Mögliche Ursachen für die hohe Empfindlichkeit bei der DNA-Detektion .....	118
5	Zusammenfassung.....	121
6	Literatur.....	123

---

## WICHTIGE ABKÜRZUNGEN

CE	Kapillarelektrophorese ( <u>C</u> apillary <u>E</u> lectrophoresis)
CCD	Kontaktlose Leitfähigkeitsmessung ( <u>C</u> ontactless <u>C</u> onductivity <u>D</u> etection)
EOF	Elektroosmotischer Fluss ( <u>E</u> lectro <u>O</u> smotic <u>F</u> low)
MinCE	Miniaturisierte CE
PMMA	Polymethylmethacrylat
PC	Polycarbonat
PS	Polystyrol
PI	Polyimid
PP	Polypropylen
COC	Cyclo Olefin Copolymer
PEEK	Polyether-Ether-Keton
BGE	Hintergrundelektrolyt ( <u>B</u> ackground <u>E</u> lectrolyte)

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2-1	Elektrische Durchschlagsfeldstärken und Dielektrizitätszahlen verschiedener Polymere, <sup>a</sup> VDE 0303, <sup>b</sup> IEC 60243-1, <sup>c</sup> IEC 60250 Frequenz = 1 MHz, <sup>d</sup> IEC 60250 Frequenz < 10 kHz	17
Tab. 2-2	Chemische Beständigkeit verschiedener Polymere, für COC <sup>1</sup> Salzsäure 36%, Schwefelsäure 40 %, <sup>2</sup> Essigsäure 99% (+), Ölsäure (-), <sup>3</sup> Salpetersäure 65%, <sup>4</sup> Natronlauge 50%, Ammoniak 33%	18
Tab. 2-3	Wasseraufnahme verschiedener Polymere [35], ISO 62, <sup>a</sup>	18
Tab. 2-4	Glasübergangs- bzw. Schmelztemperaturen (ISO 11357) und Wärmeleitfähigkeiten (DIN 52612) verschiedener Polymere, <sup>a</sup> Typ 8007, <sup>b</sup> Wärmeformbeständigkeit B (ISO 75) für Typ 8007, <sup>c</sup> Wärmeformbeständigkeit B (ISO 75) für Typ 6017, <sup>d</sup>	19
Tab. 3-1	Verwendete Polymere und Dicke der Deckel-Folien	35
Tab. 4-1	Konzentration, Anteil und Größe der DNA-Fragmente	116

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2-1	Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes	5
Abb. 2-2	Schematischer Aufbau eines CE-Chips: Analyt-Injektion (oben) und Trennung (unten) 1 Analyt-Reservoir, 2 Analyt-Waste-Reservoir, 3 Puffer-Reservoir, 4 Puffer-Waste-Reservoir	6
Abb. 2-3	Schematische Darstellung der Grenzfläche zwischen einer Polymeroberfläche und einer Elektrolytlösung und Potentialverlauf	9
Abb. 2-4	Strukturformel von PMMA	12
Abb. 2-5	Strukturformel von PC	13
Abb. 2-6	Strukturformel von PS	13
Abb. 2-7	Strukturformel des Polyetherimid Kapton®	14
Abb. 2-8	Strukturformel von PP	15
Abb. 2-9	Strukturformel von COC	15
Abb. 2-10	Strukturformel von PEEK	16
Abb. 2-11	CCD-Aufbau: a) Aufsicht, b) seitlicher Querschnitt, c) vereinfachtes Ersatzschaltbild	27
Abb. 2-12	Erweitertes Ersatzschaltbild einer CCD-Zelle	29
Abb. 2-13	Struktur des DNA-Moleküls	32
Abb. 3-1	Geometrie des CE-Chips	37
Abb. 3-2	Durch Mikrozerspanung hergestellter Formeinsatz aus CuBeCo	38
Abb. 3-3	Formeinsatz aus CuBeCo im Injektionskreuzungsbereich	39
Abb. 3-4	REM-Aufnahme: Formeinsatz aus CuBeCo im Injektionskreuzungsbereich	39
Abb. 3-5	REM-Aufnahme: Formeinsatz aus CuBeCo; Reduzierung des Kanalquerschnitts im Detektionsbereich	39
Abb. 3-6	REM-Aufnahme: Durch UV-LIGA hergestellter Formeinsatz im Injektionskreuzungsbereich	40
Abb. 3-7	Mit Wolframdisulfid beschichteter Formeinsatz aus Messing	40
Abb. 3-8	REM-Aufnahme: Injektionskreuzungsbereich eines in COC abgeformten CE-Chips	41
Abb. 3-9	REM-Aufnahme: Reservoirbereich eines in COC abgeformten CE-Chips	41
Abb. 3-10	Schattenmaskensatz	43
Abb. 3-11	Maskenhalterung mit eingebautem CE-Chip	43
Abb. 3-12	CE-Chip aus PMMA mit Reservoirstruktur	44
Abb. 3-13	Polyimid-CE-Chip mit aufgesputterten CCD-Elektroden	44
Abb. 3-14	Injektionskreuzungsbereich: Polyimid-CE-Chip, lasergeschnitten, Lichtmikroskop, Vergrößerung: 200 x	45
Abb. 3-15	Injektionskreuzungsbereich: Polyimid-CE-Chip, lasergraviert,	

Lichtmikroskop, Vergrößerung: 200 x	45
Abb. 3-16 Hochspannungseinheit	47
Abb. 3-17 Aufbau der Softwareoberfläche	48
Abb. 3-18 CE-CCD-Messplatz mit vier Detektionsbereichen (Der CE-Chip wird von unten mit der Messelektronik kontaktiert, die Hochspannungselektroden werden von oben zugeführt)	49
Abb. 3-19 Konzept einer miniaturisierten CE-Einheit	50
Abb. 3-20 Miniaturisierte CE-Einheit MinCE	52
Abb. 3-21 MinCE Softwareoberfläche	53
Abb. 3-22 Strukturformel von Fluorescein	54
Abb. 3-23 Strukturformeln von organischen Säuren in Getränken	57
Abb. 3-24 Strukturformeln von Sacchariden in Getränken	57
Abb. 3-25 Strukturformeln der proteinogenen Aminosäuren	58
Abb. 3-26 Strukturformel des EOF-Modifiers CTAB	58
Abb. 4-1 Kontaktwinkel der verwendeten Polymermaterialien, abgeformte gereinigte Teile, Messmedium Wasser	59
Abb. 4-2 Zugfestigkeiten thermische gebondeter Polymere (Prozessdruck: 3,4 N/mm <sup>2</sup> , bei PP 1,7 N/mm <sup>2</sup> und Zeit: 5 min für alle Proben gleich groß)	62
Abb. 4-3 Zugfestigkeiten thermisch gebondeter PEEK-Proben bei unterschiedlicher Plasma Vorbehandlung (RF-Leistung: 240W, Druck: 200 Torr (26664 Pa), Gasfluss: 50 sccm und Behandlungszeit im Plasma: 10 min für alle Proben gleich groß; UV-Bestrahlung: 1 mW/cm <sup>2</sup> bei 240 nm, 40 min)	63
Abb. 4-4 Zugfestigkeiten thermisch gebondeter PP-Proben bei unterschiedlicher Plasma Vorbehandlung (RF-Leistung: 240W, Druck: 200 Torr (26664 Pa), Gasfluss: 50 sccm und Behandlungszeit im Plasma: 10 min für alle Proben gleich groß; UV-Bestrahlung: 1 mW/cm <sup>2</sup> bei 240 nm, 40 min)	64
Abb. 4-5 Oberflächenladungsdichte plasmabehandelter PEEK-Proben	65
Abb. 4-6 Kontaktwinkel plasmabehandelter PEEK-Proben	65
Abb. 4-7 AFM-Untersuchung der Oberfläche des CuBeCo-Formeinsatzes	66
Abb. 4-8 CE-Chip aus PEEK mit 3 CCD-Elektrodenpaaren	67
Abb. 4-9 Elektroosmotische Mobilität der verwendeten Polymermaterialien (direkt nach Fertigung der CE-Chips und nach einem Tag mit Wasser befüllt)	69
Abb. 4-10 Elektropherogramme: Variation der Konzentration des EOF-Modifiers CTAB bei der Trennung von Sacchariden	70
Abb. 4-11 Adsorption von DNA in CE-Chips aus PMMA, PEEK und COC: Leitfähigkeit der CCD-Messzelle (f = 1 MHz) nach Befüllung mit 1 zu 50 in Wasser verdünnter Heringssperma-DNA, einer Wartezeit und mehreren Spülungen mit Wasser (Referenzmessung: Wasser)	71

Abb. 4-12 KCl-Kalibrierkurven zur Optimierung der CCD-Elektrodengeometrie: Variation der Länge und Breite der Elektroden, sowie deren Abstand ( $f = 625 \text{ kHz}$ )	73
Abb. 4-13 Elektropherogramme einer Testlösung mit $\text{Li}^+$ , $\text{Na}^+$ und $\text{K}^+$ : CCD-Signal ( $f = 625 \text{ kHz}$ ) bei unterschiedlichem Elektrodenabstand	74
Abb. 4-14 KCl-Kalibrierkurven bei Verwendung sehr dünner Deckelfolien von $40 \text{ }\mu\text{m}$ und $15 \text{ }\mu\text{m}$ ( $f = 625 \text{ kHz}$ )	75
Abb. 4-15 Strömungsverhalten im Injektionskreuz mit abgerundeten und $90^\circ$ Ecken während Injektion und Trennung (Injektion im Kanal von oben nach unten, Trennung im Kanal von rechts nach links) ( $E_{\text{Inj.}} = 500 \text{ V/cm}$ , $E_{\text{Sep.}} = 230 \text{ V/cm}$ )	77
Abb. 4-16 Strömungsverhalten im Doppel-T-Injektionskreuz während der Injektion (Injektion von oben nach unten, $E_{\text{Inj.}} = 500 \text{ V/cm}$ )	78
Abb. 4-17 Strömungsverhalten im Injektionskreuz: Einfluss der Füllhöhe des Analytreservoirs auf das Nachströmverhalten während der Trennung, restliche Reservoirs $60 \text{ }\mu\text{l}$ , ( $E_{\text{Sep.}} = 230 \text{ V/cm}$ )	79
Abb. 4-18 Strömungsverhalten im Doppel-T-Injektionskreuz: Einflusses der Füllhöhe der Analytreservoirs auf die Injektion, links: alle Reservoirs $60 \text{ }\mu\text{l}$ (gleiche Füllhöhe) rechts: Analytreservoirs $50 \text{ }\mu\text{l}$ , BGE-Reservoirs $60 \text{ }\mu\text{l}$ , ( $E_{\text{Inj.}} = 500 \text{ V/cm}$ )	80
Abb. 4-19 Strömungsverhalten im Injektionskreuz: Reduktion des Nachströmverhaltens durch Anlegen einer Pullback-Spannung ( $E_{\text{Sep.}} = 230 \text{ V/cm}$ )	81
Abb. 4-20 Reproduzierbarkeit bei Standardinjektion, Analyt ( $250 \text{ }\mu\text{M}$ LiCl, NaCl, KCl) in MesHis-Puffer, $U_i = 1 \text{ kV}$ , $t_i = 10 \text{ s}$	82
Abb. 4-21 Reproduzierbarkeit bei Sample-Stacking, Analyt ( $100 \text{ }\mu\text{M}$ LiCl, NaCl, KCl) in Wasser, $U_i = 1 \text{ kV}$ , $t_i = 10 \text{ s}$	82
Abb. 4-22 CE-Chip mit aufgesputterten CCD-Elektroden im Injektionskreuzungs- bereich (rechts)	83
Abb. 4-23 Aufgesputterte CCD-Elektroden im Injektionskreuzungsbereich	84
Abb. 4-24 Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal	86
Abb. 4-25 Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit $90^\circ$ Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal	86
Abb. 4-26 Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal	87



Abb. 4-27	Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit 90° Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal	87
Abb. 4-28	Variation der Injektionsspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal	88
Abb. 4-29	Variation der Injektionsspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal	88
Abb. 4-30	Variation der Trennspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal	89
Abb. 4-31	Variation der Trennspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal	89
Abb. 4-32	Kontrolle von Mehrfachanalysezyklen durch CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, Analyt im Hintergrundelektrolyten (BGE) verdünnt, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal	90
Abb. 4-33	Kontrolle von Mehrfachanalysezyklen durch CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, Analyt in Wasser verdünnt, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal	91
Abb. 4-34	Elektropherogramme: Fingerprints verschiedener Weine, Hauptsäurebestandteile, BGE: 10 mM MesHis	93
Abb. 4-35	Simulationen mit dem Simulationstool PeakMaster: Trennung der Hauptsäurebestandteile von Wein, doppelte Trennstrecke: 15 cm, $U_t = 2$ kV, BGE: 10 mM MesHis	95
Abb. 4-36	Simulationen mit dem Simulationstool PeakMaster: Trennung der Hauptsäurebestandteile von Wein, lange Kapillare, Trennstrecke: 75 cm, $U_t = 20$ kV, BGE: 10 mM MesHis	96
Abb. 4-37	Elektropherogramme: Fingerprints verschiedener Weine, Hauptsäurebestandteile, BGE: 30 mM Mes 10 mM His	96
Abb. 4-38	Elektropherogramme von Sacchariden in verschiedenen Weinen, Standard je 5 mM, BGE: 50 mM NaOH (pH 12.65) mit 0,2 mM CTAB	97

---

Abb. 4-39	Elektropherogramm von Sacchariden in verschiedenen Getränken, Standard je 5 mM, BGE: 50 mM NaOH (pH 12.65) mit 0,2 mM CTAB	97
Abb. 4-40	Elektropherogramm: Nachweis von Li <sup>+</sup> neben K <sup>+</sup> und Na <sup>+</sup> in einer Modelllösung, wobei die Konzentrationen von K <sup>+</sup> und Na <sup>+</sup> den Referenzwerten im Blutserum entsprechen	99
Abb. 4-41	Li <sup>+</sup> -Peaks zur Aufnahme der Kalibrierungskurven (links) und Patientenblutplasmaproben (rechts) gemessen mit CE-CCD-Chip	100
Abb. 4-42	Kalibrierkurve und Patientenblutplasmaproben gemessen mit CE-CCD-Chip und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	100
Abb. 4-43	Elektropherogramm: 13 proteinogene Aminosäuren, 1 bis 11 je 0,4 mM, 12 und 13 je 0,8 mM, CE-Chip aus PEEK, BGE: 2 M Essigsäure (pH 2,25)	102
Abb. 4-44	Impedanzspektren einer DNA-Leiter (Fermentas SM 271) im BGE, gemessen in einer direkten Leitfähigkeits-Messzelle mit großem Volumen (7 mm · 7 mm · 0,7 mm), Messamplitude: 1V	105
Abb. 4-45	Impedanzspektren von KCl-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen, Messamplitude 1V	106
Abb. 4-46	Phasenverläufe von KCl-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen, Messamplitude 1V	107
Abb. 4-47	Impedanzspektren einer 10 mM KCl-Lösungen bei verschiedenen Messamplituden	107
Abb. 4-48	Impedanzspektren des Hintergrundelektrolyten in verschiedenen Konzentrationen, Verdünnung in Wasser, Messamplitude 1V	108
Abb. 4-49	Phasenverläufe des Hintergrundelektrolyten in verschiedenen Konzentrationen, Verdünnung in Wasser, Messamplitude 1V	109
Abb. 4-50	Impedanzspektren von DNA-Lösungen in Wasser, Messamplitude 1V	110
Abb. 4-51	Phasenverläufe von DNA-Lösungen in Wasser, Messamplitude 1V	110
Abb. 4-52	Impedanzspektren von DNA-Lösungen im Hintergrundelektrolyten (BGE), Messamplitude 1V	111
Abb. 4-53	Phasenverläufe von DNA-Lösungen im Hintergrundelektrolyten (BGE), Messamplitude 1V	112
Abb. 4-54	Impedanzspektren von zwei verschieden Gelmatrixsystemen, Messamplitude 1V	113
Abb. 4-55	Phasenverläufe von zwei verschieden Gelmatrixsystemen, Messamplitude 1V	113
Abb. 4-56	Impedanzspektren von Lösungen von DNA im Gelmatrixsystem A, Messamplitude 1V	114
Abb. 4-57	Erste Sensitivitätstests: CCD von Lösungen von DNA im Gelmatrixsystem A	115
Abb. 4-58	Erste Versuche: Elektropherogramm von DNA-Fragmenten, Detektion mittels CCD	117

# 1 Einleitung

Das Konzept vom "Labor-auf-dem-Chip" (*engl. Lab-on-a-Chip*) hat einen geradezu revolutionären Trend in der Analytischen Chemie eingeleitet. Es zielt auf die immer weiterführende Miniaturisierung und Automatisierung aller Teilschritte der chemischen Analyse, wie sie insbesondere im Life-Science-Bereich mit den Forderungen nach High-Throughput-Screening von extrem kleinen Probevolumina dringend sind. Aber auch andere Anwendungsfelder, wie Umweltmonitoring und Prozessanalytik, können davon profitieren.

Die technologische Umsetzung baut dabei auf die weitestgehende Anwendung mikrosystemtechnischer - neuerdings auch nanotechnischer - Wirkprinzipien und Technologien. Im Bereich der Mikrofluidik nimmt dabei die Übertragung des traditionellen Prinzips der Kapillarelektrophorese (*engl. Capillary Electrophoresis - CE*) in das Chipformat eine Schrittmacherrolle ein. Beginnend mit den Pionierarbeiten von A. MANZ und J. HARRISON [1] [2] zu  $\mu$ TAS (*engl. Micro Total Analysis Systems*) Anfang der 1990er Jahre ist eine stetig wachsende Anzahl von Entwicklungen dieses mikrofluidischen Chips zu registrieren. Das belegt u. a. der Eintrag von insgesamt mehr als 1000 Zitaten zu den Schlagwörtern "capillary electrophoresis" und "chip" im führenden Literaturnetzwerk "ISI Web of Knowledge" [3] mit weiter steigender Tendenz! Aus Sicht des Elektrotechnikers besticht bei diesem Wirkprinzip insbesondere die konsequente Anwendung elektrischer Felder für Transport, Injektion und Separation der zu analysierenden Probe.

CE-Chips sind bereits am Markt zu finden, beispielsweise in den Systemen "Bioanalyser 2100" von Agilent [4] (Waldbronn / Deutschland) und "Experion<sup>TM</sup>" von Bio Rad [5] (Hercules / USA) zur Bestimmung von DNA, RNA und Proteinen, die damit einen wichtigen Meilenstein bei der praktischen Nutzung mikrofluidischer Bausteine in der Analytik markieren. Bei allem Erfolg ist aber ein dringender Wunsch von Herstellern und Kunden nicht zu übersehen: Entscheidende Kostensenkung ist eine Grundvoraussetzung für die weitere Verbreitung dieser ansonsten hoch entwickelten Technik.

Nach übereinstimmenden Ansichten von Fachleuten sind die größten Kostenanteile beim Anschaffungspreis für das Gerät im optischen Detektionsverfahren der laserinduzierten Fluoreszenz (LIF) und beim Verbrauchsmaterial Chip im Substratmaterial Glas zu suchen. Die LIF dominiert aufgrund optimaler analytischer Leistungsfähigkeit, insbesondere der hohen Nachweisempfindlichkeit; für Glaschips kann man vorteilhaft auf umfangreiche Erfahrungen mit Glaskapillaren in der traditionellen CE zurückgreifen.

Alternativ zur gängigen Praxis soll in dieser Arbeit eine elektrische Detektionsmethode für den Einsatz in der Mikrochip-CE untersucht und optimiert werden. Studiert wird die kontaktlose Leitfähigkeitsdetektion (*engl. Contactless Conductivity Detection – CCD\**), die in jüngster Zeit bei traditioneller CE eine Renaissance erlebt hat. Sie verzichtet im Gegensatz zur LIF auf (kostenintensiven) Markerzusatz zur Probe und vermeidet darüber hinaus störende chemische Interferenzen, wie sie sonst bei ebenfalls alternativ genutzten elektrochemischen Methoden mit direktem Elektrodenkontakt zu Lösung auftreten können. Zu diesen messtechnischen Vorteilen kommen als großer Vorteil die sehr geringen Kosten für die Detektorelektronik.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit betrifft die Substitution des Substratmaterials Glas durch Polymere. Die mikrotechnische Nutzung von Polymeren, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften maßgeschneidert und zudem sehr flexibel 3-dimensional strukturiert werden können, zählt zu den Kernkompetenzen des Institutes für Mikrostrukturtechnik (IMT) im Forschungszentrum Karlsruhe. In dieser Arbeit steht deren spezielle Anpassung an die Chip-CE mit CCD im Vordergrund. Sowohl technologische Entwicklungen als auch Untersuchungen zur analytischen Leistungsfähigkeit sind dafür erforderlich. Als eine Neuheit wird dabei die Einführung von Polyetheretherketon (PEEK) für Lab-on-a-Chip angestrebt, das aufgrund seiner großen chemischen und thermischen Beständigkeit als ideales Material für die chemische Analytik gilt.

Wesentliches Anliegen dieser Arbeit ist es darüber hinaus, Grundlagen für zukünftige Aktivitäten im Bereich der Detektion und der praktischen Nutzung von Lab-on-a-Chip-Systemen zu schaffen. So erfolgen vertiefte Studien unter dem Aspekt der Erweiterung des Einsatzes der CCD von bisher kleinen ionischen Spezies hin zu biologisch relevanten Makromolekülen. Schließlich wird auch der Demonstrator eines kompletten Messsystems für die miniaturisierte Kapillarelektrophorese vorgestellt, in dem die gewonnenen Erkenntnisse und Erfahrungen zusammengefasst sind. Diese Entwicklung soll insbesondere das Interesse von Anwendern wecken, für die niedrige Kosten hohe Priorität haben.

---

\* Da sich die Abkürzung CCD in der einschlägigen Fachliteratur durchgesetzt hat, wird sie auch in der vorliegenden Arbeit beibehalten, obwohl CCD auch als Abkürzung für „Charge-Couple Device“ in der Elektronik verwendet wird und als solche im allgemeinen wissenschaftlichen technischen Sprachgebrauch weit bekannt ist.

Die vielseitigen Aspekte von grundlegenden Untersuchungen bis hin zur praktischen Anwendung sind in der Arbeit wie folgt gegliedert:

Kapitel 2 enthält die theoretischen Grundlagen zur Kapillarelektrophorese und zur Detektion in Kapillaren, darunter speziell zu den elektrischen Verfahren. Des Weiteren werden die Eigenschaften der verwendeten Polymermaterialien und die Methoden zu deren Mikrostrukturierung vorgestellt. Eine kurze Einführung zu Struktur, Funktion und physikalischen Eigenschaften von DNA soll dem Verständnis der Studien zur DNA-Detektion mittels CCD am Schluss der Arbeit dienen.

Im experimentellen Teil Kapitel 3 werden zunächst die Methoden zur Herstellung und Charakterisierung der CE-Chips erläutert. Danach werden Konzeption und Aufbau eines komplexen CE-CCD-Messplatzes beschrieben, der schließlich zum anwenderfreundlichen Demonstrator des miniaturisierten CE Analysesystems „MinCE“ weiter geführt wird.

Kapitel 4 stellt die Ergebnisse der Arbeit vor.

Nach der Charakterisierung der verwendeten Polymermaterialien werden die Verbindungstechniken zur Herstellung der CE-Chips beschrieben; speziell wird hierbei auf ein neu entwickeltes Verbindungsverfahren für PEEK eingegangen. Die gefertigten CE-Chips aus den verschiedenen Polymeren werden bzgl. des für die Trennleistung maßgeblichen elektroosmotischen Flusses charakterisiert, gefolgt von ersten Tests zur Adsorption von DNA.

Danach werden Ergebnisse zur Optimierung der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung in der Chipebene vorgestellt. Es folgen Untersuchungen zum Fluidtransport im Injektionskreuz, der für die Leistungsfähigkeit des CE-Chips entscheidenden Stelle, zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie, danach erstmalig mit der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung.

Mögliche Anwendungsgebiete werden für die Lebensmittelanalytik anhand der Bestimmung von Säuren und Sacchariden in Wein und anderen Getränken, in der medizinischen Diagnostik durch den quantitativen Nachweis von Lithium als Antidepressivum im Blutserum und in der Bioanalytik durch die Trennung von proteinogene Aminosäuren, demonstriert.

Nach der Analyse von kleinen Ionen folgen impedanzspektroskopische Voruntersuchungen zur elektrischen Detektion von DNA, die zu einer hochempfindlichen kontaktlosen elektrischen Detektion von DNA führen.

Abschließend werden die Ergebnisse in Kapitel 5 zusammengefasst.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Kapillarelektrophorese (CE)

#### 2.1.1 Historische Entwicklung

Elektrophorese bezeichnet die Migration von elektrisch geladenen Teilchen in einem Trägermedium unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Dabei wandern die Teilchen abhängig von ihrer Ladung, Form und Größe, sowie ihrem Umgebungsmedium und der Größe des angelegten elektrischen Feldes mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Die Grundlagen für die Elektrophorese wurden durch Arbeiten von Kohlrausch Ende des 19. Jahrhunderts gelegt [6].

Ab den 1930er Jahren nutzte Arne Tiselius das Prinzip der Elektrophorese zur Trennung von Serum-Proteinen in mit Pufferlösung gefüllten Röhren aus und führte so die Elektrophorese als Analysetechnik ein [7]. „Für seine Arbeiten über die Analyse mit Hilfe von Elektrophorese und Adsorption, insbesondere für seine Entdeckungen über die komplexe Natur von Serum-Proteinen“ erhielt er 1948 den Nobelpreis [8]. Durch die Verwendung von rotierenden Röhren (Durchmesser 3 mm) konnte Hjertén 1967 störende Konvektionseffekte reduzieren und die Trennleistung somit verbessern [9]. Die eigentliche Entwicklung der Kapillarelektrophorese zu einer Methode mit hoher Trennleistung begann Ende der 1970er Jahre durch Mikkers et al. [10] und Anfang der 1980er Jahre durch Jorgenson und Lukacs [11]. Durch die Reduzierung des Kapillarinne Durchmesser auf 200  $\mu\text{m}$  bzw. 75  $\mu\text{m}$  und die damit verbundene Erhöhung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses konnte die störende thermische Konvektion deutlich reduziert werden. Ende der 1980er Jahre kamen die ersten kommerziellen Kapillarelektrophoresegeräte auf den Markt.

#### 2.1.2 Traditioneller Aufbau

Der prinzipielle Aufbau eines konventionellen Kapillarelektrophoresegerätes ist sehr einfach und in Abbildung 2.1 dargestellt. Zur Trennung wird eine Quarzglaskapillare verwendet, die je nach Anwendung eine typische Länge zwischen 30 cm und 100 cm aufweist. Sie besitzt in der Regel einen Innendurchmesser zwischen 25  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$  und ist zur besseren Handhabung und zur Verringerung der Bruchgefahr mit Polyimid beschichtet. Die Kapillare taucht in zwei Puffergefäße ein, an welche eine Hochspannung von bis zu 30 kV angelegt wird. Somit werden bei der Trennung in der Kapillaren typische Feldstärken von 100 bis 500 V/cm erreicht. Zur

Probenaufgabe wird der Kapillareingang in das Probengefäß getaucht. Die Injektion der Probe kann dabei elektrokinetisch - durch Anlegen einer Spannung - oder hydrodynamisch erfolgen. Nach der Injektion der Probe wird der Kapillareingang wieder in das Puffergefäß getaucht und die Hochspannung angelegt. Die Ionen wandern nun im elektrischen Feld ihrer Größe und Ladung entsprechend unterschiedlich schnell zum Kapillarausgang und passieren dabei den Detektor. Dieser ist möglichst nahe am Ende der Kapillaren angebracht. Erfolgt die Detektion optisch (vgl. Kapitel 2.4.1), so findet die Detektion meist in der Kapillare statt (On-Column-Detektion), die elektrochemische Detektion (vgl. Kapitel 2.4.2) erfolgt meist nach der Kapillare (End-Column-Detektion). Die kontaktlose Leitfähigkeitsmessung (vgl. Kapitel 2.4.3) stellt dabei eine Ausnahme dar. Sie erfolgt „on-column“.

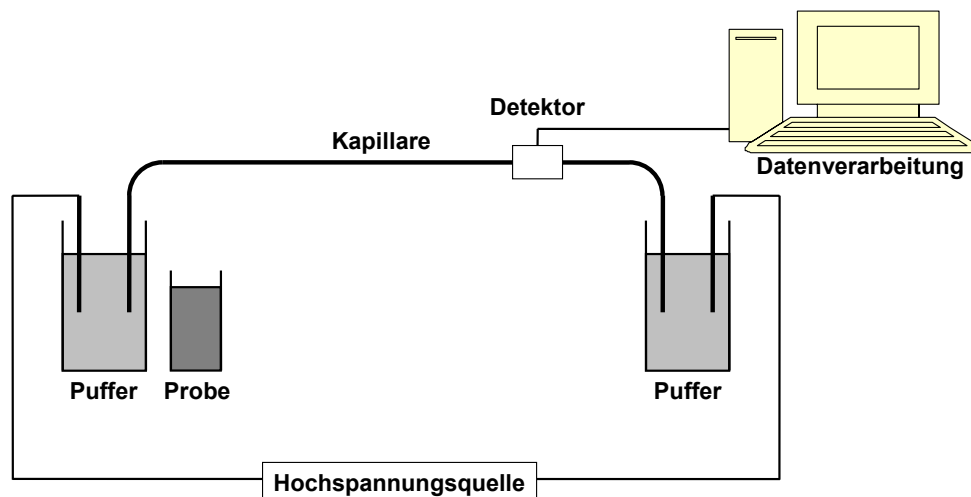


Abb. 2-1 Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes

### 2.1.3 Kapillarelektrophorese im Chip-Format

Anfang der 1990er Jahre wurde die Kapillarelektrophorese ins Chipformat übertragen. Dies war ein wichtiger Meilenstein zu Beginn der Lab-on-a-Chip Entwicklung [1] [2].

Neben kürzeren Analysezeiten, einem geringeren Reagenzienverbrauch und kleineren Analytmengen haben die Chipsysteme das Potential zur Parallelisierung und Automatisierung der Analysen. Erste Produkte sind bereits in den Life-Science-Markt vorgedrungen [4] [5]. Dabei kommen derzeit hauptsächlich Glaschips zum Einsatz, zu deren Herstellung teure und technisch anspruchsvolle Prozesse

notwendig sind [12]. Für die kostengünstigen Massenproduktion stellen Polymere eine Alternative dar [13] (vgl. Kapitel 2.2).

Ein typischer CE-Chip besteht aus zwei sich kreuzenden Mikrokanälen, wobei ein zumeist kürzerer Kanal zur Injektion der Probe dient und im anderen Kanal dann die Separation stattfindet (siehe Abbildung 2.2). Die Injektion des Analyten kann dadurch erfolgen, dass man über den Injektionskanal ein elektrisches Feld anlegt. Legt man danach über den Trennkanal die Trennspannung an, so wird die definierte Analytmenge, die sich im Kreuzungsbereich der beiden Kanäle befindet, in den Trennkanal überführt. Am Ende des Kanals werden die aufgetrennten Ionen optisch oder elektrisch detektiert.

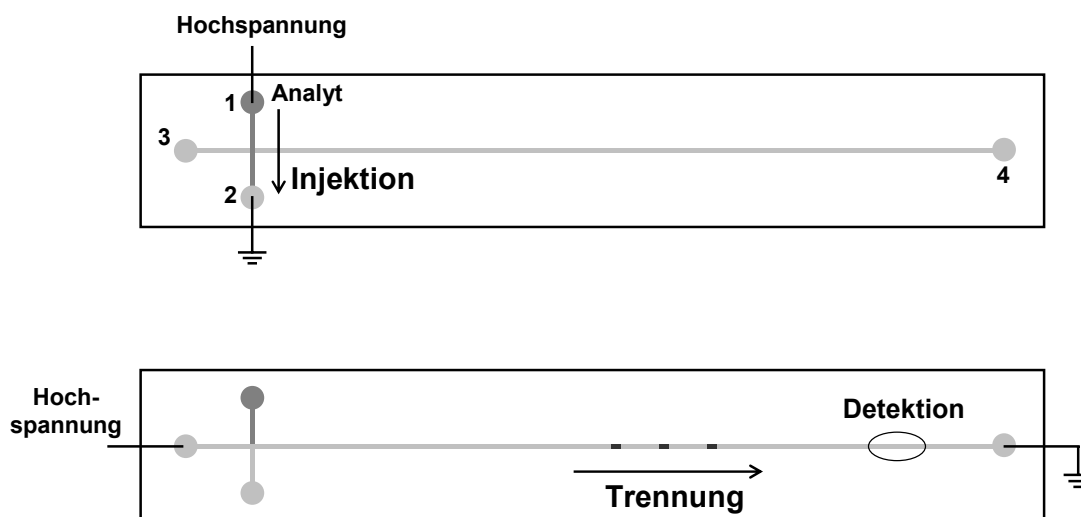


Abb. 2-2 Schematischer Aufbau eines CE-Chips:  
 Analyt-Injektion (oben) und Trennung (unten)  
 1 Analyt-Reservoir, 2 Analyt-Waste-Reservoir,  
 3 Puffer-Reservoir, 4 Puffer-Waste-Reservoir

### 2.1.4 Elektrophoretische Mobilität

Bei der Elektrophorese nutzt man die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit  $v_i$  der Ionen im elektrischen Feld. Diese ist von deren elektrophoretischer Mobilität  $\mu_i$  abhängig und steigt proportional mit der angelegten Feldstärke  $E$  an:

$$v_i = \mu_i \cdot E \quad (2.1)$$



Im elektrischen Feld wirkt auf das Ion eine beschleunigende Kraft  $F_e$ , die mit der Feldstärke und der Ladung des Ions, die sich als Vielfaches (Ladungsanzahl)  $z_i$  der Elementarladung  $e_0$  angeben lässt, zunimmt:

$$F_e = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad (2.2)$$

Dem entgegen wirkt eine verzögernde Kraft  $F_r$ , die durch die Reibung des Ions mit dem umgebenden Medium entsteht. Sie lässt sich näherungsweise mit dem Stokesschen Gesetz beschreiben und nimmt mit der Viskosität  $\eta$  des Umgebungsmediums, sowie dem Stokesschen Ionenradius  $r_i$  und der Geschwindigkeit  $v_i$  des Ions zu:

$$F_r = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i \cdot v_i \quad (2.3)$$

Die Geschwindigkeit des Ions stellt sich entsprechend dem Kräftegleichgewicht ein:

$$v_i = \frac{z_i \cdot e_0 \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (2.4)$$

Setzt man diese in Gleichung 2.1 ein, so ergibt sich die elektrophoretische Mobilität zu:

$$\mu = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (2.5)$$

Da der Stokessche Ionenradius in der Regel nicht bekannt ist und nicht mit dem Ionenradius im Kristallgitter korreliert werden kann, lässt sich die Mobilität nicht direkt berechnen.

### 2.1.5 Elektroosmotischer Fluss

Neben der elektrophoretischen Bewegung der Ionen kommt es bei der Elektrophorese durch das Anlegen des elektrischen Feldes und aufgrund der Oberflächenladungen der Kapillarenwand zu einem weiteren Transportmechanismus, dem elektroosmotischen Fluss (EOF), welcher die gesamte Lösung in der Kapillare bewegt [14].

Die meisten Kapillaren zeigen eine negative Oberflächenladung. Bei Quarzglas entsteht diese im Kontakt mit Wasser durch Deprotonierung der Silanolgruppen. Die negativen Ladungen werden durch Kationen aus der Lösung kompensiert, die ohne Hydrathülle als starre Schicht an der Kapillarenwand adsorbiert sind und darüber

hinaus mit ihren Hydrathüllen als diffuse Schicht in das Lösungsinere reichen (siehe Abbildung 2.3). Bei angelegtem elektrischem Feld bewegen sich die Kationen dieser diffusen Schicht einschließlich ihrer Hydrathülle in Richtung Kathode. Da Wassermoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind kommt es zu einer Bewegung der gesamten Lösung in Richtung Kathode.

Betrachtet man das elektrische Potential mit zunehmendem Abstand von der Kapillarwand, so fällt es in der starren Schicht, welche auch als innere Helmholtz- oder Stern-Schicht bezeichnet wird, linear ab, wohingegen es in der diffusen Schicht, welche auch als äußere Helmholtz-Schicht bezeichnet wird, zu einem exponentiellen Abfall kommt (siehe Abbildung 2.3).

Zur Beschreibung des EOF wird häufig das  $\zeta$ -Potential herangezogen [15]. Dieses ist das Potential an der Scherfläche zwischen der starren und der beweglichen Schicht. Es ist abhängig von der Oberflächenladung der Kapillaren  $\sigma$ , der Dicke der diffusen Grenzschicht  $\delta$ , sowie der Dielektrizitätszahl  $\epsilon_r$  des Elektrolyten:

$$\zeta = \frac{4 \cdot \pi \cdot \sigma \cdot \delta}{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r} \quad (2.6)$$

$$\epsilon_0 = \text{elektrische Feldkonstante} = 8,854 \cdot 10^{-12} \frac{As}{Vm}$$

Die Geschwindigkeit des EOF ist proportional zu seiner Beweglichkeit  $\mu_{EOF}$  und dem angelegten elektrischen Feld  $E$ . Sie steigt linear mit dem  $\zeta$ -Potential an und fällt mit zunehmender Viskosität  $\eta$  des Elektrolyten ab:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_r \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \cdot E \quad (2.7)$$

Während der CE-Separation addieren sich die durch die elektrophoretische Mobilität und den elektroosmotischen Fluss bedingten Geschwindigkeiten der Ionen, was in der analytischen Praxis folgende Auswirkungen hat:

- Bei großem EOF werden auch Anionen zur Kathode transportiert und können so analysiert werden.
- Bei kleinem EOF gelingt die Separation der Ionen, die sich in Richtung desselben bewegen (bei negativer Oberflächenladung: Kationen), mit höherer Trennleistung.

Erwähnt sei an dieser Stelle auch, dass vielfältige Methoden zur chemischen Oberflächenmodifikation der Kapillareninnenwand entwickelt wurden, um den EOF definiert einstellen zu können.

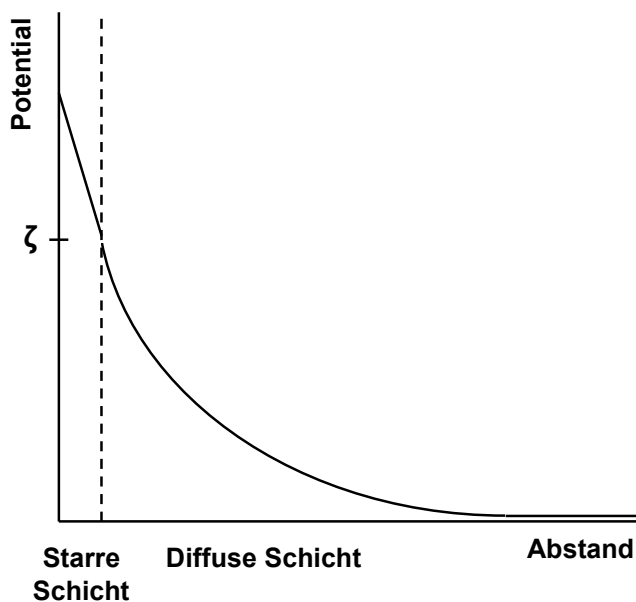
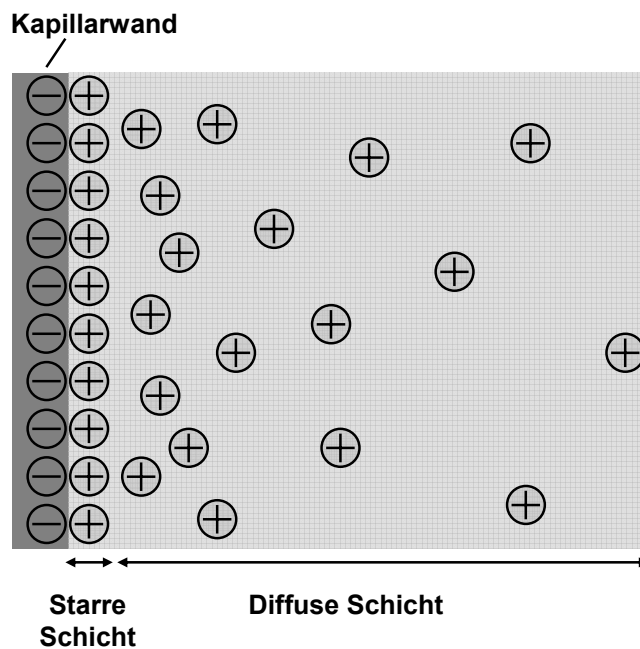


Abb. 2-3 Schematische Darstellung der Grenzfläche zwischen einer Polymeroberfläche und einer Elektrolytlösung und Potentialverlauf

### 2.1.6 Injektion

Im Gegensatz zur konventionellen CE, bei der die Kapillare zur Injektion des Analyten in diesen eingetaucht wird - wodurch es anschließend zu einer Verschleppung des Analyten in das Pufferreservoir kommen kann - erfolgt die Injektion auf dem Chip über einen den Separationskanal kreuzenden Kanal. Die Injektion erfolgt vorzugsweise elektrokinetisch, d.h. durch Anlegen einer elektrischen Spannung werden die Analytionen in das Injektionskreuz transportiert.

Bei der Injektion soll eine definierte Analytmenge aus dem Injektions- in den Separationskanal in Form eines scharf begrenzten Pfropfens überführt werden, um am Ende der Separation wiederum möglichst scharf begrenzte Pfropfen der einzelnen Spezies zu erhalten und so die quantitative Auswertung der Analytzusammensetzung mit hoher Reproduzierbarkeit zu ermöglichen. Aus dem Injektionskanal soll bei der anschließenden Separation möglichst kein Analyt in den Trennkanal nachströmen, da dies zu einer Erhöhung der Basislinie bei der Detektion und damit zu einem Empfindlichkeitsverlust der Messung führt. Ein unkontrolliertes Nachströmen verschlechtert zudem die Reproduzierbarkeit der Messungen.

Im Idealfall würde nur das Volumen des Kreuzungsbereichs der beiden Kanäle und somit eine definierte Analytmenge in den Trennkanal injiziert werden. Praktisch ist jedoch eine größere Analytmenge zu erwarten. Die Ursachen hierfür sind eine Expansion der Strömung des Analyten im Injektionskreuzungsbereich in den Trennkanal hinein, Inhomogenitäten des elektrischen Potentials im Injektionskreuzungsbereich, sowie eine Diffusion des Analyten in den Trennkanal [16]. Weiterhin ist bekannt, dass es zu einem unerwünschten Nachströmen kommt [17].

Um diese beiden Effekte zu vermeiden wurde schon in einer frühen Phase der CE-Chip-Entwicklung vorgeschlagen, bei der Injektion und Separation den jeweils inaktiven Kanal nicht vom Potential getrennt (floating) zu schalten, sondern aktiv Spannung anzulegen [17]. Bei der sog. „Pinched Injection“ wird während der Injektion an den Trennkanal eine Spannung angelegt, die einen Fluss des Puffers aus beiden Seiten des Trennkanals in Richtung des Injektionskreuzes und somit eine Fokussierung des Analytpfropfens bewirkt. Bei der Separation kann an den Injektionskanal eine Pullback-Spannung angelegt werden, die dem Nachströmen des Analyten in den Separationskanal entgegenwirkt.

Ein Problem bei der Pinched Injection ist, dass nur ein sehr kleiner Analyt-Pfropf entsteht, für ein hohes Analytsignal aber ein großer Pfropfen vorteilhaft ist. Von Nachteil sind bei dieser Methode zudem die langen Injektionszeiten, die in der Größenordnung der Separationszeiten liegen können [18]. Auch muss die Pullback-Spannung während der Separation sehr genau eingestellt werden, um nicht durch „Überkompensation“ den Analyt im Injektionskanal mit Puffer zu verdünnen.

Im Laufe der CE-Chip-Entwicklung wurden zudem verschiedene Geometrien zur Injektion vorgeschlagen. Der erste CE-Chip verwendete ein T-förmiges Injektionskreuz [1]. Da jedoch Probleme bei der Kontrolle des Analyt-Pfropfens auftraten wurde diese Struktur durch ein einfaches Kreuz [19] oder eine Doppel-T-Struktur [20], die die Injektion einer größeren Analytmenge erlaubt, ersetzt. Weitere Strukturen zur Injektion, wie zum Beispiel eine Triple- und Multi-T-Injektionsstruktur [21] oder eine  $\pi$ -Injektionsstruktur [22], wurden vorgeschlagen. Letztlich setzen sich bei anwendungsorientierten Arbeiten verstärkt die einfachen Kreuz- und Doppel-T-Strukturen durch [23].

Des Weiteren wurde eine Verringerung des Querschnittes der Injektionskanäle vorgeschlagen, wodurch schärfere Analyt-Pfropfen erzielt werden konnten [18], nachteilig ist jedoch dabei die kleinere injizierte Analytmenge.

Eine interessante Variante ist die Injektion über eine Membran, die durch ein Kernspurätzverfahren erzeugt wird und somit ein Nanokapillarenarray enthält [24]. Durch diesen aufwendigeren Aufbau wurden kurze Injektionszeiten, hohe Reproduzierbarkeiten und eine Vermeidung des Nachströmens erreicht. Derzeit sind Kernspurmembranen jedoch nur in wenigen Polymeren - hauptsächlich Polycarbonat - erhältlich.

Als Alternative zur elektrokinetischen Injektionsmethode bietet sich für die CE im Chipformat auch eine druckgetriebene Injektion an. Da für diese jedoch externe Pumpen notwendig sind, werden solche Systeme aufwendiger und teurer [25][26].

## 2.2 Polymere als Kapillarmaterial für die Kapillarelektrophorese

Bei der Wahl des Materials für CE-Chips dominiert derzeit Glas [28]. Dies liegt zum einen daran, dass bei der Verwendung von Glas auf ein breites Grundlagenwissen zurückgegriffen kann, das bei der Verwendung von konventionellen Quarzglaskapillaren erarbeitet wurde. So sind zum Beispiel Verfahren zur Oberflächenmodifikation bekannt [29]. Zum anderen können Fertigungsprozesse aus der Halbleitertechnik übernommen werden. Zusätzlich eignet sich Glas beim Einsatz der optischen Detektion, die ebenfalls dominiert. Für eine kostengünstige Massenproduktion mittels Replikationstechnologien (vgl. Kapitel 2.3.2) stellen jedoch Polymere ein Alternative dar. Dabei kann auf eine breite Palette von Polymeren mit unterschiedlichen Eigenschaften zurückgegriffen werden [13].

### 2.2.1 Polymethylmethacrylat

Polymethylmethacrylat (PMMA) wurde 1928 gleichzeitig in Deutschland, Großbritannien und Spanien entwickelt und 1933 zur Marktreife gebracht [27]. Es ist heute unter den Handelsnamen „Plexiglas“ oder „Acrylglas“ bekannt und wird durch Polymerisation von Methacrylsäuremethylester hergestellt. Abbildung 2.4 zeigt die Strukturformel von PMMA.

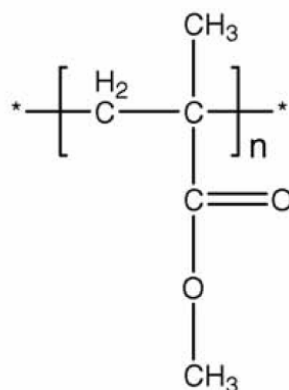


Abb. 2-4 Strukturformel von PMMA [28]

Seinen breiten Einsatz verdankt es primär seinen guten optischen Eigenschaften. Im sichtbaren Bereich (380 - 780 nm) weist es eine hohe Transparenz auf, im Infraroten hingegen eine niedrige. Im Vergleich zu Glas ist es wesentlich einfacher zu bearbeiten und nur etwa halb so schwer.

### 2.2.2 Polycarbonat

Das erste industriell relevante Polycarbonat (PC) wurde 1953 von der Firma Bayer entwickelt [27]. Dabei handelte es sich um Bisphenol-A-Polycarbonat, auf dessen Basis eine Vielzahl der Polycarbonate aufgebaut sind (siehe Abbildung 2.5).

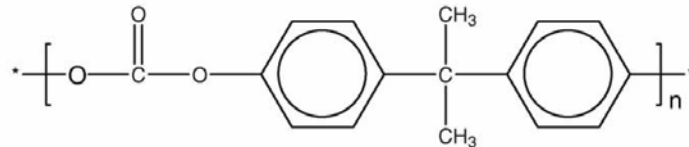


Abb. 2-5 Strukturformel von PC [28]

Polycarbonat wird für eine Vielzahl von Spritzgussartikeln (z.B. CDs) verwendet. Aufgrund seiner hohen Wärmeformbeständigkeit von bis zu 140 °C lässt sich Polycarbonat einfach sterilisieren. Zudem ist es sehr bruchfest und zeigt eine gute Verträglichkeit mit Körperflüssigkeiten und Geweben bei Kontaktzeiten von bis zu 30 Tagen.

### 2.2.3 Polystyrol

Polystyrol wurde bereits 1839 von Eduard Simon bei der Extraktion von Styrol aus Naturharz entdeckt. Zur großtechnischen Herstellung und Markteinführung kam es jedoch erst 1930 durch die IG Farben. Abbildung 2.6 zeigt die Strukturformel von Polystyrol.

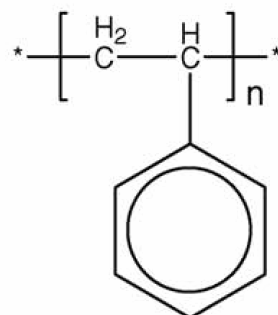


Abb. 2-6 Strukturformel von PS [28]

Es wird zwischen Styrol-Homopolymeren und Styrol-Copolymeren unterschieden. Durch die Copolymerisation können nachteilige Eigenschaften des Homopolymers,

wie zum Beispiel dessen Sprödigkeit, reduziert werden. Große Bedeutung haben die Styrol-Copolymere mit Butadien,  $\alpha$ -Methylstyrol, Acrylnitril, Vinylcarbazol [30].

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Styrolux<sup>®</sup> handelt es sich um ein Styrol-Butadien-Copolymer, welches in den 1970er Jahren von der Firma BASF AG entwickelt wurde.

Polystyrol gilt als gesundheitlich unbedenklich und ist so für Lebensmittelverpackungen uneingeschränkt zugelassen. In der Elektroindustrie wird es wegen seiner guten elektrischen Isolationseigenschaften eingesetzt.

### 2.2.4 Polyimide

Polyimide gehören zur Gruppe der hochtemperaturbeständigen Polymere. Da sie in Temperaturbereichen von -260 °C bis 400 °C eingesetzt werden können, nicht oder nur schwer entflammbar, selbstverlöschend und darüber hinaus gegenüber Strahlung beständig sind, wurden sie zuerst in der Luft- und Raumfahrt eingesetzt. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch eine sehr gute chemische Beständigkeit aus. Wegen ihrer guten elektrischen Isolationseigenschaften werden sie in der Elektro- und Elektronikindustrie eingesetzt, bekannt sind sie unter anderem unter dem Handelsnamen Kapton<sup>®</sup> des Herstellers DuPont.

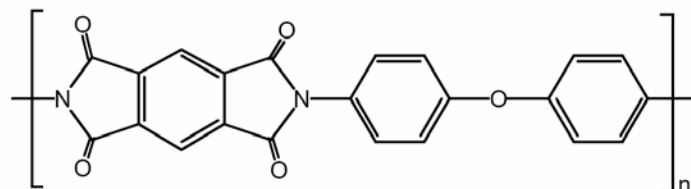


Abb. 2-7 Strukturformel des Polyetherimid Kapton<sup>®</sup> [31]

### 2.2.5 Polypropylen

Durch die Arbeiten von Giulio Natta konnte 1957 Polypropylen zum ersten Mal industriell hergestellt werden. Die Methyl-Seitengruppe (siehe Abbildung 2.8) kann isotaktisch, syndiotaktisch oder ataktisch eingebaut sein. Dies hat Auswirkungen auf die physikalischen Eigenschaften des Polymers. Des Weiteren kommen Copolymere hinzu, sodass eine Vielzahl von Polypropylenen mit unterschiedlichen Eigenschaften angeboten werden.

Generell zeichnen sich Polypropylene durch eine hohe chemische Beständigkeit aus. Sie werden als physiologisch unbedenklich eingestuft und finden somit Einsatz im



Lebensmittelbereich (z.B. Verpackungen) und in der Pharmazie. Ein weiterer Vorteil ist ihre hohe Gebrauchstemperatur von 100 °C bis 110 °C (kurzzeitig 140 °C).

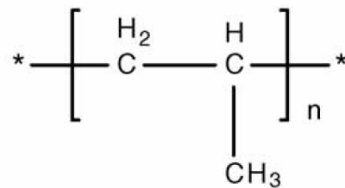


Abb. 2-8 Strukturformel von PP [28]

### 2.2.6 Cycloolefin-Copolymer

Der Herstellungsprozess von Cycloolefin-Copolymeren (COC) wurde Anfang der 1990er Jahre von der Firma Hoechst und der japanischen Firma Mitsui Sekka zur Marktreife gebracht. Seither wird COC von der Firma Ticona unter dem Markennamen Topas<sup>®</sup> (Thermoplastic Olefin Polymer of Amorphous Structure) angeboten.

Im Vergleich zu den meisten Polymeren, die nur aus Ketten eines Monomers bestehen, setzt sich COC aus zwei verschiedenen Monomeren, Ethylen und Norbornen, zusammen (siehe Abbildung 2.9). Eine wirtschaftliche Synthese von COC konnte erst durch die Verwendung von Metallocen-Katalysatoren erreicht werden [32].

Über das Verhältnis von Ethylen zu Norbornen können die physikalischen Eigenschaften des Copolymers verändert werden. So weisen zum Beispiel verschiedene Topas<sup>®</sup>-Sorten Wärmeformbeständigkeit von 75 °C bis 170 °C auf.

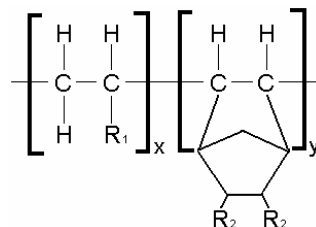


Abb. 2-9 Strukturformel von COC [30]

Neben sehr guten optischen Eigenschaften gilt COC als biokompatibler Werkstoff, es zeigt eine gute chemische Beständigkeit gegen Laugen, Säuren und polare Lösungsmittel sowie eine geringe Wasserdampfdurchlässigkeit und Wasseraufnahme und wird deshalb vermehrt im Life-Sciences-Bereich eingesetzt.

### 2.2.7 Polyether-Ether-Keton

Polyetheretherketon (PEEK) ist der wichtigste Vertreter der Gruppe der Polyetherketone, welche zu den hochtemperaturbeständigen Thermoplasten gehören. Abbildung 2.10 zeigt die Strukturformel von PEEK.

Es ist gegen fast alle organischen und anorganischen Lösungsmittel beständig und weist neben einer hohen thermischen (Dauergebrauchstemperatur 260 °C, Schmelztemperatur 340 °C) auch eine hohe mechanische Stabilität auf. Hinzu kommen sehr gute elektrische Eigenschaften, Stabilität gegenüber Gammastrahlung sowie eine sehr hohe Biokompatibilität.

Dies führte dazu, dass PEEK seit seiner Markteinführung 1978 in viele Anwendungsbereiche vorgedrungen ist [33]. Neben dem Einsatz in der Luft- und Raumfahrttechnik sowie im Automobilbau ersetzt PEEK in der Medizintechnik zunehmend Glas, Metalle und Edelstahl als Material für Implantate und Operationsbesteck. In der chemischen Industrie und im Anlagenbau kommen wirtschaftliche Vorteile durch seine einfache Verarbeitung sowie seine Verschleiß- und Abriebsfestigkeit hinzu. Für die Lebensmittelverarbeitung besitzt es die wichtige Zulassung der US Food and Drug Administration (FDA). In der Elektrotechnik wird es zum Beispiel als Schaltungsträger eingesetzt, wegen seiner hohen Durchschlagsfestigkeit kommt es in der Hochspannungstechnik als Isolationswerkstoff zum Einsatz.

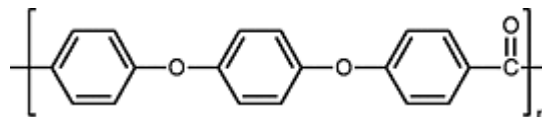


Abb. 2-10 Strukturformel von PEEK [34]

## 2.2.8 Elektrische Eigenschaften

Die elektrischen Eigenschaften der Polymere sind im Hinblick auf eine Optimierung der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung von Bedeutung (vgl. Kapitel 2.4.3 und 4.5), dabei sind eine hohe Durchschlagsfestigkeit und eine hohe Dielektrizitätszahl vorteilhaft.

Polymer	Durchschlagsfeldstärke [kV/mm]	Dielektrizitätszahl
PMMA	30 <sup>a</sup>	2,8 <sup>c</sup>
PC	30 <sup>b</sup>	2,9 <sup>c</sup>
PS	135 <sup>b</sup>	2,5 <sup>c</sup>
PI (Polyetherimid PEI)	33 <sup>b</sup>	2,9 <sup>c</sup>
PP	140 <sup>b</sup>	2,3 <sup>c</sup>
COC	k. A.	2,25 <sup>d</sup>
PEEK	190 <sup>b</sup>	3,2 <sup>c</sup>

Tab. 2-1 Elektrische Durchschlagsfeldstärken und Dielektrizitätszahlen verschiedener Polymere [35], <sup>a</sup> VDE 0303, <sup>b</sup> IEC 60243-1, <sup>c</sup> IEC 60250 Frequenz = 1 MHz, <sup>d</sup> [36] IEC 60250 Frequenz < 10 kHz

## 2.2.9 Chemische Eigenschaften

Eine gute chemische Beständigkeit kann nicht nur im Hinblick auf den Analyten, sondern auch auf den in einem CE-Chip verwendeten Hintergrundelektrolyten notwendig sein (vgl. Kapitel 4.7.3).

Chemische Beständigkeit	PMMA	PC	PS	PI	PP	COC	PEEK
Schwache Mineralsäuren	+	+	+	+	+	+	+
Starke Mineralsäuren	-	0	0	+	+	+ <sup>1</sup>	-
Schwache org. Säuren	+	+	+	+	+	+	+
Starke org. Säuren	-	0	+	+	+	0 <sup>2</sup>	0
Oxidierende Säuren	-	-	0	-	0	+ <sup>3</sup>	-
Schwache Laugen	+	-	+	+	+	+	+
Starke Laugen	-	-	+	0	+	+ <sup>4</sup>	+
Aceton	-	-	-	0	+	+	+
Alkohole	-	0	+	+	+	+	+
Hydrolysebeständigkeit	-	-	0	+	+		+

Tab. 2-2 Chemische Beständigkeit verschiedener Polymere [35],  
für COC [36] <sup>1</sup>Salzsäure 36%, Schwefelsäure 40 %, <sup>2</sup>Essigsäure 99%  
(+), Ölsäure (-), <sup>3</sup>Salpetersäure 65%, <sup>4</sup>Natronlauge 50%, Ammoniak 33%

Polymer	Wasseraufnahme bei Normalklima [%]	Wasseraufnahme bei Wasserlagerung [%]
PMMA	0,6	2
PC	0,15	0,35
PS	< 0,1	< 0,1
PI (Polyetherimid PEI)	0,7	0,15
PP	< 0,1	< 0,1
COC	< 0,01 <sup>a</sup>	< 0,01 <sup>a</sup>
PEEK	< 0,1	0,5

Tab. 2-3 Wasseraufnahme verschiedener Polymere [35], ISO 62, <sup>a</sup>[36]

### 2.2.10 Thermische Eigenschaften

Die Glasübergangstemperaturen der Polymere sind für die Verbindungstechnik des thermischen Bondens (vgl. Kapitel 4.2) von Interesse. Hohe Temperaturen werden in der Medizintechnik z.B. zur Sterilisation eingesetzt. Durch eine hohe Wärmeleitfähigkeit kann die bei der CE entstehende störende Joulesche Wärme effizienter durch die Kapillarwand abgeführt werden.

Polymer	Glasübergangs- bzw. Schmelztemperaturen [°C]	Maximale kurzzeitige/dauernde Einsatztemperatur [°C]	Wärmeleitfähigkeit [W/Km]
PMMA	110	100 / 80	0,19
PC	148	140 / 125	0,21
PS	90	80 / 70	0,17
PI (Polyetherimid PEI)	217	200 / 170	0,24
PP	163	140 / 100	0,22
COC	80 <sup>a</sup>	75 <sup>b</sup> bis 170 <sup>c</sup>	0,16 <sup>d</sup>
PEEK	340	300 / 250	0,25

Tab. 2-4 Glasübergangs- bzw. Schmelztemperaturen (ISO 11357) und Wärmeleitfähigkeiten (DIN 52612) verschiedener Polymere [35],  
<sup>a</sup> [36] Typ 8007, <sup>b</sup> [36] Wärmeformbeständigkeit B (ISO 75) für Typ 8007,  
<sup>c</sup> [36] Wärmeformbeständigkeit B (ISO 75) für Typ 6017, <sup>d</sup> [36]

## 2.3 Mikrofertigung

### 2.3.1 Herstellung von Formeinsätzen

Zur kostengünstigen Massenproduktion mikrostrukturierter Polymerbauteile bietet sich die Abformung mit Formeinsätzen, in welche die inverse Struktur der Bauteile eingearbeitet ist, an.

#### 2.3.1.1 Mikrozerspanen

Ein kostengünstiges Verfahren zur Herstellung eines Formeinsatzes ist die Strukturierung durch Mikrozerspanen [37]. Mit Mikrofräsern aus Hartmetall oder Diamant lassen sich Abformwerkzeuge aus Metallen und Metalllegierungen (z.B. Messing) sowie formstabilen Kunststoffen (z.B. PEEK) und Keramiken strukturieren. Es lassen sich kleinste Strukturbreiten von wenigen 10  $\mu\text{m}$  bei einem Aspektverhältnis von freistehenden Einzelstrukturen von 3 bis 10 realisieren.

#### 2.3.1.2 LIGA-Verfahren

Formwerkzeuge mit Strukturen bis in den sub- $\mu\text{m}$ -Bereich (bis 0,1  $\mu\text{m}$ ) die hohe Aspektverhältnisse (Detailstrukturen bis 500) aufweisen können, lassen sich mit dem LIGA-Verfahren (**L**ithographie, **G**alvanoumformung und **A**bformung) herstellen. Das Verfahren wurde Ende der 1970er Jahren zur Herstellung von Trenndüsen zur Urananreicherung am Kernforschungszentrum Karlsruhe entwickelt und in den 1980er Jahren auf die Mikrosystemtechnik übertragen [38][39].

Bei diesem Verfahren wird ein Resist (z.B. PMMA), der sich auf einer elektrisch leitenden Substratschicht (Startschicht für die Galvanik) befindet, über eine Maske mit paralleler und energiereicher Röntgenstrahlung (Synchrotronstrahlung) mit einer Wellenlänge zwischen ca. 0,2 bis 0,6 nm belichtet. Die belichteten Bereiche werden mit einem Entwickler herausgelöst und galvanisch zum Beispiel mit Nickel, Gold oder Kupfer gefüllt, wodurch der Formeinsatz entsteht [40].

Bei geringeren Anforderungen kann der lithographische Schritt zur Kostenreduzierung mit UV-Strahlung, wie in der Halbleitertechnik, durchgeführt werden [41].

## 2.3.2 Replikationstechniken

### 2.3.2.1 Heißprägen

Beim Heißprägen [42] handelt es sich um einen Warmumformprozess. Das zu strukturierende Polymer liegt meist in Form einer Folie vor. Diese wird über ihre Glasübergangstemperatur hinaus erwärmt, sodass sie sich in einem viskoelastischen Zustand befindet. In diesem wird der Formeinsatz in die Polymerfolie gedrückt. Nach einer Abkühlung unter die Glasübergangstemperatur erfolgt die Entformung. Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen findet der Prägevorgang in der Regel in einer evakuierten Kammer statt.

Da bei diesem Prozess nur kurze Fließwege auftreten, können die Temperaturzyklen klein gehalten werden, was - im Vergleich zum Spritzgießen - zu einer geringeren Schrumpfung des Materials führt. Abformungen mit höheren Strukturgenauigkeiten und Aspektverhältnissen werden möglich. Im Vergleich zum Spritzgießen lässt sich der Heißprägeprozess einfacher realisieren. Nachteilig sind die langen Zykluszeiten und damit verbundenen hohen Kosten.

### 2.3.2.2 Spritzgießen

Beim Spritzgießen wird das Polymer meist in Form eines Granulates verarbeitet. Dieses wird aufgeschmolzen und unter hohem Druck in eine kalte evakuierte Form eingespritzt. Die Methode zeichnet sich durch sehr kurze Zykluszeiten aus und ist somit bei größeren Stückzahlen besonders günstig. Zur Replikation von Mikrokanalstrukturen wurde dieses Verfahren erstmals von Wissenschaftlern der Firma ACLARA (San Francisco, USA) verwendet [43] [13]. Weniger geeignet ist die Methode bei der Abformung von Strukturen mit hohem Aspektverhältnis. Um diese unbeschadet abformen zu können, müssen die Zykluszeiten verlängert werden (langsames Einspritzen, Heizen und Abkühlen der Form ist notwendig) [40].

Eine Abwandlung des Spritzgießens stellt das Spritzprägen dar, bei dem die Polymermasse drucklos in die Form eingespritzt wird. Diese ist dabei noch nicht vollständig geschlossen. Beim Schließen der Form erfolgt durch den Schließdruck die endgültige Abformung. Diese Technik wird bei der Herstellung von CD und DVD Datenträgern (Spurbreiten 0,5  $\mu\text{m}$  bzw. 0,25  $\mu\text{m}$ ) verwendet. Mit einer Maschine können  $\sim 15.000$  Stück pro Tag gefertigt werden. Die Kosten sind dabei sehr gering. Derzeit werden 1000 CDs (mehrschichtiger Aufbau) für einen Stückpreis von ca. € 0,30 angeboten (incl. Formwerkzeugherstellung), ab 10.000 Stück reduziert sich der Stückpreis auf ca. 0,20 €.

## 2.4 Detektion in Kapillaren

### 2.4.1 Optische Detektion

Durch die Verwendung von Quarzglaskapillaren wird eine optische On-Column-Detektion bei der Kapillarelektrophorese ermöglicht. Dabei wird die Kapillare mit Licht durchstrahlt. Dieses wird entweder vom Analyt absorbiert, der Analyt wird zur Fluoreszenz angeregt, oder es erfolgt eine indirekte Messung über die Absorption des Hintergrundelektrolyten.

Die Absorption  $A$  ist durch das Lambert-Beersche Gesetz definiert:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2.8)$$

wobei  $I_0$  die Anfangsintensität des Lichtes,  $I$  die transmittierte Intensität,  $\varepsilon$  der molare Extinktionskoeffizient,  $c$  die Konzentration der Probe und  $d$  der Lichtweg durch die Messzelle - bei der CE der Innendurchmesser der Kapillare - ist. Somit ist ein langer Lichtweg für eine empfindliche Messung vorteilhaft.

Bei der Detektion über die Absorption werden vorzugsweise UV-Detektoren eingesetzt, es wird zwischen Festwellen- (Anregung meist mit Quecksilberdampflampe), Variablen- (Anregung mit Deuteriumlampe bei einer Wellenlänge) und Photodiodenarray-Detektoren (Anregung mit Deuteriumlampe mit gesamtem Wellenlängenbereich) unterschieden.

Die Detektion über die Absorption wird am häufigsten für organische Moleküle eingesetzt, da diese meist im UV-Bereich ein Absorptionsmaximum aufweisen. Es werden Nachweisgrenzen im Bereich von  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  Mol erreicht [44]. Liegt im UV-Bereich keine oder eine zu schwache Absorption vor, so können bei einigen organischen Molekülen absorbierende Derivate erzeugt werden [45]. Ist dies nicht möglich, muss die Erfassung indirekt (schwächere Absorption als der Hintergrundelektrolyt) erfolgen, dieses Prinzip wird meist bei kleinen (anorganischen) Ionen angewandt [46] [47].

Fluoreszenzdetektoren regen entweder das Analytmolekül bzw. dessen Derivat selbst oder einen an das Analytmolekül angehefteten Marker (Labeln der Probe) zur Fluoreszenz an. Als Lichtquelle kann wiederum eine Lampe eingesetzt werden, die gewünschte Wellenlänge wird wie bei den UV-Detektoren über Filter oder Gitter dem Spektrum entnommen. Bei der laserinduzierten Fluoreszenz (LIF) wird als Lichtquelle ein Laser verwendet, welcher eine feste Wellenlänge besitzt. Durch die hohe



Leistungsdichte werden mit dieser Methode die kleinsten Nachweisgrenzen erzielt ( $10^{-13}$  Mol on-column) [48].

Im CE-Chip-Format wird wegen ihrer hohen Nachweisempfindlichkeit vorzugsweise die (laserinduzierte) Fluoreszenzdetektion angewandt [49]. Weiterhin wurden zahlreiche Methoden von der Chemilumineszenz und Elektrochemilumineszenz [50] bis hin zur Thermischen-Linsen-Spektroskopie [51] realisiert. Mit dieser Vielzahl von optischen Detektoren können hohe Nachweisempfindlichkeiten erreicht werden, dabei werden die Systeme und Methoden jedoch aufwendig und teuer.

## 2.4.2 Elektrochemische Detektion

Alternativ zur optischen Detektion haben sich auch elektrochemische Methoden etabliert. Deren wesentlich einfacherer Aufbau führt generell zu kostengünstigeren Systemen. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz beim Nachweis kleiner Ionen, da diese der optischen Detektion oft nur indirekt zugänglich sind und sich aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit ein großes Leitfähigkeitssignal ergibt. Auch können nichttransparente Kapillarmaterialien verwendet werden, die der optischen Detektion nicht zugänglich sind.

Potentiometrie, Amperometrie und Konduktometrie gelten als die drei grundsätzlichen Methoden der elektrochemischen Detektion [52].

*Potentiometrie* erfasst das von der Ionenkonzentration in der Lösung abhängige Potential an einer Grenzfläche ionenselektive Membran / Analytlösung gemäß der Nernstschen Gleichung:

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{z_e \cdot F} \cdot \ln \frac{c_{Ox.}}{c_{Red.}} \quad (2.9)$$

wobei  $E$  das Elektrodenpotential,  $E_0$  das Standardpotential,  $R$  die universelle Gaskonstante ( $8,314510 \frac{J}{mol \cdot K}$ ),  $T$  die Temperatur,  $z_e$  die Anzahl der übertragenen

Elektronen,  $F$  die Faradaykonstante ( $9,6485309 \cdot 10^4 \frac{C}{mol}$ ),  $c_{Ox.}$  die Konzentration der oxidierten Form und  $c_{Red.}$  die der reduzierten Form der am Redoxprozess beteiligten Spezies beschreibt.

*Amperometrie* basiert auf dem Faradayschen Gesetz, wonach der bei einer elektrochemischen Oxydation oder Reduktion an einer Arbeitselektrode gemessene Strom  $i_t$  proportional zur Anzahl von Spezies im Analyt ist:

$$i = \frac{\partial Q}{\partial t} = z \cdot F \frac{\partial N}{\partial t} \quad (2.10)$$

wobei  $Q$  die Ladung,  $t$  die Zeit,  $z$  die Anzahl der pro Analytmolekül übertragenen Ladungen und  $N$  die Anzahl der oxydierten oder reduzierten Moleküle ist. Die Faradaykonstante  $F$  lässt sich dabei auch über die Avogadro-Konstante  $N_A$  ( $6,0221367 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol}$ ) und die Elementarladung  $e$  ( $1,60217733 \cdot 10^{-19} C$ ) ausdrücken:

$$F = e \cdot N_A \quad (2.11)$$

*Konduktometrie* beruht auf der Messung der Leitfähigkeit zwischen Detektorelektroden, wobei faradaysche Reaktionen an den Elektroden durch Anwendung von Wechselstrom vermieden werden. Die Analytkonzentration ist dabei korreliert mit der Änderung der Leitfähigkeit gegenüber derjenigen des Hintergrundelektrolyten:

$$\sigma = \frac{A}{l} \cdot \sum_{i=1}^n \lambda_i \cdot c_i = \frac{1}{K_{zell}} \cdot \sum_{i=1}^n \lambda_i \cdot c_i \quad (2.12)$$

wobei  $\sigma$  die Leitfähigkeit der Lösung,  $A$  die Elektrodenfläche,  $l$  der Elektrodenabstand,  $\lambda_i$  die molare Leitfähigkeit,  $c_i$  die Ionenkonzentration und  $K_{zell}$  die Zellkonstante ist.

*Potentiometrische Detektion* wurde bisher zwar vielfach für die konventionelle CE angewandt [53]. Für Mikrochips sind bisher entsprechende Anwendungen zwar bekannt geworden [54] [55], jedoch nicht in Verbindung mit der CE, wobei die eng begrenzte Selektivität der Ionenselektiven Elektroden sicher ein wesentlicher Grund dafür ist.

Umfangreiche Anwendungen werden hingegen für amperometrische Detektion bei der Chip-CE beschrieben, besonders häufig für die Bestimmung von Neurotransmittern [56]. Aber auch für Saccharide wie Glucose [57], für die Bestimmung von Aminosäuren [58], Ascorbinsäure [59] und auch umweltrelevante Stickstoff-Verbindungen [60] ist die amperometrische Detektion verwendet worden. Vorteilhaft können dabei an Quarzglas kapillaren gewonnene Erfahrungen genutzt werden, etwa zur Art des Elektrodenmaterials, das Platin, Gold, Kupfer, Kohlenstoff oder entsprechende Siebdruckpasten umfasst, sowie zur optimalen Positionierung der Arbeitselektrode, die zumeist unmittelbar am Kapillarende angeordnet wird um so auch Einflüsse der CE-Hochspannung zu minimieren [61]. Wenn auch mit amperometrischer Detektion vereinzelt beeindruckende Ergebnisse erzielt worden sind, wie z. B. Nachweisgrenzen im Attomol-Bereich [62], so sind doch auch die Grenzen der Amperometrie klar zu sehen:

- Die Detektorherstellung ist aufwendig. Neben der Arbeitselektrode müssen noch eine Gegenelektrode und eine Referenzelektrode, die das elektrochemische Referenzpotential unabhängig von Analytzusammensetzung liefert, präpariert werden. Eine genaue Positionierung der Elektroden ist erforderlich, ebenso eine perfekte elektrische Isolierung, um Leckströme zu vermeiden.
- Ablagerungen von Lösungsbestandteilen und Produkten der Redoxreaktionen können die Elektrodenoberfläche kontaminieren und inaktiv werden lassen. Korrosion des Elektrodenmaterials und Unterwanderung der Elektrodenisolation durch den Elektrolyten stellen weitere Störung an der Grenzfläche Elektrode / Lösung dar.

Konduktometrische Messungen zur Detektion wurden erst vergleichsweise spät (etwa im Jahr 2000) in das Chipformat übertragen, wobei wohl die von Beginn an große Dominanz der optischen Verfahren für die besonders interessierenden bioanalytischen Anwendungen ausschlaggebend gewesen ist. Doch mit dem zunehmenden Interesse an der Bestimmung kleiner Ionen, die aufgrund ihrer großen Mobilität auch eine hohe Nachweisempfindlichkeit ermöglichen, finden sich auch in der Literatur Angaben zum Einsatz der Konduktometrie, zunächst mit direktem Kontakt zum Analyt in der Mikrokapillare.

Es wurden grundlegende Untersuchungen an Polymerchips und Polymer / Glas-Hybridchips mit integrierten Mikroelektroden durchgeführt, wobei insbesondere das Layout der Leitfähigkeitsmesszelle betrachtet wird [61][63]-[67]. Dessen Parameter (Elektrodenfläche, Elektrodenabstand, Elektrodenposition zum Trennkanal) beeinflussen die Messempfindlichkeit gemäß der Zellkonstanten in Gleichung 2.12 sowie das Auflösungsvermögen der bei der Trennung erhaltenen Analyt-Pfropfens. Nahe an die praktische Anwendung kommt dabei ein Messsystem zur Bestimmung von Ionen im Blut und in Trinkwasser [23], bei dem planare Platin-Mikroelektroden am Kapillarausgang in Glaschips integriert sind. Interessant ist ebenfalls die Detektion von Proteinen [68].

Bei allem Fortschritt dürfen aber die generellen Probleme der Leitfähigkeitsmessungen mit direktem Kontakt der Elektroden zur Lösung nicht außer Acht gelassen werden:

- Die genaue Positionierung der Elektroden zum Kanal ist schwierig bzw. aufwendig.
- Kontaminationen und / oder Biofouling der Elektrodenoberfläche beeinträchtigen die Elektrodenfunktion.

- Probleme bei der Haftung der Elektroden zum Substrat bzw. zur Isolatorschicht können zu Lösungsunterwanderungen und damit zu veränderter Elektrodenfläche führen.
- Wechselwirkungen mit der im Separationskanal wirkenden CE-Hochspannung sind störend, im Extremfall bewirken sie sogar die Bildung von Gasblasen.

### 2.4.3 Kontaktlose Leitfähigkeitsmessung (CCD)

Bei der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung (contactless conductivity detection, CCD) besteht kein nachteiliger galvanischer Kontakt zwischen den Elektroden und dem Elektrolyten, da diese durch die Detektionszellenwand vom Analyten getrennt sind. Der Signaltransfer zum Analyten erfolgt durch eine kapazitive Kopplung, sodass auch von der C<sup>4</sup>D (capacitively coupled contactless conductivity detection) gesprochen wird [69].

Die Grundlagen zur kontaktlosen Signalkopplung in eine Messzelle wurden bereits in den 1960er geschaffen [70]. Zu Beginn der 1980er wurde dieses Prinzip aufgegriffen und zur Detektion bei der Isotachophorese verwendet [71]. Ende der 1990er wurde diese Detektion erstmals von zwei unabhängigen Gruppen gleichzeitig bei der Kapillarelektrophorese eingesetzt [72][73]. Schließlich erfolgte in den letzten Jahren die Übertragung auf den Chip [74][75].

Wie bei der direkten Leitfähigkeitsmessung ist auch bei der CCD kein Labeln der Probe notwendig und es können Kapillarmaterialien eingesetzt werden, die der optischen Detektion nicht zugänglich sind (z. B. PEEK). Die Vermeidung elektrochemischer Prozesse an den Elektroden wie zum Beispiel der Elektrodenkorrosion und dem Biofouling führt zu reproduzierbaren Ergebnissen und einer unbegrenzten Einsatzdauer. Aufgrund des einfachen Funktionsprinzips lassen sich sehr kostengünstige und kleine CCD-Detektoren realisieren.

Ein Nachteil gegenüber der direkten Leitfähigkeitsmessung ist der zu erwartende Signal- und somit Empfindlichkeitsverlust der Messung durch die kapazitive Kopplung. Um diesen möglichst gering zu halten sind mehrere Einflussfaktoren zu beachten.

Zu grundsätzlichen Überlegungen kann ein vereinfachtes Ersatzschaltbild (siehe Abbildung 2.11) herangezogen werden. Das Kapillar- bzw. Kanalstück (CE-Chip) zwischen den beiden Elektroden bildet das eigentliche Messzellenvolumen.

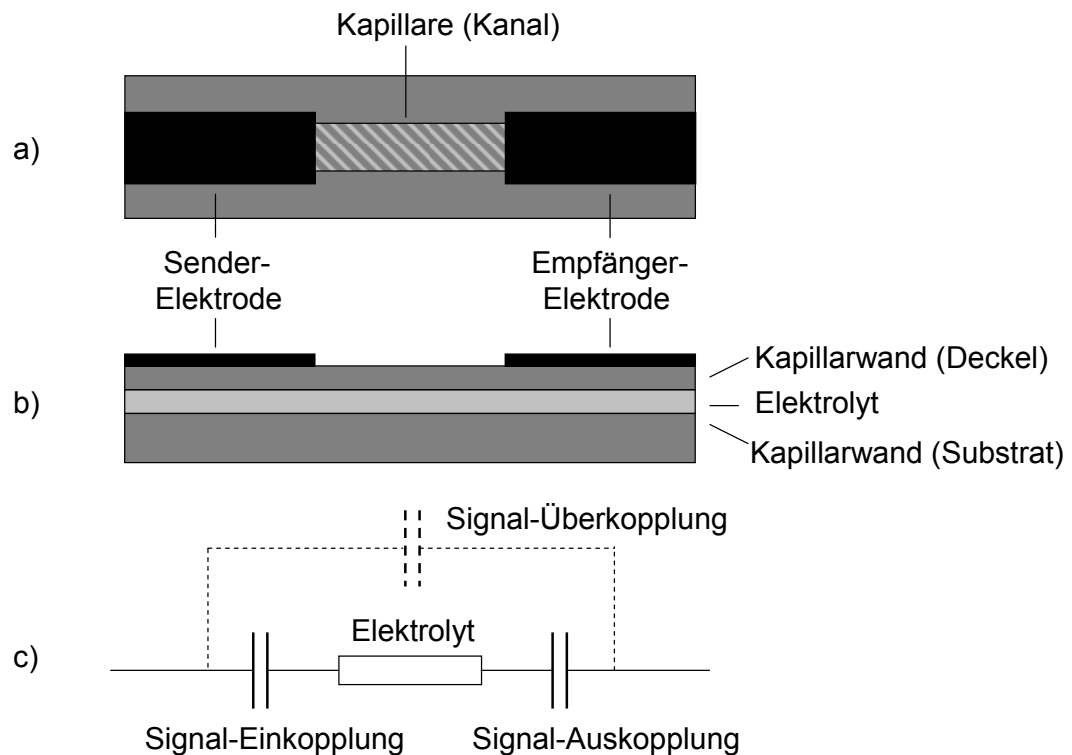


Abb. 2-11 CCD-Aufbau: a) Aufsicht, b) seitlicher Querschnitt, c) vereinfachtes Ersatzschaltbild

Die Leitfähigkeit  $G$  ist als reziproker Wert des Widerstandes  $R$  definiert:

$$G = \frac{1}{R} \quad (2.13)$$

Aus der Messzellegeometrie (Länge der Messzelle  $l$ ; Querschnitt der Messzelle  $A$ ) ergibt sich über die spezifische Leitfähigkeit  $\sigma$  des Analyten dessen Widerstand zu:

$$R = \frac{1}{\sigma} \cdot \frac{l}{A} \quad (2.14)$$

Gemessen werden soll der reale Widerstand  $R$  des Analyten; bei der Messung besitzt der Hintergrundelektrolyten bereits eine Grundleitfähigkeit, sodass eine Widerstandsänderung erfasst wird.

Da die Messung mit einem hochfrequenten Signal erfolgt, muss der Betrag der komplexen Impedanz  $|Z|$  betrachtet werden, der sich aus dem realen Widerstand  $R$  und einem imaginären kapazitiven Anteil  $X_c$  zusammensetzt:

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X_c^2} \quad (2.15)$$

Das Messsignal soll möglichst verlustfrei in die Kapillare ein- und am anderen Ende der Messzelle wieder ausgekoppelt werden. Hierzu wird ein hochfrequentes Signal verwendet, d.h. die CCD arbeitet nach dem „Sender- und Empfängerprinzip“. Durch die Kapillarwand (Dielektrikum) werden die Ein- und Auskoppelimpedanzen gebildet, die möglichst gering gehalten werden sollen.

Die komplexe Impedanz eines Kondensators berechnet sich wie folgt:

$$X_c = \frac{1}{j\omega C} \quad \text{mit } \omega = 2 \cdot \pi \cdot f \quad (f = \text{Frequenz}) \quad (2.16)$$

wobei die Kapazität  $C$  zwischen zwei Platten

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{A}{d} \quad (2.17)$$

$\varepsilon_0$  = elektrische Feldkonstante  $8,854 \cdot 10^{-12} \frac{As}{Vm}$

$\varepsilon_r$  = Dielektrizitätszahl

$A$  = Fläche der Kondensatorplatte

$d$  = Plattenabstand

ist.

Dies bedeutet, dass die Ein- und Auskoppelimpedanzen mit steigender Frequenz, einer Vergrößerung der Ein- und Auskoppelflächen und einer Reduzierung der Kapillarwanddicken sinken. Gleichzeitig ist eine hohe Dielektrizitätszahl des Kapillarwandmaterials von Vorteil.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass ein direktes Überkoppeln des Signals zwischen den Elektroden vermieden werden muss. Bei der Verwendung von Standardkapillaren (typ. Innendurchmesser 25  $\mu\text{m}$  bis 75  $\mu\text{m}$ , typ. Außendurchmesser  $\sim$  400  $\mu\text{m}$ ), ist die Geometrie der Elektroden in der Regel zylindrisch. Im einfachsten Fall können als Sende- und Empfangselektroden zwei Röhrchen über die Kapillare geschoben werden [72]. Zur Reduzierung eines Überkoppelns wird bei dieser Geometrie häufig eine zusätzliche Abschirmung zwischen den Elektroden eingefügt. Diese lässt sich einfach realisieren, indem die Kapillare zum Beispiel durch ein Loch in einem dünnen Blech geschoben wird [77].

Zahlreiche Arbeiten beschäftigten sich mit den optimalen Parametern - wie der Frequenz, Signalamplitude und Elektrodengeometrie - für die CCD bei runden

Kapillaren [76]-[81]. Dabei sind die verwendete Frequenz, Signalamplitude, Elektrodengeometrie (Länge, Abstand und ggf. Breite), Zellgeometrie, Verstärkerschaltung (Frequenzverhalten, Signalamplitude), Abschirmung, sowie die Leitfähigkeit des Analyten und Hintergrundelektrolyten stets zusammenhängend zu betrachten, da sonst widersprüchliche Aussagen entstehen können.

So führt zum Beispiel eine Erhöhung der Frequenz zu einer besseren Ein- und Auskopplung des Signals, gleichzeitig wird jedoch ein größerer Teil des Signals übergekoppelt. Der Betrag des übergekoppelten Signals hängt wiederum von der Elektroden- und Zellgeometrie, sowie der Abschirmung ab. Die Gewichtung der Ein- und Auskoppelimpedanzen ist von der Leitfähigkeit des Analyten- und Hintergrundelektrolyten abhängig. Weiterhin steigt mit zunehmender Frequenz der kapazitive Leitwertanteil des Analyten und des Hintergrundelektrolyten ( $\epsilon_r, \text{Wasser} = 81$ ), wohingegen im Idealfall nur der reale Widerstand des Analyten erfasst werden soll. Zusätzlich muß der Einfluss der Frequenz und der Messamplitude auf das Signal-Rausch-Verhalten des Verstärkers berücksichtigt werden, welches letztlich entscheidend ist.

Optimale Parameter können nur in Betrachtung aller Zusammenhänge und Rückwirkungen gefunden werden, wobei bei jeder Anwendung die einzelnen Parameter unterschiedlich stark variiert werden können. Zur Simulation wurden hierzu erweiterte Ersatzschaltbilder aufgestellt [82] (siehe Abbildung 2.12).

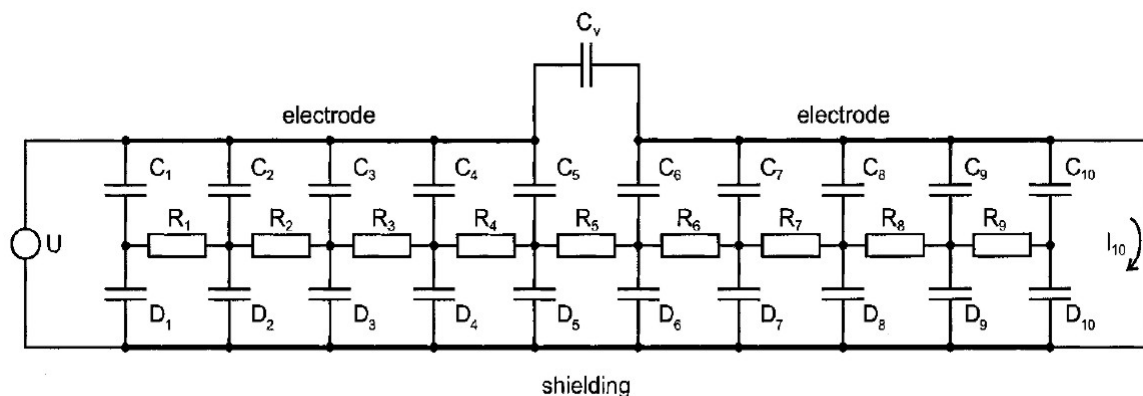


Abb. 2-12 Erweitertes Ersatzschaltbild einer CCD-Zelle [82]

#### 2.4.4 Impedanzspektroskopie

Die Impedanzspektroskopie wird zur Charakterisierung frequenzabhängiger Phänomene eingesetzt [83]. Ihr Einsatzgebiet reicht von der Untersuchung von

Energiespeichern wie Batterien [84] und Brennstoffzellen [85] über biologische Systeme [86] und Halbleiter [87] bis hin zu Korrosionseffekten [88].

Generell lässt sich die Impedanzspektroskopie auf jedes elektrisch zugängliche System anwenden. Dies bedeutet, dass sich aus gemessenen Impedanzspektren durch Reihen- und Parallelschaltungen von Teilimpedanzen Ersatzschaltbilder entwickeln lassen, und sich diese Teilimpedanzen physikalisch-chemischen Teilvorgängen im gemessenen System zuordnen lassen. Ein Kondensator kann zum Beispiel eine elektrochemische Doppelschicht darstellen.

Regt man ein elektrisches System mit einer harmonischen Wechselspannung

$$\underline{U} = U \cdot e^{j\omega t} \quad (2.18)$$

an, so antwortet es mit einem um den Phasenwinkel

$$\phi = \phi_I - \phi_U \quad (2.19)$$

verschobenen Wechselstrom

$$\underline{I} = I \cdot e^{j(\omega t + \phi)} \quad (2.20)$$

Daraus ergibt sich die komplexe Impedanz

$$\underline{Z} = \frac{U}{I} = |\underline{Z}| \cdot e^{j\phi} = \text{Re}\{\underline{Z}\} + j \text{Im}\{\underline{Z}\} \quad (2.21)$$

wobei sich der Betrag von Z und die Phase  $\phi$  wie folgt berechnen:

$$|\underline{Z}| = \sqrt{\text{Re}^2\{\underline{Z}\} + \text{Im}^2\{\underline{Z}\}} \quad (2.22)$$

$$\phi = \arctan \frac{\text{Im}\{\underline{Z}\}}{\text{Re}\{\underline{Z}\}} \quad (2.23)$$

Misst man die Impedanz über ein ganzes Frequenzband, so erhält man eine für das System charakteristische Frequenzkurve, das so genannte Impedanzspektrum. Dieses lässt sich in verschiedenen Formen darstellen. Eine dieser Darstellungsmöglichkeiten ist das Bodediagramm, bei dem der Betrag der Impedanz (logarithmisch) und die Phase (linear) über eine logarithmische Frequenzachse aufgetragen werden.



## 2.5 DNA

### 2.5.1 Struktur und Funktion

Aufbauend auf Röntgenstrukturanalysen von R. Franklin und M. Wilkins, erkannten J. D. Watson und F. Crick 1953 die Doppelhelix-Struktur der DNA [89][90].

Die Doppelhelix besitzt ein Phosphat-Zucker-Rückgrat (siehe Abbildung 2.13). Bei DNA (deoxyribonucleic acid) ist der Zucker die Desoxyribose, bei RNA (ribonucleic acid) - die zweite in Zellen vorkommende Nucleinsäure - ist es die Ribose.

Die Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin, durch welche die genetische Information kodiert ist, sind an die Zucker gebunden und befinden sich auf der Innenseite der Doppelhelix. Zur Beschreibung werden sie mit ihren Anfangsbuchstaben A, G, T, C abgekürzt.

A T und G C bilden jeweils gegenüberliegende Paare; somit besteht die DNA immer aus zwei komplementären Strängen. Diese sind über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden. A und T sind über zwei, G und C über drei Wasserstoffbrücken verbunden. RNA enthält anstelle von Thymin die Pyrimidinbase Uracil.

Die kleinsten Einheiten der DNA, bestehend aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat, sowie einer Purin- bzw. Pyrimidinbase, werden als Nucleotide bezeichnet und sind 0,34 nm lang. Aufgrund ihres Dipolmomentes sind die aufeinander folgenden Nucleotide um jeweils  $36^\circ$  zueinander versetzt angeordnet. Somit kommt es nach zehn Nucleotiden zu einer kompletten Windung der Helix. Der Durchmesser der DNA beträgt rund 2 nm [91].

Die genetische Information ist in der DNA über Triplets kodiert, d.h. drei Basen kodieren eine Aminosäure zur Synthese von Proteinen [92]. Proteine bestehen aus langen Ketten von Aminosäuren. In der Natur kommen in Proteinen 20 verschiedene Aminosäuren vor, welche auch als proteinogene Aminosäuren bezeichnet werden. Durch die hohe Anzahl an möglichen Kombinationen in der Reihenfolge der Aminosäuren kommt es zur Vielzahl der Proteine.

Die meisten Proteine bestehen aus 200 – 400 Aminosäuren, d.h. es sind durchschnittlich 600 – 1200 Nucleotide für die Kodierung eines Proteins notwendig. Diese Sequenz wird als Gen bezeichnet. Auf einem DNA Molekül sind in der Regel mehrere Proteine kodiert, sodass es zu langen Molekülen kommt, die in den Zellen meist in kompakter Form, den Chromosomen vorliegen.

RNA wird in der Zelle zum größten Teil zur Informationsübertragung eingesetzt. Sie kommt zum Beispiel bei der Proteinsynthese als messenger-RNA (mRNA) und transfer-RNA (tRNA) zum Einsatz.

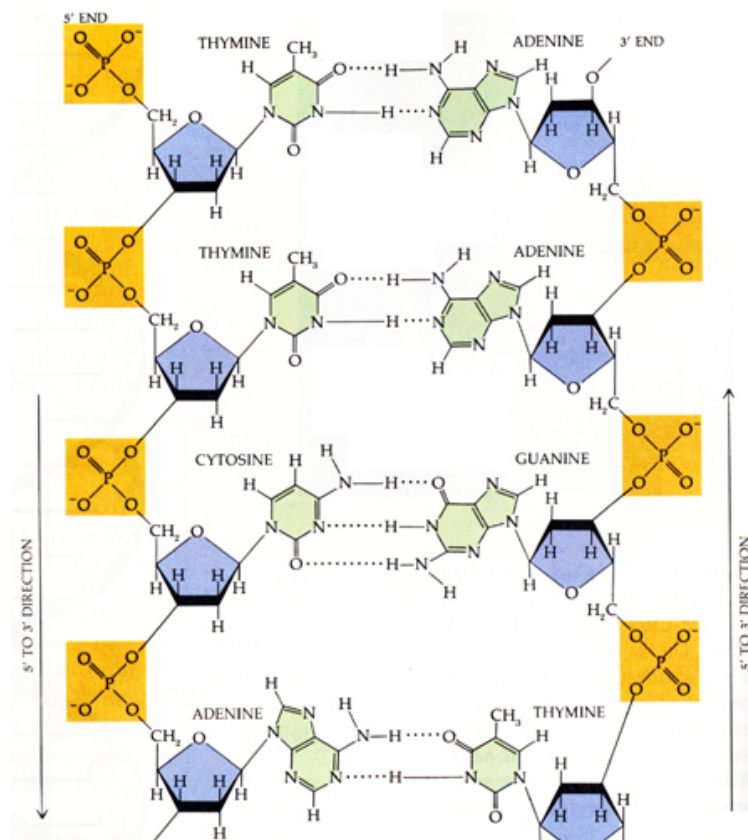


Abb. 2-13 Struktur des DNA-Moleküls [93]

## 2.5.2 Elektrische Eigenschaften

Die Angaben zum elektrischen Verhalten von DNA sind vielfältig [94]. Sie reichen von metallisch [95] [96] über halbleitend [97] und isolierend [98] bis hin zu supraleitend [99].

Diese unterschiedlichen Angaben lassen sich auf unterschiedliche Messbedingungen bei Untersuchungen des komplexen Moleküls zurückführen. Schon bei Messungen an direkt kontaktierten Molekülen können Unterschiede in den Messbedingungen zu unterschiedlichen Aussagen führen, sodass zur Klärung der Ladungstransportmechanismen grundlegende numerische Simulation über die Quantenchemie gewünscht werden, die jedoch am Rechenaufwand scheitern [100].

Als Ladungstransportmechanismus in DNA werden die Hopping-Leitung und das Tunneln favorisiert [101], dabei wird von einem Transport über die Basen und nicht über das Rückgrat ausgegangen [102]. So werden unterschiedliche Leitfähigkeiten bei unterschiedlichen Basenpaarsequenzen beobachtet [103]. In Anwesenheit von Luftfeuchtigkeit wurde eine Zunahme der Leitfähigkeit beobachtet. In diesem Fall wird über einen Ladungstransport mittels eines ionischen Protonentransportes absorbiertes Wassermoleküle am Rückgrat spekuliert [105].

Bei Untersuchungen von reiner DNA in Schichten wird unter Wechsellspannung eine starke Zunahme der Leitfähigkeit mit steigender Frequenz beobachtet [94]. Des Weiteren wird ein Anstieg der Leitfähigkeit mit der Temperatur und der angelegten Feldstärke beschrieben (Halbleiterverhalten wie bei Einzelmoleküluntersuchungen) [104]. Zusätzlich wird über eine Zunahme der Leitfähigkeit mit der Luftfeuchtigkeit berichtet.

### 2.5.3 Detektion

Die Analytik von DNA bzw. von DNA-Fragmenten ist von großer Bedeutung in der Genomik und zur Aufklärung von Krankheiten, wobei CE in Quarzglas kapillaren in so genannten Sequenzierautomaten durchgeführt wird [143] [144]. Die derzeit modernste Technik zur Detektion ist dabei die laserinduzierte Fluoreszenz (LIF). Bei dieser Methode muß die DNA mit Fluoreszenzmarkern gelabelt werden. Dies benötigt einen zusätzlichen Prozessschritt. Zudem ist das optische System sehr teuer. Deshalb werden Standard-DNA-Separationen immer noch mit Agarose- oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt [91]. Dabei müssen die Fragmente mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. Ethidiumbromid, welches als sehr giftig und mutagen eingestuft ist, gelabelt werden, um sie nach der Auftrennung unter UV-Licht sichtbar zu machen. Zusätzlich ist diese Methode sehr langsam; typische Trennungen dauern mehrere Stunden. Eine schnellere Alternative zur Agarose-Gelelektrophorese-Technik ist der Lab-on-a-Chip basierte Agilent 2100 Bioanalyser, der 1999 in den Markt eingeführt wurde [4] [145]. Dieses System benutzt ebenfalls die LIF, um die am Ende eines Mikrokanals separierten DNA Fragmente zu detektieren.

Bisher konnte sich keine Alternative zu diesen optischen Methoden etablieren. Auch zum Einsatz der CCD zur DNA-Analytik gibt es Vorbehalte:

- Die Konzentrationen der zu messenden DNA sind sehr gering. Typische "ready to use" DNA-Leitern werden mit einer DNA-Gesamtkonzentration von 0,1 µg/µl angeboten [146], d. h. die einzelnen DNA-Fragmente liegen in Bereich von wenigen ng/µl vor.
- Bei DNA erwartet man kleine CCD-Signale. Typische DNA-Fragmente mit 50 bis 10.000 Basenpaaren sind Makromoleküle mit Molmassen von

33.000 g/mol bis 6.600.000 g/mol. Die CCD wird aber bisher für kleine Ionen mit Molmassen bis ca. 200 g/mol eingesetzt.

- Messtechnisch kommt erschwerend hinzu, dass kleine Signaldifferenzen bei hoher Grundimpedanz in der Kapillare gemessen werden müssen.

## 3 Experimentelles

### 3.1 Polymercharakterisierung

#### 3.1.1 Verwendete Polymere

In Tabelle 3-1 sind die zur Herstellung der CE-Chips verwendeten Polymerfolien aufgeführt.

Polymer	Handelsname, Hersteller und Dicke der Deckfolien
PMMA	Chip: Plexiglas <sup>®</sup> 99530, Degussa AG <sup>1</sup> Deckfolie: Plexiglas <sup>®</sup> 99845, Degussa AG <sup>1</sup> , 40 µm
PS	Chip: Polyflex <sup>®</sup> 110, Sidaplast <sup>2</sup> Deckfolie: ST311025, Goodfellow <sup>3</sup> , 25 µm Polyflex <sup>®</sup> 0530, Sidaplast <sup>2</sup> , 75 µm
PC	Chip: Makrolon <sup>®</sup> 281, Bayer AG <sup>4</sup> Deckfolie: Europlex <sup>®</sup> PC99506, Degussa AG <sup>1</sup> , 50 µm
PP	Chip: PP301460, Goodfellow <sup>3</sup> Deckfolie: PP301150, Goodfellow <sup>3</sup> , 15 µm
COC	Chip: Topas <sup>®</sup> 8007, Ticona <sup>5</sup> Deckfolie: Topas <sup>®</sup> 8007, Ticona <sup>5</sup> , 90 µm
PEEK	Chip: Lite K, Lipp-Terler <sup>6</sup> Deckfolie: Lite TK, Lipp-Terler <sup>6</sup> , 15 µm, 25 µm

<sup>1</sup> Degussa AG (Düsseldorf, Deutschland)

<sup>2</sup> Sidaplast (Northampton, Großbritannien)

<sup>3</sup> Goodfellow GmbH (Bad Nauheim, Deutschland)

<sup>4</sup> Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)

<sup>5</sup> Ticona GmbH (Kelsterbach, Deutschland)

<sup>6</sup> Lipp-Terler GmbH (Gafenz, Österreich)

Tab. 3-1 Verwendete Polymere und Dicke der Deckel-Folien

### **3.1.2 Kontaktwinkelmessungen**

Der Kontaktwinkel ist der Winkel, den eine an einem Flüssigkeitstropfen angelegte Tangente im Kontaktpunkt zur Oberfläche eines Festkörpers, auf der der Flüssigkeitstropfen aufliegt, bildet. Je kleiner der Kontaktwinkel ist, desto besser ist die Benetzbarkeit.

Die Bestimmung der Kontaktwinkel wurde am Institut für biologische Grenzflächen (IBG) des Forschungszentrums Karlsruhe mit einem Messgerät des Typs Contact Angle System OCA von DataPhysics (Filderstadt, Deutschland) durchgeführt. Das Kontaktwinkelmessgerät besteht aus einem Probentisch, einem Mikroskop mit einer Skala zur Messung des Winkels, und einer Spritze zur präzisen Dosierung des Flüssigkeitstropfens. Als Testflüssigkeit wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Über die Spritze wird das Volumen eines auf die Probe aufgetragenen Wassertropfens so lange erhöht, bis dieser seinen maximalen Kontaktwinkel zeigt, bevor der Rand des Tropfens zu fließen beginnt. Dieser maximale Kontaktwinkel wird als fortschreitender (advancing) Kontaktwinkel bezeichnet. Danach wird das Volumen des Wassertropfens mittels der Spritze wieder verkleinert bis sich der minimale Kontaktwinkel einstellt, bevor der Rand des Tropfens zur Mitte fließt. Dieser Winkel wird als rückschreitender (receding) Kontaktwinkel bezeichnet.

Für die Aussage über die Benetzbarkeit der Probenoberfläche wird meist nur der Advancing-Kontaktwinkel angegeben. Der Receding-Kontaktwinkel ist von Interesse, wenn über die Kontaktwinkelhysterese weitere Schlüsse über die Oberflächeneigenschaften gezogen werden sollen. Im theoretischen Idealfall liegt keine Hysterese vor, das Vorhandensein einer Hysterese kann auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Die Hauptursachen sind in der Oberflächenrauigkeit, Inhomogenität oder Verunreinigung der Festkörperoberfläche, sowie einer Anlagerung in der Testlösung gelöster Substanzen auf der Festkörperoberfläche begründet.

### **3.1.3 Oberflächenladungsdichtemessung**

Polymere besitzen in der Regel negative Oberflächenladungen, welche in direktem Zusammenhang mit dem elektroosmotischen Fluss stehen.

Das Verfahren, das zur Bestimmung der Oberflächenladungsdichte eingesetzt wurde, beruht auf der Anlagerung eines entgegengesetzt geladenen Farbstoffes an die Oberfläche der Probe, dessen Menge nach einer anschließenden Ablösung mit einem definierten Volumen Desorptionslösung über Extinktion bestimmt wird [106]. Die Extinktion ist ein Maß für die Absorptionskapazität eines Stoffes bei einer

gegebenen Wellenlänge. Als Farbstoff wurde Kristallviolett verwendet, welches eine hohe Absorption im Gelblichtbereich (ca. 550-600nm) aufweist. Die Bestimmung der Extinktion kann somit mit einem UV/VIS-Spektrometer durchgeführt werden.

Die Proben wurden in einer 1 mM Kristallviolettlösung gefärbt. Um eine Sättigung der Adsorption des Farbstoffs an der Probenoberfläche zu erreichen, wurden die Probe mindestens 5 Minuten in der Lösung gelassen. Der nicht adsorbierte Farbstoff wurde durch zwei Spülvorgänge in Wasser entfernt. Als Desorptionslösung wurde 80% Ethanol + 20% HCl verwendet. Die Messung der Extinktion der Desorptionslösung erfolgte bei einer Wellenlänge von 591 nm mit einem UV/VIS-Spektrometer des Typs Lambda 20 von Perkin Elmer (Wellesley, USA) am Institut für biologische Grenzflächen des Forschungszentrums Karlsruhe.

## 3.2 Chipherstellung

### 3.2.1 Herstellung von Formeinsätzen

Die zur Abformung der CE-Chips aus verschiedenen Polymeren benötigten Formeinsätze wurden am Institut für Mikroverfahrenstechnik (IMVT) des Forschungszentrums Karlsruhe durch Mikrozerspanung hergestellt. Als Material kam dabei sowohl Messing als auch CuBeCo (siehe Abbildung 3-2) zum Einsatz (vgl. Kapitel 4.3).

Die am häufigsten eingesetzte Chipgeometrie (Standardgeometrie) ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Die Kanäle besitzen einen quadratischen Querschnitt von  $50\ \mu\text{m} \cdot 50\ \mu\text{m}$ , die Reservoirs weisen einen Durchmesser von 2 mm auf.

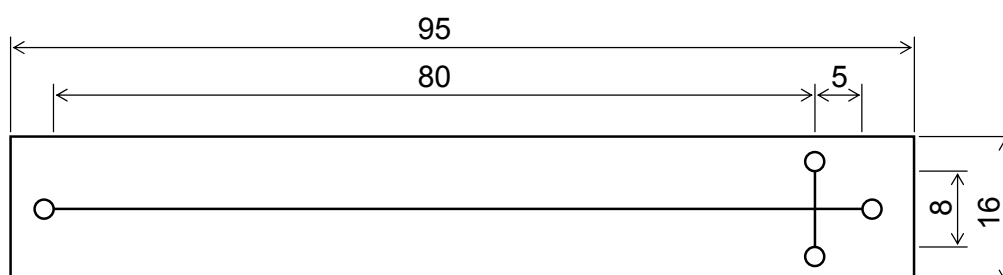


Abb. 3-1 Geometrie des CE-Chips

Abbildung 3-2 zeigt einen Formeinsatz aus CuBeCo. In der Mitte des Werkzeuges befindet sich die inverse Standardgeometrie. Bei den anderen beiden Strukturen handelt es sich um Teststrukturen (vgl. Kapitel 4.3 und 4.5). Die Struktur im oberen

Bildbereich besitzt eine Verengung im Detektionsbereich über die Länge von einem halben Millimeter auf  $30\ \mu\text{m} \cdot 30\ \mu\text{m}$  (hier nicht zu erkennen, siehe Abbildung 3-5), die Struktur im unteren Bildbereich einen rund 2,5 mal längeren Trennkanal, wobei die Kanalbreite in den Wendebereichen auf  $30\ \mu\text{m}$  reduziert wurde.

Zur Positionierung von Sputtermasken, die zum Aufbringen von CCD-Elektroden im Detektions- und Injektionsbereich verwendet werden, werden zusätzlich je zwei Löcher mit einem Durchmesser von 1,5 mm in den Chip geprägt. Die inversen Strukturen hierzu sind in Abbildung 3-3, in der der Injektionskreuzungsbereich vergrößert abgebildet ist, deutlich zu erkennen.

Im Injektionskreuzungsbereich entstehen bei der Mikrozerspanung fertigungsbedingt abgerundete Ecken (siehe Abbildung 3-4).

Für die in Kapitel 4.6 beschriebenen Untersuchungen benötigten CE-Chips mit  $90^\circ$  Ecken im Injektionskreuzungsbereichen wurde auf Chips zurückgegriffen, die mit einem am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) (Forschungszentrum Karlsruhe) durch UV-LIGA hergestellten Formeinsatz abgeformt wurden. Abbildung 3-6 zeigt das Formwerkzeug. Die leichte Abrundung der  $90^\circ$  Ecken dient einer verbesserten Abformung und ist nicht technologisch bedingt.

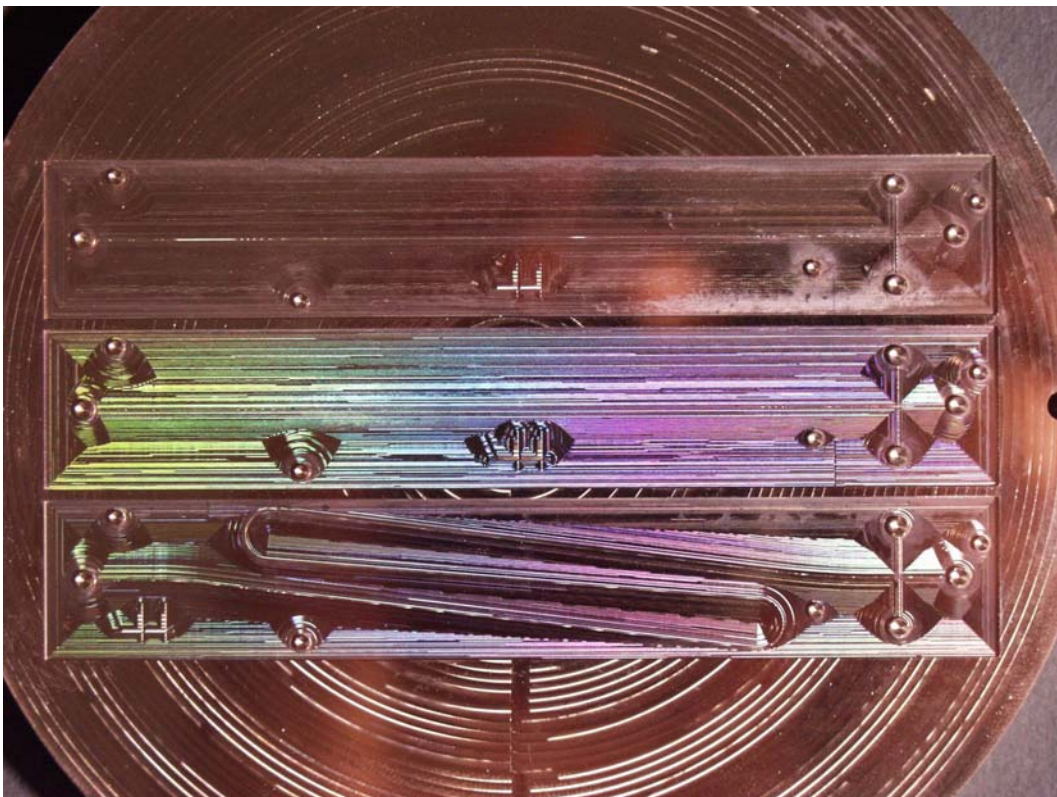


Abb. 3-2 Durch Mikrozerspanung hergestellter Formeinsatz aus CuBeCo





Abb. 3-3 Formeinsatz aus CuBeCo im Injektionskreuzungsbereich

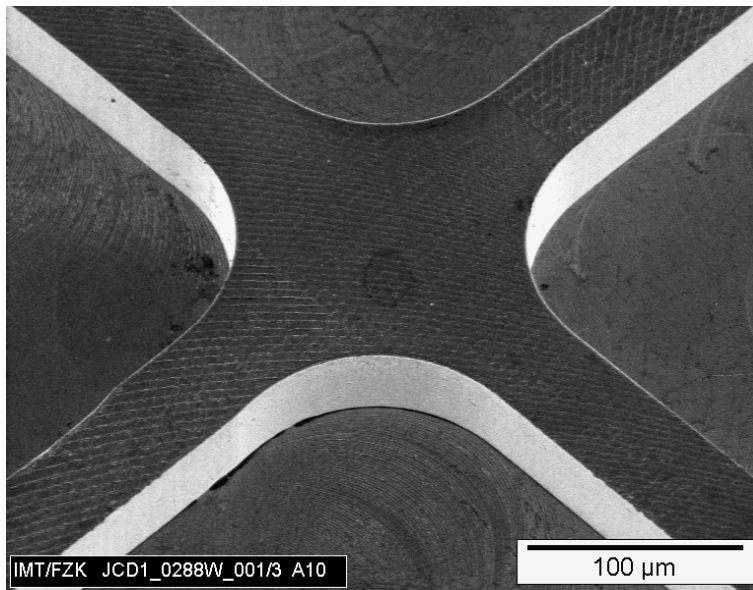


Abb. 3-4 REM-Aufnahme: Formeinsatz aus CuBeCo im Injektionskreuzungsbereich

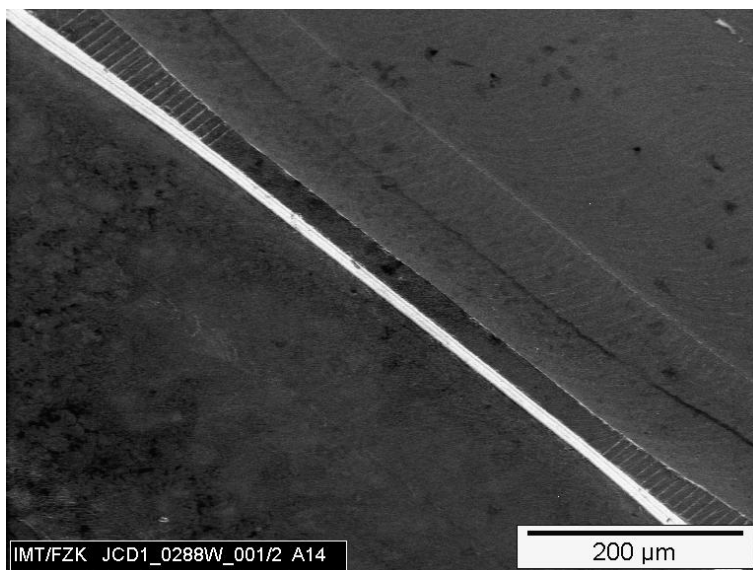


Abb. 3-5 REM-Aufnahme: Formeinsatz aus CuBeCo; Reduzierung des Kanalquerschnitts im Detektionsbereich

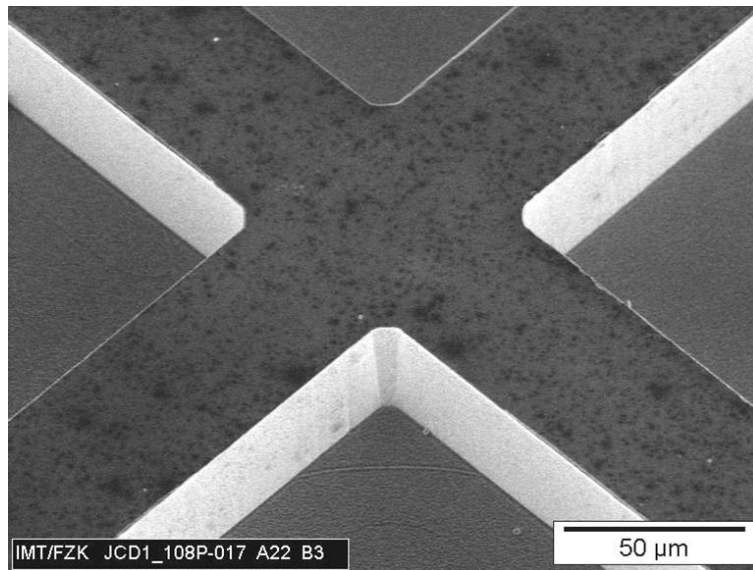


Abb. 3-6 REM-Aufnahme: Durch UV-LIGA hergestellter Formeinsatz im Injektionskreuzungsbereich

Zur Abformung von PEEK wurde ein Messingformeinsatz mit Wolframdisulfid bei Dicronite® (Dicronite U.T.E. Pohl GmbH, Iserlohn, Deutschland) beschichtet (vgl. Kapitel 4.3). In Abbildung 3-7 erkennt man die Beschichtung des Formwerkzeuges im Bereich der CE-Chips.

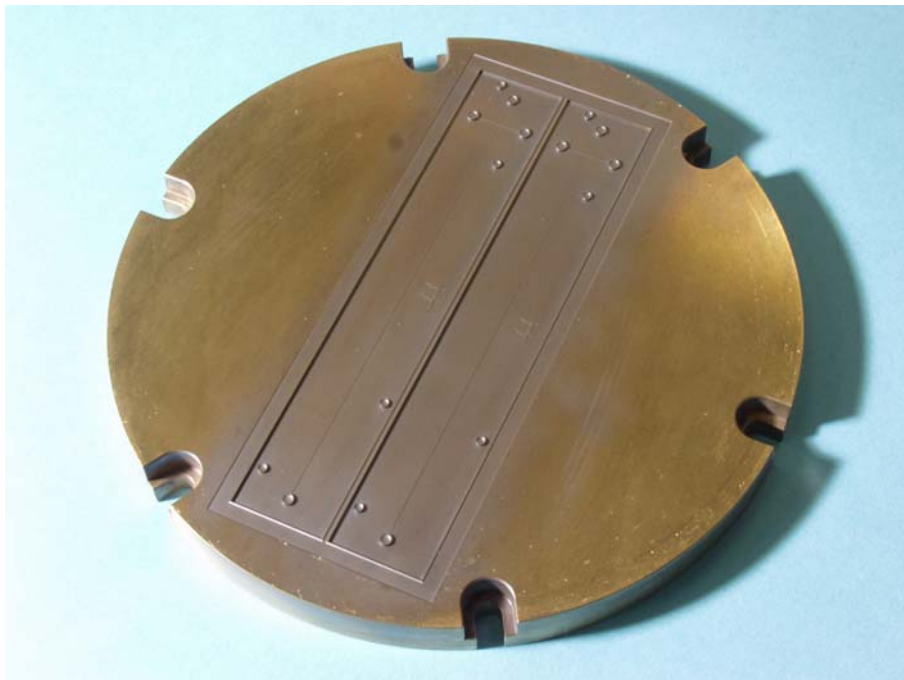


Abb. 3-7 Mit Wolframdisulfid beschichteter Formeinsatz aus Messing

### 3.2.2 Abformung durch Heißprägen

Die Abformung der CE-Chips aus den Polymeren PMMA, PS, PC, COC, PP und PEEK erfolgte am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des Forschungszentrums Karlsruhe durch Vakuumheißprägen mit der Anlage HEX03et des Herstellers Jenoptik Mikrotechnik GmbH.

Abbildung 3-8 zeigt den Injektionskreuzungsbereich eines abgeformten CE-Chips aus COC; im Kanal ist eine gute Oberflächenqualität zu erkennen. Abbildung 3-9 zeigt den Übergang eines Kanals in ein Reservoir. Die Befüllung des Reservoirs erfolgt bei den fertigen CE-Chips (Struktur mit Folie gedeckelt) von der gegenüberliegenden Seite. Die verbleibende Restschicht (Boden des Reservoirs in Abbildung 3-9) lässt sich einfach durchstoßen.

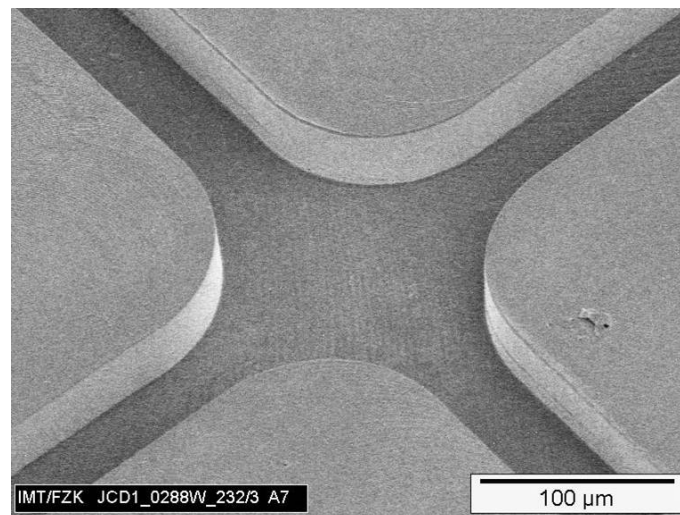


Abb. 3-8 REM-Aufnahme: Injektionskreuzungsbereich eines in COC abgeformten CE-Chips

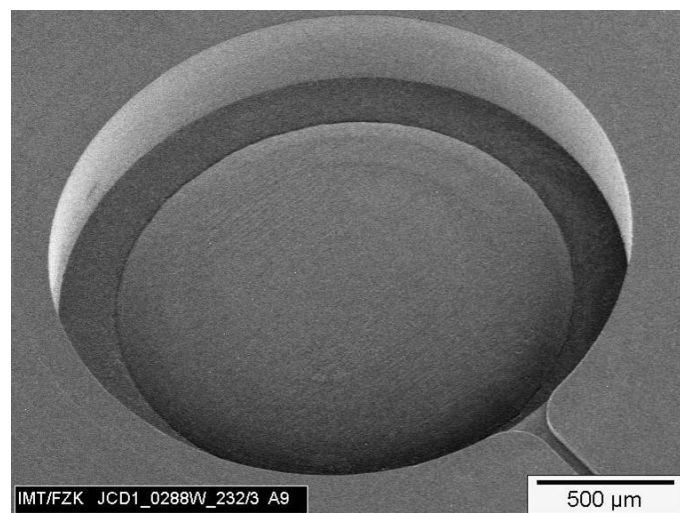


Abb. 3-9 REM-Aufnahme: Reservoirbereich eines in COC abgeformten CE-Chips

### 3.2.3 Verbindungstechnik

Die Vorbehandlungen zum plasmaunterstützten thermischen Bonden (Kapitel 4.2) wurden am Institut für biologische Grenzflächen des Forschungszentrums Karlsruhe mit einer Plasmaanlage vom Typ AMR 80 (Plasma Technology, Bristol, UK) durchgeführt. Der Prozessdruck betrug 200 Torr (26664 Pa), die Generatorleistung 240 W, der Massenfluss der Prozessgase 50 sccm und die Prozesszeit 10 Minuten.

Das thermische Bonden zur Herstellung der Zugversuchsproben und zum Deckeln der Chips mit dünnen Folien wurde mit einer Heißpresse (LAT 6.0, Bürkle GmbH, Freudenstadt, Deutschland) am IMT durchgeführt.

Die Zugversuche wurden mit einer Universalprüfmaschine vom Typ Instron 4505 (Instron GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Proben mit einer Fläche von 2 cm · 2 cm hergestellt. Als kritisch erwies sich die Verbindung zwischen Probenhalter (Zylinder die auf die beiden Seiten der Probe aufgeklebt werden) und Probe. Beste Verbindungen zwischen den Probenhaltern und der Probe konnten erreicht werden, indem sowohl die Oberfläche der Probenhalter als auch die der Proben durch Sandstrahlen mit Edelmetall (60-120 µm) aufgeraut wurden. Als geeigneter Klebstoff erwies sich DELO-CA<sup>®</sup> 2153 (DELO Industrie Klebstoffe, Landsberg, Deutschland).

### 3.2.4 Aufbringen der CCD-Elektroden

Die CCD-Elektroden wurden durch Sputtern über Schattenmasken (siehe Abbildung 3-10) aufgebracht. Diese wurden durch einen nasschemischen Ätzprozess hergestellt (Ätztechnik Herz, Epfendorf, Deutschland). Die Positionierung der Masken auf dem Chip erfolgte über Positionierungsstifte. Hierzu wurden eine Halterung entworfen, bei der starke Permanentmagnete (NdFeB-Magnete, IBS Magnet, Berlin) unter dem Chip die Stahlmasken anziehen, wodurch der Luftspalt zwischen Maske und Chip gering gehalten wird. Dadurch ist eine scharfe Abbildung der Elektroden möglich. Abbildung 3-11 zeigt diese Halterung mit eingebautem Chip. Das Sputtern erfolgte in einer Anlage des Typs SCD 040 der Firma Balzers Union (Balzers, Lichtenstein). Als Prozessgas wurde Argon verwendet, der Prozessdruck betrug 0,05 bar. Es wurde mit Beschichtungsraten von 6 nm/min ( $I = 15\text{mA}$ ) und 16 nm/min ( $I = 30\text{ mA}$ ) gearbeitet, um bei Gold Schichtdicken von 500 nm zu erzielen.

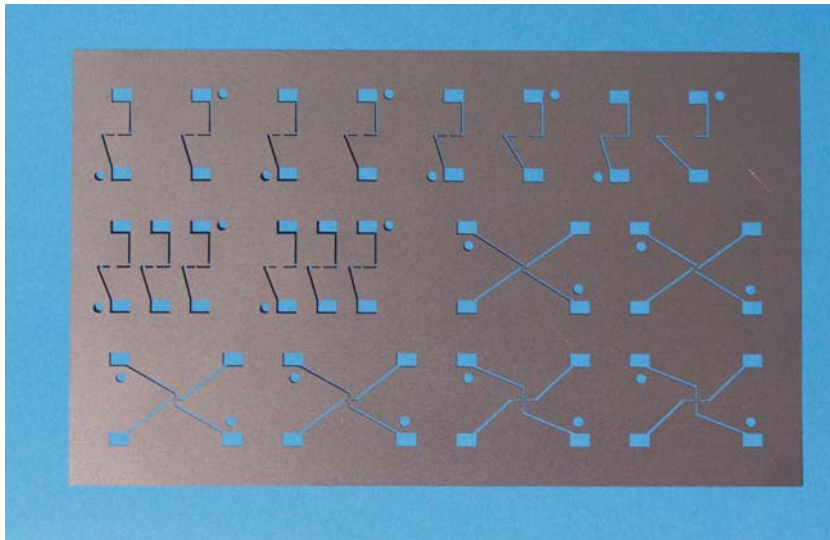


Abb. 3-10 Schattenmaskensatz

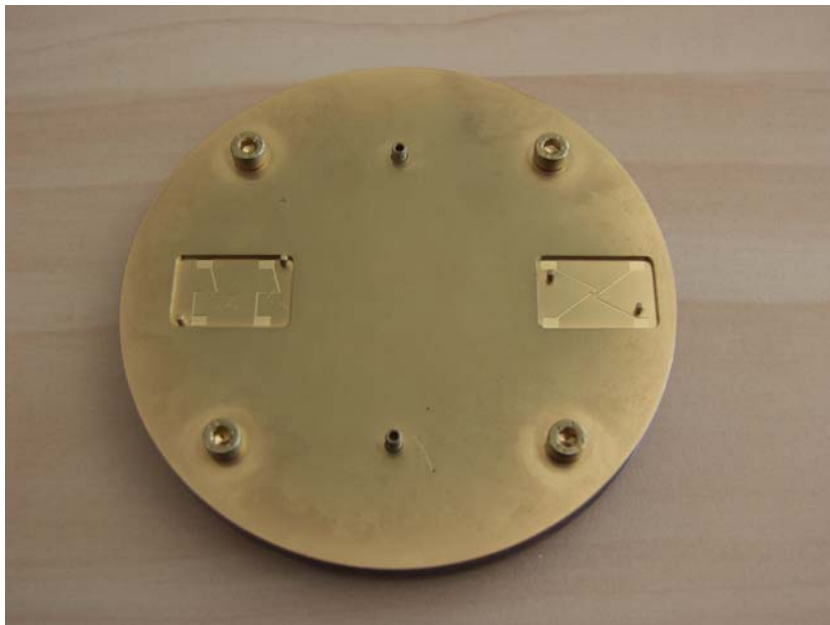


Abb. 3-11 Maskenhalterung mit eingebautem CE-Chip

### 3.2.5 Charakterisierung durch mikroskopische Untersuchungen

Zur Charakterisierung und Dokumentation der Herstellungsschritte der CE-Chips wurden Lichtmikroskope (Leica INM 20, Leitz Aristomet), ein Rasterelektronenmikroskop (JEOL 6600) und ein Rasterkraftmikroskop (Digital Instruments Dimension 3100) eingesetzt.



### 3.2.6 Aufbringen der Reservoirstrukturen

Da die Dicke der Chips nur rund 0,5 mm beträgt sind die Reservoirvolumina sehr klein ( $< 2 \mu\text{l}$ ). Um mit einfach handhabbaren Lösungsvolumina arbeiten zu können, wurden deshalb die Reservoirs durch Aufkleben von Reservoirstrukturen vergrößert. Es wurden 10 mm hohe Blöcke aus PMMA verwendet, die runde Reservoirs mit einem Durchmesser von 4 mm enthalten. Die Reservoirs wurden mit einem UV aushärtenden Klebstoff (DYMAX<sup>®</sup> 191-M, DYMAX GmbH, Frankfurt, Deutschland) aufgebracht. Abbildung 3-12 zeigt einen CE-Chip mit aufgeklebter Reservoirstruktur.



Abb. 3-12 CE-Chip aus PMMA mit Reservoirstruktur

Auf CE-Chips aus PEEK wurden 6 mm hohe Reservoirstrukturen aus dem gleichen Polymer aufgebracht. Zum Aufkleben der Reservoirs aus PEEK wurde Epo-Tek<sup>®</sup> 353ND (Epoxy Technology, Billerica, USA) verwendet, welcher 20 Minuten bei 120 °C ausgehärtet wurde.

### 3.2.7 Laserstrukturierte Polyimid-Chips

In einer Kooperation wurden von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) CE-Chips aus Polyimid durch Laserablation hergestellt. Durch seine hohe optische Absorption (vgl. Abbildung 3-13) lässt sich das Polymer gut laserstrukturieren. Es wurden sowohl Chips eingesetzt, die durch Laserschneiden (vgl. Abbildung 3-14) als auch durch Lasergravieren (vgl. Abbildung 3-15) hergestellt wurden. Durch das Laserschneiden werden senkrechte Kanalseitenwände erzielt, wohingegen beim Lasergravieren ein abgerundetes Kanalprofil entsteht.



Abb. 3-13 Polyimid-CE-Chip mit aufgesputterten CCD-Elektroden

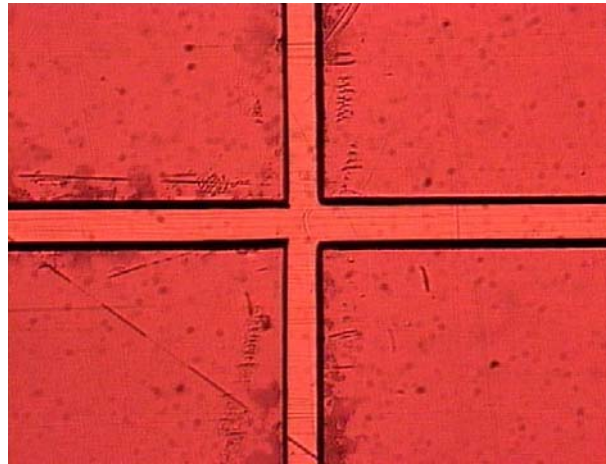


Abb. 3-14 Injektionskreuzungsbereich: Polyimid-CE-Chip, lasergeschnitten, Lichtmikroskop, Vergrößerung: 200 x

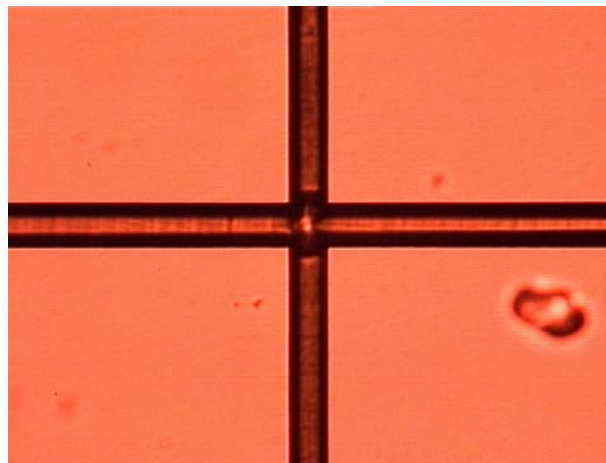


Abb. 3-15 Injektionskreuzungsbereich: Polyimid-CE-Chip, lasergraviert, Lichtmikroskop, Vergrößerung: 200 x

### **3.3 Aufbau eines CE-CCD-Messplatzes**

#### **3.3.1 Flexible Hochspannungssteuereinheit mit Prozessdatendarstellung und -aufzeichnung**

Neben der Herstellung von CE-Chips war es notwendig, einen geeigneten mikrofluidischen Versuchsplatz aufzubauen. Die Hochspannungseinheit sollte nicht nur die Spannungen für die elektrokinetische Injektion und Trennung von Kationen und Anionen (vgl. Kapitel 4.7) bereitstellen, sondern auch umfangreichere Untersuchungen zum Beispiel zur Injektion (vgl. Kapitel 4.6) ermöglichen. Sie sollte so flexibel gestaltet werden, dass sie auch für zukünftige Arbeiten eingesetzt werden kann. Darüber hinaus sind zur Kontrolle und für grundlegende Untersuchungen die im System fließenden Ströme von Interesse.

Die maximale Flexibilität wird dadurch erreicht, dass an jede Hochspannungselektrode des CE-Chips (Analyt-Reservoir, Analyt-Waste-Reservoir, Puffer-Reservoir, Puffer-Waste-Reservoir) ein beliebiges Potential von -6,5 kV bis +6,5 kV angelegt, die Elektrode auf Masse (ground) oder vom Potential getrennt (floating) geschaltet werden kann. Hierzu wird für jede Elektrode eine positive und eine negative Hochspannungsquelle (HCE 7 6500, F.u.G. Elektronik GmbH, Rosenheim, Deutschland) benötigt. Die Verbindung der Elektroden mit der jeweiligen Quelle oder mit Masse erfolgt über Hochspannungsreedrelais. Diese sind so ausgelegt, dass sie auch unter Spannung geschaltet werden können. Die Einstellung der Spannungen der Quellen erfolgt über Steuerspannungen von 0 bis 10 Volt. Diese werden für die Injektionsquellen von einer 16 Bit Multi-I/O-Karte (ME-4600, Meilhaus Electronic GmbH, Puchheim, Deutschland) erzeugt, für die Trennquellen wird eine 12 Bit D/A-Wandler-Karte (ME-1600, Meilhaus Electronic GmbH, Puchheim, Deutschland) verwendet. Die Quellen besitzen einen Strommonitorausgang, der eine dem Strom proportionale Spannung von 0 bis 10 Volt ausgibt. Diese Spannungen werden ebenfalls von der 16 Bit Multi-I/O-Karte eingelesen.

Abbildung 3-16 zeigt die Hochspannungseinheit. Links erkennt man die Hochspannungsquellen, rechts die Hochspannungsanschlüsse für die vier Elektroden. Die Verbindung mit den PC-Karten erfolgt auf der Rückseite. Der Aufbau erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Prozessdatenverarbeitung und Elektronik (IPE) des Forschungszentrums Karlsruhe.

Das Konzept für die Software setzt wiederum auf maximale Flexibilität. Dennoch sollte die Softwareoberfläche überschaubar bleiben. Abbildung 3-17 zeigt den Aufbau der Softwareoberfläche. Die Einstellung von bis zu sechs Prozessschritten, wie zum Beispiel der Injektion und Separation, erfolgt im linken oberen Block. Hierzu wird die Startzeit und Dauer des Prozesses eingeben. Zusätzlich wird festgelegt, in



welchem Prozess die Aufzeichnung des CCD Messsignals (zweiter PC) gestartet werden soll. Nach der Wahl der Anzahl der Wiederholungen der gesamten Prozesskette und dem Start wird der jeweilig aktive Prozessschritt und dessen Fortschritt angezeigt. Im rechten oberen Block wird für jede Elektrode festgelegt, auf welchem Potential sie im jeweiligen Prozessschritt liegen soll. Im unteren Teil werden auf der linken Seite die Ströme an den beiden Injektionselektroden und auf der rechten Seite die Ströme an den beiden Trennelektroden dargestellt. Diese können zusätzlich automatisch abgespeichert werden. Weitere Vorgaben, wie Schutzeinstellungen, können im Hintergrund vorgenommen werden und sind dem regulären Benutzer nicht zugänglich. Die Programmierung der Software in LabView<sup>®</sup> (National Instruments) wurde vom IPE übernommen.



Abb. 3-16 Hochspannungseinheit



Abb. 3-17 Aufbau der Softwareoberfläche

### 3.3.2 CCD-Messplatz

Der CE-CCD-Messplatz sollte wiederum möglichst flexibel gestaltet sein. Es wurde ein Messplatz aufgebaut, bei dem Messungen an vier Stellen des Chips möglich sind. Neben der eigentlichen Detektion am Ende des Tennkanals gibt es die Möglichkeit für eine Referenzmessung, die eingesetzt werden kann, wenn z.B. im Detektionsbereich eine Geometrieänderung der Messelektroden oder Messzelle durchgeführt wird. Zusätzlich kann an zwei Stellen im Injektionskreuzungsbereich gemessen werden um zum Beispiel grundlegende Untersuchung zur Injektion durchzuführen oder um diese zu überwachen und zu steuern (siehe Kapitel 4.6).

Abbildung 3-18 zeigt den Versuchsaufbau. Die Zuführung der Hochspannung erfolgt von oben über Platinstifte, die in die Reservoirs des Chips eintauchen. Der Chip liegt auf einer isolierenden Platte auf, die CCD-Elektroden werden von unten über Federkontaktstifte mit der CCD-Elektronik, den Sender- und Empfängermodulen verbunden. Diese befinden sich in kleinen abgeschirmten Metallboxen. Über Hochfrequenz- (HF-) Stecker lassen sich die Module an den vier verschiedenen Messpunkten installieren. Die Kontaktstifte mit den HF-Buchsen befinden sich in abgeschirmten Kammern. Beim Aufbau wurde auf eine gute HF-Abschirmung und eine Reduzierung der Signalverluste geachtet. Während der Messung wird der Messplatz zusätzlich mit einem Metallkäfig abgedeckt. Dieser sorgt für eine zusätzliche Abschirmung und verhindert, dass der Bediener mit der Hochspannung in Kontakt kommt. Durch einen Sicherheitsschalter wird sichergestellt, dass im geöffneten Zustand keine Hochspannung anliegen kann.

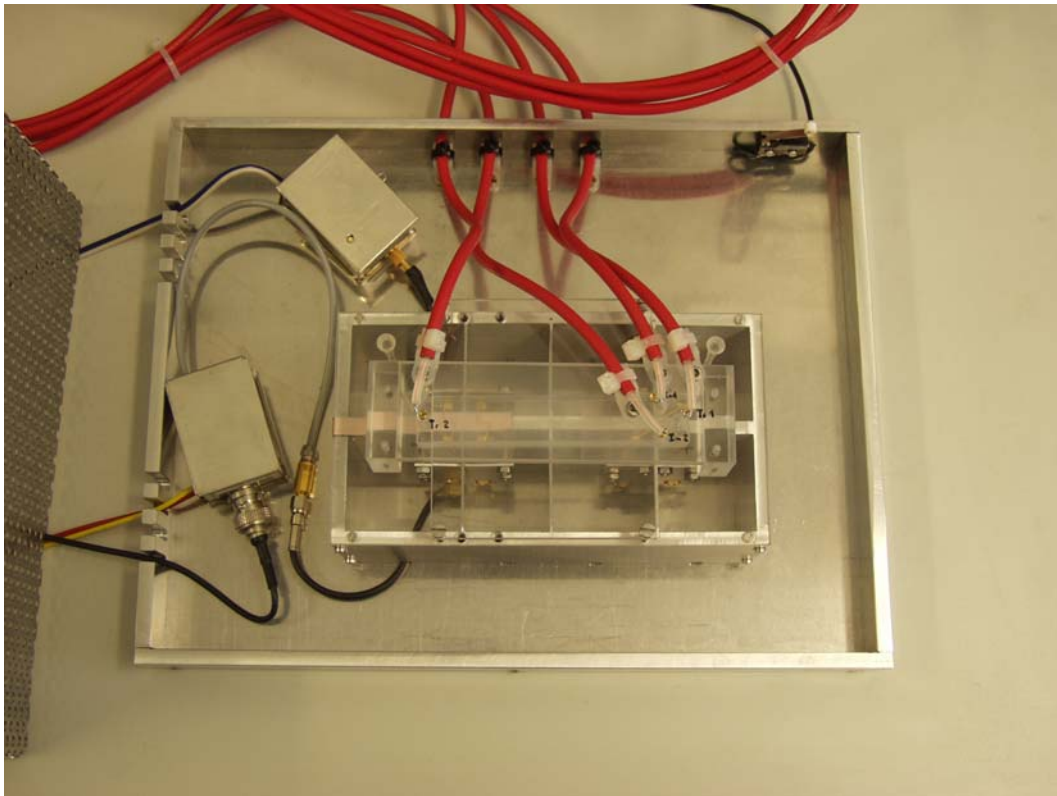


Abb. 3-18 CE-CCD-Messplatz mit vier Detektionsbereichen  
(Der CE-Chip wird von unten mit der Messelektronik kontaktiert, die Hochspannungselektroden werden von oben zugeführt)

### 3.3.3 CCD-Elektronik

Bei der verwendeten CCD-Elektronik handelt es sich um eine Eigenentwicklung der Universität Prag von J. Zuska und B. Gaš. Während der Kooperation kam es zur Weiterentwicklung der Elektronik, sodass am Beginn der Arbeit mit einem 625 kHz und am Ende mit einem 3.8 MHz Detektor gearbeitet wurde, welcher durch weitere Verbesserungen noch rauschärmer ist.

Die Digitalisierung des CCD-Messsignals erfolgt mit einem AD-Wandler von Hewlett Packard (HP Interface 35900), die Erfassung und Auswertung mit der Software ChemStation (Agilent Technologies, 2003).

### 3.4 Miniaturisierte CE-Einheit „MinCE“

Der in Kapitel 3.3 beschriebene Messplatz ermöglicht grundlegende Untersuchungen an CE-CCD-Chips. Für den Einsatz in der Praxis widerspricht es jedoch dem grundlegenden Lab-on-Chip-Konzept, wenn zum Betrieb der Chips eine Hardware notwendig ist, die in ihrer Größe und ihrem Preis konventionellen Laborgeräten entspricht. Deshalb wurde ein Konzept einer möglichst kleinen, kostengünstigen und portablen CE-Einheit entwickelt. Diese Kriterien sind zu erfüllen, wenn diese Systeme in großem Maßstab als Massenprodukt eingesetzt werden sollen.

Das Konzept einer CE-CB (CE in der Cigar-/Cigarette-Box), bei der das Gesamtsystem in einem ersten Schritt auf die Größe einer Zigarrenkiste und in weiteren Schritten bis auf die Größe einer großen Zigaretenschachtel reduziert werden sollte, ist in Abbildung 3-19 dargestellt.

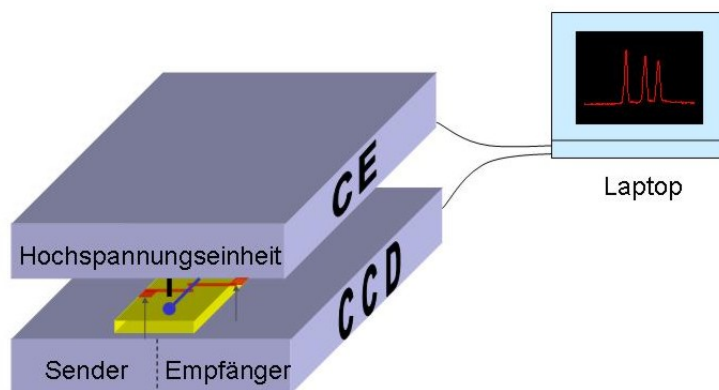


Abb. 3-19 Konzept einer miniaturisierten CE-Einheit

Mit dem Messsystem „MinCE“ (Miniaturisierte CE) wurde dieses Konzept zum ersten Mal in einem Demonstrator verwirklicht (Abbildung 3-20). Das etwa zigarrenkisten-große Gerät besteht aus einer Hochspannungseinheit (oben) und einer CCD-Einheit (unten), zwischen die ein CE-Chip eingelegt wird. Dabei wird er von unten mit der CCD-Elektronik kontaktiert. Beim Schließen des Gerätes tauchen von oben Hochspannungselektroden in die Reservoirs ein. Das Gerät wird über ein Notebook gesteuert, mit welchem auch die Messergebnisse erfasst und dargestellt werden.

Die Hochspannungseinheit besteht im Wesentlichen aus einer regelbaren bipolaren Hochspannungsquelle, die zur elektrokinetischen Injektion und Separation verwendet wird. Dadurch sind Trennungen sowohl von Anionen als auch von Kationen möglich. Die Quelle setzt sich aus zwei unipolaren miniaturisierten Hochspannungsquellen (C40 und C40N, EMCO High Voltage Corporation, Sutter Creek, USA) zusammen, die jeweils etwa die Größe einer Zündholzschachtel besitzen. Neben ihrer Kompaktheit zeichnen sich diese Quellen durch ein sehr geringes Rauschen sowie

eine sehr niedrige elektromagnetische und hochfrequente Abstrahlung aus, wodurch eine Störung der Hochfrequenz-CCD verhindert wird. Der maximal von den Quellen zur Verfügung gestellte Strom von 250  $\mu\text{A}$  reicht auch für Anwendungen mit hochleitfähigen Elektrolyten aus. Die Spannungsregelung erfolgt über Steuerungsspannungen von 0 bis 5 V. Diese werden von DA-Wandlern, die sich auf einer PCMCIA-Steckkarte (PCMDA12B/U, SuperLogics Inc., Waltham, USA) befinden zur Verfügung gestellt. Auf der Karte befinden sich zusätzlich digitale Ein- und Ausgänge zur Ansteuerung von Hochspannungsrelais. Über diese werden die Hochspannungselektroden am Injektions- bzw. Separationsreservoir mit einer positiven oder negativen Spannung beaufschlagt oder vom Potential getrennt (floating). Die beiden Elektroden in den Ausgangsreservoirs werden vom Potential getrennt (floating) geschaltet oder mit Masse (ground) verbunden. Da die Quellen sehr kurze Einschwingzeiten aufweisen ( $<160$  ms) kann auf ein Schalten unter Spannung verzichtet werden. Dadurch können sehr kleine Hochspannungsreedrelais verwendet werden.

Bei der CCD-Elektronik konnte auf die in Kapitel 3.3 beschriebenen Module zurückgegriffen werden, da diese sehr klein sind und die Bauteilkosten vernachlässigbar gering sind. Die Digitalisierung des Messsignals erfolgt mit einer 21 Bit PCMCIA-AD-Wandler-Karte (AD218, Elan Digital Systems Ltd., Fareham, U. K., mit 24 Bit Sigma-Delta-Wandler AD7710, Analog Devices, Norwood, USA). Der auf der Karte verwendete AD-Wandler ist darauf optimiert, eine hohe effektive Bitzahl (kleines Rauschen) bei kleinen Ausgangsdatenraten zu erzielen. Dies entspricht den Anforderungen, da eine Ausgangsdatenrate von 10 Hertz absolut ausreichend ist und das Rauschen bei der CCD-Elektronik auf wenige Mikro-Volt reduziert ist, d.h. der AD-Wandler nicht stärker rauschen sollte.

Um eine Störung des Messsignals zu verhindern, wurde besonders auf eine gute Abschirmung geachtet. Ein hoher Stellenwert wurde auch der Sicherheit eingeräumt. Die Gefahr, die von der Hochspannung ausgeht, wird dadurch reduziert, dass die Ströme auf sehr kleine Werte begrenzt sind. Zusätzlich stellt ein Schutzschalter sicher, dass die Hochspannung nur anliegen kann, wenn das Gerät geschlossen ist.



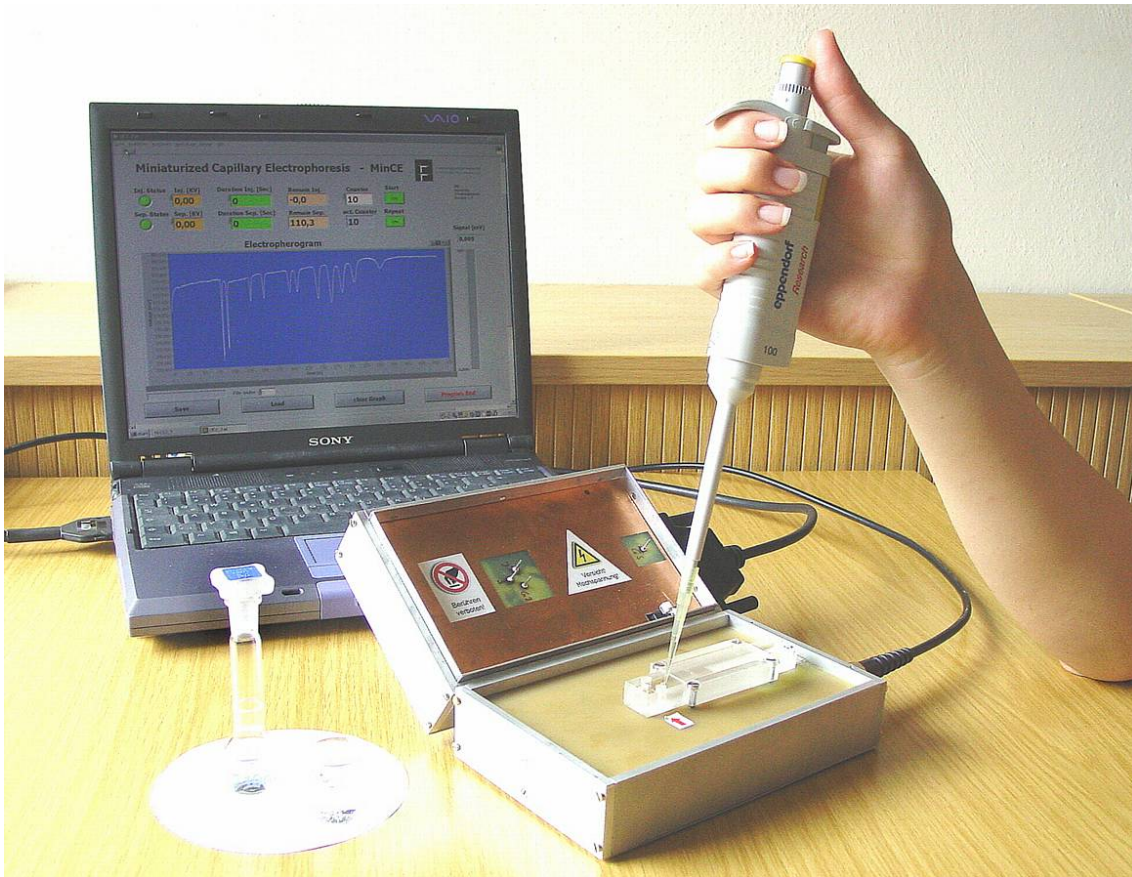


Abb. 3-20 Miniaturisierte CE-Einheit MinCE

Die Steuerungs- und Auswertesoftware wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Prozessdatenverarbeitung und Elektronik (IPE) des Forschungszentrums Karlsruhe realisiert. Im Vergleich zur der in Kapitel 3.3 beschriebenen Softwareoberfläche ist diese auf das Notwendigste reduziert und ist so übersichtlich und einfach zu bedienen (siehe Abbildung 3-21). Der Benutzer gibt lediglich für die Injektion und Separation Spannung und Zeit vor und gibt an, wie oft er die Messung automatisch wiederholt werden soll. Nach dem Start des Prozesses erfolgt eine Status- und Laufzeitanzeige. Das Elektropherogramm wird während der Messung ständig automatisch skaliert. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Messergebnisse zu speichern.

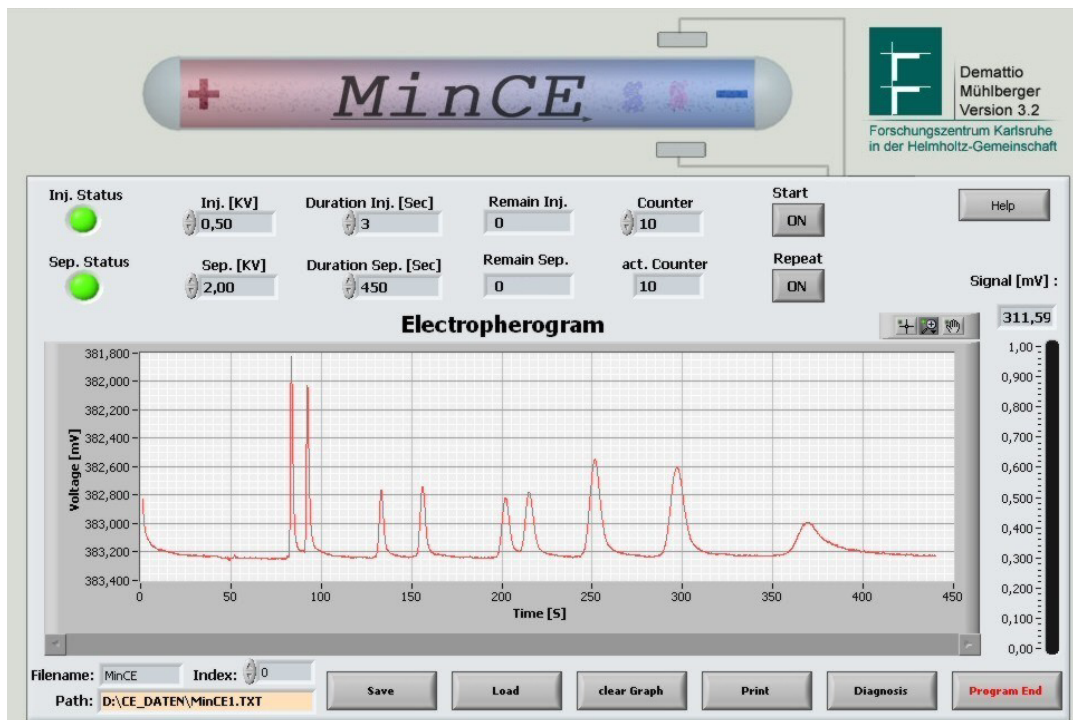


Abb. 3-21 MinCE Softwareoberfläche

### 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Ein Fluoreszenzmikroskop besitzt eine zusätzliche Lichtquelle in einem Wellenlängenbereich, der zur Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes geeignet ist. Dieser ermöglicht es, Strömungen in Mikrokapillaren mit einer hohen Auflösung sichtbar zu machen.

Zur Untersuchung von Strömungsverhalten im Injektionskreuzungsbereich (Kapitel 4.6) wurde Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt (siehe Abbildung 3-22). Die Anregung erfolgt mit blauem Licht (Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 496 nm), wodurch es zu einer Fluoreszenz im grünen Wellenlängenbereich (Wellenlänge ca. 520-530 nm) kommt. Sowohl die Löslichkeit als auch die Intensität der Fluoreszenz nehmen bei diesem Fluoreszenzfarbstoff mit dem pH-Wert zu. Es wurden 2 mM Fluorescein in Natronlauge mit einem pH-Wert von 10 gelöst. Gegen einen höheren pH-Wert spricht die mangelnde Stabilität des Chipmaterials PMMA.

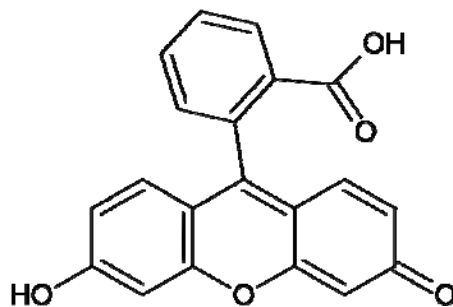


Abb. 3-22 Strukturformel von Fluorescein

In dieser Arbeit wurden zwei Fluoreszenzmikroskope eingesetzt. Die Aufnahmen in Abbildung 4-15 und 4-16 entstanden mit dem OLYMPUS IX 50 (Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) (Lichtquelle U-LH100L).

Für die weiteren Untersuchungen wurde ein Epi (Echo Planar Imaging)-Fluoreszenzmikroskop (SVM340) der Firma LabSmith (Livermore, USA) verwendet, welches im Vergleich zum OLYMPUS IX 50 klein und portabel ist.

### 3.6 Impedanzspektroskopie

Für die impedanzspektroskopischen Untersuchungen wurde ein Alpha High Resolution Dielectric Analyzer der Firma Novocontrol (Hundsangen, Deutschland) verwendet. Der Impedanzmessbereich reicht von  $0,01 \Omega$  bis  $10^{14} \Omega$ , der Kapazitätsmessbereich von  $10^{-15} \text{ F}$  bis  $1 \text{ F}$ . Der Frequenzbereich von  $3 \mu\text{Hz}$  bis  $10 \text{ MHz}$  wird bei Verwendung des für dieses Gerät vorgesehenen Hochspannungsverstärkers auf  $1 \text{ MHz}$  beschränkt. Die Messgenauigkeit ist von der Frequenz sowie vom Betrag der Messgröße abhängig und ist im Alpha High Resolution Dielectric Analyzer User Manual gelistet [107]. Die Messungen wurden mit der systemeigenen Software WinDETA durchgeführt.



### 3.7 Chemikalien

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit deren Bezugsquellen aufgeführt. Zur Herstellung von Lösungen wurde, mit einem Milli-Q<sup>®</sup> Plus-System / Filter: QPAK<sup>®</sup> 2 (Millipore, Billerica, USA), gefiltertes Wasser verwendet.

Mes (2-Morpholinoethansulfonsäure) Hydrate	Fluka <sup>1</sup>
Histidine (L-Histidine)	Fluka <sup>1</sup>
Lithiumchlorid	Fluka <sup>1</sup>
Natriumchlorid	Merck <sup>2</sup>
Kaliumchlorid	Merck <sup>2</sup>
Sulfat (Natriumsulfat)	Merck <sup>2</sup>
Weinsäure (L(+)-Weinsäure)	Merck <sup>2</sup>
Äpfelsäure (L(-)-Äpfelsäure)	Carl Roth <sup>3</sup>
Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat)	Merck <sup>2</sup>
Bernsteinsäure	Aldrich <sup>4</sup>
Essigsäure	Merck <sup>2</sup>
Milchsäure	Aldrich <sup>4</sup>
Natronlauge (1mol/l Lösung)	Merck <sup>2</sup>
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)	Carl Roth <sup>3</sup>
D(-)-Fructose	Fluka <sup>1</sup>
D(+)-Glucose	Fluka <sup>1</sup>
D(+)-Sucrose	Fluka <sup>1</sup>
Lactose Monohydrat	Merck <sup>2</sup>
Lysin (L-Lysin-Monohydrat)	Merck <sup>2</sup>
Arginin (L-Arginin)	Merck <sup>2</sup>
Histidine (L-Histidine)	Fluka <sup>1</sup>
Glycin	Merck <sup>2</sup>
Alanin (L-Alanin)	Fluka <sup>1</sup>
Valin (L-Valin)	Merck <sup>2</sup>
Leucin (L-Leucin)	Merck <sup>2</sup>
Threonin (L-Threonin)	Aldrich <sup>4</sup>
Methionin (L-Methionin)	Merck <sup>2</sup>
Tryptophan (L-Tryptophan)	Merck <sup>2</sup>
Phenylalanin (L-Phenylalanin)	Aldrich <sup>4</sup>
Tyrosin (L-Tyrosin)	Fluka <sup>1</sup>
Cystein (L-Cystein)	Merck <sup>2</sup>

Fluorescein Isothiocyanate	Fluka <sup>1</sup>
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck <sup>2</sup>
Salzsäure	Merck <sup>2</sup>
EDTH (Ethyldiamintetraessigsäure)	Aldrich <sup>4</sup>
Agarose	Merck <sup>2</sup>
Glycerin	Merck <sup>2</sup>
Gelmatrix (2100 Bioanalyzer, DNA 1000 Kit)	Agilent <sup>5</sup>
SM 271 Fermentas (pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker)	Fermentas <sup>6</sup>
SM 231 Fermentas (Lambda Mix Marker)	Fermentas <sup>6</sup>
GeneRuler™ SM 241 Fermentas (100 bp DNA Ladder)	Fermentas <sup>6</sup>
Heringssperma-DNA	IBG <sup>7</sup>

<sup>1</sup> Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)

<sup>2</sup> Merck (Darmstadt, Deutschland)

<sup>3</sup> Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

<sup>4</sup> Aldrich (Steinheim, Deutschland)

<sup>5</sup> Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

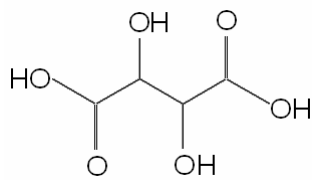
<sup>6</sup> Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

<sup>7</sup> Präparat hergestellt am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG)

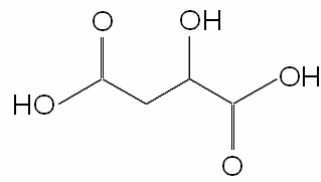
(Forschungszentrum Karlsruhe), Ausgangsbasis: Salmon Sperm DNA 10 mg/ml, Life Technologies (Gibco BRL) (Gaithersburg, USA) Cat. No. 15632-011, ausgefällt, mehrfach in Wasser gewaschen und getrocknet

Die Patienten-Blutplasmaproben wurden vom Zentrallabor des Städtischen Klinikums Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

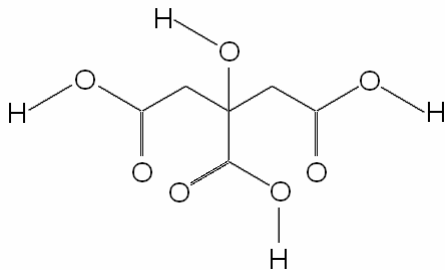
Die Strukturformeln der in Getränken untersuchten Säuren und Saccharide (vgl. Kapitel 4.7.1) sind in Abbildung 3-23 und 3-24 aufgeführt. Abbildung 3-25 zeigt die chemische Struktur der in Kapitel 4.7.3 getrennten proteinogenen Aminosäuren. Der Aufbau des zur Änderung des EOF eingesetzten Cetyltrimethylammoniumbromids (CTAB) (vgl. Kapitel 4.4.2) ist in Abbildung 3-26 dargestellt.



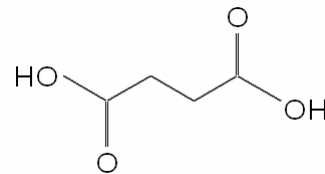
Weinsäure



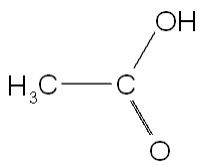
Äpfelsäure



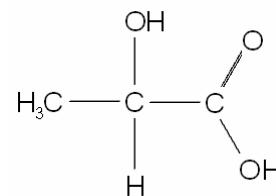
Zitronensäure



Bernsteinsäure

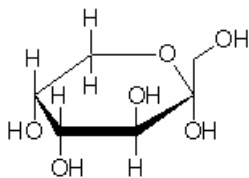


Essigsäure

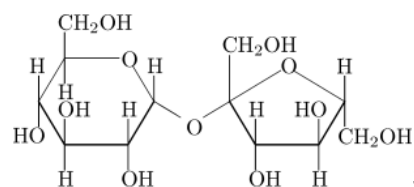


Milchsäure

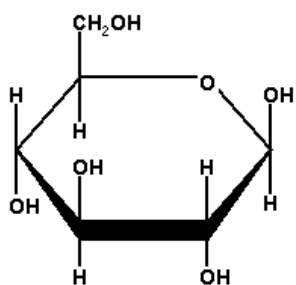
Abb. 3-23 Strukturformeln von organischen Säuren in Getränken



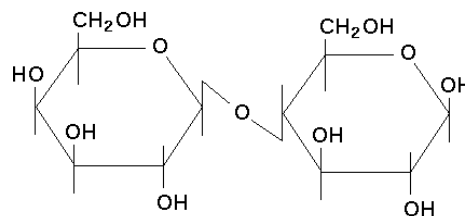
Fructose



Saccharose



Glucose



Lactose

Abb. 3-24 Strukturformeln von Sacchariden in Getränken

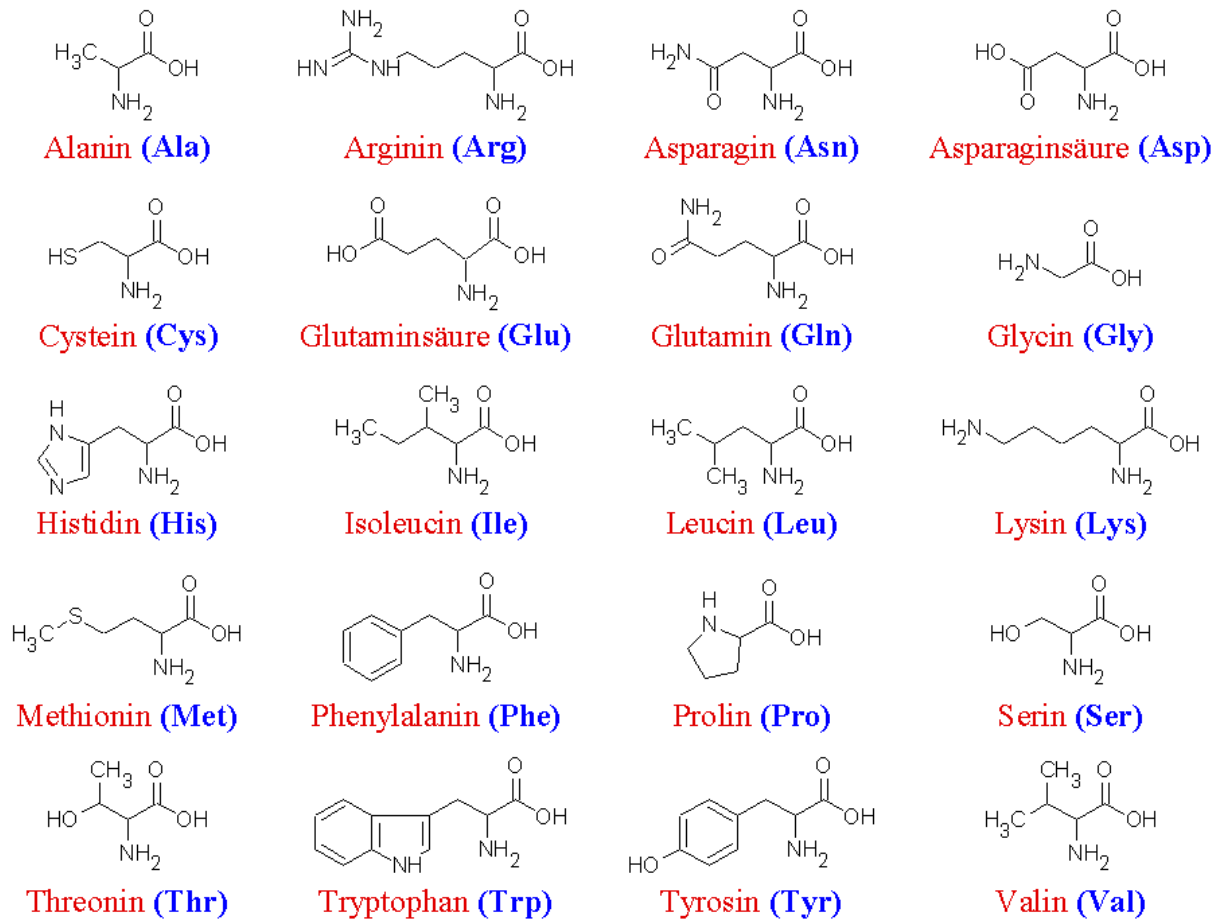


Abb. 3-25 Strukturformeln der proteinogenen Aminosäuren

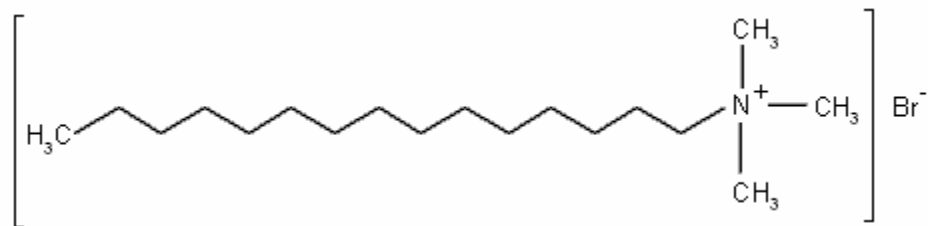


Abb. 3-26 Strukturformel des EOF-Modifizierers CTAB

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Polymercharakterisierung

#### 4.1.1 Kontaktwinkel

Für eine vollständige und blasenfreie Befüllung von dünnen Kapillaren ist eine gute Benetzbarkeit von Vorteil. Diese kann über den Kontaktwinkel charakterisiert werden, der für eine gute Benetzung möglichst klein sein sollte. Für die Aussage über die Benetzbarkeit wird meist nur der Advancing-Winkel angegeben (siehe Kapitel 3.1).

Abbildung 4-1 zeigt die Kontaktwinkel der verwendeten Polymere, die an abgeformten und gereinigten Chips vor deren Deckelung gemessen wurden. Die Advancing-Kontaktwinkel der gereinigten Deckelfolien lagen im gleichen Bereich (typ. Abweichung  $\pm 2^\circ$ ).

Die Werte liegen in einer Größenordnung, wie sie auch in der Literatur zu finden sind (PMMA:  $73^\circ \pm 3^\circ$ , PS:  $94^\circ \pm 3^\circ$ , PC:  $80^\circ \pm 3^\circ$ , PP:  $104^\circ \pm 3^\circ$  [28]). Im Vergleich zu Glas, für welches ein Kontaktwinkel von  $35^\circ \pm 3^\circ$  angegeben wird [28], sind die verwendeten Polymere schlechter benetzbar. Dennoch war bei den meisten CE-Chips eine einfache Befüllung möglich, lediglich die CE-Chips aus PP waren schwer zu befüllen.

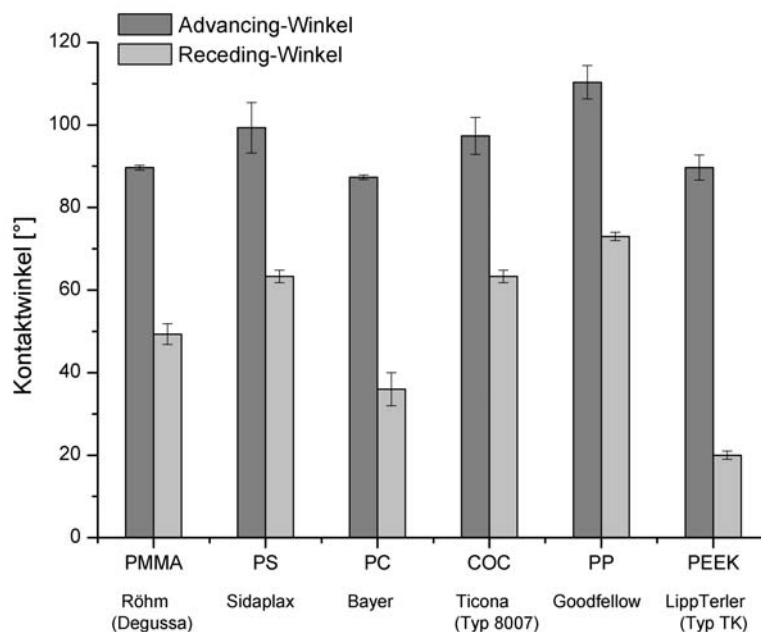


Abb. 4-1 Kontaktwinkel der verwendeten Polymermaterialien, abgeformte gereinigte Teile, Messmedium Wasser

#### **4.1.2 Oberflächenladungsdichte**

Die Oberflächenladungen sind von Interesse, da diese in direktem Zusammenhang mit dem elektroosmotischen Fluss (EOF) stehen (siehe Kapitel 3.1). Wird eine Trennung von sowohl Kationen als auch Anionen mit einem Chip angestrebt, so ist ein möglichst kleiner EOF und somit eine kleine Oberflächenladungsdichte vorteilhaft.

Es wurden sowohl die die zur Abformung verwendeten Polymerfolien, die daraus abgeformten Chips sowie die zur Deckelung verwendeten Folien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die verwendeten Polymere alle eine sehr geringe Oberflächenladungsdichte aufweisen. Die gemessenen Oberflächenladungs-dichten bewegen sich zum Teil an der Grenze der Messgenauigkeit der verwendeten Methode, sodass ein Vergleich der Polymere wenig aussagekräftig ist. Bei den verwendeten Deckelfolien lagen die Oberflächenladungsdichten deutlich unter einer Ladung pro Quadratnanometer. Die Werte der Polymerfolien, die für die Abformung verwendet wurden und die der daraus abgeformten Chips lagen tendenziell höher.

Zu einer signifikanten Erhöhung der Oberflächenladungsdichte kam es durch Oberflächenbehandlungen, wie der Bestrahlung mit UV-Strahlung oder einer Vorbehandlung mit Plasma (Erzeugung von Bindungsbrüchen), wie sie zur Verbesserung des thermischen Bondprozesses eingesetzt werden können (siehe Kapitel 4.2). Deshalb wurde beim thermischen Bonden auf eine Vorbehandlung wenn möglich verzichtet. Lediglich bei PEEK wurde sie zur Verbesserung der Verbindung eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.2).

## 4.2 Verbindungstechnik

### 4.2.1 Thermisches Bonden

Zur Deckelung der Chips wurde ein thermischer, lösungsmittelfreier Bondprozess entwickelt.

Von PMMA ist bekannt, dass sich durch eine Bestrahlung mit UV-Strahlung die Glasübergangstemperatur in einer schmalen Oberflächenzone senken lässt und sich PMMA Folien so deutlich unter der Glasübergangstemperatur thermisch unter Druck miteinander verbinden lassen [108]. Für weitere Polymere ist dieser starke Effekt durch UV-Bestrahlung nicht bekannt. Durch die UV-Bestrahlung kommt es zu einer Erhöhung der Oberflächenladungsdichte, welche sich jedoch minimieren lässt, wenn die Bestrahlung im Vakuum stattfindet [109].

Es wurde versucht ohne diesen Vorbehandlungsschritt auszukommen. Für die Polymere PMMA, PS und Copolyester wird ein thermisches Verbindungsverfahren beschrieben. Dabei wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Verbindung sehr kritisch ist und schon eine um ein Grad zu hohe Temperatur die Kanalstruktur zerstören kann, wohingegen es bei einer Temperatur, die ein Grad zu niedrig liegt zu nicht vollständig dichten Kanälen kommt [110].

Um eine geeignete Verbindung zu erhalten, mussten die Parameter für den Druck, die Temperatur und die Dauer des thermischen Bondens daraufhin optimiert werden, dass eine möglichst belastbare, dichte Verbindung zwischen Chip und Deckel entsteht und gleichzeitig die Kanalgeometrie erhalten bleibt.

Da mit dem thermischen Bondverfahren (ohne Vorbehandlung) bei PMMA belastbare Verbindungen erzielt werden konnten, wurde es auf weitere Polymere ausgedehnt. Der Druck und die Dauer des Prozesses erwiesen sich als weniger kritisch. Optimiert werden konnte der Prozess über die Temperatur, die nahe unter der Glasübergangstemperatur gewählt wurde.

Abbildung 4-2 zeigt die Zugfestigkeit von Verbindungen, die bei den angegebenen Temperaturen unter der Schmelz- bzw. Glasübergangstemperatur gebondet wurden. Die Versuche wurden mit den Folien, die zur Abformung der Chips verwendet wurden, durchgeführt. Die Polymere wurden 10 °C unter der Glasübergangstemperatur miteinander verbunden. Bei PP musste eine kleinere Bondtemperatur gewählt werden, da ansonsten eine plastische Verformung auftrat. Bei PEEK wurde die Bondtemperatur durch die Heißpresse limitiert. Es ergeben sich für CE-Chips ausreichende Festigkeiten. Eine Verbesserung ist aber bei den Polymeren PEEK

und PP wünschenswert. Bei COC sollte der tatsächliche Wert noch höher liegen, da Proben zum Teil an den Klebestellen zum Probenhalter gerissen sind.

Bei der Herstellung der CE-Chips mit dünnen Deckfolien wurde das Verfahren weiter optimiert, sodass sich folgende Bondtemperaturen ergaben: PMMA: 92 °C, PC: 141 °C, PS: 85 °C, COC: 72 °C, PP: 130 °C. Für die meisten Polymere wurde ein Druck von 3,4 N/mm<sup>2</sup> gewählt, bei PP betrug er lediglich die Hälfte. Eine Verpressdauer von 5 Minuten erwies sich als ausreichend.

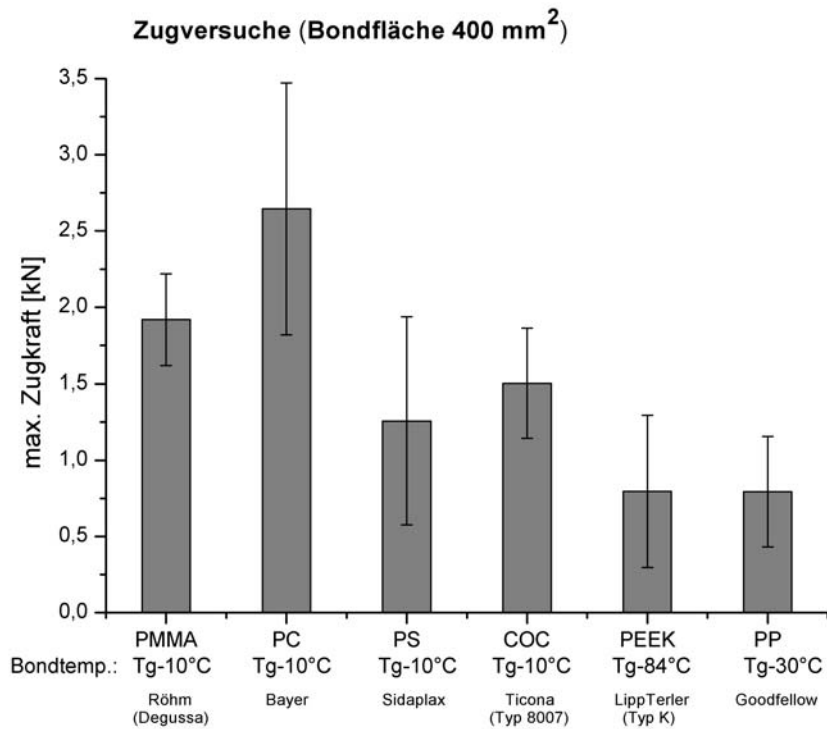


Abb. 4-2 Zugfestigkeiten thermische gebondeter Polymere (Prozessdruck: 3,4 N/mm<sup>2</sup>, bei PP 1,7 N/mm<sup>2</sup> und Zeit: 5 min für alle Proben gleich groß)



## 4.2.2 Plasmaunterstütztes thermisches Bonden

In Kapitel 4.2.1 zeigte sich, dass es bei den beiden chemisch hochbeständigen Polymeren PEEK und PP eine Verbesserung des thermischen Bonds wünschenswert ist. Besonderes Interesse gilt hierbei PEEK, welches wegen seiner besonderen Eigenschaften (vgl. Kapitel 2.2) nicht nur für die CE (vgl. Kapitel 4.4 und 4.7) und CCD (vgl. Kapitel 4.5) besonders geeignet ist, sondern auch in weiteren Anwendungsfeldern eine breite Akzeptanz besitzt (vgl. Kapitel 2.2).

Es wurden Versuche durchgeführt, den thermischen Bondprozess durch vorausgehende Oberflächenplasmabehandlungen zu verbessern. Zugversuche zeigten bei PEEK überraschenderweise eine deutliche Verbesserung der Verbindung beim Einsatz eines Stickstoffplasmas (siehe Abbildung 4-3). Es konnten so gute Verbindungen erzielt werden, dass einige Proben teilweise im Material gerissen sind [111]. Das standardmäßig zur Oberflächenaktivierung eingesetzte Sauerstoffplasma [112][114] zeigte hingegen keine Wirkung. Bei PP zeigt das Stickstoffplasma keine Wirkung, wohingegen eine Vorbehandlung mit Sauerstoffplasma eine leichte Verbesserung bringt (Abbildung 4-4).

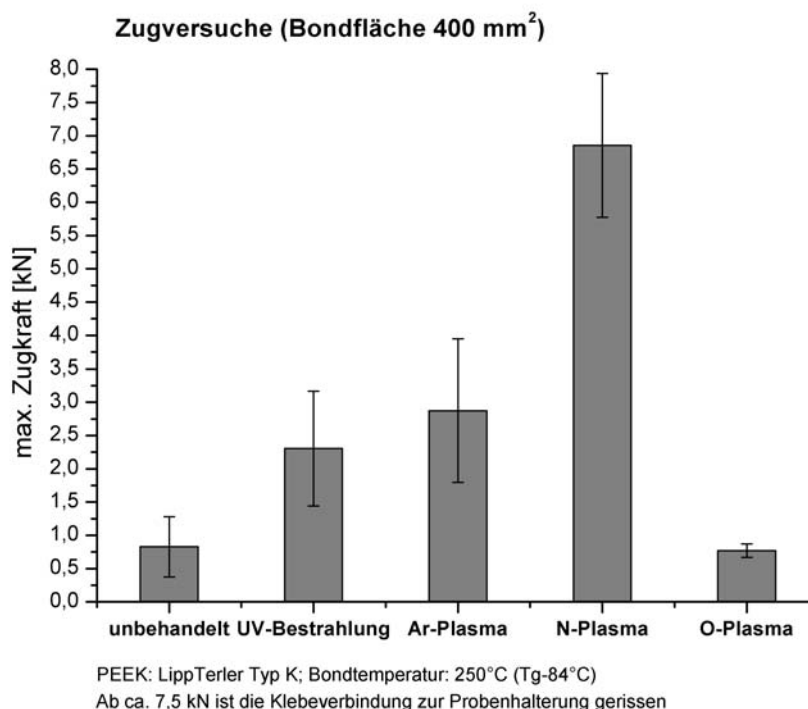


Abb. 4-3 Zugfestigkeiten thermisch gebondeter PEEK-Proben bei unterschiedlicher Plasma Vorbehandlung (RF-Leistung: 240W, Druck: 200 Torr (26664 Pa), Gasfluss: 50 sccm und Behandlungszeit im Plasma: 10 min für alle Proben gleich groß; UV-Bestrahlung: 1 mW/cm<sup>2</sup> bei 240 nm, 40 min)

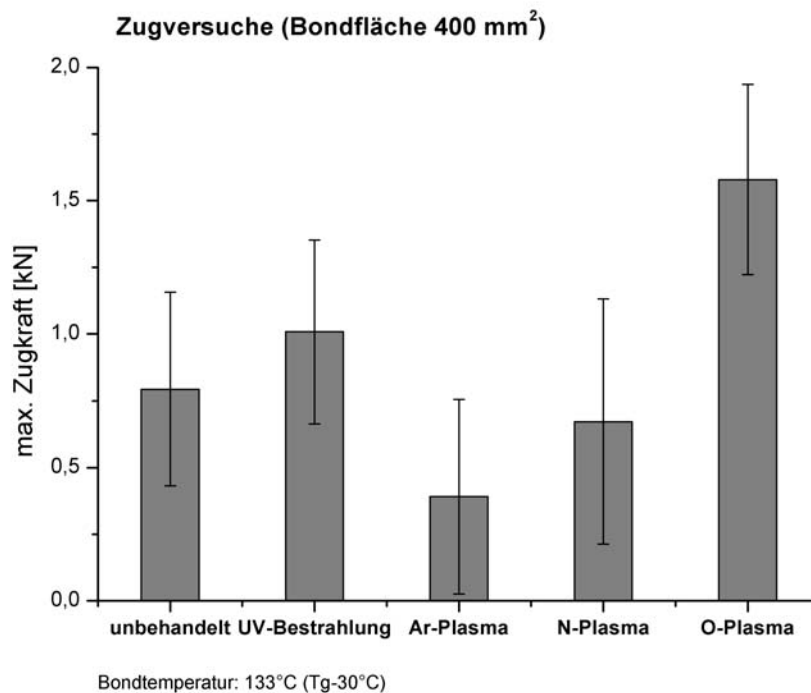


Abb. 4-4 Zugfestigkeiten thermisch gebondeter PP-Proben bei unterschiedlicher Plasma Vorbehandlung (RF-Leistung: 240W, Druck: 200 Torr (26664 Pa), Gasfluss: 50 sccm und Behandlungszeit im Plasma: 10 min für alle Proben gleich groß; UV-Bestrahlung: 1 mW/cm<sup>2</sup> bei 240 nm, 40 min)

Vorteilhafterweise erhöht sich beim Einsatz dieses Plasmas die Oberflächenladungsdichte von PEEK nicht stärker als beim Einsatz anderer Plasmen oder UV-Strahlung; sie bewegen sich immer noch in einem niedrigen Bereich (siehe Abbildung 4-5). Dies lässt eine nur geringfügige Erhöhung des elektroosmotischen Flusses erhoffen (vgl. Kapitel 4.4). Gleichzeitig verbessert sich die Benetzbarkeit deutlich (siehe Abbildung 4-6), was angesichts der sicheren Befüllung der nichttransparenten Chips von großer Wichtigkeit ist.

Diese Bondtechnologie ermöglichte die zuverlässige Herstellung von CE-Chips aus PEEK [115] [116].

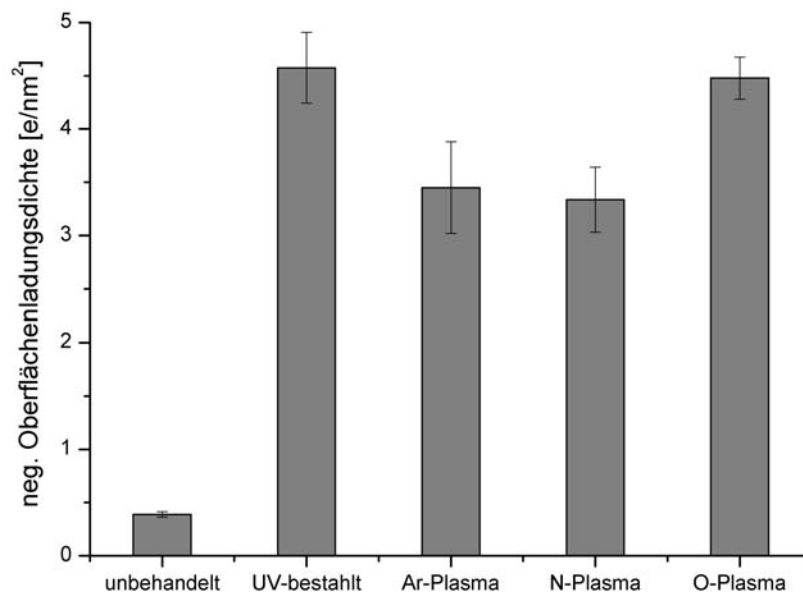


Abb. 4-5 Oberflächenladungsdichte plasmabehandelter PEEK-Proben

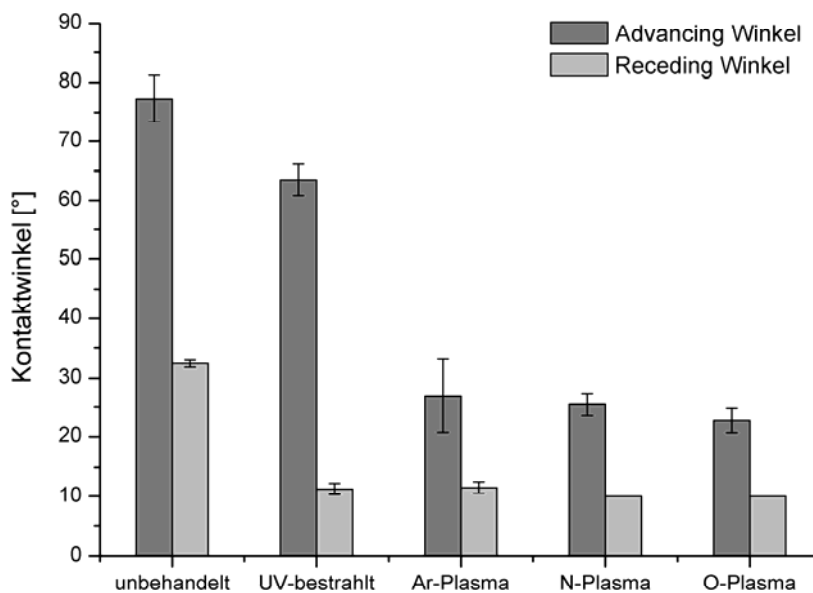


Abb. 4-6 Kontaktwinkel plasmabehandelter PEEK-Proben

### 4.3 Chipherstellung / Chipgeometrie

Zur Abformung der Polymerchips wurde erstmals auch ein Formeinsatz aus einer CuCoBe Legierung eingesetzt. Dieses Material weist im Vergleich zu Messing, aus welchem standardmäßig durch Mikrozerspanung Abformwerkzeugen hergestellt werden, eine höhere Festigkeit auf. Im Vergleich zu ebenfalls verwendeten Stählen ist eine bessere Oberflächengüte zu erreichen. In Kapitel 3.2 wurde der Formeinsatz bereits vorgestellt. Untersuchung mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) zeigen eine gute Oberflächengüte (siehe Abbildung 4-7).

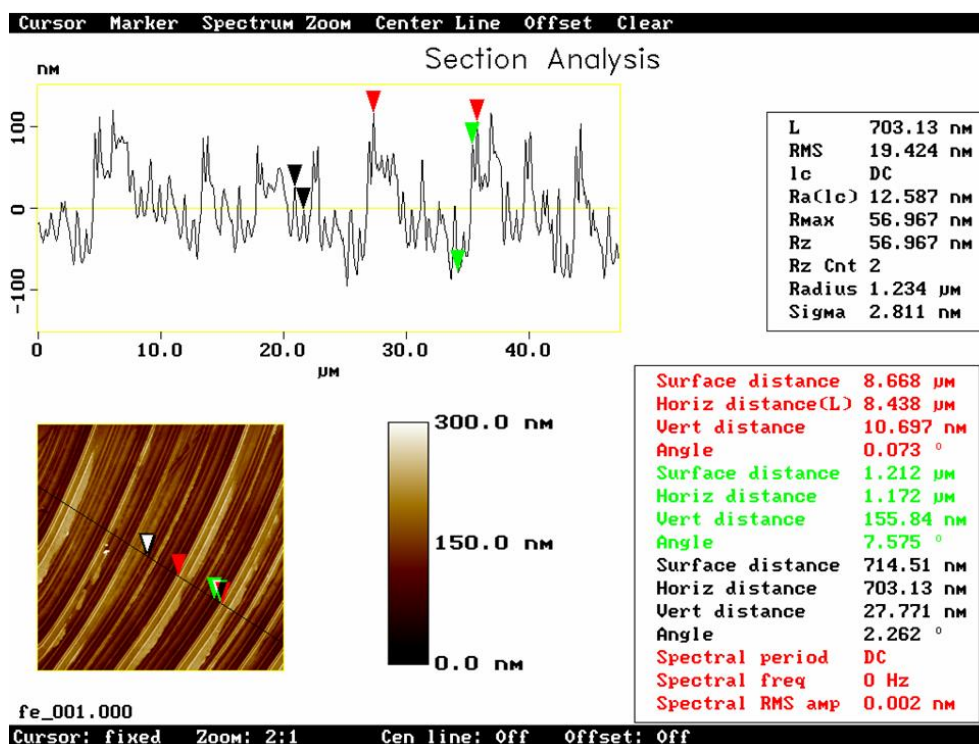


Abb. 4-7 AFM-Untersuchung der Oberfläche des CuBeCo-Formeinsatzes

Bei der Abformung von PEEK traten bei der Entformung dennoch Probleme auf, das Material ließ sich teilweise nicht mehr aus dem Formeinsatz entfernen. Eine Reinigung des Werkzeuges war wegen der hohen chemischen Beständigkeit des Polymers nicht möglich.

Durch die Beschichtung eines Messingformeinsatzes mit Wolframdisulfid, konnte bei der Abformung von PEEK die Entformung verbessert werden, es bleibt jedoch ein kritischer Prozess. Alternativ könnte PEEK aufgrund seiner hohen optischen Absorption laserstrukturiert werden (vgl. Kapitel 3.2.7) [117].

Auf die optimalen Bondparameter zur Deckelung der CE-Chips mit dünnen Polymerfolien durch thermisches Bonden wurde bereits in Kapitel 4.2 kurz eingegangen.

Das plasmaunterstützte thermische Bonden wurde nur bei der Deckelung von CE-Chips aus PEEK eingesetzt. Dabei wurde Stickstoff-Plasma eingesetzt. Die Deckelung mit Folien unterschiedlichen Kristallisationsgrades (TK und K) mit Dicken im Bereich von 15  $\mu\text{m}$  bis 50  $\mu\text{m}$  wurde untersucht. Beste Verbindungen konnten mit 25  $\mu\text{m}$  dicken TK-Folien (höherer Kristallisationsgrad) bei einer Bondtemperatur von 250  $^{\circ}\text{C}$  über 10 Minuten und einem Druck von 5  $\text{N}/\text{mm}^2$  erreicht werden. Ebenfalls gute Ergebnisse konnten bei der Verwendung von 15  $\mu\text{m}$  Folien erzielt werden. Bei der Verwendung des niedriger kristallinen K-Materials kam es hingegen zur Verdrängung der Folien in den Kanal. Abbildung 4-8 zeigt einen gedeckelten CE-Chip aus PEEK.



Abb. 4-8 CE-Chip aus PEEK mit drei CCD-Elektrodenpaaren

Beim Aufbringen der CCD-Elektroden durch Sputtern konnte bei der Verwendung von Gold als Elektrodenmaterial auf allen Polymeren eine gute Haftung erzielt werden. Bei häufiger Montage und Demontage der Chips am Messplatz wurden die dünnen, weichen Goldschichten jedoch von den Kontaktstiften des Messplatzes im großflächigen Kontaktierungsbereich zerkratzt. Alternativ zu Gold konnte in ersten Versuchen mit CE-Chips aus PMMA Aluminium als Elektrodenmaterial eingesetzt werden, welches gute elektrische Eigenschaften aufweist. Zum mechanischen Schutz der Elektroden ist das Aufbringen einer dünnen Schutzschicht denkbar (z. B. Polymer-Sprays). Durch die große Fläche der Kontaktierung sind dabei nur minimale Verluste des CCD-Signals zu erwarten.

Es wurden drei grundsätzlich verschiedene Trennkanalgeometrien untersucht (vgl. Abbildung Formeinsatz Kapitel 3.2.1, Abb. 3-2). Mit der einfachsten Struktur eines 80 mm langen Trennkanals, der einen konstanten Kanalquerschnitt von 50  $\mu\text{m}$  · 50  $\mu\text{m}$  aufweist, konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Eine Verringerung des Kanalquerschnitts im Bereich der Detektion (siehe Kapitel 4.5) brachte keine Verbesserung. Des Weiteren wurde der Kanal auf das rund 2,5 fache verlängert. Um diese Länge auf dem Chipformat zu realisieren wurden zwei Windungen benötigt. Zur Reduzierung dabei auftretender Laufzeitunterschiede

zwischen Kurveninnenradius und Außenradius wurde die Kanalbreite in den Kurven von 50  $\mu\text{m}$  auf 30  $\mu\text{m}$  verringert. Es konnte eine deutliche Verbesserung der Trennung erreicht werden. Durch die langen Migrationszeiten und die Kurven kam es jedoch zu stark verbreiterten und verkleinerten Signalen. Die Chips kamen daher nicht weiter zum Einsatz.

## **4.4 Charakterisierung der CE-Chips aus verschiedenen Polymeren**

### **4.4.1 Elektroosmotischer Fluss (EOF)**

Der elektroosmotische Fluss ist maßgeblich für die Trenneigenschaften der CE-Chips verantwortlich (vgl. Kapitel 2.1). Angestrebt wird meist ein kleiner, in jedem Fall aber ein stabiler EOF. Mögliche Instabilitäten wirken sich bei einem kleinen EOF weniger stark auf die Trennung aus.

Der EOF wurde in CE-Chips aus verschiedenen Polymeren bestimmt. Dies erfolgte mit zwei unterschiedlich leitfähigen Puffern (10 mM und 8 mM MesHis) nach der Current-Monitoring-Methode [118]. Der Kanal wird dabei zuerst mit dem leitfähigeren Puffer befüllt. Danach wird in einem Reservoir am Ende des Kanals der Puffer gegen den weniger leitfähigen ausgetauscht. Beim Anlegen einer Spannung über dem Kanal wandert durch den EOF der weniger leitfähige Puffer durch den Kanal. Wegen des Leitfähigkeitsunterschiedes fällt der durch den Kanal fließende elektrische Strom linear ab, bis der weniger leitfähige Puffer mit dem EOF vollständig durch den Kanal bewegt wurde. Anschließend wird der Puffer im Reservoir wieder gegen den leitfähigeren getauscht. Nach Anlegen der Spannung steigt der Strom nun wieder an. Werden die Ströme dabei aufgezeichnet, so entspricht der Zeitpunkt der Kreuzung der beiden Verläufe der halben Migrationzeit des EOF.

Abbildung 4-9 zeigt die gemessenen elektroosmotischen Mobilitäten. Die Kanaloberflächen der verwendeten CE-Chips wurden mit Ausnahme von PEEK nicht vorbehandelt. PEEK zeigt trotz einer Stickstoff-Plasmabehandlung im Fertigungsprozess (vgl. Kapitel 4.2) und einer damit verbundenen leichten Erhöhung der Oberflächenladungsdichte den kleinsten EOF. Nach längerer Befüllung mit Wasser, was einen längeren Einsatz der Chips oder eine befüllte Lagerung simulieren soll, fällt der EOF tendenziell leicht ab.

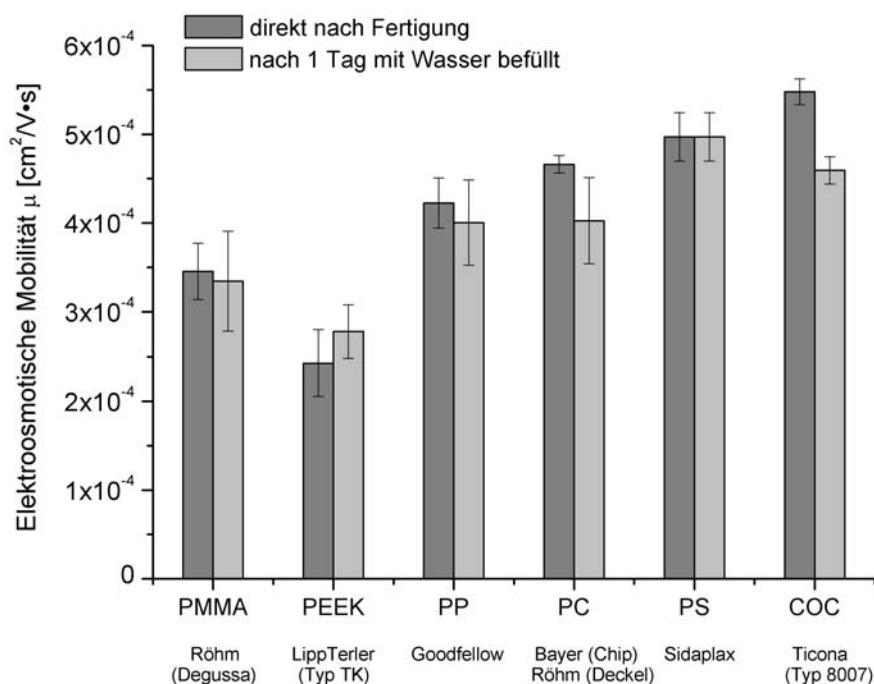


Abb. 4-9 Elektroosmotische Mobilität der verwendeten Polymermaterialien (direkt nach Fertigung der CE-Chips und nach einem Tag mit Wasser befüllt)

#### 4.4.2 Einsatz von EOF-Modifiern

Bei EOF-Modifiern handelt es sich um kationische und anionische Tenside, die sich an die Oberfläche der geladenen Kapillarwand anlagern und somit deren Ladung kompensieren bzw. umkehren können. Dadurch kann der EOF in seiner Größe und Richtung geändert werden.

Polymere besitzen in der Regel eine negative Oberflächenladung. Dies bedeutet, dass die Trennung von Kationen in Richtung des EOF erfolgt, wohingegen Anionen bei der Trennung den EOF gegen ihre Bewegung gerichtet haben. Bei Kationen wird somit die Analysezeit mit steigendem EOF verkürzt, wohingegen sie sich bei Anionen verlängert und sich die Separation des Analyten aber in der Regel verbessert. Bei Polymeren können kationische Tenside wie zum Beispiel Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) dem Hintergrundelektrolyten zugesetzt werden, die Beschichtung der Kapillarwand erfolgt dabei dynamisch [119].

Abbildung 4-10 zeigt die Optimierung einer Trennung durch Zugabe des EOF-Modifiers CTAB. Der EOF wurde umgekehrt, wodurch er nun eine zur Trennung von Anionen gleiche Richtung aufweist. Eine Erhöhung der CTAB-Konzentration vergrößert den EOF. Die Analysezeit verkürzt sich, wohingegen die Analytbestandteile schlechter getrennt werden. Ziel ist es, bei möglichst kurzer Analysezeit eine

ausreichend gute Trennung zu erzielen. Deshalb wurde in diesem Fall eine CTAB-Konzentration von 0,2 mM gewählt (siehe Kapitel 4.7.1).

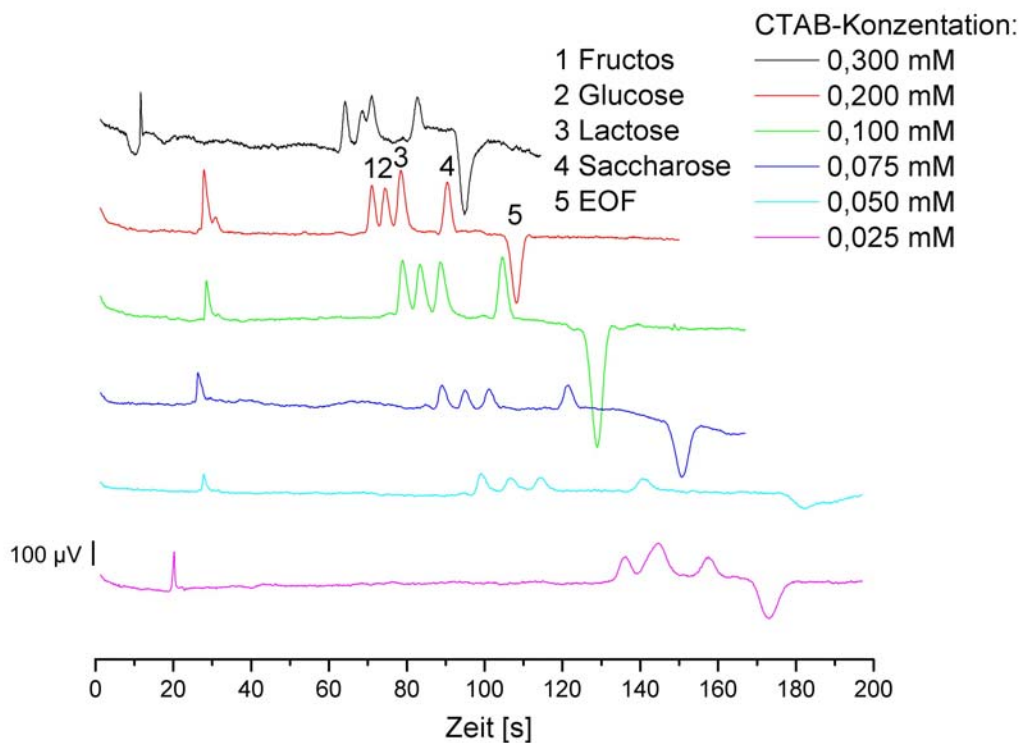


Abb. 4-10 Elektropherogramme: Variation der Konzentration des EOF-Modifiers CTAB bei der Trennung von Sacchariden

#### 4.4.3 Adsorption von DNA

Anders als bei kleinen Ionen ist bei biologischen Makromolekülen eine Wechselwirkung mit der Oberfläche des Polymers zu erwarten [110].

Es wurde untersucht, wie stark sich DNA an die Oberfläche verschiedener Polymere anlagert. Nach einer Referenzmessung mit Wasser wurden hierzu die Kanäle von CE-Chips mit 1 zu 50 in Wasser verdünnter DNA (Heringssperma-DNA) befüllt und das Impedanzspektrum der befüllten Messzelle aufgezeichnet. Eine weitere Messung folgte nach einer Wartezeit von zwei Stunde. Danach folgten Spülungen mit Wasser (30 s Druck mit Spritze), um die DNA wieder aus den Kanälen zu entfernen. Nach jeder Spülung folgten drei aufeinanderfolgende Messungen des Impedanzspektrums. Eine Erhöhung der Leitfähigkeit zeigt hierbei eine vergrößerte DNA-Konzentration an.



Es zeigt sich, dass es bei PMMA zu einer starken Anlagerung kommt (siehe Abbildung 4-11). So steigt die Leitfähigkeit nach der Wartezeit an. Nach der ersten Spülung bleibt die Leitfähigkeit auf einem konstant hohen Wert. Erst mit der zweiten Spülung beginnt sie zu sinken und selbst nach der vierten Spülung zeigt die im Vergleich zu Referenz (Wasser) erhöhte Leitfähigkeit, dass die DNA noch nicht vollständig entfernt ist. Anders verhält es sich bei PEEK, bei dem es nach der Wartezeit zu keiner Erhöhung der Leitfähigkeit kommt und diese bereits nach der ersten Spülung auf den Referenzwert zurückgeht. Trotz einer Plasmabehandlung beim Herstellungsprozess zeigt diese Messung bei PEEK keine Anhaftung der DNA an der Polymeroberfläche. Ein ähnlich gutes Verhalten zeigt sich bei CE-Chips aus COC, wobei COC unbehandelt verarbeitet wurde.

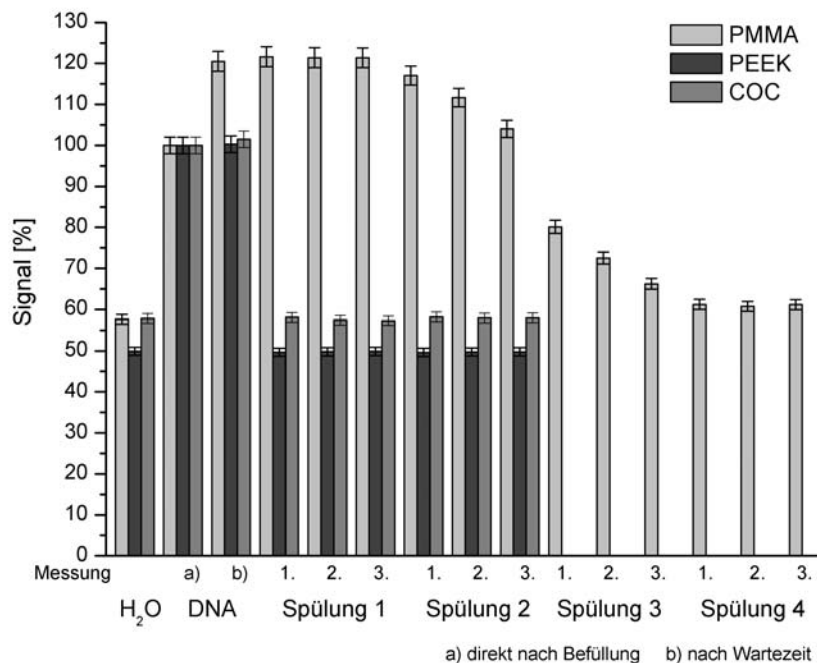


Abb. 4-11 Adsorption von DNA in CE-Chips aus PMMA, PEEK und COC: Leitfähigkeit der CCD-Messzelle ( $f = 1$  MHz) nach Befüllung mit 1 zu 50 in Wasser verdünnter Heringssperma-DNA, einer Wartezeit und mehreren Spülungen mit Wasser (Referenzmessung: Wasser)

## 4.5 Optimierung der CCD

Im Gegensatz zur direkten Leitfähigkeitsmessung, muss bei der kontaktlosen Messung das Messsignal in den Kanal ein- und auf der anderen Seite des Messzellenvolumens wieder ausgekoppelt werden. Um die Ein- und Auskoppelimpedanzen möglichst gering zu halten, wird ein hochfrequentes Signal verwendet (vgl. Kapitel 2.4.3). Das Signal soll zu einem möglichst großen Teil über das Messzellenvolumen geführt und nicht direkt vom Sender zum Empfänger übergekoppelt werden. Um dies zu vermeiden kann zwischen den beiden Elektroden eine elektrische Abschirmung eingefügt werden [69] [77] [75]. Ein Teil des Signals geht dabei über die Abschirmung verloren. Der minimale Abstand zwischen den Elektroden vergrößert sich durch die Abschirmung, im Chipformat wird ein Abstand von 2,5 mm beschrieben [75].

Um das Überkoppeln zu verringern, wurde die Elektrodendicke erheblich reduziert. Da über die Elektroden nur sehr geringe Ströme fließen, wurde sie auf  $\sim 0,5 \mu\text{m}$  reduziert. Die Verbindung zwischen den rechteckigen Kontaktierungsflächen und der Elektrode (Leiterstück über dem Kanal) sind schmaler als die Elektrodenlänge über dem Kanal und befinden sich am äußeren Ende der Elektroden (siehe z.B. CE-Chip aus PEEK, Kapitel 4.3, Abbildung 4.8). Bei der Messung liegt der Chip auf einer isolierenden Platte, darunter befindet sich die Abschirmung von Sender und Empfänger (siehe Kapitel 3.3, Abbildung 3-18). Die einzige kapazitive Kopplung des Signals gegen Masse findet somit über diese statt.

Zur Erhöhung der Messempfindlichkeit wurden Versuche durchgeführt, bei denen sowohl die Länge und die Breite der Elektroden in Bezug auf den Kanal, als auch deren Abstand variiert wurde. Die dabei erreichten Empfindlichkeiten gehen aus den Steigungen der Kurven in Abbildung 4-12 hervor. Bei diesen Messungen wurde das Sensorsignal von Kaliumchloridlösungen in verschiedenen Konzentrationen aufgenommen, indem die Lösungen nacheinander, durch Anlegen eines Unterdrucks am Ausgangsreservoir, durch die Messzelle des Chips bewegt wurden. Je größer die Steigung der Kurve ist, desto größer ist der Signalhub der durch den Leitfähigkeitsunterschied (bei der realen Messung wird der Leitfähigkeitsunterschied zwischen dem Hintergrundelektrolyten und dem Analyten gemessen) bewirkt wird.

Durch eine Verbreiterung der Elektroden über die Kanalbreite von  $50 \mu\text{m}$  hinaus kann durch einen Fokussierungseffekt des elektrischen Feldes in das im Vergleich zum umgebenen Polymer leitfähigere Fluid im Kanal mehr Signal eingekoppelt werden. Auf der anderen Seite wird durch breitere Elektroden mehr Signal zwischen den Elektroden übergekoppelt. Bei einer Verbreiterung von  $300 \mu\text{m}$  auf  $600 \mu\text{m}$  zeigt sich über den gesamten Konzentrationsbereich keine deutliche Verbesserung. Bei der Verlängerung von  $500 \mu\text{m}$  auf  $1000 \mu\text{m}$  zeigen sich hingegen über den gesamten

Konzentrationsbereich deutlich höhere Empfindlichkeiten. Der Verlängerung werden unter Anderem dadurch Grenzen gesetzt, dass auch der Analyt unter der Elektrode mit ins Messsignal eingeht und sich somit die Trennung der Signalpeaks verschlechtern kann.

Eine Reduktion des Abstands der Messelektroden verkürzt die Länge der Messzelle und somit ihre Impedanz, gleichzeitig wird mehr Signal zwischen den Elektroden übergekoppelt. Abbildung 4-12 zeigt bei kleinen Konzentrationen eine Erhöhung der Empfindlichkeit mit Verkleinerung des Abstandes. Deutlicher wird dies bei der Trennung einer Testlösung mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  in Abbildung 4-13. Die unterschiedlichen Trennzeiten ergeben sich dadurch, dass die Elektrodenpaare hintereinander auf einem Chip angeordnet wurden [147]. Noch kleinere Abstände werden auch durch die Durchschlagsfeldstärke der Luft zwischen der Sende- und Empfangselektrode begrenzt, da die CCD mit Spannungen von bis zu 200 Volt arbeitet.

Die Ergebnisse führten zu längeren (2000  $\mu\text{m}$ ) und schmaleren (200  $\mu\text{m}$ ) Elektrodenpaaren mit einem Abstand von 250  $\mu\text{m}$ .

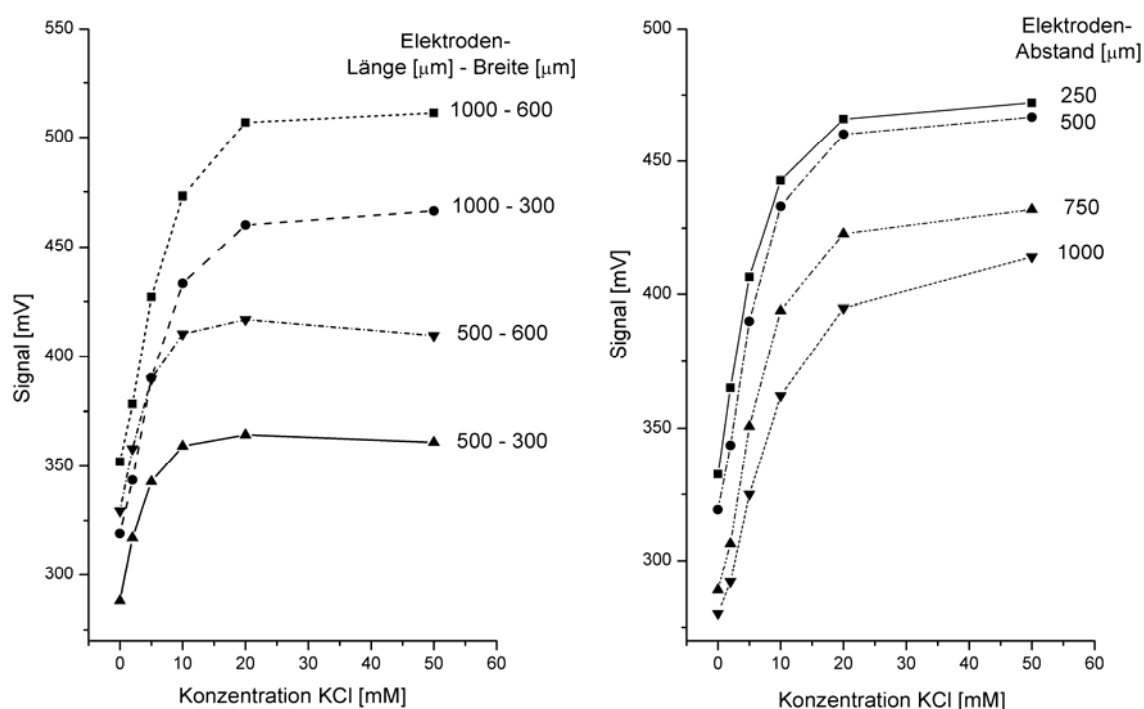


Abb. 4-12 KCl-Kalibrierkurven zur Optimierung der CCD-Elektrodengeometrie: Variation der Länge und Breite der Elektroden, sowie deren Abstand ( $f = 625 \text{ kHz}$ )

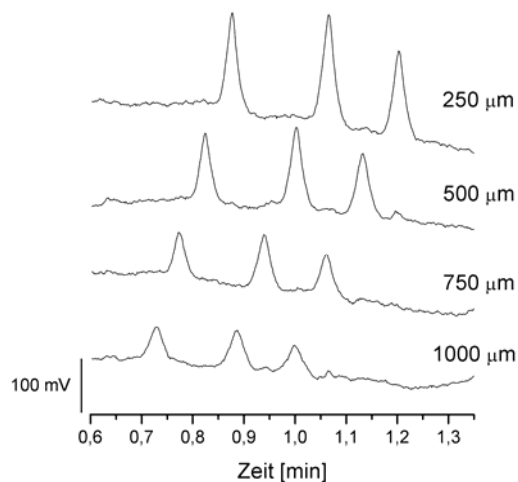


Abb. 4-13 Elektropherogramme einer Testlösung mit  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ :  
CCD-Signal ( $f = 625 \text{ kHz}$ ) bei unterschiedlichem Elektrodenabstand

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die Empfindlichkeit zu verbessern, ist die Reduzierung der Ein- und Auskoppelimpedanzen durch die Verringerung der Deckeldicke. Diese wird durch die Durchschlagsfeldstärke des verwendeten Polymers beschränkt (siehe Tabelle Kapitel 2.2). Dies bedeutet, dass bei einem zu dünnen Deckel die an den Kanal angelegte Trennungsspannung auf den Detektor durchschlagen würde. Befindet sich bei der Trennung der Trennkanalausgang auf Masse-Potential, so fällt die am Trennkanaleingang angelegte Spannung entsprechend zum Ausgang hin ab. Die CCD-Elektroden sollten sich auch deshalb möglichst weit am Ende des Trennkanals befinden.

Bei der in Abbildung 4-14 verwendeten 40  $\mu\text{m}$  Deckfolie handelt es sich um einen sehr dünnen Deckel. Dennoch konnte mit der Verwendung einer noch dünneren 15  $\mu\text{m}$  Deckelfolie eine Verbesserung erzielt werden. Betrachtet man den gesamten Konzentrationsbereich in Abbildung 4-14, so wird ein stärkerer Signalanstieg deutlich.

Des Weiteren können die Ein- und Auskoppelimpedanz durch Wahl eines Polymers mit einer hohen Dielektrizitätszahl reduziert werden (siehe Tabelle Kapitel 2.2).

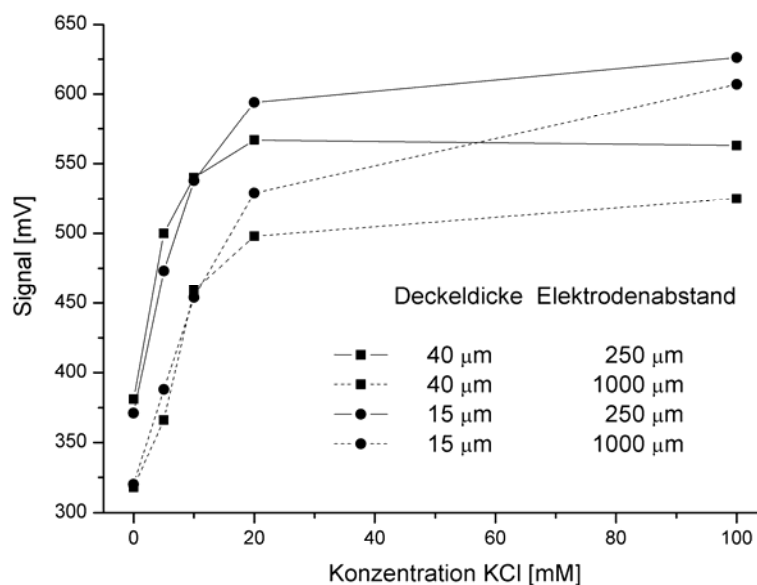


Abb. 4-14 KCl-Kalibrierkurven bei Verwendung sehr dünner Deckelfolien von 40  $\mu\text{m}$  und 15  $\mu\text{m}$  ( $f = 625 \text{ kHz}$ )

Eine in [120] vorgeschlagene Verringerung des Kapillardurchmessers in der Messzelle zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurde der Kanalquerschnitt im Messvolumen zwischen den Elektroden (Abstand: 0,5 mm) auf rund ein Drittel reduziert. Der Vergleich mit der bisherigen Geometrie zeigte keine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses.

In [120] wird beschrieben, dass es durch die Verengung im Detektionsbereich zu einer größeren Impedanz des Analyten kommt und sich somit das Verhältnis zwischen Einkoppelimpedanz und Analytimpedanz verbessern soll, indem die Einkoppelimpedanzen klein im Vergleich zur Analytimpedanz werden. Weiterhin soll die Ein- und Auskopplung des Signals im Bereich der vollen Kanalbreite erfolgen um diese gering zu halten. Die Erhöhung der Analytimpedanz bedeutet jedoch eine Verringerung des Analytleitwerts. Leitwertänderungen, die bei der CCD detektiert werden, werden somit geringer, kleine Signale führen in der Regel zu schlechteren Signal-Rausch-Verhältnissen. Die beschriebene Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei dünneren Kapillaren kann auch darauf zurückzuführen sein, dass die gesamte Kapillare einen reduzierten Querschnitt hat und somit die Erwärmung reduziert wird. Die Streckung des Analytpropfens lässt keine deutliche zeitliche Streckung des Analytsignals mit besserer Auftrennung der Analytpeaks erwarten, da sich in der Verengung die Strömungsgeschwindigkeit erhöht.

## 4.6 Optimierung der Injektion

### 4.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im Injektionskreuzungsbereich

Mit der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Injektion und das Nachströmen an PMMA-Chips mit unterschiedlichen Geometrien untersucht. Verglichen wurden ein Injektionskreuz mit abgerundeten Ecken, dessen Abformwerkzeug durch Mikrozerspanung hergestellt wurde und ein Injektionskreuz mit 90° Ecken, abgeformt mit einem durch UV-LIGA hergestellten Werkzeug.

Abbildung 4-15 zeigt den Injektionskreuzungsbereich bei einer typischen Injektion sowie während der Separation. Sowohl bei der Geometrie der abgerundeten Ecken im Injektionskreuzungsbereich als auch bei der Geometrie der 90° Ecken wird bei der elektrokinetischen Injektion ein deutliches Strömen des Analyten über den eigentlichen Injektionskreuzungsbereich hinaus in den Trennkanal hinein beobachtet. Während der anschließenden Separation kommt es bei beiden Geometrien zu einem unerwünschten Nachströmen des Analyten in den Trennkanal. Dieses war bei mehreren Messungen unterschiedlich stark ausgeprägt.

Um eine größere definierte Analytmenge zu injizieren, ist zudem eine Doppel-T-Injektionskreuzungsstruktur bekannt [20]. Diese wurde ebenfalls untersucht. Bei der Injektion strömt der Analyt etwas über den Doppel-T-Bereich hinaus (siehe Abbildung 4-16).

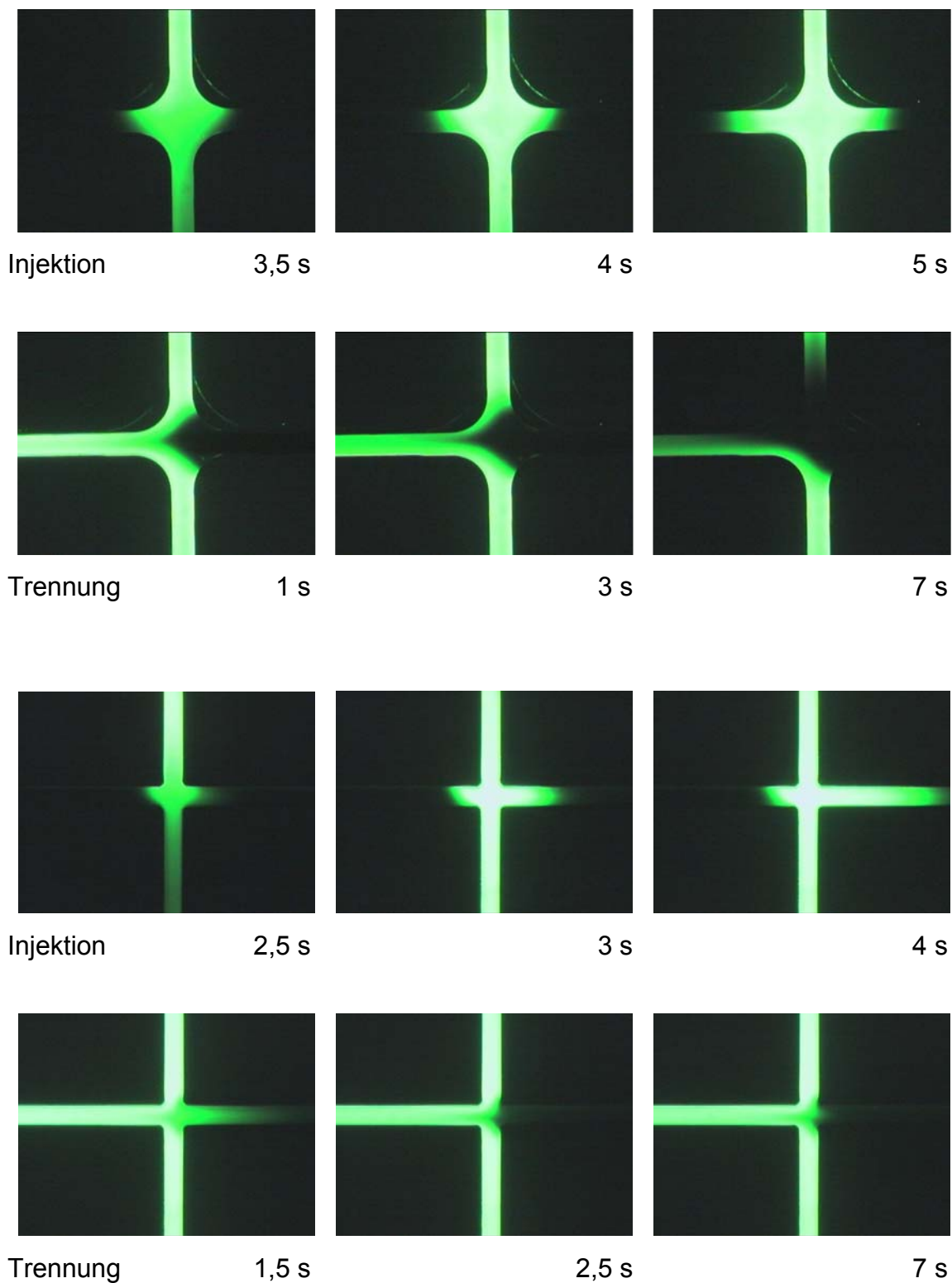


Abb. 4-15 Strömungsverhalten im Injektionskreuz mit abgerundeten und 90° Ecken während Injektion und Trennung (Injektion im Kanal von oben nach unten, Trennung im Kanal von rechts nach links) ( $E_{\text{Inj.}} = 500 \text{ V/cm}$ ,  $E_{\text{Sep.}} = 230 \text{ V/cm}$ )

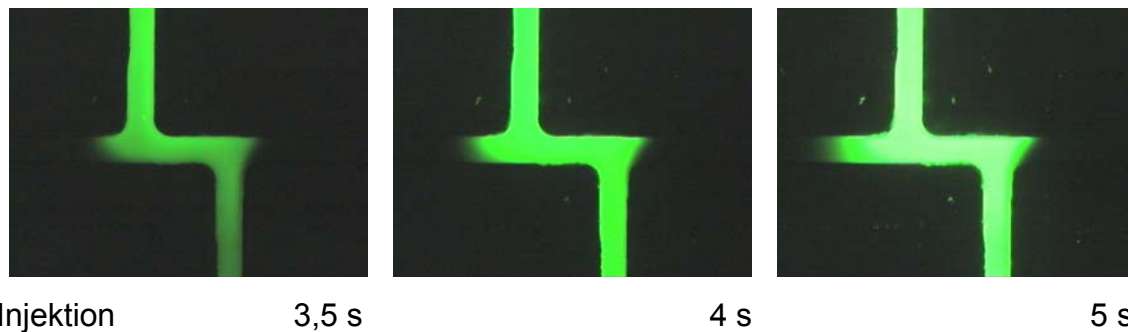


Abb. 4-16 Strömungsverhalten im Doppel-T-Injektionskreuz während der Injektion (Injektion von oben nach unten,  $E_{inj.} = 500 \text{ V/cm}$ )

Im Weiteren wurde der Einfluss der Füllhöhe der Reservoirs untersucht. Abbildung 4-17 zeigt den Einfluss eines Füllhöhenunterschiedes im Analytreservoir auf das Nachströmverhalten während der Trennung. Die Bildserien beginnen nach der Injektion, welche von links nach rechts erfolgt (Analytreservoir links). Der Trennkanal verläuft von oben nach unten. Die Bilder in der Mitte zeigen ein schwaches Nachströmen bei einer gleich hohen Befüllung aller Reservoirs. In der oberen Bildreihe erkennt man, dass schon ein geringfügig höherer Flüssigkeitspegel im Analytreservoir zu einem stärkeren Nachströmen aus der Richtung des Reservoirs führt. Dementsprechend kommt es bei einer entsprechend geringeren Füllhöhe zu einem stärkeren Nachströmen in den Trennkanal aus der Gegenrichtung (untere Bildreihe).



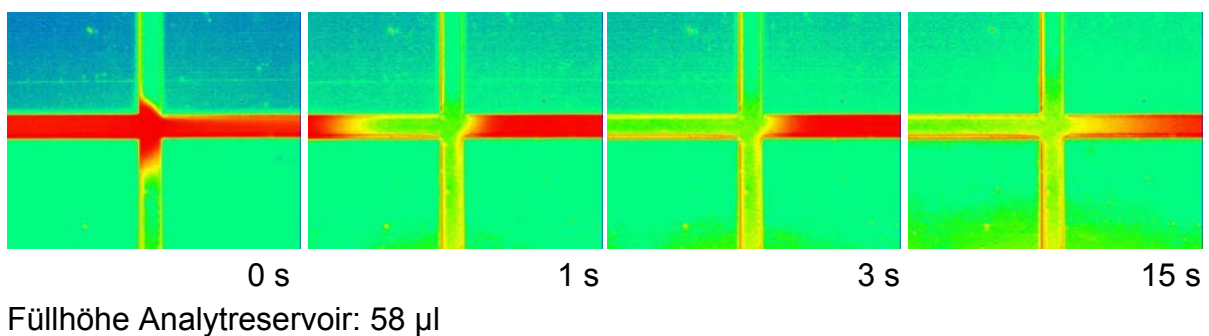
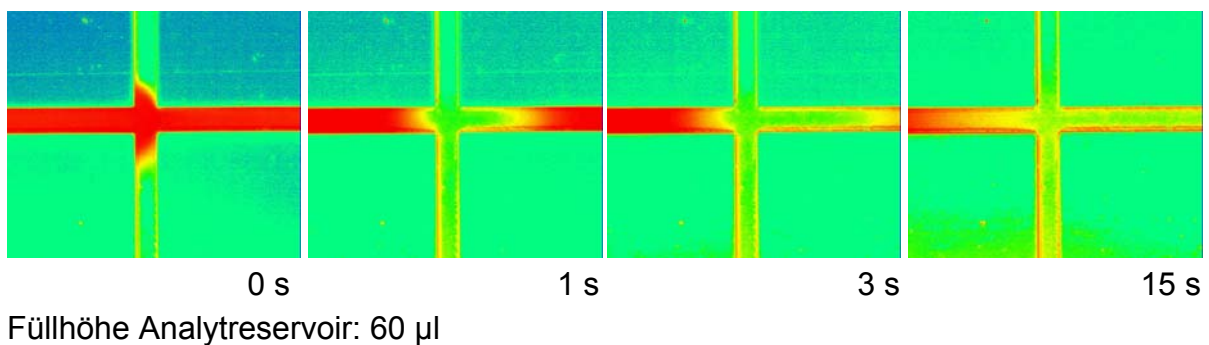
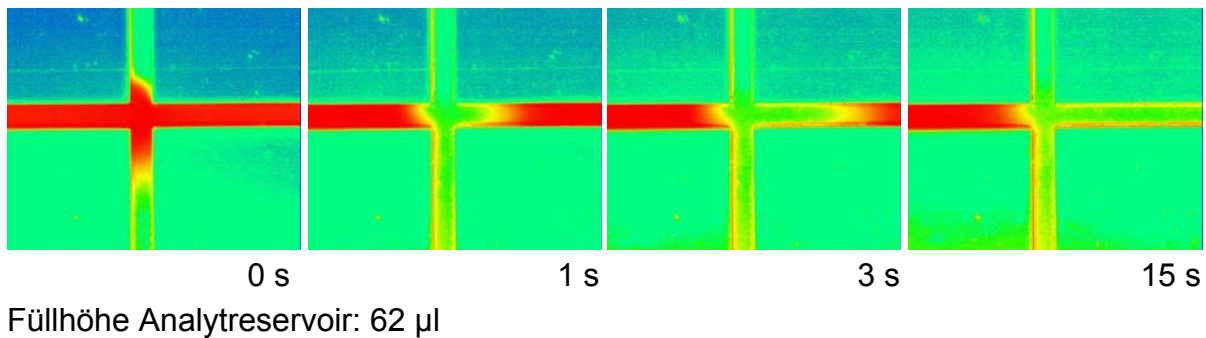


Abb. 4-17 Strömungsverhalten im Injektionskreuz:  
Einfluss der Füllhöhe des Analytreservoirs auf das Nachströmverhalten  
während der Trennung, restliche Reservoirs 60 µl, ( $E_{\text{Sep.}} = 230 \text{ V/cm}$ )

Die Füllhöhe der Reservoirs wirkt sich ebenfalls entscheidend auf die Injektion aus. Abbildung 4-18 zeigt die Injektion über ein Doppel-T-Injektionskreuz. Im linken Bild sind alle Reservoirs gleich hoch befüllt, wohingegen im rechten Analyt- und Analyt-Waste-Reservoir einen geringeren Flüssigkeitspegel aufweisen. Durch die höheren Flüssigkeitspegel im Puffer- und Puffer-Waste-Reservoir strömt während der Injektion deutlich weniger Analyt über den Doppel-T-Bereich in den Trennkanal hinein.

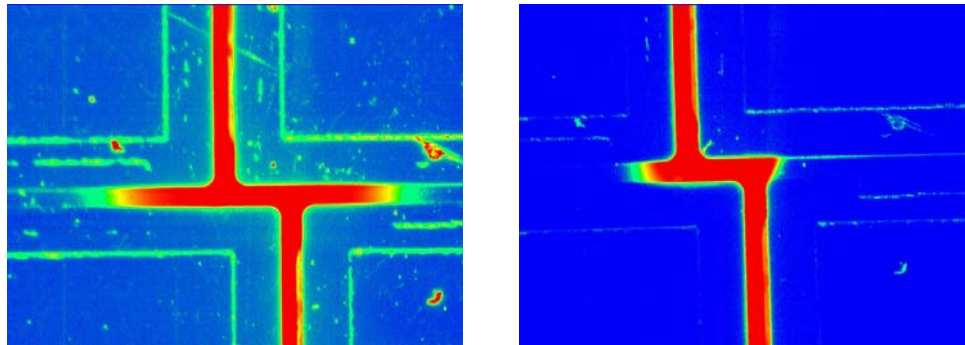


Abb. 4-18 Strömungsverhalten im Doppel-T-Injektionskreuz:  
Einflusses der Füllhöhe der Analytreservoirs auf die Injektion,  
links: alle Reservoirs 60  $\mu\text{l}$  (gleiche Füllhöhe)  
rechts: Analytreservoirs 50  $\mu\text{l}$ , Puffer-Reservoirs 60  $\mu\text{l}$ , ( $E_{\text{inj.}} = 500 \text{ V/cm}$ )

Eine bekannte Methode zur Vermeidung des Nachströmens des Analyten während der Trennung ist das Anlegen einer Pullback-Spannung [17]. Dies bedeutet, dass während der Trennung das Analytreservoir nicht vom Potential getrennt (floating) geschaltet wird, sondern ein Potential angelegt wird, welches den Analyten in den Analytkanal zurückzieht.

Abbildung 4-19 zeigt Versuche zum Anlegen einer Pullback-Spannung. Die Bildserien beginnen nach der Injektion, welche von links nach rechts erfolgte. Der Trennkanal verläuft von oben nach unten. Die erste Bildserie zeigt das typische Nachströmverhalten bei der Trennung, wenn sich die Analytreservoirs im Floating Zustand befinden. Das Anlegen einer Pullback-Spannung in der zweiten Bildserie zeigt deutlich, dass das Nachströmen verhindert werden kann. Bei einem zu starken Pullback-Effekt fließt jedoch Puffer in den Analytkanal; der Analyt wird somit mit Puffer verdünnt. Das Problem dieser Methode ist es das Pullback-Potential definiert so einzustellen, dass kein Analyt nachströmt, aber auch kein Puffer in den Analytkanal gezogen wird. Dieser Punkt konnte nicht stabil fixiert werden.

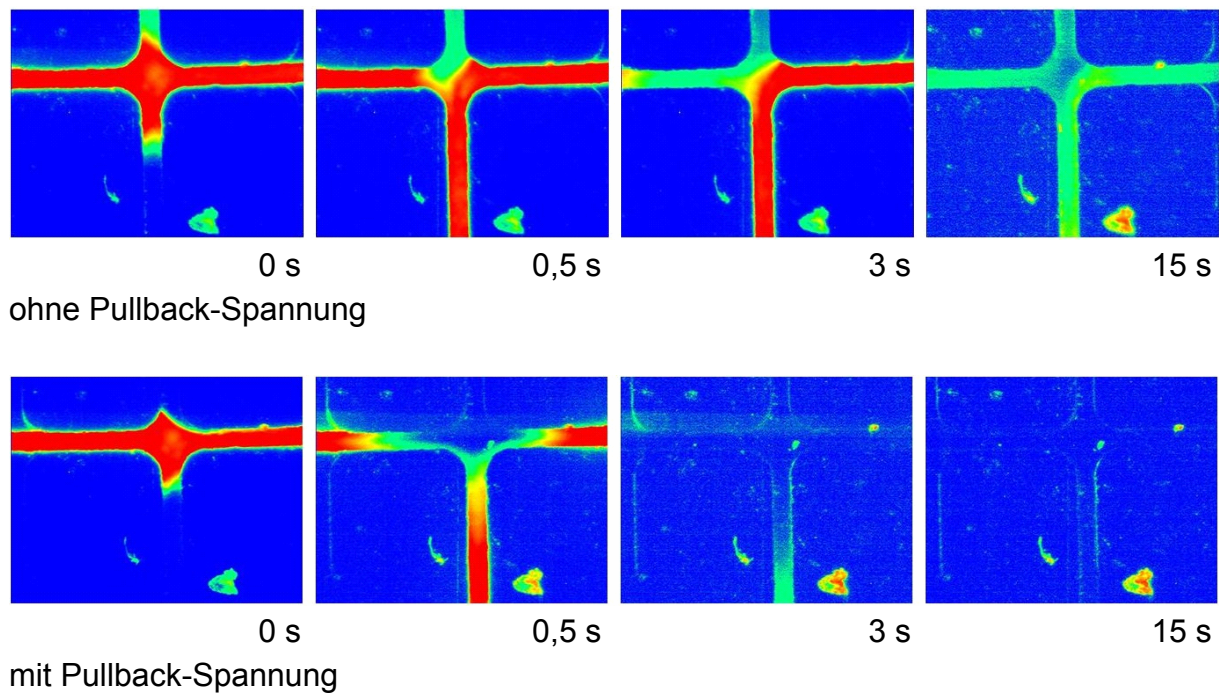


Abb. 4-19 Strömungsverhalten im Injektionskreuz:  
Reduktion des Nachströmverhaltens durch Anlegen einer  
Pullback-Spannung ( $E_{\text{Sep.}} = 230 \text{ V/cm}$ )

#### 4.6.2 Injektion bei Mehrfachanalysezyklen

Erste Versuche zur Injektion bei mehrfach wiederholten Analysezyklen, wie sie zum Beispiel bei einer Prozesskontrolle auftreten können, wurden durchgeführt. Mehrere Analysezyklen (Injektion und Separation) einer Lösung aus  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  wurden in einem CE-Chip aus PMMA mit abgerundetem Injektionskreuz durchlaufen. Dabei wurde der Injektionsstrom aufgezeichnet und die Höhe des Kaliumsignals am Ende der Trennstrecke bestimmt. Der Lösungsansatz des Analyten erfolgte zunächst im Hintergrundelektrolyten, was der Standardmethode entspricht. In weiteren Versuchen wurde der Analyt in Wasser ohne weiteren Elektrolytzusatz gelöst. Bei diesem Verfahren kann durch einen Aufkonzentrierungseffekt des Analyten, dem so genannten Sample-Stacking, eine hohe Messempefindlichkeit erzielt werden [121].

Abbildung 4-20 zeigt bei der Standardmethode einen stabilen Injektionsstrom. Auch bei ungünstigen Bedingungen, wie der langen Injektionszeit und der hohen Injektionsspannung, zeigt das Kaliumsignal nur kleine Schwankungen. Bei der Stacking-Methode hingegen wurden instabile Zustände beobachtet. Beispielhaft ist ein Mehrfachanalysezyklus unter Stacking-Bedingungen in Abbildung 4-21 dargestellt. Das instabile Kaliumsignal am Ende der Trennstrecke kann dabei durch eine instabile Injektionsmenge, sowie durch ein instabiles Nachströmen verursacht sein. Diese sollten auf Diffusionseffekte, die durch Konzentrationsunterschiede im

Injektionskreuzungsbereich entstehen, zurückzuführen sein.

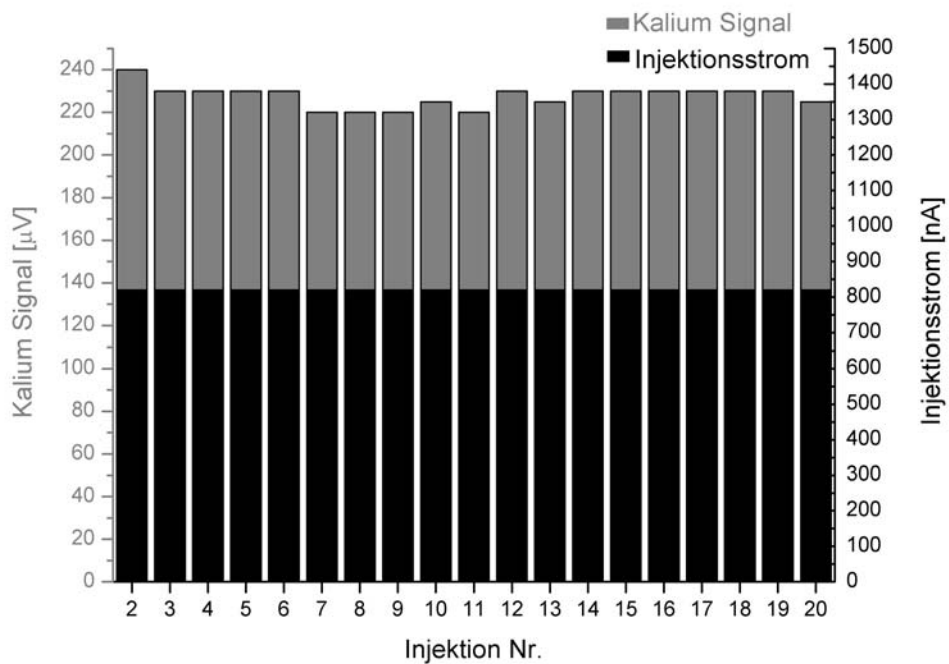


Abb. 4-20 Reproduzierbarkeit bei Standardinjektion, Analyt (250 µM LiCl, NaCl, KCl) in MesHis-Puffer,  $U_i = 1$  kV,  $t_i = 10$  s

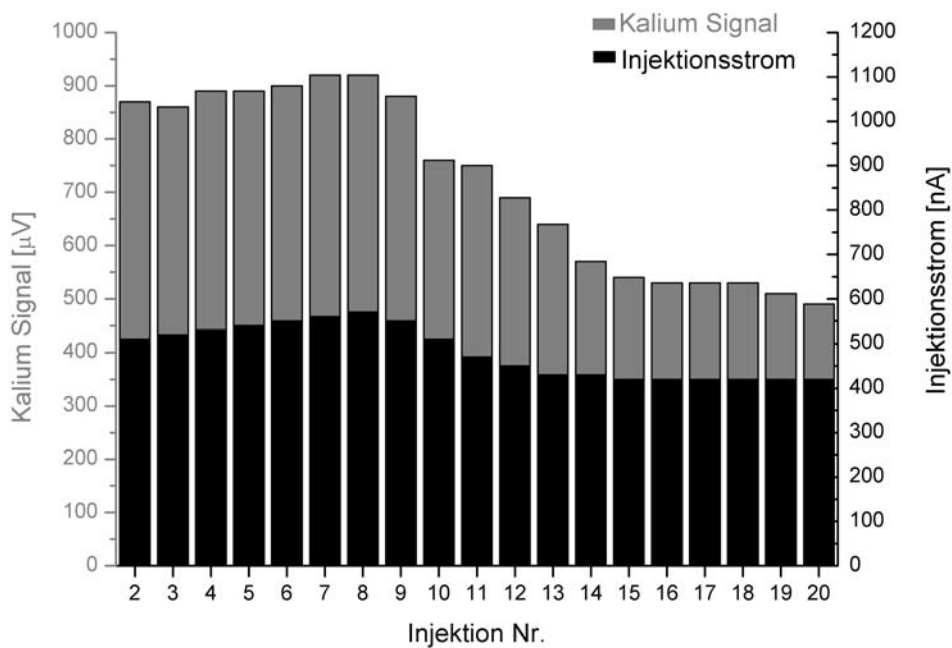


Abb. 4-21 Reproduzierbarkeit bei Sample-Stacking, Analyt (100 µM LiCl, NaCl, KCl) in Wasser,  $U_i = 1$  kV,  $t_i = 10$  s

### 4.6.3 CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich

In Kapitel 4.6.1 wurde gezeigt, dass es während der Trennung zu einem unerwünschten Nachströmen des Analyten in den Trennkanal kommen kann und Unterschiede in den Füllhöhen der Reservoirs dieses Verhalten wesentlich beeinflussen. Diese wirken sich ebenfalls auf die Injektionsmenge aus. Die Versuche in Kapitel 4.6.2 zeigten, dass unter Standardbedingungen dennoch stabile Messungen durchführbar sind, es aber bei speziellen Methoden zu Instabilitäten kommen kann.

Zur Kontrolle ist es bei der Analyse deshalb wünschenswert, Informationen über die tatsächlich injizierte Analytmenge sowie über den Nachstrom zu gewinnen. Wenn die tatsächlich injizierte Menge bekannt ist, kann dadurch die quantitative Analyse verbessert werden. Eine kontinuierliche Information über den Nachstrom könnte zur Regelung einer Pullback-Spannung genutzt werden, um diesen zu verhindern.

Optische Methoden scheiden bei der Lösung der Aufgabe aus, da sie teuer und aufwendig sind. Des Weiteren würde eine Beimengung von Farbstoff die Messung beeinträchtigen. Eine Messung der elektrischen Ströme über den ganzen Kanal ist bei einer geforderten Genauigkeit von wenigen Nano-Ampere ebenfalls aufwendig. Zudem werden hydrostatische Effekte von einer solchen Messung nicht erfasst. Es bietet sich aber an, die bisher ausschließlich zur Messung der Separation am Ende des Trennkanals genutzte CCD auch zur Charakterisierung der Lösungsströme im Injektionsbereich zu nutzen. Grundlage sind die unterschiedlichen elektrischen Leitfähigkeiten von Hintergrundelektrolyt und Analytgemisch, wobei letztere in der Regel höher ist.

Deshalb wurden zusätzliche CCD-Messelektroden im Injektionskreuzungsbereich angebracht (siehe Abbildungen 4-22 und 4-23). Ein Messelektrodenpaar ist in Richtung des Injektionskanals angeordnet, ein weiteres in Richtung des Trennkanals.

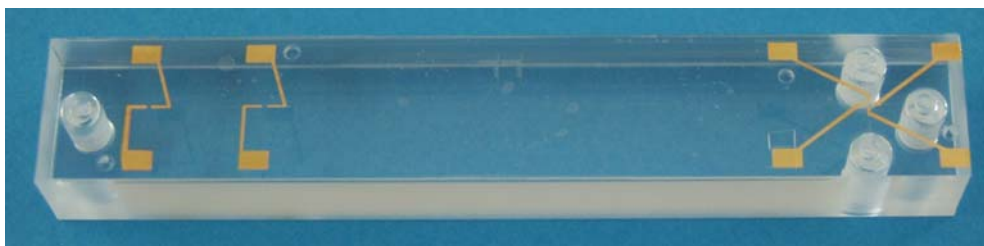


Abb. 4-22 CE-Chip mit aufgesputterten CCD-Elektroden im Injektionskreuzungsbereich (rechts)

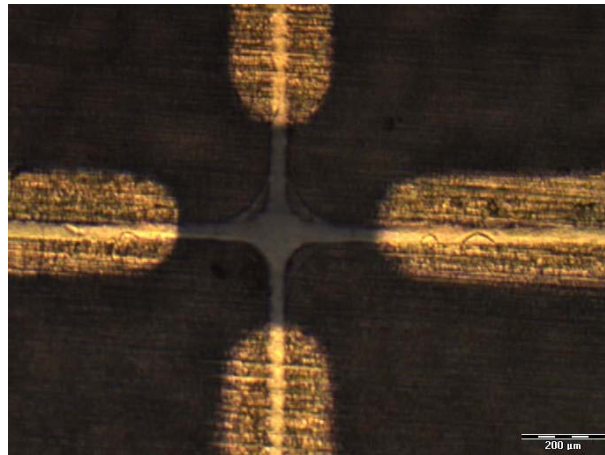


Abb. 4-23 Aufgesputterte CCD-Elektroden im Injektionskreuzungsbereich

Erste grundlegende Messungen mit dieser Elektrodenanordnung wurden an CE-Chips mit abgerundeten Injektionskreuzen (abgeformt / PMMA) und an Injektionskreuzen mit 90° Ecken (laserstrukturiert / Polyimid) durchgeführt. Dabei wurde nacheinander in Injektionsrichtung und in Trennrichtung gemessen (Abstand der Elektroden zum Injektionskreuzungsmittelpunkt: 250  $\mu\text{m}$ , Elektrodenlänge: 1 mm).

In den Abbildungen 4-24 und 4-25 sind die mit den über dem Injektionskreuz angeordneten Messelektrodenpaar in Richtung des Injektionskanals gemessenen Signale bei den beiden verschiedenen Kreuzungsgeometrien bei einer Variation der Injektionszeit dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach einer Sekunde der Injektionskanal noch nicht vollkommen mit Analyt befüllt ist, dies tritt erst ein, wenn der Kurvenverlauf nicht weiter ansteigt. Der am Ende der Injektionszeit kurze Anstieg des Signals ist in diesen, wie in allen folgenden Diagrammen, auf den Umschaltimpuls der Hochspannung von der Injektion auf die Separation zurückzuführen. Beobachtet man den gleichen Vorgang mit dem Elektrodenpaar über dem Trennkanal (Abbildungen 4-26 und 4-27), so erkennt man, dass die Signale auch nach 10 Sekunden noch weiter ansteigen, d.h. es strömt kontinuierlich mehr Analyt in den Separationskanal hinein.



Bei einer Variation der Injektionsspannung (feste Injektionszeit jeweils 5 Sekunden) zeigt sich bei der Betrachtung in Richtung des Injektionskanals (Abbildung 4-28) mit zunehmender Spannung ein steilerer Anstieg des Kurvenverlaufs. Der Analyt bewegt sich schneller durch den Injektionskanal, somit wird das Ende des Anstiegs, d.h. die komplette Befüllung des Kanals, früher erreicht. Die Betrachtung desselben Vorgangs in Richtung des Separationskanals (Abbildung 4-29) zeigt, dass kontinuierlich mehr Analyt in den Separationskanal strömt und sich die Menge mit zunehmender Injektionsspannung stärker erhöht, da der Analyt schneller hineinströmt.

Bei der Variation der Trennspannung (Abbildung 4-30 Richtung Injektionskanal; Abbildung 4-31 Richtung Trennkanal) ist der Signalverlauf nach der Injektionszeit (nach 5 Sekunden) von Interesse. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Trennspannung das Signal schneller abfällt, d.h. dass der Analyt schneller aus dem Injektionskreuzungsbereich entfernt wird. Danach stellt sich mit zunehmender Trennspannung tendenzielle eine kleinere Signalhöhe ein, was auf ein schwächeres Nachströmen hindeutet.

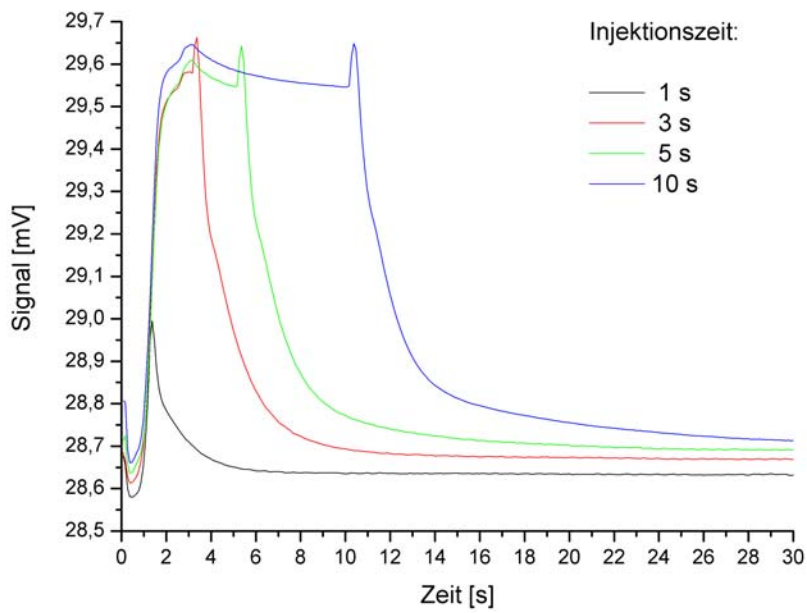


Abb. 4-24 Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal

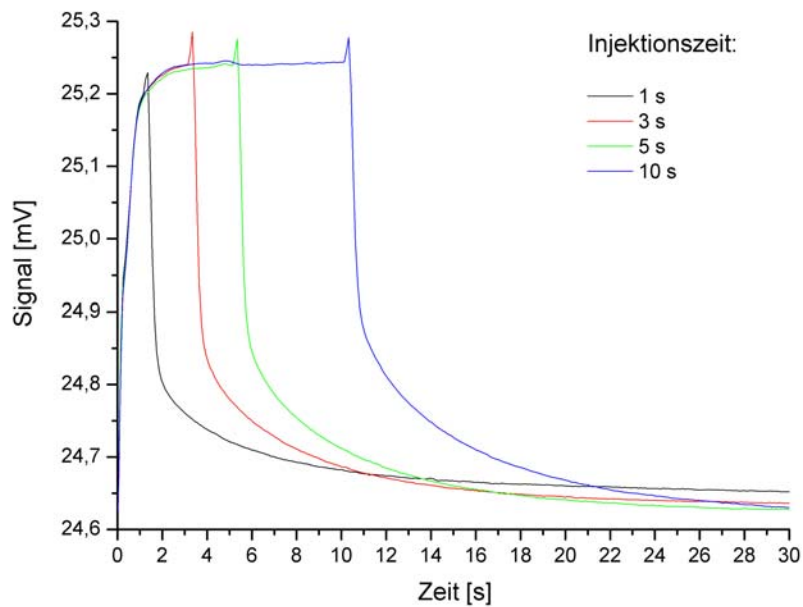


Abb. 4-25 Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit 90° Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal



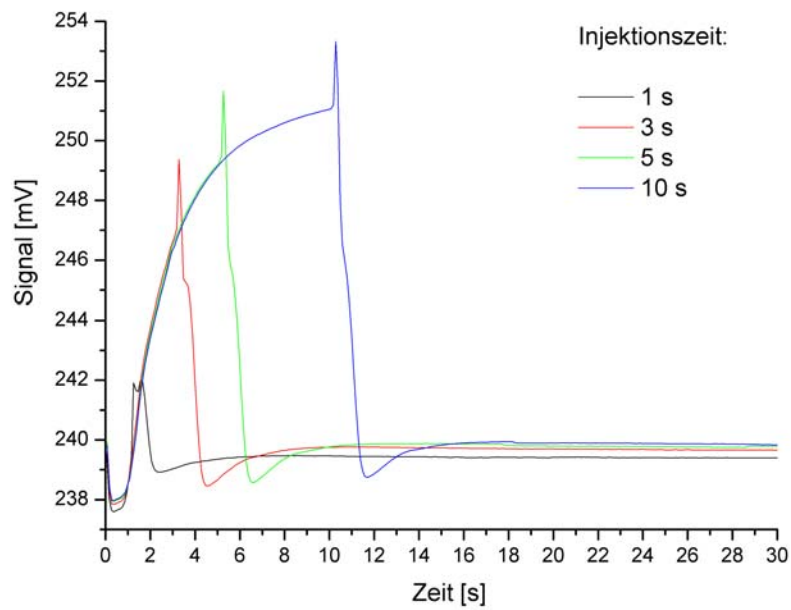


Abb. 4-26 Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal

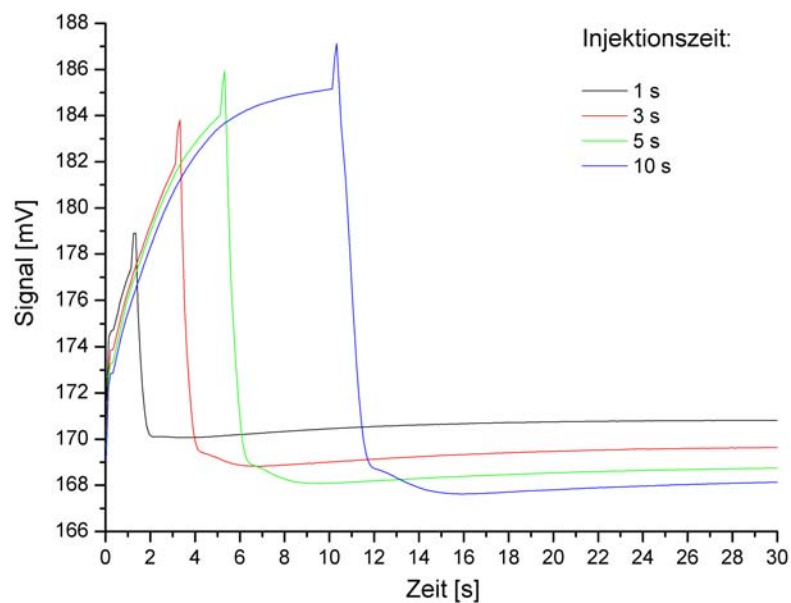


Abb. 4-27 Variation der Injektionszeit bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit 90° Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal

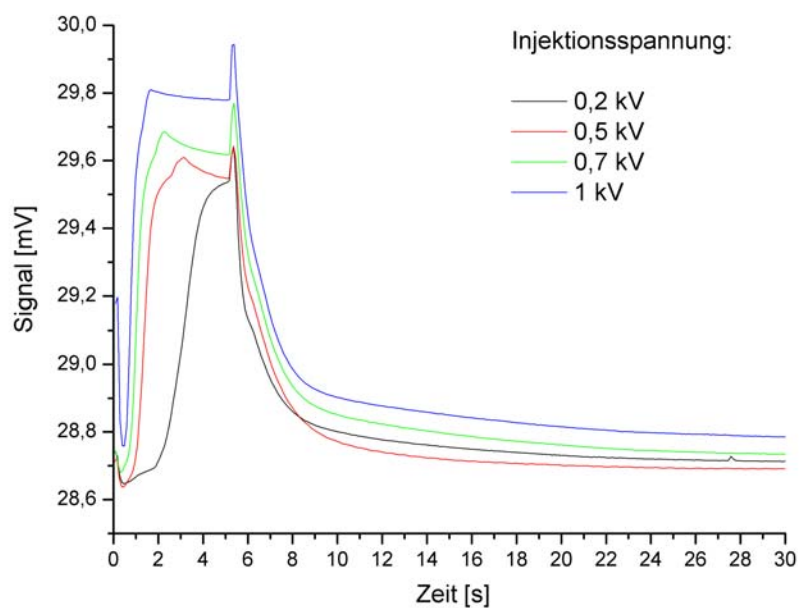


Abb. 4-28 Variation der Injektionsspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal

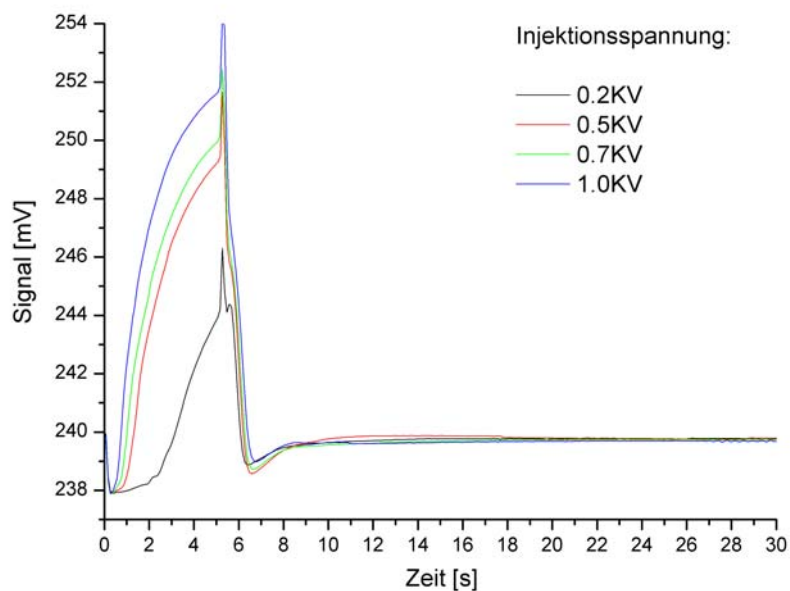


Abb. 4-29 Variation der Injektionsspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal

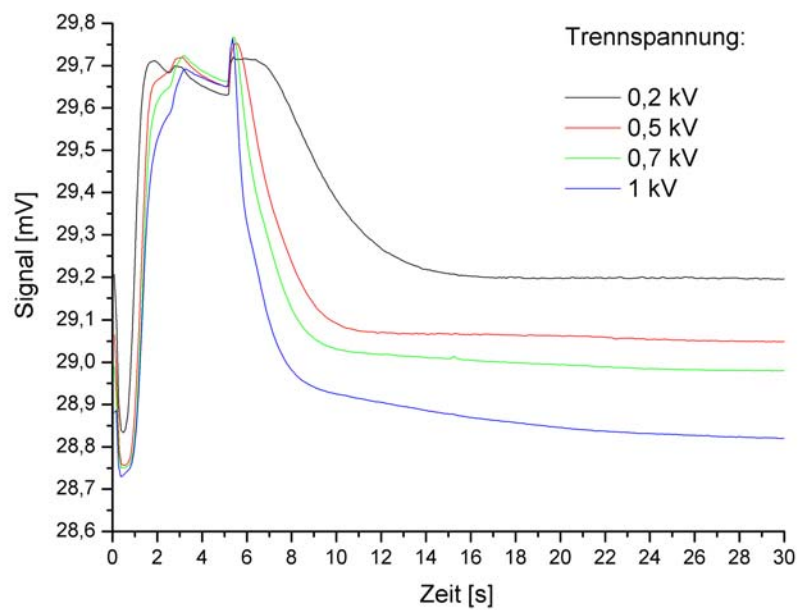


Abb. 4-30 Variation der Trennungsspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Injektionskanal

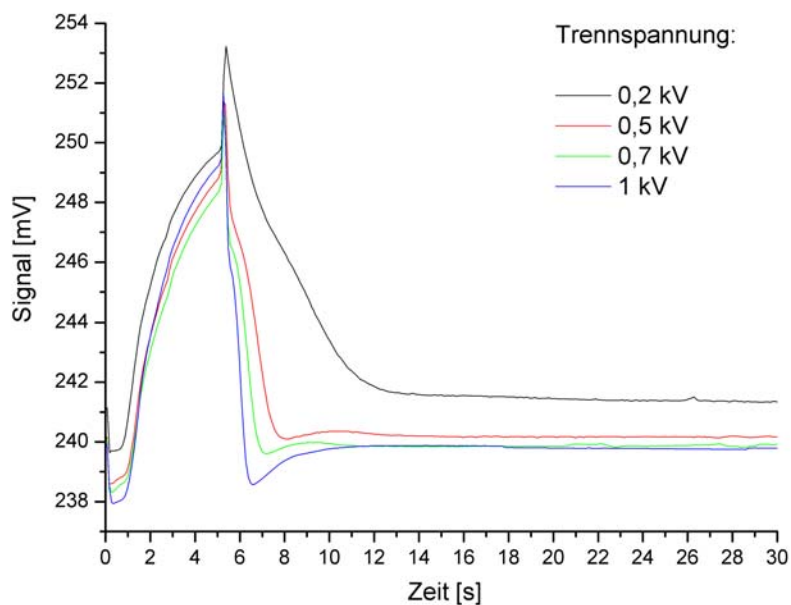


Abb. 4-31 Variation der Trennungsspannung bei CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal

Die Messungen in Kapitel 4.6.2 zeigten, dass sich bei Mehrfachanalysezyklen bei der Standardmethode, wobei der Analyt im Elektrolyt gelöst wird, stabile Bedingungen einstellen. Bei der Methode des Sample-Stackings, bei der der Analyt in Wasser ohne weiteren Elektrolytzusatz gelöst wird, wurden hingegen instabile Injektionsströme und Analytsignale am Ende der Trennstrecke beobachtet, was durch eine instabile Injektionsmenge und ein instabiles Nachströmverhalten verursacht werden kann.

Setzt man die CCD-Elektroden im Injektionskreuz zur Kontrolle bei Mehrfachanalysezyklen ein, so zeigen sich ebenfalls stabile Injektionen und ein stabiles Nachströmverhalten (siehe Abbildung 4-32). Bei der Methode des Sample-Stackings hingegen sind deutliche Instabilitäten in der Injektion und im Nachströmverhalten zu beobachten (siehe Abbildung 4-33). Bei vergleichenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Mehrfachinjektion (hier nicht dargestellt) traten weniger deutliche Unterschiede zwischen der Standardmethode und dem Sample-Stacking auf. Zudem ist diese CCD-Messung aussagekräftiger, da am Ende des Trennkanals der Analyt mit dem gleichen Messprinzip erfasst wird.

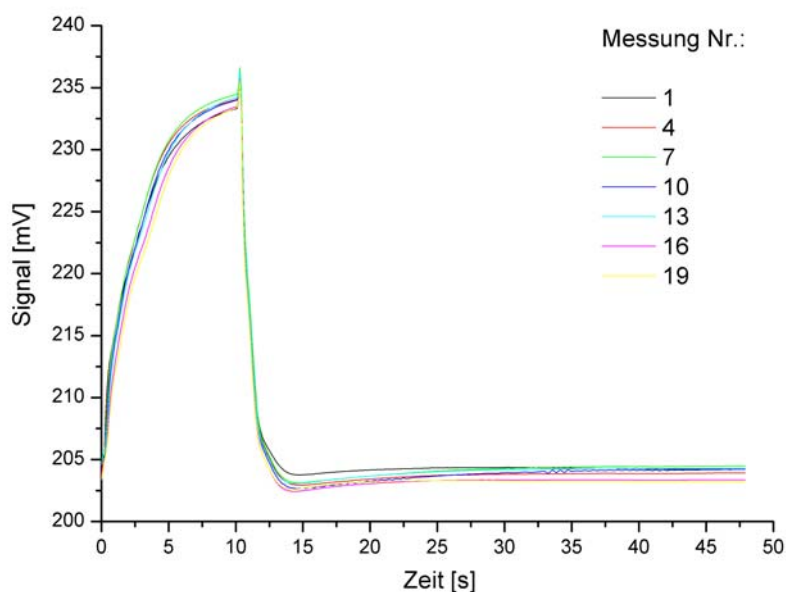


Abb. 4-32 Kontrolle von Mehrfachanalysezyklen durch CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, Analyt im Hintergrundelektrolyten (BGE) verdünnt, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal

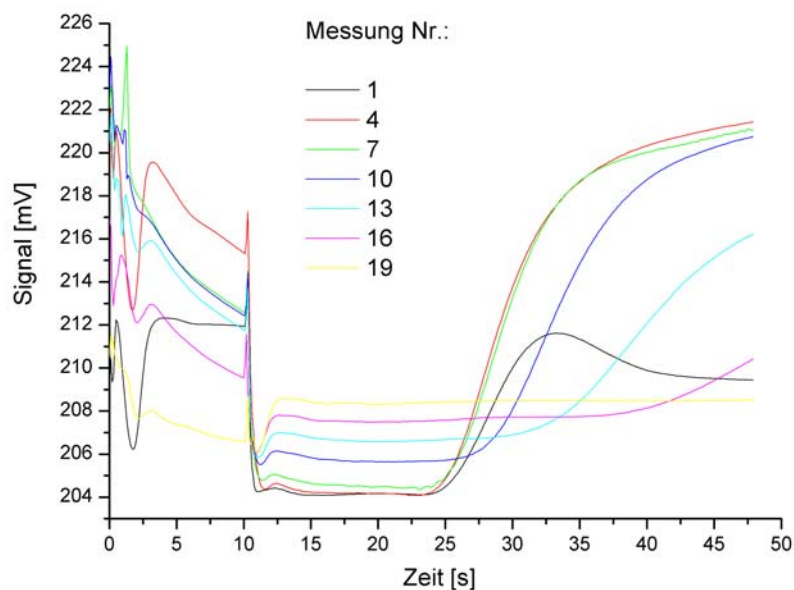


Abb. 4-33 Kontrolle von Mehrfachanalysezyklen durch CCD-Messungen im Injektionskreuzungsbereich, Analyt in Wasser verdünnt, CE-Chip mit abgerundeten Ecken im Kreuzungsbereich, Elektroden über dem Trennkanal

Die Messungen zeigen, dass die CCD im Injektionskreuzungsbereich zur Kontrolle der Injektion und des Nachströmens eingesetzt werden kann [148]. Durch Kontrolle der injizierten Analytmenge kann ggf. die quantitative Analyse verbessert werden. Des Weiteren sollte es möglich sein, durch die CCD-Messung des Nachströmens eine Regelung der Pullbackspannungen zu realisieren. Diese Methoden sind auch bei Einzelanalysen sinnvoll anwendbar. Bei einer Beschränkung auf die Überwachung der Injektion kann während dieser ggf. die schon vorhandene CCD-Elektronik auf diesen Bereich umgeschaltet werden.

## 4.7 Anwendung zur Analytik kleiner Ionen

### 4.7.1 Lebensmittelanalytik

Die Bestimmung kleiner Ionen in der Lebensmittelanalytik ist ein breites Gebiet, wobei insbesondere in Getränken die organischen Säuren und Zucker von Interesse sind. In einem breiten Anwendungsfeld, welches von der Fermentationsüberwachung über die Prozesskontrolle bis hin zu Produktauthentizitätsprüfung reicht, ist es notwendig, schnelle und kostengünstige Bestimmungen unter geringem Kapitaleinsatz durchzuführen. Die Kapillarelektrophorese ist dabei eine kostengünstige Alternative zur HPLC (HHiH PPressure LLiquid CChromatography) und GC-MS (GGas CChromatography - MMass SSpectrometer) [122]. Polymer-CE-Chips mit kontaktloser Leitfähigkeitsmessung in Verbindung mit der MinCE (Kapitel 3.4) bieten gegenüber Standardkapillarelektrophoresegeräten nochmals einen erheblichen Kostenvorteil. Zudem handelt es sich um ein kleines und portables System. Im Vergleich zur Trennung in einer rund zehnfach längeren Standardglaskapillare [122] [123] sind jedoch neben kürzeren Analysezeiten schlechtere Trennungen zu erwarten. Es ist daher zu untersuchen, inwieweit dennoch ausreichende Resultate erzielt werden können.

Aufgrund seiner vielen unterschiedlichen organischen Säuren stellt die Analyse von Wein eine entsprechend hohe Anforderung an die Trennleistung. Betrachtet wurden die Hauptsäureanteile des Weins, welche sich bei seiner Herstellung in ihrem Verhältnis steuern lassen und wesentlich dessen Geschmack beeinflussen.

Die Trennungen wurden im neutralen pH-Bereich durchgeführt. Somit konnten CE-Chips aus PMMA verwendet werden. Aufgrund der hohen Säurekonzentration in Wein mussten die Weine im Hintergrundelektrolyten verdünnt werden. Beste Ergebnisse konnten bei Verdünnungen von 1 : 50 bis 1 : 100 erzielt werden. Als Hintergrundelektrolyt wurde zunächst 10 mM MesHis eingesetzt.

Abbildung 4-34 zeigt die Fingerprints von zwei Rotweinen und zwei Weißweinen, sowie einem Standard als Referenz. Neben den organischen Säuren wurde in die Referenz Sulfat aufgenommen, da es sich um einen weiteren interessanten Parameter handelt. Schweflige Säure wird in kleineren Konzentrationen bei der Gärung von Wein gebildet. Erhöht wird die Konzentration durch das Schwefeln, welches zur Konservierung des Weines dient. Dies kann zum Beispiel durch Zugabe von schwefliger Säure erfolgen. Das Sulfid wirkt dabei antimikrobiell und enzymdeaktivierend sowie reduzierend, d.h. es wird durch freien Sauerstoff zu Sulfat oxidiert und dient somit als Oxidationsschutz. Bei der Herstellung von qualitativ hochwertigen Weinen wird möglichst wenig geschwefelt.

Die Fingerprints zeigen, dass bei den beiden Weißweinen (Weißburgunder, Müller-Thurgau) die Äpfelsäure und bei den beiden Rotweinen (Sangiovese, Chateau Baronne) die Weinsäure die Hauptkomponente darstellt. Während der Reifung der Traube wird Äpfelsäure in Zucker umgewandelt. Dagegen bleibt der Weinsäureanteil nach seinem Aufbau konstant, sodass sich das Verhältnis der beiden Säuren mit der Reifung zugunsten der Weinsäure verschiebt. Nach der alkoholischen Gärung kann ein biologischer Säureabbau eingeleitet werden, bei dem Äpfelsäure in Milchsäure umgewandelt wird. Durch diesen Prozess lässt sich der Geschmack des Weines beeinflussen, da Milchsäure einen wesentlich mildereren und runderen Geschmack als Äpfelsäure besitzt. Eingesetzt wird diese Methode hauptsächlich bei Rotweinen, da Weißweine an Fruchtigkeit verlieren würden. Die Äpfelsäure gibt dem Wein einen spritzigen und erfrischenden Geschmack. Ein unkontrollierter oder spontaner Abbau kann zu Weinfehlern, wie zum Beispiel einem Joghurt-Aroma oder einem Milchsäurestich führen. Als Nebenprodukt entsteht dabei Bernsteinsäure, die in Weintrauben nur in geringem Umfang enthalten ist. Zitronensäure wird ebenfalls in Milchsäure abgebaut. Kommt der Wein längere Zeit mit Luft in Kontakt, so können Essigsäurebakterien Ethanol zu Essigsäure oxidieren, d.h. der Wein wird sauer. Bei dem Wein aus dem Chateau Baronne, der 25 Jahre alt war, ist dies deutlich zu erkennen.

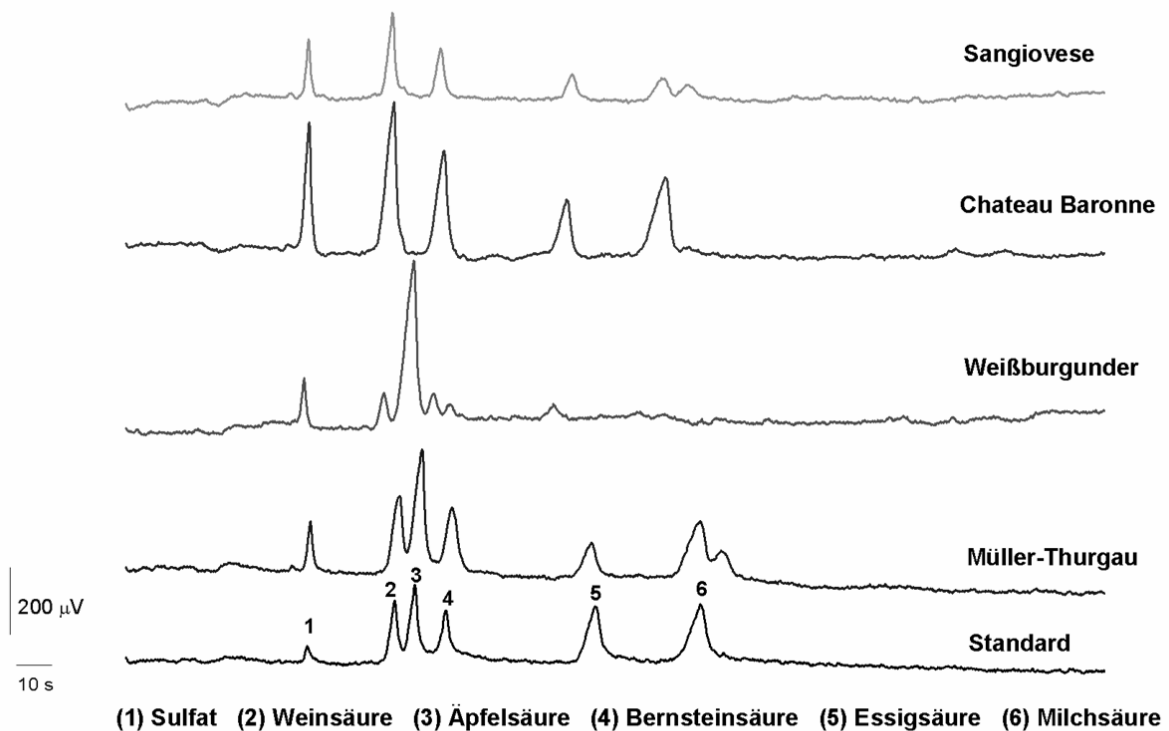


Abb. 4-34 Elektropherogramme: Fingerprints verschiedener Weine, Hauptsäurebestandteile, BGE: 10 mM MesHis

Die im Standard enthaltenen Säuren konnten bei allen Weinen sauber voneinander getrennt werden [124]. Beim Weißburgunder zeigt sich zwischen der Äpfelsäure und der Bernsteinsäure ein weiterer Peak. Durch Zugabe von Zitronensäure zur Probe wurde herausgefunden, dass es sich um diese handelt. Es wurden Simulationen zur Trennung der Säuren mit dem Simulationsprogramm PeakMaster, welches frei verfügbar ist [125] [126] [127], durchgeführt. Mit diesem Programm lassen sich CE-Trennungen bei verschiedenen Kapillarlängen und angelegten Feldstärken simulieren. Insbesondere kann damit der Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die Trennung untersucht werden und es können so Puffer speziell für die Trennung einer bestimmten Analytzusammensetzung optimiert werden. Bei Verwendung eines 10 mM MesHis-Puffers ließen die Simulationsergebnisse keine Trennung dieses Peaks erwarten. Abbildung 4-35 zeigt Simulationen mit PeakMaster. Im oberen Bild ist eine Trennung ohne die Zitronensäure dargestellt, im unteren Bild erkennt man keine Trennung der Zitronensäure von der Weinsäure. Der verwendete Chip besitzt zudem eine im Vergleich zur Simulation nur halb so lange Trennstrecke.

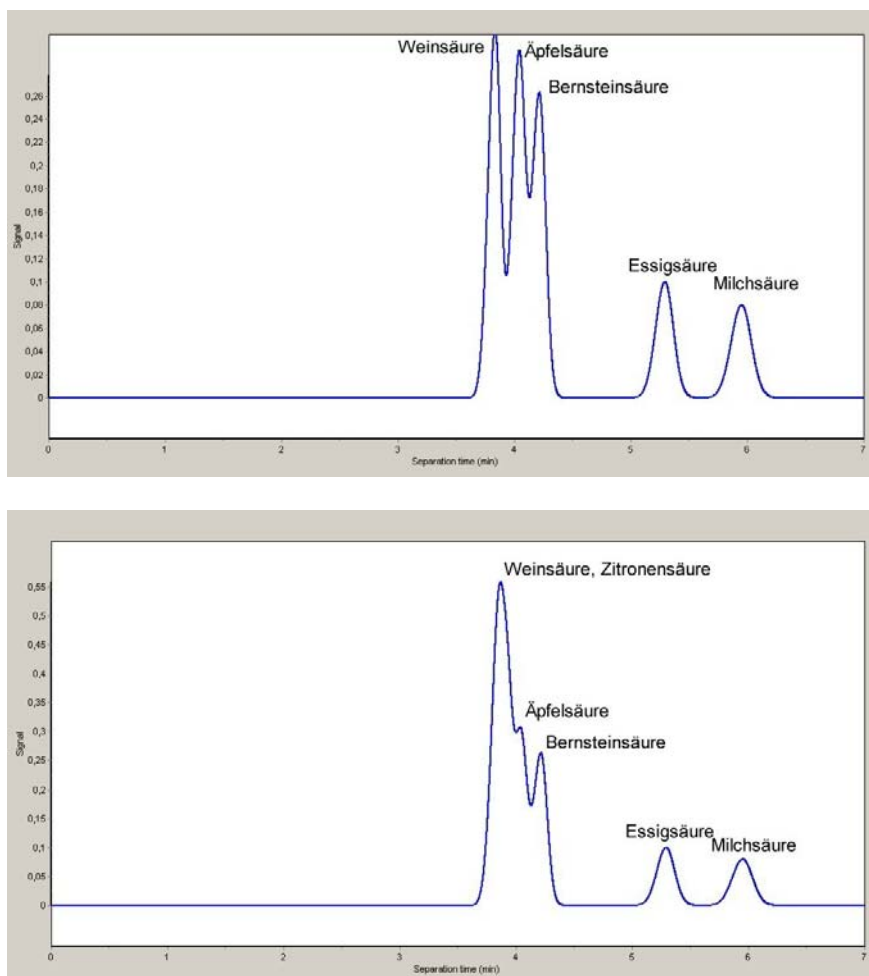


Abb. 4-35 Simulationen mit dem Simulationstool PeakMaster:  
Trennung der Hauptsäurebestandteile von Wein,  
doppelte Trennstrecke: 15 cm,  $U_t = 2$  kV, BGE: 10 mM MesHis



Abbildung 4-36 zeigt die Simulation einer Trennung der Säuren in einer langen Kapillaren mit einer Trennstrecke von 75 cm. Im Gegensatz zur Simulation erscheint die Zitronensäure bei der Messung mit dem Chip nicht vor, sondern erst nach der Äpfelsäure.

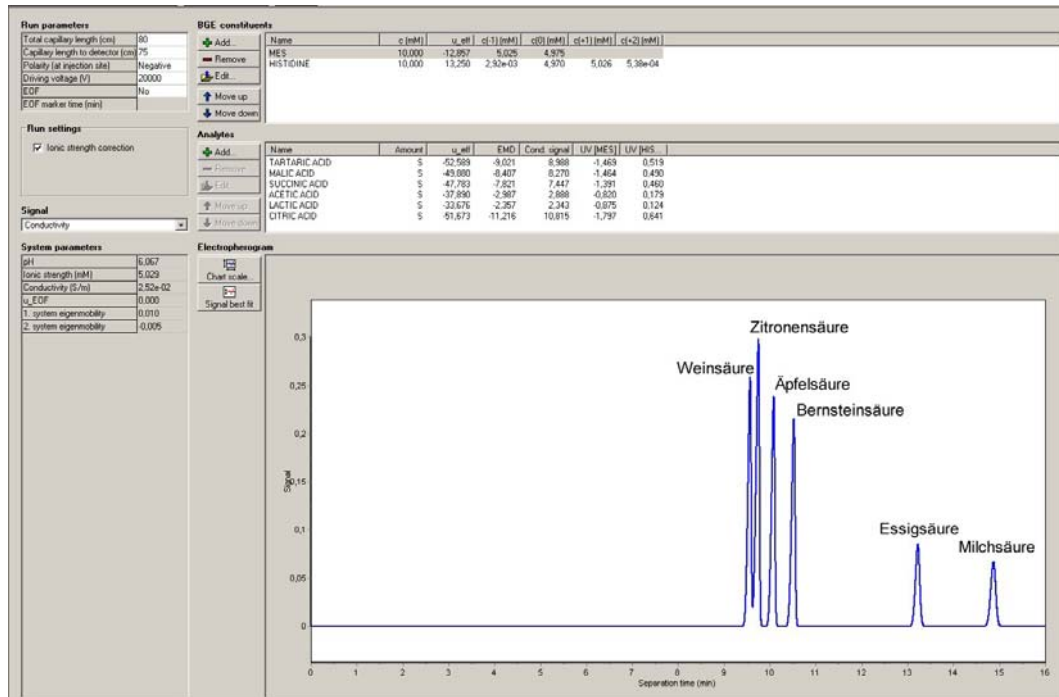


Abb. 4-36 Simulationen mit dem Simulationstool PeakMaster: Trennung der Hauptsäurebestandteile von Wein, lange Kapillare, Trennstrecke: 75 cm,  $U_t = 20$  kV, BGE: 10 mM MesHis

Durch eine weitere Optimierung konnte die Trennung nochmals verbessert werden. Für die Trennungen in Abbildung 4-37 wurde ein Puffer aus 30 mM Mes und 10 mM His verwendet. Weinsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure und Bernsteinsäure sind ideal von einander getrennt. Der sehr alte chinesische Wein zeigt neben einem erhöhten Anteil an Essigsäure für einen Weißwein viel Milchsäure. Der Reiswein enthält ebenfalls viel Milchsäure und besitzt so einen weichen Geschmack, ebenso der Sherry. Der Pflaumenwein Ume hingegen zeigt eine ausgewogene Verteilung von Apfel- und Milchsäure und einen hohen Anteil an Zitronensäure.

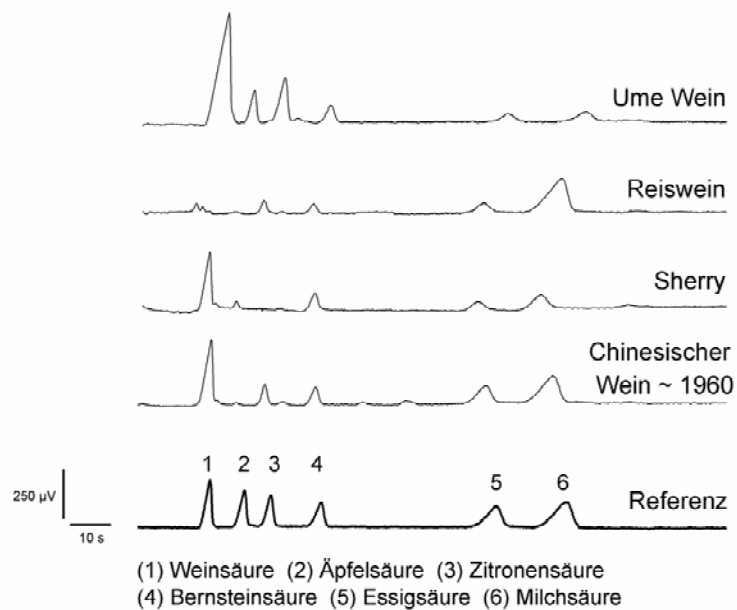


Abb. 4-37 Elektropherogramme: Fingerprints verschiedener Weine, Hauptsäurebestandteile, BGE: 30 mM Mes 10 mM His

Neben den organischen Säuren sind in Getränken Saccharide von großem Interesse. Diese sind im neutralen pH-Bereich nicht dissoziiert, sodass die Trennung in einem stark basischen Hintergrundelektrolyten erfolgen musste. Nach guten Simulationsergebnissen wurde 50 mM NaOH verwendet. Da PMMA bei dem sich einstellenden pH-Wert von 12,35 nicht mehr dauerhaft stabil ist, wurden die Trennungen in CE-Chips aus PEEK durchgeführt [115]. Weiterhin wurde die Trennung durch Modifizierung des elektroosmotischen Flusses mit dem EOF-Modifizierer Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) optimiert (siehe Kapitel 4.4).

Abbildung 4-38 zeigt eine Trennung der Monosaccharide Fructose und Glucose, sowie der Disaccharide Lactose und Saccharose im Standard. Die Beerenauslese weist nur die natürlich in der Traube vorkommenden Fructose und Glucose auf. Saccharose kann in Weintrauben nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Fructose wird während der Reifung nach Glucose gebildet und ist so in überreifen und edelfaulen Beeren stärker enthalten. Der Pflaumenwein Ume weist eine große Menge an Saccharose auf, welches in großen Mengen in Rüben- und Rohrzucker enthalten ist. Dies deutet auf eine nachträgliche künstliche Süßung hin.

Über den Wein hinaus wurde die Getränkeanalytik auf weitere Getränke ausgedehnt (siehe Abbildung 4-39). Im Gegensatz zum Traubensaft, bei dem die hauptsächlich in der Traube vorkommende Fructose und Glucose nachgewiesen wurden, enthielt

der Johannisbeernektar zusätzlich Saccharose. Dies entspricht der Kennzeichnung, bei der bei einem Nektar im Gegensatz zum Saft nachträglich eine größere Menge an Zucker zugesetzt werden darf. Cola enthält erwartungsgemäß viel Saccharose.

In weiteren Messungen konnte auch Lactose in Milch nachgewiesen werden. Da viele Menschen unter Lactoseunverträglichkeit leiden, wird inzwischen auch lactosefreie Milch angeboten. Bei dieser Milch konnte keine Lactose mehr nachgewiesen werden.

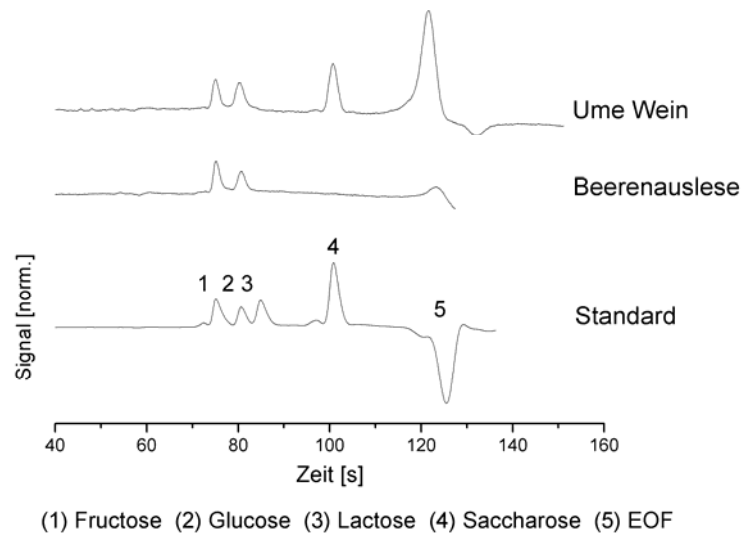


Abb. 4-38 Elektropherogramme von Sacchariden in verschiedenen Weinen, Standard je 5 mM, BGE: 50 mM NaOH (pH 12.65) mit 0,2 mM CTAB

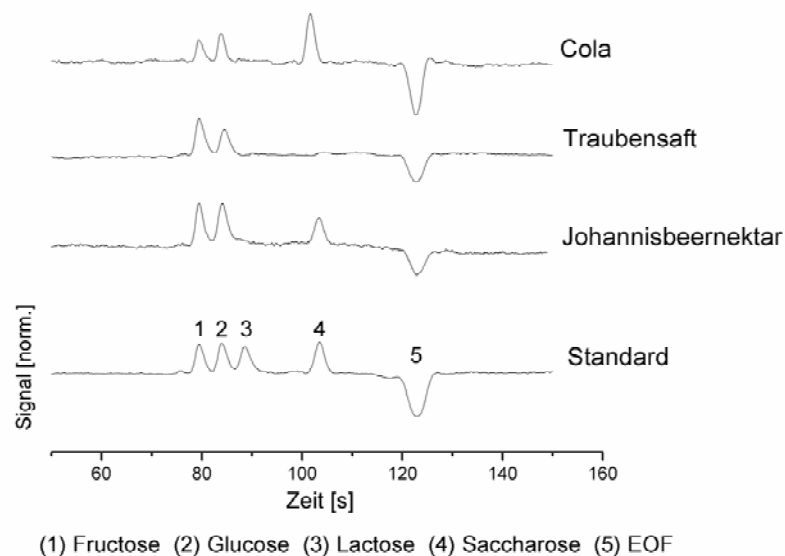


Abb. 4-39 Elektropherogramm von Sacchariden in verschiedenen Getränken, Standard je 5 mM, BGE: 50 mM NaOH (pH 12.65) mit 0,2 mM CTAB

#### 4.7.2 Medizinische Diagnostik

Zur Behandlung von Depressionen wird häufig Lithium eingesetzt [128]. Dabei muss die Lithiumdosierung individuell auf den Patienten eingestellt werden. Die zur Behandlung erforderliche ideale Konzentration von Lithium im Blut bewegt sich individuell im Bereich von 0,5 bis 1,2 mM, um diese zu erreichen sind für jeden Patienten unterschiedliche Lithiumdosierungen notwendig. Des Weiteren kann es durch Schwankungen in der Ausscheidung, zum Beispiel durch verstärkte Transpiration im Sommer, zu einer Veränderung der Lithiumkonzentration kommen [23]. Eine zu geringe Blutkonzentration zeigt keine Wirkung, eine zu hohe kann toxisch wirken (die toxische Konzentration liegt bei  $\sim 1,6$  mM).

Die Bestimmung des Lithiumwertes erfolgt derzeit im klinischen Zentrallabor mit der aufwendigen Methode der Atomabsorptionsspektroskopie [129] [130]. Wünschenswert ist eine Point-of-Care-Analyse, die direkt in der Arztpraxis, oder idealerweise vom Patienten selbst vor Ort durchgeführt werden kann.

Um dieses Ziel zu erreichen, wird nach Literaturangaben an einer Analyse mit Glas-CE-Chips und direkter Leitfähigkeitsmessung gearbeitet [23] [131]. Die in dieser Arbeit verwendeten Polymerchips stellen eine kostengünstigere Alternative zu Glas-CE-Chips dar. Die CCD ermöglicht eine einfachere und somit kostengünstigere Positionierung der Elektroden, die sich nicht zwingend auf dem Chip, sondern auch im Analysegerät befinden können. Dies gewinnt an Bedeutung im Hinblick darauf, dass bei einer medizinischen Applikation von Einwegchips ausgegangen werden muss. Da bei der CCD keine elektrochemischen Effekte auftreten, können diese das Messergebnis nicht verfälschen.

Im natürlichen Blut kommt Lithium in keiner signifikanten Konzentration vor. Es enthält jedoch eine große Menge an Natrium ( $\sim 150$  mM) und Kalium ( $\sim 5$  mM). Bei der CE bereitet diese große Menge an Natrium Probleme, da Lithium und Natrium ähnliche Migrationszeiten aufweisen. Die erste Aufgabe war es somit, die beiden Peaks deutlich voneinander zu trennen. Hierzu wurden eine Lösung aus Natriumchlorid und Kaliumchlorid entsprechend der im Blut vorkommenden Konzentrationen angesetzt und 1 mM Lithiumchlorid hinzugesetzt. Nach vorangegangenen Simulationen mit dem Simulationstool PeakMaster [125] [126] konnte unter Verwendung eines 100 mM MesHis-Hintergrundelektrolyten das Lithium deutlich vom Natrium getrennt werden (siehe Abbildung 4-40).

Anhand von Patientenblutplasmaproben, die vom Städtischen Klinikum Karlsruhe zur Verfügung gestellt wurden, konnte eine quantitative Analyse demonstriert werden (siehe Abbildungen 4-41 und 4-42). Die Messungen wurden mit CE-Chips aus Polyimid durchgeführt. PMMA erschien aufgrund seiner starken Adsorption von Proteinen und einer damit verbundenen Instabilität des EOF ungeeignet [110]. Die

erste und die dritte Probe weisen eine sehr gute Übereinstimmung mit den mittels Atomabsorptionsspektroskopie gemessenen Werten und genügen der geforderten Messgenauigkeit. Bei der zweiten Probe zeigt sich ein etwas größerer Unterschied. An dieser Stelle müssten weitere Messungen für statistische Aussagen folgen. Eine Verbesserung der quantitativen Bestimmung ist ggf. mit den in Kapitel 4.6 beschriebenen Erkenntnissen, wie zum Beispiel dem Anbringen von CCD-Messelektroden im Injektionskreuzungsbereich zur quantitativen Kontrolle und Steuerung der Injektion, möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis von Lithium im Blutplasma im medizinisch relevanten Konzentrationsbereich mit Polymer-CE-Chips und kontaktloser Leitfähigkeitsmessung prinzipiell möglich ist [132].

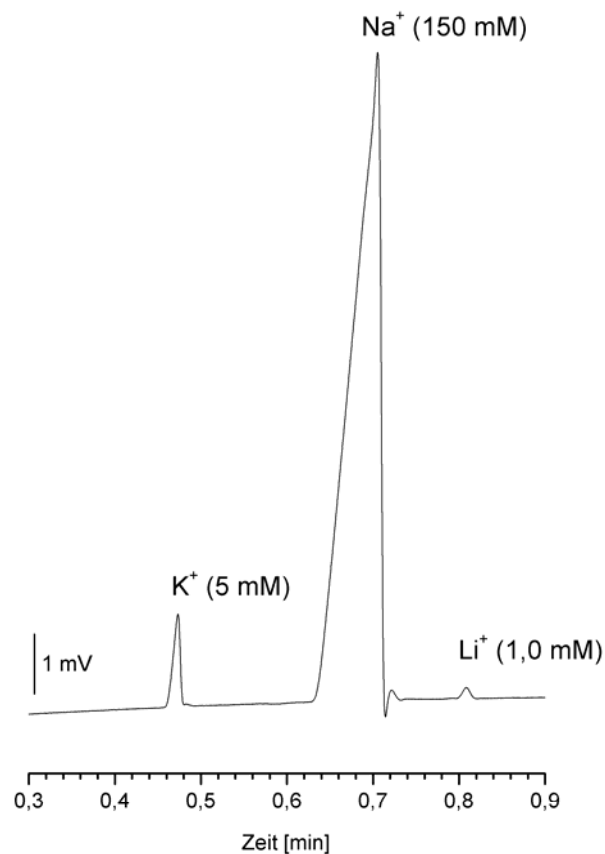


Abb. 4-40 Elektropherogramm: Nachweis von  $Li^+$  neben  $K^+$  und  $Na^+$  in einer Modelllösung, wobei die Konzentrationen von  $K^+$  und  $Na^+$  den Referenzwerten im Blutserum entsprechen

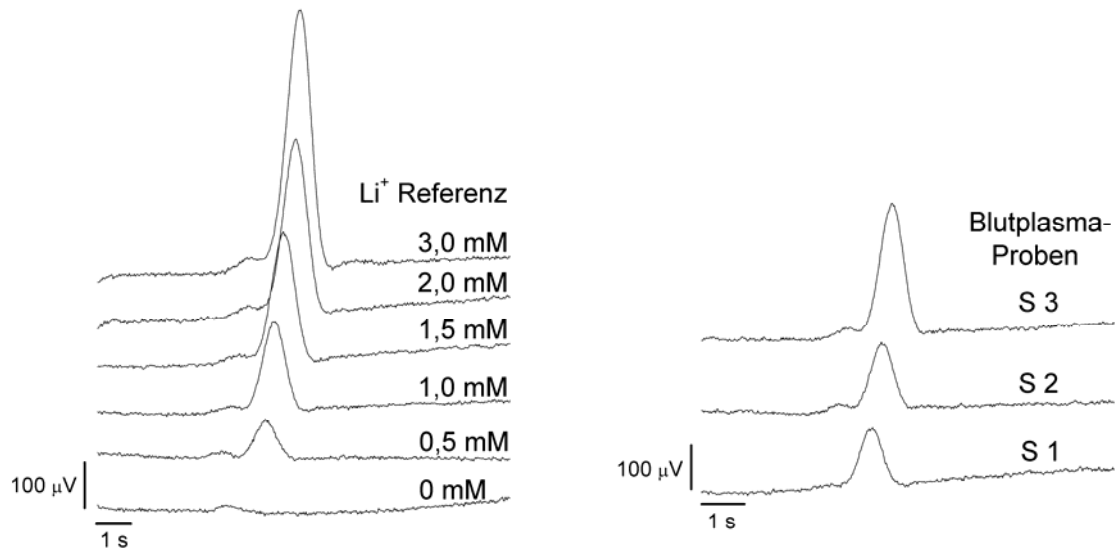


Abb. 4-41  $\text{Li}^+$ -Peaks zur Aufnahme der Kalibrierungskurven (links) und Patientenblutplasma-Proben (rechts) gemessen mit CE-CCD-Chip

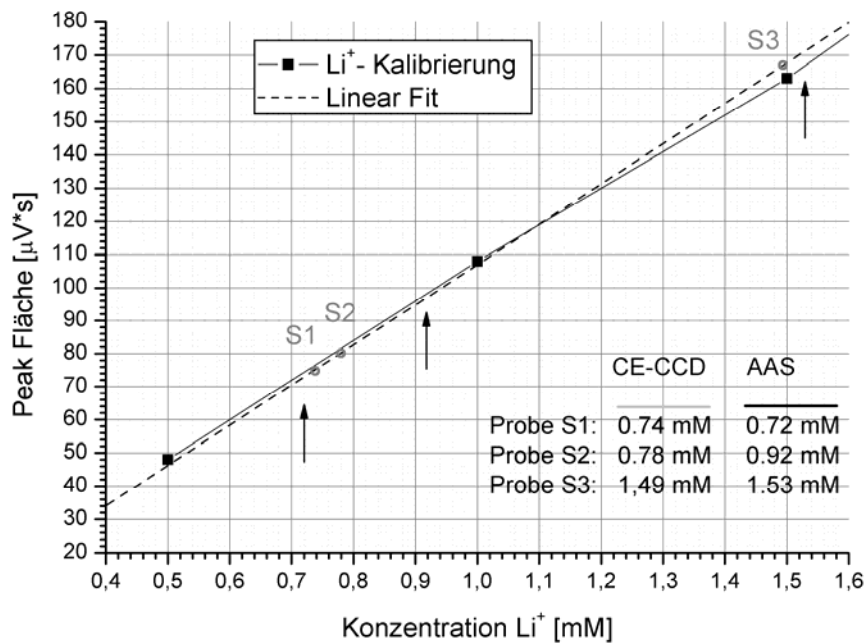


Abb. 4-42 Kalibrierkurve und Patientenblutplasma-Proben gemessen mit CE-CCD-Chip und Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

### 4.7.3 Bioanalytik

Als Einstieg in die Bioanalytik wurde die Analyse von Aminosäuren gewählt, die als Bausteine der Proteine wichtig sind (proteinogenen Aminosäuren). Im neutralen pH-Bereich liegen Aminosäuren als Zwitterionen vor, d.h. sie besitzen eine protonierte Aminogruppe und eine deprotonierte Carboxylgruppe. Dies bedeutet, dass im neutralen pH-Bereich keine elektrophoretische Auftrennung sowie keine Leitfähigkeitsmessung möglich sind. Deshalb wird der pH-Bereich zur Analyse ins Saure oder ins Basische verschoben. Dementsprechend betrachtet man die Säure-Anionen oder Kationen.

In langen (80 cm) Standard-Glaskapillaren wurden bereits sehr gute Trennungen von Aminosäuren mit CCD-Detektion erzielt [133]. Die Analysezeiten waren dabei typisch für lange Kapillaren und lagen im Bereich von rund 30 Minuten.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Trennungen auch auf der kurzen Trennstrecke der verwendeten CE-Chips möglich sind. Hierzu wurden zuerst Simulationen mit dem Simulationstool PeakMaster [125] [126] durchgeführt. Im sauren pH-Bereich wurden bessere Trennungen erwartet. Zum Einsatz kamen wegen ihrer hohen chemischen Beständigkeit CE-Chips aus PEEK. Bei ihnen waren auch über einen längeren Zeitraum keine Stabilitätsprobleme zu erwarten. Als Hintergrundelektrolyt wurde Essigsäure verwendet. Das Elektropherogramm in Abbildung 4-43 zeigt, dass es auch auf dieser kurzen Trennstrecke mit entsprechend kurzen Analysezeiten gelungen ist proteinogene Aminosäuren zu trennen. Die meisten sind dabei zudem sauber basisliniengetrennt.

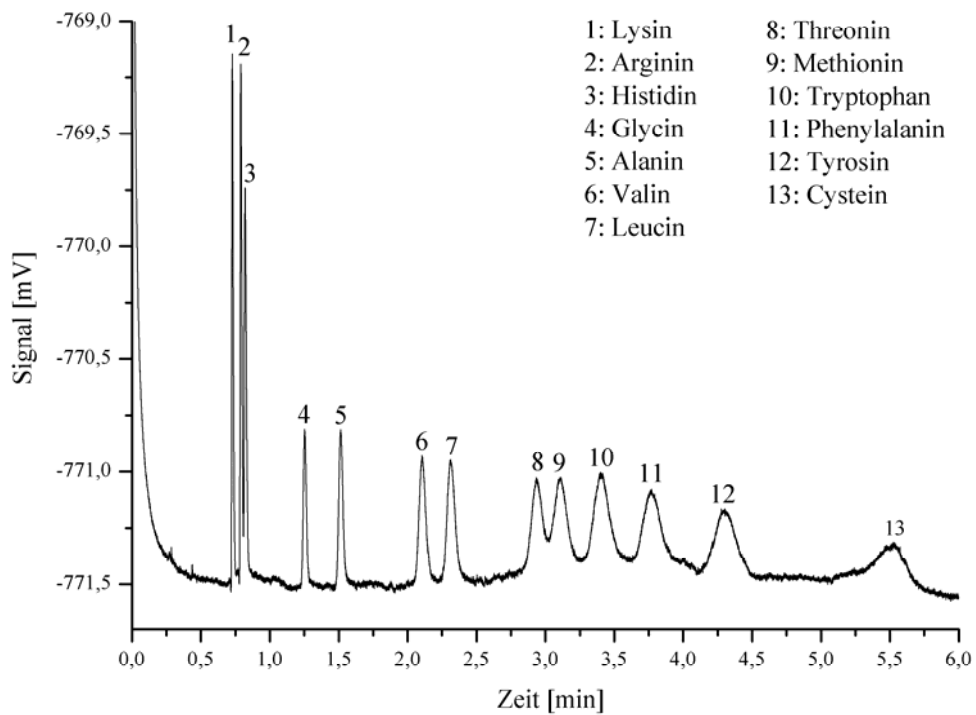


Abb. 4-43 Elektropherogramm: 13 proteinogene Aminosäuren, 1 bis 11 je 0,4 mM, 12 und 13 je 0,8 mM, CE-Chip aus PEEK, BGE: 2 M Essigsäure (pH 2,25)



#### 4.7.4 Messungen mit MinCE

Mit der miniaturisierten CE-Einheit „MinCE“ (siehe Kapitel 3.4 Abb. 3-20) konnten bei der Analyse von Weinen und der Trennung von proteinogenen Aminosäuren Messergebnisse in gleicher Qualität, wie bei den bisher beschriebenen Ergebnissen mit dem Laborversuchsaufbau gemäß Kapitel 3.3, erzielt werden. Für Personen mit Laborerfahrung war nur eine sehr kurze Einweisung notwendig, um selbständig mit dem Gerät zu arbeiten.

Das Gerät konnte potentiellen Anwendern nicht nur durch Veröffentlichung [134]-[142] vorgestellt werden, sondern auch in der Anwendung auf mehreren Messen (Hannovermesse 2005, Sensor + Test 2005, Analytica 2006) gezeigt werden und stieß auf breites Interesse.

Deshalb wurde inzwischen ein Technologietransferprojekt gestartet, bei dem in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner die MinCE zur Marktreife weiterentwickelt wird.

Vorrangiges Ziel ist hierbei eine weitere Kostenreduzierung; eine weitere Miniaturisierung ist möglich. Da der größte Teil der Kosten derzeit durch die zwei PCMCIA Karten verursacht wird (vgl. Kapitel 3.4), sollen diese durch eine eigene in das Gerät integrierte Lösung auf  $\mu$ Controller Basis ersetzt werden. Dies erhöht die Flexibilität sowohl in der Entwicklung des Gerätes als auch beim Anwender, der das Gerät dann zum Beispiel über eine USB-Schnittstelle mit jedem beliebigen PC oder Notebook verwenden kann.

## 4.8 Voruntersuchungen zur DNA-Detektion

Angesichts der guten Ergebnisse zur CCD beim Nachweis kleiner Ionen und der großen Bedeutung für den Life-Science-Bereich sollen an dieser Stelle grundlegende Untersuchungen zur Erweiterung der CCD für den Nachweis von Makromolekülen am Beispiel der DNA durchgeführt werden.

Wie in Kapitel 2.5 beschrieben, sind bei DNA sehr komplexe Einflüsse auf das Signalverhalten zu erwarten. Insbesondere bleibt unklar, inwieweit DNA in wässrigem Medium leitend ist oder sich kapazitiv verhält. Deshalb werden einleitende impedanzspektroskopische Untersuchungen vorgenommen.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass unter der Bedingung der CE die DNA in einem Trenngel separiert wird, das der Auftrennung der DNA entsprechend ihrer Molekülgröße dient. Deshalb muss DNA in den Medien Wasser, Hintergrundelektrolyt (BGE) bzw. Puffer und Trenngel untersucht werden.

### 4.8.1 Impedanzspektroskopische Untersuchungen

#### 4.8.1.1 Messung im direkten Kontakt mit großem Messzellenvolumen

Da zunächst von einer geringen Leitfähigkeit der DNA auszugehen war, wurde eine großvolumige Messzelle mit direktem Elektroden/Lösungskontakt, d. h., ohne Ein- und Auskoppelkapazitäten verwendet (Goldelektroden 7 mm · 7 mm im Abstand von 0,7 mm).

In ersten Versuchen wurde eine DNA-Leiter<sup>†</sup> (Fermentas SM 271, Puffer = BGE: 10 mM Tris-HCl, pH7.6, 1 mM EDTA) auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt und die Impedanzspektren aufgenommen. Die Leiter wird in einer DNA Gesamtkonzentration von 0,05 % im Puffer geliefert. Zur Verdünnung wurde ein identischer Puffer angesetzt.

Die Impedanzspektren (siehe Abbildung 4-44) zeigen Übereinstimmungen im qualitativen Verlauf des BGE und der DNA. Unter diesen Messbedingungen ist kein zusätzlicher kapazitiver Beitrag der DNA in Lösung zu beobachten. Vielmehr zeigen sich bei diesen kleinen DNA-Konzentrationen sehr große Leitfähigkeitsunterschiede. In Abbildung 4-44 entspricht die 0,01%ige DNA-Lösung der im Agilent Bioanalyzer eingesetzten Referenzlösung. Selbst eine vierfache Verdünnung zeigt in diesen

---

<sup>†</sup> Eine so genannte DNA-Leiter ist ein kommerziell erhältliches Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die bei der Gelelektrophorese als Referenz zur Größenbestimmung dient.

Vorversuchen noch einen deutlichen Signalunterschied zum BGE. Aufgrund dieses überraschenden Befundes war es möglich, die weiteren Untersuchungen mit der CCD-Messzelle auf dem CE-Chip fortzusetzen.

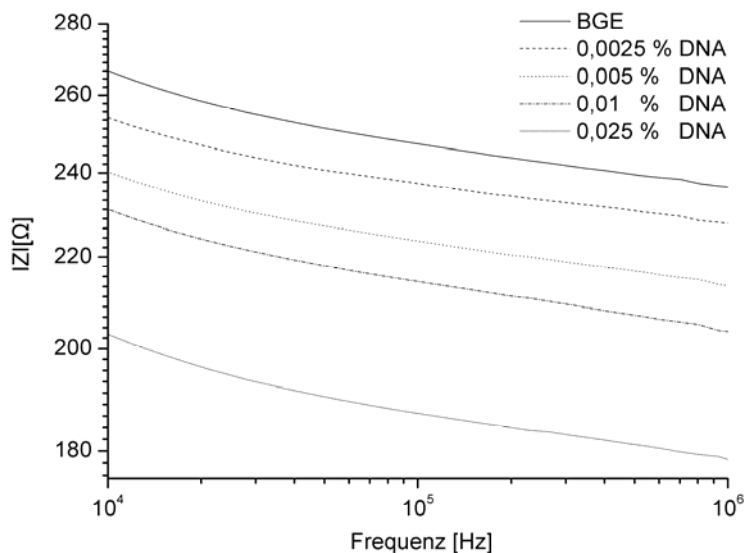


Abb. 4-44 Impedanzspektren einer DNA-Leiter (Fermentas SM 271) im BGE, gemessen in einer direkten Leitfähigkeits-Messzelle mit großem Volumen (7 mm · 7 mm · 0,7 mm), Messamplitude: 1V

#### 4.8.1.2 Charakterisierung der CCD-Messzelle bei Variation der Leitfähigkeit

Zur Variation der Leitfähigkeit wurde die Messzelle (Standard CE-CCD-Chip aus PMMA) mit Kaliumchloridlösungen unterschiedlicher Konzentrationen befüllt, dabei entspricht eine 10 mM Lösung in etwa den maximalen Konzentration des Bereichs in welchem normalerweise bei der Analyse kleiner Ionen gearbeitet wird. Messungen mit höheren KCl-Konzentrationen wurden aufgenommen, da bei Kalibrierungsversuchen in Kapitel 4.5 bei sehr hohen Analytkonzentrationen ein Abfall des Messsignals beobachtet wurde.

Generell wurden die Impedanzspektren im Frequenzbereich von 10 kHz bis 1 MHz aufgenommen. Da mit abnehmender Frequenz die Signalein- und Auskopplungsimpedanzen zunehmen, fällt die Messspannung mit abnehmender Frequenz zunehmend über diesen Impedanzen ab. Somit liegt mit abnehmender Frequenz ein zunehmend kleinerer Anteil der Messamplitude über dem Analyt an. Eine Betrachtung des Impedanzspektrums muss deshalb vorzugsweise auf den Bereich oberhalb von 100 kHz konzentriert werden, unter 100 kHz bleibt sie kritisch.

Die Befüllung der Messzelle erfolgte durch Anlegen eines Überdrucks. Es wurde nur ein Reservoir mit einer definierten Flüssigkeitsmenge befüllt. Somit wurde während der Messung die Lösung aufgrund des hydrostatischen Drucks durch den Füllhöhenunterschied zum Ausgangsreservoir kontinuierlich durch die Messzelle bewegt.

In Abbildung 4-45 ist der Betrag der komplexen Impedanz, in Abbildung 4-46 die Phase dargestellt. Die leere (luftgefüllte) Messzelle zeigt - wie erwartet - ein kapazitives Verhalten. Betrachtet man den Phasenverlauf der 10 mM KCl-Lösung, so zeigt sich ein Anstieg der Phase mit zunehmender Frequenz. Dies bedeutet, dass der Anteil der kapazitiven Impedanz - hauptsächlich Ein- und Auskoppelimpedanz - kleiner wird und somit der reale Impedanzanteil - ionische Leitfähigkeit des Elektrolyten - stärker gewichtet ist. Die 100 mM Lösung zeigt über 100 kHz das gleiche Verhalten, wohingegen die 1 M Lösung auch bei höheren Frequenzen die Impedanz kapazitiver wird. Da bei höheren Frequenzen ein größerer Teil der Messspannung über dem Analyten abfällt, kommt es zu einer stärkeren Erwärmung des Analyten, deren Auswirkungen zu diesem Kurvenverlauf führen.

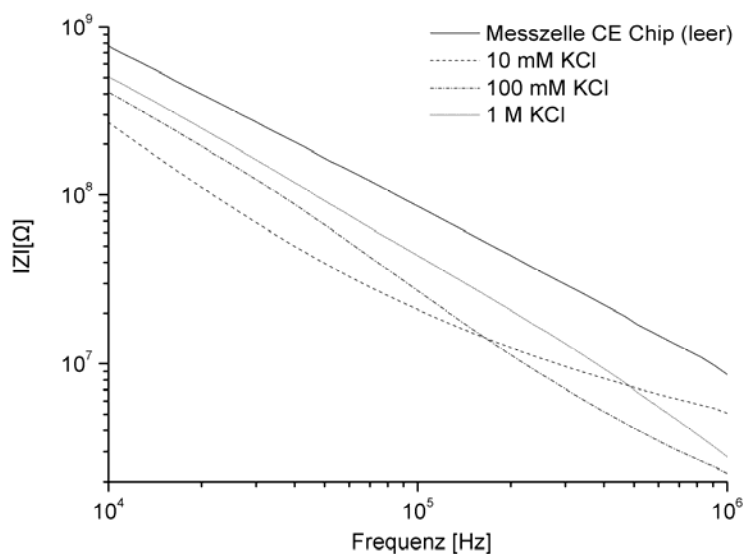


Abb. 4-45 Impedanzspektren von KCl-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen, Messamplitude 1V

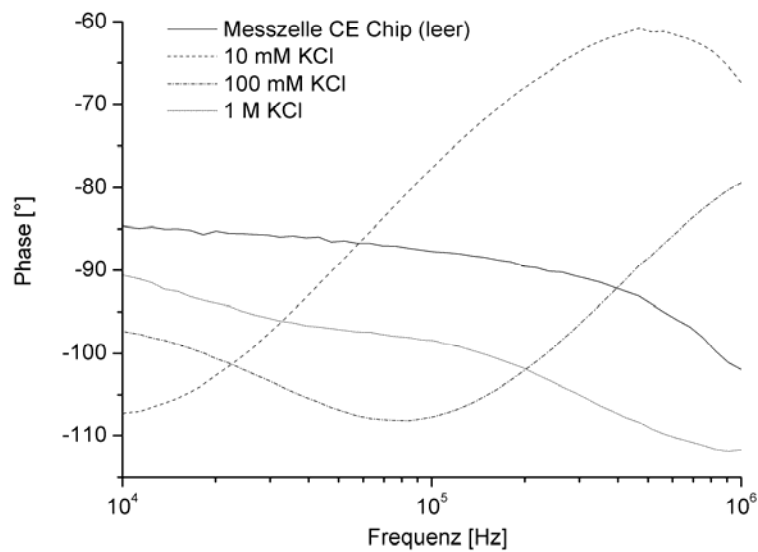


Abb. 4-46 Phasenverläufe von KCl-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen, Messamplitude 1V

Des Weiteren wurde der Bereich der Messamplituden bis auf 100 V ausgedehnt in Anlehnung an die bei der CCD-Elektronik verwendete Messamplitude von bis zu 200 V. Abbildung 4-47 zeigt, dass der gleiche Kurvenverlauf auch bei hoher Anregungsspannung erhalten bleibt. Lediglich ein geringfügiger Abfall des Betrages der Impedanz mit steigender Messamplitude ist zu beobachten.

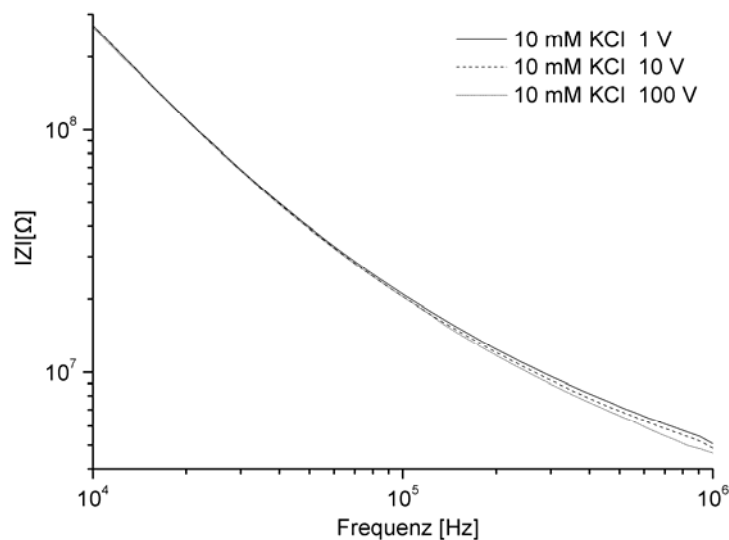


Abb. 4-47 Impedanzspektren einer 10 mM KCl-Lösungen bei verschiedenen Messamplituden

### 4.8.1.3 Charakterisierung des DNA-Puffers

Nach diesen grundlegenden Untersuchungen wurde der Puffer, d. h. Hintergrundelektrolyt (BGE) für DNA (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA) untersucht.

Die Impedanzspektren des auf verschiedene Konzentrationen in Wasser verdünnten Puffers wurden aufgenommen. Abbildung 4-48 zeigt, dass mit steigender Frequenz ein stärkerer Abfall der Impedanz bei kleineren Konzentrationen und ein schwächerer Abfall der Impedanz bei höheren Konzentrationen zu beobachten ist. Dadurch treten die maximalen Impedanzunterschiede im mittleren Frequenzbereich auf.

Die Phasenverläufe (siehe Abbildung 4-49) zeigen zuerst einen Anstieg der Phase mit steigender Frequenz und dann einen Abfall. Dieser tritt mit steigender Konzentration später auf. Mit zunehmender Konzentration beginnt der Phasenverlauf bei einem kleineren Phasenwinkel und endet bei einem höheren. Es werden Phasenmaxima in gleicher Größenordnung erreicht.

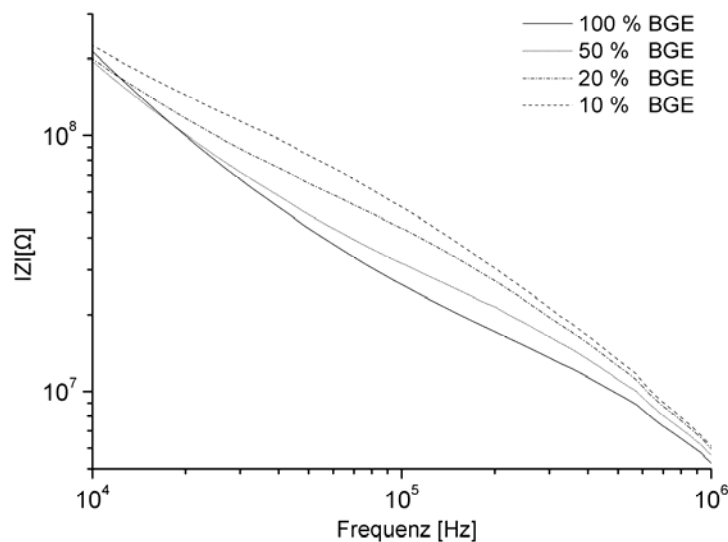


Abb. 4-48 Impedanzspektren des Hintergrundelektrolyten in verschiedenen Konzentrationen, Verdünnung in Wasser, Messamplitude 1V

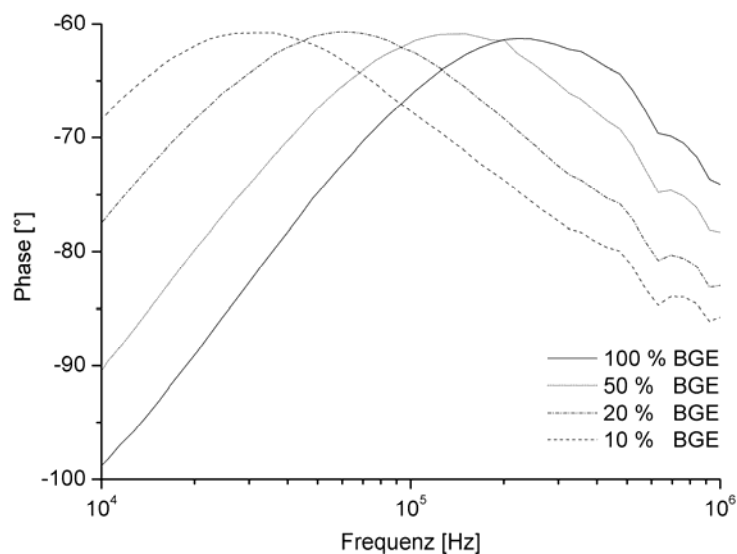


Abb. 4-49 Phasenverläufe des Hintergrundelektrolyten in verschiedenen Konzentrationen, Verdünnung in Wasser, Messamplitude 1V

#### 4.8.1.4 Charakterisierung von DNA-Lösungen in Wasser

Als DNA wurde Heringssperma-DNA verwendet, welche gut verfügbar ist und häufig verwendet wird.

Es zeigt sich wiederum ein mit zunehmender Frequenz stärker werdender Abfall der Impedanz bei kleineren Konzentrationen und schwächer werdender Abfall der Impedanz bei höheren Konzentrationen (siehe Abbildung 4-50). Das Wasser - Dielektrikum ( $\epsilon_r = 81$ ) - zeigt einen konstanten Abfall der Impedanz mit steigender Frequenz. Somit treten bei höheren DNA-Konzentrationen die größten Impedanzunterschiede zum Wasser bei mittlerer Frequenz auf. Kleinere Konzentrationen zeigen hingegen einen maximalen Impedanzunterschied zum Wasser bei kleinster dargestellter Frequenz.

Die Phasenverläufe (Abbildung 4-51) zeigen wiederum zuerst einen Anstieg und dann einen Abfall mit zunehmender Frequenz. Dieser verschiebt sich mit zunehmender Konzentration zu höheren Frequenzen. Anstieg und Abfall der Phasenverläufe sind mit zunehmenden Konzentrationen steiler. Der bei der mit Wasser befüllten Messzelle gemessene Phasenwinkel fällt - ähnlich wie bei Luft (siehe Abbildung 4-46) - mit zunehmender Frequenz kontinuierlich über  $-90^\circ$  hinaus ab. Dies deutet auf ein systembedingtes Verhalten hin.

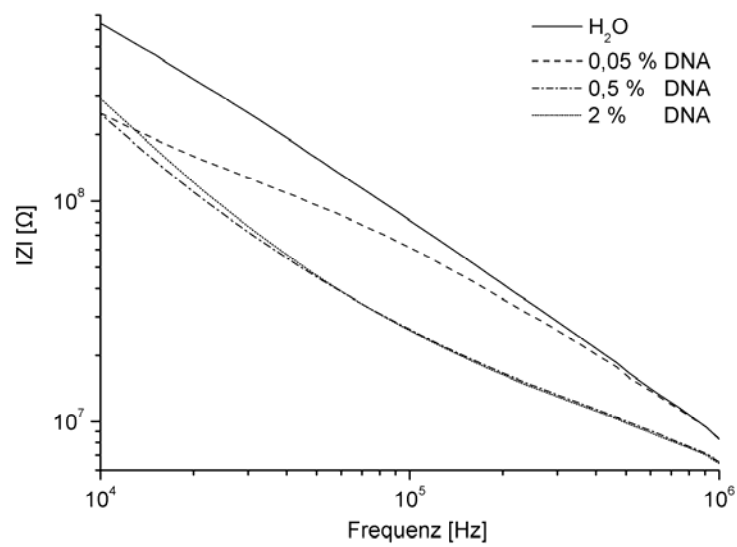


Abb. 4-50 Impedanzspektren von DNA-Lösungen in Wasser, Messamplitude 1V

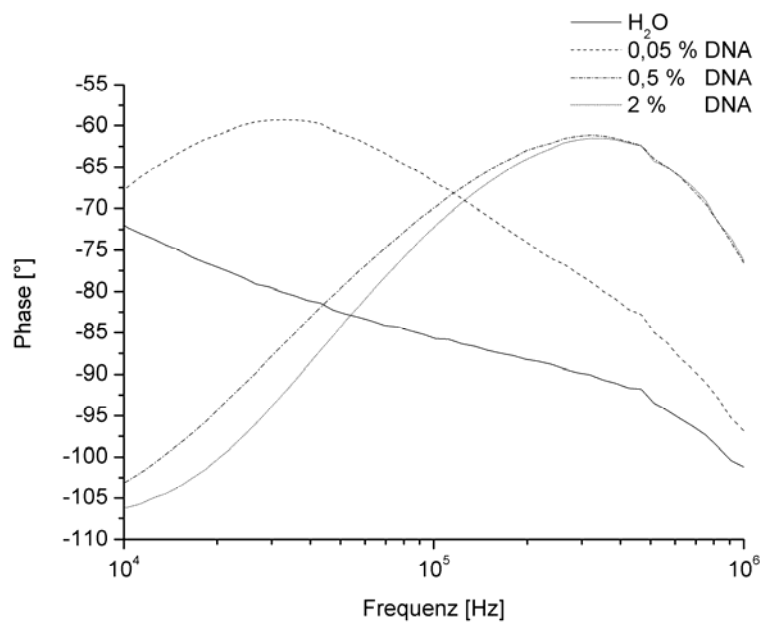


Abb. 4-51 Phasenverläufe von DNA-Lösungen in Wasser, Messamplitude 1V



#### 4.8.1.5 Charakterisierung von DNA in Puffer

Im nächsten Schritt wurde DNA im Puffer, d.h. Hintergrundelektrolyten (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA) untersucht. Hierzu wurde wiederum Heringssperma-DNA in verschiedenen Konzentrationen im Puffer gelöst.

In Abbildung 4-52 wird ein mit zunehmender Frequenz schwächer werdender Abfall der Impedanz beobachtet. Der Abfall ist mit zunehmender Konzentration größer. So kommt es bei der höchsten dargestellten Frequenz zu den höchsten Impedanzunterschieden. Bei der niedrigsten dargestellten Frequenz ist ein entgegengesetztes Verhalten der Impedanz zur Konzentration zu beobachten, d.h. die höchste Konzentration führt zur höchsten Impedanz.

Es kommt wiederum mit zunehmender Frequenz zuerst zu einem Anstieg und dann zu einem Abfall der Phase (siehe Abbildung 4-53). Mit zunehmender Konzentration werden kleinere Phasenmaxima erreicht. Bei der höchsten Konzentration fällt die Phase zunächst ab, bevor es zum Anstieg kommt.

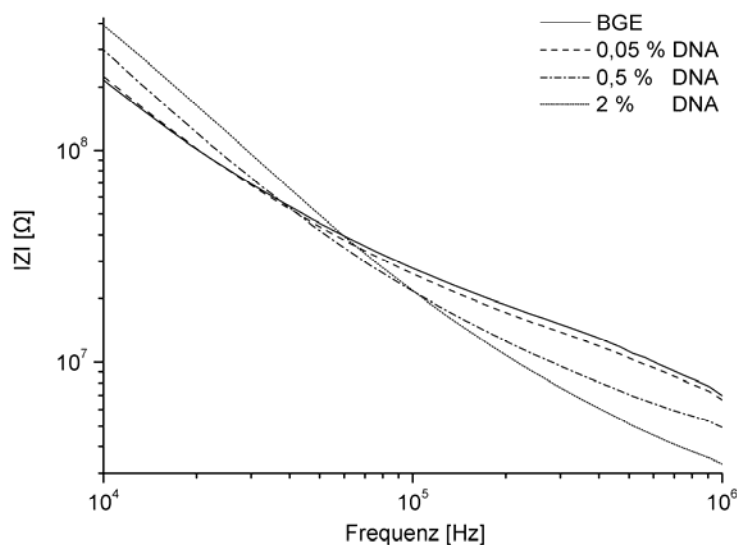


Abb. 4-52 Impedanzspektren von DNA-Lösungen im Hintergrundelektrolyten (BGE), Messamplitude 1V

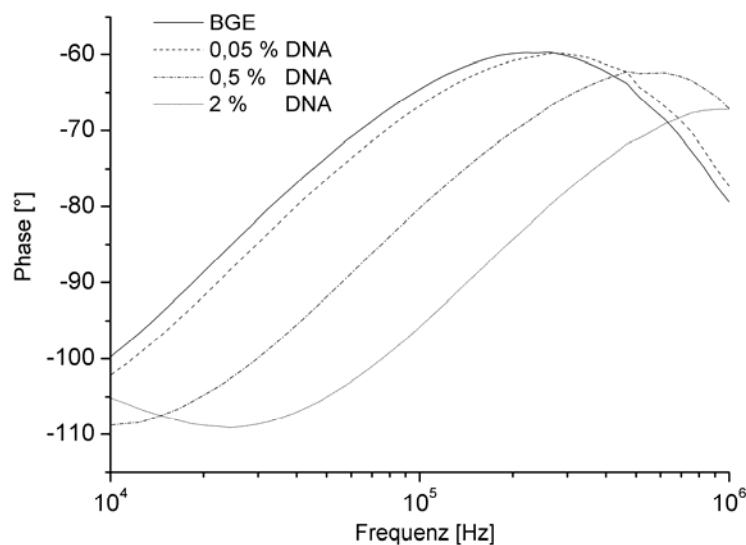


Abb. 4-53 Phasenverläufe von DNA-Lösungen im Hintergrundelektrolyten (BGE), Messamplitude 1V

#### 4.8.1.6 Charakterisierung von Trenngelen

Im Folgenden wurden verschiedene Trenngele untersucht. Da sich die Gele nur sehr schlecht wieder aus dem Chip entfernen lassen, wurden die Messungen nicht im gleichen Chip vorgenommen. Um die Gele dennoch sicher vergleichen zu können wurden die Messzellen zuerst mit Wasser befüllt und Referenzimpedanzspektren aufgenommen. Diese zeigen ein vergleichbares Verhalten der Chips.

Die Impedanzspektren sind in Abbildungen 4-54, die Phasenverläufe in Abbildung 4-55 dargestellt. Gelmatrix A (Agilent Bioanalyzer 2100, DNA 1000 Kit Gelmatrix) zeigt einen mit zunehmender Frequenz stärker werdenden Abfall der Impedanz, wohingegen Gelmatrix B (1 % Agarose, 50 % Glycerin, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA) einen mit zunehmender Frequenz schwächeren Abfall aufweist. Bei höheren Frequenzen ist die Impedanz der Gelmatrix B sehr hoch und nähert sich der des Wassers an. Die Phasenverläufe entsprechen qualitativ den bereits bei hohen Lösungskonzentrationen (Gelmatrix A) und niederen Lösungskonzentrationen (Gelmatrix B) beobachteten.

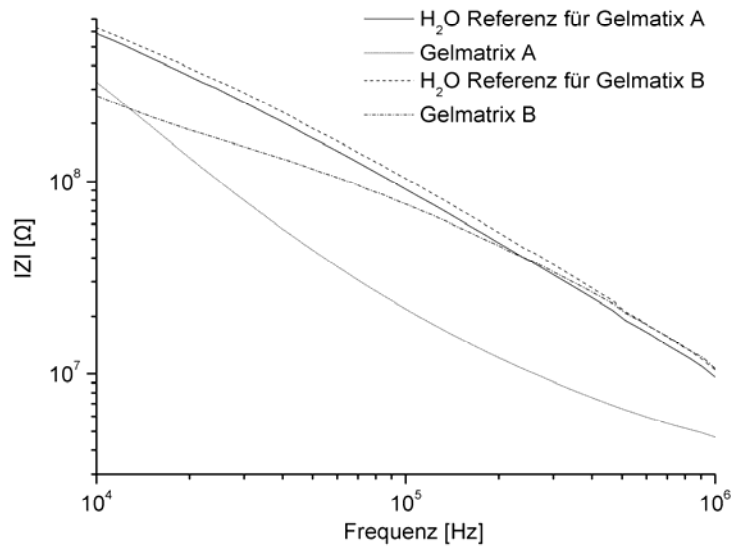


Abb. 4-54 Impedanzspektren von zwei verschiedenen Gelmatrixsystemen, Messamplitude 1V

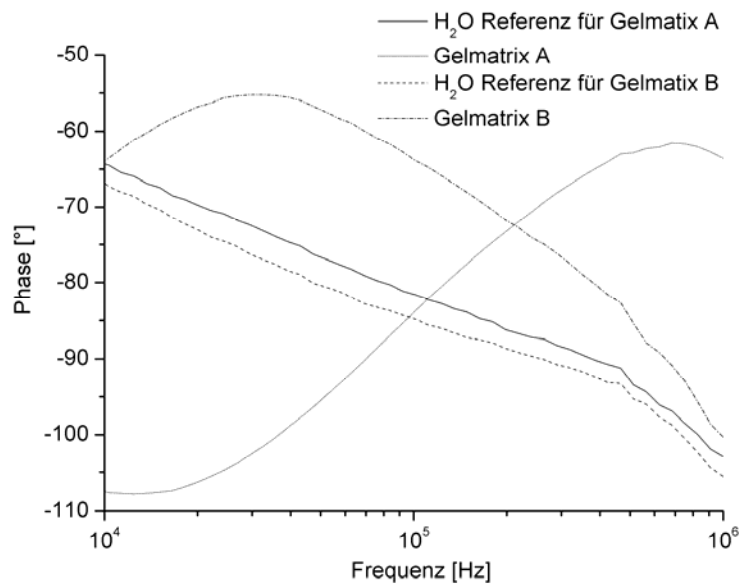


Abb. 4-55 Phasenverläufe von zwei verschiedenen Gelmatrixsystemen, Messamplitude 1V

#### 4.8.1.7 Charakterisierung von DNA in Trenngel

Zum Abschluss der impedanzspektroskopischen Experimente wurde Heringssperma-DNA in einer Gelmatrix untersucht. Um einen möglichst großen Impedanzunterschied zwischen der DNA und der Gelmatrix zu erzielen wäre es nahe liegend, die Gelmatrix mit der kleineren Leitfähigkeit zu verwenden. Da aber Gelmatrix B nach der Befüllung (Abkühlung) fest ist und sich somit nicht durch eine Gelmatrix mit einer

anderen DNA-Konzentration verdrängen lässt, wurde die flüssige Gelmatrix A gewählt.

Die größten Impedanzunterschiede zeigten sich im oberen Frequenzbereich. Im Ausschnitt des Impedanzspektrums nahe 1 MHz (siehe Abbildung 4-56) erkennt man, dass bei der kleinen Konzentration von 0,05 % DNA noch ein sehr großer Impedanzunterschied zur Gelmatrix besteht. Dies ist die Konzentration von kommerziellen Standard-DNA-Leitern, die bei der Anwendung noch auf 1/5 verdünnt wird. Auch in diesem für die eigentliche DNA-Analytik relevanten Konzentrationsbereich sollten demnach noch auswertbare Signale zu erwarten sein.

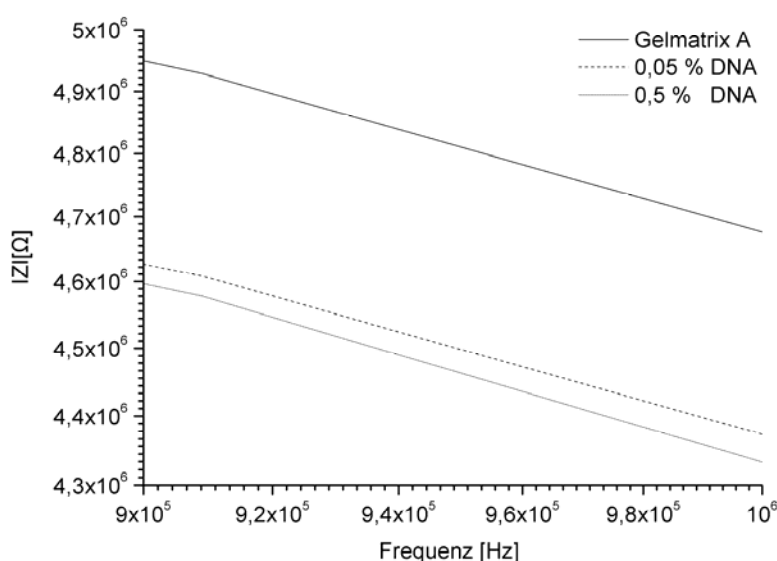


Abb. 4-56 Impedanzspektrums von Lösungen von DNA im Gelmatrixsystem A, Messamplitude 1V

#### 4.8.2 CCD-Detektion für die CE von DNA-Fragmenten

Die teure und aufwendige Impedanzspektroskopie liefert wichtige Erkenntnisse zur Optimierung des Detektors und des Gelmatrixsystems. Für die praktische DNA-Bestimmung muss das teure Impedanzspektrometer aber durch einen low-cost-Detektor ersetzt werden, was am Besten durch Messung bei einer festen Frequenz realisiert werden kann. Dazu soll untersucht werden, inwieweit der in dieser Arbeit verwendete CCD-Detektor für die CE von DNA-Fragmenten in Gelmatrix geeignet ist.

Der CCD-Detektor arbeitet oberhalb des bisher betrachteten Frequenzbereiches bei der höheren Frequenz von 3,8 MHz. Unter Weiterverwendung von Gelmatrix A sollte dies zu größeren Impedanzunterschieden führen. Des Weiteren arbeitet das System mit höheren Spannungsamplituden von bis zu 200 V. Die in die Messzelle

eingekoppelte Leistung ist im Vergleich zu den bei einer Messamplitude von 1 V durchgeführten Experimenten in Kapitel 4.8.1 entsprechend höher.

Erste Versuche zur Sensitivität des CCD-Detektors wurden durchgeführt. Hierzu wurde Heringssperma-DNA auf verschiedene Konzentrationen in Gelmatrix A verdünnt. Die Lösungen wurden nacheinander durch den Kanal gedrückt. Während der Messung wirkten nur hydrostatische Kräfte aufgrund der Füllhöhenunterschiede in den Reservoirs am Kanaleingang bzw. -ausgang.

Die Signalunterschiede zur Gelmatrix ohne DNA sind in Abbildung 4-57 aufgetragen. Wenn auch bei diesem ersten Versuch bei Verwendung von nur zwei Chips Empfindlichkeitsunterschiede auftreten, sind doch grundsätzliche Aussagen möglich. Der CCD-Detektor zeigt eine sehr große Empfindlichkeit. Selbst bei einer Verdünnung der DNA von 1 zu 200.000 ergeben sich noch sehr große Signalunterschiede. Es lässt sich, mit dem bei diesem Detektor typischen Messrauschen bei einer CE-Trennung, bei dieser Konzentration ein Signal-Rausch-Verhältnis in der Größenordnung von 100 bis 1000 abschätzen. Bei zu hohen Konzentrationen fallen die Signale wieder ab.

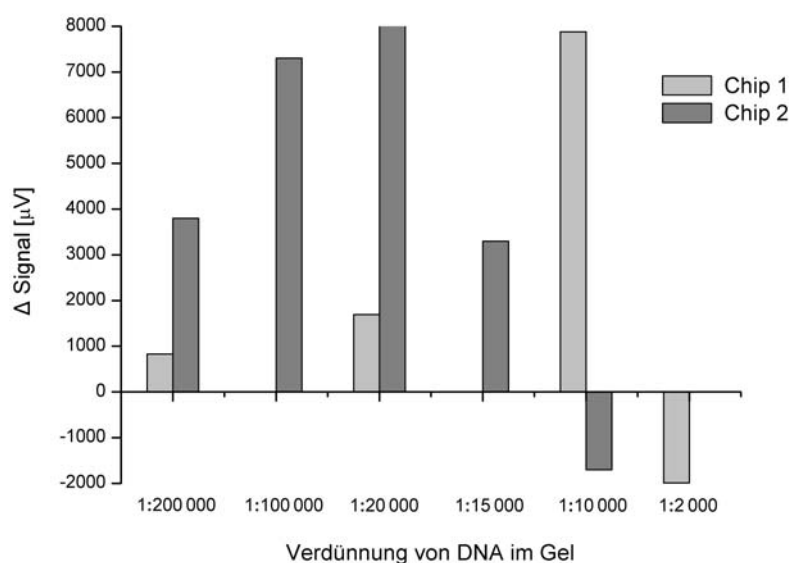


Abb. 4-57 Erste Sensitivitätstests: CCD von Lösungen von DNA im Gelmatrixsystem A

Für erste Trennversuche mit dem CE-Chip wurde eine DNA-Leiter vom Typ Fermentas GeneRuler™ SM 241 verwendet. Die Gesamtkonzentration der DNA beträgt 0,5 μg/μl, was einer Verdünnung der DNA im Puffer von 1 zu 2000 entspricht. Zur Anwendung wird diese Leiter normalerweise nochmals verdünnt und dabei mit Fluoreszenzmarkern versetzt. Direkt einsetzbare DNA-Leitern, die jedoch schon den

Fluoreszenzfarbstoff enthalten, sind typischerweise mit 0,1 µg/µl erhältlich (z.B. Fermentas SM 243 „ready-to-use“ GeneRuler™). Diese Verdünnung auf 1 zu 10.000 erschien aufgrund der vorangegangenen Messungen mit Heringssperma-DNA immer noch zu konzentriert. Somit wurde die SM 241 Leiter um 1 zu 1000 (bis 1 zu 100 in Wasser, danach in Gelmatrix) auf eine DNA-Gesamtkonzentration von 1 zu 2 Mio., entsprechend 0,5 ng/µl, verdünnt. Die Konzentrationen der einzelnen Fragmente sind in Tabelle 4-1 aufgeführt.

Fragmentgröße [bp]	Anteil [%]	Konzentration [ng/µl]
80	1	0,005
100	7	0,035
200	7	0,035
300	7	0,035
400	7	0,035
500	19	0,094
600	8	0,039
700	9	0,045
800	10	0,052
900	12	0,058
1031	13	0,067

Tab. 4-1 Konzentration, Anteil und Größe der DNA-Fragmente

Abbildung 4-58 zeigt das Elektropherogramm der Trennung. Der erste analyttypische Signalpeak tritt nach einer Minute auf und kann dem ersten Fragment mit der geringsten Einzelkonzentration (0,005 ng/µl; Verdünnung 1 zu 200 Mio.) zugeordnet werden. Ordnet man dem stärksten Fragment (19 % der Gesamtkonzentration) den stärksten Peak bei 2,7 Minuten zu, so liegen zwischen diesem und dem ersten Signalpeak vier Fragmente in gleicher Konzentration (vgl. Tabelle 4-1). Im Elektropherogramm erscheinen drei Signalpeaks in der gleichen Größenordnung und ein Doppelpeak. Nach dem größten Signalpeak bei 2,7 Minuten zeigen sich im Elektropherogramm weitere Peaks, die in etwa den in der DNA-Leiter enthaltenen Fragmenten zugeordnet werden können. Auffallend ist dabei ein negativer Peak. Das Auftreten solcher Peaks ist aufgrund der in Abbildung 4-57 gezeigten Sensitivität des CCD-Detektors auch möglich.

Abschließend sei zu diesem Abschnitt festgestellt, dass hier allererste orientierende Messungen zur CE-CCD von DNA vorgestellt werden, die die grundsätzliche Eignung der Methode klar erkennen lassen. Dabei bedarf es zukünftig weiterer detaillierter Untersuchungen und Optimierung sowohl der Separation der DNA-Fragmenten in der Gelmatrix als auch der Detektion von DNA mittels CCD.

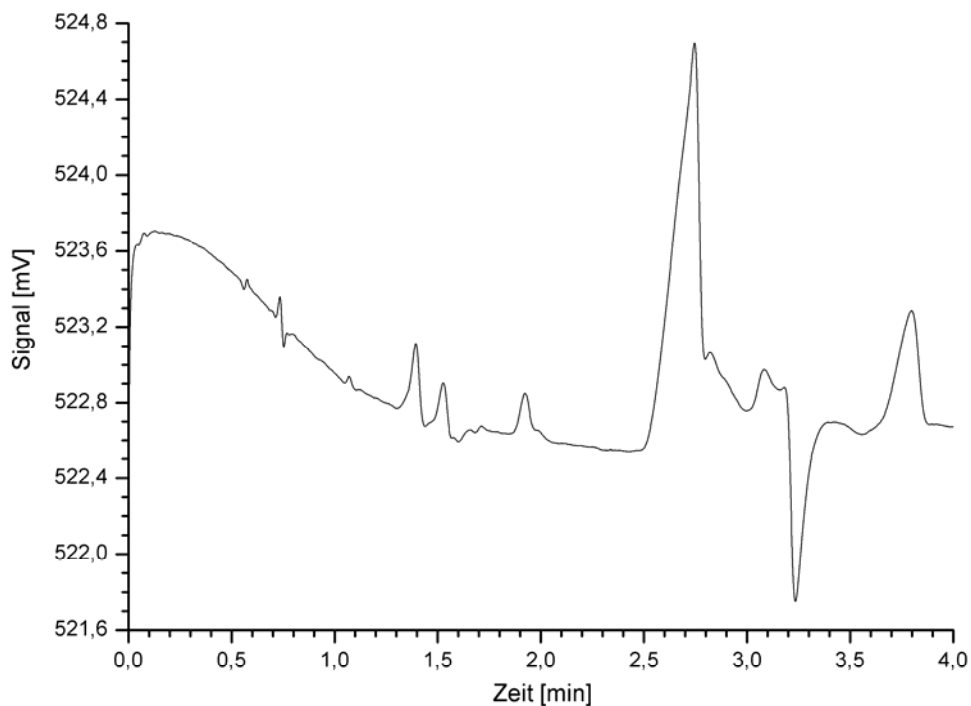


Abb. 4-58 Erste Versuche: Elektropherogramm von DNA-Fragmenten, Detektion mittels CCD

### 4.8.3 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.8.3.1 Generelle Charakterisierung der Messzelle und der Messlösungen

Grundlegendes Ergebnis der impedanzspektroskopischen Untersuchungen ist das ausgeprägte von der Konzentration der Messlösung abhängige Verhalten von Impedanz- und Phasenverlauf, das somit in erster Linie von der Leitfähigkeit der Messlösung abhängig ist.

Entgegen dem erwarteten kontinuierlichen Anstieg der Phase mit zunehmender Frequenz zeigt sich nach Durchlaufen eines Maximums typischerweise ein Abfall des Phasenwinkels. Schon beim leeren Chip fällt die Phase leicht ab (siehe Abbildung 4-46), bei Befüllung mit Wasser (siehe Abbildung 4-51) fällt die Phase noch stärker ab. Dies deutet auf ein systembedingtes Verhalten hin, d.h. dieser Effekt sollte mit der Geometrie des Aufbaus zusammenhängen. Ein großer Einfluss kann dabei der Abschirmung<sup>‡</sup> des Messplatzes zugeschrieben werden, die kapazitiv gekoppelt ist.

<sup>‡</sup> Hierbei ist keine Abschirmung zwischen den Elektroden, sondern die Abschirmung von Sender und Empfänger unter der Auflagefläche des CE-Chips gemeint, über die eine

Bzgl. des Verhaltens von DNA im Vergleich zu anderen Analyten zeigen sich keine deutlichen qualitativen Unterschiede, das konzentrationsabhängige systembedingte Verhalten dominiert. Die gemessenen Impedanzspektren und Phasenverläufe sind speziell für dieses System charakteristisch und sind auf die komplexen Zusammenhänge zwischen dessen Geometrien, Abschirmung und thermischen Effekten zurückzuführen.

Interessant ist, dass sich die größten Impedanzunterschiede nicht immer bei maximaler Frequenz zeigen, bei der die Ein- und Auskoppelimpedanzen am geringsten sind. Damit kann durch die Wahl der Messfrequenz die Sensitivität bei der Detektion optimiert werden, abhängig vom Analyten, Hintergrundelektrolyten und deren Konzentrationen. Hierzu ist es wiederum vorteilhaft, DNA in ihren verschiedenen Umgebungsmedien, Wasser, Puffer und Gelmatrixsystem, zu untersuchen, bzw. diese zuerst getrennt voneinander zu betrachten [149].

### **4.8.3.2 Mögliche Ursachen für die hohe Empfindlichkeit bei der DNA-Detektion**

Die erreichte Empfindlichkeit ist außerordentlich hoch. Bis zu einer Konzentration von 0,005 ng/ $\mu$ l, was einer Verdünnung von 1 zu 200 Mio. entspricht, konnte DNA in einer Gelmatrix, die zudem eine sehr hohe Grundleitfähigkeit aufweist, gemessen werden.

Ein erster Ansatz zur Deutung zielt auf die hohe Energiedichte in der Messzelle. Diese resultiert aus der hohen Messamplituden von bis zu 200 V und dem sehr kleinen Messzellvolumen ( $250 \mu\text{m} \cdot 50 \mu\text{m} \cdot 50 \mu\text{m}$ ). Dadurch können lokal hohe Temperaturen entstehen. Diese werden durch einen stark leitfähigen Hintergrundelektrolyten begünstigt. Die in der Messzelle entstehende Wärme muss größtenteils in Längsrichtung der Messzelle (Mikrokanal) abgeführt werden, da sie in radialer Richtung thermisch vom Polymer isoliert wird. Das Polymer ist dabei ein schlechterer Wärmeleiter ( $\lambda_{\text{PMMA}} = 0,19 \text{ W/Km}$ ) als Wasser ( $\lambda_{\text{Wasser}} = 0,6 \text{ W/Km}$ ). Die Abführung der Wärme muss somit größtenteils außerhalb des Messvolumens über die Messelektroden erfolgen, die höchste Temperatur entsteht somit in der Mitte der Zelle.

Es stellt sich die Frage, ob in der Mitte der Zelle Bedingungen herrschen können, bei denen das DNA-Molekül nicht nur denaturiert, sondern weiter in kleinere Stücke auseinander bricht. Dadurch würde sich die Leitfähigkeit stark erhöhen, da kleinere

---

kapazitive Kopplung der CCD-Elektroden und des Kanalstücks zwischen den Elektroden (des Messvolumens) gegen Masse erfolgt.



Fragmente eine höhere Mobilität besitzen. Die Anzahl der ladungstragenden Teilchen würde ansteigen und an den Bruchstellen könnten weitere Ladungen entstehen. Dies bedeutet einen sehr starken Verstärkungseffekt. Zur Klärung ob und bis zu welchem Grad DNA durch den Detektor fragmentiert wird sind weiterführende experimentelle Untersuchungen notwendig.

Ein zusätzliches Gedankenexperiment deutet an, dass ein Fragmentierungseffekt allein die hohe Empfindlichkeit nicht ausreichend erklärt. Dazu wird angenommen, dass die DNA in viele kleine Bruchstücke von der Größe der bisher untersuchten kleinen Ionen, zum Beispiel Kalium, zerlegt wird. Die so resultierende Konzentration an kleinen Ionen kann mit den bisherigen Erfahrungswerten zur Nachweisgrenze verglichen werden. Für das Beispiel des kleinsten DNA-Fragments mit zugleich der geringsten Konzentration in der untersuchten DNA-Leiter ergibt sich so eine Konzentration von 0,13  $\mu\text{M}$  Kaliumionen (80 bp Fragment mit Molekulargewicht 52800 g/mol, Konzentration: 0,005 ng/ $\mu\text{l}$ , Molekulargewicht Kalium: 39 g/mol). Unter diesen Messbedingungen im hochleitfähigen Elektrolyten liegt die Nachweisgrenze bei etwa 10  $\mu\text{M}$  Kalium. Hinzu kommt, dass die tatsächlich zu erwartenden Bruchstücke wesentlich größer sind, d. h., im Falle der Fragmentierung ist die Konzentration noch kleiner und das zu erwartende Signal ist auch kleiner.

Weiter ist zu bedenken, ob die unerwartet großen CCD-Signale durch Wechselwirkungen der DNA mit kleinen Ionen in der Lösung ( $\text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$ , Pufferionen) verursacht wird, analog zum Prinzip der Entstehung des EOF an geladenen Oberflächen. Die Ionen in Lösung sollten sich dann schneller an der DNA-Oberfläche bewegen als in der freien Lösung. In der Praxis liegt der EOF in der gleichen Größenordnung wie die Bewegung der Ionen in der Lösung und ist nicht um mehrere Größenordnungen höher, wie zur Erklärung der hohen Leitfähigkeit bei großen CCD-Signalen notwendig wäre.

Schließlich kann noch betrachtet werden, inwieweit ein Ladungstransport über das Molekül selbst eine Rolle spielen kann. Ein kapazitives Verhalten - d.h. ein Anstieg der Leitfähigkeit mit der Frequenz - der DNA konnte aus den Impedanzspektren nicht abgeleitet werden. Elektrisch leitende DNA ist vergleichbar mit einer Suspension von metallischen Drähten in Lösung. Für einen Stromfluss in diesem System ist ein Austausch von Ladung zwischen dem elektrischen Leiter und der umgebenden Flüssigkeit nötig. Ein solches Verhalten wurde bei Platindrähten in Pufferlösung im Makroskopischen festgestellt [150] und könnte dabei auch bei DNA-Drähten eine Rolle spielen. Die Anwesenheit von kleinen Ionen könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen. Darauf deutet die kontinuierliche Zunahme der Leitfähigkeit mit der DNA-Konzentration im Hintergrundelektrolyt hin, wohingegen in Wasser bei 0,5 % DNA eine Sättigung erreicht wird (Abbildung 4-52 und Abbildung 4-50, Signale jeweils bei 1 MHz).

Für den Fall des elektrischen Ladungstransports über das Molekül wird der große Signalgewinn plausibel, wenn man bedenkt, dass ein elektronischer Ladungstransport eine um mehrere Größenordnungen größere Leitfähigkeit im Vergleich zur ionischen Leitfähigkeit des Hintergrunds erwarten lässt, wie ein Vergleich der spezifischen Leitfähigkeiten von Metallen ( $\sigma_{\text{Metall}} \sim 10^7 \text{ S/m}$ ) und Kaliumchloridlösung ( $\sigma_{1 \text{ mM Kalium in Lösung}} = 2,7 \cdot 10^{-2} \text{ S/m}$ ) zeigt.

## 5 Zusammenfassung

Als Beitrag zur Entwicklung innovativer mikrofluidischer Lab-on-a-Chips liefert diese Arbeit wichtige Ergebnisse zur Praxiseinführung der Kapillarelektrophorese im Chipformat - insbesondere mit dem Ziel einer drastischen Kostenreduzierung. Schlüssel dazu sind die Substituierung des konventionellen Substratmaterials Glas durch Polymere und die Einführung der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung zur Detektion anstelle teurer optischer Methoden.

CE-Chips konnten aus den in der Massenproduktion bewährten kostengünstigen Polymeren PMMA, Polystyrol und Polycarbonat und auch aus den chemisch sehr inerten und biokompatiblen Hochleistungsmaterialien COC und PEEK hergestellt werden. Die sonst technologisch kritische Deckelung der Kanalstrukturen konnte durch einfaches thermisches Bonden erreichen werden, wobei die bisher übliche Vorbehandlung der Polymere mit Plasma oder UV-Strahlung entfallen kann. Deshalb ist die sonst störende Erhöhung elektrischer Ladungen an der Kanaloberfläche nicht zu beobachten und die Chipherstellungskosten werden verringert.

PEEK konnte erstmals als nahezu ideales Material für mikrofluidische CE-Systeme eingesetzt werden. Hier gelang die Kanaldeckelung mit Hilfe einer neuartigen Stickstoffplasma-Vorbehandlung, wobei trotz dieses Prozesses der vergleichsweise kleinste elektroosmotische Fluss resultierte. Auch zeigte die PEEK-Oberfläche keine Adsorption von DNA. Der analytische Vorteil von PEEK konnte u. a. bei der Trennung von Sacchariden demonstriert werden. Diese erfordert einen stark alkalischen Hintergrundelektrolyten, in dem die anderen Polymere nicht mehr resistent sind. Einziger Nachteil von PEEK ist die fehlende optische Transparenz, der aber mit elektrischer Detektion des Fluids im Mikrokanal elegant zu eliminieren ist.

Die Übertragung des Prinzips der kontaktlosen Leitfähigkeitsmessung in die Chipebene verlangte die umfassende Optimierung des Layouts der Messzelle. Durch gesputterte Dünnschichtelektroden mit optimalem Signaltransfer über die Kanalwand und verbesserte Abschirmung konnte ein großes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Entscheidend war dabei auch die Reduzierung der Kanaldeckeldicke, die technologisch bei Polymeren weitaus besser als bei Glas zu beherrschen ist.

Da das chemische Analysenergebnis natürlich auch vom Fluidtransport wesentlich bestimmt wird, wurde das Transportverhalten fluoreszenzmikroskopisch visuell *insitu* untersucht. Störende hydrostatische Effekte und Nachströmen des Analyt während der Injektion und der Separation konnten so beobachtet werden. Ein Vergleich der Geometrie des Injektionskreuzes - 90° und abgerundete Ecken - zeigte keinen eindeutigen Einfluß auf das Strömungsverhalten. Schließlich konnten auch methodenbedingte Instabilitäten am Beispiel des Sample Stackings gezeigt werden.

Alternativ zur aufwendigen Fluoreszenzmikroskopie konnte der Fluidtransport optimal mit Leitfähigkeitsmessungen beobachtet werden, da der injizierte Analyt und der Hintergrundelektrolyt unterschiedliche Leitfähigkeiten besitzen. Im Injektionskreuz angeordnete CCD-Elektroden erlaubten quantitative Aussagen zum Strömungsverhalten in Echtzeit. Damit konnten die Ursachen schlechter Reproduzierbarkeit bei der CE ermittelt werden. Die Messungen können darüber hinaus zum Regeln des Strömungsverhaltens dienen, z. B. durch Anpassen der elektrischen Feldstärken für den elektrokinetischen Transport.

Ein großer, komplexer CE-CCD-Messplatz wurde konzipiert und realisiert, der flexibel für alle grundlegenden experimentellen Untersuchungen genutzt werden konnte. Da im Hinblick auf die praktische Anwendung jedoch einfach zu bedienende, portable und kostengünstige Geräte erforderlich sind, wurde unter konsequenter Nutzung aller mikrosystemtechnischen Vorteile ein vollständiges Messsystem für die Miniaturisierte Kapillarelektrophorese (*Miniaturized Capillary Electrophoresis* „MinCE“) entwickelt. MinCE konnte als Demonstrator auf mehreren Messen erfolgreich präsentiert werden. Aufgrund des regen Interesses ist es sogar gelungen, ein Technologietransferprojekt mit dem Ziel der Kleinserienfertigung zu starten.

Potentielle Anwendungen - und damit der Nutzen der Arbeit für die Praxis - wurden an ausgewählten typischen Beispielen demonstriert: für die vor-Ort-Lebensmittelanalytik die Bestimmung der organischen Säuren und Zucker in Getränken, für die medizinische Point-of-Care-Diagnostik die quantitative Bestimmung des Antidepressivums Lithium im Blutserum und für die Bioanalytik der Nachweis proteinogener Aminosäuren. Bei allen Analyten handelt es sich um kleine Ionen, die aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit große Signale bei Leitfähigkeitsmessungen zeigen.

Makromoleküle - und insbesondere die in Life-Science hochwichtige DNA - waren bisher nicht im Fokus der CCD. In impedanzspektroskopischen Studien zum Abschluss dieser Arbeit konnten umfangreiche Detailkenntnisse zum Einfluß der CCD-Messzelle und der analytischen Komponenten DNA, Hintergrundelektrolyt und Trennmatrix auf das CCD-Signal gewonnen werden. Es wurden DNA-konzentrationsabhängige Signale mit sehr hoher Empfindlichkeit und äußerst kleiner Nachweisgrenze gemessen, die mit LIF-Resultaten bei kommerziellen CE-Chip-Geräten gut konkurrieren können. In ersten orientierenden Versuchen zur CE-Trennung einer DNA-Leiter konnten die CCD-Signale im Elektropherogramm einzelnen Komponenten zugeordnet werden; die äußerst kleinen Nachweisgrenzen wurden dabei bestätigt. Mehrere Ansätze zur Deutungen dieses zunächst überraschenden Befundes wurden diskutiert, die zu weiteren Entwicklungen auf dem Weg zu einer kostengünstigen Hochleistungsanalytik in den Life-Sciences anregen können.

## 6 Literatur

- [1] D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H. M. Widmer: *Capillary Electrophoresis and Sample Injection Systems Integrated on a Planar Glass Chip*, Anal. Chem. **1992**, 64, S. 1926-1932.
- [2] A. Manz, D. J. Harrison, E. M. J. Verpoorte, J. C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi, H. M. Widmer: *Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip*, J. Chromatogr. **1992**, 593, S. 253-258.
- [3] <http://portal.isiknowledge.com>
- [4] Agilent Bioanalyzer 2100, <http://www.agilent.com>
- [5] Bio-Rad Experion, <http://www.bio-rad.com>
- [6] F. Kohlrausch: *Über Concentrations-Verschiebungen durch Electrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen*, Ann. Phys. Chem. **1897**, 62, S. 209-239.
- [7] A. Tiselius: *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. Trans. Faraday Soc. **1937**, 33, S. 524.
- [8] *Nobel Lectures Chemistry 1942-1962*, **1964**, Elsevier, Amsterdam.
- [9] S. Hjertén: *Free Zone Electrophoresis*, Chromatogr. Rev. **1967**, 9, S. 122-219.
- [10] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen: *High-Performance Zone Electrophoresis*, J. Chromatogr. A **1979**, 169, S. 11-20.
- [11] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs: *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries*, Anal. Chem. **1981**, 53, S. 1298-1302.
- [12] N. A. Lacher, N. F. de Rooij, E. Verpoorte, S. M. Lunte: *Comparison of the performance characteristics of poly(dimethylsiloxane) and Pyrex microchip electrophoresis devices for peptide separations*, J. Chromatogr. A **2003**, 1004, S. 225-235.
- [13] H. Becker and L. E. Locascio: *Polymer microfluidic devices*, Talanta **2002**, 56, S 267-287.
- [14] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice* **1993**, Springer-Verlag, Berlin.
- [15] B. J. Kirby, E. F. Hasselbrink: *Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separation*, Electrophoresis **2004**, 25, S. 187-202.
- [16] D. P. J. Barz: *Ein Beitrag zur Modellierung und Simulation von*

- elektrokinetischen Transportprozessen in mikrofluidischen Einheiten*, Dissertationsschrift **2005**, Fakultät für Maschinenbau der Universität Karlsruhe (TH), Forschungszentrum Karlsruhe, Wissenschaftliche Berichte, FZKA 7172.
- [17] S. C. Jacobson, R. Hergenröder, L. B. Koutny, R. J. Warmack, J. M. Ramsey: *Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices*, Anal. Chem. **1994**, 66, S. 1107-1113.
- [18] C. -X. Zhang, A. Manz: *Narrow Sample Channel Injectors for Capillary Electrophoresis on Microchips*, Anal. Chem. **2001**, 73, S. 2656-2662.
- [19] D. J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C. S. Effenhauser, A. Manz: *Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip*, Science **1993**, 261, S. 895-897.
- [20] C. S. Effenhauser, A. Manz, H. M. Widmer: *Glass Chips for High-Speed Capillary Electrophoresis Separations with Submicrometer Plate Heights*, Anal. Chem. **1993**, 65, S. 2637-2642.
- [21] L.-M. Fu, R.-J. Yang, G.-B. Lee, H.-H. Liu: *Electrokinetic Injection Techniques in Microfluidic Chips*, Anal. Chem. **2002**, 74, S. 5084-5091.
- [22] C.-A. Emrich, R.-A. Mathies: *The  $\pi$ -injector: A new electrokinetic dispensing element for microdevice separations*, Proceedings of micro total analysis systems **2002**, Y. Baba, S. Shoji, A. Van den Berg (ed.), Dordrecht, Kluwer academic publishers, vol. 2, S. 748-750.
- [23] E. Vrouwe: *Quantitative microchip capillary electrophoresis for inorganic ion analysis at the point of care*, Dissertationsschrift **2005**, Febodruk, Enschede.
- [24] D. M. Cannon Jr., T.-C. Kuo, P. W. Bohn, J. V. Sweedler: *Nanocapillary Array Interconnects for Gated Analyte Injections and Electrophoretic Separations in Multilayer Microfluidic Architectures*, Anal. Chem. **2003**, 75, S. 2224-2230.
- [25] X. Bai, H. J. Lee, J. S. Rossier, F. Reymond, H. Schafer, M. Wossner, H. H. Girault: *Pressure pinched injection of nanolitre volumes in planar micro-analytical devices*, Lab on a Chip **2002**, 2, S. 45-49.
- [26] N. Y. Lee, M. Yamada, M. Seki: *Pressure-Driven Sample Injection with Quantitative Liquid Dispensing for On-Chip Electrophoresis*, Anal. Sci. **2004**, 20, S. 483-487.
- [27] <http://www.wikipedia.de>
- [28] H. Shadpour, H. Musyimi, J. Chen, S. A. Soper: *Physiochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance*, J. Chromatogr. A **2006**, 1111, S. 238-251.
- [29] D. Belder, M. Ludwig: *Surface modification in microchip electrophoresis*, Electrophoresis **2003**, 24, S. 3595-3606.

- [30] H. Domininghaus: *Die Kunststoffe und ihre Eigenschaften*, **1998**, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [31] F. Santoso: *Untersuchungen zur simultanen Aminierung und Porenöffnung von Polyetherimid-Membranen*, Dissertationsschrift **2004**, Technische Universität Berlin.
- [32] R. Weihofen: *Topas – der CD-Werkstoff der Zukunft*, Informationsdienst Wissenschaft e.V., **1995**, Bayreuth.
- [33] R. Weiding: *PEEK etabliert sich als Werkstoff für hohe Anforderungen*, Pharma + Food **2002**, 2, S. 32-33.
- [34] RÖMPP Online, **2006**, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [35] Kern GmbH, *Werkstoff Datenblätter*, **1995-2003**, Großmaiseid, <http://www.kern-gmbh.de>.
- [36] Ticona GmbH, *Thermoplastisches Olefin-Polymer amorpher Struktur Topas® (COC)*, Kelsterbach.
- [37] W. Pfleging, Th. Schaller: *Mikromaterialbearbeitung durch spanabhebende und lasergestützte Verfahren*, NACHRICHTEN Forschungszentrum Karlsruhe **2002**, 34 (2-3), S. 210- 220.
- [38] E. W. Becker, H. Betz, W. Ehrfeld, W. Glashauser, A. Heuberger, H. J. Michel, D. Münchmeyer, S. Pongratz, R. v. Siemens: *Production of Separation-Nozzle System for Uranium Enrichment by a Combination of X-Ray Lithography and Galvanoplastics*, Naturwissenschaften **1982**, 69, S. 520-523.
- [39] E. W. Becker, W. Ehrfeld, P. Hagmann, A. Maner, D. Münchmeyer: *Fabrication of microstructures with high aspect ratios and great structural heights by synchrotron radiation lithography, galvanofforming and plastic molding (LIGA process)*, Microelectronic Engineering **1986**, 4, S. 35-56.
- [40] W. Menz, J. Mohr: *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*, **1997**, 2. erweiterte Auflage, VCH, Weinheim.
- [41] A. E. Guber, M. Hecke, D. Herrmann, A. Muslija, V. Saile, L. Eichhorn, T. Gietzelt, W. Hoffmann, P. C. Hauser, J. Tanyanyiwa, A. Gerlach, N. Gottschlich, G. Knebel: *Microfluidic lab-on-a-chip-systems based on polymers – fabrication and application*, Chemical Engineering Journal **2004**, 101, S. 447-453.
- [42] M. Hecke, W. K. Schomburg: *Review on micro molding of thermoplastic polymers*, J. Micromech. Microeng. **2004**, 14, S. 1-14.
- [43] R. M. McCormick, R. J. Nelson, M. G. Alonso-Amigo, D. J. Benvegno, H. H. Hopper: *Microchannel Electrophoretic Separations of DNA in Injection-Molded Plastic Substrates*, Anal. Chem. **1997**, 69, S. 2626-2630.

- [44] K. Swinney and D. Bornhop: *A Review of CE Detection Methodologies*, Crit. Rev. Anal. Chem. **2002**, 30, S.1-30.
- [45] T. Hu, H. Zuo, C. M. Riley, J. F. Stobaugh, S. M. Lunte: *Determination of  $\alpha$ -difluoromethylornithine in blood by microdialysis sampling and capillary electrophoresis with UV detection*, J. Chromatogr. **1995**, 716, S. 381-388.
- [46] F. Foret, S. Fanali, A. Nardi, P. Boček: *Capillary zone electrophoresis of rare earth metals with indirect UV absorbance detection*, Electrophoresis **1990**, 11, S. 780-783.
- [47] M. W. F. Nielen: *Quantitative aspects of indirect UV detection in capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. **1991**, 588, S. 321-326.
- [48] A. T. Timperman, K. Khatib, J. V. Sweedler: *Wavelength-Resolved Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis*, Anal. Chem. **1995**, 67, S. 139-144.
- [49] M. A. Schwarz, P. C. Hauser: *Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices*, Lab on a Chip **2001**, 1, S. 1-6.
- [50] T. Vilker, D. Janasek, A. Manz: *Micro Total Analysis Systems: Recent Developments*, Anal. Chem. **2004**, 76, S. 3373-3386.
- [51] T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara, K. Sato: *Thermal Lens Microscopy and Microchip Chemistry*, Anal. Chem. **2004**, 76, S. 52A-60A.
- [52] P. T. Kissinger and W. R. Heineman: *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, **1984**, Marcel Dekker Inc., New York and Basel.
- [53] T. Kappes and P.C. Hauser: *Recent Developments in Electrochemical Detection Methods for Capillary Electrophoresis*, Electroanalysis **2000**, 12, S. 165-170.
- [54] R. Ferrigno, J. N. Lee, X. Jiang, G. M. Whitesides: *Potentiometric Titrations in a Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Device*, Anal. Chem. **2004**, 76, S. 2273-2280.
- [55] R. Tantra and A. Manz: *Integrated Potentiometric Detector for Use in Chip-Based Flow Cells*. Anal. Chem. **2000**, 72, S. 2875-2878.
- [56] R. P. Baldwin: *Recent advances in electrochemical detection in capillary electrophoresis*, Electrophoresis **2000**, 21, S. 4017-4028.
- [57] G. Chen and J. Wang: *Fast and simple sample introduction for capillary electrophoresis Microsystems*, Analyst **2004**, 129, S. 507-511.
- [58] J. Wang, S. Mannino, C. Camera, M. P. Chatrathi, M. Scampicchio, J. Zima: *Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of seleno amino acids*, J. Chromatogr. A **2005**, 1091, S. 177-182.



- [59] U. Backofen, F. M. Matysik, C. E. Lunte: *A Chip-Based Electrophoresis System with Electrochemical Detection and Hydrodynamic Injection*, Anal. Chem. **2002**, 74, S. 4054-4059.
- [60] J. Wang, M. Prakash, B. Tian, R. Polsky: *Capillary Electrophoresis Chips with Thick-Film Amperometric Detectors: Separation and Detection of Hydrazine Compounds*, Electroanalysis **2000**, 12, S. 691-694.
- [61] M. Strasser: *Miniaturisierte elektrochemische Detektoren für kapillare Analysensysteme*, Dissertation **2002**, Universität Basel.
- [62] S. Sloss and A. G. Ewing: *Improved Method for End-Column Amperometric Detection for Capillary Electrophoresis*, Anal. Chem. **1993**, 65, S. 577-581.
- [63] B. Grass, A. Neyer, M. Jöhnck, D. Siepe, F. Eisenbeiß, G. Weber, R. Hergenröder: *A new PMMA-microchip device for isotachopheresis with integrated conductivity detector*, Sensors and Actuators B **2001**, 72, S. 249-258.
- [64] B. Grass, D. Siepe, A. Neyer, R. Hergenröder: *Comparison of different conductivity detector geometries on an isotachopheresis PMMA-microchip*, Fresenius Journal of Analytical Chemistry **2001**, 371, S. 228-233.
- [65] P. Jacobs, A. Varlan, W. Sansen: *Design Optimization of Planar Electrolytic Conductivity Sensors*, Medical & Biological Engineering & Computing **1995**, 33, S. 802-810.
- [66] W. Olthuis, W. Streekstra, P. Bergveld: *Theoretical and experimental-determination of cell constants of planar-interdigitated electrolyte conductivity sensors*, Sensors and Actuators B **1995**, 24, S. 252-256.
- [67] B. Timmer, W. Sparreboom, W. Olthuis, P. Bergveld, A. van den Berg: *Optimization of an electrolyte conductivity detector for measuring low ion concentrations*, Lab on a Chip **2002**, 2, S. 121-124.
- [68] E. Ölvecká, D. Kaniansky, B. Pollák, B. Stanislawski: *Separation of proteins by zone electrophoresis on-line coupled with isotachopheresis on a column-coupling chip with conductivity detection*, Electrophoresis **2004**, 25, S. 3865-3874.
- [69] A. J. Zemann, *Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis*, Electrophoresis **2003**, 24, S. 2125-2137.
- [70] E. Pungor: *Oscillometry and Conductometry*, **1965**, Pergamon Press, Oxford, London, Paris, Frankfurt.
- [71] B. Gaš, B. Demjaněnko, J. Vacík: *J. Chromatogr., High-frequency contactless conductivity detection in isotachopheresis*, J. Chromatogr. **1980**, 192, S. 253-257
- [72] A. J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, G. K. Bonn, *Contactless Conductivity*

- Detection for Capillary Electrophoresis*, Anal. Chem. **1998**, 70, S. 563-567.
- [73] J. A. F. da Silva and C. L. do Lago: *An Oscillometric Detector for Capillary Electrophoresis*, Anal. Chem. **1998**, 70, S. 4339-4343.
- [74] M. Pumera, J. Wang, F. Opekar, I. Jelínek, J. Feldman, H. Löwe, S. Hardt: *Contactless Conductivity Detector for Microchip Capillary Electrophoresis*, Anal. Chem. **2002**, 74, S.1968-1971.
- [75] J. Tanyanyiwa, E. M. Abad-Villar, M. T. Fernandez-Abedul, A. Costa-Garcia, W. Hoffmann, A. E. Guber, D. Herrmann, A. Gerlach, N. Gottschlich, P. C. Hauser: *High-voltage contactless conductivity-detection for lab-on-chip devices using external electrodes on the holder*, Analyst **2003**, 128, S. 1019-1022.
- [76] P. Kubáň, P. C. Hauser: *Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part I: Frequency behaviour and cell geometry*, Electrophoresis **2004**, 25, S. 3387-3397.
- [77] J. Tanyanyiwa, J. B. Galliker, M. A. Schwarz, P.C. Hauser: *Improved Capacitively coupled conductivity detector for capillary electrophoresis*, Analyst **2002**, 127, S. 214-218.
- [78] J. A. F. da Silva, N. Guzman, C. L. do Lago: *Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis Hardware improvements and optimization of the input-signal amplitude and frequency*, J. Chromatography A **2002**, 942, S. 249-258.
- [79] P. Tůma, F. Opekar, K. Štutlík: *A contactless conductivity detector for capillary electrophoresis: Effects of the detection cell geometry on the detector performance*, Electrophoresis **2002**, 23, S. 3718-3724.
- [80] P. Kubáň, P. C. Hauser: *Fundamental aspects of contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. Part II: Signal-to-noise ratio and stray capacitance*, Electrophoresis **2004**, 25, S. 3398-3405.
- [81] E. Baltussen, R. M. Guijt, G. van der Steen, F. Laugere, S. Baltussen, G. W. K. van Dedem: *Considerations on contactless conductivity detection in capillary electrophoresis*, Electrophoresis **2002**, 23, S. 2888-2893.
- [82] B. Gaš, J. Zuska, P. Coufal, T. van de Goor: *Optimization of the high-frequency contactless conductivity detector for capillary electrophoresis*, Electrophoresis **2002**, 23, S. 3520-3527.
- [83] J. R. MacDonald: *Impedance Spectroscopy*, **1987**, Wiley, New York.
- [84] J. Tu, X. B. Zhao, D. G. Zhuang, G. S. Cao, T. J. Zhu, J. P. Tu: *Studies of cycleability of  $\text{LiMn}_2\text{O}_4$  and  $\text{LiLa}_{0.01}\text{Mn}_{1.99}\text{O}_4$  as cathode materials for Li-ion battery*, Physica B **2006**, 382, S. 129-134.
- [85] P. M. Gomadam and J. W. Weidner: *Analysis of electrochemical impedance spectroscopy in proton exchange membrane fuel cells*, International Journal of

- Energy Research **2005**, 29, S. 1133-1151.
- [86] I. O. K'Owino, O. A. Sadik: *Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring*, *Electroanalysis* **2005**, 17, S. 2101-2113.
- [87] M. Chemla, V. Bertagna, R. Erre, F. Rouelle, S. Petitdidier, D. Levy: *R and C Impedance Components Equivalent to the Charge Distribution within Si-Substrate Depletion Layer*, *Electrochemical and Solid-State Letters* **2003**, 6, S. G7-G11.
- [88] F. Mansfeld: *The use of electrochemical techniques for the investigation and monitoring of microbiologically influenced corrosion and its inhibition*, *Materials and Corrosion* **2003**, 54, S. 489-502.
- [89] J. D. Watson, F. H. C. Crick: *Molecular Structure of Nucleic Acids: A structure for desoxyribose nucleic acid*, *Nature* **1953**, 171, S.737-738.
- [90] J. D. Watson, F. H. C. Crick: *Genetical implications of the Structure of Desoxyribonucleic Acid*, *Nature* **1953**, 171, S. 964-967.
- [91] R. Knippers: *Molekulare Genetik*, **1997**, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- [92] H. G. Gassen: *Gentechnik*, **1996**, 4. Auflage, Fischer Verlag, Stuttgart.
- [93] P. H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn: *Biology of plants*, **1992**, 5th ed., Worth Publishers, New York, S. 138.
- [94] Z. Kutnjak and C. Filipič: *Electrical Conduction in Native Deoxyribonucleic Acid: Hole Hopping Transfer Mechanism?*, *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 90, 9.
- [95] Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka, M. Shimomura: *Anisotropic Electric Conductivity in an Aligned DNA Cast Film*, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, S. 6165-6166.
- [96] H. W. Fink and C. Schönenberger: *Electrical conduction through DNA molecules*, *Nature* **1999**, 398, S.407-410.
- [97] D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, C. Dekker: *Direct measurement of electrical transport through DNA molecules*, *Nature* **2000**, 403, S. 635-638.
- [98] P. J. Pablo, F. Moreno-Herreon, J. Colchero, J. Gómez Herreon, P. Herrero, A. M. Baró, P. Ordejón, J. M. Soler, E. Artacho: *Absence of dc-Conductivity in  $\lambda$ -DNA*, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 85, S. 4992-4995.
- [99] A. Y. Kasumov, M. Kociak, S. Guéron, B. Reulet, V. T. Volkov, D. V. Klinov, H. Bouchiat: *Proximity-Induced Superconductivity in DNA*, *Science* **2001**, 291, S.280-282.
- [100] G. Cuniberti, L. Craco, D. Porath, C. Dekker: *Backbone-induced semiconducting behaviour in short DNA wires*, *Phys. Rev. B* **2002**, 65,

- S. 241314 (R).
- [101] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely: *Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling*, Nature **2001**, 412, S. 318-320.
- [102] H. Kleine: *Ladungstransport durch DNA*, Dissertationsschrift **2004**, Universität Bielefeld.
- [103] B. Xu, P. Zhang, X. Li, N. Tao: *Direct Conductance Measurement of Single DNA Molecules in Aqueous Solution*, Nano Letters **2004**, 4, S. 1105-1108.
- [104] Z. Kutnjak, C. Filipič, R. Podgornik, L. Nordenskiöld, N. Korolev: *Charge Transport Mechanism in Native Deoxyribonucleic Acid*, Physica Scripta **2005**, 118, S. 208-210.
- [105] Y.-S. Jo, Y. Lee, Y. Roh: *Current-voltage characterisation of  $\lambda$ - and poly-DNA*, Material Science and Engineering C **2003**, 23, S. 841-846.
- [106] A. Bruil, J. G. A. Terling, T. Beugeling, W. G. van Aken, J. Feijen: *In vitro leucocyte adhesion to modified polyurethane surfaces, I. Effect of ionizable functional groups*, Biomaterials **1992**, 13, S. 915-923.
- [107] *Users's Manual: Alpha High Resolution Dielectric Analyzer*, **2001**, Novocontrol GmbH, Hundsangen.
- [108] R. Truckenmüller, P. Henzi, D. Herrmann, V. Saile, W. K. Schomburg: *Bonding of polymer microstructures by UV irradiation and welding at low temperatures*, Proc. 5<sup>th</sup> Symposium on Design, Test, Integration and Packaging of MEMS / MOEMS, May 5-7, **2003**, Cannes, France, K. Bergman [Hrsg.], New York, IEEE S. 265-267.
- [109] P. Henzi: *UV-induzierte Herstellung monomodiger Wellenleiter in Polymeren* **2004**, Wissenschaftliche Berichte FZKA 6978, Forschungszentrum Karlsruhe.
- [110] L. E. Locascio, C. E. Perso, C. S. Lee: *Measurement of Electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate*, J. Chromatogr. A **1999**, 857, S. 275-284.
- [111] H. Mühlberger, A. E. Guber, D. Schauz: *Verfahren zum dauerhaften Verbinden von Bauteilen aus Polyetheretherketon*, **2005**, Patentanmeldung 102005028330.6, Deutsches Patent- und Markenamt, München.
- [112] Z. Wu, N. Xanthopoulos, F. Reymond, J. S. Rossier, H. H. Girault: *Polymer microchips bonded by O<sub>2</sub>-plasma activation*, Electrophoresis **2002**, 23, S.782-790.
- [113] K. Narushima, S. Tasaka, N. Inagaki: *Surface Modification of Poly (aryl ether ether keton) by Pulsed Oxygen Plasma*, Jpn. J. Appl. Phys. **2002**, 41, S. 6506-6516.

- [114] C. Seidel, L. Zirkel, H. Münstedt: *Flexible Schaltungsträger: Hochtemperatur-Thermoplastfolien*, *Kunststoffe* **2005**, 10, S. 197-201.
- [115] H. Mühlberger, A. E. Guber, W. Hoffmann: *Microfluidic Polyetheretherketon (PEEK) Chips combined with Contactless Conductivity Detection for  $\mu$ TAS*, K. F. Jensen, Proc. of  $\mu$ TAS 2005: 9<sup>th</sup> Internat. Conf. on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, **2005**, Boston, USA, Vol.1, S. 184-186.
- [116] H. Mühlberger, A. E. Guber, W. Hoffmann: *Introducing polyether ether keton (PEEK) into the field of lab-on-a-chip systems*, MSB 2006: 20<sup>th</sup> Internat. Symp. on Microscale Bioseparations, Jan. 22-26, **2006**, Amsterdam, Netherlands.
- [117] Y. Feng, J. Gottmann, E. W. Kreutz: *Structuring of poly ether ether ketone by ArF excimer laser radiation in different atmospheres*, *Applied Surface Science* **2003**, 211, S. 68-75.
- [118] X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare: *Current-Monitoring Method for Measuring the Electroosmotic Flow Rate in Capillary Zone Electrophoresis*, *Anal. Chem.* **1988**, 60, S. 1837-1838.
- [119] G. A. M. Mersal and U. Bilitewski: *Manipulation of the Electroosmotic Flow in Glass and PMMA Microchips with Respect to Specific Enzymatic Glucose Determinations*, *Microchim Acta* **2005**, 151, S. 29-38.
- [120] P. Kaltenbach, K. Witt, B. Gas, T. van de Goor: *Contactless Detection Cell*, **2005**, Internationale Patentanmeldung (PTC) WO 2005/095935 A1, Agilent Technologies.
- [121] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček: *Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures*, *Electrophoresis* **2003**, 24, S. 466-485.
- [122] Y. S. Fung and K. M. Lau: *Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* **2003**, 24, S. 3224-3232.
- [123] A. Z. Carvalho, J. A. F. da Silva, C. L. do Lago: *Determination on mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*, *Electrophoresis* **2003**, 24, S. 2138-2143.
- [124] H. Mühlberger, B. Gaš, A. E. Guber, T. van de Goor, K. Witt, W. Hoffmann: *Analysis of Organic Acids as Main Components in Beverages by Capillary Electrophoresis in Polymer Chips with Contactless Conductivity Detection*, *Analytica* 2004, May 11-13, **2004**, München.
- [125] B. Gaš, M. Jaroš, V. Hruška, I. Zusková, M. Štědrý: *PeakMaster – A Freeware Simulator of Capillary Zone Electrophoresis*, *LC GC Europe*, **2005**, 18, S. 282-288.
- [126] <http://www.natur.cuni.cz/~gas/>

- [127] M. Jaroš, V. Hruška, M. Štědrý, I. Zusková, B. Gaš: *Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster*, *Electrophoresis* **2004**, 25, S. 3080-3085.
- [128] G. M. Goodwin, for the Consensus Group of the British Association for Psychopharmacology: *Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder: recommendations from the British Association for Psychopharmacology*, *J. Psychopharmacology* **2003**, 17, S. 149-173.
- [129] J. Pybus and G. N. Bowers: *Measurement of Serum Lithium by Atomic Absorption Spectroscopy*, *Clinical Chemistry* **1970**, 16, S.139-143.
- [130] M. Camus, G. Henneré, G. Baron, G. Peytavin, L. Massias, F. Mentré, R. Farinotti: *Comparison of lithium concentrations in red blood cells and plasma in samples collected for TDM, acute toxicity, or acute-on-chronic toxicity*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2003**, 59, S. 583-587.
- [131] E. X. Vrouwe, R. Lutge, A. van den Berg: *Direct measurement of lithium in whole blood using microchip capillary electrophoresis with integrated conductivity detection*, *Electrophoresis* **2004**, 25, S. 1660-1667.
- [132] H. Mühlberger, B. Gaš, A. Guber, W. Hoffmann: *CE-CCD in Polymer Chip Format for Determination of Lithium in Blood Serum*, *NanoTech 2004*, Nov. 16-18, **2004**, Montreux, CH.
- [133] P. Coufal, J. Zuska, T. van de Goor, V. Smith, B. Gaš: *Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection*, *Electrophoresis* **2003**, 24, S. 671-677.
- [134] H. Mühlberger, H. Demattio, B. Gaš, A. E. Guber, J. Zuska, W. Hoffmann: *Miniaturized Capillary Electrophoresis Device for Budget-Conscious Application*, 29<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations (HPLC 2005), June 26-30, **2005**, Stockholm, Schweden.
- [135] H. Mühlberger, H. Demattio, B. Gaš, A. Guber, J. Zuska, W. Hoffmann: *Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis Device for Budget-Conscious Application*, 11th International Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis, Oct. 20-23, **2005**, Beijing, China.
- [136] H. Mühlberger, A. E. Guber, W. Hoffmann: *Lab-on-Chip Systeme für die chemische Analytik*, *Sensor + Test*, 10.-12. Mai **2005**, Nürnberg.
- [137] H. Mühlberger, H. Demattio, B. Gaš, A. Guber, J. Zuska, W. Hoffmann: *Lab-on-Chip Kapillarelektrophorese-System für den budgetbewussten Anwender*, 7. Dresdner Sensor-Symposium, 12.-14. Dez. **2005**, Dresden.
- [138] M. Kautt, W. Hoffmann, S. Giselbrecht, H. Mühlberger: *Mikro- und Nanotechnologie im Dienste der Biowissenschaften*, **2005**, *Mikro System Technik*, 2, S. 16-17.

- [139] W. Hoffmann, H. Mühlberger, A. E. Guber, H. Demattio, B. Gaš: *Auf dem Weg zum Budgetbewussten Anwender: Kapillarelektrophorese im Polymer-Chipformat mit elektrischer Detektion*, Mikro System Technik **2001**, 6, S. 17-18.
- [140] W. Hoffmann, H. Mühlberger, A. E. Guber, H. Demattio, B. Gaš: *Auf dem Weg zum Budgetbewussten Anwender: Kapillarelektrophorese im Polymer-Chipformat mit elektrischer Detektion*, GIT Labor-Fachzeitschrift **2006**, 50, S. 448-451.
- [141] W. Hoffmann, H. Mühlberger, H. Demattio, B. Gaš, A. E. Guber, V. Saile: *Pushing Capillary Electrophoresis in Chip Format into the Low Cost Region*, Proceedings of the 210<sup>th</sup> Meeting of The Electrochemical Society, Oct. 29 - Nov. 3, **2006**, Cancun, Mexico.
- [142] H. Mühlberger, W. Hoffmann: *Messgerät zur Kapillarelektrophorese*, **2005**, Gebrauchsmuster Nr. 20 2005 009 960.0, Deutsches Patent- und Markenamt, München.
- [143] A. McCook: *The Automated DNA Sequencer*, The Scientist **2005**, 19, S. 15.
- [144] L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner: S. B. H. Kent, L. E. Hood, *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*, Nature **1986**, 321. S. 674-679.
- [145] Agilent Technologies, *A bioanalyzer for nucleic acids is featured*, Anal. Chem. **1999**, 71, S. 829 A.
- [146] Fermentas GmbH, [www.fermentas.de](http://www.fermentas.de)
- [147] W. Hoffmann, H. Mühlberger, B. Gaš, A. E. Guber, T. van de Goor, K. Witt, A. Gerlach, N. Gottschlich: *Polymer Capillary Electrophoresis Chips - Evaluation and Optimization by Model Aided Contactless Conductivity Detection*, Joint Internat. ECS Meeting, Oct. 3-8, **2004**, Honolulu, Hawaii, USA.
- [148] H. Mühlberger, W. Hoffmann, B. Gaš: *Messgerät zur Überwachung und Steuerung der Injektion von Fluiden in mikrofluiden Kanälen*, **2006**, Gebrauchsmusteranmeldung 202006018535.6, Deutsches Patent- und Markenamt, München.
- [149] H. Mühlberger, W. Hoffmann: *Verfahren zum Nachweis eines Analyten in Form von Fragmenten einer Nukleinsäure und Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens*, **2005**, Patentanmeldung 102005061487.6, Deutsches Patent- und Markenamt, München.
- [150] A. Arora, J. C. Eijkel, W. E. Morf, A. Manz: *A Wireless Electrochemiluminescence Detector Applied to Direct and Indirect Detection for Electrophoresis on a Microfabricated Glass Device*, Anal. Chem. **2001**, 73, S. 3282-3288.

