



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Chemie

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie

**Folienbasierter Mikroreaktor für die
NMR-relaxometrische online-Charakterisierung
magnetischer Nanopartikel und flussbasierte
Mikroarrays**

Jonas A. Bemetz

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines**

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr.-Ing. Kai-Olaf Hinrichsen

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Michael Seidel

2. Prof. Dr. Oliver Hayden

Die Dissertation wurde am 13.06.2019 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.09.2019 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von Juni 2015 bis Mai 2018 am Lehrstuhl für Analytische Chemie (Leitung bis März 2017: Prof. Reinhard Nießner) bzw. Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie ab April 2017 unter der Leitung von Prof. Martin Elsner an der Technischen Universität München. Die Arbeit wurde durch das Projekt „*MiCSMaP – Microreactor with integrated Characterization for the Synthesis of Magnetic Nanoparticles*“ (Mikroreaktor mit integrierter Charakterisierung zur Synthese magnetischer Nanopartikel) der International Graduate School of Science and Engineering – IGSSSE gefördert.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Supervisor PD Dr. Michael Seidel. Bei zahlreichen fachlichen Diskussionen bot er Unterstützung bei Fragen und Offenheit für meine eigenen Ideen und Einbringungen. Er betreute und förderte das selbständige, lösungsorientierte Arbeiten und regte zu spannenden und abwechslungsreichen Aufgaben an. Außerdem unterstützte er den Besuch außerfachlicher Weiterbildungsmöglichkeiten und wissenschaftlicher Tagungen und einen Forschungsaufenthalt im Ausland. All dies trug zu meinem persönlichen und wissenschaftlichen Wachstum bei.

Ebenfalls gilt mein ausdrücklicher Dank meinem Mentor Prof. Dr. Reinhard Nießner, meine Doktorarbeit in einem äußerst spannenden und interdisziplinären Thema und wissenschaftlich hochkarätigem Umfeld des IWC durchführen zu können. Durch seine klaren und konstruktiven Empfehlungen trieb er stets ein Vorankommen an. Als Direktor des IWC bis März 2017 ermöglichte er die Nutzung der Einrichtungen und Laborausstattung und förderte wissenschaftlichen Austausch und Tagungsbesuche. Dies wurde von seinem Nachfolger Prof. Dr. Martin Elsner fortgeführt. Auch ihm gebührt mein besonderer Dank.

Für die Gastfreundschaft und Betreuung während meines Auslandsaufenthalts im Rahmen dieser Doktorarbeit möchte ich mich herzlichst bei Prof. Dr. Urs Häfeli und Dr. Katayoun Saatchi von der Faculty of Pharmaceutical Sciences an der University of British Columbia in Vancouver bedanken.

Bei meinen Kollegen am IWC möchte ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gemeinsame Zeit bedanken. Eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre förderten wissenschaftlichen und persönlichen Austausch und gegenseitige Unterstützung. Darüber hinaus erfreuten mich gemeinsame Tätigkeiten und Unternehmungen außerhalb unserer Doktorarbeiten.

Besonderer Dank gilt auch meinen Projektpartnern Andreas Wegemann und dessen Gruppenleiter Dr.-Ing. Bernhard Gleich von der Arbeitsgruppe Magnetische Felder der Munich School of BioEngineering (MSB) für die herausragende und äußerst reibungslose Zusammenarbeit. Deren technische und fachliche Kompetenz im Bereich der Elektrotechnik, Softwareentwicklung und

Kernspinresonanz haben maßgeblich zum Erfolg der gemeinsamen Projekte beigetragen. Außerdem wurde stets Zugang zu deren Laboren und Werkstätten gewährt und das Nutzen der Apparaturen und Einrichtungen ermöglicht.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Hayden und Mathias Reisbeck vom Heinz Nixdorf Lehrstuhl für Biomedizinische Elektronik am Zentralinstitut für translationale Krebsforschung der TUM (translaTUM) für den fachlichen Austausch im Bereich der Mikrofluidik und der Entwicklung auf magnetischen Nanopartikel basierten Assays sowie die Bereitstellung von Referenzproben und Messapparaturen bedanken.

Für die technische und mechanische Umsetzung gebührt mein Dank Roland Hoppe und Sebastian Wiesemann von der Mikromechanischen Werkstatt des IWC. Stets standen sie mir mit fundierten Ideen und Problemlösungen zur Seite und setzten diese mit Liebe fürs Detail um. Auch bei allen permanenten Mitarbeitern möchte ich mich bedanken, ganz besonders bei Christine Sternkopf für die gute Zusammenarbeit, Diskussion und das Aufnehmen von Rasterelektronenmikroskopie-Bildern.

Äußerst wichtigen Dank möchte ich meiner lieben Freundin Sonja aussprechen, die mir in gut als auch in schlecht laufenden Zeiten dieser Doktorarbeit stets zur Seite stand, mich unterstützte und mit einem offenen Ohr meinen Ideen, Gedanken und Problemen horchte. Ein ebenfalls besonders wichtiger Dank gilt meinen Eltern Sigi und Uli, welche mich durch mein gesamtes Studium unterstützten und mir beistanden. Dies gilt auch meinen Geschwistern Valentin, Josefa, Paulina und Henriette.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Bemetz, J.; Wegemann, A.; Saatchi, K.; Haase, A.; Häfeli, U. O.; Niessner, R.; Gleich, B.; Seidel, M., Microfluidic-based synthesis of magnetic nanoparticles coupled with miniaturized NMR for online relaxation studies. *Anal. Chem.* **2018**, 9975–9982

Bemetz, J.; Kober, C.; Meyer, V.; Niessner, R.; Seidel, M., Succinylated Jeffamine ED-2003 coated polycarbonate chips for low-cost analytical microarrays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, 1943-1955.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Veröffentlichungen.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Theoretische Grundlagen.....	3
2.1. Mikrofluidik	3
2.1.1. Grundprinzipien zu Massen und Stofftransport	3
2.1.2. Mischen und Mischstrukturen	6
2.1.3. Herstellungsmethoden von mikrofluidischen Strukturen.....	12
2.1.4. Mikroreaktoren zur Synthese von Nanomaterialien	17
2.1.5. Mikroarrays	18
2.2. Prinzipien der nuklearen magnetischen Resonanz (NMR)	22
2.2.1. Transversale Relaxation (T_2 -Zeit)	23
2.2.2. Longitudinale Relaxation (T_1 -Zeit).....	25
2.2.3. Einfluss von Beschichtungen magnetischer Nanopartikel auf die Relaxation	28
2.2.4. Einfluss der Clustergröße magnetischer Nanopartikel auf die transversale Relaxation.....	29
2.3. Magnetische Nanopartikel	32
2.3.1. Herstellungsmethoden magnetischer Nanopartikel.....	32
2.3.2. Herstellung von magnetischen Nanopartikeln in Mikroreaktoren	36
2.3.3. Oberflächenmodifikation magnetischer Nanopartikel	37
2.3.4. Analytische Anwendungen magnetischer Nanopartikel.....	38
2.3.5. Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln	40
Elektronenmikroskopie (EM).....	40
Dynamische Lichtstreuung (DLS)	41
Raman-Mikroskopie (RM)	42
Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR).....	42

Zeta-Potential	43
3. Ergebnisse und Diskussion	45
3.1. Evaluierung von Herstellungsmethoden von mikrofluidischen Strukturen aus Kunststofffolien	45
3.1.1. Aufbau des Mikroreaktors	45
3.1.2. Laserschneiden von doppelseitigen Klebefolien.....	46
3.1.3. Verkleben von lasergeschnittenen Folien.....	47
3.1.4. Schneiden von Folien und doppelseitigen Klebefolien mit einem Schneideplotter.....	49
3.1.5. Aufbau des Reaktors zur Synthese magnetischer Nanopartikel.....	53
3.2. Herstellungsverfahren von analytischen Mikroarrays aus Kunststofffolien	63
3.2.1. <i>Needs</i> zur Oberflächenfunktionalisierung	65
3.2.2. Ansatz für neuen Herstellungsprozess auf Kunststoffsubstraten.....	65
3.2.3. Succinylierung von Jeffamine® ED-2003	66
3.2.4. Potentielle Kunststoffsubstrate zur Herstellung von Mikroarrays	67
3.2.5. Herstellungsprozess von Mikroarrays auf Polycarbonat-Folien	68
3.2.6. Gegenüberstellung von Herstellungsprozess von Glas-Chips und Herstellungsprozess von Polycarbonat-Chips.....	71
3.2.7. Optimierung des Herstellungsprozesses von Mikroarrays auf Polycarbonat.....	73
Ofenzeit	73
Aktivierungsreagenzien	75
Pluronic® F-127 und Trehalose.....	76
3.2.8. Charakterisierung der Oberflächenqualität	79
3.2.9. Charakterisierung des Mikrodosierprozesses	82
3.3. Integration eines NMR-Relaxometers in einen kontinuierlichen Syntheseprozess.....	84
3.3.1. Aufbau des Geräts.....	84
3.3.2. NMR-Relaxometer.....	86
3.3.3. Fluidischer Aufbau.....	87
Ablaufprogramme	87

Verschlauchung	87
Die final verwendete Ablaufsteuerung	88
Syntheseprogramm	89
3.3.4. Messung der Relaxationszeit im Fluss	90
3.3.5. Stopped-Flow-Messung	93
3.3.6. Automatische Messung der Relaxivität	94
3.4. Synthese magnetischer Nanopartikel	98
3.4.1. Nanopartikelsynthese im mikrofluidischen Reaktor.....	98
3.4.2. Optimierung der transversalen Relaxivität	103
3.4.3. Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel.....	109
3.5. Anwendung magnetischer Nanopartikel zur Detektion von Legionellen	112
3.5.1. Herstellung der Filtermodule	113
3.5.2. Detektion von Legionellen auf Filtermodulen	114
4. Zusammenfassung und Ausblick	119
4.1. Herstellung von Mikroreaktoren.....	119
4.2. Mikroarrays	120
4.3. NMR.....	121
5. Summary and Outlook	125
5.1. Production of microreactors	125
5.2. Microarrays	126
5.3. NMR.....	127
6. Material und Methoden.....	131
6.1. Geräte und Materialien	131
6.1.1. Geräte	131
6.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	132
6.1.3. Chemikalien.....	132
6.1.4. Puffer.....	134
6.1.5. Software	135

6.2.	Mikroreaktor	135
6.2.1.	Herstellung mikrofluidischer Strukturen.....	135
6.2.2.	Charakterisierung der Mikrofluidik und des Flussprofils	135
	Standardlichtmikroskopie	135
	Fluoreszenzmikroskopie	136
	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	136
6.2.3.	Synthese magnetischer Nanopartikel	136
6.2.4.	Funktionalisierung der Nanopartikel	137
6.2.5.	Charakterisierung von Nanopartikeln	137
	Raman-Mikroskopie	137
	FT-IR.....	138
	Eisenkonzentrationen.....	138
	FESEM	138
	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	139
	Messung des Zeta-Potentials	139
	Transversale und longitudinale Relaxivität	139
6.3.	Mikroarrays	141
	Funktionalisierung von <i>Jeffamine</i> und Herstellung der Beschichtung.....	141
6.3.2.	Beschichten von Polycarbonat-Platten	141
6.3.3.	Immobilisieren der Antikörper.....	141
6.3.4.	Aufbau eines Flusskanals	141
6.3.5.	Charakterisierung der Mikroarrays.....	142
	Bewertung der Oberflächenhomogenität.....	142
	Bewertung der Homogenität des Mikrodosier-Verfahrens	143
6.4.	Detektion von Legionellen auf makroporösen Filtern mit NMR Relaxometer.....	144
6.4.1.	MAF-Synthese	144
6.4.2.	Bakterienkultivierung.....	145
6.4.3.	Durchführung der Messungen	145

7.	Abkürzungsverzeichnis.....	147
8.	Literatur.....	151
9.	Anhang	167
9.1.	Bewertung der Oberflächenhomogenität von beschichteten Glas-Chips	167
9.2.	Berechnung zum optimalen molaren Verhältnis von Succinanhidrid und <i>Jeffamine</i>	170
9.3.	Auflistung der Arbeitszeit zur Herstellung von Polycarbonat- und Glas-Chips.....	173
9.4.	Ablaufprogramm zur Chemilumineszenz-Testmessung am MCR zur Optimierung des Herstellungsprozesses	176

1. Einleitung und Zielsetzung

Modularen Mikroreaktoren für die kontinuierliche Synthese von Nanopartikeln und Chemikalien wird eine Kernrolle im Bereich der Chemie in Zeiten von Industrie 4.0 zugesprochen [1]. Solche Systeme sind etwa für die verteilte Fertigung (*distributed manufacturing*) auf Abruf von pharmazeutischen Wirkstoffen für die personalisierte Medizin [2] oder die Produktion von Feinchemikalien mit schneller Marktreife von Vorteil [1]. Eine große Hürde stellt die Verfügbarkeit und Integration analytischer Systeme zur online-Charakterisierung der produzierten Substanzen dar [3]. Dabei sind die erhaltenen analytischen Informationen einerseits für die Prozess- und Qualitätskontrolle wichtig, andererseits könnten in Zukunft Selbstopтимierungsalgorithmen durch maschinelles Lernen (*machine learning*) und automatischen Austausch analytischer Messdaten die Entwicklung neuartiger Synthesemethoden und Substanzen beschleunigen [4, 5]. Des Weiteren stellt die Handhabung von Feststoffen bei mikrofluidischen Synthesemethoden eine besondere Herausforderung dar, da es durch das hohe Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis in Mikroreaktoren leicht zu Ablagerungen und Verstopfungen der Kanäle kommt [4, 5].

In dieser Arbeit war das Ziel, Möglichkeiten der Folientechnologie zum Bau von Mikroreaktoren zur Synthese magnetischer Nanopartikel zu untersuchen. Magnetische Nanopartikel werden vielfach im Bereich der Biomedizin und analytischen Chemie angewendet. Dabei war zum Ziel gestetzt, eine einerseits einfache Herstellungsmethode für Mikroreaktoren aus Folien zu entwickeln, andererseits aber auch das Ablagern von Feststoffen weitgehend zu verhindern. Zusätzlich sollte in Zusammenarbeit mit der Munich School of BioEngineering (MSB) der TUM ein miniaturisiertes Relaxometer, welches auf nuklearer magnetischer Resonanz (NMR) beruht, entwickelt und in den Syntheseprozess integriert werden. Dadurch war angedacht, ein direktes Messen der Relaxivität der magnetischen Nanopartikel zu ermöglichen. Die Relaxivität ist einer der wichtigsten zu charakterisierenden Parameter von magnetischen Nanopartikeln, speziell bei der Anwendung als Kontrastmittel in der Magnetresonanz-Bildgebung und der Anwendung zur Detektion von Zellen und anderen Analyten in bioanalytischen Messsystemen. Aktuell wird die Relaxivität meist an klinischen Magnetresonanz-Scannern gemessen. Der Zugang und die Messzeit an solchen Geräten ist jedoch limitiert und teuer. Durch das direkte Messen der Relaxivität im Syntheselabor können Synthesewege überwacht, optimiert und beschleunigt werden.

Des Weiteren eignen sich miniaturisierte NMR-Relaxometer für bioanalytische Assays [6]. Für viele bioanalytische Assays ist eine vorangegangene Probenaufkonzentrierung notwendig. Eine am IWC vielfach verwendete Aufkonzentrierung ist die monolithische Adsorptionsfiltration [7-9]. Zentraler

Bestandteil dieser Methode ist eine effiziente Elution der Analyten vom Filtermodul. Um die Detektion der Analyten direkt auf dem Filtermodul ohne Elution durchzuführen, sollte die monolithische Adsorptionsfiltration in das NMR-Relaxometer integriert werden. Dazu sollten passende Filtermodule entwickelt und hergestellt werden und deren Anwendung zur Aufkonzentrierung von Legionellen untersucht werden. Die Detektion sollte durch Markieren der Legionellen mit Antikörper-gekoppelten, magnetischen Nanopartikeln erfolgen, welche die mit dem NMR-Relaxometer gemessene transversale Relaxationszeit in Abhängigkeit der Konzentration verkürzen.

Die Anzahl miniaturisierter Laboranwendungen (*lab on chip*) nimmt kontinuierlich zu, jedoch stellen Anwendungen zur Synthese in Mikroreaktoren den kleinsten Anteil dar [10]. Die wichtigste Sparte sind *point-of-care* Anwendungen zur medizinischen Diagnostik und Bioanalytik. Dennoch sind auch in diesem Bereich aktuell Mikrotiterplatten noch der Goldstandard [11, 12]. Ein hohes Maß an Automatisierung und das parallele Messen von vielen Proben machen diese Methode vor allem in der Hochdurchsatz-Diagnostik wichtig [13-15]. Durch die geringe Probenanzahl bei *point-of-care* Anwendungen stellen die Möglichkeit zur Parallelisierung jedoch keinen Mehrwert dar [16]. Eine Alternative bieten flussbasierte Mikroarrays [15].

Am IWC sind flussbasierte Mikroarrays zusammen mit der automatisierten Testplattform *Microarray Chip Reader* (MCR) bereits für Antibiotika [17], Proteine [18], Mikroorganismen [8] und Viren [19] etabliert und publiziert. Die Herstellung der Mikroarrays erfolgte jedoch auf funktionalisierten Glasträgern. Dieser Prozess ist zeitaufwendig und teuer [20]. Kunststofffolien stellen eine lukrative Alternative zum Herstellen von miniaturisierten Laboranwendungen dar.

Die Folientechnologie sollte ebenfalls zur Herstellung von flussbasierten Mikroarrays angewendet und untersucht werden. Ein kostengünstiges Herstellungsverfahren von Mikroarrays auf Polycarbonat-Folien sollte dazu entwickelt werden, welches die Oberflächenfunktionalisierung und Immobilisierung von Fänger-molekülen beinhaltet. Zusätzlich sollte das neue Herstellungsverfahren die Übertragung etablierter Mikroarrays von Glas- auf Kunststoffoberflächen ermöglichen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Mikrofluidik

Die Mikrofluidik beschreibt das Verhalten und die Handhabung von Flüssigkeiten im Submikroliterbereich. Mikrofluidik kann mit fast allen gängigen Laborpraktiken kombiniert werden und findet wichtige Anwendung zur chemischen, biologischen und medizinischen Analytik, chemischen und molekularbiologischen Synthese und in der Kultivierung und Manipulation von Zellen. Viele dieser Anwendungen profitieren von der Miniaturisierung aufgrund von geringerem Einsatz an Reagenzien, der damit verbundenen Kostenersparnis und Verringerung von Abfällen, höherem Durchsatz und Reproduzierbarkeit bei Analysen sowie besserer Kontrolle über Stoff- und Wärmetransport [21, 22].

2.1.1. Grundprinzipien zu Massen und Stofftransport

Zur Handhabung von Fluiden im Submikroliterbereich werden Kanäle in der Größenordnung < 1 mm verwendet. Die auftretenden Strömungen fallen meist in den laminaren Bereich. Die Einteilung kann anhand der Reynoldszahl Re geschehen, die das Verhältnis von Trägheits- und Zähigkeitskräften darstellt und folgendermaßen definiert ist:

$$Re = \rho u L / \mu \quad (1)$$

Darin ist ρ die Dichte des Fluids, u die mittlere Strömungsgeschwindigkeit, μ die dynamische Viskosität und L die charakteristische Länge oder auch Bezugslänge des Flusskanals. Für Mikrokanäle unterschiedlicher Strukturen kann die Bezugslänge L durch $L = 4A/U_{wet}$ berechnet werden. Dazu wird die vierfache Querschnittsfläche A durch den benetzten Umfang U_{wet} dieser Fläche geteilt. Für Mikrokanäle mit quadratischem oder kreisförmigem Querschnitt reduziert sich die charakteristische Länge zur Seitenlänge respektive dem Durchmesser.

Unter einer kritischen Reynolds-Zahl von 2300 sind fluidische Systeme laminar. Es resultiert ein typisches parabolisches Flussprofil (Abbildung 1-A). Bei höheren Flussgeschwindigkeiten geht die Strömung in eine turbulente Strömung über (Abbildung 1-B).

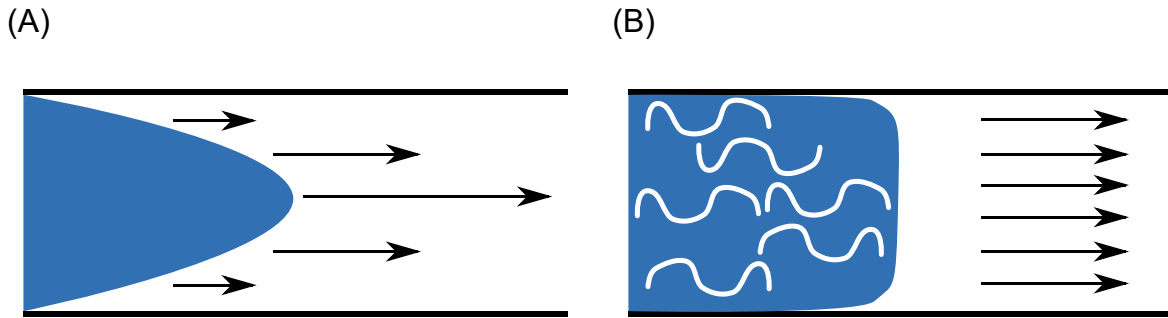


Abbildung 1: Gegenüberstellung von parabolischem (A) und turbulentem (B) Flussprofil. Die Länge der Pfeile deutet die Flussgeschwindigkeit an.

Durch den Wegfall von Turbulenzen findet im laminaren Bereich kein konvektiver Stofftransport quer zur Flussrichtung statt. Ein Durchmischen erfolgt durch Diffusion. Durch zufällige Bewegung von Ionen, Molekülen oder Partikeln entsteht ein Fluss von hoher zu niedriger Konzentration. Der Fluss J wird durch das Fick'sche erste Gesetz gegeben:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2)$$

Dabei ist D der Diffusionskoeffizient des betrachteten Stoffes und $\frac{\partial c}{\partial x}$ die Konzentrationsänderung in der betrachteten Raumrichtung. Beim Durchmischen ist der Fluss an der initial scharfen Grenze zwischen zwei Konzentrationen maximal. Durch Diffusion von höherer zu niedriger Konzentration bildet sich ein Konzentrationsgradient aus. In Abhängigkeit des Konzentrationsgradienten ändert sich auch der Fluss. Die zeitliche Änderung wird durch das Fick'sche zweite Gesetz beschrieben:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}\right)_t \quad (3)$$

Aufgelöst ist der Konzentrationsgradient mit der Zeit:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = -\frac{c_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \exp(-x^2/4Dt) \quad (4)$$

Abbildung 2 zeigt den zeitlichen Verlauf eines Konzentrationsprofils in einem stillstehenden System. Die initial scharfe Grenze ($t = 0$) verschwindet. Es kommt zur Diffusion von hoher zu niedriger Konzentration, bis beide Substanzen komplett durchgemischt sind ($t = \infty$).

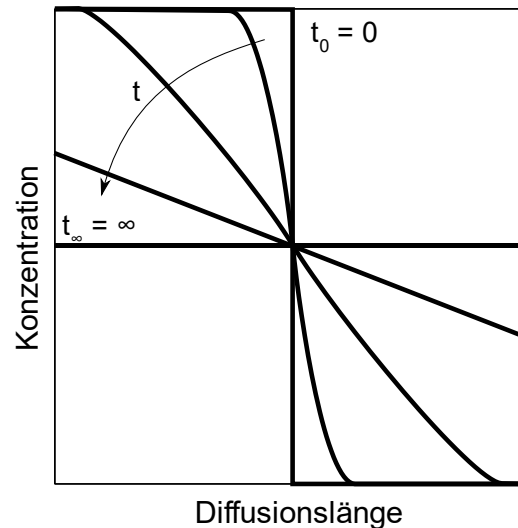


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf des Konzentrationsprofils beim Vermischen von zwei Fluiden durch Diffusion.

Die Zeit zum Durchmischen von zwei laminar fließenden Fluiden hängt somit stark von der charakteristischen Diffusionslänge l ab. Im Fall von zwei laminaren Strömen entspricht dies der Breite der beiden Ströme. Die Fourier Zahl F_0 gibt den Grad der Durchmischung an. Im Normalfall wird ab $F_0 > 0,1$ von adäquat, $F_0 > 0,5$ von gutem und ab $F_0 > 5$ von komplettem Mischen ausgegangen. Die Fourier Zahl F_0 ist gegeben als:

$$F_0 = \frac{Dt_r}{l^2} \quad (5)$$

Worin t_r die durchschnittliche Verweilzeit und D der Diffusionskoeffizient ist. Die dazugehörigen Konzentrationsprofile können durch Lösen von Gleichung (3) gegeben werden:

$$c(x, y) = \frac{1}{2} c_0 \left(1 - \operatorname{erf} \frac{y\sqrt{v_{av}}}{\sqrt{4Dx}} \right) \quad (6)$$

Abbildung 3 zeigt Konzentrationsprofile anhand von Gleichung (6) entlang eines mikrofluidischen Kanals im Fall von zwei laminar fließenden Strömungen.

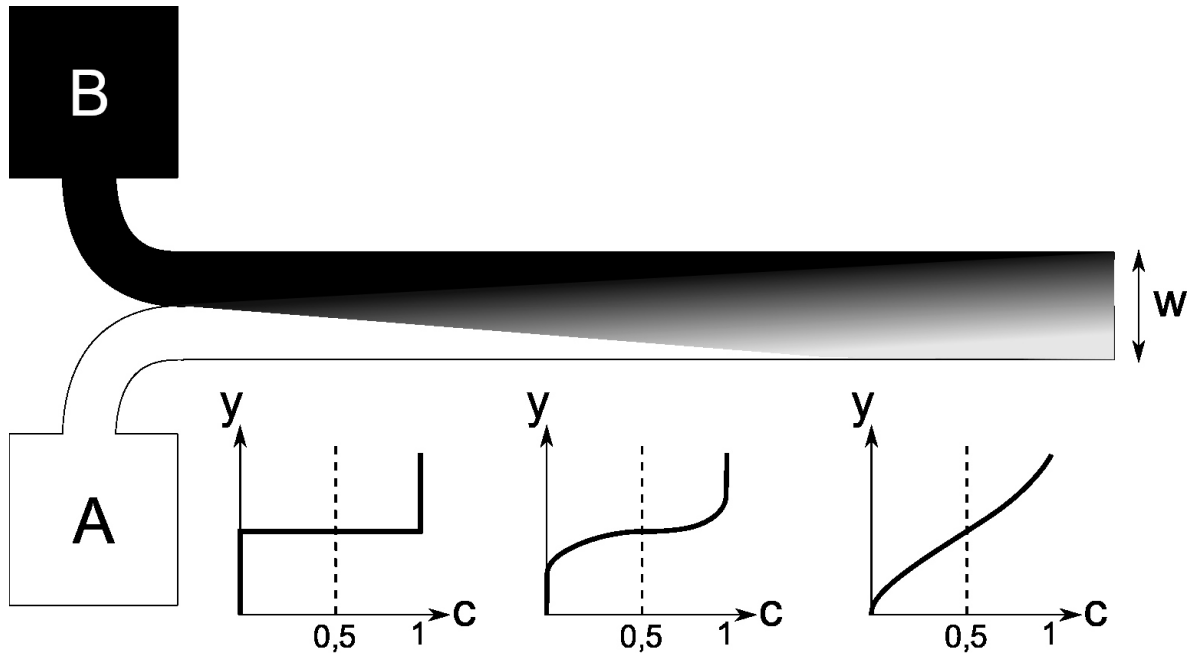


Abbildung 3: Konzentrationsprofile quer zur Flussrichtung beim diffusiven Vermischen von zwei Flüssigkeiten im mikrofluidischen Kanal bei laminarer Strömung.

Aufgrund des parabolischen Flussprofils werden die Konzentrationsprofile auch zusätzlich durch die unterschiedliche Flussgeschwindigkeit beeinflusst. Konzentrationsgradienten in der Nähe der Fluidik-Wände sind durch die geringere Flussgeschwindigkeit somit weniger stark ausgeprägt als im Inneren des Flusskanals. In diesem Fall können die Konzentrationsprofile nur noch numerisch berechnet werden [23].

Die Diffusionslänge beeinflusst somit maßgeblich die zum kompletten Durchmischen notwendige Zeit. In makroskopischen und somit meist turbulenten Systemen wird die Diffusionslänge grundsätzlich durch konvektiven Stofftransport gering gehalten. In mikrofluidischen und somit meist laminaren Systemen muss die Diffusionslänge durch Mischstrukturen verringert werden.

2.1.2. Mischen und Mischstrukturen

In der Literatur sind zahlreiche Strukturen zur Verbesserung des Durchmischens beschrieben [24]. Die Strukturen verkürzen aktiv die zum Durchmischen wichtigen Diffusionslängen oder erzeugen Turbulenzen. Durch serielle Segmentierung mit Hilfe von stark pulsierenden Flussgeschwindigkeiten können Segmente mit kurzen Diffusionslängen erzeugt werden. Turbulentes Durchmischen kann durch Druckfluktuationen mit mehreren seitlichen Zuflüssen und sogar aktiv durch rotierende Mischer erzeugt werden. Weiters können pulsierende Flüsse entlang und quer zur Flussrichtung durch Elektroden mit einer angelegten pulsierenden Spannung, Ultraschall oder thermische Fluktuationen erzeugt werden. Aktive Mischer können Diffusionslängen und somit auch Mischzeiten stark verkürzen.

Trotzdem erfahren sie in der Praxis weniger Bedeutung, da ihre Realisierung oft mit einem deutlichen technischen Mehraufwand verbunden ist.

Deshalb sind zahlreiche passive Mischstrukturen veröffentlicht. Diese erzeugen durch Oberflächenstrukturierung Turbulenzen oder verkürzen die Diffusionslängen der zu mischenden Flüssigkeiten. Dazu reicht der interne Fluss und es sind keine äußeren Einwirkungen nötig. Durch geschickt angeordnete Rippen und Rillen [25], Tesla-Strukturen [26] oder engen Serpentinstrukturen [27] können Turbulenzen in Systemen mit initial niedriger Reynolds-Zahl erzielt werden. Das Erzeugen solch feiner Strukturen im Mikrometerbereich ist jedoch mit zusätzlichem Aufwand bei der Formenherstellung und allgemein dem Herstellungsprozess der mikrofluidischen Struktur verbunden. Alternativ kann durch paralleles Laminieren eine kurze Diffusionslänge erzeugt werden. Die zu mischenden Ströme werden in mehrere Ströme aufgespalten und parallel zusammengefügt. Schematisch ist dieses Prinzip in Abbildung 4 gezeigt.

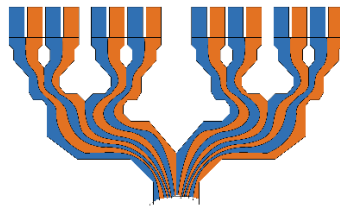


Abbildung 4: Prinzip des parallelen Laminierens zur Verkürzung der Diffusionslänge und zur schnelleren Durchmischung.

Um unterschiedliche Druckabfälle in den aufgespaltenen Strömen auszuschließen, müssen alle Einzelströme aus demselben Querschnittprofil und derselben Länge bestehen. Deshalb wird auch für diese Art des Mischens hohe Präzision bei der Herstellung der mikrofluidischen Struktur vorausgesetzt. Wird das Laminieren seriell durch ein Streck- und Faltprinzip (*stretch and fold*) durchgeführt, steigt die Anzahl an Schichten exponentiell [28]. Durch eine 3D-Struktur wird der zu mischende Strom entlang der vertikalen Ebene gespalten und die Einzelströme aufeinander laminiert (Abbildung 5). Dazu ist das Erstellen einer dreidimensionalen, mehrschichtigen Struktur notwendig, die präzise aufeinander ausgerichtet ist.

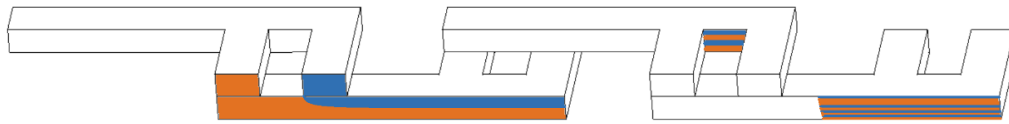


Abbildung 5: Streck- und Faltprinzip zur Verkürzung von Diffusionslängen und schnelleren Durchmischung im 3D-Kanal.

Das Streck- und Faltprinzip führt auch zur effizienten Vermischung von einzelnen Tropfen in Mehrphasensystemen mit segmentiertem Fluss (*segmented flow*). Mikrofluidische Kanäle erlauben das definierte Erzeugen von Tropfen in kontinuierlichen Phasen. Dies kann durch apolare Tropfen in polaren Flüssigkeiten oder Flüssigkeiten in Gasen sowie jeweils umgekehrt erreicht werden. Der Hauptvorteil des segmentierten Flusses ist, dass jeder Tropfen ein eigenes Kompartiment darstellt. Somit können eine Vielzahl an Reaktionen wie die Amplifikation von DNA [29] oder die Synthese von Nanopartikeln [30] parallel und räumlich getrennt voneinander durchgeführt werden. Die Verweilzeit der einzelnen Tropfen im Mikroreaktor ist dabei äußerst eng verteilt und der fehlende Kontakt mit der Innenwand verhindert das Ablagern von Feststoffen wie Nanopartikel oder Zellen. Trotzdem existieren Reibungskräfte zwischen den Tropfen und der Kanalwand. Diese erzeugen im Tropfeninneren eine Konvektion (Abbildung 6-3) und verbessern das Durchmischen. Werden die Tropfen zusätzlich durch eine Mäanderstruktur geleitet, erfolgt eine alternierende Umkehrung der internen Konvektion um 90° (Abbildung 6-2), was die Tropfen nach dem Streck- und Faltprinzip durchmischt. Durch das Mehrphasensystem ist jedoch ein erhöhter Aufwand durch mehr Pumpen, den Einsatz von Tensiden und einem anschließenden Separationsprozess der Phasen notwendig.

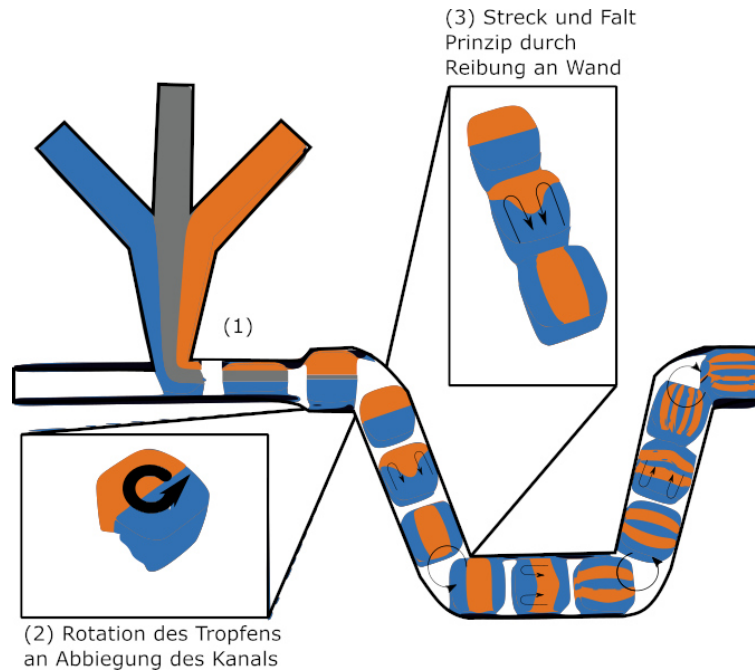


Abbildung 6: Prinzip der Erzeugung eines segmentierten Flusses im mikrofluidischen Kanal (1) zur Durchmischung von drei Flüssigkeit durch innere Rotation (2) und Konvektion (3).

Um geringe Diffusionslängen ohne turbulente Strömung, ohne segmentierten Fluss oder auch in vergleichsweise größeren Kanalstrukturen zu erzeugen, kann das aus der Durchflusszytometrie bekannte Konzept der hydrodynamischen Fokussierung verwendet werden. Das Prinzip beruht auf dem Erzeugen eines sehr dünn fokussierten Fluidikstroms in einem Hüllstrom mit höherer Flussrate [31]. Die Dicke des dünnen Probenstroms kann durch die relative Flussrate zum Hüllstrom eingestellt werden. Es kann somit ein sehr dünner Probenstrom erzeugt werden. Diffusionszeiten werden deutlich verkürzt und die notwendige Zeit zum Durchmischen ist nur von der Dicke des Probenstroms w_f und des Diffusionskoeffizienten abhängig [31]:

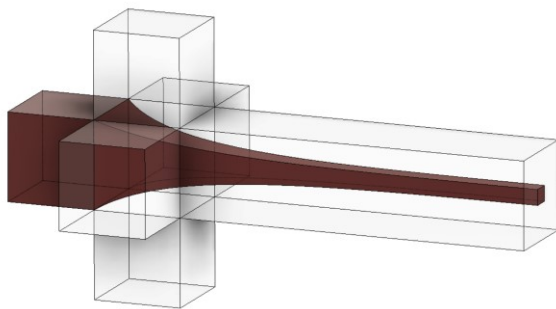
$$t_{mix} = \frac{w_f^2}{2D} = \left(\frac{w_f}{l}\right)^2 \tau_{conv} Pe \quad (7)$$

Zusätzlich beschränkt sich das Probevolumen durch die Fokussierung auf das Innere des Flusskanals und ist räumlich weitgehend von den Wänden des Kanals getrennt [31]. Der Probenstrom wird somit weniger vom parabolischen Flussprofil verzerrt. Dies ist besonders effektiv, wenn die Fokussierung dreidimensional durchgeführt wird. Dabei wird sowohl von beiden Seiten als auch von oben und unten ein Hüllstrom in den Hauptkanal eingespeist. Dadurch können einheitliche Verweilzeiten in mikrofluidischen Systemen erhalten werden. Die komplette räumliche Trennung des Probenstroms

von den Kanalwänden bei der 3D-hydrodynamischen Fokussierung bietet außerdem den Vorteil, dass Ablagerungen an den Reaktorwänden vermieden werden können. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn der mikrofluidische Kanal zur Synthese von Feststoffen wie Nanopartikel verwendet wird. Trotz der vielen Vorteile der dreidimensionalen hydrodynamischen Fokussierung werden bei vielen Anwendungen aber immer noch zweidimensionale Strukturen aufgrund ihrer viel einfacheren Herstellungsweise bevorzugt [31].

Zahlreiche mikrofluidische Strukturen zur 3D-hydrodynamischen Fokussierung sind publiziert. Dabei kann zwischen planaren Strukturen (Abbildung 7-B) und coaxialen Kapillarstrukturen (Abbildung 7-A) unterschieden werden. Coaxiale Kapillarstrukturen bestehen aus zwei konzentrischen Kapillaren, die ineinandergesteckt sind. Durch die innere Kapillare kann ein Strom in das Innere des Stroms der äußeren Kapillare fokussiert werden [30, 32]. Die intuitivste planare Struktur besteht aus einem dreidimensionalen T-Mischer (Abbildung 7-A).

(A)



(B)

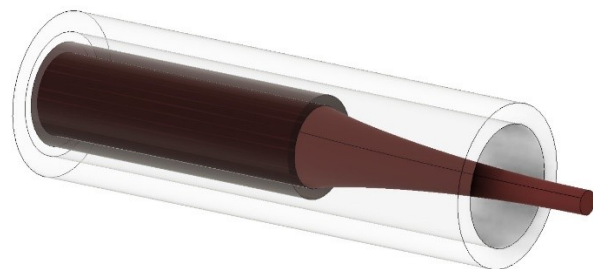


Abbildung 7: Mikrofluidische Strukturen zur 3D-hydrodynamischen Fokussierung. Dreidimensionaler T-Mischer mit innerem Probenstrom und vier Zuläufen (A) und coaxiale Struktur mit innerem Probenstrom und einem Zulauf für den Hüllstrom(B).

Sowohl seitlich als auch von oben und unten werden Hüllströme zugeleitet, sodass der Probenstrom dreidimensional fokussiert wird [33-35]. Der Aufbau der Struktur muss aufgrund der Zuleitungen aus allen drei Raumrichtungen aus mehreren Lagen aufgebaut sein. Zusätzlich müssen die Lagen präzise aufeinander ausgerichtet sein. Um die Anzahl der Lagen zu verringern, existieren Lösungen, die das Fokussieren des Probenstroms in mehreren Schritten durchführen. Eine Möglichkeit ist, den Probenstrom zuerst vertikal durch zwei aufeinanderfolgende Einlässe zu fokussieren und dann die horizontale Fokussierung durchzuführen [36]. Eine Darstellung dieser Methode ist in Abbildung 8 gezeigt. Diese Konzepte zur 3D-hydrodynamischen Fokussierung erfordern jedoch fünf Einlässe und somit auch fünf Pumpen.

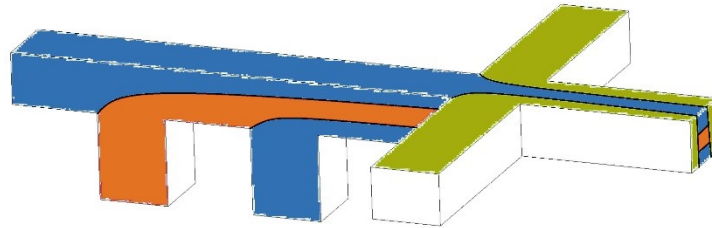


Abbildung 8: Prinzip zur 3D-Fokussierung mit weniger Lagen als beim 3D-T-Mischer. Zuerst erfolgt das vertikale Fokussieren und danach das horizontale Fokussieren.

Eine Möglichkeit die Anzahl der Lagen und auch Einlässe zu verringern, basiert auf der Verwendung von Dean-Strömungen in gezielt gekrümmten und strukturierten Kanälen [37]. Dean-Strömungen treten bei stark gekrümmten Kanälen und Rohren auf. Da unter laminaren Bedingungen die Strömungsgeschwindigkeit im Inneren des Kanals höher ist, wird durch die höhere Zentrifugalkraft das Fluid aus dem Inneren an die Wand gedrückt und das langsamer fließende Fluid von der Außenwand verdrängt. Das verdrängte Fluid fließt oberhalb und unterhalb zurück, was die typischen gegenläufigen Wirbel erzeugt. Die Dean-Zahl De kann verwendet werden, um abzuschätzen, ab wann sich Wirbel bilden.

$$De = Re \sqrt{\frac{s}{2r}} \quad (8)$$

Dabei ist r der Radius der inneren gekrümmten Fläche und s der Abstand der beiden gekrümmten Flächen zueinander. Im mikrofluidischen Kanal wird zur 3D-Fokussierung mit Hilfe von Dean-Strömungen ein Probenstrom und ein Hüllstrom zuerst parallel laminiert. Beim Durchfließen eines eng gekrümmten Kanals entstehen Dean-Strömungen, welche den sich innen befindenden Probenstrom vertikal fokussieren. Die horizontale Fokussierung wird danach durch einen T-Mischer durchgeführt [38, 39]. Der Nachteil ist, dass die Struktur nur für eine bestimmte Flussgeschwindigkeit und ein Mischungsverhältnis von Proben- und Hüllstrom optimiert ist und somit wenig Flexibilität beim Betrieb herrscht. Dean-Strömungen können weiters durch eine Vielzahl an Strukturierungen erzeugt werden. Ein dreidimensionales Fokussieren ist dadurch auch ohne horizontales Fokussieren durch einen T-Mischer möglich, was die Anzahl von Zuflüssen weiter reduziert. Dies wurde an geschickt angeordneten Kontraktions- und Expansionszonen [40] und einer Anordnung von Rillen und Grätenstrukturen demonstriert [41-43].

Schlussendlich hängt die Art der verwendeten Mischstruktur von der jeweiligen Anforderung und Anwendung ab. Zusätzlich ist entscheidend, ob die zur Verfügung stehenden Fabrikationsmethoden und Materialien für die jeweilige Struktur geeignet sind.

2.1.3. Herstellungsmethoden von mikrofluidischen Strukturen

Materialien und Herstellungsmethoden für mikrofluidische Strukturen sind ebenfalls zahlreich beschrieben und werden im Folgenden zusammengefasst.

In den Anfängen mikrofluidischer Anwendungen in den 1990er-Jahren wurden die mikrofluidischen Aufbauten meist aus Glas oder Silizium hergestellt [44]. Zur Herstellung mikrofluidischer Kanalstrukturen werden hauptsächlich lithographische Methoden aus der Herstellung elektronischer Mikrochips verwendet [45, 46]. Dabei wird mit Hilfe einer Maske die Kanalstruktur subtraktiv oder additiv hergestellt. Dazu wird auf das Substrat zunächst eine dünne Schicht eines Fotolacks aufgetragen und durch Belichtung mit einer Maske selektiv ausgehärtet (Abbildung 9-A). In Abhängigkeit des verwendeten Fotolacks werden nur belichtete (negativer Fotolack, Abbildung 9-D) oder nur unbelichtete (positiver Fotolack, Abbildung 9-B) Stellen ausgehärtet und die restlichen Stellen durch ein geeignetes Lösemittel entfernt (Abbildung 9-C und Abbildung 9-F).

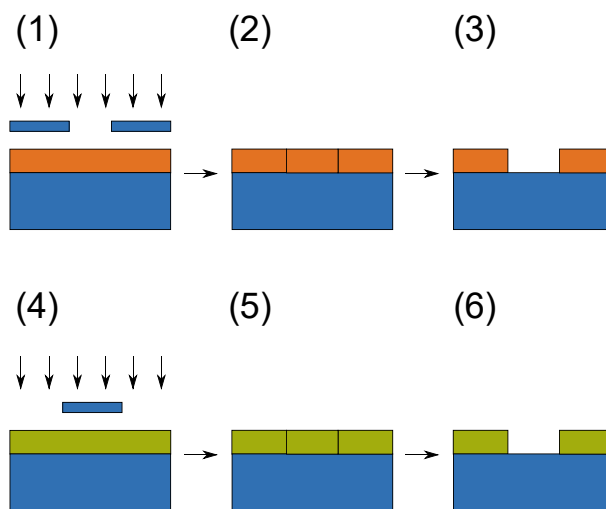


Abbildung 9: Lithografisches Herstellen von mikrofluidischen Kanälen. Positiver Fotolack wird durch eine Maske belichtet (1) und dabei härtet nur die unbelichtete Stelle aus (2), der Rest wird entfernt (3). Beim negativen Fotolack (4) härtet die belichtete Stelle aus (5) und der Rest wird entfernt.

Zum Übertragen der Kanalstruktur auf des Substrat kann diese trocken (z.B. durch Ionen- oder Laserbestrahlung im Hochvakuum) oder nass (z.B. mit Flusssäure) in das Substrat geätzt werden [47]. Durch Bedampfung mit Metallen oder Polymeren können die Kanalstrukturen additiv auf das Substrat übertragen werden. Nach dem Übertragen der Kanalstruktur wird bei beiden Methoden der

ausgehärtete Fotolack wieder entfernt. Die anfängliche Beliebtheit von Silizium und Glas geht hauptsächlich auf die damalige Verfügbarkeit von Herstellungsmethoden von Kanalstrukturen mit der notwendigen Auflösung zurück. Glas ist chemisch inert und gasundurchlässig. Die Oberfläche von Glas und Silizium kann mit Hilfe von Silanen modifiziert werden. Somit finden Kanäle aus Glas und Silizium heute meist Anwendung, wenn ein hohes Maß an chemischer Stabilität und Robustheit notwendig ist. Eine Vielzahl an mikrofluidischen Strukturen aus Glas kann über kommerzielle Anbieter wie Micronit (Deutschland) oder Invenios (USA) bezogen werden.

Heutzutage werden meist Polymere aufgrund ihrer einfacheren Handhabung während der Herstellung von mikrofluidischen Strukturen genutzt. Im akademischen Umfeld ist Polydimethylsiloxan (PDMS) das am meisten genutzte Polymer [22]. Zur Herstellung wird flüssiges PDMS in eine Form gegossen und gehärtet. Die Form enthält ein Negativ der Kanalstruktur und wird wie bei Glas durch lithografische Methoden oder auch maschinell (z.B. durch Fräsen, Laser-Ablation, 3D-Drucken) hergestellt. Das weich ausgehärtete PDMS lässt sich leicht entformen, weswegen die Form mehrfach verwendet werden kann. PDMS-Oberflächen können ebenfalls durch Silane modifiziert werden [48]. Jedoch sind die Modifizierungen oft nur kurze Zeit stabil, sodass hydrophobe Moleküle leicht an Kanaloberflächen adsorbieren. Außerdem lässt die hohe Gas- und Wasserpermeabilität, geringe Druckresistenz und schlechte Resistenz gegenüber vielen Lösemitteln fast keine kommerziellen Anwendungen zu [45].

Alternativ werden daher thermoplastische Polymere zur Herstellung mikrofluidischer Strukturen verwendet. Es kann aus einer Vielzahl unterschiedlicher verfügbarer Materialien gewählt werden. Diese verfügen über unterschiedliche Eigenschaften wie chemische Resistenz, Oberflächeneigenschaften und Funktionalisierbarkeit, optische Eigenschaften und Permeation von Gasen und kleinen Molekülen. Die am häufigsten verwendeten Materialien sind Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonat (PC), Polystyrol (PS) und Cycloolefin-Copolymer (COC) [22].

Durch Fabrikationsmethoden, wie das Heißprägen oder Spritzgießen, ist das günstige Produzieren großer Stückzahlen möglich [45]. Durch stark wachsende Verfügbarkeit von mikromaschinellen Bearbeitungsmethoden, wie Fräsen, verwenden eines Schneideplotters oder Laser-Schneiders und 3D-Drucken, ist auch das Produzieren kleiner Stückzahlen oder Prototypen aus thermoplastischen Kunststoffen möglich. Entworfenen Strukturen können wiederum von kommerziellen Anbietern wie Acamp (Kanada), Microfluidic ChipShop (Deutschland), Aline (USA) und Epigem (GB) auf Kundenwunsch gefertigt werden [45].

Ein weiterer Vorteil von thermoplastischen Polymeren ist die große Verfügbarkeit an dünnen Folien. Zusätzlich zu den in dickeren Stärken eingesetzten Polymeren werden vor allem auch Folien aus

Polyethylen (PE), Polypropylen (PP) und Polyethylenterephthalat (PET) verwendet. Mikrofluidische Produkte aus dünnen Folien sind vor allem für preisgünstige Einweganwendungen interessant [49]. Die geringe Materialdicke hält die eingesetzte Materialmenge und Kosten gering. Fertigungsverfahren aus der Verpackungsindustrie, wie Thermoformen, Heißrollenprägen oder Laminieren mehrerer Folien, lassen sich auch auf die Massenproduktion mikrofluidischer Produkte anwenden [46]. Beim Thermoformen wird eine erhitzte Folie in eine starre Form gepresst. Der Raum zwischen Folie und Form wird dazu evakuiert. Zusätzlich kann auf der anderen Seite ein Überdruck angelegt werden. Kontinuierlich können Folien mit der Heißrollenprägung strukturiert werden. Dabei wird ein strukturierter Zylinder gegen einen flachen Zylinder gepresst und die Folie hindurch gewalzt. Dadurch können schnell große Flächen strukturiert werden.

Thermoformen und Heißrollenprägung erfordern hohe Investitionen für die notwendigen Maschinen. Ebenfalls muss für jede Struktur eine neue Form gebaut werden. Dadurch sind diese Methoden für Kleinserien und Prototypen ungeeignet. Durch Laser-Ablation können Oberflächen direkt ohne Form strukturiert werden. Für sehr feine Strukturen kann zusätzlich eine Maske aus Photolack aufgebracht werden. Die Ablationstiefe kann durch die Anzahl an Laserpulsen pro Fläche variiert werden [50]. Zusätzlich können Kanäle durch komplettes Durchschneiden einer Folie und Laminieren zwischen zwei Deckfolien erzeugt werden. Durch das Laminieren mehrerer Folien sind so auch 3D-Kanalstrukturen möglich. Das Durchschneiden kann ebenfalls mit Laserschneidern oder Schneideplottern erfolgen. Dieses Verfahren ist hauptsächlich aus der Grafikindustrie bekannt. Dabei werden bunte Klebefolien für Beschriftungen und Werbung zugeschnitten. Die verwendeten Schneideplotter erzielen mechanische Auflösungen von 0,005 mm und können auch zum Schneiden von Folien für mikrofluidische Anwendungen verwendet werden [51]. Dabei ist das Verfahren unter dem Begriff „Xurografie“ (*Xurography*) bekannt [52].

Neben der Herstellung der Kanalstruktur ist das Deckeln der Kanäle und das Verbinden mit Schläuchen zum Fördern von Reagenzien und Analyten eine der größten Herausforderungen der Mikrofluidik [45]. Je nach verwendetem Material gibt es unterschiedliche Methoden, Kanalstrukturen zu verschließen. Erste mikrofluidische Strukturen aus Silizium wurden aufwändig durch eine Kombination aus anionischen und Si-Si *Fusionbonding* mit Glas verschlossen [53]. Ähnlich kann auch Glas mit Glas verbunden werden. Wie bereits zur Herstellung mikrofluidischer Strukturen aus Silizium und Glas sind die Verfahren zum Verschließen sehr aufwändig und erfordern sehr hohe Temperaturen. Andere Verfahren nutzen Flusssäure, sehr hohen Druck oder eine O₂/CF₄ Plasma-Behandlung der Oberfläche, um Kanal und Deckel zu verbinden. Die Verfahren funktionieren bei niedrigeren Temperaturen, jedoch sind spezielle Werkzeuge und Apparaturen, Chemikalien mit gefährlichen Eigenschaften und ebenfalls extrem saubere Oberflächen und Arbeitsumgebungen notwendig.

Das zum Erstellen von Prototypen verwendete PDMS haftet an sich selbst. So können Kanäle durch Verpressen mit einer glatten PDMS-Schicht reversibel verschlossen werden. Um Kanäle permanent zu verschließen, kann die Oberfläche durch ein O_2 -Plasma vorbehandelt und während dem Verpressen erhitzt werden. Hydroxylgruppen an den jeweiligen Oberflächen kondensieren unter Abspaltung von H_2O und bilden eine Si-O-Si Bindung aus. Ebenfalls eignen sich Glas und Silizium zum Verschließen von PDMS-Strukturen mit dieser Methode. Zusätzlich zu diesen Standardmethoden sind zahlreiche Verfahren publiziert, um PDMS mit unterschiedlichsten Materialien zu verschließen. Meist werden Polymere dazu mit Organosilanen funktionalisiert und analog zu Glas oder Silizium mit PDMS verbunden [54]. Wichtige thermoplastische Kunststoffe lassen sich so auch untereinander verbinden. Aufgrund des zusätzlichen Aufwands der Oberflächenfunktionalisierung werden mikrofluidische Kanäle aus thermoplastischen Kunststoffen meist direkt verschweißt. Dazu werden Kanal und Deckel nahe ihrer Glasübergangstemperatur erhitzt und verpresst. Probleme können jedoch bei fragilen Kanalstrukturen oder dem gegenseitigen Verpressen von unterschiedlichen Materialien entstehen. Dann eignet sich das Lösemittelschweißen besser. Dazu werden die Oberflächen in einem geeigneten Lösemittel in flüssiger oder gasförmiger Phase ausgesetzt. Die Oberfläche quillt dadurch mit dem Lösemittel an. Nach dem Verbinden der beiden Oberflächen können sich gequollene Polymerketten ineinander verhaken und nach dem Abdiffundieren der Lösemittel fest verbinden. Der gleiche Effekt kann durch lokales Erhitzen der Oberflächen beim Verpressen erzielt werden. Dies kann durch Laser oder Mikrowellen sowie auch durch Ultraschall geschehen.

Aufwändige Oberflächenmodifizierungen, die Notwendigkeit spezieller Werkzeuge oder Apparaturen, extrem saubere und staubfreie Oberflächen und Arbeitsumgebungen und die Ähnlichkeit von Kanal- und Deckelmaterial schränken die Anwendung der bis hier beschriebenen Verfahren jedoch ein. Die Verwendung von Klebstoffen stellt eine der wichtigsten Alternativen dar. Eine Vielzahl verfügbarer Klebstoffe mit unterschiedlichen Aushärtemechanismen lassen das Verkleben verschiedener Materialien bei Raumtemperatur zu. Im Normalfall wird eine dünne Schicht des Klebstoffes aufgetragen. Ausgehärtet werden die Klebstoffe hauptsächlich durch Abdampfen enthaltender Lösemittel, Kreuzvernetzung durch UV-Licht oder dem Vermischen mit einem reaktiven Härter. Um ein Ausfließen in die Kanalstruktur zu verhindern, wird die Kanalstruktur oft zuerst wie ein Stempel auf eine dünne Klebstoffschicht eines Hilfsmaterials gedrückt und anschließend mit dem Deckel verklebt [55].

Die Verwendung von Klebebändern ist eine der einfachsten Methoden zum Verschließen mikrofluidischer Strukturen. Hersteller wie 3M oder Adhesive Research bieten Klebebänder in zahlreichen Stärken und Klebstoffen mit engen Toleranzen der Klebstoffschichtdicke sowie medizinischer Qualität an. Dabei ist zwischen Klebstofftransfer-Filmen und eigentlichen Klebebändern

zu unterscheiden. Bei Klebstofftransfer-Filmen handelt es sich um eine einheitliche Schicht an Klebstoff, während bei Klebebändern zusätzlich eine Folie den Klebstofffilm stabilisiert. Der allgemeine Aufbau ist in Abbildung 10 gezeigt.

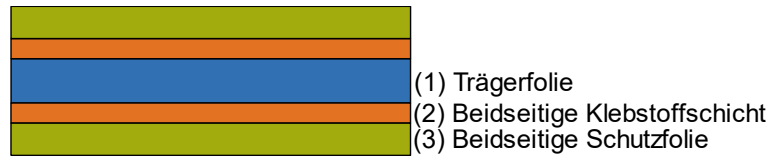


Abbildung 10: Darstellung des Aufbaus von doppelseitigen Klebefolien. Die zentrale Trägerfolie (1) ist beidseitig mit Klebstoff (2) beschichtet der wiederum durch eine leicht abziehbare Schutzfolie (3) bedeckt ist.

Bei doppelseitigen Klebebändern sind Klebstofffilme (Abbildung 10-1) beidseitig von der Stabilisierungsfolie (Abbildung 10-2) aufgetragen. Die meisten Klebstoffe sind drucksensitive Klebstoffe, die nach dem Verpressen durch Van-der-Waals Kräfte haften. Es gibt auch Klebebänder mit UV-Licht- oder Wärme-härtenden Klebstoffen. Bis zur Anwendung wird der Klebstofffilm durch eine leicht abziehbare Schutzfolie (*liner*) (Abbildung 10-3) geschützt.

Obwohl Klebebänder allein zum Verbinden von Kanal und Deckel verwendet werden können, eignen sich diese auch besonders zum Aufbau der Kanalstruktur. Wie Polymerfolien können auch Klebebänder und Kanäle in Klebebänder direkt mit Laserschneidern oder Schneideplottern eingeschnitten werden. Somit können Entwurfsänderungen sehr schnell umgesetzt werden. Der Zusammenbau der mikrofluidischen Struktur wird zusätzlich beschleunigt, da das separate Auftragen eines Klebstoffs entfällt. Diese Herstellungsmethode ist somit zum schnellen Erstellen und Entwickeln von Prototypen geeignet. Am IWC werden so Flusszellen für flussbasierte Mikroarray-Immunoassays aus doppelseitigem Klebeband hergestellt [56, 57]. Die Kanäle sind maximal 8 mm breit, haben eine Länge von 65 mm und werden mit einem Laserschneider in das Klebeband geschnitten. Kleinere Auflösungen sind ebenfalls möglich und wurden von Islam et al. in 2015 detailreich untersucht [51]. Gerade Kanäle bis zu einer minimalen Breite von 200 μm sowie freistehende Strukturen mit einer minimalen Größe von 300 μm waren möglich. Da viele mikrofluidische Anwendungen nicht die Auflösung von Fabrikationsmethoden für Mikrochips benötigen, die im Bereich von Zehntel bis Hundertstel eines Mikrometers liegen, hat sich die Xurografie auch zur Massenproduktion mikrofluidischer Strukturen bewährt [52].

Zahlreiche mikrofluidische Aufbauten wurden bisher aus Klebeband realisiert, darunter Ventile [58], 3D-Mischer aus mehrlagigen Strukturen [59] und Aufbauten in Kombination mit Origami-Techniken [60].

2.1.4. Mikroreaktoren zur Synthese von Nanomaterialien

Im Zuge dieser Arbeit wurden Mikroreaktoren zur Synthese magnetischer Nanopartikel aus doppelseitigem Klebeband konstruiert und eingesetzt. Mikroreaktoren zur chemischen Synthese stellen den geringsten Anteil an allen mikrofluidischen Systemen dar [10]. Dabei beschränken sich einerseits die hergestellten Stoffe meist auf organische Verbindungen, wie pharmazeutische Wirkstoffe, sowie Nanomaterialien oder Spezialpolymere. Andererseits werden sie zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen, zum Ermitteln von Reaktionskinetiken oder zur Optimierung von Reaktionsbedingungen eingesetzt [4]. Der geringe Durchsatz aufgrund der geringen Flussraten stellt den limitierenden Faktor dar. Trotzdem eignen sich Mikroreaktoren für die verteilte Fertigung (*distributed manufacturing*) von pharmazeutischen Wirkstoffen [2] oder Feinchemikalien [4], von denen nur geringe Mengen gebraucht werden. Um den Durchsatz zu erhöhen, besteht ein Ansatz darin, eine Vielzahl an Mikroreaktoren parallel einzusetzen [61]. Dabei bedarf es jedoch auch einer Vielzahl an Pumpen oder genauer Kontrolle des Druckverlustes beim Aufteilen von Reaktandenströmen [62]. Um dies zu vermeiden, kann die Querschnittsfläche des Kanals des Mikroreaktors in eine Dimension erweitert werden. Massen- und Wärmetransport bleiben dadurch annähernd konstant, jedoch kann durch den größeren Querschnitt die Flussrate und somit der Durchsatz gesteigert werden [4].

Der Einsatz von Mikroreaktoren zur Synthese von Nanomaterialien erlaubt in der Regel bessere Kontrolle und konstantere Bedingungen wie Konzentrationen der Reaktanden, Temperatur und Druck. Somit können Nanopartikel mit einheitlicherer Größe, Form und Zusammensetzung als im Batch-Verfahren hergestellt werden [3, 63]. Die kontinuierliche Synthese bietet die Möglichkeit zum Einbinden von analytischen Methoden zur Kontrolle dieser Eigenschaften der Nanopartikel [63]. Optische Methoden zum Messen von Absorption oder Fluoreszenz werden vielfach eingesetzt [3]. Diese Methoden eignen sich besonders zur Analyse der Größe und Oberflächenbeschaffenheit von Quantenpunkten (*quantum dots*). Neben der Kontrolle der Reaktionsbedingungen können die Messdaten auch zur Optimierung eingesetzt werden. So optimierten Krishnadasan et al. 2004 die Fluoreszenzeigenschaften von CdSe Quantenpunkten mit einem automatischen Algorithmus [64]. Darauf folgend wurden auch Optimierungsalgorithmen mit künstlichen neuronalen Netzwerken zur Vorhersage von Reaktionsbedingungen eingesetzt [65]. Speziell zur Synthese von organischen Verbindungen wurden Messmethoden mit höherem qualitativem Informationsinhalt mit Mikroreaktoren gekoppelt. So koppelten Schwolow et al. 2015 ein Raman-Spektrometer für kinetische Studien während der kontinuierlichen Synthese von 3-Piperidino-Propionsäureethylester [66]. Ebenfalls wurden organische Reaktionen durch Koppeln mit FTIR-Spektrometern [67], Massenspektrometern [68] sowie Kernspinresonanzspektrometer [69] optimiert. Zur einfacheren

Integrierbarkeit sind jedoch vor allem miniaturisierte analytische Systeme notwendig [4], um komplett eigenständige Systeme aufbauen zu können [1, 2].

Der Hauptnachteil bei der Synthese von Nanomaterialien in Mikroreaktoren liegt in der Handhabung von Feststoffen. Durch das hohe Verhältnis von Oberfläche zu Volumen kommt es leicht zur Ablagerung von Partikeln. Dies kann das Strömungsverhalten ändern oder den Kanal komplett verstopfen [3]. Dieses Problem wird hauptsächlich durch zwei Varianten gelöst. Einerseits kann die Synthese der Nanopartikel in einzelnen Kompartimenten im segmentierten Fluss ablaufen. Die zusätzliche Phase trennt das Kompartiment von der Kanaloberfläche und verhindert so das Ablagern von Partikeln [30]. Andererseits können die hergestellten Nanopartikel durch dreidimensionale hydrodynamische Fokussierung von der Kanaloberfläche getrennt werden [36].

2.1.5. Mikroarrays

Neben Mikroreaktoren können auch Mikroarrays auf Folien hergestellt werden. Am IWC (Institut für Wasserchemie) wurden bereits zahlreiche Anwendungen von flussbasierten Mikroarray-Assays demonstriert. Dabei wurden Antibiotika [17], Proteine [18], Mikroorganismen [8] und Viren [19] analysiert und dazu kleine organische Moleküle, Antikörper oder DNA immobilisiert. Als Reportersystem dient die Chemilumineszenz von Luminol/H₂O₂, welche durch Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase* – HRP) katalysiert wird. Die Auslesung erfolgt über eine CCD-Kamera auf der automatisierten Analyseplattform *Microarray Chip Reader* (MCR). Diese Analyseplattform verfügt zusätzlich über automatisch gesteuerte Pumpen und Ventile zum Fördern von Reagenzien, Analyten und Puffern.

Bisher wurde am IWC Glas als Substrat zur Herstellung von Mikroarrays verwendet [8, 17, 19, 20, 70]. Die Oberfläche des Substrats muss so beschaffen sein, dass einerseits eine hohe Dichte an Fängermolekülen in definiertem Raster immobilisiert werden kann, andererseits muss die unspezifische Bindung an Stellen zwischen den Spots minimiert werden [71]. Damit sich Glas zur Herstellung von Mikroarrays eignet, ist ein mehrstufiger nasschemischer Prozess zur Funktionalisierung der Oberfläche notwendig, um diese Eigenschaften zu erhalten [20, 72-74]. Der am IWC verwendete Prozess zur Oberflächenfunktionalisierung von Glas zur Herstellung von Mikroarrays ist in Tabelle 1 zusammengefasst [8, 17, 19, 20, 70].

Tabelle 1: Darstellung der Prozessschritte zur Herstellung von analytischen Mikroarrays auf Glaträgern.

	Prozessschritt	Zweck / Nachteil	Zeit
1	Waschen der Oberfläche	Entfernen von Fett und Staub mit Reinigungslösung	18 h
2	Anätzen der Oberfläche mit HCl/MeOH und H ₂ SO ₄	Vorbehandlung zur Silanisierung der Oberfläche / Große Mengen and Säure- und Lösemittelabfall	3 h
3	Silanisierung	Einführung von Epoxygruppen zum Immobilisieren von <i>Jeffamine</i> / Raum mit kontrollierter Feuchtigkeit notwendig, große Mengen an EtOH- und MeOH-Abfällen	4 h
4	Beschichtung mit <i>Jeffamine</i> ® ED-2003, waschen der Oberfläche	<i>Jeffamine</i> vermindert unspezifische Bindung und erlaubt das Immobilisieren von Fängermolekülen	17 h
5	Aktivierung der Aminogruppen	Chemische Aktivierung mit <i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat in trockenem DMF	5 h
6	Mikrodosierung von Fängermolekülen und inkubieren	Immobilisierung von Fängermolekülen in strukturiertem Mikroarray	18 h
7	Blocken	Deaktivierung der funktionellen Gruppen mit TRIS-HCl, um unspezifische Bindung zu minimieren	1h

Die zahlreichen Prozessschritte stellen einen großen Arbeitsaufwand dar. Gepaart mit langen Inkubationszeiten dauert die Herstellung bis zu 66 h und muss somit über vier Arbeitstage verteilt werden. Für mehrere Funktionalisierungsschritte sind außerdem starke Säuren und organische Lösemittel notwendig. Der hohe Verbrauch verursacht hohe Kosten, generiert Abfall und erfordert das Arbeiten in einem Abzug.

Die Verwendung von Polymeren zur Herstellung von Mikroarrays stellt eine vielversprechende Alternative zu Glas dar [15].

Um unspezifische Bindungen aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen mit der Polymeroberfläche zu verhindern, ist trotzdem eine Oberflächenfunktionalisierung der Polymeroberfläche notwendig. Häufig werden die Polymeroberflächen mit Sauerstoffplasma behandelt, um diese hydrophiler zu machen und die unspezifische Bindung zu verringern [75-77]. Problematisch ist jedoch, dass durch die Plasmabehandlung oft eine Vielzahl an funktionellen Gruppen

auf der Oberfläche generiert wird [78], was ein definiertes Immobilisieren von Fängermolekülen erschwert.

Eine Beschichtung mit wasserlöslichen Polymeren wie Aminodextran [79] oder Polyethylenglycol (PEG) [73, 74] kann ebenfalls die unspezifische Bindung verringern. Im Fall von Polyethylenglycol hat sich ein Molekulargewicht von 2000 g mol^{-1} als ideal herausgestellt [15]. Zur Immobilisierung eignen sich besonders funktionalisiertes Polyethylenglycol wie Diamino-PEG. Aufgrund der sehr hohen Kosten von Diamino-PEG (64 € g^{-1} [80]) kann auch das technische Jeffamine® ED-2003 als kostengünstige Alternative verwendet werden [20]. Jeffamine® ED-2003 ist ein Polyethylenglycol, welches an den Kettenenden jeweils mit einem kurzen Polypropylenglycol und einer Aminogruppe funktionalisiert ist.

Bei der Herstellung von Mikroarrays auf Glas, wird Jeffamine® ED-2003 durch Reaktion einer Aminogruppe mit der Epoxygruppe von zuvor aufgetragenem (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (GOPTS) immobilisiert [8, 17, 19, 20, 70]. Bei manchen Polymeren können aminierte Polymere auch direkt immobilisiert werden. Ein direktes Immobilisieren von *Jeffamine* auf einer PMMA-Oberfläche kann durch Aussetzen der Oberfläche gegenüber einer Lösung von Amino-PEG erreicht werden. Die aliphatische Aminogruppe reagiert dabei mit der Methylester-Gruppe der Polymethylmethacrylat-Oberfläche [81]. Eine ähnliche Technik existiert zum Funktionalisieren der Oberfläche von Polycarbonat. Durch das Aussetzen der Polycarbonat-Oberfläche gegenüber einer Dodecylamin-Lösung können äußerst hydrophobe Oberflächeneigenschaften erreicht werden [82]. Die Aminogruppen des Dodecylamins reagieren dabei mit der Carbonat-Gruppe. Die Polycarbonat-Kette wird gespalten und Dodecylamin an einer der verbleibenden Polycarbonat-Ketten durch ein Urethan immobilisiert. Das als Aminolyse bekannte Verfahren ist in Abbildung 11 gezeigt.

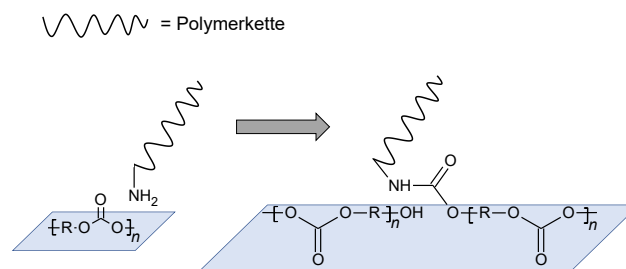


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer Aminolyse zur Immobilisierung von Aminen auf einer Polycarbonat-Oberfläche. Das Amin greift als Nukleophil das Carbonyl-C Atom an und spaltet die Polymerkette. Es resultiert ein Urethan und ein Alkohol [82].

Sehr ähnlich kann auch zum hydrophilen Modifizieren von PC-Oberflächen vorgegangen werden. Die Oberfläche wird dabei mit Aminosilanen behandelt, welche mit der Carbonatgruppe von PC reagieren. Durch anschließende Hydrolyse der Alkoxy-Gruppen können hydrophile Oberflächen geschaffen werden oder mit bekannter Glaschemie weiter funktionalisiert werden [83].

Großtechnisch werden Kunststoffoberflächen durch Pfropfpolymerisation modifiziert [84, 85]. Dieses mehrstufige Verfahren besteht aus drei Schritten. Zuerst wird ein Initiator auf der Kunststoffoberfläche adsorbiert, um Radikale auf der Oberfläche zu erzeugen. Danach wird die Oberfläche mit einem polymerisierbaren Monomer ohne Lösemittel oder in einem Lösemittel, welches geringe Löslichkeit für den Initiator aufweist, beladen. Durch Anregen des Initiators durch Bestrahlung mit UV-Licht oder Wärmeeinwirkung wird die Polymerisation gestartet. Solch funktionalisierte Mikroarrays sind kommerziell von beispielsweise der PolyAN GmbH erhältlich.

Polymere als Substrat zur Herstellung von Mikroarrays bieten den Vorteil geringer Kosten sowie geeigneter optischer Eigenschaften. Zusätzlich sind Polymere im Vergleich zu Glas einfacher maschinell bearbeitbar und können gefräst, gesägt oder mit digitalen Schneideplotter oder Laserschneider geschnitten werden. Im Falle von Polymer-Folien ist auch eine Funktionalisierung im Rolle-zu-Rolle-Verfahren (roll-to-roll, R2R) und somit eine kontinuierliche Funktionalisierung möglich [86]. Lange Inkubationszeiten zum Immobilisieren von Fängermolekülen sind jedoch beim Herstellen von Mikroarrays per R2R-Verfahren problematisch. In diesem Fall eignet sich eine Herstellungsmethode in Anlehnung an die Herstellung von elektronischen Mikrochips auf Silikon-Wafern [87]. So werden mehrere Mikroarrays auf einer Polymerplatte hergestellt und erst zum Schluss des Herstellungsprozesses vereinzelt.

2.2. Prinzipien der nuklearen magnetischen Resonanz (NMR)

Die nukleare magnetische Resonanz (*nuclear magnetic resonance* – NMR) oder auch Kernspinresonanz bildet die Basis für die NMR-Spektroskopie und die Magnetresonanztomographie (*magnetic resonance imaging* - MRI). Sie geht auf mit dem Nobelpreis belohnte Arbeiten von Isidor Isaac Rabi [88], Felix Bloch [89] und Edward Mills Purcell [90] zurück. Dementsprechend ist die dazugehörige Theorie ausgiebig beschrieben, sowohl unter quantenmechanischer als auch vereinfachter klassischer Betrachtung [91].

Im Folgenden wird auf die grundlegenden Prinzipien der NMR eingegangen und deren Messwerte sowie deren Bedeutung für die Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln und Anwendung magnetischer Nanopartikel in der analytischen Chemie beschrieben.

Nuklei mit Kernspin $I \neq 0$ besitzen ein nukleares magnetisches Moment μ , welches über das gyromagnetische Verhältnis γ des betrachteten Nukleus definiert ist:

$$\mu = \gamma I \quad (9)$$

Für die NMR-Spektroskopie sehr wichtige Nuklei sind unter anderen ^1H , ^{13}C sowie ^{31}P . In biologischen und medizinischen Anwendungen, sowie auch in dieser Arbeit, wird der Fokus auf die Nuklearmagnetresonanz von ^1H gelegt. Wasserstoffkerne besitzen mit Kernspin $I = 1/2$ zwei mögliche Orientierungen des magnetischen Moments, welche durch die magnetische Kernspinquantenzahl $m_I = +1/2$ und $m_I = -1/2$ gekennzeichnet sind. Ohne den Einfluss eines äußeren Magnetfeldes sind diese beiden Zustände entartet, sind also energetisch gleich. Durch das Anlegen eines magnetischen Feldes B_0 entsteht ein Drehmoment, welches die Spins parallel oder antiparallel zum magnetischen Feld ausrichtet. Aufgrund von thermischer Energie sind die Spins nicht perfekt mit den Feldlinien ausgerichtet und präzessieren mit der vom Magnetfeld B_0 abhängigen Larmor-Frequenz $\omega_0 = \gamma B_0$. Ebenfalls erfolgt eine Aufspaltung der Energiezustände mit Energiedifferenz ΔE . Quantenmechanisch betrachtet ist jeder Zustand eine Superposition dieser beiden Eigenzustände [91]. Bei Raumtemperatur sind die niedrigen Energiezustände bevorzugt und einer Boltzmann-Verteilung folgend besetzt. Dadurch entsteht eine Magnetisierung M_0 entlang des angelegten magnetischen Feldes (Abbildung 12-1). Die Energiedifferenz ΔE hängt von der Stärke des angelegten magnetischen Feldes ab und ist gegeben durch:

$$\Delta E = \hbar \gamma B_0 = \hbar \omega_0 \quad (10)$$

Dabei ist \hbar das reduzierte Planck'sche Wirkungsquantum und ω_0 Larmor-Frequenz der präzessierenden Spins. Ein Übergang in den energiehöheren Zustand kann somit durch Einstrahlen elektromagnetischer Wellen mit der Larmor-Frequenz erfolgen, welche meist im Hochfrequenzbereich liegt (etwa 21 MHz für ^1H Nuklei bei 0,5 T). Wird ein magnetisches Wechselfeld mit Larmor-Frequenz ω_0 quer zu B_0 angelegt, erfolgt die Präzession in Phase. Dadurch entsteht eine rotierende Magnetisierung in der x-y-Ebene (Abbildung 12-2). Folglich kippt die Magnetisierung M_0 zur Seite und rotiert um die z-Achse. Durch die Anregung erfolgt auch ein Übergang der Spins in das höhere Energieniveau und die Magnetisierung in Richtung B_0 nimmt ab. Die Auslenkung der Magnetisierung hängt von der Dauer τ des angelegten Wechselfeldes ab. Mit zunehmender Auslenkung nimmt die Magnetisierung in B_0 ab, ist gleich null, wenn beide Energieniveaus gleich besetzt sind (Abbildung 12-2) und wird in weiterer Folge negativ.

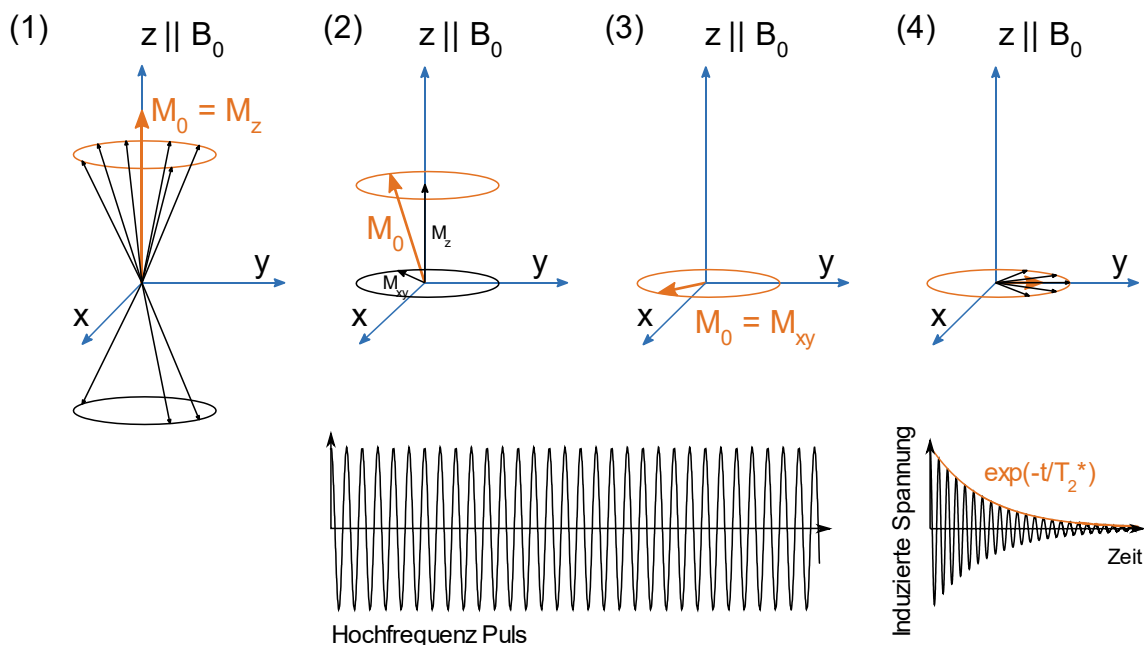


Abbildung 12: Darstellung der nuklearen Magnetisierung im Magnetfeld B_0 . Im thermischen Gleichgewicht ist die Magnetisierung M_0 parallel zu B_0 ausgerichtet (1). Ein Hochfrequenz-Puls erzeugt ein Wechselfeld senkrecht zu B_0 , M_0 präzessioniert um die z-Achse und die Magnetisierung M_{xy} in der xy-Ebene entsteht (2). Durch ein anhaltendes Wechselfeld verschwindet M_z und M_0 präzessioniert in der xy-Ebene (3). Das Wechselfeld der präzessionierenden Magnetisierung M_{xy} induziert eine Spannung, welche durch dephasierende Spins exponentiell mit der Zeitkonstanten T_2^* abnimmt (4).

2.2.1. Transversale Relaxation (T_2 -Zeit)

Zum Messen der transversalen Relaxationszeit wird die Auslenkung in der Ebene quer zu B_0 gestoppt. Die Spins rotieren in der Ebene mit ihrer Larmor-Frequenz und erzeugen ein detektierbares elektromagnetisches Signal. Durch Inhomogenitäten im Magnetfeld (welche unter anderem auch von der Anwesenheit magnetischer Nanopartikel hervorgerufen werden) unterscheiden sich auch die

einzelnen Larmor-Frequenzen, wodurch ein schnelles Dephasieren der Spins resultiert. Dies zeichnet sich in einem schnellen Signalabfall (*free induction decay* – FID) ab. Der Abfall erfolgt mit der Zeitkonstanten T_2^* (Abbildung 12-4). T_2^* hängt stark vom verwendeten Messinstrument und vor allem von der Homogenität von dem verwendeten Magneten ab.

Durch eine Spin-Echo-Sequenz kann ein Teil des FID-Signals wiederhergestellt werden. Die nach Carr und Purcell [92] sowie Meiboom und Gill [93] benannte Sequenz (CPMG-Sequenz) ist, wie in Abbildung 13 gezeigt, wie folgt aufgebaut.

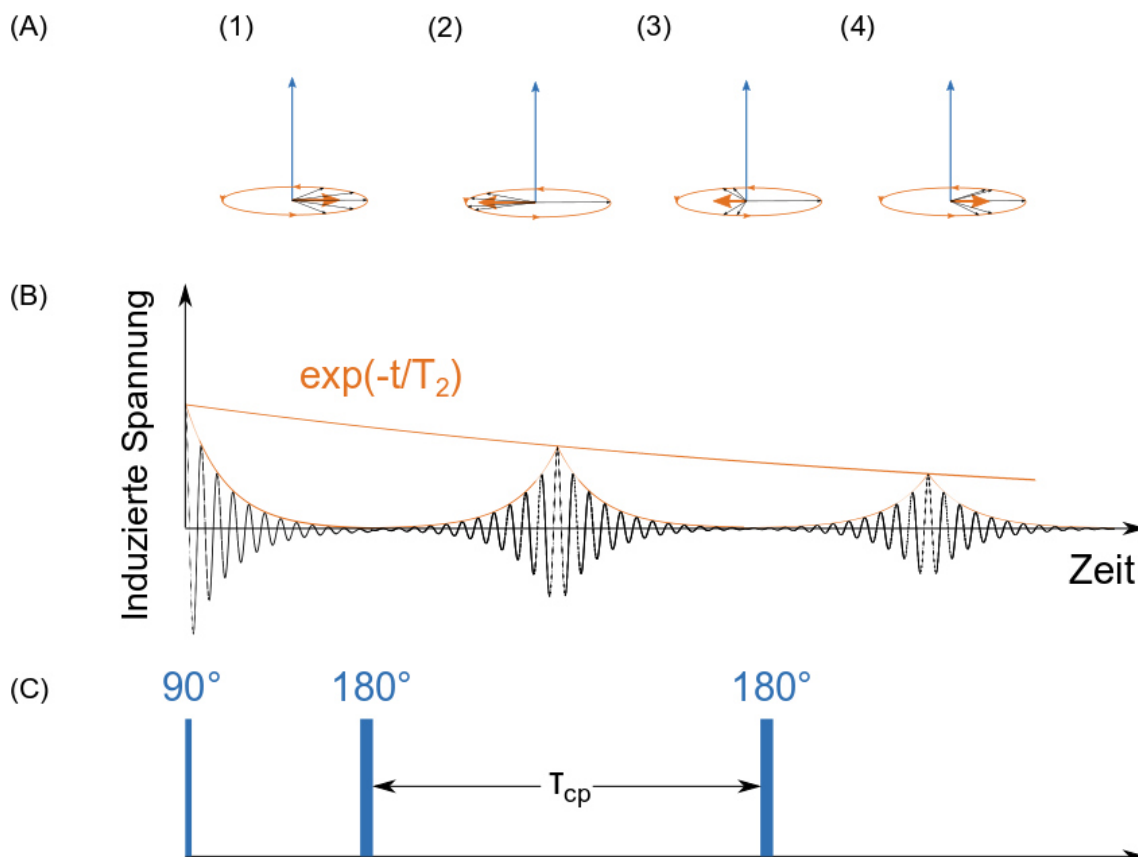


Abbildung 13: Darstellung einer Spinecho-Sequenz mit Spin-Ausrichtung (A), induzierter Spannung (B) und zeitlicher Darstellung der Puls-Sequenz (C) zur Ermittlung der transversalen Relaxationszeit T_2 . Nach 90°-Puls und schneller Abnahme der transversalen Magnetisierung M_{xy} durch FID erfolgt 180°-Puls (1). Die transversale Magnetisierung wird teilweise wiederhergestellt und als Spin-Echo detektiert (2). Der 180°-Puls und die Detektion des Spin-Echos erfolgt in regelmäßigen Abständen mit der Echozeit τ_{cp} (3). Dabei nimmt die einhüllende Funktion der Spin-Echos mit der Zeit ab (4). Die Zeitkonstante der exponentiellen Abnahme entspricht der transversalen Relaxationszeit T_2 .

Unmittelbar nach dem Signalabfall (Abbildung 13-B1) erfolgt ein Puls mit einer 180° entsprechenden Dauer (Abbildung 13-C). Ein Teil der Spins wird dadurch zurück in Phase gebracht und kann erneut detektiert werden (Abbildung 13-B2). Nach jedem Signalabfall erfolgt ein erneuter 180°-Puls in

regelmäßigen Abständen mit der Echo-Zeit τ_{CP} (Abbildung 13-C3). Durch Diffusion der Protonen und aufgrund von Feldinhomogenitäten ändert sich die jeweilige Larmor-Frequenz. Durch die zufällige Diffusion wird ein Refokussieren schwieriger. Die einzelnen Spin-Echo-Signale werden dadurch geringer und nehmen mit der transversalen Zeitkonstanten T_2 ab (Abbildung 13-B4) [94]. Superparamagnetische Nanopartikel erzeugen besonders hohe lokale Feldinhomogenitäten [95]. Diese lokal starken Feldgradienten beschleunigen das Dephasieren und verkürzen somit die transversale Relaxationszeit. Da die Interaktion von Protonenspins und magnetischem Dipol über Diffusion des Wassers im Feldgradient erfolgt, wird dieser Mechanismus auch als *outer sphere* Relaxation bezeichnet [94, 96].

Im Vergleich zu T_2^* wird T_2 weniger von makroskopischen Feldinhomogenitäten des verwendeten Magneten sondern viel mehr von Feldinhomogenität nanometrischer Größenordnung und somit von magnetischen Nanopartikeln beeinflusst [97]. Die Magnetfeldstärke selbst beeinflusst die transversale Relaxation kaum [98].

2.2.2. Longitudinale Relaxation (T_1 -Zeit)

Wird kein Wechselfeld mehr angelegt, fällt das System in sein thermodynamisches Gleichgewicht zurück. Durch den Auslenkimpuls angeregte Spin-Zustände fallen zurück in das niedrigere Energieniveau. Deren Energie wird an die Umgebung (*spin – lattice relaxation*) abgegeben. Es bildet sich wieder ein magnetisches Moment M_0 entlang des magnetischen Feldes aus. Die Wiederherstellung der longitudinalen Magnetisierung erfolgt mit der longitudinalen Zeitkonstanten T_1 . T_1 beschreibt also auch die durchschnittliche Verweilzeit eines Spins im angeregten Zustand. Aufgrund der höheren Triebkraft in stärkeren Magnetfeldern ist T_1 viel stärker von der magnetischen Feldstärke abhängig [98]. Da die Magnetisierung in Richtung des magnetischen Feldes nicht präzisiert und nach 90°-Auslenkung schnell dephasiert, kann die longitudinale Magnetisierung und deren Relaxation nicht direkt gemessen werden. Durch spezielle Pulssequenzen kann die longitudinale Relaxation jedoch indirekt ermittelt werden. Eine bekannte und für diese Arbeit verwendete Sequenz erfolgt durch Inversions-Wiederherstellung (*inversion recovery sequence – IRS*). Die Inversions-Wiederherstellung Sequenz ist in Abbildung 14 dargestellt.

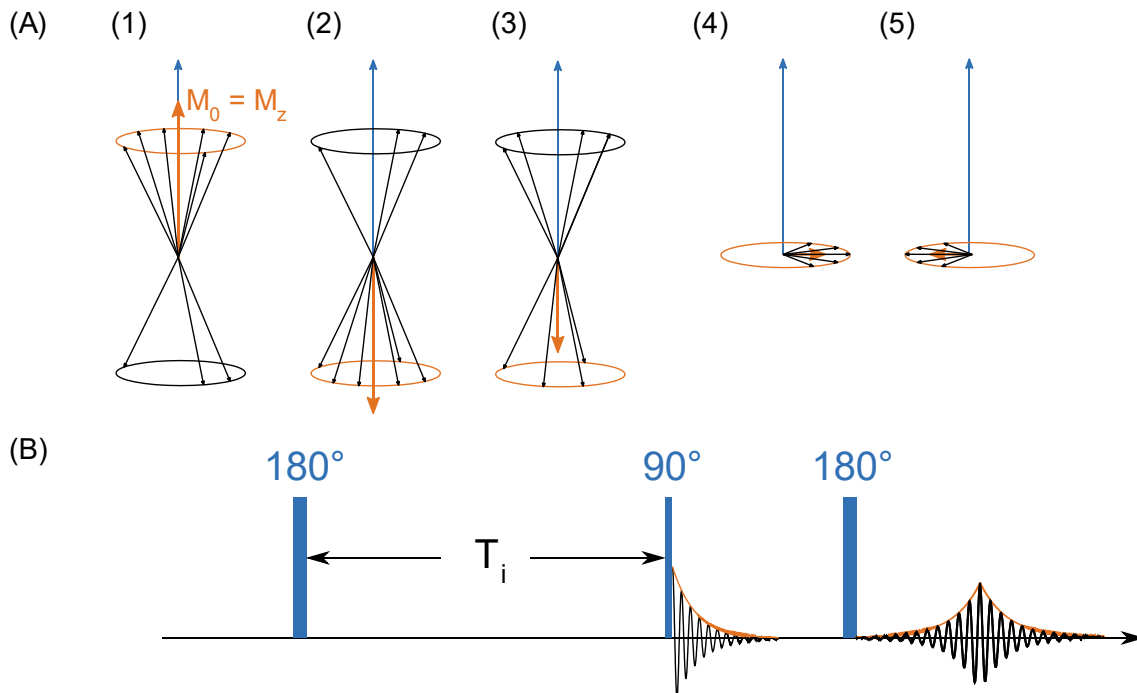


Abbildung 14: Darstellung der Inversions-Wiederherstellungssequenz zur Ermittlung der longitudinalen Relaxationszeit T_1 mit Spin-Ausrichtung (A) und Puls-Sequenz (B). Die Magnetisierung parallel zu B_0 (1) wird durch einen 180° -Puls antiparallel zu B_0 ausgerichtet (2). Die antiparallele Komponente nimmt durch den Rückgang der Spins zur parallelen Ausrichtung ab (3). Nach der Verzögerungszeit T_i erfolgt ein 90° -Puls, um M_z in xy -Ebene zu messen (4). Die Detektion erfolgt durch Spin-Echo-Sequenzen (5).

Vom Grundzustand (Abbildung 14-A1) wird ein 180° -Inversionspuls angelegt (Abbildung 14-B2). Mit zunehmender Verzögerungszeit T_i nimmt die antiparallele Komponente ab (Abbildung 14-A3). Danach wird ein 90° -Puls angelegt (Abbildung 14-B3) und die longitudinale Magnetisierung kann anhand des FIDs (Abbildung 14-B4) oder anhand der Spin-Echo-Sequenzen in der Ebene quer zum Magnetfeld gemessen werden (Abbildung 14-B5). Nach der Messung wird gewartet bis sich der Grundzustand wiederherstellt. Im Normalfall beträgt die Wartezeit (*delay*) $D = 5 T_1$. Danach wird die Messung wiederholt. Jedoch wird bei jeder Wiederholung der zeitliche Abstand (Verzögerungszeit T_i) zwischen 180° -Inversionspuls und dem folgenden 90° -Puls vergrößert. In der Ebene quer zum Magnetfeld kann dadurch der zeitliche Verlauf der longitudinalen Magnetisierung gemessen werden. Die longitudinale Relaxationszeit T_1 wird dann durch Regression mit folgendem Zerfallsmodell mit den Parametern M_0 und T_1 ermittelt:

$$M = M_0(1 - 2e^{-t/T_1}) \quad (11)$$

Im Vergleich zur transversalen Relaxation erfolgt die Beschleunigung der longitudinalen Relaxation anders. In diesem Fall basiert die Relaxation auf dem Energieaustausch der angeregten Spins mit deren Umgebung. Dies kann durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung von Protonen-Spins mit Magnetfeldfluktuation paramagnetischer Ionen geschehen. Die Magnetfeldfluktuationen werden durch die Bewegung der paramagnetischen Ionen hervorgerufen. Die Bewegungen sind auch als molekulares Taumeln (*molecular tumbling*) bekannt. Für einen effizienten Energieaustausch müssen sich die Magnetfeldfluktuationen im Bereich der Larmor-Frequenz befinden [99]. Aufgrund der geringen Reichweite der Dipol-Dipol-Wechselwirkung ist ein naher Kontakt der Wassermoleküle mit T_1 -Beschleunigern notwendig. Dies wird etwa durch Koordination von Wassermolekülen an paramagnetischen Ionen erreicht. Deshalb wird diese Form der Relaxation auch als *inner sphere* Relaxation bezeichnet. Oft verwendete paramagnetische Ionen sind Gd^{3+} oder Mn^{2+} [99-103]. Diese weisen aufgrund von sieben, respektive fünf ungepaarten Elektronen hohen Paramagnetismus auf, wodurch starke Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auftreten und ein schneller Energieaustausch stattfindet [103, 104]. Bei weniger paramagnetischen Ionen mit geringerer Anzahl ungepaarter Elektronen wie Cr^{3+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} und Co^{2+} ist dieser Effekt weniger ausgeprägt. Des Weiteren wird die Relaxation durch die Anwesenheit von Liganden, der Anzahl freier Bindestellen und der Austauschrate von Wasser sowie der chemischen Form der Ionen in Abhängigkeit des pH-Werts beeinflusst [105]. Das Binden der Ionen an große Moleküle ändert die Bewegung, deren Magnetfeldfluktuationen und folglich deren Relaxationseigenschaften [103]. Weitere Magnetfeldfluktuationen erfahren die relaxierenden Protonenspins durch die Diffusionsbewegung der Wassermoleküle [94]. Diese Art der Relaxation wird als *outer sphere* Relaxation bezeichnet und trägt in den meisten klinisch angewendeten T_1 -Beschleunigern zu etwa 40 % zur Gesamtrelaxation bei [103]. Daraus resultiert eine Zunahme der beschleunigenden Eigenschaften mit abnehmender hydrodynamischer Größe [104]. Aus diesem Grund sind auch besonders kleine (< 5-10 nm) superparamagnetische Nanopartikel zur Beschleunigung der longitudinalen Relaxation geeignet [106-109].

Paramagnetische Ionen und kleine superparamagnetische Partikel erzeugen ebenfalls Feldinhomogenitäten. Diese sind jedoch diese sehr klein. Daher wird T_2 nur zu einem geringen Ausmaß beeinflusst [95]. Anders herum zeigen zur Beschleunigung von T_2 optimierte Substanzen durch ihren größeren Durchmesser und geringere relative Oberfläche wenig Einfluss auf T_1 [110].

Generell wird der Einfluss auf die Relaxationszeiten über die Relaxivität (r) charakterisiert. Als Relaxivität wird die lineare Abhängigkeit der Relaxationsrate (R) von der Partikelkonzentration bezeichnet. Die Relaxationsrate ergibt sich aus der inversen Relaxationszeit ($R = 1/T$).

2.2.3. Einfluss von Beschichtungen magnetischer Nanopartikel auf die Relaxation

Wichtigen Einfluss nehmen die Beschichtungen der magnetischen Nanopartikel auf die T_2 - und T_1 -Zeiten [104]. So ist mitunter das Material der Beschichtung und das verwendete Molekulargewicht besonders einflussreich. Der genaue Mechanismus der Einflussnahme konnte bisher noch nicht vollends aufgeklärt werden und publizierte Effekte sind oft gegenläufig [104]. Eine Abnahme der transversalen Relaxationszeit (R_2) mit zunehmender Dicke einer SiO_2 -Beschichtung wurde 2012 deutlich durch Ye et al. und Pinho et al. gezeigt [111, 112]. Speziell im Fall von SiO_2 -Beschichtungen wirkt die Beschichtung als harte Barriere, welche die Diffusion von Wasser um den magnetischen Kern verhindert. Mit zunehmender Dicke erfahren Wassermoleküle weniger Einfluss vom magnetischen Kern und die transversale Relaxationsrate nimmt ab [113]. Im Fall von linearen Polymeren zeigte LaConte et al. 2007 ebenfalls eine Abnahme der transversalen Relaxivität (r_2) mit zunehmendem Molekulargewicht einer Polyethylenglycol (PEG)-Beschichtung zwischen 500 und 5000 g mol^{-1} [113]. Beim Vergleich der einzelnen Molekulargewichte von 500 und 750 g mol^{-1} untereinander war dieser Trend jedoch auch gegenläufig. Besteht die Beschichtung aus wasserlöslichen Polymeren, ist das Diffundieren von Wasser in der Nähe des Kerns immer noch möglich. Diffusionsgeschwindigkeiten sind jedoch verlangsamt, Wassermoleküle halten sich länger in dieser Zone auf und die Relaxationsrate wird erhöht [113]. Somit konkurrieren im Fall der Beschichtung mit Polymeren zwei Effekte, welche mit zunehmendem Molekulargewicht der Beschichtung die transversale Relaxivität gegenläufig beeinflussen. Hu et al. zeigte 2009 eine Zunahme der transversalen Relaxationsrate beim Beschichten mit homobifunktionalem PEG-CCOH bis zu einem Molekulargewicht von 600 g mol^{-1} [114]. Auch Hajesmaeelzadeh et al. zeigte 2016 eine erhöhte transversale Relaxationsrate von PEG600-beschichteten gegenüber PEG300-beschichteten Partikeln [115]. Die Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des verwendeten Polymers kann auch für die Erklärung des Einflusses der Art des Polymers bei gleicher Dicke der Beschichtung herangezogen werden [116].

2.2.4. Einfluss der Clustergröße magnetischer Nanopartikel auf die transversale Relaxation

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Größe magnetischer Nanopartikel-Cluster zur Maximierung der transversalen Relaxivität optimiert. Der Einfluss der Größe magnetischer Nanopartikel-Cluster auf die transversale Relaxation ist theoretisch ausgiebig beschrieben [97, 117] und wird im Folgenden zusammengefasst. Dabei können einzelne Partikel oder Cluster mit demselben hydrodynamischen Durchmesser gleich betrachtet werden. Drei Regime werden zur Beschreibung des Einflusses der Größe auf die transversale Relaxation unterschieden. Dabei erfolgt die Einteilung der Regime anhand der charakteristischen Diffusionszeit τ_D eines Wassermoleküls, die zum Zurückleger für die Distanz des Durchmessers des betrachteten magnetischen Partikels benötigt wird. Diese ist gegeben als:

$$\tau_D = \frac{d_p^2}{4D} \quad (12)$$

Darin ist d_p der Durchmesser des betrachteten Partikels und D der Selbstdiffusionskoeffizient von Wasser. Zur Einteilung wird die charakteristische Diffusionszeit τ_D mit der Verschiebung der Larmor-Frequenz $\Delta\omega$ in der Nähe des Partikels verwendet. Diese ist definiert als:

$$\Delta\omega = \frac{\mu_0\gamma M_S}{3} \quad (13)$$

Worin μ_0 die Vakuumpermeabilität, γ das gryomagnetische Verhältnis eines Protons und M_S die Sättigungsmagnetisierung pro Volumeneinheit der betrachteten Partikel mit hydrodynamischem Durchmesser d_p beschreibt. Für sehr kleine magnetische Partikel diffundieren Protonen äußerst schnell um ein Partikel. Es wird als Regime der Bewegungsmittelung (*motional averaging regime – ma*) bezeichnet. Somit ist $\tau_D \ll \frac{1}{\Delta\omega}$ und das magnetische Feld, welchem die Protonen ausgesetzt sind, ändert sich schnell. Mit zunehmender Größe der Partikel und höheren Sättigungsmagnetisierungen werden zusätzlich stärkere Feldinhomogenitäten ausgeprägt. Ein Refokussieren der Spins wird schwieriger, was eine Erhöhung der transversalen Relaxationsrate R_2 proportional zum Quadrat des hydrodynamischen Durchmessers d_p zur Folge hat. Es kann die *outer sphere* Theorie angewendet werden:

$$R_{2ma} = \frac{16}{45} f(\Delta\omega)^2 \tau_D \quad (14)$$

R_2 hängt zusätzlich vom Volumenanteil f der Partikel in der betrachteten Probe ab.

Bei weiterer Zunahme der Partikelgröße erfahren die diffundierenden Protonen ab $\tau_D > 1/\Delta\omega$ eine annähernd konstante Änderung des magnetischen Feld-Gradienten mit zunehmender Partikelgröße. Die transversale Relaxationsrate ist somit nicht mehr von der Größe, sondern nur noch von der Sättigungsmagnetisierung abhängig. Die transversale Relaxationsrate im Regime des statischen Dephasierens (*static dephasing regime – sd*) ist gegeben als:

$$R_{2sd} = \frac{2\pi}{3\sqrt{3}} f \Delta\omega \quad (15)$$

Gleichung (14) und Gleichung (15) beschreiben jedoch den Spezialfall von unendlichen Echozeiten ($\tau_{CP} = \infty$). Dies ist praktisch nicht durchführbar, dennoch kann die transversale Relaxationsrate bis $\tau_D < 2 \tau_{CP}$ durch Gleichung (14) und Gleichung (15) approximiert werden. Bei größeren Partikeln nehmen magnetische Feldgradienten entlang des Diffusionspfades eines Wassermoleküls ab. Ein Refokussieren durch Spin-Echo-Sequenzen wird wieder effizienter. Deshalb wird dieses Regime als echolimitiertes Regime (*echo limited regime – el*) bezeichnet. Die transversale Relaxationsrate nimmt mit der Partikelgröße d_p ab und hängt nun zusätzlich auch von der Echozeit τ_{CP} ab:

$$R_{2el} = \frac{7,2 f D x^{1/3} (1,52 + f x)^{5/3}}{d^2} \quad (16)$$

Der dimensionslose Parameter x ist dabei als $x = \Delta\omega \tau_{CP}$ definiert. Durch Auflösung von Gleichung (15) und Gleichung (16) können die Regime auch anhand zweier kritischer hydrodynamischer Durchmesser definiert werden. Diese sind gegeben als:

$$d_{sd} = \left(\frac{5\pi D \sqrt{3}}{2\Delta\omega} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (17)$$

$$d_{el} = 2 \left(\frac{1,49 D x^{\frac{1}{3}} (1,52 + f x)^{\frac{5}{3}}}{\Delta\omega} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (18)$$

Da die transversale Relaxationsrate meist nur für eine Partikelgröße berechnet wird, die Partikelgrößen jedoch um einen Mittelwert verteilt sind, sind die Grenzen zwischen den Regimen in Wirklichkeit unschärfer als durch die analytischen Ausdrücke in Gleichung (17) und Gleichung (18).

Carroll et al. zeigten 2010, dass Gleichung (14)-(16) aber verwendet werden kann, um bei bekannter Sättigungsmagnetisierung und bekannter Größenverteilung aus Transmissionselektronenmikroskopie-Bildern (TEM-Bildern) oder Kleinwinkel-Röntgenstreuung (*small-angle X-ray scattering – SAXS*) die

transversale Relaxationsrate zu berechnen [97]. Dazu muss Gleichung (14)-(16) zusammen mit der volumengewichteten Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $p(v)$ aus der Größenverteilung über die Grenzen der Größen der einzelnen Regime integriert werden:

$$R_{2tot} = \int_0^y p(v)R_{2ma}(v)dv + \int_y^z p(v)R_{2sd}(v)dv + \int_z^\infty p(v)R_{2el}(v)dv \quad (19)$$

Die Grenzen y und z sind die Volumina für den Übergang zwischen Regime der Bewegungsmittelung und statischer Dephasierung, respektive statischer Dephasierung und echolimitiertem Regime. Die Volumina werden aus den Durchmessern in Gleichung (17) und Gleichung (18) berechnet.

2.3. Magnetische Nanopartikel

Im Zuge dieser Arbeit wurden magnetische Nanopartikel in einem Mikroreaktor hergestellt. Magnetische Nanopartikel finden zahlreiche Anwendungen in unterschiedlichsten wissenschaftlichen und technischen Gebieten. Im biomedizinischen Bereich sind die Anwendungen vor allem Kontrastmittel zur Magnetresonanz-Bildgebung (*magnetic resonance imaging – MRI*) [106, 118], Hyperthermie zur Behandlung von Tumoren [119, 120] und die gezielte pharmazeutische Wirkstoffverabreichung (*targeted drug delivery*) [121, 122]. In der analytischen Chemie werden magnetische Eisenoxid-Nanopartikel (*MIONS – magnetic iron oxide nanoparticles*) zur Probenaufkonzentrierung durch immunomagnetische Separation sowie als Marker zur Detektion von Analyten verwendet [123, 124]. Des Weiteren können durch magnetisches Markieren gezielt Zellen oder DNA isoliert [125], homogene Katalysatoren aus Syntheselösungen abgetrennt [126] oder Umweltschadstoffe entfernt werden [127].

2.3.1. Herstellungsmethoden magnetischer Nanopartikel

Zur Herstellung von MIONS existieren zahlreiche Methoden sowohl in organischen als auch wässrigen Lösemitteln.

In organischen Lösemitteln weisen die Eisenionen eine niedrigere Reaktivität als in wässriger Lösung auf. Somit können durch thermische Zersetzung, der Polyolsynthese-Methode und in umgekehrten Mikroemulsionen, MIONS mit höherer Monodispersität und gleichmäßigerer Morphologie erzeugt werden.

Bei der thermischen Zersetzung werden organometallische Komplexe wie Eisenacetylacetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) oder Eisenpentacarbonyl ($\text{Fe}(\text{CO})_5$) in hochsiedenden Lösemitteln wie Diphenylether zersetzt [128]. Dabei sind hohe Reaktionstemperaturen im Bereich von 100 – 400 °C notwendig, um die Zersetzung einzuleiten [106]. Zusätzlich wird als Tensid meist Ölsäure oder Hexadecylamin zugegeben, welche die gebildeten Nanopartikel kolloidal stabilisieren. Trotz der harscheren Reaktionsbedingungen wird diese Methode aufgrund der hohen Monodispersität und Sättigungsmagnetisierung sowie der einheitlichen Morphologie der erhaltenen Nanopartikel oft verwendet. Durch Abwandlung der Herstellungsmethode, beispielsweise durch Zugabe von Siliziumdioxid-Nanopartikeln, können magnetische Nanopartikel auf die Oberfläche der Siliziumdioxid-Nanopartikel synthetisiert werden, um sogenannte *Raspberry*-Partikel herzustellen [129].

Um direkt wasserlösliche MIONS durch thermische Zersetzung zu erhalten, kann die Reaktion in Polyolen wie Di- oder Triethylenglykol durchgeführt werden, welche *in situ* auf die Oberfläche adsorbieren und hydrophile Nanopartikel erzeugen [114, 130].

Zum Herstellen von MIONS in umgekehrten Mikroemulsionen werden Wassertröpfchen durch Tenside in einem organischen Lösemittel dispergiert. Die Wassertröpfchen enthalten eine Base. Unter starkem Rühren wird eine Eisensalzlösung zugetropft [131]. Durch das beschränkte Reaktionsvolumen in den Wassertröpfchen können Größenverteilung und Morphologie gut kontrolliert werden und monodisperse MIONS hergestellt werden [132].

Komplizierte Aufreinigungsschritte zum Entfernen der Tenside und die weniger gute Ausbeute schränken diese Methode jedoch ein [106]. Zusätzlich ist ein aufwändiger Ligandenaustausch notwendig, um wasserlösliche Partikel für biokompatible Anwendungen zu erhalten [133].

Durch Methoden wie Mitfällung oder Hydrothermalsynthese können MIONS direkt in wässriger Lösung und mit hoher Wasserlöslichkeit hergestellt werden. Die Mitfällung ist die am häufigsten verwendete Methode. Sie bietet zahlreiche Vorteile, wie milde Synthesebedingungen ohne hohen Druck und ohne hohe Temperatur, niedrige Kosten der Ausgangsmaterialien, eine einfache Skalierbarkeit, hohe Ausbeute und gute Wasserlöslichkeit der erhaltenen Nanopartikel [106]. Dabei werden Nanopartikel durch Zugabe einer Base, meist Natrium- oder Ammoniumhydroxid, zu einer Eisensalzlösung hergestellt. Durch Mitfällung hergestellte Nanopartikel sind generell negativ geladen jedoch bei den Synthesebedingungen nicht kolloidal stabil und aggregieren deshalb leicht [134]. Durch den Einsatz von Trimethylammoniumhydroxid (TMAOH) als Base während der Mitfällung [32] oder durch Zugabe von Perchlor-, Salz- oder Salpetersäure werden die Partikel positiv geladen, peptisiert und stabilisiert [135]. Eine weitere Möglichkeit ist Stabilisatoren direkt während der Mitfällung zuzugeben [136]. Dazu können beispielsweise Dextran, Stärke, Polyethylenglycol oder Polyacrylsäure der Präkursurlösung zugegeben werden [136]. Um ein Desorbieren der Polymere zu verhindern und die Langzeitstabilität zu verbessern, kann zusätzlich eine Kreuzvernetzung der Polymere mit beispielsweise Epichlorhydrin durchgeführt werden [6]. Kommerziell erhältliche magnetische Nanopartikel, wie beispielsweise von Miltenyi Biotec GmbH oder micromod Partikeltechnologie GmbH, werden meist durch diese Methoden hergestellt [137, 138].

Bei der Hydrothermalsynthese werden MIONS unter hohen Temperaturen von 130-250 °C und hohem Druck von 3-40 bar hergestellt [128]. Dadurch ist das Herstellen von Nanopartikeln mit besonders hoher Kristallinität möglich [139]. Jedoch sind teure und aufwändige Autoklaven notwendig und das Herstellen großer Partikelmengen schwierig [106].

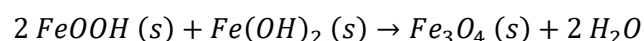
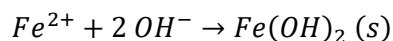
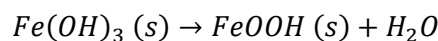
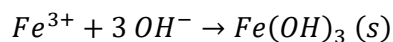
Eine Zusammenfassung der Herstellungsmethoden für magnetische Nanopartikel ist in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2: Zusammenfassung von Herstellungsmethoden magnetischer Nanopartikel.

Methode	Ausgangsmaterialien	Lösemittel und Temperatur	Größenverteilung	Biokompatibilität	Ref.
Thermische Zersetzung	Organometallische Komplexe	Organische Lösemittel bei 100 – 400 °C	Enge Größenverteilung und gute Kontrolle über Größe	Partikel nicht wasserlöslich und aufwändiger Ligandenaustausch notwendig	[128]
Polyolsynthese	Organometallische Komplexe	Di- oder Triethylenglycol bei 100 – 400 °C	Enge Größenverteilung und gute Kontrolle über Größe	Bessere Wasserlöslichkeit als thermische Zersetzung, trotzdem Ligandenaustausch notwendig	[114, 130]
umgekehrte Mikroemulsionen	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Base	Wasser in Öl bei RT	Gute Kontrolle über Größe und Größenverteilung durch beschränktes Reaktionsvolumen	Aufreinigung aus der zweiten Phase aufwändig, entfernen von Tensiden notwendig	[131, 132]
Hydrothermal-synthese	Organometallische Komplexe oder Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Base	Wasser bei 100 – 200 °C unter Druck	Mittelgute Kontrolle über Größe und Größenverteilung jedoch mit hoher Kristallinität	Direkt wasserlösliche Partikel ohne Ligandenaustausch	[128, 139]
Mitfällung	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Base	Wasser bei RT	Wenig Kontrolle über Größe und Größenverteilung	Direkt wasserlösliche Partikel ohne Ligandenaustausch	[140-142]

Im Zuge dieser Arbeit wurden magnetische Eisenoxid-Nanopartikel durch Mitfällung hergestellt. Die Bildung von Magnetit läuft dabei nach folgendem Reaktionsschema ab [140]:

Reaktionsschema:



Gesamtreaktion:



In einem ersten Schritt bilden sich nach Zugabe der Base Eisenhydroxide. Diese Reaktionen laufen äußerst schnell über Deprotonierung des als Hexaqua-Komplex vorliegenden Eisenions ab [143]. $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ist nicht stabil und kondensiert zu FeOOH [144]. Die Bildung von Magnetit-Nanopartikeln erfolgt durch die Kondensation von FeOOH und $\text{Fe}(\text{OH})_2$ [145]. Nach dem LaMer-Mechanismus entsteht eine Lösung dieser Polyionen (Phase I, Abbildung 15-1). Bei Übersättigung erfolgt die Nukleation erster Kristallisationskeime (Phase II, Abbildung 15-2), welche weiter zu Nanopartikeln wachsen (Abbildung 15-3) [61]. Werden die wachsenden Nanopartikel nicht ausreichend kolloidal stabilisiert, aggregieren diese zu Clustern (Abbildung 15-4).

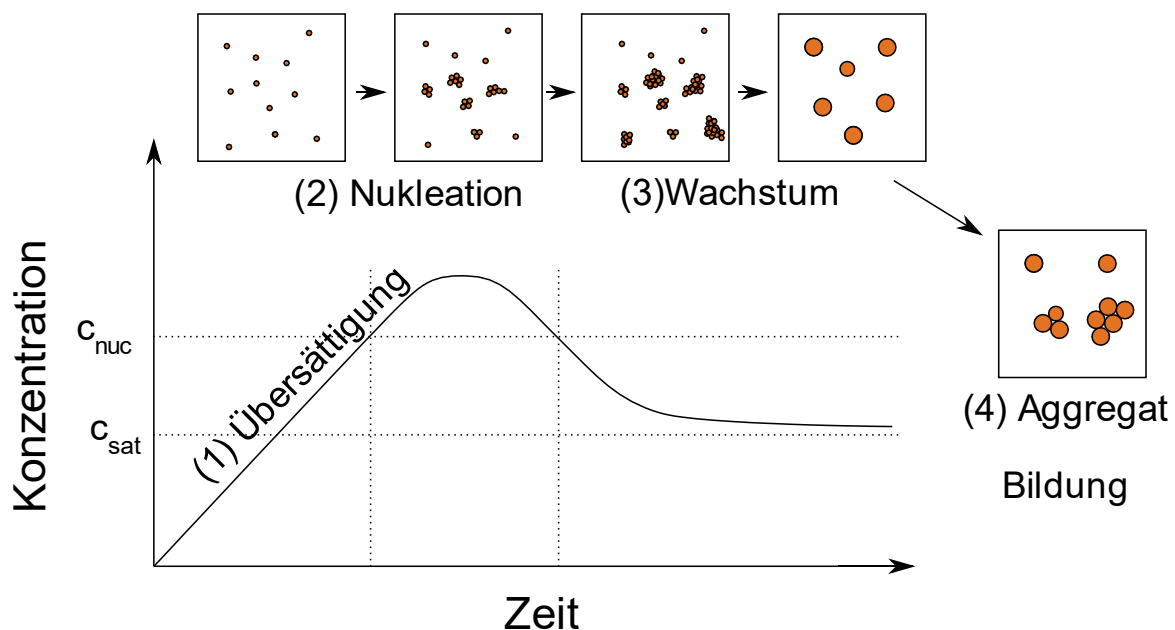


Abbildung 15: Konzentrationsverlauf und schematische Darstellung des LaMer-Mechanismus. Aus Polyionen entstehen nach Übersättigung (1) erste Kristallisationskeime (2), welche zu Nanopartikeln wachsen (3). Erfolgt keine kolloidale Stabilisierung, aggregieren die Nanopartikel zu Clustern (4).

Anhand von Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) wurde gezeigt, dass das Partikelwachstum durch Aggregation von primären Partikeln mit einer Größe von etwa 1 nm geschieht [146].

Optimale Reaktionsbedingungen liegen bei einem stöchiometrischen Verhältnis von Fe^{2+} und Fe^{3+} von 1:2 und einem pH-Wert von 9-12 [141]. Da Fe^{2+} -Spezies unter alkalischen Bedingungen extrem schnell oxidieren [147], ist ein Durchführen der Synthese unter Stickstoffatmosphäre, sowie ein vorangegangenes Durchblasen der Syntheselösung mit Stickstoff vorteilhaft [30, 32, 140]. Außerdem oxidiert Magnetit leicht zu Maghemit [148]. Das Ansäuern der Eisensalzlösung verhindert zusätzlich die Bildung von Eisenhydroxiden [149] und die Oxidation von Fe^{2+} vor der Basenzugabe.

Die hohe Reaktivität von Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen in wässriger Lösung schränkt die Kontrolle über Nukleation und Wachstum der Nanopartikel ein und erschwert das Herstellen von monodispersen Nanopartikeln mit gleichmäßiger Morphologie [106]. Zum Erzeugen monodisperser MIONS durch Mitfällung ist daher das Halten konstanter Reaktionsbedingungen und eine zeitliche Trennung von Partikel-Nukleation und -Wachstum notwendig [61].

Dies wurde einerseits durch das Verwenden automatisierter Batchreaktoren [150, 151], als auch durch die Verwendung von Rotationsscheibenreaktoren realisiert [152]. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, bieten auch Mikroreaktoren eine gute Kontrolle über Reaktionsbedingen wie Temperatur, Mischprozesse und Verweilzeiten und erlauben so die zeitliche Trennung von Nukleation und Wachstum [153, 154].

2.3.2. Herstellung von magnetischen Nanopartikeln in Mikroreaktoren

MIONS wurden bereits durch Mitfällung in kommerziell erhältlichen Mikroreaktoren aus Glas synthetisiert [155, 156]. Eines der Hauptprobleme bei der mikrofluidischen Synthese von Nanopartikeln stellt das Ablagern von Feststoffen an den Reaktorwänden und folglich ein Verstopfen der Kanäle dar [30]. Umgangen wurde dieses Problem durch Zweiphasen-Mikroreaktoren. Dabei findet die Partikelsynthese in der wässrigen Phase statt, welche als Tropfen in der kontinuierlichen Ölphase dispergiert sind [30, 157]. In Einphasen-Mikroreaktoren konnte ein Ablagern von Partikeln durch co-axiale Flussfokussierung von zwei ineinanderlaufenden Kapillaren erreicht werden [32]. Eine Zusammenfassung der Herstellung von magnetischen Nanopartikeln in Mikroreaktoren ist in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Herstellung magnetischer Nanopartikel in Mikroreaktoren.

Reaktor	Base	Eisensalzpräkursor	Temp.	Relative Größenverteilung	Ref.
Glas, 2D-fokussieren in Base	1 M NaOH	10 mM FeCl_2 , 20 mM FeCl_3 in 1,1 M HCl	RT	---	[155, 156]
Glaskapillaren/PDMS, segmentierter Fluss in Oktadecen	28 % NH_4OH	20 mM FeCl_2 , 40 mM FeCl_3 in 0,4 M HCl und 50 mM Dextran ($M_w = 10000 \text{ g mol}^{-1}$)	60 °C, Ölbad	22 %	[30]
PDMS, segmentierter Fluss in Perfluorcarbonöl	28 % NH_4OH	240 mM FeCl_2 , 480 mM FeCl_3 und 30 mM FeCl_2 , 60 mM FeCl_3 jeweils in 0,5 M HCl	RT	---	[157]
Glaskapillaren/PDMS	Trimethylammoniumhydroxid $((\text{CH}_3)_4\text{NO})$	3,3 mM FeCl_2 , 6,6 mM FeCl_3 , 0,4 M HCl	RT	22 %	[32]

2.3.3. Oberflächenmodifikation magnetischer Nanopartikel

Neben der Herstellung der magnetischen Nanopartikel selbst, ist deren Oberflächenmodifikation und -Funktionalisierung einer der wichtigsten Schritte während ihrer Herstellung. Einerseits werden die Partikel dadurch kolloidal stabilisiert, um ein Aggregieren, zum Beispiel während medizinischen Anwendungen, zu verhindern [114]. Andererseits werden chemisch-funktionelle Gruppen eingefügt, um ein Konjugieren mit Biomolekülen zu ermöglichen [133]. Außerdem kann die Stabilität gegenüber Oxidation [158], die Dispergierbarkeit der Nanopartikel [114] und deren toxikologisches Profil [159] beeinflusst sowie ein unspezifisches Adsorbieren von Biomolekülen verhindert werden [160].

Die beiden wichtigsten Mechanismen zum kolloidalen Stabilisieren von magnetischen Nanopartikeln sind sterische und elektrostatische Wechselwirkungen [161]. Diese wirken den anziehenden Kräften, wie Van-der-Waals- und magnetischen Wechselwirkungen zwischen den Nanopartikeln, entgegen [161]. Sterische Abstoßung wird meist durch adsorbierte oder kovalent gebundene Polymere induziert. Die Polymere sind im Dispersionsmedium gut löslich und quellen auf. Nähern sich Nanopartikel, verdrängen die gequollenen Polymerketten die Lösemittelmoleküle. Der dadurch entstehende osmotische Druck wirkt der Aggregation entgegen. Durch die Wiederholung funktioneller Gruppen in Polymeren können diese stark auf Oberflächen adsorbieren. Die Bindung der Polymerkette ist stark, auch wenn jede einzelne Gruppe für sich nur schwach bindet. Polymere können aber auch direkt kovalent über eine funktionelle Gruppe an die Oberfläche gebunden werden.

Die elektrostatische Stabilisierung tritt ein, wenn die Nanopartikel über eine ausreichend stark geladene Oberfläche verfügen [162]. Gegenionen lagern sich durch Coulomb-Kräfte an der geladenen Oberfläche an. Ebenfalls reichern sich hydratisierte Gegenionen in einer diffusen Schicht in der Nähe der Partikeloberfläche an. In einem Gleichgewicht aus elektrostatischer Anziehung und thermischer Bewegung nimmt das Potential exponentiell ab [163]. Nähern sich zwei Partikel, wird das Aggregieren durch elektrostatische Abstoßung verhindert. Nimmt die Konzentration an Gegenionen in Lösung zu, wird die diffuse Schicht komprimiert und das elektrostatische Potential nimmt schneller mit dem Abstand vom Partikel ab. Die Partikel aggregieren dann leichter. Noch stärker beeinflusst die Ladungszahl der Gegenionen die Kompression. Die zur Destabilisierung notwendigen Ionenkonzentration sinkt mit der sechsten Potenz der Ladungszahl.

Die Ladung von magnetischen Nanopartikeln kommt von ionisierten Hydroxy-Gruppen auf der Oberfläche. Wurden die Partikel unter Ausschluss von Wasser hergestellt, entstehen die Hydroxy-Gruppen durch Chemisorption von Wasser auf der Oberfläche, sobald die Partikel mit Wasser in Berührung kommen. Bei der Synthese in Wasser werden Metallkationen als Hydroxy-Komplexe eingebaut. Die Hydroxy-Gruppen auf der Oberfläche des Partikels kommen daher von dem zuletzt eingebauten Hydroxykomplex. In Abhängigkeit des pH-Werts werden die Hydroxy-Gruppen ionisiert.

Die pK_s -Werte der einzelnen Hydroxy-Gruppen sind dabei von der Art des Metallkations und Wechselwirkung zwischen Hydroxy-Gruppen durch ihre Nähe untereinander abhängig und können sich je nach ihrer Position auf der Partikeloberfläche unterscheiden. Die Oberflächenladung ist schlussendlich vom pH-Wert und der Ionenstärke des Elektrolyts abhängig.

Außerdem kann die Oberflächenladung durch Adsorption von geladenen Molekülen geändert werden. Moleküle mit Catechol-, Carboxylat-, Phosphonat- oder Sulfonatgruppen binden stark an die Oberfläche von Eisenoxiden [133].

2.3.4. Analytische Anwendungen magnetischer Nanopartikel

Magnetische Nanopartikel eignen sich im Bereich der analytischen Chemie einerseits zur Probenaufkonzentrierung und Probenaufreinigung, andererseits auch als Sensoren. Der große Vorteil beim Einsatz zur Probenvorbereitung liegt darin, dass mit Affinitätsliganden funktionalisierte magnetische Nanopartikel effizient Analyten (Ionen, kleine organische Moleküle, Zellen, Proteine, Nukleinsäuren, Viren) binden können und diese durch ein magnetisches Feld manipuliert (abgetrennt, abgelenkt, zurückgehalten) werden können [136]. Somit ist eine Aufreinigung meist einfacher, schneller und kostengünstiger durchzuführen als mit Hilfe von beispielsweise der Affinitätschromatographie [164].

Zahlreiche Anwendungen wurden zur Aufkonzentrierung von Ionen aus Wasserproben demonstriert. Ausgehend von mit Purpald [165] oder Cyclodextrin [166] funktionalisierten Partikeln zur Aufkonzentrierung von Cu(II) wurden Nanopartikel mit höherer affiner spezifischer Oberfläche durch den zusätzlichen Einsatz von Karbonnanoröhren [167] oder Dendrimeren [168] entwickelt und deren Einsatz zur Aufkonzentrierung von zahlreichen Schwermetallen erforscht. Zur Aufkonzentrierung kleiner organischer Moleküle eignen sich ebenfalls magnetische Nanopartikel, etwa mit Natriumdodecylsulfat funktionalisierte Partikel zur Aufkonzentrierung organischer Farbstoffe [169]. Zur Aufkonzentrierung pharmazeutischer Substanzen aus Umweltproben werden vor allem mit molekular geprägten Polymeren (*molecular imprinter polymers* – MIP) funktionalisierte Partikel beliebt [170]. Zur Aufreinigung von DNA eignen sich mit Silizindioxid, Polyvinylpyrrolidon oder Tripolyphosphat funktionalisierte Nanopartikel [171]. Zusätzlich kann eine sequenzspezifische Aufreinigung durchgeführt werden, wenn die Partikel mit entsprechenden Oligonukleotiden funktionalisiert sind [172]. Mit Antikörpern funktionalisierte Nanopartikel sind besonders effektiv zur selektiven Aufreinigung von Analyten aus einer komplexen Matrix, was beispielsweise anhand der Aufkonzentrierung von Enterotoxin B aus Milch [124] oder *E. coli* aus Wasserproben [173] gezeigt wurde. Darüber hinaus eignen sich mit Bakteriophagen oder Antibiotika funktionalisierte magnetische Nanopartikel zur Aufkonzentrierung von Bakterien [174, 175].

Neben den zahlreichen Aufkonzentrierungsmethoden eignen sich funktionalisierte Nanopartikel auch als Sensoren. Sie profitieren dabei von den umfangreichen Funktionalisierungsmethoden und der Möglichkeit Analyten an Sensoroberflächen zusätzlich zu konzentrieren. Außerdem können Signale homogen durch optische oder magnetische Ausleseverfahren gemessen werden [164, 176]. Eine der ersten Messmethoden basiert auf der Änderung der magnetischen Permeabilität, welche sich in Anwesenheit magnetischer Nanopartikel erhöht. Magnetische Nanopartikel sedimentieren in einen mit einer Spule umgebenen Bereich, indem sie über den Analyten an einen größeren Transportpartikel binden [177]. Durch die Messung der Induktivität kann die magnetische Permeabilität berechnet werden, welche wiederum proportional zur Konzentration der magnetischen Partikel und somit zum Analyten ist.

Das durch Analyten induzierte Aggregationsverhalten kann ebenfalls durch die Messung der nuklearen magnetischen Relaxation, besonders der transversalen Relaxation, bestimmt werden. Dabei wird zwischen zwei Messprinzipien unterschieden, je nachdem ob größere Analyten wie Bakterien oder Zellen oder kleinere organische Moleküle sowie Ionen untersucht werden [176]. Bei der Detektion von Bakterien oder Zellen binden markierte Nanopartikel an diese und können mechanisch abgetrennt werden. Die verbleibenden Partikel werden über die transversale Relaxationszeit quantifiziert, welche mit abnehmender Partikelkonzentration zunimmt [178]. Bei der Quantifizierung kleiner Moleküle nimmt die transversale Relaxationszeit durch das Bilden von Clustern ab, indem mehrere magnetische Nanopartikel an einen Analyten binden [179].

Eine Kombination an magnetischer Aufkonzentrierung und magnetischer Auslesung wurde anhand der magnetischen Durchflusszytometrie gezeigt [180]. Magnetische Zellen wurden durch einen NdFeB-Magneten unterhalb des Flusskanals an der Kanaloberfläche konzentriert. Durch ein zusätzliches NiFe-Fischgrätenmuster auf der Kanaloberfläche konnten die Zellen in die Mitte der Kanaloberfläche fokussiert und so eine Aufkonzentrierung um den Faktor x700 erreicht werden. Die Detektion der magnetisierten Partikel auf den Zellen, die sich über den Sensor bewegen, erfolgte über eine Weatstone-Halbbrücken-Anordnung. Quantitative und qualitative Eigenschaften von Zellen in reinem Blut konnten so ohne vorangegangenen Probenaufarbeitung bestimmt werden.

2.3.5. Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln

Zur Charakterisierung von magnetischen Nanopartikeln im Hinblick auf deren Größe und Morphologie, Stabilität sowie chemischer Zusammensetzung wird eine Kombination analytischer Techniken und Methoden eingesetzt. Diese werden im Folgenden beschrieben.

Elektronenmikroskopie (EM)

Die Bestimmung von Morphologie, sowie Größe und Größenverteilung magnetischer Nanopartikel wird meist anhand der Elektronenmikroskopie durchgeführt. Dazu ist sowohl die Rasterelektronenmikroskopie (REM, *scanning electron microscopy* - SEM) als auch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) geeignet. Beide Methoden bieten die Möglichkeit, direkt Form und Größe der Partikelproben zu beobachten [181].

Im Rasterelektronenmikroskop werden Elektronen zwischen einer Kathode und Anode mit einer Beschleunigungsspannung zwischen 0,1 keV und 50 keV beschleunigt [182]. Durch elektrostatische Linsen werden die beschleunigten Elektronen auf eine Querschnittsfläche mit einem Durchmesser von 1-10 nm auf der Probenoberfläche fokussiert. Der Elektronenstrahl rastert die Probenoberfläche ab und baut so ein Bild auf. Dazu werden unterschiedliche Detektoren eingesetzt, die sowohl rückgestreute Elektronen sowie auch sekundäre Elektronen seitlich detektieren. Durch den stark fokussierten Elektronenstrahl entsteht eine tiefe Fokusebene, wodurch dreidimensional erscheinende Bilder aufgenommen werden können. Um ein Aufladen der Probe durch den Elektronenstrahl zu vermeiden, wird die Probe generell mit einer leitenden Schicht aus Gold oder Platin bedampft. Neuere Feldemissions-Rasterelektronenmikroskope (*field emission scanning electron microscope* – FESEM) können auch im Niederspannungsbereich zwischen 0,1 keV und 5 keV betrieben werden [182]. Durch eine nadelförmige Kathode entsteht ein elektrisches Feld mit sehr hoher Feldstärke, was die Emission der Elektronen bei niedriger Spannung ermöglicht. Durch die niedrigere Arbeitsspannung können auch Aufnahmen ohne Beschichtung mit leitenden Materialien gemacht werden, ohne dass es zur Aufladung der Probe kommt [183, 184]. Dies beschleunigt die Probenvorbereitung und ist besonders für das Abbilden von biologischen Proben vorteilhaft. Proben werden durch Eintrocknen von Nanopartikel-Suspensionen vorbereitet. Dabei stellt das Aggregieren der Partikel während der Probenvorbereitung eine der größten Schwierigkeiten dar [181]. Aggregierte Proben können zwar abgebildet werden, jedoch ist das Erkennen der Grenzen zwischen einzelnen Partikeln schwierig. Dies gilt besonders für die automatisierte Bildauswertung. Außerdem kommt es durch die ungleiche Lage der Partikel in Z-Richtung zu teils unscharfen Bereichen des Bildes [181].

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchstrahlt ein Elektronenstrahl die Probe. Dabei kommt es zur Interaktion der Probe mit dem Strahl. Eine Detektionslinse unterhalb der Probe leitet die transmittierten Elektronen auf einen Detektor. Dabei ist eine direkte Betrachtung durch einen

fluoreszierenden Leuchtschirm möglich. Zur Aufnahme eines Bildes werden CCD-Sensoren oder fotografische Filme eingesetzt. Die TEM nutzt im Vergleich zur REM eine höhere Beschleunigungsspannung im Bereich von 80 – 400 kV, wodurch Auflösungen bis zu 0,1 nm möglich sind [185].

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Um die Größe bzw. den hydrodynamischen Durchmesser dispergierter Nanopartikel zu bestimmen, wird meist die dynamische Lichtstreuung verwendet. Dabei wird die dispergierte Probe mit einem Laser bestrahlt und das gebrochene Licht detektiert. Die Intensität des gebrochenen Lichts fluktuiert aufgrund der Brown'schen Bewegung der Nanopartikel [186]. Auf die fluktuierenden Werte wird eine Autokorrelationsfunktion angepasst. Diese gibt an, inwieweit zwei Intensitätswerte nach einem zeitlichen Abstand korrelieren. Die Korrelation ist umso größer, je kleiner der zeitliche Abstand der beiden Werte ist. Bei einer nicht-periodischen Verteilung der Intensitätswerte nimmt die Autokorrelationsfunktion monoton ab. Je kleiner die Nanopartikel, desto schneller nimmt die Autokorrelationsfunktion ab. Daraus kann der Diffusionskoeffizient D bestimmt werden [187]. Der hydrodynamische Durchmesser D_{hyd} kann bei bekannter Temperatur T und Viskosität η mit der Boltzmann-Konstanten k_B und der Stokes-Einstein Gleichung berechnet werden:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_{hyd}} \quad (20)$$

Diese Berechnungsmethode des Durchmessers ist der größte Nachteil der DLS. Prinzipiell wird durch die Methode der Durchmesser einer Kugel angegeben, welche sich mit gleicher Diffusionsgeschwindigkeit bewegt. Bei der Größenbestimmung von nicht-sphärischen Partikeln wie *Nanorods*, *Nanocubes* oder *Nanostars*, zeichnet sich dieser Nachteil besonders ab. Außerdem ist die Auflösung limitiert. Zwei Größen von Nanopartikeln müssen sich mindestens um den Faktor drei unterscheiden, um durch DLS aufgelöst zu werden [188]. Liegen die Größen näher beieinander, erscheint lediglich ein Peak mit breiter Verteilung. Die Bestimmung der Größe und Größenverteilung polydisperser Proben ist deshalb besonders schwierig [181]. Dies wird weiters dadurch verstärkt, dass die Intensität des gebrochenen Lichts mit der sechsten Potenz des Durchmessers steigt. Ein kleiner Anteil aggregierter Partikel überlagert so meist das gestreute Licht primärer Partikel. Somit ist auch die Rückrechnung der auf der Intensität-basierten Größenverteilung auf eine Anzahl- oder Volumen-basierte Größenverteilung sehr fehlerbehaftet [186]. Obwohl es schwierig ist, durch DLS eine absolute Größe und Größenverteilung anzugeben, bietet die Methode durch ihre schnelle Durchführbarkeit den Vorteil, unterschiedliche Partikelchargen schnell zu vergleichen. Dies ist besonders für Syntheseoptimierungen hilfreich.

Raman-Mikroskopie (RM)

Bei der Raman-Mikroskopie wird eine Probe im UV-Vis-Bereich mit einem Laser bestrahlt. Dabei entsteht Streulicht, welches rechtwinklig zur Probenebene detektiert wird. Es entsteht hauptsächlich Rayleigh-Streulicht mit derselben Wellenlänge wie das einstrahlende Licht. Nur ein geringer Teil (10^{-5} des einstrahlenden Licht) ist Raman-Streulicht [189]. Das Raman-Streulicht hat zwei Frequenzen, welche jeweils um die Vibrationsfrequenz des betrachteten Stoffs negativ (Stokes-Streuung) und positiv (anti-Stokes-Streuung) verschoben ist. Die Verschiebung kommt dabei von einer Änderung der Polarisierung von chemischen Bindungen zustande [190]. Zur Detektion muss daher die zur Anregung verwendete Wellenlänge herausgefiltert werden. Dazu werden meist Notchfilter verwendet, die vor dem CCD-Detektor verbaut sind [191]. In Kombination mit einem Mikroskop können auch ortsaufgelöste Spektren aufgenommen werden. Dabei sind geringe Anforderungen an die Probenvorbereitung gestellt und selbst wässrige Proben können aufgrund der geringen Raman-Aktivität von Wasser analysiert werden. Hauptsächliche Einschränkung ist das schwache Raman-Signal und teilweise die Überlagerung mit Fluoreszenz. Somit sind meist starke Laserintensitäten oder lange Belichtungszeiten notwendig.

Bei der Analytik von magnetischen Nanopartikeln eignet sich die Raman-Mikroskopie zur Charakterisierung unterschiedlicher Kristallstrukturen der Eisenoxide und speziell zur Unterscheidung zwischen Magnetit und Maghemit [192]. Aufgrund der geringen Eindringtiefe werden jedoch meist nur die Oberflächenschichten charakterisiert, welche stärker oxidiert sind [193].

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR)

Die FT-IR-Spektroskopie basiert auf der Absorption von IR-Licht bei der Frequenz der molekularen Vibration des betrachteten Stoffes [194]. Dabei sind die molekularen Vibrationen ausschlaggebend, die zu einer Änderung des molekularen Dipols führen [190]. Anders als bei der dispersiven Spektroskopie, bei der die Intensitätsänderung von monochromatischem Licht bei unterschiedlichen Wellenlängen betrachtet wird, funktioniert die FT-IR folgendermaßen: Breitbandiges Licht wird durch ein Interferometer moduliert. Dazu wird der Strahl gespalten, an zwei Spiegeln reflektiert und wieder kombiniert. Dabei ist ein Spiegel beweglich. Je nach Position kommt es zu unterschiedlichen Interferenzen und der Auslöschung bestimmter Wellenlängen. Der kombinierte Lichtstrahl wird durch die Probe geschickt und dessen Intensität gemessen. Dabei entsteht in Abhängigkeit der Spiegelposition ein Interferogramm, welches durch Fouriertransformation in ein Spektrum umgewandelt wird.

Die FT-IR-Spektroskopie ist fast universal anwendbar, Geräte sind relativ preisgünstig, Messungen können schnell durchgeführt werden und liefern eine Fülle an chemischer Information [195]. Hauptsächlicher Nachteil ist die starke Absorption von Wasser, weshalb nur trockene Proben analysiert

werden können [190]. Außerdem ist es oft schwierig, Gemische zu analysieren [195]. Bei der Charakterisierung magnetischer Nanopartikel eignet sich die FT-IR-Spektroskopie hauptsächlich zur Charakterisierung von Beschichtung mit Molekülen oder Polymeren [130, 196-198].

Zeta-Potential

Das Zeta-Potential oder elektrokinetisches Potential ist das Potential am Rande der elektrochemischen Doppelschicht von Kolloiden, welche sich im elektrischen Feld bewegen [186]. Geladene Oberflächen verfügen über eine Schicht adsorbierter Ionen oder geladener Moleküle. Auf diese sogenannte Stern-Schicht folgt die diffusive Schicht. Die diffusive Schicht enthält sowohl positiv als auch negativ geladene Ionen oder Moleküle. In dieser Schicht nimmt das Potential exponentiell ab. Die Zusammensetzung und Dicke der diffusiven Schicht hängt von mehreren Faktoren, wie dem pH-Wert, der Ionenstärke oder der Konzentration ab. Während der Bewegung der geladenen Nanopartikel im elektrischen Feld, der Elektrophorese, existiert eine hypothetische Abscherschicht (*slipping/shear plane*). Diese Schicht teilt die das Partikel umgebende Ionen in solche ein, die sich mit dem Partikel bewegen und die sich frei um das Partikel bewegen. Das Potential an dieser Schicht ist das Zeta-Potential.

Zur Messung des Zeta-Potentials wird ein elektrisches Feld angelegt. Aufgrund der elektrophoretischen Bewegung der Partikel ändert sich die Frequenz des von ihnen gebrochenen Lichts (Dopplerverschiebung). Daraus kann wiederum die Geschwindigkeit und weiters die elektrophoretische Mobilität berechnet werden. Durch eine weiter mathematische Operation folgt das Zeta-Potential.

Meist wird angegeben, dass ab einem Zeta-Potential von ± 25 mV Partikelsuspensionen aufgrund ausreichender elektrostatischer Stabilisierung kolloidal stabil sind [101]. Kolloidale Stabilität hängt jedoch stets davon ab, ob entweder elektrostatische Abstoßung oder Van-der-Waals-Anziehung zwischen den Partikeln dominiert [199]. Somit können auch Suspension mit einem Zeta-Potential unter ± 25 mV stabil sein, als auch umgekehrt [200]. Auch sterische Abstoßung ist zu berücksichtigen. Des Weiteren kann das Zeta-Potential nicht mit der Oberflächenladung gleichgesetzt werden [148]. Besonders sinnvoll ist die Messung des Zeta-Potentials nach Oberflächenfunktionalisierungen, da diese direkt in einer Änderung des Zeta-Potentials oder besser dem isoelektrischen Punkt widerspiegelt werden [186].

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Evaluierung von Herstellungsmethoden von mikrofluidischen Strukturen aus Kunststofffolien

Die Herstellungsmethode für mikrofluidische Strukturen zur Synthese magnetischer Nanopartikel baute grob auf der Herstellungsmethode des Flusskanals für flussbasierte Mikroarrays auf. Diese Methode wird am IWC verwendet und ist in Abbildung 16 gezeigt.

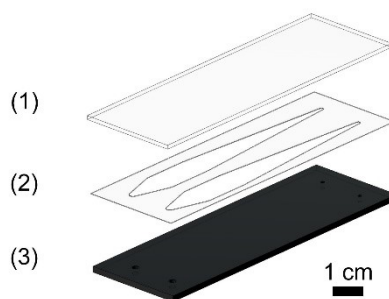


Abbildung 16: Darstellung des Aufbaus einer mikrofluidischen Flusszelle für flussbasierte Mikroarrays. Der Kanal ist in doppelseitiges Klebeband (2) geschnitten und mit einem Glas-Objektträger- (1) und einem Träger aus PMMA (3) gedeckelt.

Der Aufbau besteht aus einem dickeren Träger aus Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polyoxymethylen (POM) mit gefrästen Löchern, welche zur späteren Verbindung mit Schläuchen dienen [56, 57]. Der Flusskanal selbst besteht aus einer doppelseitigen Klebefolie. Ein lasergeschnittener Ausschnitt in der Klebefolie bildet den Flusskanal. Die Klebefolie wird anschließend zwischen den dickeren Träger und ein Deckglas geklebt und durch eine Rolle angepresst.

3.1.1. Aufbau des Mikroreaktors

Zur Synthese magnetischer Nanopartikel wurde der Träger durch eine 10 mm starke, transparente PMMA-Platte ersetzt (Abbildung 17-3). Zum Anschließen von Schläuchen wurden Löcher mit Gewinde in die PMMA-Platte eingefräst. Dies erlaubte ein einfaches Anschließen von Schläuchen mit HPLC-Verbindern.

Zur Synthese magnetischer Nanopartikel wurde statt eines Glasträgers eine transparente PMMA-Folie (Abbildung 17-1) zum Deckeln des lasergeschnittenen Kanals (Abbildung 17-2) verwendet. Dadurch konnte die Klebefolie leichter vom Träger abgelöst und dieser mehrfach verwendet werden.

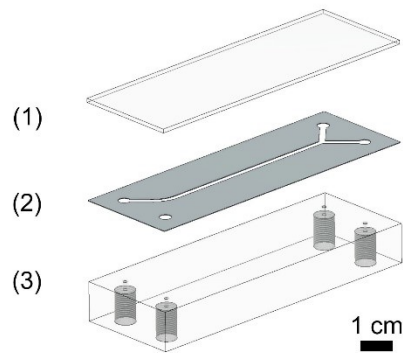
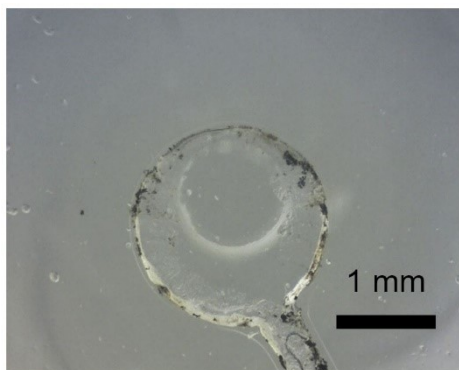


Abbildung 17: Darstellung des Aufbaus eines Mikroreaktors zur Synthese magnetischer Nanopartikel. Der Reaktionskanal ist in doppelseitiges Klebeband (2) geschnitten und mit PMMA-Folie (1) und dem Träger aus PMMA mit Anschlusslöcher mit Gewinde (3) gedeckelt.

3.1.2. Laserschneiden von doppelseitigen Klebefolien

Lasergeschnittene Kanäle aus doppelseitiger Klebefolie (ARCare® 90106) sind in Abbildung 18 gezeigt.

(A)



(B)

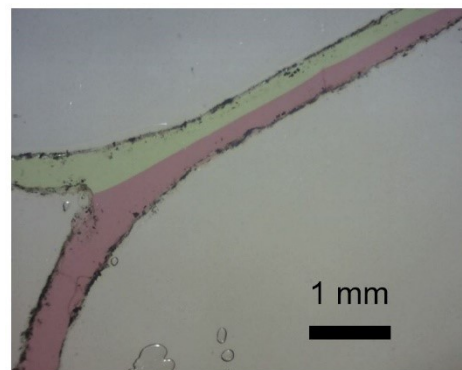


Abbildung 18: Lasergeschnittene Reaktionskanäle in doppelseitigem Klebeband (ARcare® 90106) mit Loch zum Anschließen eines Schlauches (A) und einem Mischpunkt (B).

Zur Synthese waren geringere Kanalbreiten notwendig. Bei den verwendeten Kanalbreiten von 0,5 mm kam es zu starker Verkohlung der Klebmasse am Rand des Flusskanals.

Durch die lokale Erhitzung kam es zusätzlich zu einem Verziehen der Kanalstruktur. Dies ist anhand von geschnittener Polyethylenterephthalat-Folie (PET-Folie) und Polystyrol-Folie (PS-Folie) in Abbildung 19-A und Abbildung 19-B gezeigt. Da beim Laserschneiden die Folie komplett

durchgeschnitten wurde, konnten somit auch keine freiliegenden Strukturen und enge Kanalgeometrien hergestellt werden.

Durch ein Stabilisieren mit selbstklebendem Glasfasergitterband konnte ein Verziehen teilweise verhindert werden (Abbildung 19-3). Aufgrund der starken Verkohlung der Klebmasse eignete sich das Laserschneiden jedoch hauptsächlich zum Schneiden von kürzeren Schnitten wie Löchern oder breiteren Kanälen. Am besten eignete sich die Methode zum Schneiden von Strukturen in Folien oder sehr dünnen Kunststoff-Platten ohne aufgetragenen Klebefilm.

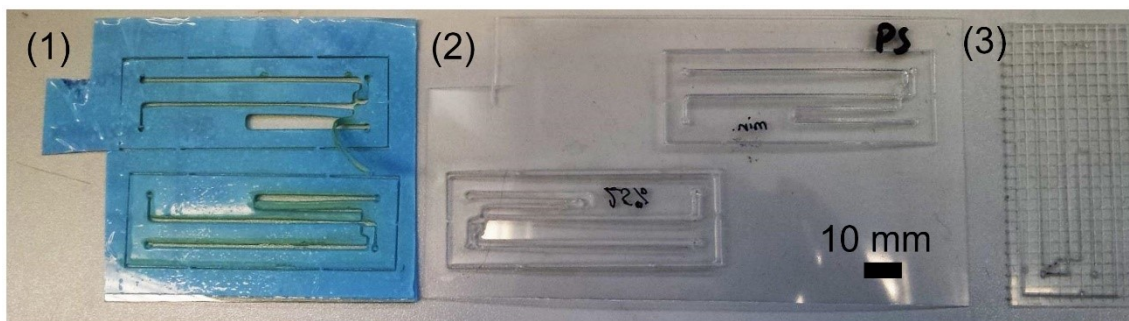
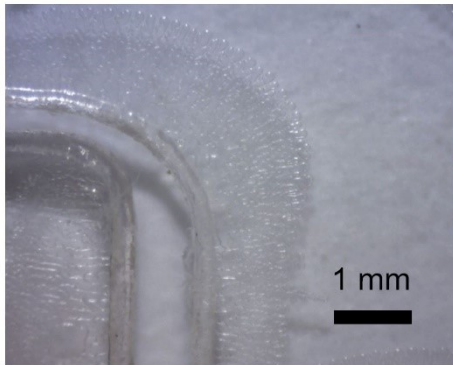


Abbildung 19: Thermische Deformation von Kanalgeometrien beim Laserschneiden von PET-Folie (1 mm) (1) und Polystyrol-Folie (0,5 mm) (2). Der Kanal kann durch Anbringen eines Glasfasergitterbands während dem Schneiden stabilisiert werden (3).

3.1.3. Verkleben von lasergeschnittenen Folien

Zum Verkleben von lasergeschnittenen Folien wurden mehrere Möglichkeiten untersucht. Verbunden wurden die Folien durch Lösemittelschweißen und die Verwendung von UV-härtendem sowie Zweikomponenten-Kleber. Zum Lösemittelschweißen wurde einerseits laborübliche Lösemittel sowie ein kommerzielles Lösemittelgemisch (ACRIFIX 1S 0117) eingesetzt. Polycarbonat (PC) wurde mit Cyclohexan, Polystyrol (PS) mit Aceton und PMMA mit Dichlormethan und 10 % (v/v) Ethanol verschweißt. Für Verklebungen mit dem kommerziellen Lösemittelgemisch wurde die Oberfläche zusätzlich mit einem mitgelieferten Kapillaraktivator (SERROX Kapillaraktivator) vorbehandelt. Dieser wurde laut Anleitung mit einem Papiertuch auf die Teile aufgetragen und nach dem Trocknen mit einem Papiertuch poliert. Teststücke sind in Abbildung 20 gezeigt.

(A)



(B)

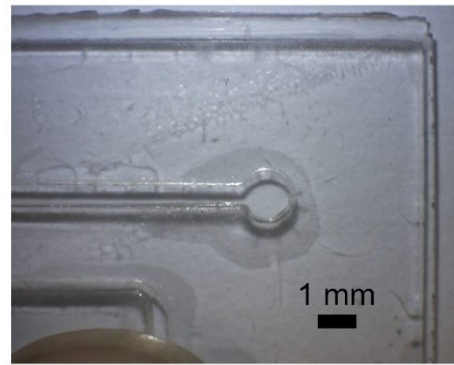
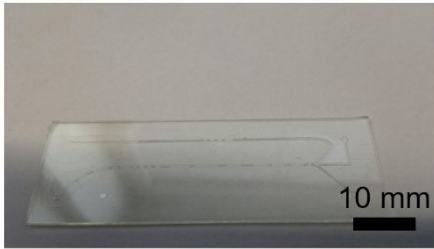


Abbildung 20: Verkleben von lasergeschnittenen Kanälen in PMMA mit Dichlormethan (A) und 10 % (v/v) Ethanol (B).

Zum Zusammenfügen wurden jeweils zwei Lagen aufeinandergelegt und ausgerichtet. Danach wurde mit einer Pipette das Lösemittel am Rand aufgetragen, welches durch Kapillarkräfte zwischen die Lagen gezogen wurde. Der Vorteil dieser Methode lag darin, dass ein Ausrichten bereits vor dem Lösemittelauftrag möglich war. Jedoch erreichte das aufgetragene Lösemittel durch die eingeschnittene Kanalstruktur oft nicht alle zu verklebenden Stellen, was zu undichten mikrofluidischen Strukturen führte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden zusätzliche Löcher zwischen den Kanälen in die Folien geschnitten, um auch dazwischen Lösemittel aufzutragen. Diese Versorgungslöcher schwächten jedoch die Kanalstruktur. Ebenfalls kam es bei den verwendeten Materialien zu Spannungen, was zu Rissen in den Folien führte (Abbildung 20).

Als Alternative zum Lösemittelschweißen wurden dünnflüssige UV-härtende Acrylklebstoffe (BEST PL 5141 und Best PL 5373) getestet, da sich diese auch zum Verkleben von Kunststoff mit Glas eignen. Die zu verklebenden Teile wurden ebenfalls aufeinandergelegt und ausgerichtet, der Klebstoff am Rand aufgetragen und durch UV-Licht gehärtet. Teststücke mit einem Kanal in PMMA und gedeckelt mit Glas sind in Abbildung 21 gezeigt. Bei der Verwendung von UV-härtendem Klebstoff mit geringer Viskosität von 100 mPa s (Best PL 5141) kam es zu einer homogenen Benetzung der Klebefläche. Jedoch trat zusätzlich das Problem auf, dass sich Klebstoff in den mikrofluidischen Kanälen sammelte und aushärtete, was eine spätere Verwendung dieser Kanäle einschränkte oder gar verhinderte (Abbildung 21-A). Bei der Verwendung von UV-härtendem Klebstoff mit höherer Viskosität von 400 mPa s (Best PL 5373) wurden die Kanäle nicht mit Klebstoff gefüllt, jedoch kam es auch zu keiner homogenen Benetzung der gesamten Klebefläche (Abbildung 21-B).

(A)



(B)



Abbildung 21: Verklebung von lasergeschnittenen Kanälen in PMMA mit Glas durch UV-Kleber Best PL 5141 (A) und Best PL 5373 (B).

3.1.4. Schneiden von Folien und doppelseitigen Klebefolien mit einem Schneideplotter

Die Verwendung eines Schneideplotters (Kurvenschreiber mit Schleppmesser) bot gegenüber dem Laserschneiden einige Vorteile. Während des Schneidevorgangs kam es zu keiner Erhitzung des Substrats und somit auch zu keiner Verkohlung der Schnittstellen beim Schneiden von doppelseitigen Klebefolien. Ebenfalls war keine Absaugung der Abluft notwendig, was das Erstellen der mikrofluidischen Strukturen an Büroarbeitsplätzen ermöglichte. Da die Kraft zum Andrücken des Messers eingestellt werden kann, konnte die zu schneidende Folie variabel tief eingeschnitten werden. Die unterste Schutzfolie von doppelseitigen Klebefolien musste somit nicht durchgeschnitten werden, was die erstellte Kanalstruktur stabilisierte. Somit konnten komplexe Kanalstrukturen mit einer minimalen Breite von 300 μm erstellt werden. Dies ist in Abbildung 22-A für eine Spiralstruktur in 125 μm starker Polyethylenterephthalat (PET)-Folie gezeigt. Spiralstrukturen werden oft für Inkubationszwecke verwendet. Auch Übergänge unterschiedlicher Geometrien wie von einem Reservoir mit einem Durchmesser von 1 mm zu einem Kanal mit einer Breite von 300 μm in 130 μm dickem PS waren dadurch möglich. Dies ist in Abbildung 22-B gezeigt.

(A)



(B)

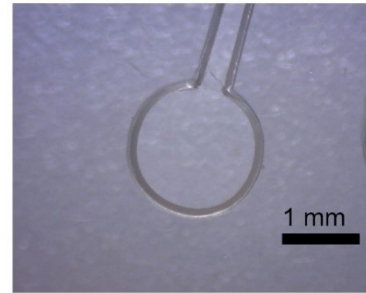
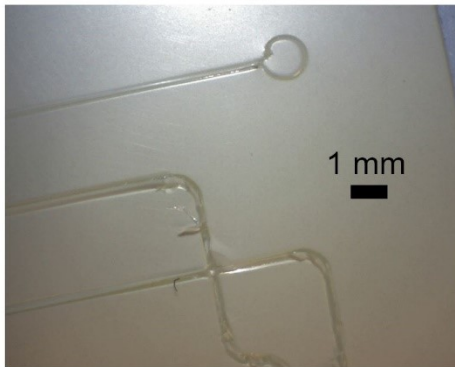


Abbildung 22: Spiralstruktur in 125 µm dickem PET, geschnitten mit digitalem Schneideplotter (A). Übergang von Kanal zu Reservoir-Struktur zum Anschließen von einem Schlauch in 130 µm dickem Polystyrol (B).

Ein generelle Grenze von 300 µm für Kanal- und andere Strukturen stimmte mit den Ergebnissen von Islam et al. überein [51]. Generell nimmt diese Grenze mit der Dicke der zu schneidenden Folie ab [51, 52]. Beim Schneiden von Klebefolien beeinflusste vor allem die Art und Dicke der Klebstoffschicht die Qualität der Schnitte. Untersuchte Klebefolien der Firma Adhesive Research sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Klebefolien ARcare® 90106 und ARseal™ 90880 waren aufgrund der dicken Klebstofffilme zum Erstellen mikrofluidischer Kanäle ungeeignet. Dicke Klebstofffilme verursachten einen hohen Widerstand des Schneidemessers am zu schneidenden Substrat. Dadurch wurde Klebstoff oder ganze Teile der Kanalstruktur verschoben (Abbildung 23). ARcare® 90106 wird zum Erstellen des Flusskanals für flussbasierte Mikroarrays am IWC verwendet [8]. Aufgrund der höheren Kanalbreite ist bei dieser Anwendung trotz des dicken Klebstofffilms ein Erstellen des Flusskanals möglich.

(A)



(B)

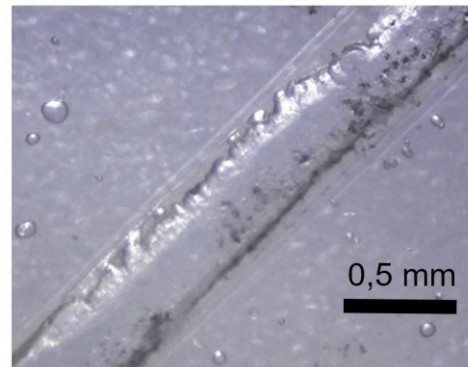
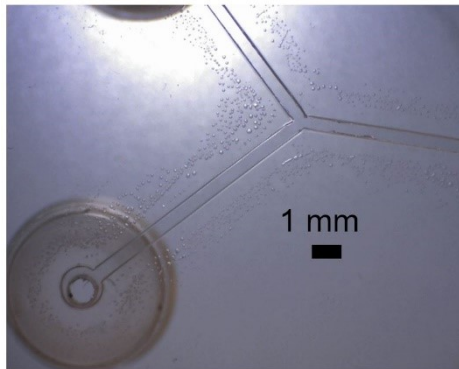


Abbildung 23: Mikrofluidische Kanäle mit einer Breite von 0,5 mm, geschnitten mit einem Schneideplotter in doppelseitiger Klebefolie (ARcare® 90106). Die Dicke der Klebstoffschicht erzeugte einen Widerstand an der Schneideklinge und verschob das Substrat mit Schutzfolie (A). Nach dem Verkleben kam es zum Ausfließen des Klebers in den Kanal (B).

Dicke Klebstofffilme erschwerten zusätzlich das Entgittern der Kanalstruktur. Die höhere freigelegte Klebstofffläche begünstigte das Ablagern von Staub an den Kanalwänden während des Herstellungsprozesses. Außerdem resultierte eine größere Kontaktfläche von Klebstoff und Fluid im späteren Kanal. Zusätzlich kam es beim Anpressen einer Deckelfolie auf die Klebefolie zu einem Ausfließen des Klebstoffs in den Kanal. Dies ist in Abbildung 23-B gezeigt.

Doppelseitige Klebefolien mit relativ dünnerer Klebeschicht im Vergleich zur Trägerfolie sind dabei besser geeignet. Klar definierte Kanäle mit einer minimalen Breite von 500 µm konnten somit erstellt werden. Abbildungen von einem 500 µm breitem Kanal in ARcare® 90845 sind in Abbildung 24-A gezeigt. Bei der Klebefolie mit der dünnsten Klebstoffschicht (ARcare® 92712) von 18 µm konnte die minimale Breite auf 300 µm reduziert werden. Dies ist anhand einer Serpentinstruktur in Abbildung 24-B gezeigt.

(A)



(B)

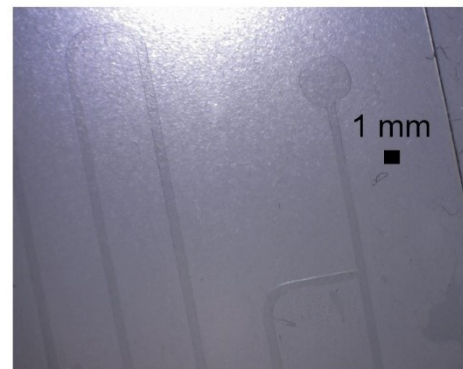


Abbildung 24: Klar definierter Kanal mit einer Breite von 500 µm in ARcare® 90845 (A) und einer Breite von 300 µm in ARcare® 92712.

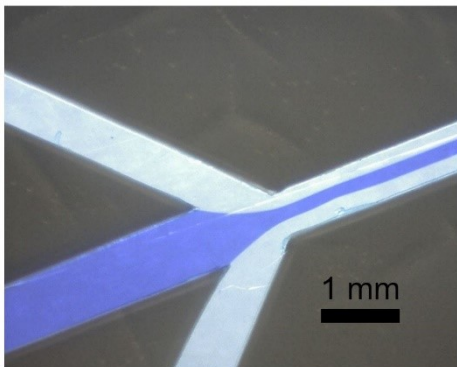
Tabelle 4: Zusammenfassung der Eigenschaften der verwendeten Klebefolien.

Klebefolie	Art der Klebefolie	Kleber	Trägerfolie	Schutzfolie
ARcare® 90106	doppelseitig, druckempfindlich	58 µm Acrylklebstoff medizinischer Qualität	25 µm Polyesterfolie	50 µm Polyesterfolie, weiß
ARseal™ 90880	doppelseitig, druckempfindlich	46 µm Silikonklebstoff	50 µm Polypropylenfolie	50 µm Polyesterfolie
ARcare® 90485	doppelseitig, druckempfindlich	38 µm Acrylklebstoff medizinischer Qualität	178 µm Polyesterfolie	50 µm Polyesterfolie
ARcare® 90445	doppelseitig, druckempfindlich	28 µm Acrylklebstoff medizinischer Qualität	25 µm Polyesterfolie	50 µm Polyesterfolie
ARcare® 8939	doppelseitig, druckempfindlich	25 µm Acrylklebstoff medizinischer Qualität	76 µm, Polyesterfolie, weiß	50 µm Polyesterfolie
ARflow® 93049	einseitig, hydrophil, druckempfindlich	25 µm hydrophiler Klebstoff	75 µm Polyesterfolie	38 µm silikonisierte Polyesterfolie
ARcare® 92484	doppelseitig, heißklebend	23 µm Heißsiegelklebstoff	50 µm, Polyesterfolie, weiß	50 µm Polyesterfolie
ARcare® 92712	doppelseitig, druckempfindlich	18 µm Acrylklebstoff medizinischer Qualität	12 µm Polyesterfolie	50 µm Polyesterfolie

Dicke Klebeschichten sind hauptsächlich zum Kleben auf rauem Untergrund geeignet. Da jedoch nur glatte Folien verklebt wurden, boten dünne Klebeschichten den Vorteil von weniger Widerstand der Klinge beim Schneiden und weniger Ausfließen des Klebefilms in den fertigen Kanal nach dem Anpressen der einzelnen Schichten. Einen Spezialfall stellte die Klebefolie ARcare® 92484 dar. Der verwendete Heißsiegel-Klebstoff wies zuerst eine äußerst geringe Klebekraft auf, was den Widerstand des Schneidmessers verringerte und das Entgittern erleichterte. Somit konnten Kanäle mit einer minimalen Breite von 200 µm geschnitten werden. Aktiviert wird der Kleber durch das Erhitzen auf 90 °C bis 120 °C für eine Zeit von 1 s bis 2 s und anschließendem Verpressen. Die Verfügbarkeit mit ausschließlich weißer Trägerfolie schränkte den Einsatzbereich dieser Folie jedoch auf 2D-Kanalstrukturen ein, da bei der Verwendung von mehreren Schichten an Klebefolie keine visuelle Inspektion der Kanäle, des Flussverhaltens oder von Partikelablagerungen mehr möglich war. Deshalb wurde zum Erstellen von 3D-Kanalstrukturen auf Klebefolien mit transparenter Trägerfolie zurückgegriffen.

Ein Aufbau aus ARcare® 92484 zwischen dem 10 mm starken PMMA-Träger und einer Deckelfolie aus 250 µm starkem Polycarbonat (PC) zum 2D-Fokussieren einer Lösung zwischen zwei Hüllströmen ist in Abbildung 25 gezeigt.

(A)



(B)

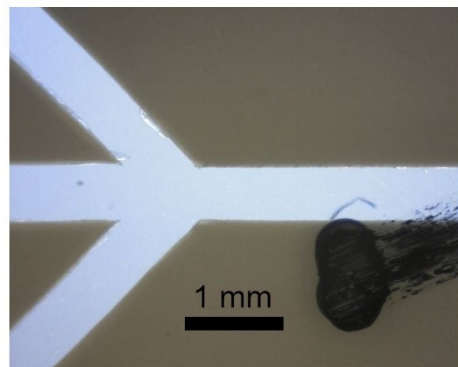
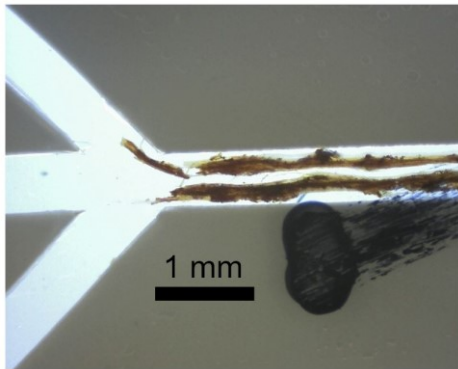


Abbildung 25: Mikrofluidischer Kanal zur hydrodynamischen 2D-Fokussierung aus ARcare® 92484.

3.1.5. Aufbau des Reaktors zur Synthese magnetischer Nanopartikel

Zur Synthese magnetischer Nanopartikel im Mikroreaktor wurde eine Eisensalzlösung im zentralen Strom und eine Base (NaOH oder NH₄OH) in dem Hüllströmen verwendet. Eine Aufnahme während der Synthese ist in Abbildung 26 gezeigt. Die schnell ausfallenden Nanopartikel lagerten sich stark an der Kanaloberfläche ab. Die durch ein parabolisches Strömungsprofil verursachten langsameren Flussgeschwindigkeit an der Kanaloberfläche begünstigten das Ablagern von Partikel [201].

(A)



(B)

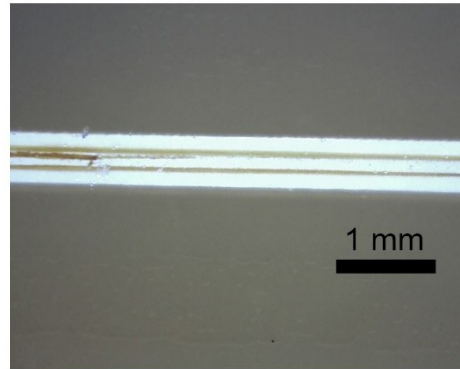


Abbildung 26: Partikelablagerung bei der Synthese magnetischer Nanopartikel durch 2D-hydrodynamische Fokussierung am Punkt des Mischens (A) und entlang des Kanals (B).

Eine stabile Synthese durch 2D-Fokussierung war somit nicht möglich. Um die Grenzflächen der beiden Reaktanden komplett von der Kanaloberfläche zu trennen, wurden mehrere Möglichkeiten untersucht. Ein Mikroreaktor mit segmentiertem Fluss wurde nicht aufgebaut [30, 157]. Das Verwenden einer zweiten Phase würde die Reaktionsfläche gut von der Kanaloberfläche trennen. Ebenfalls würde die interne Konvektion in den wässrigen Segmenten für eine schnelle und gute Durchmischung der Reaktanden sorgen. Das Fördern der zweiten öligen Phase würde jedoch zusätzliche Pumpen sowie einen separaten Aufreinigungsschritt zum Abtrennen der öligen Phase erfordern.

Bei der Verwendung von Einphasensystem eignet sich das aus der Durchflusszytometrie bekannte Konzept der 3D-Fokussierung. Hassan et al. zeigten 2008, dass das Ablagern von magnetischen Nanopartikeln bei der Synthese in Mikroreaktoren mit 3D-Fokussierung verhindert werden kann [32]. Dazu wurden zwei ineinander gesteckte Glas-Kapillaren verwendet, welche in Polydimethylsiloxan (PDMS) eingebettet wurden. Ein ähnliches Konzept wurde in dieser Arbeit getestet. Dazu wurde eine Glaskapillare in eine mikrofluidische Struktur aus doppelseitiger Klebefolie eingeklebt. Der Aufbau ist in Abbildung 27 gezeigt.

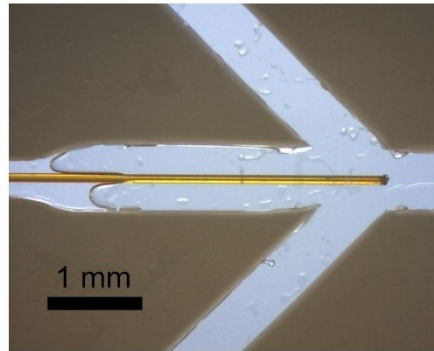


Abbildung 27: Aufbau zur 3D-hydrodynamischen Fokussierung in einem Kanal aus doppelseitigem Klebeband. Die Kapillare wurde dazu in den zentralen Kanal eingeklebt, dass der zentrale Strom von Boden und Deckel nach der Fokussierung getrennt war.

Das robuste Einkleben der Kapillare mit Cyanacrylatklebstoff oder 2-Komponenten-Exoxidklebstoff erwies sich als einer der limitierenden Schritte. Einerseits musste die in Abbildung 27 gezeigte Stelle komplett abgedichtet werden, außerdem musste ein Einfließen des Klebstoffs in die Kapillare verhindert werden. Der fokussierte Strom hatte ein annähernd kreisförmiges Querschnittsprofil. Der maximale Durchmesser konnte somit die Höhe des mikrofluidischen Hauptkanals betragen. Aufgrund des hohen Verhältnisses von Breite zu Höhe des mikrofluidischen Hauptkanals konnten nur sehr geringe Flussgeschwindigkeiten für den zu fokussierenden Strom im Vergleich zum Hüllstrom verwendet werden. Dies stellte einen zusätzlichen Nachteil dar und schränkte die maximal produzierbare Menge an magnetischen Nanopartikeln ein.

Als ideal hat sich ein planarer Aufbau zur 3D-Fokussierung erwiesen. Die Herstellungsmethode ist schematisch in Abbildung 28 gezeigt und kombinierte die Vorteile der Verwendung von einem Laserschneider und einem Schneideplotter.

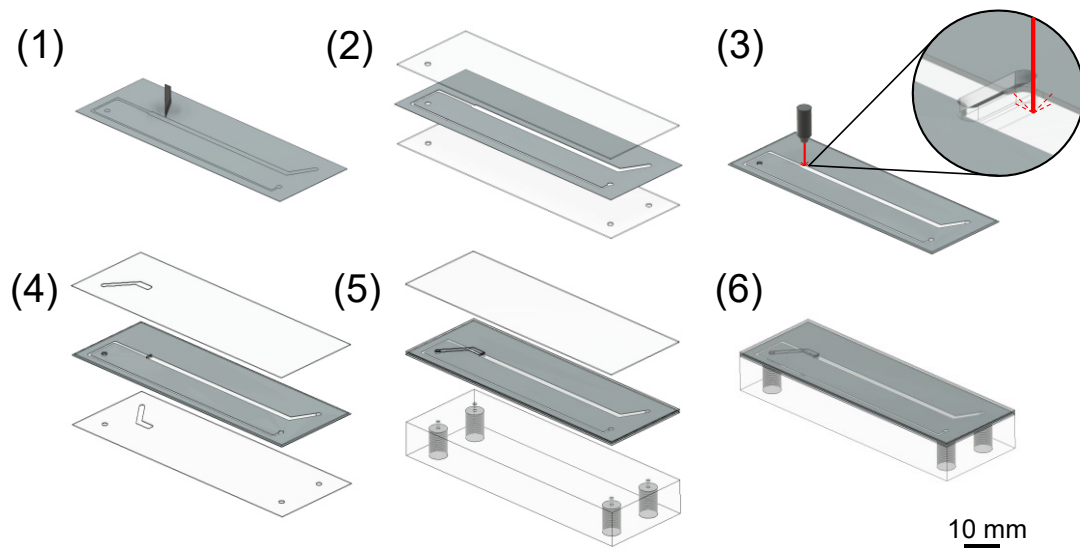


Abbildung 28: Herstellungsschema eines Mikroreaktors mit 3D-hydrodynamischer Flussfokussierung aus einer mehrlagigen Struktur aus doppelseitigem Klebeband. Der Hauptkanal wurde mit einem digitalen Schneideplotter in doppelseitiges Klebeband geschnitten (1). Der Kanal wurde mit einer dünnen PMMA-Platte beidseitig gedeckelt (2). Ein Durchgangsloch wurde mit einem Laserschneider geschnitten (3). Danach wurden Versorgungskanäle für die Hüllströme aus doppelseitigem Klebeband aufgeklebt (4). Diese wurden wiederum durch eine dünne PMMA-Folie oben und eine dicke PMMA-Platte mit Gewinde gedeckelt (5).

Der zentrale Reaktionskanal wurde mit einem digitalen Schneideplotter in doppelseitige Klebefolie geschnitten (Abbildung 28-1). Änderungen an der Kanalgeometrie waren somit einfach durchzuführen, indem die digitale Vorlage des Schneidepfads geändert wurde. Der zentrale Reaktionskanal hatte eine Breite von 1,5 mm und eine Höhe von 127 μm , was der Höhe der verwendeten Klebefolie entsprach. Die verwendete Andruckkraft des Messers wurde so eingestellt, dass die unterste Schutzfolie nicht komplett durchgeschnitten wurde. Somit verschob sich die Kanalstruktur auch nach dem Entfernen der überschüssigen Klebefolie im späteren Kanalinneren nicht. Durch Entfernen der Schutzfolie wurde die Klebefläche freigelegt und zuerst auf der Oberseite und dann auf der Unterseite mit einer 0,3 mm starken PMMA-Folie gedeckelt (Abbildung 28-2). Die PMMA-Folie wurde mit einem Laserschneider zugeschnitten. Die Länge sowie Breite der der PMMA-Folie wurde jeweils um 1 mm geringer gewählt. Somit entstand ein Überhang der Klebefolie von etwa 0,5 mm an jeder Seite. Das dreilagige Konstrukt konnte somit anhand der mittleren Klebefolie im Laserschneider ausgerichtet werden, um die Durchgangslöcher für die späteren Hüllströme in einem Schritt und an der richtigen Stelle zu schneiden (Abbildung 28-3). Diese Art des Verklebens stellte sicher, dass die Durchgangslöcher genau fluchteten. Als die Durchgangslöcher vor dem Zusammenkleben in die PMMA-Folie geschnitten wurden, war ein

exaktes Ausrichten nur schwer möglich. Dazu wären Schablonen oder Spannvorrichtungen notwendig, was einen erheblichen Zusatzaufwand zur Konstruktion der mikrofluidischen Struktur erfordern würde. Im Fall nicht genau fluchtender Durchgangslöcher führte dies zu einer Verschiebung der 3D-Fokussierung.

Die Versorgungskanäle für die Hüllströme wurden wiederum mit einem Schneideplotter in doppelseitige Klebefolie geschnitten und unten und oben auf die bisherigen drei Lagen aufgeklebt (Abbildung 28-4). Dabei wurden die Versorgungskanäle 0,1 mm breiter als die Durchgangslöcher gewählt, um erneut ein einfaches Ausrichten der Klebefolie auf die Durchgangslöcher zu ermöglichen.

Zum Schluss wurden die Versorgungskanäle oben mit einer 0,3 mm starken PMMA-Folie und unten mit einer 10 mm starken PMMA-Platte mit eingefrästen Gewinden zum Verbinden mit Schläuchen gedeckelt (Abbildung 28-5). Die dadurch entstandene 3D-Kanalstruktur ist in Abbildung 28-6 gezeigt. Der durch die Kanalstruktur gebildete Hohlraum ist in Abbildung 29-1 gezeigt. Der zu fokussierende Strom floss in der Kanalebene. Die Hüllströme flossen von oben und unten her durch die Durchgangslöcher, wie vergrößert in Abbildung 29-2 gezeigt ist. Dadurch kam es zur Separation des fokussierenden Stroms vom Kanaldeckel und -boden sowie den Seiten (Abbildung 29-3).

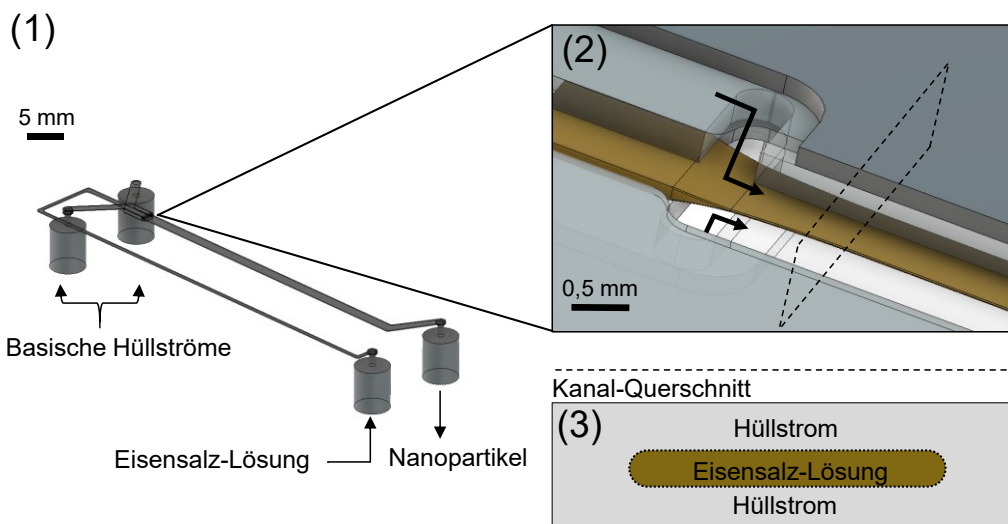
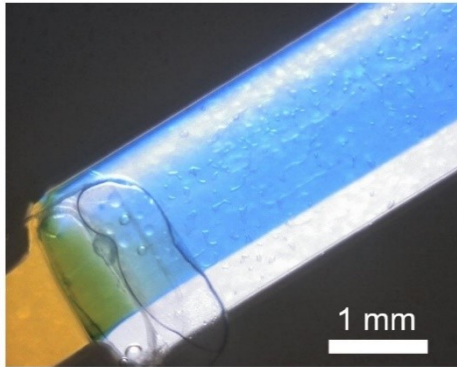


Abbildung 29: Durch Kanalstruktur gebildeter Hohlraum (1) mit vergrößerter Ansicht des Mischpunktes zur 3D-hydrodynamischen Fokussierung (2) und Querschnittsansicht nach dem Fokussieren (3).

Eine Aufsicht beim hydrodynamischen Fokussieren einer Bromthymolblau-Lösung mit basischem Hüllstrom ist in Abbildung 30 gezeigt. Bromthymolblau ist bei saurem pH-Wert gelb gefärbt. Durch Zulauf der Hüllströme durch die Durchgangslöcher (orthogonal zur Abbildungsebene in Abbildung 30) kam es zur hydrodynamischen Fokussierung. Durch Erhöhung des pH-Werts färbte sich die

Bromthymolblau-Lösung blau. Eine Blaufärbung entlang der gesamten Kanalbreite zeigte die Anwesenheit der basischen Hüllströme ober- und unterhalb der Bromthymolblau-Lösung an (Abbildung 30-B).

(A)



(B)

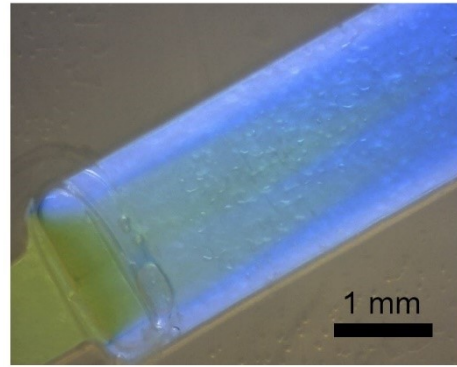
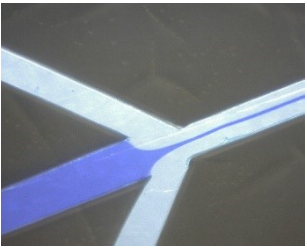
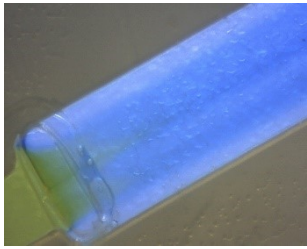
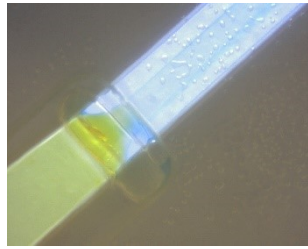

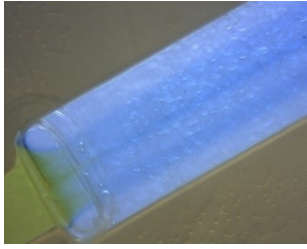
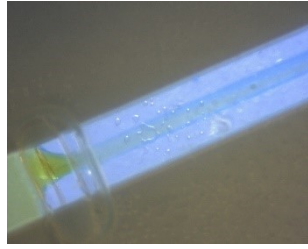

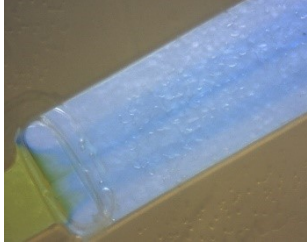
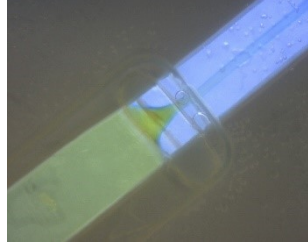

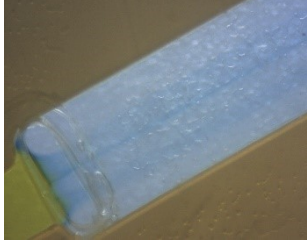
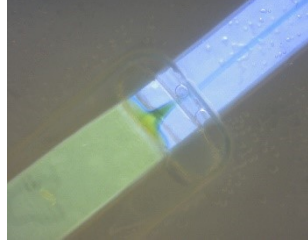

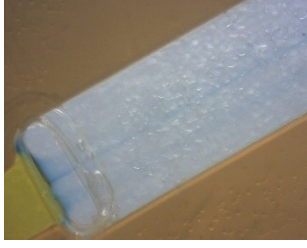
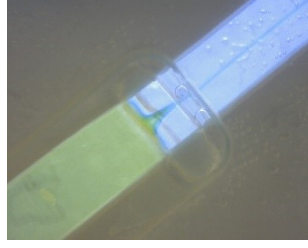


Abbildung 30: 3D-hydrodynamische Fokussierung einer Bromthymolblau-Lösung im basischen Hüllstrom. Bei falsch ausgerichteten Durchgangslöchern (A) war keine komplette Separation von den Kanalwänden möglich. Bei korrekter Ausrichtung (B) war der innere Strom komplett von allen Wänden getrennt (B).

Das exakte Ausrichten und Fluchten der beiden Durchgangslöcher für den Hüllstrom erwies sich als äußerst wichtig zum Erreichen des 3D-Fokussierungseffekts. Falsch ausgerichtete Löcher sind in Abbildung 30-A gezeigt. Der zentrale Strom wurde dadurch nicht komplett in das Kanalinnere fokussiert, sondern floss teils am Rand des Kanals.

Ein Vergleich der Änderung der Breite des fokussierten Stroms in Abhängigkeit des Flussratenverhältnisses (FRR – *flow rate ratio*), welches das Verhältnis der totalen Flussrate des Hüllstrom zur Flussrate des zu fokussierenden Stroms beschreibt, für 2D-Fokussierung, 3D-Fokussierung und 3D-Fokussierung ohne Verbreiterung des Hauptkanals ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Vergleich 2D-, 3D- und 3D-Fokussierung ohne Verbreiterung des Hauptkanals.

FRR	2D	3D	3D ohne Verbreiterung
5			
10			
20			
40			
80			

Der relative Breitenanteil des fokussierten Stroms an der Gesamtbreite des Kanals ist gegenüber der relativen Flussrate des fokussierten Stroms an der Gesamtflussrate in Abbildung 31 aufgetragen.

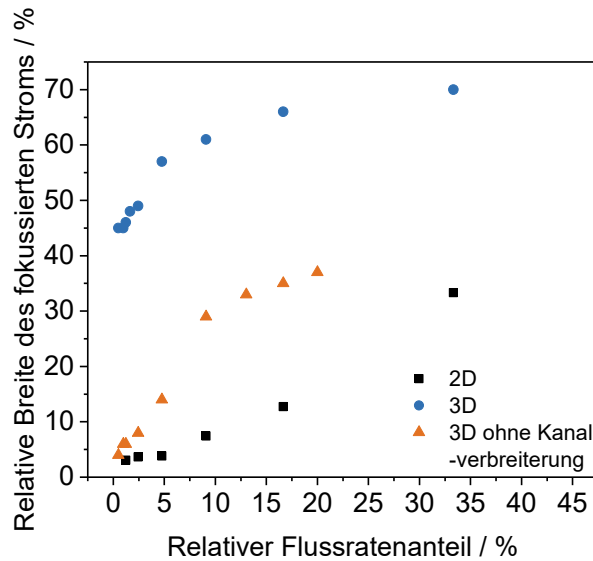


Abbildung 31: Relativer Breitenanteil des fokussierten Stroms in Abhängigkeit dessen relativer Flussrate für 2D-, 3D- und 3D-Fokussierung ohne Kanalverbreiterung.

Dabei ist zu erkennen, dass im Fall der 2D-Fokussierung der relative Breitenanteil annähernd gleich der relativen Flussrate des fokussierten Stroms war. Bei der Variation der relativen Flussrate zwischen 0,012 und 0,3 variierte der relative Breitenanteil annähernd linear zwischen 0,03 und 0,33. Die Fokussierung fand in horizontaler Richtung statt. Im Fall der 3D-Fokussierung lag der relative Breitenanteil mit 0,45 bis 0,7 weit über der relativen Flussrate des fokussierten Stroms, welche zwischen 0,005 und 0,33 variiert wurde. Aufgrund der Massenbilanz kann geschlossen werden, dass der fokussierte Strom nicht die komplette Kanalhöhe einnahm und eine Fokussierung in vertikaler Richtung stattfand. Eine geringe Änderung der Breite des fokussierten Stroms mit der relativen Flussrate zeigte ebenfalls einen geringen Anteil an horizontaler Fokussierung. Grund dafür war die höhere Breite der Versorgungskanäle. Diese wurden breiter konstruiert, um das Zusammenkleben zu vereinfachen.

Dies wurde deutlich, wenn der Hauptkanal an der Stelle des Zusammenlaufens nicht verbreitert wurde, während die Breite der Durchgangslöcher und Versorgungskanäle nicht geändert wurde (siehe Tabelle 5, 3D ohne Verbreiterung). Die Durchgangslöcher waren so deutlich breiter als der Hauptkanal. Die relative Breite des fokussierten Stroms sank bei einer relativen Flussrate von 0,005 annähernd auf denselben Wert der 2D-Fokussierung ab, was einer komplett horizontalen Fokussierung entsprach.

Das Flussprofil wurde ebenfalls durch Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Dazu wurde eine Fluorescein-Lösung dreidimensional in Wasser fokussiert. Abbildung 45 zeigt die Intensitätsprofile quer zur Flussrichtung für unterschiedliche FRR.

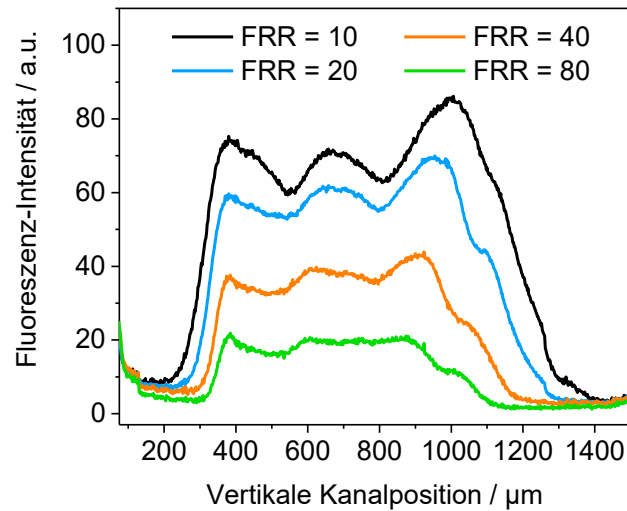


Abbildung 32: Fluoreszenz-Intensitätsprofil entlang der vertikalen (quer zur Flussrichtung) Kanalposition für variierende Flussratenverhältnisse.

Wie bei der Fokussierung von Bromthymolblau war ebenfalls nur eine leichte Zunahme der Breite des fokussierten Stroms von 650 μm bei einem FRR von 80 auf 880 μm bei einem FRR von 10 zu erkennen. Dies deutet an, dass die Fokussierung sowohl in horizontaler als auch vertikaler Richtung stattfand. Die Höhe des fokussierten Stroms zeichnete sich durch Höhe der Intensitätsprofile ab, da mit Zunahme der Höhe die Menge an Fluorescein in vertikaler Kanalrichtung zunahm. Diese Höhe der Intensitätsprofile stieg von 20 a.u. bei einem FRR von 80 auf durchschnittlich 75 a.u. bei einem FRR von 10.

Bestätigt wurde die 3D-Fokussierung und komplette Separation des fokussierten Stroms von allen Wänden durch konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie. Abbildung 33 zeigt den Schnitt durch das Flussprofil von fokussiertem Fluorescein. Aufgrund des verwendeten Objektivs (10x) war nur das Erstellen eines Schnitts durch eine Kanalhälfte möglich und ist somit so in Abbildung 33 gezeigt.

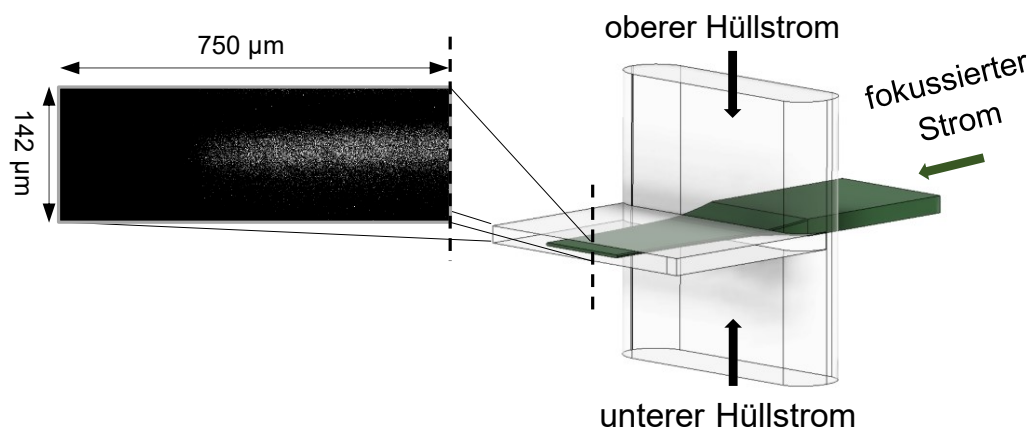
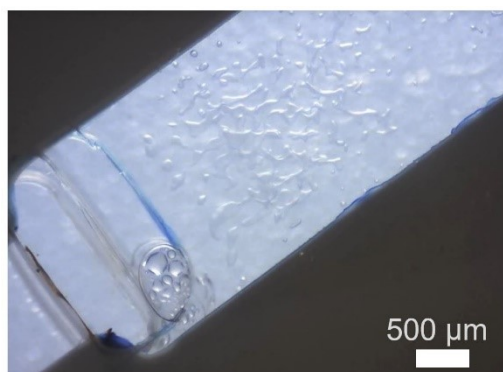


Abbildung 33: Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahme einer 3D-fokussierten Fluorescein-Lösung. Die Aufnahme wurde an der schematisch gezeigten Stelle der 3D-hydrodynamischen Fokussierung gemacht.

Während der Verwendung von 2D-fokussierenden Reaktoren bei der Synthese magnetischer Nanopartikel kam es zu Ablagerungen innerhalb weniger Minuten. Als durch 3D-Fokussierung der Eisensalzlösung durch basische Hüllströme die Partikelbildung komplett von den Kanalwänden getrennt wurde, war das Herstellen von Partikeln ohne Ablagerungen möglich. Ein Vergleich von 2D- und 3D-fokussierendem Reaktor während der Synthese von magnetischen Nanopartikeln bei gleichen Synthesebedingungen ist in Abbildung 34 gezeigt.

(A)



(B)

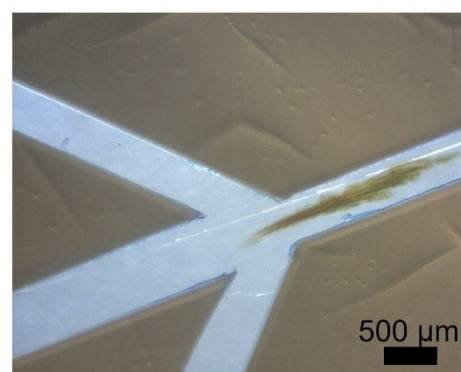


Abbildung 34: Vergleich von Partikelablagerung bei der Synthese magnetischer Nanopartikel mit 3D-hydrodynamischer Fokussierung (A) und 2D-Fokussierung (B).

Der Vergleich in Abbildung 34 zeigte, dass durch die 3D-Fokussierung eine stabile Synthese magnetischer Nanopartikel möglich war, ohne dass es schnell zu Ablagerungen in dem Kanal kam.

3.2. Herstellungsverfahren von analytischen Mikroarrays aus Kunststofffolien

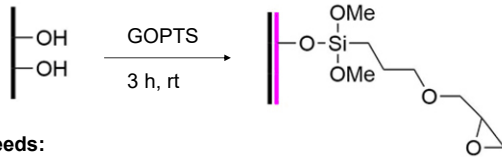
Am IWC finden analytische Mikroarrays zahlreiche Anwendung zur Detektion und Quantifizierung von Legionellen, Antibiotika und Viren. Dazu wurden Mikroarrays mit Antikörpern, Antibiotika und DNA als Fängermoleküle hergestellt [8, 17, 19]. Grundlage dafür sind funktionalisierte Glasträger, welche in einem mehrstufigen Prozess funktionalisiert werden. Der Funktionalisierungsprozess stellt jedoch einen hohen Arbeitsaufwand dar, erfordert viel Zeit und verursacht hohe Mengen an Lösemittel- und Säureabfall [15, 202].

Im Zuge der Entwicklung eines Herstellungsverfahrens für analytische Mikroarrays auf Kunststofffolien galt es, den Arbeitsaufwand sowie zeitlichen Aufwand zur Herstellung zu verringern. Dies ist einerseits wichtig, um die eigentliche Assay-Entwicklung nicht durch die Chipherstellung zu limitieren, andererseits sollte ein kostengünstigerer Herstellungsprozess geschaffen werden, um bessere Möglichkeiten und Ausgangssituation für eine spätere Massenproduktion zu bieten. Durch das Einsparen von Lösemittel- und Säureabfällen sollten ebenfalls Kosten gespart, sowie ein umweltfreundlicherer Herstellungsprozess gestaltet werden.

Der ursprüngliche Prozess zum Herstellen von Mikroarrays auf Glasträgern ist schematisch in Abbildung 35 gezeigt. Darin sind die einzelnen Prozessschritte und deren zeitlicher Aufwand aufgetragen. Der Zweck jeden Schrittes wurde analysiert, um im Zuge dessen die Anforderungen (*Needs*) des neu zu entwickelnden Herstellungsprozesses zu definieren [203].

1. Gravieren und Waschen der Glaträger

2. Anätzen der Glasoberfläche mit HCl/MeOH (1:1) and konz. H₂SO₄
 3. Silanisieren mit GOPTS

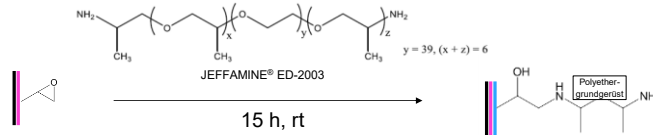


Needs:

- System zum **Unterscheiden** der Chips
- **Saubere** Oberfläche
- **Bindestellen** zum Beschichten mit *Jeffamine*

Gravieren und Waschen 18 h
Anätzen → 3 h
Silanisieren → 4 h

4. Beschichtung mit Jeffamine® ED-2003 :

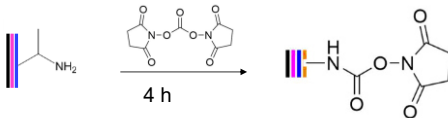


Needs:

- Verhindern der **unspezifischen Bindung**
- **Funktionelle Gruppen** zur Immobilisierung von Fängermolekülen

Gravieren und Waschen 18 h
Anätzen → 3 h
Silanisieren → 4 h
<i>Jeffamine</i> → 16 h, 100 °C
Waschen → 15 min, rt

5. Aktivieren mit with DSC in DMF:



6. Spotten von Antikörpern durch Mikrokontakt-Drucken
 7. Blocken der Oberfläche mit TRIS-HCl

Needs:

- **Aktivieren der Oberfläche** zum **chemischen Immobilisieren** von Fängermolekülen
- **Deaktivieren verbleibender Bindestellen** um unspezifische Bindung zu minimieren

Gravieren und Waschen 18 h
Anätzen → 3 h
Silanisieren → 4 h
<i>Jeffamine</i> → 16 h, 100 °C
Aktivieren → 5 h, rt
Spotten und inkubieren → 18 h
Blocken und Zusammenbau der Flusszelle → 1 h

Abbildung 35: Funktionalisierungsprozess von Glas zur Herstellung von Mikroarrays mit Anforderungen (Needs) an jeden Schritt der Funktionalisierung sowie Angabe der Gesamtzeit.

3.2.1. Needs zur Oberflächenfunktionalisierung

Beim Herstellungsprozess von Mikroarrays auf Glas wird zu Beginn jeder Glasrager mit einer fortlaufenden Nummer graviert. Dies dient zur späteren Unterscheidung sowie zur Identifizierung der funktionalisierten Seite. Anschließend wird die Oberfläche in wässriger Hellmanex®-Lösung (2 % (v/v)) gereinigt, um Staub und Fett zu entfernen. Dies geschieht für 1 h im Ultraschallbad, 15 h auf einem Schüttler und erneut für 1 h im Ultraschallbad. Danach wird die Oberfläche mit einem 1:1 (v/v) Gemisch aus Salzsäure (37 % (v/v)) und Methanol sowie konzentrierter Schwefelsäure für jeweils 1 h angeetzt, um das Silanisieren der Oberfläche zu ermöglichen. Die Silanisierung erfolgt mittels (3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan (GOPTS), welches zwischen zwei Glas-Chips als Sandwich für 3 h inkubiert wird. Danach wird ausgiebig mit Ethanol und Methanol gewaschen. Die Silanisierung dient zum Einführen reaktiver Epoxid-Gruppen auf der Glasoberfläche zur Immobilisierung von Jeffamine® ED-2003. Die Beschichtung mit *Jeffamine* erfolgt ebenfalls im Sandwich für 15 h bei 98 °C. Die *Jeffamine*-Beschichtung minimiert unspezifische Bindungen im späteren Assay und erlaubt durch terminale Aminogruppen das Immobilisieren von Fängermolekülen. Uberschussiges *Jeffamine* wird durch zweimaliges Spülen mit Wasser im Ultraschallbad für 15 min abgewaschen. Um Fängermoleküle chemisch zu immobilisieren, wird die Oberfläche mit Disuccinimidylcarbonat (DSC) in Dimethylformamid (DMF) für 4 h aktiviert und mit Methanol gewaschen. Eine zweite Möglichkeit ist, die Oberfläche mit Diepoxy-PEG im Sandwich zu aktivieren. Nach dem Mikrodosieren und Inkubieren wird die restliche Oberfläche 15 min in 1 M Tris-HCl bei pH 8,5 geblockt, um die unspezifische Bindung der aktivierten Oberfläche zu minimieren.

3.2.2. Ansatz für neuen Herstellungsprozess auf Kunststoffsubstraten

Der Ansatz der Auslegung des neuen Herstellungsprozesses ist im Folgenden beschrieben. Jeffamine® ED-2003 sollte als zentrale Beschichtung beibehalten werden, da dies als kostengünstige Chemikalie verfügbar ist, wasserlöslich ist und beste Eigenschaften zur Verringerung unspezifischer Bindungen aufweist [15]. Durch die Verwendung von Kunststofffolien sollte sich das einfache Zuschneiden von Chips während oder nach dem Funktionalisierungsprozess ermöglichen. Dadurch sollten mehrere Chips als eine Einheit gemeinsam funktionalisiert werden können. Da nicht mit organischem Lösemittel gewaschen werden sollte, entfiel zusätzlich das Gravieren der einzelnen Chips. Da Kunststofffolien mit einer Schutzfolie versehen sind, muss die Oberfläche vor der Funktionalisierung nicht separat gereinigt werden. Vielen Kunststofffolien verfügen zudem über chemische Gruppen innerhalb deren Polymerstruktur, welche das direkte reagieren mit *Jeffamine* erlaubt. Somit wäre kein Anetzen und Silanisieren notwendig. Das gemeinsame Auftragen von Aktivierungsreagenzien zum Immobilisieren der Fängermoleküle mit den Fängermolekülen zusammen im Mikrodosierschritt würde einen separaten Aktivierungsschritt ersparen. Da nur lokal aktiviert werden würde, könnte auch der Schritt des Blockens gespart werden.

3.2.3. Succinylierung von Jeffamine® ED-2003

Die Aktivierung der Oberfläche mit DSC in DMF war aufgrund der Unbeständigkeit der Kunststoffe gegenüber DMF nicht möglich. Außerdem war das Kombinieren der organischen Aktivierungslösung mit der wässrigen Mikrodosier-Lösung nicht möglich. Um dennoch eine *N*-Hydroxysuccinimid-aktivierte Oberfläche zu erhalten, wurde ein Carboxy-funktionalisiertes *Jeffamine* erstellt, indem *Jeffamine* mit Succinanhidrid in Toluol umgesetzt wurde. Jeffamine® ED-2003 verfügt über zwei Aminogruppen. Dabei sollte möglichst nur eine funktionalisiert werden. Die serielle Nebenreaktion zum doppelt-funktionalisierten *Jeffamine* war dabei unerwünscht. Somit konnte das einfach-funktionalisierte *Jeffamine* weiterhin mit der verbleibenden Aminogruppe an der PC-Oberfläche reagieren.

Unter Annahme doppelter Reaktionsgeschwindigkeit für die erste Funktionalisierung gegenüber der zweiten, lag das ideale molare Verhältnis von Succinanhidrid zu *Jeffamine* bei 1:1 für ein maximales Verhältnis an einfach zu doppelt funktionalisiertem *Jeffamine* (siehe Berechnung im Anhang). Um jedoch mehr nicht-funktionalisiertes als doppelt-funktionalisiertes *Jeffamine* zu erhalten, wurde ein molares Verhältnis von 0,8:1 gewählt. Doppelt-funktionalisiertes *Jeffamine* kann nicht mehr durch Aminolyse mit der Oberfläche reagieren.

FT-IR-Spektren vor und nach der Funktionalisierung von *Jeffamine* sind in Abbildung 36 gezeigt. Die zusätzlichen Banden zeigten bei 1734 cm^{-1} die Carbonyl-Streckschwingung (C=O) der freien Säuregruppe und bei 1671 cm^{-1} die Carbonyl-Streckschwingung (-NH-C=O) der Amid-Carbonylgruppe [204].

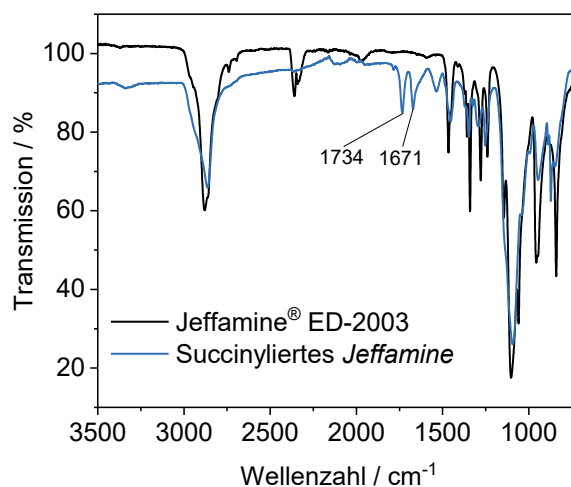


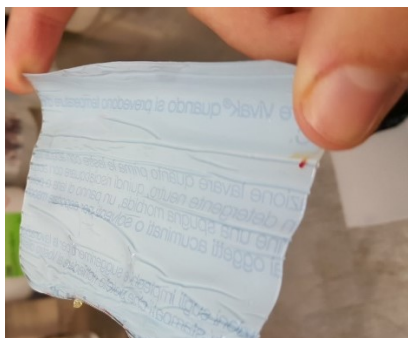
Abbildung 36: FT-IR-Spektrum von nicht-funktionalisiertem Jeffamine® ED-2003 und nach der Funktionalisierung mit Succinanhidrid.

3.2.4. Potentielle Kunststoffsubstrate zur Herstellung von Mikroarrays

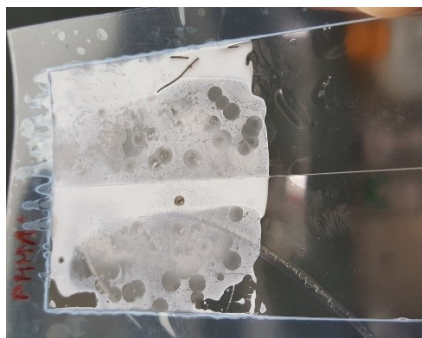
Als potentielle Kunststoffsubstrate wurden Kunststoffe gewählt, die aufgrund ihrer chemischen Struktur die Möglichkeit besitzen mit Aminogruppen und somit potentiell mit *Jeffamine* zu reagieren. Dies ist für Polyethylenterephthalat (PET) [205], Polymethylmethacrylat (PMMA) [81] sowie Polycarbonat (PC) [82] bekannt. Im Fall von PET verläuft die Reaktion über einen nukleophilen Angriff des Amins am Carbonyl-C-Atom der Estergruppe in der Polymerkette. Dabei kommt es zur Auftrennung der Polymerkette. Das Amin ist über ein Amid an eine Kette gebunden, während die andere über eine terminale Hydroxygruppe verfügt [205]. Analog läuft die Reaktion im Falle von PC. Der nukleophile Angriff erfolgt am Carbonyl-C-Atom der Carbonat-Gruppe. Durch Auftrennen der Polymerkette ist das Amin über ein Urethan gebunden. Die andere Kette verfügt über eine terminale Hydroxy-Gruppe [82]. Bei PMMA erfolgt der nukleophile Angriff ebenfalls am Carbonyl-C-Atom der Methyl ester entlang der Polymerkette. Dabei kommt es zu keiner Aufspaltung der Polymerkette, sondern lediglich zur Abspaltung von Methanol [81].

Modifiziertes *Jeffamine* wurde direkt auf die Kunststoffoberfläche ohne Deckeln aufgeschmolzen und 2 h bei 100 °C inkubiert. Kunststoffe nach der Behandlung sind in Abbildung 37 gezeigt. PET hielt der Hitzebehandlung nicht stand (Abbildung 37-A). Es verformte sich stark und es bildeten sich Risse. PMMA wurde durch die Paste stark angegriffen, was sich durch eine nicht abwaschbare weiße Kruste abzeichnete (Abbildung 37-B). Polycarbonat zeigte nach der Behandlung eine leicht milchige aber gleichmäßige Struktur mit deutlich besserer Benetzbarkeit. Ein Vergleich der Benetzbarkeit vor und nach der Behandlung von PC ist in Abbildung 38 gezeigt.

(A)



(B)



(C)

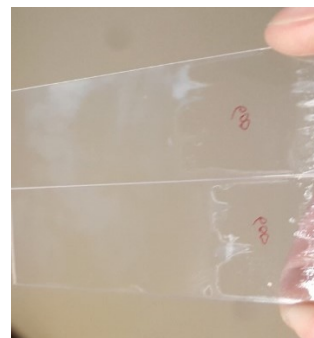


Abbildung 37: PET (A), PMMA (B) und PC (C) nach dem Aufschmelzen von funktionalisiertem Jeffamine® ED-2003 bei 100 °C für 2 h und Abwaschen von überschüssigem Material mit Wasser im Ultraschallbad.

(A)



(B)



Abbildung 38: Benetzbarkeit von unbeschichtetem (A) und mit modifiziertem Jeffamine® ED-2003 beschichtetem PC (B).

Somit wurde PC als Substrat zur Herstellung der Mikroarrays gewählt. Succinyliertes *Jeffamine* wurde zum Beschichten verwendet. Da funktionalisiertes *Jeffamine* wie reines Jeffamine® ED-2003 bei Raumtemperatur erstarrt, wurde durch die Zugabe von 15 % (w/w) Wasser eine hochviskose Paste erstellt, um das Auftragen auf die Kunststoffoberfläche zu vereinfachen.

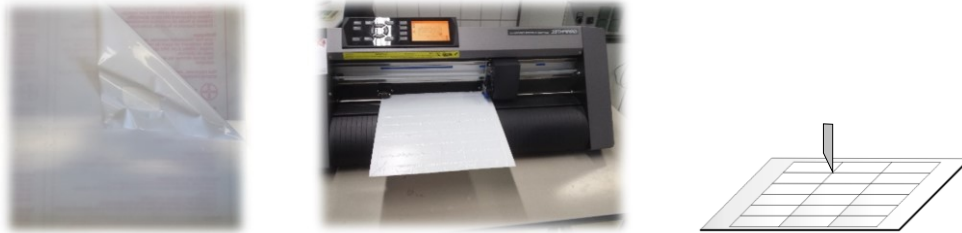
3.2.5. Herstellungsprozess von Mikroarrays auf Polycarbonat-Folien

Der auf dem Beschichten von PC basierende Herstellungsprozess für Mikroarray-Chips ist in Abbildung 39 dargestellt. Im Herstellungsprozess wurden jeweils insgesamt neun Chips als eine Einheit gehandhabt. Dazu wurden die Umrisse eines Chips mit 76 x 26 mm als 3 x 3 Anordnung mit einem digitalen Schneideplotter in eine PC-Platte geritzt (Abbildung 39-1). Die verwendeten Platten hatten eine Abmessung von 25 x 25 cm, sodass zwei der 3 x 3-Anordnungen nebeneinander in eine Platte geritzt werden konnten. Die Schutzfolie verblieb während des Schneidens auf der PC-Platte. Das Markieren durch Gravieren oder Beschriften jedes einzelnen Chips war in diesem Fall nicht notwendig. Einerseits war die beschichtete Seite später zu erkennen, andererseits verblieben die Chips bis zum Verkleben als 3 x 3-Einheit, sodass nur die Einheit selbst markiert werden musste. Da die Schutzfolie bis zu dem Beschichten mit der *Jeffamine*-Paste auf der Kunststoffoberfläche verblieb, entfiel der Waschschriff über Nacht. Da im nächsten Schritt modifiziertes *Jeffamine* direkt auf die Kunststoffoberfläche aufgetragen werden konnte, entfiel das Silanisieren und somit auch das Anätzen der Oberfläche. Zum homogenen Auftragen des modifizierten *Jeffamine* wurde ein Siebdrucker verwendet (Abbildung 39-2). Die verwendete Maske (24T Gewebe) ermöglichte das gleichzeitige Beschichten von zwei 3 x 3-Einheiten. Um das Ausrichten unter der Maske zu erleichtern, wurde aus

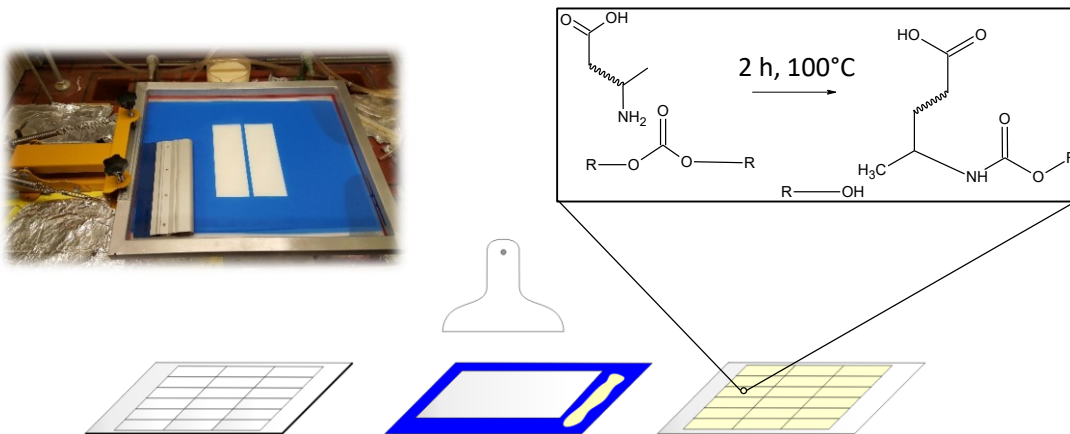
praktischen Gründen jedoch meist nur eine 3 x 3-Einheit auf einmal beschichtet. Nach dem Beschichten wurden die Platten für 2h bei 100 °C inkubiert, deutlich kürzer als zum Beschichten von Glas-Chips. Danach wurde überschüssiges *Jeffamine* durch zweimaliges Waschen mit Wasser im Ultraschallbad für jeweils 15 min von der Oberfläche gespült (Abbildung 39-3). Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom erfolgte das Mikrodosieren von Fängermolekülen (Abbildung 39-4). Da die Aktivierungsreagenzien in der Mikrodosier-Lösung enthalten waren, war kein separater Aktivierungsschritt der Oberfläche nötig. Jeweils eine 3 x 3-Einheit wurde in den Mikrodosierroboter eingelegt. Das Einlegen und Ausrichten im Mikrodosierroboter wurde durch die als 3 x 3-Einheit zusammengehaltenen Chips extrem erleichtert. Somit waren immer neun Chips gleich im Mikrodosier-Gerät ausgerichtet. Die Inkubation der Spots auf der Oberfläche erfolgte über Nacht für 15 h in einem Thermoschrank mit geregelter Luftfeuchtigkeit (Abbildung 39-5). Die Bedingungen zum Inkubieren von Antikörpern lagen dabei bei 25 °C und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Aufgrund der nur lokal chemisch aktivierten Oberfläche war ein separater Schritt zum Blocken der aktivierten Stellen danach nicht notwendig. Zum Aufkleben der Flusszelle wurde die 3 x 3-Einheit durch Auseinanderbrechen entlang der angeritzten Linien in neun Chips vereinzelt. Der vorgefertigte Flusskanal aus einer ausgeschnittenen Klebefolie und einem schwarzen Polyoxymethylen (POM)-Deckel wurde aufgeklebt und mit einer Walze verpresst (Abbildung 39-6). Jeder Chip wurde mit einem Aufkleber mit Chargennummer und zusätzlichen Information wie Herstellungsdatum und verwendeten Fängermolekülen markiert. Diese Aufkleber konnten vorgedruckt und schnell aufgeklebt werden, was einen deutlichen Vorteil gegenüber dem manuellen Gravieren der Glas-Chips bot. Wurden die Chips nicht direkt verwendet, wurden diese mit einer Pipette mit einer Konservierungslösung befüllt und die Löcher zu dem Flusskanal mit einer Klebefolie verschlossen.

1) Polycarbonat anritzen

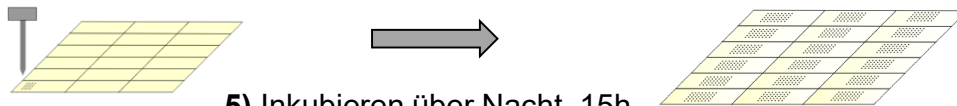


2) Siebdrucken von modifiziertem *Jeffamine* und inkubieren



3) PC-Chips waschen und trocknen

4) Mikrodosieren von Fänger-molekülen



5) Inkubieren über Nacht, 15h

6) Zusammenbau mit Flusszelle

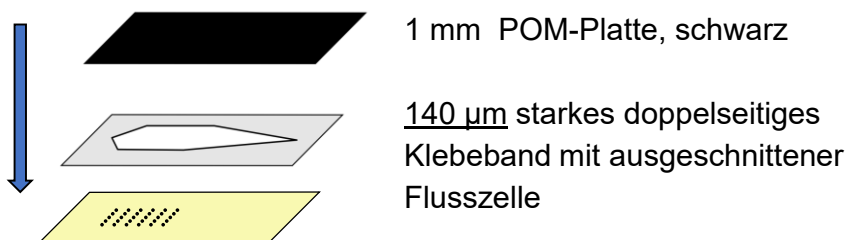


Abbildung 39: Darstellung des Herstellungsprozesses für Mikroarray-Chips aus PC. Anritzen der PC-Platte mit digitalem Schneideplotter (1). Danach erfolgte das Auftragen der *Jeffamine*-Paste mit einem Siebdrucker (2). Nach der Hitzebehandlung und dem Waschen mit Wasser (3) wurden Fänger-moleküle mikrodosiert (4). Nach der Inkubation über Nacht (5) wurden die Chips vereinzelt und mit dem Flusskanal und Deckel verklebt (6).

3.2.6. Gegenüberstellung von Herstellungsprozess von Glas-Chips und Herstellungsprozess von Polycarbonat-Chips

In Abbildung 40 ist der zeitliche Vergleich des neuen Herstellungsprozesses von PC-Chips zum bisherigen Herstellungsprozess von Glas-Chips dargestellt. Eine genaue tabellarische Auflistung aller Arbeitsschritte zur Berechnungsgrundlage ist im Anhang gegeben.

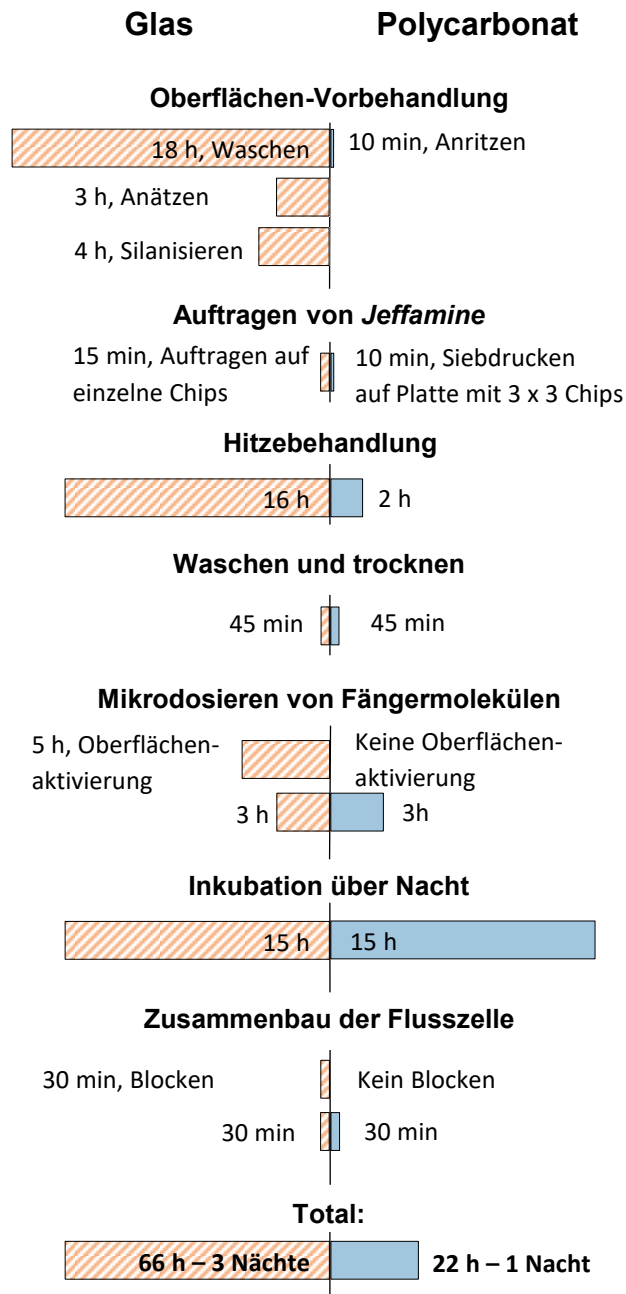


Abbildung 40: Darstellung der benötigten Zeit für die Herstellung von Mikroarrays aus PC im Vergleich zu Glas.

Das Gravieren einzelner Chips entfiel komplett. Ebenfalls war kein Waschen, Anätzen und Silanisieren der Oberfläche mehr notwendig. Außerdem war kein separater Aktivierungsschritt der Oberfläche vor dem Mikrodosieren und damit auch kein Blocken notwendig. Durch wegfallende Inkubationsschritte wurde der Prozess dadurch um knapp 27 h beschleunigt. Bei der Berechnungsgrundlage von neun hergestellten Chips konnte dadurch ebenfalls eine Arbeitszeit von über 3 h eingespart werden.

Die Inkubation bei 100 °C zum Beschichten mit *Jeffamine* wurde auf 2 h verkürzt. Dadurch konnten weitere 13 h eingespart werden. Durch das gemeinsame Handhaben von immer 3 x 3-Chips wurden Arbeitsabläufe wie das Einlegen in den Mikrodosier-Gerät sowie die Handhabung der Chips während dem Waschen vereinfacht und beschleunigt. Dadurch konnte eine weitere zeitliche Verkürzung des Arbeitsaufwands der restlichen Prozessschritte von 15 min erreicht werden.

Wurde die 10-fache Menge an produzierten Chips (99 Chips) als Berechnungsgrundlage verwendet, resultierte der neue Prozess in einer Arbeitszeit-Ersparnis von bis zu 22 h.

Durch Verwendung von PC-Chips und dem neu entwickelten Herstellungsprozess war somit das Erstellen von fertig gedeckelten Mikroarrays in unter 24 h möglich. Der längste Inkubationsschritt von 15 h zum Immobilisieren der Fängermoleküle konnte über Nacht zwischen zwei Arbeitstagen geschehen. Somit reichte zusammengezählt ein Arbeitstag zur Erstellung der Mikroarrays aus. Insgesamt waren zum Erstellen von neun Chips 3,5 Arbeitsstunden und 18,25 h zum Inkubieren notwendig.

Im Vergleich dazu dauerte der Herstellungsprozess für Glas-Chips insgesamt 65 h. Durch drei lange Inkubationsschritte von jeweils 15 h muss der Prozess auf 4 Arbeitstage verteilt werden. Insgesamt waren mit 6,7 Arbeitsstunden fast der doppelte Arbeitsaufwand notwendig. Werden mehr Chips produziert steigt der Arbeitsaufwand für Glas-Chips stärker an. So sind zur Herstellung von 99 PC-Chips 13 Arbeitsstunden und von 99 Glas-Chips 35,5 Arbeitsstunden notwendig.

3.2.7. Optimierung des Herstellungsprozesses von Mikroarrays auf Polycarbonat

Der Mikrodosier- und Beschichtungsprozess wurde mit Antikörpermikroarrays optimiert. Dazu wurde ein Antikörper gegen Meerrettichperoxidase (*anti-horseradish peroxidase*, anti-HRP) mit einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} immobilisiert und Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* - HRP) über eine Chemilumineszenz-Reaktion mit Luminol und Wasserstoffperoxid detektiert. Die HRP-Konzentration wurde auf 100 ng mL^{-1} festgelegt. Das verwendete Ablaufprogramm am MCR ist im Anhang beschrieben. Die Carboxy-Oberfläche erlaubte das Aktivieren mit *N*-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz (*s*-NHS) und EDC in wässriger Lösung. Die Aktivierungsreagenzien wurden zusammen mit den Fängermolekülen im Mikrodosierprozess aufgetragen. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 41 gezeigt.

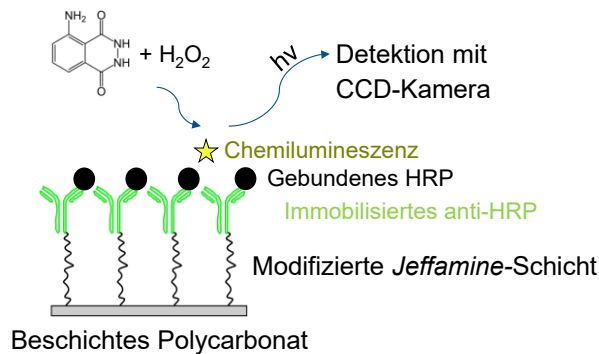


Abbildung 41: Darstellung des Assay-Prinzips zu Optimierung der Herstellungsbedingungen. Anti-HRP wurde auf beschichtetem PC immobilisiert und bindet HRP. Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz mit Luminol/ H_2O_2 als Reportersystem.

Ofenzeit

Die Zeit zum Beschichten der Kunststoffoberfläche mit *Jeffamine* bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ konnte im Vergleich zum Herstellungsprozess von Glas-Chips deutlich reduziert werden. Zur Optimierung der Inkubationszeit wurde die Inkubationszeit zwischen 0,5 h und 3 h variiert. Zusätzlich wurden die Signalintensitäten mit einem unbeschichteten PC-Chip verglichen. Intensitäten der Chemilumineszenz (CL)-Signale in Abhängigkeit der Inkubationszeit sind in Abbildung 42 gezeigt.

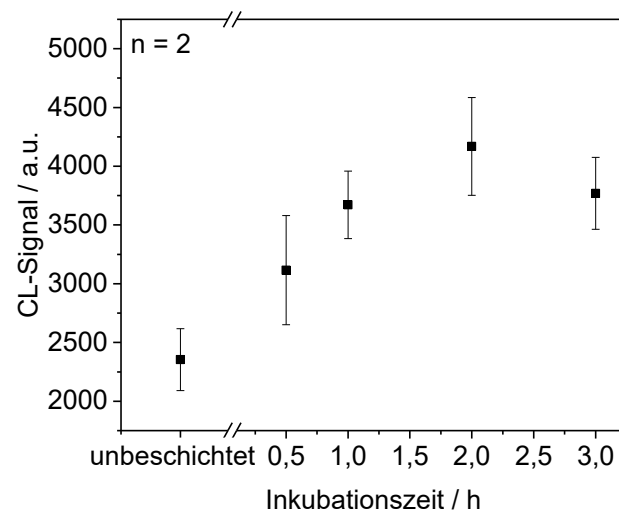


Abbildung 42: CL-Signal in Abhängigkeit der Inkubationszeit der Beschichtung bei 100 °C.

Es ließ sich eine Zunahme der CL-Signal mit der Inkubationszeit bis zu 2 h beobachten. Dabei stiegen die CL-Signal zwischen 0,5 h und 2 h von 3115 ± 464 a.u. auf 4169 ± 415 a.u. Das CL-Signal des unbeschichteten PC-Chips lag bei 2354 ± 262 a.u. und damit bei nur 56 % des maximalen Signals, welches bei einer Inkubationszeit von 2 h erzielt wurde. Eine längere Inkubationszeit von 3 h führte zu einer Verringerung des CL-Signals auf 3769 ± 305 a.u. Han *et al.* zeigte 1997, dass sich Polyethylenglycole bei erhöhter Temperatur an der Luft zersetzen [206]. Dazu wurde Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 6000 g mol^{-1} über 1000 h auf 80°C erhitzt und die Zersetzung anhand der Schmelztemperatur untersucht. Zwar wurde bei geringen Zeiten keine signifikante Änderung des Schmelzpunktes festgestellt, trotzdem besteht diese Möglichkeit während des Beschichtens aufgrund der höheren Temperatur von 100°C und der dünnen Schichtdicke.

Deutlich Unterschiede zwischen den beschichteten und unbeschichteten PC-Chips waren zudem bei dem Signal-Hintergrund-Verhältnis zu beobachten. Als Signal galt das ausgegebene CL-Signal des Spots. Als Hintergrund wurde der durchschnittliche Intensitätswert zwischen den Spots gemessen. Während bei beschichteten PC-Chips Signal-Hintergrund-Verhältnisse zwischen 131 und 151 beobachtet wurden, lagen das Signal-Hintergrund-Verhältnis der unbeschichteten PC-Chips bei 63. Dies deutete eine Reduzierung der unspezifischen Bindung neben den Spots durch die Beschichtung an.

Aktivierungsreagenzien

Zur chemischen Aktivierung der Carboxy-Oberflächen mit *N*-Hydroxysuccinimid wurden die Aktivierungsreagenzien EDC und s-NHS der Mikrodosier-Lösung beigemischt. Zur Optimierung der Konzentration wurde die Konzentration jeweils von 0 mg mL⁻¹ bis 5 mg mL⁻¹ variiert. Aufgrund der stöchiometrischen Reaktion und der ähnlichen molaren Masse wurden die gleichen Massenkonzentration verwendet. Dabei wurden die anderen Konzentrationen konstant bei 1 mg mL⁻¹ anti-HRP, 0,1 mg mL⁻¹ Pluronic® F-127 und 50 mg mL⁻¹ Trehalose gehalten. Die CL-Signal-Intensitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Aktivierungsreagenzien sind in Abbildung 43 gezeigt. Es wurden jeweils die gleichen Mengen an EDC und s-NHS verwendet.

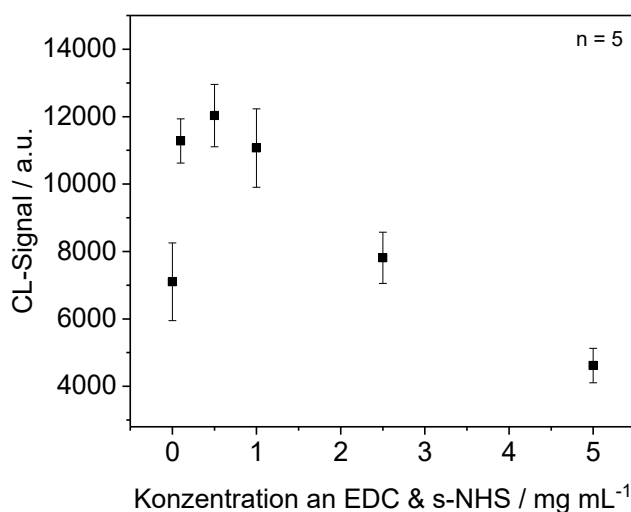


Abbildung 43: CL-Signal in Abhängigkeit der Konzentration von jeweils EDC und s-NHS beim Immobilisieren von 1 mg mL⁻¹ anti-HRP.

Die Zugabe von jeweils 0,1 mg mL⁻¹ EDC und s-NHS zur Mikrodosier-Lösung zeigte einen deutlichen Anstieg des CL-Signals von 7101 ± 1155 a.u. auf 12032 ± 922 a.u. gegenüber der Verwendung von keinem EDC und s-NHS. Das maximale CL-Signal von 12032 ± 922 a.u. wurde bei einer EDC und s-NHS Konzentration von jeweils 0,5 mg mL⁻¹ erreicht. Danach nahmen die CL-Signale bis auf 4615 ± 508 a.u. bei einer EDC und s-NHS Konzentration von jeweils 5 mg mL⁻¹ ab.

Da Antikörper neben Aminogruppen auch Carboxygruppen in ihrer chemischen Struktur besitzen, besteht die Möglichkeit des Vernetzens zwischen den Antikörpern [77]. Dies kann zur Inaktivierung der Bindestellen führen. Eine höhere Konzentration an EDC und s-NHS kann diesen Vorgang begünstigen.

Im finalen Prozess wurde eine EDC und s-NHS von 1 mg mL⁻¹ zur Herstellung von Antikörper-Mikroarrays gewählt. Einerseits sind die CL-Signal-Intensitäten bei 1 mg mL⁻¹ nicht deutlich geringer als

bei $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, andererseits ist somit sichergestellt, dass bei höheren Antikörperkonzentrationen genügend EDC und s-NHS vorhanden ist.

Pluronic® F-127 und Trehalose

Um die Antikörper während des Mikrodosierens zu stabilisieren, wurde der Mikrodosierlösung das Detergens Pluronic® F-127 zugegeben. Eine CL-Aufnahme bei von links nach rechts zunehmender *Pluronic*-Konzentration ist in Abbildung 44-A gezeigt. CL-Aufnahmen bei zusätzlichem Einsatz von Trehalose sind in Abbildung 44-B (50 mg mL^{-1}) und Abbildung 44-C (100 mg mL^{-1}) gezeigt.

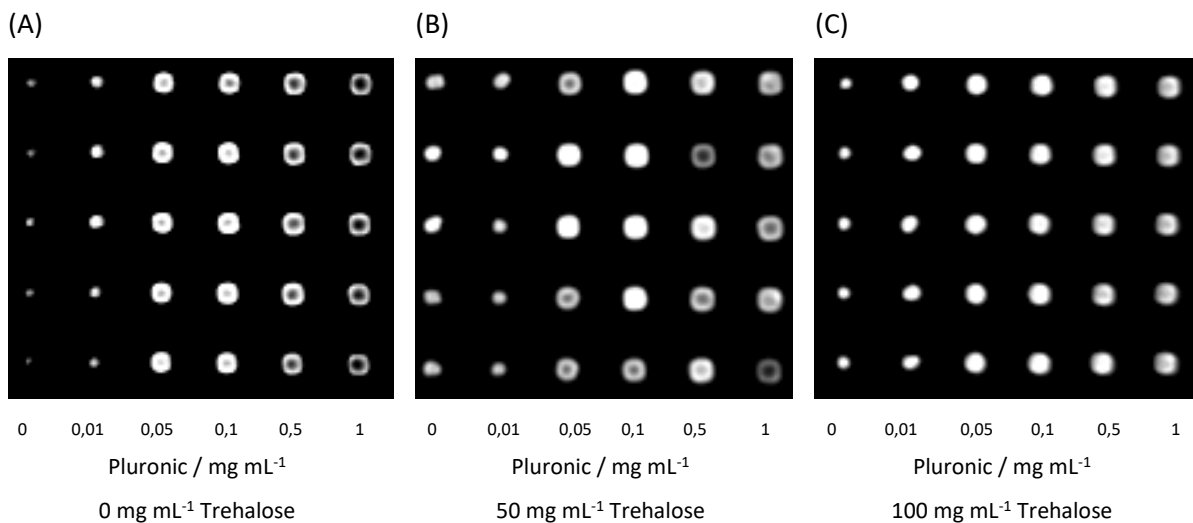
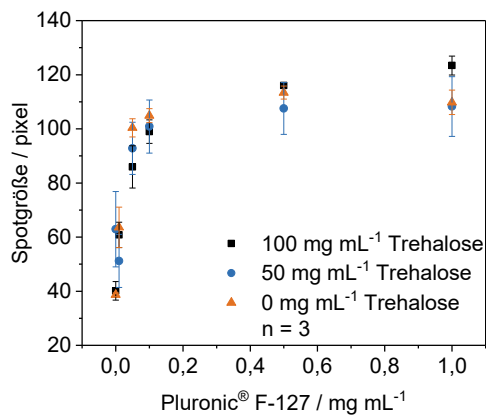


Abbildung 44: Chemilumineszenz-Aufnahme bei variiertem Konzentration an Pluronic® F-127 in horizontaler Richtung bei einer Trehalose-Konzentration von 0 mg mL^{-1} (A), 50 mg mL^{-1} (B) und 100 mg mL^{-1} (C).

Wurde keine Trehalose während des Mikrodosierungs-Prozesses verwendet, bildeten sich mit zunehmender *Pluronic*-Konzentration ringförmige Spots (*Donuts*). Dies zeichnete sich besonders bei den beiden höchsten *Pluronic*-Konzentration von $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ und 1 mg mL^{-1} ab. Beim Einsatz von 50 mg mL^{-1} Trehalose wurde dieser Effekt schwächer und verschwand beim Einsatz von 100 mg mL^{-1} Trehalose komplett.

Mit zunehmender *Pluronic*-Konzentration von 0 mg mL^{-1} bis 1 mg mL^{-1} erhöhte sich zudem der Durchmesser der Spots. Zur Ermittlung der Spotgröße wurde ein Schwellwert herangezogen, welcher der durchschnittlichen Intensität über alle Pixel des Bildausschnittes mit den betrachteten Spots entsprach. Pixel mit einer Intensität oberhalb des Schwellwerts wurden zum Spot gezählt. Die Größe des Spots wurde mit der Funktion *Analyze Particles* innerhalb des Programms *ImageJ* bestimmt. Die Spotgrößen in Abhängigkeit der *Pluronic*-Konzentration bei einer Trehalose-Konzentration von 0, 50 und 100 mg mL^{-1} sind in Abbildung 45-A gezeigt. Daneben sind in Abbildung 45-B die CL-Intensitäten in derselben Abhängigkeit aufgetragen.

(A)



(B)

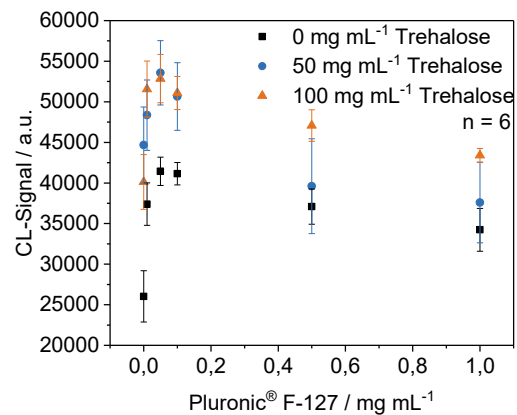


Abbildung 45: Darstellung der ermittelten Spotgröße der zugehörigen Chemilumineszenz-Aufnahme bei variiertem Konzentration an Pluronic® F-127 (A) und dazugehörige Chemilumineszenz-Signalintensitäten (B).

Für alle betrachteten Trehalose-Konzentrationen war ein steiler Anstieg der Spotgröße von 40 pixel auf 100 pixel zwischen einer *Pluronic*-Konzentration von 0 mg mL⁻¹ und 0,1 mg mL⁻¹ zu verzeichnen. Danach flachte die Zunahme der Spotgröße ab und stieg bei zunehmender *Pluronic*-Konzentration bis 1 mg mL⁻¹ lediglich bis maximal 123 pixel an

Die Zugabe von 0,05 mg mL⁻¹ *Pluronic*® F-127 bei der mittleren Trehalose Konzentration von 50 mg mL⁻¹ führte zum höchsten CL-Signal von 53572 ± 3963 a.u. Dies zeichnete sich durch eine Zunahme der CL-Signalintensitäten von 44675 ± 4687 a.u. auf 53572 ± 3963 a.u. über einen *Pluronic*-Konzentrationsbereich von 0 mg mL⁻¹ bis 0,05 mg mL⁻¹ ab. Bei höheren Konzentrationen bis 1 mg mL⁻¹ war eine Abnahme der CL-Signalintensitäten auf 37594 ± 4957 a.u. zu verzeichnen. Auch bei der Verwendung von keiner Trehalose führte das Einsetzen von bis zu 0,05 mg mL⁻¹ *Pluronic*® F-127 zu einer Erhöhung der CL-Signale von 26027 ± 3160 a.u. auf 41428 ± 1742 a.u. Danach war ebenfalls eine Abnahme auf 34236 ± 2637 a.u. bei einer *Pluronic*-Konzentration bis 1 mg mL⁻¹ zu verzeichnen. Beim Einsatz von 100 mg mL⁻¹ Trehalose in der Mikrodosierlösung und keinem Auftreten kreisförmiger Spots stiegen die CL-Signale auf maximal 52857 ± 2982 a.u. bei einer *Pluronic*-Konzentration von 0,05 mg mL⁻¹ und sanken bis zu einer *Pluronic*-Konzentration von 1 mg mL⁻¹ auf 43397 ± 836 a.u. ab.

Durch den Einsatz von *Pluronic*® F-127 konnten die Spotgrößen und Signalintensitäten erhöht werden. Bei zu hohen Konzentrationen an *Pluronic*® F-127 kann jedoch ein effizientes Immobilisieren auf dem PC-Chip gestört und die CL-Signal Intensitäten reduziert werden. Der Einsatz von Trehalose verhinderte das Bilden von kreisförmigen Spots und verminderte somit die Abnahme CL-Signalintensitäten bei zunehmender *Pluronic*-Konzentration. Obwohl die höchste Trehalose-Konzentration von 100 mg mL⁻¹

die höchsten CL-Signale über den größten Bereich an *Pluronic*-Konzentrationen zeigte, konnten bei einer *Pluronic*-Konzentration von $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ und einer Trehalose-Konzentration von 50 mg mL^{-1} die höchsten CL-Signale erzielt werden. Der Einsatz von 100 mg mL^{-1} an Trehalose wurde zusätzlich durch die Herstellung hochkonzentrierter Stammlösungen durch die beschränkte Löslichkeit von Trehalose eingeschränkt. Zur Optimierung der Trehalose Konzentration wurde diese zwischen 0 mg mL^{-1} und 100 mg mL^{-1} variiert, während eine Antikörperkonzentration von 1 mg mL^{-1} anti-HRP und $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ EDC, $1,1 \text{ mg mL}^{-1}$ s-NHS und $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ Pluronic® F-127 eingesetzt wurden. Abbildung 46-A zeigt eine CL-Aufnahme bei variiertem Trehalose-Konzentration in horizontaler Richtung. Die dazugehörigen Spotgrößen sind in Abbildung 46-B und Abbildung 46-C gezeigt.

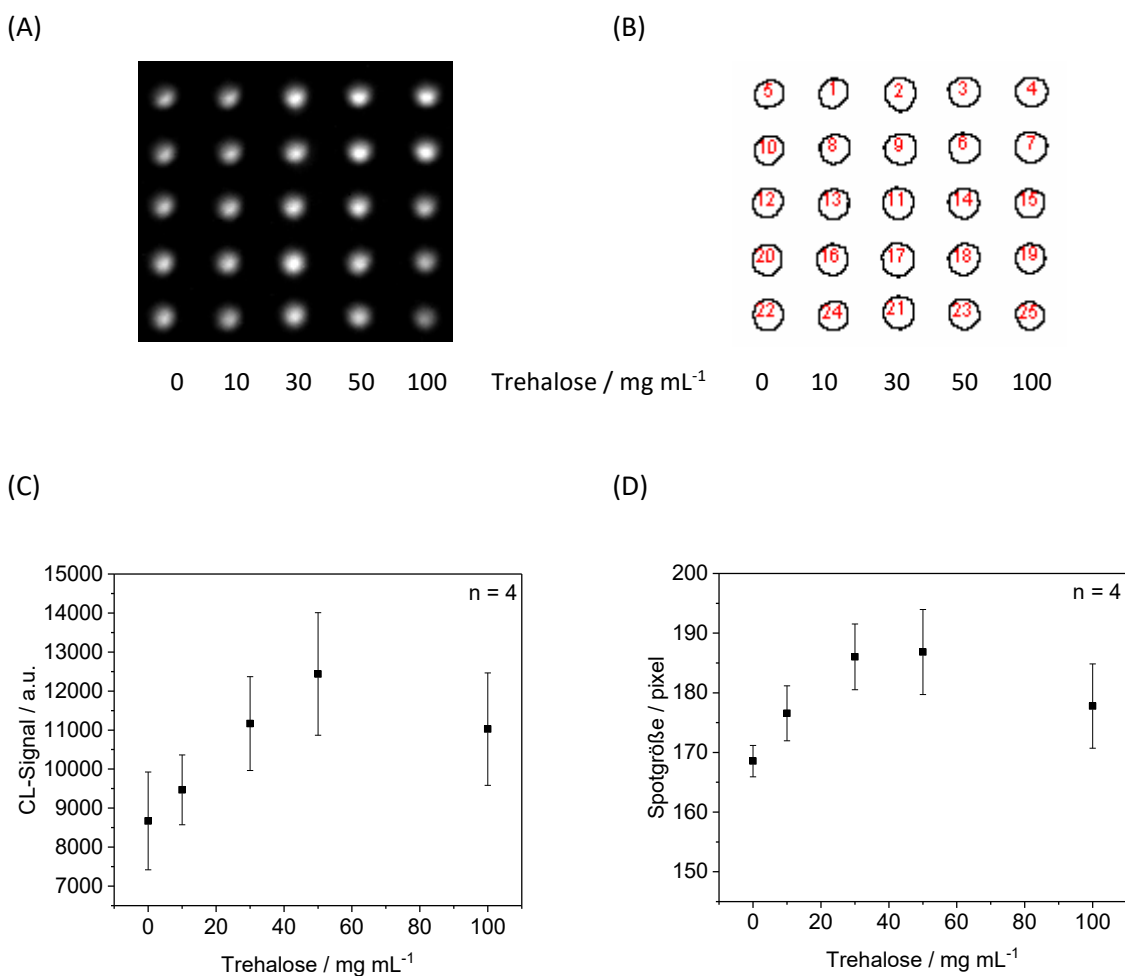


Abbildung 46: Chemilumineszenz-Aufnahme bei variiertem Trehalose-Konzentration in horizontaler Richtung (A). Darstellung der ermittelten Spotgröße der zugehörigen Chemilumineszenz-Aufnahme (B). CL-Signal in Abhängigkeit der Trehalose-Konzentration in der Mikrodosier-Lösung beim Immobilisieren von 1 mg mL^{-1} anti-HRP, EDC- und s-NHS-Konzentration von jeweils 1 mg mL^{-1} (C). Durchschnittliche Spotgröße in Abhängigkeit der Trehalose-Konzentration (D).

Zur Ermittlung der Spotgröße wurde analog zur Variation an Pluronic® F-127 ein Schwellwert herangezogen, der der durchschnittlichen Intensität über alle Pixel des Bildausschnittes mit den betrachteten Spots entsprach, Pixel mit einer Intensität oberhalb des Schwellwerts wurden zum Spot gezählt.

Zwischen 0 mg mL^{-1} und 50 mg mL^{-1} Trehalose war eine Zunahme der CL-Signal-Intensität von $8671 \pm 1253 \text{ a.u.}$ auf $12438 \pm 1571 \text{ a.u.}$ zu beobachten. Wurde die Trehalose Konzentration auf 100 mg mL^{-1} erhöht, nahm die CL-Signal Intensität auf $11024 \pm 1439 \text{ a.u.}$ ab. Die HRP-Konzentration war im Vergleich zu Abbildung 44 und Abbildung 45-C geringer, was zu allgemein niedrigeren CL-Signalen führte.

Trehalose kann das Austrocknen der Spots während dem Mikrodosieren und Inkubieren verhindern aber auch die Proteinaktivität verringern [20], weshalb zu hohe Konzentrationen zu einer Abnahme der CL-Signale führen könnten. Insgesamt konnte durch das Einsetzen von Trehalose die CL-Signal-Intensität um bis zu 43 % erhöht werden. Die durchschnittliche Spotgröße nahm mit zunehmender Trehalose-Konzentration zwischen 0 mg mL^{-1} und 50 mg mL^{-1} leicht von 168 ± 2 Bildpunkten auf 186 ± 7 Bildpunkte zu. Bei einer weiteren Erhöhung der Trehalose-Konzentration auf 100 mg mL^{-1} verringerte sich die durchschnittliche Spotgröße auf 177 ± 7 Bildpunkte. Aufgrund der geringen Änderung der Spotgröße mit der Trehalose-Konzentration kann angenommen werden, dass der Größenunterschied von sich ändernden CL-Intensität herrührt, welche die größte Intensität ebenfalls bei einer Trehalose-Konzentration von 50 mg mL^{-1} zeigte.

3.2.8. Charakterisierung der Oberflächenqualität

Die Charakterisierung der Oberflächenqualität und Homogenität des Mikrodosier-Vorgangs wurde ebenfalls per Chemilumineszenz durchgeführt. Es wurde ähnlich zur Charakterisierung der Glas-Chips durch Wolter et al. vorgegangen [20]. Die komplette Oberfläche der funktionalisierten PC-Chips wurde zunächst mit EDC und s-NHS im Sandwich aktiviert. Danach fand eine Biotinylierung mit Bicytin (N^{ϵ} -(+)-Biotinyl-L-lysin) statt. Danach wurde die Flusszelle aufgeklebt. Während des Messvorgangs wurde Streptavidin-HRP durch den Chip geleitet, um nach dessen Bindung an die Oberfläche die Chemilumineszenz-Reaktion zu katalysieren.

Die durchschnittliche Intensität der Aufnahme der Chemilumineszenz betrug $37507 \pm 2136 \text{ a.u.}$ (5,7 %). Die durch Wolter et al. charakterisierte Glasoberfläche zeigte eine durchschnittliche Intensität von $34549 \pm 2799 \text{ a.u.}$ (8,1 %) [20]. Die Aufnahme der Chemilumineszenz auf Glas ist im Anhang gezeigt. Die Standardabweichung der Chemilumineszenzwerte kann jedoch nicht alleinig zur Beurteilung der Oberflächenhomogenität herangezogen werden, da dadurch die räumliche Verteilung

der Intensitätswerte nicht berücksichtigt wird. Zur Kenntlichmachung von Intensitätsvariation erfolgte die Auswertung mit *ImageJ*. Zur Korrektur von Belichtungsgradienten wurden die Aufnahme der Chemilumineszenz (Abbildung 47-A) durch ein *pseudo*-Dunkelfeldbild (Abbildung 47-B) dividiert. Belichtungsgradienten können durch eine ungleichmäßige Verteilung von Chemilumineszenz Reagenzien oder durch die Kamera selbst entstehen. Das *pseudo*-Dunkelfeldbild wurde durch Anwenden eines Gauss'schen Unschärfefilters erhalten. Dadurch wurden Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche ausgeglichen und nur Belichtungsgradienten betrachtet. Da nach der Division die Intensitätswerte nah beieinander lagen (Abbildung 47-C), wurden zu Kenntlichmachung von Unregelmäßigkeiten die Intensitätswerte auf die volle Breite an Intensitätswerten eines 16-Bit-Bildes erweitert (Abbildung 47-D).

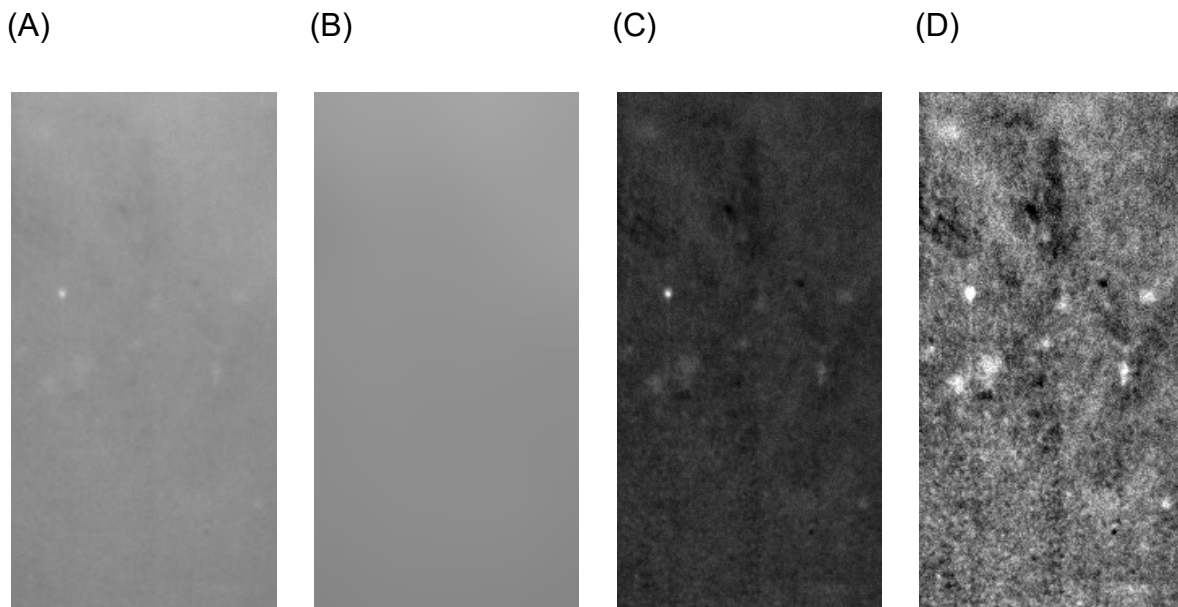


Abbildung 47: Bewertung der Oberflächenhomogenität durch Chemilumineszenz. Aufgenommenes Bild der Chemilumineszenz (A) wurde durch ein *pseudo*-Dunkelfeldbild (B) dividiert, um ein Bild mit korrigierter Belichtung (C) zu erhalten. Um Inhomogenitäten besser sichtbar zu machen, wurden die Intensitätswerte durch automatische Kontrastanpassung auf die volle Breite an Intensitätswerten erweitert (D).

Die Intensitätswerte mit einer Abstufung von jeweils einer Standardabweichung (σ) um den Mittelwert sind in Abbildung 48 gezeigt. Dadurch konnten Stellen mit einer starken Abweichung der Intensitätswerte vom Mittelwert kenntlich gemacht werden. Diese Stellen, im Folgenden als Inseln bezeichnet, konnten zur Beurteilung der Homogenität der Beschichtung herangezogen werden. Waren die Inseln klein aber vielfach, zeigte dies eine raue aber gleichmäßige Oberfläche. Vereinzelt größere Inseln zeigten eine inhomogen beschichtete Oberfläche. Inseln mit geringerer Intensität waren länglich in Flussrichtung gestreckt. Die Beschichtung wurde ebenfalls in diese Richtung aufgerakelt. Einerseits

könnten die Inhomogenitäten somit von Rakelspuren herrühren, andererseits könnte auch ein inhomogenes Einfließen der Chemilumineszenz-Reagenzien der Grund dafür sein.

Inseln mit erhöhter Intensität fielen eher rundlich aus und waren nicht in Fluss- oder Rakelrichtung gestreckt. Ein weiterer Grund für Unregelmäßigkeiten in der Beschichtung könnten Luftblasen in der aufgerakelten Paste sein. Diese expandierten beim Erhitzen und erzeugten somit inhomogene Stellen.

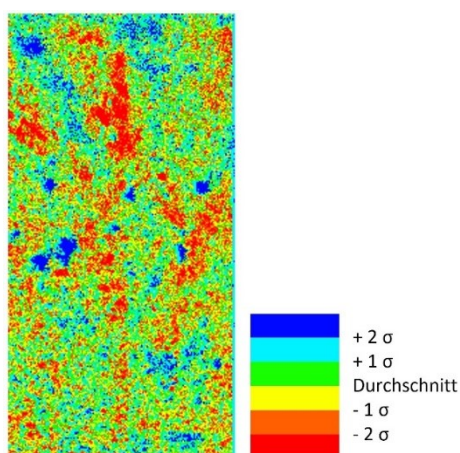
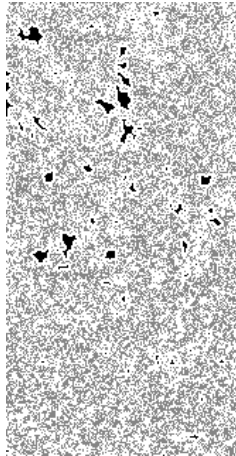


Abbildung 48: Darstellung der Intensitätswerte von jeweils 1-3 Standardabweichungen (σ) um den Mittelwert der Intensitätsverteilung von beschichtetem PC.

Zur quantitativen Beurteilung der Inseln wurde deren prozentuale Fläche bestimmt. Abbildung 49 zeigt dazu die um 1σ und 3σ um den Mittelwert verteilten Intensitäten sowie die Inseln außerhalb dieses Intervalls in schwarz. Der Anteil der Fläche von Inseln mit Intensitäten außerhalb eines Intervalls von 1σ betrug 1,6 % und außerhalb von 3σ betrug der Anteil 0,5 %. Im Vergleich dazu lag der Anteil der Fläche von Inseln bei Glas bei 6,5 % bei einem Intervall von 1σ um den Mittelwert der Intensitäten und bei 0,24 % bei einem Intervall von 3σ . Die Bilder von Wolter et al. [20] wurden dazu nach dem gleichen Schema ausgewertet und sind im Anhang gezeigt. Der Anteil an Inseln mit Abweichung von Mittelwert war somit bei PC geringer, jedoch die Abweichung stärker.

(A)



(B)

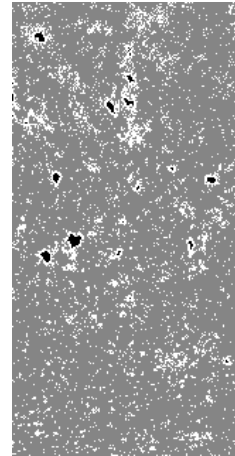


Abbildung 49: Darstellung von Inseln in schwarz mit Intensitäten mit mehr als 1σ (A) und 3σ (B) Abweichung vom Mittelwert von beschichtetem PC.

3.2.9. Charakterisierung des Mikrodosierprozesses

Zur Qualitätskontrolle des Mikrodosierprozesses wurden ebenfalls anti-HRP-Mikroarrays verwendet. Jeder Spot wurde mit derselben Mikrodosierlösung erstellt. Abbildung 50-B zeigt das erhaltene Chemilumineszenz-Bild mit Spots mit gleicher Signalintensität. Die Intensitätsprofile in Flussrichtung und quer dazu sind in Abbildung 50-A und Abbildung 50-C gezeigt. Die Signalintensitäten der Spots untereinander waren äußerst homogen mit einer durchschnittlichen Standardabweichung von $6,8 \pm 3,8 \%$ in Flussrichtung und $6,2 \pm 2,8 \%$ quer dazu. Das maximale Signal im Zentrum des Spots betrug 23193 ± 1694 a.u. Bei einem durchschnittlichen Hintergrund zwischen den Spots von 37 a.u. ergab dies ein Signal-zu-Hintergrund Verhältnis von über 600:1. Dies entsprach den charakterisierten Eigenschaften des Glas-Chips durch Wolter et al. [20], welche ebenfalls ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 600:1 aufwiesen.

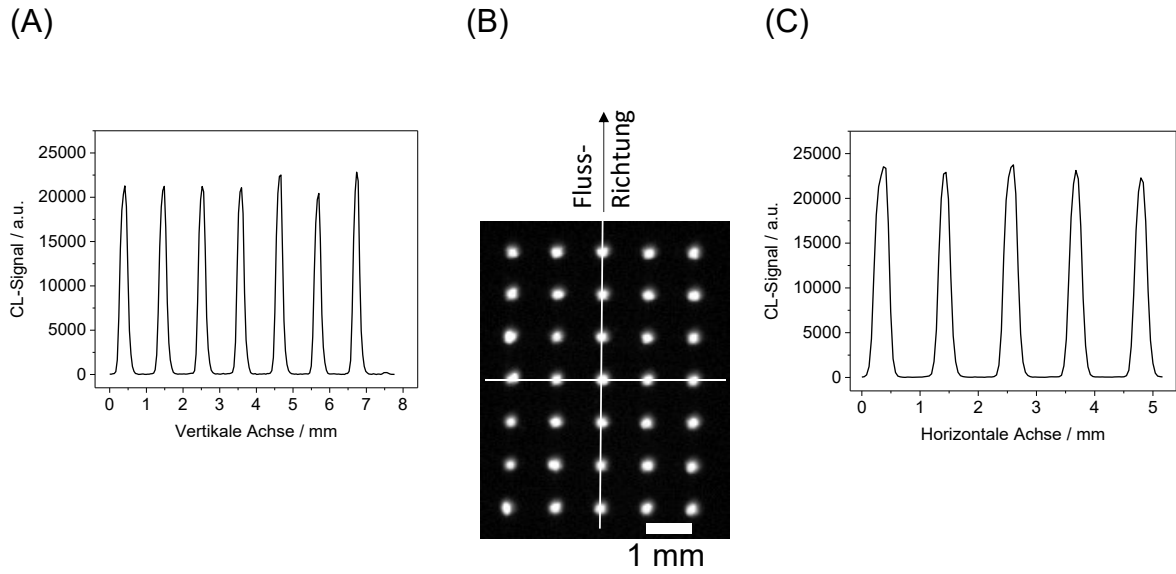


Abbildung 50: Beurteilung der Homogenität der Spots anhand von Chemilumineszenz-Aufnahmen von immobilisiertem anti-HRP (A). Zugehörige Intensitätsprofile in Flussrichtung (A) und quer zur Flussrichtung (C).

3.3. Integration eines NMR-Relaxometers in einen kontinuierlichen Syntheseprozess

Zum Einsetzen funktionaler magnetischer Nanopartikel als Kontrastmittel in der Magnetresonanz-Bildgebung (*magnetic resonance imaging* – MRI) oder Immunoassays mit magnetischen Relaxivitäts-Schaltern (*magnetic relaxivity switches* – MRS) sind Nanopartikel mit einer hohen Relaxivität vorteilhaft [136]. Dadurch können höhere Bildkontraste respektive Sensitivitäten erreicht werden. Als Relaxivität wird die lineare Abhängigkeit der Relaxationsrate von der Partikelkonzentration bezeichnet. Die Relaxationsrate ergibt sich aus der inversen Relaxationszeit ($R = 1/T$). Als Partikelkonzentration wird meist die Eisenkonzentration verwendet. Somit ergeben Partikel mit hoher Relaxivität höhere Signale bei einer geringeren Menge an eingesetzten Partikeln.

Die Relaxivität wird durch zahlreiche Partikeleigenschaften beeinflusst. So ändert die primäre Partikelgröße, Zusammensetzung und Kristallinität und folglich die Sättigungsmagnetisierung die Relaxivität [207]. Des Weiteren beeinflusst der Grad der Aggregation und die Clustergröße [117, 208] sowie Beschichtungen der Partikel die Relaxivität [209].

Zur Optimierung der Relaxivität können somit zahlreiche Parameter variiert werden. Das Ermitteln der Relaxivität ist dann nach jedem Syntheseschritt vorteilhaft. Dazu werden oft klinische MRI-Scanner verwendet. Zugang sowie Messzeit an klinischen MRI-Scannern ist jedoch oft limitiert und mit hohen Kosten verbunden.

Zur Umgehung dieses Problems wurde in Zusammenarbeit mit der Munich School of BioEngineering (MSB) der TUM ein Gerät gebaut, welches ein miniaturisiertes NMR-Relaxometer in die mikrofluidische Synthese magnetischer Nanopartikel integrierte.

3.3.1. Aufbau des Geräts

Abbildung 51 zeigt den Aufbau des Geräts. Hauptbestandteile sind drei Pumpen mit Mehrwegventilen zum Fördern von Reagenzien (Abbildung 51-1 und Abbildung 51-2), ein Mikroreaktor (Abbildung 51-4, siehe Kapitel 3.1.5) und ein NMR-Relaxometer mit Permanentmagnet (Abbildung 51-5). Das Gehäuse ist aus Aluminiumprofilen und Edelstahlblechen aufgebaut und befindet sich auf einer massiven Aluminiumplatte. Die Aluminiumplatte verfügt über Ausbuchtung zum Bereitstellen von Reagenzien. Das Gehäuse hat eine Breite von 50 cm, eine Tiefe von 30 cm und eine Höhe von 33 cm und wiegt mit Magnet etwa 30 kg. Motoren der Pumpen und Ventile sowie Netzteile und Steuerelektronik sind im

hinteren Teil des Geräts verbaut (Abbildung 51-6). Durch Tragegriffe kann der komplette Aufbau einfach getragen und transportiert werden.

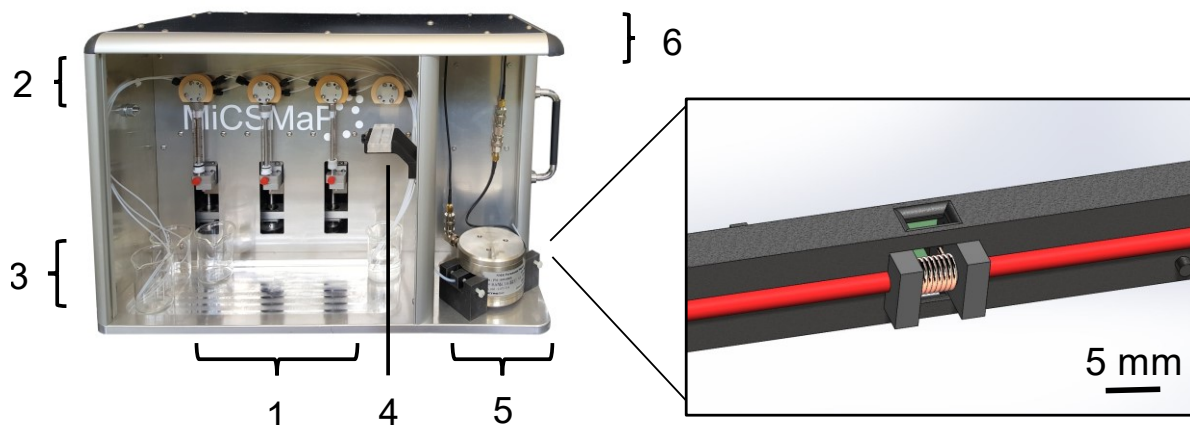


Abbildung 51: Aufbau des Geräts zur mikrofluidischen Synthese magnetischer Nanopartikel mit integrierter Charakterisierung der Relaxationseigenschaften durch ein NMR-Relaxometer. Der Aufbau enthält Pumpen (1) und Mehrwegeventile (2) zum Fördern und Verteilen von Reagenzien (3), einen Mikroreaktor (4) und ein NMR-Relaxometer mit Permanentmagnet (5). Die Motoren der Pumpen und Ventile, Netzteile und Steuerelektronik sind im hinteren Teil des Geräts verbaut (6). Die Vergrößerung zeigt eine CAD-Konstruktionszeichnung des inneren Teils des NMR-Relaxometers mit dem Schlauch zum Einbringen der Probe in die Spule.

Das Gerät verfügt über insgesamt drei Spritzenpumpen mit einem Volumen von zweimal 5 mL und einmal 1 mL. Die verwendeten Glasspritzen sind direkt mit 6-Wegeventilen verbunden. Somit können unterschiedliche Reagenzien zum Herstellen und Funktionalisieren von Partikeln sowie Reinigungsflüssigkeiten gefördert werden. Ein ausgefräster Abstellplatz vor den Pumpen dient zum Bereitstellen von Reagenzien. Ein weiteres 6-Wegeventil dient zur Verteilung des Synthesestroms nach dem Reaktor. So kann zwischen dem Sammeln des Synthesestroms oder Beprobung mittels des NMR-Relaxometers auch während einer laufenden Synthese umgeschaltet werden. Jedes Ventil verfügt über einen Ausgang zu einem Abfall-Sammelgefäß. Dies erlaubt das separate Reinigen der Pumpen und Ventile. Die Pumpen sind durch ein Edelstahlblech zur Abschirmung von elektromagnetischer Strahlung vom NMR-Relaxometer abgetrennt.

Im hinteren Teil des Geräts sind insgesamt sieben Schrittmotoren zum Stellen der Ventile und Fahren der Pumpen untergebracht. Bei den Ventilen handelt es sich um kommerziell verfügbare Ventile mit eingebauter Steuereinheit (Tecan Cavro Ceramic Smart Valve) die über RS232 von der zentralen Steuereinheit angesteuert werden. Die Pumpen werden über einen Arduino mit Pololu-Treiber betrieben. Die Steuerbefehle werden über die zentrale Steuerelektronik (ATmega2560) prozessiert.

Die zentrale Steuerelektronik ist durch ein Edelstahlblech von den Motoren und den Netzteilen abgeschirmt. Insgesamt sind drei Netzteile verbaut. Diese versorgen die zentrale Steuerelektronik sowie die Motoren der Ventile und die Motoren der Pumpen separat. Der Stromanschluss erfolgt über eine 230 V Steckdose. Die komplette Steuerelektronik wurde von Andreas Wegemann im Zuge der Projektkooperation entwickelt und gebaut [210].

Zur Kommunikation mit einem Messrechner ist eine Ethernetbuchse verbaut. Dies ermöglichte die Kommunikation mittels *TCP/IP* entweder direkt mit dem Messrechner oder über die Einbindung in ein lokales Netzwerk.

3.3.2. NMR-Relaxometer

Das NMR-Relaxometer nutzte einen Permanentmagneten mit speziell hoher Feldhomogenität. Diese lag am Ort der angeordneten Spule bei 117 ppm. Die Flussdichte betrug 0,516 T bei 23 °C. Die daraus resultierende Anregungsfrequenz von ^1H -Kernen lag bei etwa 21 MHz. Der Temperaturdrift der Flussdichte lag bei 1200 ppm K^{-1} . Die Software verfügte daher über eine automatische Anpassung der Anregungsfrequenz bei Änderung der Temperatur. Der Optimierungsalgorithmus variierte die Anregungsfrequenz um einen Startwert mit einem Abstand von 0,02 MHz und wählte die Anregungsfrequenz mit maximalem Spin-Echo-Signal.

Die Probe wurde durch einen Teflonschlauch in das Innere der Spule gepumpt. Der Schlauch hatte einen Außendurchmesser von 3,2 mm und einen Innendurchmesser von 2,4 mm. Die Spule war um eine 3D-gedruckte Halterung mit einer Wandstärke von 0,3 mm gewickelt. Bei einem effektiven Probenvolumen von 19 μL lag der Füllfaktor somit bei 40 %. Die Spule bestand aus einem emaillierten Kupferdraht mit einem Durchmesser von 0,56 mm mit insgesamt sieben Windungen über eine Länge von 5 mm. Die Spule und der Probenschlauch befanden sich innerhalb einer 3D-gedruckten Halterung. Diese wurde durch Stellschrauben im Inneren des Magneten positioniert.

Die Spule diente sowohl zum Anregen als auch zum Aufnehmen des NMR-Signals. Dazu wurde die Leistung aus dem Transmitter mit einer definierten Radiofrequenz (RF) auf die Probe übertragen. Der Transmitter erzeugte durch direkte digitale Synthese bei 500 MHz den Anregungspuls, welcher durch asymmetrische Signalübertragung an die Spule übertragen wurde. Die angeregten präzessierenden Spins induzierten eine Spannung in der Spule, welche als NMR-Signal aufgenommen wurde. Um den Empfänger vor der hohen Leistung des Anregungspulses zu schützen, schaltete ein Duplexer mit pin-Diode zwischen Empfänger und Sendeeinrichtung um. Das NMR-Signal wurde über einen schmalen 10-kHz-Bandpassfilter selektiert und verstärkt. Nach der Aufbereitung wurde das Signal per Ethernet

an den Messrechner übertragen. Die Auswertung erfolgte automatisiert in *MATLAB* durch anpassen einer exponentiellen Zerfallskurve an die integrierten Spin-Echo-Signale.

3.3.3. Fluidischer Aufbau

Ablaufprogramme

Ablaufprogramme für Pumpen und Ventile wurden über ein *MATLAB*-Skript erstellt. Das *MATLAB*-Skript erzeugte Vektor-basierte Dateien, welche Pumpenparameter und Ventilparameter enthielten. Eine solche Datei ließ sich über die grafische Benutzeroberfläche einlesen und starten. Pumpenparameter beinhalteten die Position der Pumpe, die angefahren werden sollte sowie die verwendete Pumpgeschwindigkeit. Außerdem konnten die verwendeten Schrittmotoren in vollen Schritten oder im Mikroschrittmodus betrieben werden. Im Mikroschrittmodus wurden die vollen Schritte in 16 Mikroschritte unterteilt, was bei langsamen Pumpgeschwindigkeiten für eine homogenere Bewegung sorgte. Zum Befüllen der Pumpen oder für Spülschritte konnte durch das Verwenden von vollen Schritten eine höhere Pumpgeschwindigkeit erreicht werden. Höhere Pumpgeschwindigkeiten wären ansonsten durch die geringe Rechenkapazität der verwendeten Arduino-Steuerung limitiert.

Bei den Ventilen wurde jeweils die Position sowie die Drehrichtung angegeben. Das Einstellen der Drehrichtung diente einerseits zum schnelleren Wechsel zwischen den Positionen durch Verwenden des kürzeren Weges. Andererseits konnten beim Wechsel das Überfahren von speziellen Ventilpositionen und somit das Verschleppen von Substanzen vermieden werden.

Das Referenzieren der Pumpen und Ventile erfolgte außerhalb der Ablaufprogramme und wurde manuell vor dem Starten durchgeführt. Die Ventile wurden referenziert und auf Position 6 (Abfallbehälter) gedreht. Danach wurden die Pumpen entleert.

Verschlauchung

Die Verschlauchung der Ventile im finalen fluidischen Aufbau ist in Abbildung 52 gezeigt. Die Positionen der Ventile waren im Uhrzeigersinn benannt. Position 1 begann links unten neben der Glasspritze. Jedes Ventil über den Pumpen nahm die Reagenzien über die erste Position links unten auf. Position 2 diente zum Aufnehmen von Spülflüssigkeit. Über Position 5 waren die Ventile mit dem Mikroreaktor verbunden. Position 6 führte direkt in einen Abfallbehälter.

Um den Mikroreaktor zu überspringen wurden die Positionen 4 der beiden linken Pumpen über ein Y-Stück vereint. Über ein T-Stück wurde der vereinte Strom mit dem Auslass des Mikroreaktors vereint und führte dann in Ventil 4, des Ventil ohne Pumpe.

Ventil 4 führte über Position 2 direkt in ein Auffanggefäß. Position 3 führte in das NMR-Relaxometer. Position 4 diente zur Aufnahme von Luft oder Stickstoff für Spülschritte, während Position 6 ebenfalls in den Abfallbehälter führte.

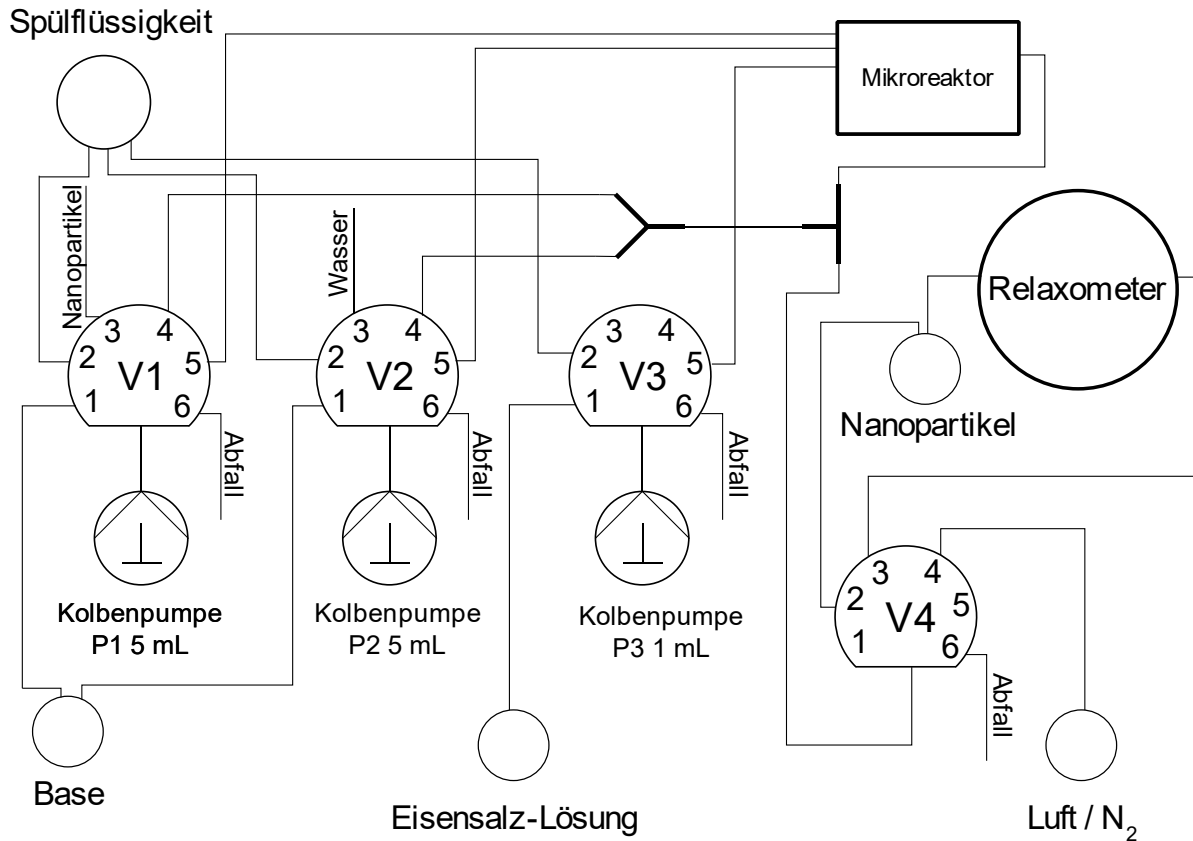


Abbildung 52: Fluidischer Aufbau zur mikrofluidischen Synthese magnetischer Nanopartikel. Die Förderung der Reagenzien (Base, Eisenalz-Lösung) erfolgte durch drei Pumpen (P1-P3) und wurde über vier Ventile distribuiert (V1-V4). Über V1-V3 und V2-3 wurden Nanopartikel und Wasser zur automatischen Bestimmung der Relaxivität aufgenommen und über einen Reaktorbypass (V1-V4 und V2-V4) in das NMR-Relaxometer geleitet. Gespült wurden die Leitung mit Spülflüssigkeit und Luft/N₂.

Die final verwendete Ablaufsteuerung

Um Luftblasen im Reaktor zu verhindern, wurde vor jeder Synthese ein Spülprogramm ausgeführt. Dazu wurde der Reaktor und die Schläuche mit hoher Flussgeschwindigkeit gespült. Als Spülflüssigkeit wurde 0,01 % (w/w) Pluronic® F-127 verwendet. Luftblasen blieben meist in der Mischstruktur des Mikroreaktors hängen. Dadurch wurde das Ausbilden der 3D-Fokussierung verhindert. Dies führte zu Partikelablagerungen und keinen reproduzierbaren Synthesebedingungen.

Um Kontamination der hergestellten Nanopartikel zu verhindern, wurden außerdem alle Probenwege nach dem Reaktor gespült. Um Spülflüssigkeit in der späteren Partikelprobe zu verhindern, wurden am

Ende des Spülvorgangs die Probenwege nach dem Reaktor mit Luft oder Stickstoff ausgespült. Das finale Spülprogramm ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Ablauf des automatischen Spülprogramms des Mikroreaktors sowie der Pumpen und Schläuche.

Programmschritt	Details Pumpe 1 und 2	Details Pumpe 3
Referenzieren	Referenz-Check für alle Pumpen und Ventile	
Spülen der Pumpen	1000 μL	200 μL
Spülen des Reaktors	6450 μL , 110 $\mu\text{L s}^{-1}$	
Spülen des NMR-Relaxometers über Bypass	1000 μL	0 μL
Spülen des Probenauslasses über Bypass	1000 μL	0 μL
Aufziehen von Luft über Bypass	3000 μL	0 μL
Spülen des NMR-Relaxometers über Bypass	1000 μL	0 μL
Spülen des Probenauslasses über Bypass	1000 μL	0 μL
Entleeren der Pumpen in Abfall	500 μL	0 μL

Nach dem Referenzieren wurden alle Pumpen mit Spülflüssigkeit direkt in das Abfallgefäß gespült. Danach wurde der Reaktor mit insgesamt 6450 μL Spülflüssigkeit mit einer Flussrate von 110 $\mu\text{L s}^{-1}$ mit allen drei Pumpen gleichzeitig gespült. Dadurch wurden eventuelle Luftblasen aus dem Mikroreaktor gespült. Danach erfolgte das Spülen des NMR-Relaxometers und des Probenauslasses mit jeweils insgesamt 2000 μL Spülflüssigkeit. Dazu wurde der Reaktorbypass verwendet. Die gleichen Wege wurden anschließend mit jeweils 2000 μL Luft ausgespült. Dadurch wurde Spülflüssigkeit aus dem NMR-Relaxometer oder dem Probenauslass in der späteren Probe verhindert.

Syntheseprogramm

Das Syntheseprogramm konnte nach der Spülroutine gestartet werden. Das Syntheseprogramm baute auf den Schritten der Spülroutine auf und setzte diese voraus. Ein typischer Syntheseablauf mit $\text{FRR} = 20$ (*flow rate ratio*, Flussratenverhältnis von basischen Hüllstrom zu Eisensalzpräkursor) ist in Tabelle 7 gezeigt. Für andere FRR und Gesamtflussraten konnten die Pumpenparameter im *MATLAB*-Skript angepasst werden.

Tabelle 7: Ablauf des Syntheseprogramms für magnetische Nanopartikel.

Programmschritt	Details Pumpe 1 und 2	Details Pumpe 3
Referenzieren	Referenz-Check für alle Pumpen und Ventile	
Spülen der Pumpen	2 x 500 μL	2x 200 μL
Befüllen des Reaktors mit Reagenzien	300 μL	100 μL
Synthese (FRR = 20, 42 mL h^{-1})	4700 μL , 5,55 $\mu\text{L s}^{-1}$	466 μL , 0,55 $\mu\text{L s}^{-1}$
Aufziehen von Luft über Bypass (nur Pumpe 2)	5000 μL	0 μL
Ausblasen von Partikeln aus dem NMR-Relaxometer über Bypass	2000 μL	0 μL
Ausblasen von Partikeln aus dem Probenauslasses über Bypass	2000 μL	0 μL
Entleeren der Pumpen in Abfall	1000 μL	0 μL

Nach dem Referenzieren der Pumpen und Ventile wurden die Pumpen jeweils zweimal mit Reagenzien befüllt und direkt in den Abfallbehälter entleert. Die großen 5-mL-Pumpen wurden jeweils mit 500 μL und die kleine 1-mL-Pumpe mit 200 μL befüllt. Dadurch wurden die Schläuche zu den verwendeten Reagenzien gespült. Dies war besonders beim Reagenzienwechsel wichtig. Außerdem wurden eventuelle Rückstände der Spülflüssigkeit aus den Pumpen gespült.

Danach erfolgte das Befüllen des Reaktors mit Reagenzien und das Ausspülen der Spülflüssigkeit. Der basische Hüllstrom wurde dabei im Überschuss verwendet, um keine Partikel zu synthetisieren. Der Auslass des Reaktors wurde über Ventil 4 direkt in das Abfallgefäß geleitet. Dann startete die Synthese. Bei einem FRR = 20 und einer Gesamtflussrate von 42 mL h^{-1} konnten so insgesamt knapp 10 mL Partikellösung hergestellt werden. Um auch die verbleibenden Partikel im NMR-Relaxometer und des Probenauslasses zu sammeln, wurden diese Wege mit jeweils 2000 μL Luft über den Reaktor-Bypass mit Luft oder Stickstoff ausgeblasen.

3.3.4. Messung der Relaxationszeit im Fluss

Zur Prozesskontrolle während der Synthese konnte die Messung der transversalen Relaxationszeit (T_2) während der laufenden Synthese durchgeführt werden. Die Messintervalle wurden innerhalb der Ablaufsteuerung als Zusatz zur jeweiligen Pumpensequenz definiert.

Zur Evaluierung ob diese Messung direkt im Fluss durchgeführt werden kann, wurde die T_2 -Zeit von Citrat-stabilisierten magnetischen Nanoclustern in einem Konzentrationsbereich von 0 – 0,96 mM

Eisen und einer Flussrate von 0 – 50 mL h⁻¹ untersucht. Die gemessenen T₂-Zeiten in Abhängigkeit der Flussrate sind für alle Konzentrationen in Abbildung 53 gezeigt.

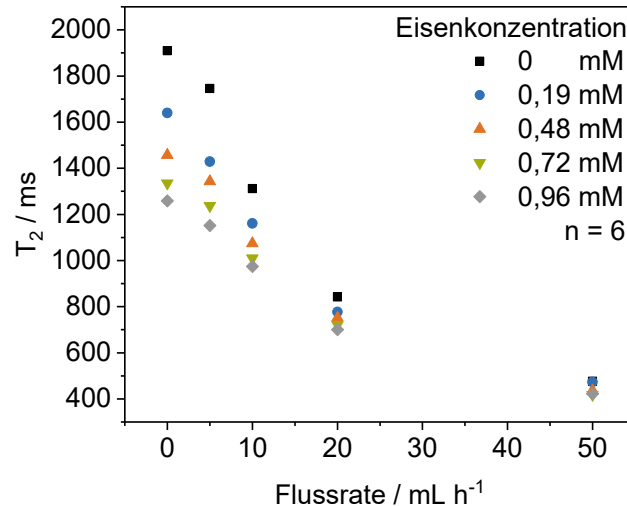


Abbildung 53: Transversale Relaxationszeit (T₂) in Abhängigkeit der Flussrate für variierte Partikelkonzentrationen Citrat-stabilsierter magnetischer Nanocluster.

Für Wasser reduzierte sich die Relaxationszeit von 1910 ms im Stillstand auf 476 ms bei der höchsten Flussrate von 50 mL h⁻¹. Für die höchste Eisenkonzentration von 0,96 mM nahm die Relaxationszeit von 1259 ms im Stillstand auf 422 ms bei einer Flussrate von 50 mL h⁻¹ ab. Mit zunehmender Flussrate nahm die Relaxationszeit bei allen Eisenkonzentration bis 20 mL h⁻¹ annähernd linear ab. Die Differenz der Relaxationszeit beim Variieren der Eisenkonzentration wurde somit mit der Flussrate geringer. Im Stillstand nahm die Relaxationszeit um 651 ms ab, wenn die Eisenkonzentration von 0 mM auf 0,96 mM erhöht wurde. Die geringste Differenz der Relaxationszeit von 54 ms war somit bei 50 mL h⁻¹, wenn die Eisenkonzentration von 0 – 0,96 mM variiert wurde.

Prinzipiell kann die T₂-Zeit als charakteristische Zeit der Änderung des Magnetfeldes angesehen werden, in welchem die Protonen ausgerichtet sind. Im Stillstand wird die Änderung durch Diffusion der Wassermoleküle hervorgerufen. Aufgrund der hohen Homogenität des verwendeten Magneten erfahren die Protonen nur geringe Feldgradienten. Die T₂-Zeit ist dementsprechend hoch. Im Fluss wird die Bewegung der Wassermoleküle ebenfalls konvektiv beeinflusst. Mit der Flussrate nahm somit die Änderung des Magnetfeldes zu und die T₂-Zeit ab.

Magnetische Nanopartikel erzeugen Inhomogenitäten im Magnetfeld. Während der Diffusionsbewegung erfahren die Protonen dadurch größere Feldgradienten und eine stärkere Änderung des Magnetfeldes. Die T₂-Zeit nahm somit mit der Konzentration von magnetischen

Nanopartikeln ab. Der konvektive Einfluss auf die Bewegung von Wassermolekülen und magnetischen Nanopartikeln kann bei gleichbleibender Flussgeschwindigkeit annähernd konstant angesehen werden. Die Flussrate hatte somit geringen Einfluss auf die durch magnetische Nanopartikel hervorgerufenen Inhomogenitäten im Magnetfeld.

Dies ist anhand der Relaxationsraten in Abhängigkeit der Eisenkonzentration ersichtlich, welche für alle Flussraten von 0 – 50 mL h⁻¹ in Abbildung 54 gezeigt sind.

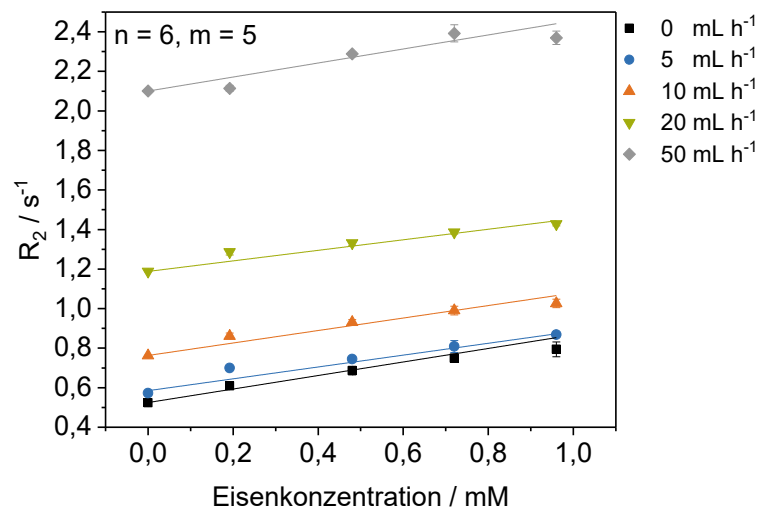


Abbildung 54: Transversale Relaxationsrate (R_2) in Abhängigkeit der Partikelkonzentration Citrat-stabilisierter magnetischer Nanocluster für variierte Flussraten. Transversale Relaxivität (r_2) wurde aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden ermittelt.

Die Relaxationsrate zeigte im Stillstand eine lineare Zunahme mit der Eisenkonzentration. Dies entspricht der klassischen Bestimmung der Relaxivität. Diese lag für die untersuchten Citrat-stabilisierten magnetischen Nanocluster im Stillstand bei $0,29 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Mit zunehmender Flussrate waren zunehmende Relaxationsraten für alle Eisenkonzentrationen zu verzeichnen, was durch konvektive Abnahme der Relaxationszeiten hervorgerufen wurde. Im Gegensatz dazu hatte die Flussrate geringen Einfluss auf die Änderungsrate der Relaxationsrate mit der Eisenkonzentration und somit auf die Relaxivität. Die Relaxivitäten lag durchschnittlich bei $0,31 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, während die größte Abweichung von 22 % bei einer Flussrate von 20 mL h^{-1} auftrat.

Obwohl diese Ergebnisse zeigten, dass die Bestimmung der transversalen Relaxivität im Fluss möglich ist, wurden die Messung generell im Stillstand durchgeführt. Einerseits um eine Abweichung aufgrund unterschiedlicher Flussraten auszuschließen, andererseits um eine bessere Vergleichbarkeit der Messwerte zu erhalten.

3.3.5. Stopped-Flow-Messung

Neben der Messung der transversalen Relaxationszeit (T_2) direkt im Fluss kann die Messung ebenfalls nach dem Stopped-Flow-Prinzip durchgeführt werden. Zur Messung der transversalen Relaxationszeit (T_2) wurde der Fluss im NMR-Relaxometer gestoppt und der Reaktorauslass durch einen Bypass geführt. Umgeschaltet wurde mit dem Ventil 4 ohne Pumpe, das während der laufenden Synthese zwischen zwei Positionen wechselte. Die Messintervalle wurden ebenfalls innerhalb der Ablaufsteuerung als Zusatz zur jeweiligen Pumpensequenz definiert. Ob im Fluss oder als Stopped-Flow gemessen wurde, konnte über einen Knopf in der grafischen Benutzeroberfläche festgelegt werden. Durchgeführte Messungen sind anhand von transversalen Relaxationszeiten während einer Synthese von Alendronat-stabilisierten magnetischen Nanopartikeln in Abbildung 55-A gezeigt. Die gemittelten Werte der transversalen Relaxationszeit in Abhängigkeit der Alendronsäure-Konzentration im basischen Hüllstrom während stabiler Synthesebedingungen sind in Abbildung 55-B gezeigt.

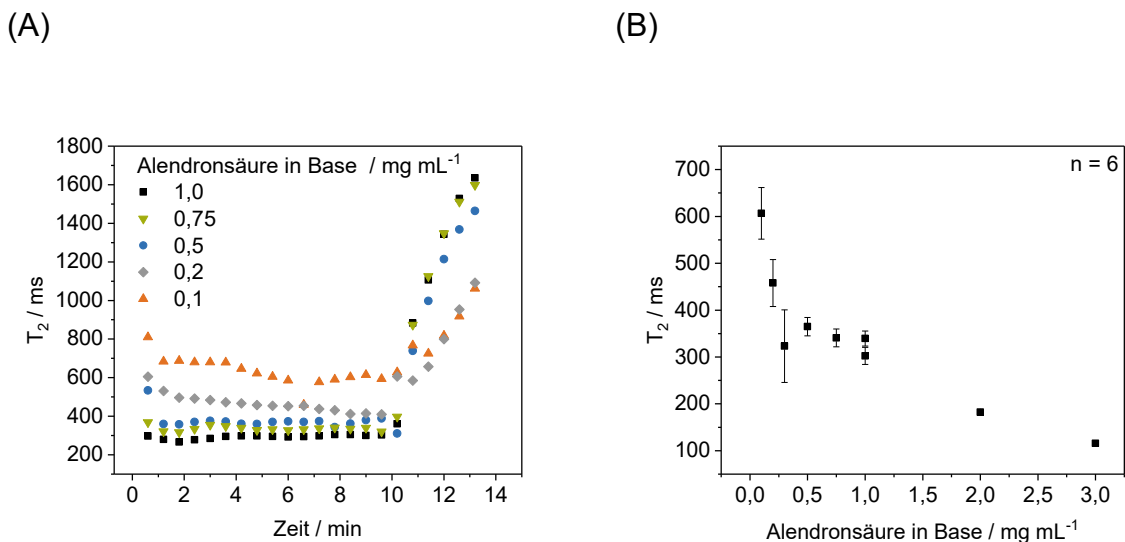


Abbildung 55: Online-Messung der transversalen Relaxationszeit während der Synthese Alendronat-stabilsierter magnetischer Nanopartikel (A). Gemittelte transversale Relaxationszeiten während stabiler Synthesebedingungen in Abhängigkeit der Alendronsäure-Konzentration in der zur Synthese verwendeten Base (B).

Innerhalb der ersten Minute stellten sich stabile Synthesebedingungen ein. Dies ist durch die stabilen Werte der transversalen Relaxationszeit mit der Zeit in Abbildung 55-A zu sehen. Nachdem die Eisensalzlösung nach 10 min aufgebraucht war, kam es zu einem Anstieg der transversalen Relaxationszeit. Mit zunehmender Konzentration der eingesetzten Alendronsäure im basischen Hüllstrom kam es zu einer Abnahme der transversalen Relaxationszeit. Mit zunehmender Konzentration der Alendronsäure von 0,1 mM auf 3 mM nahm die transversale Relaxationszeit von 606 ± 55 ms auf 115 ± 3 ms ab. Alendronsäure verhinderte das schnelle Aggregieren der sich bildenden

Nanopartikel im Mikroreaktor, was sich durch abnehmende hydrodynamische Durchmesser mit zunehmender Alendronsäure-Konzentration anhand von DLS-Messungen zeigte. Das eingesetzte Relaxometer konnte so auch bei der direkten Stabilisierung von Nanopartikeln während der Synthese eingesetzt werden. Direkt stabilisierte Partikel zeigten jedoch eine viel geringere transversale Relaxivität als magnetische Nanopartikel, welche ohne direkte Stabilisierung hergestellt wurden.

3.3.6. Automatische Messung der Relaxivität

Generell erfolgt das Ermitteln der Relaxivität durch lineare Regression der Relaxationsraten bei unterschiedlichen Partikelkonzentration. Die Steigung der Regressionsgeraden entsprach der Relaxivität. Dazu wurden verdünnte Partikellösungen zwischen 0 – 1 mM Eisen hergestellt und die Relaxationszeiten einzeln gemessen. Um Relaxivitäten automatisch zu bestimmen und dabei das Verdünnen und das manuelle Messen jeder einzelnen Konzentration zu vermeiden, wurde eine Messroutine zur Ermittlung der Relaxivität in das Gerät integriert. Die Partikellösung sowie ein Lösemittel zum Verdünnen (generell Wasser) wurden dazu nur vorgelegt. Nach dem Spülen des NMR-Relaxometers mit Wasser wurden Konzentrationen zwischen 0 – 100 % (v/v) der Partikellösung gemischt und in den NMR-Relaxometer gepumpt. Das Einstellen der Konzentration erfolgte durch Anpassen der Flussraten von Partikellösung und Wasser. Bei jeder Konzentration wurde die longitudinale (T_1) und transversale (T_2) Relaxationszeit gemessen. Die Zeiten wurden automatisch in die Relaxationsraten umgerechnet und zusammen mit dem Verdünnungsschritt gespeichert. Das Ermitteln der Relaxivität konnte somit in unter einer Stunde und völlig automatisch durchgeführt werden. Zur Überprüfung wurde die Relaxivität von kommerziell erhältlichen T_1 - und T_2 -Kontrastmitteln ermittelt.

Abbildung 56 zeigt die Ermittlung der Relaxivität von Godatersäure. Dazu wurde die transversale und longitudinale Relaxationszeit in einem Konzentrationsbereich von 0 mM bis 5 mM bestimmt. Godatersäure ist ein T_1 -Kontrastmittel für Ganzkörper-MRI-Untersuchungen, das unter dem Markennamen DOTAREM® von der Firma Guerbet vertrieben wird. Chemisch handelt es sich um einen Gd^{3+} -Komplex, das mit 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) komplexiert ist. Die transversale und longitudinale Relaxationszeit wurde in einem Konzentrationsbereich von 0 mM bis 5 mM Gd bestimmt.

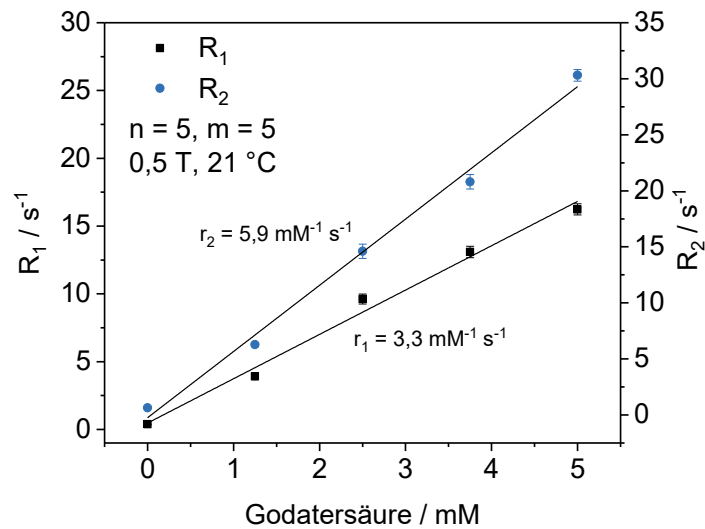


Abbildung 56: Longitudinale (R_1) und transversale (R_2) Relaxationsrate in Abhängigkeit der Konzentration von Godatersäure (DOTAREM®) zur Ermittlung der longitudinalen (r_1) und transversalen (r_2) Relaxivität.

Aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden ergab sich eine transversale Relaxivität (r_2) von $5,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ sowie eine longitudinale Relaxivität (r_1) von $3,3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Bei einem Relaxivitätsverhältnis (r_2/r_1) von 1,8 zählt Godatersäure seiner Verwendung entsprechend zu den positiven Kontrastmitteln. Positive Kontrastmittel werden zur Erzeugung von Bildern anhand verkürzter longitudinaler Relaxationszeiten (T_1) eingesetzt.

Bei einer ähnlichen Flussdichte von 0,47 T und einer Temperatur von 40 °C wurde eine longitudinale Relaxivität von Godatersäure von $3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ publiziert [211]. Die longitudinale Relaxivität von Godatersäure ist stark von der Larmor-Frequenz und somit von der zur Messung verwendeten Flussdichte abhängig. Dies wurde anhand einer starken Abnahme der longitudinalen Relaxivität (r_1) bei 37 °C von $9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei Änderung der Flussdichte zwischen 1 MHz (23 mT) und 50 MHz (1,2 T) gezeigt. Ebenfalls nahm die longitudinale Relaxivität (r_1) von Godatersäure bei 0,47 T mit der Temperatur zwischen 5 °C und 45 °C von $6,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ab [212].

In Anbetracht der höheren Messtemperatur und etwas niedrigeren Flussdichte zeigte der publizierte Wert $3,4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ von Rohrer et al. [211] gute Übereinstimmung mit der gemessenen longitudinalen Relaxivität von $3,3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, welche mit dem automatisierten Aufbau und miniaturisierten Relaxometer bestimmt wurde.

Aufgrund des geringen magnetischen Moments des Gd-Kerns, zeigte DOTAREM® eine niedrige transversale Relaxivität (r_2) von $5,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert zeigte ebenfalls gute Übereinstimmung mit

der publizierten transversalen Relaxivität (r_2) bei einer Flussdichte von 0,47 T für Godatersäure von $5,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [211].

Negative Kontrastmittel zeigen eine höhere transversale Relaxivität im Vergleich zur longitudinalen Relaxivität. Dazu sind starke magnetische Momente im Kern des Kontrastmittels notwendig. Somit sind magnetische Nanopartikel als negative Kontrastmittel geeignet. Die Ermittlung der Relaxivität wurde an fünf kommerziell erhältlichen magnetischen Nanopartikeln der Firma Micromod Partikeltechnologie GmbH durchgeführt. Bei den Partikeln handelt es sich um clusterförmige, Dextran-beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel. Die Partikeleigenschaften und ermittelten Relaxivitäten sind in Tabelle 8 aufgezeigt.

Tabelle 8: Ermittelte transversale und longitudinale Relaxivitäten von kommerziell erhältlichen magnetischen Nanopartikeln.

Oberfläche	Durchmesser	$r_1 / \text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$r_2 / \text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	r_2/r_1
PEG300 - COOH	20 nm	28,0	270	9,6
PEG300 - COOH	100 nm	29,7	310	10,4
Streptavidin	50 nm	23,7	143	6,1
Streptavidin	100 nm	30,2	257	8,5
Streptavidin	500 nm	3,0	138	46

Bis auf Streptavidin-beschichtete Partikel mit einem Durchmesser von 500 nm zeigten die kommerziell erhältlichen Nanopartikel hohe longitudinale Relaxivitäten zwischen $23,7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $30,2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Somit waren die longitudinalen Relaxivitäten zwischen sieben und neun Mal so hoch wie im Fall des positiven Kontrastmittels Godatersäure. Die Verkürzung der longitudinalen Relaxationszeit wird im Fall von magnetischen Nanopartikeln hauptsächlich durch die *outer sphere* Relaxation bestimmt [213]. Dabei kommt es zur Interaktion der Protonenspins mit dem magnetischen Moment der Nanopartikel. Diese dipolare Wechselwirkung hängt von der relativen Diffusionsgeschwindigkeit der Wassermoleküle und des Nanopartikels ab. Der Energieaustausch ist am effizientesten, wenn die Larmor-Frequenz im Bereich der Frequenz des Wechselfelds liegt, dem die Wassermoleküle aufgrund der relativen Molekularbewegung ausgesetzt sind. Somit ist die longitudinale Relaxivität auch im Fall von Nanopartikeln stark von der Flussdichte des verwendeten Magneten abhängig. Die verwendete Flussdichte von 0,5 T liegt genau im Maximalbereich, indem magnetische Nanopartikel die höchste longitudinale Relaxivität aufweisen [213]. Lediglich Streptavidin-beschichtete Partikel mit einem Durchmesser von 500 nm zeigten aufgrund ihrer Größe eine deutlich geringere longitudinale Relaxivität von $3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Von clusterförmigen, Dextran-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel von micromod mit einem Durchmesser von 100 nm und einer PEG5000 (5 kDa Polyethylenglycol)-

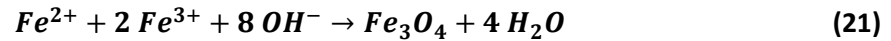
Funktionalisierung wurde bei einer Flussdichte 0,47 T eine longitudinale Relaxivität von $29,2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ publiziert [214]. Mit zunehmender Flussdichte nimmt die longitudinale Relaxivität generell ab [213]. So wurde bei einer Flussdichte von 1,5 T eine longitudinale Relaxivität von $9,7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für clusterförmige, Dextran-beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 20 nm gemessen [215]. Bei einer Flussdichte von 3 T wurde eine longitudinale Relaxivität von $2,3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für PEG300 – COOH beschichtete Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm gemessen [216]. Bei einer Flussdichte von 4,7 T wurde bereits eine vernachlässigbar kleine longitudinale Relaxivität von $0,06 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für PEG300 – NH₂ beschichteten Partikeln mit einem Durchmesser von 100 nm gemessen [217]. In Anbetracht der Flussdichte zeigte das konstruierte Relaxometer auch für longitudinale Relaxivitäten von magnetischen Nanopartikeln vergleichbare Werte mit kommerziellen Geräten.

Die ermittelten transversalen Relaxivitäten nahmen sowohl für PEG-COOH als auch für Streptavidin-beschichtete Partikel bei einem Partikeldurchmesser von 20 nm und 100 nm von $270 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $310 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respektive 50 nm und 100 nm von $143 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $257 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$, zu. Bei einem Durchmesser von 500 nm nahm die transversale Relaxivität Streptavidin beschichteter Partikel wieder auf $138 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ab. Dies entsprach der Größenabhängigkeit der transversalen Relaxivität mit dem Partikeldurchmesser [97, 117].

Die transversale Relaxivität ist generell weniger von der Flussdichte abhängig als die longitudinale Relaxivität. Dennoch wurde eine Abhängigkeit der transversalen Relaxivität von der Flussdichte des bei der Messung verwendeten Magneten gezeigt [211]. Bei Zunahme der Flussdichte von 0,47 T zu 1,5 T nahmen die transversalen Relaxivitäten ab, während sie zu 3 T und 4,7 T wieder zunahmen [211]. Ein Vergleich zu transversalen Relaxivitäten, welche bei höherer Flussdichte ermittelt wurden, ist deshalb nur schwer möglich. Für clusterförmigen, Dextran-beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel von Micromod mit einem Durchmesser von 100 nm und einer zusätzlichen Beschichtung mit PEG5000 wurde eine transversale Relaxivität von $252 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei einer Flussdichte von 0,47 T publiziert [214]. Das höhere Molekulargewicht der PEG5000-Beschichtung macht den magnetischen Kern für Wassermoleküle weniger gut zugänglich, was in einer geringeren transversalen Relaxivität als für PEG300-beschichtete Partikel resultierte. Streptavidin hat einen durchschnittlichen Durchmesser von 4 nm [218]. Somit ist die Oberfläche ähnlich gut zugänglich wie mit PEG5000-beschichtete Oberfläche (6 nm, [219]), was sich in einer vergleichbaren Relaxivität von $257 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ abzeichnete. Ein Vergleich zu publizierten Werten bei gleicher Flussdichte von transversale Relaxivitäten des konstruierten Relaxometers kann somit als möglich angesehen werden. Aufgrund des starken Einflusses der Clustergröße (Grad der Aggregation) ist jedoch auch immer auf vergleichbare Probenlagerung und Präparation der Verdünnungsreihen zu achten.

3.4. Synthese magnetischer Nanopartikel

Die Synthese magnetischer Nanopartikel erfolgte durch Mitfällung einer Eisensalz-Lösung und einer Base. Die Eisensalzlösung bestand aus Eisen(II)- und Eisen(III)chlorid mit einem molaren Verhältnis von 1:2. Als Base wurde Natriumhydroxid verwendet. Die Bildung von Magnetit läuft nach nachfolgendem Schema ab.



Die Eisensalzlösung wurde vor der Synthese durch die Zugabe von Salzsäure angesäuert. Dadurch wird die Bildung von Eisen-Hydroxiden und die Oxidation der Eisen(II)-Ionen minimiert [147, 149]. Zur Synthese im Mikroreaktor wurde die Eisensalz-Lösung durch zwei basische Hüllströme dreidimensional fokussiert. Im laminaren Fluss erfolgte die Durchmischung dabei durch Diffusion.

Zur Beschichtung der magnetischen Nanopartikel wurde Alendronsäure verwendet. Alendronsäure ist ein Bisphosphonat mit einer primären Aminogruppe. Bisphosphonate binden durch eine Chelatbindung stark an die Eisenoxid-Oberfläche der magnetischen Nanopartikel. Die freie Aminogruppe erlaubt das weitere Funktionalisieren mit Biomolekülen. Durch die negative Ladung der Phosphonat-Gruppen werden Alendronat-beschichtete Nanopartikel bei neutralem pH-Wert kolloidal stabilisiert [220, 221].

Bei der sequenziellen Herstellung beschichteter Partikel wurden die Partikel ohne Stabilisatoren im Mikroreaktor synthetisiert. Dabei wurde die Eisensalz- und Basenkonzentration variiert und der Einfluss auf die Partikelgröße, Zusammensetzung und transversale Relaxivität untersucht. Ohne Stabilisatoren aggregierten die Partikel stark. Durch Peptisieren mit verdünnter Salzsäure wurden die Aggregate verkleinert und kolloidal stabilisiert. Die Aggregatgröße wurde durch den pH-Wert verändert und auf maximale transversale Relaxivität optimiert. Danach erfolgte die Beschichtung mit Alendronsäure.

3.4.1. Nanopartikelsynthese im mikrofluidischen Reaktor

Bei der sequenziellen Synthese wurden magnetische Nanopartikel ohne Stabilisatoren im Mikroreaktor hergestellt. Die hergestellten Nanopartikel aggregierten dabei stark und wurden als schwarzes Präzipitat erhalten. Die Größenordnung der Aggregate lag im Bereich des Schlauchdurchmessers (ID = 2,4 mm) des Reaktorauslasses. Die während der Synthese gemessene transversale Relaxationszeit (T_2) wurde dadurch nur geringfügig von den magnetischen Nanopartikel beeinflusst. Generell sind maximale Relaxationsraten bei Clustergrößen von 100 nm bis 150 nm zu

erwarten. Bei größeren Clustern nimmt die Relaxationsrate invers proportional zum Quadrat des Durchmessers ab ($R_2 \sim 1/d_p^2$) [97, 117]. Dennoch konnte die Messung der transversalen Relaxationszeit (T_2) herangezogen werden, um Aussagen über den Umsatz der Reaktion oder Stabilität der Synthesebedingungen zu tätigen. Wurden keine Partikel gebildet, beeinflussten Fe^{3+} -Ionen die transversale Relaxationszeit (T_2). Die transversale Relaxivität von Fe^{3+} -Ionen betrug $8,6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und wurde mit dem automatisierten Messablauf zur Bestimmung der Relaxivität gemessen.

Abbildung 57 zeigt die Messungen der transversalen Relaxationsrate während stabiler Syntheseabläufe bei unterschiedlichen Synthesebedingungen. Dabei wurde die Basen- oder Eisensalzkonzentration variiert. Stabile Synthesebedingungen wurden nach einer Startzeit von 5 min erreicht. Die einzelnen Messpunkte sind zur Führung des Auges mit Linien verbunden.

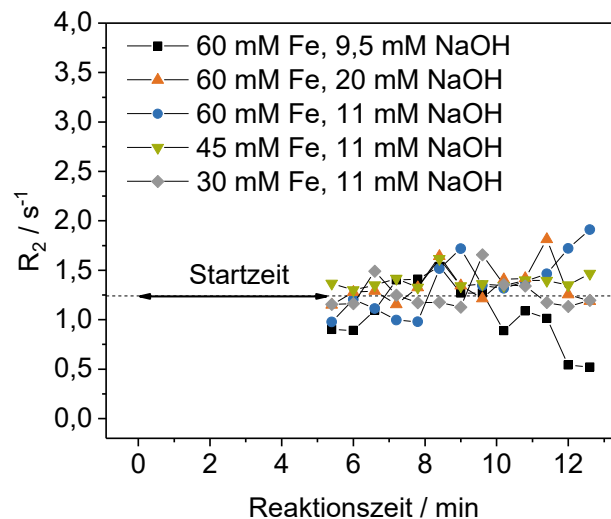


Abbildung 57: Online-Messung der transversalen Relaxationsrate (R_2) während der Synthese magnetischer Nanopartikel bei variierten Reaktionsbedingungen. Die Linien zwischen den Messpunkten dienen zur Führung des Auges.

Unabhängig von den Synthesebedingungen befanden sich die transversalen Relaxationsraten um einen Wert von $1,25 \text{ s}^{-1}$. Diese Relaxationsrate entspricht einer Fe^{3+} -Konzentration von $0,14 \text{ mM}$. Die Relaxationsraten von Fe^{3+} -Ionen bei den eingesetzten Eisenkonzentrationen von 60 mM , 45 mM und 30 mM wären hingegen bei einem Flussratenverhältnis der basischen Hüllströme zur Eisensalzlösung von $FRR = 20$ bei $16,4 \text{ s}^{-1}$, $12,3 \text{ s}^{-1}$ und $8,2 \text{ s}^{-1}$ zu erwarten und damit deutlich höher. Dies zeigte den Verbrauch des Fe^{3+} -haltigen Präkursors an.

Die getrockneten Nanopartikel wurden durch Raman-Mikroskopie charakterisiert. Abbildung 58 zeigt das Raman-Spektrum der Nanopartikel zusammen mit Referenzspektren von Magnetit und Maghemit.

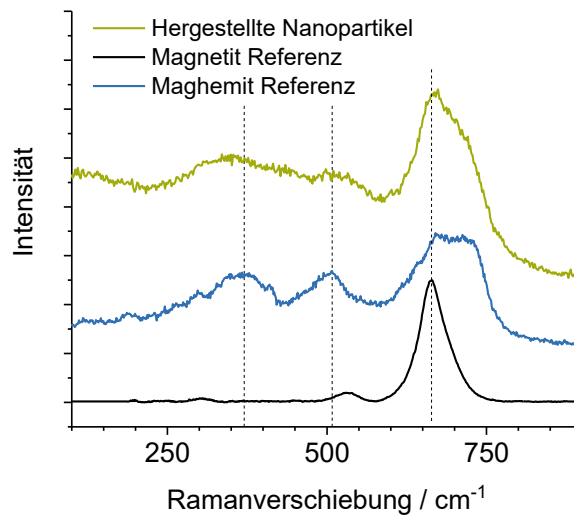


Abbildung 58: Raman-Spektren der hergestellten magnetischen Nanopartikel und Vergleich zu Referenzspektren von Magnetit und Maghemit (Messung durchgeführt von Carolin Hartmann, MSc., Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie).

Magnetit zeigt typischerweise eine schwache breite Bande bei 532 cm⁻¹, sowie die sehr starke breite Bande bei 664 cm⁻¹ [222]. Für Maghemit sind Banden von ähnlicher Intensität bei 660 cm⁻¹ und 710 cm⁻¹ charakteristisch. Zusätzlich zeigt Maghemit zwei schwache Banden bei 300 cm⁻¹ und 530 cm⁻¹ [129, 193]. Die hergestellten Nanopartikel zeigten die starke Magnetit-Bande bei 664 cm⁻¹. Daneben deutete die Schulter in Richtung höherer Wellenzahlen als auch die schwachen Banden bei 300 cm⁻¹ und 530 cm⁻¹ auf Maghemit. Somit konnte von einer Mischung aus Magnetit und Maghemit ausgegangen werden. Magnetit oxidiert an Luft besonders an der Oberfläche der Nanopartikel zu Maghemit [129, 148]. Bei der Raman-Mikroskopie werden besonders die Oberflächen-Charakteristika der Nanopartikel betrachtet und somit zeichnete sich der hohe Anteil an Maghemit deutlich ab [193].

Größe und Größenverteilung der primären magnetischen Nanopartikel wurden anhand Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie-Bildern (*field emission scanning electron microscopy* – FESEM) bestimmt. Abbildung 59 zeigt ein FESEM-Bild der magnetischen Nanopartikel.

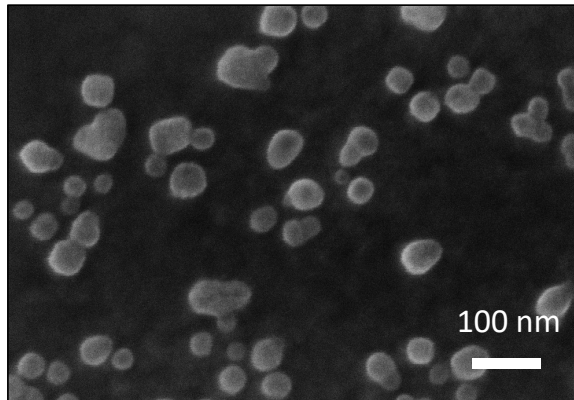


Abbildung 59: FESEM-Aufnahme der hergestellten magnetischen Nanopartikel.

Die generell runden Partikel waren teilweise aggregiert. Die Bilder wurden mit Hilfe der Software *ImageJ* ausgewertet und die Durchmesser der Partikel gemessen. Zur Bestimmung der Durchschnittsgröße und Größenverteilung wurde an die Messwerte eine logarithmische Normalverteilung angepasst. Dabei wurde der Einfluss der Basenkonzentration sowie der Eisensalzkonzentration auf die Größenverteilung untersucht. Abbildung 60 zeigt die Größenverteilung magnetischer Nanopartikel bei variierten Basenkonzentration (Natriumhydroxid) von 10 mM, 20 mM und 40 mM.

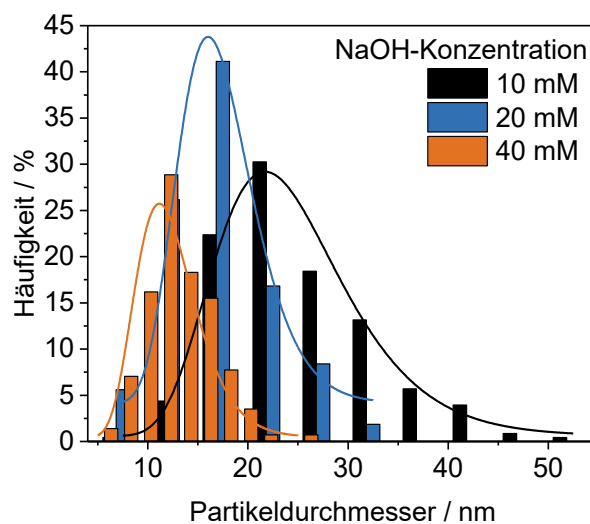


Abbildung 60: Partikelgrößenverteilung anhand von FESEM-Aufnahmen magnetischer Nanopartikel bei variierten Basenkonzentration und einer Eisenkonzentration von 60 mM während der Synthese (FRR = 20).

Der gemessene pH-Wert am Reaktorausgang lag bei 10,14, 11,53 und 12,06. Die durchschnittlichen Partikeldurchmesser nahmen mit der Basenkonzentration ab. Bei einer Basenkonzentration von 10 mM lag dieser bei $24,8 \pm 7,1$ nm ($n = 228$), von 20 mM bei $17,3 \pm 4,1$ nm ($n = 107$) und von 40 mM bei $12,3 \pm 3,3$ nm ($n = 142$). Die Standardabweichung des Durchmessers nahm mit dem Durchmesser ebenfalls zu. Die relative Standardabweichung blieb etwa gleich.

Ausgehend von der niedrigsten Basenkonzentration wurde der Eisensalzkonzentration verändert. Abbildung 61 zeigt die Größenverteilung bei einer Eisensalzkonzentration von 60 mM, 45 mM und 30 mM Fe.

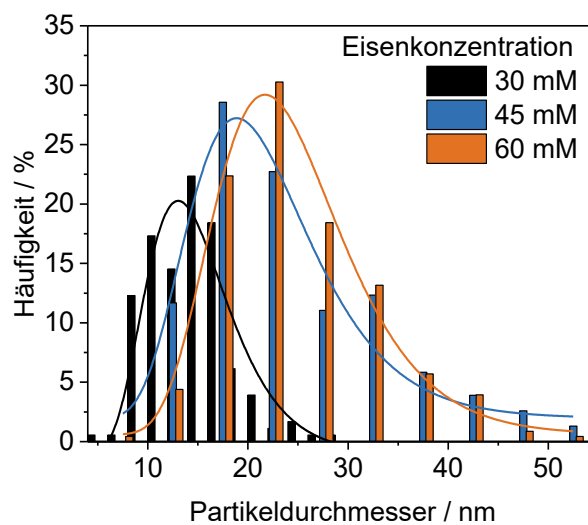


Abbildung 61: Partikelgrößenverteilung anhand von FESEM-Aufnahmen magnetischer Nanopartikel bei variierter Konzentration der Eisensalz-Lösung und einer Basenkonzentration von 10 mM NaOH während der Synthese (FRR = 20).

Der gemessene pH-Wert am Reaktorausgang nahm mit abnehmender Eisenkonzentration zu und lag bei jeweils 10,14, 11,02 und 11,20. Die durchschnittlichen Partikeldurchmesser nahmen mit abnehmender Eisensalzkonzentration ab. Bei einer Eisensalzkonzentration von 60 mM lag der Durchmesser bei $24,8 \pm 7,1$ nm ($n = 228$), von 45 mM bei $22,0 \pm 7,2$ nm ($n = 154$) und von 30 mM bei $15,1 \pm 4,8$ nm ($n = 179$). Mit abnehmender Eisensalzkonzentration begünstigte sowohl der höhere pH-Wert als auch die geringere Verfügbarkeit an Ausgangsmaterial die Bildung kleinerer Nanopartikel.

3.4.2. Optimierung der transversalen Relaxivität

Zur Messung des hydrodynamischen Durchmessers mit dynamischer Lichtstreuung (*dynamic light scattering* – DLS) und des Einflusses der magnetischen Nanopartikel auf die transversale (T_2) und longitudinale (T_1) Relaxationszeit, wurden die Partikel durch Zugabe von verdünnter Salzsäure peptisiert [223]. Die Konzentration der Salzsäure und der daraus resultierende pH-Wert beeinflusste den hydrodynamischen Durchmesser, wie in Abbildung 62 gezeigt.

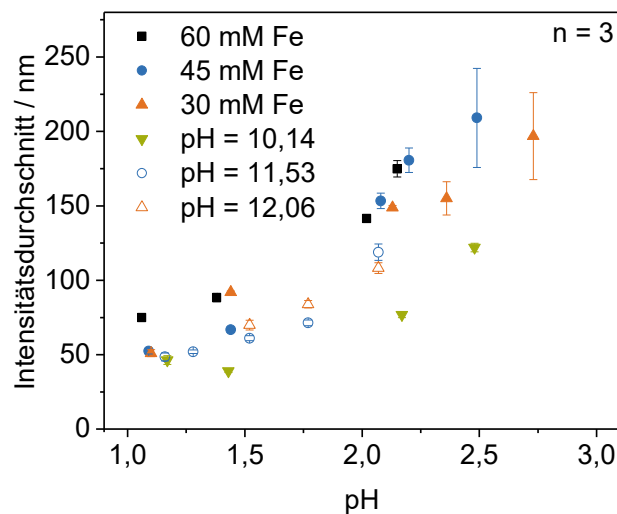


Abbildung 62: Durchschnittliche Clustergröße gemessen durch dynamische Lichtstreuung (DLS) in Abhängigkeit des pH-Werts während der Peptisierung magnetischer Nanopartikel bei variierten Synthesebedingungen.

Zwischen einem pH-Wert von 1 bis 3 war eine Zunahme der hydrodynamischen Durchmesser von 39 nm bis 209 nm zu erkennen. Die hydrodynamischen Durchmesser beim jeweils niedrigsten pH-Wert jeder Synthesebedingung lagen zwischen 46 nm und 75 nm. Im Vergleich zur primären Partikelgröße aus FESEM-Bildern kann davon ausgegangen werden, dass mehrere Partikel als Di- und Trimere vorlagen [223]. Zusätzlich basierten die Werte in Abbildung 62 auf der Intensitätsverteilung des gestreuten Lichtes der DLS-Messung. Größere Partikel streuen viel stärker, so ist die Intensität direkt proportional zur sechsten Potenz des Partikeldurchmessers. Deshalb beeinflussten vorhandene Cluster die durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser stark [187].

Durch die verwendete Software ließ sich der starke Einfluss auf die Intensitätsverteilung korrigieren und eine Anzahl-basierte Partikelgrößenverteilung berechnen. Die berechneten Durchschnittswerte lagen im Bereich der Durchschnittswerte aus FESEM-Bildern. Aufgrund der hohen Fehlerbehaftung und dem zusätzlichen Einfluss der Hydrathülle um die Partikel war jedoch kein direkter Vergleich mit FESEM-Bildern möglich [186, 187].

Der Einfluss des hydrodynamischen Durchmessers war ebenfalls in den transversalen und longitudinalen Relaxationszeiten zu erkennen. Abbildung 63 zeigt den Einfluss des hydrodynamischen Durchmessers von magnetischen Nanopartikel-Clustern auf die transversale Relaxationsrate, der inversen Relaxationszeit ($R_2 = 1/T_2$). Die Nanopartikel wurden bei unterschiedlichen Basenkonzentrationen und durch Zugabe von verdünnter Salzsäure peptisiert.

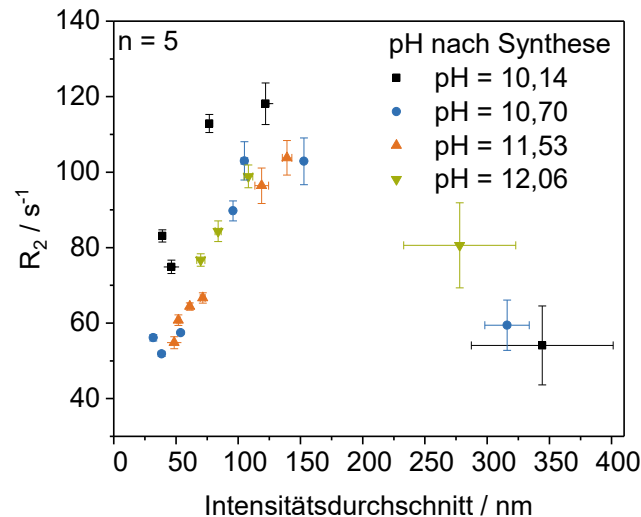


Abbildung 63: Transversale Relaxationsrate (R_2) in Abhängigkeit der durchschnittlichen Clustergröße gemessen durch DLS für variierte Basenkonzentrationen während der Synthese.

Unter einem hydrodynamischen Durchmesser von 150 nm nahm die transversale Relaxationsrate mit der Clustergröße zu. Die geringste transversale Relaxationsrate lag bei $51,8 s^{-1}$, bei einer durchschnittlichen Clustergröße von 38,5 nm. Die maximale transversale Relaxationsrate von $118 s^{-1}$ wurde bei einer Clustergröße von 122 nm gemessen. Mit zunehmender Clustergröße erzeugen magnetische Nanopartikel stärkere Inhomogenitäten mit höheren Gradienten im magnetischen Feld. Einerseits wird dadurch das Dephasieren von Protonenspins beschleunigt und durch die hohen Feldgradienten werden Refokussierungspulse zum Erzeugen von Spin-Echos weniger effizient. Theoretisch (Regime der Bewegungsmittelung) nimmt die Clustergröße proportional zum Quadrat der Clustergröße zu.

Nur bei der geringsten Basenkonzentration von 10 mM NaOH war ein deutlicher Unterschied zu den anderen Basenkonzentrationen zu erkennen. Bei diesen Synthesebedingungen war die transversale Relaxationsrate bei gleicher Clustergröße durchschnittlich $26 s^{-1}$ höher. Neben der Clustergröße bestimmt vor allem die Sättigungsmagnetisierung die transversale Relaxationsrate. Einerseits zeigten FESEM-Bilder bei der niedrigsten Basenkonzentration größere primäre Nanopartikel, andererseits

zeigten Studien durch Mascolo et al. und Ramadan et al. zur Optimierung der Sättigungsmagnetisierung höhere Werte bei niedrigeren pH-Werten während der Nanopartikel-Synthese [140, 224]. Beide Fälle sprechen für eine höhere Sättigungsmagnetisierung und die daraus folgende höhere transversale Relaxationsrate bei gleicher Clustergröße.

Theoretisch flacht die transversale Relaxationsrate bei weiterer Zunahme der Clustergröße ab und wird von der Clustergröße unabhängig (Regime der statischen Dephasierung). Dies gilt jedoch nur unter der Annahme unendlich langer Echozeiten [97, 117]. Experimentell wurde dieses Plateau nicht beobachtet. Zusätzlich erfordert das Ausbilden eines Plateaus perfekt monodisperse Partikel. Unter realen Bedingungen beeinflussen aufgrund der Größenverteilung der Partikel meist mehrere Regime die transversale Relaxationszeit und diese erreicht kein Plateau in Abhängigkeit der durchschnittlichen Partikelgröße [97].

Bei weiterer Zunahme der Clustergröße beeinflussen die durch magnetische Nanopartikel hervorgerufenen Magnetfeldgradienten immer weniger das gesamte Dispersionsvolumen. Der Einfluss der magnetischen Nanopartikel und somit auch die Relaxationsrate nehmen dann mit der Clustergröße ab. Dies war bei Clustergrößen zwischen 250 nm und 350 nm der Fall.

Bei Variation der Eisensalzkonzentration wurden zur besseren Vergleichbarkeit die Messungen bei konstanter Eisenkonzentration durchgeführt. Diese wurde durch verdünnen eingestellt. Der Einfluss der Clustergröße auf die transversale Relaxationszeit ist in Abbildung 64 gezeigt.

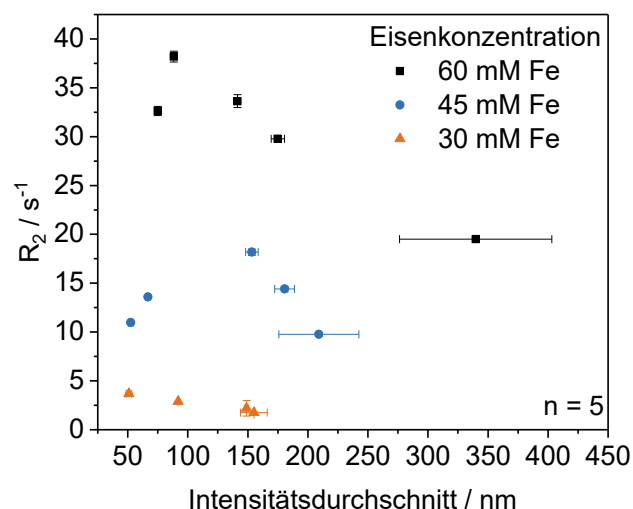


Abbildung 64: Transversale Relaxationsrate (R_2) in Abhängigkeit der durchschnittlichen Clustergröße gemessen durch DLS für variierte Eisensalz-Konzentration während der Synthese.

Trotz gleicher Eisenkonzentration waren deutliche Unterschiede in den transversalen Relaxationszeiten bei unterschiedlichen Eisenkonzentrationen während der Synthese zu erkennen. Bei einer Eisenkonzentration von 60 mM lag die maximale transversale Relaxationsrate bei $38,2 \text{ s}^{-1}$ und bei einer Eisenkonzentration von 45 mM und 30 mM bei $18,2 \text{ s}^{-1}$ respektive $3,6 \text{ s}^{-1}$.

Raman-Messungen zeigten, dass mit abnehmender Eisensalzkonzentration während der Synthese zunehmend nicht-magnetische Phasen von Eisenoxid gebildet wurden. Diese befanden sich im Überstand nach magnetischem Abtrennen der magnetischen Nanopartikel. Raman-Spektren der Überstände sind zusammen mit Referenzspektren von Magnetit (Fe_3O_4), Hämatit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) und Goethit ($\alpha\text{-FeO(OH)}$) in Abbildung 65 gezeigt.

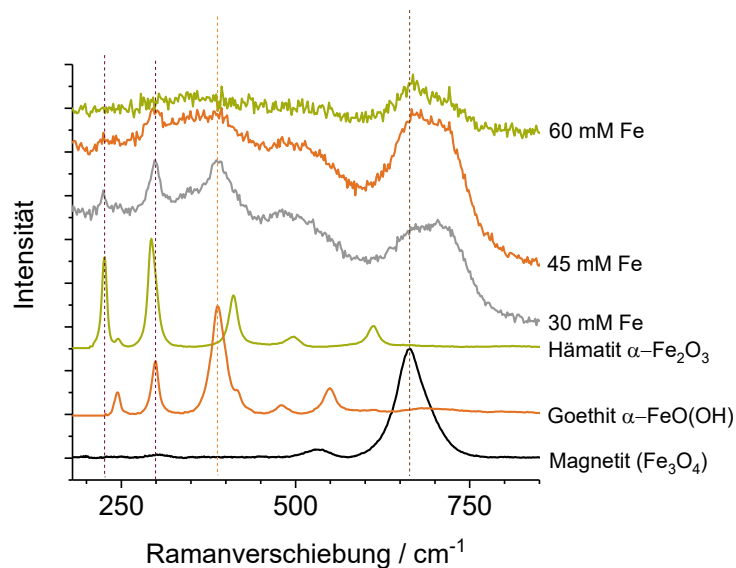


Abbildung 65: Raman-Spektren des Überstands nach der Synthese magnetischer Nanopartikel bei variierter Eisensalz-Konzentration und Referenzspektren für Magnetit, Goethit und Hämatit (Messung durchgeführt von Carolin Hartmann, MSc., Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie).

Bei einer eingesetzten Eisensalzkonzentration von 60 mM war der Überstand klar und farblos. Das Raman-Spektrum des Überstandes zeigte eine schwache Bande bei der charakteristischen Bande von Magnetit bei 663 cm^{-1} . Bei einer verringerten Eisensalzkonzentration von 45 mM und 30 mM war eine braun-rötliche Färbung des Überstandes zu erkennen. Mit abnehmender Eisensalzkonzentration waren im Raman-Spektrum des Überstandes die charakteristischen Banden von Hämatit (226 cm^{-1}) sowie Goethit (386 cm^{-1}) zu erkennen [222]. Zur Bildung von Magnetit ist eine ausreichend hohe Reaktionsrate notwendig [149], um das schnelle oxidieren von Fe^{2+} bei basischen pH-Wert zu verhindern [147].

Zusätzlich wurde die longitudinale Relaxationszeit bestimmt. Abbildung 66 zeigt die longitudinale Relaxationsrate in Abhängigkeit der Clustergröße von Nanopartikeln, welche bei variierten Basenkonzentrationen während der Synthese hergestellt wurden.

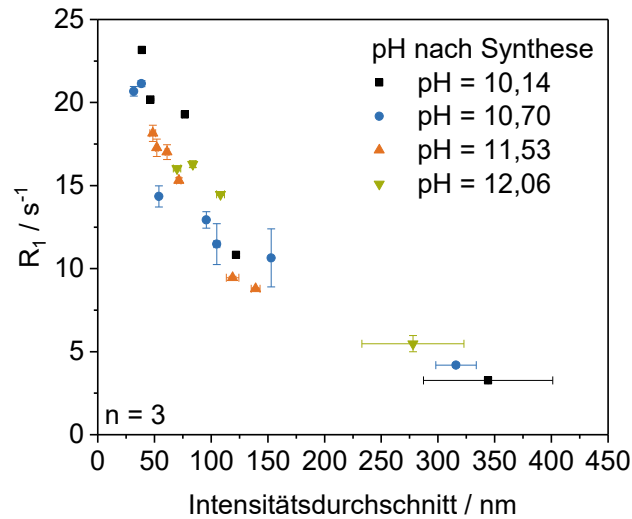


Abbildung 66: Longitudinale Relaxationsraten (R_2) in Abhängigkeit der durchschnittlichen Clustergröße gemessen durch DLS für variierte Basenkonzentrationen während der Synthese.

Mit zunehmender Clustergröße war eine abnehmende longitudinale Relaxationsrate zu erkennen. Bei einer Clustergröße von 39 nm lag diese bei 23 s^{-1} und nahm bis zu einer Clustergröße von 344 nm auf 3 s^{-1} ab. Bei der longitudinalen Relaxation erfolgt ein Energieübertrag der angeregten Spins an die Umgebung (Spin-Gitter Relaxation, *spin-lattice relaxation*). Im Fall von magnetischen Nanopartikeln erfolgt der Energieübertrag an paramagnetische Eisenionen an der Oberfläche der Nanopartikel [225]. Bei kleiner Clustergröße steht den Wassermolekülen eine höhere Oberfläche zum Energieaustausch zur Verfügung, die Relaxation wird beschleunigt und die Relaxationsrate nimmt zu.

Mit der longitudinalen Relaxationsrate kann ebenfalls das dimensionslose Relaxivitätsverhältnis der transversalen Relaxivität über der longitudinalen Relaxivität (r_2/r_1) ermittelt werden. Das Relaxivitätsverhältnis dient zur Klassifizierung von Kontrastmitteln in positive (kleines r_2/r_1) und negative (großes r_2/r_1) Kontrastmittel. Das Relaxivitätsverhältnis kann wie in Gleichung (22) ohne bekannte Konzentration c der Nanopartikel aus den Relaxationsraten R_i berechnet werden. Eine zusätzliche Vereinfachung ist unter der Annahme viel kleinerer Relaxationsraten des reinen Lösemittels ($R_{i,sol} \ll R_i$) möglich [210]:

$$\frac{r_2}{r_1} = \frac{(R_2 - R_{2,sol})/c}{(R_1 - R_{1,sol})/c} = \frac{(R_2 - R_{2,sol})}{(R_1 - R_{1,sol})} \approx \frac{R_2}{R_1} \quad (22)$$

Das Relaxivitätsverhältnis der synthetisierten Nanopartikel ist in Abbildung 67 gezeigt.

(A)

(B)

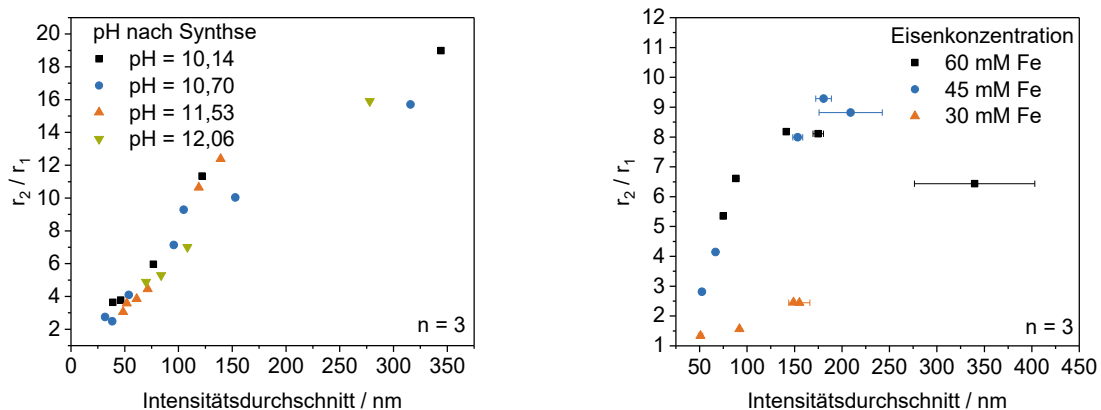


Abbildung 67: Quotient aus transversaler und longitudinaler Relaxivität (r_2/r_1) in Abhängigkeit der durchschnittlichen Clustergröße gemessen durch DLS für variierte Basenkonzentrationen (A) und variiertes Eisensalz-Konzentration (B) während der Synthese.

Die geringen longitudinalen Relaxationsraten bei großen Clustergrößen mit einem hydrodynamischen Durchmesser von mehreren 100 nm resultierten in hohen Relaxivitätsverhältnissen von bis zu 19. Aufgrund der stark abfallenden transversalen Relaxationsraten bei diesen Clustergrößen, wurden Bedingungen mit maximaler transversaler Relaxationsrate zur weiteren Synthese gewählt. Das Relaxivitätsverhältnis lag hier bei etwa 11, somit zählten die Partikel zu den negativen Kontrastmitteln [118]. Im Fall der Variation der Eisensalz-Konzentration während der Synthese wurde die Wichtigkeit der Konzentrationsunabhängigkeit des Relaxivitätsverhältnisses deutlich. Während die transversale Relaxationsrate deutliche Unterschiede in der maximalen Relaxationsrate bei gleicher

Eisenkonzentration zeigte, lagen die Relaxivitätsverhältnisse nah beieinander. Die durch Raman-Mikroskopie identifizierten nicht magnetischen Phasen beeinflussten die transversale Relaxation nicht. Somit konnte nach dem Abtrennen des nicht-magnetischen Überstandes von Partikeln mit ähnlichen Relaxationseigenschaften ausgegangen werden. Lediglich die geringste Ausgangskonzentration an Eisen von 30 mM zeigte niedrigere Relaxationsraten, welche auf den hohen Anteil an nicht magnetischen Phasen zurückgeführt werden konnten.

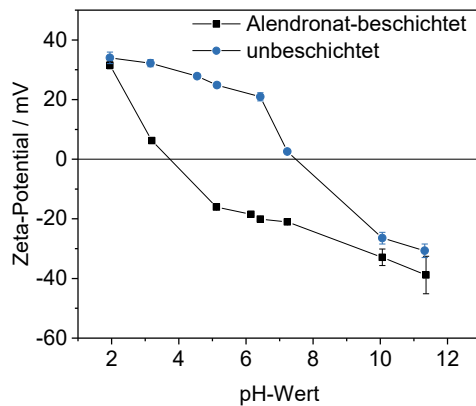
Zur weiteren Funktionalisierung wurden die Nanopartikel-Cluster mit der maximalen transversalen Relaxationsrate verwendet. Die optimalen Reaktionsbedingungen bei einer Eisenkonzentration von insgesamt 60 mM lagen dazu bei einem pH-Wert von 10 am Reaktorauslass. Die Peptisierung wurde bei einem pH-Wert von 2 durchgeführt.

3.4.3. Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel

Die weitere Funktionalisierung diente zum Verbessern der kolloidalen Stabilität und zum Einführen funktioneller Gruppen, die ein weiteres Biofunktionalisieren erlaubten. Ein Beschichten mit Polymeren kann die Partikel gut über einen großen pH-Bereich stabilisieren. Polymere beeinflussen jedoch auch den hydrodynamischen Durchmesser und zu einem größeren Ausmaß auch die transversale Relaxivität. Deshalb wurde die Funktionalisierung mit Alendronat durchgeführt. Alendronat ist ein Bisphosphonat mit terminaler Aminogruppe. Die Bisphosphonate binden stark durch eine Fe-O-P Bindung an der Eisenoxid-Oberfläche [133, 197, 226]. Die terminale Aminogruppe lässt das weitere Funktionalisieren mit Antikörpern oder Medikamenten zu [121, 130, 198].

Zur Funktionalisierung wurden peptisierte Nanopartikel mit Alendronat inkubiert. Dabei flockten die Partikel und ließen sich mit einem Permanentmagneten abtrennen und waschen. Die Redisperion erfolgte bei neutralem pH-Wert. Abbildung 68-A zeigt die FT-IR-Spektren unbeschichteter und Alendronat-beschichteter magnetischer Nanopartikel sowie Abbildung 68-B die Änderung des Zeta-Potentials in Abhängigkeit des pH-Werts.

(A)



(B)

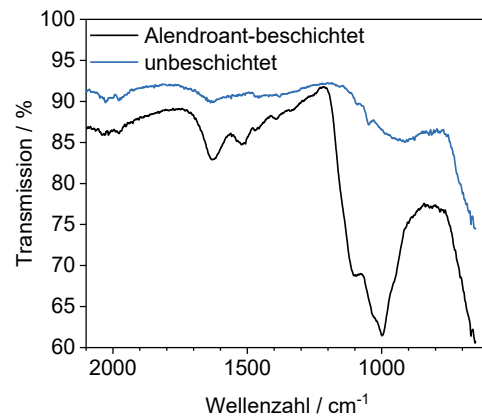
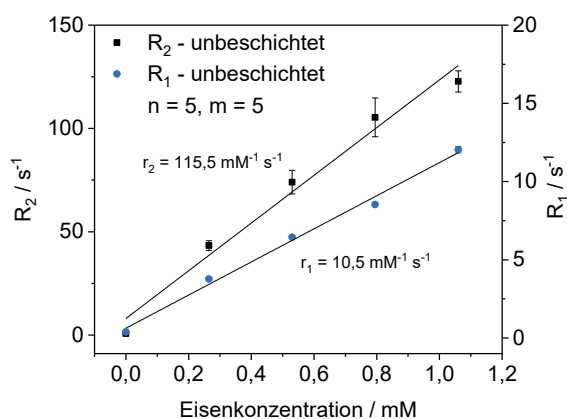


Abbildung 68: Bestimmung des isoelektrischen Punkts von unbeschichteten und Alendronat-beschichteten magnetischen Nanopartikeln durch Messung des Zeta-Potentials in Abhängigkeit des pH-Werts (A). FT-IR-Spektren getrockneter unbeschichteter und Alendronat-beschichteter magnetischer Nanopartikel (B).

Nach magnetischer Aufreinigung zeigten die funktionalisierten Nanopartikel im Vergleich zu den unbeschichteten Partikeln die charakteristischen Banden der P-O-Streckschwingung bei 900 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} , sowie eine Bande bei 1522 cm^{-1} , welche der N-H-Scherschwingung zugeordnet werden konnte [196, 221]. Bei unbeschichteten Partikeln lag der isoelektrische Punkt bei 7,5 und nahm nach dem Funktionalisieren mit Alendronat auf 3,7 ab. Durch die Oberflächenladung bei neutralem pH-Wert wurden die Partikel kolloidal stabilisiert. Die negative Oberflächenladung wurde durch deprotonierte Hydroxylgruppen der Phosphonate hervorgerufen [130, 197].

Vor und nach dem Beschichten wurde die transversale (r_2) und longitudinale (r_1) Relaxivität bestimmt. Dazu wurde der beschriebene automatisierte Messablauf verwendet (siehe Kapitel 3.3.6). Abbildung 69 zeigt die transversale und longitudinale Relaxationsrate bei variierender Partikelkonzentration vor (Abbildung 69-A) und nach (Abbildung 69-B) der Beschichtung.

(A)



(B)

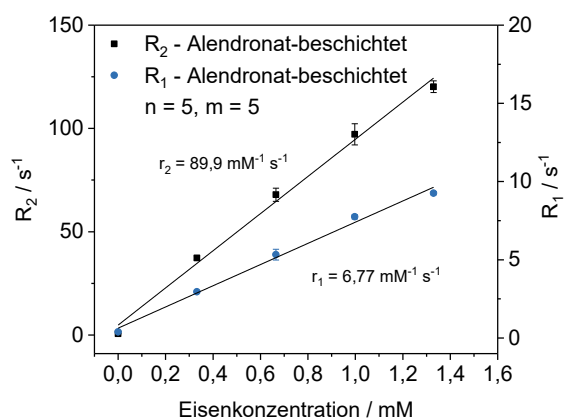


Abbildung 69: Longitudinale (R_1) und transversale (R_2) Relaxationsrate in Abhängigkeit der Partikel-Konzentration zur Ermittlung der longitudinalen (r_1) und transversalen (r_2) Relaxivität von unbeschichteten (A) und Alendronat-beschichteten magnetischen Nanopartikeln (B).

Durch das Beschichten mit Alendronat nahm die transversale Relaxivität von $115,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $89,9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ab. Die longitudinale Relaxivität nahm ebenfalls von $10,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf $6,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ab. Das Beschichten, zusammen mit mehrmaligem magnetischem Abtrennen der Partikel, führte zu einer Zunahme des durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmessers. Dieser nahm von 230 nm auf 267 nm zu. Da Alendronat viel kleiner als oft verwendete polymerische Stabilisatoren ist, kann angenommen werden, dass die Alendronat-Beschichtung die Diffusionseigenschaften von Wasser in der Nähe der Oberfläche des Partikels wenig änderte und Änderung der Relaxivität auf eine Änderung der durchschnittlichen Clustergröße zurückgeführt werden konnten.

3.5. Anwendung magnetischer Nanopartikel zur Detektion von Legionellen

Zur Detektion von Legionellen wurden Alendronat-beschichtete magnetische Nanopartikel mit einem polyklonalen Antikörper gegen *Legionella pneumophila* (anti-*Legionella pneumophila*) funktionalisiert. Die schematische Darstellung der Funktionalisierung ist in Abbildung 70 gezeigt.

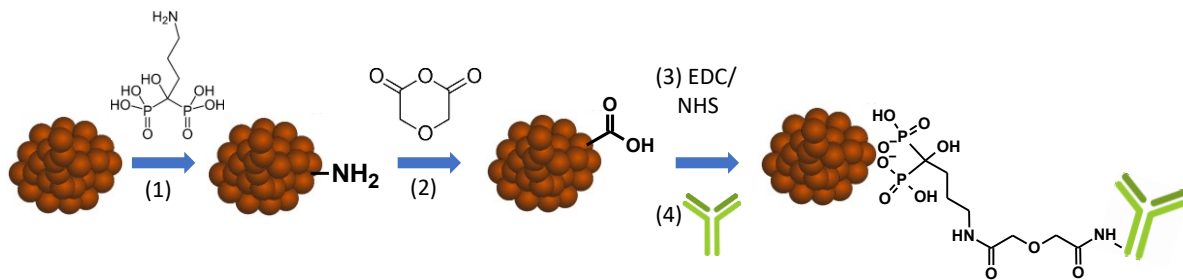


Abbildung 70: Schematische Darstellung der Funktionalisierung magnetischer Nanopartikel mit Antikörpern. Nach der Synthese von Cluster-förmigen Nanopartikeln erfolgte die Beschichtung mit Alendronsäure (1). Danach erfolgte die Carboxylierung mit Diglycolanhydrid (DGA) (2), Aktivierung mit EDC und NHS (3) sowie die Kopplung mit einem Antikörper (4).

Ausgehend von Alendronat-beschichteten und auf maximale transversale Relaxivität optimierten magnetischen Nanopartikeln erfolgte die Carboxylierung mit Diglycolanhydrid (DGA) (Abbildung 70-2). Die Funktionalisierung mit DGA diente der Erhöhung der kolloidalen Stabilität. Durch die Einführung der Carboxylgruppe sank der isoelektrische Punkt von einem pH-Wert von 3,7 für Alendronat-beschichtete Partikel auf einen pH-Wert von 2,3 mit zusätzlicher DGA-Funktionalisierung. Dadurch erhöht sich die Stabilität bei neutralem pH-Wert. Durch die zusätzliche Ethergruppe erhöht sich zusätzlich die Dispergierbarkeit in wässriger Lösung. Längere Polyether wie Polyethylenglycol (PEG) würden die kolloidale Stabilität zusätzlich erhöhen, jedoch nimmt die transversale Relaxivität mit zunehmendem Molekulargewicht von PEG ab 600 g mol^{-1} ab [113]. Bei einem Molekulargewicht von PEG unter 600 g mol^{-1} kann die transversale Relaxivität durch die PEG-Beschichtung zunehmen. Dies liegt an der langsameren Diffusion von Wassermolekülen in der Nähe des magnetischen Kerns [113, 115, 116]. Die transversale Relaxivität DGA-funktionalisierter Nanopartikel nahm durch die Beschichtung zu. Mit einem Wert von $298 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ war diese deutlich höher als von nur mit Alendronat beschichteten Nanopartikeln. Nach der Aktivierung der Carboxygruppen mit EDC und sulfo-NHS (Abbildung 70-3) erfolgte die Kopplung mit Antikörpern (Abbildung 70-4).

3.5.1. Herstellung der Filtermodule

Die Detektion von Legionellen erfolgte direkt auf monolithischen Filtermodulen. Die Synthese der Filtermodule ist schematisch in Abbildung 71 gezeigt.

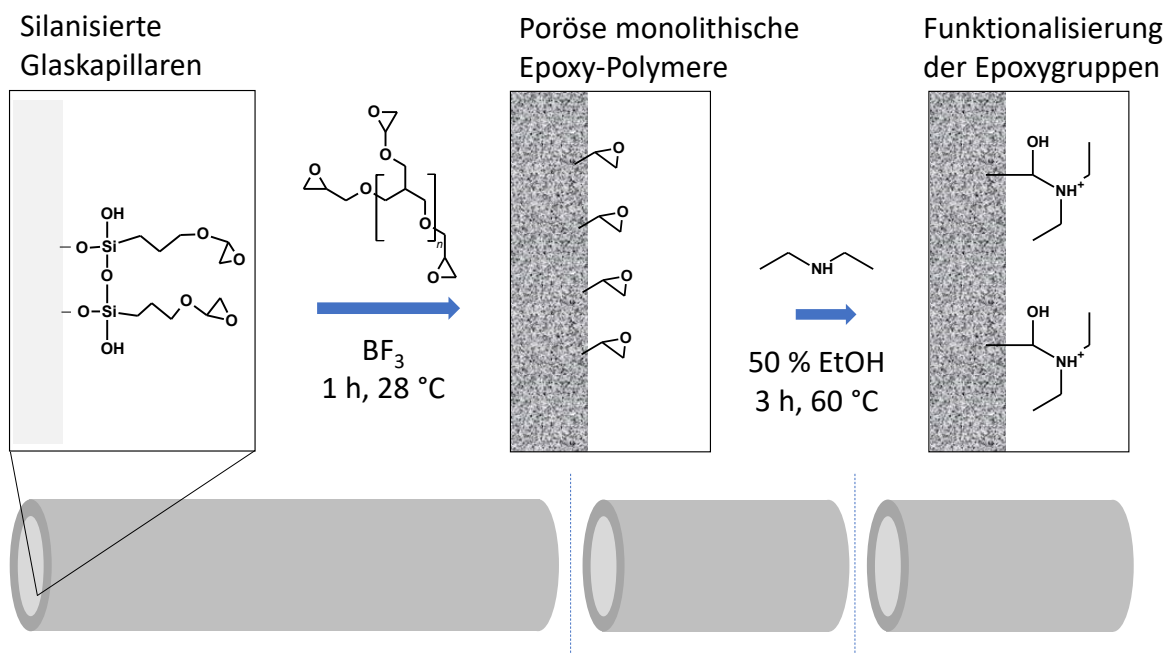


Abbildung 71: Schematische Darstellung der Synthese monolithischer Filter in silanisierten Glaskapillaren und anschließende Funktionalisierung mit Diethylamin.

Die Polymerisation des Polyepoxids wurde in silanisierten Glaskapillaren (ID = 0,5 mm, OD = 1,8 mm) durchgeführt. Die Glaskapillaren wurden nach der publizierten Methode von Peskoller et al. silanisiert [227]. Danach erfolgte die Polymerisation des Polyepoxids nach Ott et al. [228]. Um bei neutralem pH-Wert eine positiv geladene Filteroberfläche zu erhalten, wurden die verbleibenden Epoxidgruppen mit Diethylamin nach der Methode aus der Doktorarbeit von D. Elsäßer funktionalisiert [9]. Daraus resultierte eine Diethylaminoethanol (DEAE)-funktionalisierte Oberfläche. DEAE hat bei Raumtemperatur einem pK_s -Wert von 9,73 [229]. Somit konnte bei neutralem pH-Wert von einer positiv geladenen Oberfläche ausgegangen werden.

Im Vergleich zu bisherigen Methoden wurde die Synthese und Funktionalisierung in 12,8 cm langen Glaskapillaren durchgeführt. Diese wurden nachträglich in Stücke mit einer Länge von jeweils 5 mm geschnitten. Somit konnten bis zu 25 Filtermodule aus einer Kapillare hergestellt werden. Dadurch wurde der Arbeitsaufwand zur Herstellung einzelner Filtermodule drastisch reduziert. Des Weiteren musste so für eine Messreihe nicht auf Filter aus unterschiedlichen Chargen zurückgegriffen werden. Unterschiedliche Chargen können insofern problematisch sein, da die Porengröße stark von der

Lösemittelzusammensetzung und Temperatur abhängt [227], was sich wiederum in unterschiedlichen Filtrationseigenschaften auswirkt.

Die zugeschnittenen Filter mit einer Länge von 5 mm wurden im Inneren der Spule des NMR-Relaxometers platziert. Filter und Spule sind in Abbildung 72 gezeigt.

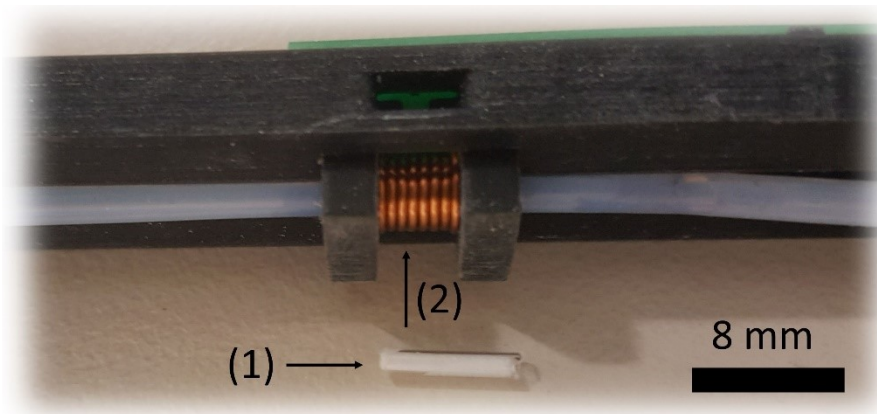


Abbildung 72: Darstellung des Einbaus eines zugeschnittenen Filtermoduls (1) in das Innere der Spule (2) des NMR-Relaxometers.

Zum Einsetzen wurde der Filter (Abbildung 72-1) durch den Teflon-Schlauch im Inneren der Spule (Abbildung 72-2) geschoben und durch zwei dünnere Teflon-Schläuche gegen Verrutschen gesichert.

3.5.2. Detektion von Legionellen auf Filtermodulen

Um die Retention von Legionellen zu detektieren, wurden Legionellen mit Antikörperfunktionalisierten magnetischen Nanopartikeln markiert und durch den Filter gepumpt. Dabei wurde die transversale Relaxationszeit in regelmäßigen Abständen gemessen. Abbildung 73 zeigt die Änderung der transversalen Relaxationszeit (ΔT_2) mit zunehmender Filtrationszeit bei unterschiedlichen Legionellen-Konzentrationen. Die Änderung wurde dabei auf die transversale Relaxationszeit des wassergefüllten Filters bezogen.

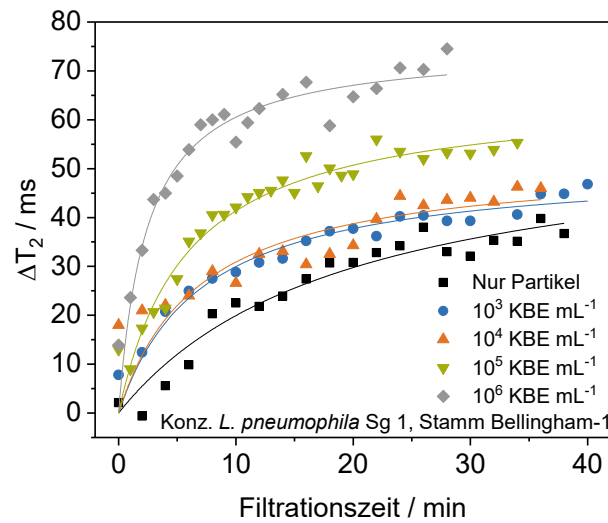


Abbildung 73: Änderung der transversalen Relaxationszeit (ΔT_2) mit der Zeit bezogen auf den frischen wassergefüllten Filter für unterschiedliche Konzentration an *L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham-1.

Die Änderung der transversalen Relaxationszeit war umso ausgeprägter, je höher die eingesetzte Konzentration an Legionellen war. Bei Leerwertproben ohne Legionellen und ausschließlich Antikörper-funktionalisierten Nanopartikeln änderte sich die transversale Relaxationszeit nach einer Filtrationszeit von 30 min um 32 ms. Die Änderung der transversalen Relaxationszeit könnte auf die Adsorption von Antikörper-funktionalisierten Nanopartikeln zurückgeführt werden. Diese Partikel waren negativ geladen. Dies lag daran, dass von keiner kompletten Funktionalisierung jeder negativ geladenen Carboxylgruppe ausgegangen werden kann, andererseits liegt der isoelektrische Punkt polyklonaler Antikörper zwischen 6 und 9 [230] und trägt somit nur wenig zu einer positiven Oberflächenladung bei.

Bei zunehmenden Konzentrationen an filtrierten Legionellen von 10^3 bis 10^6 KBE mL⁻¹ stieg die Änderung der transversalen Relaxationszeit nach einer Filtrationszeit von 30 min und einem Volumenstrom von $30 \mu\text{L min}^{-1}$ von 39 ms auf 75 ms. Legionellen waren aufgrund deprotonierter Phospholipide und Lipopolysaccharide auf der Oberfläche bei neutralem pH-Wert ebenfalls negativ geladen und adsorbierten an der positiven Filteroberfläche [231]. Der größte Anstieg der Änderung der transversalen Relaxationszeit (ΔT_2) war innerhalb der ersten 10 min zu beobachten. Danach flachte die Änderung ab. Dabei kam es zu einer Annäherung der ΔT_2 -Werte für die filtrierten Konzentration von 10^3 KBE mL⁻¹ und 10^4 KBE mL⁻¹ sowie dem Leerwert bei durchschnittlich 53 ms. Die ΔT_2 -Werte von 10^5 KBE mL⁻¹ und 10^6 KBE mL⁻¹ flachten ab und näherten sich einer Änderung von 65 ms respektive 75 ms. Bei einer filtrierten Konzentration von 10^3 KBE mL⁻¹ und 10^4 KBE mL⁻¹ ist anzunehmen, dass die

direkt auf der Filteroberfläche adsorbierten freien Nanopartikel das Signal im Sättigungsbereich dominierten und zusätzlich adsorbierte und magnetisch markierte Legionellen zu keiner maßgeblichen weiteren Erhöhung des Signals führte. Die Filtration von Legionellen mit einer Konzentration von 10^5 KBE mL^{-1} und 10^6 KBE mL^{-1} führte zu einer höheren Änderung der transversalen Relaxationszeit. Es kann angenommen werden, dass durch markierte Legionellen mehr Partikel im Filter binden konnten, was zu den höheren Signaländerungen führte.

Bei den verwendeten Filtrationsbedingungen war beim Betracht der Änderung der transversalen Relaxationszeit nach einer Filtrationszeit von 30 min somit erst ab einer filtrierten Legionellen-Konzentration von 10^5 KBE mL^{-1} eine Unterscheidung vom Leerwert möglich. Dies entspricht bei kompletter Rückhaltung einer Anzahl an Legionellen von etwa 10^5 KBE. Bei einem aktuellen Grenzwert von 100 KBE/100 mL [8, 232] würde dies unter Anbetracht des geringen Filterdurchmessers und der der Annahme der kompletten Rückhaltung der Bakterien im Filter einem unrealistischen Filtrationsvolumen von 100 L entsprechen.

Deshalb wurde die Änderung am Beginn der Filtration vor dem Auftreten von Sättigungseffekten durch die Nanopartikel betrachtet. Durch Anpassen eines Adsorptionsmodells wurde die initiale Änderungsrate der transversalen Relaxationszeit in Abhängigkeit der eingesetzten Legionellen-Konzentration ermittelt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 74 gezeigt.

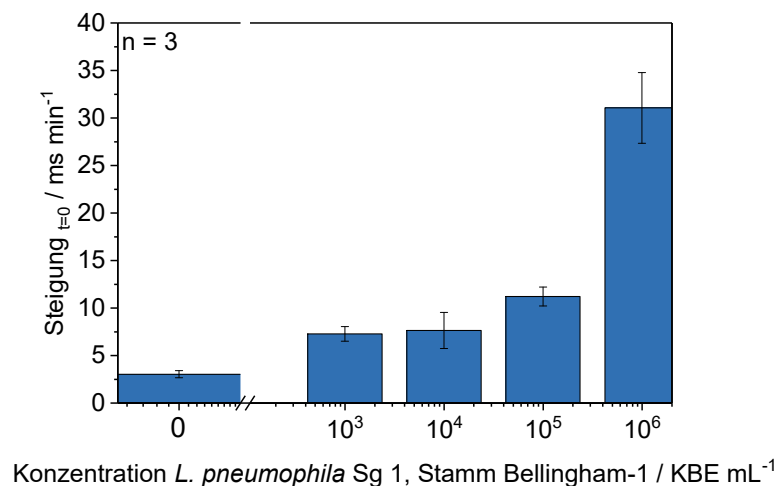


Abbildung 74: Initiale Änderungsrate der transversalen Relaxationszeit in Abhängigkeit der zur Filtration eingesetzten Konzentration an Legionellen.

Die initiale Änderungsrate nahm zwischen einer Legionellen-Konzentration von 10^3 KBE mL^{-1} und 10^6 KBE mL^{-1} von $7,2 \pm 0,8$ ms min^{-1} auf $31,0 \pm 3,7$ ms min^{-1} zu. Der Leerwert lag bei $3,0 \pm 0,4$ ms min^{-1} .

Bei Betrachtung der initialen Änderungsrate war somit bereits bei einer filtrierten Konzentration an Legionellen von 10^3 KBE mL^{-1} eine Unterscheidung vom Leerwert möglich.

Bei einem filtrierten Volumen von maximal $100 \mu\text{L}$ entsprach dies einer rückgehaltenen Menge an Legionellen von 10^2 KBE. Bei dem aktuellen Grenzwert von 100 KBE/ 100 mL und einer kompletten Rückhaltung der Bakterien im Filtern würde dies einem zu filtrierenden Volumen von 100 mL entsprechen. Bei dem geringen Volumen des Filters innerhalb der Spule von nur $1 \mu\text{L}$ entspricht dies einer Konzentration von 10^5 KBE mL^{-1} , die innerhalb des Relaxometers detektiert werden könnte.

Die durchgeführten Messungen zeigten, dass die Detektion von Legionellen auf porösen Filtern durch Markieren mit magnetischen Nanopartikeln und dem Messen der Änderung der transversalen Relaxationszeit möglich ist. Durch die Aufkonzentrierung ohne Elution konnte die geringe Sensitivität von NMR-Systemen kompensiert werden. Als weiteren Schritt wäre eine sequentielle Filtration mit anschließendem Markieren der adsorbierten Legionellen mit magnetischen Nanopartikeln durchzuführen. Durch einen dazwischen liegenden Schritt zum Blocken der Oberfläche nach der Filtration der Legionellen könnte das Adsorbieren der Nanopartikel auf der Oberfläche ohne Legionellen reduziert werden. Aufgrund des geringen Volumens des Filtermoduls wäre auch eine Funktionalisierung mit selektiveren und stärker bindenden Rezeptoren wie Antikörpern denkbar. Durch das Markieren mit magnetischen Nanopartikeln ist des Weiteren eine Kombination mit einer magnetischen Separation und Aufkonzentrierung durchführbar.

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Herstellung von Mikroreaktoren

Aufgrund von höherem Stoff- und Wärmetransport bieten Mikroreaktoren oft reproduzierbarere Synthesebedingungen als herkömmliche Batchverfahren. Durch einen modularen Aufbau eignen sich Mikroreaktoren besonders für die verteilte Fertigung von pharmazeutischen Wirkstoffen und Feinchemikalien am Ort der Verwendung. Dennoch stellen Mikroreaktoren den geringsten Teil mikrofluidischer Anwendungen dar. Hauptverantwortlich dafür sind das einfache Ablagern von Feststoffen innerhalb der Kanalstruktur aufgrund der hohen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisse, die damit verbundene beschränkte Anwendungsdauer und teils aufwendige Herstellungsverfahren der Mikroreaktoren und daraus resultierende Kosten.

Das Ziel war somit, eine einfache Herstellung von Mikroreaktoren auf Basis von Folien zu entwickeln, welche die Herstellung ohne großen Aufwand, wie die Arbeit in Reinräumen oder die Notwendigkeit spezieller chemischer Prozesse, ermöglicht. Zur Vermeidung von Ablagerungen während der Synthese sollte der Synthesestrom durch 3D-hydrodynamische Fokussierung von der Kanaloberfläche getrennt werden.

Zur Herstellung des Mikroreaktors wurde ein mehrlagiger Aufbau aus doppelseitigem Klebeband und dünner PMMA-Folie konstruiert. Diese wurden alternierend aufeinander geklebt. Doppelseitige Klebefolie wurde mit einem digitalen Schneideplotter geschnitten. Die minimal mögliche Kanalbreite nahm mit der Klebstoffdicke der Klebefolie ab. Die geringste Kanalbreite von 300 μm konnte bei einer Klebstoffdicke von 18 μm erzielt werden. Um die 3D-hydrodynamische Fokussierung zu erhalten, war die exakte Ausrichtung der einzelnen Lagen zueinander notwendig. Speziell die planparallele Ausrichtung der Durchgangslöcher zum zentralen Reaktionskanal war für das Ausbilden der 3D-Fokussierung von hoher Wichtigkeit. Die Durchgangslöcher wurden für die exakte Ausrichtung nach dem Zusammenkleben mit einem Laserschneider gefertigt.

Das Flussprofil des 3D-fokussierten Stroms wurde durch Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Bei einem Flussratenanteil des zu fokussierenden Stroms von 5 – 35 % stieg die relative Breite des Stroms lediglich von 60 % auf 70 %. Dabei nahm hauptsächlich die Dicke des fokussierten Stroms zu. Dies wurde ebenfalls durch die Intensitätsprofile der Fluoreszenz bestätigt. Die komplette Einhüllung des fokussierten Stroms wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie bestätigt.

Die gezeigte Herstellungsmethode erlaubt durch kurze Herstellungszeiten und ihre einfache Anpassbarkeit ein breites Anwendungsfeld. So bietet die Herstellungsmethode der Mikroreaktoren auch Laboren mit weniger Erfahrung im Bereich der Mikrofluidik die Möglichkeit, Mikroreaktoren für die Nanopartikelsynthese einzusetzen, auf dem Gebiet der flussbasierten Mikrosynthese zu forschen

und neue Synthesewege für Nanomaterialien zu entwickeln. Die breite Verfügbarkeit unterschiedlichster Folien und Klebefolien mit diversen Arten von Klebstoffen garantiert große Flexibilität in Bezug auf Chemikalienverträglichkeit, Synthesetemperaturen oder dem Einbinden von z.B. optischen Messsystemen. Zu guter Letzt kann bei der Herstellung auf viele Technologien zur Folienbearbeitung zurückgegriffen werden, was auch die kostengünstige Massenfertigung von Mikroreaktoren ermöglichen kann.

4.2. Mikroarrays

Flussbasierte Mikroarrays bieten zusammen mit der Analyseplattform MCR zahlreiche Anwendungen zur qualitativen und quantitativen Analytik von Bakterien, Viren, Antibiotika und Proteinen. Die bisherige Herstellung der Mikroarrays auf Glaträgern ist jedoch äußerst arbeitsintensiv, erfordert teure Chemikalien und generiert viel Lösemittel- und Säureabfälle. Der Arbeitsaufwand und die Kosten schränken sowohl die Assay-Entwicklung als auch die Anwendung ein.

Als Zielsetzung galt den Herstellungsprozess weitgehend zu vereinfachen, die Arbeitsschritte und den Arbeitsaufwand je Schritt zu reduzieren und gleichzeitig Abfall einzusparen.

Der neu entwickelte Herstellungsprozess nutzte ebenfalls die Folientechnologie und Polycarbonat als Substrat zur Mikroarray-Herstellung. Auf Polycarbonat konnten die Mikroarray-Chips mit einem digitalen Schneideplotter angeritzt und somit mehrere Chips als Platte während des Herstellungsprozesses gehandhabt werden. Dies lehnte an Herstellungstechniken von Mikrochips auf Silizium-Wafern an. Succinyliertes *Jeffamine* wurde direkt per Siebdruck auf die Polycarbonat-Oberfläche aufgetragen und bei 100 °C für 2 h aufgeschmolzen. Danach war nur ein Waschschrift in Wasser nötig und nach dem Trocknen konnten Fängermoleküle ohne vorangegangene chemische Aktivierung aufgebracht werden. Die gesamte Herstellungszeit reduzierte sich durch den neuen Prozess von 67 h für Glas-Chips auf 22 h für Polycarbonat-Chips. Betrachtet man die reine Arbeitszeit wurde auch diese um 3,3 h von 6,6 h für Glas-Chips auf 3,3 h für Polycarbonat-Chips reduziert.

Die Charakterisierung der Oberfläche durch Chemilumineszenz zeigte eine homogen beschichtete Oberfläche. Inseln mit einer starken Abweichung von mehr als einer Standardabweichung von der mittleren Chemilumineszenz-Intensität waren selten mit einem Anteil an der Gesamtfläche von 1,6 %. Bei Glas lag dieser Anteil bei 6,5 %. Jedoch waren die Abweichungen bei Polycarbonat in diesen Inseln im Vergleich zu Glas höher. Spuren vom Rakeln während dem Siebdrucken sowie expandierende Luftpinschlüsse während dem Erhitzen könnten die Ursache für die lokalen Inhomogenitäten und starken Abweichungen in den Chemilumineszenz-Intensitäten sein. Speziell für die industrielle Massenproduktion der Polycarbonat-Mikroarrays für standardisierte Anwendungen gilt es, diese Probleme weiter zu untersuchen und zu lösen. Für standardisierte Anwendungen sind keine

Inhomogenitäten der Oberfläche zulässig, um konstante und reproduzierbare Signale zu garantieren. Dazu ist ebenfalls das Aufklären des Bindemechanismus von modifiziertem Jeffamine® ED-2003 auf Polycarbonat-Oberflächen durchzuführen. Neben der Immobilisierung durch Aminolyse bestehen weitere Möglichkeiten, wie *Jeffamine* auf PC-Oberflächen binden kann, die weiter untersucht werden müssen.

Für bisherige Messungen wurden fünf Replikate der Fängermoleküle aufgetragen. Testmessungen mit immobilisiertem anti-HRP zeigten homogene Signalintensitäten sowohl in Flussrichtung als auch quer zur Flussrichtung. Die durchschnittlichen Standardabweichungen lagen bei $6,8 \% \pm 3,8 \%$ respektive $6,2 \% \pm 2,8 \%$. Ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von über 600:1 entsprach ähnlicher Werte im Vergleich zu Glas.

Als nächsten Schritt zur weiteren Anwendbarkeit von flussbasierten Mikroarrays ist die Größenreduzierung der Analyseplattformen zu werten. Pumpen, Ventile und Kameras sind leichter zu miniaturisieren als Pipettier-Roboter und Roboter zum Handhaben und Wechseln der Mikrotiterplatten. Die Miniaturisierung stellt somit einen entscheidenden Vorteil gegenüber Mikrotiterplatten dar, um flussbasierte Mikroarrays in weiteren *point-of-care* Anwendungen wie Wareneingangskontrollen, Qualitäts- und Feldmessungen sowie zur mikrobiellen Risikobewertung zu etablieren.

4.3. NMR

Beim Einsatz magnetischer Nanopartikel als Kontrastmittel in der Magnetresonanz-Bildgebung (MRI) und in analytischen Assays sind Partikel mit hoher Relaxivität notwendig, da dadurch der Kontrast und die Sensitivität steigt. Zur Optimierung der Synthesebedingung sind zahlreiche Messungen der Relaxivität notwendig. Meist werden diese an klinischen MRI-Scannern durchgeführt. Der Zugang zu solchen Scannern ist jedoch meist nur beschränkt möglich und Messzeit teuer. Miniaturisierte *Benchtop*-Relaxometer erlauben das Messen der Relaxivität direkt im Syntheselabor. Daneben bieten miniaturisierte Analysegeräte die Möglichkeit direkt in kontinuierlich Syntheseprozesse integriert zu werden. Dies ist besonders zur schnellen Optimierung und Qualitätskontrolle bei der dezentralen Herstellung von Nanomaterialien und Chemikalien wichtig.

Zur Problemlösung wurde zum Ziel gesetzt, in Zusammenarbeit mit der Munich School of BioEngineering (MSB) der TUM ein miniaturisiertes NMR-Relaxometer mit Permanentmagnet zu bauen und dies mit der mikrofluidischen Synthese magnetischer Nanopartikel zu koppeln und in einem Gerät zu vereinen.

Dazu wurde ein Gerät mit automatisierten Pumpen und Ventilen zum Fördern der Reagenzien aufgebaut. Magnetische Nanopartikel wurden im folienbasierten Mikroreaktor durch 3D-hydrodynamische Flussfokussierung einer Eisensalzlösung in einem basischen Hüllstrom hergestellt. Der Syntheseprozess wurde fortlaufend durch das integrierte NMR-Relaxometer überwacht. Durch Ändern der Basenkonzentration von 10 bis 40 mM NaOH wurden Nanopartikel mit einem primären Durchmesser von $24,8 \pm 7,1$ nm bis $12,3 \pm 3,3$ nm hergestellt. Auch durch das Erhöhen der Eisensalzkonzentration zwischen 30 und 60 mM Fe stieg die primäre Partikelgröße von $15,1 \pm 4,8$ nm auf $24,8 \pm 7,1$ nm. Zur Maximierung der transversalen Relaxivität wurde der pH-Wert der Peptisierung aggregierter Nanopartikel anhand von Relaxivitätsmessungen mit dem miniaturisierten Relaxometer optimiert. Die maximale transversale Relaxivität von $115 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ wurde bei einer durchschnittlichen Clustergröße von 122 nm bei einem pH-Wert von 2 bei der Peptisierung erreicht. Nach der Beschichtung mit Alendronat änderte sich die transversale Relaxivität auf einen Wert von $89 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Aufgrund der kolloidalen Stabilität durch negatives Zeta-Potential bei neutralem pH-Wert als auch der vorhanden terminalen Aminogruppen der Alendronat-beschichteten Nanopartikel eignen sich die hergestellten magnetischen Nanocluster zur weiteren Funktionalisierung mit Biomolekülen zum Einsatz in Biossays. Das miniaturisierte Relaxometer bot zudem die Möglichkeit der Messung der longitudinalen Relaxationszeit. Für unbeschichtete und Alendronat-beschichtete Nanopartikel wurde eine longitudinale Relaxivität von $10,5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respektive $6,8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gemessen, woraus sich ein Relaxivitätsverhältnis r_2/r_1 von 11 respektive 13,3 ergab.

Das miniaturisierte Relaxometer wurde zur Prozesskontrolle und Optimierung von Synthesebedingungen eingesetzt. Die große Schwierigkeit bei der Bewertung von Relaxationszeiten bleibt jedoch die Abhängigkeit der Relaxationszeit von zahlreichen Partikeleigenschaften. So beeinflussen neben der Partikelkonzentration auch die Sättigungsmagnetisierung und somit die primäre Partikelgröße als auch der Grad der Aggregation und Oberflächenbeschichtungen die Relaxationszeit. Weitere Entwicklungen von miniaturisierten Analytikgeräten für (magnetische) Nanopartikel sind somit unumgänglich, um eine komplette Charakterisierung der Konzentration, Größe und Größenverteilung durchzuführen. Speziell bei Konzentrationsangaben von Nanopartikel muss neben der Angabe einer rein elementaren Konzentration unterschieden oder überprüft werden, ob das betrachtete Element neben den Nanopartikeln auch in gelöster Form vorliegt. Eine Konzentrationsmessung einer Lösung aufgeschlossener Partikel (durch z.B. ICP-MS) ist somit für die Nanopartikelanalytik meist nicht aussagekräftig genug, weshalb es auch hier weiterer Entwicklungen bedarf. Ebenfalls ist die Angabe von absoluten Konzentrationen (Partikelzahl/mL) von Nanopartikeln schwierig.

In Kombination mit weiteren analytischen Geräten zeigt die Kopplung eines miniaturisierten NMR-Relaxometers mit der kontinuierlichen mikrofluidischen Synthese von Nanopartikel auch Potential für

die Anwendbarkeit in Produktionsprozessen. Dies gilt speziell für die dezentrale Fertigung aber auch für die schnelle Optimierung von Synthesebedingungen und dem Finden neuer Synthesewege. Besonders, da durch die Vernetzung mehrerer (miniaturisierter) analytischer Geräte einer Fülle an analytischen Daten kombiniert und dadurch ein maschinelles Lernen zur Datenauswertung unterstützt werden kann. Des Weiteren bieten solche Systeme die Möglichkeit der Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Chemikalien auf Abruf, etwa für die personalisierte Medizin der der schnellen Anpassung an Kundenwünsche oder sich ändernde Marktverhältnisse.

Eine weitere Problemstellung existiert bei der kontinuierlichen beziehungsweise automatisierten, regelmäßigen Quantifizierung von Mikroorganismen. Dazu sind meist eine vorherige Probennahme, Aufkonzentrierung und anschließende Quantifizierung im Labor notwendig. Da die Aufkonzentrierung ebenfalls meist im Labor durchgeführt wird, müssen meist große Probenvolumina transportiert werden. Des Weiteren ist eine effiziente Elution der Probe nach der Aufkonzentrierung notwendig. Zur Umgehung dieses Problems war angedacht, eine Aufkonzentrierung in miniaturisierten monolithischen Säulen durch monolithische Adsorptions-Filtration (MAF) durchzuführen und das miniaturisierte NMR-Relaxometer als Sensor einzusetzen. Dabei sollte die Quantifizierung von Legionellen direkt auf dem Filter und ohne Elution durchgeführt werden.

Dazu wurden makroporöse MAF-Säulen in silanisierten Glaskapillaren synthetisiert und mit Diethylamin funktionalisiert. Aus einer Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm und einer Länge von 12,8 cm konnten 25 Filtermodule geschnitten werden. Ein einzelnes Filtermodul wurde in der Spule des NMR-Relaxometers für die Filtration und Messung von Legionellen platziert. Zum Nachweis von Legionellen wurde diese magnetisch markiert. Dazu wurden Alendronat-beschichtete magnetische Nanocluster mit Diglycolanhydrid und anschließendem Koppeln mit anti-*Legionella pneumophila* funktionalisiert.

Während der Filtration magnetisch markierter Legionellen wurde die Änderung der transversalen Relaxationszeit (T_2) gemessen. Die initiale Änderungsrate der transversalen Relaxationszeit (T_2) mit der Filtrationszeit zeigte eine Abhängigkeit zur eingesetzten Legionellen-Konzentration zwischen 10^3 KBE mL⁻¹ und 10^6 KBE mL⁻¹. Bei einem filtrierten Volumen von 100 μ L entsprach dies einer filtrierten Anzahl an Legionellen von 10^2 KBE bis 10^5 KBE. Eine Unterscheidung zum Leerwert war bereits ab 10^2 KBE filtrierter Legionellen möglich. Bei dem aktuellen Grenzwert von 100 KBE/100 mL und kompletter Rückhaltung der Bakterien in einem Filter entspricht dies einem realistischen zu konzentrierenden Wasservolumen von 100 mL. Somit kann durch das kleine Volumen innerhalb der NMR-Spule von 1 μ L eine rasche Aufkonzentrierung erzielt und die generell niedrige Sensitivität von NMR-Systemen kompensiert werden. Im Vergleich dazu ist bei flussbasierten Mikroarrays zur

Quantifizierung von Legionellen mit einem Detektionslimit von 4×10^3 KBE mL⁻¹ ein Probenvolumen von 0,6 mL notwendig, was einer Anzahl an $2,4 \times 10^3$ KBE entspricht [8]. Dazu müssen 2,4 L einer Probe mit einer Legionellen-Konzentration von 100 KBE/100 mL konzentriert werden. Beim Binax Equate™ Assay sind sogar $3,3 \times 10^5$ KBE notwendig [233]. Dazu müssten 333 L Wasser filtriert werden.

Der Einsatz von sehr kleinen Filtermodulen mit einem Gesamtvolumen von 1 µL macht auch die Funktionalisierung mit selektiven Rezeptoren wie Antikörpern weniger kostspielig und denkbar. Somit ließe sich die Filtration und Detektion auf zahlreiche andere Anwendungen erweitern. Bisher wurden die verwendeten Mikroorganismen bereits vor der Filtration magnetisch markiert. Die sequentielle Filtration und anschließende Markierung auf dem Filter würden die Menge der notwendigen Nanopartikel einsparen und das Durchführen einer komplett automatisierten Messung ermöglichen. Um einen Filterwechsel zu vermeiden, kann eine Regeneration des Filters, etwa durch Rückspülen mit einem Elutionspuffer, durchgeführt werden. Ein komplettes System mit automatisierten Pumpen und einem NMR-Relaxometer mit Permanentmagnet wäre zu einem relativ günstigen Preis realisierbar. Durch die kleine Bauform könnten solche Systeme direkt in Wasserkreisläufe integriert werden. Somit wäre eine konstante Kontrolle von mikrobiellen Belastungen in Verdunstungsrückkühlanlagen sowie Trink- und Brauchwasserleitung möglich, um rechtzeitige Gegenmaßnahmen durchzuführen, damit die allgemeine Sicherheit verbessert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten zum Einsatz von Kunststoff- und Klebefolien zum Bau von Mikroreaktoren zur Nanopartikelsynthese und zur Herstellung von analytischen flussbasierten Mikroarrays erörtert und neue Methoden entwickelt. Die entwickelten Methoden erlauben einfach, schnell und kostengünstig Mikroreaktoren und Mikroarrays auf Folienbasis herzustellen. Gepaart mit einer großen Flexibilität für verschiedene Anwendungen ermöglichen die Methoden zahlreiche Forschungsmöglichkeiten im Bereich der Nanopartikelsynthese und der Entwicklung von analytischen Mikroarrays und Bioassays.

Die Kombination mit einem miniaturisierten NMR-Relaxometer zeigte eine schnelle Optimierung von Synthesebedingungen von magnetischen Nanopartikeln und die Vorteile von flussbasierten und mit miniaturisierten Analysetechniken gekoppelten Systemen. Breite Anwendungsmöglichkeiten miniaturisierter NMR-Relaxometer wurden ebenfalls anhand des Einsatzes als Sensor zur Detektion von Legionellen auf porösen Filtern nach magnetischer Markierung mit dafür optimierten und funktionalisierten magnetischen Nanopartikeln gezeigt.

5. Summary and Outlook

5.1. Production of microreactors

Due to higher mass and heat transfer, microreactors often provide better reproducibility of synthesis conditions than conventional batch processes. Because of their modular structure, microreactors are particularly suitable for the distributed manufacturing of pharmaceuticals and fine chemicals at the point of use. However, microreactors represent the least part of microfluidic applications. The main reasons for this are the simple deposition of solids within the channel structure due to the high surface to volume ratio, the associated limited duration of use and sometimes expensive manufacturing processes of the microreactors.

Therefore, the goal was to develop a simple production method of foil-based microreactors. The developed method was straight forward, without the need for a clean room or special chemical processes. To avoid solid deposits in the microchannels, the synthesis stream was separated from the channel surface by 3D-hydrodynamic focusing.

A multilayer construction of double-sided adhesive tape and thin PMMA film was used for the preparation of the microreactor. Double-sided adhesive film was cut with a digital cutting plotter. The minimum channel width decreased with the adhesive thickness of the adhesive film. The lowest possible channel width of 300 μm was achieved with an adhesive thickness of 18 μm . In order to obtain 3D-hydrodynamic focusing, the exact alignment of the individual layers to each other was of great importance. In particular, the plane-parallel alignment of the through-holes to the central reaction channel was important. Therefore, the through holes were cut with a laser after putting together the central channel.

The stream profile was characterized by fluorescence microscopy. With an increasing relative flowrate of the inner stream from 5% - 35%, the relative width of the central stream only increased from 60% to 70% and mainly the thickness of the focused stream increased. This was also confirmed by the fluorescence intensity profiles. Complete separation from the channel walls was confirmed by confocal fluorescence microscopy.

The presented production method allows a wide range of applications due to short production times and their easy adaptability. Thus, the microreactor production method also allows laboratories with less experience in the field of microfluidics to use microreactors for nanoparticle synthesis. This is especially helpful for research in the field of flow synthesis, and to develop new synthetic pathways for nanomaterials. The wide availability of a wide variety of different foils and tapes with various types of adhesives guarantees great flexibility in terms of chemical compatibility, synthesis temperatures or

the incorporation of e.g. optical analysis systems. Also, many technologies for foil processing can be used in the production, which also can enable the cost-effective mass production of microreactors.

5.2. Microarrays

Flow-based microarrays offer numerous applications for the qualitative and quantitative analysis of bacteria, viruses, antibiotics and proteins. However, the current production of the microarrays on glass slides is extremely labor-intensive, requires expensive chemicals and generates solvent and acid waste. Workload and costs limit both the assay development and the application.

The goal was to simplify the manufacturing process to a large extent, to reduce the work steps and the work required per step while saving waste at the same time.

The newly developed manufacturing process also uses a foil-based production process and polycarbonate as substrate. On polycarbonate, the microarray chips could be slit with a digital cutting plotter. Therefore, multiple chips could be handled as one plate during the manufacturing process. This relied on manufacturing techniques of microchips on silicon wafers. Succinylated *Jeffamine* was applied directly by screen printing on the polycarbonate surface and melted at 100 °C for 2 h. Thereafter, only one washing step with water was necessary. After dry blowing, capture molecules could be spotted without previous surface activation. The entire production time was reduced from 67 h for glass chips to 22 h for polycarbonate chips. Also, pure working time without incubation steps reduced by 3.3 h from 6.6 h for glass chips to 3.3 h for polycarbonate chips.

The characterization of the surface by chemiluminescence showed a homogeneously coated surface. Islands with a strong deviation of more than one standard deviation from the mean chemiluminescence intensity were rare with a total area of 1.6%. In comparison, the value for glass was as high as 6.5%. However, the deviations at the locations of these islands were higher for polycarbonate. Possible reasons for local inhomogeneities and strong deviations in the chemiluminescence intensities could be marks of the squeegee from the screen-printing process as well as expanding air inclusions during heating. Especially for the industrial mass production of polycarbonate microarrays and for standardized applications it is necessary to further investigate on and solve these problems. For standardized applications, no inhomogeneities of the surface are permitted to guarantee constant and reproducible signals. Also, the binding mechanism of modified *Jeffamine*® ED-2003 on polycarbonate-surfaces needs to be clarified. In addition to aminolysis there exist other ways *Jeffamine* can bind on polycarbonate-surface, that need to be investigated.

For measurements in this work, five replicates of each capture molecules were applied. Test measurements with immobilized anti-HRP showed homogeneous signal intensities both in and

perpendicular to the flow direction. Average standard deviation was $6.8 \pm 3.8\%$ and $6.2 \pm 2.8\%$, respectively. A signal to background ratio of over 600:1 corresponded to similar values compared to glass.

The next step towards further applicability of flow-based microarrays is the size reduction of the analysis platform. Pumps, valves and cameras are easier to miniaturize than pipetting robots and plate handlers. Thus, miniaturization represents a decisive advantage over microtiter plates in order to establish flow-based microarrays in point-of-care applications, such as incoming goods inspections, quality control and field measurements as well as microbial risk assessment.

5.3. NMR

When magnetic nanoparticles are used as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI) and in bioassays, particles with high transverse relaxivity are necessary. This increases the contrast or the sensitivity, respectively. To optimize the synthesis conditions numerous measurements of relaxivity are necessary. Most of these are performed with clinical MRI scanners. However, access to such scanners is usually limited and expensive. Miniaturized benchtop NMR relaxometers allow direct measurement of relaxivity in the synthesis laboratory. In addition, such systems can be integrated directly into continuous synthesis processes. This is particularly important for rapid optimization and quality control in the decentralized production of nanomaterials and chemicals.

The goal was to build a miniaturized NMR relaxometer with permanent magnet. In cooperation with the Munich School of BioEngineering (MSB) at TUM this device was built and combined with the microfluidic synthesis of magnetic nanoparticles.

For this purpose, a device with automated pumps and valves was built to supply the reagents. Magnetic nanoparticles were prepared in the foil-based microreactor by 3D-hydrodynamic flow-focusing of an iron salt precursor solution in a basic sheath stream. The synthesis process was continuously monitored by the integrated NMR relaxometer. By changing the base concentration between 10 to 40 mM NaOH, nanoparticles with a primary diameter from 24.8 ± 7.1 nm to 12.3 ± 3.3 nm were prepared. Also, by increasing the iron salt concentration between 30 and 60 mM Fe, the primary particle size increased from 15.1 ± 4.8 nm to 24.8 ± 7.1 nm. To maximize the transverse relaxivity, the pH of peptization of aggregated nanoparticles was optimized. Maximum transverse relaxivity of $115 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was achieved with an average cluster size of 122 nm at a peptization pH of 2. After coating with alendronate, the transverse relaxivity changed to $89 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Because of colloidal stability due to negative zeta potential at neutral pH and the terminal amino groups of alendronate, the prepared magnetic nanoclusters are suitable for further functionalization

with biomolecules to be used in analytical bioassays. The miniaturized relaxometer also offers the possibility of measuring the longitudinal relaxation time. For uncoated and alendronate-coated nanoparticles, a longitudinal relaxivity of $10.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $6.8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was measured, respectively. This results in a relaxivity ratio r_2/r_1 of 11 and 13.3, respectively.

The miniaturized relaxometer was used for process control and optimization of synthesis conditions. However, the major difficulty in the evaluation of relaxation times remains the dependency of relaxation time on numerous particle properties. In addition to the particle concentration, the saturation magnetization and thus the primary particle size as well as the degree of aggregation and surface coatings influence the relaxation time. Further developments of miniaturized analytical devices for (magnetic) nanoparticles are therefore inevitable to carry out a complete characterization of the concentration, size and size distribution. Especially when measuring the concentration of nanoparticles, it must be distinguished or checked whether the considered element is dissolved or present as nanoparticles. Therefore, concentration measurement of a solution of digested nanoparticles (e.g. by ICP-MS) is generally not enough for nanoparticle analysis, which is why further developments are needed here as well. In addition, no real methods for measurement of number-based concentrations of nanoparticles are available.

In combination with other analytical devices, the coupling of a miniaturized NMR relaxometer with continuous microfluidic synthesis of nanoparticles also shows potential for applicability in production processes. This is especially true for decentralized production but also for the rapid optimization of synthesis conditions and new synthetic routes. Especially, because interconnection of analytical devices and sharing of analytical data can support machine learning. Furthermore, such systems offer the possibility of producing pharmaceuticals or chemicals on demand, for example for personalized medicine, rapid adaptation to customer requirements or changing market conditions.

A similar problem exists in the continuous or automated regular quantification of microorganisms. This usually requires sampling, concentration and subsequent quantification in the laboratory. Since the concentration is usually carried out in the laboratory large sample volumes of water must be transported. Furthermore, efficient elution of the sample after concentration is necessary. To circumvent this problem, it was envisaged to carry out a concentration in miniaturized monolithic columns by monolithic adsorption filtration (MAF) and to use the NMR relaxometer as a sensor to carry out the quantification of *Legionella* directly on the filter. In this way no elution would be necessary.

For this purpose, polymeric MAF columns were synthesized in silanized glass capillaries and functionalized with diethylamine. From a glass capillary with an inner diameter of 0.5 mm and a length of 12.8 cm, 25 filter modules were cut. A single filter module was placed in the coil of the NMR relaxometer for the filtration and measurement of *Legionella*. For the detection, *Legionella* were

magnetically labelled. For this, alendronate-coated magnetic nanoclusters were functionalized with diglycolic anhydride followed by coupling with anti-*Legionella pneumophila*.

During the filtration of magnetically labelled Legionella, the change of the transverse relaxation time (T_2) was measured. The initial rate of change of T_2 with the filtration time showed a dependence on the used Legionella concentration between 10^3 and 10^6 CFU mL⁻¹. 10^2 CFU of Legionella could be distinguished from the blank value. According to the legislative limit of 100 CFU / 100 mL and an assumption of complete retention of the bacteria in the filter, this corresponds to a realistic filtration volume of at least 100 mL. Thus, due to the small sample volume of 1 μ L, a rapid concentration can be achieved and the generally low sensitivity of NMR systems can be compensated. By comparison, flow-based microarrays require a sample volume of 0.6 mL to quantify Legionella with a detection limit of 4×10^3 CFU mL⁻¹, which corresponds to 2.4×10^3 CFU [8]. For this, 2.4 L of a sample with a Legionella concentration of 100 CFU/100 mL must be concentrated. The Binax Equate™ assay even requires 3.3×10^5 CFU [233]. For this purpose, 333 L of water would have to be filtered.

The use of very small filter modules with a total volume of 1 μ L also makes functionalization with selective receptors such as antibodies less expensive and conceivable. Thus, the filtration could be extended to many other applications. So far, microorganisms have been magnetically labelled before filtration. The sequential filtration and subsequent labelling on the filter would reduce the number of nanoparticles necessary and also allow for a fully automated measurement. In order to avoid a filter change, a regeneration of the filter can be carried out. This could be done by backwashing with an elution buffer, for example. A complete system with automated pumps and NMR relaxometer with permanent magnet would be feasible at a relatively low cost. Due to the small design such systems could be integrated directly into water cycles. Thus, a constant control of microbial loads in evaporative recooling plants, as well as drinking and process water pipes would be possible. Followingly, timely countermeasures can be carried out to improve overall safety.

In the present work, possibilities for the use of plastic and adhesive films for the construction of microreactors for nanoparticle synthesis and for the preparation of analytical flow-based microarrays were discussed and new methods were developed. The developed methods allow simple, fast and cost-effective production of microreactors and film-based microarrays. Coupled with great flexibility for various applications, the methods enable numerous research opportunities in the field of nanoparticle synthesis and the development of analytical microarrays and bioassays.

The combination with a miniaturized NMR relaxometer showed a rapid optimization of synthesis conditions of magnetic nanoparticle and the advantages of flow-based and miniaturized analysis techniques. Wide scope of applications of miniaturized NMR relaxometers has also been demonstrated

by use as a sensor to detect *Legionella pneumophila* on macroporous filters after magnetic labelling with optimized and functionalized magnetic nanoparticles.

6. Material und Methoden

6.1. Geräte und Materialien

6.1.1. Geräte

Digitaler Schneideplotter (Kurvenschreiber mit Schleppmesser), CE6000-40 (Graphtec Corporation, Yokohama, JPN)

Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop, Gemini (Zeiss, Jena)

Fluoreszenzmikroskop, BX60 (Olympus, Hamburg)

FT-IR-Spektrometer, Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Madison, WI, USA)

Heizofen (Heraeus, Hanau)

ICP-MS, Nexion 350D (Perkin-Elmer, Rodgau)

Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, LMS 510 Meta (Zeiss, Jena)

Laserschneider, VLS4.60 (Universal Laser Systems, Scottsdale, AZ, USA)

Lichtmikroskop, SU 1071 (supra, Kaiserslautern)

Magnetrührer mit Heizung, RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen)

MCR 3 (GWK Präzisionstechnik GmbH, München)

MCR R (GWK Präzisionstechnik GmbH, München)

Mikrokontaktpotter, BioOdyssey Calligrapher Mini Arrayer (Bio - Rad Laboratories, München)

Mikrowelle Speedwave ENTRY (Berghof Products + Instruments GmbH, Eningen)

NMR-Permanentmagnet, PM-1055-050N (Metrolab Technology SA, Genf, CH)

Raman-Mikroskop, alpha300R (WITec, Ulm)

Reflektiertes Fluoreszenzsystem, U-RFL-T (Olympus, Hamburg)

Reinstwasseranlage, Milli-Q Reference (Merck Millipore, Darmstadt)

Rotationsverdampfer, Rotavapor RE 121 (Büchi Labortechnik, Flawil, CH)

Rotilabo-Mini-Zentrifuge "Uni-fuge" (CX73.1, Carl Roth, Karlsruhe)

Siebdrucker, HDT150 (Siebdruckversand, Magdeburg)

Spritzenpumpe, 70-2213 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)

Spritzenpumpe, BS-8000 (Braintree Scientific Inc., Braintree, MA, USA)

Spritzenpumpe, Fusion 400 (CHEMYX Inc., Stafford, TX, USA)

Spritzenpumpe, LA-102 (HLL Landgraf Laborsysteme, Langenhagen)

Trockenschrank, max. 120 °C (Memmert, Büchenbach)

Ultraschallbad, SONOREX SUPER RK 510 (Bandelin, Berlin)

Vortexer, Top Mix FB15024 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)

Zentrifuge, 5804 R (Eppendorff, Hamburg)

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK)

6.1.2. Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie (EE77.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Einmalküvetten, Polystyrol, Halb-Mikro (Y195.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 1 mL (T987.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 25 mL (T987.3, Carl Roth, Karlsruhe)
Einmalspritze Injekt, PP/PE, 20 mL (0059.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Glaskapillaren, BLAUBRAND intraMark 100 µL (BRAND, Wertheim)
Hochgradient-Separationssäule, autoMACS column (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
Keramikklinge (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)
Klebefolie ARcare® 8939, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, IRL)
Klebefolie ARcare® 90106, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, IRL)
Klebefolie ARcare® 90445, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, IRL)
Klebefolie ARcare® 90485, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, IRL)
Klebefolie ARcare® 92484, Heißsiegelklebstoff, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, IRL)
Klebefolie ARcare® 92712, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, IRL)
Klebefolie ARseal™ 90880, Silikon, doppelseitig (Adhesive Research, Limerick, IRL)
Kunststoffträger, PMMA (TUM, Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, München)
Kunststoffträger, POM (GWK Präzisionstechnik, München)
PET-G-Platte, transparent, 495 x 245 x 1 mm, Vivak (Covestro, Leverkusen)
Polycarbonat-Folie, 297 x 210 x 0.25 mm, Makrolon (Covestro, Leverkusen)
Polycarbonat-Platte, 250 x 250 x 1 mm, Makrolon (Covestro, Leverkusen)
Polystyrol-Platte transparent, Evergreen (Maine, IL, USA)
Präzisions-Acrylglas, 400 x 400 x 0.3 mm (Evonik, Essen)
Rollrandgläser aus Kalk-Soda-Glas, 10 mL (X655.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Siliziumträger, 10mm x 10mm geschnitten (Plano, Marburg)
Spotternadel, Stealth Solid Pin SNS9 (ArrayIt, Sunnyvale, USA)
Tygonschlauch, LMT - 55, SC0015T (IDEX Health & Science GmbH, Wertheim)
Zentrifugenröhrchen, PP, 15 mL (AN77.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Zentrifugenröhrchen, PP, 50 mL (AN79.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Zeta-Küvette, Folded Capillary Cell, DTS 1070 (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK)

6.1.3. Chemikalien

Anti-Peroxidase Antikörper, produziert in Hase (P 7899, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Anti-*Legionella pneumophila*, produziert in Hase (B65051G, Meridian Life Science, Inc., Memphis, TN, USA)

Dextran-Eisenoxid-Kompositpartikel, nanomag-D Streptavidin, 500 nm (09-19-502, micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock)

Dextran-Eisenoxid-Kompositpartikel, nanomag-D-spio PEG-COOH, 100 nm (79-56-102, micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock)

Dextran-Eisenoxid-Kompositpartikel, nanomag-D-spio PEG-COOH, 20 nm (79-56-201, micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock)

Dextran-Eisenoxid-Kompositpartikel, nanomag-D-spio Streptavidin, 100 nm (79-19-102, micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock)

Dextran-Eisenoxid-Kompositpartikel, nanomag-D-spio Streptavidin, 50 nm (79-19-501, micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock)

(3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan, ≥ 98 % (440167, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

1,4-Dioxan, $\geq 99,5$ % (42510, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), ≥ 99 % (4256.2, Carl-Roth, Karlsruhe)

2-Propanol (34959, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Aceton, $\geq 99,5$ % (5025.5, Carl Roth, Karlsruhe)

Alendronsäure, $> 97,0$ % (A2456, TCI America, Portland, OR, USA)

Ammoniumhydroxid-Lösung, 33 % (05002, Riedel-de Haën, Seetze)

Bortrifluorid-diethyletherat (175501, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Bromthymolblau, 95 % (114413, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Citronensäure wasserfrei, $\geq 99,5$ % (27487, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Cyclohexan (34496, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

D-(+)-Trehalose dihydrate, ≥ 99 % (T9531, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Dichlormethan, $\geq 99,5$ % (66749, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Diethylamin (KK00.2, Carl-Roth, Karlsruhe)

Diglycolsäureanhydrid, 97 % (B24498, Alfa Aesar, Karlsruhe)

Dimethylsulfoxid, $> 99,9$ % (278655, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

DNA Stain, Fast Blast (166-0420EDU, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat, 99.99 % (380024, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Eisen(III)-chlorid Hexahydrat, ≥ 99 % (31232, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Glycin, 99,7-101 % (33226, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Godatersäure (DOTAREM®) (Guerbet, Villepinte, FRA)

Hellmanex II (Hellma, Müllheim)

Kapillaraktivator (Serrox Technischer Handel, Ober-Ramstadt)

Lösungsmittelklebstoff, Acrifix 1S 0117 (Evonik, Essen)

Meerrettich Peroxidase, lyophilisiertes Pulver, 250 Einheiten mg^{-1} (P8375, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methanol, $\geq 99,8$ % (65548, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methanol, $\geq 99,8$ % (65548, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Methyl-tert-butylether, $\geq 99,5$ % (20249, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

N-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (E6383, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Natrium Alendronat Trihydrat, 97 % (AB352239, abcr, Hamburg)
Natrium Fluorescein (F6377, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Natriumcarbonat wasserfrei, $\geq 99,0$ % (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Natriumchlorid $> 99,8$ % (9285.2, Carl Roth, Karlsruhe)
Natriumhydroxid, ≥ 98 % (S5881, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz, ≥ 98 % (56485, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
O,O'-Bis(2-aminopropyl) polypropylene glycol-*block*-polyethylene glycol-*block*-polypropylene glycol, Jeffamine® ED-2003 (Hunstman, Everberg, BEL)
Pluronic® F-127 (P2443, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Polyglycerol-3-glycidylether (CL9, ipox Chemicals, Laupheim)
Salzsäure, ≥ 37 % (84415, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Schwefelsäure, 95-97 % (84720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Succinanhydrid, ≥ 99 % (239690, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Toluol, $\geq 99,7$ % (89677, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Triethylamin, $\geq 99,5$ % (471283, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
UV-Kleber, Best PL 5141 (Best Klebstoffe GmbH, Kinsau)
UV-Kleber, Best PL 55373 (Best Klebstoffe GmbH, Kinsau)
WESTSTAR SUPERNOVA ELISA Luminol Lösung (XLSE2L, 0250, Cyanagen, Bologna, ITA)
WESTSTAR SUPERNOVA ELISA Peroxide Lösung (XLSE2P, 0250, Cyanagen, Bologna, ITA)

6.1.4. Puffer

Phosphatpuffer (PBS) (pH 7,6)

10 mM KH_2PO_4
70 mM K_2HPO_4
145 mM NaCl

Laufpuffer (pH 7,4)

0,5 % (w/v) Casein
PBS

Aktivierungspuffer

1,6 mg mL^{-1} EDC
6 mg mL^{-1} s-NHS
0,5 M MES

Der pH wurde mit 2,5 M Na_2CO_3 auf 6,3 eingestellt.

6.1.5. Software

Coreldraw	Corel Draw 12 (Corel Corporation, Ottawa, CAN)
Endnote	EndNote X8 (Thomson Reuters, New York City, NY, USA)
Fusion360	Fusion 360 (Autodesk, San Rafael, CA, USA)
ImageAnalyzer	MCRImageAnalyzer (GWK Präzisionstechnik, München)
ImageJ	ImageJ 1.51K (Rasband, NIH, Bethesda, USA)
MATLAB	MATLAB 2017b (Mathworks, Natick, MA, USA)
Office 365	Office 365 (Microsoft, Redmond, WA, USA)
OriginLab	OriginPro 2017 (OriginLab, Northampton, MA, USA)
Solidworks	SolidWorks Lehr-Edition 2016 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, FRA)

6.2. Mikroreaktor

6.2.1. Herstellung mikrofluidischer Strukturen

Mikroreaktoren zur Synthese magnetischer Nanopartikel durch 3D-hydrodynamische Fokussierung wurden aus sieben Lagen aufgebaut. Dazu wurden alternierend Polymethylmethacrylat-Folien (PMMA-Folien) und doppelseitiges, drucksensitives Klebeband aufeinander geklebt. Der Zuschnitt der Klebefolie erfolgte mit einem Schneideplotter, der Zuschnitt der PMMA-Folien mit einem Laserschneider. Der zentrale Reaktionskanal wurde mit einer Breite von 1,5 mm in doppelseitige Klebefolie (ARcare® 8939) geschnitten. Nach dem Entfernen der überschüssigen Folie im Inneren des Kanals wurde die Klebefolie zwischen zwei Lagen PMMA-Folie geklebt. Das dreilagige Konstrukt wurde in einem Laserschneider ausgerichtet und ein Durchgangsloch geschnitten. Auf beiden Seiten wurden anschließend zwei Versorgungskanäle für Hüllströme aus transparentem, doppelseitigem Klebeband (ARcare® 90445) angebracht. Der Mikroreaktor wurde einseitig mit einer 0,3 mm starken PMMA-Folie verschlossen. Auf der anderen Seite wurde eine 10 mm starke PMMA-Platte mit eingefrästen Gewindelöchern (1/4" - 28 UNF) angeklebt. Das spätere Anschließen an Schläuche und Pumpen konnte dadurch mit Schraubgewinden erfolgen.

6.2.2. Charakterisierung der Mikrofluidik und des Flussprofils

Standardlichtmikroskopie

Zur Charakterisierung des Flussprofils mit Standardlichtmikroskopie wurden einzelne Fluide mit blauem Farbstoff (*Fast Blast™ DNA Staining Solution*) gefärbt. Die Konzentration wurde je nach Kanalhöhe so eingestellt, dass ein optimaler Farbkontrast zu erkennen war. Zum Darstellen von Mischvorgängen wurde ein Fluid mit Bromthymolblau gefärbt und im anderen Fluid ein basischer

pH-Wert mit 0,1 M NaOH eingestellt. Die Aufnahmen wurden jeweils im Durchlichtmodus aufgenommen.

Fluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung des Flussprofils mit Fluoreszenzmikroskopie wurden einzelne Fluide mit Na-Fluorescein gefärbt. Die Konzentration wurde je nach Kanalhöhe so eingestellt, dass ein optimaler Fluoreszenzkontrast zu erkennen war. Die Belichtungszeit wurde so eingestellt, dass keine überbelichteten Bildbereiche auszumachen waren. Die Auswertung der Intensitätsprofile erfolgte anhand der aufgenommenen Bilder mit 8-bit-Informationstiefe mit Hilfe des Programms *ImageJ*.

Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung des 3D-Flussprofils mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde der zentrale, zu fokussierende Strom mit Na-Fluorescein gefärbt. Die Anregung erfolgte mit einem 488-nm-Laser. Mit einem Bandpassfilter wurde ein Wellenlängenbereich von 505-530 nm des emittierten Lichts selektiert und mit einer Belichtungszeit von 12,8 μs bei einer Lochblendenöffnung von 70 μm (1 Airy Unit) detektiert. Linienscans wurden alle 1 μm durchgeführt.

Aufgrund der reflektierenden Kanaloberfläche wurde jeweils ein Spiegelbild des zentral fokussierten Stroms im Abstand von einer Kanaltiefe detektiert [234]. Zur Auswertung wurde jeweils die zentrale Abbildung ohne Betrachtung der Spiegelbilder verwendet.

6.3. Synthese magnetischer Nanopartikel

Die Synthese magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel erfolgte durch die Mitfällung von 20 mM Eisen(II)- und 40 mM Eisen(III)chlorid mit einer Base (Natriumhydroxid oder Ammoniumhydroxid). Die Herstellung der Eisensalzlösung erfolgte durch Lösen von Eisen(II)- und Eisen(III)chlorid in einem molaren Verhältnis von 1:2 und einer Gesamtkonzentration an Eisen von 60 mM. Zusätzlich wurde die Eisensalzlösung durch 20 mM Salzsäure angesäuert. Die Kopräzipitation wurde im entwickelten Mikroreaktor durch dreidimensionale hydrodynamische Fokussierung der Eisensalzlösung in einen basischen Hüllstrom durchgeführt. Für jeden der beiden basischen Hüllströme wurde eine Flussrate von 20 mL h^{-1} gewählt. Die Flussrate des inneren fokussierten Stroms betrug 2 mL h^{-1} . Vor jeder Synthese wurde der Mikroreaktor mit 0,01 % (w/w) Pluronic® F-127 gespült, um adsorbierte Luftblasen aus dem Reaktor zu spülen.

6.3.1. Funktionalisierung der Nanopartikel

Nach der Synthese erfolgte die Peptisation der Nanopartikel-Aggregate durch Zugabe verdünnter Salzsäure. Danach erfolgte eine Beschichtung mit Alendronat. Zu den peptisierten Partikeln wurden 30 % (*mol/mol*) Alendronat, bezogen auf die Eisen-Gesamtkonzentration, in gelöster Form zugegeben. Unter Schütteln wurden die Partikel für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Partikel mit Hilfe eines Magneten abgetrennt, dreimal mit 0,01 mM Salzsäure gewaschen und in Wasser redispergiert.

Alendronat-beschichtete Nanopartikel wurden weiter mit Diglycolanhydrid (DGA) funktionalisiert. Dazu wurden aufgereinigte Partikel in 1,4 mL DMSO im Ultraschallbad redispergiert. Die redispergierten Partikel wurden im Ultraschallbad zu 0,7 mL einer wässrigen Diglycolanhydrid-Lösung mit einer Konzentration von 20 mg mL⁻¹ tropfenweise zugegeben. Die Partikel wurden für weitere 15 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde ein Tropfen Triethylamin zugegeben und 20 h unter Schütteln inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mithilfe einer magnetischen Säule mit Hochgradient bei einer Flussrate von 12 mL h⁻¹. Nach der Abtrennung von dem DMSO wurde mit 2 mL Wasser gewaschen und danach in 1 mL Wasser eluiert.

Die Kopplung der magnetischen Partikel mit Antikörpern erfolgte nach Aktivierung mit Carbodiimid-Chemie. Dazu wurden zu 750 µL der Partikel 375 µL Aktivierungspuffer (1,6 mg mL⁻¹ EDC und 6 mg mL⁻¹ s-NHS in 0,5 M MES, pH = 2,5) zugegeben und 45 min inkubiert. Anschließend wurden die Partikel magnetisch separiert, mit 0,01 M PBS-Puffer gewaschen und in 0,01 M PBS-Puffer redispergiert. Danach wurden 3 µL Antikörperlösung zugegeben und für 3 h unter Schütteln inkubiert. Die Konzentration der polyklonalen anti- *Legionella pneumophila* betrug laut Datenblatt 4-5 mg mL⁻¹. Freie Stellen wurden mit 30 µL einer 25 mM Glycin-Lösung für 30 min geblockt. Die finale Aufreinigung erfolgte mit einer magnetischen Säule mit Hochgradient. Eluiert wurden die Partikel in 0,01 M PBS.

6.3.2. Charakterisierung von Nanopartikeln

Raman-Mikroskopie

Raman-Messungen wurden von Caroline Hartmann, MSc. mit einem Raman-Mikroskop (alpha300R) der Firma WITec durchgeführt. Proben zur Raman-Mikroskopie wurden durch Eintrocknen von wässrigen Suspensionen der Nanopartikel auf einem Mikroskopie-Glasträger hergestellt. Raman-Messungen wurden durch einen He-Ne Laser mit einer Laser-Wellenlänge von 633 nm und einer Leistung von 1 mW angeregt und durchgeführt. Jede Probe wurde 50-mal für 5 s integriert und gemittelt.

FT-IR

Infrarot-Spektren wurden mit einem Gerät (Nicolet 6700 FT-IR) der Firma ThermoFisher Scientific Inc. aufgenommen. Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel wurden getrocknet, in Isopropanol suspendiert, auf den Probenhalter mit ATR-Stempel (*attenuated total reflectance*) pipettiert und erneut eingetrocknet. Der Hintergrund der Luft wurde abgezogen.

Eisenkonzentrationen

Die Eisenkonzentration wurde von C. Sternkopf am Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie bestimmt. Zum Ermitteln der Eisenkonzentration von Suspensionen von Eisenoxid-Nanopartikeln wurde ein saurer Mikrowellenaufschluss (Speedwave ENTRY, Berghof Products + Instruments GmbH) in Fluss- und Salpetersäure durchgeführt. Das verwendete Temperaturprogramm erhitzte für 10 min auf 130 °C, 10 min auf 180 °C und 30 min auf 210 °C. Anschließend wurde die Eisenkonzentration mittels induktiv-gekoppelter Plasma-Massenspektrometrie mit einem Gerät (ICP-MS Nexion 350D) der Firma Perkin Elmer ermittelt.

FESEM

Zum Erstellen von Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen (*field emission scanning electron microscopy* – FESEM) wurden Eisenoxid-Nanopartikel in Abhängigkeit der Partikel-Oberfläche in 1 mM Salzsäure suspendiert und dekadisch ultrareinem Wasser verdünnt. Die unterschiedlichen Verdünnungen wurden auf Aluminiumfolie eingetrocknet. Diese wurde zuvor mit Isopropanol gereinigt. Die Proben wurden anschließend auf den Aluminium-Probenteller geklebt. Des Weiteren wurden Partikel adsorptiv nach ein Verfahren von Lu et al. aus 2018 auf Silizium-Oberflächen gebunden [181]. Dazu wurde Silizium-Plättchen in 10 % (v/v) NH₄OH gelegt und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurden die Plättchen mit Wasser und Ethanol gespült und mit Stickstoff getrocknet. Die trockenen Plättchen wurden 2 h mit der Nanopartikelsuspension (positiv geladene Nanopartikel) belegt, mit Wasser und Isopropanol gespült und 20 min im Abzug getrocknet.

Aufnahmen wurden durch C. Sternkopf bei niedriger Arbeitsspannung von 4 kV und einem Arbeitsabstand von 2,4 mm gemacht. Das Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (Gemini) der Firma Zeiss wurde bei niedriger Arbeitsspannung betrieben, um ein Aufladen der Probe ohne Metall-Bedampfung zu verhindern. Bei der Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie werden beschleunigte Elektronen durch elektrostatische Linsen auf die Proben-Oberfläche fokussiert (1-10 nm). Rückgestreute Elektronen und sekundäre Elektronen werden mit mehreren Detektoren detektiert. Durch Abrastern der Oberfläche wird ein Bild mit hohem Tiefengehalt aufgebaut.

Zur Ermittlung der Größenverteilung der Nanopartikel wurde deren Durchmesser manuell mit Hilfe der Software *ImageJ* gemessen. Dazu wurde das Werkzeug *ROI Manager* verwendet, welches die Messdaten für ein jeweiliges Bild sammelt und einen Export der Messdaten zur Auswertung in

OriginLab erlaubt. Als Größenreferenz wurden die jeweiligen Referenzbalken auf den FESEM-Bildern verwendet. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Messung des hydrodynamischen Durchmessers wurde in Einmalküvetten aus Polystyrol an einem Gerät (Zetasizer Nanoseries NanoZS) der Firma Malvern Instruments an der Munich School of BioEngineering, TUM durchgeführt. 20 μL – 40 μL einer Nanopartikelsuspension wurden in 1 mL Wasser verdünnt und für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Danach wurde die Lösung 10 s in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um eventuellen Staub zu entfernen. 700 μL der Probe wurden in die Küvette transferiert. Jede Messung wurde mit zehn Durchläufen gemacht, dreimal durchgeführt und gemittelt. Die Auswertung erfolgte durch Anpassung einer Autokorrelationsfunktion an die fluktuierenden Messwerte des durch die Probe gestreuten Lichts innerhalb der Malvern Auswertesoftware. Anhand der angepassten Autokorrelationsfunktion ermittelte die Software den Diffusionskoeffizient der Probe und berechnete mit Hilfe der Stokes-Einstein Gleichung und festgelegter Messparameter den hydrodynamischen Durchmesser der untersuchten Nanopartikel.

Messung des Zeta-Potentials

Der isoelektrische Punkt wurde durch lineare Interpolation zum pH-Wert 7 ermittelt. Dazu wurden Messungen des Zeta-Potentials bei variierendem pH-Wert und einer Salzkonzentration von 10 mM NaCl durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge zwischen 2 und 12 eingestellt. 20 μL – 40 μL einer Nanopartikelsuspension wurden zugefügt, sodass eine leichte Färbung sichtbar war. Anschließend wurden die Proben für 10 min im Ultraschallbad equilibriert. Der pH-Wert wurde direkt vor der Messung des Zeta-Potentials erneut gemessen. Jede Zeta-Potential-Messung wurde dreimal durchgeführt und gemittelt.

Transversale und longitudinale Relaxivität

Relaxivitäten wurden anhand der Steigung einer linearen Regressionsgeraden der Relaxationsraten bei einer Eisenkonzentration zwischen 0 mM und 1 mM ermittelt. Zur Ermittlung der Relaxationsraten wurde ein automatisierter Messablauf des NMR-Relaxometers verwendet. Die Probe mit einer Eisenkonzentration von etwa 1 mM wurde zusammen mit Wasser zum Verdünnen vorgelegt. Danach wurde durch eine automatische Pumpensequenz eine Probenkonzentration von 0 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % mit Bezug auf die eingesetzte Probenkonzentration eingestellt. Von jeder Konzentration wurde die transversale und longitudinale Relaxationszeit gemessen.

Transversale Relaxationszeiten wurden mittels einer Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)-Sequenz ermittelt. Es wurden 1000 Echos mit einer Echozeit von 6 ms verwendet. CPMG-Sequenzen wurden für jede Partikelkonzentration fünf Mal wiederholt.

Longitudinale Relaxationszeiten wurden mittels einer Inversionswiederherstellungssequenz ermittelt. Jede longitudinale Relaxationszeit wurde aus 17 Datenpunkten mit zunehmender Verzögerungszeit

(T_i) ermittelt. Als Verzögerungszeit ($T_{i,n}$) ist die Zeit zwischen 180° -Inversionspuls und 90° -Auslenkpuls definiert. Die erste Verzögerungszeit ($T_{I,1}$) betrug 30 ms und wurde danach exponentiell erhöht:

$$T_{i,n} = T_{i,n-1} + 1,4^{n-1}T_{I,0} \quad (23)$$

Mit: $n = 1, 2, \dots, 16$ und $T_{I,0} = 30 \text{ ms}$

Die einzelnen Datenpunkte wurden nach dem 180° -Inversionspuls und dem 90° -Auslenkpuls aus einer CPMG-Sequenzen mit 1000 Inversionen und einer Echozeit von jeweils 6 ms ermittelt. T_1 wurde durch Regression von Gleichung (11) an die Datenpunkte ermittelt.

Zwischen jeder Inversionswiederherstellung wurde mindestens $6T_1$ (Wiederholungszeit) gewartet. Die erste Wiederholungszeit betrug 10 s. Mit zunehmender Partikelkonzentration wurde die Wiederholungszeit automatisch an die longitudinale Relaxationszeit der vorherigen Konzentration angepasst, um den Messablauf zu beschleunigen. Inversionswiederherstellungssequenzen wurden für jede Partikelkonzentration dreimal wiederholt.

6.4. Mikroarrays

Funktionalisierung von *Jeffamine* und Herstellung der Beschichtung

20 g des kommerziell erhältlichen Polyetherdiamins (*Jeffamine*[®] ED-2003, 2 kDA) wurden in 60 mL wasserfreiem Toluol bei Raumtemperatur unter Inertatmosphäre gelöst. Zur Lösung wurden 800 mg Succinanhydrid gegeben und über Nacht unter Inertatmosphäre gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Zu der erhaltenen öligen Flüssigkeit wurden 15 % (w/w) Wasser gegeben und so zum Beschichten eingesetzt.

6.4.2. Beschichten von Polycarbonat-Platten

Auf Polycarbonat-Platten mit einer Stärke von 1 mm und Abmessungen von 250 mm x 250 mm wurden neun Chips mit den Abmessungen von jeweils 76 mm x 26 mm angeritzt. Dazu wurde ein digitaler Schneideplotter (Graphtec, Cutting Plotter CE6000-40) verwendet.

Nach dem Entfernen der Schutzfolie wurden 10 g der Paste per Siebdruck auf die Polycarbonat-Oberfläche aufgetragen. Die bedruckte Polycarbonat-Platte wurde für 2 h auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurde die Platte zweimal für 15 min im Ultraschallbad mit Wasser gewaschen. Die gewaschene Platte wurde mit Stickstoff trocken geblasen.

6.4.3. Immobilisieren der Antikörper

Auf die modifizierte Polycarbonat-Oberfläche wurde anti-Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* – HRP) immobilisiert. Dazu wurden per Mikrokontaktdruck Tropfen einer anti-HRP-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ aufgebracht. Insgesamt wurden pro Chip 15 Reihen mit jeweils fünf gleichen Tropfen immobilisiert. Die bedruckte Polycarbonat-Platte wurde 12 h bei 25 °C und 55 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

In einer zweiten Charge wurde anti-HRP in unterschiedlichen Konzentrationen immobilisiert. Dies erfolgte sowohl mit als auch ohne Zugabe von EDC und s-NHS zum Aktivieren der Oberfläche.

Standardkonzentration der Mikrodosier-Lösung waren 1 mg mL⁻¹ EDC, 1 mg mL⁻¹ s-NHS, 0,01 mg mL⁻¹ Pluronic[®] F-127 and 50 mg mL⁻¹ Trehalose.

6.4.4. Aufbau eines Flusskanals

Nach dem Inkubieren wurden die Mikroarrays mit einem Flusskanal gedeckelt. Der Deckel bestand dabei aus einem doppelseitigen Klebeband mit einem Ausschnitt, welcher den Flusskanal bildete. Der Flusskanal wurde auf der zweiten Seite mit einer zweiten Platte oder Folie geschlossen. In dieser zweiten Folie befanden sich Löcher zum anschließenden Befüllen des Flusskanals. Der Aufbau ist als Explosionsansicht der Flusszelle in Abbildung 75 dargestellt.

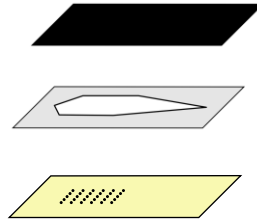


Abbildung 75: Explosionsansicht des Aufbaus des flussbasierten Mikroarray-Chips, bestehen aus bedrucktem Träger, Flusskanal und schwarzem Deckel mit Löchern zum Befüllen.

6.4.5. Charakterisierung der Mikroarrays

Zur Analyse der hergestellten Antikörper-Mikroarrays wurde ein flussbasierter Immunoassay zur Detektion von HRP (Meerrettichperoxidase) durchgeführt. Die Mikroarrays wurden dazu mit einer Flusszelle verklebt, sodass sich die aufgebrachtten Antikörper-Spots im Inneren der Flusszelle befanden. Die Signalgebung erfolgte durch die Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid. Die Lichtsignale wurden als Bild mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

Bewertung der Oberflächenhomogenität

Die Oberflächenhomogenität wurde durch Chemilumineszenz analysiert [20]. Die komplette Oberfläche der beschichteten Chips wurde dazu mit Biocytin funktionalisiert. Zuerst wurde die Oberfläche in 0,1 M MES-Puffer mit 0,4 mg mL⁻¹ s-NHS und 1,1 mg mL⁻¹ EDC für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Oberfläche mit Wasser gewaschen und im Sandwich für 2 h bei Raumtemperatur mit 1 mg mL⁻¹ Biocytin in PBS-Puffer inkubiert. Die Biocytin-beschichteten Chips wurden mit der Flusszelle verklebt. Am MCR wurde poly-Streptavidin-HRP (poly-SA-HRP) durch den Flusskanal geleitet, um auf der Oberfläche zu binden. Nach der Zugabe von Luminol/H₂O₂ erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz.

Die Bildauswertung erfolgte mit der Software *ImageJ*. Belichtungsgradienten wurden durch die Division des aufgenommenen Bildes mit einer unscharfen Version des Bildes korrigiert (*Image Calculator*). Die unscharfe Version wurde durch Anwendung eines Gauß'schen Unschärfefilters mit 20 px erstellt (*Filters*). Das erhaltene 32-bit-Bild wurde in ein 16-bit-Bild zurückgewandelt (*Type*). Der Kontrast des erhaltenen Bildes wurde automatisch auf die komplette Breite an Intensitätswerten erweitert (*Adjust*). Der Durchschnittswert der Intensitätswerte wurde aus dem Histogramm ermittelt (*Histogramm*). Um die Homogenität der Oberfläche zu beurteilen, wurden alle Pixel mit Intensitätswerten von einer Standardabweichung um den Mittelwert angezeigt (*Threshold*). Inhomogene Stellen wurden durch Inseln an Intensitätswerten identifiziert, welche alle vom Bereich um den Mittelwert abweichen. Die Markierung der Inseln erfolgte durch Anwenden eines

Durchschnittsfilters mit 2 px (*Mean*) und anschließender Kenntlichmachung von weißen Stellen durch anzeigen der Pixel mit den drei niedrigsten Intensitäten (*Threshold*).

Um Bilder mit mehreren Abstufungen zu erhalten, wurden Bilder mit unterschiedlichen Abweichungen der Intensitätswerte von Mittelwert überlagert. Zu besseren Veranschaulichung wurde jede Abstufung eingefärbt.

Bewertung der Homogenität des Mikrodosier-Verfahrens

Die Homogenität des Mikrodosier-Verfahrens wurde anhand eines Rasters von aufgetragenem anti-HRP ermittelt. Alle Spots mit anti-HRP wurden unter den gleichen Bedingungen aufgetragen. Standardkonzentration der Mikrodosier-Lösung waren 1 mg mL^{-1} EDC, 1 mg mL^{-1} s-NHS, 0.01 mg mL^{-1} Pluronic® F-127 and 50 mg mL^{-1} Trehalose. Die aufgetragenen Spots wurden 12 h bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 55 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Signalwerte der Spots wurden mit dem Programm *ImageAnalyzer* ausgewertet. Dazu wurde der Mittelwert aus den zehn hellsten Pixeln innerhalb eines festgelegten Rasters ermittelt. Die Intensitätsprofile wurden in *ImageJ* erstellt (*Plot Profile*).

6.5. Detektion von Legionellen auf makroporösen Filtern mit NMR Relaxometer

6.5.1. MAF-Synthese

Monolithische Filter wurden in Glasskapillaren mit einem internen Volumen von 100 μL durchgeführt. Dazu wurde das am IWC entwickelte Verfahren nach Ott et al. [228] angewandt. Die Glasskapillaren mit einer Länge von 12,8 cm und einem Außendurchmesser von 1,8 mm wurden durch Silanisieren vorbehandelt. Zum Silanisieren wurde das durch Peskoller et al. [227] veröffentlichte Verfahren angewandt. Mehrere Glaskapillaren wurden in einem 100 mL Messkolben 1 h in 2 % (v/v) Hellmanex® im Ultraschallbad behandelt, in der gleichen Lösung über Nacht geschüttelt und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Kapillaren für 1 h in eine 1:1 (v/v) Mischung aus konzentrierter Salzsäure und Methanol getaucht, mit Wasser gewaschen und erneut für 1 h in konzentrierte H_2SO_4 getaucht. Nach erneutem Waschen mit Wasser und Trocknen durch einen Stickstoffstrom wurden die Kapillaren für 1 h in GOPTS getaucht. Danach wurden sie für jeweils 15 min mit Ethanol, Methanol und Ethanol im Ultraschallbad gewaschen. Die Kapillaren wurden anschließend mit Stickstoff getrocknet, für 10 min auf 100 °C erhitzt und bis zur weiteren Anwendung unter Vakuum gelagert.

Die Synthese der Monolithen erfolgte bei 28 °C. Das Porogen und Monomer wurden vor der Durchmischung auf diese Temperatur temperiert. Als Porogen wurden 700 μL Toluol und 470 μL Methyl-*tert*-butylether (MTBE) vermischt. Als Initiator wurde 50 μL $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ in 450 μL 1,4-Dioxan verdünnt. 18,7 μL des verdünnten Initiators wurden der Porogen-Lösung zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen mit einem Vortexer wurde 300 μL des CL 9-Monomers zugegeben und erneut für 1 min gründlich gemischt. Anschließend wurde die Lösung mit 1 mL-Einwegspritzen in die Kapillaren gesaugt. Die Polymerisation erfolgte für 1 h bei 28 °C. Anschließend wurde das Porogen mit 5 mL Methanol pro Kapillare ausgespült. Bis zur weiteren Funktionalisierung wurden die mit Methanol gefüllten Kapillaren bei 5 °C über Nacht gelagert. Die Funktionalisierung erfolgte wie in der Doktorarbeit von Dr. D. Elsässer [9] beschrieben mit Diethylamin, um bei neutralem pH-Wert eine positive Filteroberfläche zu erhalten. Zuerst wurden die Monolithen mit Wasser gespült. Zur Funktionalisierung wurde für 3 h 10 % (v/v) Diethylamin in 50 % (v/v) Ethanol bei einer Flussrate von 12 mL h^{-1} durch die Monolithen gepumpt, während diese in ein 60 °C heißes Wasserbad getaucht wurden. Nach der Funktionalisierung wurden die Monolithen mit Wasser gewaschen und bei 5 °C mit Wasser befüllt gelagert.

Zum Einbau der Kapillaren in den NMR-Aufbau, wurden die Kapillaren mit einer Keramik Klinge in Stücke mit 5 mm Länge geschnitten. Um die Keramik Klinge sauber über die Glaskapillare zu führen, wurde ein Tygon-Schlauch mit einem Überlapp von 5 mm über die Glaskapillare gestülpt. Das Anritzen mit der Klinge erfolgte entlang des Randes des Tygon-Schlauchs. Das gewünschte Stück der

Glaskapillare konnte anschließend zusammen mit dem Tygon-Schlauch abgezogen werden. Zum Entfernen des Tygon-Schlauchs wurde dieser mit einem Skalpell aufgeschnitten. Die Kanten der Glaskapillare wurden mit einem Siliziumkarbid-Schleifpapier mit einer Korngröße von 800 gebrochen, um einfacher in den NMR-Aufbau geschoben werden zu können und den umliegenden Teflon-Schlauch nicht zu beschädigen.

6.5.2. Bakterienkultivierung

Verwendet wurde *Legionella pneumophila* Serogruppe (Sg) 1, Stamm Bellingham-1. Diese wurden von Catharina Kober, MSc. für 10 Tage bei 37 °C auf GVPC (Glycin, Polymyxin B, Vancomycin, Cycloheximid) Agar kultiviert und anschließend in Wasser verdünnt und quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch Durchflussszytometrie. Die Bakterienprobe wurde mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYTO 9 angefärbt. Dazu wurden 500 µL der Bakteriensuspension mit 3 µL 10 % (v/v) SYTO gemischt und unter völligem Lichtausschluss für 30 min inkubiert. Die angefärbten Proben wurden verdünnt, um in dem Arbeitsbereich des Durchflussszytometers ($10^5 - 10^6$ KBE mL⁻¹) zu liegen. Die Konzentration wurde mittels des Verdünnungsfaktors zurückgerechnet.

6.5.3. Durchführung der Messungen

Zur Messung der Besetzung der Filtermodule wurde 900 µL einer Lösung von Legionellen (*L. pneumophila* Sg 1, Stamm Bellingham-1) mit bekannter Konzentration mit 20 µL der anti-*Legionella pneumophila* funktionalisierten magnetischen Nanopartikel für 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Lösung wurde auf 1 % (v/v) verdünnt und mit einer Flussrate von 30 µL min⁻¹ durch das Filtermodul gepumpt. Währenddessen erfolgte die Messung der transversalen Relaxationszeit. Die Relaxationszeiten wurden mit der Relaxationszeit des wassergefüllten Filters vor der Messung korrigiert.

7. Abkürzungsverzeichnis

ATR	<i>Attenuated total reflectance</i> - abgeschwächte Totalreflexion
CCD	<i>Charged coupled device</i>
CL	Chemilumineszenz
COC	Cycloolefin-Copolymer
DEAE	Diethylaminoethanol
DGA	Diglycolanhydrid
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> - Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DSC	Disuccinimidylcarbonat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide Hydrochlorid
el	<i>Echo limited Regime</i> - Echolimitiertes Regime
EM	Elektronenmikroskopie
FESEM	<i>Field emission scanning electron microscope</i> – Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie
FID	<i>Free induction decay</i>
FRR	<i>Flow rate ratio</i> - Flussratenverhältnis
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
GOPTS	Glycidylxypropyltrimethoxysilan
ha-RPA	heterogene asymmetrische Rekombinase Polymerase Amplifikation
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> - Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> - Meerrettichperoxidase
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma - mass spectrometry</i> - Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ID	<i>Inner diameter</i> - Innendurchmesser
IRS	<i>Inversion recovery sequence</i> - Inversions-Wiederherstellung
IWC	Institut für Wasserchemie
KBE	Kolonie-bildende Einheit
LOC	<i>Lab on chip</i>

ma	<i>Motional averaging Regime</i> - Regime der Bewegungsmittelung
MAF	Monolithische Adsorptions Filtration
MCR	<i>Microarray chip reader</i>
MIONS	<i>Magnetic iron oxide nanoparticles</i> - magnetische Eisenoxid-Nanopartikel
MIP	<i>Molecular imprinted polymer</i> - molekular geprägtes Polymer
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i> - Magnetresonanz Bildgebung
MRS	<i>Magnetic relaxivity switches</i> - magnetische Relaxivitätsschalter
MSB	Munich School of BioEngineering
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> – Nukleare magnetische Resonanz
OD	<i>Outer diameter</i> - Außendurchmesser
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
PMMA	Polymethylmethacrylat
POM	Polyoxymethylen
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
R2R	<i>roll-to-roll</i> , Rolle-zu-Rolle
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RF	Radiofrequenz
RM	Raman-Mikroskopie
RS-232	serielle asynchrone Schnittschnelle zur Datenkommunikation
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i> - Kleinwinkel-Röntgenstreuung
sd	<i>Static dephasing regime</i> - Regime der statischen Dephasierung
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
Sg	Serogruppe

s-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz
TCP-IP	Transmission control protocol/Internet Protocol
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMAOH	Trimethylammoniumhydroxid
UV	Ultraviolet
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>

8. Literatur

- [1] Bieringer, T., Buchholz, S., Kockmann, N., Future Production Concepts in the Chemical Industry: Modular – Small-Scale – Continuous. *Chemical Engineering & Technology* **2013**, *36*, 900-910.
- [2] Adamo, A., Beingessner, R.L., Behnam, M., Chen, J., Jamison, T.F., Jensen, K.F., Monbaliu, J.-C.M., Myerson, A.S., Revalor, E.M., Snead, D.R., Stelzer, T., Weeranoppanant, N., Wong, S., Zhang, P., On-demand continuous-flow production of pharmaceuticals in a compact, reconfigurable system. *Science* **2016**, *352*, 61-67.
- [3] Phillips, T.W., Lignos, I.G., Maceiczky, R.M., deMello, A.J., deMello, J.C., Nanocrystal synthesis in microfluidic reactors: where next? *Lab on a Chip* **2014**, *14*, 3172-3180.
- [4] Jensen, K.F., Flow chemistry—Microreaction technology comes of age. *AIChE Journal* **2017**, *63*, 858-869.
- [5] Shukla, C.A., Kulkarni, A.A., Automating multistep flow synthesis: approach and challenges in integrating chemistry, machines and logic. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2017**, *13*, 960-987.
- [6] Issadore, D., Min, C., Liong, M., Chung, J., Weissleder, R., Lee, H., Miniature magnetic resonance system for point-of-care diagnostics. *Lab on a Chip* **2011**, *11*, 2282-2287.
- [7] Kunze, A., Pei, L., Elsässer, D., Niessner, R., Seidel, M., High performance concentration method for viruses in drinking water. *Journal of virological methods* **2015**, *222*, 132-137.
- [8] Wunderlich, A., Torggler, C., Elsässer, D., Lück, C., Niessner, R., Seidel, M., Rapid quantification method for *Legionella pneumophila* in surface water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408*, 2203-2213.
- [9] Elsässer, D., Verbundverfahren zur schnellen Aufkonzentrierung von Bakterien und Viren für das Inline-Monitoring von Trink- und Rohwasser. **2017**, Technische Universität München, Dissertation.
- [10] Ruffert, C., Mikrofluidische Separationsverfahren und-systeme. *Springer*; 2018.
- [11] Longwell, C.K., Labanieh, L., Cochran, J.R., High-throughput screening technologies for enzyme engineering. *Current Opinion in Biotechnology* **2017**, *48*, 196-202.
- [12] Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods* **2000**, *40*, 175-179.
- [13] Gao, H., Liu, M., Zhou, X., Liu, J., Zhuo, Y., Gou, Z., Xu, B., Zhang, W., Liu, X., Luo, A., Identification of avermectin-high-producing strains by high-throughput screening methods. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *85*, 1219-1225.
- [14] Xu, Z.N., Shen, W.H., Chen, X.Y., Lin, J.P., Cen, P.L., A high-throughput method for screening of rapamycin-producing strains of *Streptomyces hygroscopicus* by cultivation in 96-well microtiter plates. *Biotechnology Letters* **2005**, *27*, 1135-1140.
- [15] Seidel, M., Niessner, R., Chemiluminescence microarrays in analytical chemistry: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 5589-5612.

- [16] Tronser, T., Popova, A.A., Levkin, P.A., Miniaturized platform for high-throughput screening of stem cells. *Current Opinion in Biotechnology* **2017**, *46*, 141-149.
- [17] Kloth, K., Rye-Johnsen, M., Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Seidel, M., A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk. *Analyst* **2009**, *134*, 1433-1439.
- [18] Szkola, A., Linares, E., Worbs, S., Dorner, B., Dietrich, R., Märtlbauer, E., Niessner, R., Seidel, M., Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay. *Analyst* **2014**, *139*, 5885-5892.
- [19] Kunze, A., Dilcher, M., Abd El Wahed, A., Hufert, F., Niessner, R., Seidel, M., On-chip isothermal nucleic acid amplification on flow-based chemiluminescence microarray analysis platform for the detection of viruses and bacteria. *Analytical Chemistry* **2015**, *88*, 898-905.
- [20] Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., Preparation and characterization of functional poly (ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4529-4537.
- [21] Chan, H., Ma, S., Leong, K.W., Can microfluidics address biomanufacturing challenges in drug/gene/cell therapies? *Regenerative Biomaterials* **2016**, *3*, 87-98.
- [22] Nge, P.N., Rogers, C.I., Woolley, A.T., Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 2550-2583.
- [23] Kamholz, A.E., Yager, P., Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels. *Biophysical journal* **2001**, *80*, 155-160.
- [24] Nguyen, N.-T., Wu, Z., Micromixers—a review. *Journal of micromechanics and microengineering* **2004**, *15*, 1-16.
- [25] Stroock, A.D., Dertinger, S.K., Ajdari, A., Mezić, I., Stone, H.A., Whitesides, G.M., Chaotic mixer for microchannels. *Science* **2002**, *295*, 647-651.
- [26] Hong, C.-C., Choi, J.-W., Ahn, C.H., A novel in-plane passive microfluidic mixer with modified Tesla structures. *Lab on a Chip* **2004**, *4*, 109-113.
- [27] Liu, R.H., Stremmer, M.A., Sharp, K.V., Olsen, M.G., Santiago, J.G., Adrian, R.J., Aref, H., Beebe, D.J., Passive mixing in a three-dimensional serpentine microchannel. *Journal of microelectromechanical systems* **2000**, *9*, 190-197.
- [28] Kim, D.S., Lee, S.H., Kwon, T.H., Ahn, C.H., A serpentine laminating micromixer combining splitting/recombination and advection. *Lab on a Chip* **2005**, *5*, 739-747.
- [29] Schaerli, Y., Wootton, R.C., Robinson, T., Stein, V., Dunsby, C., Neil, M.A., French, P.M., DeMello, A.J., Abell, C., Hollfelder, F., Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets. *Analytical chemistry* **2008**, *81*, 302-306.
- [30] Kumar, K., Nightingale, A.M., Krishnadasan, S.H., Kamaly, N., Wylenzinska-Arridge, M., Zeissler, K., Branford, W.R., Ware, E., deMello, A.J., deMello, J.C., Direct synthesis of dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in a capillary-based droplet reactor. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 4704-4708.
- [31] Lu, M., Ozcelik, A., Grigsby, C.L., Zhao, Y., Guo, F., Leong, K.W., Huang, T., Microfluidic hydrodynamic focusing for synthesis of nanomaterials. *Nano Today* **2016**, *11*, 778-792.

-
- [32] Hassan, A., Sandre, O., Cabuil, V., Tabeling, P., Synthesis of iron oxide nanoparticles in a microfluidic device: preliminary results in a coaxial flow millichannel. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **2008**, 1783-1785.
- [33] Chiu, Y.-J., Cho, S., Mei, Z., Lien, V., Wu, T.-F., Lo, Y.-H., Universally applicable three-dimensional hydrodynamic microfluidic flow focusing. *Lab on a Chip* **2013**, *13*, 1803-1809.
- [34] Min, K.-I., Im, D., Lee, H.-J., Kim, D.-P., Three-dimensional flash flow microreactor for scale-up production of monodisperse PEG-PLGA nanoparticles. *Lab on a Chip* **2014**, *14*, 3987-3992.
- [35] Sundararajan, N., Pio, M.S., Lee, L.P., Berlin, A.A., Three-dimensional hydrodynamic focusing in polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels. *Journal of Microelectromechanical systems* **2004**, *13*, 559-567.
- [36] Rhee, M., Valencia, P.M., Rodriguez, M.I., Langer, R., Farokhzad, O.C., Karnik, R., Synthesis of size-tunable polymeric nanoparticles enabled by 3D hydrodynamic flow focusing in single-layer microchannels. *Advanced Materials* **2011**, *23*, 79-83.
- [37] Dean, W.R., Fluid motion in a curved channel. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A* **1928**, *121*, 402-420.
- [38] Lu, M., Ho, Y.-P., Grigsby, C.L., Nawaz, A., Leong, K.W., Huang, T., Three-dimensional hydrodynamic focusing method for polyplex synthesis. *ACS Nano* **2014**, *8*, 332-339.
- [39] Lu, M., Yang, S., Ho, Y.-P., Grigsby, C.L., Leong, K.W., Huang, T., Shape-controlled synthesis of hybrid nanomaterials via three-dimensional hydrodynamic focusing. *ACS Nano* **2014**, *8*, 10026-10034.
- [40] Lee, M.G., Choi, S., Park, J.-K., Three-dimensional hydrodynamic focusing with a single sheath flow in a single-layer microfluidic device. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 3155-3160.
- [41] Jr, P.B., Golden, J.P., Hilliard, L.R., Erickson, J.S., Mott, D.R., Ligler, F.S., Two simple and rugged designs for creating microfluidic sheath flow. *Lab on a Chip* **2008**, *8*, 1097-1103.
- [42] Golden, J.P., Kim, J.S., Erickson, J.S., Hilliard, L.R., Howell, P.B., Anderson, G.P., Nasir, M., Ligler, F.S., Multi-wavelength microflow cytometer using groove-generated sheath flow. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1942-1950.
- [43] Thangawng, A.L., Kim, J.S., Golden, J.P., Anderson, G.P., Robertson, K.L., Low, V., Ligler, F.S., A hard microflow cytometer using groove-generated sheath flow for multiplexed bead and cell assays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 1871-1881.
- [44] Reyes, D.R., Iossifidis, D., Auroux, P.-A., Manz, A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical chemistry* **2002**, *74*, 2623-2636.
- [45] Temiz, Y., Lovchik, R.D., Kaigala, G.V., Delamarche, E., Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectronic Engineering* **2015**, *132*, 156-175.
- [46] Focke, M., Kosse, D., Müller, C., Reinecke, H., Zengerle, R., Stetten, F.v., Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films. *Lab on a Chip* **2010**, *10*, 1365-1386.
- [47] Iliescu, C., Taylor, H., Avram, M., Miao, J., Franssila, S., A practical guide for the fabrication of microfluidic devices using glass and silicon. *Biomicrofluidics* **2012**, *6*, 16505-16516.

- [48] Zhou, J., Ellis, A.V., Voelcker, N.H., Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 2-16.
- [49] Fiorini, G.S., Chiu, D.T., Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *BioTechniques* **2005**, *38*, 429-446.
- [50] Roberts, M.A., Rossier, J.S., Bercier, P., Girault, H., UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. *Analytical chemistry* **1997**, *69*, 2035-2042.
- [51] Islam, M., Natu, R., Martinez-Duarte, R., A study on the limits and advantages of using a desktop cutter plotter to fabricate microfluidic networks. *Microfluidics and Nanofluidics* **2015**, *19*, 973-985.
- [52] Bartholomeusz, D.A., Boutte, R.W., Andrade, J.D., Xurography: rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter. *Journal of Microelectromechanical Systems* **2005**, *14*, 1364-1374.
- [53] Gray, B., Jaeggi, D., Mourlas, N., Van Driehuisen, B., Williams, K., Maluf, N., Kovacs, G., Novel interconnection technologies for integrated microfluidic systems1. *Sensors and Actuators A: Physical* **1999**, *77*, 57-65.
- [54] Lee, K.S., Ram, R.J., Plastic-PDMS bonding for high pressure hydrolytically stable active microfluidics. *Lab on a Chip* **2009**, *9*, 1618-1624.
- [55] Satyanarayana, S., Karnik, R.N., Majumdar, A., Stamp-and-stick room-temperature bonding technique for microdevices. *Journal of Microelectromechanical Systems* **2005**, *14*, 392-399.
- [56] Kloth, K., Niessner, R., Seidel, M., Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 2106-2112.
- [57] Lengger, S., Otto, J., Elsässer, D., Schneider, O., Tiehm, A., Fleischer, J., Niessner, R., Seidel, M., Oligonucleotide microarray chip for the quantification of MS2, ΦX174, and adenoviruses on the multiplex analysis platform MCR 3. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2014**, *406*, 3323-3334.
- [58] Cooksey, G.A., Atencia, J., Pneumatic valves in folded 2D and 3D fluidic devices made from plastic films and tapes. *Lab on a Chip* **2014**, *14*, 1665-1668.
- [59] Cosson, S., Aeberli, L.G., Brandenberg, N., Lutolf, M.P., Ultra-rapid prototyping of flexible, multi-layered microfluidic devices via razor writing. *Lab on a Chip* **2014**, *15*, 72-76.
- [60] Saez, J., Basabe-Desmonts, L., Benito-Lopez, F., Low-cost origami fabrication of 3D self-aligned hybrid microfluidic structures. *Microfluidics and Nanofluidics* **2016**, *20*, 1781-1787.
- [61] deMello, J.C., deMello, A.J., Microscale reactors: nanoscale products. *Lab on a Chip* **2004**, *4*, 11-15.
- [62] Lim, J.-M., Bertrand, N., Valencia, P.M., Rhee, M., Langer, R., Jon, S., Farokhzad, O.C., Karnik, R., Parallel microfluidic synthesis of size-tunable polymeric nanoparticles using 3D flow focusing towards in vivo study. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2014**, *10*, 401-409.
- [63] Maceiczky, R.M., Lignos, I.G., deMello, A.J., Online detection and automation methods in microfluidic nanomaterial synthesis. *Current Opinion in Chemical Engineering* **2015**, *8*, 29-35.

-
- [64] Krishnadasan, S., Tovilla, J., Vilar, R., On-line analysis of CdSe nanoparticle formation in a continuous flow chip-based microreactor. *Journal of Materials Chemistry* **2004**, *14*, 2655-2660.
- [65] Orimoto, Y., Watanabe, K., Yamashita, K., Uehara, M., Nakamura, H., Furuya, T., Maeda, H., Application of artificial neural networks to rapid data analysis in combinatorial nanoparticle syntheses. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 17885-17896.
- [66] Schwolow, S., Braun, F., Rädle, M., Kockmann, N., Röder, T., Fast and efficient acquisition of kinetic data in microreactors using in-line Raman analysis. *Organic Process Research & Development* **2015**, *19*, 1286-1292.
- [67] Moore, J.S., Jensen, K.F., Automated multitrajectory method for reaction optimization in a microfluidic system using online IR analysis. *Organic Process Research & Development* **2012**, *16*, 1409-1415.
- [68] Holmes, N., Akien, G.R., Savage, R.J., Stanetty, C., Baxendale, I.R., Blacker, A.J., Taylor, B.A., Woodward, R.L., Meadows, R.E., Bourne, R.A., Online quantitative mass spectrometry for the rapid adaptive optimisation of automated flow reactors. *Reaction Chemistry & Engineering* **2016**, *1*, 96-100.
- [69] Sans, V., Porwol, L., Dragone, V., Cronin, L., A self optimizing synthetic organic reactor system using real-time in-line NMR spectroscopy. *Chemical Science* **2015**, *6*, 1258-1264.
- [70] Kober, C., Niessner, R., Seidel, M., Quantification of viable and non-viable *Legionella* spp. by heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification (haRPA) on a flow-based chemiluminescence microarray. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *100*, 49-55.
- [71] Gong, P., Grainger, D.W. Nonfouling Surfaces. In: Rampal JB, editor. *Microarrays: Volume 1: Synthesis Methods*. Totowa, NJ: *Humana Press*; 2007. 59-92.
- [72] Mehne, J., Markovic, G., Pröll, F., Schweizer, N., Zorn, S., Schreiber, F., Gauglitz, G., Characterisation of morphology of self-assembled PEG monolayers: a comparison of mixed and pure coatings optimised for biosensor applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 1783-1791.
- [73] Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B., Gauglitz, G., A high-density poly (ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosensors and Bioelectronics* **2000**, *15*, 473-481.
- [74] Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G.M., Laibinis, P.E., Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 426-436.
- [75] Tamarit-López, J., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., Oxygen plasma treated interactive polycarbonate DNA microarraying platform. *Bioconjugate chemistry* **2011**, *22*, 2573-2580.
- [76] Li, Y., Wang, Z., Ou, L., Yu, H.Z., DNA detection on plastic: surface activation protocol to convert polycarbonate substrates to biochip platforms. *Analytical chemistry* **2007**, *79*, 426-433.
- [77] Rowinska, M., Kelleher, S., Soberon, F., Ricco, A., Daniels, S., Fabrication and characterisation of spin coated oxidised PMMA to provide a robust surface for on-chip assays. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 135-143.

- [78] Chen, T.F., Siow, K.S., Ng, P.Y., Nai, M.H., Lim, C.T., Yeop Majlis, B., Ageing properties of polyurethane methacrylate and off-stoichiometry thiol-ene polymers after nitrogen and argon plasma treatment. *Journal of Applied Polymer Science* **2016**, *133*, 44107-44113.
- [79] Ahn, J., Shin, Y.-B., Chang, W.-S., Kim, M.-G., Sequential patterning of two fluorescent streptavidins assisted by photoactivatable biotin on an aminodextran-coated surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *87*, 67-72.
- [80] Rapp. Rapp Polymere: α,ω -Bis-amino PEGs. <http://www.rapp-polymere.com/index.php?id=1189¤cy=978>. 2018.
- [81] Kitagawa, F., Kubota, K., Sueyoshi, K., Otsuka, K., One-step preparation of amino-PEG modified poly(methyl methacrylate) microchips for electrophoretic separation of biomolecules. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *53*, 1272-1277.
- [82] Jankowski, P., Ogonczyk, D., Kosinski, A., Lisowski, W., Garstecki, P., Hydrophobic modification of polycarbonate for reproducible and stable formation of biocompatible microparticles. *Lab on a Chip* **2010**, *11*, 748-752.
- [83] Jang, M., Park, C.K., Lee, N.Y., Modification of polycarbonate with hydrophilic/hydrophobic coatings for the fabrication of microdevices. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *193*, 599-607.
- [84] Matuschewski, H., Schedler, U. (2015) Method for producing a plastic article with a hydrophobic graft coating and plastic article. WO/2014/108278.
- [85] Wessig, P., Bendig, J., Schedler, U. (2004) Surface-Functionalised Carrier Material, Method for the Production thereof and Solid Phase Synthesis Method. EP1355978B1.
- [86] Péter, M., Schöler, T., Furthner, F., Rensing, P.A., van Heck, G.T., Schoo, H.F., Möller, R., Fritzsche, W., van Breemen, A.J., Meinders, E.R., Flexible biochips for detection of biomolecules. *Langmuir* **2009**, *25*, 5384-5390.
- [87] Van Zant, P., Microchip fabrication: A practical guide to semiconductor processing. *McGraw-Hill*; 2001.
- [88] Rabi, I.I., Space quantization in a gyrating magnetic field. *Physical Review* **1937**, *51*, 652-654.
- [89] Bloch, F., Über die Quantenmechanik der Elektronen in Kristallgittern. *Zeitschrift für Physik* **1929**, *52*, 555-600.
- [90] Bloembergen, N., Purcell, E.M., Pound, R.V., Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. *Physical review* **1948**, *73*, 679-714.
- [91] Hanson, L.G., Is quantum mechanics necessary for understanding magnetic resonance? *Concepts in Magnetic Resonance Part A* **2008**, *32*, 329-340.
- [92] Carr, H.Y., Purcell, E.M., Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical review* **1954**, *94*, 630-638.
- [93] Meiboom, S., Gill, D., Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments* **1958**, *29*, 688-691.

-
- [94] Gillis, P., Koenig, S.H., Transverse relaxation of solvent protons induced by magnetized spheres: application to ferritin, erythrocytes, and magnetite. *Magnetic resonance in medicine* **1987**, *5*, 323-345.
- [95] Rügenapp, C., Gleich, B., Haase, A., Magnetic nanoparticles in magnetic resonance imaging and diagnostics. *Pharmaceutical Research* **2012**, *29*, 1165-1179.
- [96] Gossuin, Y., Gillis, P., Hocq, A., Vuong, Q.L., Roch, A., Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009**, *1*, 299-310.
- [97] Carroll, M.R.J., Woodward, R.C., House, M.J., Teoh, W.Y., Amal, R., Hanley, T.L., Pierre, T.G.S., Experimental validation of proton transverse relaxivity models for superparamagnetic nanoparticle MRI contrast agents. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 35103-35110.
- [98] Stanisiz, G.J., Odrobina, E.E., Pun, J., Escaravage, M., Graham, S.J., Bronskill, M.J., Henkelman, M.R., T1, T2 relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T. *Magnetic Resonance in Medicine* **2005**, *54*, 507-512.
- [99] Caravan, P., Ellison, J.J., McMurry, T.J., Lauffer, R.B., Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2293-2352.
- [100] Ai, H., Layer-by-layer capsules for magnetic resonance imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63*, 772-788.
- [101] Patel, D., Kell, A., Simard, B., Xiang, B., Lin, H.Y., Tian, G., The cell labeling efficacy, cytotoxicity and relaxivity of copper-activated MRI/PET imaging contrast agents. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1167-1176.
- [102] Kurki, T., Komu, M., Spin-lattice relaxation and magnetization transfer in intracranial tumors in vivo: effects of Gd-DTPA on relaxation parameters. *Magnetic Resonance Imaging* **1995**, *13*, 379-385.
- [103] León-Rodríguez, L.M., Martins, A.F., Pinho, M.C., Rofsky, N.M., Sherry, D.A., Basic MR relaxation mechanisms and contrast agent design. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2015**, *42*, 545-565.
- [104] Busquets, A.M., Estelrich, J., Sánchez-Martín, M., Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *International Journal of Nanomedicine* **2015**, 1727-1741.
- [105] Barnhart, J.L., Berk, R.N., Influence of paramagnetic ions and pH on proton NMR relaxation of biologic fluids. *Investigative radiology* **1986**, *21*, 132-136.
- [106] Shen, Z., Wu, A., Chen, X., Iron Oxide Nanoparticle Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Molecular Pharmaceutics* **2017**, *14*, 1352-1364.
- [107] Wei, H., Bruns, O.T., Kaul, M.G., Hansen, E.C., Barch, M., Wiśniowska, A., Chen, O., Chen, Y., Li, N., Okada, S., Cordero, J.M., Heine, M., Farrar, C.T., Montana, D.M., Adam, G., Ittrich, H., Jasanoff, A., Nielsen, P., Bawendi, M.G., Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2017**, *114*, 2325-2330.
- [108] Senpan, A., Caruthers, S.D., Rhee, I., Mauro, N.A., Pan, D., Hu, G., Scott, M.J., Fuhrhop, R.W., Gaffney, P.J., Wickline, S.A., Lanza, G.M., Conquering the Dark Side: Colloidal Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3917-3926.

- [109] Taboada, E., Rodríguez, E., Roig, A., Oró, J., Roch, A., Muller, R.N., Relaxometric and Magnetic Characterization of Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles with High Magnetization. Evaluation as Potential T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Molecular Imaging. *Langmuir* **2007**, *23*, 4583-4588.
- [110] Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., Dobson, J., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2003**, *36*, 167-181.
- [111] Ye, F., Laurent, S., Fornara, A., Astolfi, L., Qin, J., Roch, A., Martini, A., Toprak, M.S., Muller, R.N., Muhammed, M., Uniform mesoporous silica coated iron oxide nanoparticles as a highly efficient, nontoxic MRI T2 contrast agent with tunable proton relaxivities. *Contrast media & molecular imaging* **2012**, *7*, 460-468.
- [112] Pinho, S.L., Laurent, S., Rocha, J., Roch, A., Delville, M.-H., Mornet, S., Carlos, L.D., Vander Elst, L., Muller, R.N., Geraldes, C.F., Relaxometric studies of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{SiO}_2$ core shell nanoparticles: when the coating matters. *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 2285-2291.
- [113] LaConte, L.E.W., Nitin, N., Zurkiya, O., Caruntu, D., O'Connor, C.J., Hu, X., Bao, G., Coating thickness of magnetic iron oxide nanoparticles affects R2 relaxivity. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2007**, *26*, 1634-1641.
- [114] Hu, F., MacRenaris, K.W., Waters, E.A., Liang, T., Schultz-Sikma, E.A., Eckermann, A.L., Meade, T.J., Ultrasmall, water-soluble magnetite nanoparticles with high relaxivity for magnetic resonance imaging. *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 20855-20860.
- [115] Hajesmaealzadeh, F., Shanehsazzadeh, S., Grüttner, C., Daha, F.J., Oghabian, M.A., Effect of coating thickness of iron oxide nanoparticles on their relaxivity in the MRI. *Iranian journal of basic medical sciences* **2016**, *19*, 166-171.
- [116] Duan, H., Kuang, M., Wang, X., Wang, Y.A., Mao, H., Nie, S., Reexamining the effects of particle size and surface chemistry on the magnetic properties of iron oxide nanocrystals: new insights into spin disorder and proton relaxivity. *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 8127-8131.
- [117] Joos, A., Löwa, N., Wiekhorst, F., Gleich, B., Haase, A., Size-dependent MR relaxivities of magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, *427*, 122-126.
- [118] Sandiford, L., Phinikaridou, A., Protti, A., Meszaros, L.K., Cui, X., Yan, Y., Frodsham, G., Williamson, P.A., Gaddum, N., Botnar, R.M., Blower, P.J., Green, M.A., de Rosales, R.T.M., Bisphosphonate-anchored PEGylation and radiolabeling of superparamagnetic iron oxide: long-circulating nanoparticles for in vivo multimodal (T1 MRI-SPECT) imaging. *ACS Nano* **2013**, *7*, 500-512.
- [119] Lartigue, L., Hugounenq, P., Alloyeau, D., Clarke, S.P., Lévy, M., Bacri, J.-C., Bazzi, R., Brougham, D.F., Wilhelm, C., Gazeau, F., Cooperative organization in iron oxide multi-core nanoparticles potentiates their efficiency as heating mediators and MRI contrast agents. *ACS nano* **2012**, *6*, 10935-10949.
- [120] Quinto, C.A., Mohindra, P., Tong, S., Bao, G., Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. *Nanoscale* **2015**, *7*, 12728-12736.
- [121] Saatchi, K., Tod, S.E., Leung, D., Nicholson, K.E., Andreu, I., Buchwalder, C., Schmitt, V., Häfeli, U.O., Gray, S.L., Characterization of alendronic- and undecylenic acid coated magnetic

-
- nanoparticles for the targeted delivery of rosiglitazone to subcutaneous adipose tissue. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2017**, *13*, 559-568.
- [122] Laurent, S., Saei, A.A., Behzadi, S., Panahifar, A., Mahmoudi, M., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2014**, *11*, 1449-1470.
- [123] Chen, Y., Xie, M., A magnetic relaxation switching immunosensor for one-step detection of salbutamol based on gold nanoparticle–streptavidin conjugate. *RSC Advances* **2015**, *5*, 95401-95404.
- [124] Nistler, A., Niessner, R., Seidel, M., Magnetic nanocomposites: versatile tool for the combination of immunomagnetic separation with flow-based chemiluminescence immunoassay for rapid biosensing of Staphylococcal enterotoxin B in milk. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2019**, 1-11.
- [125] Smith, J.E., Sapsford, K.E., Tan, W., Ligler, F.S., Optimization of antibody-conjugated magnetic nanoparticles for target preconcentration and immunoassays. *Analytical Biochemistry* **2011**, *410*, 124-132.
- [126] Stevens, P.D., Fan, J., Gardimalla, H.M., Yen, M., Gao, Y., Superparamagnetic nanoparticle-supported catalysis of Suzuki cross-coupling reactions. *Organic letters* **2005**, *7*, 2085-2088.
- [127] Hariani, P.L., Faizal, M., Ridwan, R., Marsi, M., Setiabudidaya, D., Synthesis and properties of Fe₃O₄ nanoparticles by co-precipitation method to removal procion dye. *International Journal of Environmental Science and Development* **2013**, *4*, 336-340.
- [128] Wu, W., He, Q., Jiang, C., Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters* **2008**, *3*, 397-415.
- [129] Nistler, A., Hartmann, C., Rügenapp, C., Opel, M., Gleich, B., Ivleva, N.P., Niessner, R., Seidel, M., Production and characterization of long-term stable superparamagnetic iron oxide-shell silica-core nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, *442*, 497-503.
- [130] Schneider, T., Löwa, A., Karagiozov, S., Sprenger, L., Gutiérrez, L., Esposito, T., Marten, G., Saatchi, K., Häfeli, U.O., Facile microwave synthesis of uniform magnetic nanoparticles with minimal sample processing. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, *421*, 283-291.
- [131] Liu, Z., Wang, X., Yao, K., Du, G., Lu, Q., Ding, Z., Tao, J., Ning, Q., Luo, X., Tian, D., Synthesis of magnetite nanoparticles in W/O microemulsion. *Journal of Materials Science* **2004**, *39*, 2633-2636.
- [132] Lee, Y., Lee, J., Bae, C.J., Park, J.G., Noh, H.J., Park, J.H., Hyeon, T., Large-scale synthesis of uniform and crystalline magnetite nanoparticles using reverse micelles as nanoreactors under reflux conditions. *Advanced functional materials* **2005**, *15*, 503-509.
- [133] Davis, K., Cole, B., Ghelardini, M., Powell, B.A., Mefford, T.O., Quantitative measurement of ligand exchange with small molecule ligands on iron oxide nanoparticles via radioanalytical techniques. *Langmuir* **2016**, *32*, 13716-13727.
- [134] Lu, A.H., Salabas, E.e.L., Schüth, F., Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 1222-1244.

- [135] Massart, R., Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics* **1981**, *17*, 1247-1248.
- [136] Lee, H., Shin, T.-H., Cheon, J., Weissleder, R., Recent developments in magnetic diagnostic systems. *Chemical Reviews* **2015**, *115*, 10690-10724.
- [137] Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A., High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* **1990**, *11*, 231-238.
- [138] Teller, J., Westphal, F., Gruettner, C. (2010) Magnetic nanoparticles having improved magnetic properties. US7691285B2.
- [139] Wang, J., Sun, J., Sun, Q., Chen, Q., One-step hydrothermal process to prepare highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles with improved magnetic properties. *Materials research bulletin* **2003**, *38*, 1113-1118.
- [140] Mascolo, M.C., Pei, Y., Ring, T.A., Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. *Materials* **2013**, *6*, 5549-5567.
- [141] Ali, A., Zafar, H., Zia, M., Haq, I.u., Phull, A.R., Ali, J.S., Hussain, A., Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications* **2016**, *Volume 9*, 49-67.
- [142] Pei, L., Rieger, M., Lengger, S., Ott, S., Zawadsky, C., Hartmann, N.M., Selinka, H.-C., Tiehm, A., Niessner, R., Seidel, M., Combination of crossflow ultrafiltration, monolithic affinity filtration, and quantitative reverse transcriptase PCR for rapid concentration and quantification of model viruses in water. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, 10073-10080.
- [143] Thanh, N.T.K., Maclean, N., Mahiddine, S., Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 7610-7630.
- [144] Vayssières, L., Chanéac, C., Tronc, E., Jolivet, J., Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: an example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, *205*, 205-212.
- [145] Larrea, A., Sebastian, V., Ibarra, A., Arruebo, M., Santamaria, J., Gas slug microfluidics: a unique tool for ultrafast, highly controlled growth of iron oxide nanostructures. *Chemistry of Materials* **2015**, *27*, 4254-4260.
- [146] Baumgartner, J., Dey, A., Bomans, P.H.H., Coadou, C., Fratzl, P., Sommerdijk, N.A.J.M., Faivre, D., Nucleation and growth of magnetite from solution. *Nature Materials* **2013**, *12*, 310-314.
- [147] Singer, P., Stumm, W., Rate-determining step in the production of acidic mine wastes. *Preprints of Papers - American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry* **1969**, *13*, 1121-1123.
- [148] Jolivet, J.-P., Tronc, E., Chanéac, C., Iron oxides: From molecular clusters to solid. A nice example of chemical versatility. *Comptes Rendus Geoscience* **2006**, *338*, 488-497.
- [149] Gribanov, N.M., Bibik, E.E., Buzunov, O.V., Naumov, V.N., Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1990**, *85*, 7-10.

-
- [150] Rūmenapp, C., Gleich, B., Mannherz, H.G., Haase, A., Detection of molecules and cells using nuclear magnetic resonance with magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, *380*, 271-275.
- [151] Roth, H.-C., Schwaminger, S.P., Schindler, M., Wagner, F.E., Berensmeier, S., Influencing factors in the CO-precipitation process of superparamagnetic iron oxide nano particles: A model based study. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, *377*, 81-89.
- [152] Haseidl, F., Müller, B., Hinrichsen, O., Continuous-Flow Synthesis and Functionalization of Magnetite: Intensified Process for Tailored Nanoparticles. *Chemical Engineering & Technology* **2016**, *39*, 2051-2058.
- [153] Zhao, C.-X., He, L., Qiao, S.Z., Middelberg, A.P.J., Nanoparticle synthesis in microreactors. *Chemical Engineering Science* **2011**, *66*, 1463-1479.
- [154] Wang, J., Song, Y., Microfluidic Synthesis of Nanohybrids. *Small* **2017**, *13*, 16040-16084.
- [155] Simmons, M., Wiles, C., Rocher, V., Francesconi, G.M., Watts, P., The Preparation of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Microreactors. *Journal of Flow Chemistry* **2013**, *3*, 7-10.
- [156] Simmons, M.D., Jones, N., Evans, D.J., Wiles, C., Watts, P., Salamon, S., Castillo, M.E., Wende, H., Lupascu, D.C., Francesconi, M.G., Doping of inorganic materials in microreactors – preparation of Zn doped Fe₃O₄ nanoparticles. *Lab on a Chip* **2015**, *15*, 3154-3162.
- [157] Frenz, L., El Harrak, A., Pauly, M., Bégin-Colin, S., Griffiths, A.D., Baret, J.C., Droplet-based microreactors for the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 6817-6820.
- [158] Stoeva, S.I., Huo, F., Lee, J.-S., Mirkin, C.A., Three-layer composite magnetic nanoparticle probes for DNA. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 15362-15363.
- [159] Han, D.-W., Hong, S.C., Lee, J.H., Lee, J., Kim, H.Y., Park, J.Y., Cho, Lee, J., Han, D.-W., Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *International Journal of Nanomedicine* **2011**, *6*, 3219-3231.
- [160] Zhang, Y., Kohler, N., Zhang, M., Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553-1561.
- [161] Bachhar, N., Bandyopadhyaya, R., Predicting complete size distribution of nanoparticles based on interparticle potential: experiments and simulation. *The Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120*, 4612-4622.
- [162] Hu, J.-D., Zevi, Y., Kou, X.-M., Xiao, J., Wang, X.-J., Jin, Y., Effect of dissolved organic matter on the stability of magnetite nanoparticles under different pH and ionic strength conditions. *Science of The Total Environment* **2010**, *408*, 3477-3489.
- [163] Jolivet, J.-P., Henry, M., Livage, J., Metal oxide chemistry and synthesis: from solution to solid state. *Wiley-Blackwell*; 2000.
- [164] Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., Adam, V., Zitka, O., Magnetic nanoparticles: from design and synthesis to real world applications. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 243-262.

- [165] Wondracek, M.H.P., Jorgetto, A.O., Silva, A.C.P., do Rocio Ivassechen, J., Schneider, J.F., Saeki, M.J., Pedrosa, V.A., Yoshito, W.K., Colauto, F., Ortiz, W.A., Synthesis of mesoporous silica-coated magnetic nanoparticles modified with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole and its application as Cu(II) adsorbent from aqueous samples. *Applied Surface Science* **2016**, *367*, 533-541.
- [166] Li, J., Chen, C., Zhao, Y., Hu, J., Shao, D., Wang, X., Synthesis of water-dispersible Fe₃O₄@ β-cyclodextrin by plasma-induced grafting technique for pollutant treatment. *Chemical engineering journal* **2013**, *229*, 296-303.
- [167] Zong, P., Gou, J., Rapid and economical synthesis of magnetic multiwalled carbon nanotube/iron oxide composite and its application in preconcentration of U (VI). *Journal of Molecular Liquids* **2014**, *195*, 92-98.
- [168] Anbia, M., Kargosha, K., Khoshbooei, S., Heavy metal ions removal from aqueous media by modified magnetic mesoporous silica MCM-48. *Chemical Engineering Research and Design* **2015**, *93*, 779-788.
- [169] Khan, M.A., Alam, M.M., Naushad, M., Alothman, Z.A., Kumar, M., Ahamad, T., Sol-gel assisted synthesis of porous nano-crystalline CoFe₂O₄ composite and its application in the removal of brilliant blue-R from aqueous phase: an ecofriendly and economical approach. *Chemical Engineering Journal* **2015**, *279*, 416-424.
- [170] Tolmacheva, V., Apyari, V., Ibragimova, B., Kochuk, E., Dmitrienko, S., Zolotov, Y.A., A polymeric magnetic adsorbent based on Fe₃O₄ nanoparticles and hypercrosslinked polystyrene for the preconcentration of tetracycline antibiotics. *Journal of Analytical Chemistry* **2015**, *70*, 1313-1321.
- [171] Haddad, Y., Xhaxhiu, K., Kopel, P., Hynek, D., Zitka, O., Adam, V., The isolation of DNA by polycharged magnetic particles: an analysis of the interaction by zeta potential and particle size. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, 550-561.
- [172] Dai, S., Wu, S., Duan, N., Wang, Z., A near-infrared magnetic aptasensor for Ochratoxin A based on near-infrared upconversion nanoparticles and magnetic nanoparticles. *Talanta* **2016**, *158*, 246-253.
- [173] Pappert, G., Rieger, M., Niessner, R., Seidel, M., Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of E. coli. *Microchimica Acta* **2010**, *168*, 1-8.
- [174] Chen, J., Duncan, B., Wang, Z., Wang, L.-S., Rotello, V.M., Nugen, S.R., Bacteriophage-based nanoprobe for rapid bacteria separation. *Nanoscale* **2015**, *7*, 16230-16236.
- [175] Hasan, N., Guo, Z., Wu, H.-F., Large protein analysis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by MALDI-TOF mass spectrometry using amoxicillin functionalized magnetic nanoparticles. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2016**, *408*, 6269-6281.
- [176] Schrittwieser, S., Pelaz, B., Parak, W.J., Lentijo-Mozo, S., Soulantica, K., Dieckhoff, J., Ludwig, F., Guenther, A., Tschöpe, A., Schotter, J., Homogeneous Biosensing Based on Magnetic Particle Labels. *Sensors (Basel, Switzerland)* **2016**, *16*, 828-877.
- [177] Kriz, C.B., Rådevik, K., Kriz, D., Magnetic permeability measurements in bioanalysis and biosensors. *Analytical chemistry* **1996**, *68*, 1966-1970.

-
- [178] Shao, H., Min, C., Issadore, D., Liong, M., Yoon, T.-J., Weissleder, R., Lee, H., Magnetic nanoparticles and microNMR for diagnostic applications. *Theranostics* **2012**, *2*, 55-65.
- [179] Demas, V., Lowery, T.J., Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. *New Journal of Physics* **2011**, *13*, 25005-25029.
- [180] Reisbeck, M., Helou, M.J., Richter, L., Kappes, B., Friedrich, O., Hayden, O., Magnetic fingerprints of rolling cells for quantitative flow cytometry in whole blood. *Scientific reports* **2016**, *6*, 32838-32849.
- [181] Lu, P.-J., Fu, W.-E., Huang, S.-C., Lin, C.-Y., Ho, M.-L., Chen, Y.-P., Cheng, H.-F., Methodology for sample preparation and size measurement of commercial ZnO nanoparticles. **2018**, *26*, 628-636.
- [182] Reimer, L., Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. *Springer*; 2013.
- [183] Jiang, H., Favaro, E., Goulbourne, C., Rakowska, P., Hughes, G., Ryadnov, M., Fong, L., Young, S., Ferguson, D., Harris, A., Stable isotope imaging of biological samples with high resolution secondary ion mass spectrometry and complementary techniques. *Methods* **2014**, *68*, 317-324.
- [184] Sekine, R., Moore, K.L., Matzke, M., Vallotton, P., Jiang, H., Hughes, G.M., Kirby, J.K., Donner, E., Grovenor, C.R., Svendsen, C., Complementary imaging of silver nanoparticle interactions with green algae: dark-field microscopy, electron microscopy, and nanoscale secondary ion mass spectrometry. *ACS nano* **2017**, *11*, 10894-10902.
- [185] Reimer, L., Mulvey, T., Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. *Springer*; 1994.
- [186] Bhattacharjee, S., DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **2016**, 235, 337-351.
- [187] Lim, J., Yeap, S., Che, H., Low, S., Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8*, 381-395.
- [188] de Kanter, M., Meyer-Kirschner, J., Viell, J., Mitsos, A., Kather, M., Pich, A., Janzen, C., Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. *Measurement* **2016**, *80*, 92-98.
- [189] Ferraro, J.R., Introductory raman spectroscopy. *Elsevier*; 2003.
- [190] Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, D.I., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* **2008**, *43*, 134-179.
- [191] Lewis, I.R., Edwards, H., Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line. *CRC Press*; 2001.
- [192] Saxena, N., Singh, M., Efficient synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles under air for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, *429*, 166-176.
- [193] Schwaminger, S.P., Bauer, D., Fraga-García, P., Wagner, F.E., Berensmeier, S., Oxidation of magnetite nanoparticles: impact on surface and crystal properties. *CrystEngComm* **2016**, *19*, 246-255.

- [194] Moore, E., Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR): Methods, analysis and research insights. *Nova Science Publishers, Incorporated*; 2016.
- [195] Smith, B.C., Fundamentals of fourier transform infrared spectroscopy. *CRC Press*; 2011.
- [196] Benyettou, F., Lalatonne, Y., Sainte-Catherine, O., Monteil, M., Motte, L., Superparamagnetic nanovector with anti-cancer properties: $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @zoledronate. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *379*, 324-327.
- [197] Benyettou, H.F.J., PEGylated versus non-PEGylated $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @alendronate nanoparticles. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* **2012**, *4*, 39-45.
- [198] Benyettou, M.F.I., Olsen, M.J.C.L., Ultra-Small superparamagnetic iron oxide nanoparticles made to order. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* **2012**, *5*, 2-7.
- [199] Missana, T., Adell, A., On the applicability of DLVO theory to the prediction of clay colloids stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *230*, 150-156.
- [200] Kim, K.-M., Kim, H.M., Lee, W.-J., Lee, C.-W., Kim, T.-i., Lee, J.-K., Jeong, J., Paek, S.-M., Oh, J.-M., Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica. *International journal of nanomedicine* **2014**, *9*, 29-40.
- [201] Georgieva, K., Dijkstra, D.J., Fricke, H., Willenbacher, N., Clogging of microchannels by nanoparticles due to hetero-coagulation in elongational flow. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *352*, 265-277.
- [202] Bemetz, J., Kober, C., Meyer, V., Niessner, R., Seidel, M., Succinylated Jeffamine ED-2003 coated polycarbonate chips for low-cost analytical microarrays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2019**, *411*, 1943-1955.
- [203] Cussler, E.L., Moggridge, G.D., Chemical product design. *Cambridge University Press*; 2011.
- [204] Pretsch, E., Bühlmann, P., Badertscher, M., Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen. *Springer-Verlag*; 2010.
- [205] Bech, L., Meylheuc, T., Lepoittevin, B., Roger, P., Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, *45*, 2172-2183.
- [206] Han, S., Kim, C., Kwon, D., Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol. *Polymer* **1997**, *38*, 317-323.
- [207] Zhang, S., Zhang, Y., Liu, J., Xu, Q., Xiao, H., Wang, X., Xu, H., Zhou, J., Thiol modified Fe_3O_4 @ SiO_2 as a robust, high effective, and recycling magnetic sorbent for mercury removal. *Chemical Engineering Journal* **2013**, *226*, 30-38.
- [208] Rügenapp, C., Wagner, F.E., Gleich, B., Monitoring of the aging of magnetic nanoparticles using Mössbauer spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, *380*, 241-245.
- [209] Khalkhali, M., Rostamizadeh, K., Sadighian, S., Khoeini, F., Naghibi, M., Hamidi, M., The impact of polymer coatings on magnetite nanoparticles performance as MRI contrast agents: a comparative study. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *23*, 45-57.

-
- [210] Bemetz, J., Wegemann, A., Saatchi, K., Haase, A., Häfeli, U.O., Niessner, R., Gleich, B., Seidel, M., Microfluidic-based synthesis of magnetic nanoparticles coupled with miniaturized NMR for online relaxation studies. *Analytical chemistry* **2018**, *90*, 9975–9982.
- [211] Rohrer, M., Bauer, H., Mintorovitch, J., Requardt, M., Weinmann, H.-J., Comparison of magnetic properties of mri contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Investigative Radiology* **2005**, *40*, 715-724.
- [212] Laurent, S., Elst, L.V., Muller, R.N., Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2006**, *1*, 128-137.
- [213] Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L.V., Muller, R.N., Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2064-2110.
- [214] Tseng, S.-H., Chu, I.M., Chou, M.-Y., Cetuximab-conjugated iron oxide nanoparticles for cancer imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine* **2015**, *Volume 10*, 3663-3685.
- [215] Firouznia, K., Amirmohseni, S., Guiti, M., Amanpour, S., Baitollahi, A., Kharadmand, A.A., Mohagheghi, M.A., Oghabian, M.A., MR relaxivity measurement of iron oxide nano-particles for MR lymphography applications. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2008**, *11*, 607-612.
- [216] Najafian, N., Shanehsazzadeh, S., Hajesmaelzadeh, F., Lahooti, A., Gruettner, C., Oghabian, M.A., Effect of functional group and surface charge of PEG and dextran-coated USPIO as a contrast agent in MRI on relaxivity constant. *Applied Magnetic Resonance* **2015**, *46*, 685-692.
- [217] Faraj, A.A., Shaik, A.S., Pureza, M.A., Alnafea, M., Halwani, R., Preferential macrophage recruitment and polarization in LPS-induced animal model for COPD: noninvasive tracking using MRI. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90829.
- [218] Li, H., Park, S.H., Reif, J.H., LaBean, T.H., Yan, H., DNA-templated self-assembly of protein and nanoparticle linear arrays. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 418-419.
- [219] Cruje, C., Chithrani, D., Polyethylene glycol density and length affects nanoparticle uptake by cancer cells. *Journal of Nanomedicine Research* **2014**, *1*, 6-12.
- [220] Lalatonne, Y., Monteil, M., Jouni, H., Serfaty, J.M., Sainte-Catherine, O., Lièvre, N., Kusmia, S., Weinmann, P., Lecouvey, M., Motte, L., Superparamagnetic bifunctional bisphosphonates nanoparticles: a potential MRI contrast agent for osteoporosis therapy and diagnostic. *Journal of Osteoporosis* **2010**, *2010*, 1-7.
- [221] Lalatonne, Y., Paris, C., Serfaty, J., Weinmann, P., Lecouvey, M., Motte, L., Bis-phosphonates–ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy. *Chemical Communications* **2008**, *22*, 2553-2555.
- [222] Ivleva, N.P., Huckele, S., Weinzierl, B., Niessner, R., Haisch, C., Baumann, T., Identification and characterization of individual airborne volcanic ash particles by Raman microspectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 9071-9084.
- [223] Mérida, F., Chiu-Lam, A., Bohórquez, A.C., Maldonado-Camargo, L., Pérez, M.-E., Pericchi, L., Torres-Lugo, M., Rinaldi, C., Optimization of synthesis and peptization steps to obtain iron oxide nanoparticles with high energy dissipation rates. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, *394*, 361-371.

- [224] Ramadan, W., Kareem, M., Hannyer, B., Saha, S., Effect of pH on the structural and magnetic properties of magnetite nanoparticles synthesised by co-precipitation. *Advanced Materials Research* **2011**, 324, 129-132.
- [225] Bao, Y., Sherwood, J.A., Sun, Z., Magnetic iron oxide nanoparticles as T 1 contrast agents for magnetic resonance imaging. *Journal of Materials Chemistry C* **2018**, 6, 1280-1290.
- [226] Portet, D., Denizot, B., Rump, E., Lejeune, J.-J., Jallet, P., Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as magnetic resonance imaging contrast agents. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, 238, 37-42.
- [227] Peskoller, C., Niessner, R., Seidel, M., Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of Escherichia coli bacteria. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, 3794-3801.
- [228] Ott, S., Niessner, R., Seidel, M., Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of Staphylococcus aureus. *Journal of Separation Science* **2011**, 34, 2181-2192.
- [229] Rayer, A.V., Sumon, K.Z., Jaffari, L., Henni, A., Dissociation constants (pKa) of tertiary and cyclic amines: structural and temperature dependences. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2014**, 59, 3805-3813.
- [230] Endo, Y., Miyai, K., Hata, N., Ichihara, K., Fractionation of polyclonal antibody by isoelectric focusing—Differences in cross-reactivity and affinity of rabbit clonotype anti-human thyrotropin antibody. *Analytical biochemistry* **1984**, 143, 249-255.
- [231] Mozes, N., Léonard, A., Rouxhet, P.G., On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1988**, 945, 324-334.
- [232] Yamaguchi, N., Tokunaga, Y., Goto, S., Fujii, Y., Banno, F., Edagawa, A., Rapid on-site monitoring of *Legionella pneumophila* in cooling tower water using a portable microfluidic system. *Scientific Reports* **2017**, 7, 3093-3299.
- [233] Lück, P.C., Liebscher, B., Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by quantitative culture and an antigen detection assay. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **2003**, 206, 201-204.
- [234] Pawley, J., Handbook of biological confocal microscopy. *Springer Science & Business Media*; 2010.

9. Anhang

9.1. Bewertung der Oberflächenhomogenität von beschichteten Glas-Chips

Abbildung 76 zeigt Chemilumineszenz-Aufnahmen beschichteter Glas-Chips von Wolter et al. [20] nach der Auswertung nach dem in Kapitel 3.2.8 beschriebenen Verfahren:

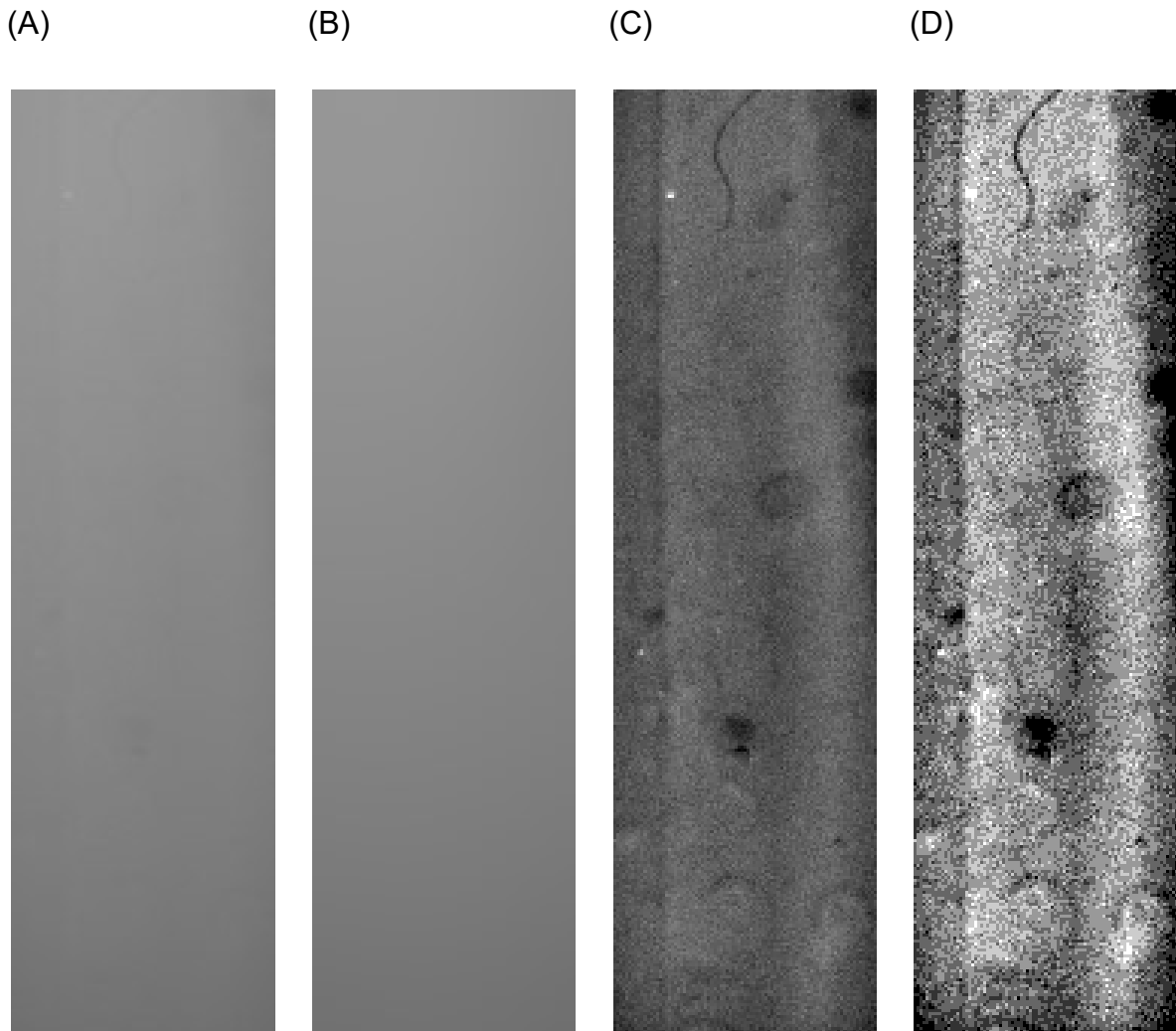


Abbildung 76: Bewertung der Oberflächenhomogenität durch Chemilumineszenz. Das Aufgenommene Bild der Chemilumineszenz auf Glasoberfläche von Wolter et al. [20] (A) wurde durch ein *pseudo*-Dunkelfeldbild (B) dividiert, um ein Bild mit korrigierter Belichtung (C) zu erhalten. Um Inhomogenitäten ersichtlich zu machen, wurden die Intensitätswerte auf die volle Breite an Kontrastwerten erweitert (D).

Abbildung 77 zeigt die farbliche Darstellung der Intensitätsverteilung beschichteter Glas-Chips um die durchschnittliche Intensität der Chemilumineszenz darzustellen.

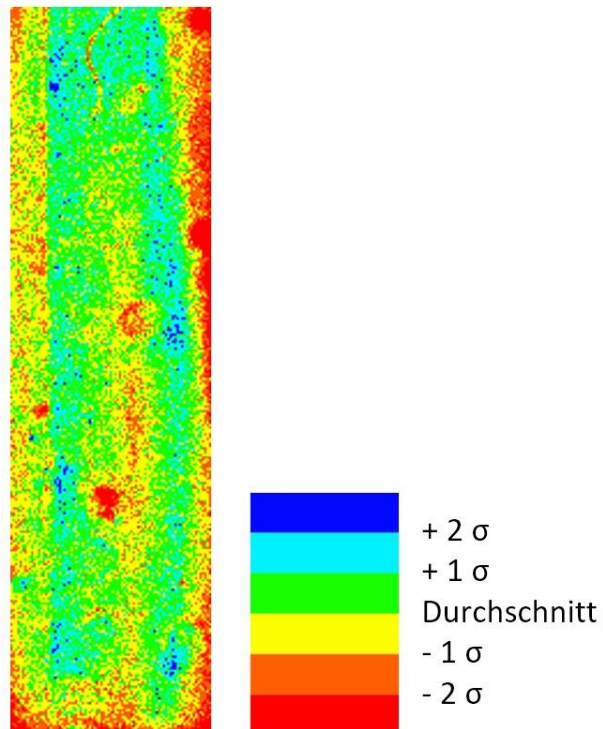
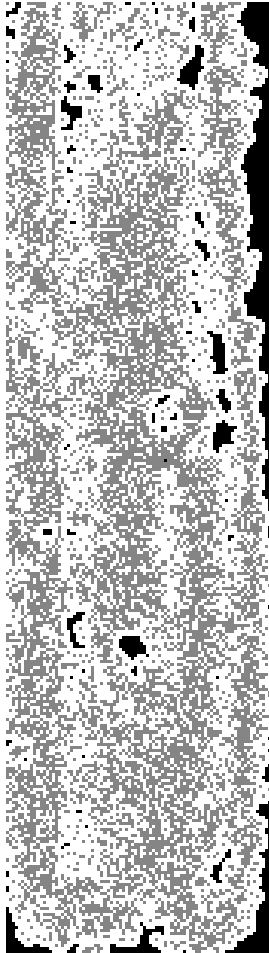


Abbildung 77: Darstellung der Intensitätswerte von jeweils 1-3 Standardabweichungen (σ) um den Mittelwert der Intensitätsverteilung von beschichtetem Glas von Wolter et al. [20].

Abbildung 78 zeigt Inseln in schwarz, welche eine größere Abweichung als 1σ (Abbildung 78-A) respektive 3σ (Abbildung 78-B) von der durchschnittlichen Intensität aufwiesen.

(A)



(B)

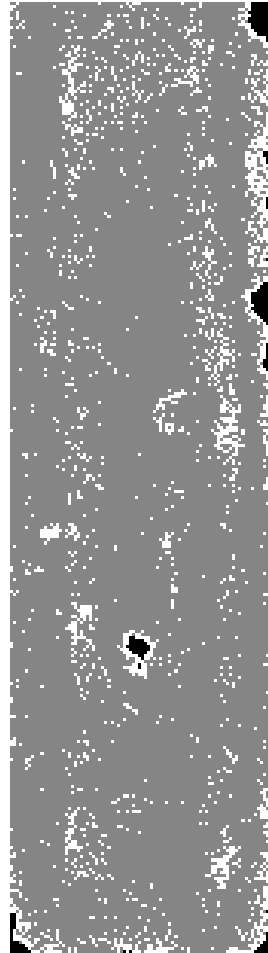


Abbildung 78: Darstellung von Inseln in schwarz mit Intensitäten mit mehr als 1σ (A) und 3σ (B) Abweichung vom Mittelwert von beschichtetem Glas [20].

9.2. Berechnung zum optimalen molaren Verhältnis von Succinanhydrid und *Jeffamine*

Jeffamine (J) kann mit Succinanhydrid (S) zu einfach-funktionalisiertem *Jeffamine* (M) reagieren. In einer unerwünschten seriellen Nebenreaktion kann das einfach-funktionalisierte *Jeffamine* weiter zu zweifach-funktionalisiertem *Jeffamine* (D) reagieren. Die Reaktionsgleichungen sind in Gleichung (24)-(29) gegeben:



Es können folgende Reaktionsraten definiert werden:

$$\frac{d c_J}{d t} = -k_1 c_J c_S \quad (26)$$

$$\frac{d c_S}{d t} = -k_1 c_J c_S - k_2 c_M c_S \quad (27)$$

$$\frac{d c_M}{d t} = k_1 c_J c_S - k_2 c_M c_S \quad (28)$$

$$\frac{d c_D}{d t} = k_2 c_M c_S \quad (29)$$

Mit der Anfangsbedingung $t = 0$, $c_J = c_J^0 = 0$, $c_S = \alpha \cdot c_J^0$, $c_M = c_D = 0$ und der Annahme $k_1 = 2k_2$. Dabei ist α das molare Verhältnis von Succinanhydrid zu *Jeffamine*.

Die Differentialgleichungen (26)-(29) wurden numerisch mit *MATLAB* gelöst.

Abbildung 79 zeigt das Verhältnis $\chi = \frac{c_M}{c_J + c_D}$ in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses α von Succinanhydrid zu *Jeffamine* nach komplettem Umsatz.

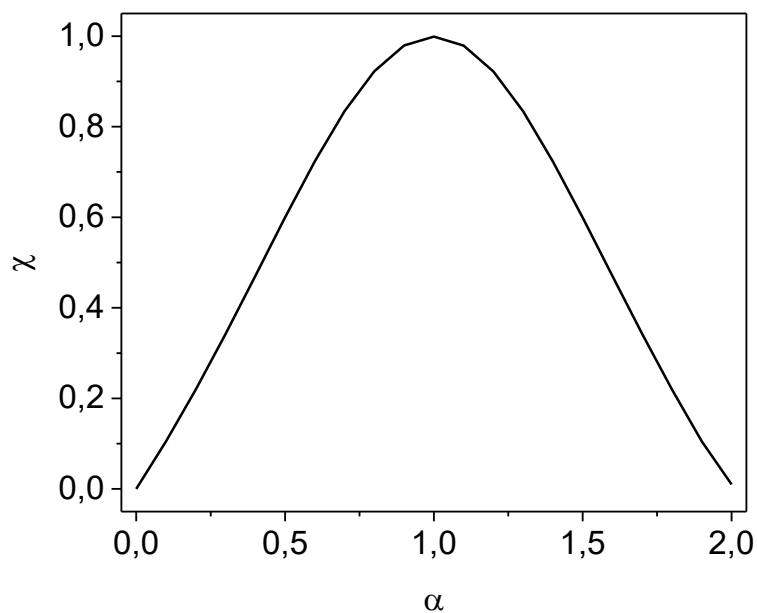


Abbildung 79: Molares Verhältnis χ von einfach-funktionalisiertem *Jeffamine* zu doppelt- und nicht-funktionalisiertem *Jeffamine* in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses α von Succinanhydrid zu *Jeffamine*.

Aus Abbildung 79 ist ersichtlich, dass der höchste Anteil an einfach-funktionalisiertem *Jeffamine* bei einem molaren Ausgangsverhältnis von *Jeffamine* zu Succinanhydrid von 1:1 erhalten wird. Die relativen Konzentrationen von *Jeffamine* sowie einfach und doppelt-funktionalisiertem *Jeffamine* in Bezug auf die Ausgangskonzentration von *Jeffamine* in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses α von Succinanhydrid zu *Jeffamine* ist in Abbildung 80 gezeigt.

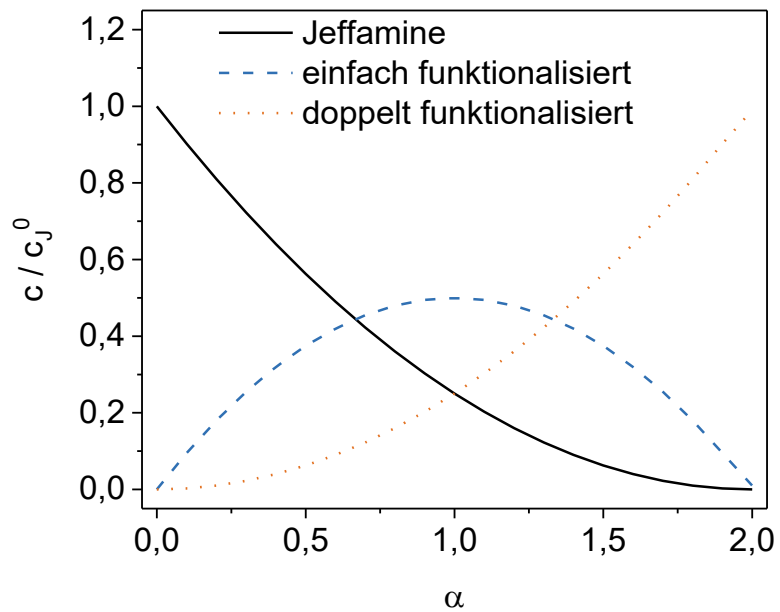


Abbildung 80: Relative Konzentration von einfach-, doppelt- und nicht-funktionalisiertem *Jeffamine* zur Ausgangskonzentration von *Jeffamine* c_J^0 in Abhängigkeit des molaren Verhältnisses α von Succinanhidrid zu *Jeffamine* nach komplettem Umsatz.

9.3. Auflistung der Arbeitszeit zur Herstellung von Polycarbonat- und Glas-Chips

Tabelle 9: Arbeitszeit zum Herstellen von 9 Polycarbonat-Chips

	Arbeitszeit pro Schritt (min)	Durchführungen	Gesamtarbeitszeit (min)	Inkubationszeit (min)	Gesamte Inkubationszeit (min)
Beschichten					
Anritzen der Chip-Geometrie mit Schneideplotter	10	1	10		
Auftragen der <i>Jeffamine</i> -Paste	3	1	3		
Inkubieren der <i>Jeffamine</i> -Paste	5	1	5	120	120
Ausbrechen der 3x3 Chip Teile	4	1	4		
Reinigen der beschichteten Oberfläche	4	1	4	30	30
Trockenblasen mit Stickstoff	2	1	2		
Mikrodosieren					
Inbetriebnahme des Mikrodosier-Geräts	10	1	10		
Einwiegen der Reagenzien	10	1	10		
Pipettieren der Mikrodosier-Lösung (11x)	10	11	110		
Einlegen und Herausnehmen der Chips in/aus Gerät	1	1	1		
Mikrodosieren				45	45
Inkubieren über Nacht					
Einlegen und Herausnehmen der Chips in/aus Inkubator	1	1	1		
Inkubieren selbst				900	900
Zusammenbau der Chips					
Zuschneiden der Klebefolie mit Foliencutter	1	1,5	1,5		
Austrennen des Flusskanals aus der Klebefolie	0,2	9	1,8		
Freibrechen eines Chips	0,15	9	1,35		
Reinigen der Unterschale	0,25	9	2,25		
Verkleben eines Chips	2	9	18		
Waschen und befüllen und verschließen	1,5	9	13,5		
			Arbeitszeit (h)	Inkubationszeit (h)	
			3,3	18,25	

Tabelle 10: Arbeitszeit zum Herstellen von 9 Glas-Chips

	Arbeitszeit pro Schritt (min)	Durchführungen	Gesamtarbeitszeit (min)	Inkubationszeit (min)	Gesamte Inkubationszeit (min)
Gravieren	3	9	27		
Waschen					
Im Ultraschallbad	15	1	15	60	60
Im Schüttler	15	1	15	900	900
Im Ultraschallbad	15	1	15	60	60
Spülen	3	1	3		
Anätzen der Oberfläche					
Mit Salzsäure / Methanol	15	1		60	60
Waschen	3	1	3		
Mit Schwefelsäure	15	1		60	60
Waschen	3	1	3		
Silanisieren der Oberfläche					
GOPTS auftragen und deckeln	2	4,5	9	180	180
Trennen und vorspülen der Glas-Chips in Ethanol	2	4,5	9	0	0
Waschen im Ultraschallbad in Ethanol	2	1	2	15	15
Waschen im Ultraschallbad in Methanol	2	1	2	15	15
Waschen im Ultraschallbad in Ethanol	2	1	2	15	15
Trocknen in Stickstoff	1	9	9	0	0
Beschichten mit <i>Jeffamine</i>					
<i>Jeffamine</i> auftragen und deckeln	2	4,5	9		
Inkubieren	1	5	5	900	900
Trennen und Vorspülen	2	4,5	9	0	0
Waschen in Wasser im Ultraschallbad	4	1	4	30	30
Trocknen in Stickstoff	1	9	9		
Aktivieren mit DSC					
Herstellen der Lösung	20	1	20		
DSC Lösung auftragen und deckeln	2	4,5	9		
Inkubieren				240	240
Trennen und vorspülen	2	4,5	9	0	0
Waschen in Methanol im Ultraschallbad (2x)	4	1	4	10	10
Trocknen in Stickstoff	1	9	9		
Trocknen in Stickstoff	1	9	9		
Mikrodosieren					
Inbetriebnahme des Mikrodosier-Geräts	10	1	10		

Einwiegen der Reagenzien	10	1	10		
Pipettieren der Mikrodosier-Lösung (11x)	10	11	110		
Einlegen und Herausnehmen der Chips in/aus Gerät	5	1	5		
Mikrodosieren				45	45
Inkubieren über Nacht					
Einlegen und herausnehmen der Chips in/aus Inkubator	4	1	4		
Inkubieren selbst				900	900
Blocken	15	1	15	15	15
Zusammenbau der Chips					
Zuschneiden der Klebefolie mit Schneideplotter	1	1,5	1,5		
Austrinnen des Flusskanals aus Klebefolie	0,2	9	1,8		
Reinigen der Unterschale	0,25	9	2,25		
Verkleben eines Chips	2	9	18		
Waschen und befüllen und verschließen	1,5	9	13,5		
			Arbeitszeit (h)	Inkubationszeit (h)	
			6,6	58,4	

Arbeitszeit pro Schritt
(min)

Durchführungen

Gesamtarbeitszeit
(min)

Inkubationszeit (min)

Gesamte Inkubationszeit
(min)

9.4. Ablaufprogramm zur Chemilumineszenz-Testmessung am MCR zur Optimierung des Herstellungsprozesses

Tabelle 11: Volumina und Fördergeschwindigkeiten beim Ablaufprogramm zur Chemilumineszenz-Testmessung.

Pumpe Nr.	Ladevolumen	Ladegeschwindigkeit	Entladevolumen	Entladegeschwindigkeit	Durchgänge
1. Laufpuffer	2500 µL	500 µL s ⁻¹	2500 µL	500 µL s ⁻¹	2
Dunkelbildaufnahme: 60 s					
1. Laufpuffer	2500 µL	500 µL s ⁻¹	2500 µL	500 µL s ⁻¹	2
3. anti-HRP	---	---	200 µL	100 µL s ⁻¹	1
3. anti-HRP	---	---	800 µL	10 µL s ⁻¹	1
1. Laufpuffer	2500 µL	500 µL s ⁻¹	2500 µL	500 µL s ⁻¹	3
1. Luminol	100 µL	500 µL s ⁻¹	---	---	1
1. H ₂ O ₂	100 µL	500 µL s ⁻¹	---	---	1
1. Luminol	100 µL	500 µL s ⁻¹	---	---	1
1. H ₂ O ₂	100 µL	500 µL s ⁻¹	---	---	1
1. Luminol/H ₂ O ₂	---	---	400 µL	500 µL s ⁻¹	1
Bildaufnahme: 60 s					
1. Laufpuffer	2500 µL	500 µL s ⁻¹	2500 µL	500 µL s ⁻¹	2