

**Entwicklung eines mikrofluidischen Systems zur kontinuierlichen
elektrophoretischen Auftrennung und Analyse von Enzymreaktionen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen
der Technischen Universität Dortmund
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

M.Sc. Matthias Jender

aus

Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Oktober 2021

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Nett
2. Gutachter: PD Dr. Joachim Franzke

Dortmund 2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	1
1.2	Hintergrund	2
1.3	Gliederung der Arbeit	4
2	Grundlagen	5
2.1	Mikrofluidische Grundlagen	5
2.1.1	Reynoldszahl und laminarer Fluss	6
2.1.2	Diffusion	7
2.1.3	Hydrodynamischer Fluss	7
2.1.4	Elektroosmotischer Fluss	8
2.2	Elektrophorese	10
2.2.1	Kapillarelektrophorese	11
2.2.2	Free-Flow-Elektrophorese	11
2.2.3	Theorie der Elektrophorese	16
2.2.4	Theorie der Bandenverbreiterung in FFZE	17
2.3	Ionenerzeugung bei der MS	18
3	Entwicklung und Herstellung der μFFE-Chips	21
3.1	Hintergrund	21
3.1.1	Materialien für μ FFE-Chips	21
3.1.2	Integration der Elektroden	22
3.2	Design und Herstellung von FFE-Chips aus PDMS	26
3.2.1	Fotolithografische Strukturierung	26
3.2.2	Design	27
3.2.3	Herstellung	32
3.2.4	Funktionalität der Chips	35
3.2.5	Fazit	36
3.3	Entwicklung Herstellung von FFE-Chips aus PMMA	38
3.3.1	Design	38
3.3.2	Herstellung	43
3.3.3	Funktionalität der Chips	45
3.3.4	Fazit	46

4 FFE mit CE-Analyse	49
4.1 Einführung	49
4.2 Materialien und Methoden	50
4.3 Voruntersuchungen mit CE	51
4.4 μ FFE-Trennung und Analyse mit μ FFE-CE	53
4.4.1 μ FFE von AMP & Fluorescein	53
4.4.2 μ FFE von AMP, ADP, ATP & Fluorescein	54
4.5 Fazit	57
5 FFE mit MS-Analyse	59
5.1 Einführung	59
5.2 Pumpensysteme für μ FFE	62
5.2.1 Spritzenpumpe	62
5.2.2 Peristaltikpumpe	62
5.3 μ FFE-MS-Methodenentwicklung	64
5.3.1 Hintergrundelektrolyten für μ FFE-MS	64
5.3.2 Nachweis der Analyten mit ESI-MS	68
5.3.3 Kopplung von μ FFE und MS	70
5.3.4 Implementierung eines Schaltventils	73
5.4 Stoffauftrennung mit μ FFE-MS	76
5.4.1 Trennung von AMP und ATP	77
5.4.2 Ablenkung von Coenzym A	80
5.4.3 Ionensuppression durch PBS	80
5.4.4 Alternative zu PBS für die Elektrodenreservoirs	83
5.5 Stoffauftrennung mit μ FFE-MS ohne PBS	84
5.5.1 AMP, CoA und ATP	84
5.5.2 AMP, CoA, ATP, Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Citrat	88
5.6 Verfolgen einer Enzymreaktion mit μ FFE-MS	91
5.7 Fazit	95
6 ESI-Multiemitter	97
6.1 Einführung	97
6.2 Design	98
6.3 Praktischer Teil	98
6.3.1 Versuchsaufbau	98
6.3.2 ESI-Hochspannung	101
6.3.3 Versuchsdurchführung	101
6.3.4 Ergebnisse	102
6.4 Fazit	109
7 Fazit	111

Abbildungsverzeichnis

1.1	LRC-Mehrstufenreaktor	3
2.1	Parabolisches Geschwindigkeitsprofil	8
2.2	EOF-Prinzip	9
2.3	EOF-Profil im offenen und im geschlossenen Kanal	10
2.4	Prinzip der Kapillarelektrophorese	12
2.5	Trennprinzipien von FFE und CE	13
2.6	Prinzipien der Trennmodi FFZE, FFFSE, FFITP und FFIEF	14
2.7	Bandenverbreiterung durch parabolisches Strömungsprofil	18
2.8	Schematische Darstellung von ESI	19
3.1	Isolierung der Elektroden mittels geometrischer Strukturen	24
3.2	Fotolackstempel	27
3.3	Technische Zeichnung: μ FFE aus PDMS	28
3.4	Gussform für μ FFE aus PDMS	29
3.5	Foto der Gussform auf Si-Wafer	31
3.6	Foto des Fotolackstempels	33
3.7	Querschnitt durch PDMS-FFE	34
3.8	Foto und Explosionszeichnung des PDMS-Chips	34
3.9	Abgelenktes Fluorescein im PDMS-Chip	35
3.10	Mikrostrukturen des μ FFE-Chips auf PMMA-Basis.	39
3.11	Trennkammer-Bauteil	40
3.12	Oberes μ FFE-Bauteil Version I	40
3.13	Explosionszeichnung PMMA-Chip v1	42
3.14	Explosionszeichnung und Foto PMMA-Chip v2	43
3.15	Dysfunktionaler Chip: Höhenunterschiede	46
3.16	FPR-Farbmix	47
4.1	CE-Separation	52
4.2	CE-4mix	52
4.3	FFE-CE: AMP mit Fluorescein als optischer Referenz	53
4.4	Elektropherogramme der Trennung von AMP und Fluorescein	54
4.5	FFE-CE Fluoresceinmarker	55

4.6	FFE-CE Elektropherogramme	56
5.1	Flussratenvariation	60
5.2	Pipettenreservoirs	63
5.3	Pulsation des Probenstroms	65
5.4	Anordnung der Pumpen in μ FFE	66
5.5	Blasenbildung durch hohe Feldstärken	67
5.6	Konzentrationsabhängige Bandenverbreiterung	67
5.7	Fluoresceinbanden 0-200V	68
5.8	Massenspektrum: Direct Infusion 4-Mix	69
5.9	EIC: A4 bei 100V	71
5.10	EIC: A6 bei 0V, 100V, 150V	72
5.11	FFE-MS: Schaltventil Proof-of-principle	74
5.12	FFE-MS Versuchsaufbau	75
5.13	ATP: In-Source-Fragmentierung	77
5.14	AMP-ATP: Spektren A1-A5	79
5.15	CoA: Spektren A1-A5	81
5.16	ESI-MS Peakscharen	82
5.17	AMP-CoA-ATP: Spektren A1-A5	85
5.18	CoA: In-Source-Fragmentierung	86
5.19	FFE-MS: Ergebnis AMP-CoA-ATP	87
5.20	CE-Analyse der FFE-MS-Proben	89
5.21	FFE-MS mit 6-Mix	90
5.22	EIC der matA-Reaktion	92
5.23	Heatmaps der matA-Reaktion	93
6.1	Technische Zeichnung des Multiemitters	99
6.2	Multiemitter Versuchsaufbau	100
6.3	Multiemitter: 100V-Trennung (EIC)	103
6.4	Multiemitter: Heatmaps 100V-Trennung	104
6.5	Multiemitter: 150V-Trennung (EIC)	106
6.6	Multiemitter: Heatmaps 150V-Trennung	107
6.7	Multiemitter: 200V-Trennung (EIC)	107
6.8	Multiemitter: Heatmaps 200V-Trennung	108
6.9	Multiemitter: CMP-Marker für Signallücken	109

Abkürzungsverzeichnis

AA	Ammoniumacetat
AC	Ammoniumhydrogencarbonat
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Ammoniumformiat
AMP	Adenosinmonophosphat
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	Rechnergestütztes Zeichnen, englisch <i>computer-aided design</i>
CE	Kapillarelektrophorese
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
COC	Cycloolefin-Copolymere
CS	Citratsynthase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	Extrahiertes Ionen-Chromatogramm
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrosprayionisierung
ESI-MS	Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie
μFFE	Mikrofluidische Free-Flow-Elektrophorese
FFE	Free-Flow-Elektrophorese
FFFSE	Free-Flow-Field-Step-Elektrophorese
FFIEF	Free-Flow-Isoelektrische-Fokussierung
FFITP	Free-Flow-Isotachophorese
FFZE	Free-Flow-Zonenelektrophorese
GC	Gaschromatographie
HEC	2-Hydroxyethylcellulose

HGE	Hintergrundelektrolyt
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
ITP	Isotachophorese
LC	Flüssigkeitschromatographie, englisch <i>liquid chromatography</i>
LE	Englisch <i>leading electrolyte</i>
LRC	Leibniz Research Cluster
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisierung
matA	Malonyl-CoA-Decarboxylase
matB	Malonyl-CoA-Synthetase
MS	Massenspektrometrie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, englisch <i>phosphate-buffered saline</i>
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PET	Polyethylenterephthalat
PKS	Polyketidsynthase
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
SERS	Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie, englisch <i>surface enhanced Raman spectroscopy</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz, englisch <i>surface plasmon resonance</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung, englisch <i>TRIS-buffered saline</i>
TE	Englisch <i>terminating electrolyte</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UMP	Uridinmonophosphat
UV/Vis	UV: ultraviolett; Vis: sichtbar, englisch <i>visible</i>
ZE	Zonenelektrophorese

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Herstellung einer mikrofluidischen Trenneinheit zur Integration in einen Mehrstufenreaktor. Der Mehrstufenreaktor sollte in Zusammenarbeit mit 4 Partnerinstituten im Rahmen des Leibniz Research Clusters (LRC) entwickelt werden. Dabei war die Vision die Herstellung von Naturstoffen in kontinuierlicher, zellfreier und enzymkatalysierter Biosynthese. Durch interdisziplinäre Forschung und biotechnologischen Verfahren sollten neue Wege zur Herstellung von Wirkstoffen erschlossen werden, die eine Alternative zur Produktionseinheit ‚Zelle‘ darstellen. Aufgereinigte Enzyme sollten dafür in Mikroreaktoren immobilisiert werden, wo sie im Durchfluss bestimmte enzymatische Reaktionen katalysieren und damit Bausteine für die Herstellung von Naturstoffen erzeugen sollten. Die Aufgabe der in dieser Arbeit entwickelten mikrofluidischen Trenneinheit bestand darin, die Substanzgemische, die von den Enzymreaktionen in den Mikroreaktoren stammten, kontinuierlich in ihre Einzelsubstanzen aufzutrennen. Dabei sollten bestimmte Stoffe, wie gebildete Produkte oder nicht benötigte Nebenprodukte, entnommen und andere, beispielweise nicht vollständig umgesetzte Edukte, zurückgeführt werden.

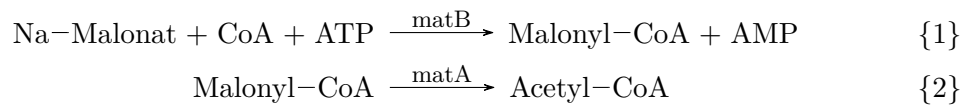
Die Methode, die für die Auftrennung der Substanzen ausgewählt wurde, war die Free-Flow Elektrophorese (FFE). Die Vorzüge von FFE für die oben beschriebene Aufgabe sind in erster Linie das kontinuierliche Trennprinzip und die Möglichkeit zur Miniaturisierung. FFE findet seit etwa 60 Jahren Anwendung. Kommerzielle Systeme sind seit einigen Jahren erhältlich und werden hauptsächlich präparativ zur Aufreinigung von Proteinen, Zellbestandteilen oder DNA genutzt. Für die Integration in den Mehrstufenmikroreaktor wurde eine mikrofluidische FFE (μ FFE) benötigt. An dieser miniaturisierten Form wird seit etwa 25 Jahren geforscht und sie bietet einige Vorteile gegenüber der großskaligen Variante: Es werden deutlich geringere Probenmengen benötigt, die Trennung kann schneller ablaufen, Wärme wird besser abtransportiert und die Flüsse lassen sich besser kontrollieren. Aufgrund des kontinuierlichen Arbeitsprinzips bietet sich μ FFE zur Kopplung mit anderen mikrofluidischen Einheiten, wie den Mikroreaktoren mit immobilisierten Enzymen, an. In der Literatur vorgestellte μ FFE-Systeme konnten jedoch bisher nicht zur Marktreife gebracht werden und waren in der Regel auf Proof-of-Principle-Experimente beschränkt. Das Ausbleiben kommerzieller Nutzung von μ FFE ist hauptsächlich zurückzu-

KAPITEL 1. EINLEITUNG

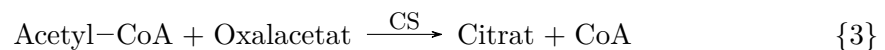
führen auf mangelnde Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Anwendung, sowie unzureichende analytische Möglichkeiten zur Überwachung der Trennung. Die Herstellung eines zuverlässig funktionierenden FFE-Chips, die Entwicklung einer leistungsfähigen Trennmethode für die im Projekt relevanten Analyten, sowie die Möglichkeit des Monitorings waren daher die wesentlichen Forschungsschwerpunkte für das Erreichen des im ersten Abschnitts formulierten Ziels dieser Arbeit.

1.2 Hintergrund

Wie bereits eingangs erwähnt war der Hintergrund des LRC-Projekts, in dessen Rahmen diese Arbeit angefertigt wurde, die zellfreie enzymkatalysierte Wirkstoffsynthese. Das Ziel war es, mit Acetyl-CoA (CoA: Coenzym A) und Malonyl-CoA die zentralen Bausteine einer großen Gruppe von Naturstoffen effizient herstellen zu können. Bei dieser Gruppe handelt es sich um die Polyketide, die über eine große strukturelle und funktionelle Vielfalt verfügen. Einige davon finden bereits pharmazeutische Anwendung, wie beispielsweise das Antibiotikum Erythromycin¹ oder das Krebsmittel Doxorubicin.² Die zellfreie Synthese von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA sollte über folgende Reaktionen durch die Enzyme Malonyl-CoA-Synthetase (matB) und Malonyl-CoA-Decarboxylase (matA) katalysiert werden:



Das Enzym matB bildet dabei zunächst unter ATP-Verbrauch Malonyl-CoA aus Na-Malonat und CoA. In der von matA katalysierten Reaktion erfolgt die Bildung von Acetyl-CoA aus Malonyl-CoA. Mit diesen beiden Produkten könnte nun eine Polyketidsynthese (PKS) größere Moleküle synthetisieren. CoA würde dabei wieder frei und könnte von neuem in Reaktion 1 einfließen. Da keine PKS zur Verfügung stand, wurde mit Citratsynthase (CS) ein anderes Enzym als Platzhalter verwendet, das das CoA wieder freisetzt:



Die Vision des LRC-Projekts bestand nun darin, diese enzymatischen Reaktionen in einem mikrofluidischen Mehrstufenreaktor kontrolliert und zyklisch ablaufen zu lassen. Das Prinzip dieses Mehrstufenreaktors ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Die Reaktionen um die Enzyme matB, matA und CS finden hier in jeweils einem mikrofluidischen Durchflussreaktor statt. Die Reaktoren sind miteinander in einer Kaskade verbunden, an dessen Ende der FFE-Chip (gelb unterlegt) steht. Mittels μ FFE soll das Stoffgemisch aus den Enzymreaktoren im kontinuierlichen Fluss in Einzelsubstanzen

1.2. HINTERGRUND

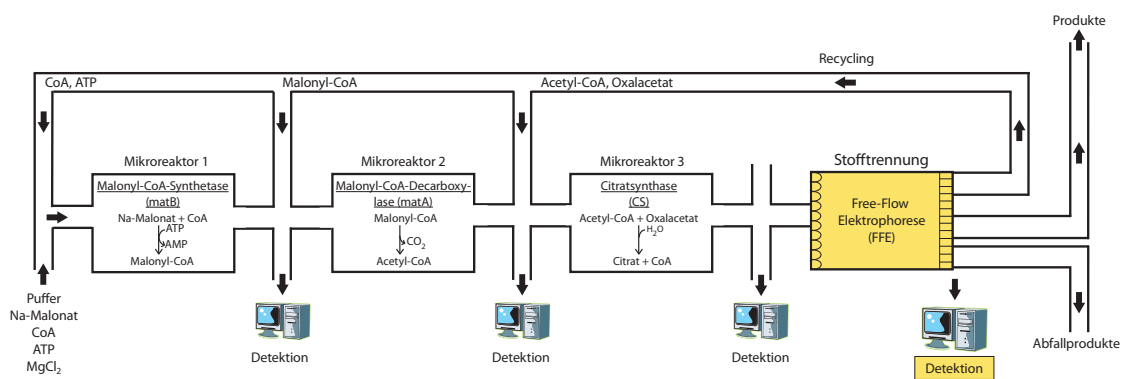


Abbildung 1.1: Die Vision des LRC-Projekts: Ein zyklischer Mehrstufenreaktor zur kontinuierlichen zellfreien Produktion von Polyketidbausteinen durch immobilisierte Enzyme. Im ersten Schritt (Mikroreaktor 1) wird durch das Enzym matB Malonyl-CoA aus Natrium-Malonat gebildet. Im zweiten Reaktor wird Malonyl-CoA von matA zu Acetyl-CoA umgesetzt. Im dritten Reaktor erfolgt die Freisetzung von CoA durch Citratsynthase, wobei Citrat gebildet wird. Im letzten Schritt wird das Reaktionsgemisch durch μ FFE in die Einzelsubstanzen aufgetrennt, die dann entweder zurückgeführt, entsorgt oder gesammelt werden können. Zwischen den Reaktoren sollen die Prozesse mit Hilfe verschiedener analytischer Methoden untersucht werden.

KAPITEL 1. EINLEITUNG

aufgetrennt werden. Wie die Pfeile in der Darstellung andeuten, sollen Substanzen, wie gebildete Produkte oder nicht benötigte Nebenprodukte, entnommen und nicht umgesetzte Stoffe, wie die Intermediate Malonyl-CoA, Acetyl-CoA oder ATP, zurückgeführt werden.

1.3 Gliederung der Arbeit

Die Arbeit beinhaltet neben dieser Einleitung einen allgemeinen Grundlagenteil (Kapitel 2), ein Kapitel über die Entwicklung und Herstellung der mikrofluidischen FFE-Chips (Kapitel 3), drei überwiegend experimentelle Kapitel (Kapitel 4 bis 6) und ein Fazit der Arbeiten (Kapitel 7). Im experimentellen Teil wird die Optimierung der Auftrennung verschiedener Stoffgemische im FFE-Chip und die damit verbundenen Analysen behandelt: Kapitel 4 beschreibt die Offline-Analyse der Proben mittels Kapillarelektrophorese (CE, englisch *capillary electrophoresis*), Kapitel 5 die Online-Analyse mittels Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) und Kapitel 6 die Entwicklung, Herstellung und Nutzung eines ESI-Multiemitters für die Massenspektrometrie. Im abschließenden Kapitel 7 werden Schlussfolgerungen gezogen und mögliche zukünftige Entwicklungen diskutiert.

2 Grundlagen

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die theoretischen Grundlagen, die für diese Arbeit eine Rolle spielen. Die zentralen Themen sind dabei verschiedene Phänomene, die im mikrofluidischen Maßstab von Bedeutung sind und die Elektrophorese. Bei der Elektrophorese liegt der Schwerpunkt vor allem auf der FFE. Außerdem wird die Ionenerzeugung bei der MS erklärt.

2.1 Mikrofluidische Grundlagen

Mikrofluidik beschäftigt sich mit der Manipulation von Flüssigkeiten und Gasen im Submillimeterbereich. Diese aufstrebende Technologie hat in den letzten Jahrzehnten zunehmend Anwendung in Bereichen der Medizintechnik,³ Sensortechnik⁴ und Zellbiologie⁵ gefunden. Sogenannte Lab-on-a-chip-Technologien ersetzen teilweise bereits traditionelle experimentelle Ansätze. Die präzise Kontrolle von Fluiden ermöglicht eine schnelle Verarbeitung von Proben, wobei nur geringe Mengen an Ressourcen benötigt werden. Das Verhalten von Fluiden im Mikromaßstab unterscheidet sich in einigen Punkten von dem makroskopischer Fluide. Es dominieren Effekte, die in der klassischen Strömungslehre oft vernachlässigt werden. Eine entscheidende Eigenschaft ist das Vorherrschen laminarer Strömung, bei der die Reibungskräfte gegenüber den Trägheitskräften überwiegen, was sich durch kleine Reynoldszahlen ausdrückt. In Abwesenheit von Turbulenzen findet das Mischen von Flüssigkeiten dann nur noch durch Diffusion statt. Ausgenutzt werden auch Phänomene wie die Kapillarkräfte oder der elektroosmotische Fluss (EOF), die im Mikrometermaßstab besonders zum Tragen kommen. Bekannte Beispiele für die praktische Nutzung sind der gerichtete Flüssigkeitsstrom durch den EOF bei der CE oder mobile Blutzuckermessgeräte und Schwangerschaftstests,⁶ bei denen Flüssigkeit durch Kapillarkräfte transportiert wird. Daneben existieren diverse weitere diagnostische Schnelltests, die bereits Anwendung finden oder in der Entwicklung sind.⁷ Dazu gehören papierbasierte Malaria-Schnelltest,⁸ ELISAs für HIV und Syphilis⁹ und PCR-Tests,¹⁰ wie aktuell für den Nachweis des Virus SARS-CoV-2.¹¹ Der entscheidende Vorteil solcher Schnelltests ist die Unabhängigkeit von Laboren und hochspezialisiertem Personal vor Ort. Um Mikrofluidikchips zur Anwendung oder gar zur Marktreife zu bringen, sind Kenntnisse und Kontrolle der relevanten Parameter für die Entwicklung und Optimierung notwendig.

2.1.1 Reynoldszahl und laminarer Fluss

Die vorherrschende laminare Strömung ist eine wichtige Eigenschaft mikrofluidischer Systeme, da sie im Gegensatz zur turbulenten Strömung vorhersehbar und damit gut zu kontrollieren ist. Eine Vorhersage für das Auftreten laminarer oder turbulenter Strömung macht die dimensionslose Reynoldszahl R_e . Sie ist definiert als:¹²

$$R_e = \frac{\rho D_h v}{\eta} = \frac{D_h v}{\nu} \quad (2.1)$$

mit der Dichte ρ des Fluids, dem hydraulischen Durchmesser D_h des durchflossenen Körpers, der Strömungsgeschwindigkeit v , der dynamischen Viskosität η und der kinematischen Viskosität ν des Fluids, die sich aus ρ und η ergibt: $\nu = \eta/\rho$. Der hydraulische Durchmesser ist definiert als:¹²

$$D_h = \frac{4A}{U} \quad (2.2)$$

mit der durchflossenen Querschnittsfläche des Kanals A und dem Umfang des Kanals U . Bei Reynoldszahlen im hohen dreistelligen Bereich werden laminare Strömungen instabil gegenüber Störungen und turbulente Strömungen können entstehen.¹³ In der Mikrofluidik sind die Reynoldszahlen aufgrund geringer Strömungsgeschwindigkeiten und kleiner Strömungsquerschnitte gering und die Strömungen laminar. Die folgende Beispielrechnung zeigt, dass mit den in dieser Arbeit verwendeten Parametern laminare Strömung vorliegen sollte. Für A ergibt sich bei einer Kanalbreite von 19 mm und einer Höhe von 90 μm :

$$A = 19 \cdot 10^{-3} \text{ m} \cdot 90 \cdot 10^{-6} \text{ m} = 1,7 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$$

Für den hydraulischen Querschnitt ergibt sich damit:

$$D_h = \frac{4 \cdot 1,7 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2}{3,8 \cdot 10^{-2} \text{ m}} = 1,8 \cdot 10^{-4} \text{ m} \quad (2.3)$$

Die kinematische Viskosität von Wasser bei 25 °C ist:¹⁴

$$\nu = 0,9 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$

Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit im μFFE -Chip liegt im Bereich von 0,4 mm/s. Für die Reynoldszahl im μFFE -Chip ergibt sich damit nach Gleichung 2.1:

$$R_e = \frac{D_h v}{\nu} = \frac{1,8 \cdot 10^{-4} \text{ m} \cdot 4 \cdot 10^{-4} \text{ m s}^{-1}}{8,9 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}} = 8,1 \cdot 10^{-2} \quad (2.4)$$

Der reale Wert für die Reynoldszahl ist zwar an einigen Stellen in den Versuchsaufbauten durch variierende Strömungsquerschnitte höher, die Näherung reicht jedoch aus, um zu zeigen, dass sich die Strömungen weit im laminaren Regime befinden. Durchmischung findet dann nur noch in geringem Maße durch Diffusion statt.

2.1.2 Diffusion

Durch Diffusion werden Partikel in einem gegebenen Volumen durch Brownsche Molekularbewegung so lange verteilt, bis die Konzentration der Partikel an allen Orten im Volumen gleich ist. Die treibende Kraft für diese ungerichteten Bewegungen sind Konzentrationsgradienten. Diffusion spielt für die Schärfe der in der FFE erzeugten Banden eine Rolle und kann mit den Fickschen Gesetzen beschrieben werden. Mit dem 1. Fickschen Gesetz wird die Teilchenstromdichte J berechnet:¹⁵

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.5)$$

dabei bezeichnet

- J die Teilchenstromdichte. Sie gibt an, wie viele Teilchen sich pro Zeit netto durch eine Fläche bewegen, die senkrecht zur Diffusionsrichtung steht.
- D den Diffusionskoeffizienten, der ein Maß für die Beweglichkeit der Teilchen ist und sich nach der Einstein-Smoluchowski-Beziehung aus dem Quadrat der zurückgelegten Wegstrecke pro Zeit ermittelt.
- $\partial c / \partial x$ den Konzentrationsgradienten in der Dimension molare Konzentration pro Strecke.

Das 2. Ficksche Gesetz gibt Auskunft über die zeitliche Änderung der Konzentration. Es lässt sich aus dem 1. Fickschen Gesetz herleiten und lautet für den eindimensionalen Fall:¹⁵

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{d^2 c}{dx^2} \quad (2.6)$$

Mit dieser Gleichung lässt sich also eine Beziehung zwischen zeitlichen und örtlichen Konzentrationsunterschieden darstellen.

2.1.3 Hydrodynamischer Fluss

Neben der Diffusion als ungerichteter Bewegung spielt die von außen erzeugte gerichtete Bewegung eine große Rolle. Wird Strömung durch einen Druckgradienten erzeugt, spricht man vom hydrodynamischen Fluss. Beim druckgetriebenen laminaren Fluss gilt die Haftbedingung. Diese besagt, dass die Fluidgeschwindigkeit an den Wänden Null ist. Das daraus resultierende parabolische Geschwindigkeitsprofil ist in Abb. 2.1 dargestellt. Der Volumenstrom Q in Mikrokanälen ist gegeben durch:¹⁶

$$Q = \Delta p / R_h \quad (2.7)$$

mit der Druckdifferenz Δp und dem hydrodynamischen Widerstand R_h . Wichtig ist R_h für das Design der Mikrokanäle zur kontrollierten Steuerung der Flüsse. Wenn beispielsweise ein Fluss aus einem Kanal auf mehrere parallele Kanäle übergeht, können

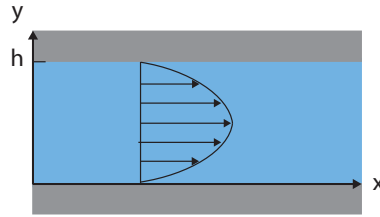


Abbildung 2.1: Zweidimensionale Darstellung eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils. Beim druckgetriebenen Fluss in x -Richtung ist die Geschwindigkeit in zentraler Höhe am größten und an den Wänden null.

die Geometrien der Kanäle so konstruiert werden, dass sich aus den daraus resultierenden hydrodynamischen Widerständen die erwünschten Volumenströme ergeben. Da R_h mit abnehmendem Radius der durchflossenen Geometrien exponentiell zunimmt, können sich unter Umständen große Drücke in den Kanälen aufbauen. Um daraus resultierende Undichtigkeiten zu vermeiden, kann R_h durch das entsprechende Design eingestellt werden.

Für kreisrunde Rohre gilt für R_h nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz:¹⁶

$$R_h = \frac{8L\eta}{\pi r^4} \quad (2.8)$$

mit der Länge L , der dynamischen Viskosität η und dem Rohrradius r . Für rechteckige Mikrokanäle mit sehr kleinem Aspektverhältnis $\alpha = (h/b)$, wie einer μ FEE-Trennkammer, gilt:¹⁶

$$R_h = \frac{12L\eta}{h^3b(1 - 0,63\alpha)} \quad (2.9)$$

2.1.4 Elektroosmotischer Fluss

Der bereits erwähnte EOF ist ein weiterer, teilweise bewusst erzeugter, teilweise als Begleiterscheinung auftretender Fluss in mikrofluidischen Kanälen. Ein EOF kommt zustande, wenn polare Flüssigkeiten in Kontakt mit Oberflächen geladener Materialien kommen und ein elektrisches Feld anliegt.¹² Beispielsweise bildet sich ein EOF bei wässriger Lösung in Kontakt mit Glas oder PDMS aus. Diese Materialien haben auf ihrer Oberfläche Silanolgruppen (SiOH), die in neutraler oder basischer Elektrolytlösung ionisieren.¹⁷ Die Oberfläche des Feststoffs ist dann elektrisch geladen, wodurch Ionen in der Lösung angezogen werden. Es bildet sich eine dünne Schicht, in der Ionen der Oberfläche mit Ionen der Flüssigkeit gepaart sind. Man nennt sie Stern-Schicht. Daran grenzt die diffuse Gouy-Chapman-Schicht, deren Nettoladung das gleiche Vorzeichen aufweist, wie die Stern-Schicht. Beide zusammen bilden die elektrochemische Doppelschicht.^{12,18} Das Prinzip ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. In der diffusen Schicht nimmt das

2.1. MIKROFLUIDISCHE GRUNDLAGEN

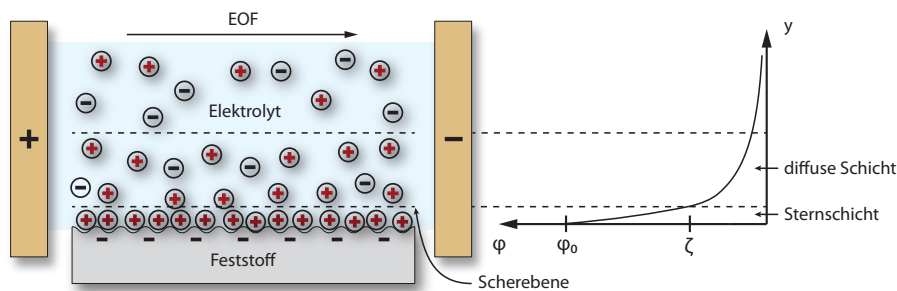


Abbildung 2.2: (a) Schematische Darstellung zur Bildung des EOF. In einem elektrischen Feld bildet sich am Feststoff eine elektrische Doppelschicht in der Elektrolytlösung aus. Die Ionen der Sternschicht sind fest gebunden, die Ionen der diffusen Schicht sind frei beweglich und sorgen im Kanal für einen Flüssigkeitsstrom Richtung Kathode. (b) Darstellung des elektrischen Potentials φ als Funktion des Abstands zur Oberfläche des Feststoffs. φ_0 ist das Oberflächenpotential, ζ das Potential an der Grenzfläche zwischen Sternschicht und diffuser Schicht. (Reproduziert nach Kohlheyer¹⁹)

elektrische Potential exponentiell ab und die Ionen sind frei beweglich. Das elektrische Potential an der Scherebene zwischen gebundener und diffuser Schicht ist das Zeta-Potential. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die Ionen der diffusen Schicht und ziehen die Flüssigkeit mit sich, wodurch ein Flüssigkeitsstrom entsteht, der EOF. Das Strömungsprofil des EOF unterscheidet sich von dem des hydrodynamischen Flusses (Abbildung 2.1). In einem offenen Kanal entsteht durch den EOF eine Pfropfenströmung, wie schematisch in Abb. 2.3a dargestellt ist. Dabei sind die Geschwindigkeiten über den Querschnitt der Strömung, bis auf den Bereich der schmalen diffusen Schicht, konstant. Die homogene Geschwindigkeitsverteilung des EOF macht man sich beispielsweise bei der CE zunutze, um einmal getrennte Banden nicht zu verbreitern, wie es beim parabolischen Strömungsprofil der Fall wäre. In der Mikrofluidik wird der EOF als Antrieb für den Flüssigkeitstransport selten genutzt, da er in komplexeren Geometrien, wie sie auch in der μ FFE zu finden sind, schwierig zu steuern ist. Vielmehr kann der EOF bei der FFE zum Störfaktor werden: Da die Trennkammer an den Seiten geschlossen ist, kommt es an den Wänden des Mikrokanals zu einem Rückstrom auf zentraler Höhe, wie in Abb. 2.3b dargestellt ist. Das Resultat sind gegenläufige Strömungsvektoren, die orthogonal zum druckgetriebenen Fluss sind und daher die Probenströme verbreitern.

Der EOF kann bei Oberflächen, die Silanolgruppen enthalten, reduziert werden. Die Oberflächenbehandlung mit bovinem Serumalbumin (BSA)²⁰ und Cellulosepolymeren wie 2-Hydroxyethylcellulose (HEC)²¹ haben sich dafür als wirksam herausgestellt. Die Funktion von BSA und HEC ist dabei die Abschirmung von Ladungen der Oberfläche

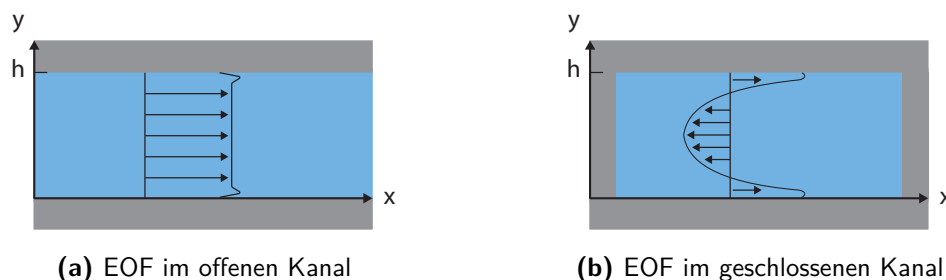


Abbildung 2.3: (a) Das elektroosmotische Strömungsprofil in einem offenen Kanal mit charakteristischer Pfropfenströmung. Die Geschwindigkeit ist homogen über den Querschnitt verteilt, mit Ausnahme der Bereiche der diffusen Schicht nahe des Feststoffs. (b) Das elektroosmotische Strömungsprofil in einem geschlossenen Kanal. An den Wänden kommt es zu einem Rückstrom auf zentraler Höhe orthogonal zum druckgetriebenen Fluss und dadurch zur Verbreiterung der Banden.

durch Bindung mit freien Silanolgruppen. Diese können für die effektive Funktionalisierung von Glas oder PDMS mittels UV-Licht, Sauerstoffplasma oder Koronaentladung erzeugt werden.²²

2.2 Elektrophorese

Elektrophorese bezeichnet die Wanderung elektrisch geladener, dispergierter Teilchen relativ zu einem Fluid durch ein homogenes elektrisches Feld. Auf diesem Phänomen beruht eine große Klasse von Trenntechniken, zu denen unter anderem Methoden wie Gelelektrophorese, Western Blot, CE und FFE gehören. In Laboren wird Elektrophorese häufig zur Trennung von Makromolekülen in der DNA-, RNA- und Proteinanalyse genutzt. Zunehmend kommen Elektrophoresetechniken wie CE auch bei niedermolekularen Verbindungen zum Einsatz, wobei hier weiterhin chromatographische Verfahren wie Flüssigkeitschromatographie (LC, englisch *liquid chromatography*) und Gaschromatographie (GC) überwiegen.^{23–26} Weniger populär ist die FFE, die hauptsächlich zur präparativen Trennung von Proteinen, DNA oder Zellbestandteilen eingesetzt wird. Die grundlegenden Prinzipien von CE und FFE werden in den folgenden Abschnitten erklärt. Eine detailliertere theoretische Erklärung der Elektrophorese erfolgt danach in einem separaten Abschnitt.

2.2.1 Kapillarelektrophorese

Bei der CE werden Analyten in flüssiger Matrix über die Länge einer Kapillare im elektrischen Feld aufgetrennt. Bei den Kapillaren handelt es sich üblicherweise um Quarzglas Kapillaren mit typischen Innendurchmessern zwischen 25 und 75 μm .²⁷ Der Einsatz von Quarzglas Kapillaren ermöglicht eine direkte UV/Vis-Spektroskopie (UV: ultraviolett; Vis: sichtbar, englisch *visible*).

Zur Trennung einer Probe wird eine kleine Menge davon in eine mit gepufferter Lösung gefüllten Kapillare gepumpt. Wird ein elektrisches Feld über die Länge der Kapillare angelegt, tragen zwei Aspekte zur Bewegung der Analyten bei: die elektrophoretische Mobilität und der EOF. Die elektrophoretische Mobilität resultiert in einer Migration der Analyten, die, vereinfacht ausgedrückt, abhängig ist von der jeweiligen Ladung und Größe eines Analyten (mehr Details dazu später). Unterschiede der elektrophoretischen Mobilität führen zu einer Auftrennung der Analyten. Der EOF hingegen bewirkt eine durch die Ionen des Puffers induzierte Nettobewegung der Flüssigkeit durch die Kapillare und dient somit als Transportmittel. Das heißt, die gesamte Flüssigkeit, inklusive der Analyten, wird in eine Richtung, üblicherweise der Kathode, bewegt, wobei sie den Detektor passieren. Der schematische Aufbau eines CE-Geräts und die Bewegungsvektoren von Analyten bei der CE sind in Abbildung 2.4 dargestellt.

2.2.2 Free-Flow-Elektrophorese

Die Trennung bei FFE erfolgt, ebenso wie bei CE, in einem trägerfreien (nicht festen) Medium. Bei der FFE werden die Analyten in flüssiger Matrix in einem kontinuierlichen druckgetriebenen Fluss durch einen flachen Kanal befördert und dort in einem annähernd homogenen elektrischen Feld orthogonal zur Flussrichtung aufgetrennt. Die Bewegungsrichtung der Teilchen ergibt sich also durch zwei Kräfte: die hydrodynamische Kraft des druckgetriebenen Flusses und die elektrische Feldkraft. Der resultierende Summenvektor beider Kräfte gibt die Bewegungsrichtung der Teilchen vor. Aus diesem Prinzip ergibt sich eine zweidimensionale Trennung von Teilchen, die sich in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden. Die Möglichkeit der orts aufgelösten Analyse stellt einen grundlegenden Unterschied zum eindimensionalen, zeitlich aufgelösten CE-Trennprinzip dar. Beide Trennprinzipien sind in Abbildung 2.5 vergleichend dargestellt. Das zweidimensionale Trennprinzip der FFE ermöglicht eine kontinuierliche Probenzufuhr, Auftrennung und Probenentnahme. Dadurch können, selbst bei geringen Volumenströmen im mikrofluidischen Maßstab, große Mengen Probe durch den Zeitfaktor gewonnen werden. μFFE bietet sich daher neben einer analytischen auch für eine präparative Probenaufbereitung an.²⁸ Für die Kopplung mit anderen kontinuierlich arbeitenden Einheiten, wie im Mehrstufenreaktor, ist das kontinuierliche Trennprinzip ebenfalls von Vorteil, da es eine nahtlose Anbindung der Einheiten möglich macht. Die von der CE bekannten Trennmodi

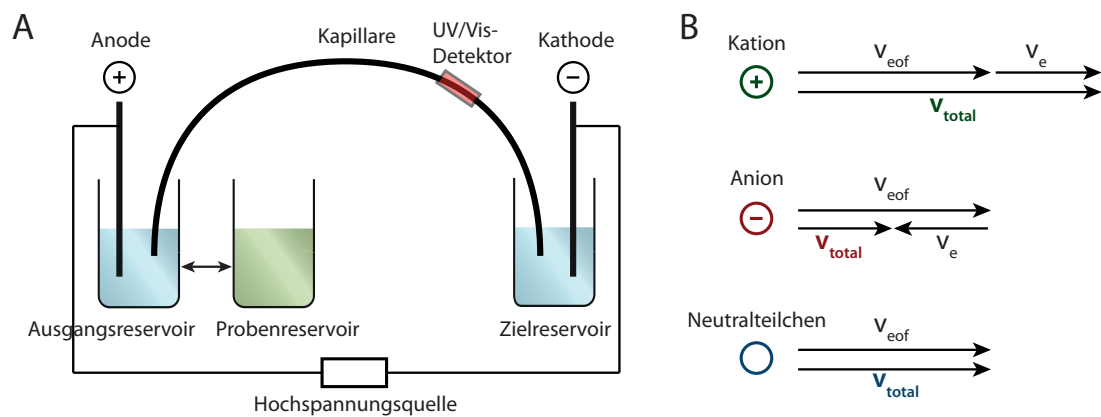


Abbildung 2.4: A Schematische Darstellung des Prinzips der Kapillarelektrophorese. In eine mit Puffer gefüllte Kapillare werden die Analyten über das Probenreservoir injiziert. Zwischen Ausgangs- und Zielreservoir wird eine Hochspannung und damit ein elektrisches Feld über die Länge der Kapillare angelegt. Der EOF bewirkt einen Nettostrom in Richtung Kathode, so dass die Analyten den UV/Vis-Detektor nach einer gewissen Zeit erreichen. Zusätzlich migrieren die Analyten in Abhängigkeit der elektrischen Feldstärke und ihrer elektrophoretischen Mobilität. B Darstellung der Bewegungsvektoren verschieden geladener Analyten bei der CE-Trennung. Kationen erreichen den Detektor am schnellsten, da ihre elektrophoretische Bewegung v_e und der EOF (v_{eof}) in die gleiche Richtung gehen. Anionen eluieren zuletzt, da deren elektrophoretische Bewegung dem EOF entgegengerichtet ist. Bei neutralen Teilchen entspricht die Bewegungsgeschwindigkeit v_{total} der des EOF.

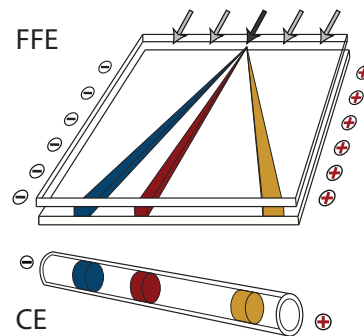


Abbildung 2.5: Vergleichende Darstellung der Trennprinzipien von FFE und CE. Bei der FFE wird die Probe kontinuierlich injiziert (Fließrichtung durch Pfeile gekennzeichnet) und getrennt. Die Fraktionen liegen örtlich getrennt am Ende der Trennkammer vor. Bei der CE wird einmalig eine Probe in die Kapillare injiziert und in Flussrichtung aufgetrennt. Proben können nur nacheinander entnommen werden.

Zonenelektrophorese (ZE), Isotachophorese (ITP) und Isoelektrische Fokussierung (IEF) lassen sich allesamt auch auf FFE übertragen, wobei sich die Hintergrundelektrolyten (HGE) in Komposition und Konzentration unterscheiden.^{28,29} Die Trennmodi, die in FFE Anwendung finden, sind in Abb. 2.6 schematisch dargestellt und werden im Folgenden kurz erläutert. Das Ziel ist bei allen Modi grundsätzlich das gleiche: eine saubere Trennung der Analyten, was sich in schmalen, klar unterscheidbaren Banden an den Ausgängen der Trennkammer äußert.

Free-Flow-Zonenelektrophorese (FFZE) ist die wohl einfachste und am häufigsten verwendete Methode. Unter dem Einfluss konstanter Parameter (pH, Leitfähigkeit) werden geladene Teilchen, abhängig von ihrer elektrophoretischen Mobilität, der elektrischen Feldstärke und der Fließgeschwindigkeit, in konstantem Winkel auf ihrem Weg durch die Trennkammer abgelenkt. Durch eine einheitliche Elektrolytlösung ist das System gut reproduzierbar und kann zur Kopplung mit anderen Prozessen oder Geräten gut auf diese abgestimmt werden.

Eine Abwandlung davon ist die Free-Flow-Field-Step-Elektrophorese (FFFSE). Hier wird ein weniger leitender HGE zentral in die Trennkammer eingebracht, während in den Randbereichen ein stark leitfähiger HGE verwendet wird. Analyten migrieren schnell durch die zentrale Zone, die eine hohe elektrische Feldstärke aufweist, bis sie die Randzone erreichen. Durch die dort stark reduzierte elektrische Feldstärke wird die elektrophoretische Migrationsgeschwindigkeit reduziert, was eine Aufkonzentrierung der Analyten und damit schärfere Banden zur Folge hat. Bei der mikrofluidischen FFE fand FSE bisher nur sehr begrenzt Anwendung.³⁰

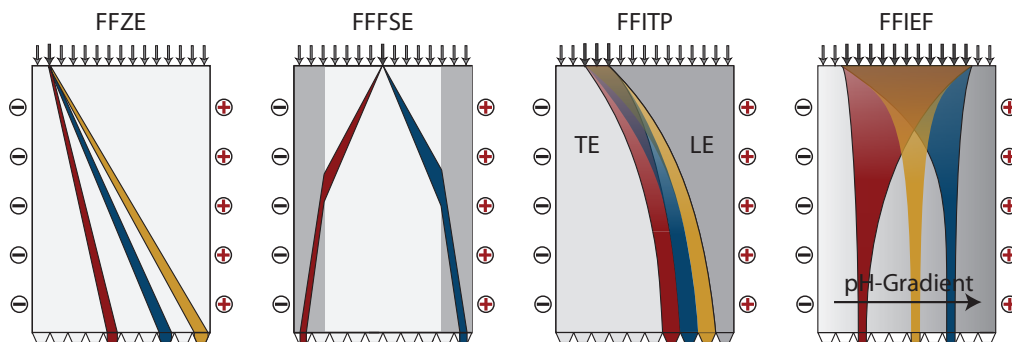


Abbildung 2.6: Darstellung der populärsten Elektrophorese-Trennmodi in μ FFE. Die Fließrichtung ist jeweils von oben nach unten. Die Trennmodi unterscheiden sich in Anordnung und Komposition der HGE, was sich auf das Maß der Ablenkung und die Geometrien der Bänder auswirkt. Bei der Free-Flow-Zonenelektrophorese (FFZE) wird das Analytgemisch in einem homogenen HGE in konstantem Winkel aufgetrennt. Bei der Free-Flow-Field-Step-Elektrophorese (FFFSE) wird ein wenig leitender HGE zentral in die Trennkammer injiziert, ein stärker leitender HGE in die Randbereiche. Dort nimmt die elektrophoretische Migration geladener Analyten durch die hohe elektrische Feldstärke ab, was eine Aufkonzentrierung der Analyten zur Folge hat. Bei der Free-Flow-Isotachophorese (FFITP) befinden sich die Analyten in angrenzenden Bändern zwischen dem sogenannten *terminating electrolyte* und dem *leading electrolyte*. Die Isoelektrische Fokussierung (FFIEF) basiert auf einem pH-Gradienten orthogonal zum druckgetriebenen Fluss. Analyten konzentrieren sich hier in bestimmten Zonen, in Abhängigkeit von ihrem isoelektrischen Punkt und dem pH.

2.2. ELEKTROPHORESE

Bei der Free-Flow-Isotachophorese (FFITP) werden die Analyten zwischen zwei HGE unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität in die Trennkammer eingebracht. Die sogenannten *leading electrolyte* (LE) und *terminating electrolyte* (TE) werden so gewählt, dass sie eine höhere, respektive niedrigere elektrophoretische Mobilität als alle vorhandenen Analyten haben. Dadurch konzentrieren sich die Analyten in unmittelbar angrenzenden Banden abhängig von ihrer elektrophoretischen Mobilität. Die Konzentrationen passen sich der des LE an.²⁹ FFITP findet in der klassischen FFE häufige Verwendung;²⁸ von der miniaturisierten Form gibt es bisher nur wenige Berichte.^{31–34}

Der vierte häufig genutzte Trennmodus in FFE ist die Isoelektrische Fokussierung (FFIEF), die sich gut für die Trennung von Proteinen eignet. Hier wird ein pH-Gradient orthogonal zum druckgetriebenen Fluss generiert. Dabei macht man sich zunutze, dass die Nettoladung mehrfach geladener Moleküle abhängig vom pH ist. In saurer Umgebung ist die Nettoladung positiv und in alkalischer Umgebung negativ. Der Übergang-pH von einem Zustand zum anderen ist der sogenannte isoelektrische Punkt (IEP), an dem die Nettoladung Null ist. Daher migrieren Moleküle innerhalb des pH-Gradienten im elektrischen Feld, bis der umgebende pH gleich dem IEP ist. Mangels elektrischer Nettoladung erfolgt dann keine elektrophoretische Ablenkung mehr. Migration durch Diffusion wird ausgeglichen, da die Moleküle immer wieder Richtung IEP zurück gelenkt werden, was eine Aufkonzentrierung zur Folge hat und als *self-sharpening effect* bezeichnet wird.^{29,35} IEF wurde sowohl in CE als auch in FFE aufgrund seiner großen Bedeutung in der Biologie und Pharmazie umfassend erforscht und verwendet.²⁸ Auch in der miniaturisierten FFE findet IEF breite Anwendung.^{36–45}

Die Miniaturisierung der FFE durch Mikrofluidik (μ FFE) ergibt einige Vorteile: (i) Durch das große Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis kann Wärme schnell abtransportiert werden, was hohe elektrische Feldstärken ermöglicht. Dadurch können die Trennzeiten reduziert werden. (ii) Das vorherrschende laminare Flussregime ermöglicht eine gute Kontrolle über sehr kleine Probenvolumina. (iii) Die geringen Abmessungen sorgen für eine erhöhte Mobilität und geringe Flüsse, was die Kombinierbarkeit mit anderen Geräten erleichtert. Der erste richtige FFE-Mikrochip wurde 1994 von Raymond *et al.* vorgestellt.⁴⁶ Dabei konnte die Joulsche Wärme im Vergleich zur normalen FFE stark reduziert und die Trennung von Aminosäuren durch FFZE in Echtzeit beobachtet werden. Die Reduzierung der Joulschen Wärme ist auf verringerte Ströme und die verbesserte Ableitung der Wärme durch das große Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis zurückzuführen. Seitdem haben mehrere Forschungsgruppen an alternativen Herstellungsmethoden, Verbesserung der Auflösung und neuen Anwendungsgebieten für μ FFE gearbeitet. Durch diese Entwicklungen ist FFE keine ausschließlich präparative Technik mehr, sondern findet in miniaturisierter Form überwiegend analytische Anwendung.

2.2.3 Theorie der Elektrophorese

Im Folgenden werden einige Phänomene anhand von Gleichungen beschrieben, die für die Elektrophorese generell und für die FFZE im Speziellen von Bedeutung sind.

Bei der Elektrophorese tritt eine Migration geladener Teilchen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes auf. Die elektrophoretische Migrationsgeschwindigkeit v_e von Ionen mit der Ladung q ergibt sich aus dem Gleichgewicht der vom elektrischen Feld E ausgeübten Kraft $F_E = qE$ und der Reibungskraft $F_R = fv$ mit dem Reibungskoeffizienten f und der Gesamtgeschwindigkeit v zu:

$$v_e = \frac{q}{f}E \quad (2.10)$$

Der Reibungskoeffizient f kann für sphärische Teilchen nach dem Gesetz von Stokes ersetzt werden durch:

$$f = 6\pi\eta r \quad (2.11)$$

mit der Viskosität η und dem Teilchenradius r .

Der Quotient q/f wird als elektrophoretische Mobilität μ bezeichnet. Zur Trennung von Teilchen ist ein Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität notwendig. Sie ergibt sich theoretisch zu:

$$\mu_t = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2.12)$$

Die obigen Gleichungen gelten genaugenommen nur für einen idealisierten, unendlich verdünnten, trägerfreien Zustand. Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die elektrophoretische Migration hat, ist der EOF (zur Theorie des EOF siehe 2.1.4). Während der EOF bei der CE eine große Rolle spielt, ist er bei der FFE von geringerer Bedeutung. Häufig wird der EOF im FFE-Chip durch Oberflächenbehandlung minimiert, da er eine unerwünschte Verbreiterung der Banden bewirkt. Viele Materialien, wie z.B. das in dieser Arbeit überwiegend verwendete PMMA, weisen keinen messbaren EOF auf. Mit der experimentell bestimmbaren realen elektrophoretischen Mobilität μ_r ergibt sich die elektrophoretische Migrationsgeschwindigkeit v_e :

$$v_e = \mu_r E \quad (2.13)$$

Daraus lässt sich die Strecke d , die ein Analyt im elektrischen Feld abgelenkt wird, ableiten:

$$d = \mu_r Et \quad (2.14)$$

Das Produkt Et bezeichnet man bei der FFE als Trennstärke, die es grundsätzlich zu maximieren gilt. In der Praxis bedeutet das, die elektrische Feldstärke und die Fließgeschwindigkeit durch die Trennkammer so anzupassen, dass die Analyten mit der höchsten Beweglichkeit möglichst über die gesamte Breite der Trennstrecke migrieren.³⁰

2.2.4 Theorie der Bandenverbreiterung in FFZE

Das Ziel der FFZE ist es, durch schmale Zonen mit scharf abgetrennten Grenzen eine hohe Auflösung zu erzielen. Es gibt jedoch einige Phänomene, die die Peaks verzerren und damit die Qualität der Trennung negativ beeinflussen,⁴⁷ man spricht von Bandenverbreiterungsmechanismen. Faktoren, die zur Gesamt-Peakvarianz σ_{FFE}^2 beitragen, sind Injektionsstrombreite σ_{inj}^2 , Diffusionsverbreiterung σ_{D}^2 , hydrodynamische Verbreiterung σ_{HD}^2 , elektrodynamische Verbreiterung durch EOF σ_{EOF}^2 , elektrohydrodynamische Verbreiterung σ_{EHD}^2 und Verbreiterung durch Joulsche Wärme σ_{J}^2 :^{30,48,49}

$$\sigma_{\text{FFE}}^2 = \sigma_{\text{inj}}^2 + \sigma_{\text{D}}^2 + \sigma_{\text{HD}}^2 + \sigma_{\text{EOF}}^2 + \sigma_{\text{EHD}}^2 + \sigma_{\text{J}}^2 \quad (2.15)$$

Die Varianz durch die Injektionsstrombreite ist abhängig von der Breite w des Probenstroms beim Eintritt in die Trennkammer:⁴⁸

$$\sigma_{\text{inj}}^2 = \frac{w^2}{12} \quad (2.16)$$

Die Injektionsstrombreite ergibt sich aus dem Verhältnis des Volumenstroms der Probe zum Gesamtvolumenstrom durch die Trennkammer. Die Varianz durch laterale Diffusion kann mit der Einstein'schen Diffusionsgleichung beschrieben werden:

$$\sigma_{\text{D}}^2 = 2Dt = \frac{2DL}{v} \quad (2.17)$$

Dabei ist D der Diffusionskoeffizient, t die Verweildauer der Analyten in der Trennkammer, L die Distanz zwischen Probeneinlass und dem Ort der Detektion in Längsrichtung und v die Fließgeschwindigkeit in Längsrichtung der Trennkammer.

Der dritte entscheidende Faktor in der μ FFE ist die hydrodynamische Verbreiterung. Bedingt durch das parabolische Strömungsprofil im druckgetriebenen Fluss (siehe Abbildung 2.1) sind Analyten in Wandnähe dem elektrischen Feld länger ausgesetzt und erfahren daher eine größere elektrophoretische Ablenkung als Analyten im Zentrum des Kanals. Abbildung 2.7 stellt den Prozess schematisch dar. Für die Varianz durch hydrodynamische Verbreiterung in Kanälen wie der μ FFE-Trennkammer, deren Breite mehrere Größenordnungen größer ist als die Höhe h , gilt⁴⁸

$$\sigma_{\text{HD}}^2 = \frac{h^2 d^2 v}{105 DL} \quad (2.18)$$

Die Gleichung zeigt, dass die Migrationsdistanz d einen großen Einfluss auf die Verbreiterung der Banden hat. Die Geschwindigkeit v der Analyten hat ebenfalls einen Effekt auf die Gestalt des parabolischen Strömungsprofils, das sich bei höheren Geschwindigkeiten verlängert. Diffusion auf der anderen Seite wirkt der Verbreiterung entgegen, da sie Analyten erlaubt, sich zwischen Zonen schneller (zentrale Höhe der Trennkammer) und langsamer Geschwindigkeit (Wandnähe) zu bewegen. Flache Kanäle wirken sich

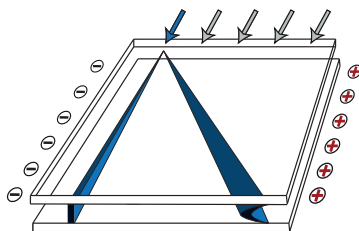


Abbildung 2.7: Darstellung der hydrodynamischen Bandenverbreiterung in μ FFE bei lateraler Ablenkung im elektrischen Feld (rechts) im Vergleich mit einer nicht abgelenkten Bande (links). Bei der lateralen Ablenkung wird die Bande verbreitert, da die Analyten durch das parabolische Strömungsprofil unterschiedliche Bewegungsgeschwindigkeiten haben und dadurch dem elektrischen Feld unterschiedlich lange ausgesetzt sind.

daher positiv aus, denn Analyten müssen weniger Distanz überwinden, um in andere Geschwindigkeitszonen zu diffundieren.

Die Bandenverbreiterung durch Joulesche Wärme σ_j^2 spielt für die mikrofluidische FFE keine entscheidende Rolle,⁴⁸ da durch Stromfluss entstehende Wärme durch das große Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis gut abgeleitet wird. σ_{EHD}^2 kommt zustande, wenn die Leitfähigkeit der Probe höher ist als die des HGE, was sich durch die Wahl geeigneter Elektrolytkonzentrationen gut beeinflussen lässt. Die Gesamtgleichung der Bandenverbreiterung in μ FFE mit den für das Chipdesign wichtigsten Faktoren σ_{inj}^2 , σ_{D}^2 und σ_{HD}^2 lautet daher:⁴⁸

$$\sigma_{\text{total}}^2 = \frac{w^2}{12} + \frac{2DL}{v} + \frac{h^2 d^2 v}{105DL} \quad (2.19)$$

Aus dieser Formel alleine lassen sich zwar nicht direkt die optimalen Parameter für das Chipdesign und die FFE-Trennung herleiten, sie kann jedoch bei der Systemoptimierung als Ausgangspunkt dafür dienen, wie sich die Änderungen gewisser Parameter auf die Ergebnisse auswirken.

2.3 Ionenerzeugung bei der MS

In dieser Arbeit wurde ESI als Ionenquelle zur Kopplung von μ FFE und MS verwendet. ESI ist wohl die bekannteste Ionisierungsmethode unter Atmosphärendruck und neben MALDI (Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisierung) die am häufigsten eingesetzte Ionisierungsmethode insgesamt. Sie wird üblicherweise bei der Kopplung von LC und MS verwendet, was entscheidend zur weiten Verbreitung beiträgt. Bei ESI handelt es sich um ein Ionisierungsverfahren, bei dem Ionen bei Atmosphärendruck aus der flüssigen in die Gasphase überführt werden. ESI findet beispielsweise Verwendung in der pharmazeuti-

2.3. IONENERZEUGUNG BEI DER MS

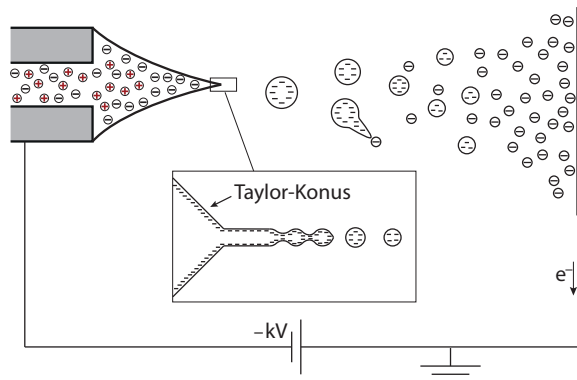


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Taylor-Konusbildung, der Ionenemission aus dem Strahl und der Zerfall in ein feines Spray. In diesem Beispiel liegt ein negatives Potential an der Emitterkapillare an, so dass negative Ionen zur Analyse in das Massenspektrometer gelangen.

schen Analytik und der Studie von Stoffwechselprodukten (Metabolomics). Dabei werden meist Analyten mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) im Bereich von 100-1500 untersucht. Welche Ionen gebildet werden, hängt von der Polarität der Analyten, dem pH-Wert, dem Salzgehalt der Lösung, den Konzentrationen, den Materialeigenschaften des Emitters und den Geometrien ab. Da bei ESI wenig Fragmentierung stattfindet, spricht man von sanfter Ionisierung. Die Lösungen für ESI bestehen aus einem flüchtigen Lösungsmittel, das die Analyten in geringer Konzentration (üblicherweise im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-4} mol L $^{-1}$) enthält. Diese werden unter Hochspannung zwischen Emitterkapillare und der Eintrittsöffnung des Massenspektrometers ionisiert.⁵⁰

Die Ionenbildung bei ESI kann man sich als Prozess in drei Stufen vorstellen: i) Erzeugung eines elektrisch geladenen Sprays, ii) Reduzierung der Tröpfchengröße um mehrere Größenordnungen, iii) Freisetzung desolvatisierter Ionen. Dieser Ionisierungsprozess ist in Abb. 2.8 schematisch dargestellt. In der Praxis befindet sich die Emitterkapillare wenige Millimeter von der MS-Eintrittsöffnung entfernt und wird auf einem Potential von 1-5 kV gehalten. An der Kapillaröffnung ist die austretende Flüssigkeit damit einem elektrischen Feld von ca. $1 \cdot 10^6$ Vm $^{-1}$ ausgesetzt. Das elektrische Feld führt zur Ladungstrennung und zur Deformation des Flüssigkeitsmeniskus zu einem Konus, dem sogenannten Taylor-Konus, wenn eine kritische Feldstärke erreicht wird. Von der Spitze des Konus emittiert ein feiner Flüssigkeitsstrahl in Richtung Gegenelektrode, der einen großen Überschuss an positiven oder negativen Ionen trägt. Der Strahl ist nicht stabil und zerfällt in viele kleine, geladene Tropfen, die aufgrund von Coulomb-Abstoßungen auseinanderdriften. Das Resultat ist ein feines Spray, das Elektrospray.⁵⁰

3 Entwicklung und Herstellung der μ FFE-Chips

3.1 Hintergrund

Die im Folgenden vorgestellten μ FFE-Chips basieren auf Designs von Pedro Novo⁵¹ und wurden im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt und optimiert.

3.1.1 Materialien für μ FFE-Chips

Viele Materialien finden zur Herstellung von μ FFE Verwendung. In den 1990ern kamen überwiegend Silizium⁴⁶ und Glas⁵² zum Einsatz. Damit konnten präzise Strukturen mit bereits etablierten Methoden (Nassätzen, Lithografie) hergestellt werden. Jedoch sind diese Herstellungsmethoden zeitintensiv und bergen Risiken durch die Verwendung gefährlicher Chemikalien wie Flusssäure und Kaliumhydroxid.²⁹ Außerdem kann die geringe Durchschlagspannung von Silizium limitierend für den Einsatz von μ FFE sein. Aus genannten Gründen findet Silizium daher kaum mehr Verwendung für die Herstellung von μ FFE-Chips. Glas hingegen kommt weiterhin zum Einsatz,³³ da es geeignete mechanische Eigenschaften aufweist, hohe elektrische Spannungen aushält, über weite pH-Bereiche stabil und relativ inert ist.⁴⁹ Die Herstellung von PDMS-Chips mittels weicher Lithografie war es jedoch, die einen rapiden Aufschwung für das Feld der Mikrofluidik bewirkte.⁵³ Bei der weichen Lithografie werden Fotolackstempel zur wiederholten Abformung von Mikrostrukturen mit PDMS verwendet. Durch die Einfachheit der Herstellungsmethode wurde PDMS auch für FFE-Chips bald zum Standardsubstrat und ist seitdem wohl das am häufigsten verwendete Material. Gründe dafür sind, dass die Herstellung eines Chips innerhalb eines Tages erfolgen kann, die Abformung sehr präzise ist und feinste Strukturen ermöglicht und dass keine gesundheitsgefährdenden Stoffe zum Einsatz kommen. Außerdem ist PDMS günstig und lässt sich mit einfachen Methoden (Plasmaaktivierung, Koronaentladung) kovalent an andere Bauteile aus PDMS oder Glas binden (Bonding). Nachteilig kann sich die geringe Steifigkeit und die nicht-spezifische Adsorption von Molekülen am PDMS auswirken. Auch der materialbedingte EOF ist in der Regel nicht erwünscht. In den letzten Jahren sind daher verstärkt thermoplastische Polymere wie Polyethylen (PE), Polyethylenterephthalat (PET), Polystyrol (PS), Cycloolefin-Copolymere (COC) und Polymethylmethacrylat (PMMA) zur Anwendung

KAPITEL 3. ENTWICKLUNG UND HERSTELLUNG DER μ FFE-CHIPS

gekommen. Wesentliche Vorteile dieser Thermoplasten sind die guten mechanischen Eigenschaften, hohe Biokompatibilität und das geringe Zeta-Potential zur Vermeidung des EOF.

Von den genannten Polymeren hat PMMA für die Herstellung von FFE-Chips besonders viele positive Eigenschaften: Zum einen ist es transparent, was essentiell für die optische Analytik ist. Außerdem ist PMMA beständig gegen Säuren und Basen, was beispielsweise die Erzeugung eines pH-Gradienten für die IEF ermöglicht. Die Beständigkeit gegenüber nicht-spezifischer Adsorption von Biomolekülen erlaubt die Nutzung des Chips mit verschiedenen Substanzen über lange Zeiträume, ohne nachteilige Veränderungen der Oberfläche durch Adsorption zu riskieren.^{54,55} Die Glasübergangstemperatur von PMMA ist mit über 100 °C hoch genug für die meisten mikrofluidischen Anwendungen. PMMA ist ausreichend hart, jedoch etwas weicher als vergleichbare Kunststoffen wie PS und Polycarbonat (PC) und mit einem E-Modul von etwa 3000 N/mm etwas elastisch. Außerdem ist PMMA günstig und weist gute Verarbeitungseigenschaften auf. Ein Nachteil von PMMA ist die Unbeständigkeit gegen organische Lösungsmittel wie Ethanol, Isopropanol und Methanol. Dadurch ist die Auswahl an Lösungsmitteln für die mikrofluidische Anwendung oder zur Reinigung eingeschränkt. Auch bei der Chip-Fertigung können lösungsmittelhaltige Klebstoffe oder Silikone nur begrenzt verwendet werden, da sie Rissbildung im PMMA verursachen. Insgesamt überwiegen für die Anwendung in dieser Arbeit jedoch die Vorteile von PMMA, da die Nutzung organischer Lösungsmittel nicht unbedingt notwendig ist.

3.1.2 Integration der Elektroden

Die Art der Einkopplung des elektrischen Feldes in den FFE-Chip spielt eine große Rolle für die elektrophoretische Trennung. Es ist wichtig, dass sich das elektrische Feld möglichst homogen und über die gesamte Trennkammer erstreckt. Die Integration der Elektroden in den FFE-Chip stellt jedoch eine der größten Herausforderung bei der Gestaltung und Herstellung der Chips dar. Die Elektroden bestehen in der Regel aus Gold, Silber oder Platin. Aufgrund der geringen Höhe der Trennkammern (in der Regel $<100\ \mu\text{m}$), können bereits kleine Gasvolumina große Beeinträchtigungen der Strömungsverhältnisse zur Folge haben. Daher muss ein Eintreten von Gasbläschen, die bei der Elektrolyse entstehen, in die Trennkammer verhindert werden. Neben dem Fließverhalten wird durch Gasbläschen auch die Homogenität des elektrischen Feldes beeinträchtigt. Aus diesem Grund ist auch wichtig, die Gasblasenbildung an den Elektroden selber zu reduzieren oder zumindest konstant zu halten. Die Schwierigkeit bei der Integration der Elektroden besteht also darin, eine Barriere zwischen Trennkammer und Elektroden zu schaffen, die einerseits die Gasblasen zurückhält und andererseits die Effizienz des elektrischen Feldes möglichst nicht beeinträchtigt. Mit ‚Effizienz des elektrischen Feldes‘ ist das Verhältnis des Spannungsabfalls über die Trennkammer zur gesamt angelegten Spannung gemeint.

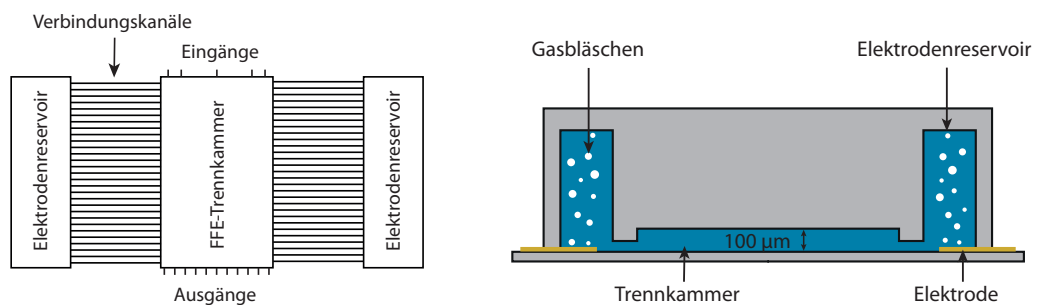
Ist der elektrische Widerstand der Barriere zu hoch, fällt ein großer Teil der Spannung bereits außerhalb der Trennkammer ab. Kommerzielle (großskalige) FFE-Geräte nutzen normale Membranen, beispielsweise Filtermembranen aus Celluloseacetat, um Reservoirs, in denen die Elektroden eingebettet sind, von der Trennkammer abzugrenzen. Dieser Aufbau beeinträchtigt das Fließverhalten in der Trennkammer nicht signifikant und ermöglicht ein zeitlich stabiles elektrisches Feld. Die Implementierung der Membranen oder analoger Methoden ist jedoch im Mikrochip deutlich schwieriger zu realisieren, da selbst geringe geometrische Änderungen große Auswirkungen auf das Fließverhalten und den elektrischen Widerstand haben können. Vier Strategien zur Integration der Elektroden in μ FFE sind bekannt.²⁹

Direkte Integration Bei direkter Integration werden die Elektroden direkt in die Trennkammer ohne Barriere eingebettet. Die Anwendung ist jedoch stark limitiert. Es können nur sehr geringe elektrische Spannungen oder sehr hohe Strömungsgeschwindigkeiten verwendet werden, damit sich Gasblasen gar nicht erst bilden können.³⁷ Eine mögliche zusätzliche Maßnahme ist die Unterdrückung der Elektrolyse durch Verwendung von Substanzen im Laufpuffer die als Elektronendonoren, beziehungsweise -akzeptoren dienen.⁵⁶

Isolation mittels geometrischer Strukturen Hierbei werden die Elektroden in Reservoirs positioniert, die durch geometrische Strukturen von der Trennkammer abgetrennt sind. Diese Methode ist die wahrscheinlich einfachste Alternative zur direkten Elektrodenintegration. Es gibt zwei Prinzipien, die man sich dabei zunutze macht:

i) Trennkammer und Elektrodenreservoirs werden mit sehr schmalen Kanälen hohen hydrodynamischen Widerstands verbunden, so dass Bläschen diese nicht passieren können, der Strom aber dennoch fließt.⁴⁶ Dieses Prinzip ist in Abbildung 3.1a dargestellt. Diese Variante ist effizient im Zurückhalten der Bläschen, hat jedoch entscheidende Nachteile. Zum einen stellen die Verbindungskanäle nicht nur einen hohen hydrodynamischen, sondern auch einen hohen elektrischen Widerstand dar, wodurch die Effizienz des elektrischen Feldes beeinträchtigt wird und hohe Spannungen benötigt werden. Die hohen Spannungen sind gesundheitsgefährdend, was gerade bei der Nutzung von gegebenenfalls unausgereiften Chip-Prototypen in gemeinschaftlich genutzten Laboren ein Risiko darstellt. Außerdem steigt die strombedingte Wärmeentwicklung, was sich nachteilig auf die Bandenschärfe auswirken kann. Die durch hohe Spannungen verstärkt ablaufenden elektrolytischen Prozesse an den Elektroden führen zu lokalen pH-Änderungen der Elektrolytlösung und verstärkter Bläschenbildung. Insgesamt ist diese Strategie in ihrer Anwendbarkeit eingeschränkt, vor allen Dingen, was die Langzeitstabilität im aktiven Betrieb angeht.

ii) Die Elektroden werden in Reservoirs geringen hydrodynamischen Widerstands platziert, so dass Bläschen gut abtransportiert werden können.⁴⁸ Das Prinzip ist in Abbildung 3.1b dargestellt. Aufgrund der nahen Positionierung der Elektroden an der Trennkammer



(a) Elektroden isoliert durch schmale Kanäle (b) Reservoirs geringen hydrodynamischen Widerstands

Abbildung 3.1: (a) Draufsicht auf einen FFE-Chip mit dem Prinzip der Isolierung von Elektroden mittels schmaler Verbindungskanäle (schwarze Linien) zwischen Elektrodenreservoirs und Trennkammer. Die Kanaldurchmesser bewegen sich typischerweise im einstelligen Mikrometerbereich und sind wenige Millimeter lang. Damit weisen sie einen hohen hydrodynamischen Widerstand auf, der Gasblasen zurückhält. (b) Querschnitt durch einen FFE-Chip mit dem Prinzip der Isolierung von Elektroden in Reservoirs hohen hydrodynamischen Widerstands. Für die Höhe der Trennkammer wurde ein beispielhafter Wert von $100\ \mu\text{m}$ gewählt. Ein schmaler Kanal verbindet die Trennkammer mit den schornsteinartigen Elektrodenreservoirs. Hier können die Blasen aufgrund des geringen hydrodynamischen Widerstands nach oben entweichen.

ist hier die Effizienz des elektrischen Feldes größer als bei (i). Eine Schwierigkeit von Aufbauten dieser Art besteht darin, dass der geringe hydrodynamische Widerstand in den Elektrodenreservoirs auch für den HGE und die Probe einen ‚Weg des geringsten Widerstands‘ darstellt. Das heißt, dass gewisse Inhomogenitäten der Bewegungsvektoren der Analyten in Kauf genommen werden müssen und die Gefahr besteht, dass Analyten im Elektrodenreservoir ‚verschwinden‘.

Gele als Salzbrücken Die Verwendung von Gelen als Barriere, beziehungsweise Salzbrücke zwischen Elektrodenreservoirs und Trennkammer, war in den letzten Jahren weit verbreitet.^{34,57–59} Mit der Methode können gute Ergebnisse erzielt werden, jedoch spielen zahlreiche Parameter für die Beschaffenheit des Gels und die Anbindung an die Oberflächen des Mikrochips eine Rolle. Daher bedarf es umfassender Experimente nach dem Trial-and-Error-Prinzip, um ein solches System funktionsfähig zu bekommen. Limitierend sind auch die anspruchsvolle Lagerung und die begrenzte Lebensdauer der Gele.²⁹

Integration von Membranen Aktuell noch weniger verbreitet als die anderen Methoden ist die Verwendung kommerzieller Membranen als Barriere zwischen Elektrodenreservoirs und Trennkammer.^{60–63} Membranen mit ihren kleinen Poren im Mikrometerbereich sind besonders gut für diesen Zweck geeignet, da sie den hydrodynamischen Fluss zwischen Trennkammer und Elektrodenreservoir effektiv verhindern, während die Poren durch ihre große Anzahl keinen signifikanten elektrischen Widerstand darstellen. Der Vergleich der Abhängigkeit des Ohmschen Widerstands vom Leiterradius ($\sim r^2$) mit der Abhängigkeit des hydrodynamischen Widerstands vom Radius des durchflossenen Körpers ($\sim r^4$) macht diese Zusammenhänge deutlich: Während die Poren für den elektrischen Widerstand beliebig klein sein können, so lange die leitende Gesamtfläche konstant bleibt, steigt der hydrodynamische Widerstand bei Verringerung der Leitungsdurchmesser auch unter Beibehaltung der Gesamtfläche drastisch an. Im Gegensatz zu Salzbrücken lassen sich Polymermembranen auch im industriellen Maßstab verwenden. Ein Vorteil von Membranen ist die nahezu unbegrenzte Lebensdauer. Außerdem existiert eine große Vielfalt an Membranen bezüglich Material, Form und Porengröße. Bisher fanden PTFE (Polytetrafluorethylen)⁶¹ und PC^{51,62,63} Verwendung in μ FEE. Membranen lassen sich mittels Ultraschallschweißen,^{60,64} Laminieren^{61,63,65} und Silanisierung^{51,62} installieren. Bei der Silanisierung werden Silanverbindungen auf der Oberfläche von beispielsweise Thermoplasten abgeschieden, wobei nach Aktivierung (durch Plasma oder Coronaentladung) Silanolgruppen entstehen.⁶⁶ Das behandelte Polymer kann dann irreversibel mit anderen Oberflächen, die über Silanolgruppen verfügen, wie Glas oder PDMS, gebondet werden. Mittels Silanisierung ist es jedoch schwierig, bei manueller Herstellung reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, da viele Parameter ohne automatisierte Herstellung nicht vollständig kontrollierbar sind. Dies kann in unzureichenden Bindungsstärken resultieren. Beim Laminieren werden Membranen zwischen anderen Ebenen durch einen Klebefilm

befestigt, was sich als einfache, funktionelle und langlebige Methode herausgestellt hat. Für die Chipherstellung in dieser Arbeit wurde die letztgenannte Strategie mit Membranen als Barriere zwischen Elektrodenreservoirs und Trennkammer gewählt. Neben der Effektivität von Membranen zu diesem Zweck spielte auch die vielseitige Einsetzbarkeit von Membranen mit verschiedenen Bondingmethoden eine Rolle für diese Wahl. Wie vorangegangene Experimente zeigten,⁶² sind PC-Membranen mit 0,1 μ m Porengröße effizient im Zurückhalten der Gasbläschen während der elektrische Widerstand vernachlässigbar klein ist, was eine hohe Effizienz des elektrischen Feldes gewährleistet.

3.2 Design und Herstellung von FFE-Chips aus PDMS

Im Folgenden werden Herstellung und Gestaltung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten FFE-Chips auf PDMS-Basis beschrieben. Zunächst wird das Herstellungsprinzip der PDMS-Chips mittels weicher Lithografie erklärt. Danach werden die Anforderungen an den FFE-Chip und das daraus resultierende Design dargelegt. Anschließend wird der Herstellungsprozess der Chips geschrieben und letztlich deren Funktionalität bewertet.

3.2.1 Fotolithografische Strukturierung

Die Methode der weichen Lithografie zur Herstellung von PDMS-Mikrochips basiert auf der Abformung von Mikrostrukturen mit PDMS von einem Stempel. Dabei wird unpolymerisiertes, das heißt flüssiges PDMS auf dem Stempel aushärten gelassen, wodurch sich die Strukturen auf das PDMS übertragen. Der Stempel wird üblicherweise mittels Fotolithografie erzeugt, man spricht von einem Fotolackstempel. Für dessen Herstellung wird das Negativ der im PDMS gewünschten Mikrostrukturen mit Fotolack auf einem Siliziumwafer erzeugt. Si-Wafer sind aufgrund ihrer hohen Härte und der besonders glatten Oberfläche gut für die Abformung geeignet. Die Härte sorgt dafür, dass die Oberfläche nicht zerkratzt und abgeformte Bauteile eine ebenso glatte Oberfläche aufweisen. Die Mikrostrukturen, die auf den Fotolack übertragen werden sollen, werden in der Regel mit einem CAD-Programm (CAD, englisch *computer-aided design*) entworfen. Die zweidimensionalen CAD-Zeichnungen dienen dann der Herstellung der entsprechenden Fotolithografiemasken. Diese werden mit speziellen hochauflösenden Druckern auf transparenten Folien erzeugt. Mit den Masken können die Mikrostrukturen durch gezielte UV-Belichtung auf eine Fotolackschicht übertragen werden. Der Fotolack wird dafür zuvor mittels Rotationsbeschichtung auf den Si-Wafer aufgetragen. Durch Vorgabe der Rotationsgeschwindigkeit lässt sich die Schichtdicke steuern, die die Höhe der Mikrostrukturen vorgibt. Als Fotolack wird meistens ein Negativlack auf Basis von Epoxidharz verwendet. Negativlack bedeutet, dass die dem Licht ausgesetzten Stellen polymerisieren und durch Quervernetzung unlöslich werden. Die unvernetzten Bereiche werden letztlich

3.2. DESIGN UND HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PDMS

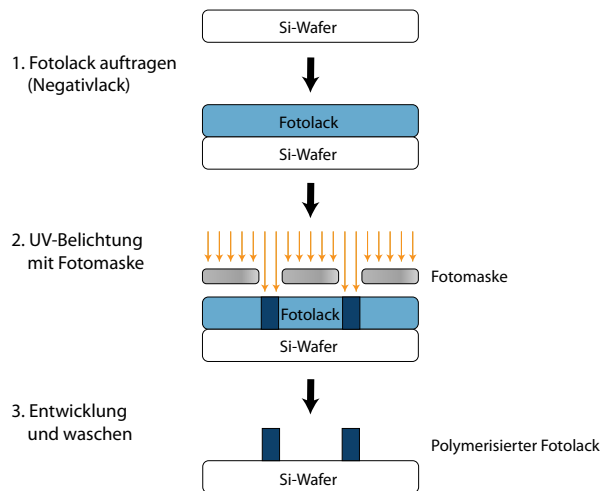


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Herstellung eines Fotolackstempels. Auf einem Si-Wafer wird zunächst Fotolack mit definierter Schichtdicke aufgetragen. Unter Verwendung einer Fotomaske werden bestimmte Bereiche des Fotolacks mit UV-Strahlung belichtet, wodurch diese polymerisieren. Nach Entwicklung des Fotolacks werden nicht-polymerisierte Bestandteile abgewaschen und zurück bleiben nur die vorher belichteten Strukturen.

abgewaschen und zurück bleiben die zuvor belichteten Stellen. Der Prozess der Erzeugung des Fotolackstempels ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt.

3.2.2 Design

Mikrostrukturen Das zentrale Bauteil für den FFE-Chip war eine mikrostrukturierte PDMS-Komponente, die die Strukturen für die Trennkammer und die Ein- und Ausgangskanäle beinhaltete. Diese Strukturen wurden durch Abformung von einem Fotolackstempel erzeugt. Das Design der Mikrostrukturen, dargestellt in Abbildung 3.3, entstand durch folgende Überlegungen:

- (1) Die Strukturen sollten über geeignete Abmessungen verfügen, das bedeutet:
 - insgesamt geringe Maße (Stichwort ‚Miniaturisierung‘)
 - eine ausreichend lange Trennstrecke in hydrodynamischer Flussrichtung (korreliert mit der Aufenthaltsdauer der Analyten im elektrischen Feld und somit der Trennstärke)
 - eine ausreichend lange Migrationsstrecke orthogonal zur Flussrichtung (korreliert mit Auflösung und Trennstärke)
 - eine geeignete Höhe im Mikrometerbereich, die die hydrodynamische Verbrei-

KAPITEL 3. ENTWICKLUNG UND HERSTELLUNG DER μ FFE-CHIPS

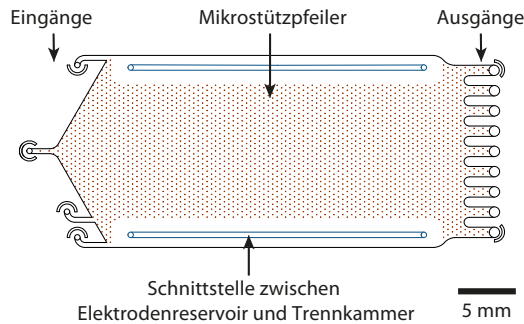


Abbildung 3.3: Technische Zeichnung der μ FFE-Strukturen für die Abformung mit PDMS. Links und rechts der zentralen Trennkammer befinden sich Ein- und Ausgangskanäle. Die zahlreichen kleinen Kreise sind Mikrostützpfiler, die ein Kollabieren der PDMS-Strukturen verhindern. Entlang der Trennkammer sind beidseitig die Bereiche der Schnittstellen zwischen Elektrodenreservoirs und Trennkammer dargestellt.

terung minimiert (siehe Gleichung 2.19) und durch ein großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis eine hohe Wärmeabfuhr und geringe Probenmengen ermöglicht.

- (2) Es werden Stützpfiler zur Stabilisierung der PDMS-Strukturen benötigt. Da PDMS über eine geringe Steifigkeit verfügt (E-Modul von etwa 2 MPa⁶⁷) würde die großflächige Trennkammer andernfalls bereits beim Zusammenbau des Chips kollabieren, das heißt durch Schwerkraft oder andere Krafteinwirkungen würden Decke (PDMS) und Boden (Glas) der Trennkammer in Kontakt kommen. Da die Oberflächen für den Herstellungsprozess plasmaaktiviert sind, würden Decke und Boden irreversibel bonden und die Trennkammer damit zerstören. Die Stützpfiler müssen dabei möglichst klein sein, um den Fluss nicht zu stören. Für das Design wurden Stützpfiler im Abstand von 500 μ m mit 50 μ m Durchmesser gewählt.
- (3) Eingänge zur Trennkammer werden benötigt, die es erlauben, HGE und Analyten an gewünschter Position zu injizieren. Die Position hängt dabei von der Zusammensetzung der Probe, beziehungsweise von den elektrophoretischen Eigenschaften der Analyten ab. Liegen beispielsweise sowohl positiv als auch negativ geladene Analyten vor, sollte die Injektion zentral erfolgen, während für die Trennung von Analyten mit Ladungen gleichen Vorzeichens die Injektion zur Maximierung der Migrationsstrecke am Rand erfolgt. Die Probe sollte jedoch nicht ganz außen in die Trennkammer eingebracht werden, da es im Randbereich zu unerwünschten Wechselwirkungen mit den Wänden der Trennkammer und den Elektrodenreservoirs kommen kann. Hier wird HGE injiziert, der eine gewisse Pufferzone darstellt. Für eine vielseitige Nutzung der Chips wurden Eingänge für alle Situationen zur

3.2. DESIGN UND HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PDMS

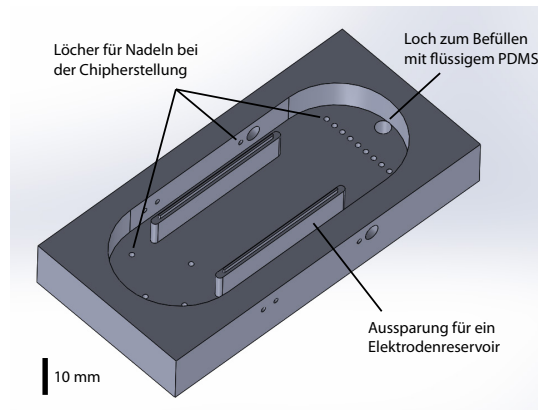


Abbildung 3.4: Technische Zeichnung der Gussform für die Herstellung von μ FFE-Chips aus PDMS. Zu sehen ist die Aushöhlung, in die das PDMS zum Aushärten befüllt wird. Die beiden länglichen Aussparungen stellen im fertigen Chip die Elektrodenreservoirs dar. Die Löcher dienen zur Fixierung von stumpfen Stahlnadeln während der Polymerisierung des PDMS.

Verfügung gestellt. Nicht-verwendete Eingänge konnten für ein Experiment situativ verschlossen werden.

- (4) Die Ausgangskanäle sollen äquidistant über die Breite der Trennkammer verteilt sein und gleiche hydrodynamische Widerstände aufweisen, um möglichst homogene Flussraten zu gewährleisten. Die Endpunkte der Kanäle, an denen Anschlüsse (z.B. Schläuche) installiert werden, benötigen einen gewissen Abstand zueinander, um mechanische Überbeanspruchung des PDMS zu vermeiden. Das wenig zähe PDMS neigt unter Spannung (beispielsweise beim Einstecken von Schläuchen) zu Rissbildung. Bei der Positionierung der Endpunkte der Ausgangskanäle, an denen Schläuche angeschlossen werden, wurde ein Abstand der Endpunkte von 2 mm gewählt.

Integration von Elektroden Von den diskutierten Methoden zur Integration der Elektroden und der Kontrolle der entstehenden Gasblasen durch Elektrolyse wurde für diese Arbeit die Verwendung von Membranen gewählt. Deren Integration in den Mikrochip stellte eine große Herausforderung an das Design und den Herstellungsprozess. Zur äußeren Formgebung des Mikrochips und der Erzeugung von Elektrodenreservoirs (und Anschlüssen zur Außenwelt) wurde eine Gussform für PDMS entworfen. Eine technische Zeichnung der Gussform ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Innerhalb der ovalen Grundform des Mikrochips lassen sich die Elektrodenreservoirs links und rechts entlang der Trennkammer erkennen. Die Reservoirs sollten mit der Trennkammer möglichst entlang der gesamten Trennstrecke (in Flussrichtung) leitend verbunden sein und müssen jeweils

über einen Ein- und Ausgang verfügen, damit sie kontinuierlich von Elektrolytlösung durchströmt werden können. Für die Membranbarriere zwischen Trennkammer und den Reservoirs wurde für diese Arbeit Ionenspur-geätzte Filtermembranen aus PC mit $0,1\ \mu\text{m}$ Porengröße gewählt. Die Befestigung der PC-Membranen am PDMS erfolgte per Silanisierung und Plasmaaktivierung. Dadurch sollte eine flüssigkeitsdichte Bindung erzielt werden.

Schnittstellen für Anschlüsse Für den kontrollierten Probeneinlass und das Durchströmen des Mikrochips mit Elektrolytlösung müssen geeignete Anschlüsse zur Außenwelt zur Verfügung stehen. Bei PDMS-Mikrochips ist es üblich, Löcher für die Konnektierung von Schläuchen mittels PDMS-Stanzern in das ausgehärtete Material einzubringen. Durch die Elastizität des PDMS werden eingesteckte Schläuche flüssigkeitsdicht angepresst. Das Ausstanzen ist jedoch nicht optimal, da die entstehenden Löcher im weichen und flexiblen PDMS geometrisch nicht einheitlich sind und bei dem Prozess die Gefahr der Rissbildung besteht. Außerdem sollten die Ausgänge möglichst einheitliche hydrodynamische Widerstände aufweisen, um homogene Volumenströme der verschiedenen Ausgänge zu gewährleisten. Daher wurden für die Chipherstellung in dieser Arbeit stattdessen Aussparungen durch Nadeln erzeugt, die unter Verwendung der Gussform in das noch flüssige PDMS an entsprechenden Stellen eingelassen (siehe Abbildung 3.5) und erst nach Polymerisierung entfernt wurden. In die zurückbleibenden dünnen zylinderförmigen Aussparungen konnten dann Schläuche angesteckt werden. Die Gussform wird bei der Chipherstellung auf den mit Fotolack mikrostrukturierten Siliciumwafer (den Fotolackstempel) gelegt. Anschließend wird die Form mit flüssigem PDMS befüllt, das in der Form aushärtet. Dabei entstehen in einem Schritt die Mikrostrukturen (Trennkammer und Ein- und Ausgangskanäle) und der Körper des PDMS-Chips mit Elektrodenreservoirs und den Ein- und Ausgängen.

Zusammenbau des Chips Das mikrostrukturierte PDMS-Bauteil war auf der Seite, die die Mikrostrukturen enthielt, ebenso wie an den Elektrodenreservoirs auf der anderen Seite des PDMS-Bauteils, offen. Diese Öffnungen mussten beim Chipzusammenbau flüssigkeitsdicht verschlossen werden. Dafür wurden folgende Überlegungen getroffen

- (1) PDMS kann durch Plasmaaktivierung mit geeigneten Materialien, wie PDMS und Glas, flüssigkeitsdicht gebondet werden.
- (2) Das eher weiche PDMS benötigt eine mechanische Stabilisierung, um Deformationen zu minimieren.
- (3) Das Gegenstück zum Verschließen der Mikrostrukturen (das dann den Boden der Trennkammer und der Kanäle darstellt) soll eine glatte Oberfläche haben, damit homogene Geometrien der Mikrokanäle gewährleistet sind.

3.2. DESIGN UND HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PDMS

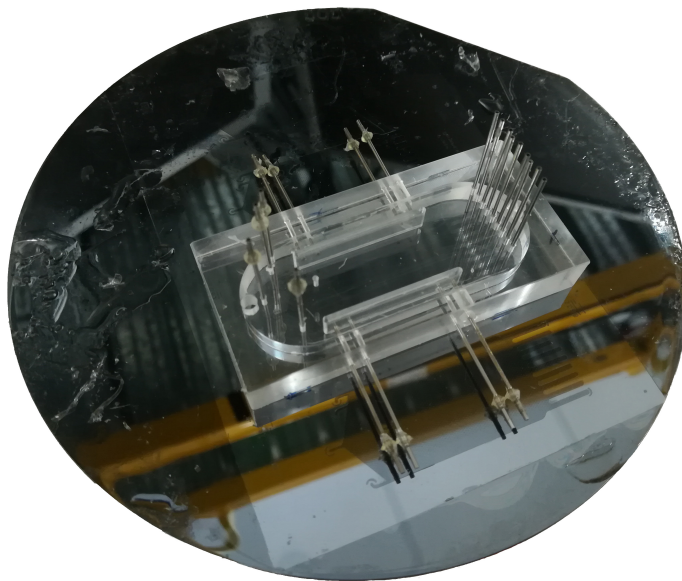


Abbildung 3.5: Foto der Gussform aus PMMA für die Herstellung von FFE-Chips aus PDMS. Die Gussform liegt auf einem Siliziumwafer, der die Mikrostrukturen für die Abformung der Mikrostrukturen mit PDMS aufweist. Die Stahlnadeln stecken in Löchern der Gussform und hinterlassen nach Aushärten des PDMS Kanäle für das Anstecken von Schläuchen.

KAPITEL 3. ENTWICKLUNG UND HERSTELLUNG DER μ FFE-CHIPS

- (4) Der Chip sollte transparent sein, damit Experimente optisch analysiert werden können.

Genannte Voraussetzungen werden von Glas erfüllt, weshalb die Wahl – sowohl für den Boden des FFE-Chips, als auch zum Verschließen der Elektrodenreservoirs auf der Oberseite – auf Mikroskopieobjektträger fiel.

Funktionalisierung der Oberflächen Das Chipdesign war nun entworfen. Durch die gewählten Materialien Glas und PDMS gab es jedoch ein Problem, das gelöst werden musste, bevor der FFE-Chip zum Einsatz kommen konnte: Sowohl Glas als auch PDMS verursachen durch ihre geladenen Oberflächen einen EOF (siehe Kapitel 2.1.4). Daher sollten die Oberflächen zur Minimierung des EOF funktionalisiert werden. Dabei kann gleichzeitig die Adsorption geladener Moleküle reduziert werden. Dies war auch hinsichtlich der geplanten Verwendung von Farbstoffen vorteilhaft, da adsorbierte Farbstoffe die optische Detektion der Farbstoffbanden erschweren. Zur Funktionalisierung wurden die Mikrochips mit einer wässrigen Lösung BSA-Lösung behandelt.

3.2.3 Herstellung

Herstellung des Fotolackstempels Für die Chipherstellung musste zunächst der Fotolackstempel erzeugt werden. Aus den im CAD-Programm (AutoCAD) gezeichneten Strukturen wurden von einem externen Unternehmen Fotolithografiemasken auf transparenter Folie erzeugt. Die Herstellung der Fotolackstempel mit Hilfe dieser Masken erfolgte im Reinraum. Dort wurde der Fotolack durch Rotationsbeschichtung auf einen Si-Wafer aufgetragen. Bei dem Fotolack handelte es sich um SU-8 25 (Microchem Corp.), einem Negativlack auf Basis von Epoxidharz. Mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 1000 rpm wurde innerhalb von 45 s eine Schicht mit einer Dicke von etwa 50 μm erzeugt. Zum Aushärten wurde der Lack anschließend für 10 min bei 95 °C gebacken. Im nächsten Schritt wurde die Lackschicht mit der Fotolithografiemaske für 14 s mit 20 mW cm^{-2} belichtet. Nach einem erneuten Backen bei 95 °C für 10 min wurde der Fotolack in einem Entwicklerbad (mr-Dev 600, Micro Resist Technology) entwickelt. Dabei wurden nicht belichtete und daher nicht polymerisierte Bereiche des Lacks abgewaschen. Die tatsächliche Dicke der Lackschicht wurde abschließend mittels Höhenprofilometrie (Alpha step, KLA-Tencor Corporation) stichpunktartig an verschiedenen Stellen überprüft. Ein Foto des fertiggestellten Fotolackstempels mit den μ FFE-Strukturen ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Die einzelnen Mikrostützpfeiler, die sich über die Strukturen im Abstand von 500 μm zueinander erstrecken, sind nicht zu erkennen.

Fabrikation des Chips Für die Abformung der Mikrostrukturen wurde zunächst das PDMS (Elastosil RT 601 A/B, Wacker Chemie AG) aus den beiden Komponenten A und

3.2. DESIGN UND HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PDMS

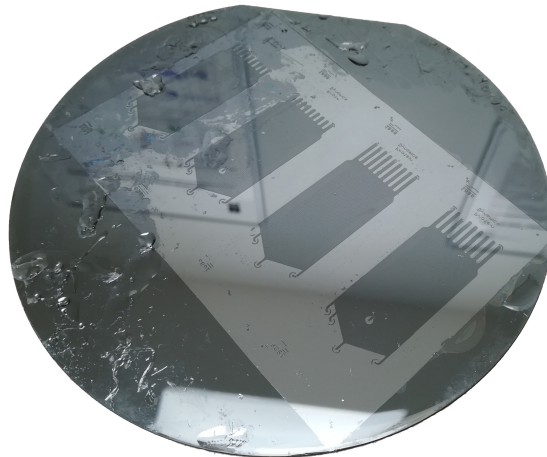


Abbildung 3.6: SU-8-Fotolackstempel auf Silicium-Wafer. Zu sehen sind vier ähnliche Designs zur Herstellung von μ FFE-Chips. Gut erkennbar ist jeweils die μ FFE-Kammer mit Eingangskanälen (vorn links) und Ausgangskanälen (hinten rechts). Die dunklen Bereiche wurden im Herstellungsprozess belichtet und haben eine Höhe von etwa 50 μ m.

B im Verhältnis 10:1 gemischt. Die beim Mischen entstandenen Gasblasen im PDMS wurden im Exsikkator unter Vakuum entfernt, um eine glatte Oberfläche des polymerisierten PDMS zu erzielen und die optischen Eigenschaften nicht durch Gaseinschlüsse zu beeinträchtigen. Die Gussform für den Mikrochip wurde mit stumpfen Stahlnadeln von 0,91 mm Außendurchmesser (VIEWEG GmbH, Kranzberg) in den entsprechenden Löchern versehen, auf den Si-Wafer gelegt und präzise an den Mikrostrukturen ausgerichtet (Abbildung 3.5). Das noch flüssige PDMS wurde mit einer Einmalspritze (3 ml, Braun Omnifix) durch das dafür vorgesehen Loch (siehe Abb. 3.4) in die Gussform injiziert. Auf einer Heizplatte härtete das PDMS auf dem Wafer anschließend für 60 min bei 80 °C aus. Die mit einer Schere zurechtgeschnittenen PC-Membranen (Nuclepore track-etched membranes, Whatman, UK) wurden silanisiert. Dafür wurden sie für 30 s mittels Sauerstoffplasma oxidiert (Femto Niederdruck-Plasmaanlage, Diener electronic) und anschließend 30 min in einer Lösung aus 2% APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) und 70% Ethanol gebadet. Nach Trocknung wurden die Membranen und das inzwischen ausgehärtete und aus der Gussform entfernte PDMS für das Bonden 30 s im Sauerstoffplasma aktiviert. Die Membranen wurden dann auf dem PDMS-Bauteil so platziert, dass sie die längliche Öffnung entlang der Elektrodenreservoirs abdeckten, wie in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt. Das PDMS-Bauteil mit integrierten Membranen wurde anschließend mit der sauerstoffaktivierten Oberfläche eines Glasobjektträgers gebondet. Nach etwa drei Stunden Wartezeit hatte sich eine starke, irreversible Bindung zwischen Glas und PDMS

KAPITEL 3. ENTWICKLUNG UND HERSTELLUNG DER μ FFE-CHIPS

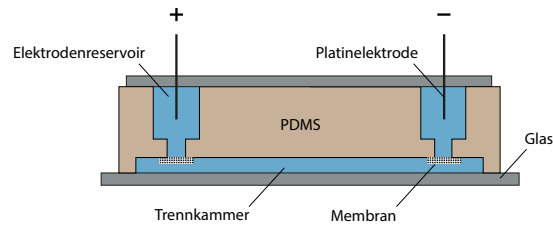


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Querschnitts durch den FFE-Chip. Erkennbar ist hier die Position der Elektrodenreservoirs, der Trennkammer und den Membranen als permeable Barriere dazwischen. Der Chip ist beidseitig durch Mikroskopobjektträger (Quarzglas) stabilisiert.

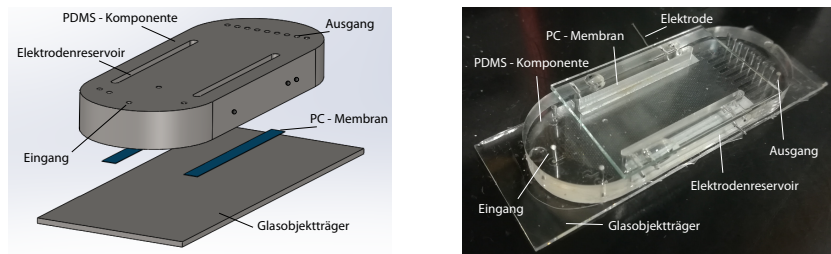


Abbildung 3.8: Explosionszeichnung und Fotografie des FFE-Chips aus PDMS. Auf der linken Seite sind die wesentlichen Chipkomponenten dargestellt. In der Fotografie des fertigen Chips rechts sind zusätzlich Elektroden (schwierig zu erkennen) und die stabilisierende Glasplatte auf der Chipoberseite vorhanden.

gebildet. Zuletzt wurden die Elektroden aus Platindraht (1 mm Durchmesser) in den Elektrodenreservoirs platziert und diese mit einem weiteren Glasobjektträger auf der Oberseite des Chips durch Plasmabonding versiegelt und mechanisch stabilisiert. Zuvor wurde der Glasobjektträger mit Hilfe eines Diamantschneiders zurechtgeschnitten, damit die Ein- und Ausgänge nicht davon verschlossen wurden und das Glas nicht seitlich über den Rand des PDMS hinausstand. Ein Foto des fertig zusammengebauten Chips und eine Explosionszeichnung der Hauptkomponenten sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

Oberflächenbehandlung Zur Funktionalisierung der Oberflächen von PDMS und Glas wurde eine 0,01%ige BSA-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit einer Spritze in den Mikrochip injiziert und nach einer Stunde Inkubationszeit mit destilliertem Wasser wieder ausgespült.

3.2. DESIGN UND HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PDMS

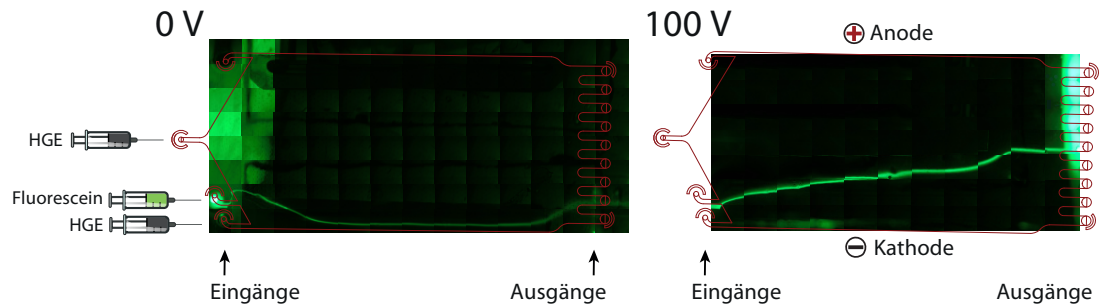


Abbildung 3.9: Collagen aus jeweils etwa 100 Einzel-Mikroskopaufnahmen eines mit Fluoresceinprobe durchflossenen FFE-Chips. Helligkeitsunterschiede zwischen den Einzelbildern sind auf lichtstreuende Objekte, wie dem mit Fluorescein gefüllten Teflonschlauch, über den die Probe injiziert wurde, zurückzuführen. Die Bilder wurden zur Orientierung an der technischen Zeichnung der Mikrostrukturen (rote Umrandung) ausgerichtet. Die Probenverläufe ohne angelegte Spannung (links) und bei 100 V Spannung (rechts) sind vergleichend gezeigt. Probe und HGE wurden jeweils an den Eingängen auf der linken Seite mit einer Spritzenpumpe injiziert (wie bei der 0 V-Collage schematisch dargestellt) und flossen in Richtung der Ausgänge auf der rechten Seite. Die Darstellung bei 100 V Spannung zeigt die Ablenkung des fluoreszierenden Probenstroms nach oben Richtung Anode.

3.2.4 Funktionalität der Chips

Vor der eigentlichen Verwendung eines zusammengebauten FFE-Chips wurde zunächst dessen grundlegende Funktionalität überprüft. Der erste wichtige Punkt war die Dichtigkeit des Chips, da sich im Betrieb durch die Injektion von Flüssigkeit ein Überdruck im Chip aufbaut. Dabei wurde untersucht, ob die durch Bonding erzeugten Bindungen stabil waren. Neben den Verbindungen Glas-PDMS ging es vor allem um die Stabilität der Bindungen zwischen den silanisierten Membranen und PDMS. Zur Prüfung wurde an den Eingängen des Chips destilliertes Wasser mit einer Spritzenpumpe über einen Zeitraum von einigen Minuten injiziert. Die gesamte Flüssigkeit sollte an den μ FFE-Ausgängen austreten und kein Fluss von der Trennkammer in die Elektrodenreservoirs stattfinden. Wurden Undichtigkeiten an einem Chip festgestellt, konnte dieser nicht mehr verwendet werden. Die Platinelektroden wurden in dem Fall wieder ausgebaut und der Rest des Chips entsorgt. Die funktionelle Einkopplung des elektrischen Feldes wurde anhand der elektrophoretischen Ablenkung geladener Fluoreszenzfarbstoffe getestet. Aufgrund seiner guten Sichtbarkeit und seiner elektrophoretischen Eigenschaften wurde dafür unter anderem Fluorescein ausgewählt. Ein Beispiel für die erfolgreiche Ablenkung einer Fluoresceinprobe bei 100 V Spannung im Vergleich zu einer Probe ohne angelegte Spannung ist in Abbildung 3.9 gezeigt. Bei dem Experiment wurde mit

KAPITEL 3. ENTWICKLUNG UND HERSTELLUNG DER μ FFE-CHIPS

einer Spritzenpumpe Fluorescein (100 μ M) an einem seitlichen Eingang des FFE-Chips mit $1 \mu\text{L min}^{-1}$ in die Trennkammer injiziert. Als HGE wurde Hepes/BisTris (BisTris: Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan; 10 mM/20 mM, pH 7,0) an zwei Eingängen beidseitig der Probe mit insgesamt $60 \mu\text{L min}^{-1}$ injiziert. Die Elektrodenreservoirs wurden von PBS (englisch *phosphate-buffered saline*; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2HPO_4 , pH 7,4) mit jeweils $50 \mu\text{L min}^{-1}$ durchströmt. In der Abbildung sieht man zwei Collagen von Mikroskopaufnahmen (Olympus IX 81): einmal für das Experiment ohne angelegte Spannung (0 V) und einmal mit angelegter Spannung (100 V). In der Abbildung wurden jeweils etwa 100 Einzelbilder zusammengefügt und zur Orientierung die technische Zeichnung der Trennkammer darübergerlegt. Man kann erkennen, dass die Bande des negativ geladenen Fluoresceins im elektrischen Feld in Richtung Anode abgelenkt wird, während die Probe des 0 V-Experiments am unteren Rand der μ FFE-Trennkammer entlangfließt. Die Einkopplung des elektrischen Feldes in den FFE-Chip war also in dem Beispiel gegeben und der Chip konnte für Trennexperimente verwendet werden.

3.2.5 Fazit

Die Herstellung der μ FFE-Chips war zu Beginn der Arbeiten noch überwiegend erfolgreich. Die Mikrostrukturen ließen sich hochpräzise herstellen und mit PDMS abformen. Die Materialkosten für die PDMS-Chips waren mit wenigen Euro pro Stück sehr gering und keine gefährlichen Substanzen oder Herstellungsschritte waren notwendig. Mit der elektrophoretischen Ablenkung von Fluoreszenzfarbstoffen konnte die Funktionalität der FFE-Chips gezeigt werden.

Als nachteilig stellte sich die geringe Steifigkeit des PDMS heraus. Zwar ermöglichte die Elastizität des Materials das variable Anschließen von Schläuchen verschiedener Durchmesser, jedoch hielten die Verbindungen keine großen Drücke aus. Mit fortschreitender Nutzungsdauer wurden die Verbindungen außerdem schlechter, da die Löcher im PDMS sich mit der Zeit weiteten. Nachteilig war die mangelnde mechanische Stabilität des PDMS auch im laufenden Betrieb, denn mechanische Einflüsse auf den Chip (z.B. Umpositionierung oder das Anschließen von Schläuchen) hatten unmittelbaren Einfluss auf das Fließverhalten in der Trennkammer, was bei der Beobachtung von Fluoreszenzfarbstoffen auffiel. Zusätzlich wölbte sich die Trennkammer durch den erhöhten Druck bei der Injektion von Probe und HGE über die Zeit, da die Mikrostützpfiler nicht fest genug mit dem gegenüberliegenden Glas bondeten, um die Form der Trennkammer zu wahren.

Ein weiterer Nachteil des PDMS waren dessen Oberflächeneigenschaften. Zum einen ist der EOF bei FFE von Nachteil und muss durch Oberflächenbehandlung minimiert werden. Dabei besteht jedoch keine Sicherheit, dass der EOF vollständig unterdrückt wird

3.2. DESIGN UND HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PDMS

und dass die Funktionalisierung langlebig ist. Es zeigte sich außerdem, dass Farbstoffe an der PDMS-Oberfläche adsorbieren, was den Kontrast bei optischen Experimenten verschlechterte.

Aufgrund anspruchsvoller Fertigungsschritte waren zu Beginn der Arbeiten etwa 80% der Chips funktionell, der Rest musste wegen Ungenauigkeiten bei der Herstellung verworfen werden. Anspruchsvoll und damit fehleranfällig war vor allem das Anbringen der Membranen. Diese mussten nach Plasmaaktivierung der Oberflächen mit hoher Präzision auf das PDMS aufgebracht werden, was sich aus folgenden Gründen als schwierig erwies: Da die aktivierten Oberflächen von PDMS und der Membranen bei Kontakt unmittelbar und irreversibel bondeten, mussten die Membranen im ersten Versuch richtig positioniert werden. Dies war besonders schwierig zu realisieren, da die Membranen sehr dünn und biegsam waren und zusätzlich durch elektrostatische Aufladungen unkontrolliert vom PDMS angezogen oder abgestoßen wurde. Bei Fehlpositionierung musste der Chip entsorgt werden. Dennoch konnten an einem Arbeitstag etwa 5 funktionierende Mikrochips hergestellt werden (wenn der Fotolackstempel zur wiederholten Abformung bereits hergestellt war), was verglichen mit den meisten in der Literatur vorgestellten Modellen und angesichts der zur erwarteten Nutzungsdauer von durchschnittlich etwa 30 Stunden, viel ist.

Das Bonding der Membranen war zunächst noch reproduzierbar. Das heißt, neue Chips waren flüssigkeitsdicht, wenn der Herstellungsprozess fehlerfrei verlief. Lediglich bei wiederholter Benutzung über längere Zeiträume oder mechanischer Beanspruchung eines Chips stellten sich die Membranen als Schwachpunkt heraus. Das äußerte sich darin, dass die Verbindung zwischen PDMS und den Membranen sich an einzelnen Stellen löste, wodurch Analyten durch die entstehenden Druckunterschiede sichtbar lateral abgelenkt wurden und teilweise in die Elektrodenreservoirs gesogen wurden. Bei vorsichtiger Handhabung und Lagerung waren die Chips jedoch normalerweise viele Stunden und über mehrere Tage verteilt funktionell.

Dies änderte sich, als der bestehende Vorrat APTES (das zur Silanisierung für das Bonding der Membranen verwendet wurde) zur Neige ging und mit einer neuen Charge gearbeitet werden musste. Bei Chips, die unter Verwendung der neuen Charge hergestellt wurden, hielten die Membranen nicht gut und mehr als die Hälfte der Mikrochips waren unmittelbar nach Zusammenbau bereits wegen Lecks an den Membranen unbrauchbar. Bei den übrigen, zunächst dichten Chips lösten sich die Membranen im Betrieb meist nach kurzer Zeit. Die Verwendung weiterer Chargen APTES verschiedener Hersteller brachte keine Verbesserung. Auch Experimente zur Verbesserung des Bondingverfahrens durch Variation der Prozessparameter blieben erfolglos.

Das problematische Anbringen der Membranen und die diskutierten Probleme durch die mechanischen und die Oberflächeneigenschaften des PDMS waren die Hauptgründe für die Motivation neue FFE-Chips zu entwickeln. Ein anderes Material sollte dabei für

bessere mechanische Eigenschaften sorgen, um Langlebigkeit und Reproduzierbarkeit zu erhöhen. Außerdem sollte das Material für optische Analysen transparent sein und keinen EOF induzieren. Basierend auf den seit vielen Jahren etablierten großskaligen FFE-Geräten sowie publizierten Herstellungsmethoden für FFE-Chips⁶⁸ fiel die Wahl letztlich auf die Methode der Chipfertigung mit Kunststoffplatten, die durch einen Abstandhalter definierter Dicke voneinander getrennt werden. PMMA bot sich aufgrund genannter Anforderungen und seiner generellen Biokompatibilität, die durch jahrelangen medizinischen Einsatz in Implantaten gezeigt wurde, dafür an.

3.3 Entwicklung Herstellung von FFE-Chips aus PMMA

Wie erwähnt, basierte das Design der PMMA-Chips auf Basis der klassischen FFE-Geräte. Bei diesen werden zwei Platten durch einen Abstandhalter definierter Dicke voneinander getrennt. Der Abstandhalter gibt durch sein Design den Umriss der Trennkammer vor, während die Höhe der Trennkammer durch dessen Dicke bestimmt wird. In FFE-Geräten handelt es sich bei den Abstandhaltern in der Regel um einen einfachen Rahmen aus einem Polymer wie PTFE oder Polyimid,⁶⁹ der unter Druck zwischen die PMMA-Platten gepresst wird. Der Anpressdruck wird bei den meisten Aufbauten durch Schrauben mit Muttern erzeugt. Für die druckgetriebene, mikrofluidische FFE lässt sich der Aufbau nicht zu 100% übertragen. Denn durch die geringen Abmessungen und damit hohen hydrodynamischen Widerstände im Mikrochip entstehen Drücke, die das flüssigkeitsdichte Verschließen des Chips mit Polymerplatten und Schrauben schwierig machen. Das hängt auch damit zusammen, dass PMMA über ein Maß an Verformbarkeit verfügt, das es nicht erlaubt, großflächig ausreichend Druck über das feste Anziehen von Schrauben im Randbereich zu erzeugen. Als Alternative zu einfachen Abstandhaltern wurde daher doppelseitiges Klebeband verwendet, das zusätzlich zur Funktion als Abstandhalter die beiden Platten durch Adhäsion zusammenhielt. Für die Gestaltung des neuen Mikrochips wurden die Erkenntnisse vom PDMS-Chip wieder aufgegriffen. Daher waren beispielsweise die mikrofluidischen Strukturen sehr ähnlich. Auch das Prinzip der Verwendung von Membranen bei der Elektrodenintegration wurde beibehalten. Die Verwendung von PMMA ermöglichte jedoch die Befestigung der Membranen durch Laminieren, wodurch die Schwachstelle des Bondings durch Silanisierung umgangen werden konnte. Im folgenden Abschnitt wird das Design des Chips bezüglich Mikrostrukturen, Elektrodenintegration und Schnittstellen zur Außenwelt beschrieben.

3.3.1 Design

Mikrostrukturen Die Mikrostrukturen wurden in doppelseitigem Klebeband erzeugt, das als Abstandhalter zwischen PMMA-Platten installiert wurde. Die Mikrostrukturen

3.3. ENTWICKLUNG HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PMMA

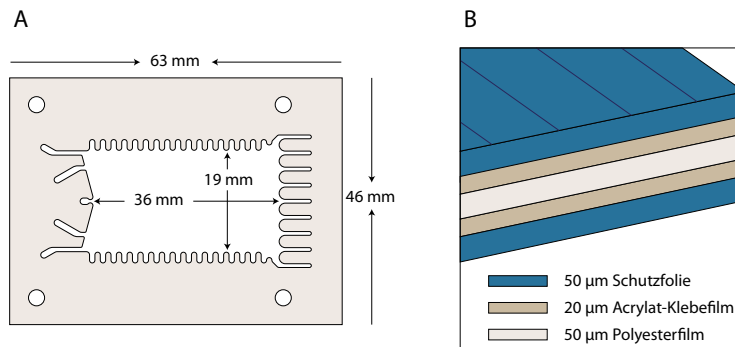


Abbildung 3.10: **A:** Technische Zeichnung der Mikrostrukturen eines μ FFE-Chips auf PMMA-Basis. Links der zentralen Trennkammer befinden sich Eingangskanäle, rechts die Ausgangskanäle. In die Nischen der wellenartigen Struktur münden die Verbindungskanäle zum später aufliegenden Elektodenreservoir. **B:** Struktur des doppelseitigen Klebebandes, in das die Mikrostrukturen geschnitten werden. Aus den Schichtdicken des Acrylat-Klebefilms und des zentralen Polyesterfilms ergibt sich für die Mikrostrukturen eine Höhe von $90\ \mu\text{m}$.

sind in Abbildung 3.10 A dargestellt. Für das Design wurde im Wesentlichen auf das der Mikrostrukturen der PDMS-Chips zurückgegriffen. Eingangs- und Ausgangskanäle und die zentrale Trennkammer mit $19\ \text{mm} \times 36\ \text{mm}$ hatten vergleichbare Abmessungen. Stützpfiler wie beim PDMS wurden nicht benötigt, da die Gefahr des Kollabierens aufgrund der höheren Steifigkeit von PMMA gering war. Bei dem doppelseitigen Klebeband, dargestellt in Abbildung 3.10 B, handelte es sich um einen weißen Polyesterfilm, der beidseitig mit einer Schicht aus acrylbasiertem Haftkleber versehen war. Der Klebefilm war jeweils von einer Schutzfolie bedeckt. Der Transfer der Mikrostrukturen von der technischen Zeichnung im CAD-Programm auf das Klebeband erfolgte mit einem Schneideplotter, der die Linien einer vorgegebenen Vektorgraphik mit einer Klinge präzise abfahren konnte. Die vom Schneideplotter ausgeschnittenen Strukturen (siehe Abbildung 3.10 A) wurden per Hand zwischen zwei PMMA-Platten geklebt. Die untere der beiden PMMA-Platten war glatt, die obere enthielt Löcher für die Ein- und Ausgänge, sowie Durchgänge zwischen Trennkammer und den Elektodenreservoirs. Ein fertiggestelltes Trennkammer-Bauteil ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Die Integration der Elektroden erfolgte hier nach dem gleichen Prinzip wie beim PDMS-Chip, bei dem Membranen eine Barriere zwischen Elektodenreservoirs und Trennkammer darstellen. Dies wurde auf zwei Wegen realisiert.

Fluidikports und Integration von Elektroden - Version I Ein wesentlicher Unterschied bei der Integration der Elektroden bestand in der flüssigkeitsdichten Fixierung der Membranen. Beim PMMA bestand nämlich die Möglichkeit, die Membranen mit Hilfe eines Klebefilms zu fixieren. Die Elektodenreservoirs befanden sich in einem PMMA-Bauteil,

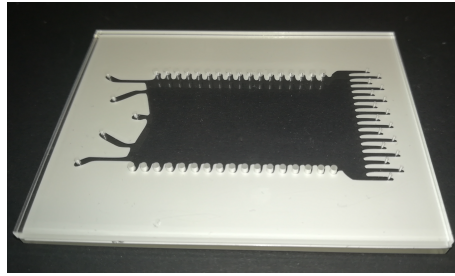


Abbildung 3.11: Das Trennkammer-Bauteil besteht aus zwei PMMA-Platten mit den Mikrostrukturen in doppelseitigem Klebeband dazwischen. Die obere PMMA-Platte enthält Löcher an den Eingängen, den Ausgängen und beidseitig entlang der Trennkammer für die Einkopplung eines elektrischen Feldes.

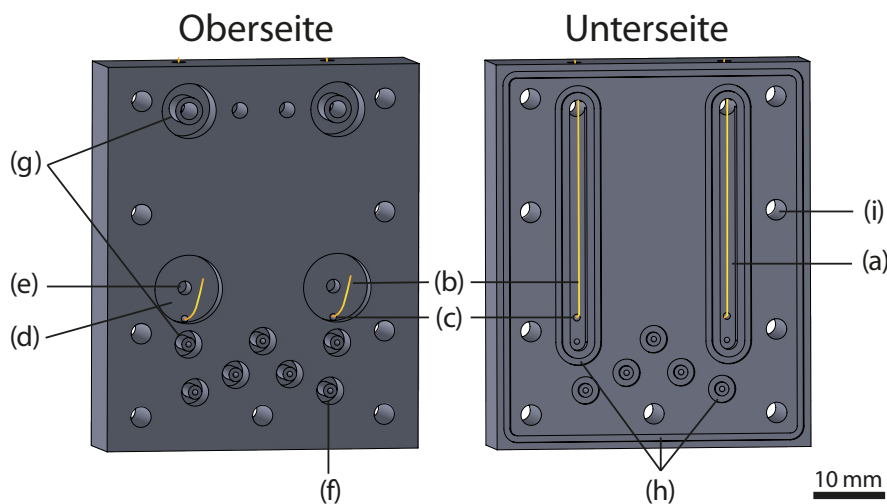


Abbildung 3.12: Technische Zeichnungen von Ober- und Unterseite des Elektrodenreservoir-Bauteils in seiner ersten Version. (a) Elektrodenreservoir, (b) Platinelektrode, (c) Durchlasskanal für die Elektrodendrähte, (d) Elektrodenport (große kreisförmige Fläche), (e) Innengewinde für die Schraube, die die Platinelektrode an ein Stromkabel klemmt (f) Fluidikport für die Trennkammer, (g) Fluidikports für die Elektrodenreservoirs, (h) Fugen für O-Ringe zur flüssigkeitsdichten Verbindung der Chipbauteile, (i) Schraubenloch zur Verbindung mit dem Trennkammer-Bauteil.

das von oben auf dem Trennkammer-Bauteil fixiert wurde. Dessen Struktur ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Bei den Reservoirs handelt es sich um nach unten geöffnete Hohlräume im PMMA, die auf der Unterseite des Bauteils eingefräst wurden (a). Die Elektroden (b) aus Platindraht (1 mm Durchmesser) liegen der Länge nach in den Reservoirs und reichen durch dafür vorgesehene Öffnungen (c) zur Oberseite des PMMA-Bauteils, wo die

3.3. ENTWICKLUNG HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PMMA

Kontaktierung zur Spannungsquelle erfolgt. Der Elektrodenport (d) dient der elektrischen Verbindung der Elektrode mit einem Stromkabel mittels einer Schraube. Die Schraube klemmt dabei beim Eindrehen in das Gewinde (e) die Elektrode und das Stromkabel mit dem Schraubkopf zusammen, wodurch diese leitend verbunden werden. Auf der Chipoberseite befanden sich außerdem Fluidikanschlüsse für die Trennkammer (f) und die Elektrodenreservoirs (g). Der obere Fluidikport des Elektrodenreservoirs ist größer, damit Gas, das sich an den Elektroden bildet, besser abtransportiert werden kann. Bei den Ports handelt es sich um in das PMMA gefräste Hohlzylinder, auf die passende Schläuche gesteckt werden können. Die Löcher in den Hohlzylindern reichen durch das PMMA-Bauteil hindurch bis zur Unterseite. Die Reservoirs und die Einlassports sollen flüssigkeitsdicht mit dem darunter liegenden Trennkammer-Bauteil (siehe Abbildung 3.11) verbunden werden. Das Trennkammer-Bauteil hat kreisförmige Öffnungen an den entsprechenden Stellen in der oberen seiner beiden Platten, die den Positionen der Öffnungen im oberen PMMA-Bauteil entsprechen. Über O-Ringe aus Nitrilkautschuk, die im Elektrodenreservoir-Bauteil in eingefrästen Fugen (h) um die Löcher herum positioniert sind, wird eine flüssigkeitsdichte Verbindung zwischen den Bauteilen erzielt. Der notwendige Anpressdruck wird über Schrauben erzeugt, die über Löcher (i) außerhalb der Mikrostrukturen durch die PMMA-Ebenen hindurchreichen und auf der Gegenseite mit Muttern festgezogen werden.

Eine Explosionszeichnung, die das Elektrodenreservoir-Bauteil, die Komponenten des Trennkammer-Bauteils und die Membranen zeigt, ist in Abbildung 3.13 A dargestellt. Das Foto in Abbildung 3.13 B zeigt den zusammengebauten Chip mit angeschlossenen Schläuchen (i), Platinelektroden (j), Stromkabeln (k), Edelstahlkanülen an den Trennkammerausgängen als Auslässe (l) und Schrauben (m), die die Bauteile zusammenpressen.

Fluidikports und Integration von Elektroden - Version II Mit oben beschriebener Methode zur Integration von Elektroden und Anschlüssen konnte ein funktioneller μ FFE-Chip erzeugt werden. Jedoch kam es gelegentlich zu Schwierigkeiten, die sich durch schwankende elektrische Ströme und beeinträchtigte elektrophoretische Migration der Analyten äußerten. Es stellte sich heraus, dass die Verbindungen mit den Gummiringen zwischen den Bauteilen nicht immer flüssigkeitsdicht waren. Dadurch bildete sich ein Flüssigkeitsfilm zwischen den beiden PMMA-Bauteilen. Dieser Flüssigkeitsfilm stellte eine elektrische Verbindung zwischen den nicht mehr vollständig abgedichteten Elektrodenreservoirs her, wodurch der Strom zu (großen) Teilen durch den Raum zwischen den Bauteilen, statt durch die Trennkammer floss. Zurückzuführen waren diese Undichtigkeiten auf Deformierung der PMMA-Platten durch das Zusammenschrauben. Die Schrauben übten dabei ungleichmäßig Druck auf die PMMA-Platten aus, die sich dadurch mit der Zeit verformten. Die Oberflächen der beiden Bauteile waren dann nicht mehr plan,

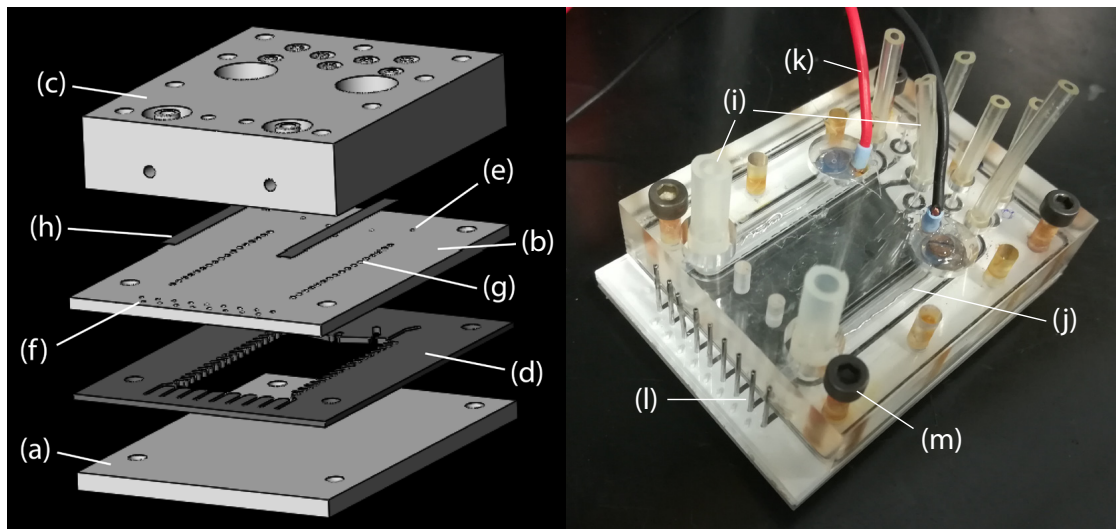


Abbildung 3.13: Explosionszeichnung (links) und Foto (rechts) des mikrofluidischen FFE-Chips auf PMMA-Basis (Version I). (a) untere PMMA-Platte, (b) obere PMMA-Platte, (c) Elektrodenreservoir-Bauteil, (d) doppelseitiges Kleband, (e) Einlass, (f) Auslass, (g) Durchgänge zwischen Trennkammer und Elektrodenreservoir, (h) PC-Membranen, (i) Schläuche an Trennkammereinlässen und den Elektrodenreservoirs, (j) Platinelektrode, (k) Stromkabel zum Anschließen der Elektroden an ein Netzteil, (l) Auslässe der Trennkammer, (m) Schrauben zum Zusammenpressen der Chipbauteile.

3.3. ENTWICKLUNG HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PMMA

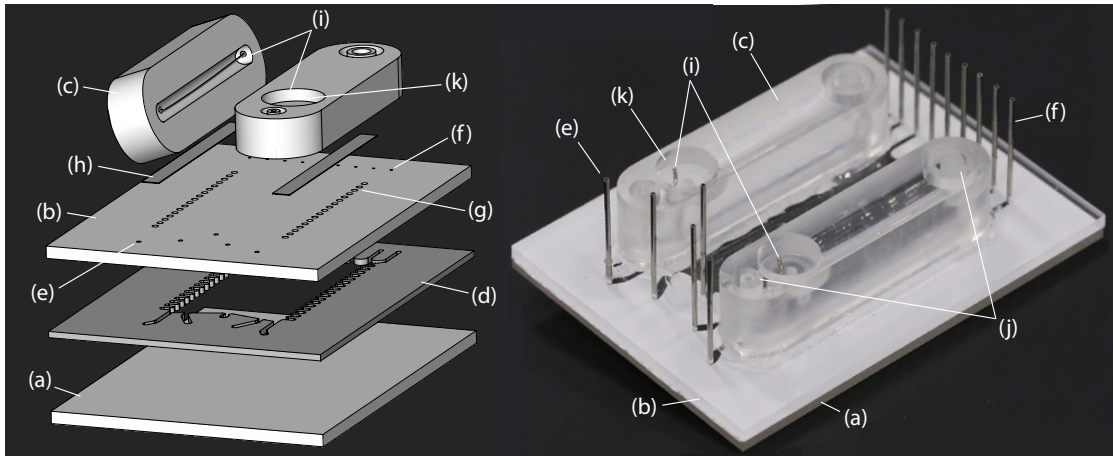


Abbildung 3.14: Explosionszeichnung (links) und Foto (rechts) des mikrofluidischen FFE-Chips auf PMMA-Basis (Version II). (a) untere PMMA-Platte, (b) obere PMMA-Platte, (c) Elektrodenreservoir, zur besseren Darstellung rotiert, (d) doppelseitiges Klebeband, (e) Einlass, (f) Auslass, (g) Durchgänge zwischen Trennkammer und Elektrodenreservoir, (h) PC-Membranen, (i) Elektroden, (j) Fluidikports, (k) Kontaktierungsport.

wodurch die O-Ringe nicht mehr ausreichend abdichten konnten. Daher wurde eine neue Bauweise zur Integration der Elektroden entwickelt, die ohne Schrauben auskam, dargestellt in Abbildung 3.14. Bei dem neuen Design wurden statt eines großen Bauteils für Elektrodenreservoirs und Anschlussstellen zwei einzelne kleinere Bauteile verwendet, dargestellt links oben in der Explosionszeichnung. Diese Bauteile enthielten jeweils ein Elektrodenreservoir und Anschlussstellen für die Versorgung der Reservoirs mit Elektrolytlösung. Anstatt einer Anbindung über Dichtungsringe und Anpressdruck durch Schrauben wurden die Bauteile mit Klebstoff an dem Trennkammer-Bauteil befestigt. Die Konnektierung von Schläuchen an den Eingängen der Trennkammer erfolgte nicht mehr über das Elektrodenreservoirbauteil, wie bei der ersten Version, sondern direkt über in das Trennkammer-Bauteil eingesteckte stumpfe Edelstahlkanülen, wie in Abbildung 3.14 gezeigt ist.

3.3.2 Herstellung

Die Mikrostrukturen wurden durch eine 2D-Zeichnung mit der Software AutoCAD erzeugt und mit Hilfe der Software Inkscape dem Schneideplotter (Cameo 3, Silhouette America) bereitgestellt. Der Plotter schnitt die Strukturen innerhalb weniger Minuten in den Klebefilm (Microfluidic Diagnostic Tape 9965, 3M, USA). Der Teil des Klebebandes, der später im Chip Trennkammer und Kanälen entsprach, wurde mit Hilfe einer spitzen Pinzette

entfernt und entsorgt. Die Schutzfolie einer Seite wurde abgezogen und das verbleibende Klebeband auf eine 2 mm dicke PMMA-Platte geklebt (siehe Abbildung 3.11). Die PMMA-Platte entsprach mit einer Länge von 63 mm und einer Breite von 46 mm den Abmessungen des ausgeschnittenen Klebebandes. Diese einfache, glatte PMMA-Platte stellte die Unterseite des Mikrochips dar. Anschließend wurde die Schutzfolie des doppelseitigen Klebebandes auf der Oberseite entfernt und die zweite PMMA-Platte wurde sorgfältig an den Klebefilmstrukturen ausgerichtet und festgeklebt. Die in der PMMA-Platte enthaltenen Löcher (für Eingänge, Ausgänge und die Durchgänge zu den Elektrodenreservoirs) wurden dabei möglichst präzise an den Mikrostrukturen ausgerichtet. Die PMMA-Platten wurden nach Aufbringen des Klebebandes fest zusammengedrückt, um eine vollständige Benetzung der Oberflächen mit dem hochviskosen Haftklebestoff des Klebebandes zu erreichen. Im nächsten Schritt wurden die PC-Membranen (Nucleopore track-etched membranes, Whatman, UK) durch Laminieren befestigt. Dafür wurde mittels Transferklebeband (Diagnostic Microfluidic Adhesive Transfer Medical Tape 9969, 3M, USA) eine Acrylat-Klebeschicht an entsprechenden Positionen der oberen Platte des Trennkammer-Bauteils aufgebracht. Die Klebeschicht deckte dabei den Bereich um die Löcher, die die Durchgänge zu den Elektrodenreservoirs darstellten, ab. Mit einem spitzen Gegenstand wurden die Löcher selber vom Klebefilm befreit, um die Durchlässigkeit für den elektrischen Strom nicht zu beeinträchtigen. Die zurechtgeschnittenen Membranen wurden dann auf dieser Klebeschicht über die Löcher gelegt und festgedrückt. Das Anbringen von Fluidikports und die Integration der Elektroden erfolgte, wie zuvor erwähnt, auf zwei verschiedene Arten.

Fluidikports und Integration von Elektroden - Version I Bei der Version mit nur einem Elektrodenreservoirbauteil wurden die Platin-Elektroden zunächst der Länge nach in die Reservoirs gelegt. Der Elektrodendraht wurde in einer dafür vorgesehenen kleinen Öffnung an einem Ende des Elektrodenreservoirs fixiert und am anderen Ende durch eine kleine Öffnung zur Oberseite des Chips zum Kontaktierungsport geführt (siehe Abbildung 3.12). Der Kontaktierungsport war eine zylinderförmige Aussparung und enthielt in der Mitte ein Innengewinde und Raum für Schraubenkopf und Unterlegscheibe. Hier wurde das Ende des Platindrahts gemeinsam und in Kontakt mit den Adern eines Stromkabels, durch Anziehen einer Schraube, zwischen Unterlegscheibe und PMMA fixiert. Der Port wurde anschließend mit Silikonkautschuk (Elastosil E41, Wacker Chemie, München) aufgefüllt und damit alle offenen Drähte elektrisch isoliert und der Durchgang zum Elektrodenreservoir flüssigkeitsdicht verschlossen. Nachdem das Silikon ausgehärtet war, wurden die O-Ringe eingesetzt und das Elektrodenreservoir-Bauteil auf dem Trennkammer-Bauteil positioniert. Über Schrauben und Muttern wurden die Bauteile aneinandergedrückt, so dass die Kanäle mit Hilfe der O-Ringe flüssigkeitsdicht verschlossen waren. Zum Schluss wurden stumpfe Edelstahlkanülen als Fluidikports in die dafür vorgesehenen Löcher an

3.3. ENTWICKLUNG HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PMMA

den Ausgängen gesteckt. Die Kanülen wurden durch das mechanische Entfernen des Propylenkörpers von Dosiernadeln (VIEWEG GmbH, Kranzberg) gewonnen und hatten einen Außendurchmesser von 0,71 mm und einen Innendurchmesser von 0,41 mm.

Fluidikports und Integration von Elektroden - Version II Bei der Version mit zwei kleineren Elektrodenreservoir-Bauteilen wurden die Platinelektroden auf die gleiche Weise eingesetzt, fixiert und konnektiert wie bei Version I. Anschließend wurden die Elektrodenreservoir-Bauteile mit Hilfe des Transferklebebandes im Bereich der Durchgangslöcher (siehe Abbildung 3.14) auf das Trennkammer-Bauteil geklebt. Die Edelstahlkanülen wurden dieses mal nicht nur an den Aus-, sondern auch an den Eingängen als Fluidikports verwendet. Die Kanülen an den Eingängen hatten einen Außendurchmesser von 0,71 mm und einen Innendurchmesser von 0,41 mm. An den Ausgängen werden entweder die gleichen Kanülen verwendet, oder alternativ Kanülen kleinerer Durchmesser (Außendurchmesser 0,41 mm, Innendurchmesser 0,20 mm) zur Reduzierung der Totvolumina.

3.3.3 Funktionalität der Chips

Zunächst wurde, noch vor Installation der Elektrodenreservoirs, die Dichtigkeit des Chips getestet. Dafür wurde destilliertes Wasser an den Eingängen injiziert und sollte lediglich (und möglichst gleichmäßig) an den Ausgängen austreten. Besonderes Augenmerk wurde auf mögliche Lecks an den Membranen gelegt.

Im fertig zusammengebauten Chip wurde mit einem Farbstoff anhand der Form und Positionierung des Probenstroms die Homogenität der Flüsse in der Trennkammer überprüft. Im Optimalfall floss der Probenstrom in Abwesenheit eines elektrischen Feldes auf einer geraden Linie durch den Chip, wie in Abbildung 3.15 A gezeigt ist. Hier wurde eine Probe 200 μM Fluoresceins zentral in den Mikrochip injiziert und floss auch zentral wieder heraus. In etwa 10% der Fälle war die zusammengebaute Trennkammer jedoch durch Wölbungen der PMMA-Platten nicht funktionell. Aufgrund der geringen durchschnittlichen Höhe der Trennkammer von etwa 90 μm konnten diese Wölbungen dazu führen, dass sich die obere und untere PMMA-Platte berührten, wodurch der Fluss entscheidend gestört wurde. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 3.15 B gezeigt. Hier war der Fluss so stark beeinträchtigt, dass das Trennkammer-Bauteil verworfen werden musste. Wegen beschriebener Schwierigkeiten wurde davon abgesehen, noch dünneres doppelseitiges Klebeband als Abstandhalter zu testen.

Abschließend wurde die Einkopplung des elektrischen Feldes getestet. Dafür wurde ein Fluoreszenzfarbstoffgemisch bestehend aus 200 μM Fluorescein (negativ geladen), 200 μM Pyronin G (positiv geladen) und 200 μM Rhodamin B (ungeladen) kontinuierlich am zentralen Einlass injiziert ($3 \mu\text{L min}^{-1}$). Der HGE Hepes/BisTris (10 mM/20 mM) wurde mit

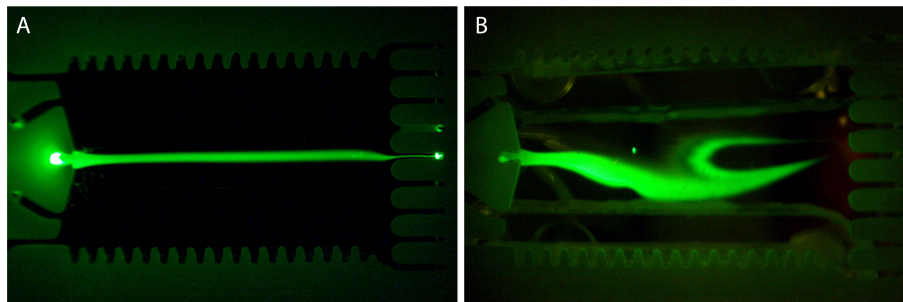


Abbildung 3.15: Fotos zur vergleichenden Darstellung (A) einer funktionellen Trennkammer und (B) einer durch gewölbte PMMA-Platten nichtfunktionellen Trennkammer. Die Verteilung des leuchtend grünen Fluoresceins, das durch den Chip von links nach rechts fließt, zeigt, dass der Fluss gestört wird. Das liegt vermutlich daran, dass die PMMA-Platten der Trennkammer in (B) stellenweise sehr nah beieinander sind.

insgesamt $80 \mu\text{L min}^{-1}$ zu beiden Seite der Probe injiziert. Durch die Elektrodenreservoirs floss PBS mit jeweils $100 \mu\text{L min}^{-1}$. Bei einer Trennungsspannung von 175 V wurde überprüft, ob die Analyten erwartungsgemäß abgelenkt wurden und die Trennung über die Zeit stabil war. Die Lampe eines Fluoreszenzmikroskop (IX 81, Olympus, Japan) wurde zur Fluoreszenzanregung verwendet, Aufnahmen wurden mit einer externen Kamera eines Mobiltelefons (Huawei P8 Lite 2017) und einem davor montierten Langpass-Kantenfilter ($>500 \text{ nm}$, Thorlabs, USA) gemacht. Das Ergebnis der Trennung des Farbstoffgemischs ist in Abbildung 3.16 gezeigt. In dem Foto lässt sich erkennen, wie sich der Farbstoffmix auf dem Weg durch die Trennkammer (von links nach rechts) auftrennt. Da die drei Farbstoffe der Probe unterschiedliche Absorptions- und Emissionsmaxima haben, war es schwierig, alle gleichzeitig gut sichtbar zu machen. Erwartungsgemäß wurden die beiden geladenen Farbstoffe Fluorescein und Pyronin G seitlich abgelenkt, während das neutrale Rhodamin B (kaum zu erkennen) auf zentraler Höhe gerade durch die Trennkammer floss. Wie man in dem Foto sehen kann, bewegten sich die Analyten auf geraden Bahnen, was auf Homogenität der Flüsse und Geometrien schließen lässt. Die Trennung der Farbstoffe war bis zum Abbruch des Experiments nach 70 min stabil.

3.3.4 Fazit

Das flüssigkeitsdichte Anbringen der Membranen durch Laminieren erwies sich als zuverlässig. Die Methode war, verglichen mit den durch Silanisierung befestigten Membranen im PDMS-Chip, einfacher in der Herstellung und langzeitstabil. Die Dichtigkeit des mikrostrukturgebenden Klebebandes war zufriedenstellend. Nur wenn der Druck im Inneren des Mikrochips über viele Stunden (>50) erhöht war, kam es zu Undichtigkeiten,

3.3. ENTWICKLUNG HERSTELLUNG VON FFE-CHIPS AUS PMMA

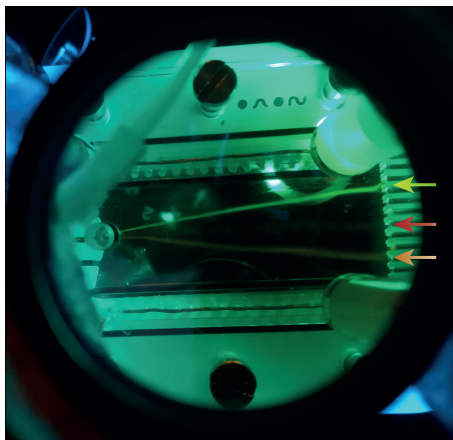


Abbildung 3.16: Foto der Auftrennung der Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein, Rhodamin B und Pyronin G. Das negativ geladene Fluorescein (gelb-grün), wird nach oben Richtung Anode abgelenkt, das neutrale Rhodamin B (rot) läuft auf zentraler Höhe durch den Chip (nur schwach sichtbar) und das positiv geladene Pyronin G (orange) wird in Richtung Kathode abgelenkt. Aufgrund unterschiedlicher Absorptions- und Emissionsmaxima sind nicht alle Farbstoffe gut erkennbar.

da sich die Flüssigkeit unter Auflösung der Klebeverbindungen langsam nach außen drückte. Dies war üblicherweise aber nicht limitierend für die Nutzungsdauer eines Chips. Das Auftreten von Lecks bei Verwendung des angeschraubten großen Elektrodenreservoir-Bauteils wurde mit der Methode mit zwei separaten geklebten Elektrodenreservoir-Bauteilen gelöst. Zwar stellte sich heraus, dass der dafür verwendete Klebefilm nur kurze Zeit seine Funktion vollständig erfüllte und es mit der Zeit zu Lecks kam, dieses Problem wurde aber auf einfache Weise gelöst: Die geklebten Reservoirs wurden zusätzlich mit Silikonkautschuk abgedichtet, was Langzeitdichtigkeit gewährleistete.

Die Verteilung der Volumenströme an den Ausgängen bei Injektion an den Eingängen war im Vergleich zu den PDMS-Chips gleichmäßiger. Die Homogenität der Flüsse durch den Mikrochip war auch deutlich verbessert. Geradlinige Verläufe der Probenströme, wie in Abbildung 3.15 A oder 3.16 konnten in den PDMS-Chips kaum erzielt werden.

Mit den PMMA-Chips konnten letztendlich gut funktionierende, zuverlässige und langzeitstabile FFE-Chips auf einfache Art und Weise mit geringen Kosten hergestellt werden. Das Ziel war es nun, mit diesen Chips eine Methode zur Trennung der für das Projekt wichtigen Analyten zu entwickeln.

4 Offline-Analyse der FFE-Trennung mit CE-UV/Vis

4.1 Einführung

Eine zentrale Schwierigkeit bei der kontrollierten Trennung von Substanzen in μ FFE ist deren Detektion. Da sich die meisten μ FFE-Systeme noch im Entwicklungsstadium befinden, werden in vorgestellten Studien in der Regel nur leicht detektierbare Modellsubstanzen für Grundlagenuntersuchungen verwendet. Dabei handelt es sich häufig um Fluoreszenzfarbstoffe, mit deren Hilfe bestimmte technische Aspekte untersucht werden. Die Verwendung von Fluoreszenzmessungen ist weit verbreitet, da es sich um eine einfache Methode handelt, die in vielen Laboren zur Verfügung steht. Die große Anzahl kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoffe bietet viele Möglichkeiten, Grundlagenuntersuchungen an mikrofluidischen Systemen durchzuführen. Gerade für Elektrophorese-Experimente sind Fluoreszenzmessungen interessant, da es sowohl elektrisch neutrale, als auch negativ und positiv geladene Farbstoffe gibt. Einerseits können Farbstoffe direkt als Analyten zur Elektrophorese verwendet werden, andererseits können andere Analyten fluoreszenzmarkiert werden.

Fluoreszenzmarkierung ist jedoch nicht immer gut geeignet. Problematisch ist das Markieren zum Beispiel, wenn komplexe Analytgemische vorliegen. Dabei muss für jeden zu detektierenden Stoff ein spezifisch bindender Fluoreszenzmarker zur Verfügung stehen. Diese Spezifität ist jedoch nicht immer gegeben, beispielsweise wenn der Farbstoff über eine chemische Gruppe bindet, über die mehrere der Analyten verfügen. Ein Nachteil von Markern bei der Elektrophorese ist, dass diese Einfluss auf die elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten haben. Experimentelle Parameter lassen sich daher nicht auf die gleichen Analyten in nicht-markierter Form übertragen. Marker können außerdem die biologischen und chemischen Eigenschaften der Analyten verändern und damit deren Funktion, beispielsweise in enzymatischen Reaktionen, beeinträchtigen.⁷⁰

Alternative Detektionsmethoden wie oberflächenverstärkte Ramanstreuung (SERS, englisch *surface enhanced Raman spectroscopy*) und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie)²⁹ sind nur begrenzt in mikrofluidischen Systemen einsetzbar. SERS wurde zwar bereits für μ FFE verwendet,³² problematisch dabei ist jedoch die geringe Selektivität, die hohe Nachweisgrenze, die schwierige Reproduzierbarkeit und der

anspruchsvolle Versuchsaufbau mit geeigneten Nanostrukturen.

Eine Alternative zur direkten Detektion der Analyten im Mikrochip stellt die Analyse der μ FFE-Trennung mit anderen Geräten dar. Eine möglichst nahtlose Kopplung bietet sich vor allem zur Reduzierung der Analysezeiten gegenüber einer nachträglichen Untersuchung gesammelter Proben an. Allerdings stellt die Kopplung von μ FFE mit anderen Systemen einige Anforderungen an den Versuchsaufbau. (i) Für einen kontinuierlichen Arbeitsablauf muss die Probe in einer für beide Systeme geeigneten Matrix vorliegen. Das heißt, Lösungsmittel, Konzentrationen und pH-Wert müssen abgestimmt sein. (ii) Die Volumenströme müssen kompatibel für die beteiligten Systeme sein. (iii) Es sollte sichergestellt werden, dass es nicht zur Interferenz elektrischer Felder kommt. Wegen dieser Anforderungen gibt es auch nur entsprechend wenige Publikationen zur Kopplung von μ FFE mit anderen Systemen. In den wenigen Veröffentlichungen, die zu dem Thema gefunden werden konnten, wurde μ FFE mit MS oder CE gekoppelt.^{33,59,71,72} Jedoch wurde dabei eine der größten Herausforderungen umgangen: die parallele Nutzung vieler Ausgänge und die Detektion von Analyten an allen oder zumindest mehreren der Ausgänge. Stattdessen wurde jeweils nur einer der zwei bis fünf Ausgänge mit dem nachfolgenden Analysegerät verbunden, was eine Analyse der Trennung nur in Näherung und auf indirektem Wege erlaubte.

Zur Untersuchung der Funktionalität der FFE-Chips in dieser Arbeit war die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen gut geeignet. Für das eigentliche Ziel, der kontinuierlichen Trennung von Enzymreaktionen, kam Fluoreszenzmarkierung aufgrund der Beeinträchtigung der Analyten bei dieser Methode jedoch nicht in Frage. Auch SERS und SPR-Spektroskopie waren wegen unzureichender Selektivität der Analyten keine Option. Also wurde mit CE-UV/Vis zunächst auf eine im Labor bereits etablierte Methode zur Offline-Analyse gesammelter μ FFE-Proben zurückgegriffen.

4.2 Materialien und Methoden

Analyten Bei den in diesem Kapitel verwendeten Analyten handelte es sich um Substanzen aus den Enzymreaktionen (siehe Abschnitt 1.2) und Fluorescein. Zur effizienten Entwicklung der Trennmethode kamen nicht alle Analyten bei der μ FFE-Trennung zum Einsatz. Das Probengemisch wurde stattdessen im Laufe der Arbeiten sukzessive um einzelne Analyten erweitert. Diese Herangehensweise wurde gewählt, da sich nicht nur die Trennmethode, sondern auch die verwendeten FFE-Chips in der Entwicklungsphase befanden. Eine zu große Fülle unbekannter Parameter, auch hinsichtlich der Analytik, sollte vermieden werden. In diesem Kapitel zum Einsatz kamen: Fluorescein, AMP (Adenosinmonophosphat), ADP (Adenosindiphosphat) und ATP.

4.3. VORUNTERSUCHUNGEN MIT CE

FFE Für die FFE-Trennexperimente wurden zu Beginn FFE-Chips auf PDMS-Basis, später auf PMMA-Basis verwendet. Als HGE kamen TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA) oder Hepes/BisTris zum Einsatz. TAE bestand aus 40 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)), 40 mM Essigsäure und 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetat) mit pH 7,4. Hepes/BisTris bestand aus 10 mM Hepes und 20 mM BisTris mit pH 7,0. In den Elektrodenreservoirs wurde PBS verwendet.

CE Die CE-Messungen in dieser Arbeit wurden gemeinsam mit Dominic Mähler und unter seiner Anleitung durchgeführt. Verwendet wurde dabei das CE-System *PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System* (Sciex) mit der entsprechenden Software *Karat 9.0*. Es wurden Quarzglas Kapillaren (Polymicro Technologies, USA) mit 50 μm Innendurchmesser, 360 μm Außendurchmesser und einer Länge von 60 cm verwendet. Als HGE wurde 50 mM NaH_2PO_4 verwendet. Die Kapillartemperatur betrug 20 °C. Proben wurden im Gerät bei maximal 7 °C gehalten. Vor jeder Messung wurde die Kapillare für 3 min mit HGE äquilibriert. Die Probeninjektion erfolgte hydrodynamisch für 5 s bei 2 kPa mit anschließender Injektion von Wasser für 3 s bei 2 kPa. Die Trennungsspannung betrug 30 kV mit einer Rampenzeit von 0,3 s. Die Gesamtlaufzeit je Probe betrug 18 min. Signale wurden bei 210 nm mit einem Diodenarray-Detektor detektiert. Die CE-Rohdaten wurden im ASCII-Format exportiert und Datensätze mit in der Software R (The R foundation for Statistical Computing, Version 3.5.3) geschriebenen Skripten extrahiert. Diese Daten (Intensitäten und Zeiten) wurden mit Origin 2018 (OriginLab Corporation) visualisiert.

4.3 Voruntersuchungen mit CE

Praktischer Teil Es sollte eine FFE-Methode entwickelt werden, um die Substanzen der Enzymreaktionen aufzutrennen und die Trennung zu charakterisieren. Dafür kamen nun die in Abschnitt 3 hergestellten funktionierenden FFE-Chips zur Anwendung. Mit CE-UV/Vis wurde zunächst auf eine etablierte Methode zurückgegriffen, die gleichzeitig Analytik und Referenz für die Trennung ist. Dies bot sich an, da die Trennprinzipien in flüssiger Matrix von CE und FFE gleich sind und Trennergebnisse damit zu einem bestimmten Grad übertragbar waren. Ein UV/Vis-Spektrometer war in dem kommerziellen CE-Gerät integriert und UV-Detektion für den Großteil der Analyten gut geeignet. Im ersten Schritt sollten die elektrophoretischen Mobilitäten der an den Enzymreaktionen beteiligten Substanzen relativ zueinander mit CE-UV/Vis ermittelt werden. Dazu wurden kommerziell erhältliche Einzelsubstanzen als Referenzsubstanzen verwendet. Das CE-Trennergebnis ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die einzelnen Substanzen konnten gut voneinander getrennt werden. Damit wurden die Mobilitäten relativ zueinander ermittelt. Zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf μFFE fehlte allerdings noch ein Anhaltspunkt, um die Trennparameter (Trennungsspannung, Flüsse) zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde

KAPITEL 4. FFE MIT CE-ANALYSE

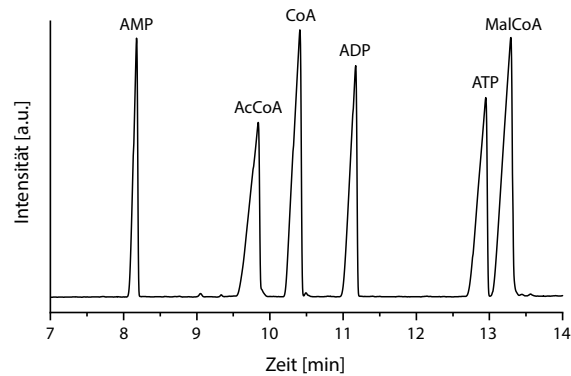


Abbildung 4.1: CE-Elektropherogramm der Analyten der Enzymreaktionen. Die Probe für die Trennung bestand aus 1 mM AMP, Acetyl-CoA, CoA, ADP, ATP und Malonyl-CoA. Die Migrationszeiten (x -Achse) der Analyten geben Aufschluss über deren elektrophoretische Mobilitäten.

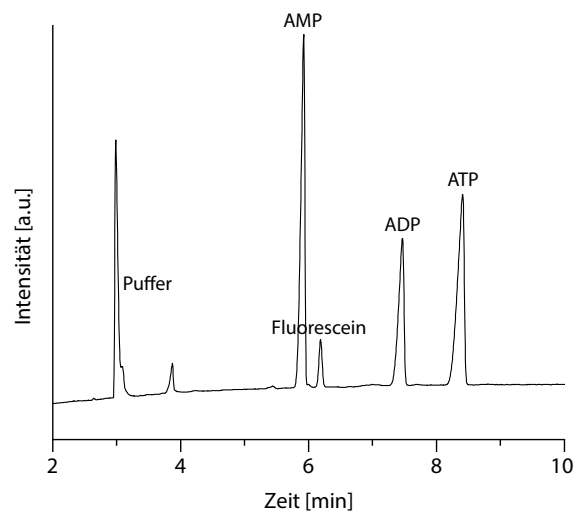


Abbildung 4.2: Elektropherogramm der Analyten AMP, ADP und ATP zusammen mit der Referenzsubstanz Fluorescein. Die elektrophoretische Mobilität von Fluorescein liegt zwischen den Mobilitäten der anderen Analyten.

eine weitere CE-UV/Vis-Messung durchgeführt. Dabei wurde der in der μ FFE etablierte Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein gemeinsam mit AMP, ADP und ATP gemessen, um dessen elektrophoretische Mobilität relativ zu den anderen Analyten zu bestimmen. Die Idee war, Fluorescein für zukünftige Trennungen in μ FFE als Referenz für die nicht-sichtbaren Analyten zu nutzen. Die Ergebnisse der CE-Messung sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Die elektrophoretische Mobilität von Fluorescein liegt zwischen AMP und ADP. Aufgrund der Ähnlichkeit der elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten war Fluorescein gut zur Orientierung dieser Analyten in der μ FFE geeignet.

4.4. μ FFE-TRENNUNG UND ANALYSE MIT μ FFE-CE

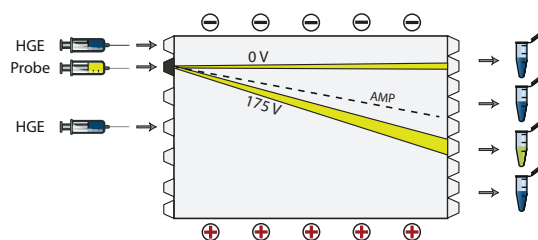


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der μ FFE-Trennung mit Fluorescein als optischer Referenz. Die Probe, bestehend aus AMP und Fluorescein, wird auf der linken Seite injiziert und auf dem Weg durch die Trennkammer einem elektrischen Feld ausgesetzt. Gelb dargestellt sind die mit Fluoreszenz sichtbaren Banden des Fluoresceins ohne Trennungsspannung (0 V) und bei 175 V. Fluorescein dient hier als Orientierung für die Ablenkung des nicht sichtbaren AMPs. Die bei 175 V erwartete ungefähre Position des AMP ist als gestrichelte Linie eingezeichnet.

4.4 μ FFE-Trennung und Analyse mit μ FFE-CE

4.4.1 μ FFE von AMP & Fluorescein

Mit Fluorescein als optischer Referenz wurden nun erste Experimente zum Verhalten der Analyten in der μ FFE durchgeführt. Der erste Analyt der Enzymreaktionen, der verwendet wurde, war AMP. Es wurde eine Probe aus AMP (500 μ M) und Fluorescein (100 μ M) in einem PDMS-FFE-Chip im elektrischen Feld abgelenkt. Durch Variation der Trennungsspannung konnte die Position der sichtbaren Fluoresceinspur gesteuert werden. Aufgrund des zuvor gemessenen CE-Elektropherogramms (Abbildung 4.2) war die Erwartung, dass AMP weniger weit abgelenkt wird als Fluorescein. Das Prinzip der μ FFE-Trennung mit Fluorescein als optischer Referenz ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt. An den μ FFE-Ausgängen wurden Proben in Mikroreaktionsgefäßen für die anschließende Analyse mit CE-UV/Vis gesammelt. Bei einer Trennungsspannung von 175 V wurde Fluorescein auf Ausgang A6 abgelenkt. Die Ergebnisse der CE-Messung, dargestellt in Abbildung 4.4, zeigen, dass Fluorescein, wie auch AMP, sowohl an A5 als auch an A6 zu finden war. Die Analyten konnten mit den verwendeten Parametern nicht vollständig voneinander getrennt werden. Entweder war die Trennkraft nicht groß genug oder die Bandenpositionen hatten sich während des 25-minütigen Sammelns verändert. Auch verbreiterte, nicht auf einen Ausgang fokussierte Banden könnten zu dem Ergebnis beigesteuert haben. Wie das Elektropherogramm zeigt, liegen AMP und Fluorescein jedoch auch elektrophoretisch sehr nah beieinander, was die Trennung in FFE mit der durch die Anzahl an Ausgängen begrenzten Auflösung schwierig macht.

Die FFE-Trennung von AMP und Fluorescein war zwar nicht erfolgreich, aber die Positionierung der AMP-Spur mit Fluorescein als Referenz funktionierte wie erhofft.

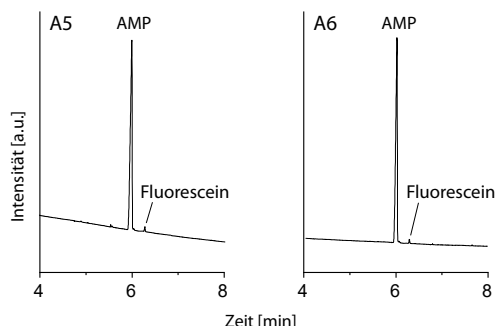


Abbildung 4.4: Elektropherogramme der FFE-Trennung von AMP und Fluorescein. μ FFE-Ausgang 5 (links) und 6 (rechts) zeigen beide einen deutlichen AMP-Peak und einen kleinen Fluorescein-Peak.

4.4.2 μ FFE von AMP, ADP, ATP & Fluorescein

In darauf aufbauenden μ FFE-Experimenten wurden zusätzlich zu Fluorescein und AMP nun auch ADP und ATP der Probe hinzugefügt (4-Mix). Da ADP und ATP den Ergebnissen der CE-Trennungen zufolge elektrophoretisch weiter auseinander liegen als Fluorescein und AMP, waren hier bessere Trennergebnisse zu erwarten. Zum Einsatz kamen diesmal die inzwischen entwickelten robusteren PMMA-Chips. Neben HEPES/BisTris wurde auch TAE als HGE untersucht. In einem Experiment zum Vergleich beider HGE wurde zur Trennung ein $500 \mu\text{M}$ 4-Mix verwendet. Die Fluoresceinspur half dabei, die Trennungsspannung so zu wählen, dass möglichst die gesamte Breite der Trennkammer genutzt wurde. Die μ FFE-Trennung mit Fluorescein als optischer Referenz und dem CE-Elektropherogramm der Analyten zum Vergleich ist schematisch in Abbildung 4.5 dargestellt. An allen 7 Ausgängen wurde Fraktionen über 25 min in Mikroreaktionsgefäßen für die spätere CE-Analyse gesammelt. Die Ergebnisse der Trennung und Analyse des 4-Mixes mit CE-UV/Vis sind in den Elektropherogrammen in Abbildung 4.6 dargestellt. Bei der CE-Messung wurde neben den Proben der verschiedenen Ausgänge eine Referenzprobe gemessen. Diese enthielt die vier Analyten AMP, ADP, ATP und Fluorescein zu je $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Die Referenzmessung diente als Anhaltspunkt, um die Peaks in den Elektropherogrammen der FFE-Proben den Analyten zuzuordnen. So ließ sich feststellen, welche Analyten während des 25-minütigen Sammelns aus den jeweiligen Ausgängen kamen.

Bei der Verwendung von HEPES/BisTris als HGE kam Fluorescein ohne Trennungsspannung aus A1 und wurde bei 125 V auf A4 gelenkt. AMP, ADP und ATP wurden ohne Trennungsspannung ebenfalls auf A1 und bei 125 V auf A3 bis A7 abgelenkt. Sehr kleine Peaks im Elektropherogramm für A3 deuten auf Spuren von AMP und Fluorescein an diesem Ausgang hin. Der Großteil beider Analyten war aber an A4 zu finden. ADP wurde auf

4.4. μ FFE-TRENNUNG UND ANALYSE MIT μ FFE-CE

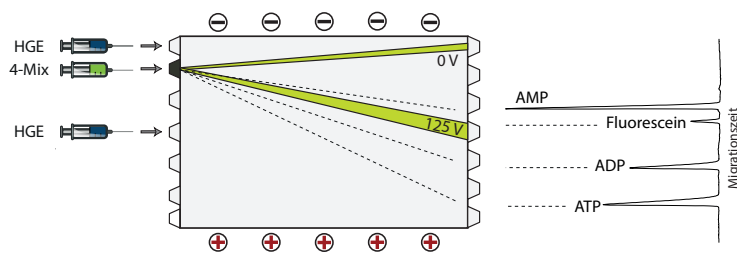


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der μ FFE-Trennung mit Fluorescein als optische Referenz. Zum Vergleich ist rechts daneben das CE-Elektropherogramm der Referenzmessung des 4-Mix dargestellt. In der μ FFE wird der 4-Mix auf der linken Seite injiziert und bei 125 V Spannung aufgetrennt. Das optisch aktive Fluorescein, das als Orientierung für die Ablenkung der nicht sichtbaren Analyten dient, ist als grüne Spur dargestellt. Die erwarteten ungefähren Bandenpositionen der nicht sichtbaren Analyten sind als gestrichelte Linien dargestellt.

A5 und A6 abgelenkt, ATP auf A6 und A7.

Mit TAE als HGE wurden die Analyten maximal auf A5 abgelenkt. An A3 war bereits der Großteil von AMP und Fluorescein. A4 enthielt alle Analyten und an A5 war ATP, neben einem geringen Anteil von ADP, zu finden. Beim Vergleich der beiden HGE fällt auf, dass die elektrophoretische Migration in Hepes/BisTris stärker war als in TAE. Unterschiede äußerten sich auch im elektrischen Strom: bei gleicher Trennungsspannung betrug der Strom in Hepes/BisTris 3,5 mA und in TAE 6,5 mA.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass eine Trennung in μ FFE stattgefunden hat, die in der Tendenz den Erwartungen entsprach. In Übereinstimmung mit den vorher gemessenen CE-Elektropherogrammen des Probengemischs wurde ATP am weitesten abgelenkt, dazwischen lag ADP, während AMP und Fluorescein am wenigsten migrierten. Bei den Adenosinphosphaten lässt sich diese Tendenz auf die jeweilige Anzahl der (negativ geladenen) Phosphatgruppen zurückführen. Es zeigte sich jedoch, dass es bei der Trennung teilweise zu Überlappungen der verschiedenen Analyten an den μ FFE-Ausgängen kam. Begründen lässt sich dies zunächst einmal mit der geringen Anzahl an Ausgängen, die die Auflösung der Trennung begrenzt. Ein weiterer Grund ist die Verbreiterung der Banden, die dafür sorgen kann, dass sich ein Analyt auf mehrere Ausgänge verteilt. Ein weiterer Faktor ist, dass es trotz des optischen Markers nicht auszuschließen war, dass die Trennung über die Dauer des Experiments instabil war, das heißt die Banden sich verschoben. Mögliche Gründe für eine Verschiebung könnten Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit durch Gasentwicklung an den Elektroden oder pH-Änderungen durch Elektrolyse sein. Eine erhöhte Anzahl an μ FFE-Ausgängen würde eine Verbesserung bringen, da sich dann die Wahrscheinlichkeit dafür erhöhen würde, dass zwei in

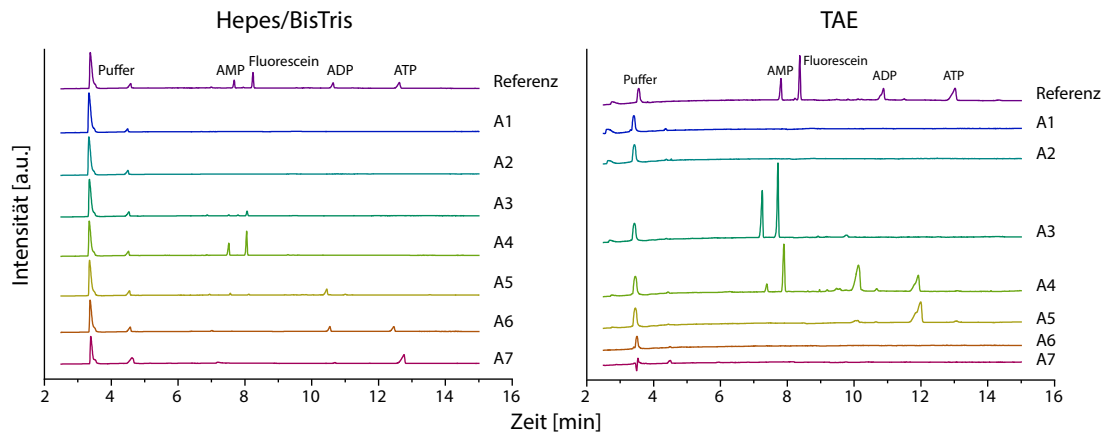


Abbildung 4.6: CE-Elektropherogramme der FFE-Trennungen des 4-Mixes. Zur Trennung eines Gemischs aus AMP, ADP, ATP und Fluorescein wurde in μ FFE einmal Hepes/BisTris (links) und einmal TAE (rechts) als HGE verwendet. Die FFE-Trennbedingungen waren ansonsten identisch. Dargestellt ist jeweils eine Referenzprobe (oben), die alle vier untersuchten Analyten enthält ($50 \mu\text{M}$) und die Proben der sieben μ FFE-Ausgänge (A1-A7). Hepes/BisTris: A1 und A2 enthalten keine sichtbaren Peaks. In A3 sind die ersten (kleinen) Analytpeaks zu sehen, die sich durch den Vergleich mit der Referenz AMP und Fluorescein zuordnen lassen. A4 enthält beide Analyten in höherer Konzentration, während an A5 ein ADP-Peak zu sehen ist. A6 enthält ebenfalls ADP und dazu ATP, was ebenfalls an A7 vorhanden ist. TAE: Hier befinden sich bereits deutliche Peaks von AMP und Fluorescein an A3. A4 enthält alle vier Analyten, A5 überwiegend ATP. In A6 und A7 sind, im Unterschied zur Trennung mit Hepes/BisTris, keine Analyten zu finden.

der Trennkammer getrennte Analyten nicht gemeinsam aus einem Ausgang kommen. Demnach würde die Trennschärfe des Systems erhöht. Durch Erhöhung der Anzahl an Ausgängen würde der Volumenstrom an den einzelnen Ausgängen geringer werden (bei Beibehaltung des Gesamtvolumenstroms). Dies würde zwar die Sammelzeit für die Offline-Analyse erhöhen, hinsichtlich der angestrebten kontinuierlichen Trennung als Teil des Mehrstufenreaktors wäre dies jedoch unerheblich. Da die Experimente zeigten, dass die verwendeten HGE einen großen Einfluss auf die Verbreiterung der Banden haben, könnte auch eine Optimierung des Puffersystems zu Verbesserungen führen. Zur Verbesserung der Trennstärke kann auch die Elektrolytkonzentration reduziert oder die Trennungsspannung erhöht werden. Beides ist jedoch durch bestimmte Faktoren limitiert. Die Trennungsspannung kann nicht beliebig erhöht werden, da ab einem bestimmten Punkt die Gasentwicklung an den Elektroden durch Elektrolyse des Wassers zu groß wird. Eine Verringerung der Elektrolytkonzentration wiederum reduziert die pH-Pufferwirkung und kann zu elektrohydrodynamischer Verbreiterung der Banden führen.

4.5 Fazit

Bei den Experimenten wurden die Schwierigkeiten der Trennung in μ FFE zum einen und der nachträglichen Analyse mit CE-UV/Vis zum anderen deutlich. Eine vollständige Auftrennung der Analyten AMP, ADP und ATP in der μ FFE konnte mit dem gewählten Aufbau nicht realisiert werden, was vor allem auf die zu geringe Anzahl der verwendeten μ FFE-Ausgänge und fehlendes Feintuning der Parameter zurückzuführen war. Eine Erhöhung der Anzahl an μ FFE-Ausgängen wäre die naheliegende Möglichkeit zur Verbesserung der Auflösung. Mehr Ausgänge bedeuten jedoch mehr Arbeit bei der nachträglichen Analyse mit CE-UV/Vis, die bereits bei 9 Ausgängen aufwändig und zeitintensiv war.

Ein Feintuning der Trennparameter war schwierig, da die exakte Wiederholbarkeit der μ FFE-Trennungen (von einem Tag auf den anderen) nicht gegeben war. Dies war wohl überwiegend auf lokale Temperaturunterschiede und angesammelte Gasblasen in den Durchgängen zwischen den Elektrodenreservoirs und der Trennkammer zurückzuführen. Zur Vereinfachung der Analytik wäre die direkte Kombination von μ FFE mit UV/Vis denkbar. Problematisch dabei wäre jedoch, dass für die Zuordnung der UV/Vis-Signale zu den Analyten jeweils Referenzmessungen der Reinsubstanzen im FFE-Chip notwendig wären. Dies ist zwar bei CE-UV/Vis nicht anders, jedoch handelt es sich dabei um eine etablierte, reproduzierbare Methode in einem kommerziell vertriebenen Gerät. Der FFE-Chip sowie die μ FFE-Trennmethode hingegen befinden sich noch im Entwicklungsstadium und die Reproduzierbarkeit der Ablenkung ist aufgrund zahlreicher Unwägbarkeiten des manuell gefertigten Chips und der fehlenden Möglichkeit zur gründlichen Reinigung nicht gewährleistet. Deshalb wären Referenzmessungen mit μ FFE wenig aussagekräftig. Als

KAPITEL 4. FFE MIT CE-ANALYSE

Alternative zur Analytik der Trennung wurde daher mit Experimenten zur Kopplung von μ FFE mit einem Massenspektrometer begonnen.

5 Online-Analyse der FFE-Trennung mit Massenspektrometrie

5.1 Einführung

Die analytischen Möglichkeiten der Massenspektrometrie übertreffen die der meisten anderen Methoden. Eine entscheidende Eigenschaft, die die Kopplung von μ FFE mit ESI-MS zur Analyse der FFE-Trennung so interessant machte, ist das kontinuierliche Arbeitsprinzip beider Systeme. Die μ FFE liefert einen dauerhaften Probenstrom in wässriger Elektrolytlösung und für ESI-MS wird ebenfalls eine Probe in Elektrolytlösung mit vergleichbaren Volumenströmen kontinuierlich injiziert und analysiert. Diese Kontinuität des Arbeitsablaufs ist ein wesentlicher Unterschied zum CE-Prinzip. Ein analytischer Vorteil von MS gegenüber CE-UV/Vis ist die hohe Spezifität. Während für CE-UV/Vis Standards als Referenz für die Laufzeit benötigt werden, können mit MS Molekülmassen auf mehrere Nachkommastellen genau bestimmt und damit auch unbekannte Substanzen analysiert werden. Verglichen mit GC-MS und LC-MS ist die Kopplung von FFE und MS jedoch nicht ganz trivial. Eine große Herausforderung ist es, die an den μ FFE-Ausgängen örtlich getrennten Analyten dem Massenspektrometer sequenziell, zeitnah und ohne Beeinträchtigung der Flüsse im Mikrochip bereitzustellen. In zuvor veröffentlichten Studien zur Kopplung von μ FFE und MS war jeweils nur ein μ FFE-Ausgang mit dem Massenspektrometer verbunden.^{33,59,71} Elektrophoretisch getrennte Fraktionen wurden durch Variation der Injektionsvolumenströme der HGE sukzessive auf diesen Ausgang gelenkt. Dieses Prinzip ist in Abb. 5.1 dargestellt. Chartogne et al.⁷¹ nutzten μ FFE zwischen CE und Massenspektrometer, um Trägerampholyten aus dem CE-Effluent zu entfernen, damit eine Messung mit MS möglich war. Dabei wurde die CE-Probe direkt über die CE-Trennkapillare in den FFE-Chip injiziert, aufgetrennt und einer der FFE-Ausgänge über eine Quarzglas Kapillare mit der ESI-Quelle des Massenspektrometers verbunden. Auch Park et al.³³ verwendeten eine Quarzglas Kapillare zur Verbindung eines FFE-Ausgangs mit der ESI-Quelle des Massenspektrometers. Hier wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe mit FFITP fokussiert und die Probe im Massenspektrometer analysiert. Der Aufbau sollte der Probenaufreinigung vor einer MS-Analyse dienen. Benz et al.⁵⁹ integrierten einen Elektrosprayemitter in den μ FFE-Chip, der dann unmittelbar vor dem Massenspektrometer positioniert war. Dadurch konnte die Totzeit zwischen der Trennkammer und dem

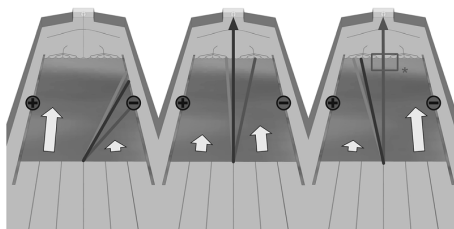


Abbildung 5.1: Prinzip der Variation der Volumenströme des HGE in μ FFE. Die weißen Pfeile repräsentieren den Volumenstrom des HGE bei Injektion an entsprechender Position im Trennbett. Durch kontinuierliche Änderung der Volumenströme wird der Probenstrom lateral abgelenkt und die elektrophoretischen Banden passieren den Ausgang, der mit dem Massenspektrometer verbunden ist (zentral oben), sukzessive. Abbildung entnommen aus.⁵⁹

Eingang des Geräts minimiert werden. Die Verbindung nur eines FFE-Ausgangs zum Massenspektrometer hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass die Volumenströme im Chip, nach dem erwähnten Prinzip, im laufenden Betrieb kontinuierlich geändert werden müssen, um mehrere Banden messen zu können. Damit lassen sich die Bandenpositionen nur abschätzen und nicht eindeutig bestimmen. Außerdem kann diese Abschätzung erst nach Auswertung der Messdaten unter Berücksichtigung der zeitlich variablen Flussratenänderungen erfolgen, was großen Aufwand bedeutet und keine gesicherten Ergebnisse über alle Positionen der Probenströme zu einem bestimmten Zeitpunkt liefert. Daher sollte in dieser Arbeit ein Messaufbau entwickelt werden, der die Analyse aller μ FFE-Ausgänge mit MS erlaubt, ohne die Fließbedingungen im Chip ändern zu müssen. Dabei gab es zwei Hauptprobleme.

(i) Es ist schwierig, gleiche Volumenströme an den parallelen μ FFE-Ausgängen zu gewährleisten, wenn Probe und HGE an den Eingängen des FFE-Chips, wie bei μ FFE üblich, mittels Pumpen injiziert wird. Homogene Volumenströme an den verschiedenen Ausgängen sind jedoch notwendig, um auch in der FFE-Trennkammer homogene Flüsse zu erzielen. Denn nur dann können die Probenströme kontrolliert und reproduzierbar getrennt werden. Der Grund für die Schwierigkeit ist, dass durch die Abhängigkeit des hydrodynamischen Widerstands von der vierten Potenz des Radius eines durchflossenen Kanals bereits kleine Fehler oder Ungenauigkeiten bei der Fertigung zu signifikanten Unterschieden des hydrodynamischen Widerstands und damit der Volumenströme führen (siehe Abschnitt 2.1.3). Bei der Konstruktion der Schnittstellen muss daher sichergestellt werden, dass alle Ausgänge den gleichen hydrodynamischen Widerstand aufweisen. Unterschiede entstehen aber insbesondere bei der Konnektierung von Schläuchen oder Kapillaren. Bei der Verwendung von Kapillaren können aufgrund der geringen Innendurchmesser bereits Mikropartikel, die aus der Luft in die Flüssigkeit gelangen oder eingetrocknete Rückstände den Fluss durch einen Kanal vollständig blockieren. Die

Gewährleistung homogener Flüsse wird mit steigender Anzahl an Ausgängen zunehmend schwieriger. In vielen der publizierten Studien zu μ FFE werden zwar mehrere Ausgangskanäle für die Trennkammer verwendet, diese werden jedoch häufig zur Vereinfachung noch im Chip mittels kleiner Kanäle zu einem oder wenigen Chip-Ausgängen vereint, die die Schnittstellen zur Außenwelt darstellen.^{46,73} Die Wichtigkeit einer großen Anzahl und Nutzung von Ausgängen wird in Studien zu μ FFE kaum thematisiert, da in der Regel nur bestimmte technische Aspekte in Proof-of-Principle-Experimenten untersucht werden und eine tatsächlich Anwendung nicht im Fokus steht. Für die meisten denkbaren Anwendungen ist es jedoch von großer Wichtigkeit, die Zahl der Ausgänge zu maximieren, da dies entscheidend für die Auflösung der elektrophoretischen Trennung ist.

(ii) Das zweite Hauptproblem bei der Kopplung von μ FFE und MS stellt die potentiell entstehende elektrisch leitende Verbindung zwischen Spannungsquellen dar, die voneinander getrennt sein sollten: zum einen die Hochspannung, die an der Emitterkapillare der ESI-Quelle anliegt, zum anderen die Trennungsspannung im FFE-Chip. Werden μ FFE-Ausgänge mit der ESI-Quelle verbunden, sind diese durch die Elektrolytlösung auch elektrisch leitend verbunden und eine gegenseitige Beeinflussung der elektrischen Felder ist zu erwarten. Dadurch könnte sowohl die Bildung des Elektrosprays als auch die FFE-Trennung beeinträchtigt werden. In der Literatur werden einige wenige Gegenmaßnahmen zur Reduzierung der Leitfähigkeit zwischen ESI-Sonde und FFE genannt. Beispielsweise erhöht die Verwendung einer Emitterkapillare aus Quarzglas den elektrischen Widerstand signifikant gegenüber den häufig verwendeten stark leitenden Stahlemittlern. Zusätzlich kann die Öffnung der Kapillare ein Stück, beispielsweise 1 mm, von der ESI-Sonde (an der das Potential anliegt) entfernt positioniert werden, damit der Flüssigkeitsfilm nicht direkt elektrisch kontaktiert wird.⁷⁴ Eine Kombination aus wenig leitfähiger Elektrolytlösung und einer Quarzglaskapillare geringen Durchmessers (= hoher elektrischer Widerstand) scheint eine elektrische Entkopplung auch ohne weitere Maßnahmen weitestgehend zu gewährleisten.^{33,71} Zumindest wurde dieses Problem in den entsprechenden Studien nicht erörtert. Es gibt auch Massenspektrometer, bei denen das Potential am Eingang des Massenspektrometers und die Emitterkapillare auf Masse liegt, was beispielsweise für CE-MS notwendig ist. Dadurch ist zumindest die Hochspannung der ESI-Quelle elektrisch von der μ FFE entkoppelt. Der μ FFE-Chip ist dann nur noch mit einer zusätzlichen Masse verbunden, was eine geringere Potentialdifferenz darstellt, als die Verbindung zu einer Hochspannungsquelle. Da ein Massenspektrometer dieser Art zur Verfügung stand, schien das Problem interferierender elektrischer Felder, unter Berücksichtigung der in der Literatur genannten Maßnahmen für den Versuchsaufbau, nicht so gravierend. Der Fokus lag daher zunächst auf der Lösung von Problem (i).

5.2 Pumpensysteme für μ FFE

Da mit dem FFE-Chip letztlich ein Gemisch von mehr als 5 verschiedenen Substanzen aufgetrennt werden sollte, war es für eine saubere Trennung wichtig, viele FFE-Ausgänge nutzen zu können. Um dennoch homogene Volumenströme an den Ausgängen zu gewährleisten, wurde neben dem Chipdesign und anderen technischen Aspekten des Versuchsaufbaus ein besonderes Augenmerk auf die verwendeten Pumpen gelegt werden.

5.2.1 Spritzenpumpe

In den ersten μ FFE-Experimenten dieser Arbeit wurden, wie bei μ FFE üblich,^{43,46,48} Probe und HGE mit Spritzenpumpen an den μ FFE-Eingängen injiziert und damit der Fluss durch den Mikrochip angetrieben. Dabei gab es einige Schwierigkeiten, homogene Flüsse an den Ausgängen zu gewährleisten. Es zeigte sich, dass eine starke Erhöhung der hydrodynamischen Widerstände an den Ausgängen, beispielsweise durch die Konnektierung an dünne Kapillaren wie der Emitterkapillare für ESI-MS, dazu führten, dass der Fluss durch einzelne Kanäle teilweise vollständig stoppte. Zur Optimierung und Überprüfung der Funktionalität des Mikrofluidikchips wurden Experimente mit Fluoreszenzfarbstoffen (nicht mit MS gekoppelt) durchgeführt. Dabei wurde ein selbstregulierendes Prinzip verwendet (dargestellt in Abb. 5.2), um Unterschiede der hydrodynamischen Widerstände der Ausgänge anzugleichen: Pipettenspitzen wurden mit den Spitzen nach unten in die μ FFE-Ausgänge gesteckt, die sich dann im Betrieb über die Zeit füllten. Ein ungleicher Anstieg der Füllstände in den Pipetten wird dabei durch den veränderten schwerkraftbedingten Gegendruck kompensiert wodurch sich die Volumenströme entsprechend anpassen. Die Flüsse konnten so weitestgehend angeglichen werden. Diese Methode ist jedoch nur bedingt für die Kopplung mit MS geeignet. Es wäre zwar möglich, aus den Pipettenspitzen Proben zum Massenspektrometer zu pumpen, eine zeitlich hochauflösende Analyse wäre jedoch aufgrund der Vermischung in den Reservoirs nicht zu realisieren.

5.2.2 Peristaltikpumpe

Aufgrund dieser Limitationen durch die Verwendung von Spritzenpumpen sollten die Möglichkeiten zur Nutzung einer Peristaltikpumpe untersucht werden. In der Literatur gibt es nur wenige Berichte zur Kombination von Peristaltikpumpe und μ FFE, was vermutlich auf die vergleichsweise hohe Pulsation der Peristaltikpumpen zurückzuführen ist, die die von Spritzenpumpen und Druckreglern übersteigt. Bei der Verwendung einer Peristaltikpumpe an den Chip-Ausgängen besteht eine Schwierigkeit darin, die Zuflüsse an den Chip-Eingängen mit den Volumenströmen, die die Peristaltikpumpe an den Ausgängen erzeugt, abzustimmen. Dies ist notwendig, damit sich keine Über- oder Unterdrücke aufbauen, die zu Undichtigkeiten oder Deformationen der Trennkammer

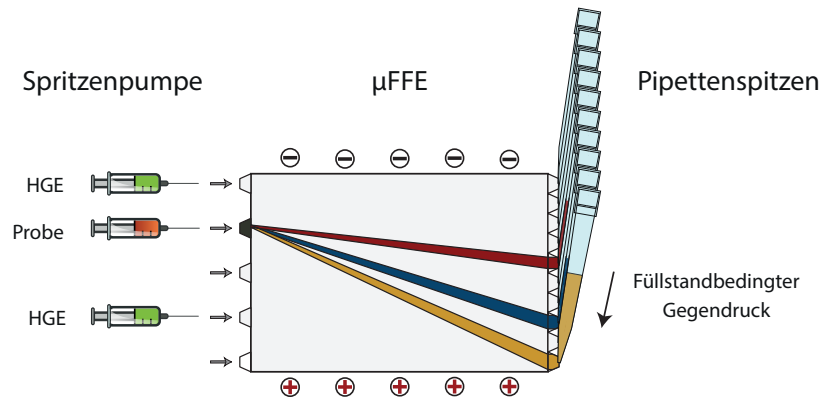


Abbildung 5.2: Pipettenspitzen für Angleichungen der Volumenströme durch Füllhöhe. Probeninjektion sowie der Antrieb des druckgetriebenen Flusses werden hier durch Spritzenpumpen an den μ FFE-Eingängen erzeugt (links). An den Ausgängen sammelt sich Flüssigkeit in Pipettenspitzen. Durch den füllhöhenbedingten Gegendruck in den Pipettenspitzen werden Ungleichmäßigkeiten der Volumenströme an den Ausgängen über die Zeit ausgeglichen.

führen könnten. Kobayashi et al.⁷⁵ nutzten beispielsweise eine Peristaltikpumpe für FFE in einem komplizierten Versuchsaufbau, in dem diverse Ventile, Reservoirs und andere Bauteile genutzt wurden, um ein Gleichgewicht zwischen Zu- und Ausfluss in dem Chip herzustellen und einen homogenen Fluss im Trennbett zu gewährleisten.

Für diese Arbeiten sollte jedoch ein weniger komplexes System entwickelt werden, um eine funktionelle Kopplung von μ FFE und MS unter Verwendung einer Peristaltikpumpe (Ismatec IPC-N ISM939D, Cole-Parmer, USA) zu realisieren. Daher wurden verschiedene Pumpenanordnungen untersucht. Drei verschiedene Pumpensysteme wurden dafür in Verbindung mit einem FFE-Chip mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein) getestet und miteinander verglichen. Für das erste Experiment wurde sowohl die Probe als auch der HGE mit einer Spritzenpumpe (neMESYS B002-01, Cetoni, Korbussen, DE) an den Eingängen des FFE-Chips injiziert. Beim zweiten Experiment erfolgte der Hauptantrieb des druckgetriebenen Flusses durch eine Peristaltikpumpe, die mit den FFE-Ausgängen verbunden war. Die Peristaltikpumpe gab den Gesamtvolumenstrom vor. Probe und HGE wurden ebenfalls mit einer Peristaltikpumpe an den Eingängen injiziert und durch den passiven Zufluss von HGE an weiteren Eingängen ergänzt. Für den passiven Zufluss wurden die jeweiligen Eingänge über Schläuche mit HGE-Reservoirs (50 ml Zentrifugenröhrchen) verbunden. Dieser Zufluss war angetrieben durch den Sog der Peristaltikpumpe an den Ausgängen und sorgte dafür, dass Zu- und Ausflüsse im Gleichgewicht waren. Beim dritten Experiment war wieder eine Peristaltikpumpe als Hauptantrieb für den druckgetriebenen Fluss mit den Ausgängen verbunden. Die Probe wurde jedoch diesmal mit einer

Spritzenpumpe an einem Eingang injiziert. Zur Kontrolle der Position des Probenstroms wurden außerdem Teile des HGE an einem der Eingänge mit einer Spritzenpumpe zugeführt. Durch Variation des Volumenstroms an diesem Eingang konnte so der Probenstrom kontrolliert abgelenkt werden, ohne den Gesamtvolumenstrom zu verändern. Der restliche HGE strömte passiv aus Reservoirs ein. Abbildung 5.3 stellt die Ergebnisse der drei Experimente dar. Die Pulsation des Probenstroms unter Verwendung der verschiedenen Pumpensysteme wurde mit Hilfe von Videoaufzeichnungen analysiert. Dabei wurde jeweils eine Probe aus Fluorescein zentral in den Mikrochip injiziert, hindurchgepumpt und die Pulsation an einer definierten Stelle beobachtet. Die Aufnahme in (A) zeigt den Fluss der Fluoresceinprobe durch die FFE-Trennkammer. Die rote Linie markiert die Stelle, an der bei Videoaufnahmen der Probenstrom des Fluoresceins in den drei verschiedenen Experimenten (B, C, D) untersucht wurde. Dafür wurden die Pixel eines jeden Einzelbildes entlang dieser Linie aufgenommen und zusammengefügt über die Zeit dargestellt. Bei der ausschließlichen Verwendung von Spritzenpumpen (B) war die Pulsation entlang der markierten Linie gering. Die Nutzung einer Peristaltikpumpe sowohl an den FFE-Ausgängen als auch zur Injektion der Probe (C) führte zu starken Schwankungen. Die Kombination aus Peristaltikpumpe an den FFE-Ausgängen und der Injektion von Probe mit einer Spritzenpumpe (D) bewirkte ähnlich geringe Schwankungen wie bei (B). Mit dieser Pumpenanordnung konnten also sowohl die Vorteile der Spritzenpumpe, das heißt geringe Pulsation und gute Kontrolle über den Volumenstrom der Probe, als auch die Vorteile der Peristaltikpumpe, das heißt gleiche Volumenströme an mehreren Ausgängen, genutzt werden. Daher wurde dieser Versuchsaufbau, dargestellt in Abbildung 5.4, für nachfolgende μ FFE-MS-Experimente verwendet. Da die Peristaltikpumpe aufgrund ihres Arbeitsprinzips, bei dem der Schlauch zur Beförderung des Fluids zu jedem Zeitpunkt an einer Stelle gequetscht ist, für eine elektrische Entkopplung von FFE-Chip und der ESI-Quelle des Massenspektrometers sorgt, wurde mit dieser Anordnung der Pumpen nicht nur das Problem der homogenen Flüsse an den FFE-Ausgängen, sondern auch gleichzeitig das potentielle Problem interferierender elektrischer Felder gelöst. Mit diesen Erkenntnissen wurde nun mit der MS-Analytik hinsichtlich der μ FFE-MS-Kopplung begonnen.

5.3 μ FFE-MS-Methodenentwicklung

5.3.1 Hintergrundelektrolyten für μ FFE-MS

Mit dem entwickelten funktionierenden, langzeitstabilen und robusten FFE-Chip aus PMMA sowie einem zuverlässigen Pumpensystem, das gleiche Flüsse an den Ausgängen gewährleisten konnte, nun die Kopplung des Mikrochips mit MS angegangen werden. Dafür musste zunächst ein geeignetes Elektrolyten-System, bestehend aus einem FFE-HGE

5.3. μ FFE-MS-METHODENENTWICKLUNG

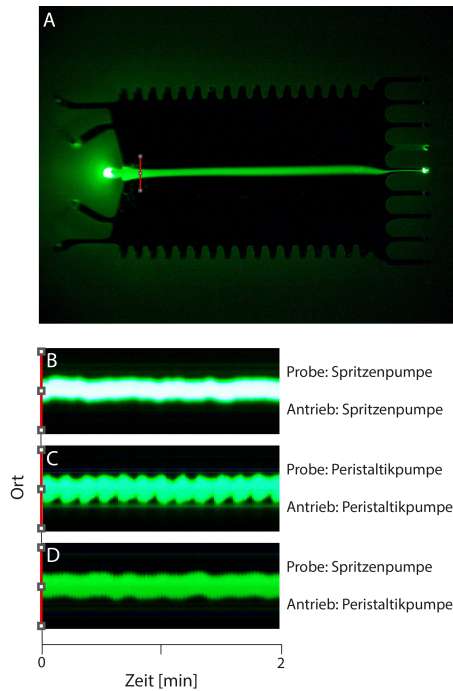


Abbildung 5.3: Pulsation des Probenstroms bei verschiedenen Pumpsystemen. **A** Foto der Trennkammer mit fluoreszierendem Probenstrom. Eine 1 mM Fluoresceinlösung und HGE fließen von links nach recht durch die FFE-Trennkammer. Entlang der eingefügten roten Linie wurde während 2-minütiger Videoaufnahmen die Pulsation des Probenstroms bei verschiedenen Pumpsystemen beobachtet. Dafür wurden die Pixel eines jeden Einzelbildes entlang der Linie aufgenommen, zusammengefügt und über die Zeit dargestellt. Die Ergebnisse von drei Aufnahmen mit jeweils unterschiedlichen Pumpenanordnungen sind in B, C und D dargestellt. **B** Der 'klassische' Aufbau bei μ FFE mit Spritzenpumpen. Probe und HGE werden an den Eingängen injiziert und fließen an den Ausgängen (rechts) hinaus. Die Pulsation, das heißt die Veränderung der Breite des Probenstroms über die Zeit, war gering. **C** Eine Peristaltikpumpe wurde verbunden mit den Ausgängen als Hauptantrieb verwendet. Die Probe und HGE wurden ebenfalls per Peristaltikpumpe injiziert. Um Zu- und Ausflüsse im Gleichgewicht zu halten, strömte HGE zusätzlich passiv über die beiden äußeren Eingänge ein. Die Pulsation des Probenstroms durch die Injektion mit der Peristaltikpumpe ist deutlich zu sehen. **D** Der druckgetriebene Fluss wurde ebenfalls durch eine Peristaltikpumpe, verbunden mit den Ausgängen, erzeugt. Im Unterschied zu C wurde jedoch die Probe per Spritzenpumpe, die eine deutlich geringere Pulsation aufweist, injiziert. Zusätzlich wurde ein Teil des HGE durch die angrenzenden Eingänge per Spritzenpumpe injiziert, um die Position des Probenstroms durch Einstellen der Volumenströme steuern zu können. Der restliche HGE strömte passiv durch die äußeren Eingänge ein. Die Pulsation ist ähnlich gering wie in B.

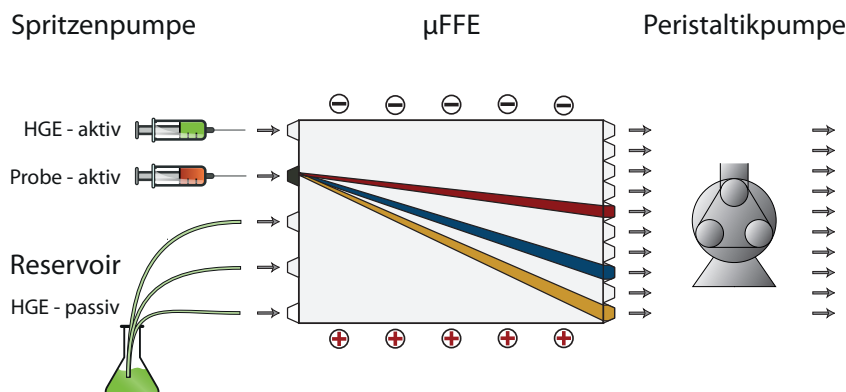


Abbildung 5.4: Verwendung von Spritzen- und Peristaltikpumpen. Zum Antrieb des druckgetriebenen Flusses in der μ FFE wird hier eine Peristaltikpumpe verwendet, die mit den μ FFE-Ausgängen verbunden ist. Die Spritzenpumpen dienen der kontrollierten und pulsationsarmen Injektion von Probe und Teilen des HGE. Der restliche HGE strömt passiv durch Druckdifferenzen an den Eingängen ein.

und einem Elektrolyten für die Elektrodenreservoirs, entwickelt werden. Damit sollte einerseits eine gute FFE-Trennung möglich sein, andererseits war es wichtig, dass die Elektrolyten auch kompatibel mit ESI-MS waren und eine gute Ionisierung ermöglichten. Die vorher in der FFE-Trennkammer erfolgreich verwendeten Elektrolyten Hepes/BisTris und TAE sind aufgrund fehlender Volatilität nicht für MS geeignet, weshalb hier Alternativen benötigt wurden. Die Wahl fiel auf Ammoniumacetat (AA), einen ungefährlichen Stoff, der breite Anwendung in der Biochemie und Massenspektrometrie findet. In den Elektrodenreservoirs wurde zunächst weiterhin das hoch leitfähige PBS verwendet. Initial wurde eine AA-Konzentration von 10 mM gewählt, da dies ein üblicher Wert für Untersuchungen mit ESI-MS ist.⁷⁶ Diese Konzentration schien zunächst vielversprechend, da Analyten im elektrischen Feld des Chips gut abgelenkt wurden, wie Experimente mit Fluoreszenzfarbstoff zeigten. Über einen Zeitraum von wenigen Minuten bildeten sich jedoch zunehmend Gasblasen in der Trennkammer und vergrößerten sich, was den Fluss und die elektrophoretische Ablenkung beeinträchtigte. In Abbildung 5.5 sind beispielhaft Messungen gezeigt, bei denen die Schwierigkeiten der elektrophoretischen Ablenkung bei übermäßiger Blasenbildung sichtbar sind. Zurückzuführen war die Gasentwicklung auf Joule'sche Wärme durch die hohe Leitfähigkeit der Lösung. Als nächstes wurde die HGE-Konzentration auf 1 mM reduziert. Damit konnte die übermäßige Gasentwicklung durch geringere elektrischen Ströme verhindert werden und eine elektrophoretische Ablenkung war möglich. Jedoch hatte die geringe HGE-Konzentration eine starke elektrohydrodynamische Verbreiterung der Banden zur Folge. In Abbildung 5.6 sind beispielhaft Messungen gezeigt, die den Zusammenhang zwischen HGE-Konzentration und Bandenverbreiterung

5.3. μ FFE-MS-METHODENENTWICKLUNG

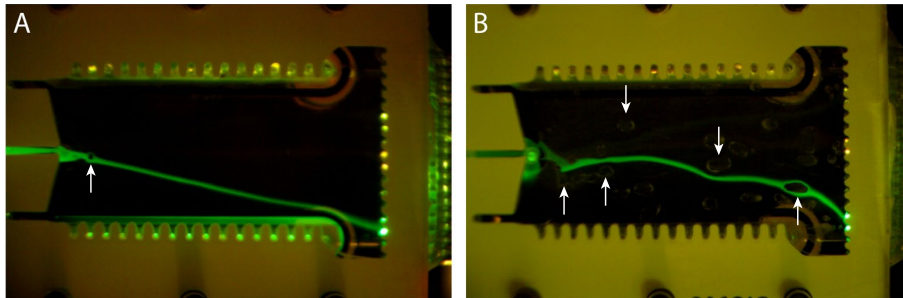


Abbildung 5.5: Fotos der Ablenkung einer Fluoresceinprobe mit 10 mM AA HGE. **A** Fluoreszenzaufnahme der Trennkammer 2 min nach Anlegen des elektrischen Feldes. Eine kleine Gasblase ist bereits im Fluorescein-Probenstrom zu erkennen (weißer Pfeil) **B** Die Trennung nach 30 min Laufzeit. Zahlreiche Gasblasen (manche beispielhaft mit Pfeilen markiert) haben sich in der Trennkammer ausgebreitet und stören die Ablenkung der Probe und die homogene Ausbreitung des elektrischen Feldes. Der Weg des Fluoresceins ist dadurch stark verzerrt und die Ablenkung reduziert.

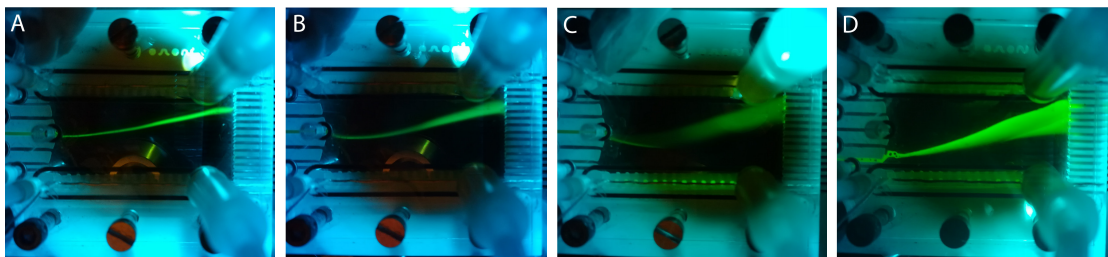


Abbildung 5.6: Konzentrationsabhängige Bandenverbreiterung von Fluorescein in der μ FFE. Dargestellt sind Fotos der Trennkammer mit Fluoresceinbande im elektrischen Feld unter verschiedenen Bedingungen. **A** Probe: 200 μ M Fluorescein in Wasser, HGE: 10 mM AA **B** Probe: 200 μ M Fluorescein in Wasser, HGE: 1 mM AA **C** Probe: 200 μ M Fluorescein in 1 mM AA, HGE: 1 mM AA, **D** Probe: 500 μ M Fluorescein, AMP, ADP und ATP in 1 mM AA, Probe: 1 mM AA

zeigen. Dabei wurde eine Probenlösung mit Fluorescein entweder in 10 mM AA HGE (A) oder in 1 mM AA HGE (B, C, D) abgelenkt. Zusätzlich wurde die Leitfähigkeit der Probenlösungen variiert: Es wurden entweder 200 μ M Fluorescein in Wasser (A, B), 200 μ M Fluorescein in 1 mM AA (C) oder ein Gemisch aus je 500 μ M Fluorescein, AMP, ADP und ATP in 1 mM AA (D) injiziert. Dabei zeigten die Proben bei Ablenkung in 1 mM AA HGE deutliche Bandenverbreiterung. Mit höherer Konzentration der Probenlösung war die Verbreiterung zusätzlich verstärkt.

Im nächsten Schritt wurde eine Konzentration von 5 mM AA als HGE gewählt. Damit

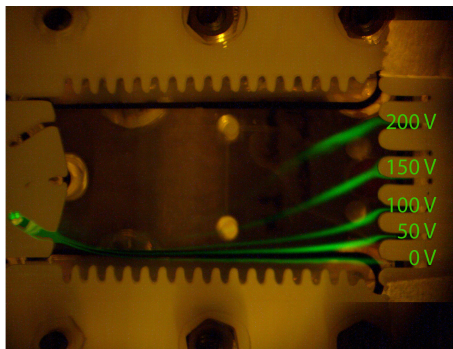


Abbildung 5.7: Fluoresceinspuren bei unterschiedlichen Trennspannungen. Fluorescein wird auf der linken Seite injiziert, fließt nach rechts durch den Chip und wird im elektrischen Feld nach oben abgelenkt. Der HGE ist 5 mM AA. Für das Bild wurden fünf verschiedene Aufnahmen bei unterschiedlichen Trennspannungen mit Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop) überlagert (0 V, 50 V, 100 V, 150 V, 200 V). Die Spuren sind aufgrund ungleichmäßiger Belichtung nicht alle vollständig erkennbar.

wurde in einem Experiment die Abhängigkeit der Ablenkung von der Trennspannung untersucht. Dafür wurde eine 200 μ M Fluorescein-Lösung an einem seitlichen FFE-Eingang per Spritzenpumpe injiziert und sollte möglichst über die gesamte Breite der Trennkammer abgelenkt werden. Verschiedene Trennspannungen (0 V, 50 V, 100 V, 150 V, 200 V) wurden angelegt und die Ablenkung beobachtet. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 5.7 zu sehen. Bei dem Bild handelt es sich um eine Überlagerung von Aufnahmen der Fluoreszenzspuren bei den unterschiedlichen Trennspannungen. Der Zusammenhang zwischen angelegter Trennspannung und elektrophoretischer Ablenkung ist deutlich zu erkennen. Die Banden scheinen zwar gegenüber der Trennung in 10 mM AA (vergleiche mit Abbildung 5.6 A) ein wenig stärker verbreitert, jedoch in einem akzeptablen Maße. Es konnten also ausreichend hohe Trennspannungen angelegt werden, ohne dass Blasen entstanden, beziehungsweise sich vergrößerten.

Insgesamt zeigten die Experimente mit dem für die MS kompatiblen AA als HGE, dass mit einer AA-Konzentration von 5 mM gute Trennergebnisse, zumindest mit Fluorescein, zu erzielen waren. Nun sollten mit diesem HGE massenspektrometrische Untersuchungen der für das Projekt wichtigen Analyten durchgeführt werden.

5.3.2 Nachweis der Analyten mit ESI-MS

Das erste Massenspektrometer, das für die Nutzung mit μ FFE zur Verfügung stand, war eine lineare Ionenfalle von Bruker (HCT Ultra). Bei diesem Modell liegt das elektrische Potential für das Elektrospray nicht am Emitter, sondern am Eingang des Massen-

5.3. μ FFE-MS-METHODENENTWICKLUNG

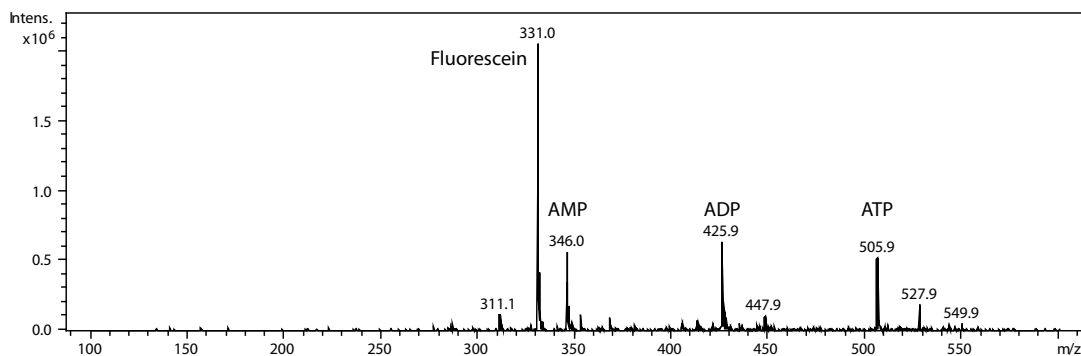


Abbildung 5.8: Massenspektrum bei direkter Infusion einer Lösung mit 10 μ M AMP, ADP, ATP und Fluorescein in 5 mM AA (Bruker Ionenfalle). Die ESI-Kapillarspannung betrug 3 kV. Die Quasi-Molekülionenpeaks der Analyten $[M-H]^-$ sind deutlich erkennbar.

spektrometers an. Die verwendete ESI-Quelle verfügte zudem über die Möglichkeit der Verwendung eines sogenannten Sheath-Liquids. Neben der Erhöhung des Gesamtflusses ermöglicht ein Sheath-Liquid das Beimischen anderer Lösungen zur Verbesserung des Elektrosprays. Da der HGE der μ FFE bei der Kopplung mit MS gleichzeitig Hauptbestandteil der Analytlösung für den ESI-Prozess ist, wurde zunächst dessen Kompatibilität mit ESI, unter Bedingungen, die man bei der Kopplung von μ FFE mit MS erwarten würde, getestet. Das heißt, es wurde eine Peristaltikpumpe mit einem für μ FFE üblichen Volumenstrom zur direkten Infusion in das MS-Gerät verwendet. Dabei wurde eine Lösung aus 5 mM AA und den zu testenden Analyten verwendet. So sollte herausgefunden werden, unter welchen Bedingungen ein stabiles Spray möglich ist, ob die Analyten besser im positiven oder im negativen Modus zu detektieren sind und welche Konzentrationen der Analyten nachgewiesen werden können.

In einem Experiment wurden zwei Probenlösungen mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen in 5 mM AA untersucht. Die erste enthielt je 10 μ M AMP, ADP, ATP und Fluorescein und die zweite 100 μ M AMP, ADP, ATP und Fluorescein. Die Probenlösungen wurden jeweils mit einer Peristaltikpumpe (Gilson Minipuls 3) mit 10 μ L min^{-1} in die ESI-Quelle injiziert. Eine Quarzglas Kapillare (ID 100 μ m, OD 190 μ m) wurde dafür auf der einen Seite in den flexiblen Peristaltikpumpenschlauch (Tygon, 0,13 mm ID, 1,95 mm OD) eingesteckt (Pressanpassung), auf der anderen Seite mittels Fitting an dem entsprechenden Port der ESI-Quelle angeschlossen.

Während im positiven Modus keine guten Ergebnisse erzielt wurden, konnten im negativen Modus alle Analyten gemessen werden. Das Spektrum einer Messung mit 10 μ M Analytlösung in 5 mM AA bei 3,0 kV Kapillarspannung im negativen Modus ist in Abbildung 5.8 dargestellt. Im gezeigten Massenspektrum sind deutliche Signale aller Analyten zu erken-

nen. Auch mit der 100 μM Analytlösung konnten gute Signale für die Analyten gemessen werden. Bei der 100 μM Lösung meldete die Software des Massenspektrometers jedoch, dass die Konzentration zu hoch sei.

Die Experimente zeigten, dass eine Konzentration der Analyten von etwa 10 μM gut für den Nachweis mit ESI-MS im negativen Modus geeignet waren. Konzentrationen dieser Größenordnung wurden daher auch für Experimente zur Kopplung von μFFE und MS an den μFFE -Ausgängen angestrebt.

5.3.3 Kopplung von μFFE und MS

Da auf diese Art der Nachweis von einigen der für diese Arbeit relevanten Analyten im μFFE -Puffer mit ESI-MS funktionierte, wurde der FFE-Chip mit dem MS-Gerät gekoppelt. Dabei wurden Proben von den μFFE -Ausgängen auf möglichst direktem Wege in die Ionenquelle des Geräts geführt. Für erste μFFE -MS-Experimente wurde eine Probenlösung bestehend aus 100 μM AMP, ADP, ATP und Fluorescein in den zentralen FFE-Eingang injiziert. Diese Konzentration wurde gewählt, um an den FFE-Ausgängen Probenkonzentrationen im niedrigen zweistelligen Bereich zu erzielen. Beim Fluss durch den FFE-Chip ohne angelegte Trennungsspannung konnten mit dem Massenspektrometer Analyt-Signale erwartungsgemäß am zentralen Ausgang A4 von insgesamt 7 FFE-Ausgängen detektiert werden. Dieser Ausgang blieb daher mit dem Massenspektrometer verbunden und Massenspektren wurden aufgenommen. Das extrahierte Ionen-Chromatogramm (EIC) einer solchen Messung ist in Abbildung 5.9 dargestellt. 30 s nach Beginn der Messung wurde eine Trennungsspannung von 100 V angelegt. Mit einer Verzögerung von etwa 5 min wurden die Auswirkungen in den Spektren sichtbar. Zunächst stieg die Intensität der Signale etwa eine Minute an und wurde dann wieder geringer, bis fast keine Analyt-Signale mehr in den Spektren zu finden waren. Bei Minute 13 wurde die Trennungsspannung ausgeschaltet, woraufhin die Analyten mit einer Verzögerung von knapp 5 min wieder mit hoher Intensität in den Spektren auftauchten. Die Messwerte des EIC lassen sich, unter Berücksichtigung der relativen elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten, die zuvor mit FFE und CE ermittelt wurden, deuten. Der Analytstrom befand sich zu Beginn bei 0 V teilweise bei A4 und migrierte bei 100 V Trennungsspannung über A4 hinweg. Der Anstieg der Intensität um Minute 6,5 herum lässt darauf schließen, dass ein Teil des Probenstroms bei 0 V auch durch A3 floss. AMP (rot) migrierte etwas langsamer über A4 hinweg als ATP (blau), was auf die geringere elektrophoretische Mobilität zurückzuführen ist. Fluorescein verhielt sich anders als die drei Adenosinphosphate, denn dessen Signale wurden im EIC deutlich länger in A4 nachgewiesen. Mögliche Gründe dafür könnten eine Anhaftung des Farbstoffs an Oberflächen der Bauteile oder Schläuche gewesen sein, die mit der Zeit wieder abgegeben wurden oder aber die Fluoresceinbande war verbreitert. Letzteres war jedoch, hinsichtlich der Vorversuche bei ähnlichen Bedingungen, unwahrscheinlich. Zum Ende der Messung, als die Trennungsspannung ausgeschaltet war, schienen die Analyten mit

5.3. μ FFE-MS-METHODENENTWICKLUNG

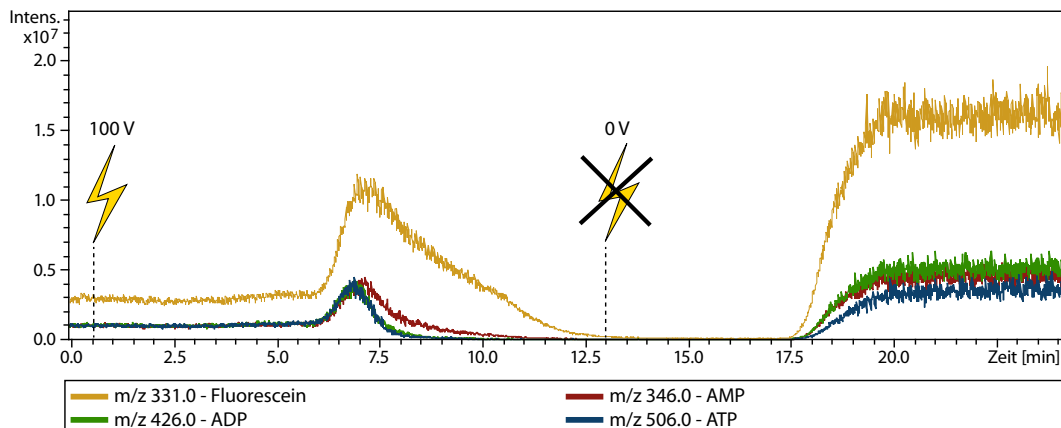


Abbildung 5.9: EIC einer Probe aus je 100 μ M AMP (rot), ADP (grün), ATP (blau) und Fluorescein (gelb), gemessen am zentralen Ausgang A4 des FFE-Chips mit einer Bruker Ionenfalle. Der gelbe Blitz im EIC symbolisiert das Anlegen, beziehungsweise Abschalten einer Trennungsspannung in der μ FFE. Der Effekt der zu Beginn angelegten Spannung von 100 V äußert sich mit einer Verzögerung von etwa 5 min durch veränderte Intensitäten der Analyt-Signale. Zunächst steigen die Intensitäten an und gehen dann innerhalb weniger Minuten gegen Null (Minute 6 bis Minute 12.5). In dieser Zeit migrieren die Analyten im elektrischen Feld zu einem anderen FFE-Ausgang. Nach Ausschalten der Trennungsspannung bei Minute 13 steigen die Intensitäten der Analyt-Signale mit einer Verzögerung von knapp 5 min wieder an. Die Analyten fließen wieder durch A4.

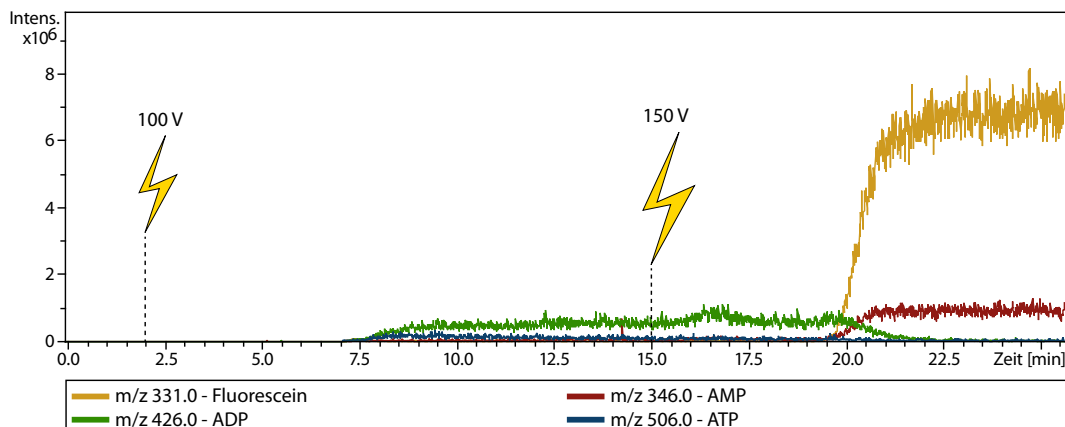


Abbildung 5.10: EIC einer Probe aus je 100 μM AMP (rot), ADP (grün), ATP (blau) und Fluorescein (gelb) gemessen am Ausgang A6 des FFE-Chips mit einer Bruker Ionenfalle. Die gelben Blitze symbolisieren das Anlegen einer bestimmten Trennungsspannung in der μFFE . Bei Minute 2 wurden 100 V angelegt, was sich ab Minute 7 im EIC bemerkbar macht. Die Intensität der ATP-Signale nimmt zunächst zu, aber nach etwa einer Minute wieder ab, während ADP sich auf einem etwas höheren Niveau stabilisiert. Bei Minute 15 wird die Trennungsspannung auf 150 V erhöht, was sich ab Minute 19,5 durch einen Anstieg von AMP- und Fluorescein-Signalen und einem Rückgang von ADP-Signalen zeigt.

einem höheren Anteil durch A4 zu fließen als zu Beginn, wie die erhöhte Intensität der Analytpeaks zeigt. Diese Verschiebung der Banden könnte durch eine Luftblase in den Mikrostrukturen, beispielsweise an einem der FFE-Ausgangskanäle, verursacht worden sein.

In einem weiteren Experiment wurde der Ausgang A6 bei angelegten Trennungsspannungen von 100 V und 150 V untersucht. Dieser Ausgang war näher Richtung Anode positioniert als der vorher untersuchte zentrale Ausgang A4. Die Erwartung war, dass die Analyten bei Anlegen einer Trennungsspannung den FFE-Chip durch A6 oder einen Ausgang noch weiter Richtung Anode verlassen würden, was im EIC beobachtbar wäre. Das EIC in Abbildung 5.10 stellt die Messergebnisse dar. In den ersten 2 min der Messung lag noch keine Trennungsspannung an der Trennkammer an. Erwartungsgemäß gab es keine Signale von den Analyten, die wahrscheinlich durch Ausgang A4 kamen. Nach Anlegen einer Trennungsspannung von 100 V dauerte es etwa 5 min bis die ersten Analyt-Signale in den Massenspektren auftauchten. Dabei handelte es sich um ADP und ATP. Von AMP und Fluorescein waren Spuren nachweisbar. Die Intensität der ATP-Signale war der der ADP-Signale zunächst ähnlich, nahmen dann jedoch deutlich ab, bis nur noch Spuren messbar waren. Bei Minute 15 wurde die Trennungsspannung auf 150 V erhöht. Diese Änderung machte

5.3. μ FFE-MS-METHODENENTWICKLUNG

sich knapp 5 min später (Minute 19,5) im EIC bemerkbar. Während das ADP-Signal geringer wurde, nahmen die Intensitäten von AMP und Fluorescein deutlich zu und stabilisierten sich auf hohem Niveau bis zum Ende der Messung.

Die Ergebnisse stimmten überein mit den elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten. Bei 100 V wurde ADP auf FFE-Ausgangskanal A6 gelenkt. Dass die Intensität der Signale von ATP nach Anlegen der Trennspannung in A6 zunächst zunahm und kurz darauf wieder weniger wurde (um Minute 8 herum), lässt sich so interpretieren, dass ATP noch weiter in Richtung Anode migrierte als A6 und an einem näher bei der Anode gelegenen Ausgang den FFE-Chip verließ. AMP und Fluorescein dagegen wurden weniger weit abgelenkt und erreichten A6 bei 100 V nicht. Bei 150 V war das elektrische Feld dann stark genug, dass AMP und Fluorescein auf A6 abgelenkt wurden, während ADP bei dieser Spannung bereits auf einen weiter Richtung Anode gelegenen Ausgang migrierte. Diese Experimente zeigten, dass sich die Trennung der Analyten in FFE mit ESI-MS sehr gut beobachten und analysieren ließ. Daher war das Ziel nun, nicht nur einen, sondern möglichst viele FFE-Ausgänge automatisiert mit MS observieren zu können. Zur Analyse weiterer Ausgänge bestand zunächst nur die Möglichkeit, die Quarzglaskapillare, welche Peristaltikpumpe und ESI-Quelle verband, per Hand auf einen anderen Schlauch der Peristaltikpumpe umzustecken. Durch die Art der Verbindung zwischen den Schläuchen der Peristaltikpumpe und den Quarzglaskapillaren mit dem Prinzip der Pressanpassung bestand dabei aber stets die Gefahr mit der harten und dünnen Quarzglaskapillare die kleinen Öffnungen der Peristaltikpumpenschläuche zu verfehlen, wodurch der weiche Tygon-Schlauch beschädigt werden und die Quarzglaskapillare durch Materialabtrag verstopfen konnten. Für den Anwender besteht bei dieser Methode außerdem Verletzungsgefahr durch abbrechende Kapillaren. Zusätzlich geht bei den meisten Massenspektrometern im laufenden Betrieb eine Gefahr von der anliegenden Hochspannung an der Emitterkapillare aus, was ein Umstecken im Messbetrieb verhindern würde. Ein weiterer Nachteil beim händischen Umstecken ist die fehlende Reproduzierbarkeit der ‚Schaltvorgänge‘, die die Zuordnung von Massenspektren zum jeweils untersuchten Kanal erschwert. Daher wurde die Möglichkeit der Nutzung eines Schaltventils untersucht.

5.3.4 Implementierung eines Schaltventils

Für Proof-of-principle-Untersuchungen kam ein Schaltventil (Upchurch Scientific) zum Einsatz, das es erlaubte, zwischen zwei Eingangskanälen auf einen gemeinsamen Ausgang zu schalten. Dafür wurden zwei Schläuche der mit dem FFE-Chip verbundenen Peristaltikpumpe über Quarzglaskapillaren mit dem Ventil verbunden. Der gemeinsame Ausgang war mit einer Quarzglaskapillare an die ESI-Quelle des Massenspektrometers angeschlossen. Die Probe des Kanals, der jeweils nicht zum Massenspektrometer geschaltet war, konnte ungehindert weiter fließen und wurde verworfen. In einem Experiment

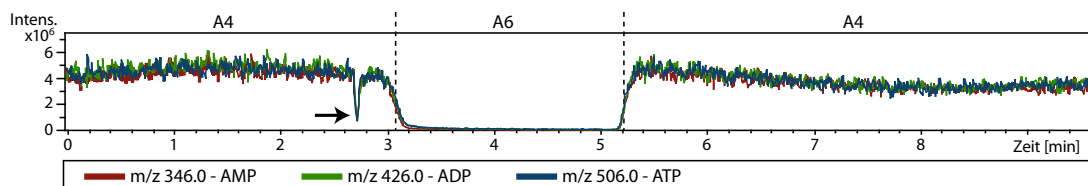


Abbildung 5.11: EIC der Analyten bei Schaltvorgängen mit einem 2-Positionenventil. Gut sichtbar ist der Schaltdip bei Minute 2,7 und die leichte Verzögerung von etwa 20 s, bis die Analyten des anderen Kanals nach dem Schaltvorgang detektiert werden. Das Tailing (A4 → A6) und das Fronting (A6 → A4) sind auf das hydrodynamische Strömungsprofil beim druckgetriebenen Fluss zurückzuführen.

wurden die bereits untersuchten FFE-Ausgänge A4 und A6 mit dem Ventil verbunden. Die Probe, bestehend aus 100 μM AMP, ADP und ATP, wurde in den zentralen Einlass des FFE-Chips injiziert. Da keine Trennungsspannung angelegt wurde, war mit den Analyten in A4 zu rechnen. Zunächst wurde A4 zum MS-Gerät geschaltet. Erwartungsgemäß waren deutliche Signale der Analyten zu sehen (Abbildung 5.11). Bei Minute 2,7 wurde mit dem Ventil von Ausgang A4 auf A6 geschaltet. Der Schaltvorgang machte sich im EIC unmittelbar durch einen kurzen Einbruch der Intensitäten der Signale bemerkbar. Dieser Einbruch ist auf einen kurzen Druckabfall zurückzuführen. Es dauerte etwa 20 s, bis der Carry-over, also das Volumen zwischen Ventil und Emitterspitze, verdrängt war und die Signale der Probe des anderen Kanals in den Massenspektren erschienen. Während der 2 min, die das Ventil auf A6 geschaltet war, konnten weiterhin geringe Signale der Analyten mit abnehmender Intensität nachgewiesen werden. Diese waren jedoch so gering, dass ausgeschlossen wurde, dass die Analyten tatsächlich am Ausgang A6 vorhanden waren. Es handelte sich dabei wahrscheinlich um Spuren der Analyten durch Diffusion aus Totvolumina innerhalb des Ventils oder durch desorbierte Analyten von Oberflächen der Bauteile oder Schläuche.

Da das Prinzip des Ventil-unterstützten Schaltens zwischen den FFE-Ausgängen erfolgreich war, wurde das 2-Positionenventil im nächsten Schritt durch ein Schaltventil mit einer größeren Anzahl an Positionen ersetzt. Da die Flüsse der einzelnen FFE-Ausgangskanäle im einstelligen $\mu\text{L min}^{-1}$ -Bereich lagen, war es wichtig, ein Ventil zu verwenden, das über möglichst geringe Volumina der Schaltkanäle verfügt, um den Carry-over bei den Schaltprozessen zu minimieren. Die Wahl fiel auf ein 5-Positionen-Schaltventil (Cheminert C5FH-0005, Vici Valco Instruments, SUI), das mit 150 μm Bohrungen für die Kanäle ausgestattet war. Ein kommerziell erhältliches Ventil mit mehr Positionen und gleichzeitig tolerierbaren Totvolumina konnte nicht gefunden werden. Entsprechend der Anzahl an Positionen des Ventils wurden daher für $\mu\text{FFE-MS}$ -Experimente in der Regel 5 μFFE -Ausgänge benutzt. Abbildung 5.12 stellt den Versuchsaufbau mit Ventil, FFE-Chip,

5.3. μ FFE-MS-METHODENENTWICKLUNG

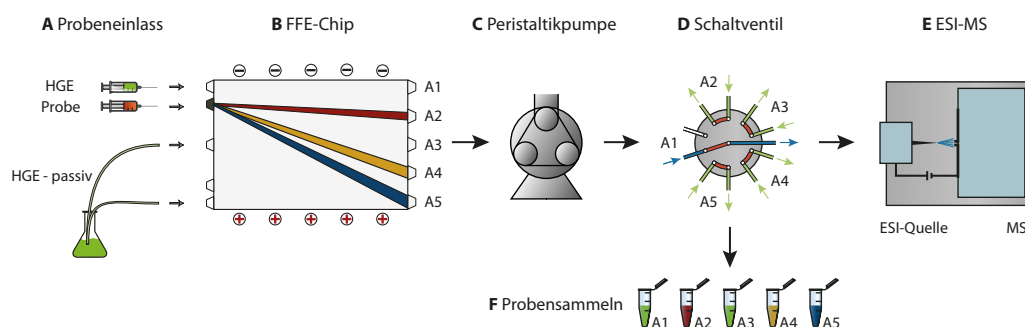


Abbildung 5.12: Versuchsaufbau zur Kopplung von μ FFE mit MS. **A** Einlass von Probe und HGE. **B** Trennung der Probe im FFE-Chip. **C** Peristaltikpumpe zur gleichmäßigen Förderung von Probe. **D** Ventil zum automatisierten Schalten zum MS-Gerät. **E** Analyse der Proben mit ESI-MS. **F** Sammeln von Proben, die nicht zum MS gehen.

Peristaltikpumpe und Massenspektrometer schematisch dar. Wie in der schematischen Zeichnung des Ventils (D) zu sehen ist, konnte das Ventil zwischen 5 Positionen zum gemeinsamen Ausgang schalten. Dieser war mit der ESI-Quelle des Massenspektrometers verbunden. Eine wichtige Eigenschaft des Ventils bestand darin, dass eingehende Ströme umgeleitet und nicht blockiert wurden. Nur so konnte der homogene Fluss im FFE-Chip beibehalten werden. Die kontinuierliche Förderung von Flüssigkeit ermöglichte außerdem das Sammeln oder Weiterleiten der Proben über die Kanäle, die jeweils nicht zum Massenspektrometer geschaltet waren.

Die Schaltzeit, beziehungsweise die Zeit, die es dauerte, bis Analyten des nächsten Kanals nach dem Schaltprozess im Massenspektrum ankamen, wurde durch Reduzierung der Länge und Durchmesser der Leitungen zwischen Ventil und dem Massenspektrometer (siehe Abbildung 5.12 D bis E) so weit reduziert, wie es möglich war. Der erste Schritt war es, die ESI-Emitterkapillare aus Quarzglas direkt über entsprechende Fittings mit dem Ventil zu verbinden, statt wie vorher zwei verschiedene Leitungen über einen Verbinder zusammenzuführen. Durch das Wegfallen des Verbinders wurde das Leitungsvolumen reduziert und eine potentielle Quelle für Totvolumina eliminiert. Totvolumina sollten bei der Kopplung von μ FFE und MS vermieden werden, da diese ein Tailing der Analyt-Signale bei MS-Messungen bewirken. Im nächsten Schritt wurde der Durchmesser der ESI-Emitterkapillare verringert. Limitierend bei der Reduzierung des Leitungsdurchmessers war der daraus resultierende hohe Gegendruck durch den steigenden hydrodynamischen Widerstand. Die durch Pressanpassung erzeugten Verbindungen zwischen den Schläuchen der Peristaltikpumpe und den Quarzglaskapillaren, die zum Ventil führten, hielten den hohen Gegendrücken bei der Förderung von Flüssigkeit durch Kanäle kleinen Durch-

messers ($\leq 50 \mu\text{m}$) nicht stand. Es wurde letztlich eine ESI-Emitterkapillare mit $75 \mu\text{m}$ Innendurchmesser anstelle der initial verwendeten Kapillare mit $100 \mu\text{m}$ Innendurchmesser verwendet. Durch die Reduzierung des Kapillardurchmessers konnte das Volumen in der Emitterkapillare und damit die Schaltzeiten um knapp 44% reduziert werden.

Neben der Verringerung der Volumina zwischen Ventil und dem Eingang des Massenspektrometers zur Reduzierung der Schaltzeiten sollten auch die Volumina in den Leitungen zwischen FFE-Chip und Ventil verringert werden (siehe Abbildung 5.12 B bis D). Diese Maßnahme reduzierte die Zeit, die es dauerte, bis sich Veränderungen im FFE-Chip in den MS-Messungen bemerkbar machten. An den μFFE -Ausgängen wurden dafür die zunächst verwendeten Edelstahlkanülen mit $0,41 \text{ mm}$ Innendurchmesser und 20 mm Länge durch Edelstahlkanülen mit $0,20 \text{ mm}$ Innendurchmesser und 14 mm Länge ersetzt. Die zu Beginn verwendete Verbindung über QuarzglasKapillaren zwischen dem FFE-Chip und dem Ventil wurde ebenfalls optimiert. Die QuarzglasKapillaren waren zuvor auf der einen Seite mit Hilfe eines kurzen Stücks Silikonschlauch mit den Edelstahlkanülen an den FFE-Ausgängen und auf der anderen Seite durch Pressanpassung mit den Schläuchen der Peristaltikpumpen verbunden. Diese Art der Verbindung wurde vereinfacht, in dem die Schläuche der Peristaltikpumpe nun direkt durch Pressanpassung mit den Edelstahlkanülen an den FFE-Ausgängen verbunden wurden. Die QuarzglasKapillaren fielen also weg, was neben dem Leitungsvolumen auch die Fehleranfälligkeit des Aufbaus reduzierte und potentielle Totvolumina an den Verbindungen der verschiedenen Leitungen verhinderte. Eine weitere Maßnahme war die Verwendung von Peristaltikpumpenschläuchen mit kleinerem Durchmesser. Die Schläuche mit $250 \mu\text{m}$ ID wurden dabei durch Schläuche mit $130 \mu\text{m}$ ID ersetzt. Dadurch wurden die Schlauchvolumina um 73% reduziert, was gleichzeitig den positiven Effekt einer verringerten Pulsation durch die Peristaltikpumpe hatte.

Mit diesen Maßnahmen konnten die Leitungsvolumina insgesamt um mehr als die Hälfte reduziert werden, wodurch die Analyse der FFE-Trennung bei der Kopplung mit dem MS-Gerät besser und schneller wurde. Die erfolgreiche Implementierung eines Schaltventils ermöglichte zudem das automatisierte Durchschalten der verschiedenen FFE-Ausgangskanäle zur Analyse mit ESI-MS.

5.4 Stoffauftrennung mit $\mu\text{FFE-MS}$

Mit dem entwickelten Versuchsaufbau wurden nun Trennexperimente mit Stoffgemischen der bekannten Analyten durchgeführt und per MS überwacht. Fluorescein und ADP wurden im Vergleich zu vorherigen Experimenten aus dem Probengemisch herausgenommen, da sie keine Rolle bei den relevanten Enzymreaktionen spielten. Außerdem stellte sich die gleichzeitige Trennung und Analyse der drei Adenosinphosphate AMP, ADP und ATP durch In-Source-Fragmentierung als problematisch dar. Die Fragmentierung an bestimm-

5.4. STOFFAUFTRENNUNG MIT μ FFE-MS

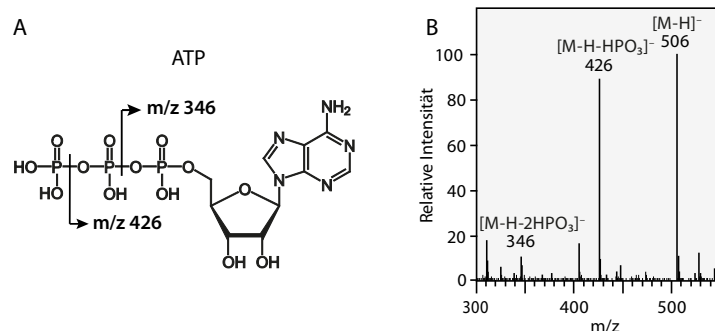


Abbildung 5.13: **A** Darstellung der molekularen Struktur von ATP. Pfeile kennzeichnen potentielle Spaltstellen beim ESI-Prozess, die beobachtet werden konnten. Die m/z von Abspaltprodukten im negativen Modus sind angegeben. **B** Das entsprechende Fragmentierungsmuster von ATP im Massenspektrum. Neben dem Quasi-Molekülionenpeak $[M-H]^-$ sind die durch Phosphatabspaltung entstandenen ADP und AMP vorherrschend.

ten Spaltstellen dieser Moleküle in ESI-MS ist ein bekanntes Phänomen.⁷⁷ Abbildung 5.13 stellt Spaltstellen, die bei ATP beobachtet wurden, dar. Wie in der Abbildung zu sehen ist, können während der Ionisierungsprozesse eine oder zwei Phosphatgruppen von ATP abgespalten werden, was in Fragmentierung zu ADP und AMP resultierte. Das Fragmentierungsmuster einer Messung von ATP mit FFE-MS ist im Massenspektrum auf der rechten Seite der Abbildung zu sehen. Das Verhältnis des Quasi-Molekülionenpeaks $[M-H]^-$ zu den Fragmenten ist abhängig von den Ionisierungsbedingungen. Diverse Parameter, wie die Beschaffenheit der Emitterkapillare, Kapillarspannung, Elektrolytzusammensetzung, Konzentrationen und pH-Wert, haben Einfluss auf das Maß der Fragmentierung. Gerade bei der Kopplung von μ FFE und MS ist die In-Source-Fragmentierung nicht vorhersehbar, denn Zusammensetzung und Eigenschaften des HGE unterscheiden sich an den verschiedenen μ FFE-Ausgängen durch die elektrophoretische Migration geladener Spezies. Bei μ FFE-MS lässt sich somit nicht direkt unterscheiden, ob beispielsweise aus einem μ FFE-Ausgang sowohl ATP als auch ADP kommen oder es sich bei dem ADP nur um ein Fragment-Ion von ATP handelt. Mit Hilfe der bekannten elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten lässt sich anhand der Verteilung der Signale auf die verschiedenen Ausgänge bei der FFE-Trennung jedoch häufig schlussfolgern, ob es sich bei einem Signal um ein Fragment handelt oder nicht.

5.4.1 Trennung von AMP und ATP

Bei ersten μ FFE-MS-Experimenten mit dem 5-Positionen-Ventil wurden die beiden Analyten AMP und ATP (je 100 μ M) ausgewählt. Entsprechend der Anzahl an Kanälen des

KAPITEL 5. FFE MIT MS-ANALYSE

Ventils wurden 5 FFE-Ausgänge verwendet. Das Ziel war es, die Trennung der Analyten durch MS-Messungen mit automatischer Schaltung zu verfolgen. Dabei wurde die Probe an einem seitlichen FFE-Eingang injiziert (siehe Abbildung 5.12), um die Trennstrecke zu maximieren. Als Referenz für die Analyt-Signale in den Massenspektren wurde die Probe zunächst ohne Trennungsspannung injiziert und durch Einstellen der Volumenströme des HGE an den FFE-Einlässen auf Ausgang A1 gelenkt. Die Messung wurde gestartet und nach 2 min eine Trennungsspannung von zunächst 150 V angelegt. Mit einer Verzögerung von etwa 5 min konnte die Migration der Analyten anhand geringer werdender Intensitäten beobachtet werden, wie das EIC in Abbildung 5.14 zeigt. Anschließend wurden die anderen FFE-Ausgangskanäle sukzessive zum Massenspektrometer geschaltet und das EIC beobachtet. Bei 150 V wurden am Ausgang A3 Signale für Ionen mit einem m/z von 346 nachgewiesen. Dieser Wert entspricht dem m/z des Quasi-Moleküls $[M-H]^-$ von AMP. Da an den Ausgängen A1 und A2 zuvor keine Signale mit dem m/z 346 nachzuweisen waren, handelte es sich höchstwahrscheinlich tatsächlich um Signale von AMP und nicht um ATP-Fragment-Ionen. Da ATP bei den Bedingungen an zwei Ausgängen (A3 und A4) nachgewiesen werden konnte, wurde die Trennungsspannung bei Minute 35 auf 170 V erhöht. Dadurch konnte der ATP-Probenstrom vollständig auf A4 gelenkt werden, während AMP in A3 blieb. Vergleicht man das Massenspektrum in Abbildung 5.14 mit dem Massenspektrum bei direkter Infusion (Abbildung 5.8), fällt auf, dass die Analyt-Peaks bei der FFE-MS-Messung deutlich weniger intensiv sind als Peaks, die nicht der Probe zugeordnet werden konnten. Diese intensiven Peaks (hier: m/z 297 und 311) sind wahrscheinlich linearen Alkylbenzolsulfonate (LAS) zuzuordnen, die Bestandteile von Reinigungsmitteln sind und typischerweise in Massenspektren bei ESI-MS auftauchen. Diese Substanzen können in höheren Konzentrationen Ionensuppression zufolge haben.⁷⁸ Da die Analyten AMP und ATP jedoch bei direkter Infusion im gleichen HGE in hoher Intensität nachgewiesen werden konnten, waren die LAS vermutlich nicht ursächlich für die geringen Intensitäten der Analyten.

Das FFE-MS-Experiment mit dem 5-Positionenventil zur Trennung von Analyse von AMP und ATP zeigte das analytische und präparative Potential des Messaufbaus. Die FFE-Ausgänge wurden sukzessive durchgeschaltet und analysiert, während die Proben an den übrigen Ausgängen gesammelt werden konnten. Die Verzögerung nach dem Schalten, bis die Analyten des nächsten Kanals in den Massenspektren nachgewiesen werden konnten, betrug circa 20 s. Änderungen im FFE-Chip, wie das Anlegen einer Trennungsspannung, machten sich mit einer Verzögerung von knapp 5 min in den Massenspektren bemerkbar, da zusätzlich die Volumina der (Pumpen-)Schläuche zwischen FFE-Chip und Ventil verdrängt werden mussten. Ein großer Vorteil der entwickelten Online-Analytik war, dass die Trennparameter in operando zur Optimierung angepasst werden konnten. Dies wurde bei der FFE-Trennung von AMP und ATP demonstriert, bei der die Analyten durch Variation der Trennungsspannung auf separate FFE-Ausgänge gelenkt wurden. Auffällig war

5.4. STOFFAUFTRENNUNG MIT μ FFE-MS

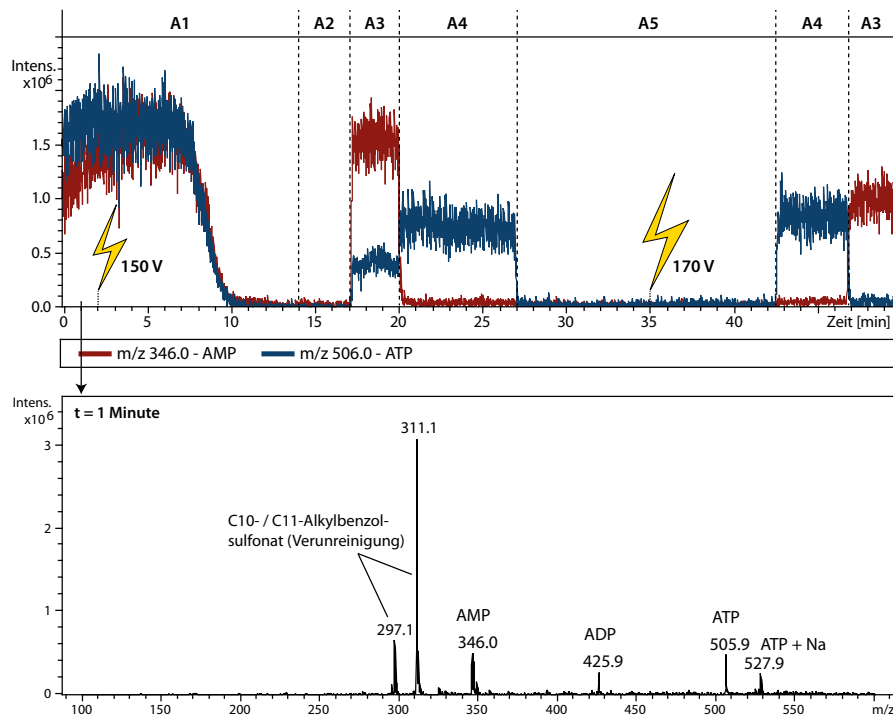


Abbildung 5.14: EIC der FFE-Trennung von AMP und ATP über einen Zeitraum von 50 Minuten (oben) und ein Massenspektrum bei Minute 1, gemessen mit einer Bruker Ionenfalle. Im EIC sind die Intensitäten von AMP (rot) und ATP (blau) über die Zeit aufgetragen. Vertikale Linien teilen das Chromatogramm in Segmente, die jeweils Signale eines bestimmten FFE-Ausgangskanals enthalten. Die Nummer des analysierten FFE-Ausgangs ist über dem jeweiligen Segment dargestellt. Die gelben Blitze symbolisieren das Anlegen einer bestimmten Trennungsspannung. Bei Messbeginn ist A1 mit dem Massenspektrometer verbunden. Für AMP und ATP sind deutliche Signale zu sehen. Etwa bei Minute 2 wird eine Trennungsspannung von 150 V angelegt. Mit knapp 5 min Verzögerung zeigt sich die Migration der Analyten in der μ FFE anhand geringer werdender Intensitäten im EIC in Kanal A1. Bei Minute 14 wird auf A2 geschaltet. Es können keine signifikanten Signale der Analyten nachgewiesen werden. AMP ist in A3 zu finden, während ATP sich auf A3 und A4 aufteilt. Bei Minute 27 wird auf A5 geschaltet, wo keine Analyten vorhanden sind. Bei Minute 35 wird die Trennungsspannung auf 170 V erhöht. Die Intensitäten bleiben für A5 unverändert. Bei Analyse der anderen Ausgänge bei dieser Trennungsspannung ist ATP jedoch nur noch in A4 zu finden und AMP weiterhin in A3. Das Massenspektrum, aufgenommen bei Minute 1, zeigt intensive Peaks bei m/z von 297 und 311, die linearen Alkylbenzolsulfonaten zugewiesen werden konnten. Dabei handelt es sich um Verunreinigungen, die wahrscheinlich von Reinigungsmitteln stammen. Auffällig ist deren hohe Intensität verglichen mit den Analyt-Peaks.

jedoch der Sensitivitätsverlust beim Nachweis der Analyten, vor allem bei angelegter Trennungsspannung.

5.4.2 Ablenkung von Coenzym A

Als nächstes wurde die Ablenkung und Detektion des Analyten CoA mit μ FFE-MS untersucht. CoA war an allen drei in dieser Arbeit relevanten Enzymreaktionen beteiligt (siehe Abschnitt 1.2). Zur Optimierung der MS-Analytik und der Identifizierung der Fragment- und Adduktpeaks wurde CoA zunächst isoliert mit μ FFE-MS untersucht. Dafür wurde eine 100 mM CoA-Lösung in den FFE-Chip injiziert und ohne Trennungsspannung hydrodynamisch auf A1 gelenkt. Dieser Ausgang war zunächst mit dem Massenspektrometer verbunden. Nach 30 s wurde eine Trennungsspannung von 150 V angelegt und die Kanäle A1 bis A5 sukzessive zum MS-Gerät geschaltet. Wie im EIC in Abbildung 5.15 A zu sehen ist, wurde CoA-Signale in A3 nachgewiesen, der als einziger FFE-Ausgangskanal CoA-Signale bei angelegter Trennungsspannung enthielt. Auffällig ist dabei der massive Verlust an Intensität im Vergleich zur Messung ohne angelegte FFE-Trennungsspannung. Beim Vergleich der Massenspektren von A1 (Abbildung 5.15 B, noch ohne Trennungsspannung) und A3 (Abbildung 5.15 C), wird die unterschiedliche Qualität der Ionisierung der Analyten deutlich. Im Massenspektrum von A1 lassen sich die drei größten vorhandenen Peaks alle CoA zuordnen. Im Vergleich dazu ist im Massenspektrum der Probe von A3 nur noch der Peak bei m/z 686 vorhanden. Dieser hat hier jedoch eine deutlich geringere Intensität und wird von Scharen unbekannter Peaks, die regelmäßige Abstände von m/z 82 zueinander haben, in seiner Intensität übertroffen. Die bereits bei AMP und ATP zuvor beobachtete Ionensuppression war bei dieser Messung noch einmal verstärkt.

5.4.3 Ionensuppression durch PBS

Das Phänomen der Ionensuppression bei angelegter Trennungsspannung in μ FFE trat bei allen Messungen (in unterschiedlichem Maße) auf und war, wie zuvor, von Peakscharen unbekannter Ursprungs begleitet. Besonders deutlich wurde dieses Problem, als Messungen an der LTQ Orbitrap (Velos Pro, Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt wurden. Bei diesem System war die Ionensuppression so groß, dass eine Detektion der Analyten während der FFE-Trennung kaum mehr möglich war. Stattdessen wurden die Massenspektren von Peakscharen dominiert, die sich in gleichmäßigen Abständen über den gesamten gemessenen m/z -Bereich verteilten, wie in Abbildung 5.16 dargestellt ist. Um die Ursache für die Ionensuppression zu finden, wurden diverse Bauteile, beziehungsweise Materialien des FFE-Chips, sowie die verwendeten Schläuche und Verbinder separat untersucht. Dabei sollte herausgefunden werden, ob diese in Kontakt mit AA-Lösung bestimmte Substanzen an das Lösungsmittel abgeben. Jedes Bauteil wurde dafür separat für 48 h in 5 mM AA bei Raumtemperatur gebadet. Die AA-Lösung wurde anschließend

5.4. STOFFAUFTRENNUNG MIT μ FFE-MS

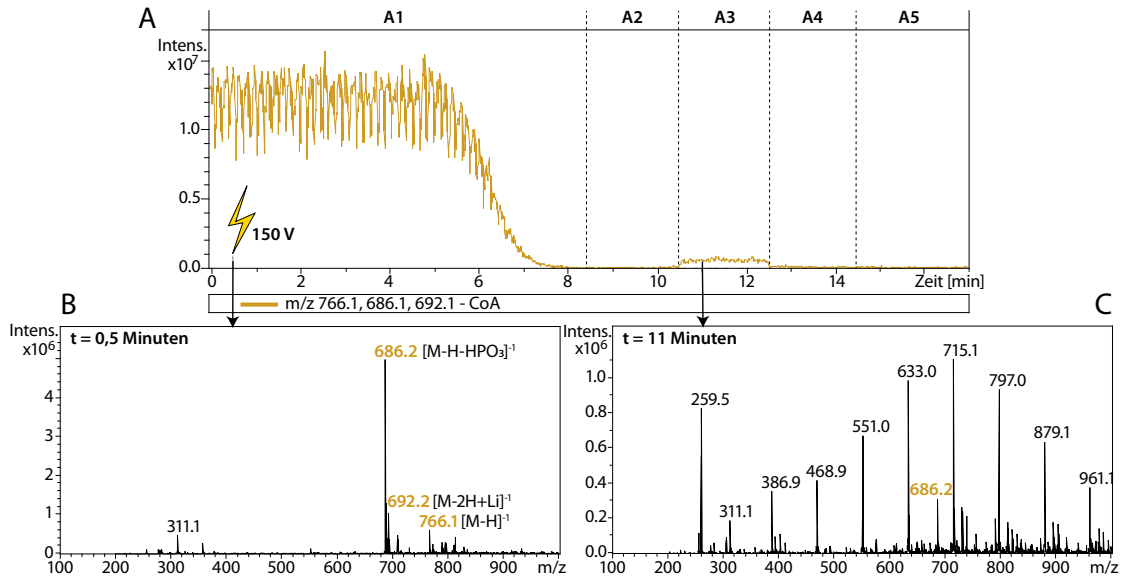


Abbildung 5.15: **A** EIC der elektrophoretischen Ablenkung von CoA in FFE, gemessen mit einer Bruker Ionenfalle. Die Intensitäten von CoA sind über die Zeit aufgetragen. Vertikale Linien teilen das Chromatogramm in Segmente, die jeweils Signale eines bestimmten FFE-Ausgangskanals enthalten. Die Nummer des analysierten FFE-Ausgangs ist über dem jeweiligen Segment dargestellt. Der gelbe Blitz symbolisiert das Anlegen einer Trennungsspannung. Bei Messbeginn ist A1 mit dem Massenspektrometer verbunden. Danach werden die FFE-Ausgänge sukzessive zum MS-Gerät geschaltet. CoA-Signale sind bei angelegter Trennungsspannung in A3 zu finden. Die Intensität der Signale ist jedoch gegenüber den Ausgangssignalen vor Beginn der elektrophoretischen Migration stark reduziert. Die Ionisierung des Analyten scheint unterdrückt. **B** Massenspektrum aus A1 vor Anlegen der Trennungsspannung. Die CoA-Peaks, mit gelb beschriftet, heben sich deutlich von den Hintergrundsignalen ab. **C** Massenspektrum von A3 bei angelegter Trennungsspannung. Von den CoA-Fragmenten ist nur noch m/z 686 zu erkennen. Es dominieren Peakscharen mit konstantem Abstand von m/z 82.

KAPITEL 5. FFE MIT MS-ANALYSE

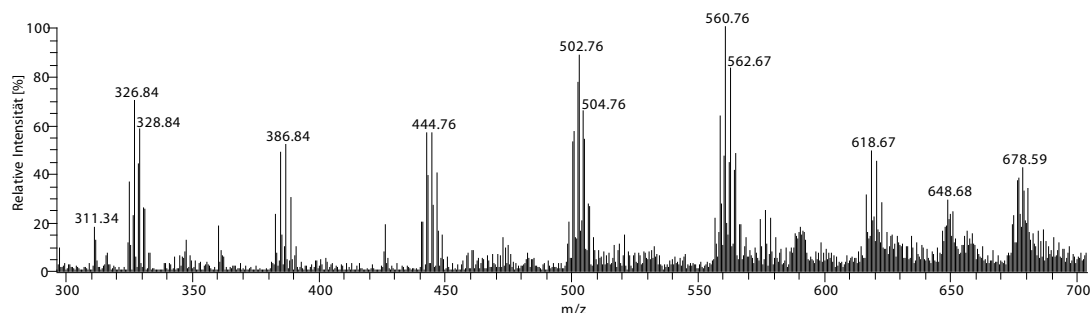


Abbildung 5.16: Massenspektrum der elektrophoretischen Trennung von AMP, ADP und ATP (LTQ Orbitrap). ATP konnte an keinem der FFE-Ausgänge mit angelegter Trennungsspannung nachgewiesen werden. Stattdessen sind Scharen von Peaks im Abstand von m/z 58 zu sehen.

per direkter Infusion mit ESI-MS untersucht. Es konnten jedoch keine Anzeichen der ionensupprimierenden Substanzen gefunden werden.

Mit der Zeit fiel bei den μ FFE-MS-Experimenten auf, dass die Peakscharen zu Beginn der Experimente, also nachdem der FFE-Chip mit darin enthaltenen Lösungsmitteln seit dem Vortag geruht hatte, mit besonders hohen Intensitäten in den Massenspektren vertreten waren. Betroffen waren dabei vor allem die Proben der seitlichen FFE-Ausgänge, die nahe der Trennkammer lagen. Dies führte letztlich zu dem Schluss, dass Bestandteile des PBS mit der Zeit aus den Elektrodenreservoirs durch Diffusion in die Trennkammer gelangt sein mussten. Bei angelegter Spannung war dann nicht Diffusion die Hauptursache für PBS-Bestandteile in der Trennkammer, sondern eine elektrophoretische Migration der Ionen. Das verwendete PBS war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 6,5 mM Na_2HPO_4
- 1,5 mM KH_2HPO_4

Beim Vergleich mit dem FFE-HGE, der aus 5 mM AA bestand, fällt auf, wie hoch die Konzentrationen der Salze im PBS sind. Nicht-Analyt-Ionen sind dafür bekannt, die Ionisierung in ESI zu unterdrücken. Der Grund ist, dass Ionen der Lösung um den Zugang zur Tropfenoberfläche für die Gasphasenemission im ESI-Prozess konkurrieren, was bei hohen Ionenkonzentrationen zur Unterdrückung bestimmter Spezies führt.⁷⁸ Als Elektrolyt für die Elektrodenreservoirs sollte daher eine flüchtige Substanz gefunden werden, die den ESI-Prozess nicht beeinträchtigt.

5.4.4 Alternative zu PBS für die Elektrodenreservoirs

Als Alternative zu PBS in den Elektrodenreservoirs wurden verschiedene ESI-MS-kompatible Elektrolyten auf ihre Eignung für die FFE-Trennung getestet. Bei den getesteten Elektrolyten handelte es sich um Ammoniumhydrogencarbonat (AC, NH_4HCO_3), Ammoniumformiat (AF, NH_4HCO_2) und AA in verschiedenen Konzentrationen bis 500 mM. Als Zusätze wurden 10 mM NaCl und 5 mM, beziehungsweise 10 mM NaH_2PO_4 getestet, da diese Substanzen auch im PBS vorhanden waren, mit dem die FFE-Trennung gut funktionierte. Wichtige Faktoren zur Bewertung der Elektrolyten waren, wie gut sich Analyten im elektrischen Feld bei definierten Bedingungen ablenken ließen, die Langzeitstabilität der Trennung (Aufrechterhalten der Trennung für mehr als 30 min) und die Verbreiterung der Banden.

Bei Konzentrationen in der Größenordnung des μ FFE-HGE (5 mM) war mit keinem der Elektrolyten (AC, AF, AA) eine FFE-Trennung möglich. Bei Erhöhung der Konzentrationen bis 100 mM wurden Trennkraft und Langzeitstabilität bei allen Kandidaten besser. Eine weitere Erhöhung der Elektrolytkonzentration bis 500 mM brachte keine Verbesserungen mehr. Da mit 100 mM in den Elektrodenreservoirs weniger Diffusion und elektrophoretische Migration in die Trennkammer zu erwarten war als mit 500 mM, wurden in der Folge 100 mM Lösungen verwendet. μ FFE-Experimente mit Fluorescein zeigten, dass die initiale Ablenkung bei definierter Trennungsspannung bei allen drei Elektrolyten vergleichbar war. Zur Quantifizierung wurde dabei die laterale Ablenkung der Fluoresceinprobe an den FFE-Ausgängen bewertet. Unterschiede gab es jedoch in der Langzeitstabilität der Trennung. Hier fiel AF im Vergleich zu AC und AA ab. Innerhalb von 30 min verringerte sich die abgelenkte Strecke bei AF um knapp 50%. AC und AA waren im Gegensatz zu AF über die gesamten 30 min stabil. Ein Nachteil von AC war jedoch die pH-Instabilität der Elektrolytlösung über die Zeit, die auf Ausgasung von CO_2 zurückzuführen war. Bereits innerhalb weniger Stunden veränderte sich der pH-Wert einer AC-Lösung bei Raumtemperatur messbar. Um reproduzierbare Trenn- und Messergebnisse zu gewährleisten, wurde daher AA als Elektrolyt für die Verwendung in den Elektrodenreservoirs vorgezogen.

Hinsichtlich Bandenverbreiterung und Trennkraft war AA (ebenso wie AF und AC) jedoch nicht so gut geeignet wie PBS. Dies zeigte sich in den Ergebnissen von CE-Messungen einer FFE-Trennung von Fluorescein und ATP. Bei den Messungen wurden unter ansonsten gleichen Trennbedingungen PBS und 100 mM AA als Elektrolyten für die Elektrodenreservoirs in μ FFE verglichen. Mit PBS wurde Fluorescein bei 9 verwendeten FFE-Ausgängen elektrophoretisch auf A4 gelenkt und ATP auf A8. Mit AA hingegen war Fluorescein in A3 und A4 zu finden und ATP in A6 und A7. Die elektrophoretischen Banden waren also mit PBS weiter gespreizt (4 Ausgänge Differenz) als mit AA (3 Ausgänge Differenz). Außerdem war die Verteilung der Analyten auf jeweils

zwei Ausgänge bei AA ein Indiz für eine stärkere Verbreiterung der Banden. Der Zusatz von bis zu 10 mM NaH_2PO_4 zum 100 mM AA bewirkte keine signifikante Verbesserung der Trennung, ebenso wenig der Zusatz von 10 mM NaCl. Das NaCl führte außerdem wieder zur Ionensuppression bei den MS-Messungen.

Insgesamt zeigte 100 mM AA die besten Ergebnisse der getesteten ESI-MS-kompatiblen Elektrolytlösungen für die Elektrodenreservoirs in Kombination mit dem verwendeten 5 mM AA als FFE-HGE. Diese Kombination wurde daher für alle weiteren FFE-MS-Experimente verwendet.

5.5 Stoffauftrennung mit μ FFE-MS ohne PBS

Mit 100 mM AA konnte eine MS-kompatible Lösung für die Elektrolytlösung in den Elektrodenreservoirs gefunden werden, die aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Experimente mit Fluorescein gute Trennergebnisse versprach. Die Trennung der Substanzen der für diese Arbeit relevanten Enzymreaktionen wurden nun mit dem neuen Elektrolytsystem untersucht.

5.5.1 AMP, CoA und ATP

Zunächst wurden die Substanzen AMP, CoA und ATP für die FFE-Trennung ausgewählt. Die elektrophoretische Ablenkung und Detektion dieser Analyten mit μ FFE-MS hatte unter Verwendung von PBS in den Elektrodenreservoirs bereits einzeln funktioniert. Es wurde wieder der Versuchsaufbau aus Abbildung 5.12 verwendet. Das Probengemisch, bestehend aus jeweils 100 μ M AMP, CoA und ATP wurde an einem seitlichen Eingang injiziert und in der Trennkammer im elektrischen Feld bei 225 V abgelenkt. Von allen Ausgängen wurden parallel zur MS-Analytik Proben in Mikroreaktionsgefäßen gesammelt. Zur Verbesserung des Elektrosprays wurde die Probe durch ein Sheath-Liquid aus Isopropanol ergänzt. Nach dem Anlegen der Trennungsspannung von 225 V wurden die 5 Kanäle von den FFE-Ausgängen mit Hilfe des Ventils für jeweils mindestens zwei Minuten zum Massenspektrometer geschaltet. Abbildung 5.17 stellt jeweils ein repräsentatives Massenspektrum von jedem Kanal dar. Die bei der Verwendung von PBS üblichen Peak-scharen wurden nicht beobachtet und die Analytpeaks waren dominant. Die den Analyten zugewiesenen m/z sind in den gezeigten Massenspektren farblich codiert (AMP = rot, CoA = gelb, ATP = blau). Im FFE-Ausgangskanal A1 wurden 30 s nach Beginn der Messung, also bevor die elektrophoretische Migration zu einer Auftrennung führte, alle Analyten anhand deutlicher Peaks im Massenspektrum nachgewiesen (Abbildung 5.17 a). Nach erfolgter elektrophoretischer Migration wurden ab Minute 5 die Proben von den FFE-Ausgängen A2 bis A5 (b bis e) untersucht, um die Verteilung der Analyten auf die verschiedenen Ausgänge zu bestimmen. Im Massenspektrum von A2 wurden die

5.5. STOFFAUFTRENNUNG MIT μ FFE-MS OHNE PBS

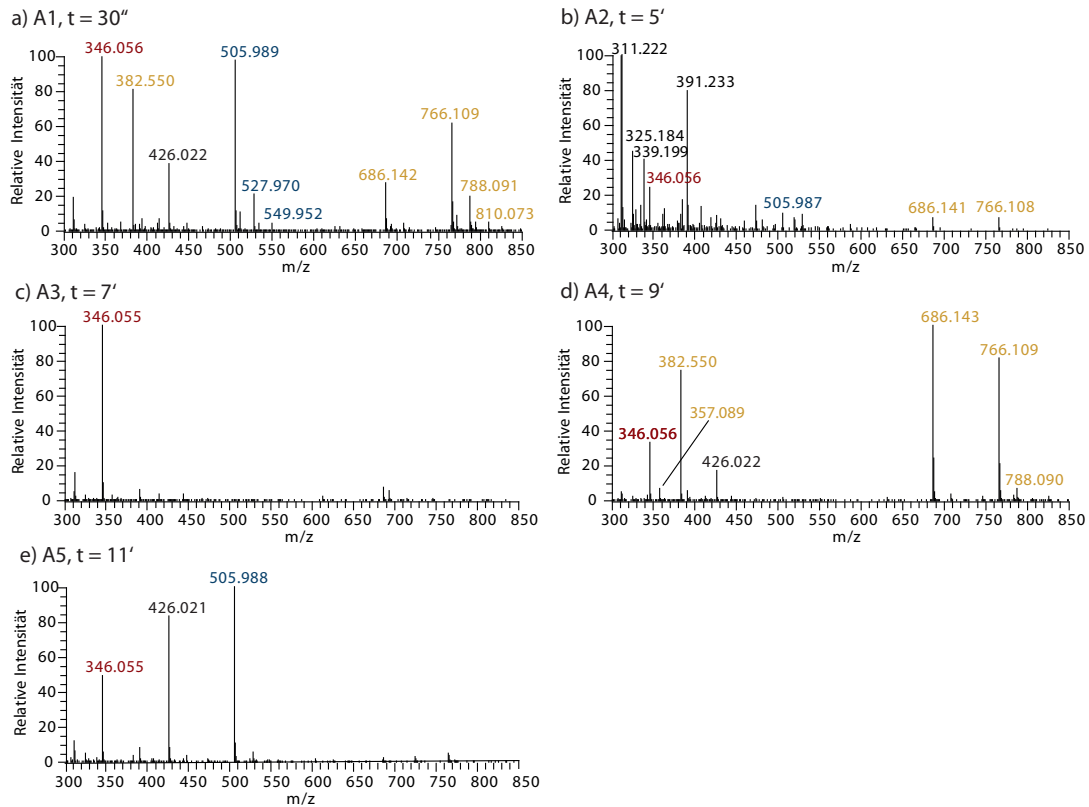


Abbildung 5.17: Darstellung der Massenspektren an den verschiedenen FFE-Ausgängen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei der Trennung von AMP, CoA und ATP. Die m/z der Spektren sind den jeweiligen Analyten farblich zugeordnet: AMP = rot, CoA = gelb, ATP = blau) (a) In Abwesenheit eines elektrischen Feldes sind alle Analyten in Kanal A1. (b) Nur Spuren der Analyten sind neben einigen unidentifizierten Peaks zu finden. (c) Der Hauptpeak ist AMP zugeordnet. (d) Die meisten größeren Peaks lassen sich CoA zuordnen. Daneben gibt es einen Peak für AMP (m/z 346,056) und einen für ADP (m/z 426,022). (e) An A5 sind die dominanten Peaks von ATP, ADP und AMP vorherrschend. Bei den Signalen von ADP und AMP handelt es sich wahrscheinlich um dephosphoryliertes ATP.

KAPITEL 5. FFE MIT MS-ANALYSE

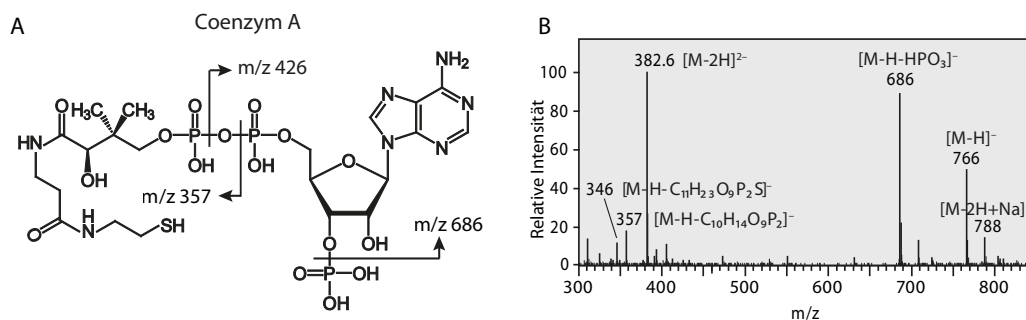


Abbildung 5.18: **A** Darstellung der molekularen Struktur von CoA. Pfeile kennzeichnen Spaltstellen, die beim ESI-Prozess beobachtet werden konnten. Die m/z der Spaltprodukte im negativen Modus sind angegeben. **B** Das entsprechende Fragmentierungsmuster von CoA im Massenspektrum. Neben dem Quasi-Molekülionenpeak $[M-H]^-$ sind vor allen Dingen das doppelt geladene CoA (m/z 382.6) und das dephosphorylierte CoA (m/z 686) dominant. Außerdem finden sich das Natriumaddukt m/z 788, das Fragment m/z 357 und AMP m/z 346 im Massenspektrum.

Analyten mit sehr geringen Intensitäten gemessen. Am Ausgang A3 war nur AMP mit hoher Intensität vorhanden. Die Probe von A4 enthielt CoA und AMP, wobei AMP wahrscheinlich das In-Source-Fragment von CoA war, wie anschließende Experimente zeigten (siehe nachfolgender Abschnitt). In der Probe von A5 wurden ATP, ADP und AMP nachgewiesen. Bei dem ADP und dem AMP handelte es sich wahrscheinlich um In-Source-Fragmente von ATP (siehe Abschnitt 5.4).

Das Fragmentierungsmuster von CoA wurde in einem weiteren Experiment überprüft, um festzustellen, ob AMP durch In-Source-Fragmentierung entstehen konnte. Dafür wurde eine Probe aus 100 μM CoA im FFE-Chip abgelenkt (unter den gleichen Bedingungen wie bei der Trennung von AMP, CoA und ATP) und mit ESI-MS analysiert. Abbildung 5.18 stellt die Molekülstruktur von CoA mit Fragmentierungsstellen dar. Wie man sieht, bildete sich auch bei der ESI von CoA AMP. Daher war die Annahme, dass zumindest Teile des in A4 nachgewiesenen AMPs von CoA stammten. Das AMP in A5 entstand wahrscheinlich vollständig durch In-Source-Fragmentierung, da es unwahrscheinlich ist, dass die AMP-Bande sich auf 3 Ausgänge verteilte.

Zur Visualisierung der Messdaten wurden aus den über 12,5 min aufgenommenen Massenspektren ein EIC erzeugt. Das EIC und eine schematische Darstellung der aufgetrennten Analytspuren im FFE-Chip sind in Abbildung 5.19 dargestellt. In der Zeichnung des FFE-Chips sind die aufgetrennten Banden farblich skizziert. Das EIC stellt die Intensitäten der Signale von AMP, CoA und ATP über die Zeit dar und ist in Segmente eingeteilt. In dem EIC wird die Verteilung der aufgetrennten Analyten auf die verschiedenen FFE-

5.5. STOFFAUFTRENNUNG MIT μ FFE-MS OHNE PBS

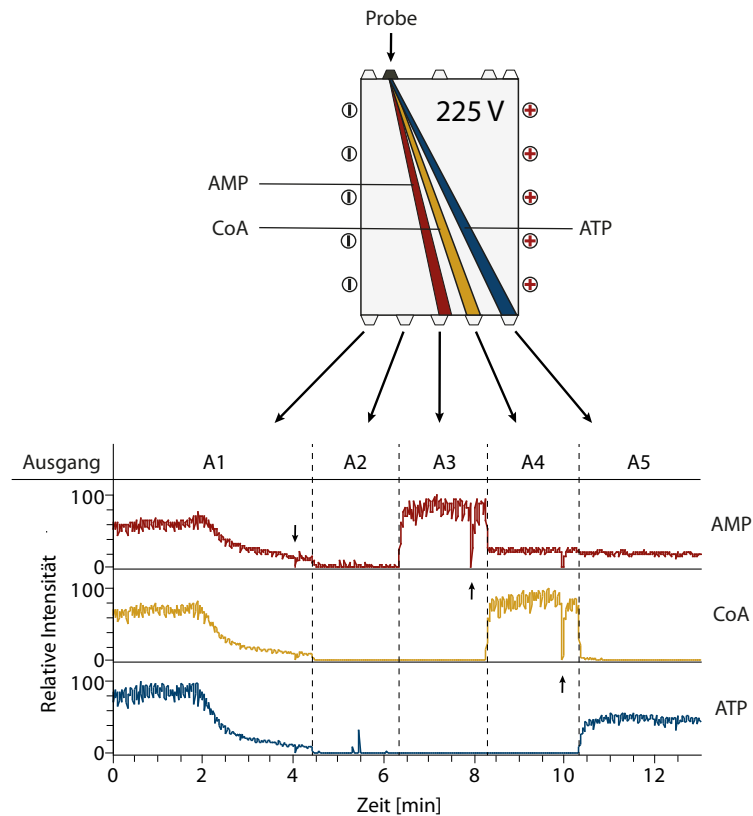


Abbildung 5.19: Darstellung der μ FFE-Trennung und der zugehörigen Ergebnisse der MS-Messungen. Oben sieht man die FFE-Trennkammer in Draufsicht. Die Analytbanden, die sich im elektrischen Feld auftrennen, sind schematisch dargestellt in rot (AMP), gelb (CoA) und blau (ATP). Unten ist das EIC dargestellt. Die Intensitäten von AMP, CoA und ATP sind über die Zeit geplottet. Vertikale Linien teilen das Chromatogramm in Segmente, die jeweils Signale eines bestimmten μ FFE-Kanals enthalten. Die Nummer des analysierten Kanals ist über dem jeweiligen Segment dargestellt. Die schwarzen Pfeile im Chromatogramm kennzeichnen Signaldips, die von Druckabfällen bei den Schaltprozessen stammen.

KAPITEL 5. FFE MIT MS-ANALYSE

Ausgangskanäle ersichtlich. Zu Beginn der Messung wurde die Trennungsspannung von 225 V im FFE-Chip angelegt. Die Analyten kamen zu dem Zeitpunkt noch alle aus A1. Die nachfolgende elektrophoretische Migration der Analyten Richtung Anode machte sich nach 2 min für etwa 30 s durch abnehmende Signale bemerkbar. Die anschließende langsamere Abnahme der Intensitäten ist auf Tailing durch Diffusion aus Totvolumina an den FFE-Ausgängen oder durch nicht-spezifische Adsorption von Analyten an den Wänden der Leitungen zurückzuführen. Nach 4 min wurde auf A2 geschaltet, was sich durch einen Signaldip im EIC bemerkbar machte (schwarzer Pfeil). Wie das Massenspektrum in Abbildung 5.17 bereits andeutete, sind die Intensitäten der Analyten in A2 sehr gering und wahrscheinlich auf zuvor an den Wänden der Leitungen adsorbierte und nun desorbierte Analyten zurückzuführen. Signale mit deutlich höheren Intensitäten wurden in den Proben der nachfolgend untersuchten FFE-Ausgänge gemessen: A3 enthielt intensive AMP-Signale, A4 enthielt CoA und wenig AMP und A5 enthielt ATP und wenig AMP. Wie bereits diskutiert, handelte es sich bei dem AMP in A4 und A5 wahrscheinlich hauptsächlich um In-Source-Fragmente von CoA und ATP. Um weitere Informationen über die Zusammensetzung der Analyten und mögliche Fragmentierungen zu erlangen, wurden die in den Mikroreaktionsgefäßen gesammelten Proben nachträglich mit CE-UV/Vis untersucht.

Für die CE-Messung wurde neben den 5 Proben der 5 μ FFE-Ausgänge eine Referenzlösung gemessen. Diese enthielt die Analyten, die mit μ FFE-MS untersucht wurden (50 μ M AMP, CoA und ATP), sowie 50 μ M ADP, das als Hydrolyseprodukt von ATP entstehen kann und außerdem ein häufiges In-Source-Fragment von ATP bei der ESI ist.⁷⁹ Die CE-Messungen wurden unter den in Abschnitt 4.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der CE-Messung sind in den Elektropherogrammen in Abbildungen 5.20 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Analyten während des μ FFE-MS-Experiments gut voneinander getrennt wurden, da in den einzelnen Spuren des Elektropherogramms jeweils nur eine Substanz mit hoher Intensität nachgewiesen wurde. AMP konnte in den Proben von A4 und A5 nicht nachgewiesen werden, was die These der In-Source-Fragmentierung von ATP und CoA zu AMP bei der ESI stützt. Kleine ADP-Peaks in den Spuren der Elektropherogramme deuten auf eine Hydrolyse von ATP in geringem Maße hin.

5.5.2 AMP, CoA, ATP, Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Citrat

Als nächstes sollte die Komplexität des aufzutrennenden Probengemischs durch das Hinzufügen weiterer Substanzen aus den Enzymreaktionen erhöht werden. Wichtig waren vor allen Dingen die beiden Reaktionsprodukte Malonyl-CoA und Acetyl-CoA. Citrat, als Nebenprodukt des CoA-Recyclings, wurde dem Probengemisch ebenfalls hinzugefügt, um realitätsnahe Bedingungen eines Enzymreaktionsgemischs nachzuahmen. Gemeinsam mit AMP, ATP und CoA bestand die Probe nun aus insgesamt 6 Substanzen. Zur

5.5. STOFFAUFTRENNUNG MIT μ FFE-MS OHNE PBS

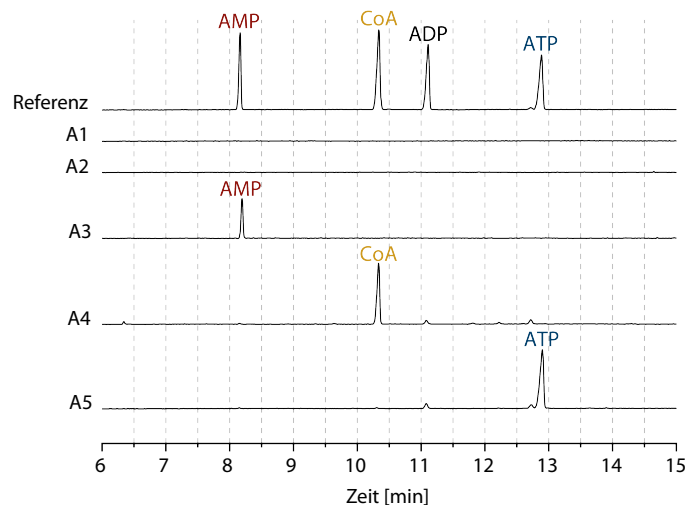


Abbildung 5.20: Elektropherogramme der CE-UV/Vis-Messungen der μ FFE-Ausgänge A1 bis A5. Zur Identifizierung der Analyten wurde eine Referenzprobe aus AMP, CoA, ADP und ATP gemessen. ADP, das Hydrolyseprodukt von ATP, wurde gemessen, um dessen Vorhandensein in den Proben zu identifizieren.

Erhöhung der Auflösung der FFE-Trennung wurden insgesamt 3 Ventile eingesetzt: 2 baugleiche 5-Positionen-Ventile (Cheminert), sowie das ebenfalls zuvor verwendete 2-Wege-Ventil (Upchurch Scientific). Die Kombination der drei Ventile ermöglichte das automatisierte Durchschalten von bis zu 10 Positionen. Dafür wurden die beiden 5-Wege-Ventile über eine Peristaltikpumpe mit den μ FFE-Ausgängen verbunden. Die beiden Ausgänge der 5-Wege-Ventile waren mit dem 2-Wege-Ventil verbunden, das einen Kanal zum Massenspektrometer schalten konnte. Mit diesem Aufbau wurde das 6-Substanzen-Gemisch (100 μ M) getrennt und untersucht. Der HGE war 5 mM AA und der Elektrolyt in den Elektrodenreservoirs 100 mM AA. Es wurde ein μ FFE-Chip mit 9 Ausgängen verwendet. In Vorversuchen wurde der Analyt mit der höchsten elektrophoretischen Mobilität, Citrat, bei einer Trennungsspannung von 200 V auf den äußersten Ausgang A9 gelenkt. Diese Trennungsspannung wurde daher für das Experiment gewählt, um eine möglichst hohe Trennkraft zu erzielen. Abbildung 5.21 stellt die Ergebnisse einer Messung dar, bei der die Trennungsspannung von 200 V 30 s nach Messbeginn angelegt wurde. Zunächst wurde A1 mit allen Analyten vor der Trennung analysiert. Ab Minute 4,5 wurden die einzelnen Kanäle in Abständen von einer Minute sukzessive zum Massenspektrometer geschaltet. Die Ergebnisse im EIC zeigen eine Verteilung der Substanzen auf die Ausgänge A4 bis A9. AMP wurde in den Kanälen A4 und A5 gemessen, Acetyl-CoA und CoA beide in A6 und wenig in A7, ATP und Malonyl-CoA vollständig in A7 und Citrat in A8 und A9. Bei den gegebenen Bedingungen konnte also nicht jede Substanz auf einen separaten Ausgang gelenkt werden. Die Ergebnisse der zuvor durchgeführten CE-Messung

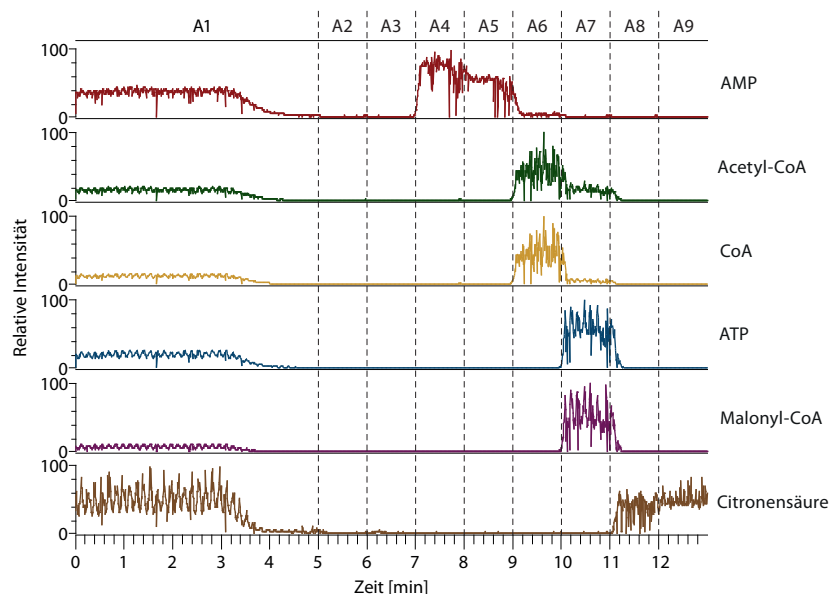


Abbildung 5.21: EIC der Trennung von AMP, Acetyl-CoA, CoA, ATP, Malonyl-CoA und Citrat mit 9 μ FFE-Ausgängen (LTQ Orbitrap). Die Spuren der Analyten sind in jeweils einer Farbe dargestellt. Vertikale Linien teilen das Chromatogramm in Segmente, die jeweils Signale eines bestimmten FFE-Ausgangskanals enthalten. Die FFE-Ausgänge A1 bis A9 werden sukzessive untersucht.

5.6. VERFOLGEN EINER ENZYMREAKTION MIT μ FFE-MS

der Substanzen (Abbildung 4.1) geben einen Hinweis darauf, warum es nicht gelang, Acetyl-CoA von CoA und ATP von Malonyl-CoA zu trennen: Wie im Elektropherogramm zu sehen ist, liegen die Peaks für diese Analyten jeweils dicht beisammen. Dies deutet darauf hin, dass die elektrophoretischen Mobilitäten von Acetyl-CoA und CoA, sowie von ATP und Malonyl-CoA, jeweils sehr ähnlich sind. Eine vollständige Trennung der verwendeten Substanzen im FFE-Chip wäre wahrscheinlich mit einer größeren Anzahl an Ausgängen und einer Optimierung der Trennbedingungen möglich. Denkbar wäre auch das Hintereinanderschalten mehrerer FFE-Chips. Dabei könnte beispielsweise die Probe von einem der FFE-Ausgänge in einem weiteren FFE-Chip aufgetrennt werden. Bei der Kaskadierung mehrere FFE-Chips wäre jedoch zu berücksichtigen, dass die Fraktionierung bei der Zonenelektrophorese immer mit einer Verdünnung der Ausgangsprobe einhergeht. Auch wenn die durchgeführten Trennungen im FFE-Chip nicht so hochauflösend waren, wie es beispielsweise mit CE möglich ist, konnte das komplexe Probengemisch doch zumindest überwiegend aufgetrennt werden.

5.6 Verfolgen einer Enzymreaktion mit μ FFE-MS

Hinsichtlich der Integration des FFE-Chips in den Mehrstufenreaktor wurde ein abschließendes Experiment mit dem experimentellen Aufbau der μ FFE-MS-Kopplung durchgeführt, bei dem das Stoffgemisch einer laufenden Enzymreaktion kontinuierlich mit μ FFE getrennt werden sollte. Die Änderung der stofflichen Zusammensetzung wurden dabei mit MS untersucht. Zum Einsatz kam das Enzym *matA*, das die Umwandlung von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA katalysiert. Die vorangegangenen Untersuchungen (siehe 5.5.2) zeigten, dass die Trennung dieser beiden Stoffe möglich sein sollte. Es wurde eine Ausgangskonzentration von 1 mM Malonyl-CoA gewählt. Für die Experimente wurde die Anzahl an Ausgängen des FFE-Chips auf 17 erhöht. Damit sollte eine bessere Auflösung erreicht werden, als bei vorherigen μ FFE-MS-Experimenten. Es wurden jedoch nicht alle 17 FFE-Ausgänge automatisiert zum Massenspektrometer geschaltet und untersucht. Stattdessen wurden mit einem 5-Positionen-Schaltventil nur die FFE-Ausgänge untersucht, an denen die Analyten Malonyl-CoA und Acetyl-CoA erwartet wurden. Zum einen wäre das automatisierte Schalten aller Ausgänge mit den vorhandenen Ventilen nicht möglich, zum anderen sollte durch die Begrenzung der Anzahl gemessener Ausgänge die Informationsdichte maximiert werden, indem die vielen leeren Kanäle nicht gemessen wurden.

Experimentelle Durchführung Vorbereitend wurde eine Eduktlösung und eine Enzymlösung angesetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Eduktlösung bestand aus 1,067 mM Malonyl-CoA gepuffert in 0,8 mM TBS (englisch *TRIS-buffered saline*; 0,8 mM TRIS, 6 mM NaCl) und wurde mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt. Die Enzymlösung wurde mit

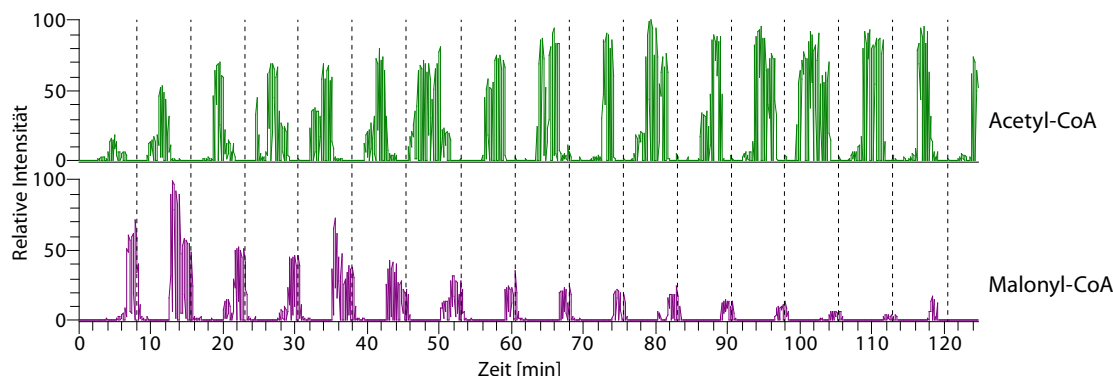


Abbildung 5.22: EIC von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA während der Enzymreaktion mit *matA*. Die gestrichelten Linien teilen das Chromatogramm in Segmente auf, die jeweils einen Schaltzyklus darstellen. Innerhalb der 7,5-minütigen Zyklen werden jeweils die μ FFE-Ausgangskanäle A13 bis A17 im 90-Sekunden-Takt durchgeschaltet. Anhand der Peaks lässt sich ein Zuwachs von Acetyl-CoA und eine Abnahme von Malonyl-CoA über die Zeit beobachten.

einer Konzentration von $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ angesetzt und in 20 mM TBS gepuffert. Für den Start der Reaktion wurden $31,25 \text{ }\mu\text{L}$ Enzymlösung mit $468,75 \text{ }\mu\text{L}$ Eduktlösung in einem Mikroreaktionsgefäß (Protein LoBind Tube, Eppendorf) mit einer Pipette vermischt und danach unmittelbar in eine $500 \text{ }\mu\text{L}$ -Spritze (Omnifix-F, B. Braun) überführt. Das Gemisch enthielt dann die gewünschten Konzentrationen von $6,25 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ *matA*, 1 mM Malonyl-CoA und 2 mM TBS. Mit diesen Konzentrationen sollte bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nach 2 h 50% enzymatischer Umsatz erreicht sein, wie Vorversuche gezeigt hatten. Über eine Spritzenpumpe wurde das Reaktionsgemisch aus der Spritze mit $1 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ an einem seitlichen μ FFE-Einlass injiziert. Der Gesamtvolumenstrom im Mikrochip ergab sich bei $17 \text{ }\mu$ FFE-Ausgängen á $3 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ zu $51 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. In vorbereitenden Experimenten war festgestellt worden, dass Acetyl-CoA und Malonyl-CoA bei 125 V Trennungsspannung auf die Ausgänge A15-A17 gelenkt wurden. Daher wurden im Hauptexperiment die Ausgänge A13-A17 bei 125 V Trennungsspannung untersucht. Mit dem Schaltventil (5 Positionen, Cheminert) waren diese Ausgänge mit dem Massenspektrometer (Orbitrap Velos Pro) verbunden und wurden für 125 min im 90-Sekunden-Takt durchgeschaltet. Die Messungen begannen 6 min nach Reaktionsbeginn.

Ergebnisse Aus den gemessenen Massenspektren wurden zunächst die m/z der Analyten extrahiert und im Zeitverlauf in einem EIC aufgetragen (Abbildung 5.22). In der Abbildung wird der Zuwachs von Acetyl-CoA und die Abnahme von Malonyl-CoA über die Zeit deutlich, was auf die Umsetzung von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA durch *matA* zurückzuführen ist. Die Unregelmäßigkeit der Peaks über die Dauer des Experiments

5.6. VERFOLGEN EINER ENZYMREAKTION MIT μ FFE-MS

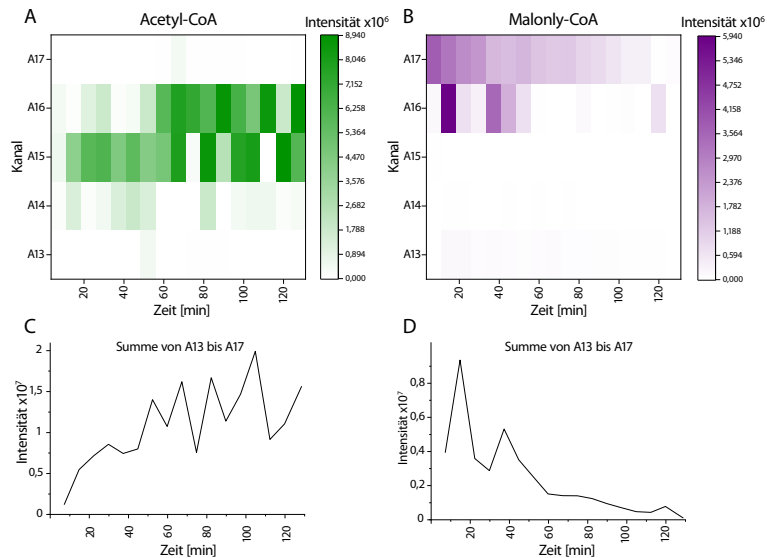


Abbildung 5.23: Darstellung der Intensitäten von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA. Die Heatmaps von Acetyl-CoA (A) und Malonyl-CoA (B) stellen die Intensitäten der Messsignale in A13 bis A17 über die Zeit dar. In den Liniendiagrammen darunter (C, D) sind die Intensitäten dieser Kanäle jeweils aufsummiert über die Zeit dargestellt.

deuten darauf hin, dass die Trennung und/oder die Analytik nicht optimal waren.

Zur genaueren Analyse wurden die gemessenen Intensitäten der Signale von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA den untersuchten Kanälen A13 bis A17 mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms (Microsoft Excel) zugewiesen. Dafür wurden die Intensitäten aus dem dargestellten EIC für jeweils die Dauer der Messung eines Ausgangs (90 s) gemittelt. Die gemittelten Werte pro Ausgang und Schaltzyklus sind in je einer Heatmap für Acetyl-CoA und Malonyl-CoA über die Zeit dargestellt (Abbildung 5.23 A und B). In den Heatmaps sind die Intensitäten der Analyten farblich codiert. Acetyl-CoA (grün) wurde fast ausschließlich in A14, A15 und A16 nachgewiesen. Zu Beginn waren die Signale noch überwiegend in A15, im Verlauf der Messung dann in vergleichbarer Intensität auch in A16. Bei Malonyl-CoA (violett) war eine ähnliche Tendenz zu sehen: Zu Beginn waren die Signale sowohl in A16 als auch in A17, nach knapp 60 min verschoben sie sich überwiegend nach A17. Diese leichte Verschiebung der elektrophoretischen Banden konnten in Wiederholungsexperimenten ebenfalls beobachtet werden.

Da sich die Analyten auf verschiedene Ausgänge verteilten, wurden die Intensitäten der Signale von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA aus den Kanälen A13-A17 jeweils aufsummiert und als Liniendiagramme über die Zeit dargestellt (C, D). In der Darstellung lassen sich die erwarteten Tendenzen durch die enzymatische Reaktion erkennen: Die Summe der

Intensitäten der Acetyl-CoA-Signale steigt an, während die der Malonyl-CoA-Signale gegen Null geht.

Diskussion Für diese ersten Experimente der gleichzeitigen Fraktionierung und Charakterisierung einer enzymatischen Reaktion mittels μ FFE-MS war noch keine genaue Quantifizierung vorhergesehen. Da die elektrophoretische Migration der HGE im FFE-Chip unterschiedliche stoffliche Zusammensetzungen und pH-Werte an den FFE-Ausgängen bewirkt, waren die Ionisierungsbedingungen und damit die Signalintensitäten der Proben verschiedener FFE-Ausgänge nicht unmittelbar vergleichbar. Die zusätzlich beobachtete sukzessive Verschiebung der elektrophoretischen Banden im Verlauf der Messung machten die ohnehin nur grobe Quantifizierung noch ungenauer, wie die unregelmäßigen Verläufe der aufsummierten Intensitäten in Abbildung 5.23 zeigen. Zahlreiche andere μ FFE-Experimente zuvor hatten jedoch gezeigt, dass die Trennung im FFE-Chip bei gleichbleibender Probenzusammensetzung üblicherweise über lange Zeiträume stabil bleibt. Daher war die Verschiebung der Banden wahrscheinlich auf Veränderungen der Probe zurückzuführen. Entscheidend dafür waren vermutlich die pH-Änderungen des Reaktionsgemisches: Bei Reaktionsbeginn wurde ein pH von 8,48 gemessen, nach 125 min lag der pH bei 7,78. Diese Zunahme an Acidität ist auf die CO_2 -Abspaltung bei der Reaktion von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA zurückzuführen. Die 2 mM TRIS konnten demnach nicht für ausreichend Pufferung sorgen. Bei 2 mM Puffer und 1 mM Reaktand war eine vollständige Pufferung jedoch auch nicht zu erwarten. Eine höhere TRIS-Konzentration war jedoch aufgrund des Effekts der elektrohydrodynamischen Bandenverbreiterung nicht sinnvoll, wie Vorversuche mit 4 mM TRIS zeigten. Die 2 mM waren bereits ein Kompromiss zwischen pH-Pufferkapazität und Bandenverbreiterung (und damit einer Verteilung der Analyten auf mehrere FFE-Ausgänge) durch eine insgesamt zu hohe Konzentration in der Probenlösung (Puffer und Analyt). Eine hohe Malonyl-CoA-Konzentration wurde gewählt, um die enzymatische Umsetzung frühzeitig durch den Nachweis des gebildeten Acetyl-CoA observieren zu können. Die Ergebnisse in Abbildung 5.22 zeigen jedoch, dass bereits bei Messbeginn deutliche Acetyl-CoA-Signale messbar waren. Daher könnte für zukünftige Experimente eine niedrigere initiale Malonyl-CoA-Konzentration gewählt werden. Eine verringerte Konzentration der Probe würde die Verbreiterung der elektrophoretischen Banden und den Anstieg der Acidität reduzieren. Eine weitere Verbesserung für zukünftige Experimente wäre eine zuverlässige Quantifizierung der Analyten. Dies wäre durch Verwendung interner Standards realisierbar. Als interne Standards kämen Isotope von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA infrage.

In Abwesenheit interner Standards war die Quantifizierung der gemessenen Proben der verschiedenen FFE-Ausgänge zwar ungenau, dennoch konnte in dem Experiment die enzymatische Umsetzung von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA über die Zeit beobachtet werden. Gleichzeitig erfolgte eine Fraktionierung der Analyten durch die FFE-Trennung,

die in zukünftigen Experimenten durch ein verbessertes Puffersystem und angepasste Konzentrationen weiter optimiert werden kann.

5.7 Fazit

Das entwickelte System ermöglicht die schnelle und unkomplizierte Nutzung von MS, der vielleicht am besten geeigneten analytischen Methode für den Nachweis gelöster Substanzen in μ FFE. Das Online-Monitoring erlaubt es, Trennparameter im laufenden Betrieb anzupassen, was einen wesentlichen Vorteil gegenüber einer nachträglichen Analyse der Proben darstellt.

Für die erfolgreiche Kopplung des FFE-Chips mit ESI-MS im Rahmen dieser Arbeit waren im Wesentlichen vier Aspekte maßgeblich: (i) Ein reproduzierbar funktionierender FFE-Chip. Entscheidend war der Wechsel des Materials von PDMS zu PMMA. Erst die mechanische Stabilität des PMMA ermöglichte reproduzierbare und stabile Trennungen. Auch das Prinzip der Elektrodenintegration mit Membranen spielte eine wichtige Rolle für die Langzeitstabilität der Trennung, die in μ FFE generell ein Problem darstellt.⁸⁰ (ii) Das Pumpensystem. Obwohl die Verwendung einer Peristaltikpumpe im Grunde trivial ist, hob sich der μ FFE-MS-Versuchsaufbau dadurch entscheidend von den bisher in der Literatur präsentierten μ FFE-Systemen ab. Die an den μ FFE-Ausgängen verbundene Peristaltikpumpe stellte gleichbleibende Flüsse an den verschiedenen Ausgängen sicher, indem Flüssigkeit dort angesogen wurde, anstatt sie vollständig an den Eingängen des FFE-Chips zu injizieren. Entscheidend war, dass der Fluss im Mikrochip durch nachgeschaltete Leitungen dadurch nicht wesentlich gestört wurde und die Trennung somit stabil blieb. Dies ermöglichte die parallele Verwendung und Analyse mehrerer μ FFE-Ausgangskanäle mit MS. (iii) Ein Elektrolyt-System bestehend aus 5 mM AA als FFE-HGE und 100 mM AA als Elektrolyt in den Elektrodenreservoirs, das eine scharfe Trennung der Analyten ermöglichte und gleichzeitig kompatibel mit ESI-MS war. Neben der Wahl der Elektrolyten waren deren Konzentrationen für eine saubere Trennung, gute Bandenschärfe und die erfolgreiche Detektion mit MS wichtig. (iv) Mehrpositionen-Schaltventile. Erst der Einsatz eines Schaltventils machte es möglich, mehrere parallele Proben zuverlässig in schneller Folge zu untersuchen. Dabei wurden mehrere Ventile kombiniert, um die Proben von bis zu 10 μ FFE-Ausgänge bei laufender Trennung automatisiert zum Massenspektrometer schalten zu können.

Verbesserungspotential des μ FFE-MS-Systems besteht wahrscheinlich in erster Linie in einem noch zuverlässigeren FFE-Chip, was durch (maschinelle) Chipherstellung mit geringeren geometrischen Abweichungen und besserer Qualitätskontrolle der Bauteile möglich wäre. Die Höhenunterschiede der FFE-Trennkammer durch unebene PMMA-Platten waren der wohl größte Faktor für Ungleichheiten zwischen verschiedenen FFE-Chips.

KAPITEL 5. FFE MIT MS-ANALYSE

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung besteht in der Optimierung des HGE-Systems. Hier mussten, unter Berücksichtigung der Kompatibilität mit MS, Kompromisse zwischen guter Trennung und leistungsfähiger Detektion gemacht werden. Die Verwendung anderer Materialien für den FFE-Chip als PMMA würde die Möglichkeit für neue HGE-Systeme eröffnen. Interessant wären beispielsweise organische Lösungsmittel, von deren Verwendung wegen der Unbeständigkeit von PMMA gegenüber diesen abgesehen wurde. Neben der Möglichkeit zur Optimierung der Trennung wäre die Verwendung organischer Lösungsmittel vor allem vielversprechend hinsichtlich der Kopplung mit MS. Denn wären die organischen Lösungsmittel bereits Teil des HGE, könnte die Verwendung eines Sheath-Liquid, beziehungsweise das Beimischen organischer Lösungsmittel über ein T-Stück, zur Verbesserung der ESI überflüssig werden. Die beiden letztgenannten Maßnahmen haben nämlich einige Nachteile. Zum einen ist die Vermischung im T-Stück zwischen organischem Lösungsmittel und der Probe nicht optimal, zum anderen stellt das Beimischen einen Verdünnungsschritt da, was hinsichtlich einer angestrebten niedrigen Nachweisgrenze bei der MS-Analyse unvorteilhaft ist. Die Verwendung eines T-Stücks hatte außerdem den Nachteil, dass durch das Bauteil zusätzliches Volumen bei den Schaltvorgängen verdrängt werden musste, bis die nächste Probe die Emitterspitze erreichte. Dadurch waren die Schaltzeiten erhöht und das Tailing verstärkt. Bei der Verwendung eines Sheath-Liquids gab es dieses Problem zwar nicht, jedoch wurden höhere ESI-Spannungen benötigt, um die Analyten nachweisen zu können. Die hohen Spannungen führten manchmal zu einer Beschädigung der Emitterkapillare.

Insgesamt stellte das entwickelte μ FFE-MS-System jedoch eine leistungsfähige Methode dar, die die wesentlichen Anforderungen erfüllte, die zu Projektbeginn an die mikrofluidische Trenneinheit gestellt wurden.

6 ESI-Multiemitter

6.1 Einführung

Um die Dauer der Analyse der FFE-Trennung mit MS zu reduzieren und gleichzeitig die Anzahl analysierter Kanäle zu erhöhen, wurde im nächsten Schritt ein ESI-Multiemitter entwickelt. In der Literatur wird von diversen ESI-Multiemitter-Systemen berichtet. Die meisten zielen auf eine Erhöhung der Volumenströme einer Probe und damit eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses ab.⁸¹⁻⁸⁴ Dafür wurde eine Probe an mehreren dicht beieinander liegenden Emitttern gleichzeitig ionisiert. In anderen Systemen wurden mehrere Emitter für verschiedene Proben verwendet, die nacheinander ionisiert werden sollten.⁸⁵⁻⁸⁷ Dabei waren die Emitter örtlich getrennt und konnten durch Bewegung des Multiemitterbauteils sukzessive vor die Einlasskapillare des Massenspektrometers gebracht werden. Die Hochspannung für das Elektrospray lag jeweils an allen Emitttern gleichzeitig an. Andere Arbeitsgruppen entwickelten ESI-Multiemitter, bei dem in Millisekundenabständen zwischen zwei,⁸⁸ beziehungsweise drei⁸⁹ Emitttern zur Erzeugung eines Elektrosprays geschaltet werden konnte. Die Emitter waren dabei nebeneinander stationär vor dem Massenspektrometer-Eingang positioniert und wurden in Synchronisation mit dem Massenspektrometer einzeln elektronisch angesteuert. Mit diesen Aufbauten war eine quasi-kontinuierliche und flexible Analyse von bis zu drei parallelen Flüssigkeitsströmen möglich.

Die Fabrikation eines Multiemitters, in dem die einzelnen Emitter automatisiert sukzessive vor das Massenspektrometer bewegt werden, wäre aufgrund des technischen Aufwandes komplex gewesen. Außerdem ist das Schalten mit mechanisch bewegten Teilen nicht so schnell, wie es rein elektronisch möglich ist. Daher wurde das Prinzip aufgegriffen, mehrere Emitter gleichzeitig vor der Massenspektrometer-Einlasskapillare zu positionieren und einzeln über das Anlegen von Hochspannung anzusteuern. Der wesentliche Vorteil gegenüber der Verwendung des zuvor genutzten Schaltventils ist die deutliche Reduzierung der Analysezeit, da kein Totvolumen beim Schaltvorgang verdrängt werden muss. Der limitierende Faktor der Schaltzeit sind dann lediglich die Scanzeiten des Massenspektrometers, die im Millisekundenbereich liegen.

Für diese Arbeit wurde ein von Stefan Höving entworfenes Design für einen ESI-Multiemitter aufgegriffen. Das Bauteil wurde dann in dieser Arbeit optimiert und eine MS-Analysemethode entwickelt, die zusammen mit der zuvor entwickelten FFE-

KAPITEL 6. ESI-MULTIEMITTER

Trennmethode ein funktionelles Trenn- und Analysesystem darstellt. Die Ergebnisse, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, wurden in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht.⁶⁵

6.2 Design

Zur Analyse einer μ FFE-Trennung mit höherer Auflösung als zuvor bei der Verwendung von Schaltventilen sollten 18 einzelne ESI-Emitter in ein Multiemitter-Bauteil integriert werden. Um diese Anzahl an Emittlern gleichzeitig funktionell vor dem MS positionieren zu können, wurden diese im Kreis angeordnet und 45° zum Kreismittelpunkt geneigt, so dass sich die Emitter bei gedachter Verlängerung in einem Brennpunkt trafen. Diese Anordnung ist in der technischen Zeichnung des ESI-Multiemitters in Abbildung 6.1 A zu sehen. Bei den Emittlern handelte es sich um Quarzglaskapillaren ($360\ \mu\text{m}$ OD) die auf der Massenspektrometer-zugewandten Seite per Hand in Stahlkapillaren gesteckt und von außen mit Tygon-Schlauch ($250\ \mu\text{m}$ ID) an diesen fixiert wurden (die Schläuche zur Fixierung sind nicht eingezeichnet). Die Stahlkapillaren (18 Stück) waren in ein Bauteil aus Polycarbonat (PC) eingelassen, wodurch sie in Position gehalten und mit jeweils einem in das PC gebohrten Kanal verbunden waren. Diese Kanäle führten zur Massenspektrometer-abgewandten Seite des Multiemitters (Abbildung 6.1 B), an der sich eine Leiterplatte befand (dunkelgrau in der Zeichnung). Dort waren Stahlkapillaren als Fluidikports in die Kanäle gesteckt. Zusätzlich gab es für jeden Emitter einen zweiten Fluidikport auf der Massenspektrometer-abgewandten Seite, über den ein Zusatzstrom, beispielsweise organische Lösungsmittel zur Verbesserung des Elektrosprays, beigegeben werden konnte. Die Kanäle der jeweils zwei Anschlüsse pro Emitter waren im PC-Bauteil Y-förmig vereint, so dass zu einem gewissen Grad Vermischung stattfinden konnte, bevor die Flüssigkeit ionisiert wurde. Auf der Massenspektrometer-abgewandten Seite des Multiemitters befanden sich neben den 18×2 Fluidikports außerdem 18 Metallstifte für den elektrischen Kontakt zu einer Hochspannungsquelle zur Erzeugung des Elektrosprays. Die Kontaktstifte waren über Leiterbahnen mit den Stahlkapillaren, und damit auch der Flüssigkeit, elektrisch verbunden. Der MS-Einlass stellte die Gegenelektrode dar, so dass an der Emitterspitze ein Elektrospray entstehen konnte.

6.3 Praktischer Teil

6.3.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau entsprach weitestgehend den vorherigen FFE-MS-Experimenten und ist in Abbildung 6.2 schematisch dargestellt. Bei dem verwendeten Massenspektrometer handelte es sich in diesem Fall um eine lineare Ionenfalle (LTQ XL, Thermo Fisher Scien-

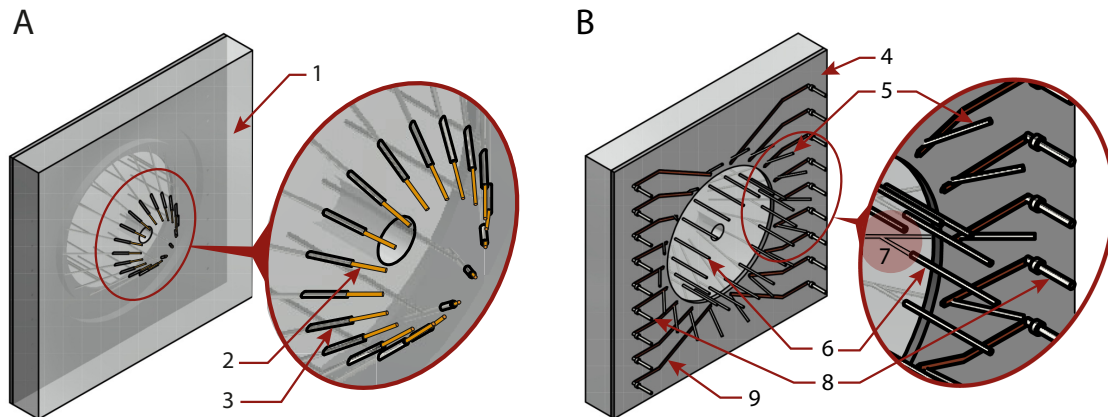


Abbildung 6.1: Technische Zeichnung des Multiemitters von der Vorder- und Rückseite. Der Körper des Multiemitters (1) besteht aus einer 12 mm dicken Platte aus PC. **A** Auf der dem Massenspektrometer zugewandten Seite des Multiemitters sind die kreisförmig angeordneten Emitterkapillaren aus Quarzglas (2) zu erkennen, die in Edelstahlkapillaren (3) fixiert sind. **B** Auf der dem Massenspektrometer abgewandten Seite liegt eine Leiterplatte auf (4). Auf dieser Seite befinden sich Edelstahlkapillaren als Fluidikports für Proben vom FFE-Chip (5) und für Zusatzströme (6). Die Fluidikports sind jeweils mit einem in das PC gebohrten Kanal verbunden. Je zwei Kanäle sind im PC-Körper zu einem Y-Kanal vereint (7, rot unterlegt), der zur Massenspektrometer-zugewandten Seite führt, wo die Edelstahlkapillaren für die Emitter (3) eingesteckt sind. Metallstifte (8) auf der Leiterplatte dienen der Kontaktierung für das Anlegen von Hochspannung für die ESI. Die Metallstifte sind über Leiterbahnen (9) mit den Fluidikports (5) elektrisch verbunden. Die Fluidikports fungieren außerdem als Bolzen zur Fixierung der Leiterplatte auf dem Polycarbonatkörper.

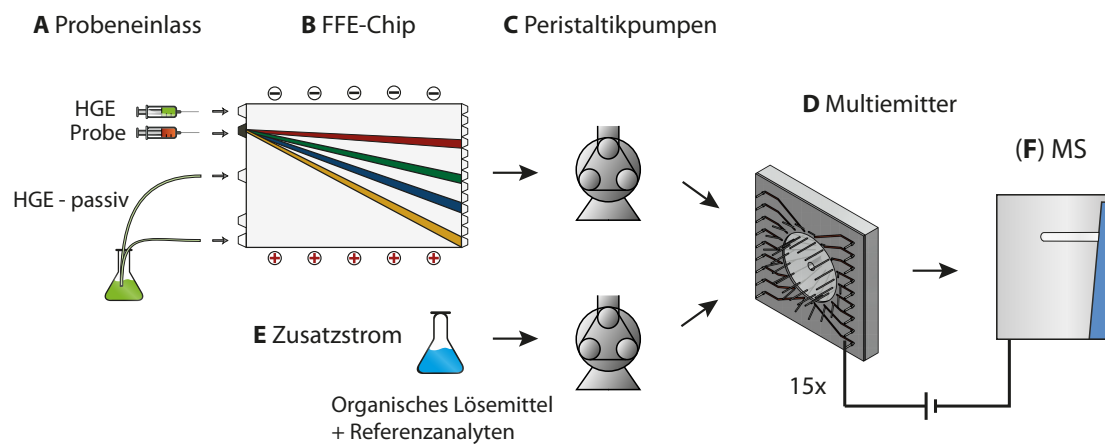


Abbildung 6.2: Versuchsaufbau zur μ FFE-MS-Analyse mit Multiemitter. Der Probeneinlass (A) in den FFE-Chip (B) erfolgt wie zuvor mit einer Kombination aus Spritzenpumpe und passivem Einlass und wird durch eine Peristaltikpumpe (C) angetrieben. Im Multiemitterbauteil (D) steht pro Emitter jeweils ein Stromanschluss, ein Einlass für die μ FFE-Probe und ein Einlass für einen Zusatzstrom (E) zur Verfügung. Die Flüsse werden im Multiemitter, der vor dem MS-Einlass (F) positioniert ist, zusammengeführt und für die Analyse ionisiert.

tific, USA). Statt der maximal 10 μ FFE-Ausgänge bei der Verwendung von Schaltventilen, wurden mit dem Multiemitter 15 μ FFE-Ausgänge verwendet. Über die Schläuche der Peristaltikpumpe war jeder μ FFE-Ausgang mit einem Emitter verbunden, der an eine Hochspannungsquelle angeschlossen war. Eine weitere Peristaltikpumpe förderte einen Zusatzstrom über den jeweiligen Zweiteinlass zu den einzelnen Emittlern.

6.3.2 ESI-Hochspannung

Für die bei ESI benötigte Hochspannung wurde von der hauseigenen Werkstatt ein 15-Kanal-Hochspannungs-Netzteil angefertigt, das Rechteckspannungen bis 3,5 kV, sowohl mit positiver, als auch negativer Polarität, erzeugen konnte. Das Schalten zwischen bis zu 15 Kanälen war im Millisekundentakt möglich. Auf ein Signal (elektrisches Potential) einer Länge von 0 ms bis 999 ms folgte jeweils eine Pause (kein Potential) von 0 ms bis 999 ms, bevor der nächste Kanal angesteuert wurde. Das Schalten einer Verzögerung nach jedem Signal fand statt, damit während eines Scans des Massenspektrometers (etwa 100 ms) kein Wechsel auf den nächsten Kanal erfolgen konnte. Damit wurde sichergestellt, dass ein Massenspektrum nur die Signale der Analyten eines FFE-Ausgangs enthielt. Die Signallücken in den Spektren dienten außerdem als Referenz für Schaltvorgänge bei der Auswertung der Daten.

6.3.3 Versuchsdurchführung

Die Probe, die in den FFE-Chip injiziert wurde, bestand aus jeweils 100 μ M AMP, CoA, ATP und Citrat. Diese Substanzen wurden gewählt, da sich gezeigt hatte, dass diese sich mit dem μ FFE-System gut trennen ließen und der Nachweis mit ESI-MS gut funktionierte. Der FFE-HGE war 5 mM AA und in den Elektrodenreservoirs wurde 100 mM AA verwendet. Zur Verbesserung des Elektrosprays wurde ein Zusatzstrom aus 60 % Isopropanol verwendet (Höhere Konzentrationen an Isopropanol hatten in Mischung mit der Probenlösung vom FFE-Chip zur Ausfällung von Salzen geführt). Der Zusatzstrom enthielt außerdem 100 μ M Cytidinmonophosphat (CMP), das somit in jedem Scan vorhanden war und als interner Standard für die Funktionalität des Elektrosprays fungieren sollte. In den μ FFE-Ausgangskanal A2 wurde dem Zusatzstrom außerdem 100 μ M Uridinmonophosphat (UMP) zugegeben. Dieses diente als Referenz für den Kanal A2 und damit als Anhaltspunkt für die Zuordnung der Kanäle bei der Auswertung. Es wurde alle 420 ms auf den nächsten Kanal geschaltet. In dem Zeitfenster von 420 ms lag für 210 ms jeweils ein Potential von -3,5 kV an, das von 210 ms Pause gefolgt wurde. Durch das negative Potential wurden negative Ionen erzeugt. Die automatische Verstärkungsregelung AGC (*automatic gain control*) wurde in der Massenspektrometer-Software (Thermo Scientific Xcalibur) deaktiviert und die Ioneninjektionszeit auf 1 ms festgelegt. Dadurch waren gleichbleibende Scanzeiten für die Zuordnung der Kanäle bei

KAPITEL 6. ESI-MULTIEMITTER

der Auswertung gewährleistet. Die Massenspektrometer-Software gab für die Messung Scanzeiten von 70 ms an. Damit sollten während der 210 ms, in denen ein Potential an einem Emitter anlag, zumindest zwei vollständige Scans stattfinden. Es zeigte sich jedoch im Nachhinein, dass zwischen den von der Software angezeigten Scanzeiten Pausen lagen, wodurch nur durchschnittlich alle 81,2 ms ein Scan stattfand. Dadurch war nicht gewährleistet, dass zwei vollständige Scans in dem Zeitfenster von 210 ms stattfanden.

Unter den beschriebenen Bedingungen wurden drei Experimente durchgeführt. Die Kanäle von 15 FFE-Ausgängen wurden sukzessive zum Massenspektrometer geschaltet und gemessen. Im ersten Experiment wurde mit Beginn der Aufzeichnung der Massenspektren eine FFE-Trennungsspannung von 100 V angelegt und für 10 min gemessen. Für die zweite Messung wurde die Trennungsspannung auf 150 V erhöht. Diese Messung wurde, nach einer Wartezeit von 5 min zur Stabilisierung der Trennbedingungen, für 5 min aufgenommen. Nach Erhöhung der Trennungsspannung auf 200 V und erneuter Wartezeit zur Stabilisierung erfolgte eine dritte Messung über 5 min.

6.3.4 Ergebnisse

Trennungsspannung 100V Wie oben beschrieben, wurde die FFE-Trennungsspannung von 100 V mit Beginn der Messaufzeichnungen angelegt. Der Effekt der Trennungsspannung war mit einer Verzögerung von wenigen Minuten in den Massenspektren zu erwarten, da die Flüssigkeit in den Kanälen zwischen FFE-Ausgängen und MS-Einlass erst verdrängt werden musste. Die über den Messzeitraum von 10 min kontinuierlich aufgezeichneten Massenspektren wurden zunächst in der Darstellung als EIC analysiert (Thermo Scientific Xcalibur Qual Browser). Dafür wurden die Intensitäten der mit μ FFE getrennten Analyten AMP, CoA, ATP und Citrat sowie die Intensitäten der Referenzanalyten UMP und CMP in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die EICs sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Bei Betrachtung der EICs fällt auf, dass in jeder Spur (mit Ausnahme von CMP) zyklisch auftauchende Signale zu sehen sind. Die Peaks treten dabei (zumindest in den ersten 2 min) im Abstand von 6,3 s auf. Diese Abstände ergeben sich aus den Schaltzeiten der 15 Kanäle ($15 \times 420 \text{ ms} = 6,3 \text{ s}$). Innerhalb dieser Dauer wurden alle Kanäle einmal angesteuert. Zu Beginn erscheinen die Peaks der verschiedenen Analyten noch alle gleichzeitig im Massenspektrum (da alle durch den gleichen Kanal flossen), etwa ab Minute 2 beginnt eine Veränderung der Peakfolgen. Es treten zusätzliche Peaks in den einzelnen Spuren auf, die Peaks verschiedener Spuren erscheinen nicht mehr gleichzeitig und die Intensitäten einiger Analyten verändern sich. Diese Änderungen zeigen die elektrophoretische Migration der Analyten an, die nun aus unterschiedlichen FFE-Ausgängen kamen. Nach etwa 4 min scheint die elektrophoretische Trennung im Gleichgewicht zu sein, was man anhand gleichmäßiger zeitlicher Abstände zwischen den Peaks innerhalb der Spuren erkennen kann. Man sieht jedoch, dass mehr Peaks vorhanden sind als zu Beginn der Messung, woraus sich schließen lässt, dass die Analyten sich auf mehr als jeweils einen Ausgang

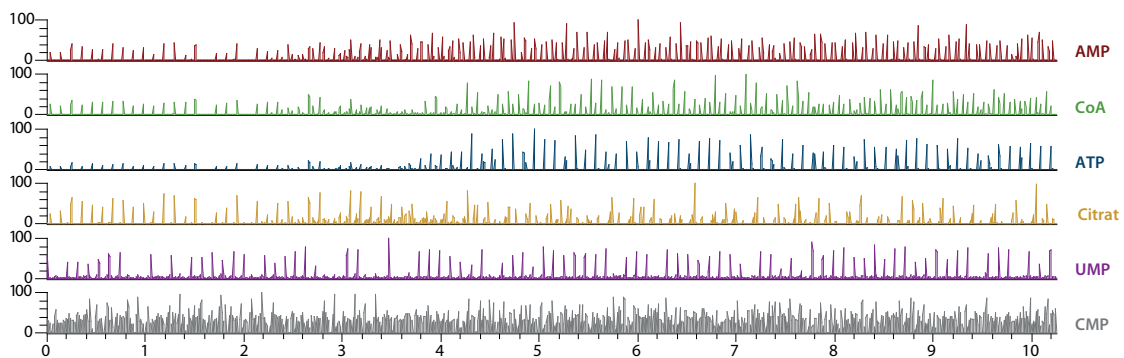


Abbildung 6.3: EICs der MS-Analyse mit Multiemitter einer FFE-Trennung bei 100 V. Dargestellt sind die Signalintensitäten der Analyten des FFE-Probengemischs AMP (rot), CoA (grün), ATP (blau), Citrat (gelb) und der Referenzanalyten UMP (violett) und CMP (grau). Mit Beginn der Messung wurde die FFE-Trennungsspannung von 100 V angelegt, die sich mit einer Verzögerung von etwa 2 min in den EICs zeigt. In den ersten zwei Minuten befinden sich die Signalpeaks in gleichen Abständen, da alle Analyten zunächst aus dem gleichen Kanal kamen. Ab Minute 2 macht sich die elektrophoretische Migration im FFE-Chip durch veränderte Peakfolgen der Probenanalyten bemerkbar. Etwa ab Minute 4 scheint die Trennung bis zum Ende der Messung stabil zu sein. Eine Zunahme an Peaks deutet darauf hin, dass Analyten an mehreren Ausgängen nachgewiesen werden. Die Abstände der Peaks der Referenzanalyten UMP und CMP sind über die Dauer der Messung erwartungsgemäß (bis auf wenige Lücken) gleichbleibend.

KAPITEL 6. ESI-MULTIEMITTER

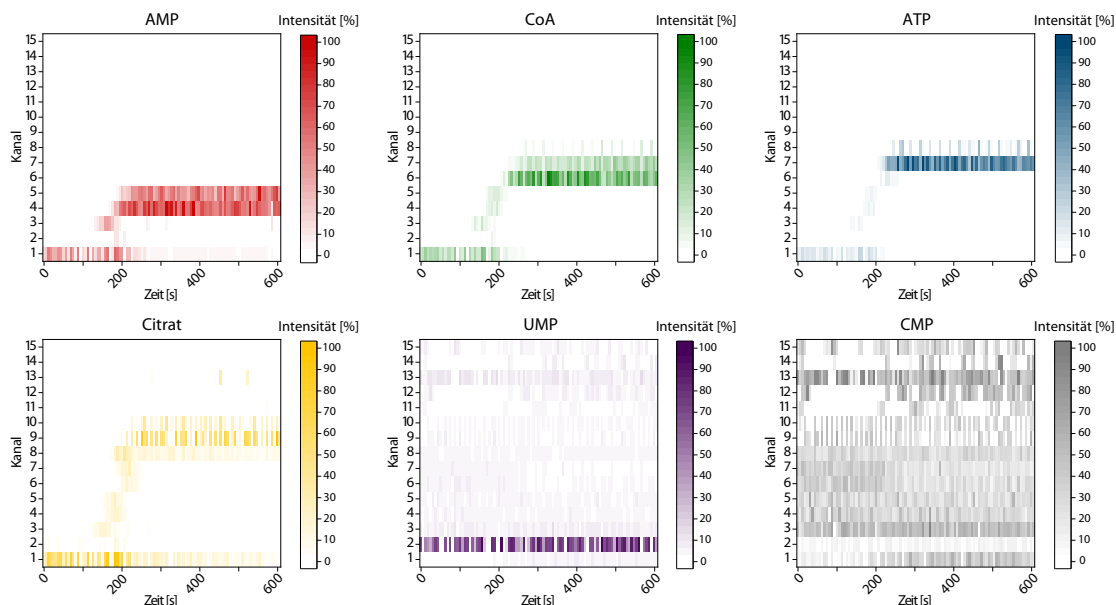


Abbildung 6.4: Heatmaps der MS-Analyse mit Multiemitter der μ FFE-Trennung bei 100V. Dargestellt sind die normierten Intensitäten der EICs in den 15 Kanälen der FFE-Ausgänge im Zeitverlauf. Die Signale der mit μ FFE getrennten Analyten AMP (rot), CoA (grün), ATP (blau) und Citrat (gelb) zeigen durch die elektrophoretische Migration eine zeitliche Veränderung, die Signale der Referenzanalyten UMP und CMP bleiben über die Zeit der Messung weitestgehend gleich. Etwa ab Sekunde 120 lässt sich die beginnende Migration der FFE-Analyten erkennen. AMP migriert von A1 nach A4 und A5, CoA nach A6 und A7, ATP nach A7 und A8 und Citrat nach A8, A9 und A10. Aussetzer des Elektrosprays lassen sich anhand von Signallücken in den Spuren erkennen.

verteilen.

Für eine genauere Analyse der Messung wurden die Datenpunkte der EICs (Intensität bestimmter m/z -Werte und Zeit) exportiert und im Tabellenkalkulationsprogramm ausgewertet. Mit Hilfe des Referenzanalyten UMP, der über den Zusatzstrom zu A2 beigemischt wurde, den regelmäßigen Zeitfenstern ohne Signale (als kein Potential anlag) und der bekannten Schaltzeiten konnten die Signale der kontinuierlich aufgezeichneten Spektren den μ FFE-Ausgängen zugeordnet werden. Dafür wurden die Intensitäten der Analyten aus den jeweils 2 bis 3 aufgenommenen Massenspektren pro Schaltvorgang gemittelt und normiert. Zur Visualisierung wurde die Verteilung der Analyten über die 15 Kanäle jeweils in Abhängigkeit der Zeit in einer Heatmap dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.4 dargestellt. Jede Heatmap stellt die Verteilung eines Analyten über die verschiedenen Kanäle über die Zeit dar. Die normierten Signalintensitäten sind

farblich gekennzeichnet. In dieser Darstellung lässt sich die Migration der elektrophoretisch getrennten Analyten AMP (rot), CoA (grün), ATP (blau) und Citrat (gelb) in Abhängigkeit der Zeit gut erkennen: In den ersten 120-150 s befinden sich die Analyten alle an A1. In einer Übergangsphase (etwa zwischen Sekunde 150-200) migriert AMP nach A4 und A5, CoA nach A6 und A7, ATP nach A7 und A8 und Citrat nach A8, A9 und A10. Bei AMP und Citrat sieht man über die gesamte Dauer der Messung Spuren des Analyten an A1. Auch CoA- und ATP-Signale sind noch für einige Sekunden an A1 nachzuweisen. Eventuell gab es Totvolumina am FFE-Ausgang oder im Multiemitter, aus denen kontinuierlich Analyten durch Diffusion abgegeben wurden. Wahrscheinlich war die Nachweisgrenze für AMP und Citrat unter den gegebenen Bedingungen niedriger, weshalb diese noch länger zu sehen waren. Bei Betrachtung der UMP-Heatmap (violett) fällt auf, dass bei fast allen Messpunkten in jedem Kanal ein schwaches Signal für UMP (m/z 323) vorhanden ist. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Auflösung und Präzision der Messungen zurückzuführen, die es notwendig machte, m/z mit relativ großen Abweichungen ($\pm 0,2 m/z$) in die Ergebnisse miteinzubeziehen. Bei vielen UMP-Signalen handelt es sich daher wahrscheinlich um Peaks von $\text{CMP-}^{13}\text{C}$ (m/z 323), die sich bei der geringen Auflösung nicht von UMP-Signalen unterscheiden ließen. Für diese These spricht, dass die Heatmaps von CMP (grau) und UMP (violett) ein sehr ähnliches Signalmuster aufweisen (bis auf A2).

CMP wurde als interner Standard über den Zusatzstrom allen Kanälen beigemischt und sollte daher in jedem Spektrum auftauchen. In der Heatmap sieht man jedoch Lücken (weiße Felder), gehäuft beispielsweise an A11 und A12. Diese Lücken, die auch an mehreren anderen Stellen in den Heatmaps vorkommen, deuten auf ein Problem bei der Erzeugung des Elektrosprays hin. Während der Experimente konnte beobachtet werden, dass nah beieinanderliegende Emittter teilweise durch Tropfen der Probe miteinander verbunden waren und dann kein Elektrospray erzeugen konnten (was sich daran erkennen ließ, dass die Tropfen nicht in Richtung Massenspektrometer beschleunigt wurden). Eine weitere Auffälligkeit sind die reduzierten Intensitäten der Signale der Proben aus Kanal A2, was besonders in der CMP-Heatmap deutlich wird. Der Unterschied gegenüber den anderen Kanälen war das gleichzeitige Vorhandensein von UMP. Daraus lässt sich schließen, dass UMP die Ionisierung der anderen Analyten unterdrückte. Die gegenseitige Ionisierungssuppression ähnlicher Analyten ist auch eine Erklärung, warum AMP, CoA und ATP zu Beginn, als alle durch den gleichen FFE-Ausgang kamen, vergleichsweise geringe Intensitäten aufwiesen.

Trennungsspannung 150V Für die Aufzeichnung der Messung der μFFE -Trennung bei 150 V wurde gewartet, bis die Trennung im Gleichgewicht war. Da dadurch keine elektrophoretische Migrations innerhalb der Messung zu erwarten war, wurde die Messzeit auf 5 min verkürzt. Die EICs der Messung sind in Abbildung 6.5 dargestellt. Auch hier lässt sich die

KAPITEL 6. ESI-MULTIEMITTER

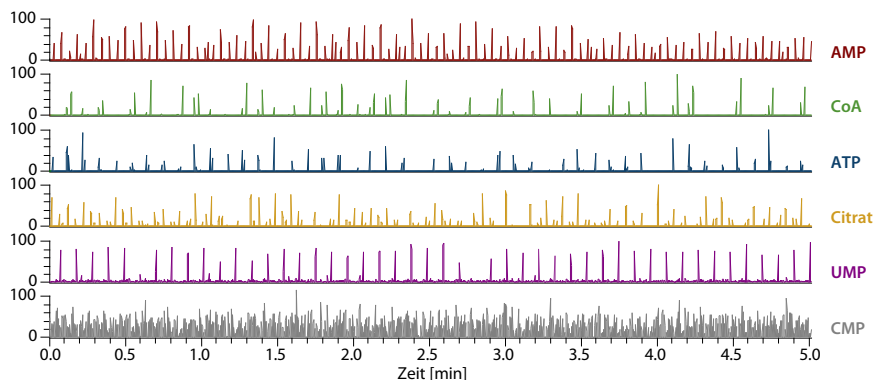


Abbildung 6.5: EICs der MS-Analyse mit Multiemitter einer μ FFE-Trennung bei 150 V. Dargestellt sind die Signalintensitäten der Analyten des FFE-Probengemischs AMP (rot), CoA (grün), ATP (blau), Citrat (gelb) und der Referenzanalyten UMP (violett) und CMP (grau). Da die Trennung zu Messbeginn bereits im Gleichgewicht ist, sind die Peakabfolgen der jeweiligen EICs über die Dauer der Messung weitestgehend stabil.

Regelmäßigkeit der Peaks erkennen. Bei CoA (grün) sind jedoch zahlreiche Lücken in der Spur, die auf Probleme mit dem Elektrospray hindeuten. Die vielen Peaks von AMP (rot) und Citrat (gelb) deuten auf eine Verteilung der Analyten auf mehrere Kanäle hin. Wie auch bei der 100 V-Messung sind die Ergebnisse der Trennung und Analyse in Heatmaps visualisiert (Abbildung 6.6). In den Heatmaps lässt sich die Migration der Analyten gut erkennen. Durch die Erhöhung der Trennungsspannung von 100 V auf 150 V konnte eine bessere Auftrennung bei insgesamt stärkerer Ablenkung erzielt werden. Es kam zu weniger Überlappungen verschiedener Analyten in einem Kanal und die Ablenkung war, der Trennungsspannung entsprechend, um etwa 50 % erhöht. Aus der CMP-Heatmap lässt sich erneut eine Ionensuppression durch UMP in A2 herauslesen.

Trennungsspannung 200V Für die Aufzeichnung der Messung der μ FFE-Trennung bei 200 V wurde wieder gewartet, bis die Trennung im Gleichgewicht war. Die Messzeit betrug 5 min. Die EICs der Messung sind in Abbildung 6.7 dargestellt. Wie zuvor lässt sich die Regelmäßigkeit der Peaks mit vereinzelt Lücken erkennen. Anhand der Anzahl an Peaks sieht man, dass CoA, ATP und Citrat vermutlich in nur jeweils einem Kanal vorkommen. Die Ergebnisse der Trennung und Analyse sind in Heatmaps in Abbildung 6.8 visualisiert. Wie die EICs bereits vermuten lassen, sind die mit μ FFE getrennten Analyten, bis auf AMP, überwiegend in nur jeweils einem Kanal zu finden. Auch Citrat, dessen Bande bei der vorherigen Messung deutlich verbreitert schien, ist nur an A15 zu finden. Aufgrund der Tendenz der vorangegangenen Messungen wird vermutet, dass Citrat bei 200 V Trennungsspannung bereits über den äußersten Ausgang A15 hinaus migrieren würde, aber

6.3. PRAKTISCHER TEIL

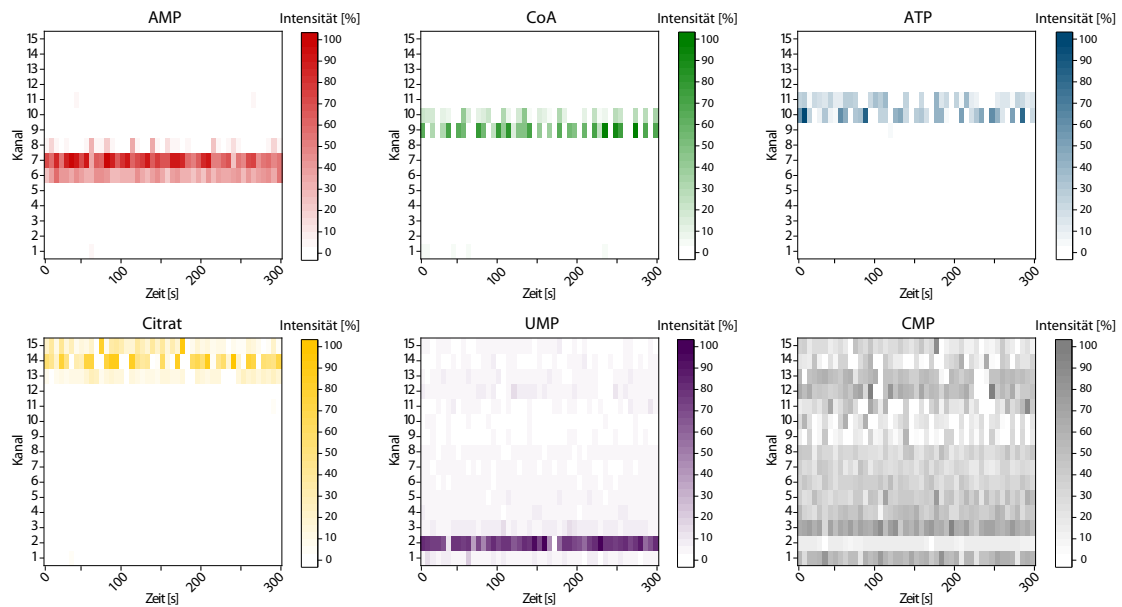


Abbildung 6.6: Heatmaps der MS-Analyse mit Multiemitter der FFE-Trennung bei 150 V. Dargestellt sind die normierten Intensitäten der EICs in den 15 Kanälen der FFE-Ausgänge über die Zeit. Die in FFE getrennten Analyten AMP (rot), CoA (grün), ATP (blau) und Citrat (gelb) sind im Vergleich zur 100 V-Messung weiter migriert: AMP nach A6, A7 und A8, CoA nach A9 und A10, ATP nach A10 und A11 und Citrat fast bis an den Rand der Trennkammer nach A13, A14 und A15. Die Signale der Referenzanalyten UMP und CMP bleiben über die Zeit der Messung weitestgehend gleich. Wieder sind gelegentliche Signallücken (weiß) in den Heatmaps zu erkennen.

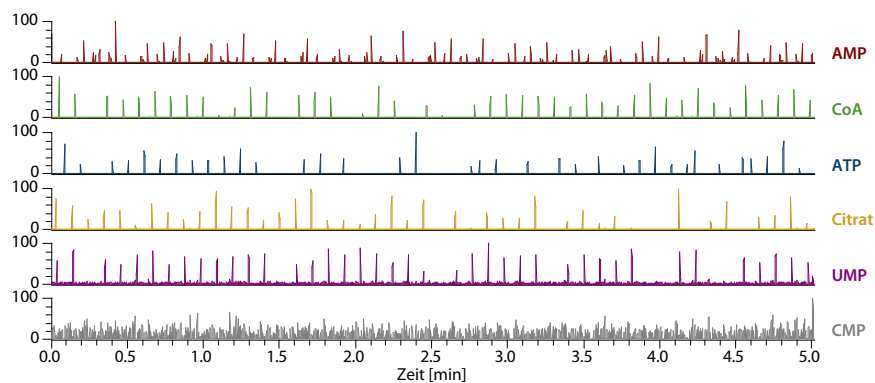


Abbildung 6.7: EICs der MS-Analyse mit Multiemitter einer FFE-Trennung bei 200 V. Dargestellt sind die Signalintensitäten der Analyten des FFE-Probengemischs AMP (rot), CoA (grün), ATP (blau), Citrat (gelb) und der Referenzanalyten UMP (violett) und CMP (grau).

KAPITEL 6. ESI-MULTIEMITTER

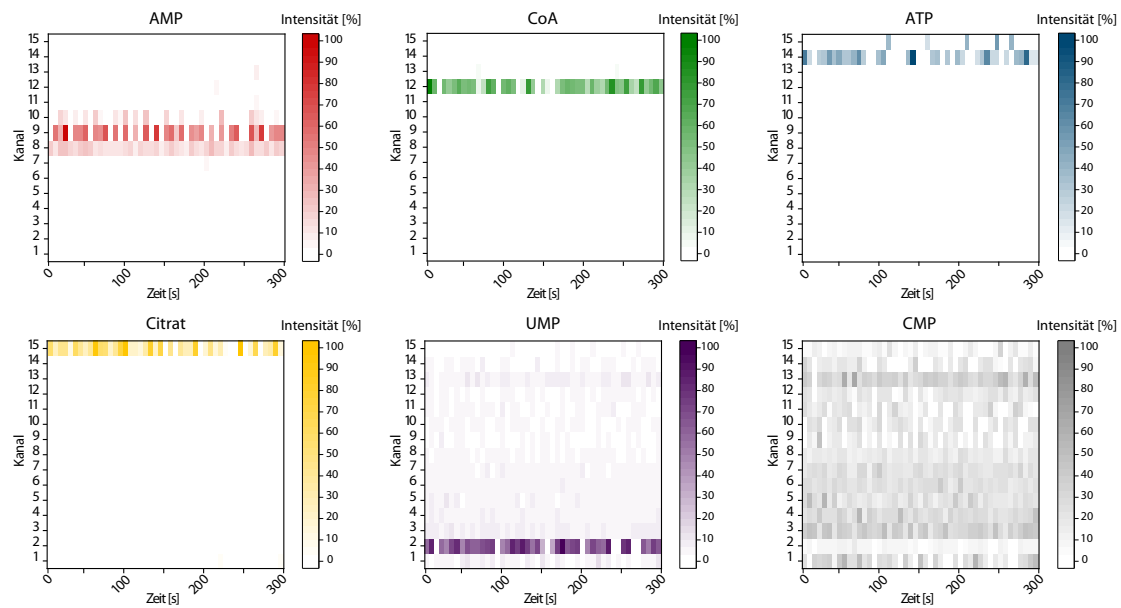


Abbildung 6.8: Heatmaps der MS-Analyse mit Multiemitter der μ FFE-Trennung bei 200 V. Dargestellt sind die normierten Intensitäten der EICs in den 15 Kanälen der FFE-Ausgänge über die Zeit. Die in FFE getrennten Analyten AMP (rot), CoA (grün), ATP (blau) und Citrat (gelb) sind durch die Erhöhung der Trennungsspannung auf 200 V weiter migriert: AMP nach A8, A9 und A10, CoA nach A12, ATP nach A14 und A15 und Citrat nach A15. Die Signale der Referenzanalyten UMP und CMP bleiben über die Zeit der Messung weitestgehend gleich. Gelegentliche Aussetzer des Elektrosprays lassen sich anhand von Signallücken in den Spuren erkennen.

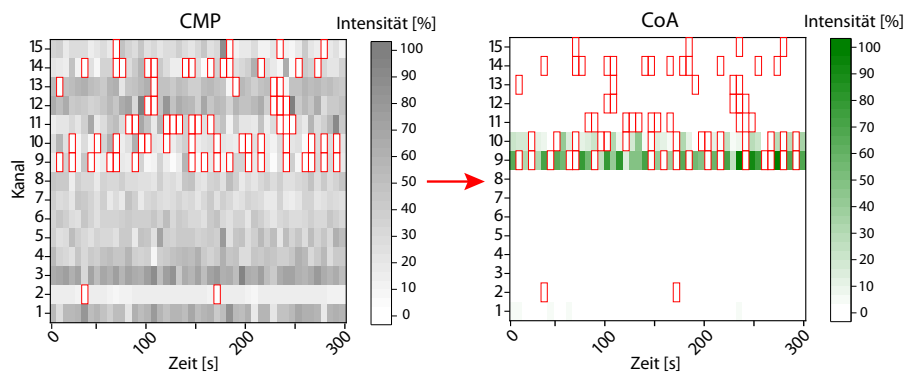


Abbildung 6.9: Hervorhebung der Signallücken der CMP-Messung (rot umrandet) bei 150 V Trennspannung als Marker für die Funktionalität des Elektrosprays. Die Maske aus rot umrandeten Feldern ist beispielhaft auf die CoA-Heatmap der gleichen Messung übertragen. Signallücken, die auf Ausfälle des Elektrosprays zurückzuführen sind, werden damit aufgezeigt.

durch die begrenzte Breite der Trennkammer beschränkt wurde. Dadurch kam es an A15 zur Überlappung mit ATP. Auch bei dieser Messung wurde eine Ionensuppression durch UMP beobachtet.

Signallücken Das Hinzufügen von CMP zu jedem Kanal über den Zusatzstrom ermöglichte es, CMP-Signale als Marker für die Funktionalität des Elektrosprays zu nutzen. Die Signallücken in den CMP-Heatmaps konnten verwendet werden, um festzustellen, ob bei nicht vorhandenem Analyt-Signal zu einem bestimmten Zeitpunkt tatsächlich keine Analyten vorhanden waren oder ob die Elektrosprayionisierung nicht funktionierte. Als Beispiel für die Verwendung der CMP-Signale als Marker sind in Abbildung 6.9 die Signallücken der CMP-Heatmap der Messung bei 150 V visuell durch rote Umrandungen hervorgehoben. An diesen Stellen gab es keine Messwerte. Die Maske aus rot umrandeten Feldern ist dann auf die CoA-Heatmap der gleichen Messung übertragen. Die gute Übereinstimmung der Maske mit den Signallücken in A9 und A10 der CoA-Heatmap zeigen, dass diese Signallücken tatsächlich auf Ausfälle des Elektrosprays zurückzuführen sind.

6.4 Fazit

Die Verwendung des Multiemitters ermöglichte die kontinuierliche Analyse 15 paralleler Kanäle und damit ein umfassendes Monitoring der μ FFE-Trennung. Die Anzahl automatisiert analysierter Ausgänge, und damit die Auflösung der FFE-Trennung gegenüber den zuvor verwendeten Schaltventilen, konnte um 50 % erhöht werden. Das Wegfallen der Totvolumina beim Schaltprozess ermöglichte eine Analyse aller Kanäle innerhalb

KAPITEL 6. ESI-MULTIEMITTER

weniger Sekunden. Damit konnte die Analysezeit im Vergleich zum zuvor präsentierten FFE-MS-Aufbau mit Schaltventilen deutlich reduziert werden. Die Analyse erforderte zwar eine nachträgliche Auswertung der Messdaten, die sich jedoch mit entsprechenden Skripten auch automatisieren ließe. Ein Nachteil des präsentierten experimentellen Aufbaus bestand darin, dass keine Proben während der Messungen gesammelt werden konnten, wie es bei der Verwendung von Schaltventilen der Fall war.

Die Zuverlässigkeit des Elektrosprays war die größte Herausforderung bei der Verwendung des Multiemitters. CMP wurde als interner Standard für die Funktionalität des Elektrosprays der Einzelemitter über den Zusatzstrom hinzugegeben. Für eine Quantifizierung der anderen Analyten war CMP nicht geeignet. Über die CMP-Signale in den Massenspektren ließ sich jedoch nachvollziehen, zu welchen Zeitpunkten das Elektrospray in den verschiedenen Kanälen funktionell war und wo nicht. Um vereinzelte Ausfälle des Elektrosprays zu kompensieren, war es notwendig, die Analysen über mehrere Schaltzyklen zu erstrecken.

Insgesamt stellt der Multiemitter in puncto Analysegeschwindigkeit und Anzahl automatisiert analysierter Kanäle eine deutliche Verbesserung dar, die derzeit allerdings auf Kosten der Ionisierungsqualität und der Möglichkeit des Probensammelns geht.

7 Fazit

Wie eingangs als Ziel der Arbeit definiert, wurde die μ FFE als Trennmethode für bestimmte niedermolekulare Verbindungen gewählt, die an Reaktionen bei der enzymatischen Herstellung von Polyketidbausteinen teilhatten. Im Rahmen des Leibniz-Research-Clusters sollte der μ FFE-Chip in ein Mehrstufenreaktorsystem integriert werden, um die Stoffgemische der anderen Mikroreaktoren kontinuierlich elektrophoretisch in ihre Einzelsubstanzen aufzutrennen.

Obwohl die erste miniaturisierte FFE bereits vor über 25 Jahren öffentlich vorgestellt wurde und seither durch zahlreiche innovative Neuerungen verbessert wurde, schienen die bis zum Jahr 2017 publizierten μ FFE-Systeme unzureichend für das Erreichen der Zielsetzung dieser Arbeit. Aspekte, die bei den meisten μ FFE-Systemen Probleme bereiteten, oder die gar nicht erst diskutiert wurden, waren die Langzeitstabilität der Trennung sowie die Trennung und Detektion anderer Analyten als der standardmäßig verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Beide Aspekte sollten in dieser Arbeit optimiert werden. Die Zuverlässigkeit der Trennung über längere Zeiträume war gerade hinsichtlich der Kopplung mit anderen Reaktoren des Mehrstufenreaktors eine wesentliche Voraussetzung.

Zunächst wurden μ FFE-Chips auf Basis von PDMS hergestellt. Das Grundprinzip dieses Designs war in einem Vorgängermodell bereits etabliert. Das Vorgängermodell ließ sich schnell und händisch herstellen und war für Proof-of-Principle-Experimente geeignet. Die Integration von Elektroden, eine zentrale Herausforderung bei der Herstellung von FFE-Chips, wurde dabei mittels Polycarbonat-Membranen als Barriere zwischen Elektrodenreservoirs und Trennkammer realisiert. Jedoch hatte das Vorgängermodell Probleme mit der Langzeitstabilität im laufenden Betrieb. Diese Probleme konnten in der vorliegenden Arbeit gelöst werden, in dem eine stabilisierende Glasplatte die nun durchflossenen Elektrodenreservoirs verschloss und gleichzeitig mechanisch stabilisierte. Die bald auftretenden Probleme der mangelhaften Bindung der durch Silanisierung fixierten Membranen konnten nicht gelöst werden, weshalb ein neuer Chip entwickelt wurde.

Der Chip auf PMMA-Basis, der den üblichen großskaligen FFE-Systemen nachempfunden war, funktionierte sehr gut und hatte einige Vorteile gegenüber dem PDMS-Chip. Zunächst einmal konnte eine zuverlässig leckfreie Befestigung der Membranen durch Laminieren erzielt werden. Außerdem bewirkte die erhöhte mechanische Stabilität des Chips ein homogeneres Flussprofil, was sich in geradlinigen Banden der Proben äußerte.

KAPITEL 7. FAZIT

In Langzeitversuchen konnte die Stabilität der elektrophoretischen Trennung nachgewiesen werden. Vorteilhaft war auch die materialbedingte Abwesenheit eines EOFs. Als nicht optimal stellten sich die Chip-zu-Chip-Unterschiede durch die Verwendung nicht vollständig homogen planer PMMA-Platten heraus. Dies führte dazu, dass bei verschiedenen FFE-Chips gleicher Bauweise jeweils ein neues Feintuning der Trennparameter vorgenommen werden musste.

Die hergestellten FFE-Chips waren theoretisch für alle bekannten CE- und FFE-Trennmodi, die in Kapitel 2 vorgestellt wurden, geeignet. Zur Anwendung kam jedoch nur FFZE. Dafür gab es verschiedene Gründe. FFITP wurde ausgeschlossen, da die getrennten Banden dabei in direktem Kontakt gestapelt sind, was die Fraktionierung bei Entnahme aus dem Chip schwierig macht. Für diesen Modus wäre eine deutlich höhere Anzahl an μ FFE-Ausgängen notwendig, um die Analyten sauber getrennt zu entnehmen. FFIEF wurde nicht verwendet, da die zu trennenden Substanzen bei den notwendigen stark sauren Bedingungen nicht stabil sind. Auch die MS-Analytik wäre bei extremen pH problematisch. FFFSE ist FFZE sehr ähnlich, hat aber in der Theorie den Vorteil einer schärferen Fokussierung der Banden. Studien zeigen jedoch, dass selbst eine zehnfache Leitfähigkeit des HGE in den Randzonen nur eine geringe Verbesserung der Aufkonzentrierung der Analyten bewirkt.²⁹ Entsprechend hohe Konzentrationen wären allerdings nicht praktikabel. Die daraus resultierenden hohen Stromdichten führen nämlich zur Bildung von Gasbläschen in der Trennkammer, was vermieden werden sollte. Daher müsste bei höheren Elektrolytkonzentrationen die Trennungsspannung reduziert werden, was wiederum die Trennkraft verringert. Dazu kommt, dass die elektrophoretische Ablenkung in den Zonen hoher Elektrolytkonzentration bereits durch die dort geringeren Feldstärken reduziert ist. Der zweite wichtige Aspekt ist die Beeinträchtigung der angestrebten Analytik mittels MS durch die benötigten hohen Salzkonzentrationen. Übliche Konzentrationen von Ammoniumacetat, das in dieser Arbeit als HGE mit einer Konzentration von 1-10 mM verwendet wurde, liegen bei ESI-MS im Bereich von 10 mM.⁷⁶ Deutlich höhere Konzentrationen können nicht verwendet werden, da diese zu Ionensuppression und Verunreinigung des Massenspektrometers führen. Aus diesen Gründen wurde daher nur mit FFZE gearbeitet, die zudem am unkompliziertesten in der Anwendung ist.

Die anfänglich durchgeführten Offline-Analysen der an den μ FFE-Ausgängen gesammelten Proben durch CE-UV/Vis ermöglichten die Analyse der μ FFE-Trennung im Nachhinein. Die Analyse war jedoch durch lange Sammel- und Messzeiten aufwendig und gegenüber der μ FFE-Trennung stark zeitverzögert. Die Optimierung der Trennbedingungen war daher mit dieser Methode schwierig zu realisieren.

Eine deutliche Verbesserung der Analyse der μ FFE-Trennung wurde durch die Kopplung der Mikrochips mit MS erzielt. Wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche μ FFE-MS-Kopplung waren das mit beiden Systemen kompatible HGE-System aus Ammoniumacetat, die Implementierung des Pumpensystems mit einer Mehrkanal-Peristaltikpumpe und

die Verwendung eines Mehrpositionen-Schaltventils. Durch sukzessive Verbesserung des technischen Aufbaus konnten die Schaltzeiten reduziert und die Totvolumina minimiert werden. In Kombination mit dem optimierten HGE-System war schließlich eine Online-Analyse der μ FFE-Trennung möglich, die in ihrer Auflösung erstmal nur durch die Anzahl der Positionen der verwendeten Schaltventile begrenzt war. Mit der Möglichkeit, die Prozesse im FFE-Chip im laufenden Betrieb zu kontrollieren, konnte nun ein direktes Feintuning der Trennparameter erfolgen. Dadurch konnte die Auftrennung komplexer Proben beobachtet und gesteuert werden. Langzeitversuche zeigten, dass die Trennung über mehrere Stunden stabil blieb. Die μ FFE-MS-Kopplung mit Schaltventil stellte dabei eine große Verbesserung zu anderen in der Fachliteratur publizierten Experimenten zu diesem Thema dar. Erstmals war es möglich, mehr als einen μ FFE-Ausgang per MS automatisiert zu analysieren. Ein entscheidender Vorteil dabei war, dass die Flüsse in der μ FFE-Trennkammer während der Analyse unverändert bleiben konnten. Der präsentierte Aufbau hat also nicht nur analytisches, sondern auch präparatives Potential und kann grundsätzlich mit jedem ESI-MS-Gerät verwendet werden.

Hinsichtlich der Vision des LRC-Projekts – der Kombination verschiedener Mikroreaktoren in einem Mehrstufenreaktor zur Herstellung von Polyketidbausteinen – wurde in einem abschließenden Experiment mit dem μ FFE-MS-Aufbau erstmals der Versuch unternommen, eine laufende Enzymreaktion zu charakterisieren. Dabei konnte die Umsetzung von Malonyl-CoA zu Acetyl-CoA durch das Enzym matA bei gleichzeitiger Fraktionierung der Analyten im FFE-Chip mittels ESI-MS beobachtet werden. Verbesserungspotential für zukünftige Experimente wurde im verwendeten Puffersystem ausgemacht, da es während des Experiments zu einer leichten Verschiebung der elektrophoretischen Banden aufgrund von pH-Änderungen kam. Das Experiment zeigte, wie komplex die Kombination verschiedener variabler Systeme ist, kann aber als vielversprechender Ansatz für zukünftige Experimente in diese Richtung angesehen werden.

Der entwickelte ESI-Multiemitter stellte nochmals eine Verbesserung der Analyse der μ FFE-Trennung gegenüber der Verwendung von Schaltventilen in zwei entscheidenden Punkten dar: Zum einen wurden die Analysezeiten deutlich reduziert und zum anderen wurden statt der vorher maximal 10 μ FFE-Ausgänge nun bis zu 15 μ FFE-Ausgänge mit MS analysiert. Nachteilig bei der Verwendung des ESI-Multiemitters war die verminderte Ionisierungsqualität und die Tatsache, dass im Gegensatz zur Verwendung eines Schaltventils keine fraktionierten Proben bei gleichzeitiger Analyse mit MS gesammelt werden konnten.

In dieser Arbeit konnte die μ FFE, vor allem durch die Kopplung mit MS, entscheidend weiterentwickelt werden. Die vielseitige MS-Analyse bei unveränderten Trennbedingungen stellt eine Verbesserung gegenüber vorherigen Systemen dar, die μ FFE deutlich näher an die Laborpraxis bringt.

Literatur

- (1) Gelbe Liste Online: Erythromycin Zugriff am 10.10.2021, https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Erythromycin_87.
- (2) Gelbe Liste Online: Doxorubicin Zugriff am 10.10.2021, https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Doxorubicin_1181.
- (3) Zhong, Q. u. a. Advances of Microfluidics in Biomedical Engineering. *Advanced Materials Technologies* **2019**, *4*, 1800663.
- (4) Wu, J.; Gu, M. Microfluidic sensing: state of the art fabrication and detection techniques. *Journal of biomedical optics* **2011**, *16*.
- (5) Novo, P. u. a. High spatial and temporal resolution cell manipulation techniques in microchannels. *Analyst* **2016**, *141*.
- (6) Sackmann, E. K.; Fulton, A. L.; Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **2014**, *507*, 181–189.
- (7) Lazar, I. M. Microfluidic devices in diagnostics: what does the future hold? *Bioanalysis* **2015**, *7*, 2677–2680.
- (8) Reboud, J. u. a. Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2019**, *116*, 4834–4842.
- (9) Chin, C. D. u. a. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 1015–1019.
- (10) Ahrberg, C. D.; Manz, A.; Chung, B. G. Polymerase chain reaction in microfluidic devices. *Lab on a Chip* **2016**, *16*, 3866–3884.
- (11) Corman, V. M. u. a. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* **2020**, *25* 2000045.
- (12) Nguyen, N.; Wereley, S., *Fundamentals and Applications of Microfluidics*; Artech House MEMS library; Artech House: 2002.
- (13) Colin, S., *Microfluidics*; ISTE Ltd und John Wiley & Sons: 2010.
- (14) Crittenden, J. C. u. a. in *MWH's Water Treatment: Principles and Design*; John Wiley & Sons: 2012, S. 1861–1862.

Literatur

- (15) Atkins, P. W., *Physikalische Chemie*, 1. deutsche Auflage; VCA Verlagsgesellschaft: 1990.
- (16) Bruus, H., *Theoretical Microfluidics*; Oxford University Press Inc.: 2008.
- (17) Duffy, D. C. u. a. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4974–4984.
- (18) Delgado, A. V. u. a. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2005**, *77*, 1753–1805.
- (19) Kohlheyer, D. Microfluidic Free-Flow Electrophoresis for Proteomics-on-a-chip, Diss., MESA Research Institute for Nanotechnology, University of Twente, Enschede, 2008.
- (20) Schrott, W. u. a. Study on surface properties of PDMS microfluidic chips treated with albumin. *Biomicrofluidics* **2009**, *3*, 044101.
- (21) Mitchelson, K.; Cheng, J.; Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids, V.I: Introduction to the Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids; Humana Press: 2001.
- (22) Wong, I.; Ho, C.-M. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics* **2009**, *7*, 291.
- (23) Altria, K.; Marsh, A.; Sanger-van de Griend, C. Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2263–82.
- (24) Espada, A.; Molina-Martin, M. Capillary electrophoresis and small molecule drug discovery: a perfect match? *Drug discovery today* **2012**, *17*, 396–404.
- (25) Nischang, I.; Bruggemann, O. On the separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography with methacrylate-based macroporous polymer monoliths. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 5389–5397.
- (26) Scheubert, K.; Hufsky, F.; Bocker, S. Computational mass spectrometry for small molecules. *Journal of Cheminformatics* **2013**, *5*, 12–12.
- (27) Harvey, D., *Analytical Chemistry 2.1*, Electronic version, 2016.
- (28) Kašička, V. From micro to macro: Conversion of capillary electrophoretic separations of biomolecules and bioparticles to preparative free-flow electrophoresis scale. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 40–52.
- (29) Novo, P.; Janasek, D. Current advances and challenges in microfluidic free-flow electrophoresis - A critical review. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *991*, 9–29.
- (30) Kohlheyer, D. u. a. Miniaturizing free-flow electrophoresis - a critical review. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 977–93.
- (31) Janasek, D. u. a. Isotachopheresis in Free-Flow Using a Miniaturized Device. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 3815–3819.

- (32) Becker, M. u. a. Isotachophoretic free-flow electrophoretic focusing and SERS detection of myoglobin inside a miniaturized device. *Analyst* **2009**, *134*, 38–40.
- (33) Park, J. K. u. a. Direct coupling of a free-flow isotachopheresis (FFITP) device with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 3495–3502.
- (34) Fu, X. u. a. Microfluidic free-flow zone electrophoresis and isotachopheresis using carbon black nano-composite PDMS sidewall membranes. *Electrophoresis* **2017**, *38*, 327–334.
- (35) Righetti, P. G.; Bossi, A. Isoelectric focusing of proteins and peptides in gel slabs and in capillaries. *Analytica Chimica Acta* **1998**, *372*, 1–19.
- (36) Xu, Y. u. a. Sub-second isoelectric focusing in free flow using a microfluidic device. *Lab on a Chip* **2003**, *3*, 224–227.
- (37) Lu, H. u. a. A Microfabricated Device for Subcellular Organelle Sorting. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 5705–5712.
- (38) Albrecht, J. W.; Jensen, K. F. Micro free-flow IEF enhanced by active cooling and functionalized gels. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4960–4969.
- (39) Albrecht, J. W.; El-Ali, J.; Jensen, K. F. Cascaded Free-Flow Isoelectric Focusing for Improved Focusing Speed and Resolution. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 9364–9371.
- (40) Kohlheyer, D. u. a. Microfluidic High-Resolution Free-Flow Isoelectric Focusing. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 8190–8198.
- (41) Wen, J. u. a. Microfluidic Preparative Free-Flow Isoelectric Focusing: System Optimization for Protein Complex Separation. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 1253–1260.
- (42) Wen, J.; Albrecht, J. W.; Jensen, K. F. Microfluidic preparative free-flow isoelectric focusing in a triangular channel: System development and characterization. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1606–1614.
- (43) Jezierski, S.; Belder, D.; Nagl, S. Microfluidic free-flow electrophoresis chips with an integrated fluorescent sensor layer for real time pH imaging in isoelectric focusing. *Chemical Communications* **2013**, *49*, 904–906.
- (44) Poehler, E. u. a. Label-free microfluidic free-flow isoelectric focusing, pH gradient sensing and near real-time isoelectric point determination of biomolecules and blood plasma fractions. *Analyst* **2015**, *140*, 7496–7502.
- (45) Herzog, C. u. a. Continuous on-chip fluorescence labelling, free-flow isoelectric focusing and marker-free isoelectric point determination of proteins and peptides. *Lab on a Chip* **2016**, *16*, 1565–1572.

Literatur

- (46) Raymond, D. E.; Manz, A.; Widmer, H. M. Continuous Sample Pretreatment Using a Free-Flow Electrophoresis Device Integrated onto a Silicon Chip. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 2858–2865.
- (47) Roman, M. C.; Brown, P. R. Free-flow electrophoresis as a preparative separation technique. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 86A–94A.
- (48) Fonslow, B. R.; Bowser, M. T. Optimizing Band Width and Resolution in Micro-Free Flow Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. **2006**, *78*, 8236–8244.
- (49) Johnson, A. C.; Bowser, M. T. Micro free flow electrophoresis. *Lab on a Chip* **2018**, *18*, 27–40.
- (50) Gross, J., *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*; Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg: 2011.
- (51) Novo, P. u. a. Integration of polycarbonate membranes in microfluidic free-flow electrophoresis. *Analyst* **2017**, *142*, 4228–4239.
- (52) Fonslow, B. R.; Bowser, M. T. Free-Flow Electrophoresis on an Anodic Bonded Glass Microchip. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 5706–5710.
- (53) Xia, Y.; Whitesides, G. M. Soft Lithography. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, *37*, 550–575.
- (54) Beruto, D. T.; Botter, R.; Fini, M. The effect of water in inorganic microsponges of calcium phosphates on the porosity and permeability of composites made with polymethylmethacrylate. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2509–2517.
- (55) Ali, U.; Karim, K. J. B. A.; Buang, N. A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews* **2015**, *55*, 678–705.
- (56) Kohlheyer, D. u. a. Bubble-Free Operation of a Microfluidic Free-Flow Electrophoresis Chip with Integrated Pt Electrodes. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 4111–4118.
- (57) Kohlheyer, D. u. a. Free-flow zone electrophoresis and isoelectric focusing using a microfabricated glass device with ion permeable membranes. *Lab on a Chip* **2006**, *6*, 374–380.
- (58) Cheng, L.-J.; Chang, H.-C. Switchable pH actuators and 3D integrated salt bridges as new strategies for reconfigurable microfluidic free-flow electrophoretic separation. *Lab on a Chip* **2014**, *14*, 979–987.
- (59) Benz, C. u. a. Chip-Based Free-Flow Electrophoresis with Integrated Nanospray Mass-Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 2766–2770.

- (60) Stone, V. N. u. a. Free flow isotachopheresis in an injection moulded miniaturised separation chamber with integrated electrodes. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1155*, 199–205.
- (61) Herzog, C. u. a. Gas removal in free-flow electrophoresis using an integrated nanoporous membrane. *Microchimica Acta* **2015**, *182*, 887–892.
- (62) Novo, P. u. a. Free Flow Electrophoresis Separation of Proteins and DNA Using Microfluidics and Polycarbonate Membranes. *Procedia Engineering* **2016**, *168*, 1382–1385.
- (63) Jender, M. u. a. Multiplexed Online Monitoring of Microfluidic Free-Flow Electrophoresis via Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2020**, *92*, 6764–6769.
- (64) Runge, T. u. a. Ultrasonically manufactured microfluidic device for yeast analysis. *Microsystem Technologies* **2017**, *23*, 2139–2144.
- (65) Jender, M. u. a. Coupling Miniaturized Free-Flow Electrophoresis to Mass Spectrometry via a Multi-Emitter ESI Interface. *Analytical Chemistry* **2021**, *93*, 7204–7209.
- (66) Sunkara, V. u. a. Simple room temperature bonding of thermoplastics and poly(dimethylsiloxane). *Lab on a Chip* **2011**, *11*, 962–965.
- (67) Johnston, I. D. u. a. Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2014**, *24*.
- (68) Walowski, B.; Hüttner, W.; Wackerbarth, H. Generation of a miniaturized free-flow electrophoresis chip based on a multi-lamination technique—isoelectric focusing of proteins and a single-stranded DNA fragment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *401*, 2465–2471.
- (69) Mazereeuw, M. u. a. Free Flow Electrophoresis Device for Continuous On-Line Separation in Analytical Systems. An Application in Biochemical Detection. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3881–3886.
- (70) Fili, N.; Toseland, C. Fluorescence and Labelling: How to Choose and What to Do. *EXS* **2014**, *105*, 1–24.
- (71) Chartogne, A.; Tjaden, U.; van der Greef, J. A free-flow electrophoresis chip device for interfacing capillary isoelectric focusing on-line with electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 1269–74.
- (72) Kinde, T. F.; Lopez, T. D.; Dutta, D. Electrophoretic Extraction of Low Molecular Weight Cationic Analytes from Sodium Dodecyl Sulfate Containing Sample Matrices for Their Direct Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 2702–2709.

Literatur

- (73) Zhang, C.-X.; Manz, A. High-Speed Free-Flow Electrophoresis on Chip. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 5759–5766.
- (74) Kochmann, S. u. a. Hyphenation of Production-Scale Free-Flow Electrophoresis to Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using a Highly Conductive Background Electrolyte. *Analytical Chemistry* **2016**, *88*, 8415–8420.
- (75) Kobayashi, H. u. a. Free-flow electrophoresis in a microfabricated chamber with a micromodule fraction separator: Continuous separation of proteins. *Journal of Chromatography A* **2003**, *990*, 169–178.
- (76) Konermann, L. Addressing a Common Misconception: Ammonium Acetate as Neutral pH “Buffer” for Native Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2017**, *28*, 1827–1835.
- (77) Xu, Y.-F.; Lu, W.; Rabinowitz, J. D. Avoiding misannotation of in-source fragmentation products as cellular metabolites in liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 2273–2281.
- (78) Furey, A. u. a. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta* **2013**, *115*, 104–122.
- (79) Wang, C.; Huang, W.; Liao, J.-L. QM/MM Investigation of ATP Hydrolysis in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*, 3720–3726.
- (80) Turgeon, R. T.; Bowser, M. T. Micro free-flow Electrophoresis: theory and applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *394*, 187–198.
- (81) Deng, W. u. a. Increase of electrospray throughput using multiplexed microfabricated sources for the scalable generation of monodisperse droplets. *Journal of Aerosol Science* **2006**, *37*, 696–714.
- (82) Duby, M.-H. u. a. Stabilization of monodisperse electrosprays in the multi-jet mode via electric field enhancement. *Journal of Aerosol Science* **2006**, *37*, 306–322.
- (83) Deng, W. u. a. Compact multiplexing of monodisperse electrosprays. *Journal of Aerosol Science* **2009**, *40*, 907–918.
- (84) Cox, J. T. u. a. Improving the sensitivity of mass spectrometry by using a new sheath flow electrospray emitter array at subambient pressures. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, *25*, 2028–2037.
- (85) Huang, G.; Li, G.; Cooks, R. G. Induced Nanoelectrospray Ionization for Matrix-Tolerant and High-Throughput Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 9907–9910.
- (86) Nissilä, T. u. a. Rotating multitip micropillar array electrospray ionization-mass spectrometry for rapid analysis and high-throughput screening. *International Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *310*, 65–71.

- (87) Mao, P.; Gomez-Sjoberg, R.; Wang, D. Multinozzle Emitter Array Chips for Small-Volume Proteomics. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 816–819.
- (88) Keating, J. E.; Glish, G. L. Dual Emitter Nano-Electrospray Ionization Coupled to Differential Ion Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry for Shotgun Lipidomics. *Analytical Chemistry* **2018**, *90*, 9117–9124.
- (89) Reginskaya, I. u. a. Emitter-assigned multi-dielectric barrier-nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 6537–6542.

Danksagung

Als ich im Jahr 2016 für meine Masterarbeit ans ISAS kam, wusste ich noch nicht was mich in der Forschung erwarten würde. Unter der Anleitung von Dr. Dirk Janasek und Dr. Pedro Novo wurde meine Begeisterung für die Mikrofluidik geweckt und ich entschied mich, auch meine Doktorarbeit in diesem Gebiet in der Arbeitsgruppe von Dr. Erik Freier durchzuführen. Im Nachhinein kann ich sagen, dass dies die richtige Entscheidung gewesen ist. Daher möchte ich allen Betreuern und Kollegen für die erfolgreiche Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren danken.

Mein Dank gilt zunächst meinem Arbeitsgruppenleiter und Betreuer Dr. Erik Freier, der die Arbeit mit Geduld und vielen Ideen unterstützt hat. Die gute Arbeitsatmosphäre in der Gruppe unter seiner Leitung trug maßgeblich zur erfolgreichen Gestaltung des Projekts bei. Für konstruktive Anregungen und ihre Unterstützung möchte ich ebenfalls meinen Gutachtern PD Dr. Joachim Franzke und Prof. Dr. Markus Nett danken.

Besonderer Dank gilt Dr. Dirk Janasek und Dr. Pedro Novo für ihre fachliche Expertise, die sie mit mir geteilt haben. Ihre Ratschläge und Vorarbeiten, insbesondere Pedros kreative mikrofluidische Designs, haben meine Arbeit erst möglich gemacht.

Wichtig für das Vorankommen waren natürlich auch die regelmäßigen fachlichen Diskussionen und die Beiträge meiner Kollegen. Mein Dank geht dabei besonders an Stefan Höving, dessen Multiemitter-Design ich verwenden und weiterentwickeln durfte, an Dominic Mähler, dessen CE-Messungen mir in der frühen Phase der Arbeit die Auswertung meiner Experimente ermöglichten und an Dr. Ute Münchberg, die mit ihren messerscharfen Analysen und konstruktiven Vorschlägen meine Manuskripte entscheidend aufwertete.

Außerdem möchte ich mich bei den Werkstattmitarbeitern Jürgen Lonzynski, Peter Röper und Günther Jestel bedanken, deren technische Fachkenntnisse und kreative Lösungsansätze die Entwicklung der zahlreichen Bauteile maßgeblich beeinflusst haben.

Matthias Jender, April 2021

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Ergebnisse eines Forschungsprojekts im Rahmen des Leibniz Research Clusters (LRC). Dabei sollte eine mikrofluidische Trenneinheit nach dem Prinzip der Free-Flow-Elektrophorese (FFE) für die Integration in einen Mehrstufenreaktor entwickelt werden. Die Forschung des LRC-Projekts war angetrieben durch die Vision der kontinuierlichen, zellfreien und enzymkatalysierten Synthese von Polyketidbausteinen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Das in dieser Arbeit entwickelte mikrofluidische FFE-System (μ FFE) sollte als Komponente eines Mehrstufenreaktors in der Lage sein, Stoffgemische kontinuierlich in ihre Einzelsubstanzen aufzutrennen.

Im Laufe der Arbeit wurden zwei verschiedene mikrofluidische FFE-Chips entwickelt: einmal auf Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) und zum anderen auf Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA). Die zunächst hergestellten PDMS-Chips wurden bald durch Chips auf PMMA-Basis abgelöst, die durch gute mechanische Eigenschaften, reproduzierbare Trennergebnisse und langzeitstabile Anwendbarkeit überzeugten.

Mit den funktionellen FFE-Chips wurden über den Zeitraum der Arbeit sukzessive Methoden zur Trennung der Substanzen, die an den enzymatischen Reaktionen beteiligt waren, entwickelt und optimiert. Mit Ammoniumacetat in bestimmten Konzentrationen konnte ein Hintergrundelektrolyt gefunden werden, der eine gute Trennung mit μ FFE ermöglichte und gleichzeitig kompatibel mit der als Kontrollanalytik geplanten Elektrosprayionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) war.

Nach einigen Versuchen der Offline-Analyse der Proben aus dem FFE-Chip mittels Kapillarelektrophorese erfolgte die Analytik überwiegend online mit ESI-MS. Die Kopplung des FFE-Chips mit MS unter Verwendung eines Schaltventils ermöglichte das Online-Monitoring der FFE-Trennung an bis zu 10 FFE-Ausgängen. Die Analysegeschwindigkeit mit MS und die Anzahl der untersuchten FFE-Ausgänge konnten mit einem neuartigen ESI-Multiemitter nochmals gesteigert werden.

Insgesamt konnten die eingangs definierten Ziele dieser Arbeit weitestgehend erreicht werden. Für die nahtlose Integration des entwickelten mikrofluidischen FFE-Systems in den erdachten Mehrstufenreaktor bedürfte es jedoch weiterer Optimierung und spezifische Anpassungen an die anderen beteiligten Systeme.

Abstract

This thesis describes the results of a research project as part of the Leibniz Research Cluster (LRC). The aim of this thesis was the development of a microfluidic free-flow electrophoresis (μ FFE) separation unit for the integration into a microfluidic multistage reactor. The research of the LRC project was driven by the vision of a continuous, cell-free and enzyme-catalysed synthesis of polyketide building blocks for the development of bioactive substances. The role of the μ FFE chips developed in this work was to continuously separate mixtures of substances into their single components.

In the course of this work two different microfluidic FFE chips were developed: one based on poly(dimethylsiloxan) (PDMS) and another one based on poly(methyl metacrylate) (PMMA). The initially manufactured PDMS chips were soon replaced by PMMA chips, which allowed for more reproducible separations and long-term stable usage.

With the functional FFE chips, methods for the separation of the substances being part of the enzymatic reactions were developed and optimised. With ammonium acetate in particular concentrations a background electrolyte was found, which enabled a good separation with μ FFE and at the same time was compatible with electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS), the conceived tool for control analytics.

After initially analysing samples from the FFE chip with capillary electrophoresis, the focus was put on online analysis via ESI-MS. The coupling of μ FFE with MS using a switching valve made an online monitoring of the FFE separation at multiple μ FFE outlets possible. With the development of a novel ESI-multi-emitter, the speed of analysis and the number of analysed μ FFE outlets were further increased.

Overall, the initially defined goals of this project were reached largely. However, for the seamless integration of the developed μ FFE system into the conceived multistage reactor, further optimisation and specific adaption to the other involved systems would be necessary.