

Technische Universität Berlin

Institut für Konstruktion, Mikro- und Medizintechnik

Fachgebiet Mikro- und Feingeräte

Ein neuartiges 3-D-mikrostrukturiertes Durchflusszytometer

von Diplom-Ingenieur

Janko Theisen

von der Fakultät V – Verkehrs- und Maschinensysteme

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

- Dr.-Ing.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Christian Oliver Paschereit

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Schmidt

Gutachter: Dr. rer. nat. Jörg Neukammer

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30.11.2006

Berlin 2007

D 83

Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter des Instituts für Konstruktion, Mikro- und Medizintechnik, Fachgebiet Mikro- und Feingeräte unter Leitung von Prof. M. Schmidt. Sie ist Teil eines Projektes, das in Kooperation mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB), Arbeitsgruppe 8.32 (Durchflusszytometrie und Mikroskopie), geleitet von Herr Dr. Jörg Neukammer, bearbeitet wird.

Das Fachgebiet Mikro- und Feingeräte der Technischen Universität Berlin orientiert sich in Lehre und Forschung an dem Entwurf, der Konstruktion, der Simulation und der Fertigung von Produkten aus der Feinwerk- und Mikrotechnik mit Detailabmessungen bis in den Submikrometerbereich. Ein derzeitiger Forschungsschwerpunkt liegt in der Entwicklung von Komponenten und Systemen der Mikrofluidik, beispielsweise mikrofluidische Analysesysteme in Kombination mit Aktor- und Sensorsystemen. Das Fachgebiet beherrscht verschiedene Fertigungstechniken, dazu zählen die Fertigung metallischer mikrostrukturierter Bauteile und Werkzeugen mit Hilfe der LIGA-Technik und/oder Ultra-Präzisionsfräsen bis hin zur Kunststoffabformung mittels Spritzgießen oder Heißprägen.

In der Arbeitsgruppe 8.32 werden seit Jahren methodische und apparative Entwicklungen zum Thema Durchflusszytometrie durchgeführt. Es werden dort gesetzliche Aufgaben, die die Bestimmung von Referenzwerten für das kleine Blutbild im Rahmen von Ringversuchen medizinischer Standesorganisationen zur Überprüfung der etwa 2000 hämatologischen Laboratorien in Deutschland betreffen, bearbeitet. Aktuelle Forschungsarbeiten befassen sich mit der Verbesserung der Zelldifferenzierung anhand der Winkelverteilung des an einzelnen Zellen gestreuten Lichtes, der Diagnostik/Prognose bei Malaria-Erkrankungen durch Konzentrationsmessungen der durch die Erkrankung veränderten Zellen sowie mit mikroskopische Verfahren zum Nachweis einzelner Fluoreszenzmoleküle auf Zellen.

Die notwendigen Anforderungen zum Bau eines Durchflusszytometers in punkto Optik, Fluidik und Impedanzmessung wurden von beiden Gruppen definiert. Konstruktion, Simulation und Fertigung der Analysechips stammen vom Fachgebiet Mikro- und Feingeräte. In der Arbeitsgruppe 8.32 wurden im Rahmen von Examensarbeiten an der Technischen Fachhochschule Berlin die wesentlichen Funktionstests der mikrostrukturierten Durchflusszytometer durchgeführt sowie die erforderlichen Aufbauten für die periphere Fluidikversorgung, für optische Messungen und Impedanzmessungen erstellt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zunächst möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Fachgebietes Mikro- und Feingeräte bedanken. Allen voran bin ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Schmidt für die

erfolgreiche 5-jährige Zusammenarbeit zu Dank verpflichtet. Seine Unterstützung und sein Rat haben einen großen Beitrag zu dieser Promotion geleistet.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitarbeitern Herr Markus Malcher und Herr Joachim Meier bedanken. Die positive Stimmung meiner Kollegen war mir über die Jahre hinweg stets eine Freude. Sie standen mir während der gesamten Zeit immer hilfsbereit zur Seite. Besonders danke ich den Studentinnen und Studenten, die in Form von Diplom-, Studien- und Projektarbeiten oder als studentische Hilfskraft wichtige Einzelbeiträge zu dieser Arbeit geleistet haben. Namentlich möchte ich Andrej Tuschsheerer, Katja Rehbach, Thilo Guschauski, Christopher Sprenger, Kiril Kalkandjiev, Anselm Wissinger, Peter Horbert und Roman Mästle nennen.

Außerdem möchte ich mich bei Herr Dr. Jörg Neukammer und seiner Arbeitsgruppe bedanken. Die fruchtbare Zusammenarbeit mit der Gruppe der PTB stellt die Grundlage dieser Promotion dar. Herrn Dr. Neukammer danke ich für die vielen Anregungen und Ideen im Zusammenhang mit der Durchflussszytometrie, sowie für das Gutachten dieser Arbeit. Bei Dr. Andreas Kummrow, Kerstin Brattke und Hülya Yildirim bedanke ich mich für die Durchführung der experimentellen durchflussszytometrischen Messungen, sowie die zahlreichen Anregungen und Vorschläge für Verbesserungen.

Herrn Prof. Dr. Christian Paschereit danke ich für die Übernahme des Vorsitzes des Promotionsverfahrens.

Meine Freundin Kerstin unterstützte mich während der gesamten, mitunter anstrengenden Zeit seelisch, moralisch und kulinarisch und leistete somit einen entscheidenden Beitrag zu dieser Arbeit. Dafür bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet.

Berlin, Oktober 2006

Janko Theisen

Inhaltsverzeichnis

Vorwort und Danksagung	3
1 Einleitung	7
2 Anwendungen und Entwicklungsziele mikrostrukturierter Durchflusszytometer	11
2.1 Ausgewählte Anwendungen mikrostrukturierter Durchflusszytometer ..	11
2.2 Ziele der Neuentwicklung eines mikrostrukturierten Durchflusszytometers.....	12
3 Stand der Technik und Grundlagen.....	14
3.1 Stand der Technik kommerzieller und mikrostrukturierter Durchflusszytometer	14
3.2 Hämatologische Grundlagen	25
3.3 Fluidische Grundlagen	26
3.4 Optische Grundlagen.....	31
3.5 Grundlagen zur Impedanzmessung	34
4 Konzeptioneller Aufbau und Auswahl der Fertigungsprozesskette.....	38
4.1 Konzeptioneller Aufbau des Analysechips	38
4.2 Übersicht Fertigungsstrategien.....	40
4.3 Auswahl des Fertigungsverfahrens des Formwerkzeugs	40
4.4 Auswahl eines Replikationsverfahrens zur Herstellung der Chipkomponenten.....	47
4.5 Auswahl des Verfahrens zum Fügen der Analysechips.....	50
4.6 Übersicht über gefertigte Versionen	55
5 Auslegung der Fluidik	60
5.1 Anforderungen an die hydrodynamische Fokussierung	60
5.2 2-dimensionale hydrodynamische Fokussierung ohne Hinterschnitte ...	61
5.3 Allgemeines zur Auslegung des fluidischen Systems	62
5.4 Auswertung der FEM-Rechnungen zur Auslegung der hydrodynamischen Fokussierung	65
5.5 Einfache hydrodynamische Fokussierung.....	68
5.6 Verbesserte hydrodynamische Fokussierung.....	75
5.7 Kaskadierte hydrodynamische Fokussierung	81
5.8 Hydrodynamische Fokussierung mit Drall	89
6 Auslegung der Optik.....	95

6.1	Auslegung der Optik der Lichtwellenleiter	95
6.2	Auslegung der Freistrahloptik	107
7	Auslegung der Impedanzmessung	111
7.1	Konstruktion mit Dünnschichtelektroden	111
7.2	Impedanzmessung mit montierten Drahtelektroden	112
7.3	Außerhalb des Analysechips liegende Elektroden	116
8	Fertigungsprozesskette	122
8.1	Werkstoffauswahl für einen Heißprägestempel	122
8.2	Ultra-Präzisionsfräsen des Formeinsatzes	124
8.3	Heißprägen der Analysechips	131
8.4	Vereinzeln der Kunststoffchips	133
8.5	Montage der Lichtwellenleiter und Elektroden	134
8.6	Fügen der Analysechips mit dem Kapillarklebeverfahren	135
8.7	Fügen der Analysechips mit dem Laserdurchstrahlschweißen	136
9	Nachweis der Funktionsfähigkeit der Analysechips	139
9.1	Mikroskopischer Messplatz zur Untersuchung der Analysechips	139
9.2	Kleinwinkelvorwärtsstreuung von 7- μ m-Polystyrolkugeln	141
9.3	Durchflusszytometrische Messung an humanem Blut	142
9.4	Leistungsfähigkeit der mikrostrukturierten Durchflusszytometer	145
10	Zusammenfassung	147
	Anhang	149
	Verzeichnis der Symbole	149
	Literaturverzeichnis	151

1 Einleitung

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Zählung und Differenzierung biologischer Zellen, die sich in einer Suspension befinden und eine Messstelle einzeln, nacheinander und mit hohem Durchsatz (typisch 10.000 s^{-1}) passieren. Aus den Messsignalen lassen sich Zelleigenschaften wie Größe, Form, DNA-Gehalt und Existenz bestimmter intrazellulärer Proteine und Oberflächenproteine ableiten. Zur Charakterisierung der Zellen werden optische Verfahren und Impedanzverfahren eingesetzt. In optischen (Laser-) Durchflusszytometern hat sich das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung zur Probenzuführung etabliert (siehe Abbildung 1.1). Die Messsuspension wird in einen Hüllstrom eingeleitet, beschleunigt und dadurch fokussiert. Diese Methode gewährleistet, dass eine große Anzahl Zellen nacheinander und weitgehend einzeln vermessen werden können. Auf Grund von Erkrankungen ändern sich Konzentrationen verschiedener Zellpopulationen, außerdem können krankhaft veränderte Zellen auftreten. Pathologisch veränderte Zellen können für bestimmte Krankheiten charakteristisch und nur selten im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten (beispielsweise Zerebrospinalflüssigkeit, bronchoalveoläre Lavage) vertreten sein. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können bestimmte (abnorme) Zellen innerhalb kurzer Zeit mit ausreichend statistischer Genauigkeit detektiert werden, auch wenn ihre Konzentration im Vergleich zu anderen Zellen mehrere Größenordnungen geringer ist. Durchflusszytometer variieren von kleinen Tischgeräten für den Laborgebrauch über große automatisierte Analysensysteme für den klinischen Alltag bis hin zu Geräten für die klinische Forschung, mit denen bis zu 16 verschiedene Messgrößen für jede einzelne Zelle registriert werden.

Die Durchflusszytometrie hat sich zu einem bedeutenden Analyseverfahren in der Biologie und Medizin entwickelt. Die Zahl der im Gebrauch befindlichen optischen Durchflusszytometer hat weltweit stark zugenommen [Shap03]. Waren Mitte der siebziger Jahre noch wenige hundert Durchflusszytometer im Einsatz, so waren es 1992 schon über 7000. Dieser Trend hat sich ungebrochen fortgesetzt [Shap03]. Der weltweite Markt im Bereich der Durchflusszytometrie – dabei sind Testreagenzien, Analysergeräte und Software mit eingeschlossen – umfasste im Jahr 2000 ein Volumen von 950 Millionen Dollar. Gegenüber dem Vorjahr war das eine Steigerung von 26 %. Langfristig wird mit einem jährlichen Wachstum in dieser Branche von 10 – 15 % gerechnet [Sanno2]. Die Firma Partec, ein deutscher Hersteller von optischen Durchflusszytometern, konnte ihren Umsatz von 1999 bis 2004 um 134 % steigern. Partec hat einen weltweiten Marktanteil von 31,8 % bezogen auf die Anzahl verkaufter Durchflusszytometer [Parteco5].

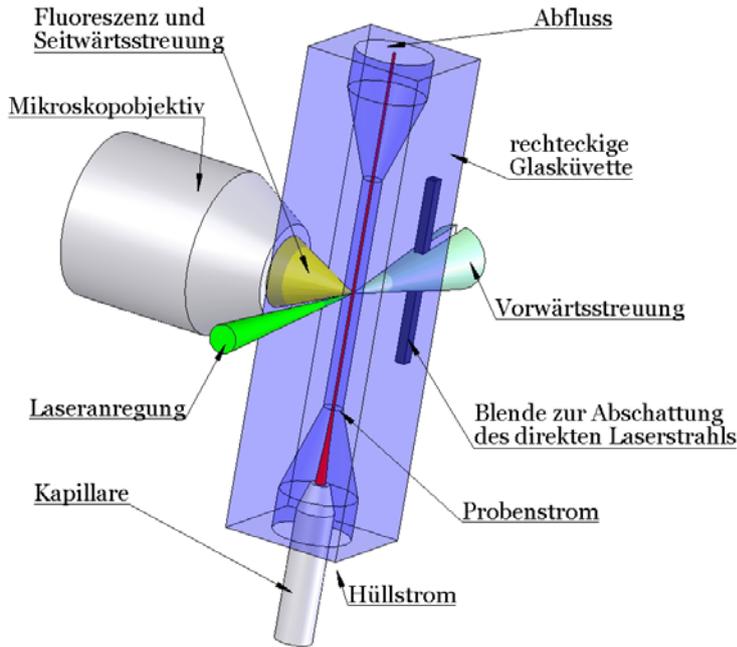


Abbildung 1.1: Funktionsprinzip eines kommerziellen optischen Durchflusszytometers

Die derzeitigen Anwendungsgebiete der Durchflusszytometrie liegen in der klinischen Diagnostik und in der Zellforschung. Sie reichen von der Erstellung eines einfachen Blutbildes und HIV-Untersuchungen bis hin zu komplexeren Analysen wie zum Beispiel der Leukämiediagnostik. In den vergangenen zwei Jahren hat die Rolle der Durchflusszytometrie für die Behandlung von AIDS-Patienten im Bereich HIV-Monitoring besonders in den Entwicklungsländern eine Sonderstellung einnehmen können [Partec05]. Aber auch in der medizinischen Forschung, zum Beispiel Zellteilung und DNA-Analyse, hat sich die Durchflusszytometrie als wichtiges Forschungsinstrument durchgesetzt.

Neue Konzepte der Durchflusszytometrie werden durch die Miniaturisierung auf Basis der Mikrotechnik eröffnet. Erst durch die neusten Entwicklungen in der Fertigungstechnologie ist es möglich geworden, Mikrostrukturen zu fertigen, die im Bezug auf die Probenzuführung und Detektion der Zellen einen entscheidenden Fortschritt darstellen. Damit lässt sich ein Messsystem bestehend aus einem mikrostrukturierten, austauschbaren Einweg-Analysechip und einem dazugehörigen tragbaren Auswertegerät aufbauen.

Mit diesem neuen Ansatz lassen sich die im Folgenden angegebenen Ziele an zukünftige Durchflusszytometer erfüllen:

- Einweg-Messzellen: Mikrostrukturierte Messzellen können kostengünstig als Einwegprodukt gefertigt werden. Einweg-Chips bieten den Vorteil, bei Verstopfung oder Verschleiß der Fluidkanäle (zum Beispiel bei der Untersuchung von Proben mit aggressiven Reagenzien) ausgetauscht werden zu können. Eine Sterilisation bzw. eine Reinigung der Analysechips nach Gebrauch entfällt. Durch die mikrostrukturierte Bauweise können Reagenzien eingespart werden. Darüber hinaus können die Analysechips spezifischen Messaufgaben angepasst werden.
- Mobilität der Messgeräte: Es besteht die Tendenz, diagnostische Geräte kleiner und damit handlicher zu bauen, um sie zum Beispiel für Point-of-care-Tests (POCT) einsetzen zu können. Damit sind Einsatzfälle gemeint, bei denen Diag-

nosewerte unmittelbar und ohne großen apparativen und zeitlichen Aufwand bestimmt werden müssen. Typischerweise werden solche Geräte außerhalb des Labors eingesetzt, zum Beispiel in der Notfallmedizin, als schnelles Messverfahren während Operationen oder als mobile Diagnoseeinheiten in Regionen mit fehlender medizinischer Infrastruktur. Für den Feldeinsatz werden robuste und tragbare Geräte verlangt, die möglichst ohne qualifiziertes Personal bedient werden können. Die Funktionsfähigkeit unter extremen Bedingungen muss bei solchen Geräten gewährleistet sein.

- Neue Messgrößen und -verfahren: Mit den derzeitigen kommerziellen Durchflusszytometern können auf Grund des konventionellen Aufbaus bestimmte Messgrößen standardmäßig nicht gemessen werden. Dazu zählen Streulichtmessungen unter extremen Raumwinkeln sowie die Kombination von optischen Messgrößen und Impedanz- oder Ultraschalluntersuchungen. Insbesondere zum Nachweis seltener Zellen, wie zum Beispiel im Blut zirkulierende Endothelzellen oder Tumorzellen, ist die detaillierte Charakterisierung der Targetzellen zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität unbedingt erforderlich. Mikrostrukturierte Analysechips bieten das Potential zur Realisierung neuer Messgrößen und -verfahren.
- Integration von Zusatzfunktionen: Ein wichtiger Aspekt ist die Reduktion des zeitlichen und apparativen Analyseaufwands und die Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Beide Forderungen können durch die Verlagerung der Probenvorbereitung (Verdünnung, Lyse, Färbung) in den Analysechip, ähnlich wie bei Geräten zur Blutzuckermessung, verwirklicht werden. Zusätzlich wäre es wünschenswert, die Sortierung seltener Zellen zu ihrer Anreicherung zu integrieren. Auf diese Weise könnten pathologisch veränderte Zellen aussortiert und beispielsweise durch genetische Methoden klassifiziert werden.

Um den unterschiedlichen Zielen gerecht zu werden, müssen die Funktionselemente oder -gruppen zu einem Gesamtsystem kombiniert werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein, schnell einen auf die Messaufgabe abgestimmten Analysechip zu entwerfen. Funktionselemente sind zum Beispiel fluidische Komponenten wie die hydrodynamische Fokussierung oder aber auch optische und elektrische Messeinheiten. Weitere Funktionseinheiten wie zum Beispiel Mischer oder Sortierer können auf dem eigentlichen Messchip vor- oder nachgeschaltet werden, um die entsprechenden Zusatzfunktionen auszuführen. Aus einem derartigen Baukastensystem können ohne großen Entwicklungsaufwand die notwendigen Komponenten zusammengestellt und funktionsfähige Produkte in relativ kurzer Zeit auf den Markt gebracht werden. Eine hohe Bedeutung kommt den fluidischen, optischen und elektrischen Schnittstellen der Einweg-Messzellen zu. Sie müssen so gestaltet sein, dass ein problemloser schneller Austausch des Messchips möglich wird.

Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Basisfunktionselemente zu entwickeln, aufzubauen und zu einem funktionsfähigen Analysechip zu integrieren. Verschiedene optische und elektrische Messverfahren werden miteinander kombiniert. Für den Aufbau werden verschiedene mikrotechnische Fertigungsverfahren bewertet und zu einer Prozesskette zusammengestellt, die eine effiziente Fertigung des Labor-musters erlaubt und das Potenzial zur Massenfertigung aufweist. Bei den spanenden Fertigungsverfahren konnten die erreichbaren Genauigkeiten in den letzten Jahren so

weit gesteigert werden, dass sie als strukturgebendes Fertigungsverfahren im Mikrometerbereich eingesetzt werden können. Im Gegensatz zu lithographischen Fertigungsverfahren können mit Ultra-Präzisionsfräsen 3-dimensionale Strukturen bei deutlich reduziertem Zeitaufwand hergestellt werden. Die 3-Dimensionalität eröffnet Möglichkeiten bei der Realisierung neuer Konzepte und Ideen, die mit 2^{1/2}-dimensionalen Strukturen nicht möglich sind. Die einzelnen Bauelemente sind zu analysieren und optimieren. Die Leistungsfähigkeit dieses Labormusters soll dabei mit der Leistungsfähigkeit kommerzieller Durchflusssyztometer verglichen werden.

In Kapitel 2 und 3 werden zunächst die Grundlagen und der Stand der Technik der Durchflusssyztometrie und die relevanten Fertigungstechniken beschrieben. Anschließend werden der konzeptionelle Aufbau der Analysechips und die Fertigungskette vorgestellt. Die Auslegung der hydrodynamische Fokussierung erfolgt in Kapitel 5. Anhand von vier unterschiedlichen hydrodynamischen Fokussierungen werden die wichtigsten Entwicklungsschritte vorgestellt. Das Kapitel 6 beschreibt die Auslegung der optischen Messung, Kapitel 7 die Auslegung der Impedanzmessung. Die Fertigungsprozesskette der Analysechips wird im folgenden Kapitel beschrieben. Abschließend werden die durchflusssyztometrischen Messungen an Kontrollblut und Frischblut zur Demonstration der Funktionsfähigkeit der aufgebauten Labormuster vorgestellt.

2 Anwendungen und Entwicklungsziele mikrostrukturierter Durchflusszytometer

2.1 Ausgewählte Anwendungen mikrostrukturierter Durchflusszytometer

Die Einsatzgebiete für Durchflusszytometer sind wie bereits angedeutet vielseitig. Ein paar Beispiele, die derzeit mit konventionellen Durchflusszytometern bearbeitet werden, sollen zeigen, wo mikrostrukturierte Durchflusszytometer zum Einsatz kommen können und Potenziale zu Verbesserungen bieten.

Bei der DNA-Analyse kann zwischen zwei verschiedenen Methoden unterschieden werden: die Analyse des integralen DNA-Gehaltes einer Zelle oder die Analyse von DNA-Fragmenten. Zur Gesamt-DNA-Analyse wird der DNA-Strang im Zellkern durch interkalierende Farbstoffe angefärbt. Mit einer Fluoreszenzmessung wird der DNA-Gehalt beispielsweise einer Tumorzelle relativ zu einer gesunden Zelle mit dem normalen, diploiden DNA-Satz (gesunde Lymphozyten) ermittelt. Neben dem als DNA-Index bezeichneten relativen DNA-Gehalt wird außerdem der prozentuale Anteil der Tumorzellen, die sich in der Phase der DNA-Synthese oder kurz vor der Teilung stehen, als charakteristisches Merkmal für bestimmte Tumorzelllinien verwendet. Bei der DNA-Fragment-Analyse wird die DNA fragmentiert und ebenfalls angefärbt. In einer durchflusszytometrischen Messung werden anhand der Fluoreszenzsignale die Größen der Fragmente ermittelt. Diese Methode könnte sich als alternatives Verfahren zur heute sonst üblichen DNA-Elektrophorese etablieren, insbesondere auf Grund der wesentlich schnelleren Verfügbarkeit der Ergebnisse. Sowohl bei der integralen DNA-Analyse als auch bei der Untersuchung von DNA-Abschnitten ist die Ortsauflösung von entscheidender Bedeutung zur Differenzierung von möglichst geringen Unterschieden im DNA-Gehalt. Um diesem Anspruch gerecht zu werden, verwendet man im Vergleich zu immunologischen (Oberflächen-) Färbungen längere Wechselwirkungszeiten bis in den Millisekundenbereich.

Die durchflusszytometrische DNA-Analyse hat in den letzten Jahren auf Grund der Möglichkeiten zur Vervielfältigung einzelner Genabschnitte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) an Bedeutung verloren. Durch den Einsatz mikrostrukturierter Analysechips und der damit verbundenen möglichen Steigerung der Empfindlichkeit, Erhöhung der Auflösung und integrierten Probenvorbereitung könnte der Stellenwert der durchflusszytometrischen DNA-Messung wieder zunehmen.

In der Malariadiagnostik werden bis heute mikroskopische Verfahren eingesetzt. Bei Malariapatienten befinden sich Parasiten in den Erythrozyten. Der Ansatz bei durchflusszytometrischen Messungen geht dahin, dass die Monozyten im Blut auf Veränderungen untersucht werden [Kräo1], da sie das Abbauprodukt der Parasiten - das Mala-

ria-Pigment Hämozoin - aufnehmen. Im Zusammenhang mit dieser Erkrankung ist der in den Erythrozyten stattfindende Abbau des Hämoglobins zu Hämozoin von besonderer Bedeutung, da sich möglicherweise neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Medikamenten ergeben [Egan04].

Bereits heute ist die HIV-Diagnostik ein wichtiges Anwendungsgebiet. Ein Ziel beim Einsatz mikrostrukturierter Durchflusszytometer ist es, mit möglichst kostengünstigen Tests eine HIV-Infektion sicher zu diagnostizieren. Da Malaria und HIV in einigen Gebieten mit hoher Wahrscheinlichkeit gleichzeitig auftreten, ist ein Instrument, mit dem beide Erkrankungen nachgewiesen werden können, von hohem Interesse.

Relativ unabhängig von der spezifischen Anwendung werden zukünftig miniaturisierte, mobil einsetzbare Handgeräte gefragt sein. Solche Geräte können bei Point-of-care-Tests eingesetzt werden, bei denen nach einer Probenentnahme unmittelbar das Messergebnis abgelesen wird.

2.2 Ziele der Neuentwicklung eines mikrostrukturierten Durchflusszytometers

Im Rahmen dieser Arbeit sollen als Grundlage eines modularen Baukastensystems Labormuster eines mikrostrukturierten Durchflusszytometers aufgebaut werden. Dieses Baukastensystem soll als Plattform für zukünftig zu entwickelnde, spezifische Analysechips dienen.

In die Labormuster sollen die wichtigsten Funktionen eines Durchflusszytometers integriert werden:

- **Probenzuführung:** Für den Probenstrom soll eine hydrodynamische Fokussierung entworfen werden, die den Probenstrom möglichst genau im Messkanal positioniert. Der hydrodynamischen Fokussierung kommt eine herausragende Bedeutung zu, da sie die Grundlage für eine qualitativ hochwertige durchflusszytometrische Messung darstellt. Angestrebt wird ein Probenstrom mit einem Querschnitt von ca. $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ in einem ca. $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ großen Messkanal.
- **Optisches Messsystem:** Es sollen die Extinktion, die Vorwärtsstreuung für zwei unterschiedliche Winkelbereiche, die Seitwärtsstreuung, die Rückwärtsstreuung und die Fluoreszenz aufgenommen werden. Die Lichteinkopplung in den Messkanal sowohl mittels Lichtwellenleiter als auch als Freistrahl sollen geprüft werden. Zur Qualitätsbeurteilung der optischen Messungen und der hydrodynamischen Fokussierung werden die Variationskoeffizienten der registrierten Signalamplituden verwendet. Als Probenmaterial dienen zur Beurteilung der Streulichtmessungen monodisperse Polystyrolkugeln. Die Fluoreszenzmessungen werden mit homogen gefärbten Kügelchen mit geringer Variation des Farbstoffgehaltes ausgeführt.
- **Messung der Impedanz:** Zur Impedanzmessung sollen verschiedene Elektrodenanordnungen erprobt und erste Signale aufgenommen werden. Im Vordergrund dieser Untersuchungen steht die Ausarbeitung eines geeigneten Aufbaus.

- Die Fertigungsprozesskette soll so ausgewählt werden, dass sie das Potenzial zu einer Massenfertigung besitzt und eine Fertigung der Labormuster in Kleinserie möglich ist. Die Montage, also das Einlegen optischer und elektrischer Komponenten, sowie das Fügen der Analysechips, soll mit einem minimalen Aufwand erfolgen. Ferner sollen sich neue Designs der Analysechips für spezielle Anwendungen schnell verwirklichen lassen.

3 Stand der Technik und Grundlagen

3.1 Stand der Technik kommerzieller und mikrostrukturierter Durchflusszytometer

Probenezuführung in kommerziellen Geräten

1934 stellte A. Moldavan ein Gerät vor, mit dem automatisch Erythrozyten in einem Fluid gezählt werden konnten [Mol34]. Dazu führte er die Zellen in einer Glaskapillare an einem Mikroskopobjektiv vorbei und registrierte den Durchgang einer Zelle mit einem am Okular angebrachten Photodetektor. Schnell wurde bei diesem Aufbau klar, dass Zellen in engen Kapillaren zur Aggregation und damit auch zur Verstopfung der Kapillare neigen. Anfang der fünfziger Jahre kam, inspiriert durch die Untersuchungen zu laminaren Strömungen von O. Reynolds, das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung auf. Dadurch konnten wesentlich größere und weniger leicht verstopfende Messkapillaren verwendet werden. Nahezu alle modernen optischen Durchflusszytometer verwenden das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung.

Der Hüllstrom wird durch den Messkanal geleitet und der Probenstrom (Suspension mit den zu messenden Zellen) wird konzentrisch unter laminaren Flussbedingungen in den Hüllstrom geleitet. Durch die unterschiedlichen Volumenströme des Proben- und Hüllstroms wird der Probenstrom bis auf einen Querschnitt von nur wenigen Quadratmikrometern verjüngt. Er verläuft zentrisch im Messkanal (siehe Abbildung 3.1).

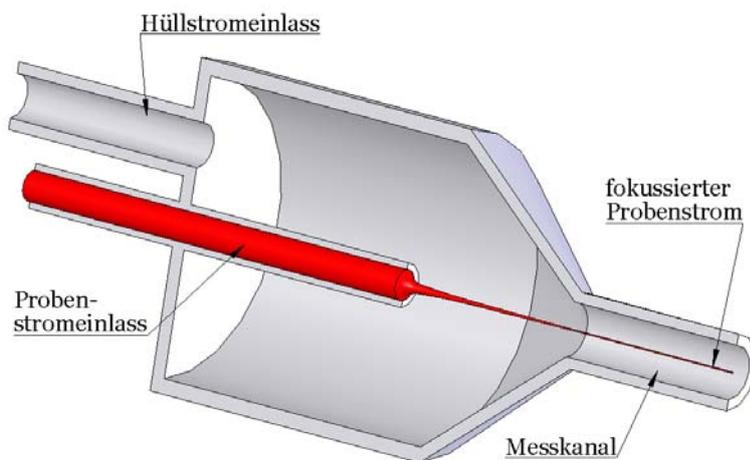


Abbildung 3.1: Querschnitt einer konventionellen Flusszelle für optische Durchflusszytometer

In kommerziellen Durchflusszytometern besteht eine hydrodynamische Fokussierung aus einer Kapillare, die in ein sich verjüngendes Rohr (im Weiteren Verjüngung ge-

nannt) hineinragt. Der Durchmesser der Kapillare beträgt zwischen 100 und 300 μm , der Durchmesser und die Länge der Verjüngung betragen einige Millimeter.

Um Verstopfungen des Messkanals durch Agglomeration der Zellen zu vermeiden, sollte der Durchmesser des Messkanals ein Vielfaches des Zelldurchmessers (siehe dazu Kapitel 3.2, Seite 25) betragen. Die Querschnitte der Messkanäle kommerzieller Durchflusszytometer variieren von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ bis $450 \times 450 \mu\text{m}^2$ [Shap03]. Für gewöhnlich besteht der Messkanal aus einer Glasküvette, die aus vier optisch polierten Glasquadern zu einer geschlossenen Küvette zusammengeklebt werden. Die Länge des Messkanals beträgt typischerweise mehrere Millimeter (siehe Abbildung 3.2). Die Strömungsgeschwindigkeiten im Messkanal werden zwischen 1 und 10 m/s eingestellt [Shap03], [Kac90].

Bei diesem Aufbau stehen die fluidische Achse (x-Achse), die optische Achse (y-Achse) und die Richtung der Seitwärtsstreuerung (z-Achse) senkrecht aufeinander (siehe Abbildung 3.2). Die radiale Variable senkrecht zur fluidischen Achse wird als r_{fluid} bezeichnet, die radiale Variable senkrecht zur optischen Achse als r_{opt} .

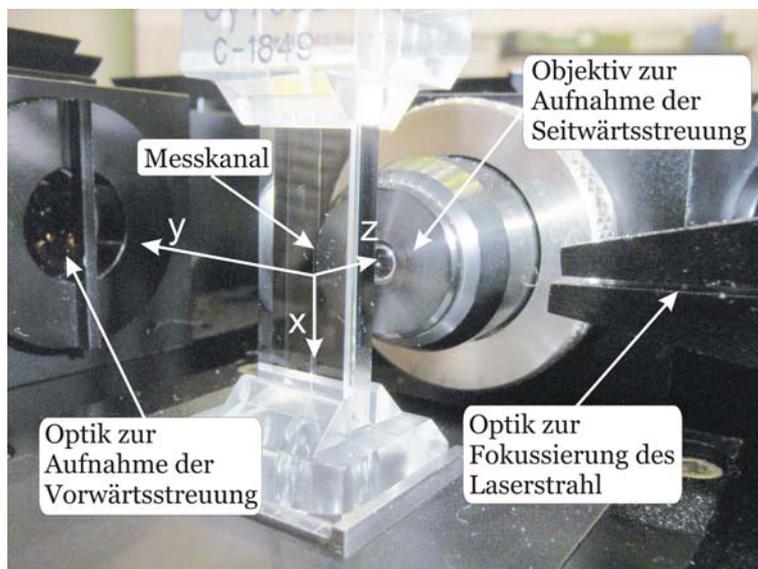


Abbildung 3.2: Messzelle eines kommerziellen Durchflusszytometers (mit freundlicher Genehmigung der Firma Partec GmbH).

Probenezuführung in mikrostrukturierten Durchflusszytometern

Probenezuführung ohne hydrodynamische oder elektrokinetische Fokussierung

Durch die Reduzierung des Fluidkanals auf den Querschnitt eines Partikels können die zu messenden Zellen ohne Abweichungen von ihrer idealen Bewegungslinie an einer Messstelle vorbeigeführt werden. Werden Zellen durch sehr enge Kanäle geleitet, besteht jedoch die Gefahr der Verstopfung.

Der überwiegende Teil der ausgewerteten Quellen über mikrostrukturierte Durchflusszytometer verzichtet auf eine hydrodynamische oder elektrokinetische Fokussierung [Park04], [Rao04], [Gaw04], [Cheu04], [Alt97], [Fu99], [Fu02], [Gaw01], [Sob93], [Sohn00], [Tay05], [Kra02], [Yama02]. Gründe dafür werden nur von J. Park genannt [Park04]. Dort wird bewusst eine hydrodynamische Fokussierung durch einen sich asymmetrisch verjüngenden Kanal umgangen. Durch diese Asymmetrie soll die Ver-

stopfungsneigung vermieden werden. Experimentelle Untersuchungen belegen, dass auch auf diese Weise die Zellen reproduzierbar an einer Messstelle vorbeigeführt werden können. Die Verstopfungsneigung wird als reduziert angegeben.

Probenzuführung mit elektrokinetischer Fokussierung

In einem inhomogenen elektrischen Feld erfahren Zellen wegen des induzierten Dipolmoments eine Kraft entlang des Feldgradienten (Dielektrophorese). Dadurch können sie bewegt bzw. fokussiert werden. Die Richtung der Kraft hängt von der Polarisierbarkeit der Zelle und des umgebenden Mediums (meist physiologische Kochsalzlösung) ab. Ist die Polarisierbarkeit der Zellen höher als des Mediums, werden die Zellen hin zu größeren Feldstärken gezogen (positive Dielektrophorese), ist sie geringer, werden sie hin zu kleineren Feldstärken gezogen (negative Dielektrophorese). Die Richtung der resultierenden Kraft hängt also nicht von der Richtung des elektrischen Feldes als viel mehr von der Richtung des Feldgradienten ab. Günstigerweise kann daher eine Wechselspannung an die Elektroden gelegt werden und dadurch eine Elektrodenkorrosion oder eine Gasentwicklung vermieden werden [Voldo2].

Die Dielektrophorese zur Ausrichtung von Partikeln oder Zellen wird in mehreren Veröffentlichungen beschrieben [Leu05], [Schr99], [Wan03], [Cheu05], [Holm04]. T. S. Leu brachte Elektroden in einem $2^{1/2}$ -dimensionalen sich verjüngenden Kanal an den seitlichen Kanalwänden an [Leu05]. Die Größenordnung der Kanäle entspricht den üblichen in der Mikrodurchflusszytometrie verwendeten. Die Elektroden werden mit einer Wechselspannung von 10 V und einer Frequenz von 1 MHz versorgt. Die Zellen lassen sich sehr gut bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten im Bereich von wenigen Mikrometern pro Sekunde fokussieren. Auch D. Schrum gelingt die elektrokinetische Fokussierung [Schr99]. Er gibt an, dass der Probenstrom in einem 100- μm -Kanal auf 8 μm fokussiert wird. Auch hier scheinen die Strömungsgeschwindigkeiten sehr gering zu sein, da der Durchsatz lediglich zwischen 15 und 50 Zellen pro Sekunde beträgt. D. Holmes beschreibt eine elektrokinetische Fokussierung mit anschließendem Sortierer [Holm04]. Damit werden 6- μm -Latexpartikel in einem 80- μm -Kanal fokussiert und anschließend sortiert. Die angelegten elektrischen Spannungen betragen 20 V bei einer Frequenz von 1 MHz. Die Strömungsgeschwindigkeit beträgt hierbei 1,5 mm/s.

Diese Art der Fokussierung funktioniert nur bei sehr langsamen Strömungsgeschwindigkeiten, da die wirkenden elektrischen Kräfte im Vergleich zu den sonstigen Kräften in einer Strömung sehr klein sind.

Probenzuführung mit 1-dimensionaler hydrodynamischer Fokussierung

Der überwiegende Teil der mikrostrukturierten Durchflusszytometer wird mit lithographischen Fertigungsverfahren hergestellt (siehe Kapitel 4.3, Seite 40). Mit lithographischen Fertigungsverfahren können vorzugsweise $2^{1/2}$ -dimensionale Strukturen gefertigt werden wie beispielsweise in Abbildung 3.3 dargestellt. Mit derartigen Strukturen lassen sich nur 1-dimensionale hydrodynamische Fokussierungen realisieren. Der Hüllstrom wird lediglich seitlich an den Probenstrom herangeleitet. Eine Hüllstromzuführung senkrecht dazu fehlt. Aus diesem Grund wird der Probenstrom nicht zu einem Stromfaden sondern zu einem Stromband fokussiert. Eine definierte Positionierung eines Partikels ist dadurch nur in einer Dimension gegeben. Die hydrodynamische

Fokussierung funktioniert auch bei größeren Strömungsgeschwindigkeiten im Gegensatz zur Dielektrophorese.

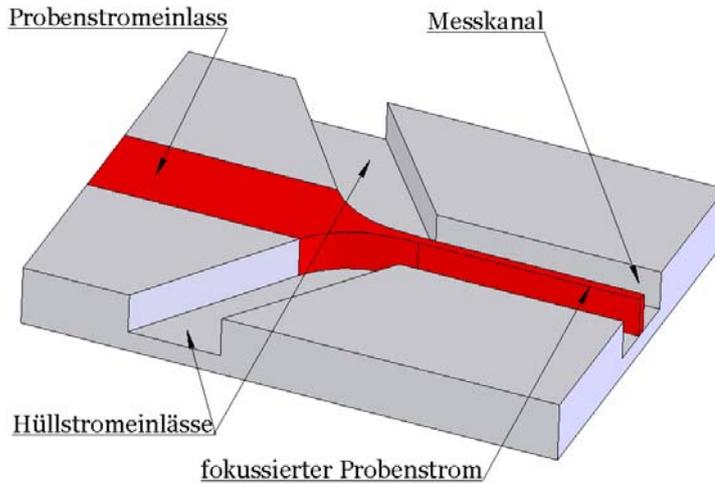


Abbildung 3.3: 1-dimensionale hydrodynamische Fokussierung

Eine 1-dimensionale hydrodynamische Fokussierung in einem mikrostrukturierten Durchflusszytometer wird in mehreren Veröffentlichungen vorgestellt [Blan98], [Krüo2], [Clai01], [Wano4], [Lino2], [Lino3], [Ver03], [Miyao4]. Am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte wurde ebenfalls in Vorarbeiten zu dieser Dissertation ein mikrostrukturiertes Durchflusszytometer mit einer 1-dimensionalen Fokussierung aufgebaut [Tucho4]. Abbildung 3.4 zeigt eine Mikroskopaufnahme der mittels LIGA-Technik gefertigten Struktur.

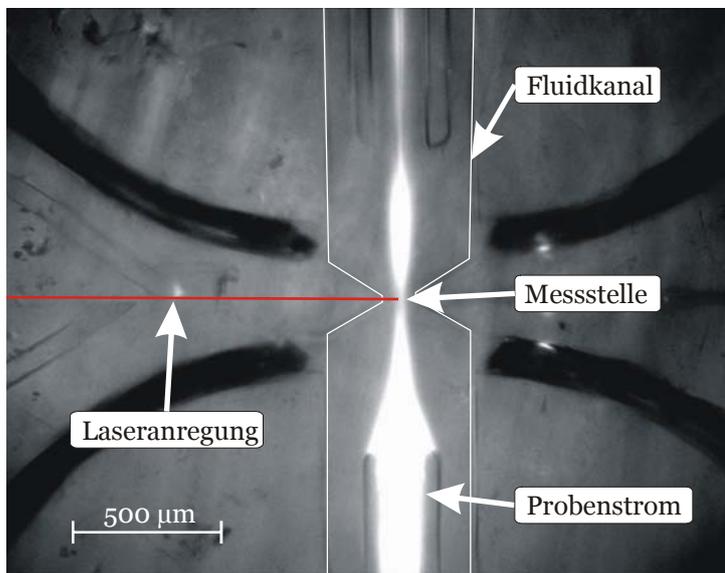


Abbildung 3.4: Mikroskopaufnahme einer 1-dimensionalen Fokussierung in einer lithographisch hergestellten Mikrostruktur

Probenzuführung mit 2-dimensionaler hydrodynamischer Fokussierung

Bei einer 2-dimensionalen Fokussierung wird der Probenstrom in zwei Ebenen verjüngt. In den untersuchten Literaturstellen über mikrostrukturierte Durchflusszytometer wird keine präzise arbeitende 2-dimensionale Fokussierung vorgestellt, die an die Leistungsfähigkeit kommerzieller Systeme herankommt.

Y.-C. Tung beschreibt ein mit Softlithographie aufgebautes Durchflusszytometer, bei dem durch einen mehrschichtigen Aufbau der Probenstrom mittig in den Hüllstrom eingeleitet werden kann [Tung02]. Eine anschließende Kanalverjüngung ist nicht integriert. Es werden keine Angaben über die Qualität der Fokussierung gemacht.

Ein weiterer Lösungsansatz wurde von A. Wolff vorgestellt [Gora01], [Wolfo0], [Wolfo3]. Die Kanalstruktur ist als 2½-dimensionale Struktur ausgeführt. Die 2-dimensionale Fokussierung wird dadurch realisiert, dass in den Hüllstrom senkrecht zur Fügeebene eine Kapillare hineinragt (siehe Abbildung 3.5). Die Kapillare wird dadurch seitlich vom Hüllstrom angeströmt. Der aus der Kapillare austretende Probenstrom wird vom Hüllstrom umflossen und mitgeführt. Damit ist auf einfache Weise gewährleistet, dass der Probenstrom von allen Seiten vom Hüllstrom umgeben ist. Eine Verjüngung der Kanalstruktur findet hier jedoch nur in einer Ebene statt. Die Breite des fokussierten Probenstroms beträgt dabei unter 100 µm in einem 500 µm breiten Messkanal.

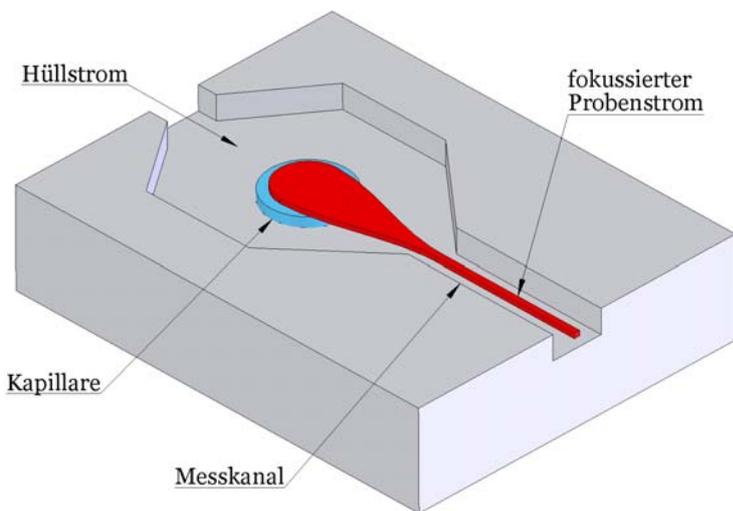


Abbildung 3.5: 2-dimensionale hydrodynamische Fokussierung aus [Gora01]

Optisches Messsystem in kommerziellen Geräten

Das optische System besteht aus einer Lichtquelle (meist ein Laser), aus einem Linsensystem zur Abbildung des Lichtes auf die Photodetektoren und aus dichroitischen Strahlteilern und Filtern zur Wellenlängenselektion des Fluoreszenz- und Streulichtes (siehe Abbildung 3.6). Passiert ein Partikel den Laserfokus, wird Licht vom Partikel in alle Richtungen gestreut. Neben der elastischen Streuung (Rayleigh-, Mie-Streuung) werden inelastische Effekte wie die Raman-Streuung und die Fluoreszenzemission beobachtet [Salz90].

Der Messkanal (fluidische Achse), die Laseranregung (optische Achse) und die Seitwärtsstreuung bzw. Fluoreszenzbeobachtung stehen jeweils senkrecht aufeinander (siehe auch Abbildung 3.2).

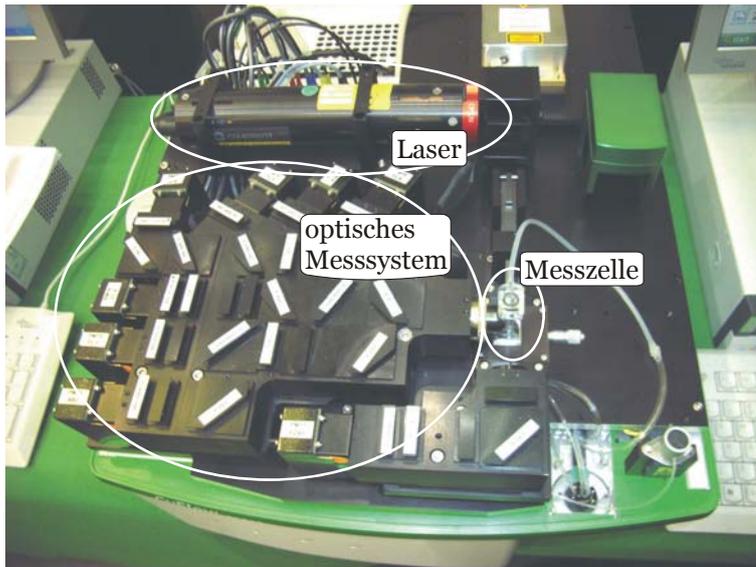


Abbildung 3.6: Aufbau eines kommerziellen optischen Durchflusszytometers (mit freundlicher Genehmigung der Firma Partec GmbH)

Zur Lichtstreuung und Fluoreszenzanregung der Zellen wird eine Freistrahloptik verwendet. Dazu werden Wellenlängen im sichtbaren (meist 488 nm bzw. 633 nm) und nahen UV-Bereich (365 nm) eingesetzt [Shap03]. Bei modernen Durchflusszytometern arbeitet man mit einem elliptischen Laserstrahlquerschnitt im Messkanal [Steen90]. Dadurch erreicht man, dass der Einfluss der Position, bei der das Partikel den Laserstrahl passiert, auf die Impulshöhe der Signale minimiert wird. Bei den derzeit kommerziell erhältlichen Durchflusszytometern beträgt der Fokus in z-Richtung 50 – 100 μm [Steen90]. In x-Richtung des Messkanals werden für den Laserstrahl wesentlich kleinere Abmessungen (im Bereich des Zelldurchmessers ca. 10 μm) gewählt. Dadurch wird die Lichtintensität erhöht und die Signallänge verkürzt. Die Vorwärtsstreuung wird in einem Winkel zwischen 2° und 10° und die Seitwärtsstreuung symmetrisch (z.B. $90^\circ \pm 30^\circ$) zum rechten Winkel zur x- und zur y-Achse aufgenommen. Die Intensität des Streulichtes in Vorwärtsrichtung beträgt ein Vielfaches der der Seitwärtsrichtung (siehe Kapitel 3.4, Seite 33).

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von Zellen ist die Extinktionsmessung. Ein passierendes Teilchen verdunkelt das transmittierte Licht (Lichtschrankenprinzip), es entsteht also ein negatives (Dunkel-) Signal. Wegen der endlichen Größe des Detektors zum Nachweis der Extinktion in Richtung der optischen Achse wird gleichzeitig Streulicht beobachtet. Die Lichtstreuung verursacht ein positives Signal. Je nach den Winkelbereichen, die mit dem Detektor beobachtet werden, können sich die beide Signale aufheben. Der Durchgang eines Teilchens ist damit nicht mehr zu erkennen [Shap03], [Steen90], [Dilla85]. Bei kommerziellen Durchflusszytometern wird die Extinktion nicht gemessen. Gründe hierfür liegen in der schwierigen Justage. Außerdem machen sich Verschmutzungen in der Küvette im Extinktionssignal stark bemerkbar.

Zur Fluoreszenzmessung werden die Zellen spezifisch über eine Antikörperreaktion mit Farbstoff angefärbt. Auf diese Weise werden zum Beispiel abnorme Zellen markiert, alle anderen nicht. So wird in der anschließenden Messung zwischen normalen und abnormen Zellen unterschieden und die verschiedenen Zelltypen quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität, die meist in einem Winkel von 90° zur optischen Achse beobachtet wird (siehe Abbildung 1.1), ist gegenüber der der Seitwärtsstreuung um mehrere Dekaden

geringer. Aus diesem Grund ist es besonders wichtig, Optiken mit einer großen numerischen Apertur zu verwenden. Die Optiken kommerzieller Systeme haben typischerweise numerische Aperturen zwischen 0,5 und 1,2 [Shap03], [Steen90], [Dilla85]. Teilweise wird zwischen Objektiv und Glasküvette ein optisches Koppelmedium (Gel) zur Erhöhung der numerischen Apertur eingebracht [Shap03].

Detektion optischer Signale in mikrostrukturierten Durchflusszytometern

Nach Schätzungen arbeiten etwa 80 % der Lab-on-a-chip-Systeme mit optischen Detektionsmethoden [Hüb04]. Durch mikrotechnische Fertigungsmethoden kann ein Aufbau realisiert werden, bei dem die Beschränkung auf die 2 Hauptrichtungen (Vorwärts-, Seitwärtsrichtung) eines kommerziellen Aufbaus entfällt.

Im Folgenden zeigen einige Beispiele die Realisierung der Detektion optischer Signale bei Mikrodurchflusszytometern (siehe Abbildung 3.7).

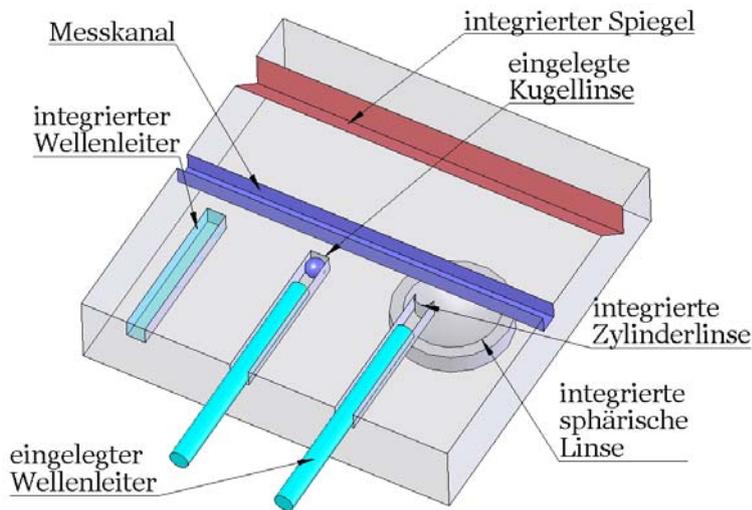


Abbildung 3.7: Darstellung verschiedener Bauelemente zur Lichtein- und Lichtauskopplung

Bei der integrierten Fertigung von Lichtwellenleitern werden in einen transparenten Analysechip zunächst Kanäle eingebracht. Anschließend werden diese Gräben mit einem transparenten Material, dessen Brechungsindex größer ist als das des umgebenden Analysechips, gefüllt. Die Oberflächen dieser Kanäle muss zur Vermeidung und Unterdrückung des Streulichts optische Qualität ($1/10$ der Wellenlänge) aufweisen. Mikrostrukturierte Analysechips mit integrierten Lichtwellenleitern werden in der Literatur mehrfach beschrieben [Hüb04], [Krü02], [Sob93], [Wan04], [Lino2], [Lino3], [Lamo3], [Kra02], [Rab05], [Henzo4].

Eine andere Möglichkeit zur Lichtleitung in Analysechips ist die Verwendung von Lichtwellenleitern. Lichtwellenleiter werden in den Mikroanalysechip in Nuten montiert. Vorteilhaft an diesem Vorgehen ist, dass die vorgesehenen Nuten keine optische Qualität aufweisen müssen. C.-H. Lin baute ein mikrostrukturiertes Durchflusszytometer auf, bei dem die Lichtein- und Lichtauskopplung mit montierten Lichtwellenleitern realisiert ist [Lino2], [Lino3].

Zur Fokussierung und zur Vergrößerung der numerischen Apertur werden mikrooptische Linsen in die Analysesysteme integriert. Mit einer montierten sphärischen Linse

lässt sich das Licht auf die gewünschte Fokusgröße bringen. Dafür bieten sich Kugellinsen an, bei denen die Orientierung keine Rolle spielt. Kugellinsen bis zu Durchmessern von 0,3 mm sind kommerziell erhältlich. Ein Beispiel für eine montierte Kugellinse in ein mit LIGA-Technik aufgebautes optisches System findet sich unter [Ruz00].

Bei einem Aufbau in Form eines heißgeprägten oder spritzgegossenen Analysechips können sphärische Linsen, deren optische Achsen senkrecht zur Entformungsebene stehen, in das Formwerkzeug integriert werden. Auch Zylinderlinsen, deren Zylinderachsen senkrecht zur Entformungsebene stehen, so dass keine Hinterschnitte entstehen, können mit dem Heißprägeverfahren hergestellt werden. Mit Zylinderlinsen ist eine Fokussierung in einer Ebene möglich, so dass sich elliptische Strahlquerschnitte ergeben. Solche Linsen sind zum Beispiel von Z. Wang in einem mikrostrukturierten Durchflusszytometer realisiert worden [Wan04].

Impedanzmessung

Zur Messung der Impedanz wird ein elektrisches Feld im Messkanal aufgebaut. Durch den Durchgang eines Teilchens ändert sich der Widerstand des Messraums. Wesentlich dabei ist die Anordnung der Elektroden und damit die Ausrichtung des elektrischen Feldes [Shap03], [Kac90a]. In kommerziellen Durchflusszytometern verläuft das elektrische Feld in Richtung der fluidischen Achse durch den Messraum. In mikrotechnisch gefertigten Durchflusszytometern besteht auch die Möglichkeit, das elektrische Feld quer zum Fluss auszurichten (siehe Abbildung 3.9).

Der klassische Aufbau eines Impedanz-Zellzählgerätes sieht wie folgt aus (siehe Abbildung 3.8): Ein Behälter wird durch eine Trennwand in zwei Bereiche mit je einer Platinelektrode geteilt. Die Probensuspension befindet sich auf der einen Seite und fließt druckgetrieben durch eine kleine Messöffnung zur anderen Seite. Die Zellen passieren den Messraum auf Grund der hohen Verdünnung und dem geringen und an die Zellgröße angepassten Durchmesser von 50 μm – 100 μm überwiegend einzeln. Die Länge der Messöffnung entspricht etwa dem Durchmesser. Je kleiner das Volumen des Messraums ist, desto empfindlicher wird die Messung. Allerdings neigen zu kleine Öffnungen zu Verstopfungen und können daher bei Routineanwendungen nicht eingesetzt werden. Mit größer werdendem Volumen treten häufiger Doppelpassagen (Koinzidenzen) auf [Shap03], [Kac90a].

Außerhalb der Messöffnung nimmt das elektrische Feld rasch an Stärke ab. Der Einfluss der Zellen, die sich außerhalb der unmittelbaren Umgebung der Messstelle befinden, auf den Widerstand nimmt daher stark ab.

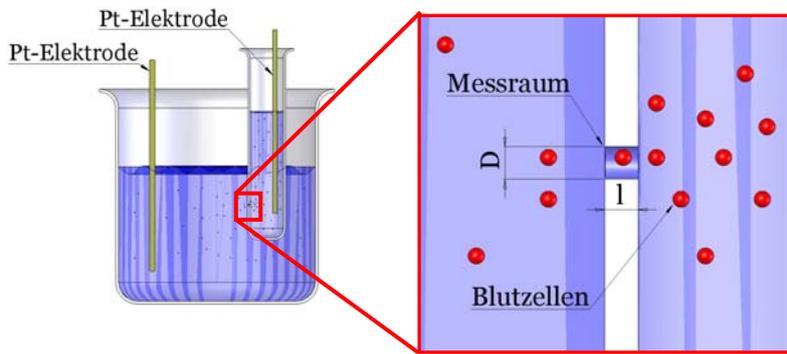


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Impedanz-Zellzählgerätes

Impedanzmessung in Mikrostrukturen

Durch mikrotechnische Fertigungsverfahren ist es möglich, die Elektroden direkt in den Messkanal einzubringen (siehe Abbildung 3.9). Das vom elektrischen Feld eingenommene Messvolumen kann verkleinert werden, um eine verbesserte Empfindlichkeit zu erreichen.

Wird ein Aufbau mit einer vorgeschalteten hydrodynamischen Fokussierung gewählt, wie in Abbildung 3.9 gezeigt, werden die Zellen auf im Zentrum des Messkanals geführt. Im Vergleich zu konventionellen Impedanz-Zellzählern ohne hydrodynamische Fokussierung wird der störende Einfluss der Zellen, die sich in der unmittelbaren Nähe der Messstelle befinden, vermieden.

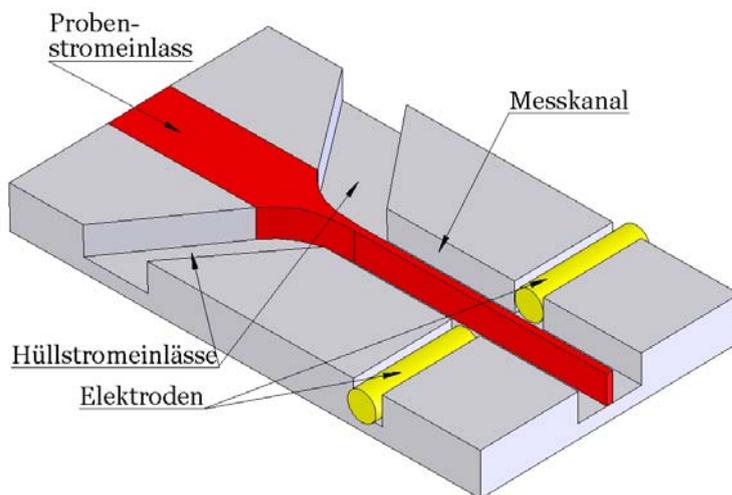


Abbildung 3.9: Impedanzmessung mit montierten Mikroelektroden

Untersuchungen zum Thema Impedanzmessung von Partikeln und Zellen in Mikrostrukturen wurden von S. Gawad durchgeführt [Cheu05], [Gaw01], [Gaw04]. Er beschreibt einen Analysechip, aufgebaut durch mehrere Lithographie- und Sputterprozesse, bei dem in einen Mikrokanal flache Elektroden von 30 μm Breite quer zur Flussrichtung eingebracht wurden. Mit diesem Analysechip wurden Streudiagramme von Polystyrolkugeln mit einer Zählrate von 16 Hz und einer Wechselstromfrequenz von 350 kHz bis 20 MHz aufgenommen. Es konnten damit Durchmesser von 4 μm , 5 μm und 6 μm unterschieden werden.

Aufnahme und Auswertung der Signale

Das Licht wird über ein optisches System bestehend aus Spiegeln, Filtern und Linsen auf einen Photodetektor geleitet. Hier kommen meist Photodioden für den Nachweis der Vorwärtsstreuung und Photomultiplier für den der seitlichen Streuung und Fluoreszenz zum Einsatz. Die verschiedenen oben angegebenen Messgrößen werden simultan mit Hilfe eines Vielkanal-Impulshöhenanalysators mit einer Amplitudenauflösung von typisch 12 Bit registriert [Shap03], [Mela91]. Eindimensionale Datensätze werden in Form von Histogrammen, in denen die Häufigkeit über die Signalhöhe aufgetragen ist, dargestellt. Werden mehrere Messgrößen für jede Zelle aufgenommen, werden die Signalhöhen als zweidimensionale Streudiagramme aufgetragen. Ein typisches Streudiagramm einer verdünnten Vollblutprobe zeigt Abbildung 3.10. Ein Punkt im Diagramm der beiden ausgewählten Messgrößen entspricht dabei einer Zelle. Die Häufigkeit kann in derartigen Diagrammen in Falschfarben sichtbar gemacht werden. Zur Lichtstreuung wird z.B. die Wellenlänge 413,1 nm verwendet. Auf der Abszisse ist der Streuwirkungsquerschnitt der Vorwärtsstreuung im Winkelbereich von $3,3^\circ$ bis $17,4^\circ$ aufgetragen, auf der Ordinate der der Seitwärtsstreuung im Winkelbereich von $90^\circ \pm 27^\circ$. Die verschiedenen zellulären Bestandteile (RBC: Erythrozyten, Ly: Lymphozyten, G: Granulozyten, M: Monozyten) bilden Punktwolken oder Cluster. Die Abgrenzung erlaubt die Bestimmung der relativen Konzentrationen der entsprechenden Zellpopulationen.

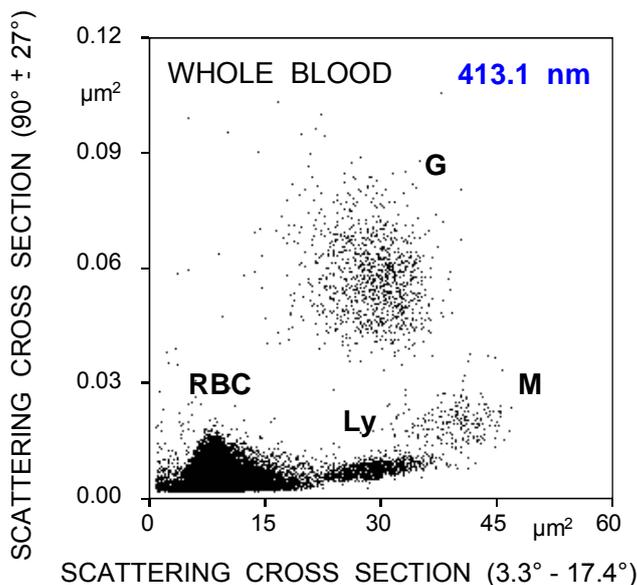


Abbildung 3.10: Streudiagramm von Vollblut, aufgenommen mit einem in konventioneller Technik aufgebauten Forschungsinstrument [Ost98]

Leistungsfähigkeit eines Durchflusszytometers

Die Leistungsfähigkeit der Durchflusszytometer wird anhand folgender Parameter charakterisiert [Shap03], [Steen90]:

Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit eines optischen Durchflusszytometers wird von mehreren Faktoren bestimmt. Von Bedeutung sind dabei das fluidische System, insbesondere die Qualität und Stabilität der hydrodynamischen Fokussierung und die Optik [Shap03],

[Steen90]. Bei der Wechselwirkung der Partikel mit den Laserstrahlen sind folgende Parameter wesentlich:

- die eingestrahelte Lichtintensität,
- die Wechselwirkungszeit (Zeit, die das Teilchen im Laserfokus verweilt),
- die Fluoreszenzintensität (die proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle ist),
- die numerischen Apertur der Optik,
- die Transmission der optischen Bauteile (Filter, Linsen, optische Wellenleiter, etc.),
- die Empfindlichkeit der Detektoren,
- der Signaluntergrund, zum Beispiel verursacht durch Reflexionen an optischen Grenzflächen.

Entsprechend der Anwendung können einzelne Parameter optimiert werden. Um beispielsweise eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen, muss die Wechselwirkungszeit erhöht werden. Damit wird die Zählrate jedoch reduziert und der Durchsatz verringert.

Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient (CV) wird als relative Standardabweichung σ dividiert durch den Mittelwert \bar{x} der Signale angegeben [Shap03], [Steen90]:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}}. \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Der Variationskoeffizient hängt sowohl von den Eigenschaften des Durchflusszytometers als auch von den Eigenschaften der Testpartikel ab. Stehen Kalibrationskügelchen mit identischen Eigenschaften (zum Beispiel identisches Volumen, identische Fluoreszenzintensität) zur Verfügung, spiegelt der Variationskoeffizient die Charakteristik des Messsystems wider. Dabei spielen die Güte und Stabilität der hydrodynamischen Fokussierung und die Qualität der optischen und elektrischen Komponenten (Lichtquelle, Übertragungssystem und Photodetektoren, etc.) eine entscheidende Rolle.

Zählrate einer durchflusszytometrischen Messung

Geht man davon aus, dass die Zellen sich stochastisch verteilt in der Suspension befinden und nicht aggregiert sind, so passieren die Zellen zeitlich zufällig verteilt den Laserfokus. Die maximale Zählrate K_m hängt vom akzeptablen Prozentsatz der Koinzidenzen f_c und der Signallänge t_p ab [Steen90]:

$$K_m = \frac{f_c}{100 \cdot t_p}. \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Ein Beispiel soll diesen Zusammenhang verdeutlichen. Die Signallänge hängt ab vom Durchmesser des Teilchens (zum Beispiel 10 μm) und vom Durchmesser des Lasers im Messkanal (zum Beispiel 10 μm). Bei den gegebenen Werten und einer Strömungsgeschwindigkeit im Messkanal von 10 m/s ergibt sich eine Signallänge von etwa 2 μs . Kann ein Koinzidenzverlust und damit ein f_c von 1 % akzeptiert werden, so beträgt die maximale Zählrate $K_m = 5000$ Zellen/s. Aus Gleichung 3.2 ist ersichtlich, dass eine

Erhöhung der Zählrate bei gleichen Zählverlusten nur über eine Verkürzung der Signallänge t_p zu erreichen ist. Entweder wird die Strömungsgeschwindigkeit erhöht oder Die x-Ausdehnung des Laserstrahls im Messkanal verkleinert.

Zur Orientierung seien typische Kennwerte eines modernen optischen Durchflusszytometers genannt: Die kleinsten in der Vorwärtsstreuung nachweisbaren Partikel haben einen Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$. Variationskoeffizienten bei der Messung der Lichtstreuung von $5\text{-}\mu\text{m}$ -Partikeln betragen wenige Prozente. Die Zählraten moderner Durchflusszytometer liegen in Kilohertzbereich [Shap03]. Durchflusszytometer zum Sortieren von Zellen, die auf einen sehr hohen Durchsatz ausgelegt sind, erreichen teilweise 100 kHz .

3.2 Hämatologische Grundlagen

Blut besteht aus Blutplasma und verschiedenen Blutzellen. Zur Unterstützung der medizinischen Diagnostik werden mit durchflusszytometrischen Messungen die zellulären Bestandteile des Blutes oder anderer Körperflüssigkeiten analysiert. Aus den Messungen kann die Anzahl der verschiedenen Blutzellen, sowie deren Größe, Form, Volumen, Brechungsindex und die Leitfähigkeit abgeleitet werden. Tabelle 3.1 und Abbildung 3.11 geben einen Überblick über die Eigenschaften verschiedener Blutzellen.

	Mittlere Konzentration in $1/\text{nl}$	Mittleres Volumen in fl	Mittlerer Durchmesser in μm	Mittlere Dicke in μm	Form	Brechungsindex bei $632,8 \text{ nm}$
Erythrozyten	5000	85	ca. 7,5	2	bikonkave Scheiben	1,41
Leukozyten						
Lymphozyten	2,2	230	ca. 7		amöboid beweglich	ca. 1,37
Granulozyten	4,4	450	10 - 17		amöboid beweglich	ca. 1,37
Monozyten	0,5	470	12 - 20		amöboid beweglich	ca. 1,37
Thrombozyten	250	6	1 - 4	0,5 - 0,75	Plättchen	ca. 1,37

Tabelle 3.1: Übersicht über die zellulären Anteile im Blut und deren Eigenschaften [Schm05]

Der Volumenanteil der roten Blutzellen (Hämatokritwert) beträgt bei Frauen ca. 42% , bei Männern ca. 47% [Schm05].

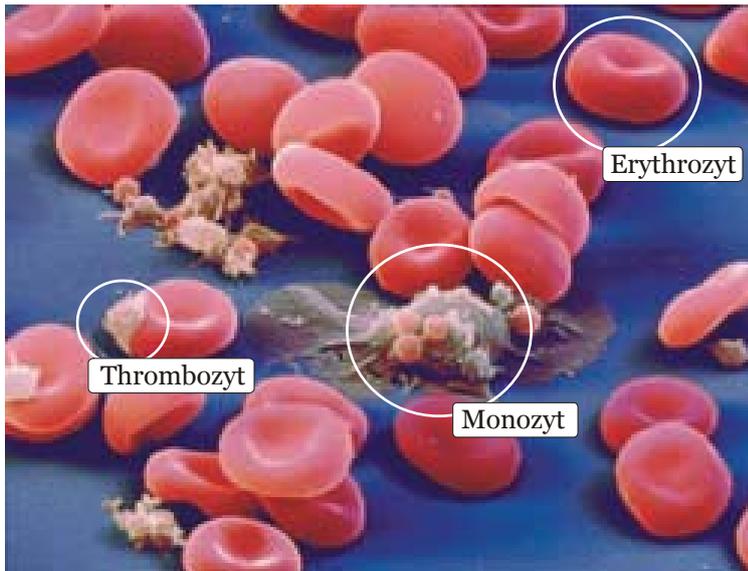


Abbildung 3.11: Nachbearbeitete Rasterelektronenmikroskopaufnahme verschiedener Blutzellen [set06]

Für die elektrische Leitfähigkeit sind der Aufbau der Zellmembran und das Zellinnere verantwortlich. Auf Grund der niedrigen Leitfähigkeit der Zellmembran können alle Blutzellen gegenüber Gleichstrom als nicht leitfähig eingestuft werden. Bei höheren Frequenzen sinkt der kapazitive Widerstand der Zellmembran, und das Zellinnere bestimmt in zunehmendem Maß die Impedanz [Shap03], [Kac90a].

Die dynamische Viskosität von Vollblut beträgt 4,5 mPas, die von Blutplasma beträgt ca. 2,2 mPas. Zum Vergleich sei die dynamische Viskosität von Wasser mit 1,0087 mPas genannt [Schm05].

3.3 Fluidische Grundlagen

Wegen der Gaußförmigen Intensitätsverteilung des Laserfokus und wegen des inhomogenen elektrischen Felds, ändern sich die aufgenommenen Signalhöhen bei einer Abweichung der Zelle von der idealen Strombahn (Trajektorie) im Zentrum des Messkanals. Nur wenn die Zellen auf eng tolerierten Trajektorien die Messstelle passieren, können kleine Variationskoeffizienten erreicht werden. Daher muss eine stabile und präzise hydrodynamische Fokussierung angestrebt werden. Im Folgenden werden die Strömungsverhältnisse der hydrodynamischen Fokussierung und des Messkanals genauer betrachtet.

Grundgleichungen der Strömungsmechanik

Navier-Stokes Gleichungen für ein inkompressibles Fluid

Bei den Navier-Stokes-Gleichungen handelt sich um die Impuls-Differentialgleichungen für ein Newtonsches Fluid. Sie werden gebildet, indem in die allgemeine Impulsbilanz für ein Fluidelement die linearen Zusammenhänge zwischen Spannungen und Verformungsgeschwindigkeiten am Fluidteilchen eingesetzt werden. Zusammen mit der Kontinuitätsgleichung stellen die drei Komponenten der Vektorim-

pulsgleichung (in die drei Raumrichtungen) ein System aus vier Differentialgleichungen zur Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeiten in x-,y-, und z-Richtung dar [Herwo4].

Neben einigen exakten Lösungen für spezielle Strömungen existieren allgemeine Lösungen nur in Form numerischer Approximationslösungen. Die FEM-Rechnungen in Kapitel 5 (Seite 60) beruhen auf diesem Gleichungssystem.

Bernoulli-Gleichung

Die Bernoulli-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen dem statischen Druck p , der Dichte des Fluids ρ und der Strömungsgeschwindigkeit v in idealen Flüssigkeiten [Herwo4]. Sie kann aus den Navier-Stokes-Gleichungen abgeleitet werden, indem die innere Reibung vernachlässigt wird. Sie lautet:

$$\frac{1}{2}\rho \cdot v^2 + \rho \cdot g \cdot h + p = \text{const} . \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Der Term $\rho g h$, in dem g die Erdbeschleunigung bedeutet, beschreibt den hydrostatischen Druck, der von der Tiefe h unter der Oberfläche abhängt. Die Gleichung bedeutet, dass die Summe aus dynamischem Druck, Schweredruck und statischem Druck konstant ist. Nimmt die Strömungsgeschwindigkeit zum Beispiel auf Grund einer Querschnittsverjüngung in einem Rohr zu, so sinkt der statische Druck [Herwo4]. Dieser Effekt spielt bei der hydrodynamischen Fokussierung eine große Rolle. Der mittlere Term kann vernachlässigt werden, da der Druck durch die Höhe der Flüssigkeitssäule (außerhalb des Analysechips) gegenüber dem Druck im Behälter für die Hüllstromflüssigkeit gering ist.

Rohrströmung mit einem parabelförmigen Strömungsprofil

Eine exakte Lösung der Navier-Stokes-Gleichungen kann für ausgebildete laminare Rohrströmungen mit runder Querschnittsfläche (siehe Abbildung 3.12) angegeben werden. Die Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit v von r_{fluid} lautet [Herwo4]:

$$v(r_{\text{fluid}}) = 2 \cdot \bar{v} \cdot \left[1 - \left(\frac{2 \cdot r_{\text{fluid}}}{D} \right)^2 \right] . \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Die Größe \bar{v} bezeichnet die mittlere Strömungsgeschwindigkeit, D den Durchmesser des Messkanals. Die maximale Strömungsgeschwindigkeit v_{max} ist:

$$v_{\text{max}} = 2 \cdot \bar{v} . \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Die Strömungsverhältnisse sind zur Verdeutlichung der Zusammenhänge in Abbildung 3.12 dargestellt.

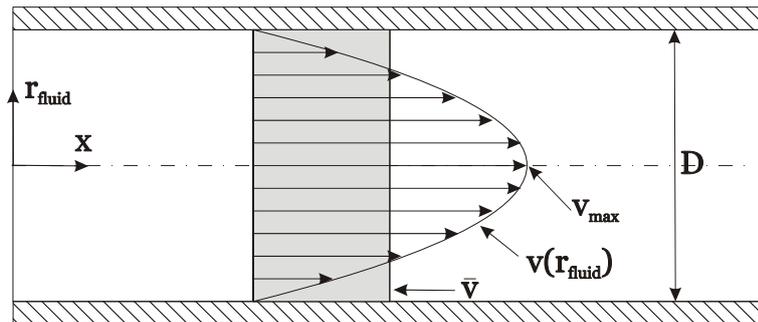


Abbildung 3.12: ausgebildetes parabelförmiges Strömungsprofil in einem Rohr

Bei rechteckigen Kanälen, wie sie überwiegend bei mikrostrukturierten Durchflusssy-
tometern vorkommen, muss zur Berechnung an Stelle des Rohrdurchmessers D der
hydraulische Durchmesser D_{hyd} verwendet werden. D_{hyd} ist definiert als [Siek01]:

$$D_{\text{hyd}} = \frac{4 \cdot A}{U} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

A ist die Querschnittsfläche und U der Umfang des Kanals. Bei einem quadratischen
Querschnitt ist der hydraulische Durchmesser D_{hyd} gleich der Seitenlänge des Quadrats.

Mit der Hagen-Poiseuille-Gleichung kann der Volumenstrom \dot{V} unter laminaren Strö-
mungsverhältnissen in einem Rohr berechnet werden [Herwo4]:

$$\dot{V} = \frac{2\pi \cdot D^4 \cdot \Delta p}{\eta \cdot l} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Dabei bedeuten Δp die Druckdifferenz, die über einem Rohrabschnitt der Länge l ab-
fällt, und η die dynamische Viskosität des Fluids.

Gesetz von Stokes

Das Gesetz von Stokes beschreibt die Reibungskraft F auf einen sphärischen Körper mit
dem Durchmesser D_{Teilchen} , das sich mit einer relativen Geschwindigkeit v durch ein
Fluid der Viskosität η bewegt [Herwo4]:

$$F = 3 \cdot \pi \cdot D_{\text{Teilchen}} \cdot \eta \cdot v \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Reynolds-Zahl

Grundsätzlich können zwei verschiedene Strömungen in Rohren unterschieden werden:
laminare und turbulente Strömungen. Bei einer laminaren Strömung strömt das Fluid
in parallelen Schichten. Turbulente Strömungen sind durch eine Verwirbelung quer zur
Strömungsrichtung gekennzeichnet, dabei kommt es zu einer Durchmischung der
einzelnen Strömungsschichten. Dieser Übergang von laminar zu turbulent findet bei
einer kritischen Reynolds-Zahl Re_{krit} statt.

Die Reynolds-Zahl Re ist eine dimensionslose Kennzahl. Sie stellt das Verhältnis Träg-
heits- zu Zähigkeitskräften dar. Re ist definiert als [Herwo4]:

$$Re = D\rho\bar{v}/\eta = D\bar{v}/\nu \quad \text{Gleichung 3.9}$$

D ist der Durchmesser des Strömungskanals, ρ die Dichte des Fluids und ν die kinema-
tische Viskosität η/ρ .

In der Literatur wird für die kritische Reynolds-Zahl in makroskopischen Rohren meist der Wert 2300 angegeben [Herwo4]. Je kleiner die Dimensionen werden, desto größer wird der Einfluss der Oberflächenqualität. Die Abhängigkeit der kritischen Reynolds-Zahl in Mikrokanälen von der Wandrauheit lautet [Taylo5], [Kando5]:

$$Re_{krit} = 2300 - 18750 \cdot (R_{max}/D) \quad \text{Gleichung 3.10}$$

für $0 < R_{max}/D < 0,08$. Dabei bedeuten Re_{krit} die kritische Reynolds-Zahl, R_{max} die maximale Rautiefe der Seitenwände und D der Durchmesser der Mikrokanäle.

Um eine hydrodynamische Fokussierung zu erreichen, müssen sowohl in den Zuführungskanälen als auch im Messkanal laminare Strömungen herrschen. Bei einem Messkanal mit einem Durchmesser $D = 100 \mu\text{m}$ und einer Rautiefe $R_{max} = 1 \mu\text{m}$ beträgt demnach die kritische Reynolds-Zahl Re_{krit} 2212.

Die kinematische Viskosität von Wasser beträgt bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ $\nu = 1,0087 \text{ mm}^2/\text{s}$. Damit liegt beispielsweise bei einer mittleren Strömungsgeschwindigkeit von 10 m/s und einem Kanaldurchmesser von $0,1 \text{ mm}$ die Reynolds-Zahl bei ca. 1000. Selbst bei diesen sehr großen Strömungsgeschwindigkeiten bleibt die Reynolds-Zahl damit unter dem kritischen Wert.

Beschleunigung der Strömung bei der hydrodynamischen Fokussierung

Eine detaillierte Betrachtung erfordern die Strömungsverhältnisse im trichterförmigen Bereich der hydrodynamischen Fokussierung (Verjüngung). Eine Berechnung der Strömungsverhältnisse kann nur mittels FEM-Simulation erfolgen (siehe Kapitel 5, Seite 60). Mit Hilfe einer einfachen analytischen Betrachtung können dennoch einige wichtige Aussagen getroffen werden. Im Bereich der Verjüngung wird das Fluid stark beschleunigt. Dies hat Auswirkungen auf die mit dem Fluid transportierten Zellen.

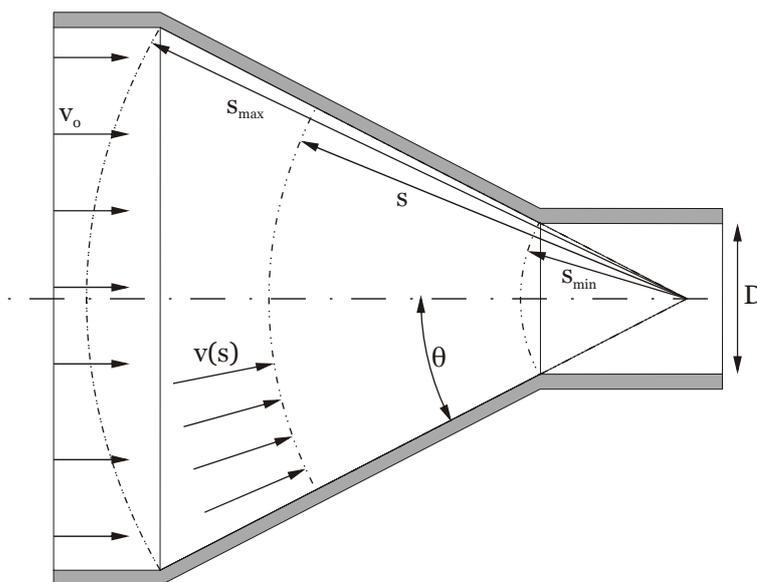


Abbildung 3.13: Darstellung der geometrischen Größen bei der Verjüngung der hydrodynamischen Fokussierung

Die hydrodynamische Fokussierung soll durch eine konzentrische trichterförmige Struktur mit einem Öffnungswinkel 2θ vereinfacht werden (siehe Abbildung 3.13). Vernachlässigt man die Viskosität und die Effekte der Randströmung, so kann die Strömungsgeschwindigkeit $v(s)$ für den Bereich $s_{\max} > s > s_{\min}$ als [Dilla85]

$$v(s) = \frac{\dot{V}}{2\pi s^2 (1 - \cos\theta)} \quad \text{Gleichung 3.11}$$

angegeben werden. Dabei ist \dot{V} der Volumenstrom und $2\pi s^2(1 - \cos\theta)$ die Querschnittsfläche. Der Geschwindigkeitsgradient in Richtung der Strömung kann als Ableitung der Geschwindigkeit nach dem Ort angegeben werden:

$$\frac{dv}{ds} = -\frac{\dot{V}}{\pi s^3 (1 - \cos\theta)}. \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Der auftretende Geschwindigkeitsgradient über einer oval geformten Zelle sorgt dafür, dass der dem Messkanal zugewandte Teil der Zellen eine größere Geschwindigkeit aufweist als der abgewandte Teil (siehe Abbildung 3.14). Der Geschwindigkeitsgradient führt dazu, dass die Längsachse einer Zelle sich zur fluidischen Achse ausrichtet.

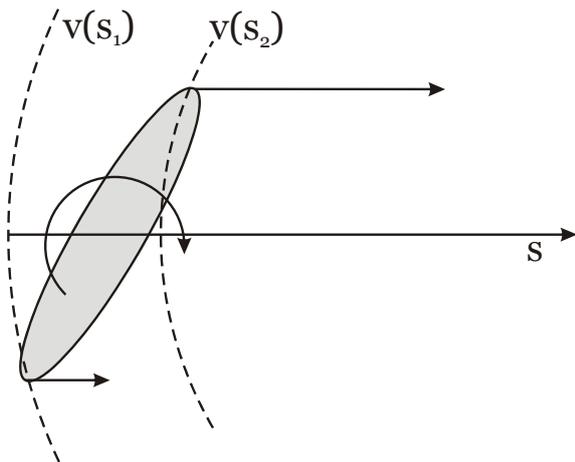


Abbildung 3.14: Darstellung der unterschiedlichen Geschwindigkeiten an einer ovalen Zelle in der Verjüngung

Dieses Verhalten wurde von V. Kachel beobachtet und beschrieben [Kac90]. Er untersuchte die Ausrichtung von Erythrozyten in der Verjüngung einer hydrodynamischen Fokussierung. Die Zellen richten sich vollständig bis zum Erreichen des Messkanals aus (siehe Abbildung 3.15). Befinden sich die Zellen auf der fluidischen Mittelachse des Messkanals, erfahren sie keine Scherkräfte, die die Ausrichtung der Zellen aufheben könnte.

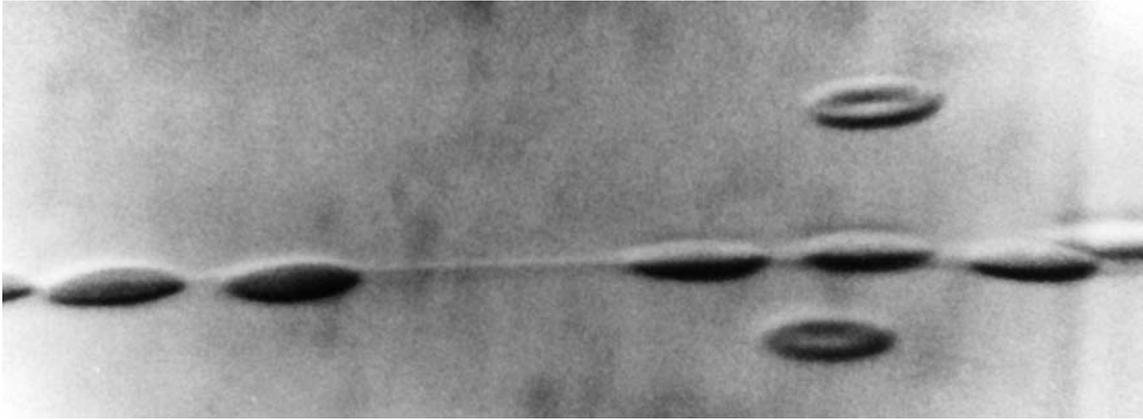


Abbildung 3.15: Mikroskopaufnahme ausgerichteter Erythrozyten [PTB, Thom69]

Ausbildung eines parabelförmigen Strömungsprofils im Messkanal

Beim Übergang der hydrodynamischen Fokussierung zum Messkanal hat sich noch kein vollständig parabelförmiges Strömungsprofil ausgebildet. Das geschieht erst im weiteren Verlauf des Messkanals stromabwärts (siehe Abbildung 3.16). Ist beim Einlauf die Geschwindigkeit konstant über dem Einlassquerschnitt verteilt, braucht die Strömung die Strecke s , um ein parabelförmiges Profil auszubilden [Dilla85]:

$$s = 0,06 \cdot D \cdot Re .$$

Gleichung 3.13

Die Strecke s hängt also von der Reynolds-Zahl Re und dem Kanaldurchmesser D ab.

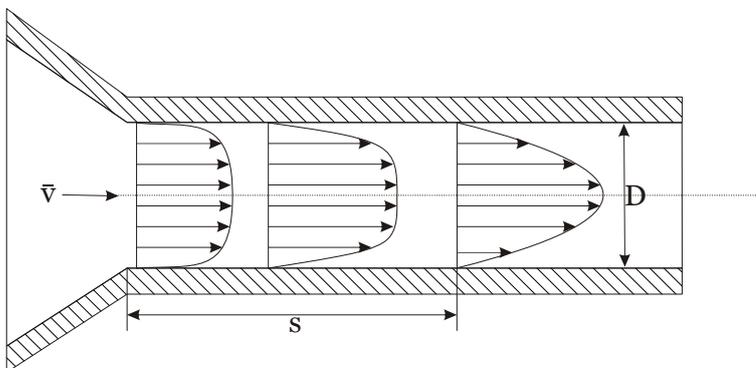


Abbildung 3.16: Ausbildung des parabelförmigen Strömungsprofils

Bei einem Messkanaldurchmesser von $D = 100 \mu\text{m}$ und einer maximalen Strömungsgeschwindigkeit $v_{\text{max}} = 3000 \text{ mm/s}$ ergeben sich für Wasser Werte für s von ca. 2 mm. Wie in Abbildung 3.16 angedeutet, ist das Strömungsprofil am Eingang des Messkanals nicht rechteckig, sondern hat sich schon durch den sich verjüngenden Trichter ansatzweise parabelförmig ausgebildet. Daher kann die abgeschätzte Strecke s eher als Maximum angesehen werden.

3.4 Optische Grundlagen

Wichtig für die einwandfreie Funktion des Durchflusszytometers ist die Größe des Laserstrahlquerschnitts im Messkanal und Intensitätsverteilung im Laserstrahl. Mit

Hilfe von Lichtwellenleitern, wie sie auch als Übertragungsmedium in der Kommunikationstechnik eingesetzt werden, lassen sich Lichtkegel erzeugen, die ein Gaußsches Intensitätsprofil haben [Vog02]. Auch die Lichtauskopplung kann mittels Lichtwellenleiter erfolgen. In diesem Kapitel werden die für die Konstruktion des mikrostrukturierten Durchflusszytometers notwendigen optischen Grundlagen erläutert.

Lichtwellenleiter

Das Grundprinzip der Lichtleitung in einem Wellenleiter beruht auf der Totalreflexion. Optische Wellenleiter sind aus zwei coaxialen Glasschichten mit verschiedenen Brechzahlen aufgebaut. Der Kern hat dabei einen höheren Brechungsindex als der Mantel, so dass das Licht im Grenzbereich Kern-Mantel totalreflektiert wird. Ein gängiger Außendurchmesser optischer Wellenleiter ist 0,125 mm. Die Kerndurchmesser liegen zwischen ca. 3 µm und 105 µm [Vog02], [Hult96].

Der Öffnungswinkel und die Intensitätsverteilung des aus einem Lichtwellenleiter abgestrahlten Lichtes sind für den Einsatz entscheidende Parameter. Der Öffnungswinkel ist gleich dem Winkel, innerhalb dessen ein Lichtstrahl auf die Stirnseite des Lichtwellenleiters treffen muss, damit er im Kern weitergeleitet wird (Akzeptanzwinkel). Der halbe Öffnungswinkel θ lässt sich aus den Brechzahlen des Mantels n_M , des Kerns n_K und des umgebenden Mediums n_U (im vorliegenden Fall entweder Luft, Wasser oder ein klarsichtiger Kunststoff) herleiten (siehe Abbildung 3.17). Es gilt [Hult96], [Vog02]:

$$n_U \cdot \sin\theta = \sqrt{n_K^2 - n_M^2} =: NA, \quad \text{Gleichung 3.14}$$

wobei NA die numerische Apertur ist. Für optische Wellenleiter wird oft anstatt der Brechzahlen von Kern und Mantel die numerische Apertur NA angegeben. Typische Werte für NA liegen im Bereich von 0,1 bis 0,3. Beispielsweise beträgt der volle Öffnungswinkel einer optischen Faser mit einer numerischen Apertur von 0,22 in einem klarsichtigen Kunststoff wie Polycarbonat ($n_{PC} = 1,59$) ca. 16°.

Für die Intensitätsverteilung des abgestrahlten Lichtes ist die Anzahl der übertragenden Moden wichtig. Die Anzahl der Moden μ hängt von der Wellenlänge λ , dem Radius des Kerns r_{Kern} und der numerischen Apertur der Faser ab. Ist

$$\frac{r_{\text{Kern}}}{\lambda} < \frac{\mu}{4 \cdot NA}, \quad \text{Gleichung 3.15}$$

so ist der entsprechende Mode μ und höhere Moden nicht übertragungsfähig [Blu98]. Eine Ausnahme bildet der Grundmode (1. Mode). Dieser ist immer übertragungsfähig. Werden 2 oder mehr Moden übertragen, interferieren diese Moden. Das Interferenzmuster bzw. die Intensitätsverteilung hängt von den Amplituden und der Phasenlage der Einzelwellen ab (siehe Abbildung 3.17). Die Phasenlage verschiebt sich in Abhängigkeit der Krümmungsradien des Wellenleiters. Zur Erzeugung eines stabilen Intensitätsprofils können Multimodefasern in den mikrostrukturierten Analysechips nicht eingesetzt werden.

Die Intensitätsverteilung des Lichtes, das aus einer Monomodefaser austritt, lässt sich mit einer Gaußfunktion beschreiben [Bäro5]:

$$I(x, z) = I_{\max}(y) \cdot \exp\left(-\frac{x^2 + z^2}{2\sigma^2}\right). \quad \text{Gleichung 3.16}$$

Die Variablen x und z sind die Abstände von der optischen Achse, $I_{\max}(y)$ ist die maximale Intensität in einem bestimmten y -Abstand vom Faserende und σ ist die Standardabweichung.

Aus der in Gleichung 3.16 gegebenen Definition für einen Gaußschen Strahl ergeben sich für $x^2 + z^2 = \sigma^2$ die $1/e^2$ -Werte. Neben den $1/e^2$ -Werten werden auch häufig die vollen Halbwertsbreiten (FWHM) zur Charakterisierung einer Gaußförmigen Verteilung angegeben. Um eine Einheitlichkeit zu schaffen, werden in dieser Arbeit die vollen Halbwertsbreiten betrachtet. Bei einer Gaußfunktion besteht die Beziehung:

$$\text{FWHM} = \sqrt{8 \cdot \ln 2} \cdot \sigma \approx 2,355 \cdot \sigma. \quad \text{Gleichung 3.17}$$

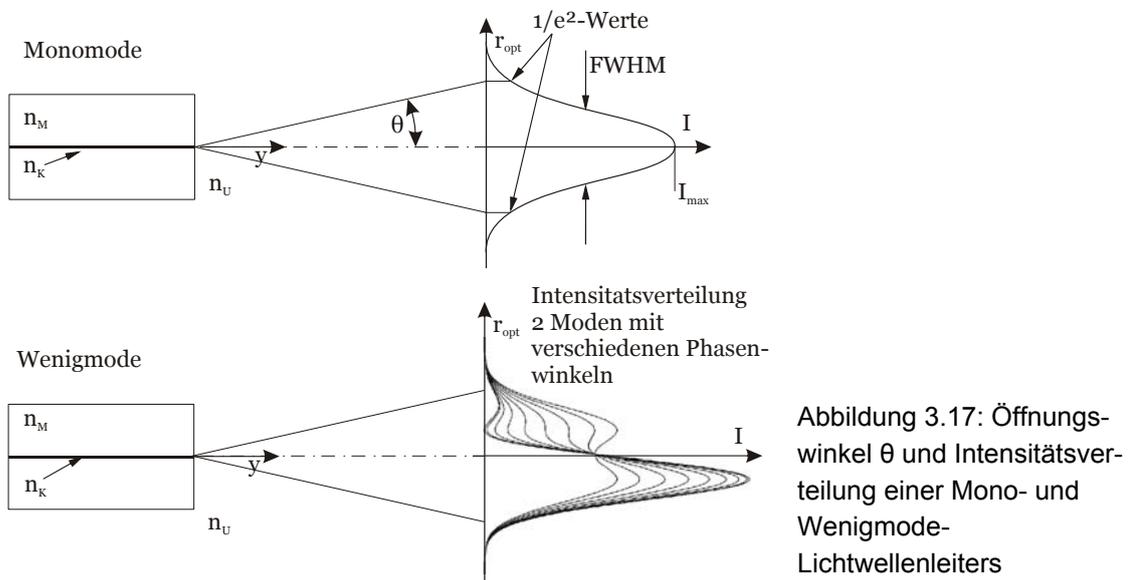


Abbildung 3.17: Öffnungswinkel θ und Intensitätsverteilung einer Mono- und Wenigmode-Lichtwellenleiters

Mie-Streuung

Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein Partikel, so wird sie gestreut. Bei Partikeln mit linearen Abmessungen bis zu $1/20$ der Wellenlänge entspricht die Winkelverteilung des Streulichtes (Rayleighstreuung) der eines einzelnen oszillierenden Dipols. Für kugelförmige, nicht absorbierende Partikel mit Durchmessern, die größer als $1/20$ der Wellenlänge sind, kann die Streulichtverteilung mit Hilfe der Mie-Theorie, die von G. Mie Anfang des 20. Jahrhundert entwickelt wurde, beschrieben werden [Misho2], [Bohr83]. Bei Partikeln von mehreren Mikrometern im Durchmesser ist bei sichtbarem Licht ($\lambda = \text{ca. } 400 - 800 \text{ nm}$) die Verwendung der Mie-Theorie erforderlich. Zur Berechnung der Lichtstreuung an beliebig geformten Mikropartikeln, zum Beispiel an Blutzellen, werden Finite-Elemente-Methoden (FEM) eingesetzt [Mishoo].

Charakteristisch für die Mie-Streuung ist, wie in Abbildung 3.18 gezeigt, die hohe Intensität der Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung. Es sind die Intensitätsverteilungen von nicht absorbierenden Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von $2 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$ und

20 μm dargestellt. Dabei ist die Streuung in Vorwärtsrichtung um mehrere Größenordnungen größer als die Streuung in die anderen Raumrichtungen. Zur Berechnung der Streulichtverteilung wurde das von C. F. Bohren veröffentlichte Programm zur Berechnung der Mie-Streuung [Bohr83] verwendet (Brechungsindizes: $n_{\text{Partikel}} = 1,5874$, $n_{\text{H}_2\text{O}} = 1,3317$, Wellenlänge: 632,8 nm). Die Streulichtverteilungen sind in Polarkoordinaten gezeigt. Die Kreise geben dabei gleiche Streulichtintensitäten an. Wegen der verwendeten logarithmischen Skala nimmt zum nächsten Kreis die Intensität um eine Größenordnung zu, d.h. die Skala variiert über insgesamt 6 Dekaden. Der Polarwinkel ändert sich von 0° (Vorwärtsrichtung) bis 180° (Rückwärtsrichtung).

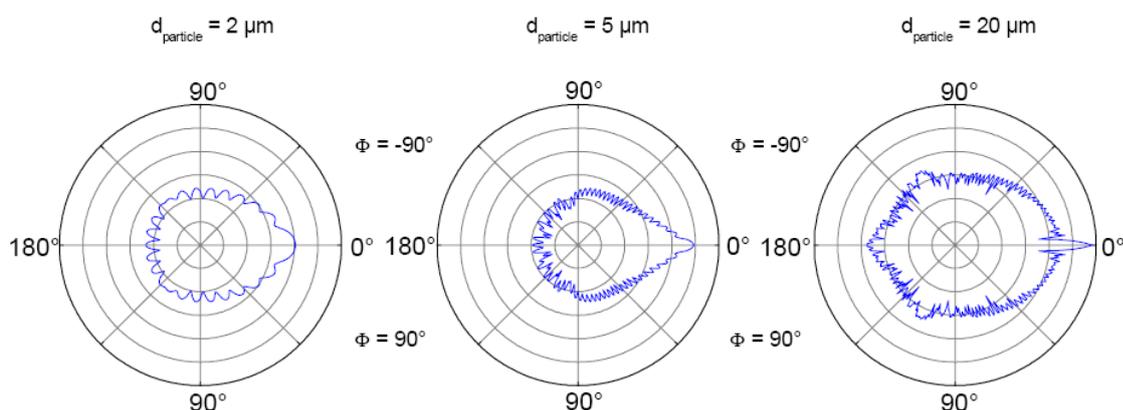


Abbildung 3.18: Streulichtverteilung von Polystyrolkugeln verschiedenen Durchmessers [PTB, Bra05]

3.5 Grundlagen zur Impedanzmessung

Eine durchflusszytometrische Impedanzmessung kann sowohl mit Gleichstrom als auch mit Wechselstrom durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird ausschließlich Gleichstrom betrachtet.

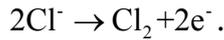
Elektrolyse und Gasblasenbildung

Zur Verdünnung der Probensuspension und als Hüllstrom wird physiologische Kochsalzlösung verwendet. Diese hat eine NaCl-Konzentration von 0,154 mmol/l und einen spezifischen Widerstand ρ_{Elek} von ca. 0,5 m/S [Ham05].

Legt man an die in die physiologische Kochsalzlösung tauchenden Elektroden eine elektrische Spannung, kommt es oberhalb einer bestimmten Spannung, der so genannten Zersetzungsspannung, zur Elektrolyse und zu einem Stromfluss. An der Kathode entsteht Wasserstoff gemäß der Reaktionsgleichung [Ham05]:



An der Anode entsteht im Wesentlichen Chlorgas. Die Anodenreaktion ist gegeben durch [Ham05]:



Gleichung 3.19

Die Zersetzungsspannung kann berechnet oder aus Tabellen abgelesen werden. Für die physiologische Kochsalzlösung mit einem pH-Wert von 7 beträgt sie ca. 1,8 V [Hamo5].

Die produzierte Gasmenge V_{Gas} kann mit dem Faradayschen Gesetz berechnet werden. Es gilt [Hamo5]:

$$V_{\text{Gas}} = \frac{I \cdot t \cdot V_{\text{mol}}}{z_{\text{wertig}} \cdot F_{\text{Fara}}}. \quad \text{Gleichung 3.20}$$

Dabei bedeuten I der Strom, t die Zeit, V_{mol} das Molvolumen von Gas (22,4 l/mol bei einem Druck von 1013 hPa und einer Temperatur von 273 K), z_{wertig} die Wertigkeit des entstehenden Gases (2 bei Wasserstoff- und Chlormolekülen) und F_{Fara} die Faradaykonstante (96485,3 C/mol).

Das entstehende Gas geht bei geringen Stromdichten in Lösung. Erhöht man die Stromdichte, kommt es zu einer Gasblasenbildung [Dink89].

Widerstände bei der Impedanzmessung

Der Klemmwiderrstand R_{Klemm} an zwei in einen Elektrolyten tauchenden Elektroden setzt sich aus den Übergangswiderständen der Elektrode-Elektrolyt-Grenzflächen R_{Grenz} , dem Elektrolytwiderstand R_{Elek} und dem Messwiderstand R_{Mess} zusammen (siehe Abbildung 3.19).

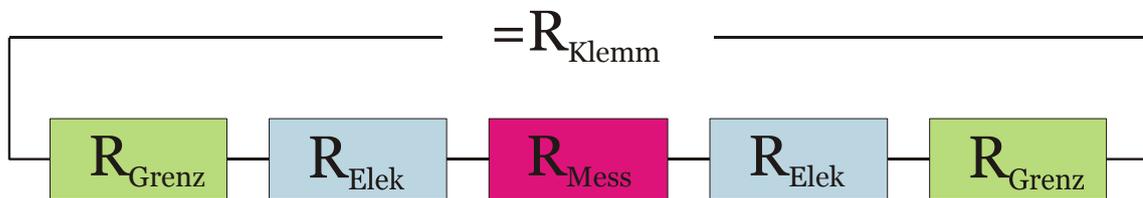


Abbildung 3.19: Ersatzschaltbild des Klemmwiderrstands

Die Übergangswiderstände der Elektrode-Elektrolyt-Grenzflächen R_{Grenz} sind nicht linear und von der elektrochemischen Reaktion, den Konzentrationen der beteiligten Reaktanden und der Überspannung abhängig. Sie können nur mit detaillierten Kenntnissen dieser Parameter berechnet werden. Der Elektrolytwiderstand R_{Elek} ist ein ohmscher Widerstand abhängig vom spezifischen Widerstand ρ_{Elek} des Elektrolyten, der Länge des Stromwegs l_{Elek} und der Querschnittsfläche A_{Elek} von den Elektroden zur Messstelle:

$$R_{\text{Elek}} = \rho_{\text{Elek}} \cdot \frac{l_{\text{Elek}}}{A_{\text{Elek}}}. \quad \text{Gleichung 3.21}$$

R_{Mess} bezeichnet den Widerstand des Messraums ohne ein Teilchen.

Widerstandsänderung beim Teilchendurchgang

Die Widerstandsänderung ΔR bei einem Teilchendurchgang hängt außer vom Volumen V_{Teilchen} auch von der Form des Teilchens und der Ausrichtung der Form zum elektrischen Feld ab. Die letzten beiden Parameter werden mit einem Formfaktor beschrieben [Thom69]. Die prinzipiellen Zusammenhänge wurden von James Clerk Maxwell für Suspensionen kugelförmiger Teilchen beschrieben [Max04]. Der Formfaktor 1,5 für eine Kugel erklärt sich wie folgt: Die Ausgangsgleichung ist der von Maxwell berechnete spezifische Widerstand ρ_{Sus} einer Suspension von Kugeln in einem sonst homogenen leitfähigen Medium:

$$\rho_{\text{Sus}} = \frac{2\rho_{\text{Teilchen}} + \rho_{\text{Elek}} + P(\rho_{\text{Teilchen}} - \rho_{\text{Elek}})}{2\rho_{\text{Teilchen}} + \rho_{\text{Elek}} - 2P(\rho_{\text{Teilchen}} - \rho_{\text{Elek}})} \cdot \rho_{\text{Elek}} \quad \text{Gleichung 3.22}$$

Dabei ist ρ_{Teilchen} der spezifische Widerstand der Teilchen, ρ_{Elek} der spezifische Widerstand des Elektrolyten und P der Volumenfüllfaktor, definiert als:

$$P = \frac{V_{\text{Teilchen}}}{V_{\text{Mess}}} \quad \text{Gleichung 3.23}$$

Dabei bedeutet V_{Mess} das Volumen des Messraums. Die Leitfähigkeit der Teilchen bzw. Zellen ist gegenüber der Leitfähigkeit des Elektrolyten wesentlich kleiner ($\rho_{\text{Teilchen}} \gg \rho_{\text{Elek}}$). Ferner gilt für große Verdünnungen der Suspension $P \ll 1$. Dadurch vereinfacht sich Gleichung 3.22 zu:

$$\rho_{\text{Sus}} \approx \left(1 + \frac{3}{2}P\right) \cdot \rho_{\text{Elek}} \quad \text{Gleichung 3.24}$$

Der nach außen messbare Widerstand R_{Sus} zwischen den Elektroden ergibt sich zu:

$$R_{\text{Sus}} = \frac{l_{\text{Mess}}}{A_{\text{Mess}}} \cdot \rho_{\text{Sus}} \quad \text{Gleichung 3.25}$$

Dabei ist l_{Mess} die Länge des Messraums und A_{Mess} der Querschnitt des Messraums. Setzt man Gleichung 3.24 in Gleichung 3.25 ein, erhält man:

$$R_{\text{Sus}} = \frac{l_{\text{Mess}}}{A_{\text{Mess}}} \cdot \rho_{\text{Elek}} + \frac{3}{2} \frac{V_{\text{Teilchen}}}{A_{\text{Mess}}^2} \cdot \rho_{\text{Elek}} = R_{\text{Mess}} + \Delta R \quad \text{Gleichung 3.26}$$

und damit den Widerstand der Teilchen bzw. des Teilchens in der Suspension:

$$\Delta R = \frac{3}{2} \frac{V_{\text{Teilchen}}}{A_{\text{Mess}}^2} \cdot \rho_{\text{Elek}} \quad \text{Gleichung 3.27}$$

Maxwells Ansatz ergibt einen Formfaktor 1,5 für Kugeln. Die Formfaktoren für weitere rotationssymmetrische Körper sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

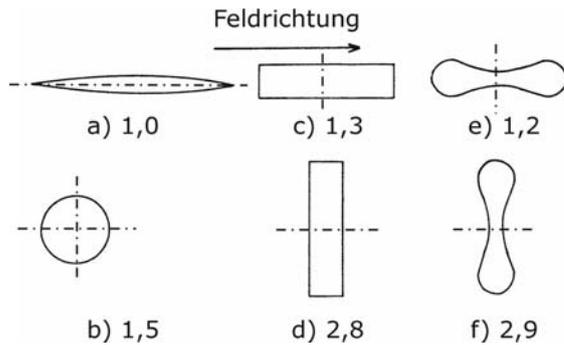


Abbildung 3.20: Formfaktoren für rotations-symmetrische Körper nach [Thom69]: a: lang gestreckter Körper entlang der elektrischen Feldrichtung ausgerichtet; b: Kugel; c, d: Scheibe mit unterschiedlicher Orientierung zur Feldrichtung; e, f: Modell für scheibenförmige Erythrozyten.

Aus Gleichung 3.26 sind drei entscheidende Fakten für die Impedanzmessung ersichtlich:

- Ist die Form und die Orientierung der Teilchen bekannt, kann aus der Widerstandsänderung auf das Volumen des Teilchens geschlossen werden.
- Die Widerstandsänderung ist umgekehrt proportional zum Quadrat des Querschnittes des Messraums. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu bekommen, muss der Messraum möglichst klein im Querschnitt gehalten werden.
- Die Widerstandsänderung ist unabhängig von der Länge des elektrischen Feldes im Messraum. Der Gesamtwiderstand jedoch hängt über R_{Mess} von der Länge des Messraums ab, und damit hängt auch das Signal-Rausch-Verhältnis von der Länge des Messraums ab.

Die prozentuale Widerstandsänderung beim Durchgang eines Teilchens durch die Messstelle kann abgeschätzt werden, indem man die Widerstandsänderung sphärischer Körper aus Gleichung 3.27 mit dem Widerstand der Messzone ins Verhältnis setzt:

$$\frac{\Delta R}{R_{\text{Mess}}} \approx \frac{3}{2} \cdot \frac{V_{\text{Teilchen}}}{A_{\text{Mess}} \cdot l_{\text{Mess}}} \approx \frac{3}{2} \cdot \frac{V_{\text{Teilchen}}}{V_{\text{Mess}}} \quad \text{Gleichung 3.28}$$

Die prozentuale Widerstandsänderung beträgt bei einem 7- μm -Kügelchen und einem Messraum von $100 \times 100 \times 50 \mu\text{m}^3$ 0,5 %. Die zu erwartenden Signale sind also relativ gering, aber dennoch gut messbar.

4 Konzeptioneller Aufbau und Auswahl der Fertigungsprozesskette

4.1 Konzeptioneller Aufbau des Analysechips

Die Probenzuführung muss derart gestaltet sein, dass die zu messenden Partikel einzeln, auf präzisen Trajektorien und mit einem hohen Durchsatz (hohe Zählrate) die Messstelle passieren. In der geschichtlichen Entwicklung der Durchflusszytometrie gab es anfänglich Ansätze der Probenzuführung ohne Fokussierung. Dabei trat häufig das Problem der Verstopfung des Messkanals auf [Mela90]. Aus diesem Grund wird eine Probenzuführung ohne Fokussierung für die Analysechips nicht verfolgt. Elektrokinetische Fokussierungen zeigen bei niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten gute Ergebnisse (siehe Kapitel 3.1, Seite 16). Die sehr geringen Strömungsgeschwindigkeiten und damit verbundenen geringen Zählraten widersprechen dem Grundgedanken der Durchflusszytometrie von einem hohen Probendurchsatz. Auch diese Art der Fokussierung wird daher für weitere Überlegungen nicht betrachtet. Eine 1-dimensionale hydrodynamische Fokussierung bietet sich für lithographische Fertigungsverfahren an und wird daher bei vielen mikrostrukturierten Durchflusszytometern eingesetzt. Damit können jedoch die zu messenden Zellen nicht auf einen Querschnitt von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ in einem $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ großen Messkanal fokussiert werden. 2-dimensionale hydrodynamische Fokussierungen dagegen haben seit langem in kommerziellen Durchflusszytometern ihre Funktionsfähigkeit bewiesen. Diese Art der Probenzuführung soll deshalb in die mikrostrukturierten Durchflusszytometer übertragen werden. Die detaillierte Ausführung des fluidischen Systems ist in Kapitel 5 (Seite 60) dargestellt.

Mit montierten Lichtwellenleitern können optische Signale in den Analysechip ein- und ausgekoppelt werden, ohne dass optischen Flächen in der Mikrostruktur geschaffen werden müssen. Aus diesem Grund empfiehlt sich dies für den Bau der ersten Labormuster. Der Analysechip muss bei einer Freistrahloptik reproduzierbar und präzise zu den im peripheren Aufbau optischen Einheiten positioniert werden. Ist dies gewährleistet, kann der Analysechip leicht ausgetauscht werden. Der optische Strahlengang kann im Analysechip durch Komponenten wie Linsen oder Spiegel geformt werden. Durch integrierte Fertigung der optischen Komponenten ist kein erhöhter Montageaufwand, wie er durch das Einlegen von zum Beispiel Lichtwellenleitern entsteht, erforderlich. Langfristig und für eine Serienproduktion eines Einweg-Chips ist der Übergang zu einer Freistrahleinkopplung sinnvoll. Im Rahmen dieser Dissertation werden Lichtwellenleiter ohne weitere mikrooptische Komponenten verwendet. Die Freistrahloptik wird durch die direkte Auskopplung der Fluoreszenz senkrecht zur Fügeebene und durch die Lichtauskopplung in der Fügeebene mit einem 45° -Spiegel realisiert und getestet.

Die Impedanzmessung wird im ersten Ansatz mit montierten Nadelelektroden realisiert. Auf Grund der Problematik der Gasblasenbildung an den Elektroden werden im zweiten Ansatz großflächige Elektroden außerhalb des Analysechips eingesetzt.

Für eine 2-dimensionale hydrodynamische Fokussierung ist eine geschlossene präzise 3-dimensionale Kanalstruktur mit Freiformflächen notwendig. Derartige Strukturen müssen durch Zusammenfügen zweier mikrostrukturierter Bauteile (Deckel und Boden) gefertigt werden. Der Aufbau der Analysechips besteht aus einem 20 x 20 mm² großen Deckel und einem Boden. In beide Komponenten werden Strukturelemente untergebracht. Daher müssen diese Komponenten präzise durch Zentrierbolzen ausgerichtet und gefügt werden. Die Analysechips müssen auf Grund des optischen Messverfahrens aus einem klarsichtigen Kunststoff hergestellt sein. Der Aufbau der mikrostrukturierten Durchflusszytometer ist in Abbildung 4.1 zu sehen.

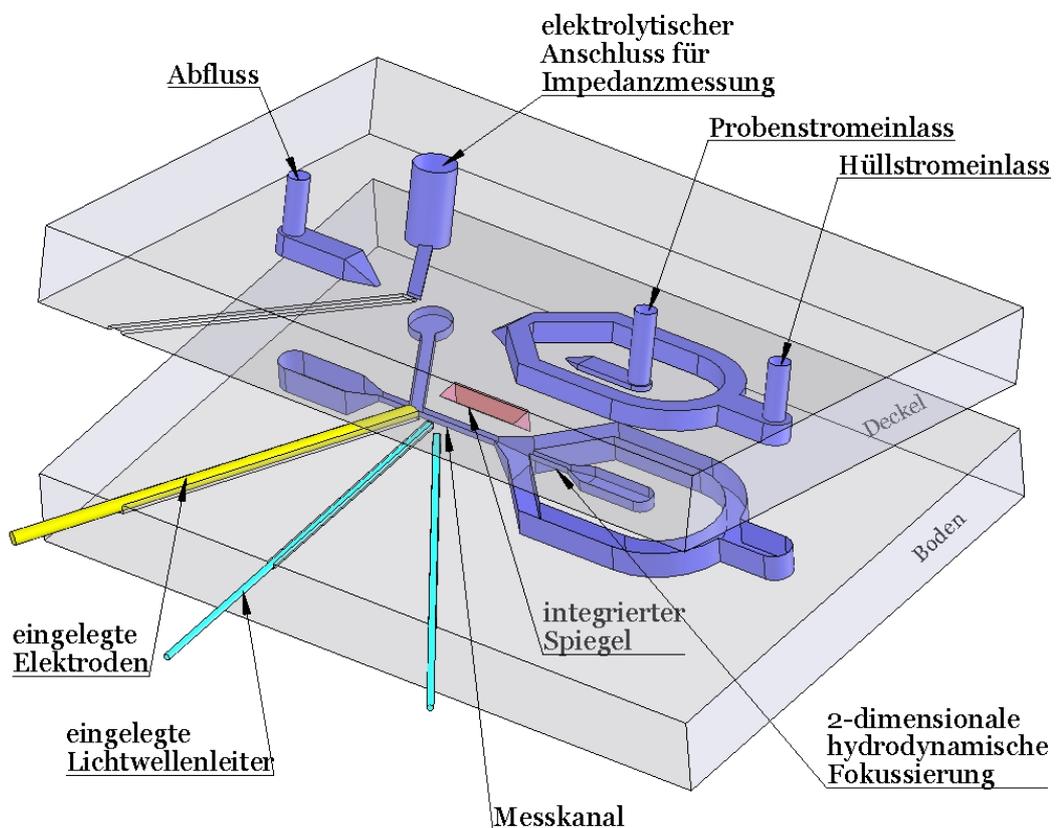


Abbildung 4.1: Konzeptioneller Aufbau des Analysechips

Der gewählte Aufbau erlaubt eine modulare Erweiterung der Funktion. Ein Mischer zur Probenvorbereitung kann direkt auf dem Analysechip oder in einer zweiten Fügeebene dem Durchflusszytometer vorgeschaltet werden. Dadurch lassen sich große Totvolumina vermeiden und die Probe kann nach dem Färbeschritt ohne zusätzlich vergrößerte Kontaktfläche in den Analyseteil des Mikrochips eingebracht werden.

Eine modulare Erweiterung ist also durch Anfügen weiterer Mikrochips und durch die Integration weitere Funktionselemente auf dem eigentlichen Analysechip möglich.

4.2 Übersicht Fertigungsstrategien

Die Analysechips werden zu Testzwecken in der Entwicklungsphase in Kleinstserien gefertigt. In dieser Phase müssen sich konstruktive Änderungen schnell umsetzen lassen. Gleichzeitig soll die Entwicklung auf einen Einweg-Analysechip in Serienfertigung hinauslaufen. Die Fertigungsprozesse müssen daher das Potenzial zu einer Serienfertigung mit hohen Stückzahlen enthalten. Fertigungsverfahren wie das Rapid-Prototyping, das direkte Fräsen der Komponenten oder das direkte Erstellen mit lithographischen Methoden werden daher nicht in Betracht gezogen.

Alternativ zur direkten Herstellung können Formeinsätze gefertigt werden, mit denen in einem Replikationsprozess die Einzelkomponenten des Analysechips (Deckel und Boden) abgeformt werden. Diese werden mit geeigneten Montage- und Fügeverfahren zu funktionsfähigen Analysechips verbunden. In der Konstruktion sind Hinterschneidungen zu vermeiden, um die Massenproduktion einfach zu gestalten.

Abbildung 4.2 zeigt die Auswahlmöglichkeiten der Fertigungsprozesskette.

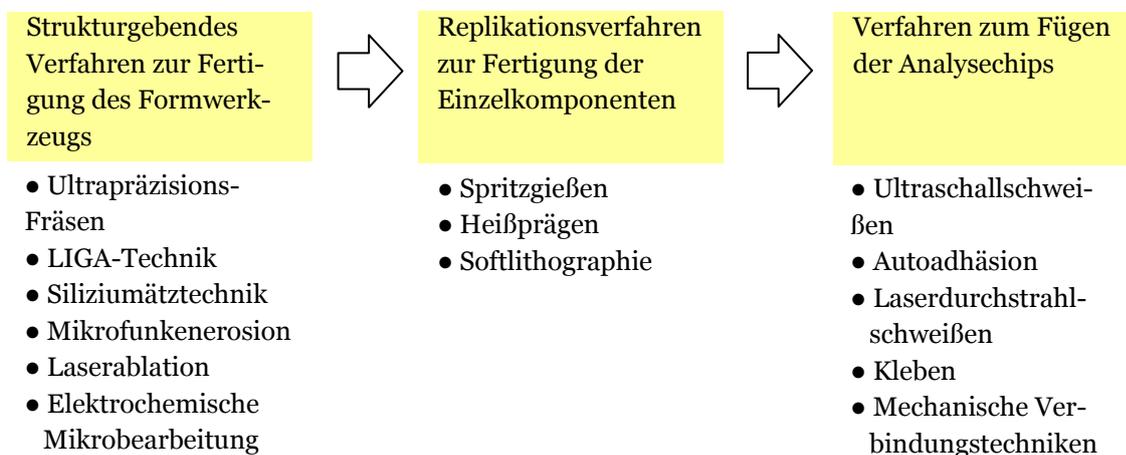


Abbildung 4.2: Auswahlmöglichkeiten der Fertigungsprozesskette

4.3 Auswahl des Fertigungsverfahrens des Formwerkzeugs

Anforderungen an den Formeinsatz zur Herstellung der Analysechips

Es soll ein Formeinsatz gefertigt werden, mit dem sich die Analysechips in einem Replikationsverfahren abformen lassen. Ein solcher Formeinsatz muss folgenden Anforderungen genügen:

- Eine 2-dimensionale hydrodynamische Fokussierung erfordert eine 3-dimensionale Freiform-Flächenstruktur.
- Die Fluidkanäle haben einen minimalen Querschnitt von $30 \times 50 \mu\text{m}^2$ und eine maximale Strukturhöhe von bis zu 1 mm.
- Die maximale Fertigungstoleranz darf $\pm 1 \mu\text{m}$ nicht überschreiten.

- Die mittlere Rautiefe R_a der für die optische Messung relevanten Flächen muss kleiner 150 nm sein. Bei hohen Anforderungen an das optische Messsystem dürfen die mittleren Rautiefen maximal 5 nm sein.
- Das Fertigungsverfahren des Formwerkzeugs muss auf Werkstoffe, die hohe Standzeiten garantieren, angewendet werden können.
- Es sind kurze Fertigungszeiten anzustreben.

Ultra-Präzisionsfräsen

Ultra-Präzisionsfräsen unterscheidet sich vom konventionellen Fräsen in der erreichbaren minimalen Strukturgröße, der erreichbaren Fertigungstoleranz und der erreichbaren Oberflächenqualität. Die im Weiteren vorgestellten Arbeiten wurden mit einer Ultra-Präzisionsfräsmaschine der Firma LT Ultra-Precision Technology GmbH ausgeführt (siehe Abbildung 4.3). Die Maschine weist alle Elemente auf, die für die Präzisions-Spanabhebung notwendig sind: Maschinenaufbau aus Granit für einen sehr steifen, schwingungsarmen Aufbau mit geringem thermischen Ausdehnungskoeffizient, hydrostatische Lagerung der drei Linearachsen, Glasmaßstäbe mit einer Auflösung von 10 nm, linear angetriebene Achsen und aerostatisch gelagerte Frässpindeln. Die Maschine ist mit zwei vertikalen Achsen mit je einer Spindel ausgestattet. Eine Spindel (bis 4000 U/min) wird als Flycutter verwendet, mit der sich plane Oberflächen mit optischer Qualität (Rauheit $R_a < 10$ nm) bis zu einem Durchmesser von 180 mm herstellen lassen. Die hochdrehende Spindel (bis 150.000 U/min) wird für das Kontur- und Strukturfräsen eingesetzt.

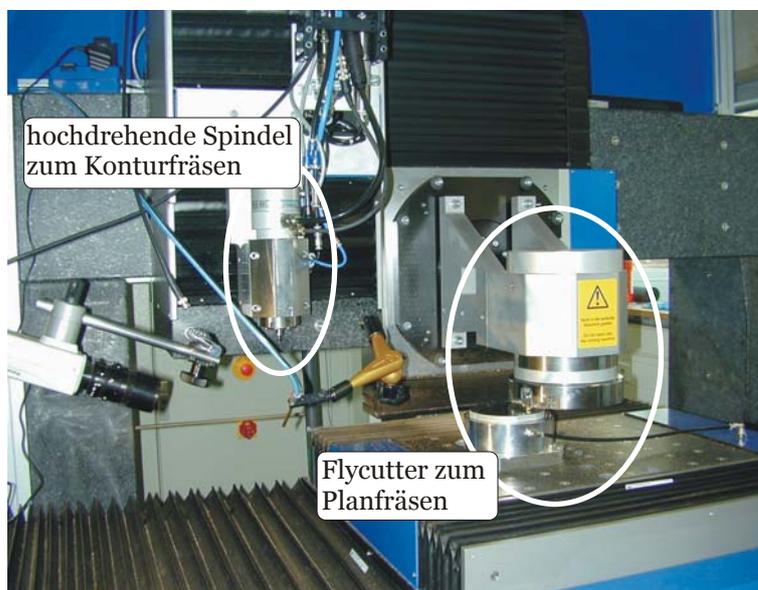


Abbildung 4.3: Ultra-Präzisionsfräsmaschine

Mit dem Konturfräsen können wie beim konventionellen Fräsen 3-dimensionale Freiformflächen erzeugt werden. Freiformflächen für die hydrodynamische Fokussierung werden mit einem Radiusfräser rasterförmig abgefahren. Die erreichbare Strukturgröße liegt im unteren Mikrometerbereich. Im Wesentlichen ist sie durch den Durchmesser der verwendeten Fräser bestimmt. Die kleinsten derzeit kommerziell erhältlichen Fräser haben einen Durchmesser von 40 μm (Hitachi Tool Engineering Europe GmbH). Der minimale Fräserdurchmesser gibt die Innenkantenverrundung bzw. die kleinsten fräsbaren Nuten des Frästeils vor. Stege können bis zu einem Aspektverhältnis von

Höhe zu Breite von ca. 10:1 gefräst werden. Bei Nuten ist das Aspektverhältnis durch die Länge des Fräasers beschränkt. Aspektverhältnisse von Mikrofräsern liegen zwischen 2:1 und 5:1. Die Lagegenauigkeit der Strukturen liegt unter einem Mikrometer. Durch die sehr kleinen Fräser spielt die Fräserabdrängung eine wichtige Rolle. Die Seitenwände des Frästeils können mit der Spindel nach eigenen Erfahrungen (siehe Kapitel 8.2, Seite 124) nur mit einer Abweichung von der Senkrechten von 2 bis 7° je nach Werkstoff gefertigt werden. Bei Messing werden Abweichungen von 2° bis 5° erreicht, bei hochfestem Aluminium und vorvergütetem Werkzeugstahl betragen die Abweichung zwischen 4° und 7°. Die Schräge kann beim Entformen des Kunststoffbauteils als Formschräge genutzt werden. Sie muss jedoch bei der Auslegung der einzelnen Funktionselemente mit berücksichtigt werden (siehe Abbildung 4.4).

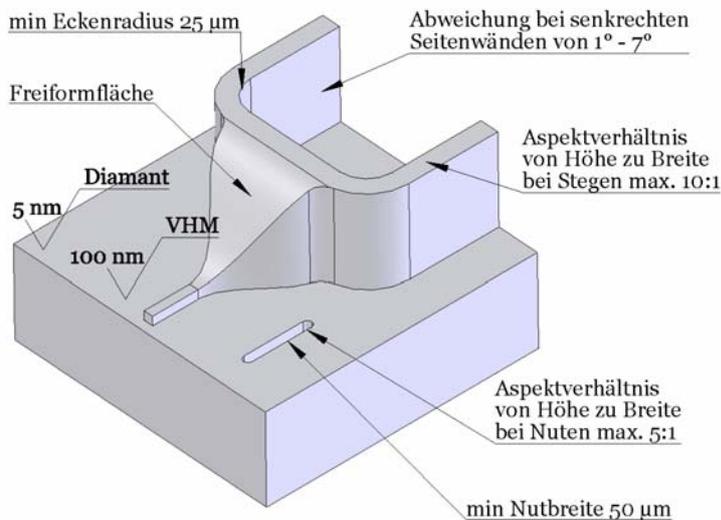


Abbildung 4.4: Charakteristische Merkmale eines mit Ultra-Präzisionsfräsen gefertigten Formwerkzeugs

Als Werkzeuge werden sowohl Vollhartmetall-Werkzeuge (VHM-Werkzeuge) als auch Diamantwerkzeuge eingesetzt. Mit VHM-Werkzeugen können Oberflächenqualitäten bis in den Bereich von $R_a = 100 \text{ nm}$ gefräst werden. Mit monokristallinen Diamantwerkzeugen lassen sich optische Oberflächen herstellen. Diamantwerkzeuge werden zur Zeit mit minimalen Durchmesser von ca. 100 µm angeboten (siehe Abbildung 4.5).

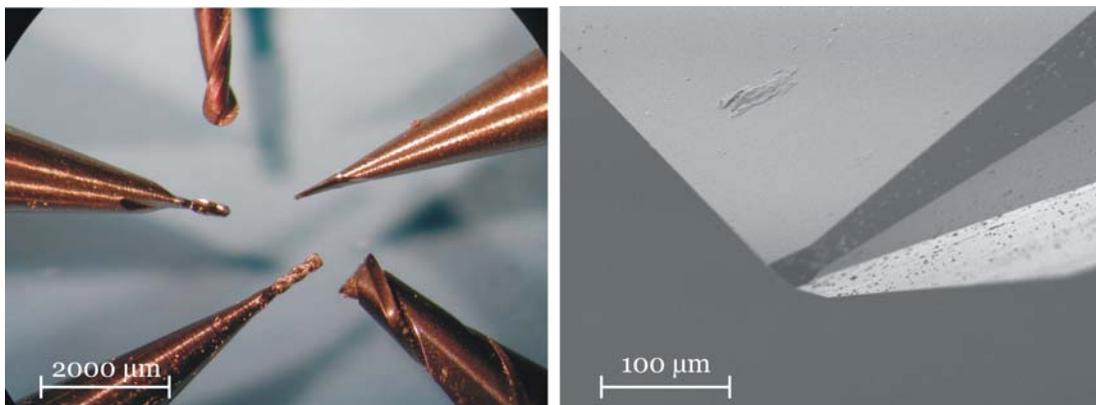


Abbildung 4.5: Werkzeuge zum Konturfräsen: links VHM-Werkzeuge, rechts REM-Aufnahme einer Schneide eines Diamantwerkzeugs

Die fräsabaren Werkstoffe unterscheiden sich nicht von denen, die mit konventionellen Maschinen bearbeitet werden können. Diamantwerkzeugen eignen sich wegen der

hohen Kohlenstoffaffinität nicht zum Fräsen von Eisenwerkstoffen. Mit VHM-Werkzeugen lassen sich dagegen auch vorvergütete Werkzeugstähle bearbeiten, wie sie für den Bau von Spritzgusswerkzeugen eingesetzt werden.

Die schnelle Fertigstellung eines ultra-präzisionsgefrästen Formeinsatzes ist ein entscheidender Vorteil. Typische Zeiten für die Fertigung eines Formeinsatzes wie in Abbildung 4.6 gezeigt, betragen wenige Arbeitstage. Dadurch lassen sich in der Entwicklungsphase schnell neue Versionen von Labormustern aufbauen.

Es ist nicht bekannt, dass das Ultra-Präzisionsfräsen zum Aufbau eines mikrostrukturierten Durchflusssytometers eingesetzt wird.



Abbildung 4.6: Ultra-präzisionsgefräster Formeinsatz (Ø 100 mm) zum Heißprägen thermoplastischer Kunststoffe

LIGA-Technik

Die LIGA-Technik ist eine Abfolge verschiedener Mikrotechniken (**L**ithographie, **G**alvanik, **A**bformung) zur Fertigung höchst präziser Mikrobauteile. Mit lithographischen Verfahren werden 2^{1/2}-dimensionale Mikrostrukturen in einem Photolack (Resist) mit definierter Höhe erzeugt. Diese Strukturen werden anschließend galvanisch zu Formeinsätzen gefertigt und in einem abschließenden Fertigungsschritt in Kunststoff übertragen [Ehr02], [Menz05].

Der LIGA-Prozess ist nur mit einem hohen apparativen Aufwand durchzuführen. Das Fachgebiet Mikro- und Feingeräte nutzt die Reinräume des Anwenderzentrums Mikrotechnik (AZM) der BESSY GmbH mit entsprechender Ausstattung. Die Belichtungen für dünnere Photolacke werden mit UV-Licht an einem Maskaligner der Firma Süss MicroTec AG (MA6) durchgeführt werden. Zur Tiefenlithographie mit Synchrotronstrahlung stehen zwei Belichtungseinrichtungen am Elektronenspeicherring der BESSY GmbH zur Verfügung. Die Formeinsätze werden in Nickel- und Nickel-Eisen-Galvanikbädern der Firma Mikro- und Oberflächentechnik GmbH elektrochemisch abgeschieden.

3-dimensionale Freiformflächen lassen sich mit der LIGA-Technik nicht erzeugen. Durch einen schichtweisen Aufbau mit Wiederholung einiger Prozesse lassen sich jedoch Mikrostrukturen mit unterschiedlichen Höhenniveaus aufbauen. Der Zeitauf-

wand und die Fehlerquote steigen jedoch mit der Anzahl der durchgeführten Einzelschritte. Die Tatsache wirkt sich als starker Nachteil zur Fertigung des Formwerkzeugs aus. Die hydrodynamische Fokussierung ist das entscheidende Funktionselement, das 3-dimensionale Flächen erfordert. Andere Funktionselemente wie die optische Messstelle oder die Imdepanzmessung kommen mit 2^{1/2}-dimensionalen Strukturen aus. Durch eine Kombination mit anderen Fertigungsverfahren kann dieser Nachteil ausgeglichen werden.

Mit der LIGA-Technik kann eine hohe Variation der Formen erreicht werden. Innenkanten können spitzwinklig mit einem Radius von weniger als 1 µm hergestellt werden. Die minimale Strukturbreite ist im Wesentlichen durch die Strukturhöhe und die für die Belichtung verwendete Wellenlänge bestimmt. Durch die Verwendung kurzwelligem Röntgenlichtes können Strukturhöhe von 1000 µm bei nahezu senkrechten Seitenwänden erreicht werden. Dabei können Fertigungstoleranzen unter einem Mikrometer und optische Oberflächenqualitäten ($R_a = 20 \text{ nm}$) erreicht werden. Das maximal erreichbare Aspektverhältnis von Höhe zu Breite von Stegen in einem Formwerkzeug liegt bei 30:1, von Nuten bei 10:1 (siehe Abbildung 4.7). Durch diese hohe Fertigungsqualität bietet sich die LIGA-Technik zu Fertigung optischer Funktionselemente an.

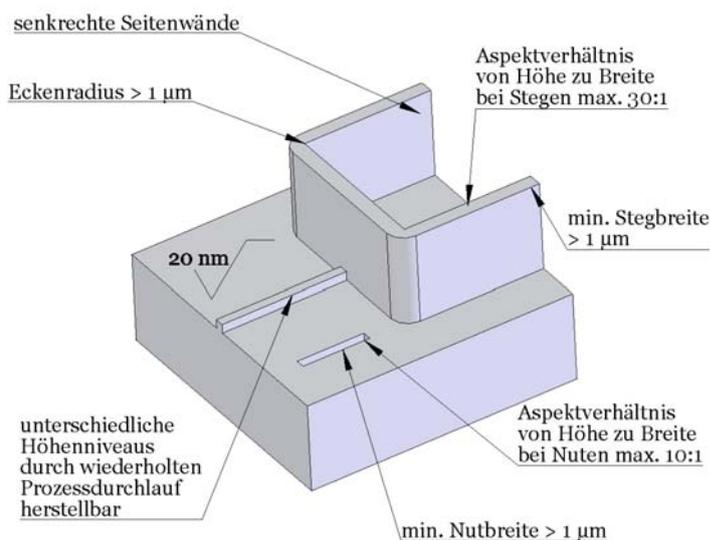


Abbildung 4.7: charakteristische Merkmale einer mit LIGA-Technik gefertigten Formwerkzeugs

Werden die Formeinsätze mit einer Nickel-Eisen-Galvanik aufgebaut, können Festigkeiten und Härten erreicht werden, die im Bereich gehärteter Stähle liegen. Insofern können solche Formeinsätze auch in einem Spritzgusswerkzeug eingesetzt werden.

In Vorarbeiten wurde ein Heißprägestempel mit Hilfe der LIGA-Technik aufgebaut [Tucho4] (siehe Abbildung 4.8). Mit Hilfe dieses Werkzeugs wurden die ersten mikrostrukturierten Durchflusszytometer aufgebaut (siehe Abbildung 3.4). Der Zeitaufwand zur Fertigstellung eines solchen Werkzeugs ist auf Grund der Vielzahl aufeinander folgender Prozessschritte groß. Von der Erstellung der Maske bis hin zum fertigen Werkzeug muss ein Zeitraum von mindestens 4 Wochen eingeplant werden. Dieser relativ lange Fertigungsprozess wirkt sich nachteilig für eine schnelle Entwicklung aus.



Abbildung 4.8: LIGA-Heißprägestempel [Tuch04]

Die LIGA-Technik wird offensichtlich wegen des hohen Fertigungsaufwand nur selten für die Fertigung mikrostrukturierter Durchflusszytometer eingesetzt [Becko2], [Mohro2].

Silizium-Mikrotechnik

Silizium-Mikrotechniken sind in der Mikrotechnik weit verbreitet. Dementsprechend groß ist auch die Anzahl der mit dieser Technik aufgebauten mikrostrukturierten Durchflusszytometer [Alt97], [Blan98], [Wolfoo], [Wolfo3], [Sob93], [Wano3], [Ver03], [Becko2].

Zunächst wird auf dem Siliziumwafer eine ätzresistente strukturierte Maske aufgebracht. Anschließend kann Silizium entweder trocken oder nasschemisch geätzt werden. Das Nassätzen mit Kalilauge (KOH) ist ein anisotroper Vorgang. Daher muss die Kristallausrichtung des Wafers beachtet werden. Häufig genutzt wird die 100-Richtung. In dieser Ätzrichtung entstehen die für das Siliziumätzen typischen V-förmigen Kanalstrukturen [Menz05]. Wird die 111-Richtung als Ätzstopp verwendet, erreichen diese Flächen optische Qualität. Mit dem Bosch-Prozess (spezieller Trockenätzprozess) können in Silizium durch abwechselnde Ätz- und Passivierungsschritte Strukturen mit senkrechten Seitenwänden hergestellt werden. Bei diesen Strukturen können Aspektverhältnisse von 30:1 mit optischen Oberflächen und senkrechten Seitenwänden erreicht werden. Darüber hinaus ist eine hohe Variabilität der Formen möglich. Kanten können mit Radien kleiner als 1 μm ausgeführt werden [Menz05], [Ehro2].

Die Herstellung 3-dimensionaler Freiformflächen ist auf Grund der Monokristallinität des Siliziums und den an der Kristallrichtung orientierten erzeugten Oberflächen nicht möglich. Durch mehrfachen Prozessdurchlauf können unterschiedliche Höhenniveaus erreicht werden. Minimale Strukturgröße und Fertigungstoleranz werden im Wesentlichen von der lithographisch aufgetragenen Ätzmaske bestimmt.

Silizium eignet sich nur bedingt als Werkzeugmaterial für die Kunststoffabformung. Als Formeinsatz beim Heißprägen kann es bei niedrigen Aspektverhältnissen eingesetzt werden. Als Formeinsatz in Spritzgießwerkzeugen wird es nicht verwendet. Zur Fertigung eines widerstandsfähigeren Formwerkzeugs kann ein strukturiertes Siliziumformwerkzeug nach einer Oberflächenmetallisierung galvanisch abgeformt werden.

Mikrofunkenerosion

Mit der Funkenerosion lassen sich alle elektrisch leitfähigen Materialien bearbeiten. Die auftretenden Prozesskräfte durch den Spüldruck sind dabei sehr klein und unabhängig von der Härte des Werkstoffs. Es lassen sich daher auch harte und verschleißarme Stähle bearbeiten. Durch den thermischen Energieeintrag kommt es zu einer Veränderung der obersten Materialschichten (meist mehrere Mikrometer). Die Spaltbreiten betragen ca. 20 μm [Menz05]. Aus dieser Tatsache wird deutlich, dass der erreichbaren minimalen Strukturbreiten Grenzen gesetzt sind.

Eine Strukturierung kann durch relatives Verfahren des Werkzeugs durch das Werkstück erfolgen. Dadurch lassen sich 3-dimensionale Strukturen problemlos erzeugen. Durch die Funkenentladung findet neben dem Abtrag am Werkstück auch ein Verschleiß des Werkzeugs statt. Die erreichbaren Oberflächenqualitäten liegen im Bereich von $R_a = 300 \text{ nm}$. Optische Flächen lassen sich nicht erzeugen.

Es ist nicht bekannt, dass Mikrofunkenerosion zur Fertigung eines mikrostrukturierten Durchflusszytometers eingesetzt wird.

Laserablation

Der Begriff Laserablation bezeichnet einen kontrollierten Materialabtrag, der mittels eines gepulsten Laserstrahls stattfindet. Das Material wird im Laserfokus aufgeschmolzen und verdampft. Auf Grund der sehr kurzen Pulse (im Piko- und Femtosekundenbereich) ist die Beeinflussung bzw. Veränderung des Werkstoffs deutlich geringer als beim Erodieren [Krac04]. Durch das Aufschmelzen und Austreiben des Werkstoffs kann es zu störenden Schmelzaufwürfen kommen.

Mit der Laserablation können die meisten Materialien bearbeitet werden. Insbesondere können auch in gehärtete Werkzeugstähle für den Kunststoffspritzguss 3-dimensionale Strukturen hergestellt werden. Oberflächenqualitäten sind im Bereich von $R_a 1,0 - 1,5 \mu\text{m}$ erreichbar [Krac04].

Mit der Laserablation kann nicht die Oberflächenqualität der Ultra-Präzisionsfräsverfahren erreicht werden. Diesbezüglich ist das Ultra-Präzisionsfräsen das derzeit weiter entwickelte Verfahren. Als Fertigungsverfahren für mikrostrukturierte Durchflusszytometer wird die Laserablation bisher nicht eingesetzt.

Elektrochemische Mikrobearbeitung

Bei diesem Verfahren wird ein kathodisch gepoltes Werkzeug in ein anodisch gepoltes Werkstück eingesenkt. Durch elektrochemische Reaktionen löst sich der Werkstoff der Anode auf. Mit diesem Verfahren können viel Stahllegierungen unabhängig von der Härte bearbeitet werden. Ein Verschleiß des Werkzeugs tritt nicht auf. Es lassen sich 3-dimensionale Formflächen erzeugen.

Die erreichten Genauigkeiten liegen bei wenigen Mikrometern, die Kantenradien bei minimal 1 μm . Aspektverhältnis von 10:1 und mittlere Rautiefen von 200 nm können erreicht werden. Die Abtragsraten liegen im Bereich von 1 $\mu\text{m/s}$ [Kiro01]. Bisher wur-

den keine mikrostrukturierten Durchflusszytometer mit diesem Fertigungsverfahren realisiert.

Bewertung der Fertigungsverfahren

Das Ultra-Präzisionsfräsen hat zwei entscheidende Vorteile: Die Fertigungsdauer ist wesentlich kürzer und es lassen sich damit echte 3-dimensionale Strukturen erzeugen. Die Nachteile der Innenkantenverrundung können durch konstruktive Maßnahmen teilweise beseitigt werden. Die Oberflächengüte mit VHM-Werkzeugen gefräster Flächen ist für das optische Messsystem ausreichend und kann durch den Einsatz von Diamantfräsern deutlich verbessert werden. Insofern bietet dieses Fertigungsverfahren alle Voraussetzungen zur Fertigung eines Formeinsatzes für mikrostrukturierte Durchflusszytometer.

In Vorarbeiten wurden mikrostrukturierte Durchflusszytometer mit Hilfe der LIGA-Technik gefertigt. Die Technologie steht der Arbeitsgruppe des Fachgebiets Mikro- und Feingeräte zur Verfügung. In Vorbereitung ist eine Kombination aus Ultra-Präzisionsfräsen und LIGA-Technik zur Fertigung eines Formwerkzeugs mit höchsten Ansprüchen. Freiformflächen werden mit Ultra-Präzisionsfräsen erzeugt. Mit LIGA-Technik werden Strukturen mit ideal senkrechten Seitenwänden, optischer Oberflächenqualität, sehr hohen Aspektverhältnissen und scharfe senkrechten Innenkanten gefertigt.

4.4 Auswahl eines Replikationsverfahrens zur Herstellung der Chipkomponenten

Das Replikationsverfahren muss folgenden Anforderungen genügen:

- Geeignet für eine Stückzahl von 100: Für den Aufbau der Labormuster und zu Testzwecken (Montage, Fügen, Einzelfunktionstests) wird eine entsprechende Anzahl Analysechips benötigt.
- Einfache Fertigung des Formwerkzeugs: Der gefertigte Formeinsatz soll sich möglichst einfach und zeitsparend in ein entsprechendes Aufnahmewerkzeug integrieren lassen. Dies ist gerade in der Entwicklungsphase mit häufig wechselnden Designs von hoher Bedeutung.
- Anwendbar auf klarsichtige Thermoplaste wie zum Beispiel Polycarbonat (PC) oder Polymethylmethacrylat (PMMA).
- Potential zur Produktion hoher Stückzahlen

Heißprägen

Das Ausgangsmaterial beim Heißprägen von Mikrostrukturen sind Platten und Folien aus thermoplastischen Kunststoffen. Diese werden in dem Prägewerkzeug bis zu einer Temperatur oberhalb der Erweichungstemperatur, typisch 50 – 100 K über der Glasübergangstemperatur, erwärmt. In diesem Bereich besitzt das Material eine hohe

Formänderungsfähigkeit. Sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist, wird das Werkzeug unter geregelter Kraftverlauf in den Kunststoff eingepresst. Anschließend wird das Substrat bis unter die Glastemperatur abgekühlt, die Form geöffnet und das fertige Substrat entformt (siehe Abbildung 4.9) [Menzo5], [Ehro2].

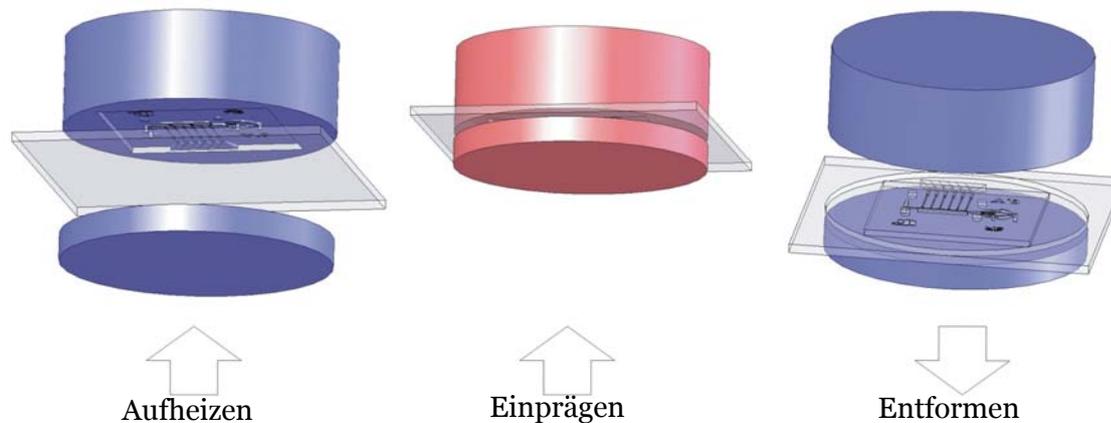


Abbildung 4.9: Darstellung eines Heißprägeprozesses: Aufheizen des Prägestempels, Einpressen in den weichen Kunststoff, Abkühlen und Entformen.

Beim Heißprägen ist die Erzeugung von Hinterschnitten nicht möglich. Die maximal abformbaren Aspectverhältnisse hängen von der Festigkeit und den Adhäsionskräften des Formeinsatzes und des Kunststoffs ab. Spröde Kunststoffe lassen sich schlechter entformen als zähe. Unter guten Voraussetzungen können Aspectverhältnisse von bis zu 5:1 abgeprägt werden.

Ein Durchprägen (Erzeugung von Durchgangslöchern im Substrat) ist ebenfalls nicht möglich. Der Kunststoff wird bei endlichen Prägekräften nicht soweit seitlich abfließen können, dass ein gratfreies Durchgangsloch entsteht [Woro3]. Durchgangslöcher, wie sie insbesondere für die Fluidikanschlüsse notwendig sind, müssen in einem nachfolgenden Bearbeitungsschritt gebohrt werden.

Da die Luft aus den Sacklöchern beim Prägen nicht Entweichen kann, muss zur vollständigen Füllung des Prägestempels der Prozess unter Vakuum (≤ 1 hPa) durchgeführt werden.

Ein Heißprägezyklus dauert typischerweise bis zu 20 min. Ca. 2/3 dieser Zeit nimmt das Aufheizen und Abkühlen in Anspruch. Für Kleinserien bis ca. 500 Bauteile ist diese Zykluszeit ein akzeptabler Wert. Durch die Erhöhung der Anzahl der Formnester kann die Produktivität gesteigert werden. Auf einem Prägestempel mit 125 mm Durchmesser können bis zu 9 Formnester mit der Größe der Analysechips untergebracht werden. Die Bauteile müssen nach dem Heißprägen einzeln werden. Dem Fachgebiet Mikro- und Feingeräte nutzt im AZM der BESSY GmbH eine Heißprägeanlage der Firma Jenoptik Mikrotechnik GmbH (HEXo3). Mit dieser Maschine können Formeinsätze bis zu 125 mm Durchmesser abgeprägt werden.

Für ein Heißprägewerkzeug ist der einfache Werkzeugaufbau bezeichnend. Neben den eigentlichen Formnestern bzw. dem Formeinsatz brauchen keine weiteren Funktionselemente wie Auswerferstifte oder Heizelemente in den Heißprägestempel integriert zu werden. Die Heizung ist maschinenseitig eingebaut. Die Entformung geschieht von

Hand. Der einfache Werkzeugaufbau ist in der Entwicklungsphase, in der schnell neue Designs umgesetzt werden, ein entscheidender Vorteil.

Spritzgießen

Das Spritzgießen ist ein vollautomatisches Fertigungsverfahren für Serien- und Massenproduktion. Es wird plastifizierter Kunststoff unter hohem Druck in ein Formnest eingespritzt und kühlt dort ab. Das Werkzeug wird im Gegensatz zum Heißprägen auf einer konstanten Temperatur unter der Erweichungstemperatur des eingespritzten Kunststoffs gehalten. Aus diesem Grund können wesentlich kürzere Zykluszeiten (wenige Sekunden) als beim Heißprägen erreicht werden. Die Anzahl der Formnester liegt beim Mikrospritzguss meist zwischen 1 und 8.

Mikrospritzguss wird im AZM der BESSY GmbH auf einer Mikrospritzgussmaschine der Firma Battenfeld Kunststoffmaschinen Ges.m.b.H. (Microsystem 50) durchgeführt. Sämtliche Achsen dieser Maschine sind elektrisch angetrieben und besitzen daher eine größere Dynamik und Genauigkeit als hydraulisch angetriebene Achsen. Die Maschine spritzt nicht wie bei konventionellen Maschinen üblich mit der Schnecke ein, sondern besitzt einen speziellen Dosier- und Spritzkolben. Nur so lassen sich die auf Grund der schnellen Abkühlzeiten bei Mikrobautteilen erforderlichen hohen Einspritzgeschwindigkeiten realisieren.

Die Bauteile werden vollautomatisch entformt. Dazu müssen im Werkzeug Auswerferstifte integriert sein. Beim Auswerfen können die Bauteile vom Anguss getrennt werden. Durch einen komplexen Werkzeugaufbau ist es beim Spritzgießen möglich, Hinterschneidungen und Durchgangslöcher herzustellen. Somit entfällt eine Nachbearbeitung. Durch die Funktionen, die für einen automatisierten Prozess notwendig sind, ist der Werkzeugaufbau eines Spritzgusswerkzeugs wesentlich aufwändiger als der eines Heißprägestempels.

Softlithographie

Alternativ für die Prototypenfertigung wird häufig das Verfahren der Softlithographie verwendet. Softlithographie ist ein Replikationsverfahren, das wegen seiner Einfachheit oft zur Fertigung mikrostrukturierter Durchflusssyteme eingesetzt wird [Park04], [Rao04], [Fu02], [Sohn00], [Clai01], [Tay05], [Wang04], [Weig03], [Kra02], [Yama02], [Beck02], [Krü02], [Fu99], [Gaw01], [Cheu05], [Lino2], [Lino3], [Ditto2], [Ver03]. Der Strukturübertrag wird mit Polydimethylsiloxan (PDMS) durchgeführt. PDMS ist ein dem Silikon ähnliches Material, chemisch inert, transparent und elastisch. Es kann leicht in eine Form gegossen werden und durch seine Elastizität gut entformt werden [Menz05]. Entweder wird das strukturierte PDMS direkt als Bauteil eingesetzt oder es kann als Stempel (Silikonmaster) für weitere Abformungen verwendet werden [Xia98]. Bei der direkten Verwendung des PDMS als Bauteil können zwar hohe Abformgenauigkeiten erreicht werden, jedoch müssen die spezifischen Materialeigenschaften des PDMS (zum Beispiel sehr geringer Elastizitäts-Modul (E-Modul), transparente optische Eigenschaften) akzeptiert werden.

Wird das PDMS als Stempel verwendet sind den abformbaren Aspektverhältnissen ($< 1:1$), erreichbaren Genauigkeiten und durchführbaren Zykluszahlen deutliche Grenzen gesetzt [Menz05].

Bewertung des Replikationsverfahrens der Analysechips

Die Entscheidung Heißprägen oder Spritzgießen wird im Wesentlichen in Abhängigkeit der angestrebten Stückzahl der zu fertigenden Bauteile getroffen. Im Rahmen dieser Arbeit werden Prototypen in Kleinstserien aufgebaut. Der deutlich reduzierte Aufwand bei der Werkzeugfertigung eines Heißprägestempels gegenüber eines Spritzgusswerkzeugs wiegt schwerer als die zusätzlich von Hand durchzuführenden Prozessschritte wie Entformen und Endbearbeitung. Die Umstellung vom Heißprägen auf Spritzgießen bedingt in der ausgewählten sonstigen Fertigungsprozesskette und im Design der Analysechips relativ geringe Änderungen. Aus diesen Gründen werden die aufgebauten Prototypen mit Heißprägen hergestellt (siehe Kapitel 8.3, Seite 131). Bei einer Entwicklung zu einem Serienprodukt ist das Spritzgießen dem Heißprägen jedoch vorzuziehen.

4.5 Auswahl des Verfahrens zum Fügen der Analysechips

Anforderungen an das Fügeverfahren der Analysechips

Deckel und Boden der Analysechips müssen zu einer Einheit zusammengefügt werden. Bei diesem Fertigungsprozess sind einige Vorgaben zu beachten.

- Anwendbarkeit auf klarsichtige thermoplastische Kunststoffe
- Dichtigkeit nach außen und innen: Es darf beim montierten Analysechip keine Flüssigkeit durch den Fügespalt nach außen dringen. Zwei auf dem Analysechip getrennte Kanäle dürfen nicht miteinander verbunden sein.
- Keine Deformation der Kanalstruktur
- Keine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der Kanalstrukturen: In die Fluidkanäle darf kein Klebstoff oder Substanzen gelangen, die beispielsweise die Benetzbarkeit oder die optische Transparenz beeinflussen und somit die Funktion des Gesamtsystems gefährden.
- Formausgleich von Unebenheiten der Fügepartner in der Fügeebene von wenigen Mikrometern und fertigungsbedingten Rauheiten
- Fügeprozess mit montierten optischen und elektrischen Elementen
- Hohe Reproduzierbarkeit
- Kostengünstiger Prozess
- Tauglichkeit zur Serienfertigung

Mechanische Verbindungstechniken

Zwei Kunststoffbauteile können durch eine Reihe mechanischer Verbindungstechniken wie Schraub-, Niet- und Schnappverbindungen gefügt werden. Das erfordert das Ein-

bringen mikrostrukturierter Konstruktionselemente wie Gewinde, Durchgangslöcher, Schnapper etc..

Ausreichende Dichtigkeit ist ohne weitere Konstruktionselemente nur unter geringsten Fertigungstoleranzen der Ebenheit und der Rauheit der Dichtflächen herzustellen. Dichtungselemente, wie Dichtlippen oder O-Ringe müssen unter entsprechend hohem Aufwand gefertigt werden. Daher werden für die Entwicklungsphase keine mechanischen Verbindungstechniken vorgesehen.

Ultraschallschweißen

Das Ultraschallschweißen ist ein industriell eingesetztes Fügeverfahren für thermoplastische Kunststoffe. Die zum Plastifizieren benötigte thermische Energie wird in der Fügefläche durch die Umwandlung von Ultraschallschwingungen in Reibungswärme erzeugt [Ehreo4].

Die zu fügenden Bauteile werden dazu in der Fügeebene mit Lippen, so genannte Energierichtungsgeber, versehen. Die zu fügenden Bauteile verschweißen entlang dieser Lippen. Ohne solche konstruktiven Maßnahmen kommt es meist zu einem unregelmäßigen flächigen Verschweißen [Kutt88]. Für die Qualität der Schweißung sind insbesondere der Fügedruck während des Schweißens und die eingebrachte Energie verantwortlich. Weitere beeinflussende Parameter sind die konstruktive Gestaltung der Schweißnaht, die Oberfläche und der Kunststoff selbst.

Grundsätzlich können alle thermoplastischen Kunststoffe ultraschallgeschweißt werden. Die erreichten Festigkeiten sind bei einer optimalen Prozessführung hoch. Eine Dichtigkeit innerhalb des Analysechips kann durch entsprechend aufgebrauchte Lippen erreicht werden. Hierbei sei aber betont, dass die Einbringung bei den im Rahmen dieser Arbeit vorherrschenden Dimensionen schwierig ist, da die Dichtlippe eine Breite und Höhe von nur wenigen Mikrometern haben müsste. Dennoch ist dieses Fügeverfahren auf Grund der Möglichkeit der Serienfertigung zum Verschweißen der Analysechips geeignet. Vorteilhaft ist ebenfalls, dass keine Fremdstoffe, welche die Mikrostruktur oder die Oberflächen beeinträchtigen können, verwendet werden müssen.

Autoadhäsion

Durch eine O₂-Plasmabehandlung werden die Polymerketten in der Fügeebene aufgebrochen und reaktionsfähige Sauerstoffgruppen an die Polymerketten gepflanzt. Werden die beiden Fügepartner bis kurz unter die Glasstemperatur erwärmt und mit Druck aufeinander gepresst, fließen die Kunststoffe im Grenzbereich und die Oberflächen werden atomar nahe aneinander gebracht. Die verkürzten Polymerketten der beiden Fügepartner diffundieren ineinander. Treffen zwei reaktionsfähige Molekülgruppen aufeinander, gehen diese entweder kovalente Bindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen ein [Brigg90].

Um eine Aussage zu den oben genannten Anforderungen treffen zu können, wurden einige Vorversuche am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte sowohl mit Polycarbonat (PC) als auch mit Polymethylmethacrylat (PMMA) durchgeführt [Reho4]. Die Proben

wurden nach einer O₂-Plasmabehandlung zusammengespreßt und unter Druck ca. 24 h in einem Vakuumofen gelagert. Die Temperaturen wurden von ca. 50 °C bis kurz unter die Glasübergangstemperatur variiert.

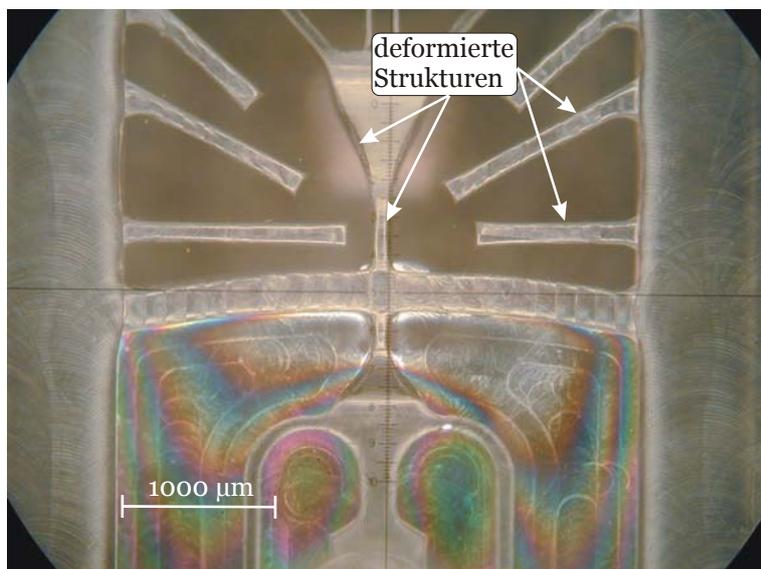


Abbildung 4.10: Mit Autoadhäsion gefügter Analysechip

Eine Dichtigkeit nach außen ist ohne weiteres nicht erreichbar. Montierte Komponenten müssen durch spezielle Maßnahmen abgedichtet werden. Eine Dichtheit innerhalb des Analysechips ist dagegen bei einer vollständig verbundenen Fügeebene möglich.

Die erreichbare Festigkeit ist zu gering. Durch die fertigungsbedingte Unebenheit der Fügeebene muss der Druck beim Bonden erhöht werden, damit sich die Fügeebene flächig miteinander verbindet. Dadurch entsteht die Gefahr, dass die Kanalstruktur deformiert. In den Vorversuchen konnte kein Kompromiss gefunden werden. In der oberen Bildhälfte der Abbildung 4.10 hat sich die Fügeebene flächig verbunden. Jedoch ist hier schon eine Deformation der Mikrostrukturen zu erkennen. Im unteren Teil hat keine Verbindung stattgefunden, erkennbar an den farbigen Interferenzmustern. Die Autoadhäsion hat den Vorteil, dass es ohne Einbringung von Fremdstoffen auskommt. Diese Versuche sollten daher fortgesetzt werden, wenn die Anforderungen an Rauheit und Ebenheit erfüllt sind.

Kleben

Polycarbonate und Polymethylmethacrylate lassen sich mit Epoxidharzen gut kleben. Wird vor dem Kleben eine O₂-Plasmabehandlung der Fügeflächen durchgeführt, kann die Festigkeit verbessert werden. In der mikrotechnischen Anwendung muss darauf geachtet werden, dass die Mikrostrukturen nicht mit Klebstoff gefüllt werden. Das Transferklebverfahren und das Kapillarklebverfahren leisten dies. Beide Verfahren wurden in Vorarbeiten untersucht.

Transferkleben

Der gewählte Kleber wird zur Einstellung einer Schichtdicke auf eine Glasplatte geschleudert und mittels Stempeln auf die Fügeebene übertragen. Dadurch gelangt er nicht in die tiefer gelegene Mikrostrukturen. Eine Dichtigkeit entlang montierter

Lichtwellenleiter und Elektroden nach außen wird ohne weitere Maßnahmen nicht erreicht. Eine Dichtigkeit der Flächen nach innen ist jedoch möglich. Bei korrekt ausgeführtem Klebstoffübertrag werden auch die freistehende Inselstrukturen im Bereich der hydrodynamischen Fokussierung benetzt und verkleben dementsprechend. Durch eine Klebstoffdicke von 3 bis 10 μm werden die fertigungsbedingten Unebenheiten der Analysechips ausgeglichen.



Abbildung 4.11: Eingeschlossene Luftblasen in der Fügeebene eines mittels Transferklebens gefügten Analysechips

Abbildung 4.11 zeigt das Ergebnis eines Transferklebeversuchs mit in der Fügeebene eingeschlossenen Luftblasen. Eine mögliche Lösung dieses Problems besteht im Fügen unter geringem Luftdruck. Das Transferkleben erfordert eine ebene Fügefläche ohne Änderung des Höhenniveaus und schränkt die konstruktiven Freiheiten der Mikrokomponenten ein.

Kapillarkleben

Die Fügeteile müssen geeignete Kanäle aufweisen, in die der Klebstoff injiziert wird. Er verteilt sich durch Kapillarkräfte oder unterstützt durch Druck von außen. Die Schwierigkeit besteht darin, dass der Klebstoff in den vorgesehenen Kanälen bleibt und nicht in die Mikrostrukturen gelangt [Müncho3], [Menz05].

Das Kapillarkleben erreicht ohne weitere Arbeitsschritte eine Dichtigkeit nach außen. Der Klebstoff läuft um montierte Komponenten herum und dichtet diese ab. Problematisch ist dagegen die Dichtigkeit innerhalb des Analysechips. Freistehende, das heißt allseitig von Fluidkanälen umgebende Inselstrukturen können vom Klebstoff nicht erreicht werden. Diese unverklebten Flächen können durch Überfließen die hydrodynamische Fokussierung nachteilig beeinflussen (siehe Abbildung 4.12). Die Inselstruktur zwischen Hüll- und Probenstrom ist nicht verklebt. Dadurch fließt der Probenstrom (hier dunkel gefärbt) durch den Fügespalt in den Hüllstromkanal.

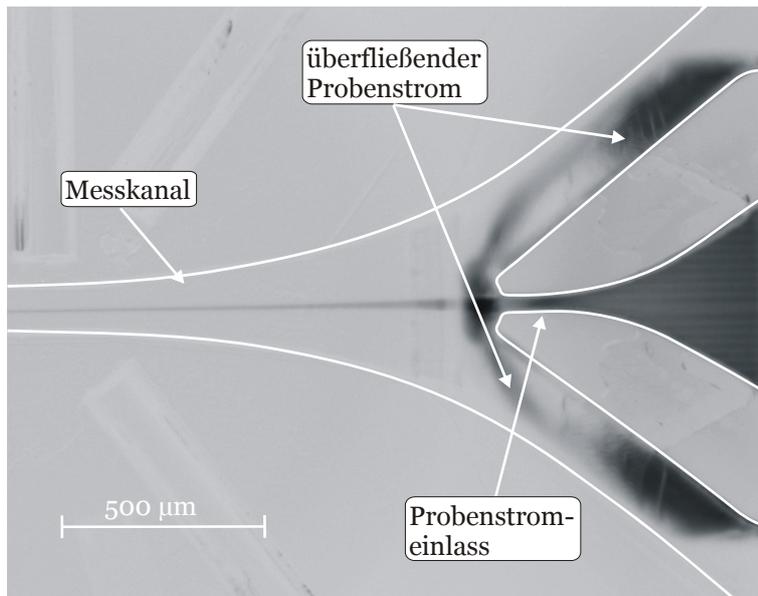


Abbildung 4.12: Fluoreszenzaufnahme in hellkeitsinvertierter Darstellung eines nicht ausreichend verklebten Analysechips

Vorteilhaft sind die gute Gleichmäßigkeit und die hohe Reproduzierbarkeit der Klebeflächen. Gleichzeitig ist der zeitliche und apparative Aufwand gering.

Während sich das Transferklebverfahren für eine Serienproduktion eignet, ist der Klebstoffeintrag im Kapillarklebeverfahren schwierig zu automatisieren.

Laserdurchstrahlschweißen

Klarsichtige Fügepartner werden durch das Laserdurchstrahlschweißen verschmolzen, wenn die Energie des Laserstrahls in der Fügeebene der Kunststoffteile absorbiert wird (siehe Abbildung 4.13). Der Laserstrahl durchdringt dabei den ersten Fügepartner und muss in der Fügeebene absorbiert werden [Ehreo4]. Das gelingt bei klarsichtigen Bauteilen nur durch die Verwendung eines Absorbers in der Fügeebene. Der Absorber besteht aus Farbstoffmolekülen, die im Spektralbereich der Laserstrahlung ein hohes Absorptionsvermögen aufweisen. Zum einen verschmelzen die Fügepartner, zum anderen werden die Farbstoffmoleküle zersetzt, so dass nach dem Schweißen nahezu keine Beeinträchtigung der Klarsichtigkeit vorhanden ist [Kleino5], [Kleino6].

Durch das Laserdurchstrahlschweißen werden gezielt definierte Flächen miteinander verbunden. Eine Flächenstrukturierung der geschweißten Fläche erfolgt entweder durch einen strukturierten Auftrag des Absorbers (Quasisimultanschweißen) oder durch einen strukturierten Eintrag der Laserenergie (Konturschweißen) [Ehreo4].

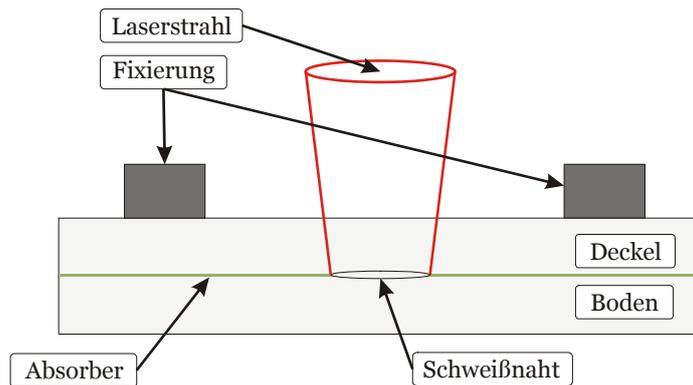


Abbildung 4.13: Prinzipskizze des Laserdurchstrahlungsschweißens von zwei klarsichtigen Kunststoffen

Bei guter Prozessführung liegt die erreichte Festigkeit im Bereich der Festigkeit der Grundmaterialien. Eine sichere Dichtigkeit nach außen kann über einen stärkeren Energieeintrag in den Randbereichen des Analysechips erfolgen. Der Kunststoff schmilzt dadurch so stark auf, dass montierte Komponenten umschlossen und abgedichtet werden. Eine Dichtigkeit innerhalb des Analysechips kann durch gezieltes Auftragen des Absorberfarbstoffs ebenfalls erreicht werden. Der Absorber muss in der Fügeebene reproduzierbar und gleichmäßig aufgetragen werden. Die absorbierte Laserleistung hängt von der Menge des aufgetragenen Farbstoffs ab. Bei einem gleichmäßigen und reproduzierbaren Absorberauftrag können hervorragende Ergebnisse erzielt werden [Spro3]. Ein Eintrag des Absorbers in die Kanalstruktur ist zu vermeiden. Zum einen können sich die Oberflächeneigenschaften der Kanalwände dadurch verändern und zum anderen besteht die Gefahr der Kanaldeformation durch die in diesem Bereich absorbierte Energie.

Zum Laserdurchstrahlungsschweißen steht ein gepulster Nd:YAG-Laser der Firma Innolas GmbH (KLS 246) mit einer Wellenlänge von 1064 nm zur Verfügung.

Bewertung der Fügeverfahren

Beim Kapillarklebeverfahren konnten in den Voruntersuchungen gute Ergebnisse erreicht werden. Dieses Verfahren wurde bei den ersten aufgebauten Labormustern umgesetzt. Eine detailliertere Beschreibung dieses Verfahrens und der erreichten Ergebnisse folgt in Kapitel 8.6 (Seite 135).

Das Laserdurchstrahlungsschweißen bietet alle nötigen Voraussetzungen als Fügeverfahren für die Analysechips. Dieses Fügeverfahren wurde daher zur Montage der jüngsten aufgebauten Labormuster verwendet. Genaueres zu diesem Verfahren ist in Kapitel 8.7 (Seite 136) zusammengefasst.

4.6 Übersicht über gefertigte Versionen

Am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte sind insgesamt neun verschiedene Versionen mikrostrukturierter Durchflusszytometer konstruiert und aufgebaut worden. Die Version 4, Version 6, Version 8 und Version 9 verdeutlichen die wesentlichen Entwicklungsstufen (siehe Abbildung 4.14 bis Abbildung 4.17).

Version 4

In Version 4 (siehe Abbildung 4.14) wird der Probenstrom mit einer einfachen hydrodynamischen Fokussierung geführt. Die optische Messung besteht lediglich aus einer Extinktionsmessung. Das elektrische Feld zur Impedanzmessung wird über flächig aufgesputterte Elektroden erzeugt und verläuft axial in Richtung des Messkanals. Die Analysechips werden mit dem Kapillarklebeverfahren gefügt.

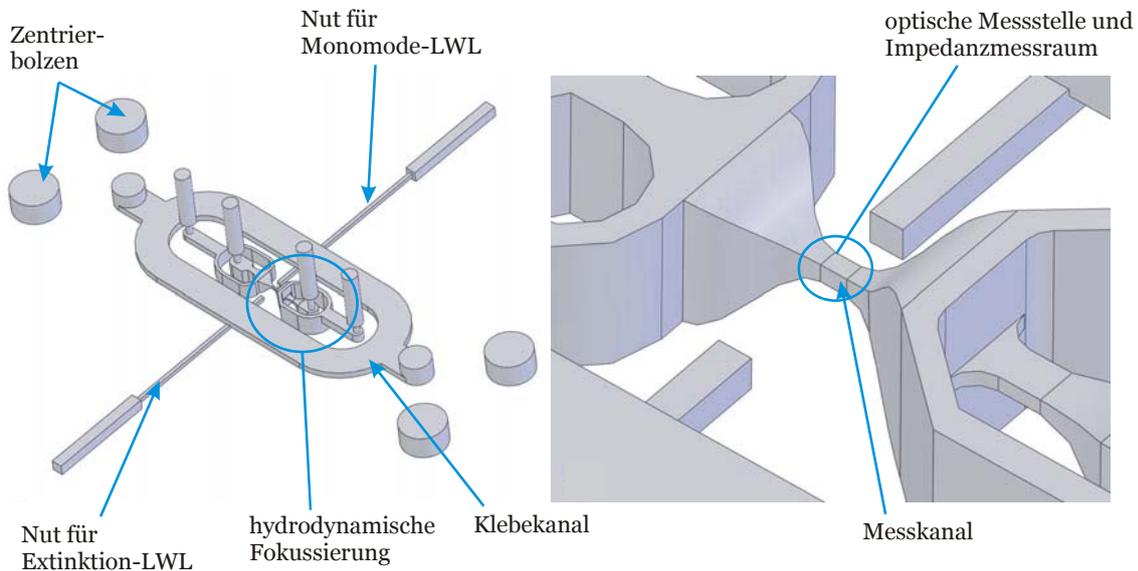


Abbildung 4.14: Hohlstruktur in Version 4. Gesamtansicht links, detaillierte Ansicht der Messraums rechts.

Version 6

Die hydrodynamische Fokussierung in Version 6 ist optimiert (siehe Abbildung 4.15). Die optische Messung wird durch die Aufnahme der Groß- und Kleinwinkelvorwärtsstreuung und durch die Rückwärtsstreuung erweitert. Zur Messung der Impedanz werden zwei an der Stirnseite zylindrische Elektroden in den Messkanal gelegt. Auch dieses Labormuster wird mit dem Kapillarklebeverfahren verbunden.

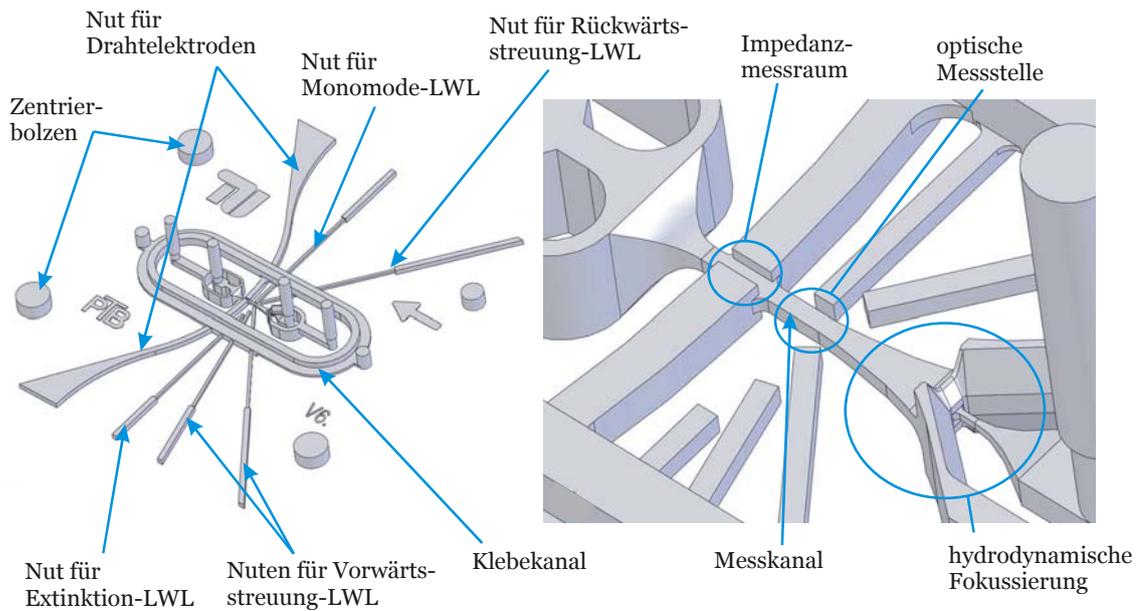


Abbildung 4.15: Hohlstruktur in Version 6. Gesamtansicht links, detaillierte Ansicht der Messräume rechts.

Version 8

In Version 8 erfolgt die Probenzuführung über eine kaskadierte hydrodynamische Fokussierung (siehe Abbildung 4.16). Die Geometrie der Nuten für die Lichtwellenleiter wurde optimiert. Die Elektroden wurden angespitzt. Außerdem wurden in dieser Version außerhalb liegende Elektroden getestet. Als Fügeverfahren wurde das Laserdurchstrahlschweißen verwendet.

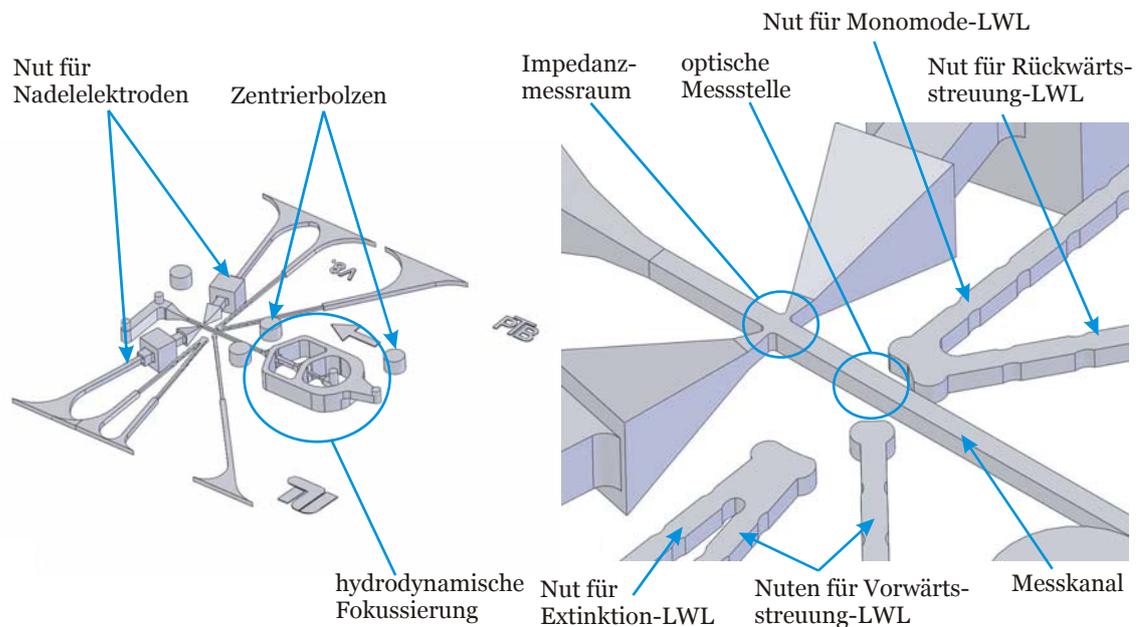


Abbildung 4.16: Hohlstruktur in Version 8. Gesamtansicht links, detaillierte Ansicht der Messstellen rechts.

Version 9

Der Probenstrom wird in Version 9 mit einem Drall fokussiert. Die Lichtauskopplung erfolgt über einen 45°-Spiegel im Freistrah. Zur Durchführung verschiedener Experimente wurden 6 Lichtwellenleiter zur Lichteinkopplung vorgesehen (siehe Abbildung 4.17). Als Fügeverfahren kommt wie in Version 8 das Laserdurchstrahlsschweißen zum Einsatz.

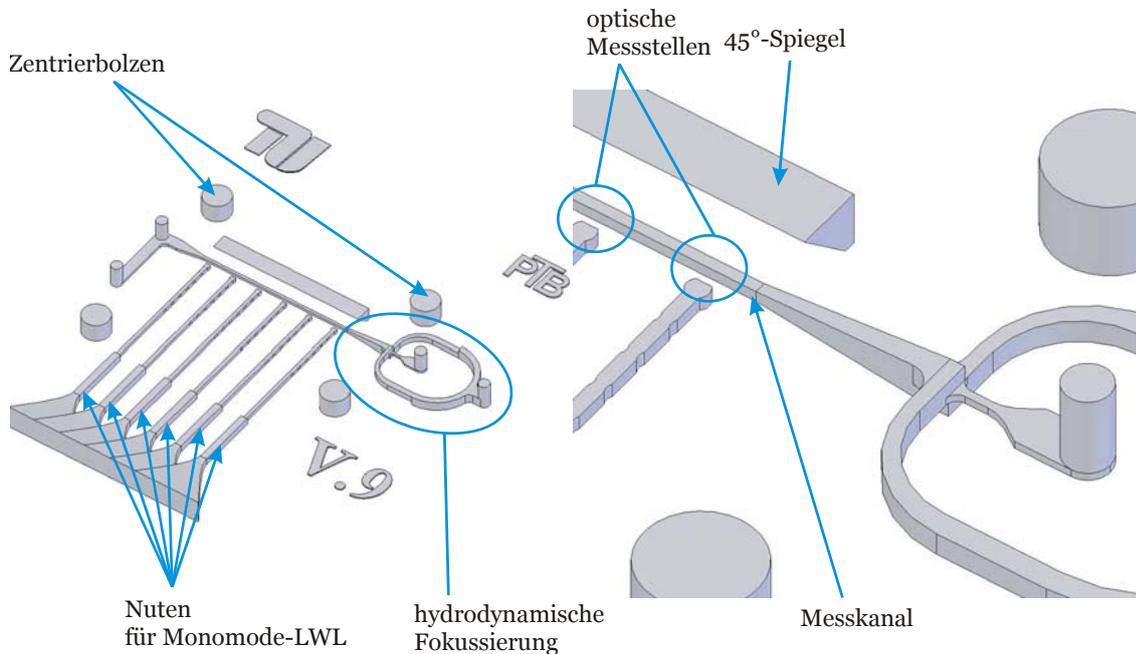


Abbildung 4.17: Hohlstruktur in Version 9. Gesamtansicht links, detaillierte Ansicht der hydrodynamischen Fokussierung rechts.

Die Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit näher beschriebenen Versionen. Neben den relevanten Maßen stellt die Tabelle auch die jeweils eingesetzten Fertigungsmethoden gegenüber.

4 Konzeptioneller Aufbau und Auswahl der Fertigungsprozesskette

	Version 4	Version 6	Version 8	Version 9
Querschnitt des Messkanals in μm	70 x 70	100 x 100	125 x 125	100 x 100
Länge des Messkanals in μm	100	750	4300	5700
maximale Strukturhöhe in μm	700	650	1000	350
mittels FEM-Rechnung unterstützte Auslegung der hydrodynamische Fokussierung	Einfache Fokussierung	optimierte einfache Fokussierung	kaskadierte Fokussierung	Fokussierung mit Drall
Abstand Monomode-LWL zur Kanalmitte in μm	255	110	200	200
Abstand LWL zur Extinktionsmessung zur Kanalmitte in μm	500	750	700	-
Abstand und Winkel der LWL zur Messung der Kleinwinkelvorwärtsstreuung	-	465 μm , 15°	700 μm , 10°	-
Abstand und Winkel des LWL zur Messung der Großwinkelvorwärtsstreuung zur Kanalmitte	-	206 μm , 36,8°	320 μm , 42°	-
Abstand und Winkel des LWL zur Messung der Rückwärtsstreuung zur Kanalmitte	-	277 μm , 143,2°	200 μm , 145°	-
Elektrodenausführung	Aufgesputterte Pt-Schicht	Pt-Nadelelektroden mit zylindrischen Enden	Pt-Nadelelektroden mit angespitzten Enden, außerhalb des Analysechips angebrachte Elektroden	-
Fügeverfahren	Kapillarklebeverfahren		Laserdurchstrahlschweißen	
kleinster eingesetzter VHM-Fräser in μm	200	50	50	50
eingesetzte Diamantfräser	-	-	-	45°-Fräser

Tabelle 4.1: Übersicht über die im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Labormuster

5 Auslegung der Fluidik

In diesem Kapitel werden die hydrodynamischen Fokussierungen der Versionen 4 bis 9 im Detail vorgestellt. Jede der hier gezeigten Versionen ist als Labormuster aufgebaut und experimentell untersucht worden.

In Abbildung 5.1 sind zur Begriffsdefinition die Konstruktionselemente einer hydrodynamischen Fokussierung dargestellt.

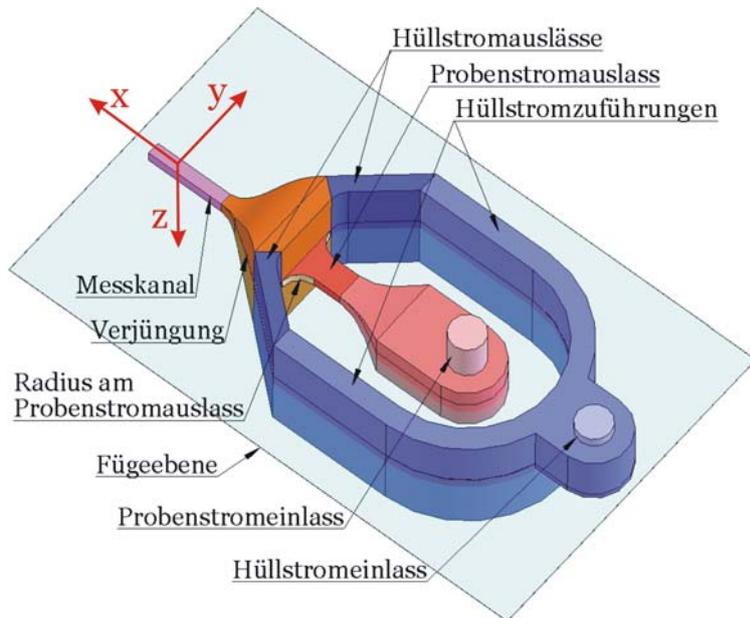


Abbildung 5.1: Konstruktionselemente einer hydrodynamischen Fokussierung. Hier als Volumenkörper dargestellt.

Die x-Achse (fluidische Achse) verläuft mittig des Messkanals, die y-Achse senkrecht dazu und stellt die optische Achse dar.

5.1 Anforderungen an die hydrodynamische Fokussierung

Die hydrodynamische Fokussierung muss folgenden Anforderungen genügen:

- Querschnitt des fokussierten Probenstroms: Der Durchmesser des fokussierten Probenstroms soll im Größenbereich der Zelldurchmesser liegen. Bei humanen Blutzellen ergibt sich damit ein maximaler Querschnitt von ca. $5 \times 5 \mu\text{m}^2$.
- Position des fokussierten Probenstroms: Der fokussierte Probenstrom muss auf einer definierten Position und zwar in der Mitte des Messkanals (fluidische Achse) verlaufen, um den Einfluss von Abweichungen auf die gemessenen Signalhöhen zu reduzieren. Ein Toleranzwert kann nur im Zusammenhang mit der Auslegung des optischen Messsystems erfolgen. Als Anhaltswert soll eine maximale Distanz von $5 \mu\text{m}$ genannt werden, die der Probenstrom von der Sollposition abweichen darf. Auch leichte Geometrieänderungen, die sich aus den Fertigungstoleranzen der Fertigungsprozesskette ergeben, dürfen den Querschnitt und die Position nur innerhalb der Toleranzwerte beeinflussen.

- Funktionsfähigkeit der hydrodynamischen Fokussierung über eine möglichst weite Variation des Proben- und Hüllvolumenstroms zur Adaption an die Messaufgabe: Die mittleren Strömungsgeschwindigkeiten im Messkanal sollen im Bereich von 1 bis 6 m/s liegen. Die Probenvolumenströme sollen von 0,001 bis 0,5 $\mu\text{l/s}$ variiert werden.
- Herstellbarkeit durch die gewählte Fertigungsprozesskette: Die Strukturen der Einzelhälften der Analysechips dürfen keine Hinterschneidungen aufweisen. An den senkrechten Innenkanten der gefrästen Strukturen ergeben sich Radien gemäß dem Radius des eingesetzten Fräasers. Große Aspektverhältnisse vergrößern die Fertigungsungenauigkeiten und erschweren die Entformung beim Heißprägen.

5.2 2-dimensionale hydrodynamische Fokussierung ohne Hinterschnitte

Eine 2-dimensionale hydrodynamische Fokussierung benötigt einen allseitigen Hüllstromzufluss, der in einem zweiteiligen Aufbau ohne Hinterschnitte realisiert werden muss. Diese Forderung beherrscht die konstruktive Auslegung der hydrodynamischen Fokussierung. Ein Lösungsansatz ohne Hinterschnitt führt den Hüllstrom erst in der x-y-Ebene, weiter stromabwärts in der x-z-Ebene an den Probenstrom heran (siehe Abbildung 5.2). Die hydrodynamischen Fokussierungen Version 4, Version 6 und Version 8 funktionieren nach diesem Prinzip. In Version 9 erhält der Hüllstrom in der Verjüngung einen Drall und umfließt den Probenstrom schraubenförmig.

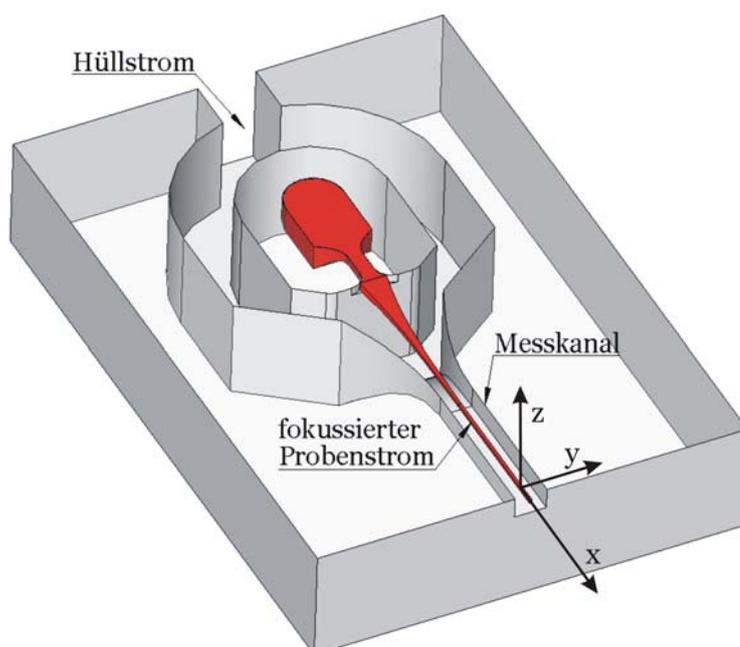


Abbildung 5.2: 2-dimensionale mikrostrukturierte hydrodynamische Fokussierung ohne Hinterschnitte. Hier ist aus Gründen der besseren Visualisierung nur die untere Hälfte dargestellt.

5.3 Allgemeines zur Auslegung des fluidischen Systems

Einfluss der Diffusion auf den fokussierten Probenstrom

Proben- und Hüllstrom fließen laminar im Messkanal nebeneinander. Ein Konzentrationsausgleich der Bestandteile wird durch die Diffusion herbeigeführt, so dass die Grenzfläche zwischen den Strömen verschwimmt und den Probenstrom ausdehnt. Eine Aufweitung von weniger als 1 μm sollte keinen Einfluss auf die durchflusszytometrische Messungen haben. Eine Überschlagsrechnung zeigt, dass bei den gegebenen Strömungsverhältnissen der Einfluss der Diffusion kleiner ist.

Der diffuse Transport ist mit dem 2. Fickschen Gesetz gegeben [Nied92]

$$D_{\text{Diff}} \cdot \Delta c = \frac{\partial c}{\partial t} \quad \text{Gleichung 5.1}$$

Dabei bedeuten D_{Diff} der Diffusionskoeffizient, c die Konzentration, Δc die zweite Ableitung der Konzentration nach dem Ort und $\partial c / \partial t$ die Ableitung der Konzentration nach der Zeit.

Unter der Voraussetzung, dass in Strömungsrichtung (x-Richtung) kein Konzentrationsgradient besteht, folgt als Lösung für die Ortsabhängigkeit der Konzentration [Iwa97]:

$$c(y, z, t) = \frac{1}{4\pi D_{\text{Diff}} t} \iint f(y_0, z_0) \cdot \exp\left(-\frac{(y_0 - y)^2 + (z_0 - z)^2}{4D_{\text{Diff}} t}\right) dy_0 dz_0 \quad \text{Gleichung 5.2}$$

Die Funktion $f(y_0, z_0)$ ist die Anfangsverteilung der Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$. Es soll nun anhand dieses Integrals abgeschätzt werden, wie weit ein Partikel bzw. Molekül aus dem Probenstrom in der Zeit, in der es sich im Messkanal befindet, in den Hüllstrom in y-z-Richtung diffundiert. Zu einer merklichen Konzentrationsänderung kann es nur kommen, wenn der Exponent in Gleichung 5.2 gegen null strebt. Die zur Verfügung stehende Zeit beträgt maximal 4 ms (bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 1000 mm/s und einer Länge des Messkanals von 4 mm). Bei einer tolerierten Abweichung von 1 μm ergibt der Zähler des Exponenten 2 μm^2 . Mit dem Diffusionskoeffizienten der Erythrozyten von $68 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{ms}$ in Wasser bei einer Temperatur von 310 K [nano06] ergibt sich der Nenner des Exponenten zu $1,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2$. Der Exponent ist also sehr viel kleiner als null und der Wert des Integrals geht gegen null. Es kann davon ausgegangen werden, dass Diffusion bei der Aufweitung des Probenstroms im Bezug auf die Zellen keine Rolle spielt.

Ausbildung des parabelförmigen Strömungsprofils im Messkanal und dessen Einfluss auf die Zellen

In Abbildung 5.3 ist der mittels FEM-Simulation berechnete Geschwindigkeitsverlauf der hydrodynamischen Fokussierung Version 4 entlang der x-Achse dargestellt. In der Probenstromzuführung (grau unterlegter Bereich) herrschen sehr niedrige Geschwindigkeiten. In der Verjüngung (gelb unterlegter Bereich) wird der Probenstrom be-

schleunigt. Im Messkanal (weiß unterlegter Bereich) bildet sich das parabelförmige Strömungsprofil aus und die maximale Geschwindigkeit (hier 4200 mm/s) wird erreicht. Eingangs des Messkanals hat der Probenstrom eine Geschwindigkeit von ca. 3000 mm/s. Das parabelförmige Strömungsprofil hat sich teilweise schon ausgebildet. Nach der Strecke $s = 0,6$ mm ist die maximale Strömungsgeschwindigkeit annähernd erreicht. Die analytische Berechnung der Strecke s nach Gleichung 3.13 ergibt ebenfalls einen Wert von 0,6 mm.

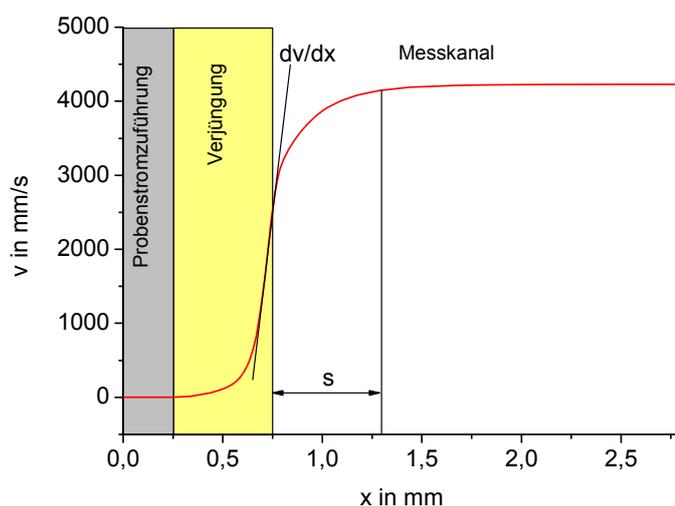


Abbildung 5.3: Mittels FEM-Simulation berechneter Geschwindigkeitsverlauf des Probenstroms vom Probenstromauslass bis in den Messkanal für $y = z = 0$

Der größte Geschwindigkeitsgradient tritt in der Verjüngung auf. In der Simulation beträgt die maximale Geschwindigkeitszunahme ca. 24.000 (mm/s)/mm. Dieser Wert wird ca. 70 μm vor dem virtuellen Schnittpunkt der Seitenwände der Verjüngung (ca. 35 μm vor dem Eintritt in den Messkanal) erreicht. Der maximale Geschwindigkeitsgradient kann mit Gleichung 3.12 berechnet werden. Der halbe Öffnungswinkel der Verjüngung beträgt ca. 45°. Bei einem Volumenfluss von 10 $\mu\text{l/s}$ beträgt der Geschwindigkeitsgradient ca. 25.000 (mm/s)/mm, dies entspricht einer Beschleunigung von ca. 5000 g. Über den Zelldurchmesser von ca. 7 μm ändert sich die Strömungsgeschwindigkeit demnach um 175 mm/s.

Damit ausgeschlossen werden kann, dass Blutzellen bei derartigen großen Beschleunigungen zerstört werden, wurde mit einem Analysechip (Version 8) ein Hämolysetest durchgeführt. Insgesamt wurden 4 Proben analysiert (siehe Tabelle 5.1). Zur Beurteilung der Hämolyse wurde der freie Hämoglobingehalt der Proben im Zentrallabor des Virchow-Klinikums Berlin bestimmt.

	Behandlung	freies Hämoglobin in mg/dl
Probe 1	Blutabnahme, keine weitere Behandlung als Referenz	14
Probe 2	Blutabnahme, mit Spritzenpumpe durch Durchflusszytometer mit einer mittleren Geschwindigkeit von 6 m/s im Messkanal in Analyseröhrchen.	24
Probe 3	wie Probe 2, nur geringere Geschwindigkeit von 2 m/s.	30
Probe 4	Blutabnahme, mit Spritzenpumpe in Analyseröhrchen.	22

Tabelle 5.1: Übersicht über Blutproben zur Hämolysebestimmung

Die Werte für freies Hämoglobin sind bei allen Proben gegenüber der Referenzprobe geringfügig erhöht. Ein direkter Zusammenhang zwischen mittlerer Fließgeschwindigkeit und der Hämolyserate ist nicht zu erkennen. Der Hämoglobingehalt menschlichen Bluts beträgt ca. 15 g/dl [Schm05]. Bei einem freien Hämoglobingehalt von 30 mg/dl sind lediglich ca. 2 ‰ der Zellen zerstört.

Durch das parabelförmige Strömungsprofil stellt sich gemäß der Gleichung von Bernoulli (Gleichung 3.3) eine Differenz des statischen Drucks zwischen dem Zentrum und der Außenwand ein. Durch diese Druckdifferenz erfahren Partikel eine Kraft, die zur fluidischen Achse hin gerichtet ist. Eine Beispielrechnung verdeutlicht die Größenordnung dieser Kraft. Es wird angenommen, dass ein 10 µm großes Teilchen sich um 5 µm aus der Kanalmitte versetzt befindet, dass der Messkanalquerschnitt 100 x 100 µm² beträgt und sich das parabelförmige Strömungsprofil mit einer Maximalgeschwindigkeit von 4200 mm/s ausgebildet hat. Nach Gleichung 3.3 ergibt sich

$$\Delta p = p_{\text{innen}} - p_{\text{außen}} = \frac{1}{2} \rho \left(v(r_{\text{fluid, außen}})^2 - v(r_{\text{fluid, innen}})^2 \right). \quad \text{Gleichung 5.3}$$

Die Indizes „innen“ und „außen“ stehen für den Druck bzw. für die Fließgeschwindigkeit entlang der fluidischen Achse bzw. in 5 µm Entfernung. Mit dem Gesetz von Stokes (siehe Gleichung 3.8) kann die durch die Druckdifferenz bedingte Geschwindigkeit in radialer Richtung zur x-Achse eines solchen Partikels berechnet werden:

$$v(r_{\text{fluid}}) = \frac{\Delta p \cdot A_{\text{Teilchen}}}{3 \cdot \pi \cdot D_{\text{Teilchen}} \cdot \eta}. \quad \text{Gleichung 5.4}$$

Bei den angenommenen Werten ergibt sich eine Geschwindigkeit von 280 µm/s in radialer Richtung. Bei einer Kanallänge von 4 mm verweilt das Teilchen 1 ms im Kanal und erfährt eine vernachlässigbare Verschiebung von 0,28 µm.

Einfluss der Scherspannung auf die Zellen

Die Scherspannung τ in einer viskosen Flüssigkeit ist definiert als [Herwo4]:

$$\tau = \eta \cdot \frac{dv(r_{\text{fluid}})}{dr_{\text{fluid}}}. \quad \text{Gleichung 5.5}$$

Mit der Ableitung aus Gleichung 3.4 nach r_{fluid} ergibt sich

$$\tau = -\eta \cdot \frac{16 \cdot \bar{v}}{D^2} \cdot r_{\text{fluid}}$$

Gleichung 5.6

Die Scherspannung in einer ausgebildeten Rohrströmung nimmt demnach von der Mitte zum Rand hin linear zu. Als größte Abweichung einer Zelle von der fluidischen Achse wird das Doppelte der gesetzten Toleranzwerte (also 10 μm) für die hydrodynamische Fokussierung angenommen. In einem Kanal mit einem Querschnitt von 125 x 125 μm^2 und einer mittleren Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} von 2000 mm/s erfahren diese Zellen eine Scherspannung von 20 Pa. S. Shin untersuchte das Verhalten roter Blutzellen unter Scherbelastung [Shino5]. Die Zellen verformen sich dabei von runden zu elliptischen Teilchen. Bei einer Schubspannung von 20 Pa wird ein Achsverhältnis kurzer zu langer Achse der Ellipse mit ca. 1:3 angegeben. Eine Zelle, die sich 10 μm neben der fluidischen Achse bewegt, wird sich demnach schon deutlich deformiert haben, aber nicht zerstört werden.

5.4 Auswertung der FEM-Rechnungen zur Auslegung der hydrodynamischen Fokussierung

Mit der Software Cosmos FlowWorks 2005 ist es nicht möglich, die Einflüsse der im Fluidstrom mitgeführten Teilchen auf die Strömung zu berücksichtigen. Da die mitgeführten Teilchen einen Durchmesser haben, der gegenüber den Kanalabmessungen nicht zu vernachlässigen ist, stellt dies eine Vereinfachung der realen Verhältnisse dar.

Mit Hilfe der FEM-Rechnungen kann nachgewiesen werden, dass es auch unter laminaren Strömungsbedingungen zu einem Durchdringen von Hüllstrom und Probenstrom, wenn nicht mit Zellen gerechnet wird, kommt (siehe Abbildung 5.4). Trajektorien, die im Messkanal auf annähernd der gleichen Bahn fließen, kommen sowohl vom Probenstrom als auch vom linken bzw. rechten Hüllstrom. Die in Abbildung 5.4 gezeigten Trajektorien fließen im Messkanal in einem Bereich von 1 μm^2 zusammen.

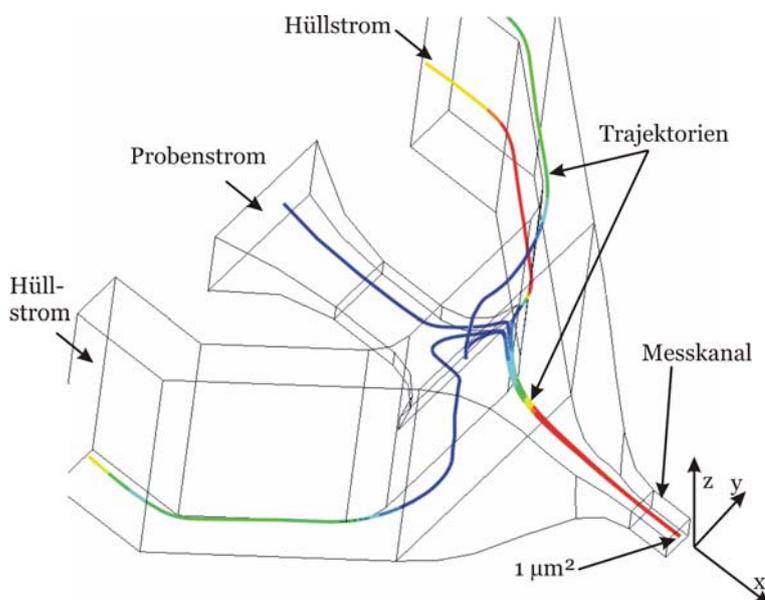


Abbildung 5.4: Rückverfolgung der Trajektorien aus einer 1 μm^2 großen Fläche im Messkanal

Ein Ineinanderfließen von Probenstrom und Hüllstrom und die sich dadurch ergebende Aufweitung des Probenstroms wird maßgeblich von der Kanalgeometrie der hydrodynamischen Fokussierung beeinflusst. Durch FEM-Rechnungen kann sowohl der Betrag als auch die Geometrie der Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms berechnet werden. Die Querschnittsfläche nimmt abhängig von den Strömungsbedingungen und der Geometrie der Fluidkanäle sehr unterschiedliche Formen an. Abbildung 5.5 zeigt verschiedene Querschnitte fokussierter Probenströme, die sich bei den im Weiteren vorgestellten hydrodynamischen Fokussierungen ergeben. Der Blick geht dabei in Strömungsrichtung (x -Achse). Die Farben geben die Strömungsgeschwindigkeit wieder. Die Position der Zellen im Probenstrom wird stochastisch verteilt sein. In einem zweigeteilten fokussierten Probenstrom, wie ihn Abbildung 5.5 c. zeigt, werden sich die Zellen in einem der beiden Strombänder auf einer unbestimmten z -Position aufhalten. Diese Abbildung verdeutlicht die Schwierigkeit einer Definition der Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms.

Der genutzte Versuchsaufbau zur Durchführung der experimentellen Strömungsuntersuchungen erlaubt lediglich eine Auswertung der y - bzw. der z -Ausdehnung des Probenstroms nicht jedoch die Form des fokussierten Probenstroms. Um eine Vergleichbarkeit mit den experimentell ermittelten Werten zu gewährleisten, wird der durch FEM-Rechnungen berechnete Betrag der Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms A_{sim} auf die gleiche Weise berechnet. A_{sim} ist das Produkt aus der z -Ausdehnung h_{sim} und der y -Ausdehnung b_{sim} der Trajektorien des fokussierten Probenstroms in der y - z -Ebene im Messkanal:

$$A_{\text{sim}} = h_{\text{sim}} \cdot b_{\text{sim}} \quad \text{Gleichung 5.7}$$

Die Größen h_{sim} und b_{sim} werden aus der graphischen Darstellung der Trajektorien des Probenstroms gewonnen.

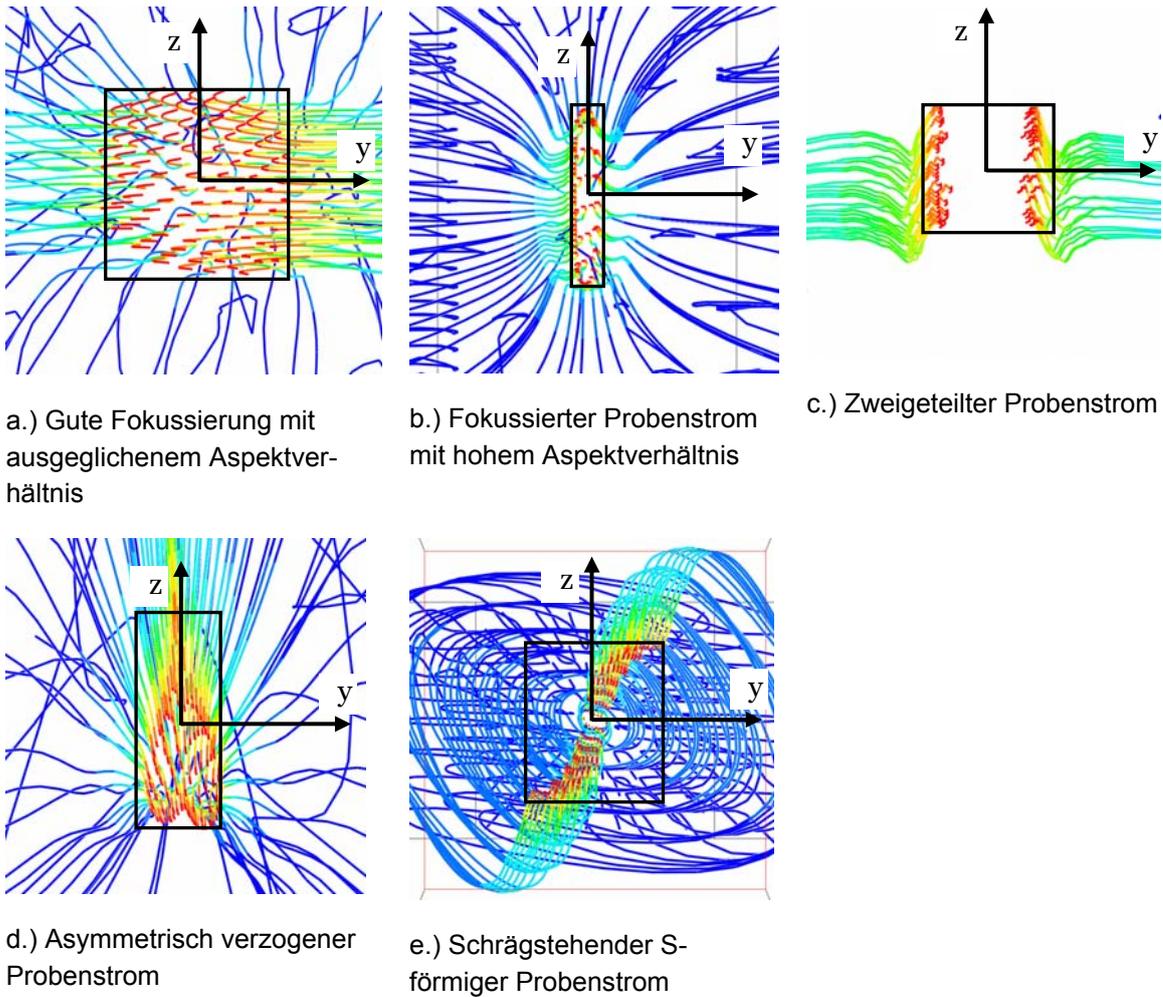


Abbildung 5.5: Verschiedene Formen des fokussierten Probenstroms. Dargestellt sind nur die Trajektorien des Probenstroms. Die eingezeichneten Rechtecke stellen die in Gleichung 5.7 definierte Querschnittsfläche A_{sim} des fokussierten Probenstroms dar.

Unter Beachtung der Massenerhaltung kann der Betrag der Querschnittsfläche (nicht die Geometrie der Querschnittsfläche) des fokussierten Probenstroms A_{phys} analytisch berechnet werden. Dazu sei angenommen, dass Hüll- und Probenstrom sich beim Zusammenfließen nicht durchdringen. Des Weiteren sei angenommen, dass sich im weiteren Verlauf im Messkanal ein ideales parabelförmiges Strömungsprofil ausgebildet hat. Ist der Volumenstrom des Probenstroms \dot{V}_{pro} wesentlich kleiner als der Volumenstrom des Hüllstroms $\dot{V}_{Hüll}$ und befindet er sich in der Mitte des Hüllstroms, so kann die Geschwindigkeit des Probenstroms im Messkanal als konstant und gemäß Gleichung 3.5 doppelt so groß wie die mittlere Strömungsgeschwindigkeit angesehen werden. Für die physikalische Querschnittsfläche A_{phys} gilt:

$$A_{phys} = \frac{\dot{V}_{Probe}}{v_{max}} = \frac{\dot{V}_{Probe}}{\dot{V}_{Hüll}} \cdot \frac{A_{Kanal}}{2} \quad \text{Gleichung 5.8}$$

Dabei ist A_{Kanal} die Querschnittsfläche des Messkanals. Die Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms ist also direkt abhängig vom Probenvolumenstrom. Der Proben-

strom und damit auch die Zellen können optimalerweise nur bis zu diesem Querschnitt fokussiert werden.

Die Fläche A_{sim} ist stets gleich oder größer als die Fläche A_{phys} . Das hat zwei Gründe. Erstens entsteht ein Ablesefehler bei der Auswertung der graphischen Darstellung der Trajektorien durch die Vereinfachung der komplexen Form des Querschnitts auf einen rechteckigen Querschnitt. Zweitens kommt es beim Zusammenfluss von Probenstrom und Hüllstrom zu einer gegenseitigen Durchdringung. Fließen Probenstrom und Hüllstrom ineinander oder ist die Grenze zwischen Probenstrom und Hüllstrom verschwommen, dehnt sich die vom fokussierten Probenstrom eingenommene Querschnittsfläche aus.

5.5 Einfache hydrodynamische Fokussierung

Konstruktiver Aufbau des Fluidsystems zur hydrodynamischen Fokussierung Version 4

In Version 4 werden eine kurze Verjüngung von $500\ \mu\text{m}$ und ein kurzer Messkanal von $100\ \mu\text{m}$ gewählt. Die Impedanzmessung erfolgt mit flächig in der Fügeebene aufbrachten Elektroden, die ein elektrisches Feld in x-Richtung erzeugen (siehe Kapitel 7.1, Seite 111). Um Koinzidenzen während der Impedanzmessung zu reduzieren, ist eine Verkürzung des Messraums notwendig. Der Querschnitt des Messkanals beträgt $70 \times 70\ \mu\text{m}^2$. Die Strukturhöhe beträgt insgesamt $700\ \mu\text{m}$. Der kleinste verwendete Fräser zur Fertigung des Formwerkzeugs hat einen Durchmesser von $200\ \mu\text{m}$. Die Radien an den senkrechten Innenkanten im Formeinsatz sind daher größer als $100\ \mu\text{m}$. Der Probenstromauslass hat einen Querschnitt von $150\ \mu\text{m}$ in der y-Richtung und $60\ \mu\text{m}$ in der z-Richtung. Die Trenn- oder Fügeebene liegt in dieser Version auf der Oberseite des Messkanals bzw. des Probenstromauslasses (siehe Abbildung 5.6). Diese Geometrie ist das Ergebnis eines Optimierungsprozesses mittels FEM-Rechnungen, bei dem die hydrodynamische Fokussierung für eine Strömungsgeschwindigkeit von $4\ \text{m/s}$ im Messkanal optimiert wurde.

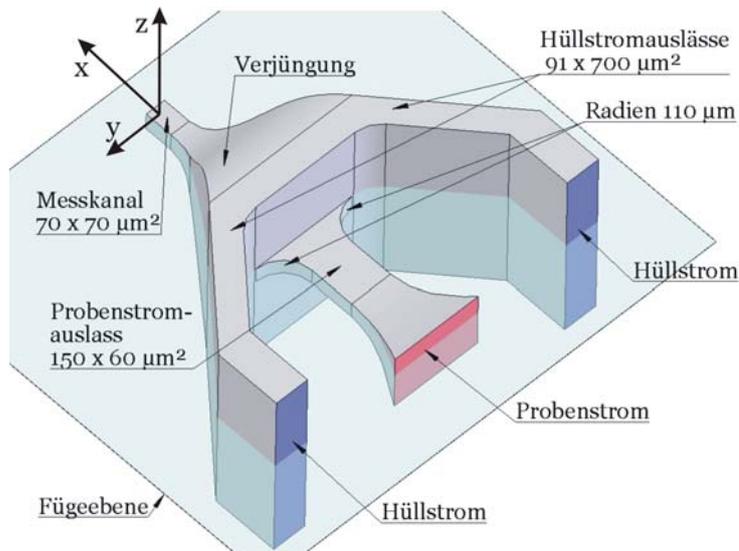


Abbildung 5.6: Hydrodynamische Fokussierung Version 4. Der Fluidikkanal ist als Volumenkörper dargestellt.

Strömungsverhältnisse der hydrodynamischen Fokussierung Version 4

Abbildung 5.7 zeigt die mittels FEM-Simulation berechneten Querschnittsflächen des fokussierten Probenstroms im Messkanal bei einer Variation des Hüll- und des Probenstroms. Durch den fräsbedingten Radius am Übergang von Hüll- und Probenstromauslass und die unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten von Probenstrom und Hüllstrom kommt es zu einem sehr späten Abreißen des Probenstroms von der Kanalwand und damit zu einer Zweiteilung des fokussierten Probenstroms. Sowohl der Einfluss des Radius am Übergang von Hüll- und Probenstromauslass (siehe hydrodynamische Fokussierung in Version 6) als auch der Einfluss unterschiedlicher Strömungsgeschwindigkeiten (siehe hydrodynamische Fokussierung in Version 8) werden noch näher diskutiert. Diese Zweiteilung bleibt über den weiteren Strömungsverlauf auch im Bereich der Verjüngung bestehen. Der fokussierte Probenstrom fließt in zwei „Bändern“ durch den Messkanal und vergrößert die mittels FEM-Simulation berechnete Querschnittsfläche A_{sim} (siehe Abbildung 5.13).

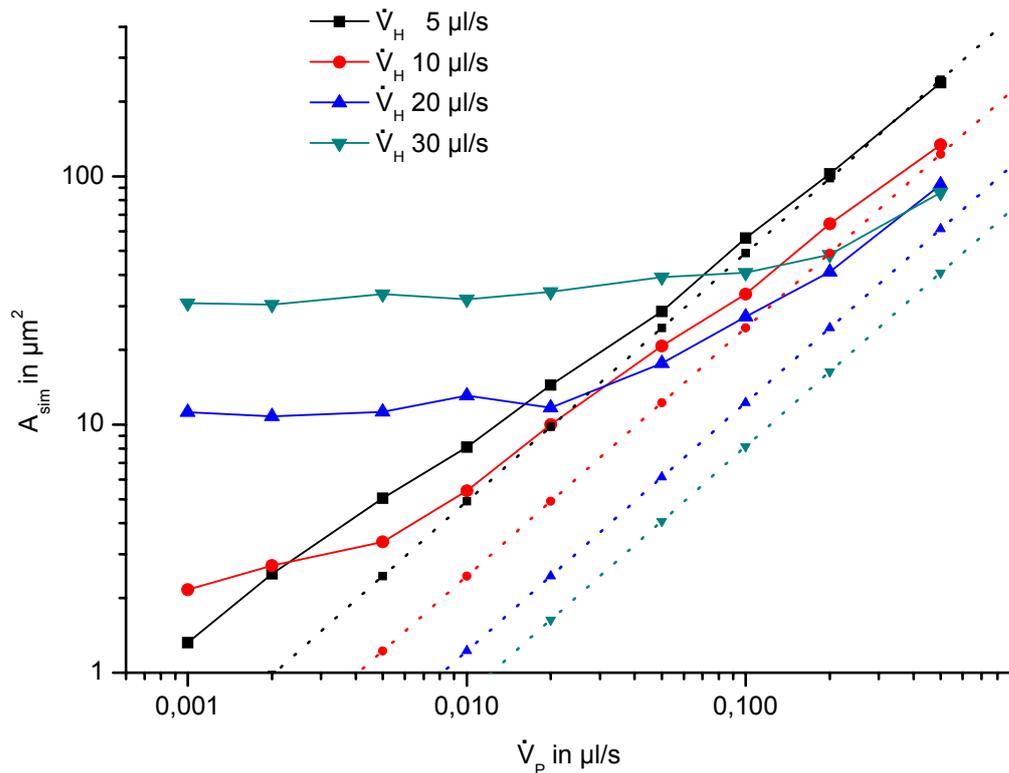


Abbildung 5.7: Vergleich der physikalischen Fläche A_{phys} (gestrichelte Linien) und der mittels FEM-Simulation berechneten Fläche A_{sim} (durchgezogene Linien) des fokussierten Probenstroms als Funktion des Probenstroms (Version 4) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

Je größer das Verhältnis vom Hüllvolumenstrom zum Probenvolumenstrom ist, desto stärker wird die Zweiteilung des fokussierten Probenstroms. Dieses Verhalten ist in Abbildung 5.7 daran zu erkennen, dass zum Beispiel bei einem Hüllvolumenstrom von 30 $\mu l/s$ schon ab einem Probenvolumenstrom von ca. 0,2 $\mu l/s$ abwärts eine Vergrößerung der Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms stattfindet. Bei kleinen Verhältnissen besteht dagegen eine gute Linearität zwischen dem Volumenstrom des Probenstroms und dem Querschnitt des fokussierten Probenstroms, wie es auch aus Gleichung 5.8 zu erwarten ist. Es wird deutlich, dass auf Grund der Zweiteilung die beiden Flächen besonders bei hohen Hüllvolumenströmen und kleinen Probenvolumenströmen deutlich voneinander abweichen.

In Abbildung 5.8 sind die Simulationsergebnisse des Verhältnisses von b_{sim} zu h_{sim} als Funktion des Probenvolumenstroms dargestellt. Bei Hüllvolumenströmen von 5 und 10 $\mu l/s$ liegt das Verhältnis zwischen 1:3 und 2:1. Bei Hüllströmen von 20 und 30 $\mu l/s$ funktioniert die Fokussierung in z-Richtung besser als y-Richtung. Dies führt zu einem Verhältnis von 3:1 bis 5,8:1.

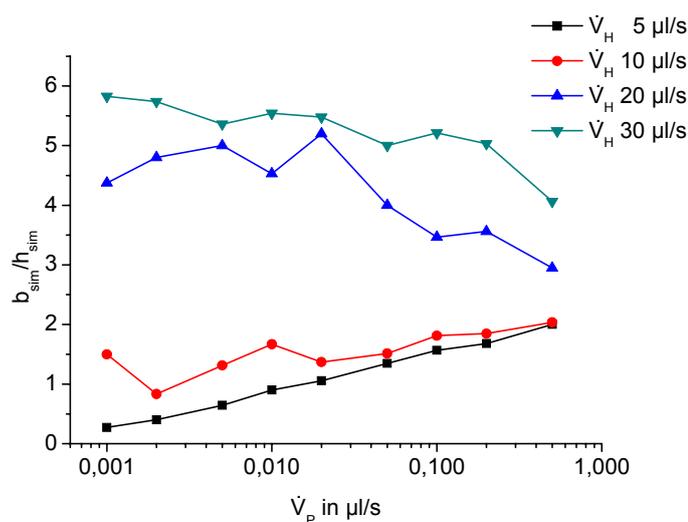


Abbildung 5.8: Mittels FEM-Simulation berechnetes Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} als Funktion des Probenvolumenstroms (Version 4) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

Die Simulationsergebnisse zeigen, dass der nutzbare Bereich der hydrodynamischen Fokussierung bei Hüllvolumenströmen zwischen 5 und 10 $\mu\text{l/s}$ und bei Probenvolumenströmen zwischen ca. 0,005 und 0,05 $\mu\text{l/s}$ liegt. In diesem Bereich liegt das Verhältnis b_{sim} zu h_{sim} zwischen 0,6:1 und 1,5:1 und der maximale Querschnitt des fokussierten Probenstroms beträgt ca. 30 μm^2 .

Einfluss der y-Ausdehnung des Proben- und Hüllstromauslasses

Im Folgenden werden exemplarisch anhand verschiedener Geometrievariationen die Auswirkungen der y-Ausdehnung des Proben- und Hüllstromauslasses auf die hydrodynamische Fokussierung gezeigt.

Mit der y-Ausdehnung des Probenstromauslasses kann die y-Ausdehnung des Probenstroms bzw. das Verhältnis zwischen b_{sim} zu h_{sim} variiert werden. Zur Untersuchung wird die y-Ausdehnung des Probenstromauslasses von 25 bis 150 μm am virtuellen Modell variiert. Bei einem Probenvolumenstrom von 0,01 $\mu\text{l/s}$ und bei einem Hüllvolumenstrom von 10 $\mu\text{l/s}$ wird das Verhalten demonstriert. Das Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} nimmt mit zunehmender y-Ausdehnung des Probenstromauslasses zu und erreicht bei ca. 100 μm den Wert 1. Die Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms sinkt jedoch bei einer Verbreiterung des Probenstromauslasses von 100 auf 150 μm (siehe Abbildung 5.9). Da beide Parameter optimiert werden müssen, wurde eine endgültige y-Ausdehnung von 150 μm gewählt.

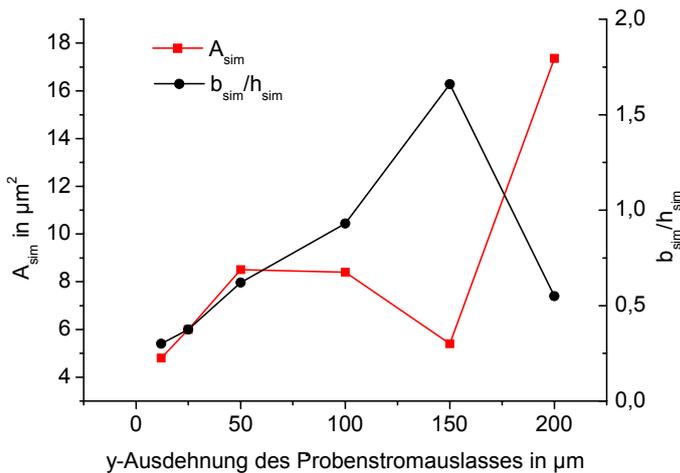


Abbildung 5.9: Mittels FEM-Simulation berechnete Auswirkungen der Variation der y-Ausdehnung des Probenstromauslasses (Version 4)

Auch die y-Ausdehnung der Hüllstromeinlässe hat einen entscheidenden Einfluss auf die Güte der Fokussierung. Sowohl durch zu breite als auch durch zu schmale Hüllstromeinlässe kann der Probenstrom defokussiert werden (siehe Abbildung 5.10). Verkleinert man die Hüllstromeinlässe, erhöht sich die Fließgeschwindigkeit. Dadurch verschiebt sich der Punkt, an dem der Probenstrom von der Seitenwand abreißt, weiter nach außen bzw. stromabwärts und es kommt dadurch zu einer Zweiteilung des Probenstroms. Wird der Hüllstromauslass verbreitert, wird der Probenstrom nur in der y-Richtung fokussiert, während er sich in der z-Richtung nahezu auf die vollständige Kanalhöhe ausdehnt. Aus der z-Richtung fließt deutlich weniger Hüllstrom zur Fokussierung in dieser Richtung an den Probenstrom heran. Bei einer y-Ausdehnung der Hüllstromauslässe von ca. 70 bis 100 μm erreicht man dagegen ein Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} von ca. 0,7.

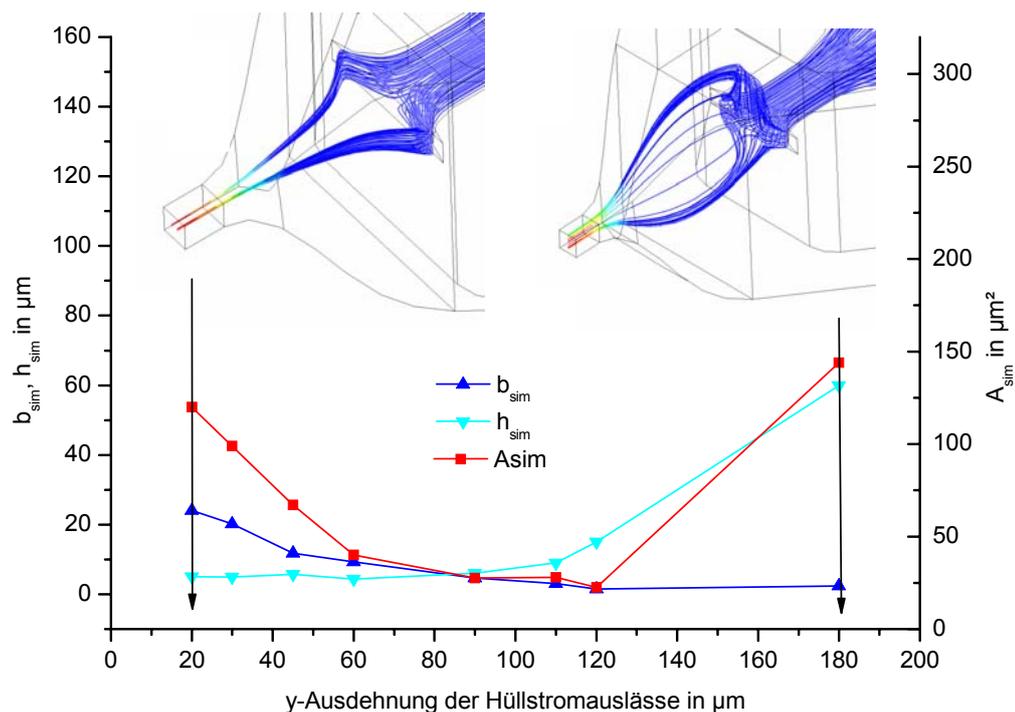


Abbildung 5.10: Veränderungen des fokussierten Probenstroms bei unterschiedlichen y-Ausdehnung der Hüllstromeinlässe in Version 4 als Ergebnis der Simulation. Die beiden eingefügten Trajektorienbilder verdeutlichen die Strömungsverhältnisse bei schmalen (links) und breiten (rechts) Hüllstromauslässen.

Experimentelle Strömungsuntersuchungen an Analysechips Version 4

Zum Zeitpunkt der experimentellen Untersuchung an den Analysechips Version 4 wurden lediglich die Drücke von Hüll- und Probenstrom an den Vorratsbehältern zur Abschätzung der Volumenströme gemessen. Von den Vorratsbehältern führten dünne Schläuche zum Analysechip. Die Volumenströme und die Drücke unmittelbar vor bzw. in den Analysechips waren unbekannt. Zur Aufnahme einer Messreihe wurde ein konstanter Druck des Hüllstrom eingestellt und der Druck des Probenstroms variiert. In Abbildung 5.11 ist zu erkennen, dass sich der Probenstrom mit zunehmendem Probenstrom ausdehnt. Für diese Aufnahmen wurde eine Rhodamin-6G-Lösung als Probe verwendet, mit Licht der Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Fluoreszenz aufgenommen. Durch die Verwendung einer invertierten Grauskala erscheint der Probenstrom dunkel. In Abbildung 5.12 ist die Fluoreszenzintensität senkrecht zur fluidischen Achse dargestellt. In Abbildung 5.12 ist die Zweiteilung des fokussierten Probenstroms an dem zweifachen Intensitätsmaxima bei einem Probenstromdruck von 240 und 260 hPa zu erkennen.

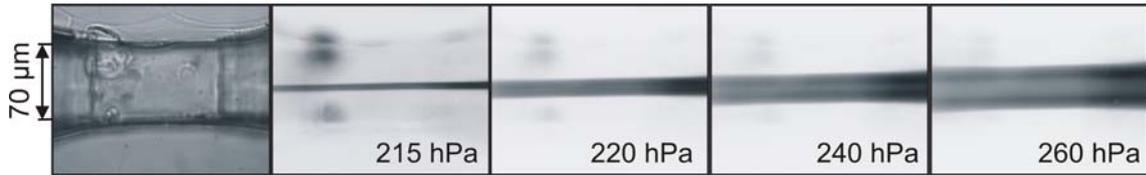


Abbildung 5.11: Fluoreszenzaufnahmen in der x-y-Ebene des fokussierten Probenstroms in Version 4 [PTB]. Zur Verdeutlichung der Kanalgrenzen ist eine Hellfeldaufnahme (linkes Bild) dargestellt.

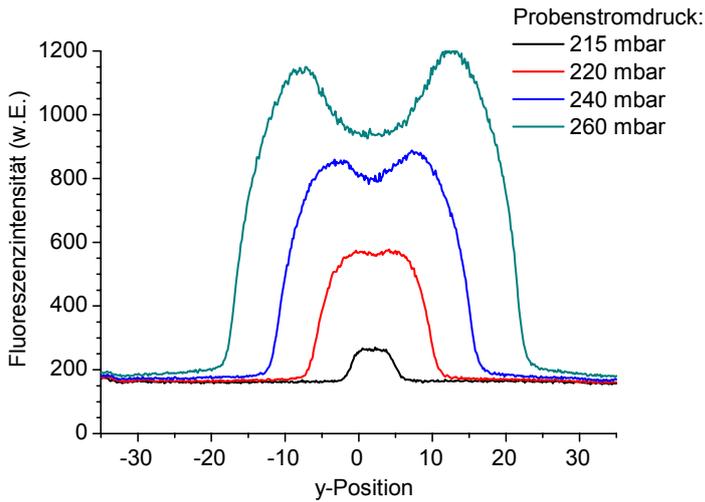


Abbildung 5.12: Fluoreszenzintensität des fokussierten Probenstroms als Funktion verschiedener Speisedrücke (Version 4) [PTB, Bra05]

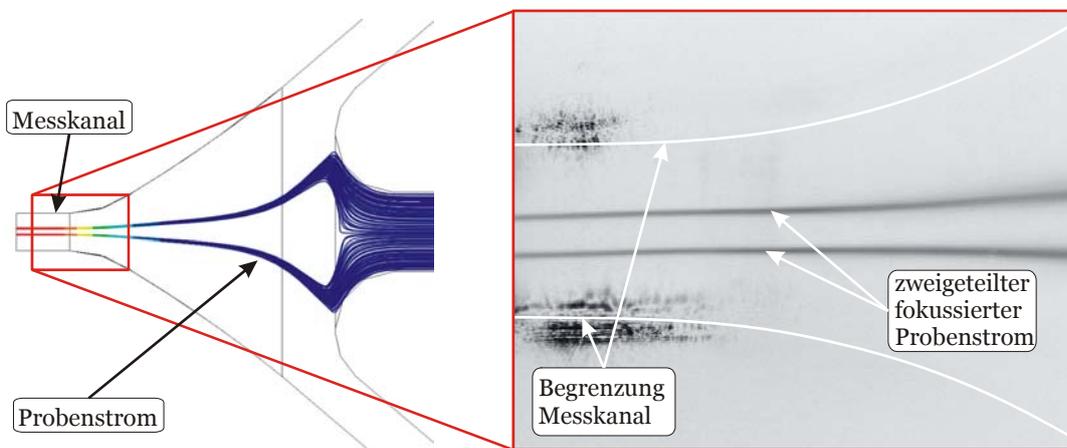


Abbildung 5.13: Zweiteilung des Probenstroms in Version 4. Links: Trajektorienbild der FEM-Simulation, rechts: vergrößerter Ausschnitt der realen Strömung jeweils in der x-y-Ebene.

In den FEM-Berechnungen zeigte sich entsprechend den experimentellen Beobachtungen eine Zweiteilung des fokussierten Probenstroms (siehe Abbildung 5.13).

5.6 Verbesserte hydrodynamische Fokussierung

Bei der hydrodynamischen Fokussierung Version 6 soll gezielt die Zweiteilung des fokussierten Probenstroms insbesondere bei großen Hüllvolumenströmen und kleinen Probenvolumenströmen beseitigt werden.

Konstruktiver Aufbau des Fluidsystems zur hydrodynamischen Fokussierung Version 6

In Version 6 wird die Impedanzmessung von einem parallel zur Flussrichtung gehenden Feld auf ein quer zur Flussrichtung ausgerichtetes Feld umgestellt (siehe dazu Kapitel 7.2, Seite 112). Aus diesem Grund kann der Messkanal deutlich länger mit Vorteilen für die optische Detektion gestaltet werden. Der Querschnitt des Messkanals wird zur Reduzierung der Verstopfungsgefahr auf $100 \times 100 \mu\text{m}$ vergrößert.

Ein leichteres Abreißen des Probenstroms von der Seitenwand des Probenstromauslasses wird durch einen kleineren Radius erreicht. Durch den Einsatz eines $50\text{-}\mu\text{m}$ -Schafffräasers wird der Radius der zwischen Probenstrom- und Hüllstromauslass um den Faktor vier gegenüber Version 4 verkleinert. Problematisch beim Einsatz eines $50\text{-}\mu\text{m}$ -Fräasers ist die sehr kurze Schneidenlänge von $100 \mu\text{m}$. Um den Bereich zwischen Hüllstrom- und Probenstromauslass mit einem $50\text{-}\mu\text{m}$ -Fräser bearbeiten zu können, muss der Hüllstromkanal für den sich aufweitenden Fräaserschaft innen um 20° angeschrägt werden.

Das Verhältnis von Proben- zu Hüllvolumenstrom bei einer durchflusszytometrischen Messung liegt in der Größenordnung von 1:1000. Das Querschnittsverhältnis von Probenstromauslass zu Hüllstromauslass in Version 4 beträgt ca. 1:14. Das bedeutet, dass der Hüllstrom eine über 70-mal größere Geschwindigkeit als der Probenstrom beim Zusammenfluss hat. Diese Geschwindigkeitsdifferenz führt zu einer Senkung des statischen Drucks im Bereich des Zusammenflusses gemäß der Bernoulli-Gleichung. Dies bewirkt ein spätes Abreißen des Probenstroms von der Seitenwand und eine Zweiteilung des fokussierten Probenstroms. In Version 6 wird die Geschwindigkeitsdifferenz durch einen deutlich verkleinerten Probenstromauslass ($30 \times 50 \mu\text{m}$) angeglichen. Das Flächenverhältnis von Proben- zu Hüllstromauslass wird in Version 6 auf 1:88 gesetzt. Bei einem 1000-fach größeren Hüllvolumenstrom fällt die Geschwindigkeit auf die 11-fache des Probenstroms. Eigene Erfahrungen haben gezeigt, dass kleinere Querschnitte des Probenstromauslasses leicht zum Verstopfen durch Zellen oder Partikel neigen.

Während in der x-y-Ebene die Verjüngung des Kanals sehr gleichförmig ausfällt, wurde die Verjüngung in der x-z-Ebene sehr steil gewählt und die Fokussierung in z-Richtung verbessert. Die Strukturhöhe beträgt $650 \mu\text{m}$. Eine Übersicht über die Geometrie der hydrodynamischen Fokussierung in Version 6 liefert Abbildung 5.14.

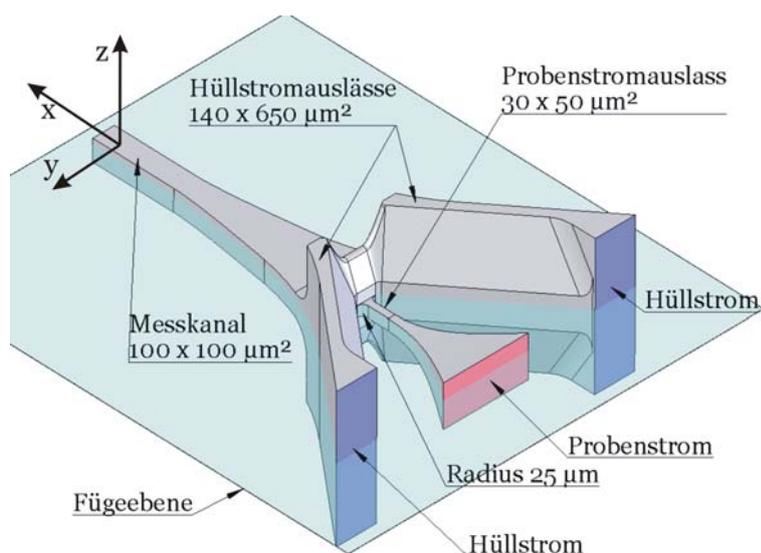


Abbildung 5.14: Hydrodynamische Fokussierung Version 6. Der Fluidikkanal ist als Volumenkörper dargestellt.

Strömungsverhältnisse der hydrodynamischen Fokussierung in Version 6

Um eine Vergleichbarkeit der Simulationsergebnisse der einzelnen Versionen herzustellen, werden die Hüllvolumenströme dem veränderten Messkanalquerschnitt so angepasst, dass die Strömungsgeschwindigkeiten im Messkanal gleich sind.

Abbildung 5.15 zeigt die mittels FEM-Simulation berechnete Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms in Abhängigkeit der Hüll- und Probenvolumenströme. Im Vergleich zu Version 4 ist die Zweiteilung deutlich reduziert (vergleiche dazu Abbildung 5.7). In Version 4 ist eine Fokussierung unter einen Querschnitt von $10 \mu\text{m}^2$ nur bei kleinen Strömungsgeschwindigkeiten möglich. In Version 6 wird dieser Wert auch bei deutlich größeren Strömungsgeschwindigkeiten erreicht. Eine Zweiteilung des Probenstroms, erkennbar an den waagrecht verlaufenden Abschnitten der einzelnen Kurven, tritt nur bei Hüllvolumenströmen größer als $40 \mu\text{l/s}$ und bei Probenvolumenströmen kleiner als $0,02 \mu\text{l/s}$ auf.

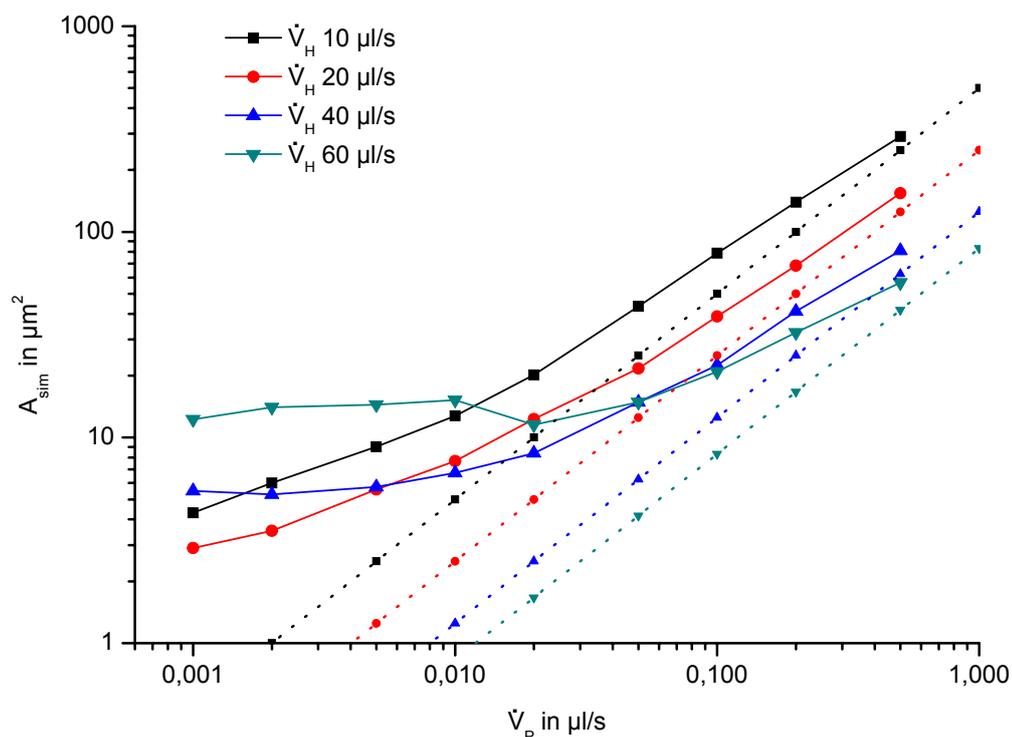


Abbildung 5.15: Vergleich der physikalischen Fläche A_{phys} (gestrichelte Linien) und der mittels FEM-Simulation berechneten Fläche A_{sim} (durchgezogene Linien) des fokussierten Probenstroms als Funktion des Probenstroms (Version 4) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

In Abbildung 5.16 ist das mittels FEM-Simulation berechnete Verhältnis b_{sim} zu h_{sim} dargestellt. Bei großen Hüllvolumenströmen ($> 40 \mu\text{l/s}$) und kleinen Probenstromen ($< 0,005 \mu\text{l/s}$) wird durch die Zweiteilung des Probenstroms ein ausgeglichenes Verhältnis von nahezu 1:1 erreicht. Da bei diesen Strömungsbedingungen b_{sim} und h_{sim} ca. $3 \mu\text{m}$ beträgt und damit kleiner oder gleich des Durchmessers der zu messenden Zellen ist, spielt die Zweiteilung in diesem Bereich keine Rolle. Bei anderen Strömungsverhältnissen ist das Verhältnis weniger optimal (bis zu 1:5,5). Bei kleinen Hüllströmen wird der Probenstrom stark zu einem in z-Richtung stehenden Band zusammengedrückt.

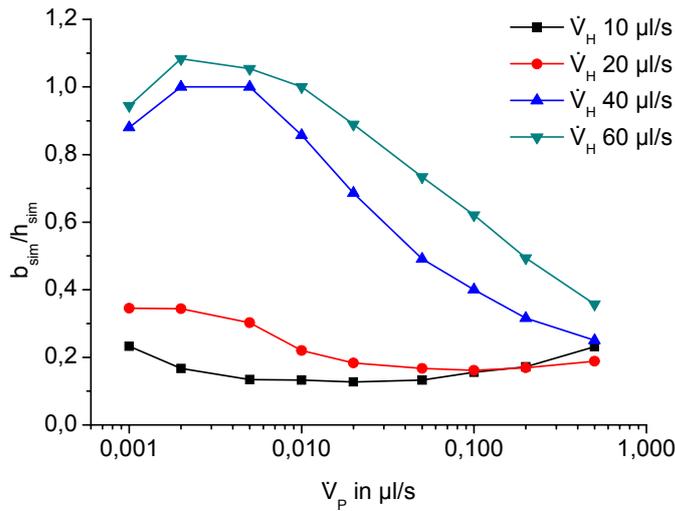


Abbildung 5.16: Mittels FEM-Simulation berechnetes Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} als Funktion des Probenstroms (Version 6) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

Einfluss des Radius am Probenstromauslass

Der Einfluss des Radius am Probenstromauslass auf die hydrodynamische Fokussierung wird am virtuellen Modell untersucht. In Abbildung 5.17 sind die Ergebnisse gezeigt. Der Radius wird von 0 bis 100 μm verändert. Der Hüllvolumenstrom beträgt 40 $\mu\text{l/s}$, der Probenvolumenstrom 0,005 $\mu\text{l/s}$. Der Fokus in y-Richtung nimmt mit steigendem Radius zu. Der Fokus in z-Richtung bleibt dagegen relativ unbeeinflusst. Dementsprechend nimmt der Querschnitt des fokussierten Probenstroms zu. Diese Zunahme ist nicht linear. Der Einfluss wird ab einem Radius von ca. 50 μm stärker. Eine Veränderung des Radius von 0 bis 50 μm hat dagegen einen verminderten Effekt. Anhand der berechneten Werte wird deutlich, dass durch den Einsatz eines 50- μm -Fräasers eine deutliche Verbesserung der Fokussierung erreicht wird.

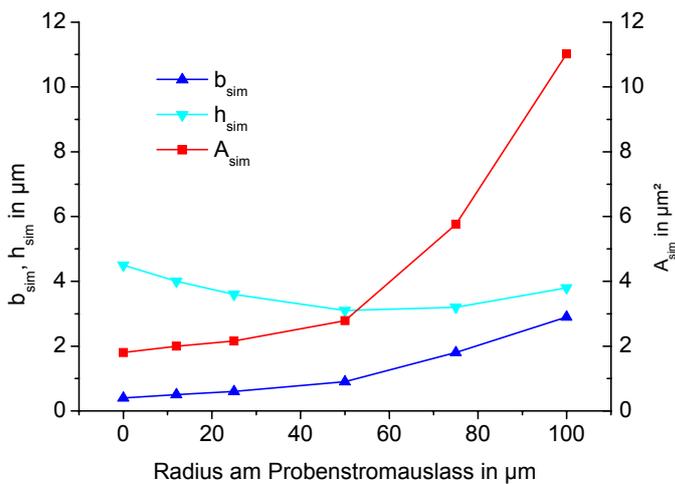


Abbildung 5.17: Mittels FEM-Simulation berechnete Auswirkungen der Variation des Radius am Probenstromauslass (Version 6)

Einfluss des Öffnungswinkels der Verjüngung

Bei den FEM-Rechnungen wurde in der x-z-Ebene der halbe Öffnungswinkel von 20° bis 90° variiert und die Fokussierung bei einem Hüllvolumenstrom von $40 \mu\text{l/s}$ und einem Probenvolumenstrom von $0,005 \mu\text{l/s}$ berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.18 dargestellt. Bei Winkeln unter ca. 40° lässt die Effizienz der Fokussierung deutlich nach. Die geringste Querschnittsfläche für den Probenstrom wird bei 90° erreicht.

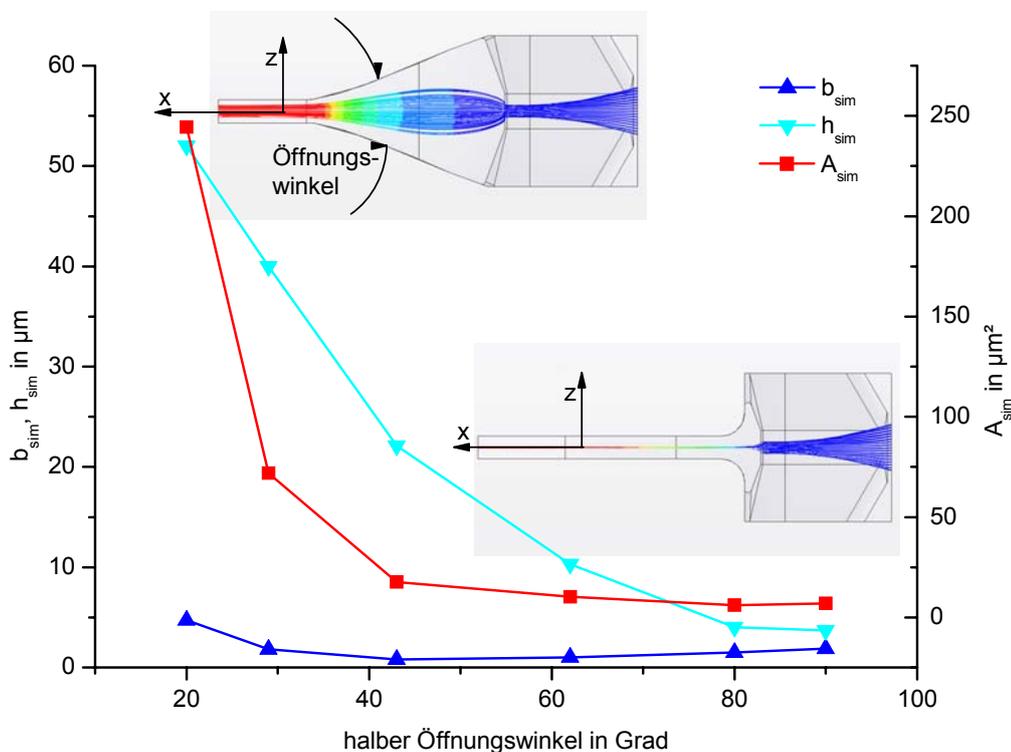


Abbildung 5.18: Mittels FEM-Simulation berechnete Auswirkungen der Variation des halben Öffnungswinkels der Verjüngung in Version 6. Die eingefügten Strömungsbilder verdeutlichen die Strömungsverhältnisse bei 20° - und 90° -Winkeln.

Experimentelle Strömungsuntersuchungen an Analysechips Version 6

Zur Untersuchung der hydrodynamischen Fokussierung in Version 6 wurden ähnliche Untersuchungen wie in Version 4 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.19 und Abbildung 5.20 zu sehen.

Bei einem Speisedruck von 210 hPa des Probenstroms und 400 hPa des Hüllstroms in den Vorratsbehältern wurde eine y-Ausdehnung des fokussierten Probenstroms von ca. $5 \mu\text{m}$ gemessen. Da zur Zeit dieser Messungen noch keine direkte Volumenstrommessung zur Verfügung stand, wurden die Volumenströme für diese Drücke durch Wägungen bestimmt und entsprechen einem Hüllstrom von ca. $26 \mu\text{l/s}$ und einem Probenstrom von $0,1 \mu\text{l/s}$. Die Simulationsrechnung ergibt für diese Werte eine y-Ausdehnung des fokussierten Probenstroms von ca. $3 \mu\text{m}$. Im Vergleich zu Version 4 (siehe Abbildung 5.11) ist bei vergleichbaren Speisedrücken eine wesentlich bessere Fokussierung in y-Richtung erreicht worden.

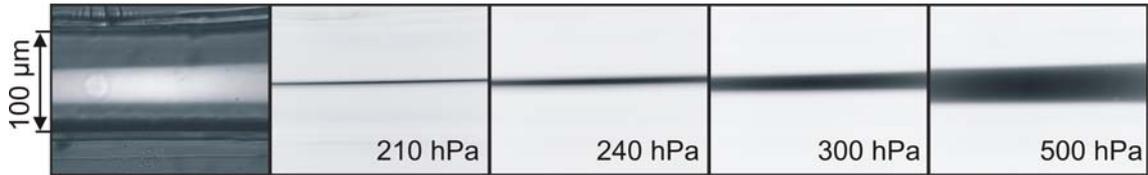


Abbildung 5.19: Fluoreszenzaufnahmen in der x-y-Ebene des fokussierten Probenstroms in Version 6 [PTB]. Zur Verdeutlichung der Kanalgrenzen wird eine Hellfeldaufnahme (linkes Bild) gezeigt.

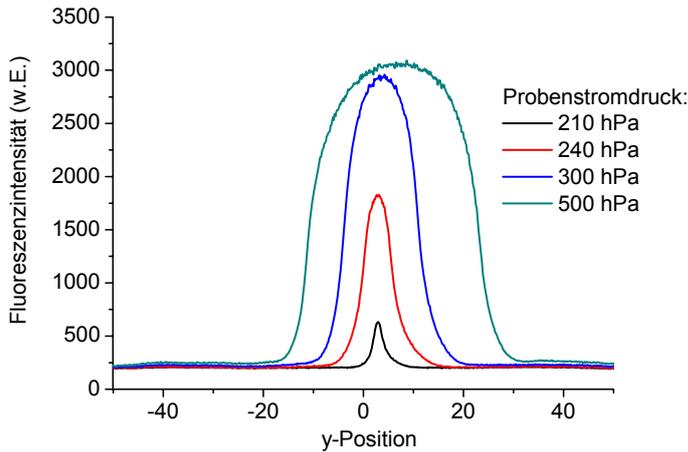


Abbildung 5.20: Fluoreszenzintensität des fokussierten Probenstroms bei verschiedenen Speisedrücken in Version 6 [PTB, Bra05]

Einfluss der Fertigungstoleranzen auf die hydrodynamische Fokussierung

Die hydrodynamische Fokussierung Version 6 weist bei den experimentellen Untersuchungen eine Instabilität in der z-Richtung auf. Um dies näher zu untersuchen werden mehrere Analysechips so präpariert, dass der Messkanal in der x-z-Ebene beobachtet werden kann (siehe Abbildung 5.21). Im linken Bild ist ein Analysechip gezeigt, bei dem eine relativ gute Fokussierung in z-Richtung erreicht worden ist. Das rechte Bild zeigt die Fokussierung in z-Richtung eines anderen Analysechips der gleichen Version, bei dem eine deutlich verschlechterte Fokussierung zu sehen ist. Zur Verdeutlichung ist die Kanalbegrenzung nachträglich in die Aufnahmen eingezeichnet. Angemerkt sei, dass bei beiden Aufnahmen der Probenstrom in y-Richtung sehr gut fokussiert.

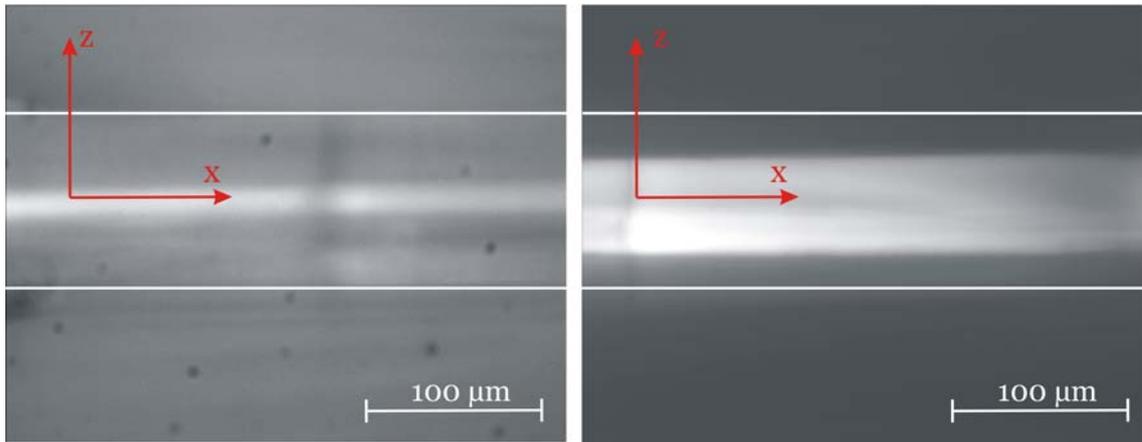


Abbildung 5.21: Mikroskopaufnahme des fokussierten Probenstroms Version 6 in der x-z-Ebene

Durch die FEM-Rechnungen wird gezeigt, dass Abweichungen auf Grund der fertigungstechnischen Toleranzen die hydrodynamische Fokussierung stark negativ beeinflussen. Insbesondere durch die nicht senkrechten Seitenwände (3° - 7° Abweichungen von der Senkrechten), die sich durch den Fräsprozess ergeben, wird die Strömung beeinträchtigt. An der hydrodynamischen Fokussierung wurden virtuell Schrägen von 5° an den Außenseiten der Hüllstromzuführungen eingefügt und die hydrodynamische Fokussierung bei einem Hüllvolumenstrom von $20 \mu\text{l/s}$ und einem Probenvolumenstrom von $0,1 \mu\text{l/s}$ berechnet. Wie in Abbildung 5.22 zu erkennen ist, fokussiert der Probenstrom in z-Richtung bei der leicht veränderten Geometrie deutlich schlechter. Die Fokussierung in y-Richtung dagegen ist stabil.

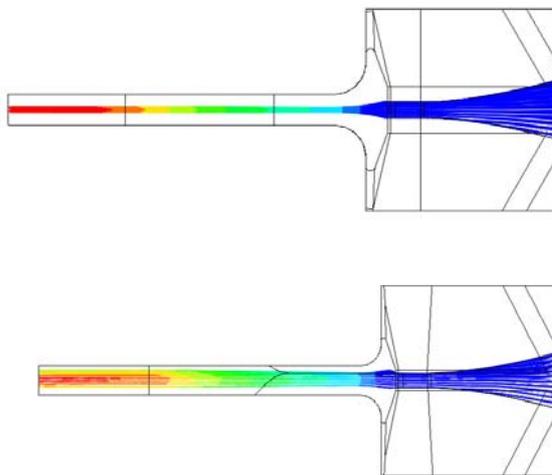


Abbildung 5.22: Vergleich der mittels FEM-Simulation berechneten z-Ausdehnung des fokussierten Probenstroms bei der idealen CAD-Geometrie (oben) und der veränderten Geometrie (unten) (Version 6).

5.7 Kaskadierte hydrodynamische Fokussierung

Mit den Versionen 4 und 6 wurden zwei hydrodynamische Fokussierungen realisiert, die einige der in Kapitel 5.1 (Seite 60) geforderten Funktionen erfüllen. Problematisch bleiben trotz einer Verbesserung von Version 6 gegenüber Version 4 die Zweiteilung des Probenstroms und die Instabilität der hydrodynamischen Fokussierung gegenüber Fertigungstoleranzen.

Mit der Version 6 konnte gezeigt werden, dass eine Angleichung der Strömungsgeschwindigkeiten des Hüll- und Probenstroms beim Zusammenfluss die Zweiteilung des fokussierten Probenstroms reduziert. Sollen die Strömungsgeschwindigkeiten weiter angepasst werden, so kann dies durch eine Hintereinanderschaltung mehrerer hydrodynamischer Fokussierungsstufen erfolgen. Eine solche Anordnung nennt man kaskadierte hydrodynamische Fokussierung [Into2].

In der Version 8 wird eine kaskadierte hydrodynamische Fokussierung in zwei Stufen realisiert. Nach außen hin besitzt der Hüllstrom einen Anschluss. Die Verteilung des Hüllstroms auf die beiden Fokussierstufen erfolgt intern auf dem Analysechip.

Konstruktiver Aufbau des Fluidsystems zur hydrodynamischen Fokussierung Version 8

In Abbildung 5.23 ist der konstruktive Aufbau des Fluidsystems zur hydrodynamischen Fokussierung Version 8 dargestellt. Der Messkanal wird gegenüber Version 6 auf einen Querschnitt von $125 \times 125 \mu\text{m}^2$ vergrößert. Diese Änderung wird zu Gunsten eines einfacheren konstruktiven Aufbaus durchgeführt. Die Nuten der Lichtwellenleiter und der Messkanal befinden sich ausschließlich im Boden des Analysechips. Dadurch wird vermieden, dass die Fügeebene durch den Messkanal läuft und Fehler wie zum Beispiel eine nicht vollflächig geschlossene Fügeebene die Messung beeinträchtigt. Die Radien am Probenstromauslass werden auf $110 \mu\text{m}$ vergrößert, so dass sie sich mit einem 0,2-mm-Fräser fertigen lassen und eine Ansträgung der Innenseiten der Hüllstromzuführungen wie in Version 6 entfallen kann. Zur Verbesserung der Fokussierung in z-Richtung wird die gesamte Strukturhöhe der hydrodynamischen Fokussierung von $650 \mu\text{m}$ auf $1000 \mu\text{m}$ vergrößert.

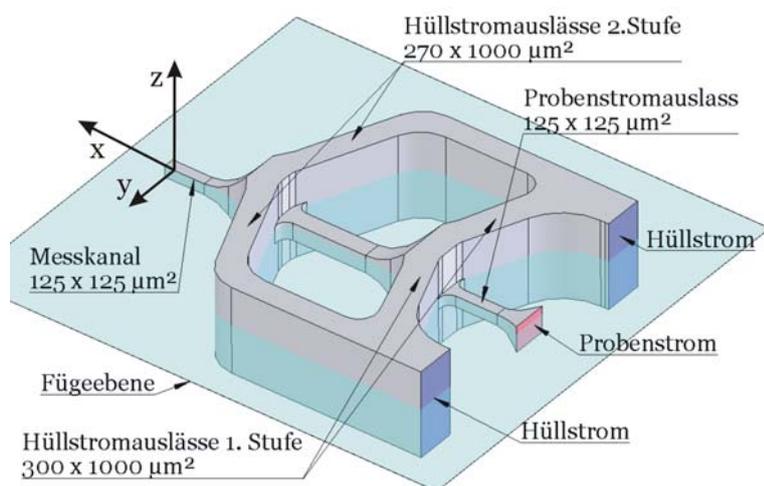


Abbildung 5.23: Hydrodynamische Fokussierung Version 8. Der Fluidikkanal ist als Volumenkörper dargestellt.

Strömungsverhältnisse der hydrodynamischen Fokussierung Version 8

Große Geschwindigkeitsdifferenzen lassen sich nur dann vermeiden, wenn die Fokussierung der ersten und der zweiten Stufe (in Flussrichtung gezählt) annähernd gleich sind. Dann gilt:

$$\frac{\dot{V}_P}{\dot{V}_{H1}} = \frac{\dot{V}_{H1} + \dot{V}_P}{\dot{V}_H - \dot{V}_{H1}} \approx \frac{\dot{V}_{H1}}{\dot{V}_{H2}}. \quad \text{Gleichung 5.9}$$

Dabei repräsentieren \dot{V}_P den Probenvolumenstrom, \dot{V}_{H1} den Hüllvolumenstrom, der durch die erste Fokussierung fließt, \dot{V}_{H2} den Hüllvolumenstrom der durch die zweite Fokussierung fließt, und \dot{V}_H den gesamten Hüllvolumenstrom.

Bei einem Probenvolumenstrom von $0,05 \mu\text{l/s}$ und einer maximalen Strömungsgeschwindigkeit von $3,8 \text{ m/s}$ (das entspricht einem gesamten Hüllstrom \dot{V}_H von ca. $60 \mu\text{l/s}$) muss \dot{V}_{H1} ca. $1,8 \mu\text{l/s}$ betragen. Das bedeutet, dass ca. $1/33$ des gesamten Hüllstroms in die erste Stufe fließen muss, der Rest in die zweite. Wie aus Gleichung 5.9 ersichtlich hängt das Verhältnis des Hüllstroms der ersten Stufe zum Hüllstrom der zweiten Stufe vom gesamten Hüllvolumenstrom und dem Probenvolumenstrom ab. Insofern kann kein festes Verhältnis für alle Volumenströme angegeben werden. Der Wert von $1:33$ wird jedoch als Anhaltswert genommen.

Durch die zweistufige Fokussierung und den Angleich der Strömungsgeschwindigkeiten ist die unerwünschte Zweiteilung des Probenstroms auch für kritische Strömungsparameter (kleine Probenströme kombiniert mit großen Hüllströmen) beseitigt. In Abbildung 5.24 ist ein Vergleich der Versionen 4 und 8 dargestellt. Die Probenströme ($\dot{V}_P = 0,001$) und die Strömungsgeschwindigkeiten im Messkanal ($\bar{v} = 6 \text{ m/s}$) sind in den Abbildungen vergleichbar. In beiden Versionen wurde der Radius am Probenstromauslass mit einem $200\text{-}\mu\text{m}$ -Fräser gefertigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass in Version 8 in der ersten Fokussierungsstufe keine Aufweitung des Probenstroms stattfindet. Die Strömungsgeschwindigkeiten von Hüllstrom und Probenstrom sind nahezu identisch. Im Vergleich dazu fließt in der Version 4 der Hüllstrom mit einer sehr viel höheren Geschwindigkeit an den Probenstrom heran. Der Probenstrom reißt spät von der Kanalwand ab, sodass es zu einer Zweiteilung kommt.

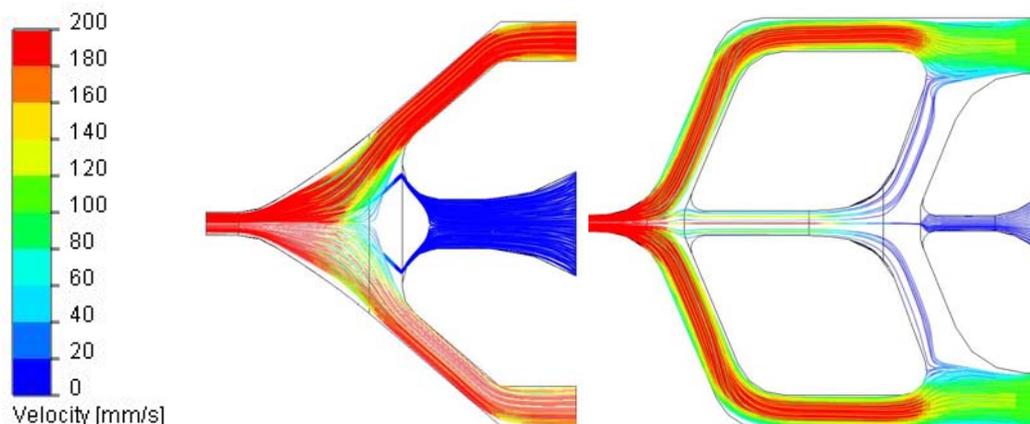


Abbildung 5.24: Vergleich der mittels FEM-Simulation berechneten Strömungen in der Version 4 links und der Version 8 rechts

Diese deutlich verbesserten Strömungsverhältnisse zeigen sich auch in den Querschnittsflächen des fokussierten Probenstroms bei verschiedenen Strömungsverhältnis-

sen. Wie in Abbildung 5.25 zu sehen ist, steigt der Querschnitt mit zunehmendem Probenstrom linear über weite Bereiche an. Lediglich bei sehr hohen Hüllvolumenströmen von $90 \mu\text{l/s}$ kommt es zu einer leichten Aufweitung des Probenstroms. Dies lässt sich wie in den Versionen 4 und 6 an der bei sehr kleinen Probenströmen abknickenden Kurve erkennen.

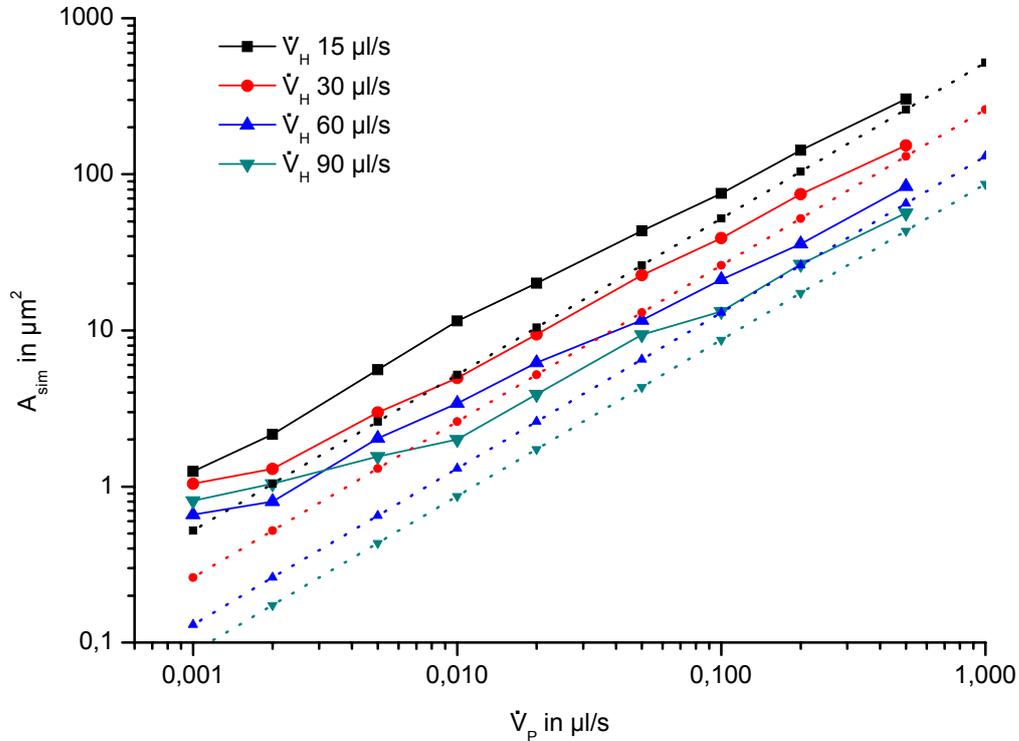


Abbildung 5.25: Vergleich der physikalischen Fläche A_{phys} (gestrichelte Linien) und der mittels FEM-Simulation berechneten Fläche A_{sim} (durchgezogene Linien) des fokussierten Probenstroms als Funktion des Probenstroms (Version 8) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

Auch das Verhältnis b_{sim} zu h_{sim} ist weitgehend ausgeglichen (siehe Abbildung 5.26). In dem für Messzwecke relevanten Bereich eines Probenstroms von $0,01$ bis $0,1 \mu\text{l/s}$ liegt das Verhältnis b_{sim} zu h_{sim} zwischen $0,6$ und 1 . Die Abhängigkeit des Verhältnisses vom Hüllvolumenstrom ist im Vergleich zu Version 6 reduziert.

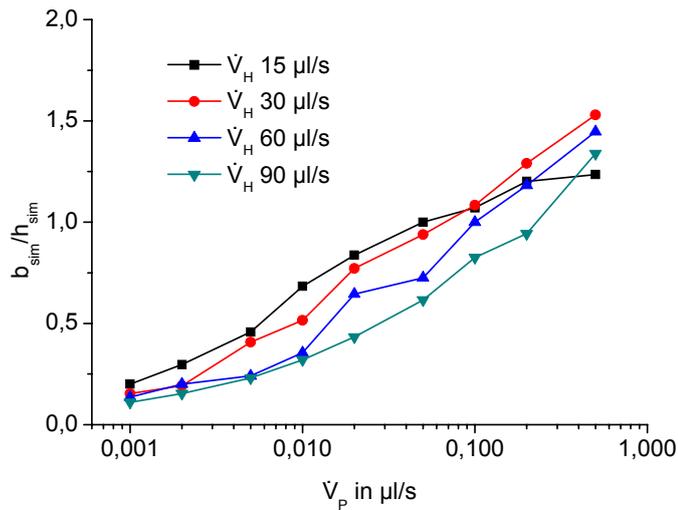


Abbildung 5.26: Mittels FEM-Simulation berechnetes Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} (Version 8) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

Experimentelle Strömungsuntersuchungen an Analysechips Version 8

Zur Bestimmung der Ausdehnung des fokussierten Probenstroms wird an die Fluoreszenzintensität in x-Richtung eine Gaußfunktion angepasst. Anhand der vollen Halbwertsbreite (FWHM) dieser angepassten Gaußfunktion wird die Ausdehnung des fokussierten Probenstroms bestimmt. In Abbildung 5.27 ist das Vorgehen für einen bestimmten Parametersatz ($\dot{V}_H = 23 \mu\text{l/s}$, $\dot{V}_p = 0,2 \mu\text{l/s}$) dargestellt. Zum Vergleich sind die aus den Simulationen berechneten Fluoreszenzintensitäten mit in die Diagramme eingezeichnet. Bei der unteren Aufnahme spiegelt sich der fluoreszierende Probenstrom in der Fügeebene.

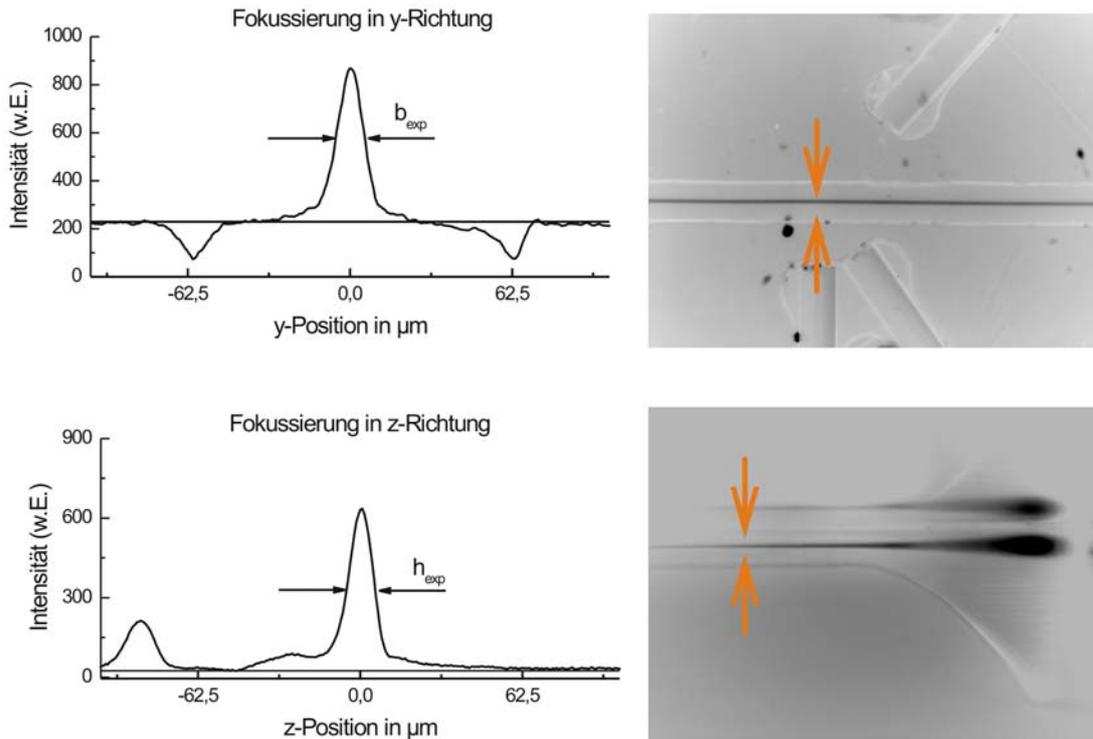


Abbildung 5.27: Auswertung der Ausdehnung der hydrodynamischen Fokussierung [PTB, Yil06]

In Abbildung 5.28 sind die gemessenen und die mittels FEM-Simulation berechneten Ausdehnungen des fokussierten Probenstroms in einem Diagramm aufgetragen. Bei Probenströmen zwischen $0,1$ und $1 \mu\text{l/s}$ stimmen die beiden Kurven bis auf eine Abweichung weniger Mikrometer überein. Oberhalb von $1 \mu\text{l/s}$ fließt der Probenstrom bei der ersten Fokussierungsstufe in den Hüllstrom zurück. Dadurch verformt sich der fokussierte Probenstrom. In z -Richtung weitet sich der fokussierte Probenstrom auf, in y -Richtung verschmälert er sich dagegen. Auch dieses Verhalten gibt die Strömungssimulation wieder. Der Bereich größer $1 \mu\text{l/s}$ hat jedoch für eine durchflusszytometrische Messung keine Bedeutung. Im Bereich kleiner als $0,1 \mu\text{l/s}$ Probenstrom ergeben sich Abweichungen bis zu $4 \mu\text{m}$. Die gemessenen Ausdehnungen nähern sich bei kleiner werdenden Probenströmen einem Wert von ca. $5 \mu\text{m}$ asymptotisch an, die mittels FEM-Simulation berechneten Werte gehen asymptotisch gegen null.

Ein Rückschluss auf die tatsächliche Ausdehnung des fokussierten Probenstrom ist bei den durchgeführten Untersuchungen auf Grund des nicht optimalen Versuchsaufbaus nur schwer möglich. Die Mikroskopbilder unterliegen einer Unschärfe. Diese Unschärfe kann optische oder strömungstechnische Ursachen haben.

Die optische Qualität der Mikroskopaufnahmen ist durch das Auflösungsvermögen des Mikroskopobjektivs und der Kamera begrenzt. Für diese Aufnahmen wurden 10-fach Objektive mit einer numerischen Apertur von $0,2$ und einer theoretisch erreichbaren Auflösung von ca. $1,25 \mu\text{m}$. Die verwendete Kamera hat eine Auflösung von 1040×1388 Pixeln. Weitere Beiträge zur optischen Unschärfe sind durch die nicht optischen Grenzflächen (fertigungsbedingte Rauheiten und Unebenheiten) beim Analysechip zu erwarten.

Durchdringen sich Proben- und Hüllstrom, kommt zu einer Aufweitung und die Grenze zwischen Proben- und Hüllstrom verwischt. Darüber hinaus ist die hydrodynamische Fokussierung sehr sensibel gegenüber äußeren Schwingungen. Körperschall überträgt sich vom äußeren fluidischen System auf die hydrodynamische Fokussierung. Die Mikroskopaufnahmen wurden mit Belichtungszeiten zwischen 10 und 500 ms aufgenommen. Hochfrequente Störungen größer als der Kehrwert der Belichtungszeiten (> 2 bis 100 Hz) können somit nicht aufgelöst werden und vergrößern die gemessenen Ausdehnungen des fokussierten Probenstroms.

Zur Beobachtung der Fokussierung der z-Richtung wird ein Durchflusszytometer der Version 8 so präpariert, dass ein Blick auf den Messkanal in der x-z-Ebene möglich ist. Der Zugang in y-Richtung zum Messkanal ist durch die Kanäle der Lichtwellenleiter sehr eingeschränkt. Es beeinträchtigt die Qualität der Aufnahmen jedoch erheblich (siehe Abbildung 5.27). Da keine vollen Halbwertsbreiten des fokussierten Probenstroms unter $10\ \mu\text{m}$ gemessen wurden, ist davon auszugehen, dass die optische Messunsicherheit bei diesen Aufnahmen bei ca. $4\ \mu\text{m}$ liegt.

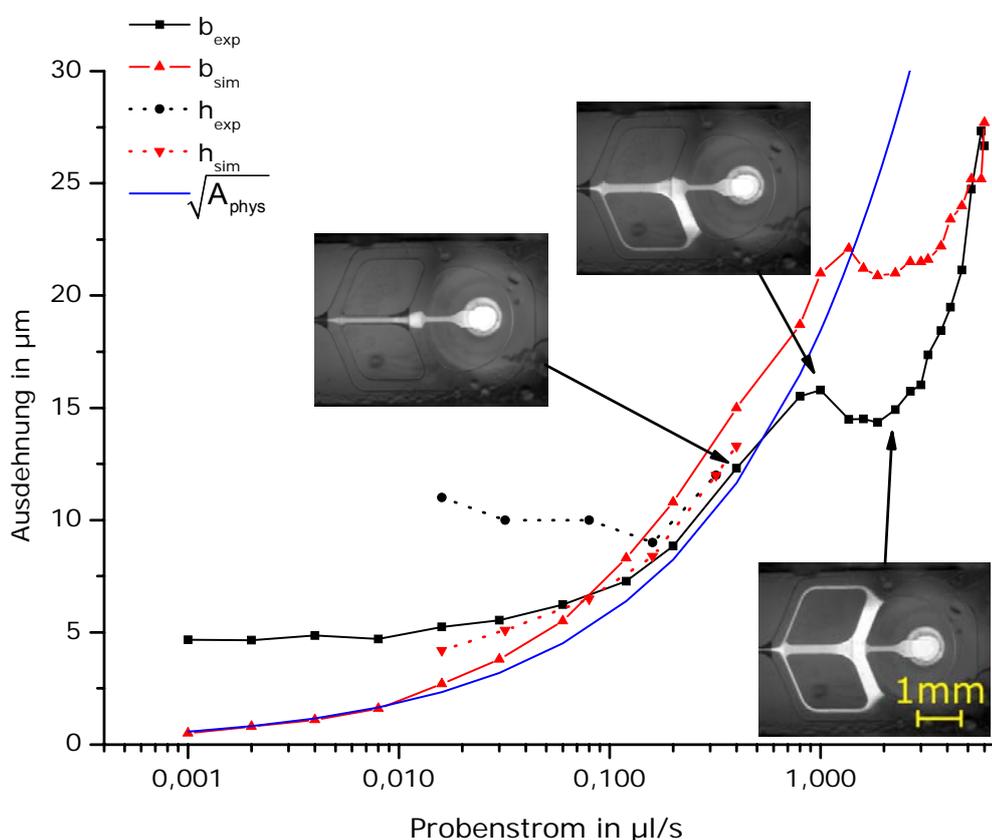


Abbildung 5.28: Vergleich berechneter und gemessener [PTB, Yil06] Ausdehnungen des fokussierten Probenstroms bei einem Hüllvolumenstrom von $23\ \mu\text{l/s}$ (Version 8)

Einfluss der Strukturhöhe

Anhand von Version 8 soll gezeigt werden, in wieweit die gesamte Strukturhöhe der hydrodynamischen Fokussierung einen Einfluss auf die Güte der Fokussierung hat. Die Strukturhöhe ist maßgeblich dafür verantwortlich, wieviel Hüllstrom aus den z-Richtungen auf den Probenstrom trifft und damit für die Fokussierung zur Verfügung

steht. Bei sehr hohen Strukturen fließt viel Hüllstrom aus den z-Richtungen zu. Bei sehr flachen Strukturen - im Extremfall ist die z-Ausdehnung des Hüllstromauslasses gleich der z-Ausdehnung des Probenstromseinlasses - wird der Probenstrom nur in y-Richtung fokussiert. Abbildung 5.29 gibt dieses Verhalten wieder. Der Probenstrom beträgt $0,1 \mu\text{l/s}$, der Hüllstrom $60 \mu\text{l/s}$. Die Fokussierung in y-Richtung ist relativ unabhängig von der Strukturhöhe. Die Fokussierung in z-Richtung zeigt hingegen eine deutliche Abhängigkeit. Bis zu einer Strukturhöhe von $1000 \mu\text{m}$ verbessert sich die Fokussierung in z-Richtung sichtbar. Eine Erhöhung über $1000 \mu\text{m}$ bringt nur einen untergeordneten Effekt. Die Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms hat ihr Minimum bei einer Strukturhöhe von $1000 \mu\text{m}$. Eine Strukturhöhe von $1000 \mu\text{m}$ kann fertigungstechnisch noch akzeptiert werden.

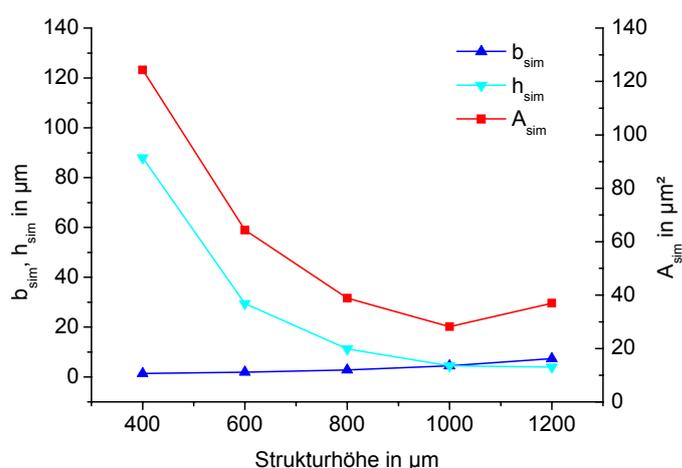


Abbildung 5.29: Mittels FEM-Simulation berechneter Einfluss der Strukturhöhe auf die hydrodynamische Fokussierung (Version 8)

Stabilität der Strömung in Version 8

Leichte geometrische Veränderungen führen in Version 6 zu einer starken Verschlechterung der Fokussierung insbesondere in z-Richtung. In Version 8 wird durch FEM-Rechnungen gezeigt, dass diese Version gegenüber Fertigungstoleranzen erheblich stabiler ist. Dazu wird das CAD-Modell mit eingefügten 8° -Schrägen innen und außen an den Hüllstromzuleitungen verifiziert. Im Vergleich dazu wurde in Version 6 mit 5° -Schrägen gerechnet. Die unmodifizierte Variante fokussiert bei einem Probenstrom von $0,1 \mu\text{l/s}$ und einem Hüllstrom von $60 \mu\text{l/s}$ auf einen Querschnitt von $4,6 \times 4,6 \mu\text{m}^2$. Durch die Ansträgung der Hüllstromzuleitungen fließt weniger Fluid in der z-Richtung zum Probenstrom. Es ergibt sich ein rechteckiger in z-Richtung stehender Querschnitt von $2,3 \times 13,6 \mu\text{m}^2$. Die eingebrachten Modifikationen sind größer als die Fertigungstoleranzen. Dennoch liegt der fokussierte Probenstromquerschnitt in der Nähe der Zielsetzung von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Diese Ergebnisse werden auch durch die experimentellen Untersuchungen an den Labormustern bestätigt.

Gemäß den aufgestellten Anforderungen soll der fokussierte Probenstrom nicht mehr als $5 \mu\text{m}$ von der Mittelposition im Messkanal abweichen. Eine Störung der Strömung ist entweder durch eine Deformation der Kanalstruktur oder durch einen Fremdkörper denkbar. Es wurde ein Modell geschaffen, bei dem eine Hüllstromzuführung um $10 \mu\text{m}$ in der x-Ausdehnung verschmälert wurden. Bei dieser Veränderung verschiebt sich der

Probenstrom um $6,5\ \mu\text{m}$ in y -Richtung aus der Mitte zur Seite der verschmalerten Hüllstromzuführung. Es wurde ebenfalls eine Asymmetrie in z -Richtung simuliert. Dazu wurden die Hüllstromzuführungen um $10\ \mu\text{m}$ in die positive z -Richtung verschoben. Dies bewirkt eine Verschiebung von $1\ \mu\text{m}$ des fokussierten Probenstroms in die negative z -Richtung.

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen ein Fremdkörper in der Kanalstruktur hat, wird virtuell ein Partikel mit einem Durchmesser von $40\ \mu\text{m}$ am Anfang des Messkanals platziert (siehe Abbildung 5.30). Die FEM-Rechnungen zeigen, dass der fokussierte Probenstrom um $3\ \mu\text{m}$ in x -Richtung und $1,6\ \mu\text{m}$ in z -Richtung abweicht und damit innerhalb der geforderten Anforderungen liegt.

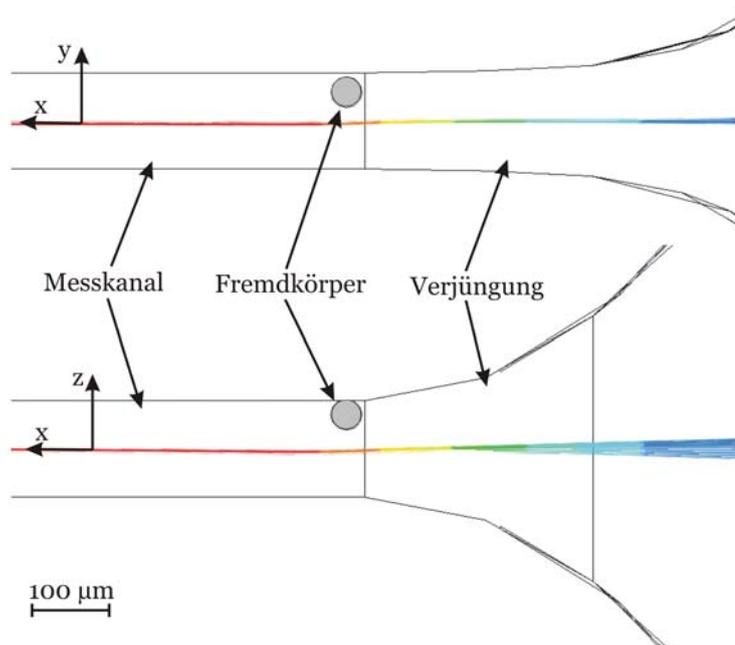


Abbildung 5.30: Visualisierung der Trajektorien des fokussierten Probenstroms bei der Umströmung eines Fremdkörpers mit einem Durchmesser von $40\ \mu\text{m}$ im Messkanal

5.8 Hydrodynamische Fokussierung mit Drill

Die experimentellen Untersuchungen an Analysechips Version 8 zeigen, dass die hydrodynamische Fokussierung gemäß den Anforderungen funktioniert. Eine Strukturhöhe von $1000\ \mu\text{m}$ mit hohen Aspektverhältnissen ist jedoch bezüglich des Ultra-Präzisionsfräsens und des Heißprägens kritisch zu bewerten. Mit Version 9 soll versucht werden, die maximalen Strukturhöhen der hydrodynamischen Fokussierung zu reduzieren. Beim Fräsen können kürzere und somit stabilere Fräser verwendet werden, was eine verbesserte Genauigkeit zur Folge hat. Beim Heißprägen lassen sich Formen mit niedrigerem Aspektverhältnis deutlich besser entformen.

Konstruktiver Aufbau des Fluidsystems zur hydrodynamischen Fokussierung Version 9

In Abbildung 5.31 ist der konstruktive Aufbau des Fluidsystems zur hydrodynamischen Fokussierung Version 9 dargestellt. Die Struktur ist achssymmetrisch zur fluidischen

Achse. Die Hüllstromzuleitungen laufen versetzt, wodurch in der Verjüngung ein Drall der Strömung entsteht. Der Radius am Probenstromauslass beträgt $100\ \mu\text{m}$. Die gesamte Strukturhöhe wird gegenüber Version 8 um ca. Faktor 3 auf $350\ \mu\text{m}$ reduziert.

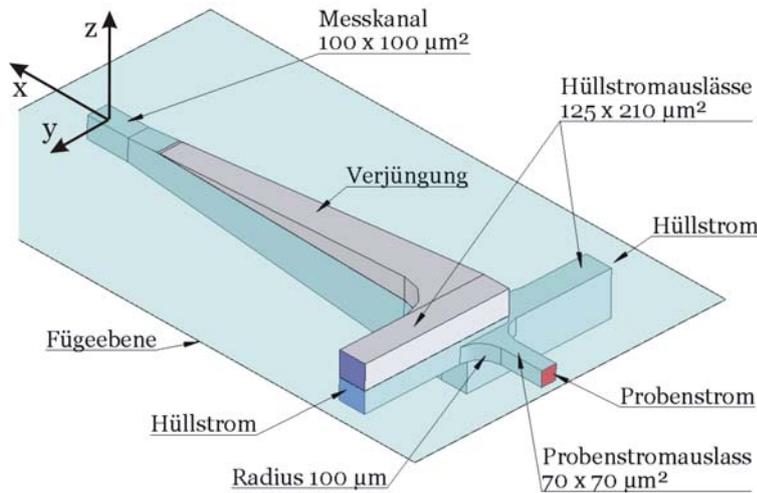


Abbildung 5.31: Hydrodynamische Fokussierung Version 9. Der Fluidikkanal ist als Volumenkörper dargestellt.

Ein Problem beim Fügen des Deckels und Bodens ist, die Fügeebene bis an die Kanalstrukturen flächig zu schließen. Gelingt dies nicht vollständig, bleibt ein Fügespalt von wenigen Mikrometern (ca. $1 - 5\ \mu\text{m}$) am Messkanal. Bei Version 9 wird daher der Messkanalquerschnitt auf $100 \times 100\ \mu\text{m}^2$ verkleinert und eine Presspassung zwischen Deckel und Boden eingeführt (siehe Abbildung 5.32). Beim Zusammenfügen wird so der Messkanal abgedichtet, auch wenn die Fügeebene nicht flächig bis an die Kanalstruktur geschlossen ist.

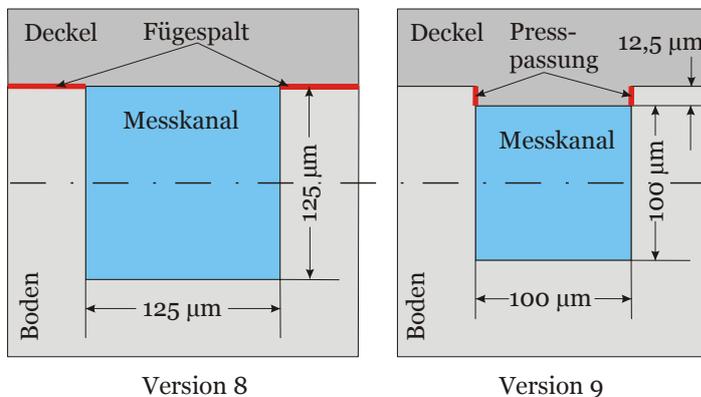


Abbildung 5.32: Lage des Messkanals in Version 8 (links) und Version 9 (rechts)

Strömungsverhältnisse der hydrodynamischen Fokussierung Version 9

In Abbildung 5.33 sind die Stromlinien der hydrodynamischen Fokussierung und insbesondere der Drall des Probenstroms visualisiert. Der Probenstrom reißt von der Kanalwand ab und wird vom Hüllstrom in Rotation versetzt. Durch die Rotation oder den Drall wird die sonst in y- oder z-Richtung vorherrschende Orientierung aufgehoben. Der Hüllstrom fließt dabei mit einem Drall um den Probenstrom und fokussiert ihn.

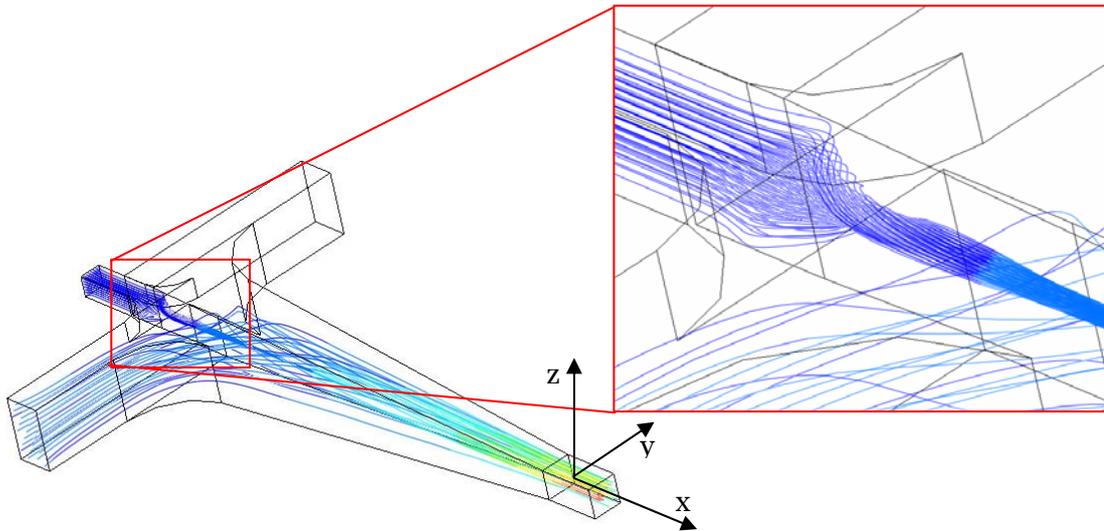


Abbildung 5.33: Darstellung der Strömungsverhältnisse der hydrodynamischen Fokussierung in Version 9. Der Übersichtlichkeit wegen werden nur die Trajektorien eines Hüllstromauslasses dargestellt.

Die Stärke des Dralls ist im Wesentlichen abhängig vom Volumenstrom des Hüllstroms und nur in geringem Maße vom Probenstrom. Durch den rechteckigen Querschnitt der Verjüngung wird der Drall schnell gebremst, so dass der Fluidstrom am Anfang des Messkanals keine Rotationsbewegung mehr aufweist. Abbildung 5.34 zeigt eine Übersicht über die Stärke des Dralls in Abhängigkeit vom Proben- und Hüllvolumenstrom. Bei zunehmendem Hüllstrom wird der Drall verstärkt.

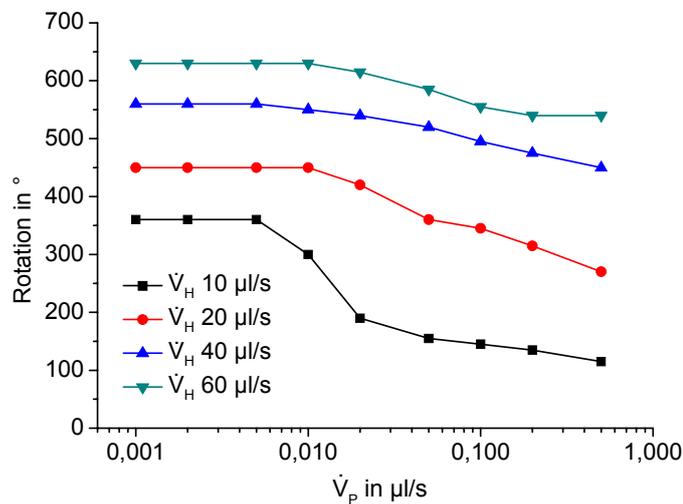


Abbildung 5.34: Mittels FEM-Simulation berechneter Drall des fokussierten Probenstroms über dem Probenvolumenstrom (Version 9) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

In den Versionen 4, 6 und 8 steht der fokussierte Probenstrom in seiner maximalen Ausdehnung entweder in y- oder in z-Richtung. Der Querschnitt des fokussierten Probenstroms in Version 9 dreht sich bei verschiedenen Strömungsverhältnissen und nimmt mitunter einen leichten S-förmigen Querschnitt ein (siehe Abbildung 5.5).

Durch die Drehung der elliptischen oder S-förmigen Querschnittsfläche kommt es bei der feststehenden Ableserichtungen in y- und z-Richtung von b_{sim} und h_{sim} zu sich verändernden Ablesefehlern. Das führt dazu, dass die mittels FEM-Simulation berech-

nete Querschnittsfläche A_{sim} nicht gleichförmig anwachsen. Analoge Verhältnisse ergeben sich für das Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} . Abbildung 5.35 zeigt die Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms bei verschiedenen Parametern und Abbildung 5.36 das dazugehörige Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} .

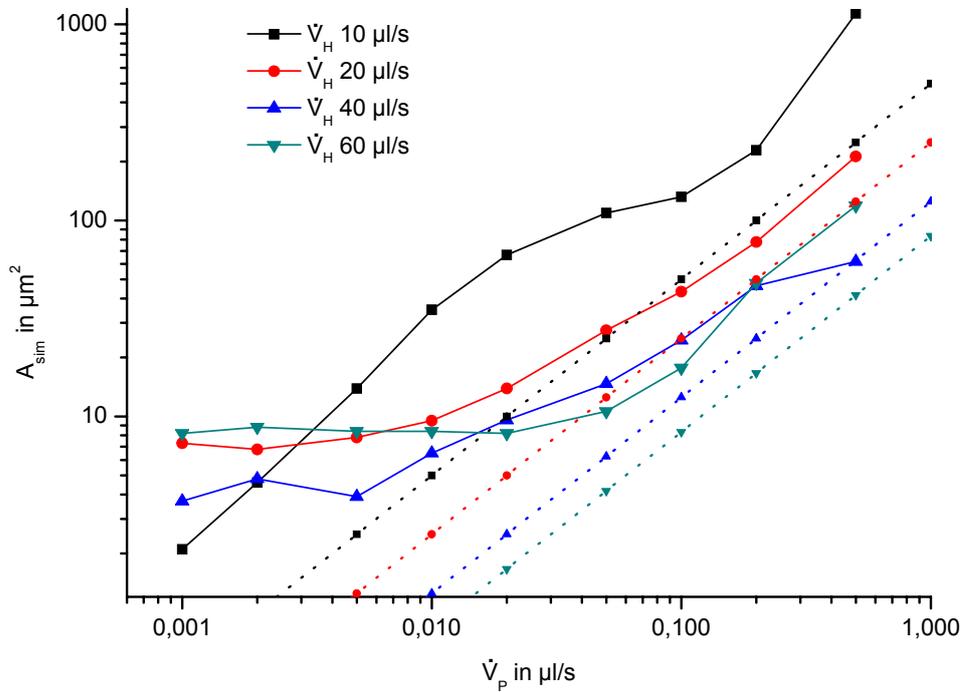


Abbildung 5.35: Vergleich der physikalischen Fläche A_{phys} (gestrichelte Linien) und der mittels FEM-Simulation berechneten Querschnittsfläche A_{sim} (durchgezogene Linien) des fokussierten Probenstroms als Funktion des Probenvolumenstroms (Version 9) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

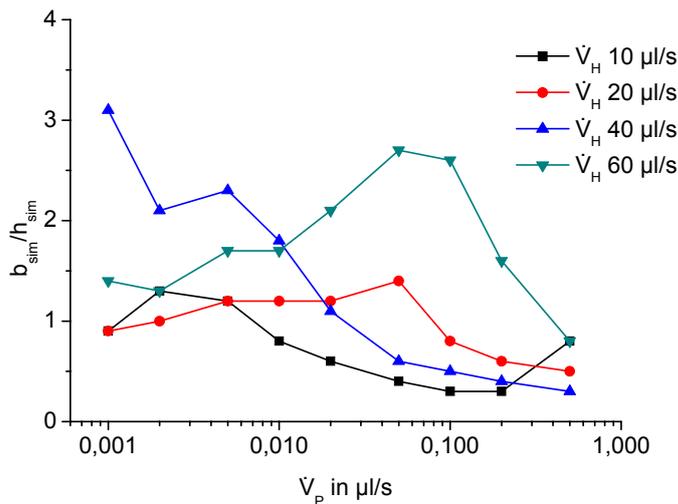


Abbildung 5.36: Mittels FEM-Simulation berechnetes Verhältnis von b_{sim} zu h_{sim} (Version 9) für verschiedene Hüllvolumenströme \dot{V}_H

Experimentelle Strömungsuntersuchungen an Analysechips Version 9

Zur experimentellen Untersuchung der hydrodynamischen Fokussierung wurde eine Messreihe mit konstantem Hüllstrom und variiertem Probenstrom durchgeführt. Der fokussierte Probenstrom wurde dabei sowohl in der x-y-Ebene als auch in der x-z-Ebene über den seitlich angebrachten Spiegel (siehe Kapitel 6.2, Seite 108) beobachtet. Die Ergebnisse sind in

Abbildung 5.37 zu sehen. Zum Vergleich sind ebenfalls die Werte aus den FEM-Rechnungen mit in das Diagramm eingetragen. Der kleinste Querschnitt des fokussierten Probenstroms beträgt $4,5 \times 5,5 \mu\text{m}^2$. Das Ziel eine Fokussierung von $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ zu realisieren, kann somit als erfüllt gelten.

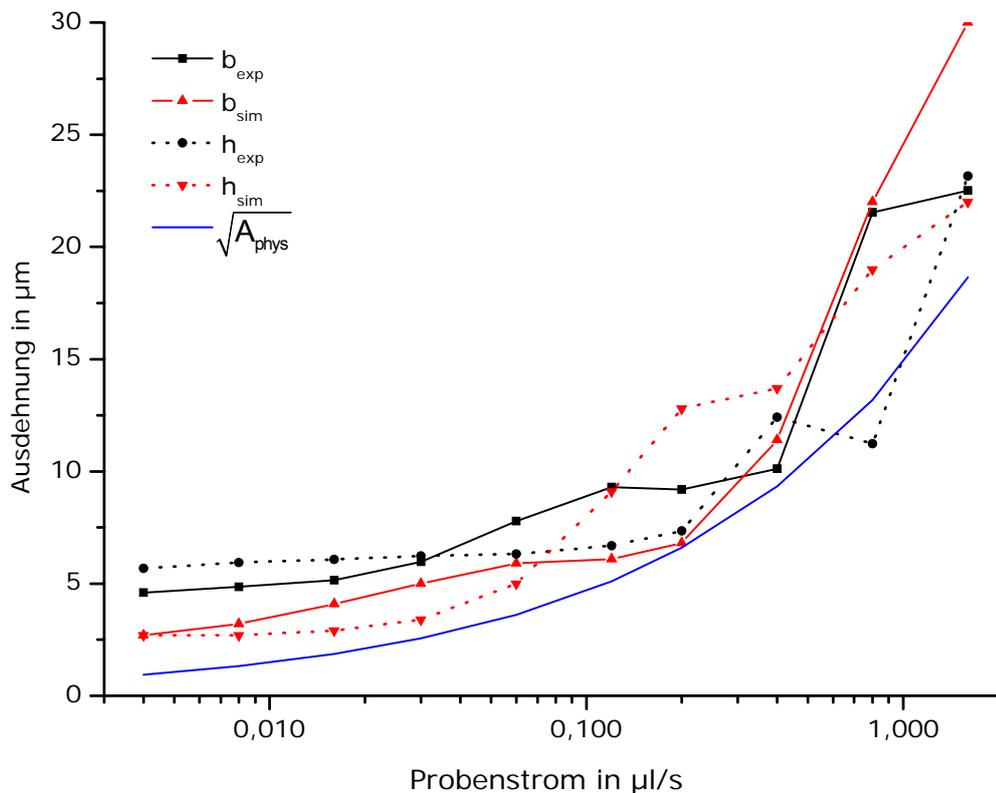


Abbildung 5.37: Ausdehnung des fokussierten Probenstroms bei einem Hüllvolumenstrom von $23 \mu\text{l/s}$ (Version 9)

Abbildung 5.38 zeigt ein Vergleich einer simulierten mit einer realen Strömung. Dieser Vergleich zeigt anschaulich, die gute Übereinstimmung der berechneten mit den experimentell ermittelten Ergebnissen.

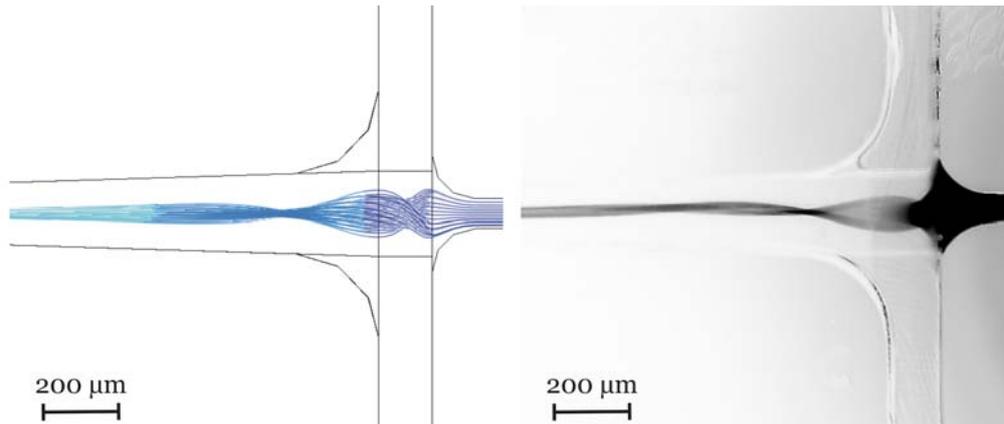


Abbildung 5.38: Vergleich der simulierten mit der realen Strömung in der x-y-Ebene. Links sind die berechneten Trajektorien des Probenstroms zu sehen, rechts ein Mikroskopbild [PTB, Yil06] der realen Strömung bei einem Probenvolumenstrom von 0,04 µl/s und einem Hüllvolumenstrom von 20 µl/s.

Einfluss der Länge der Verjüngung

Form und Drehung des fokussierten Probenstroms können durch gezielte Geometrievariationen verändert werden. Die Länge der Verjüngung bestimmt wesentlich, ob der fokussierte Probenstrom in allen Richtungen gleichmäßig fokussiert, oder ob er sich zu einem flachen Band ausformt. Je länger die Verjüngung ist, desto gleichmäßiger ist die Fokussierung. Wird die Verjüngung auf nahezu null verkürzt, fokussiert der Probenstrom zu einem flachen Band (siehe Abbildung 5.39). Die Drehung des Bandes kann durch die anfängliche y-Ausdehnung der Verjüngung und die z-Ausdehnung der beiden Hüllstromauslässe variiert werden.

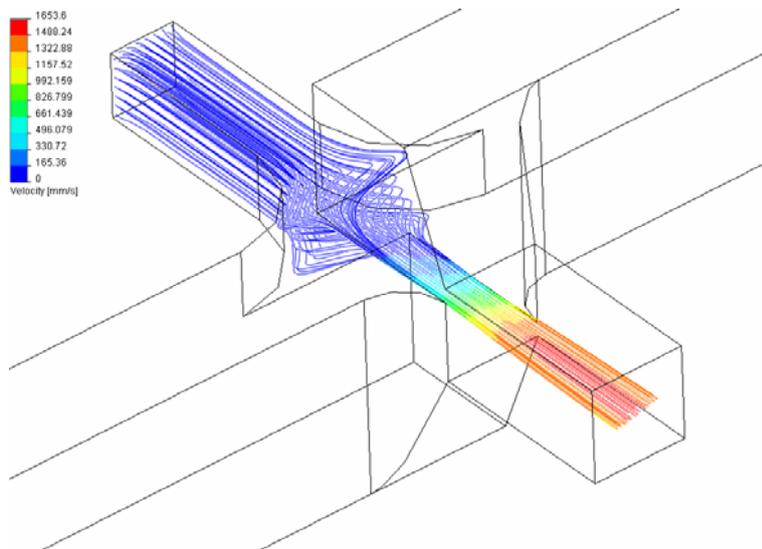


Abbildung 5.39: Variation der Länge der Verjüngung (Version 9)

6 Auslegung der Optik

Grundsätzlich können die Lichtein- und die Lichtauskopplung über Lichtwellenleiter (LWL) oder als Freistrahл erfolgen. Schwerpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit ist der Einsatz der Lichtwellenleiter.

Für die Lichteinkopplung wird ein Monomodelichtwellenleiter verwendet. Die Extinktion, Vorwärts- und Rückwärtsstreuungen werden über Multimodelichtwellenleiter gemessen. Abweichend von dem Lichtwellenleiterkonzept wird die 90°-Seitwärtsstreuung über einen Freistrahл mit einem Mikroskopobjektiv aufgenommen, ebenso die Fluoreszenz.

Die im Folgenden angegebenen Durchmesser der Strahlprofile beziehen sich auf die vollen Halbwertsbreiten (FWHM).

6.1 Auslegung der Optik der Lichtwellenleiter

Anforderungen an die Lichtwellenleiteroptik

Die Lichtwellenleiter werden durch Nuten positioniert. Die folgenden Anforderungen werden an die Auslegung zur Position und Ausführung der Lichtwellenleiternuten gestellt:

- Durchmesser des Laserstrahls soll 15 bis 22 μm betragen. Für eine Gaußförmige Intensitätsverteilung gilt: Je kleiner der Durchmesser des Laserspots, desto größere Signalunterschiede ergeben sich beim Durchgang zweier identischer Teilchen auf zwei unterschiedlichen Trajektorien. Der angegebene Wert stellt einen Kompromiss aus der Lichtintensität und der Abweichung des auf das Teilchen eingestrahлten Lichts bei unterschiedlichen Teilchentrajektorien dar.
- Der aufgenommene Raumwinkelbereich der Lichtwellenleiter zur Streulichtmessung ist auf Grund der inhomogenen Intensitätsverteilung der Mie-Streuung dem Winkel der aufgenommenen Lichtstreuung anzupassen. Er soll bei der Rückwärtsstreuung möglichst groß sein, um die schwachen Signale detektieren zu können. Bei der Vorwärtsstreuung steht ein großer Raumwinkelbereich nicht im Vordergrund, so dass eher der Winkel selbst ausschlaggebend ist. Neben der Kleinwinkelvorwärtsstreuung soll eine zweite Streulichtmessung mit einem größeren Winkel realisiert werden. Für diese zweite Streulichtmessung soll ein maximal möglicher großer aufgenommener Raumwinkel realisiert werden.
- Die technischen Grenzflächen, die Licht zur optischen Detektion transmittieren, müssen - wenn fertigungstechnisch möglich - optische Qualität besitzen. Je kleiner der Brechungsindexunterschied der beiden Materialien an der Grenzfläche, desto geringer ist diese Anforderung zu gewichten.

Übersicht der Anordnung der Lichtwellenleiter

Abbildung 6.1 zeigt eine schematische Darstellung der Lichtwellenleiteranordnung in Version 8. Im Folgenden wird die konstruktive Auslegung und die experimentellen Untersuchungen zu den einzelnen Lichtwellenleitern vorgestellt.

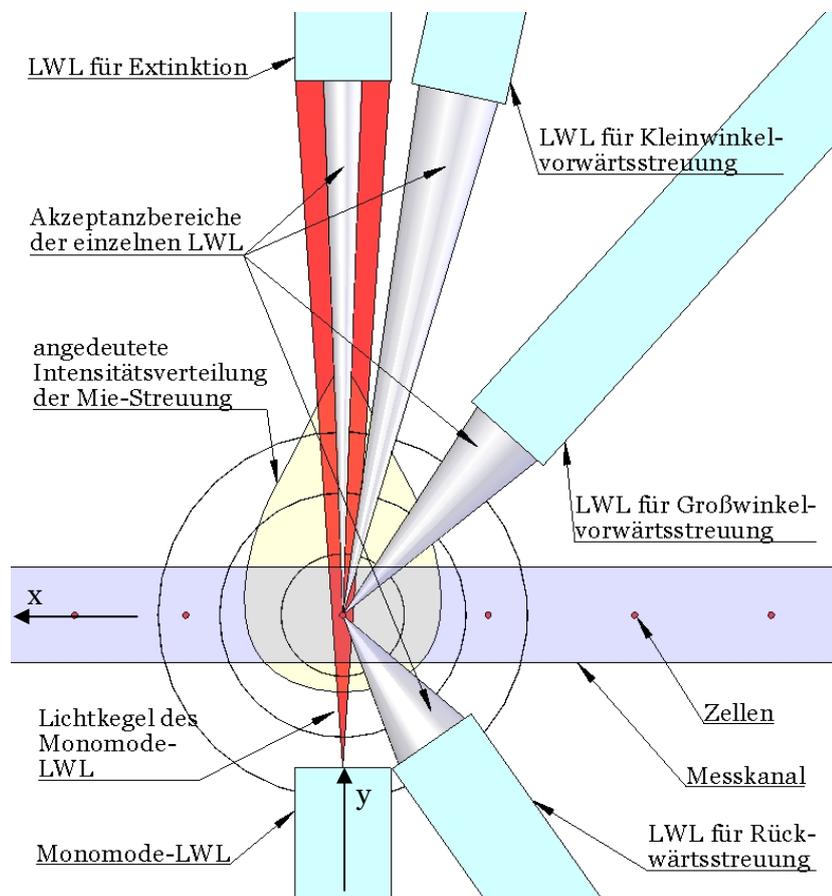


Abbildung 6.1: Prinziplskizze der Lichtwellenleiteroptik

Zum Aufbau der Labormuster wurden Lichtwellenleiter mit 4 verschiedenen Kern-durchmessern eingesetzt. Die nachfolgende Tabelle 6.1 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Lichtwellenleiter.

Kerndurchmesser in μm	Außendurchmesser in μm	Außendurchmesser mit Kunststoffisolierung in μm	numerische Apertur	Cut-off-Wellenlänge in nm	Einsatz
3,5	125	250	0,11	450	Monomode zur Lichteinkopplung
9,5	125	250	0,22	1060	Extinktion
50	125	250	0,22	multimode	Streulicht, Extinktion
105	125	250	0,22	multimode	Streulicht, Extinktion

Tabelle 6.1: Übersicht über eingesetzte Lichtwellenleiter

Abstand des Monomodelichtwellenleiters

Der Durchmesser des Laserstrahls an der Messstelle D_{Laser} (volle Halbwertsbreite) kann in der Konstruktion durch die Wahl des Lichtwellenleiters und den Abstand des Lichtwellenleiters zur Messstelle beeinflusst werden. Der Öffnungswinkel des abgestrahlten Lichtes der Monomodefaser wird durch die numerische Apertur und dem Brechungsindex des umgebenden Mediums festgelegt. Der Brechungsindex des umgebenden Mediums (Polycarbonat) beträgt $n_U = 1,59$. Bei einer numerische Apertur der eingesetzten Monomodefasern von $NA_{\text{LWL}} = 0,11$ ergibt sich ein halber Öffnungswinkel von $3,9^\circ$ bezogen auf die $1/e^2$ -Intensität. Die Abweichungen, die sich durch den Übergang vom Kunststoff in den mit Wasser gefüllten Messkanal ergeben, können auf Grund der kleinen Winkel zu den Flächennormalen und des kleinen Brechungsindexunterschieds zwischen Wasser und Polycarbonat vernachlässigt werden. Der Sollabstand m der Monomodefaser zum Messkanal wird durch eine einfache trigonometrische Beziehung berechnet:

$$m = \frac{n_U}{1,177 \cdot NA_{\text{LWL}}} \cdot D_{\text{Laser}} \quad \text{Gleichung 6.1}$$

Der Faktor 1,177 ergibt sich aus der Umrechnung der $1/e^2$ -Intensität auf die volle Halbwertsbreiten (FWHM).

In Version 4 wird für $D_{\text{Laser}} = 21 \mu\text{m}$ die Monomodefaser in einem Abstand von $255 \mu\text{m}$ positioniert. In Version 8 beträgt der Abstand $200 \mu\text{m}$ zur Messstelle und der Durchmesser des Laserstrahls in der Mitte des Messkanals ist $16,3 \mu\text{m}$.

Experimentelle Untersuchung des Laserdurchmessers im Messkanal

Die Größe des Laserstrahls im Flusskanal wurde durch die Abbildung der Fluoreszenz einer Rhodamin-6G-Lösung nach Anregung mit einer Hg-Hochdrucklampe bestimmt. Aus dem Fluoreszenzbild werden die Querschnitte entlang der x-Achse extrahiert und die x-Ausdehnung des Laserstrahls bestimmt. Der aus den Fluoreszenzaufnahmen

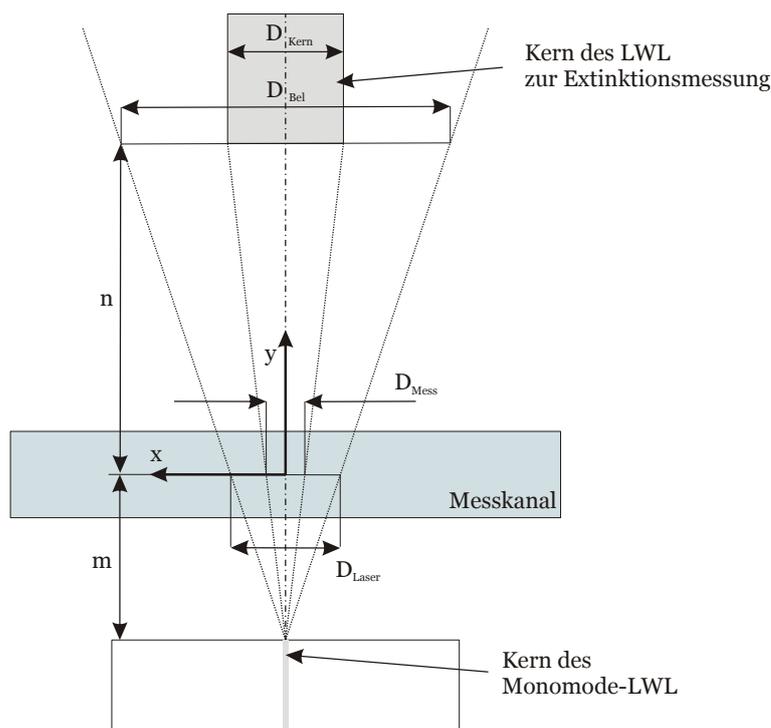


Abbildung 6.4: Schematische Darstellung der geometrischen Verhältnisse zur Auslegung der LWL zur Messung der Extinktion

Das Streulicht eines Partikels, das gerade in den Laserstrahl eintritt und in den Lichtwellenleiter zur Extinktionsmessung gestreut wird, soll minimiert werden, da dieses Streulichtsignal in seinem Vorzeichen dem Extinktionssignal entgegengesetzt ist. Eine Verringerung des Streulichtanteils im Messsignal wird durch eine Vergrößerung des Abstands n oder eine Reduktion des Kerndurchmessers D_{Kern} erreicht. Beides bringt jedoch zwangsläufig eine Verkleinerung des Messfensters D_{Mess} mit sich. Die Beziehung zwischen den geometrischen Größen lautet:

$$D_{\text{Mess}} = \frac{m}{m+n} \cdot D_{\text{Kern}} \cdot \quad \text{Gleichung 6.2}$$

In Version 4 wird ein Lichtwellenleiter mit einem Kerndurchmesser von $50 \mu\text{m}$ in einem Abstand von $500 \mu\text{m}$ von der Messstelle eingesetzt und damit ein Messfensterdurchmesser von rechnerisch $17 \mu\text{m}$ erzielt. In Version 8 beträgt der Abstand $700 \mu\text{m}$ und der Kerndurchmesser $105 \mu\text{m}$. Dadurch ergibt sich ein Messfenster von $23,6 \mu\text{m}$ Durchmesser.

Experimentelle Untersuchungen der Extinktionssignale

Die Untersuchungen der Extinktionssignale mit Labormustern der Version 4 wurden anhand transparenter Polystyrolkugeln mit Durchmessern von 3 bis $22 \mu\text{m}$ von der PTB durchgeführt. Das Laserlicht hat eine Wellenlänge von 633 nm . Zur Rauschminderung wurden jeweils 64 Ereignisse über der Zeit gemittelt und eine Gaußfunktion diesem gemittelten Signal angepasst. Abbildung 6.5 zeigt ein typisches Extinktionssignal eines $6\text{-}\mu\text{m}$ -Teilchens. Am Signalverlauf ist bei genauer Betrachtung die Superposition der Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung und der Extinktion zu erkennen. Unmittelbar vor dem Eintritt in das Messfenster erzeugt das Teilchen einen leichten Signalausschlag nach oben. Dieser Einfluss der Vorwärtsstreuung macht sich gemäß der Mie-Theorie bei größeren Teilchen stärker bemerkbar als bei kleineren. Bei den Versuchen wurde

sowohl die Signalhöhe (prozentualer Lichtverlust) als auch die Signalbreite (volle Halbwertsbreiten, FWHM in μs) ausgewertet. Die Messergebnisse sind der Tabelle 6.2 zu entnehmen.

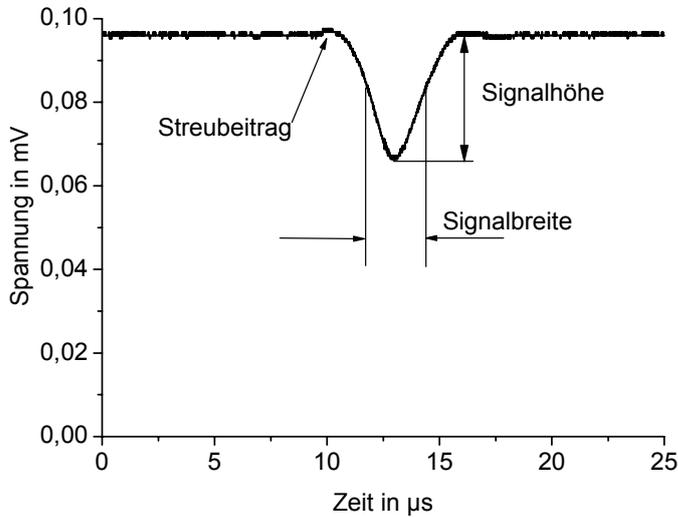


Abbildung 6.5: Typisches Extinktionssignal (Version 4) eines 6- μm -Polystyrolteilchens [PTB, Bra05]

Teilchendurchmesser in μm	Prozentualer Lichtverlust in %	Volle Halbwertsbreiten der Extinktionssignale in μs
3,0	8	2,38
3,5	10	2,48
5,0	29	2,21
6,0	30	2,33
7,0	43	2,26
10,0	66	2,54
15,0	71	3,23
20,0	88	3,86
22,0	86	4,54

Tabelle 6.2: Extinktionssignale verschieden großer Polystyrolteilchen [PTB]

Trägt man die vollen Halbwertsbreiten (FWHM) über den Durchmesser der gemessenen Polystyrolkugelchen auf, so ist zu erkennen, dass hierbei kein linearer Zusammenhang besteht (siehe Abbildung 6.6). Bis zu einem Teilchendurchmesser von ca. 10 – 15 μm bleiben die vollen Halbwertsbreiten konstant, danach ist ein linearer Anstieg zu erkennen. Der Schnittpunkt dieser beiden Geraden liegt bei einem Wert von 11,5 μm . Aus diesem Wert kann der Durchmesser des Messfensters der Extinktionsmessung direkt abgeleitet werden. In Version 4 beträgt der gemessene Durchmesser des Messfensters 11,5 μm . Im Vergleich zu dem gemessenen Wert wurde aus der geometrischen Optik ein Durchmesser von 17 μm ermittelt. Die Differenz lässt sich durch Fertigungsungenauigkeiten erklären. Sind die Monomodefaser und die Faser zur Messung der Extinktion nicht koaxial angeordnet sondern versetzt zueinander, verschiebt sich das Messfenster gegenüber dem Laserstrahl. Dadurch erhöht sich der Anteil des Streulichts

im Messsignal, was eine Verkürzung der gemessenen Signallänge und damit einen kleineren gemessenen Durchmesser des Messfensters bewirkt.

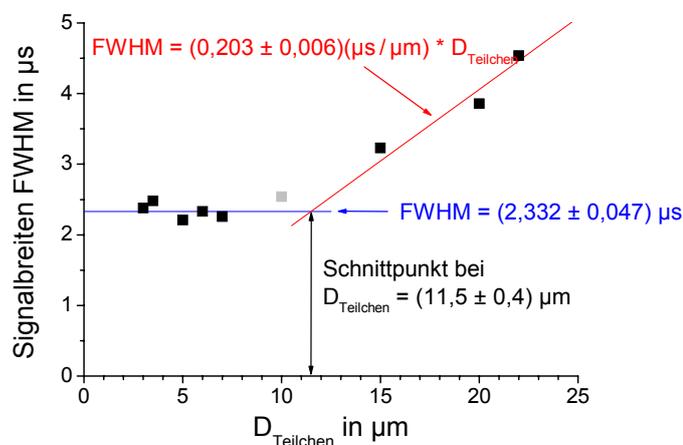


Abbildung 6.6: Volle Halbwertsbreiten Extinktionssignale in Abhängigkeit vom Durchmesser der untersuchten Polystyrolteilchen [PTB, Bra05]

Mit Labormustern der Version 8 wurden ebenfalls Untersuchungen des Extinktionssignals durchgeführt. Dazu wurden 7-μm-Polytyrolkugeln verwendet. Es wurden sowohl die Signalverläufe über der Zeit als auch Histogramme, in denen die Verteilung der Einzelsignale zu sehen ist, aufgenommen (siehe Abbildung 6.7). Der Variationskoeffizient (CV) der Extinktionsmessung beträgt 22 %.

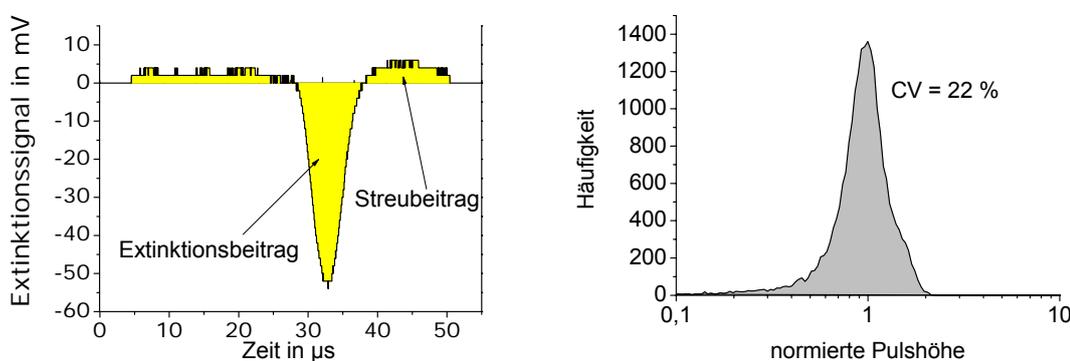


Abbildung 6.7: Extinktionssignal 7-μm-Teilchen bei einer Wellenlänge von 633 nm (Hüllvolumenstrom = 16,1 μl/s, Probenvolumenstrom = 0,23 μl/s) [PTB]. Links ist das Signal über der Zeit dargestellt (Mittelung über 128 Ereignisse), rechts das dazugehörige Histogramm der Einzelsignale.

Abstand, Winkel und Kerndurchmesser der Lichtwellenleiter zur Messung der Vorwärtsstreuung

In Version 8 wurden zwei Lichtwellenleiter (Klein- und Großwinkelvorrwärtsstreuung) zur Aufnahme der Vorwärtsstreuung vorgesehen. Anhand dieser Version sollen die konstruktiven Überlegungen dazu dargestellt werden.

Abbildung 6.8 verdeutlicht die geometrischen Verhältnisse der Lichtwellenleiter für die Vorwärtsstreuungen. Bei einem Winkel von 10° zwischen den Lichtwellenleitern zur

Aufnahme der Kleinwinkelvorwärtsstreuung und der Extinktion berühren sich die Lichtwellenleiter gerade. Für die Kleinwinkelvorwärtsstreuung ist ein Winkel unter 10° nur möglich, wenn der Lichtwellenleiter deutlich hinter den Lichtwellenleitern zur Messung der Extinktion zurückgezogen wird. Dadurch verkleinert sich der aufgenommene Winkelbereich, bzw. liegt der Lichtwellenleiter teilweise im Schatten des Lichtwellenleiters zur Messung der Extinktion. Wird der Abstand verkleinert und der Lichtwellenleiter für die Kleinwinkelvorwärtsstreuung vor den Lichtwellenleiter zur Messung der Extinktion gezogen, so wird letzterer ab einem Abstand von ca. $500 \mu\text{m}$ abgeschattet. Ein Kompromiss stellt die in Abbildung 6.8 dargestellte Lösung dar. In diesem Fall beträgt der beobachtete Raumwinkel $8,5^\circ$.

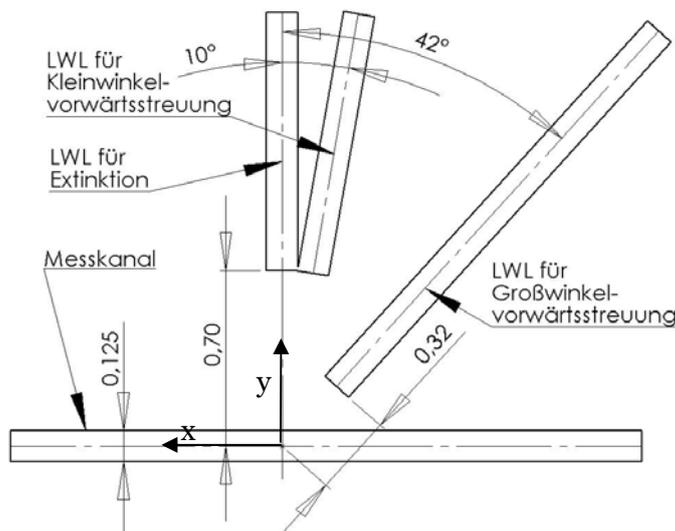


Abbildung 6.8: Anordnung von Fasern zur Messung der Kleinwinkel- und Großwinkelvorwärtsstreuungen (Version 8)

Der Winkel der Großwinkelvorwärtsstreuung beträgt 53° . Bei diesem Winkel spielt der Brechungsindexunterschied zwischen Polycarbonat und Wasser eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Die Abweichung bei 53° beträgt bei diesen Medien ca. 11° . Die Faser muss daher in einem Winkel von 42° platziert und entsprechend versetzt werden.

Gemäß der Mie-Theorie nimmt die Streulichtintensität zwischen 10° und 53° um ein bis zwei Größenordnungen ab. Insofern ist ein großer aufgenommener Raumwinkel der Großwinkelvorwärtsstreuung zwingend. Bei einem Abstand von $320 \mu\text{m}$ vom Faserende zur Messstelle ergibt sich ein Raumwinkel von $18,6^\circ$. Der aufgenommene Raumwinkel wird in diesem Fall jedoch durch die numerische Apertur des Lichtwellenleiters von $0,22$ (ca. 16°) begrenzt.

Abstand, Winkel und Kerndurchmesser der Lichtwellenleiter zur Messung der Rückwärtsstreuung

Eine Übersicht zur Geometrie des Monomodelichtwellenleiters und der Faser für die Rückwärtsstreuung liefert Abbildung 6.9. Bei einem Winkel von 145° und einem gegebenen Abstand der Monomodesendefaser von $200 \mu\text{m}$ von der Messstelle berühren sich die Sendefaser und die Faser für die Rückwärtsstreuung. Der aufgenommene Raumwinkel beträgt bei dieser Anordnung $29,5^\circ$. Bei dieser Anordnung kann mit einem $50 \mu\text{m}$ -Schافتfräser die notwendige Struktur bearbeitet werden.

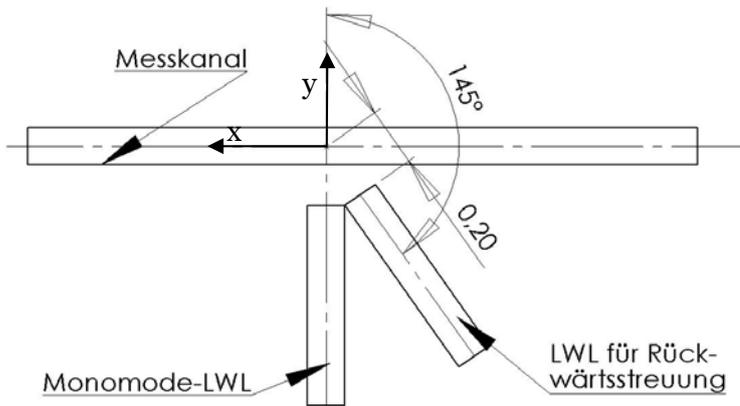


Abbildung 6.9: Anordnung der Faser zur Messung der Rückwärtsstreuung (Version 8)

Experimentelle Untersuchungen der Streulichtsignale

An Labormustern der Version 8 wurden Signale der Groß- und Kleinwinkelvorwärtsstreuung aufgenommen. In Abbildung 6.10 sind der Zeitverlauf des Signals sowie ein Histogramm der Kleinwinkelvorwärtsstreuung zu sehen. Der Variationskoeffizient der Kleinwinkelvorwärtsstreuung beträgt 22 %.

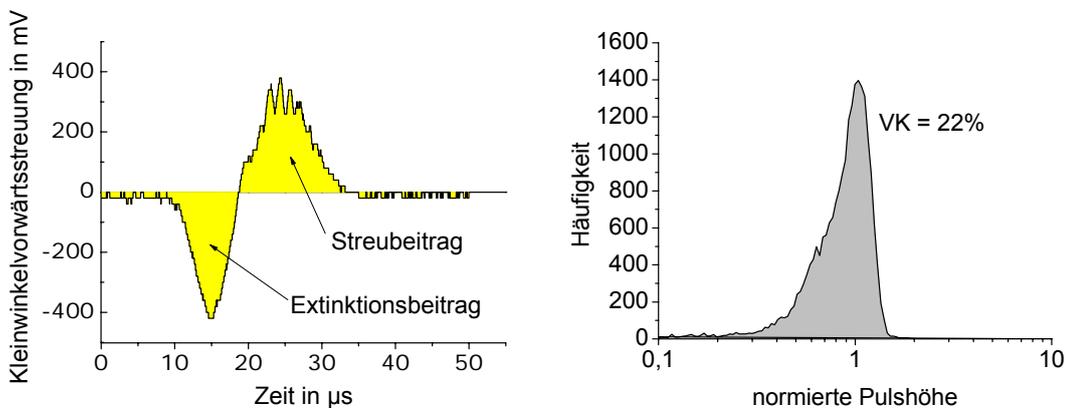


Abbildung 6.10: Signal der Kleinwinkelvorwärtsstreuung eines 7- μm -Teilchens bei einer Wellenlänge von 488 nm (Hüllvolumenstrom = 16,1 $\mu\text{l/s}$, Probenvolumenstrom = 0,23 $\mu\text{l/s}$) [PTB, Yil06]. Links ist das Signal über der Zeit dargestellt (Mittelung über 128 Ereignisse), rechts das dazugehörige Histogramm der Einzelsignale.

In den Ausläufern der Gaußkurve des Laserstrahls trifft direktes Licht aus dem Monomodelichtwellenleiter in den Lichtwellenleiter zur Aufnahme der Kleinwinkelvorwärtsstreuung. Ein durch die optische Messstelle sich bewegendes Teilchen streut oder absorbiert dieses Licht teilweise, so dass es zunächst zu einer Verdunklung des aufgenommenen Lichts kommt. Hat das Teilchen das Zentrum des Laserstrahls (y-Achse) erreicht, verursacht die Lichtstreuung am Teilchen ein positives Signal.

Abbildung 6.11 zeigt den zeitlichen Verlauf der Großwinkelvorwärtsstreuung. Ein Histogramm zur Bestimmung des Variationskoeffizienten wurde nicht aufgenommen.

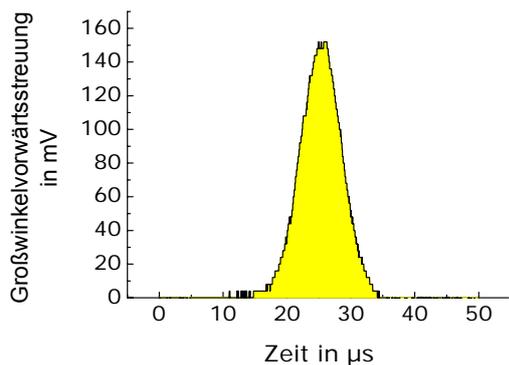


Abbildung 6.11: Signal der Großwinkelvorwärtsstreuung von 7- μm -Teilchen (Mittelung über 128 Ereignisse) bei einer Wellenlänge von 488 nm (Hüllvolumenstrom = 16,1 $\mu\text{l/s}$, Probenvolumenstrom = 0,23 $\mu\text{l/s}$) [PTB, Yil06]

Wellenleiternuten

Die Erfahrung im Umgang mit den Analysechips zeigen, dass häufig Brüche der Lichtwellenleiter am Austrittsbereich aus dem Analysechip auftreten. Zur Reduzierung der Biegespannung und damit der Bruchgefahr wurden Radien am Ende der Führungsnut der Wellenleiter angebracht (siehe Abbildung 6.12). Im weiteren Verlauf der Führungsnut nach innen zur Messstelle weist sie zunächst einen Querschnitt von $250 \times 250 \mu\text{m}^2$ auf, angepasst an die Kunststoffummantelung der Faser. Die Führungsnut verjüngt sich anschließend auf einen Querschnitt von $125 \times 125 \mu\text{m}^2$. In diesem Bereich soll bei der Montage durch das Laserschweißen eine Abdichtung nach außen erfolgen. Im nächsten Abschnitt der Führungsnut reduziert sich der Querschnitt auf $125 \times 135 \mu\text{m}^2$ auf. In diesem Abschnitt sind die sechs Noppenpaare untergebracht, die den Lichtwellenleiter bei der Montage durch leichte Klemmung in der Führungsnut halten.

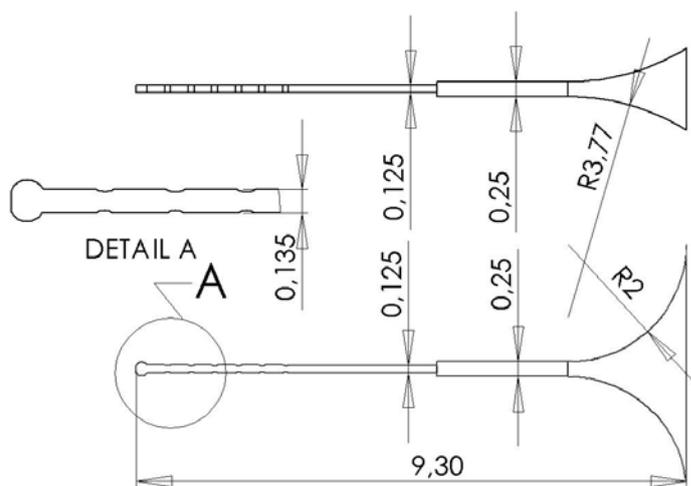


Abbildung 6.12: Skizze der Lichtwellenleiternuten Version 8

Streulicht und Reflexionen an technischen Grenzflächen

Beim Übergang von Licht an rauen Grenzflächen zweier Materialien mit verschiedenen Brechungsindizes kommt es zu Lichtstreuung und Reflexionen. Das Licht, das von der Monomodefaser ausgesendet wird, muss in den Kunststoff des Analysechips eingekoppelt werden. An dieser Stelle liegt der Lichtwellenleiter entweder direkt am Kunststoff an oder es befindet sich ein anderes Medium, typischerweise Luft, mit einem anderen Brechungsindex dazwischen. Am Phasenübergang von Kunststoff in den mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Messkanal treten die gleichen Effekte auf. Bevor das Lichtsignal von einem Lichtwellenleiter aufgenommen wird, sind mindestens zwei weitere Phasenübergänge zu durchlaufen.

Jeder sichtbare Lichtstrahl aus der Monomodefaser wird auf Grund einer Störung in das Mikroskopobjektiv gestreut. Die optische Qualität der Grenzflächen und der Materialien selbst kann anhand der Reflexionen und Lichtstreuung beurteilt werden. Abbildung 6.13 verdeutlicht diesen Effekt im Bereich vor der Licht emittierenden Monomodefaser.

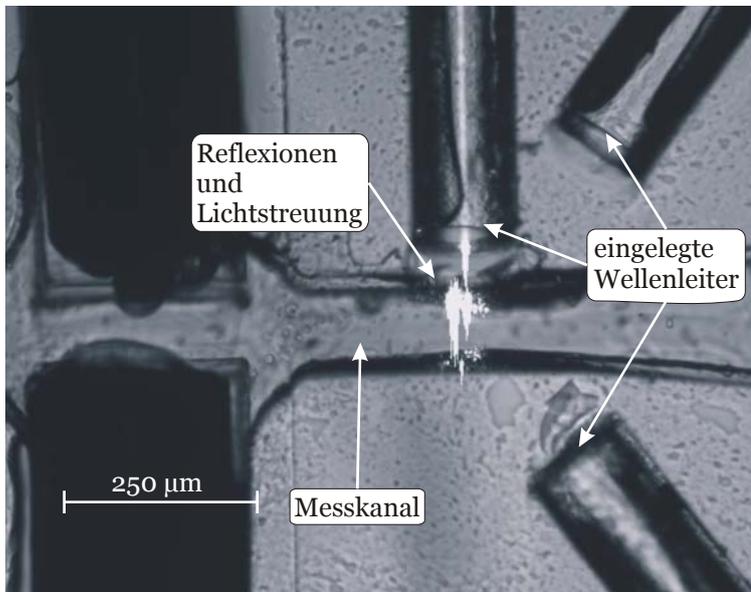


Abbildung 6.13: Reflexionen und Lichtstreuung (Version 6)

Für eine Reduzierung des Streulichts und der Reflexionen muss entweder die Rauheit am Phasenübergang zweier Materialien oder der Brechungsindexunterschied der beiden Materialien (Indexmatching) reduziert werden. Die Rauheit kann durch eine plastische Verformung mit einem physikalischen Kontakt reduziert werden. Der Brechungsindexunterschied wird durch den Ersatz von Luft durch ein transparentes Material mit einem dem PC ähnlichen Brechungsindex ersetzt. Beides wurde im Rahmen dieser Arbeit realisiert und getestet.

Physikalischer Kontakt zwischen Wellenleiterende und Seitenwand des Analysechips

Die Stirnfläche des Wellenleiters wird mit einem Faserscheidegerät senkrecht zur Faserrichtung geschnitten. Die dabei entstehende Oberfläche hat optische Qualität. Diese Stirnfläche wird in den Kunststoff gedrückt, so dass sich die raue Kunststoffoberfläche ohne Zwischenräume an den Wellenleiter anlegt. Damit wird das Licht ohne Verlust in den Kunststoff eingekoppelt. Dieser Zustand muss bis zur endgültigen Fixierung der Wellenleiter in seiner Führungsnut für den Zeitraum der Montage gehalten werden.

Dazu eignen sich Noppen, die in die Führungsnut der Wellenleiter ragen und durch Druck die Wellenleiter in der Führungsnut fixieren. Diese Noppen werden paarweise gegenüberliegend angeordnet (siehe Abbildung 6.12). Die Auslegung der Noppen und der Stirnseite der Führungsnut erfolgte mit Hilfe einer strukturmechanischen FEM-Rechnung.

Das Ergebnis dieser Modifikation ist in Abbildung 6.14 zu sehen. Bei dieser Aufnahme wurde der Messkanal durch die Monomodefaser beleuchtet. Direkt vor dem Ausgang der Monomodefaser ist kein Streulicht zu erkennen. Streulicht tritt an den nicht-optischen Seitenwänden des Messkanals und vor dem Lichtwellenleiter zur Messung der Extinktion auf.

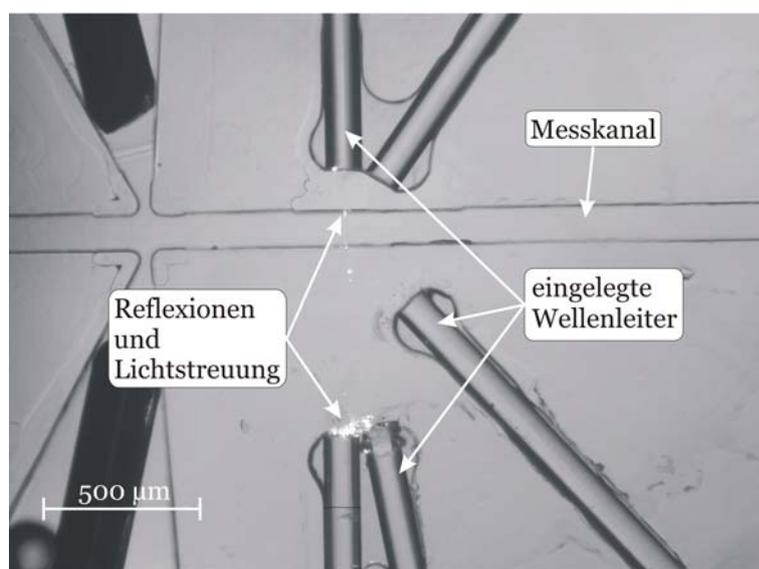


Abbildung 6.14: Mikroskopaufnahme eines Analysechips Version 8 ohne Indexmatching

Indexmatching am Wellenleiterende

In den Spalt zwischen Wellenleiterende und Kunststoff wird ein Koppelfluid eingefüllt, das annähernd den gleichen Brechungsindex wie der Kunststoff der Analysechips besitzt. Selbst bei einer rauen Kunststoffoberfläche kann das Licht so ohne Reflexionen und Brechung die Grenzschicht passieren. Um überschüssiges Koppelfluid abfließen lassen zu können, wurde seitlich der Stirnflächen ein kleines Reservoir angebracht. Als Koppelfluid wird Epoxidharz mit einem ähnlichen Brechungsindex wie Polycarbonat verwendet.

Abbildung 6.15 zeigt das Ergebnis des Indexmatchings. Das Streulicht an der Stirnseiten der Lichtwellenleiter zur Messung der Extinktion und Vorwärtsstreuung ist nahezu beseitigt. Lediglich die nicht optischen Seitenwände des Messkanals verursachen eine Restlichtstreuung. Zur Optimierung des Strahlengangs kann die Oberflächenqualität der Seitenflächen beispielsweise durch eine Politur oder durch die Verwendung von Diamantwerkzeugen beim Ultra-Präzisionsfräsen verbessert werden.

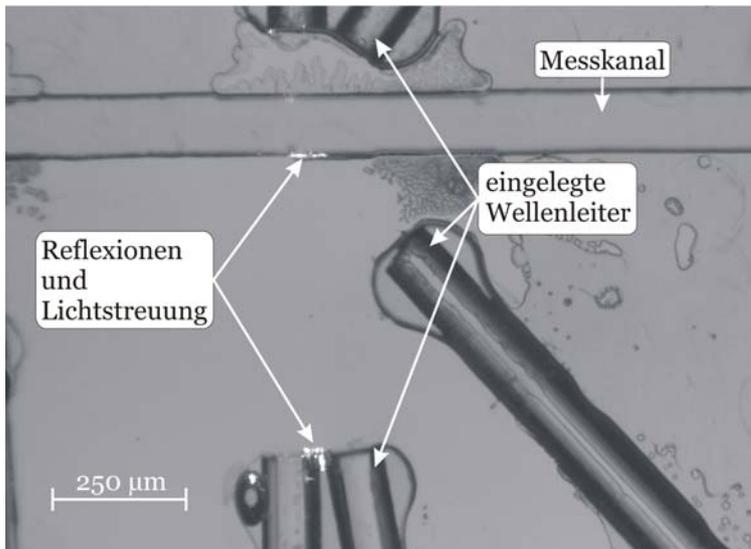


Abbildung 6.15: Mikroskop-
aufnahme eines Analyse-
chips Version 8 mit Index-
matching

6.2 Auslegung der Freistrahloptik

Die Fluoreszenz und die 90°-Seitwärtsstreuung werden als Freistrah über ein Mikroskopobjektiv aufgenommen. Über einen integrierten 45°-Spiegel wird der Messkanal und der fokussierte Probenstrom aus der y-Richtung beobachtet. Über diesen Spiegel können auch Lichtsignale ausgekoppelt werden (siehe Abbildung 6.16). Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

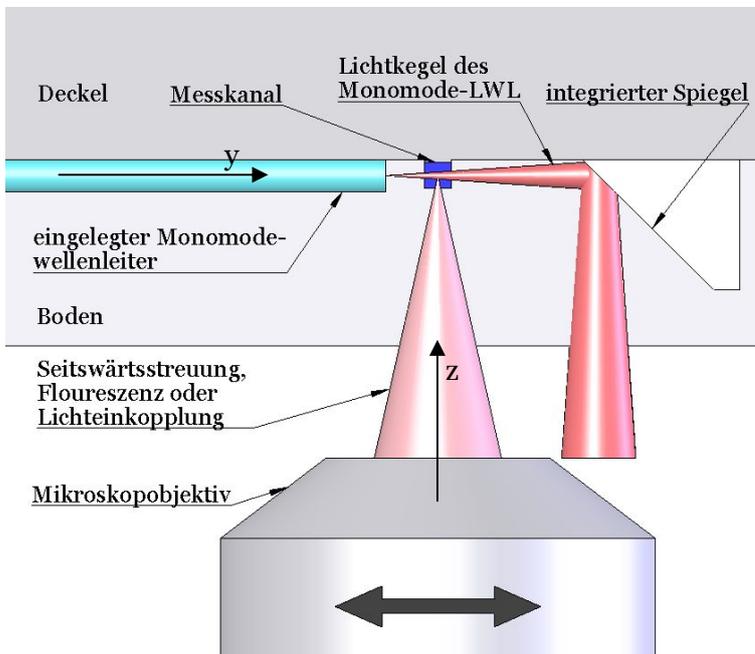


Abbildung 6.16: Prinzipskiz-
ze der Detektion des senk-
recht zur Fügeebene austren-
denden Lichtes und der
seitlichen Beobachtung des
Messkanals

Strahlein- und Strahlauskopplung mit einem Mikroskopobjektiv

Untersuchungen zu der Seitwärtsstreuung in 90°-Richtung und der Fluoreszenz wur-
den mit Labormustern der Version 8 an 7-µm-Polystyrolkugelchen durchgeführt.
Abbildung 6.17 und Abbildung 6.18 zeigen die Signalform und die jeweils aufgenom-

menen Histogramme der 90°-Seitwärtsstreuung und der Fluoreszenz. Der Variationskoeffizient für die Seitwärtsstreuung in 90°-Richtung beträgt 24 % und für die Fluoreszenz 19 %.

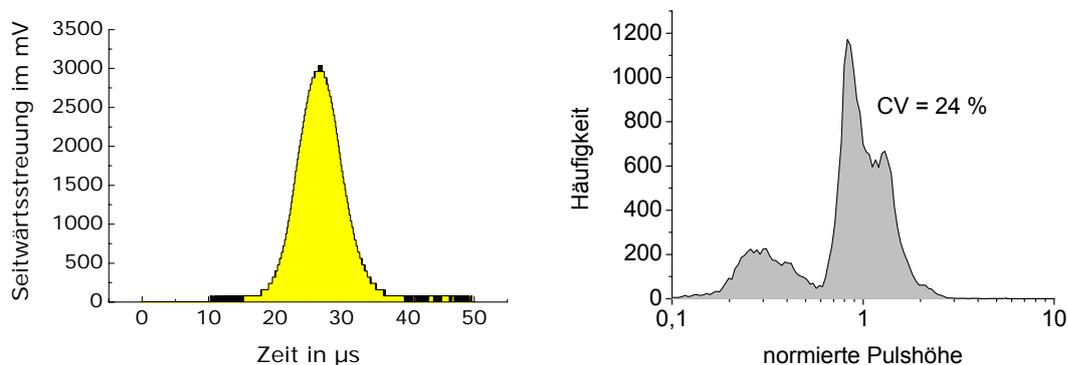


Abbildung 6.17: Signal der Seitwärtsstreuung eines 7- μm -Teilchens bei einer Wellenlänge von 488 nm (Hüllvolumenstrom = 16,1 $\mu\text{l/s}$, Probenvolumenstrom = 0,23 $\mu\text{l/s}$) [PTB]. Links ist das Signal über der Zeit dargestellt (Mittelung über 128 Ereignisse), rechts das dazugehörige Histogramm der Einzelsignale.

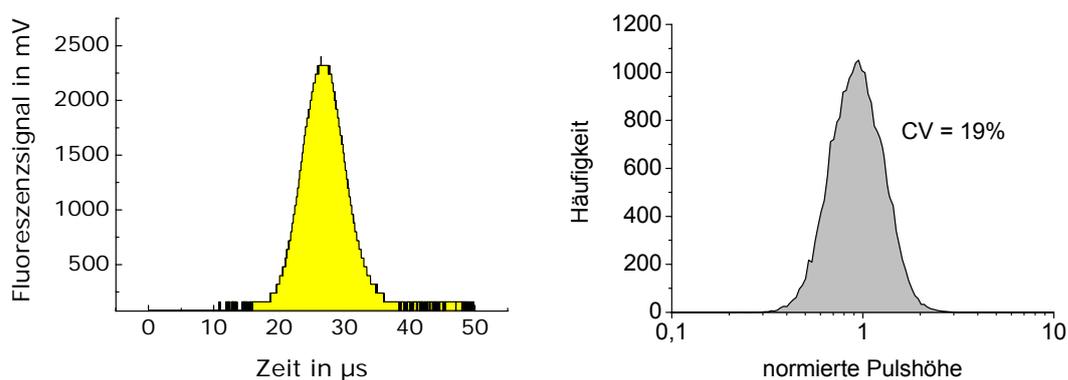


Abbildung 6.18: Signal der Fluoreszenz eines 7- μm -Teilchens angeregt bei einer Wellenlänge von 488 nm aufgenommen bei einer Wellenlänge von 535 nm (Hüllvolumenstrom = 16,1 $\mu\text{l/s}$, Probenvolumenstrom = 0,23 $\mu\text{l/s}$) [PTB]. Links ist das Signal über der Zeit dargestellt (Mittelung über 128 Ereignisse), rechts das dazugehörige Histogramm der Einzelsignale.

Lichtauskopplung mit einem integrierten Spiegel

Die Anordnung des 45°-Spiegels längs des Messkanals erlaubt eine gleichzeitige Beobachtung des Messkanals aus zwei Richtungen. Die Strömung im Messkanal wird somit über die gesamte Länge in zwei Richtungen beobachtbar. Über einen 45°-Spiegel kann auch die Extinktion bzw. die Kleinwinkelvorwärtsstreuung ausgekoppelt werden. Ebenso kann die Lasereinkopplung über einen solchen Spiegel ausgeführt werden. Auf diese Weise ist die Messstelle von der y-Richtung aus über einen kurzen Weg durch den Kunststoff zugänglich. Experimentelle Untersuchungen dazu wurden nicht gemacht.

Um eine optimale Auflösung zu erhalten, muss die numerische Apertur, die über den Spiegel übertragen wird, möglichst groß sein. Der Spiegel soll ohne weitere Fertigungsschritte funktionsfähig sein. Dies bedeutet, dass eine Bedampfung mit Metall, um eine spiegelnde Fläche zu erhalten, ausgeschlossen wird und anstatt dessen das Prinzip der Totalreflexion zum Einsatz kommt.

In Abbildung 6.19 ist ein schematischer Querschnitt quer zum Messkanal der Version 9 zu sehen. Der Spiegel wird als Hohlraum im Analysechip längs des Messkanals ausgeführt (siehe Abbildung 4.17). Auf diese Weise kann an entsprechender Stelle auf dem Werkzeug ein Steg mit einer optischen 45°-Schräge platziert werden.

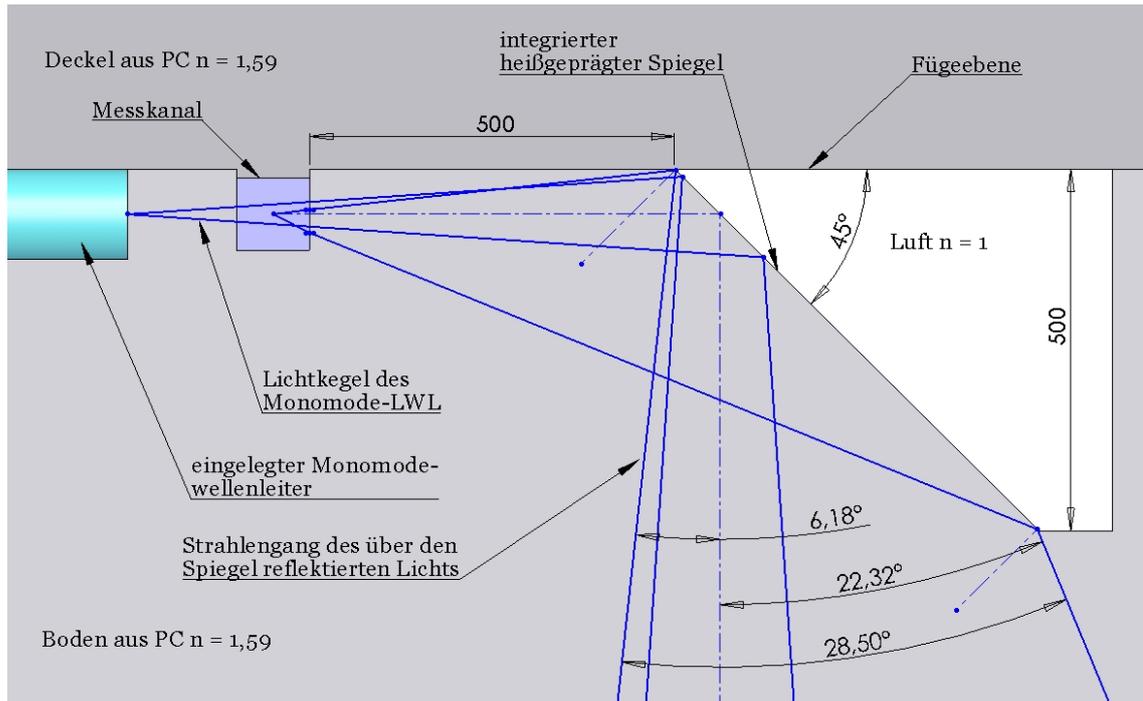


Abbildung 6.19: Schematische Darstellung des integrierten Spiegels in Version 9

Totalreflexion tritt bei einer Grenzfläche von Polycarbonat zu Luft ab einem Winkel von $38,9^\circ$ auf. Dies bedeutet bei einem 45°-Spiegel, dass Strahlen, die in einem Winkel von größer als $6,1^\circ$ von der Mittelachse abweichen, nicht mehr totalreflektiert werden. Bei einem Abstand von $500 \mu\text{m}$ des Spiegels vom Messkanal ergibt sich ein Winkel von $6,2^\circ$. Auf der Fläche zwischen Spiegel und Messkanal wird eine Laserschweißnaht gezogen. Diese verhindert, dass Wasser in den Spiegelhohlraum läuft. Eindringendes Wasser senkt den Grenzwinkel für die Totalreflexion deutlich und die Funktion des Spiegels ist damit sehr eingeschränkt.

In Version 9 ist ein Spiegel seitlich entlang des Messkanals integriert worden. Dieser Spiegel wurde mit Diamantwerkzeugen gefräst, um eine optische Oberfläche zu erhalten. Rauheitsmessungen mit einem AFM (Atomic Force Mikroskop) der Firma Digital Instruments ergaben mittlere Rautiefen $R_a = 36,5 \text{ nm}$ quer zur Fräsrichtung und $R_a = 13,8 \text{ nm}$ längs zur Fräsrichtung. Es wird erwartet, dass durch eine Optimierung der Fräsparameter und der Schneidenqualität des Schneiddiamants Oberflächenrauheiten R_a von bis zu 5 nm erreicht werden können.

Anhand der Abbildung 6.20 wird die Funktion des Spiegels demonstriert. Der fokussierte Probenstrom ist in der x - z -Ebene über den Spiegel mit einem Mikroskop aufgenommen.

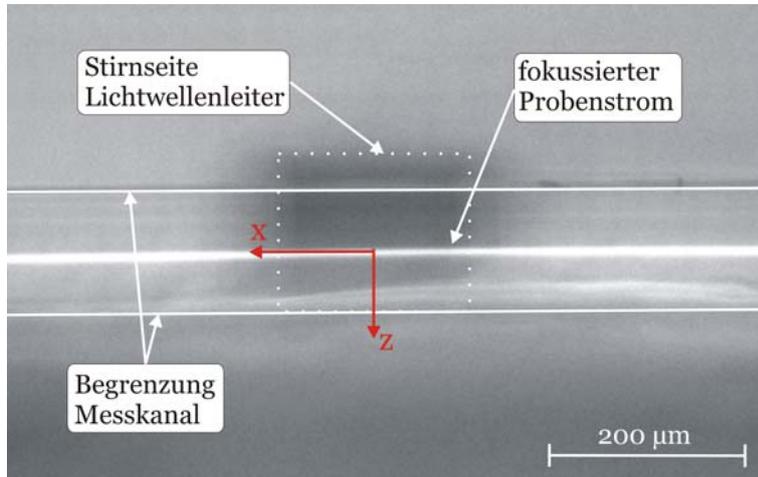


Abbildung 6.20: Fluoreszenzabbildung des Probenstroms mit Rhodamin-6G-Farbstoff zur Überprüfung der Fokussierung in y -Richtung Version 9

7 Auslegung der Impedanzmessung

In Kapitel 3.5 (Seite 34) wurden die theoretischen Grundlagen zur Impedanzmessung bereits vorgestellt. Insbesondere die in Gleichung 3.27 dargestellte Beziehung zwischen der Widerstandsänderung und dem Zellvolumen und dem Querschnitt der Messstelle ist von elementarer Bedeutung für die konstruktive Auslegung der Impedanzmessung. Eine möglichst große Widerstandsänderung erhält man bei einem möglichst kleinen Querschnitt des elektrischen Felds.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei geometrische Anordnungen zur Impedanzmessung getestet. In der ersten Anordnung verläuft das elektrische Feld längs des Messkanals, entsprechend dem Aufbau eines konventionellen Coulter-Counters. In der zweiten Anordnung werden zwei Elektroden seitlich in den Messkanal gebracht. Das elektrische Feld liegt dabei quer zur Strömungsrichtung. Dadurch kann der Messkanal verlängert und zusätzlicher Bauraum für die optische Messstelle geschaffen werden, ohne das elektrische Feld in der x-Achse auszudehnen und damit die Koinzidenzrate bei den Messungen zu erhöhen. Bei der dritten Konstruktion wurde diese Orientierung des elektrischen Feldes beibehalten, jedoch wurden die Elektroden außerhalb des Analysechips platziert, um störende Einflüsse der Elektrolyse zu beseitigen.

7.1 Konstruktion mit Dünnschichtelektroden

Bei der Konstruktion der Version 4 wurden erstmals Elektroden zur durchflusszytometrischen Impedanzmessung integriert. Die Elektroden sind als flächige Elektroden ausgeführt. Die Bodenhälfte der Analysechips soll mit Platin besputtert werden. Durch den Prozess des Sputterns werden neben nicht abgedeckten Flächen auch senkrecht zum Sputtertarget stehenden Wände der Kanalstruktur genügend bedeckt. Über die auf die Fügeebene aufgebraute Schicht können die Elektroden außen kontaktiert werden (siehe Abbildung 7.1).

Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, muss der Messkanal so kurz wie möglich und der Querschnitt so klein wie möglich gehalten werden. Der Messkanal hat daher den kleinsten Querschnitt der aufgebauten Versionen von $70 \times 70 \mu\text{m}^2$ und eine Länge von $100 \mu\text{m}$.

Bei dieser Konstruktion ist der Raum für das Einlegen von Fasern für optische Messungen stark eingeschränkt. In Version 4 konnten aus diesem Grund nur eine Monomodefaser zur Lichteinkopplung und eine Multimodefaser zur Extinktionsmessung eingebracht werden.

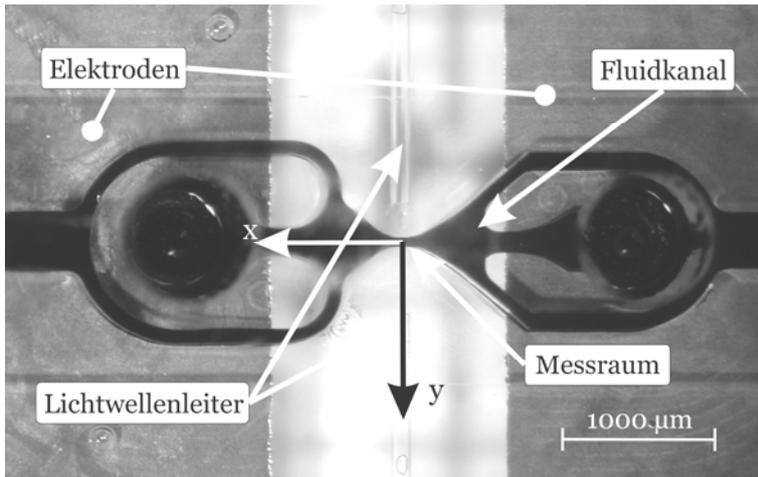


Abbildung 7.1: Aufnahme des Analysechips Version 4 mit eingelegten Lichtwellenleitern und aufgesputterten Elektroden. Die Fluidkanäle sind mit Tinte gefüllt zur Verbesserung des Kontrastes

Experimentelle Untersuchungen liegen zur Zeit noch nicht vor. In den weiteren Versionen wurde die optische Baugruppe erweitert, so dass die Messanordnung zunächst nicht weiterverfolgt wurde.

7.2 Impedanzmessung mit montierten Drahtelektroden

Alternativ wurde eine Messanordnung der Impedanz mit einem quer zur Strömungsrichtung angelegten elektrischen Feld ausgearbeitet. In Version 6 wurde zunächst mit stirnseitig flachen Elektroden gearbeitet. In Version 8 wurden zur Verkleinerung des vom elektrischen Feld eingenommenen Volumens angespitzte Platinelektroden aus Platinvollmaterial eingeführt (siehe Abbildung 7.2).

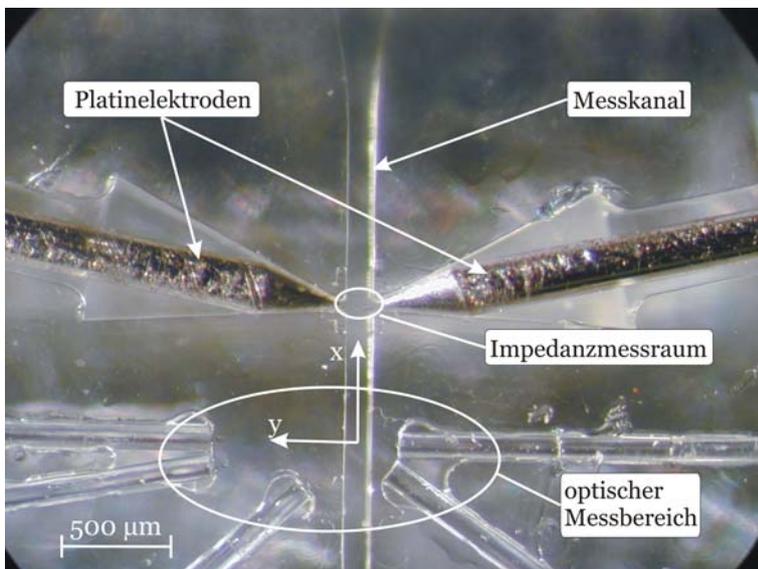


Abbildung 7.2: Mikroskopaufnahme des Fluidikkanals mit montierten Platinelektroden (Version 8)

Simulation der Widerstandsänderung

Das elektrische Feld im Messraum wurde zur Optimierung der Elektrodenanordnung mit der Software Comsol Multiphysics 3.2 als 3-dimensionales Modell simuliert. Die relative Permittivität physiologischer Kochsalzlösung wird mit 81, die Leitfähigkeit mit

1,89 S/m angenommen [Ham05]. Ferner wird ein Polystyrolteilchen mit einem Durchmesser von 10 μm , einer Permittivität von 2,4 und einer Leitfähigkeit von 10^{-15} S/m mittig im Messkanal platziert. Es wurde ein konstanter Strom von 0,5 mA angesetzt.

Es werden sowohl die Feldlinienverläufe als auch die Widerstandsänderung beim Passieren eines Partikels berechnet. Bei den Simulationsrechnungen werden die Übergangswiderstände der Elektrode-Elektrolyt-Grenzflächen R_{Grenz} nicht berücksichtigt. Der gesamte Widerstand kann mit dieser Simulation nicht berechnet werden, wohl aber die Widerstandsänderung, die sich bei der Passage eines Teilchens einstellt.

In Version 6 ragen stirnseitig zylindrische Elektroden von 250 μm Durchmesser in den Messkanal von $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. Die Elektroden haben demnach eine vom Elektrolyt benetzte Fläche von ca. $100 \times 250 \mu\text{m}^2$ (siehe Abbildung 7.3). In Version 6 liegt der berechnete Widerstand R_{Mess} zwischen den Elektroden bei 1973Ω . Beim Durchgang eines Polystyrolteilchens mit dem oben angegebenen Durchmesser erhöht sich der Widerstand um $0,18 \Omega$ (0,09 ‰). Zum Vergleich wird die absolute und relative Widerstandsänderung nach Gleichung 3.27 und Gleichung 3.28 berechnet. Die y- und z-Ausdehnung des Messraums beträgt 100 μm und die x-Ausdehnung ist nicht exakt begrenzt und wird mit 300 μm angenommen. Für die Widerstandsänderung nach Gleichung 3.27 erhält man $0,46 \Omega$, für die relative Widerstandsänderung nach Gleichung 3.28 0,26 ‰. Die auf diese Weise berechneten Widerstandsänderungen liegen in der gleichen Größenordnung wie die simulierten.

Wird die Elektrodenfläche auf ca. $960 \mu\text{m}^2$ (Durchmesser von 35 μm) verringert, so erhöht sich der Elektrodenwiderstand auf 16151Ω . Bei einem Durchgang eines Teilchens erhöht sich der Widerstand um $9,5 \Omega$ (0,59 ‰). Durch eine Verkleinerung der wirksamen Elektrodenflächen und damit des vom elektrischen Feld eingenommenen Raumes kann also die Widerstandsänderung deutlich erhöht und damit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Die Bedingung eines homogenen elektrischen Feldes für eine analytische Berechnung der Widerstandsänderung ist in diesem Fall nicht gegeben.

Durch den größeren Querschnitt des Messkanals in Version 8 ($125 \times 125 \mu\text{m}^2$) verringert sich zwar die absolute Widerstandsänderung, jedoch sinkt der Gesamtwiderstand auf 6829Ω . Beim Durchgang eines 10- μm -Polystyrolteilchens erhöht sich der Widerstand um $4,8 \Omega$ (0,7 ‰). Gegenüber Version 6 kann also durch eine veränderte Elektrodengeometrie die relative Widerstandsänderung um Faktor 8 verbessert werden. Eine Übersicht über die Simulationsmodelle und Ergebnisse liefert Tabelle 7.1.

	Version 6	Version 6 mit verkleinerten Elektroden	Version 8
Querschnitt des Messkanals in μm^2	100 x 100	100 x 100	125 x 125
Elektrodengeometrie	rechteckig 100 x 250 μm^2	Kugelsegment mit \varnothing 35 μm und Höhe 5 μm	Kugelsegment mit \varnothing 45 μm und Höhe 17 μm
Elektrodenfläche in Kontakt mit Elektrolyt in μm^2	25.000	960	3000
Abstand der Elektroden in μm	100	90	90
mittels FEM-Simulation berechneter Widerstand R_{Mess} in Ω	1973	16151	6829
Normierter Widerstand $R_{\text{norm}} = R_{\text{Mess}} \cdot F / \text{Abstand}$ in $\Omega \cdot \text{m}$	0,493	0,172	0,205
mittels FEM-Simulation berechnetes ΔR bei 10- μm -Teilchen in Ω	0,18	9,5	4,8
$\Delta R / R_{\text{Mess}}$ in %	0,09	0,59	0,7

Tabelle 7.1: Übersicht über die Simulationsmodelle und Ergebnisse

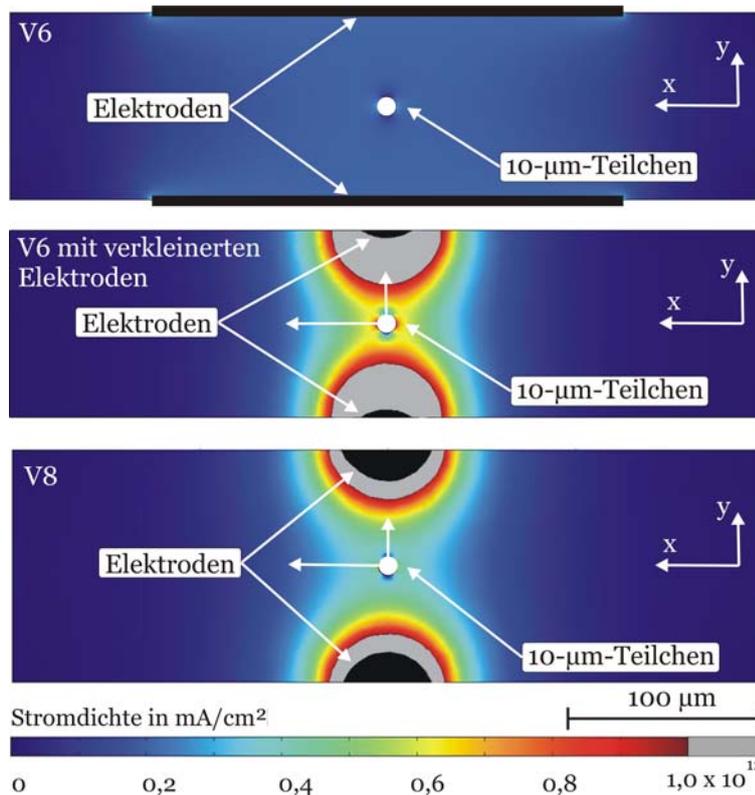


Abbildung 7.3: Mittels FEM-Simulation berechnete Stromdichte in Version 6 (oben), in Version 6 mit verkleinerten Elektroden (Mitte) und Version 8 (unten)

Experimentelle Ergebnisse

An Labormustern der Version 8 wurden Strom-Spannungskurven aufgenommen (siehe Abbildung 7.4). Es ist deutlich zu erkennen, dass Strom und Spannung nicht in linearer Weise zusammenhängen. Der Klemmwiderrstand R_{Klemm} sinkt mit größer werdendem Stromfluss von 70 k Ω bei einem Strom von wenigen Mikroampere auf ca. 18 k Ω bei

einem Strom größer als 0,2 mA. Der mittels Simulation berechnete Widerstand beträgt $R_{\text{Mess}} = 7 \text{ k}\Omega$. Die Differenz entspricht dem Übergangswiderstand der Elektrode-Elektrolyt-Grenzflächen R_{Grenz} .

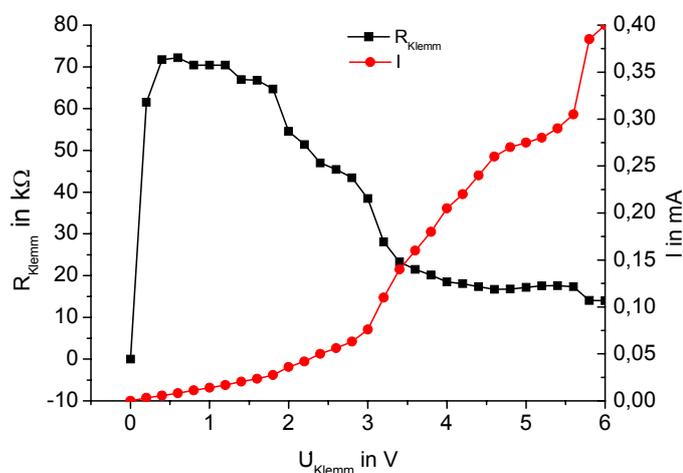


Abbildung 7.4: Elektrischer Widerstand R_{Kleemm} und Strom über der angelegten Klemmspannung U_{Kleemm} mit montierten Platinelektroden (Version 8)

Bei sehr kleinen Stromdichten wird das entstehende Gas im Elektrolyten gelöst und mittels molekularer Diffusion und überlagerter Konvektion durch den Elektrolyten ohne Bildung einer Gasphase abtransportiert. Überschreitet die Stromdichte einen kritischen Wert (10^{-2} bis 10^{-3} mA/cm^2), bilden sich einzelne Gasblasen an aktiven Keimstellen der Elektrode, an denen die kritische Konzentration gelöster Gase überschritten ist. Diese ist von mehreren Parametern wie zum Beispiel der Oberflächenspannung und der Keimstellengeometrie abhängig. Die Blasen wachsen durch die Zuführung weiteren Gases an und reißen ab einer Größe von 20 bis 100 μm ab. Bei Stromdichten von größer als 10 mA/cm^2 kommt es zu einer sichtbaren und vollständigen Blasenbedeckung der Elektrode. Diese Werte wurden an nicht angeströmten Elektroden ermittelt [Dink89].

Die Blasenbildung kann bei den Analysechips der Version 8 ab einer Stromdichte von ca. 1000 mA/cm^2 (entspricht einem Strom von $30 \mu\text{A}$) beobachtet werden. Der Durchmesser, bei dem die Blasen abreißen, wird auf 5 bis 30 μm geschätzt. Der Unterschied des Durchmessers gegenüber des von M. Dinkelacker experimentell ermittelten Werts kann auf die hohen Strömungsgeschwindigkeiten im Messkanal zurückgeführt werden. Gasblasen im Messraum verändern den elektrischen Widerstand ähnlich den Messobjekten und können nicht anhand des Signals von zu messenden Partikeln unterschieden werden.

Die entstehende Gasmenge wird mit Gleichung 3.20 berechnet. Bei einem Strom $I = 0,5 \text{ mA}$ entstehen $0,2 \text{ cm}^3/\text{h}$ bzw. $0,058 \mu\text{l/s}$. Bei einem angenommenen durchschnittlichen Blasendurchmesser von 10 μm entspricht das 10.000 Blasen/s. Die Zählraten bei einer durchflusszytometrischen Messung liegen im Bereich von 1.000 bis 10.000 Zellen/s. Damit ist nicht nur das Blasenvolumen dem der Zellen ähnlich, sondern auch die Häufigkeit mit der Blasen auftreten.

Darüber hinaus verändern die an den Elektroden anhaftenden Gasblasen die wirksame Elektrodenfläche und damit auch den Messwiderstand.

Die Gasblasenbildung kann durch verschiedene Gegenmaßnahmen abgeschwächt werden. Der Strom kann zwei bis drei Größenordnungen gesenkt werden, so dass die Reaktionsprodukte in Lösung gehen, mit dem Fluidstrom abtransportiert werden und so keine Blasen entstehen. Dabei ist kritisch zu bewerten, dass die erwarteten Signale kleiner werden und möglicherweise im Rauschen untergehen. Ein weiterer Lösungsansatz ist die Verwendung von Wechselstrom. Bereits ab einer Frequenz von 100 Hz kommt es durch die Umpolung der Stromrichtung zu einer deutlich verminderten Blasenbildung. Für eine durchflusszytometrische Messung ist jedoch eine Steigerung der Wechselstromfrequenz auf mindestens das zehnfache des Kehrwertes der Signallänge notwendig. Die Signallänge wird von der Strömungsgeschwindigkeit und der x-Ausdehnung des Messraums bestimmt. Typische Werte sind 10 bis 50 μs .

Als weitere Lösungsmöglichkeit bietet sich an, die Elektrodenflächen entsprechend der Anordnung bei konventionellen Impedanz-Zellzählgeräten stark zu vergrößern und zwangsläufig außerhalb des Analysechips anzuordnen. An derartigen Elektroden beeinflussen Blasen die Messung nahezu nicht, da sie gemessen am Volumen des elektrischen Feldes vernachlässigbar sind. Dieser Lösungsansatz wurde experimentell an Labormustern der Version 8 untersucht und wird im nächsten Kapitel vorgestellt.

7.3 Außerhalb des Analysechips liegende Elektroden

Zur experimentellen Untersuchung wurde ein Analysechip der Version 8 entsprechend modifiziert. Die Zuleitungskanäle der Nadelelektroden wurden von außen aufgebohrt und jeweils ein kleiner Behälter mit einer ca. 100 mm² großen Platinelektrode angeklebt (siehe Abbildung 7.5 und Abbildung 7.8). Die Stromdichte bei 0,5 mA an den Elektroden sinkt dadurch von ca. 16.600 mA/cm² auf 0,5 mA/cm².

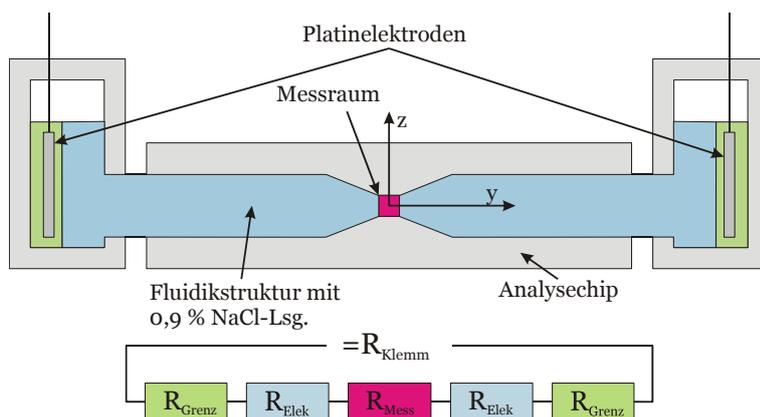


Abbildung 7.5: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Impedanzmessung mit außerhalb liegenden Elektroden

Der Strom wird über den Elektrolytkanal zum Messraum geleitet. Der Messraum wird räumlich durch die relativ schmalen seitlichen Öffnungen ($40 \times 125 \mu\text{m}^2$) eingengt (siehe Abbildung 7.6).

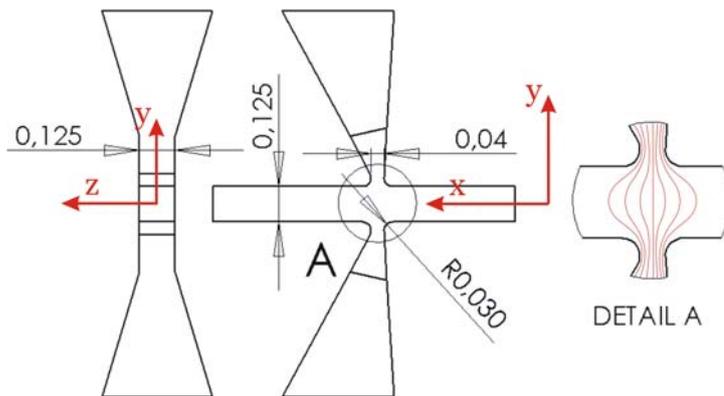


Abbildung 7.6: Abmessungen der Impedanzmessraums Version 8

Der Aufbau ähnelt dem eines konventionellen Impedanz-Zellzählgerätes. Der entscheidende Unterschied liegt darin, dass das elektrische Feld quer zur Flussrichtung orientiert ist und die Zellen in einem fokussierten Probenstrom zugeführt werden. Dadurch werden Koinzidenzen und von den Trajektorien abhängige Signalformen, die sich in einem Impedanz-Zellzählgeräten ohne hydrodynamische Fokussierung ergeben, vermieden.

Durch den wesentlich größeren Abstand der Elektroden ergibt sich ein experimentell ermittelter Klemmwiderrstand R_{Klemm} zwischen den Elektroden von ca. 60 k Ω . R_{Elek} kann aus der Länge (je Seite ca. 38 mm) und der Querschnittsfläche (durchschnittlicher Innendurchmesser 1,5 mm) der Schlauchverbindung zu 11 k Ω rechnerisch abgeschätzt werden.

Simulation der Widerstandsänderung

Zur Simulation dieser Variante wurde ein Modell erstellt, bei dem sich die Elektroden an den 40 μm in x-Richtung und 125 μm in z-Richtung messenden Engstellen seitlich des Messkanals befinden (siehe Abbildung 7.7). Damit wird nicht der gesamte Widerstand simuliert, sondern nur der Messwiderstand R_{Mess} . Dieses Modell setzt voraus, dass der Strom mit einer homogenen Stromdichte durch die seitlichen Engstellen fließt. Wie bei den Simulationen der vorangegangenen Versionen beträgt der Strom 0,5 mA. Es ergibt sich ein aus den Simulationsrechnungen ermittelter Widerstand von 12017 Ω . Beim Durchgang eines 10- μm -Teilchens erhöht sich der Widerstand um 1,59 Ω (0,13 %). Das vom elektrischen Feld eingenommene Volumen ist deutlich größer als mit montierten Nadelelektroden. Dadurch verschlechtert sich das Signal-Rausch-Verhältnis. Tabelle 7.2 zeigt eine Übersicht und einen Vergleich von simulierten und experimentell gemessenen Ergebnissen.

	Simulationsmodell der Version 8	reales Labormuster der Version 8
Querschnitt des Messkanals in μm^2	125 x 125	125 x 125
Elektrodenfläche in Kontakt mit dem Elektrolyt in mm^2	0,004	100
Abstand der Elektroden	190 μm	ca. 2 x 38 mm
mittels FEM-Simulation berechneter Widerstand R_{Mess} in Ω	12019	60.000 (gemessen)
mittels FEM-Simulation berechnetes ΔR bei 10- μm -Teilchen in Ω	1,59	1,1 (gemessen)
$\Delta R/R_{\text{Mess}}$ in ‰	0,13 ‰	0,18 ‰

Tabelle 7.2: Vergleich des Simulationsmodells und des realen Labormusters

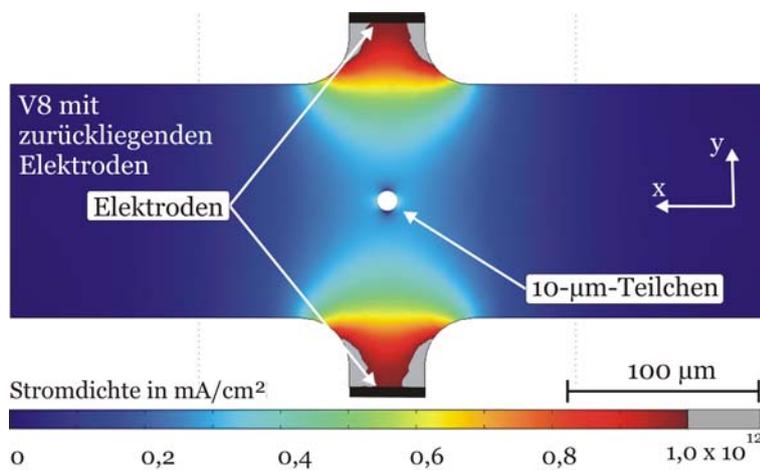


Abbildung 7.7: Mittels FEM-Simulation berechnete Stromdichte in Version 8 mit außerhalb liegenden Elektroden

Experimentelle Ergebnisse

Abbildung 7.8 zeigt einen Analysechip mit außerhalb liegenden Elektroden, wie er für die experimentellen Untersuchungen verwendet wurde.

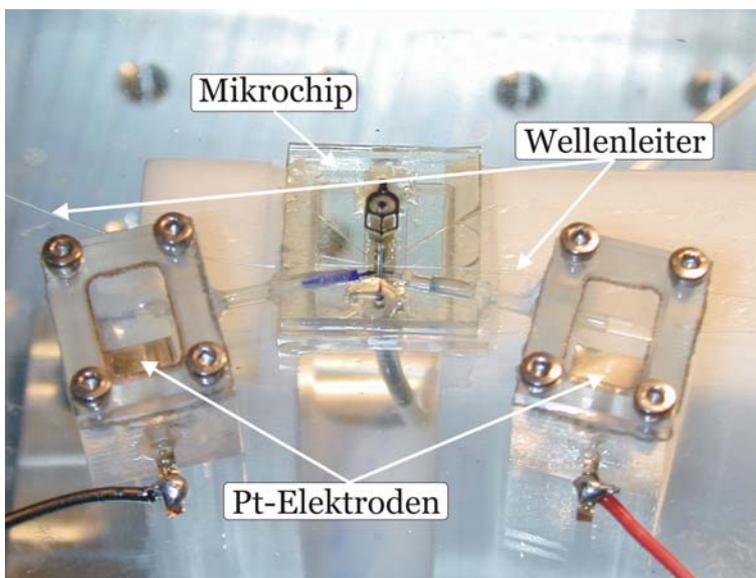


Abbildung 7.8: Messaufbau zur Messung von Impedanzänderung beim Durchgang von Partikeln durch den Messsensor

Zur Rauschunterdrückung wurde eine HF-Abschirmung um den Analysechip gebaut. Die erste Elektrode wird an der HF-Abschirmung geerdet. Die zweite Elektrode wird an einen Vorverstärker (Typ MS VK1, Partikel-Detektor MSPD1 1105/1, Telefunken) angeschlossen. Das Modul liefert einen konstanten Strom, der für die Messung auf 0,5 mA eingestellt wurde. Die bei konstantem Strom gemessene Änderung des Spannungsabfalls (AC-Kopplung) wird in dem Vorverstärker verstärkt. Die Weiterverarbeitung des Signals erfolgt durch einen einstellbaren linearen Nachverstärker. Zur Unterdrückung niederfrequenter akustischer induzierter Störungen wurde insbesondere für Messungen an kleinen Partikeln zwischen Vorverstärker und Nachverstärker ein RC-Hochpassfilter geschaltet. Die gemessenen Signale werden mit einem digitalen Oszillographen registriert und für die Auswertung gespeichert.

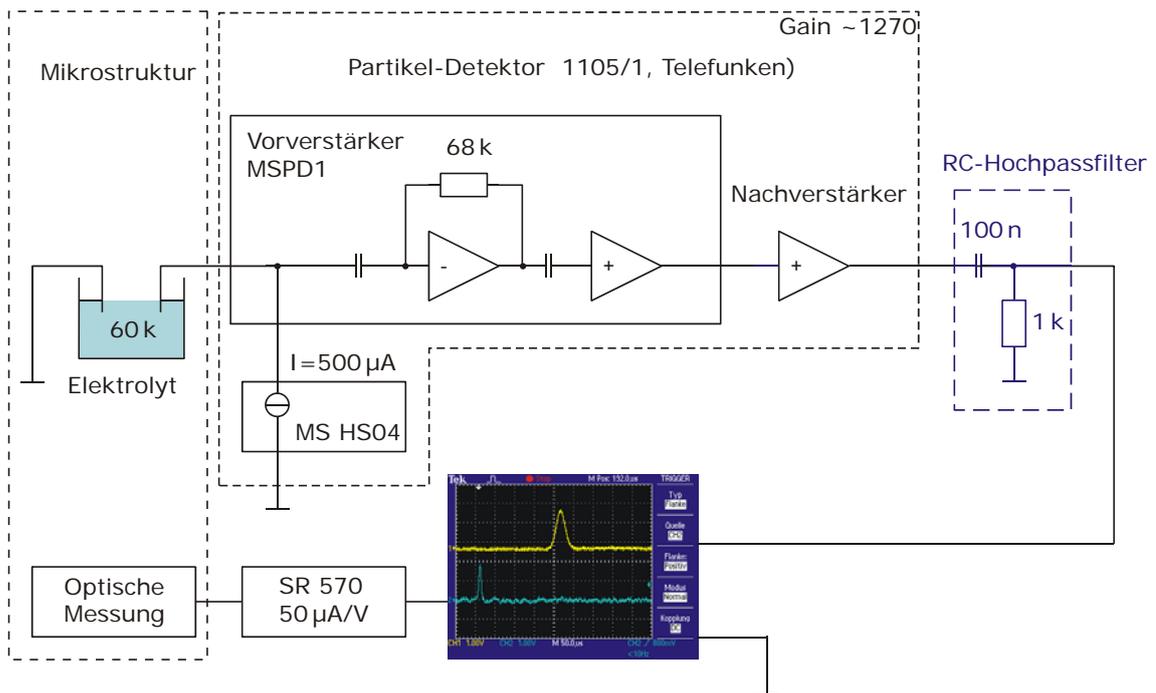


Abbildung 7.9: Schaltbild der gesamten Elektronik für die Impedanzmessung und für das gemessene optische Signal (Extinktionssignal) [PTB]

Als Proben wurden Partikelsuspensionen mit monodispersen Polystyrolteilchen verschiedener Durchmesser (5, 7, 10, 15 und 20 μm) verwendet.

Die optische Messstelle liegt in Flussrichtung des Messkanals 680 μm vor der Impedanzmessstelle. Die Messung der Impedanzänderung wird mit Hilfe des Extinktionssignals getriggert. Abbildung 7.10 zeigt die zeitlichen Signalverläufe des Extinktions- und Impedanzsignals.

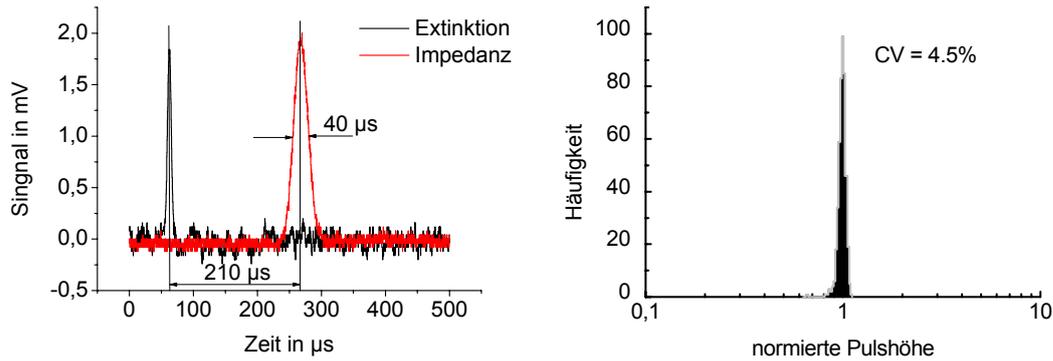


Abbildung 7.10: Impedanzsignal eines 20- μm -Teilchens [PTB, Yil06]. Links ist das Signal über der Zeit dargestellt, rechts das dazugehörige Histogramm monodisperser 20- μm -Teilchen.

Das Signal der Impedanzmessung folgt mit einer Zeitverzögerung von 210 μs auf das Signal der Extinktion. Anhand der Zeitverzögerung zwischen Extinktions- und Impedanzsignal ergibt sich eine gemessene Flussgeschwindigkeit der Teilchen von 3,23 m/s. Bei diesem Versuch wurden Durchflussmengen von 24,1 $\mu\text{l/s}$ von 0,5 $\mu\text{l/s}$ für den Hüll- und Probenvolumenstrom eingestellt. Unter der Annahme, dass sich bis zu der optischen Messstelle ein parabelförmiges Strömungsprofil aufgebaut hat, ergibt sich aus der Gesamtdurchflussmenge von 24,6 $\mu\text{l/s}$ bei einem Messkanalquerschnitt von $125 \times 125 \mu\text{m}^2$ eine Strömungsgeschwindigkeit von 3,15 m/s. Mit der Kenntnis der Strömungsgeschwindigkeit und der Signaldauer von ca. 40 μs (FWHM) wird die x-Ausdehnung des elektrischen Feldes abgeschätzt. Mit der gemessenen Strömungsgeschwindigkeit ergibt das eine x-Ausdehnung des elektrischen Feldes von ca. 130 μm . Aus dem Simulationsmodell kann ebenfalls die x-Ausdehnung (FWHM) des elektrischen Feldes abgelesen werden. Mit 140 μm ergibt sich zu den gemessenen Werten eine relativ gute Übereinstimmung.

Die Impedanzmessung ist unempfindlich gegenüber Trajektorienabweichungen. Aus diesem Grund ergibt sich ein Variationskoeffizient von 4,5 %.

Nach Gleichung 3.27 ist die Widerstandsänderung proportional zum Volumen und hängt – bei nicht kugelförmigen Partikeln - außerdem von ihrer Form und Orientierung ab. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurden Impedanzänderungen von monodispersen Polystyrolkugeln verschiedener Durchmesser gemessen. Trägt man die Widerstandsänderung über dem Teilchenvolumen auf, so ergibt sich der in Abbildung 7.11 gezeigte Graph.

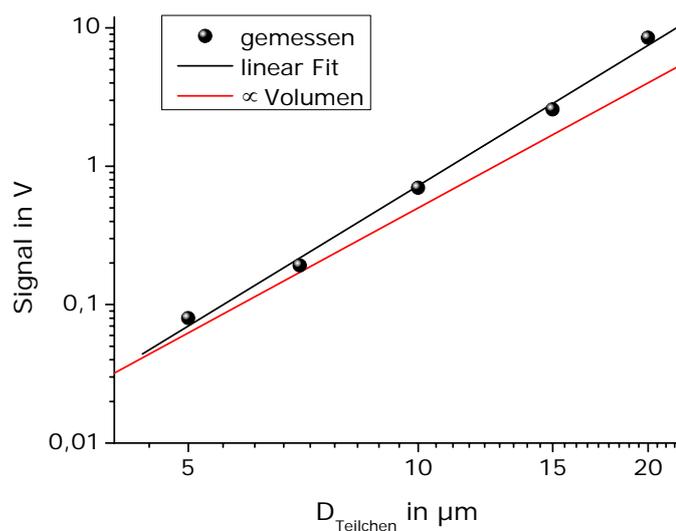


Abbildung 7.11: Signalamplituden (über 128 Ereignisse gemittelt) der Impedanz in Abhängigkeit vom Teilchendurchmesser der Polystyrolkugeln

Dieser Versuch beweist die Funktionsfähigkeit der Impedanzmessung, indem Polystyrolkugeln verschiedener Durchmesser unterschieden werden können.

Die Messpunkte wurden doppelt logarithmisch aufgetragen, dadurch kann aus der Steigung der Geraden die Potenz des Durchmessers abgelesen werden, mit der das Signal variiert. Da eine Abhängigkeit proportional zum Volumen erwartet wird, sollte sich hierbei eine Potenz von 3 ergeben. Die durch einen linearen Fit angegebene Potenz ist 3,4. Die Steigung für die Potenz 3 ist ebenfalls in die Grafik eingezeichnet. Experimentelle Untersuchungen, die diese Abweichungen klären, sind bis jetzt nicht durchgeführt worden.

8 Fertigungsprozesskette

8.1 Werkstoffauswahl für einen Heißprägestempel

Werkstoffanforderungen an einen Heißprägestempel

Der Werkstoff des Heißprägestempels muss sowohl für den Fräsprozess als auch zum Heißprägen gut geeignet sein. Zum Teil widersprechen sich die Anforderungen, so dass ein Kompromiss gefunden werden muss. Die Anforderungen im Einzelnen sind:

- gute Zerspanbarkeit mit sehr filigranen Werkzeugen zur Reduktion der Gefahr eines Fräserbruchs
- Standzeiterhöhung der eingesetzten Werkzeuge
- Fräsbarkeit mit Diamantwerkzeugen zur Herstellung optischer Oberflächen
- hohe 0,2 %-Dehngrenze
- hohe Härte zur Reduzierung der Gefahr einer Werkzeugbeschädigung
- hohe Wärmeleitfähigkeit zur Reduzierung der Zykluszeiten
- an die Kunststoffe angepasster thermischer Ausdehnungskoeffizient zur Minimierung der durch Schrumpfung hervorgerufenen Maßabweichung der heißgeprägten Platten
- Korrosionsbeständigkeit zur Vermeidung von Metalloxide in den Mikrostrukturen

Ausgewählte Werkstoffe für die Fertigung von Heißprägestempeln

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Werkstoffe auf ihre Tauglichkeit zum Ultra-Präzisionsfräsen und Heißprägen getestet:

Vorvergüteter Werkzeugstahl

X14CrMoS17 (1.4101) ist ein nichtrostender ferritischer Chromstahl. Der hohe Chromanteil von 17 % bewirkt eine ausreichende Korrosionsbeständigkeit. X14CrMoS17 wird auf Grund seiner hohen Härte von 220 HB mit beschichteten VHM-Werkzeugen bearbeitet. Die Beschichtung erhöht die Standzeit, rundet jedoch auch die Schneidkante ab. Dadurch entstehen größere Schnittkräfte, was die Abdrängung des Fräasers und die Gefahr des Fräserbruchs erhöht. Gleichzeitig vergrößert sich der beim Fräsen entstehende Grat. Stähle können auf Grund der hohen Kohlenstoffaffinität zu Eisen nicht mit Diamantfräsern bearbeitet werden.

Vorvergütete Stähle eignen sich gut für den Einsatz als Formwerkzeuge. Auf Grund ihrer hohen Härte und hohen 0,2 %-Dehngrenze von 500 bis 550 MPa ist der Ver-

schleiß bei der Kunststoffabformung minimal. Die Wärmeleitfähigkeit von $25 \text{ W/m}\cdot\text{K}$ bei Stahl ist deutlich schlechter als bei Messing oder Aluminium. Mit einem thermischen Ausdehnungskoeffizienten von $10\cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ ist die Differenz zu dem thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Kunststoff ($65 - 90\cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$) größer als bei Messing oder Aluminium.

Messing

Bei Messing ($\text{CuZn}_{39}\text{Pb}_3$, MS58) sind die auftretenden Schnittkräfte kleiner als bei vorvergüteten Werkzeugstählen. Messing kann darüber hinaus mit unbeschichteten Werkzeugen bearbeitet werden. Hierbei werden durch die schärferen Schneidkanten sowohl die Gratbildung als auch die Schnittkräfte reduziert. Die Standzeit von unbeschichteten Fräsern in Messing ist um ein Vielfaches größer als die von beschichteten in vorvergütetem Stahl. Messing kann mit Diamantfräsern problemlos bearbeitet werden.

Messing hat eine sehr gute Wärmeleitfähigkeit (125 W/mK) und einen thermischen Ausdehnungskoeffizienten von $20\cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$. Die Härte von 90 HB und die 0,2 %-Dehngrenze von 250 MPa sind zwar gering, sind aber ausreichend für den Einsatz als Formwerkzeug für Kleinserien. Bei hohen Aspektverhältnissen in der Struktur des Prägestempels treten beim Heißprägen und Entformen leicht Beschädigungen auf.

Hochfeste Aluminiumlegierung

Hochfeste Aluminiumlegierungen wurden speziell für den Formen- und Maschinenbau entwickelt. Die Legierung AMP 8000 der Firma alimex Metallhandels-gesellschaft mbH lässt sich mit unbeschichteten VHM-Werkzeugen sehr gut zerspanen. Mit dem Einsatz von Diamantwerkzeugen werden optische Oberflächen erreicht.

Aluminium hat eine hervorragende Wärmeleitfähigkeit (165 W(mK)) und den größten thermischen Ausdehnungskoeffizienten ($23\cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$) der vorgestellten Werkstoffe. Die 0,2 %-Dehngrenze von 400 bis 550 MPa erreicht annähernd Werte von vorvergütetem Stahl. Die Härte liegt mit 145 bis 180 HB etwas unter der des vorgestellten Stahls, jedoch deutlich über der des Messings (MS58). Aluminium besitzt eine hohe Korrosionsbeständigkeit, was diesen Werkstoff zum Einsatz als Formwerkzeug für Mikrostrukturen prädestiniert.

Die nachfolgende Tabelle 8.1 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Eigenschaften ausgewählter Werkstoffe im Bezug auf die Prozesskette Ultra-Präzisionsfräsen und Heißprägen.

Eigenschaft	X14CrMoS17	CuZn39Pb3	AMP 8000
Zugfestigkeit in MPa	ca. 730	360	460 - 590
0,2 %-Dehngrenze in MPa	500 - 550	250	400 - 550
Härte in HB	ca. 220	ca. 90	145 - 180
Fräsbarkeit mit VHM	gut	sehr gut	sehr gut
Fräsbarkeit mit Diamant	nein	sehr gut	sehr gut
Wärmeleitfähigkeit in W/mK	25	125	165
Wärmeausdehnungskoeffizient in K ⁻¹	10·10 ⁻⁶	20·10 ⁻⁶	23·10 ⁻⁶
Oberflächenhärbarkeit	z. B. nitrieren	nein	nein
Korrosionsbeständigkeit	gut	gut	gut

Tabelle 8.1: Eigenschaften verschiedener ausgewählter Werkstoffe

Mit allen drei Werkstoffen wurden Frästests durchgeführt und testweise Heißprägestempel gefertigt. Messing hält den hohen Belastungen beim Heißprägen nicht immer Stand. Stahl ist schwierig zu fräsen. Aluminium vereint eine gute Fräsbarkeit mit einer Eignung als Werkstoff für ein Kunststoffumformwerkzeug.

8.2 Ultra-Präzisionsfräsen des Formeinsatzes

Das Ultra-Präzisionsfräsen ist eine relativ neue Fertigungstechnologie. Es stehen noch keine Parametersätze allgemein zur Verfügung wie beim konventionellen Fräsen. Auf der neu beschafften Ultra-Präzisionsfräsmaschine der Firma LT Ultra-Precision Technology GmbH mussten zunächst Parametersätze und die damit erreichbaren Genauigkeiten gefunden werden. Dazu wurden umfangreiche Frästests durchgeführt. Die in Kapitel 4.3 (Seite 40) beschriebenen erreichbaren Qualitäten beruhen auf diesen Untersuchungen. Nachfolgend werden die eingesetzten Fräser und die erreichbaren Genauigkeiten diskutiert.

Eingesetzte Fräser beim Ultra-Präzisionsfräsen

Die Heißprägestempel sind als Mehrfachwerkzeug ausgeführt. Je nach Version sind sie als 2- oder 3-fach-Werkzeug gefertigt, so dass bei einem Heißprägeprozess jeweils 2 oder 3 Deckel und Böden geprägt werden können. Die Größe der Analysechips beträgt 20 x 20 mm², die Einfrästiefe beträgt 0,7 mm. Die verwendeten Werkzeuge (Tabelle 8.2) müssen auf diese Frästiefe angepasst sein.

Ø in µm	Art	Schneidenlänge in µm	Zähnezahl	Spindeldrehzahl in U/min	Zustellung in µm
800	VHM-Schaftfräser	1600	2	40.000	100
200	VHM-Schaftfräser	700	4	150.000	20
50	VHM-Schaftfräser	100	2	150.000	5
200	VHM-Radiusfräser	400	2	150.000	20
100	VHM-Radiusfräser	200	2	150.000	10
140	45°-Diamant-Fräser	500	1	150.000	10

Tabelle 8.2: Übersicht über die eingesetzten Fräser zur Fertigung des Formeinsatzes

Die Schwierigkeit bei der Fräserauswahl besteht darin, genügend steife und gleichzeitig genügend lange Fräser zu wählen. Eine Frästiefe von 0,7 mm mit einem 0,8-mm-Fräser zu erreichen, stellt kein Problem dar. Mit einem niedrigen Aspektverhältnis von 2 ist dieser Fräser ausreichend steif. Bei einem 0,2-mm-Fräser wird ein Aspektverhältnis von über 3 benötigt, um 0,7 mm tief zu fräsen. Fräser mit einer höheren Schneidzahl haben kleinere Spannuten und daher eine dickere Seele. Dies lässt die Fräser steifer werden. Aus diesem Grund wurde bei dem 0,2-mm-Fräser eine Zähnezahl von 4 gewählt. Größere Zähnezahlen bei Fräsern dieser Größe sind kommerziell nicht erhältlich. 50-µm-Fräser gehören zu den derzeit kleinsten kommerziell erhältlichen Fräsern. Sie sind nur mit einer Schneidzahl von 2 erhältlich und haben eine Schneidlänge von 100 µm. Die Radiusfräser werden zur Erzeugung der Freiformflächen, wie sie bei der hydrodynamischen Fokussierung und bei den Ausläufen an den Enden der Fasernuten auftreten, eingesetzt. Ihre Größe wird den Platzverhältnissen und dem kleinsten Radius der Freiformfläche angepasst. Mit Diamantfräsern werden deutlich bessere Oberflächenqualitäten als mit VHM-Werkzeugen erzielt. Derartige Fräser sind Einzahnfräser aus monokristallinem Naturdiamant.

Die mit den verschiedenen Fräsern erreichten Fräsergebnisse werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

Ergebnis der Ultra-Präzisionsfräsung

Die Fräsqualität des Prägestempels soll anhand folgender Qualitätskriterien beurteilt werden:

- Oberflächenqualität
- Gratbildung
- Steilheit der Seitenwände
- Erreichbare Lagegenauigkeit

Oberflächenqualität beim Ultra-Präzisionsfräsen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gesonderte Untersuchungen der Oberflächenrauheit beim Mikrofräsen verschiedener Werkstoffen durchgeführt. Dazu wurden mit unterschiedlichen Schaftfräsern und Fräsparametern Testfelder in die oben beschriebenen Werkstoffe Stahl (X14CrMoS17), Messing (CuZn39Pb3) und Aluminium (alimex, AMP 8000) gefräst. Die verwendeten Fräser waren zweischneidige beschichtete Schaftfräser mit Durchmessern von 0,1 mm, 0,2 mm und 0,8 mm. Die Drehzahlen und Vorschübe

wurden über weite Bereiche variiert und dem Werkstoff und Fräserdurchmesser angepasst. Die Oberflächenrauheiten wurden anschließend mit einem optischen Profilometer der Firma UBM gemessen.

Bei Messing und Aluminium wurde bei größerem Vorschub, ähnlich wie in der konventionellen Fertigung, eine Erhöhung der Oberflächenrauheit festgestellt. Der Einfluss der Vorschubgeschwindigkeit ist bei allen Fräserdurchmessern deutlich zu erkennen. Je größer der Vorschub, desto rauer wird die Oberfläche. Der Einfluss des Fräserdurchmessers und der Spindeldrehzahl ist dagegen geringer. Tendenziell ergeben kleinere Fräser und größere Spindeldrehzahlen bessere Oberflächenqualitäten (siehe auch Abbildung 8.1).

Bei den Versuchen in Stahl konnte im Gegensatz zu Messing und Aluminium kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Rauheit und dem Vorschub festgestellt werden. Insgesamt sind die Rautiefen in Stahl größer als in Messing und Aluminium.

Bei der Festlegung der optimalen Fräsparameter muss sowohl die Oberflächenqualität als auch die Gratbildung (siehe nächsten Abschnitt) berücksichtigt werden. Hierbei ergeben sich zum Teil entgegengesetzte Tendenzen, so dass ein Kompromiss gefunden werden muss. Abbildung 8.1 zeigt die Mikroskopaufnahme eines in Aluminium gefrästen Heißprägestempels. Die mit verschiedenen Fräsern bearbeiteten Bereiche sind deutlich zu unterscheiden. Bei den eingesetzten Fräsparametern werden folgende Rauhtiefen mit den einzelnen Fräsern erreicht:

- 0,8-mm-Fräser $R_a = \text{ca. } 500 \text{ nm}$
- 0,2-mm-Fräser $R_a = \text{ca. } 150 \text{ nm}$
- 0,05-mm-Fräser $R_a = \text{ca. } 75 \text{ nm}$

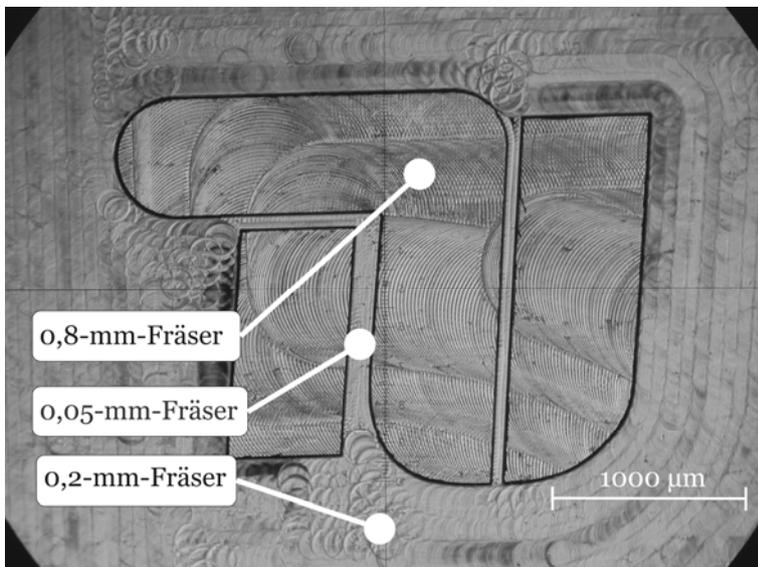


Abbildung 8.1: Mikroskopaufnahme von Fräsriefen verschiedener Schaftfräser

Gratbildung beim Ultra-Präzisionsfräsen

Bei den Untersuchungen zur Gratbildung konnten drei Tendenzen festgestellt werden:

- Bei Stahl ist die Gratbildung am stärksten, bei Messing und Aluminium dagegen deutlich reduziert.
- Kleinere Fräser hinterlassen weniger Grat als größere.

- Je größer der Vorschub und je kleiner die Spindeldrehzahl, desto weniger Grat entsteht. Dieser Punkt widerspricht der Tendenz nach einer optimalen Oberflächengüte.

Der entstehende Grat ist bei Messing und Aluminium sehr fein und lässt sich durch mehrfachen Einsatz beim Heißprägen entfernen. Der Kunststoff umfließt den Grat und reißt diesen beim Entformen ab. Nach ca. 10 Heißprägezyklen ist bei Messing und Aluminium annähernd kein Grat mehr festzustellen.

Bei Stahl ist der Grat auf Grund der höheren Werkstofffestigkeit deutlich fester. Aber auch hier vermindert sich der Grat bei den ersten Prägungen deutlich. Nach 15-maligem Abprägen des Stempels ist der Grat nahezu vollständig entfernt. (siehe Abbildung 8.2).

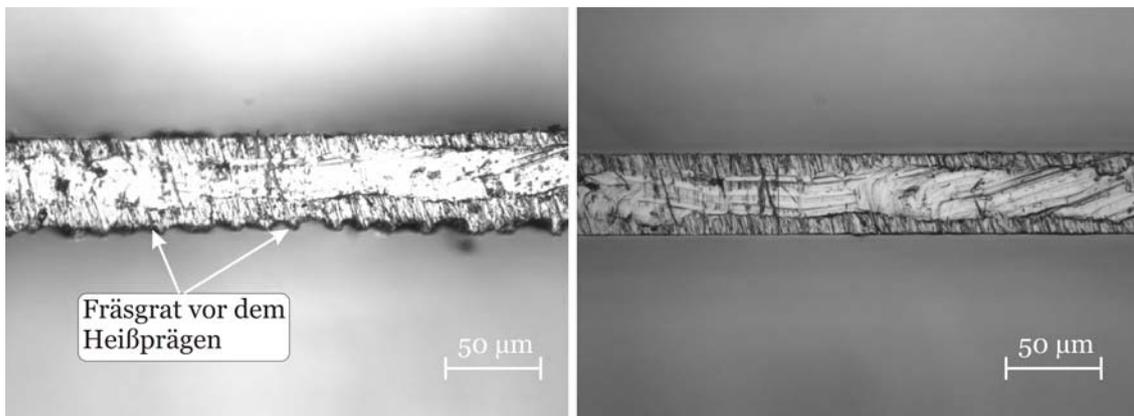


Abbildung 8.2: Grat bei Stahl unmittelbar nach dem Fräsen (links) und nach 15-maligem Heißprägen (rechts)

Steilheit der Seitenwände beim Ultra-Präzisionsfräsen

Die Seitenwände beim Fräsen weichen auf Grund der Fräserabdrängung von der idealen Senkrechten ab. Um den Einfluss zu untersuchen, wurden systematisch verschiedene Fräsparameter untersucht:

- **Fräsbahnüberlappung:** Die Fräsbahnüberlappung wurde zwischen 10 % und 90 % bei ansonsten gleichen Fräsparametern variiert. Sowohl in Stahl als auch in Messing und Aluminium konnte keine Abhängigkeit der Steilheit der Seitenwände von der Fräsbahnüberlappung gefunden werden.
- **Vorschubgeschwindigkeit:** Bei der Vorschubgeschwindigkeit ist zu vermuten, dass die Steilheit der Seitenwände mit steigendem Vorschub abnimmt. Hierzu wurden mit einem 0,3-mm-Fräser Vorschübe zwischen 0,3 und 1,6 µm pro Zahn bei ansonst gleichen Parametern gefahren. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang gefunden werden.
- **Schnittgeschwindigkeit:** Einen weiteren Faktor für die Werkzeugabdrängung und somit die Verminderung der Steilheit der Seitenwände könnte die Schnittgeschwindigkeit darstellen. Bei ansonsten gleichen Parametern wurden innerhalb des hier untersuchten Schnittgeschwindigkeitsbereichs zwischen 30 und 140 m/min jedoch keine Abweichungen beobachtet, die einen Rückschluss auf eine Beziehung zu der Schnittgeschwindigkeit zulassen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stimmen mit den Ergebnissen von J. Schwab überein [Schwa94].

Im Unterschied zu J. Schwab stellte K. Weinert [Wein05] bei Mikrofräsversuchen mit Schaftfräsern ($\varnothing = 0,4 \text{ mm}$) in vergütetem Stahl fest, dass eine starke Verringerung der Schnittgeschwindigkeit von 100 auf 20 m/min zu einer größeren Abweichung von der Sollkontur führt.

- Zustellung: Bei der Zustellung konnte in Messing eine leichte Abhängigkeit der Steilheit der Seitenwände gefunden werden. Bei großen Zustellungen von 80 bis 100 μm verbesserte sich das Fräsergebnis leicht. Bei Stahl konnte dies nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den oben genannten Faktoren konnte ein starker Einfluss des Werkstoffs festgestellt werden. In Stahl traten merklich größere Abweichungen auf. Sie betragen zwischen 5° bis 7° von der Senkrechten. In Aluminium weichen die Wände um zwischen 4° und 7° , in Messing zwischen 2° und 5° von der Senkrechten (siehe Abbildung 8.3).

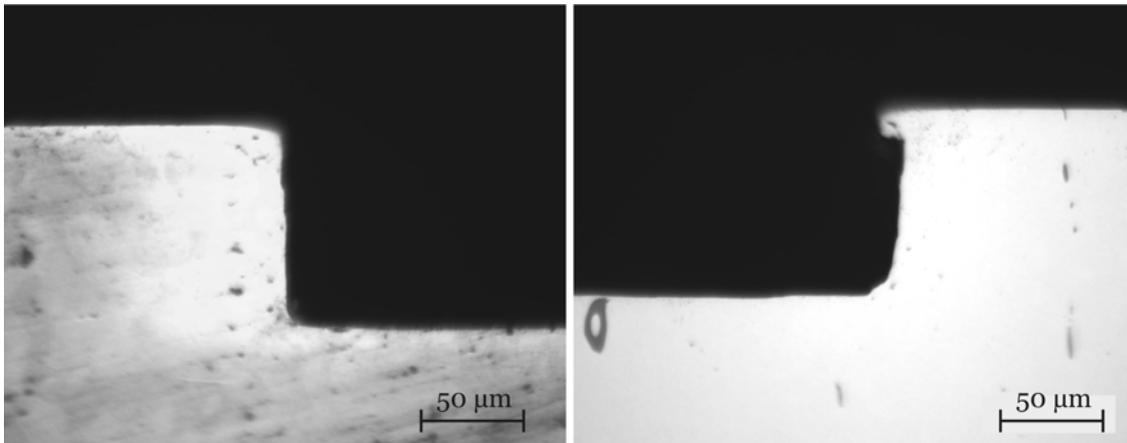


Abbildung 8.3: Schliffbild einer gefrästen Tasche in Messing (links) und Stahl (rechts)

Erreichbare Genauigkeit in x-y-Richtung beim Ultra-Präzisionsfräsen

Bei der erreichbaren Kantengenauigkeit muss zwischen der x-y-Arbeitsebene und der Zustellrichtung Z unterschieden werden. In x-y-Richtung ist die Genauigkeit im Wesentlichen von der Steifigkeit der Maschine und des Fräasers sowie von den entstehenden Schnittkräften abhängig. Die Steifigkeit der Maschine ist wesentlich größer als die des Fräasers. Auch J. Schwab berichtet, dass der Anteil der Maschinensteifigkeit größer wird, je kleiner der Werkzeugdurchmesser ist [Schwa94]. Die Fräsersteifigkeit wurde exemplarisch an einem 0,2-mm-Schaftfräser mittels einer FEM-Rechnung simuliert. Die Durchbiegung resultiert lediglich aus der Schneide, der Schaft zeigt nahezu keine Deformation. Die Durchbiegung an der Fräuserspitze beträgt $1,7 \mu\text{m}$. Bei der gegebenen Fräsergeometrie beträgt die berechnete Fräsersteifigkeit $c_{\text{Fräser}} = 0,11 \text{ N}/\mu\text{m}$ (siehe Abbildung 8.4).

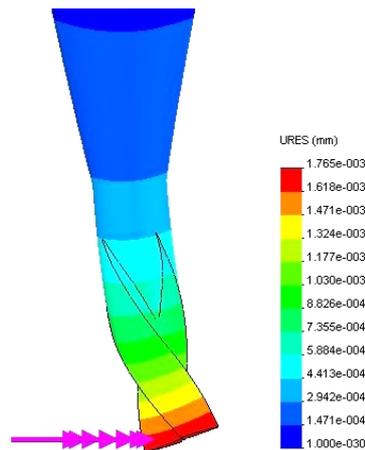


Abbildung 8.4: Mittels FEM-Rechnung ermittelte Durchbiegung eines 0,2-mm-Schaftfräasers bei einer angreifenden Schnittnormalkraft von 0,21 N

Die Schnittkräfte können analytisch abgeschätzt werden. In der Literatur werden dazu verschiedene Ansätze beschrieben. An dieser Stelle soll der empirische Ansatz von Victor und Kienzle verwendet werden [Emu04]. Dieser Ansatz ist aus umfangreichen Drehversuchen entwickelt worden. Ähnlich umfangreiche Untersuchungen aus dem Fräsbereich liegen nicht vor. Die in diesen Versuchen verwendeten Zustellungen und Spandicken entsprechen nicht denen, die beim Mikrofräsen auftreten. Es ist nicht bekannt, dass die Fräskräfte beim Mikrofräsen bisher detailliert untersucht worden sind.

Die Schnittkraft F_C ist proportional zum Spanquerschnitt A [Emu04]:

$$F_C = k_c \cdot A.$$

Gleichung 8.1

Der Parameter k_c steht für die spezifische Schnittkraft. Sie ist in erster Linie abhängig vom Werkstoff und der Spandicke. Darüber hinaus werden weitere Faktoren wie zum Beispiel der Spanwinkel, die Schnittgeschwindigkeit, der Schneidstoff, die Werkstückform die Kühlschmierung und der Schneidverschleiß mit eingerechnet. Die Beschichtung des Fräasers wird bei diesem Ansatz nicht berücksichtigt. Für einen 2-schneidigen 0,2-mm-Schaftfräser mit einer Drehzahl von 85.000 U/min, einem Vorschub von 800 mm/min, einer Zustellung von 20 μm , einer Fräsbahnüberlappung von 50 % ergibt sich in Stahl eine Schnittkraft von ca. 0,7 N. Für die verwendete Aluminiumlegierung sind im Handbuch der Gewindetechnik und Frästechnik keine Werte angegeben [Emu04]. Da es sich um einen hochfesten Werkstoff mit einer 0,2 %-Dehngrenze von ca. 500 MPa handelt, wird mit Stahlwerten der entsprechenden Festigkeit gerechnet. Die Schnittkraft reduziert sich bei Aluminium auf 0,5 N. Für die Abdrängung und damit die Kantenungenauigkeit ist nur der Anteil der Schnittkraft verantwortlich, der senkrecht zur Fräserachse steht. Nach J. Schwab lässt sich die Schnittnormalkraft F_{CN} mit 30 % der Schnittkraft abschätzen [Schwa94]. Demnach ergeben sich in Stahl Schnittnormalkräfte von ca. 0,21 N und in Aluminium von 0,15 N.

In Frästests wurden im Rahmen dieser Arbeit Abdrängungen an gefrästen Taschen bestimmt. Dazu wurden mit einem 0,2-mm-Fräser der gleichen Geometrie, wie sie für die FEM-Rechnungen verwendet wurde, Frästests mit verschiedenen Vorschüben, Drehzahlen und Zustellungen in Aluminium und Stahl durchgeführt. Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Abdrängung und den veränderten Parametern gefunden werden. Diese Ergebnisse sind analog zu denen

der Steilheit der Seitenwände. Einzig eine Werkstoffabhängigkeit kann festgestellt werden. In Stahl lag die Abdrängung bei ca. $1,5\ \mu\text{m}$ in Aluminium bei ca. $1\ \mu\text{m}$ bei einer Taschentiefe von $100\ \mu\text{m}$.

Vergleicht man die theoretisch abgeschätzten Abdrängungen mit den real gemessenen, stellt man eine gute Übereinstimmung fest. Bei Stahl beträgt die rechnerische Abdrängung $1,7\ \mu\text{m}$, die experimentell ermittelte ca. $1,5\ \mu\text{m}$. Bei Aluminium werden rechnerisch $1,2\ \mu\text{m}$ Abdrängung erreicht, gemessen wurden ca. $1,0\ \mu\text{m}$. In dem dargestellten Beispiel korrelieren die rechnerischen und realen Ergebnisse sehr gut. Bei anderen Randbedingungen kommen zum Teil deutlich schlechtere Übereinstimmungen zu Stande. Gründe hierfür sind in den speziellen Gegebenheiten des Mikrofräsens zu suchen. Beispielsweise ist der Schneidenradius bei VHM-Werkzeugen im Vergleich zum abgenommenen Span deutlich größer als beim konventionellen Fräsen. Daraus resultieren veränderte Schnittkräfte und Abdrängungen.

Erreichbare Genauigkeit in z-Richtung beim Ultra-Präzisionsfräsen

Die axiale Steifigkeit des Fräsers und der Maschine sind im Vergleich zu der Steifigkeit in x-y-Richtung sehr groß. Abweichungen in der z-Richtung ergeben sich in erster Linie durch die thermische Ausdehnung der Frässpindel in z-Richtung. Darüber hinaus entstehen bei der Nullpunktbestimmung des Fräsers am Werkstück Ungenauigkeiten.

Die verwendete Frässpindel (Firma Precise Präzisionsspindeln GmbH, ASC 180) dehnt sich in Abhängigkeit der Drehzahl in z-Richtung aus. Zur Erreichung des thermischen Gleichgewichts muss die Spindel erfahrungsgemäß ca. 45 min warm laufen. Langzeitmessungen über 4 Stunden haben gezeigt, dass die Spindel sich in diesem Zeitraum um ca. $3\ \mu\text{m}$ ausdehnt oder zusammenzieht. In diesem Größenbereich liegen auch die an den Formeinsätzen nachgemessenen Ungenauigkeiten. Mit einer Temperaturkompensation werden die thermischen Ausdehnungen ausgeglichen. Ein solches System ist geplant, stand aber zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

Die verwendete Ultra-Präzisionsfräsmaschine verfügt nicht über ein Werkzeugvermessungssystem. Derartige Systeme, die mit einer Reproduzierbarkeit von weniger als $1\ \mu\text{m}$ arbeiten, stehen noch nicht zur Verfügung. Jeder Fräser muss daher von Hand in seinem Nullpunkt justiert werden. Dazu wird der rotierende Fräser auf die Werkstückoberfläche gefahren und genullt. Dieser Vorgang ist einem Fehler von ca. $1\ \mu\text{m}$ unterworfen.

Beide Fehler, thermische Spindelausdehnung und Justage, addieren sich im Ergebnis. Deutlich sichtbar werden die Ungenauigkeiten bei Geometrieebenen, die mit 2 verschiedenen Fräsern bearbeitet werden. Abbildung 8.5 zeigt ein solches Beispiel. In der REM-Aufnahme ist deutlich die Stufe, die sich durch 2 verschiedene Fräser ergibt, zu erkennen. Problematisch sind derartige Ungenauigkeiten, wenn sie in der Fügeebene auftreten. Diese Stufen verhindern ein spaltloses Fügen. Das Fügeverfahren muss daher gegenüber diesen Fertigungsungenauigkeiten tolerant sein (siehe auch Kapitel 8.6 und 8.7).

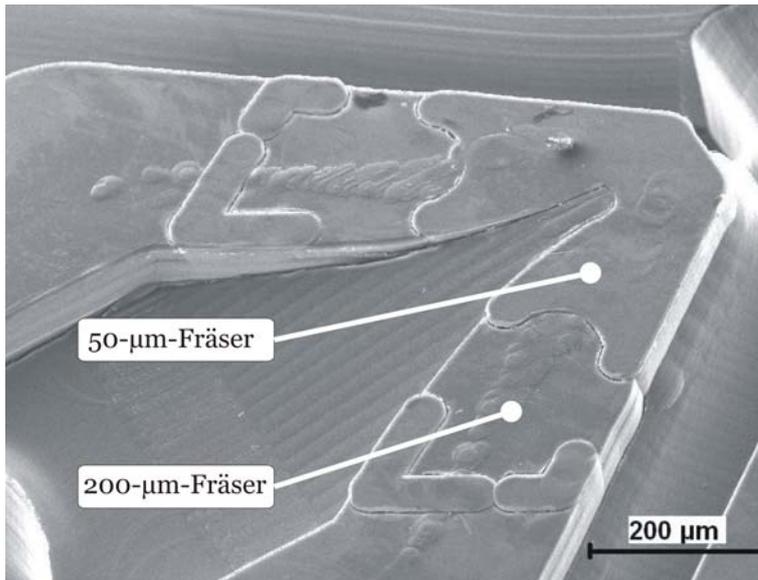


Abbildung 8.5: REM-Aufnahme eines Analysechips Version 6

8.3 Heißprägen der Analysechips

Die Analysechips zum Aufbau der Labormuster wurden am AZM der Bessy GmbH mit einer Heißpräganlage der Firma Jenoptik Mikrotechnik GmbH (HEX03) hergestellt. Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über diesen Fertigungsschritt. Anhand der aufgetretenen Fehler werden der Heißprägezyklus und die optimalen Heißprägeparameter diskutiert.

Gleichmäßige Dicke der Analysechips

Die angestrebte Dicke der Analysechips beträgt 1,5 mm mit maximalen Abweichungen von $\pm 20 \mu\text{m}$. Größere Toleranzen erschweren eine reproduzierbare Montage. Um die geforderte Toleranz von $\pm 20 \mu\text{m}$ einhalten zu können, wird ein „Weg gesteuerter“ Heißprägeprozess gefahren.

Abreißen von Strukturen

Beim Entformen der Kunststoffplatten besteht die Gefahr, dass die abgeprägte Struktur teilweise abreißt und im Heißprägestempel verbleibt. Hierfür sind drei Gründe zu nennen. Die Adhäsionskräfte zwischen Kunststoff und Stempel sind zu groß. Durch Beschichtungen des Werkzeugs (DLC, Gold) könnten diese Kräfte reduziert werden. Der Kunststoff besitzt keine ausreichende Festigkeit, um die auftretenden Entformungskräfte aufzunehmen. Die gefährdeten Bereiche liegen in den Kanalstrukturen der hydrodynamischen Fokussierung und den Zentrierbolzen. Bei ersten aufgebauten Labormustern (Version 1 bis 5) wurde Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet. Es zeigte sich, dass die Entformung von Polycarbonatplatten wesentlich einfacher gelingt. Aus diesem Grund wurde ab Version 6 Polycarbonat (PC) als das Material verwendet.

Beschädigung des Prägestempels

Bei hohen Aspektverhältnissen im Stempel können nicht nur die heißgeprägten Platten beim Entformen reißen, es kann auch zu einer Beschädigung des Prägestempels kommen. Diese Gefahr erhöht sich mit abnehmender Festigkeit des verwendeten Werkzeugmaterials. Bei den anfänglich verwendeten Messingstempeln traten bei unvorsichtiger Entformung Beschädigungen im Bereich der Fluidikanschlüsse auf.

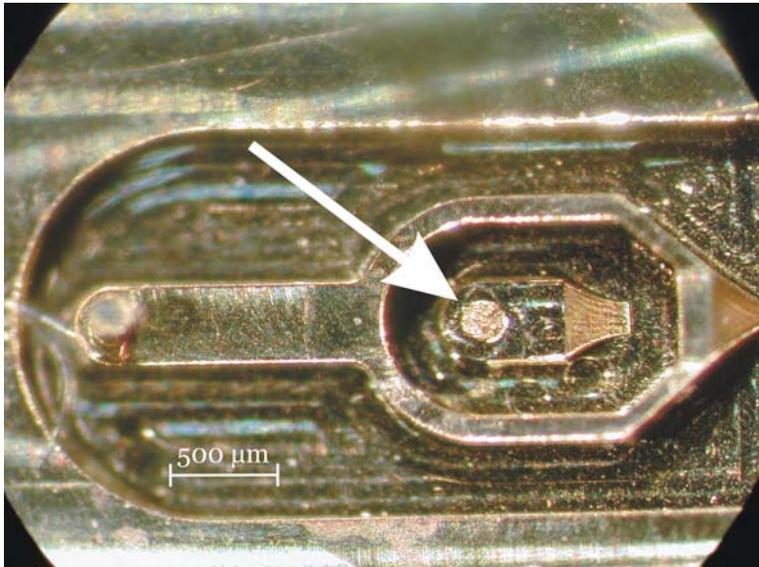


Abbildung 8.6: Beschädigtes Messing-Werkzeug (Version 4)

Schrumpfung und Verzüge beim Heißprägen

In Version 4 und 6 wurden laterale Verzüge zwischen Deckel und Boden festgestellt. Deckel und Boden wichen in ihrer Struktur um bis zu 20 µm voneinander ab (siehe Abbildung 8.8).

Die gesamte Schrumpfung liegt im Bereich von 1 %. Dieser Wert ist für die Verzüge zwischen Deckel nicht relevant, sondern nur für die absolute Größe der Elemente auf dem Analysechip. Relevant für den Verzug zwischen Deckel und Boden ist der Verzug der Struktur gegenüber den Zentrierbolzen in den Einzelkomponenten. An einer ausreichenden Anzahl von Einzelkomponenten (Böden und Deckel) wurden die Verzüge der einzelnen Formnester nachgemessen. Dazu wurde der Nullpunkt an den Zentrierbolzen ausgerichtet und in die Mitte der Analysechips gelegt. Anschließend wurden die Abweichungen der Messstelle gegenüber dem Sollwert in Betrag und Richtung gemessen. Der Betrag lag im Mittel bei 7 µm. Die Verzugsrichtung ist in allen vier Formnestern gleich. Sie ist unabhängig von der Lage des Formnestes und der untersuchten Platte.

Sind die Formnester wie bei dem Formeinsatz der Version 6 angeordnet, addieren sich die Verzüge von Deckel und Boden bei der Montage (siehe Abbildung 8.7). Die Addition gilt zumindest in der gezeigten horizontalen Richtung. Die Formnester im Formeinsatz der Version 8 sind so angeordnet, dass die Verzüge von Deckel und Boden sich bei der Montage subtrahieren. Dies kann durch eine Drehung einer Formnestes um 90° erreicht werden.

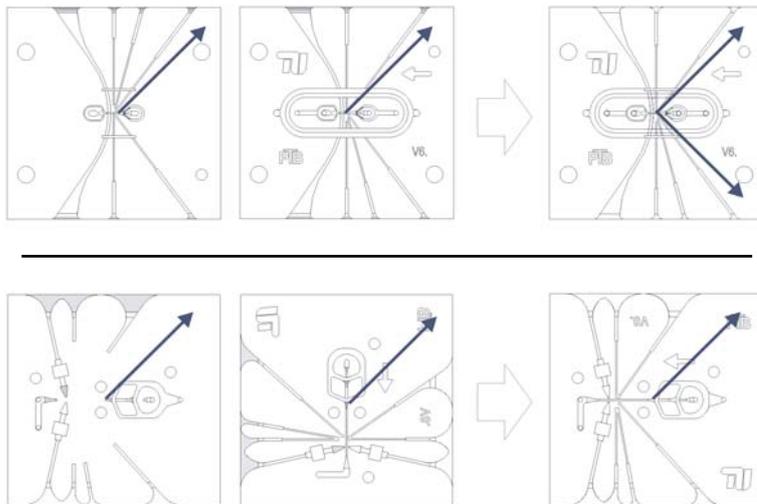


Abbildung 8.7: Anordnung der Formnester in Version 6 (obere Reihe) und Version 8 (untere Reihe)

Zusätzlich zu dieser Maßnahme wurden die Zentrierbolzen näher an die Messstelle gesetzt. Dadurch verringern sich der für die Schrumpfung relevante Abstand und somit auch der Absolutbetrag der Verzüge. Das Ergebnis der Verbesserung zwischen Version 6 und Version 8 ist in Abbildung 8.8 zu sehen.



Abbildung 8.8: Mikroskopaufnahmen von Analysechips der Version 6 (links) und Version 8 (rechts)

8.4 Vereinzeln der Kunststoffchips

Die Analysechips auf den heißgeprägten Kunststoffplatten müssen vor dem Aufbau der fertigen Labormuster vereinzelt werden. Ferner müssen die Bohrungen für die Fluidikanschlüsse rückseitig gefräst werden. Beide Bearbeitungsschritte können in einem Fräsvorgang durchgeführt werden. Die Kunststoffplatten werden dazu mit der geprägten Seite nach unten auf einem speziellen Vakuumchuck gespannt, der eine reproduzierbare Aufnahme ermöglicht und die Strukturen nicht beschädigt (siehe Abbildung 8.9).

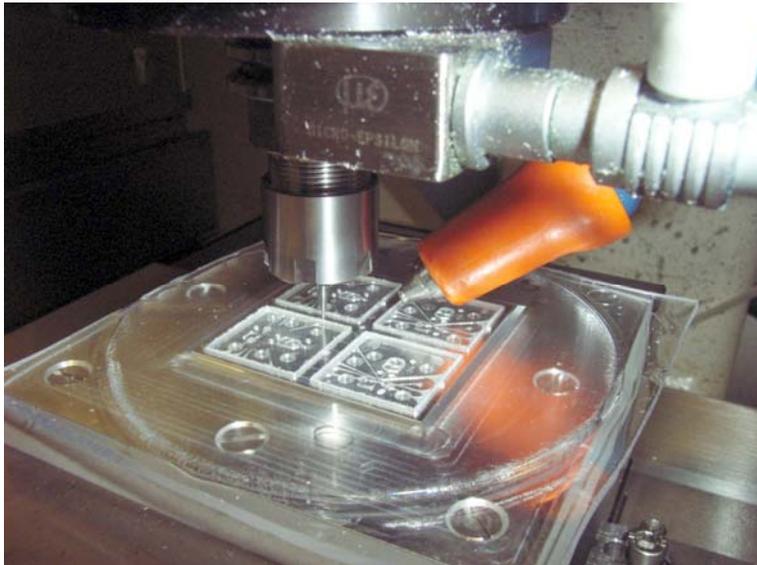


Abbildung 8.9: Vereinzelung der Analysechips

8.5 Montage der Lichtwellenleiter und Elektroden

Bevor die Analysechips mit Lichtwellenleitern und Elektroden bestückt werden, wird im Falle des Laserdurchstrahlschweißens der Absorberfarbstoff aufgetragen (siehe dazu Kapitel 8.7, Seite 136). Im Falle des Kapillarklebeverfahrens wird zur Erhöhung der Klebefestigkeit eine O_2 -Plasmabehandlung der Analysechips durchgeführt.

In Version 8 werden 5 Glasfasern montiert. Die Glasfasern werden vor dem Einlegen mit einem Faserschneidegerät geschnitten, um eine saubere Stirnfläche der Faser zur optimalen Lichtein- und Lichtauskopplung zu erzielen. Die Fasern werden nacheinander in die dafür vorgesehenen Nuten im Boden des Analysechips montiert. Durch die in der Nut integrierten Noppen werden sie dort ohne weitere Maßnahmen bis zur fertigen Montage gehalten (siehe Abbildung 8.10).

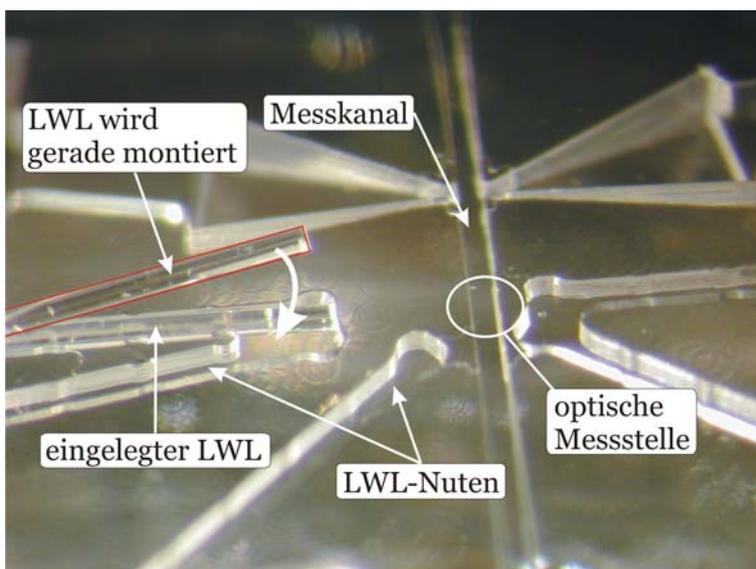


Abbildung 8.10: Montage der Lichtwellenleiter (LWL)

Nach dem Einlegen der Wellenleiter und Elektroden wird der Deckel über die Zentrierbolzen positioniert und mit Prätzen fixiert. Die so vorbereiteten Labormuster werden anschließend verklebt oder verschweißt.

8.6 Fügen der Analysechips mit dem Kapillarklebeverfahren

Mit dem Kapillarklebeverfahren wurde in Version 4 und Version 6 gearbeitet. Beide Versionen sind mit einem ovalen Klebekanal ausgestattet. Dieser zieht sich rings um die Fluidikstruktur und ist an den Enden mit zwei Bohrungen nach außen offen. Eine Bohrung wird zum Befüllen des Klebstoffs verwendet, die andere dient als Entlüftungsbohrung (siehe Abbildung 8.11).

Durch die Bohrungen nach außen kann der Klebstoff im bereits montierten und fixierten Zustand in den Klebekanal eingebracht werden. Je nach Viskosität des Klebers geschieht dies durch Kapillarkräfte oder von außen aufgebrachtem Druck. Der Klebstoff läuft entlang des Klebekanals, umfließt die montierten Wellenleiter und Elektroden und dichtet sie nach außen.

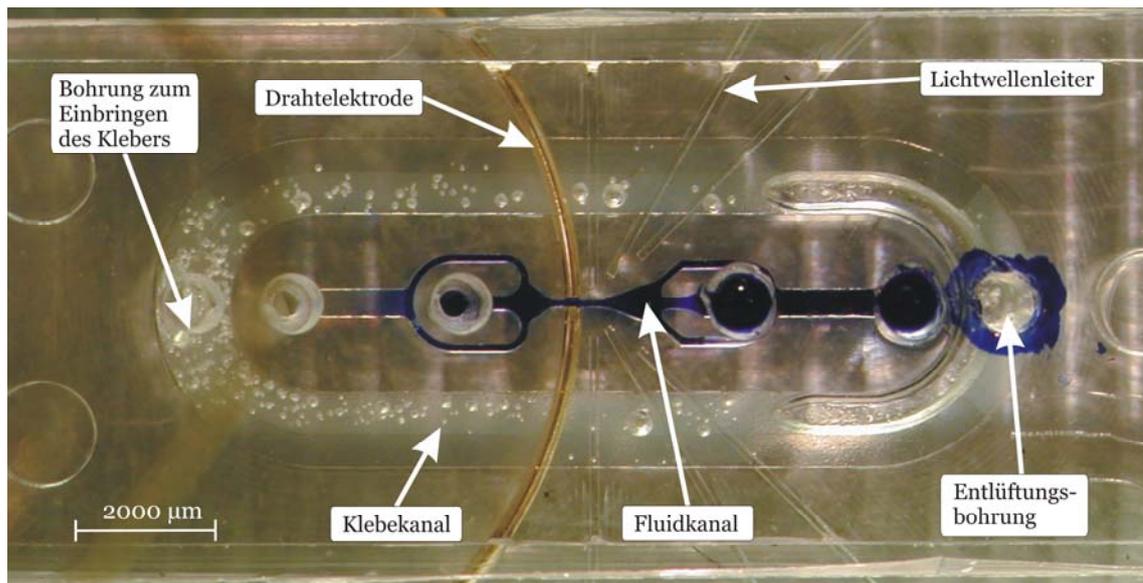


Abbildung 8.11: Mikroskopaufnahme eines mit dem Kapillarklebeverfahren gefertigten Analysechips Version 4

Der Klebstoff fließt unterstützt durch die Kapillarkräfte vom Klebekanal in die Fügeebene. An den Kanalstrukturen öffnet sich der Spalt. In Abhängigkeit der geometrischen Verhältnisse, der Viskosität des Klebstoffs und der Oberflächenspannungen stoppt der Kleber an dieser Stelle oder er fließt unbeabsichtigt in die Kanalstrukturen. Dieses Problem wurde auch von M. Münch bereits festgestellt [Münch03]. Hinzu kommt, dass verschiedene Spaltmaße zwischen Deckel und Boden die Fügeebene sich nicht gleichmäßig füllt (siehe Abbildung 8.12).

Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass die Inselstrukturen im Bereich der hydrodynamischen Fokussierung mit diesem Verfahren nicht verklebt werden. Diese Bereiche

werden auf Grund des unterbrochenen Fügspalts nicht vom Klebstoff erreicht. Die Folge ist, dass der Fügspalt in diesem Bereich offen bleibt und es durch den Fügspalt zu einem Kurzschluss im fluidischen System kommt (siehe Abbildung 4.12).

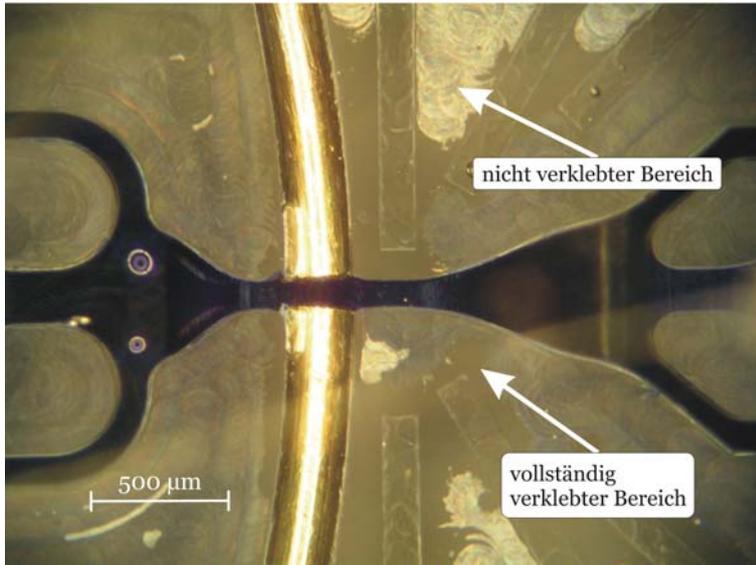


Abbildung 8.12: Mit dem Kapillarklebeverfahren gefertigtes Durchflusszytometer der Version 4

8.7 Fügen der Analysechips mit dem Laserdurchstrahlschweißen

Zur Durchführung der Laserdurchstrahlschweißversuche wurde der Absorber Clearweld (Fa. Gentex Corporation) verwendet. Die absorbierte Energie und damit die Güte der Schweißverbindung hängen von der Menge des aufgetragenen Absorbers und der eingestrahnten Laserleistung ab. Daher ist ein gleichmäßiger Absorberauftrag für ein gutes Ergebnis mitverantwortlich. Gleichzeitig kann durch verstärkten Absorberauftrag eine stärkere Schweißverbindung erreicht werden [Spro3].

In den äußeren Bereichen der Analysechips wird die gewünschte Festigkeit der Schweißverbindung und eine Dichtigkeit der Fluidikstrukturen über einen stärkeren Absorberauftrag erreicht. Um den notwendigen Fügedruck aufzubringen, werden die beiden Fügepartner mit Hilfe einer 6 mm dicken Glasplatte verspannt (siehe Abbildung 8.13).

Die Schwierigkeit bei diesem Verfahren besteht in einer gleichmäßigen und reproduzierbaren Aufbringung des Absorberauftrags. Im Zuge einer geplanten Automatisierung wurden erste Versuche durchgeführt, der Absorber durch Aufstempeln auf die Fügepartner aufgetragen. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit waren diese Versuche jedoch nicht abgeschlossen.

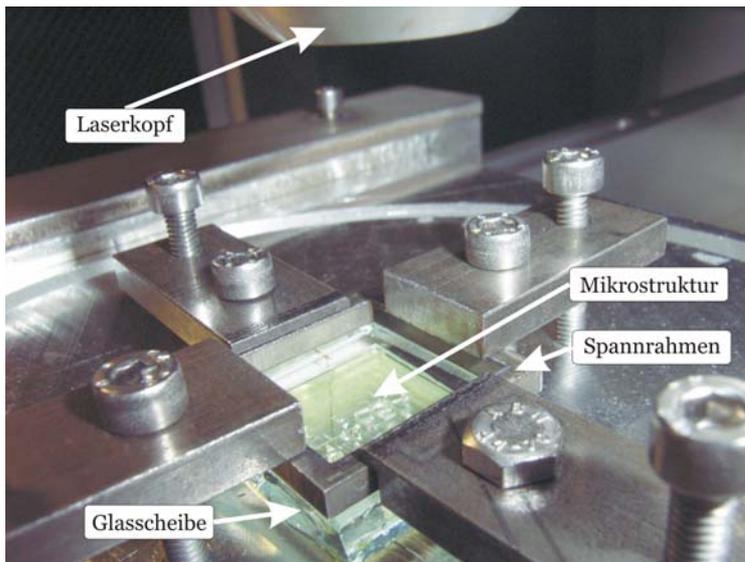


Abbildung 8.13: Fertig montierte Analysechips beim Laserdurchstrahlenschweißen

Die Laserparameter (Laserenergie, Impulsdauer, Impulsfrequenz, Durchmesser des Laserstrahls und Vorschubgeschwindigkeit) müssen auf die aufgebrauchte Absorbermenge und die gewünschte Schweißstärke angepasst werden. In den Innenbereichen rund um die Fluidikstruktur dürfen die Mikrokanäle durch das Schweißen nicht deformiert werden. Neben einem geringeren Absorberauftrag wird hier die Laserleistung reduziert. Außen müssen die Lichtwellenleiter und Elektroden abgedichtet werden. Die rechteckig ausgeführten Nuten für die montierten Elemente müssen so weit aufgeschmolzen werden, dass sie um die runden Lichtwellenleiter und Drahtelektroden fließen und abdichten.

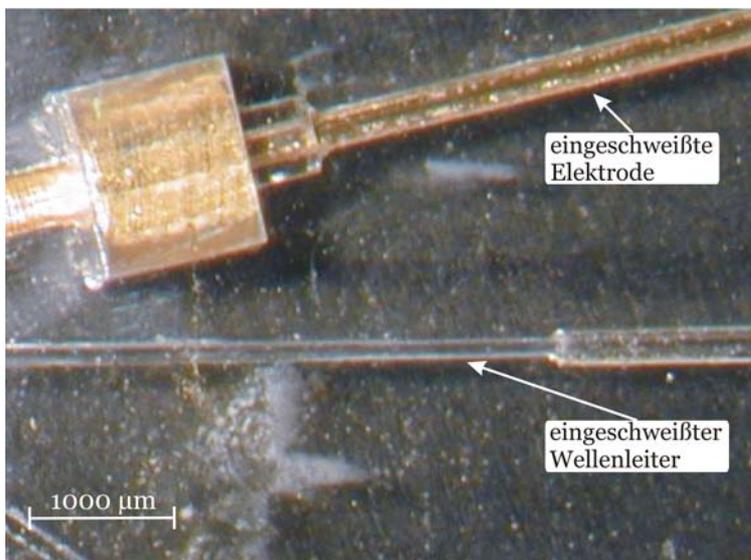


Abbildung 8.14: Mikroskopaufnahme eines eingeschweißten Lichtwellenleiters und einer Nadelelektrode

Ist die eingebrachte Laserleistung zu gering, schweißen die beiden Teile nicht vollständig zusammen. Dies macht sich in einer Undichtigkeit im Bereich der Lichtwellenleiter und Drähte bemerkbar. Bei einer zu hohen Laserleistung besteht die Gefahr der Deformation der inneren Kanalstrukturen. Im äußeren Bereich kann es bei zu hoher Laserleistung zu einem Verbrennen des Kunststoffes kommen.

Das Laserdurchstrahlenschweißen hat sich für den Aufbau der Labormuster bewährt. Mit diesem Verfahren wurden bisher die besten Ergebnisse im Bezug auf das Fügen der Analysechips erreicht.

Abbildung 8.15 zeigt einen mit fünf Lichtwellenleitern und zwei Nadelelektroden bestückten Analysechip.

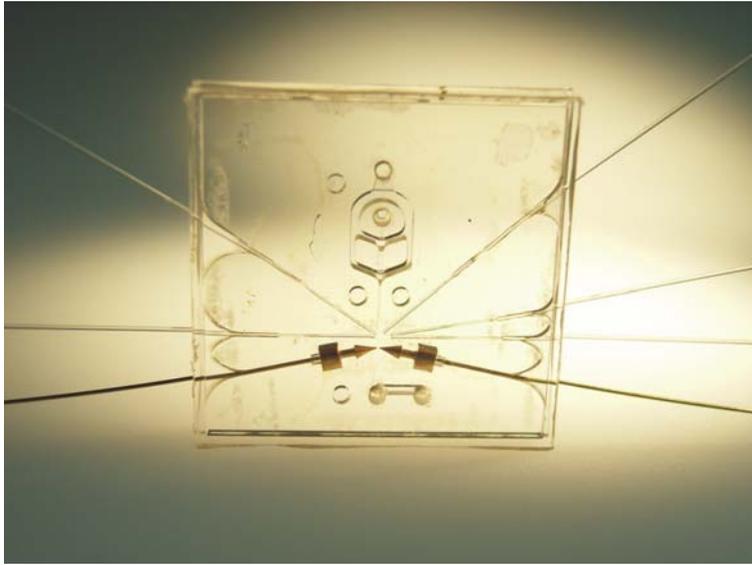


Abbildung 8.15: Mikrostrukturiertes Durchflusszytometer (Version 8)

9 Nachweis der Funktionsfähigkeit der Analysechips

9.1 Mikroskopischer Messplatz zur Untersuchung der Analysechips

Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der Analysechips wurde in der PTB ein Versuchsaufbau erstellt [Bra06], [Yilo6]. An diesem Versuchsaufbau wurde der überwiegende Teil der experimentellen Untersuchungen durchgeführt. Einen schematischen Überblick der Messanordnung zeigt Abbildung 9.1.

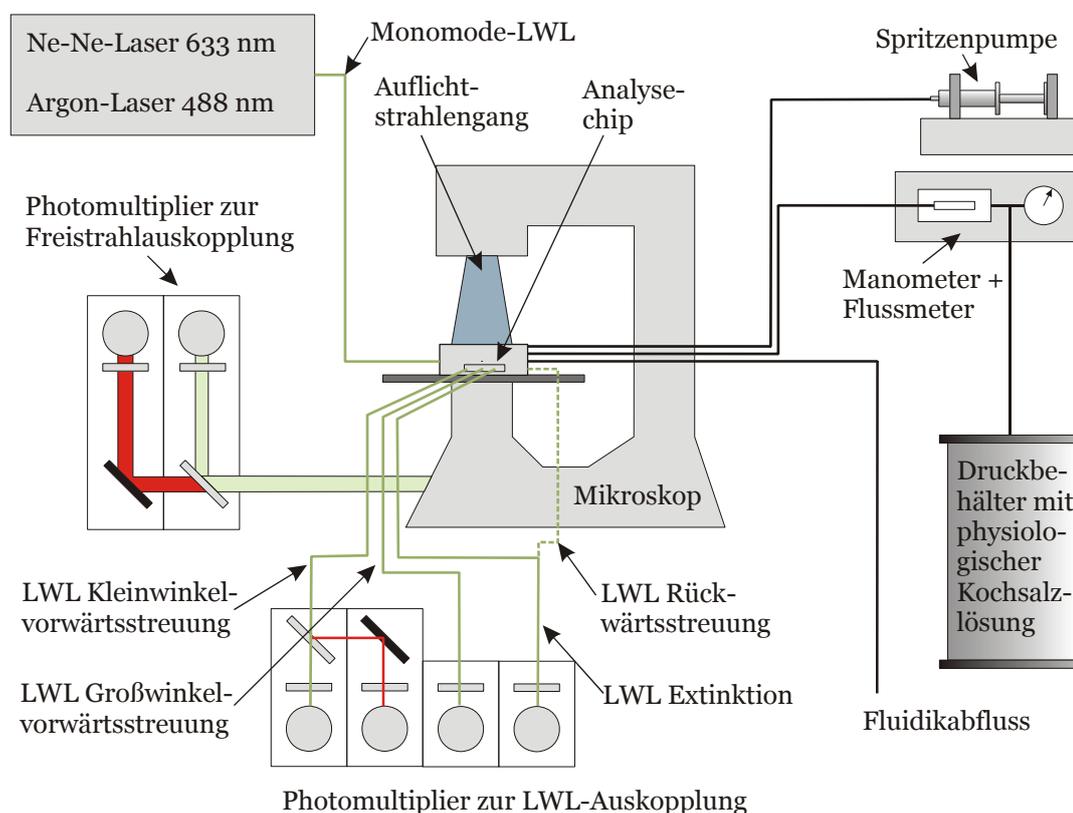


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur optischen Messung [PTB]

Die optischen Strahlengänge, die Fluidikversorgung für die Analysechips und die mechanische Komponenten wurden an ein inverses Lichtmikroskop der Firma Carl Zeiss AG (Axiovert 200M) adaptiert. Dieser Aufbau bietet eine hohe Flexibilität. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgt nicht nur mit den in die Analysechips eingelegten Lichtwellenleitern, sondern die anregende Laserstrahlung kann alternativ in den mikroskopischen Auflichtstrahlengang eingekoppelt werden. Die Strömungsverhältnisse im Analysechip werden von unten mit Hilfe einer CCD-Kamera beobachtet. Dabei werden

neben Fluoreszenzaufnahmen auch Hellfeldaufnahmen ausgewertet. Die fluidischen, optischen und elektrischen Anschlüsse sind nach oben geführt (siehe Abbildung 9.2).

Der Hüllstrom wird durch einen einstellbaren Druck getrieben. Der Hüllvolumenstrom wird mit einem Flussmeter der Firma Sensirion AG gemessen. Der Probenstrom wird durch eine Spritzenpumpe der Firma TSE Systems GmbH injiziert. Damit können die Volumendurchsätze des Hüll- und des Probenstroms quantifiziert werden, so dass ein Vergleich mit den FEM-Rechnungen möglich ist.

Für die durchflusszytometrischen Messungen stehen zwei Laser zur Verfügung. Der erste Laser ist ein amplituden- und frequenzstabilisierter Helium-Neon-Laser der Firma Laboratory for Science (Ultra Stable Laser Model 210) mit einer Wellenlänge von 632,8 nm und einer Leistung von 4 mW. Die zweite Lichtquelle ist ein Argonionen-Laser der Firma Coherent (Wellenlänge 488 nm, Leistung 1 W). Dieser Argonlaser kann sowohl über die montierten Lichtwellenleiter der Analysechips als auch über den Auflichtstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt werden. Der HeNe-Laser kann mit dem Argon-Laser gleichzeitig in die Lichtwellenleiter eingekoppelt werden.

Die Streulichtsignale können entweder per Freistrahl über das Mikroskopobjektiv oder über die montierten Lichtwellenleiter (siehe Abbildung 9.1) gemessen werden. Vor allen Detektoren (Photomultiplier, Firma Hamamatsu Photonics) sind austauschbare Filter zur Wellenlängenselektion montiert. Die Fluoreszenzsignale werden mit der Freistrahlanordnung, d.h. der beim Auflichtstrahlengang des Mikroskops vorgesehen seitlichen Auskopplung, aufgenommen.

Die Ausgangssignale der Photomultiplier werden durch einen rauscharmen Strom-Spannungswandler (SR 570, Stanford Research Systems) mit einstellbarer Verstärkungsbandbreite verstärkt. Der Gleichspannungsanteil der Extinktionssignale sowie die vom Streulichtuntergrund verursachten Signale lassen sich mit der Hochpassfunktion unterdrücken. Anschließend werden die Signale zur Anpassung an den nachfolgenden Vielkanal-Impulshöhenanalysator durch einen von der PTB gebauten Hauptverstärker bis auf maximal 10 V verstärkt. Das Datenerfassungssystem eines Hochgeschwindigkeitszellsortierers der Firma Cytomation Inc. (Moflo) erlaubt die korrelierte Erfassung der Impulshöhen von bis zu zwölf Eingangssignalen.

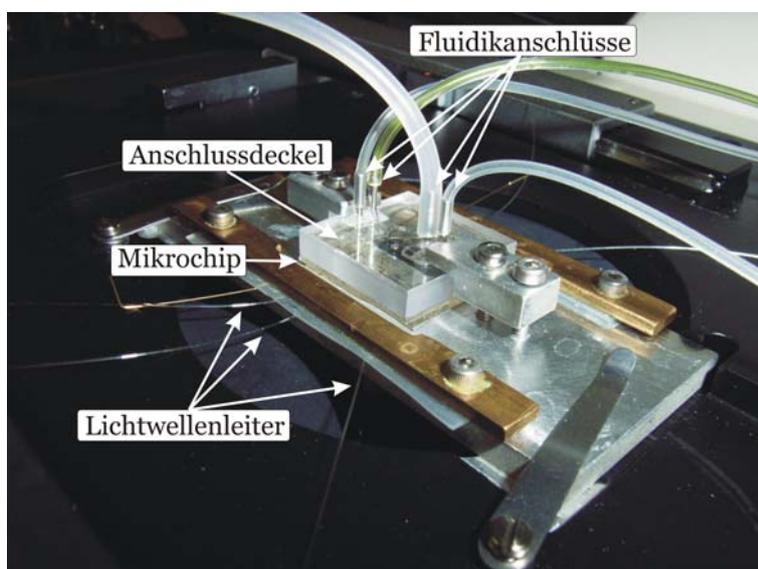


Abbildung 9.2: Montiertes Durchflusszytometer auf dem Mikroskoptisch

Zur Aufnahme der Analysechips auf dem Lichtmikroskop wurde eine Mikroskophalterung konstruiert. Sie soll zum einen eine sichere Aufnahme der Chips gewährleisten zum anderen einen raschen Austausch der Analysechips ermöglichen. Aus diesem Grund wurde ein Anschlussdeckel für die fluidischen Anschlüsse konstruiert (siehe Abbildung 9.3). Die Schläuche bleiben dabei immer mit dem Anschlussdeckel verbunden. Der Anschlussdeckel wird auf dem Analysechip mit eigens angefertigten Dichtringen (Außendurchmesser 2 mm, Innendurchmesser 0,9 mm) aus Silikon abgedichtet.

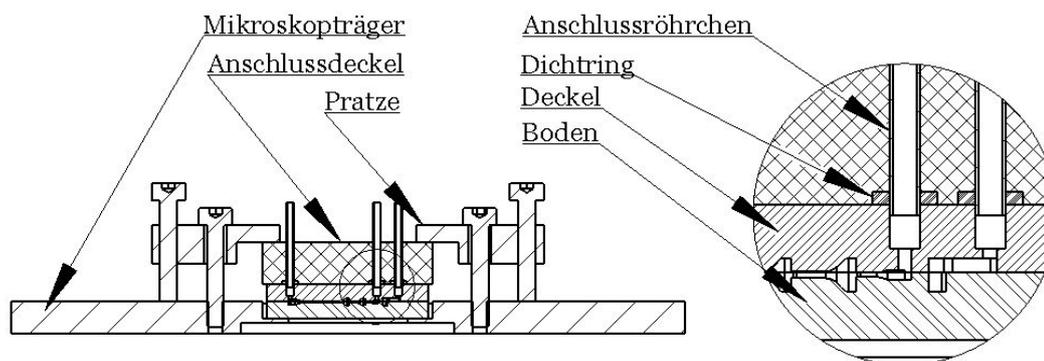


Abbildung 9.3: Schnittdarstellung des Mikroskopträgers

Bei den experimentellen Untersuchungen stand die Frage der Funktionsfähigkeit der Analysechips im Vordergrund. Der beschriebene Versuchsaufbau erfüllt die Anforderungen, um die hydrodynamische Fokussierung anhand von Fluoreszenzaufnahmen zu messen. Das Signal-Rausch-Verhältnis als weiteres Merkmal für die Funktionsfähigkeit der Analysechips wurde durch die Messung der Impulshöhen monodisperser Polystyrolkugeln verschiedener Durchmesser überprüft.

9.2 Kleinwinkelvorderstreuung von 7- μ m-Polystyrolkugeln

Abbildung 9.4 zeigt die Ergebnisse der ersten korrelierten Messung der Kleinwinkelvorderstreuung bei 633 nm und bei 488 nm mit einem Analysechip Version 8. Als Probe wurde eine Suspension mit 7- μ m-Polystyrolkugeln verwendet. In den Streudiagrammen ist die Häufigkeit der beobachteten Ereignisse durch Falschfarben charakterisiert. Dunkelblaue Punkte im Diagramm entsprechen jeweils einem einzelnen Teilchen. Die Position in der Darstellung charakterisiert die Pulshöhe der beiden Messgrößen. Die Pulshöhen der Signale sind in Volt in logarithmischer Skalierung angegeben. Der Schwerpunkt der Punktwolke, die den 7- μ m-Partikeln entspricht, liegt bei den Koordinaten von etwa (0,35 V / 0,2 V). Die bei kleineren Werten der Vorwärtstreuung registrierten Signale (30 mV / 20 mV) entsprechen dem Rauschen der Messanordnung. Die bei höheren Pulshöhen (3 V / 1 V) registrierten Ereignisse werden durch Agglomerate aus zwei oder mehreren Kugeln hervorgerufen. Die Variationskoeffizienten betragen bei dieser Messung 19 % bei der Wellenlänge $\lambda = 633$ nm und 22 % bei der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm.

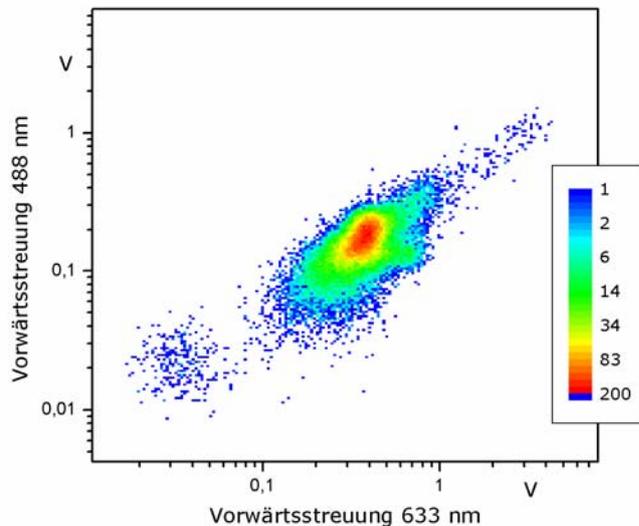


Abbildung 9.4: Korrelierte Messung der Vorwärtsstreuung bei 633 nm und der Vorwärtsstreuung 488 nm an Polystyrolkugeln \varnothing 7 μ m mit Version 8 [PTB, Yi106].

Hüllvolumenstrom: 16 μ l/s
 Probenvolumenstrom: 0,23 μ l/s
 Zählrate: 500 Hz

9.3 Durchflusszytometrische Messung an humanem Blut

In den folgenden Abschnitten werden Messungen an stabilisierten Kontrollbluten und an frischen Blutproben diskutiert. Das Kontrollblut wird von INSTAND (Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium e.V.) und der DGKL (Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin) bei Ringversuchen zur externen Qualitätskontrolle hämatologischer Laboratorien eingesetzt. In der PTB werden die Referenzwerte für die Messgrößen des Kleinen Blutbildes bestimmt. Das Kontrollblut ist durch die Stabilisierung etwa 1 bis 2 Monate haltbar. Durch die Stabilisierung ändern sich jedoch die Volumina der Erythrozyten und ihre Flexibilität wird drastisch reduziert. Um frische Blutproben untersuchen zu können, wurde Blut aus der Vene eines Probanden entnommen. Um die Gerinnung des frischen Blutes zu vermeiden, wird dabei das Blut mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt. Um die frischen Proben länger verwenden zu können, wird der Blutprobe als Stabilisierungsreagenz Cyto Chex (Streck Laboratories, La Vista, NE, USA) im Verhältnis von 1:1 hinzugefügt. Die Blutprobe ist nach der Stabilisierung mindestens sieben Tage haltbar und kann in dieser Zeit für quantitative Untersuchungen verwendet werden.

Ziel der Messungen war die objektive Beurteilung der einzelnen Versionen der Analysechips. Die Differenzierung von Erythrozyten und Thrombozyten wird mit einem Analysechips Version 8 demonstriert. Zum Vergleich wurden die gleichen Proben mit einem als Referenzgerät in PTB aufgebauten konventionellen Laser-Durchflusszytometer gemessen.

Vor Beginn der Untersuchungen müssen die Blutproben mit einer isotonischen Kochsalzlösung verdünnt werden, damit die Zählrate im Messbereich des jeweiligen Durchflusszytometers liegt. Die Messungen der Streulichtverteilungen werden im Analysechip mit Laserlicht der Wellenlängen 488 nm und 633 nm durchgeführt. In dem konventionellen Laser-Durchflusszytometer wurden Laser mit den Wellenlängen 413 nm und 633 nm eingesetzt. Die Pulshöhen des Streulichtes werden vor der Analog-digital-

Wandlung logarithmisch verstärkt, um einen genügend großen Dynamikbereich zur gleichzeitigen Detektion von Erythrozyten und Thrombozyten zu erhalten. Die Amplitudenauflösung der beiden verwendeten Impulshöhenanalysatoren beträgt 12 bit entsprechend 4096 Kanälen. In den graphischen Darstellungen wurden jeweils 16 ADC-Kanäle zusammengefasst, so dass 256 Kanäle den gemessenen Impulshöhenbereich repräsentieren. Die Zuordnung zwischen der Eingangsspannung und dem Kanal des AD-Wandlers ist bei den mikrostrukturierten Durchflusszytometern bekannt, so dass in den Diagrammen die Spannung der Impulshöhen vor der logarithmischen Verstärkung auf den Achsen angegeben wird.

Erste durchflusszytometrische Messungen an Kontrollblut

In Abbildung 9.5 sind die Ergebnisse der korrelierten Messung der Vorwärtsstreuung bei den Wellenlängen 488 nm und 633 nm für Kontrollblut gezeigt. Die Blutprobe wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:105 verdünnt. Der Hüllvolumenstrom wurde auf 16,1 $\mu\text{l/s}$ eingestellt, der Probenvolumenstrom betrug 0,16 $\mu\text{l/s}$. Die drei Punktwolken im Streudiagramm werden durch die Erythrozyten, die Thrombozyten sowie durch vom Rauschen verursachte Signalimpulse hervorgerufen. Für die Datenauswertung wurden die Ereignisse der beiden Zellentypen von den restlichen Ereignissen abgegrenzt. Zwischen den Punktwolken der Erythrozyten und Thrombozyten befindet sich ein ausgeprägtes Minimum, beide Zellarten lassen sich daher gut voneinander unterscheiden. Mit dieser Messung wurde erstmals im Rahmen der Zusammenarbeit zwischen dem Fachgebiet Mikro- und Feingeräte und der PTB die erfolgreiche Differenzierung roten Blutzellen und Blutplättchen demonstriert. Die Messung der Konzentrationen von Erythrozyten und Thrombozyten mit mikrostrukturierten Durchflusszytometern wird zukünftig systematisch vorgenommen, um insbesondere Verluste durch Adhäsion an Schläuchen und Mikrokanälen zu minimieren.

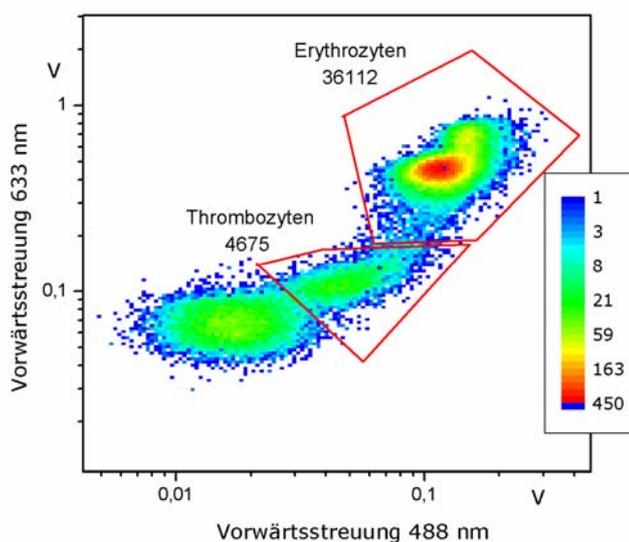


Abbildung 9.5: Korrelierte Messung der Vorwärtsstreuung einer Kontrollblutprobe bei 633 nm und 488 nm mit Version 8 [PTB, Yil06].
Hüllvolumenstrom: 16,1 $\mu\text{l/s}$
Probenvolumenstrom: 0,16 $\mu\text{l/s}$
Zählrate: 110 Hz

Die gleiche Probe wurde mit dem konventionellen Referenz-Durchflusszytometer untersucht. In dem Streudiagramm (siehe Abbildung 9.6), das die korrelierte Vorwärtsstreuung bei 413 nm und 633 nm zeigt, kann man nicht nur Erythrozyten und Thrombozyten differenzieren, sondern auch die Punktwolke der Leukozyten erkennen. Die

Wellenlänge von 413 nm liegt im Absorptionsmaximum von Hämoglobin. Durch die Absorption wird die Streulichtintensität der roten Blutzellen deutlich reduziert, so dass Leukozyten und Erythrozyten durch die Messung der Lichtstreuung unterschieden werden können [Ost98].

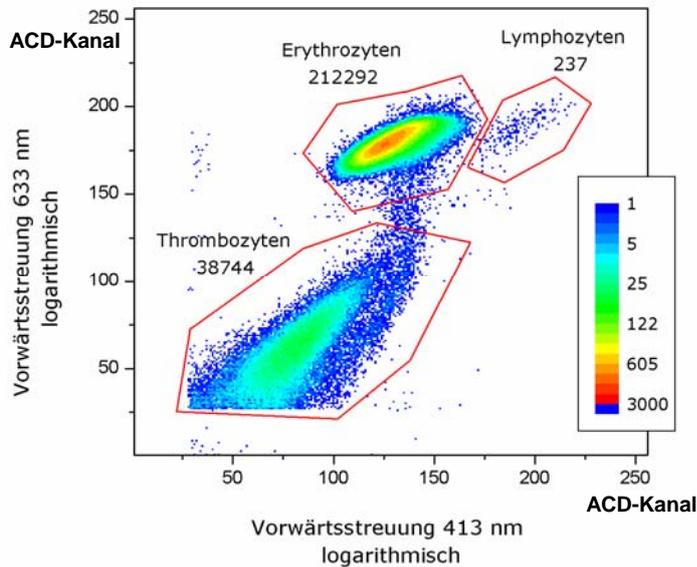


Abbildung 9.6: Korrelierte Messung der Vorwärtsstreuung einer Kontrollblutprobe bei 413 nm und der Vorwärtsstreuung 633 nm mit einem konventionellen Durchflusszytometer [PTB, Yil06].
Zählrate: 2 kHz

Erste durchflusszytometrische Messungen an Frischblut

Analoge Messungen wurden mit einer frischen Blutprobe mit Laserlicht der Wellenlängen 488 nm und 633 nm durchgeführt. In diesem Test wurde das stabilisierte Frischblut mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1:218 verdünnt. Das Ergebnis ist in Abbildung 9.7 als zweidimensionales Streudiagramm dargestellt. Die entsprechende Messung mit dem konventionellen Laser-Durchflusszytometer ist in Abbildung 9.8 gezeigt. Die Blutprobe wurde auf 1:176 verdünnt. Diese Messungen wurden analog den Untersuchungen mit den Analysechips mit Laserlicht der Wellenlängen von 488 nm und 633 nm durchgeführt. Daher haben die Signale der Leukozyten - im Gegensatz zur Messungen unter Verwendung des Lasers bei 413 nm - etwa die gleichen Intensitäten wie die der Erythrozyten. In beiden Diagrammen können die Zellpopulationen der Erythrozyten und der Thrombozyten voneinander unterschieden werden. Konzentrationsmessungen wurden nicht durchgeführt. Sie erfordern kürzere als die derzeit bestehende Verbindung bei der Probenzuführung in den Analysechip und aufwendige Messungen von Verdünnungsreihen, um Zell- und Zählverluste zu charakterisieren.

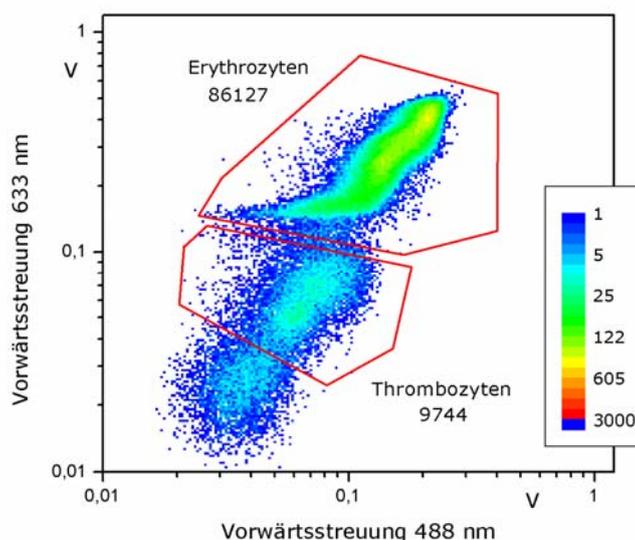


Abbildung 9.7: Korrelierte Messung der Vorwärtsstreuung bei 488 nm und der Vorwärtsstreuung 633 nm mit Version 8. Gemessen wurde mit dem stabilisierten Frischblut [PTB].
Hüllvolumenstrom: 16,6 $\mu\text{l/s}$
Probenvolumenstrom: 0,5 $\mu\text{l/s}$
Zählrate: 3,4 kHz

Im Vergleich zu dem Streudiagramm, das mit dem mikrostrukturierten Labormuster gemessen wurde, ist die Unterscheidung von Erythrozyten und Thrombozyten mit dem konventionellen Durchflusszytometer deutlicher (siehe Abbildung 9.8). Die bessere Differenzierung hängt mit der Wahl der Winkelbereiches für den Polarwinkel von ca. $3 - 17^\circ$ koaxial zur optischen Achse (d.h. für alle Azimuthwinkel $0 - 2\pi$ wird die Lichtstreuung registriert), in denen das Streulicht beobachtet wird, zusammen.

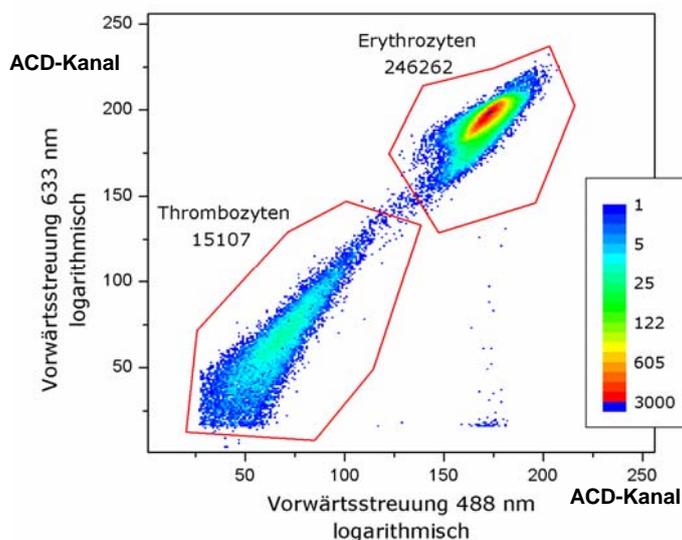


Abbildung 9.8: Korrelierte Messung der Vorwärtsstreuungen bei 488 nm und 633 nm mit einem konventionellen Durchflusszytometer. Gemessen wurde mit dem stabilisierten Frischblut [PTB].
Zählrate: 1,6 kHz

9.4 Leistungsfähigkeit der mikrostrukturierten Durchflusszytometer

Die oben beschriebenen durchflusszytometrischen Messungen wurden mit Zählraten im Kilohertzbereich aufgenommen. Die Zählrate ist mit denen konventioneller Durchflusszytometer vergleichbar.

Die Durchmesser der kleinsten mit der Extinktion beobachteten Polystyrolkugeln liegen bei ca. $2 \mu\text{m}$. Mit einem konventionellen Aufbau können ähnliche minimale

Durchmesser ($1 - 2 \mu\text{m}$) beobachtet werden [Ost98]. Mit der Kleinwinkelvorwärtsstreuung konnten humane Thrombozyten vom Rauschen der Messanordnung unterschieden werden. Mit kommerziellen Durchflusszytometern können Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ beobachtet werden. Aufgrund des höheren Brechungsindex von Polystyrol (1,6) im Vergleich der Thrombozyten (1,37) streuen die Polystyrolteilchen deutlich stärker als die Thrombozyten. Durchflusszytometrische Messungen mit $0,5\text{-}\mu\text{m}$ -Polystyrolkugeln wurden nicht durchgeführt. Auf Grund der Tatsache, dass die Thrombozyten beobachtet werden konnten, ist jedoch davon auszugehen, dass auch Polystyrolkugeln mit Durchmessern im Bereich von ca. $1 \mu\text{m}$ in der Kleinwinkelvorwärtsstreuung beobachtet werden können.

Die Variationskoeffizienten der optischen Messungen liegen im Bereich von 20 %, die der Impedanzmessung bei 4,5 %. Die Variationskoeffizienten der Analysechips reichen nicht an die Qualität der kommerziellen Geräte heran. Hier liegen typische Werte im Bereich von 0,5 – 3 %. In den Variationskoeffizienten spiegeln sich Fehler und Abweichungen des gesamten Messsystems und der verwendeten Probenkörper wider. Da die Durchmesser-Verteilung der verwendeten Probenkörper nicht bekannt ist, kann der Einfluss auf die gemessenen Variationskoeffizienten nicht abgeschätzt werden. Verbesserungen lassen sich jedoch sicher durch verschiedene Maßnahmen erreichen: ellipsoidisch geformter und in der Größe optimierter Durchmesser des Laserstrahls, Optimierung der Abstände und der Winkel der Lichtwellenleiter, Optimierung der Oberflächenqualität der Grenzflächen des optischen Systems.

10 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, das durchflusszytometrische Messprinzip in einen mikrostrukturierten Analysechip zu übertragen. Dieser Innovationsschritt ist Voraussetzung, um ein miniaturisiertes und mobiles Analysesystem, bestehend aus einem Einweg-Analysechips und einem Auslesegerät mit Lichtquellen, Detektoren und Fluidikversorgung, aufzubauen. In die Analysechips sind zwei Messprinzipien integriert worden: die optische Streulicht- und Fluoreszenzlicht-Analyse und die Messung der Impedanzänderung.

Die Konzeption der Analysechips und die gewählte Fertigungsprozesskette haben das Potenzial schnell austauschbare Einweg-Analysechips in einer Großserienfertigung herzustellen. Voraussetzung für eine qualitativ hochwertige durchflusszytometrische Messung ist eine stabile hydrodynamische Fokussierung in zwei Ebenen, die nur mit Freiformflächen erreicht wird. Die Analysechips sind aus einem 3-dimensional strukturierten Boden und Deckel aus einem klarsichtigen Kunststoff aufgebaut. Als Fertigungsprozesskette wurde das Ultra-Präzisionsfräsen als dreidimensional strukturgebendes Fertigungsverfahren gewählt. Mit dieser Technik werden Formeinsätze gefertigt, die in dem Heißprägeverfahren zur Replikation der Strukturen in thermoplastischem klarsichtigem Kunststoff (PMMA oder PC) eingesetzt werden. Als Fügeverfahren der Kunststoffkomponenten liefert das Laserdurchstrahlschweißen die besten Ergebnisse.

Es wurden verschiedene Ansätze bezüglich der hydrodynamischen Fokussierung konstruiert, simuliert, aufgebaut und getestet. Eine präzise und stabile hydrodynamische Fokussierung des Probenstroms von maximal $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ist Voraussetzung für eine optimierte Messung zur Differenzierung bestimmter Zellpopulationen. Diese Zielvorgabe konnte mit zwei unterschiedlichen Funktionsprinzipien erreicht werden: eine kaskadierte hydrodynamische Fokussierung und eine hydrodynamische Fokussierung mit einer drallförmigen Strömung.

Die Detektion optischer Signale wurde sowohl über Lichtwellenleiter als auch über Freistrahloptiken zur Lichtein- und Lichtauskopplung realisiert. Die Extinktion, die Klein- und Großwinkelvorwärtsstreuung und die 135° -Rückwärtsstreuung wurden durch montierte Lichtwellenleiter gemessen. Die Fluoreszenz und die 90° -Seitwärtsstreuung wurden über ein Mikroskopobjektiv aufgenommen. Zur seitlichen Beobachtung der hydrodynamischen Fokussierung und zur Vorbereitung auf eine Freistrahlauskopplung der Streulichtsignale wurde ein Analysechip mit integriertem 45° -Spiegel gefertigt. Unter Verwendung von monodispersen $7\text{-}\mu\text{m}$ -Polystyrolkugeln wurden die Variationskoeffizienten für die Kleinwinkelvorwärtsstreuung (22 %), die Extinktion (22 %), die Seitwärtsstreuung (24 %) und die Fluoreszenz (19 %) gemessen. Der bei diesen Messungen eingestellte Partikeldurchsatz im Kilohertzbereich entspricht den Arbeitsbedingungen konventioneller optischer Zählgeräte. Die kleinsten mit der Extinktion nachgewiesenen Polystyrolkugeln haben einen Durchmesser von $2 \mu\text{m}$.

Um das Potenzial der mikrostrukturierten Durchflusszytometer bezüglich der Kombination verschiedener Messgrößen zu demonstrieren, wurde zusätzlich zur optischen Messstelle eine Impedanzmessstelle mit einem quer zur Flussrichtung angelegtem elektrischen Feld integriert. Der Ansatz montierter Mikro-Nadelelektroden brachte nicht die erforderliche Messstabilität auf Grund der störenden Gasblasenentwicklung durch die elektrochemische Reaktion. Zur Vermeidung störender Einflüsse wurde die Oberfläche der Elektroden stark vergrößert und außerhalb der Analysechips verlagert. Mit dieser Anordnung wurden erfolgreiche Testmessungen mit Polystyrolkugeln verschiedener Durchmesser (5, 7, 10, 15 und 20 μm) mit Variationskoeffizienten von 4,5 % durchgeführt.

Zur Demonstration der Gesamtfunktion der Analysechips für die spätere Anwendung in der hämatologischen Diagnostik wurden durchflusszytometrischen Messungen an humanem Blut durchgeführt. Die korrelierten Messungen der Kleinwinkelvorwärtsstreuung mit 488 nm und 633 nm erlaubte die Unterscheidung von Thrombozyten und Erythrozyten. Außerdem konnte bei der untersuchten Normalblutprobe die Punkt Wolke der Thrombozyten vom Rauschen abgegrenzt werden.

Die aufgebauten Labormuster wurden im Verlauf dieser Arbeit kontinuierlich verbessert. Sie dienen als Ausgangspunkt für die weitere Optimierung der mikrostrukturierten Durchflusszytometer und die spätere Entwicklung von speziellen Analysechips. Beispielsweise ist eine Verbesserung der Pulshöhenauflösung bei den optischen Signalen durch die elliptische Formung des Laserstrahls oder durch die Optimierung der Oberflächenqualität der Grenzflächen des optischen Messsystems zu erwarten. Bei der Impedanzmessung kann durch eine Verkleinerung des Messraums eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht werden.

Für spezielle biologische oder medizinische Anwendungen können in die Analysechips weitere Funktionselemente integriert werden. Erste Ansätze sind am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte mit dem Aufbau eines Mikromischers, der den mikrostrukturierten Durchflusszytometern vorgeschaltet ist, verwirklicht worden. Durch die Integration des Mikromischers und Färbereagenzien könnte eine Teil der Präparation auf einen Einweg-Chip verlagert werden. Damit wird einerseits die Handhabung vereinfacht und möglicherweise die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert. Ebenso kann eine Ablenkeinheit zur Sortierung der Zellen der durchflusszytometrischen Messung nachgeschaltet werden. Damit wäre eine Anreicherung seltener Zellen für eine nachfolgende genetische Analyse, beispielsweise für die Identifikation von Tumorzellen, möglich. Ein Projekt mit diesem Ziel befindet sich am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte derzeit in Bearbeitung.

Anhang

Verzeichnis der Symbole

a	Beschleunigung (allgemein)	m/s ²
A	Querschnittsfläche (allgemein)	mm ²
A _{Elek}	Querschnittsfläche eines elektrolytischen Leiters	μm ²
A _{exp}	experimentell ermittelte Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms	μm ²
A _{phys}	theoretisch berechnete Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms	μm ²
A _{sim}	mittels FEM-Simulation berechnete Querschnittsfläche des fokussierten Probenstroms	μm ²
A _{Teilchen}	Querschnittsfläche eines Partikels	μm ²
b _{sim}	simulierte y-Ausdehnung des fokussierten Probenstroms	μm
c	Konzentration	mol/l
CV	Variationskoeffizient	
d	Abstand (allgemein)	μm
D	Durchmesser des Fluidikkanals	mm
D _{Diff}	Diffusionskoeffizient	μm ² /ms
D _{hyd}	hydraulischer Durchmesser	mm
D _{Teilchen}	Durchmesser eines Partikels	μm
F	Kraft (allgemein)	N
f _c	Prozentsatz aggregierter Zellen	%
F _{Fara}	Faraday-Konstante	96485 As mol ⁻¹
g	Erdbeschleunigung	m/s ²
h _{sim}	simulierte z-Ausdehnung des fokussierten Probenstroms	μm
I	Strom, Intensität	mA, W/m ²
I _{max}	maximale Intensität des Gaußschen Strahlprofils	W/m ²
K _m	durchschnittliche Zählrate	1/s
l	Länge (allgemein)	mm
l _{Elek}	Länge eines elektrolytischen Leiters	μm
n, m	Abstände	μm
NA	numerische Apertur	
n _K	Brechungsindex des Kernmaterials	
n _M	Brechungsindex des Mantelmaterials	
n _U	Brechungsindex des umgebenden Mediums	
p	statischer Druck	Pa
r	radiale Laufvariable	μm
r _{fluid}	radiale Laufvariable senkrecht zur fluidischen Achse	μm
r _{opt}	radiale Laufvariable senkrecht zur optischen Achse	μm

Anhang

R	elektrischer Widerstand	Ω
ΔR	Widerstandsänderung	Ω
R_a	Mittenrauwert	nm
R_{\max}	maximale Rautiefe	nm
Re	Reynolds-Zahl	
R_{Gas}	allgemeine Gaskonstante	$8,314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$
R_K	Kernradius eines Wellenleiters	μm
R_{Kanal}	Radius des Fluidikkanals	mm
R_{Teilchen}	Radius eines Partikels	μm
s	axiale Laufvariable	mm
T	Temperatur	K
ΔT	Temperaturdifferenz	K
t	Zeit	ms
t_p	Signallänge	s
U	Umfang (allgemein)	mm
v	Strömungsgeschwindigkeit	m/s
\bar{v}	mittlere Strömungsgeschwindigkeit	m/s
v_{\max}	maximale Strömungsgeschwindigkeit	m/s
V	Volumen (allgemein)	mm^3
V_{Mess}	Volumen des Messraums	μm^3
V_{mol}	Molvolumen	l
V_{Teilchen}	Volumen des Teilchens	pl
\dot{V}	Volumenstrom	$\mu\text{l/s}$
\dot{V}_H	Hüllvolumenstrom	$\mu\text{l/s}$
\dot{V}_p	Probenvolumenstrom	$\mu\text{l/s}$
x	Laufvariable koaxial der optischen Achse	mm
y	Laufvariable senkrecht zur fluidischen und optischen Achse	mm
z	Laufvariable koaxial der fluidischen Achse	mm
\bar{x}	Mittelwert der aufgenommenen Signale	
Z_{wertig}	Wertigkeit der Elektrodenreaktion	
$\Delta\alpha$	Differenz zweier thermischer Ausdehnungskoeffizienten	K^{-1}
ν	kinematische Viskosität	m^2/s
η	dynamische Viskosität	Pa s
θ	halber Öffnungswinkel	
θ_D	halber Divergenzwinkel	
λ	Wellenlänge	nm
ρ	Dichte	g/cm^3
ρ_{Elek}	spezifischer Widerstand	Ωm
σ	Standardabweichung	
τ	Schubspannung	N/mm^2

Literaturverzeichnis

- [Agro98] Agronskaia, Alexandra; et all.: Photon-Counting Device Compatible With Conventional Flow Cytometric Data Acquisition Electronics. *Cytometry*, 32 pp 255 – 259, 1998.
- [Alt97] Altendorf, Eric; et all.: Differential Blood Cell Counts Obtained Using a Microchannel Based Flow Cytometer. *Transducers '97, International Conference on Solid-State Sensors and Actuators*, Chicago, pp 531 – 534, 1997.
- [Bäro5] Bärwolff, Günter: *Höhere Mathematik für Naturwissenschaftler und Ingenieure*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005.
- [Beck02] Becker, Holger; Locascio, Laurie E.: Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 56, pp 267 – 287, 2002.
- [Blan98] Blankenstein, Gert; Larsen, Ulrik Darling: Modular concept of a laboratory on a chip for chemical and biochemical analysis. *Biosensors Bioelectronics* Vol. 13 No. 3 – 4, pp 427 – 438, 1998.
- [Blu98] Bludau, Wolfgang: *Lichtwellenleiter in Sensorik und optischer Nachrichtentechnik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998.
- [Bohr83] Bohren, C.F.; Huffmann, D.R.: *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1983.
- [Bra05] Brattke, Kerstin: Erstellung eines optischen Messaufbaus und Charakterisierung von Mikrostrukturen zum durchflusszytometrischen Nachweise von Blutzellen. Diplomarbeit bei der PTB, Arbeitsgruppe 8.32, 2005.
- [Brigg90] Briggs, D.; Seah, M. P.: *Practical Surface Analysis, Volume 1- Auger and x-ray Photoelectron Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 437 – 483, 1990.
- [Cheu04] Cheung, Karen; Gawad, Shady; Renaud, Philippe: Impedance Spectroscopy Flow Cytometry: Parameters For Label-Free Cell Differentiation. In [Lau04], pp 55 – 57, 2004.
- [Cheu05] Cheung, Karen; Gawad, Shady; Renaud, Philippe: Impedance Spectroscopy Flow Cytometry: On-Chip Label-Free Cell Differentiation. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com), DOI 10.1002/cyto.a.20141, April 2005.
- [Clai01] McClain, Maxine A.; et al.: Flow Cytometry of Escherichia coli on Microfluidic Devices. *Anal. Chem.*, 73, pp 5334 – 5338, November 2001.
- [Dilla85] van Dilla, Marvin A., et all.: *Flow Cytometry – Instrumentation and Data Analysis*. Academic Press, London, 1985.
- [Dink89] Dinkelacker, M.: *Zur Gasentwicklung und Blasenbildung an Elektroden*. Herausgegeben von der Deutschen Forschungsanstalt für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR), Institut für technische Thermodynamik, Stuttgart, 1989.

- [Ditto2] Dittrich, Petra S.; Schwille, Petra: Spatial Two-Photon Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Controlling Molecular Transport in Microfluidic Structures. *Anal. Chem.*, 74, pp 4472 – 4479, September 2002.
- [Egan04] Egan, B.: Haemozoin formation as a target for the rational design of new antimalarials. *Drug Design Reviews*, Online 1, pp 93 – 110, 2004.
- [Ehro2] Ehrfeld, Wolfgang; Bähr, Jochen: *Handbuch Mikrotechnik*. Carl Hanser Verlag, München, 2002.
- [Ehreo4] Ehrenstein, Gottfried W.: *Handbuch Kunststoff-Verbindungstechnik*. Carl Hanser Verlag, München, 2004.
- [Emuo4] Emuge Franken (Hrsg.): *Handbuch der Gewindetechnik und Frästechnik*. Publics Corp. Publ., Erlangen, 2004.
- [Fu02] Fu, Anne Y.; et al.: An Integrated Microfabricated Cell Sorter. *Anal. Chem.* 74, pp 2451 – 2457, 2002.
- [Fu99] Fu, Anne Y.; et al.: A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nature Biotechnology* Vol 17, pp 1109 – 1111, Nov. 1999.
- [Gaw01] Gawad, S.; Schild, L.; Renaud, Ph.: Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab on a chip*, 1, pp 76 – 82, 2001.
- [Gaw04] Gawad, Shady; Cheung, Karen; Renaud, Philippe: Impedance Spectroscopy Flow Cytometry: Model Validation. In [Lau04], pp 58 – 60, 2004.
- [Gora01] Goranovic, G.; et al.: Three-Dimensional Single Step Flow Sheathing in Micro Cell Sorters. Online-Resource: http://www2.mic.dtu.dk/research/MIFTS/publications/confproc/2001/MSM2001_GG.pdf, 2001.
- [Ham05] Hamann, Carl H.; Vielstich, Wolf: *Elektrochemie*. 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005.
- [Henz04] Henzi, Patric; et al.: UV-induced Modification of Dielectric Properties of Polymers for Fabrication of Passive Planar Lightwave Circuits. 17th Annual IEEE/LEOS Meeting, Rio Grande, Puerto Rico, November 7-11, 2004.
- [Herwo4] Herwig, Heinz: *Strömungsmechanik A – Z*. Vieweg Verlag, Wiesbaden, 2004.
- [Holmo4] Holmes, David; et al.: High-speed Particle Sorting: Combining Dielectrophoresis And Fluid Flow. In [Lau04], pp 6 – 8, 2004.
- [Hübo4] Hübner, Jörg; et al.: Multimode Integrated Optical Components For μ TAS – A Rigorous Approach. In [Lau04], pp 357 – 359, 2004.
- [Hult96] Hultsch, Hagen (Hrsg.): *Optische Telekommunikationssysteme – Physik, Komponenten und Systeme*. Damm-Verlag KG, Gelsenkirchen, 1996.
- [Into2] Intel Corporation, Santa Clara, Californien, USA: Offenlegungsschrift, DE 103 34 341 A1, Kaskadierte hydrodynamische Fokussierung in Mikrokanälen, 30.08.2002.

- [Iwa97] Iwata, Koichi; Hamaguchi, Hiro-o: Microscopic Mechanism of Solute-Solvent Energy Dissipation Probed by Picosecond Time-Resolved Raman Spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 101, pp. 632-637, 1997.
- [Kac90] Kachel, Volker; Feller-Feldegg, Hugo; Menke, Everhard: Hydrodynamic Properties of Flow Cytometry Instruments. In [Mela91], pp 27 – 44, 1990.
- [Kac90a] Kachel, Volker: Electrical Resistance Pulse Sizing: Coulter Sizing. In [Mela91], pp 45 – 80, 1990.
- [Kando5] Kandlikar, S. G.: Roughness effects at microscale – reassessing Nikuradse’s experiments on liquid flow in rough tubes. *Bulletin of the Polish Academy of Science*, Vol. 53, No. 4, 2005.
- [Kiro1] Kirchner, Viola: Elektrochemische Mikrostrukturierung mit ultrakurzen Spannungspulsen. Inaugural-Dissertation, FU-Berlin, 2001.
- [Kleino5] Klein, Rolf; McGrath, Gareth; Frieder, L.P.: Laser Welding of Textiles with Clearweld Process. ATC-32nd Aachen Textile Conference, 23. – 24. November, 2005.
- [Kleino6] Klein, Rolf; McGrath, Gareth: Creating Transparent Laser Weldings on Thermoplastic components. *Joining Plastics*, London, 25. - 26. April, 2006.
- [Kräo1] Krämer, B; et al.: Relative frequency of malaria pigment-carrying monocytes of nonimmune and semiimmune patients from flow cytometric depolarized side scatter. *Cytometry*, 45, pp 133-140, 2001.
- [Krao2] Krawczyk, Stanislas: Discussion on optical integration in Lab-on-a-Chip Microsystems for medical diagnostics. *Phys. stat. sol.*, No.3, pp 998 – 1012, 2003.
- [Krac04] Krack, Markus C.; Dumitru, Gabriel: Laserengraving - Die Fertigungstechnologie der Zukunft. *Kunststoffe-Synthetics*, pp 68 – 70, Oktober 2004.
- [Krüo2] Krüger, Jan; et al.; Development of a microfluidic device for fluorescence activated cell sorting. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 12 (2002), pp 486 – 494, 2002.
- [Kutt88] Kuttruff, Heinrich: *Physik und Technik des Ultraschalls*. S. Hirzel Verlag Stuttgart, 1988.
- [Lam03] Lamontagne, Nancy D.: Getting the Photonics on the Chip Isn’t Easy. *Lab on a Chip*, pp 42 – 45, Januar/Februar 2003.
- [Lau04] Laurell, Thomas, et al.: *Micro Total Analysis Systems 2004*, Volume 1, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004.
- [Leu05] Leu, Tzong-Shyng; Chen, Hung-Ying; Hsiao, Fei-Bin: Studies of particle holding, separating and focusing using convergent electrodes in micro-sorters. *Microfluidics Nanofluidics*, DOI 10.1007/s10404-005-0035-x, 2005.
- [Lino2] Lin, Che-Hsin; Chang, Guan-Liang: Micro Flow Cytometers with Buried SU-8/SOG optical Waveguides for On-line Cell Counting. *Sensors Actuator*, A103, pp 165 – 170, 2003.

- [Lino03] Lin, Che-Hsin; Lee, Gwo-Bin: Micromachined flow cytometers with embedded etched optic fibers for optical detection. *J. Micromechanics and Microengineering*, 13, pp 447 – 453, 2003.
- [Mad97] Madou, Marc, J.: *Fundamentals of Mikrofabrication*. CRC Press, Boca Raton, 1997.
- [Max04] J. C. Maxwell: *A treatise on electricity and magnetism*, third edition, Oxford at the Clarendon Press, 1904, Chap. IX.
- [Mela90] Melamed, Myron R.; Mullaney, Paul F.; Shapiro, Howard M.: An Historical Review of the Development of Flow Cytometers and Sorters. In [Mela91], pp 1 – 9, 1990.
- [Mela91] Melamed, Myron R.; Lindmo, Tore; Mendelsohn, Mortimer L.: *Flow Cytometry And Sorting*. Wiley-Liss, Inc., New York, 1991.
- [Menz05] Menz, Wolfgang; Mohr, Jürgen; Paul, Oliver: *Mikrosystemtechnik für Ingenieure*. WILEY-VCH Verlag Weinheim, 2005.
- [Mish00] Mishchenko, Michael I.; Hovenier, Joachim W.; Travis, Larry D.: *Light Scattering by Nonspherical Particles*. Academic Press, San Diego, 2000.
- [Mish02] Mishchenko, Michael I.; Travis, Larry D.; Lacis, Andrew A.: *Scattering, Absorption and Emission of Light by Small Particles*. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.
- [Miyao4] Miyamura, K.; Yoshida, Y.; Kitamori, T.: On-chip Coulter Counter For Airdust Monitor. In [Lau04], pp 267 – 269, 2004.
- [Mohr02] Mohr, Jürgen A.; et al.: A Modular Fabrication Concept for Microoptical Systems. *Journal of Lightwave Technology*, Vol. 21, No. 3, pp 643 – 647, März 2003.
- [Mol34] Moldovan A.: Photo-elektrik technique for counting of microscopical cells. *Science* 80.188, 1934
- [Müncho3] Münch, M; Willmann, M.: Entwicklung neuer Verbindungstechniken für Komponenten miniaturisierter Mikrofluidiksysteme aus Kunststoff. Hahn-Schickard-Gesellschaft, Villigen-Schwenningen, FV-Nr. 45 Z, 2003.
- [nano06] <http://www.nanomedicine.com/NMI/Tables/3.3.jpg>, Abruf 06.2006.
- [Neu05] Neukammer, J.; et al.: Entwicklung und Erprobung von Mikrostrukturen zur durchflusszytometrischen Charakterisierung humaner Zellen. VDE, Mikrosystemtechnik Kongress 2005 in Freiburg, 10. bis 12. Oktober 2005.
- [Nied92] Niedrig, Heinz: *Physik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992.
- [Ost98] Ost, V.; Neukammer, J.; Rinneberg, H.: Flow Cytometric Differentiation of Erythrocytes and Leukocytes in Dilute Whole Blood by Light Scattering. *Cytometry* 32, pp 191 – 197, 1998.
- [Park04] Park, Junha; et al.: Sheathless Microfluidic Cytometer With Asymmetric Micronozzle For Absolut Counting Of Blood Cells. In [Lau04], pp 500 – 502, 2004.

- [Partec05] Firma Partec GmbH, Otto-Hahn-Str. 32, D-48161 Münster, www.partec.com. Die Informationen stammen aus persönlichen Kontakten mit der Firma Partec, 2005.
- [PTB] Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Arbeitsgruppe „Durchflusszytometrie und Mikroskopie, Dr. Jörg Neukammer.
- [Rab05] Rabus, Dominik G.; Henzi, Patric; Mohr, Juergen: Photonic Integrated Circuits by DUV-Induced Modification of Polymers. IEEE Photonic Technology Letters, Vol. 17, No. 3, pp 591 – 593, März 2005.
- [Rao04] Rao, Ramachandra S.; et al.: Multiplexed Microfluidic Devices For Single-Cell Manipulation And Analysis. In [Lau04], pp 61 – 63, 2004.
- [Reh04] Rehbach, Katja: Aufbau und Test eines Mikrodurchflusszytometers auf Basis eines LIGA-Prägeformeinsatzes. Diplomarbeit am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte, 2004.
- [Ruz00] Ruzzo, Antinio Claudio M.: Entwicklung einer opto-elektromechanischen 2 x 2 Schaltmatrix in LIGA-Technik für die optische Telekommunikation. Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe, <http://www.ubka.uni-karlsruhe.de/vvv/2000/maschinenbau/9/9.pdf>, 2000.
- [Salz90] Salzman, Gary C.; et al.: Light Scattering and Cytometry. In [Mela91], pp 81 – 107, 1990.
- [Sanno2] Sannes, Lucy J., Ph.D.: Diagnostics and Related Technologies, Advances in Flow Cytometry. Spectrum Life Sciences, Decision Resources, Inc., Massachusetts, März 2002.
- [Schä06] Schädel, S.; et al.: Development of Microfluidic Structures for High Throughput Flow Cytometric Characterization of Blood Cells. ISAC XXIII, International Congress in Quebec, 20. bis 24. Mai 2006.
- [Schm05] Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Thews, Gerhard: Physiologie des Menschen mit Pathologie. 29. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005.
- [Schr99] Schrum, David; et al.: Microchip Flow Cytometry Using Electrokinetic Focusing. Anal. Chem., Vol. 71, No. 19, pp 4173 – 4177. Oktober 1999.
- [Schwa94] Schwab, J.: Kompensation der Fräserabdrängung beim Schlichten von Hohlformen. IFW der Universität Hannover, VDI-Verlag, 1994.
- [set06] Stiftung zur Förderung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen, <http://www.tierversuche-ersatz.de>, 2006.
- [Shap03] Shapiro, Howard M.: Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, Inc., New Jersey, 2003.
- [Shin05] Shin, Sehyun; et al.: Slit-Flow Ektacytometry: Laser Diffraction in a Slit Rheometer. Clinical Cytometry, 65B, pp. 6- 13, 2005.
- [Siek01] Siekmann, Helmut E.: Strömungslehre für den Maschinenbau: Technik und Beispiele. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001.
- [Sob93] Sobek, Daniel; et al.: A Microfabricated Flow Chamber For Optical Measurements In Fluids. Micro Electro Mechanical Systems, 1993,

- MEMS '93, Proceedings 'An Investigation of Micro Structures, Sensors, Actuators, Machines and Systems'. IEEE, Fort Lauderdale, USA, pp 219 – 224, 1993.
- [Sohn00] Sohn, L. L.; et al.: Capacitance cytometry: Measuring biological cells one by one. PNAS, Vol. 97, No. 20, pp 10687 – 10690, September 2000.
- [Spr03] Sprenger, Christopher: Laserdurchstrahlschweißen von klarsichtigem PMMA mit einem gepulsten NdYAG-Laser. Studienarbeit am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte, 2003.
- [Steen90] Steen, Harald B.: Characteristics of Flow Cytometers. In [Mela91], pp 11 – 25, 1990.
- [Tay05] Taylor, Anne M., et al.: A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. Nature Methods, Vol. 2, No. 8, pp 599 – 605, August 2005.
- [Tay105] Taylor, James B.; Carrano, Andres L.; Kandlikar, Satish G.: Characterisation of the Effect of Surface and Texture on Fluid Flow – Past, Present, And Future. Proceedings of ICM 2005, 3rd International Conference on Microchannels and Minichannels, Toronto, Ontario, Canada, June 2005.
- [Thom69] Thom, R.; Hampe, A.; Sauerbrey, G.: Die elektronische Volumenbestimmung von Blutkörperchen und ihre Fehlerquellen, Z. ges. exp. Med. 151, pp 331-349, 1969.
- [Tuch04] Andrej Tuchscheerer: Maskenentwurf und Anfertigung einer Prägeform mittels LIGA-Technik für mikrofluidische Anwendungen. Diplomarbeit am Fachgebiet Mikro- und Feingeräte, 2004.
- [Tung02] Tung, Yi-Chung: Micro Integrated Flow Cytometer (MIFC). Online-Resource: <http://www-personal.umich.edu/~katsuo/project3.htm>, 2002.
- [Ver03] Verpoorte, Elisabeth; de Rooij, Nico F.: Microfluidics Meets MEMS. Proceedings of the IEEE, Vol. 91, No. 6, pp 930 – 953, June 2003.
- [Vog02] Voges, Edgar; Petermann, Klaus: Optische Kommunikationstechnik – Handbuch für die Wissenschaft und Industrie. Springer-Verlag, Berlin, 2002.
- [Voit] Voit, Matthias; Schlaak, Helmut F.: Universelles Berechnungsverfahren für Singlemode-Faserkopplung mit Fehlaustrichtungen. Technische Universität Darmstadt, Institut für Elektromechanische Konstruktion, http://www.emk.tu-darmstadt.de/forsch/publikationen/mv_itg04.pdf.
- [Vold02] Voldman, Joel, et al.: A Micofabrication-Based Dynamic Array Cytometer. Anal. Chem., 74, pp 3984 – 3990, August 2002.
- [Wano3] Wang, Jeff: Micro-fluidic Chip for Flow Cytometry. <http://www2.ece.jhu.edu/faculty/andreou/495/2003/LectureNotes/FlowCytometerDirectEtch.pdf>, September 2003.
- [Wano4] Wang, Z.; et al.: Measurements of scattered light an a microchip flow cytometer with integrated polymer based optical elements. Lab on a chip, 4, pp 372 – 377, 2004.

- [Weig03] Weigl, Bernhard; Bardell, Ron L.; Cabrera, Catherine R.: Lb-on-a-chip for drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, pp 349 – 377, 2003.
- [Weino5] K. Weinert, P. Kahnis. Technologische Aspekte der mikromechanischen Fräsbearbeitung. www.mikro-nano.unidortmund.de/seminar2/vortrag/weinert.pdf, Institut für spanende Fertigung, Dortmund, 2005.
- [Wolfoo] Wolff, A.; et al.: Chip-Integrated Microfluidic System for Cell Sorting and Cell Culturing. *Euroensors XIV, 14th European Conference on Solid-State Transducers*, Copenhagen Denmark, pp 235 – 238, August 2000.
- [Wolfo3] Wolff, A.; et al.: Integrating advanced functionality in a microfabricated high-throughput fluorescent cell sorter. *Lab on a chip*, 3, pp 22 – 27, 2003.
- [Wor03] Worgull, M.; Heckeke, M.; Schomburg W. K.: Analyse des Mikro-Heißprägeverfahrens. Forschungszentrum Karlsruhe, Institut für Mikrostrukturtechnik, Wissenschaftliche Berichte FZKA 6922, Oktober 2003.
- [Xia98] Xia, Younan; Whitesides, George M.: Softlithographie. *Angewandte Chemie*, 110, pp 568 – 594, 1998.
- [Yama02] Yamaguchi, Akira; et al.: Rapid fabrication of electrochemical enzyme sensor chip using polydimethylsiloxane microfluidic channel. *Analytica Chimica Acta*, 468, pp143 – 152, 2002.
- [Yilo6] Yildirim, Hülya: Durchflusszytometrische Mikrostrukturen mit integrierten Lichtwellenleitern und Elektroden zur Untersuchung von (Blut-) Zellen. Diplomarbeit bei der PTB, Arbeitsgruppe 8.32, 2006.