

Entwicklung einer tropfenbasierten mikrofluidischen Plattform für das High- Throughput-Screening multizellulärer Systeme

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur
(Dr.-Ing.)

vorgelegt der
Fakultät für Maschinenbau der
Technischen Universität Ilmenau

von Herrn
Dipl.-Ing. (FH) Stefan Wiedemeier

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Martin Hoffmann, Technische Universität Ilmenau
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Stefan Sinzinger, Technische Universität Ilmenau
3. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Walter Bodemer, Deutsches Primatenzentrum (DPZ)
Göttingen

Tag der Einreichung: 11.12.2018

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 11.07.2019

urn:nbn:de:gbv:ilm1-2019000520

Abstract

In droplet-based microfluidics, medical, biological or chemical experiments take place in discrete reaction spaces named “droplets”. The droplet-based microfluidics offers a considerable potential for applications like optimization of screening processes for the development of drugs or for the manipulation of cells and 3D cell structures, respectively. However, for such applications the currently available concepts do not provide the necessary reliability and practicability. In particular, the maintenance of reproducible and stable process conditions are decisive factors for a breakthrough of this technology on the market.

Applying multicellular systems like native tissue or spheroids cultivated *in vitro*, special requirements have to be fulfilled. For example, the use of surface-active substances (surfactants), which are applied for stabilizing the droplets in the majority of droplet-based microfluidics applications, is disadvantageous for investigations of cells and 3D cell structures in droplets. The abandonment of surface-active substances is an important step towards a fundamental acceptance of droplet-based microfluidic processes. The results presented in this work show an alternative to avoid the use of surface-active substances for the handling and cultivation of cells and 3D cell structures in droplets. The technical system developed as part of the research work is based on novel microfluidic components and meets the high demands on reproducibility and stability for handling cells and 3D cell structures.

The results of the research work include the development of the entire droplet-based system as well as the investigations on the droplet generation process. This includes the investigation of basic parameters like surface properties of the microfluidic channels, the arrangement of the channels, the fluid flow conditions, and the kind of sample medium. Partial aspects of the extensive experiments that were performed to analyze the influence of the above mentioned parameters were also investigated by numerical simulations. In addition, the work describes the development of a biomimetic approach to increase the stability of droplet generation and to reduce the adhesion of aqueous droplets to the microchannel surfaces of the polymer chips. This approach succeeded even with samples containing anticoagulated whole blood. Concluding, the newly developed and characterized droplet-based microfluidic system points out a high application potential for the life sciences and especially for the field of individual medicine.

Zusammenfassung

Im Bereich der tropfenbasierten Mikrofluidik werden medizinische, biologische oder auch chemische Experimente in diskrete Reaktionsräume überführt. Diese als Tropfen bezeichneten Reaktionsräume besitzen als seriell angeordnete Mikroreaktoren ein hohes Anwendungspotenzial, sei es zur Optimierung von Screening-Prozessen für die Medikamentenentwicklung oder zur Manipulation von Zellen und 3D Zellstrukturen. Für solche Anwendungen bieten die derzeit existierenden Konzepte jedoch nicht die erforderliche Zuverlässigkeit und Praktikabilität. Vor allem die Aufrechterhaltung reproduzierbarer und stabiler Prozessbedingungen sind ausschlaggebende Faktoren als Voraussetzung für einen Durchbruch dieser Technologie am Markt.

Insbesondere bei Anwendungen mit multizellulären Systemen wie nativen Gewebefragmenten oder *in vitro* kultivierten Sphäroiden sind besondere Voraussetzungen zu erfüllen. Beispielsweise ist die Verwendung oberflächenaktiver Substanzen (Tenside), die bei der Mehrzahl tropfenbasierter mikrofluidischer Applikationen zur Stabilisierung der Tropfen eingesetzt werden, nachteilig für Untersuchungen dieser Proben. Der Verzicht auf Tenside ist ein wichtiger Schritt in Richtung einer grundlegenden Akzeptanz tropfenbasierter Verfahren. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen eine Alternative auf, bei der für das Handling und die Kultivierung multizellulärer Systeme auf die Verwendung von Tensiden verzichtet werden kann. Das im Rahmen der Forschungsarbeiten entwickelte technische System beruht auf neuartigen, mikrofluidischen Komponenten, die die hohen Ansprüche für das Handling multizellulärer Systeme erfüllen.

Neben der Beschreibung der Systementwicklung steht die Charakterisierung der Einflussfaktoren auf die Tropfengenerierung im Mittelpunkt der Arbeit. Relevante Einflussgrößen wie die Kanalanordnung und deren Oberflächenbeschaffenheit sowie der Einfluss der Volumenströme und unterschiedlicher Probenmedien auf die Tropfengenerierung wurden untersucht. Zusätzlich zu den umfangreichen Laborexperimenten wurden numerische Simulationen zu Teilaspekten der Tropfengenerierung durchgeführt. Die Arbeit beschreibt weiterhin die Entwicklung eines biomimetischen Ansatzes zur Steigerung der Stabilität der Tropfengenerierung durch die Verringerung des Adhäsionspotenzials wässriger Proben mit den Kanaloberflächen der Mikrosysteme. Mit Hilfe dieses Ansatzes gelang eine erfolgreiche Tropfengenerierung sogar mit Proben, die antikoaguliertes Vollblut enthielten. Damit ist die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte mikrofluidische Plattform insbesondere für Anwendungen im Bereich der Biowissenschaften und speziell für die Individualmedizin prädestiniert.

Danksagung

Viele großartige Menschen haben mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt, denen ich meine Wertschätzung ausspreche. Ich danke ...

- ... meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil. Martin Hoffmann, für die fortwährende Unterstützung und die fachlichen Diskussionen während meiner Dissertation.
- ... meinem Zweitgutachter, Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Walter Bodemer, für die vielen Ratschläge und Anmerkungen sowie die intensiven Diskussionen zum Thema der Arbeit und darüber hinaus.
- ... Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Stefan Sinzinger für die Unterstützung bei der Promotion und für die Bereitschaft, meine Arbeit als weiterer Gutachter zu bewerten.

Ich danke allen Kollegen des Fachbereichs Bioprozesstechnik für die vertrauensvolle Zusammenarbeit, insbesondere ...

- ... Herrn Dr. Josef Metze, der diese Arbeit erst möglich machte, und für die Unterstützung, die ich am Fachbereich für die Bearbeitung meiner Arbeit hatte.
- ... Herrn Dr. Gunter Gastrock für die fachliche und persönliche Unterstützung, die vielen Gespräche, die diese Arbeit vorangebracht haben, und insbesondere für die Freiräume, die ich für die Bearbeitung meiner Arbeit hatte.
- ... Frau Dr. Karen Lemke für die konstruktiven Ratschläge und die Inspirationen in die richtige Richtung.
- ... Herrn Andreas Grodrian für die Gespräche unter Ingenieuren und darüber hinaus für alles, was ich von ihm gelernt habe.
- ... Herrn Robert Römer für so vieles, das ich hier nicht alles aufzählen kann.
- ... Herrn Mario Saupe für die motivierenden Gespräche, die meine Arbeit unterstützt haben, und für das freundschaftliche Miteinander.

Dem gesamten Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik für die vielfältige und fortwährende Unterstützung. Vor allem ...

- ... Frau Dr. Steffi Grohmann für die aufmunternden Gespräche, die konstruktive Kritik und die wissenschaftlichen Anregungen, die mich neue Aspekte und Ansätze entdecken ließen.

- ... Herrn Dr. Alexander Scholte für die guten Ratschläge und das offene Ohr für fachliche Fragestellungen.
- ... Herrn Holger Rothe und Frau Dr. Marion Frant für die fachlichen Gespräche und ganz besonders für die Unterstützung bei der Oberflächenanalyse und der Ermittlung der physikochemischen Parameter.
- ... der Laborwerkstatt für die Fertigung der Module und Komponenten sowie die Verkabelung der mikrofluidischen Plattform.
- ... insbesondere Herrn Gerd Hollenbach, mit dessen Fähigkeiten und Engagement die Module erst realisiert werden konnten.

Mein besonderer Dank gebührt meiner Familie für den Rückhalt,

- ... meinen Eltern und meinem Bruder für die unermüdliche und fortwährende Unterstützung.
- ... meiner Frau und meinen Kindern für Ihr Verständnis, die Unterstützung und den Halt, der einen so stark macht.

Diese Arbeiten wurden durch die Europäische Forschungsgesellschaft Dünne Schichten e.V. (EFDS), die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) und die Thüringer Aufbaubank im Rahmen zweier Forschungsprojekte (366ZBG ,2013 VF 0003) gefördert. Die Arbeit wurde finanziell vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, dem Freistaat Thüringen und dem Europäischen Fond für regionale Entwicklung (EFRE) unterstützt.

Für die Unterstützung im Rahmen der Forschungsprojekte möchte ich mich bei Herrn Dr. Eichler vom Fraunhofer-Institut für Schicht- und Oberflächentechnik (IST) in Braunschweig, Herrn Staps und Herrn Kolbe von der FKT Formenbau und Kunststofftechnik GmbH in Triptis, Herrn Wächter vom Günter-Köhler-Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH in Jena und beim Kunststoff-Zentrum in Leipzig für die Zusammenarbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	III
Zusammenfassung.....	V
Danksagung.....	VII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
Abkürzungen und Symbole.....	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Individualmedizin	1
1.2 Tropfenbasierte Mikrofluidik	6
1.3 Stand der Technik	9
1.4 Ziele der Arbeit.....	13
2 Theoretische Grundlagen.....	15
2.1 Hydrodynamik.....	16
2.2 Dimensionslose Kennzahlen	18
2.3 Grenzflächen	20
3 Tropfenbasierte mikrofluidische Plattform	25
3.1 Konzept	25
3.2 Charakteristische Merkmale	27
3.3 Fluidische Einheit	31
3.3.1 Pumpenmodul.....	31
3.3.2 Mischmodul.....	33
3.3.3 Tropfenmodul.....	34
3.3.4 Speichermodul	35

3.3.5	Druckmodul.....	35
3.3.6	Zudosiermodul	36
3.3.7	Spektroskopiemodul	38
3.4	Kontrolleinheit	40
3.4.1	Hardware	40
3.4.2	Software.....	41
4	Material und Methoden	47
4.1	Beschichtungsverfahren	47
4.1.1	Atmosphärendruck-Plasmaverfahren.....	47
4.1.2	Niederdruck-Plasmaverfahren.....	48
4.2	Spritzguss	48
4.2.1	Spritzgusswerkzeuge.....	49
4.2.2	Lasergestützte Mikrostrukturierung.....	49
4.2.3	Formteile.....	50
4.2.4	Spritzgussverfahren	51
4.3	Physikochemische Untersuchungen	52
4.3.1	Kontaktwinkelmessung.....	52
4.3.2	Oberflächenenergie	52
4.3.3	Stoffeigenschaften	52
4.4	Oberflächentopographische Untersuchungen	53
4.4.1	Weißlichtinterferometer.....	54
4.4.2	Rasterkraftmikroskop	54
4.4.3	Rasterelektronenmikroskop	54
5	Tropfengenerierung	55
5.1	Charakterisierung der physikochemischen Oberflächeneigenschaften.....	55
5.2	Bestimmung relevanter dimensionsloser Kennzahlen	59
5.3	Numerische Simulation.....	60
5.4	Charakterisierung der Tropfengenerierung.....	66
5.4.1	Einfluss der Standzeit.....	70
5.4.2	Einfluss des FMS-Design	72
5.4.3	Einfluss der Förderraten	75
5.5	Einfluss des Probenmediums.....	80

6	Mikrostrukturierung	89
6.1	Eigenschaften einer Mikrostrukturierung.....	90
6.2	Übertragbarkeit einer Mikrostruktur.....	95
6.3	Einfluss der Spritzgussparameter	96
6.4	Einfluss der Spritzguss-Polymere	98
6.5	Einfluss des Temperierungsmediums	101
6.6	Gegenüberstellung der mikrostrukturierten Oberfläche mit der eines Lotusblattes	102
6.7	Tropfengenerierung mit mikrostrukturierten FMS	103
7	Diskussion und Ausblick	108
7.1	Diskussion	108
7.2	Ausblick	112
A	Anhang	113
A.1	Comsol-Modell	113
A.2	Übersicht der Ergebnisse zum Tropfenvolumen in Abhängigkeit von der Standzeit	121
A.3	Übersicht der Ergebnisse zum Tropfenvolumen in Abhängigkeit von den Förder- raten	122
	Literaturverzeichnis	123
	Abbildungsverzeichnis	133
	Tabellenverzeichnis	140

Abkürzungen und Symbole

$1D$	eindimensional, eine Dimension
$2D$	zweidimensional, zwei Dimensionen
$3D$	dreidimensional, drei Dimensionen
AFM	atomic force microscopy (Rasterkraftmikroskop)
C_4F_8	zyklisches Octafluorocyclobutan
COC	Cycloolefin-Copolymere
d	Durchmesser
D	disperser Anteil
d_{HK}	Durchmesser des Hauptkanals
d_K	Durchmesser eines Kanals
d_{VK}	Verbindungskanal
$DMEM$	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
d_{PD1}	Durchmesser des 1. photometrischen Detektors
d_{PD2}	Durchmesser des 2. photometrischen Detektors
d_{SK}	Durchmesser des Seitenkanals
d_T	Durchmesser eines Tropfens
ECM	Extracellular matrix (Extrazelluläre Matrix)
\vec{f}	Vektor der Volumenkraftdichte
FBS	Fetal bovine serum (fetales Serum Albumin, fetales Kälberserum)
FMS	Fluidmikrosystem
g	Gravitation
HTS	High-Throughput-Screenings (Hochdurchsatz-Screening)
$IMDM$	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
l_{RS}	Breite des Ringspaltes
kS/s	Abtastrate in Kilosample pro Sekunde (Messungen pro Zeiteinheit)
l	Länge
m	Masse
n	Tropfen Index
n_{max}	Anzahl aller gemessenen Tropfen
$OWRK$	Owens, Wendt, Rabel und Kaelble Methode
p	Druck
P	polarer Anteil

<i>PA-CVD</i>	Plasma-activated chemical vapor deposition (Plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung)
<i>PBS</i>	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
<i>PC</i>	Polycarbonat (Polykarbonat)
<i>PD1</i>	1. photometrischer Detektor
<i>PD2</i>	2. photometrischer Detektor
<i>PDMS</i>	Polydimethylsiloxan
<i>FEP</i>	Fluorethylenpropylen
<i>PFD</i>	Perfluordecalin
<i>pH</i>	negativer dekadischer Logarithmus (= Zehnerlogarithmus) der Wasserstoffionen-Aktivität
p_K	Laplace-Druck
<i>PR</i>	Phenolrot
<i>PTFE</i>	Polytetrafluorethylen
$Q_d = \dot{V}_d$	Volumenstrom (Förderrate) der dispersen Phase (wässrige, hydrophile oder Proben – Phase, Probenmedium, biologisches Medium)
$Q_k = \dot{V}_k$	Volumenstrom (Förderrate) der kontinuierlichen Phase (organische oder hydrophobe Phase, Separationsmedium, Trägermedium, Perfluordecalin)
<i>r</i>	Radius
<i>S</i>	Abtastrate; Samples per second; Messungen pro Sekunde
<i>S10z</i>	Rauheitsparameter, die Zehn-Punkte-Höhe der Oberfläche
<i>S_a</i>	flächenbezogener Rauheitswert (arithmetische mittlere Höhe der Oberfläche)
<i>sccm</i>	Volumenstrom in Standardkubikzentimeter
<i>Sdr</i>	flächenbezogener Rauheitswert (Grenzflächenverhältnis der Oberfläche)
<i>slm</i>	Volumenstrom in Standard Liter pro Minute
<i>SP</i>	Spritzenpumpe
<i>S_{PD12}</i>	Abstand zwischen dem 1. und 2. photometrischen Detektor
<i>S_{Tnn++PD}</i>	Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Tropfen (Tropfen n zu Tropfen n+1)
<i>S_{TnPD}</i>	Länge eines einzelnen Tropfens (z-Achse, Strömungsrichtung) berechnet auf Basis der Signalverläufe der photometrischen Detektoren
<i>S_{TnSP}</i>	mittlere Länge eines Tropfens (z-Achse, Strömungsrichtung) berechnet auf Basis der Volumendifferenz der dispersen Phase während einer Messung
<i>S_{TTnPD}</i>	Transformierte Länge eines einzelnen Tropfens (z-Achse, Strömungsrichtung), Basis: photometrische Detektoren
<i>S/μm</i>	Auflösung in Sample pro Mikrometer
$t_{TnPD1in}$	Zeitpunkt zu dem ein Tropfen den Erfassungsbereich des 1. photometrischen Detektors erreicht
$t_{TnPD2in}$	Zeitpunkt zu dem ein Tropfen den Erfassungsbereich des 2. photometrischen Detektors erreicht
$t_{TnPD1out}$	Zeitpunkt zu dem ein Tropfen den Erfassungsbereich des 1. photometrischen Detektors verlässt

$t_{TnPD2out}$	Zeitpunkt zu dem ein Tropfen den Erfassungsbereich des 2. photometrischen Detektors verlässt
$T_{sSP/sPD}$	Transformationsfaktor (Quotient der mittleren Tropfenlänge, Basis: Volumendifferenz disperse Phase / Signalverläufe der photometrischen Detektoren)
VK-Wert	Variationskoeffizienten in Prozent
v	Strömungsgeschwindigkeit
$v_m = v_A$	mittlere Strömungsgeschwindigkeit
V_{TnPD}	Strömungsgeschwindigkeit eines einzelnen Tropfens, Basis: photometrische Detektoren
V_T	gemitteltetes Tropfenvolumen
V_{TnPD}	Volumen eines einzelnen Tropfens, Basis: photometrische Detektoren
V_{TTnPD}	Transformiertes Volumen eines einzelnen Tropfens, Basis: photometrische Detektoren
$\%(v/v)$	Volumenprozent
$\%(w/v)$	Gewichtsprozent
∇	Nabla-Operator
$\dot{\gamma}$	Schergeschwindigkeit
γ	Reinitialisierungsparameter
γ_L^D	disperser Anteil der Grenzflächenspannung zwischen einer Flüssigkeit und einem Gas
γ_L^P	polarer Anteil der Grenzflächenspannung zwischen einer Flüssigkeit und einem Gas
$\gamma_L = \gamma_{LG} = \sigma$	Grenzflächenspannung zwischen einer Flüssigkeit und einem Gas. Diese Grenzflächenspannung wird auch als Oberflächenspannung bezeichnet
γ_S^D	disperser Anteil der Grenzflächenspannung zwischen einer Feststoffoberfläche und einem Gas
$\gamma_S = \gamma_{SG}$	Grenzflächenspannung zwischen einer Feststoffoberfläche und einem Gas. Diese Grenzflächenspannung wird auch als freie Oberflächenenergie bezeichnet
γ_{SL}	Grenzflächenspannung zwischen einer Feststoffoberfläche und einer Flüssigkeit
γ_S^P	polarer Anteil der Grenzflächenspannung zwischen einer Feststoffoberfläche und einem Gas
Δ	Laplace-Operator oder Delta zur Beschreibung der Differenz
$\Delta t_{TnPD12in}$	Zeitdifferenz, die ein Tropfen benötigt, um vom Eingang des 1. zum Eingang des 2. photometrischen Detektors zu strömen
$\Delta t_{TnPD1inPD2out}$	Zeitdifferenz, die ein Tropfen benötigt, um vom Eingang des 1. zum Ausgang des 2. photometrischen Detektors zu strömen
$\Delta t_{TnPD12out}$	Zeitdifferenz, die ein Tropfen benötigt, um vom Ausgang des 1. zum Ausgang des 2. photometrischen Detektors zu strömen
ϵ_{ls}	Grenzflächendicke
ν	kinematische Viskosität

θ	Kontaktwinkel
λ	Lamé-Konstante
μ	dynamische Viskosität
$\mu m/S$	Auflösung in Bezug zur Strömungsgeschwindigkeit (Strecken, die der strömende Tropfen zwischen den Messungen zurückgelegt)
π	Pi
ρ	Dichte
τ	Scherspannung
ϕ	Level-Set-Funktion

1 Einleitung

Die Medizin befindet sich im Wandel. Aus dem wissenschaftlich-technischen Fortschritt der letzten Jahrzehnte resultiert ein Paradigmenwechsel. Dank neuer Methoden der Molekularbiologie ist heute eine Vielzahl von Indikatoren bekannt, die zunehmend eine differenzierte Analyse von Krankheiten ermöglichen. Zumeist handelt es sich bei diesen Indikatoren um Biomarker. Biomarker sind messbare Parameter, die Rückschlüsse auf biologische Prozesse im Körper eines Patienten zulassen [1].

Eine aus alter Zeit bekannte Analyse, die auf der Bestimmung eines Biomarkers beruht, basiert auf der Untersuchung von Urin. Schon die einfache Analyse der Farbe, des Geruchs und auch des Geschmacks des Urins ermöglicht Rückschlüsse auf mögliche Erkrankungen. Ist beispielsweise der Geschmack des Urins süßlich, so ist dies ein Hinweis auf einen erhöhten Glukosegehalt des Urins. Normalerweise ist der Glukosegehalt des Urins gering. Ein süßlicher Geschmack kann ein Indikator für eine Diabetes-erkrankung sein. Jedoch sind mittlerweile durch die Molekularbiologie tiefgreifende Urin-Analysen möglich, die durch Untersuchungen verschiedener RNA-Transkripte u.a. auch zum Nachweis von Prostatakarzinomen eingesetzt werden können [2].

Durch die kontinuierliche Entwicklung der Molekularmedizin und der modernen Diagnostik sind heute eine Reihe von molekularen und zellulären Biomarkern bekannt [3]. Die vielfältigen Informationen, die sie bieten, ermöglichen eine umfassende Diagnose unterschiedlicher Erkrankungen. Durch diese Entwicklung kann das Entstehen und Fortschreiten vieler Krankheiten wesentlich genauer analysiert werden, und auf Basis dieser Erkenntnisse lassen sich völlig neue Therapien entwickeln. Die Fortschritte auf diesen Gebieten fördern zunehmend individualmedizinische Ansätze, die eine gezielte Therapie und eine schnelle Genesung des Patienten ermöglichen [4].

1.1 Individualmedizin

Der grundlegende Gedanke einer individualisierten Medizin ist die Berücksichtigung patientenspezifischer Charakteristika [5]. Der Vorteil dieser Herangehensweise liegt auf der Hand: Jeder Mensch ist bei allen Ähnlichkeiten seiner Spezies ein einzigartiges Individuum, ein biologisches Unikat. Die charakteristischen Unterschiede der menschlichen Persönlichkeit spiegeln sich in seiner biologischen Vielfalt wider. Durch diese individuellen Unterschiede kann die Wirkung eines Therapeutikums von Patient zu Patient stark variieren. Für eine gezielte Behandlung müssen diese Unterschiede berücksichtigt werden.

Durch umfassende Voruntersuchungen auf Basis neuartiger diagnostischer Verfahren werden die Voraussetzungen geschaffen, patientenspezifische Charakteristika bei der Therapieentwicklung zu berücksichtigen. Zudem ermöglicht eine therapiebegleitende Diagnostik (Theranostik) eine fortlaufende Beurteilung des Therapieverlaufes [6]. All diese Aspekte lassen sich unter dem Begriff der personalisierten Medizin zusammenfassen, bei der durch tiefgreifende Untersuchungen Patienten in vergleichbare Gruppen eingeteilt werden, für die eine spezifische Therapie den höchstmöglichen Erfolg verspricht. Darüber hinaus wird von Individualmedizin gesprochen, wenn z.B. für einzelne Patienten spezielle Therapeutika eingesetzt werden. Dieser Therapieansatz wird auch als Präzisionsmedizin bezeichnet [7].

Das vordringliche Anliegen der Individualmedizin ist die Identifikation geeigneter Therapeutika und deren optimaler Dosierung unter Berücksichtigung aller für eine Therapie relevanten patientenspezifischen Merkmale [8]. Das Ziel ist hierbei eine möglichst genaue Vorhersage der Wirkung und der Verträglichkeit potenzieller Therapeutika. Durch gezielte Voruntersuchungen bleiben dem betreffenden Patienten wirkungslose Therapien und unnötige Nebenwirkungen erspart. Diese Vorgehensweise bietet Vorteile für den Patienten, da die Wahrscheinlichkeit für einen Therapieerfolg steigt. Zudem sinken durch effiziente Therapien die Kosten im Bereich des Gesundheitswesens [9].

Für eine optimale Krebstherapie sind beispielsweise detaillierte Untersuchungen der spezifischen Tumorzellen eines Patienten erforderlich. Tumorzellen weisen gegenüber gesunden Körperzellen eine Reihe von Mutationen auf. Ein individualmedizinischer Ansatz berücksichtigt hierbei, dass verschiedene Patienten, die an der gleichen Tumorerkrankung leiden, oftmals nicht die gleichen Mutationen aufweisen. Durch ein tiefgreifendes Screening können geeignete Therapien entwickelt werden, die diese Unterschiede berücksichtigen [10, 11]. Zudem sind Krebspatienten durch ihre Erkrankung im Allgemeinen erheblich geschwächt. Um den Patienten in diesem Zustand nicht unnötig zu belasten, dürfen die erforderlichen Untersuchungen nicht direkt am Patienten (*in vivo*) durchgeführt werden.

Für Untersuchungen von Tumorzellen, entkoppelt vom Patienten, werden *in vitro* diagnostische Verfahren eingesetzt. Aus Gründen der Handhabbarkeit bieten sich für solche Studien Zelllinien an, da diese im Gegensatz zu primären Tumorzellen einfach kultiviert und untersucht werden können. Insbesondere Untersuchungen an 3D multizellulären Systemen (Sphäroiden) spiegeln die Wirkung eines Therapeutikums unter dem Einfluss ihres gewebespezifischen Aufbaues realistischer wider als Untersuchungen an 2D-Zellsystemen [12]. Im Gegensatz zu 2D-Zellsystemen, bei denen die Zellen in Kulturfラスchen oder Multiwellplatten als Monolayer auf den Oberflächen der Gefäßböden vorliegen, berücksichtigen Untersuchungen an Sphäroiden die Mikroumgebung der Zellen im Gewebeverbund [13].

Viele adhärent wachsende Zelllinien, insbesondere Tumorzelllinien, bilden in einer geeigneten 3D-Umgebung organotypische Sphäroide [14]. Die Zellen werden hierfür z.B. in Hydrogele wie Dextran-Polyethylenglycol (PEG) [15], Alginat [16] oder festen Gerüststrukturen (Scaffolds) [17] eingebettet, in denen sie unter geeigneten Kulturbedingungen Sphäroide bilden. Diese Trägerstrukturen ermöglichen eine räumliche Organisation der Zellen und unterstützen die spätere Bildung einer nativen extrazellulären Matrix (ECM) [18].

Weitere etablierte Methoden zur Bildung von Sphäroiden sind die des „liquid overlay“ [19], des „hanging drop“ [20] und des „modified hanging drop“ [21]. Beim „liquid overlay“ (s. Abb. 1.1, A) werden die Sphäroide in den Wells von Mikrotiterplatten (MTP) gebildet. Um einer Adhäsion der Zellen an der Oberfläche der Wells entgegenzuwirken, werden die Oberflächen mit Agarose beschichtet. Hierfür wird eine temperierte Agaroselösung in die Wells pipettiert. Durch Adhäsionseffekte bildet die Agarose in den Wells eine gewölbte Oberfläche, die sich durch die Polymerisation beim Abkühlen in diesem Zustand verfestigt. Zur Bildung von Sphäroiden wird in einem ersten Schritt eine Einzelzellsuspension in die mit Agarose modifizierten Wells pipettiert (s. Abb. 1.1, A I). Nachfolgend sedimentieren die Zellen im Gravitationsfeld und sammeln sich im tiefsten Bereich der Wells. Da aufgrund der Agarosebeschichtung keine geeignete Oberfläche zum Adhärenieren zur Verfügung steht (s. Abb. 1.1, A II), bilden die Zellen durch Selbstorganisation Sphäroide (s. Abb. 1.1, A III).

Bei der „hanging drop“ (s. Abb. 1.1, B) und der „modified hanging drop“ Methode (s. Abb. 1.1, C - D) erfolgt die Sphäroidbildung in hängenden Tropfen. Bei der „hanging drop“ Methode wird die Zellsuspension auf den Deckel einer Petrischale pipettiert. Anschließend wird der Deckel auf geeignete Weise gedreht, ohne dass sich Tropfen ablösen oder zusammenfließen. Der gedrehte Deckel mit den hängenden Tropfen wird auf eine mit phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) befüllten Petrischale gesetzt (s. Abb. 1.1, B). Die PBS-Lösung wirkt hierbei der Verdunstung der Tropfen entgegen.

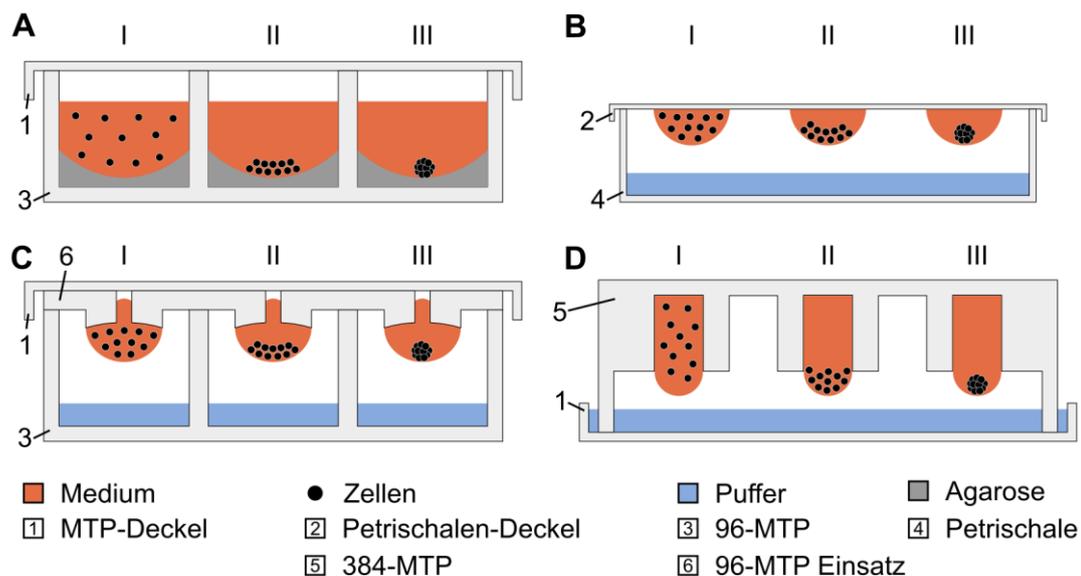


Abb. 1.1: Darstellung unterschiedlicher Methoden zur Bildung von Sphäroiden.
 A – „liquid overlay“; B – „hanging drop“; C und D – „modified hanging drop“;
 I – Aliquotierung der Zellsuspension;
 II – Inkubation (Zellproliferation und Sedimentation);
 III – Sphäroidbildung.

Bei den „modified hanging drop“ Methoden werden die Tropfen an einem speziell designten MTP-Einsatz gebildet (s. Abb. 1.1, C). Der MTP-Einsatz weist hierfür kreisförmige Durchführungen auf, die in speziell geformte Halteflächen zur Stabilisierung der hängenden Tropfen übergehen. Die Tropfengenerierung erfolgt durch Injektion der Zellsuspension von oben durch die kreisförmigen Durchführungen. Das Medium, aus denen die Tropfen bestehen, adhärirt an den Halteflächen.

Bei der zweiten Variante der „modified hanging drop“ Methode wird eine Zellsuspension direkt in die Wells einer 384-MTP pipettiert. Wie bei der „hanging drop“ Methode wird die befüllte MTP für die Sphäroidbildung gedreht (s. Abb. 1.1, D).

Bei der „hanging drop“ und der „modified hanging drop“ Methode fehlt in den hängenden Tropfen eine geeignete Oberfläche, an denen die Zellen adhären können [22]. Die Sphäroide werden hierbei wie beim „liquid overlay“ durch Selbstorganisation gebildet. Neben diesen etablierten Verfahren werden in der Literatur weitere Methoden zum Induzieren der Sphäroidbildung mittels elektrischer [23], magnetischer [24] und akustischer Felder [25] sowie in Spinnerflaschen [26] beschrieben.

Zwischen den Zellen eines Sphäroids bildet sich eine ECM. Als ECM wird die Gesamtheit aller Makromoleküle aufgefasst, die den Interzellularraum zwischen den Gewebezellen ausfüllt. Die Bestandteile der ECM werden in zwei Gruppen unterteilt, in Fasern und die Grundsubstanz. Die Gruppe der Fasern besteht aus Kollagen, retikulären und elastischen Fasern. Die Grundsubstanz liegt in den Räumen zwischen den Fasern vor und wird von Glykosamino- und Proteoglykanen, Adhäsionsproteinen, Wasser und Elektrolyten gebildet [27]. Die ECM wird von den Zellen eines Gewebes synthetisiert und sezerniert. Bestandteile der ECM stehen über Rezeptoren mit den Zellen in Verbindung. Die Zusammensetzung und der Aufbau der ECM sind abhängig von den jeweiligen Zelltypen und haben einen entscheidenden Einfluss auf Wechselwirkungen des Gewebes mit seiner Umgebung. Durch den gewebespezifischen Aufbau und die über die ECM vermittelte Signaltransduktion weisen Untersuchungen an Sphäroiden eine hohe Vergleichbarkeit zu Untersuchungen mit nativem Gewebe auf. Diese Vergleichbarkeit können 2D-Zellsysteme nicht bieten [28-30].

In vitro generierte Sphäroide aus Tumorzelllinien spiegeln die Wirkung eines Therapeutikums nur in begrenztem Umfang wider. Aussagekräftiger für die *in vivo* Situation sind Untersuchungen an Primärzellen oder direkt an nativem Gewebe [31]. Somit lassen sich Schlussfolgerungen auf Basis dieser Ergebnisse besser auf den spezifischen Tumor des Patienten übertragen. Gleichwohl muss auch bei solchen Untersuchungen berücksichtigt werden, dass sich nicht alle Ergebnisse unmittelbar auf die Situation des Patienten übertragen lassen. Dazu fehlt die spezifische biologische Umgebung, in der das erkrankte Gewebe im Körper des Patienten vorliegt. Die körperspezifische Umgebung hat einen erheblichen Einfluss auf die Physiologie der Gewebezellen.

Die Vorteile von *in vitro* Untersuchungen an Sphäroiden liegen jedoch im direkten Bezug zum humanen Zellsystem und bei Untersuchungen an Patientenzellen vor allem im direkten Bezug zur spezifischen *in vivo* Situation des Patienten. Jedoch führt das Fehlen der körperspezifischen Umgebung zu Abweichungen in der Wirkungsweise eines Therapeutikums. Das hat zur Folge, dass während einer Therapie „nachgesteuert“ werden muss, um den Therapieverlauf an die körperspezifischen Gegebenheiten anzupassen. Durch die Theranostik wird dieser Anpassungsprozess unterstützt.

In der Onkologie kann ein individualmedizinischer Ansatz die Effizienz der Tumorthherapie erheblich steigern. Hierfür sind *in vitro* diagnostische Methoden insbesondere für Wirkstoff-Screenings von großer Bedeutung. Unter Berücksichtigung des 2014 erschienenen „World Cancer Reports“ besteht hier ein dringender Handlungsbedarf. Mit jährlich 14,1 Millionen Neuerkrankungen und 8,2 Millionen Todesfällen gehören Tumorerkrankungen weltweit zu den häufigsten Krankheiten [32].

Das stellt die Gesundheitsforschung vor enorme Herausforderungen bei der Entwicklung neuer Therapien. Zudem wird das Gesundheitswesen mit steigenden Kosten konfrontiert. Die Vielzahl unterschiedlicher Tumorarten und der individuelle Aspekt eines jeden Patienten erschwert die Einleitung einer wirksamen Therapie.

Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems sind *in vivo* nahe Untersuchungen des spezifischen Tumorgewebes oder deren Zellen. Zum Beispiel kann für ein Wirkstoffscreening ein Teil des Tumorgewebes durch eine Biopsie entnommen werden. Dieses ist in vielen Fällen mit einem minimal-invasiven Eingriff möglich. Mit etablierten Methoden wird das entnommene Tumorgewebe für ein Wirkstoffscreening vorbereitet. Die Gewebeprobe wird mechanisch und enzymatisch zerkleinert, wodurch native Tumorfragmente als Ausgangsbasis für das Wirkstoffscreening gewonnen werden.

Sollen individualmedizinische Ansätze langfristig für jeden Patienten zur Verfügung stehen, bedarf es neuer Konzepte. Hierfür sind spezielle Technologien erforderlich, um z.B. ein Wirkstoff-Screening oder eine Biomarker-Analyse zuverlässig und kostengünstig durchführen zu können. Fragen zum Zusammenspiel zwischen Biologie und Technik spielen hier eine entscheidende Rolle, insbesondere zum Interface zwischen biologischem System (Gewebe, Zellen, Kulturmedien) und technischen System (Bioreaktoren zur Zellkultivierung und Sensoroberflächen).

Am Anfang der Entwicklung neuer Konzepte steht die Beantwortung folgender Fragen:

- Wie kann die Bildung von Tumorsphäroiden aus Einzelzellen oder das Handling von nativen Tumorsphäroiden über längere Zeiträume automatisiert erfolgen?
- Wie kann unter dem Kostendruck eine hochgenaue und reproduzierbare Analyse von Biomarkern durchgeführt werden?
- Biomarker liegen in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin oder in Kotproben vor. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Proben müssen bei der Systementwicklung berücksichtigt werden.
- Für eine hohe Verfügbarkeit müssen solche Systeme direkt in Kliniken oder bei Fachärzten eingesetzt werden können. Das Fachpersonal muss für einen sicheren Betrieb sorgen. Dafür muss die Bedienung der Systeme einfach und zuverlässig sein.

Ein innovativer Ansatz zur Etablierung individualmedizinischer Konzepte beruht auf der Anwendung der Mikrofluidik. Insbesondere die tropfenbasierte Mikrofluidik als Teilgebiet der Mikrofluidik bietet hierfür optimale Voraussetzungen. Die tropfenbasierte Mikrofluidik kann einen bedeutenden Beitrag leisten, um Tumorerkrankungen gezielt zu behandeln.

Hierfür müssen regelmäßig patientenspezifische Parameter wie Enzym- und Proteinwerte, Entzündungs- und Gerinnungsfaktoren, Tumormarker und das Blutbild ermittelt und die Therapie entsprechend angepasst werden. Vor allem hier kann die gewünschte enge Verzahnung zwischen Diagnostik und Therapie durch tropfenbasierte mikrofluidische Verfahren erreicht werden.

Ein weiteres Argument für die tropfenbasierte Mikrofluidik liegt bei zell- und gewebebasierten diagnostischen Verfahren. Speziell hier bietet die tropfenbasierte Mikrofluidik geeignete Voraussetzungen, um die Effizienz zu steigern [33, 34]. Ein für solche Verfahren entwickeltes mikrofluidisches System, mit dem sowohl zellhaltige Proben einer Dosis-Wirkungs-Analyse unterzogen als

auch Körperflüssigkeiten auf Biomarker untersucht werden können, unterstützt die breite Anwendbarkeit individualmedizinischer Konzepte [35].

1.2 Tropfenbasierte Mikrofluidik

Die tropfenbasierte oder digitale Mikrofluidik fasst Technologien zusammen, die zur Bearbeitung von Fluidproben im unteren Mikroliterbereich eingesetzt werden. Bei Verfahren der tropfenbasierten Mikrofluidik wird eine Probe nicht wie bei herkömmlichen Verfahren auf Reaktionsgefäße aufgeteilt, sondern in einer mit der Probe nicht mischbaren Phase aliquotiert. Das Aliquotieren der Proben erfolgt in diesem Fall nicht in einzelne Gefäße, sondern durch die mit der Probe nicht mischbare Phase (Trägerfluid) [36]. So kann beispielsweise ein Zellkulturmedium wie Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Hilfe eines Fluidmikrosystems (FMS) aus Polycarbonat (PC) in einem Öl wie Perfluordecalin (PFD) aliquotiert bzw. kompartimentiert werden (s. Abb. 1.2, A). Durch die Unmischbarkeit beider Phasen (Probemedium hydrophil / Trägermedium hydrophob) bilden sich Grenzflächen zwischen den Fluiden. Zur Kompartimentierung des Probenfluids wird das Trägerfluid mit einer höheren Rate in das mikrofluidische System eingeleitet (s. Abb. 1.2, A).

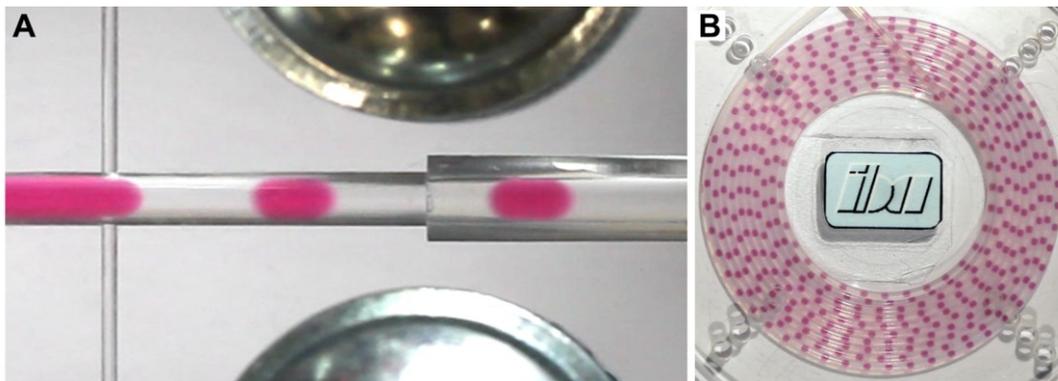


Abb. 1.2: Tropfen aus Zellkulturmedium (rot, DMEM) kompartimentiert in einem Öl (transparent, PFD);
 A – Tropfengenerierung in einem PC-FMS ($Q_k = 250 \mu\text{l}/\text{min}$, $Q_d = 100 \mu\text{l}/\text{min}$);
 B – Tropfensequenz in einem aufgewickelten Teflon-Schlauch (Schlauchdisk).

Durch den höheren Volumenstrom bilden sich Kompartimente des Probenfluids (disperse Phase) im Trägerfluid (kontinuierliche Phase). Die disperse Phase, in unserem Beispiel das DMEM, weist eine deutlich höhere Oberflächenspannung ($\sigma = 62,37 \text{ mN}/\text{m}$) auf als die kontinuierliche Phase, das PFD ($\sigma = 17,72 \text{ mN}/\text{m}$). Zudem weisen die Kanaloberflächen in diesem Beispiel einen hydrophoben Charakter auf, um eine Adhäsion des Probenmediums zu verhindern.

Unter diesen Voraussetzungen bilden die DMEM-Kompartimente in der PFD-Phase eine Tropfenform. Durch eine fortwährende Kompartimentierung wird eine Tropfensequenz generiert (s. Abb. 1.2, B). Die Probentropfen liegen im mikrofluidischen System zumeist in einer seriellen Abfolge vor. Die seriell angeordneten Tropfen werden als einzelne Mikroreaktoren betrachtet.

Bei Verfahren, in denen mit wässrigen Proben gearbeitet wird, wie es bei medizinischen und biotechnologischen Anwendungen der Fall ist, werden zur Tropfengenerierung hydrophobe Medien eingesetzt. Hierfür kommen, wie im obigen Beispiel gezeigt, perfluorierte Fluorkohlenwasserstoffe

aus der Gruppe der Perfluorcarbone (z.B. PFD) oder reine Kohlenwasserstoffe aus der Gruppe der Alkane (z.B. Tetradekan (TD)) in Frage. Insbesondere das perfluorierte PFD bietet Eigenschaften, die für biologische Anwendungen interessant sind und deren Biokompatibilität nachgewiesen ist [37, 38]. Zudem bildet es unter normalen Bedingungen keine Radikale und weist ein hohes Potenzial für den Transport von Gasen wie Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid auf. Es ist nicht mit wässrigen oder organischen Phasen mit geringem Fluorgehalt mischbar [39]. Des Weiteren weist PFD wie erwähnt eine niedrige Oberflächenspannung auf, wodurch es sich sehr leicht auf Oberflächen ausbreitet. Die geringe Löslichkeit mit einer Vielzahl von Flüssigkeiten prädestiniert PFD für die Separation wässriger Medien.

Bei medizinischen und biotechnologischen Fragestellungen werden oftmals Organismen in den Tropfen kultiviert, bearbeitet und analysiert. Die auf diesen Applikationen basierende Plattform wird in dieser Arbeit als „*pipe based bioreactor*“ (*pbb*) bezeichnet (s. Abb. 1.3) [40].

- Als „*pipe*“ wird das Kanalsystem aufgefasst, durch das die Tropfen (Proben) geleitet werden.
- Die Tropfen selbst bilden den „*bioreactor*“, in dem z.B. Bakterien, Hefen, Zellen oder Sphäroide kultiviert werden können.

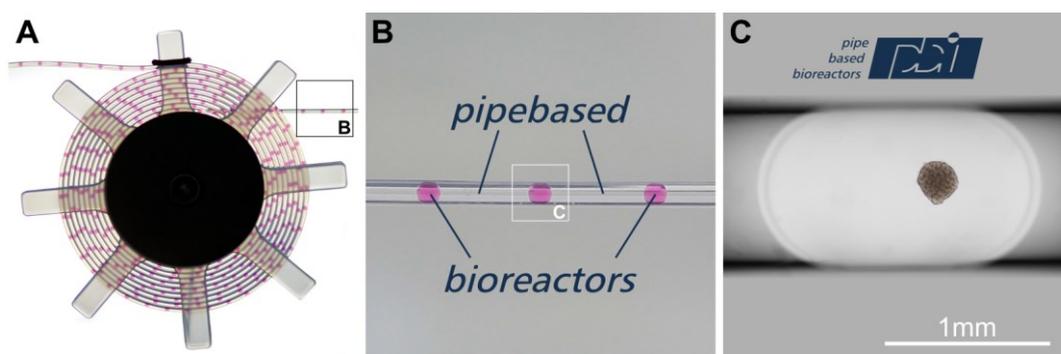


Abb. 1.3: Pipe based bioreactor; A – Schlauchdisk mit separierten Medientropfen; B – Schema zur Illustration der „*pipe based bioreactor*“ Plattform; C – Medientropfen mit einem Sphäroid.

Diese Plattform beruht auf dem Prinzip der tropfenbasierten Mikrofluidik [41] und stellt eine Alternative zu plattenbasierten Verfahren dar. Die *pbb*-Plattform besteht aus mikrofluidischen Modulen, mit denen zelluläre Systeme im Hochdurchsatz kultiviert und charakterisiert werden können [42].

Auf der Basis der tropfenbasierten Mikrofluidik können eine Vielzahl von Applikationen im Bereich der Life Science [43] und der Chemie [44-46] umgesetzt werden. Sie bietet z.B. bei Multiparameteranalysen entscheidende Vorteile zu etablierten Verfahren wie der MTP-Technologie [47]. Nicht nur, dass bei tropfenbasierten Verfahren mit Proben vom Mikro- bis in den Picoliterbereich deutlich kleinere Volumina bearbeitet werden können (1536-MTP, typisches Volumen pro Well 10 μ l), auch werden durch die Miniaturisierung nur geringe Reagenzmengen benötigt, was eine Kostenersparnis zur Folge hat [48]. Zudem kann entgegen der MTP-Technologie bei mikrofluidischen Verfahren auf großräumige Pipettierroboter, wie sie beispielsweise bei High-Throughput-Screenings (HTS) erforderlich sind, verzichtet werden. Demzufolge bieten tropfenbasierte Verfahren insbesondere für die Bearbeitung kleinster Probenvolumina ein hohes Optimierungspotenzial [49].

Ein weiterer Vorteil liegt im hohen Maß der Automatisierbarkeit mikrofluidischer Verfahren, die zu einer Steigerung der Reproduzierbarkeit und zur Reduktion des Zeitaufwandes führen [50]. All diese Aspekte ermöglichen eine Effizienzsteigerung gegenüber etablierten Verfahren.

Des Weiteren werden tropfenbasierte Verfahren überwiegend in geschlossenen Systemen durchgeführt, wo Verdunstungseffekte im Gegensatz zu MTP-Verfahren deutlich minimiert werden [51]. Zudem bieten geschlossene Systeme bei Anwendungen mit zellhaltigen Proben einen weiteren Vorteil: Durch das geschlossene System werden die Proben vor Kontaminationen geschützt. Folglich können aseptische Bedingungen einfach aufrechterhalten werden, was besonders für biologische Anwendungen entscheidend ist [52]. Darüber hinaus wird durch die geschlossene Anordnung auch die Sicherheit des Nutzers erhöht.

Die genannten Vorteile eines geschlossenen Systems können bei einer seriellen Probensequenz aber auch Probleme hervorrufen. Zum Beispiel führt die Adhäsion eines einzelnen Tropfens im System zur Störung der gesamten Tropfensequenz: Ein Tropfen adhärirt an der Kanaloberfläche, wodurch die Strömung des Tropfens verzögert wird. Die nachfolgenden Tropfen strömen auf den an der Störstelle adhärirten Tropfen auf und die zuvor kompartimentierte Probenphase fließt wieder zusammen.

Bei der überwiegenden Zahl tropfenbasierter mikrofluidischer Applikationen wird die Koaleszenz der dispersen Phase und die Adhäsion an Kanaloberflächen durch den Einsatz von Tensiden verhindert [53]. Die Tenside lagern sich an den Grenzflächen der beiden Phasen an und verringern durch ihren amphiphilen Charakter die Grenzflächenspannung. Hierbei richten sich die hydrophilen Enden der Tensidmoleküle zur hydrophilen Phase und die hydrophoben Enden zur hydrophoben Phase aus. Die Tropfen werden durch dieses Verhalten abgeschirmt und eine Interaktion mit den Kanaloberflächen und weiteren Tropfen wird verhindert. Der Einsatz von Tensiden wird jedoch vor allem im Bereich der Zellkulturtechnik kontrovers diskutiert.

Tenside beeinflussen die physikochemischen Eigenschaften des Tropfens und infolgedessen zum Teil auch die physiologische Umgebung der in den Tropfen vorliegenden biologischen Systeme. Diese Beeinflussung ist sogar noch beträchtlicher, wenn z.B. Sphäroide über Tage oder gar Wochen untersucht werden. Durch Tenside können Inhaltsstoffe zwischen benachbarten Tropfen übertragen werden [54]. Der Austausch erfolgt über die kontinuierliche Phase. Polare Substanzen werden hierbei durch die Tenside in sogenannte inverse Mizellen eingeschlossen. Diese Mizellen dienen als Transportvesikel durch die hydrophobe Phase. Insbesondere bei einer Dosis-Wirkungs-Analyse ist ein Austausch der Wirkstoffe zwischen den Proben unerwünscht.

Bei Applikationen, die eine medizinische Zulassung erfordern, stellt der Einsatz von Tensiden ein weiteres Hemmnis dar. Für eine medizinische Zulassung ist es notwendig, alle verwendeten Substanzen und deren Produktionsverfahren genau zu charakterisieren. Diese Erfordernisse sind mit einem erheblichen Aufwand verbunden. Der Verzicht auf unnötige Zusätze erleichtert eine Zulassung.

Mikrofluidische Systeme werden vorwiegend aus Glas, Silizium und Polymeren gefertigt. All diese Materialien weisen für biologische Anwendungen der tropfenbasierten Mikrofluidik geeignete Eigenschaften auf: sie sind biokompatibel, optisch transparent (außer Silizium), chemisch ausreichend inert und leicht verfügbar. Systeme aus Glas und Silizium werden mittels Ätzverfahren hergestellt. Solche Verfahren sind jedoch kostenintensiv. Mikrosysteme auf der Basis von Polymeren bieten hier Vorteile

[55]. Häufig eingesetzte Polymere sind z.B. Thermoplasten wie PC [56], Cyclo-Olefin-Copolymere (COC) [57] und Polymethylmethacrylat (PMMA), aber auch Siloxane wie Polydimethylsiloxan (PDMS), um nur einige zu nennen.

Mikrofluidische Systeme auf der Basis von PDMS werden in der Regel mittels Gießverfahren hergestellt. Das unvernetzte PDMS wird in eine Form gegossen, die einen entsprechenden Master mit der gewünschten Kanalstruktur enthält. Zur Aushärtung wird das PDMS mit UV-Licht bestrahlt. Das gegossene Element wird anschließend zumeist mit Silizium, Glas oder weiteren PDMS-Elementen gedeckelt und so das eigentliche FMS gebildet. Systeme auf der Basis von Thermoplasten werden mittels Spritzgussverfahren hergestellt. Hierfür wird eine Spritzgussform mittels hochpräzisen feinmechanischen und/oder elektroerosiven Verfahren hergestellt. Die anschließende Fertigung mittels Spritzguss erfolgt hierbei mit einem geringen Zeit- und Kostenaufwand. Nachfolgend werden die Formteile mit geeigneten Methoden zusammengefügt.

Bei biologischen sowie medizinischen Verfahren liegen die Proben vorwiegend in einer wässrigen Phase vor oder werden aus dieser gebildet. Bei der Probe handelt es sich somit um eine polare Phase. Um eine Adhäsion der Probentropfen zu verhindern, müssen die Oberflächen der Kanäle eine ausreichend hohe Hydrophobizität aufweisen. Die hier aufgeführten Materialien weisen für Applikationen mit polaren Probenmedien nicht die erforderliche Hydrophobizität auf, um eine störungsfreie Strömung der Tropfen ohne Tenside zu ermöglichen. Aus diesem Grund müssen die Oberflächen der eingesetzten mikrofluidischen Systeme auf geeignete Weise hydrophobisiert werden. Eine derartige Hydrophobisierung kann z.B. mittels Plasmaverfahren durch eine chemische Gasphasenabscheidung (CVD) erreicht werden.

Gegenwärtig sind vielfältige mikrofluidische Funktionselemente bekannt, mit denen Tropfen auf unterschiedliche Weise generiert werden können [58-60]. Zudem wurden mikrofluidische Technologien entwickelt, mittels derer Tropfen manipuliert werden können, d.h. eine Zugabe von Substanzen zu den Tropfen kann ermöglicht werden [61]. Mit geeigneten Methoden können Tropfen fusioniert, sortiert, gelagert, kultiviert und analysiert werden [62-71]. Diese Prozesse wurden bereits erfolgreich für Suspensionen von Prokaryonten, Eukaryonten und Sphäroiden nachgewiesen [72-77]. Des Weiteren wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um tropfenbasierte mikrofluidische Prozesse wie die Tropfengenerierung und Mischvorgänge mathematisch zu beschreiben [78-83].

1.3 Stand der Technik

Der enorme Fortschritt der tropfenbasierten Mikrofluidik in den letzten Jahren zeigt das hohe Anwendungspotenzial dieser Technologie für die Wissenschaft und Industrie [84-88]. Die vielversprechenden Entwicklungen eröffnen neue Perspektiven für Applikationen im Bereich der Life Science und der Chemie [89-94]. Entsprechend steigt der Bedarf an mikrofluidischen Systemen in diesen Bereichen stetig an [95].

Eine zunehmende Anzahl von Forschungsgruppen verwendet tropfenbasierte Verfahren für biologische Anwendungen [96], wie z.B. zur Suche und gerichteten Evolution neuer Enzyme [97-100] oder zum Screening von Mikroorganismen hinsichtlich ihres Potenzials zur Herstellung von Komponenten

für Arzneimittel [101] und zur Untersuchung ihrer Resistenz gegen Schwermetalle [102]. Andere Gruppen berichteten über die Kultivierung einzelner Zellen, um ihre Proteinexpression quantitativ zu detektieren [103]. Zudem können Verfahren für Screening- und Entwicklungsstudien an Sphäroiden [104] oder Embryonen wie dem Zebrafisch [105] umgesetzt werden.

Die tropfenbasierte Mikrofluidik ermöglicht z.B. neue Wege zur Bildung von Sphäroiden. Auf der Basis dieser Technologie können Sphäroide nicht wie in der Literatur dargelegt unter Zuhilfenahme formgebender Gele wie Alginate, Agarose oder Kollagen gebildet werden (s. Literatur in Kapitel 1.1 und [104]), sondern in Anlehnung an die Methodik des „hanging drop“ (s. Abb. 1.4).

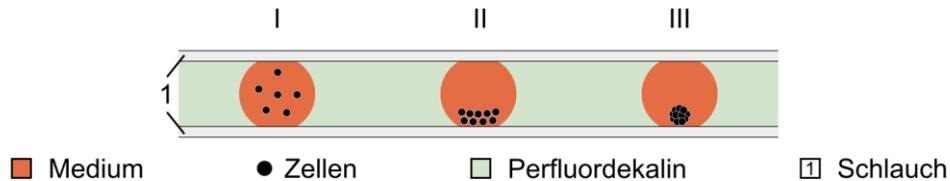


Abb. 1.4: Darstellung der Sphäroidbildung auf der Basis tropfenbasierter Verfahren
 I – Aliquotierung der Zellsuspension;
 II – Inkubation (Zellproliferation und Sedimentation);
 III – Sphäroidbildung.

Hierfür wird in einem ersten Schritt eine Suspension adhärenter Zellen kompartimentiert und die generierten Tropfen in einen Schlauch gefördert. Die Tropfen liegen hierbei in einem PTFE-Schlauch (Mikrokanal), umgeben vom hydrophoben Trägermedium (PFD), vor. In dieser Anordnung steht den Zellen keine geeignete Oberfläche zur Verfügung, an der sie adhären können. Während der Kultivierung der Tropfen sedimentieren die Zellen, nähern sich dabei an und bilden nach mehreren Tagen in den Tropfen Sphäroide. Die Größe der Sphäroide ist maßgeblich abhängig von der ausgesäten Zellzahl pro Tropfen, der Kultivierungsdauer und dem Tropfenvolumen.

Ein Beispiel hierfür ist die tropfenbasierte Kultivierung von „Embryoid bodies“ (EBS), die sich aus murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) bilden [106]. Diese mESC-Experimente wurden mit einer modular aufgebauten mikrofluidischen Plattform durchgeführt und dienen als Langzeitkultivierungssystem für 3D-Zellkulturen in einem Volumenbereich von 100 nL bis zu 10 μ L [107]. Darüber hinaus können tropfenbasierte Verfahren zur Immunsolierung von Pankreaszellen [108] oder zur Überprüfung von Lebensmittelproben hinsichtlich möglicher Kontaminationen [109] sowie zu deren Qualitätskontrolle [110] eingesetzt werden. Indes erwiesen sich tropfenbasierte Konzepte als äußerst effizient für Anwendungen im Bereich des Wirkstoff- und Zellscreenings [111-114].

Ein potenziell interessantes Anwendungsfeld stellt die moderne Pharmaforschung dar, wo in den letzten Jahren vor allem die Anzahl der zu testenden Proben erheblich gestiegen ist [115]. Für die Entwicklung eines Medikamentes bis hin zur Marktzulassung müssen eine Vielzahl von Untersuchungen und Studien durchgeführt werden [116] (s. Abb. 1.5). Gerade bei solchen Untersuchungen können tropfenbasierte Verfahren die Effizienz steigern. Zumeist werden hierdurch die Prozessgeschwindigkeit erhöht und die benötigten Volumina der verwendeten Medien minimiert, was zur Reduktion der Kosten führt [117].

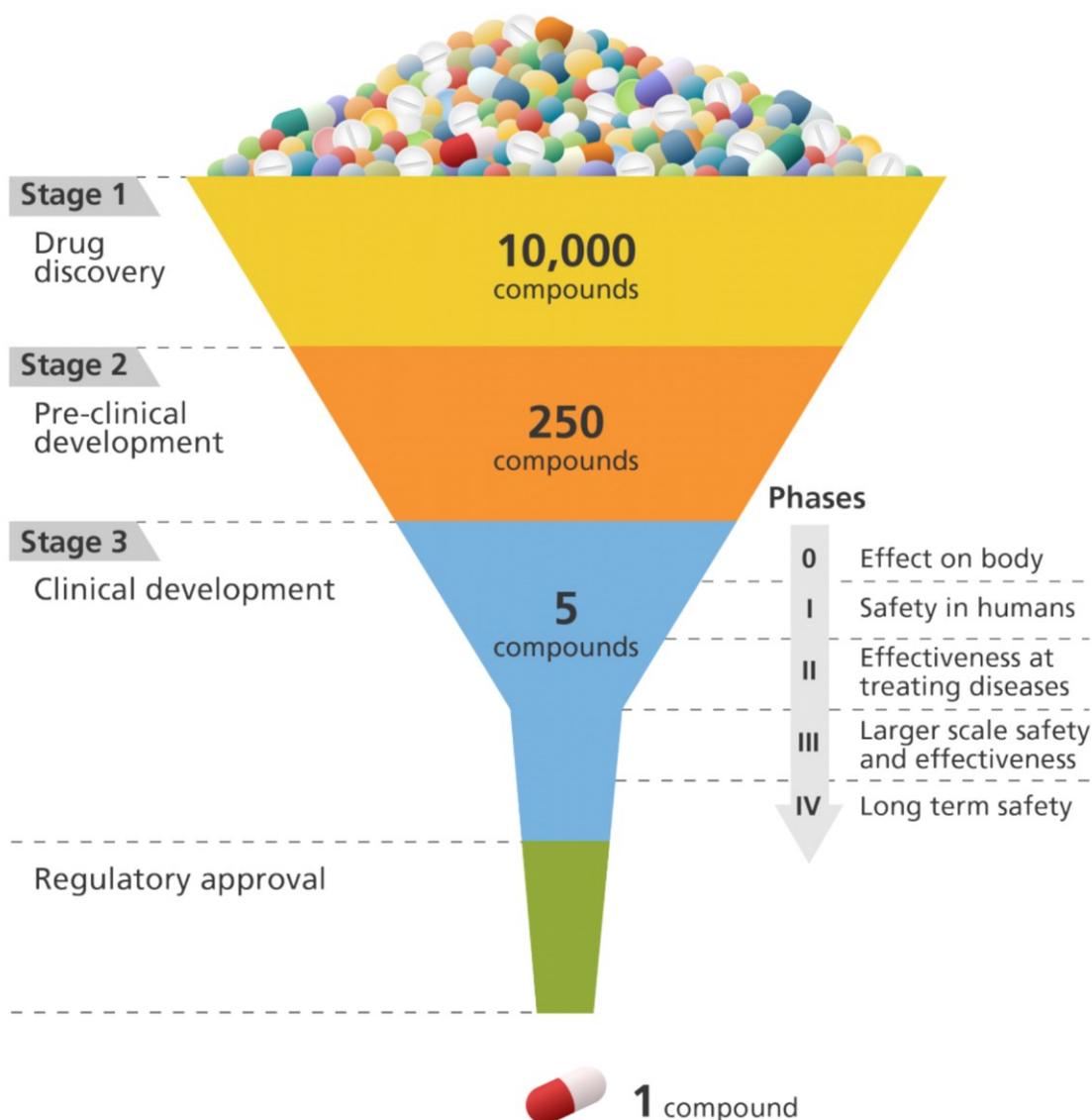


Abb. 1.5: Illustration zur Arzneimittelentwicklung – Von der Entwicklung bis zur Zulassung (Bildquelle: <https://www.yourgenome.org/facts/how-are-drugs-designed-and-developed>, 05.12.2017).

Die tropfenbasierte Mikrofluidik bietet vor allem Vorteile für die Durchführung von Hochdurchsatz-Screenings und sensitiven Analysen. Eine Manipulation und Analyse von Proben mit einer hohen Geschwindigkeit ist hiermit realisierbar. Durch die Kompartimentierung der Probe in kleine Volumeneinheiten können seltene Spezies identifiziert werden. Zudem wird hierdurch die Empfindlichkeit erhöht, was eine entscheidende Voraussetzung für Einzelzell- und Einzelmolekül Analysen ist [118].

Insbesondere auf dem Gebiet der Onkologie können solche Aspekte den ersehnten Fortschritt ermöglichen, Tumorerkrankungen schnell und zuverlässig zu diagnostizieren. Für eine erfolgreiche Therapie muss die Diagnose in einem frühen Stadium erfolgen [119]. Trotz großer Fortschritte bei der Diagnose von malignen Tumoren werden diese oft erst diagnostiziert, wenn sich bereits Metastasen gebildet haben. Deshalb weisen Tumorerkrankungen immer noch eine hohe Mortalitätsrate auf. In den rückliegenden Jahren wurden beträchtliche Anstrengungen unternommen, neue Biomarker zu identifizieren.

ren [120] und effiziente Analyseverfahren zu entwickeln, um die Missstände bei der Frühdiagnose auszuräumen. Die tropfenbasierte Mikrofluidik kann hier einen entscheidenden Beitrag leisten.

So existieren bereits heute Konzepte auf der Basis dieser Technologie für die Biomarker-Analyse [121-123], z.B. zur Früherkennung von intraoralen Plattenepithelkarzinomen (Oral squamous cell carcinoma; OSCC) [124] oder für eine hochsensitive Quantifizierung von Kirsten-Ratten-Sarkom-Virus-onkogenen (KRAS-Onkogene) [125]. Für die Analyse von KRAS-Onkogenen werden z.B. aus einer Probe Tausende von Tropfen generiert und die in den Probentropfen vorliegende DNA (hier der Biomarker) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Durch eine Fluoreszenzfärbung kann nachfolgend das Verhältnis zwischen Mutanten- und Wildtyp-Genen ermittelt werden. Die Empfindlichkeit ist hierbei signifikant höher als bei herkömmlichen Verfahren, wie dem TaqMan® Assay.

Ein weiterer Fokus im Bereich der Onkologie liegt auf Anwendungen, mit denen zuverlässige Wirkstoff-Screenings bei Krebspatienten durchgeführt werden können. Etablierte Hochdurchsatz-Verfahren basieren gegenwärtig zumeist auf der MPT-Technologie [21, 126]. Jedoch rücken zunehmend auch tropfenbasierte Verfahren für Untersuchungen von Dosis-Wirkungs-Beziehungen in den Vordergrund [127]. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Brusttumorzellen in Alginate verkapselt werden können, in denen sie nach mehreren Tagen Tumorsphäroide bilden. Nach der Zugabe verschiedener Konzentrationen des Zytostatikums Doxorubicin kann dessen Einfluss auf die Lebensfähigkeit und Proliferation der Sphäroide ermittelt werden [128]. Auch in einer Co-Kultur mit Stromazellen können Brustkrebszellen Sphäroide bilden, die dann auf die Wirkung von Zytostatika wie Paclitaxel untersucht werden [129]. Ähnliche Verfahren werden für das Screening anderer Tumorarten eingesetzt. So beschreiben Jang et al. Wirkstoff-Screenings an zwei morphologisch unterschiedlichen Magentumorarten [130]. Die entsprechenden Tumorzelllinien des intestinalen (AGS) und diffusen (Hs746T) Typen werden hierbei in Kollagen verkapselt, um die ECM-Bildung zu initiieren. Mit diesen Mikrotumormodellen wurden Screenings mit dem Zytostatikum 5-FU durchgeführt.

Die aufgeführten Beispiele zeigen zum einen die Vorteile von Untersuchungen auf der Basis von Sphäroiden und zum anderen die Effizienz tropfenbasierter Verfahren für die Durchführung solcher Studien. Das Wissen über interzelluläre Wechselwirkungen und die Reaktion des Tumorgewebes auf Wirkstoffkandidaten ist entscheidend für die Entwicklung patientenspezifischer Medikamente [131]. Wichtige Parameter für eine möglichst geringe Variabilität bei Zytotoxizitätsuntersuchungen an Tumorsphäroiden sind eine einheitliche Größe und eine vergleichbare Form der Sphäroid-Modelle [132, 133]. Tropfenbasierte mikrofluidische Verfahren bieten durch ihre Präferenz für das Handling von Proben im Mikromaßstab die erforderlichen Voraussetzungen, um diesen Ansprüchen gerecht zu werden [35].

Die Applikationsbeispiele zeigen, dass die tropfenbasierte Mikrofluidik auf ihrem gegenwärtigen Entwicklungsstand moderne Laboreinrichtungen und -geräte sowie zeitaufwändige Bearbeitungsprozesse und Protokolle ersetzen kann. Ein Fokus liegt dabei auf der Entwicklung kostengünstiger Diagnosegeräte. Für eine umfassende Etablierung solcher Geräte und Verfahren müssen spezielle mikrofluidische Module entwickelt werden, die an die jeweiligen Anforderungen adaptiert werden können [134].

Trotz des enormen Anwendungspotenzials und der stetig wachsenden Zahl von Publikationen auf dem Gebiet der tropfenbasierten Mikrofluidik [117] bleiben die meisten Studien beim „proof-of-concept“ stehen [86, 135].

Ein Durchbruch für eine umfangreiche kommerzielle Nutzung ist noch nicht erkennbar [95]. Ein Grund dafür ist die eingeschränkte Verfügbarkeit mikrofluidischer Systeme für ein stabiles und reproduzierbares Handling biologischer Proben. Die vorhandenen Konzepte bieten für den routinemäßigen Einsatz nicht die erforderliche Zuverlässigkeit [136]. Für die Bedienung und Wartung tropfenbasierter mikrofluidischer Systeme werden weiterhin Spezialisten benötigt. Weitere Arbeiten in Richtung Standardisierung und Automatisierung sind erforderlich [137, 138].

Die Möglichkeiten der tropfenbasierten Mikrofluidik sind äußerst verheißungsvoll und können einen großen Betrag zur Etablierung individualmedizinischer Konzepte leisten [139]. Sie gestattet die Etablierung einer Fülle von Anwendungen. Insbesondere im Bereich der Onkologie birgt diese Technologie ein hohes Potenzial für Innovationen [140]. Speziell für Wirkstoff-Screenings auf der Basis multizellulärer Systeme, wie nativen Gewebefragmenten oder *in vitro* generierten Sphäroiden, bietet diese Technologie geeignete Voraussetzungen, um modernste Technologien für Hochdurchsatzverfahren zu optimieren oder sogar zu ersetzen. Durch den hohen Grad der Automatisierbarkeit können aufwendige und zeitintensive Prozesse optimiert werden [141]. Neben der Automatisierung ist die Reproduzierbarkeit ein ausschlaggebender Faktor für eine signifikante Optimierung bestehender Verfahren. Ein erster Schritt für einen Durchbruch dieser Technologie ist die Entwicklung robuster und preiswerter mikrofluidischer Systeme und Protokolle, deren Bedienung auch durch nicht spezialisierte Fachkräfte erfolgen kann. Es werden mikrofluidische Systeme benötigt, die in einem definierten Bereich zuverlässig betrieben werden können, um sie für Fragestellung in der Individualmedizin nutzbar zu machen [142].

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung, die Charakterisierung und der Nachweis der Funktionalität einer tropfenbasierten mikrofluidischen Plattform für Wirkstoff-Screenings und Biomarker-Analysen. Ausgehend von den anwendungsspezifischen Anforderungen wurden Konzepte zur technologischen Realisierung und zum Test mikrofluidischer Funktionsmodule mit biologisch/medizinisch relevanten Medien und Zellen entwickelt. Neben dem bewussten Verzicht auf die Verwendung von Tensiden zur Tropfenstabilisierung war eine weitere Randbedingung die Forderung nach einem routinemäßigen Einsatz der Plattform im Laboralltag. Auf die Entwicklung und Durchführung von Protokollen für ein vollständiges Wirkstoffscreening an Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Komplexität bewusst verzichtet, jedoch wurden die wesentlichen Aspekte für die angestrebten Anwendungen bei der Entwicklung der tropfenbasierten Plattform berücksichtigt.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Charakterisierung der entwickelten Plattform und deren Funktionsmodule für das Aliquotieren der Proben Tropfen. Grundlegende Qualitätsmerkmale für Wirkstoff-Screenings und Biomarker-Analysen sind die Bereitstellung exakt reproduzierbarer Reak-

tionsvolumina und deren zuverlässiges Handling. Die Reaktionsvolumina bilden die flüssige Matrix, in der die Reaktionssubstanzen als homogene oder heterogene Gemische vorliegen.

Hierbei ist es unerheblich, ob sich eine Untersuchung der Tropfen auf einzelne Inhaltsstoffe oder auf komplexe Prozesse konzentriert, die Fragestellungen beziehen sich immer auf die Massenverhältnisse der beteiligten Substanzen. Hieraus ergibt sich die Bedeutung der Reproduzierbarkeit der Verfahren für die Qualität der Ergebnisse. Ein Beispiel ist die Bildung von Sphäroiden mittels tropfenbasierter Verfahren (s. S. 10, Abb. 1.4), wo die Qualität (einheitliche Größe und Form der Sphäroide) im direkten Bezug zur Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung steht.

Die in diesem Zusammenhang zu beantwortenden Fragen lauten: Welche Voraussetzungen müssen geschaffen werden, um den Qualitätsansprüchen gerecht zu werden? Welche konstruktiven Maßnahmen sind erforderlich? In welchen Bereichen liegen die relevanten Prozessparameter und welche Eigenschaften der Systemkomponenten sind ausschlaggebend?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden umfangreiche Versuchsreihen durchgeführt. In deren Fokus standen Untersuchungen des Einflusses der Kanalanordnung, der Fluidförderraten und der Oberflächeneigenschaften aller eingesetzten Komponenten auf die Reproduzierbarkeit. Für eine stabile Generierung und Strömung der Tropfen im Mikrokanal ist es essenziell, Interaktionen der Tropfen mit der Kanaloberfläche zu vermeiden. Vor allem für die Biomarker-Analyse wird ein System benötigt, mit dem unterschiedliche Proben wie Serum, Speichel, Urin und Vollblut zuverlässig bearbeitet werden können [124].

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst die theoretischen Betrachtungen mit Bezug zur Mikrofluidik dargelegt. Die sich anschließende Beschreibung der Entwicklung der mikrofluidischen Plattform konzentriert sich neben technischen und mikrofluidischen Aspekten auch auf die Wechselwirkungen zwischen den Oberflächen der Mikrokanäle und den biologischen Medien. Es schließt sich das Kapitel zu Material und Methoden an, bevor in den nachfolgenden Kapiteln die Experimente beschrieben und die erzielten Ergebnisse aufgeführt werden. Abschließend erfolgt die Diskussion der Ergebnisse.

2 Theoretische Grundlagen

Mikrofluidische Systeme weisen naturgemäß hinsichtlich der Skalierung im Vergleich zu makroskopischen Systemen deutlich kleinere Dimensionen auf. Eine Miniaturisierung führt zu einer Verschiebung der das System dominierenden Kräfte [143]. Zum Beispiel verringert sich die Oberfläche eines Tropfens um den Faktor vier bei einer Halbierung des Durchmessers. Das Volumen des Tropfens verringert sich hingegen um das Achtfache, wodurch sich das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis (A/V-Verhältnis) verdoppelt.

Die Verringerung der Dimensionen hat somit einen signifikanten Einfluss auf das Verhalten fluidischer Systeme. Bei makroskopischen Systemen können z.B. Grenzflächeneffekte zumeist vernachlässigt werden, da der Anteil der Teilchen in der Volumenphase wesentlich größer ist als an der Grenzfläche. Durch eine Miniaturisierung verändert sich dieses Verhältnis, da die Volumenphase schrumpft. Die oberflächenabhängigen Eigenschaften nehmen zu, wohingegen der Einfluss des Volumens mit dem Miniaturisierungsgrad in den Hintergrund tritt. Dieser Effekt beeinflusst z.B. den Transfer von Materie oder Wärmeenergie. Durch die Zunahme des A/V-Verhältnisses werden Transportvorgänge beschleunigt. Hierdurch kann z.B. die für eine Reaktion erforderliche Wärmeenergie oder die bei einer Reaktion erzeugte Wärme schneller übertragen beziehungsweise abgeführt werden.

Ein weiteres Resultat der Miniaturisierung ist, dass die viskosen Kräfte gegenüber den Trägheitskräften dominieren. Die Bindungskräfte zwischen Teilchen gleicher Phasen (z.B. einer Flüssigkeit) werden mit der Kohäsion beschrieben. Sie resultieren aus chemischen Bindungen, zwischenmolekularen Kräften wie Van-der-Waals Wechselwirkungen und bei wässrigen Medien insbesondere aus verhältnismäßig starken Wasserstoffbrückenbindungen. Die Kohäsion ist somit für den Zusammenhalt gleichartiger Phasen verantwortlich. Die Viskosität und die Oberflächenspannung eines Stoffes resultieren aus diesen Bindungskräften. Sowohl die Viskosität als auch die Oberflächenspannung haben insbesondere bei tropfenbasierten mikrofluidischen Verfahren einen starken Einfluss auf das Strömungsverhalten und vor allem auf die Tropfengenerierung.

Des Weiteren werden durch die Zunahme des A/V-Verhältnisses Adhäsionseffekte verstärkt, da der Einfluss der Oberfläche zunimmt. Im Gegensatz zu makroskopischen Systemen spielen die Grenzflächeneigenschaften in Mikrosystemen somit eine übergeordnete Rolle. Vor allem bei Verfahren der tropfenbasierten Mikrofluidik, bei denen mit jedem weiteren Tropfen im System neue Grenzflächen gebildet werden, nimmt der Einfluss der Grenzflächen auf die Strömungsdynamik deutlich zu.

Ein weiterer Effekt, der durch die Miniaturisierung im Gegensatz zu makroskopischen Systemen in den Vordergrund tritt, ist die Kapillarität. Sie beruht auf Wechselwirkungen zwischen den einge-

setzten Fluiden und der Oberfläche des Systems. Der Kapillareffekt ist eine Folge der Oberflächen- und Grenzflächenspannung und resultiert aus den Kohäsionskräften im Inneren der Fluide und den Adhäsionskräften zwischen den Fluiden und einer Oberfläche.

Die relevanten Parameter zum Verständnis mikrofluidischer Vorgänge sind die Volumenströme, die daraus resultierenden Strömungsgeschwindigkeiten und Partialdrücke der einzelnen Fluide sowie die Dimensionen des betrachteten Systems und deren Oberflächeneigenschaften. Weiterhin sind die physikochemischen Parameter der beteiligten Fluide, wie die Dichte, die Viskosität und die Grenzflächenspannung, relevante Einflussgrößen für das Systemverhalten (s. Abb. 2.1, B).

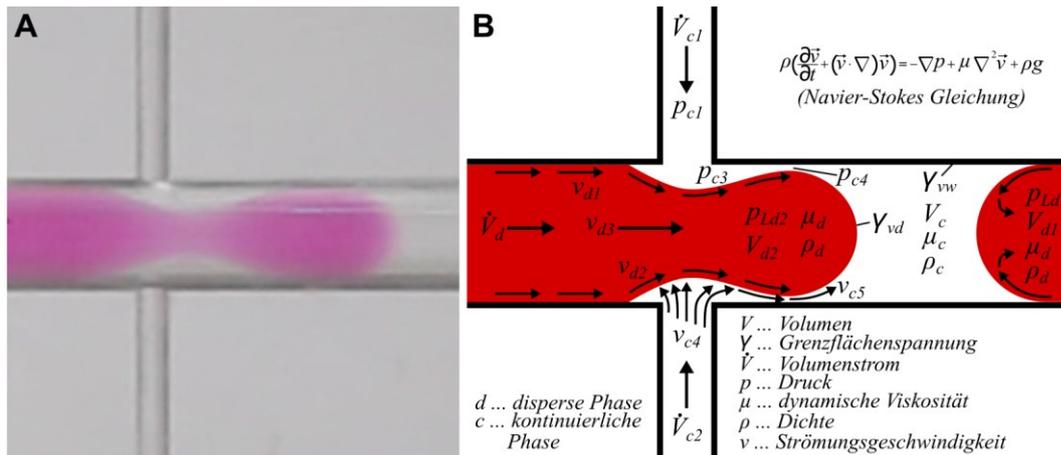


Abb. 2.1: Tropfgenerierung im 2D Flow-Focusing; A – Photographie der Tropfgenerierung von DMEM in PFD; B – Schematische Darstellung der Tropfgenerierung und der relevanten Parameter.

2.1 Hydrodynamik

Navier-Stokes-Gleichungen:

Die Grundlage zur Berechnung fluidischer Prozesse ist die Strömungsdynamik. Das mathematische Modell der Strömungsdynamik wird durch die Navier-Stokes-Gleichungen gebildet. Diese beinhalten speziell für numerische Untersuchungen die Impuls-, Kontinuitäts- und die Energiegleichung und bilden ein nichtlineares partielles Differentialgleichungssystem zweiter Ordnung (Gl. 2.1).

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla p + \mu \Delta \vec{v} + (\lambda + \mu) \nabla (\nabla \cdot \vec{v}) + \vec{f} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

In dieser Arbeit werden nur Strömungsvorgänge von inkompressiblen Flüssigkeiten (konstante Dichte) betrachtet. Durch die Inkompressibilität ist die Divergenz des Geschwindigkeitsfeld gleich Null (Gl. 2.2).

$$\nabla \cdot \vec{v} = 0 \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Die Divergenzfreiheit ermöglicht die Vereinfachung des Gleichungssystems zur inkompressiblen Ausführung (Gl. 2.3).

$$\rho \left(\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} + \rho \mathbf{g} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Trägheitskraft = Druckgradient + Reibungskraft + Volumenkraft

In dieser Form wird das Strömungsverhalten nur durch die Trägheitskraft, den Druckgradient, die Reibungskraft und die Volumenkraft beschrieben. Die Berechnung der Terme erfolgt über die Dichte ρ , die dynamische Viskosität μ , die Gravitation \mathbf{g} , die vektorielle Strömungsgeschwindigkeit \vec{v} und den Druck p .

Hagen-Poiseuille-Gleichung:

Aus der vereinfachten Ausführung der Navier-Stokes-Gleichungen kann im Fall homogener, stationärer und nicht turbulenter Strömungsbedingungen das für laminare Strömungen signifikante parabolische Strömungsprofil hergeleitet werden. Mit der Hagen-Poiseuille-Gleichung (Gl. 2.4) kann unter diesen Bedingungen der Zusammenhang zwischen der Druckdifferenz und dem Volumenstrom für einen definierten zylindrischen Streckenabschnitt eines fluidischen Systems bestimmt werden.

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot r^4}{8 \cdot \mu \cdot l} \cdot \Delta p \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Hier ist r der Radius und l die Länge des betrachteten Streckenabschnitts sowie μ die dynamische Viskosität des strömenden Fluids.

Jedoch gilt dieser Zusammenhang nur für newtonsche Fluide, somit für Fluide, bei denen die Scherspannung τ und die Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ ein proportionales Verhältnis aufweisen (Gl. 2.5).

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \text{konst.} \quad \tau \propto \dot{\gamma} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Hierbei ist die dynamische Viskosität μ die Proportionalitätskonstante.

Fluidischer Widerstand:

In Analogie zu elektrischen Systemen kann der Widerstand eines fluidischen Systems bestimmt werden. In Bezug zu den Strömungsvoraussetzungen für die Anwendung der Hagen-Poiseuille-Gleichung kann der fluidische Widerstand mit folgender Gleichung berechnet werden (Gl. 2.6).

$$R_{\text{fluid}} = \frac{\Delta p}{\dot{m}} = \frac{8 \cdot \mu \cdot l}{\pi \cdot \rho \cdot r^4} \quad R = \frac{U}{I} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Für die Berechnung des fluidischen Widerstandes wird zusätzlich zu den Parametern der Hagen-Poiseuille-Gleichung noch die Dichte ρ des strömenden Fluids benötigt. Wie bei der Hagen-Poiseuille-Gleichung geht der Radius des betrachteten Strömungskanales mit der vierten Potenz in die Berechnung des fluidischen Widerstandes ein. Hieraus wird ersichtlich, dass eine Halbierung des Kanaldurch-

messers den fluidischen Widerstand um das 16-fache erhöht. Somit hat eine Veränderung des Kanalquerschnittes einen erheblichen Einfluss auf das Strömungsverhalten eines fluidischen Systems.

2.2 Dimensionslose Kennzahlen

Zur Charakterisierung fluidischer Systeme bieten dimensionslose Kennzahlen geeignete Werkzeuge. Insbesondere bekannte Größen wie die Reynolds-, die Kapillar-, die Bond-, die Weber- und die Euler-Zahl ermöglichen eine Klassifizierung mikrofluidischer Systeme. Mit diesen Kennzahlen werden die Kräfte, die in Mikrokanälen wirken, zueinander ins Verhältnis gesetzt und Fragen zu deren Dominanz beantwortet. Sie ermöglichen eine Einschätzung der Auswirkung von Änderungen des Kanalquerschnitts, der verwendeten Fluide und der Prozessparameter auf die Strömungsdynamik und somit einen Vergleich fluidischer Systeme. Sind die Kennzahlen zweier Systeme identisch, ist die Strömungsdynamik der Systeme vergleichbar. Nachfolgend werden die dimensionslosen Kennzahlen vorgestellt, die für die in dieser Arbeit vorgestellten strömungsdynamischen Vorgänge relevant sind.

Reynolds-Zahl:

Die Reynolds-Zahl Re (Gl. 2.7) als bekanntester Vertreter der dimensionslosen Kennzahlen in der Strömungsmechanik bildet das Verhältnis der Trägheitskraft zur viskosen Reibungskraft ab [144].

$$Re = \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{viskose Reibungskraft}} = \frac{\rho \cdot v \cdot d_k}{\mu} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

Die Reynolds-Zahl wird über die Stoffeigenschaften der eingesetzten Medien, wie die Dichte ρ und die dynamische Viskosität μ , sowie über die fluidischen Parameter, wie die mittlere Strömungsgeschwindigkeit v und die charakteristische Systemlänge (Kanaldurchmesser d_k), berechnet.

Die Reynolds-Zahl dient in der Strömungsmechanik in erster Linie der Einschätzung, ob unter den gegebenen Bedingungen eine laminare oder turbulente Strömung vorherrscht. Liegt die Reynolds-Zahl unterhalb eines Wertes von $Re_{krit} \sim 2000$ [95], bildet sich ein laminares Strömungsprofil aus, oberhalb dieses Wertes erfolgt der Übergang hin zu einer turbulenten Strömung. Mikrofluidische Systeme weisen kleine Kanalquerschnitte auf, die Reynolds-Zahl für Gase wie für Flüssigkeiten liegt deutlich unter den Wert von Re_{krit} .

Bei sehr niedrigen Reynolds-Zahlen ($Re \ll 1$) übersteigt die viskose Reibungskraft die Trägheitskraft deutlich. Mit zunehmender Dominanz der Reibungskraft werden Mischvorgänge erschwert und ein Massentransport erfolgt nur noch über die Diffusion. Insbesondere in der tropfenbasierten Mikrofluidik werden die Proben tropfen häufig aus mehreren Phasen gebildet oder in die Tropfen werden Wirkstoffe dosiert. Zur Beschleunigung der Mischvorgänge müssen geeignete Maßnahmen ergriffen werden. Hierfür können z.B. die Tropfen durch mäanderförmig angeordnete Kanäle gefördert werden [145, 146]. Ebenso kann eine aktive Wirkstoffzugabe, beispielsweise mit einem drucküberlagerten Mikroventil, starke Mischeffekte im Tropfen induzieren.

Bond-Zahl:

Die Bond-Zahl **Bo** (Gl. 2.8) beschreibt das Verhältnis der Volumenkraft zur Oberflächenkraft. Sie dient im Gegensatz zur Reynold-Zahl der Beurteilung der wirkenden Kräfte unter statischen Bedingungen. Bei der Betrachtung eines Tropfens in einem Mikrokanal mit waagerechter Lage und einer deutlichen Differenz der Dichten der kontinuierlichen und der dispersen Phase wird die Bond-Zahl wie folgt berechnet.

$$Bo = \frac{\text{Volumenkraft}}{\text{Oberflächenkraft}} = \frac{\Delta\rho \cdot g \cdot d_T^2}{\gamma} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Zur Berechnung wird die Differenz der Dichten beider Fluide $\Delta\rho$, die Gravitation g , das Quadrat des Tropfendurchmessers d_T^2 und die Grenzflächenspannung γ zwischen der kontinuierlichen und der dispersen Phase benötigt [36]. Im Bereich der Mikrofluidik gestattet die Bond-Zahl eine Einschätzung des Einflusses der Gravitation auf die Form eines sich im statischen Zustand befindlichen Tropfens. Bei sehr kleinen Bond-Zahlen ($Bo \ll 1$) dominieren die Oberflächenkräfte und die Schwerkraft hat keinen merklichen Einfluss.

Bei einem sehr hohen Wert für die Bond-Zahl ($Bo \gg 1$) kann die Gravitation nicht vernachlässigt werden. In der Mikrofluidik zeigt die Bond-Zahl zumeist einen niedrigen Wert und eine Verformung des Tropfens durch den Einfluss der Volumenkraft tritt nicht auf.

Weber-Zahl:

Die Weber-Zahl **We** (Gl. 2.9) definiert das Verhältnis der Trägheitskraft zur Oberflächenkraft. In der tropfenbasierten Mikrofluidik wirkt die Trägheitskraft deformierend und die aus der Kohäsion resultierende Oberflächenkraft stabilisierend auf einen Tropfen. Die Weber-Zahl berechnet sich über die Dichte ρ , das Quadrat der mittleren Strömungsgeschwindigkeit v , den Tropfendurchmesser d_T und die Grenzflächenspannung γ zwischen der kontinuierlichen und der dispersen Phase [147].

$$We = \frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{Oberflächenkraft}} = \frac{\rho \cdot v^2 \cdot d_T}{\gamma} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Bei einer hohen Weber-Zahl ($We \gg 1$) wird ein Tropfen durch den Einfluss der Trägheitskraft deformiert. Bei einer kleinen Weber-Zahl, wie Sie zumeist in der Mikrofluidik vorliegt, überwiegt der Einfluss der Oberflächenkraft und ein Tropfen bildet eine Form minimaler Oberfläche.

Kapillar-Zahl:

Die Kapillar-Zahl **Ca** (Gl. 2.10) bildet das Verhältnis der Reibungs- zur Oberflächenkraft ab. Die Berechnung der Kapillar-Zahl erfolgt über die dynamische Viskosität μ , die mittlere Strömungsgeschwindigkeit v und die Grenzflächenspannung γ zwischen der kontinuierlichen und der dispersen Phase [148].

$$Ca = \frac{\text{Reibungskraft}}{\text{Oberflächenkraft}} = \frac{We}{Re} = \frac{\mu \cdot v}{\gamma} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

Im Gegensatz zur Weber-Zahl, wo der Einfluss der Trägheitskraft auf die Form eines Tropfens beurteilt wird, ermöglicht die Kapillar-Zahl eine Beurteilung der Form in Bezug zur Reibungskraft. Bei einer kleinen Kapillar-Zahl dominiert die Oberflächenkraft über die Reibungskraft. Ein Tropfen in einem Mikrosystem bildet eine Form kleinster Oberfläche. Dieser Zustand wird bei vielen biologisch relevanten Medien mit Viskositäten im Bereich von Wasser erreicht. Steigt der Einfluss der Reibungskraft ($Ca \gg 1$), dominiert diese deutlich über die Oberflächenkraft. Das Bestreben, den Zustand der kleinsten Oberfläche zu bilden, wird durch die Reibungskraft unterdrückt. Ein Tropfen in einem Mikrokanal weicht somit von der Form der kleinsten Oberfläche ab.

Euler-Zahl:

Die Euler-Zahl Eu (Gl. 2.11) dient zur Beschreibung des Verhältnisses der Druckkräfte zur Trägheitskraft. Zur Berechnung der Euler-Zahl ist die Kenntnis der Druckdifferenz Δp , der Dichte ρ und des Quadrats der mittleren Strömungsgeschwindigkeit v^2 erforderlich [143].

$$Eu = \frac{\text{Druckkraft}}{\text{Trägheitskraft}} = \frac{\Delta p}{\rho \cdot v^2} \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Mikrofluidische Systeme weisen per Definition sehr kleine Kanaldurchmesser ($d_k \leq 1000 \mu\text{m}$) auf. Schon bei moderaten Strömungsgeschwindigkeiten der Fluide treten relativ hohe Druckverluste auf, weshalb die Euler-Zahl hohe Werte erreicht.

2.3 Grenzflächen

Grenzflächenspannung:

Aus der Grenzflächenspannung resultiert das Bestreben einer Flüssigkeit, ihre Oberfläche zu minimieren und den Zustand niedrigster Energie zu erhalten. Handelt es sich bei der betrachteten Grenzfläche um die einer mit einem Gas in Kontakt stehenden Flüssigkeit (z.B. eine Wasser-Luft Grenzfläche), spricht man von Oberflächenspannung. Im Inneren der Volumenphase sind alle Teilchen isotrop verteilt, die Bindungskräfte gleichen sich aus und die resultierende Kraft zwischen den Teilchen ist Null (s. Abb. 2.2, A).

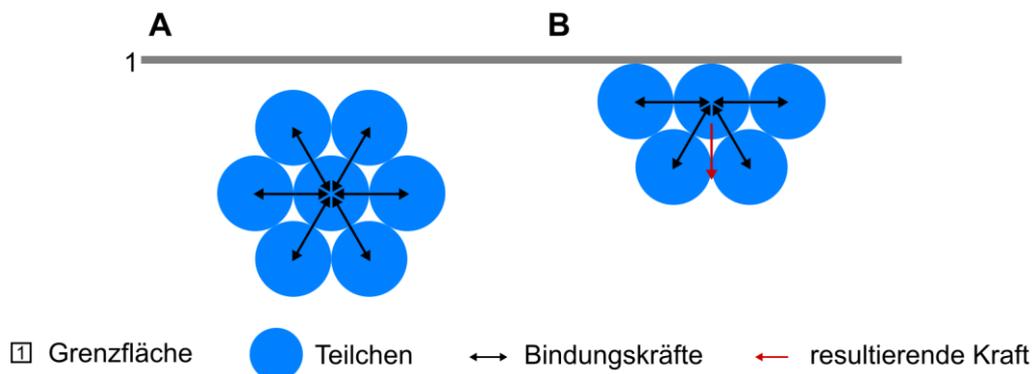
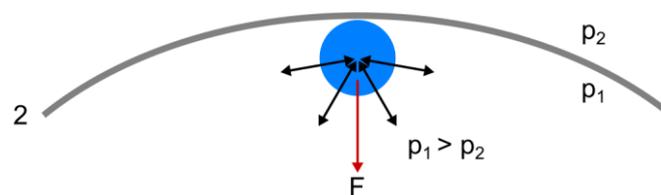


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Bindungskräfte A – in einer Volumenphase
B – an der Grenzfläche.

An der Phasengrenze stehen den Flüssigkeitsteilchen über die Grenzfläche hinaus keinen gleichartigen Nachbarn gegenüber. Die Teilchen an der Grenzfläche befinden sich in einem höheren energetischen Zustand. Die Bindungskräfte der Volumenphase aus dem Inneren überwiegen und die Teilchen an der Grenzfläche werden ins Phaseninnere gezogen. Tangential zur Grenzfläche gleichen sich die Bindungskräfte zwischen den Teilchen aus und durch den Zug ins Phaseninnere resultiert eine ziehende Kraft parallel zur Oberfläche (s. Abb. 2.2, B). Um die Grenzflächenenergie zu minimieren, muss die Anzahl der Teilchen an der Grenzfläche vermindert werden. Dieser Zusammenhang führt zur Verringerung der Oberfläche und zur Bildung kugelförmiger Tropfen.

Laplace-Druck

Eine weitere Eigenschaft, der in der tropfenbasierten Mikrofluidik eine wichtige Rolle zukommt, ist der Krümmungsdruck. Bei tropfenbasierten Verfahren liegt die disperse Phase kompartimentiert in der kontinuierlichen Phase vor. Durch das Bestreben der Oberflächenspannung zur Verringerung der Oberfläche liegen die Kompartimente tropfenförmig vor. Aus der Tropfenform resultiert eine gekrümmte Grenzfläche zwischen disperser und kontinuierlicher Phase. Durch die Krümmung werden die tangentialen Kräfte parallel zur Grenzfläche nicht wie bei ebenen Flächen ausgeglichen, vielmehr führt die Krümmung der Grenzfläche zu einer in die Volumenphase gerichteten Kraftkomponente (s. Abb. 2.3).



2 gekrümmte Grenzfläche ● Teilchen ↔ Bindungskräfte ← resultierende Kraft

Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Bindungskräfte an einer ebenen und einer gekrümmten Grenzfläche und der resultierenden Druckverhältnisse an einer Grenzfläche.

Dieser Zusammenhang führt zu einer Druckdifferenz zwischen der Innen- und der Außenseite eines Tropfens. Der Druck an der konkaven Seite ist hierbei größer als an der konvexen Seite. Diese Druckdifferenz wird als Laplace-Druck p_k bezeichnet. Der Laplace-Druck kann aus der Young-Laplace-Gleichung für eine beliebig gekrümmte Grenzfläche (Gl. 2.12) berechnet werden.

$$p_k = \gamma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad (\text{Gl. 2.12})$$

Im Fall einer flüssig/flüssig Phasengrenze, die bei tropfenbasierten mikrofluidischen Verfahren im Allgemeinen vorliegt, geht nicht die Oberflächenspannung des Tropfens, sondern die Grenzflächen-spannung zwischen den beiden Phasen mit γ in die Gleichung ein. Zudem sind bei einer beliebig gekrümmten Grenzfläche die Hauptkrümmungsradien r_1 und r_2 für die Berechnung erforderlich.

Benetzung:

In der tropfenbasierten Mikrofluidik sind die Oberflächeneigenschaften der tropfenführenden Kanäle ein entscheidender Parameter für die Stabilität des mehrphasigen Systems. Zur Gewährleistung

reproduzierbarer Strömungsbedingungen müssen Wechselwirkungen des Tropfens mit der Kanaloberfläche verhindert werden. Einen Aufschluss über die Benutzungseigenschaften von Oberflächen können Kontaktwinkelmessungen liefern. Der Kontaktwinkel steht nach der Young-Gleichung (Gl. 2.13) in folgendem Zusammenhang mit der freien Oberflächenenergie eines Festkörpers:

$$\cos\theta = \frac{\gamma_s - \gamma_{SL}}{\gamma_L} \quad (\text{Gl. 2.13})$$

Zur Ermittlung des Kontaktwinkels wird ein Tropfen auf die Oberfläche des zu untersuchenden Materials gesetzt. Die Young-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel θ , der Oberflächenspannung der Tropfenflüssigkeit γ_L (liquid), der Grenzflächenspannung γ_{SL} (solid-liquid) zwischen der Materialoberfläche und der Flüssigkeit und der freien Oberflächenenergie γ_s (solid) des Festkörpers (s. Abb. 2.4).

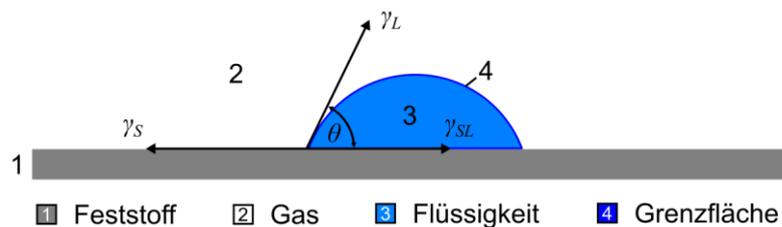


Abb. 2.4: Schema der Kontaktwinkelmessung und des Zusammenhangs zwischen dem Kontaktwinkel θ , der Oberflächenspannung γ_L , der Grenzflächenspannung γ_s und der freien Oberflächenenergie γ_{SL} .

Die Ermittlung der Kontaktwinkel zwischen einer Flüssigkeit und einer Oberfläche ermöglicht eine Aussage, inwieweit die Flüssigkeit die Oberfläche benetzt. Handelt es sich bei der Flüssigkeit um Wasser, kann die Wasserbenetzbarkeit klassifiziert werden (s. Abb. 2.5). Ist der Wasserkontaktwinkel kleiner als 90° , so wird die Oberfläche als benetzbar bezeichnet, die Oberfläche weist einen hydrophilen Charakter auf (s. Abb. 2.5, A). Bei einem Kontaktwinkel über 90° wird der Oberfläche ein hydrophober Charakter zugeschrieben. In diesem Fall spricht man von einer nicht benetzbaren Oberfläche (s. Abb. 2.5, B). Im Weiteren können Kontaktwinkelmessungen zur Ermittlung der freien Oberflächenenergie genutzt werden. Über Kontaktwinkelmessungen von mehreren definierten Flüssigkeiten kann die unbekannte Grenzflächenspannung zwischen der Flüssigkeit und der Oberfläche γ_{SL} ermittelt werden.

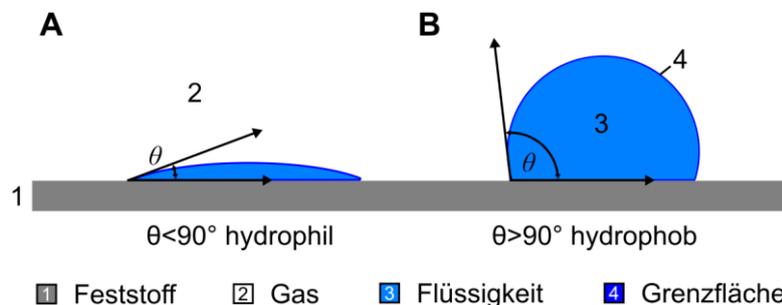


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Benetzbarkeit, A – Hydrophil, B – Hydrophob.

Auf der Basis des Owens-, Wendt-, Rabel und Kaelble-Modells (OWRK) [149, 150] kann so die freie Oberflächenenergie berechnet und in einen polaren und dispersen Anteil aufgesplittet werden (Gl. 2.14).

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2 \left(\sqrt{\gamma_S^D + \gamma_L^D} + \sqrt{\gamma_S^P + \gamma_L^P} \right) \quad (\text{Gl. 2.14})$$

Hierbei werden die geometrischen Mittelwerte des dispersen und des polaren Anteils mit **D** und **P** gekennzeichnet. Der disperse Anteil beruht auf der London-Kraft, also schwachen Wechselwirkungen zwischen unpolaren Molekülen und Atomen. Diese resultieren aus spontanen Polarisierungen von Teilchen und hierdurch induzierten Dipolen. Der polare Anteil beruht wiederum auf nicht-kovalenten, polaren Wechselwirkungen wie permanenten Dipolmomenten.

Oberflächentopografie

Der Zusammenhang des Kontaktwinkels und der Grenzflächenspannungen nach Young basiert auf der Annahme einer aus physikochemischer Sicht homogenen Oberfläche mit einer ebenen Topographie. Diese Voraussetzungen sind jedoch nicht immer gegeben. Zum Beispiel weisen die Kanäle von Mikrosystemen in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren unterschiedliche Rauigkeiten auf. Bei der Herstellung von Mikrosystemen mittels Spritzgussverfahren weisen die Oberflächen eine niedrige Rauigkeit auf, wohingegen feinmechanische Verfahren zu einer höheren Rauigkeit führen. Der Einfluss der Oberflächentopografie auf die Benetzung kann anhand mikrostrukturierter Oberflächen anschaulich beschrieben werden. Dieser Beschreibung liegen die Modelle nach Wenzel und Cassie-Baxter (s. Abb. 2.6) zugrunde [151, 152]. Nach dem Wenzel-Modell führt eine Mikrostruktur zu einer Verstärkung der ursprünglichen Oberflächencharakteristik. Bei einer hydrophoben Oberfläche wird durch die Mikrostruktur der Kontaktwinkel vergrößert, wohingegen der Kontaktwinkel bei einer hydrophilen Oberfläche sinkt.

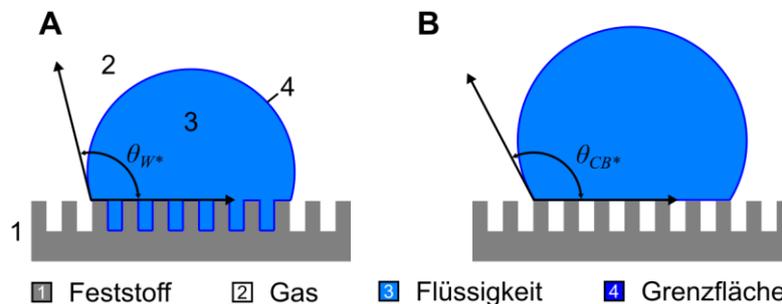


Abb. 2.6: Schema der Benetzung einer Oberflächenstruktur und der resultierenden Kontakte
A – nach Wenzel θ_{W^*} , B - Cassie-Baxter θ_{CB^*} .

Nach Wenzel resultiert aus der Strukturierung eine homogene Benetzung der Oberfläche (s. Abb. 2.6, A). Die Wenzel-Gleichung (Gl. 2.15) beschreibt den Zusammenhang zwischen den Kontaktwinkeln einer unstrukturierten zu einer strukturierten Oberfläche.

$$\cos \theta_{W^*} = r \cos \theta \quad (\text{Gl. 2.15})$$

Hierbei ist der Faktor r der Quotient der tatsächlichen (strukturierten) zur projizierten (unstrukturierten) Oberfläche.

Nach dem Cassie-Baxter-Modell führt eine Strukturierung zu einer heterogenen Benetzung (s. Abb. 2.6, B). Zwischen den Mikrostrukturen kommt es zu Lufteinschlüssen, wodurch die Kontaktfläche zu einer Flüssigkeit verringert wird. Die Cassie-Baxter-Gleichung (Gl. 2.16) beschreibt den Zusammen-

hang zwischen dem Kontaktwinkel einer unstrukturierten zu einer strukturierten Oberfläche mit φ der Kontaktfläche zwischen der Oberfläche und der Flüssigkeit.

$$\cos\theta_{\text{CB}} = \varphi(\cos\theta + 1) - 1 \quad (\text{Gl. 2.16})$$

3 Tropfenbasierte mikrofluidische Plattform

3.1 Konzept

Die Entwicklung der Plattform erfolgte mit dem Ziel, die Effizienz von Wirkstoff-Screenings und Biomarker-Analysen durch den Einsatz tropfenbasierter mikrofluidischer Technologie zu steigern. Über die im Fokus stehenden Anwendungen lässt sich das Anforderungsspektrum für die Plattform ableiten (s. Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Schema der einzelnen Prozessschritte.

Mikrofluidische Systeme werden in integrierten oder modularen Anordnungen ausgeführt. Bei einem integrierten System (z.B. Lab on a Disk) sind alle Komponenten für die entsprechende Anwendung in einem System zusammenfasst. Der Vorteil ist hierbei eine hohe Kompaktheit bei gleichzeitig kleiner Ausführung. Weiterhin weisen solche Systeme wenige Kopplungsstellen auf. Modulare Konzepte haben dagegen meist größere Dimensionen und verfügen über eine höhere Anzahl an Kopplungsstellen, bieten jedoch eine hohe Flexibilität. Im Gegensatz zu integrierten Systemen können hier verschiedene Funktionsmodule in beliebiger Reihenfolge kombiniert und der Funktionsumfang jederzeit erweitert werden. Zur Umsetzung der Zielstellung wurde ein modulares Konzept gewählt.

Für die in Abb. 3.1 aufgeführten Prozessschritte sind die nachfolgenden Module erforderlich:

- **Pumpenmodul**
Ein Pumpenmodul bestehend aus einem Spritzenpumpensystem und Vorlagerreservoirs wird für eine pulsationsfreie Förderung aller erforderlichen Fluide benötigt.
- **Mischmodul**
Ein Mischmodul ist notwendig, um eine kontinuierliche und homogene Durchmischung heterogener bzw. zellhaltiger Proben als Voraussetzung für eine reproduzierbare Tropfengenerierung zu gewährleisten.
- **Tropfenmodul**
Wie bei allen tropfenbasierten Verfahren wird die Probe in einem ersten Schritt kompartimentiert. Hierfür ist ein Modul zur Tropfengenerierung erforderlich.

- Speichermodul
Zellhaltige Proben erfordern ein Kultivieren, beispielsweise im Inkubator unter definierten Bedingungen. Hierfür werden Speichermodule (Schlauchdisks) benötigt.
- Zudosiermodul
Für die Zugabe von Wirkstoffen und Reagenzien ist ein Zudosiermodul notwendig. Dafür werden zusätzlich ein Vorlagereservoir und ein Druckmodul benötigt.
- Spektroskopiemodul
Ein Spektroskopiemodul ist zur Erfassung von Reaktionen innerhalb der Tropfen erforderlich, die spektroskopisch erfassbar sind.

Zur Umsetzung der Zielstellung wurden die aufgeführten Module entwickelt und gefertigt. Diese Module bilden in ihrer Gesamtheit die fluidische Einheit (s. Abb. 3.2, A).



Abb. 3.2: Photographie der tropfenbasierten mikrofluidischen Plattform; A – Fluidische Einheit, 1: Mischmodul, 2: Tropfenmodul, 3.1 und 3.2: Speichermodul, 4: Druckmodul, 5: Zudosiermodul, 6: Vorlagereservoir, 7: Spektroskopiemodul; B – Kontrolleinheit, 1: 1. Untereinheit, 2: 2. Untereinheit.

Die Module sind entsprechend der im Fokus stehenden Anwendungen in der nachfolgenden Reihenfolge angeordnet und fluidisch verbunden. Der fluidische Pfad beginnt mit dem Mischmodul (s. Abb. 3.2, A1), gefolgt vom Tropfenmodul (s. Abb. 3.2, A2), dem Druckmodul (s. Abb. 3.2, A4), dem mit dem Vorlagereservoir (s. Abb. 3.2, A6) fluidisch verbundenen Zudosiermodul (s. Abb. 3.2, A5) und dem Spektroskopiemodul (s. Abb. 3.2, A7). Zudem ist die Einheit entsprechend der Anwendung mit Speichermodulen (s. Abb. 3.2, A3.1 und A3.2) ausgestattet.

Die Steuerung und Regelung der fluidischen Einheit erfolgt durch eine Kontrolleinheit (s. Abb. 3.2, B). Die Kontrolleinheit beinhaltet sämtliche elektronischen und pneumatischen Komponenten und ermöglicht eine automatisierte Prozessführung. Die fluidische Einheit (s. Abb. 3.2, A) und die Kontrolleinheit (s. Abb. 3.2, B) bilden die tropfenbasierte mikrofluidische Plattform.

3.2 Charakteristische Merkmale

Eine Besonderheit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten tropfenbasierten mikrofluidischen Plattform ist, dass generell auf die Anwendung oberflächenaktiver Substanzen (Tenside) zur Tropfenstabilisierung verzichtet wird. Dieser Verzicht bringt Vorteile z.B. hinsichtlich der Kosten, da insbesondere die in der tropfenbasierten Mikrofluidik eingesetzten Tenside einen zusätzlichen Kostenfaktor darstellen. Auch ist die Zugabe von Wirkstoffen zu den Tropfen oder der Austausch von Tropfenmedium bei einem Verzicht auf Tenside einfacher realisierbar. Auf der anderen Seite ergeben sich daraus jedoch besondere Anforderungen an die FMS und damit an alle Module und deren fluidischen Verbindungen.

Bei Anwendungen, bei denen multizelluläre Systeme wie z.B. Gewebefragmente oder Zellsphäroide im Fokus stehen, müssen weitere Anforderungen an die tropfenführenden Komponenten gestellt werden. Um Adhäsionen der segmentierten Proben und speziell der in ihnen transportierten Zellsysteme zu verhindern, müssen enge Radien der tropfenführenden Kanäle vermieden werden. Multizelluläre Systeme werden von adhären Zellen gebildet, diese haben verstärkt das Bestreben, mit extrazellulären Objekten zu interagieren. Sie suchen den Zell-Zellkontakt, bilden eine extrazelluläre Matrix und adhären an Oberflächen. Sie besitzen und bilden vielfältige Strukturen, die der Adhäsion dienen. Dieses Adhäsionsbestreben muss bei tropfenbasierten Verfahren blockiert werden. Zudem nehmen solche Zellsysteme hinsichtlich ihrer räumlichen Dimension eine Sonderstellung im Bereich der Mikrofluidik ein. Für eine störungsfreie Förderung müssen die Kanalquerschnitte genügend groß sein. Umfangreiche experimentelle Erfahrungen zeigen, dass der Durchmesser der Kanäle ca. das 3- bis 5-fache der Zellsysteme betragen sollte. Im Folgenden werden diese Anforderungen und deren Realisierung beschrieben.

Eigenschaften der FMS-Materialien:

Grundlegende Voraussetzungen bei der Wahl geeigneter FMS-Materialien sind deren biologische und chemische Inertheit, deren Sterilisierbarkeit und Formstabilität. Des Weiteren sind transparente Materialien vorteilhaft. Auch spielen die Materialeigenschaften beim Fügen (Kleben, Bonden und Verschrauben) und in Bezug zur Dichtigkeit eine gewichtige Rolle.

Für die FMS-Fertigung wurden die etablierten Materialien PC und COC verwendet. Beide Polymere sind optisch transparent, wodurch eine Beobachtung der Prozesse ermöglicht wird. Weiterhin begünstigt die Transparenz den Einsatz optischer Verfahren zur Detektion der Probentropfen und zur Analyse der in den Tropfen ablaufenden Reaktionen. Für die angestrebten Anwendungen weisen diese Polymere eine ausreichend hohe Formstabilität und chemische Inertheit auf.

Eigenschaften der Kanaloberflächen:

Soll ohne die Verwendung von Tensiden eine störungsfreie Strömung der wässrigen Probentropfen ermöglicht werden, müssen die Kanaloberflächen und die Verbindungen zu den Schläuchen einen ausreichend hohen Hydrophobisierungsgrad aufweisen. Insbesondere bei Anwendungen mit biologisch relevanten Flüssigkeiten, die zumeist einen hohen Proteingehalt aufweisen (z.B. Zellkulturmedien), müssen die Kanaloberflächen zur Verhinderung einer Adhäsion des Probenmediums hydrophobisiert werden. Nicht nur der Hydrophobisierungsgrad spielt hierbei eine hervorgehobene Rolle, auch muss die Hydrophobisierung über die gesamte Oberfläche der tropfenführenden Kanäle eine gleichmäßige und konsistente Qualität aufweisen. Hierfür werden die entsprechenden Oberflächen mittels Plasmaverfahren beschichtet. Alle in dieser Arbeit eingesetzten FMS wurden mit auf CVD basierenden Plasmaverfahren zur Abscheidung von Octafluorocyclobutan (C_4F_8) beschichtet (s. Kapitel 4.1).

Eigenschaften der dispersen und kontinuierlicheren Phasen:

Ein weiterer Aspekt, der beim Verzicht auf Tenside berücksichtigt werden muss, ist der Auftrieb, der aufgrund von Unterschieden der Dichte der dispersen und der kontinuierlichen Phase auftritt. Unter dem Aspekt, dass eine Adhäsion der dispersen Phase an der Kanaloberfläche verhindert werden muss, spielt der Auftrieb eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Während der Strömung der Tropfen ist dieser Effekt nicht so erheblich, da sich in diesem Zustand ein schützender Film der kontinuierlichen Phase auf der Kanaloberfläche ausbildet. Wird eine Tropfensequenz jedoch im Zuge der Prozessgestaltung angehalten, wird die disperse Phase (die Tropfen) durch den Auftrieb (im Fall von PFD als kontinuierliche Phase) gegen die Kanaloberfläche gedrückt [153]. Der schützende Film wird nach einer gewissen Haltezeit verdrängt und eine Adhäsion der dispersen Phase initiiert. Aus diesem Grund müssen lange Haltezeiten der Tropfen auf den beschichteten Oberflächen vermieden werden.

Aspekte der Tropfengröße:

Um die Anordnung einer Tropfensequenz bei komplexen Systemen (langen Förderwegen, Richtungsänderung und Kopplungsstellen) erhalten zu können, müssen die Tropfen den Kanalquerschnitt vollständig ausfüllen. Hierdurch wird die Sequenz stabilisiert, da ein unerwünschtes Umströmen der Tropfen durch die kontinuierliche Phase (PFD) erschwert wird. Sind die Tropfen kleiner als der Kanaldurchmesser, strömt das PFD um die Tropfen herum und die Abstände der Tropfen zueinander werden verändert. Dieser Effekt kann Vereinigung der Tropfen zur Folge haben und die Sequenz zerstören.

Aspekte des Aufbaues (Fertigung, Montage und Anordnung der Module):

Allgemein müssen kantenbehaftete Kanalanordnungen vermieden werden, um der Adhäsion des Probenmediums entgegenzuwirken. Weiterhin sind runde Kanalstrukturen zur Leitung von Tropfen anderen Strukturen vorzuziehen, da runde Strukturen die bestmögliche Führung ermöglichen.

Die Entwicklung aller FMS basiert auf dem Patent des „montier- und demontierbaren Fluidmikrosystems“ [154]. Die meisten FMS werden aus zwei Elementen (Deckel- und Bodenelement) zusammengesetzt. Das Fügen der FMS-Elemente wird hierbei mit symmetrisch angeordneten Schrauben (M4) realisiert. Zur genauen Ausrichtung der FMS-Elemente vor dem Fügen werden Justierstifte genutzt. Hierfür sind die einzelnen Elemente mit speziellen Justierbohrungen ($d = 2 \text{ mm}$) ausgestattet.

Durch das reversible Fügen der FMS können die Elemente leicht gereinigt und mittels Plasmaverfahren hydrophobisiert werden. Hierdurch können die Oberflächen der FMS, die die Kanalstruktur aufweisen, flächig beschichtet werden. Durch diese Vorgehensweise wird eine hohe Qualität bei der Beschichtung erreicht.

Basierend auf dem o.g. Patent erfolgt das Dichten der FMS-Elemente durch den Anpressdruck, den die Schrauben beim Fügen hervorrufen (Drehmoment: 2 Nm). Um die Anpresskräfte gleichmäßig zu verteilen, werden Unterlegscheiben verwendet. Die hydrophobisierten Oberflächen werden hierdurch aneinandergespreßt und das FMS wird fluidisch abgedichtet. Nach der Montage der FMS-Elemente wird das System zuerst mit dem hydrophoben Separationsmedium (PFD) gefüllt. Hierdurch wird die Beschichtung zum Schutz vor polaren Medien mit dem Separationsmedium beladen (fluorierete Oberfläche / perfluoriertes Medium). Kleine Kavitäten, die sich im Bereich der Pressflächen der FMS-Elemente an der Wandung der fluidischen Kanäle ausbilden, werden durch den niedrigen Kontaktwinkel mit dem Trägermedium gefüllt. Somit sind die Kavitäten für das Probenmedium unzugänglich. Der angegebene Anpressdruck von 2 Nm ist ausreichend, um eine geschlossene Dichtfläche zwischen den fluidischen Kanälen und der äußeren Umgebung zu bilden.

Die FMS-Elemente müssen eine ausreichend hohe Steifigkeit aufweisen, um eine vollständige Dichtigkeit zu ermöglichen. Für FMS-Systeme aus PC oder COC ist hier eine Plattendicke von min. 3 mm erforderlich. Zur Fertigung der FMS-Elemente werden Polymerplatten eingesetzt, die mittels Extrusionsverfahren gefertigt wurden. Diese Platten weisen eine geringe Oberflächenrauheit auf und somit eine hohe Transparenz. Hierdurch wird eine optische Beurteilung der in den FMS durchgeführten fluidischen Prozesse ermöglicht.

Die FMS werden vorwiegend mittels feinmechanischer Fräsverfahren (FP2A, Deckel AG) hergestellt. Hierdurch kann eine Vielzahl verschiedenster Kanalstrukturen schnell und mit hoher Qualität realisiert werden. Zudem wurden ausgewählte FMS mittels Spritzguss (Kapitel 4.2) gefertigt. Für die spritzgussbasierte Fertigung werden Formeinsätze (Gussformen) mittels Fräs- und Elektroerosionsverfahren hergestellt, die die gewünschte Kanalstruktur in einer erhabenen Ausführung aufweisen.

Um Gefügespannungen durch die Herstellung und Bearbeitung zu verringern, werden die Polymere vor und nach der Bearbeitung getempert. Hierfür werden die Polymere im Wärmeschrank mit einem Temperaturprofil von 1 °C/min auf 100 °C erhitzt. Nachfolgend werden die Polymere für 1 h bei 100 °C gehalten und nachfolgend langsam (zumeist über Nacht) auf Raumtemperatur abgekühlt. Hierdurch können Gefügespannungen deutlich reduziert und die FMS-Elemente vor einer Beschädi-

gung durch das Handling im Einsatz (z.B. Haarrisse durch die mechanische Beanspruchung beim Fügen) geschützt werden.

Die einzelnen Module der fluidischen Einheit werden auf eine Montageplatte (s. Abb. 3.2, A8) gesetzt, die ein Lochraster aufweist. Alle Module verfügen über entsprechende Montagefüße (s. Abb. 3.3, 3) im Abstand des Lochrasters. Hierdurch können die einzelnen Module der Plattform schnell gewechselt und in ihrer Anordnung variiert werden. Im Weiteren verhindert die definierte Anordnung der Module die Ausbildung enger Radien der Schläuche, mit denen die einzelnen Module verbunden werden. Des Weiteren garantieren die Montagefüße (durch unterschiedliche Längen, entsprechend der Module), dass alle Module der Plattform in der horizontalen Ebene einheitlich angeordnet sind. Hierdurch ist gewährleistet, dass kein Gefälle zwischen den Modulen entsteht. Auch ermöglichen die Montagefüße eine einfache Anbindung von Schläuchen und Sensoren aus allen Raumrichtungen, da die Module durch die Füße leicht von der Montageplatte entnommen werden können und eine räumliche Distanz zur Montageplatte aufweisen. Diese Art der Montage gewährleistet eine stabile und reproduzierbare Ausrichtung der Module zueinander. Dieses ist insbesondere bei Untersuchungen zur Charakterisierung einzelner Module erforderlich, um hierbei vergleichbare Voraussetzungen zu gewährleisten.

Durch einen Anschlussrahmen (s. Abb. 3.3, 2) sind für die fluidische Kopplung keine Gewinde an den FMS erforderlich, wodurch der Fertigungsaufwand und die Kosten reduziert werden. Zudem kann ein gewindeloses FMS, welches mittels Fräsverfahren gefertigt wurde, nach erfolgreicher Funktionsprüfung leicht auf ein spritzgussbasiertes Fertigungsverfahren übertragen werden. Der Anschlussrahmen und die entsprechenden Füße wurden aus PEEK gefertigt. Alle für die Plattform benötigten Polymere (PC, PVC, PEEK) wurden von der KTK Kunststofftechnik Vertriebs GmbH bezogen.

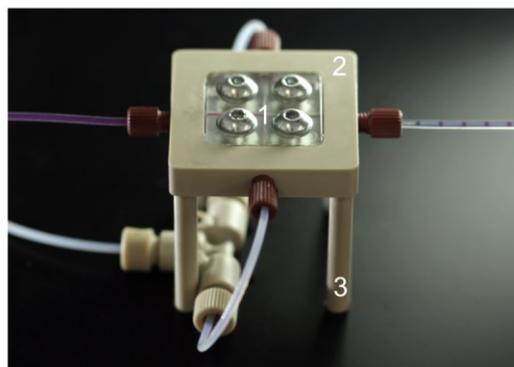


Abb. 3.3: Tropfengenerierung mit einem Tropfenmodul, 1: FMS, 2: Anschlussrahmen, 3: Montagefüße.

Aspekte der FMS-Fertigung (Kanalverlauf und fluidische Kopplung):

Die Module der Plattform werden mit hydrophoben Schläuchen aus PTFE und Fluorethylenpropylen (FEP) fluidisch verbunden (Jasco Deutschland GmbH). Die Schlauchpositionierung und –befestigung erfolgt einheitlich mittels 10/32“ Fitting-Ferrul-Verbindern (IDEX Health & Science).

Um Ablagerungen an den Übergängen vom FMS zu den Schläuchen zu verhindern, werden spezielle Schlauchführungen genutzt. Die Ankopplung erfolgt hierbei über Führungsbohrungen zur exakten Justierung der Schläuche zu den Kanälen der Module. Diese Führungsbohrungen sind an die geometrischen Dimensionen der eingesetzten Schläuche exakt angepasst. Auf diese Weise wird eine genaue

Ausrichtung der Schläuche garantiert und Anlagerungen der Tropfen oder des Mediums an den Kopplungsstellen werden verhindert.

Bei der sequenziellen Förderung von Tropfen unter Ausschluss von Tensiden können abrupte Änderungen der Kanalgeometrie und des Kanalverlaufes eine Störung der Tropfensequenz verursachen. Aus diesem Grund wurden die Module so konzipiert, dass die Tropfen auch innerhalb der Module keine engen Radien durchströmen.

Aspekte der FMS-Fertigung (Kanalquerschnitt):

Die FMS-Elemente aller Module weisen alle eine halbrunde Kanalstruktur auf. Bei der feinmechanischen Fertigung wird die gewünschte Kanalstruktur in die Oberfläche der FMS-Elemente gefräst. Die Kanalstruktur und die Führungsbohrungen für die Schlauchkopplung liegen bei allen FMS-Elementen in einer halbrunden Ausführung vor. Nach der Montage des Deckel- und Bodenelements weisen hierdurch alle Kanäle eines FMS einen runden Querschnitt auf (s. Abb. 3.4).

Entsprechend der im Fokus stehenden Applikation der Plattform für das Handling von Sphäroiden weist das gesamte tropfenführende fluidische System (Mikrokanäle der Module, Verbindungsschläuche) einen runden Querschnitt mit einem Durchmesser von 1000 μm auf. Die Größenordnung dieses Durchmessers hat sich für ein störungsfreies und reproduzierbares Handling von Sphäroiden mit Durchmessern von 150 μm bis 500 μm bewährt.

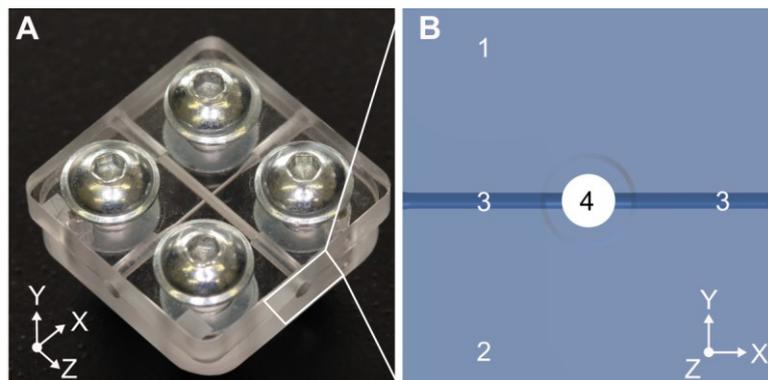


Abb. 3.4: FMS basierend auf dem Patent des „Montier- und demontierbaren Fluidmikrosystem“; A – Photographie eines montierten FMS zur Tropfengenerierung; B – Modell des Kanalquerschnittes nach der Montage, 1: Deckelelement, 2: Bodenelement, 3: Seitenkanäle, 4: Hauptkanal.

3.3 Fluidische Einheit

Im Folgenden werden die einzelnen Modelle bezüglich Ihrer Funktion und ihrer Spezifikationen detailliert beschrieben:

3.3.1 Pumpenmodul

Das modulare neMESYS Spritzenpumpensystem der cetoni GmbH realisiert als integraler Bestandteil der Plattform alle fluidischen Operationen und ermöglicht eine gleichmäßige und pulsationsfreie

Förderung kleinster Fluidmengen. Das Spritzenpumpensystem ist als Niederdrucksystem für die Förderung von Fluiden mit einem Druck von maximal 6 bar ausgelegt und besteht aus drei „double Modulen“ sowie einem „Basismodul“. Jeder Kanal des Systems kann über die entsprechende Steuerungssoftware (QmixElements) einzeln gesteuert werden. Damit verfügt das System über sieben unabhängige Spritzenpumpenkanäle (s. Abb. 3.5).

Jeweils zwei Kanäle dienen zur Förderung der kontinuierlichen Phase (PFD) und zur Förderung von TD. Damit stehen drei Kanäle zur Förderungen weiterer Fluide zur Verfügung. Jeder Spritzenpumpenkanal ist mit einem 3/2-Wegeventil ausgestattet.

Zur Förderung des PFD werden 25 ml- und für das TD 10 ml-Spritzen (ILS Innovative Labor Systeme GmbH, Series C, PTFE - Seal) eingesetzt. Da für beide Fluide je zwei Kanäle vorhanden sind, kann durch eine geeignete Verschaltung (IDEX Health & Science) der Ventile und eine entsprechende Steuerung der Kanäle ein wechselseitiges Befüllen und Entleeren der Spritzen erreicht werden. Hierdurch ist eine kontinuierliche Förderung beider Medien möglich. Die kontinuierliche Phase (PFD) wird in die Seitenkanäle des Tropfenmoduls gefördert. Das TD wird in das Mischmodul eingeleitet.

Die Befüllung der Spritzen mit PFD und TD erfolgt über je ein Vorlagereservoir (Vorratsflasche). Eine dritte Flasche wird zum Auffangen aller geförderten Medien am Ausgang der Plattform eingesetzt. Zur Vermeidung des undefinierten Eintrags von Luftblasen in die Fluidkanäle ist das Spritzenpumpensystem senkrecht an einer Halterung befestigt, wobei die Ausgänge der Spritzen einheitlich nach oben ausgerichtet sind. Luftblasen, die beim Befüllen der Spritzen gegebenenfalls aus den Vorratsflaschen aufgenommen werden, können so leicht entfernt werden.

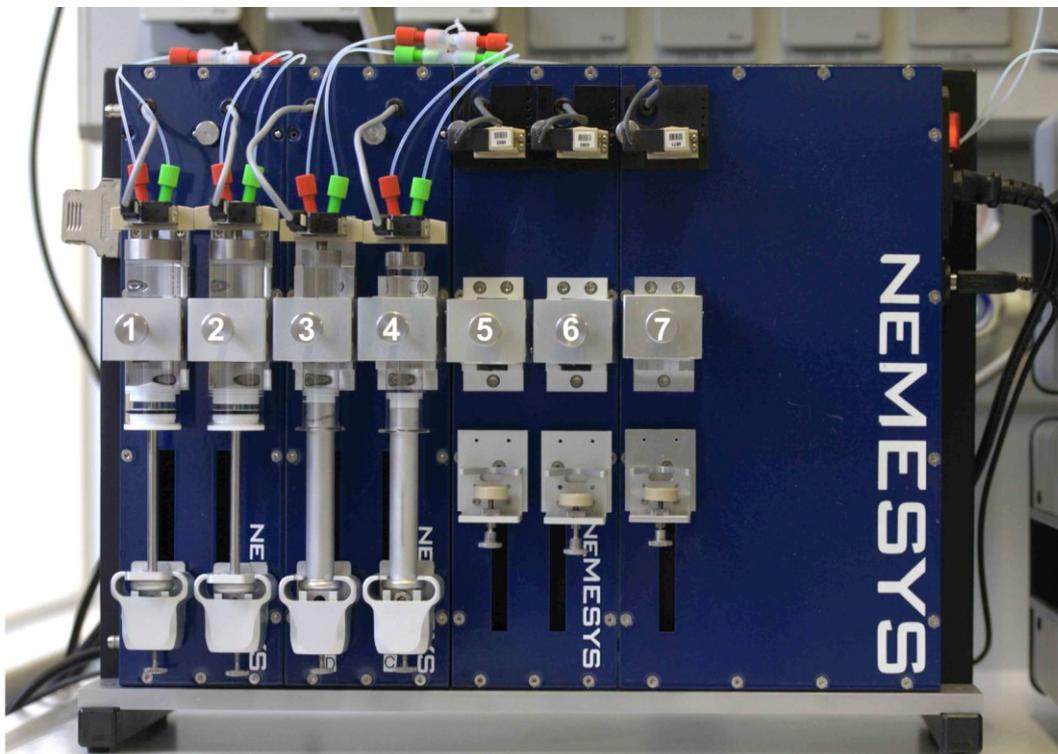


Abb. 3.5: Spritzenpumpensystem; 1 - 7 : Kanal 1 bis 7.

Die Halterung gewährleistet einen soliden Stand des senkrecht angeordneten Spritzenpumpensystems und dient gleichzeitig zur Befestigung der Vorlagereservoire an der Rückseite der Halterung. Die aufgeführten Komponenten in ihrer Gesamtheit bilden das Pumpenmodul.

3.3.2 Mischmodul

Das Mischmodul (s. Abb. 3.6) wird zum Dispergieren der Proben vor der Einleitung in das System eingesetzt. Es wurde speziell für Anwendungen mit heterogenen Medien entwickelt, die z.B. Zellen oder andere sedimentierende Bestandteile (Partikel) enthalten. Das Reservoir für die Probe wird durch Kavitäten im Deckel- und Bodenelement des Moduls gebildet (s. Abb. 3.6, B1 und B3). Die Befüllung kann mit einer gewöhnlichen Pipette erfolgen. Hierfür ist ein Verschluss (s. Abb. 3.5, B6) im Deckelelement vorhanden. Um Lufteinschlüsse nach der Befüllung zu entfernen, ist das Modul mit einem verschließbaren (IDEX Health & Science) Entlüftungskanal ausgestattet.

Der Auslauf für die Probe befindet sich im Bodenelement (s. Abb. 3.6, B3) des Moduls. Die Durchmischung erfolgt mit einem Blattrührer. Der Blattrührer (s. Abb. 3.6, B2) wird mit einem Gleichstrommotor angetrieben, dessen Drehzahl mit einem in der Kontrolleinheit (s. S. 26, Abb. 3.2, B1) befindlichen Servokontroller im Bereich zwischen 30 rpm und 300 rpm eingestellt werden kann. Der Motor ist am Deckelelement montiert und über eine spielbehaftete formschlüssige Kupplung (s. Abb. 3.6, B5) mit dem Blattrührer verbunden. Dadurch kann der Motor vor dem Sterilisieren des Mischmoduls im Autoklaven problemlos abgenommen werden.

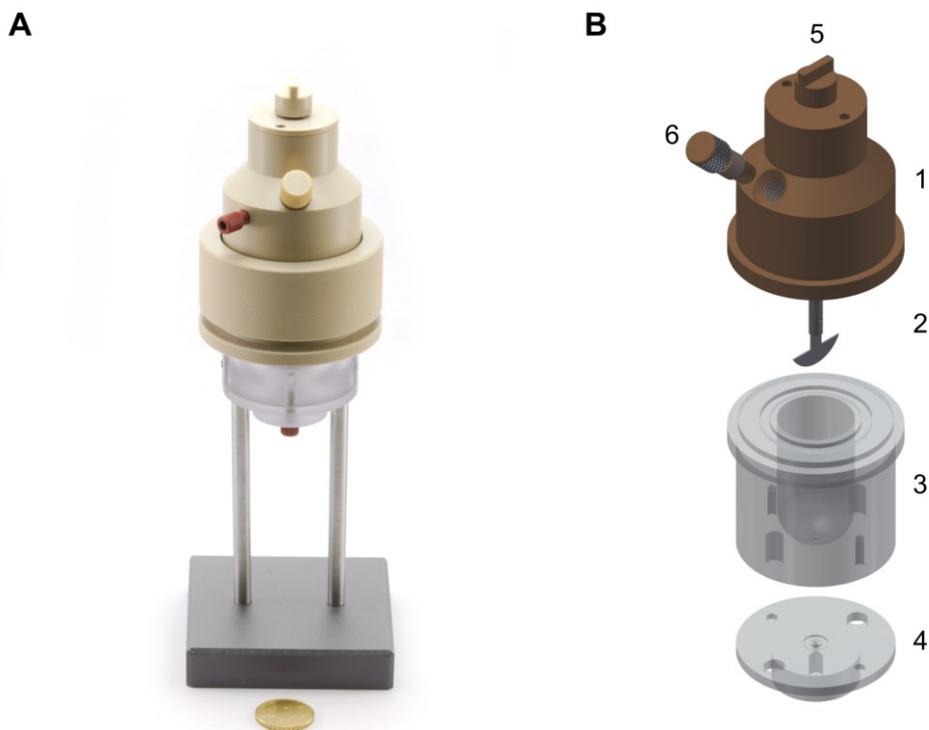


Abb. 3.6: Mischmodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Deckelelement, 2: Röhrelement, 3: Bodenelement, 4: Auslasselement, 5: Kupplung zum Röhrelement, 6: Verschluss des Reservoir.

Eine Besonderheit des Mischmoduls besteht darin, dass das Einleiten der Proben in das fluidische System durch Verdrängung mittels TD erfolgt. TD ist eine unpolare Flüssigkeit mit einer Dichte von 767 kg/m^3 bei 298.15 K . Durch seinen hydrophoben Charakter ist TD mit wässrigen Proben nicht mischbar und ordnet sich infolge der im Vergleich zur wässrigen Probe geringeren Dichte immer im oberen Bereich des Probenreservoirs an. Nach der Einleitung über einen Zulauf im Deckelement (s. Abb. 3.6, A, roter Fitting) des Mischmoduls verdrängt das TD die homogenisierte Probe in den Auslauf. Da im Mischmodul durch die Entlüftung keine Luft vorhanden ist, entspricht die Förderrate des TD der der verdrängten Probe (disperse Phase). Über das Auslaufelement des Mischmoduls (s. Abb. 3.6, B4) wird die disperse Phase zum Tropfenmodul gefördert.

3.3.3 Tropfenmodul

Zur Aliquotierung der Probe wurde ein Tropfenmodul entwickelt (s. Abb. 3.7). Dessen Kernelement ist das FMS (s. Abb. 3.7, C1) mit einer für die Tropfengenerierung spezifischen Kanalstruktur. Zur fluidischen Kontaktierung wird das FMS in einen Anschlussrahmen eingelegt, der die zur Befestigung erforderlichen Gewinde enthält (s. Abb. 3.7, C2). Die exakte Ausrichtung des FMS in allen Raumrichtungen wird durch einen Ausschnitt im Anschlussrahmen erreicht, der an die Dimension des FMS angepasst ist. Das FMS des Tropfenmoduls wird aus zwei quadratischen Polymer-Platten (Deckel- und Bodenelement) mit einer Breite von 24 mm und einer Stärke von 4 mm gebildet (s. Abb. 3.7, C1). Das reversible Fügen der FMS-Elemente wird mit M4-Schrauben ermöglicht. Die Ausrichtung der FMS-Elemente zueinander erfolgt über 2 mm Justierstifte.

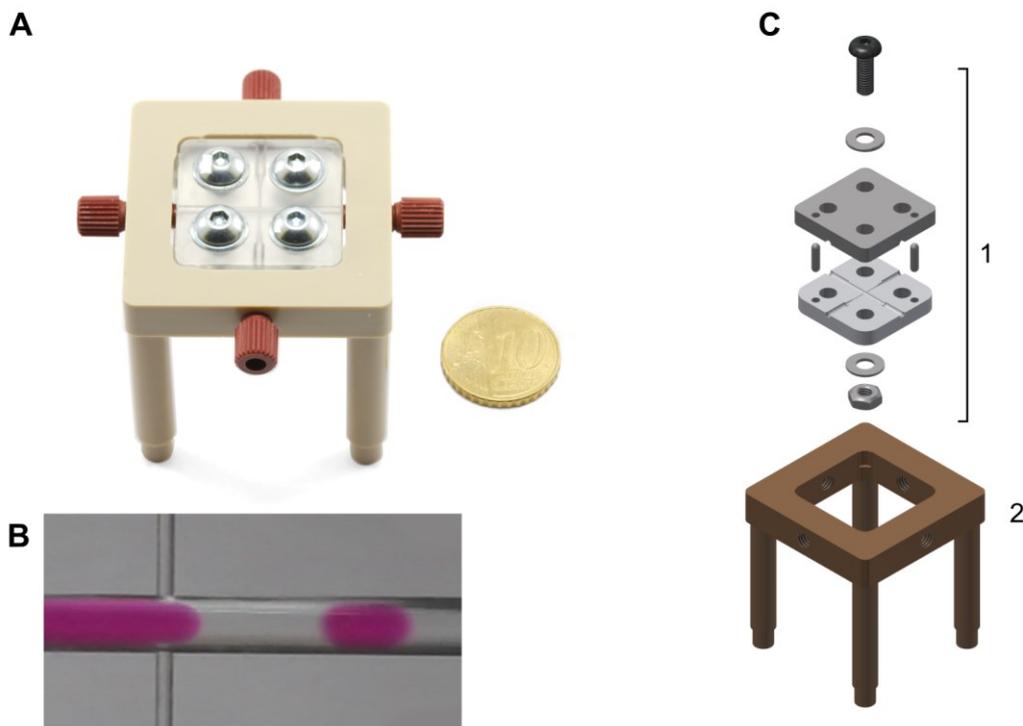


Abb. 3.7: Tropfenmodul; A – Photographie; B – Photographie der Tropfengenerierungszone; C – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Tropfengenerierungs-FMS, 2: fluidischer Anschlussrahmen.

Alle für das Tropfenmodul gefertigten FMS weisen einen Hauptkanal mit einem Durchmesser $d_{HK} = 1000 \mu\text{m}$ und einem oder zwei Seitenkanälen (je nach Ausführung des FMS) mit einem Durchmesser $d_{SK} = 300 \mu\text{m}$ auf. Am Übergang der Seitenkanäle zum Hauptkanal erfolgt die Tropfengenerierung. Dieser Bereich wird nachfolgend als Tropfengenerierungszone bezeichnet (s. Abb. 3.7, B am Beispiel eines Kanalkreuzes mit zwei Seitenkanälen).

3.3.4 Speichermodul

Die Speichermodule (s. S. 26, Abb. 3.2, A3.1 und A3.2) sind als Schlauchdisks ausgeführt und werden zur Kultivierung der in den Tropfen befindlichen Zellen im Inkubator gelagert und/oder dienen zur zwischenzeitlichen Ablage der Tropfensequenzen während der Arbeiten mit der fluidischen Plattform. Der zur Tropfenspeicherung eingesetzte PTFE-Schlauch des Speichermoduls ist auf eine aus Polycarbonat bestehende Halterung (Disk) aufgewickelt und an dieser fixiert (s. Abb. 3.8). Bei den hier vorgestellten Anwendungen wurde ein drei Meter langer Schlauch verwendet. Je nach Anwendung (Strömungsparameter) können die so konfigurierten Module bis zu 900 Tropfen aufnehmen.



Abb. 3.8: Schlauchdisk befüllt mit DMEM-Tropfen.

3.3.5 Druckmodul

Für die Zudosierung von Wirkstoffen oder allgemein von Reagenzien mit dem Zudosiermodul ist es für die Kontrolle des Zudosier Volumens erforderlich, den Druck im fluidischen System (Systemdruck) zu erfassen. Hierfür wurde ein Druckmodul entwickelt (s. Abb. 3.9), welches an die Spezifikationen tropfenbasierter Anwendungen angepasst ist.

Die Druckmessung erfolgt mit einem Druckmessumformer, der eine frontbündige Metall-Membran aufweist (DAV-06HF, AirCom Pneumatic GmbH). Der Druckmessumformer kann bei tropfenbasierten mikrofluidischen Verfahren nicht direkt in das Kanalsystem integriert werden. Zum einen ist die Membranfläche hierfür zu groß, zum anderen würden die strömenden Tropfen an der Metall-Membran adhären. Der Anschlussadapter (s. Abb. 3.9, B3) löst diese Probleme, indem er den Druckmessumformer vom Mikrokanal geometrisch, aber nicht fluidisch trennt. Nach dem Einschrauben des Druckmessumformers von unten in den Anschlussadapter bildet sich oberhalb der Membran eine Kavität. Diese Kavität ist über einen senkrechten Verbindungskanal ($d_{VK} = 500 \mu\text{m}$) mit dem Druck-

FMS (s. Abb. 3.9, B1) verbunden. Das Druck-FMS verfügt über einen Hauptkanal ($d_k = 1000 \mu\text{m}$), durch den die Tropfen unbeeinflusst strömen. Das Bodenelement des Druck-FMS weist im Zentrum des Hauptkanals passgenau zum Anschlussadapter einen weiteren senkrechten Verbindungskanal ($d_{vk} = 500 \mu\text{m}$) auf. Dieser stellt die fluidische Verbindung zum Anschlussadapter her und ermöglicht die Erfassung des Drucks im Kanal des FMS.

Vor dem Einsatz wird das gesamte Modul über einen am Anschlussadapter befindlichen und verschließbaren Befüllungskanal (IDEX Health & Science) mit PFD gefüllt und dadurch die in den Kanälen des Druckmoduls befindliche Luft vollständig verdrängt. Strömen nun Tropfen durch das Modul, wird der resultierende Druck über den Verbindungskanal und das darin befindliche PFD auf die Membran des Druckmessumformers übertragen, ohne dass die Tropfen mit diesem in Kontakt treten können.

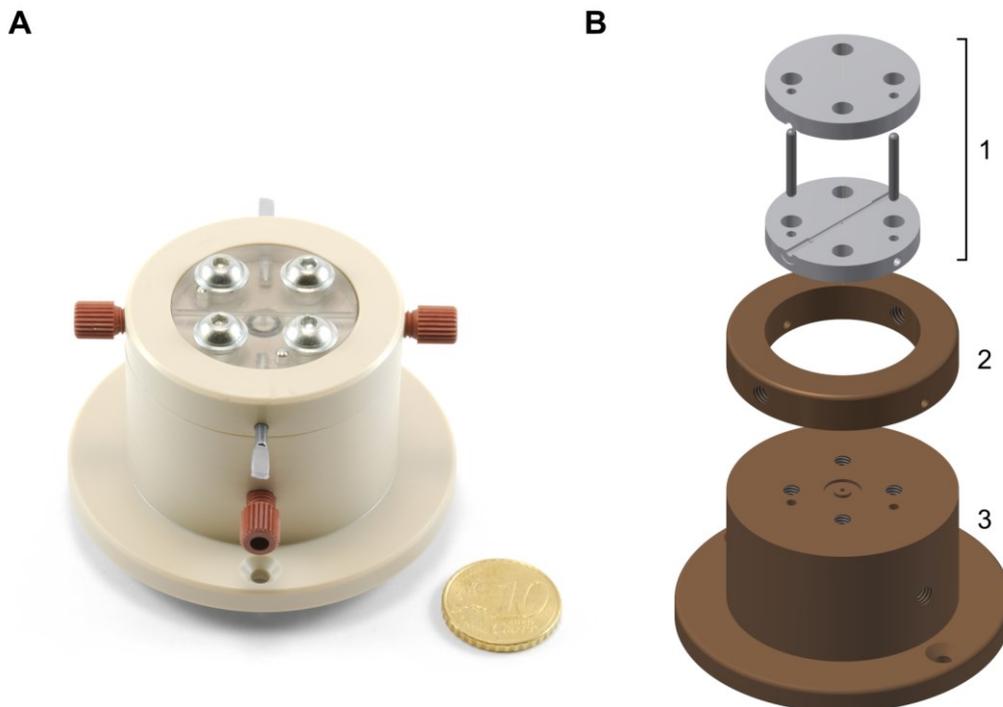


Abb. 3.9: Druckmodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Druck-FMS, 2: fluidischer Anschlussring, 3: Anschlussadapter.

Der durch die Dichteunterschiede zwischen PFD und den Probentropfen hervorgerufene Auftrieb verhindert ein Eindringen der Tropfen in den Verbindungskanal und garantiert damit einen störungsfreien Tropfentransport durch das Druckmodul. Der Anschlussring (s. Abb. 3.9, B2) zur fluidischen Kontaktierung komplettiert das Druckmodul.

3.3.6 Zudosiermodul

Aufgabe des Zudosiermoduls (s. Abb. 3.10) ist die aktive, reproduzierbare und automatisierte Zugabe von Reagenzien in die durch das Modul strömenden Tropfen. Das zu diesem Zweck verwendete Mikroventil (SMLD 300 H J0.15 T1 S, Fritz Gyger AG) befindet sich im Zudosier-FMS (s. Abb. 3.10, B2), welches wiederum mit einem modifizierten Anschlussrahmen (s. Abb. 3.10, B3) fluidisch kontaktiert

ist. Während des Zudosierens strömen die Tropfen durch den Hauptkanal (dHK = 1000 μm) des Zudosier-FMS. Das Zudosieren mit dem Mikroventil erfolgt über einen Seitenkanal (dSK = 200 μm), der mit dem Hauptkanal einen Winkel von 90° bildet.

Zur Kopplung des Ventils weist das FMS Bohrungen zentrisch zum Seitenkanal auf, die an die Dimensionen des Ventils angepasst sind. Die Befestigung des Ventils erfolgt mit einem Metallschieber (s. Abb. 3.10, B4 viertes Element von links). Die Dichtheit des Ventils gegenüber dem FMS garantiert ein Dichtring.

Das Ventil wird mittels Adaptern (s. Abb. 3.10, B4) mit einem Filtereinsatz verbunden. Der darin integrierte Partikelfilter verhindert das Verblocken des Ventils durch Schwebstoffe. Über den Filtereinsatz ist das Ventil mit dem Reservoir (s. S. 26, Abb. 3.2, A6) fluidisch verbunden.

Die für das Triggern des Mikroventils erforderliche Erfassung der Tropfen basiert auf der Messung der Extinktion (bei 635 nm), die die Tropfen beim Durchströmen der in das Modul integrierten zwei photometrischen Detektoren hervorrufen. Jeder der beiden photometrischen Kanäle besteht aus einer Laserdiode (ADL-63201TL, 635 nm, Laser Components GmbH) und einer Photodiode (SD057-11-21-011, Laser Components GmbH). Die Regelung der Lichtintensitäten und die Stromversorgung der Laserdioden erfolgt über je eine Treiberelektronik (LSC-025, Laser Components GmbH). Je ein Transimpedanzverstärker pro Detektorkanal erfasst den Photostrom, konvertiert ihn in eine Spannung und verstärkt diesen. Die Laser- und Photodioden sowie die Diodentreiber, Netzgeräte und Verstärker sind in die Kontrolleinheit integriert (s. S. 26, Abb. 3.2, B2).

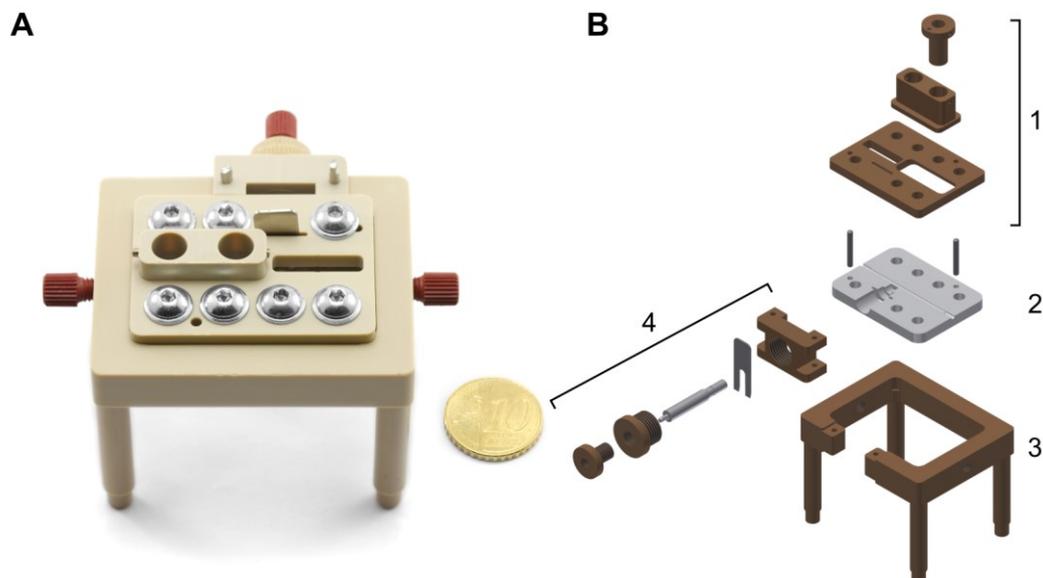


Abb. 3.10: Zudosiermodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell),
1: Lichtleiterkopplungsgruppe, 2: Zudosier-FMS, 3: fluidischer Anschlussrahmen, 4: Mikroventil-
Kopplungsgruppe.

Die Kopplung der elektronischen Komponenten mit dem FMS erfolgt über jeweils zwei Lichtleiter (#39-365, Edmund Optics GmbH). Somit sind die elektronischen Komponenten nicht direkt in das Modul integriert und es erfolgt kein Wärmeeintrag durch die Lichtquellen. Die genaue Ausrichtung der Lichtleiter hinsichtlich ihres Abstandes zueinander und in Bezug zum Hauptkanal erfolgt mit einem Adaptersystem (s. Abb. 3.10, B1). Die beiden Lichtleiter jedes der beiden Detektorkanäle sind

diametral zueinander ausgerichtet. Zudem sind für die Ein- und Auskopplung des Lichtes Linsen (N-BK7 Ball Lens, Edmund Optics GmbH) in das Adaptersystem integriert.

Für die automatische Zudosierung wird nur ein Detektor verwendet (s. Abb. 3.10, A, 2. Bohrung von links). Die Routine für die automatische Zudosierung wird in Kapitel 3.4.2 detailliert beschrieben. Durch diese Routine wird das Mikroventil geöffnet, wenn ein Tropfen den Seitenkanal passiert.

Es stehen zwei Parameter zur Verfügung, mit denen das Zudosiervolumen variiert werden kann. Zum einen kann die Zeit verändert werden, die das Ventil während der Zudosierung geöffnet ist. Zum anderen kann der Druck des Mikroventilreservoirs in Bezug zum Systemdruck variiert werden. Für die Messung des Systemdrucks wird das vorgeschaltete Druckmodul eingesetzt. Die erforderliche Regelung des Reservoirdrucks (s. S. 26, Abb. 3.2, A6) erfolgt mit einem Proportionaldruckregler (PRE1-U06RC, AirCom Pneumatic GmbH), der ebenfalls in die Kontrolleinheit (s. S. 26, Abb. 3.2, B2) integriert ist.

Tropfenanalyse:

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Charakterisierung des Tropfengenerierungsprozesses und auf der Ermittlung der Einflussgrößen, die für die Reproduzierbarkeit ausschlaggebend sind. Es wurden umfangreiche Untersuchungen vorgenommen, um die Einflussgrößen zu charakterisieren. Die Beurteilung der Reproduzierbarkeit erfolgte anhand der Tropfenvolumen.

Die Ermittlung der Tropfenvolumina erfolgte mit einem anderen Zudosiermodul. Die Detektion beruht hierbei auf dem bereits beim vorherigen Zudosiermodul beschriebenen Prinzip, abweichend basiert die Erfassung der Tropfen hierbei jedoch auf der Messung der Extinktion bei 525 nm. Das erforderliche Licht für die Extinktionsmessung wird zudem von einer Hochleistungs-LED (18182605, Conrad Electronic SE) bereitgestellt und die Messung des Extinktionssignals erfolgte mit einem Photodiodenmodul (E57-622, Edmund Industrie Optik GmbH). Die Kopplung der elektronischen Komponenten mit dem FMS wird wie beim vorherigen Zudosiermodul mit je zwei Lichtleitern (#39-365, Edmund Optics GmbH) pro Detektorkanal realisiert. Im Unterschied zum Zudosiermodul erfolgt die Tropfendetektion nicht im Hauptkanal, sondern in einem in das FMS integrierten FEP-Schlauch. Die detaillierte Beschreibung der entsprechenden Routine erfolgt in Kapitel 3.4.2.

3.3.7 Spektroskopiemodul

Nicht invasive Detektionsmethoden sind insbesondere für die tropfenbasierte Mikrofluidik vorteilhaft, da die entsprechenden Detektoren nicht direkt in das fluidische System eingreifen. Interaktionen des Detektors mit den Medien werden ausgeschlossen. Hierdurch können aseptische Bedingungen und eine störungsfreie Tropfenströmung gewährleistet werden. Vor allem optische Analysemethoden bieten diese Voraussetzungen und erfordern lediglich eine optische Transparenz der tropfenführenden Komponenten. Diese Transparenz bieten sowohl die Materialien PC und COC, aus denen die entwickelten FMS bestehen, wie auch die zum Teil eingesetzten Schläuche aus FEP. Für eine einfache Erfassung von Tropfen zum Steuern von Komponenten eines mikrofluidischen Systems ist oftmals auch die Transparenz von PTFE-Schläuchen ausreichend.

Spektroskopische Analyseverfahren eignen sich für Absorptions-, Transmissions- und Fluoreszenzmessungen, die insbesondere für die Analyse biologischer Prozesse eingesetzt werden. Zudem ermöglichen Spektrometer eine Analyse der Proben über einen breiten Wellenlängenbereich. Vor allem in der Entwicklungsphase bieten solche Analysen durch den großen Messbereich eine hohe Flexibilität. Aus diesem Grund basiert das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Spektroskopiemodul auf der Nutzung spektroskopischer Analyseverfahren. Das eigentliche Spektroskopiemodul (s. Abb. 3.11) wurde entwickelt, um die benötigten Lichtquellen und Spektrometer mit dem mikrofluidischen System zu koppeln. Für die Kopplung verfügt das Spektroskopiemodul über ein entsprechendes FMS (s. Abb. 3.11, B1). Dieses weist eine Durchgangsbohrung auf, in die ein FEP-Schlauch eingelegt wird, durch den die Tropfen zur Analyse geleitet werden. Zur Fixierung wird der Schlauch am Ein- und Ausgang der Bohrung mit dem FMS verschraubt. Das Spektroskopiemodul ist für die genannten drei Messmethoden konzipiert.

Für die im Fokus stehenden Anwendungen soll das Spektroskopiemodul für Fluoreszenzmessung eingesetzt werden, die Beschreibung des Moduls erfolgt somit nur für Fluoreszenzmessung. Als Lichtquelle für die Fluoreszenzanalyse wird eine 100 W Xenonlichtquelle (ILP-1, Olympus GmbH) eingesetzt. Das emittierte Weißlicht wird mit einem Flüssigkeitslichtleiter (Olympus GmbH) zu einem Kopplungsmodul geleitet, an dem ein weiterer Lichtleiter (F1000-UVVis-SR-1, StellarNet Inc.) in diametraler Richtung zum ersten Lichtleiter montiert ist. Die Anbindung des zweiten Lichtleiters an das Kopplungsmodul erfolgt über eine SMA-Kollimationsoptik (STE-LENS-QCOL, StellarNet Inc.), die des ersten über eine Anschlussbohrung, welche an die äußeren Dimensionen der Flüssigkeitslichtleiter angepasst ist. Über das Kopplungsmodul wird ein Bandpassfilter (SEM-FF01-554/23-12.7-D, 554 nm \pm 23 nm, Semrock Inc.) zwischen den Lichtleitern positioniert.

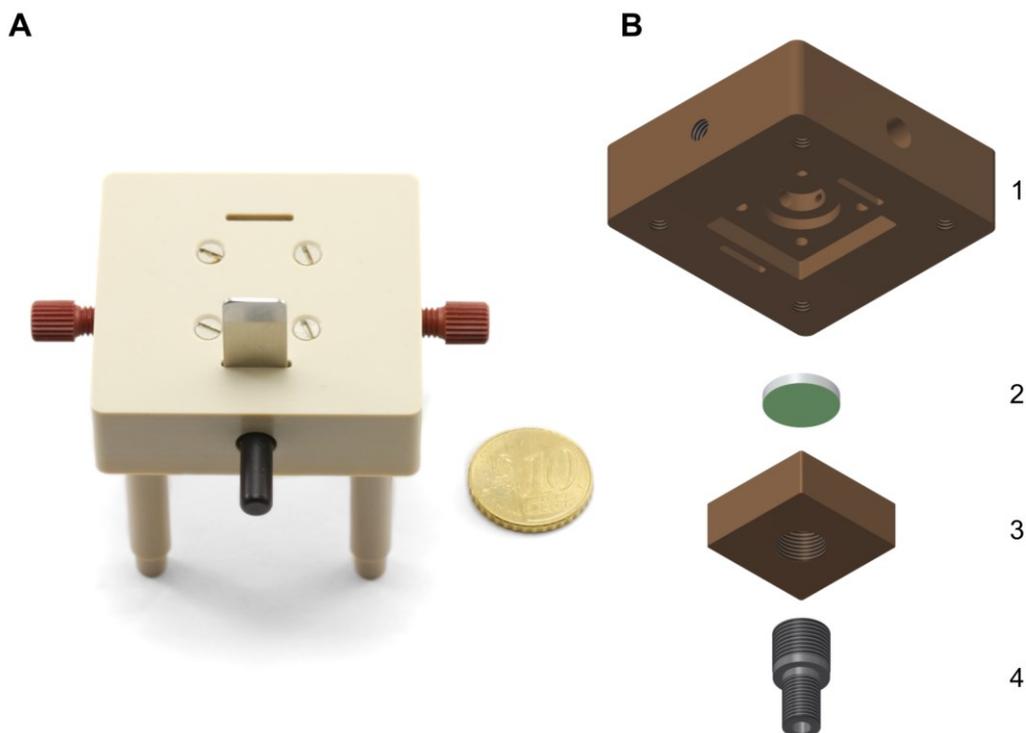


Abb. 3.11: Spektroskopiemodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Spektroskopie-FMS, 2: Fluoreszenzfilter, 3: Anschlussadapter, 4: Kollimator.

Die Ankopplung des zweiten Lichtleiters an das FMS erfolgt über eine Bohrung, die wiederum an die äußere Struktur des zweiten Lichtleiters angepasst ist. Die Befestigung dieses Lichtleiters erfolgt mit einem Montageschieber, der in das FMS eingesetzt wird (s. Abb. 3.11, A). Nach der Montage des Lichtleiters an das FMS ist dieser im 90° Winkel zum FEP-Schlauch ausgerichtet und endet direkt am Schlauch.

Für die im Fokus stehenden Anwendungen wird eine Vitalitätsanalyse von Zellen auf der Basis eines alamarBlue®-Assays angestrebt (Thermo Fisher Scientific). Die Fluoreszenzmessung basiert hierbei auf der spektroskopischen Analyse des Fluoreszenzfarbstoffes des Assays. Zur Erfassung des von den Proben tropfen emittierten Fluoreszenzlichts wird ein Bandpassfilter (SEM-FF01-590/20-12.7-D, 590 nm \pm 20nm, Semrock Inc.) im 90° Winkel zum Lichtleiter für die Einkopplung des Anregungslichts in das FMS eingesetzt (s. Abb. 3.11, B2).

Zur Auskopplung des von der Probe emittierten Lichtes wird ebenfalls eine SMA-Kollimationsoptik (STE-LENS-QCOL, StellarNet Inc.) eingesetzt (s. Abb. 3.11, B4). Zur Anbindung der Optik ist ein Anschlussadapter am Spektroskopiemodul vorhanden (s. Abb. 3.11, B3).

Die Messung der Fluoreszenz erfolgt mit einem UV/VIS Spektrometer (SILVER-Nova, 190-1110 nm, StellarNet Inc.). Das Spektrometer ist in die Kontrolleinheit (s. S. 26, Abb. 3.2, B1) integriert. Die Kopplung des Lichtleiters mit dem Spektrometer erfolgt mittels einer SMA-Verschraubung. Für die Analyse des Fluoreszenzsignals wird die spektrometerspezifische Software SpectraWiz (StellarNet Inc.) eingesetzt. Die Software ermöglicht die Visualisierung der gemessenen Spektren in Echtzeit und die Kalibrierung des Spektrometers. Zudem dient die Software zur Einstellung aller für die Messung relevanten Parameter, wie der Messmethode, der Detektor-Integrationszeit und der Mittelwertfunktion. Des Weiteren bietet die Software eine automatische Speicherfunktion, mit der innerhalb der kürzesten Integrationszeit von 1 ms und bei einer Mittelwertfunktion von 1 alle 70 ms ein Spektrum automatisch gespeichert wird.

3.4 Kontrolleinheit

Die Kontrolleinheit wird aus zwei Untereinheiten (s. S. 26, Abb. 3.2, B1 und 2) gebildet. Die fluidische Einheit ist über die Montageplatte (s. S. 26, Abb. 3.2, A) in den Deckel der 1. Untereinheit integriert (s. S. 26, Abb. 3.2, B1).

3.4.1 Hardware

Die beiden Untereinheiten (s. S. 26, Abb. 3.2, B1 und 2) beinhalten zusätzlich zu den bereits aufgeführten Komponenten (s. Kapitel 3.2) Potentiometer zur manuellen Einstellung der Drehzahl des Mischmoduls, der Lichtpegel des Zudosiermoduls und des Reservoirdrucks für das Mikroventil. Des Weiteren sind die Untereinheiten mit entsprechenden Netzgeräten ausgestattet, um alle Komponenten mit Spannung zu versorgen. Die 2. Untereinheit beinhaltet zudem alle Komponenten zur Beschickung des Druckreglers (Filtereinheit, Druckminderer, Manometer, Rückschlagventil), mit dem die Druckregelung des Mikroventilreservoirs erfolgt. Weiterhin ermöglichen Displays die Anzeige des

Reservoirdrucks, der Rührerdrehzahl und der Spannungssignale der Photodioden sowie die Anzeige des Systemdrucks. Zur Anpassung und Glättung der Prozesssignale, z.B. für die Displayanzeige, werden Operationsverstärker eingesetzt.

Die Regelung- und Steuerung der Plattform erfolgt über ein Prozessorboard (mySmartControl MK2 32K, Laser & Co. Solutions GmbH). Das Board ist in die 2. Untereinheit integriert und verfügt über einen ATmega328 Mikrocontroller (20 MHz) sowie die erforderlichen digitalen und analogen Ein- und Ausgänge.

Das Prozessorboard ist die Kernkomponente für die Prozesssteuerung. Alle in die Kontrolleinheit integrierten Komponenten, außer das Spektrometer, sind mit dem Prozessorboard gekoppelt. Zur Bereitstellung eines analogen Sollwertes für die Druckregelung ist das Prozessorboard über einen Digital-Analog-Wandler mit dem Druckregler verbunden. Die Steuerung des Mikroventils erfolgt mit einem MOS-FET, der über das Prozessorboard gesteuert wird. Für die Programmierung und zur Kommunikation ist das Board mit einer USB-Schnittstelle ausgestattet. Über die Kontrolleinheit wird das Prozessorboard mit einem PC gekoppelt. Der PC ist über weitere USB-Schnittstellen direkt mit der Spritzenpumpe und dem Spektrometer gekoppelt. Die Plattform stellt in dieser Konfiguration ein robustes und kompaktes System für reproduzierbare Untersuchungen tropfenbasierter mikrofluidischer Anwendungen dar.

3.4.2 Software

Die Prozesssteuerung der Plattform erfolgt mit einer eigens für den Mikrocontroller entwickelten Firmware auf der Basis der Programmiersprache C++. Die Firmware (AutoInjCS v18.0) beinhaltet alle für die Prozesssteuerung erforderlichen Routinen.

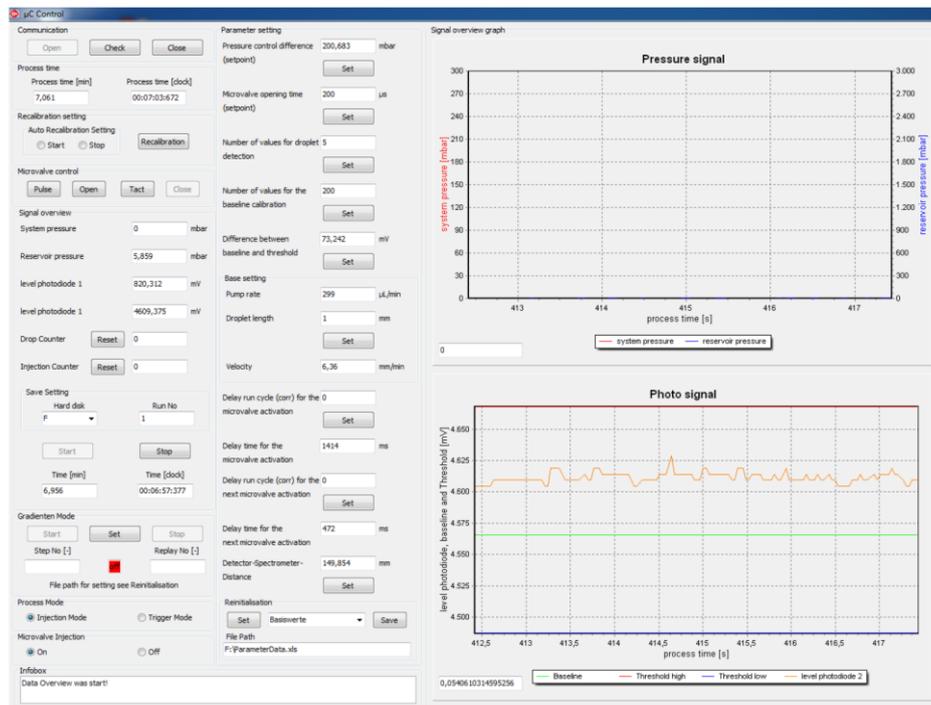


Abb. 3.12: Bedien- und Visualisierungs-Oberfläche der PC-Anwendung (AutoInjCS Interface v5.0).

Die Firmware erfüllt vier grundlegende Funktionen:

1. Die Erfassung der strömenden Tropfen und die Aktivierung des Mikroventils.
2. Die mikrosekundengenaue Steuerung der Öffnungszeit des Mikroventils.
3. Die Regelung einer definierten Druckdifferenz zwischen dem Mikroventilreservoir und dem System.
4. Den Datenaustausch zwischen dem Mikrocontroller und dem PC zur Datenvisualisierung, Speicherung und zur Parametereinstellung.

Für die Kommunikation mit dem angeschlossenen PC wurde eine PC-Anwendung (μ C-Control) entwickelt, die ebenfalls auf der Programmiersprache C++ basiert. Die PC-Anwendung ermöglicht z.B. durch die Variation von Prozessparametern Eingriffe in die Prozesssteuerung. Zudem können alle relevanten Prozessparameter über die Anwendung visualisiert und gespeichert werden (s. Abb. 3.12).

Automatische Zudosierung:

Für eine automatische Zudosierung müssen die strömenden Tropfen mit dem Zudosiermodul erfasst werden. Die Tropfendetektion basiert auf der Erfassung einer Signaländerung, die ein Tropfen beim Durchströmen des zweiten photometrischen Detektors (s. S. 37, Abb. 3.10, links von der Ventilan-Kopplung) hervorruft. Hierfür wird der Spannungspegel des photometrischen Detektors mittels der Firmware im 2 ms-Takt erfasst. Beim Start der Zudosieroutine wird innerhalb der ersten zwei Sekunden (Parameter) ein Basisbereich ermittelt, der über- oder unterschritten werden muss, um eine Signaländerung einem Tropfen zuzuordnen. Zur Bestimmung des Basisbereichs wird in der angegebenen Zeitspanne ein Mittelwert des photometrischen Detektorsignals berechnet, der nur aus der Strömung des Separationsmediums hervorgeht. Das heißt, dass während der Mittelwertbestimmung kein Proben tropfen den photometrischen Detektor durchströmen darf. Zusätzlich wird während der Mittelwerterfassung ein Maximal- und Minimalwert ermittelt.

Zur Definition des Basisbereichs wird ein vorgegebener Spannungswert (Parameter) vom Minimalwert subtrahiert und zum Maximalwert addiert. Diese beiden Parameter stellen die obere und untere Grenze des Basisbereichs dar. Durchströmt ein Tropfen den photometrischen Detektor, resultiert aus der Bewegung der Tropfen (zumeist aus Phasengrenze) eine Signaländerung. Führt die Signaländerung zu einem Über- oder Unterschreiten des Basisbereichs, wird dies einem Tropfen zugeordnet. Der Basisbereich verhindert, dass eine geringe Signalschwankung während der Strömung des Separationsmediums fälschlicherweise einem Tropfen zugeordnet wird. Zur weiteren Stabilisierung der Tropfenerfassung muss das photometrische Detektorsignal für eine vorgegebene Zeitspanne (Parameter) außerhalb des Basisbereichs liegen, bevor die Signaländerung einem Tropfen zugeordnet wird.

Nach der Erfassung eines Tropfens wird die Zeitspanne berechnet, die der Tropfen benötigt, um vom Detektor zum Seitenkanal zu strömen, an welchen das Mikroventil gekoppelt ist. Zur Berechnung der Zeitspanne muss die mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Tropfen bestimmt werden. Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit wird aus dem Volumenstrom, mit dem die Tropfen gefördert werden (Parameter), und dem Querschnitt des Hauptkanals ($d_{HK} = 1000\mu\text{m}$, Parameter) berechnet. Mit der

Strömungsgeschwindigkeit und der Distanz zwischen dem photometrischen Detektor und dem Seitenkanal (8 mm, Parameter) wird der Zeitpunkt berechnet, an dem der strömende Tropfen den Seitenkanal passiert.

Nach Ablauf des berechneten Zeitpunktes wird das Mikroventil für eine vorgegebene Zeit (Parameter) geöffnet und das entsprechende Fluid mit einer definierten Druckdifferenz (Parameter) vom Reservoir in die Tropfen injiziert. Die Öffnungszeit kann wahlweise von 200 μs in Schritten von 100 μs bis zu einem Grenzwert von 5 ms erhöht werden. Zur Gewährleistung einer reproduzierbaren Zudosierung wird der Druck des Mikroventilreservoirs in Bezug zum Systemdruck geregelt. Zudem ermöglicht eine gezielte Erhöhung des Drucks eine Steigerung des Zudoservolumens. Zu diesem Zweck kann der Reservoirdruck in Bezug zum Systemdruck von 15 mbar in Schritten von ca. 1,5 mbar bis zum Maximaldruck von 6 bar erhöht werden.

Zur Verhinderung einer mehrmaligen Erfassung desselben Tropfens wird über einen vorgegebenen Tropfenabstand (Parameter) und die Strömungsgeschwindigkeit eine Verzögerungszeit berechnet. Erst nach Ablauf der Verzögerungszeit ist eine erneute Tropfenerfassung möglich. Über die PC-Anwendung können die angegebenen Parameter variiert und hierdurch das Verhalten der Routine angepasst werden.

Tropfenanalyse:

Für eine genaue Untersuchung der Tropfengenerierung wurde eine weitere PC-Anwendung (HFDatalogger v9.43) auf Basis von C++ entwickelt. Die Anwendung ermöglicht eine tiefgreifende Analyse des Tropfengenerierungsprozesses.

Die Analyse erfolgte mit dem zweiten Zudosiermodul. Zur Bestimmung des Tropfenvolumens werden beide photometrischen Detektoren genutzt. Die Spannungspegel hierbei werden nicht wie bei der automatischen Zudosierung mit einem Prozessorboard erfasst, sondern mit einem Datenerfassungsmodul (NI PCIe-6363, National Instruments Germany GmbH). Das Modul ist über eine PCI Express Schnittstelle direkt in den PC integriert.

Die Erfassung der Spannungspegel mit dem Datenerfassungsmodul erfolgt mit Abtastraten von bis zu 60 kS/s (Kilosample pro Sekunde). Die hohen Abtastraten ermöglichen eine exakte Messung der strömenden Tropfen. Die Abtastrate wird hierbei an die Strömungsgeschwindigkeit angepasst, um die Tropfen mit einer einheitlichen Auflösung von 0,5 $\mu\text{m}/\text{S}$ zu erfassen. Auf diese Weise können die Messungen unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit verglichen werden.

Zu Beginn einer Analyse wird innerhalb der ersten 10 s für jeden photometrischen Detektorkanal ein Mittelwert bestimmt. Auch bei dieser Routine wird ein Maximal- und Minimalwert bestimmt. Jedoch wird hierbei nur ein unterer Grenzwert definiert, da im Rahmen dieser Arbeit nur Medien untersucht wurden, die eine deutlich höhere Absorption hervorrufen als das Separationsmedium. Zur Festlegung des Grenzwerts wird die Hälfte der Differenz zwischen dem Maximal- und Minimalwert vom Minimalwert subtrahiert.

Bei der hohen Abtastrate werden die photometrischen Detektorsignale während der Analyse nur gespeichert, da eine gleichzeitige Auswertung nicht möglich ist. Erst nach Abschluss einer Messung werden die gespeicherten Daten ausgewertet. Aus den Messdaten werden alle relevanten Prozess-

parameter zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit, wie die Strömungsgeschwindigkeit der einzelnen Tropfen, ihr Abstand zueinander, die Länge und das Volumen sowie die Anzahl der untersuchten Tropfen, ermittelt.

Die Ermittlung der Strömungsgeschwindigkeiten der einzelnen Tropfen wird durch die Verwendung beider photometrischen Detektoren (**PD1** und **PD2**) ermöglicht. Die theoretischen Grundlagen der Tropfenanalyse werden nachfolgend erläutert.

Zur Erfassung der Strömungsgeschwindigkeit wird die Zeit ermittelt, die ein Tropfen benötigt, um vom ersten zum zweiten photometrischen Detektor zu strömen (s. Abb. 3.13, A).

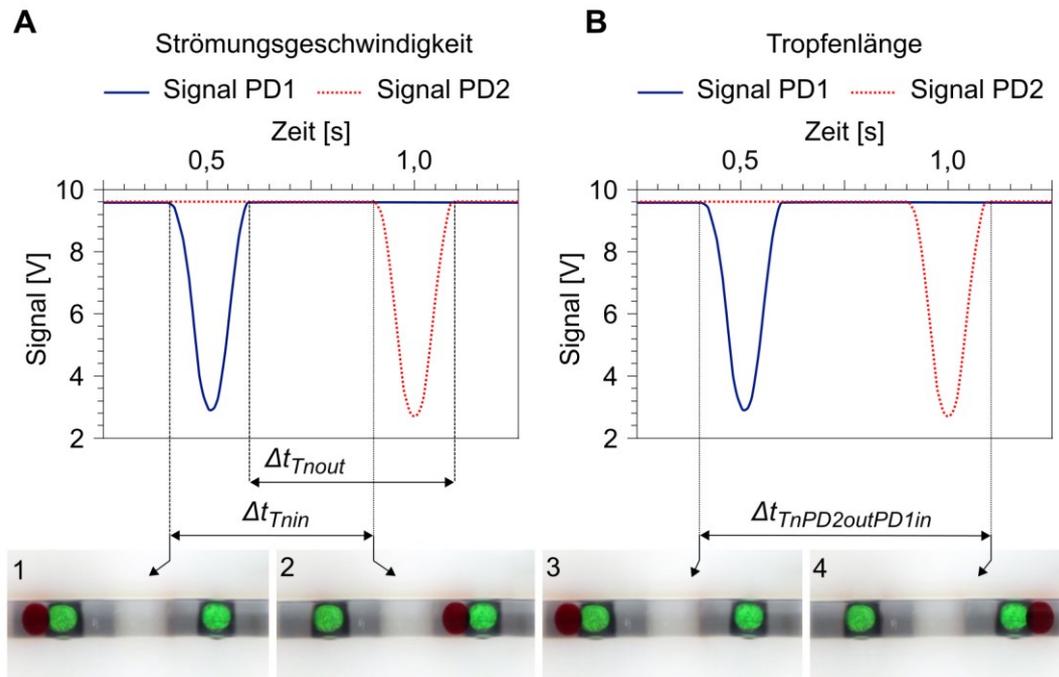


Abb. 3.13: Parameterbestimmung für die Berechnung des Tropfenvolumens. 1 – 4: Rotes Objekt: Tropfen, grünes Objekt: Detektor 1 (links, **PD1**) und 2 (rechts, **PD2**).

A – Schema zur Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit,

1 – Tropfenposition direkt vor Eintritt in **PD1**, 2 – Tropfenposition direkt vor Eintritt in **PD2**.

B – Schema zur Bestimmung der Tropfenlänge, 3 – Tropfenposition direkt vor Eintritt in **PD1**, 4 – Tropfenposition direkt nach Verlassen von **PD2**. Δt_{Tnin} : Zeitdifferenz, die der Tropfen vom Eintritt in **PD1** bis zum Eintritt in **PD2** benötigt. Δt_{Tnout} : Zeitdifferenz, die der Tropfen vom Verlassen von **PD1** bis zum Verlassen von **PD2** benötigt. $\Delta t_{TninPD2outPD1in}$: Zeitdifferenz, die der Tropfen vom Eintritt in **PD1** bis zum Verlassen von **PD2** benötigt.

Durch die konstruktive Anordnung ist der Abstand zwischen den photometrischen Detektoren (**PD1** zu **PD2**) bekannt (12 mm). Mit der Ermittlung der Zeitdifferenz Δt_{τ} (*in* – Eingang, *out* – Ausgang) und der Strecke s_{D12} , die ein Tropfen in dieser Zeit zurücklegt, wird die Strömungsgeschwindigkeit v_{TnPD} der einzelnen Tropfen n errechnet (Gl. 3.1).

$$V_{TnPD} = \frac{s_{PD12}}{t_{TnPD2in} - t_{TnPD1in}} + \frac{s_{PD12}}{t_{TnPD2out} - t_{TnPD1out}} \quad \begin{matrix} t_{Tnin} = t_{TnPD2in} - t_{TnPD1in} \\ t_{Tnout} = t_{TnPD2out} - t_{TnPD1out} \end{matrix} \quad \begin{matrix} \text{(s. Abb.} \\ \text{3.13, A)} \end{matrix} \quad \text{Gl. 3.1}$$

Die Kenntnis der Strömungsgeschwindigkeit ermöglicht im Weiteren die Ermittlung des Abstandes der Tropfen zueinander. Dafür wird die Zeit erfasst, die zwischen den aufeinander folgenden Tropfen

vergeht, bis sie den zweiten Detektor erreichen. Mittels der Strömungsgeschwindigkeit v_{Tn} und der Zeitdifferenz Δt_{Tnn++} kann der Abstand zwischen den beiden Tropfen s_{Tnn++} ermittelt werden (Gl. 3.2).

$$s_{Tnn++PD} = v_{Tn} \cdot (t_{Tn++PD2in} - t_{TnPD2in}) \quad t_{Tnn++} = t_{Tn++PD2in} - t_{TnPD2in} \quad \text{Gl. 3.2}$$

Für die Berechnung des Tropfenvolumens wird im ersten Schritt die Länge eines Tropfens erfasst. Hierfür wird die Zeitspanne ermittelt, die ein Tropfen benötigt, um von Eingang des 1. Detektors zum Ausgang des 2. Detektors zu strömen. In dieser Zeitspanne $t_{TnPD1inPD2out}$ hat der Tropfen eine Strecke zurückgelegt, die sich aus der Distanz zwischen den Detektoren s_{D12} (Zentrum/Zentrum) und den jeweils halben Durchmessern des 1. und des 2. Detektors $d_{D1}/2$ und $d_{D2}/2$ zusammensetzt. Mit der Strömungsgeschwindigkeit v_{Tn} des Tropfens, der zurückgelegten Strecke und der dafür benötigten Zeit kann die Länge eines Tropfens s_{Tn_PD} berechnet werden (Gl. 3.3).

$$s_{TnPD} = v_{Tn} \cdot (t_{TnPD2out} - t_{TnPD1in}) - \left(\frac{d_{PD1}}{2} + s_{PD12} + \frac{d_{PD2}}{2} \right) \quad \frac{t_{TnPD2outPD1in}}{t_{TnPD2out} - t_{TnPD1in}} = \quad \text{(s. Abb. 3.13, B)} \quad \text{Gl. 3.3}$$

In Abhängigkeit zur ermittelten Tropfenlänge wird in Bezug zum Kanaldurchmesser das Volumen der Tropfen V_{TnPD} berechnet. Ist die Länge des Tropfens \leq dem Kanaldurchmesser, erfolgt die Volumeberechnung für einen Kugelkörper nach Gleichung (Gl. 3.4). Im Fall, dass die Länge des Tropfens den Durchmesser des Kanals überschreitet, wird das Volumen nach Gleichung (Gl. 3.5) für einen zylindrischen Körper mit konvexen Enden berechnet.

$$V_{TnPD} = \frac{s_{TnPD}^3 \cdot \pi}{6} \quad s_{TnPD} \leq d_c \quad \text{Gl. 3.4}$$

$$V_{TnPD} = \frac{d_c^3 \cdot \pi}{6} + \frac{d_c^2 \cdot \pi}{4} \cdot (s_{TnPD} - d_c) \quad s_{TnPD} > d_c \quad \text{Gl. 3.5}$$

Die vorgestellte Berechnung des Volumens basiert auf der Annahme einer idealisierten Kugelform bzw. sphärischen Form der Tropfen. Bei der Messung werden jedoch die strömenden Tropfen in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit deformiert. Hierdurch weicht die tatsächliche Tropfenform von der idealisierten ab. Im Vergleich mit einem stehenden (nicht deformierten) Tropfen wird diese Formabweichung mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit v_{Tn} immer größer. Zur Berücksichtigung dieser Formabweichungen wird ein Transformationsfaktor $T_{SSP/SPD}$ eingeführt.

Zur Berechnung des Faktors wird das Volumen des Probenmediums, das während der Tropfengenerierung mit der Spritzenpumpe (**SP**) eingeleitet wird, ermittelt. Das gesamte geförderte Probenvolumen wird durch die Anzahl der generierten Tropfen geteilt. Das resultierende gemittelte Tropfenvolumen wird in Abhängigkeit vom Volumen in eine mittlere Tropfenlänge s_{TSP} umgerechnet. Zudem wird ein Mittelwert der Tropfenlängen s_{TnPD} gebildet, die nach der zuvor beschriebenen Methode aus den Signalen der photometrischen Detektoren ermittelt wurden. Der Transformationsfaktor wird abschließend durch die Division beider Tropfenlängen gebildet (Gl. 3.6).

$$T_{SSP/SPD} = \frac{s_{TSP}}{s_{TnPD}} \quad \text{Gl. 3.6}$$

Mit Hilfe des Transformationsfaktor $T_{SSP/SPD}$ wird die Länge der einzelnen Tropfen s_{TnPD} in Abhängigkeit zur Formabweichung in die transformierte Länge s_{TTnPD} umgerechnet (Gl. 3.7).

$$s_{\text{TnPD}} = s_{\text{TnPD}} \cdot T_{s_{\text{Sp}}/s_{\text{PD}}} \quad \text{Gl. 3.7}$$

Abschließend wird das Volumen der Tropfen mit den transformierten Längen nach Gleichung Gl. 3.4 und Gl. 3.5 berechnet.

Die beschriebene Routine ermöglicht die Vergleichbarkeit der Tropfenvolumina unabhängig vom Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf das Detektionsverfahren. Für eine genaue Erfassung der Tropfen muss das entsprechende Probenmedium eine ausreichend hohe Absorption hervorrufen. Um dieses gewährleisten zu können, wurde den Probenmedien 0,1%(v/v) Phenolrot zugesetzt.

4 Material und Methoden

4.1 Beschichtungsverfahren

Für eine zuverlässige Hydrophobisierung wurde C_4F_8 eingesetzt. Dieser Präkursor ermöglicht unter geeigneten Voraussetzungen die Abscheidung von C_xF_{x*2} Fragmenten. Es werden Fluorkohlenstoff-Verbindungen abgeschieden und teflonähnliche Schichten gebildet. Hierdurch wird das Bestreben des perfluorierten PFD, mit fluorierten Oberflächen zu interagieren, befördert und die Affinität des PFD zur Bildung eines schützenden Filmes zwischen der wässrigen Probephase (Tropfen) und den Oberflächen der tropfenführenden Kanäle steigt. Zur Generierung der Beschichtung wurden zwei Verfahren eingesetzt: Ein Atmosphärendruck- und ein Niederdruck-Plasmaverfahren. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten FMS wurden mit einem der beiden Verfahren beschichtet oder ohne eine Beschichtung eingesetzt.

Der Präkursor C_4F_8 ist bei Raumtemperatur und Umgebungsdruck gasförmig und besteht aus einem Kohlenstoffring mit vier Kohlenstoffatomen. Im Gegensatz zu typischen Kohlenwasserstoff Verbindungen sind die Wasserstoffatome vollständig durch Fluoratome ersetzt (s. Abb. 4.1).

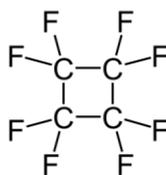


Abb. 4.1: Strukturformel C_4F_8 .

4.1.1 Atmosphärendruck-Plasmaverfahren

Die Beschichtung der FMS mittels eines Atmosphärendruck-Plasmaverfahrens wurde vom Fraunhofer-Institut für Schicht- und Oberflächentechnik (IST) durchgeführt. Für die Atmosphärendruck-Plasmabeschichtung wurde eine DBE-Anlage der Firma TIGRES V20-901 Typ 1 eingesetzt. Das Elektrodensystem und ein verfahrbarer Substrattisch befinden sich bei dieser Anlage im Rezipienten, der evakuiert werden kann. Hierdurch kann z.B. Sauerstoff vom Entladungsbereich entfernt werden. Für die Behandlung der FMS wurde der Druck im Rezipienten dem Umgebungsdruck angeglichen. Die zwei Elektroden der Anlage sind mit Keramik ummantelt, um so Kurzschlüsse zwischen dem geerdeten Substrattisch und den Elektroden zu verhindern. Nachfolgend sind die Kenndaten der Atmosphärendruck-Plasmaanlage aufgeführt (s. Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Kenndaten der Atmosphärendruckplasmaanlage DBE-1.

Parameter	Wert	Einheit
Elektrodenlänge	120	mm
Elektrodenbreite	15	mm
Anzahl Elektroden	2	-
Frequenz	~ 38	kHz
Pulsmuster	cw / PP	-
Gasspalt	1	mm

Das Beschichtungsverfahren beruht auf einer plasmaaktivierten chemischen Gasphasenabscheidung (Plasma-Activated Chemical Vapour Deposition PA-CVD). Die Generierung des Plasmas erfolgte hierbei mittels einer dielektrischen Barrierenentladung (DBE). Details über das DBE-aktivierte PA-CVD-Wachstum von perfluorierten hydrophoben Plasmapolymere wurden von Vinogradov und Lunk [155] beschrieben. Die Techniken, mit der die Atmosphärendruck-Plasmabeschichtung in dieser Arbeit erfolgte, wurden von Eichler *et al.* beschrieben [156].

Zwischen den Elektroden wird das Prozessgas eingespeist. Das Prozessgas ist hierbei ein Gemisch aus Argon mit 5%(v/v) C_4F_8 (Linde AG), welches mit 10 slm (Standard-Liter pro Minute) eingeleitet wird. Durch das elektrische Wechselfeld wird das Gas ionisiert. Die Geschwindigkeit des Substrattisches und die Anzahl der Überfahrten der Elektroden über das Substrat sind entscheidend für die Schichtdicke. Die Beschichtungsdauer betrug bei diesem Verfahren 100 s.

4.1.2 Niederdruck-Plasmaverfahren

Die Beschichtung mit dem Niederdruck-Plasmaverfahren [157] erfolgte mit einer Niederdruck-Plasmaanlage (Pico 110265, Typ F, Diener electronic GmbH + Co. KG). Als Präkursor wurde ebenfalls C_4F_8 (Air Liquide Deutschland GmbH) verwendet. Vor der Beschichtung wurden die entsprechenden FMS-Elemente mittels Isopropanol im Ultraschallbad (Sonorex super RK 100 H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG) für 15 min gereinigt und nachfolgend erst mit Ethanol 80 %(v/v) und dann mit Reinstwasser gespült. Nach der Reinigung wurden die Elemente mit gefilterter Druckluft getrocknet. Zur Beschichtung wurde der Rezipient auf einen Druck von 10 Pa evakuiert und anschließend das Präkursorgas mit 15 sccm (Standardkubikzentimeter) eingeleitet. Das Plasma wird mit einer Anregungsfrequenz von 13,56 MHz erzeugt. Zur Generierung der gewünschten Hydrophobizität werden die zu beschichtenden FMS-Elemente dem Plasma für 30 min ausgesetzt.

4.2 Spritzguss

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten Untersuchungen mit spritzgussgefertigten mikrostrukturierten FMS und mikrostrukturierten Testelementen (MTE). Das entsprechende Spritzwerkzeug wurde von der FKT Formenbau und Kunststofftechnik GmbH gefertigt. Das Abformen der Formteile erfolgte am Kunststoff-Zentrum Leipzig. Die Mikrostruktur wurde bei diesem Verfahren direkt

beim Spritzgießen übertragen. Hierfür wurden die entsprechenden Formeinsätze (Gussformen) mit einem Laserablationsverfahren am Günter-Köhler-Institut für Fügetechnik und Werkstoffprüfung GmbH (ifw) strukturiert.

4.2.1 Spritzgusswerkzeuge

Das Spritzgusswerkzeug (s. Abb. 4.2) wird aus mehreren Komponenten gebildet: zum einen aus den Spritzgussrahmen (s. Abb. 4.2, A1.1 und B1.2) und zum anderen aus den entsprechenden Formeinsätzen (s. Abb. 4.2, A2.1, B2.2 und B2.3).

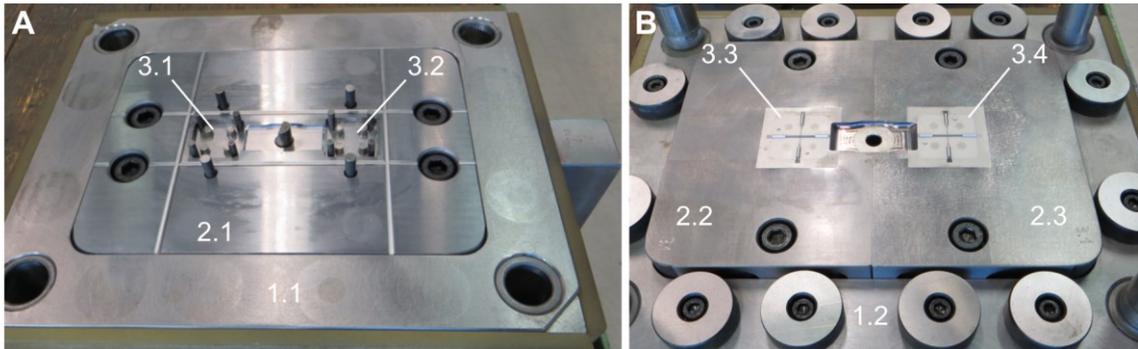


Abb. 4.2: Spritzgusswerkzeuge; A – Komponenten für die Außenseite der FMS; B – Komponenten für die Innenseite der FMS, 1.1: Spritzgussrahmen (Außenseite), 1.2: Spritzgussrahmen (Innenseite), 2.1: Formeinsatz für die Außenseite der FMS-Elemente, 2.2 und 2.3: Formeinsätze für die Innenseite der FMS, 3.1: Kavität für das FMS-Bodenelement, 3.2: Kavität für das FMS-Deckelelement, 3.3: Kanalstruktur für das FMS-Bodenelement, 3.4: Kanalstruktur für das FMS-Deckelelement.

Ein Teil des Werkzeuges dient der Formgebung der Außenmaße (Länge/Breite/Höhe) der MTE und der FMS. Der andere Teil dient der Formgebung der Kanalstruktur der FMS (s. Abb. 4.2, B) und mit zwei weiteren Formeinsätzen der Formgebung der Mikrostruktur der MTE.

Alle Komponenten wurden aus poliertem 1.2343 Warmarbeitsstahl gefertigt. Die entsprechenden MTE- und FMS-Konturen wurden mittels spanender Verfahren in die Formeinsätze gefräst (s. Abb. 4.2, A2.1).

Die Erstellung der Kanalstruktur bei den FMS-Formeinsätzen erfolgte mittels Elektroerosion der Oberfläche. Die FMS-Formeinsätze weisen nach der Bearbeitung ein erhabenes halbrundförmiges Negativ der gewünschten Kanalstruktur für das FMS-Bodenelement (s. Abb. 4.2, B3.3) und für das FMS-Deckelelement (s. Abb. 4.2, B3.4) auf.

4.2.2 Lasergestützte Mikrostrukturierung

Zur Erstellung einer Mikrostruktur auf der Oberfläche der Formeinsätze wurde ein Ultrakurzpulslaser (UKP-Laser, Hyper Rapid, Coherent GmbH) eingesetzt, der mit einem Galvanometer-Scanner ausgestattet war. Die Strukturierung der Oberflächen erfolgte mit einer Leistung von 0,5 W. Die Pulsbreite betrug 8 ps bei einer Wellenlänge von 355 nm.

Zur Ermittlung der physikochemischen Eigenschaften und der Oberflächentopographie der untersuchten Mikrostrukturen wurde die Oberfläche der MTE-Formeinsätze mit einem Strukturfenster

versehen (s. Abb. 4.3, A1). Diese Mikrostruktur wurde beim Abformen auf das MTE-Formteil übertragen (s. Abb. 4.3, B2).

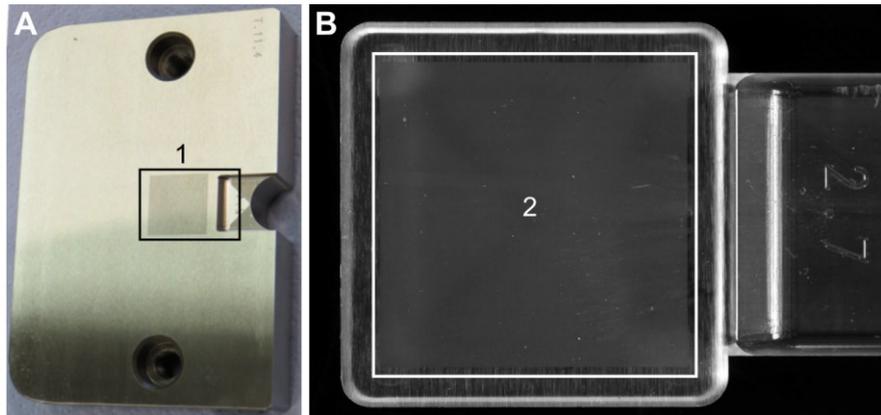


Abb. 4.3: Mikrostrukturiertes Testelement (MTE); A – Formeinsatz; B – Formteil aus PC; 1: Mikrostruktur des Formeinsatzes, 2: Mikrostruktur des Formteiles.

Die lasergestützte Strukturierung der FMS-Formeinsätze erfolgte wiederum auf Teilbereichen der erhabenen Kanalstruktur (s. Abb. 4.2, B3.3 und B3.4). Für die Strukturierung wurden die Formeinsätze im Lasersystem auf einen xyz-Tisch positioniert und entsprechend der gewünschten Strukturdimensionen bearbeitet.

Die MTE-Formeinsätze lagen hierbei planar auf dem Positioniertisch, so dass der Laserstrahl senkrecht in die Oberfläche eindringen konnte. Die Realisierung der gewünschten Abstände der einzelnen Strukturelemente erfolgte über Spiegel, die eine nanometergenaue Auslenkung des Laserstrahls ermöglichen. Für größere Auslenkungen wurden die Formeinsätze mittels des xyz-Tisches ausgerichtet.

Um ein senkrecht Eindringen des Laserstrahles in die Kanaloberfläche der FMS-Formeinsätze zu garantieren, wurden diese gekippt. Dieses war erforderlich, da die erhabene Kanalstruktur der FMS-Formeinsätze eine gekrümmte Oberfläche aufweist und nur durch Kippen der Formeinsätze ein annähernd senkrecht Eindringen des Laserstrahles ermöglicht werden konnte. Für ein genaues Kippen der Formeinsätze wurde eine spezielle Kippvorrichtung (ifw Jena, Deutschland) eingesetzt. Sowohl die Verkippung als auch die Positionierung der Formeinsätze erfolgte mit hoher Präzision im Mikrometer-Bereich.

4.2.3 Formteile

Die Maße der abgeformten MTE- und FMS-Formteile betragen 25 x 25 x 4 mm (s. Abb. 4.4). Die MTE-Formteile (s. Abb. 4.4, A) weisen auf einer Seite das 20 x 20 mm große Strukturfeld auf (s. Abb. 4.3, B2), welches für die physikochemische und die oberflächentopographische Analyse eingesetzt wurde.

Die FMS-Formteile (s. Abb. 4.4, B) dienen der Untersuchung des Einflusses, den die Mikrostruktur auf die Tropfengenerierung ausübt. Vor den Untersuchungen wurden die entsprechenden FMS-Formteile (Deckel- und Bodenelement) beschichtet und mit der Kanalstruktur zueinander ausgerichtet.

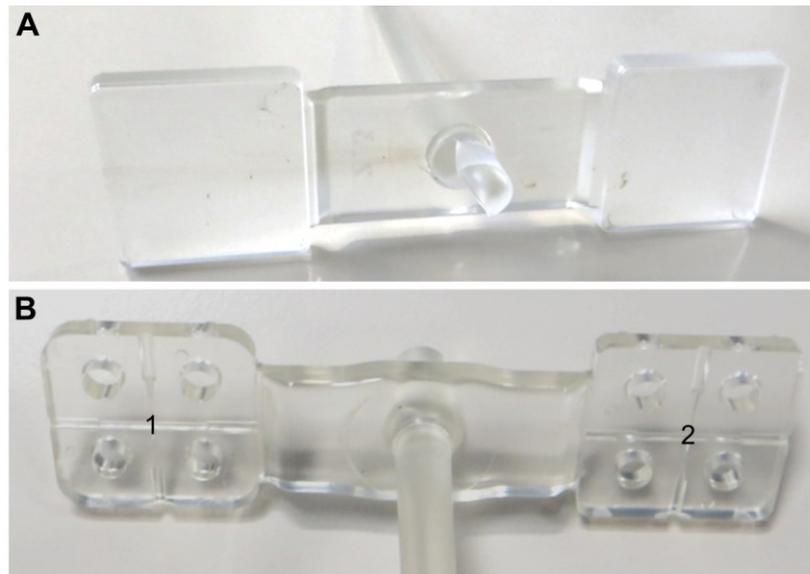


Abb. 4.4: Spritzgegossene Formteile aus PC; A – MTE-Formteile; B – FMS-Formteile, 1: FMS-Bodenelement, 2: FMS-Deckelement.

Für eine exakte Ausrichtung der abgeformten FMS-Elemente sind das Deckelement (s. Abb. 4.4, B2) mit zwei Justiernoppen und das Bodenelement (s. Abb. 4.4, B1) mit entsprechenden Justiervertiefungen ausgestattet. Die Montage erfolgt analog zu den gefrästen FMS mit vier M4-Schrauben über entsprechende Bohrungen, die hierfür in den FMS-Formteilen vorhanden sind.

4.2.4 Spritzgussverfahren

Das Abformen der MTE- und FMS-Formteile erfolgte mit einer Arburg Allrounder 320s Spritzgussmaschine. Als Standardparameter wurden folgende Prozessgrößen festgelegt (s. Tab. 4.2):

Tab. 4.2: Standard Spritzgussparameter.

Parameter	Wert	Einheit
Schmelztemperatur	320	°C
Spritzdruck	45,3	MPa
Einspritzgeschwindigkeit	20	ml/s
Einspritzzeit	0,9	s
Dosierzeit	2,35	s
Kühlzeit	70	s
Nachdruck	80	MPa
Formtemperatur	110	°C

Entsprechend dem Untersuchungsverlauf wurden die Standardparameter variiert.

4.3 Physikochemische Untersuchungen

Zur Charakterisierung der Oberflächeneigenschaften wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen wurden zur Bestimmung des energetischen Zustands der Oberflächen eingesetzt. Die Beurteilung erfolgte anhand des dispersen und polaren Anteils der freien Oberflächenenergie. Zur Charakterisierung mikrofluidischer Phänomene wurden Stoffeigenschaften wie die Viskosität, die Ober- und Grenzflächenspannung sowie die Dichte der eingesetzten Fluide ermittelt.

4.3.1 Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkel wurden mit dem computergestützten Messsystem OCA (Optical Contact Angle, DataPhysics Instruments GmbH) gemessen, welches mittels der herstellereigenen Software „SCA20“ betrieben wurde. Die Kontaktwinkelmessungen erfolgten mit der Methode des liegenden Tropfens. Für die Messung wurden drei Tropfen des jeweiligen Mediums mit einem Volumen von je 3 μl auf die zu analysierende Oberfläche gesetzt und der resultierende Kontaktwinkel gemessen. Bei jedem Tropfen erfolgte hierbei eine fünfzehnfache Bestimmung der Kontaktwinkel.

4.3.2 Oberflächenenergie

Die freie Oberflächenenergie sowie deren polare und disperse Anteile wurden mit dem OWRK-Ansatz (Owens, Wendt, Rabel und Kaelble) ermittelt. Hierfür wurden vier charakterisierte Testflüssigkeiten auf die zu analysierende Oberfläche gesetzt und gemessen. Als Messlösungen dienten neben deionisiertem Wasser (polar) Formamid, Ethylenglykol (überwiegend polar) und Dijodmethan als rein disperse Flüssigkeiten, deren oberflächenenergetische Parameter aus Messungen und der Literatur bekannt sind.

4.3.3 Stoffeigenschaften

Das fluidische Verhalten der untersuchten Probenmedien wird durch deren Dichte, Oberflächenspannung und Viskosität charakterisiert. Diese Stoffeigenschaften sind die relevanten Parameter für mikrofluidische Untersuchungen. Für die Medien, bei denen diese Eigenschaften nicht bekannt waren, wurden diese ermittelt. Des Weiteren wurde bei allen untersuchten Medien die Grenzflächenspannung zum Separationsmedium PFD bestimmt.

Oberflächenspannung:

Die Ermittlung der Oberflächenspannung erfolgte mit einem Tensiometer nach der Wilhelmy-Platten-Methode. Hierfür wurde ein Kraftsensor-Tensiometer DCAT21 (dataphysics GmbH) genutzt. Das zu analysierende Medium wurde in einem dem Tensiometer zugehörigem Gefäß vorgelegt und ein Messkörper aus Platin wurde in das Medium eingetaucht. Die hierbei gemessene Zugkraft, bezogen auf die benetzte Länge des Messkörpers und dessen Kontaktwinkel zum Medium, ermöglicht die Ermittlung der Oberflächenspannung.

Grenzflächenspannung:

Für Medien, bei denen mit der Platten-Methode keine Bestimmung der Oberflächenspannung möglich war (z.B. proteinhaltige Medien), wurde diese mit dem Pendant-Drop-Verfahren [158] über Kontaktwinkelmessungen bestimmt. Bei dieser Methode wird aus dem Abbild eines an einer Kapillare hängendem Tropfen mittels Konturanalyse die Oberflächenspannung oder Grenzflächenspannung berechnet. Die Bestimmung der Grenzflächenspannung zwischen den untersuchten Probenmedien zum PFD erfolgte ausschließlich mit dieser Methode. Zur Ermittlung der Oberflächenspannung der Medien wurde das Medium in die Kapillare zur Konturanalyse gefördert. Die Ermittlung der Oberflächenspannung erfolgte hierbei in Bezug zu Luft. Zur Bestimmung der Grenzflächenspannung der Medien im Kontakt zum PFD wurde das Separationsmedium in die Kapillare gefördert. Die Kapillare ragte hierbei in ein transparentes Gefäß, das mit dem entsprechenden Medium gefüllt war. Durch die Konturanalyse des PFD wurde somit die Grenzflächenspannung ermittelt. Diese Messvariante war erforderlich, da PFD eine Dichte von 1930 kg/m^3 hat und alle untersuchten Probenmedien eine geringere Dichte aufweisen.

Viskosität:

Die Viskosität wurde mit einem Kapillarviskosimeter bestimmt. Hierfür wurde eine Ubbelohde Glas-Kapillare (Schott Geräte GmbH) eingesetzt. Bei diesem Niederdruck-Kapillarviskosimeter wird die kinematische Viskosität durch die Ermittlung der Durchflusszeit eines definierten Volumens der Probe durch eine Messkapillare bestimmt.

Für Medien, die mit dieser Methode nicht vermessen werden konnten, wurde ein Rheometer des Typs MCR 522 (Modular Compact Rheometer, Anton Paar GmbH) zur Viskositätsbestimmung eingesetzt. Hierbei wurde die Probe zwischen einem rotierenden Messkörper und einer ruhenden Oberfläche des Rheometers geschert. Aus der Geometrie des Messkörpers und deren Rotation ergibt sich die Schergeschwindigkeit. Das Drehmoment, das zur Aufrechterhaltung der Bewegung benötigt wird, ermöglicht die Ermittlung der Schubspannung. Mit der Kenntnis der Schergeschwindigkeit und der Schubspannung kann die Viskosität bestimmt werden.

Dichte:

Die Bestimmung der Dichte erfolgte mit einem Pyknometer (Brand GmbH & CO KG). Das Pyknometer dient der Bereitstellung eines präzisen Volumens der Probe. Durch eine Differenzwägung des leeren und gefüllten Pyknometers wird die Dichte ermittelt. Eventuelle Luftblasen, die durch die Befüllung eingebracht wurden und das Ergebnis verfälschen könnten, wurden mittels einer Ultraschall-Behandlung entfernt. Zur Gewährleistung einer hohen Genauigkeit wurde das Pyknometer dreimal mit derselben Probe gefüllt und jeweils dreimal gewogen.

4.4 Oberflächentopographische Untersuchungen

Die Beschaffenheit der Oberflächen ist ein wichtiger Parameter fluidischer Systeme und insbesondere für deren Benetzungsverhalten. Zur Bestimmung der Oberflächenbeschaffenheit wurde ein Stereoringstrahlerelektronenmikroskop (Stereo-REM, engl.: Scanning Electron Microscopy SEM) und ein Raster-

kraftmikroskop (engl. atomic force microscope, AFM) eingesetzt. Die Analyse der Schichtdicke erfolgte ebenfalls mit dem AFM. Zur Bestimmung der Oberflächenrauheit wurde ein Weißlichtinterferometer eingesetzt.

4.4.1 Weißlichtinterferometer

Für die Rauheitsanalyse von Polymeroberflächen wurde ein Weißlichtinterferometer (ContourGT, Bruker Corporation) eingesetzt. Die Analyse erfolgte mit einer 50-fachen Vergrößerung. Hierbei wird ein Feld von 125 x 94 µm gemessen. Die Pixelgröße betrug 0.195 µm. Die Erstellung von Oberflächenmodellen und die Bestimmung relevanter Rauheitsparameter erfolgten mit der Software SPIP™ V6.4.3. Das Leveling erfolgte in Anlehnung ISO 25178-2 mit einem Gauß-filter (entsprechend ISO 16610).

4.4.2 Rasterkraftmikroskop

Für die topographischen Untersuchungen und zur Schichtdickenbestimmung wurde ein NanoWizard® AFM eingesetzt, das mit einem 100 µm z-Scan-Modul CoHesion® (jpk Instruments AG) ausgestattet ist. Alle Scans wurden im Kontaktmodus bei Umgebungsbedingungen mit einem ARROW-NC Cantilever (Nanoworld®) durchgeführt. Der Cantilever weist eine Nennfederkonstante von 42 N/m und einen Spitzenradius von weniger als 20 nm auf. Für Untersuchungen von Mikrostrukturen mit einem hohen Seitenverhältnis wurde die Abtastung mit einer relativ niedrigen Abtastrate von 0,1 Hz durchgeführt. Mit der Software SPIP™ (Image Processing A/S) wurden die Scandaten mittels einer Hintergrundkorrektur und eines Gaußschen Glättungsfilters nachbearbeitet.

4.4.3 Rasterelektronenmikroskop

Der überwiegende Teil der topographischen Untersuchungen der Oberflächen (Mikrostruktur) erfolgte mit einem Stereo-REM Evo LS10 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Dabei werden für verschiedene vordefinierte Vergrößerungen REM-Aufnahmen der Oberflächen in drei unterschiedlichen Kippwinkeln aufgenommen. Dies wird durch eine automatisierte euzentrische Verkippung des Probenstisches ermöglicht. Die Rekonstruktion der Oberfläche in einem dreidimensionalen digitalen Oberflächenmodell (3D-DOM) erfolgt nachgeschaltet mit der Analysesoftware MeX® (Alicona Imaging GmbH).

Die Messungen zur Erzeugung eines 3D-DOM erfolgten mit einem Kippwinkeltriplet von 0° - 7° - 15°. Die Messungen wurden im Hochvakuum mit einer Vergrößerung von 250 durchgeführt. Die Auflösung betrug 1024 x 768 Pixel. Es wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 15 kV und einem Sondenstrom von 10 – 30 pA bei einem Arbeitsabstand von 9 mm gearbeitet. Für die Untersuchungen wurden die Proben mit einem Sputter Coater (K550X, Quorum Technologies Ltd) mit Gold (ca. 9 nm) beschichtet.

5 Tropfengenerierung

Ein wichtiger Aspekt für die Qualität tropfenbasierter Anwendungen ist die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung. Das Generieren reproduzierbarer Tropfenvolumina bei einer definierten Konzentration der Inhaltsstoffe ist ein bestimmender Faktor für die Genauigkeit. Insbesondere im Fall der Generierung von Tropfen mit definierten Zellenkonzentrationen ist eine möglichst geringe Abweichung vom mittleren Tropfenvolumen entscheidend für die Qualität des gesamten Verfahrens. Parameter wie die Beschichtung der Mikrokanäle und deren Oberflächenbeschaffenheit, die Kanalordnung (FMS-Design), die Förderraten und die Art der Probenmedien beeinflussen die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung in entscheidendem Maße und lagen deshalb im Fokus der Untersuchungen.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit FMS, die mittels feinmechanischer Fräsverfahren aus PC hergestellt wurden. Die FMS wurden mit dem in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Atmosphärendruck-Plasmaverfahren hydrophobisiert. Die Tropfengenerierung erfolgte mit PFD (kontinuierliche Phase).

Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse sind in fünf Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt werden die Oberflächenrauheit und die Beschichtung der FMS charakterisiert. Im zweiten Abschnitt folgt die Charakterisierung des fluidischen Systems anhand dimensionsloser Kennzahlen. Im dritten Abschnitt wird die Tropfenbildung auf der Basis numerischer Simulationen analysiert. Im vierten Abschnitt folgen die Untersuchungen der Tropfengenerierung in Bezug zur Standzeit sowie in Abhängigkeit vom FMS-Design und den Förderraten. Der fünfte Abschnitt befasst sich mit Untersuchungen zur Eignung der FMS zur Generierung von Tropfen aus einem breiten Spektrum bio-(technologisch) relevanter Medien.

5.1 Charakterisierung der physikochemischen Oberflächeneigenschaften

Die physikochemischen Oberflächeneigenschaften mikrofluidischer Systeme haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Qualität tropfenbasierter Verfahren. Dies gilt vor allem für die Beschaffenheit und das Benetzungsverhalten der Kanaloberflächen. Insbesondere bei Anwendungen, bei denen auf die Verwendung von Tensiden verzichtet wird, ist die Qualität der Beschichtung entscheidend für die

Reproduzierbarkeit und Stabilität. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Untersuchungen das Benetzungsverhalten von PC in Abhängigkeit zur Oberflächenbeschaffenheit charakterisiert.

Die Bestimmung der Oberflächenrauheit wurde mittels Weißlichtinterferometrie bestimmt (s. Kapitel 4.4.1). Die Analyse des Benetzungsverhaltens erfolgte auf der Basis von Kontaktwinkelmessungen (s. Kapitel 4.3.1). Erläuternd sei erwähnt, dass die untersuchten Kanäle für Kontaktwinkelmessungen ungeeignete Strukturen (kleine Radien: Hauptkanal $r_{HK} = 500 \mu\text{m}$, Seitenkanal $r_{SK} = 150 \mu\text{m}$) aufweisen. Zur Gewährleistung optimaler Bedingungen bei der Analyse des Benetzungsverhaltens wurden planare Testelemente (TE) eingesetzt.

Das Material und die Dimensionen der TE sind identisch mit denen der FMS (PC 24 x 24 x 4 mm). Zur Untersuchung des Einflusses der Oberflächenbeschaffenheit auf das Benetzungsverhalten wurde die Oberfläche der TE auf einer Seite zur Hälfte (12 x 12 mm) mit einem Fräser um 0,5 mm abgetragen. Die TE weisen hierdurch eine unbehandelte glatte und eine gefräste raue Fläche auf und ermöglichen so die Bestimmung des Benetzungsverhaltens in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Oberflächen.

Oberflächenrauheit:

Die Rauheitsanalyse erfolgte zum einen an einen FMS zur Tropfengenerierung und zum anderen an einem TE. Das untersuchte FMS weist zwei Seitenkanäle im 90° Winkel zum Hauptkanal auf. Die Rauheit wurde im Zentrum des Haupt- und des Seitenkanals eines FMS-Bodenelements bestimmt. Die nachfolgende REM-Aufnahme zeigt die Messfelder ($125 \times 94 \mu\text{m}$), in denen die Rauheit mittels Weißlichtinterferometrie bestimmt wurde (s. Abb. 5.1, rote Rahmen).

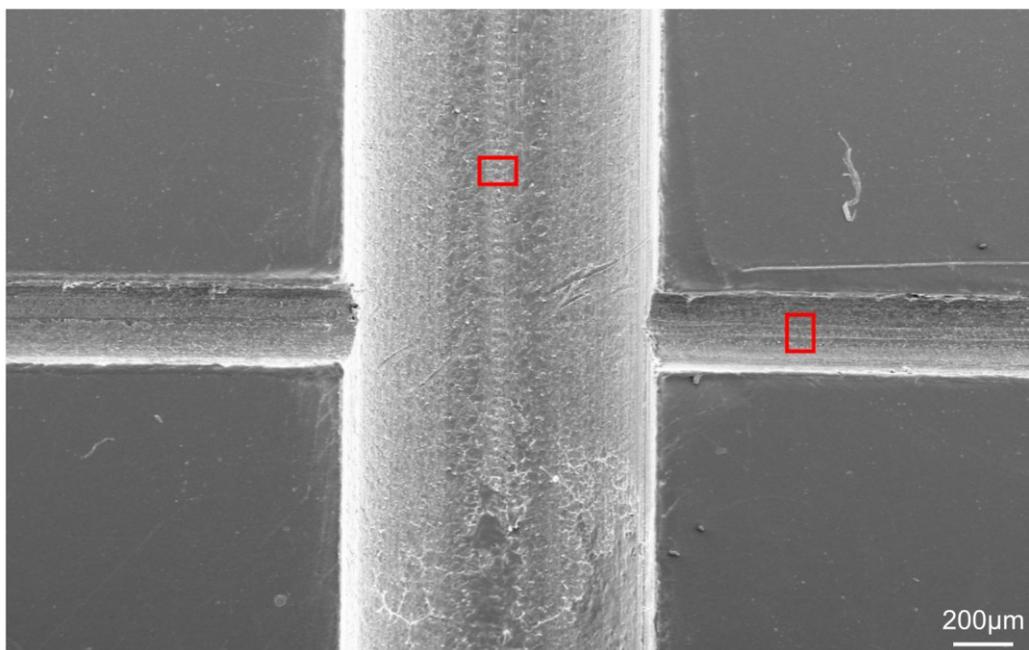


Abb. 5.1: REM-Aufnahmen des Kanalkreuzes eines FMS-Bodenelements; rote Rahmen: Positionen der Rauheitsbestimmung im Haupt- und Seitenkanal des FMS-Bodenelements.

Für die Gegenüberstellung der Oberflächenrauheit wurden sowohl die unbehandelte glatte als auch die gefräste raue Oberfläche des TE in vergleichbaren Messfeldern untersucht.

Anzumerken ist, dass die Rauheitsanalyse beim Haupt- und Seitenkanal auf einer gekrümmten und beim TE auf einer planaren Oberfläche erfolgte. Die Krümmung der Kanäle wurde für die Weißlichtinterferometer-Modelle mittels Leveling (Trennung von Rauheit und Form) ausgeglichen.

Die Modelle zeigen, wie erwartet, eine deutliche Zunahme der Rauheit der gefrästen Oberflächen des FMS und des TE (s. Abb. 5.2, A – C) im Vergleich zur unbehandelten extrudierten Oberfläche des TE (s. Abb. 5.2, D). Insgesamt weisen die bearbeiteten Oberflächen im Maximum vergleichbare Werte auf. Beim plangefrästen TE zeigt sich eine einheitliche Rauheit der Oberfläche (s. Abb. 5.2, A - C), wohingegen bei den Kanaloberflächen vereinzelte Maxima auftreten (s. Abb. 5.2, A in der Mitte des Messfeldes und Abb. 5.2, B am Rand des Messfeldes).

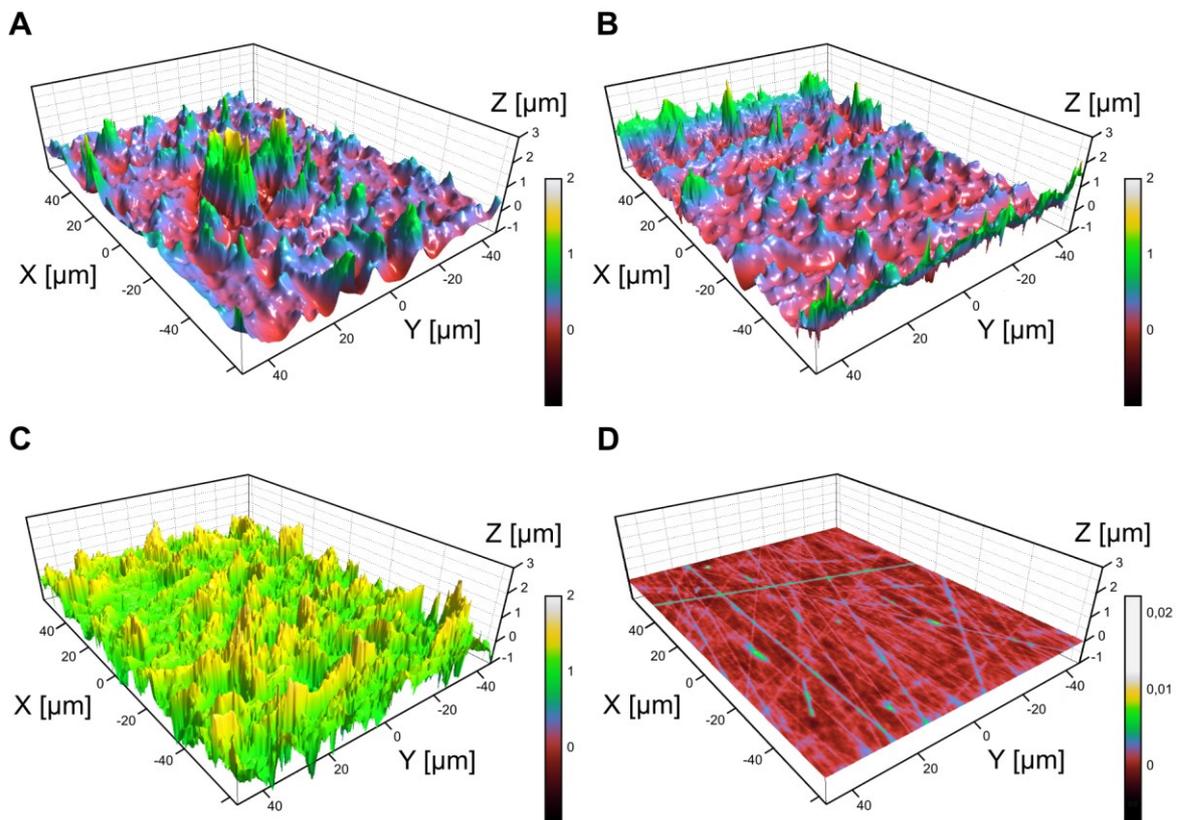


Abb. 5.2: Weißlichtinterferometer-Modelle der untersuchten Oberflächen; A – Hauptkanal des FMS (gefräst), B – Seitenkanal des FMS (gefräst); C – TE gefräst Oberfläche; D – TE unbehandelt Oberfläche.

Für eine genaue Beurteilung wurden drei repräsentative Rauheitsparameter ermittelt: die mittlere arithmetische Höhe (S_a), die Zehn-Punkte-Höhe der Oberfläche (S_{10z}) und das entwickelte Grenzflächenverhältnis (S_{dr}).

Die Einschätzung der Rauheit aus den Weißlichtinterferometer-Modellen spiegelt sich in den Rauheitsparametern wieder (s. Tab. 5.1). Für die gefräste Oberfläche der TE wurde im arithmetischen Mittel (S_a) die stärkste Rauheit ermittelt. Für die Kanäle zeigen die arithmetischen Mittelwerte nur geringfügige Unterschiede in der Ausbildung der Rauheit. Diese Unterschiede in der Rauheit resultieren aus den unterschiedlichen Fräsern, die für die Bearbeitung der Oberflächen eingesetzt wurden. Allgemein ist festzuhalten, dass die aus der Fräsbearbeitung resultierende Rauheit bei der Charakterisierung des Benetzungsverhaltens berücksichtigt werden muss. Zudem sind die gewonnenen Ergeb-

nisse der Rauheitsanalyse repräsentativ für alle untersuchten FMS, die mittels Präzisionsfertigung (Fräsen, Bohren) hergestellt wurden.

Tab. 5.1: Ermittelte Rauheitsparameter der Kanaloberflächen eines FMS für den Haupt- und Seitenkanal sowie einer gefrästen und unbehandelten Oberfläche eines TE.

Probe	Parameter	Mittelwert		Standardabweichung		
		Wert	Einheit	Wert	Einheit	VK
Hauptkanal (FMS)	Sa	249,6	nm	32,0	nm	12,8%
	S10z	4156,0	nm	1601,1	nm	38,5%
	Sdr	3,6	%	2,0	%	55,9%
Seitenkanal (FMS)	Sa	269,5	nm	27,5	nm	10,2%
	S10z	5004,2	nm	1271,7	nm	25,4%
	Sdr	8,3	%	4,0	%	48,3%
Testelement (gefräst)	Sa	389,6	nm	8,4	nm	2,2%
	S10z	6555,1	nm	1126,9	nm	17,2%
	Sdr	30,4	%	5,7	%	18,8%
Testelement (unbehandelt)	Sa	1,6	nm	0,1	nm	9,0%
	S10z	22,2	nm	3,8	nm	17,2%
	Sdr	0,0	%	0,0	%	21,2%

Benetzung:

Zur Charakterisierung des Benetzungsverhaltens wurden drei TE mit C_4F_8 beschichtet und die Kontaktwinkel zu den Messflüssigkeiten (s. 4.3.2) bestimmt. Nach der Beschichtung erhöhte sich der Wasserkontaktwinkel auf der glatten Oberfläche um ca. 32° auf 120° und auf der rauen Oberfläche um ca. 25° auf $129,9^\circ$ (s. Tab. 5.2). Außerdem sank die Oberflächenenergie der unbehandelten Oberfläche um ca. 30 mN/m und auf der gefrästen Oberfläche um ca. 38 mN/m . Hierbei sanken sowohl der disperse wie auch der polare Anteil der Oberflächenenergie, wobei der überwiegende Anteil der Minderung auf den dispersen Anteil entfällt. Der polare Anteil macht bei PC unabhängig von der Beschichtung weniger als 3,5% der freien Oberflächenenergie aus.

Tab. 5.2: Ermittelte Wasserkontaktwinkel und Oberflächenenergien un behandelter und gefräster PC-Oberflächen vor und nach einer Beschichtung mit C_4F_8 .

Beschichtung	Oberfläche	Wasser-Kontaktwinkel	Oberflächenenergie		
			gesamt	dispers	polar
		[°]	[mN/m]	[mN/m]	[mN/m]
unbehandelt	unbehandelt	88,3 ±1,4	40,4 ±0,9	39,6 ±0,7	0,7 ±0,1
	gefräst	105,1 ±4,1	44,5 ±1,1	43,8 ±0,9	0,7 ±0,2
C_4F_8	unbehandelt	120,0 ±3,0	10,6 ±0,4	10,4 ±0,2	0,2 ±0,1
	gefräst	129,9 ±1,4	6,4 ±0,2	6,2 ±0,1	0,2 ±0,1

Die beschichteten Oberflächen sind im Allgemeinen sehr niederenergetisch. Weiterhin zeigen die Anteile der Oberflächenenergie, dass die Beschichtung einen hydrophoben Charakter hervorruft.

Interessanterweise wurde die Benetzbarkeit nicht nur für wässrige Testflüssigkeiten reduziert, sondern auch für Öle wie TD. Die beschichteten Oberflächen waren jedoch vollständig benetzbar für das perfluorierte Separationsmedium PFD (Kontaktwinkel $<20^\circ$). Der niedrige Kontaktwinkel des PFD weist auf einen fluorophilen Charakter der beschichteten Oberflächen hin.

Schichtdicke:

Zur Ermittlung der Dicke der abgeschiedenen Schicht wurde ein AFM eingesetzt (s. Kapitel 4.4.2). Zunächst wurde ein Glas-Slide mit den entsprechenden Parametern beschichtet und anschließend die aufgebraute C_4F_8 -Schicht mit einem Skalpell gezielt abgetragen. Die so entstandene Fehlstelle wurde danach topografisch charakterisiert. Die Messung erfolgte im Intermittent Contact Mode auf einer Fläche von $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ (s. Abb. 5.3, B).

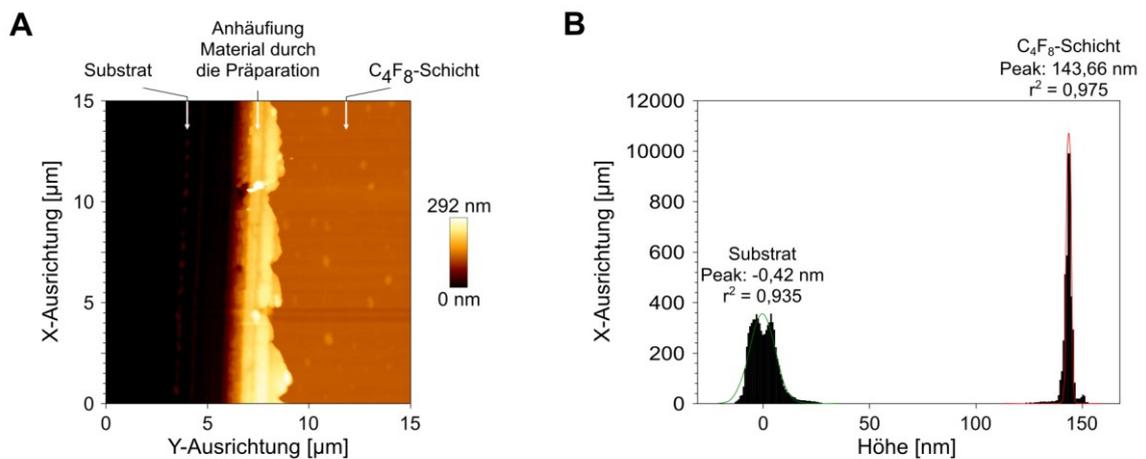


Abb. 5.3: Schichtdickenbestimmung; A – AFM-Aufnahme des Messfensters, B – Histogramm der Messwerte.

Die Methode ermöglicht eine exakte Bestimmung der Schichtdicke. Das aus den Messungen resultierende Histogramm weist eine Schichtdicke auf Glas von 143 nm auf. Diese Ergebnisse sind repräsentativ für alle mit dem Atmosphärendruck-Plasmaverfahren erzeugten Schichten.

5.2 Bestimmung relevanter dimensionsloser Kennzahlen

Eine erste Charakterisierung erfolgte anhand von dimensionslosen Kennzahlen, die für mikrofluidische Prozesse relevant sind. Entsprechend der Systemspezifikationen (s. Kapitel 3, Durchmesser des fluidischen Systems $d_{HK} = 1000 \mu\text{m}$) und der Strömungsbedingungen (Volumenströme der verwendeten Medien sowie deren Stoffeigenschaften (s. S. 83, Tab. 5.7) wurden für die Reynolds-, die Bond-, die Weber-, die Kapillar- und die Euler-Zahl je ein minimaler und ein maximaler Wert bestimmt (s. Tab. 5.3).

Die Werte für die Reynolds-Zahl bestätigen, dass wie erwartet keine Turbulenzen während der Untersuchungen auftreten. Jedoch ist der minimale Wert für die Reynolds-Zahl nicht deutlich kleiner als 1, somit dominiert die viskose Reibungskraft nicht gegenüber der Trägheitskraft. Im Gegensatz zu einer

Vielzahl von mikrofluidischen Anwendungen erfolgt ein Massentransport hierbei nicht ausschließlich über Diffusionsvorgänge. Zudem kann der Einfluss der Trägheitskraft nicht vernachlässigt werden und eine Vereinfachung der Navier-Stokes-Gleichung zur Stokes-Gleichung ist nicht zulässig.

Tab. 5.3: Ermittelte Minimal- und Maximal-Werte aller relevanten dimensionslose Kennzahlen unter Berücksichtigung der untersuchten Medien und der fluidischen Prozessparameter. Die Berechnungen erfolgte in Bezug zu einem Durchmesser des Hauptkanal von $d_{HK} = 1000 \mu\text{m}$.

Kennzahl	Formelzeichen	minimal Wert	maximal Wert
Reynolds-Zahl	Re	0,58	66,56
Bond-Zahl	Bo	0,13	1,01
Weber-Zahl	We	4,66E-04	3,64E-01
Kapillarzahl	Ca	7,13E-05	1,74E-02
Euler-Zahl	Eu	812	51151

Obwohl die in dieser Arbeit eingesetzten FMS mit einem Kanaldurchmesser von $1000 \mu\text{m}$ für Mikrosysteme verhältnismäßig große Dimensionen aufweisen, sind die Werte für die Bond-Zahl nicht wesentlich größer als 1. Der Einfluss der Gravitation kann jedoch durch die relativ große Differenz der Dichten zwischen der dispersen Phase (z.B. Wasser, $\rho = 997 \text{ kg/m}^3$, $Bo = 0,13$) und der kontinuierlichen Phase (PFD, $\rho = 1930 \text{ kg/m}^3$, $Bo = 1,01$) nicht vollständig vernachlässigt werden. Die Gravitation hat einen Einfluss auf die Form eines im Mikrokanal befindlichen, unbewegten Tropfens.

Die Werte für die Weber-Zahl sind bei niedrigen Volumenströmen (Minimal-Wert) deutlich kleiner als 1. In diesem Fall werden die strömenden Tropfen nicht durch den Einfluss der Trägheitskraft deformiert, da die Oberflächenkraft dominiert. Die Tropfen bilden eine Form minimaler Oberfläche. Mit der Erhöhung der Volumenströme strebt die Weber-Zahl gegen 1, der Einfluss der Trägheitskraft steigt und der Tropfen wird im Strömungsfeld deformiert.

Gleiches gilt für die Kapillar-Zahl, die bei niedrigen Volumenströmen (Minimal-Wert) ebenfalls deutlich unter 1 liegt. Die Oberflächenkräfte dominieren gegenüber den Reibungskräften. Bei höheren Volumenströmen erfolgt eine Verformung des Tropfens unter dem Einfluss der Reibungskraft.

Zudem zeigen die Werte für die Weberzahl und die Kapillarzahl, dass der Einfluss der Trägheitskraft auf die Tropfenform größer ist als der Einfluss der Reibungskraft.

Die Werte für die Euler-Zahl zeigen, dass, hervorgerufen durch den relativ großen Kanaldurchmesser ($d_{HK} = 1000 \mu\text{m}$) in Bezug zu einer Vielzahl von tropfenbasierten mikrofluidischen Anwendungen aus der Literatur, die Druckverluste bei den hier beschriebenen Anwendungen moderat ausfallen.

5.3 Numerische Simulation

In einem zweiten Schritt erfolgt eine Charakterisierung der Tropfengenerierung auf der Basis numerischer Simulationen mittels COMSOL Multiphysics®. Die Simulation der Tropfengenerierung wurde anhand eines FMS mit einem Kanalkreuz, bestehend aus zwei Seitenkanälen im 90° Winkel zum Hauptkanal, durchgeführt. Die numerischen Berechnungen basieren auf einem 2D-Modell des FMS.

Die Dimensionen der Kanäle entsprechen denen der in dieser Arbeit untersuchten FMS ($d_{HK} = 1000 \mu\text{m}$, $d_{SK} = 300 \mu\text{m}$). Der Fokus der Untersuchungen lag auf der Tropfengenerierung und den hierbei auftretenden Strömungen und Druckverhältnissen im FMS.

Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Level-Set-Methode (s. (Gl. 5.1)).

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \phi = \gamma \nabla \cdot \left(\varepsilon_s \nabla \phi - \phi(1-\phi) \frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) \quad (\text{Gl. 5.1})$$

Die Gleichung beinhaltet die Level-Set-Funktion ϕ , die Strömungsgeschwindigkeit \mathbf{v} sowie die parameterbestimmende Grenzflächendicke ε_s und den Reinitialisierungsparameter γ , die als numerische Stabilisierungsfaktoren eingesetzt werden.

Mit der Level-Set-Methode können bewegte Objekte (hier die strömenden Tropfen) verfolgt werden. Die Level-Set-Methode verwendet hierfür ein festes Netz (Mesh) und die Lösung der Gleichung ermöglicht die Berechnung der Grenzflächenbewegung.

Die Charakterisierung der beteiligten Fluide erfolgt über die Dichte ρ , die dynamische Viskosität μ und die Grenzflächenspannung γ zwischen den Fluiden.

Die Dichte und die dynamische Viskosität der Fluide werden über die Level-Set-Funktion ϕ nach den Gleichungen (Gl. 5.2) und (Gl. 5.3) gewichtet.

$$\rho = \rho_1 + (\rho_2 - \rho_1) \cdot \phi \quad (\text{Gl. 5.2})$$

$$\mu = \mu_1 + (\mu_2 - \mu_1) \cdot \phi \quad (\text{Gl. 5.3})$$

Hierbei bezeichnet der Index **1** die kontinuierliche und Index **2** die disperse Phase. Für das Modell wurde als kontinuierliche Phase PFD und als disperse Phase DMEM definiert (s. S. 83, Tab. 5.7). Das Modell berechnet die Tropfengenerierung bei einer PFD-Förderrate von $Q_k = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ und einer DMEM-Förderrate von $Q_d = 200 \mu\text{l}/\text{min}$.

Die Charakterisierung der Kanaloberfläche erfolgte unter der Annahme einer befeuchteten Wand ohne Slip-Stick Verhalten. Der genaue Aufbau und die spezifischen Randbedingungen des Modells sind im Anhang (s. Anhang A.1) aufgeführt.

Tropfenbildung:

Die Tropfengenerierung ist ein hoch dynamischer Prozess. Hiermit ist gemeint, dass sich die Strömungen der beteiligten Phasen kontinuierlich beeinflussen - nichts ist statisch. Der gesamte Bereich der Tropfengenerierungszone (s. Abb. 5.4, 1) befindet sich aus strömungstechnischer Sicht in einem stetigen Wandel. Betrachtet man im Gegensatz dazu eine normale Kanalverengung nach dem Kontinuitätsgesetz, so ist bekannt, dass bei einem gegebenen Volumenstrom die Strömungsgeschwindigkeit in einer Verengung ansteigt, während der Druck sinkt (Bernoulli-Effekt). Diese Betrachtung erfolgt unter der Annahme, dass die geometrische Anordnung der Verengung unveränderlich ist. Bei den hier untersuchten FMS gilt diese Annahme für die Anordnung der Tropfengenerierungszone ebenfalls, jedoch resultiert aus den Strömungen der nicht mischbaren Phasen eine ständige Veränderung der einzelnen Strömungskorridore (s. Abb. 5.4, 3 und 4). Der Raum, der der kontinuierlichen

Phase während der Tropfengenerierung zur Verfügung steht, wird mit der Bildung eines Tropfens im Kanal zunehmend kleiner (s. Abb. 5.4, 4). Das Kontinuitätsgesetz hat weiterhin seine Gültigkeit, jedoch sind die entscheidenden Querschnitte abweichend vom Kontinuitätsgesetz einer ständigen Änderung unterworfen.

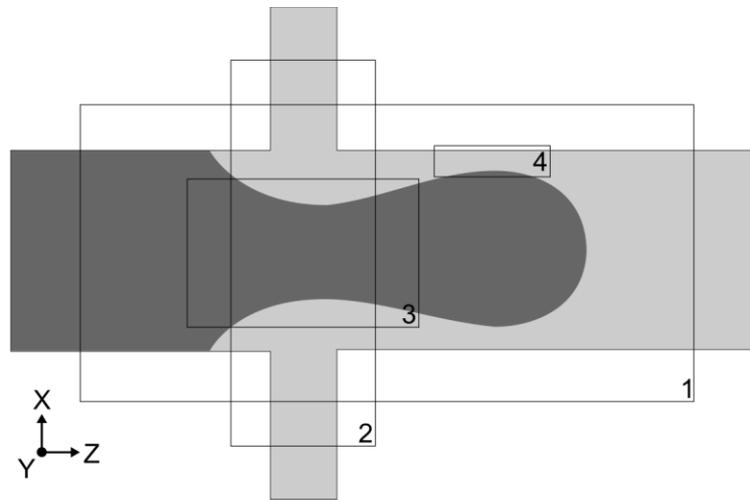


Abb. 5.4: Zuweisung der unterschiedlichen Zonen bei der Tropfengenerierung; 1: Tropfengenerierungszone; 2: Kanalkreuz; 3: Verbindung zwischen dem sich bildenden Tropfen und der dispersen Phase vor dem Kanalkreuz; 4: Strömungskorridor der kontinuierlichen Phase um den sich bildenden Tropfen.

Darüber hinaus hat die Anordnung der Kanalkreuzung (s. Abb. 5.4, 2), an der die kontinuierliche Phase auf die disperse Phase trifft, einen entscheidenden Einfluss auf die Tropfenbildung und auf deren Reproduzierbarkeit. Es ist bekannt, dass die Volumenströme der kontinuierlichen und dispersen Phase das Tropfenvolumen beeinflussen (s. Kapitel 5.4.3). Sind die Volumenströme der beteiligten Phasen konstant und der Tropfenabriss erfolgt in einem engen Zeitintervall, weisen die Tropfenvolumina eine hohe Reproduzierbarkeit auf.

Im Weiteren muss bei der Tropfengenerierung der Einfluss der Oberflächen berücksichtigt werden. Bei den kleinen Dimensionen mikrofluidischer Systeme kommt Oberflächeneffekten eine große Bedeutung für das Strömungsverhalten zu. Die Tropfengenerierung erfolgt unter laminaren Bedingungen, jedoch fällt der Einfluss oberflächennaher Wechselwirkungen durch die Miniaturisierung stärker ins Gewicht als bei makroskopischen Systemen.

Nachfolgend wird der Tropfengenerierungsprozess anhand numerischer Untersuchungen genauer beschrieben. Hierfür wird der Prozess in vier Phasen unterteilt. Die Beschreibung der einzelnen Phasen erfolgt anhand der Volumenanteile der dispersen und kontinuierlichen Phase sowie deren Strömungen (Ansicht A). Zudem erfolgt die Beschreibung anhand des Druckes im Bereich der Tropfengenerierungszone (Ansicht B).

- Ansicht A: Farbskala der Volumenanteile der dispersen Phase (rot) und der kontinuierlichen Phase (blau). Die resultierenden Strömungsvektoren werden durch weiße Pfeile dargestellt. Die Länge und Größe entspricht hierbei dem Betrag der Vektoren.
- Ansicht B: Farbskala des Druckes im FMS (rot = 50 Pa, blau = 0 Pa).

Phase 1:

Die Beschreibung der ersten Phase beginnt nach einem zuvor erfolgten Tropfenabriss. Zu diesem Zeitpunkt hat der Tropfen die Generierungszone verlassen und strömt zum Ausgang des FMS. Die disperse Phase wird durch den Hauptkanal (s. Abb. 5.5, A, in z-Richtung, von links) mit einem konstanten Volumenstrom ($Q_d = 200 \mu\text{l}/\text{min}$) in die Tropfengenerierungszone gefördert. Die Einleitung der kontinuierlichen Phase erfolgt durch die zwei gegenüberliegenden, um 90° zum Hauptkanal versetzten Seitenkanäle (s. Abb. 5.5, A, in x-Richtung von oben und unten) ebenfalls mit konstanten Volumenströmen (pro Kanal $Q_k = 250 \mu\text{l}/\text{min}$). Durch die räumliche Anordnung der Seitenkanäle vollzieht die kontinuierliche Phase eine entsprechende Richtungsänderung, um zum Ausgang des FMS (s. Abb. 5.5, A, in z-Richtung, nach rechts) zu strömen. Die Grenzfläche zwischen der dispersen und der kontinuierlichen Phase hat sich nach dem vorherigen Tropfenabriss bis zum Kanalkreuz zurückgezogen (s. Abb. 5.5, A). Da die Einleitung der kontinuierlichen Phase in die Tropfengenerierungszone mit höheren Volumenströmen und über kleinere Kanalquerschnitte erfolgt, ist die Strömungsgeschwindigkeit der kontinuierlichen Phase ($v_m = 29,47 \text{ mm}/\text{s}$ pro Seitenkanal) deutlich höher als die der dispersen Phase ($v_m = 1,06 \text{ mm}/\text{s}$). An der Grenzfläche der beiden Phasen (s. Abb. 5.5, A1) induzieren die gegenläufigen Strömungen der kontinuierlichen Phase eine Zirkulation in der dispersen Phase (s. Abb. 5.5, A2). Auf Grund der gegenläufigen Strömungsvektoren der kontinuierlichen Phase aus den gegenüberliegenden Seitenkanälen (s. Abb. 5.5, A1) erfolgt die Zirkulation innerhalb der dispersen Phase von Richtung der Seitenkanäle ins Zentrum des Hauptkanals (s. Abb. 5.5, A2) [145].

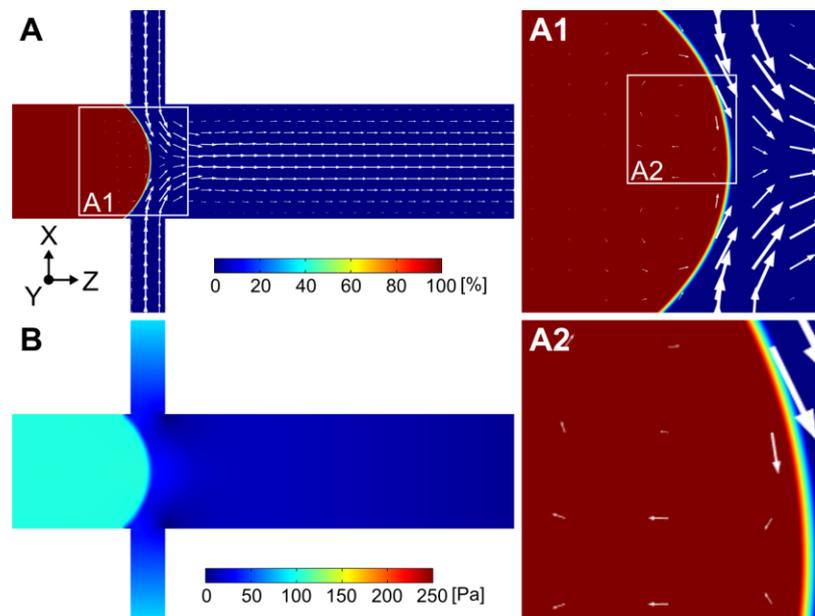


Abb. 5.5: Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000 \mu\text{m}$, $d_{SK} = 300 \mu\text{m}$) zum Beginn der Tropfenbildung (Phase 1) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFD) von $Q_k = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200 \mu\text{l}/\text{min}$, A - COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFD, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile); A1 – Detailansicht der Grenzflächenströmungen; A2 – Detailansicht der Strömungen in der dispersen Phase; B – COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse.

Hinsichtlich des Druckes liegt im Bereich der Tropfengenerierungszone kein signifikanter Gradient vor (s. Abb. 5.5, B). Lediglich innerhalb der dispersen Phase herrscht ein erhöhter Druck, da die kontinuierliche Phase der Strömung der dispersen Phase einen Widerstand entgegensetzt.

Phase 2:

Durch die fortwährende Einleitung der dispersen Phase strömt diese über das Kanalkreuz hinaus und weiter in den Hauptkanal (s. Abb. 5.6, A). Hinter dem Kanalkreuz bildet die disperse Phase unter dem Einfluss der Oberflächenspannung eine tropfenförmige Kontur (ein Volumen minimaler Oberfläche). Die kontinuierliche Phase muss um die disperse Phase herumströmen. Durch die Ausbreitung der dispersen Phase verringert sich der Strömungskorridor für die kontinuierliche Phase (s. Abb. 5.6, A1, oben und unten). Folglich erhöht sich die Strömungsgeschwindigkeit (s. Abb. 5.6, A1) der kontinuierlichen Phase und der Druck vor der Verengung steigt (s. Abb. 5.6, B). Die Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit im Korridor um den sich bildenden Tropfen führt zu einer Verstärkung der Zirkulation innerhalb der dispersen Phase (s. Abb. 5.6, A1). Zudem führt die Strömung der kontinuierlichen Phase von den Seitenkanälen in die Tropfengenerierungszone (s. Abb. 5.6, A) aufgrund des daraus resultierenden Druckes (s. Abb. 5.6, B und B1) zur Einschnürung der Verbindung der dispersen Phase vor und hinter dem Kanalkreuz (s. Abb. 5.6, A).

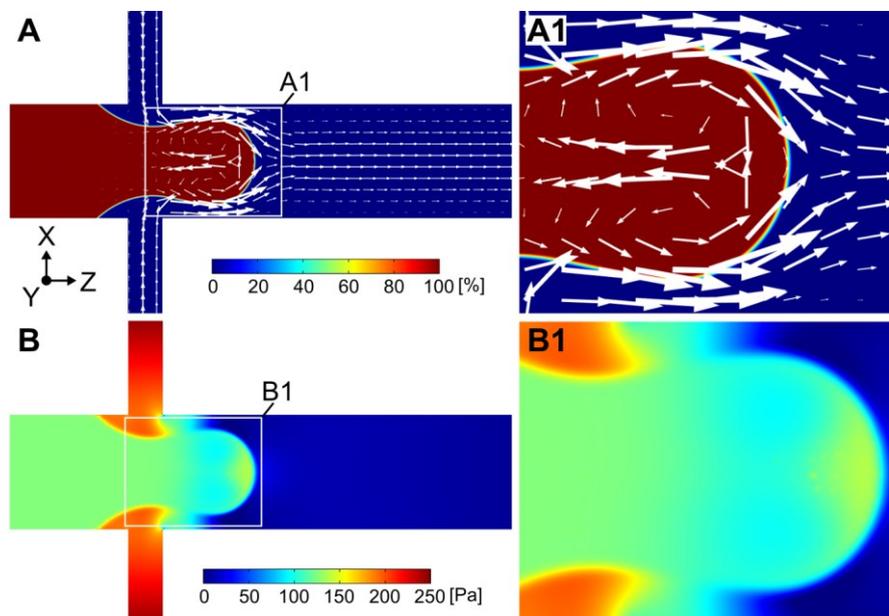


Abb. 5.6: Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000\mu\text{m}$, $d_{SK} = 300\mu\text{m}$) zum Beginn der Tropfenbildung (Phase 2) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFM) von $Q_k = 1000\ \mu\text{l}/\text{min}$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200\ \mu\text{l}/\text{min}$, A - COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFM, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile) ; A1 – Detailansicht der Grenzflächenströmungen; B - COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse; B1 – Detailansicht der Druckverhältnisse an der Grenzfläche des sich bildenden Tropfens.

Phase 3:

Durch die weitere Einleitung der dispersen Phase vergrößert sich die Tropfenkontur hinter dem Kanalkreuz (s. Abb. 5.7, A). Die Ausbreitung des sich bildenden Tropfens verengt den Strömungskorridor der kontinuierlichen Phase zunehmend. Infolgedessen erhöht sich die Strömungsgeschwindigkeit der kontinuierlichen Phase an der Verengung (s. Abb. 5.7, A). Der sich bildende Tropfen dringt weiter in den Hauptkanal vor und dehnt sich in Strömungsrichtung aus. Hierdurch verlängert sich der Strömungskorridor der kontinuierlichen Phase um den sich bildenden Tropfen (s. Abb. 5.7, A). Der durch die Einleitung der kontinuierlichen Phase auf die Verbindung der dispersen Phase wirkende Druck verringert sich, da der Raum, der der kontinuierlichen Phase zur Verfügung steht, durch die Verengung

der Verbindung zunimmt (s. Abb. 5.7, B). Der geringere Druck wirkt hierbei jedoch auf eine größere Fläche (Kraft = Druck x Fläche). Es beginnt ein Wettstreit zwischen der Kohäsion, die die disperse Phase zusammenhält, und der Oberflächenspannung, die bewirkt, dass der sich bildende Tropfen eine minimale Oberfläche im Verhältnis zum Volumen einnimmt. Die Wirkung der Kohäsion wird durch die Verengung der Verbindung gemindert und die Oberflächenspannung gewinnt an Dominanz.

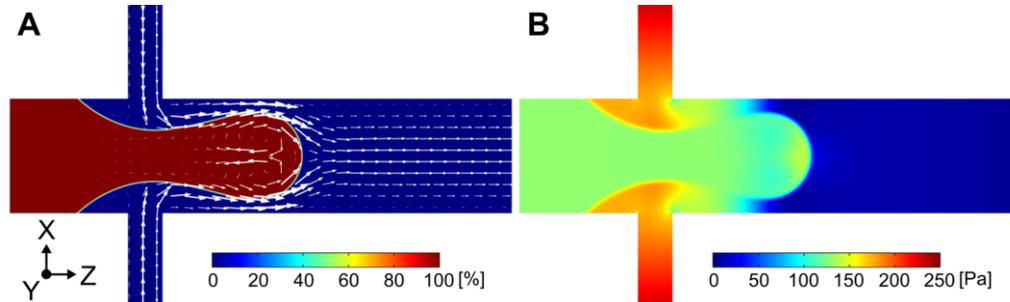


Abb. 5.7: Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000\mu\text{m}$, $d_{SK} = 300\mu\text{m}$) während der Tropfenbildung (Phase 3) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFD) von $Q_k = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200 \mu\text{l}/\text{min}$, A – COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFD, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile); B – COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse.

Phase 4:

Durch die beschriebenen Effekte gewinnt die Oberflächenspannung letztendlich die Oberhand über die Kohäsion und die Verbindung zwischen dem sich bildenden Tropfen und der dispersen Phase vor dem Kanalkreuz reißt ab. Durch die Oberflächenspannung formt sich ein Tropfen, der in Bezug auf sein Volumen eine minimale Oberfläche aufweist. Ist der gebildete Tropfen bezüglich seines Durchmessers größer als der Kanal, ist die Form der minimalen Oberfläche ein Zylinder mit konvexen Enden (s. Abb. 5.8, A und A1).

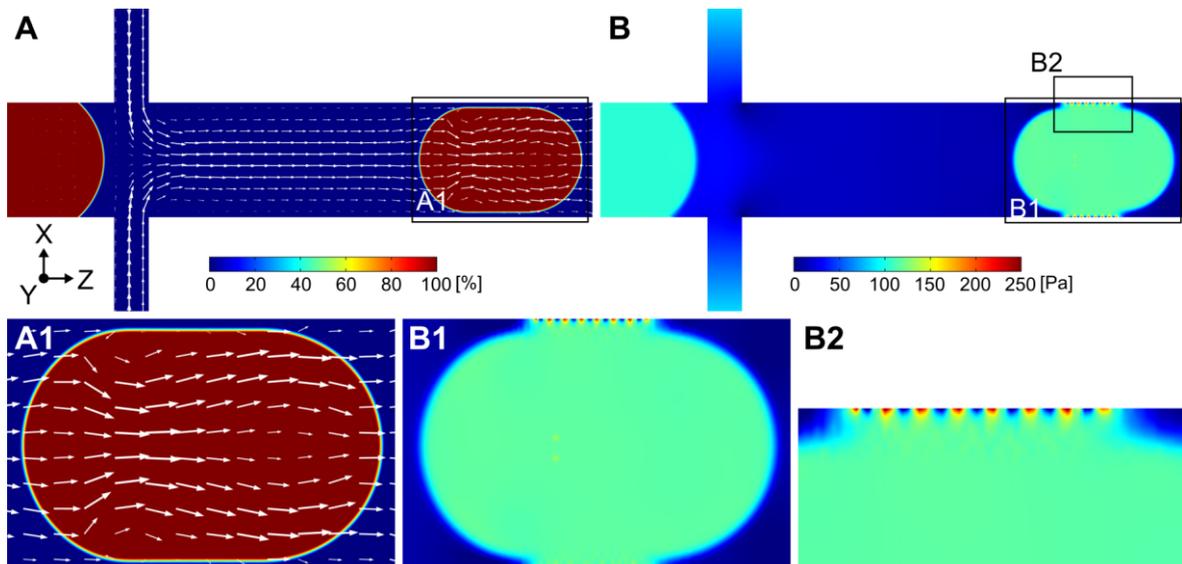


Abb. 5.8: Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000\mu\text{m}$, $d_{SK} = 300\mu\text{m}$) nach der Tropfenbildung (Phase 4) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFD) von $Q_k = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200 \mu\text{l}/\text{min}$, A - COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFD, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile) ; A1 – Detailansicht des gebildeten Tropfens ; B – COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse im FMS; B1 und B2 – Detailansicht der Druckverhältnisse zwischen Grenzfläche des Tropfens und der Kanaloberfläche.

Der durch die Krümmung der Oberfläche hervorgerufene Laplace-Druck innerhalb des Tropfens und das Bestreben der Oberflächenspannung diese zu minimieren führen zu einem Druck auf den Film der kontinuierlichen Phase an der Kanaloberfläche (s. Abb. 5.8, B). Dieser Druck wird über den Film der kontinuierlichen Phase auf die Kanaloberfläche übertragen (s. Abb. 5.8, B1 und B2). Aus dieser Beschreibung wird ersichtlich, welche Effekte für die Tropfenbildung relevant sind.

5.4 Charakterisierung der Tropfengenerierung

Um die Reproduzierbarkeit beurteilen und relevante Einflussgrößen charakterisieren zu können, wurden umfangreiche mikrofluidische Untersuchungen durchgeführt. Im Vordergrund stand in diesem Abschnitt der Einfluss der Volumenströme der eingesetzten Fluide und der Einfluss der Kanalordnung (FMS-Design) auf die Tropfengenerierung. Zudem lag das Augenmerk auf der Beständigkeit der Beschichtung.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit mikrofluidischer Verfahren ist es erforderlich, vergleichbare Untersuchungen durchführen zu können. Soll ein Parameter identifiziert werden, darf nur dieser durch die Variation einer Komponente beeinflusst werden. Insbesondere für solche Untersuchungen ist die entwickelte Plattform prädestiniert. Durch die definierten Abstände der Baugruppen zueinander und den modularen Aufbau können die erforderlichen Voraussetzungen für vergleichende Untersuchungen garantiert werden.

FMS-Design:

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit in Abhängigkeit zur Kanalordnung wurden fünf FMS-Designs entwickelt und untersucht (s. Abb. 5.9, 1-5). Die Entwürfe unterscheiden sich in der Art der Tropfengenerierung. Die Entwürfe umfassten sowohl Änderungen der Anzahl der Seitenkanäle als auch der Winkel, mit denen die kontinuierliche Phase in die Tropfengenerierungszone eingeleitet wird.

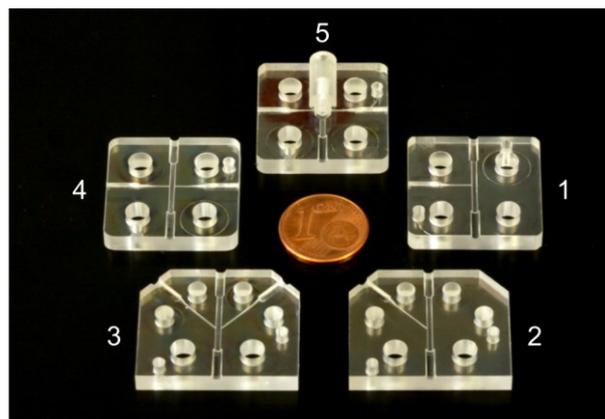


Abb. 5.9: Photographie der fünf untersuchten FMS-Designs zur Tropfengenerierung; engl.: 1 und 2 Junction; 3 bis 5 Flow – Focusing.

Zwei der fünf FMS weisen einen Seitenkanal oder zwei Seitenkanäle im 45° Winkel zum Hauptkanal auf (s. Abb. 5.9, 2 und 3), die übrigen drei FMS (s. Abb. 5.9, 1, 4 und 5) einen oder zwei Seitenkanäle im 90° Winkel. Zwei FMS (s. Abb. 5.9, 1 und 2) verfügen über einen Seitenkanal, drei FMS (s. Abb. 5.9,

3, 4 und 5) über zwei Seitenkanäle. Bei allen FMS zur Tropfengenerierung sind die Seitenkanäle mittig zur Länge des Hauptkanals angeordnet.

Die FMS (s. Abb. 5.9, 1, 2, 3 und 4) werden aus einem Boden- und einem Deckelement gebildet. Die fünfte FMS-Variante (s. Abb. 5.9, 5) benötigt ein Kegelelement (s. Abb. 5.10) als weitere Komponente zur Tropfengenerierung.

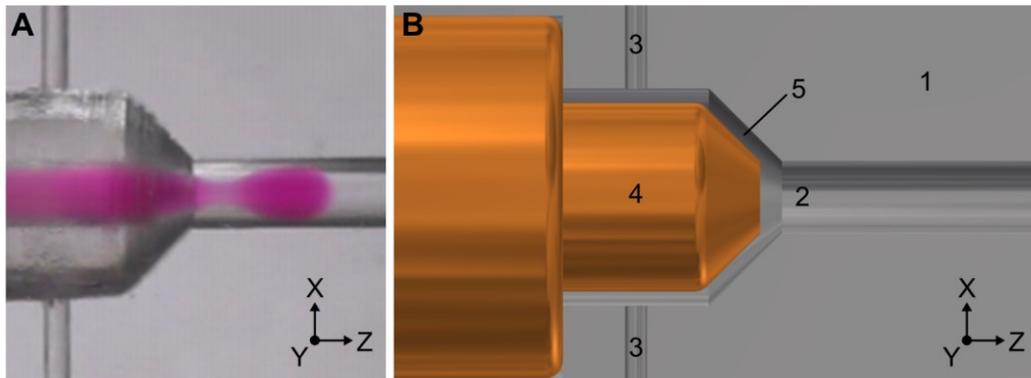
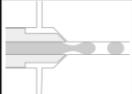


Abb. 5.10: Fünftes FMS-Design; engl.:3D Flow – Focusing; A – Photographie der Tropfengenerierung mit PFD (farblos, $Q_k = 250\mu\text{l}/\text{min}$) und DMEM (rot, $Q_d = 50\mu\text{l}/\text{min}$); B – Detaildarstellung (3D-Modell), 1: Bodenelement des FMS, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Kegelelement, 5: Ringspalt.

Durch die Montage der FMS-Elemente (Boden/Deckel) mit dem Kegelelement bildet sich an der Tropfengenerierungszone ein im Winkel von 45° zum Hauptkanal ausgerichteter, 360° umspannender Ringspalt (s. Abb. 5.10, A5) aus. Hierdurch wird eine den Hauptkanal vollständig umspannende Einleitung des Separationsmediums in die Tropfengenerierungszone ermöglicht. Der Spalt weist im montierten Zustand am Übergang zum Hauptkanal eine Breite von $300\mu\text{m}$ auf. Durch diese Ausführung des Überganges erfolgt die Tropfengenerierung bei diesem FMS als sogenanntes 3D Flow-Focusing. Die Breite des Ringspalt (I_{RS}) von $300\mu\text{m}$ wurde so gewählt, dass die Einleitung des Separationsmediums von den Dimensionen vergleichbar ist mit denen der übrigen FMS. Dieser Ansatz wurde gewählt, um bei der Ermittlung von Einflussgrößen nur einen Unterschied in der Art der Einleitung hervorzurufen.

Nachfolgend sind die geometrischen Spezifikationen der fünf FMS aufgeführt. Zudem werden den Systemen Bezeichnungen zugewiesen, die sich aus der Art der Tropfengenerierung ergeben (s. Tab. 5.4). Bei allen FMS-Designs wurde der Hauptkanal verwendet, um die wässrigen Proben (disperse Phase) zur Tropfengenerierungszone zu leiten. Die Tropfengenerierung mit den fünf FMS unterscheidet sich somit nur bezüglich der Einleitung der kontinuierlichen Phase (45° oder 90° , einen Seitenkanal, zwei Seitenkanäle oder ein Ringspalt). Abschließend wird angemerkt, dass beim fünften FMS (s. Abb. 5.10) die Seitenkanäle (s. Abb. 5.10, B3) im 90° Winkel zum Hauptkanal (s. Abb. 5.10, B2) ausgerichtet sind, die Einleitung der kontinuierlichen Phase durch das Kegelelement (s. Abb. 5.10, B4) jedoch über den Ringspalt (s. Abb. 5.10, B5) im 45° Winkel erfolgt.

Tab. 5.4: Kennzeichnung der untersuchte FMS-Designs.

FMS Nr.	Beschreibung	Dimension	Bezeichnung	Referenz	Piktogramm
1	ein 90° Seitenkanal	1D (junction)	1D 90° FMS	Abb. 5.7, Nr. 1	
2	ein 45° Seitenkanal	1D (junction)	1D 45° FMS	Abb. 5.7, Nr. 2	
3	zwei 90° Seitenkanäle	2D (flow-focusing)	2D 90° FMS	Abb. 5.7, Nr. 3	
4	zwei 45° Seitenkanäle	2D (flow-focusing)	2D 45° FMS	Abb. 5.7, Nr. 4	
5	zwei 90° Seitenkanäle auf einen 45° Ringspalt	3D (flow-focusing)	3D 45° FMS	Abb. 5.7, Nr. 5	

Regime zur Ermittlung des Einflusses des FMS-Designs und der Förderraten auf die Tropfengenerierung:

Zur Gewährleistung standardisierter Bedingungen wurde eine einheitliche Versuchsreihe definiert, die nachfolgend beschrieben wird: Es wurde je eine Versuchsreihe mit den verschiedenen FMS-Designs zur Tropfengenerierung durchgeführt. Durch die Gegenüberstellung der Ergebnisse wird der Einfluss der Standzeit, des FMS-Designs und der Förderraten auf die Reproduzierbarkeit und auf die Beständigkeit der Beschichtung charakterisiert.

Die Untersuchungen erfolgten mit der mikrofluidischen Plattform in der aufgeführten Anordnung (s. Kapitel 3). Jedes der zu untersuchenden FMS wurde mit dem beschriebenen Atmosphärendruck-Plasmaverfahren beschichtet (s. Kapitel 4.1.1). Zu Beginn einer Versuchsreihe wurde das entsprechende FMS an der vorgesehenen Position in die Plattform integriert (s. S. 26, Abb. 3.2, A2) und die gesamte Plattform mit PFD befüllt. Zur Gewährleistung identischer Versuchsbedingungen wurde die Plattform für eine definierte Zeitspanne von mindestens 2 h mit PFD konditioniert.

Zur Ermittlung des Einflusses der Förderraten auf die Tropfengenerierung wurden unterschiedliche Förderratenverhältnisse zwischen der kontinuierlichen und der dispersen Phase festgelegt. Hierfür erfolgten die Untersuchungen bei drei verschiedenen Förderraten der kontinuierlichen Phase Q_k von 250, 500 und 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ und je drei unterschiedlichen Förderratenverhältnissen zur dispersen Phase Q_d von 10/1, 5/1, und 2,5/1. Somit wurden mit jedem FMS neun Förderratenkombinationen untersucht. Um die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung in Abhängigkeit zu den Förderraten zu untersuchen, wurden Experimente mit den neun Kombinationen in einer definierten Reihenfolge durchgeführt. Die Experimente mit den neun Kombination, die den 1. Lauf darstellen, begannen mit der Förderratenkombination 250/25 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Q_k/Q_d) und endeten mit der Kombination 1000/400 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Q_k/Q_d) (s. Tab. 5.5).

Um die Reproduzierbarkeit zweier identischer Förderratenkombinationen, die zeitlich aufeinander folgen, beurteilen zu können, wurden exemplarisch die Läufe mit einem Förderratenverhältnis von

5/1 direkt nacheinander wiederholt, welche dem 2. Lauf zugeordnet werden. Folglich wurden im Rahmen der zwei Läufe zwölf Experimente mit demselben FMS durchgeführt. Diese Experimente werden der 1. Serie zugeordnet. Um eine zeitliche Veränderung der Beschichtungseigenschaft über einen längeren Zeitraum zu berücksichtigen und deren Stabilität zu untersuchen, wurde die beschriebene Abfolge der Experimente nach der Beendigung der 1. Serie in ihrer Gesamtheit wiederholt. Die Wiederholung aller Läufe der 1. Serie bildet die 2. Serie und beinhaltet den 3. und 4. Lauf. Der Zeitverzug zwischen der 1. und der 2. Serie betrug ca. 48 h. Im Rahmen einer Versuchsreihe wurden so über mehrere Tage insgesamt 24 Experimente (24 Läufe) mit jedem FMS durchgeführt (s. Tab. 5.5). In den Zeiträumen zwischen den Experimenten wurde das fluidische System vollständig mit der kontinuierlichen Phase PFD gefüllt.

Tab. 5.5: Regime zur Untersuchungen der Tropfengenerierung.

Förderraten- verhältnis Q_k / Q_d	Serie 1				Serie 2		Experiment Nr.
	Experiment Nr.	1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf	4. Lauf		
		Förderraten- Kombination Q_k / Q_d	Förderraten- Kombination Q_k / Q_d	Förderraten- Kombination Q_k / Q_d	Förderraten- Kombination Q_k / Q_d		
10 / 1	1	250 / 25		250 / 25		13	
5 / 1	2 - 3	250 / 50	250 / 50	250 / 50	250 / 50	14 - 15	
2.5 / 1	4	250 / 100		250 / 100		16	
10 / 1	5	500 / 50		500 / 50		17	
5 / 1	6 - 7	500 / 100	500 / 100	500 / 100	500 / 100	18 - 19	
2.5 / 1	8	500 / 200		500 / 200		20	
10 / 1	9	1000 / 100		1000 / 100		21	
5 / 1	10 - 11	1000 / 200	1000 / 200	1000 / 200	1000 / 200	22 - 23	
2.5 / 1	12	1000 / 400		1000 / 400		24	
	Abweichung	Einzellauf	Einzellauf	Einzellauf	Einzellauf		
		Kurzzeit		Kurzzeit			
		Langzeit					

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung in Abhängigkeit von der Standzeit wurden drei unterschiedliche zeitabhängige Standardabweichungen definiert:

1. Einzellaufabweichung (Standardabweichung für einen einzelnen Lauf, ein Experiment)
2. Kurzzeitabweichung (Standardabweichung für zwei direkt aufeinanderfolgende Läufe mit der gleichen Förderratenkombination und einem Förderratenverhältnis von 5/1, Standardabweichung über den 1. und 2. sowie den 3. und 4. Lauf)
3. Langzeitabweichung (Standardabweichung über alle vier Läufe (Experimente der 1. Serie und 2. Serie) mit der gleichen Förderratenkombination)

Die Beurteilung der Reproduzierbarkeit erfolgte anhand der durchschnittlich generierten Tropfenvolumina und auf der Basis des prozentualen Variationskoeffizienten (VK-Wert). Die aufgeführte Vorgehensweise ermöglicht eine vielfältige Beurteilung der Einflüsse auf die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung und die Stabilität der Beschichtung. Bei jeder Versuchsreihe wurden die Läufe entsprechend der Reihenfolge der Experiment-Nr. nacheinander untersucht.

Um eine ausreichend hohe Anzahl an Tropfen in die Bewertung aufnehmen zu können, wurde für die Läufe mit einer niedrigen Förderrate der kontinuierlichen Phase (z.B. bei $Q_k = 250 \mu\text{l}/\text{min}$) eine minimale Laufzeit für den entsprechenden Lauf von 17 min festgelegt. Bei höheren Förderraten wurde die Laufzeit auf einen Minimalwert von 9 min reduziert. Diese Vorgehensweise war dem zeitlichen Aufwand und dem Medienverbrauch geschuldet. In Abhängigkeit von den Förderratenkombinationen und dem FMS-Design wurden während der Laufzeit eines Experimentes ca. 390 bis 4850 Tropfen generiert. Während einer Versuchsreihe (Dauer ca. 4 Tage) wurden mit jedem der untersuchten FMS durchschnittlich ca. 6 h Tropfen generiert. Die Gestaltung der Versuchsdurchführung orientierte sich an vergleichbaren Untersuchungen aus der Literatur [159-163]. Jedoch wurden die Kanalquerschnitte und die Förderraten an die Bedürfnisse scherkraftempfindlicher Zellkulturen angepasst.

Alle Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses der Standzeit, des FMS-Designs und der Förderraten wurden mit DMEM der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Produkt Nummer D5523) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein standardisiertes Nährmedium in der Zellkulturtechnik, welches häufig zur Zellkultivierung eingesetzt wird. Es enthält eine Vielzahl von Inhaltsstoffen, wie anorganische Salze, Vitamine, Aminosäuren und Natriumpyruvat. Dem Nährmedium wurden zusätzlich 5 g/l D-Glucose, 2 mmol/l L-Glutamin, 1% v/v eines Antibiotikagemisches aus Penicillin und Streptomycin sowie 10 % v/v fetales Kälberserum (FBS) und 0,1%(v/v) Phenolrot zugesetzt. Durch die Zusammensetzung stellt DMEM ein überaus anspruchsvolles Probenmedium für mikrofluidische Verfahren dar. Für die Untersuchungen zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurde nur zellfreies DMEM eingesetzt. Nach Abschluss einer vollständigen Versuchsreihe mit einem FMS wurden alle Schläuche, die mit dem DMEM in Kontakt kamen, gewechselt und das nächste FMS untersucht.

5.4.1 Einfluss der Standzeit

Zunächst erfolgt die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung und der Stabilität der Beschichtung anhand des Einflusses, den die Standzeit der FMS auf die Tropfengenerierung ausübt. Repräsentativ für alle durchgeführten Versuchsreihen werden die Ergebnisse mit dem 1D 45° und dem 2D 90° FMS verglichen. Zur Veranschaulichung wurden die während eines Laufes generierten Topfenvolumina gemittelt und den zugehörigen Standardabweichungen der einzelnen Läufe (Einzellaufverhalten) gegenübergestellt (s. Abb. 5.11). Zur Beurteilung sind die Ergebnisse aller Läufe mit den Förderratenkombinationen von 250/50, 500/100 und 1000/200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (je ein Block im Diagramm) aufgetragen. Das entspricht allen Läufen mit einem Förderratenverhältnis von 5/1. Zur Beurteilung des Einflusses der Standzeit sind die VK-Werte für alle Läufe einer Förderratenkombination (Langzeitabweichung) seitlich an den drei Blöcken aufgetragen.

Zum Verständnis des zeitlichen Ablaufes sei erwähnt, dass die linke Säule im Diagramm (1. Lauf, 250/50) immer den dritten Lauf und die rechte Säule (4. Lauf, 1000/200) den vorletzten Lauf einer Versuchsreihe repräsentieren. Der 1. und 2. sowie der 3. und 4. Lauf eines Blocks (z.B. bei der Förderratenkombination von 250/50) wurden direkt hintereinander untersucht (Kurzzeitverhalten). Zwischen den 2. und 3. Lauf erfolgten die weiteren Untersuchungen einer Versuchsreihe, somit die Läufe der übrigen Förderratenkombinationen. Das entspricht je zehn Läufen zwischen der zweiten und

dritten Säule eines Blocks. Hierdurch kann die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung in Bezug zu den verschiedenen Förderraten und der zeitlichen Beständigkeit der Beschichtung analysiert werden.

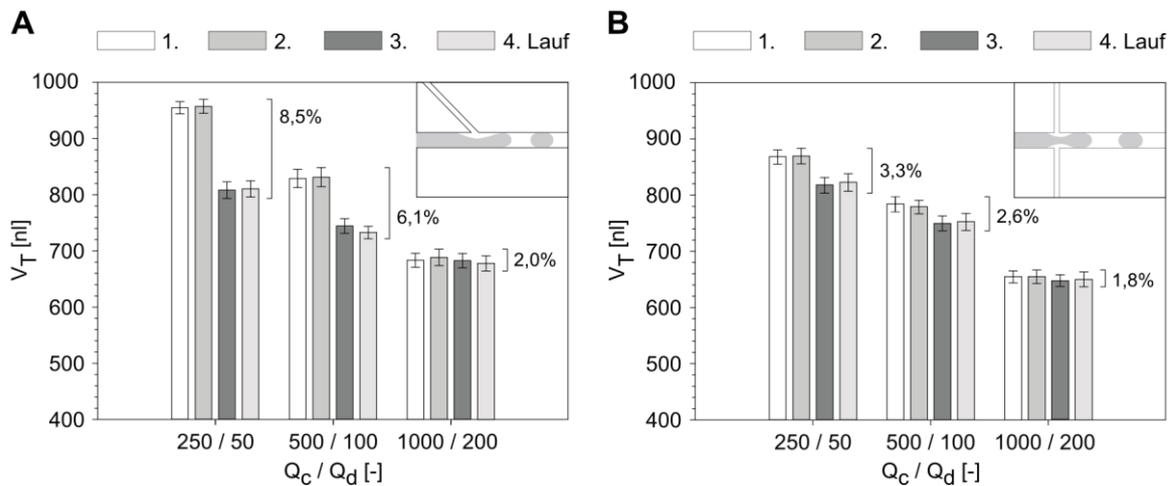


Abb. 5.11: Gegenüberstellung der mittleren Tropfenvolumina und der entsprechenden Standardabweichungen aller Läufe bei den Förderratenkombinationen von 250/50, 500/100 und 1000/200. Für jede Förderratenkombination (je ein Block) sind die VK-Werte für die Langzeitabweichung aufgetragen; A – 1D 45° FMS; B – 2D 90° FMS.

Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Tropfenvolumens:

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass durch eine Erhöhung der Förderraten im gleichen Verhältnis die Volumina der Tropfen signifikant verringert werden. Die Betrachtung der Standardabweichung der einzelnen Läufe (Einzellaufabweichung) zeigen allgemein eine geringe Schwankungsbreite. So lagen die VK-Werte beim 1D 45° FMS in einem Bereich von 1,1 bis 2,1% und beim 2D 90° FMS in einem Bereich von 1,4 bis 2,1 %.

Betrachtet man die Reproduzierbarkeit der direkt aufeinanderfolgenden Läufe (1. und 2. Lauf sowie 3. und 4. Lauf, Kurzzeitabweichung), so weisen diese unabhängig von der Förderratenkombination ebenfalls nur eine geringe Schwankung von 1,2 bis 2,0 % beim 1D 45° FMS und von 1,5 bis 1,9 % beim 2D 90° FMS auf.

Die Reproduzierbarkeit über alle vier Läufe einer Förderratenkombination (Langzeitabweichung) zeigt jedoch merkbare Unterschiede hinsichtlich des Einflusses der Förderraten. Auch ist ein Einfluss des FMS-Designs erkennbar. Es wird ersichtlich, dass sich das mittlere Tropfenvolumen vom 1. und 2. Lauf zum 3. und 4. Lauf bei der Förderratenkombination von 250 / 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ im Mittel beim 1D 45° FMS (s. Abb. 5.11, A) um 8,5 % und beim 2D 90° FMS (s. Abb. 5.11, B) um 3,3 % verringert. Dies sind vor allem beim 1D 45° FMS erhebliche Schwankungen und zeigen, dass keine solide Vergleichbarkeit bei Anwendungen mit diesen Förderraten über einen längeren Zeitraum möglich ist.

Unabhängig vom gewählten FMS zur Tropfengenerierung nimmt die Schwankungsbreite von den niedrigen Förderratenkombinationen (250/50 $\mu\text{L}/\text{min}$) zu den höheren (1000/200 $\mu\text{L}/\text{min}$) ab (s. Abb. 5.11). Allgemein ist die Schwankungsbreite beim 2D 90° FMS deutlich geringer als beim 1D 45° FMS. Betrachtet man die Reproduzierbarkeit aller vier Läufe bei einer Förderratenkombination von 1000/200 $\mu\text{L}/\text{min}$, sind die Schwankungen mit 2,0 % (1D 45° FMS) und 1,8 % (2D 90° FMS) deutlich

geringer. Beide FMS zeigen hierbei eine für analytische Anwendungen vertretbare Schwankungsbreite über einen längeren Zeitraum.

Die Beobachtungen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit lassen sich in Bezug zur Standzeit vom 1D 45° FMS weitestgehend auf die des 1D 90° FMS übertragen, wobei hier die Schwankungen zumeist geringer ausfallen. Das 2D 45° FMS weist zwischen dem 2. und 3. Lauf eine merklich geringere Volumenänderung auf. Betrachtet man hier die Schwankungsbreite der drei Blöcke (250/50, 500/100 und 1000/200 $\mu\text{l}/\text{min}$), liegen diese über alle vier Durchläufe zwischen 2 % bis 2,7 %.

Das 3D 45° FMS hingegen entzieht sich vollständig dem Trend, dass zwischen dem 2. und 3. Lauf eine markante Volumenverringering auftritt. Vielmehr schwankt das mittlere Tropfenvolumen bei allen vier Läufen einer Förderratenkombination um einen gemeinsamen Mittelwert, wobei die Volumenschwankung mit 2,5 % bis 4,7 % stärker ausfällt.

5.4.2 Einfluss des FMS-Design

Der Einfluss der Kanalordnung auf die Tropfengenerierung wird auf der Basis einer Gegenüberstellung der Ergebnisse mit allen fünf FMS-Designs beurteilt. Die Beurteilung des Tropfenvolumens und deren Reproduzierbarkeit erfolgt stellvertretend für alle durchgeführten Untersuchungen anhand der Läufe mit einem Förderratenverhältnis von 5/1.

Schon die Betrachtung der Tropfengenerierung zeigt, welchen Einfluss das FMS-Design auf die Tropfenbildung ausübt (s. Abb. 5.12). Mit der Zunahme der Dimensionen, mit der die kontinuierliche Phase in die Tropfengenerierungszone eingeleitet wird, nimmt das Tropfenvolumen ab. Vor allem beim Vergleich der Tropfengenerierung mit den 1D FMS (s. Abb. 5.12, B1 und B2) und dem 3D FMS (s. Abb. 5.12, B5) wird dieser Zusammenhang ersichtlich.

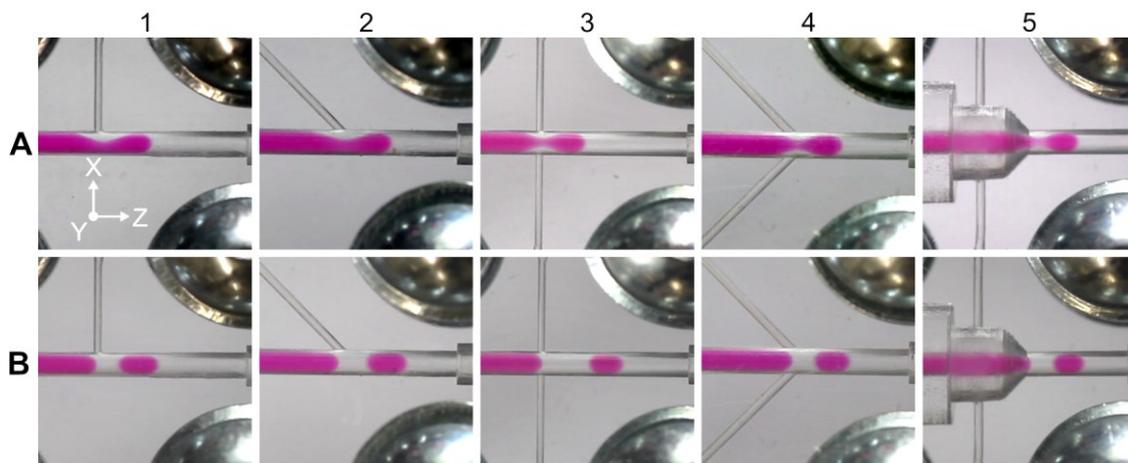


Abb. 5.12: Photographie der Tropfengenerierung der fünf unterschiedlichen FMS-Designs bei einer Förderratenkombination von 250/50 $\mu\text{l}/\text{min}$; disperse Phase (rot, DMEM); kontinuierliche Phase (farblos, PFD)
 A – vor dem Tropfenabriss; B – nach dem Tropfenabriss; 1 – 1D 90° FMS; 2 – 1D 45° FMS; 3 – 2D 90° FMS; 4 – 2D 45° FMS; 5 – 3D 45° FMS.

Zur genauen Beurteilung wurden die Tropfenvolumina aller vier Läufe für die Förderratenkombinationen 250/50, 500/100 und 1000/200 $\mu\text{l}/\text{min}$ gemittelt und mit den entsprechenden VK-Werten für die Langzeitabweichung aufgetragen (s. Abb. 5.13).

Einfluss auf das Tropfenvolumen:

Die Ergebnisse zeigen, dass es erhebliche Unterschiede bei der Generierung der Tropfen in Abhängigkeit von den Winkeln der Seitenkanäle sowie deren Anzahl und Ausführungen gibt (s. Abb. 5.13). Obwohl die Strömungsgeschwindigkeit der kontinuierlichen Phase (PFD) mit den Dimensionen der Einleitung in die Tropfengenerierungszone (1D, 2D und 3D) abnimmt, verursacht die Einleitung des PFD von mehr als einem Seitenkanal eine stärkere Fokussierung und führt folglich zu einer intensiveren Abschnürung des sich entwickelnden Tropfens. Dadurch verringert sich das Tropfenvolumen signifikant.

Zusätzlich beeinflusst der Winkel, mit dem das PFD in die Tropfengenerierungszone eingeleitet wird, ebenfalls das Tropfenvolumen. Mit der Abnahme des Winkels zwischen dem Seitenkanal und dem Hauptkanal von 90° auf 45° verringert sich das Tropfenvolumen (s. Abb. 5.13).

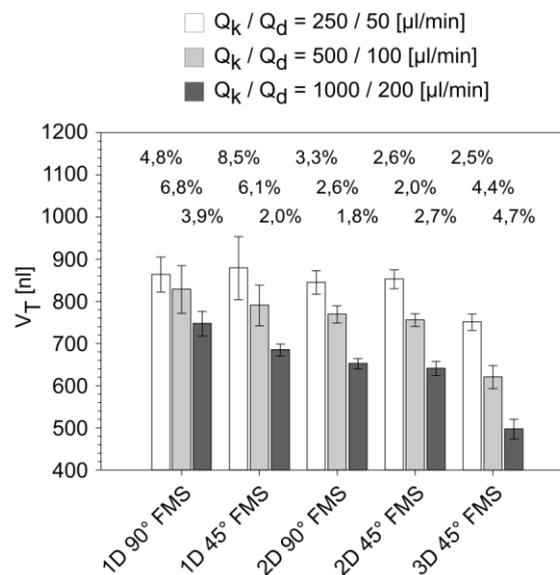


Abb. 5.13: Gegenüberstellung der gemittelten Tropfenvolumen und der Standardabweichung (Langzeitabweichung) in Bezug zu den fünf untersuchten FMS-Designs für die Förderratenkombinationen 250/50, 500/100 und 1000/200 bei einem Förderratenverhältnis von 5/1.

Dieser Effekt konnte sowohl für einen Seitenkanal als auch für zwei Seitenkanäle beobachtet werden. Jedoch ist dieser Zusammenhang nur bei den Förderratenkombinationen von 500/100 und 1000/200 erkennbar. Bei niedrigen Förderraten (250/50) liegen die Tropfenvolumina bei den 1D und den 2D FMS auf einem vergleichbaren Niveau.

Aufgrund des geringeren Winkels von 45° sind die Tangentialkräfte in Strömungsrichtung stärker und die Tropfen werden im Gegensatz zu den 90° FMS zusätzlich von der Tropfengenerierungszone in Strömungsrichtung verdrängt. Dies führt zu einem beschleunigten Abriss des Tropfens im Vergleich zu den 90° FMS. Zudem ist dieses Phänomen bei 1D FMS stärker ausgeprägt als bei den 2D FMS.

Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Tropfenvolumens:

Der Einfluss des FMS-Designs auf die Reproduzierbarkeit des Tropfenvolumens ist weniger deutlich zu erkennen wie der Einfluss auf das Tropfenvolumen selbst. Die Ergebnisse zeigen in Bezug zur Reproduzierbarkeit (s. Abb. 5.13), dass die Standardabweichung (Langzeitabweichung) bei den 2D FMS im

Vergleich zu den 1D FMS deutlich geringer ausfällt, mit Ausnahme der Läufe mit hoher Strömungsgeschwindigkeit (1000/200 $\mu\text{l}/\text{min}$). Hierbei ist die Standardabweichung des Tropfenvolumens für das 1D 45° FMS zum einen deutlich geringer als für das 1D 90° FMS und zum anderen geringer als für das 2D 45° FMS. Für das 3D 45° FMS wurde in Bezug zu den Förderratenkombinationen ein entgegengesetztes Verhalten beobachtet. Mit der Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit der beteiligten Fluide erhöhte sich die Standardabweichung.

Der Winkel (90° und 45°) und die Ausführung der PFD-Einleitung (1D, 2D und 3D) beeinflussen die Reproduzierbarkeit des Tropfenvolumens und werden für die Förderratenkombination 1000/200 $\mu\text{l}/\text{min}$ genauer diskutiert, da hierbei keine signifikante Volumendifferenz bei der Tropfengenerierung im Vergleich zu den vier gemittelten Läufen auftrat (s. S. 39, Abb. 5.11).

PFD zeigt eine hohe Affinität zur Anlagerung an die plasmabeschichtete Kanaloberfläche (Kontaktwinkel des PFD zur Oberfläche $> 20^\circ$). Dies führt zur Bildung eines dünnen PFD-Films auf der Kanaloberfläche. Dieser Film verhindert, dass die Tropfen die Kanaloberfläche berühren [153, 164]. Das Vorhandensein eines solchen schützenden PFD-Films wurde in Experimenten nachgewiesen, in denen die Oberflächen des FMS vor dem Einsatz nicht mit PFD in Kontakt kamen. In diesen Experimenten wurde eine direkte Interaktion der dispersen Phase mit der beschichteten Kanaloberfläche beobachtet. Diese Wechselwirkung wurde nicht beobachtet, wenn das FMS vor der Einleitung der dispersen Phase mit PFD durchströmt wurde und sich ein schützender PFD-Film gebildet hatte [165]. Auch hat die Strömungsgeschwindigkeit der Tropfensequenz einen Einfluss auf die Dicke des Filmes. Untersuchungen mit bildgebenden Verfahren (Imaging-System, Medea AV Multimedia und Software GmbH) zeigen, dass die Dicke des PFD-Films durch eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit zunimmt (s. Abb. 5.14).

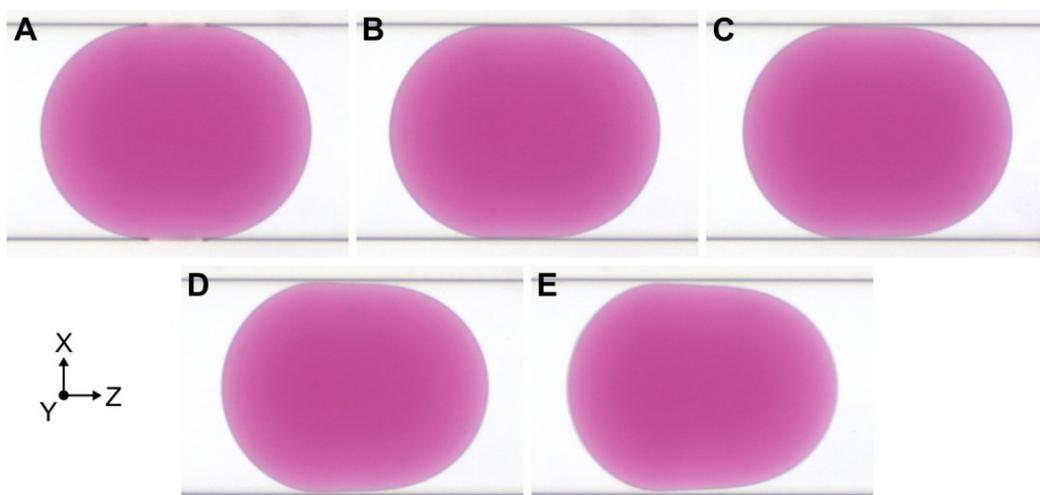


Abb. 5.14: Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Tropfenform und die Dicke des PFD-Film. Die Tropfen wurden mit einem 2D 90° FMS bei einer Förderratenkombination von 250/50 $\mu\text{l}/\text{min}$ generiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Imaging-System in einem FEP-Schlauch ($d_i = 1\text{mm}$); A – ruhender Tropfen; B – Tropfen bei einer mittleren Strömungsgeschwindigkeit v von 1,06 mm/s ($Q_k = 50 \mu\text{l}/\text{min}$); C – $v = 4,24 \text{ mm/s}$ ($Q_k = 200 \mu\text{l}/\text{min}$); D – $v = 10,61 \text{ mm/s}$ ($Q_k = 500 \mu\text{l}/\text{min}$); E – $v = 21,22 \text{ mm/s}$ ($Q_k = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$).

Die Untersuchungen mit den 1D FMS haben gezeigt, dass durch die einseitige Einleitung der kontinuierlichen Phase die disperse Phase gegen die diametrale Kanaloberfläche gedrückt wird. Der resul-

tierende Druck beeinflusst die Ausbildung des PFD-Films auf der Kanaloberfläche und kann Wechselwirkungen zwischen der dispersen Phase und der Kanaloberfläche zur Folge haben. Bei der 90° Einleitung der kontinuierlichen Phase ist die Druckkomponente gegen die Kanaloberfläche (in x-Richtung) größer als bei einer 45° Einleitung (s. S. 72, Abb. 5.12, A1 und 2). Zudem führt im Fall der 45° Einleitung die stärkere Druckkomponente in z-Richtung zu einem schnelleren und reproduzierbareren Tropfenabriss (s. S. 72, Abb. 5.12, A3 und 4). Die Effekte, die bei der Tropfengenerierung mit dem 2D- und 3D-FMS beobachtet wurden, werden im nächsten Abschnitt im Zusammenhang mit dem Einfluss der Förderraten diskutiert.

5.4.3 Einfluss der Förderraten

Zur weiteren Analyse des Tropfengenerierungsprozesses wurden die untersuchten Förderratenkombinationen in Ihrer Gesamtheit herangezogen. Die vergleichende Betrachtung der Tropfengenerierung im 2D 90° FMS (s. Abb. 5.15; A) und der zugehörigen Tropfensequenz im Speichermodul (s. Abb. 5.15, B) vermitteln einen Eindruck, wie sich die Variation der Förderraten auf das Tropfenvolumen und deren Abstände zueinander auswirkt.

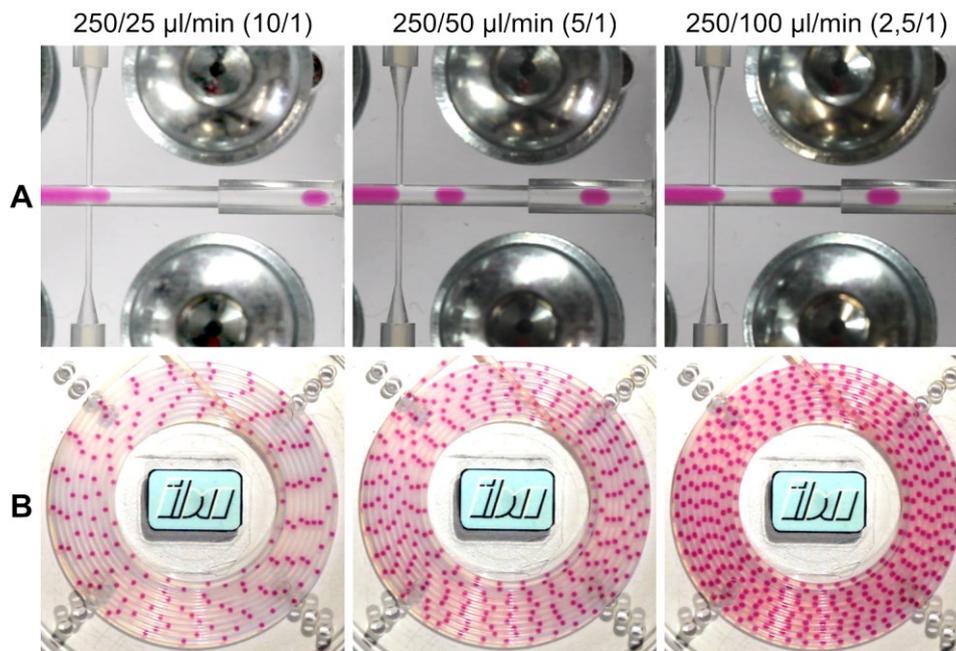


Abb. 5.15: Photographie der Tropfengenerierung mit dem 2D 90° FMS bei drei unterschiedlichen Förderratenkombinationen von 250/25, 250/50 und 250/100 µl/min; A – Tropfengenerierung im FMS; B – gebildete Tropfensequenz im Speichermodul.

Bei einer konstanten Förderrate der kontinuierlichen Phase Q_k und einer schrittweisen Verdoppelung der Förderrate der dispersen Phase Q_d nimmt das Volumen zu und die Abstände zwischen den Tropfen verringern sich (s. Abb. 5.15). Der Einfluss der Förderraten auf die Tropfengenerierung wurde in der Literatur beschrieben [166-168]. Diese Untersuchungen beziehen sich jedoch auf Mikrokanäle mit kleineren und zumeist rechtwinkligen Dimensionen. Eine Vielzahl von Untersuchungen erfolgt mit Tensiden oder es handelt sich um rein simulative Untersuchungen.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Prinzip des „montier- und demontierbaren Fluidmikrosystems“ [154] unterscheidet sich in wesentlichen Eigenschaften von den in der Literatur beschriebenen mikrofluidischen Systemen und wurde aus diesem Grund, auch unter dem Aspekt der angestrebten Anwendung (s. Kapitel 1.4), weitergehend untersucht.

Einfluss auf das Tropfenvolumen:

In einem weiteren Schritt wird untersucht, wie sich die Änderung nur einer Förderrate der beteiligten Phasen auf die Entwicklung des Tropfenvolumens auswirkt. Hierfür wurden geeignete Förderratenkombinationen ausgewählt, um den Einfluss einer Änderung der Förderung sowohl der dispersen Phase (s. Abb. 5.16, A) als auch der kontinuierlichen Phase (s. Abb. 5.16, B) bewerten zu können. Dazu wurden die gemittelten Tropfenvolumina und die Standardabweichung (Langzeitabweichungen) der entsprechenden Förderratenkombinationen gegenübergestellt. Die Bewertung der Trends erfolgte anhand geeigneter Regressionen.

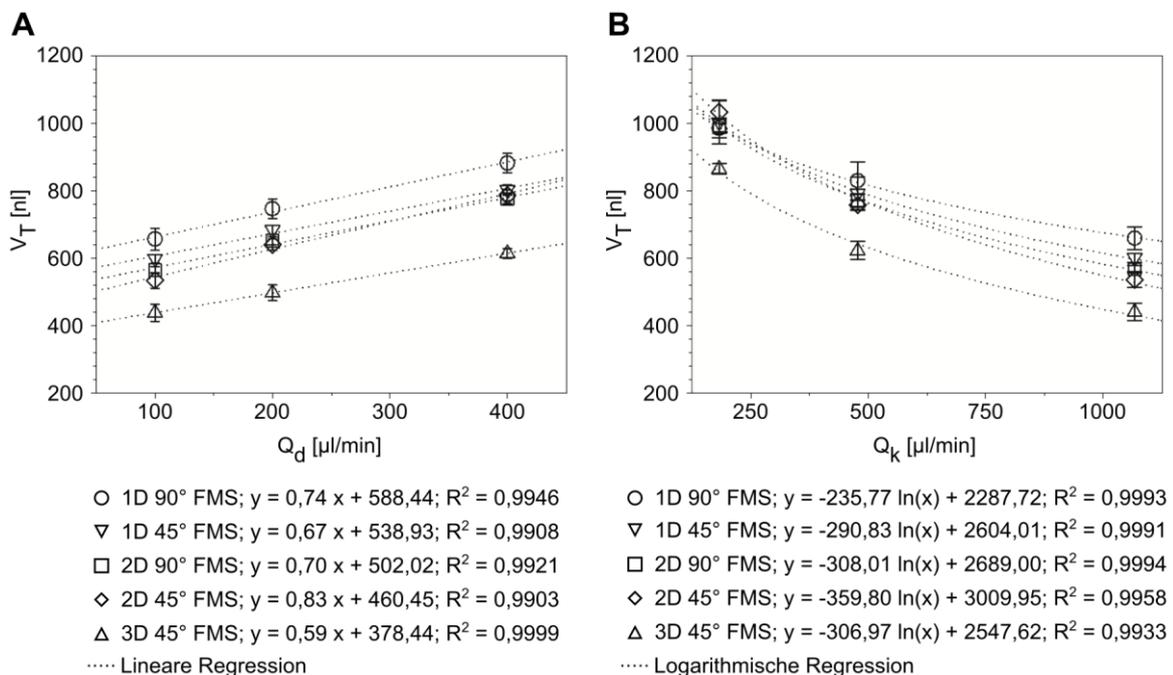


Abb. 5.16: Gegenüberstellung des Einflusses der Förderraten auf das Tropfenvolumen und der ermittelten Regressionen aller FMS-Designs; A – Tropfenvolumen in Abhängigkeit zur Förderrate der dispersen Phase bei einer konstanten Förderrate der kontinuierlichen Phase von 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$; B – Einfluss der Förderrate der kontinuierlichen Phase auf das Tropfenvolumen bei einer konstanten Förderrate der dispersen Phase von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Bei konstanter Förderung der kontinuierlichen Phase Q_k (1000 $\mu\text{l}/\text{min}$) führt ein proportionaler Anstieg der Förderung der dispersen Phase Q_d (100, 200 und 400 $\mu\text{l}/\text{min}$) zu einer Zunahme des Tropfenvolumens. Dagegen führt die proportionale Erhöhung der Förderrate der kontinuierlichen Phase Q_k (250, 500 und 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$) bei gleichbleibender Förderung der dispersen Phase Q_d (100 $\mu\text{l}/\text{min}$) zu einer Verringerung des Tropfenvolumens.

Im untersuchten Förderratenbereich erfolgt die Zunahme des Tropfenvolumens mit zunehmender Förderrate der dispersen Phase Q_d linear, während sich das Tropfenvolumen mit steigender Förder-

ung der kontinuierlichen Phase Q_k logarithmisch verringert. Diese Korrelationen sind aus der Literatur bekannt [169-173] und konnten hier im Rahmen der eigenen Untersuchung bestätigt werden.

Die hier beschriebenen Untersuchungen dienen in erster Linie der Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung unter dem Einfluss der Laufzeit, des FMS-Design und der Förderraten. Aus diesem Grund wurden mit jedem FMS-Design neun Förderratenkombinationen im Rahmen zeit- und materialintensiver Experimente untersucht (mehrere unabhängige Läufe mit einer ausgeprägten Laufzeit und einer hohen Anzahl an Tropfen). Deshalb wurden nur die Ergebnisse der Experimente von je drei Förderratenkombinationen zur Bewertung des Trends berücksichtigt. Es ist bekannt, dass für eine Beurteilung linearer oder logarithmischer Zusammenhänge drei Messpunkte die geringstmögliche Datenbasis darstellen. Da diese drei Messpunkte jedoch aus einer hohen Anzahl von Daten berechnet wurden, ist eine Beurteilung der Zusammenhänge zulässig.

Zur weiteren Verdeutlichung des Einflusses des FMS-Designs werden nachfolgend exemplarisch die Ergebnisse mit dem 2D 90° und dem 3D 45° FMS in Bezug zu den Förderraten aufgeführt (s. Abb. 5.17). Hierfür wurden die gemittelten Tropfenvolumina aller untersuchten Förderratenkombinationen der beiden FMS gegenübergestellt. Für eine bessere Vergleichbarkeit sind zusätzlich die VK-Werte der Langzeitabweichung für die entsprechenden Förderratenkombinationen aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Tropfenvolumina durch Anpassung der Förderraten Q_k und Q_d und durch Verwendung verschiedener FMS-Designs in einem großen Volumenbereich variiert werden können. Beim 2D 90° FMS liegt dieser Bereich zwischen 560 nl und 1010 nl, und beim 3D 45° FMS zwischen 425 nl und 870 nl.

Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Tropfenvolumens:

Aus den Ergebnissen (VK-Werte) wird ersichtlich, dass die Variation der Förderraten auch die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung beeinflusst (s. Abb. 5.17).

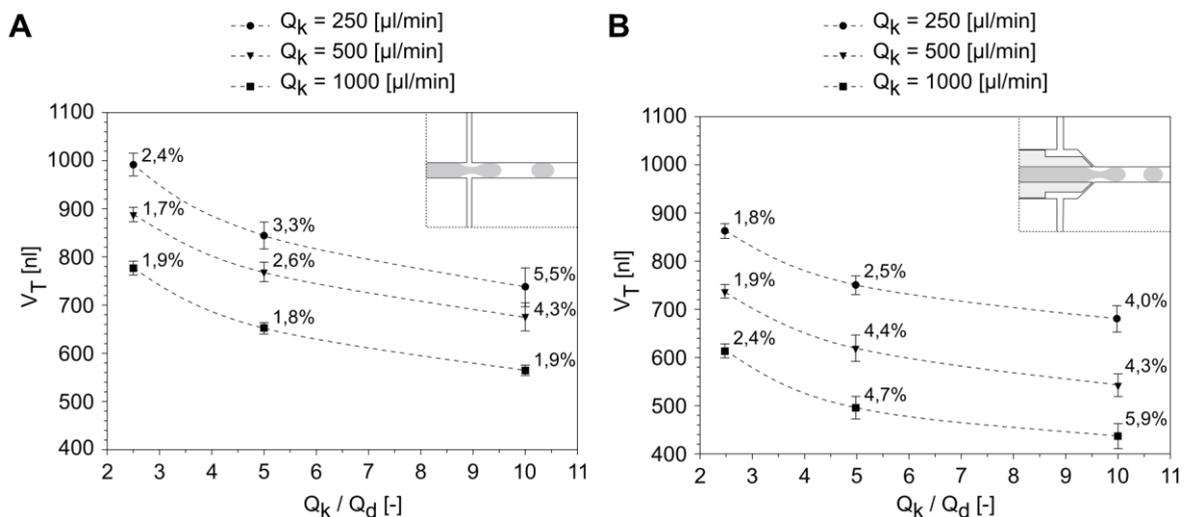


Abb. 5.17: Gegenüberstellung der Tropfenvolumen und der KV-Werte der untersuchten Förderratenverhältnisse Q_k/Q_d bei drei unterschiedlichen Förderraten der kontinuierlichen Phase Q_k von 250, 500 und 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$; A – Korrelation der Ergebnisse mit dem 2D 90° FMS; B – Korrelation der Ergebnisse mit dem 3D 45° FMS.

Allgemein führt eine Erhöhung der Förderrate der dispersen Phase Q_d zu einer Erhöhung der Reproduzierbarkeit (s. Abb. 5.17, A und B von rechts nach links). Für die meisten FMS-Designs führt eine Erhöhung der Förderrate der kontinuierlichen Phase Q_k ebenfalls zur einer Erhöhung der Reproduzierbarkeit (s. Abb. 5.17, A von oben nach unten). Ausnahmen bilden das 3D 45° FMS, bei dem durch eine Erhöhung der Förderrate der kontinuierlichen Phase ein gegenläufiges Verhalten festgestellt wurde (s. Abb. 5.17, B), sowie für das 2D 45° FMS, bei dem keine eindeutige Korrelation der Reproduzierbarkeit in Abhängigkeit von den Förderraten erkennbar war.

Argumentation:

Wenn die Förderrate der kontinuierlichen Phase Q_k erhöht wird, steigt die Strömungsgeschwindigkeit v an und folglich der Druck p , mit dem die Phase eingeleitet wird. Infolgedessen erhöhen sich auch die Kräfte, mit denen die disperse Phase durch die Einleitung der kontinuierlichen Phase abgeschnürt wird. Als Konsequenz wird die Verbindung zwischen der dispersen Phase vor der Tropfengenerierungszone und dem sich abschnürenden Tropfen hinter der Tropfengenerierungszone stärker eingengt. Die höheren Kräfte, die durch die kontinuierliche Phase hervorgerufen werden, bewirken ein schnelleres Abschnüren des Tropfens. Zudem führt eine Erhöhung der Förderrate der kontinuierlichen Phase Q_k zu einer höheren Dynamik des Tropfengenerierungsprozesses. Die beschriebenen Zusammenhänge führen zu einer höheren Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung.

Wenn die Förderrate der dispersen Phase Q_d erhöht wird, steigt ebenfalls deren Strömungsgeschwindigkeit v und somit der Druck p , mit dem diese Phase in den Hauptkanal eingeleitet wird. Durch die Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit v wird der Einfluss der Kräfte der kontinuierlichen Phase auf den Tropfenabriss verringert. Durch die höhere Einleitung der dispersen Phase Q_d wird das Tropfenvolumen vergrößert. Diese Effekte führen ebenfalls zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit.

Vergleicht man die Ergebnisse des 2D 90° FMS (s. Abb. 5.17, A) mit denen des 3D 45° FMS (s. Abb. 5.17, B), wird ersichtlich, dass die niedrigsten Standardabweichungen (Langzeitabweichungen) für das 2D 90° FMS bei einer hohen und für das 3D 45° FMS bei einer niedrigen Förderrate der kontinuierlichen Phase Q_k auftreten. Die Gründe für dieses gegensätzliche Verhalten des 3D 45° FMS werden im Folgenden diskutiert.

Ein Aspekt für dieses Verhalten liegt in der Tropfengröße, die beim 3D 45° FMS aus der 360° Einleitung der kontinuierlichen Phase resultiert. Bei den Förderratenverhältnissen von 1000/100 und 1000/200 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Q_k/Q_d) werden im 3D 45° FMS, im Gegensatz zu den anderen FMS-Designs, Tropfen gebildet, die den Hauptkanal ($d_{HK} = 1 \text{ mm}$) beim Abriss nicht vollständig ausfüllen ($V_T < 523 \text{ nl}$). Der sich bildende Tropfen wird hierbei nicht wie bei anderen Förderraten durch einen Wandkontakt vor dem Abriss zusätzlich verformt. Wenn ein Tropfen durch die Kanaloberfläche gehindert wird eine kugelige Form auszubilden, steigt das A/V-Verhältnis. Dieser Effekt führt zu einer zusätzlichen Komponente, die den Tropfenabriss befördert. Der Effekt fehlt bei Tropfen, die den Kanal vor dem Abriss nicht ausfüllen. Hierdurch fehlt die Stabilisierung, die normalerweise durch die Wand des mikrofluidischen Kanals auf den sich bildenden Tropfen ausgeübt wird. Aufgrund dieses höheren Freiheitsgrades erfolgt die Tropfengenerierung unregelmäßig, da der Zeitpunkt des Tropfenabrisses einer höheren

Schwankung unterworfen ist. Das führt zur Abnahme der Reproduzierbarkeit bei diesen Förderratenkombinationen.

Es ist aus der Literatur nicht bekannt, dass dieser Effekt bei anderen Systemen auftritt. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die überwiegende Zahl der im Bereich der tropfenbasierten Mikrofluidik publizierten Anwendungen mit Tensiden betrieben wird und hierbei vorwiegend kleinere Tropfen mit deutlich höherem Volumenstrom generiert werden. Diese Aspekte haben einen erheblichen Einfluss auf die Tropfengenerierung und lassen sich nicht eins zu eins mit dem hier vorgestellten System vergleichen.

Ein weiterer Aspekt für das unterschiedliche Verhalten bezüglich der Reproduzierbarkeit liegt in der 45° Einleitung der kontinuierlichen Phase Q_k beim 3D 45° FMS (s. Abb. 5.18, B) im Vergleich zum 2D 90° FMS (s. Abb. 5.18, A). Durch die unterschiedlichen Einleitungswinkel greifen die Kräfte, die durch die Einleitung der kontinuierlichen Phase auf den sich bildenden Tropfen wirken, mit unterschiedlichen Kraftvektoren an. Bei der Tropfenabschnürung verursacht der 45° Winkel eine stärkere Kraftkomponente in z-Richtung (s. Abb. 5.18, B; horizontal). Der Tropfen wird hierdurch stärker in Strömungsrichtung (z-Richtung) verdrängt. Jedoch ist die Kraftkomponente in x-Richtung (vertikal) im Vergleich zum 2D 90° FMS geringer. Die Verbindung zwischen der dispersen Phase vor der Tropfengenerierungszone und dem sich abschnürenden Tropfen hinter der Tropfengenerierungszone wird somit beim 2D 90° FMS stärker verengt, wohingegen der Tropfen beim 3D 45° FMS durch die höhere Kraftkomponente in z-Richtung stärker in diese Richtung gedrückt wird.

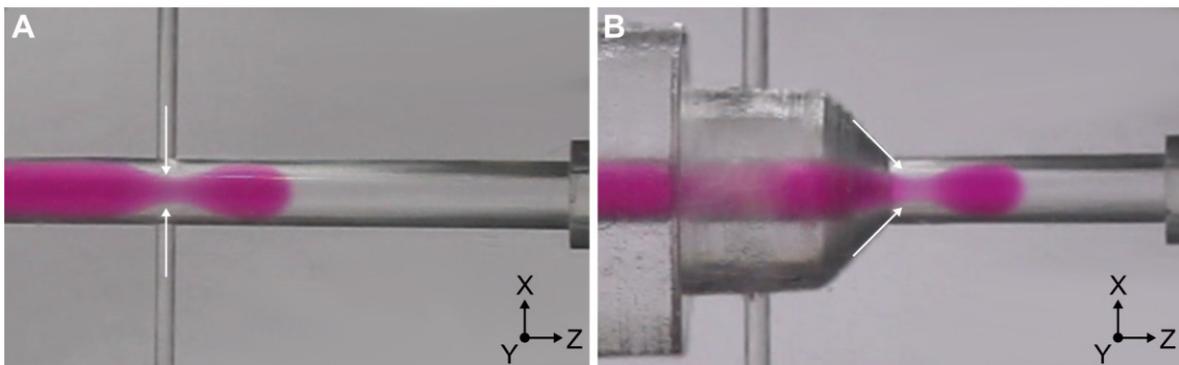


Abb. 5.18: Gegenüberstellung der Wirkungsrichtung der Kräfte, die durch die Einleitung der kontinuierlichen Phase auf den sich bildenden Tropfen wirken; A – 2D 90° FMS; B – 3D 45° FMS.

Die Abschnürung des Tropfens wird beim 3D 45° FMS somit mehr durch das Dehnen der Verbindung verursacht als durch die Verengung der Verbindung. Ein Vergleich des 3D 45° FMS mit dem 2D 45° FMS zeigt für die Förderratenverhältnisse von 10/1 ein ähnliches Verhalten, wodurch dieses Argument gestützt wird. Die Tropfengenerierung ist bei diesen Förderratenverhältnissen stärkeren Schwankungen unterworfen.

Ein weiterer Aspekt, der eine Rolle spielt, ist die Art der Einleitung der kontinuierlichen Phase. Beim 2D 90° FMS wird die kontinuierliche Phase von den beiden Seitenkanälen direkt in den Hauptkanal eingeleitet. Beim 3D 45° FMS wird die kontinuierliche Phase zwar ebenfalls aus zwei Seitenkanälen eingeleitet, jedoch erfolgt über den Ringspalt eine 360° umspannende räumliche Verteilung (s. Abb. 5.19).

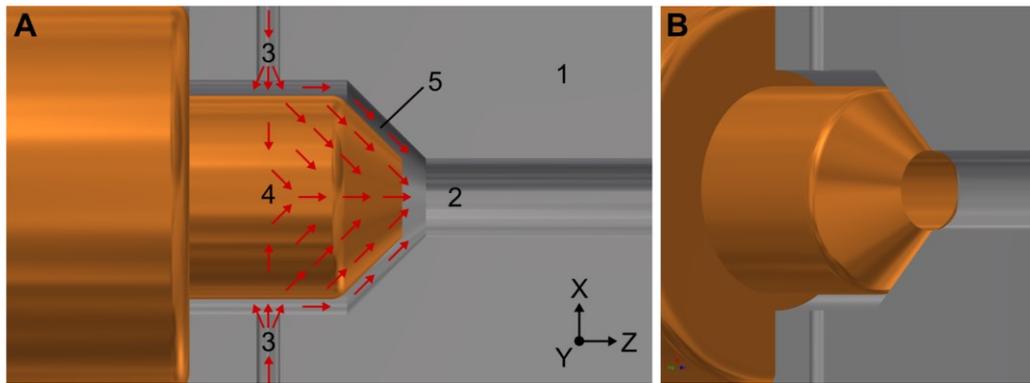


Abb. 5.19: Modell des 3D 45° FMS; A – Darstellung der Strömungsvektoren (rote Pfeile) der kontinuierlichen Phase im Ringspalt; 1: Bodenelement des FMS, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Kegelelement, 5: Ringspalt; B – 45° Perspektive des Übergangs vom Kegel zum Hauptkanal.

Durch die Einleitung der kontinuierlichen Phase aus den zwei Seitenkanälen in den Ringspalt resultieren unterschiedliche Strömungsvektoren im Spalt. Die Seitenkanäle liegen auf einer Ebene (x-Ebene) mit dem Hauptkanal und sind im 180° Winkel zueinander und im 90° Winkel zum Hauptkanal angeordnet. Über die Seitenkanäle strömt die kontinuierliche Phase in den Ringspalt und über die kegelförmige Verengung im 45° Winkel in die Tropfengenerierungszone (s. Abb. 5.19). Analog zum elektrischen Strom hat eine Fluidströmung das Bestreben entlang des Vektors mit dem geringsten fluidischen Widerstand zu strömen. Hierdurch bildet sich ein Strömungsgradient im Ringspalt aus. Die Strömungsvektoren sind auf der x-Ebene am stärksten und nehmen zur y-Ebene ab.

Der Tropfengenerierungsprozess ist ein höchst dynamischer Vorgang. Während sich der Tropfen vor dem Abriss ausbildet, wird der Strömungspfad für die kontinuierliche Phase um den Tropfen herum durch die Ausbreitung der dispersen Phase hinter der Tropfengenerierungszone zunehmend schmaler. Hierdurch nimmt der Druck vor dem sich bildenden Tropfen zu. Die Verengung des Strömungspfades hat einen Einfluss auf die Ausprägung des Strömungsgradienten im Ringspalt. Insbesondere bei hohen Förderraten ist das Strömungsfeld im Ringspalt stärkeren Schwankungen unterworfen und die Reproduzierbarkeit sinkt.

Die beschriebenen Effekte weisen bei niedrigen Förderraten eine wesentlich geringere Dominanz auf, wodurch die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung beim 3D 45° FMS und niedrigen Förderraten zunimmt.

5.5 Einfluss des Probenmediums

Ein weiterer Schwerpunkt bei der Charakterisierung lag auf der Untersuchung des Einflusses, den das Probenmedium (disperse Phase) auf die Beständigkeit der Beschichtung und die Tropfengenerierung ausübt. Dazu wurde die Beständigkeit der Beschichtung über einen Zeitraum von 8 Stunden mit einer Vielzahl biomedizinisch und biotechnologisch relevanter Medien (s. Tab. 5.6) untersucht. Für jedes Medium wurde ein unbenutztes, erstmalig beschichtetes 1D 90°FMS eingesetzt. Durch die einseitige Einleitung der kontinuierlichen Phase wird hierbei die Beschichtung am stärksten beansprucht (s. Kapitel 5.4.2). Für ausgewählte Medien wurden weitere Untersuchungen mit einem 2D 90°FMS durchgeführt.

Die Untersuchungen erfolgten mit jedem Medium an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Am ersten Tag (erster Versuchsabschnitt) wurde eine Beanspruchung der Beschichtung durch wechselnde Strömungsparameter initiiert. Dazu wurden Tropfen mit vier verschiedenen Förderratenkombinationen (500/50, 500/100, 1000/100 und 1000/200 $\mu\text{l}/\text{min}$) generiert. Analog zu den vorherigen Versuchsreihen (s. Kapitel 5.4) erfolgte die Tropfengenerierung am ersten Versuchstag entsprechend den o.g. Förderratenkombinationen in vier aufeinanderfolgenden Läufen (viermalige Wiederholung jeder Förderratenkombination). Die Dauer eines Laufes betrug in Abhängigkeit von den Förderraten 9 bis 15 min. In den Zeiten zwischen den Läufen war das FMS mit PFD gefüllt.

Am zweiten Tag (zweiter Versuchsabschnitt) erfolgte die Untersuchung der Schichtbeständigkeit mit demselben FMS vom Vortag, hierbei jedoch anhand einer kontinuierlichen Tropfengenerierung für einen Zeitraum von 6 Stunden bei einer Förderratenkombination von 250/25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Bei dieser Förderratenkombination erfolgte die Tropfengenerierung und -strömung mit einer geringeren Strömungsgeschwindigkeit, was die Wahrscheinlichkeit für Interaktionen des Probenmediums mit der Kanaloberfläche des FMS erhöhte. Bei den Medien, die eine Interaktion mit der Beschichtung zeigten, wurden die entsprechenden FMS mit Reinstwasser gespült und nachfolgend nochmals mit DMEM untersucht. Dieser Schritt sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit und unter welchen Bedingungen die FMS-Beschichtungen regenerierbar sind.

Bei den untersuchten Medien handelt es sich um biologisch relevante Medien, die bei Applikationen im Bereich der Life Sciences genutzt werden. Mögliche Einflüsse verschiedener Medienzusätze auf die Stabilität der Beschichtung wurden ebenso berücksichtigt wie die Einflüsse der Dichte, der Viskosität, der Oberflächenspannung und der chemischen Natur der Medien.

Als repräsentative Beispiele für Zellkulturmedien wurden DMEM und Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM) [174] ausgewählt. Antikoagulierte Blutprodukte wie Vollblut, Plasma und Serum zählten ebenso zu den untersuchten Medien wie eine Hefe-Suspension. Zur Charakterisierung des Einflusses verschiedener Zusätze wurden weiterhin Medien ausgewählt, die sich bezüglich der Salz-, Kohlenhydrat-, Protein- und Lipid-Konzentration unterscheiden. Zudem wurde der Einfluss des pH-Wertes und unpolarer, nicht fluorierter Medien auf die Tropfengenerierung untersucht. Zur Beurteilung des Einflusses der Viskosität diente eine Alginatlösung. Die relevanten Spezifikationen der untersuchten Medien sind in Tab. 5.6 aufgeführt. Alle Experimente wurden mit PFD als kontinuierliche Phase durchgeführt.

Tab. 5.6: Übersicht der untersuchten Medien.

Probenmedien	Spezifikationen
Vollblut	Schweineblut + 0,37 % (w/v) Natriumcitrat-Dihydrat
Blutplasma	Humanes Blutplasma; ITM Suhl gGmbH (Deutschland)
Blutserum	Fötales Bovines Serum (FBS), Product Nr.: S 0115 FBS (Kalb) Biochrom GmbH (Germany)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Produkt Nummer D5523 Sigma-Aldrich Chemie GmbH ergänzt mit 5 g/l D-Glucose, 2 mmol/l L-Glutamin, 1% v/v (Penicillin/Streptomycin), 10 % v/v fötales Kälberserum (FBS)
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium Produkt Nr.: 31980030 Thermo Scientific GmbH (Germany); ergänzt mit 20 % (v/v) FBS, 2 mmol/l L-Glutamin, 1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren and 100 µmol/l β-Mercaptoethanol
Hefesuspension	3 * 10 ⁷ KBE/ml (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>) in YPD-Medium (10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Pepton; 20 g/l D-Glucose; pH 6,5)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 8 g/l NaCl; 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ ; 0,2 g/l KCl; 1,8 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; pH 7,4
pH 2 Lösung	PBS eingestellt auf pH 2 mit HCl
pH 4 Lösung	PBS eingestellt auf pH 4 mit HCl
pH 8 Lösung	PBS eingestellt auf pH 8 mit NaOH
pH 10 Lösung	PBS eingestellt auf pH 10 mit NaOH
Glucoselösung	PBS + 90,1 g/l D-Glucose
Salzlösung	PBS + 146,1 g/l NaCl
Alginatlösung	5 g/l Alginat + 0,9 g/l NaCl Product Nr. (Alginat): W201502 Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland)
konzentrierte Milch	7,5 % Fettgehalt; Tchibo GmbH (Deutschland)
Sahne	20 % Fettgehalt; Milbona (Lidl Stiftung & Co. KG; Deutschland)
Tetradekan	Product Nr.: 87140 Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland)

Die für den Einfluss auf die Beschichtung relevanten Stoffeigenschaften (Dichte, Viskosität, Oberflächenspannung, Grenzflächenspannung zur kontinuierlichen Phase (PFD)) der Medien bzw. Suspensionen wurden entsprechend den technischen Möglichkeiten mit den in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Methoden und Verfahren bestimmt und sind in Tab. 5.7 zusammengestellt.

Tab. 5.7: Stoffeigenschaften der untersuchten Medien.

Stoffparameter	Dichte	kine- matische Viskosität	dynamische Viskosität		Oberflächen- spannung		Grenz- flächen- spannung
			berechnet aus der kinema- tischen Viskosität	Rheo- meter	Pendant Drop	Tensio- meter	
Methode/Verfahren	Pykno- meter	Kapillar- viskosi- meter					
Formelzeichen	ρ	ν	μ	μ	σ	σ	γ
Medien	[g/ml]	[mm ² /s]	[mPas]	[mPas]	[mN/m]	[mN/m]	[mN/m]
Reinstwasser (Literatur)	0,997	0,893	0,890	0,890	71,960	71,960	N/A
Reinstwasser	0,997	0,899	0,896	0,947	72,810	72,847	51,638
Vollblut	1,041	N/A	N/A	8,858	55,359	N/A	N/A
Blutplasma	1,021	N/A	N/A	2,359	62,210	N/A	N/A
Blutserum	1,017	N/A	N/A	2,277	51,390	N/A	32,493
DMEM	1,008	N/A	N/A	1,924	62,880	N/A	35,153
IMDM	N/A	N/A	N/A	N/A	63,323	N/A	N/A
PBS	1,005	0,914	0,918	0,903	73,480	72,882	50,328
pH 2 Lösung	1,002	0,916	0,918	1,336	70,456	72,317	48,498
pH 10 Lösung	1,005	0,928	0,933	0,910	72,871	72,589	49,810
Glucoselösung	1,037	1,107	1,147	1,193	72,830	73,039	49,528
Salzlösung	1,189	1,069	1,271	1,698	81,760	81,856	46,399
Sahne 30%	0,997	10,037	10,003	N/A	43,549	N/A	N/A
Tetradekan	0,767	2,726	2,091	N/A	21,007	N/A	4,090
PFD	1,930	2,850	5,502	N/A	17,717	18,737	Basis

Einige Parameter konnten mit den in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Methoden nicht bestimmt werden. Beispielsweise war es nicht möglich, die kinematische Viskosität der stark proteinhaltigen Medien mit dem Kapillarviskosimeter zu messen. Gleiches gilt für die Bestimmung der Oberflächenspannung mittels des Tensiometers. Die Erfassung der Grenzflächenspannung der Medien zum PFD war mit der Pendant Drop Methode nur bei ausreichend transparenten Medien möglich. Des Weiteren war die Bestimmung der dynamischen Viskosität der Sahne mit dem Rheometer nicht zielführend, da die Viskosität der Sahne durch die Rotation der Sonde des Rheometers kontinuierlich zunahm.

Bei allen Versuchen wurde auf die Zugabe von Phenolrot verzichtet, um einen möglichen Einfluss auf die Beständigkeit der Beschichtung auszuschließen. Für die photometrische Erfassung des Tropfenvolumens wäre jedoch eine definierte Färbung der überwiegend transparenten Medien mittels Phenolrot erforderlich gewesen, um die Qualität der Volumenbestimmung zu garantieren (s. Kapitel 3.4.2). Aus diesem Grund wurde bei diesen Untersuchungen auf die Bestimmung der Tropfenvolumina und eine statistische Auswertung der Reproduzierbarkeit verzichtet, die Charakterisierung der Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung erfolgte im Gegenzug ausschließlich anhand der optischen Beurteilung sowohl der Tropfengenerierung im FMS als auch der generierten Tropfensequenz im Speichermodul (s. Abb. 5.20).

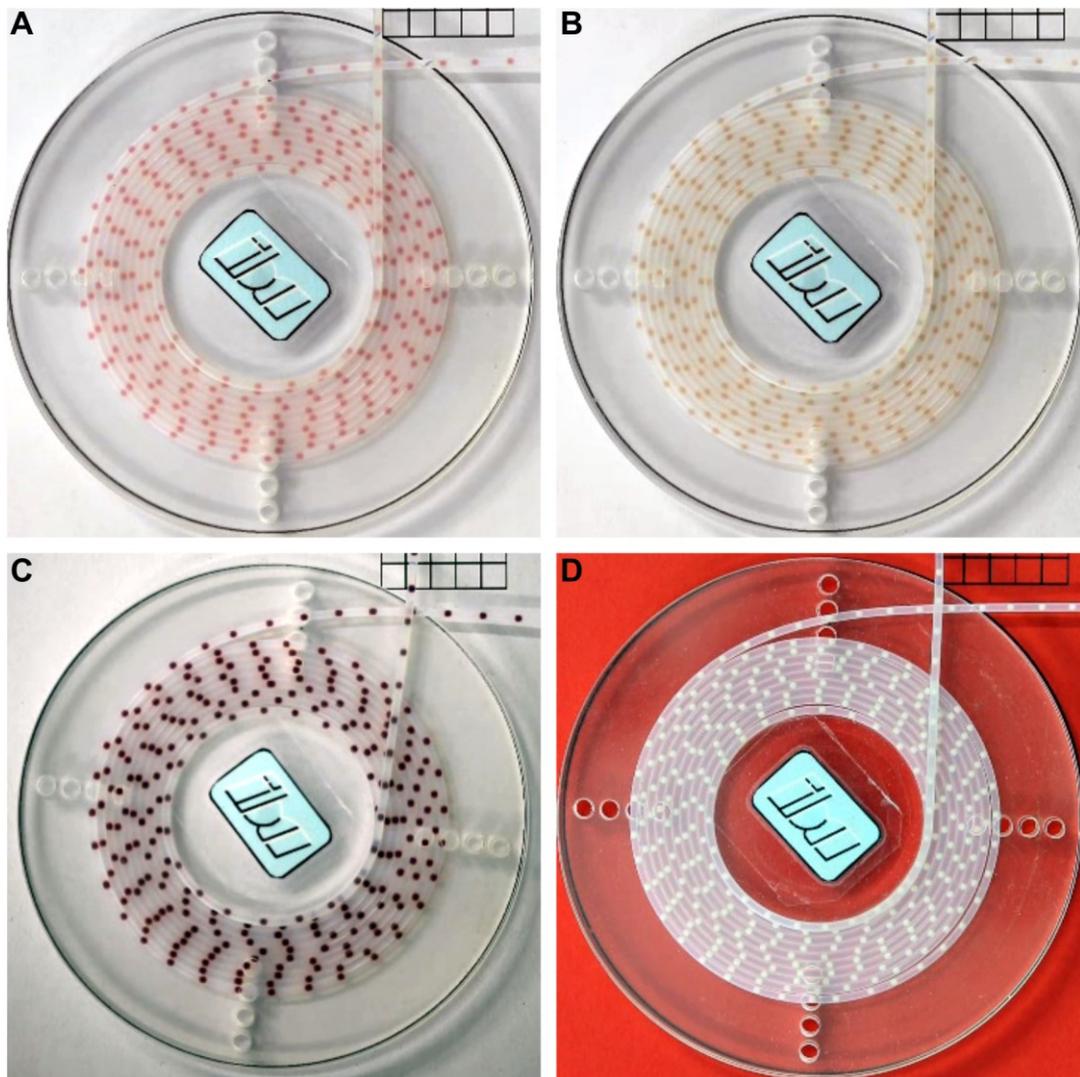


Abb. 5.20: Photographie der im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss der Probenmedien mit einer Förderratenkombination von 500/50 $\mu\text{l}/\text{min}$ generierten Tropfensequenzen im Speichermodul nach einer Prozesszeit von 15 min; A – IMDM-Tropfensequenz; B – Blutserum-Tropfensequenz; C – Vollblut-Tropfensequenz; D – Sahne-Tropfensequenz; A, B und D: Tropfengenerierung mit einem 1D 90° FMS; C: mit einem 2D 90° FMS.

Zur Klassifizierung der Stabilität der Beschichtung sind den Medien entsprechende Wertungskategorien zugeordnet (s. Tab. 5.8). Die Beobachtungen wurden in drei Kategorien eingeteilt. Ein "+" kennzeichnet eine störungsfreie Tropfengenerierung über den gesamten Versuchszeitraum, "0" bedeutet, dass Interaktionen mit der beschichteten Oberfläche beobachtet wurden und "-" steht für eine irreversible Beschädigung der Beschichtung durch das Medium.

Mit dem überwiegenden Teil der untersuchten Medien war eine uneingeschränkte Tropfengenerierung über einen Zeitraum von 8 Stunden mit hoher Qualität möglich. Damit konnte die Stabilität der FMS-Beschichtung für diesen Zeitraum nachgewiesen werden. Die Beurteilung der Tropfensequenz im Speichermodul zeigte, dass insbesondere mit Kondensmilch, Sahne und Alginat eine hohe Reproduzierbarkeit und Stabilität der Tropfengenerierung erzielt wurde. Ursache hierfür sind die hohe Viskosität der Medien und ihr hoher Lipidgehalt.

Tab. 5.8: Bewertung der Stabilität der FMS-Beschichtung.

Probenmedien	Stabilität
Vollblut	0
Blutplasma	0
Blutserum	+
DMEM	+
IMDM	+
Hefesuspension	+
PBS	+
pH 2 Lösung	-
pH 4 Lösung	+
pH 8 Lösung	+
pH 10 Lösung	-
Glucoselösung	+
Salzlösung	+
Alginatlösung	+
konzentrierte Milch	+
Sahne	+
Tetradekan	+

Demgegenüber zeigte die Beschichtung gegen hochkomplexe Medien wie Vollblut und Blutplasma sowie Lösungen mit sehr hohen beziehungsweise sehr niedrigen pH-Werten eine geringe Stabilität und demzufolge eine geringe Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung. Die in Frage kommenden Ursachen für diese Instabilitäten werden nachfolgend diskutiert.

Die Tropfengenerierung von Vollblut mit dem 1D 90° FMS verlief zunächst störungsfrei (s. Abb. 5.21, A1). Nach ca. 5 min kam es jedoch zu Störungen in der Tropfengenerierung durch eine ausgeprägte Adhäsion des Blutes an der dem Seitenkanal gegenüberliegenden Kanaloberfläche (s. Abb. 5.21, A2). Eine Wiederholung der Versuche mit einem 2D 90° FMS führte zu einer Verbesserung der Situation, eine störungsfreie Tropfengenerierung erfolgte hier über einen Zeitraum von 15 min (s. Abb. 5.21, B1 und Abb. 5.20, C).

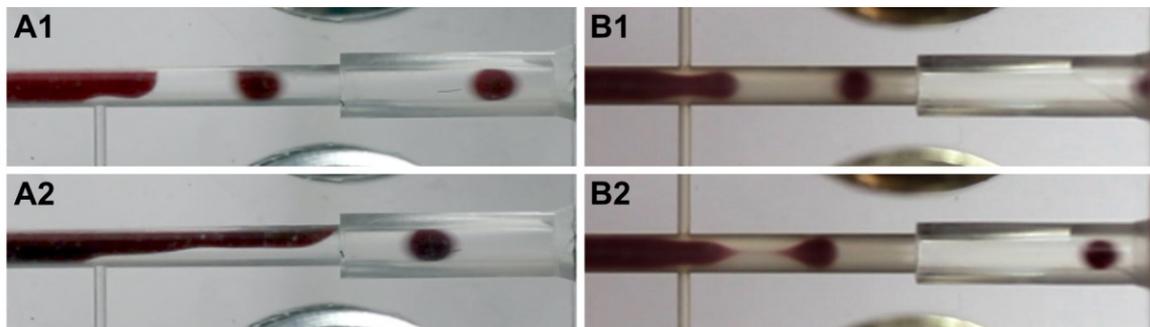


Abb. 5.21: Photographie der Tropfengenerierung mit Vollblut; A – Tropfengenerierung mit einem 1D 90° FMS; B – Tropfengenerierung mit einem 2D 90° FMS; 1: nach einer Laufzeit von 5 min; 2: nach einer Laufzeit von 15 min.

Nach ca. 15 min wurde jedoch auch beim 2D 90° FMS eine zyklisch auftretende Interaktion des Vollblutes mit der Kanaloberfläche hinter der Tropfengenerierungszone beobachtet (s. Abb. 5.21, B2).

Hierdurch wurde die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung beeinflusst. Der gleiche Effekt trat in einem deutlich geringeren Maß bei den Untersuchungen mit Blutplasma auf. Am Ende der Versuche des zweiten Tages mit einem 2D 90° FMS (Förderratenkombination von 250/25 µl/min) wurden jedoch azyklische Interaktionen des Blutplasmas mit der Kanaloberfläche beobachtet. Durch eine Erhöhung der Förderraten auf 500/100 µl/min konnten diese Interaktionen deutlich reduziert werden.

Die Ursache für die Interaktionen des Blutplasmas und des Vollblutes mit der Kanaloberfläche sind nicht eindeutig geklärt. Es ist wahrscheinlich, dass Blut- und Blutplasmabestandteile die Oberflächen beeinträchtigen, indem sie diese maskieren und somit die Oberflächeneigenschaften verändern. Eine exakte Analyse der Beschichtung an den Interaktionsstellen (z.B. mittels XPS) steht noch aus, ist jedoch aufgrund ihrer Komplexität nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit. Durch die Ergebnisse mit Blutserum (s. Tab. 5.8), bei dem keine Interaktion mit der Kanaloberfläche beobachtet wurden, kann die Ursache jedoch eingegrenzt werden.

Vollblut stellt ein heterogenes Medium mit einer Vielzahl verschiedenster Inhaltstoffe dar. Vollblut unterscheidet sich von Blutplasma dadurch, dass im Plasma keine Blutzellen mehr, wie z.B. Erythrozyten, Thrombozyten oder Leukozyten, vorhanden sind. Im Unterschied zum Blutplasma fehlen dem Blutserum wiederum zusätzlich alle Gerinnungsfaktoren (überwiegend Proteine).

Diese Tatsache lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Gerinnungsfaktoren für die Interaktion des Blutplasmas mit der Oberfläche verantwortlich sind. Es wird jedoch ausgeschlossen, dass durch die Adhäsion der Gerinnungsfaktoren eine Initiation der Gerinnungskaskade ausgelöst wird, da Citrat-Zusätze im Vollblut und im Blutplasma diese blockieren. Entsprechend wurden keine Anzeichen einer Fibrinpolymerisation wie bei einer Gerinnung beobachtet. Vielmehr scheinen speziell die Gerinnungsfaktoren selbst als Proteine ein erhöhtes Adhäsionspotenzial zur Kanaloberfläche aufzuweisen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass mit Blutserum störungsfreie Tropfen generiert werden konnten und dem Blutserum im Gegensatz zum Blutplasma nur die Gerinnungsfaktoren fehlen. Die noch stärkere Interaktion des Vollblutes mit der Oberfläche lässt wiederum den Schluss zu, dass hierfür die Blutzellen verantwortlich sind. Weitere Untersuchungen zur Adhäsion von Blutzellen und Gerinnungsfaktoren müssen durchgeführt werden, um diese Hypothesen zu belegen.

Im Weiteren zeigen die Versuchsergebnisse, dass eine Erhöhung der Förderraten die Anhaftung des Blutplasmas signifikant vermindert, wohingegen dieser Effekt für Vollblut nicht beobachtet wurde. Bei der Förderratenkombination 250/25 µl/min nahmen die Adhäsionseffekte des Blutplasmas zu, während diese bei einer Erhöhung der Förderraten auf 500/100 µl/min vollständig gehemmt wurden. Die Ursachen für dieses Verhalten liegen zum einen in der kürzeren Verweildauer der Tropfen im Mikrokanal, zum anderen ist das Adhäsionspotenzial des Blutplasmas aufgrund der fehlenden zellulären Bestandteile geringer als das des Vollblutes.

Mit dem 2D 90° FMS war es möglich, die Generierung von Tropfen aus Vollblut über einen längeren Zeitraum (mehr als 15 min) aufrecht zu erhalten. Das lässt sich damit begründen, dass bei diesem FMS das Vollblut durch die PFD-Einleitung von zwei Seitenkanälen im Zentrum des Hauptkanals fokussiert wird (s. Abb. 5.22, B). Dieser Effekt bewirkt eine deutliche Reduzierung der Kontaktfläche des Vollblutes zur Kanaloberfläche und wirkt damit einer Interaktion entgegen. Im Gegensatz dazu wird das

Vollblut beim 1D 90° FMS gegen die dem Seitenkanal entgegengesetzte Kanaloberfläche gedrückt (s. Abb. 5.22, A).

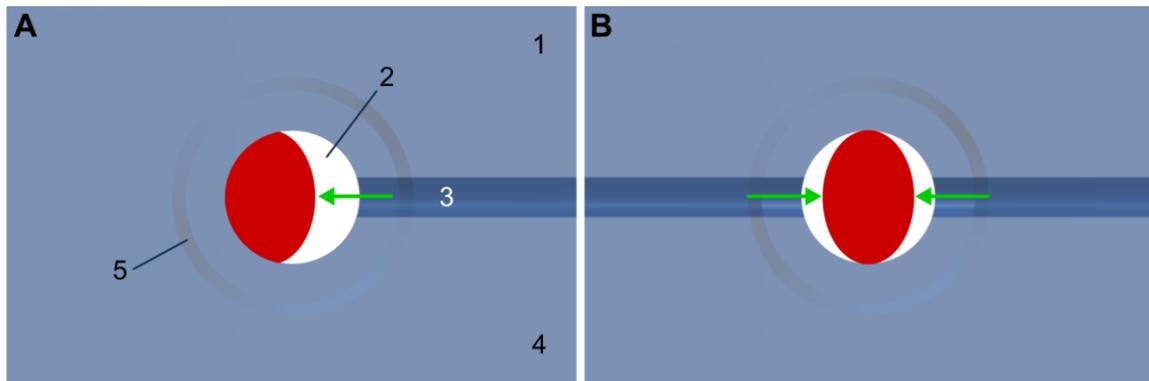


Abb. 5.22: Gegenüberstellung der Wirkungsrichtung der Kräfte (grüne Pfeile), die durch die Einleitung des PFD auf das Vollblut (rot) an der Tropfengenerierungszone wirken; Querschnitt durch die Tropfengenerierungszone, A – 1D 90° FMS; B – 2D 90° FMS,

1: Deckelement, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Bodenelement, 5: Schlauchjustierbohrung.

Abschließend soll erwähnt werden, dass die beschriebenen Effekte nicht eindeutig erklären, wie die Bestandteile des Vollblutes und des Blutplasmas den PFD-Film durchdringen, der sich zwischen den strömenden Tropfen und der Kanaloberfläche ausbildet. Eine mögliche Ursache ist die Oberflächenrauheit der gefrästen FMS. Gefräste Oberflächen weisen keine einheitliche Rauheit auf (siehe Weißlichtinterferometer-Modelle s. Abb. 5.2, A), vielmehr ragen vereinzelt Materialspitzen im Mikrometerbereich aus der Oberfläche. An solchen Stellen weist der PFD-Film eine deutlich geringere Stärke auf, was einen Kontakt der Medienbestandteile der Tropfen mit den Materialspitzen der Kanaloberfläche wahrscheinlich erscheinen lässt. Die durch die Adhäsion des Vollblutes induzierten Änderungen der Oberflächeneigenschaften waren irreversibel.

Noch ausgeprägter waren die Auswirkungen auf den Tropfengenerierungsprozess bei Medien mit extremen pH-Werten. Eine Erhöhung der H^+ - und der OH^- -Konzentration führt bei pH-Werten unterhalb von 2 bzw. oberhalb von 10 zur Störung der Tropfengenerierung. Während zu Beginn des jeweiligen Versuches einige Tropfen gebildet wurden, strömte das Probenmedium (pH 2 und pH 10 Lösung) nach wenigen Sekunden undefiniert zum Ausgang des FMS und die Tropfenbildung erfolgte am Übergang des Kanals zum Ausgangsschlauch. Dieser Effekt ist aus Versuchen mit unbeschichteten FMS bekannt und tritt immer dann auf, wenn die Kanaloberfläche eines FMS keine ausreichend hohe Hydrophobizität aufweist. Offensichtlich verursachen hohe H^+ - und OH^- -Konzentrationen eine irreversible Schädigung der Beschichtung. Trotz anschließenden Spülens der Kanäle des Systems mit Reinstwasser zeigten nachfolgende Versuche mit DMEM, dass keine Tropfengenerierung mehr möglich war.

Hinsichtlich der Medien mit niedrigen bzw. hohen pH-Werten ist davon auszugehen, dass die H^+ - oder OH^- -Ionen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (s. Tab. 5.8) die Kanalbeschichtung angreifen und zu einer Ablösung führen. Durch die initiale Ablösung kann das Probenmedium bis an die FMS-Oberfläche vordringen und die Beschichtung entlang des Hauptkanals vollständig ablösen. Eine Tropfengenerierung ist dann nicht mehr möglich. Detaillierte Untersuchungen zum Einfluss der H^+ - und OH^- -Konzentrationen auf die Beschichtung sind Gegenstand laufender Untersuchungen, jedoch nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

Die aufgeführten Untersuchungen zum Einfluss der Probenmedien auf die Tropfengenerierung haben gezeigt, dass eine Vielzahl von Medien für den Bereich der Life Science mit der entwickelten mikrofluidischen Plattform und deren Modulen bearbeitet werden können. Jedoch stehen insbesondere Vollblut und Blutplasma im Fokus der zukünftig angestrebten Biomarker-Analysen. Um diese Medien mit der Plattform reproduzierbar und langzeitstabil bearbeiten zu können, müssen die Eigenschaften der Kanaloberflächen hinsichtlich des Hydrophobisierungsgrades und der Beschichtungsstabilität signifikant verbessert werden. Die zu diesem Zweck durchgeführten Arbeiten und deren Ergebnisse beschreibt das nachfolgende Kapitel.

6 Mikrostrukturierung

Eine Steigerung der Hydrophobizität und der Beschichtungsstabilität kann nicht nur den Einsatz von Vollblut und Blutplasma ermöglichen, auch die Bedingungen für die Verwendung von proteinhaltigen Zellkulturmedien können dadurch verbessert werden. Zellkulturmedien enthalten zumeist oberflächenaktive Biomoleküle wie Proteine, die aus hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren bestehen. Dabei sind die hydrophoben Aminosäuren eines Proteins vorwiegend ins Innere gerichtet und bilden den Kern, während die Proteinoberfläche von hydrophilen Aminosäuren dominiert wird. Der Anteil hydrophober Aminosäuren an der Oberfläche von Proteinen ist hingegen häufig gering. Die Affinität von Proteinen zur Adhäsion an hydrophoben Oberflächen ist jedoch wiederum deutlich höher als deren Affinität zur Adhäsion an hydrophilen Oberflächen. Zumeist führt ein direkter Kontakt eines Proteins mit einer hydrophoben Oberfläche zu einer Anlagerung einzelner hydrophober Aminosäuren, die an der Oberfläche des Proteins vorliegen. Die Wechselwirkung mit der Oberfläche bewirken eine Änderung der Proteinkonformation, wodurch der Proteinkern freigelegt wird und die hydrophoben Aminosäuren an der hydrophoben Oberfläche adhären [175].

Eine Interaktion proteinhaltiger Probenmedien mit den Kanaloberflächen eines FMS beeinträchtigt z.B. die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung, da hierdurch eine Verzögerung des Tropfenabrisses hervorgerufen wird. Um Medienanlagerungen zu verhindern und eine Steigerung der Prozessstabilität zu erreichen, muss bei tropfenbasierten Verfahren das Bestreben des perfluorierten Separationsmediums (PFD), die durch die Beschichtung fluorierten Kanaloberflächen zu benetzen, erhöht werden. Eine Steigerung der Affinität des PFD zur Bildung eines Filmes zwischen den wässrigen Proben und der Kanaloberflächen ist erforderlich.

Im Hinblick auf eine kommerzielle Nutzung tropfenbasierter mikrofluidischer Verfahren ist es zudem erforderlich, die entsprechenden FMS kostengünstig zu fertigen. Bei polymerbasierten Systemen, die heute zumeist in der Mikrofluidik eingesetzt werden, bieten sich dafür Spritzgussverfahren an. Hierdurch lassen sich hohe Stückzahlen bei gleichbleibender Qualität erreichen. Soll auf Tenside verzichtet werden, um z.B. die medizinische Zulassung tropfenbasierter Anwendungen zu erleichtern, ist es erforderlich, die für eine Interaktion des Probenmediums zur Verfügung stehenden FMS-Oberflächen signifikant zu verringern.

6.1 Eigenschaften einer Mikrostrukturierung

Die Untersuchungen der Oberflächenbeschaffenheit (s. Kapitel 5.1) haben gezeigt, dass die Oberflächenrauheit, die aus der mechanischen Bearbeitung (Fräsen) der Kanäle resultiert, die Ausprägung der Hydrophobizität verstärkt. Mittels Spritzguss hergestellte Oberflächen weisen demgegenüber eine geringe Rauheit auf (s. Abb. 6.1).

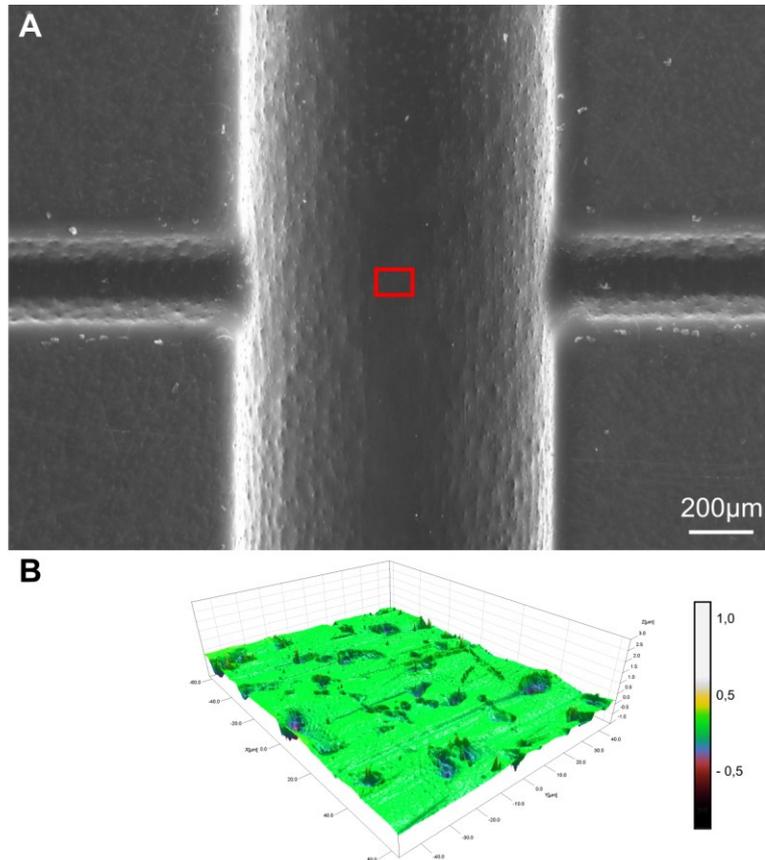


Abb. 6.1: Analyse der Oberflächenbeschaffenheit einer spritzgegossenen PC-Oberfläche; A – REM-Aufnahme der Tropfengenerierungszone eines spritzgegossenen 2D 90° FMS, roter Rahmen: Positionen der Rauheitsbestimmung am FMS-Bodenelement; B – Weißlichtinterferometer-Modelle der Oberfläche im rot markierten Bereich.

Die Rauheitsanalysen mittels Weißlichtinterferometrie ergaben (s. Tab. 6.1), dass die Oberflächenrauheit vergleichbar ist mit der einer mittels Extrusion-Verfahrens gefertigten Polymeroberfläche (s. S. 57 und 58, Abb. 5.2, D und Tab. 5.1, TE (unbehandelt)).

Tab. 6.1: Ermittelte Rauheitsparameter eines spritzgegossenen FMS.

Probe	Parameter	Mittelwert		Standardabweichung		
		Wert	Einheit	Wert	Einheit	VK
Hauptkanal (Spritzguss-FMS, unstrukturiert)	Sa	79,6	nm	5,5	nm	6,9%
	S10z	1895,7	nm	145,5	nm	7,7%
	Sdr	2,0	%	0,3	%	13,0%

Die spritzgegossenen Oberflächen weisen zudem nur eine geringe Rauheit im Vergleich zu den gefrästen Oberflächen der in Kapitel 5 untersuchten FMS auf.

Die Untersuchungen des Einflusses spritzgussgefertigter FMS erfolgte anhand eines 2D 90° Designs, da die vorangegangenen Untersuchungen (s. Kapitel 5) gezeigt haben, dass dieses Design eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Tropfengenerierung ermöglicht. Für die Spritzgussfertigung des 2D 90° FMS (s. Abb. 6.1) wurde ein Spritzgusswerkzeug mit den entsprechenden FMS-Formeinsätzen (Gussformen) hergestellt (s. Kapitel 4.2.1). Die Rauheit der mittels Spritzguss gefertigten FMS-Formteile (abgeformte Deckel- und Bodenelemente) resultiert aus der Oberflächenbeschaffenheit, die durch die Bearbeitung der FMS-Formeinsätze mittels Funkenerosionsverfahren hervorgerufen wird.

Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen zur Tropfengenerierung (s. Kapitel 5) wurden die in diesem Kapitel untersuchten Formteile mit dem in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Niederdruck-Plasmaverfahren hydrophobisiert.

Die geringe Oberflächenrauheit des spritzgegossenen FMS spiegelt sich ebenfalls in den vergleichsweise (s. S. 58, Tab. 5.2, gefräste Oberflächen) hohen Oberflächenenergien und den niedrigen Wasserkontaktwinkeln nach der Beschichtung mit C_4F_8 wieder (s. Tab. 6.2).

Tab. 6.2: Ermittelte Wasserkontaktwinkel und Oberflächenenergien einer unstrukturierten PC-Oberfläche vor und nach einer Beschichtung mit C_4F_8 .

Beschichtung	Oberfläche	Wasser-Kontaktwinkel	Oberflächenenergie		
			gesamt	dispers	polar
		[°]	[mN/m]	[mN/m]	[mN/m]
unbehandelt	unstrukturiert	88,1 ±3,4	41,9 ±1,0	40,0 ±1,1	1,9 ±0,3
C_4F_8	unstrukturiert	119,4 ±0,7	8,9 ±0,2	8,4 ±0,3	0,5 ±0,2

Fluidische Untersuchungen mit den spritzgegossenen FMS haben gezeigt, dass die geringe Rauheit der Oberfläche die Stabilität der Beschichtung mindert. Schon nach einer kurzen Prozesszeit von ca. 10 min traten bei der Tropfengenerierung Interaktionen des DMEM (Probenmedium) mit der Kanaloberfläche der spritzgegossenen FMS auf, was zur Störung der Tropfengenerierung führte. Eine reproduzierbare Prozessführung war mit diesem FMS nicht möglich.

Um mittels Spritzguss gefertigte FMS für tropfenbasierte mikrofluidische Anwendungen ohne den Zusatz von Tensiden einsetzen zu können, muss die Kanaloberfläche der FMS eine ausreichend hohe Rauheit aufweisen. Zudem ist im Fall der Applikation von Blut und Plasma zur Gewährleistung stabiler Prozessbedingungen eine hohe Hydrophobizität der Kanaloberfläche erforderlich. Dazu müssen die Oberflächen der Mikrokanäle möglichst schon während des Spritzgusses topografisch so strukturiert werden, dass sie nach der Beschichtung superhydrophobe Eigenschaften besitzen.

Zur technischen Umsetzung einer Strukturierung der Kanaloberfläche mit dem Ziel einer Erhöhung der Hydrophobizität ist es sinnvoll, sich die Natur zum Vorbild zu nehmen. Das Lotusblatt und der hiernach benannte Lotuseffekt zeigen, welche Voraussetzungen geschaffen werden müssen, um Oberflächen mit einer geringen Benetzbarkeit für wässrige Medien zu erzeugen.

Der Lotuseffekt beruht auf zwei Faktoren: Zum einen weist die Oberfläche des Lotusblatt eine Mikrostruktur auf, zum anderen ist diese Mikrostruktur mit einer weiteren nanoskaligen Struktur (Nanostruktur) versehen [176, 177]. Die Mikrostruktur wird durch die Epidermis des Lotusblattes gebildet. Die Epidermiszellen bilden an der Oberfläche makroskopische Auswüchse, die als Papillen bezeichnend werden [178]. Die Papillen des Blattes weisen eine Höhe und eine Breite von ca. 10 – 15 μm sowie einen Abstand von ebenfalls ca. 10 – 15 μm auf. Die Nanostruktur wird wiederum durch die Cuticula, einer den Epidermiszellen aufliegenden Wachsschicht, gebildet [179]. Diese Doppelstruktur ist für den superhydrophoben Charakter des Lotusblattes verantwortlich [180].

Der Zweck der Hydrophobisierung der Oberflächen von tropfenbasierten Mikrosystemen liegt, wie erwähnt, in der Verringerung des Adhäsionspotenzials für das Probenmedium, um Interaktionen mit den Kanaloberflächen zu verhindern. Da wiederum die Stabilität der Beschichtung von der Rauheit der Oberflächen beeinflusst wird, ist es naheliegend, mit einer dem Lotusblatt ähnlichen Oberflächenstruktur die erforderliche Rauheit zur Stabilisierung der Beschichtung zu erreichen.

Diverse Veröffentlichungen beschreiben Möglichkeiten der Oberflächenmodifikation mit dem Ziel, superhydrophobe Eigenschaften auf Polymeroberflächen zu erzielen [181, 182]. Üblicherweise wird die Oberfläche mikrostrukturiert und anschließend mit geeigneten Methoden hydrophobisiert. Etablierte Verfahren sind das Heißprägen [183], eine Sol-Gel-Beschichtung [184] und die Ablagerung von Ruß [185] oder Nanopartikeln [186]. Darüber hinaus werden zur Strukturierung der Oberflächen Laserablationsverfahren eingesetzt [187, 188]. Die abschließende Hydrophobisierung erfolgt hierbei vorwiegend mittels einer nasschemischen oder plasmaunterstützten Beschichtung [189]. Die aufgeführten Verfahren sind jedoch teurer als die Herstellung von Mikrosystemen durch Spritzgießen oder nicht geeignet für tropfenbasierte mikrofluidische Anwendungen.

In dieser Arbeit wird ein biomimetischer Ansatz zur Herstellung superhydrophober lotusblattähnlicher Eigenschaften [190] auf der Basis von PC- und COC-Polymeren angestrebt. Der Lotuseffekt soll hier aus der Kombination einer definierten Mikrostruktur resultieren, die anschließend durch eine Beschichtung hydrophobisiert wird [191-193].

Für eine effiziente und kostengünstige Fertigung ist es vorteilhaft, die gewünschte Mikrotopographie direkt beim Spritzgießen auf die Kanaloberflächen der FMS zu übertragen. Um die Mikrotopographie des Lotusblattes [194-197] zu replizieren, wird hierfür die Oberfläche der Formeinsätze mittels Laserablationsverfahrens mit einer Mikrostruktur versehen, vergleichbar mit dem von Groenendijk beschriebenen Femtosekundenimpuls-Laser-Ablationsverfahren [198]. Welche Bedingungen erforderlich sind, um die gewünschte Mikrostruktur beim Spritzgießen auf die Polymeroberflächen zu übertragen und somit einen Lotuseffekt zu erzielen, wird nachfolgend beschrieben.

Zum Erreichen des Lotuseffektes sind Kegelstrukturen mit abgerundeten Spitzen (papillenähnliche Struktur) auf der Oberfläche erforderlich. Um solche Strukturen beim Spritzgießen zu übertragen, muss die entsprechende Negativstruktur auf die Oberfläche der Formeinsätze aufgebracht werden; d. h., die Oberfläche der Formeinsätze muss Kavitäten im Mikrometerbereich aufweisen (s. Abb. 6.2, A). Um diese Mikrokavitäten in die Oberfläche von Formeinsätzen mit einer hohen Güte einzubringen, wird ein Ultrakurzpuls-Laser (UKP-Laser) eingesetzt (Kapitel 4.2.2).

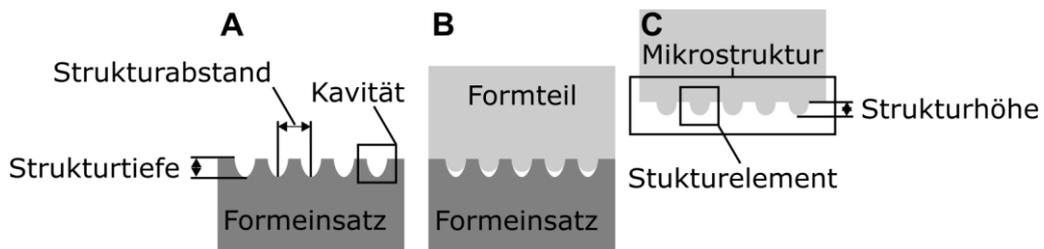


Abb. 6.2: Schematische Darstellung der Übertragung einer Mikrostruktur beim Spritzgießen, A – Mikrostruktur des Formeinsatzes (Negativstruktur); B – Übertragung der Mikrostruktur vom Formeinsatz auf das Formteil; C – Strukturelemente der Mikrostruktur auf der Oberfläche des Formteiles (Positivstruktur).

Dafür wird die Oberfläche der Formeinsätze entsprechend dem gewünschten Strukturabstand und der Strukturtiefe punktuell mit dem UKP-Laser bearbeitet. Da die Intensität eines Laserstrahles ein Gauß-Profil aufweist, ist die Energiedichte im Zentrum höher als in den Randbereichen, wodurch der Materialabtrag zu einer kegelförmigen Kavität führt (s. Abb. 6.2, A). Beim Spritzgießen werden die Mikrostrukturen in der Oberfläche der Formeinsätze von der Polymerschmelze ausgefüllt und die Mikrostruktur wird auf die Formteile übertragen (s. Abb. 6.2, B). Durch diesen Ansatz wird eine definierte Mikrostruktur, die entsprechend der Mikrostrukturen auf der Oberfläche der Formeinsätze aus einzelnen Strukturelementen gebildet wird, auf die Oberfläche der Formteile übertragen (s. Abb. 6.2, C).

Eine anschließende Beschichtung mit C_4F_8 bildet eine hydrophobe Schicht auf der Oberfläche der Formteile. Unter Berücksichtigung der Theorie der heterogenen Benetzung nach Cassie-Baxter [199] wird durch diesen Ansatz die Oberfläche für die Probentropfen reduziert, wodurch die Adhäsionskräfte gemindert werden. Der theoretische Ansatz bezüglich des Nutzens für tropfenbasierte mikrofluidische Verfahren ist nachfolgend schematisch dargestellt (s. Abb. 6.3, A und B).

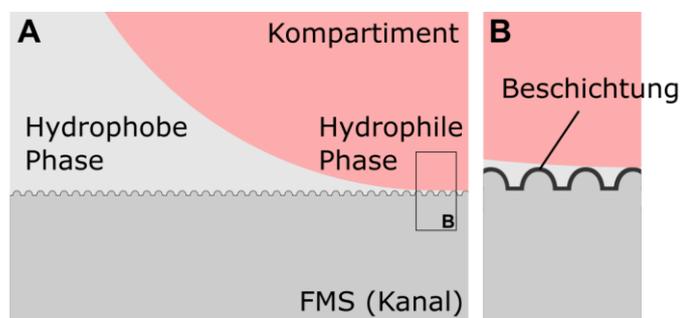


Abb. 6.3: A – Schematische Darstellung einer mikrostrukturierten Kanaloberfläche in Bezug zu einem kugelförmigen Tropfen in einem Kanal mit 1 mm Durchmesser, B – Detaildarstellung der Kontaktfläche zwischen dem Tropfen und der mikrostrukturierten Oberfläche (Annahme: Cassie-Baxter-Zustand).

Der dem Cassie-Baxter-Zustand zugrundeliegende Ansatz, dass durch die hydrophobe Struktur die Kontaktfläche für die wässrige Phase verringert wird, resultiert aus der Annahme, dass die Räume zwischen den Strukturelementen mit Luft gefüllt sind und somit das wässrige Medium auf einem Luftpolster aufliegt [197].

Bei den hier vorgestellten tropfenbasierten Anwendungen sind diese Zwischenräume mit dem unpolaren PFD (hydrophobe Phase) gefüllt (s. Abb. 6.2, A). PFD weist eine niedrige Oberflächenspannung auf (s. S. 83, Tab. 5.7), wodurch es Oberflächen leicht benetzt. Zudem handelt es sich bei PFD um ein perfluoriertes Öl. Dessen Vorteil ist hierbei das Bestreben fluorierte Oberflächen vollständig zu benet-

zen (s. Abb. 6.3, B). Hierdurch wird die Kanaloberfläche zusätzlich vor dem wässrigen Probenmedium (hydrophile Phase) geschützt.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zeigen, welche Voraussetzungen erfüllt werden müssen, um eine geeignete Mikrostruktur zur Verbesserung der Prozessstabilität direkt beim Spritzgießen zu übertragen. Hierfür wurden Formeinsätze erstellt, mittels Laser mikrostrukturiert und anschließend abgeformt und beschichtet.

Für die Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Formeinsätze zur Abformung mikrostrukturierter Formteile verwendet. Die Untersuchungen der physio-chemischen Eigenschaften und der Oberflächentopografie erfolgten mit planaren, mikrostrukturierten Formteilen (mikrostrukturiertes Testelement (MST)), vergleichbar mit den in Kapitel 5.1 beschriebenen Testelementen (TE). Die planare Anordnung der Mikrostrukturierung ermöglichte deren grundlegende topografische Charakterisierung. Demgegenüber erfolgten die Untersuchungen zum Einfluss der Mikrostrukturierung auf die Stabilität der Beschichtung und die Reproduzierbarkeit der Tropfenbildung anhand eines mikrostrukturierten FMS (2D 90° FMS). Diese fluidischen Untersuchungen erfolgten mit DMEM und antikoaguliertem Blut.

Die zu strukturierenden Formeinsätze wurden definiert im Lasersystem positioniert und entsprechend der gewünschten Strukturdimensionen bearbeitet (Kapitel 4.2). In Anlehnung an die Mikrostruktur des Lotusblattes wurden durch die Laserablation ca. 6 – 15 µm tiefe Mikrokavitäten auf den Oberflächen der Formeinsätzen erzeugt [200]. Der Durchmesser des Laserfokus betrug bei dem hier verwendeten UKP-Laser 10 µm. Die Tiefen der Mikrokavitäten wurden durch Variieren der Dichte der Laserimpulse pro Fläche (Wiederholungen oder Impulszählung) eingestellt. Für die ersten Untersuchungen wies die Mikrostruktur eine lineare Ausrichtung auf.

In einem ersten Schritt wurde der Einfluss verschiedener Ausführungen der Strukturelemente auf die Oberflächeneigenschaften untersucht (Variation der Strukturabstände und -tiefen der Mikrokavitäten). In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Spritzgussparameter auf die Ausbildung der Mikrostruktur analysiert. Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit MST auf der Basis von PC. Um den Einfluss des Materials, aus denen die Formteile hergestellt werden, zu untersuchen, wurden in einem dritten Schritt Formteile aus PC und COC abgeformt. Zudem wurde in einem weiteren Schritt der Einfluss des Temperierungsmediums auf die Ausbildung der Mikrostruktur untersucht.

All diese Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit MST. Die Beurteilung der Einflüsse der Mikrostruktur erfolgte anhand der Strukturdimensionen und der Wasserkontaktwinkel. Zur weiteren Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften wurde die freie Oberflächenenergie ermittelt. Die freie Oberflächenenergie weist einen polaren und einen dispersen Anteil auf, die Kenntnis der Anteile ermöglicht eine Aussage inwieweit eine Oberfläche von polaren und unpolaren Medien benetzt wird.

In einem fünften Schritt wurde die finale Mikrostruktur eines MST mit der eines Lotusblattes verglichen. Die finale Mikrostruktur wurde auf die Kanaloberfläche der FMS-Formeinsätze übertragen. Die mit dieser finalen Struktur abgeformten FMS bildeten die Basis für die abschließenden fluidischen Untersuchungen.

6.2 Übertragbarkeit einer Mikrostruktur

Im Fokus der Untersuchungen zur Übertragung der Mikrostruktur der Formeinsätze (s. Abb. 6.4, A) auf die Formteile (s. Abb. 6.4, B) standen die Einflüsse auf die erreichbaren Strukturdimensionen und deren Einfluss auf die physikochemischen Oberflächeneigenschaften. Hierfür wurden drei unterschiedliche Mikrostrukturen untersucht, die sich hinsichtlich der Abstände und der Tiefe der Mikrokavitäten der Formeinsätze unterschieden. Die Bezeichnung der untersuchten MST-Formeinsätze leitet sich aus dem Strukturabstand (1. Zahl) und der Strukturtiefe (2. Zahl) ab, die aus der Lasermodifikation der Formeinsätze resultieren. Die Zahlenwerte entsprechen den Zielvorgaben für die Strukturdimensionen in Mikrometern. Die Abformung der MST-Formteile erfolgte unter definierten Standardbedingungen (s. Kapitel 4.2.4) mit dem als mittelviskosem Polymer klassifiziertem PC (Kennzeichnung: 2805).

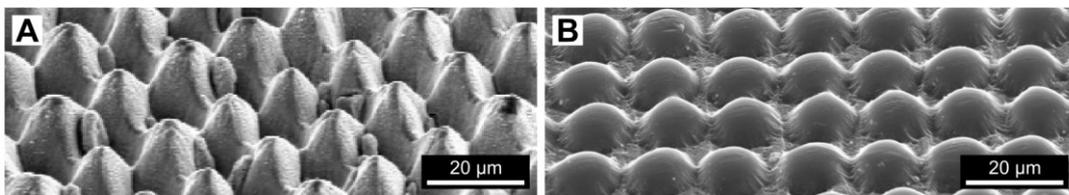


Abb. 6.4: Übertragung der Mikrostruktur; A – Mikrostruktur eines 15/8-Formeinsatzes (Negativ); B – Mikrostruktur auf dem entsprechenden Spritzgusselement (15/15-MST, Positiv).

Die erreichten Strukturhöhen und der Einfluss der Mikrostruktur auf den Wasserkontaktwinkel nach einer Beschichtung mit C_4F_8 sind nachfolgenden aufgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass sich die Tiefe der Mikrostruktur der MST-Formeinsätze nicht im vollen Umfang auf die abgeformten MST überträgt (s. Abb. 6.5). Die Strukturanalyse des 30/15-Formeinsatzes ergab für die Tiefe der Mikrokavitäten die geforderten 15 μm . Die Strukturelemente des abgeformten 30/15-MST weisen jedoch nur eine Höhe von ca. 4,4 μm auf.

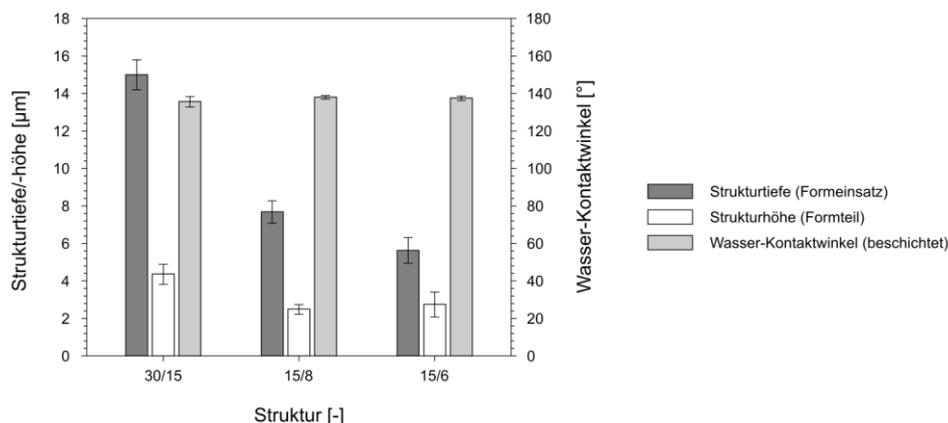


Abb. 6.5: Gegenüberstellung der Struktur tiefen der Formeinsätze mit den erzielten Strukturhöhen der Formteile und den ermittelten Wasserkontaktwinkeln nach einer C_4F_8 -Beschichtung der Formteilen.

Zudem zeigt sich, dass bei den 15/8- und 15/6-Formeinsätzen, die deutlich kleinere Mikrokavitäten aufweisen, die Höhe der abgeformten Strukturelemente nur geringfügig kleiner ist (ca. 1,9 μm) als die des 30/15-MST. Somit hat die Tiefe der Mikrokavitäten des Formeinsatzes zwar einen Einfluss auf die

Höhe der abgeformten Strukturelemente, doch muss der Formeinsatz deutlich tiefere Mikrokavitäten aufweisen, um beim Abformen höhere Strukturelemente zu erreichen.

Zwei Effekte verhindern die Ausbildung höherer Strukturen. Zum einen weisen die Polymerschmelzen eine hohe Viskosität auf und erschweren dadurch das Einströmen in die Mikrokavitäten der Formteile. Zum anderen sind die vor dem Einspritzen geschlossenen Formeinsätze mit Luft gefüllt, welche beim Einspritzen der Schmelze nicht entweichen kann. Die Luft wird durch die einströmende Polymerschmelze komprimiert und in die Mikrokavitäten gepresst. Das dort gebildete Luftpolster beschränkt das Einströmen der Schmelze in die Mikrokavitäten.

Die plasmabeschichteten MST mit einem Strukturabstand von 15 μm (das 15/8- und 15/6-MST) weisen höhere Wasserkontaktwinkel auf als die 30/15-MST. Hierbei ist der Kontaktwinkel der 30/15-MST jedoch nur um ca. $2,5^\circ$ niedriger als beim 15/8-MST. Die theoretischen Grundlagen zum Einfluss einer Mikrostruktur auf die Hydrophobizität einer Oberfläche besagt jedoch, dass höhere Strukturen zu höheren Kontaktwinkeln führen. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass ein Strukturabstand von 15 μm eine stärkere Zunahme der Hydrophobizität hervorruft als ein 30 μm Abstand (s. Abb. 6.5).

Im Vergleich zu den Wasserkontaktwinkeln einer unstrukturierten, beschichteten PC-Oberfläche (θ ca. 120°) lässt sich feststellen, dass die untersuchten Mikrostrukturen nur eine geringe Steigerung des Wasserkontaktwinkels um max. 17° hervorrufen. Dieses Ergebnis lässt sich zum einen mit den geringen Strukturhöhen begründen. Für eine signifikante Steigerung der Hydrophobizität sind höhere Strukturelemente erforderlich.

Die Untersuchungen zeigten zudem, dass eine weitere Verringerung der Strukturabstände nicht möglich ist, da bei einem Abstand der Strukturelemente von 15 μm und einem Durchmesser von ca. 15 μm die Mikrostrukturen ineinander übergehen (s. Abb. 6.4, A und B). Sind die Abstände zu gering, wird die ursprüngliche Oberfläche der Formeinsätze durch die Lasermodifikation abgetragen und die Tiefe der Mikrokavitäten minimiert. Infolge dessen würde die Höhe der abgeformten Mikrostruktur ebenfalls minimiert.

Hinsichtlich der Strukturabstände und -tiefe der Mikrokavitäten der Formeinsätze wurde aus der ersten Versuchsreihe ein optimaler Strukturabstand von 15 μm bei einer Strukturtiefe von ebenfalls 15 μm abgeleitet. Für die weiteren Untersuchungen wurde die Mikrostruktur mit diesen Parametern gefertigt.

6.3 Einfluss der Spritzgussparameter

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, welche Parameter beim Spritzgießen eine Steigerung der Strukturhöhe ermöglichen. Die Temperatur und der Druck sind zwei Parameter, die die Ausbildung einer Mikrostruktur beim Spritzgießen beeinflussen. Die Temperatur hat einen direkten Einfluss auf die Viskosität der Polymerschmelze und somit auf das Fließverhalten. Wird die Viskosität reduziert, kann die Schmelze tiefer in die Mikrokavitäten einströmen.

Bei den Untersuchungen wurde das Polymer (PC2805) im Temperaturbereich von 300 - 320°C eingespritzt (s. Kapitel 4.2.4). Eine Erhöhung der Einspritztemperatur war nicht möglich, da bei den verwen-

deten Polymeren oberhalb dieser Temperaturen eine irreversible thermische Zersetzung eintritt (z.B. PC, $T > 350^\circ\text{C}$). Eine Erhöhung der Formtemperatur kann jedoch das Einströmen der Polymerschmelze in die Mikrokavitäten erhöhen. Trifft die Schmelze beim Einspritzen auf die Oberfläche der Form-einsätze, die eine niedrigere Temperatur als die Polymerschmelze aufweist, wird diese abgekühlt. Hierdurch wird die Viskosität erhöht und die Fließfähigkeit verringert. Das Einströmen der Schmelze in die Mikrokavitäten wird erschwert. Durch eine Erhöhung der Formtemperatur kann diesem Verhalten entgegengewirkt werden.

Ein weiterer Parameter, der einen direkten Einfluss auf die Strukturhöhe hat, ist der Nachdruck. Der Nachdruck presst die Schmelze beim Abkühlen in die Form und hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Formtreue der spritzgegossenen Formteile. Durch eine Erhöhung des Nachdrucks wird die Schmelze stärker in die Mikrokavitäten gepresst und die vorhandene Luft weiter komprimiert.

Um die Einflüsse der benannten Parameter auf die Strukturbildung und die physikochemischen Oberflächeneigenschaft zu ermitteln, wurden Untersuchungen bei verschiedenen Formtemperaturen und Nachdrücken durchgeführt (s. Abb. 6.6, A und B).

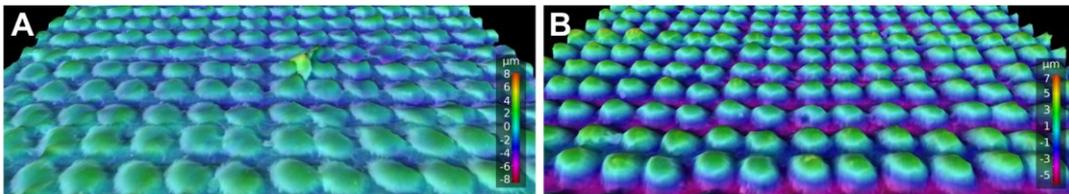


Abb. 6.6: REM-3D-DOM zur Gegenüberstellung des Einflusses der Formtemperatur und des Nachdruckes auf die Ausbildung der Mikrostruktur der Formteile (MST), A – 15/15-MST abgeformt bei einer Formtemperatur von 110°C und einem Nachdruck von 80 MPa; B – 15/15-MST abgeformt bei einer Formtemperatur von 180°C und einem Nachdruck von 160 MPa.

Die Ergebnisse zeigen (s. Abb. 6.7), dass bei einem Nachdruck von 100 MPa eine Erhöhung der Formtemperatur von 110°C auf 150°C zu einem Anstieg der Strukturhöhe führt. Jedoch ist der Einfluss mit ca. $0,3\ \mu\text{m}$ nur gering. Auch hat die leichte Zunahme der Strukturhöhe keinen signifikanten Einfluss auf die Hydrophobizität. Der Wasserkontaktwinkel steigt lediglich um ca. $3,5^\circ$.

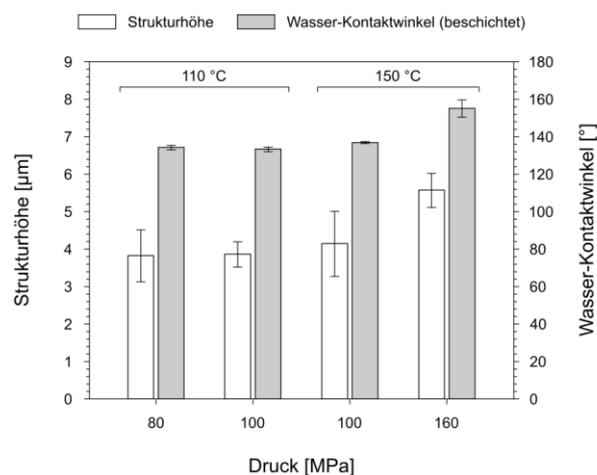


Abb. 6.7: Ergebnisse der Untersuchungen zum Einflusse der Formtemperatur und des Nachdruckes auf die Strukturhöhe der Formteile und der Wasserkontaktwinkel nach einer Beschichtung mit C_4F_8 .

Durch die Erhöhung des Nachdrucks von 80 MPa auf 160 MPa bei einer Anhebung der Formtemperatur um 30° konnte jedoch eine merkliche Zunahme der Strukturhöhe um ca. 1,8 µm erreicht werden (s. Abb. 6.7). Das führte nach der Beschichtung der MST zu einem signifikanten Anstieg des Wasserkontaktwinkels um 21°.

Von einer weiteren Erhöhung des Nachdrucks wurde abgesehen, da dies zu einer deutlich höheren Beanspruchung der Formeinsätze geführt hätte. Die beschriebenen Maßnahmen zur Optimierung der Spritzgussparameter führten nach der Beschichtung der MST zu einer superhydrophoben Oberflächencharakteristik. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die Zunahme der Hydrophobizität mit der Erhöhung der Struktur einhergeht. Als Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen erfolgten die weiteren Untersuchungen mit Formteilen, die mit einer Formtemperatur von 150 °C und einem Nachdruck von 160 MPa abgeformt wurden.

6.4 Einfluss der Spritzguss-Polymere

In einer nachfolgenden Versuchsreihe wurde untersucht, welchen Einfluss die zur Abformung eingesetzten Polymere auf die Ausbildung der Mikrostruktur haben. Es wurden zusätzlich zu dem bisher verwendeten PC2085 zwei weitere Polymere untersucht: Ein COC mit der Kennung 6017 und ein weiteres PC mit der Kennung 2400. PC2400 weist gegenüber dem zuvor verwendeten PC2805 bei gleicher Temperatur der Schmelze eine niedrigere Viskosität auf. Der Einfluss der Viskosität auf die Ausbildung der Strukturen wurde im Zusammenhang mit der Erhöhung der Formtemperatur diskutiert. Durch die geringere Viskosität des Polymers sollte eine weitere Erhöhung der Strukturelemente und der Hydrophobizität erreicht werden. Gegenüber PC2805 und PC2400 hat COC6017 die höchste Viskosität und weist bedingt durch seine andersartige chemische Struktur gegenüber PC Unterschiede in den physikochemischen Eigenschaften auf [201].

Bei den vorherigen Untersuchungen wies die Mikrostruktur eine lineare Ausrichtung auf. Um die Packungsdichte der Strukturelemente zu erhöhen, wurde die Mikrostruktur modifiziert und versetzt angeordnet. Hierdurch wurden die Strukturelemente in einer hexagonalen Anordnung ausgerichtet und somit die Packungsdichte der Mikrostruktur erhöht [191, 202]. Durch die hexagonale Ausrichtung der Mikrostruktur wurde eine weitere Steigerung der Hydrophobizität erwartet.

Die REM-Aufnahmen zeigen, dass PC (s. Abb. 6.8, A und B) spitze Strukturelemente bildet. Das COC (s. Abb. 6.8, C) bildet hingegen gerundete Strukturelemente aus.

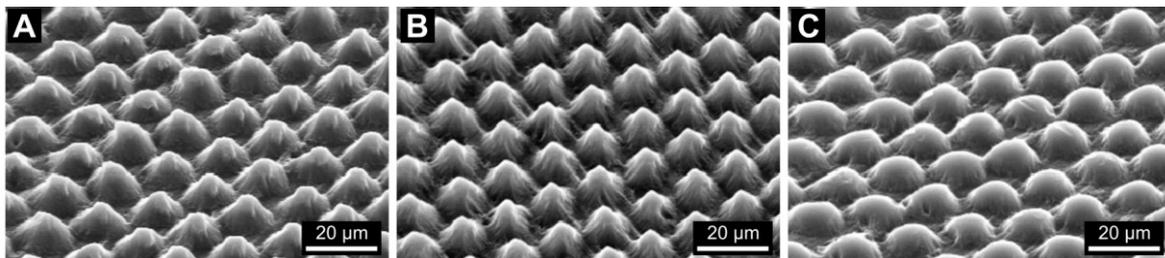


Abb. 6.8: Gegenüberstellung der Ausbildung der Mikrostruktur in Abhängigkeit zum verwendeten Polymer anhand von REM-Aufnahmen; A – PC2400; B – PC2805; C – COC6017.

Die Ausbildung spitzer Strukturen bei PC wird mit den erreichten Strukturhöhen und der im Vergleich zu COC geringeren Viskosität begründet. Bei den ersten Untersuchungen zur Übertragbarkeit der Mikrostruktur mit PC2805 zeigte die Mikrostruktur, wie hier beim COC, gerundete Strukturelemente (s. S. 95, Abb. 6.4, B). Im Gegensatz zu den hier erreichten spitzen PC-Strukturen, mit einer Höhe von 5,11 μm (PC2805, s. Abb. 6.9, A) und 6,1 μm (PC2400, s. Abb. 6.9, A), waren die Strukturelemente dabei mit 2,49 μm und 2,75 μm jedoch deutlich kleiner (s. S. 95, Abb. 6.5).

Es wird angenommen, dass die Strukturelemente bei einer solchen Höhe zu spitzeren Strukturen neigen. In diesem Kontext ist jedoch zu beachten, das COC bei den aktuellen Untersuchungen mit einer Strukturhöhe von 5,11 μm (s. Abb. 6.9, A) nur geringfügig kleinere Strukturelemente ausbildet. Ein Grund hierfür könnte in der höheren Viskosität liegen, wodurch die Polymerschmelze verstärkt zu runderen Strukturen neigt. Die genaue Ursache für die Strukturunterschiede ist noch nicht eindeutig geklärt und wird weiter untersucht.

Die Ergebnisse der drei Polymere zeigen, dass die Strukturhöhe mit der Viskosität korreliert (s. Abb. 6.9, A). Je niedriger die Viskosität der Polymerschmelze ist, desto höher werden die Strukturelemente ausgebildet. Die Höhe der Strukturelemente des niederviskosen PC2400 ist hierbei ca. 1 μm höher als die des mittelviskosen PC2805 und des COC6017. Weiterhin bestätigen die Ergebnisse, dass die höchste Mikrostruktur auch den größten Wasserkontaktwinkel hervorruft (s. Abb. 6.9, A).

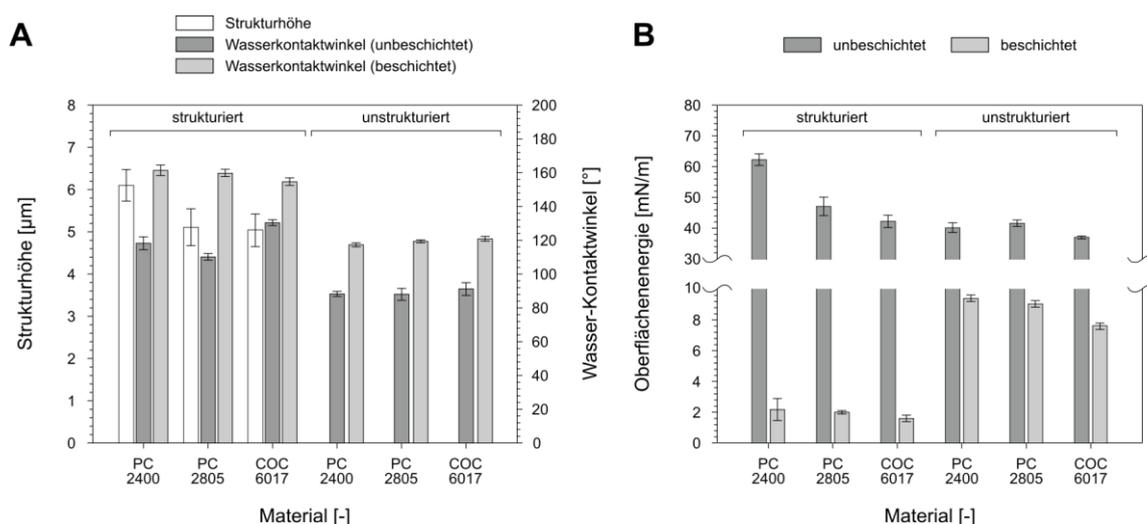


Abb. 6.9: Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der verwendeten Polymere anhand unstrukturierter und strukturierter sowie unbeschichteter und beschichteter MST; A – Ausbildung der Strukturhöhe und der Wasserkontaktwinkel; B – Oberflächenenergien.

Das niederviskose PC2400 weist nach der Beschichtung einen Wasserkontaktwinkel von 161,4° auf und liegt somit um 1,5° über dem des PC2805. COC6017 hingegen weist einen Wasserkontaktwinkel von 154,6° auf. Die Strukturhöhe ist jedoch nur um 0,07 μm kleiner als die des PC2805. Ein Grund dafür, dass aus dem geringen Unterschied der Strukturhöhe ein um 5,3° kleinerer Wasserkontaktwinkel resultiert, kann mit der gerundeten Struktur des COC begründet werden. Durch die spitzen Strukturen des PC wird die Kontaktfläche zur polaren Phase im Vergleich zu den gerundeten COC-Strukturen zusätzlich reduziert und die Hydrophobizität fällt größer aus.

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen der MST mit einer hexagonalen Strukturordnung (s. Abb. 6.9, A) zeigen im Vergleich zu Messungen an MST mit einer linearen Strukturordnung (s. S. 97,

Abb. 6.7) auch eine höhere Hydrophobizität. Durch die Erhöhung der Packungsdichte der Mikrostruktur steigt der Wasserkontaktwinkel nochmals um $4,7^\circ$.

Zur Beurteilung der Veränderung der physikochemischen Eigenschaften durch die Mikrostruktur und die Beschichtung wurden Kontaktwinkelmessungen an unstrukturierten und strukturierten MST vor und nach einer Beschichtung durchgeführt (s. Abb. 6.9, A). Sowohl die unstrukturierten als auch die strukturierten MST wurden mittels Spritzguss gefertigt. Die Messungen der drei unstrukturierten MST zeigen, unabhängig vom Material, unbeschichtet wie beschichtet ähnliche Kontaktwinkel. Wie aus der Literatur bekannt, weist hierbei das unbeschichtete COC mit $91,2^\circ$ den größten Wasserkontaktwinkel auf und liegt damit um ca. 3° über den Werten der PC-MST. Durch die Beschichtung werden die Wasserkontaktwinkel aller MST im Mittel um ca. 30° vergrößert (s. Abb. 6.9, A).

Der Vergleich mit den strukturierten MST zeigt eine signifikante Vergrößerung der Wasserkontaktwinkel sowohl vor als auch nach der Beschichtung. Die Gegenüberstellung (s. Abb. 6.9, A) zeigt, dass die Wasserkontaktwinkel bei den unbeschichteten, strukturierten MST stärker variieren als bei den unstrukturierten MST. Allein durch die Strukturierung (unbeschichtet) vergrößert sich der Wasserkontaktwinkel im Vergleich zu den unstrukturierten Oberflächen bei PC2400 um ca. 30° , bei PC2805 um ca. 22° und beim COC6017 um ca. 40° (s. Abb. 6.9, A).

Diese Ergebnisse lassen sich sowohl mit den Dimensionen der Mikrostrukturen als auch mit den Unterschieden in den physikochemischen Eigenschaften der verschiedenen Polymere begründen. Wie die Messungen an den strukturierten MST zeigen, führt die Beschichtung allgemein zu einer weiteren Erhöhung der Hydrophobizität, bezüglich des Materials aber auch zu einer Angleichung. Das COC zeigt nach der Beschichtung die geringste Zunahme der Hydrophobizität. Bemerkenswert ist jedoch, dass das strukturierte COC6017 unbeschichtet einen Kontaktwinkel von ca. 130° aufweist. Dieser Kontaktwinkel deutet auf eine Hydrophobizität hin, die eine Tropfengenerierung mit einem entsprechend strukturierten FMS auch ohne eine Beschichtung zuließe.

Die Analyse der freien Oberflächenenergie vor und nach der Beschichtung der drei strukturierten MST ergab, dass sowohl die Strukturierung als auch die Beschichtung eine signifikante Senkung der freien Oberflächenenergie hervorruft (s. Abb. 6.9, B). Dabei resultierte die Oberflächenenergie der drei Polymere hauptsächlich aus dem dispersen Anteil. Bei den unstrukturierten Oberflächen lag der polare Anteil vor und nach der Beschichtung unter 1 mN/m . Durch die Strukturierung erhöhte sich der polare Anteil bei den unbeschichteten Oberflächen, jedoch max. um ca. $4,5 \text{ mN/m}$. Nach der Beschichtung der strukturierten Oberflächen weisen diese einen polaren Anteil von unter $0,2 \text{ mN/m}$ auf.

Die Bestimmung der Oberflächenenergie nach einer C_4F_8 -Beschichtung zeigt, dass dadurch die Benutzbarkeit im Vergleich zu den unstrukturierten Oberflächen reduziert wird. Die Messung der strukturierten Polymeroberflächen ergab nach der Beschichtung allgemein Werte für die Oberflächenenergie von unter 2 mN/m . Alle drei strukturierten Polymere weisen nach der Beschichtung einen niederenergetischen Zustand auf. Daraus resultiert eine niedrige Benetzbarkeit. Die hohen Wasserkontaktwinkel resultieren aus einer heterogenen Benetzung der strukturierten Polymeroberflächen. Der für die Messung des Kontaktwinkels auf die strukturierte, beschichtete Polymeroberfläche gesetzte Wassertropfen befindet sich im Cassie Baxter-Stadium [152, 203].

Der Vergleich der strukturierten mit den unstrukturierten MST zeigt, dass ohne die C_4F_8 -Beschichtung sowohl der Wasserkontaktwinkel als auch die Oberflächenenergie zunimmt. Eine höhere Oberflächenenergie weist auf eine höhere Benetzbarkeit hin. Die Vergrößerung der Wasserkontaktwinkel bei den unbeschichteten, strukturierten MST resultiert aus einer homogenen Benetzung der strukturierten Polymeroberfläche. Der zur Kontaktwinkelmessung auf die Oberfläche gesetzte Wassertropfen befindet sich im Wenzel-Stadium [151, 204].

6.5 Einfluss des Temperierungsmediums

Im Rahmen einer abschließenden Versuchsreihe wurde der Einfluss des Temperierungsmediums auf die Höhe der Strukturelemente untersucht. Bei den vorherigen Untersuchungen wurde Öl zur Temperierung der Formeinsätze genutzt. Das hatte zur Folge, dass ein Ölfilm auf und vor allem in den Mikrokavitäten der Formeinsätze zurückblieb. Es wurde angenommen, dass das Öl die Ausbildung der Mikrostruktur einschränkte. Die Verwendung von Wasser zur Temperierung der Formeinsätze lässt eine höhere Mikrostruktur erwarten, da das Wasser bei der vorgegebenen Formtemperatur im Gegensatz zum Öl verdampft. Dadurch konnte die Polymerschmelze tiefer in die Mikrokavitäten eindringen. Die Untersuchungen zum Einfluss des Temperierungsmediums auf die Ausbildung der Mikrostruktur erfolgten anhand der Polymere PC2400 und COC6017. Die Betrachtung der Mikrostruktur zeigte, dass ein Wechsel des Temperierungsmediums bei PC2400 von Öl (s. Abb. 6.10, A) auf Wasser (s. Abb. 6.10, B) die Ausbildung der Mikrostruktur signifikant beeinflusst.

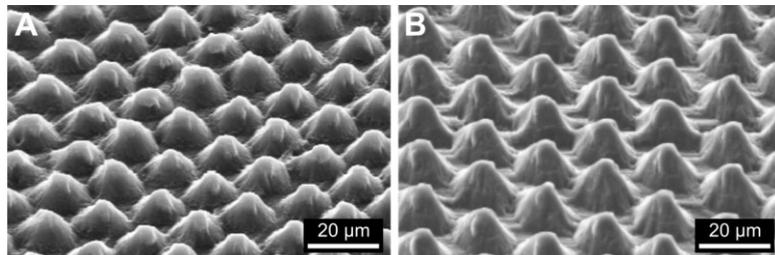


Abb. 6.10: Gegenüberstellung der Mikrostruktur eines PC2400 MST in Abhängigkeit zum eingesetzten Temperierungsmedium anhand von REM-Aufnahmen; A – Temperierungsmedium Öl; B – Temperierungsmedium Wasser.

Die Gegenüberstellung der mit den Wasser und Öl abgeformten MST zeigt, dass die Verwendung von Wasser eine weitere Erhöhung der Strukturhöhe bewirkt (s. Abb. 6.11). Für PC2400 und COC6017 wurde eine Zunahme der Strukturhöhe von ca. 2 μm ermittelt.

Die Beurteilung der Hydrophobizität anhand des Wasserkontaktwinkels zeigt jedoch beim PC2400-MST nur eine geringfügige Steigerung um ca. 2°. Bei COC6017 erfolgte hingegen keine messbare Erhöhung der Hydrophobizität. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass hinsichtlich der Strukturdimensionen das Maximum in Bezug zur Steigerung der Hydrophobizität erreicht wurde.

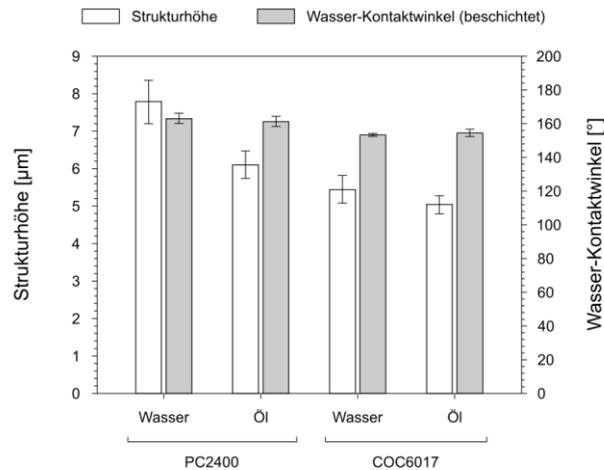


Abb. 6.11: Gegenüberstellung der Höhe der Strukturelemente und der Wasserkontaktwinkel nach einer Beschichtung mit C_4F_8 vom jeweils ausgewählten Polymer (PC2400 und COC6017) bei der Verwendung von Wasser und Öl zur Temperierung der Formeinsätze.

6.6 Gegenüberstellung der mikrostrukturierten Oberfläche mit der eines Lotusblattes

Der Lotuseffekt resultiert aus einer hierarchisch geordneten mikro- und nanostrukturierten Oberfläche. Die Mikrostruktur des Lotusblattes (*Nelumbo nucifera*) wird von der Epidermis in Form der Papillen gebildet, die Nanostruktur von einer hydrophoben epikutikularen Wachsschicht auf der Oberfläche des Blattes.

Bei der technischen Oberfläche (im Rahmen der Arbeit mittels Laserablation erzeugt und durch das Spritzgießen auf die MST übertragen) bildet das Polymer die Mikrostruktur und beim Erstarren der Polymerschmelze zusätzlich eine Nanostruktur. Der hydrophobe Charakter der Wachsschicht wird durch die C_4F_8 -Beschichtung erreicht.

Eine Gegenüberstellung der Mikrostruktur eines PC2400-MST mit der des Lotusblattes zeigt eine hohe Übereinstimmung (s. Abb. 6.12). Für die Gegenüberstellung wurden die Oberflächen mittels AFM untersucht. Zur Vermeidung von Artefakten wurde das Lotusblatt mit Glycerin stabilisiert.

Die technische Oberfläche weist eine geordnete Ausrichtung der Mikrostruktur auf (s. Abb. 6.12, A1), was dem einheitlichen Fertigungsverfahren geschuldet ist und von der stochastischen Anordnung der Mikrostruktur des Lotusblattes (s. Abb. 6.12, B1) abweicht. Die Dimensionen der Mikrostruktur hinsichtlich der Abstände und Höhen zeigen eine hohe Übereinstimmung (s. Abb. 6.12, A1 und B1).

Die Gegenüberstellung der Nanostruktur des Lotusblattes mit der der technischen Oberfläche nach einer C_4F_8 -Beschichtung zeigt in beiden Fällen eine stochastische Anordnung. Die Nanostruktur der technischen Oberfläche ist etwas flacher und einheitlicher als die des untersuchten Lotusblattes.

Das Ergebnis der Bestimmung der physikochemischen Eigenschaften der mikrostrukturierten und beschichteten Oberflächen zeigt die gewünschte geringe Benetzbarkeit (s. S. 99, Abb. 6.9). Die Was-

serkontaktwinkel der beschichteten MST weisen mit ca. 160° ein vergleichbares Niveau im Vergleich zum Lotusblatt auf und zeigen eine superhydrophobe Oberflächencharakteristik [178].

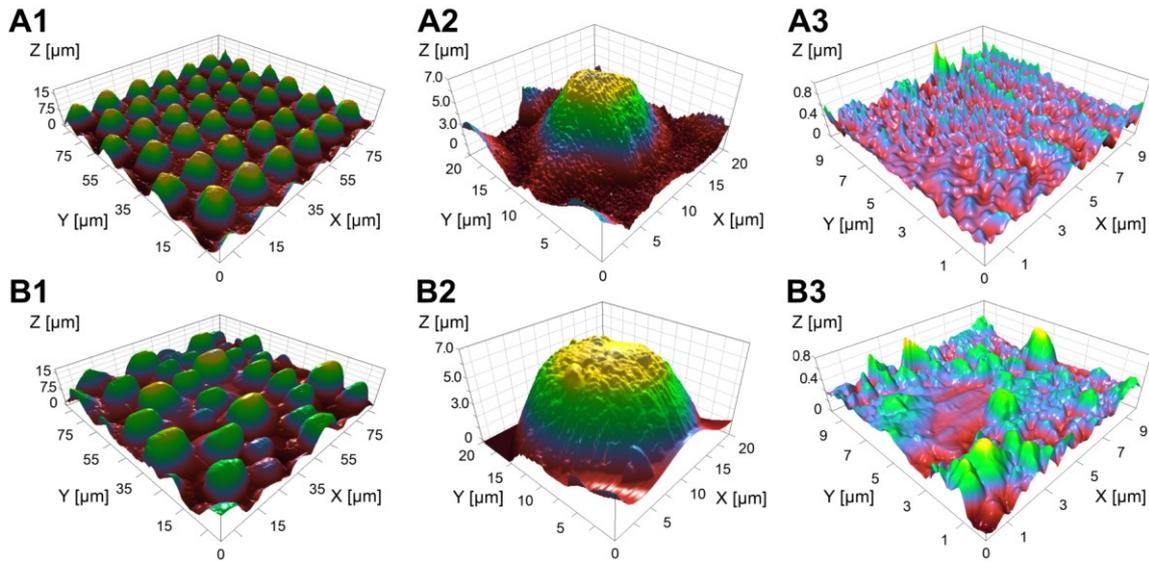


Abb. 6.12: Gegenüberstellung der Mikrostruktur (1 und 2) und der Nanostruktur (3); A – technische Oberfläche abgeformt aus PC2805; B – Oberfläche eines Lotusblattes (*Nelumbo nucifera*).

6.7 Tropfengenerierung mit mikrostrukturierten FMS

Die finale hierarchische Mikro- und Nanostruktur wurde für die finalen fluidischen Untersuchungen auf die Oberfläche von FMS zur Tropfengenerierung mittels Spritzguss übertragen (s. Abb. 6.13, A - C). Die Mikrostruktur wurde hierbei auf die Oberfläche des Hauptkanales, in dem die Tropfengenerierung erfolgt, sowie auf die Randbereiche um den Hauptkanal und auf die Übergänge zu den Seitenkanälen übertragen (s. Abb. 6.13, C).

Die FMS-Formeinsätze weisen eine im Vergleich zu den abgeformten FMS-Formteilen komplementäre, erhabene Kanalstruktur auf. Um die erforderlichen Kavitäten für die Mikrostruktur auf die Oberfläche des Hauptkanals der FMS-Formeinsätze aufbringen zu können, müssen diese während der Laserstrukturierung gekippt werden (s. Kapitel 4.2.2). Das Kippen der FMS-Formeinsätze stellt sicher, dass der Laserstrahl die gekrümmte Oberfläche im rechten Winkel strukturiert. Für eine exakte Anordnung der Mikrokavitäten muss das Kippen der Form mit einer hohen Präzision im einstelligen Mikrometerbereich erfolgen.

Zur Charakterisierung der Mikrostruktur wurde ein 3D-DOM der Oberfläche am Scheitelpunkt des Hauptkanals erstellt (s. Abb. 6.13, D). Das 3D-DOM bildet die Anordnung der Mikrostruktur im Verhältnis zur Krümmung des Hauptkanals ab. Das Oberflächenmodell zeigt, dass die hohe Präzision beim Kippen der Form nicht über die gesamte gekrümmte Kanaloberfläche gewährleistet werden konnte. Aus diesem Grund weist die Mikrostruktur an drei Stellen im Hauptkanal einen Versatz auf (s. Abb. 6.13, C und D).

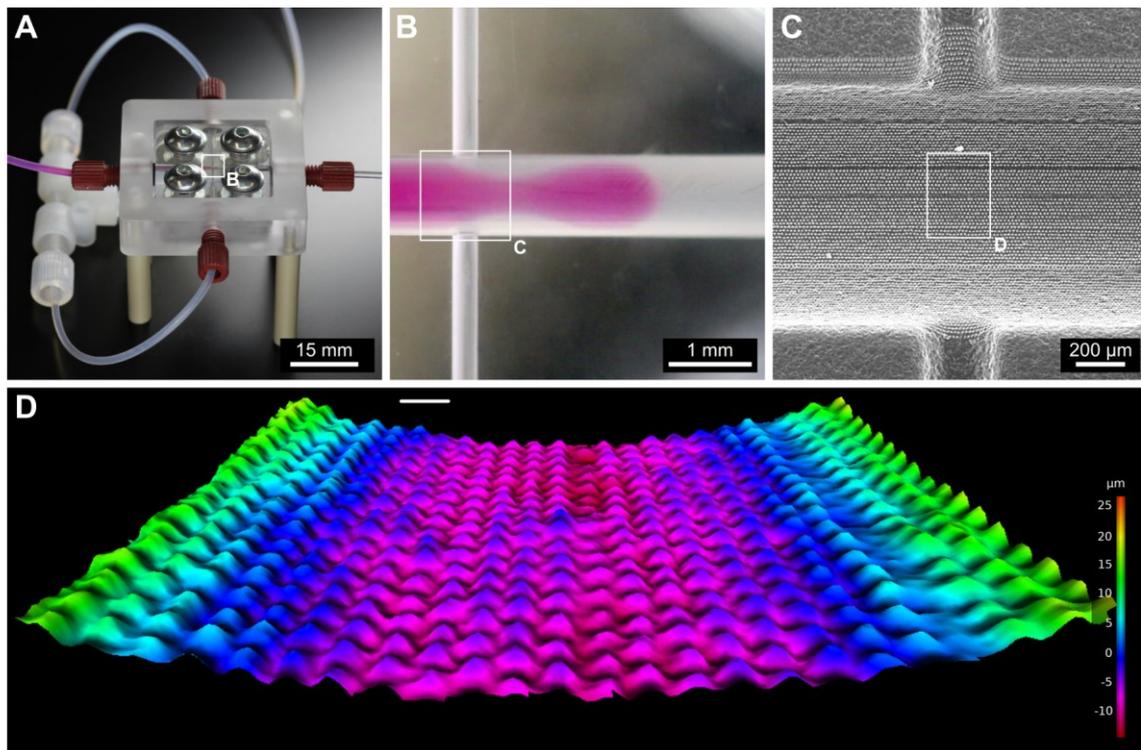


Abb. 6.13: Dimensionen und Anordnung der Mikrostruktur auf den 2D 90° FMS, A – FMS integriert in die tropfenbasierte mikrofluidische Plattform; B – Tropfengenerierung im mikrostrukturierten FMS; C – REM-Aufnahmen der Mikrostruktur im Bereich der Tropfengenerierungszone; D – DOM der Mikrostruktur im Hauptkanal.

Die Charakterisierung des Einflusses der hierarchischen Mikro- und Nanostruktur auf die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung und die Schichtstabilität erfolgte anhand fluidischer Untersuchungen mit DMEM und Vollblut (s. S. 82, Tab. 5.6). Hierfür wurden sechs unterschiedlich konfigurierte FMS eingesetzt (s. Tab. 6.3). Als Separationsmedium für die Tropfengenerierung wurde bei allen Untersuchungen PFD eingesetzt. Bei den Experimenten wurde das PFD (Q_k , kontinuierliche Phase) mit 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ je Seitenkanal in das FMS eingeleitet, das Probenmedium (Q_d) mit 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ in den Hauptkanal.

Tab. 6.3: FMS – Konfigurationen und die untersuchten Probenmedien.

FMS Nr.	Polymer	strukturiert	beschichtet	Probenmedium
1	PC2400	ja	ja	Vollblut
2	PC2400	ja	ja	DMEM
3	PC2805	ja	ja	DMEM
4	COC6017	ja	ja	DMEM
5	PC2805	nein	ja	DMEM
6	COC6017	ja	nein	DMEM

Zur Untersuchung des Einflusses der Strukturierung wurden mit den angegebenen Parametern 5 min Tropfen generiert (ein Lauf). Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung und der Stabilität der Beschichtung wurden sechs identische Läufe mit jedem FMS durchgeführt. Die Bewertung der Reproduzierbarkeit erfolgte anhand der Streuung des mittleren Tropfenvolumens über die sechs unabhängigen Läufe, somit über einen Zeitraum von 30 min.

Zur Verdeutlichung des Einflusses der physikochemischen Oberflächeneigenschaften auf die Tropfengenerierung sind die Wasserkontaktwinkel sowie die freie Oberflächenenergie der untersuchten FMS, entsprechend ihrer spezifischen Konfiguration, in Abb. 6.14, A aufgeführt.

Mit den strukturierten, beschichteten FMS aus den drei untersuchten Polymeren (s. Tab. 6.3, Nr. 1 - 4) konnten alle sechs Läufe ohne eine erkennbare Interaktion des Probenmediums mit der Kanaloberfläche durchgeführt werden.

Das unstrukturierte, beschichtete PC2805-FMS (s. Tab. 6.3, Nr. 5) ermöglichte hingegen nur zwei reproduzierbare Läufe. Beim dritten Lauf wurde eine Adhäsion des DMEM an der Kanaloberfläche beobachtet. Durch die Interaktion verringerte sich die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung merklich. Zum Schluss des dritten Laufes konnten die Tropfen nicht mehr reproduzierbar generiert werden, somit standen für die Gegenüberstellung nur die Ergebnisse der zwei ersten Läufe zur Verfügung.

Mit dem strukturierten, unbeschichteten COC6017-FMS (s. Tab. 6.3, Nr. 6) wurden drei Läufe ohne störende Beeinflussung durchgeführt. Bei diesem FMS erfolgte die Tropfengenerierung ab dem vierten Lauf nicht mehr reproduzierbar. Folglich wurden für den Vergleich die Ergebnisse der ersten drei Läufe genutzt.

Aus den Daten wurden für jedes FMS das mittlere Tropfenvolumen sowie deren Standardabweichung und die entsprechenden VK-Werte ermittelt (s. Abb. 6.14, B).

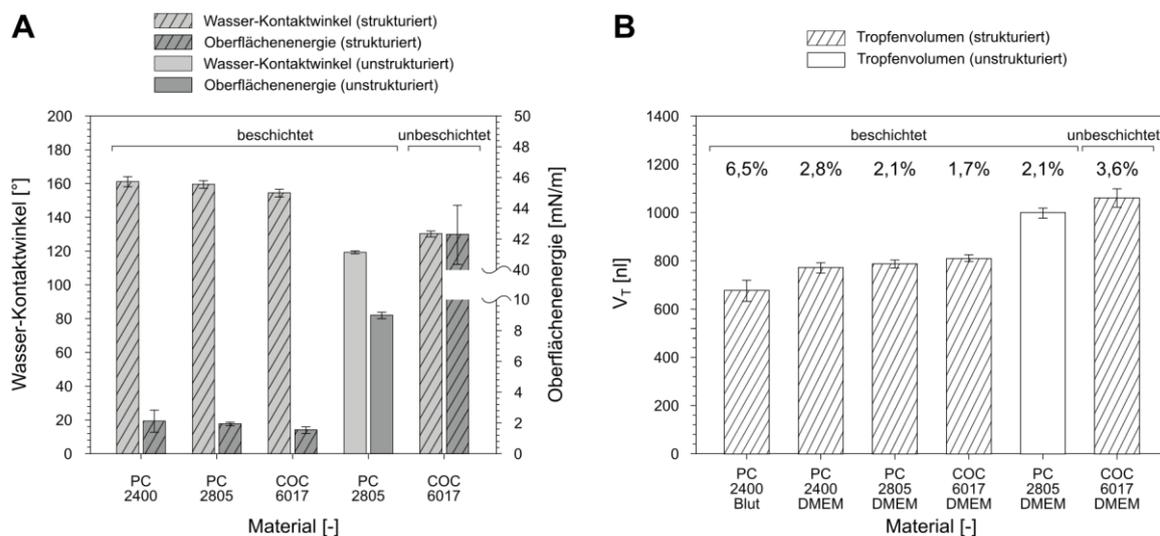


Abb. 6.14: Ergebnisse der fluidischen Untersuchungen in Abhängigkeit von der FMS-Konfiguration; A – Wasserkontaktwinkel und die freie Oberflächenenergie der untersuchten FMS; B – mittleres Tropfenvolumen, deren Standardabweichung und die VK-Werte in Abhängigkeit von dem untersuchten Probenmedium und der Konfiguration der FMS.

Zuerst erfolgte die Beurteilung der Ergebnisse in Bezug zum Tropfenvolumen anhand der Untersuchungen mit DMEM. Bei den drei strukturierten, beschichteten FMS (s. Tab. 6.3, Nr. 2 – 4) erfolgte die Tropfengenerierung im Vergleich zu den zwei weiteren FMS, die mit DMEM untersucht wurden, bezüglich des mittleren Tropfenvolumens auf einem niedrigen Niveau ($V_T \sim 772 - 812$ nl). Zudem nahm das Tropfenvolumen dieser drei FMS mit sinkendem Wasserkontaktwinkel ab (s. Abb. 6.14, B).

Dieser Zusammenhang lässt sich damit erklären, dass ein höherer Wasserkontaktwinkel (s. Abb. 6.14, A) mit einer höheren Hydrophobizität einhergeht und hierdurch die Adhäsion des DMEM an der Kanaloberfläche geringer ausfällt. Der Tropfenabriss erfolgt früher als bei einer niedrigeren Hydrophobizität der Oberflächen, wodurch das Tropfenvolumen reduziert wird.

Der Vergleich des mittleren Tropfenvolumens des unstrukturierten, beschichteten PC2805-FMS mit dem strukturierten, unbeschichteten COC6017-FMS (s. Abb. 6.14, B) zeigt, dass die Tropfengenerierung im COC6017-FMS auf einem höheren Volumenniveau erfolgt (PC2805 $V_T \sim 1000$ nl, COC6017 $V_T \sim 1062$ nl). Die Messung der Wasserkontaktwinkel weist im Vergleich zum unstrukturierten, beschichteten PC2805-FMS auf eine höhere Hydrophobizität der strukturierten, unbeschichteten COC6017-Oberfläche hin (s. Abb. 6.14, A).

Diese Ergebnisse widersprechen der zuvor getroffenen Aussage, dass ein höherer Wasserkontaktwinkel auf eine höhere Hydrophobizität schließen lässt und hierdurch das Tropfenvolumen sinkt. Der Wasserkontaktwinkel allein ist folglich nicht das einzige Kriterium zur Begründung für die Unterschiede der Tropfenvolumina, vielmehr muss die freie Oberflächenenergie als ein weiteres Kriterium berücksichtigt werden.

Die Messungen der freien Oberflächenenergie beider FMS zeigen, dass hierbei das Tropfenvolumen in Abhängigkeit zur Höhe der freien Oberflächenenergie steigt. Zur Begründung sei erwähnt, dass die unbeschichtete COC6017-Oberfläche durch die fehlende C_4F_8 -Beschichtung keinen Fluoranteil aufweist. Es ist bekannt, dass insbesondere fluorhaltige Oberflächen sowohl eine geringe Adhäsionsneigung zu polaren wie auch unpolaren, nichtfluorierten Medien aufweisen. Vielmehr neigen solche Oberflächen dazu, nur von fluorierten Medien benetzt zu werden (Fluorphilie). Bei den hier beschriebenen Untersuchungen wird zur Tropfengenerierung vollständig perfluoriertes PFD als kontinuierliche Phase eingesetzt. Weiterhin ist bekannt, dass PFD auf Oberflächen mit einem Fluoranteil einen schützenden Film bildet. Diese Eigenschaft des PFD zur Filmbildung kommt aufgrund der fehlenden C_4F_8 -Beschichtung bei den unbeschichteten Oberflächen des COC6017 nicht zum Tragen. Demzufolge führt der dadurch verursachte verzögerte Abriss des DMEM zu größeren Tropfenvolumina.

Das Ergebnis, dass sowohl der polare wie auch der disperse Anteil der freien Oberflächenenergie beim strukturierten, unbeschichteten COC6017 über dem des unstrukturierten, beschichteten PC2805 liegt, führt zu der Schlussfolgerung, dass die freie Oberflächenenergie eine bessere Beurteilung des Einflusses der Oberflächeneigenschaften auf die Tropfenbildung zulässt.

Allerdings ist diese Annahme nicht auf die strukturierten, beschichteten FMS übertragbar, da sich hier das Tropfenvolumen indirekt proportional zur freien Oberflächenenergie verhält. Eine abschließende Begründung für diesen Zusammenhang kann derzeit nicht gegeben werden, wird jedoch im Rahmen weiterführender Experimente untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass ein direkter Vergleich unstrukturierter und strukturierter sowie unbeschichteter und beschichteter FMS nicht uneingeschränkt möglich ist.

Für die abschließende Betrachtung der Reproduzierbarkeit muss berücksichtigt werden, dass mit dem unstrukturierten, unbeschichteten FMS nicht alle sechs geplanten Läufe durchgeführt werden konnten. Aus diesem Grund ist ein Vergleich der Reproduzierbarkeit mit den übrigen FMS nicht möglich. Jedoch zeigen das strukturierte, beschichtete PC2400- und PC2805-FMS mit VK-Werten von 2,1 % und

2,8 % eine geringe Streuung der Tropfenvolumina. Das strukturierte, beschichtete COC6017-FMS hebt sich mit einem VK-Wert von 1,7 % jedoch nochmals von den anderen FMS ab. Mit dieser Konfiguration konnte die höchste Reproduzierbarkeit bei der Tropfengenerierung erreicht werden.

Für die Tropfengenerierung mit Vollblut wurde ein strukturiertes, beschichtetes PC2400-FMS verwendet (Tab. 6.3, Nr. 1). Die Tropfenbildung erfolgte reproduzierbar über alle sechs Läufe (insgesamt 30 min). Das mittlere Tropfenvolumen war mit $V_T \sim 677$ nl deutlich geringer und die Streuung mit einem VK-Wert von 6,5 % deutlich höher als bei den Untersuchungen mit DMEM. Die Ursache für diesen hohen VK-Wert wird in der komplexen Zusammensetzung des Blutes (höhere Proteinkonzentration, Blutzellen) gesehen, was im Vergleich zu den Versuchen mit DMEM auch bei superhydrophoben Kanaloberflächen zu Wechselwirkungen des Blutes mit der Kanaloberfläche führt [205].

Die Experimente mit DMEM und Vollblut wurden mit den vier strukturierten, beschichteten FMS (s. Tab. 6.3, Nr. 1-4) fortgesetzt, um die Langzeitstabilität der Tropfengenerierung zu untersuchen. Dazu wurden kontinuierlich an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 6 h Tropfen mit DMEM und Vollblut generiert. Mit den drei strukturierten, beschichteten FMS (s. Tab. 6.3, Nr. 2 – 4) konnten Tropfen mit DMEM über die gesamte Testdauer von 12 h störungsfrei erzeugt werden. Bei der Tropfenbildung aus Vollblut mit dem strukturierten, beschichteten PC2400-FMS (s. Tab. 6.3, Nr. 1) wurden nach ca. 1 h punktuelle Adhäsionen des Blutes an der Kanaloberfläche beobachtet. Diese Adhäsion führte jedoch nicht zu einer Beeinflussung der Tropfengenerierung.

Weiterführende Untersuchungen mit den strukturierten, beschichteten FMS (s. Tab. 6.3, Nr. 2 – 4) zeigten, dass diese Systeme ohne erneute Beschichtung eine reproduzierbare und stabile Tropfengenerierung mit DMEM für mehr als zwei Wochen ermöglichen. Die Experimente haben gezeigt, dass spritzgegossene, mikrostrukturierte und plasmabeschichtetes FMS einen stabilen und langfristigen Tropfengenerierungsprozess garantieren. Das bedeutet, dass diese FMS als Disposable für Routineanwendungen im medizinischen Bereich hervorragend geeignet sind, aber auch für Anwendungen im Bereich der Forschung über lange Zeiträume funktionieren und damit eine kostengünstige Möglichkeit zur Entwicklung beispielsweise von miniaturisierten Bioprozessen darstellen.

Zusammenfassend senkt die finale hierarchische Mikro- und Nanostruktur in Kombination mit einer hydrophoben Beschichtung (C_4F_8) die freie Oberflächenenergie der FMS-Kanaloberfläche. Folglich wird die Tendenz insbesondere von Vollblut, an der Kanaloberfläche zu haften, verringert. Nach Cassie und Baxter [203, 206] konnte die Kontaktfläche zwischen den Tropfen und der Kanaloberfläche deutlich reduziert werden. Insbesondere für hydrophobe Oberflächen [207] sollte diese reduzierte Kontaktfläche auch die Neigung zur Proteinadhäsion verringern. Eine Kombination der Mikrostruktur und der hydrophoben Beschichtung reduziert die Adhäsion biologisch relevanter Medien an der Kanaloberfläche signifikant. Die entwickelten spritzgegossenen FMS unterstützen einen langzeitstabilen Tropfengenerierungsprozess mit einer hohen Reproduzierbarkeit.

7 Diskussion und Ausblick

7.1 Diskussion

Die detaillierte Diskussion der Ergebnisse erfolgte bereits in den jeweiligen Kapiteln dieser Arbeit. Die hier abschließend geführte allgemeine Diskussion fasst die Bewertung der Ergebnisse im Kontext mit der Aufgabenstellung zusammen.

Das Ziel der Arbeit, die Entwicklung und Charakterisierung einer tropfenbasierten mikrofluidischen Plattform, wurde erreicht. Hierbei wurden die wesentlichen Aspekte für Wirkstoffscreenings und Biomarker-Analysen berücksichtigt. Die in diesem Zusammenhang für die angestrebten Anwendungen zu beantwortenden Fragen bezogen sich auf konstruktive Maßnahmen und relevante Prozessparameter. Einflussgrößen wie die Kanalanordnung und deren Oberflächenbeschaffenheit sowie der Einfluss der Volumenströme und verschiedener Probenmedien auf die Tropfengenerierung wurden umfassend untersucht. Die Funktion des Systems konnte für unterschiedliche Proben wie Zellkulturmedien, Serum und Vollblut nachgewiesen werden. Wechselwirkungen des Probenmediums mit der Kanaloberfläche wurden vor allem mit mikrostrukturierten Modulen verhindert.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Beschichtung mit dem C_4F_8 -Präkursor sowohl mit dem Atmosphärendruck-Plasmaverfahren, als auch mit dem Niederdruck-Plasmaverfahren geeignete Voraussetzungen bietet, um mikrofluidische Systeme für tensidfreie tropfenbasierte Anwendungen zu hydrophobisieren. Die Beschichtung weist eine ausreichend hohe Hydrophobizität auf und ermöglicht für eine Vielzahl biologisch relevanter Medien stabile Prozessbedingungen.

Das Verfahren zur Strukturierung der Spritzguss-Formeinsätze und die anschließende Hydrophobisierung der FMS-Formteile mittels Niederdruck-Plasmaverfahren haben sich als geeignet erwiesen, um dem Lotusblatt ähnliche Oberflächeneigenschaften zu erzeugen (s. Kapitel 6). Im Vergleich zu unstrukturierten Oberflächen bewirkt die Strukturierung eine signifikante Erhöhung der Hydrophobizität und im Zuge dessen eine Verringerung der Benetzbarkeit. Die anschließende C_4F_8 -Beschichtung führt zu superhydrophoben Oberflächeneigenschaften. Durch die Strukturierung konnte die Standzeit der FMS für kritische Medien wie Vollblut deutlich erhöht werden.

Für die Strukturierung der Spritzguss-Formeinsätze mittels Femtosekunden-Laser ist zwar ein zusätzlicher Bearbeitungsschritt notwendig, die Kosten sind jedoch im Vergleich zu den Gesamtkosten für die Fertigung der Spritzguss-Formeinsätze vergleichsweise gering. Darüber hinaus wären Anwendungen mit kritischen Medien wie Vollblut ohne Strukturierung der spritzgegossenen FMS-Formteile

generell nicht möglich. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die niedrige Rauheit unstrukturierter, mittels Spritzguss gefertigter FMS-Formteile schon bei gewöhnlichen Kulturmedien (z.B. DMEM) nach einer kurzen Prozessdauer (max. 10 min) zu einer Störung der Tropfengenerierung führt (s. Abb. 7.1, FMS 5).

Durch die Wahl eines Polymers wie COC kann die Oberflächenstrukturierung eine weitere Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung ermöglichen. Ein Vergleich der VK-Werte bei einer Förderratenkombination von 500/100 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit DMEM zeigt bei einem gefrästen 2D 90°FMS aus PC2805 einen VK-Wert von 2,6 % (s. Abb. 7.1, FMS 1), während der VK-Wert für ein mikrostrukturiertes spritzgegossenes COC6017-FMS lediglich 1,7 % beträgt (s. Abb. 7.1, FMS 4).

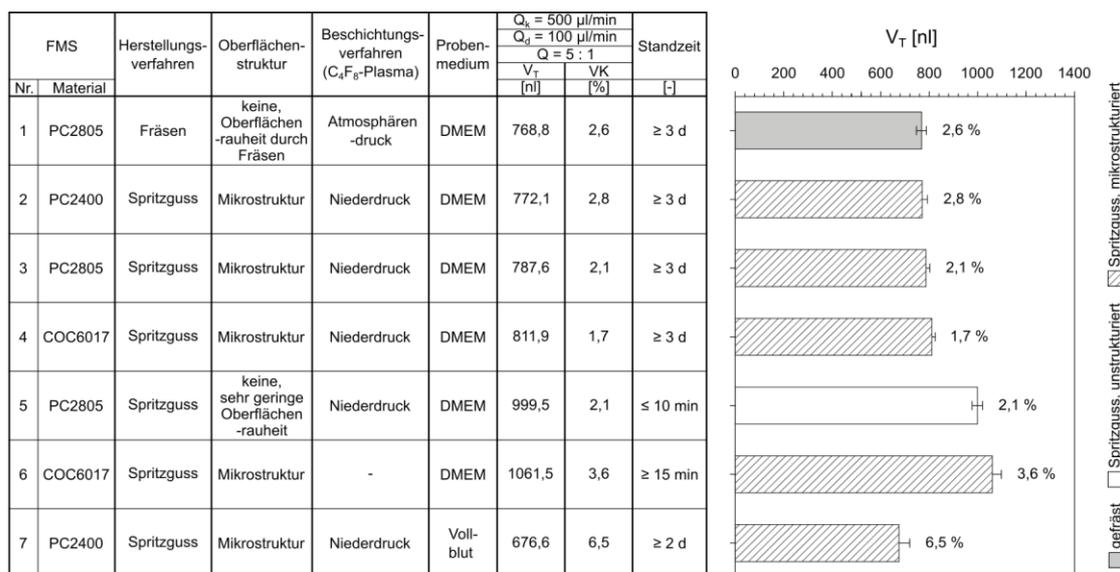


Abb. 7.1: Übersicht der mittleren Tropfenvolumina und der VK-Werte unterschiedlich konfigurierter 2D 90° FMS bei einer Förderratenkombination von 500/100 $\mu\text{l}/\text{min}$ für Untersuchungen mit DMEM und Vollblut.

Bei kurzzeitigen Anwendungen (ca. 15 min) mit strukturierten COC-FMS kann sogar auf eine Plasma-beschichtung verzichtet werden! Unter dem Aspekt, FMS als Disposable für einmalige Anwendungen einzusetzen, ist dies ein erheblicher wirtschaftlicher Vorteil. Der Verzicht auf eine Plasmabeschichtung führt jedoch zu einer Verringerung der Reproduzierbarkeit (s. Abb. 7.1, FMS 6).

Die erfolgreichen Untersuchungen mit Blut zeigen das Potenzial mikrostrukturierter Oberflächen für tropfenbasierte Anwendungen im Bereich der Life Science auf. Die hierbei auftretende Verringerung der Reproduzierbarkeit muss bei heterogenen Medien wie Blut akzeptiert werden (s. Abb. 7.1, FMS 7). Mit der Mikrostrukturierung und der anschließenden Plasmabeschichtung sind die Voraussetzungen für reproduzierbare und stabile Prozessbedingungen sowie eine hohe Standzeit für eine Vielzahl von unterschiedlichen Medien erfüllt (s. Abb. 7.1, FMS 2 – 4) und damit die Grundlagen für eine kommerzielle Nutzung geschaffen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen zu den Einflüssen auf die Tropfengenerierung (s. Kapitel 5) zeigen, dass durch die Wahl der Förderraten eine Variation der Tropfenvolumina um ca. 400 nl für die meisten FMS-Designs möglich ist (s. Tab. 7.1). Darüber hinaus beeinflussen die Förder-raten auch die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung. Eine zusammenfassende Übersicht über

die gemittelten Tropfenvolumina und die zugehörigen VK-Werte (Langzeitabweichungen) für alle Förderratenkombination und FMS-Designs (ohne Mikrostruktur) gibt Tab. 7.1.

Tab. 7.1: Übersicht der mittleren Tropfenvolumina und der KV-Werte aller untersuchten FMS-Design (ohne Mikrostruktur) und für alle Förderratenkombinationen.

FMS-Material	Q _k [µl/min]	250						500						1000					
	Q _d [µl/min]	100		50		25		200		100		50		400		200		100	
	Q [-]	2,5 : 1		5 : 1		10 : 1		2,5 : 1		5 : 1		10 : 1		2,5 : 1		5 : 1		10 : 1	
	Parameter	V _T	VK																
	Design/Einheit	[nl]	[%]																
PC2805	1D 90° FMS	983,4	2,9	863,0	4,8	814,8	6,9	958,6	4,7	827,6	6,8	719,3	5,5	882,8	3,4	746,7	3,9	656,5	5,1
PC2805	1D 45° FMS	1001,7	6,4	878,3	8,5	804,2	8,9	934,5	3,5	789,9	6,1	703,4	9,3	803,4	1,9	684,2	2,0	598,5	2,2
PC2805	2D 90° FMS	991,4	2,4	844,3	3,3	736,6	5,5	887,6	1,7	768,8	2,6	675,3	4,3	776,6	1,9	651,8	1,8	564,4	1,9
PC2805	2D 45° FMS	1032,7	3,4	851,8	2,6	739,4	1,9	916,6	3,3	755,2	2,0	643,7	2,6	787,1	2,1	640,3	2,7	533,9	4,3
PC2805	3D 45° FMS	862,8	1,8	750,2	2,5	680,5	4,0	737,9	1,9	619,7	4,4	543,1	4,3	614,2	2,4	496,6	4,7	437,2	5,9

Unabhängig von der Kanalanordnung zeigen alle FMS bei kurzen Prozessintervallen eine hohe Reproduzierbarkeit. Bei hohen Förderraten, insbesondere für eine Förderratenkombination von 1000/400 µl/min, gilt dieses für alle FMS-Designs auch über einen längeren Zeitraum (s. Tab. 7.1, KV-Werte der Langzeitabweichung). Für Prozesse, bei denen das Tropfenvolumen reproduzierbar über einen größeren Volumenbereich einstellbar sein soll, bieten für höhere Förderraten der kontinuierlichen Phase ($Q_k = 1000$ µl/min) das 2D 90° FMS und für niedrige Förderraten ($Q_k = 250$ µl/min) das 3D 45° FMS die besten Voraussetzungen.

Sollen FMS mit einem Seitenkanal (1D) eingesetzt werden (Kostengründe, einfacher Prozessaufbau), sind FMS mit einem 45° Winkel hinsichtlich der Reproduzierbarkeit bei höheren Förderraten der kontinuierlichen Phase besser geeignet als FMS mit einem 90° Winkel.

Weiterhin ist allgemein eine hohe Förderrate der kontinuierlichen Phase von 1000 µl/min niedrigeren Förderraten vorzuziehen, da hierbei das hohe Einleitungsvolumen die Reproduzierbarkeit der Tropfengenerierung bei den meisten FMS-Designs befördert.

Eine Betrachtung des Einflusses der Förderratenverhältnisse zwischen der kontinuierlichen Phase und der dispersen Phase zeigt, dass bei niedrigeren Förderratenverhältnissen ($Q = 2,5/1$) die Reproduzierbarkeit ebenfalls positiv beeinflusst wird. Jedoch ist eine Erhöhung der Förderrate der dispersen Phase und somit eine Verringerung des Förderratenverhältnisses zur kontinuierlichen Phase nicht unbegrenzt möglich, da hierdurch die Abstände der Tropfen zueinander zu gering werden. Dies kann einen unerwünschten Kontakt der Tropfen untereinander verursachen, der ohne Verwendung von Tensiden zu Tropfenvereinigungen und damit zum Zerstören der Tropfensequenz führt. Dieser Fall tritt schon bei einer Verringerung des Förderratenverhältnisses auf unter 2,5/1 ein.

Tropfenvereinigungen treten ebenso bei einer Erhöhung der Förderrate der kontinuierlichen Phase über 2000 µl/min auf. Soll der Durchsatz ohne die Verwendung von Tensiden erhöht werden, muss dies mittels einer Parallelisierung der Tropfengenerierung oder durch eine der Tropfengenerierung nachgeschaltete Abstandvergrößerung erfolgen.

Für Applikationen von Probenmedien mit sehr hohen oder niedrigen pH-Werten weisen sowohl die mit Atmosphärendruck- als auch mit Niederdruck-Verfahren erzeugten C₄F₈-Beschichtungen nicht die erforderliche Stabilität auf. Grundsätzlich bleibt festzustellen, dass nicht alle im Bereich der Bio-

wissenschaften oder der Chemie zum Einsatz kommen Medien mit dem im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen mikrofluidischen System verarbeitet werden können, was jedoch zu erwarten war.

Ein modifiziertes 3D-FMS könnte für solche Medien eine geeignete Alternative zur Tropfengenerierung darstellen, da hier die Proben im Zentrum des Hauptkanals fokussiert werden (s. Abb. 7.2, B). Im Gegensatz zu FMS mit einem oder zwei Seitenkanälen (s. Abb. 7.2, A) verhindert diese Art der Tropfengenerierung den Kontakt des Probenmediums mit der Kanaloberfläche.

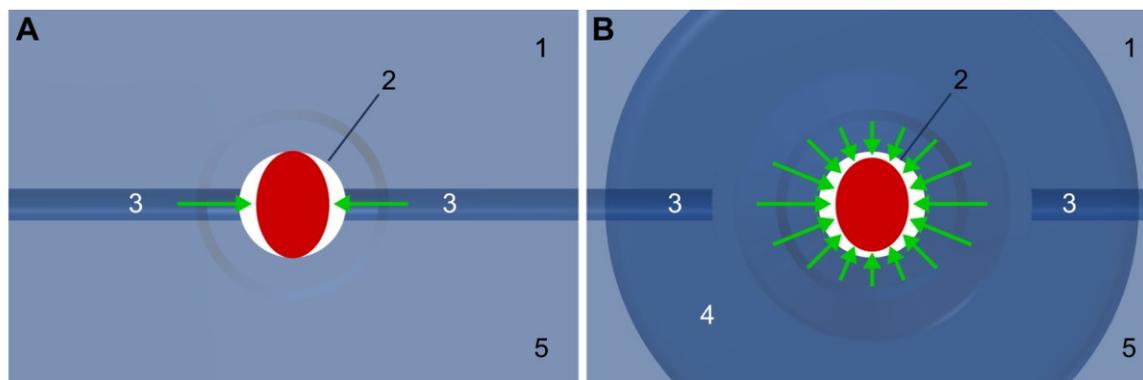


Abb. 7.2: Gegenüberstellung der Wirkungsrichtung der Kräfte (grüne Pfeile) die durch die Einleitung des PFD auf das Probenmedium (rot) an der Tropfengenerierungszone wirken; Querschnitt durch die Tropfengenerierungszone, A – 2D 90° FMS; B – 3D 45° FMS,

1: Deckelelement, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Bodenelement, 5: Schlauchjustierbohrung.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse des 2D 90° FMS und des 3D 45° FMS (s. Tab. 7.1) lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei einem 3D FMS durch eine Änderung des Einströmwinkels von 45° auf 90° eine Steigerung der Reproduzierbarkeit erreicht werden kann.

Zudem ist anzunehmen, dass zur bisherigen zweiseitigen Einleitung (s. Abb. 7.2, B, zwei Seitenkanäle) eine zusätzlich um 90° versetzte Einleitung der kontinuierlichen Phase (vierseitig) eine Verringerung des Strömungsgradienten im Ringspalt zur Folge hat und hierdurch ebenfalls die Reproduzierbarkeit erhöht wird.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und charakterisierten FMS, einschließlich der C₄F₈-Beschichtung, steht nunmehr eine robuste und vielseitig einsetzbare mikrofluidische Technologieplattform für tiefgreifende Untersuchungen zum Wirkstoffscreening und zur Biomarker-Analyse zur Verfügung.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Tropfengenerierung (s. Kapitel 5) und der Mikrostrukturierung (s. Kapitel 6) wurden im Rahmen zweier Publikationen vom Autor der Dissertation veröffentlicht [208, 209].

Eine Übersicht der Ergebnisse mit den gefrästet fünf FMS-Design zur Beurteilung der Standzeit ist in Anhang A.2 aufgeführt, eine Übersicht zum Einfluss der Förderraten im Anhang A3.

7.2 Ausblick

Die nächsten Schritte dienen der weiteren Charakterisierung der mikrofluidischen Plattform im Kontext mit der angestrebten Anwendung eines Wirkstoffscreening. Hierfür werden alle Module der Plattform verwendet und über einen Zeitraum von zehn Tagen zyklisch beansprucht. Ein Wirkstoffscreening auf der Basis von multizellulären Strukturen, beispielsweise von Sphäroiden, stellt eine komplexe Aufgabe dar, die für potenzielle Interessenten die Vielseitigkeit dieser Technologie abbildet. Eine erfolgreiche Applikation wie das Wirkstoffscreening kann zudem die Akzeptanz für diese Technologie erhöhen und sie am Markt etablieren.

Eine Übersicht über den Umfang der für ein vollständiges Wirkstoffscreening notwendigen Prozess- und Verfahrensschritte gibt Abb. 7.3.

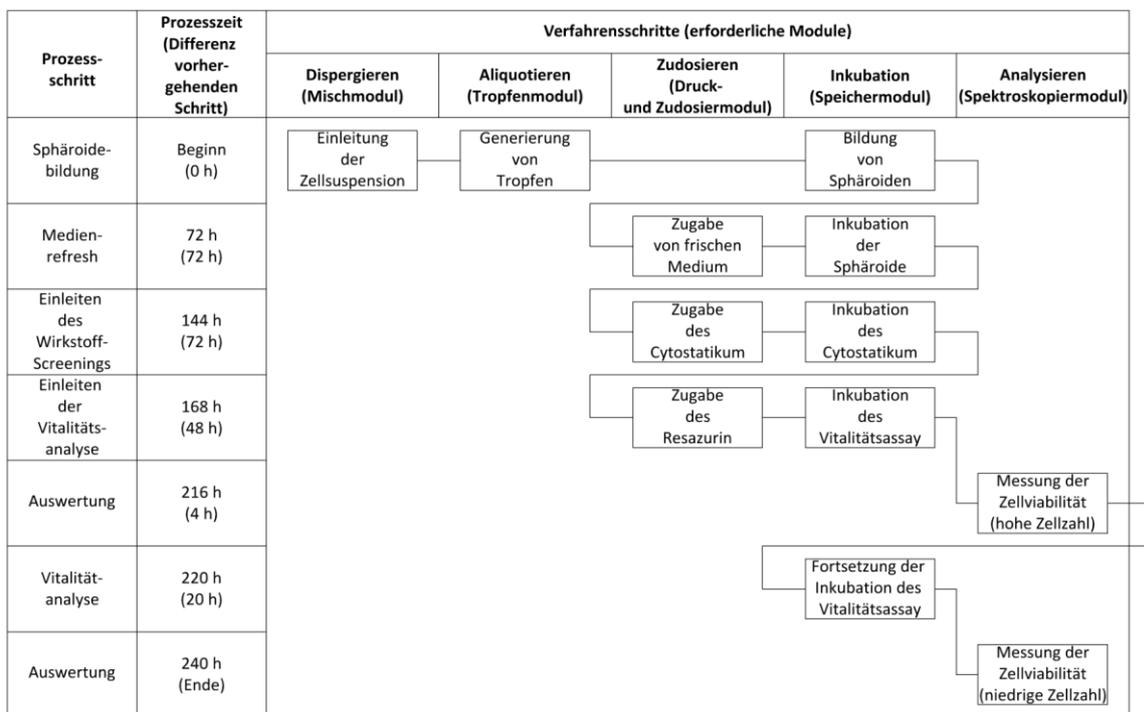


Abb. 7.3: Schema des Ablaufes eines Wirkstoffscreening auf der Basis multizellulärer Systeme.

Die ersten Untersuchungen für ein Wirkstoffscreening nach dem aufgeführten Schema haben gezeigt, dass mit den entwickelten Modulen die erforderlichen Prozessschritte zuverlässig durchgeführt werden können. Weitere Untersuchungen zur Umsetzung eines Wirkstoffscreening ermöglichen eine weitere Charakterisierung aller Module der mikrofluidischen Plattform. Der Fokus bei den zukünftigen Untersuchungen liegt jedoch vor allem auf der Optimierung des Handlings der Plattform für Wirkstoffscreenings. Denn nur ein zuverlässig einsetzbares und einfach zu handhabendes System kann am Markt etabliert werden. Zum Erreichen dieser Ziele liegt der Schwerpunkt der zukünftigen Arbeiten auf einer umfassenden Automatisierung des Systems und der Entwicklung spezieller Anwendungsprotokolle für Wirkstoffscreenings auf der Basis multizellulärer Systeme.

A Anhang

A.1 Comsol-Modell

Global Definitions

GLOBAL SETTINGS

Name	1.0_2DS_2D_90_FMS_1000_200_8_M.mph
Version	COMSOL Multiphysics 5.3a (Build-Version: 180)

USED PRODUCTS

COMSOL Multiphysics
CFD Module

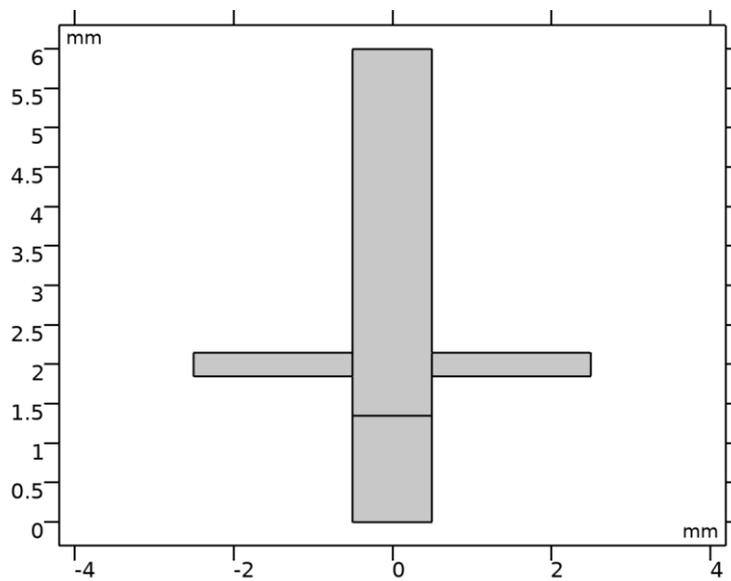
Parameters

PARAMETERS 1

Name	Expression	Value	Description
VSkp	1000[μl/min]	1.6667E-8 m ³ /s	Volumenstrom kontinuierliche Phase
SGkp	$VSkp / (((dSK^2) * \pi) / 4)$	0.23579 m/s	Strömungsgeschwindigkeit kontinuierliche Phase
VSdp	200[μl/min]	3.3333E-9 m ³ /s	Volumenstrom disperse Phase
SGdp	$VSdp / (((dHK^2) * \pi) / 4)$	0.0042441 m/s	Strömungsgeschwindigkeit disperse Phase
IS	0.5[m]	0.5 m	Länge Schlauch
dHK	1000[μm]	0.001 m	Durchmesser Hauptkanal
IHK	$(24[\text{mm}] - (ISj * 2)) / SF$	0.006 m	Länge Hauptkanal
dSK	300[μm]	3E-4 m	Durchmesser Seitenkanal
ISK	$(12[\text{mm}] - (ISj)) / SF$	0.003 m	Länge Seitenkanal
aAGF	0.5[mm]	5E-4 m	Abstand der Anfangsgrenzflächen zum Seitenkanal
kwKO	135[°]	2.3562 rad	Kontaktwinkel der Kanaloberfläche
visPFD	5.50174[mPa*s]	0.0055017 Pa·s	dynamische Viskosität PFD

Name	Expression	Value	Description
diPFD	1.93048[g/ml]	1930.5 kg/m ³	Dichte PFD
visDMEM	1.9237[mPa*s]	0.0019237 Pa·s	dynamische Viskosität DMEM
diDMEM	1.00847[g/ml]	1008.5 kg/m ³	Dichte DMEM
GFS_PFD_DMEM	35.15347[mN/m]	0.035153 N/m	Grenzflächenspannung PFD zu DMEM
RIP	5e-2[m/s]	0.05 m/s	Reinitialisierungsparameter
dGF	6.25e-6[m]	6.25E-6 m	Dicke der Grenzfläche
TFVS	2	2	Teilungsfaktor Volumenstroms
ISj	6[mm]	0.006 m	Länge Schlauchjustierung

Geometrie 1



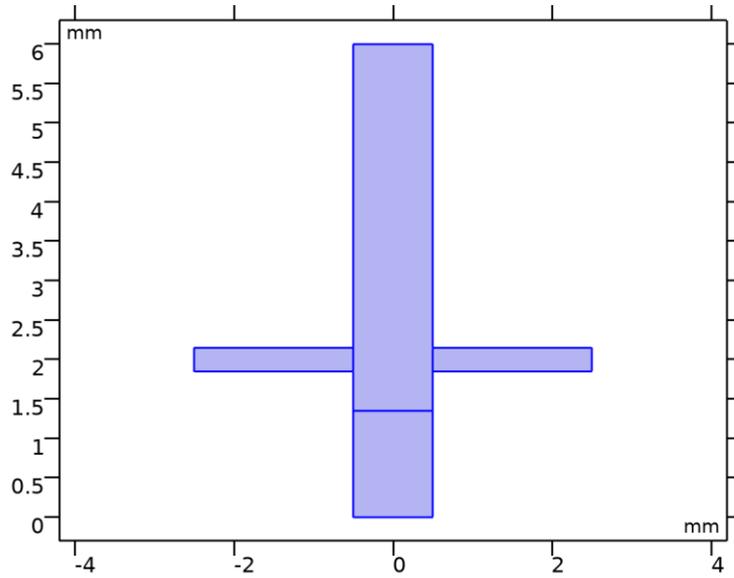
Geometrie 1

UNITS

Length unit	mm
Angular unit	deg

Materials

PFD

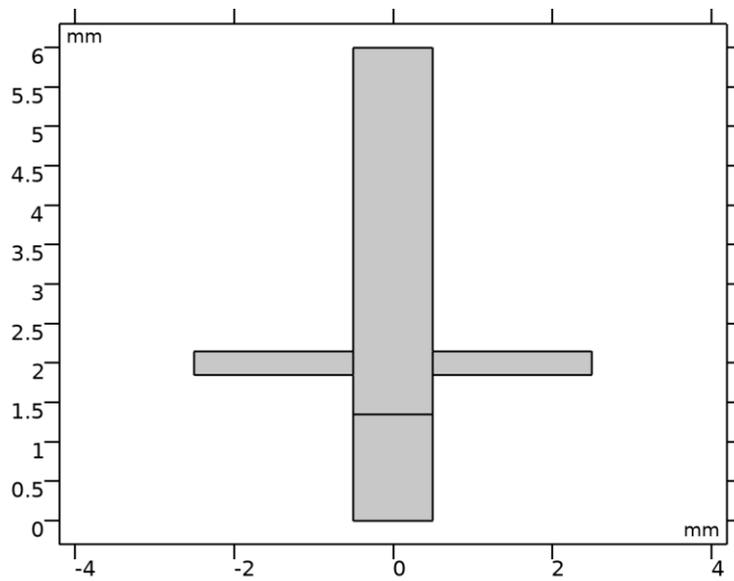


PFD

SELECTION

Geometric entity level	Domain
Selection	Domains 1-4

DMEM

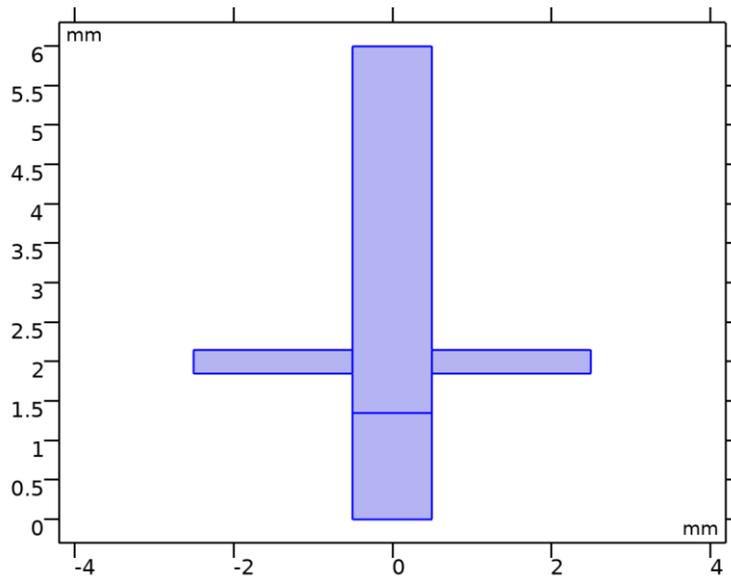


DMEM

SELECTION

Geometric entity level	Domain
Selection	No domains

Laminare Strömung



Laminare Strömung

EQUATIONS

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \cdot [-\rho \mathbf{l} + \mathbf{K}] + \mathbf{F}$$

$$\rho \nabla \cdot (\mathbf{u}) = 0$$

$$\mathbf{K} = \mu (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T)$$

FEATURES

Fluideigenschaften 1
Anfangswerte
Wand 1
Einlass kp 1
Einlass kp 2
Einlass dp
Auslass 1

Fluideigenschaften 1

EQUATIONS

$$\rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \cdot [-\rho \mathbf{l} + \mathbf{K}] + \mathbf{F}$$

$$\rho \nabla \cdot (\mathbf{u}) = 0$$

$$\mathbf{K} = \mu (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T)$$

Wand 1

EQUATIONS

$$\mathbf{u} = \mathbf{0}$$

Einlass kp 1

EQUATIONS

$$L_{\text{entr}} \nabla_t \cdot \left[-p\mathbf{l} + \mu \left(\nabla_t \mathbf{u} + (\nabla_t \mathbf{u})^\top \right) \right] = -p_{\text{entr}} \mathbf{n}$$

Einlass kp 2

EQUATIONS

$$L_{\text{entr}} \nabla_t \cdot \left[-p\mathbf{l} + \mu \left(\nabla_t \mathbf{u} + (\nabla_t \mathbf{u})^\top \right) \right] = -p_{\text{entr}} \mathbf{n}$$

Einlass dp

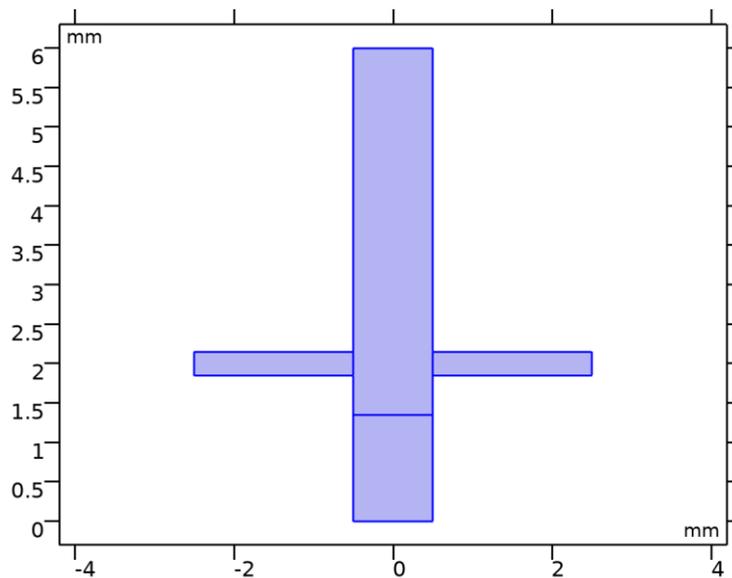
EQUATIONS

$$L_{\text{entr}} \nabla_t \cdot \left[-p\mathbf{l} + \mu \left(\nabla_t \mathbf{u} + (\nabla_t \mathbf{u})^\top \right) \right] = -p_{\text{entr}} \mathbf{n}$$

Auslass 1

EQUATIONS

$$L_{\text{exit}} \nabla_t \cdot \left[-p\mathbf{l} + \mu \left(\nabla_t \mathbf{u} + (\nabla_t \mathbf{u})^\top \right) \right] = -p_{\text{exit}} \mathbf{n}$$

Level-Set*Level-Set*

EQUATIONS

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \phi = \gamma \nabla \cdot \left(\varepsilon_{\text{ls}} \nabla \phi - \phi(1-\phi) \frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right), \quad \phi = \text{phils}$$

FEATURES

Level-Set Modell 1
Anfangswerte kp
Keine Strömung 1
Anfangswerte dp
Einlass kp 1
Einlass kp 2
Einlass dp
Auslass 1
Anfangs-Grenzfläche 1

Level-Set Modell 1

EQUATIONS

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \phi = \gamma \nabla \cdot \left(\varepsilon_{\text{ls}} \nabla \phi - \phi(1-\phi) \frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right), \quad \phi = \text{phils}$$

Keine Strömung 1

EQUATIONS

$$\mathbf{n} \cdot \left(\varepsilon_{\text{ls}} \nabla \phi - \phi(1-\phi) \frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) = 0$$

Einlass kp 1

EQUATIONS

$$\phi = \phi_b$$

Einlass kp 2

EQUATIONS

$$\phi = \phi_b$$

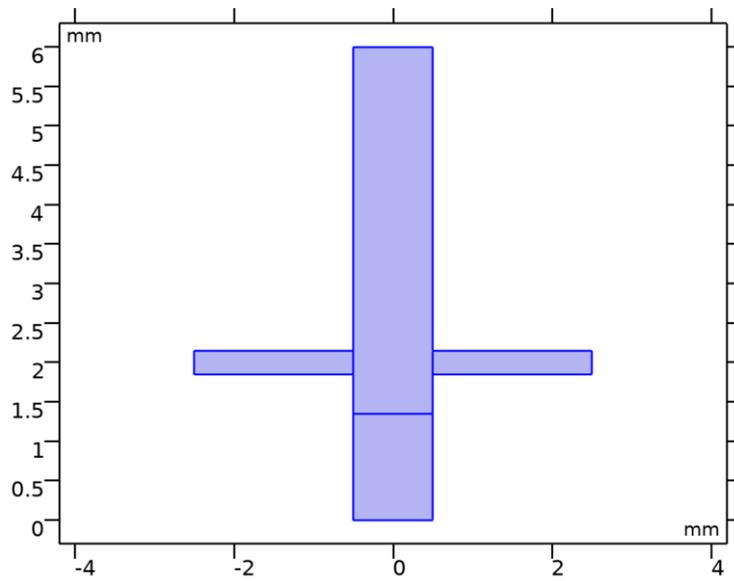
Einlass dp

EQUATIONS

$$\phi = \phi_b$$

Multiphysics

Zwei-Phasenströmung, Level-Set 1



Zwei-Phasenströmung, Level-Set 1

EQUATIONS

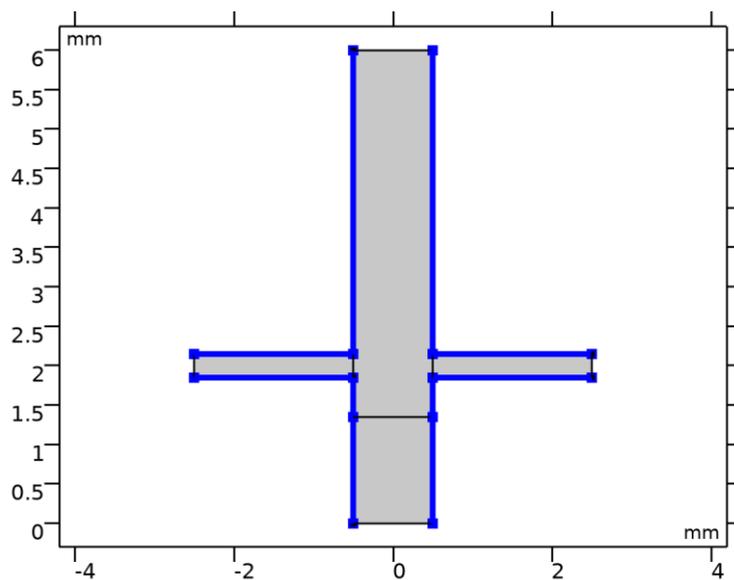
$$\mathbf{F}_{st} = \sigma \delta \kappa \mathbf{n}_{int} + \delta \nabla_s \sigma$$

$$\kappa = -\nabla \cdot \mathbf{n}_{int}; \quad \nabla_s = (\mathbf{I} - \mathbf{n}_{int} \mathbf{n}_{int}^T) \nabla$$

$$\rho = \rho_1 + (\rho_2 - \rho_1) \phi$$

$$\mu = \mu_1 + (\mu_2 - \mu_1) \phi$$

Befeuchtete Wand 1



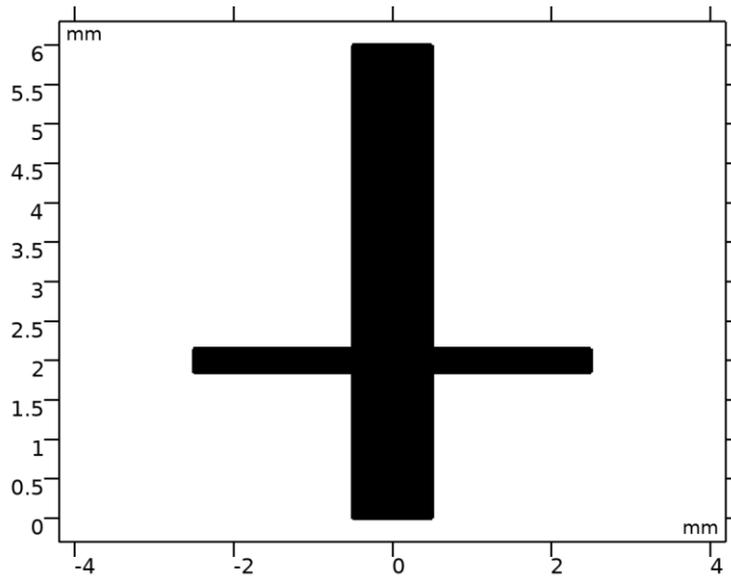
Befeuchtete Wand 1

EQUATIONS

$$\mathbf{n} \cdot \mathbf{u} = 0$$

$$\mathbf{F}_{\text{wall}} = \sigma \delta (\mathbf{n} \cdot \mathbf{n}_{\text{int}} - \cos(\theta_w)) \mathbf{n}_{\text{int}} - \frac{\mu}{\beta} \mathbf{u}$$

$$\mathbf{n} \cdot \left(\varepsilon_{\text{ls}} \nabla \phi - \phi (1 - \phi) \frac{\nabla \phi}{|\nabla \phi|} \right) = 0$$

Netz 1*Netz 1*

A.2 Übersicht der Ergebnisse zum Tropfenvolumen in Abhängigkeit von der Standzeit

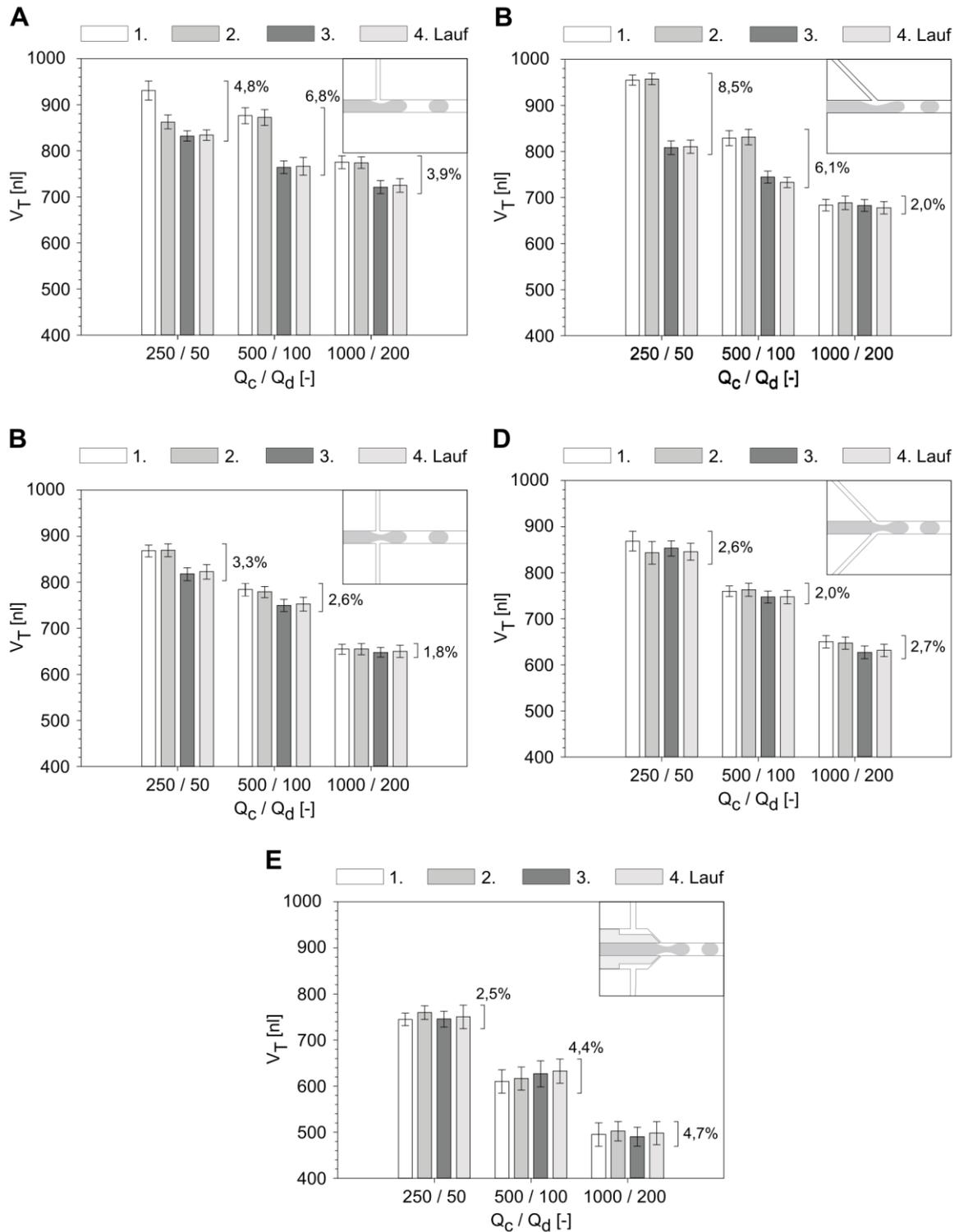


Abb. A.1: Gegenüberstellung der mittleren Tropfenvolumina und der entsprechenden Standardabweichungen aller Läufe bei den Förderratenkombinationen von 250/50, 500/100 und 1000/200. Für jede Förderatenkombinationen (je ein Block) sind die VK-Werte für die Langzeitabweichung aufgetragen;
 A – 1D 90° FMS; B – 1D 90° FMS; C – 2D 90° FMS; D – 2D 45° FMS; E – 3D 45° FMS.

A.3 Übersicht der Ergebnisse zum Tropfenvolumen in Abhängigkeit von den Förderraten

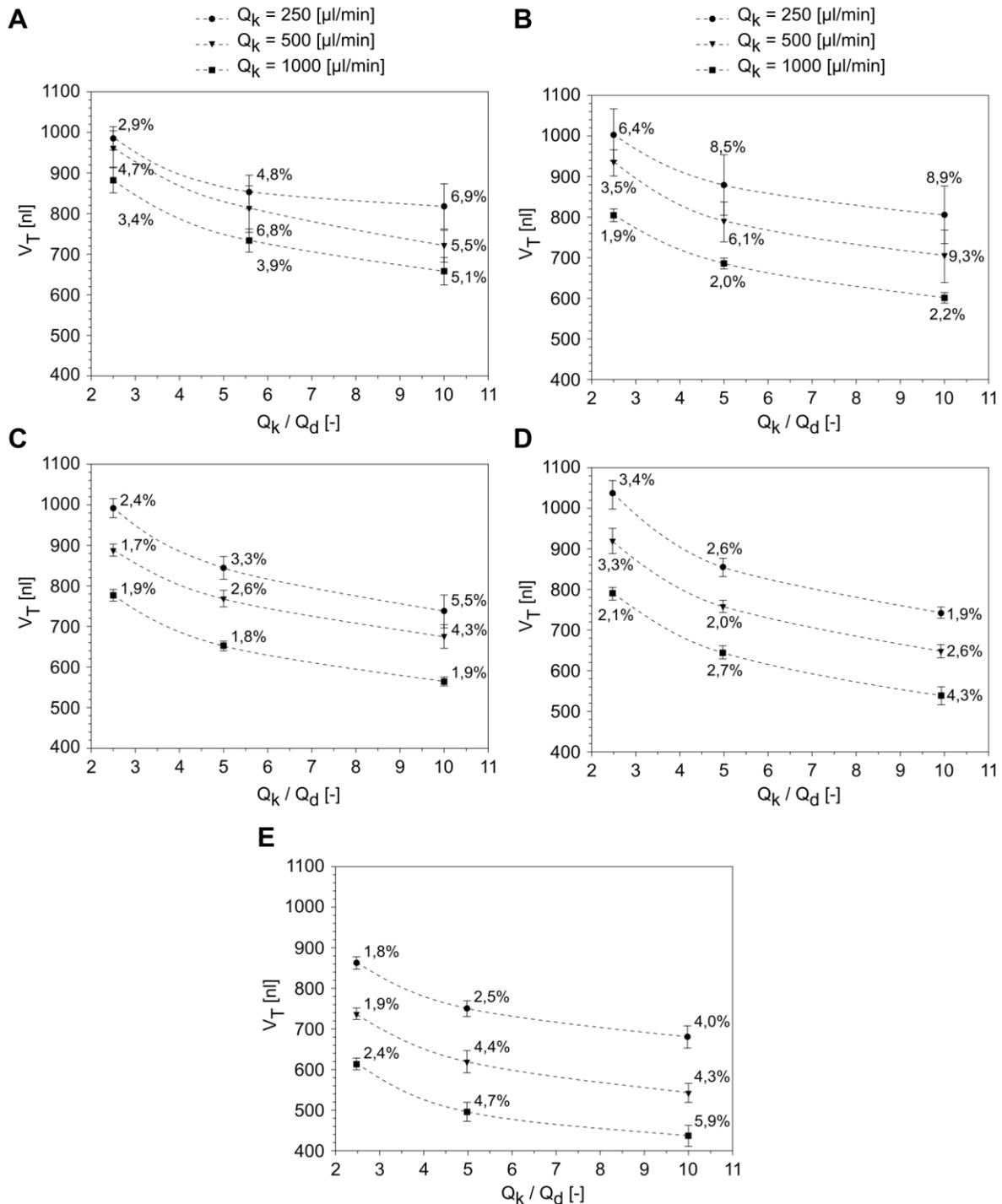


Abb. A.2: Gegenüberstellung der Tropfenvolumen und der KV-Werte der untersuchten Förderratenverhältnisse Q_k/Q_d bei drei unterschiedlichen Förderraten der kontinuierlichen Phase Q_k von 250, 500 und 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$; Korrelation der Ergebnisse mit dem A – 1D 90° FMS; B – 1D 45° FMS; C – 2D 90° FMS; D – 2D 45° FMS; E – 3D 45° FMS.

Literaturverzeichnis

- [1] Strimbu, K. and Tavel, J. A., What are Biomarkers? *Current opinion in HIV and AIDS* 2010, 5, 463-466.
- [2] Laxman, B., Morris, D. S., Yu, J., Siddiqui, J., et al., A First-Generation Multiplex Biomarker Analysis of Urine for the Early Detection of Prostate Cancer. *Cancer Research* 2008, 68, 645-649.
- [3] Schmidt, K. T., Chau, C. H., Price, D. K. and Figg, W. D., Precision Oncology Medicine: The Clinical Relevance of Patient-Specific Biomarkers Used to Optimize Cancer Treatment. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2016, 56, 1484-1499.
- [4] Barbieri, C. E., Chinnaiyan, A. M., Lerner, S. P., Swanton, C., et al., The Emergence of Precision Urologic Oncology: A Collaborative Review on Biomarker-driven Therapeutics. *European Urology* 2017, 71, 237-246.
- [5] Ruppert, T., Sydow, S. and Stock, G., Personalized medicine: consequences for drug research and therapy. *Advances in Precision Medicine* 2016, 1,
- [6] Yang, K., Feng, L., Shi, X. and Liu, Z., Nano-graphene in biomedicine: theranostic applications. *Chemical Society Reviews* 2013, 42, 530-547.
- [7] Pokorska-Bocci, A., Stewart, A., Sagoo, G. S., Hall, A., et al., 'Personalized medicine': what's in a name? *Personalized Medicine* 2014, 11, 197-210.
- [8] Friedman, A. A., Letai, A., Fisher, D. E. and Flaherty, K. T., Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. *Nature Reviews Cancer* 2015, 15, 747.
- [9] Vogenberg, F. R., Isaacson Barash, C. and Pursel, M., Personalized Medicine: Part 1: Evolution and Development into Theranostics. *Pharmacy and Therapeutics* 2010, 35, 560-576.
- [10] Crystal, A. S., Shaw, A. T., Sequist, L. V., Friboulet, L., et al., Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* 2014, 346, 1480-1486.
- [11] Li, Y. Y. and Jones, S. J. M., Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Medicine* 2012, 4, 27-27.
- [12] Ota, H. and Miki, N., Microtechnology-based three-dimensional spheroid formation. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 2013, 5, 37-48.
- [13] Cui, X., Hartanto, Y. and Zhang, H., Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of The Royal Society Interface* 2017, 14,
- [14] Ivascu, A. and Kubbies, M., Rapid Generation of Single-Tumor Spheroids for High-Throughput Cell Function and Toxicity Analysis. *Journal of Biomolecular Screening* 2006, 11, 922-932.
- [15] Rimann, M., Angres, B., Patocchi-Tenzer, I., Braum, S., et al., Automation of 3D Cell Culture Using Chemically Defined Hydrogels. *Journal of Laboratory Automation* 2014, 19, 191-197.
- [16] Privalova, A. M., Uglanova, S. V., Kuznetsova, N. R., Klyachko, N. L., et al., Microencapsulated Multicellular Tumor Spheroids as a Tool to Test Novel Anticancer Nanosized Drug Delivery Systems In Vitro. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2015, 15, 4806-4814.
- [17] Felfel, R. M., Leander, P., Miquel, G.-F., Tobias, M., et al., In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. *Biomedical Materials* 2016, 11, 015011.

- [18] He, Y. and Lu, F., Development of Synthetic and Natural Materials for Tissue Engineering Applications Using Adipose Stem Cells. *Stem Cells International* 2016, 2016, 5786257.
- [19] Costa, E. C., Gaspar, V. M., Coutinho, P. and Correia, I. J., Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnology and Bioengineering* 2014, 111, 1672-1685.
- [20] Tung, Y.-C., Hsiao, A. Y., Allen, S. G., Torisawa, Y.-S., et al., High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 2011, 136, 473-478.
- [21] Widder, M., Lemke, K., Kekeç, B., Förster, T., et al., A modified 384-well-device for versatile use in 3D cancer cell (co-)cultivation and screening for investigations of tumor biology in vitro. *Engineering in Life Sciences* n/a-n/a.
- [22] Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M., et al., Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 83, 173-180.
- [23] Sebastian, A., Buckle, A.-M. and Markx, G. H., Tissue engineering with electric fields: Immobilization of mammalian cells in multilayer aggregates using dielectrophoresis. *Biotechnology and Bioengineering* 2007, 98, 694-700.
- [24] Kim, J. A., Choi, J.-H., Kim, M., Rhee, W. J., et al., High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials* 2013, 34, 8555-8563.
- [25] Alhasan, L., Qi, A., Al-Abboodi, A., Rezk, A., et al., Rapid Enhancement of Cellular Spheroid Assembly by Acoustically Driven Microcentrifugation. *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2016, 2, 1013-1022.
- [26] Mueller-Klieser, W., Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophysical Journal* 1984, 46, 343-348.
- [27] Hay, E. D., *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition*. Springer US 2013.
- [28] Shri, M., Agrawal, H., Rani, P., Singh, D., et al., Hanging Drop, A Best Three-Dimensional (3D) Culture Method for Primary Buffalo and Sheep Hepatocytes. *Scientific Reports* 2017, 7, 1203.
- [29] Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. and Noel, G., Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *Int J Mol Sci* 2015, 16, 5517-5527.
- [30] Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. and Yang, L., Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and Drug Development Technologies* 2014, 12, 207-218.
- [31] Marsden, C. G., Wright, M. J., Carrier, L., Moroz, K., et al., "A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies". *BMC Cancer* 2012, 12, 10-10.
- [32] Stewart, B. W., Wild, C., International Agency for Research On, C. and World Health, O., World cancer report 2014. 2014.
- [33] Alsalloom, A. a. M., An update of biochemical markers of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Health Sciences* 2016, 10, 121-136.
- [34] Yoon, S., Kim, J. A., Lee, S. H., Kim, M., et al., Droplet-based microfluidic system to form and separate multicellular spheroids using magnetic nanoparticles. *Lab on a Chip* 2013, 13, 1522-1528.
- [35] Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., et al., Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology* 2010, 148, 3-15.
- [36] Gu, H., Duits, M. H. and Mugele, F., Droplets Formation and Merging in Two-Phase Flow Microfluidics. *Int J Mol Sci* 2011, 12, 2572-2597.
- [37] Lowe, K. C., Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood Reviews* 1999, 13, 171-184.
- [38] Brandhorst, H., Muehling, B., Yamaya, H., Henriksnaes, J., et al., New Class of Oxygen Carriers Improves Islet Isolation From Long-Term Stored Rat Pancreata. *Transplantation Proceedings* 2008, 40, 393-394.

- [39] Maruyama, T., Nakashima, K., Kubota, F. and Goto, M., Perfluorocarbon-based Liquid-Liquid Extraction for Separation of Transition Metal Ions. *Analytical Sciences* 2007, 23, 763-765.
- [40] Iba. Mark. Trade Mark 2005, pipe-based bioreactors (pbb), Reg. no. 305 304 226.
- [41] Martin, K., Henkel, T., Baier, V., Grodrian, A., et al., Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices. *Lab on a Chip* 2003, 3, 202-207.
- [42] Wessel, J., Schmalz, K., Scheytt, J. C., Cahill, B., et al., Microwave biosensor for characterization of compartments in teflon capillaries. In: 2012 42nd European Microwave Conference; 2012.
- [43] Huebner, A., Sharma, S., Srisa-Art, M., Hollfelder, F., et al., Microdroplets: A sea of applications? *Lab on a Chip* 2008, 8, 1244-1254.
- [44] Žnidaršič Plazl, P., Enzymatic microreactors utilizing non-aqueous media. *Chimica Oggi – Chemistry Today* 2014, 32, 54-60.
- [45] Köhler, J. M., Li, S. and Knauer, A., Why is Micro Segmented Flow Particularly Promising for the Synthesis of Nanomaterials? *Chemical Engineering & Technology* 2013, 36, 887-899.
- [46] Song, H., Chen, D. L. and Ismagilov, R. F., Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. *Angewandte Chemie International Edition* 2006, 45, 7336-7356.
- [47] Leung, K., Zahn, H., Leaver, T., Konwar, K. M., et al., A programmable droplet-based microfluidic device applied to multiparameter analysis of single microbes and microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109, 7665-7670.
- [48] Fallah-Araghi, A., Baret, J.-C., Ryckelynck, M. and Griffiths, A. D., A completely in vitro ultrahigh-throughput droplet-based microfluidic screening system for protein engineering and directed evolution. *Lab on a Chip* 2012, 12, 882-891.
- [49] Teh, S.-Y., Lin, R., Hung, L.-H. and Lee, A. P., Droplet microfluidics. *Lab on a Chip* 2008, 8, 198-220.
- [50] Zhang, Y. and Jiang, H.-R., A review on continuous-flow microfluidic PCR in droplets: Advances, challenges and future. *Analytica Chimica Acta* 2016, 914, 7-16.
- [51] Shi, W., Qin, J., Ye, N. and Lin, B., Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay. *Lab on a Chip* 2008, 8, 1432-1435.
- [52] Srinivasan, V., Pamula, V. K. and Fair, R. B., Droplet-based microfluidic lab-on-a-chip for glucose detection. *Analytica Chimica Acta* 2004, 507, 145-150.
- [53] Baret, J.-C., Surfactants in droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip* 2012, 12, 422-433.
- [54] Gruner, P., Riechers, B., Semin, B., Lim, J., et al., Controlling molecular transport in minimal emulsions. *Nature Communications* 2016, 7, 10392.
- [55] Alrifaiy, A., Lindahl, O. A. and Ramser, K., Polymer-based microfluidic devices for pharmacy, biology and tissue engineering. *Polymers* 2012, 4, 1349-1398.
- [56] Sun, T., Feng, L., Gao, X. and Jiang, L., Bioinspired Surfaces with Special Wettability. *Accounts of Chemical Research* 2005, 38, 644-652.
- [57] Mair, D. A., Geiger, E., Pisano, A. P., Frechet, J. M. J., et al., Injection molded microfluidic chips featuring integrated interconnects. *Lab on a Chip* 2006, 6, 1346-1354.
- [58] Zhu, P. and Wang, L., Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. *Lab on a Chip* 2017, 17, 34-75.
- [59] Sharma, S., Srisa-Art, M., Scott, S., Asthana, A., et al., Droplet-Based Microfluidics. In: Jenkins, G. and Mansfield, C. D., eds. *Microfluidic Diagnostics*. Vol. 949: Humana Press; 2013, 207-230.
- [60] Chong, Z. Z., Tan, S. H., Ganan-Calvo, A. M., Tor, S. B., et al., Active droplet generation in microfluidics. *Lab on a Chip* 2016, 16, 35-58.
- [61] Henkel, T., Bermig, T., Kielpinski, M., Grodrian, A., et al., Chip modules for generation and manipulation of fluid segments for micro serial flow processes. *Chemical Engineering Journal* 2004, 101, 439-445.
- [62] Köhler, J. M. and Cahill, B. P., *Micro-Segmented Flow: Applications in Chemistry and Biology*. Springer Berlin Heidelberg 2013.

- [63] Leman, M., Abouakil, F., Griffiths, A. D. and Tabeling, P., Droplet-based microfluidics at the femtolitre scale. *Lab on a Chip* 2015, 15, 753-765.
- [64] Lim, J., Gruner, P., Konrad, M. and Baret, J. C., Micro-optical lens array for fluorescence detection in droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip* 2013, 13, 1472-1475.
- [65] Ralf, S., Martin, B., Thomas, P. and Stephan, H., Droplet based microfluidics. *Reports on Progress in Physics* 2012, 75, 016601.
- [66] Cahill, B. P., Land, R., Nacke, T., Min, M., et al., Contactless sensing of the conductivity of aqueous droplets in segmented flow. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2011, 159, 286-293.
- [67] Baroud, C. N., Gallaire, F. and Dangu, R., Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip* 2010, 10, 2032-2045.
- [68] Di Carlo, D., Inertial microfluidics. *Lab on a Chip* 2009, 9, 3038-3046.
- [69] Grodrian, A., Metze, J., Henkel, T., Martin, K., et al., Segmented flow generation by chip reactors for highly parallelized cell cultivation. *Biosensors and Bioelectronics* 2004, 19, 1421-1428.
- [70] Xi, H.-D., Zheng, H., Guo, W., Ganon-Calvo, A. M., et al., Active droplet sorting in microfluidics: a review. *Lab on a Chip* 2017, 17, 751-771.
- [71] Girault, M., Kim, H., Arakawa, H., Matsuura, K., et al., An on-chip imaging droplet-sorting system: a real-time shape recognition method to screen target cells in droplets with single cell resolution. *Scientific Reports* 2017, 7, 40072.
- [72] Jang, M., Neuzil, P., Volk, T., Manz, A., et al., On-chip three-dimensional cell culture in phase-guides improves hepatocyte functions in vitro. *Biomicrofluidics* 2015, 9, 034113.
- [73] Chen, A., Byvank, T., Chang, W.-J., Bharde, A., et al., On-chip magnetic separation and encapsulation of cells in droplets. *Lab on a Chip* 2013, 13, 1172-1181.
- [74] Clausell-Tormos, J., Lieber, D., Baret, J.-C., El-Harrak, A., et al., Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms. *Chemistry & Biology* 2008, 15, 427-437.
- [75] Cao, J., Kürsten, D., Funfak, A., Schneider, S., et al., Characterization of Combinatorial Effects of Toxic Substances by Cell Cultivation in Micro Segmented Flow. In: Köhler, J. M. and Cahill, B. P., eds. *Micro-Segmented Flow*: Springer Berlin Heidelberg; 2014, 203-230.
- [76] Carlo, D. D., Wu, L. Y. and Lee, L. P., Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip* 2006, 6, 1445-1449.
- [77] El Debs, B., Utharala, R., Balyasnikova, I. V., Griffiths, A. D., et al., Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109, 11570-11575.
- [78] Bringer, M. R., Gerdt, C. J., Song, H., Tice, J. D., et al., Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 2004, 362, 1087-1104.
- [79] Handique, K. and Burns, M. A., Mathematical modeling of drop mixing in a slit-type microchannel. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 2001, 11, 548.
- [80] Chen, X., Glawdel, T., Cui, N. and Ren, C. L., Model of droplet generation in flow focusing generators operating in the squeezing regime. *Microfluid Nanofluid* 2015, 18, 1341-1353.
- [81] Lashkaripour, A., Abouei Mehrizi, A., Rasouli, M. and Goharimanesh, M., Numerical Study of Droplet Generation Process in a Microfluidic Flow Focusing. *Journal of Computational Applied Mechanics* 2015, 46, 167-175.
- [82] Malsch, D., Gleichmann, N., Kielpinski, M., Mayer, G., et al., Dynamics of droplet formation at T-shaped nozzles with elastic feed lines. *Microfluid Nanofluid* 2010, 8, 497-507.
- [83] Teo, A. J. T., Li, K.-H. H., Nguyen, N.-T., Guo, W., et al., Negative Pressure Induced Droplet Generation in a Microfluidic Flow-Focusing Device. *Analytical Chemistry* 2017, 89, 4387-4391.
- [84] Schneider, T., Kreutz, J. and Chiu, D. T., The Potential Impact of Droplet Microfluidics in Biology. *Analytical Chemistry* 2013, 85, 3476-3482.
- [85] Streets, A. M. and Huang, Y., Chip in a lab: Microfluidics for next generation life science research. *Biomicrofluidics* 2013, 7, 011302.

- [86] Casadevall I Solvas, X. and Demello, A., Droplet microfluidics: recent developments and future applications. *Chemical communications (Cambridge, England)* 2011, 47, 1936-1942.
- [87] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006, 442, 368-373.
- [88] Zengerle, R., Koltay, P. and Ducree, J., Microfluidics: an enabling technology for the life sciences. In: *Micro-Nanomechatronics and Human Science, 2004 and The Fourth Symposium Micro-Nanomechatronics for Information-Based Society, 2004. Proceedings of the 2004 International Symposium on; 2004.*
- [89] Hwang, Y.-J., Coley, C. W., Abolhasani, M., Marzinzik, A. L., et al., A segmented flow platform for on-demand medicinal chemistry and compound synthesis in oscillating droplets. *Chemical Communications* 2017, 53, 6649-6652.
- [90] Mashaghi, S., Abbaspourrad, A., Weitz, D. A. and Van Oijen, A. M., Droplet microfluidics: A tool for biology, chemistry and nanotechnology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016, 82, 118-125.
- [91] Martino, C. and Demello, A. J., Droplet-based microfluidics for artificial cell generation: a brief review. *Interface Focus* 2016, 6, 20160011.
- [92] Karande, R., Schmid, A. and Buehler, K., Applications of Multiphasic Microreactors for Biocatalytic Reactions. *Organic Process Research & Development* 2016, 20, 361-370.
- [93] Stanley, C. E., Wootton, R. C. and Demello, A. J., Continuous and segmented flow microfluidics: applications in high-throughput chemistry and biology. *Chimia* 2012, 66, 88-98.
- [94] Neužil, P., Giselbrecht, S., Länge, K., Huang, T. J., et al., Revisiting lab-on-a-chip technology for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012, 11, 620.
- [95] Shembekar, N., Chaipan, C., Utharala, R. and Merten, C. A., Droplet-based microfluidics in drug discovery, transcriptomics and high-throughput molecular genetics. *Lab on a Chip* 2016, 16, 1314-1331.
- [96] Chou, W.-L., Lee, P.-Y., Yang, C.-L., Huang, W.-Y., et al., Recent Advances in Applications of Droplet Microfluidics. *Micromachines* 2015, 6, 1249.
- [97] Beneyton, T., Wijaya, I. P. M., Postros, P., Najah, M., et al., High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics. *Scientific Reports* 2016, 6, 27223.
- [98] Agresti, J. J., Antipov, E., Abate, A. R., Ahn, K., et al., Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107, 4004-4009.
- [99] Wang, B. L., Ghaderi, A., Zhou, H., Agresti, J., et al., Microfluidic high-throughput culturing of single cells for selection based on extracellular metabolite production or consumption. *Nature Biotechnology* 2014, 32, 473.
- [100] Beneyton, T., Thomas, S., Griffiths, A. D., Nicaud, J.-M., et al., Droplet-based microfluidic high-throughput screening of heterologous enzymes secreted by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories* 2017, 16, 18.
- [101] Zang, E., Brandes, S., Tovar, M., Martin, K., et al., Real-time image processing for label-free enrichment of Actinobacteria cultivated in picolitre droplets. *Lab on a Chip* 2013, 13, 3707-3713.
- [102] Cao, J., Kürsten, D., Krause, K., Kothe, E., et al., Application of micro-segmented flow for two-dimensional characterization of the combinatorial effect of zinc and copper ions on metal-tolerant *Streptomyces* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, 97, 8923-8930.
- [103] Huebner, A., Srisa-Art, M., Holt, D., Abell, C., et al., Quantitative detection of protein expression in single cells using droplet microfluidics. *Chemical Communications* 2007, 1218-1220.
- [104] Mcmillan, K. S., Boyd, M. and Zagnoni, M., Transitioning from multi-phase to single-phase microfluidics for long-term culture and treatment of multicellular spheroids. *Lab on a Chip* 2016, 16, 3548-3557.
- [105] Funfak, A., Brosing, A., Brand, M. and Kohler, J. M., Micro fluid segment technique for screening and development studies on *Danio rerio* embryos. *Lab Chip* 2007, 7, 1132-1138.

- [106] Lemke, K., Förster, T., Römer, R., Quade, M., et al., A modular segmented-flow platform for 3D cell cultivation. *Journal of Biotechnology* 2015, 205, 59-69.
- [107] Spitkovsky, D., Lemke, K., Förster, T., Römer, R., et al., Generation of Cardiomyocytes in Pipe-Based Microbioreactor Under Segmented Flow. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2016, 38, 1883-1896.
- [108] Wiedemeier, S., Ehrhart, F., Mettler, E., Gastrock, G., et al., Encapsulation of Langerhans' islets: Microtechnological developments for transplantation. *Engineering in Life Sciences* 2011, 11, 165-173.
- [109] Schemberg, J., Grodrian, A., Römer, R., Gastrock, G., et al., Online optical detection of food contaminants in microdroplets. *Engineering in Life Sciences* 2009, 9, 391-397.
- [110] Schemberg, J., Grodrian, A., Römer, R., Cahill, B. P., et al., Application of segmented flow for quality control of food using microfluidic tools. *physica status solidi (a)* 2010, 207, 904-912.
- [111] Baret, J.-C., Beck, Y., Billas-Massobrio, I., Moras, D., et al., Quantitative Cell-Based Reporter Gene Assays Using Droplet-Based Microfluidics. *Chemistry & Biology* 2010, 17, 528-536.
- [112] Baret, J. C., Miller, O. J., Taly, V., Ryckelynck, M., et al., Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab Chip* 2009, 9, 1850-1858.
- [113] Sjostrom, S. L., Bai, Y., Huang, M., Liu, Z., et al., High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics. *Lab on a Chip* 2014, 14, 806-813.
- [114] Miller, O. J., El Harrak, A., Mangeat, T., Baret, J.-C., et al., High-resolution dose-response screening using droplet-based microfluidics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109, 378-383.
- [115] Dimasi, J. A., Hansen, R. W. and Grabowski, H. G., The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics* 2003, 22, 151-185.
- [116] Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B. and Philpott, K. L., Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* 2011, 162, 1239-1249.
- [117] Dressler, O. J., Maceiczuk, R. M., Chang, S.-I. and Demello, A. J., Droplet-Based Microfluidics Enabling Impact on Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening* 2014, 19, 483-496.
- [118] Guo, M. T., Rotem, A., Heyman, J. A. and Weitz, D. A., Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab on a Chip* 2012, 12, 2146-2155.
- [119] Schiffman, J. D., Fisher, P. G. and Gibbs, P., Early detection of cancer: past, present, and future. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology Meeting* 2015, 57-65.
- [120] Rusling, J. F., Kumar, C. V., Gutkind, J. S. and Patel, V., Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *The Analyst* 2010, 135, 2496-2511.
- [121] Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S. K., et al., Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical Chemistry* 2013, 59, 1722-1731.
- [122] Didelot, A., Kotsopoulos, S. K., Lupo, A., Pekin, D., et al., Multiplex Picoliter-Droplet Digital PCR for Quantitative Assessment of DNA Integrity in Clinical Samples. *Clinical Chemistry* 2013, 59, 815-823.
- [123] Taly, V., Pekin, D., Abed, A. E. and Laurent-Puig, P., Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends in Molecular Medicine* 2012, 18, 405-416.
- [124] Ziober, B. L., Mauk, M. G., Falls, E. M., Chen, Z., et al., Lab-on-a-chip for oral cancer screening and diagnosis. *Head & Neck* 2008, 30, 111-121.
- [125] Pekin, D., Skhiri, Y., Baret, J.-C., Le Corre, D., et al., Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip* 2011, 11, 2156-2166.
- [126] Wenzel, C., Riefke, B., Gründemann, S., Krebs, A., et al., 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions. *Experimental Cell Research* 2014, 323, 131-143.

- [127] Wong, A. H.-H., Li, H., Jia, Y., Mak, P.-I., et al., Drug screening of cancer cell lines and human primary tumors using droplet microfluidics. *Scientific Reports* 2017, 7, 9109.
- [128] Yu, L., Chen, M. C. W. and Cheung, K. C., Droplet-based microfluidic system for multicellular tumor spheroid formation and anticancer drug testing. *Lab on a Chip* 2010, 10, 2424-2432.
- [129] Sabhachandani, P., Motwani, V., Cohen, N., Sarkar, S., et al., Generation and functional assessment of 3D multicellular spheroids in droplet based microfluidics platform. *Lab on a Chip* 2016, 16, 497-505.
- [130] Jang, M., Koh, I., Lee, S. J., Cheong, J.-H., et al., Droplet-based microtumor model to assess cell-ECM interactions and drug resistance of gastric cancer cells. *Scientific Reports* 2017, 7, 41541.
- [131] Ying, L. and Wang, Q., Microfluidic chip-based technologies: emerging platforms for cancer diagnosis. *BMC Biotechnology* 2013, 13, 76-76.
- [132] Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., et al., 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports* 2016, 6, 19103.
- [133] Kim, C., Droplet-based microfluidics for making uniform-sized cellular spheroids in alginate beads with the regulation of encapsulated cell number. *BioChip Journal* 2015, 9, 105-113.
- [134] Pit, A., Duits, M. and Mugele, F., Droplet Manipulations in Two Phase Flow Microfluidics. *Micro-machines* 2015, 6, 1455.
- [135] Volpatti, L. R. and Yetisen, A. K., Commercialization of microfluidic devices. *Trends in Biotechnology* 2014, 32, 347-350.
- [136] Shang, L., Cheng, Y. and Zhao, Y., Emerging Droplet Microfluidics. *Chemical Reviews* 2017, 117, 7964-8040.
- [137] Chiu, D. T., Demello, A. J., Di Carlo, D., Doyle, P. S., et al., Small but Perfectly Formed? Successes, Challenges, and Opportunities for Microfluidics in the Chemical and Biological Sciences. *Chem* 2017, 2, 201-223.
- [138] Aijian, A. P. and Garrell, R. L., Digital Microfluidics for Automated Hanging Drop Cell Spheroid Culture. *Journal of Laboratory Automation* 2015, 20, 283-295.
- [139] Zhang, J. Z. and Nagrath, S., Microfluidics and Cancer: Are we there yet? *Biomed Microdevices* 2013, 15, 595-609.
- [140] Ahn, J., Sei, Y., Jeon, N. and Kim, Y., Tumor Microenvironment on a Chip: The Progress and Future Perspective. *Bioengineering* 2017, 4, 64.
- [141] Wlodkowic, D. and Cooper, J. M., Tumors on chips: oncology meets microfluidics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2010, 14, 556-567.
- [142] Santo, V. E., Rebelo, S. P., Estrada, M. F., Alves, P. M., et al., Drug screening in 3D in vitro tumor models: overcoming current pitfalls of efficacy read-outs. *Biotechnology Journal* 2017, 12, 1600505-n/a.
- [143] Nguyen, N.-T., *Mikrofluidik: Entwurf, Herstellung und Charakterisierung*. Springer-Verlag 2013.
- [144] Rott, N., Note on the History of the Reynolds Number. *Annual Review of Fluid Mechanics* 1990, 22, 1-12.
- [145] Malsch, D., Kielpinski, M., Merthan, R., Albert, J., et al., μ PIV-Analysis of Taylor flow in micro channels. *Chemical Engineering Journal* 2008, 135, S166-S172.
- [146] Tice, J. D., Song, H., Lyon, A. D. and Ismagilov, R. F., Formation of Droplets and Mixing in Multi-phase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers. *Langmuir* 2003, 19, 9127-9133.
- [147] Huang, H., Yu, Y., Hu, Y., He, X., et al., Generation and manipulation of hydrogel microcapsules by droplet-based microfluidics for mammalian cell culture. *Lab on a Chip* 2017, 17, 1913-1932.
- [148] Shestopalov, I., Tice, J. D. and Ismagilov, R. F., Multi-step synthesis of nanoparticles performed on millisecond time scale in a microfluidic droplet-based system. *Lab on a Chip* 2004, 4, 316-321.
- [149] Kaelble, D. H., Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids. *The Journal of Adhesion* 1970, 2, 66-81.

- [150] Owens, D. K. and Wendt, R. C., Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 1969, 13, 1741-1747.
- [151] Wenzel, R. N., Surface Roughness and Contact Angle. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry* 1949, 53, 1466-1467.
- [152] Cassie, A. B. D. and Baxter, S., Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society* 1944, 40, 546-551.
- [153] Jovanović, J., Zhou, W., Rebrov, E. V., Nijhuis, T. A., et al., Liquid-liquid slug flow: Hydrodynamics and pressure drop. *Chemical Engineering Science* 2011, 66, 42-54.
- [154] Gastrock, G., Grodrian, A., Lemke, K., Wiedemeier, S., et al., Mountable and dismountable microfluid system and method for flooding the system. *Mountable and dismountable microfluid system and method for flooding the system. EU Patent EP2248588A1*, 2010.
- [155] Vinogradov, I. and Lunk, A., Spectroscopic Diagnostics of DBD in Ar/Fluorocarbon Mixtures – Correlation between Plasma Parameters and Properties of Deposited Polymer Films. *Plasma Processes and Polymers* 2005, 2, 201-208.
- [156] Eichler, M., Nagel, K., Hennecke, P. and Klages, C.-P., Area-Selective Microplasma Treatment in Microfluidic Channels for Novel Fluid Phase Separators. *Plasma Processes and Polymers* 2012, 9, 1160-1167.
- [157] Drost, J., Etablierung eines Niederdruckplasma-Verfahrens zur langzeitstabilen Hydrophobisierung von Polymer-Mikrofluid-Systemen sowie fluidische Untersuchung der Systeme für Life Science Applikationen. *Masterarbeit* 2015,
- [158] Butt, H.-J., Cappella, B. and Kappl, M., Force measurements with the atomic force microscope. *Surface Science Reports* 2005, 59, 1-152.
- [159] Robert De Saint Vincent, M., Cassagnère, S., Plantard, J. and Delville, J.-P., Real-time droplet caliper for digital microfluidics. *Microfluid Nanofluid* 2012, 13, 261-271.
- [160] Sivasamy, J., Wong, T.-N., Nguyen, N.-T. and Kao, L. T.-H., An investigation on the mechanism of droplet formation in a microfluidic T-junction. *Microfluid Nanofluid* 2011, 11, 1-10.
- [161] Vanapalli, S. A., Banpurkar, A. G., Van Den Ende, D., Duits, M. H. G., et al., Hydrodynamic resistance of single confined moving drops in rectangular microchannels. *Lab on a Chip* 2009, 9, 982-990.
- [162] Abate, A. R., Poitzsch, A., Hwang, Y., Lee, J., et al., Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation. *Physical Review E* 2009, 80, 026310.
- [163] Xu, J. H., Li, S. W., Tan, J., Wang, Y. J., et al., Preparation of highly monodisperse droplet in a T-junction microfluidic device. *AIChE Journal* 2006, 52, 3005-3010.
- [164] Vaswani, S., Koskinen, J. and Hess, D. W., Surface modification of paper and cellulose by plasma-assisted deposition of fluorocarbon films. *Surface and Coatings Technology* 2005, 195, 121-129.
- [165] Leslie, D. C., Waterhouse, A., Berthet, J. B., Valentin, T. M., et al., A bioinspired omniphobic surface coating on medical devices prevents thrombosis and biofouling. *Nature Biotechnology* 2014, 32, 1134-1140.
- [166] Fu, T., Wu, Y., Ma, Y. and Li, H. Z., Droplet formation and breakup dynamics in microfluidic flow-focusing devices: From dripping to jetting. *Chemical Engineering Science* 2012, 84, 207-217.
- [167] Gupta, A. and Kumar, R., Flow regime transition at high capillary numbers in a microfluidic T-junction: Viscosity contrast and geometry effect. *Physics of Fluids* 2010, 22, 122001.
- [168] Liu, H. and Zhang, Y., Droplet formation in a T-shaped microfluidic junction. *Journal of Applied Physics* 2009, 106, 034906.
- [169] Christopher, G. F. and Anna, S. L., Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2007, 40, R319.
- [170] Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A. and Whitesides, G. M., Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip* 2006, 6, 437-446.

- [171] Xu, J., Li, S., Tan, J. and Luo, G., Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: from squeezing to dripping. *Microfluid Nanofluid* 2008, 5, 711-717.
- [172] Wu, P., Wang, Y., Luo, Z., Li, Y., et al., A 3D easily-assembled Micro-Cross for droplet generation. *Lab on a Chip* 2014, 14, 795-798.
- [173] Ward, T., Faivre, M., Abkarian, M. and Stone, H. A., Microfluidic flow focusing: drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping. *Electrophoresis* 2005, 26, 3716-3724.
- [174] Potta, S. P., Liang, H., Winkler, J., Doss, M. X., et al., Isolation and functional characterization of alpha-smooth muscle actin expressing cardiomyocytes from embryonic stem cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2010, 25, 595-604.
- [175] Czeslik, C., Factors Ruling Protein Adsorption. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 2004. Vol. 218, Page 771.
- [176] Cheng, Y. T., Rodak, D. E., Wong, C. A. and Hayden, C. A., Effects of micro- and nano-structures on the self-cleaning behaviour of lotus leaves. *Nanotechnology* 2006, 17, 1359.
- [177] Patankar, N. A., Mimicking the Lotus Effect: Influence of Double Roughness Structures and Slender Pillars. *Langmuir* 2004, 20, 8209-8213.
- [178] Ensikat, H. J., Ditsche-Kuru, P., Neinhuis, C. and Barthlott, W., Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 2011, 2, 152-161.
- [179] Koch, K., Bhushan, B., Jung, Y. C. and Barthlott, W., Fabrication of artificial Lotus leaves and significance of hierarchical structure for superhydrophobicity and low adhesion. *Soft Matter* 2009, 5, 1386-1393.
- [180] Hüger, E., Rothe, H., Frant, M., Grohmann, S., et al., Atomic force microscopy and thermodynamics on taro, a self-cleaning plant leaf. *Applied Physics Letters* 2009, 95, 033702.
- [181] Shirtcliffe, N. J., Mchale, G. and I. Newton, M., The superhydrophobicity of polymer surfaces: Recent developments. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 2011, 49, 1203-1217.
- [182] Xue, C.-H., Jia, S.-T., Zhang, J. and Ma, J.-Z., Large-area fabrication of superhydrophobic surfaces for practical applications: an overview. *Science and Technology of Advanced Materials* 2010, 11, 033002.
- [183] Wang, J., Yi, P., Deng, Y., Peng, L., et al., Recovery behavior of thermoplastic polymers in micro hot embossing process. *Journal of Materials Processing Technology* 2017, 243, 205-216.
- [184] Wu, Z., Shi, Z., Xu, C., Zhang, F., et al., Rose petal mimic surface by TiO_2 sol-gel process. In: 2016 IEEE International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO); 2016.
- [185] Esmeryan, K. D., Castano, C. E. and Mohammadi, R., Interactions of superhydrophobic carbon soot coatings with short alkyl chain alcohols and fluorocarbon solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2017, 529, 715-724.
- [186] Saarikoski, I., Suvanto, M. and Pakkanen, T. A., Modification of polycarbonate surface properties by nano-, micro-, and hierarchical micro-nanostructuring. *Applied Surface Science* 2009, 255, 9000-9005.
- [187] Bachus, K. J., Mats, L., Choi, H. W., Gibson, G. T. T., et al., Fabrication of Patterned Superhydrophobic/Hydrophilic Substrates by Laser Micromachining for Small Volume Deposition and Droplet-Based Fluorescence. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017, 9, 7629-7636.
- [188] Rowthu, S., Böhlen, K., Bowen, P. and Hoffmann, P., Surface 3D Micro Free Forms: Multi-functional Microstructured Mesoporous α -Alumina by in Situ Slip Casting Using Excimer Laser Ablated Polycarbonate Molds. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2015, 7, 24458-24469.
- [189] Jankowski, P., Ogonczyk, D., Kosinski, A., Lisowski, W., et al., Hydrophobic modification of polycarbonate for reproducible and stable formation of biocompatible microparticles. *Lab on a Chip* 2011, 11, 748-752.
- [190] Barthlott, W. and Neinhuis, C., Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* 1997, 202, 1-8.

- [191] Andreas, S., Zdenek, C., Boris, F. S., Manuel, S., et al., The dream of staying clean: Lotus and biomimetic surfaces. *Bioinspiration & Biomimetics* 2007, 2, S126.
- [192] Darmanin, T. and Guittard, F., Superhydrophobic and superoleophobic properties in nature. *Materials Today* 2015, 18, 273-285.
- [193] Quéré, D., Wetting and Roughness. *Annual Review of Materials Research* 2008, 38, 71-99.
- [194] Gornik, C., Injection Moulding of Parts with Microstructured Surfaces for Medical Applications. *Macromolecular Symposia* 2004, 217, 365-374.
- [195] Kim, B. I., Lee, K. G., Lee, T. J., Choi, B. G., et al., A continuous tilting of micromolds for fabricating polymeric microstructures in microinjection. *Lab on a Chip* 2013, 13, 4321-4325.
- [196] Oh, H. J., Park, J. H., Lee, S. J., Kim, B. I., et al., Sustainable fabrication of micro-structured lab-on-a-chip. *Lab on a Chip* 2011, 11, 3999-4005.
- [197] Tuvshindorj, U., Yildirim, A., Ozturk, F. E. and Bayindir, M., Robust Cassie State of Wetting in Transparent Superhydrophobic Coatings. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2014, 6, 9680-9688.
- [198] Groenendijk, M., Fabrication of Super Hydrophobic Surfaces by fs Laser Pulses. *Laser Technik Journal* 2008, 5, 44-47.
- [199] Murakami, D., Jinnai, H. and Takahara, A., Wetting Transition from the Cassie–Baxter State to the Wenzel State on Textured Polymer Surfaces. *Langmuir* 2014, 30, 2061-2067.
- [200] Groenendijk, M. N. W. and Meijer, J., Surface Microstructures obtained by Femtosecond Laser Pulses. *CIRP Annals - Manufacturing Technology* 2006, 55, 183-186.
- [201] Shin Ju, Y., Park Ji, Y., Liu, C., He, J., et al., Chemical structure and physical properties of cyclic olefin copolymers (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 2005. Vol. 77, Page 801.
- [202] Feng, L., Zhang, Y., Xi, J., Zhu, Y., et al., Petal Effect: A Superhydrophobic State with High Adhesive Force. *Langmuir* 2008, 24, 4114-4119.
- [203] Cassie, A. and Baxter, S., Large contact angles of plant and animal surfaces. *Nature* 1945, 155, 21-22.
- [204] Wenzel, R. N., RESISTANCE OF SOLID SURFACES TO WETTING BY WATER. *Industrial & Engineering Chemistry* 1936, 28, 988-994.
- [205] Pham, T. T., Wiedemeier, S., Maenz, S., Gastrock, G., et al., Hemodynamic aspects of reduced platelet adhesion on bioinspired microstructured surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016, 145, 502-509.
- [206] Cassie, A. B. D., Contact angles. *Discussions of the Faraday Society* 1948, 3, 11-16.
- [207] Absolom, D. R., Zingg, W. and Neumann, A. W., Protein adsorption to polymer particles: Role of surface properties. *Journal of Biomedical Materials Research* 1987, 21, 161-171.
- [208] Wiedemeier, S., Eichler, M., Römer, R., Grodrian, A., et al., Parametric studies on droplet generation reproducibility for applications with biological relevant fluids. *Engineering in Life Sciences* 2017, 1-10.
- [209] Wiedemeier, S., Römer, R., Wächter, S., Staps, U., et al., Precision moulding of biomimetic disposable chips for droplet-based applications. *Microfluid Nanofluid* 2017, 21, 167.

Abbildungszeichnis

Abb. 1.1: Darstellung unterschiedlicher Methoden zur Bildung von Sphäroiden. A – „liquid overlay“; B – „hanging drop“; C und D – „modified hanging drop“; I – Aliquotierung der Zellsuspension; II – Inkubation (Zellproliferation und Sedimentation); III – Sphäroidbildung.	3
Abb. 1.2: Tropfen aus Zellkulturmedium (rot, DMEM) kompartimentiert in einem Öl (transparent, PFD); A – Tropfengenerierung in einem PC-FMS ($Q_k = 250 \mu\text{l}/\text{min}$, $Q_d = 100 \mu\text{l}/\text{min}$); B – Tropfensequenz in einem aufgewickelten Teflon-Schlauch (Schlauchdisk).....	6
Abb. 1.3: Pipe based bioreactor; A – Schlauchdisk mit separierten Medientropfen; B – Schema zur Illustration der „pipe based bioreactor“ Plattform; C – Medientropfen mit einem Sphäroid.	7
Abb. 1.4: Darstellung der Sphäroidbildung auf der Basis tropfenbasierter Verfahren I – Aliquotierung der Zellsuspension; II – Inkubation (Zellproliferation und Sedimentation); III – Sphäroidbildung.....	10
Abb. 1.5: Illustration zur Arzneimittelentwicklung – Von der Entwicklung bis zur Zulassung (Bildquelle: https://www.yourgenome.org/facts/how-are-drugs-designed-and-developed , 05.12.2017).	11
Abb. 2.1: Tropfengenerierung im 2D Flow-Focusing; A – Photographie der Tropfengenerierung von DMEM in PFD; B – Schematische Darstellung der Tropfengenerierung und der relevanten Parameter.....	16
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Bindungskräfte A – in einer Volumenphase B – an der Grenzfläche.	20
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Bindungskräfte an einer ebenen und einer gekrümmten Grenzfläche und der resultierenden Druckverhältnisse an einer Grenzfläche.	21
Abb. 2.4: Schema der Kontaktwinkelmessung und des Zusammenhangs zwischen dem Kontaktwinkel ϑ , der Oberflächenspannung γ_L , der Grenzflächenspannung γ_S und der freien Oberflächenenergie γ_{SL}	22
Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Benetzbarkeit, A – Hydrophil, B – Hydrophob.	22

- Abb. 2.6: Schema der Benetzung einer Oberflächenstruktur und der resultierenden Kontakte A – nach Wenzel θ_{W*} , B - Cassie-Baxter θ_{CB*} 23
- Abb. 3.1: Schema der einzelnen Prozessschritte..... 25
- Abb. 3.2: Photographie der tropfenbasierten mikrofluidischen Plattform; A – Fluidische Einheit, 1: Mischmodul, 2: Tropfenmodul, 3.1 und 3.2: Speichermodul, 4: Druckmodul, 5: Zudosiermodul, 6: Vorlagereservoir, 7: Spektroskopiemodul; B – Kontrolleinheit, 1: 1. Untereinheit, 2: 2. Untereinheit..... 26
- Abb. 3.3: Tropfengenerierung mit einem Tropfenmodul, 1: FMS, 2: Anschlussrahmen, 3: Montagefüße..... 30
- Abb. 3.4: FMS basierend auf dem Patent des „Montier- und demontierbaren Fluidmikrosystem“; A – Photographie eines montierten FMS zur Tropfengenerierung; B – Modell des Kanalquerschnittes nach der Montage, 1: Deckelement, 2: Bodenelement, 3: Seitenkanäle, 4: Hauptkanal 31
- Abb. 3.5: Spritzenpumpensystem; 1 - 7 : Kanal 1 bis 7. 32
- Abb. 3.6: Mischmodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Deckelement, 2: Rührelement, 3: Bodenelement, 4: Auslasselement, 5: Kupplung zum Rührelement, 6: Verschluss des Reservoir..... 33
- Abb. 3.7: Tropfenmodul; A – Photographie; B – Photographie der Tropfengenerierungszone; C – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Tropfengenerierungs-FMS, 2: fluidischer Anschlussrahmen. 34
- Abb. 3.8: Schlauchdisk befüllt mit DMEM-Tropfen..... 35
- Abb. 3.9: Druckmodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Druck-FMS, 2: fluidischer Anschlussring, 3: Anschlussadapter..... 36
- Abb. 3.10: Zudosiermodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Lichtleiterkopplungsgruppe, 2: Zudosier-FMS, 3: fluidischer Anschlussrahmen, 4: Mikroventil- Kopplungsgruppe. 37
- Abb. 3.11: Spektroskopiemodul; A – Photographie; B – Explosionsdarstellung (3D-Modell), 1: Spektroskopie-FMS, 2: Fluoreszenzfilter, 3: Anschlussadapter, 4: Kollimator. 39
- Abb. 3.12: Bedien- und Visualisierungs-Oberfläche der PC-Anwendung (AutoInjCS Interface v5.0).41
- Abb. 3.13: Parameterbestimmung für die Berechnung des Tropfenvolumens. 1 – 4: Rotes Objekt: Tropfen, grünes Objekt: Detektor 1 (links, **PD1**) und 2 (rechts, **PD2**). A – Schema zur Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit, 1 – Tropfenposition direkt vor Eintritt in **PD1**, 2 – Tropfenposition direkt vor Eintritt in **PD2**. B – Schema zur Bestimmung der Tropfenlänge, 3 – Tropfenposition direkt vor Eintritt in **PD1**, 4 – Tropfenposition direkt nach Verlassen von **PD2**. $\Delta t_{T_{in}}$: Zeitdifferenz, die der Tropfen vom Eintritt in **PD1** bis zum Eintritt in **PD2** benötigt. $\Delta t_{T_{out}}$: Zeitdifferenz, die der Tropfen vom Verlassen von **PD1** bis zum Verlassen

	von PD2 benötigt. $\Delta t_{T_{inPD2outPD1in}}$: Zeitdifferenz, die der Tropfen vom Eintritt in PD1 bis zum Verlassen von PD2 benötigt.	44
Abb. 4.1:	Strukturformel C_4F_8	47
Abb. 4.2:	Spritzgusswerkzeuge; A – Komponenten für die Außenseite der FMS; B – Komponenten für die Innenseite der FMS, 1.1: Spritzgussrahmen (Außenseite), 1.2: Spritzgussrahmen (Innenseite), 2.1: Formeinsatz für die Außenseite der FMS-Elemente, 2.2 und 2.3: Formeinsätze für die Innenseite der FMS, 3.1: Kavität für das FMS-Bodenelement, 3.2: Kavität für das FMS-Deckelement, 3.3: Kanalstruktur für das FMS-Bodenelement, 3.4: Kanalstruktur für das FMS-Deckelement.	49
Abb. 4.3:	Mikrostrukturiertes Testelement (MTE); A – Formeinsatz; B – Formteil aus PC; 1: Mikrostruktur des Formeinsatzes, 2: Mikrostruktur des Formteiles.....	50
Abb. 4.4:	Spritzgegossene Formteile aus PC; A – MTE-Formteile; B – FMS-Formteile, 1: FMS-Bodenelement, 2: FMS-Deckelement.....	51
Abb. 5.1:	REM-Aufnahmen des Kanalkreuzes eines FMS-Bodenelements; rote Rahmen: Positionen der Rauheitsbestimmung im Haupt- und Seitenkanal des FMS-Bodenelements.	56
Abb. 5.2:	Weißlichtinterferometer-Modelle der untersuchten Oberflächen; A – Hauptkanal des FMS (gefräst), B – Seitenkanal des FMS (gefräst); C – TE gefräst Oberfläche; D – TE unbehandelt Oberfläche.	57
Abb. 5.3:	Schichtdickenbestimmung; A – AFM-Aufnahme des Messfensters, B – Histogramm der Messwerte.....	59
Abb. 5.4:	Zuweisung der unterschiedlichen Zonen bei der Tropfengenerierung; 1: Tropfengenerierungszone; 2: Kanalkreuz; 3: Verbindung zwischen dem sich bildenden Tropfen und der dispersen Phase vor dem Kanalkreuz; 4: Strömungskorridor der kontinuierlichen Phase um den sich bildenden Tropfen.	62
Abb. 5.5:	Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000\mu m$, $d_{SK} = 300\mu m$) zum Beginn der Tropfenbildung (Phase 1) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFD) von $Q_k = 1000 \mu l/min$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200 \mu l/min$, A - COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFD, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile) ; A1 – Detailansicht der Grenzflächenströmungen; A2 – Detailansicht der Strömungen in der dispersen Phase; B – COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse.	63
Abb. 5.6:	Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000\mu m$, $d_{SK} = 300\mu m$) zum Beginn der Tropfenbildung (Phase 2) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFD) von $Q_k = 1000 \mu l/min$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200 \mu l/min$, A - COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFD, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile) ; A1 – Detailansicht der Grenzflächenströmungen; B - COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse; B1 – Detailansicht der Druckverhältnisse an der Grenzfläche des sich bildenden Tropfens.	64

- Abb. 5.7: Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000\mu\text{m}$, $d_{SK} = 300\mu\text{m}$) während der Tropfenbildung (Phase 3) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFD) von $Q_k = 1000\ \mu\text{l}/\text{min}$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200\ \mu\text{l}/\text{min}$, A – COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFD, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile); B – COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse..... 65
- Abb. 5.8: Tropfenbildung mit einem Kanalkreuz ($d_{HK} = 1000\mu\text{m}$, $d_{SK} = 300\mu\text{m}$) nach der Tropfenbildung (Phase 4) bei einer Förderrate der kontinuierlichen Phase (PFD) von $Q_k = 1000\ \mu\text{l}/\text{min}$ und der dispersen Phase (DMEM) von $Q_d = 200\ \mu\text{l}/\text{min}$, A - COMSOL-Modell: Darstellung der Volumenanteile (blau = PFD, rot = DMEM) und der Strömungsvektoren (weiße Pfeile); A1 – Detailansicht des gebildeten Tropfens; B – COMSOL-Modell: Darstellung der Druckverhältnisse im FMS; B1 und B2 – Detailansicht der Druckverhältnisse zwischen Grenzfläche des Tropfens und der Kanaloberfläche. 65
- Abb. 5.9: Photographie der fünf untersuchten FMS-Designs zur Tropfengenerierung; engl.: 1 und 2 Junction; 3 bis 5 Flow – Focusing..... 66
- Abb. 5.10: Fünftes FMS-Design; engl.:3D Flow – Focusing; A – Photographie der Tropfengenerierung mit PFD (farblos, $Q_k = 250\mu\text{l}/\text{min}$) und DMEM (rot, $Q_d = 50\ \mu\text{l}/\text{min}$); B – Detaildarstellung (3D-Modell), 1: Bodenelement des FMS, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Kegelelement, 5: Ringspalt..... 67
- Abb. 5.11: Gegenüberstellung der mittleren Tropfenvolumina und der entsprechenden Standardabweichungen aller Läufe bei den Förderratenkombinationen von 250/50, 500/100 und 1000/200. Für jede Förderratenkombination (je ein Block) sind die VK-Werte für die Langzeitabweichung aufgetragen; A – 1D 45° FMS; B – 2D 90° FMS. 71
- Abb. 5.12: Photographie der Tropfengenerierung der fünf unterschiedlichen FMS-Designs bei einer Förderratenkombination von 250/50 $\mu\text{l}/\text{min}$; disperse Phase (rot, DMEM); kontinuierliche Phase (farblos, PFD) A – vor dem Tropfenabriss; B – nach dem Tropfenabriss; 1 – 1D 90° FMS; 2 – 1D 45° FMS; 3 – 2D 90° FMS; 4 – 2D 45° FMS; 5 – 3D 45° FMS. 72
- Abb. 5.13: Gegenüberstellung der gemittelten Tropfenvolumen und der Standardabweichung (Langzeitabweichung) in Bezug zu den fünf untersuchten FMS-Designs für die Förderratenkombinationen 250/50, 500/100 und 1000/200 bei einem Förderratenverhältnis von 5/1. 73
- Abb. 5.14: Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Tropfenform und die Dicke des PFD-Film. Die Tropfen wurden mit einem 2D 90° FMS bei einer Förderratenkombination von 250/50 $\mu\text{l}/\text{min}$ generiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Imaging-System in einem FEP-Schlauch ($d_i = 1\text{mm}$); A – ruhender Tropfen; B – Tropfen bei einer mittleren Strömungsgeschwindigkeit v von 1,06 mm/s ($Q_k = 50\ \mu\text{l}/\text{min}$); C – $v = 4,24\ \text{mm}/\text{s}$ ($Q_k = 200\ \mu\text{l}/\text{min}$); D – $v = 10,61\ \text{mm}/\text{s}$ ($Q_k = 500\ \mu\text{l}/\text{min}$); E – $v = 21,22\ \text{mm}/\text{s}$ ($Q_k = 1000\ \mu\text{l}/\text{min}$). 74
- Abb. 5.15: Photographie der Tropfengenerierung mit dem 2D 90° FMS bei drei unterschiedlichen Förderratenkombinationen von 250/25, 250/50 und 250/100 $\mu\text{l}/\text{min}$; A – Tropfengenerierung im FMS; B – gebildete Tropfensequenz im Speichermodul..... 75

- Abb. 5.16: Gegenüberstellung des Einflusses der Förderraten auf das Tropfenvolumen und der ermittelten Regressionen aller FMS-Designs; A – Tropfenvolumen in Abhängigkeit zur Förderrate der dispersen Phase bei einer konstanten Förderrate der kontinuierlichen Phase von 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$; B – Einfluss der Förderrate der kontinuierlichen Phase auf das Tropfenvolumen bei einer konstanten Förderrate der dispersen Phase von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 76
- Abb. 5.17: Gegenüberstellung der Tropfenvolumen und der KV-Werte der untersuchten Förderratenverhältnisse Q_k/Q_d bei drei unterschiedlichen Förderraten der kontinuierlichen Phase Q_k von 250, 500 und 1000 $\mu\text{l}/\text{min}$; A – Korrelation der Ergebnisse mit dem 2D 90° FMS; B – Korrelation der Ergebnisse mit dem 3D 45° FMS. 77
- Abb. 5.18: Gegenüberstellung der Wirkungsrichtung der Kräfte, die durch die Einleitung der kontinuierlichen Phase auf den sich bildenden Tropfen wirken; A – 2D 90° FMS; B – 3D 45° FMS. 79
- Abb. 5.19: Modell des 3D 45° FMS; A – Darstellung der Strömungsvektoren (rote Pfeile) der kontinuierlichen Phase im Ringspalt; 1: Bodenelement des FMS, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Kegelelement, 5: Ringspalt; B – 45° Perspektive des Übergangs vom Kegel zum Hauptkanal. 80
- Abb. 5.20: Photographie der im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss der Probenmedien mit einer Förderratenkombination von 500/50 $\mu\text{l}/\text{min}$ generierten Tropfensequenzen im Speichermodul nach einer Prozesszeit von 15 min; A – IMDM-Tropfensequenz; B – Blutserum-Tropfensequenz; C – Vollblut-Tropfensequenz; D – Sahne-Tropfensequenz; A, B und D: Tropfengenerierung mit einem 1D 90° FMS; C: mit einem 2D 90° FMS. 84
- Abb. 5.21: Photographie der Tropfengenerierung mit Vollblut; A – Tropfengenerierung mit einem 1D 90° FMS; B – Tropfengenerierung mit einem 2D 90° FMS; 1: nach einer Laufzeit von 5 min; 2: nach einer Laufzeit von 15 min. 85
- Abb. 5.22: Gegenüberstellung der Wirkungsrichtung der Kräfte (grüne Pfeile), die durch die Einleitung des PFD auf das Vollblut (rot) an der Tropfengenerierungszone wirken; Querschnitt durch die Tropfengenerierungszone, A – 1D 90° FMS; B – 2D 90° FMS, 1: Deckelelement, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Bodenelement, 5: Schlauchjustierbohrung. 87
- Abb. 6.1: Analyse der Oberflächenbeschaffenheit einer spritzgegossenen PC-Oberfläche; A – REM-Aufnahme der Tropfengenerierungszone eines spritzgegossenen 2D 90° FMS, roter Rahmen: Positionen der Rauheitsbestimmung am FMS-Bodenelement; B – Weißlichtinterferometer-Modelle der Oberfläche im rot markierten Bereich. 90
- Abb. 6.2: Schematische Darstellung der Übertragung einer Mikrostruktur beim Spritzgießen, A – Mikrostruktur des Formeinsatzes (Negativstruktur); B – Übertragung der Mikrostruktur vom Formeinsatz auf das Formteil; C – Strukturelemente der Mikrostruktur auf der Oberfläche des Formteiles (Positivstruktur). 93

- Abb. 6.3: A – Schematische Darstellung einer mikrostrukturierten Kanaloberfläche in Bezug zu einem kugelförmigen Tropfen in einem Kanal mit 1 mm Durchmesser, B – Detaildarstellung der Kontaktfläche zwischen dem Tropfen und der mikrostrukturierten Oberfläche (Annahme: Cassie-Baxter-Zustand)..... 93
- Abb. 6.4: Übertragung der Mikrostruktur; A – Mikrostruktur eines 15/8-Formeinsatzes (Negativ); B – Mikrostruktur auf dem entsprechenden Spritzgusselement (15/15-MST, Positiv). 95
- Abb. 6.5: Gegenüberstellung der Strukturiefen der Formeinsätze mit den erzielten Strukturhöhen der Formteile und den ermittelten Wasserkontaktwinkeln nach einer C_4F_8 -Beschichtung der Formteilen. 95
- Abb. 6.6: REM-3D-DOM zur Gegenüberstellung des Einflusses der Formtemperatur und des Nachdruckes auf die Ausbildung der Mikrostruktur der Formteile (MST), A – 15/15-MST abgeformt bei einer Formtemperatur von 110°C und einem Nachdruck von 80 MPa; B – 15/15-MST abgeformt bei einer Formtemperatur von 180°C und einem Nachdruck von 160 MPa. 97
- Abb. 6.7: Ergebnisse der Untersuchungen zum Einflusses der Formtemperatur und des Nachdruckes auf die Strukturhöhe der Formteile und der Wasserkontaktwinkel nach einer Beschichtung mit C_4F_8 97
- Abb. 6.8: Gegenüberstellung der Ausbildung der Mikrostruktur in Abhängigkeit zum verwendeten Polymer anhand von REM-Aufnahmen; A – PC2400; B – PC2805; C – COC6017. 98
- Abb. 6.9: Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der verwendeten Polymere anhand unstrukturierter und strukturierter sowie unbeschichteter und beschichteter MST; A – Ausbildung der Strukturhöhe und der Wasserkontaktwinkel; B – Oberflächenenergien..... 99
- Abb. 6.10: Gegenüberstellung der Mikrostruktur eines PC2400 MST in Abhängigkeit zum eingesetzten Temperierungsmedium anhand von REM-Aufnahmen; A – Temperierungsmedium Öl; B – Temperierungsmedium Wasser..... 101
- Abb. 6.11: Gegenüberstellung der Höhe der Strukturelemente und der Wasserkontaktwinkel nach einer Beschichtung mit C_4F_8 vom jeweils ausgewählten Polymer (PC2400 und COC6017) bei der Verwendung von Wasser und Öl zur Temperierung der Formeinsätze..... 102
- Abb. 6.12: Gegenüberstellung der Mikrostruktur (1 und 2) und der Nanostruktur (3); A – technische Oberfläche abgeformt aus PC2805; B – Oberfläche eines Lotusblattes (*Nelumbo nucifera*). 103
- Abb. 6.13: Dimensionen und Anordnung der Mikrostruktur auf den 2D 90° FMS, A – FMS integriert in die tropfenbasierte mikrofluidische Plattform; B – Tropfengenerierung im mikrostrukturierten FMS; C – REM-Aufnahmen der Mikrostruktur im Bereich der Tropfengenerierungszone; D – DOM der Mikrostruktur im Hauptkanal. 104

- Abb. 6.14: Ergebnisse der fluidischen Untersuchungen in Abhängigkeit von der FMS-Konfiguration; A – Wasserkontaktwinkel und die freie Oberflächenenergie der untersuchten FMS; B – mittleres Tropfenvolumen, deren Standardabweichung und die VK-Werte in Abhängigkeit von dem untersuchten Probenmedium und der Konfiguration der FMS..... 105
- Abb. 7.1: Übersicht der mittleren Tropfenvolumina und der VK-Werte unterschiedlich konfigurierter 2D 90° FMS bei einer Förderratenkombination von 500/100 µl/min für Untersuchungen mit DMEM und Vollblut. 109
- Abb. 7.2: Gegenüberstellung der Wirkungsrichtung der Kräfte (grüne Pfeile) die durch die Einleitung des PFD auf das Probenmedium (rot) an der Tropfengenerierungszone wirken; Querschnitt durch die Tropfengenerierungszone, A – 2D 90° FMS; B – 3D 45° FMS, 1: Deckelement, 2: Hauptkanal, 3: Seitenkanal, 4: Bodenelement, 5: Schlauchjustierbohrung. 111
- Abb. 7.3: Schema des Ablaufes eines Wirkstoffscreening auf der Basis multizellulärer Systeme. 112
- Abb. A.1: Gegenüberstellung der mittleren Tropfenvolumina und der entsprechenden Standardabweichungen aller Läufe bei den Förderratenkombinationen von 250/50, 500/100 und 1000/200. Für jede Förderratenkombinationen (je ein Block) sind die VK-Werte für die Langzeitabweichung aufgetragen; A – 1D 90° FMS; B – 1D 90° FMS; C – 2D 90° FMS; D – 2D 45° FMS; E – 3D 45° FMS..... 121
- Abb. A.2: Gegenüberstellung der Tropfenvolumen und der KV-Werte der untersuchten Förderratenverhältnisse Q_k/Q_d bei drei unterschiedlichen Förderraten der kontinuierlichen Phase Q_k von 250, 500 und 1000 µl/min; Korrelation der Ergebnisse mit dem A – 1D 90° FMS; B – 1D 45° FMS; C – 2D 90° FMS; D – 2D 45° FMS; E – 3D 45° FMS. 122

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 4.1: Kenndaten der Atmosphärendruckplasmaanlage DBE-1.</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 4.2: Standard Spritzgussparameter.</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 5.1: Ermittelte Rauheitsparameter der Kanaloberflächen eines FMS für den Haupt- und Seitenkanal sowie einer gefrästen und unbehandelten Oberfläche eines TE.</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 5.2: Ermittelte Wasserkontaktwinkel und Oberflächenenergien un behandelter und gefräster PC-Oberflächen vor und nach einer Beschichtung mit C₄F₈.</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 5.3: Ermittelte Minimal- und Maximal-Werte aller relevanten dimensionslose Kennzahlen unter Berücksichtigung der untersuchten Medien und der fluidischen Prozessparameter. Die Berechnungen erfolgte in Bezug zu einem Durchmessers des Hauptkanal von $d_{HK} = 1000 \mu m$.</i>	<i>60</i>
<i>Tab. 5.4: Kennzeichnung der untersuchte FMS-Designs.</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 5.5: Regime zur Untersuchungen der Tropfengenerierung.</i>	<i>69</i>
<i>Tab. 5.6: Übersicht der untersuchten Medien.</i>	<i>82</i>
<i>Tab. 5.7: Stoffeigenschaften der untersuchten Medien.</i>	<i>83</i>
<i>Tab. 5.8: Bewertung der Stabilität der FMS-Beschichtung.</i>	<i>85</i>
<i>Tab. 6.1: Ermittelte Rauheitsparameter eines spritzgegossenen FMS.</i>	<i>90</i>
<i>Tab. 6.2: Ermittelte Wasserkontaktwinkel und Oberflächenenergien einer unstrukturierten PC-Oberfläche vor und nach einer Beschichtung mit C₄F₈.</i>	<i>91</i>
<i>Tab. 6.3: FMS – Konfigurationen und die untersuchten Probenmedien.</i>	<i>104</i>
<i>Tab. 7.1: Übersicht der mittleren Tropfenvolumina und der KV-Werte aller untersuchten FMS-Design (ohne Mikrostruktur) und für alle Förderratenkombinationen.</i>	<i>110</i>

