

Aufbau und Charakterisierung eines Systems zur  
Untersuchung intermolekularer Wechselwirkungen mit hohen  
Ratenkonstanten

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

**Bernd Bühler**

Tag der mündlichen Prüfung : 23.02.2001

Dekan : Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter : Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Oberhammer

*„Ist sie gut und geschickt erzählt, so habe ich mein Ziel erreicht. Ist sie aber mittelmäßig oder gar schlecht, so gab ich doch mein Bestes.“*

2 Makk 15, 38

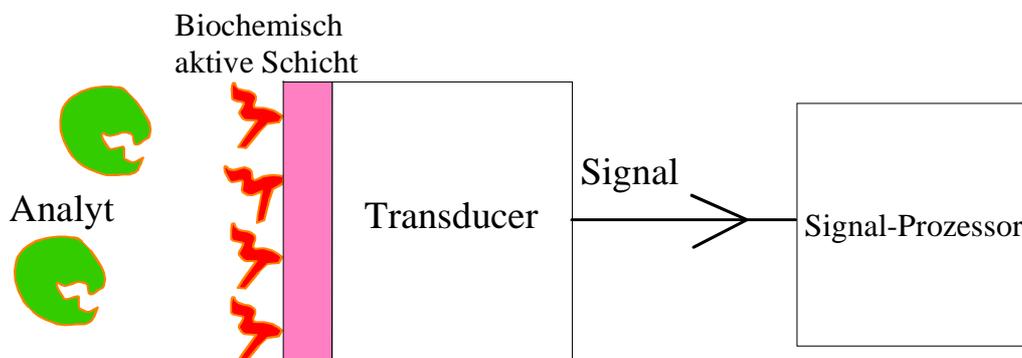
# Inhaltsverzeichnis:

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2 AUFBAU DES UNTERSUCHUNGS-SYSTEMS</b>	<b>13</b>
2.1 Die Flußzelle	13
2.2 Die Abdichtung der Flußzelle	16
2.3 Durchfluß und Modulation	19
2.4 Versuchsaufbau mit CCD-Kamera	21
2.5 Der Versuchsaufbau mit Photomultiplier	24
2.6 Der Lock-In-Verstärker	26
2.7 Die Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie	29
<b>3 CHARAKTERISIERUNG DES SYSTEMS</b>	<b>32</b>
3.1 Die Strömung in einem rechteckigen, geraden Kanal	32
3.2 Messungen mit der CCD-Kamera	37
3.2.1 Zwei parallel nebeneinander fließende Strömungen	38
3.2.2 Dispersion eines Farbstoffpakets	46
3.3 Vergleich der Meßwerte der CCD-Kamera mit theoretischen Berechnungen	57
3.3.1 Die Diffusion zwischen zwei parallelen Strömen	57
3.3.2 Taylor-Dispersion in einer Röhre mit rechteckigem Querschnitt	62
3.4 Messungen mit dem Photomultiplier	73
3.5 Vergleich der Messwerte des Photomultipliers mit theoretischen Daten	76
3.5.1 Berechnung der Konzentrationsentwicklung bei einem endlichen Anfangsquader	76
3.5.2 Die zeitliche Änderung der Konzentration an einem festgehaltenen Punkt	78
<b>4 MESSUNGEN MIT DEM LOCK-IN-VERSTÄRKER</b>	<b>83</b>
4.1 Kombination mit dem Photomultiplier	83

<b>4.2 Kombination mit RfS</b>	<b>86</b>
<b>5 UNTERSUCHUNGEN AN EINEM MIT HOHEN RATENKONSTANTEN WECHSELWIRKENDEN MOLEKÜLSYSTEM</b>	<b>88</b>
5.1 Das System Vancomycin-Tripeptid	88
5.2 Die Herstellung der Transducer	95
5.3 Affinitätsreaktionen an Grenzflächen	99
5.4 Charakterisierung der Transducer	102
5.5 Affinitätsreaktionen in homogener Phase	109
5.6 Messungen mit der Modulationstechnik	114
5.7 Messungen mit RfS in einem kleinen Bioreaktor	118
<b>6 ERZEUGUNG DÜNNER FLÜSSIGKEITSSCHICHTEN ÜBER DER TRANSDUCER-OBERFLÄCHE</b>	<b>123</b>
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>128</b>
<b>8 LITERATUR</b>	<b>130</b>
<b>9 DANKSAGUNG</b>	<b>135</b>
<b>10 LEBENS LAUF</b>	<b>137</b>

# 1 Einleitung

Die Welt um uns herum setzt sich aus einer Vielzahl von Substanzen zusammen. Um diese Welt und die Vorgänge in ihr besser verstehen zu können, ist die Kenntnis ihrer stofflichen Zusammensetzung von außerordentlicher Bedeutung. Dieses Wissen zu schaffen ist Aufgabe der Analytischen Chemie seit ihrer Entstehung irgendwann in vorchristlicher Zeit im Vorderen Orient, wenn man dem Chemie-Historiker Ferenc Szabadváry Glauben schenken will [1]. Je genauer die raum-zeitliche Verteilung der verschiedenen Moleküle in einem System bekannt ist, desto mehr kann auch über die Vorgänge im System und natürlich auch über das System selbst gesagt werden. Dabei reicht das Spektrum der Analytik von Objekten im fernen Kosmos, wo im interstellaren Raum organische Verbindungen in teilweise gigantischen Molekülwolken (bis zu 100000 Sonnendurchmessern Größe) mit Hilfe der Radio- und Infrarot-Spektroskopie entdeckt wurden [2] oder wo auf dem Mars durch die Raumsonde Pathfinder bzw. dem Marsfahrzeug Sojourner eine Analyse des Bodens und einiger Felsen mit Alpha-Protonen-Röntgenspektrometrie durchgeführt wurde [2], bis zu irdischen Systemen und Vorgängen in Organismen und Ökosystemen. Gerade die Analyse der irdischen Systeme hat ungeheure praktische Bedeutung v. a. in den Bereichen Umweltschutz, Medizin und Biotechnologie.



**Bild 1:** Schema eines Biosensors.

Im Gegensatz zu den nur wenigen, und dazu auch noch recht einfachen Molekülen in kosmischen Dunkelwolken und den wenigen anorganischen Verbindungen in Mars-Gesteinen ist in Organismen und Ökosystemen eine ungeheure Vielzahl an komplizierten Molekülen zu finden. Solch komplexe Medien erfordern hochsensitive und -selektive Methoden, um Aussagen über Art und Konzentration all dieser Stoffe machen zu können. Die bisher erfolgversprechendste Methode ist der Einsatz von Biosensoren (siehe z. B. [3])

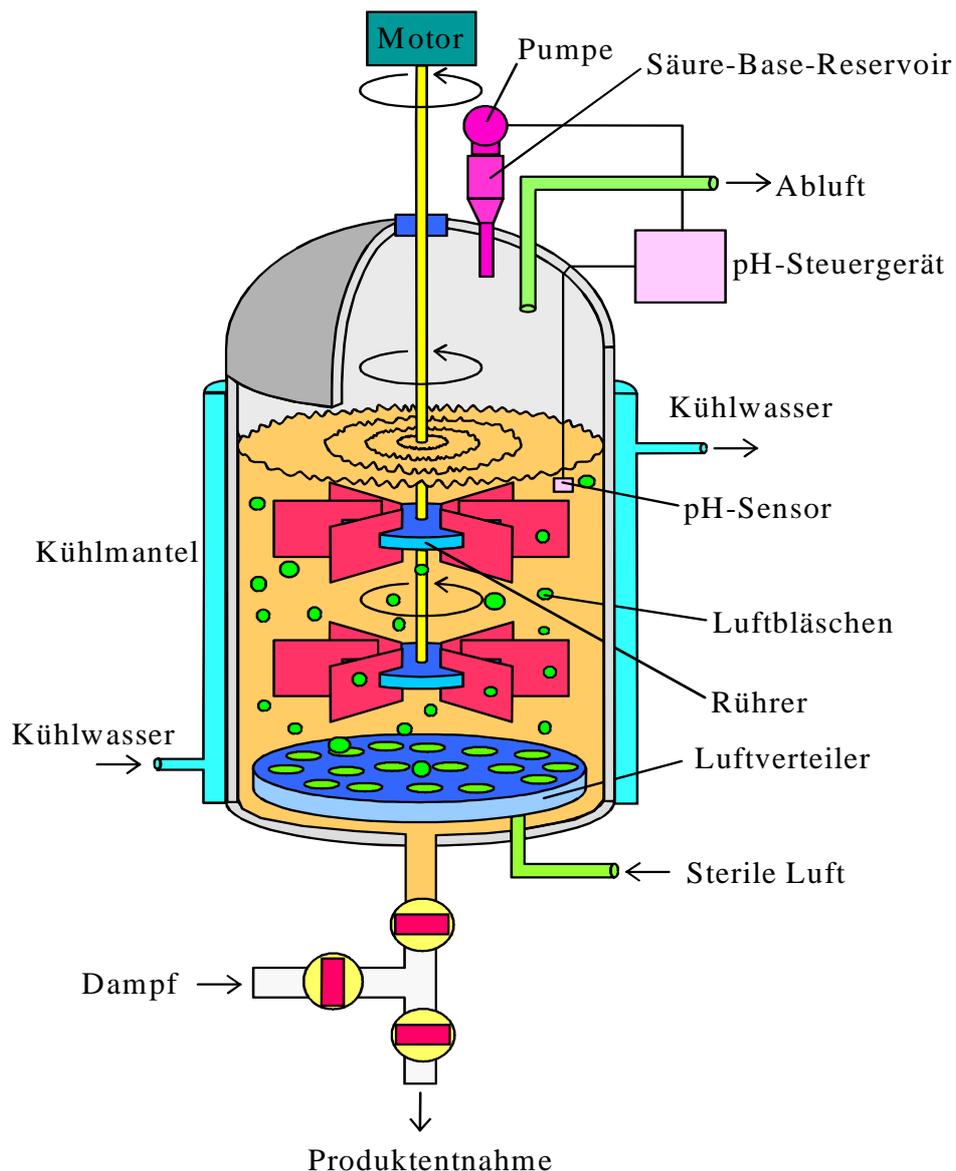
oder [4]), Bild 1 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen Biosensors. Das besondere an diesen Sensoren ist die direkte Kopplung eines biologisch sensitiven Elements mit einem Transducer. Sowohl Spezifität als auch Selektivität des Biosensors beruhen auf der biochemisch aktiven Schicht, in der sich die unterschiedlichsten Biomoleküle befinden können, von Enzymen und sonstigen Proteinen über Zucker, Nucleinsäuren und kleinere Metabolite der Zelle bis hin zu kompletten Organismen (Hefe oder Bakterien). Die Spezifität und Selektivität des Biosensors beruht also auf der Spezifität und Selektivität der Biomoleküle, mit einem Wort: auf „biorecognition“. Besonders interessant sind hierbei naturgemäß die Antikörper, die (im Idealfall) spezifisch für ein Molekül sind [5], aber nicht minder interessant ist auch die Erkennung von komplementären Nucleinsäuren.

Die biologischen Elemente (Moleküle, Zellfragmente oder ganze Zellen) werden durch verschiedene Methoden immobilisiert, von der einfachen physikalischen Adsorption bis hin zur kovalenten Anbindung an die Transducer-Oberfläche (für einen Überblick siehe z. B. [6]). Durch die Bindung des Analyt-Moleküls an die biochemisch aktive Schicht ändern sich die physikalischen Eigenschaften des Transducers. Auf den unterschiedlichen Eigenschaften, die gemessen werden, beruht die Einteilung der Transducer und damit auch der Biosensoren. Die wichtigsten Gruppen sind die elektrochemischen, die thermischen und die optischen Transducer (für einen Überblick siehe z. B. [7]).

Die drei Hauptanwendungsbereiche der Biosensoren sind

- Umweltüberwachung: Erfassung der Verschmutzung von Luft und Wasser.
- Klinische Diagnostik: Erfassung der Inhaltsstoffe in Körperflüssigkeiten.
- Prozeßkontrolle: Echtzeit-Überwachung von Nährstoffen, Gasen, Produkten etc. in Bioreaktorprozessen.

Während die Wichtigkeit der ersten beiden Anwendungsbereiche keinerlei Diskussion erfordert, ist die Bedeutung des letzten Punktes noch einer Erklärung bedürftig. Die chemische Produktion der neueren Zeit geht immer mehr von der rein chemischen Synthese zurück zur Urform der Herstellung von Substanzen, wie sie schon in der Antike und wohl noch früher betrieben wurde: Organismen verschiedensten Ursprungs (v. a. Bakterien und Pilze) werden gezüchtet, die in der Lage sind, die gewünschten Stoffe zu synthetisieren. So werden Bakterien und Pilze nicht mehr nur in den Brauereien und Weinkellereien verwendet, auch in immer größeren Teilen der chemischen Industrie werden sie eingesetzt. In allen Bereichen des menschlichen Lebens sind solcherart hergestellte Stoffe von hoher Bedeutung, besonders augenfällig sind dabei pharmakologisch relevante Substanzen.



**Bild 2:** Aufbau eines aeroben Fermenters (Typ: Zwangselüfteter Rührwerkskessel).

All diese biotechnologischen Synthesen finden in mehr oder weniger großen Bioreaktoren statt [8]. Bild 2 zeigt schematisch den Aufbau eines typischen, aeroben Fermenters. Die Bakterien oder Pilze wachsen in einer komplex zusammengesetzten Nährlösung heran und produzieren die gewünschten Moleküle. Nur in wenigen Fällen stammt das gewünschte Produkt aus dem sogenannten primären Stoffwechsel, also dem Grundstoffwechsel des Organismus, ohne den er nicht existieren kann. Ein - natürlich außerordentlich wichtiges - Beispiel dafür ist Ethanol, das von Hefe und gewissen Bakterien als Teil ihres Energie-Stoffwechsels gebildet wird. Die Mehrheit der biotechnologisch hergestellten Produkte gehört dem sekundären Stoffwechsel

an, ein Stoffwechsel, der nur unter bestimmten, meist negativen, Bedingungen - z. B. Nahrungsmangel, hohe Populationsdichte etc. - angeworfen wird. Bestes Beispiel ist die Erzeugung von Antibiotika, die von Bakterien oder Pilzen zur Verteidigung ihres Lebensraumes nur in Notsituationen gebildet werden. Für den Produktionsprozeß im Bioreaktor ist es von allergrößter Wichtigkeit, die Bedingungen so einzustellen, daß der gewünschte sekundäre Metabolit mit hoher Rate gebildet wird. Dies kann einerseits durch Manipulation des Genoms des verwendeten Organismus herbeigeführt werden, andererseits durch Bereitstellung bestimmter Moleküle in der Nährlösung, die zur biochemischen Synthese des gewünschten Stoffes erforderlich oder zumindest förderlich sind, oder durch Einstellung weiterer physikalischer, chemischer oder auch biologischer (z. B. hohe Populationsdichte) Randbedingungen.

Die Optimierung all dieser Bedingungen bis zum maximalen Ertrag ist eine langwierige und schon allein dadurch sehr kostspielige Angelegenheit. Für die Einstellung der äußeren Bedingungen ist es daher notwendig, so viel Information wie möglich aus dem Bioreaktor zu bekommen. Daher zählen Meßeinrichtungen für Temperatur, Belüftung, Rührerdrehzahl, Druck, pH-Wert, Gehalt an gelöstem O<sub>2</sub>, Schaumstand und Gewicht zur Grundausstattung eines jeden Bioreaktors [9]. Eine der wichtigsten Komponenten des Prozesses, das Produkt selbst, wird bisher jedoch meist nur auf indirekte Weise nachgewiesen, z. B. durch den Verbrauch von Sauerstoff oder die Änderung des pH-Wertes. Die direkte on-line-Erfassung des Produktes bleibt also ein wichtiges Ziel in der Beobachtung des Bioprozesses, um so die Bedingungen rasch und sicher einstellen zu können, die nötig sind, um eine maximale Ausbeute zu garantieren. Eine der wenigen Ausnahmen ist die on-line-Verfolgung der Penicillin-Konzentration während der Fermentation durch eine Enzym-Elektrode (immobilisierte Penicillinase), die in ein FIA-(Fließ-Injektions-Analyse)-System eingebaut wurde [10]. Ebenso wird zur Zeit versucht, mit IAsys<sup>TM</sup> [11], einem optischen Biosensor, die Menge an Gärungsprodukten während des Bioprozesses zu messen [12]. Doch noch sind diese Forschungen auf dem off-line-Niveau angesiedelt.

Ein FIA-System ist eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz eines Biosensors in einem Bioreaktor. Ein direktes (in-line) Einsetzen des Sensors in den Reaktor bringt immense Probleme mit sich [13]. Biosensoren können nicht sterilisiert werden, denn nach einer Sterilisationsprozedur werden die biologisch aktiven Schichten zerstört oder zumindest stark beeinträchtigt sein. Daher muß ein Bypass an den Bioreaktor angeschlossen werden, in dem sich dann der Biosensor befindet. Kontinuierlich wird dann Kulturmedium, das vorher durch einen Membranfilter floß, über den Biosensor geführt, der dann Auskunft über

die Konzentration des Produktes liefert, jederzeit kann der Sensor dann auch neu kalibriert oder sogar ausgetauscht werden. Die Reduktion der Größe des benutzten FIA-Systems ist hierbei von eminenter Bedeutung, denn eine kleinere Anlage ist verbunden mit geringerer Probengröße, kleineren Reaktionszeiten, geringerem Verbrauch von Energie und Reagenzien [14, 15]. Die Technik ist auf diesem Gebiet schon weit vorangeschritten. Teilweise werden schon Pumpen und Ventile miniaturisiert und in ein einziges Chip eingebaut [16]. Pfenniggroße Minilaboratorien werden zur elektrophoretischen Trennung von Substanzen herangezogen [17]. Ein weiteres interessantes Beispiel ist ein „µFIA demonstrator system“ der Universität von Twente, bei dem das Gesamtsystem aus Modulen für Detektion, Fluidzuführung und elektronische Steuerung aufgebaut ist [18]. Es gibt eine Vielzahl von Methoden, Mikrokanäle zu erzeugen, einen Überblick bietet E. Verpoorte und N. F. de Rooij in ihrem Review [19], für einzelne, besonders verbreitete oder besonders interessante Methoden siehe z. B. [20], [21], [22], [23], [24] und [25]. Mittels der sequentiellen Injektions-Analyse können der Probe noch vor Eintritt in den Sensor zusätzlich Chemikalien beigemischt werden, die mit dem zu untersuchenden Analyten reagieren [26]. Das daraus entstehende Derivat kann dann leichter nachgewiesen werden.

Ein wesentliches Problem für die on-line-Untersuchung ist die Regenerierbarkeit der Sensoren. Nur wenn die Analyt-Moleküle, die sich an die biologisch aktive Schicht anlagern, sich auch schnell wieder davon lösen, wenn die Bindung des Analyten an die Oberfläche also reversibel ist, kann der Biosensor für eine kontinuierliche Überwachung benutzt werden. Der Sensor muß sich von selbst regenerieren können. Bei Enzym-Sensoren gibt es in diesem Bereich kein Problem, weil die Enzym-Kinetik sehr schnell abläuft, daher konnte der Penicillinase-Sensor für die Überwachung des Fermentationsprozesses benutzt werden. Ein Immunosensor, der auf der Antigen-Antikörperwechselwirkung beruht, ist wesentlich problematischer. Ein Molekül, das von einem Antikörper ergriffen wird, kommt nur schwer wieder von ihm los, was auch gar nicht im Sinne dieser Moleküle wäre, denn schließlich sollen Antikörper fremde Stoffe aus dem tierischen Körper entfernen. Ein Ansatz zur Verbesserung dieser Regenerationseigenschaften ist die Konstruktion von Biomolekülen mit schneller Kinetik (gentechnisch veränderte Fab-Fragmente von Antikörpern oder „Affibodies“ [27]), die für alle möglichen Analyte passend konstruiert werden können. Solche Moleküle (Schlagwort „reversible sensing“), die sowohl mit einer hohen Assoziations- als auch mit einer hohen Dissoziationskonstanten ausgestattet sind, können mit den herkömmlichen Methoden der Sensorik nur schwer detektiert werden, weil sie so schnell wieder von der Sensor-Oberfläche verschwinden, noch bevor der

Transducer ein Signal abgeschickt hat. Daher sollten hier neue Methoden zur Erfassung dieser schnell wechselwirkenden Moleküle verwendet werden.

In dieser Arbeit wurde u. a. versucht, *eine* neue Methode im Umgang mit Molekülen mit hohen Ratenkonstanten zu untersuchen und zu etablieren. Kernpunkt der Methode ist, die Konzentration des Analyten periodisch zu verändern (Konzentrationsmodulation) und diese modulierte Analyt-Konzentration wird dann in den Biosensor geschleust. Da die Konzentration des Analyten periodisch mit der Zeit verändert wird, ändert sich auch die Antwort des Transducers, das Meß-Signal, entsprechend periodisch. Zur Auswertung dieses periodischen Meß-Signals wird dieses in einen Lock-In-Verstärker eingespeist. Dieser spezielle Verstärker kann dann die gewünschte Information aus dem Signal herausarbeiten. Dazu entnimmt er durch elektronische Filterung dem Signal, in dem auch ein großer Rausch-Anteil enthalten ist, den Wert, für den allein der Analyt verantwortlich ist. Dadurch ist es u. a. möglich, auch sehr kleine Konzentrationsänderungen schnell und sicher zu erfassen.

Gerade für diesen Punkt (Modulation der Analytkonzentration) ist der Einsatz von Mikrofluidik unumgänglich. Eine Modulation mit Frequenzen im Bereich von einigen Hertz ist nur mit sehr kleinen Proben-Mengen möglich, und gerade die Reduktion der Probengröße ist ja einer der Haupt-Vorteile einer  $\mu$ -FIA.

#### *Gliederung der Arbeit :*

Die Arbeit gliedert sich im wesentlichen nach dem zeitlichen Vorgehen: In Kapitel 2 wird der Aufbau des Systems beschrieben, die Struktur der einzelnen Komponenten (Flußzelle, Druckanlage, Ventile) sowie die Meßgeräte (CCD-Kamera, Photomultiplier und Lock-In-Verstärker).

Das dritte Kapitel widmet sich der Charakterisierung des Systems, v. a. auf hydrodynamischer Basis. Es wurden genaue Messungen der Strömungen in der Flußzelle durchgeführt, um die Möglichkeit der Modulation des Analytmoleküls besser abschätzen zu können. Dazu wurde eine CCD-Kamera zur räumlichen Erfassung des Strömungsgeschehens benutzt, für die zeitliche Erfassung dagegen wurde mit einem Photomultiplier gemessen. Die Messungen werden mit theoretischen Modellen verglichen.

Im vierten Kapitel geht es um den Kern der neuen Methode, nämlich um den Einsatz des Lock-In-Verstärkers. Die Konzentration der Analyt-Moleküle wird

moduliert. Hier finden sich die Messungen in Kombination sowohl mit einem Photomultiplier als auch mit einem Spektrometer.

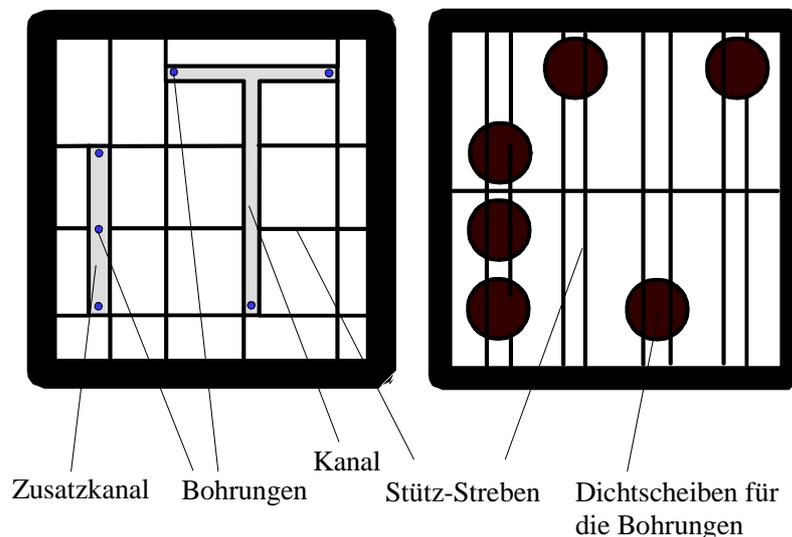
Im fünften Kapitel wird die neue Technik auf ein verhältnismäßig schnelles Molekülsystem angewendet, auf die Wechselwirkung Vancomycin-Tripeptid. Es wird beschrieben, wie die Transducer hergestellt werden, die spezifisch für Vancomycin sind, dann werden Messungen (off-line) in einem kleinen Vancomycin-Reaktor mit herkömmlicher Technik dargestellt. Schließlich werden die Ergebnisse der Anwendung der Konzentrations-Modulation auf die Detektion von Vancomycin aufgezeigt.

Das sechste Kapitel beschreibt einen weiteren, wichtigen Ansatz: Die Herstellung dünner Interaktionsschichten über der Oberfläche des Transducers.

## 2 Aufbau des Untersuchungs-Systems

### 2.1 Die Flußzelle

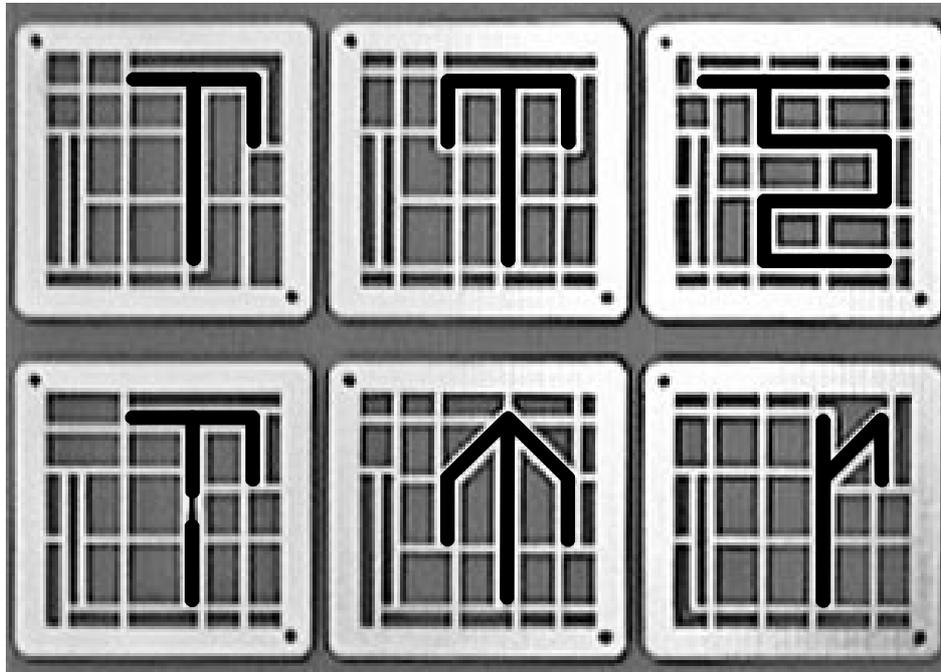
Als Methode zur Herstellung der Flußkanäle der  $\mu$ -FIA wurde die Leiterplattentechnik (PCB - Printed Circuit Board) gewählt, die bereits von Hans-Martin Schmitt im Rahmen seiner Diplom-Arbeit etabliert wurde ([28] und [29]). Hierzu wurde mit dem Leiterplatten-Entwurfsprogramm TANGO das Design dieser Kanäle mit den dazugehörigen Bohrlöchern für den Ein- und Austritt der Flüssigkeiten erstellt. Bild 3 zeigt ein Beispiel eines solchen Designs.



**Bild 3:** Beispiel der Struktur eines der in dieser Arbeit verwendeten  $\mu$ -FIA-Plättchens, links die Vorderseite, rechts die Rückseite. Der Zusatzkanal wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

Auf einer Leiterplatte wurden verschiedene Plättchen mit unterschiedlichen Kanalgeometrien entworfen. Die Firma Kern in Reutlingen machte aus dem Entwurf die fertige Platine, aus der dann die einzelnen quadratischen Plättchen mit einer Kantenlänge von 2.5 cm herausgesägt wurden. Es wurden verschiedene Kanal-Strukturen hergestellt, um Strömung und Diffusion bei unterschiedlicher Kanalgeometrie erforschen zu können. Einige dieser Strukturen sind auf Bild 4, das einen Ausschnitt aus der fertigen Platine zeigt, zu sehen. Die Platinen bestehen aus glasfasergewebeverstärktem Epoxidharz mit einer Auflage von 70  $\mu$ m Kupfer. Auf den geätzten Bahnen wurde 3  $\mu$ m Gold als Haftgrund für die Silicon-

Dichtung abgeschlossen. Da die Kanäle mit einer Breite von 1 mm versehen sind, ergibt sich insgesamt ein rechteckiger Kanalquerschnitt von  $1 \times 0.07 \text{ mm}^2$ . Auch die Rückseite der Plättchen wurde mit goldbelegten Kupferstrukturen versehen. Diese dienen ausschließlich der Abdichtung der Kanäle gegenüber dem Flußzellkörper.



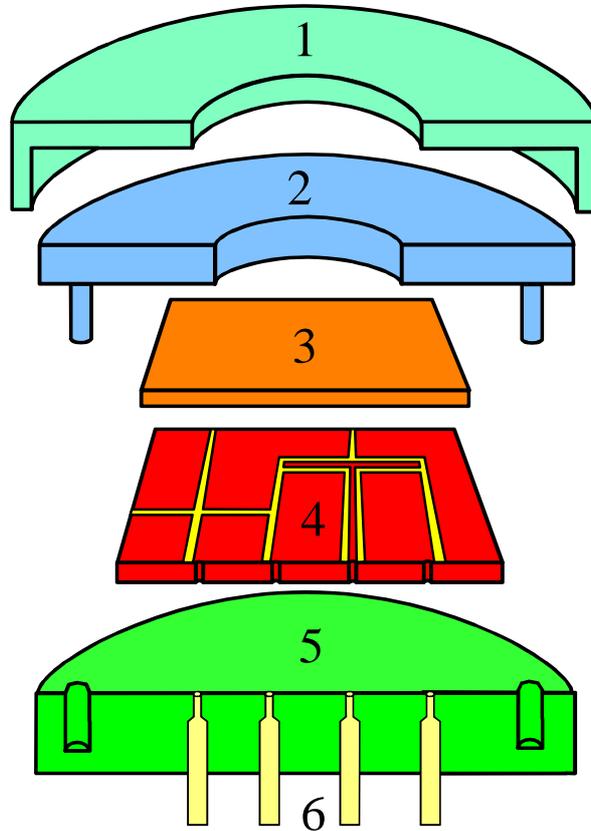
**Bild 4:** Ein Teil der Platine mit  $\mu$ -FIA-Strukturen.

Wichtig für das Verständnis dieses Designs ist die Tatsache, daß dieses  $\mu$ -FIA-Plättchen nur ein Teil der Flußzelle ist. Auf dem Plättchen selbst sind nur der Boden (der Platinengrund) und die Seitenwände des Kanals angebracht. Als Decke des Kanals dient ein Glasplättchen, der Transducer. In Bild 5 ist der Gesamtaufbau der Flußzelle dargestellt. Es gleicht einem Sandwich, in dessen Mitte sich das  $\mu$ -FIA-Plättchen befindet.

Die Fluidzuführung aus den Reservoirs geschieht über Stahlkapillaren mit 1 mm Innendurchmesser (in Bild 5 mit der Nummer 6 versehen), die in den Flußzellkörper, auf dem das  $\mu$ -FIA-Plättchen zu liegen kommt, eingepresst und geklebt worden sind. Die Flüssigkeiten müssen durch das Plättchen hindurch in die Kanalstrukturen (im Bild 3 sind die Kanalstrukturen grau unterlegt) ein- und auslaufen, dazu dienen die Bohrlöcher. Die Kanäle haben eine Breite von 1 mm, die Seitenwände eine von 0.5 mm, der Durchmesser der Bohrungen beträgt 0.5 mm.

Die Unterseite des Plättchens muß an den Stellen der Bohrungen gegen den Flußzellkörper abgedichtet werden. Daher wurden auch auf der Unterseite des  $\mu$ -

FIA-Plättchens PCB-Strukturen angebracht. Um jede der Bohrungen befindet sich eine vergoldete Kupferscheibe, die die Kontaktfläche zwischen dem Plättchen und dem Metall des Flußzellkörpers erhöht. Um eine gleichmäßige Auflage auf dem Flußzellkörper zu ermöglichen, wurden zusätzlich einige Stützstreben angebracht.



**Bild 5:** Schematischer Aufbau der Flußzelle, 1 = Überwurfmutter, 2 = Anpreßplatte, 3 = Glasplättchen (Transducer), 4 =  $\mu$ -FIA-Plättchen, 5 = Flußzellkörper, 6 = Stahl-Kapillaren.

Die Oberseite des  $\mu$ -FIA-Plättchens wurde ebenfalls zusätzlich zu den Kanalstrukturen mit zahlreichen Stützstreben versehen, um die Auflagefläche des Plättchens mit der Decke, die vom Transducer, einem Glasplättchen (in Bild 5 mit der Nummer 3 versehen) gebildet wird, möglichst weiträumig und gleichmäßig zu gestalten. Der in Bild 3 eingezeichnete Zusatzkanal wurde in dieser Arbeit nicht verwendet.

Der gesamte Flußzellkörper, der die  $\mu$ -FIA aufnehmen und mit den Flüssigkeits-Zu- und Ableitungen verbinden soll, wurde aus Edelstahl gefertigt. Einen Querschnitt durch die Halterung mit allen Bauteilen in ihrer Anordnung zeigt Bild 5. Neben dem eigentlichen Flußzellkörper (im Bild Nummer 5), auf dem das  $\mu$ -FIA-Plättchen zu liegen kommt, mit der Vorderseite, also den Kanalstrukturen, nach oben, wurde eine Anpreßplatte (im Bild Nummer 2) konstruiert. Diese presst

den Transducer (Nummer 3), der ja zugleich als obere Kanalbegrenzung für die  $\mu$ -FIA dient, auf das Leiterplättchen mit den Kanälen, letzteres wird dadurch auf den Flußzellkörper gedrückt. Die Anpress-Kraft wird mit einer Überwurfmutter erzeugt, die auf den Flußzellkörper geschraubt wird. In den Flußzellkörper eingepresste Stahlkapillaren übernehmen die Flüssigkeiten von den Reservoirien und führen sie von unten in die Kanäle der  $\mu$ -FIA ein bzw. übernehmen die Flüssigkeit wieder aus den Kanälen und leiten sie dem Abfallbehälter zu (Bild 7).

Die problematischen Punkte in dieser Bauweise sind der Übergang von dem Flußzellkörper in das  $\mu$ -FIA-Plättchen und die Decke des Plättchens. Hier muß sorgfältig abgedichtet werden, was im nächsten Abschnitt beschrieben werden soll.

Sowohl die Überwurfmutter als auch die Anpress-Platte sind in der Mitte mit einer runden Öffnung versehen, durch die hindurch die Kanäle sicht- und beobachtbar werden. Die gesamte Flußzelle ruht auf einem quadratischen Tisch mit vier Edelstahlbeinen. Dadurch entsteht unter der Flußzelle ein Arbeitsraum, in dem Silicon-Schläuche auf die Stahlkapillaren gesteckt werden können.

## 2.2 Die Abdichtung der Flußzelle

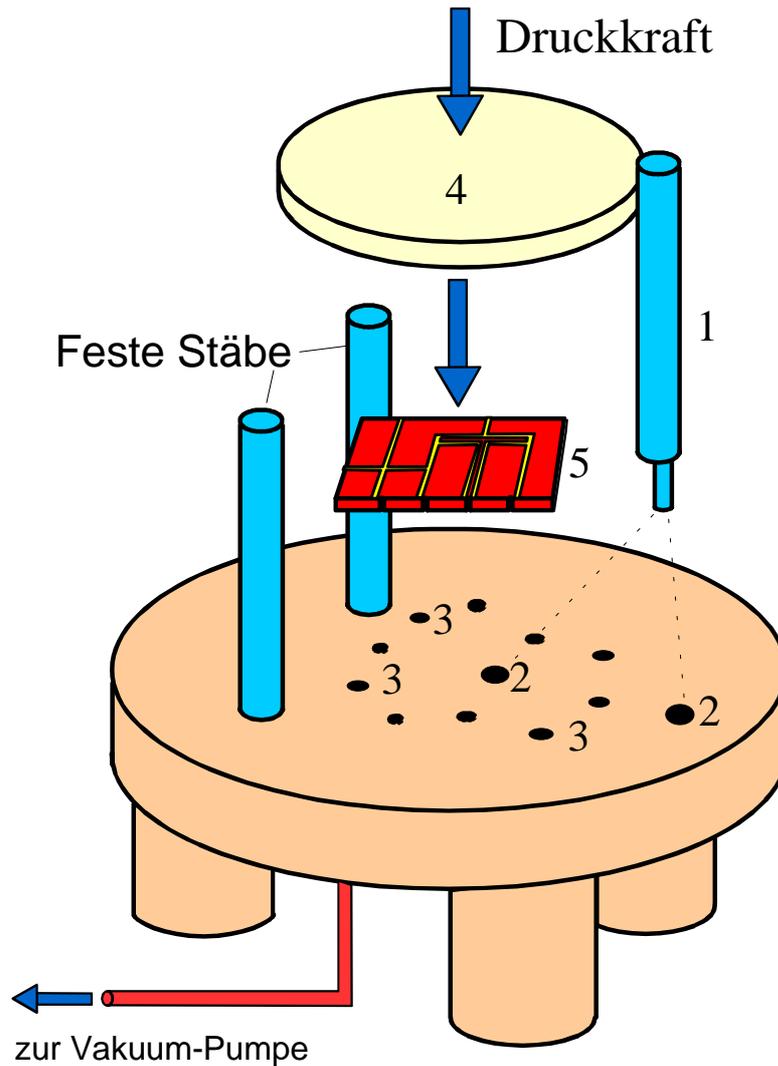
Kritische Stellen der Flußzelle sind die Übergänge vom Flußzellkörper zum  $\mu$ -FIA-Plättchen und die Berührungsflächen der Kanalwände mit dem Glas-Transducer. Hier muß abgedichtet werden. Dazu wird die Goldoberfläche der Strukturen des Plättchens auf beiden Seiten einer speziellen chemischen Behandlung unterzogen. Als Dichtungssubstanz wurden Siloxane, und zwar das Siloxanmonomerenmisch VP 1529 der Firma Wacker, Burghausen, verwendet, ähnlich wie in [28] beschrieben. Diese Siloxane werden auf der Goldoberfläche polymerisiert. Um die Polysiloxane wiederum fest mit der Goldoberfläche zu verbinden, wurden Thiole verwendet, die mit ihrer SH-Gruppe eine starke kovalente Verbindung mit Gold-Oberflächen eingehen.

Das  $\mu$ -FIA-Plättchen wird zunächst für ein paar Stunden in Toluol gereinigt. Kein einziges Schmutzpartikelchen darf auf den kritischen Stellen noch verbleiben, denn in diesem Fall würde die Polymer-Abdichtungsschicht ein Loch bekommen. Dann werden die Plättchen 6 h lang in eine 1%ige Lösung von 1-Phenylethanthiol in Toluol gelegt. Hierbei bildet sich ein Monolayer von Thiolen auf der Goldoberfläche aus. Dann werden die Plättchen für einen Tag in reinem Toluol geschüttelt, um alles nicht gebundene Thiol zu entfernen. Schließlich werden die Plättchen getrocknet.

Nun folgt der schwierigste Schritt der gesamten Prozedur, die Auftragung der Siloxan-Monomere. Diese müssen in einer möglichst dünnen Schicht ausschließlich auf die Goldoberfläche der Kanalstrukturen, Stützstreben und Abdichtungsscheiben des Plättchens aufgetragen werden und dürfen auf keinen Fall in die Kanäle selbst gelangen, da sie diese mit einer Höhe von nur 70  $\mu\text{m}$  sofort irreversibel verstopfen würden. Zur Vermeidung dieser Probleme wird die Stempel-Technik angewendet. Auf einen Spin-Coater der Firma Convac, Wiernsheim, Modell Convac 1001, wird dazu eine Borosilicat-Glasscheibe der Firma Edmund Scientific gelegt. Es wurden zwei verschieden dimensionierte Scheiben verwendet, eine große ( $\varnothing$  75 mm, Dicke 6.5 mm) und eine kleine ( $\varnothing$  50 mm, Dicke 3.3 mm). Dann wird das Siloxan-Monomeren-Gemisch in die Mitte der Scheibe pipettiert. Der Spin-Coater dreht sich daraufhin mit 2000 rpm und verteilt die Siloxane in einer dünnen Schicht gleichmäßig auf der Oberfläche der Scheibe.

Jetzt müssen die Siloxane auf das  $\mu$ -FIA-Plättchen übertragen werden. Der Übertrag darf ausschließlich die nur 70  $\mu\text{m}$  über dem Untergrund liegenden Strukturen betreffen, d. h. beim Übertrag darf die Glasscheibe nicht verrutschen, sonst würden die Monomere in die Kanalbereiche gelangen. Ein weiteres Problem erwächst aus der Tatsache, daß beide Seiten des Plättchens mit den Monomeren belegt werden müssen, daher mußte ein völlig neuer Apparat konstruiert werden, mit dem diese Probleme überwunden werden konnten.

Bild 6 zeigt diesen Apparat und zugleich schematisch seine Arbeitsweise. Die Plättchen müssen in ihrer Position exakt fixiert werden, dazu sind an dem Apparat (im wesentlichen eine 12 cm große Scheibe mit etlichen Bohrungen, drei langen Beinen und drei Festhalte-Stäben) Bohrlöcher angebracht, die von unten mit Kupferröhrchen versehen sind, an die Schläuche angeschlossen werden können, die mit einer Vakuum-Pumpe (Wasserstrahlpumpe) verbunden werden. Durch den auf die Unterseite des Plättchens wirkenden Unterdruck wird das Plättchen fest auf die Metallscheibe gedrückt. Aber nicht nur das Plättchen, auch die Glasscheibe darf keine seitlichen Verrückungen erfahren, dazu wurden drei Festhalte-Stäbe an dem Apparat angebracht. Zwei der Stäbe sind schon fest mit der Metallscheibe verschraubt, ein dritter ist mit einer exzentrischen Verankerung versehen, durch die er dem Durchmesser der Glas-Scheibe exakt angepaßt werden kann. Die Glasscheibe wird horizontal zwischen die Stäbe positioniert und dann unter Führung der Stäbe vorsichtig auf das Plättchen abgesenkt. Ein auf die Glasscheibe gelegtes Gewicht sorgt für die benötigte Druckkraft, unter der der Übertrag der Siloxan-Monomere auf die Strukturen des  $\mu$ -FIA-Plättchens erfolgt. Nach ein paar Minuten wird die Glasscheibe vorsichtig entfernt.



**Bild 6:** Der Apparat, mit dem die Monomere des Siloxans von der Glasscheibe auf die Goldbahnen des  $\mu$ -FIA-plättchens übertragen wurden. Der Apparat hat einen Durchmesser von 12 cm. **1** Beweglicher Stab mit exzentrischem Stift, **2** Bohrlöcher für den beweglichen Stab, **3** Bohrlöcher für das Anlegen des Vakuums, **4** Glasscheibe mit 50 oder 75 mm Durchmesser, **5**  $\mu$ -FIA-Plättchen.

Das Plättchen wird im Anschluß in eine staubfreie Kammer in einem Reinraum gelegt und mit UV-Licht 12 Stunden lang bestrahlt. Dann wird die Coating- und Stempel-Prozedur für die andere Seite des Plättchens durchgeführt.

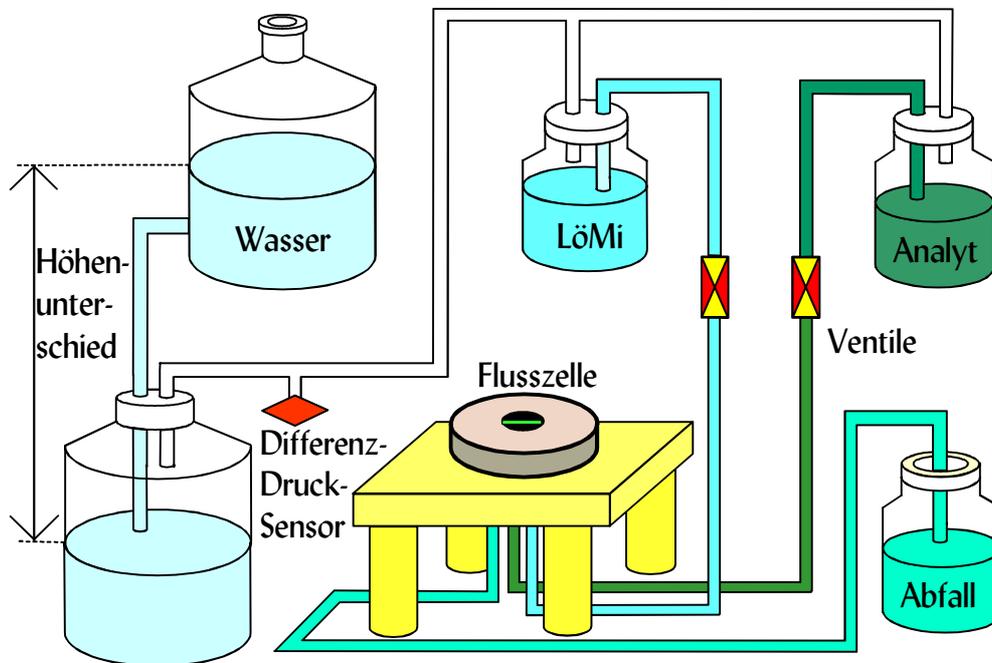
## 2.3 Durchfluß und Modulation

Für die Modulation der Probe müssen abwechselnd aus dem Probenbehälter und einem Lösungsmittelbehälter kleine Volumina in die Flusszelle injiziert werden. Dazu muß auf die Flüssigkeiten in den Behältern ein Druck ausgeübt werden, der höher ist als der Druck in der Atmosphäre. Damit die Modulation völlig gleichförmig ist, muß unter anderem sichergestellt werden, daß dieser (leichte) Überdruck ständig konstant bleibt. Dies garantiert gleiche Volumina und gleiche Strömungsgeschwindigkeiten während der gesamten Dauer des Experiments. Eine Pumpe wurde nicht verwendet, auch wenn die Entwicklung von Mikropumpen schon weit gediehen ist [30], doch eine exakt gleichmäßige Pumpleistung ist mit den handelsüblichen Pumpen (noch) nicht zu erreichen.

Zunächst wurde versucht, eine Druckanlage für Lösungsmittel der Firma Sycam, wie sie für die HPLC üblich ist, für die Fluid-Injektion zu benutzen. Argon wurde mit Überdruck auf die Reservoirs für Analyt und Lösungsmittel gegeben. Der Nachteil dieses Verfahrens war eine ständige Schwankung des Druckes bei den niedrigen Werten, die für die Experimente gebraucht wurden (um 100mbar herum). So wurde als Alternative ein hydrostatischer Druck als Überdruck auf die Reservoirs geleitet. Den prinzipiellen Aufbau dieser Druckregelanlage im Zusammenhang mit dem Gesamtsystem zeigt Bild 7. Ein großer Behälter mit Wasser wird mit einem weiteren Behälter durch einen Schlauch verbunden und auf eine kleine Hebebühne gestellt (diese Hebebühne ist in Bild 7 nicht mit eingezeichnet). Durch die leicht einstellbare Höhendifferenz wird auf den unteren Behälter Druck ausgeübt. Dieser Druck wird nun direkt (pneumatisch) auf die Reservoirs übertragen. Da die Flußraten nur im Bereich von einigen 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  liegen und das auf der Hebebühne ruhende Gefäß ein recht hohes Fassungsvermögen von einigen 10 l besitzt, bleibt der Druck über den Reservoirs viele Stunden lang konstant.

Der Druck wird mit einem Differenzdruck-Sensor gemessen, der die Druckdifferenz zwischen dem System und der Atmosphäre ermittelt. Der Sensor wurde von der Firma Motorola bezogen. Es war ein Sensor des Typs MPX5100DP. Die maximal meßbare Druckdifferenz ist 100 kPa, das entspricht etwa Atmosphärendruck. Bei diesem maximalen Druck gibt der Sensor, der mit einer AD-Wandlerkarte des Typs DAS1700 der Firma Keithley verbunden und mit einem TESTPOINT-Programm (TESTPOINT ist eine Labor-Programmiersprache, entwickelt von der Firma Keithley) ausgelesen wurde, ein Signal von 4,5 V ab. Die Sensitivität des Sensors beträgt nach Herstellerangaben 45mV pro kPa bei einer Genauigkeit von 2,5%.

Für die Modulation wurden die Flüssigkeitsströme periodisch und wechselseitig unterbrochen. Dazu wurde mit Ventilen der Firma Takasago Electric Inc. vom Typ PM-0815W gearbeitet. Diese Ventile waren in der Lage, das dauernde An- und Ausschalten über Stunden hinweg im Sekundenrhythmus problemlos zu verkraften.

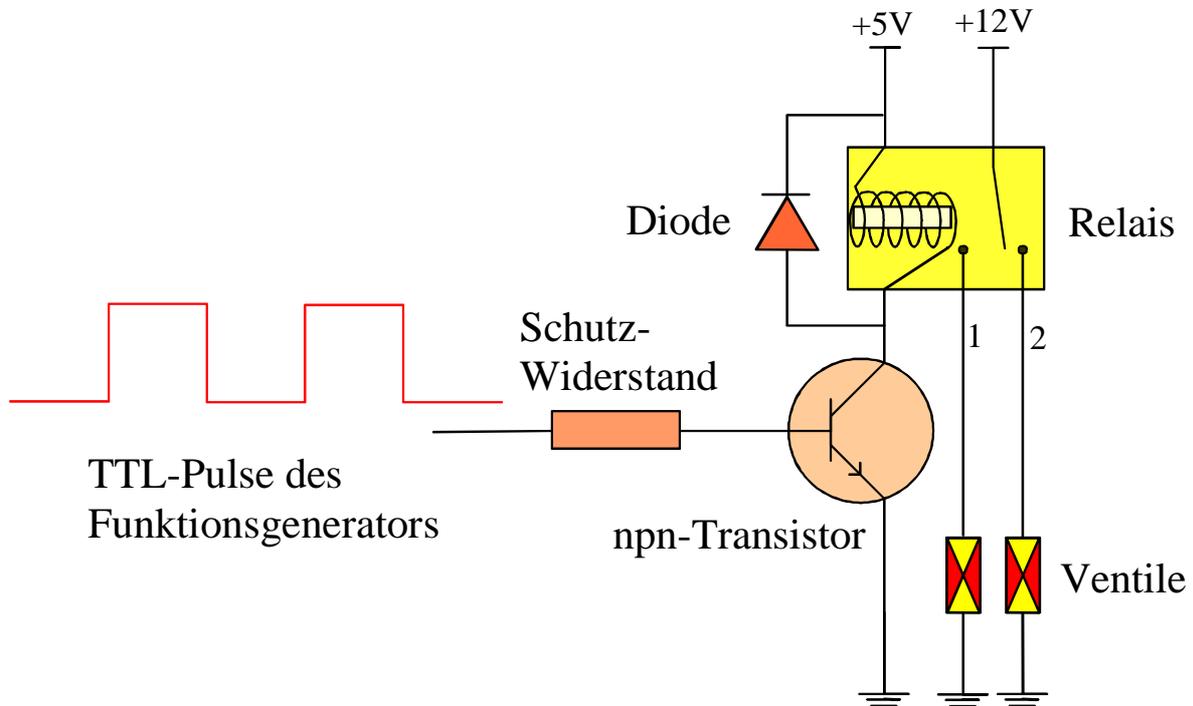


**Bild 7:** Aufbau der Gesamtanlage mit Flußzelle, Probenzuführungen und Druckregelung.

Die Steuerung des Ein- und Ausschaltens wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt: Zunächst wurde eine Relaiskarte an den Computer angeschlossen und mit entsprechenden TESTPOINT-Befehlen wurden zwei Relais, die mit je einem Ventil verbunden waren, gesteuert. Für die Messungen mit dem Lock-In-Verstärker erwies sich diese Methode jedoch als unzureichend, da der Lock-In-Verstärker selbst durch die Relaiskarte seine Referenz-Frequenz erhalten mußte (siehe Abschnitt 2.6) und die Pulse, die letztlich vom Computer über das Testpoint-Programm zur Relaiskarte liefen, nicht immer die genau gleiche Dauer hatten. Die zeitliche Konstanz der Pulse war völlig unzureichend. Der Lock-In-Verstärker konnte so nicht auf die Referenzfrequenz einrasten.

Da der verwendete Lock-In-Verstärker einen Funktionsgenerator (für die interne Referenz-Frequenz) besaß, wurde die Ventilsteuerung dem Lock-In-Verstärker selbst übertragen. Dazu mußte ein kleines Verbindungsmodul konstruiert werden, dessen Schaltung in Bild 8 gezeigt ist. Die TTL-Pulse werden über einen Schutzwiderstand einem Transistor zur Verstärkung zugeführt. Wenn der Puls selbst ankommt, leitet der Transistor den Strom, das Relais schaltet dann Ventil 1

zu und gleichzeitig Ventil 2 auf. In der spannungslosen Phase leitet der Transistor keinen Strom, das Relais schaltet Ventil 1 auf und Ventil 2 zu. Mit dieser Methode kam der Lock-In nicht mehr aus dem Takt, da er ja selbst den Takt angab.

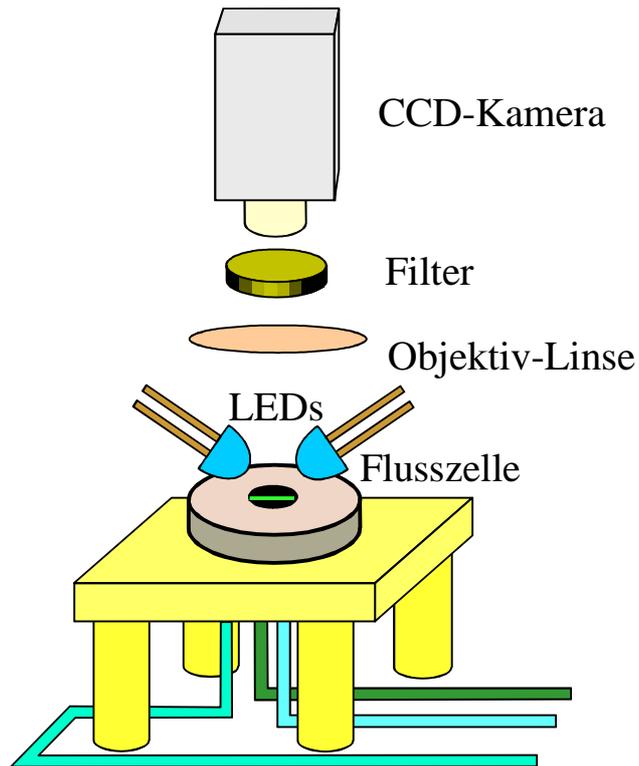


**Bild 8:** Schaltplan des Verbindungselements zwischen Funktionsgenerator des Lock-In-Verstärkers und den Ventilen.

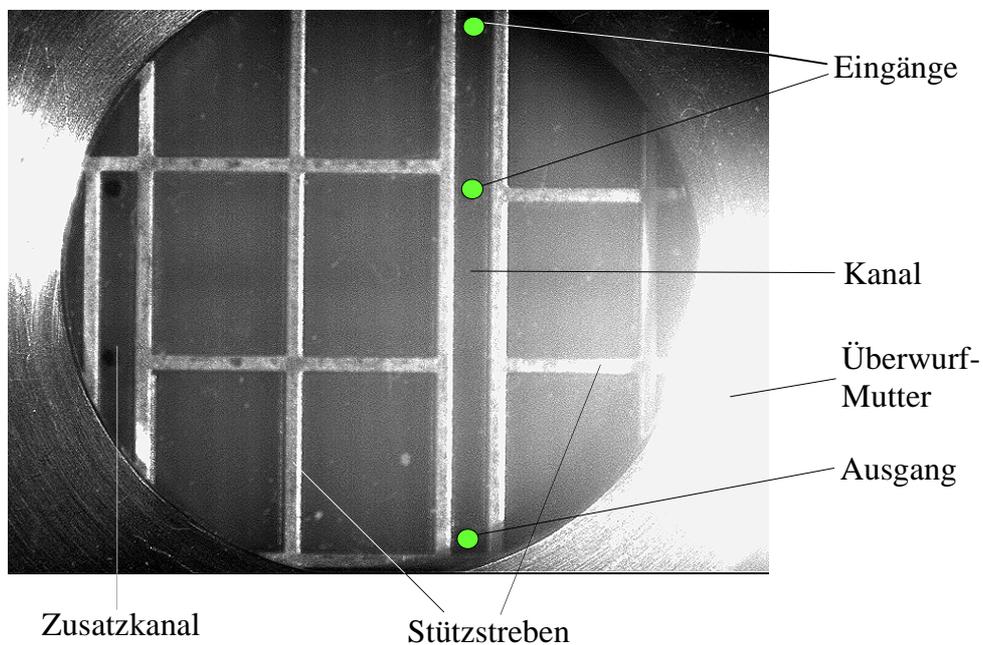
## 2.4 Versuchsaufbau mit CCD-Kamera

Zur Charakterisierung des Systems wurde eine CCD-Kamera der Firma Hitachi Denshi, Ltd., Modell KP-M2E/K, verwendet. Bild 9 zeigt schematisch den Versuchsaufbau mit dieser Kamera, hier mit den zusätzlichen Bauteilen für den Fluoreszenz-Farbstoff Fluorescein.

Die Kamera sieht durch die Öffnungen der Anpreßplatte und der Überwurfmutter hindurch direkt auf die Mikrokanäle (Bild 10). Je nach Stellung der Objektivlinse wird der Mikrokanal im Überblick vollständig oder nur ein Teil des Kanals genau von der Kamera erfaßt.



**Bild 9:** Die CCD-Kamera beobachtet die Vorgänge in den Mikrokanälen der Flusszelle. Als Testsubstanz ist hier Fluorescein gewählt.



**Bild 10:** Blick mit der CCD-Kamera auf die Flusszelle. Durch die Öffnung von Überwurfmutter und Anpreßplatte hindurch erscheint das  $\mu$ FIA-Plättchen mit seinen vergoldeten Kupferstrukturen. Die Eingänge sowie der Ausgang sind zur Verdeutlichung hervorgehoben.

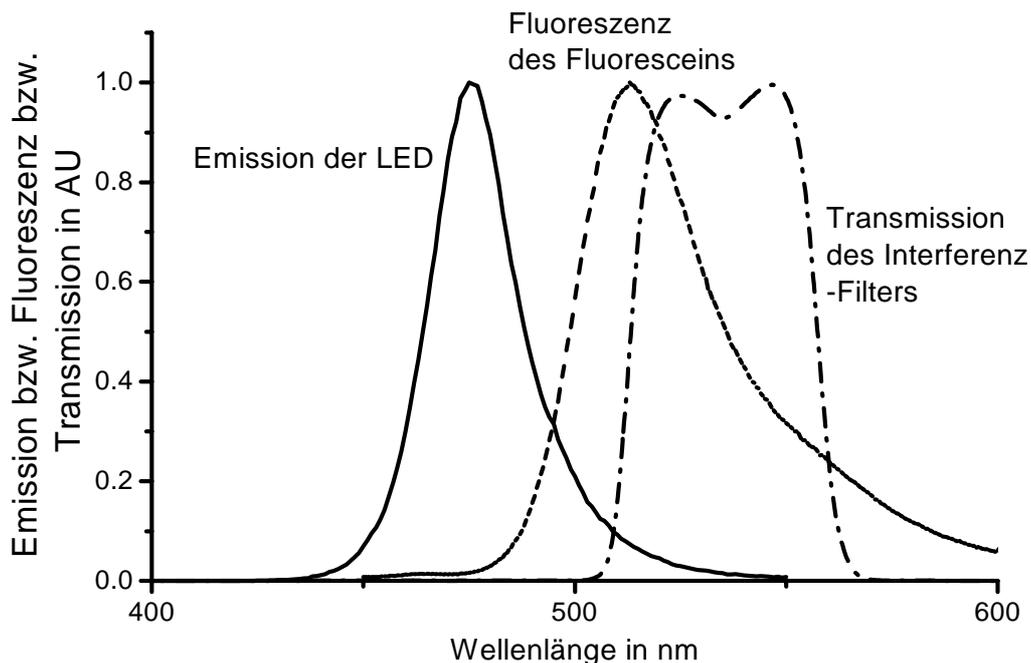
Als Testfarbstoffe fanden Indigocarmin wegen seines Absorptionskontrastes und Fluorescein wegen seiner Fluoreszenz Verwendung. Für Indigocarmin wurde eine Rundumbeleuchtung der Flußzelle mit vier 20W-Halogenstrahlern konstruiert. Die vier Lämpchen wurden auf einem Ring verteilt, der zwischen der Flußzelle und der Kamera positioniert wurde. Damit konnte eine halbwegs gleichmäßige Ausleuchtung der Mikrokanäle erreicht werden.

Für die zweite Testsubstanz zur Charakterisierung des Systems, Fluorescein, wurde eine Anregungslichtquelle gebraucht, die hauptsächlich kurzwelliges Licht ausstrahlt. Es wurden blaue Leuchtdioden der Firma Conrad verwendet, die Licht bei 475 nm abstrahlen. Die I-U-Kennlinie dieser Leuchtdioden wurde vermessen. Die Schwellenspannung beträgt etwa 2.5 V, dann folgt der steile, lineare Teil der Kennlinie. Laut Angaben des Herstellers darf durch die Dioden nicht mehr als 20 mA Strom fließen. Daher muß der Strom sorgfältig gesteuert werden. Das Emissions-Spektrum der Dioden ist in Bild 11 gezeigt. Das Maximum der Emissionsintensität liegt bei etwa 475 nm.

Das Licht der Diode fällt auf die Fluorescein-Moleküle im Mikrokanal. Diese geben Licht einer höheren Wellenlänge ab, das Emissionsspektrum des Fluoresceins ist ebenfalls in Bild 11 dargestellt.

Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt ein Problem auf: Das Licht der Photodiode darf nicht in die CCD-Kamera gelangen, da sonst außer dem Licht der Photodiode nichts weiter sichtbar wäre (Übersteuerung der CCD-Kamera). Es muß ein Filter eingesetzt werden. Dieser Filter sollte allerdings das Fluoreszenz-Licht des Fluoresceins durchlassen. Die Spektren der LED und des Fluoresceins überlappen jedoch im Bereich zwischen 480 und 510 nm recht stark. So mußte ein Kompromiß gefunden werden, der nicht zu viel Licht der LED durchläßt, aber auch nicht zu wenig Licht des Fluoresceins in die Kamera gelangen läßt. Zahllose Filtertypen wurden getestet. Die besten Eigenschaften zur Lösung des Problems hatte ein Interferenzfilter der Firma Melles Griot vom Typ 03 FIV 311. In Bild 11 ist die Transmission dieses Filters im Vergleich zur Emission der Leuchtdiode und der Fluoreszenz des Fluoresceins dargestellt.

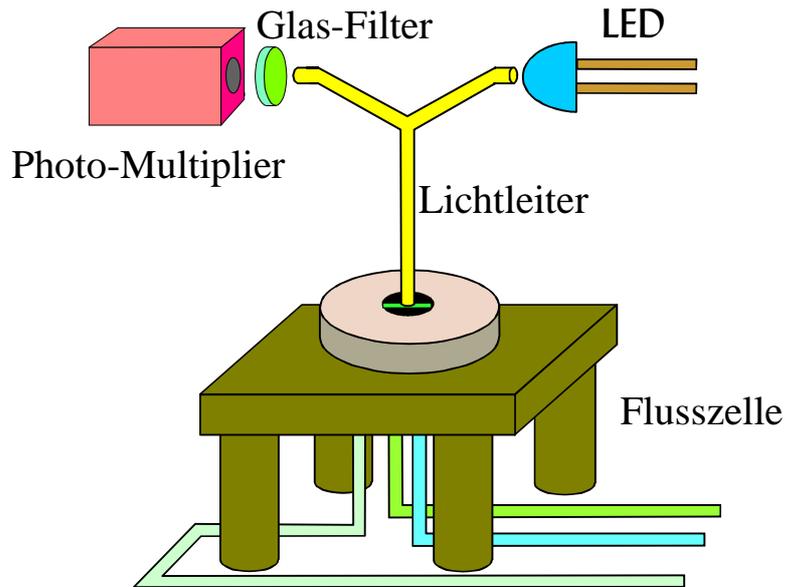
Der Interferenz-Filter schneidet nicht nur das Licht der LED ab, im langwelligen Bereich wird ab 560 nm ebenfalls abgeschnitten, was die Beobachtungsbedingungen weiter verbessert, da die Abschirmung der Apparatur vor Umgebungslicht nur unvollkommen möglich war. Meist wurden vier LEDs gleichzeitig benutzt, um eine möglichst homogene Ausleuchtung der Mikrokanäle zu gewährleisten (die LEDs hatten einen Abstrahlwinkel von nur 13°).



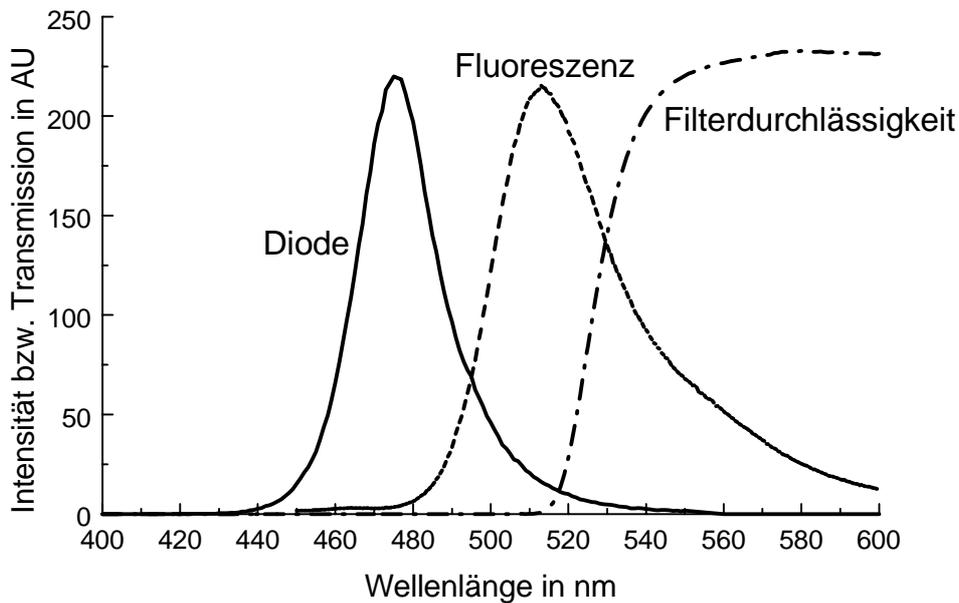
**Bild 11:** Diagramm, in dem die Transmission des Interferenz-Filters mit der Emission der Leuchtdiode und der Fluoreszenz des Fluoresceins verglichen wird.

## 2.5 Der Versuchsaufbau mit Photomultiplier

Ein Nachteil der CCD-Kamera ist die geringe zeitliche Auflösung von nur 0.04 s. Die vorgesehenen Modulationsfrequenzen befinden sich im Bereich zwischen 0.1 und 10 Hz, das bedeutet eine Periode von 0.1 bis 10 s. Mit der CCD-Kamera sind dann für die höheren Frequenzen nur wenige Messungen in einer Periode durchführbar. Ein weiterer Nachteil ist die geringe Empfindlichkeit. Um Konzentrationen im  $\mu\text{M}$ -Bereich zu messen, reicht die CCD-Kamera nicht aus. So wurde als zweites Meßgerät ein Photomultiplier der Firma Hamamatsu (Modell H5783) an die Flußzelle angeschlossen. Der Multiplier wird durch Lichtleiter in einem komplett abgedunkelten Raum mit dem Fluoreszenz-Licht verbunden. Schematisch sieht dies wie in Bild 12 aus: Die blaue Photodiode leuchtet jetzt nicht mehr direkt in den Mikrokanal, sondern in einen Y-förmigen Lichtleiter, der das Licht auf einen Punkt des Kanals wirft. Das angeregte Fluorescein emittiert Fluoreszenz-Licht, das wieder in den Lichtleiter gelangt und in den Photomultiplier geführt wird. Über eine A/D-Wandlerkarte (DAS1700) werden die Meßwerte durch ein TESTPOINT-Programm aufgenommen und in eine Datei abgelegt.



**Bild 12:** Versuchsaufbau mit Photomultiplier.



**Bild 13:** Die Transmission des Filters OG530 im Vergleich zur Emission der Diode und der Fluoreszenz des Fluoresceins.

Als Filter zwischen dem Fluorescein und dem Photomultiplier wurde nicht auf den Interferenzfilter im Aufbau mit der CCD-Kamera zurückgegriffen, da die Abschirmung von Fremdlicht- im Gegensatz zu dem Aufbau mit CCD-Kamera -

hier recht gut gestaltet werden konnte. Es wurde ein Kantenfilter aus Glas der Firma Schott (ein OG530) eingesetzt. Das Transmissionsvermögen dieses Filters ist in Bild 13 im Vergleich zum Emissionsspektrum der Photodiode und zum Fluoreszenzspektrum des Fluoresceins gezeigt.

Der größte Nachteil des Photomultipliers ist das mangelnde räumliche Auflösungsvermögen. Es wird über die gesamte Fläche des Lichtleiters gemittelt (etwa 1 mm<sup>2</sup>), so daß die viel größere zeitliche Auflösung mit einer viel kleineren räumlichen erkaufte werden muß. Die Aufnahme eines Flußprofiles ist mit dieser Technik nicht möglich, aber - da dies mit der CCD-Kamera gemacht wurde - auch nicht nötig.

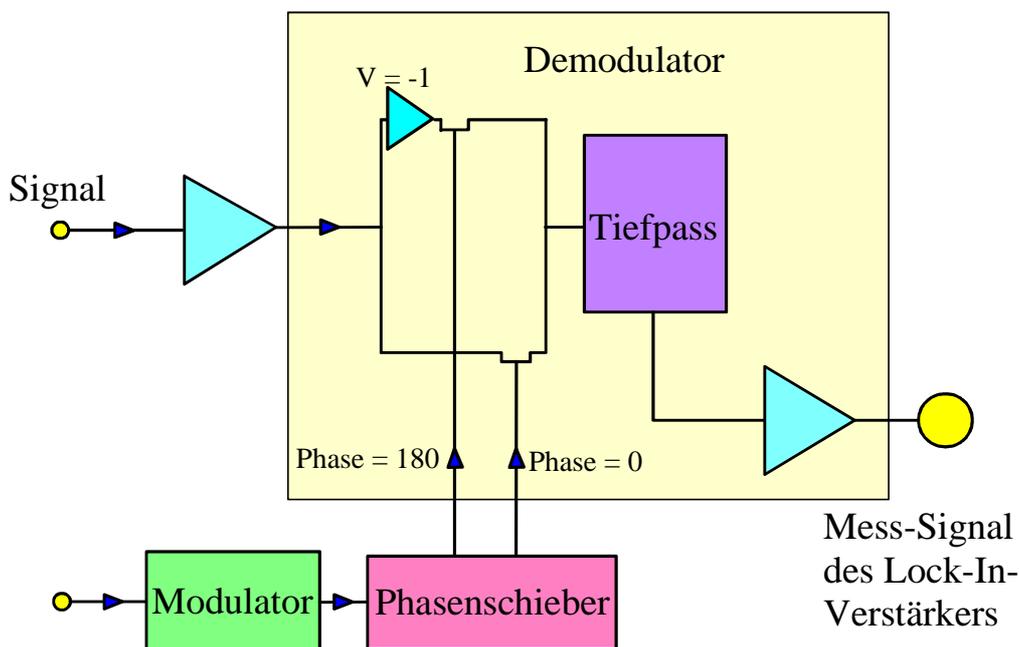
## 2.6 Der Lock-In-Verstärker

Wie in der Einleitung schon erwähnt, ist das Kernstück dieser Arbeit die Untersuchung der Möglichkeiten, die eine Modulation der Konzentration des Analyten mit sich bringt. Die Konzentration des Analyten wird periodisch mit Frequenzen im Bereich 0.1 bis 10 Hz variiert. Der Transducer liefert dann ein Signal, das sich ebenfalls periodisch ändert, natürlich nur unter der Voraussetzung von mehr oder weniger vollständiger Reversibilität. Diese Bedingung ist nicht immer erfüllt (siehe Einleitung). Ist sie aber erfüllt, so kann durch ein geeignetes Meßgerät die in dem periodischen Signal enthaltene Information mit hoher Empfindlichkeit ausgelesen werden. Ein solches Gerät steht schon seit langer Zeit [31] in vielerlei Anwendungen in Physik und Technik zur Verfügung [32]. Es handelt sich um den Lock-In-Verstärker. Er wird häufig in der Strahlungsmeßtechnik eingesetzt. Hierbei wird die Intensität der Eingangsstrahlung moduliert und in den Lock-In-Verstärker wird das Signal eines Detektors (z. B. eines Photomultipliers) eingespeist. Im Falle dieser Arbeit wird nun nicht die Beleuchtung moduliert, sondern die Konzentration des Analyten. Diese Vorgehensweise führt zu einem modulierten Signal eines Transducers. Es wird hier also die in einer anderen Form schon gut etablierte Lock-In-Technik in analoger Weise auf eine neue Methode angewendet.

Was sind die Vorteile einer solchen Vorgehensweise? Zunächst einmal entgeht man einem sehr weit verbreiteten Problem in der Mess-Technik, der Drift. Alle Mess-Geräte neigen zu Drift-Problemen, das Signal ändert sich im Laufe der Zeit, obwohl sich an der zu messenden Größe nichts ändert. Hervorgerufen wird diese Drift durch Temperaturschwankungen, elektromagnetische Störungen etc. Wird nun das Signal moduliert, so kann der Einfluß der Drift ausgeschaltet werden, da diese ja nicht mitmoduliert wird. Dies ist ein bedeutungsvoller Punkt

gerade in Hinblick auf das on-line-Monitoring von biotechnologischen Prozessen durch Biosensoren. Denn auch Biosensoren zeigen Drift, was besonders bei stunden- und tagelangem Gebrauch immer störender wird. Durch Einsatz der Modulationstechnik kann dieses Problem vollständig beseitigt werden.

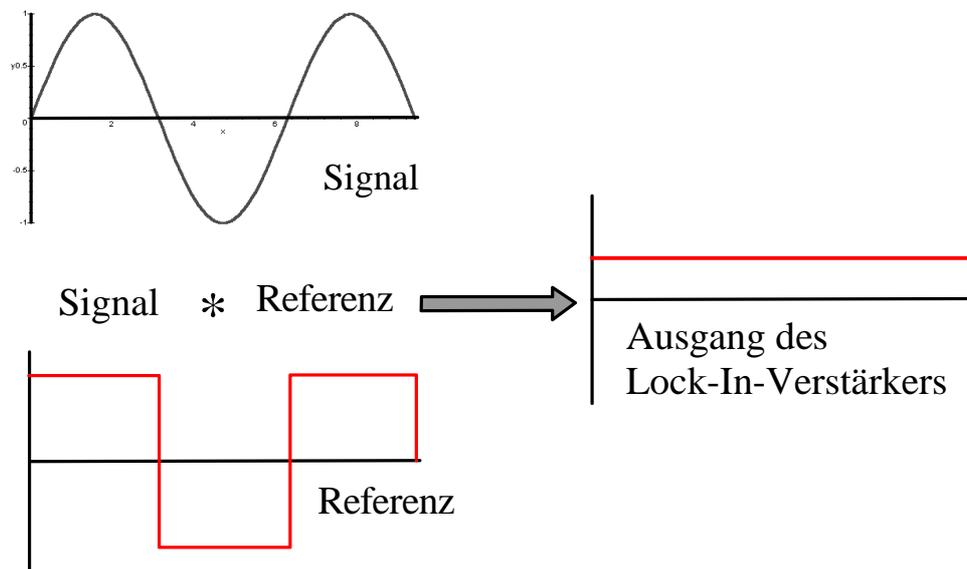
Die Driftbeseitigung ist jedoch nicht der einzige Vorteil dieser Technik. Der vielleicht größte Vorteil ist das stark verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis. Zum besseren Verständnis dieser Zusammenhänge zeigt Bild 14 ein Schema des Aufbaus eines Lock-In-Verstärkers.



**Bild 14:** Schema des Aufbaus eines Lock-In-Verstärkers. Erläuterungen im Text.

Der Lock-In-Verstärker ist so aufgebaut, daß er nur das modulierte Signal mit der gewählten Modulationsfrequenz verstärkt, alle anderen Frequenzen, die sonst noch aus dem Meßgerät kommen, die mit der zu messenden Größe nichts zu tun haben (alle Störungen durch Rauschen) mitteln sich heraus. Dazu benötigt der Lock-In-Verstärker zusätzlich zum Signal-Eingang noch einen Referenz-Eingang, über den ihm die gewünschte (Referenz-)Frequenz zugeführt wird. Die Referenz-Frequenz wird typischerweise mit einem Funktionsgenerator erzeugt, der zugleich auch die Modulation des Eingangssignals übernimmt. In dieser Arbeit wurde der in dem benutzten Lock-In-Verstärker (das Modell SR830 DSP Lock-In Amplifier der STANFORD RESEARCH SYSTEMS) eingebaute Funktionsgenerator zur elektronischen Steuerung der Ventile verwendet (siehe Abschnitt 2.3). Das Referenz-Signal wird vom Modulator abgenommen und über einen Phasenschieber zum

Demodulator geleitet. Dort wird das Eingangssignal mit dem phasenverschobenen Referenzsignal multipliziert. Dieses Produkt wird durch einen Tiefpaß-Filter geschickt, der die hochfrequenten Teile nicht durchläßt.



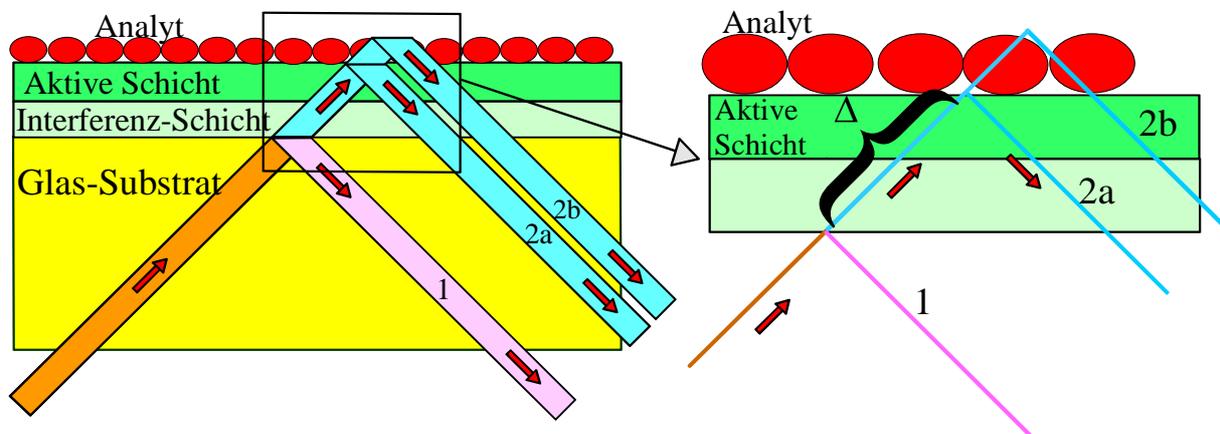
**Bild 15:** Arbeitsweise des Lock-In-Verstärkers. Die x-Achsen sind immer Zeitachsen, die y-Achsen zeigen Spannungen bzw. Stromstärken.

Die niederfrequenten Anteile ergeben genau dann ein vom Rauschen verschiedenes Signal, wenn die Referenz- mit der Signalfrequenz übereinstimmt. Wenn also die Rauschanteile nicht sehr nahe bei der Modulationsfrequenz liegen, werden sie vollständig unterdrückt. Das Ausgangssignal des Lock-In-Verstärkers ist ein konstanter Wert, der dem Effektivwert des modulierten Signals proportional ist. Bild 15 zeigt schematisch die Arbeitsweise des Lock-In-Verstärkers, das Signal ist eine Sinusfunktion, hier ohne Rauschen dargestellt, die Referenz ist eine Rechteckfunktion, das Ergebnis bzw. der Ausgang des Lock-In-Verstärkers liefert einen konstanten Wert, proportional dem Effektiv-Wert des Signals.

In Bild 15 ist die Signalfunktion völlig unverrauscht, doch können mit dem Lock-In-Verstärker auch dann noch (modulierte) Signale wahrgenommen werden, wenn sich diese vom Rauschuntergrund kaum oder gar nicht abheben, sogar, wenn das Rauschen größer ausfällt als das Signal. Daher eignet sich diese Methode auch zur Erweiterung der Nachweisgrenze in der Biosensorik wie in Abschnitt 5.6 noch gezeigt werden wird.

## 2.7 Die Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie

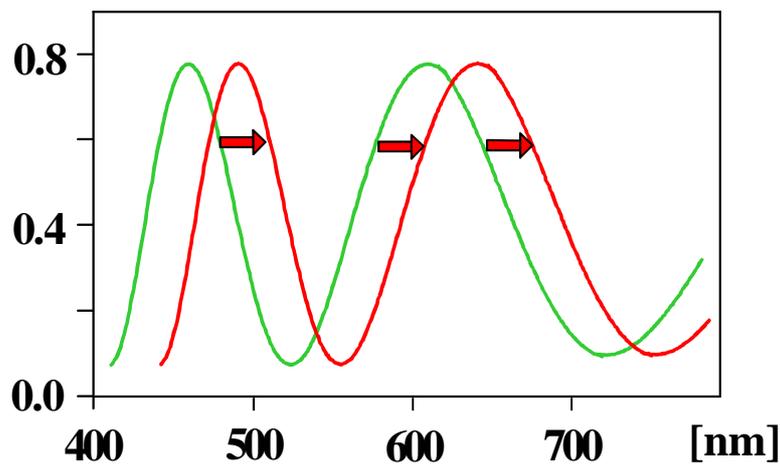
In der vorliegenden Arbeit wurde neben den Fluoreszenz-Messungen auch die Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (RIfS) verwendet. Grundlage dieser Methode ist die Mehrfachreflexion an dünnen Schichten ([33], [34] und [35]). Bild 16 zeigt das Grundprinzip dieser Methode: Als Transducer wird ein Glasplättchen verwendet, das eine spezielle, 500 nm dicke Interferenzschicht aus Siliciumdioxid trägt.



**Bild 16:** Zum Prinzip der Reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie.

Auf der Interferenzschicht wird die biochemisch aktive Schicht aufpräpariert. An dieser Schicht bleiben nun die Analytmoleküle (in Bild 16 dargestellt als dunkle Figuren mit elliptischer Form) hängen und erhöhen dadurch die Dicke der Interferenzschicht (das Siliciumdioxid hat denselben Brechungsindex  $n = 1.4$  wie große Biomoleküle). Wird nun durch Glasplättchen und Interferenzschicht weißes Licht geleitet, so wird an der Grenzschicht Glas-SiO<sub>2</sub> und an der Grenzschicht SiO<sub>2</sub>-Wasser ein Teil dieses Lichtes jeweils reflektiert, in Bild 16 kommt Teilstrahl 1 von der Grenze Glas-SiO<sub>2</sub>, Teilstrahl 2a von der Grenze SiO<sub>2</sub>-Wasser, solange keine Analyt-Moleküle adsorbiert sind. Die Teilstrahlen 1 und 2a haben einen unterschiedlich langen Weg zurückgelegt, bei senkrechtem Einfall, wie er in der Praxis gewählt wird, hat Teilstrahl 2a die Interferenz- und die aktive Schicht zweimal durchquert, also ist die Weglängendifferenz  $\Delta$  der beiden Teilstrahlen gleich der doppelten Dicke dieser beiden Schichten. Werden die beiden Teilstrahlen durch eine Linse wieder zusammengebracht, so interferieren sie miteinander. Da weißes Licht benutzt wird, sind alle sichtbaren

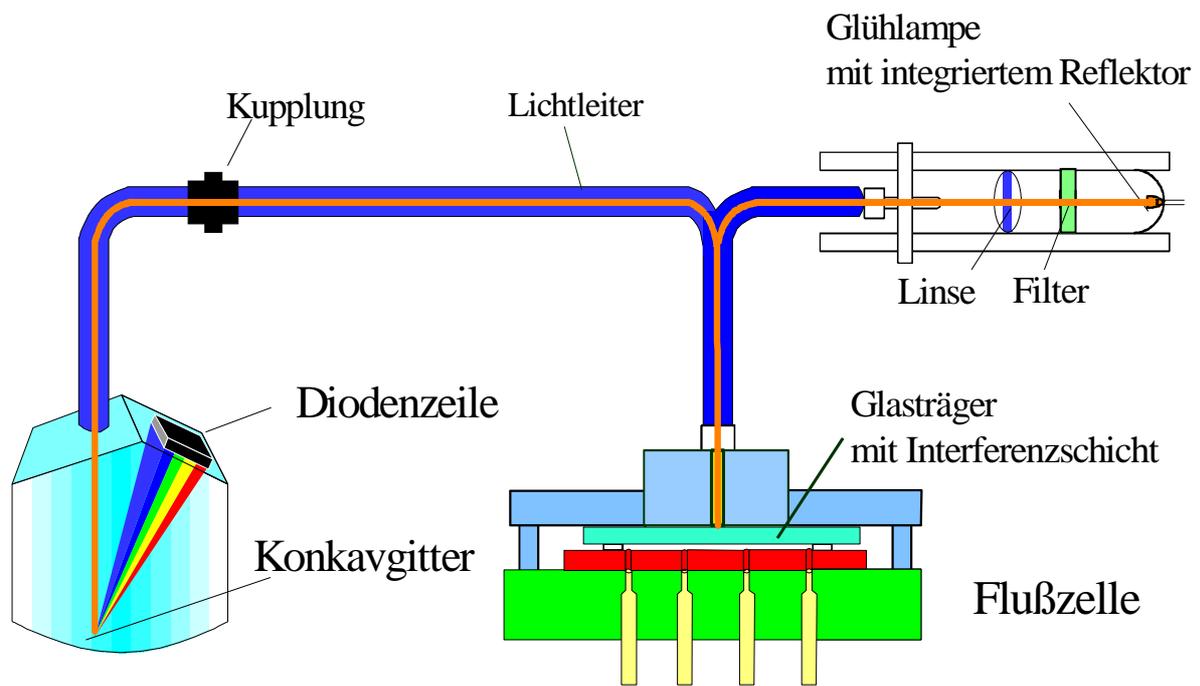
Wellenlängen vertreten und die Interferenz ist für jede Wellenlänge unterschiedlich, von maximaler Verstärkung bis zur völligen Auslöschung. Maximale Verstärkung wird bei  $\Delta = n \cdot \lambda$  ( $n \in \mathbb{N}_0$ ) erhalten, völlige Auslöschung dagegen bei  $\Delta = (2n+1) \cdot \lambda/2$  ( $n \in \mathbb{N}_0$ ). Durch spektrale Zerlegung des reflektierten Lichtes erhält man eine sogenannte Interferenzfigur (Bild 17, die unverschobene, hellgrau gezeichnete Kurve).



**Bild 17:** Interferenzspektrum des reflektierten Lichtes. Die y-Achse stellt die Intensität in willkürlichen Einheiten dar.

Wird nun durch die Analytmoleküle, die sich an der aktiven Schicht anlagern, die Dicke der oberen Schichten erhöht, so ändern sich die Bedingungen der Verstärkung und Auslöschung, und das Interferenz-Spektrum verschiebt sich (in Bild 17 mit Pfeilen angedeutet, die verschobene Kurve ist dunkler gezeichnet). Diese Verschiebung kann nun als Maß für die Änderung der optischen Schichtdicke genommen werden, diese Änderung wiederum als Maß für die Konzentration der Analyt-Moleküle in der Flüssigkeit, die über dem Transducer fließt (für Einzelheiten der Affinitätsreaktionen siehe Abschnitt 5.3).

Zur Messung des Interferenz-Spektrums wurde ein modifiziertes Simultanspektral-Photometer der Firma Zeiss, Jena vom Typ SPEKOL 1100 verwendet. Der Gesamtaufbau des Systems ist in Bild 18 dargestellt. Die Lichtleiteranordnung, die zum Transport des Lichts verwendet wird, ist die gleiche wie sie für den Versuchsaufbau mit Photomultiplier verwendet wurde.

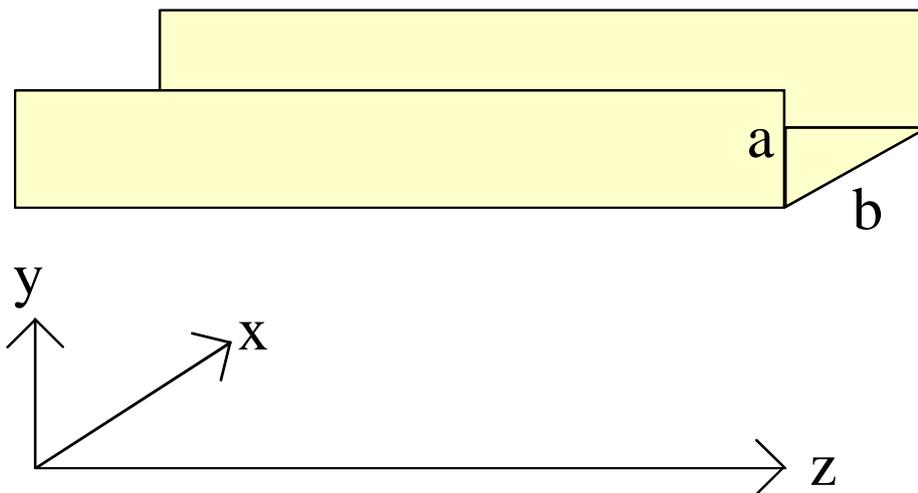


**Bild 18:** Schematischer Aufbau des SPEKOLs mit Integration der Flußzelle.

### 3 Charakterisierung des Systems

Für die Verbindung des beschriebenen  $\mu$ -FIA-Systems mit der Methode der modulierten Analyt-Konzentration mußten die Mikro-Kanäle vorher genau untersucht werden, v. a. bezüglich der Konzentrationsverteilung der Analytmoleküle während der Strömung. Für diese Untersuchungen wurden sowohl die CCD-Kamera als auch der Photomultiplier angewandt.

Neben diesen Messungen wurden auch theoretische Berechnungen durchgeführt, um aufzuzeigen, inwieweit die Messungen mit mathematischen Modellen in Übereinstimmung zu bringen sind. Für alle Berechnungen wurde das Mathematik-Programm Maple, Version V4, benutzt. Um die Rechnungen und Funktionen klarer und übersichtlicher zu machen, wird in Bild 19 die (mathematische) Orientierung des Kanals gezeigt, die im folgenden immer wieder gebraucht wird.



**Bild 19:** Orientierung des Mikrokanals: Die z-Achse des Koordinatensystems zeigt in Strömungsrichtung längs des Kanals, die x-Achse ist längs der Breite orientiert, die y-Achse längs der Tiefe bzw. Höhe des Kanals. Die Größe a gibt die Tiefe des Kanals an (0.07 mm), b seine Breite (1 mm).

#### 3.1 Die Strömung in einem rechteckigen, geraden Kanal

Grundlage zur Berechnung der Strömung in dem rechteckigen Mikrokanal ist die Navier-Stokes-Gleichung für die Bewegung einer inkompressiblen, newtonschen Flüssigkeit [36]:

$$\rho \cdot \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \cdot \vec{v} \right) = -\nabla p + \eta \cdot \Delta \vec{v} + \rho \cdot \vec{F} \quad (1)$$

Hier bedeutet  $p$  der Druck,  $\rho$  die Dichte,  $\eta$  die Viskosität der Flüssigkeit,  $\vec{F}$  die äußere Kraft auf die Flüssigkeit,  $\vec{v}$  die Strömungsgeschwindigkeit,  $\nabla$  der Nabla-,  $\Delta$  der Laplace-Operator.

In dem System gibt es nur eine Geschwindigkeitskomponente - unter der Voraussetzung strenger Laminarität. Die Laminarität wird durch die Reynoldszahl  $R$  bestimmt:

$$R = \frac{\rho \cdot v \cdot D_h}{\eta} \quad (2)$$

hierbei sind  $\rho$  die Dichte,  $\eta$  die Viskosität,  $v$  die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit und  $D_h$  der sogenannte hydraulische Durchmesser des Kanals [37]. Dieser ist wiederum definiert als

$$D_h = \frac{4 \cdot A}{U} \quad (3)$$

mit  $A$  als Fläche und  $U$  als Umfang des Kanalquerschnitts. Für einen Kanal muß die Reynoldszahl unter 1000 sein, dann herrschen laminare Bedingungen. Für die verwendeten Mikrokanäle ergibt sich bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 10 mm/s die Reynoldszahl zu  $R \approx 1.6$ . Das System befindet sich also ganz sicher im laminaren Bereich. Dies ist ganz allgemein in der Mikrofluidik zu beobachten ([38], [39] und [40]).

Nach Bild 19 zeigt die Strömungsgeschwindigkeit in die  $z$ -Richtung. Diese Strömungsgeschwindigkeit  $v_z$  ändert sich entlang der  $z$ -Achse nicht, da sich sonst die Dichte der Flüssigkeit, entgegen der Annahme der Inkompressibilität, ändern müßte. Das bedeutet, der Betrag der Geschwindigkeit  $v_z$  bzw.  $v$  ist nur eine Funktion von  $x$  und  $y$ . Dann verschwindet aber der Ausdruck  $\vec{v} \cdot \nabla \cdot \vec{v}$  in der Navier-Stokes-Gleichung. Die Bedingungen des Experiments sind stationär, äußere Kräfte können außer acht gelassen werden, daher vereinfacht sich Gleichung (1) zu

$$\nabla p = \eta \cdot \Delta \vec{v} \quad (4).$$

Die  $x$ - und die  $y$ -Komponente dieser Vektor-Gleichung liefern zusammen mit einer nochmaligen Ableitung der  $z$ -Komponente eine Gleichung für den Druck:

$$p(z) = -\Pi \cdot z + c \quad (5)$$

Der Druck ist also eine lineare Funktion von  $z$  ( $c$  ist eine Integrationskonstante,  $\Pi$  der konstante Druckgradient). Die Druckgleichung kann nun in Gleichung (4) eingesetzt werden:

$$\left( \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) v_z = -\frac{\Pi}{\eta} \quad (6)$$

Diese Gleichung gilt nun für die laminare Strömung mit beliebigem Querschnitt des Kanals. Nun erst kommen spezielle Randbedingungen zum Zuge: an den Kanalrändern wird die Geschwindigkeit gleich Null sein. Mit diesen Randbedingungen muß die Differentialgleichung (6) gelöst werden, abhängig also von der Geometrie des Kanalquerschnittes. Für einen kreisförmigen Kanalquerschnitt erhält man beispielsweise die bekannte parabolische Formel für die Strömungsgeschwindigkeit. Im vorliegenden Fall jedoch ist der Kanalquerschnitt rechteckig mit Tiefe  $a$  in  $y$ -Richtung (0.07 mm) und Breite  $b$  in  $x$ -Richtung (1 mm). Die Lösung der DGL ist unter diesen Bedingungen nicht mehr in einer exakten algebraischen Form darstellbar, es müssen transzendente Funktionen hinzugezogen werden. Die Lösung sieht wie folgt aus ([41]):

$$v_z(x,y) = -\frac{\Pi}{2} y(y-a) + \sum_{m=0}^{\infty} \sin\left(\frac{m \cdot \pi \cdot y}{a}\right) \left( A_m \cosh\left(\frac{m \cdot \pi \cdot x}{a}\right) + B_m \sinh\left(\frac{m \cdot \pi \cdot x}{a}\right) \right) \quad (7)$$

Gleichung (7) erfüllt die Randbedingungen  $v_z = 0$  bei  $y = 0$  und bei  $y = a$ . Die Koeffizienten  $A_m$  und  $B_m$  müssen nun so gewählt werden, daß  $v_z = 0$  bei  $x = 0$  und  $x = b$  erfüllt wird. Dies führt zu

$$A_m = \frac{\Pi \cdot a^2}{m^3 \cdot \pi^3} \cdot (\cos(m \cdot \pi) - 1) \quad (8)$$

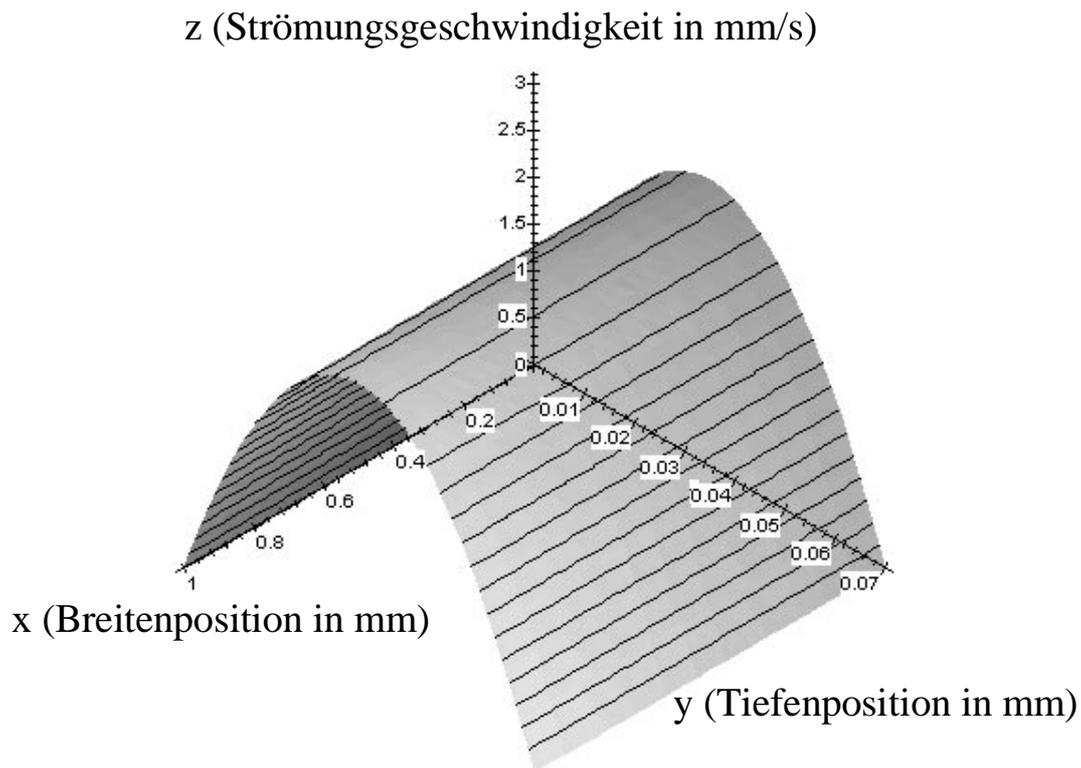
und

$$B_m = -\frac{A_m \left( \cosh\left(\frac{m \cdot b \cdot \pi}{a}\right) - 1 \right)}{\sinh\left(\frac{m \cdot b \cdot \pi}{a}\right)} \quad (9)$$

Für die gewählte Kanalgeometrie gilt  $a = 0.07$  mm und  $b = 1$  mm, als Druckgradient wird 5 Pa/mm genommen, die Viskosität von Wasser ist 0.001 Pa s. Mit diesen Werten kann die Funktion  $v_z(x,y)$  von MapleV4 aufgezeichnet werden. Zunächst nur die „nullte“ Näherung, also ohne die Summe: Aus Gleichung (7) wird

$$v_z = -\frac{\Pi}{2} \cdot y \cdot (y-a) \quad (10).$$

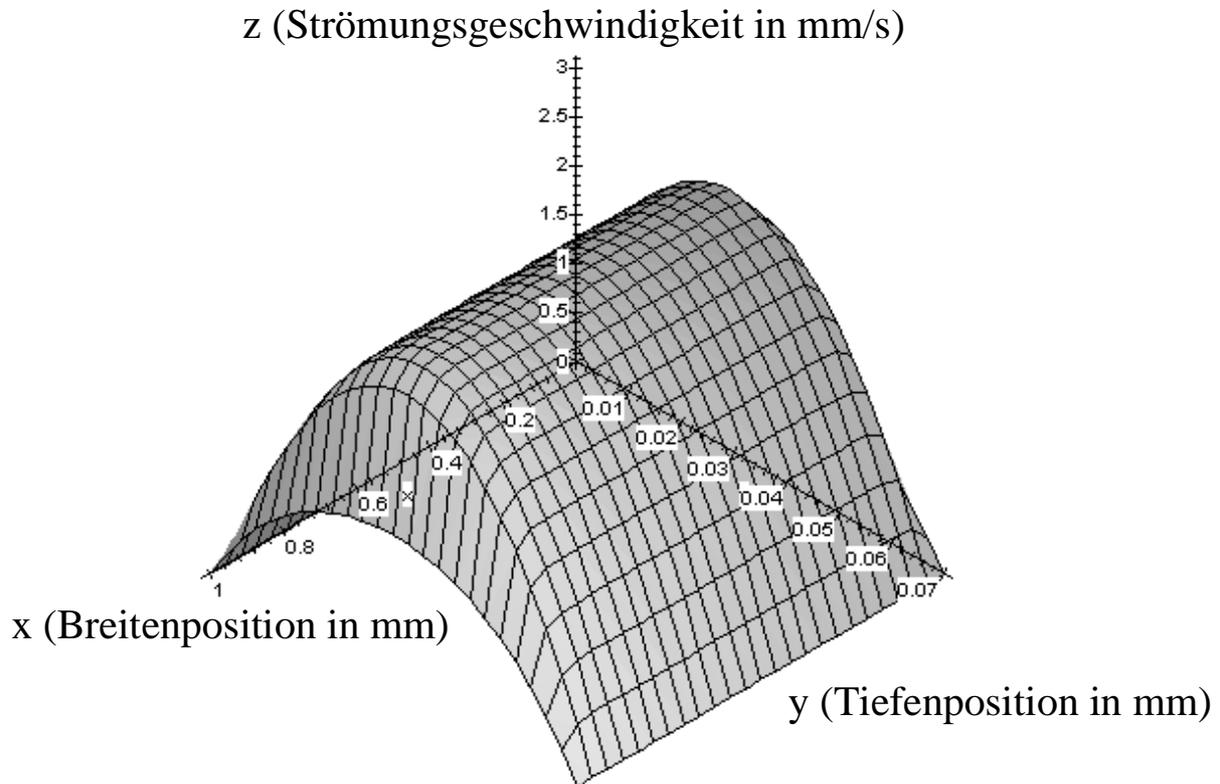
Wie Bild 20 zeigt, ähnelt dieses Strömungsprofil dem bekannten parabolischen eines Rohres mit rundem Querschnitt, hier ist das Profil eine Parabel, die sich über die gesamte Breite des Kanals hinzieht. Am Grund und an der Decke des Kanals ist die Strömungsgeschwindigkeit 0, in der Mitte, also 35  $\mu\text{m}$  über dem Boden, ist sie am größten, in diesem Fall etwa 3 mm/s.



**Bild 20:** Strömungsgeschwindigkeiten in einem rechteckigen Kanal in „nullter“ Näherung. Die x-Achse, die nach links vorne zeigt, ist entlang der Breite des Kanals orientiert, die Einheit ist mm, daher geht x von 0 bis 1 mm. Die y-Achse, die nach rechts weist, ist entlang der Tiefe des Kanals orientiert, ihre Einheit ist ebenfalls mm, daher der Bereich von 0 bis 0.07 mm. Die nach oben gehende z-Achse stellt die Strömungsgeschwindigkeit dar in der Einheit mm/s.

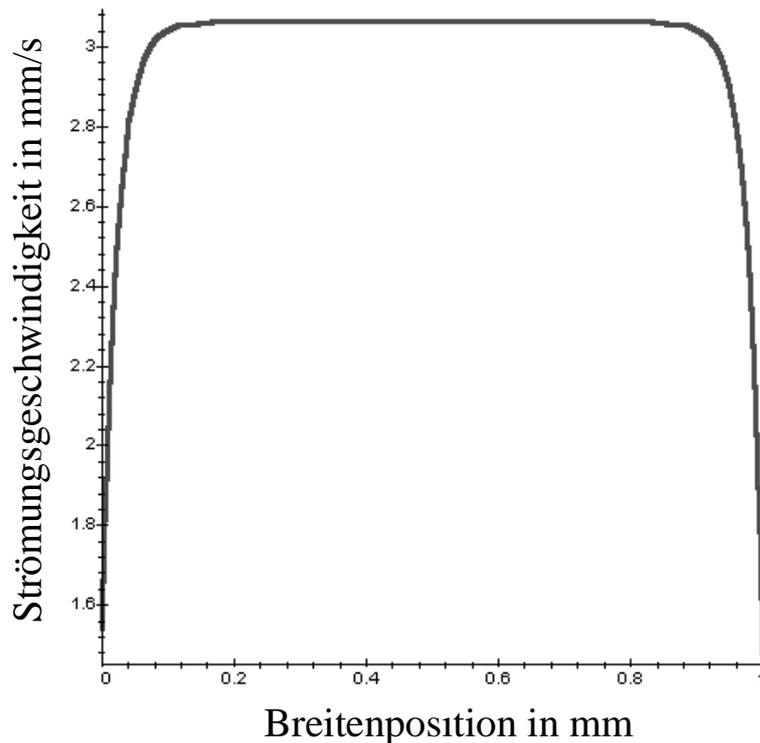
An dieser grundsätzlichen Struktur des Strömungsprofils ändert sich nicht viel, auch wenn nun weitere Glieder der Summe in Gleichung (7) berechnet werden. Bild 21 zeigt das Aussehen des Profils in der dritten Näherung, wenn also drei Summanden mitberücksichtigt werden. Der Näherungscharakter dieser Funktion ist dadurch zu erkennen, daß die Geschwindigkeit an den Rändern

nicht auf null zurückgeht. Je mehr Summenglieder berücksichtigt werden, desto kleiner wird die Randgeschwindigkeit.



**Bild 21:** Strömungsgeschwindigkeiten in einem rechteckigen Kanal in dritter Näherung. Für die Achsen gilt das zu Bild 20 gesagte.

In dieser dritten Näherung erfaßt das Modell den Umstand, daß an den Seitenwänden des Kanals die Strömungsgeschwindigkeit gegen 0 geht, genauso wie an den oberen und unteren Begrenzungen. Doch da die Breite des Kanals viel größer als seine Tiefe ist, wirken sich die seitlichen Begrenzungen weit weniger auf das Strömungsprofil aus wie die oberen und unteren. Auch weitere Näherungen ändern an diesem Bild nichts wesentliches. An den seitlichen Rändern des Kanals gibt es eine deutliche Abhängigkeit von  $x$ , in den übrigen Bereichen bleibt die Strömungsgeschwindigkeit von  $x$  unabhängig. Um diese Aussage etwas mehr zu quantifizieren, wird die Funktion  $v_z(x, y)$  bei einem konkreten  $y$ -Wert betrachtet, z. B. in der Mitte des Kanals, also bei  $y = 0,035$  mm. Dieser Profil-Querschnitt ist in Bild 22 zu sehen. Die Strömungsgeschwindigkeit bleibt im Bereich von  $x = 0.1$  bis  $0.9$  mm konstant, also auf etwa 80% der gesamten Breite.



**Bild 22:** Schnitt durch das Strömungsprofil von Bild 21 bei  $y = 0.035$  mm entlang der gesamten Breite des Mikrokanals.

In letzter Zeit erschienen Arbeiten, die solche Berechnungen (siehe auch [41]) auf kompliziertere Kanalgeometrien erweiterten. So berechneten D. Thangaraj und A. Nathan in [42] die Strömung von einem dünneren Kanalabschnitt in einen dickeren Kanalabschnitt numerisch. Mit Strömungen von Flüssigkeiten unter dem Einfluß elektrischer Felder beschäftigt sich X. C. Qiu et al. [43]. Hier kommt zu der Navier-Stokes-Gleichung noch die Poisson-Boltzmann-Gleichung für das elektrostatische Feld hinzu.

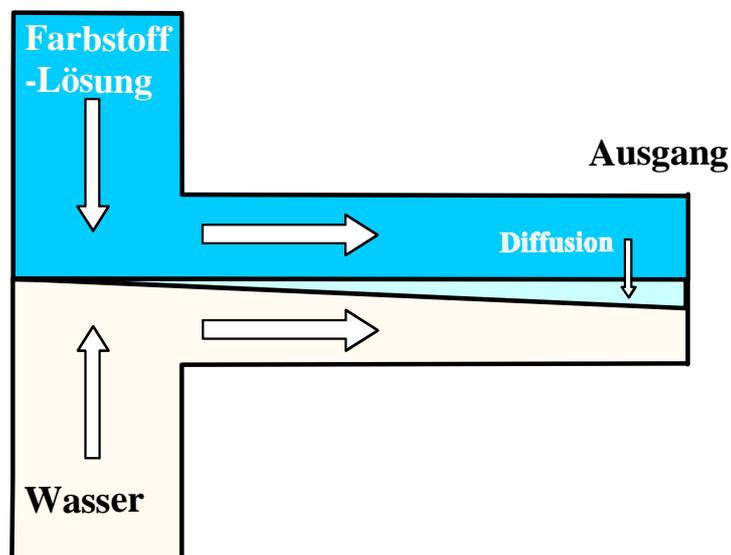
### 3.2 Messungen mit der CCD-Kamera

Mit der CCD-Kamera wurden zwei Charakterisierungsexperimente durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es, den Einfluß von Strömung und Diffusion auf die Konzentrationsverteilung eines Analyten abschätzen zu können. Beim ersten Experiment ging es hauptsächlich um den Einfluß der Diffusion. Dazu wurde die Analyt-Lösung parallel zu einem Strom reinen Wassers geführt. Der Analyt konnte in das Wasser diffundieren (es gibt keine Strömungsgeschwindigkeit senkrecht zur Länge des Kanals), dies wurde mit der

CCD-Kamera sichtbar gemacht. Beim zweiten Experiment ging es um den Einfluß der Strömung, der Konvektion. Dazu wurden Segmente von Analyt-Lösung zwischen Wasser-Segmenten entlang ihres Weges durch den Mikrokanal beobachtet. Das Strömungsprofil führte zu einer Dispersion der Analyt-Segmente. Die Bilder der CCD-Kamera wurden mit dem Programm VISION der Firma Impuls GmbH aufgenommen und verarbeitet.

### 3.2.1 Zwei parallel nebeneinander fließende Strömungen

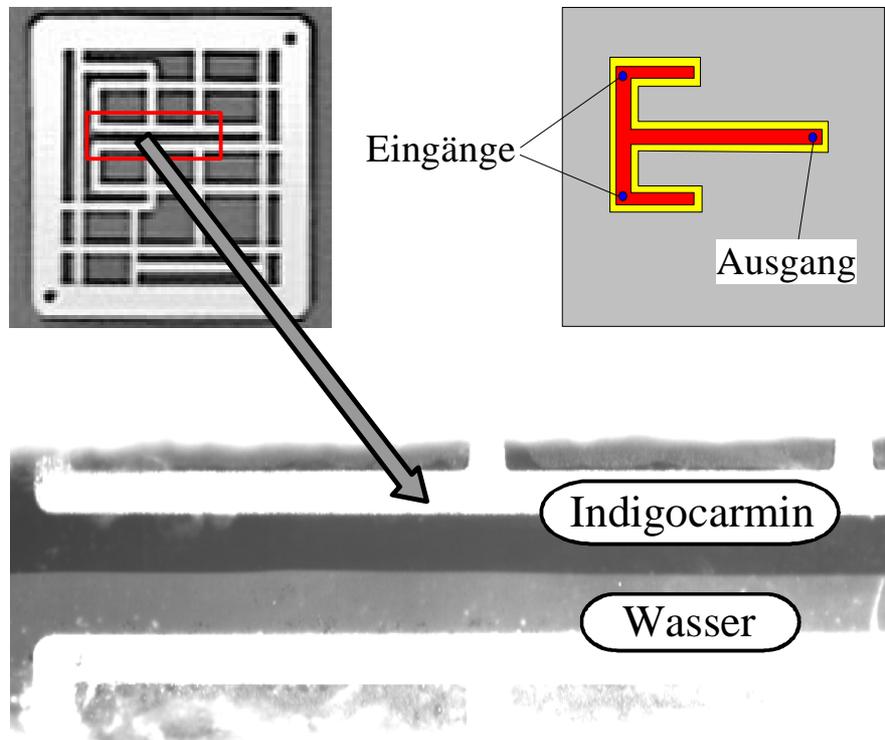
Das erste Charakterisierungsexperiment ist schematisch in Bild 23 dargestellt. Es wurde die T-förmige Geometrie der Mikrokanäle mit zwei Eingängen und einem Ausgang gewählt. Durch den einen Eingang wird eine Farbstofflösung (Indigocarmin) in den Mikrokanal geleitet, durch den anderen reines Wasser. In der Mitte treffen sich die beiden Flüssigkeiten und fließen nebeneinander her in Richtung Ausgang. Entlang dieses Weges diffundiert der Farbstoff in den Strom mit reinem Wasser hinein. Dieses Experiment wurde in einer ähnlichen Anordnung bereits von B. H. Weigl durchgeführt ([44] und [45]).



**Bild 23:** Schema des ersten Charakterisierungsexperiments.

Bild 24 zeigt links oben die verwendete Kanalgeometrie (eine Aufnahme mit der CCD-Kamera), rechts davon eine Zeichnung mit Kennzeichnung der Ein- und Ausgänge zur Verdeutlichung. Oben ist der Eingang für die Lösung des Indigocarmins und unten der Eingang des reinen Wassers zu sehen, rechts schließlich befindet sich der Ausgang am Ende einer etwa 1.6 cm langen

gemeinsamen, geraden Strecke. Unten in Bild 24 ist eine Aufnahme der CCD-Kamera zu sehen, der erfaßte Ausschnitt des Mikrokanals ist links oben als Rechteck eingezeichnet. In diesem Fall wurden etwa 80% der gemeinsamen Fließstrecke erfaßt.



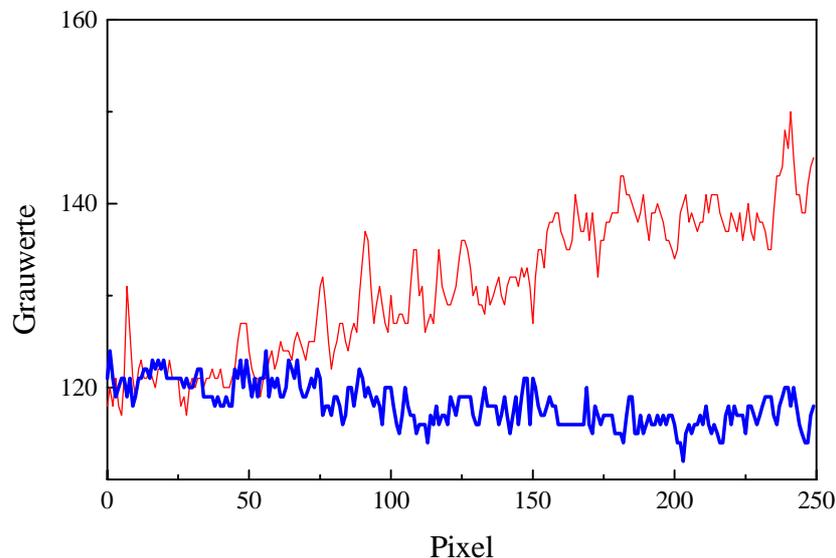
**Bild 24:** Parallel fließende Strömungen im Überblick: Oben links ist das verwendete  $\mu$ -FIA-Plättchen mit seiner T-förmigen Kanal-Struktur gezeigt, das Rechteck markiert den von der Kamera in diesem Fall beobachteten Ausschnitt, der unten abgebildet ist. Rechts oben sind die Mikrokanäle des Plättchens zum besseren Verständnis schematisch wiedergegeben.

In dem Photo der Kamera ist links das Zusammenströmen der Indigocarmin-Lösung von oben und des reinen Wassers von unten zu sehen. Obwohl beide Ströme mit recht hoher Geschwindigkeit zusammenkommen, bilden sich keine Wirbel. Die Grenze zwischen Farbstofflösung und Wasser ist völlig scharf, erst im weiteren Verlauf wird diese Grenze ein wenig verwaschen, bedingt durch die allmähliche Diffusion des Indigocarmins in die Wasserströmung. Die gesamte Strömung ist also in hohem Maße laminar, es treten keinerlei Turbulenzen auf, die Reynoldszahl bleibt also deutlich unter ihrem kritischen Wert für die Ausbildung von Turbulenz.

Um eine genaue Beschreibung der Konzentrationsverteilung des Indigocarmins zu erhalten, müssen die Bilder quantitativ ausgewertet werden. Eines der größten Probleme bei der Auswertung der Kamera-Bilder stellt die inhomogene

Beleuchtung dar, da die Lampenanordnung die einzelnen Bereiche des Mikrokanals unterschiedlich beleuchtet (Shading-Effekt). Um diesen Effekt in den Griff zu bekommen, wurde bei gleicher Beleuchtung reines Wasser durch den Mikrokanal geschickt. Auf diese Weise konnte die Beleuchtungsverteilung erfaßt werden. Für jede Pixelspalte des Kamerabildes konnte damit ein Korrekturwert ermittelt werden. Die Breite des Kanals ist so gering, daß quer zur Flußrichtung mit annähernd homogener Beleuchtung gerechnet werden kann.

In Bild 25 ist eine solche Shading-Korrektur dargestellt. Die y-Achse ist in Grauwert-Einheiten eingeteilt. Die CCD-Kamera liefert Grauwerte von 0 bis 255. Die dünn gezeichnete Kurve gibt die Intensitätsverteilung längs des Kanals vor der Korrektur, die dicke (untere) Kurve die Intensitätsverteilung danach an. Vor der Korrektur ist klar die Inhomogenität der Beleuchtung zu erkennen, das rechte Ende des Kanals wird stärker beleuchtet als das linke. Der Verlauf der Inhomogenität ist in erster Näherung linear, so kann der Beleuchtungsgradient zu 0.1 Grauwert-Einheiten pro Pixel berechnet werden. Alle 10 Pixelspalten wird also eine Grauwert-Einheit abgezogen. Nach Korrektur schwankt das Intensitätsprofil um einen konstanten Wert, das Shading ist weitgehend eliminiert. Das relativ starke Rauschen der Intensitätswerte war allerdings dadurch nicht zu beheben.

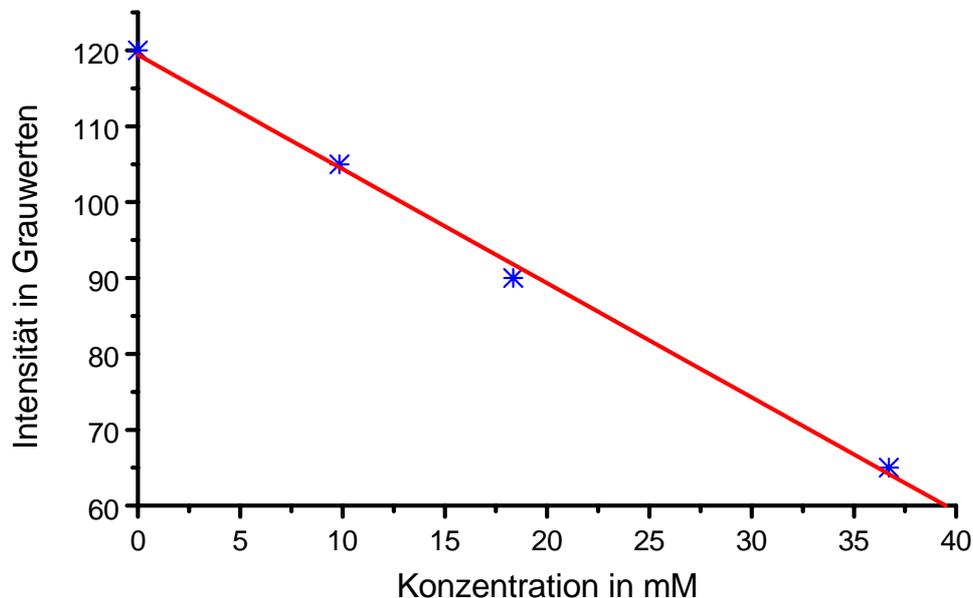


**Bild 25:** Die Shading-Korrektur. Dünne (obere) Kurve ist die Intensitätsverteilung längs des Kanals vor der Korrektur, die dicke (untere) Kurve die Intensitätsverteilung danach.

Was jetzt jedoch vorliegt, sind Intensitäten, keine Konzentrationen. Diese Intensitäten (Grauwerte) müssen in Konzentrationen umgerechnet werden. Dazu muß das System kalibriert werden. Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Indigocarmin werden dazu durch den Kanal geleitet. Die Grauwerte, die die CCD-Kamera liefert, werden gemessen und eine Shading-Korrektur wird durchgeführt. Bild 26 zeigt das Ergebnis dieser Messung. Es ergibt sich tatsächlich ein linearer Zusammenhang zwischen Grauwert und Konzentration. Er läßt sich beschreiben durch die Gleichung

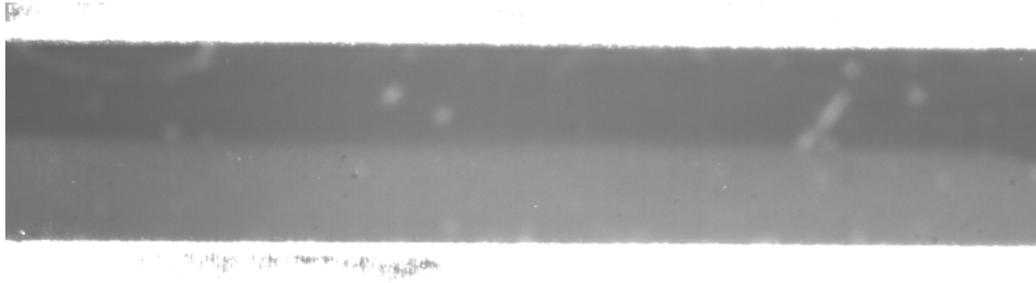
$$I = 120 - 1.5 \frac{1}{\text{mmol}} \cdot c \quad (11),$$

hierbei bedeutet  $I$  die Intensität in Grauwerten und  $c$  die Konzentration des Indigocarmins in mmol/l.



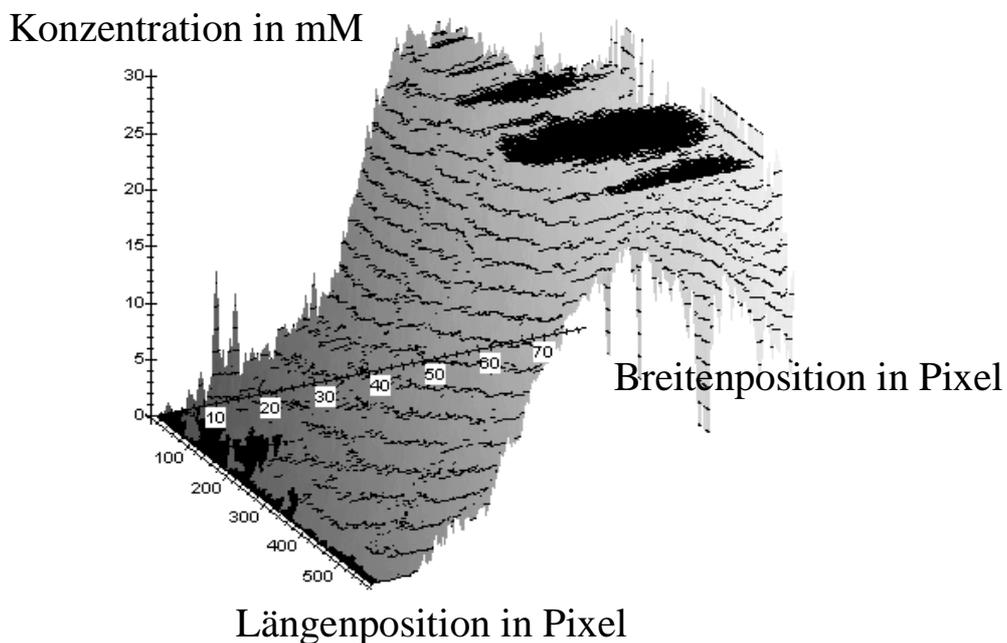
**Bild 26:** Kalibrierung der Indigocarmin-Konzentration.

Eine Vielzahl von Photographien dieses Nebeneinanderfließens der beiden Ströme wurde bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten gemacht. Meist war die Strömungsgeschwindigkeit so hoch, daß die Diffusion überhaupt nicht sichtbar wurde. Als ein Beispiel für die Diffusion sei hier die in Bild 27 dargestellte Aufnahme gezeigt. Auf Grund der schlechten Reproduktion auf Papier ist die Diffusion hier wesentlich schwerer zu erkennen als auf dem Monitor.



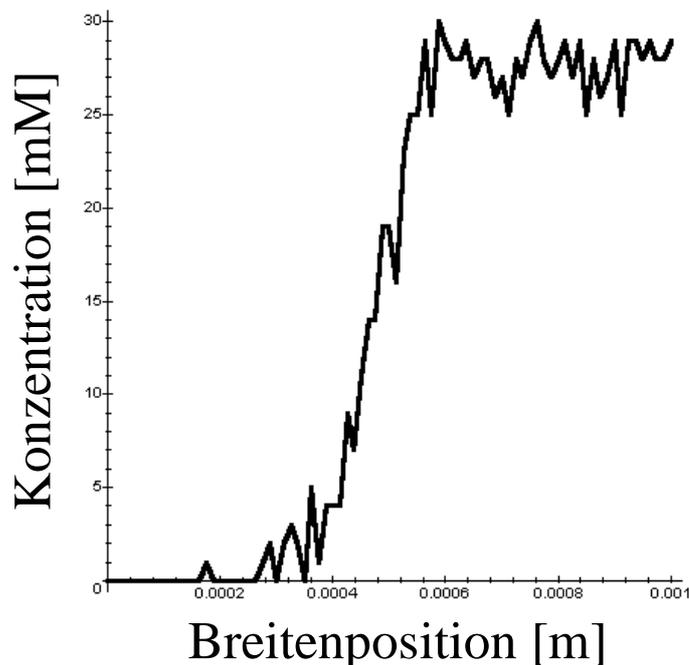
**Bild 27:** Photographie der CCD-Kamera: Oben fließt die Indigocarmin-Lösung (30 mM), unten reines Wasser. Der Bereich umfaßt 8.1 mm. Die Strömungsrichtung geht von links nach rechts. Die Flußrate beträgt 1.68 µl/min.

Es ist zu erkennen, wie der Farbstoff im Verlauf des Flusses in den Strom mit reinem Wasser diffundiert. Die erhaltenen Werte wurden korrigiert und anhand der Kalibriergerade in Konzentrationen umgerechnet. Das Programm Maple V Release 4 erstellte aus diesen Konzentrationswerten eine Graphik (Bild 28).



**Bild 28:** Korrigierte und in Intensitäten umgerechnete Werte der CCD-Kamera. Die Achse nach rechts hinten stellt die Breite des Kanals dar, die 75 Einheiten sind somit 1 mm. Die Achse nach vorn stellt die Länge des Kanals dar, die 550 Einheiten sind die beobachteten 8.1 mm, die vertikale Achse gibt die Konzentration des Indigocarmins in mM an.

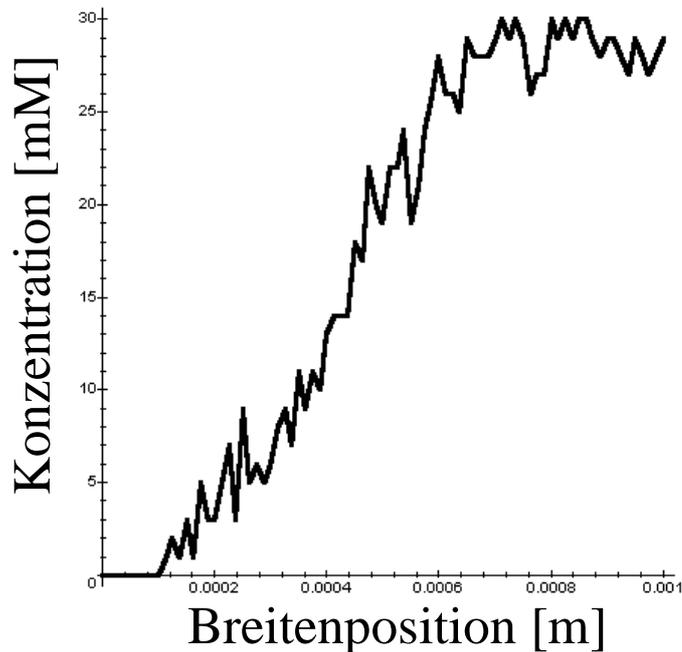
Die Gesamtflußrate wurde durch Messung der Zeit zwischen zwei Tröpfchen, die aus dem Ausgang der Flußzelle herauskommen, bestimmt (die Tropfen besitzen ein konstantes Volumen von 24  $\mu\text{l}$ ). Beim vorliegenden Experiment beträgt die Flußrate 1.68  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Für den Vergleich mit theoretischen Werten war auch das Problem zu lösen, an welcher Stelle im Kanal die einzelnen Pixel-Werte genau lagen. Dazu wurde der Maßstab der Photographie ermittelt. 709 Pixel entsprechen genau 1 cm. Der Beginn der Diffusion ist am Ort des Zusammentreffens der beiden Ströme und damit außerhalb des Bereichs von Bild 27. Von der Kamera wurde der Bereich von 0.35 bis 1.16 cm vom Beginn der Diffusionsstrecke aufgenommen, die beobachtete Diffusionsstrecke beträgt also etwa 8.1 mm.



**Bild 29:** Das gemessene Konzentrationsprofil 0.35 cm vom Beginn der Diffusionsstrecke entfernt. Die x-Achse geht die Breite des Kanals entlang und ist in m eingeteilt, der Maßstab der y-Achse mit der Konzentration des Indigocarmins ist in mM gegeben.

Um Messdaten mit der Rechnung besser vergleichen zu können, werden Querschnitte durch die dreidimensionale Figur in Bild 28 gelegt, zwei davon sind in Bild 29 bzw. Bild 30 dargestellt. Bild 29 zeigt die Situation zu Beginn der Strecke bei 0.35 cm, links befindet sich reines Wasser ohne Farbstoff, rechts die Farbstofflösung mit hoher Konzentration. Die Diffusion ist noch nicht weit vorangeschritten, das Profil ist noch recht steil. In Bild 30 haben wir den Fall am Ende der betrachteten Strecke vor uns, bei 1.15 cm. Hier ist das Profil der Farbstoff-Konzentration schon wesentlich flacher, da der Farbstoff schon einige Zeit in den Wasserstrom diffundiert ist. Da die Flußrate den Wert 1.68  $\mu\text{l}/\text{min}$

hatte (die mittlere Strömungsgeschwindigkeit beträgt dann 24 mm/min), entspricht die Strecke von 0.8 cm einer Zeit von 20 s.

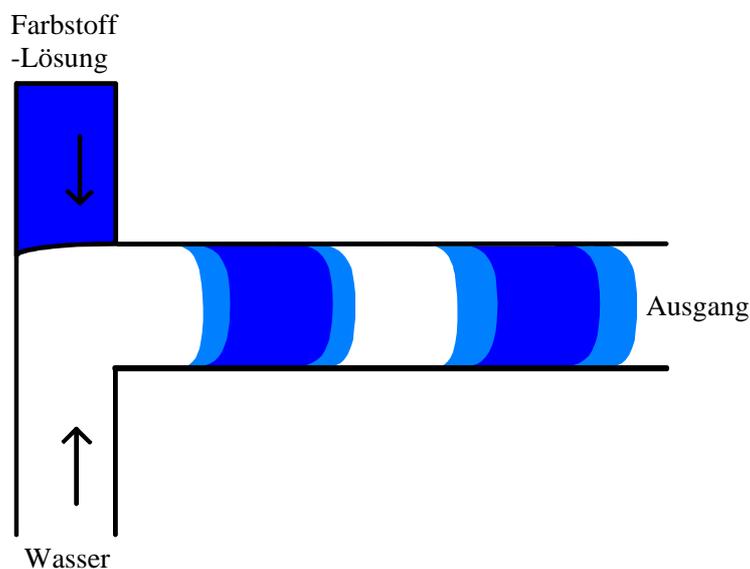


**Bild 30:** Das gemessene Konzentrationsprofil 1.15 cm vom Beginn der Diffusionsstrecke entfernt. Die Maßstäbe der Achsen sind wie in Bild 29.

Als deutliches Ergebnis zeichnet sich ab, daß auf weite Strecken nur eine sehr geringe Vermischung der beiden Ströme stattfindet. Wollte man also beispielsweise eine chemische Reaktion in dem Mikrokanal ablaufen lassen, so müßte man die beiden Reaktanden sehr lange Zeit nebeneinander her fließen lassen bis sich durch die Diffusion eine Vermischung ergäbe. Grund dieses Phänomens ist die strenge Laminarität der Strömung im Mikrokanal. Ohne Turbulenz kann nur die Diffusion für Vermischung sorgen, und die Diffusion ist ein recht langsamer Prozess (abhängig von der Molekülgröße) verglichen mit der Konvektion. Daher ist es für den genannten Zweck, der allerdings in dieser Arbeit nicht verfolgt wurde, nötig, sogenannte Mischer in den Aufbau einzufügen, die die Oberfläche der Ströme stark vergrößern, so daß die Diffusion die Vermischung in kürzerer Zeit bewerkstelligen kann (siehe z. B. [46]).

### 3.2.2 Dispersion eines Farbstoffpakets

In einem zweiten Experiment, das in Richtung Modulation weist, soll beobachtet werden, wie sich eine Folge von Paketen mit konzentrierter Farbstofflösung in einem Mikrokanal verhält. Bild 31 zeigt ein Schema dieses Experiments. Abwechselnd wird in den Mikrokanal Farbstofflösung und reines Wasser hydrostatisch injiziert. Im Verlauf des Kanals verteilt sich der Farbstoff aufgrund der Konvektion und der Diffusion.

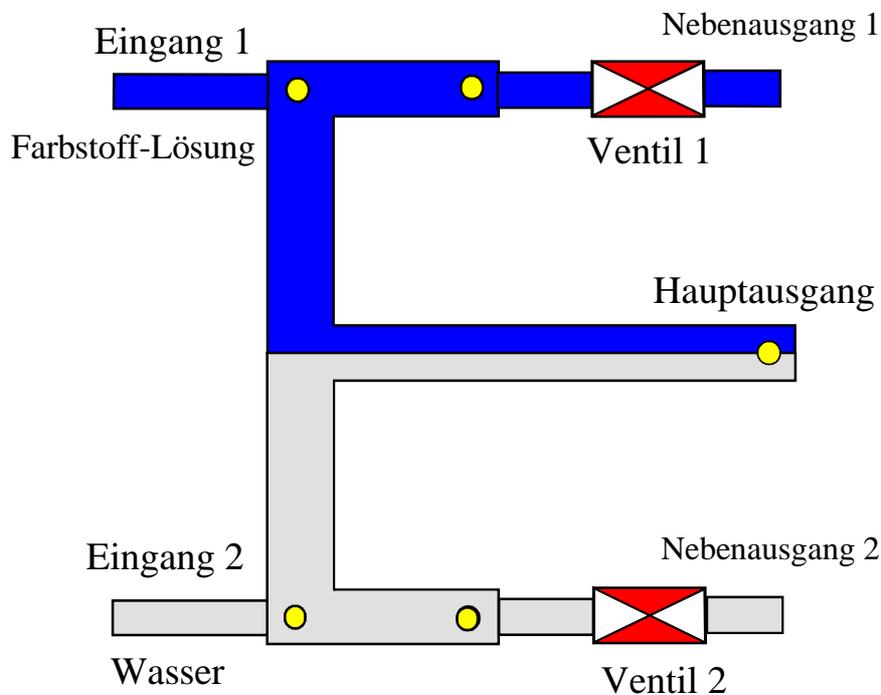


**Bild 31:** Skizze des zweiten Charakterisierungsexperiments.

Es wurden zwei verschiedene Kanalgeometrien für diese Charakterisierung verwendet: Zum einen die schon für das erste Charakterisierungsexperiment benutzte T-Geometrie, bei der die Injektion der beiden Ströme seitlich in den Mikrokanal erfolgte, zum anderen eine noch einfachere, gerade Geometrie, bei der die Injektion jeweils direkt von unten in den Mikrokanal durchgeführt wird.

Im Fall der T-Geometrie war die Ventilanordnung zur Modulation so wie in Bild 32 gezeigt wird. Die Mikrokanal-Anordnung besitzt neben ihrem Hauptausgang noch zwei Nebenausgänge direkt hinter den beiden Eingängen. Durch Eingang 1 fließt eine Farbstofflösung in den Mikrokanal, durch Eingang 2 wird reines Wasser geleitet. Für dieses Experiment wurde als Farbstoff Fluorescein gewählt. Wenn die Flüssigkeiten durch die Bohrlöcher in die Mikrokanal-Struktur einlaufen, so haben sie zwei Fließ-Möglichkeiten: Entweder sie fließen geradlinig zum entsprechenden Nebenausgang wieder aus der Mikrokanalstruktur heraus, oder sie schwenken in den langen Hauptkanal

ein und verlassen den Kanal über den Hauptausgang. Wenn die beiden Ventile offen sind (dies ist die Situation in Bild 32), dann wird etwa die Hälfte der Flüssigkeitsmoleküle über die Nebenausgänge abgeleitet, die andere Hälfte dagegen fließt durch den Mikrokanal, wobei dann beide Ströme wegen der Laminarität des Systems nebeneinander herfließen.

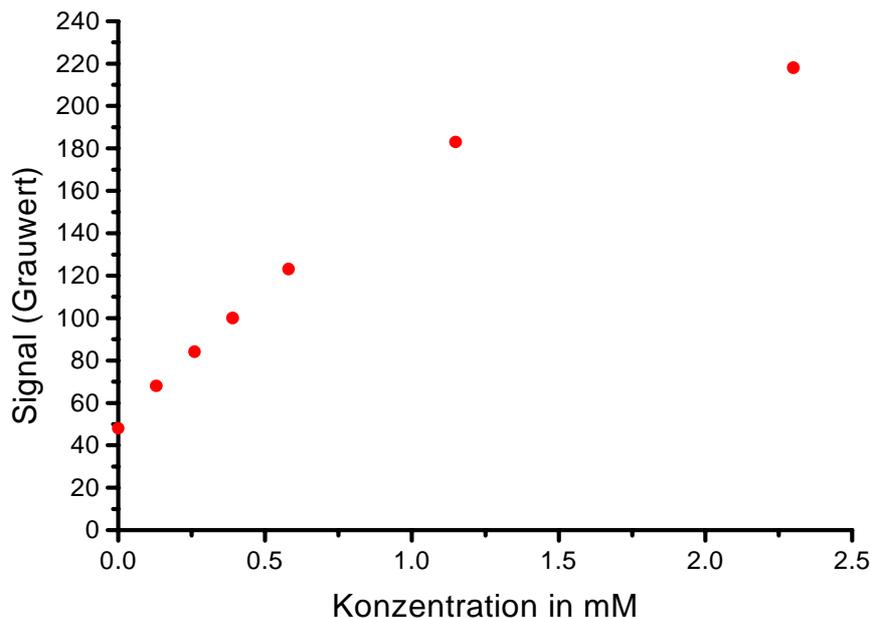


**Bild 32:** Anordnung der Ventile bei der T-Geometrie zur Modulation der Farbstoff-Lösung. Es ist der Zustand gezeigt, bei dem beide Ventile offen sind.

Wenn nun jedoch Ventil 1 geschlossen wird, hat die Farbstofflösung keine Möglichkeit mehr, in den Nebenausgang zu fließen, sie ist jetzt aufgrund des hydrostatischen Drucks gezwungen, den Hauptausgang zu nehmen und muß dabei das reine Wasser verdrängen, das ja seinerseits noch nach wie vor die Möglichkeit des Nebenausgangs besitzt. In diesem Fall fließt im Hauptkanal nur noch die Farbstoff-Lösung. Wird dagegen Ventil 2 geschlossen und Ventil 1 wieder geöffnet, dann kann das reine Wasser nicht mehr durch den Nebenausgang 2 abfließen und verdrängt die Farbstofflösung aus dem Hauptkanal. Durch entsprechende Steuerung der Ventile kann somit die Farbstoff-Lösung moduliert werden.

Wie schon im Falle des Indigocarmins, so mußte auch beim Fluorescein eine Kalibrierung durchgeführt werden. Es wurden - ausgehend von einer Stammlösung von 2.3 mM - verschiedene Konzentrationen in die Flusszelle geleitet und das Signal der CCD-Kamera ausgelesen. Beim Auftragen der CCD-Kamera-Signale (Grauwerte), am selben Punkt des Mikrokanals gemessen, gegen die Fluorescein-Konzentration ergibt sich die Kalibrierung von Bild 33.

Bis zu einer Konzentration von etwa 1 mM bleibt das Signal linear zur Konzentration. Bei höheren Konzentrationen steigt das Signal infolge des Quench-Effekts nicht mehr so weit an, wie dies bei weiterer Linearität zu erwarten wäre und erreicht langsam einen maximalen Sättigungswert. Für die Messungen bedeutet dies, daß die Konzentration des Fluoresceins nicht über 1 mM hinausgehen sollte. Für den linearen Bereich wurden die ersten 5 Werte einer Regression unterzogen, das Ergebnis zeigt Bild 34.

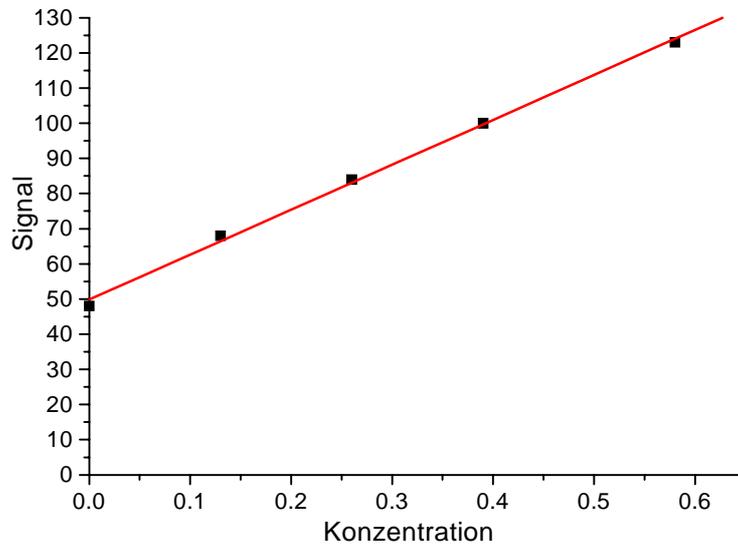


**Bild 33:** Kalibrierkurve des Fluoresceins mit der CCD-Kamera.

Die Kalibrierung ist allerdings abhängig von der Anordnung und Lichtintensität der verwendeten Leuchtdioden. Die Kalibrierung der Bilder 33 und 34 gelten also nur für eine ganz bestimmte Konditionierung der Leuchtdioden; bei jeder Veränderung muß auch neu kalibriert werden.

Auch wenn überhaupt kein Fluorescein in der Lösung ist, die durch die Flußzelle strömt, gibt die Kamera ein Signal von immerhin 49 Grauwert-Einheiten ab. Dies liegt zu einem kleinen Teil an dem Licht, das trotz Interferenzfilter von der Photodiode noch die CCD-Kamera erreicht, zum größten Teil jedoch am Dunkelwert der Kamera selbst, der mit 40 Grauwert-Einheiten auch bei absoluter Dunkelheit doch recht hoch ausfällt. Die Steigung der Gerade, also die Empfindlichkeit der Analyse, beträgt etwa 128 Grauwerteinheiten pro mM. Damit ist die Konzentrationsauflösung bei etwa 10

$\mu\text{M}$  angesiedelt, die gerade noch meßbare Fluorescein-Konzentration bei etwa  $20 \mu\text{M}$ .



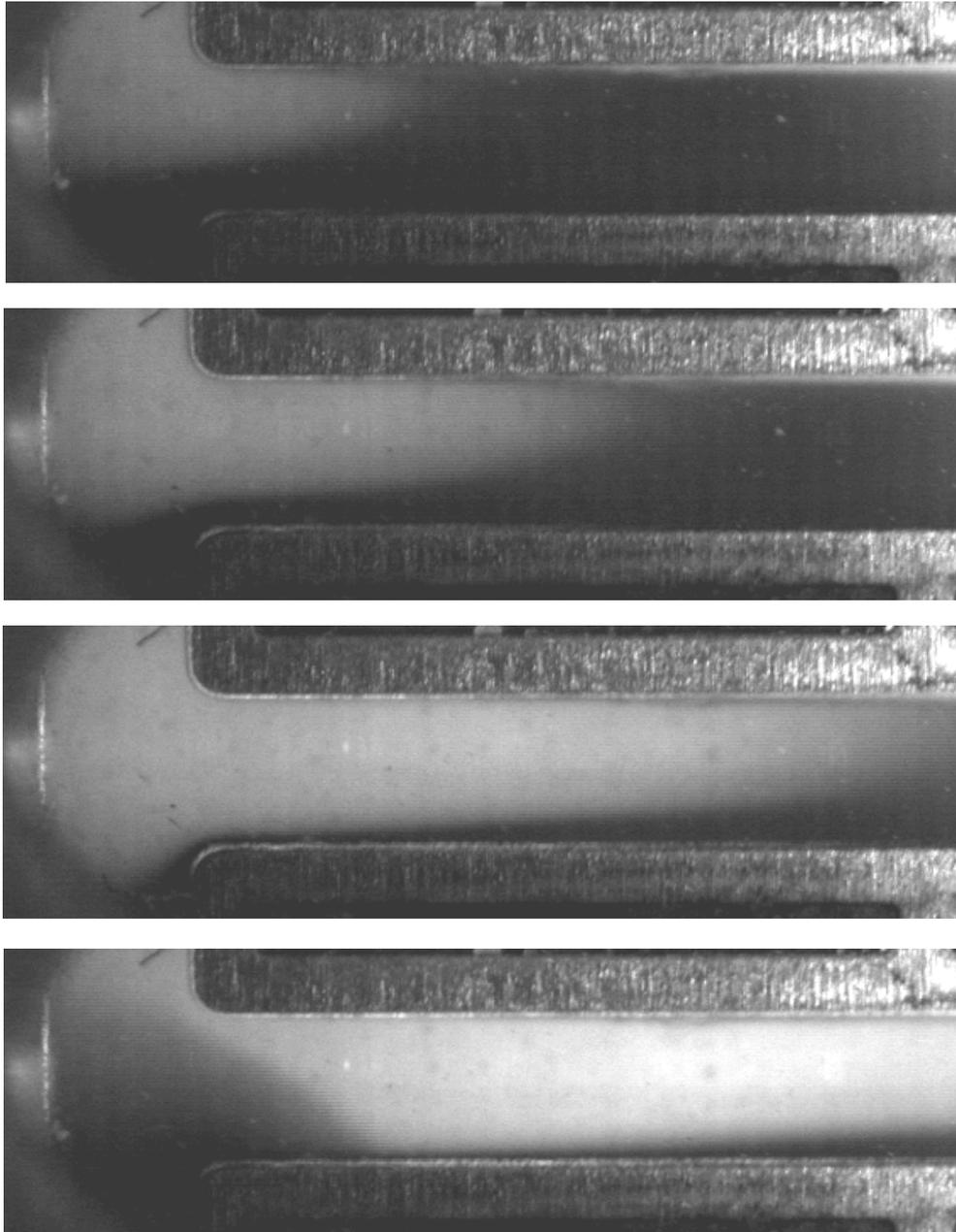
**Bild 34:** Linearer Bereich der Kalibrierkurve des Fluoresceins bei niedrigen Konzentrationen.

Bildsequenzen, die die Bewegung der Farbstoff-Pakete zeigen, wurden mit der CCD-Kamera aufgenommen. Die Ventil-Umschaltfrequenz wurde auf 1 Hz eingestellt, d. h. daß genau 1 s lang die Fluorescein-Lösung durch den Hauptkanal strömt und 1 s lang das reine Wasser. Die Flußgeschwindigkeit wurde auf wenige mm/s ( $\approx 8 \text{ mm/s}$ , d. h. die Flußrate war etwa  $5 \mu\text{l/s}$ ) eingestellt, die Fluorescein-Konzentration war mit  $0.69 \text{ mM}$  an der oberen Grenze des noch linearen Bereichs der Kalibrierkurve, als Stromstärke für die Photodiode wurde der maximale Wert von  $20 \text{ mA}$  gewählt.

In Bild 35 sind vier Photographien aus einer der aufgenommenen Sequenzen gezeigt. Die Bilder sind in einem zeitlichen Abstand von  $0.24 \text{ s}$  aufgenommen. Die zeitliche Auflösung der CCD-Kamera ist auf  $0.04 \text{ s}$  beschränkt. Es sind also jeweils fünf Bilder aus der Sequenz weggelassen worden. Der von der Kamera erfasste Ausschnitt war  $550$  auf  $80$  Pixel, also entsprechen  $80$  Pixel der vollen Breite des Kanals ( $1 \text{ mm}$ ).

Im ersten Photo ist das Fluorescein-Paket zu sehen, wie es von oben links kommend in den Hauptkanal eintritt. Am oberen Kanalrand sind noch die Reste des letzten Fluorescein-Pakets zu erkennen. Am Rand des Kanals ist die Strömungsgeschwindigkeit praktisch gleich Null, das System befindet sich im Bereich strenger Laminarität. Die Fluorescein-Lösung scheint gewissermassen kleben zu bleiben. Das idealerweise parabelförmige Geschwindigkeitsprofil zieht die Vorderfront auseinander, die einzelnen nacheinander kommenden

Fluorescein-Pakete werden ineinandergeschachtelt wie Pappbecher, die zur Platzersparnis ineinandergestellt werden. So ist zwischen der hellen Randschicht oben am Rand des Kanals eine dunkle Trennlinie zu sehen, die den Rest des Wasser-Pakets darstellt, der zwischen den beiden Farbstoff-Paketen in den Mikrokanal geschleust wurde. Die Asymmetrie des Tropfens über die Breite des Kanals ist systembedingt durch die seitliche Injektion in den Hauptkanal und kann mit der gewählten Mikrokanal-Geometrie nicht vermieden werden.

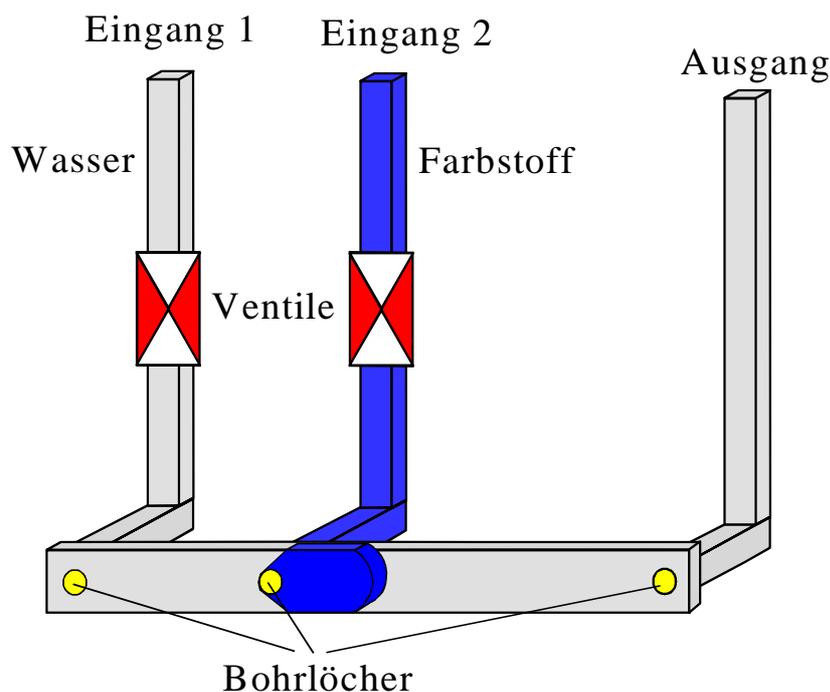


**Bild 35:** Bildsequenz mit Fluorescein-Paket, wie es von oben links kommend in den Hauptkanal eingespritzt wird. Die Bilder sind in einem zeitlichen Abstand von 0.24 s aufgenommen worden.

Auf den Photos ist - genau wie bei den Experimenten mit Indigocarmin - der Shading-Effekt zu erkennen. Für quantitative Auswertungen mußte dieser beseitigt werden. Hierzu wurden vor dem Experiment zwei Referenzbilder aufgenommen. Bei der Aufnahme von Referenzbild 1 floss reine Fluorescein-Lösung (Intensität  $I_{Fluorescein}$ ), bei der Aufnahme von Referenzbild 2 reines Wasser (Intensität  $I_{Wasser}$ ) durch den Mikrokanal. Die Intensitätswerte der Bilder der aufgenommenen Sequenz ( $I_{roh}$ ) wurden Pixel für Pixel mit Hilfe der beiden Referenzbilder nach folgender Formel normiert:

$$I_{norm}(x,y) = \frac{I_{roh}(x,y) - I_{Wasser}(x,y)}{I_{Fluorescein}(x,y) - I_{Wasser}(x,y)} \quad (12)$$

Durch diese Normierung wurde erreicht, daß die Intensität Werte zwischen 0 und 1 annimmt, 0 für die Fluorescein-Konzentration 0 und 1 für die Konzentration der verwendeten Fluorescein-Lösung von 0.69 mM.

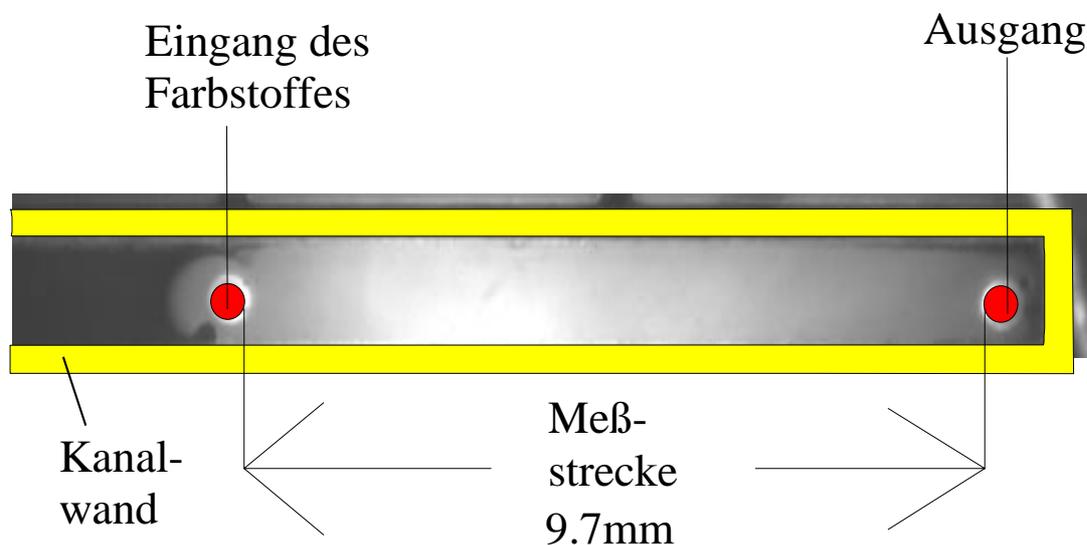


**Bild 36:** Schema der Anordnung des Charakterisierungsexperiments 2 mit linearer Injektion.

Wie schon oben erwähnt, waren die Fluorescein-Pakete asymmetrisch. Um dies zu ändern, wurde ein  $\mu$ -FIA-Plättchen mit anderer Geometrie der Kanäle und Bohrlöcher gewählt. Hierbei war der Mikrokanal ein gerades Stück, das mit drei hintereinanderliegenden Bohrlöchern versehen wurde, zwei Einlaß- und einer Auslaß-Öffnung. Bild 36 zeigt das Schema des Aufbaues. Die Flüssigkeiten werden nun nicht mehr seitlich in den Hauptkanal geleitet, sondern von unten

direkt in das gerade Mittelstück injiziert. Am linken Eingang ist das reine Wasser angeschlossen, am mittleren die Fluorescein-Lösung. Durch das rechte Bohrloch verlassen die Flüssigkeiten den Kanal. Die Ventile sind jetzt vor den Eingängen angebracht und erlauben durch abwechselndes Öffnen und Schließen die Injektion von Farbstoff-Paketen.

Das Experiment war weitgehend analog zum Fall der T-Geometrie mit asymmetrischer Einspritzung. Die Meßstrecke reduzierte sich auf den Abschnitt zwischen mittlerem und rechtem Bohrloch. Bild 37 zeigt die Meßstrecke in einer Photographie der CCD-Kamera mit besonderer Hervorhebung der Kanalwände und der Bohrlöcher. Das Bohrloch für den Einlaß des reinen Wassers liegt links außerhalb des Bildes.



**Bild 37:** Darstellung der Meßstrecke zwischen Eingang der Farbstofflösung und Ausgang. Bohrlöcher und Kanalwand sind der Deutlichkeit wegen nachgezeichnet.

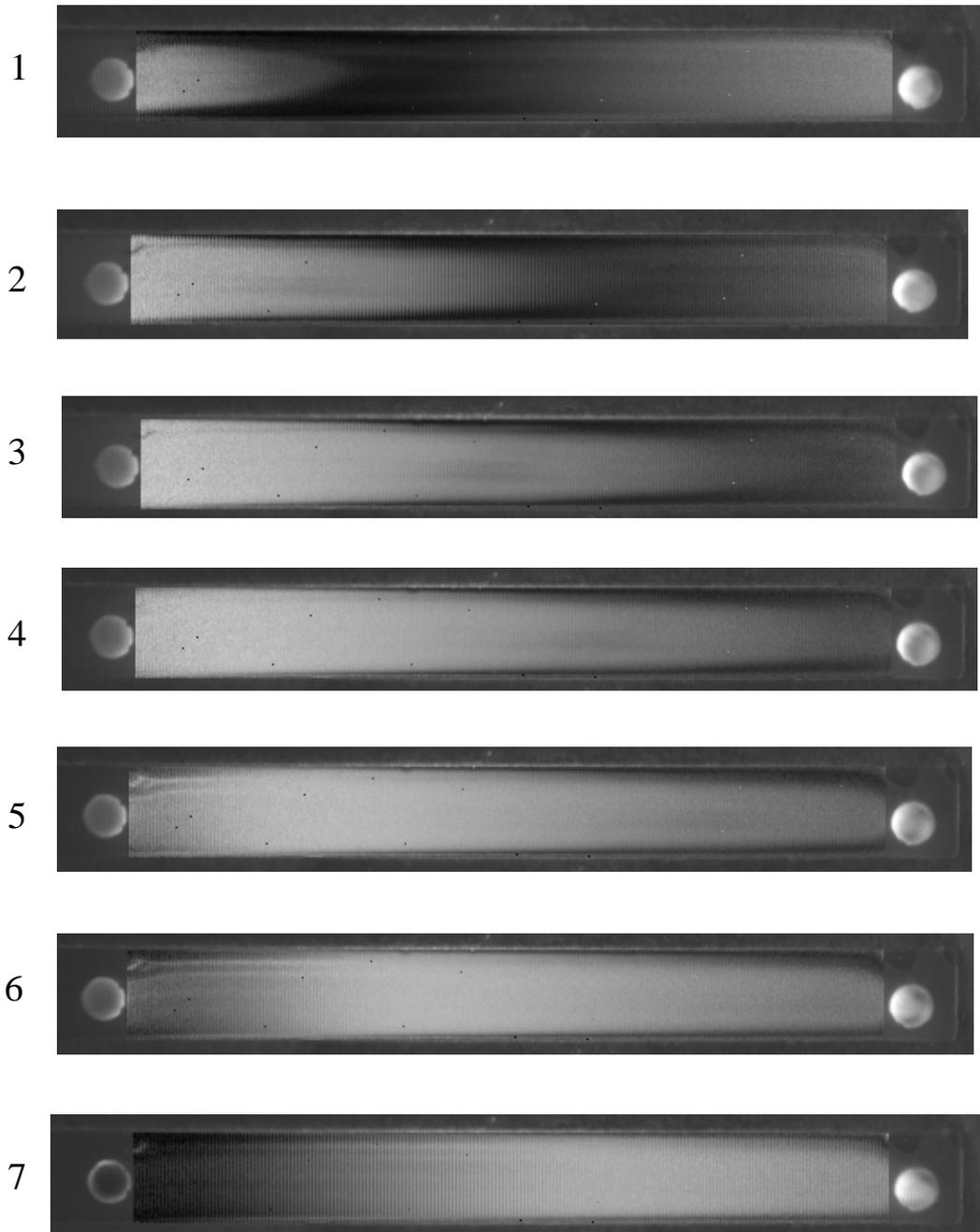
Mit der CCD-Kamera wurden zahlreiche Bildsequenzen mit unterschiedlicher Periodendauer der Modulation und unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten aufgenommen. Eine typische Sequenz soll im folgenden dokumentiert werden. Die Flußrate liegt bei  $1.20 \mu\text{l/s}$ , die Strömungsgeschwindigkeit bei  $17 \text{ mm/s}$ . Die Konzentration des Fluoresceins beträgt  $1.03 \text{ mM}$ , eine Konzentration, die sich noch innerhalb des linearen Bereichs der Kalibrierkurve befindet.

Bild 38 zeigt die Sequenz, wie sie nach der Shading-Korrektur von der CCD-Kamera geliefert wird. Die Korrektur wurde nur in den Bereichen zwischen den beiden Bohrlochern durchgeführt. Im obersten Photo ist die Situation nur wenige ms nach Beginn der Injektion eines Farbstoff-Pakets zu sehen: Das

Farbstoff-Paket hat gerade begonnen, das Eingangsbohrloch zu verlassen und hat einen noch schmalen, kerzenflammenähnlichen Fortsatz in den Kanal hineingebracht, während das Vorgänger-Paket gerade dabei ist, den Kanal über das Ausgangsbohrloch wieder zu verlassen. Im zweiten Photo hat sich das Vorgänger-Paket bis auf geringe Reste aus dem Kanal zurückgezogen, sein Nachfolger hat sich jetzt mit breiter Front in den Kanal vorgestreckt, seine Vorderfront hat schon über die Hälfte der Meßstrecke zurückgelegt. Im vierten Photo hat die Front des Pakets den gesamten Kanal durchschritten, das Vorgänger-Paket ist völlig verschwunden, einzig an den Rändern des Kanals ist noch jeweils ein schmaler Rest zu erkennen, Überbleibsel der extrem langsamen Strömung an den Kanalrändern. Auch das Wasserpaket, das die beiden Farbstoff-Pakete getrennt hat, bleibt als schmaler dunkler Strich noch bis zum letzten Photo der Serie erkennbar.

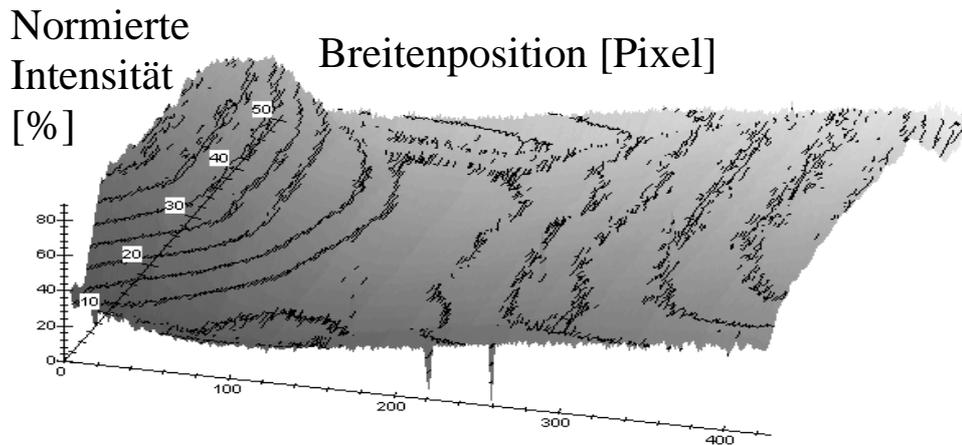
Auf Photo 6 ist das Ventil für die Farbstofflösung geschlossen, das Ventil für das reine Wasser geöffnet worden. Das Wasser beginnt, um das Eingangsbohrloch für die Farbstofflösung herumzulaufen, bis es dann auf dem siebten und letzten Photo mit breiter Front über dieses Bohrloch hinwegläuft.

Die CCD-Kamera-Grauwerte wurden schließlich in Konzentrationen des Fluoresceins umgerechnet und vom Programm Maple als Diagramme visualisiert (Bild 39). In diesen Diagrammen sind die Fronten des Fluorescein-Pakets sehr gut zu erkennen, besonders schön im vierten und fünften. Die Strömungsfronten sind auf einem großen Teil der Kanalbreite gerade Linien, erst zum Rand hin krümmen sie sich parabolisch ab. Die Konzentration der Ausgangslösung an Fluorescein wird nur für sehr kurze Zeit erreicht, meist bleibt sie deutlich unter 100 %.

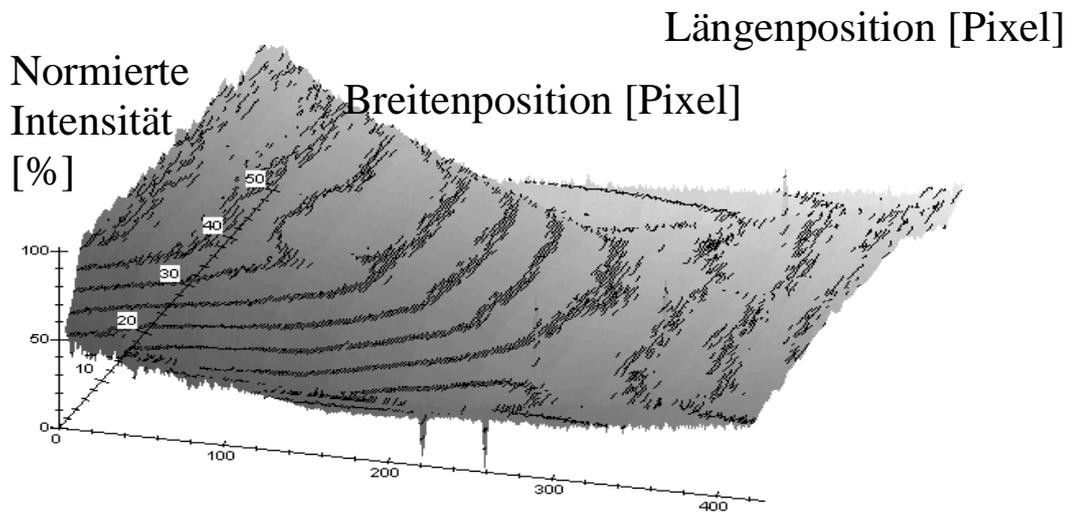


**Bild 38:** Bildfolge der CCD-Kamera nach Shading-Korrektur. Zeitlicher Abstand der einzelnen Bilder 0.16 s. Die Strömung geht von links nach rechts. Das linke Bohrloch stellt den Eingang der Farbstofflösung dar, das rechte den Ausgang. Nur der Bereich genau zwischen diesen beiden Bohrlochern hat die Shading-Korrektur erfahren, daher der abrupte Helligkeitswechsel an den entsprechenden Stellen.

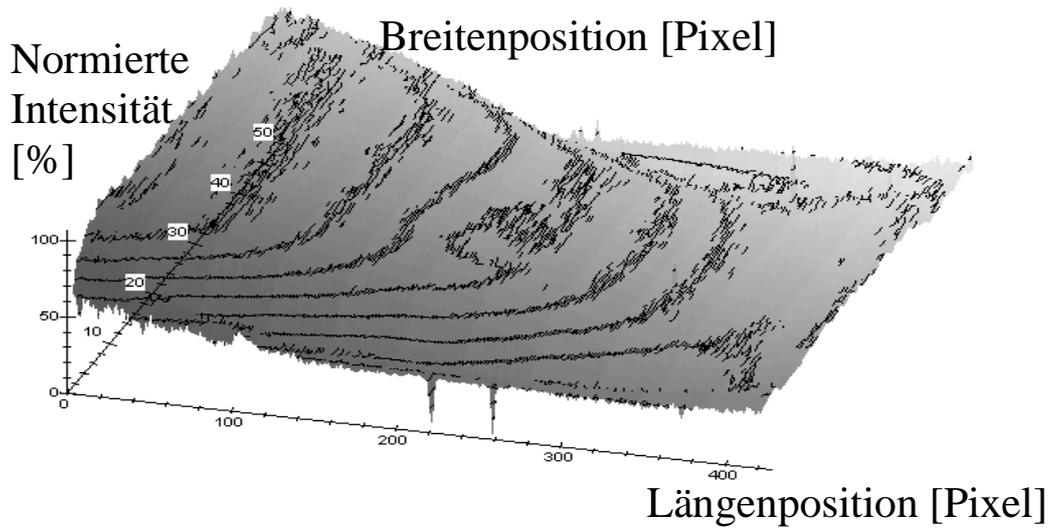
1

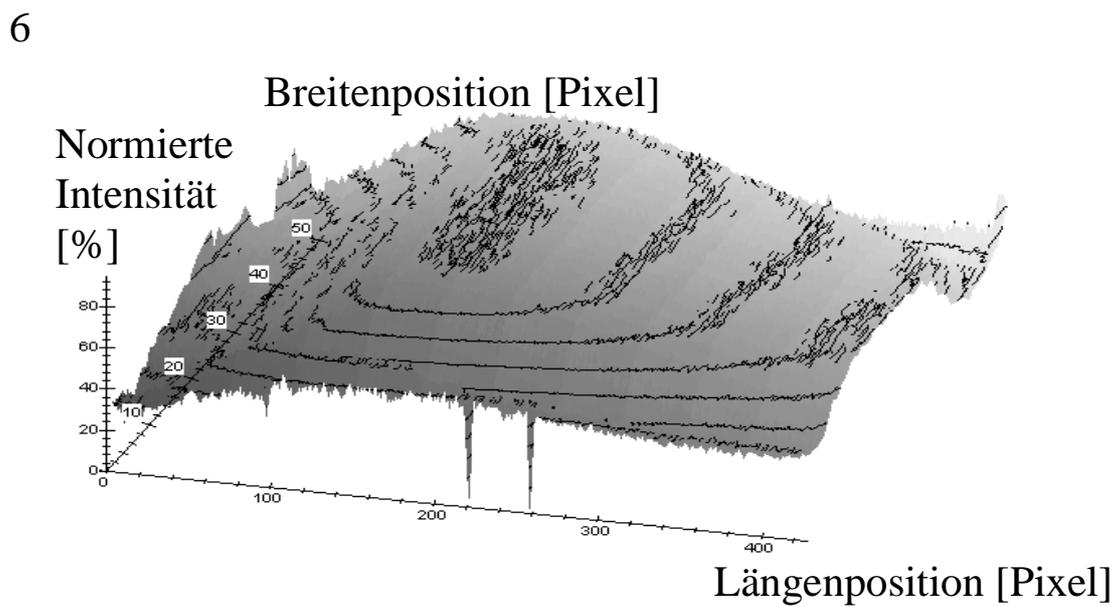
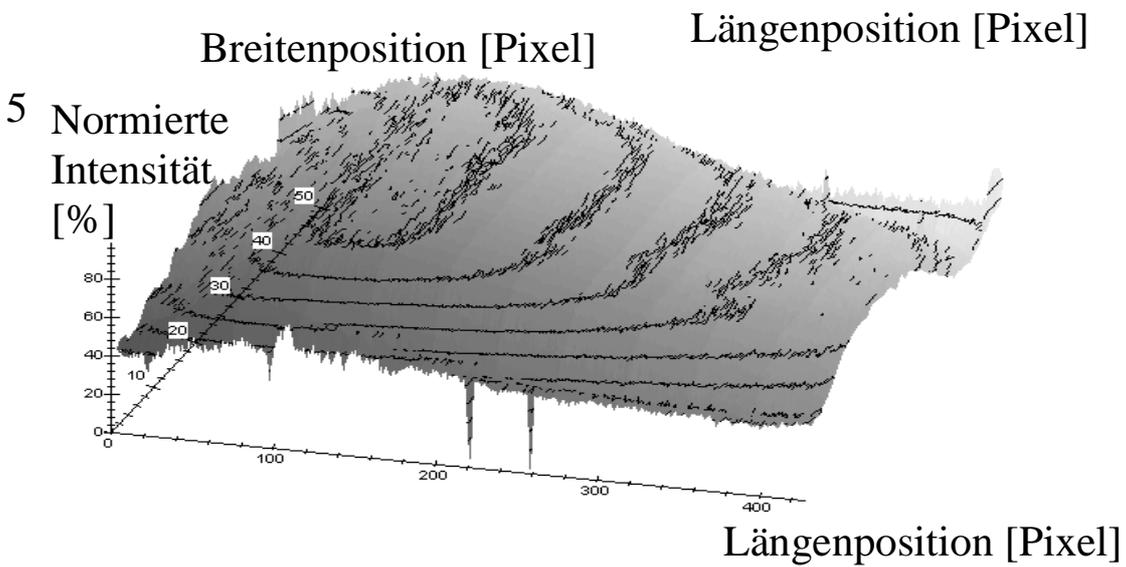
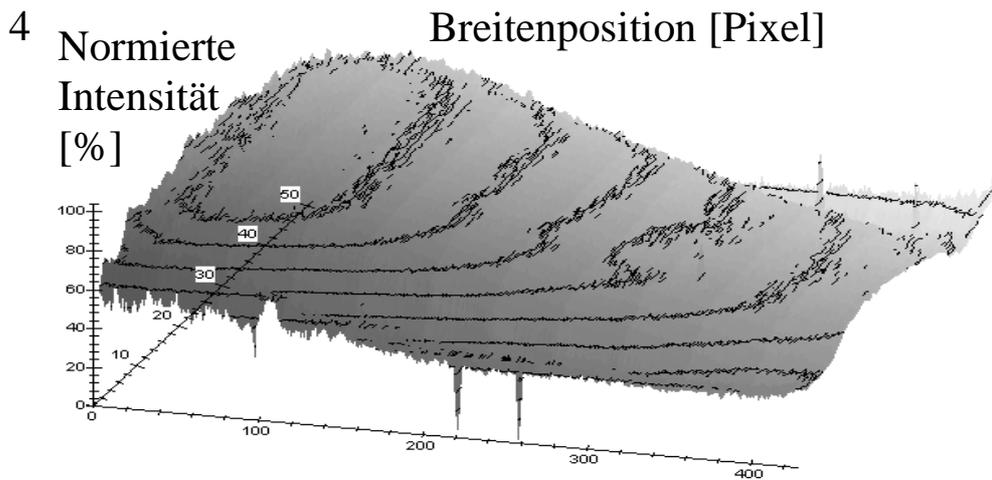


2

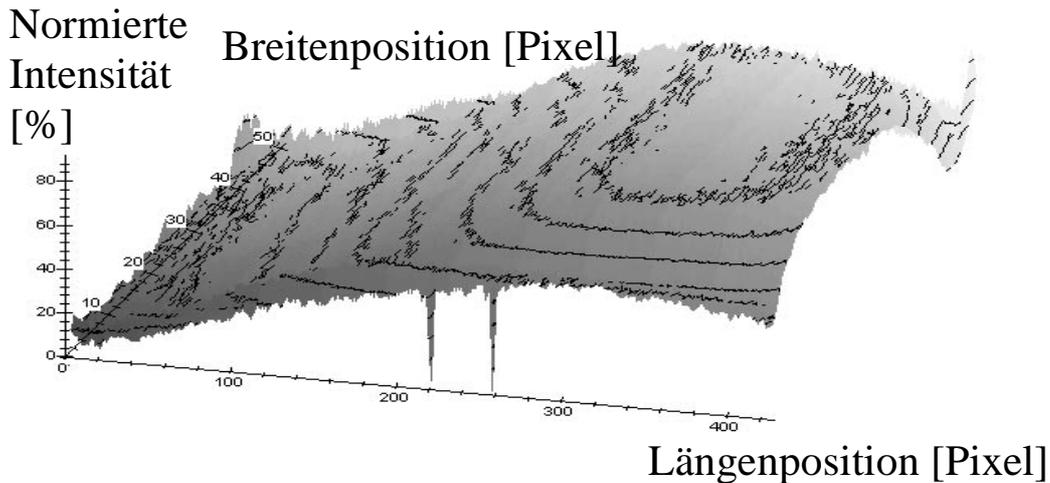


3





7



**Bild 39:** Die Konzentrationen des Fluoresceins in der Sequenz von Bild 38, berechnet über eine Kalibrierkurve der Art von Bild 33, aufgezeichnet von Maple. Die Orientierung ist gleich wie in Bild 38, der Eingang der Fluorescein-Lösung ist links, der Ausgang rechts. Die Nummern der Diagramme entsprechen den Nummern der CCD-Photographien in Bild 38.

### 3.3 Vergleich der Meßwerte der CCD-Kamera mit theoretischen Berechnungen

Die von der CCD-Kamera erhaltenen Meßwerte sollen nun mit theoretischen Werten verglichen werden. Dazu muß zunächst die Diffusion eines Farbstoffes zwischen zwei parallel und gerade fließenden Strömen berechnet werden. Es handelt sich hierbei um die Überlagerung zweier Bewegungen, zum einen der Diffusion des Farbstoffes und zum anderen um die Strömung des Farbstoffes mit den Flüssen.

#### 3.3.1 Die Diffusion zwischen zwei parallelen Strömen

In unserem Experiment kommt es zu einer Überlagerung zweier verschiedener Phänomene, nämlich der (konvektiven) Strömung und der Diffusion. Durch

beide Bewegungen kommt es zu einer ständigen Veränderung der Konzentration der einzelnen Substanzen im Lösungsmittel (hier: Wasser). Die partielle Differentialgleichung, die beide Phänomene beschreibt, die sogenannte Transportgleichung [47], lautet:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + v_x \cdot \frac{\partial c}{\partial x} + v_y \cdot \frac{\partial c}{\partial y} + v_z \cdot \frac{\partial c}{\partial z} = D \cdot \left[ \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] + Q \quad (13)$$

Hierbei ist  $c$  die Konzentration der betrachteten Substanz,  $v_{x,y,z}$  sind die Komponenten der Strömungsgeschwindigkeit,  $D$  ist der Diffusionskoeffizient und  $Q$  ein Quellterm, der für die Entstehung der Substanz durch chemische Reaktionen verantwortlich ist (Produktionsrate). Auf das vorliegende System angewendet ergeben sich einige entscheidende Vereinfachungen. Es gibt im System keine chemischen Reaktionen, das bedeutet, der Quellterm  $Q$  verschwindet. Außerdem wurde als Strömungsrichtung die  $z$ -Achse gewählt, daher ist nur die Komponente  $v_z$  von Null verschieden. Desweiteren sollen stationäre Bedingungen herrschen, d. h. an einer bestimmten Stelle im System soll die Konzentration zeitlich konstant bleiben, also verschwindet der Term  $\partial c / \partial t$ . Da der Diffusionsausgleich über die Tiefe wesentlich schneller vonstatten geht als die Diffusion über die Breite, kann von einem raschen Konzentrationsausgleich in der Tiefe des Kanals ausgegangen werden, also ist  $\partial^2 c / \partial y^2$  gleich Null. Da die Strömungsgeschwindigkeit über die Breite des Kanals als konstant angenommen werden kann [44], verschwindet auch der Term  $\partial^2 c / \partial z^2$ . Von unserer Transportgleichung (13) bleibt nur noch

$$v_z \cdot \frac{\partial c}{\partial z} = D \cdot \left[ \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \right] \quad (14)$$

Die Grenze zwischen den beiden parallel nebeneinander fließenden Strömen hängt von deren Flußraten (Volumen/Zeit) ab. Es gilt:

$$x_{grenz} = \frac{V_1 \cdot b}{V_1 + V_2} \quad (15)$$

Hierbei sind  $V_1$  und  $V_2$  die jeweiligen Flußraten der Ströme 1 und 2. Die Strecke  $x_{grenz}$  wird dabei von  $x = 0$  gemessen. Wenn die beiden Flußraten gleich groß sind, ist  $x_{grenz}$  die halbe Breite des Kanals.

Für jede Differentialgleichung werden Rand- bzw. Anfangswerte gebraucht, um eine eindeutige Lösbarkeit zu garantieren. In diesem Fall gilt für die Anfangskonzentration  $c_0$  bei  $z = 0$ ,

$$c(x, z=0) = \begin{cases} c_{1,0} & \text{für } 0 < x < x_{Grenz} \\ c_{2,0} & \text{für } x_{Grenz} < x < b \end{cases} \quad (16)$$

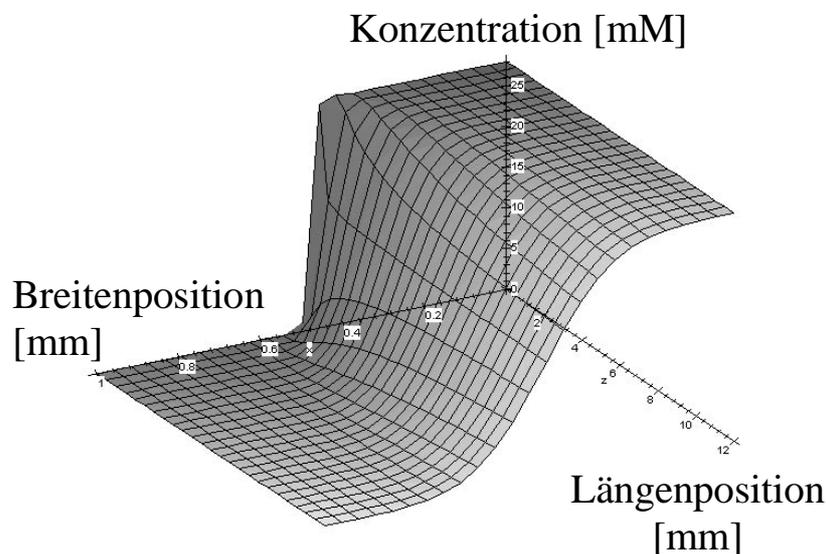
Hierbei sind  $c_{1,0}$  und  $c_{2,0}$  die Anfangskonzentrationen in Strom 1 und Strom 2. Nach unendlich langer Strecke  $z$  hat sich die Konzentration ausgeglichen. Diese Grenz-Konzentration beträgt

$$c(x, \infty) = \frac{c_{1,0} \cdot V_1 + c_{2,0} \cdot V_2}{V_1 + V_2} \quad (17)$$

Werden die Bedingungen so gewählt, daß die Flußraten gleich groß sind, ist die Grenzkonzentration der Mittelwert der beiden Anfangskonzentrationen.

Durch Separation der Variablen und Fourier-Analyse wird als Lösung der Gleichung (14) die folgende Funktion erhalten [44]:

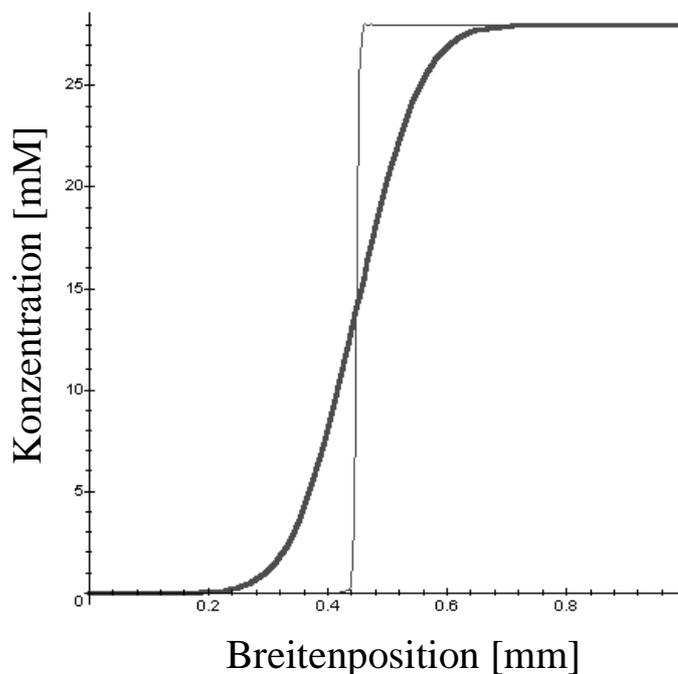
$$c(x, z) = \frac{c_{1,0} \cdot V_1 + c_{2,0} \cdot V_2}{V_1 + V_2} + (c_{1,0} - c_{2,0}) \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2}{n \cdot \pi} \sin\left(n \cdot \pi \cdot \frac{V_1}{V_1 + V_2}\right) \cdot \exp\left(-n^2 \cdot \pi^2 \cdot \left[\frac{D}{v_z \cdot b}\right] \cdot \frac{z}{b}\right) \cdot \cos\left[\frac{n \cdot \pi \cdot x}{b}\right] \quad (18)$$



**Bild 40:** Gerechnetes Konzentrationsprofil von Indigocarmine zwischen zwei parallel nebeneinanderfließenden Strömen. Die nach links zeigende x-Achse stellt die Breite des Kanals dar, die Einheit ist mm, daher geht  $x$  von 0 bis 1 mm. Die y-Achse, die nach vorn weist, bedeutet die Länge des Kanals in Strömungsrichtung, Einheit ist ebenfalls mm, der gezeichnete Bereich geht von 0 (Zusammentreffen der beiden Ströme) bis 12 mm. Auf der nach oben gehenden z-Achse ist die Konzentration des Indigocarmins aufgetragen (Einheit mM).

Bild 40 zeigt diese Funktion. Dabei wurde  $c_{1,0}$  zu 28 mM,  $c_{2,0}$  zu 0,  $v_z$  zu 3 mm/s (damit ergeben sich die Werte von  $V_1$  und  $V_2$  zu 1.3  $\mu\text{l/s}$ ) und  $D$  zu  $3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  angenommen.

Am Beginn des Zusammenströmens der beiden Flüsse bei  $z = 0$  ist die Konzentration nur im rechten Teil ungleich Null, nämlich gleich der Konzentration der Indigocarminlösung. Dann diffundiert die Substanz langsam in den linken Teil des Kanals. Dieser Vorgang kann durch Aufzeichnen der Konzentrationsverläufe quer zur Flußrichtung an zwei verschiedenen Stellen verdeutlicht werden, bei  $z = 0$  und bei  $z = 5 \text{ mm}$  beispielsweise, wie es in Bild 41 gezeigt ist.

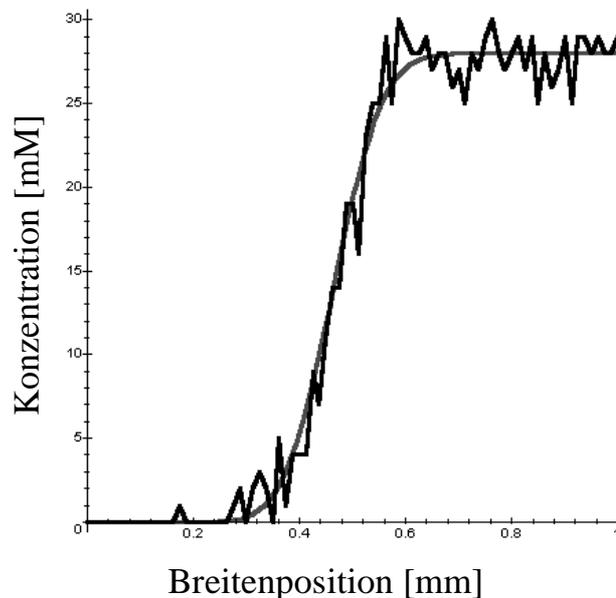


**Bild 41:** Schnitt durch das Konzentrationsprofil von Bild 40 bei  $z = 0$  (dünne Linie) und bei  $z = 5 \text{ mm}$  (dicke Linie). Die x-Achse (in mm) stellt die Breite des Kanals dar, auf der y-Achse ist die Konzentration des Indigocarmins aufgetragen (in mM).

Bei  $z = 0$  hat die Konzentrationsverteilung die Form eines Rechtecks (dünne Kurve in Bild 41), da zu Beginn der Diffusion die Grenze zwischen der Indigocarmin-Lösung und dem reinen Wasser noch sehr scharf ist, die dicke Kurve in Bild 41 stellt dann die Konzentrationsverteilung bei  $z = 5 \text{ mm}$  dar. Hier ist der Konzentrations-Ausgleich durch Diffusion schon verhältnismäßig weit vorangeschritten. Im weiteren Verlauf wird sich schließlich ein vollständiger Ausgleich ergeben, doch dieser war immer weit außerhalb der

Beobachtungsgrenzen. Die Rechnung zeigt, daß erst nach etwa 1 m ein Ausgleich der Konzentrationen eingestellt wird.

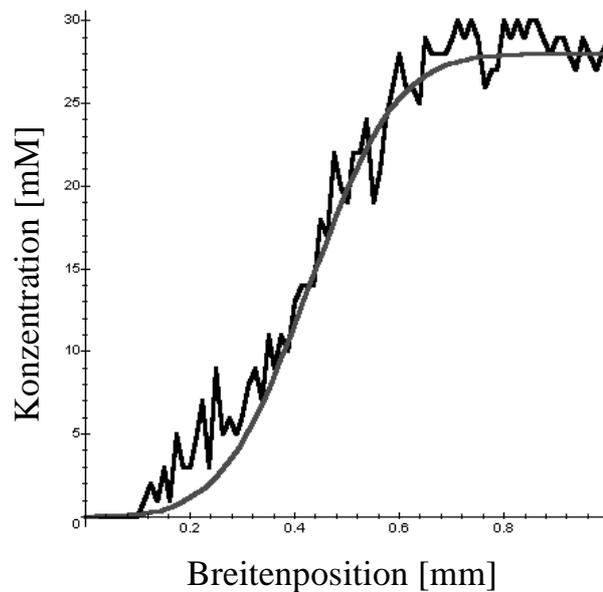
Die theoretischen Rechnungen wurden an die experimentellen Werte angepasst, die Gesamtflußrate wurde nach der in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Methode (Zählen von Tröpfchen) zu 1.68  $\mu\text{l}/\text{min}$  bestimmt. Die Aufteilung der Flußrate auf die beiden Ströme wurde durch die relative Breite der Flüsse zu Beginn der Strecke bestimmt. Die Flußraten verhielten sich wie 13 zu 15 (Wasser zu Farbstoff). Als Diffusionskoeffizient wurde ein in der Literatur angegebener Wert von  $3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  für organische Moleküle mit Molekulargewicht von einigen hundert Dalton in Wasser verwendet. Aufgrund der eingestellten Vergrößerung des Kamera-Objektivs ergab sich ein Abbildungsmaßstab von 709 Pixel pro cm in der Längsrichtung des Kanals.



**Bild 42:** Vergleich der experimentellen Werte der CCD-Kamera (dünne Kurve, vgl. Bild 29) mit dem theoretisch sich ergebenden Konzentrationsprofil (dicke Kurve). Die Konzentrationsprofile befinden sich in einer Entfernung von 3.5 mm vom Beginn der Diffusion. x-Achse: Breite des Kanals in mm, y-Achse: Konzentration des Indigocarmins in mM.

Der Beginn der Diffusion befindet sich am Ort des Zusammentreffens der beiden Ströme. Aufgezeichnet wurde der Bereich von 3.5 bis 11.6 mm vom Beginn der Diffusionsstrecke. Für den Vergleich von Messung und Rechnung wurden die beiden Querschnitte durch das gemessene Konzentrationsprofil von Bild 28 herangezogen, also die Kurven der Bilder 29 und 30. Es handelt sich hierbei um die Konzentrationsprofile in einer Entfernung von 3.5 bzw. 11.5 mm

vom Beginn der Diffusionsstrecke. Die Bilder 42 und 43 zeigen nun die Meßkurven zusammen mit den für die entsprechenden experimentellen Werte berechneten Kurven. Die Übereinstimmungen sind im Rahmen der Meßgenauigkeit (relativ großes Rauschen der CCD-Kamera) als sehr gut zu bezeichnen.



**Bild 43:** Vergleich der experimentellen Werte der CCD-Kamera (dünne Kurve, vgl. Bild 30) mit dem theoretisch sich ergebenden Konzentrationsprofil (dicke Kurve). Die Konzentrationsprofile befinden sich in einer Entfernung von 11.5 mm vom Beginn der Diffusion. x-Achse: Breite des Kanals in mm, y-Achse: Konzentration des Indigocarmins in mM.

### 3.3.2 Taylor-Dispersion in einer Röhre mit rechteckigem Querschnitt

Die Dispersion eines Analyten in einem laminaren Strömungssystem wird nach dem ersten genaueren Betrachter dieses Phänomens als Taylor-Dispersion bezeichnet. Taylor veröffentlichte seine mathematischen und experimentellen Ergebnisse 1953 [48], er nahm jedoch für seine Betrachtungen Röhren mit kreisförmigem Querschnitt. Seine Ergebnisse müssen also an einen rechteckigen Querschnitt angepaßt werden, dies soll im folgenden geschehen. Von der Diffusion soll jedoch abgesehen werden, denn, wie schon gezeigt, spielt sie in unserem System nur eine geringe Rolle. Eine Berechnung von Konvektion und Diffusion mit einem komplizierten numerischen Programm mit

finiten Elementen (aus dem Bereich der „Computational Fluid Dynamics“, kurz CFD genannt), findet sich in einer Veröffentlichung von van Akker und van der Linden [49], doch waren die numerischen Ergebnisse nicht direkt mit ihren experimentellen Meßwerten vergleichbar, so dass dort keine Beurteilung der numerischen Leistungen möglich ist. In den folgenden Seiten wird klar werden, dass auf eine komplizierte Numerik auf weiten Strecken verzichtet und trotzdem eine gute Annäherung an die experimentelle Wirklichkeit erreicht werden kann.

### 3.3.2.1 Zur Strömungsgeschwindigkeit

Für die Berechnung der Dispersion wird das Strömungsprofil in einem rechteckigen Kanal benötigt. Diese wird jedoch durch eine Formel mit unendlich vielen Gliedern beschrieben (Gleichung (7)). Um die Mathematik nicht unnötig kompliziert zu machen, wird die „nullte“ Näherung herangezogen, im folgenden ist außerdem  $v_z$  durch  $v$  ersetzt:

$$v = -\frac{\Pi}{2\eta} \cdot y \cdot (y-a) \quad (19)$$

Diese Geschwindigkeit ist nur von der Tiefe  $y$  des Kanalquerschnittes abhängig, ansonsten ist  $v$  von der Breitenposition im Kanal, also  $x$ , unabhängig. In der Tat ist dies ja auch für etwa 90 % der Kanalbreite erfüllt (vgl. Bild 22). In der halben Tiefe des Kanals, also bei  $y = a/2$ , ist die Strömungsgeschwindigkeit maximal, also  $v = v_{\max}$ . Für  $v_{\max}$  ergibt sich durch Einsetzen von  $y = a/2$

$$v_{\max} = \frac{\Pi \cdot a^2}{8 \cdot \eta} \quad (20)$$

Damit können wir die Formel für die Strömungsgeschwindigkeit auch mit  $v_{\max}$  schreiben:

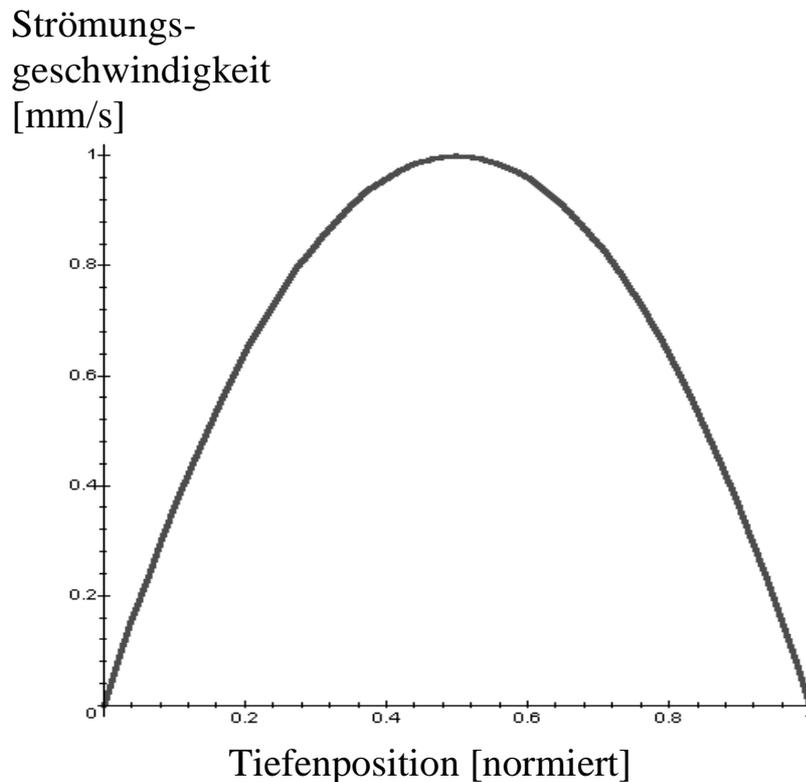
$$v = 4 \cdot v_{\max} \cdot \left( \frac{y}{a} - \frac{y^2}{a^2} \right) \quad (21)$$

Diese Funktion ist für  $v_{\max} = 1 \text{ mm/s}$  in Bild 44 dargestellt.

Experimentell zugänglich ist jedoch nicht  $v_{\max}$  selbst, sondern nur die durchschnittliche Strömungsgeschwindigkeit  $v_m$  über den gesamten Kanalquerschnitt. Daher muß die Frage nach dem Zusammenhang der beiden Größen  $v_m$  und  $v_{\max}$  gestellt werden. Durch Integration ergibt sich:

$$v_m = \frac{1}{a} \cdot \int_0^a v(y) \cdot dy = \frac{1}{a} \cdot \int_0^a 4 \cdot v_{\max} \cdot \left( \frac{y}{a} - \frac{y^2}{a^2} \right) \cdot dy = \frac{2}{3} \cdot v_{\max} \quad (22)$$

Der mathematische Parameter  $v_{\max}$  wird also durch Multiplikation mit  $3/2$  aus dem experimentellen Parameter  $v_m$  berechnet.



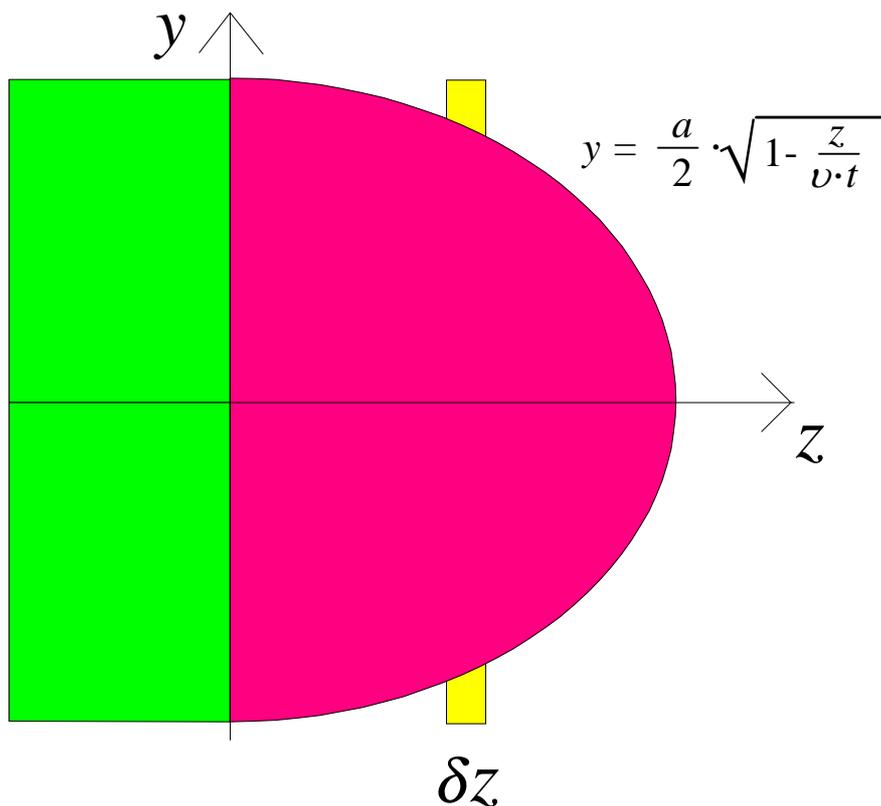
**Bild 44:** Schnitt durch das Strömungsprofil in nullter Näherung entlang der gesamten Tiefe des Mikrokanals. Die x-Achse stellt die Tiefenposition dar, wobei diese mit  $a$  normiert ist. Die maximale Strömungsgeschwindigkeit ist hier 1 mm/s.

### 3.3.2.2 Berechnung der Konzentrationsentwicklung bei einem semi-infiniten Anfangsquader

Die Konzentrationsverteilung soll in diesem Abschnitt mit der Anfangsbedingung eines semi-infiniten Quaders berechnet werden. Der Kanal wird als unendlich lang angenommen, links vom Ursprungspunkt  $z = 0$ , also für alle  $z < 0$ , befindet sich Farbstofflösung der Konzentration  $c$ , rechts vom Ursprungspunkt, also für alle  $z > 0$ , dagegen ist reines Wasser. Die Grenzschicht zwischen beiden ist zur Zeit  $t = 0$  eine senkrechte Fläche. Zur Beschreibung des

Experiments genügt ein Quader, der sehr lang im Vergleich zur Meßstrecke ist. Wenn die Strömung einsetzt, wird die Frontfläche zu einer Parabel verbogen. Bild 45 soll dies veranschaulichen. Der linke, hellere Teil der Zeichnung symbolisiert den Anfangs-Quader, der sein linkes Ende in der Unendlichkeit, sein rechtes aber bei  $z = 0$  findet. Die dritte Dimension, die entlang der nicht eingezeichneten  $x$ -Achse zu denken ist, wurde der Übersichtlichkeit halber weggelassen (alle hier zu betrachtenden Phänomene sind ohnehin unabhängig von  $x$ ). Die Breite des Quaders sei  $b$ , seine Tiefe  $a$ . Nach einer gewissen Zeit  $t$  wird sein rechtes Ende zu einer immer steiler verlaufenden Parabel (dunkler gezeichnet) verzogen, deren Form durch eine Parabel- bzw. eine Wurzelfunktion zu beschreiben ist. Die Grenzfläche zwischen Wasser und Farbstofflösung gehorcht der Formel

$$z = 4 \cdot v_{\max} \cdot t \cdot \left( \frac{y}{a} - \frac{y^2}{a^2} \right) \quad (23)$$



**Bild 45:** Skizze der Bewegung eines (semi-infiniten) Quaders, gefüllt mit Farbstofflösung konstanter Konzentration, in der laminaren Strömung eines rechteckigen Kanals.

Bei der Messung der Konzentrationsverteilung mit der CCD-Kamera werden die Intensitätswerte der Pixel ausgewertet. Dabei ist zu beachten, dass jedes Pixel ein endliches Flächenstück  $\delta x \cdot \delta z$  abbildet und die Konzentration in einem

Quader über diesem Flächenstück mittelt. Bild 45 stellt eine Seitenansicht des Strömungsprofils dar, dieses wird von der CCD-Kamera von oben her beobachtet. Der helle Streifen mit der Breite  $\delta z$  symbolisiert den Bereich, über den ein CCD-Pixel mittelt. Um die mittlere Konzentration in diesem Bereich zu berechnen, wird die Schnittmenge der dunklen Parabelfläche mit der Fläche des hellen, schmalen Rechecks benötigt. Zur Berechnung dieser Schnittfläche muss die Umkehrfunktion der Parabel gebildet werden. Es gilt:

$$y(z) = \frac{a}{2} \cdot \sqrt{1 - \frac{z}{v_{\max} \cdot t}} \quad (24)$$

Es ist jedoch zu beachten, daß diese Funktion nur die obere Hälfte des Strömungsprofils beschreibt. Da die Strömung symmetrisch zur Mittelebene ist, stellt dies kein Problem dar.

Da Diffusion ausgeschlossen wird, kann die Anfangskonzentration  $c_0$  als konstant betrachtet werden. Das Volumen, über das die CCD-Kamera mittelt, soll mit  $V_{CCD}$  abgekürzt werden. Für die mittlere Konzentration  $c_m$  in diesem Bereich ergibt sich zunächst

$$c_m = \frac{n}{V_{CCD}} \quad (25)$$

Hierbei ist  $n$  die Stoffmenge in diesem Volumen  $V_{CCD}$ . Diese Stoffmenge ergibt sich durch Multiplikation der Konzentration  $c_0$  mit dem Schnittvolumen von  $V_{CCD}$  mit dem (verzerrten) Farbstoff-Quader, dieses Schnittvolumen sei  $V_s$ , also

$$n = V_s \cdot c_0 \quad (26)$$

Die Breite des Volumens, also die im Diagramm nicht eingezeichnete Dimension, ist die Breite  $b_p$ , die von einem Pixel erfaßt wird. Die Ausdehnung in  $z$ - und  $y$ -Richtung errechnet sich durch die Bildung des Integrals von  $y(z)$  über die Länge des Pixels  $\delta z$ . Dieses Integral muß noch verdoppelt werden, um die Gesamtfläche zu erhalten. Also

$$V_s = b_p \cdot a \cdot \int_z^{z+\delta z} \sqrt{1 - \frac{z}{v_{\max} \cdot t}} \cdot dz \quad (27)$$

Nach der Integration ergibt sich:

$$V_s = b_p \cdot a \cdot \frac{2}{3} \cdot \left[ \left( 1 - \frac{z}{v_{\max} \cdot t} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z+\delta z}{v_{\max} \cdot t} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \quad (28)$$

Der von dem Pixel erfaßte Volumenbereich ist jedoch größer, nämlich

$$V_{CCD} = \delta z \cdot a \cdot b_p \quad (29)$$

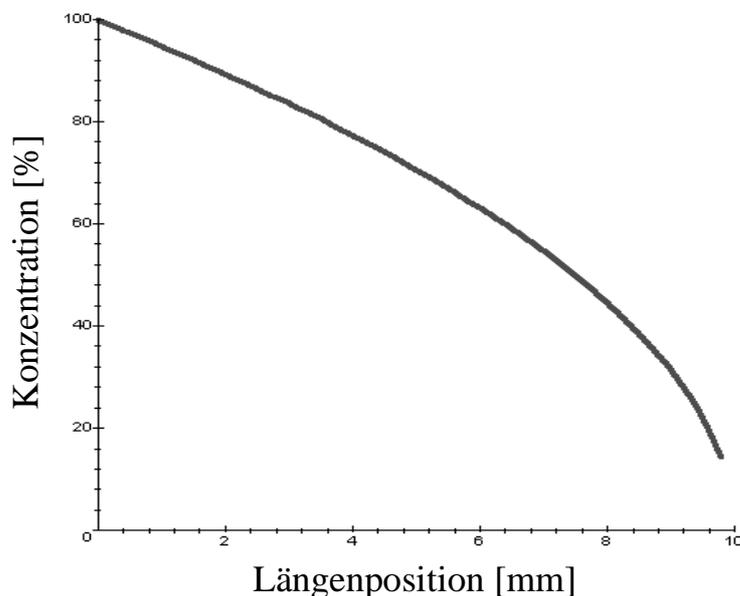
Für die mittlere Konzentration  $c_m$  ergibt sich schließlich:

$$c_m = \frac{n}{V_{CCD}} = \frac{C_0 \cdot V_s}{\delta z \cdot a \cdot b_p} \quad (30)$$

Mit Gleichung (28):

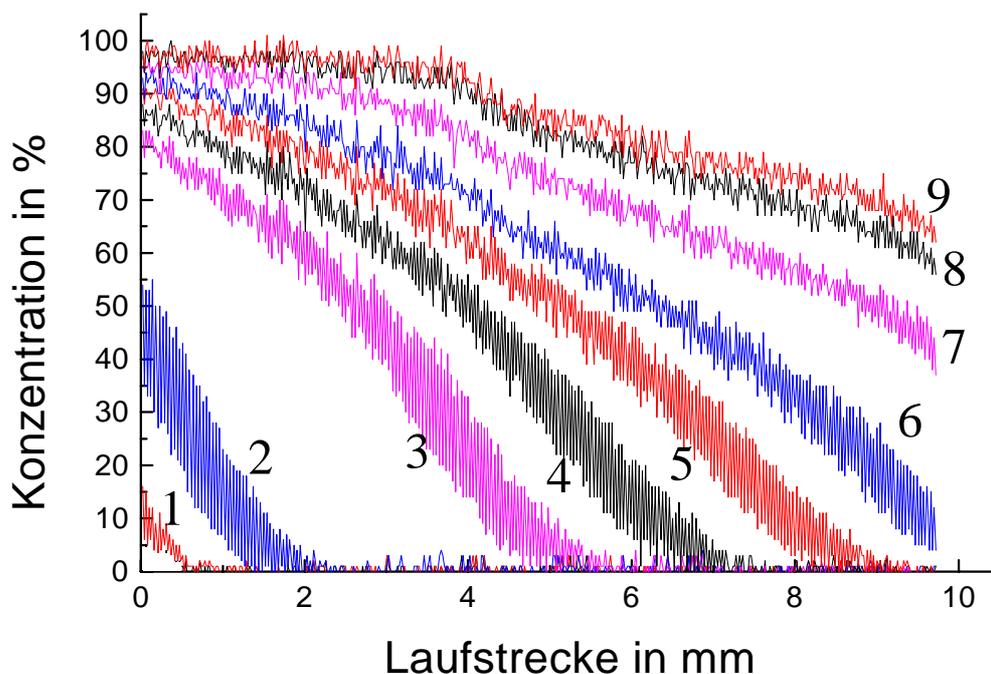
$$c_m = \frac{2 \cdot c_0 \cdot v_{\max} \cdot t \cdot \left[ \left( 1 - \frac{z}{v_{\max} \cdot t} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z + \delta z}{v_{\max} \cdot t} \right)^{\frac{3}{2}} \right]}{3 \cdot \delta z} \quad (31)$$

Diese Funktion ist in Bild 46 über die Länge des Kanals (hier 10 mm, entsprechend der Meßstrecke des Experiments von 9.7 mm) mit einer Fließzeit von 10 s dargestellt. Als Parameter wurden verwendet:  $v = 1$  mm/s,  $\delta z = 0.025$  mm,  $c_0 = 100$  %.



**Bild 46:** Gerechnete Konzentrationsverteilung eines Farbstoffes, der als Paket in einen rechteckigen Mikrokanal injiziert wird ( $v = 1$  mm/s,  $t = 10$  s,  $\delta z = 0.025$  mm,  $c_0 = 100$  %). Es wurde rechnerisch über die gesamte Kanaltiefe gemittelt, um den Konzentrationswert zu simulieren, den ein CCD-Pixel aufnehmen würde.

Um diese theoretischen Ergebnisse mit einem Experiment vergleichen zu können, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die äußeren Parameter (Strömungsgeschwindigkeit, Zeitintervall) exakt festgelegt wurden. Die Fließzeit des Farbstoffs wurde auf 3 s gesetzt, eine Zeit, in der schon problemlos mit einem semi-infiniten Modell gerechnet werden kann. Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit war mit 30 mm/s hoch genug, um Diffusion als wesentliche Einflußgröße auszuschließen. Die maximale Strömungsgeschwindigkeit in der Kanalmitte berechnet sich dann zu 45 mm/s. Aufgrund der Symmetrie der Strömung kann die weitere Betrachtung auf die Konzentrationswerte entlang der Mittelachse des Kanals beschränkt werden, da ein solcher (eindimensionaler) Vergleich weit einfacher und für unsere Zwecke absolut ausreichend ist, es werden praktisch Längsschnitte durch das Konzentrationsprofil betrachtet.



**Bild 47:** Längsschnitte durch das Konzentrationsprofil des Mikrokanals entlang der Mittelachse des Kanals zu 10 verschiedenen Zeiten.

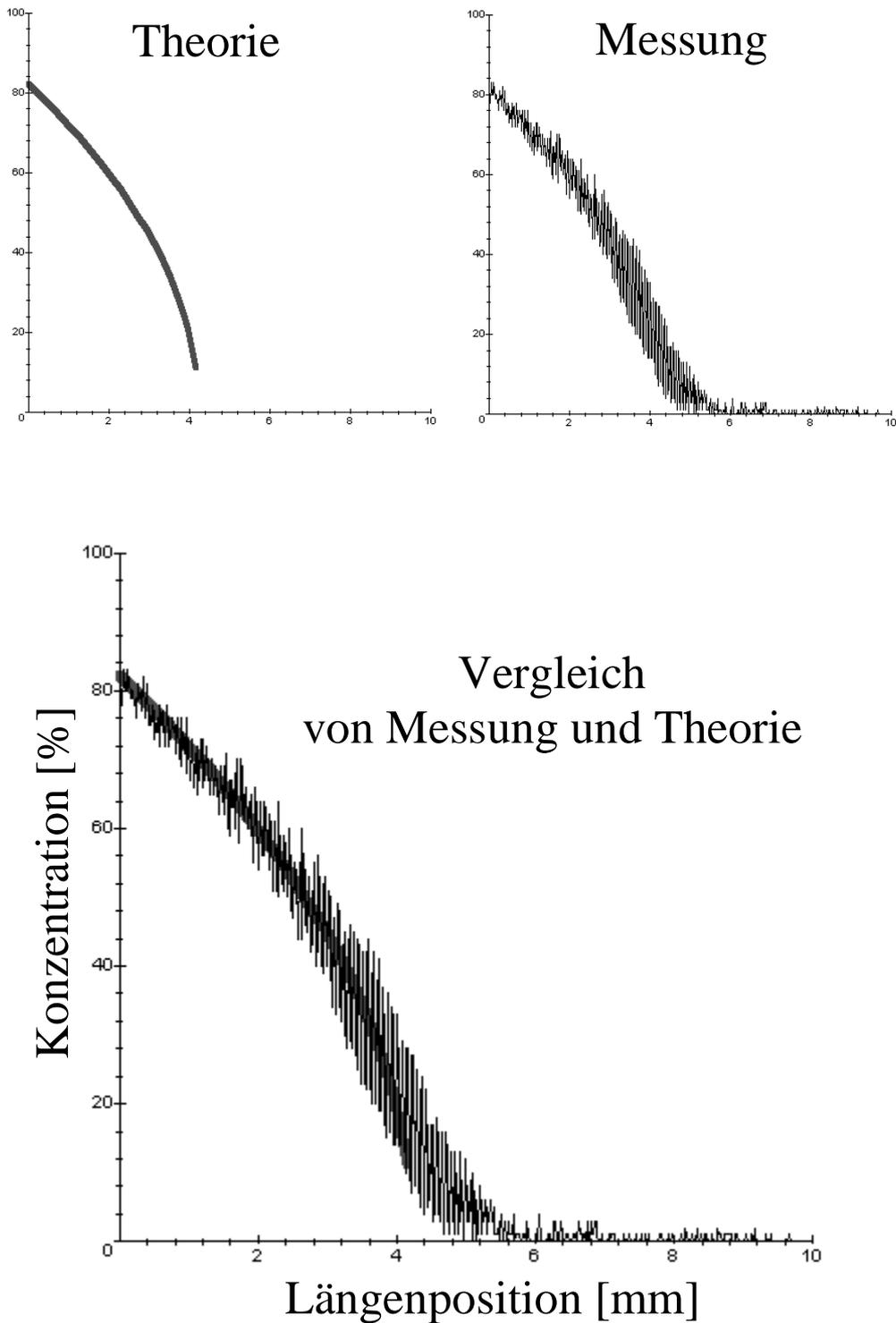
In Bild 47 sind solche Längsschnitte zu verschiedenen Zeiten in einem Diagramm dargestellt. Die Farbstofflösung tritt am Nullpunkt der x-Achse in den Kanal ein, die Strömung geht von links nach rechts. Die Kurve, die am nächsten am Ursprung liegt (Kurve 1) stellt das Farbstoffpaket in dem

Augenblick dar, in dem es nur wenige Zehntel Millimeter in den Kanal eingedrungen ist. Alle weiteren, sich rechts anschließenden Kurven sind in einem Zeitabstand von 0.04 bzw. 0.08 s aufgenommen. Die verschiedenen großen Zeitintervalle ergeben sich aus dem Umstand, daß die Kamera die Bilder schneller lieferte, als der Rechner sie verarbeiten konnte. So wurde ab und zu ein Bild verworfen.

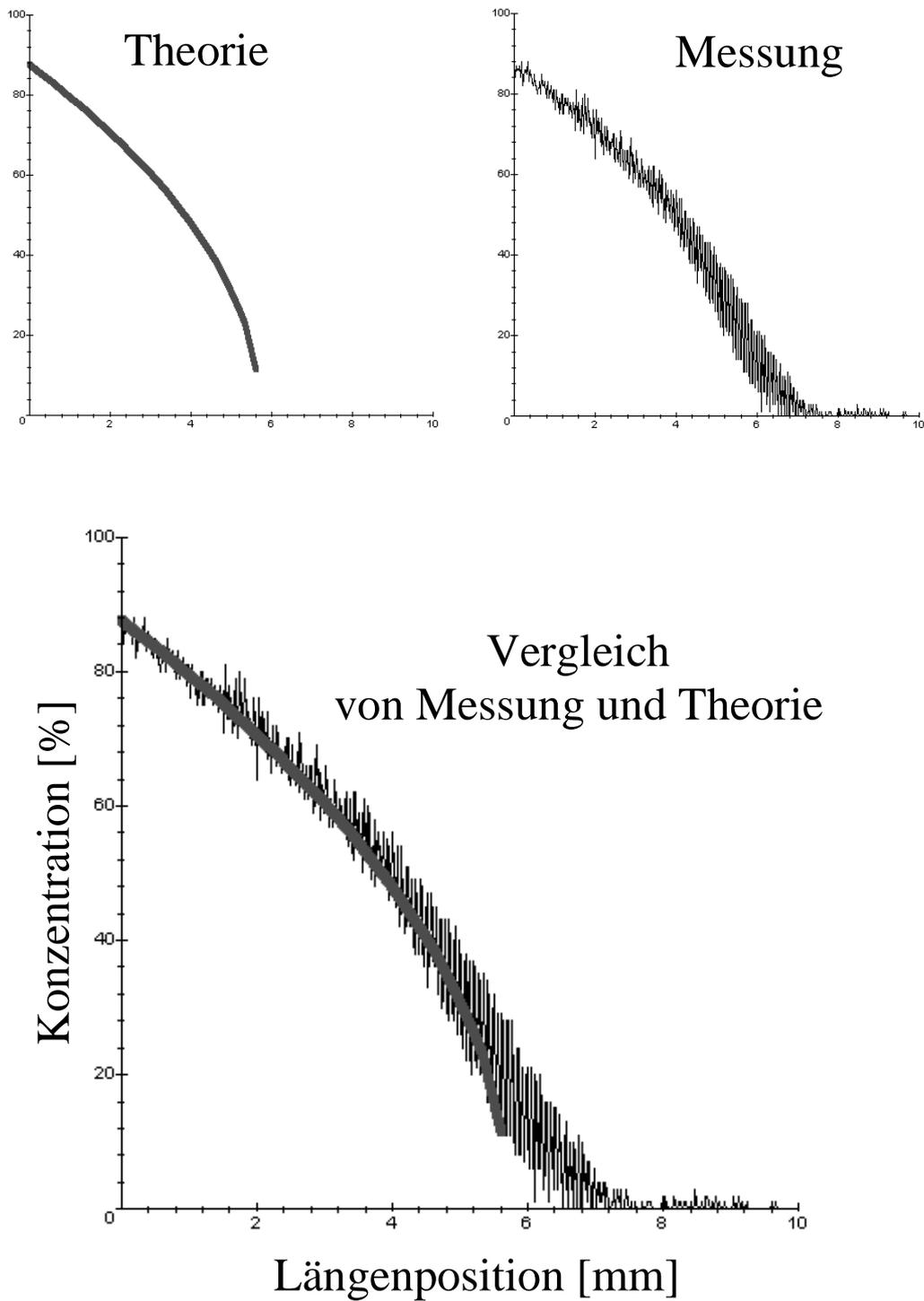
Mit den entsprechenden Daten werden von Maple die theoretischen Kurven berechnet. Für die Simulation wurden die Kurven 3, 4 und 5 ausgewählt, da bei diesen Kurven der Konzentrationsbereich am größten war. Die dritte Kurve erreicht für  $z = 0$  schon 80 % der maximalen Konzentration. Was hier deutlich wird, ist die Tatsache, daß der Anfangspunkt des semi-infiniten Quaders gar nicht aufgenommen wurde, denn dann wäre bei  $z = 0$  die Konzentration  $c = 100$  %. Dieser Anfangspunkt lag außerhalb des Meßbereichs. Durch Extrapolation wurde der Anfangspunkt auf  $z = -1.7$  mm ermittelt. Dies ergibt für Kurve 3 den Zeitpunkt 0.13 s nach Eintritt der Vorderfront des Pakets in den Kanal. In Bild 48 ist der Vergleich von Theorie und Experiment zu sehen.

Es ist klar zu erkennen, daß die Simulation den Teil der vordersten Front nur schlecht wiedergibt. Dies ist auf die Anfangsbedingungen der Injektion von unten in ein rundes Bohrloch zurückzuführen. Diese Anfangsbedingung ist mit den hier gemachten Idealisierungen nicht zu erfassen. Doch ist die Abweichung auch nur dort von Bedeutung. Der Rest der Meßkurve wird durch die Simulation sehr gut wiedergegeben.

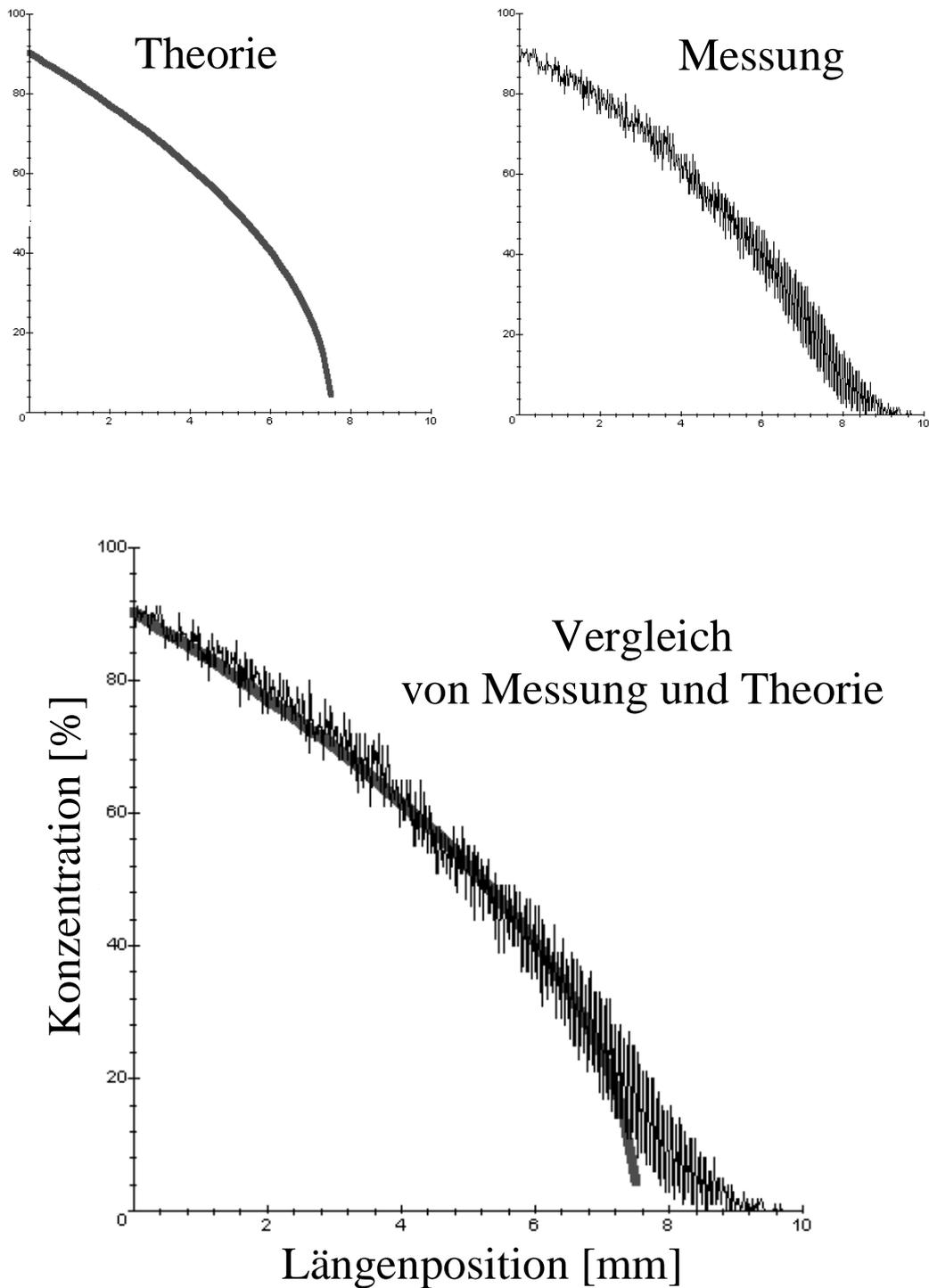
Die Kurven 4 und 5 sind zum Zeitpunkt 0.17 s bzw. 0.21 s aufgenommen worden, bei ansonsten unveränderten Parametern. Die Bilder 49 und 50 zeigen den entsprechenden Vergleich von Theorie und Experiment. Auch hier wird nur der Anfangsteil durch die Simulation nicht korrekt wiedergegeben, der Rest der Simulation passt sehr gut.



**Bild 48:** Vergleich von Theorie und Experiment zur Zeit 0.13 s. Die Abszisse stellt die Längenposition des Kanals dar (in mm), die Ordinate die Konzentration in % der Stammlösungskonzentration. Oben sind die theoretische und die gemessene Kurve einzeln, unten zum besseren Vergleich gemeinsam in einem Diagramm eingezeichnet worden.



**Bild 49:** Vergleich von Theorie und Experiment zur Zeit 0.17 s. Die Abszisse stellt die Längenposition des Kanals dar (in mm), die Ordinate die Konzentration in % der Stammlösungskonzentration. Oben sind die theoretische und die gemessene Kurve einzeln, unten zum besseren Vergleich gemeinsam in einem Diagramm eingezeichnet worden.

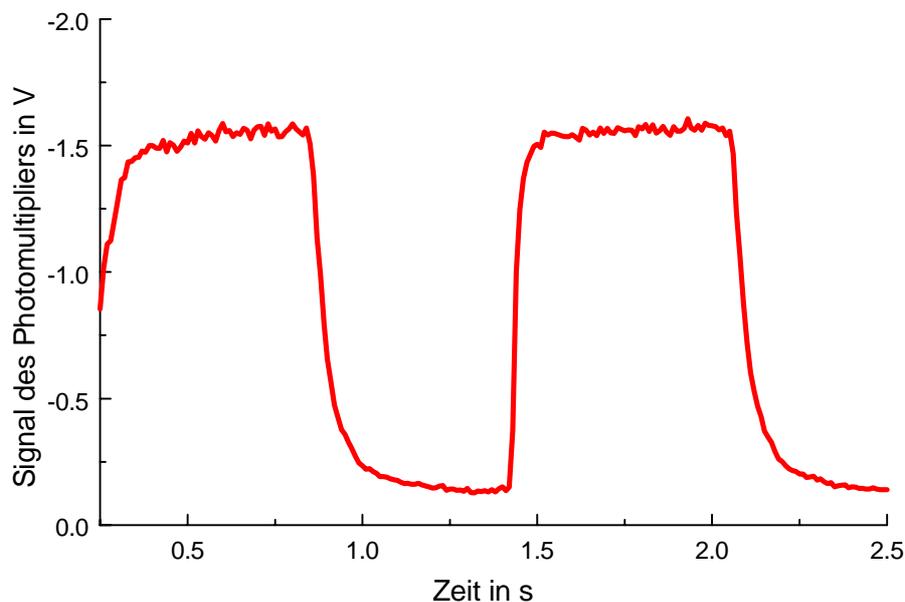


**Bild 50:** Vergleich von Theorie und Experiment zur Zeit 0.21 s. Die Abszisse stellt die Längenposition des Kanals dar (in mm), die Ordinate die Konzentration in % der Stammlösungskonzentration. Oben sind die theoretische und die gemessene Kurve einzeln, unten zum besseren Vergleich gemeinsam in einem Diagramm eingezeichnet worden.

### 3.4 Messungen mit dem Photomultiplier

Mit dem Photomultiplier werden die Messungen mit der CCD-Kamera ergänzt und vor allem mit Blick auf die Modulation erweitert: Die zeitliche Auflösung des Photomultipliers ist um drei Größenordnungen höher als die der CCD-Kamera. Die räumliche Auflösung allerdings ist auf 1 mm beschränkt, d. h. es wird über die gesamte Kanalbreite gemittelt.

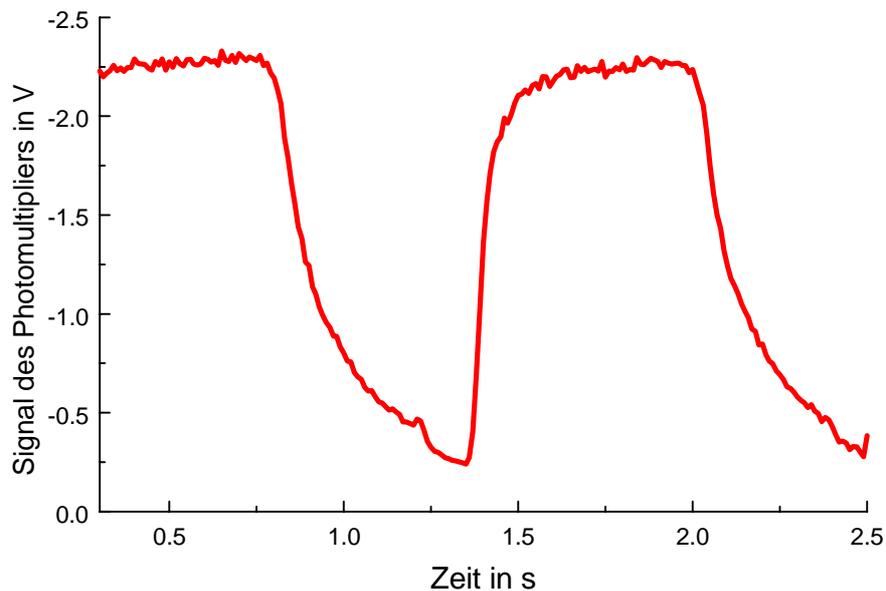
Eine der wichtigsten Größen, die die zeitliche Konzentrationsverteilung beeinflussen, ist die Strömungsgeschwindigkeit. Bild 51 zeigt die Farbstoff-Pakete bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 29 mm/s, gemessen in einer Entfernung von 2 mm vom Eingang. Die Pulse sind deutlich ausgebildet, der Anstieg der Konzentration erfolgt sehr schnell, der Abfall der Konzentration ist etwas langsamer und geht bis auf nahezu null zurück. Die Asymmetrie des An- und Abstiegs der Konzentration ist auf die asymmetrischen Bedingungen zurückzuführen. Die Injektion der Farbstofflösung erfolgt von unten im mittleren Bohrloch des  $\mu$ -FIA-Plättchens, während die Injektion des Wassers im linken Bohrloch erfolgt.



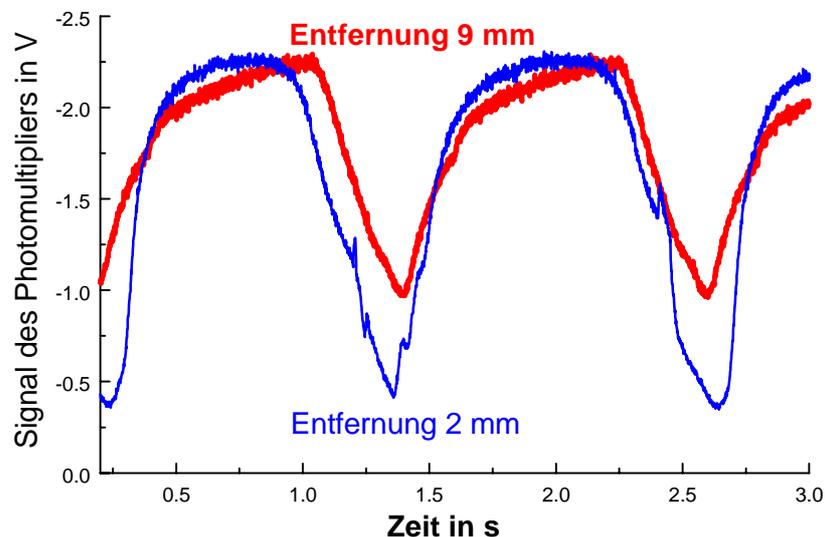
**Bild 51:** Messung der zeitlichen Konzentrationsverteilung mit dem Photomultiplier in einer Entfernung von 2 mm vom Eingang mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 29 mm/s.

Bild 52 zeigt das gleiche Experiment mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 13.4 mm/s. Sowohl Anstieg als auch Abfall der Konzentration verlaufen wesentlich langsamer, was sich bei noch niedrigeren Strömungsgeschwindigkeiten natürlich noch weiter verstärkt. Bei diesen

Geschwindigkeiten folgen die Pulse in so geringem räumlichen Abstand, dass die Konzentration auch nicht mehr auf Null zurückgeht.



**Bild 52:** Messung der zeitlichen Konzentrationsverteilung mit dem Photomultiplier in einer Entfernung von 2 mm vom Eingang mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 13.4 mm/s.

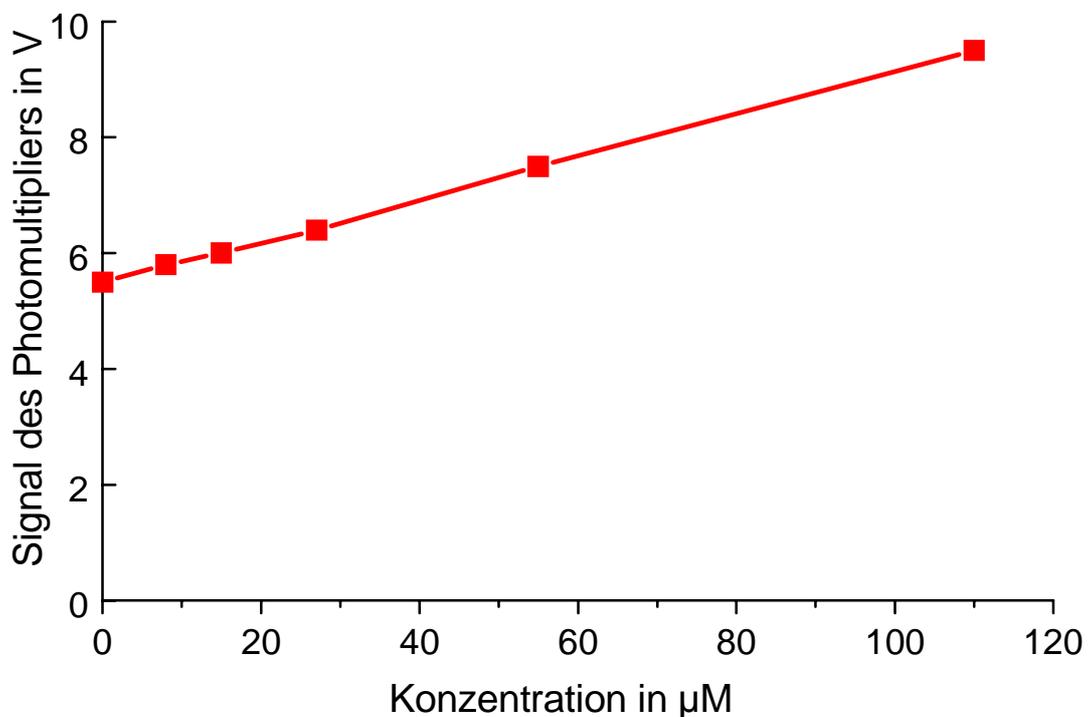


**Bild 53:** Vergleich der zeitlichen Konzentrationsverteilungen mit dem Photomultiplier, gemessen an zwei verschiedenen Orten des Mikrokanals bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 9.7 mm/s.

Bild 53 zeigt Messungen an zwei verschiedenen Stellen des Mikrokanals. Wie nicht anders zu erwarten, steigt der Einfluß der Dispersion mit der Entfernung

vom Eingang des Farbstoffes. In einer Entfernung von 9 mm geht die Konzentration auf etwa 40 % der Maximal-Konzentration zurück

Schließlich wurde der Photomultiplier noch kalibriert. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen des Fluoresceins in die Flußzelle injiziert und das Signal des Photomultipliers wurde aufgezeichnet. Das Ergebnis ist in Bild 54 zu sehen. Der Untergrund ist hoch, denn auch ohne Fluorescein ist schon ein hohes Signal des Photomultipliers zu beobachten. Dieses Signal rührt von dem relativ hohen Anteil an reflektiertem Licht der blauen Leuchtdiode her, das nicht von dem OG530-Glas-Filter verschluckt wird. Die Nachweisgrenze dieses an sich sehr empfindlichen Photomultipliers erniedrigt sich dadurch auf etwa 2 bis 3  $\mu\text{M}$ .

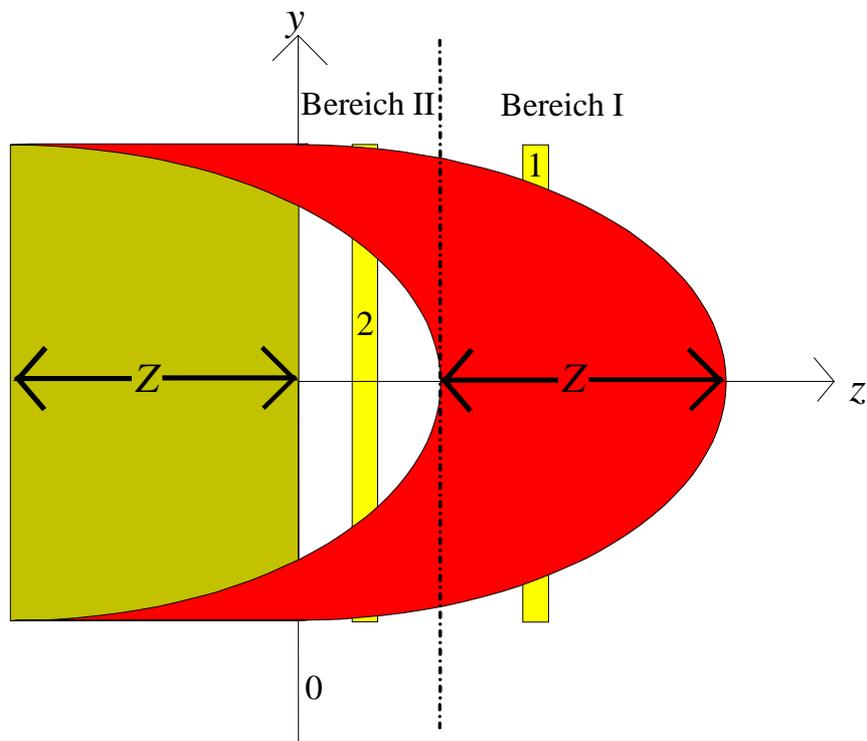


**Bild 54:** Kalibrierkurve des Photomultipliers.

### 3.5 Vergleich der Messwerte des Photomultipliers mit theoretischen Daten

#### 3.5.1 Berechnung der Konzentrationsentwicklung bei einem endlichen Anfangsquader

Zur Bildung eines theoretischen Modells für die Messdaten des Photomultipliers reicht der semi-infinite Anfangsquader von Abschnitt 3.3.2.2, der für die Berechnung der Daten der CCD-Kamera so gute Dienste leistete, bei weitem nicht mehr aus. Hier soll eine schnelle Aufeinanderfolge vieler Farbstoffpakete berechnet werden. Daher müssen die Anfangsbedingungen variiert werden, genauer gesagt, aus dem semi-infiniten Anfangsquader wird ein finiter Anfangs-Quader mit der Länge  $Z$ , der durch die Strömung verzerrt wird. Bild 55 zeigt schematisch den Vorgang. Zu Beginn ist der Farbstoff auf den Bereich zwischen 0 und  $-Z$  beschränkt (helles Rechteck), zu einer späteren Zeit (dunkle Fläche) sind die vertikalen Begrenzungen zu Parabeln verzogen.



**Bild 55:** Skizze der Bewegung eines finiten Quaders aus Farbstofflösung konstanter Konzentration, in der laminaren Strömung eines rechteckigen Kanals.

Die rechte (von der Strömung her gesehen vordere) Begrenzungslinie wird wiedergegeben durch

$$y_v(z) = \frac{a}{2} \cdot \sqrt{1 - \frac{z}{v_{\max} \cdot t}} \quad (32)$$

die linke (hintere) Begrenzungslinie hinkt um  $Z$  hinterher

$$y_h(z) = \frac{a}{2} \cdot \sqrt{1 - \frac{z + Z}{v_{\max} \cdot t}} \quad (33)$$

Ein Blick auf Bild 55 zeigt, daß für die Berechnung der mittleren Konzentration zwei verschiedene Bereiche unterschieden werden müssen. Die Funktionen sind, wenn komplexe Zahlen einmal außer Acht gelassen werden sollen, nur bis zu einem bestimmten  $z$ -Wert definiert, nämlich die Funktion  $y_v$  bis zu  $z = v_{\max} \cdot t$ ,  $y_h$  bis zu  $v_{\max} \cdot t - Z$ . Daher kann im Intervall  $[v_{\max} \cdot t - Z, v_{\max} \cdot t]$  nur  $y_v$  berechnet werden, wobei dort die Ergebnisse von Abschnitt 3.3.2.2 übernommen werden können, im Intervall  $[0, v_{\max} \cdot t - Z]$  jedoch müssen beide Funktionen,  $y_v$  und  $y_h$ , berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu Abschnitt 3.3.2.2 handelt es sich bei  $\delta z$  jetzt nicht um die Ausdehnung eines Pixels der CCD-Kamera, sondern um den Durchmesser des Lichtleiters.

**Bereich I:** Hier wird die Lösung von Abschnitt 3.3.2.2 übernommen:

$$c_m = \frac{2 \cdot c_0 \cdot v_{\max} \cdot t \cdot \left[ \left( 1 - \frac{z}{v_{\max} \cdot t} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z + \delta z}{v_{\max} \cdot t} \right)^{\frac{3}{2}} \right]}{3 \cdot \delta z}$$

für  $z \in [v_{\max} \cdot t - Z, v_{\max} \cdot t]$

(34)

**Bereich II:** Hier muß beachtet werden, daß bei der Schnittfläche zwischen dem schmalen Rechteck 2 und der dunklen Parabelfläche die Fläche der linken Begrenzungsparabel abgezogen werden muß, das bedeutet, daß die Lösungsfunktion eine Differenz von Termen der obigen Form wird. Als Subtrahend wird die auf Bereich II erweiterte Lösung von Bereich I genommen, als Minuend ein nahezu identischer Term, wobei dort anstelle von  $z$  nur  $z + Z$  zu setzen ist. Nach kleineren Umformungen wird dann daraus:

$$c_m = \frac{2 \cdot c_0 \cdot v_{\max} \cdot t \cdot \left[ \left(1 - \frac{z}{v_{\max} \cdot t}\right)^{\frac{3}{2}} - \left(1 - \frac{z+Z}{v_{\max} \cdot t}\right)^{\frac{3}{2}} + \left(1 - \frac{z+Z+\delta z}{v_{\max} \cdot t}\right)^{\frac{3}{2}} - \left(1 - \frac{z+\delta z}{v_{\max} \cdot t}\right)^{\frac{3}{2}} \right]}{3 \cdot \delta z}$$

für  $z \in [0, v_{\max} \cdot t - Z]$ .

(35)

Damit sind die Formeln zur Berechnung der mittleren Konzentration eines isolierten Farbstoffpakets vollständig abgeleitet.

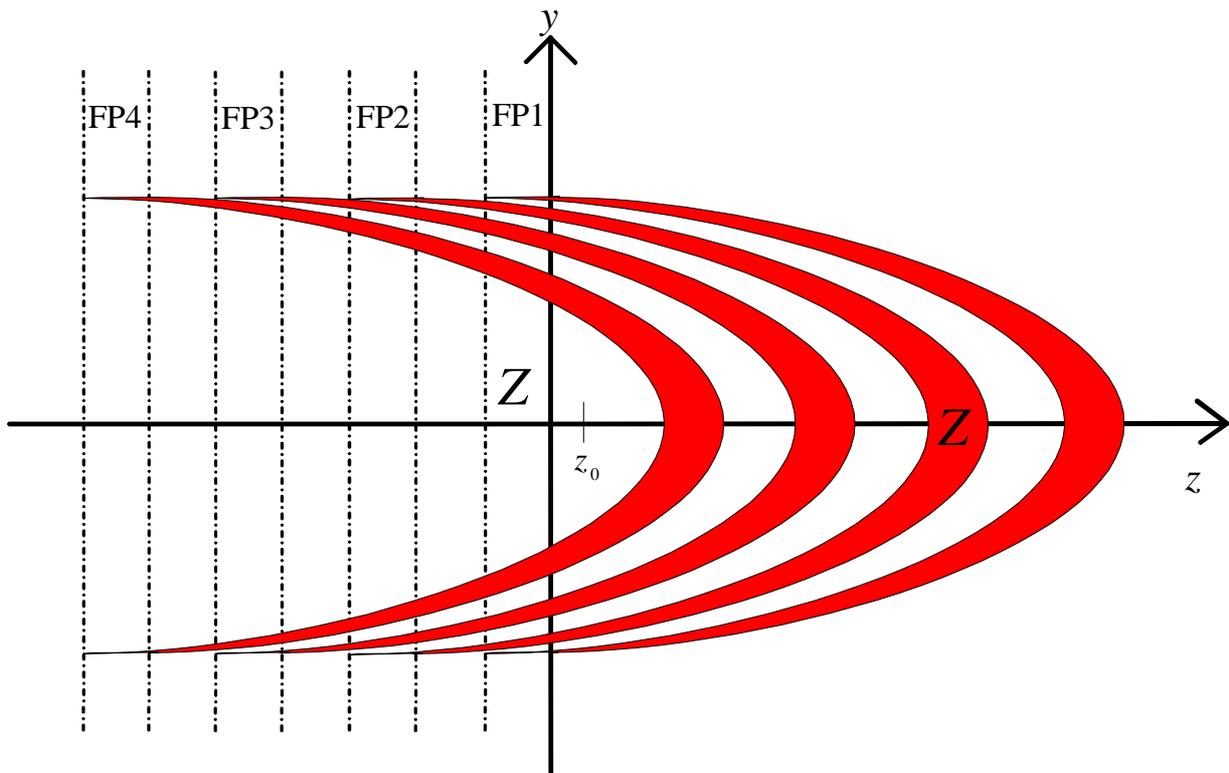
### 3.5.2 Die zeitliche Änderung der Konzentration an einem festgehaltenen Punkt

Für die Modulations-Experimente ist in erster Linie die zeitliche Änderung der Konzentration an einem festgehaltenen Punkt von großer Bedeutung. Hierfür kann natürlich die gleiche Funktion wie die für die räumliche Verteilung der Konzentration verwendet werden, Gleichungen (34) und (35), diesmal jedoch mit der Zeit als unabhängiger Variable,  $z$  wird zu einer frei wählbaren Konstanten. Allerdings genügt in diesem Fall ein isoliertes Farbstoff-Paket nicht mehr. Es muß eine Folge von solchen Paketen betrachtet werden, die durch die Strömung ineinandergeschachtelt werden, ähnlich wie Pappbecher, die zur Platzersparnis ineinandergestellt werden. In Bild 56 ist dieser Vorgang schematisch dargestellt.

Die die mittlere Konzentration beschreibende Funktion wird dann eine immer längere Reihe, proportional zur Anzahl der Farbstoffpakete, die in den Kanal injiziert werden. Die Bereichsunterscheidungen, die schon für das isolierte Paket gemacht wurden, müssen also noch vielfältiger gemacht werden. Es handelt sich jedoch nun nicht mehr um räumliche Bereiche, sondern um zeitliche, also um Zeitintervalle. Der Ort des Interesses sei  $z_0$ . Der Zeitnullpunkt soll in jenem Augenblick sein, in dem das erste Farbstoffpaket den Ursprung der  $z$ -Achse überschreitet. Dann gibt es zunächst den Zeitbereich, in dem einfach nichts passiert, weil das erste Farbstoff-Paket an dem betrachteten Ort  $z_0$  noch gar nicht angekommen ist. Dieses erste Zeitintervall ist  $T_1 = [0, z_0/v_{\max}]$ , da sich das Paket mit der Geschwindigkeit  $v_{\max}$  in  $z$ -Richtung bewegt und den Ort  $z_0$  nach  $\frac{z_0}{v_{\max}}$  erreicht hat. In diesem Zeitintervall gilt  $c_m = 0$ . Dann fließt das verzerrte Paket am Ort  $z_0$  vorbei. Die Länge des Paketes soll mit  $Z$  bezeichnet werden. Der nächste Grenzpunkt ist die Zeit, wenn die hintere Grenzfläche des

Farbstoff-Pakets die Stelle  $z_0$  passiert, also bei  $z_0/v_{max} + Z/v_{max}$ . In diesem Zeitintervall  $T_2 = [z_0/v_{max}, z_0/v_{max} + Z/v_{max}]$  gilt nun die Formel:

$$c_{mT_2} = \frac{2 \cdot c_0 \cdot v_{max} \cdot (t - \frac{z_0}{v_{max}})}{3 \cdot \delta z} \cdot \left[ \left( 1 - \frac{z_0}{v_{max} \cdot (t - \frac{z_0}{v_{max}})} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z_0 + \delta z}{v_{max} \cdot (t - \frac{z_0}{v_{max}})} \right)^{\frac{3}{2}} \right] \quad (36).$$



**Bild 56:** Schema der Aufeinanderfolge von vier Farbstoff-Paketen. FP1 bis 4: Farbstoff-Paket 1 bis 4. Z bedeutet die Länge der Pakete auf der z-Achse.

Das dritte Zeitintervall  $T_3$  ist  $[z_0/v_{max} + Z/v_{max}, z_0/v_{max} + 2 \cdot Z/v_{max}]$ . Dies ist die Zeit, in der ein Wasser-Paket über den Punkt  $z_0$  hinwegläuft. Für  $T_3$  muß die Formel von Bereich II genommen werden, wobei hier  $t$  um  $z/v_{max} + Z/v_{max}$  verschoben ist:

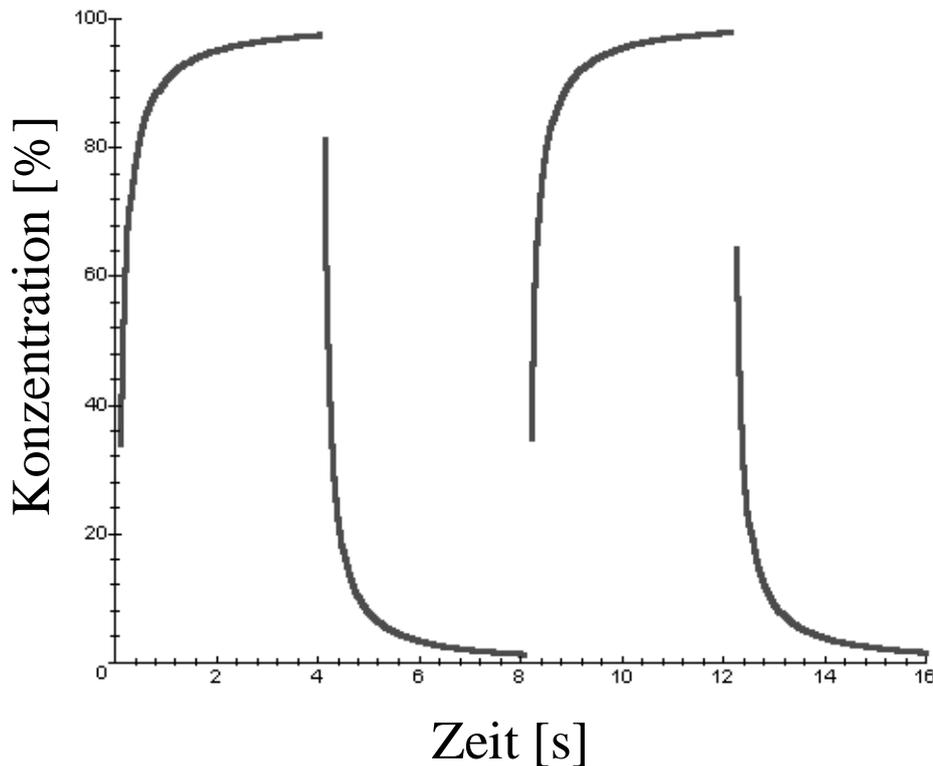
$$c_{mT_3} = \frac{2 \cdot c_0 \cdot v_{\max}}{3 \cdot \delta z} \cdot \left[ \begin{aligned} & \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} \right) \cdot \left\{ \left( 1 - \frac{z_0}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z_0 + \delta z}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} \right\} \\ & - \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - \frac{Z}{v_{\max}} \right) \cdot \left\{ \left( 1 - \frac{z_0 + Z}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - \frac{Z}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z_0 + Z + \delta z}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - \frac{Z}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} \right\} \end{aligned} \right] \quad (37)$$

Die restlichen Rechnungen laufen nun analog. Immer wieder werden jetzt für jedes neue Zeitintervall Terme dazugesetzt. Keiner der alten Terme kann weggelassen werden, weil das erste Farbstoff-Paket auch dann noch in Spuren vorhanden ist, wenn das fünfte oder auch zwanzigste schon angekommen ist. Die Zeit in den Termen muß immer stärker verschoben werden, da immer neue Farbstoffpakete entstehen und den Ort  $z_0$  durchheilen. Im n-ten Zeitintervall  $T_n$  gilt die Formel:

$$c_{mT_n} = \frac{2 \cdot c_0 \cdot v_{\max}}{3 \cdot \delta z} \sum_{k=0}^{n-1} \left[ \begin{aligned} & \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - 2k \frac{Z}{v_{\max}} \right) \cdot \left\{ \left( 1 - \frac{z_0}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - 2 \cdot k \cdot \frac{Z}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z_0 + \delta z}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - 2 \cdot k \cdot \frac{Z}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} \right\} \\ & - \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - (2 \cdot k + 1) \cdot \frac{Z}{v_{\max}} \right) \cdot \left\{ \left( 1 - \frac{z_0 + Z}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - \frac{Z}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} - \left( 1 - \frac{z_0 + Z + \delta z}{v_{\max} \cdot \left( t - \frac{z_0}{v_{\max}} - \frac{Z}{v_{\max}} \right)} \right)^{\frac{3}{2}} \right\} \end{aligned} \right] \quad (38)$$

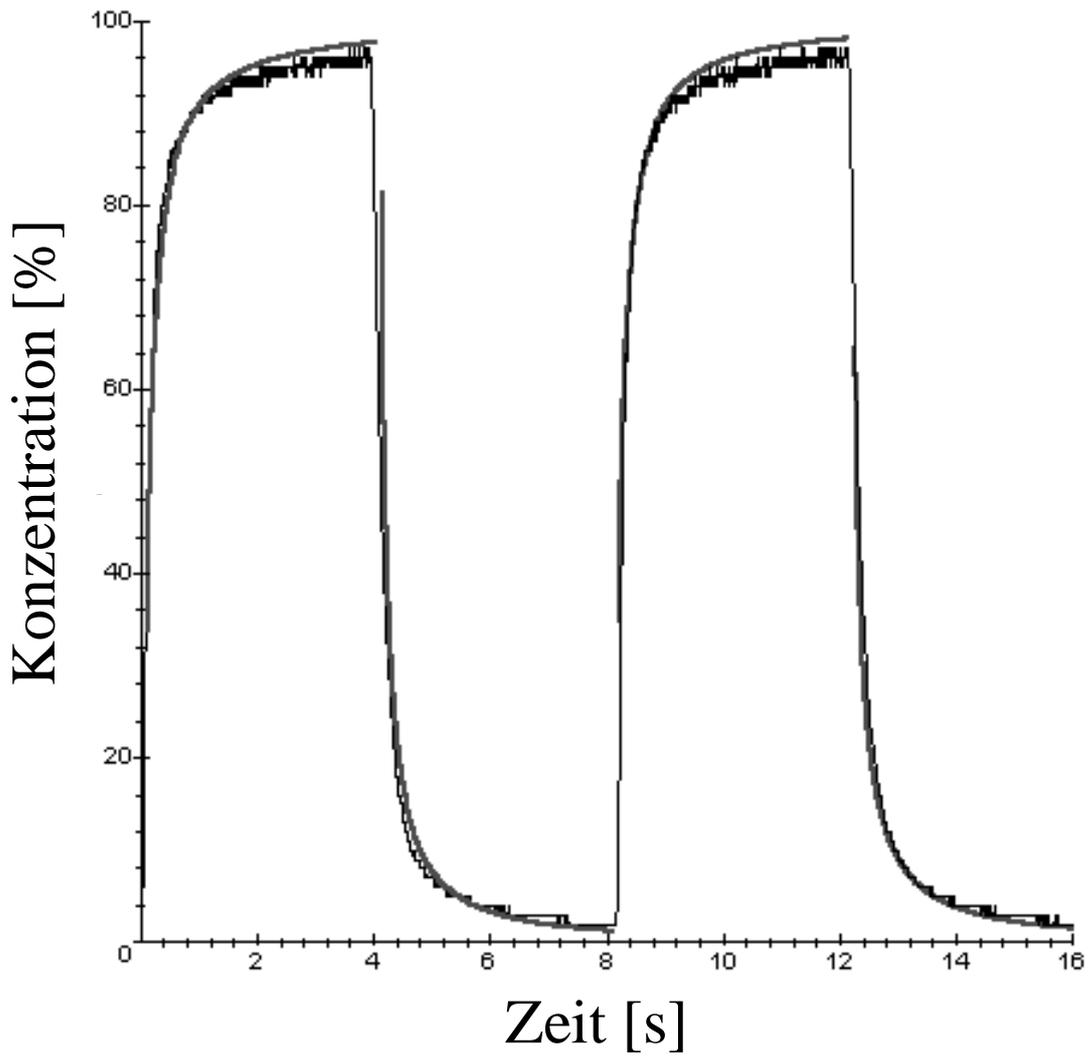
In Gleichung (38) werden nun experimentelle Werte eingesetzt, wie sie in der nachfolgend beschriebenen Messung ermittelt wurden: Die maximale Strömungsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  wird auf 42 mm/s eingestellt,  $\delta z$  ist 0.5 mm, da die Lichtleiter-Faser einen Durchmesser von 0.5 mm hatte, die Zeit, in der die

Farbstoff-Lösung injiziert wird, wurde auf 4 s gesetzt, die Länge des Farbstoff- und auch des Wasser-Paketes  $Z$  berechnet sich dann zu 168 mm. Der Meßpunkt  $z_0$  ist 8 mm vom Eingang des Farbstoffs entfernt, für das erste Zeitintervall gilt dann  $T_1 = [0, 0.19]$ . Die weiteren Intervalle haben nun jeweils eine Länge von 4 s, d. h. z. B.  $T_2 = [0.19, 4.19]$ . Die ersten Farbstoffpakete sehen dann wie in Bild 57 aus.



**Bild 57:** Berechnung der zeitlichen Konzentrationsänderung einer modulierten Fluorescein-Injektion mit Gleichung (38). Die y-Achse stellt die Konzentration in % der Ausgangskonzentration der verwendeten Fluorescein-Lösung dar, die x-Achse die Zeit in s.

Mit den genannten Werten für die Parameter wurde eine Messung durchgeführt, Bild 58 zeigt den Vergleich. Die Übereinstimmung erscheint recht gut, lediglich die errechnete maximale Konzentration wird von den Farbstoff-Paketen nicht ganz erreicht. Hierfür dürfte der Einfluß der Diffusion verantwortlich sein, denn dieser wurde im vorliegenden Modell nicht berücksichtigt.



**Bild 58:** Vergleich der theoretischen Berechnungen mit den experimentellen Werten des Photomultipliers.

## 4 Messungen mit dem Lock-In-Verstärker

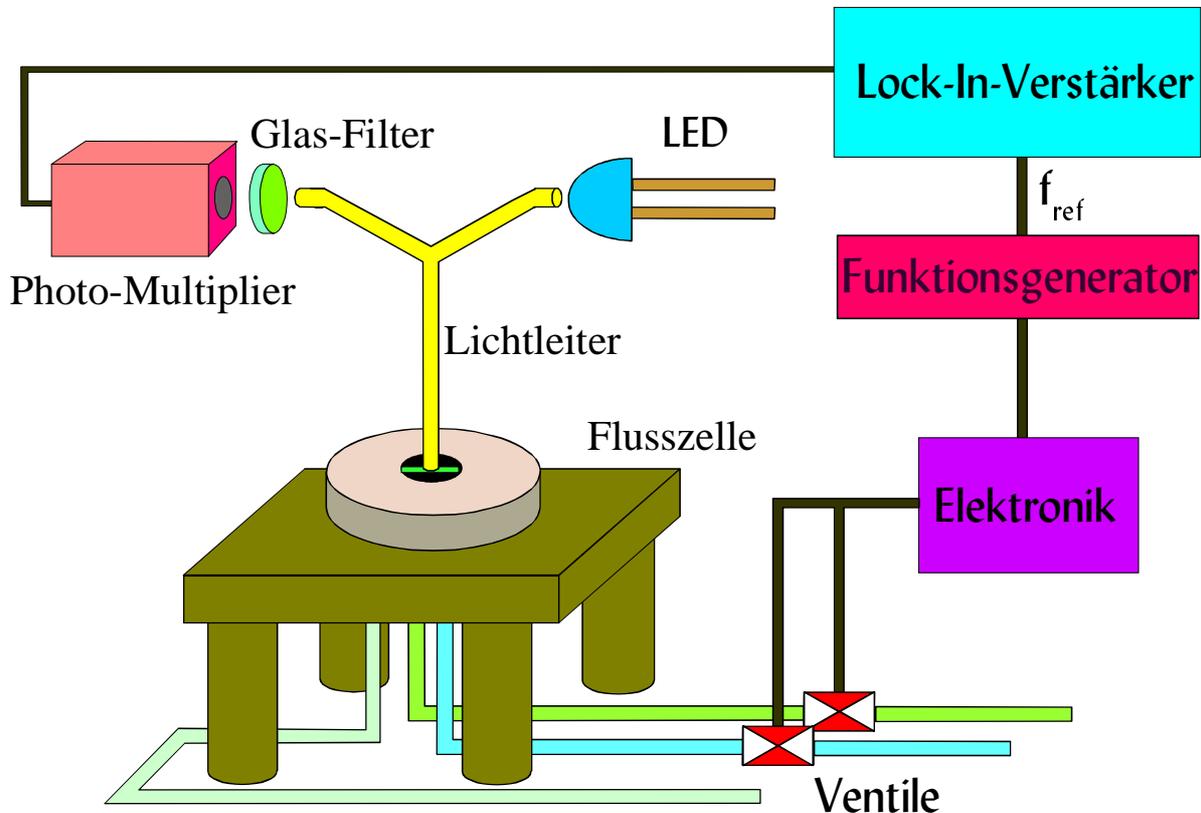
In Abschnitt 2.6 wurden die Vorteile der Benutzung eines Lock-In-Verstärkers mit Modulation der Analyt-Konzentration besprochen. Nach der Charakterisierung des Systems soll nun gezeigt werden, daß die rein theoretisch zweifellos vorliegenden Vorteile des Lock-In-Verstärkers auch in der Praxis vorhanden sind.

### 4.1 Kombination mit dem Photomultiplier

Als erstes wurde versucht, den Lock-In-Verstärker in den Versuchsaufbau mit dem Photomultiplier einzubauen, quasi als Test, um zu sehen, ob es sich überhaupt lohnen kann, den Lock-In-Verstärker in komplizierteren Aufbauten einzusetzen. Der neue Aufbau wird in Bild 59 wiedergegeben. Als einzige Änderung zum Versuchsaufbau mit Photomultiplier allein (Bild 12) ergibt sich die Verbindung des Photomultipliers zum Lock-In-Verstärker. Der (im Lock-In eingebaute) Funktionsgenerator erzeugt ein TTL-Referenz-Signal, mit dem sowohl der Referenz-Eingang des Lock-In-Verstärkers als auch die Steuerelektronik der Ventile gespeist wird.

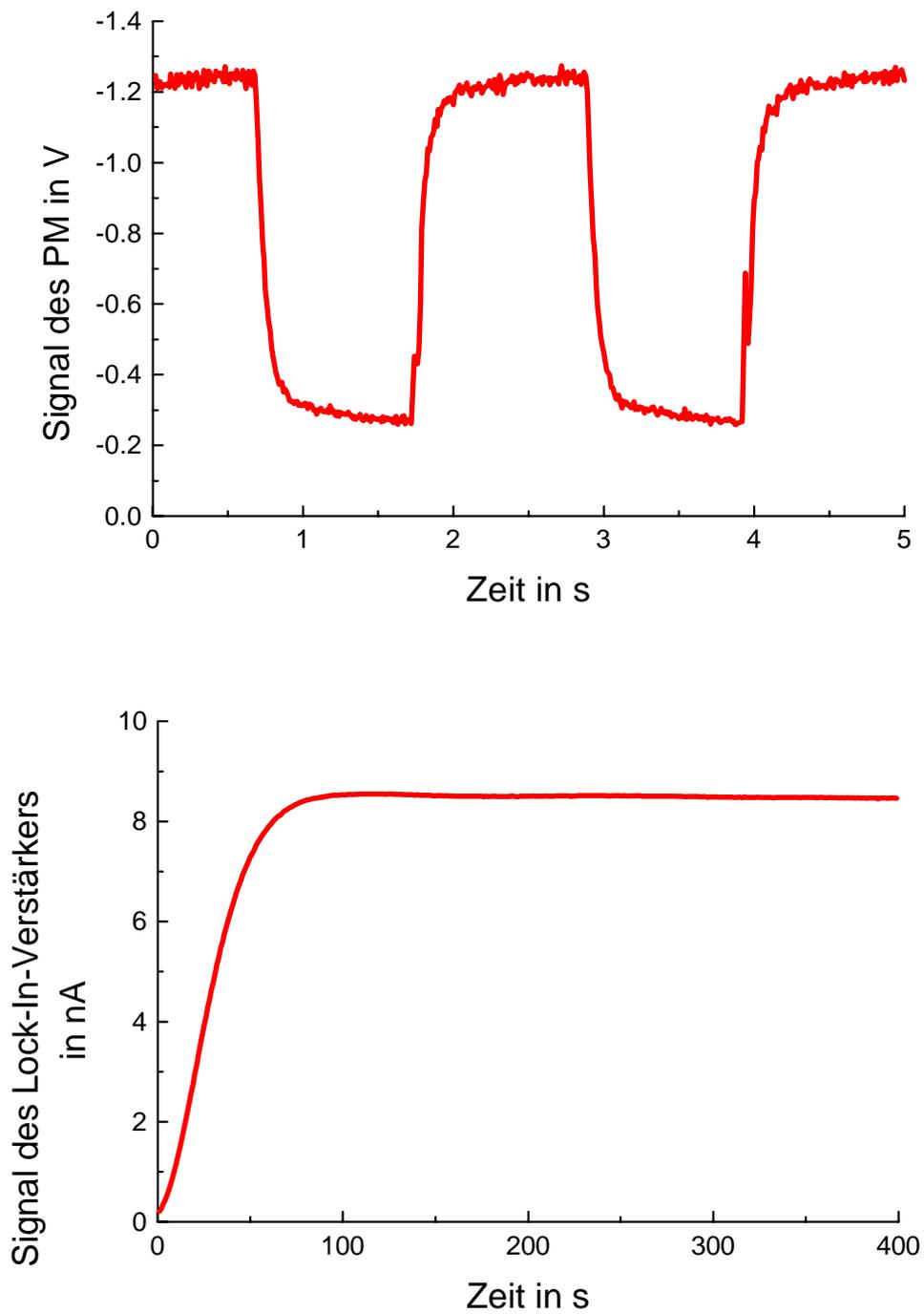
Der Versuch läuft nun ähnlich ab wie bei den Modulationsmessungen mit dem Photomultiplier allein: Eine Fluorescein-Lösung bekannter Konzentration wird moduliert in den Mikrokanal gespeist mit einer bestimmten Frequenz. Das Signal des Photomultipliers wird dann in den Signal-Eingang des Lock-In-Verstärkers gebracht, wo der Effektiv-Wert der modulierten Konzentration berechnet und schließlich, nach einer gewissen Einschwingzeit, vom Lock-In-Verstärker angezeigt wird. Bild 60 zeigt den Unterschied der Signale des Photomultipliers und des Lock-In-Verstärkers. Die Fluorescein-Konzentration bei dieser Messung war  $23.9 \mu\text{M}$ , die Dauer eines Zyklus von Fluorescein- und Wasser-Paket belief sich auf 2.3 s. Der Photomultiplier zeigte die gewohnte Signalform der Konzentrationsmodulation. Bei der niedrigen Frequenz von 0.43 Hz geht das Photomultiplier-Signal für eine kurze Zeit auf den Dunkelstromwert zurück. Das Signal des Lock-In-Verstärkers, der das Signal des Photomultipliers mit dem TTL-Referenzsignal des Funktionsgenerators multipliziert, zeigt einen völlig anderen Verlauf. Das Signal steigt zunächst relativ langsam (man beachte die völlig unterschiedlichen Zeitskalen der Diagramme von PM und Lock-In) im Verlauf einer Minute auf den dann nahezu

völlig konstant bleibenden Wert von 8.5 nA. Diese „Einschwingzeit“ ist typisch für die Messung mit dem Lock-In-Verstärker. Je nach eingestellter Zeitkonstante ist sie unterschiedlich lang.

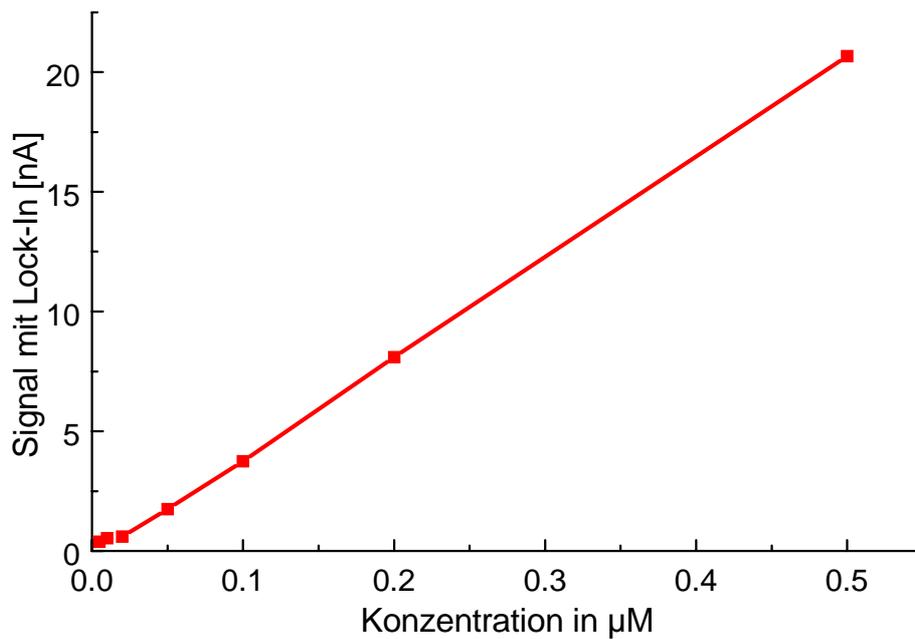


**Bild 59:** Versuchsaufbau mit Photomultiplier und Lock-In-Verstärker.

Desweiteren soll gezeigt werden, daß sich mit dem Lock-In-Verstärker die Messungen der Fluorescein-Konzentration in Hinblick auf die Nachweisgrenze verbessern lassen. Dazu wurden verschieden konzentrierte Fluorescein-Lösungen bekannter Konzentration verwendet und das Signal des Lock-In wurde aufgezeichnet, der Lock-In-Verstärker wurde also kalibriert. Bild 61 zeigt das Ergebnis. Wie erwartet, konnte die Nachweisgrenze mit dem Lock-In deutlich verbessert werden. Beim Photomultiplier (Kalibrierkurve in Bild 54) war die Nachweisgrenze bei dem verwendeten Aufbau auf ungefähr  $1\mu\text{M}$  beschränkt. Durch den Einsatz des Lock-In-Verstärkers kann die Grenze auf etwa  $0.01\mu\text{M}$  herabgesetzt werden, ohne sonst irgendetwas am Aufbau optimiert zu haben. Das bedeutet eine Steigerung der Leistungsfähigkeit eines analytischen Systems um einen Faktor in der Größenordnung von 100. Damit wurde gezeigt, daß der Einsatz des Lock-In-Verstärkers auch zumindest theoretisch in anderen analytischen Systemen von Vorteil sein kann.



**Bild 60:** Vergleich der Signale des Photomultipliers (oben) und des Lock-In-Verstärkers (unten). Fluorescein-Konzentration ist  $23.9 \mu\text{M}$ , Dauer eines kompletten Ventilzyklus 2.3 s.



**Bild 61:** Kalibrierung des Lock-In-Verstärkers mit Fluorescein.

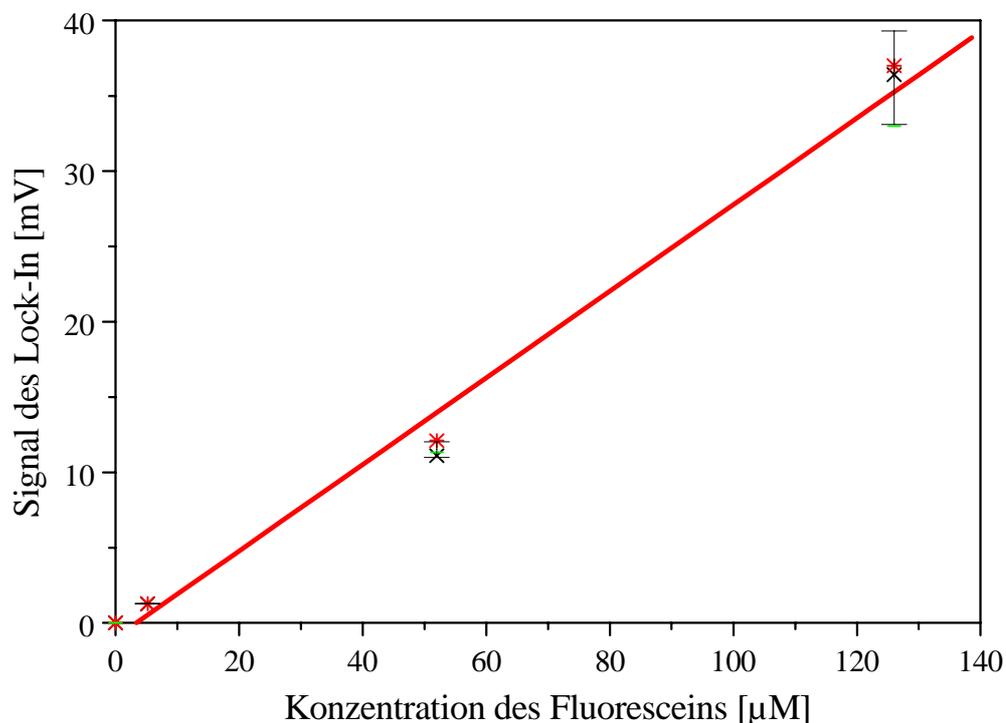
## 4.2 Kombination mit RfS

Nachdem gezeigt ist, daß der Einsatz eines Lock-In-Verstärkers prinzipiell sinnvoll ist, soll er in ein anderes, komplizierteres Meßsystem eingebaut werden. Als neues Meß-System wurde die Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.7) gewählt.

Zuerst mußte der Lock-In-Verstärker in den Aufbau (Bild 18) integriert werden. Das SPEKOL lieferte die Werte der optischen Schichtdicke digital, der Lock-In-Verstärker jedoch benötigt analoge Daten. Daher mußten die digitalen Werte mit Hilfe eines D/A-Wandlers (A/D-D/A-Wandler-Karte DAS 1600 der Firma Keithley) in ein Analog-Signal umgewandelt werden, das dann mit dem Lock-In-Verstärker verarbeitet wurde. Ein TESTPOINT-Programm, das Hans-Martin Haake geschrieben hatte, wurde nach Erweiterung zur Steuerung der Messung verwendet.

Zum Testen des experimentellen Aufbaus und zur Ermittlung der Grenzen des Einsatzes des Lock-In-Verstärkers in der RfS-Meß-Technik wurden verschieden konzentrierte Fluorescein-Lösungen moduliert durch die Flußzelle geleitet. Im Grunde ist die RfS-Methode natürlich nicht für Fluoreszenz-Messungen vorgesehen, doch für diesen ersten Test war es erforderlich,

grundsätzlich die Möglichkeit des Einsatzes des Lock-In-Verstärkers in diesem System zu verifizieren, ohne ein Oberflächensystem dafür konstruieren zu müssen. Das Ergebnis war positiv: Die gemessene Kalibrierkurve zeigt Bild 62. Die Kurve zeigt ein lineares Ansprechverhalten, die Modulation ist also auch auf diese Technik grundsätzlich anwendbar, mehr sollte hier nicht gezeigt werden. Im Gegensatz zur sonstigen Funktionsweise der Reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie wird in diesem Fall keine Bindung an eine aktive Oberfläche beobachtet, sondern die periodische Änderung des Brechungsindex, der ebenfalls zu einer Änderung des Interferenzmusters führt und damit zu einer (allerdings nur scheinbaren) Änderung der optischen Schichtdicke.



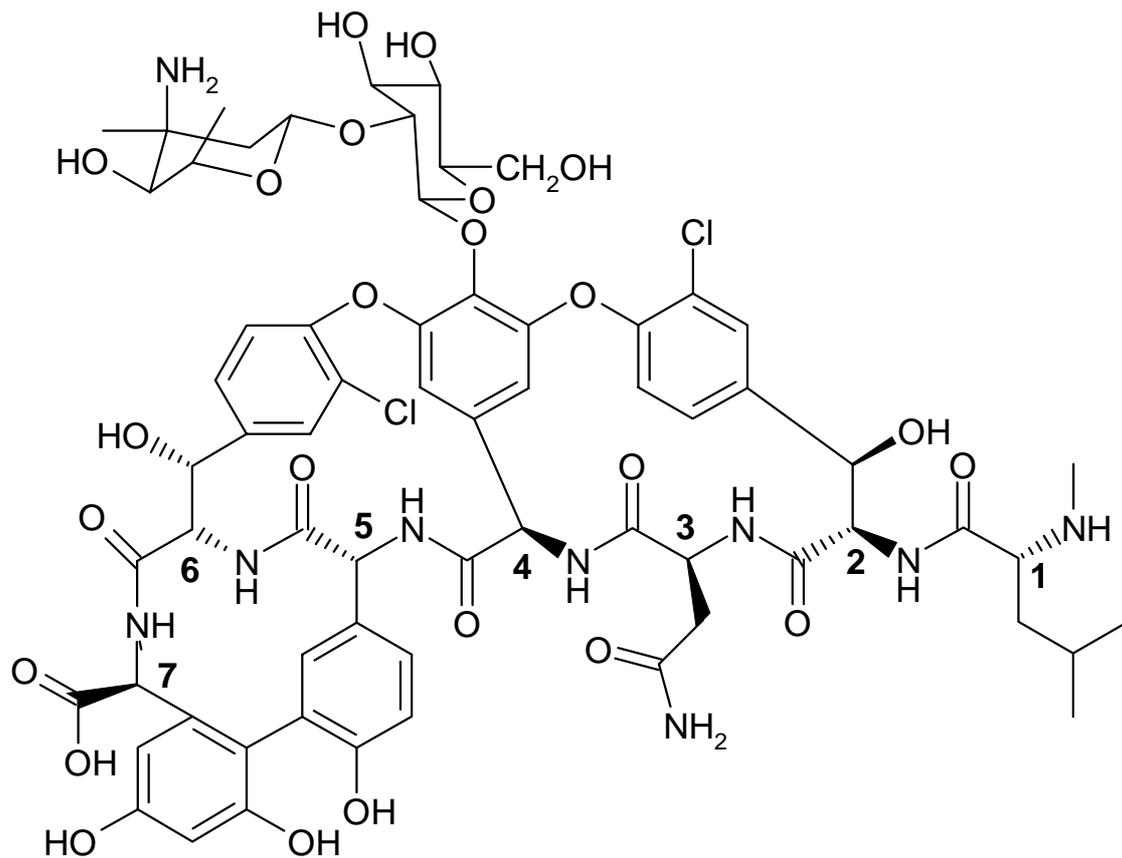
**Bild 62:** Kalibrierkurve des Fluoresceins mit dem System RfS-Lock-In-Verstärker.

Schließlich soll im folgenden Kapitel die Kombination Lock-In-Verstärker und RfS-Technik auf ein Molekülsystem angewendet werden, das die optische Schichtdicke durch Bindung an den Transducer ändert. Die Voraussetzungen sind hohe Reversibilität, denn nur wenn die optische Schichtdicke bei Injektion des reinen Lösungsmittels auch wieder vollständig auf den ursprünglichen Wert absinkt, kann die Modulationstechnik angewendet werden. Eine Substanz stellte sich als geeignet heraus: Vancomycin. Dieses Molekül bindet mit hoher Ratenkonstante an sein Substrat, aber es geht auch mit hoher Ratenkonstante wieder von der Oberfläche weg ([50], [51] und [52]).

## 5 Untersuchungen an einem mit hohen Ratenkonstanten wechselwirkenden Molekülsystem

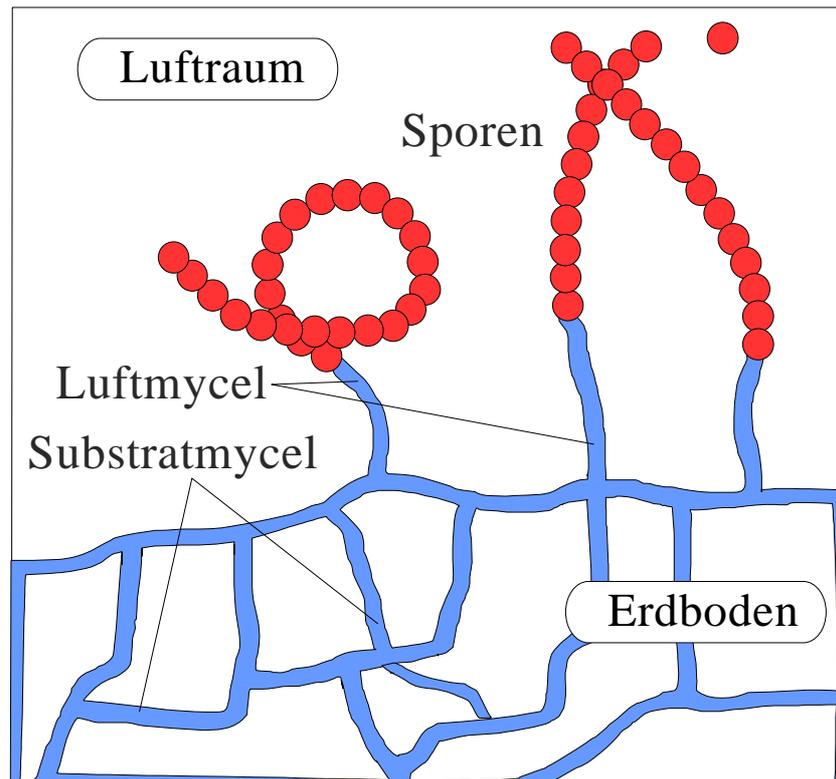
### 5.1 Das System Vancomycin-Tripeptid

Vancomycin ist ein relativ kleines Glycoprotein (Molekulargewicht 1450 g/mol). Die Struktur des Moleküls ist in Bild 63 dargestellt. Im wesentlichen besteht Vancomycin aus sieben Aminosäuren und zwei Zucker-Einheiten [53]. Interessant ist die Gegenwart zweier Chlor-Atome, einer der wenigen Fälle, in denen Halogen-Atome kovalent in ein Biomolekül eingebaut werden (ein anderes Beispiel ist das Thyroxin, ein Wirbeltierhormon, in dem Jod-Atome kovalent gebunden sind). Synthetisiert wird dieses Molekül von einem Bakterium namens *Amycolatopsis orientalis*. Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen Vertreter der außerordentlich vielfältigen und faszinierenden Gruppe der Actinomyceten, Bakterien, die auf den ersten Blick eher einem Pilz als einer Bazille ähnlich sehen. Bild 64 zeigt die typische Gestalt eines Streptomyceten, einer Untergruppe der Actinomyceten, zu denen *Amycolatopsis* gehört (früher trug dieser Organismus sogar den Namen *Streptomyces orientalis*). Diese Bakterien leben meist im Erdboden (*A. orientalis* im Erdboden des indischen Subkontinents) und bilden dort ein Geflecht von Fäden, das - analog zu dem Fadengeflecht der Pilze - Myzel genannt wird. Die Dicke der Fäden beträgt nur etwa 10 µm, ist damit um eine Größenordnung kleiner als bei den Pilzen. Wird die Nahrung knapp, so strecken sich einige Fäden nach oben in den Luftraum (dabei das sogenannte Luftmyzel bildend) und beginnen mit der Sporen-Produktion (siehe dazu Bild 64). Nach der Ausreifung lösen sich die Sporen vom Luftmyzel und werden vom Wind in andere Gegenden verweht. Sind die Bedingungen dort besser, keimt die Spore aus und ein neues Erd-Myzel entsteht.



**Bild 63:** Strukturformel von Vancomycin. Die arabischen Ziffern bezeichnen die sieben Aminosäuren, aus denen Vancomycin besteht, die Zählung beginnt am N-Terminus des Peptids.

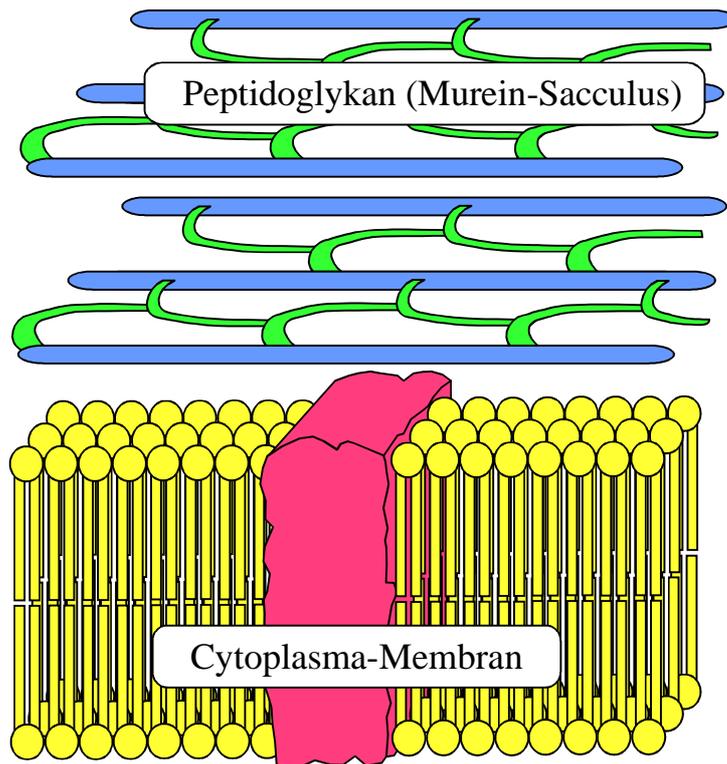
Wenn die Bildung des Luftmyzels einsetzt, beginnt zugleich die Synthese der Antibiotika, je nach Art des Streptomyeten eine andere Substanz, bei *A. orientalis* eben Vancomycin. Die Gründe für diese Synthese sind noch unklar. Am wahrscheinlichsten erscheint aber die Theorie, daß die Bildung der Antibiotika eine zweite Waffe der Streptomyeten (neben der Sporenbildung) gegen widrige Umweltbedingungen darstellt. Sehr oft werden sich die Bedingungen im Erdboden dadurch verschlechtern, daß fremde Bakterien eindringen und den Streptomyeten die Nahrungsgrundlage streitig machen. Die Streptomyeten reagieren mit der chemischen Keule Antibiotikum, um sich den Lebensraum zu sichern und die Eindringlinge zu vertreiben oder gar um neue Lebensräume zu erobern und die angestammten Einwohner zu vernichten.



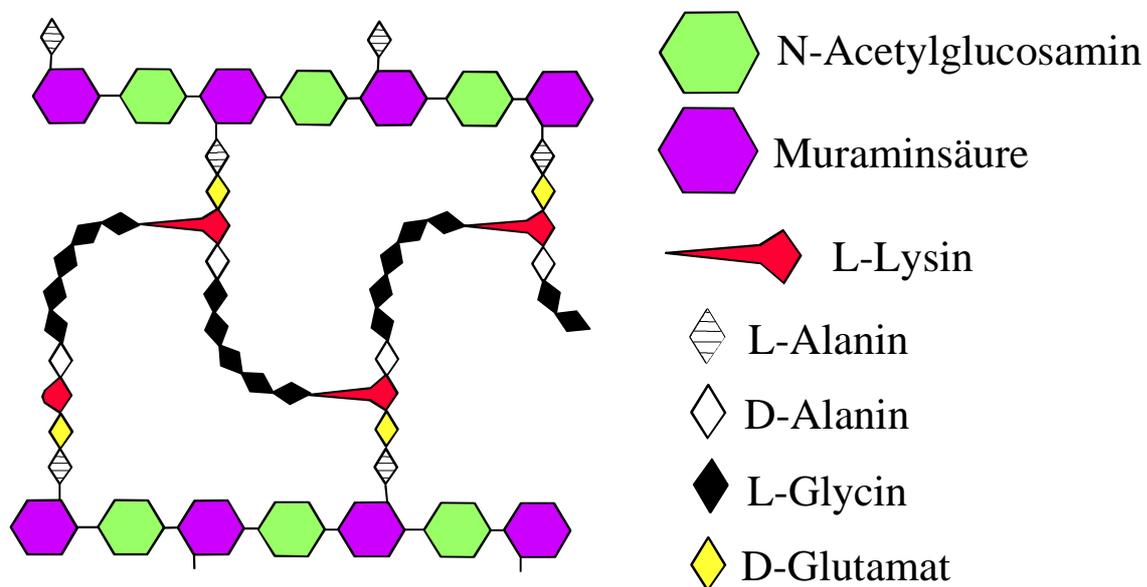
**Bild 64:** Schema der Gestalt eines typischen Streptomyzeten (angelehnt an *Streptomyces coelicolor*, die morphologisch am besten untersuchte Art der Actinomyceten).

Das Vancomycin wirkt hauptsächlich - wie viele andere Antibiotika auch - gegen Gram-positive Bakterien. Gram-positive Bakterien (Streptokokken, Staphylokokken, Corynebakterien, Clostridien, *Bacillus spec.* etc.) zeichnen sich durch eine besondere Zellhülle aus, die in Bild 65 schematisch dargestellt ist. Im Gegensatz zu den Gram-negativen Bakterien besitzen die G(+)-Bakterien keine zusätzliche äußere Zellmembran über der sogenannten Peptidoglykanschicht. Zum Ausgleich dafür ist diese Schicht besonders dick. Sie heißt dann - wegen ihrer das gesamte Bakterium einhüllenden Form - Mureinsacculus. Und genau an diesem Sacculus wirkt das Vancomycin.

Vancomycin greift in die Peptidoglykan-Synthese der G(+)-Bakterien ein. Einem fertigen Sacculus allerdings kann das Vancomycin nicht gefährlich werden, daher können nur wachsende Bakterien Opfer des Vancomycins werden, da die Zellwand nicht fertig gebaut werden kann. Der osmotische Druck des bakteriellen Cytoplasmas bringt die wachsenden Bakterien - jetzt ohne Wandgedruck durch einen vollständigen Sacculus - zum Platzen.



**Bild 65:** Schema der Zellhülle eines grampositiven Bakteriums.



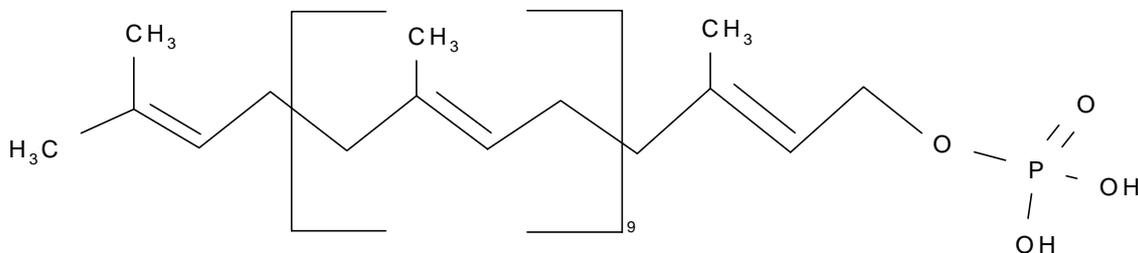
**Bild 66:** Ein kleiner Ausschnitt aus dem Peptidoglykan.

Um den genauen Wirkmechanismus des Vancomycins zu verstehen, ist es nötig, die Biosynthese des Mureins genauer zu verfolgen [54]. Bild 66 zeigt die Struktur dieses Mureins etwas genauer. Es handelt sich dabei um Ketten von

Kohlenhydraten (Polymere des Disaccharids N-Acetylglucosamin-Muraminsäure), die mit Peptid-Brücken quervernetzt sind.

Die ersten Biosynthese-Schritte finden im Cytoplasma des Bakteriums statt. Es bildet sich dort ein Muraminsäure-Pentapeptid, also das Saccharid Muraminsäure, an dem die fünf Aminosäuren L-Alanin, D-Glutamat, L-Lysin und zwei D-Alanin gebunden sind. Auffällig ist das Vorkommen von D-Aminosäuren, wohl eine Gegenstrategie der Bakterien im Kampf gegen die Antibiotika der Streptomyceten und Pilze.

Dieses Muraminsäurepentapeptid wandert zur Cytoplasma-Membran und verbindet sich dort mit einem in der Membran befindlichen Molekül, Undekaprenylphosphat (Struktur siehe Bild 67).

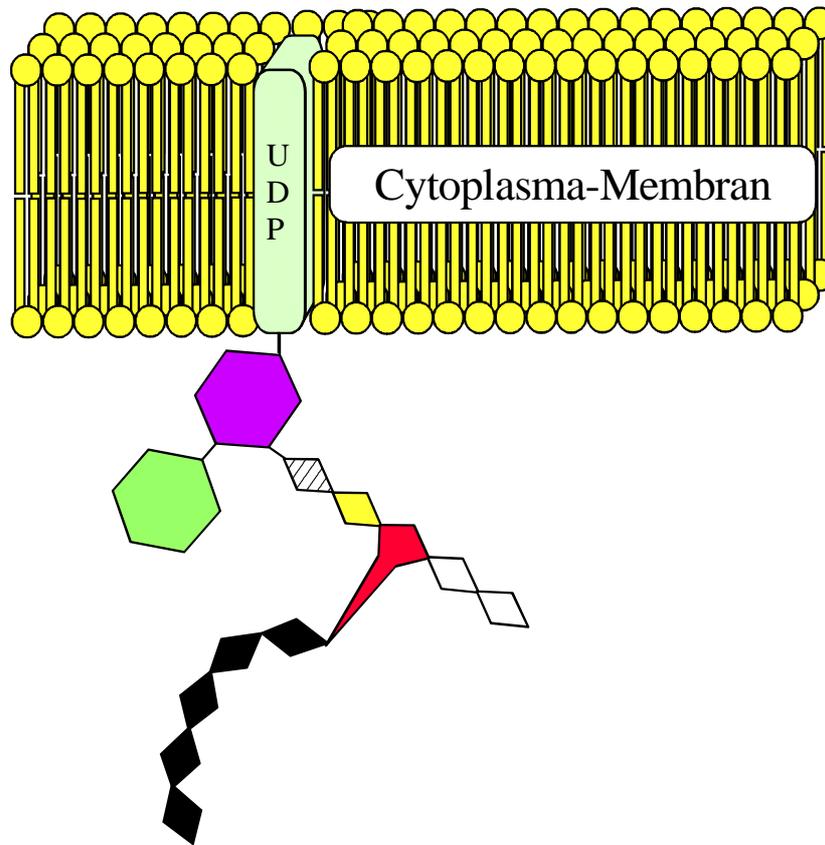


**Bild 67:** Undekaprenylphosphat.

Der Undekaprenyl-Rest ist in der Cytoplasmamembran eingelagert, die fünf Aminosäuren mitsamt der Muraminsäure ragen in das Cytoplasma hinein. Dort im Cytoplasma wird nun an die Muraminsäure ein Molekül N-Acetylglucosamin angeheftet, und an die noch freie Aminogruppe des Lysins der Pentapeptidkette wird ein Pentaglycin kondensiert. Damit ist das Vorläufermolekül des Mureins, die sogenannte Mucopeptidvorstufe, fertig (Bild 68).

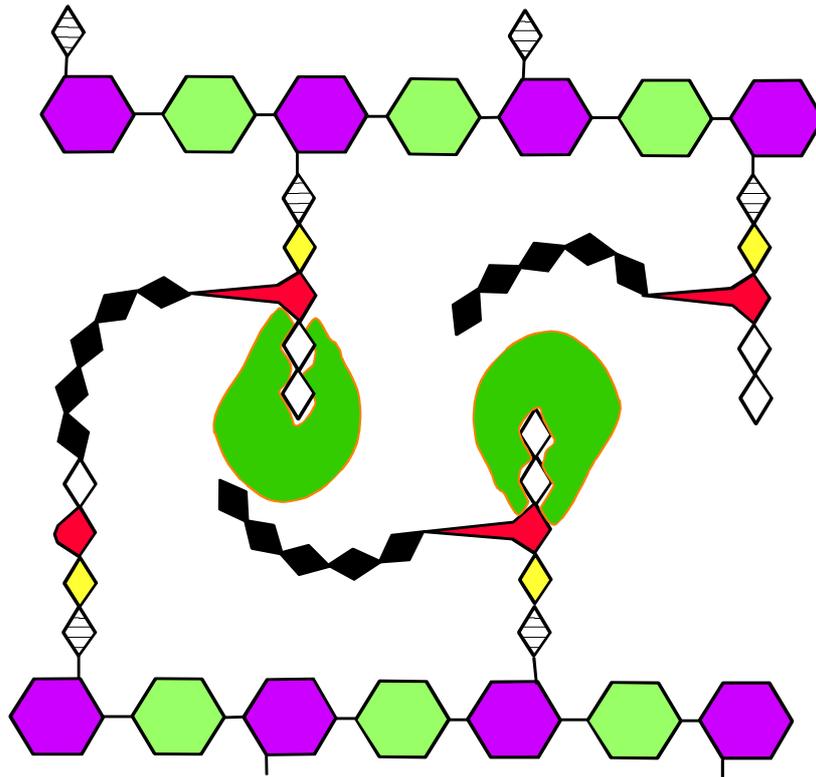
Der nächste Schritt ist der Transport durch die Zellmembran: Der gesamte bisher zusammengebaute Komplex rotiert auf noch unbekannte Weise durch die Membran hindurch. Jetzt liegen die Peptide und die beiden Zucker im Außenraum. Zunächst werden die beiden Zucker durch eine Transglykosylase in die wachsende Kohlenhydratkette des Muramins eingebaut. Daraufhin erfolgt die Quervernetzung durch eine Transpeptidase. Dieses Enzym erkennt die Sequenz D-Ala-D-Ala am Ende der Peptidkette, spaltet den endständigen Alaninrest ab und verbindet den Rest mit der Peptidkette eines benachbarten Polysaccharids. Der N-Terminus des Penta-Glycins wird dabei mit dem C-Terminus des D-Alanins kondensiert. Außerdem wird das Undekaprenylphosphat als Diphosphat wieder freigesetzt. Bei der Abspaltung einer

Phosphatgruppe rotiert es wieder in die Ausgangslage, um auf der Cytoplasmaseite ein neues Muraminsäure-Pentapeptid zu binden.

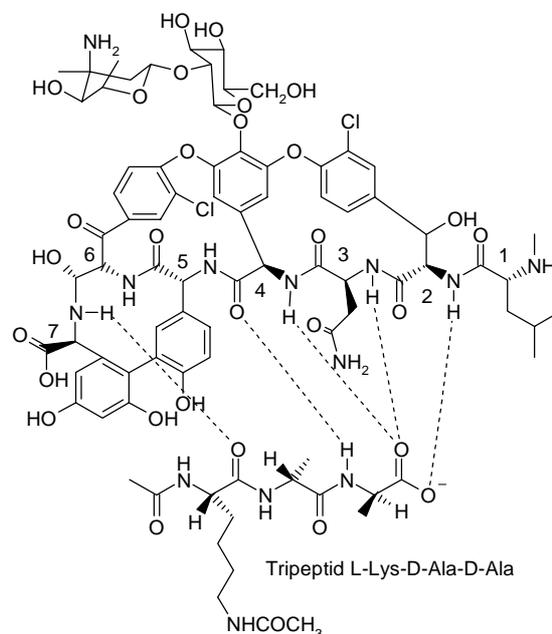


**Bild 68:** Schema des letzten Zustands des Murein-Bausteines im Cytoplasma (die Symbolik der Bausteine in dem Schema ist wie in Bild 66, das mit UDP bezeichnete Kästchen in der Zellmembran, an dem die Mucopetidvorstufe angeheftet ist, stellt das Undekaprenylphosphat dar).

Erst in diesen Prozess der Verknüpfung der Pentaglycin-Einheit mit dem endständigen Di-Alanin unter D-Alanin-Abspaltung greift das Vancomycin ein. Aufgrund seiner Größe und polaren Bauweise kann Vancomycin nicht durch die Zellmembran hindurch kommen. Daher können alle Schritte, die im Cytoplasma ablaufen, nicht gestört werden. Im Zell-Außenraum aber bindet das Vancomycin an die endständige D-Alanin-D-Alanin-Einheit, dabei zumindest teilweise das L-Lysin noch umgreifend. Dadurch kann weder das Glycin noch das entsprechende Enzym, das für diese Reaktion zuständig ist, an den Reaktionsort gelangen, der Murein-Sacculus kann nicht mehr zusammengebaut werden (Bild 69).



**Bild 69:** Hemmung der Peptidbrückenbindung während der Mureinsynthese im Außenraum der Zelle durch Anlagerung von Vancomycin-Molekülen an die D-Ala-D-Ala Enden der Mucopptide. Symbolik wie in Bild 66.



**Bild 70:** Die Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) zwischen Vancomycin und dem Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala.

Die Bindung zwischen Vancomycin und dem Tripeptid beruht hauptsächlich auf Wasserstoffbrücken [55], in Bild 70 sind diese als gestrichelte Linien zwischen den Strukturformeln der Moleküle in stark gedehnter Darstellung eingezeichnet. Zusätzlich zu den Wasserstoffbrückenbindungen wirken auch noch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alanin-Methylgruppen und den Kohlenwasserstoffabschnitten des Vancomycins [55].

## 5.2 Die Herstellung der Transducer

Grundlage des Transducers ist ein Glasplättchen, dessen Oberfläche mit 10 nm  $Ta_2O_5$  und 330 nm  $SiO_2$  als Interferenzschicht belegt ist. Zur Reinigung und zur Aktivierung der SiOH-Gruppen werden die Glasplättchen in ein Gemisch mit 60 Vol% konzentrierter Schwefelsäure und 40 Vol% Wasserstoffperoxidlösung (30%ig) getaucht [56].

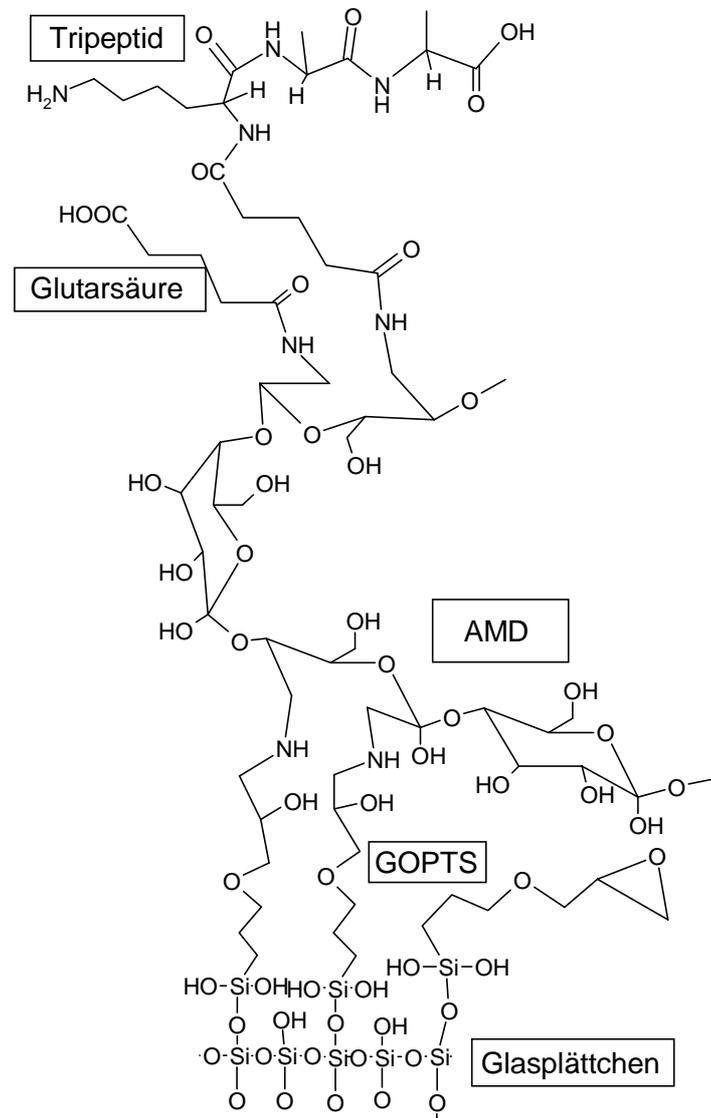
Anstatt das Substrat (im Falle des Vancomycins das Tripeptid D-Ala-D-Ala-L-Lys) direkt auf die Glasoberfläche zu bringen, wird zwischen Glas und Substrat noch ein Polymer-Spacer eingeschaltet (Aminodextran (AMD) bzw. Polyethylenglykol (PEG), siehe weiter unten). Mit diesen Spacern, die die Glasoberfläche im Idealfall völlig bedecken, wird die unspezifische Bindung der in großer Anzahl und Vielfalt in den zu untersuchenden Proben vorliegenden „Fremd-Moleküle“, v. a. Proteine und Kohlenhydrate, vermindert oder sogar völlig unterdrückt. Denn während Proteine und Kohlenhydrate auf Glas ganz hervorragend binden, ist dies auf AMD und PEG nicht der Fall.

Der nächste Schritt im Aufbau des Transducers besteht in der Silanisierung: 3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS) wird auf den Transducer aufgebracht. Die GOPTS-Moleküle binden kovalent mit den Si-OH-Gruppen der Transducer-Oberfläche über die Methoxy-Gruppen. Die GOPTS-Moleküle können an der Oberfläche auch quervernetzen. Von dieser silanisierten Schicht ausgehend können zwei verschiedene Wege beschriftet werden, um das Tripeptid anzukuppeln, entweder mit AMD oder mit PEG.

### **Aminodextran (AMD):**

Das Aminodextran (im wesentlichen ein Polysaccharid, in dem im Schnitt in jeder zehnten Zuckereinheit zwei Aminogruppen eingefügt sind) reagiert über seine Aminogruppen mit den GOPTS-Molekülen der Oberfläche. Es findet eine nukleophile Substitution statt, in deren Verlauf die Epoxid-Gruppe in eine

Hydroxy-Gruppe umgewandelt und ein sekundäres Amin gebildet wird (Bild 71).



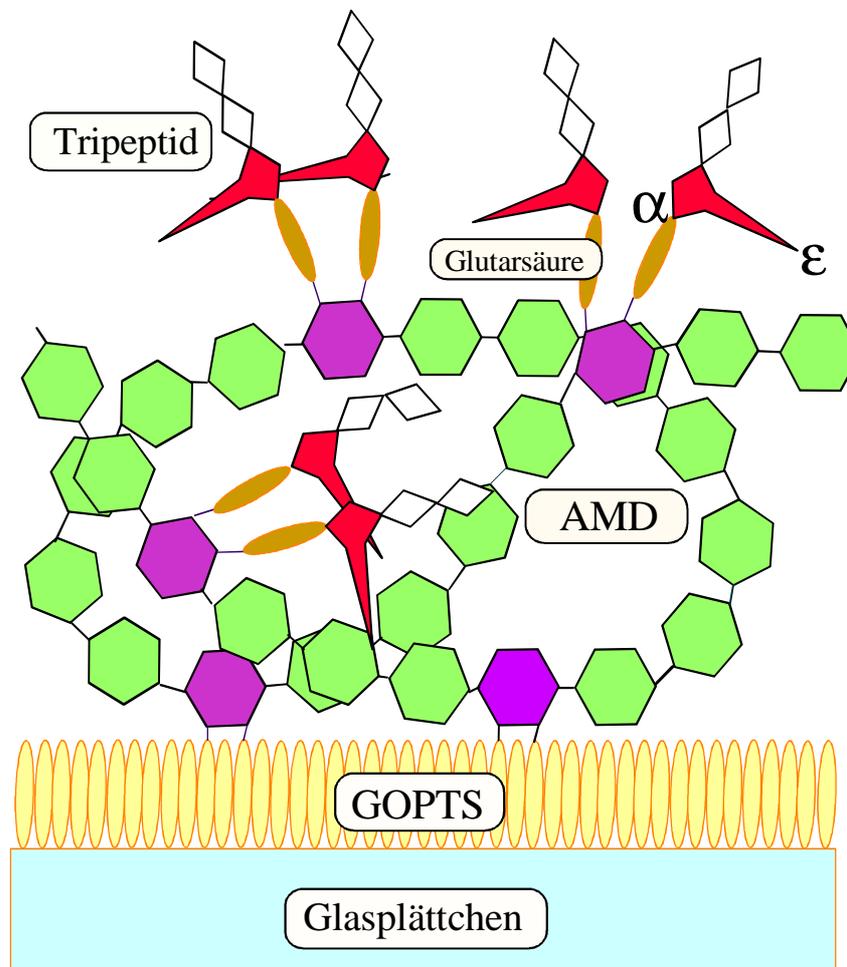
**Bild 71:** Chemische Struktur des fertigen AMD-Transducers

Bei dieser Dextrankupplung reagieren aber nicht alle Aminogruppen des AMD mit den Oxiran-Gruppen des GOPTS. Das Polymer bildet ein mehr oder weniger lockeres Knäuel auf der Transducer-Oberfläche (ein sogenanntes Hydrogel). Die noch freien Aminogruppen des AMD stehen für weitere chemische Reaktionen zur Verfügung. An diese Gruppen können nun beispielsweise die Tripeptide, die die Bindung mit dem Vancomycin eingehen sollen, angeheftet werden. Ein Problem besteht hier darin, daß das Aminoende des Tripeptids mit dem AMD verbunden werden muß, nicht das Carboxyl-Ende. Dazu müssen die noch freien Aminogruppen in Carboxyl-Gruppen umgewandelt werden. Dies wird erreicht, indem die Oberfläche mit Glutarsäureanhydrid behandelt wird. Das Anhydrid reagiert mit den

Aminogruppen und bildet eine Amid-Bindung. Die zweite Carboxyl-Gruppe steht jetzt für die Bindung mit dem Tripeptid zur Verfügung. Bild 71 zeigt im linken, oberen Teil noch eine solche Glutarsäure mit einer freien Carboxyl-Gruppe.

Diese freien Carboxyl-Enden können nun mit den N-Termini des Tripeptids verknüpft werden. Dazu werden die Carboxyl-Gruppen aktiviert, dies geschieht durch Zugabe eines Gemisches von Diisopropylcarbodiimid (DIC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS).

Nun kann das Tripeptid angelagert werden. Da das Tripeptid zwei freie Aminogruppen besitzt, ergeben sich mehrere Möglichkeiten: Anlagerung mit der  $\alpha$ -Aminogruppe, Anlagerung mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe oder beides. Will man die Reaktion nur einer der beiden Aminogruppen des Lysins, so muß die andere durch eine Schutzgruppe davon abgehalten werden, selbst zu reagieren.

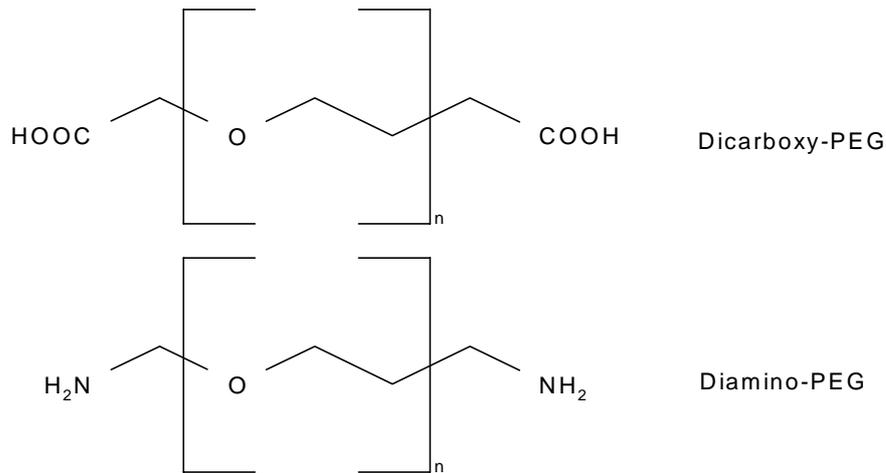


**Bild 72:** Schematische Darstellung eines fertigen AMD-Transducers. An einer der Lysin-Aminosäuren sind die beiden Aminotermine mit  $\alpha$  und  $\epsilon$  gekennzeichnet. In diesem Fall ist das  $\alpha$ -Aminoende des Tripeptids mit der Glutarsäure verknüpft.

Das geschützte Tripeptid wird direkt auf den Transducer gebracht und ersetzt dabei das NHS. Anschliessend wird die Schutzgruppe abgespalten. Damit ist der Transducer fertig. Bild 72 zeigt ein Schema des fertigen AMD-Transducers.

### Polyethylenglycol (PEG):

Zwei Sorten von PEG stehen zur Verfügung: Diamino-PEG und Dicarboxy-PEG (Bild 73).



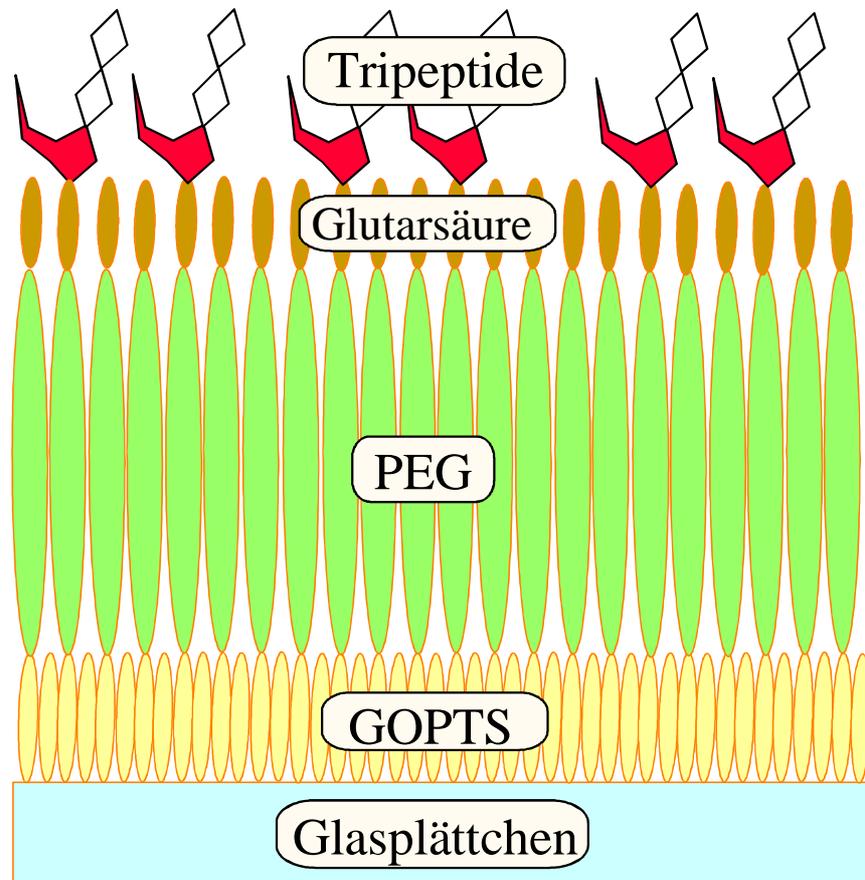
**Bild 73:** Dicarboxy- und Diamino-PEG.

Eine der beiden Carboxy- bzw. Amino-Gruppen des langen Moleküls reagiert mit der Epoxid-Gruppe von GOPTS, die andere steht für die Kupplung des Peptids zur Verfügung. Dicarboxy-PEG reagiert unter Ester-Bildung mit GOPTS auf der Oberfläche, Diamino-PEG dagegen unter Bildung eines sekundären Amins.

Die weiteren Schritte laufen nun analog wie beim Aminodextran ab. Wurde Diamino-PEG verwendet, muß die endständige Amino-Gruppe in eine Carboxyl-Gruppe umfunktionalisiert werden (auch hier mit Glutarsäureanhydrid). Die Carboxylgruppe wird dann mit dem Gemisch NHS/DIC aktiviert, genau wie für AMD-Transducer beschrieben, dann kann das Peptid aufgebracht werden. Der Umweg der Umfunktionalisierung hat den Vorteil, die Zugänglichkeit des Tripeptids für die Vancomycin-Moleküle zu erhöhen. Bild 74 zeigt ein Schema eines fertigen PEG-Transducers.

Es sind deutliche Unterschiede zum AMD-Transducer zu erkennen: Die Tripeptide sind alle direkt an der Oberfläche versammelt, da das PEG im Gegensatz zum AMD keine Knäuel auf der Oberfläche bildet, sondern eine mehr oder weniger geschlossene Oberfläche, ähnlich einem frisch gemähten

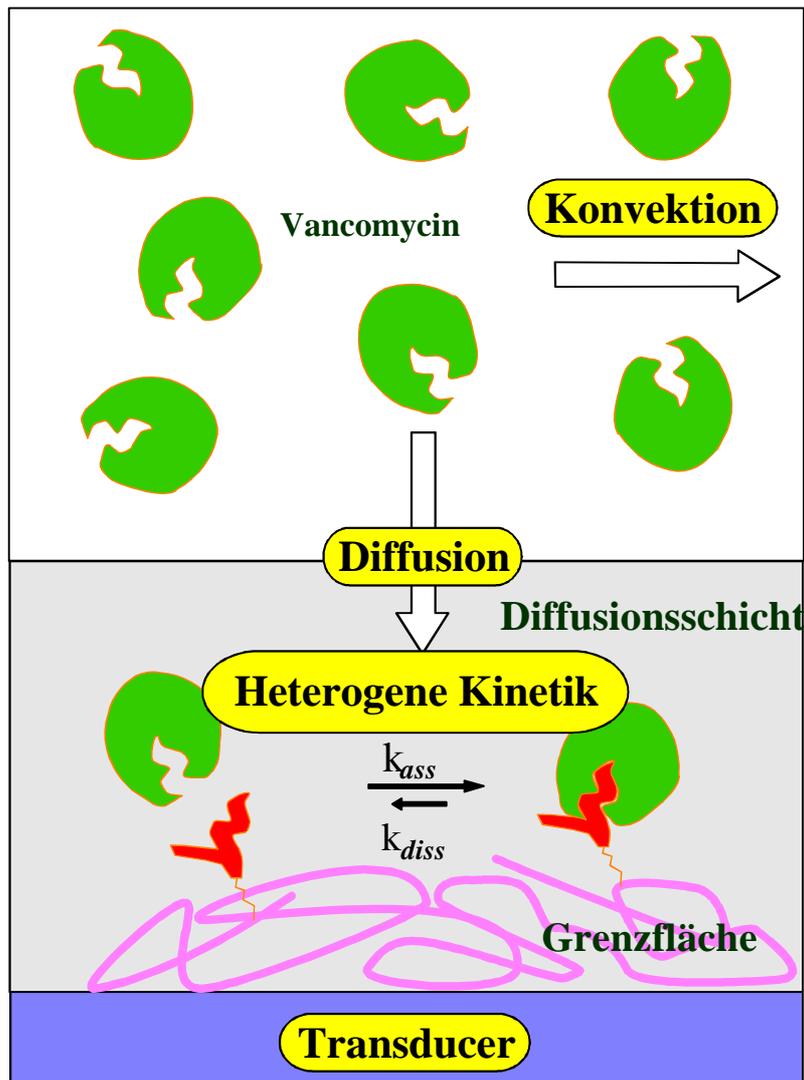
Rasen. Die in Bild 74 eingezeichnete Glutarsäure ist, wie aus dem obigen hervorgeht, nur bei Verwendung von Diamino-PEG erforderlich.



**Bild 74:** Schema eines fertigen Diamino-PEG-Transducers.

### 5.3 Affinitätsreaktionen an Grenzflächen

Die Affinitätsreaktion an der Grenzfläche besteht formal gesehen aus zwei Folgereaktionen, der Diffusion des Zielmoleküls (hier: Vancomycin) an die Grenzfläche und der eigentlichen Bindung an das immobilisierte Substrat (hier: Tripeptid D-ala-D-ala-L-Lys) (Bild 75). Die Summe beider Schritte wird vom Detektionssystem wahrgenommen. Geschwindigkeitsbestimmend ist der langsamere der beiden. In den entsprechenden Grenzfällen wird nur die Bindung an den immobilisierten Bindungspartner oder die Diffusion an die Oberfläche gemessen. Die folgenden Ausführungen sind an [56] angelehnt, umfassendere Darlegungen sind in [57], [58] und [59] zu finden.



**Bild 75:** Schema der Affinitätsreaktion des Vancomycins mit dem immobilisiertem Tripeptid an der Oberfläche (verändert nach [56]).

Geht man von rein kinetisch kontrollierter Reaktion an der Oberfläche aus, dann müßte sich die Änderung der optischen Schichtdicke durch eine einfache Kinetik pseudo-erster Ordnung ergeben. Die Gleichung dafür lautet:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-k_s t}) \quad (39)$$

Hierbei ist  $\Gamma$  die Belegung der Schicht, also ein Maß für die Änderung der optischen Schichtdicke,  $\Gamma_{GG}$  die Gleichgewichtsbelegung, die Belegung für den Fall also, daß Dissoziation und Assoziation gleich häufig vorkommen, und  $k_s$  die konzentrationsabhängige Ratenkonstante.  $k_s$  hängt dabei sowohl von der Assoziations- als auch von der Dissoziationskonstante ab [56]:

$$k_s = k_a \cdot c_0 + k_d \quad (40)$$

Hierbei ist  $c_0$  die Konzentration des Vancomycins,  $k_a$  die Assoziations- und  $k_d$  die Dissoziationskonstante. Trägt man also  $k_s$  gegen die Konzentration auf, so können  $k_a$  als auch  $k_d$  aus dem Diagramm abgelesen werden.

Bei diffusionskontrollierten Bedingungen liegen die immobilisierten Liganden im Überschuß vor, so daß praktisch jedes Vancomycin-Molekül, das an die Oberfläche gelangt, auch gebunden wird. Da die Messungen alle bei konstantem Durchfluß gemacht werden, wird für stationäre Bedingungen gesorgt. Für die zeitliche Änderung der Belegung gilt dann (Ableitung aus dem ersten Fickschen Gesetz):

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = \frac{D}{\delta} \cdot (c_0 - c_s) \quad (41)$$

Hierbei bedeutet  $D$  der Diffusionskoeffizient,  $\delta$  die Dicke der Nernstschen Diffusionsschicht,  $c_0$  die Konzentration im Fluß und  $c_s$  die Konzentration an der Oberfläche. Diese diffusionskontrollierte Bedingung findet man zu Beginn einer jeden Messung, wenn noch nichts an die Oberfläche gebunden hat. Folglich kann dort die exponentielle Kurve für bindungskontrollierte Verhältnisse (Gleichung 39) nicht angepaßt werden.

Doch nicht nur der Anfangsbereich der Bindungskurve weicht vom exponentiellen Verhalten ab, auch im End-Bereich gibt es Paßungenauigkeiten. Häufig nimmt die Bindungskurve dort eine biexponentielle Gestalt an:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG1} \cdot (1 - e^{-k_{s1}t}) + \Gamma_{GG2} \cdot (1 - e^{-k_{s2}t}) \quad (42)$$

Dieses Verhalten kann auf verschiedene Bindungsstellen zurückgeführt werden: zum einen gibt es gut zugängliche Stellen, die zuerst belegt werden, zum anderen aber auch schlechter zugängliche im Innern der Schicht, die erst später besetzt werden.

Wird über die Oberfläche nur Lösungsmittel ohne Vancomycin geleitet, so findet nur Dissoziation statt, die Belegung ändert sich nach der Formel:

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot e^{-k_d t} \quad (43)$$

Dies ist jedoch nur im Idealfall korrekt. In der Realität stört die Rückbindung, d. h. die abdissoziierten Moleküle werden erneut an die Oberfläche gebunden, ehe sie noch mit dem Lösungsmittel weggespült werden. Trägt man die Gleichgewichtsbelegung  $\Gamma_{GG}$  über die verwendete Vancomycin-Konzentration ab, so ergibt sich theoretisch eine Langmuir-Adsorptionsisotherme:

$$\Gamma_{GG}(c) = \Gamma_{\max} \cdot \frac{K \cdot c}{1 + K \cdot c} \quad (44)$$

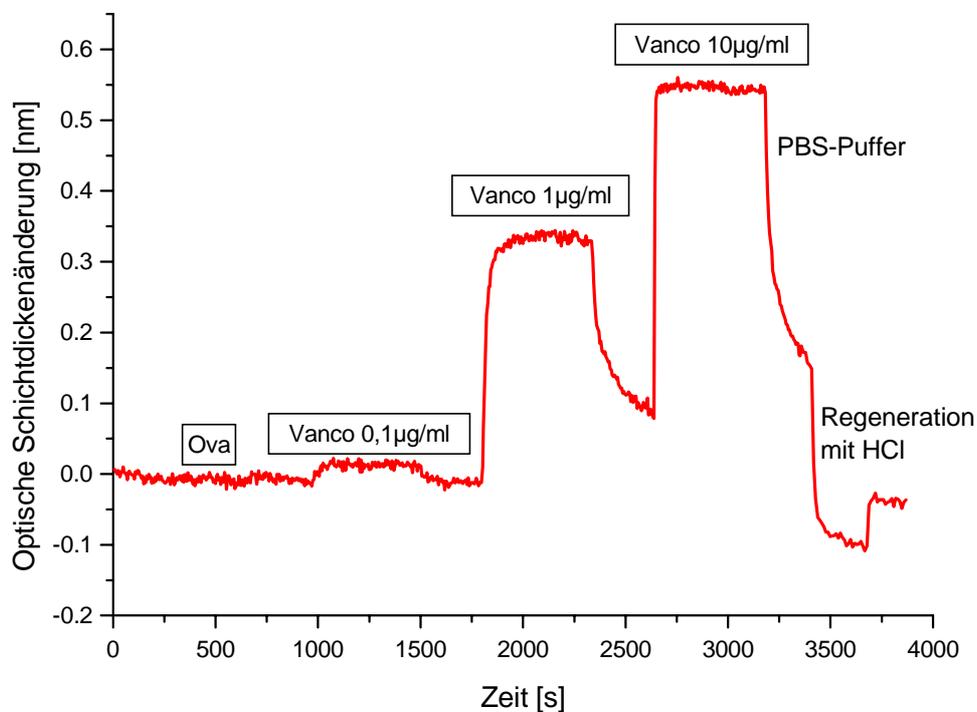
Hierbei ist  $K$  die Affinitätskonstante, die aus dieser Auftragung durch Anpassung ermittelt werden kann,  $c$  die Vancomycinkonzentration und  $\Gamma_{\max}$  die maximale Belegung, wenn alle möglichen Bindungsstellen belegt sind.

Durch Umstellung der Gleichung (44) erhält man die sogenannte Scatchard-Gleichung [60], die eine Gerade darstellt, über deren Steigung die Affinitätskonstante ermittelt werden kann:

$$\frac{\Gamma_{GG}}{c} = \Gamma_{\max} \cdot K - K \cdot \Gamma_{GG} \quad (45)$$

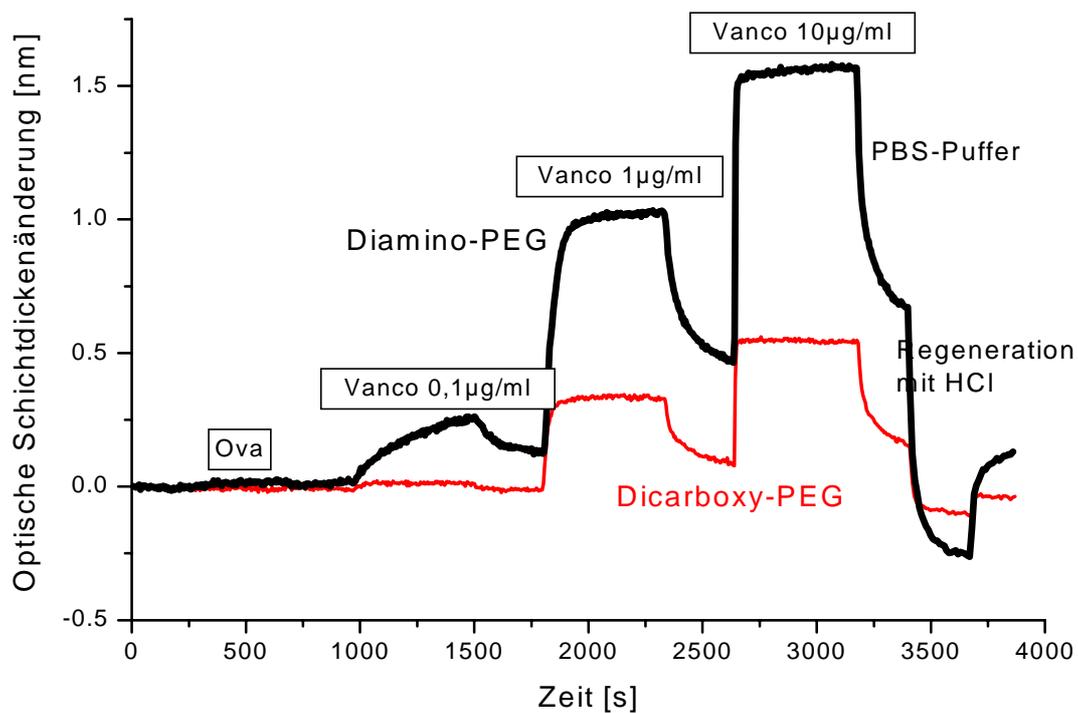
## 5.4 Charakterisierung der Transducer

Um die Transducer zu charakterisieren werden nacheinander das Protein Ovalbumin zum Nachweis unspezifischer Bindung und drei verschiedene Konzentrationen von Vancomycin ( $0.1\mu\text{g/ml}$ ,  $1\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$ ) über den Transducer geleitet.



**Bild 76:** Charakterisierung eines Dicarboxy-PEG-Transducers.

In Bild 76 ist die Charakterisierung eines Dicarboxy-PEG-Transducers gezeigt. Das Ovalbumin zeigt so gut wie keine Schichtdickenänderung, das bedeutet, daß die unspezifische Bindung nur sehr gering ausfällt, eine unbedingte Voraussetzung für den Einsatz eines solchen Transducers in einem Biofermenter. Bei der geringsten Konzentration des Vancomycins ist das Signal nur sehr klein, durch reines Spülen mit PBS-Puffer wird die Basislinie wieder erreicht. Die Bindung ist also reversibel, eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz der Modulationstechnik. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml ist das Signal schon ganz deutlich, immerhin 0.35 nm Schichtdickenänderung. Während der anschließenden fünfminütigen Spülung mit PBS geht das Signal noch nicht ganz auf Null zurück. Dasselbe gilt für die höchste Konzentration von Vancomycin. Um die Basislinie schneller zu erreichen, um also alles Vancomycin wieder vom Transducer zu entfernen, wird mit Salzsäure (pH 1.5) nachgespült bzw. regeneriert.

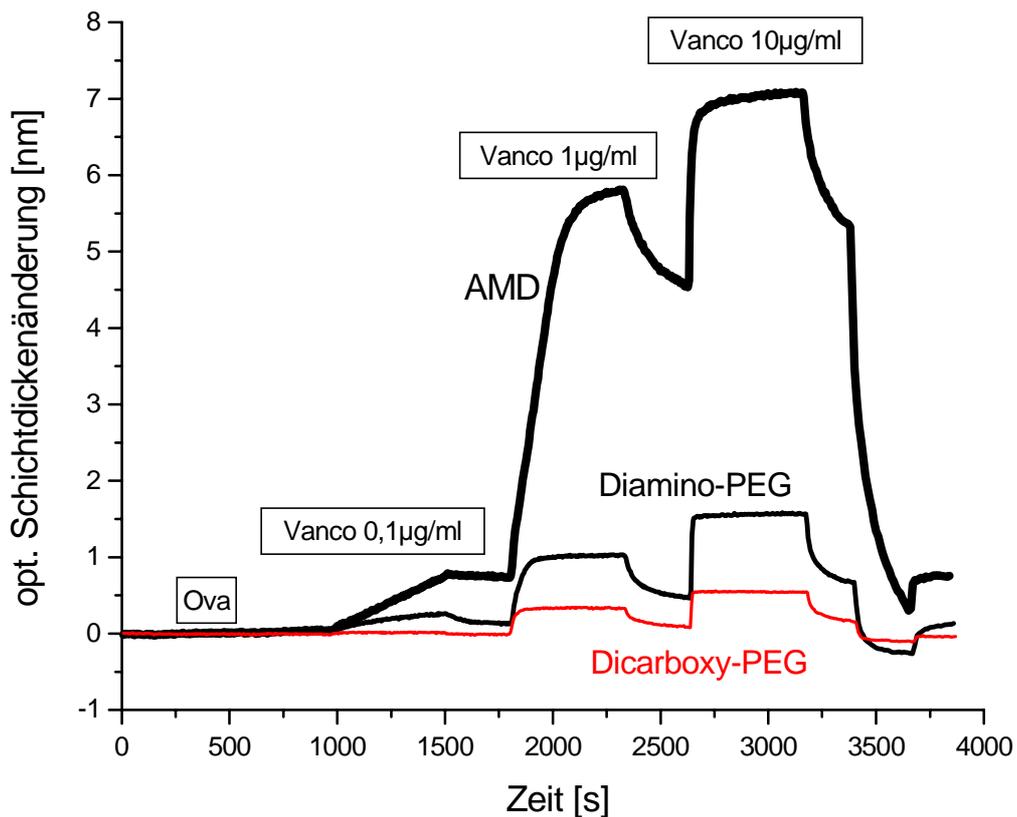


**Bild 77:** Charakterisierung eines Diamino-PEG-Transducers im Vergleich mit einem Dicarboxy-PEG-Transducer.

Bild 77 zeigt zusätzlich die entsprechende Charakterisierungskurve eines Diamino-PEG-Transducers. Die Kurve sieht von ihrer Form her der Kurve für den Dicarboxy-PEG-Transducer sehr ähnlich, doch ist die Signalstärke deutlich höher. Die unspezifische Bindung ist genauso gering wie bei den Dicarboxy-

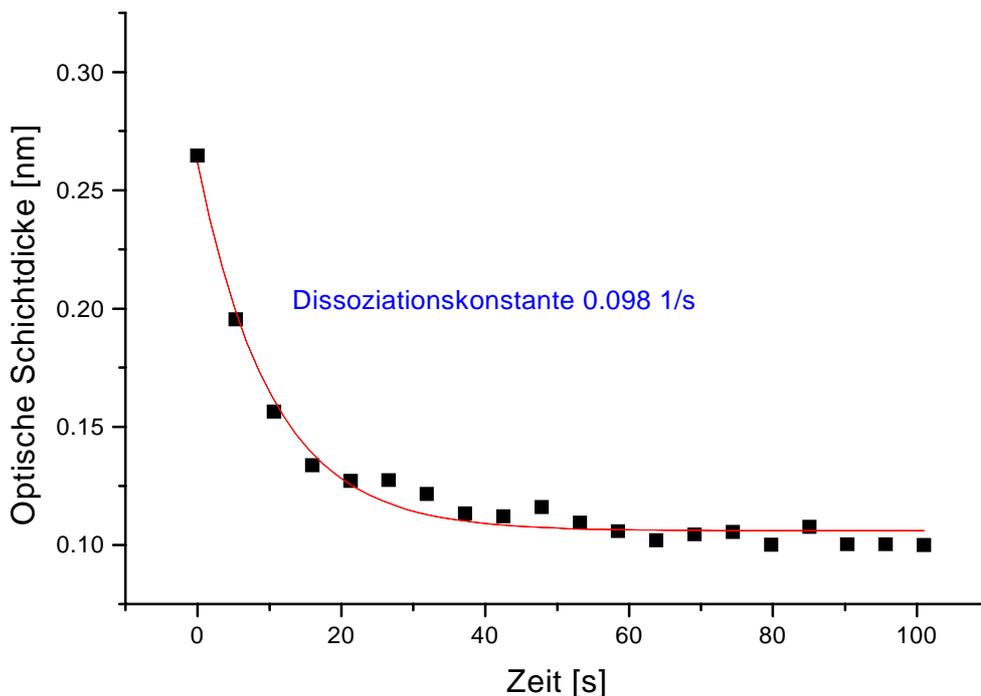
PEG-Transducern. Schon bei der kleinsten Konzentration des Vancomycins liegt jedoch ein klares Signal vor, auch wenn die Gleichgewichtsbelegung hier noch nicht erreicht wird. Bei den übrigen Konzentrationen ist die Signalstärke wesentlich höher, etwa um den Faktor 3 gegenüber dem Dicarboxy-PEG. Bei 10  $\mu\text{g/ml}$  Vancomycin mit dem Dicarboxy-PEG entsteht ein Signal von 0.55 nm, mit dem Diamino-PEG-Transducer eines von 1.6 nm. Abgesehen von der höheren Signalstärke ist auch die wesentlich langsamer ablaufende Kinetik erwähnenswert, besonders gut sichtbar bei der geringsten Vancomycin-Konzentration von 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . Bei höheren Konzentrationen verwischt dieser Unterschied.

Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Transducer-Typen müssen wohl mit der Glutarsäure zusammenhängen. Ein Blick auf Bild 74 zeigt, daß die Tripeptide durch die Glutarsäure weiter hinaus in den Flüssigkeitsraum ragen, auf diese Weise kann das Vancomycin leichter angreifen.



**Bild 78:** Charakterisierung eines AMD-Transducers im Vergleich mit den beiden PEG-Transducern

Eine noch wesentlich höhere Signalstärke wird mit den AMD-Transducern erreicht, einen Vergleich aller drei Typen zeigt Bild 78. Bei 10 µg/ml Vancomycin erreicht der AMD-Transducer eine optische Schichtdickenänderung von 7.3 nm, also einen Faktor von annähernd 5 im Vergleich zu den Diamino-PEG-Transducern. Die Gleichgewichtsbelegung wird allerdings hier bei keiner der Vancomycin-Konzentrationen erreicht. Dies liegt wohl an der wesentlich schlechteren Zugänglichkeit von einigen der immobilisierten Tripeptide im Hydrogel des AMD, da das Vancomycin ein recht großes Molekül ist. Auch die Dissoziation verläuft wesentlich langsamer, dies dürfte auf die stärkere Rückbindung im Hydrogel zurückzuführen sein.



**Bild 79:** Beispiel einer Dissoziationskurve des Vancomycins auf einem PEG-Transducer.

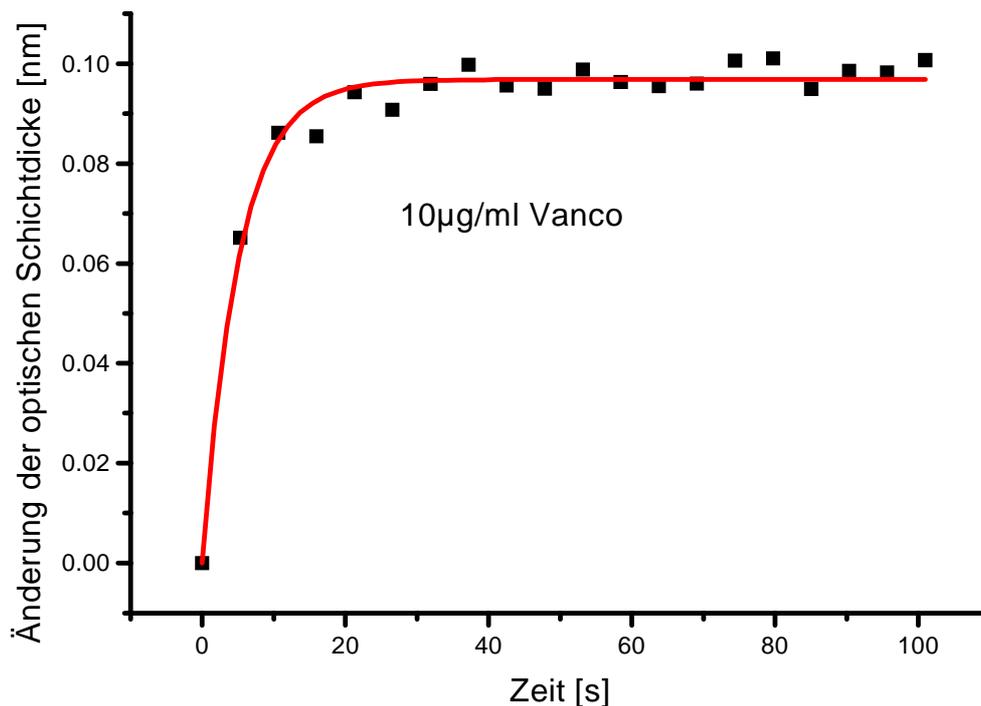
Was den Fall der Dissoziation betrifft, so wird deutlich, daß die Unterschiede zwischen PEG- und AMD-Transducern erheblich sind. Auf den AMD-Transducern zeigt das Vancomycin eine so starke Rückbindung, daß eine Ermittlung der Dissoziationskonstante aus diesem Bereich unmöglich ist. Bei den PEG-Transducern ist die Rückbindung wesentlich schwächer. Der Grund für diese Verschiedenheit ist in der Struktur der Oberflächen zu suchen. Das Hydrogel des AMD bietet viele Rückhaltungsmöglichkeiten, kaum verläßt ein Molekül seine Bindungsstelle im Dickicht des Gels, so findet es nach kurzer Zeit

eine neue Stelle. Bei den PEG-Oberflächen dagegen kann ein Molekül nach der Dissoziation sofort in die Strömung gelangen und dann vom Transducer verschwinden, ohne noch einmal gebunden zu werden.

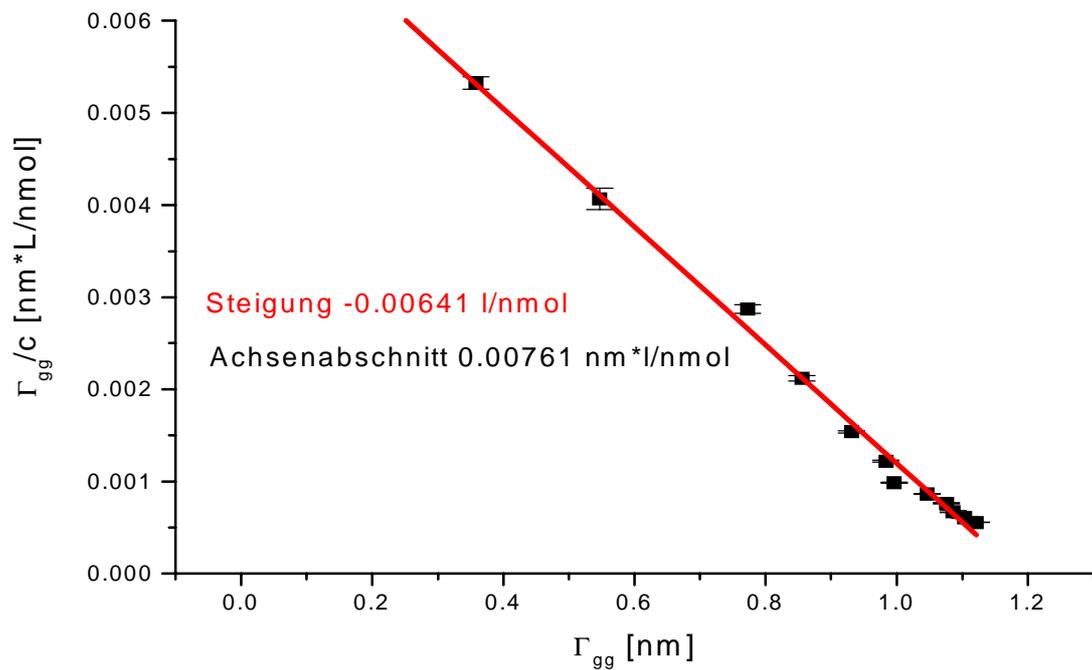
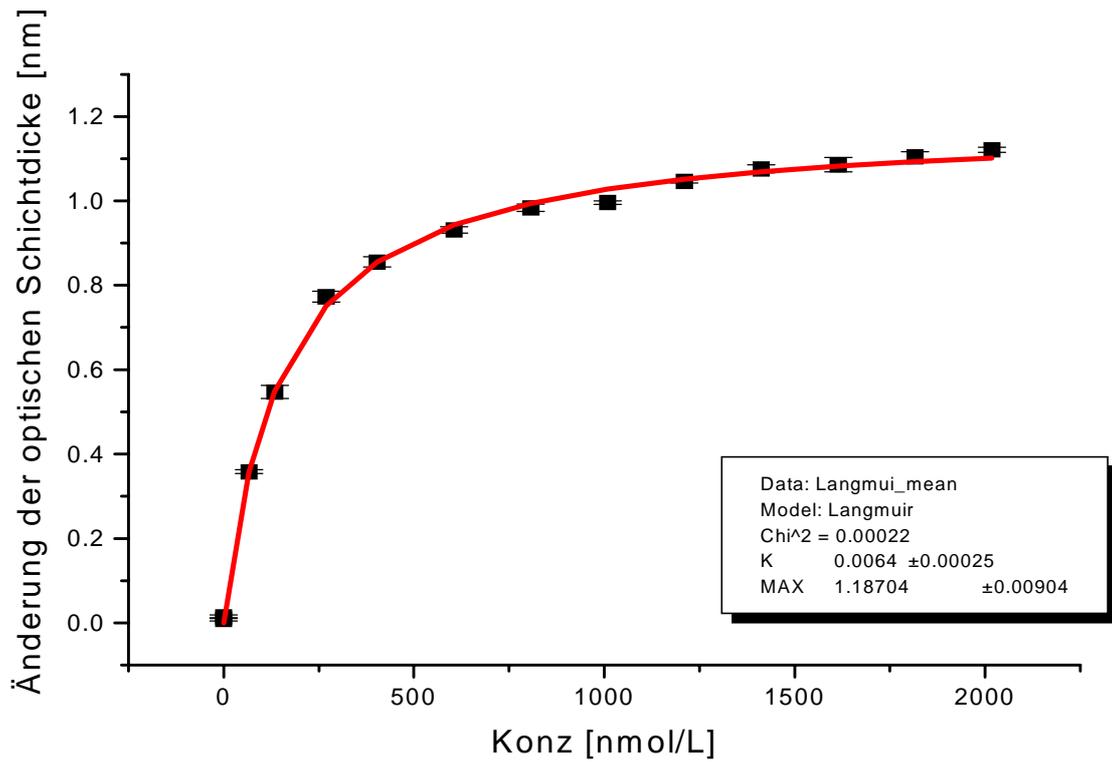
Bei den PEG-Oberflächen kann eine Simulation des gemessenen Kurvenverlaufs mit einer Exponentialfunktion versucht werden, was in Bild 79 gezeigt ist. Durch die Verschiedenheit der Transducer in Bezug auf die Rückbindung ist das  $k_d$  bei jedem Transducer unterschiedlich. Für die Abschätzung des  $k_d$  wurde ein Dicarboxy-PEG-Transducer mit minimaler Rückbindung benutzt. Bei Auswertung solcher Dissoziationskurven ergibt sich:

$$k_d = (0.117 \pm 0.017) \text{ 1/s.}$$

Schwieriger ist die Simulation des Anstiegs der Bindungskurve. Als Beispiel sei hier die Simulation mit biexponentiellem Ansatz (Gleichung 42) in Bild 80 gezeigt. Der biexponentielle Verlauf kann ein Hinweis auf die Existenz zweier unterschiedlich zugänglicher Bindungsstellen auf dem Transducer sein.



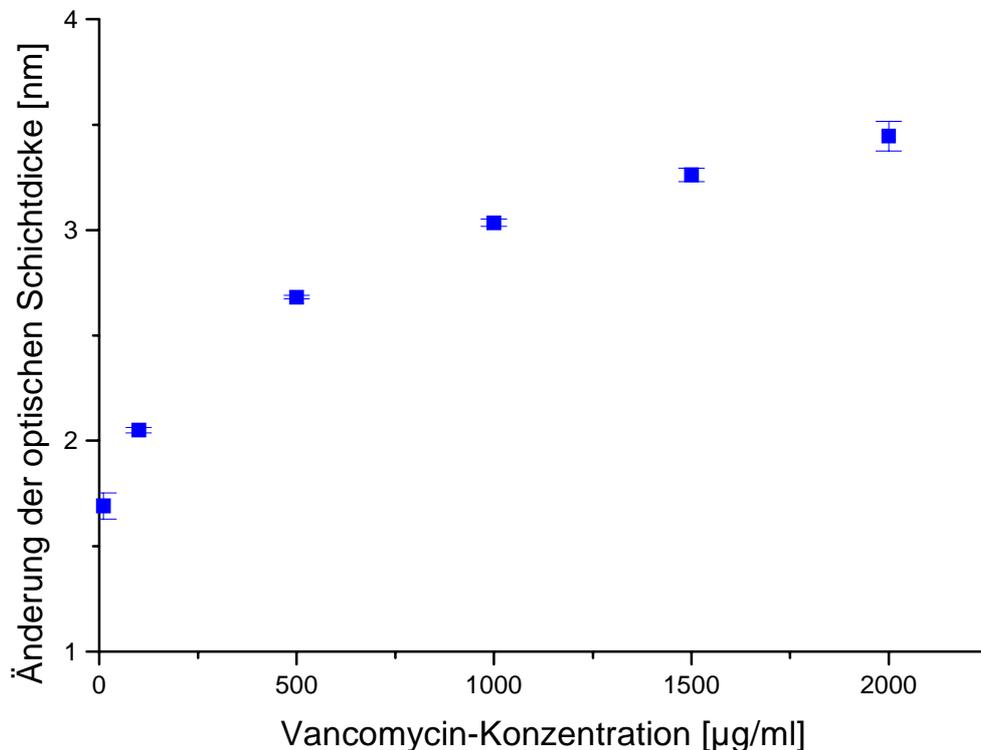
**Bild 80:** Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Bindungskurve eines PEG-Transducers (Quadrate: experimentelle Daten, durchgezogene Linie: Simulation).



**Bild 81:** Oben: Auftragung der Gleichgewichtsbelegung von Vancomycin auf einem Diamino-PEG-Transducer bei verschiedenen Konzentrationen des Vancomycins. Unten: Scatchard-Auftragung der entsprechenden Meßwerte.

Bei Auftragung der Gleichgewichtsbeladung bei verschiedenen Konzentrationen des Vancomycins wird (näherungsweise wegen des biexponentiellen Verlaufs) bei den beiden Arten von PEG-Transducern eine Langmuir-Isotherme erhalten. Bild 81 oben zeigt das Beispiel eines Diamino-PEG-Transducers: Die Gleichgewichtsbelegung wird hier durch die Dicke der optischen Schicht im Gleichgewichtsfall repräsentiert. Der steile erste Bereich dieser Kurve kann zur Kalibrierung des Transducers eingesetzt werden, so daß Messungen unbekannter Konzentrationen, z. B. in einem Fermenter, möglich werden. Der entsprechende Scatchard-Plot wird in Bild 81 unten gezeigt. Die Affinitätskonstante ergibt sich zu  $K = (6.4 \pm 0.024) \cdot 10^6$  l/mol.

Auch bei den AMD-Transducern wurde die Gleichgewichtsbelegung bei verschiedenen Konzentrationen des Vancomycins ermittelt, Bild 82 zeigt das Ergebnis bei einem solchen Transducer. Im Gegensatz zu den Gegebenheiten des PEG-Transducers ist hier keine Simulation mit einer Langmuir-Funktion möglich.



**Bild 82:** Gleichgewichtsbelegung verschiedener Vancomycin-Konzentrationen auf einem AMD-Transducer.

Nachdem die Transducer charakterisiert wurden, können nun die entsprechenden Konsequenzen für die weiteren Messungen gezogen werden: Für die Anwendung modulierter Konzentrationen eignen sich die AMD-Transducer nicht, da die Dissoziation durch die starke Rückbindung zu sehr verzögert wird. Das Signal des Spektrometers selbst wäre in diesem Fall nicht moduliert, trotz modulierter Konzentrationen. Der Lock-In-Verstärker würde ein nur sehr kleines Signal selbst bei hohen Vancomycin-Konzentrationen liefern.

Anders dagegen die Dicarboxy-PEG-Transducer. Hier ist die Rückbindung sehr gering, die Dissoziation erfolgt schnell. Bei modulierter Konzentration des Vancomycins wird auch das Spektrometer-Signal entsprechende Modulationen aufweisen. Dadurch kann der Lock-In-Verstärker eine optimale Information herausfiltern.

Für die Messung der Vancomycin-Konzentration auf herkömmliche Weise, also ohne den Einsatz des Lock-In-Verstärkers, eignen sich dagegen die AMD-Transducer wegen ihrer höheren Empfindlichkeit wesentlich besser als die PEG-Transducer.

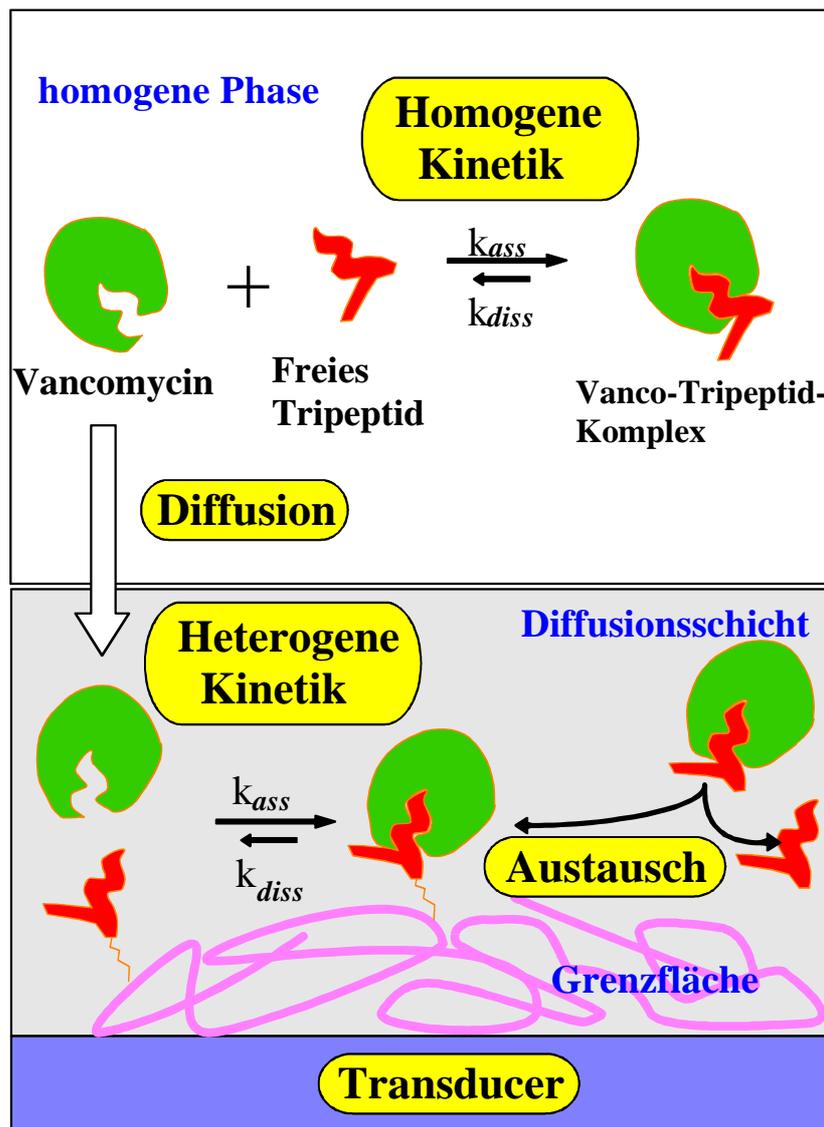
## 5.5 Affinitätsreaktionen in homogener Phase

Zusätzlich zu den Messungen der heterogenen Kinetik wurden noch Messungen der Affinitäten in der homogenen Phase durchgeführt. Es sollte ermittelt werden, für welches Substrat Vancomycin die höchste Affinität zeigt. In der Literatur ([61] und [62]) ist als Substrat für das Vancomycin nicht nur die Rede von dem Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala, sondern auch von einigen anderen Peptiden.

Vancomycin wurde mit drei verschiedenen freien Tripeptiden, L-Lys-D-Ala-D-Ala, L-Ala-D-Ala-D-Ala und diacetyliertes L-Lys-D-Ala-D-Ala in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min, in der sich in der flüssigen Phase ein Gleichgewicht zwischen Ligand (Tripeptid), Rezeptor (Vancomycin) und Ligand-Rezeptor-Komplex einstellt, wurde die Konzentration an freiem Rezeptor im Durchfluß mit RfS durch die Bindung an den immobilisierten Ligand bestimmt. An diesen immobilisierten Liganden bindet der freie Rezeptor in der kombinierten Diffusions- und Bindungskinetik (s. Bild 83). Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich als Konzentration des freien Rezeptors (hier: Vancomycin) [56]:

$$c_{Rfr}(c_{LO}) = \frac{c_{R0} - c_{LO} - \frac{1}{K}}{2} + \sqrt{\frac{\left(c_{R0} + c_{LO} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - c_{R0}c_{LO}} \quad (46)$$

Hierbei ist  $c_{Rfr}$  die Konzentration des freien Rezeptors,  $c_{R0}$  die Ausgangskonzentration des Rezeptors,  $c_{LO}$  die Ausgangskonzentration des Liganden und  $K$  die Affinitätskonstante in der homogenen Phase. Diese Funktion beschreibt die Titration des Rezeptors mit seinem Liganden, daher wird diese Untersuchung auch Affinitätstitration genannt.

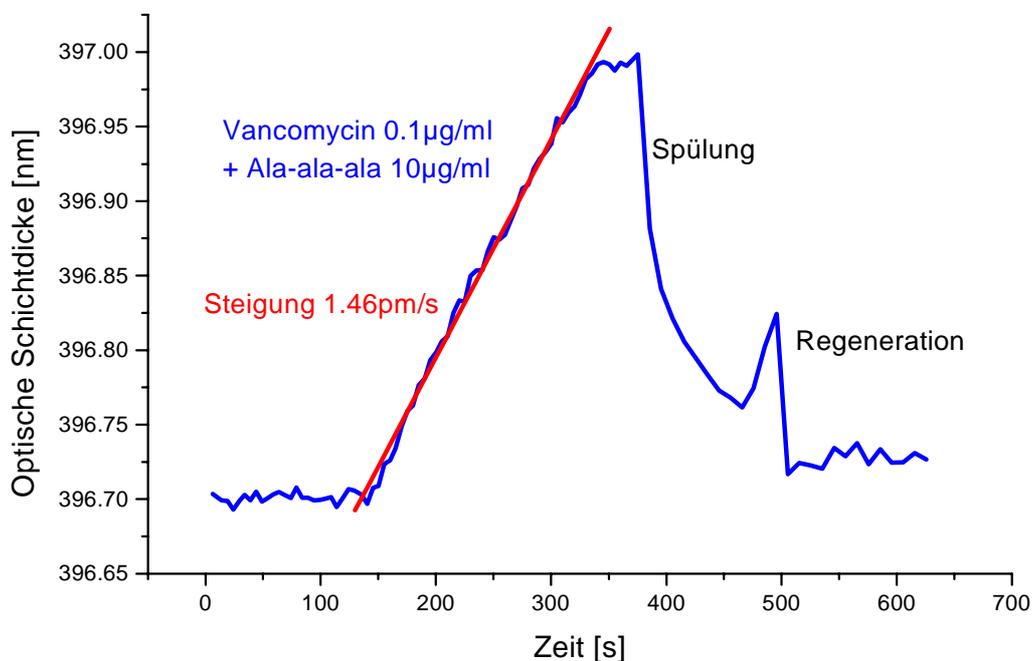


**Bild 83:** Schema der Affinitätstitration des Vancomycins mit freiem Tripeptid (verändert nach [56]).

Die Konzentration des freien Rezeptors wird unter diffusionskontrollierten Bedingungen gemessen, d. h. zu Beginn der Bindungsreaktion, wenn jedes

ankommende Rezeptor-Molekül auch einen unbesetzten immobilisierten Liganden antrifft. Der Anstieg der optischen Schichtdicke ist dann ein direktes Maß für die Konzentration des freien Rezeptors. Die Dissoziation des Komplexes in der Nähe der Oberfläche, die zusätzliche Bindungsereignisse liefert, muß durch einen Korrekturterm  $C_D$  beschrieben werden, der die zusätzliche Bindungsrate durch diesen Prozess, der proportional zur Konzentration des Komplexes ist, berücksichtigt [56]:

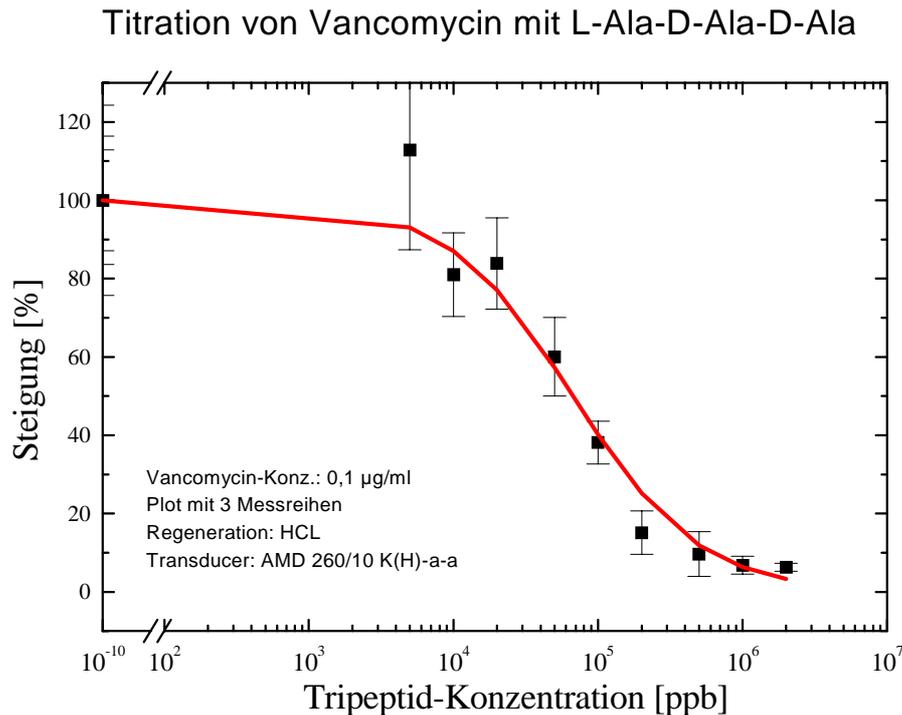
$$c_{Rfr}(c_{L0}) = c_{L0} - \left[ \frac{c_{R0} + c_{L0} + \frac{1}{K}}{2} + \sqrt{\frac{\left(c_{R0} + c_{L0} + \frac{1}{K}\right)^2}{4} - c_{R0} \cdot c_{L0}} \right] \cdot (1 - C_D) \quad (47)$$



**Bild 84:** Zur Datenauswertung der Affinitätstiteration.

Als Maß für die Konzentration des ungebundenen Vancomycins wurde die Änderungsgeschwindigkeit der optischen Schichtdicke im linearen Anfangsteil der Messung bei der Probeninjektion herangezogen. Hierbei wurde eine Konzentration des Vancomycins zu 100 ng/ml gewählt, um die Steigung der Bindungskurve zwischen 1 und 2 pm/s einzustellen. Die Konzentrationen der Liganden wurden auf einer logarithmischen Skala etwa äquidistant gewählt. (1, 2, 5, 10, 20, 50 etc.). Die Steigung der Bindungskurven wurde durch lineare Regression bestimmt (s. Bild 84). Die erhaltenen Steigungen wurden auf einen

Nullwert maximaler Steigung normiert (Vancomycinlösung ohne Ligand) und gegen die zugehörigen Konzentrationswerte des Liganden aufgetragen (zwei Beispiele werden in den Bildern 85 und 86 gezeigt). Aus den so erhaltenen Titrationskurven läßt sich durch Anpassung der Modellfunktion der Gleichung (47) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate die Affinitätskonstante bestimmen.



**Bild 85:** Titrationskurve des Vancomycins mit freiem L-Ala-D-Ala-D-Ala. Es wurde ein AMD-Transducer benutzt.

Dieses Experiment wurde mit freiem L-Lys-D-ala-D-ala, mit freiem L-Ala-D-ala-D-ala und auch mit diacetyliertem L-Lys-D-Ala-D-Ala durchgeführt. Das Ergebnis:

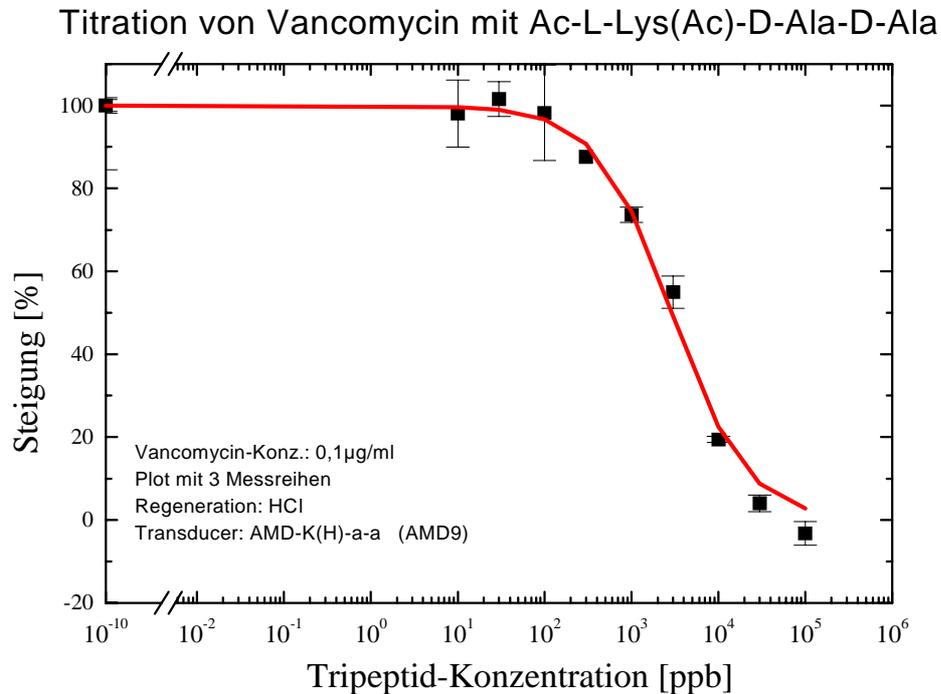
$$K_{L-a-a}: (9.67 \pm 0.74) * 10^2 \text{ l/mol (Literaturwert: } 1.16 * 10^4 \text{ l/mol)}$$

$$K_{A-a-a}: (3.44 \pm 0.77) * 10^3 \text{ l/mol (Literaturwert: } 5.0 * 10^4 \text{ l/mol)}$$

$$K_{Ac-K(Ac)-a-a}: (1.30 \pm 0.11) * 10^5 \text{ l/mol (Literaturwert: } 1.5 * 10^6 \text{ l/mol)}$$

Alle diese Affinitätskonstanten gelten für die homogene Phase. Die heterogene Affinitätskonstante ist deutlich größer ( $K = (6.4 \pm 0.024) * 10^6 \text{ l/mol}$ ). Dies ist durchaus verständlich, denn auch das natürliche Substrat ist bei genauer Betrachtung an der wachsenden Bakterienwand immobilisiert. Daher ist das

Vancomycin auf das heterogene Tripeptid spezialisiert, die heterogene Affinität ist größer als die homogene.



**Bild 86:** Titrationskurven des Vancomycins mit freiem diacetyliertem L-Lys-D-Ala-D-Ala. Es wurde ein AMD-Transducer benutzt.

Die erhaltenen Werte der homogenen Affinitätskonstanten sind erstaunlicherweise eine Größenordnung kleiner als die in der Literatur angegebenen Werte ([61], [62]). Ein Grund für diese Abweichung wurde bisher nicht gefunden. Interessant ist, daß die Affinität des Vancomycins zum freien Trialanin größer ist als die zu Lys-ala-ala. Die Affinität zum diacetylierten Lys-ala-ala ist sogar um eine Größenordnung höher. Die freien Aminogruppen des Lysins vermindern also die Affinität des Vancomycins. Das Tri-Alanin hat nur noch eine freie, die  $\alpha$ -Aminogruppe, dadurch ist die Affinität ein wenig höher, doch scheint v. a. gerade die  $\alpha$ -Aminogruppe für die Herabsetzung der Affinität verantwortlich zu sein. Da bei dem diacetylierten Tripeptid auch diese besetzt wird, ist dort die Affinität am größten. In der freien Natur greift Vancomycin das Tripeptid in einem Zustand an, in dem auch beide Aminogruppen des Lysins mit anderen Aminosäuren verknüpft sind, die  $\alpha$ -Aminogruppe mit D-Glutaminsäure, die  $\epsilon$ -Aminogruppe mit dem Pentaglycin.

Das Fehlen der freien NH<sub>2</sub>-Gruppe allein ist jedoch nicht der einzige Grund für die erhöhte Affinität. Dies zeigt ein Bindungshemmtest mit freiem Dipeptid D-ala-D-ala. Dieses Dipeptid war auch mit einer Konzentration von 2mg/ml nicht in der Lage, die Bindung von 0.1µg/ml Vancomycin an die Sensoroberfläche signifikant zu hemmen.

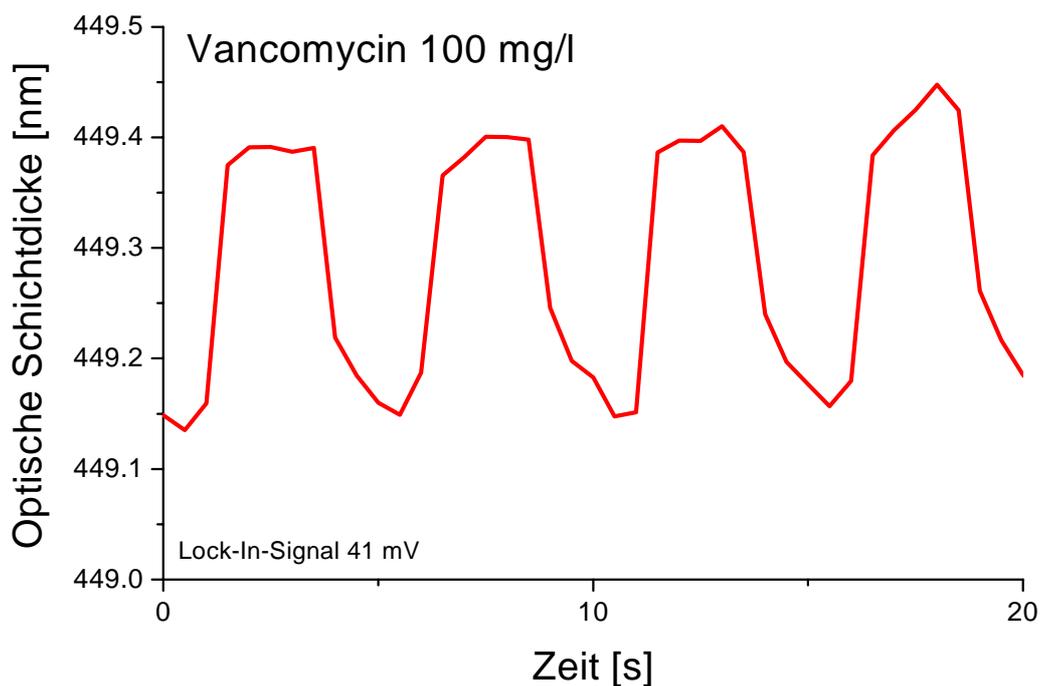
## 5.6 Messungen mit der Modulationstechnik

Nachdem das Vancomycin mit der herkömmlichen RfS-Technik recht gut analysiert werden konnte, sollte versucht werden, die in Abschnitt 4 beschriebene Methode der Modulation der Analyt-Konzentration auf das System Vancomycin-Tripeptid anzuwenden. Dazu wurde die in Kapitel 2 und 3 beschriebene µ-FIA-Anlage eingesetzt, da nur dort die entsprechenden Bauteile für die Modulation zur Verfügung standen. Die Kopplung der RfS-Apparatur mit dem Lock-In-Verstärker ist in Abschnitt 4.2 beschrieben. Dort wurde bereits gezeigt, dass die RfS-Technik prinzipiell mit der Modulationstechnik verträglich ist. In jenem Abschnitt 4.2 wurde allerdings keine Oberflächenbindung untersucht, sondern die Fluoreszenz einer modulierten Analyt-Konzentration. Um eine richtige RfS-Untersuchung machen zu können, mußten die Transducer mit dem Substrat des Vancomycins belegt werden. Die Oberflächenbelegung erfolgt dabei nach der in Abschnitt 5.2 beschriebenen Prozedur. Dort wurden drei verschiedene Bauformen der Oberfläche dargestellt, die sich durch die verwendeten Spacer-Polymere unterscheiden: Dicarboxy-PEG, Diamino-PEG oder Aminodextran. Für die Zwecke der Modulationstechnik ist der Transducer mit Aminodextran jedoch überhaupt nicht geeignet (Bild 78), da die Reversibilität des Vancomycins im Dickicht des Aminodextran-Waldes viel zu gering ist. Eine schnelle Modulation im Bereich 0.1 bis 1 Hz ist nicht möglich. Auch bei Diamino-PEG-Transducern ist die Reversibilität zu gering (Bild 77), so daß einzig Dicarboxy-PEG-Transducer in Frage kommen (Bild 76). In Bild 76 ist eine typische Meßkurve mit einem Dicarboxy-PEG-Transducer abgebildet. Wenn die Belegungsichte mit Tripeptid noch etwas geringer wird, wird die Reversibilität sogar noch größer, da dann die Rückbindung eine noch geringere Rolle spielen wird. Die Dissoziation kann dann ungehindert ablaufen. So erfüllt also das Vancomycin mit nicht optimalen Dicarboxy-PEG-Transducern die Reversibilitätsbedingung in zumindest für den Anfang zufriedenstellender Weise.

Die relativ großen Transducer-Glasplättchen (2.5 x 2.5 cm<sup>2</sup>) der in dieser Arbeit aufgebauten µ-FIA-Anlage wurden also mit Dicarboxy-PEG belegt und schließlich mit dem Tripeptid L-Lys-D-Ala-D-Ala verknüpft. Der fertige

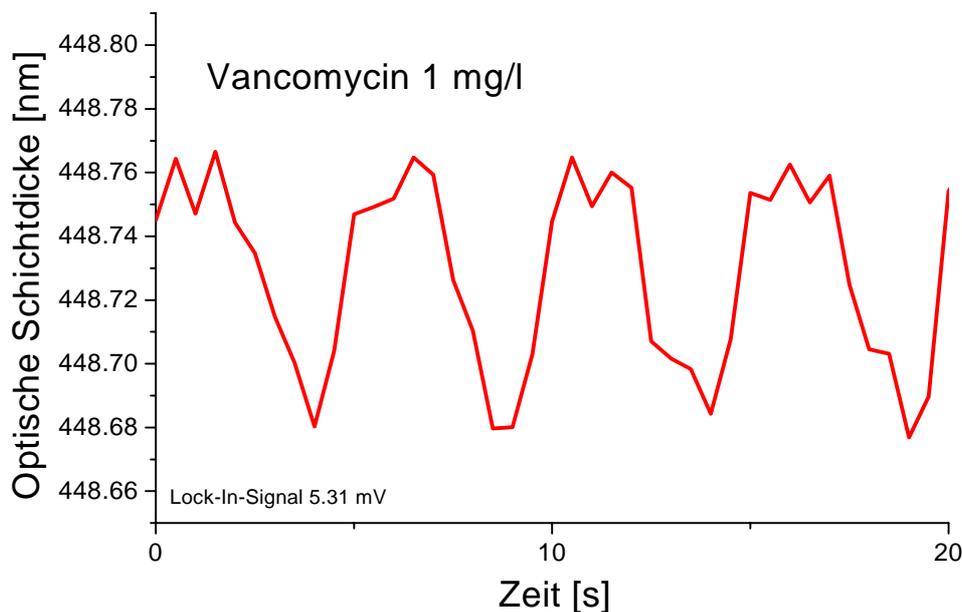
Transducer wurde in das System eingebaut und schließlich wurden verschieden stark konzentrierte Vancomycin-Lösungen in die Flußzelle geleitet, moduliert durch reines Lösungsmittel. Im vorliegenden Fall wurde als Lösungsmittel für das Vancomycin PBS-Puffer verwendet. Es mußte dabei genau darauf geachtet werden, daß der Puffer, der zur Modulation verwendet wurde, aus demselben Vorrat genommen wurde wie der Puffer zum Lösen des Vancomycins, da schon geringe Temperatur- und pH-Wert-Unterschiede bei der hohen Empfindlichkeit des Lock-In-Verstärkers zu Signalverfälschungen geführt hätten.

Als Modulationsfrequenz wurde 0.2 Hz gewählt, als erste Konzentration 100 mg/l. Bild 87 zeigt den Verlauf der optischen Schichtdicke, wie er vom SPEKOL gemessen wird. Die Änderung der optischen Schichtdicke ist vergleichsweise gering, nur etwa 250 pm. Um eine hohe Ansprechgeschwindigkeit zu erreichen, mußte die Oberflächenbelegung mit PEG niedrig gewählt werden. Der Transducer stellt also einen Kompromiss zwischen Signaldynamik und Ansprechgeschwindigkeit dar.



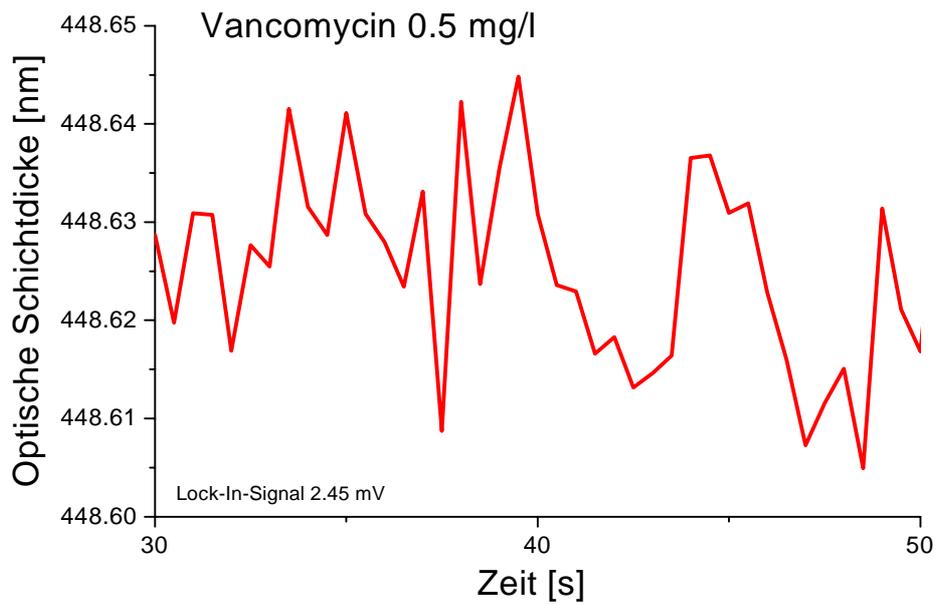
**Bild 87:** Verlauf der optischen Schichtdicke bei einer mit 0.2 Hz modulierten Vancomycin-Konzentration von 100 mg/l. Direkte Messung mit dem SPEKOL.

Der Lock-In-Verstärker, der mit dem Signal nach D/A-Wandlung gespeist wurde, lieferte seinerseits das (konstante) Signal von 41 mV. Bei den hohen Konzentrationen von Vancomycin ist allerdings ein Lock-In-Verstärker noch nicht nötig. Die Messung der Amplitude der Pulse wäre auch mit dem SPEKOL allein möglich gewesen. Bild 88 zeigt das gleiche Experiment mit einer Konzentration von nur 1 mg/l. Hier wird das Rauschen im Verhältnis zum Signal schon recht deutlich, nur mühsam und ungenau kann die Pulshöhe abgelesen werden, sie liegt zwischen 70 und 80 pm, das Rauschen bei fast 20 pm. Der Lock-In-Verstärker gibt als konstantes Signal genau 5.31 mV aus.

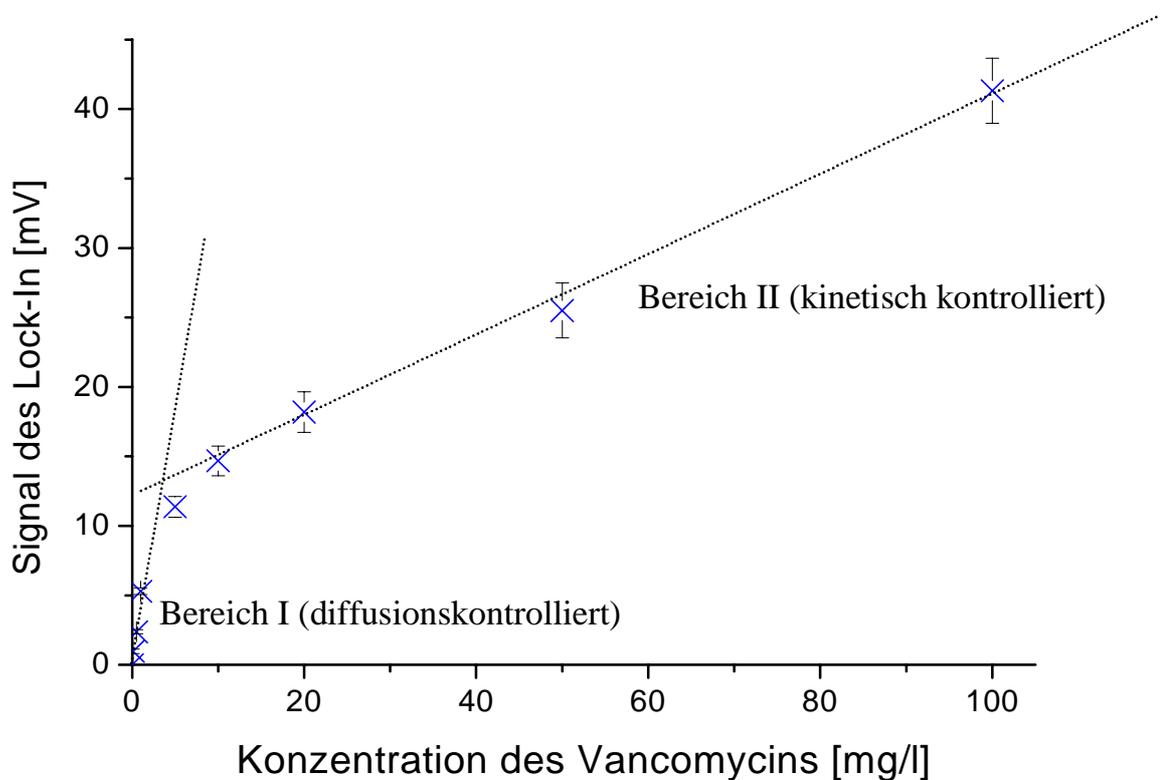


**Bild 88:** Verlauf der optischen Schichtdicke bei einer mit 0.2 Hz modulierten Vancomycin-Konzentration von 1 mg/l. Direkte Messung mit dem SPEKOL.

Bild 89 schließlich zeigt die Messung mit einer Konzentration von nur noch 0.5 mg/l. Die Pulse als solche sind nicht mehr zu erkennen, geschweige denn in ihrer Amplitude bestimmbar. Der große Unterschied zu Bild 88 ist auffällig, doch befindet sich die Messung von Bild 89 in genau dem Bereich, in dem das Rauschen so groß wie das Signal ist. Die zufälligen Rausch-Ereignisse führen zur völligen Strukturzerstörung der Pulse. Der Lock-In-Verstärker jedoch hat keinerlei Probleme, aus diesem Chaos noch ein vernünftiges Signal herauszufiltern und gibt 2.45 mV aus.



**Bild 89:** Verlauf der optischen Schichtdicke bei einer mit 0.2 Hz modulierten Vancomycin-Konzentration von 0.5 mg/l. Direkte Messung mit dem SPEKOL.



**Bild 90:** Kalibrierkurve des Vancomycins mit der Kombination RfS und Lock-In-Verstärker.

Es wird also deutlich, daß der Lock-In-Verstärker in der Lage ist, auch dann noch Konzentrationen zu messen, wenn das herkömmliche Meßgerät völlig überfordert ist und das Rauschen eine Messung völlig unmöglich macht.

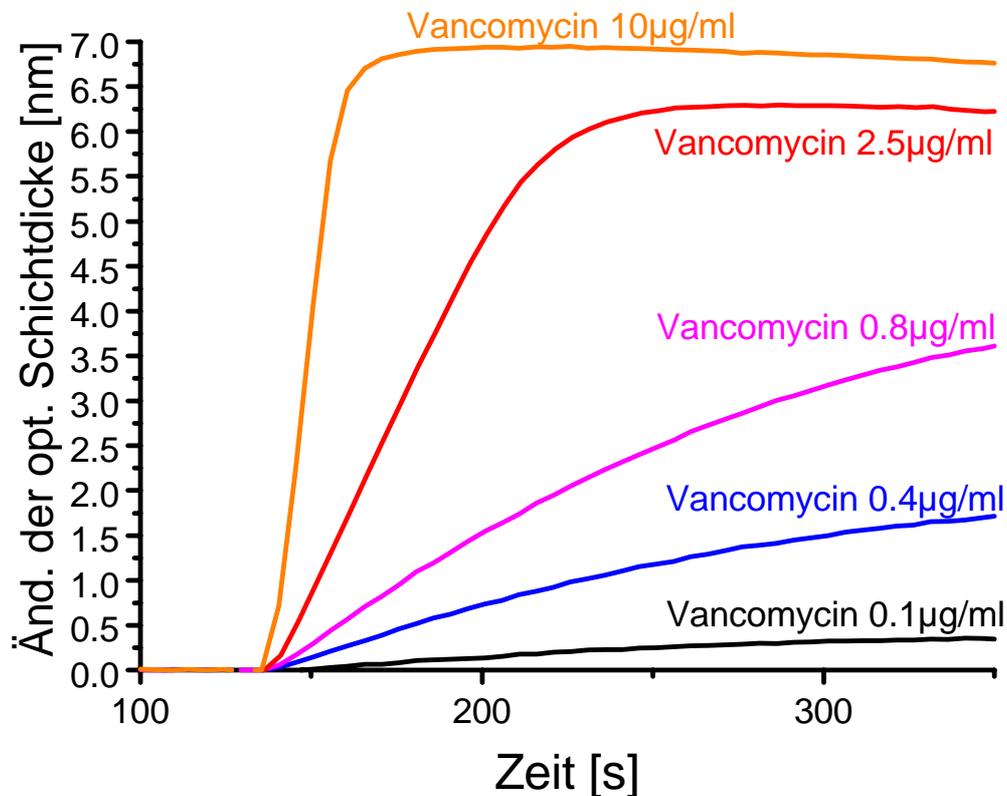
Bild 90 zeigt die Kalibrierkurve des Systems SPEKOL + Lock-In-Verstärker. Die Kurve ist in zwei deutlich verschiedene Regionen eingeteilt. Bei sehr geringen Konzentrationen, also im Bereich der diffusionslimitierten Bindung, in dem jedes Molekül, das an die Oberfläche ankommt, auch seinen Liganden an der Oberfläche findet, gibt es einen sehr steilen Anstieg. Ab einem Bereich von etwa 5 mg/l wird die Steigung der Kurve wesentlich geringer. In diesem Bereich der kinetisch kontrollierten Bindung findet in der relativ kurzen Zeit der Vancomycin-Injektion nicht mehr jedes Molekül einen Bindungspartner an der Oberfläche. Dies reduziert die Steigung der Kalibrierkurve massiv.

## 5.7 Messungen mit RIfS in einem kleinen Bioreaktor

Ein Ziel der in dieser Arbeit zusammengefaßten Forschung ist, wie in der Einleitung schon erwähnt, die Einrichtung eines On-Line-Monitoring für biotechnologische Prozesse. Die ersten Schritte für einen Vancomycin-Reaktor sind in diesem Abschnitt beschrieben.

Für die Messungen wurde der Einfachheit halber das gewöhnliche RIfS-System mit einem Diodenzeilenspektrometer Modell MCS210 der Firma Zeiss, Jena ohne Lock-In-Verstärker verwendet. Es sollte bei dieser ersten Messung nur gezeigt werden, daß es prinzipiell möglich ist, den Verlauf einer Vancomycin-Fermentation mit RIfS zu verfolgen. Als Transducer-Polymer wurde AMD benutzt wegen seiner höheren Empfindlichkeit. Auf die Reversibilität kam es in dieser Off-Line-Messung nicht an. Als Reaktor fand ein 500-ml-Erlenmeyer-Kolben Verwendung. Bakterien der Art *Amycolatopsis orientalis* der Arbeitsgruppe von Prof. Wohlleben, Universität Tübingen, wurden einer Petri-Schale entnommen, auf der sie in einem dichten Rasen gewachsen waren. Ein Viereck dieses Rasens mit Kantenlänge 5 mm wurde ausgestanzt, mit Nährlösung homogenisiert und in einen Vorinkubations-Erlenmeyer-Kolben gegeben. Dieser enthielt ein spezielles Vorkultur-Nährmedium (in 1 l Wasser 1.5 g Glucose, 1.5 g Sojamehl, 0.5 g Cornsteep flüssig, 0.2 g CaCO<sub>3</sub>, 0.5 g NaCl bei einem pH von 7.0). Dort wurden die Bakterien zwei Tage lang inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein Teil dieser Bakterienlösung (10 ml) in einen neuen Erlenmeyer-Kolben, das Hauptkultur-Gefäß, gegeben, das mit einer anderen Nährlösung (in 1 l Wasser 20 g Glycerin, 5.0 g Glucose, 10 g

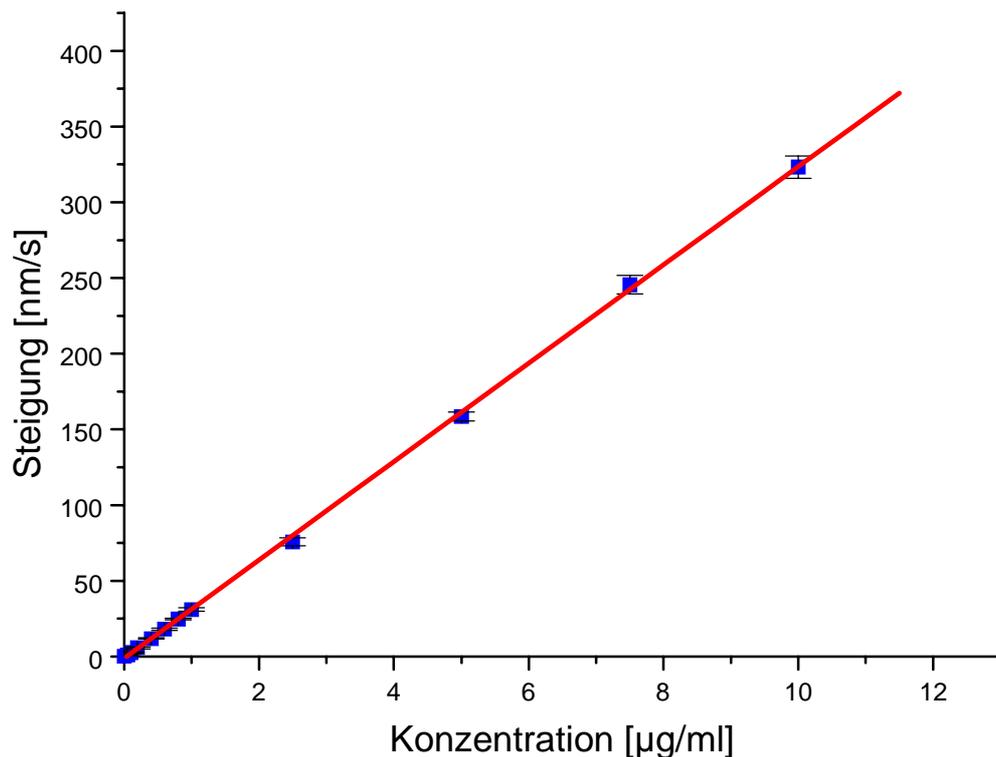
Sojapepton, 3 g Hefeextrakt, 3 g  $\text{CaCO}_3$  bei einem pH von 7.0) zu 200 ml gefüllt war.



**Bild 91:** Messungen zur Kalibrierung eines AMD-Transducers über die Anfangssteigungen.

Dann wurden in bestimmten Abständen Proben aus dem Erlenmeyer-Kolben entnommen und 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde eingefroren. Die Zentrifugation war die einzige Probenmanipulation um größere Partikel, die die Zuführungskapillaren zum Transducer verstopfen könnten, aus der Lösung zu entfernen. Ansonsten wurde die komplette Kultur-Brühe für die weiteren Messungen benutzt.

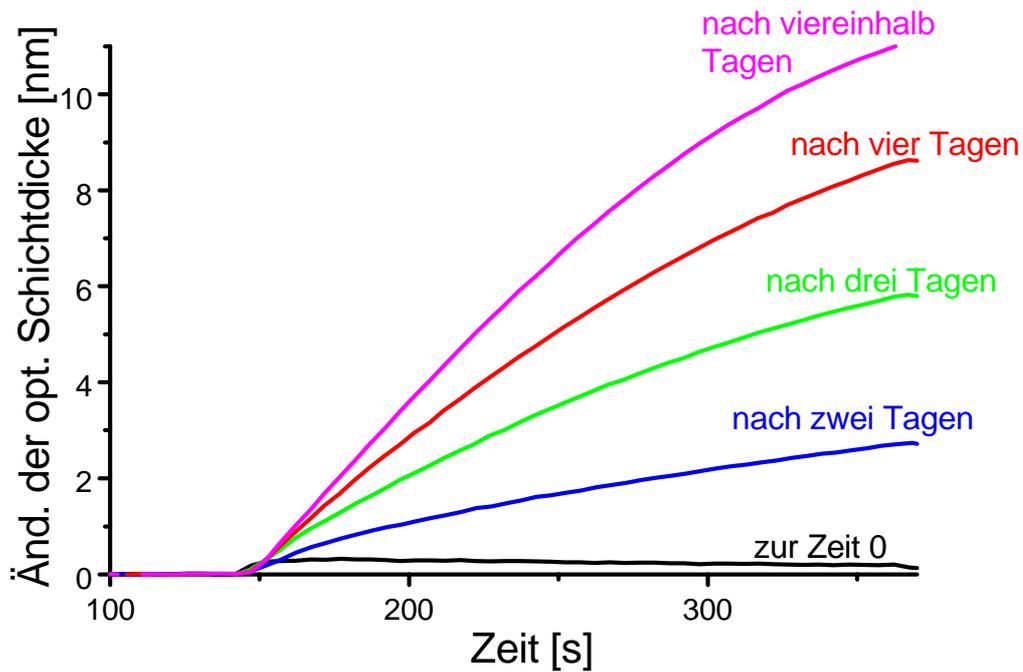
In der Zwischenzeit wurde ein AMD-Transducer kalibriert (Bild 91 und 92). Wie schon in Abschnitt 5.4 erwähnt, geht die Gleichgewichtsbildung der Affinitätsreaktion bei einem AMD-Transducer nur sehr langsam voran, weswegen man für die Kalibrierung die Anfangssteigung nach Injektion des Vancomycins benutzt (Bild 91). Die fertige Kalibrierkurve des AMD-Transducers zeigt Bild 92. Bis 10 µg/ml Vancomycin bleibt sie streng linear.



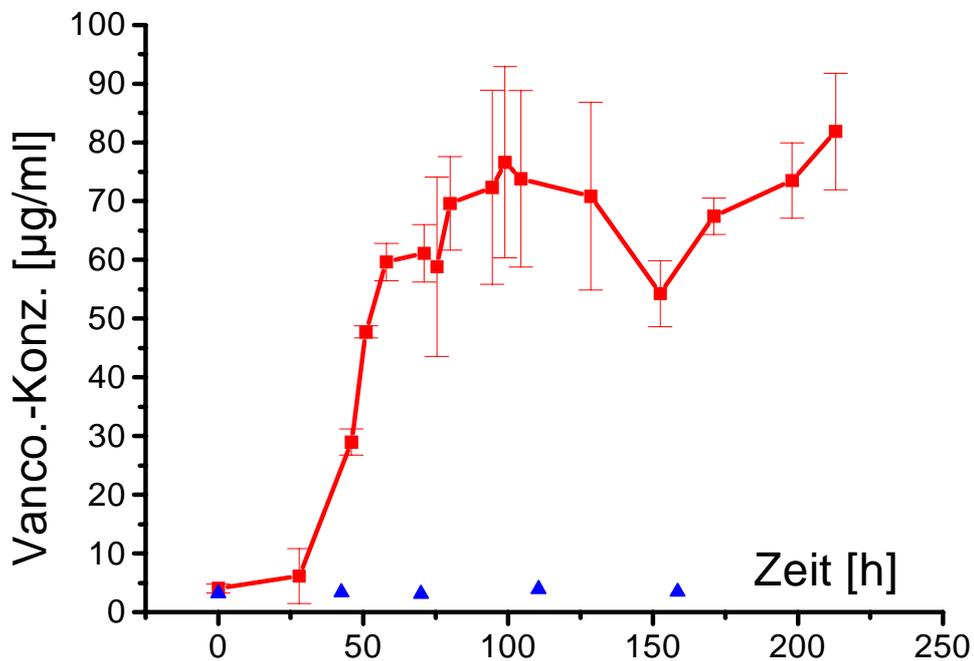
**Bild 92:** Kalibrierkurve des für die Bioreaktor-Messung benutzten AMD-Transducers.

Bei der Messung der Proben stellte es sich heraus, daß die Konzentration des Vancomycins schon nach zwei Tagen außerhalb des Kalibrierbereichs des Transducers lag, so wurden alle Proben 1:100 verdünnt und dann erst vermessen (Bild 93). Auch eine kleine unspezifische Bindung, die in den unverdünnten Proben sichtbar war, wurde durch die Verdünnung ausgemerzt. Für weitere Details siehe [63].

Bild 94 schließlich zeigt die gesamte Fermentation im Überblick: Nach etwa 30 h ist ein gigantisches Anwachsen des Vancomycin-Gehalts zu verzeichnen, der sich dann nach 60 h auf einen Wert von etwa 70  $\mu\text{g/ml}$  einpendelt. Inwieweit der Einbruch der Vancomycin-Konzentration nach etwa 130 h auf nur noch 50  $\mu\text{g/ml}$  und die sofortige Erholung charakteristisch ist oder nur ein Artefakt bzw. einen Meßfehler darstellt (vielleicht wegen des kleinen Volumens von 200 ml) ist unbekannt. In den bisherigen Veröffentlichungen zum Thema Vancomycin-Produktion (z. B. [64] ist keine Rede hiervon. Eine genauere Analyse hätte hier das Bakterientrockengewicht ergeben, doch wurde dies in dieser ersten Messung nicht bestimmt.



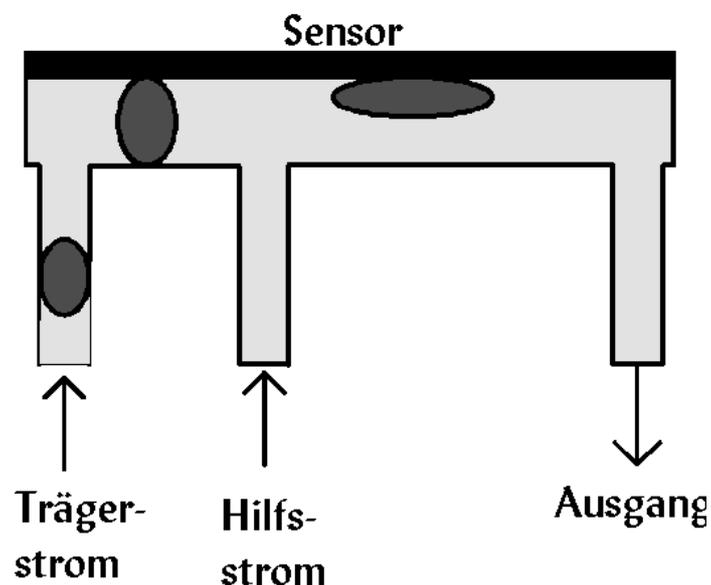
**Bild 93:** Messungen einiger der Reaktorproben, jeweils 1:100 verdünnt.



**Bild 94:** Off-Line-Monitoring der Vancomycin-Produktion in einem Mini-Bioreaktor. Die Dreiecke geben die Referenz-Messung mit einer Nullmutante im gleichen Medium an.

## 6 Erzeugung dünner Flüssigkeitsschichten über der Transducer-Oberfläche

Neben den bisher genannten Arbeiten wurde auch noch eine weitere Idee verfolgt: Viele der Analyt-Moleküle, die durch die Mikro-Kanäle hindurchgehen, gelangen überhaupt nicht in die Nähe der Transducer-Oberfläche, sondern fließen einfach vorbei, insbesondere bei hohen Flußraten. Damit entgehen sie der Detektion, diese wird dadurch unempfindlicher für den Nachweis der entsprechenden Moleküle. Die Idee: Die Schicht, in der die Analyt-Moleküle am Transducer vorbeifließen, muss dünner werden, damit die Wahrscheinlichkeit der Reaktion mit der Transducer-Oberfläche für jedes Analyt-Molekül größer wird. Bislang ist diese Schicht ja noch genauso dick wie der Mikrokanal selbst, in dieser Arbeit also 70  $\mu\text{m}$ . Um diese Schicht dünner zu machen, wurde versucht, die Analyt-Lösungs-Schicht durch eine Unterspülung mit einem Strom reinen Lösungsmittels an die Transducer-Oberfläche zu drücken. Bild 95 zeigt das Prinzip. Die Kanalgeometrie entspricht der in dieser Arbeit verwendeten Struktur für die symmetrische Modulation mit zwei hintereinander liegenden Eingängen und einem Ausgang. Die Injektion erfolgt von unten in den Mikrokanal.

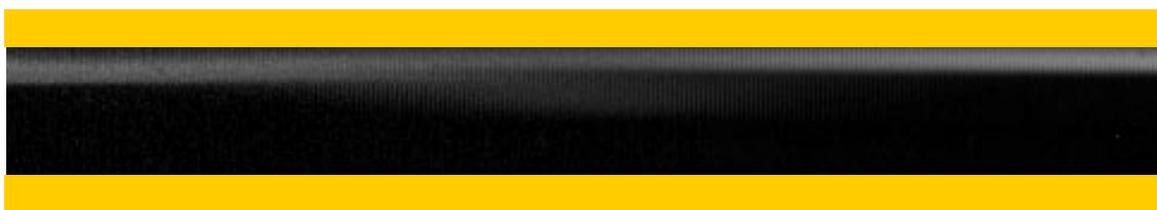


**Bild 95:** Darstellung des Prinzips der Erzeugung einer dünnen Reaktionsschicht über der Oberfläche des Transducers.

Das Analyt-Lösungs-Paket (die Modulation der Analyt-Konzentration fand in diesem Fall also schon vor dem Eintritt in den Mikro-Kanal statt) wird durch einen Trägerstrom in den Hauptkanal der Fluß-Zelle gebracht. Ein Hilfsstrom mit reinem Lösungsmittel, der ebenfalls von unten in den Hauptkanal eintritt,

drängt das Analyt-Paket in den oberen Bereich des Hauptkanals. Dadurch werden die Analyt-Moleküle des Pakets näher an die Transducer-Oberfläche herangeführt, die Wahrscheinlichkeit der Reaktion bzw. Bindung mit der Oberfläche des Transducers wächst dadurch stark an. Durch noch stärkeres Einengen des Analyt-Pakets könnte dies so weit gesteigert werden, dass nahezu jedes Analyt-Molekül mit der Transducer-Oberfläche in Berührung kommen muß. Allerdings sind diesem Vorgehen natürliche Grenzen gesetzt: Jedes Molekül schleppt im Regelfall eine mehr oder weniger dicke Hülle aus Lösungsmittelmolekülen mit sich herum, deren Durchmesser den des Moleküls meist um ein mehrfaches übersteigt. Ein größeres Molekül, beispielsweise ein Antikörper, der selbst schon einen Durchmesser von einigen nm hat, dürfte durchaus einen gesamten Durchmesser (Molekül + Hülle) von einigen 10 bis zu 100 nm besitzen. Eine Verkleinerung der Analyt-Schicht auf Werte in dieser Größenordnung und knapp darüber hätte also keinerlei positive Effekte. Ein Molekül sollte noch in der Lage sein, frei in dieser Schicht diffundieren zu können. Dazu muss die Schicht aber um mindestens eine Größenordnung dicker sein als das Molekül selbst mitsamt seiner Hülle.

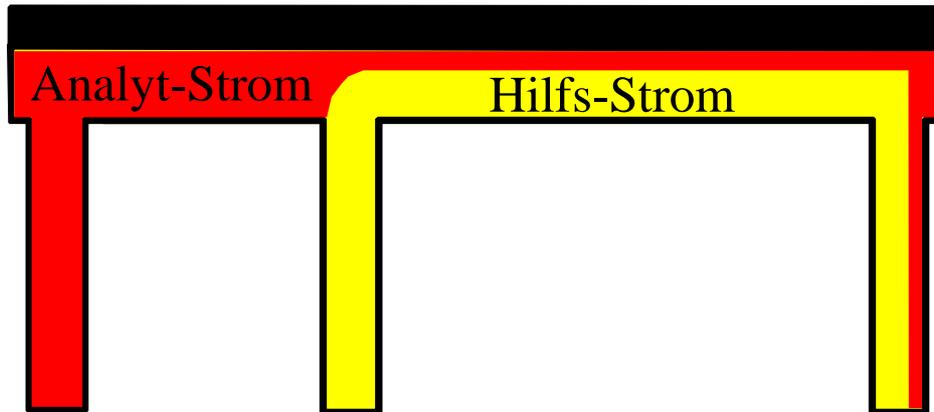
Es wurde zunächst ein analoges Experiment mit der T-förmigen Geometrie der Fluß-Kanäle durchgeführt, hierbei konnte einer der beiden Ströme, die parallel nebeneinander her fließen, durch Flußratenverschiebung (die Flußrate des Hilfsstroms wurde vierfach gegenüber der Flußrate des Trägerstroms erhöht) eng an eine der Kanalwände gedrückt werden. Bild 96 zeigt ein Photo dieses Experiments. Der schmale, helle Streifen ist die an die Wand gedrückte Fluorescein-Lösung. Er nimmt etwa 20 % der Breite des Kanals ein. Der Streifen konnte auch noch stärker verkleinert werden.



**Bild 96:** Photographie des Mikrokanals während des Experiments zur Herstellung dünner Analytschichten. Die Kanalwände sind der besseren Sichtbarkeit wegen hervorgehoben. Ansicht von oben.

Beim Übertragen dieses (vorbereitenden) Experiments von der Breite in die Höhe bzw. Tiefe des Kanals ergibt sich allerdings eine Schwierigkeit: Die beiden Ströme müssen parallel im Kanal fließen, die Injektionsanordnung in der hier besprochenen Apparatur erlaubt jedoch nur Injektionen von unten. Bild 97 zeigt das gedachte Experiment von der Seite des Kanals. Der dunkler gezeichnete Analyt-Strom wird vom Hilfsstrom unterschichtet und dadurch

Richtung Transducer gedrückt. Hier wurde noch keine Modulation des Analyt-Stroms durchgeführt.



**Bild 97:** Schema des gedachten Experiments zur Herstellung dünner Analytschichten.

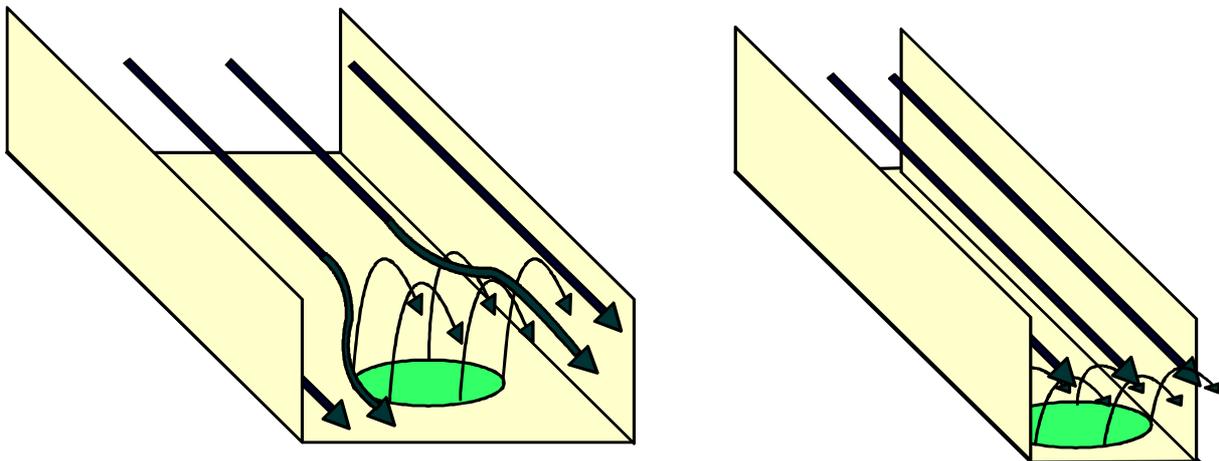


**Bild 98:** Idealer (links) und realer (rechts) Fall bei der Durchführung des Experiments von Bild 97. Im realen Fall verdrängt der Hilfsstrom den Analytstrom von der Oberfläche des Transducers.

Eine Beobachtung von der Seite liess die experimentelle Anordnung nicht zu, doch auch die Beobachtung von oben brachte genügend Hinweise über den

Verlauf des Experiments. Bei dem in Bild 97 skizzierten Vorgang wäre von oben überall im Kanal das Fluorescein zu sehen, wenn auch mit deutlich schwächerer Intensität als ohne den unterschichteten Hilfsstrom. Doch tatsächlich ergab sich ein völlig anderes Bild: Der Hilfsstrom drängte den Strom des Fluoresceins an die beiden Kanalwände ab. Der Analytstrom fließt dann praktisch um den Hilfsstrom herum. In Bild 98 ist rechts dieser Fall dargestellt, links im Bild ist der gewünschte Fall aufgezeichnet. Durch die Verdrängung zur Seite hin wird die Oberfläche des Transducers, die von den Analyt-Molekülen erreicht wird, stark reduziert. Somit ergibt sich durch dieses Verfahren keine Verbesserung, sondern eine Verschlechterung des Ergebnisses. Das Ziel, eine dünne Schicht an der Kanaldecke zu erzeugen, wurde durch diese Anordnung nicht erreicht.

Es muss also offensichtlich eine andere Anordnung konstruiert werden. Die Gründe für das Scheitern des Experiments sind hydrodynamischer Natur. Die Injektion des Hilfsstroms von unten in einen solch dünnen, aber dafür relativ breiten Kanal führt dazu, dass der Hilfsstrom schon direkt bei der Injektion Kontakt zur (hydrophilen) Transduceroberfläche bekommt. Die Öffnung des Eingangsbohrloches erfasst auch nicht die volle Breite des Kanals, nur der mittlere Bereich des Kanals wird erfasst. Daher ist es für den Hilfsstrom wesentlich einfacher, den Analytstrom zu den Seiten zu verdrängen als ihn zu unterschichten.



**Bild 99:** Gegenüberstellung der Strömungen in dem benutzten, 1 mm breiten Kanal (links) und in dem geplanten, 0,5 mm breiten Kanal (rechts). Die Ellipse in den unteren Teilen der Kanäle stellt das Eingangsbohrloch des Hilfsstroms dar, die dünnen Pfeile das Fließen des Hilfsstroms, die dicken Pfeile das Fließen des Analytstroms.

Dieses Problem lässt sich unter Umständen durch eine veränderte Geometrie umgehen. Die Kanalwände sollten etwas höher, die Breite dafür kleiner werden. Da die Bohrlöcher einen halben Millimeter groß sind, kann die Breite nur auf

diesen Wert reduziert werden. Dadurch erfasst das Eingangsbohrloch des Hilfsstroms die gesamte Breite des Kanals, der Hilfsstrom kann nun nicht mehr so einfach den Analyt-Strom zu den Wänden des Kanals abdrängen und wird dadurch gezwungen, den Analyt-Strom zu unterschichten. Bild 99 skizziert diesen Vorgang.

Links im Bild ist die bisherige Kanalgeometrie mit 1 mm Breite gezeichnet, das Bohrloch ist gerade halb so groß. Der Hilfsstrom schießt mit voller Wucht nach oben (dünne, stark gebogene Pfeile) und erreicht ohne Probleme die Decke des Kanals, der Analytstrom (dicke Pfeile) wird zu den Wänden des Kanals abgedrängt. Im rechten Teil von Bild 99 ist der geplante, nur einen halben Millimeter breite Kanal gezeigt: Hier ist der Durchmesser des Bohrlochs genauso groß wie die Breite des Kanals. Der Analyt-Strom kann nicht mehr zur Seite abgedrängt werden, da der Hilfsstrom den Kanal in seiner vollen Breite erfasst. Dadurch ist es nun möglich, den Analytstrom zu unterschichten.

Die Höhe des Kanals könnte noch auf 100  $\mu\text{m}$  erhöht werden. Dadurch liesse sich insgesamt eine deutliche Verbesserung der Breiten-Höhen-Relation erzielen, was ebenfalls dazu beitragen würde, das Experiment gelingen zu lassen. Zusätzlich könnte direkt nach dem Eingangsbohrloch eine Kanalverengung eingebaut werden, die die Abdrängung des Analyt-Stromes zu den Kanal-Wänden ebenfalls erschweren würde.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sind folgende Ergebnisse zusammengefaßt und erörtert worden:

1. Es wurde ein mikrofluidisches System mit hydrodynamischer bzw. hydrostatischer Injektion aufgebaut. Als Technik für die Mikrostrukturierung der Kanäle wurde die PCB-Technik als billige und effiziente Alternative zu den zahllosen anderen Techniken angewandt.
2. Dieses System wurde unter hydrodynamischen Gesichtspunkten genauestens mit CCD-Kamera und Photomultiplier charakterisiert. Alle Messungen wurden mit relativ einfachen mathematischen Methoden - ohne Benutzung teurer CFD-Software - auch nachgerechnet. Theorie und Experiment stimmten im Rahmen des möglichen miteinander überein. Es konnte also gezeigt werden, daß auch ohne den heute üblichen mathematisch-numerischen Simulationsballast exakte Angaben zu Experimenten gemacht werden können. (Das bedeutet natürlich nicht, daß auch auf den Gebieten der Meteorologie oder Astrophysik auf den „Simulationsballast“ verzichtet werden kann, dort sind die Systeme viel komplexer.)
3. Ein Lock-In-Verstärker wurde in das System integriert und es konnte gezeigt werden, daß Empfindlichkeit und Nachweisgrenze bei Beobachtung eines Fluoreszenz-Farbstoffs mit einem Photomultiplier bei Anwendung der Modulationstechnik um den Faktor 50 bis 100 verbessert werden konnte.
4. Die Modulationstechnik wurde auf die reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) angewendet. Ein SPEKOL zur Beobachtung des Reflexionsspektrums wurde anstatt des Photomultipliers in das Meß-System eingebaut.
5. Als „Versuchskaninchen“ wurde Vancomycin gewählt. Transducer wurden hergestellt, die spezifisch für dieses Molekül sind. Es wurde gezeigt, daß mit diesen Transducern ein Fermentationsprozeß (wenn auch nur off-line) verfolgt werden kann.
6. Schließlich wurde das Vancomycin mit dem SPEKOL in Zusammenarbeit mit dem Lock-In-Verstärker gemessen. Die Ergebnisse geben zu einigen Hoffnungen Anlaß. Prinzipiell konnte damit ein System fertiggestellt werden, daß es erlaubt, ein Biomolekül reversibel mit der Modulationstechnik zu detektieren.

7. Ein weiterer Ansatz, der verfolgt wurde, war die Erzeugung dünner Analytschichten an der Oberfläche des Transducers. Die Versuche, die dazu durchgeführt wurden, zeigten keine positiven Ergebnisse, da die hydrodynamischen Bedingungen in den Mikrokanälen eine Einengung der Analytschicht an der Oberfläche des Transducers nicht zuließen. Der Kanal war höchstwahrscheinlich zu breit. Es ist die Idee dargestellt und begründet worden, wie durch einen halb so breiten Kanal diese Probleme beseitigt werden könnten. Es dürfte ein sehr großes Potential in diesem Ansatz stecken...

Trotz all diesen Ergebnissen bleibt noch einiges zu tun. Die Transducer für das Vancomycin müssen noch besser werden, es muß ein Kompromiß zwischen hoher Empfindlichkeit und guter Reversibilität gefunden werden, um eine Verbesserung des herkömmlichen RIfS-Systems zu erhalten. Dann sollte die gesamte Lock-In-Spekol- $\mu$ FIA-Einheit on-line an einen Bioreaktor angeschlossen werden, was noch einige technische Arbeit erfordert. Die Herstellung dünner Analytschichten muß ebenfalls noch weiter verfolgt werden.

Davon abgesehen kann die Modulationstechnik aber auch mit vielen anderen reversiblen Sensor-Systemen kombiniert werden. Die Möglichkeiten sind beinahe unbegrenzt...

## 8 Literatur

- [1] F. Szabadváry, „Geschichte der Analytischen Chemie“, Vieweg, Braunschweig, 1966.
- [2] A. Unsöld und B. Baschek, „Der neue Kosmos“, Springer 1999.
- [3] E. A. H. Hall, „Biosensoren“, Springer 1995.
- [4] F. Scheller und R. D. Schmid (Hrsg.): „Biosensors: Fundamentals, technologies and applications“, GBF Monographs 17, Verlag Chemie, Weinheim 1992.
- [5] C. A. Janeway, A. Charles und P. Travers,: „Immunologie“, Spektrum Akademischer Verlag 2. Aufl. 1997.
- [6] B. R. Eggins, „Biosensors: an Introduction“, Wiley 1996.
- [7] G. Schwedt, „Analytische Chemie“, Thieme 1995.
- [8] T. D. Brock, M. T. Madigan, J. M. Martinko und J. Parker: „Biology of Microorganisms“, Prentice Hall 1998.
- [9] A. Leuchtenberger, „Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie“, Teubner, 1998.
- [10] Tran-Minh und H. Meier, „Biosensor for On-Line Monitoring of Penicilin during its production by fermentation“, in Biosensor and Chemical Sensor Technology, ACS Symposium Series 613, Washington 1995.
- [11] A. Gill, J. Harrison, I. Holwill, P. A. Lowe und M. Hoare: „Determination of bioactive protein product during fermentation using an optical biosensor“, Protein Peptide Lett. **3** (3), 199-206.
- [12] A. Gill, D. G. Bracewell, C. H. Maule, P. A. Lowe und M. Hoare: „Bioprocess monitoring: An optical biosensor for rapid bioproduct analysis“, Journal of Biotechnology **65** (1998), 69-80.
- [13] T. Scheper, „Bioanalytik“, Vieweg, Braunschweig 1991.
- [14] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, „Miniaturized total analysis systems: a novel concept for chemical sensors“, Sens. Actuators B **1** (1990), 244.
- [15] B. van der Schoot, E. Verpoorte, S. Jeanneret, A. Manz und N. de Rooij, „Microsystems for Analysis in Flowing Solutions“, Proceed. 1<sup>st</sup> International Symposium on Micro Total Analysis Systems, (21. - 22. November 1994).
- [16] M. Richter, A. Prak, J. Naundorf, M. Eberl, H. Leewis, P. Woias und A. Steckenborn, „Development of a Micro-Fluid System as a Demonstrator for a  $\mu$ TAS“, Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS'96, 129-137.
- [17] J. M. Ramsey, „Miniature Chemical Measurement Systems“, Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS'96, 24-27.

- [18] A. van den Berg und P. Bergveld, „Development of  $\mu$ TAS Concepts at the MESA Research Institute“, *Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS'96*, 9-15.
- [19] E. Verpoorte und N. F. de Rooij, „Microfabrication Technology for the Construction of  $\mu$ TAS FSA“, *Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS'96*, 16-21.
- [20] K. E. Peterson, „Silicon as a mechanical Material“, *Proc. IEEE*, **70** (5), (1982), 420-428.
- [21] K. E. Bean, „Anisotropic etching of silicon“, *IEEE Trans. ED*, **25** (10), 1978, 1185-1197.
- [22] M. A. Roberts, J. S. Rossier, P. Bercier und H. Girault, „UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems“, *Anal. Chem.* **69**, (1997), 2035-2042.
- [23] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller und G. M. Whitesides, „Rapid Prototyping of Microfluidic systems in Poly(dimethylsiloxane)“, *Anal. Chem.* **70**, (1998), 4974-4984.
- [24] N. H. Chiem und D. J. Harrison, „Microchip systems for immunoassay: an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline determination“, *Clinical chemistry* **44** (1998), 591-597.
- [25] D. Figeys and D. Pinto, „Lab-on-a-chip: A revolution in biological and medical systems“, *Analytical Chemistry* **72** (2000), 330-335.
- [26] N. W. Barnett, C. E. Lenehan und S. W. Lewis, „Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry“, *trends in analytical chemistry* **18**, (5), 1999.
- [27] K. Nord, E. Gunneriusson, J. Ringdahl, S. Stahl, M. Uhlen und P. A. Nygren, „Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain“, *Nat. Biotechnol.* **15** (8), (1997) 772-7.
- [28] H.-M. Schmitt, „Aufbau eines interferometrischen Meßsystems zur markierungsfreien Beobachtung von Protein-Protein-Wechselwirkungen“, *Diplomarbeit Universität Tübingen* 1995.
- [29] H.-M. Schmitt, A. Brecht und G. Gauglitz, „An integrated system for microscale affinity measurements“, *Analytical Methods & Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS '96*, 33-38.
- [30] R. Zengerle, M. Stehr, M. Freygang, H. Haffner, S. Messner, R. Roßberg und H. Sandmeier, „microfabricated Devices and Systems for Handling Liquids and Gases“, *Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS'96*, 91-94.
- [31] Danby, P. C. G. (1970), „Signal Recovery Using a Phase Sensitive Detector“, *Electronic Engineering* **42**, (503), 383 - 389.
- [32] Kohlrausch, F. (1996), „Praktische Physik“, B. G. Teubner, Stuttgart
- [33] G. Gauglitz, A. Brecht, G. Kraus und W. Nahm, „Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers“, *Sensors and Actuators B*, **11** (1993) 21-27.

- [34] A. Brecht, G. Gauglitz, J. Polster: „Interferometric immunoassay in a FIA-system: a sensitive and rapid approach in label-free immunosensing“, *Biosens. Bioelectron.* **8** (1993), 387-392.
- [35] A. Brecht, „Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen“, Dissertation Universität Tübingen 1993.
- [36] W. Greiner und H. Stock, „Hydrodynamik“, 4. Auflage, Harri Deutsch 1991.
- [37] G. Gerlach und W. Dötzel, „Grundlagen der Mikrosystemtechnik“, Carl Hanser Verlag München, Wien 1997.
- [38] M. Elwenspoek, T. S. J. Lammerink, R. Miyake und J. H. J. Fluitman: „Towards integrated microliquid handling systems“, *J. Micromech. Microeng.*, **4** (1994) 227-245.
- [39] P. Gravesen, J. Branebjerg und O. S. Jensen: „Microfluidics - a review“, *J. Micromech. Microeng.*, **3** (1993) 168-182.
- [40] R. Zengerle und M. Richter: „Simulation of microfluid systems“, *J. Micromech. Microeng.*, **4** (1994) 192-204.
- [41] J. Happel und H. Brenner, „Low Reynolds number hydrodynamics“, 2. Auflage 1973, Leyden: Noordhoff International Publishing.
- [42] D. Thangaraj und A. Nathan, „Two-Dimensional Analysis of Incompressible Viscous Flow in Ducts Using a Rotated Difference Scheme“, *Sensors and Materials*, **8**, (1), (1996), 013-022.
- [43] X. C. Qiu, L. Hu, J. H. Masliyah und D. J. Harrison, „Understanding Fluid Mechanics within Electrokinetically Pumped Microfluidic Chips“, *Transducers '97*, 1997 International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, 923-926.
- [44] B. H. Weigl, M. R. Holl, D. Schutte, J. P. Brody und P. Yager, „Diffusion-Based Optical Chemical Detection in Silicon Flow Structures“, *Analytical Methods and Instrumentation, Special Issue  $\mu$ TAS'96*, 174-184.
- [45] B. H. Weigl und P. Yager, „Silicon-microfabricated diffusion-based optical chemical sensor“, *Sensors and Actuators B* **38**, (1997) 452-457.
- [46] D. Bökenkamp, A. Desai, X. Yang, Y.-C. Tai, E. M. Marzluff und S. L. Mayo, „Microfabricated Silicon Mixers for Submillisecond Quench-Flow Analysis“, *Anal. Chem.* **70**, (1998), 232-236.
- [47] E. L. Cussler, „Diffusion: Mass transfer in fluid systems“, Cambridge University Press, 1984.
- [48] Sir Geoffrey Taylor, „Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube“, *Proceedings of the Royal Society of London, Series A*, **219** (1953), 186-203.
- [49] E. B. van Akker, M. Bos, W. E. van der Linden, „Convection and diffusion in a micro-flow injection system“, *Analytica Chimica Acta* **373** (1998), 227-239.

- [50] P. H. Popienek und R. F. Pratt: „Rates of Specific Peptide Binding to the Glycopeptide Antibiotics Vancomycin, Ristocetin and Avoparcin“, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, (1988), 1285-1286.
- [51] P. H. Popienek und R. F. Pratt: „A Fluorescent Ligand for Binding Studies with Glycopeptide Antibiotics Of the Vancomycin Class“, *Analytical Biochemistry* **165**, (1987), 108-113.
- [52] P. H. Popienek und R. F. Pratt: „Kinetics and Mechanism of Binding of Specific Peptides to Vancomycin and other Glycopeptides Antibiotics“, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, (1991), 2264-2270.
- [53] J. C. J. Barna und D. H. Williams, „The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group“, *Ann. Rev. Microbiol.* **38**, (1984), 339-57.
- [54] H. G. Schlegel, „Allgemeine Mikrobiologie“, Thieme 1997.
- [55] D. H. Williams und B. Bardsley, „Die Vancomycin-Antibiotika und der Kampf gegen resistente Bakterien“, *Angew. Chem.* **111**, (1999), 1264-1286.
- [56] J. Piehler, „Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern“, Dissertation Universität Tübingen 1997.
- [57] M. J. Eddowes: „Direct immunochemical sensing: Basic chemical principles and fundamental limitations“, *Biosens.* **3** (1987), 1-15.
- [58] D. Shoup und A. Szabo: „Role of diffusion in ligand binding to macromolecules and cell-bound receptors“, *Biophys. J.* **40** (1982), 33-39.
- [59] R. W. Glaser: „Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: A two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics“, *Anal. Biochem.* **213** (1993), 153-161.
- [60] G. Scatchard: „The attractions of proteins for small molecules and ions“, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51** (1949), 660-672.
- [61] M. Nieto und H. R. Perkins: „Physicochemical Properties of Vancomycin and Iodovancomycin and their Complexes with Diacetyl-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine“, *Biochem. J.* **123**, (1971), 773-787.
- [62] M. Nieto und H. R. Perkins: „Modifications of the Acyl-D-alanyl-D-alanine Terminus Affecting Complex-Formation with Vancomycin“, *Biochem. J.* **123**, (1971), 789-803.
- [63] M. Mehlmann, „Vorbereitende Untersuchungen zur on-line-Überwachung eines Fermentationsprozesses“, Diplomarbeit Universität Tübingen 1999.
- [64] J. J. McIntyre, A. T. Bull und A. W. Bunch, „Vancomycin Production in Batch and Continuous Culture“, *Biotechnology and Bioengineering*, **49**, (4), (1996).
- [65] H. J. Ache, „Chemical microanalytical systems: objectives and latest developments“, *Fresenius J Anal Chem* **355**, (1996), 467-474.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle gilt es, vielen Leuten Dank zu sagen, Leuten, ohne die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Als erstem möchte ich Prof. Dr. G. Gauglitz meinen Dank aussprechen, nicht nur, weil er es wagte, mich in seine Arbeitsgruppe aufzunehmen und mir ein interessantes Thema zu geben. Nein, ich habe ihm für einiges mehr zu danken, für die schöne Zeit in seiner Gruppe, für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, seine Anregungen, nicht zuletzt auch für sein Vertrauen. Immerhin gab er mir die Verantwortung für die Studenten in den Übungsgruppen Physikalische Chemie für Pharmazeuten. Einen der Höhepunkte meines bisherigen Lebenslaufs, eine Vorlesung vertretungsweise im Hörsaal N6 zu halten, verdanke ich ihm, eine Erfahrung, die ich nie vergessen werde...

Auch für sein nahezu unerschöpfliches Verständnis für einige meiner recht zeitaufwendigen Hobbies (Etruskologie, Lehramt für Gymnasien u. a. m.), bei denen er mir nie Knüppel in den Weg legte, bin ich ihm von ganzem Herzen dankbar. Ich glaube nicht, dass ich je einen besseren Chef bekommen werde...

Auch Prof. H. Oberhammer schulde ich großen Dank für seine Mühe, sich durch diese Arbeit zu quälen.

Dann danke ich natürlich auch Dr. Andreas Brecht, der die Grund-Idee zu dieser Arbeit lieferte und mich im ersten Jahr mit Rat und Tat intensiv unterstützte. Als er dann das Institut verließ, kümmerte er sich um einen Ersatz für sich: Dieter Fröhlich. In den weiteren Jahren war er es, der sich unermüdlich mit allerlei Problemen, die sich im Verlauf dieser Arbeit stellten, beschäftigte, vom Glätten einer Edelstahlplatte bis zur Programmierung einer Relaiskarte. Es ist keineswegs übertrieben zu behaupten, dass ohne ihn diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre. Ihm kann ich daher gar nicht genug danken...

Meinem Vorgänger auf dem Gebiet der Mikrofluidik, Hans-Martin Haake, sei als nächstem gedankt, in erster Linie für seine hervorragende Vorarbeit (auch wenn die Thiole, die er sich für die Dichtung der Flußzelle hat einfallen lassen, einen ganz entsetzlichen Geruch von sich gegeben haben), aber auch für die große Hilfe, die er mir während dieser Zeit hat zukommen lassen.

Es sei auch Martin Mehlmann für die Zusammenarbeit im Zusammenhang mit dem DBU-Projekt gedankt.

Der gesamten Arbeitsgruppe sei an dieser Stelle Dank gesagt, die Atmosphäre war spitze, das ist keineswegs selbstverständlich, wie ich aus eigener Erfahrung schmerzlich zu berichten weiss. Für die vielen Diskussionen, nicht nur über Physikalische Chemie, und für den Spass, den ich hier hatte, danke ich namentlich Albrecht Klotz, Armin Schütz, Jochen Mehne, Ivo Stemmler, Kerstin Länge, Conny Hänel, Alexander Jung, Oliver Birkert, Ingrid Coille, Matthias Rothmund, Bernd Drapp, Frank Rathgeb, Dieter Reichl, Claudia Barzen, Dirk Nopper, Martin Herold, Kerstin Kröger, Sabine Reeder, Birgit Kieser, Johannes Riedt, Rüdiger Frank und Margarete Hotz, in der Hoffnung, jetzt niemanden vergessen zu haben. Es war eine gute Zeit, habt Dank dafür....

Auch der Werkstatt schulde ich Dank, auch wenn sie ab und zu meine Nerven vor harte Zerreihsproben stellte.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Wohlleben schulde ich dank für die Bakterien und die Geräte, die sie mir zur Verfügung stellten.

Dem Graduierten-Kolleg danke ich für die Unterstützung während eines großen Teils meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank soll hier meinen Eltern und meiner Schwester ausgesprochen werden: Es ist doch noch wahr geworden...

Ebenfalls ein ganz besonderes Dankeschön an Felor, meine Gefährtin, die mir die Zeit ausserhalb des Labors verschönerte.

Danke auch an alle Freunde, die sich während dieser Zeit mein Gefasel über diese Arbeit anhören mussten. Das wird sich jetzt ändern. Nicht, dass mein Gefasel besser würde, nein, aber das Thema wird sich immerhin ändern...

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Bernd Bühler  
Geburtstag und -ort: 07.09.1965 in Gosheim  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1972-1976: Grundschule in Gosheim  
1976-1982: Progymnasium Gosheim-Wehingen  
1982-1985: Gymnasium Spaichingen

### Grundwehrdienst:

01.10.1985-31.12.1986 in der 10. Panzerdivision in Stetten a. k. M.

### Studium und weitere Ausbildung:

1986-1996: Studium der Physik und Biologie an der  
Universität Tübingen  
August 1994: Diplom-Abschluß in Physik  
Seit Oktober 95: Studium der Religionswissenschaft, Archäologie  
und Romanistik  
August 1996: Diplom-Abschluß in Biologie  
September/Oktober 1996: Arbeit als Wissenschaftliche Hilfskraft im  
Institut für Mikrobiologie in Tübingen  
November 1996 bis  
Dezember 2000 : Promotion bei Prof. Gauglitz im Institut für  
Physikalische und Theoretische Chemie  
März 1998: Zwischenprüfung in Archäologie und Religions-  
wissenschaft  
Mai 1999: Erstes Staatsexamen für das höhere Lehramt an  
Gymnasien in den Fächern Physik und Biologie  
März 2000: Zwischenprüfung in Romanistik  
Seit September 1999: Studienreferendar am Staatlichen Seminar für  
Schulpädagogik in Rottweil

## **Veröffentlichungen:**

Zwei Veröffentlichungen für „Trends in Analytical Chemistry“ in Vorbereitung, eine davon bereits eingereicht.

## **Meine akademischen Lehrer waren**

in der Mathematik: H. Fischer, K. Hadeler, H. Kaul, A. Wolf,

in der Physik: M. Baumann, K. Gaukler, F. Gönnenwein, P. Grabmayr, K. Herrmann, R. Hübener, C. Jönsson, E. Kendziorra, P. Kramer, F. Lenz, H. Lichte, H. Lindel, O. Lutz, G. Mack, H. Mauder, G. Mertens, H. Müther, H. Pfister, R. Schief, G. Staudt, H. Stumpf, G. Wagner.

in der Chemie: E. Bayer, Ebert, G. Gauglitz, G. Häfelinger, B. Hamprecht, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, K. A. Kovar, V. Schurig, H. Stegmann,

in der Biologie: D. Ammermann, R. Apfelbach, C.-F. Bardele, V. Braun, D. Bunke, K. Eisler, W. Engels, F. Götz, A. Hager, E. Kulzer, W. Maier, H. Netzel, F. Oberwinkler, K. Poralla, W. Rähle, W. Sauer, B. Schink, H. Schnitzler, B. Schwemmler, H. U. Seitz, W. Seyffert, D. Sperlich,

in der Geologie/Paläontologie: E. Appel, A. Seilacher, J. Wendt, F. Westphal,

in der Romanistik: E. Coseriu, H. Kohring, A. Murguia, F. Penzenstadler, F. Oneta,

in der Archäologie und Religionswissenschaft: H. Cancik, W. Gauer, B. Gladigow, G. Kehrer, H. Küng, F. Prayon, C. de Simone, R. Wolters.