

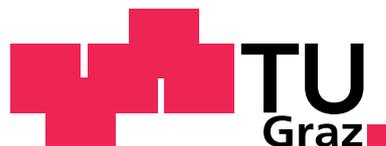
Markus RUMPLER, BSc

Design eines Probeneingabemoduls für einen Mikrofluidikchip zur Detektion von Folsäure

Masterarbeit



HEALTH-Institut für Biomedizin und Gesundheitswissenschaften
Biomedizinische Technik und Monitoring JOANNEUM RESEARCH
Forschungsgesellschaft mbH
Elisabethstraße 5, A-8010 Graz
Leitung: Univ.-Prof. Dr. Thomas Rudolf Pieber



Institut für Medizintechnik
Technische Universität Graz
Kronesgasse 5, A-8010 Graz
Vorstand: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Rudolf Stollberger

Betreuer (JR): DI Dr. Martin Hajsek

Begutachter (TUG): Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Hermann Scharfetter

Graz, August 2012

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz am,

.....

(Unterschrift)

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....

date

.....

(signature)

Danksagung

Ich bedanke mich beim Institut HEALTH der JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH, speziell bei DI Dr. Martin Hajnsek, für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit. Danken möchte ich auch allen übrigen Mitarbeitern für ihre Unterstützung.

Von Seiten der TU Graz möchte ich mich beim Institut für Biomedizinische Technik, speziell bei Herrn Professor Hermann Scharfetter, für die universitäre Betreuung bedanken.

Weiters gilt mein Dank Franz, Stefan, Michael, Heinz, Sylvia, Med. u. Chem. Labordiagnostik Lorenz & Petek, Alison, Ina, Felix, Barbara und Christoph sowie Josef, Martha, Ruth und Gabriel.

Design eines Probeneingabemoduls für einen Mikrofluidikchip zur Detektion von Folsäure

Zusammenfassung Ziel dieser Arbeit war es, ein Probeneingabemodul für einen Mikrofluidikchip zu designen, zu fertigen und zu evaluieren. Als Probe wurde humanes Vollblut verwendet. Am Ende der mikrofluidischen Behandlung der Probe soll die im Blutplasma vorhandenen Folsäure optisch gemessen werden. Das im Blut vorhandene Hämoglobin ist für diese optische Messung jedoch störend. Aus diesem Grund wurde eine Methode designt, welche das Einbringen von Vollblut in die Mikrokanäle des Mikrofluidikchips (Makro-zu-Mikro Interface genannt), sowie die Separation der im Blut enthaltenen Erythrozyten kombiniert. Die dadurch erhaltene separierte (zellreduzierte) Suspension soll anschließend der Folsäuremessung zugeführt werden.

Die ausgewählte Methode zur Separation von Erythrozyten basiert rein auf Strömungseffekten. Die Methode wurde mit drei unterschiedlichen Herstellungsprozessen (Heißprägen, Fräsen und *polymer prototyping*) gefertigt. Die besten Ergebnisse wurden mit den gefrästen Kanalstrukturen erzielt, weshalb diese auch für die spätere Verwendung bevorzugt werden. Es wurden der Einfluss der Geometrien und der Struktur der Mikrokanäle auf die Separationseffektivität untersucht. Es gelang 10 μL erythrozytenreduzierte Suspension zu generieren, welche ein Drittel der Hämoglobinkonzentration des eingebrachten Vollblutes enthielt. Keines der verwendeten Materialien zeigte eine Erythrozyten-, Hämoglobin- oder Folsäureadsorption. Das Makro-zu-Mikro Interface wurde aufgrund der Druckverhältnisse der Separationsmethode ausgewählt. Die erzielten Ergebnisse dieser Machbarkeits- und Implementierungsarbeit zeigten, dass es möglich ist, Erythrozyten mit Hilfe eines Mikrofluidikchip aus Vollblut zu separieren um Folsäure optisch zu detektieren. Die Herstellungsprozesse des Mikrofluidikchips konnten dabei fortlaufend verbessert werden.

Schlüsselwörter: *Mikrofluidikchip, Makro-zu-Mikro Interface, Erythrozytenseparation, Vollblut, Folsäuredetektion*

Design of a Pre-Treatment Module for a Microfluidic Chip to Detect Folic Acid

Abstract The aim of this study was to design, to produce and to evaluate a pre-treatment module for measuring folic acid in human blood by using a microfluidic chip. The measurement of folic acid is done with optical spectroscopy. In human blood, however, the presence of hemoglobin interferes the optical detection of folic acid. With this in mind, a method which combined the introduction of whole human blood into the microchannel structure of a microfluidic chip, so-called macro-to-micro interface, and the separation of the red blood cells was designed. The cell-reduced suspension can then be analyzed for folic acid.

The separation of red blood cells on a microfluidic chip is based on purely physiological flow effects. Three different processes for creating the chip (hot embossing, milling, polymer prototyping) were investigated. The milled-channel method gave the best results and was therefore preferred for use. Also the effect of channel structure and geometries on the separation efficiency was examined. With the optimized chip it was possible to generate 10 μL of separated (cell-reduced) suspension containing three times less hemoglobin than whole blood. It was shown that the used materials did not adsorb erythrocytes, hemoglobin or folic acid. The macro-to-micro interface was chosen because of the high pressures involved in the separation method. Thus, in this proof of concept study, it was shown that it is possible to separate red blood cells from whole blood in a microfluidic chip for the purpose of measuring folic acid. The production of the microfluidic chips was improved over time.

Keywords: *microfluidic chip, macro-to-micro interface, separation of erythrocytes, whole blood, folic acid detection*

Inhaltsverzeichnis

Begriffserklärung	x
Abkürzungsverzeichnis	x
1. Einleitung	1
1.1. Mikrofluidik und Lab-on-Chip	1
1.2. Eigenschaften von Blut	3
1.2.1. Physiologie des Blutes	4
1.2.2. Hämorheologie	5
1.2.3. Strömungseffekte von Blut	6
1.3. Das Vitamin B9 (Folsäure)	14
1.4. <i>Biosens II</i> und Ziele dieser Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Makro-zu-Mikro Interface	16
2.1.1. Material	17
2.1.2. Versuchsaufbau und -ablauf	19
2.2. Erythrozytenseparation	22
2.2.1. Material	25
2.2.2. Versuchsaufbau und -ablauf	31
2.3. Referenzchip	40
2.3.1. Material	40
2.3.2. Versuchsaufbau und -ablauf	40
2.4. Statistik	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Makro-zu-Mikro Interface	43
3.2. Erythrozytenseparation	46
3.2.1. Simulation und Mikroskopie	46
3.2.2. Hb/Hkt-Messung	48

3.2.3. Separationsversuch	49
3.2.4. Folsäuremessung	55
4. Diskussion	58
4.1. Makro-zu-Mikro Interface	58
4.2. Erythrozytenseparation	59
4.3. Schlussfolgerung	63
Literaturverzeichnis	70
Abbildungsverzeichnis	72
Tabellenverzeichnis	73
A. Entscheidungsmatrizen	74

Begriffsdefinition

Adsorption Unter Adsorption versteht man das Anhaften eines Analyten an einer Oberfläche. Diese Anhaftung basiert auf Wechselwirkungsmechanismus zwischen der Oberfläche und dem Analyten.

Bonden Unter *Bonden* versteht man das Abdecken der erzeugten Kanalstrukturen durch eine Kunststoffschicht. Diese wird zuerst erwärmt und anschließend auf die Unterseite der Kanalstrukturen gepresst.

Diarrhoe Diarrhoe ist der medizinische Fachausdruck für Durchfall.

Drabkin's Reagent Methode Ist eine Analysemethode (Cyanmethhämoglobinmethode) zur quantitativen Bestimmung von Hämoglobin in Vollblut. Die dabei verwendete Lösung nennt sich *Drabkin's Reagent*.

Interface Als Interface, auch Makro-zu-Mikro Interface bezeichnet, wird in dieser Arbeit das Verbindungselement zwischen den Kanalstrukturen des Mikrofluidikchips und den Glaskapillaren bezeichnet.

JR-Chip Die von der JOANNEUM RESEARCH gefertigten mikrofluidischen Chips.

Leckage Leckage ist das Auftreten eines Flüssigkeitsverlustes am Makro-zu-Mikro Interface.

Leckagedruck Jener Druck, bei dem eine Leckage auftritt d.h. maximaler Druck bevor das Makro-zu-Mikro Interface undicht wird.

Lysieren Lysieren ist das Austreten des Erythrozytenzytosols nach Beschädigung der Erythrozytenmembran.

Point-of-Care Unter Point-of-Care versteht man medizinische Diagnostik am oder in unmittelbarer Nähe des Patienten.

recovery Jener prozentuelle Anteil eines Analyten, welcher nach dem Durchfluss der Probe durch eine Membran in der gefilterten Probe enthalten ist.

Ref-Chip Ist ein kommerziell erhältlicher Mikrofluidikchip zur Plasmaerzeugung aus Vollblut. Er dient als Referenz der Trenneffektivität.

Spiken Unter *Spiken* versteht man das Beimengen (Zusetzen) eines Analyten zu einer Probe.

Totvolumen Das Totvolumen ist jener Volumenanteil einer Probe, welcher in der Interfacestruktur verbleibt und der Separation nicht zugeführt werden kann.

Abkürzungsverzeichnis

μ TAS	Mikrototalanalysensystem (Micro Total Analysis Systems)
Bio-MEMS	biomedizinische mikroelektromechanische Systeme (Biological-MicroElectroMechanical Systems)
CN-Hb	Cyanmethhämoglobin
COP	Cyclo-Olefin-Polymere
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
ID	Innendurchmesser
JR-Chip	JO ANNEUM R ESEARCH Chip
LOC	Lab-on-Chip
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (mean cellular heamoglobine concentration)
MW	Mittelwert
OD	Außendurchmesser
PDMS	Polydimethylsiloxan
Ref-Chip	Referenzchip
STD	Standardabweichung

1. Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, humanes Vollblut in Mikrokanalstrukturen einzubringen und daraus die Erythrozyten zu separieren. Die dadurch erzeugte separierte Suspension soll anschließend einer optischen Folsäuremessung zugeführt werden, für welche die Lichtabsorption von Hämoglobin störend ist. Es sollen dafür ein Makro-zu-Mikro Interface und eine Separationsstruktur aus Mikrokanälen designt werden, welche anschließend mit der in der JAONNEUM RESEARCH vorhandenen Infrastruktur sowie derer Know-how gefertigt werden kann.

1.1. Mikrofluidik und Lab-on-Chip

Ziel vieler Sensortechnologien ist es, ein elektrisches Signal mittels Transducer zu erzeugen, welches eine Aussage über die in der Lösung enthaltene Konzentration einer chemischen Verbindung liefert. Das Erreichen dieses Zieles, ausgedrückt durch die Sensorparameter Lebenszeit und Selektivität, ist jedoch noch verbesserungsfähig. Die analytische Chemie hält eine Vielzahl an Methoden bereit um nahezu jede chemische Verbindung zu messen. Jedoch braucht es dazu Geräte, welche einen großen Platzbedarf und lange Analysezeiten haben. Zusätzlich wird häufig ein qualifizierter Techniker zur Durchführung der Analysen benötigt. Ein Lösungsansatz für diese Probleme, welche von Manz A. *et al.* [1] 1990 beschrieben wurden, ist die Miniaturisierung und Kombination verschiedener Methoden und Sensoren. [1]

Im Jahre 1959 begann, nach einem Vortrag von Richard Feynman [2], mit der Miniaturisierung von elektronischen Geräten die schnellste technologische Entwicklung in der Geschichte der Menschheit. In den 80er Jahren startete die erste Phase der Geräteentwicklung mit Mikropumpen, Mikroflusssensoren und Mikroventilen. Die Entwicklung ging seit der Publikation von Manz A. *et al.* 1990 rasant voran. Die Autoren deuteten darin an, das die Hauptanwendung solcher „Mikrogeräte“ in den Biowissenschaften und der Chemie liegt. Seither entstanden viele Begriffe wie z. B. „Mikrofluidik“ und „Biological-MicroElectroMechanical Systems“ (Bio-MEMS) für diese neue Technologie. Nguyen N.T. und Wereley S. lieferten u.a. folgende Definition dafür:

Die Mikrofluidik ist eine Teildisziplin der Mikrosystemtechnik. Sie umfasst Entwurf, Herstellung, Anwendung und Untersuchung von Mikrosystemen, die Fluidmengen in Kanalquerschnitten mit Abmessungen von 1 μm bis 1 mm manipulieren und behandeln. [3]

In der Mikrofluidik ist nicht die Größe des Gerätes das bestimmende Längenmaß, sondern jenes, welches das Fließverhalten der verwendeten Flüssigkeit beeinflusst. Somit stellt der Term „Mikro“ von Mikrofluidik keinen Zusammenhang zwischen der Strömungslehre und einem speziellen Längenmaß, z.B. Mikro- oder Nanometer her. Vielmehr ist das Verhalten von Flüssigkeiten im Mikroskopischen gemeint. [4]

So ist mit zunehmender Miniaturisierung ein Unterschied im Strömungsverhalten von Flüssigkeiten zu bemerken. Man nähert sich dem laminaren Fluss, die Diffusion für Transportprozesse bekommt einen größeren Stellenwert und das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis wird bei kontinuierlicher Miniaturisierung sehr schnell größer. [5]

Giannitsis A. T. und Min M. [6] publizierten 2010 eine Zusammenfassung der Entwicklung und des Potentials mikrofluidischer Geräte. Darin wurde u.a. die Hauptanwendung dieser Geräte in den Biowissenschaften bestätigt (Vergleiche Manz A. *et al.* aus 1990). Der dabei erwähnte Begriff „Lab-on-chip“ (LOC) ist ein Überbegriff für Geräte, welche Fluidik und Elektronik auf einem Chip kombinieren. Somit sind diese Chips in der Lage Flüssigkeiten individuell zu behandeln und analysieren. LOC ist, neben Micro Total Analyses Systems (μTAS), eine Untergruppe der Mikrofluidik. Diese beiden Untergruppen unterscheiden sich im Einsatzgebiet: mit LOC können Laborabläufe, mit μTAS gesamte biochemische Analysen durchgeführt werden. Mittels LOC ist es folglich möglich, automatisiert Vorgänge auf einem Chip durchzuführen. Dazu zählt u.a. das Kontrollieren, Trennen und Mischen von Flüssigkeiten. Dies ist speziell für *Point-of-Care* Entwicklungen interessant. Heutzutage sind LOC Geräte durchaus mit konventionellen Analysegeräten konkurrenzfähig und werden u.a. für die Diagnose von Krankheiten verwendet. Ihre Stärken liegen in ihrer Kompaktheit, den kleinen Probenvolumina, den kurzen Bearbeitungszeiten, der geringen Kontaminationsgefahr, der entfallenden externen Probenvorbereitung, der sowohl parallelen als auch seriellen Messung und der leichten Reinigung bzw. Sterilisation. [6]

Bei all den Vorteilen die bisher genannt wurden, dürfen jedoch die Nachteile nicht außer Acht gelassen werden. Einige dieser wurden speziell für die Probenvorbereitung in [7] zusammengefasst. So gilt die *on-Chip*-Probenvorbereitung bis dato kostentechnisch und technologisch noch als wenig konkurrenzfähig mit den jetzigen Standards. Dies erschwert die Kommerzialisierung. Weiters ist der Anwender, mit teils mangelnder Bereitschaft gewohnte Arbeitsabläufe zu ändern, ein weiterer Grund für die geringe Verbreitung dieser Anwendungen. Zu guter Letzt ist auch die Integration mancher Probenvorbereitungsschritte, wie z.B. das Einbringen der Probe in die Mikrofluidik, problematisch. Bezogen

auf diese Arbeit sei hier die Komplexität des Blutes als Probe und die daraus resultierenden Probleme bei der Implementation einer Plasmaseparation in die Mikrofluidik erwähnt. Gleichzeitig sind aber genau einige dieser Nachteile Ansporn für weitere Forschungstätigkeit, denn der Einfluss des Menschen bei der Probenvorbereitung bringt eine Reihe von Unsicherheiten wie z.B. den Verlust an Analyten durch variierende Handlungsabläufe mit sich. [7]

Annahmen zur Modellierung und Berechnung: Abschließend seien einige für das Verständnis und die Modellierung relevante und übliche Annahmen in der Mikrofluidik angeführt. Da man stetig bemüht ist, geeignete Simulationen für das Verhalten von Flüssigkeiten in der Mikrowelt zu finden, müssen ein paar Annahmen für die zugrunde liegenden Modelle getroffen werden.

Eine der am weitesten verbreitetsten Annahmen ist die *no-slip*-Bedingung. Dabei wird die Flüssigkeit als eine Stapelung von parallelen Schichten im Kanal angenommen. Die vom Rand aus gesehen jeweils erste Schicht ist diesem gegenüber unbeweglich. Alle weiteren Schichten sind jeweils zu ihren angrenzenden verschiebbar. Daraus resultiert, dass sich die Geschwindigkeiten der (Flüssigkeits-)schichten an unterschiedlichen Stellen unterscheiden. Dadurch können verschiedene (z.B. parabolische) Geschwindigkeitsprofile der Flüssigkeit entstehen. Weiters geht man dabei von einer sehr kleinen Reynoldszahl aus. Dies bedeutet einen geringen Fluss, kleine Kanalgeometrien und eine große Viskosität. Das System befindet sich zudem im eingeschwungenen Zustand. [8, 9]

Eine weitere Annahme ist die des laminaren Flusses in den Kanälen. [4, 5, 10]. So hat Blut in Mikrokanälen mit hydrodynamischen Durchmessern von 10 μm bis 500 μm eine Reynoldszahl die im Bereich von 0,01 bis 100 liegt, [7] was mit laminar vereinbar ist.

Das zuvor bereits erwähnte parabolische Strömungsprofil kommt als Annahme in der Mikrofluidik ebenfalls zum Tragen. Dieses stellt sich bei druckgetriebenen Flüssen ein und wird unter anderem in Verbindung mit dem Hagen-Poiseuille Gesetz (unter bestimmten Voraussetzungen) genannt. [4, 5] Eine dieser Voraussetzungen ist die Verwendung einer Newtonschen Flüssigkeit. [11] Wird Blut als Flüssigkeit verwendet, so gilt die Annahme eines parabolischen Strömungsprofils strenggenommen nur für das Blutplasma [12].

1.2. Eigenschaften von Blut

In dieser Arbeit wird unter dem Begriff Blut immer humanes Blut verstanden, auf Ausnahmen wird explizit hingewiesen. Grund dieses einleitenden Hinweises ist, dass bei den in der Literatur gefundenen Trennmethoden mit Blut unterschiedlichster Quellen (humanes und tierisches) gearbeitet wird.

Blut ist ein sehr komplexer Bestandteil des menschlichen Körpers, welcher in vielerlei Hinsicht interessante Eigenschaften besitzt. In diesem Unterkapitel werden nur jene erläutert, welche für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Eine umfassendere Beschreibung der Eigenschaften des Blutes sind u.a. in [11, 13, 14] zu finden.

1.2.1. Physiologie des Blutes

Blut besteht grundlegend aus zwei Komponenten, dem Blutplasma, in Folge nur Plasma genannt, und den Hämozyten. Plasma ist eine eiweißhaltige Flüssigkeit dessen Beitrag zum Gesamtblutvolumen ca. 55 % beträgt. Wird von Plasma Fibrinogen abgetrennt, erhält man Blutserum. Unter Hämozyten versteht man die Formelemente Lymphozyten, Thrombozyten und Erythrozyten, wobei letztere mit ca. 44 % des Gesamtblutvolumens den größten Teil ausmachen. Aus ihnen wird üblicherweise auch der Hämatokrit (Hkt) bestimmt, da diese mit ca. 95 % den Hauptanteil an den Hämozyten tragen [14]. Damit Blut nach der Entnahme, beispielsweise mittels Kapillare, nicht zu gerinnen beginnt, ist es notwendig die Gerinnung zu unterbinden. Hierfür können die Oberflächen der Kapillarenwand u.a. mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Citrat (Salz der Zitronensäure) oder Heparin behandelt werden. Diese Substanzengreifen an unterschiedlichen Stellen des Gerinnungsprozesses ein. [11]

Erythrozyten besitzen eine bikonkave Scheibenform aufgrund des Oberflächenüberschusses d.h. das Zytosol füllt die Membran nicht vollständig aus. Dadurch weicht die Form der Erythrozyten von jener einer Kugel ab. Der mittlere Durchmesser liegt zwischen 7 μm und 8 μm . Die Dicke am Rand beträgt 2 μm , in der Mitte 1 μm . Die durchschnittliche Erythrozytenanzahl liegt bei erwachsenen Männern im Bereich von $(4,9 \times 10^6$ bis $5,6 \times 10^6)$ pro μL , bei Frauen von $(4,4 \times 10^6$ bis $5,1 \times 10^6)$ pro μL . Zentrales Element der Erythrozyten ist das Hämoglobin (Hb). [14]

Das Hämoglobin beim Erwachsenen ist ein Heterotetramer, welches aus vier Globulinmolekülen, zwei α - und zwei β -Ketten, besteht. Jede dieser vier Ketten ist Trägerin einer Hämgruppe deren zentrales Element ein Fe^{2+} -Ion ist. Die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration liegt bei erwachsenen Männern im Bereich von (140 bis 180) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ und bei erwachsenen Frauen von (120 bis 160) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Hämoglobin besitzt ein Molekulargewicht von ca. 64,5 kDa. [13, 15]

Je nach Oxidationsgrad des Hämoglobins zeigen sich unterschiedliche Absorptionsspektren und -maxima für Licht (oxygeniertes Hb: 541 nm und 577 nm, deoxygeniertes Hb: 555 nm) [16]. Alle Hämoglobine zeigen bei 400 nm die Soret-Bande, für welche der Porphyrinanteil verantwortlich ist [13].

1.2.2. Hämorheologie

Die dynamische Viskosität η ist das Verhältnis von Schubspannung τ zu Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$. Flüssigkeiten können aufgrund ihres viskosen Verhaltens in zwei Kategorien unterteilt werden, Newtonsche und nicht-Newtonsche Flüssigkeiten. Bei Newtonschen Flüssigkeiten ist die Viskosität unabhängig von Veränderungen der Schubspannung bzw. der Schergeschwindigkeit d.h. die Steigung im Schubspannungs-Schergeschwindigkeits-Diagramm ist konstant. Daraus folgt, dass die Viskosität bei konstanter Temperatur und konstantem Druck konstant ist [17]. Bei nicht-Newtonschen Flüssigkeiten ist die Viskosität abhängig von den Zahlenwerten der Schubspannung bzw. der Schergeschwindigkeit. In diesem Fall spricht man von Scheinviskosität η_{app} . Nicht-Newtonsche Flüssigkeiten werden weiter unterteilt in dilatante (Viskosität nimmt mit $\dot{\gamma}$ zu) und scherverdünnende (Viskosität nimmt mit $\dot{\gamma}$ ab) Flüssigkeiten. Diese Unterteilung ist abhängig von ihrem Verhalten bei größer werdender Schergeschwindigkeit. Blut zählt zu letztgenannter Kategorie. Grund für das dynamische Verhalten ist das Vorhandensein der Hämozyten. Diese stören die Strömungslinien bei angenommenen laminarem Fluss. Aufgrund dieses Verhaltens besitzt Blut eine höhere (Schein-)Viskosität als Plasma. Bei 37 °C liegt die Viskosität von Plasma in einem Bereich von $(1,1 \times 10^{-3}$ bis $1,35 \times 10^{-3}) \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$, jene von Blut bei Schergeschwindigkeiten größer (100 bis 200) s^{-1} in einem Bereich von $(4 \times 10^{-3}$ bis $5 \times 10^{-3}) \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$. Bei steigendem Hämatokrit ist ein exponentieller Anstieg der Viskosität zu bemerken. [18, 19]

Zusätzlich zum Hämatokritwert sind auch die rheologischen Eigenschaften der Formelemente für das Fließvermögen verantwortlich. Rheologisch gesehen, kann Blut als eine Flüssigkeit aufgefasst werden, welche aus einer festen und einer flüssigen Phase besteht. Die flüssige Phase entspricht dabei dem Plasma, die feste dem Hämatokrit. Bei ausreichend großer Krafteinwirkung verformen sich Erythrozyten derart, dass sie unter den meisten Strömungsverhältnissen ein flüssigkeitstropfenähnliches Verhalten zeigen d.h. die feste Hämatokritphase wandelt sich in eine flüssige Phase um. Dieses Verhalten ermöglicht den Erythrozyten sich entlang der Strömungslinien zu orientieren, wodurch die Viskosität sinkt.

Ein anderer bedeutender Effekt ist die Bildung so genannter „Rouleaux“-Formationen, auch Erythrozytenaggregation oder Pseudoagglutination genannt. Vergleichbar ist dies mit einem Stapel von Geldmünzen, wobei jede einzelne Münze einen Erythrozyten darstellt. Dieses Verhalten tritt bei Blut bei geringer Krafteinwirkung, z.B. bei geringen Fließgeschwindigkeiten, auf. In Plasma ist dieses Verhalten maßgeblich von der Fibrinogenkonzentration beeinflusst. Die beschriebenen Verformungen sind mit nachlassender bzw. zunehmender Krafteinwirkung reversibel. [18]

Die Erythrozytenmembran besteht aus einer lipiden Doppelschicht und dem darin ent-

haltenen Zytoskelett. Sie ist jene Struktur, welche für dieses dynamische Verhalten der Erythrozyten verantwortlich ist. Weitere Faktoren, welche ebenfalls die Verformbarkeit der Erythrozyten beeinflussen, sind die Viskosität des Zytoplasmas der Erythrozyten, die Membransteifigkeit und ihre äußere Gestalt. Daneben hat die Verformung der Erythrozyten auch einen Einfluss auf den Flusswiderstand, da sie das hydrodynamisch wirksame Volumen der Erythrozyten verändert. [18, 19]

Die in diesem Kapitel genannten Eigenschaften sind für die Entstehung der im folgenden Kapitel erklärten Effekte, des Fåhræus und Fåhræus-Lindqvist Effektes sowie des Zweifach-Fung Effektes, mitverantwortlich.

1.2.3. Strömungseffekte von Blut

Beim Vergleich von Strömungseffekten in Mikrogefäßen des menschlichen Körpers sowie in schmalen Glaskapillaren eines Laboraufbaus fand man heraus, dass diese qualitativ gleich sind. Jedoch ergaben sich bei einigen Experimenten quantitative Unterschiede. Strukturell unterscheiden sich Mikrogefäße und Glaskapillaren in der Wandsteifigkeit, den Wechselwirkungsmechanismen zwischen Erythrozyten und der Mikrogefäßwand (hier besonders mit den mit Glykokalix besetzten Endothelzellen) bzw. der Glaskapillarwand, den Durchmessern (im Gegensatz zu den Mikrogefäßen ist der Durchmesser einer Glaskapillare als konstant anzunehmen) und den Geometrien (die Glaskapillare ist meist länger als einzelne Gefäßabschnitte). Daraus resultiert u.a., dass die Viskosität und die Erythrozytenverformbarkeit im Mikrogefäß kleiner als in der Glaskapillare ist, wohingegen der Flusswiderstand im Mikrogefäß größer als in der Glaskapillare ist. Weiters hängen in Mikrogefäßen die zell-reduzierte Schicht und der Flusswiderstand stärker vom Hämatokrit ab. [19, 20]

Wie in Kapitel 1.1 bereits erwähnt, gibt es einige Annahmen, die in der Mikrofluidik zu treffen sind. Im Zuge dieser Arbeit wird der Fluss als laminar, viskos und stationär angenommen. Weiters ist Blut als inkompressible [21], nicht-Newtonsche, Plasma alleine jedoch als Newtonsche Flüssigkeit zu betrachten.

Die Strömungseffekte in den Mikrogefäßen bzw. Glaskapillaren sind auch von deren Lage im Schwerfeld abhängig. In horizontalen Mikrogefäßen bzw. Glaskapillaren haben Aggregation und Sedimentation eine Auswirkung auf diese Strömungseffekte, da der Hämatokrit radial ungleich verteilt ist. Dies führt zu einem asymmetrischen Strömungsprofil. Aggregation und Sedimentation sind zeitlich abhängige Phänomene. [22]

In den folgenden fünf Abschnitten werden Strömungseffekte von Blut erklärt, welche die Grundlage für die Funktion der Separationsmethode dieser Arbeit sind.

Tank treated motion: Unter *tank treated motion* versteht man eine kontinuierliche Deformation der Erythrozyten, d.h. sie zeigen bei Vorhandensein eines Flusses folgendes Verhalten: Durch die asymmetrischen Kräfte, welche aufgrund des Strömungsprofils auf die Erythrozyten wirken, beginnt die Membran um das Zytosol zu rotieren (ähnlich einer Panzerkette). Die so erzeugte Bewegung bewirkt wiederum einen Rotationsfluss des Zytosols. Die Gestalt und Orientierung der Erythrozyten bleibt dabei unverändert. Mit steigendem Verhältnis der Viskositäten des Zytosols und des die Erythrozyten umgebenden Mediums wandelt sich diese rotierende Bewegung der Erythrozytenmembran in ein Flippen oder Schwingen des gesamten Erythrozyten um. Die *tank treated motion* wird auch für die axiale Migration der Erythrozyten verantwortlich gemacht. [19, 20, 23, 24]

Axiale Migration: Die *tank treated motion* entsteht ohne Interaktion mit der Gefäß-/Kapillarwand. Durch zusätzliche mechanische Interaktion der Erythrozyten sowohl mit der Gefäß-/Kapillarwand auch mit anderen Erythrozyten, beginnen die Erythrozyten Richtung Gefäßmitte zu migrieren. Dies nennt man axiale Migration. Sie wird, in Abhängigkeit der Reynoldszahl, von verschiedenen Auftriebskräften hervorgerufen. Durch die axiale Migration entsteht eine zellreduzierte bzw. zellfreie Schicht direkt an der Gefäß-/Kapillarwand. [7, 23]

Dieses Verhalten ist ab einer Schergeschwindigkeit von ca. 100 s^{-1} dokumentiert worden und gilt nur für deformierbare Zellen/Partikel. Starre Kugeln folgen strikt den Strömungslinien. [25]

Das Zusammenspiel von *tank treated motion* und axialer Migration ist in Abbildung 1.1a dargestellt. Es zeigt Erythrozyten mit rotierenden Membranen (*tank treated motion*) aufgrund des parabolischen Strömungsprofils, sowie die axiale Migration.

Zellreduzierte Schicht: Als direkte Konsequenz der axialen Migration ist die Bildung einer zellreduzierten Schicht an der Gefäß-/Kapillarwand zu sehen. Die Reduktion bezieht sich hier hauptsächlich auf Erythrozyten.

Die Ausbildung dieser zellreduzierten Schicht ist u.a. abhängig vom Gefäß-/Kapillardurchmesser. Bei einem Innendurchmesser größer $10 \mu\text{m}$ wird die zellreduzierte Schicht breiter wenn der Gefäßdurchmesser größer, der Hämatokrit kleiner und die Flussrate größer wird. Das Verhältnis der Breite der zellreduzierten Schicht zum Innendurchmesser des/der Gefäßes/Kapillare ist maximal bei einem Innendurchmesser von (10 bis $15 \mu\text{m}$). Bei einem Innendurchmesser kleiner gleich $10 \mu\text{m}$ ist die Verformbarkeit und die Strömungsgeschwindigkeit der Erythrozyten entscheidend für die Ausbildung der zellreduzierten Schicht. Unabhängig vom Ausbildungsprozess (ihrer Entstehung) reduziert sich durch diese Schicht die Reibung zwischen den Erythrozyten und der Gefäß-/Kapillarwand

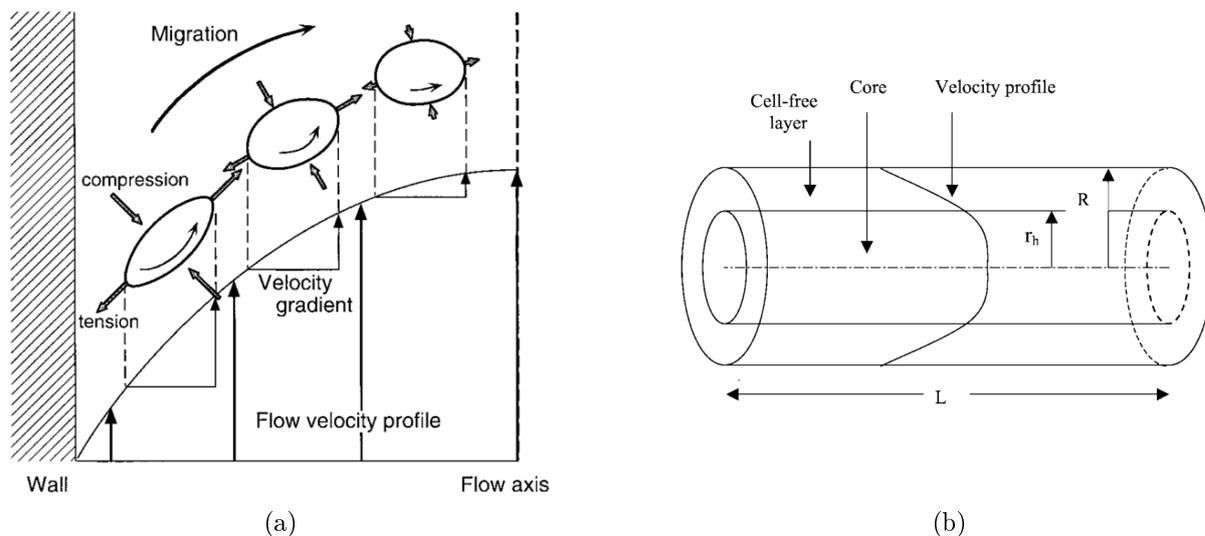


Abb. 1.1.: (a) Die Abbildung zeigt die Entstehung der axialen Migration. Aufgrund des Geschwindigkeitsgradienten im Strömungsprofil beginnen die Erythrozytenmembranen zu rotieren (*tank treading motion*). Bei Vorhandensein einer Grenzfläche (Gefäß- oder Kapillarwand) interagieren die rotierenden Erythrozyten mit dieser und wandern in Richtung der höchsten Geschwindigkeit (axiale Migration). Die Breite der dadurch entstehenden zellreduzierten Schicht ist abhängig von der Art der Grenzfläche. Abbildung aus [20]. (b) Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Modells eines Mikrogefäßes inklusive Geschwindigkeitsprofil. Die hier mit *Core* bezeichnete Kernzone aus Erythrozyten entsteht aufgrund der axialen Migration und weist ein deutlich abgeflachtes Strömungsprofil auf. Gleichzeitig entsteht eine zellreduzierte Schicht (*Cell-free layer*), welche als Gleitschicht fungiert. Modellhaft wird die Kernzone als ein Zylinder angenommen. In diesem Zylinder sind alle Erythrozyten in kompakter Form enthalten, was die Abflachung des Strömungsprofils erklärt. [22] Abbildung aus [12].

und somit sinkt der Flusswiderstand. Zeitgleich mit der Ausbildung dieser zellreduzierten Schicht bildet sich im Zentrum des/der Gefäßes/Kapillare eine „Kernzone“ aus Erythrozyten. Dies führt zu einem Abflachen des parabolischen Strömungsprofils in dieser Kernzone (siehe Abbildung 1.1b). [19]

Die zellreduzierte Schicht dient, wie bereits beschreiben, als eine Art Gleitschicht für die darin enthaltene Kernzone. So wird der Flusswiderstand verringert, wenn diese Gleitschicht breiter wird. Dies tritt u.a. bei einer Verengung des Gefäß-/Kapillardurchmessers und bei der Bildung von „Rouleaux“-Formationen auf. [22]

Fåhræus (-Lindqvist) Effekt: Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden hier nur Gefäße betrachtet. Sowohl der Fåhræus Effekt, als auch der Fåhræus-Lindqvist Effekt treten, unter Berücksichtigung der bereits erwähnten quantitativen Unterschiede, auch in Glaskapillaren auf. Bei der Beschreibung dieser Effekte spricht man von einem Zulauf und Ablauf (Gefäßdurchmesser größer $300 \mu\text{m}$) mit einer dazwischenliegenden Engstelle. Im Zu- bzw. Ablauf strömt Blut ohne die Ausbildung der bisher beschriebenen Strömungseffekte. In der Engstelle treten beide Effekte abhängig vom Gefäßdurchmesser auf.

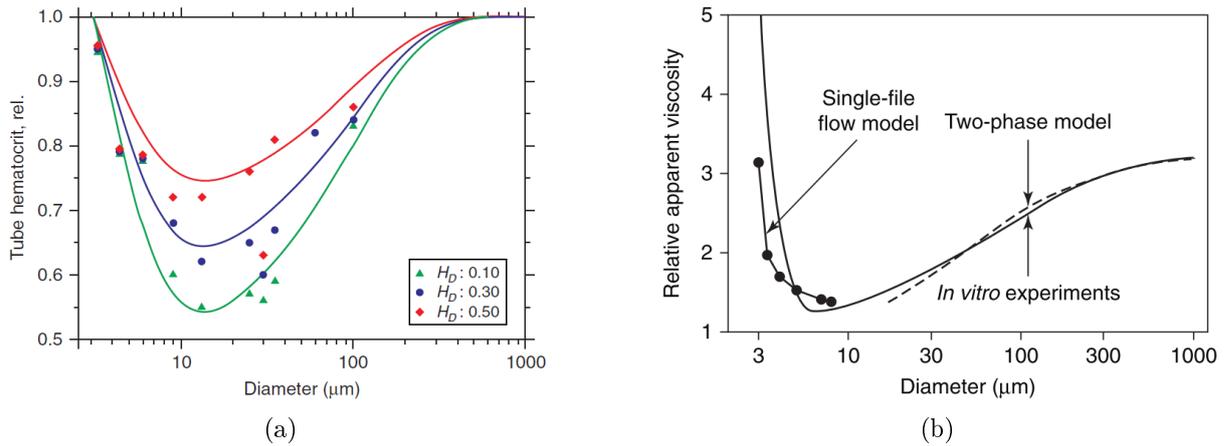


Abb. 1.2.: (a) Fåhræus Effekt. Es ist deutlich die Reduktion des relativen Håmatokrits (Verhåltnis des Håmatokrits von Engstelle zu Zufluss/Abfluss) bis zu einem gewissen unteren Schwellwert des Gefåßdurchmessers zu sehen. Der Verlauf hångt außerdem vom Håmatokrit des Zuflusses ab, was durch die drei unterschiedlichen Kurven dargestellt ist. Abbildung aus [26]. (b) Fåhræus-Lindqvist Effekt. Die relative Scheinviskositåt sinkt ebenfalls bei Reduktion des Gefåßdurchmessers. Die durchgezogene Linie repråsentiert experimentelle Daten, die strichlierte Linie zeigt das Ergebnis der Berechnung mit Formel (1.2) im *multi-file flow* und die mit Punkten markierte durchgezogene Linie zeigt die modellhafte Vorhersage für den *single-file flow*. Abbildung aus [27].

Bei immer kleiner werdendem Gefåßdurchmesser beginnt ab dem oberen Schwellwert von ca. 200 μm der relative Håmatokrit (Fåhræus Effekt) bzw. ab ca. 300 μm die relative Scheinviskositåt (Fåhræus-Lindqvist Effekt) im Gefåß zu sinken. Der relative Håmatokrit ist definiert als das Verhåltnis des Håmatokrits in der Engstelle (H_E) und des Håmatokrits im Zu- bzw. Ablauf (H_Z). Der H_E wurde u.a. nach stoppen des Flusses und entleeren des Engstelleninhaltes bestimmt [28]. Die relative Scheinviskositåt ist definiert als das Verhåltnis der Scheinviskositåt in der Engstelle (η_{app}) und der Viskositåt der zellreduzierten Schicht (η_P). Beobachten lassen sich beide Effekte bis zu einem unteren Schwellwert, welcher bei ca. (15 bis 20) μm für den relativen Håmatokrit und ca. (5 bis 7) μm für die relative Scheinviskositåt liegt. Bei Gefåen in diesem Durchmesserbereich spricht man von *multi-file flow* [23], da die Erythrozyten in der Kernzone in mehreren Schichten strömen. Bei kleineren Durchmessern beginnt der relative Håmatokrit bzw. die relative Scheinviskositåt wieder zu steigen (Abbildung 1.2). Hier spricht man von *single-file flow* [23], da die Erythrozyten hintereinander die Engstelle passieren. [19, 22]

Der **Fåhræus Effekt** ist die Konsequenz aus der Bildung einer zellreduzierten Schicht. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Kernzone (v_K) aus Erythrozyten in Abbildung 1.1b ist größer als die gemittelte Geschwindigkeit des gesamten Inhaltes der Engstelle (v_E). Eine solche Geschwindigkeitsdifferenz in der Engstelle führt zu einer Verånderung des Håmatokrits in der Engstelle (H_E) verglichen mit dem Håmatokrit nach bzw. vor der

Engstelle (H_Z). Ist $v_K > v_B$, so passieren die Erythrozyten die Engstelle schneller als die sie umgebende zellreduzierte Schicht. Dies führt zu einer Reduktion von H_E relativ zu H_Z . Pries A. R. und Secomb T. W. beschreiben dies formal für den *multi-file flow* in [29] mit

$$\frac{H_E}{H_Z} = \frac{v_B}{v_K} \quad (1.1)$$

wobei v_K die Geschwindigkeit der Kernzone und v_B die gemittelte Geschwindigkeit des Inhaltes der Engstelle ist. [29]

Beträgt das Verhältnis aus v_K zu v_B gleich 2, so ist der relative Hämatokrit gleich 0,7 bei einem $H_Z = 0,4$ und einem Durchmesserbereich der Engstelle von (20 bis 10) μm . [22] Sinkt der Durchmesser weiter (*single-file flow*), so steigt der relative Hämatokrit wieder und nähert sich gleich 1. Albrecht untersuchte dies in [30] und beschreibt den relativen Hämatokrit als das inverse Verhältnis der Geschwindigkeiten aus Gleichung (1.1) für den Durchmesserbereich von (11 bis 3,3) μm .

Der **Fåhræus-Lindqvist Effekt** gilt auch als Konsequenz aus der Bildung einer zellreduzierten Schicht. Die Breite der zellreduzierten Schicht beeinflusst den Flusswiderstand, da diese als Gleitschicht angesehen werden kann. Je breiter die zellreduzierte Schicht, desto geringer der Flusswiderstand. Secomb zeigte in [23] u.a. anhand eines Modells, dass der Flusswiderstand auch über die Scheinviskosität (η_{app}) ausgedrückt werden kann. Die relative Scheinviskosität ist auch hier die Scheinviskosität bezogen auf die Viskosität des Plasmas bzw. der zellreduzierten Schicht.[23]

Verwendet man wieder das Modell aus Abbildung 1.1b, wobei die Viskosität der Kernzone (η_K) größer als die Viskosität der zellreduzierten Schicht (η_P) ist, so gilt laut [29]

$$\eta_{\text{app}} = \frac{\eta_P}{1 - \lambda^4 \cdot \left(1 - \frac{\eta_P}{\eta_K}\right)} \quad (1.2)$$

mit

$$\lambda = 1 - \frac{h}{r} \quad (1.3)$$

wobei h die Breite der zellreduzierten Schicht und r der Gefäßradius ist. Nimmt man h aufgrund der Unabhängigkeit von r als konstant an, so sinkt λ mit kleiner werdendem r . Dies führt zu einer Reduktion von η_{app} und somit auch der relativen Scheinviskosität, was in Abbildung 1.2b zu sehen ist. Mit dieser formalen Beschreibung können experimentelle Daten von Gefäßdurchmessern größer 30 μm erklärt werden. [29]

Eine formale Beschreibung des Fåhræus-Lindqvist Effekt im *single-file flow*, welche wesentlich komplexer als jene im *multi-file flow* ist, liefert Secomb in [23].

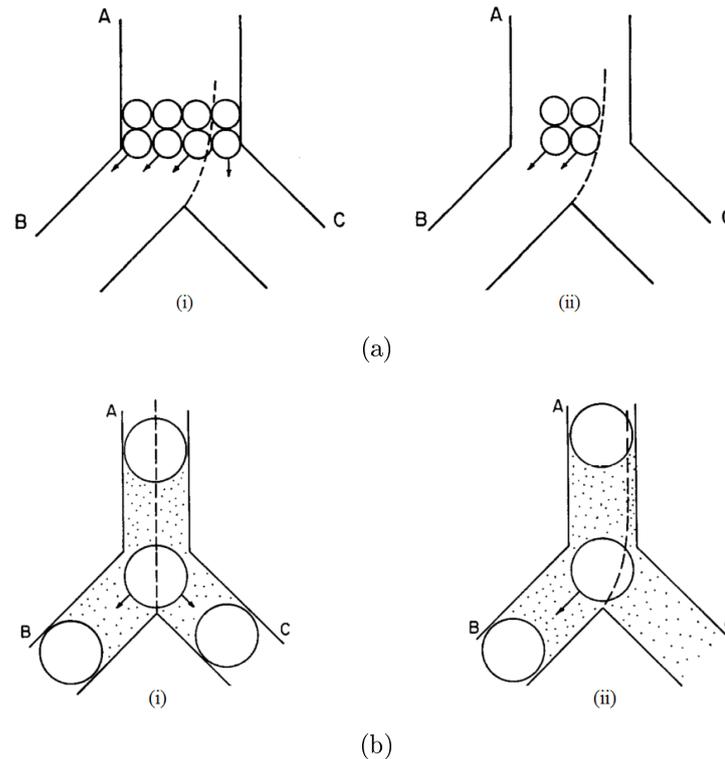


Abb. 1.3.: Zweifach-Fung-Effekt. A bezeichnet den Zulauf, B und C bezeichnet die Abläufe, die Pfeile repräsentieren den resultierenden Kraftvektor an der Zelle und die strichlierte Linie markiert die Strömungstrennlinie. (a) *plasma skimming*. Volumenstrom in B und C ist gleich groß. (i): Bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten in A ist es möglich, dass die Zellen bis zur Wand des Zulaufs gelangen und somit sowohl in B als auch in C strömen können. (ii): Bei Ausbildung einer zellreduzierten Schicht in A ist dies nur schwer bzw. gar nicht möglich. (b) *red cell screening*. Der Durchmesser des Zulaufs ist kleiner als in (a). (i): Bei gleichen Volumenströmen in B und C können Zellen gleichwahrscheinlich in B und C strömen. (ii): Hier ist der Volumenstrom in B größer. Dies führt zu einer resultierenden Kraft an den Zellen, welche diese in B strömen lässt. Abbildungen modifiziert aus [31].

Zweifach-Fung Effekt: Mit dem Zweifach-Fung Effekt wird das Verhalten von Erythrozyten an einer Y-Aufzweigung beschrieben. Es gibt zwei Ansätze, mit Hilfe derer man dieses Phänomen beschreiben kann. Die Abbildung 1.3 stellt diese beiden grafisch dar. In jeder der Abbildungen ist „A“ der Zulauf, „B“ und „C“ sind die beiden Abflüsse der Aufzweigung. Die Pfeile repräsentieren die resultierenden Kraftvektoren, welche an den Zellen wirken. Die strichlierte Linie zeigt die auftrennende Strömungslinie.

In den Abbildungen 1.3a und 1.3b sind die Durchmesser der Zuläufe unterschiedlich groß. Mit kleiner werdendem Durchmesser von A fällt es Zellen immer schwerer in jene Aufzweigung (B oder C) zu strömen in der der Volumenstrom geringer ist, sodass man bei der Betrachtung der Aufzweigungsstelle vom *plasma skimming* (rechte Grafik in Abbildung 1.3a) zum *red cell screening* (rechte Grafik in Abbildung 1.3b) übergeht. [26]

In der Literatur werden die Begriffe *plasma skimming* [22, 23] für das in Abbildung 1.3a

gezeigte Verhalten und *red cell screening* [22] für das in Abbildung 1.3b gezeigte Verhalten verwendet.

Zu Abbildung 1.3a: Der Volumenstrom in B ist größer als in C. Dies gilt für (i) und (ii). In der linken Grafik (i) hat sich in A keine zellreduzierte Schicht aufgebaut, was dazu führt, dass Zellen auch entlang der Wand strömen können. Erreichen diese eine Y-Aufzweigung, können sie in B und C strömen. In der rechten Grafik (ii) hat sich eine zellreduzierte Schicht in A ausgebildet. Dies führt dazu, dass keine Zellen in C strömen.

Zu Abbildung 1.3b: Hier ist der Durchmesser von A kleiner, als jener in Abbildung 1.3a. In der linken Grafik (i) ist der Volumenstrom in B und C gleich groß, wodurch die Zellen an der Aufzweigungsstelle gleichwahrscheinlich in B und C strömen können. In der rechten Grafik (ii) ist der Volumenstrom in B größer als in C. Dies entspricht dem Verhalten in Abbildung 1.3a. Dadurch verschiebt sich die auftrennende Strömungslinie und die resultierende Kraft lässt die Zellen in jene Aufzweigung (B oder C) strömen in der der Volumenstrom größer ist, hier in B. [31]

Pinched flow fractionation: Die *pinched flow fractionation* ist ein Verfahren, welches die Effektivität einer Separation, z.B. von Erythrozyten aus Blut, verstärkt. Sie wurde von Yamada *et al.* 2004 [32] publiziert. Sie zeigten damit, dass es durch spezielle Kanalgeometrien und mit Hilfe einer Fokussierung (Verhältnis von unterschiedlichen Strömungen in den Zuflüssen) möglich ist, Partikel der Größe nach zu sortieren. Kernelement seiner Anordnung ist eine Kanalverengung, welche spontan in einen breiteren Kanal mündet. Sie konnten zeigen, dass große Partikel eher in die Mitte des breiten Kanals fließen, kleine hingegen in einem bestimmten Winkel zum treibenden Fluss abgelenkt werden. Der Ablenkwinkel ist u.a. abhängig von der Größe der Partikel. Abbildung 1.4 zeigt schematisch das Kernelement der *pinched flow fractionation*. Das Separationsergebnis ist dabei u.a. abhängig von der Geometrie der Kanäle und der Flussrate in der Kanalverengung. [32]

Diese Abhängigkeit wurde 2007 von Mortensen [33] in Frage gestellt. Er erklärte den Trenneffekt folgendermaßen: Das Stokessche Gesetz besagt, dass Partikel den Strömungslinien folgen und daher im breiten Kanal im verhältnismäßig gleichen Abstand zur Kanalwand strömen wie in der Verengung. Dies hat zur Folge, dass die Partikeltrajektorie im breiten Kanal (ab einer gewissen Distanz von der Aufweitung) unabhängig von der Geometrie der Kanalaufweitung ist. Einzig die jeweiligen Breiten der beiden Kanäle beeinflussen die Partikeltrajektorie im breiten Kanal, was in Abbildung 1.5 angedeutet ist. Er kommt zur Schlussfolgerung, dass die gezielte Anwendung dieses Effektes sehr detaillierte Modellierungen voraussetzt und wesentlich komplexer ist als zuvor beschrieben. Grund sind viele Interaktionen und Seiteneffekte welche berücksichtigt werden müssen. [33]

Durch Kombination der bisher erklärten Strömungseffekte kann eine Abtrennung der

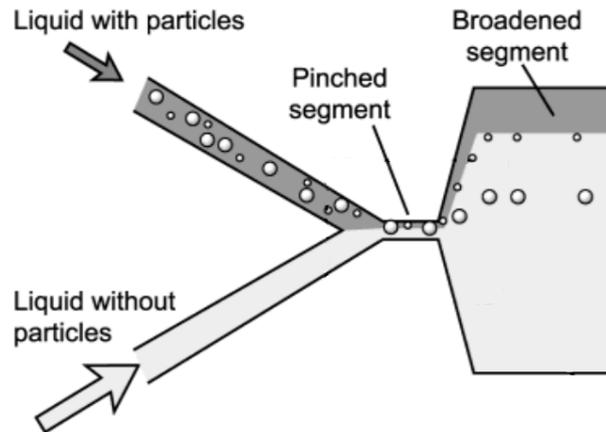


Abb. 1.4.: *pinched flow fractionation*: Links sind die beiden Zuflüsse zu sehen. Die Größe der Pfeile deutet die unterschiedlichen Flüsse an. Die Partikel werden am oberen Rand der Verengung fokussiert und an der abrupten Aufweitung, aufgrund der wirkenden Kräfte, abgelenkt. Der Winkel in dem die Partikel die Verengung verlassen ist dabei unter anderem abhängig von deren Größe. Abbildung modifiziert aus [32].

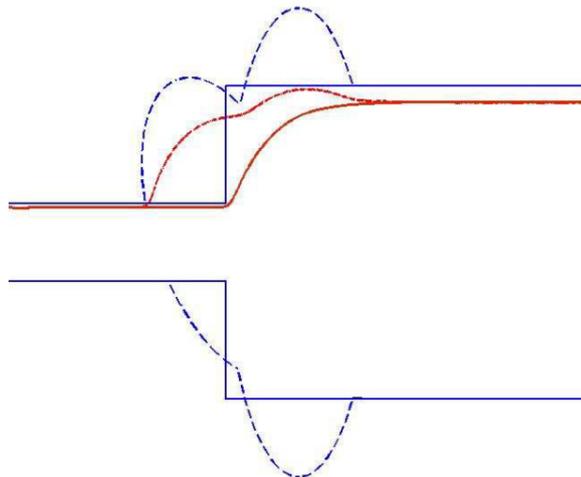


Abb. 1.5.: Die blauen durchgezogenen Linien stellen die Kanalwände eine abrupte Kanalaufweitung dar. Die roten durchgezogenen Linien die dazugehörigen Partikeltrajektorie aus einer finiten-Elemente-Simulation. Strichliert dargestellt sind die Kanalwände einer komplexeren Aufweitungsgeometrie (blau) sowie die dazugehörigen Partikeltrajektorie (rot). Beide Strömungslinien weisen ab einer bestimmten Stelle im breiten Kanal die gleiche Position auf. Abbildung modifiziert aus [33].

Erythrozyten aus Vollblut und der Erhalt einer zellarmen separierten Suspension, im Idealfall Plasma erreicht werden. Die genaue Beschreibung dieser Separationsmethode folgt in Kapitel 2.2.

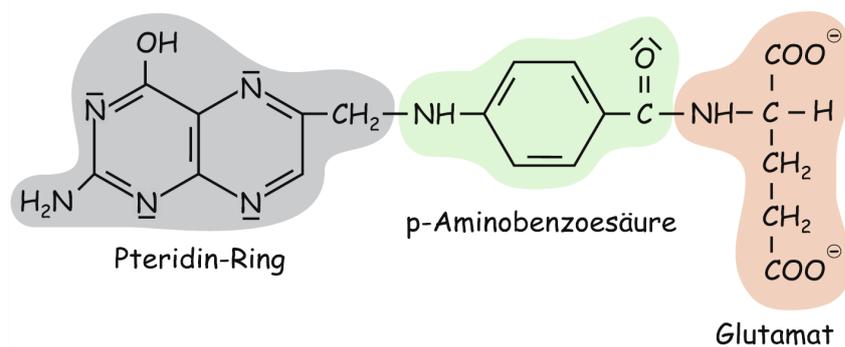


Abb. 1.6.: Strukturformel der Folsäure mit den Bezeichnungen der verschiedenen Teilstrukturen. Abbildung aus [34].

1.3. Das Vitamin B9 (Folsäure)

Die für diese Arbeit relevanten Eigenschaften von Folsäure werden beschreiben in [21, 34, 35].

Abbildung 1.6 zeigt die chemische Strukturformel und deren Zusammensetzung von Folsäure. Chemisch gesehen ist Folsäure bzw. Folat (lat. folium = Blatt, daraus folgt die Bezeichnung Blattsäure) ein wasserlösliches Vitamin mit einem Molekulargewicht von 441,4 Da, welches in der Natur nur in geringen Konzentrationen vorkommt. Folsäure ist wichtiger Überträger von C1-Einheiten im Stoffwechsel und wirkt in reduzierter Form als Koenzym im C1-Stoffwechsel. Dieser wiederum spielt eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Nukleinsäuren (Purine und Pyrimidine). Der tägliche Bedarf an Folsäure wird mit ca. 400 μg angegeben wobei je nach Literatur zwischen 10 mg und 15 mg in der Leber gespeichert werden können. Hauptaufnahmequelle von Folsäure ist die Nahrung. So enthalten u.a. Salat, Spinat, Leber und Niere reichlich Folsäure. Bei nüchternen Erwachsenen liegt der Serumspiegel (primäre Analyseflüssigkeit) im Bereich von (3 bis 15) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ und in den Erythrozyten im Bereich von (160 bis 640) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Bei normaler Ernährung kommen Mangelerscheinungen selten vor, jedoch können diese beispielsweise bei der Gabe von Folsäure-Antimetaboliten und speziellen Pharmaka, [21] sowie während der Schwangerschaft auftreten. Symptome und Folgen eines Mangels sind anfänglich an einer Störung der Zellteilung, besonders im blutbildenden System, sowie folglich an Diarrhoe und Gewichtsverlust zu erkennen. Bei Folsäuremangel in der Schwangerschaft kann es zu einem Neuralrohrdefekt des Embryos kommen.

1.4. Biosens II und Ziele dieser Arbeit

Wie einleitend bereits erklärt, ist die Mikrofluidik eine geeignete Technik für *Point-of-Care* Anwendungen. Ihre Hauptvorteile liegen in der kostengünstigen Herstellung, den kleinen Abmessungen und einer raschen Analysezeit. Damit ist es dem Arzt möglich in kurzer Zeit Messergebnisse zu erhalten ohne ein externes Labor zu beauftragen. Von enormem Vorteil ist dies u.a. für niedergelassene Ärzte. Der Arzt hat die Möglichkeit selbst gewisse Blutparameter zu messen. Dies ermöglicht eine schnelle Diagnose und erspart dem Patienten eine Wiederbestellung. Die Hauptvorteile für die Humanmedizin gelten auch in der Lebensmittelindustrie. Zusätzlich ist mit mikrofluidischen Anwendungen die Durchführung engmaschiger Qualitätskontrollen möglich.

Biosens II ist ein vom Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie, kurz bmvit, gefördertes Projekt mit dem Ziel, ein Demonstratorsystem zu entwickeln, welches einen bestimmten Analyten optisch detektiert. Dieses soll sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch in der Humanmedizin Anwendung finden. Da u.a. Vitamine in der Sensorik bisher wenig Beachtung fanden, fiel die Wahl des Demonstratoranalyten auf Folsäure. Weiters ist diese für beide Anwendungsbereiche von Interesse. Ausgehend von Folsäure soll die im Projekt entwickelte Methode auf andere Analyten ausgedehnt werden können. Das Demonstratorsystem ist ein fluoreszenzbasierendes Sensorsystem zur Messung der Folsäurekonzentration in flüssigen Proben. Es ist als Einweg-Sensor-Chip aus Kunststoff konzipiert und soll Basis für weitere Produktentwicklungen sein. [36]

Ziele dieser Arbeit: Diese Arbeit beschäftigt sich mit den ersten Vorbereitungsschritten für die humanmedizinische Anwendung. Es soll ein Probeninterface sowie eine Probenvorbereitung für den anschließende Folsäureassay designt werden. Die Arbeit umfasst folgende Arbeitspakete: Erarbeitung eines Konzeptes, Implementation dessen in die Mikrofluidik und anschließende Evaluierung für ein Probeninterface sowie eine Probenvorbereitung. Das Probeninterface dient zum Einbringen von humanem Vollblut in die Mikrofluidik (Makro-zu-Mikro Interface), die Probenvorbereitung dient zur Abtrennung von Erythrozyten aus dem Vollblut. Dabei soll eine möglichst erythrozytenreduzierte (dem Blutplasma ähnliche) Suspension entstehen. Grund dafür ist die wellenlängenabhängige Absorption von Licht durch Hb, welche für die optische Detektion der Folsäure störend ist. Das Vorhandensein von freiem Hämoglobin in der Probe wird dabei nicht berücksichtigt.

Die Resultate der Arbeitspakete sollen auf einem Einweg-Sensor-Chip realisiert werden, wobei eine Anknüpfung an das nachfolgende Folsäureassay gegeben sein muss. Beim Design soll darauf geachtet werden, dass dieses mit der in der JAONNEUM RESEARCH vorhandenen Infrastruktur sowie deren Know-how gefertigt werden kann.

2. Material und Methoden

Die Kapitel 2.1 und 2.2 beinhalten den Methodenteil der Versuche mit den JR-Chips (JOANNEUM RESEARCH Chips), Kapitel 2.3 beinhaltet den Methodenteil der Versuche mit einem kommerziell erhältlichen Mikrofluidikchip zur Plasmaerzeugung aus Vollblut. Dieser wird in Folge Referenzchip (Ref-Chip) genannt.

2.1. Makro-zu-Mikro Interface

Das Makro-zu-Mikro Interface soll sowohl für humanmedizinische Blutproben als auch für flüssige Lebensmittelproben geeignet sein. Aufbauend auf einer Literaturrecherche wurde eine Entscheidungsmatrix (Abbildung A.1) der umsetzbaren Interfaces erstellt, welche Grundlage für die Auswahl des zu realisierenden Interfaces war. Die Probe sollte primär mit Hilfe einer Glaskapillare in das Interface eingebracht werden. Da diese mit einer antikoagulierenden Schicht versehen sein kann, würde sie nicht nur als Probenbehälter, sondern auch zur Probenbehandlung dienen. Weitere Entscheidungskriterien waren Kosten, Aufwand, Wiederverwendbarkeit, Leckagedruck und Totvolumen.

Als Makro-zu-Mikro Interface wurde die *needle-tubing press-fit* Methode [37] ausgewählt. Diese ist kostengünstig, wiederverwendbar, hat ein geringes Totvolumen und ist einfach an die Rahmenbedingungen, wie die bereits vorhandene Glaskapillare und Dichtschlauchtype, adaptierbar. Weiters bietet sie auch die Möglichkeit alternativ zur Glaskapillare eine Injektionskanüle für die Probeneingabe zu verwenden. Dies würde den Einsatzbereich erweitert. Im Gegensatz zur Originalmethode wurde in dieser Arbeit zum einen nicht der Nadeldurchmesser sondern der Interfaceöffnungsdurchmesser variiert und zum anderen wurde eine Glaskapillare anstatt einer Stahlnadel verwendet.

Abbildung 2.1 zeigt eine schematische Darstellung des Interfaceaufbaus. Aufgrund der Tatsache, dass der Außendurchmesser der Glaskapillare (OD_G) größer als der Innendurchmesser des Dichtschlauchs (ID_D) und der Außendurchmesser des Dichtschlauchs (OD_D) größer als der Interfaceöffnungsdurchmesser (d) ist, kommt eine Abdichtung mit kleinem Totvolumen zustande. Ein zusätzliches Verkleben des Dichtschlauchs, um den erforderliche Leckagedruck von mehr als 25 kPa (maximaler Wert der Drücke innerhalb der Kanäle

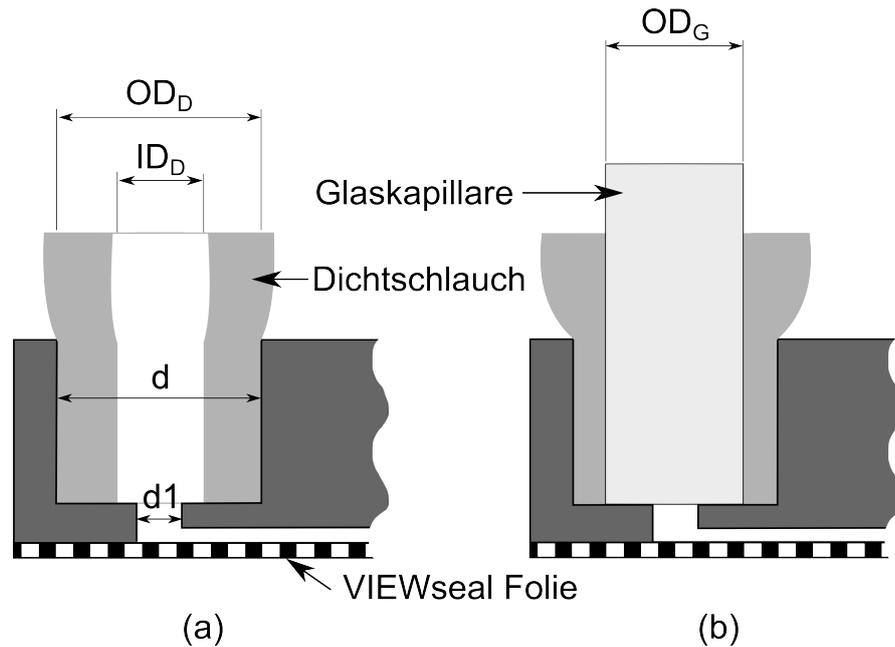


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung des *needle-tubing press-fit* Interfaces. (a) Der Außendurchmesser des Dichtschlauchs (OD_D) ist größer als der Durchmesser (d) des vertikalen Kanalabschnittes (= Interfaceöffnung). (b) Bei Einsetzen der Glaskapillare wird der Dichtschlauch aufgrund der unterschiedlichen Durchmesser ($OD_G > ID_D$) sowohl gegen die Wand des vertikalen Kanalabschnittes als auch gegen die Glaskapillare gedrückt. Abbildung modifiziert aus [37].

aus [38]) zu erreichen, sollte nicht notwendig sein.

2.1.1. Material

Um erste Abschätzungen über die Druckfestigkeit der gewählten Interfacemethode zu erhalten, wurden Pilotversuche an Testchips durchgeführt. Anschließend wurde ein JR-Chip im Zuge des Hauptversuches getestet. Dabei wurde bereits jener Aufbau verwendet, welcher auch für die weiteren Versuche dieser Arbeit verwendet wurde.

- Spritzenstempelvortrieb
 - Pilotversuch: per Hand
 - Hauptversuch: Spritzenpumpe SP230IWZ (Word Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA)
- Halterungen
 - Pilotversuch: dritte Hand: Toolcraft ZD-10F (Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland)
 - Hauptversuch: 2 Stück Klemmen, Kühlkörper SK 76 37,5 SA (Fischer Elektronik GmbH & Co. KG, Lüdenscheid, Deutschland), Peltierelement QC-17-1.4-

8.5M (Quick-Ohm Küpper & Co. GmbH, Wuppertal, Deutschland), Distanzhalter für Peltierelement (eigene Herstellung)

- Testlösung
 - Pilotversuch: Lebensmittelfarbe rot, E124 (SUWAG, Wien, Österreich) in destilliertem Wasser aufgelöst
 - Hauptversuch: destilliertes Wasser
- Spritze 1: Inject Luer Solo 10 mL (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Spritze 2: BD 3 ml Syringe Luer-Lock Tip™ (BD, NJ, USA)
- Verbindung: Spritze 1-Druckmesser
 - Dreiwegehahn: Connecta™ Luer Lock (BD, NJ, USA)
 - Male to Male Luer Lock Connector (Qosina, Edgewood, NY, USA)
- Verbindung: Druckmesser-Glaskapillare
 - Rückschlagventil (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
 - Dreiwegehahn: Connecta™ Luer Lock (BD, NJ, USA)
 - Verbindungsschlauch Kanüle-Glaskapillare: Tygon® R3607, Saint-Gobain Performance Plastics (ID × OD: (0,51 × 0,91) mm, Länge: 85 mm)
 - Kanüle: Sterican Gr. 1 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Druckmesssystem
 - Drucksensor: Fluke PV350 (Fluke Corporation, Everett, WA, USA)
 - Anzeigegerät: Fluke 179 (Fluke Corporation, Everett, WA, USA)
- Glaskapillare
 - Pilotversuch: Hirschmann ete 10 µL, OD: 0,9 mm (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)
 - Hauptversuch: Hirschmann ete NA-hep 10 µL, OD: 1 mm (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)
- Dichtschlauch
 - Pilotversuch: Tygon® 3350 Silicone, ID: 0,79 mm, OD: 2,38 mm (Saint-Gobain Performance Plastics, Paris, Frankreich)

- Hauptversuch: Tygon® S-50 HL, ID: 0,79 mm, OD: 2,38 mm (Saint-Gobain Performance Plastics, Paris, Frankreich)
- Schlauchschneidegerät: manuelles Schlauchschneidegerät (BW-Tec, Höri, Schweiz)
- Chips
 - Pilotversuch: Testchip; gefräster JR-Chip aus Polycarbonat (Abbildung 2.2)
 - Hauptversuch: JR-Chip 1 (heißgeprägter JR-Chip aus Cyclo-Olefin-Polymer (COP)), siehe Abbildung 2.7
- VIEWseal™ Folie (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)

Testchip: In Abbildung 2.2 sind das Layout sowie eine Aufnahme des gefrästen Testchips zu sehen. Es wurden Einflüsse auf die Leckagedrücke aufgrund unterschiedlicher Kanaltiefen (h , h_1) und -durchmesser (d) des vertikalen Kanalabschnittes (in Folge Interfaceöffnung bezeichnet) sowie aufgrund der Dichtschlauchlängen verglichen. Die Interfaceöffnungen mit unterschiedlichem Durchmesser (1-8) und Tiefe (obere Reihe und untere Reihe) wurden mittels Fräsbohrplotter ProtoMat S (LPKF Laser & Electronics AG, Garbsen, Deutschland) gefertigt. Die Ausgangswerte für d wurden den Überlegungen und Berechnungen mehrerer Publikationen [37, 39, 40], welche ähnliche Interfaces testeten, entnommen. Es wurden zwei Varianten des Testchips hergestellt, eine mit und eine ohne Einlagen (weiße Kunststoffrechtecke). Die weißen Rechtecke aus Polyester mit einer mittleren Fläche von $A = (30,1 \pm 1,9) \text{ mm}^2$ (Abbildung 2.2b) sollen, bei den Interfaceöffnungen mit $h = 1 \text{ mm}$, ein Anhaften des Dichtschlauchs an der VIEWseal™ Folie verhindern. Ein etwaiges Anhaften könnte ein Abdichten des horizontalen Kanals sowie veränderte Leckagedrücke zur Folge haben.

2.1.2. Versuchsaufbau und -ablauf

Beim Pilotversuch wurden fünf aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt. Zur Festlegung der Anzahl der Messungen beim Hauptversuch wurde die Anzahl der in [37] durchgeführten Messungen verdoppelt, was die statistische Aussagekraft verbessert.

Aufbau: Abbildung 2.3a zeigt den gesamten Versuchsaufbau. In Abbildung 2.3b sind die einzelnen Komponenten des Anschlusses abgebildet und beschrieben. Eine mit Luft gefüllte 10 mL Spritze wurde mittels Dreiwegehahn mit dem Drucksensor (3) verbunden. Am dritten Anschluss wurde über ein Rückschlagventil ein weiterer Dreiwegehahn angeschlossen. An diesem waren eine mit Testlösung gefüllte Spritze (3 mL) sowie eine Kanüle

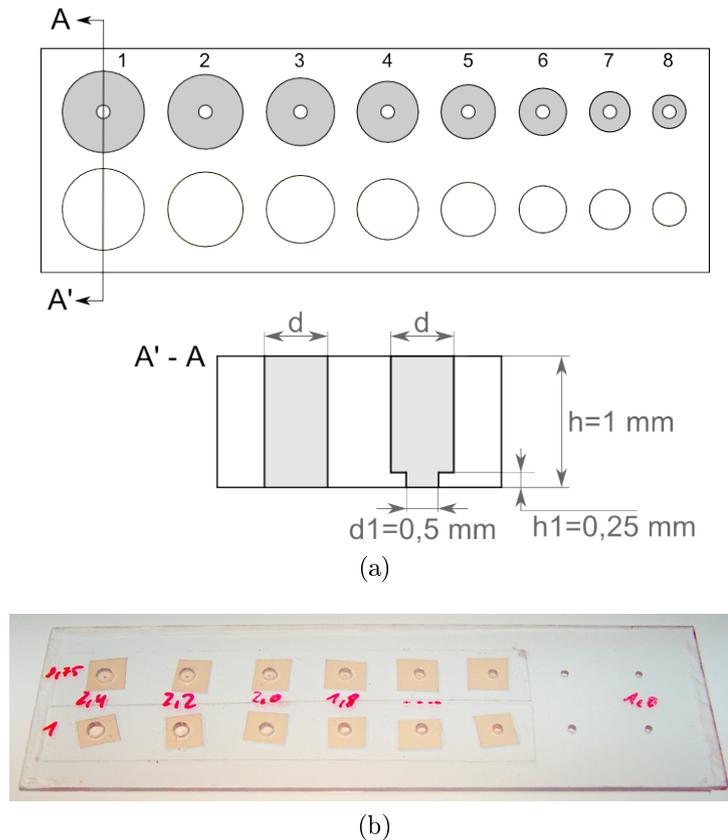
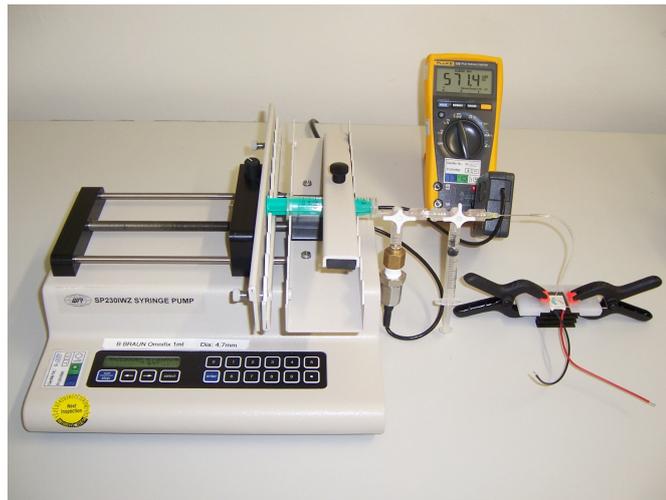


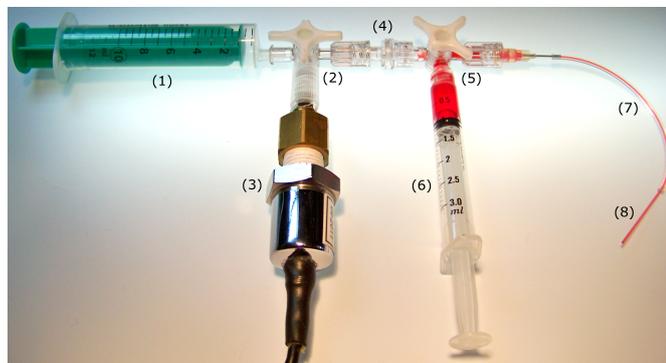
Abb. 2.2.: (a) Layout des Testchips aus Polycarbonat. Die Interfaceöffnungen mit Durchmesser (d) werden beginnend mit 2,4 mm bei Nr. 1 in 0,2 mm Schritten bis Nr. 8 kleiner. (b) Gefertigter Testchip. Die Interfaceöffnungen wurden mittels VIEWseal™ Folie an der Unterseite verschlossen. Die weißen Rechtecke aus Polyester sollen ein Anhaften des Dichtschlauchs an der Folie verhindern. Eigene Darstellung.

angeschlossen. Letztere wurde mit Hilfe eines Schlauchstückes mit der Glaskapillare verbunden.

Ablauf: Vor jeder Messung wurden die Interfaceöffnungen mit destilliertem Wasser gespült und anschließend mit Pressluft und Papier getrocknet. Anschließend wurde der Dichtschlauch eingesetzt und der richtige Sitz kontrolliert. Für jede Messung wurde ein neuer Dichtschlauch verwendet. Der erste Dreiwegehahn war zu allen Anschlüssen hin geöffnet. Der zweite Dreiwegehahn war Richtung Kapillare und 3 mL Spritze geöffnet. Anschließend wurde die 10 mL Spritze mit Luft, die 3 mL Spritze mit der Testlösung befüllt. Als erstes wurde die 10 mL Spritze am ersten Dreiwegehahn, dann die 3 mL Spritze am zweiten Dreiwegehahn angeschlossen. Danach wurde die Konstruktion vom zweiten Dreiwegehahn bis zur vollständigen Füllung der Glaskapillare mit der Testlösung befüllt. Anschließend wurde die Glaskapillare in den Dichtschlauch gesteckt. Abschließend wurde der zweite Dreiwegehahn verdreht, sodass er nur vom Rückschlagventil zur Glaskapilla-



(a)



(b)

Abb. 2.3.: (a) Gesamter Versuchsaufbau für die Messung des Leckagedrucks beim Hauptversuch. Der dabei verwendete JR-Chip 1 wurde auf der dafür gebauten Halterung befestigt. (b) Komponentenerklärung des zentralen Elements des Versuchsaufbaus. 10 mL Spritze (1), erster Dreiwegehahn (2), Drucksensor des Druckmesssystems (3), Rückschlagventil (4), zweiter Dreiwegehahn (5), 3 mL Spritze (6), Kanüle mit Verbindungsschlauch (7), Glaskapillare (8).

re offen war. Der zu testende Chip wurde, bei den Pilotversuchen auf der Tischplatte, bei den Hauptversuchen auf der eigens gefertigten Halterung (siehe Abbildung 2.3a), befestigt. Beim Hauptversuch wurden die Interfaceöffnungen des Auslass- sowie des Separationskanals mit der VIEWseal™ Folie verschlossen. Vor Beginn der Messung musste der Drucksensor auf 0 mV abgeglichen werden (1 mV entspricht 1 kPa). Während der Messung wurde der Spritzenstempel der 10 mL Spritze bei den Pilotversuchen per Hand, bei den Hauptversuchen mittels Spritzenpumpe ($Q = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) angetrieben. Die Messung wurde beendet sobald eine Leckage (Dichtheitsfehler) auftrat. Diese waren der Austritt von Flüssigkeit aus dem Interface oder das Herauslösen der Interfacestruktur (Glaskapillare aus dem Dichtschlauch oder Glaskapillare und Dichtschlauch aus der Interfaceöffnung). Ein exemplarischer Verlauf des Drucks bei einer Pilotversuchsmessung

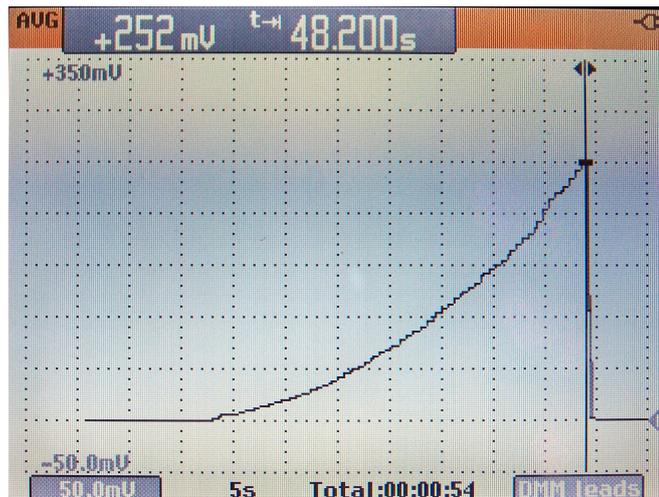


Abb. 2.4.: Exemplarischer Druckverlauf einer Messung beim Pilotversuch. Es ist deutlich der Anstieg des Drucks beim Betätigen des Spritzenstempels sowie der abrupte Abfall des Drucks beim Herauslösen der Interfacestruktur aus der Interfaceöffnung bei $p_{\max} = 252$ kPa zu erkennen.

ist in Abbildung 2.4 zu sehen. Dafür wurde das Anzeigegerät Fluke 179 gegen ein Fluke ScopeMeter 196C (Everett, WA, USA) ausgetauscht.

2.2. Erythrozytenseparation

Die Methode zur mikrofluidischen Separation von Erythrozyten aus Vollblut wurde auf gleiche Weise ausgewählt wie das Makro-zu-Mikro Interface. Es wurde, basierend auf einer Entscheidungsmatrix (siehe Abbildung A.2), jene Methode im Zuge eines Projektmeetings ausgewählt, welche für die gegebenen Rahmenbedingungen am besten geeignet erschien. Diese waren unter anderem das verwendete Grundmaterial, die ausschließliche Verwendung von unverdünntem Blut, die benötigte Blutmenge, die Komplexität der Methode sowie die Trenneffektivität. Weiters wurde eine kommerzielle Methode als Referenzchip, siehe Kapitel 2.3, ausgewählt um einen Ergebnisvergleich mit den JR-Chips anstellen zu können.

Separationsmethode (JR-Chip): Die für die Umsetzung gewählte Methode zur Erythrozytenseparation stammt von Rodríguez-Villarreal *et al.* [38, 41]. Sie bedienen sich dabei physiologischer Effekte welche einleitend in Kapitel 1.2.3 bereits erklärt wurden. Ergänzend wird an dieser Stelle das Design der Separationsstruktur sowie der Separationsvorgang präsentiert.

Die Ausgangsabmessungen sowie das Ausgangsdesign der Mikrokanäle für die Separation von Erythrozyten aus unverdünntem Blut wurden [38, 41] entnommen. Darin wurde

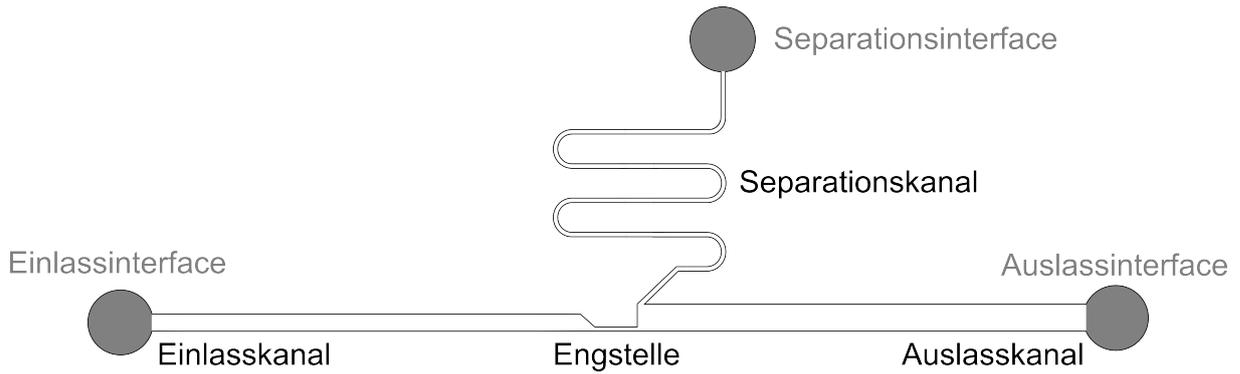


Abb. 2.5.: Design und Bezeichnungen der Separationsstruktur. Blut fließt vom Einlasskanal in die Engstelle. Am Ausgang der Engstelle fließt die separierte Suspension in den Separationskanal, das restliche (zellreiche) Blut in den Auslasskanal.

weitere auf die Einflussfaktoren Temperatur und Flussrate eingegangen. Das in dieser Arbeit verwendete Design sowie die Bezeichnungen der einzelnen Teilbereiche (Mikrokanäle) sind in Abbildung 2.5 zu sehen. In die Kreissegmente wurden nach der Chipherstellung die Interfaceöffnungen gefräst. Abbildung 2.6 zeigt eine Vergrößerung der Engstelle. Darin ist der Ablauf des Separationsvorgangs schematisch dargestellt und erklärt.

Von links nach rechts: Vollblut wird über das Makro-zu-Mikro Interface in den Einlasskanal gepumpt. Der Volumenstrom im Einlasskanal (Q_1) sollte idealerweise größer als $150 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ sein [41]. Der Einlasskanal mündet nach einer Abschrägung in eine Engstelle. Nach Ausbildung eines (anzunehmenden) parabolischen Strömungsprofils in der Engstelle beginnt die Effektreihenfolge *tank treated motion*, axiale Migration und Entstehung der zellreduzierten Schicht. Die ausgebildete zellreduzierte Schicht besteht aus einer Kernzone (Fokussierung der Erythrozyten in der Kanalmitte) und einer umhüllenden Plasmaschicht. Während bei der *pinched flow fractionation* zwei unterschiedliche Flüsse für die Zellfokussierung verwendet werden, bewirkt bei dieser Methode der Fåhræus (-Lindqvist) Effekt diese Fokussierung. Die am Ende der Engstelle entstandene zellreduzierte Schicht wird durch eine spontane Kanalaufweitung (Beginn des Auslasskanals) vergrößert. Im Inlay *pinched flow fractionation* in Abbildung 2.6 ist eine Hochgeschwindigkeitsaufnahme aus [38] dargestellt. Hier ist ein großer zellreduzierter Bereich (links oben) sowie ein zellreicher Bereich in der Mitte des Auslasskanals zu sehen. An dieser Stelle kommt der dritte entscheidende Effekt, der Zweifach-Fung Effekt, zu tragen. Aufgrund der unterschiedlichen Volumenströme im Auslasskanal (Q_1') und im Separationskanal (Q_2) tendieren die Erythrozyten dazu in den Auslasskanal statt in den Separationskanal zu fließen. Letzterer zweigt am Beginn des Auslasskanals schräg nach oben ab. Somit sammelt sich im Separationskanal (nur) der Inhalt der zellreduzierten Schicht (separierte Suspension). In welchem Maße die separierte Suspension zellreduziert ist, hängt von einigen Faktoren ab.

Rodríguez-Villarreal *et al.* verglichen die Trenneffektivität ihrer Methode bei Variati-

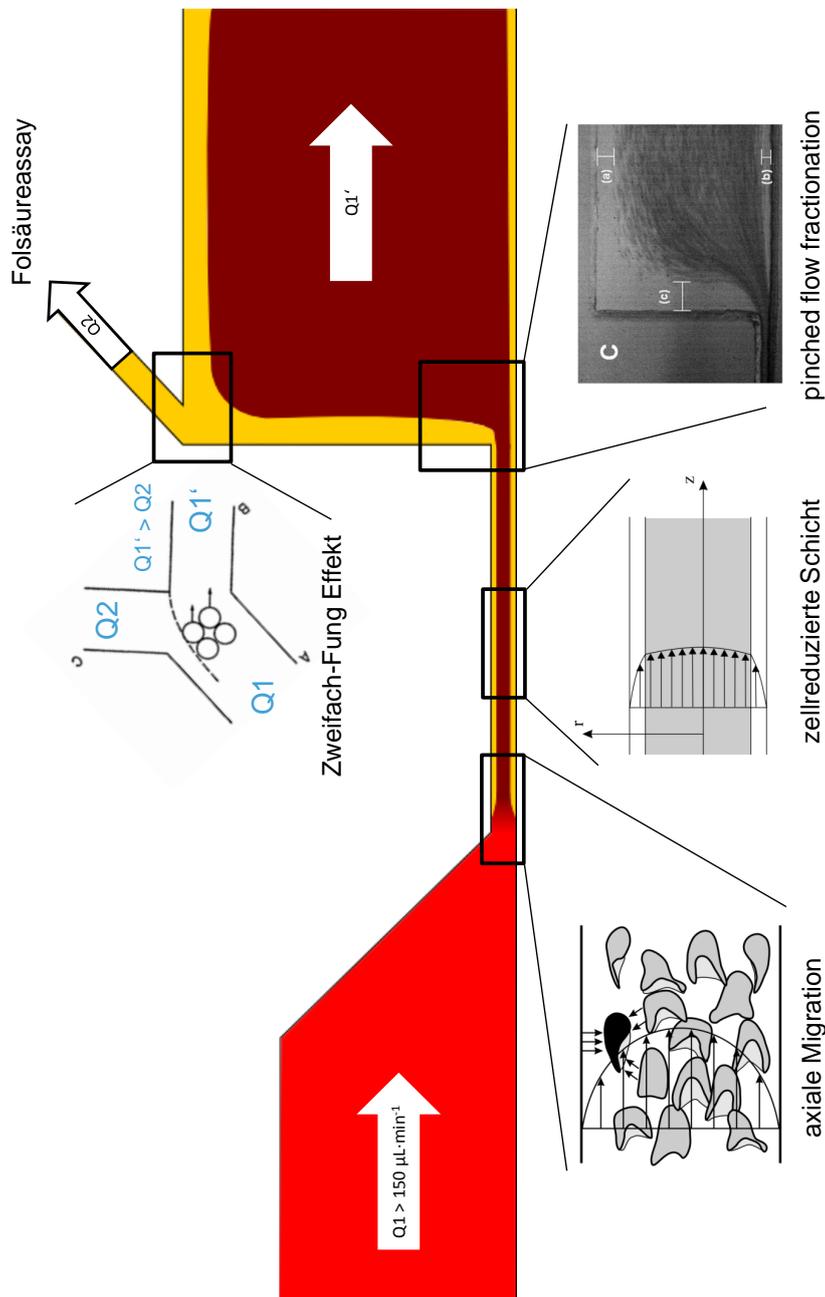


Abb. 2.6.: Schematischer Ablauf des Plasmaseparation durch Kombination von Strömungseffekten. Blut fließt vom Einlasskanal in die Engstelle. Dort entsteht aufgrund axialer Migration eine zellreduzierte Schicht, welche mit Hilfe der *pinched flow fractionation* vergrößert wird. Der Inhalt des so entstandenen zellreduzierten Bereiches am Anfang des Auslasskanals (gelb dargestellt) wird unter Ausnutzung des Zweifach-Fung Effektes über den Separationskanal dem Folsäureassay zugeführt, das restliche Blut fließt in den Auslasskanal. Inlays: „axiale Migration“ und „zellreduzierte Schicht“ aus [23], *pinched flow fractionation* aus [41] und Zweifach-Fung Effekt aus [31].

on der Einflussfaktoren Temperatur, Hämatokrit und Flussrate der Spritzenpumpe. In dieser Arbeit wurde nur der Einfluss der Flussrate untersucht, wobei im Gegensatz zu Rodríguez-Villarreal *et al.* nicht die Zellreduktion sondern die Hämoglobinkonzentration der separierten Suspension als Maß für die Trenneffektivität betrachtet wurde. Der Einfluss der Bluttemperatur wurde aufgrund der Ergebnisse aus [38, 41] für hohe Flussraten vernachlässigt. Auch der Einfluss des Hkt wurde aufgrund der Verwendung von unverdünntem Blut nicht untersucht.

Gleichzeitig mit Beginn der ersten Versuche der Chipfertigung wurden Simulationen des Strömungsverhaltens von Blut innerhalb der Kanalstrukturen mit Hilfe der Software COMSOL Multiphysics® (COMSOL, Inc., MA, USA) durchgeführt. Dabei galt es u.a. die Eigenschaften von Blut, speziell des Plasmas und der Erythrozyten, so gut wie möglich in die Simulation einzubinden. Es wurde versucht die *pinched flow fractionation* sowie die Ausbildung einer zellreduzierten Schicht in der Simulation zu zeigen. Die Software bot die Möglichkeit unterschiedliche Modelle zur Simulation des Strömungsverhaltens des Blutes zu wählen. Diese waren bereits in der *Comsol-Model-Library* integriert. Es wurde mit den Modellen *Power-law* und *Carreau* simuliert. Die dazugehörigen Gleichungen sind u.a. in [42] zu finden.

Nach der Fertigung der ersten JR-Chips wurden Versuche mit Hilfe des Fluoreszenz Video Mikroskops SVM340 (LabSmith, Livermore, CA) durchgeführt. Damit könnten Vergleiche zu den theoretisch beschriebenen Effekten, sowie den Simulationsergebnissen angestellt werden. Von Interesse war hier vor allem die Funktion der *pinched flow fractionation*. Da für diese Versuche ein fluoreszierender Farbstoff (Fluorescein red) verwendet wurde, konnte die Ausbildung der zellreduzierten Schicht auf diese Weise nicht nachgewiesen werden.

2.2.1. Material

Blutproben: Die verwendeten venösen Blutproben wurden von einem Arzt jeweils zwischen 9:00 Uhr und 10:00 Uhr von einem nüchternen, gesunden männlichen Probanden entnommen. Eine größere Bestellung von Blut aus einer Blutbank wurde aufgrund des organisatorischen Aufwandes und der nicht vorhersehbaren benötigten Blutmenge nicht durchgeführt. Weiters sollte für rheologischen Untersuchungen das verwendete Blut nicht länger als vier Stunden gelagert sein, bevor es untersucht wird. Es wurden Entnahmekanülen mit einem Durchmesser von 21 G verwendet. Der Stauschlauch wurde maximal für eine Minute geschlossen. Für die Hb-Messungen wurde das Blut in 3 mL K₃EDTA Vacuetten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich), für die Folsäurebestimmung in 3 mL Lithium Heparin Vacuetten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) entnom-

men. Das EDTA-Blut wurde innerhalb von vier Stunden nach Entnahme, das lithiumheparinisierte Blut innerhalb von 24 Stunden verwendet. Letzteres wurde im Kühlschrank bei $(5 \pm 0,2)$ °C gelagert. Vor der Verwendung der Blutproben wurden diese auf einem Taumelrollenmischer (OCS.tec GmbH & Co. KG, Erding, Deutschland) für mindestens 30 min bei $35 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer Raumtemperatur von $(25,9 \pm 0,1)$ °C homogenisiert. Bei Verwendung der Spritzenpumpe wurde die horizontal eingelegte Spritze ca. alle 30 Sekunden gedreht, bei Verwendung der Hand wurde diese regelmäßig bewegt. Dies sollte die Blutproben homogen halten. Eine genaue Beschreibung der Blutabnahme und Lagerung sowie die zeitlichen Veränderungen von Blutproben sind den Dokumenten [43, 44, 45] zu entnehmen.

JR-Chip: Die Kanalstrukturen wurden im Zuge eines Arbeitspaketes des Projektes Biosens II mit Hilfe dreier Herstellungsverfahren, Prägen, Fräsen und Gießen (= *polymer prototyping*) gefertigt. Aufgrund visueller Kontrollen der gefertigten JR-Chips wurden vier ausgewählt (JR-Chips 1 bis 4) und weiter getestet. Diese unterscheiden sich aufgrund der Herstellungsverfahren und der Kanalgeometrien (siehe Tabelle 2.1) und sind das Ergebnis eines iterativen Prozesses zur Anpassung verschiedener Parameter. Die ersten Versuche zur Fertigung des JR-Chips wurden mittels Heißprägen angestellt. Da erste Versuche nicht zum gewünschten Ergebnis führten, mussten Überlegungen und Berechnungen angestellt werden, wie man die Geometrien bzw. Herstellungsparameter anpassen könnte. Gleichzeitig wurden alternative Herstellungsverfahren gesucht um die auftretenden Probleme zu lösen. Als erstes wurde das *polymer prototyping* etabliert. In weiterer Folge kam das Fräsen der Kanalstrukturen hinzu. Aufgrund der dadurch entstandenen großen Anzahl an JR-Chips mussten jene ausgeschieden werden, welche keine Rückschlüsse zwischen den Änderungen und den Ergebnissen zulassen würden. Bei den geprägten JR-Chips kam erschwerend hinzu, dass der Herstellungsprozess selbst einige Unsicherheiten mit sich brachte, worunter die Vergleichbarkeit zum *polymer prototyping* und zum Fräsen erschwert möglich sein könnte.

Bei den geprägten JR-Chips (Abbildung 2.7) wurden die Kanalstrukturen mittels *hot embossing* (Heißprägeverfahren) erzeugt. Das *hot embossing* Verfahren gehört zu den Verfahren der Nanolithographie. Das Grundmaterial des gerägten JR-Chips (COP) muss dabei über die Glasübergangstemperatur erhitzt werden bevor der Stempel, welcher mittels Laserlithographie hergestellt wurde, die darauf enthaltenen Strukturen auf das Polymer überträgt. Dies geschah mittels Druck des Stempels auf das erhitzte Polymer. Mit dieser Methode konnten bereits Kanalstrukturen zwischen einigen hundert Mikrometer und hundert Nanometer mit hoher Oberflächengüte (Glattheit) hergestellt werden. [46]

Beim zweiten Verfahren zum Herstellen der Kanalstrukturen wurde der Fräsbohrplotter

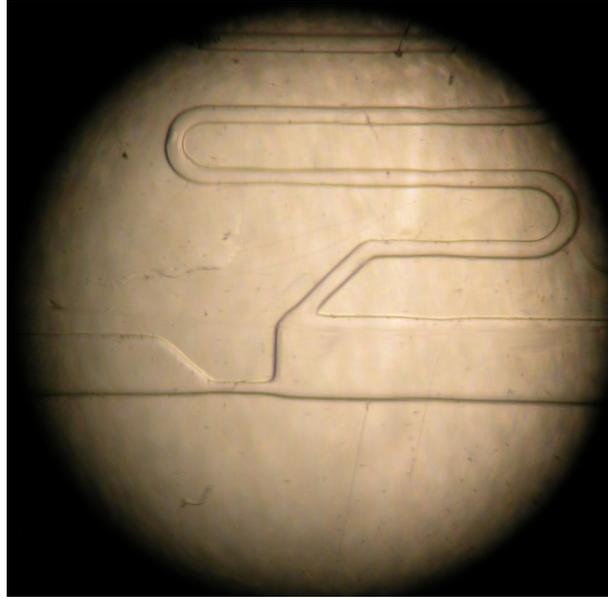


Abb. 2.7.: Mikroskopaufnahmen des geprägten JR-Chips. Es ist die Separationsstruktur nach dem Heißprägeprozess erkennbar. Es zeigen sich wellige Kanalkonturen aufgrund des Herstellungsprozesses. Weiters wurden Ecken durch den Herstellungsprozess abgerundet.

ProtoMat S (LPKF Laser & Electronics AG, Garbsen, Deutschland) verwendet. Dieses Herstellungsverfahren erreichte eine schlechtere Oberflächengüte im Vergleich zum Heißprägen. Dies könnte eventuell einen Einfluss auf das Strömungsverhalten der Erythrozyten zur Folge haben. Die Kanalbreite war aufgrund des Fräskopfes auf minimal 150 μm limitiert. Somit war die Engstelle bei den gefrästen JR-Chips fünfmal so breit wie in [38] beschrieben. Um einen späteren Vergleich der Ergebnisse anstellen zu können wurden alle Kanalbreiten fünfmal breiter als in [38] beschrieben gefertigt. Es wurden zwei Versionen der Kanalstrukturen hergestellt. Bei der ersten Version wurden nur die Kanalbreiten wie beschrieben verändert (Abbildung 2.8a), bei der zweiten (Abbildung 2.8b) wurde zusätzlich der Separationskanal verlängert und alle Kanaltiefen um 10 μm verringert. Nach Fertigung der Kanalstrukturen mittels Prägen bzw. Fräsen wurden die Interfaceöffnungen mit $d = 2,2 \text{ mm}$, $d1 = 0,5 \text{ mm}$ und $h = 0,8 \text{ mm}$, $h1 = 0,2 \text{ mm}$ (siehe Abbildung 2.2a) hergestellt. Die unterschiedlichen Durchmesser (d und $d1$) der Interfaceöffnungen waren notwendig um ein Anhaften des Dichtschlauchs an der VIEWseal™ Folie zu vermeiden. Abschließend wurden die JR-Chips an der Unterseite mittels VIEWseal™ Folie verschlossen.

Das dritte Verfahren war ein *polymer prototyping*-Verfahren, welches es ermöglichte mit geringem Zeit- und Materialaufwand Kanalstrukturen zu erzeugen. In Abbildung 2.9a ist der Herstellungsprozess skizziert, sowie das Ergebnis daraus abgebildet. Der HE-Master (**H**ot **E**mbossing **M**aster) ist jener, welcher auch für das Heißprägen verwendet wurde. Der

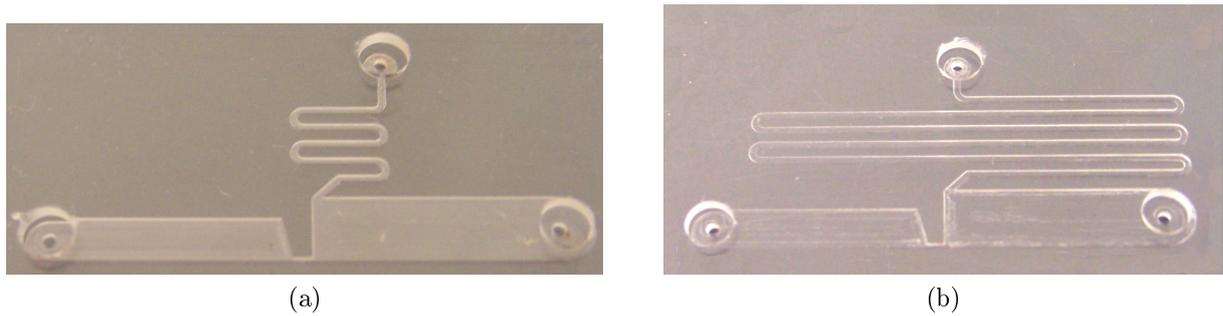


Abb. 2.8.: Die Abbildung zeigt die beiden gefrästen Chips (JR-Chip 2 und 3). Bei den gefrästen JR-Chips wurden die Kanalstrukturen spiegelverkehrt (vergleiche mit Abbildung 2.7) gefertigt. Der Einlass ist somit rechts. In (a) und (b) sind die Kanäle fünfmal so breit wie in der Originalmethode. In (b) wurde zusätzlich der Separationskanal verlängert und die Tiefe aller Kanäle reduziert. Dies vergrößert den hydrodynamischen Widerstand, speziell des Separationskanals. Die Makro-zu-Mikro Interfaces sind ident zu jenen der geprägten Strukturen.

Abguss des Stempels besteht aus Polydimethylsiloxan (PDMS), die Kanalstruktur besteht aus einem Thiol-En basierten Photopolymer und das Substrat ist ein Glasobjektträger der mit einem dünnen Film beschichtet wurde. [47]

Der Mittels PDMS gefertigte Master (PDMS-Master) zeigte bessere Stabilitätseigenschaften beim Fertigen der Kanalstrukturen d.h es konnten mehrere Kanalstrukturen mit einem Master erzeugt werden. Beim Heißprägen brachen die Strukturen des HE-Masters aufgrund des aufbrachten Druckes leicht ab, da die Strukturen (schwarze Rechtecke in Abbildung 2.9a) nicht aus ein und dem selben Material wie das Substrat (weises Rechteck in Abbildung 2.9a) waren.

Zur Berechnung des hydrodynamischen Widerstandes R_f eines Kanals mit rechteckigem Querschnitt wurde die Formel

$$R_f = \frac{12 \cdot L \cdot \mu}{b \cdot h^3} \quad (2.1)$$

aus [38] verwendet, wobei μ die Viskosität der Flüssigkeit und L die Länge, b die Breite und h die Höhe des Kanals sind. Formel (2.1) gilt nur für $b \gg h$ und muss bei $b > h$ mit dem Korrekturterm $g(\lambda)$ (siehe [38]) erweitert werden.

Material der Separationsversuche

- Spritzenpumpe SP230IWZ (Word Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA)
- Halterung
 - 2x Klemmen
 - Kühlkörper SK 76 37,5 SA (Fischer Elektronik GmbH & Co. KG, Lüdenscheid,

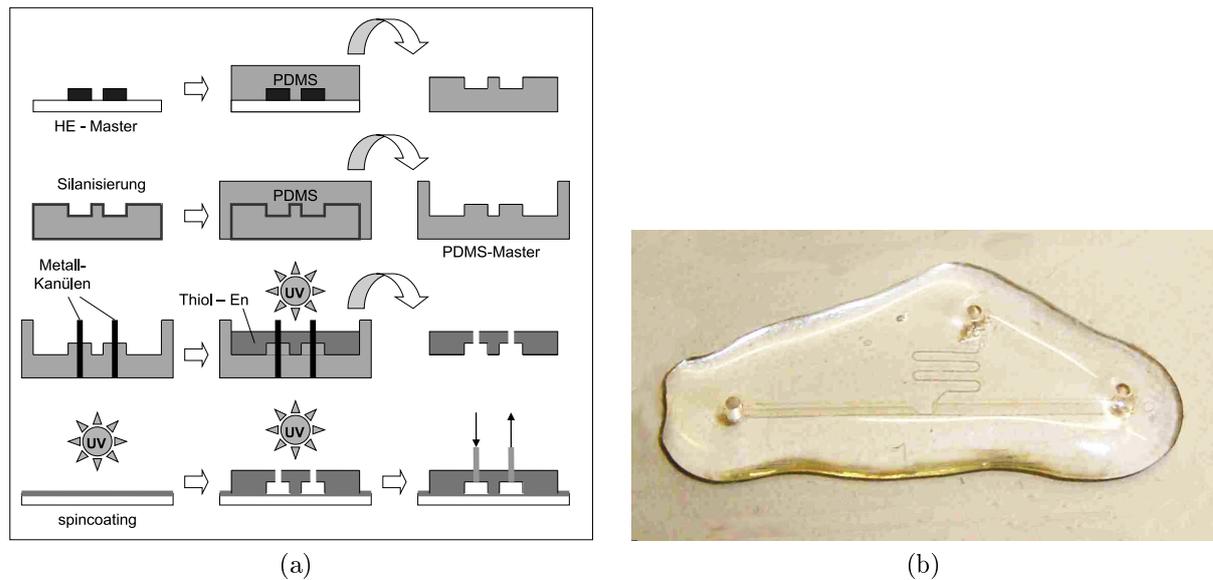


Abb. 2.9.: (a) Schematische Darstellung des *polymer prototyping*-Verfahrens. Der HE-Master (Stempel vom Heißprägen) wurde in PDMS abgegossen. Von diesem Negativ wurde ein weiterer Stempel aus PDMS gefertigt. Nach Einsetzen der Kanülen (Platzhalter für das Interface) wurde die finale Kanalstruktur aus einem Polymer abgegossen und mittels UV-Licht gehärtet. Die Kanalstruktur wurde anschließend auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Abbildung aus [47]. (b) Gefertigte Kanalstrukturen mittels *polymer prototyping* (Gießen).

Deutschland)

- Peltierelement QC-17-1.4-8.5M (Quick-Ohm Küpper & Co. GmbH, Wuppertal, Deutschland)
- Distanzhalter für Peltierelement (Eigenbau)
- Spritze: BD 3 mL Syringe Luer-Lok Tip™, ID: 8,76 mm (BD, NJ, USA)
- Einlassanschluss
 - Kanüle: Sterican Gr. 1 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
 - Verbindungsschlauch von der Kanüle bis zur Glaskapillare: Tygon® SH-50 HL, ID: 0,51 mm, OD: 0,91 mm, Länge: 85 mm (Saint-Gobain Performance Plastics, Paris, Frankreich)
 - Glaskapillare: Hirschmann ete NA-hep 10 µL, OD: 1 mm (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)
 - bei JR-Chip 4: Pipettenspitze (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Auslassanschluss
 - Glaskapillare: Hirschmann ete NA-hep 10 µL, OD: 1 mm (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)

Tab. 2.1.: Kanalabmessungen aller verwendeten JR-Chips. Die Höhe (h) geht zur dritten Potenz, die Breite (b) zur ersten Potenz in die Berechnung für den hydrodynamischen Widerstand (R_f) ein. Die Kanallängen (L) der JR-Chips mit der Nr. 1, 2 und 4 entsprechen den Maßen in Abbildung 2.5. Beim JR-Chip Nr. 3 ist der Separationskanal 10,95 cm lang. Messpkt. Der Messpunkt IN liegt vor der Engstelle, jener von ENG liegt in der Mitte der Engstelle, jener von OUT liegt nach der Engstelle und der Messpunkt von SEP in der Mitte des Separationskanals.

Nr.	Art	IN		ENG		OUT		SEP	
		b (μm)	h (μm)						
1	geprägt	430,0	15,0	45,0	12,5	630,5	15,0	35,0	12,5
2	gefräst	2000,0	40,0	150,0	40,0	3000,0	40,0	300,0	40,0
3	gefräst	2000,0	30,0	150,0	30,0	3000,0	30,0	300,0	30,0
4	gegossen	540,0	27,5	70,0	27,5	740,0	27,5	120,0	27,5

- Verbindungsschlauch von der Kanüle bis zur Glaskapillare: Tygon® R3607, ID: 0,51 mm, OD: 0,91 mm, Länge: 85 mm (Saint-Gobain Performance Plastics, Paris, Frankreich)
- bei JR-Chip 4: Pipettenspitze (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Behälter für die separierte Suspension
 - Hirschmann ete NA-hep 10 μL , OD: 1 mm (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)
 - bei JR-Chip 4: Pipettenspitze (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Restblutsammelbehälter: VWR Becher 15 mL (VWR International GmbH, Wien, Österreich)
- Chips: JR-Chip 1 bis 4
- VIEWseal™ Folie (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)

Material der Hb/Hkt-Messung

- Photospektrometer U-2000 (Hiatachi, Tokyo, Japan)
- Plastibrand®-Einmal-Küvetten, PMMA, 2,5 mL, 2 klare Seiten (VWR International GmbH, Wien, Österreich)
- Hemoglobin, Human H7379 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louise, MO, USA)
- *Drabkin's Reagent* (Sigma-Aldrich Co., Saint Louise, MO, USA)

- Eppendorf Research® Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Präzisionswaage PLS 720-A3 (KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland)
- Chips: JR-Chip 1 bis 4
- Zentrifuge: Haematokrit 24, Type 2075 (A. Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
- Mikro-Haematokritröhrchen NH4-heparinisiert (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland)

Material der Folsäuremessung

Hier wurden ergänzend zum Separationsversuch folgende Materialien verwendet:

- dritte Hand: Toolcraft ZD-10F (Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland)
- Lithium Heparin Vacuette®, 3 mL (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
- Folic Acid F7876 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louise, MO, USA)
- Chips: Kanalchip und nur JR-Chip 4

2.2.2. Versuchsaufbau und -ablauf

Separationsversuch

Für die Beurteilung der Effektivität der Erythrozytenseparation wurden folgende Parameter herangezogen:

- Menge an benötigtem Vollblut am Einlass um 10 μ L separierte Suspension am Separationsinterface zu erhalten,
- Adsorption des Hämoglobins bzw. der Erythrozyten durch die verwendeten Materialien,
- Hb-Konzentration in der separierten Suspension,
 - in Abhängigkeit der Flussrate und
 - in Abhängigkeit der Versuchsdauer.
- Folsäureadsorption an den verwendeten Materialien,
- Folsäurekonzentration in der separierten Suspension.

Aufbau: Die Versuchsaufbauten für die Separation der Erythrozyten sind in Abbildung 2.10a und 2.10b zu sehen. Das mittels Taumelrollenmischer homogenisierte Blut wurde bei den gefrästen und geprägten JR-Chip mittels Spritzenpumpe, beim gegossen per Hand über den Einlassanschluss eingebracht. Im Separationsinterface steckte eine 10 μL fassende Glaskapillare in welcher die separierte Suspension gesammelt wurde. Das restliche Blut floss über den Auslasskanal und den Auslassanschluss in ein Sammelgefäß. Befestigt wurden die JR-Chip auf einer speziellen Halterung, welche ein optionales Erwärmen der Kanalstrukturen auf konstante 37 °C durch ein Peltierelement ermöglichte. Ein Entfall des Elements würde veränderte Verhältnisse der Chipauflagefläche zur Folge haben. Da der Einfluss der Temperatur auf die Trenneffektivität aufgrund der hohen Flussraten nicht untersucht wurde, wurde das Peltierelement jedoch an keine Stromversorgung angeschlossen.

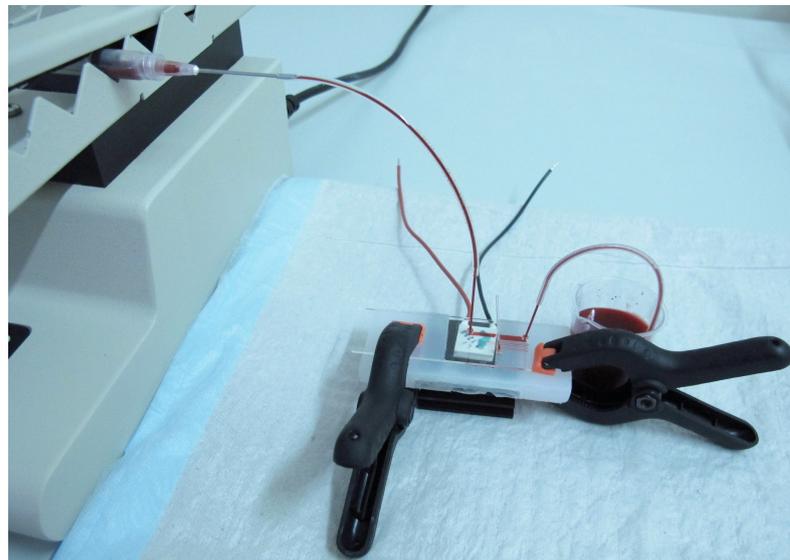
Für die Messung der Folsäureadsorption wurde ein spezieller Kanalchip (siehe Abbildung 2.12 verwendet, alle übrigen Messungen wurden an den entsprechenden JR-Chips durchgeführt.

Der allgemeine Ablauf der Versuche ist nachfolgend beschrieben. Abweichungen davon werden explizit an der betreffenden Stelle angeführt.

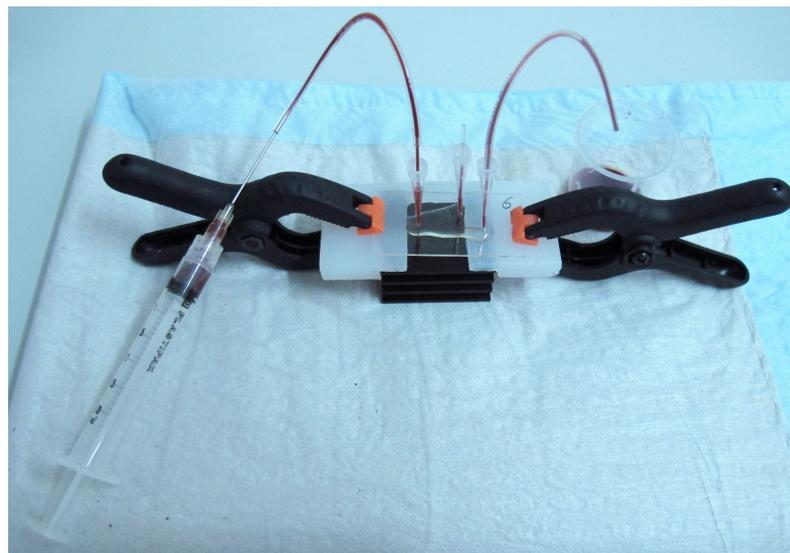
Ablauf (Separationsversuche): Vor Beginn jeder Messung wurden die Kanalstrukturen mit destilliertem Wasser gereinigt und getrocknet. Anschließend wurde die VIEWseal™ Folie aufgebracht um die Unterseite des zu vermessenden JR-Chips zu verschließen. Nach dem Einbringen der Dichtschräuche in die Interfaceöffnungen wurde der JR-Chip gemeinsam mit dem Peltierelement auf der Halterung befestigt. Nach dem Einstecken der Glaskapillare in das Separationsinterface sowie des Anschlusses in das Auslassinterface wurde die Spritze über den Einlassanschluss mit Blut befüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Schaumbildung aufgrund von aspirierter Luft kam. Zuerst wurde die Spritze in der Spritzenpumpe befestigt, dann der Einlassanschluss in das Einlassinterface gesteckt. Abschließend wurde der Versuchsaufbau mit einem Spritzschutz versehen (nicht aufgelistet und abgebildet) um eine eventuelle Kontamination der Umgebung mit Blut zu vermeiden.

Während des Versuches konnte die bereits eingebrachte Blutmenge am Display der Spritzenpumpe abgelesen werden. Da es herauszufinden galt, wie viel Blut notwendig war, um 10 μL separierte Suspension zu erhalten, konnte dies durch Ablesen des Displays bei voller Glaskapillare geschehen. Diese Messung wurde für jeden JR-Chip viermal durchgeführt.

Da Hb bzw. Erythrozyten an den Materialien adsorbiert werden könnten, mussten alle mit Blut in Kontakt stehenden Materialien der Anschlüsse und die JR-Chips darauf



(a)



(b)

Abb. 2.10.: Versuchsaufbau für die Erythrozytenseparation. In (a) ist der Aufbau für die gefrästen und geprägten JR-Chips zu sehen. Das Peltierelement wurde ohne Anschluss an eine Stromversorgung eingesetzt, damit die Chipunterseite eine gerade Auflagefläche hat. Blut wurde über eine Spritzenpumpe (links) in den JR-Chip gepresst. Die separierte Suspension wurde mittels Glaskapillare gesammelt, das restliche Blut floss in ein Sammelgefäß (rechts hinten). In (b) fehlt die Spritzenpumpe, da das Blut per Hand aus der Spritze in den gegossenen JR-Chip 4 gepresst wurde. Aufgrund des geänderten Interfaces wurden hier Pipettenspitzen anstatt des Dichtschauchs verwendet. Das in (a) eingesetzte Peltierelement wurde für diese Messungen aufgrund des starren Glasobjektträgers weggelassen.

untersucht werden. Dies geschah durch Vergleich der Cyanmethhämoglobinkonzentration (CN-Hb-Konzentration) vor und nach dem Durchfluss der unterschiedlichen JR-Chips. Dafür wurde pro Herstellungsprozess ein JR-Chip in modifizierter Form verwendet. Es wurden dabei die Separationskanäle an ihrem Ursprung am Auslasskanal verschlossen. Blut wurde anschließend mittels Spritzenpumpe bei der höchsten, chipspezifischen Flussrate eingebracht. Zum Detektieren der Adsorption von Hb bzw. Erythrozyten wurde das am Interface des Auslasskanals entnommene Blut mit dem eingebrachten Blut photometrisch verglichen (siehe Abschnitt Hb/Hkt-Messung). Der jeweils erste und fünfte Versuch wurde mit neuen Materialien (Spritze, Ein- und Auslassanschluss, VIEWseal™ Folie und mit dest. Wasser gespülte und getrocknete Kanalstrukturen) der zweite bis vierte Versuch mit den Materialien des ersten durchgeführt. Im Falle einer Adsorption sollte das Blut am Interface des Auslasskanals eine geringere Absorbanz zeigen.

Wie in [38] gezeigt ist die Effektivität der Methode auch von der Flussrate abhängig. Um dies zu untersuchen wurden die Absorbanzen der separierten Suspensionen bei Verwendung dreier unterschiedlicher Flussraten am JR-Chip 2 untersucht. Zuerst wurde der JR-Chips 2 per Hand befüllt. Danach wurde er aufgrund der fünffachen Kanalbreite mit der fünffachen Flussrate ($1000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ und $2000 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), welche bei Verwendung von Blut in [38] vorgeschlagen wurde, über eine Spritzenpumpe befüllt. Somit sollten gleiche Druckverhältnisse im Einlasskanal des JR-Chip 2 wie in [38] herrschen. Alle vier Messungen wurden hintereinander mit den selben Materialien durchgeführt. Für die Druckverhältnisse in einem Kanal gilt folgender formaler Zusammenhang zwischen Druck P , Flussrate Q und hydrodynamischen Widerstand R_f

$$P = R_f \cdot Q \quad (2.2)$$

Aufgrund des geringeren R_f des JR-Chip 1 sollte dieser mit einer Flussrate von $11 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ befüllt werden um gleiche Druckverhältnisse im Einlasskanal wie in [38] beschrieben zu erhalten. Da für diese Arbeit Vollblut verwendet wurde, wurden die finale Flussrate jedoch beim JR-Chip 1 mit $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ und $200 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ gewählt. Aufgrund dieser Anpassung hat die Bluttemperatur keinen Einfluss mehr auf das Separationsergebnis, jedoch ist ein direkter Vergleich von JR-Chip 1 und 2 nicht mehr gültig.

Abschließend wurde ein Vergleich der Hb-Reduktion über die Dauer der Versuche der einzelnen JR-Chips durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, ob sich die Hb-Konzentration der 2. und 3. Probe im Vergleich zur 1. Probe ändert. Dies hat Auswirkung auf die weitere verfahrenstechnische Behandlung der separierten Suspension. Dazu wurde das Verhältnis der CN-Hb-Konzentrationen der 1. zur 2. bzw. 3. Probe gebildet.

Hb/Hkt-Messung

Eine qualitative Bestimmung von Hb in Erythrozyten ist ab einer Konzentration von $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ visuell durch die rote Färbung des Plasmas möglich. [48]

Für die quantitative Bestimmung der Hb-Konzentration im Blut bzw. der separierten Suspension wurde das *Drabkin's Reagent* verwendet. Dies dient zur Aufbereitung der Proben vor der photometrischen Absorbanzmessung. Das *Drabkin's Reagent* besteht aus einer Kombination aus alkalischem Ferrizyanid und Zyanid. Es wandelt unter alkalischem pH das Gesamthämoglobin in Cyanmethhämoglobin (CN-Hb) um. Dessen Konzentration kann anschließend bei 540 nm quantitativ bestimmt werden. Das *Drabkin's Reagent* reagiert mit allen Formen des Hämoglobins, einzige Ausnahme stellt das Sulfhämoglobin dar, welches nur in minimalen Mengen im Körper vorhanden ist. Das *Drabkin's Reagent* ist ausschließlich für Forschungszwecke zu verwenden. [49]

Das *Drabkin's Reagent* ist linear von (0 bis 200) $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ und weist eine Sensitivität von $0,04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pro 0,001 Absorbanzen auf. Weiters besitzt es bei der *within-run precision* einen Variationskoeffizient (CV) von kleiner 1,5 % im Bereich von (111 bis 200) $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ und bei der *between-run precision* kleiner 1,6 % im Bereich von (111 bis 200) $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. [50]

Das Herstellen der Drabkin-Lösung, die Erstellung der Kalibrationskurve und die Aufbereitung der Proben wurden der Gebrauchsanweisung entnommen.

Hb-Messung: Für die photometrische Bestimmung der Hb-Konzentration der Probe wurde eine Kalibrationskurve aufgenommen. Die dafür benötigten Lösungen wurden der Gebrauchsanweisung des *Drabkin's Reagent* entsprechend hergestellt. Die Konzentrationen sowie die Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 2.2 zu sehen. Die gewählten Konzentrationen decken den physiologischen Bereich des Blutes und des Plasmas ab. Die Messung der Absorbanz wurde mit dem Photospektrometer U-2000 des Instituts für Chemie der Karl-Franzens-Universität Graz durchgeführt. Die Absorbanz (dekadisches Absorptionsmaß) A_λ ($[A_\lambda] = 1$), ist wellenlängenabhängig und nach dem Lamber-Beerschen Gesetz wie in Gleichung (2.3) dargestellt, definiert.

$$A_\lambda = \log \left(\frac{I_e}{I_t} \right) \sim c_{\text{CN-Hb}} \quad (2.3)$$

Dabei ist I_e die Intensität des einfallenden, I_t die Intensität des transmittierten Lichtes und $c_{\text{CN-Hb}}$ die Cyanmethhämoglobinkonzentration der Probe. Die photometrische Genauigkeit (*accuracy*) des Gerätes liegt bei $\pm 0,002$ im Absorbanzbereich von (0 bis 0,5). Die Einstellungen des Photospektrometers sind in Abbildung 2.11 dargestellt.

Beim Herstellen der Lösungen aus Tabelle 2.2 wurde zuerst die Drabkin-Lösung und anschließend die Hb-Lösung in die Küvette pipettiert. Die verwendete 1 mL Pipette weist

Tab. 2.2.: Konzentrationen und Mischungsverhältnisse für die CN-Hb-Kalibrationskurve. Hb-Lösung ... Hergestellte Lösung mit $180 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Hämoglobin, Drabkin-Lösung ... *Drabkin's Reagent* in destilliertem Wasser gelöst (ohne Hämoglobin). Die Messlösung Nr. 1 (Hb-Konzentrat) wurde laut Gebrauchsanweisung hergestellt, ab Nr. 2 wurde der jeweilige Prozentanteil der Hb-Lösung aus der vorigen Messlösung entnommen. $c_{\text{CN-Hb}}$... Ziel-Cyanmethhämoglobinkonzentration.

Nr.	Hb-Lösung (%)	Drabkin-Lösung (%)	$c_{\text{CN-Hb}}$ (mg/mL)
1	100,0	0,0	180,0
2	83,3	16,7	150,0
3	80,0	20,0	120,0
4	75,0	25,0	90,0
5	67,0	33,0	60,0
6	50,0	50,0	30,0
7	33,0	67,0	10,0
8	0,0	100,0	0,0

eine Messabweichung von (0,6 bis 1) % im Volumenbereich von (500 bis 1000) μL auf. Nach dem Mischen beider Lösungen in der Küvette wurde zweimal die Absorbanz gemessen. Die erste Messung erfolgte direkt nach dem Einbringen der Probe in das Photospektrometer, die zweite Messung 20 Sekunden später. Als Referenzlösung fungierte die Drabkin-Lösung. Der Mittelwert aus zwei Absorbanzmessungen pro CN-Hb-Konzentration wurde zur Bestimmung der Koeffizienten k_0 und k_1 der Geradengleichung

$$c_{\text{CN-Hb}} = k_1 \cdot A_\lambda + k_0 \quad (2.4)$$

verwendet. Die Geradengleichung diente zur Umrechnung der gemessenen Absorbanz bei 540 nm (A_{540}) in Hb-Konzentrationswerte ($[c_{\text{CN-Hb}}] = \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Alternativ dazu wurden zwei weitere Verfahren zur Überprüfung der oben beschriebenen *Drabkin's Reagent* Methode verwendet. Zum einen wurde ein Umrechnungsfaktor aus der Literatur [51], zum anderen wurde ein Hb-Referenzwert in einem externen Labor verwendet. Die Umrechnung mit dem Faktor lautet:

$$c_{\text{CN-Hb}} = 367,7 \cdot A_\lambda \quad (2.5)$$

Aus dem Hb-Referenzwert des externen Labors konnte mittels Schlussrechnung folgende Umrechnungsgleichung erstellt werden:

$$c_{\text{CN-Hb}} = 372,2 \cdot A_\lambda \quad (2.6)$$

```

PHOTOMETRY/JR-HB          04/03/12 13:50

DATA MODE                  CONC
SAMPLE NUM                 1
WL (nm)                   540.0
INIT DELAY (sec)          0
HI LIMIT                   9999
LO LIMIT                   0.000
UNIT LABEL
CURVE TYPE                 1ST ORDER
NUM STDS                   10
NUM REPEAT                 2
CURVE MODE                 NEW
BASELINE                   SYSTEM
RESPONSE                   MEDIUM
LAMP CHANGE WL (nm)       325.0
VIS. LAMP                  ON
UV LAMP                    ON
TEXT PRINT                 ON

```

Abb. 2.11.: Einstellungen am Photospektrometer zur Bestimmung der Hb-Kalibrationskurven.

Hkt-Messung: Der Hämatokrit der Blutproben, welche in die Separationsstruktur eingebracht wurden, wurde mittels der Mikrozentrifuge Haematokrit 24, Type 2075 (A. Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bestimmt. Blut wurde direkt aus dem EDTA-Röhrchen mittels Mikro-Haematokritröhrchen entnommen. Anschließend wurde die entsprechende Seite des Mikro-Haematokritröhrchens mit Dichtkitt verschlossen. Das Blut wurde für 6,42 Minuten bei einer Umdrehungszahl von 12800 s^{-1} zentrifugiert. Anschließend konnte der Hkt-Wert mit Hilfe einer Ableseskala bestimmt werden. Pro Blutprobe wurden zwei Messungen durchgeführt. Zur Umrechnung des Hkt-Wertes in den Hb-Wert im Blut wurde die Formel

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hb}}{\text{Hkt}} = (3,2 \text{ bis } 3,6) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (2.7)$$

verwendet. MCHC ist die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration. Der in Formel (2.7) angegebene Referenzbereich für MCHC wurde [7] entnommen. Bei einer Hkt-Bestimmung in einem externen Labor wurde ein MCHC Wert von $3,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ für den Probanden gemessen.

Folsäuremessung

Die Folsäure wurde bei der *Med. u. Chem. Labordiagnostik Lorenz & Petek GmbH* in Graz gemessen. Die Folsäuremessungen wurden auf drei Messreihen aufgeteilt. Bei der ersten Messreihe wurde primär getestet wie und ob die weiterführenden Messungen durchzuführen sind. Dieser Pilotmessreihe folgten zwei weitere in denen die Adsorption der Folsäure an den verwendeten Materialien sowie der Folsäurespiegel in der separierten Suspension

untersucht wurden.

Für die Messung der Folsäure wurde der ARCHITECT Folate Assay auf einem ARCHITECT i2000 System der Firma Abbott Laboratories (Illinois, USA) verwendet. Dieser forderte lithiumheparinisiertes Blut für die Bestimmung der Folsäure aus dem Serum. Das Limit of Quantification liegt bei $1,5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, der CV bei kleiner gleich 12 % im Bereich (3,5 bis 20) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Standardabweichung liegt zwischen 0,17 und 0,41 im Bereich (3,5 bis 10,8) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Im Bereich (3,5 bis 20) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ist der Assay linear. [52]

Folsäureadsorption: Den Messreihen zur Detektion von Folsäureadsorption und zur Folsäurebestimmung der separierten Suspension ging eine Pilotmessreihe voraus (Proben ACK01 bis ACK09). Im Zuge dieser ersten Messreihe wurden u.a. bereits erste Adsorptionsmessungen mit niedriger Folsäurekonzentration durchgeführt. Bei den Proben ACK05 und ACK07 wurden jeweils neue Materialien (Spritze, Ein- und Auslassanschluss, VIEWseal™ Folie und mit dest. Wasser gespülte und getrocknete Kanalstrukturen), bei den Proben ACK06 und ACK08 die selben Materialien wie zuvor verwendet. Der Chip wurde nicht erneuert, sondern zwischen den jeweils gepaarten Messungen wurde der Kanal mit destilliertem Wasser gespült. Der Versuchsaufbau sowie -ablauf waren bei der Pilot- und den Hauptmessreihen ident, weshalb sie in diesem Abschnitt der Arbeit gemeinsam beschrieben werden. Die jeweiligen Resultate sind gesondert dargestellt.

In Abbildung 2.12 ist der Messaufbau dargestellt. Für die Messung der Folsäureadsorption wurde ein Kanalchip verwendet, welcher aus zwei geraden, nicht verbundenen Kanälen bestand. Die vier Makro-zu-Mikro Interfaces waren gleich wie jene bei den Separationsversuchen. Der Kanalchip bestand aus dem selben Material wie die JR-Chips. Da Folsäure ein hydrophiles Vitamin ist, wurde bei der Dimensionierung des Kanalchips das Oberflächen- zu Volumenverhältnis als nicht entscheidend erachtet. Dessen Länge betrug 2 mm, die Breite betrug 500 μm und die Tiefe betrug 100 μm .

Blut wurde aus dem Probenröhrchen in eine Spritze aufgezogen. Anschließend wurde per Hand der Spritzenstempel vorgetrieben und das Blut floss durch einen der beiden geraden Kanäle in ein zweites, neues Probenröhrchen. Das zu vermessende Blut wurde dadurch doppelt lithiumheparinisiert. Die verwendeten Materialien, welche mit Blut in Kontakt kamen, waren die selben wie beim Separationsversuch. Die zwei getrennten Kanäle des Kanalchip besitzen die gleichen Dimensionen und dienten einer schnelleren Abwicklung der Messungen.

Bei der ersten Hauptmessreihe (Proben ACH01 bis ACH17) wurde das entnommene Blut teilweise mit Folsäure (siehe Material) auf eine Zielkonzentration von $15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ gespikt. Bei den Messungen ACH02 bis ACH08 wurden, mit Ausnahme des Kanalchips, immer neue Materialien (Spritze, Ein- und Auslassanschluss, VIEWseal™ Folie und mit

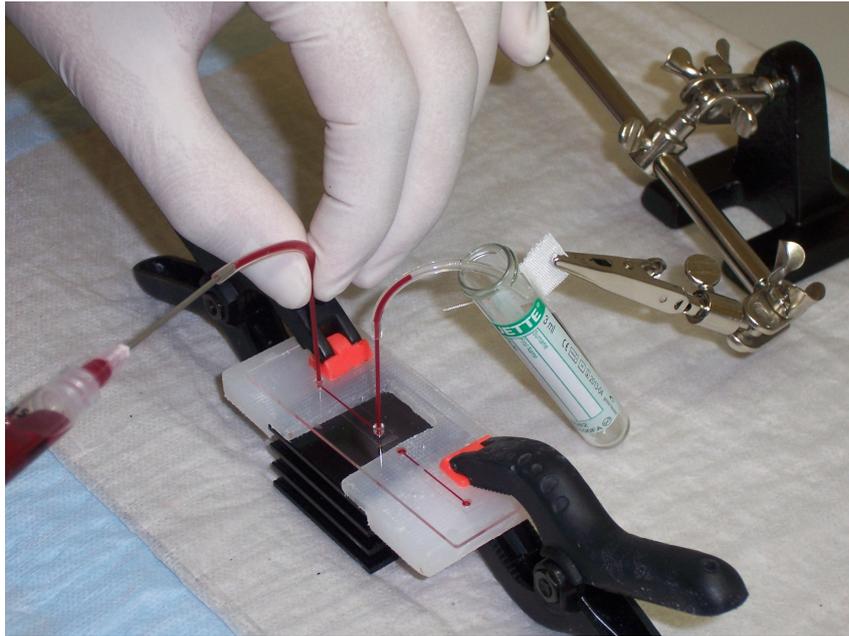


Abb. 2.12.: Versuchsaufbau zur Messung der Foläureadsorption. Lithiumheparinisiertes Blut wurde über eine Spritze in die Kanalstruktur eingebracht. Nach Durchfluss des Blutes durch den geraden Kanal wurde das Blut in einem weiteren Probenröhrchen gesammelt.

dest. Wasser gespülte und getrocknete Kanalstrukturen) verwendet. Beim zweiten Hauptversuch wurden zwei Messgruppen aufeinanderfolgend vermessen um den Memoryeffekt der Materialien zu untersuchen. Gruppe 1 bestand aus den Proben ACH10 bis ACH13, Gruppe 2 bestand aus den Proben ACH14 bis ACH17. Innerhalb einer Gruppe wurden immer die selben Materialien verwendet. Vor dem Versuch mit der Gruppe 2 wurde der Kanal inklusive Interfacestruktur und VIEWseal™ Folie gespült und getrocknet. Die übrigen Materialien wurden durch neue ersetzt. Sollten sich bei den Messergebnissen der Gruppe 2 erhöhte Werte zeigen, so wäre dies ein Hinweis für einen Memoryeffekt der Materialien.

Folsäurespiegel in der separierten Suspension: Im Zuge der zweiten Hauptmessreihe wurde der Folsäurespiegel in der separierten Suspension bestimmt. Dazu wurde der JR-Chip 2 verwendet, da dieser das beste Verhältnis aus Hämoglobinreduktion und benötigter Menge Probenmaterial besaß. Der Versuchsaufbau und -ablauf war jenem der Separationsversuche angelehnt. Es wurde jedoch lithiumheparinisiertes statt EDTA-Blut verwendet und die Menge an separierter Suspension betrug 1,5 mL statt 10 μ L. Die separierte Suspension wurde wieder in einem lithiumheparinisierten Probenröhrchen gesammelt.

2.3. Referenzchip

Als Vergleich zu der in dieser Arbeit angewandten Methode zur mikrofluidischen Erythrozytenseparation wurde der kommerziell erhältliche „Membran Chip“ (microfluidic ChipShop, Jena, Deutschland) als Referenz herangezogen. Aufgrund der eingehenden Literaturrecherche war dies das einzig kommerzielle, vergleichbare Produkt. Becker *et al.* zeigten in [53], dass der Ref-Chip 80 % des im Vollblut befindlichen Plasmas separieren kann. Dabei wurde ein vergleichbares Chipmaterial, sowie unverdünntes Blut verwendet. Aus der dazu bestehenden Literatur konnte jedoch kein detaillierter Versuchsaufbau/-ablauf sowie Angaben zur Separationseffektivität gefunden werden.

2.3.1. Material

Für die Messung des Plasmavolumens sowie dessen Hb-Wertes wurden die selben Materialien wie in Kapitel 2.2.1 verwendet. Der Versuchsaufbau selbst bestand aus:

- Membran Chip (microfluidic ChipShop, Jena, Deutschland)
- Spritzenpumpe: per Hand angetrieben
- Probenbehälter: Injekt® -F 1 mL (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Plasmabehälter: auf dem Ref-Chip befindliches Interface (OUT)
- PARAFILM® M Verschlussfolie (BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland)
- Probe: 1 mL EDTA-Blut

2.3.2. Versuchsaufbau und -ablauf

Wie einleitend erwähnt, gibt es keine genaue Beschreibung der verwendeten Materialien sowie des Ablaufs d.h. es konnten Parameter wie Flussrate, quantitative Größe des angelegten Unterdrucks am Ausgang, Art der Blutprobeneinbringung, u.s.w. nur aufgrund der Bild- und Videodokumentation der Literatur und der darin enthaltenen weiteren Quellenangaben abgeleitet werden.

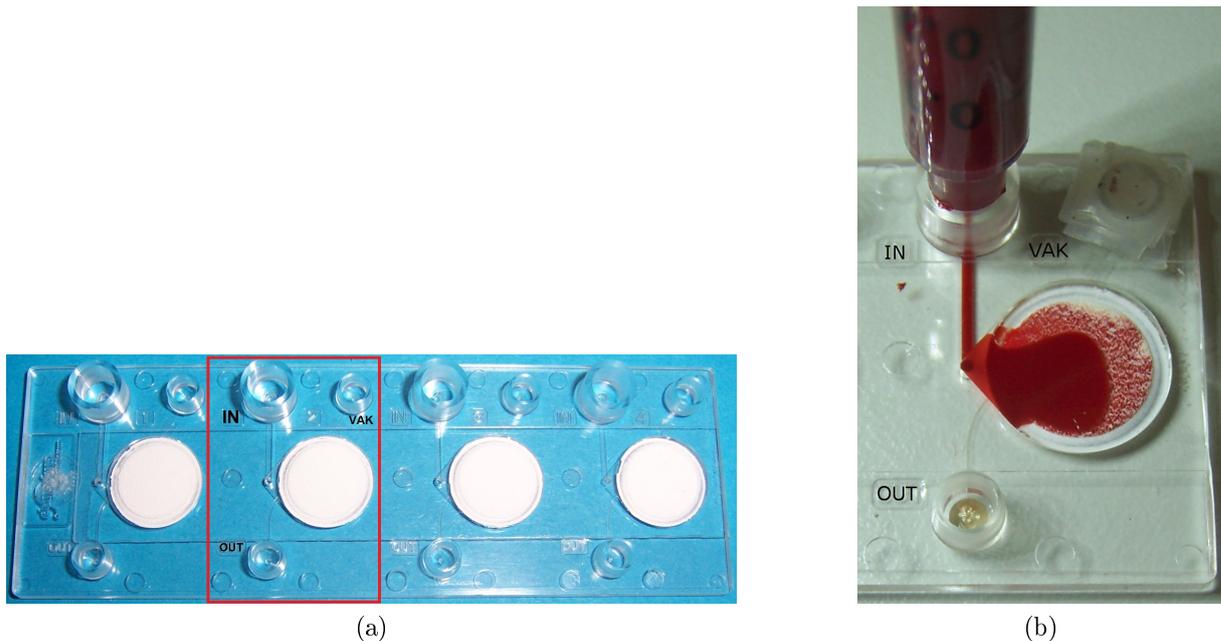


Abb. 2.13.: (a) Verwendeter Membranchip vom microfluidic ChipShop mit vier Separationseinheiten. Rot eingrahmt ist eine Separationseinheit bestehend aus drei Interfaces und einer Plasmamembran. (b) Separationseinheit nach der Probeneingabe. Das Blut war bereits durch die Plasmamembran gedrückt worden. Blut floss auf die Oberseite der Membran, separiertes Plasma floss von der Unterseite zum Ausgang (OUT). Das dritte Interface (VAK) dient zur Aufhebung eines Unterdrucks, welcher am OUT angelegt werden könnte (wurde in dieser Arbeit nicht angelegt). Dies wäre notwendig wenn die Membran verstopft ist. Hier ist das VAK-Interface verschlossen, da separiertes Plasma (im OUT-Interface zu sehen) noch ungehindert nachfließen konnte.

Aufbau: Abbildung 2.13a zeigt den verwendeten Membranchip. Darauf sind vier Plasmamembranen mit den dazugehörigen Kanal- und Interfacestrukturen vorhanden. Der rot umrandete Bereich stellt eine der Separationseinheiten dar. Diese besteht aus einem Luer-Lock Interface am Probeneingang (IN), einer Plasmamembran als zentrales Separationselement, sowie einem Plasmaausgang (OUT). Durch Anlegen eines Unterdruckes am OUT könnte das generierte Plasma abfließen. Ein zusätzliches Interface (VAK) muss beim Befüllen der oberen Probenkammer (Kammer oberhalb der Plasmamembran) mit Blut geschlossen sein. Im Falle einer verlegten Plasmamembran würde das VAK Interface geöffnet werden, damit Plasma aus der unteren Probenkammer zum OUT fließen kann. In Abbildung 2.13b ist der Versuchsaufbau abgebildet. Die obere Probenkammer ist bereits mit Blut gefüllt, das VAK-Interface ist noch verschlossen und im OUT-Interface ist bereits Plasma zu sehen. Befestigt wurde der Membranchip direkt auf der Tischoberfläche.

Ablauf: EDTA-Blut wurde mittels Kanüle in die Spritze aufgezogen. Das VAK-Interface wurde mit Hilfe des PARAFILM® verschlossen. Die Spritze wurde anschließend in das

IN-Interface eingesteckt. Nach dem Vortreiben des Spritzenstempels füllte sich die Probenkammer oberhalb der Plasmamembran mit Blut. Ohne weiteres Zutun wurde das Blut durch die Plasmamembran gepresst und die Erythrozyten wurden herausgefiltert. In Folge der Füllung der Probenkammer unterhalb der Plasmamembran wurde das separierte Plasma zum OUT-Interface gedrückt. Sollte die Membran verkleben, so konnte das VAK-Interface geöffnet werden und der verbliebene Inhalt der unteren Probenkammer konnte mittels Kapillarkraft zum OUT-Interface transportiert werden. Der bisher beschriebene Vorgang wurde so lange wiederholt, bis im OUT-Interface 10 μL separierte Suspension enthalten waren. Anschließend wurde diese mittels Glaskapillare gesammelt und das darin enthaltene Hb gemessen. In Summe wurden an vier Separationseinheiten Versuche durchgeführt. Die Messung der benötigten Menge Blut zum Erhalt von 10 μL Plasma am OUT erfolgte durch Ablesen der Volumenskala der Spritze.

2.4. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Programmiersprache **R**, Version 2.14.2, (The R Foundation for Statistical Computing) durchgeführt. Die Grafiken wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt.

Alle Ergebnisse werden in Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (STD) ausgedrückt. Die STD bei Verhältnissen wurde unter Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung

$$\text{STD}_z = \bar{z} \cdot \sqrt{\left(\frac{\text{STD}_x}{\bar{x}}\right)^2 + \left(\frac{\text{STD}_y}{\bar{y}}\right)^2} \quad (2.8)$$

berechnet. Dabei ist der Mittelwert von z (\bar{z}) das Verhältnis aus dem Mittelwert von x (\bar{x}) zum dem Mittelwert von y (\bar{y}). $\text{STD}_{x,y,z}$ sind die dazugehörigen Standardabweichungen. Die Standardabweichung von Differenzen wurde unter Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung

$$\text{STD}_z = \sqrt{\text{STD}_x^2 + \text{STD}_y^2} \quad (2.9)$$

berechnet. Dabei ist \bar{z} die Differenz aus \bar{x} und \bar{y} . $\text{STD}_{x,y,z}$ sind die dazugehörigen Standardabweichungen.

3. Ergebnisse

3.1. Makro-zu-Mikro Interface

Das Herstellen der Interfaceöffnungen mittels Fräsbohrplotter brachte einige Probleme mit sich. Aufgrund der Rotation des Fräskopfes kam es zur Erwärmung des Chipmaterials. Eine Kühlung des Chipmaterials war nicht möglich. Weiters wurden Materialspäne an den Interfaceöffnungen gefunden. Sowohl die Späne als auch die Erwärmung trugen dazu bei, dass die Kanalstrukturen verschlossen wurden (siehe Abbildung 3.1) wenn die Interfaceöffnungen erst nach dem Prägen und Bonden der Kanalstrukturen gefräst wurden. Wurden die Löcher zuerst gefräst, entstanden Risse im Chipmaterial aufgrund des aufgebracht Druckes beim Prägen. Nach einigen Versuchen konnte eine Lösung gefunden werden, bei der weder die Kanalstrukturen verschlossen, noch Risse bei der Fertigung der Interfaceöffnungen entstanden. Diese bestand darin, dass zuerst die Kanalstrukturen geprägt, anschließend die Interfaceöffnungen gefräst und die Kanalstrukturen gebondet wurden.

In Abbildung 3.2 ist ein funktionstüchtiges Interface dargestellt. Es zeigt eine deutliche Kompression des Dichtschlauches durch die eingesetzte Glaskapillare, was einen hohen Leckagedruck zur Folge hat.

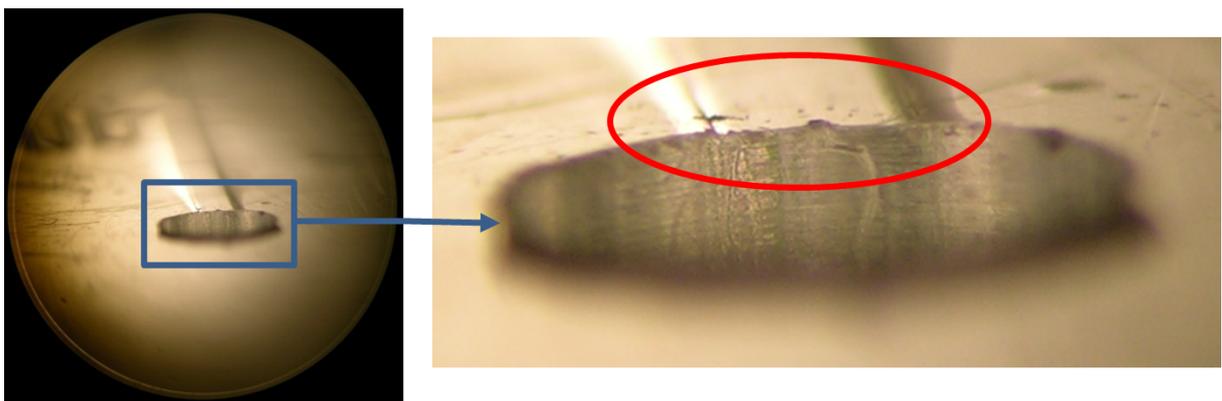


Abb. 3.1.: Die Bilder zeigen die verstopften Kanäle aufgrund des Fräsvorganges. Diese waren somit für Flüssigkeiten undurchlässig. Verhindert werden konnte dies, indem die Interfaceöffnungen nach dem Heißprägen und vor dem Bonden gefräst wurden.

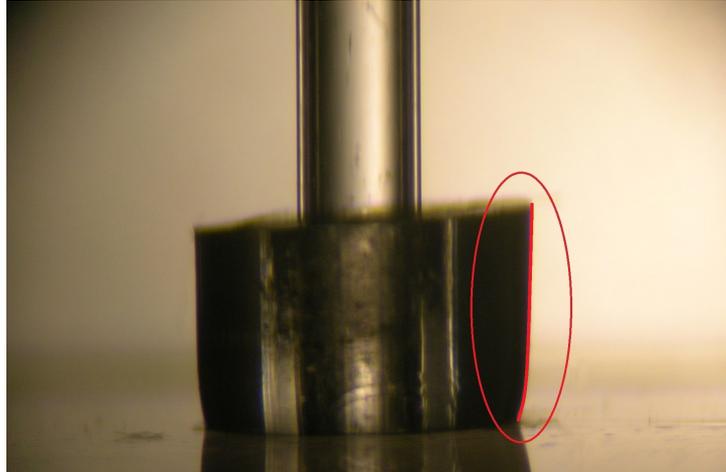


Abb. 3.2.: Seitliche Aufnahme eines JR-Chips mit Interfacestruktur (Dichtschlauch und Glaskapillare am Einlasskanal). Es ist zu sehen, dass der Dichtschlauch bei eingesteckter Glaskapillare nach außen gepresst wird (rote Markierung) und somit eine Abdichtung entsteht.

Pilotversuch

Beim Pilotversuch wurden diverse Einflüsse auf den Leckagedruck untersucht. Ziel war es, jene Kombination aus Glaskapillar-, Interfaceöffnungs- und Dichtschlauchdurchmesser sowie Dichtschlauchlänge zu finden, welche die größten Leckagedrücke zeigt. Die Messungen ergaben, dass sowohl die Tiefe der Interfaceöffnungen als auch deren Durchmesser einen messbaren Einfluss auf den Leckagedruck haben. Dies gilt auch für die Dichtschlauchlänge. Tabelle 3.1 zeigt eine Zusammenfassung der Messwerte. Weiters war zu bemerken, dass beim mechanischen Vorgang des Einsetzens des Dichtschlauches und der Glaskapillare so viel Kraft aufgebracht wurde, dass ein Anhaften des Dichtschlauches an der VIEWseal™ Folie erfolgte, was unerwünscht war. Bei einem ungeeigneten Verhältnis der drei Durchmesser konnte eine Leckage des Interfaces bereits bei geringen Drücken festgestellt werden, was in Abbildung 3.3 dargestellt ist.

Die größten Messwerte ergaben sich für die Kombination aus einem Interfaceöffnungsdurchmesser von 2,2 mm, einer Interfaceöffnungstiefe von 1,0 mm sowie einer Dichtschlauchlänge von 2,0 mm. Dies ist unabhängig davon ob Einlagen verwendet wurden oder nicht. Der mittlere Leckagedruck beim Einbringen der Testlösung in das Interface ($n = 5$) lag bei $(220,8 \pm 7,9)$ kPa mit Einlagen und $(248,8 \pm 20,6)$ kPa ohne Einlagen. Der CV war ohne Einlage größer als mit Einlagen (8,3 % im Vergleich zu 3,6 %). Diese Ergebnisse sind um rund eine Zehnerpotenz größer als das geforderte untere Limit des Leckagedrucks von 25 kPa.

Tab. 3.1.: Zusammenfassung der Messwerte des Interface-Pilotversuches. Es sind die Einflüsse der Parameter Dichtschlauchlänge (L), Interfaceöffnungsdurchmesser (d), Interfaceöffnungstiefe (h) und der Einlagen dargestellt. Die größten Leckagedrücke ergaben sich bei der Kombination von $L = 2,00$ mm, $d = 2,20$ mm und $h = 1,00$ mm.

L (mm)	d (mm)	h (mm)	Einlagen	Leckagedruck	
				MW (kPa)	STD (kPa)
2,00	2,20	1,00	mit	220,80	7,90
1,00				187,10	5,91
2,00	2,20	1,00	mit	220,80	7,90
	2,40			0,70	0,20
2,00	2,20	1,00	mit	220,80	7,90
		0,75		108,50	1,20
2,00	2,2	1,0	mit	220,80	7,90
			ohne	248,80	20,70

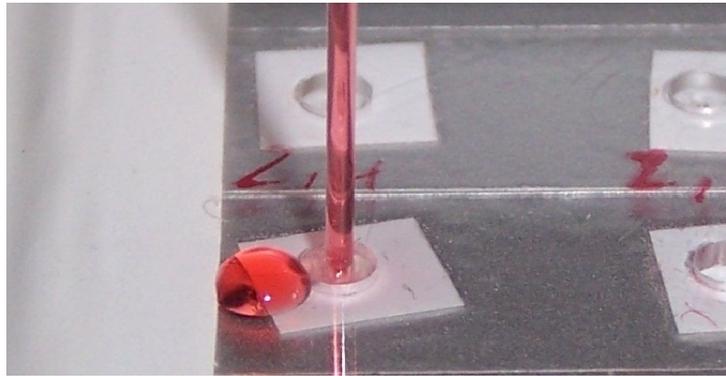


Abb. 3.3.: Austritt von Flüssigkeit bei geringem Druck ($p_{\max} = 0,5$ kPa) aufgrund eines ungeeigneten Verhältnisses von Dichtschlauch-, Kapillar- und Interfaceöffnungsdurchmesser.

Hauptversuch

Bei den Hauptversuchen wurden ein paar Materialien (Dichtschlauchtype, Glaskapillare, Testchip), die Dichtschlauchlänge ($L = 1,5$ mm) sowie die Interfaceöffnungstiefe ($h = 0,75$ mm) geändert, sowie die Anzahl der Messungen auf $n = 19$ erhöht. Die neu verwendete Glaskapillare besaß neben einem größeren Außendurchmesser auch eine antikoagulierende Innenbeschichtung. Diese Anpassungen führten zu einem wesentlich höheren Leckagedruck als bei den Pilotversuchen. Als Leckageursache trat immer ein Herauslösen des Dichtschlauches und der Glaskapillare aus der Interfaceöffnung auf. Der mittlere Leckagedruck des Interfaces beim Hauptversuch war ($570,8 \pm 1,2$) kPa (CV = 0,21 %). Somit war die Druckfestigkeit des Interfaces, bei Verwendung von destilliertem Wasser, 22,8 mal größer als gefordert. Die Zusammenfassung der besten Ergebnisse des Pilot- und Hauptversuches sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

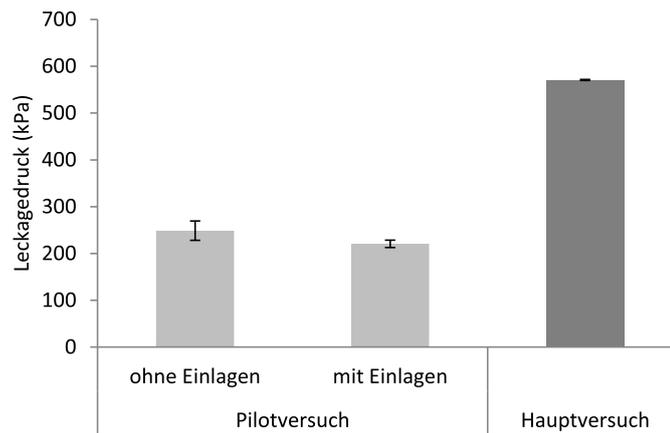


Abb. 3.4.: Die größten Leckagedrücke aller Interfaceversuche. Die Leckagedrücke der Pilotversuche ($n = 5$) mit Einlagen sind im Vergleich zu jenen ohne Einlagen geringer. Weiters zeigt das Ergebnis beim Hauptversuch ($n = 19$) eine sehr kleine Standardabweichung bei deutlich erhöhtem Leckagedruck.

3.2. Erythrozytenseparation

3.2.1. Simulation und Mikroskopie

Bei fluoreszenzbasierten Strömungsversuchen mit den hergestellten JR-Chips sowie anhand von Simulationen konnten einige im Methodenteil beschriebenen Trenneffekte gezeigt werden.

Fluoreszenzmikroskopie: Es konnte gezeigt werden, dass das Prinzip der *pinched flow fractionation* bei den JR-Chips funktioniert. In Abbildung 3.5 sind Bilder aus einer Videoaufnahme in zeitlicher Reihenfolge dargestellt. Der Bildausschnitt stellt den Übergang der Engstelle zum Auslasskanal dar. Zum Zeitpunkt 00:00,00 ist noch kein Teilchen zu sehen. In den nachfolgenden 0,73 Sekunden kann man die Strömungslinie, welcher das Teilchen folgt, erkennen (rote Linie im rechten unteren Bild). Würde nun Blut als Flüssigkeit verwendet werden, so würden die Erythrozyten der gleichen Strömungslinie folgen wie das Teilchen. Dies hätte zur Folge, dass am Beginn des Separationskanals sehr wenige bis keine Erythrozyten auftreten.

Fluidiksimulation: In Simulationen mit der Fluidiksoftware COMSOL Multiphysics® (COMSOL, Inc., MA, USA) konnte sowohl die *pinched flow fractionation* wie auch die Entstehung einer zellreduzierten Schicht gezeigt werden. Die Einbindung der Membraneigenschaften in das Erythrozytenmodell gelang nicht vollständig, jedoch konnten auch mit diesem reduzierten Satz an Parametern gute Ergebnisse erzielt werden. Als Erythrozyten

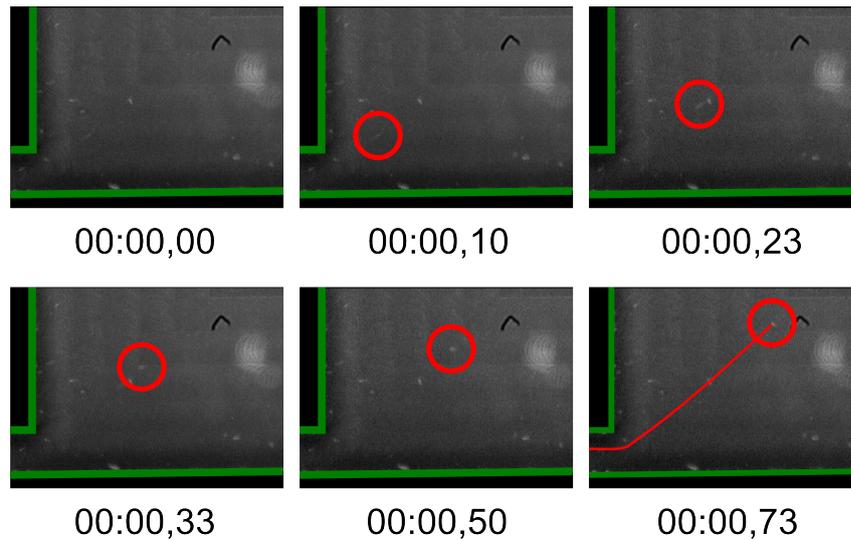


Abb. 3.5.: Die Abbildung zeigt den Strömungsverlauf eines Partikel am Übergang von der Engstelle (links) zum Auslasskanal (rechts). Die grünen Linien repräsentieren die Kanalwände. Die Zeitfolge stammt aus einem Video, rechts oben beginnend mit 00:00,00. Durch Verfolgung des Teilchens (rote Kreise) ist es möglich den Verlauf der Strömungslinie zu erkennen. Aufgrund derer kann man Rückschlüsse auf das Strömungsverhalten von Erythrozyten ziehen. Diese würden, ähnlich dem Teilchen, mit geringer Wahrscheinlichkeit an den Beginn des Separationskanals strömen.

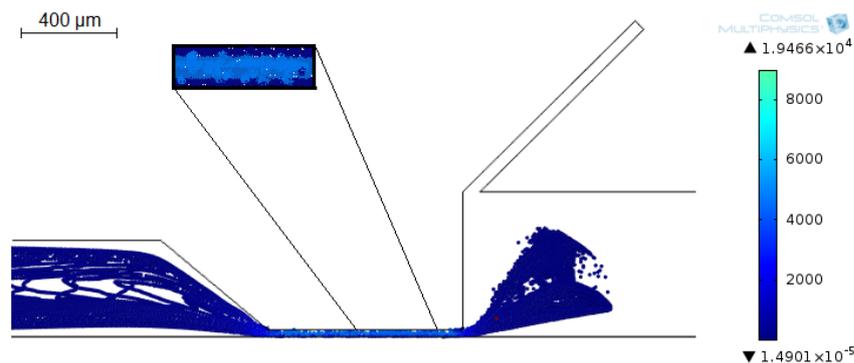


Abb. 3.6.: Simulationsergebnis beim Einbringen der Partikelsuspension mit 300 kPa Druck. Die Farbskala in der Abbildung zeigt den Betrag der Geschwindigkeiten der Partikel ($[v] = \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$). Sowohl die *pinched flow fractionation* als auch die Ausbildung der zellreduzierten Schicht konnten simuliert werden. Ein Teilbereich der Engstelle in der man die ausgebildete zellreduzierte Schicht erkennt, ist schematisch im Inlay vergrößert. Die Partikel in der Mitte der Engstelle weisen eine höhere Geschwindigkeit als jene am Kanalrand auf. Es sind keine Partikel am Beginn des Separationskanals zu erkennen.

fungierten Partikel, welche eine Kugeloberfläche besaßen. Die Eigenschaften von Plasma konnten vollständig in die Simulation implementiert werden.

Abbildung 3.6 stellt die nachgewiesenen Effekte dar. Der Druck mit dem die Partikelsuspension eingebracht wurde, betrug 300 kPa (Flussrichtung von links nach rechts). Die Farbskala in der Abbildung zeigt den Betrag der Geschwindigkeiten der Partikel ($[v] = \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$). Es ist die Ausbildung einer Kernzone mit höherer Geschwindigkeit in

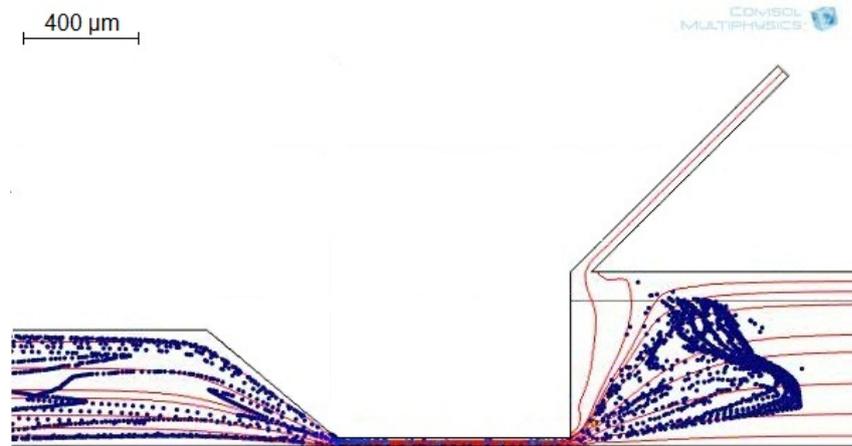


Abb. 3.7.: Die roten Linien stellen die Strömungslinien dar. Hier ist zu erkennen, dass Flüssigkeiten vom Randbereich der Engstelle zum Separationskanal strömen. Jene aus der Mitte strömen im flacheren Winkel aus der Engstelle heraus.

der Mitte der Engstelle zu sehen (siehe Inlay). Die Partikel am Rand weisen im Vergleich dazu eine reduzierte Geschwindigkeit auf.

In die Kanalstruktur von Abbildung 3.7 wurden weniger Partikel eingebracht als in jene von Abbildung 3.6, jedoch sind zusätzlich die Strömungslinien des Blutes (bei Anwendung des Stream-Modells) eingezeichnet. Diese sagen vorher, dass das Prinzip der *pinched flow fractionation* in den Kanalstrukturen der JR-Chips funktionieren und die Partikel den Beginn des Separationskanals nicht erreichen sollten.

3.2.2. Hb/Hkt-Messung

Abbildung 3.8 zeigt den Konzentrationsverlauf sowie die Regressionsgerade der Hb-Kalibrationskurve. Die dazugehörigen Messwerte sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Die gemessenen Absorbanzen verhalten sich über den gesamten Messbereich linear. Ausreißer konnten trotz manuellen Pipettierens der Lösungen nicht beobachtet werden. Die berechneten Parameter der Geradengleichung (2.4) sind $k_0 = 0$ und $k_1 = 372,47$. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der linearen Regression ist 0,9998. Somit konnten die Absorbanzwerte (A_{540-MW}) mit Hilfe der Gleichung

$$c_{CN-Hb} = 372,47 \cdot A_{540-MW} \quad (3.1)$$

in die entsprechenden CN-Hb-Konzentrationen (c_{CN-Hb}) umgerechnet werden. Die Parameter k_0 und k_1 der Umrechnungsgleichung (3.1) sind vergleichbar mit jenen aus der Berechnung mittels externer Referenzmessung (Gleichung (2.6)).

Es wurden vier Hämatokritbestimmungen nach jeder Blutabnahme direkt aus dem

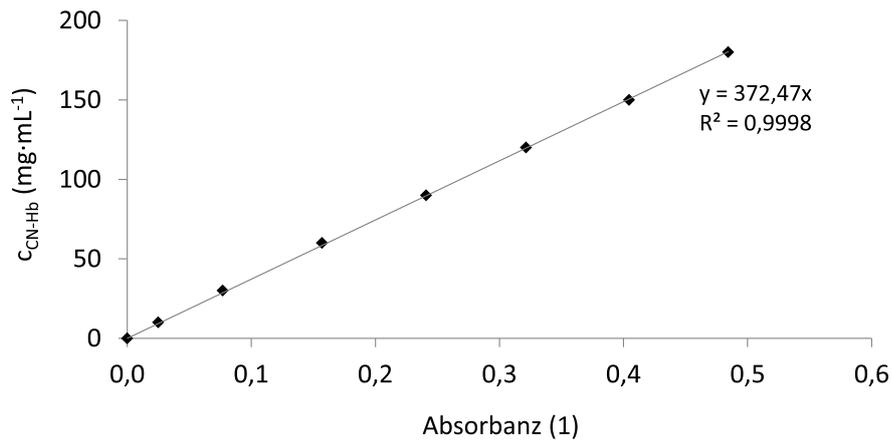


Abb. 3.8.: Messpunkte einer Kalibrationskurve der Hb-Messung mit Regressionsgerade. Die Regressionsgerade verläuft durch den Koordinatenursprung. Weiters ist die Geradengleichung für die Umrechnung der gemessenen Absorbanz in CN-Hb-Konzentrationen angegeben. Das berechnete Bestimmtheitsmaß von 0,9998 weist auf eine starke Linearität der Messpunkte hin.

Tab. 3.2.: Messergebnisse einer Hb-Kalibration bei $\lambda = 540$ nm. A_{540-1} und A_{540-2} sind die Absorbanzwerte je CN-Hb-Konzentration. A_{540-MW} und $A_{540-STD}$ sind der Mittelwert aus A_{540-1} und A_{540-2} mit dazugehöriger Standardabweichung.

Nr.	$c_{\text{CN-Hb}}$ (mg/mL)	A_{540-1} (1)	A_{540-2} (1)	A_{540-MW} (1)	$A_{540-STD}$ (1)
1	180,0	0,484	0,485	0,4845	0,0005
2	150,0	0,405	0,404	0,4045	0,0005
3	120,0	0,322	0,321	0,3215	0,0005
4	90,0	0,242	0,240	0,2410	1,0000
5	60,0	0,157	0,157	0,1570	0,0000
6	30,0	0,077	0,077	0,0770	0,0000
7	10,0	0,025	0,025	0,0250	0,0000
8	0,0	0,000	0,000	0,0000	0,0000

EDTA-Röhrchen durchgeführt. Über alle Messungen ergab der Hämatokrit im Mittel $(45,6 \pm 1,1)$ %. Verifiziert wurde dies durch eine Stichprobenmessung einer Probe in einem externen Labor. Dabei ergab sich eine mittlere Abweichung von 1,5 % zwischen dem Laborwert und dem Zentrifugenwert. Die geringe Variabilität des Hkt lässt vermuten, dass eine konstante Erythrozytenzahl bei den Versuchen vorlag.

3.2.3. Separationsversuch

Vor der Bestimmung der Hb-Reduktion, mussten einige Rahmenbedingungen untersucht werden. Es galt, die Adsorption von Hb bzw. der Erythrozyten an den verwendeten Materialien sowie das benötigte Probenvolumen zu untersuchen. Nach der Bestimmung der Hb-

Reduktion wurde die Flussratenabhängigkeit sowie die Abhängigkeit der Hb-Reduktion von der Versuchsdauer untersucht.

Hb-/Erythrozytenadsorption

In Abbildung 3.9 ist das Ergebnis der Messungen zur Bestimmung der Hb- bzw. Erythrozytenadsorption zu sehen. Es wurden pro Herstellungsprozess ein JR-Chip mit fünf Proben vermessen. Das Messergebnis einer Probe wurde aus dem Mittelwert zweier photometrischer Einzelmessungen berechnet. Der jeweils erste und fünfte Versuch wurde mit neuen Materialien (Spritze, Ein- und Auslassanschluss, VIEWseal™ Folie und mit dest. Wasser gespülte und getrocknete Kanalstrukturen) der zweite bis vierte Versuch mit den Materialien des ersten durchgeführt. In Abbildung 3.9a sind die Ergebnisse als direkter Vergleich der Proben vor und nach dem Durchfließen des Blutes durch die Kanalstrukturen dargestellt. Es zeigte sich, dass es zu keiner wesentlichen Reduktion der CN-Hb-Konzentration der Proben durch die verwendeten Materialien kam. Die höheren Standardabweichungen nach dem Chipdurchlauf sind auf Ungenauigkeiten beim Probenhandling nach dem Chipdurchlauf, die große Standardabweichung beim gefrästen JR-Chip ist auf nur eine der fünf vermessenen Proben zurückzuführen. Abbildung 3.9b zeigt das Verhältnis in Prozent der CN-Hb-Konzentration vor zu jener nach dem Chipdurchfluss. Die kleinste Wiederfindung von Hämoglobin zeigte sich beim gefrästen JR-Chip mit $(98,75 \pm 2,98) \%$.

Beim Ref-Chip konnten keine Adsorptionsversuche gemacht werden, da es nicht möglich war die Membran und das Chipmaterial separat zu untersuchen. Da für den Ref-Chip kaum Literatur zu finden war, konnten dahingehend auch keine Vergleiche gemacht werden.

Benötigtes Probenvolumen

Das benötigte Probenvolumen zum Erhalt von 10 µL separierter Suspension wurde nur für die JR-Chip 1 bis 3 untersucht. Die Messergebnisse des JR-Chip 4 streuten sehr stark, sodass ein Vergleich mit den JR-Chips 1 bis 3 nicht sinnvoll/möglich gewesen wäre. Grund für diese Streuung war, dass der JR-Chip 4 per Hand befüllt wurde, jedoch im Vergleich zum Ref-Chip geschah die Befüllung beim JR-Chip 4 kontinuierlich. Dies erschwerte ein rechtzeitiges Stoppen des Füllvorgangs und ein damit verbundenes genaues Bestimmen des Probenvolumens.

Bei den dargestellten Chips in Abbildung 3.10 wurden pro Flussrate vier Proben vermessen. Wie bereits beschrieben, konnte der Ref-Chip nur per Hand betrieben werden, was die große Standardabweichung erklärt. Es zeigten sich, wie zu erwarten war, höhere Werte bei den höheren Flussraten der JR-Chips 1 und 2. Die Standardabweichungen blieben

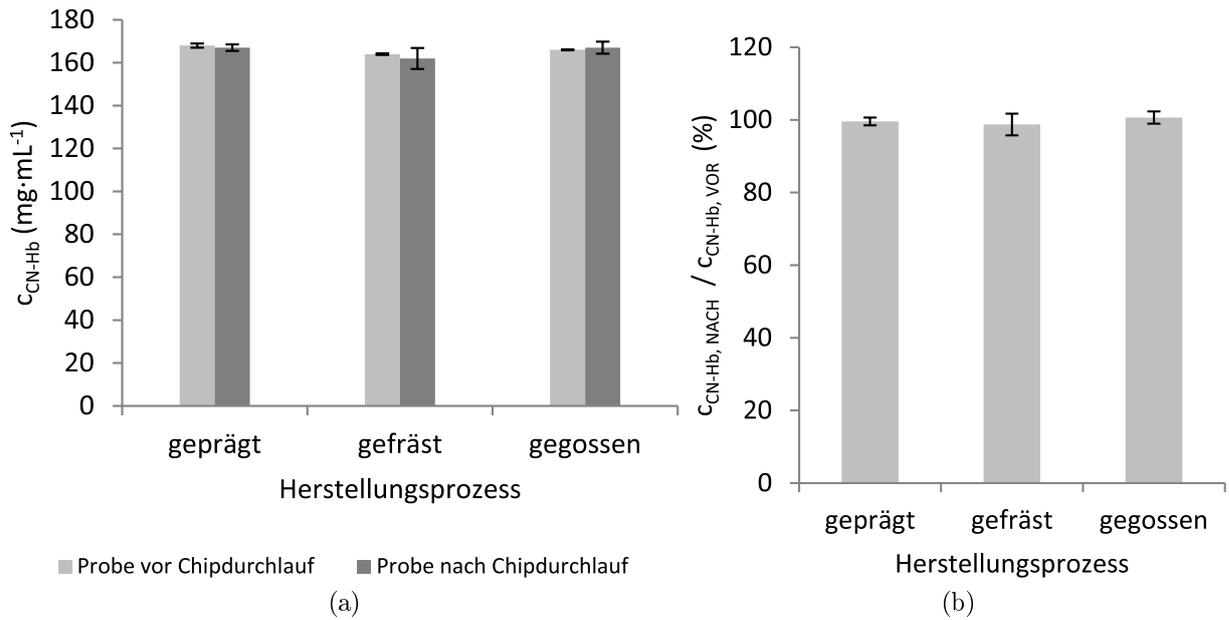


Abb. 3.9.: Hb-/Erythrozytenadsorption ($n = 5$ pro Prozess). (a) Es wurden keine nennenswerten Verluste in der CN-Hb-Konzentration der Proben nach dem Chipdurchfluss festgestellt. Die große Standardabweichung bei gefrästen JR-Chip ist auf eine einzige Probe zurückzuführen. (b) zeigt das Verhältnis der CN-Hb-Konzentrationen der Proben nach zu jenen vor dem Chipdurchfluss.

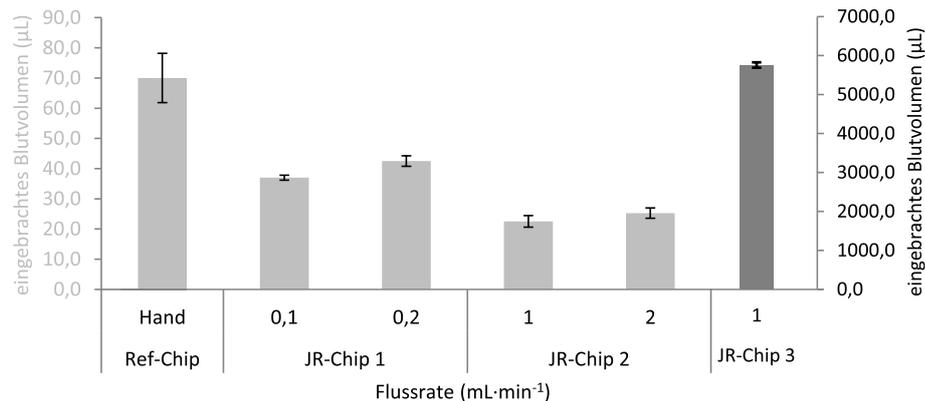


Abb. 3.10.: Das benötigte Probenvolumen pro Chip und Flussrate ($n = 4$ pro Flussrate) sind dargestellt. Bei JR-Chip 1 und 2 fällt auf, dass bei höherer Flussrate auch die verbrauchte Menge Blut größer war. JR-Chip 3 benötigte für 10 μL separierte Suspension fast das 100-Fache an Probenvolumen. Die große Standardabweichung beim Ref-Chip dürfte auf die Befüllung per Hand zurückzuführen sein. Die Messergebnisse des JR-Chips 4 sind nicht dargestellt, da diese beim verwendeten Versuchsaufbau so stark streuten, dass ein Vergleich mit den gezeigten Ergebnissen nicht möglich ist.

aufgrund der Verwendung einer Spritzenpumpe (konstante Flussraten bei den Versuchen) gering. Das, beim Vergleich von JR-Chip 1 und 2, höhere benötigte Probenvolumen beim JR-Chip 1 ist u.a. auf die höher gewählte Flussrate (siehe Methodenteil unter „Ablauf der Separationsversuche“) zurückzuführen. Weiters spielen die Abmessungen der Engstelle eine Rolle bei der Ausbildung der zellreduzierten Schicht. Da diese keinen fixen Faktor

zwischen JR-Chip 1 und 2 aufweisen ist auch ein Vergleich der beiden Chips nicht möglich. Beim JR-Chip 3 ist das benötigte Volumen ca. um den Faktor 100 höher als beim JR-Chip 2. Grund dafür sind der längere Separationskanal und damit verbunden, geänderte Strömungs- und Druckverhältnisse.

Hb-Reduktion

Die Hb-Reduktion der einzelnen Chips wurde photometrisch gemessen. Dabei wurden die Absorbanzen (diese sind proportional zur Hb-Konzentration) von Vollblut mit den jeweiligen separierten Suspensionen verglichen. Abbildung 3.11 stellt einen Ausschnitt der Absorptionsspektren von Vollblut und der am meisten Hb-reduzierten separierten Suspensionen pro Chip dar. Die Hb-Reduktion wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen und ist in Prozent vom Vollblut angegeben. Es konnte gezeigt werden, dass minimale Veränderungen an den Kanalgeometrien, vergleiche blaue (JR-Chip 2) und gelbe (JR-Chip 3) Kurve, eine Reduktion um mehr als das dreifache bewirken. Bei den Adsorptionsversuchen konnte keine Hb- bzw. Erythrozytenadsorption an den Materialien festgestellt werden. Daraus folgt, dass eine Reduktion von 67,12 % nur aufgrund der Strömungseffekte und Kanalgeometrien stattfinden kann. Beim Ref-Chip wurde die größte Reduktion erzielt, jedoch ist diese sehr abhängig von den Drücken, mit welchen das Blut durch die Membran gepresst wurde. Es zeigte sich teilweise eine sichtbare Rotfärbung des Plasmas durch hämolysierte Erythrozyten an der Membran. Der CV der Hb-Reduktion über allen Messungen betrug 62,9 %. Beim Vergleich der Hb-Reduktion der grünen (JR-Chip 1) und blauen Kurve ist nur eine geringe Abweichung zu bemerken. So liegt der Schluss nahe, dass ähnliche Bedingungen innerhalb der Kanäle herrschen mussten. Beim Vergleich der grünen und schwarzen (JR-Chip 4) Kurve ist eine größere Abweichung zu bemerken. Die beiden Chips wurden mit dem selben Master gefertigt, jedoch auf unterschiedliche Weise mit Blut befüllt (JR Chip 1 per Spritzenpumpe, JR-Chip 4 per Hand). Somit kann sowohl die Befüllung als auch der Fertigungsprozess der Kanalstrukturen für die Differenz der Hb-Reduktion verantwortlich sein.

Flussratenabhängigkeit

Die Hb-Reduktion wurde auch in Abhängigkeit der verwendeten Flussrate untersucht. Dabei wurden je Flussrate vier Messungen durchgeführt. Der gesamte Versuch wurde am JR-Chip 2 durchgeführt. In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse dargestellt. Auffällig ist die große Standardabweichung im Handbetrieb. Es wird vermutet, dass das Blut innerhalb der Spritze nicht homogen gehalten werden konnte und die Flussrate über die Dauer der Messungen nicht konstant war. Weiters konnte die Flussrate im Handbetrieb nicht

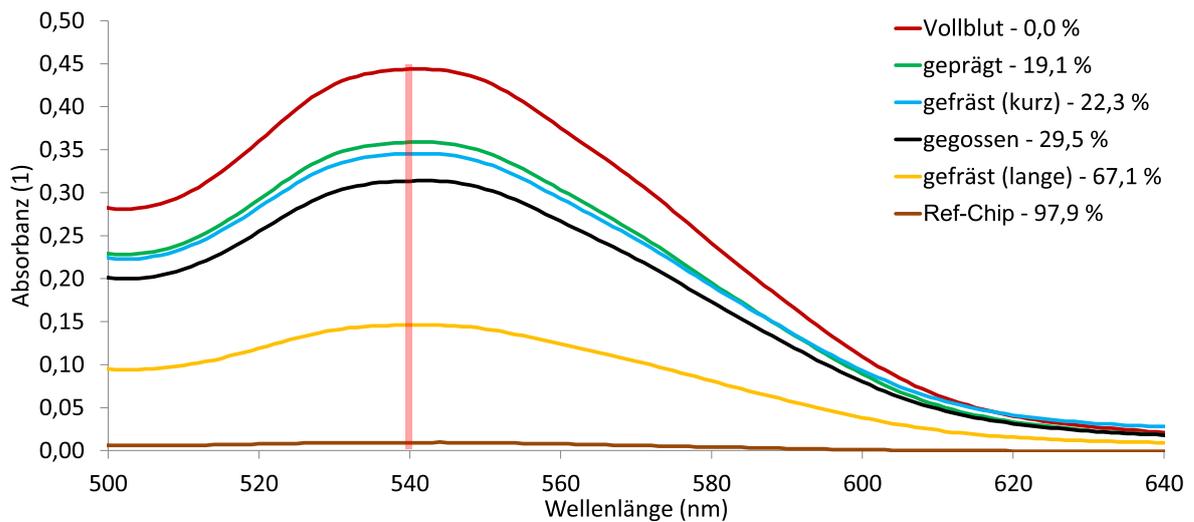


Abb. 3.11.: Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Absorptionsspektrums von Vollblut sowie der, am meisten Hb-reduzierten, separierten Suspensionen der einzelnen Chips. Die Hb-Reduktion wurde über die Absorbanzwerte bei 540 nm berechnet. Die deutliche Differenz der Hb-Reduktionen von JR-Chip 2 und 3 ist ausschließlich auf veränderte Kanalgeometrien zurückzuführen. Die Ursache für die Differenz der Hb-Reduktion von JR-Chip 1 und 4 ist nicht eindeutig erklärbar. Die größte Reduktion konnte mit dem Ref-Chip erzielt werden.

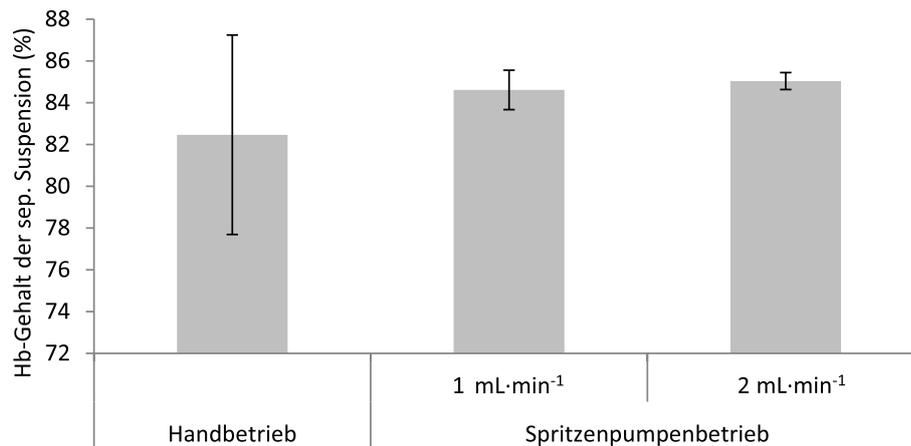


Abb. 3.12.: Flussratenabhängigkeit der Hb-Reduktion ($n = 4$ pro Flussrate) beim JR-Chip 2. Die Differenz der Hb-Reduktion beim Pumpenbetrieb ist $(0,43 \pm 1,03)$ %. Es ist eine Differenz des Hb-Gehaltes der separierten Suspension zwischen dem Handbetrieb und dem Spritzenpumpenbetrieb (sowohl bei $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ als auch bei $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) erkennbar. Die hohe Standardabweichung im Handbetrieb ist nicht ausreichend begründbar. Es wird eine inhomogene Verteilung der Erythrozyten in der Spritze vermutet.

ausreichend quantitativ bestimmt werden. Die beiden Flussraten im Pumpenbetrieb zeigten eine mittlere Abweichung von $(0,43 \pm 1,03)$ % untereinander. Der Handbetrieb zeigt gegenüber dem Pumpenbetrieb eine größere Standardabweichung, welche nicht ausreichend begründet werden kann. Eine mögliche Ursache liegt in der nicht homogenen Verteilung der Erythrozyten in der Spritze beim Handbetrieb. Es kann somit aus den vorliegenden

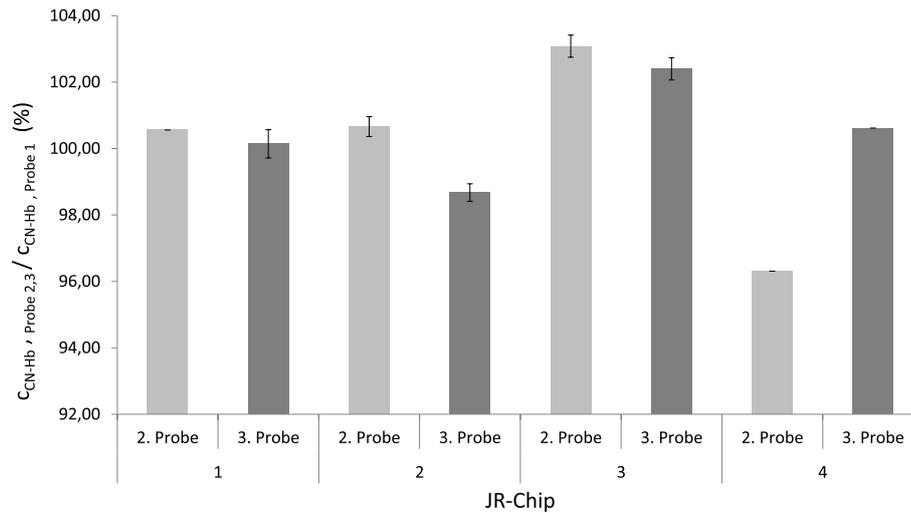


Abb. 3.13.: Die Abbildung zeigt das prozentuelle Verhältnis der CN-Hb-Reduktion der 2. und 3. Probe zur 1. Probe. In der 2. und 3. Probe zeigten die CN-Hb-Konzentrationen der JR-Chips 1 bis 3 keine nennenswerten Veränderungen. Die größte Abweichung (im Pumpenbetrieb) zur CN-Hb-Konzentration der 1. Probe gab es bei der 2. Probe des JR-Chip 3 mit $(1,47 \pm 0,16) \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, was einer Hb-Erhöhung von 1 % entspricht. Die deutliche Abweichung beim handbetriebenen JR-Chip 4 ist nicht eindeutig klärbar.

Ergebnissen lediglich der Schluss gezogen werden, dass die verwendeten Flussraten im Pumpenbetrieb keinen Einfluss auf die Hb-Reduktion haben.

Hb-Reduktion in der 2. und 3. Probe

Für die weitere mikrofluidische Behandlung der separierten Suspension galt es zu untersuchen, ob sich die Hb-Reduktion im Laufe der Separationszeit veränderte. Es wurden bei den JR-Chips die jeweils ersten 10 μL (1. Probe) mit den beiden darauf folgenden 10 μL (2. und 3. Probe) separierter Suspension verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 als Verhältnis der CN-Hb-Konzentrationen abgebildet. Die größte Abweichung bei einmaliger Messung gab es bei Probe Nr. 2 des JR-Chip 4. Da JR-Chip 4 nicht spritzenpumpenbetrieben war, wurde er als nicht vergleichbar mit den JR-Chips 1 bis 3 angesehen. Der genaue Grund des niedrigen Wertes ist nicht eindeutig erklärbar. Er könnte wie zuvor beschreiben auf den Handbetrieb und die Flussratenvariabilität der Messungen oder auf einen statistischen Ausreißer zurückzuführen sein. Bei den spritzenpumpenbetriebenen JR-Chips gab es bei Probe Nr. 2 des JR-Chip 3 mit $(1,47 \pm 0,16) \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ die größte Abweichung. Dies entspricht einer prozentuellen Hb-Erhöhung um ca. 1 %.

3.2.4. Folsäuremessung

Folsäureadsorption Beim Pilotversuch der Folsäuremessung wurde der Messablauf sowie das Probenhandling untersucht. In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse dazu dargestellt. Es ist erkennbar, dass es keinerlei Veränderung der Folsäurekonzentration aufgrund des Probenhandlings sowie der Lagerung über zwei aufeinander folgende Tage gibt (ACK02 und ACK09). Weiters hat das doppelte Lithiumheparinisieren keinen Einfluss auf das Messergebnis (ACK01 und ACK02). Die verwendeten Anschlüsse zeigten kein Adsorptionsverhalten (ACK03 und ACK04). Bei den vier Messungen mit niedriger Folsäurekonzentration (ACK05 bis ACK08) konnte nahezu keine Adsorption am Chip, sowie den Interfaces festgestellt werden. Die Folsäurekonzentration lag nach dem Durchfluss des Blutes durch den Kanalchip im Mittel bei $(4,45 \pm 0,37) \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Originalprobe hatte laut Laborbefund $4,9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Standardabweichung der Messmethode in diesem Bereich ist größer als $0,17 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

In Abbildung 3.15 ist das Ergebnis der Hauptmessreihen für die Messung der Folsäureadsorption zu sehen. Dabei wurden einige Proben gespikt (mit * gekennzeichnet), um das Adsorptionsverhalten von Folsäure im hohen Konzentrationsbereich zu untersuchen. Die Zielkonzentration von $15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ wurde überschritten, wodurch die gespikten Proben nicht quantitativ bestimmt werden konnten. Bei der ersten Hauptmessreihe in Abbildung 3.15a wurden die Proben ACH02, ACH04, ACH06, ACH08 bei Verwendung von neuen Materialien (Spritze, Ein- und Auslassanschluss, VIEWseal™ Folie und mit dest. Wasser gespülte und getrocknete Kanalstrukturen), die Proben ACH03, ACH05,

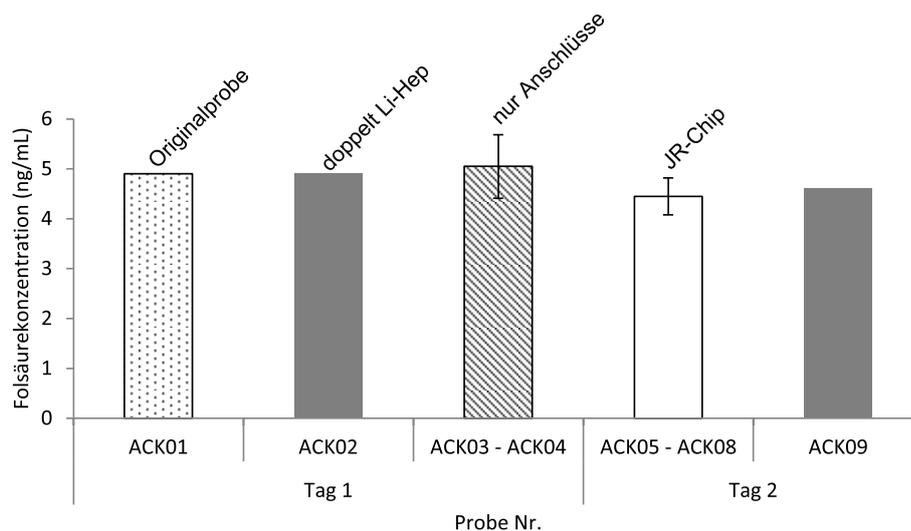


Abb. 3.14.: Pilotversuchsergebnisse der Folsäureadsorption. Weder die Lagerung über zwei aufeinander folgende Tage noch das Probenhandling haben einen Einfluss auf die Folsäurekonzentration (ACK01, ACK02, ACK09). Die verwendeten Materialien führen zu keiner nennenswerten Adsorption bei niedrigen Folsäurekonzentration (ACK03 bis ACK08).

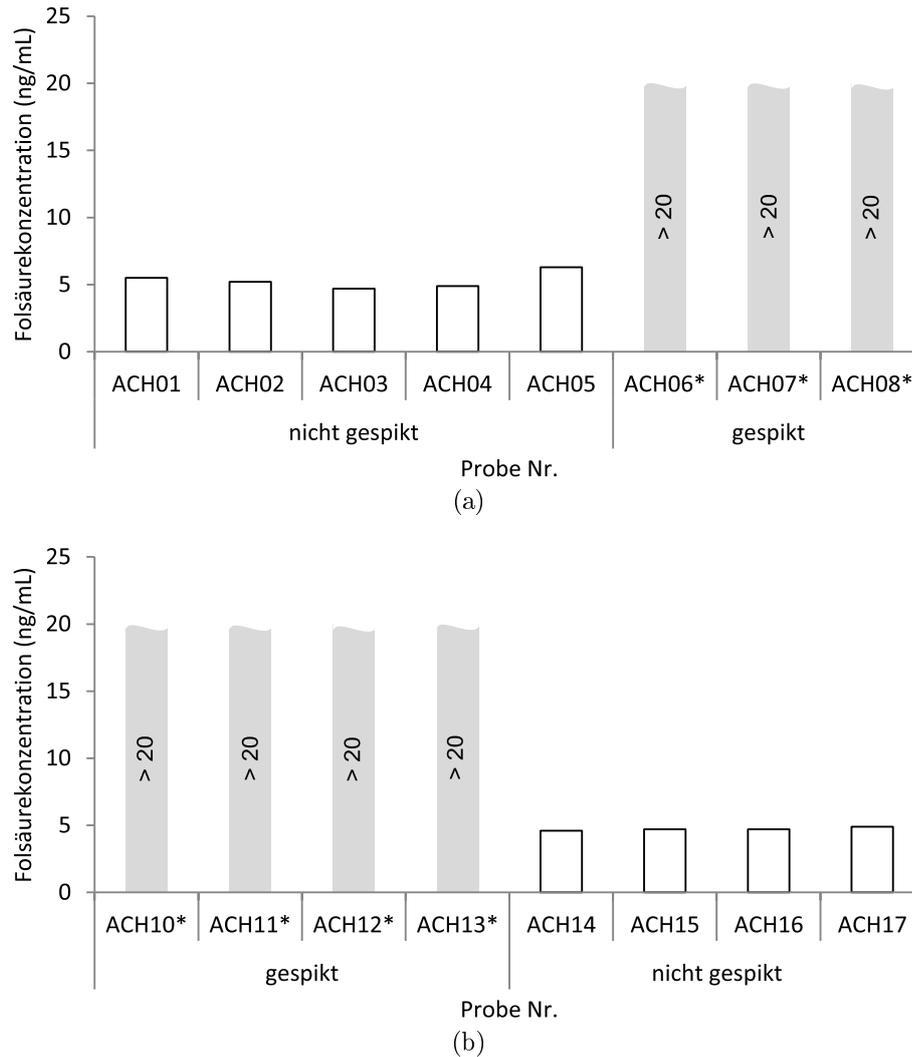


Abb. 3.15.: Hauptversuchsergebnisse der Folsäureadsorption. (a) Erster Hauptversuch mit abwechselnd neuen und gespülten Kanälen. ACH01 ist die unveränderte Originalprobe. (b) Zweiter Hauptversuch mit jeweils vier aufeinanderfolgenden Messungen je Folsäurekonzentration. Mit „*“ gekennzeichnete Proben waren gespikt. Vor der Probe ACH14 wurde der Kanal gespült sowie die Anschlüsse erneuert. In (a) und (b) war kein Adsorptionsverhalten bei niedriger Folsäurekonzentration an den Materialien zu erkennen. In (b) konnte gezeigt werden, dass auch kein Memoryeffekt vorliegt.

ACH07 mit den selben Materialien wie zuvor durchgeführt. ACH01 ist die unveränderte Originalprobe. Aufgrund des Überschreitens des *limit of quantification* des Folsäureassays kann keine Aussage über das Adsorptionsverhalten bei hoher Folsäurekonzentration gemacht werden, jedoch zeigte sich bei den Messungen ACH02 bis ACH05 ebenso wie im Pilotversuch keine Adsorption im niedrigen Konzentrationsbereich.

Bei der zweiten Hauptmessreihe (Abbildung 3.15b) flossen zuerst die Proben ACH10 bis ACH13, nach Spülen des Kanals mit destilliertem Wasser die Proben ACH14 bis ACH17 jeweils direkt aufeinanderfolgend durch den Kanal. Es kann aufgrund der Ergebnisse dar-

auf geschlossen werden, dass kein Memoryeffekt vorliegt, welcher sich durch eine Erhöhung der Werte von ACH14 bis ACH17 bemerkbar gemacht hätte. ACH01 ist die unveränderte Originalprobe.

Folsäure in separierter Suspension Bei der Messung der Folsäurekonzentration in der separierten Suspension des JR-Chip 2 konnten aufgrund des hohen benötigten Blutvolumens (ca. 4,5 mL pro Messung) nur zwei Messungen durchgeführt werden. Es zeigte sich eine Konzentrationsänderung, welche in der Größenordnung der Standardabweichung der Messmethode lag. Da die Folsäurebestimmung im Blutserum erfolgte, war dieses Ergebnis auch zu erwarten.

4. Diskussion

Eine Einschränkung bei der Bewertung aller Versuchsergebnisse ist die geringe Wiederholungszahl der einzelnen Versuche. Um statistisch aussagekräftige Tests (Normalverteilung, Signifikanz) durchzuführen, waren die durchgeführten Wiederholungen jedoch zu gering. Es wurde darauf geachtet, dass zumindest die in der Literatur zu findenden Wiederholungszahlen durchgeführt wurden. Limitierende Faktoren waren die Menge an zur Verfügung stehendem Blut und die teilweise langen Fertigungszeiten der JR-Chips. Es wurde zur leichteren Lesbarkeit der Messergebnisse konsistent der $MW \pm STD$ angegeben, wobei auf eine Fehlerfortpflanzung geachtet wurde.

4.1. Makro-zu-Mikro Interface

Ein negativer Aspekt des Fräsens war, dass der JR-Chip 1 mit zwei unterschiedlichen Fertigungsverfahren (Prägen der Kanalstrukturen und Fräsen der Interfaceöffnungen) hergestellt wurde. Beide Fertigungsverfahren wurden von unterschiedlichen Personen ausgeführt. Dies machte die Fertigung der Fräslöcher fehleranfällig. Einige heißgeprägte JR-Chips wurden entweder seitenverkehrt oder nicht zentriert gefräst und mussten ausgeschieden werden. Die Vorteile dieser Art der Interfacefertigung überwogen allerdings die genannten Nachteile. So ist die Oberfläche der Interfaceöffnungen nicht glatt sondern rau, was die Haftreibung des Dichtschlauches und somit den Leckagedruck vergrößert. Weiters ist die Fertigungsgenauigkeit sehr hoch, da der Fräsvorgang automatisiert abläuft.

Limitierend muss bei den Pilotversuchen angemerkt werden, dass die Messungen nicht an den finalen Kanalstrukturen durchgeführt wurden. Weiters wurde die Testlösung per Hand aus der Spritze in das Interface gedrückt. Dies erklärt unter anderem die Variabilität der Messergebnisse. Bei den Vergleichsmessungen mit und ohne Einlagen konnte zwar ein Unterschied bei den Leckagedrücken festgestellt werden, jedoch wurde kein Signifikanztest durchgeführt. Daraus folgt, dass ein Einfluss der VIEWseal™ Folie aufgrund der Ergebnisse in Abbildung 3.4 zu sehen ist, jedoch statistisch nicht bestätigt werden kann.

Bei den Hauptversuchen ist die kleine Standardabweichung auffällig. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die Verwendung einer Spritzenpumpe als auch die konstanten

Materialeigenschaften und Interfacegeometrien dafür verantwortlich sind. Eine Erklärung dafür liefert die Berechnung der Haftreibung. Diese ist maßgeblich für die Druckresistenz des Interfaces verantwortlich und setzt sich u.a. aus dem Produkt aus Druck und Grenzfläche (zweier Materialien) zusammen. Im Vergleich mit der Originalmethode in [37] konnten bei den hier durchgeführten Hauptversuchen ähnliche Ergebnisse erzielt werden. In [37] wurde ein reproduzierbarer Leckagedruck von 610 kPa (in dieser Arbeit wurden ca. 570 kPa erreicht) angegeben. Es wurde jedoch auf weitaus höhere Drücke verwiesen, welche mit modifizierten Komponenten erreicht wurden. Dies gilt auch für die Ergebnisse dieser Arbeit, sofern die genannten Einflussfaktoren optimiert werden würden. Die geringe Standardabweichung wurde auch in der Literatur wie z.B. [37, 40] erzielt. In der Literatur ist der CV des Leckagedruckes etwa um den Faktor zehn größer als in dieser Arbeit. Dort wurde jedoch bei den Hauptversuchen der Einfluss durch wiederholte Messungen an den gleichen Materialien ebenfalls untersucht.

Die Verwendung von destilliertem Wasser als Testlösung bei den Hauptversuchen war nötig gewesen, da Blut bei Leckage des Interfaces eine Kontaminationsgefahr darstellte.

Trotz der Limitierungen konnte ein Interface umgesetzt werden, dessen Eigenschaften und Druckverhalten weit über den geforderten Anforderungen (Druckfestigkeit, kleines Totvolumen, usw.) lag. Dank der Pilotversuche konnten bei den Hauptversuchen wesentliche Verbesserungen erzielt werden. Wie sich später bei den Versuchen zur Erythrozytenseparation zeigte, hielt das Interface bei allen Versuchen den aufgebrauchten Drücken stand.

4.2. Erythrozytenseparation

Bei einer diese Arbeit begleitenden Literaturrecherche konnten weitere Publikationen zur Trennung von Erythrozyten aus Vollblut gefunden werden. Die dabei verwendeten Separationsmethoden bedienten sich keiner neuen Effekte oder Mechanismen, sondern implementierten die in dieser Arbeit gezeigten auf andere Weise. Es wurden bei der Recherche aber nur jene Suchergebnisse genauer analysiert, welche den Rahmenbedingungen dieser Arbeit entsprachen. Zu erwähnen sind beispielsweise die Arbeiten von Aota *et al.* [25] sowie Kobayashi T. und Konishi S. [54]. Darin wurde ebenfalls Plasma unter Ausnutzung der axialen Migration separiert. Aota *et al.* präsentierten Ergebnissen in denen 3 μL Plasma aus 10 μL Blut in einer Minute separiert werden konnten. Kobayashi T. und Konishi S. separierten 12,8 μL Plasma aus 50 μL Schweineblut. Sie verwiesen jedoch auf Versuche mit Humanblut und eine damit erzielte besseren Effektivität ihrer Methode. Da diese Publikationen erst nach Beginn der JR-Chip-Fertigung veröffentlicht wurden, konnten diese

in der Methodenauswahl nicht berücksichtigt werden. Die beiden Publikationen zeigen, dass der in dieser Arbeit ausgewählte Separationsmechanismus, auch aktuell erforscht und weiterentwickelt wird.

Somit kann die Separationsmethode als *state of the art* angesehen werden, welche weiter Entwicklungspotential besitzt.

Simulation und Mikroskopie: Neben den Separationsversuchen mit den gefertigten JR-Chips wurden auch Simulationen sowie mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen mit den JR-Chips durchgeführt. Bei den Fluoreszenzaufnahmen konnten aufgrund der möglichen Kontamination (Gerät war nicht für biologische Proben vorbereitet), sowie des Probenhandlings keine Aufnahmen mit Blut durchgeführt werden. Dies reduzierte die Anzahl der zu untersuchenden Strömungseffekte. Aufgrund der Verwendung eines Fluorophors als Testlösung konnte die zellreduzierte Schicht nicht nachgewiesen werden, was für den Beweis funktionierender Kanalstrukturen und -dimensionen von Vorteil gewesen wäre. Die *pinched flow fractionation* konnte, wie in Abbildung 3.5 gezeigt, jedoch eindeutig nachgewiesen werden. Das dabei zu sehende Partikel wurde zufällig eingebracht.

Bei den Simulationen des Strömungsverhaltens innerhalb der Kanalstrukturen mussten Abstriche bei den Eigenschaften des Erythrozytenmodells gemacht werden. Speziell die Eigenschaft einer beweglichen Membran konnte nicht vollständig implementiert werden. Trotz dieser Einschränkung ließ sich zeigen, dass sich eine zellreduzierte Schicht in der Engstelle ausbildet. Es zeigte sich, dass zukünftige Optimierungsschritte mit Hilfe dieser Software leichter und schneller als bisher durchgeführt werden könnten. Ein Optimum wäre eine Korrelation zwischen Simulationsergebnis und den tatsächlichen Resultaten aus den Versuchen. Da die Software im Projekt Biosens II erstmalig eingesetzt wurde und dadurch das Know-how in diesem Bereich noch nicht vollkommen ausgereift war, wurde dies aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

Sowohl Simulation als auch Mikroskopie konnten trotz der Einschränkungen zwei der theoretisch beschriebenen Effekte bestätigen und lieferten wichtige Informationen für die Erklärung der Versuchsergebnisse.

Hb/Hkt-Messung: Das zur Bestimmung der Hb-Absorbanz verwendete Messgerät war örtlich vom Versuchsaufbau getrennt aufgestellt. Somit konnte anfangs nicht sichergestellt werden, dass die Lösungen zur Erstellung der Kalibrationsgeraden immer gleiche Reaktionszeiten hatten (Mindestreaktionszeit bei stillstehendem Gefäß beträgt 15 min). Diese Zeitabhängigkeit konnte durch einige Versuche optimiert werden, was durch eine Referenzmessung eines externen Labors bestätigt wurde. Durch Bestimmung der Absorbanz mittels Referenzmessung (Vergleich der Probe mit einer Referenzlösung), konnten Einflüs-

se wie u.a. Temperatur, Küvettenmaterial und Drabkin-Lösung vernachlässigt werden. Die *Drabkin's Reagent* Methode wurde mit Hilfe einer Hb-Bestimmung eines externen Labors verifiziert, was weitere Sicherheit für die Fehlerfreiheit der Messergebnisse gab. Die erzielte Linearität der Regression wies auf eine hohe Präzision beim Pipettieren der Standardlösungen hin. Da die Regressionsgerade keinen Offset besaß vereinfachte sich die Gleichung (3.1).

Die Bestimmung des Hämatokrits wurde mittels Zentrifuge durchgeführt. Die Ableseskala war der Zentrifuge beigelegt. Da diese jedoch eine Kopie der Originalskala war, kommen hier zwei Einflussfaktoren zum Tragen. Einerseits besteht ein Fehler durch das Kopieren, andererseits durch das Anlegen der Mikro-Haematokritröhrchen und das Ablesen des Hkt-Wertes (Anwenderfehler). Wie bereits beschrieben, wurde auch hier der Einfluss auf das Messergebnis durch den Anwenderfehler von einem externen Labor überprüft.

Durch Überprüfen der Messergebnisse beider Methoden (Hb- und Hkt-Messung) durch ein externes Labor konnten Fehlereinflüsse bereits bei Testmessungen aufgezeigt und minimiert werden, was den späteren Versuchsergebnisse mehr Zuverlässigkeit gab.

Separationsversuch: Die Bestimmung der Hb-/Erythrozytenadsorption fanden unter gleichen Bedingungen statt wie nachfolgende Versuche. Somit konnten bereits bei diesen Messungen Störfaktoren ausgeschlossen werden, was die Fehleranfälligkeit späterer Messungen reduzierte.

Bei den Ergebnissen zur benötigten eingebrachten Blutmenge (Abbildung 3.10) muss einschränkend erwähnt werden, dass das Einbringen des Volumens beim Ref-Chip nur mit Hilfe der Skala an der 1 mL Spritze erfolgte. Diese weist zwar eine Unterteilung in 10 μL Schritte auf, jedoch ergeben sich Unsicherheiten aufgrund des manuellen Ablesens (Anwenderfehler) sowie etwaiger Luftblasen in der Spritze. Die eingebrachte Blutmenge konnte bei den JR-Chips 1 bis 3 an der Spritzenpumpe in 1 μL -Schritten abgelesen werden, was diese Ergebnisse präziser machte. In der Literatur beschriebene Methoden verwenden zumeist separate Flussmesser, welche eine höhere Genauigkeit aufweisen. Dies war in dieser Arbeit aufgrund der fehlenden Messgeräte nicht möglich, wobei die verwendete Methode als ausreichend erachtet wurde. Für den JR-Chip 4 sollte die Messung unter Verwendung eines anderen Versuchsaufbaus/-ablaufs wiederholt werden, um die Ergebnisse mit jenen der anderen Chips vergleichen zu können. Dies wurde aufgrund von Zeitmangel unterlassen. Es ist jedoch zu erwarten, dass die Ergebnisse aufgrund ähnlicher Kanalgeometrien im Bereich der JR-Chips 1 bis 3 liegen.

Bei der Darstellung der Hb-Reduktion wurden nur jene Absorptionsspektren pro Chip dargestellt, welche die größte prozentuelle Reduktion zeigten. Den größte CV bei $n = 4$

pro pumpenbetriebenem JR-Chip lieferte der JR-Chip 3 (gelbe Kurve) mit 1,9 %. Der Ref-Chip (braune Kurve) hatte einen CV von 62,9 %. Dies verdeutlicht, dass im Zuge dieser Arbeit sowohl der Aufbau und die Durchführung der Versuche als auch das Handling der Messgeräte bei den JR-Chips zu einem hohen Grad standardisiert werden konnten. Somit ist es möglich, vor Weiterentwicklungen der Methode dieser Arbeit, die vorliegenden Ergebnisse zu reproduzieren und darauf aufbauend Verbesserungen durchzuführen. Dies ist besonders bei den Ergebnissen zur Bestimmung der Hb-Reduktion wichtig, da von ihnen der spätere Erfolg der optischen Detektion abhängt. Kritisch hinterfragt müssen an dieser Stelle jedoch die Herstellungsprozesse der Kanalgeometrien werden. Der primäre Prozess, das Heißprägen, benötigte am längsten um die geforderten Kanaldimensionen herstellen zu können. Wie in Abbildung 2.7 zu sehen ist, sind die Kanten der Kanäle nicht exakt gerade. Weiters hat die Tiefe der Kanäle einen wichtigen Einfluss auf das Hb-Reduktionsergebnis, da diese zur dritten Potenz in die Berechnung des hydrodynamischen Widerstandes (Gleichung (2.1)) eingeht. Wie der Vergleich von JR-Chip 2 und 3 (blaue und gelbe Kurve) zeigt, hatten solche minimalen Unterschiede eine beträchtliche Auswirkung.

In der Literatur sind für die maximale Hb-Konzentration der zu analysierenden Proben unterschiedliche Grenzwerte zu finden. Zum Beispiel wird im Patent von Weisheit R. und Treiber W. [55] ein Korrekturverfahren vorgestellt, welches mit Hilfe einer Referenzmessung (Messung bei einer zweiten Wellenlänge) und eines mathematischen Algorithmus arbeitet. Damit ist eine optische Detektion eines Analyten trotz einer Hb-Konzentration von $65 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ möglich. Ob dies auch für Folsäure gilt, muss noch untersucht werden. Dies zeigt, dass es mit der beim JR-Chip 3 erzielten Hb-Konzentration der separierten Suspension ($54,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durchaus möglich wäre, optisch eine Analytenkonzentration zu messen.

Bei der in Abbildung 3.12 gezeigten Flussratenabhängigkeit ist die hohe Standardabweichung im Handbetrieb nicht eindeutig erklärbar. Die möglichen Ursachen wurden bereits erläutert. Da die Wiederholungszahl der Messungen ($n = 4$) relativ gering war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich der CV bei höherem n wieder reduziert. Dies würde bedeuten, dass die Standardabweichung im vorliegenden Ergebnis auf Ausreißer zurückzuführen wäre. Der Ref-Chip wurde nicht untersucht, da die Messungen nicht mit kontinuierlichen Flussraten durchgeführt worden sind (siehe Methodenteil).

Die Untersuchung der Hb-Konzentrationen der 2. und 3. Probe unterlag aufgrund der benötigten Blutmenge einer noch geringeren Wiederholungszahl wie die bisherigen Messungen dieser Arbeit. Es wurde vor Beginn der Messungen vermutet, dass sich die Hb-Konzentration mit fortlaufender Zahl der Proben verringert, da die verschiedenen Strömungseffekte erst ihren eingeschwungenen Zustand erreichen mussten. Die Ergebnisse

weisen auf eine Bestätigung dieser Vermutung hin, aufgrund der verwendeten Wiederholungszahl konnte jedoch kein eindeutiger Beweis erbracht werden.

Zusammenfassend konnte dank der durchgeführten Versuchen gezeigt werden, dass sowohl die verwendeten Materialien als auch die verwendete Separationsmethode zielführend waren. Bereits durch kleinen Änderungen der Kanalgeometrien können Verbesserungen durchgeführt werden, was eine Weiterentwicklung erleichtert. Weiters konnte nach relativ kurzer Zeit eine Separationseffektivität erreicht werden, welche mit Hilfe von Korrekturmaßnahmen eine optische Messung durchführbar machen würde.

Folsäuremessung: Die Folsäuremessung wurde in einem externen Labor durchgeführt. Dies reduzierte die Messfehler, da die Messungen von qualifiziertem Personal im Routinebetrieb durchgeführt wurden. Das Aufstellen einer eigenen Messmethode hätte zu wesentlich größeren Ungenauigkeiten geführt. Bei Bewertung der Ergebnisse in [Abbildung 3.15](#) muss eine Einschränkung berücksichtigt werden. Dies ist die nicht vorhandene quantitative Bestimmung der gespikten Proben. Somit kann nicht sicher festgestellt werden, ob tatsächlich keine Adsorption vorliegt. Weitere Versuche mit Proben im oberen Quantifizierungsbereich des Folsäureassays wären notwendig um der aufgestellten Vermutung mehr Sicherheit zu geben. Hingegen kann der Memoryeffekt eindeutig widerlegt werden.

Der Ref-Chip konnte nicht vermessen werden, da das benötigte Probenvolumen für die Folsäurebestimmung nicht erreicht wurde. Dadurch kann kein Vergleich mit einer kommerziellen Methode der Erythrozytenseparation gezogen werden. Es konnten dafür auch keine Literaturstellen gefunden werden. Da es für den Ref-Chip bis dato keine Folsäureadsorptionsergebnisse gibt und aufgrund der komplexeren Probeneinbringung (die Hb-Reduktion ist abhängig vom Druck mit dem die Probe durch die Membran gepresst wird), wurde dieser für die Verwendung im Projekt Biosens II als nicht geeignet eingestuft.

4.3. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit dem in der JOANNEUM RESEARCH vorhandenen Know-how möglich ist, ein Probeneingabemodul für einen Einweg-Sensor-Chip zu designen, zu fertigen und erste Evaluierungsversuche durchzuführen. Dabei wurde humanes Vollblut in den Mikrofluidikchip eingebracht und für die nachfolgende optische Folsäuremessung vorbereitet.

In Bezug auf das Makro-zu-Mikro Interface sollten für ein Demonstratorsystem keine weiteren Verbesserungsmaßnahmen nötig sein. Eine Anpassung für die Verwendung in einem späteren Produkt wird jedoch nicht ausgeschlossen.

Mit den im Zuge dieser Arbeit hergestellten JR-Chips ist eine reproduzierbare Hb-Reduktion von ca. 67 % möglich. Jedoch zeigte Rodriguez-Villarreal *et al.*, dass es möglich ist, bis zu zu 97 % aller Erythrozyten abzutrennen. Sie analysierten bei ihren Versuchen die Anzahl der Erythrozyten, nicht die Hb-Konzentration in der separierten Suspension. Dies relativiert ihre Trenneffektivität von 97 %, da freies Hämoglobin nicht berücksichtigt wurde.

Weiters war es aufgrund der aufwendigen Fertigung nur möglich, eine begrenzten Anzahl an Chips zu testen. Trotz dieser begrenzten Anzahl war es möglich, die Separationsstruktur so zu verändern, dass eine Verbesserung der Hb-Reduktion erzielt werden konnte. Diese erzielte Hb-Reduktion von 67 % würde zum jetzigen Zeitpunkt bereits eine optische Detektion von Analyten zulassen. An keinen der verwendeten Materialien konnte eine Hb-, Erythrozyten- oder Folsäureadsorption festgestellt werden.

Verglichen mit dem Ref-Chips, welcher ca. 98% Hb-reduktion erzielte, erscheinen die 67 % der JR-Chips relativ gering. Der Ref-Chip zeigte allerdings eine Reihe von Nachteilen, wodurch er keine Alternative zu den JR-Chips darstellt. Beim Ref-Chip kann Blut nur aus einem Probengefäß mit Luer-Lock Anschluss in die Separationseinheit eingebracht werden. Bei Verwendung einer Glaskapillare müsste das Eingangsinterface (IN) umgebaut werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, neigen Membranen zum Lysieren von Erythrozyten, wenn der aufgebrauchte Druck zu groß wird. Dies bedeutet, dass die Hb-Konzentration in der separierten Suspension ansteigt. Weiters konnte in [56] nachgewiesen werden, dass am Markt befindliche Membranen zur Plasmaerzeugung eine niedrige *recovery* für bestimmte Analyten zeigen. Dies schränkt die Anzahl der zu messenden Analyten ein. Abschließend sei noch die begrenzte Menge an separierter Suspension erwähnt. Membranen verstopfen ab einer bestimmten Menge an separierten Erythrozyten, [57, 58] was eine kontinuierliche Separation über längere Zeit verhindert.

Bis zum Abschluss dieser Arbeit wurde keine Vorgabe für den Grad der Hb-Reduktion sowie das benötigte Volumen an separierter Suspension definiert. So gilt es in Zukunft, nach Definition dieser Vorgaben, auf Basis dieser Arbeit die Separationsmethode dahingehend zu optimieren. Die vorliegenden Methodenbeschreibungen sowie Ergebnisse sollten dabei als Basis genutzt werden können.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Manz, N. Graber, and H.M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1(1-6):244–248, 1990.
- [2] Richard P Feynman. There’s Plenty of Room at the Bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 1(1):60–66, 1992.
- [3] N.T. Nguyen. *Mikrofluidik: Entwurf, Herstellung und Charakterisierung*. Teubner Verlag, Stuttgart-Leipzig-Wiesbaden, 2004.
- [4] N.T. Nguyen and S. Wereley. *Fundamentals and applications of microfluidics*. Artech House, Boston-London, 2006.
- [5] J.P. Kutter and H. Klank. Microfluidics - Theoretical Aspects. In *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, pages 13–37. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004.
- [6] A.T. Giannitsis and M. Min. Usage of microfluidic lab-on-chips in biomedicine. In *12th Biennial Baltic Electronics Conference*, pages 249–252. IEEE, 2010.
- [7] M. Kersaudy-Kerhoas. *Design , test and biological validation of microfluidic systems for blood plasma separation*. Dissertation, Heriot-Watt University, 2010.
- [8] H. Moradi, S. Raza, and G. Kvaal. PINCHED-FLOW FRACTIONATION in LAB-ON-A-CHIP SYSTEMS. Technical report, Department of Micro- and Nanotechnology at Technical University of Denmark, 2008.
- [9] X. Xue, M.K. Patel, M. Kersaudy-Kerhoas, Ch. Bailey, M.P.Y. Desmulliez, and D. To-pham. Effect of fluid dynamics and device mechanism on biofluid behaviour in micro-channel systems: Modelling biofluids in a microchannel biochip separator. In *International Conference on Electronic Packaging Technology & High Density Packaging*, pages 179–186. Ieee, August 2009.

- [10] F. Hoffmann-La Roche AG. Große Fortschritte durch winzige Dimensionen. *Innovation - unser Schlüssel zum Erfolg*, page 77, April 2002.
- [11] H. Chmiel and B. Störmer. Zur Rheologie des Blutes. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering*, 17(5):174–180, 1972.
- [12] M. Sharan and A. S. Popel. A two-phase model for flow of blood in narrow tubes with increased effective viscosity near the wall. *Biorheology*, 38(5-6):415–28, January 2001.
- [13] G. Löffler and P.E. Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Heidelberg, 2007.
- [14] E.J. Speckmann, J. Heschleler, and R. Köhling. *Physiologie*. ELSEVIER-Urban & Fischer, München-Jena, 2008.
- [15] J. Koolman and Kl.H. Röhm. *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. Thieme, Stuttgart, 2009.
- [16] G. Thews and P. Vaupel. *Vegetative Physiologie*. Springer, Heidelberg, 2005.
- [17] W. Merrill. Rheology of Blood. *Physiological Reviews*, 49(4):863–888, 1969.
- [18] O. K. Baskurt and H. J. Meiselman. Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 29(5):435–50, October 2003.
- [19] N. Maeda. Erythrocyte Rheology in Microcirculation. *The Japanese Journal of Physiology*, 46(1):1–14, 1996.
- [20] G. McHedlishvili and N. Maeda. Blood flow structure related to red cell flow: determinant of blood fluidity in narrow microvessels. *The Japanese journal of physiology*, 51(1):19–30, February 2001.
- [21] G. Thews, E. Mutschler, and P. Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 4 edition, 1991.
- [22] A.R. Pries, T.W. Secomb, and P. Gaehtgens. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature. *Cardiovascular research*, 32(4):654–67, October 1996.
- [23] T.W. Secomb. Mechanics of red blood cells and blood flow in narrow tubes. In *Modeling and Simulation of Capsules and Biological Cells*, chapter 4, pages 163–198. Chapman & Hall/CRC, London, 2003.

- [24] M. Abkarian and A. Viallat. Vesicles and red blood cells in shear flow. *Soft Matter*, 4(4):653, 2008.
- [25] A. Aota, S. Takahashi, K. Mawatari, Y. Tanaka, Y. Sugii, and T. Kitamori. Microchip-based plasma separation from whole blood via axial migration of blood cells. *Analytical sciences*, 27(12):1173–8, January 2011.
- [26] R.F. Tuma, W.N. Duran, and K. Ley. *Handbook of Physiology; Microcirculation*. Elsevier-Academic Press, Amsterdam- Boston, 2008.
- [27] A.R. Pries, D. Neuhaus, and P. Gaehtgens. Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *The American journal of physiology*, 263(6 Pt 2):H1770–8, December 1992.
- [28] A.S. Popel and P.C. Johnson. Microcirculation and hemorheology. *Annual review of fluid mechanics*, 37:43, 2005.
- [29] A R Pries and T W Secomb. Blood Flow in Microvascular Networks. In *Handbook of physiology: MICROCIRCULATION*, page 949. Elsevier Inc, 2008.
- [30] K.H. Albrecht, P. Gaehtgens, A.R. Pries, and M. Heuser. The Fahraeus Effect in Narrow Capillaries (i.d. 3.3 to 11.0 μm). *Microvascular Research*, 18:33–47, 1979.
- [31] K. Svanes and B.W. Zweifach. Variations in small blood vessel hematocrits produced in hypothermic rats by micro-occlusion. *Microvascular Research*, 1(2):210–220, October 1968.
- [32] M. Yamada, M. Nakashima, and M. Seki. Pinched flow fractionation: continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Analytical chemistry*, 76(18):5465–71, September 2004.
- [33] N.A. Mortensen. Comment on “Pinched Flow Fractionation : Continuous Size Separation of Particles Utilizing a Laminar Flow Profile in a Pinched Microchannel“. *Analytical chemistry*, 79(23):9240–9241, 2007.
- [34] F. Horn. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2009.
- [35] Sigma-Aldrich Co. Folsäure - Sicherheitsdatenblatt, 2012.
- [36] St. Köstler and M. Hajnsek. Miniaturisierte optische Biosensor-Systeme 2: Förderungsvereinbarung 2011-2012. Technical report, JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH, Graz, 2010.

- [37] D. Sabourin, M. Dufva, T. Jensen, J. Kutter, and D. Snakenborg. One-step fabrication of microfluidic chips with in-plane, adhesive-free interconnections. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 20(3):037001, March 2010.
- [38] Angeles Ivón Rodríguez-Villarreal, Martin Arundell, Manuel Carmona, and Josep Samitier. High flow rate microfluidic device for blood plasma separation using a range of temperatures. *Lab on a chip*, 10(2):211–9, January 2010.
- [39] G. Perozziello, F. Bundgaard, and O. Geschke. Fluidic interconnections for microfluidic systems: A new integrated fluidic interconnection allowing plug'n'play functionality. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 130(2):947–953, March 2008.
- [40] A. A. S. Bhagat, P. Jothimuthu, A. Pais, and I. Papautsky. Re-usable quick-release interconnect for characterization of microfluidic systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(1):42–49, January 2007.
- [41] Angeles Ivón Rodríguez-Villarreal and Martin Arundell. Method and Apparatus for Separating Particles in a fluid - Patent, 2009.
- [42] R.P. Hesketh. Non-Newton Flow - Modified from the Comsol CHE Library module. Technical report, 2007.
- [43] WORLD HEALTH ORGANIZATION. USE OF ANTICOAGULANTS IN DIAGNOSTIC LABORATORY INVESTIGATIONS & Stability of blood, plasma and serum samples. Technical report, 2002.
- [44] O. K. Baskurt, M. Boynard, G. C. Cokelet, Ph. Connes, B. M. Cooke, S. Forconi, F. Liao, M. R. Hardeman, F. Jung, H.J. Meiselman, G. Nash, N. Nemeth, B. Sandhagen, S. Shin, G. Thurston, and J. L. Wautier. New guidelines for hemorheological. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 42:75–97, 2009.
- [45] Mehmet Uyklu, Melike Cengiz, Pinar Ulker, Timea Hever, Julien Tripette, Philippe Connes, Norbert Nemeth, Herbert J Meiselman, and Oguz K Baskurt. Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 41(4):269–78, January 2009.
- [46] Stefan Köstler et al. Miniaturisierte optische Biosensor-systeme: Endbericht 2010. Technical report, JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH, Graz, 2011.

- [47] Stefan Köstler. Biosensor-2 - Miniaturisierte optische Biosensor-Systeme 2: Zwischenbericht 2011. Technical report, JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH, 2012.
- [48] R Kruszyna, R P Smith, and L Ou. Method for measuring increased plasma hemoglobin in the presence of erythrocytes. *Clinical chemistry*, 23(11):2156–9, November 1977.
- [49] Sigma-Aldrich Co. Drabkin's Reagent, Produktinformation.
- [50] Medical Atlas. HEMOGLOBIN PROCEDURE Intended for the Quantitative Determination of Hemoglobin in the blood. Technical report, 2006.
- [51] MEDICHEM Diagnostica GmbH and Co. KG. Manual Procedure Hemoglobin - Drabkin colorimetric method, 2010.
- [52] Abbott Laboratories. Folate, Produktinformation, 2010.
- [53] Holger Becker, Richard Klemm, Cornelia Carstens, and Claudia Gärtner. HIGHLY EFFICIENT ON-CHIP PLASMA/SERUM GENERATION FOR DIS-POSABLE POINT-OF-CARE DEVICES. In *14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, number October, pages 133–135, 2010.
- [54] Taizo Kobayashi and Satoshi Konishi. Microfluidic chip with serially connected filters for improvement of collection efficiency in blood plasma separation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 161(1):1176–1183, January 2012.
- [55] Ralph Weisheit and Wolfgang Treiber. Verfahren zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase - Patent, 2006.
- [56] Alexandra Homsy, Peter D van der Wal, Werner Doll, Roland Schaller, Stefan Korszako, Maria Ratzer, Martin Ellmerer, Thomas R Pieber, Andreas Nicol, and Nico F de Rooij. Development and validation of a low cost blood filtration element separating plasma from undiluted whole blood. *Biomicrofluidics*, 6(1):12804–128049, March 2012.
- [57] Ali Asgar S Bhagat, Hansen Bow, Han Wei Hou, Swee Jin Tan, Jongyoon Han, and Chwee Teck Lim. Microfluidics for cell separation. *Medical & biological engineering & computing*, 48(10):999–1014, October 2010.

- [58] Han Wei Hou, Ali Asgar S. Bhagat, Wong Cheng Lee, Sha Huang, Jongyoon Han, and Chwee Teck Lim. Microfluidic Devices for Blood Fractionation. *Micromachines*, 2(3):319–343, July 2011.

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Grafische Darstellung der <i>tank treated motion</i> und zellreduzierten Schicht.	8
1.2.	Verlaufskurven des Fåhraeus-(Lindqvist) Effektes.	9
1.3.	Grafische Darstellung von <i>plasma skimming</i> und <i>red cell sreening</i>	11
1.4.	Grafische Darstellung der <i>pinched flow fractionation</i>	13
1.5.	Partikeltrajektorie bei unterschiedlichen Kanalaufweitungsgeometrien.	13
1.6.	Strukturformel von Folsäure.	14
2.1.	Schematische Darstellung des <i>needle-tubing press-fit</i> Interfaces.	17
2.2.	Layout und Abbildung des Testchips.	20
2.3.	Versuchsaufbau beim Leckagetest des Interfaces.	21
2.4.	Exemplarischer Druckverlauf einer Messung beim Pilotversuch.	22
2.5.	Design und Bezeichnungen der Separationstruktur.	23
2.6.	Schematischer Ablauf der Plasmaseparation.	24
2.7.	Gepprägter JR-Chip.	27
2.8.	Gefräster JR-Chip.	28
2.9.	Verfahrens zur Herstellung des JR-Chip 4.	29
2.10.	Versuchsaufbau für die Erythrozytenseparation.	33
2.11.	Einstellungen am Photospektrometer.	37
2.12.	Versuchsaufbau zur Messung der Folsäureadsorption.	39
2.13.	Verwendeter Membranchip vom microfluidic ChipShop.	41
3.1.	Verschlossene Kanaleingänge beim JR-Chip.	43
3.2.	Seitliche Aufnahme eines JR-Chips mit Interfacestruktur.	44
3.3.	Dichtheitsfehler beim Interface-Pilotversuch.	45
3.4.	Leckagedrucke aller Interfaceversuche.	46
3.5.	Prinzip der <i>pinched flow fractionation</i> bei den JR-Chips.	47
3.6.	Simulationsergebnis zu den Strömungseffekten.	47
3.7.	Simulationsergebnis zum Strömungsverhalten.	48
3.8.	Kalibrationskurve und Regressionsgerade der Hb-Messung.	49
3.9.	Hb-/Erythrozytenadsorption	51

3.10. Benötigtes Probenvolumen.	51
3.11. Hb-Reduktion pro Chip.	53
3.12. Flussratenabhängigkeit der Hb-Reduktion.	53
3.13. Hb-Reduktion in der 2. und 3. Probe.	54
3.14. Pilotversuchsergebnisse der Folsäureadsorption.	55
3.15. Hauptversuchsergebnisse der Folsäureadsorption.	56

Tabellenverzeichnis

2.1. Abmessungen der Kanäle aller verwendeten JR-Chips.	30
2.2. Konzentrationen und Mischungsverhältnisse der CN-Hb Kalibrationskurve.	36
3.1. Zusammenfassung der Messwerte des Interface-Pilotversuches.	45
3.2. Messergebnisse einer Hb-Kalibration.	49

A. Entscheidungsmatrizen

Eigenschaft	microfluidic ChipShop	microfluidic ChipShop	LabSmith
Kommerziell erhältlich	ja	ja	ja
Kosten in €/Stk	30	16.9	a.A.
Probenbehälter (Macrowelt)	Spritze	Teflonschlauch /Kapillare Klebestreifen	Teflonschlauch /Kapillare Klebestreifen
Befestigungsmethode			
Wiederverwendbarkeit (verschiedene Chips)	nein	nein	nein
Druckfestigkeit in Pa ... sollte >30kPa sein*	???	10.3M	???
Totvolumen in nL **	???	???	???
Anmerkung / Produktname	Luer Lock connector großes Volumen: ~80µL	Upchurch NanoPort	Bonded-port

Eigenschaft	Korivi2007	Li2003	Sabourin2010	Bhagat2007	Saarel2006
Kommerziell erhältlich	nein	nein	nein	nein	nein
Kosten in €/Stk					
Probenbehälter (Macrowelt)	Kapillare/Spritze	Kapillare/Spritze	Kapillare/Spritze	Teflonschlauch/Kapillare	Teflonschlauch/Kapillare
Befestigungsmethode	Epoxykleben	Epoxykleben	Kompression	Kompression	Kompression/Adhesion
Wiederverwendbarkeit (verschiedene Chips)	nein	nein	ja	ja	ja
Druckfestigkeit in Pa ... sollte >30kPa sein*	430k	435k	7.4k	H2O ~1556k bei 40 °C Air: ~612k	~220k ± 56k
Totvolumen in nL **	???	???	???	???	???
Anmerkung / Produktname	modifizierte Spritzenadel in Loch kleben und Schlauch darüber geben Verbesserungspotential durch Tsal2001 mit Mylar-schicht unterm Kleber	PDMS Block mit eingestanztem Loch auf Chip-inlet kleben, Kapillare in PDMS-Block stecken	Schlauch in Chip-inlet stecken, Nadel (größerer Durchmesser als Schlauch) in Schlauch stecken -> Dichtung aufgrund von Schlauchkompression	O-Ring wird in den Deckel der Halterung eingebracht. Durch Kompression des Deckels wird O-Ring zusammengedrückt und Innendurchmesser wird kleiner -> Halten der Kapillare im O-Ring Abwandlung: Statt O-Ring einen Silikon Schlauch verwenden (siehe Yang2002)	Konnektorplatte aus PDMS wird mit Dummykapillare vorgefertigt und auf Fluidicchip aufgebracht. Kann zusätzlich aktiv angepresst werden. Positionieren der PDMS-Platte mittels Ausrichtungvertiefungen

* Berechnete Drücke innerhalb des Separators ** Papers beschreiben nur "low dead volume" oä.

Abb. A.1.: Die dargestellten Interfacemethoden hatten die besten Übereinstimmungen mit den vorgegebenen Rahmenbedingungen. Alle mit ??? gekennzeichneten Daten konnten nicht erhoben werden. Die Entscheidung für die umzusetzende Methode fiel in einer Projektbesprechung nach Diskussion der jeweiligen Vor- und Nachteile.

Eigenschaften	Lenzhofer 2009	Kim 2008	Sethu 2006	Becker 2010	Shim 2010	Yang 2006	Rodriguez-Villarreal 2010	Partz 2005	Meng 2007	Khumpuang 2007	Crowley 2005
Chipmaterial	Silikon	Glas	PDMS	COC	COC, Quarz	PDMS	PDMS	PDMS	Silikon / Glas	oxidisiertes Silikon	Silikon
Chipgröße (l x b) in mm	~22 x 70	???	~25 x 15	25,5 x 75,5	~50 x ???	~15 x 15	~2,5 x 2 cm	???	20 x 30	20 x 30	???
Kanalgröße-Hauptkanal (l x b) in µm ***	350 x ~125**	???	200 x 50	300 x 100	100 x 100	15 x 10	400 x 40	50 x 20	Reservior	Reservior	Reservior
Kanalgröße-Trennkanal (l x b) in µm	geklebter Silikon Schlauch	4000 x 0,5	40 x 2,5	???	100 x 100	9,6 x 10	60 x 40	20 x 20	>1 x 1 - 2	20-2 x 5	100 x 10
Porbeneneinlage				Luer-interfaces				Kapillare	Reservior	Reservior	Reservior
Probenmaterial	Citratbehandeltes Humanblut (HK:40%)	unbehandeltes Humanblut	heparinisiertes Humanblut	Humanblut	unbehandeltes Humanblut	defibriniertes Schafsblood (HK:3,6%)	Citratbehandeltes Humanblut (HK:40%)	humanes, antikoaguliertes Vollblut	???	Testblut & Vollblut	elutriertes Rinderblut (HK 40%)
Probenmenge (möglich) in µL	???	0,2	500	25	5	kontinuierlich über 30 min	kontinuierlich über 60min	~20	10	20	5
Flussrate in µL/min oder Separationszeit in s	80 µL/min	20 s	> 5 µL/min	???	2,5 µL/min	3 - 4 µL/min	200 µL/min	~ 50 ml/min	~120 sek	< 60 sek	30-110 sek
Flusserzeugung	Spritzpumpe	Kapillarkraft	Spritzpumpe	Vakuumpumpe	Kapillarkraft	Spritzpumpe	Spritzpumpe oder Handspritze	Peristaltikpumpe an Ausgängen	Kapillarkraft	Kapillarkraft	Kapillarkraft
Trennmethode		Filterstruktur	Filterstruktur	Membranfilter	Filterstruktur	Zweifach-Fang	Zweifach-Fang, plasmastimmung	hydrodynamisch	Filterstruktur	Größenausschluss	Filterstruktur
Externe Geräte nötig	Piezokeramische Platte (PZ26) mit ~300mW Einstrahlleistung										
	Ultraschallgel										
	Funktionsgenerator										
Plasmanmenge in % von Probenmenge oder nL	???	1%	???	bis 80% von totalem Plasma	350 nL	15-25% von totalem Plasma	~3,5% aus 1 mL Blut	???	1: 10-50nL 2: > 50nL	<1 µL	14 - 45 nL
Trenneffizienz (in % oder Rest an Ery in Plasma)*	3,65 x 10 ⁹ /L	???	???	???			97,58%	???	@ 1: 98% @ 2: ~80%	abh von Kanalgeometrie	???
Plasmasammelbehälter	Outputöffnung; 2/3 der Kanalbreite; VICI Valco - Valve Port, extern über Silikon Schlauch			Luer-interfaces						Reservior	Reservior
Theoretischer Hintergrund (Berechnungsmethoden)	nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja			ja	Ja
Anmerkung	eigentlich für Glukosemessung am Patienten; Trennung binnen 20 sec		Entwickelt f Leukotrennung --> Änderung der Kanalsstrukturen f Ery-trennung	Kommerziell erhältliches Produkt (microfluidic ChipShop) ... 80€ für 4 Filter		eigentlich sind zwei Methoden beschrieben: einfaches Sample und kontinuierliches Sample	Temperatur konst bei 37°C hat Auswirkung bei 100 µL/min, darüber nicht; Untersuchung d Auswirkung von Temp und Flussrate	Flussrate in den Kanälen prinzipiell steuerbar		Teilweise Hämolyse beobachtet (vermutet)	patentiert

* ... x 10⁹ /L ist laut EU max wert für Plasmatransfusion ** ... [Evan der 2008] *** Länge der Kanäle ist Achse in Flussrichtung geringe Plasmanmenge oder hohe Messzeit kommerziell erhältlich

Abb. A.2.: Die dargestellten Separationsmethoden hatten die besten Übereinstimmungen mit den vorgegebenen Rahmenbedingungen. Alle mit ??? gekennzeichneten Daten konnten nicht erhoben werden. Die Entscheidung für die umzusetzende Methode fiel in einer Projektbesprechung nach Diskussion der jeweiligen Vor- und Nachteile.